

図5 2 Lマリネリ容器における測定時間と測定精度

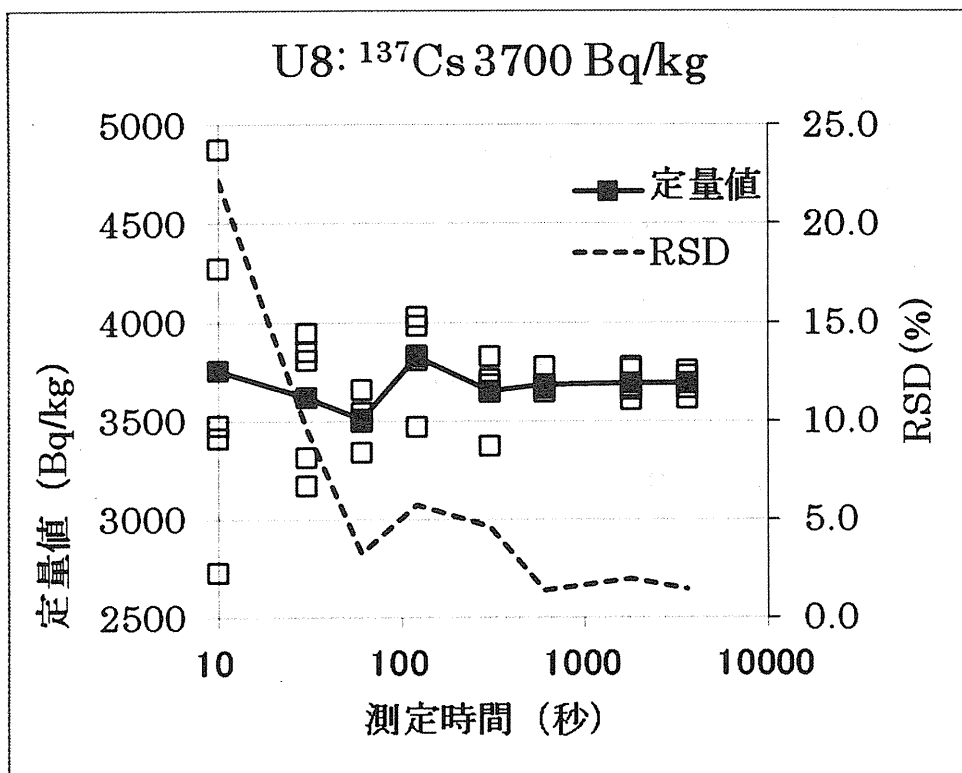


図6 U8 容器における測定時間と測定精度

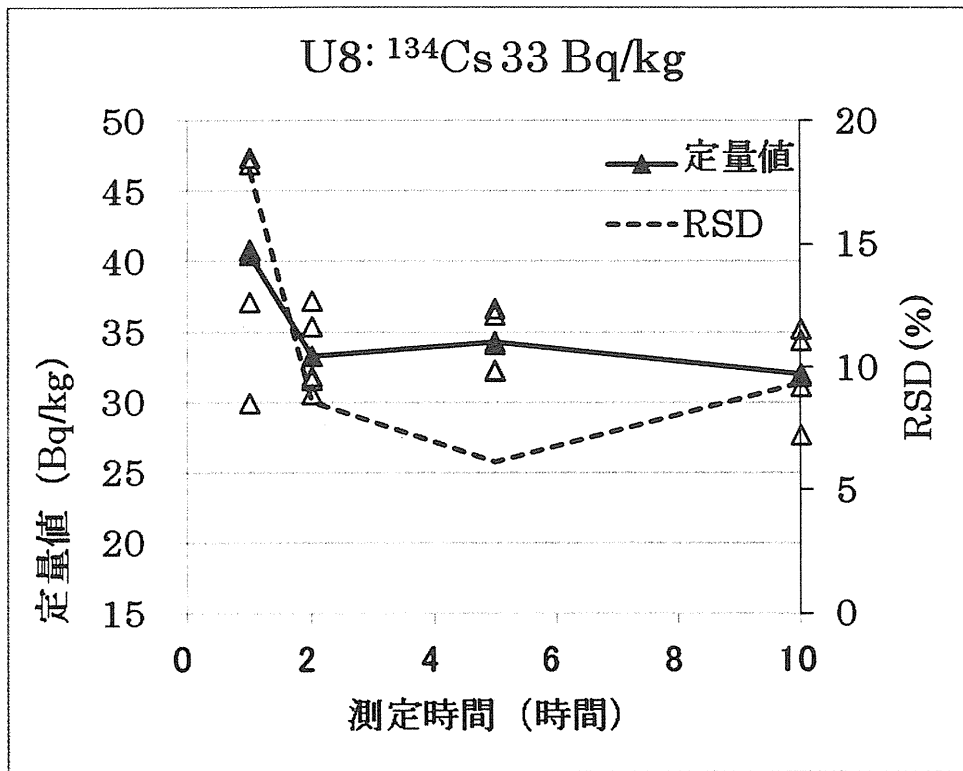


図7 U8 容器におけるセシウム 134 (33 Bq/kg) の測定時間と測定精度

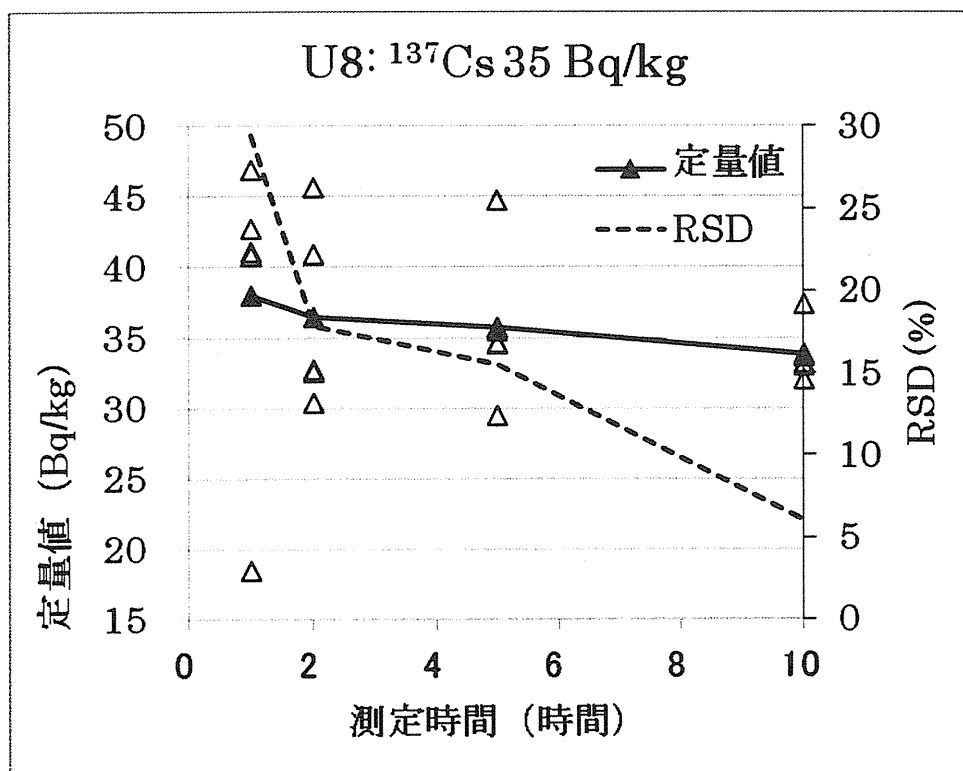


図8 U8 容器におけるセシウム 137 (35 Bq/kg) の測定時間と測定精度

厚生労働科学研究費補助金(食品の安全推進研究事業)

検査機関の信頼性確保に関する研究

平成 23 年度 分担研究報告書

食品衛生外部精度管理調査用適正試料(理化学検査、微生物学検査、
アレルギー物質検査、組換え DNA 技術応用食品検査)の作製検討と

信頼性確保に関する研究

分担研究者 鈴木 達也

厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)

分担研究報告書(平成 23 年度)

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	小島 幸一	(財)食品薬品安全センター秦野研究所	所長
分担研究者	鈴木 達也	(財)食品薬品安全センター秦野研究所	室長
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	部長
	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

適正な調査試料作製は精度管理調査を行う上で非常に重要であり、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。また、実分析をふまえ、新規基材を開発していかなければならないことも課題である。そこで、これらの必須項目を満たす残留動物用医薬品検査、食品添加物検査および残留農薬検査に関する調査試料の作製を試みた。

これまでに、スルファジミジン(以下 SDD)を添加した鶏肉各部位(ささみ、むねおよびもも)および豚肉各部位(ヒレ、カタ、カタロースおよびバラ肉)を基材に SDD を含む 10 種類のサルファ剤を添加して試料を作製し、均一性、冷凍保存安定性、冷蔵保存安定性および凍結融解安定性を検討した。鶏肉については、ささみおよびむねの 2 部位の適用が可能であり、既に、外部精度管理用調査試料の基材として用いているところである。一方、豚肉については、ヒレ肉の調査試料への適用性が確認できた。今年度は、昨年引き続き、残留動物用医薬品検査用調査試料については、豚肉に替わり、牛肉の 3 部位(ヒレ、カタおよびバラ)を用いて調査試料としての採用の可否を検討した。その結果、牛肉試料はこれまでの鶏肉および豚肉と比較してブランク試料由来の夾雑ピークが多く、また添加したサルファ剤全体として回収率が低かった。しかしながら、ヒレ肉においては添加したすべてのサルファ剤について良好な均一性が得られ、調査試料としての適用の可能性があると考えられた。またカタ肉についても、残留基準のある SDD の回収率および均一性ともに良好であることから、今後、その 2 部位について調査試料とするための更なる保存安定性の検討を要すると考える。

また、食品添加物検査用調査試料について、着色料および保存料を対象として作製検討を行った。着色料には新基材として、ゼラチンを用いたゼリー菓子の作製を試みた結果、4 種類の色調の異なる試料においても、抽出、精製においてゼラチンの妨害を受けることなく、添加色素が正しく検出された。作製工程がやや煩雑であるが、固体試料の 1 つとして、ゼリー菓子が適用できると考えられた。

保存料には、新たに固体試料として大根漬けを用い、ソルビン酸を添加して各大根部位の均

一性および安定性を検討した。その結果、作製 0 日後(作製直後)において、大根漬けの 3 部位についてのソルビン酸濃度は、外皮、外皮を除く外表面および中心部のいずれも、浸漬液のソルビン酸濃度 0.52 g/kg(理論値)とほぼ同濃度であり、いずれの部位にも均等にソルビン酸溶液が浸透したと考えられた。また、冷蔵保存 60 日後に、同様にソルビン酸濃度を測定した結果、いずれの部位においても作製当日に対し約 97~100%の安定性を示した。さらに、冷蔵保存中に大根漬試料から滲出した液についても、ソルビン酸濃度を測定した結果、大根各部位とほぼ同濃度であった。このことから、作製 60 日後においても、試料基材中のソルビン酸濃度は、いずれの部位においても安定しており、また、滲出液ともほとんど差が認められないことから、実際の試験検査時には、全部位を細切・均質化して用いるため、滲出液があった場合でも、濃度が変わることなく十分に定量試験として適用できることが示唆された。

また、市販のシロップを基材とし(シロップ含有量 50%)、ソルビン酸およびソルビン酸カリウムを添加して試料を作製し、安定性の検討を行った。その結果、ソルビン酸を添加した試料の安定性が、ソルビン酸カリウムを添加した試料と比較して著しく低下したことから、水溶液試料の場合、添加標準品にはソルビン酸よりソルビン酸カリウムを用いる方が、より安定した試料を作製できることが示唆された。

さらに、残留農薬検査用調査試料の新たな基材として、マッシュポテトの適用性を検討した。乾燥材料に水を添加して冷凍保存後、調査試料とする作製方法では、解凍時に離水する現象があり、均質な試料が得られなかったことから、離水防止の目的で、試料の安定剤となる添加物の検討を行った。その結果、農薬の添加回収率および均一性(n=5)から、安定剤にはペクチン及びパールアガーが有効である可能性が示唆された。今後は実試料作製の方法を確立し、引き続き、冷凍後の均一性、冷凍保存安定性、複数回の凍結融解の安定性、冷蔵保存での安定性を確認する必要があると考える。

A. 研究目的

食品の安全性を確保するためには、試験・検査等の信頼性の確保が重要である。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。信頼性の確保のためには、外部・内部精度管理調査が重要な項目である。この精度管理調査を実施するためには、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、残留動物用医薬品検

査、食品添加物検査および残留農薬検査を対象とした検討を行った。

B. 研究方法

残留動物用医薬品検査に使用する調査試料として、牛肉にスルファジミジンを含む 10 種のサルファ剤を添加し、基材としての牛肉の利用の可能性を検討した。

食品添加物検査として、着色料にはゼリー菓子を、また保存料(ソルビン酸)には、新たに大根漬を基材として用い、試料作製を試みた。

残留農薬検査としては、新たにマッシュポ

テトを基材として、試料作製を試みた。

1. 試料基材および試薬

1) 残留動物用医薬品

(1) 試料基材(食肉)

市販の輸入牛肉(ヒレ、カタおよびバラ肉)を3度挽いたミンチ肉

(2) 標準品

スルファジミジン(以下 SDD)、スルファジアジン(以下 SDZ)、スルファメラジン(以下 SMR)、スルファメトキシピリダジン(以下 SMPD)、スルファモノメトキシ(以下 SMMX)、スルファクロルピリダジン(以下 SCPD)、スルファメトキサゾール(以下 SMX)、スルファジメトキシ(以下 SDMX)およびスルファキノキサリン(以下 SQ)(食品分析用、関東化学(株))、スルフィソキサゾール(以下 SIX)(残留農薬試験用、関東化学(株))

(3) 試薬

メタノール、アセトニトリルおよび蒸留水(高速液体クロマトグラフ(以下、HPLC)用、和光純薬工業(株))、n-ヘキサン、無水硫酸ナトリウム、リン酸一ナトリウム二水塩およびジエチルエーテル(試薬特級、和光純薬工業(株))、けい砂(鹿1級、関東化学(株))

フィルター:アクロディスク LC PVDF、25 mm (0.45 μm 孔径)(日本ポール(株))

2) 食品添加物

2)-1 着色料

(1) 試料材料(ゼリー菓子)

日本薬局方注射用水(以下、水)(光製薬(株))、ゼラチン(新田ゼラチン(株))、水あめ(丸玄本舗(株))、精製白糖(日本薬局方、和光純薬工業(株))、トウモロコシ油(ナカライテスク(株))

(2) 標準品

食用赤色2号(以下 R2)、食用赤色3号(以下 R3)、食用赤色40号(以下 R40)、食用赤色102号(以下 R102)、食用赤色104号(以

下 R104)、食用赤色105号(以下 R105)、食用青色1号(以下 B1)、食用黄色4号(以下 Y4)、および食用緑色3号(以下 G3)(食品添加物公定書標準品、(一財)医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス財団)

(3) 添加用色素

R2、R3、R40、R104 および R105(和光特級、和光純薬工業(株))、R102、B1 および Y4(和光一級、和光純薬工業(株))、G3(和光純薬工業(株))

(4) 試薬

水(光製薬(株))、28%アンモニア水およびアセトニトリル(試薬特級、関東化学(株))、エタノール(99.5)、酢酸、無水硫酸ナトリウム、酢酸エチル、アセトン、3-メチル-1-ブタノールおよびメタノール(試薬特級、和光純薬工業(株))、ポリアミド C-100(カラムクロマトグラフ用、和光純薬工業(株))、HPTLC シリカゲル 60、TLC シリカゲル 60 RP-18 F254_s および 50 HPTLC Plates Cellulose (Merck)

2)-2 保存料(ソルビン酸)

(1) 試料基材

① 漬物(大根漬け)

紀の郷(株古川)

② シロップ

ガムシロップ(株ジーエスフード)

(2) 標準品

ソルビン酸標準品(食品分析用、関東化学(株))、ソルビン酸カリウム(和光一級、99.7%、和光純薬工業(株)、添加用標準品として使用)

(3) 試薬

蒸留水、メタノール、アセトニトリル(HPLC用、和光純薬工業(株))、クエン酸一水塩、クエン酸三ナトリウム二水塩(アミノ酸自動分析用、和光純薬工業(株))

3) 残留農薬

(1) 試料材料(マッシュポテト)

蒸留水(HPLC用、和光純薬工業(株))、マッシュ

ユポテト(明治乳業(株))、ペクチン(株鈴商)、
パールアガー(成分:ブドウ糖、ローストビー
ンガム、カラギナンおよびリン酸二水素カリウ
ム)(株パイオニア企画)

(2) 標準品

クロルピリホス、フェニトロチオン、マラチオ
ン、ダイアジノン、エトプロホス、ブタミホス、ジ
メトエート、フェンスルホチオン
(Dr.Ehrenstorfer GmbH、関東化学(株))

(3) 試薬

蒸留水(HPLC 用、和光純薬工業(株))、アセト
ン、ヘキサン、酢酸エチル(残留農薬・PCB
試験用、和光純薬工業(株))、塩化ナトリウム、
無水硫酸ナトリウム(試薬特級、和光純薬工
業(株))

2. 使用機器および測定条件

1) 残留動物用医薬品

(1) 試料作製用混合機

ロボ・クープブリクサー5 プラス(容器容量:3.5
L、以下ブリクサー)(株エフ・エム・アイ)

(2) 試料抽出用機器

オムニミキサー(OMNI-International)、減圧
濃縮器(東京理化学器械(株))

(3) 測定機器

高速液体クロマトグラフ(以下 HPLC):LC-
10A(株島津製作所)、検出器:SPD-10A(株
島津製作所)

(4) 測定条件

カラム:Mightysil RP-18(H)(内径 4.6 mm、長
さ 150 mm、粒子径 5 μm)、移動相:0.025
mol/L リン酸一ナトリウム溶液:アセトニトリル
(17:3)、流速:0.8 mL/min、カラム温度:
40°C、測定波長:268 nm

2) 食品添加物

2)-1 着色料

(1) 試料作製用使用機器

湯浴 SB-55(東京理化学器械(株))

(2) 試料抽出用機器

卓上多本架遠心機 KN-70(株久保田製作
所)、湯浴 SB-55(東京理化学器械(株))

(3) 薄層クロマトグラフィー(以下 TLC)

① HPTLC シリカゲル 60:酢酸エチル・メタ
ノール・28%アンモニア水(3:1:1)、② TLC
シリカゲル 60 RP-18 F254_s:メタノール・アセ
トニトリル・5%硫酸ナトリウム(3:3:10)、③ 50
HPTLC Plates Cellulose:アセトン・3-メチル
1-ブタノール・水(6:5:5)

2)-2 保存料(ソルビン酸)

(1) 試料作製用混合機

ケミカルミキサー(TCM-W 型)(株セムコーポ
レーション)

(2) 試料抽出用機器

水蒸気蒸留装置(株前田製作所)

(3) 測定機器

高速液体クロマトグラフ(以下 HPLC):LC-
10A(株島津製作所)、検出器:SPD-10A(株
島津製作所)

(4) 測定条件

カラム:Inertsil ODS-2(内径 4.6 mm、長さ
150 mm、粒子径 5 μm)、移動相:メタノール・
アセトニトリル・5 mmol/L クエン酸緩衝液(1:
2:7)、流速:1.0 mL/min、カラム温度:40°C、
測定波長:230 nm

3) 残留農薬

(1) 試料作製用使用機器

ホットプレート(NP-6 型)(柴田科学(株))、電子
レンジ HD 型(EM-A1)(三洋電機(株))、ハン
ドミキサー(NK-H3-P)(ナショナル(株))

(2) 試料抽出用機器

オムニミキサー(日本精機(株))、減圧濃縮器
(東京理化学器械(株))

(3) 測定機器

リン検出器付きガスクロマトグラフ(以下
GC(FPD)):Agilent 7890A(アジレント・テクノ
ロジー)

(3) 測定条件

カラム:DB-210(内径 0.25 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25 μm)、カラム流量:2.5 mL/min、カラム温度:60°C で 2 分間保持し、その後毎分 10°C で昇温し、200°C に到達後 10 分間保持、注入口温度:250°C、検出器温度:250°C、キャリアーガス:ヘリウム

3. 試料作製

1) 残留動物用医薬品

ブrikサーを用いて各部位のミンチ肉をペーストにすると同時にサルファ剤混合標準溶液(メタノール溶液)を添加し、よく混合した(添加濃度:SDD、SDZ、SMR、SHPD、SMMX、SCPD、SMX、SDMX、SQ および SIX いずれも 0.2 $\mu\text{g/g}$)。これらを約 80 g ずつ容器に分注して冷凍(-24°C~-20°C)し、試料とした。同様にして、ほぼ同量の基材に同割合のメタノールを添加して、ブランク試料を作製した。これらの各サルファ剤の回収率、均一性および冷凍保存(ヒレ 58 日、カタ 60 日およびバラ 63 日)における安定性を検討した。

2) 食品添加物

2)-1 着色料

複数色素を選択し、ゼリー菓子として自然な色調となる組み合わせおよび濃度を調整し、ゼラチン濃度が異なる 2 種類のゼリー菓子に添加し、それらが検出可能であることを確認した。また、均一性(n=5)の確認を行った。

水 75 mL をとり、ゼラチン 18 g および 21 g を各々振り入れ、膨潤させた。別の容器に、水あめ 30 g、精製白糖 50 g およびトウモロコシ油 2 g を量り、以下に示す濃度の調製した色素液(水溶液)50 mL を加え、水浴上で加熱した。内容物が溶解後、膨潤させたゼラチンを入れ、再び水浴上で穏やかに加熱しながら混合し、完全にゼラチンを溶かした(ゼラチン濃度:8%および 9.2%)。放冷後、200 g を量りとり、容器に入れ冷蔵した。

色調①(茶系):R40(約 40 $\mu\text{g/mL}$)、R2(約 40 $\mu\text{g/mL}$)、G3(約 16 $\mu\text{g/mL}$)および Y4(約 40 $\mu\text{g/mL}$)

色調②(赤系):R104(約 20 $\mu\text{g/mL}$)、R105(約 8 $\mu\text{g/mL}$)、Y4(約 40 $\mu\text{g/mL}$)および R2(約 20 $\mu\text{g/mL}$)

色調③(赤系):R2(約 28 $\mu\text{g/mL}$)、B1(約 4 $\mu\text{g/mL}$)、R102(約 8 $\mu\text{g/mL}$)および R105(約 8 $\mu\text{g/mL}$)

色調④(紫系):R104(約 8 $\mu\text{g/mL}$)、R105(約 8 $\mu\text{g/mL}$)、R3(約 8 $\mu\text{g/mL}$)、R102(約 40 $\mu\text{g/mL}$)および Y4(約 8 $\mu\text{g/mL}$)

2)-2 保存料(ソルビン酸)

(1) 漬物(大根漬け)

長さ約 10~15 cm の円柱状の漬物を縦長方向に 4 分割し、ソルビン酸濃度が 0.52 g/kg になるように調製した溶液(水溶液)に、約 1 週間、冷暗所で浸漬した。浸漬後、溶液から取り出し、作製試料とした。

(2) シロップ

①ソルビン酸およびソルビン酸カリウムの検討

市販のシロップを基材とし、ソルビン酸およびソルビン酸カリウムを添加標準品とした。シロップ含有量はいずれも 50%とし、水を用いて希釈して試料を作製し、それぞれの均一性および冷蔵保存(30 および 60 日間)における安定性を検討した(ソルビン酸濃度はいずれも 0.95 g/kg)。

②シロップ含有量およびソルビン酸濃度の検討

市販のシロップを基材として用い、シロップ含有量を 10、30 および 50%に、それらのソルビン酸濃度を 0.95 g/kg として、それぞれ試料を作製した。更に、シロップ含有量を 50%とした場合のソルビン酸濃度を 0.40、0.60 および 0.75 g/kg に変えて、それぞれ試料として作製した。作製は水を用いて希釈し、ソルビン酸カリウムを添加混合して行った。安定性

は、冷蔵保存(47日間)後、試験に供した。

3) 残留農薬

(1) 安定剤溶液の調製

① ペクチン

ペクチン 3 g および 6 g を量り、各々に水 100 mL を加え、ホットプレート上で緩やかに加熱溶解した。溶解後、溶液が熱い状態で以下のマッシュポテトの調製に供した。

② パールアガー

パールアガー 4.5 g および 6 g を量り、各々に水 100 mL を加え、電子レンジにより溶解した。溶解後、溶液が熱い状態で以下のマッシュポテトの調製に供した。

(2) 農薬添加マッシュポテトの調製

マッシュポテト 45 g を量り、水 150 mL を加え、マッシュポテトを十分膨潤させた後、スパチュラで混合した。(1)で調製した安定剤溶液全量を、溶液が熱い状態で加え、沸騰水(熱い状態) 10 mL を用いて洗い込む操作を 2 回行い、十分混合後、放冷した。各々 250 g を量り、クロルピリホス、フェニトロチオン、マラチオン、ダイアジノンおよびエトプロホス各 0.1 $\mu\text{g/g}$ 、ブタミホス、ジメトエートおよびフェンスルホチオン各 0.2 $\mu\text{g/g}$ となるように添加し、ハンドミキサーを用いて十分混合した。調製した試料は、ジップロックに入れ、冷凍保存した。

4. 試験方法

1) 残留動物用医薬品

(1) 試料からのサルファ剤の抽出

測定操作は、「食品衛生検査指針 動物用医薬品・飼料添加物編(2003)」に準じた。

試料 5.00 g を採取し、アセトニトリル 50、30 および 30 mL で 3 回オムニミキサーを用い抽出した。抽出液を無水硫酸ナトリウムで脱水し、アセトニトリル飽和 n-ヘキサン 50 mL を加え振とうした。アセトニトリル層を採り、残った n-ヘキサン層に n-ヘキサン飽和アセト

ニトリル 50 mL を加え振とうし、先に採取したアセトニトリル層と合わせ、40°C 以下で濃縮乾固した。残留物を 0.025 mol/L リン酸一ナトリウム溶液:アセトニトリル(17:3) 5 mL で溶解させ、フィルターでろ過した後、HPLC(UV)で測定した。ただし鶏肉(もも肉)および豚肉については必要に応じて、濃縮乾固の後、残留物を 0.025 mol/L リン酸一ナトリウム溶液:アセトニトリル(17:3) 5 mL で溶解させ、フィルターでろ過した後、HPLC(UV)で測定した。

(2) 基材の脂質量の測定(エーテル抽出法)

試料 10 g を採取し、無水硫酸ナトリウム 20 ~ 30 g を加え、ジエチルエーテル各 100 mL で 3 回オムニミキサーを用いて抽出した。1 晩放置後、エーテル層を採り、さらに無水硫酸ナトリウムを加えて脱水後、濃縮乾固して得られた残留物質量を脂質量とした。

(3) 基材の水分量の測定(常圧加熱乾燥法(乾燥助剤法))

試料 5 g を蒸発皿に採取し、適量の水およびけい砂を加えて混合した。65°C で加温し、添加した水分がほぼなくなった状態から 105°C で 5 時間乾燥した。採取した質量から得られた残留物質量を差し引いた量を水分量とした。

2) 食品添加物

2)-1 着色料

測定操作は、「食品衛生検査指針 食品添加物編(2003)」の第 9 章 着色料の項に準じた。

試料 20 g をとり、50 mL の水、50v/v%エタノールまたはアンモニア・エタノール溶液を加え、水浴上で 30 分間加温した。冷後、綿ろ過した。アンモニアを含む場合は、ろ液を酢酸(3→50)で中和した後、水浴上で濃縮して約 20 mL とし、検液とした。

検液を遠心管にとり、酢酸(3→50)を加えて酸性(pH3~4)とし、良く混和した。次にポリ

アミド 0.6 g を加え、約 1 分間振り混ぜた後、3,500 回転/分で 5 分間遠心分離した。上澄液は捨て、残留物を酢酸 (3→50) および水で洗った。着色したポリアミドをカラムに充てんし、エタノール・アンモニア混液を加え、溶出してきた着色液を集めた。酢酸 (3→50) で中和した後、水浴上で濃縮乾固した。残留物に溶解液 1 mL を正確に加えて溶かし、試料液とした。

あらかじめ活性化 (120°C、15 分間) した薄層板の下端より 1.5 cm のところに、試料液および定性用標準液 (1000 µg/mL) を直径約 3 mm 以下になるように、1 cm の間隔に塗布し、ドライヤー (冷風) を用いて風乾した。各薄層板に対応する展開溶媒を用い、薄層板の下端 0.5~1 cm を展開溶媒に浸し展開した。展開終了後、試料液および定性用標準液それぞれから得られたクロマトグラムの色と R_f 値を、それぞれ比較観察した。

2)-2 保存料 (ソルビン酸)

測定操作は、「食品衛生検査指針 食品添加物編 (2003)」の第 1 章 保存料の項に準じた。

(1) 漬物 (大根漬け)

試料の外皮、外皮を除く外表面および中心部の 3 部位に分け、それらを部位別に合わせ細切した。その約 50 g を精密に量り、水 100 mL を加えてかき混ぜ、pH 試験紙を用いて水酸化ナトリウム溶液 (1→10) または硫酸 (1→10) で中和した。これに酒石酸溶液 (1→10) 10 mL、食塩 100 g およびシリコーン樹脂 1 滴を加えた後、全量を水で約 200 mL とした。これを、毎分約 10 mL の留出速度で水蒸気蒸留に付し、留液を採り 500 mL とした後、HPLC(UV) で測定した。

また、試料作製直後および 60 日後の浸漬液中ソルビン酸濃度、ならびに試料作製 60 日後の、大根試料から滲出した液 (以下、滲

出液) 中ソルビン酸濃度を、同様に HPLC(UV) で測定した。ただし水蒸気蒸留は行わず、水による希釈後、測定に供した。

(2) シロップ

試料を適宜水で希釈し、HPLC(UV) で測定した。

3) 残留農薬

測定操作は、「食品衛生検査指針 残留農薬編 (2003)」に準じた。

試料 20 g を採取し、アセトン 100、50 および 50 mL で 3 回オムニミキサーを用い抽出した。抽出液を合わせ、40°C 以下でアセトンを留去した。濃縮物に 10% 塩化ナトリウム水溶液 10 mL を合わせ、これに n-ヘキサン 100 mL を加え振とうした。n-ヘキサン層を採り、残った水層に酢酸エチル・n-ヘキサン (1:4) 100 mL を加え、上記の操作を 2 回繰り返す。酢酸エチル・n-ヘキサン (1:4) 層を n-ヘキサン層に合わせた。これに適量の無水硫酸ナトリウムを加え、時々振り混ぜながら 15 分間放置後、40°C 以下で酢酸エチル・n-ヘキサンを除去した。残留物に n-ヘキサンを加えて溶解させ、正確に 10 mL とした後、GC(FPD) で測定した。

(倫理面への配慮)

食の安全・安心に係わる研究であり、特に倫理面への配慮を必要としなかった。実験者および環境への配慮としては、有害な溶媒 (ベンゼン等) を使用しなかった。

C. D. 研究結果および考察

1. 残留動物用医薬品

1) 牛肉試料の均一性の確認

均一性試験は、作製後、冷凍保存した試料について、分注した容器から 10 容器を選択し、それぞれの容器につき n=2 で各サルファ剤濃度を測定した。得られた結果について

一元配置分散分析を行ったところ、ヒレ肉では全てのサルファ剤において均一性が認められた(表 1)。添加した 10 種類のサルファ剤標準品のクロマトグラムを図 1 に示した。得られたブランク試料のクロマトグラムにおいて、5 種類のサルファ剤 (SDZ、SMR、SMMX、SCPD および SMX) の保持時間付近に基材由来の夾雑ピークが認められ(図 2)、バックグラウンドとして試料のピークエリアから差し引いて計算した(図 3)。また、添加量の 0.2 $\mu\text{g/g}$ に対する回収率は、70~80%とやや低かったが、70%を下回るサルファ剤はなかった。

カタ肉では、4 種類のサルファ剤 (SDZ、SMR、SIX および SQ) において均一性が認められなかったが、他のサルファ剤 (SDD、SMPD、SMMX および SCPD) においては均一性が認められた(表 1)。また試料のバックグラウンドとして、ヒレ肉と同じ 5 種類のサルファ剤において、ブランク試料を差し引いて濃度の計算を行った。添加量に対する回収率は、SDZ が約 57%と著しく低かったが、その他では、71~87%であった。

バラ肉では、10 種類中 6 種類のサルファ剤 (SDZ、SDD、SMPD、SCPD、SIX および SQ) において均一性が認められなかったが、他のサルファ剤 (SMR、SMMX、SMX および SDMX) においては均一性が認められた(表 1)。クロマトグラムについては、ヒレ肉およびカタ肉とは異なるサルファ剤 (SMPD) の保持時間付近にバックグラウンドとなるピークが認められたが、その他の 4 種類のサルファ剤 (SDZ、SMR、SMMX および SCPD) はヒレ肉およびカタ肉と同様に夾雑ピークが認められ、ブランク試料のバックグラウンドのピークを差し引いて計算した。添加量に対する回収率は、SIX が 69%、SQ が 68%と 70%を下回った。その他のサルファ剤は、70~87%であった(表

1)。

各基材について脂質量および水分量の測定を行ったところ、脂質量についてはバラ肉 (20.3%) > カタ肉 (11.0%) > ヒレ肉 (5.7%) となり(表 2)、水分量については逆にヒレ肉 (69.6%) > カタ肉 (69.3%) > バラ肉 (55.1%) となった(表 3)。以上の結果から、バラ肉は脂肪分が多く、ヒレ肉などと比較して水分量が少ないため、ヒレおよびカタ肉と同様の混合方法では均一な試料を作製することが困難であることが示唆された。これまで検討を行ってきた鶏肉および豚肉のサルファ剤の回収率が、いずれの基材においてもほぼ全てのサルファ剤について 80~95%であったのに対し、牛肉を基材とした場合は、いずれの部位でも、約 10%程度低い傾向があった。(表 1)。

2) 牛肉試料の冷凍保存安定性の確認

冷凍保存安定性試験は、作製後より冷凍保存した試料について、均一性試験の約 60 日後に、均一性試験同様、10 容器を選択し、それぞれの容器につき $n=2$ で各サルファ剤濃度を測定した。得られた結果について、均一性試験時の各サルファ剤濃度に対する割合(安定性(%))を算出した。3 種の基材について、冷凍約 60 日後の安定性を確認したところ、ヒレ肉における SIX (79.1%)、カタ肉における SDZ (135.7%) およびバラ肉における SDZ (105.4%) を除き、いずれの基材においても全てのサルファ剤について 85~99%の安定性が得られた(表 4)。ブランク試料のクロマトグラムについては、3 部位のいずれの基材においても、SDZ、SMMX および SCPD の 3 種類のサルファ剤で差し引き計算が必要であった。また得られた F 値は、カタ肉の SMR (5.93) および SDD (3.59) を除き、いずれのサルファ剤および基材でも、3.02 より小さかった。しかしながら、いずれのサルファ剤および基材についても、均一性試験時と比較して、

RSD (%)は大きくなる傾向であった。また F 値は、1 を下回るサルファ剤がカタ肉およびバラ肉にみられた。(表 4)。このことから、今後、更に牛肉試料の冷蔵保存および凍結融解の安定性を確認する必要があると考えられる。

2. 食品添加物

1) 着色料

新基材として、ゼラチンを用いたゼリー菓子中の着色料を対象とした定性試験用調査試料の作製を試みた。

複数色素を選択し、3. 2)-1 に示す茶系の色調①、赤系の色調②および③ならびに紫系の色調④について、それぞれゼラチン濃度を変えて作製し、均一性を確認した(n=5)。

その結果、いずれの試料からも、抽出、精製においてゼラチンの妨害を受けることなく、添加色素が正しく検出された。作製工程がやや煩雑であるが、固体試料の 1 つとして、ゼリー菓子が適用できると考えられた。

2) 保存料(ソルビン酸)

2)-1 漬物(大根漬)

これまで保存料の調査試料として、清涼飲料やしょう油など、液体試料を多く作製してきた。

今回、新たに固体試料として大根漬を基材として用い、定量試験として保存料(ソルビン酸)の調査試料の作製を試みた。

市販の大根漬を、ソルビン酸カリウム水溶液(ソルビン酸濃度として 0.52 g/kg)に 1 週間浸漬して得られた試料の外皮、外皮を除く外表面および中心部の 3 部位について、試料作製 0 日および冷蔵保存 60 日後のソルビン酸濃度を測定した。

その結果、作製 0 日後(作製直後)において、大根漬の 3 部位についてのソルビン酸濃度は、外皮で 0.525 ± 0.006 g/kg、外皮を除く外表面で 0.517 ± 0.005 g/kg および中

心部で 0.517 ± 0.002 g/kg であり、浸漬液のソルビン酸濃度 0.52 g/kg(理論値)とほぼ同濃度であり、いずれの部位にも均等にソルビン酸溶液が浸透したと考えられた(表 5)。

また、試料を取り出した後の浸漬液についてもソルビン酸濃度を測定したところ、 0.530 ± 0.004 g/kg であった(表 5)。浸漬液中ソルビン酸濃度を他試料と比較すると、やや高い値を示したが、これは、浸漬液のみ水蒸気蒸留による抽出は行わず、水で希釈後測定したことによると考えられる。

また、冷蔵保存 60 日後に、同様にソルビン酸濃度を測定して安定性を検討した結果、いずれの部位においても作製当日に対し 97~100%の安定性を示した。さらに、大根漬試料と同期間、同様に保存した浸漬液および保存中に大根漬試料から滲出した液(以下、滲出液)についても、ソルビン酸濃度を測定した結果、両液とも添加濃度に近接した値であった。このことから、作製 60 日後においても、試料基材中のソルビン酸濃度は、いずれの部位においても安定しており、また、滲出液ともほとんど差が認められないことから、実際の試験検査時には、全部位を細切・均質化して用いるため、滲出液があった場合でも、濃度が変わることなく十分に定量試験として適用できることが示唆された(表 6 および図 4)。

2)-2 シロップ

市販のシロップを基材とし、シロップ含有量を 50%とし、保存料であるソルビン酸およびソルビン酸カリウムを添加して試料を作製し、安定性の検討を行った。

その結果、作製後、冷蔵保存約 30 日後でソルビン酸添加試料の安定性は 90%、約 60 日後で 77%と低下する傾向があった。一方、ソルビン酸カリウム添加試料では、約 30 日後で 99%、約 60 日後で 98%と、良好な安定性を

確保することができた。ソルビン酸を添加した試料の安定性が、ソルビン酸カリウムを添加した試料と比較して著しく低下したことから、水溶液試料の場合、ソルビン酸よりソルビン酸カリウムを用いる方が、より安定した試料を作製できることが示唆された(図 5)。

また、添加試薬にソルビン酸カリウムを用いて、シロップ含有量およびソルビン酸としての濃度を変えて試料を作製し、それらのソルビン酸濃度の安定性を検討したところ、作製後、冷蔵保存 47 日後において、いずれのシロップ含有量(10、30 および 50%)およびシロップ含有量 50%におけるソルビン酸濃度(0.40、0.60、0.75 および 0.95 g/kg)でも、102~103%の良好な安定性が得られた。このことから、使用基準の 1.0 g/kg に近い、高い濃度で作製しても、シロップ含有量 10~50%の範囲においては、ソルビン酸の定量試験に適用できることが示唆された(表 7)。

3. 残留農薬

これまで調査試料に用いてきた野菜ペーストに加えて、新たな基材として、マッシュポテトの適用性を検討した。乾燥材料に水を添加して作製し冷凍するため、解凍時、離水する現象があり、均質な試料が得られなかったことから、離水防止の目的で、試料の安定剤となる添加物の検討を行った。

安定剤には、ペクチンおよびパールアガーを用いた。それぞれの添加剤につき、2 濃度の添加量で試料作製をしたところ、解凍後の状態は、いずれの添加剤および濃度でも、水分と基材が分離することなく、目視では、ほぼ均質な解凍試料が得られた。そこで、それぞれの添加剤につき、添加剤濃度の高い試料について、添加農薬の回収率および均一性(n=5)を検討した。

その結果、クロルピリホス、フェニトロチオン、マラチオン、ダイアジノンおよびエトプロホ

スの 0.1 µg/g、ならびにブタミホス、ジメトエートおよびフェンスルホチオン 0.2 µg/g の添加濃度に対しペクチンおよびパールアガーのいずれでも、フェンスルホチオンの 140%を超える回収率を除いては、83~105%の良好な結果であった。しかしながら、RSD(%)は、4~12%と、農薬により差がみられ、添加した安定剤の違いは、ほとんどみられなかった(表 8)。クロマトグラムについては、ブランク試料に、添加農薬の測定を妨害するピークは認められなかった。

今後は実試料作製の方法を確立し、引き続き、複数回の凍結融解の安定性、冷蔵保存での安定性を確認する必要があると考える。

E. 結論

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同等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、実分析をふまえた調査試料の作製を検討し、以下の結論を得た。

1. 残留動物用医薬品

新たな基材として作製検討をした牛肉試料は、これまでの鶏肉および豚肉と比較してブランク試料由来の夾雑ピークが多く、また添加したサルファ剤全体として回収率が低かった。しかしながら、ヒレ肉においては添加したすべてのサルファ剤について良好な均一性が得られ、調査試料としての適用の可能性があると考えられた。またカタ肉についても、残留基準のある SDD の回収率および均一性ともに良好であることから、今後、この 2 部位について調査試料とするための更なる保存安定性の検討を要すると考える。

2. 食品添加物

1) 着色料

新基材であるゼラチンを用いたゼリー菓子は、4 種の色調の異なる試料を作製した。その結果、固体試料として、本基材は適用できることが示唆された。今後、調査試料としての必要量(約 50~80 kg)を作製する場合の操作などを考慮した、実試料作製へ向けての作製方法の検討は必要である。

2) 保存料(ソルビン酸)

2)-1 漬物

定量試験としては、新たに固体試料である大根漬けを基材としてソルビン酸添加試料作製を試みた。その結果、大根の部位によるソルビン酸濃度の違いはほとんどなく、良好な安定性が得られたことから、本基材はソルビン酸の定量試験用調査試料に適用できる可能性が示唆された。

2)-2 シロップ

シロップを基材として、ソルビン酸の定量試験用調査試料を作製する際、添加標準品としてソルビン酸およびソルビン酸カリウムを用いて作製した場合の安定性を検討した。その結果、シロップのような水溶液の場合は、ソルビン酸を標準品として添加すると、ソルビン酸カリウムと比較して安定性が著しく低下し、調査試料としてはソルビン酸カリウムの方が適していることが示唆された。また、基材成分によりいずれの標準品が適しているか異なる可能性も考えられた。

3. 残留農薬

新たな基材としてマッシュポテトの適用の可能性を検討した結果、離水防止の目的で安定剤を添加することで解凍後の均質性が目視観察で明らかに改善された。安定剤として、ペクチンおよびパールアガーを用い 8 種の農薬を添加して作製した試料の回収率は、1 農薬を除いて良好な結果であった。今後は実試料作製に近い量で農薬を添加・混

合し、均一性を確認し、さらに複数回の凍結融解後の均一性および安定性を検討する必要があると考えた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

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

表1 牛肉試料の均一性試験結果

添加薬剤:サルファ剤10種 各 0.2 µg/g いずれも固相抽出カラム処理は行っていない。

サルファ剤		ヒレ肉				カタ肉				バラ肉			
		平均値 (µg/g)	回収率 (%)	RSD (%)	F値	平均値 (µg/g)	回収率 (%)	RSD (%)	F値	平均値 (µg/g)	回収率 (%)	RSD (%)	F値
スルファジアジン	SDZ	0.159**	79.5	2.41	1.16	0.113**	56.5	3.52	14.08*	0.149**	74.5	2.97	4.73*
スルファメラジン	SMR	0.152**	76.0	3.43	2.47	0.174**	87.0	2.40	4.19*	0.173**	86.5	2.31	1.01
スルファジミジン	SDD	0.155	77.5	1.66	0.91	0.163	81.5	1.37	1.85	0.159	79.5	2.77	6.70*
スルファメトキシピリダジン	SMPD	0.156	78.0	1.83	1.31	0.168	84.0	1.43	1.52	0.152**	76.0	2.74	6.42*
スルファモノトキシシン	SMMX	0.146**	73.0	1.84	0.65	0.157**	78.5	2.07	1.56	0.154**	77.0	2.90	2.78
スルファクロロピリダジン	SCPD	0.141**	70.5	2.12	1.79	0.144**	72.0	2.31	2.48	0.140**	70.0	3.10	4.96*
スルフイソキサゾール	SIX	0.141	70.5	1.56	0.41	0.149	74.5	2.52	3.21*	0.138	69.0	3.20	3.85*
スルファメトキサゾール	SMX	0.153**	76.5	3.10	1.46	0.154**	77.0	2.82	2.11	0.165	82.5	2.74	2.75
スルファジメトキシシン	SDMX	0.153	76.5	3.21	0.91	0.160	80.0	3.12	2.39	0.154	77.0	4.22	2.42
スルファキノキサリン	SQ	0.140	70.0	3.50	0.82	0.142	71.0	3.91	3.85*	0.135	67.5	7.18	5.74*

平均値およびRSDは、容器間(n=10)で算出した。

得られたF値が有意水準5%でのF境界値(3.02)より小さい場合、試料は均一であるとした(均一と見なされないものに*を付した)。

**HPLC測定におけるピークがバックグラウンドと重なったため、ブランク試料のバックグラウンドピークを差し引いて計算した。

表2 牛肉基材の脂質量

牛肉基材	ヒレ	カタ	バラ
測定値(%)	5.82	11.08	20.33
	5.62	10.87	20.37
	5.72	11.17	20.29
平均値(%)	5.72	11.04	20.33
SD(%)	0.10	0.15	0.04
RSD(%)	1.7	1.4	0.2

表3 牛肉基材の水分量

牛肉基材	ヒレ	カタ	バラ
測定値(%)	69.52	68.74	54.41
	69.56	68.34	55.24
	69.60	70.67	55.79
平均値(%)	69.56	69.25	55.15
SD(%)	0.04	1.25	0.69
RSD(%)	0.1	1.8	1.3

表 4 牛肉試料の安定性試験結果

添加薬剤: サルファ剤10種 各 0.2 μg/g

いずれも固相抽出カラム処理は行っていない。

サルファ剤	ヒレ肉					カタ肉					バラ肉				
	平均値 (μg/g)	回収率 (%)	RSD (%)	F値	安定性 (%)	平均値 (μg/g)	回収率 (%)	RSD (%)	F値	安定性 (%)	平均値 (μg/g)	回収率 (%)	RSD (%)	F値	安定性 (%)
スルファジアジン SDZ	0.147**	73.5	2.96	1.40	92.4	0.153**	76.5	1.90	1.45	135.7	0.157**	78.5	4.78	1.61	105.4
スルファメラジン SMR	0.150	75.0	3.77	1.59	98.6	0.161	80.5	4.32	5.93*	92.6	0.151	75.5	4.66	1.27	87.1
スルファジミジン SDD	0.137	68.5	3.48	1.74	88.5	0.153	76.5	2.44	3.59*	93.9	0.145	72.5	3.65	0.80	91.2
スルファメキシピリダジン SMPD	0.137	68.5	3.50	1.52	88.0	0.152	76.0	2.13	2.75	90.5	0.148	74.0	4.41	1.20	97.2
スルファモノメキシシン SMMX	0.135**	67.5	3.41	1.09	92.7	0.149**	74.5	2.22	1.71	94.6	0.152**	76.0	3.66	0.94	98.8
スルファクロルピリダジン SCPD	0.124**	62.0	3.73	1.64	88.2	0.139**	69.5	2.27	2.04	96.6	0.130**	65.0	4.83	1.02	92.9
スルフィンキサゾール SIX	0.112	56.0	4.28	1.89	79.1	0.127	63.5	2.26	0.72	85.4	0.124	62.0	5.02	1.24	90.0
スルファメキサゾール SMX	0.143	71.5	3.68	1.35	93.4	0.148	74.0	2.50	2.15	96.3	0.153	76.5	3.56	0.94	92.9
スルファジメキシシン SDMX	0.133	66.5	5.98	2.04	87.0	0.143	71.5	4.48	1.64	89.1	0.141	70.5	6.36	1.17	91.6
スルファキノキサリン SQ	0.132	66.0	5.34	2.10	94.6	0.125	62.5	5.46	1.72	88.1	0.129	64.5	4.41	0.38	95.7

平均値およびRSDは、容器間(n=10)で算出した。

得られたF値が有意水準5%でのF境界値(3.02)より小さい場合、試料は均一であるとした(均一と見なされないものに*を付した)。

**HPLC測定におけるピークがバックグラウンドと重なったため、ブランク試料のバックグラウンドピークを差し引いて計算した。

表5 大根漬け部位別ソルビン酸濃度の測定(作製 0日後)

大根漬け部位	外皮	外皮を除く 外表面	中心部	浸漬液*
ソルビン酸濃度	0.520	0.510	0.517	0.533
(g/kg)	0.522	0.512	0.519	0.532
	0.534	0.520	0.517	0.533
	0.523	0.522	0.515	0.527
	0.527	0.520	0.519	0.524
平均値(%)	0.525	0.517	0.517	0.530
SD(%)	0.006	0.005	0.002	0.004
RSD(%)	1.1	1.0	0.4	0.8
回収率(%)**	103	101	101	104

*水蒸気蒸留は行わず、水で希釈後測定した。

**添加量:ソルビン酸として0.52 g/kg

表6 大根漬け部位別ソルビン濃度の安定性(60日後、冷蔵保存)

大根漬け部位	外皮		外皮を除く外表面		中心部		浸漬液*		滲出液*
	ソルビン酸 濃度(g/kg)	安定性(%)	ソルビン酸 濃度(g/kg)	安定性(%)	ソルビン酸 濃度(g/kg)	安定性(%)	ソルビン酸 濃度(g/kg)	安定性(%)	ソルビン酸 濃度(g/kg)
測定結果	0.510	97.1	0.510	98.7	0.512	99.0	0.531	100.2	0.524
	0.511	97.3	0.513	99.2	0.506	97.8	0.516	97.4	0.526
	0.502	95.6	0.523	101.2	0.515	99.5	0.520	98.1	0.525
	0.506	96.3	0.519	100.4	0.506	97.8	0.526	99.2	0.524
	0.517	98.4	0.516	99.8	0.516	99.7	0.521	98.3	0.524
平均値(%)	0.509	96.9	0.516	99.9	0.511	98.8	0.523	98.6	0.525
SD(%)	0.006	1.1	0.005	1.0	0.005	0.9	0.006	1.1	0.001
RSD(%)	1.2	1.1	1.0	1.0	1.0	0.9	1.1	1.1	0.2

*水蒸気蒸留は行わず、希釈後測定

表7 シロップ含量及びソルビン酸濃度の違いによる安定性

シロップ含有量(%)	ソルビン酸濃度(g/kg)	安定性(%)		回収率(%)
		平均値*	RSD(%)	
50	0.40	100.1	0.6	103.4
	0.60	99.5	0.7	102.4
	0.75	99.6	0.2	102.4
	0.95	98.3	0.3	101.8
30	0.95	98.4	0.3	102.1
10	0.95	98.4	0.4	102.0

*平均値はn=5で測定した結果から算出した。

$$\text{安定性(}\%) = \frac{\text{作製47日後のソルビン酸濃度}}{\text{作製当日のソルビン酸濃度}} \times 100$$

表8 マッシュポテト(安定剤添加)への8種農薬添加回収の検討

添加農薬: クロルピリホス、フェニトロチオン、マラチオン、ダイアジノン、エトプロホス 各0.1 µg/g
 ブタミホス、ジメトエート、フェンスルホチオン 各0.2 µg/g

農薬名	ペクチン		パールアガー	
	回収率(%)	RSD(%)	回収率(%)	RSD(%)
クロルピリホス	84.2	7.0	83.0	7.8
フェニトロチオン	105.0	6.2	101.9	10.0
マラチオン	103.3	5.0	99.7	7.6
ダイアジノン	72.3	7.9	77.0	5.9
エトプロホス	84.2	4.4	83.4	4.8
ブタミホス	89.2	6.7	83.5	8.0
ジメトエート	84.5	6.1	84.7	7.6
フェンスルホチオン	142.1	7.7	145.6	11.9

回収率(平均値)及びRSDは、いずれもn=5で測定した結果から算出した。

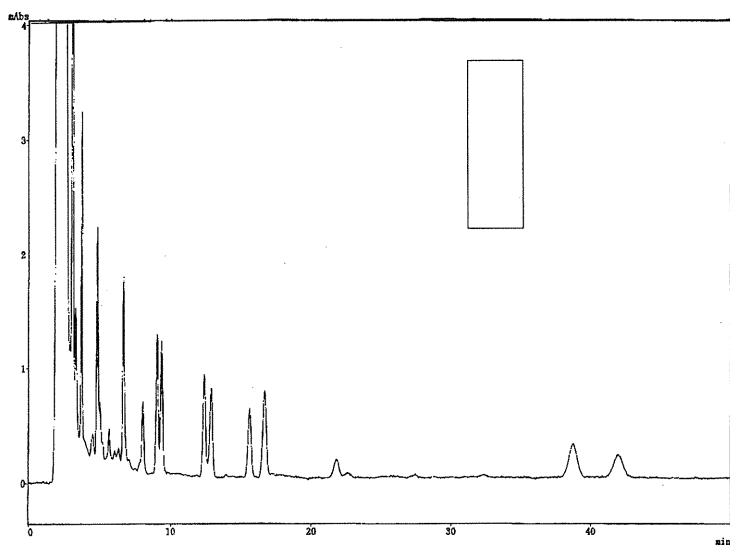
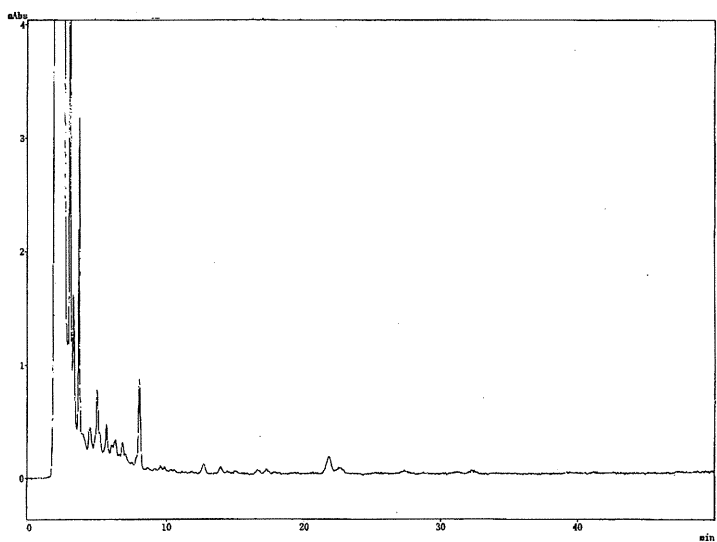
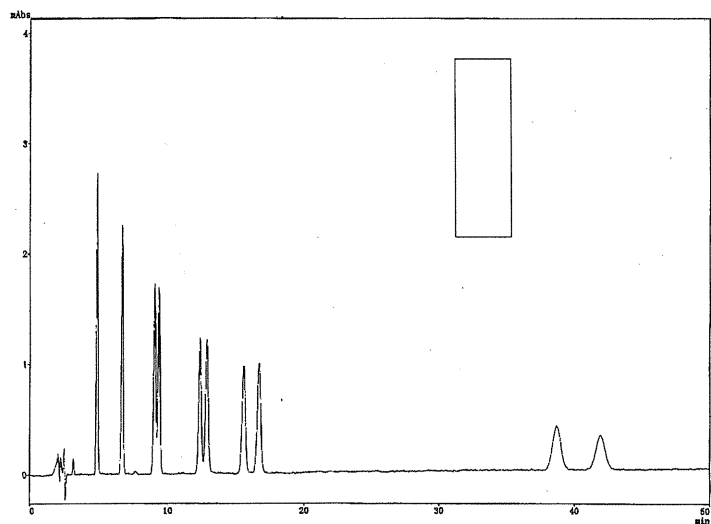


図3 牛肉(ヒレ肉)のサルファ剤添加試料のクロマトグラム(固相抽出カラム処理無し)