

クロマトグラフ質量分析計 (GC/MS)、液体クロマトグラフ質量分析計 (LC/MS) を用いた方法が多用されるようになってきた。質量分析計を検出器として用いた方法は、その選択性の高さから定性方法として汎用されるのみならず、多成分一斉分析等では定量にも欠かせない検出方法となっている。しかしながら、質量分析計は検体由来のマトリックスの影響を受けやすく、測定値の安定性が従来の検出器より劣る欠点がある。質量分析計は測定対象化合物をイオン化して、その質量数に応じて電磁氣的に分別して測定する手法であるが、イオン化の段階で共存するマトリックスにより測定対象化合物のイオン化が増進あるいは抑制される現象が起きる。また、イオン化後の電磁氣的分別の段階においても、共存マトリックスによる飽和、二次衝突等により影響を受けることが知られている。

質量分析計におけるマトリックスの影響を軽減するためには、抽出、精製の段階において測定対象化合物以外のマトリックスを極力排除することが基本であるが、多成分一斉分析において化学的性質の異なる測定対象化合物を他のマトリックスから選択的に分別回収することは困難である。また、適正な安定同位体をサロゲートとして用いる方法は、マトリックス効果の補正のみならず、抽出、精製における回収率の補正にも有効であり、質量分析計を検出器として用いる分析では最良の方法であるが、すべての測定対象化合物に最適な安定同位体が準備されていない。

質量分析計におけるマトリックスの影響を軽減するために、現状で一般的に行われている方法はマトリックス標準による補正

である。検体由来のマトリックスに標準品を加えることにより、マトリックスの影響の度合いを測り、検体中の測定対象化合物の測定値を補正することを目的とする。具体的な手法としては、抽出、精製操作を繰り返してマトリックス溶液を集め、標準溶液をマトリックス溶液で希釈して標準検量線を作成する方法 (マトリックス検量線法)、検体に標準溶液を添加して抽出、精製操作を行う方法 (標準添加法)、抽出、精製操作を行い得られた試験溶液に標準溶液を添加、希釈する方法 (標準希釈法) 等がある。マトリックス検量線法は、一定のマトリックスが安定して得られる試験法に有効な手法である。標準添加法は、抽出、精製における測定対象化合物の回収率の補正にも有効であるが、抽出、精製操作および測定が 2 回分以上になる。標準希釈法は、抽出、精製操作は簡便であるが、測定は 2 回分以上になる。これらのマトリックス効果補正方法は、経験的に使い分けられており、補正方法の選択の目安は明確にされていない。

本研究では、残留農薬、食品添加物等の各種クロマトグラフ質量分析計を用いた試験検査における各種マトリックス効果補正方法の特性を調査し、補正効果の最適化を図り、検査機関の信頼性確保に寄与する事を目的とした。

B. 研究方法

1. GC/MS によるクロルピリホス、フルトラニル、マラチオンの定量

1-1) 試料

冷凍ほうれんそう (測定対象農薬が残留していないことを確認して用いた。)

1-2) 試薬

- ・クロルピリホス (98.5%、Dr. Ehrenstorfer 製)
- ・フルトラニル (99.5%、Dr. Ehrenstorfer 製)
- ・マラチオン (99.0%、Dr. Ehrenstorfer 製)

1-3) 装置および測定条件

1-3-1) GC/MS による農薬等の一斉試験法 (農産物)、厚生労働省通知法

- ・ガスクロマトグラフ質量分析計
ガスクロマトグラフ：GC-2010 (島津製作所製)
質量分析計：GCMS-QP2010Plus (島津製作所製)
- ・カラム：DB-5MS, 0.25 mm φ × 30 m, 膜厚 0.25 μm (Agilent J&W 製)
- ・カラム温度：50°C (1分) -25°C/分-125°C (0分) -10°C/分-300°C (10分)
- ・注入口温度：250°C
- ・注入方式：スプリットレス
- ・キャリアーガス：ヘリウム
- ・インターフェース温度：300°C
- ・イオン化モード：EI
- ・測定モード：SIM
- ・測定イオン (m/z, 定量イオン, {確認イオン}) :
クロルピリホス ; 314, {197}
フルトラニル ; 281, {145, 173}
マラチオン ; 173, {125}

1-3-2) クロルピリホス個別試験法

- ・炎光光度検出器付きガスクロマトグラフ：GC-2010 (島津製作所製)
- ・カラム：DB-5, 0.53 mm φ × 10 m, 膜厚 1.5 μm (Agilent J&W 製)
- ・カラム温度：80°C (1分) -8°C/分-125°C (5分)

- ・注入口温度 : 230°C
- ・検出器温度 : 280°C
- ・キャリアーガス : ヘリウム

1-4) 試験法

1-4-1) GC/MS による農薬等の一斉試験法 (農産物)、厚生労働省通知法

試料 20.0 g を量り採り、これにアセトニトリル 50 mL を加え、ホモジナイズした後、吸引ろ過した。ろ紙上の残留物にアセトニトリル 20 mL を加え、ホモジナイズした後、吸引ろ過した。得られたろ液を合わせ、アセトニトリルを加えて正確に 100 mL とした。得られた抽出液 20 mL を採り、塩化ナトリウム 10 g および 0.5 mol/L リン酸緩衝液 (pH7.0) 20 mL を加え、振とうした。静置した後、分離した水層を捨てた。アセトニトリル層に無水硫酸ナトリウムを加えて脱水し、無水硫酸ナトリウムをろ別した後、ろ液を 40°C 以下で濃縮し、溶媒を除去した。残留物にアセトニトリルおよびトルエン (3 : 1) 混液 2 mL を加えて溶かした。

グラファイトカーボン/アミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム (500 mg/500 mg) に、アセトニトリルおよびトルエン (3 : 1) 混液 10 mL を注入し、流出液は捨てた。このカラムに上述操作で得られた溶液を注入した後、アセトニトリルおよびトルエン (3 : 1) 混液 20 mL を注入し、全溶出液を 40°C 以下で 1 mL 以下に濃縮した。これにアセトン 10 mL を加えて 40°C 以下で 1 mL 以下に濃縮し、再度アセトン 5 mL を加えて濃縮し、溶媒を除去した。残留物をアセトンおよび n-ヘキサン (1 : 1) 混液に溶かして、正確に 1 mL としたものを試験溶液

とした。

操作の概略をフローチャート 1 に示した。

1-4-2) クロルピリホス個別試験法 (EPN、アニコホス、イサゾホス、イプロベンホス、エチオン、エディフェンホス、エトプロホス、エトリムホス、カズサホス、キナルホス、クロルピリホス、クロルピリホスメチル、クロルフェンビンホス、シアノホス、ジスルホトン、ジメチルビンホス、ジメトエート、スルプロホス、ダイアジノン、チオメトン、テトラクロルビンホス、テルブホス、トリアゾホス、トリブホス、トルクロホスメチル、パラチオン、パラチオンメチル、ピペロホス、ピラクロホス、ピラゾホス、ピリダフェンチオン、ピリミホスメチル、フェナミホス、フェニトロチオン、フェンスルホチオン、フェンチオン、フェントエート、ブタミホス、プロチオホス、プロパホス、プロフェノホス、プロモホス、ベンスリド、ホキシム、ホサロン、ホスチアゼート、ホスファミドン、ホスメット、ホレート、マラチオン、メカルバム、メタクリホス、メチダチオンおよびメビンホス試験法 (農産物) 厚生労働省通知法)

試料 20.0 g を量り採り、これにアセトン 100 mL を加え、3 分間細砕した後、ケイソウ土を 1 cm の厚さに敷いたろ紙を用いてすり合わせ減圧濃縮器中に吸引ろ過した。ろ紙上の残留物を採り、アセトン 50 mL を加え、3 分間細砕した後、上記と同様に操作して、ろ液をその減圧濃縮器中に合わせ、40°C 以下でアセトンを除去した。

これをあらかじめ飽和塩化ナトリウム

溶液 100 mL を入れた 300 mL の分液漏斗に移した。酢酸エチルおよび n-ヘキサン

(1 : 4) 混液 100 mL を用いて上記の減圧濃縮器のナス型フラスコを洗い、洗液を上記の分液漏斗に合わせた。振とう機を用いて 5 分間激しく振り混ぜた後、静置し、酢酸エチルおよび n-ヘキサンの層を 300 mL の三角フラスコに移した。水層に酢酸エチルおよび n-ヘキサン (1 : 4) 混液 50 mL を加え、上記と同様に操作して、酢酸エチルおよび n-ヘキサンの層を上記の三角フラスコに合わせた。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 分間放置した後、すり合わせ減圧濃縮器中にろ過した。次いで n-ヘキサン 20 mL を用いて三角フラスコを洗い、その洗液でろ紙上の残留物を洗う操作を 2 回繰り返した。両洗液をその減圧濃縮器中に合わせ、40°C 以下で酢酸エチルおよび n-ヘキサンを除去した。この残留物にアセトンおよび n-ヘキサン (1 : 1) 混液 5 mL を加えて溶かした。

内径 15 mm、長さ 300 mm のクロマトグラフ管にカラムクロマトグラフィー用シリカゲル (粒径 63~200 μm) 5 g をアセトンおよび n-ヘキサン (1 : 1) 混液に懸濁させたもの、次いでその上に無水硫酸ナトリウム約 5 g を入れ、カラムの上端に少量のアセトンおよび n-ヘキサン (1 : 1) 混液が残る程度までアセトンおよび n-ヘキサン (1 : 1) 混液を流出させた。このカラムに上述操作で得られた溶液を注入した後、アセトンおよび n-ヘキサン (1 : 1) 混液 100 mL を注入し、流出液をすり合わせ減圧濃縮器中に採り、40°C 以下でアセトンおよび n-

ヘキサンを除去した。この残留物にアセトンを加えて溶かし、正確に 5 mL として、これを試験溶液とした。

操作の概略をフローチャート 2 に示した。

2. LC/MS によるサイクラミン酸の定量

2-1) 試料

粉末食品 (サイクラミン酸が残留していないことを確認して用いた。)

2-2) 試薬

- ・サイクラミン酸 (98.0%以上、和光純薬製)

2-3) 装置および測定条件

2-3-1) LC/MS によるサイクラミン酸の定量、第 2 版食品中の食品添加物分析法 2000 変法

- ・液体クロマトグラフ質量分析計

液体クロマトグラフ : 1200 Infinity Series (Agilent 製)

質量分析計 : 6460 Triple Quad LC/MS (Agilent 製)

- ・カラム : L-column ODS, 2.1 mm ϕ \times 25 cm, 粒径 5 μ m (CERI 製)
- ・カラム温度 : 40°C
- ・移動相 : 0.1%ギ酸-メタノール (7:3), 0.2 mL/min
- ・イオン化モード : ESI (-)
- ・測定モード : MRM
- ・測定イオン (m/z) : 178.1 \rightarrow 79.8

2-3-2) HPLC-UV によるサイクラミン酸の定量、第 2 版食品中の食品添加物分析法 2000

- ・液体クロマトグラフ : LC-20A Series (島津製作所製)

- ・カラム : L-column ODS, 4.6 mm ϕ \times 25 cm,

粒径 5 μ m (CERI 製)

- ・カラム温度 : 40°C
- ・移動相 : アセトニトリル-水 (7:3), 1.0 mL/min
- ・測定波長 : 314 nm

2-4) 試験法

2-4-1) LC/MS によるサイクラミン酸の定量、第 2 版食品中の食品添加物分析法 2000 変法

試料 10.0 g を量り採り、これに蒸留水 30~40 mL を加えて沸騰水浴上で 15 分間加熱した。冷却後、蒸留水を加えて正確に 100 mL とした。遠心分離 (3000rpm 5 分間) 後、上澄液を試験溶液とした。

操作の概略をフローチャート 3 に示した。

2-4-2) HPLC-UV によるサイクラミン酸の定量、第 2 版食品中の食品添加物分析法 2000

試料 10.0 g を量り採り、これに蒸留水 30~40 mL を加えて沸騰水浴上で 15 分間加熱した。冷却後、蒸留水を加えて正確に 100 mL とした。遠心分離 (3000rpm 5 分間) した。

あらかじめメタノール 10 mL および蒸留水 10 mL を通過させコンディショニングした Sep-Pack plus C18 Environment 900 mg カートリッジと Bond Elut Jr SAX 500 mg カートリッジの順番に接続したものに上述操作で得られた抽出液を負荷した。流下後、蒸留水 10 mL で洗浄した。Sep-Pack plus C18 Environment 900 mg カートリッジを取り外した後、Bond Elut Jr SAX 500 mg カートリッジに塩酸 (1 \rightarrow 100) 10 mL を負荷した。

上述操作で得られた溶出液に硫酸溶液

2 mL および正確に n-ヘキサン 5 mL を加えた後、次亜塩素酸ナトリウム試液（有効塩素 2.5%以上）1 mL を加えて 1 分間激しく振とうした。水層（下層）を除去後、ヘキサン層（上層）に 5%炭酸水素ナトリウム溶液 25 mL を加えて 1 分間振とうした。下層を除去した後上層を分取し試験溶液とした。

操作の概略をフローチャート 4 に示した。

C. D. 研究結果・考察

1. GC/MS によるクロルピリホス、フルトラニル、マラチオンの定量

GC/MS による定量の例として GC/MS による農薬等の一斉試験法（農産物）によるほうれんそう中のクロルピリホス、フルトラニル、マラチオンを絶対検量線法およびマトリックス検量線法により定量した際の結果を表 1 に示した。測定対象農薬を含まないことを確認したほうれんそうに対して、各農薬それぞれを 0.02 ppm 相当添加回収した結果である。マトリックス検量線法のマトリックス標準溶液は、試験溶液と同時に調整したマトリックス試験溶液と標準溶液を 1 : 1 で混合調整した。同じ検査員が異なる日時に実施した 2 回の試行結果を示した。

絶対検量線法による回収率は 119~200% でありマトリックス効果によるレスポンスの増強を受けている事が分かる。各農薬それぞれを 0.02 ppm 相当添加回収した試験溶液のクロマトグラム（図 1）上では妨害ピークは認められないので、いわゆるマトリックス効果による影響であると考えられる。一方、マトリックス検量線法による回収率

は 78~106% であり、レスポンスの増強は相殺されているが、試行 2 において回収率がいずれも 80% 以下になっている。マトリックス検量線法は検量線作成用標準溶液と、試験溶液のマトリックスの種類、濃度を等しくする事により、マトリックス効果の度合いを等しくして、定量精度を高める方法であるが、試験法の頑健性の程度により、同一試料から同時並行で抽出精製してもマトリックスに差が出る可能性を示している。

また、質量分析計以外の検出器を用いた例として炎光光度検出器付きガスクロマトグラフィー（GC-FPD）によるクロルピリホスの添加回収試験の結果を表 2 に示した。GC/MS と同様に 0.02 ppm 相当添加回収した結果で、異なる検査員が異なる日時に実施した結果をまとめたものである。回収率は 94~105% の範囲内、RSD は 3.28% であり、回収率、再現性ともに良好な結果であった。クロルピリホスを 0.02 ppm 相当添加回収した試験溶液のクロマトグラム（図 2）は GC/MS と比較して、夾雑ピークおよびベースラインの変動が目立つが、いずれもクロルピリホスの定量を妨害しない。

2. LC/MS によるサイクラミン酸の定量

サイクラミン酸は塩素処理誘導体化して HPLC-UV にて定量する方法が第 2 版食品中の食品添加物分析法 2000 に記載されているが、乾燥粉末食品等の一部では添加回収率が 0~30% 程度に低下する場合がある。このような場合には HPLC-UV に代わり LC/MS により定量することがあるが、マトリックス効果が現れやすい。

今回検討した結果は表 3 に示したとおり、絶対検量線法によっても 80~90% の回収率

が得られたが、標準溶液添加法により回収率、再現性ともに向上した。図3は、試料No. 3の20 ppm標準添加試験溶液に20 ppm相当の標準溶液を1:1で混合した溶液のクロマトグラムで、妨害ピークは認められない。

今回実施した標準溶液添加法を概念を図4に示した。サイクラミン酸を20 ppm相当含む試験溶液に対して、0、20、40 ppm相当の標準溶液を1:1で混合した時、それぞれのレスポンスは $(20+0)/2=10$ 、 $(20+20)/2=20$ 、 $(20+40)/2=30$ ppm相当であることが期待されるので、回帰分析結果から $y=0$ に外挿することにより試験溶液中の濃度を求められる。

マトリックス検量線法では先に述べたとおり、試験溶液と検量線作成用標準溶液のマトリックスはそれぞれ別に作成するため、試験法の頑健性の程度により、同一試料から同時並行で抽出精製してもマトリックスに差が出る可能性があるが、標準溶液添加法では試験溶液が均一である限りマトリックスに差が出る事はない。また、マトリックス検量線用のマトリックスを別途調製する必要がない。標準溶液添加法では、試料数の増加に伴いクロマトグラフィーの測定回数が増加するが、人手を省ける上に、より正確な結果が得られる点で、標準溶液添加法はマトリックス検量線法より優れている。

E. 結論

1. GC/MSによるクロルピリホス等の定量においては、GC-FPDによるクロルピリホス個別試験法と比べて定量精度、再現性ともに劣っていた。GC/MSにおいては、絶対検

量線法による回収率が119~200%であったが、マトリックス検量線法による回収率は78~106%であり、厚生労働省が示している精度管理ガイドライン(平成9年4月1日)、試験法妥当性評価ガイドライン(平成22年12月24日)に規定されている真度70~120%の範囲内であった。

2. LC/MSによるサイクラミン酸の定量食品衛生法においては、標準溶液添加法により簡便かつ高精度に定量を行う事ができた。標準溶液添加法は人手を省ける上に、より正確な結果が得られる点で、マトリックス検量線法より優れていた。

F. 健康危機情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表等
なし

2. 学会発表等

1) 村山三徳: 食品中の放射性物質の新基準と対応について, 第7回食品品質管理セミナー(2012.5.15)

2) 村山三徳: 食品中の放射性セシウム検査の実際と問題点, サイエンスフォーラムセミナー(2012.5.29)

3) 村山三徳: 放射性セシウム新基準に伴う食品等の検査の実際と課題, 工業技術会講習会(2012.7.25)

4) 村山三徳: 食品中の放射性物質はどうなったか~2011年3月11日から現在、そしてこれから~, 第9回食品衛生講演会(2012.10.1)

5) 村山三徳: 食品中の残留農薬等試験検査におけるマトリックスの影響評価に関する研究, アジレント・テクノロジー ユーザ

ーミーティング (2013. 2. 19)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得 なし

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

試料：野菜類 20.0 g

↓ ホモジナイズ：アセトニトリル 50 mL, 吸引ろ過
ろ紙上残留物

↓ ホモジナイズ：アセトニトリル 20 mL, 吸引ろ過
ろ液を合わせアセトニトリルを加えて 100 mL

↓
抽出液 20 mL

↓ 塩析：塩化ナトリウム 10 g, 0.5 M リン酸緩衝液 (pH7.0) 20 mL
アセトニトリル層

↓ 脱水：無水硫酸ナトリウム, 溶媒留去
アセトニトリル-トルエン (3:1) 2 mL

↓
グラファイトカーボン/アミノプロピルシリカ積層ミニカラム

↓ アセトニトリル-トルエン (3:1) 20 mL 溶出, 溶媒留去
試験溶液：アセトン-ヘキサン (1:1) 1 mL

↓
GC/MS

フローチャート 1 GC/MS による農薬等の一斉試験法 (農産物)

試料：野菜類 20.0 g

↓ アセトン 100, 50 mL

↓ ホモジナイズ

↓ 吸引ろ過

↓ アセトン留去

↓ 飽和塩化ナトリウム 100 mL

↓ 酢酸エチル-ヘキサン (1:4) 100, 50 mL

酢酸エチル・ヘキサン層

↓ 脱水：無水硫酸ナトリウム，溶媒留去

↓ アセトン-ヘキサン (1:1) 5 mL

シリカゲルカラム

↓ アセトン-ヘキサン (1:1) 100 mL 溶出

↓ 溶媒留去

↓ アセトン 5 mL

試験溶液

↓

GC-FPD

フローチャート2 クロルピリホス個別試験法

試料 10 g

↓ 水 100 mL

↓ 遠心分離

水層

↓

LC/MS

フローチャート 3 LC/MS によるサイクラミン酸の定量

試料 10 g

↓ 水 100 mL

↓ 遠心分離

水層 10 mL

↓

C18+SAX ミニカラム

↓ 水 10 mL 洗浄

SAX ミニカラム

↓ 希塩酸 10 mL 溶出

溶出液

↓ ヘキサン 5 mL

↓ 2.5% C12 溶液 1 mL

↓ 振とう

ヘキサン層

↓ 5% NaHCO₃ 溶液 25 mL

↓ 振とう

ヘキサン層

↓

試験溶液

↓

HPLC-UV (314 nm)

フローチャート 4 HPLC-UV によるサイクラミン酸の定量

表 1 GC/MS による農薬等の一斉試験法による添加回収率

定量法 試行 No.	添加回収率 (%、添加量各 0.02 ppm 相当)			
	絶対検量線法		マトリックス検量線法	
	1	2	1	2
クロルピリホス	119.1	177.6	101.2	78.4
フルトラニル	134.2	200.2	106.2	78.1
マラチオン	126.0	181.8	95.6	79.0

表 2 個別試験法 (GC-FPD) によるクロルピリホスの添加回収率

試料 No.	添加回収率 (%、 添加量各 0.02 ppm 相当)
1	104.5
2	102.3
3	96.4
4	99.1
5	94.3
6	102.2
7	97.0
8	102.9
9	98.9
10	98.6
平均	99.6
RSD (%)	3.28%

表 3 LC/MS によるサイクラミン酸の添加回収率

試料 No.	添加回収率 (%、添加量各 20 ppm 相当)				RSD (%)
	1	2	3	平均	
絶対検量線法	82.3	84.3	91.1	85.9	5.37
標準溶液添加法	102.3	101.0	97.6	100.3	2.42

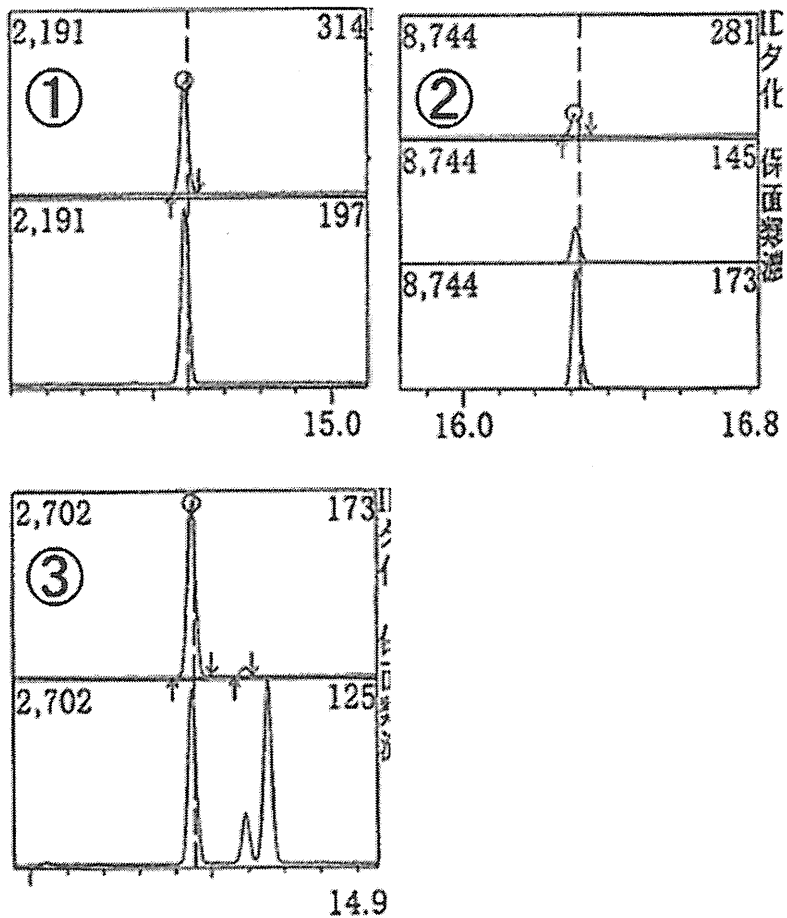


図1 GC/MSによる農薬等の一斉試験法によるクロマトグラム
 ①クロルピリホス、②フルトラニル、③マラチオン

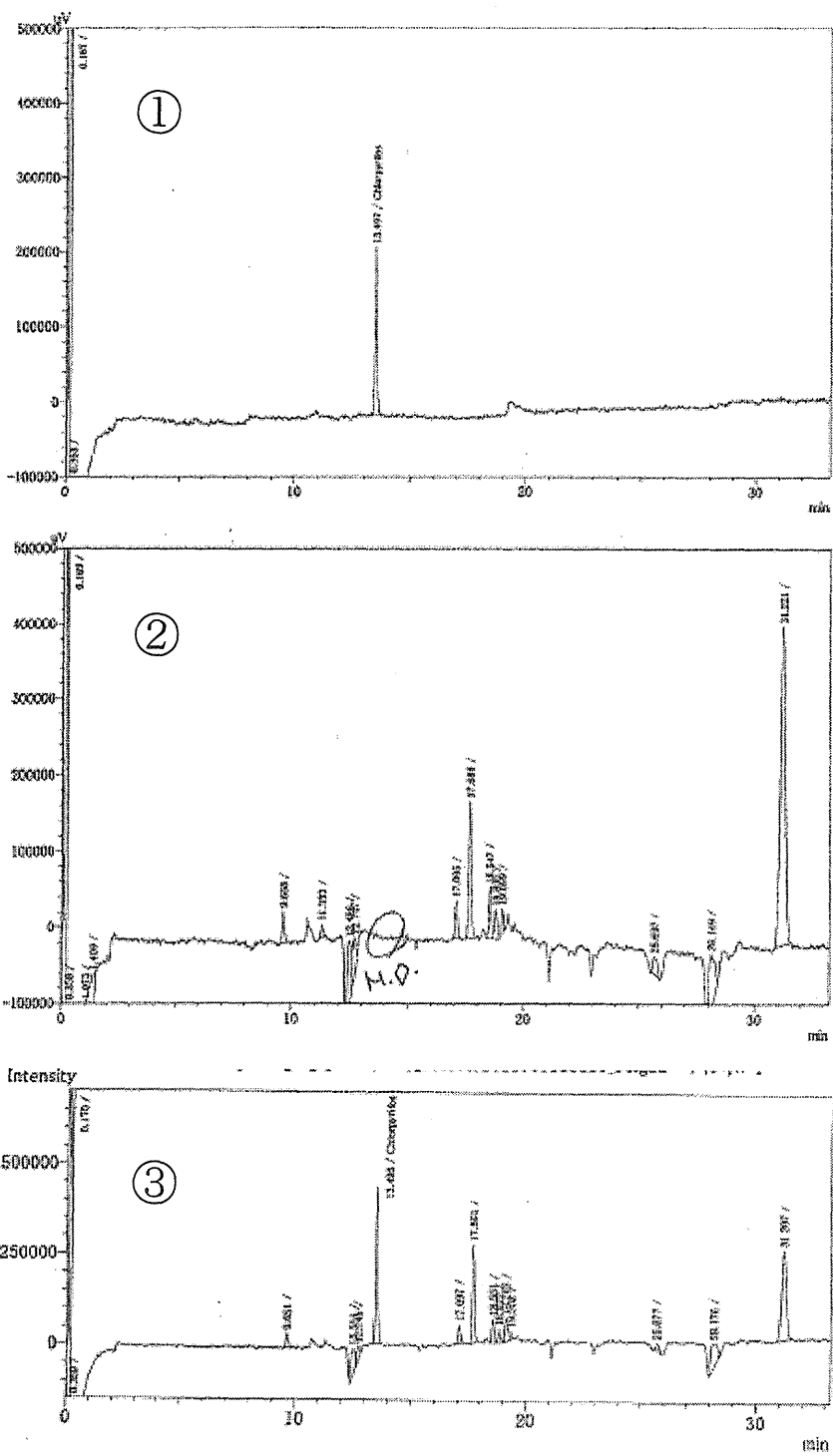
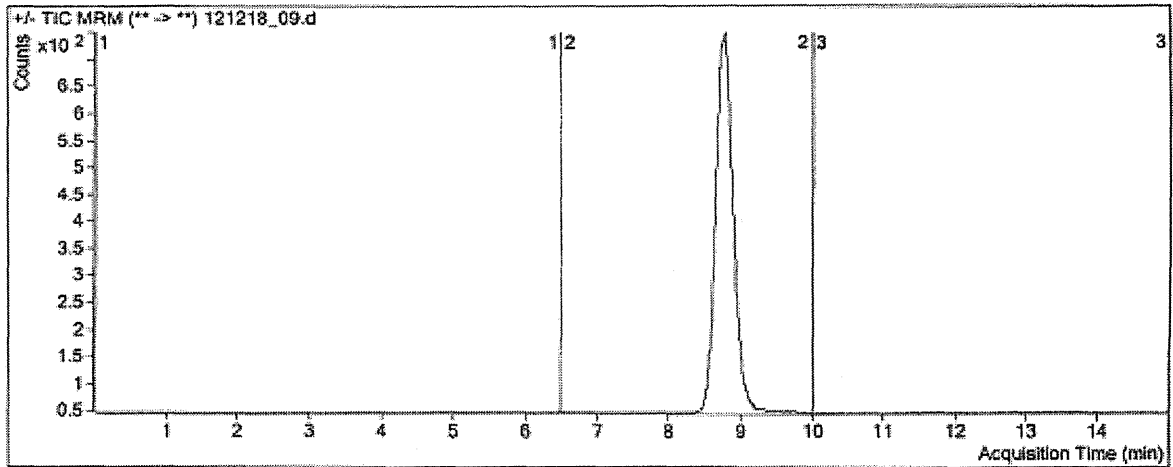


図2 個別試験法によるクロルピリホスのクロマトグラム
 ①標準溶液、②無添加試験溶液、③標準添加試験溶液

サンプルのクロマトグラム



定量結果

化合物	RT	レスポンス	濃度
Cycla	8.787	11871	273.3023

化合物のグラフィック

Target Compound Cycla

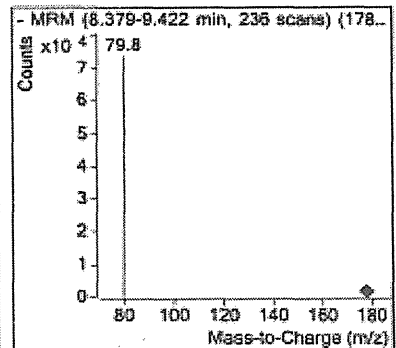
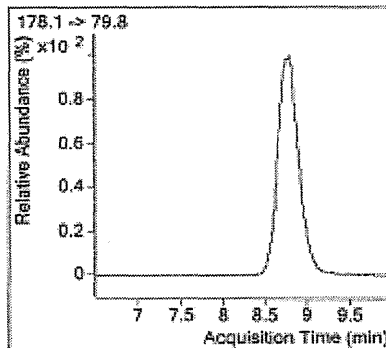
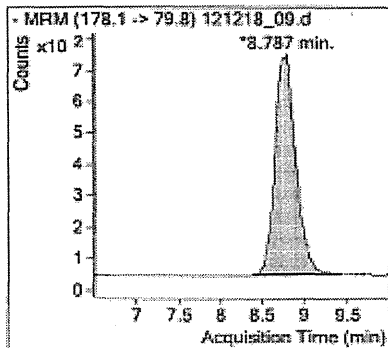


図3 LC/MSによるサイクラミン酸のクロマトグラム

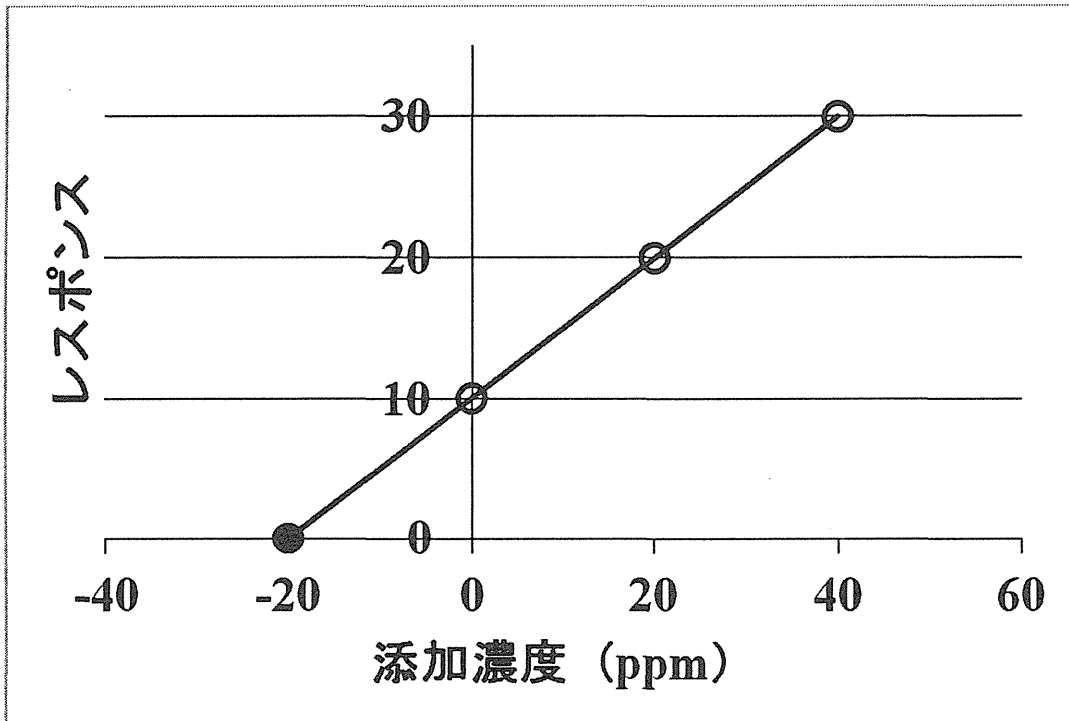


図4 標準希釈法の概念図

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)

検査機関の信頼性確保に関する研究

平成 24 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 渡辺 卓穂

検査機関の信頼性確保に関する研究

分担研究報告書

食品衛生外部精度管理調査用適性試料の作製検討と
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	渡辺 卓穂	(財) 食品薬品安全センター秦野研究所 部長
協力研究者	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	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、残留農薬検査および重金属検査に関する調査試料の作製を試みた。

残留動物用医薬品検査については、これまでに鶏肉および豚肉を基材として調査試料の作製検討を行ってきたが、昨年度から新たに牛肉の 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ているところである。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 10 種のサルファ剤全体として回収率が低かったが、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、残留基準のあるスルファミジンの回収率および均一性ともに良好であることから、その 2 部位について調査試料とするための冷蔵保存安定性（ヒレ肉のみ）および凍結融解安定性を検討した。その結果、スルフィソキサゾールにおいて 14 日後には 10%以下にまで減少し、安定性は認められなかったが、その他 9 種のサルファ剤においては 7 日後で約 76~94%、14 日後で約 58~74%の安定性であった。2 種の部位について、凍結融解の安定性を確認したところ、ヒレ肉においては、8 種のサルファ剤については、概ね凍結融解ごとに漸減傾向が認められたが、3 回目までで 85%以上と、良好な安定性であった。なお、一部のサルファ剤について腐敗による夾雑物の影響と考えられる回収率（濃度）の上昇傾向が見られた。また、カタ肉においては、ヒレ肉同様腐敗が原因と考えられる上昇傾向が 4 種のサルファ剤に見られた。他 6 種のサルファ剤では 3 回までで 80%以上の安定性があった。

また、食品添加物検査用調査試料については、昨年度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たところ、いずれの大根部位でも良好な均一性および安定性を確認できた。今年度は、同様に作製した試料の固体部分のみについての長期冷蔵保存安定性（冷蔵保存 3～135 日）を検討した。さらに、作製条件について、基材対浸漬溶液比とソルビン酸濃度の関係を検討した。その結果、大根漬けの固体部分についてのソルビン酸濃度は、作製後冷蔵保存 3～60 日で作製直後の濃度に対し 94%以上の安定性を示した。以後、徐々に濃度は低下したものの、90 日で 91%、135 日で 86%の安定性があった。基材対浸漬溶液比とソルビン酸濃度の関係は、浸漬溶液比率が高いほど大根漬け中ソルビン酸濃度は高くなった。実濃度の理論値との乖離の点では、添加したソルビン酸濃度の理論値と大根漬け中の実濃度との差異は、基材比率が高いほど、高い傾向がわずかに認められた。基材対浸漬溶液比は 1:1 で浸漬する条件が最も理論値に近い濃度となり、添加濃度の理論値を算出する上でも、当該比が適していると考えられた。

残留農薬検査用調査試料については、基材として、新たに玄米の適用性を検討した。農薬添加溶媒に玄米を浸漬後、浸漬溶媒を留去し、得られた玄米を乾燥・粉砕することで作製する方法を検討した。はじめに、適切な浸漬用溶媒を検討するため、ヘキサン、アセトン、20%含水アセトンおよび酢酸エチルを用い、それぞれの農薬添加混合溶液に玄米を浸漬し、上記の方法で作製した試料について添加回収試験を行った。その結果、酢酸エチルを浸漬用溶媒に用いる方法が、回収率、操作性の上でもっとも適していた。そこで、酢酸エチルを浸漬用溶媒に選択し 5 種農薬を添加し、同様にして、農薬添加玄米粉末試料を繰り返し 10 回の操作により作製し、10 バッチ間の均一性を検討した。一元配置の分散分析の結果、いずれの農薬においても得られた F 値は F 境界値より大きく、10 バッチ間の均一性は得られなかった。そこで、重金属検査における試料の作製方法の効率化を目的として、これまで手動で行っていた玄米の混合に機械を用いる方法を検討した。試作条件にて混合後、得られた試料について一元配置の分散分析により均一性を確認したところ、いずれも F 境界値より小さく、良好な均一性が得られた。

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、外部および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。また、重金属検査については、手動による作製方法を機械化する方法への変更を検討した。

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、冷蔵保存および繰り返し凍結融解安定性の観

点から、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、保存料（ソルビン酸）の検査試料に、昨年度新たに大根漬けを基材として用い、試料作製を試みた。今年度はその固体部分のみの長期冷蔵保存安定性の検討を行った。また、作製時の浸漬溶液と基材の混合比について検討した。

残留農薬検査としては、新たに玄米を基材として、試料作製を試みた。農薬添加溶液に玄米を浸漬し、一定時間放置後、減圧濃縮装置にて、浸漬溶液を留去し、得られた玄米を乾燥後、粉碎することで作製する方法を検討した。

重金属検査における試料の作製は、これまで、手動により混合を行ってきた。今年度は、混合工程に機械を用いる方法を検討した。

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、バラおよびカタ肉）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シン（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シン（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㈱）、スルファイソキサゾール

（以下 SIX）（残留農薬試験用、関東化学㈱）

(3) 試薬および材料

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㈱）、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㈱）、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㈱）

2) 食品添加物（保存料：ソルビン酸）

(1) 試料基材（漬物）

大根漬け（紀の郷、㈱古川）

(2) 標準品

ソルビン酸標準品（食品分析用、関東化学㈱）、ソルビン酸カリウム（和光一級、99.7%、和光純薬工業㈱、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㈱）、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㈱）

3) 残留農薬

(1) 試料材料

玄米（銘柄：ひとめぼれ、水稲うるち玄米、宮城県産）

(2) 標準品

クロルピリホス、フェニトロチオン、馬拉チオン、ダイアジノン、テルブホス（Dr. Ehrenstorfer GmbH、関東化学㈱）

(3) 試薬

蒸留水（HPLC 用、和光純薬工業㈱）、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)）

4) 重金属

(1) 試料材料

玄米（銘柄：ひとめぼれ、水稻うるち玄米、宮城県産）

(2) 標準品

カドミウム標準液（化学分析用、関東化学(株)）

(3) 試薬

精製水（以下、水）（日本薬局方注射用水、光製薬(株)）、硝酸（有害金属測定用、関東化学(株)）、硫酸（有害金属測定用、関東化学(株)）、(+)-酒石酸ナトリウムカリウム四水和物（原子吸光分析用、以下、酒石酸カリウムナトリウム、関東化学(株)）、4-メチル-2-ペンタノン（原子吸光分析用、以下、MIBK、和光純薬工業(株)）、*N,N*-ジエチルジチオカルバミン酸ナトリウム三水和物（原子吸光分析用、以下、DDTC、和光純薬工業(株)）、硫酸アンモニウム（原子吸光分析用、和光純薬工業(株)）、アンモニア水（原子吸光分析用、関東化学(株)）、プロモチモールブルー（試薬特級、和光純薬工業(株)）、エタノール（95）（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

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

(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

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および器材

粉体攪拌用フラスコ（株旭製作所）、減圧濃縮器（東京理化学器械(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)）