

(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）

(4) 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℃で 2 分間保持し、その後毎分 10℃で昇温し、200℃に到達後 10 分間保持、注入口温度：250℃、検出器温度：250℃、キャリアーガス：ヘリウム

4) 重金属

(1) 試料作製用使用機器

ロッキングミキサー（RM-10G）（愛知電機㈱）

(2) 試料前処理用機器および器材

ケルダール分解装置（㈱前田製作所）、

(3) 測定機器

原子吸光分光光度計（AA-6800、㈱島津製作所）

(4) 測定条件

原子吸光光度法条件

使用ガス：可燃性ガス（アセチレン）および支燃性ガス（空気）、ランプ：カドミウム中空陰極ランプ、波長：228.8 nm、スリット幅：2.0 nm

3. 試料作製

1) 残留動物用医薬品

ブリーク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 10 種の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：いずれも 0.2 μg/g）。これらを約 80 g ずつ容器に分注して冷凍（-24℃～-20℃）

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。これらを用い、各サルファ剤について、14 日間の冷蔵保存（6℃～10℃）安定性（ヒレ肉のみ）および試料の 3 回繰り返し凍結融解による安定性をヒレ及びカタで検討した。

2) 食品添加物

①保存料（ソルビン酸）の長期冷蔵保存安定性の検討

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 0.680 g/kg になるように調製した水溶液に、約 1 週間、冷暗所で浸漬した。浸漬後、溶液から取り出し、検討試料とした。長期冷蔵保存（6℃～10℃）安定性は作製後 135 日までの経時変化を検討した。

②基材対浸漬溶液比の検討

①と同様に分割した漬物を、ソルビン酸濃度が 0.680 g/kg になるように調製した水溶液に、基材対浸漬液比が 1：1、1：1.5 および 1：2（w/w）となるように浸漬した（約 1 週間、冷暗所）。浸漬後、溶液から取り出し、検討試料とした。

3) 残留農薬

①浸漬用溶媒の検討

粉体攪拌用フラスコ（1 L 容）に各溶媒（ヘキサン、アセトン、20% 含水アセトンおよび酢酸エチル）をそれぞれ 400 mL とり、これに添加用農薬混合標準液（テルブホス 0.5 μg/mL、ダイアジノン、クロルピリホスおよびマラチオン 10 μg/mL、フェニトロチオン 20 μ

g/mL、アセトン溶液) 3 mL を正確に加え、ロータリーエバポレーターに取り付け、常圧で、5 分間回転混合した。これに、玄米 300 g を量り入れ、同様に 5 分間回転混合した後、室温で遮光下 24 時間放置した。浸漬後、浸漬溶媒を減圧乾固し、さらに室温下で 3 日間乾燥し、粉碎後、浸漬溶媒検討用 (試料溶媒留去後理論値：テルブホス 0.005 μ g/g、ダイアジノン、クロルピリホスおよびマラチオン 0.1 μ g/g、フェニトロチオン 0.2 μ g/g) とした。作製した試料は、ジップロックに入れ、冷蔵保存 (6°C~10°C) した。

②バッチ間の均一性の検討

粉体攪拌用フラスコ (2L 容) 10 個に酢酸エチルをそれぞれ 700 mL とり、これに添加用農薬混合標準液 (テルブホス 0.5 μ g/mL、ダイアジノン、クロルピリホスおよびマラチオン 10 μ g/mL、フェニトロチオン 20 μ g/mL、アセトン溶液) 6 mL を正確に加え、ロータリーエバポレーターに取り付け、常圧で、5 分間回転混合した。これに、玄米 600 g を量り入れ、同様に 5 分間回転混合した後、以下、浸漬溶媒検討用試料と同様に行い、10 個のバッチ間均一性の検討用試料とした (溶媒留去後理論値：テルブホス 0.005 μ g/g、ダイアジノン、クロルピリホスおよびマラチオン 0.1 μ g/g、フェニトロチオン 0.2 μ g/g)。

4) 重金属

予め濃度を測定した高濃度玄米 (2.10 μ g/g) およびブランク玄米 (0.0273 μ g/g) を用い、以下のとおりに条件を変えてロッキングミキサーを用いて混合

し、試料を作製した。混合後、内容物を容器からなるべく混合終了時の状態で取り出し、10 個の容器に分注した。

条件 1：高濃度玄米 40 g + ブランク玄米 360 g (高濃度玄米希釈率：質量で 10 倍)、混合時間 0.5 分間

条件 2：高濃度玄米 40 g + ブランク玄米 360 g (高濃度玄米希釈率：質量で 10 倍)、混合時間 10 分間

条件 3：①=高濃度玄米 200 g + ブランク玄米 200 g、②=①+ブランク玄米 400 g、③=②+ブランク玄米 800 g、④=③+ブランク玄米 1600 g、各混合時間①~③：5 分間および④：20 分間、①から④の順で、等倍希釈を繰り返し 4 回実施 (高濃度玄米希釈率：質量で 16 倍)

4. 試験方法

1) 残留動物用医薬品

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とり、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。

2) 食品添加物

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。

各保存期間終了時に、試料の固体部位をとり、合わせて細切した。その約 50 g を精密に量り、水 100 mL を加えて混和した後、pH 試験紙を用いて水酸化ナトリウム溶液 (1→10) 又は硫酸 (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、全量の水で約 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、留液をとり 500 mL とした後、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。

はじめに、浸漬用溶液に用いる適切な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を調製し、これに玄米を浸漬した後、上記の方法で作製して得られた玄米試料について添加回収試験を行った。

浸漬用溶媒の検討では、溶媒ごとに得られた試料につき $n=5$ で、また、バッチ間の均一性の検討では、10 バッチ間につきそれぞれ $n=2$ で以下のとおりに測定を行った

試料 10 g を採取し、水 20 mL を加え 2 時間膨潤させた後、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 -ヘキサン層をとり、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 回繰り返すし、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 -ヘキサンを留去した。残留物をアセトニトリル飽和 n -ヘキサン 30 mL に溶解し、 n -ヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL を加えて振とうした。アセトニトリル層をとり、残った n -ヘキサン層に n -ヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL を加え、上記の操作を 2 回繰り返すし、 n -ヘキサン層を合わせた後、 n -ヘキサンを留去した。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。なお、各農薬の定量にはマトリックス添加検量線を用いた。

4) 重金属

それぞれの条件で得られた試料 10 個につき $n=2$ で、測定を行い、一元配置の分散分析により、均一性の確認を行った。カドミウム濃度の測定は、公定法に従い、硝酸および硫酸を用いて湿式分解後、DDTC-MIBK 法で原子吸光光度計により測定を行った。

(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（ヒレ肉）の冷蔵保存安定性の検討

冷蔵保存安定性試験は、作製後、冷蔵保存した試料について、分注した容器から5容器を選択し、それぞれの容器につき $n=1$ で各サルファ剤濃度を測定した。得られたブランク試料のクロマトグラムにおいて、サルファ剤の保持時間付近に基材由来の夾雑ピークが認められた場合は、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。また、作製後における回収率は添加量の $0.2 \mu\text{g/g}$ に対し、81~87%といずれも良好であり、これを100%として、14日間の安定性を検討した。

ヒレ肉では、SIXにおいて冷蔵7日後に顕著な減少が認められ、更に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。その他9種のサルファ剤（SDZ、SMR、SDD、SMPD、SMMX、SCPD、SMX、SDMXおよびSQ）においては7日後で76~94%、14日後で58~74%の安定性であり、やや減少傾向が認められた（表1）。

2) 牛肉試料の凍結融解安定性の検討

凍結融解安定性試験は、作製後より冷凍保存した試料10容器について、凍結融解を3回まで行い、凍結融解ごとに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。なお、繰り返し3回時点で腐敗を認めたため、それ以上の凍結融解は行わなかった。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。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、SMXおよびSQを除く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、SMX（2回目：90%、3回目：100%）およびSQ（2回目：98%、3回目：120%）の3回目の上昇傾向の原因は、腐敗による夾雑物の影響と考えられた（表2、図1）。また、カタ肉においては、SDZが2回目で60%となり、他のサルファ剤と比較してやや低い安定性であった。3回目では、ヒレ肉同様腐敗が原因と考えられる回収率（濃度）の上昇傾向が4種のサルファ剤（SDZ、SMX、SDMXおよびSQ）に見られた。他6種のサルファ剤（SMR、SDD、SMPD、SMMX、SCPDおよびSIX）では3回までで80%以上の安定性があった（表3、図2）。

2. 食品添加物

1) 漬物（大根漬け）中保存料（ソルビン酸）の長期冷蔵保存安定性の検討

長期冷蔵保存安定性試験は、作製0日後から冷蔵保存135日後まで、経時的にソルビン酸濃度を測定し、作製0日後におけるソルビン酸の平均試料濃度 0.323g/kg （回収率96.7%）を100%として安定性を確認した。

その結果、60日後までは94%以上の安定性が認められ、90日後で91%、135日後で86%と緩やかな減少傾向となったが、作製4ヶ月後で85%以上の安定

性が確認できた（図 3）。

2) 基材対浸漬溶液比の検討

基材である漬物（大根漬け）およびソルビン酸添加浸漬溶液について、浸漬比を変えて試料を作製し、回収率を確認した。

その結果、基材/浸漬溶液=1:1、1:1.5 および 1:2（w/w）の回収率はそれぞれ 96.7%、95.0% および 94.1% となり、わずかではあるが、基材比率が高い程、回収率が良好となる結果が得られた（表 4）。このことから、基材対浸漬溶液比は 1:1（質量比）とする条件が最も理論値に近い濃度となり、添加濃度をコントロールする上で適していると考えられた。

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、玄米の適用性を検討した。玄米を 4 種の浸漬用溶媒（n-ヘキサン、アセトン、20% 含水アセトンおよび酢酸エチル）に浸漬し、乾燥後粉碎した試料中の各農薬の回収率を確認した。

その結果、各農薬の添加濃度（理論値）（テルブホス 0.005 $\mu\text{g/g}$ 、ダイアジノン、クロルピリホスおよびマラチオン 0.1 $\mu\text{g/g}$ 、フェニトロチオン 0.2 $\mu\text{g/g}$ ）に対し、各浸漬溶媒における回収率は、それぞれヘキサンでは 47～91%、アセトンでは 38～86%、20% 含水アセトンでは 62～95%、酢酸エチルでは 53～97% となった（表 5～8、図 4）。含水アセトンが最も良好な回収率が得られたが、含水であることから試料作

製に他の 3 溶媒に比べて溶媒留去時に突沸しやすいなど注意と時間を要するため、実試料作製には不適と判断した。他の 3 溶媒の中では、作業面、回収率および標準偏差の点から、酢酸エチルが最適と考えられた。また、農薬別では、いずれの浸漬溶媒でもマラチオンが他の農薬に比べて低い回収率であった（47～63%）。また、テルブホスはいずれの浸漬溶媒においても他の農薬と比べて標準偏差が大きかった（3～17%）。なお、作製に用いた玄米は予めクロマトグラムについて、添加農薬の測定を妨害するピークは認められないことを確認した。

浸漬用溶媒に酢酸エチルを選択し、10 回繰り返し作製で得られた 10 バッチの試料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 F 値は F 境界値より大きく、均一性は得られなかった（表 9～13）。今後は、ロッキングミキサーを用いて混合し、均一性を確認するとともに、冷蔵保存安定性を検討することが必要である。

4. 重金属

混合には、ロッキングミキサー（RM-10G）を用いた。この混合機は、回転による拡散混合と揺動による移動混合を同時に行い、短時間で均一混合が可能であった。

条件 1 の最も短時間の混合でも理論値の 0.234 $\mu\text{g/g}$ に対し、変動係数 2.4% の範囲で 100% の回収率であり、一元配置の分散分析により均一性のある混合試料が得られた（表 14）。また条件 2 においても同様であった。更に高濃度玄米の

希釈率が最も高い 16 倍の条件 3 においても、倍散する方法で行ったが、理論値の 0.157 $\mu\text{g/g}$ に対し、変動係数 1.0% の範囲で 100% の回収率であり、同様に良好な均一性が得られた (表 15)。ロッキングミキサー (RM-10G) は、粉体の混合には非常に有効な混合機であることが確認された。

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

新たな基材として検討した牛肉試料は、ヒレ肉においては SIX を除く 9 種の (添加した) サルファ剤について冷蔵保存 7 日後までは概ね良好な安定性が得られた。凍結融解安定性についても、ヒレ肉、カタ肉ともに 3 回目で一部のサルファ剤に見かけ上回収率が上がる傾向があったが、基準値がある SDD についてはいずれの基材でも 80% 以上の安定性があり、調査試料としての適用の可能性があると考えられた。

2. 食品添加物

漬物 (大根漬け) を基材としたソルビン酸の長期安定性を確認した。その結果、作製後 60 日間は良好な安定性であり、その後緩やかに減少する傾向が認め

られたが、作製後約 135 日でも 85% 以上の安定性が確認できた。また、基材対浸漬溶液比では、1:1 が最も理論値に近い濃度となり、添加濃度コントロールの点からも最も適していると考えられた。

3. 残留農薬

新たな基材として玄米の適用の可能性について、5 種の農薬を添加して検討した。試料作製には浸漬溶媒に酢酸エチルが適していると考えられたが、一部の農薬で回収率やばらつきに問題があった。今後は、実試料作製に向けて均一化の方法を検討し、さらに安定性を確認する必要があると考えられた。

4. 重金属

カドミウム添加玄米試料の作製において、手動で行ってきた混合をロッキングミキサーを用いることで機械化できることが確認できた。今後は、高濃度カドミウム玄米を用いた場合、濃度の分散性も考慮して希釈率の上限を確認する必要があると考えられた。

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

- 1) 高坂典子、勝村利恵子、福光徹、鈴木達也、渡辺卓穂、小島幸一 (食品薬品安全センター 秦野研究所) : 食品衛生外部精度管理用調査試料の作製検討

—残留動物用医薬品検査用調査試料編
一、日本薬学会第133回年会、横浜、
2013

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 牛ヒレ肉試料の冷蔵保存安定性

添加薬剤		冷蔵日数(日)	0	4	7	14
*スルファジアジン	SDZ	平均値(μg/g)	0.166	0.171	0.126	0.121
		回収率(%)	83.0	85.5	63.0	60.5
		RSD(%)	4.9	3.9	5.9	10.7
		安定性(%)	100.0	103.0	75.9	72.9
スルファメラジン	SMR	平均値(μg/g)	0.171	0.172	0.161	0.127
		回収率(%)	85.5	86.0	80.5	63.5
		RSD(%)	5.8	2.7	4.1	2.4
		安定性(%)	100.0	100.6	94.2	74.3
スルファジミジン	SDD	平均値(μg/g)	0.169	0.168	0.150	0.107
		回収率(%)	84.5	84.0	75.0	53.5
		RSD(%)	6.7	2.6	4.2	6.7
		安定性(%)	100.0	99.4	88.8	63.3
スルファメトキシピリダジン	SMPD	平均値(μg/g)	0.162	0.164	0.142	0.107
		回収率(%)	81.0	82.0	71.0	53.5
		RSD(%)	7.2	5.2	5.0	4.0
		安定性(%)	100.0	101.2	87.7	66.0
スルファモノメキシシ	SMMX	平均値(μg/g)	0.172	0.169	0.151	0.115
		回収率(%)	86.0	84.5	75.5	57.5
		RSD(%)	5.6	4.3	3.8	4.2
		安定性(%)	100.0	98.3	87.8	66.9
スルファクロルピリダジン	SCPD	平均値(μg/g)	0.162	0.159	0.132	0.094
		回収率(%)	81.0	79.5	66.0	47.0
		RSD(%)	6.1	5.3	5.7	6.5
		安定性(%)	100.0	98.1	81.5	58.0
スルフィンキサゾール	SIX	平均値(μg/g)	0.161	0.134	0.061	0.017
		回収率(%)	80.5	67.0	30.5	8.5
		RSD(%)	6.7	7.1	6.2	27.8
		安定性(%)	100.0	83.2	37.9	10.6
スルファメトキサゾール	SMX	平均値(μg/g)	0.174	0.165	0.145	0.111
		回収率(%)	87.0	82.5	72.5	55.5
		RSD(%)	4.1	5.0	5.4	3.0
		安定性(%)	100.0	94.8	83.3	63.8
スルファジメキシシ	SDMX	平均値(μg/g)	0.169	0.167	0.148	0.124
		回収率(%)	84.5	83.5	74.0	62.0
		RSD(%)	9.8	5.8	8.1	7.0
		安定性(%)	100.0	98.8	87.6	73.4
スルファキノキサリン	SQ	平均値(μg/g)	0.161	0.166	0.141	0.105
		回収率(%)	80.5	83.0	70.5	52.5
		RSD(%)	9.0	9.6	6.7	6.9
		安定性(%)	100.0	103.1	87.6	65.2

平均値および RSD は n=5 の測定値から算出した。

安定性は、冷蔵 0 日目に対する冷蔵 n 日目の濃度平均値の割合 (%) として算出した。

*HPLC 測定におけるピークがバックグラウンドと重なったサルファ剤(ブランク試料のバックグラウンドピークを差し引いて算出)

表2 牛ヒレ肉試料の凍結融解安定性

添加薬剤		解凍回数(回)	1	2	3
スルファジアジン	SDZ	平均値(μg/g)	0.159	0.147	0.139
		回収率(%)	79.5	73.5	69.5
		RSD(%)	2.4	2.3	3.6
		F 値	1.16	1.42	1.19
		安定性(%)	100.0	92.3	87.4
スルファメラジン	SMR	平均値(μg/g)	0.152	0.153	0.141
		回収率(%)	76.0	76.5	70.5
		RSD(%)	3.4	1.3	2.9
		F 値	2.47	0.51	0.81
		安定性(%)	100.0	100.9	92.6
スルファジミジン	SDD	平均値(μg/g)	0.155	0.149	0.142
		回収率(%)	77.5	74.5	71.0
		RSD(%)	1.7	1.2	2.1
		F 値	0.91	0.64	1.05
		安定性(%)	100.0	96.3	91.6
スルファメキシピリダジン	SMPD	平均値(μg/g)	0.156	0.148	0.136
		回収率(%)	78.0	74.0	68.0
		RSD(%)	1.8	1.7	2.6
		F 値	1.31	0.69	0.42
		安定性(%)	100.0	94.9	86.9
スルファモノメキシシ	SMMX	平均値(μg/g)	0.146	0.156	0.142
		回収率(%)	73.0	78.0	71.0
		RSD(%)	1.8	2.1	3.3
		F 値	0.65	0.78	0.55
		安定性(%)	100.0	106.1	97.2
スルファクロルピリダジン	SCPD	平均値(μg/g)	0.141	0.133	0.127
		回収率(%)	70.5	66.5	63.5
		RSD(%)	2.1	2.0	3.4
		F 値	1.79	1.21	1.10
		安定性(%)	100.0	94.5	90.4
スルフィンキサゾール	SIX	平均値(μg/g)	0.141	0.126	0.129
		回収率(%)	70.5	63.0	64.5
		RSD(%)	1.6	2.0	4.0
		F 値	0.41	1.75	0.75
		安定性(%)	100.0	89.2	91.1
スルファメキサゾール	SMX	平均値(μg/g)	0.153	0.137	0.154
		回収率(%)	76.5	68.5	77.0
		RSD(%)	3.1	2.6	3.3
		F 値	1.46	1.67	0.59
		安定性(%)	100.0	89.3	100.5
スルファジメキシシ	SDMX	平均値(μg/g)	0.153	0.151	0.150
		回収率(%)	76.5	75.5	75.0
		RSD(%)	3.2	3.7	2.6
		F 値	0.91	1.60	0.43
		安定性(%)	100.0	98.6	98.2
スルファキノキサリン	SQ	平均値(μg/g)	0.140	0.138	0.169
		回収率(%)	70.0	69.0	84.5
		RSD(%)	3.5	3.3	3.6
		F 値	0.82	0.52	3.23
		安定性(%)	100.0	98.3	120.7

平均値および RSD は n=10 の測定値から算出した。

安定性は、解凍 1 回目に対する解凍 n 回目の濃度平均値の割合 (%) として算出した。

表3 牛カタ肉試料の凍結融解安定性

添加薬剤		解凍回数(回)	1	2	3
スルファジアジン	SDZ	平均値(μg/g)	0.113	0.069	0.083
		回収率(%)	56.5	34.5	41.5
		RSD(%)	3.5	5.3	4.4
		F 値	14.08	0.77	0.92
		安定性(%)	100.0	61.1	73.5
スルファメラジン	SMR	平均値(μg/g)	0.174	0.151	0.143
		回収率(%)	87.0	75.5	71.5
		RSD(%)	2.4	2.5	2.5
		F 値	4.19	1.88	0.64
		安定性(%)	100.0	87.0	82.4
スルファジミジン	SDD	平均値(μg/g)	0.163	0.152	0.150
		回収率(%)	81.4	76.0	75.0
		RSD(%)	1.4	2.0	2.1
		F 値	1.85	1.19	0.63
		安定性(%)	100.0	93.2	92.1
スルファメキシピリダジン	SMPD	平均値(μg/g)	0.168	0.149	0.150
		回収率(%)	84.0	74.5	75.0
		RSD(%)	1.4	3.0	2.2
		F 値	1.52	1.11	0.30
		安定性(%)	100.0	88.8	89.2
スルファモノメキシ	SMMX	平均値(μg/g)	0.157	0.150	0.148
		回収率(%)	78.5	75.0	74.0
		RSD(%)	2.1	4.6	4.1
		F 値	1.56	1.54	0.90
		安定性(%)	100.0	95.5	94.5
スルファクロピリダジン	SCPD	平均値(μg/g)	0.144	0.124	0.133
		回収率(%)	72.0	62.0	65.5
		RSD(%)	2.3	2.9	3.6
		F 値	2.48	0.44	0.66
		安定性(%)	100.0	86.4	92.5
スルフィンキサゾール	SIX	平均値(μg/g)	0.149	0.126	0.129
		回収率(%)	74.5	63.0	64.5
		RSD(%)	2.5	3.8	3.5
		F 値	3.21	0.69	0.97
		安定性(%)	100.0	84.8	86.6
スルファメキサゾール	SMX	平均値(μg/g)	0.154	0.122	0.158
		回収率(%)	77.0	61.0	79.0
		RSD(%)	2.8	5.0	5.2
		F 値	2.11	0.49	0.85
		安定性(%)	100.0	79.2	102.4
スルファジメキシ	SDMX	平均値(μg/g)	0.160	0.144	0.157
		回収率(%)	80.0	72.0	78.5
		RSD(%)	3.1	1.6	6.0
		F 値	2.39	0.18	0.78
		安定性(%)	100.0	89.8	98.2
スルファキノキサリン	SQ	平均値(μg/g)	0.142	0.136	0.166
		回収率(%)	71.0	68.0	83.0
		RSD(%)	3.9	4.0	8.5
		F 値	3.85	0.59	0.57
		安定性(%)	100.0	95.6	116.6

平均値および RSD は n=10 の測定値から算出した。

安定性は、解凍 1 回目に対する解凍 n 回目の濃度平均値の割合 (%) として算出した。

表 4 基材対浸漬溶液比と保存料(ソルビン酸)の回収率

基材対浸漬溶液 の質量比	添加濃度 (g/kg)	試料濃度 (g/kg)	平均回収率 (%)	相対標準偏差 (%)
1:1	0.340	0.329	96.7	2.5
1:1.5	0.408	0.388	95.0	1.1
1:2	0.453	0.426	94.1	0.6

浸漬溶液のソルビン酸濃度は 0.680 g/kg で調製した。

表 5 ヘキサンを浸漬用溶媒としたときの農薬の添加回収率 (単位:%)

測定 回数	農薬				
	ダイアジノン	テルブホス	クロルピリホス	マラチオン	フェニトロチオン
1	68.7	40.0	84.7	51.2	92.1
2	67.0	84.0	80.1	45.7	85.3
3	71.0	70.0	86.9	47.6	91.2
4	72.2	62.0	87.7	46.1	93.5
5	70.7	76.0	88.3	44.8	89.9
平均(%)	69.9	67.0	85.5	47.1	90.5
SD(%)	2.1	16.8	3.3	2.5	3.1
RSD(%)	2.9	24.7	3.9	5.4	3.4

表 6 アセトンを浸漬用溶媒としたときの農薬の添加回収率 (単位:%)

測定 回数	農薬				
	ダイアジノン	テルブホス	クロルピリホス	マラチオン	フェニトロチオン
1	65.7	34.0	80.8	49.3	84.7
2	66.5	46.0	84.2	49.5	89.6
3	66.2	34.0	83.1	49.0	87.6
4	65.1	34.0	80.7	45.5	85.7
5	59.1	36.0	75.4	42.9	79.4
平均(%)	64.5	37.6	80.8	47.2	85.5
SD(%)	3.1	5.2	3.4	2.9	3.8
RSD(%)	4.8	14.0	4.2	6.2	4.5

表 7 20%含水アセトンを浸漬用溶媒としたときの農薬の添加回収率 (単位:%)

測定回数	農薬				
	ダイアジノン	テルブホス	クロルピリホス	マラチオン	フェニトロチオン
1	90.6	86.0	93.7	62.9	97.4
2	91.1	84.0	91.9	63.5	97.4
3	88.9	70.0	91.3	62.8	96.0
4	87.8	62.0	88.3	60.1	91.8
5	86.5	76.0	90.4	58.9	94.4
平均(%)	88.9	76.0	91.1	61.6	95.4
SD(%)	1.9	9.9	2.0	2.0	2.4
RSD(%)	2.1	13.5	2.2	3.3	2.5

表 8 酢酸エチルを浸漬用溶媒としたときの農薬の添加回収率 (単位:%)

測定回数	農薬				
	ダイアジノン	テルブホス	クロルピリホス	マラチオン	フェニトロチオン
1	78.3	54.0	92.7	65.4	99.8
2	76.5	34.0	94.1	63.8	103.3
3	75.2	70.0	89.3	64.9	92.0
4	74.1	58.0	87.3	59.2	95.3
5	73.0	44.0	87.4	61.9	94.9
平均(%)	75.4	52.8	90.2	63.0	97.1
SD(%)	2.1	13.7	3.1	2.5	4.5
RSD(%)	2.7	26.1	3.4	4.5	4.6

表9 浸漬溶媒に酢酸エチルを用いた10バッチ試料間の各添加農薬の均一性-テルブホス-

No.	テルブホス濃度(μg/g)		平均値 (μg/g)
	1	2	
1	0.00338	0.00281	0.00300
2	0.00285	0.00318	0.00300
3	0.00335	0.00387	0.00360
4	0.00266	0.00378	0.00320
5	0.00337	0.00364	0.00350
6	0.00320	0.00290	0.00300
7	0.00285	0.00324	0.00300
8	0.00344	0.00278	0.00310
9	0.00269	0.00364	0.00310
10	0.00327	0.00342	0.00330
平均値(μg/g)			0.0030
SD			0.00000
RSD(%)			0.0
回収率(%)			60.0
F 値			0.47

表10 浸漬溶媒に酢酸エチルを用いた10バッチ試料間の各添加農薬の均一性-ダイアジノン-

No.	ダイアジノン濃度(μg/g)		平均値 (μg/g)
	1	2	
1	0.0762	0.0710	0.0736
2	0.0798	0.0788	0.0793
3	0.0866	0.0849	0.0857
4	0.0759	0.0845	0.0802
5	0.0877	0.0841	0.0859
6	0.0887	0.0856	0.0871
7	0.0831	0.0828	0.0829
8	0.0923	0.0871	0.0897
9	0.0872	0.0903	0.0887
10	0.0920	0.0952	0.0936
平均値(μg/g)			0.0847
SD			0.005814
RSD(%)			6.9
回収率(%)			84.7
F 値			7.77

表11 浸漬溶媒に酢酸エチルを用いた10バッチ試料間の各添加農薬の均一性-クロルピリホス-

No.	クロルピリホス濃度 (μg/g)		平均値 (μg/g)
	1	2	
1	0.0786	0.0729	0.0757
2	0.0864	0.0831	0.0847
3	0.0892	0.0867	0.0879
4	0.0804	0.0874	0.0839
5	0.0967	0.0858	0.0912
6	0.0935	0.0894	0.0914
7	0.0857	0.0880	0.0868
8	0.0964	0.0939	0.0951
9	0.0922	0.0959	0.0940
10	0.0950	0.1000	0.0975
平均値 (μg/g)			0.0888
SD			0.006431
RSD(%)			7.2
回収率(%)			88.8
F 値			5.80

表12 浸漬溶媒に酢酸エチルを用いた10バッチ試料間の各添加農薬の均一性-マラチオン-

No.	マラチオン濃度 (μg/g)		平均値 (μg/g)
	1	2	
1	0.0653	0.0591	0.0622
2	0.0645	0.0632	0.0638
3	0.0700	0.0654	0.0677
4	0.0621	0.0631	0.0626
5	0.0678	0.0625	0.0651
6	0.0782	0.0754	0.0768
7	0.0688	0.0684	0.0686
8	0.0777	0.0704	0.0740
9	0.0698	0.0696	0.0697
10	0.0706	0.0733	0.0719
平均値 (μg/g)			0.0682
SD			0.004947
RSD(%)			7.3
回収率(%)			68.2
F 値			6.16

表13 浸漬溶媒に酢酸エチルを用いた10バッチ試料間の各添加農薬の均一性-フェニトロチオン-

No.	フェニトロチオン濃度 (μg/g)		平均値 (μg/g)
	1	2	
1	0.159	0.146	0.152
2	0.171	0.164	0.167
3	0.184	0.169	0.176
4	0.161	0.176	0.168
5	0.189	0.173	0.181
6	0.184	0.177	0.180
7	0.171	0.178	0.174
8	0.199	0.189	0.194
9	0.183	0.195	0.189
10	0.185	0.209	0.197
平均値 (μg/g)			0.178
SD			0.01341
RSD(%)			7.5
回収率(%)			178.1
F 値			3.90

表14 ロッキングミキサーを用いた希釈混合によるカドミウム添加玄米試料の作製(条件1)結果
 玄米試料理論値:0.234 μg/g
 混合機:愛知電機、RM-10G

No.	カドミウム濃度 (μg/g)		平均値 (μg/g)
	1	2	
1	0.246	0.244	0.245
2	0.238	0.236	0.237
3	0.246	0.233	0.239
4	0.237	0.220	0.228
5	0.229	0.222	0.225
6	0.230	0.234	0.232
7	0.234	0.237	0.235
8	0.239	0.227	0.233
9	0.231	0.237	0.234
10	0.234	0.238	0.236
平均値 (μg/g)			0.234
SD			0.00558
RSD(%)			2.4
F 値			1.63

表15 ロッキングミキサーを用いた希釈混合によるカドミウム添加玄米試料の作製(条件3)結果

玄米試料理論値:0.157 $\mu\text{g/g}$

混合機:愛知電機、RM-10G

No.	カドミウム濃度 ($\mu\text{g/g}$)		平均値 ($\mu\text{g/g}$)
	1	2	
1	0.160	0.159	0.159
2	0.157	0.159	0.158
3	0.157	0.154	0.155
4	0.161	0.157	0.159
5	0.154	0.155	0.154
6	0.158	0.156	0.157
7	0.156	0.160	0.158
8	0.155	0.160	0.157
9	0.159	0.157	0.158
10	0.156	0.159	0.157
平均値 ($\mu\text{g/g}$)			0.157
SD			0.00162
RSD(%)			1.0
F 値			1.01

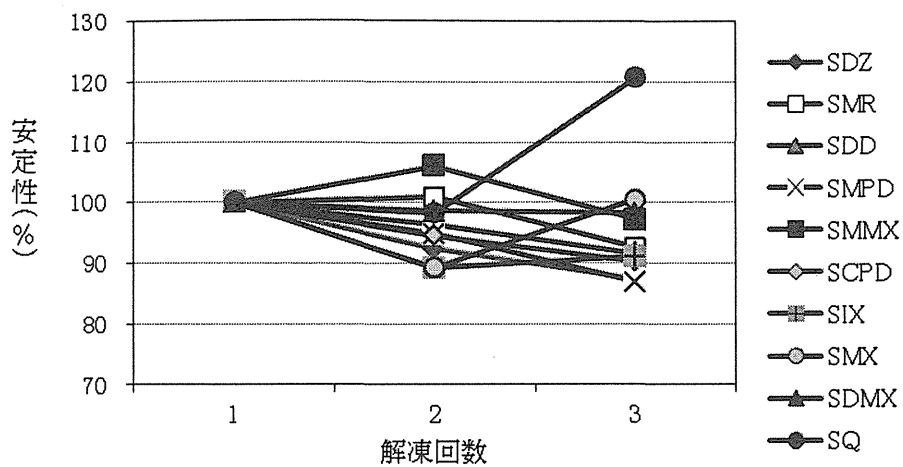


図1 牛ヒレ肉におけるサルファ剤10種の凍結融解安定性

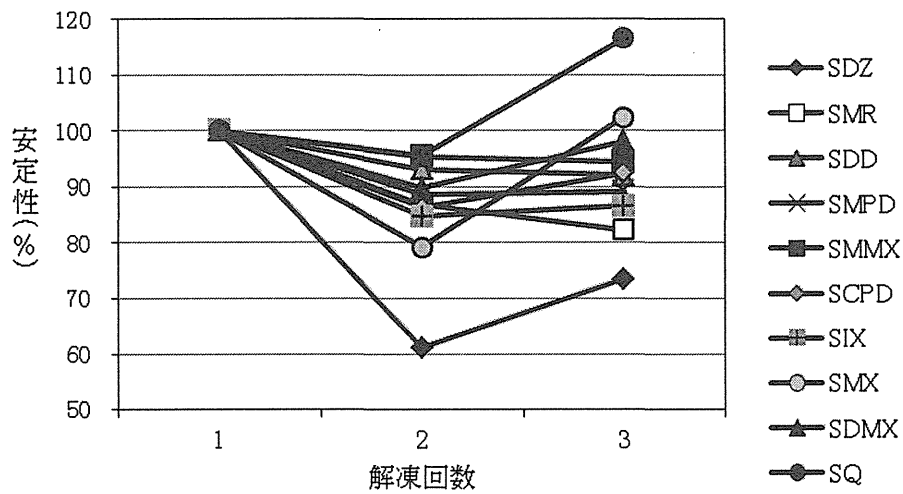


図2 牛カタ肉におけるサルファ剤10種の凍結融解安定性

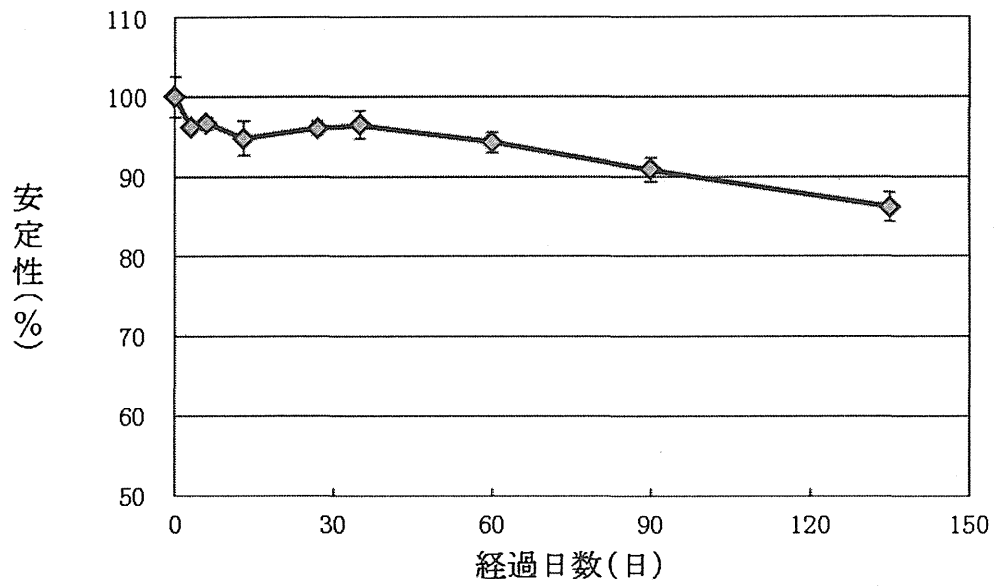


図3 ソルビン酸安定性(大根漬物中)

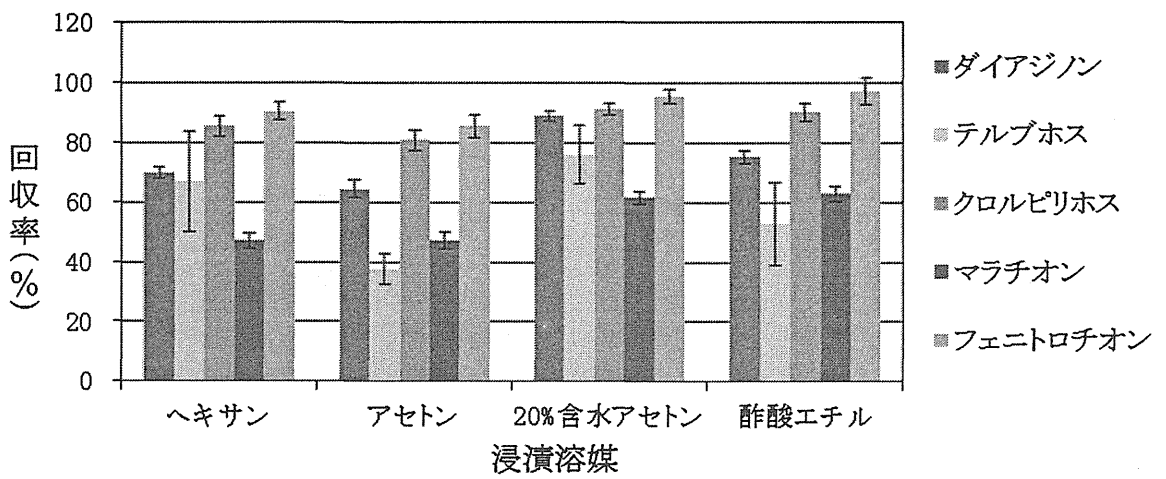


図4 浸漬溶媒別農薬の回収率(玄米中)

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正試料の作製検討と

信頼性確保に関する研究（その 2）

—セレウス菌検査用調査試料およびビブリオ属菌検査用調査試料の
新規開発に関する基礎的検討—

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
研究協力者	山田 健一	(財) 食品薬品安全センター	秦野研究所	研究員
研究協力者	梶原三智香	(財) 食品薬品安全センター	秦野研究所	研究員
研究協力者	梅津 麻実	(財) 食品薬品安全センター	秦野研究所	研究員

研究要旨

これまでに米飯を基材としたセレウス菌検査用調査試料の開発を進めてきたが、陰性対照菌において、保存温度に依存した菌数の増加が認められたことから、輸送時の安定した菌数確保を目的として、基材中に添加する食塩濃度について検討した。その結果、20%以上の食塩濃度において 22.5℃以上の保存温度でも菌数の増加は認められず、35 日目まで安定性が確保できた。

一方、ビブリオ属菌についてはグラム陽性菌が混入したときの対策としてナイシンの影響について検討したが、ビブリオ属菌の増殖には影響を与えないものの、*S. aureus*、*B. subtilis* のいずれに対しても増殖抑制効果は認められず、本基材中においてはナイシンの効果はないものと考えられた。さらに、こうや豆腐以外の基材の開発を行うため、マッシュポテト、ハンバーグおよびまぐろ切り身を用いて、ビブリオ属菌の菌液接種後の菌数変化について確認したが、いずれの基材も 1 週間以内に 1 オーダーの菌数減少が認められたことから、現状では精度管理試料の基材としての採用は難しいものと考えられた。

さらに、平成 24 年度の一般細菌数測定検査における外部精度管理調査結果において例年と比較すると大きな変動係数となったこと、ならびに外部精度管理調査への参加者からの意見をもとに、一般細菌数測定に用いるストマッカー袋のメーカーによる回収率の相違について検討した。その結果、ストマッカー袋のメーカーにより回収率が異なっていた。このことから寒天状基材を用いた場合に、フィルター孔径により微細化した寒天粒子の通過性が異なることが外部精度管理調査における変動係数が大きくなったことの原因のひとつ

つである可能性が示唆された。

以上のことから、セレウス菌検査用調査試料は外部精度管理調査においても菌数測定用基材としても有用である可能性が高いものと考えられた。また、ビブリオ属菌においては有用な基材を見出すには至らなかった。

A. 研究目的

食品衛生外部精度管理調査（衛生指標菌および食中毒病因微生物検査）試料の作製にあたり、とりわけ考慮しなければならない事項として、「実食材を基材とした調査試料の開発」と「試験菌（標準菌株）の選択」ならびに試験に用いる培地の組み合わせでの反応性が挙げられる。これまでに外部精度管理調査試料の定性検査用試料として、大腸菌群、E. coli、黄色ブドウ球菌、サルモネラ属菌の4種について提供してきた。しかしながら、食品検査における微生物検査はこれら以外にも多数存在することから、実際の微生物検査を見据えた調査項目の選定が必要である。また、外部精度管理調査では参加機関からの意見として、実際の食材に近いものを提供してほしいとのことであるため、単に検査対象菌種の安定性を保証し、寒天培地等を用いて検査対象菌のみを提供することはできない。そのため、採用する食品基材中においても接種菌の安定性を保証する必要がある。セレウス菌は、土壌、塵埃、汚水等に存在しており、食品の腐敗菌として広く知られていることに加え、耐熱性芽胞を形成するため、加熱処理することによっても完全に死滅させることが困難であることから、品質管理上大きな問題となりうる。さらに、本菌による食中毒は感染型と毒素型の両者が認められている。一方、ビブリオ属菌は、水中に多く生息しているが、耐塩性を有しているために

海水中にも存在することから、魚介類の生食による食中毒の原因としても挙げられる。さらに、既存の調査試料の改良を行うための知見を得ることは、よりばらつきの少ない調査試料を作製することにつながり、結果として外部精度管理調査におけるより精度の高い実施へとつながると考えられる。

外部精度管理調査用試料は、その試料を用いて共同試験を実施することから、試料中の均一性と安定性が保証されなければならない。また、特に微生物検査の場合には通常採用される検査方法に基づいた定性検査を実施したときに、その選択培地上で明らかに陽性、陰性が調査試料の配布から1ヶ月間に亘って判定できることが求められる。さらに、定量検査が指定されている検査項目については菌数の変動やばらつきを考慮した調査試料を提供する必要がある。

そこで、本年度はセレウス菌検査およびビブリオ属菌検査を対象とした調査試料作製を目標として、基材を用いた接種菌の安定性に関する検討を行うこととした。さらに現在、一般細菌数測定用基材として使用されている寒天状基材におけるストマッカ一袋の影響についても検討した。

B. 研究方法

1. 試験菌株

試験菌株は、秦野研究所に保存してある以下の菌株を用いた。

セレウス菌検査用