

mm に各添加濃度になるよう添加量を調整して添着後風乾した。オカダ酸吸着濾紙ディスクは1.5 mL容遮光バイヤルに密封保管した。

2-c) 蛍光(ADAM)誘導体化

蛍光誘導体用のOA画分を濃縮乾固後最小量のアセトンでバイヤルへ移行後内部標準物質100 μ Lを加えて窒素気流中で乾固した。残渣にADAM試薬100 μ Lを添加し、常温、遮光下で3時間反応してHPLC用のサンプルとした。

2-d) 機器類

ポンプ: 東洋曹達工業製CCPMグラジェントポンプとCCP用コントローラを使用した。

カラム: 野村化学社製Deverosil ODS-5 (250 mm X 4.6 mm ID) を用いた。

移動相:A (MeCN-MeOH-H₂O, 8:1:1, v/v/v)とB (MeOH)。溶出条件は流速1.1 mL/min で室温下グラジェント溶出を行った。グラジェント条件は100% Aを15分保持した、その後55分にBが100%になるよう溶出し、90分まで100% Bを保持した。

検出器: 東洋曹達工業製FS-8000蛍光検出器を用い、Em 412, Ex 365 で検出した。

レコーダー: 東洋曹達工業製Chromatocorder 21 を用い、ATT 4, chart speed 0.2 cm/minで記録した。

定量: サンプル注入量; 20 μ L, ピークの帰属はISによる保持時間の補正後、標準品との直接比較により行った。定量計算はISで補正後ピーク高法により行い、検量線は最小二乗法により行った。

3) 冷凍、冷蔵及び室温条件下での遮光バイヤル中のオカダ酸の回収率の経時変化

オカダ酸の保存: オカダ酸をバイヤル中に溶液保存するサンプルは250 μ L容ガラスイ

ンサートにオカダ酸アセトン溶液40 μ L(オカダ酸量として10 μ g)を分注し、バイヤル中に密栓保存した。オカダ酸のバイヤルまたは濾紙ディスクへの吸着は、同溶液 40 μ L を、1.5 mL容バイヤルおよび濾紙ディスクに添着後風乾した。さらに濾紙ディスクは1.5 mL容バイヤルに密栓保管した。バイヤル中に保存したオカダ酸は直接ADAM化を行った。

ADAM試薬による蛍光HPLC法: Leeらの方法を一部改良して行った。

オカダ酸の回収率の経時変化の測定頻度: 0日、1週、2週、3週、4週と6週、3ヶ月、6ヶ月にn = 5で行った。

測定データの解析: 各データをJUSE-QCASにより統計解析を行い、箱髭図を比較した。

4) オカダ酸の加熱処理

オカダ酸の加熱処理はヒーティングブロック内にバイヤルを静置した。温度は50°C~150°C、加熱処理時間は48時間以内で、n=5で回収率を求めた。

5) 測定データの解析

各データをJUSE-QCASにより統計処理を行い箱髭図を比較した。

6) 下痢性貝毒検査外部精度管理用試料作製および、検査経験が豊富な2機関への実試料配布と検査結果の検討

6-1) 貝の細切物(貝ホモジネート)

実際の精度管理用試料配布に向けた大量の試料作製法について検討するために、青森県内のホタテ処理業者より、貝柱を除去した残りの部位を取り寄せ、良く洗浄後、手動式の小型挽肉器を導入し、貝の身の細切を試みた。

6-2) 下痢性貝毒検査の経験豊富な試験

所の試験室による同一ロット試料の性能調査

実際に配布される予想量の1/3程度(15サンプル)を作製し信頼のおける2機関と当研究所の合計3機関で各n=5ずつ下痢性貝毒検査を行った。

C. D. 結果及び考察

1) 下痢性貝毒検査調査の概略

下痢性貝毒の陽性サンプルの作製は公定法の安元バイオアッセイ法を用いて陰性を予め確認後、凍結保存してある陰性ホタテホモジネート試料に、毒性が現れると予想される濃度の市販のオカダ酸の標準品を添加した。添加法としてはオカダ酸をバイアル底に付着させる方法と濾紙ディスクに吸着させる方法の2つの添加法が考えられるが、昨年までの検討により、現在は濾紙ディスク法を採用している。濾紙ディスク法は、一定量のオカダ酸アセトン溶液を濾紙ディスクに添着後風乾してバイアル中に密栓した。陰性サンプルは濾紙ディスクをそのまま用いることとした。各検査施設は検査に先立ち濾紙ディスクをバイアル中より取り出し試料に加える操作が必要になる。陽性サンプルと陰性サンプルは、マウスアッセイで毒性の有無を確認後各検査施設に冷凍輸送した。確認試験の結果如何によりオカダ酸の量を適宜加減することとした。

現在問題となることが予想される下痢性貝毒調査用試料の検討課題として、濾紙ディスクに吸着させたオカダ酸が保存中、輸送中、精製操作中に本来の力価が失われる可能性が危惧される。そこでそれらの問題を解決するための基礎的データを得るために、オカダ酸の①保存条件の検討と②温度に対

する安定性の2点について検討することにした。

オカダ酸の各種保存条件の検討では結果をより早くモニターするために、実際予定される添加量の1/4の濃度で行った。保存方法は試料の状態としては①遮光スクリーバイアル中にアセトン溶液で密栓、②遮光スクリーバイアルの底に吸着風乾させる方法を、温度条件としては①冷凍(-35℃)、②冷蔵(5℃)、③室温(夏季)の3条件について追跡調査した。以上、保存方法と温度条件の組み合わせを変えて6種の保存条件につきオカダ酸の回収率を経時的に追跡した。

オカダ酸の温度に対する安定性の調査では加熱試験を行った。加熱試験は50℃～200℃の温度範囲で48時間以内加熱したときの回収率を調査した。

2) オカダ酸の各種保存による回収率

オカダ酸の各種保存による回収率の結果は図1および図2に示した。グラフは縦軸に回収率、横軸に時系列を示し、n=5の回収率は箱髭図で示した。

図1～図2に示した通り、遮光バイアルにアセトン溶液で密栓及び遮光バイアルに吸着したオカダ酸は当初の予想に反し冷凍、冷蔵、室温のどの条件でも6ヶ月安定であることが明らかとなり、現在更に長期に亘り観察中である。以上より実際に使用を予定している冷凍条件のみならず、どの条件でも外部精度管理用サンプルとして使用可能である事が示唆された。今後安定してオカダ酸標準品を長期保存するための基礎的な検討を更に加える予定である。

3) オカダ酸の加熱試験の結果

オカダ酸の加熱試験の結果は図3と図4に示したが、熱処理に対しても想像以上に

安定であることが判明した。図3に示した通り50℃では48時間安定で、100℃では経時的に回収率が減少し48時間後には30%程度まで減少した。またグラフより100℃加熱時に半減期が24時間であることが推定された。

120℃では8時間で30%以下に回収率が減少し、150℃および200℃では1時間の加熱処理で回収率が0%であることが判明した。この事実より120℃を超える加熱処理で急激に回収率が低下することが観察されたので、加熱時間を1時間に固定して、温度を100℃～150℃に可変させた(図4)。そのときの回収率は、シグモイド曲線状に減少が観察され、オカダ酸の半減期は1時間加熱で120℃～130℃であり、150℃で完全に分解する事が推定された。オカダ酸は120℃以上の加熱処理により急激に回収率の低下を招くが、通常の外部精度管理に於ける輸送、分析操作で負荷されると予想される程度の熱に対しては安定である事が明らかとなった。

4) 下痢性貝毒検査外部精度管理用試料作製および、検査経験が豊富な2機関への実試料配布と検査結果の検討

貝の細切物(貝ホモジネート): 実際の精度管理用試料配布に向けた大量の試料作製法について検討するために、青森県内のホタテ処理業者より、貝柱を除去した残りの部位を取り寄せ、良く洗浄後、手動式の小型挽肉器を導入し、貝の身の細切を試みた。従来用いていたフードプロセッサーに比し、細切されきれずに残る、残渣となるようなものが比較的少なく、効率良く、良好な細切物が得られた。また、この細切物は、この後の抽出作業においても扱いやすく、特に問題が発生せず、実用上推奨されるものと判断された。

添加毒試料に関する検討: 小径濾紙(φ13mm)に一定量のオカダ酸(OA)を含浸、乾燥させたものを小型バイアルビンに入れ、マウスバイオアッセイ(MBA)により下痢性貝毒陰性と判断できた貝ホモジネートに同梱して試験協力施設へ発送する方式とした。

また、添加毒素量は、従来の結果を基に、確実にマウスが死亡する量、即ち、100gの貝ホモジネート(マウス5匹分の注射液ができる)当りOAを80μgとした。

下痢性貝毒検査の経験豊富な試験所の試験室による同一ロット試料の性能調査(Table. A): 添加毒素は、致死量に十分な量であったが、一機関で判定は陽性(3匹中2匹以上死亡)であった。このことから、濾紙への毒素の含浸法の更なる検討、或いは新たな添加法の検討、また、別の観点からは、マウスへの毒素の投与方法の実際についての聞き取り調査、或いは指導についても検討する必要性も考えられた。因みに麻痺性貝毒で観察された、朝の投与と夜の投与でマウスの毒素に対する感受性が若干異なる、即ち、午前中早め(満腹時)に毒素を投与した場合より、午後遅く(空腹時)に毒素を投与した場合の方が、有意に死亡に至る時間が延長する(感受性が低い)と言う点につき、OAに関しても調査したところ同様の傾向が見られた。この点に関しては、まだ例数が少ないため、更に検討が必要である。

5) 麻痺性貝毒試料作製についての検討: 近年、高い毒値を示す例が少なく、十分量の適切な毒値の試料が作製出来なかった。従って、次年度に元となる高毒値の試料の収集に努力する。

E. 結論

①遮光バイヤルにアセトン溶液で密栓及び遮光バイヤルに吸着したオカダ酸は冷凍、冷蔵、室温のどの条件でも6ヶ月間安定であることが明らかとなり、現在更に長期に亘り観察中である。

②昨年までの知見で濾紙に吸着したオカダ酸はどの条件でも回収率は経時的に緩徐に減少することが明らかであったが、冷蔵及び冷凍条件下では3週間比較的安定であった。

③以上より実際に使用を予定している冷凍条件はどの条件でも外部精度管理用サンプルとして使用可能である事が示唆された。

④オカダ酸の熱に対する耐性を検討するため、50℃について経時的に回収率を求めたところ、48時間安定であり、通常の分析及び輸送等に影響の無い事が示唆された。

⑤今回加熱時間と加熱温度の相関に関する基礎的データが得られたので、加熱時間と分解の予測の可能性が示唆され、今後のリファレンスマテリアル作製に大きく寄与すると考えられる。

⑥小型挽肉器を導入し、貝の身の細切を試みた。従来用いていたフードプロセッサーに比し、細切されきれずに残る、残渣となるようなものが比較的少なく、効率良く、良好な細切物が得られた。また、この細切物は、この後の抽出作業においても扱いやすく、特に問題が発生せず、実用上推奨されるものと判断された。

⑦下痢性貝毒検査の経験豊富な試験所の試験室による同一ロット試料の性能調査で、添加毒素は、致死量に十分な量であったが、一機関で判定は陽性(3匹中2匹以上死亡)であった。このことから、濾紙への毒素

の含浸法の更なる検討、或いは新たな添加法の検討、また、別の観点からは、マウスへの毒素の投与方法の実際についての聞き取り調査、或いは指導についても検討する必要性も考えられた。

今後は安定してオカダ酸含有試料を供給できる条件について更に検討を加える予定である。更に、毒性の評価をより正確に行うために、LC-MS等による活性成分の多成分同時分析法を導入することも不可欠である。

F. 健康危険情報

なし

G. 学会発表

K Machii, M Kawasaki

12th International Conference on Harmful Algae, Copenhagen, Denmark, 4-8 September 2006

Within-day variations in responses of the mouse bioassay for diarrhetic shellfish poisoning toxin (okadaic acid)

川崎勝、大島赴夫、山本茂貴、伊藤嘉典、町井研士

日本食品衛生学会第90回学術講演会 愛知

食品衛生外部精度管理調査に於ける下痢性貝毒検査用試料作製に関する基礎的研究 -オカダ酸の各種保存条件に於ける安定性について-

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし
3. その他
なし

【方法】

ADAM 化

サンプル溶液 (バイヤル)

内部標準液100 μ L 添加

(10 μ g/ml デカン酸 CHCl_3 溶液)

N_2 気流下乾燥

ADAM (9-anthryl diazomethane) 溶液添加

(0.1 % ADAM メタノール溶液)。

↓ 暗所室温

3時間

↓
HPLC 溶液, 20 μ L 注入

HPLC 条件

| | |
|-----------|---|
| ポンプ: | CCPM gradient pump and CCP controller (TOYO soda)。 |
| カラム: | Deverosil ODS-5 (250 mm X 4.6 mm ID) (Nomura pure chemical)。 |
| 移動相: | A (MeCN-MeOH-H ₂ O, 8:1:1, v/v/v), B (MeOH)。 |
| 溶出条件: | 1.1 mL/min, room temperature |
| gradient: | 100% A, 15 min; 100 %B, 55min; 100 % B, 90min. |
| 検出器: | FS-8000 fluorescent (TOYO soda)、Em 412, Ex 365。 |
| レコーダー: | Chromatocorder 21, ATT 4, |

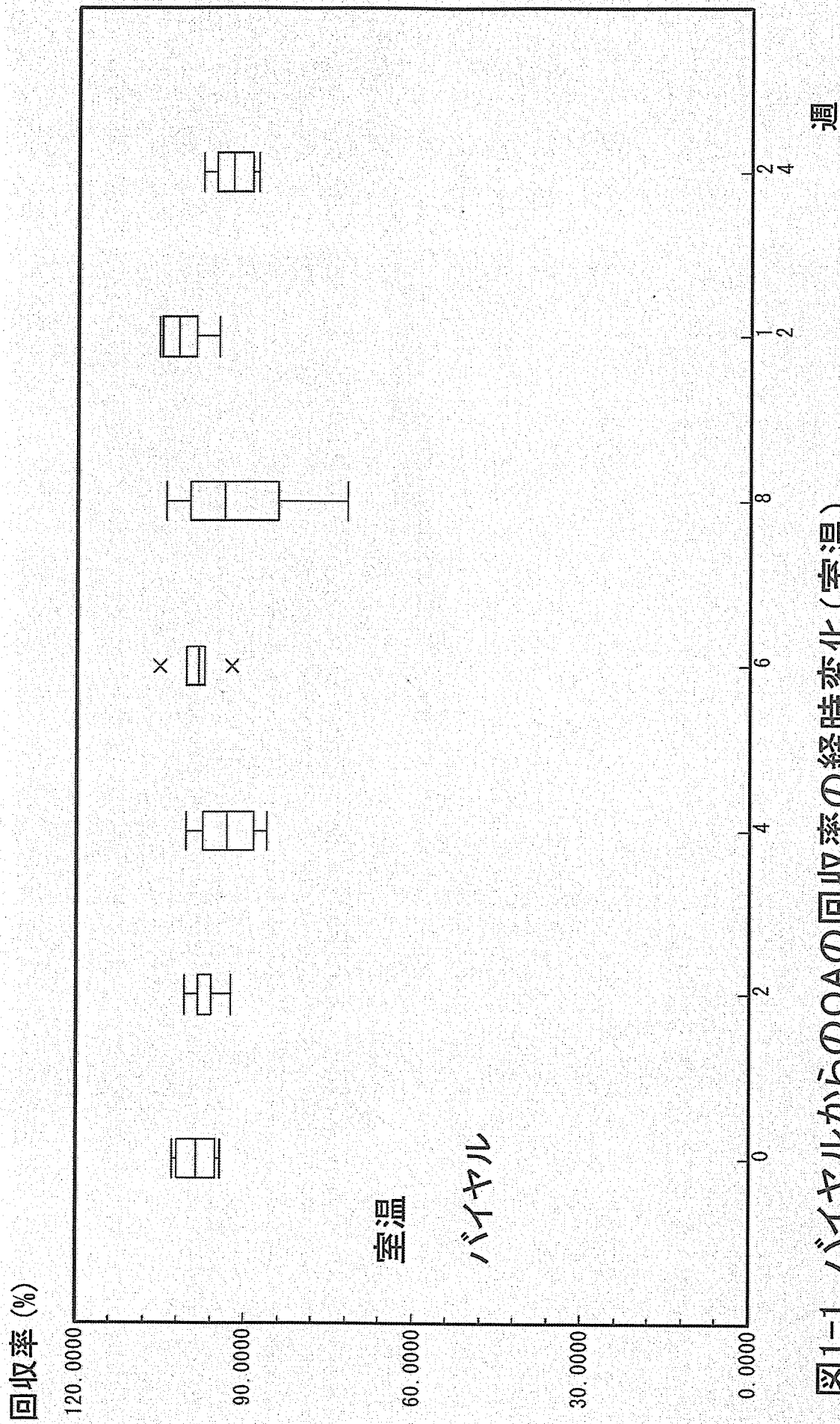


図1-1 バイヤルからのOAの回収率の経時変化(室温)

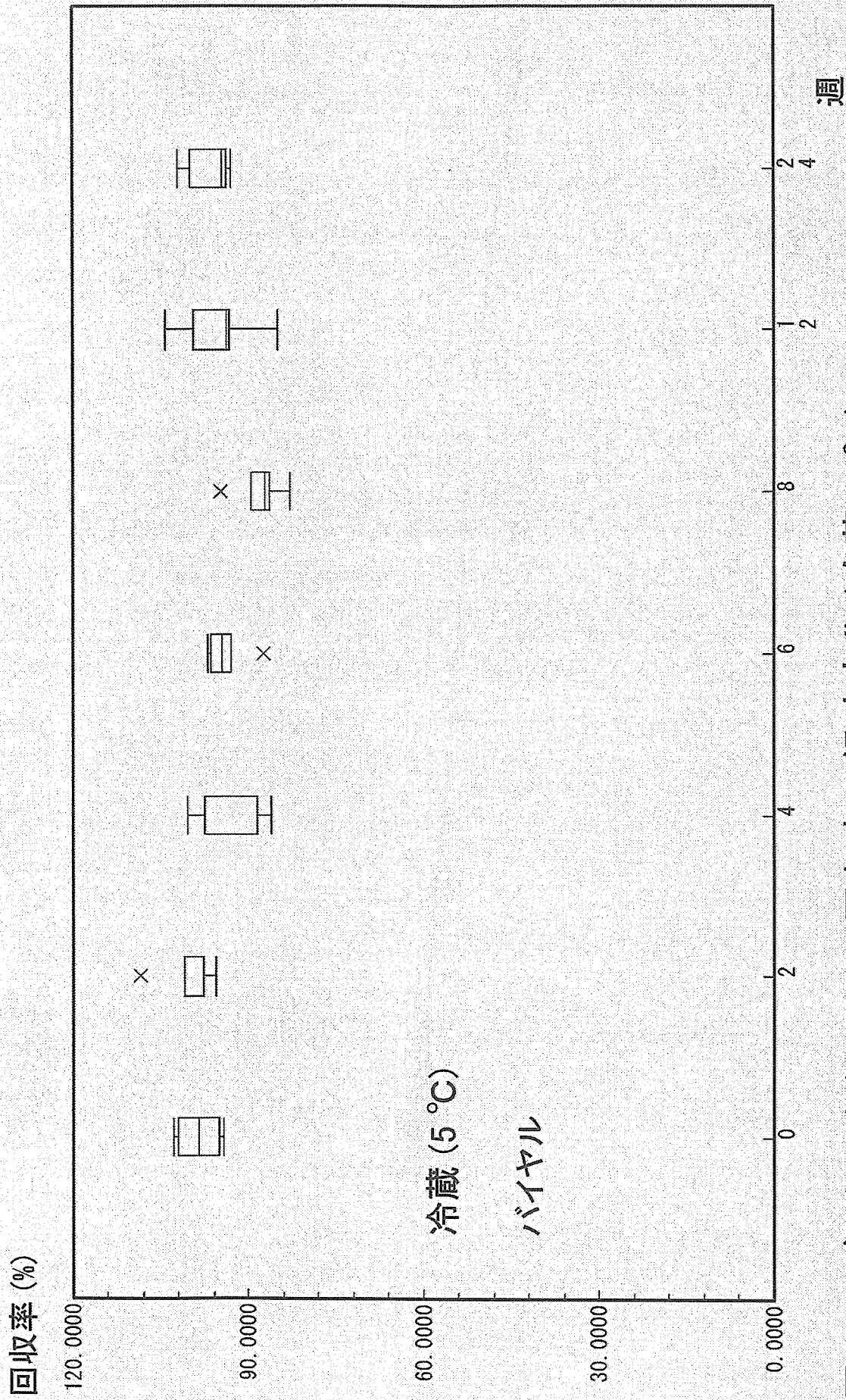


図1-2 バイヤルからのOOAの回収率の経時変化(冷蔵:5 °C)

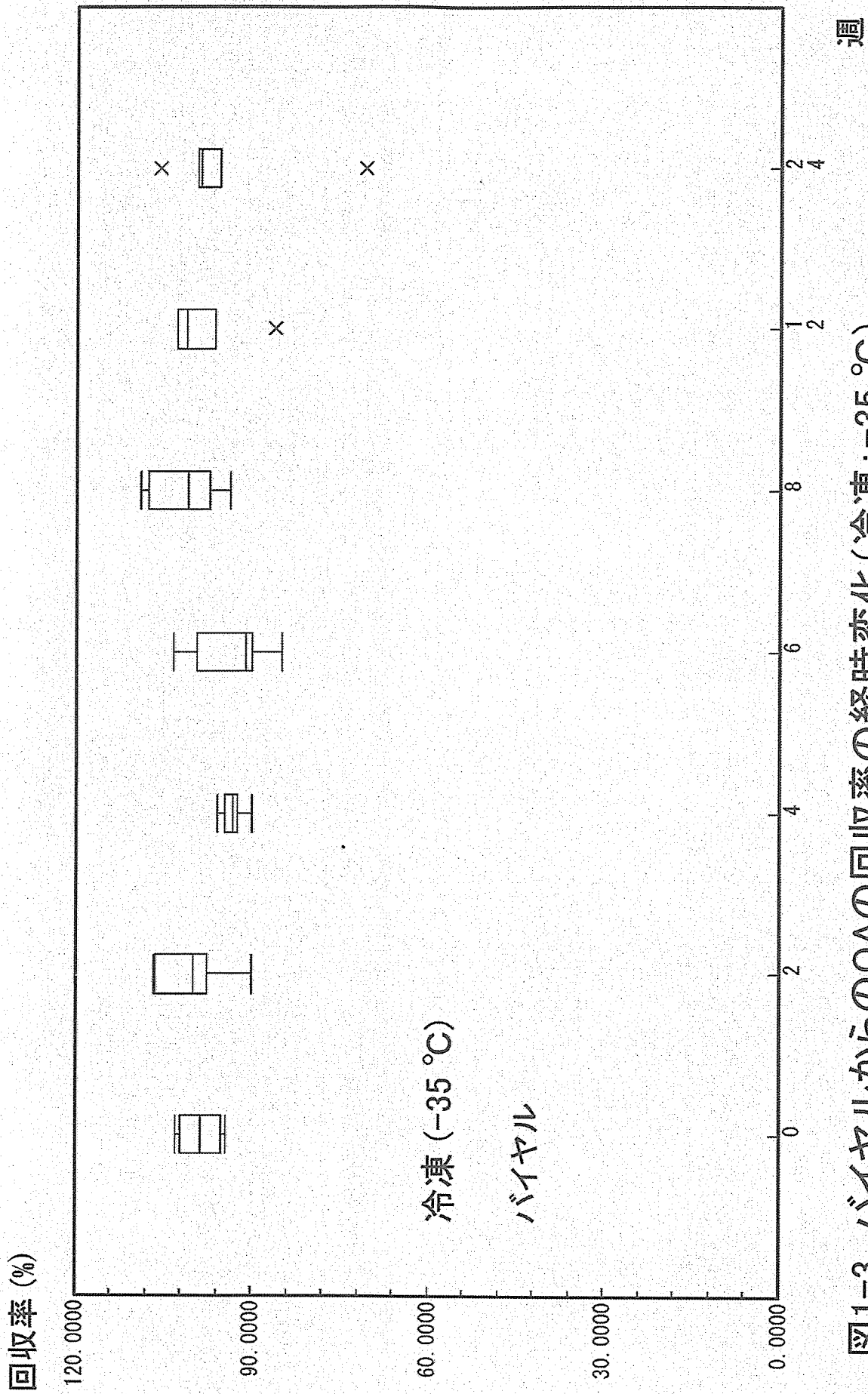


図1-3 バイヤルからのOAOの回収率の経時変化(冷凍:-35 °C)

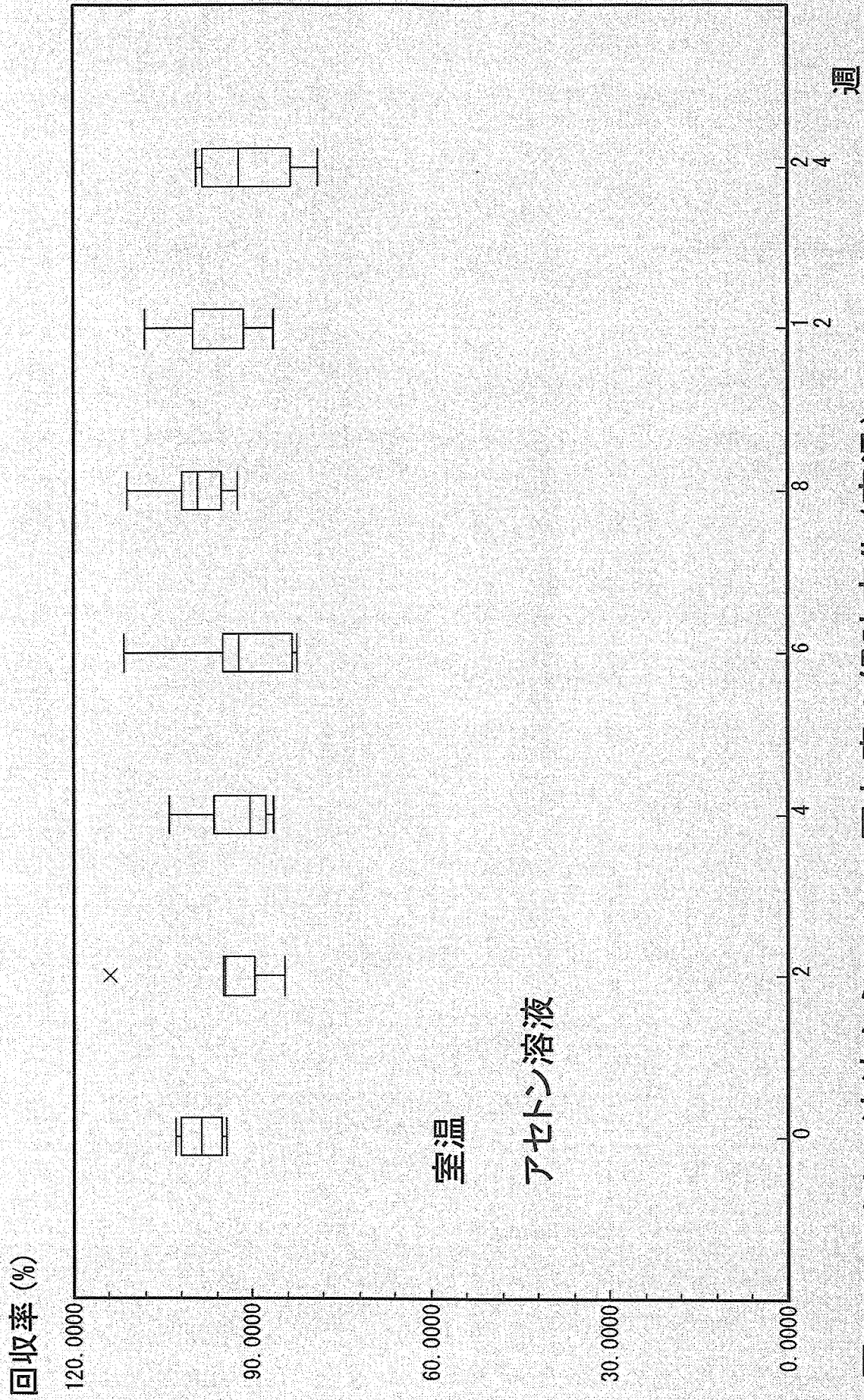


図2-1 アセトン溶液からのOOAの回収率の経時変化(室温)

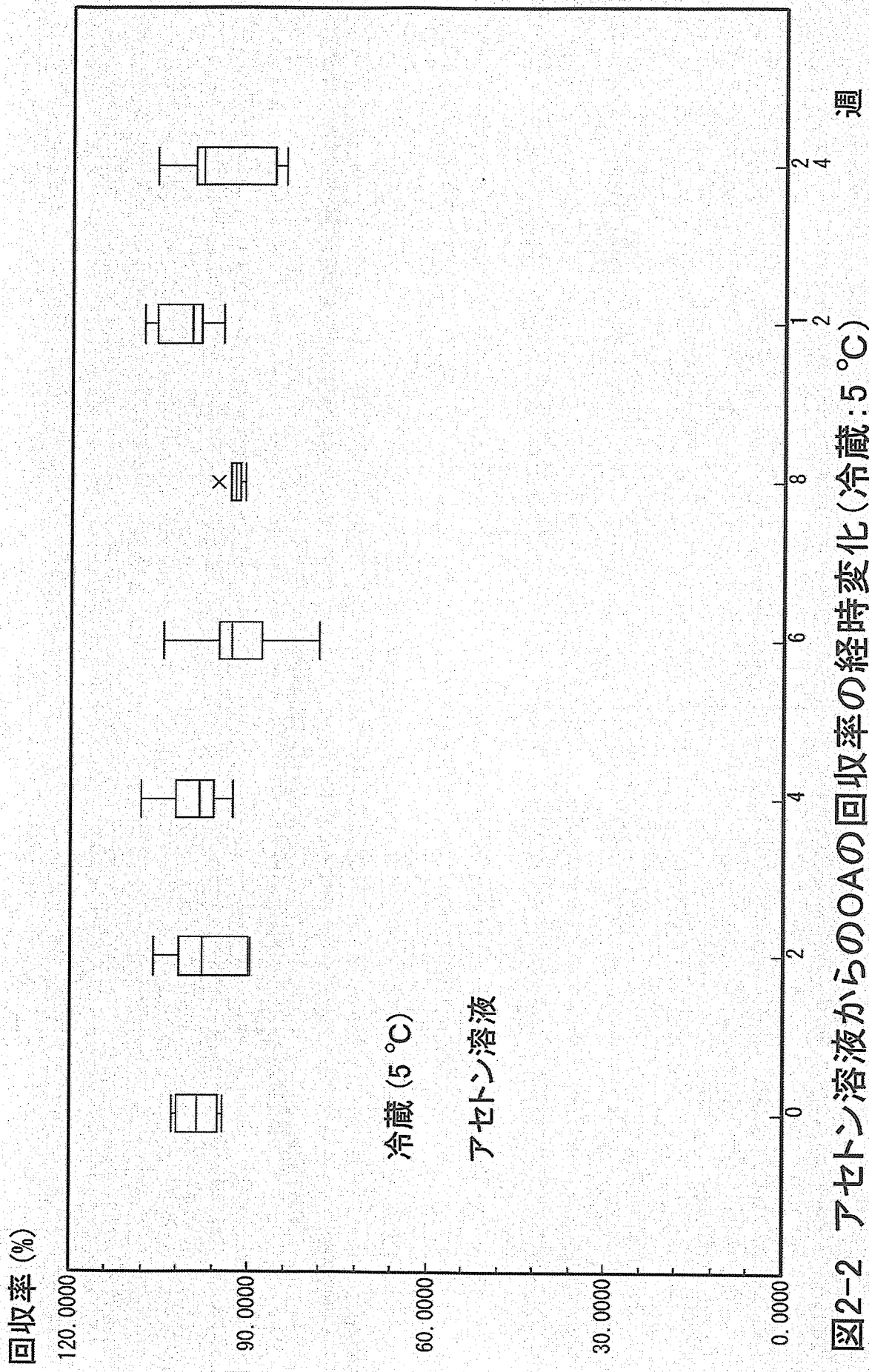


図2-2 アセトン溶液からのOAsの回収率の経時変化(冷蔵:5 °C)

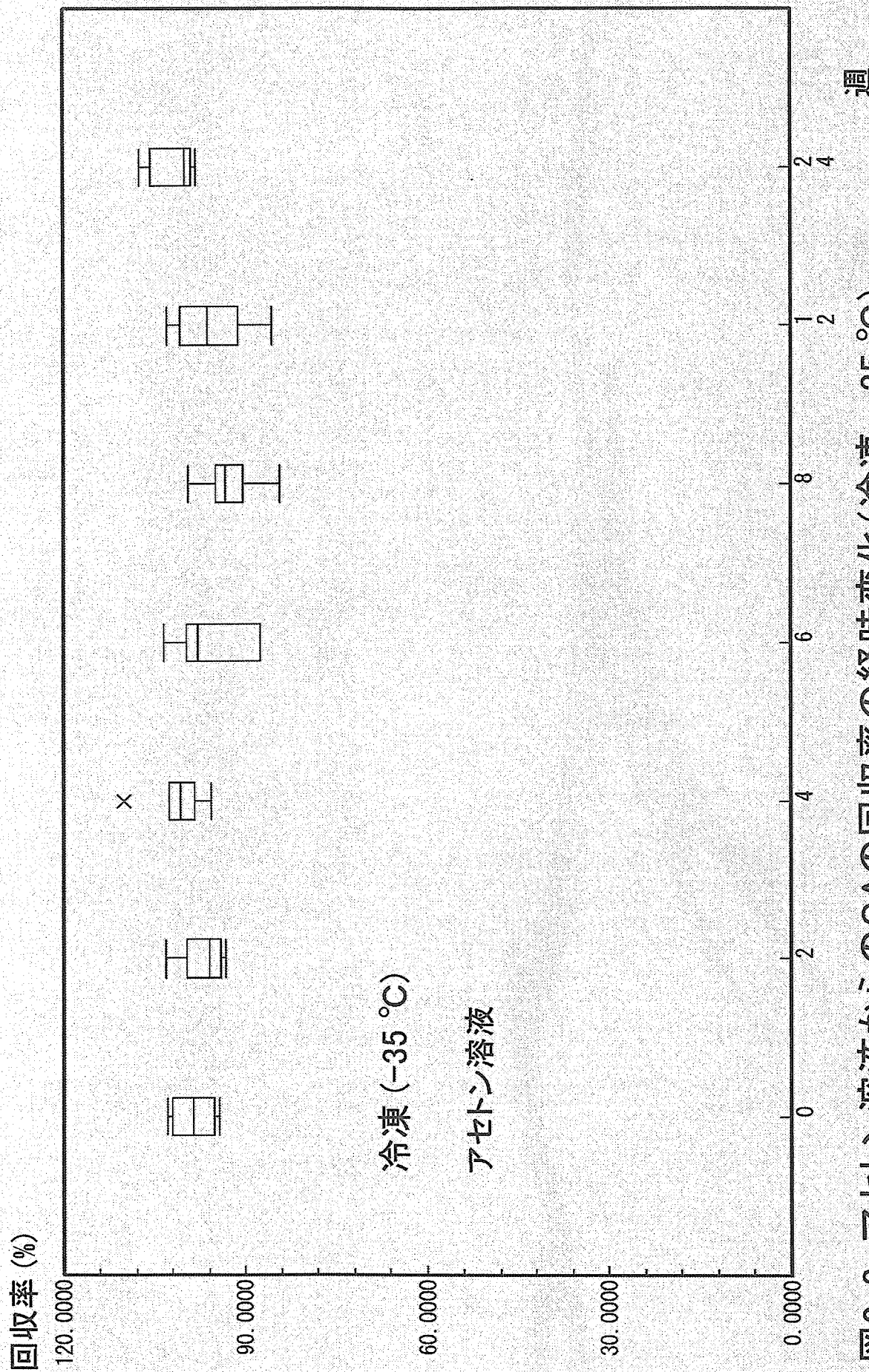


図2-3 アセトン溶液からのOAの回収率の経時変化(冷凍:-35 °C)

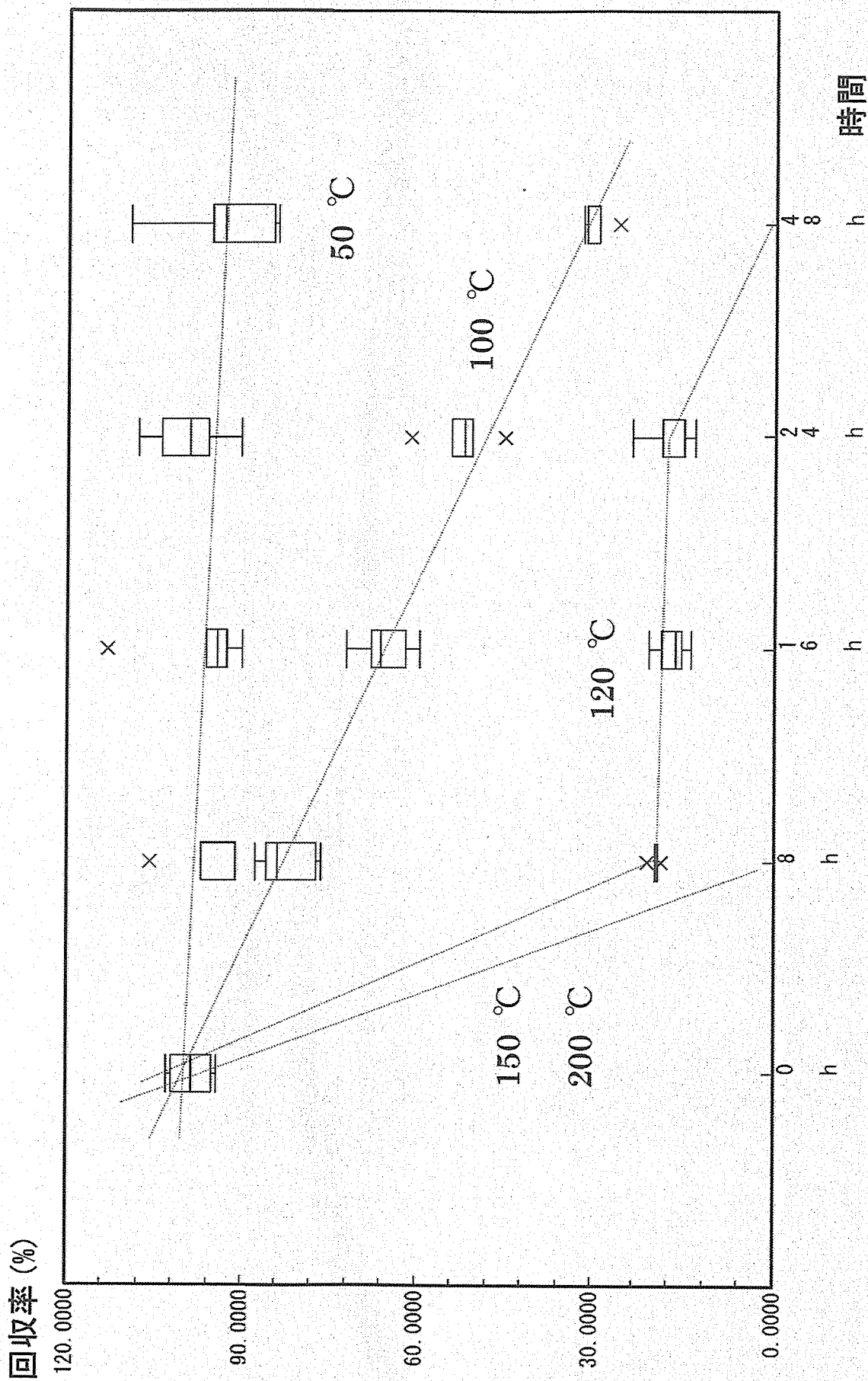


図3 OAの50°C～200°C下に於ける回収率の経時変化

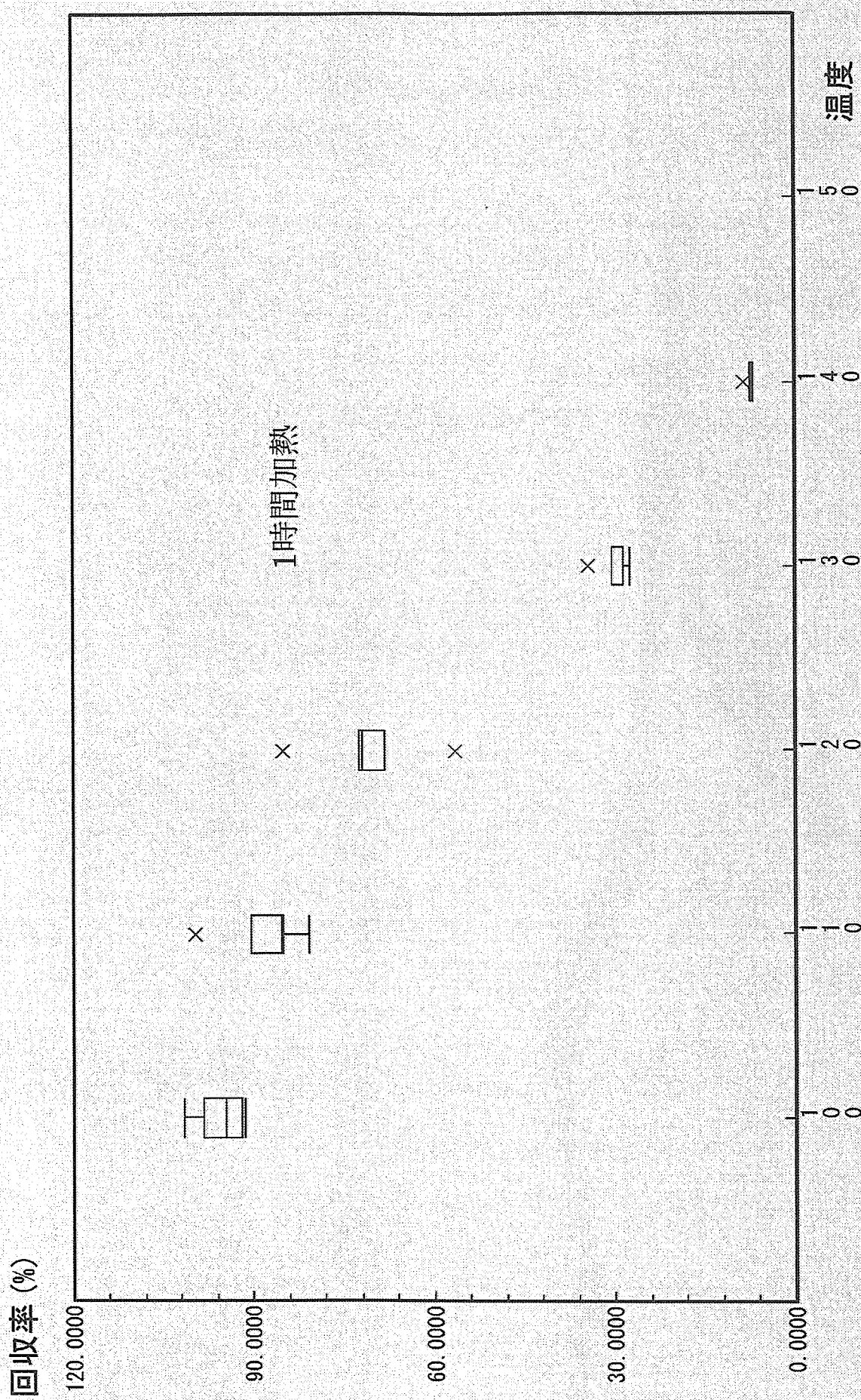


図4 OAの100°C~150°Cで1時間加熱下に於ける回収率

Table. A 下痢性貝毒検査の経験豊富な試験室における検査結果比較

| Laboratory A | | Laboratory B | | Laboratory NIHS | |
|--------------|--------------|--------------|--------------|-----------------|--------------|
| Sample No. | Dead/Tested. | Sample No. | Dead/Tested. | Sample No. | Dead/Tested. |
| 1 | 3/3 | 1 | 3/3 | 1 | 3/3 |
| 2 | 3/3 | 2 | 3/3 | 2 | 3/3 |
| 3 | 3/3 | 3 | 2/3 | 3 | 3/3 |
| 4 | 3/3 | 4 | 3/3 | 4 | 3/3 |
| 5 | 3/3 | 5 | 2/3 | 5 | 3/3 |
| 6 | 0/3 | 6 | 0/3 | 6 | 0/3 |

Sample No.1～5が陽性試料、6が陰性試料

厚生労働科学研究費補助金(食品の安心・安全確保推進研究事業)

「検査機関の信頼性確保に関する研究」

平成 18 年度

分担研究報告書

食品外部精度管理調査における適正調査試料作製と信頼性確保に関する研究

- (その 1) 理化学的検査調査試料の作製に関する研究
- (その 2) 食品基材中の大腸菌群の安定性確保に関する検討
- (その 3) 食品中のアレルギー関連物質検査の外部精度管理に関する
調査試料の作製検討

分担研究者 大島 赴夫

検査機関の信頼性確保に関する研究

分担研究報告書

食品外部精度管理調査における適性調査試料作製と
信頼性確保に関する研究 (その 1)
—理化学的検査調査試料の作製に関する研究—

| | | | |
|-------|-------|---------------------|------|
| 主任研究者 | 遠藤 明 | (財) 食品薬品安全センター秦野研究所 | 理事長 |
| 分担研究者 | 大島 赴夫 | (財) 食品薬品安全センター秦野研究所 | 部長 |
| 協力研究者 | 渡辺 卓穂 | (財) 食品薬品安全センター秦野研究所 | 室長 |
| | 鈴木 達也 | (財) 食品薬品安全センター秦野研究所 | 室長補佐 |
| | 勝村利恵子 | (財) 食品薬品安全センター秦野研究所 | 研究員 |
| | 高坂 典子 | (財) 食品薬品安全センター秦野研究所 | 研究員 |

研究要旨

精度管理調査における適正な調査試料作製は重要であり、調査対象項目の濃度の均一性および調査期間中の濃度の安定性の確保が必須となる。そこで、これらの必須項目を満たす調査試料を作製することを目的とし、実分析に即した調査試料の作製を試みた。調査試料として、玄米（カドミウム）、野菜ペースト（有機リン系農薬）及び食肉（サルファ剤）について均一性等の検討を行った。玄米調査試料作製には、カドミウム溶液に玄米を浸漬して行った。その時のカドミウム溶液の酸濃度及び浸漬時間を検討した結果、0.01mol/L 硝酸中に 24 時間浸漬した場合が良好であった。そこで、これらの条件を用い、カドミウム高濃度米を作製し、均一性、安定性を検討した。この結果、作製予定濃度に対して 98.8%と近似した濃度の試料を作製することができた。また、F 比が、1.462 と 5%水準（F 値 3.02）より小さく、精度管理調査に使用する調査試料として均一な濃度を確保することができた。120 日間の冷蔵保管における安定性は 99.5±0.8%であり、調査試料としては十分な期間の安定性が確認された。また、有機リン系残留農薬調査試料の基材として、かぼちゃ及びサツマイモペーストを比較した結果、6 種類の有機リン系残留農薬いずれにおいても、かぼちゃペーストで良好な回収率と均一性が認められた。また、かぼちゃペースト中での EPN 及びクロロピリホスの冷凍 100 日間の安定性はそれぞれ 96.0%及び 95.0%と調査試料に適正であった。一方、残留動物用医薬品用基材として食肉の調査試料としての可能性について、サルファ剤を用いて基礎的検討を行った。マルチミルグラインダーを用いることで、均一な食肉のペーストができた。水無添加ペーストにおいて、8 種のサルファ剤の回収率は約 70%であり、ばらつきが大きかった。今後、他の残留動物用医薬品、分析法も含め、詳細な検討が必要であると考えられた。

A. 研究目的

食品衛生法により、それぞれの検査機関は、業務管理について具体的事項を定め、試験・検査等の信頼性の確保が求められて

いる。試験・検査等の信頼性の確保のためには、精度管理調査（内部、外部）が重要な項目である。この精度管理調査を実施するに当たり、検査対象物質の濃度が均一で、

検査期間において濃度が安定である調査試料が求められる。そこで、検査対象物質の濃度が均一で安定な調査試料を開発するために以下の検討を行った。

B. 研究方法

1. 重金属（カドミウム）の玄米調査試料の検討

重金属（カドミウム）検査に使用する調査試料として、カドミウム添加玄米の作製法を検討し、その結果により適切な作製条件を設定後、作製したカドミウム添加玄米について、そのカドミウム濃度の均一性および安定性を調べた。

1) 試料基材および試薬

玄米：ひとめぼれ、千葉県産、生産年2005年、硝酸、硫酸：有害金属測定用、関東化学株式会社、カドミウム標準液（1000 ppm）：原子吸光分析用、関東化学株式会社、ジエチルジチオカルバミン酸ナトリウム（DDTC）、メチルイソブチルケトン（MIBK）：原子吸光分析用、和光純薬工業株式会社、酒石酸ナトリウムカリウム：原子吸光分析用、関東化学株式会社、硫酸アンモニウム：原子吸光分析用、和光純薬工業株式会社、水：日局注射用水、光製薬株式会社、チアベンダソール（TBZ）：MP Biomedicals, LLC

2) 実験方法

2)・1 処理方法

(1) 浸漬液の酸濃度

カドミウム濃度を $0.5\mu\text{g/mL}$ 、TBZ 濃度を $500\mu\text{g/mL}$ とした玄米浸漬液の硝酸濃度を 0.005 、 0.01 及び 0.1mol/L とし、それぞれ異なる溶液 1.5L ずつを硬質ガラス容器に採り、それぞれに玄米 1.0kg を浸漬した。浸漬時間は 24 時間とし、その間 10 回攪拌した。浸漬後、ポリプロピレン製網バスケットを用いて浸漬液と玄米を分け、玄米を捕集し、水分を除去し

た。これらをろ紙上に移し、厚み約 $0.5\sim 1\text{cm}$ となるように広げ、室温で 3 日間風乾した。風乾後、遠心粉碎機で粉末とした後、それぞれの玄米試料のカドミウム濃度及び水分を測定した。

(2) 浸漬時間

浸漬液の硝酸濃度を 0.01mol/L 、カドミウム濃度を $0.5\mu\text{g/mL}$ 及び TBZ 濃度を $500\mu\text{g/mL}$ とし、それぞれ異なる溶液 1.5L ずつを硬質ガラス容器に採り、それぞれに玄米 1.0kg を浸漬し、玄米浸漬時間を 6 、 24 、 48 時間と変えた。浸漬時間が 6 時間及び 24 時間の際は、その間 10 回攪拌し、 48 時間については 20 回攪拌した。浸漬後、(1)と同様にして、玄米を捕集、風乾、粉碎し、それぞれの玄米試料のカドミウム濃度及び水分を測定した。

2)・2 試料作製

①カドミウム高濃度添加玄米（添加玄米）

0.01mol/L 硝酸酸性カドミウム溶液（カドミウム 1ppm ・TBZ $500\mu\text{g/mL}$ ） 30L を採り、玄米 20kg を浸漬し、混和・攪拌して 24 時間静置した。この間 10 回、良く攪拌した。浸漬液から玄米を取り出し、ろ紙上に厚さ約 $0.5\sim 1\text{cm}$ に広げ、ろ紙上に 3 日間放置して風乾した（添加玄米）。これを遠心粉碎機で粉碎後、 100g ずつ 100 個の容器に充填し、無作為に 10 容器につき玄米 10g を採取してカドミウム濃度（ $n=2$ ）を測定した。また、その 10 容器から無作為に 5 容器を採り、水分を測定した。

②カドミウム無添加玄米（無添加玄米）

市販の玄米を遠心粉碎機で粉碎後に無作為に玄米 10g を採取してカドミウム濃度を測定した（ $n=3$ ）。

③混合玄米

①カドミウム添加玄米および②カドミウム無添加玄米を混合した後、遠心粉碎機で粉碎して混合玄米を作製した（作製予定濃度約 0.41 ppm）。これをポリプロピレン製容器に小分けし、無作為に容器 10 個を採り、各容器につき n=2 でカドミウム濃度及び水分を測定した。容器に小分けした残りの試料を冷蔵庫に保管して同様にカドミウム濃度及び水分の安定性を調べた。

2)-3 測定方法

(1) カドミウムの測定法

試料 10 g をケルダール分解フラスコに量り、硝酸 40 mL を添加して、加熱、分解した。硝酸による激しい反応が終了後、硫酸 20 mL を加え、溶液が暗色になったら硝酸を 2~3 mL 追加して溶液が透明になるまで加熱を繰り返した。分解液を水で希釈しながらメスフラスコに移し、100 mL に定容した。カドミウム無添加玄米については 50 mL に定容した。この試料液 10 mL（カドミウム無添加玄米については 50 mL）を採り、DDTC・MIBK 法により抽出を行い、原子吸光光度法により以下の条件でカドミウムを測定した。

原子吸光光度計の条件

原子吸光光度計 AA-660 株式会社 島津製作所

| | |
|------|-------------------------|
| 使用ガス | 可燃性ガス；アセチレン 支燃性ガス；空気 |
| ランプ | 中空陰極ランプ |
| 波長 | カドミウム；228.8 nm |

(2)水分の測定

予め恒量とした質量既知の秤量瓶に試料 2~3g を採り、蓋をして秤量した。これを 135℃とした定温恒温槽に入れ蓋を

ずらし、3 時間放置した。乾燥後、デシケータに移し、放冷後秤量した。

2. 有機リン系残留農薬調査試料の検討

かぼちゃ及びサツマイモを調査試料基材として、6 種の有機リン系農薬を用いて調査試料の作製法及び 2 種類の基材の比較検討も行った。

1) 試料基材および試薬

かぼちゃ及びサツマイモ（マイクロペースト状食材）：株式会社 新進、クロルピリホス、EPN、フェニトロチオン、フェンチオン、マラチオンおよびダイアジノン：残留農薬分析用、関東化学株式会社、アセトン、ヘキサンおよびアセトニトリル：残留農薬分析用、和光純薬工業株式会社

2) 試料作製

かぼちゃペースト 10 kg をテフロンコーティングステンレス容器（20 L 容）に採り、これに 6 種の有機リン系農薬（EPN、クロルピリホス、ダイアジノン、フェニトロチオン、フェンチオンおよびマラチオン）のアセトン溶液 10mL を添加した。ハンドミキサーで 5 分間ずつ 3 回攪拌した後、ポリプロピレン製容器に小分けにした（作製予定濃度 EPN：0.1ppm、クロルピリホス：0.1ppm、ダイアジノン：0.1ppm、フェニトロチオン：0.2ppm、フェンチオン：0.05ppm およびマラチオン：0.1ppm）。小分けした容器から無作為に 10 個ずつ採取して、それぞれ繰り返し 2 回、有機リン系農薬を測定し、均一性を調べた。

また、サツマイモペーストの場合、農薬のアセトン溶液添加時、さつまいもペーストが硬く、ハンドミキサーでの混合はできないことから、手で約 30 分間良く混合した。その後の操作はかぼちゃペー

スト同様に行った。

3) 測定方法

試料 20 g を秤量してオムニミキサーを使用し、アセトン 100 mL を加えて5分間抽出した。ろ過を行い、残渣に新たなアセトン 100 mL を加えて5分間抽出の操作を2回繰り返して液と合わせて、約25 mLまで減圧濃縮した。濃縮液に10%塩化ナトリウム溶液 100 mL を加えた後、ヘキサン 100mL で振とう抽出し、20%酢酸エチル含有ヘキサン 100 mL ずつで、2回、振とう・抽出(10分間)した。有機溶媒層を合わせ、無水硫酸ナトリウムで脱水後、減圧下(40℃以下)で濃縮し、窒素気流下で溶媒を留去した。残渣をヘキサン 20 mL に溶解してガスクロマトグラフに供した。

ガスクロマトグラフ条件

ガスクロマトグラフ：島津製作所 GC-17A (炎光光度型検出器付)

カラム：DB-210 (内径 0.25 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25 μm)

注入口温度：250℃、検出器温度：325℃

カラムオープン温度：60℃ (2 min)、昇温 10℃/min、280℃ (5 min) キャリヤーガス：ヘリウム、流量：1.1 mL/min、線速度：29 cm/sec、水素：100 kpa 空気：70 kpa、試料導入：スプリットレス

3. 残留動物用医薬品のための調査試料 基材の基礎的検討

残留動物用医薬品の検査に使用する調査試料として、食肉にサルファ剤を添加して、基材としての食肉の利用の可能性を検討した。

1) 基材および試薬

食肉：市販の豚(ヒレ肉)、サルファジ

アジン (SDZ)、サルファメラジン (SMR)、サルファジミジン (SDD)、サルファモノメトキシシン (SMMX)、サルファメトキサゾール (SMXZ)、サルファジメトキシシン (SDMX)、サルファキノキサリン (SQ)、サルファメトキシピダジン (SMPD)：残留動物用医薬品検査用、関東化学株式会社、アセトニトリル、酢酸エチル、メタノール、無水硫酸ナトリウム：試薬特級、和光純薬工業株式会社、アセトニトリル、メタノール：高速液体クロマトグラフ用、和光純薬工業株式会社

2) 試料作製

食肉をミンチにして、マルチミルグラインダー(グローエンジニアリング製)を使用し、ペースト肉 2kg に8種サルファ剤を含むメタノール溶液(10μg/mL) 20mL 及び(50μg/mL) 40mL を添加し良く混合した。作製予定濃度は、低濃度試料(0.1μg/g)、高濃度試料(1μg/g)に調製し、均一性を調べた。

3) 測定方法

測定操作は食品衛生法に準拠した。すなわち、試料 5g を採取して酢酸エチル 20 mL ずつで3回抽出し、抽出液を無水硫酸ナトリウムで脱水した後、濃縮乾固した。残渣をアセトニトリル 50 mL で溶解した後、アセトニトリル飽和ヘキサン 50 mL ずつ2回抽出して、油脂分を除去した。アセトニトリル層を濃縮乾固し、高速液体クロマトグラフの移動相に溶解して、高速液体クロマトグラフで測定した。

高速液体クロマトグラフ条件

高速液体クロマトグラフ：島津製作所 LC-6A、検出器：島津製作所 SPD-6A、検出波長：272 nm、カラム：mightysil