

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) 鎗田孝、青柳嘉枝、大竹貴光、沼田雅彦、高津章子（産業技術総合研究所）：農薬が残留した大豆粉末を試験試料とした技能試験、第36回農薬残留分析研究会、秋田、2013

2) 鎗田孝、大竹貴光、青柳嘉枝、黒田陽子、沼田雅彦、岩田仁、渡井正俊、光田均、藤川敬、太田秀和（産業技術総合研究所、日本食品分析センター、環境総合テクノス）：残留農薬分析用大豆粉末標準物質の開発、日本食品衛生学会第106回学術講演会、沖縄、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 とうもろこしペーストを基材とした添加回収試験の結果

測定対象農薬	IDMSによる定量値 (添加量に対する比、%)		添加農薬の 回収率(%)
	校正標準液 (マトリックス有) による定量	校正標準液 (マトリックス無) による定量	
シマジン	99.7 ± 0.4	96.3 ± 0.4	84.3 ± 2.2
ダイアジノン	100.4 ± 0.6	97.5 ± 0.6	81.9 ± 2.0
フェントロチオン	99.6 ± 2.0	90.1 ± 1.8	82.2 ± 1.7
マラチオン	99.9 ± 0.2	92.5 ± 0.2	84.5 ± 2.8
クロルピリホス	100.2 ± 0.1	99.5 ± 0.1	83.2 ± 2.4
チオベンカルブ	100.3 ± 0.9	98.2 ± 0.9	83.7 ± 2.6
インプロチオラン	100.1 ± 0.8	90.1 ± 0.7	84.8 ± 2.5
インキサチオン	99.9 ± 0.8	92.5 ± 0.7	83.0 ± 3.6
エトフェンプロックス	99.3 ± 1.0	93.8 ± 0.9	84.1 ± 3.6

添加濃度:0.5 µg/g (ppm)、平均±標準偏差(n=4)

表2 にんじんペーストを基材とした添加回収試験の結果

測定対象農薬	IDMSによる定量値 (添加量に対する比、%)		添加農薬の 回収率(%)
	校正標準液 (マトリックス有) による定量	校正標準液 (マトリックス無) による定量	
シマジン	100.3 ± 0.4	96.0 ± 0.3	88.5 ± 2.2
ダイアジノン	100.6 ± 0.2	97.8 ± 0.2	82.0 ± 2.4
フェントロチオン	99.7 ± 0.7	87.5 ± 0.6	88.1 ± 2.4
マラチオン (a)	99.3 ± 0.5	95.4 ± 0.4	87.4 ± 1.5
クロルピリホス	99.9 ± 0.1	99.7 ± 0.1	85.6 ± 1.7
チオベンカルブ	100.4 ± 0.3	98.8 ± 0.3	86.9 ± 2.2
インプロチオラン	99.9 ± 0.5	88.0 ± 0.5	89.3 ± 1.5
インキサチオン	100.8 ± 0.2	84.6 ± 0.2	92.9 ± 4.1
エトフェンプロックス	101.2 ± 0.6	91.7 ± 0.6	88.7 ± 1.9

添加濃度:0.5 mg/g (ppm)、平均±標準偏差(n=4)

(a) 対象農薬のSIMクロマトグラムに、約4%に相当する基材からのピークが重なっていた

表3 枝豆ペーストを基材とした添加回収試験の結果

測定対象農薬	IDMSによる定量値 (添加量に対する比、%)		添加農薬の 回収率(%)
	校正標準液 (マトリックス有) による定量	校正標準液 (マトリックス無) による定量	
シマジン	99.8 ± 0.3	95.8 ± 0.6	87.9 ± 2.6
ダイアジノン	100.2 ± 0.7	96.2 ± 0.7	84.6 ± 1.3
フェニトロチオン	99.5 ± 1.4	91.2 ± 1.1	83.8 ± 0.3
マラチオン	99.7 ± 0.8	92.5 ± 0.7	88.2 ± 1.9
クロルピリホス	100.0 ± 0.2	100.5 ± 0.2	86.4 ± 1.8
チオベンカルブ	99.5 ± 1.0	99.5 ± 0.2	86.5 ± 2.3
イソプロチオラン	102.8 ± 3.7	85.2 ± 2.8	87.3 ± 2.5
イソキサチオン	100.7 ± 1.2	92.9 ± 1.2	87.0 ± 1.7
エトフェンプロックス	99.8 ± 0.7	92.9 ± 0.3	89.4 ± 7.1

添加濃度:0.5 mg/g (ppm)、平均±標準偏差(n=4)

表4 かぼちゃペーストを基材とした添加回収試験の結果

測定対象農薬	IDMSによる定量値 (添加量に対する比、%)		添加農薬の 回収率(%)
	校正標準液 (マトリックス有) による定量	校正標準液 (マトリックス無) による定量	
シマジン	100.7 ± 0.7	95.6 ± 0.6	82.2 ± 2.5
ダイアジノン	100.8 ± 0.4	98.5 ± 0.4	79.4 ± 2.2
フェニトロチオン	102.0 ± 1.0	92.8 ± 0.9	76.3 ± 2.8
マラチオン	100.2 ± 0.4	94.3 ± 0.4	81.4 ± 2.7
クロルピリホス	100.3 ± 0.1	100.0 ± 0.1	81.5 ± 1.9
チオベンカルブ	100.5 ± 0.4	99.0 ± 0.4	77.8 ± 2.1
イソプロチオラン	100.1 ± 0.2	89.9 ± 0.2	82.8 ± 2.7
イソキサチオン	101.7 ± 1.5	96.1 ± 1.4	77.6 ± 3.7
エトフェンプロックス	99.5 ± 0.7	94.4 ± 0.6	85.3 ± 3.7

添加濃度:0.5 mg/g (ppm)、平均±標準偏差(n=4)

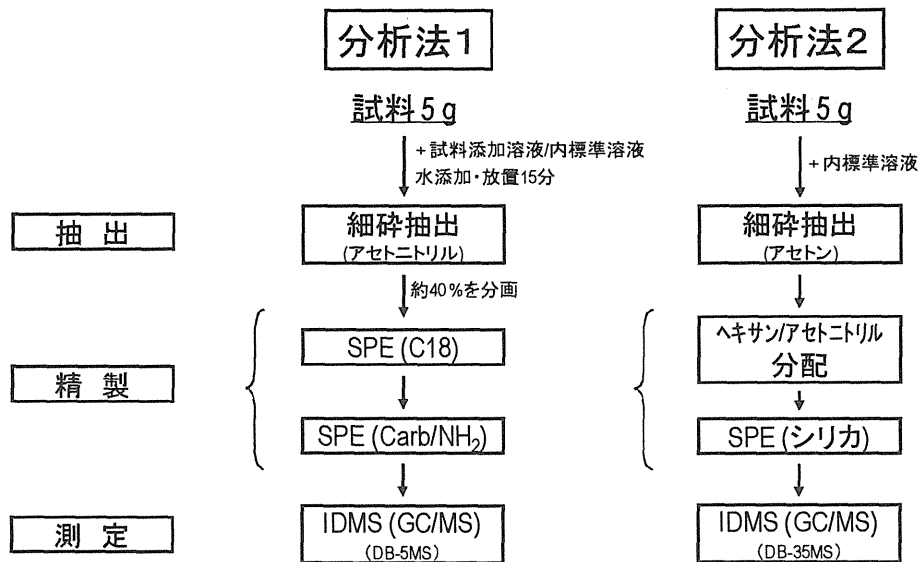


図1 分析法1および分析法2の概略

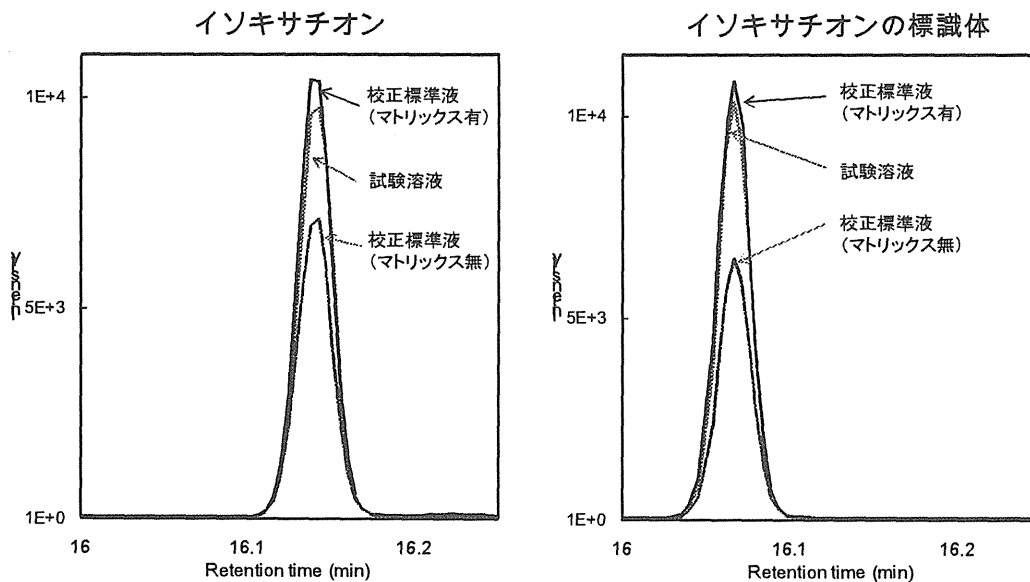


図2 にんじんペーストを基材とした添加回収試験における
イソキサチオンのGC/MSクロマトグラム

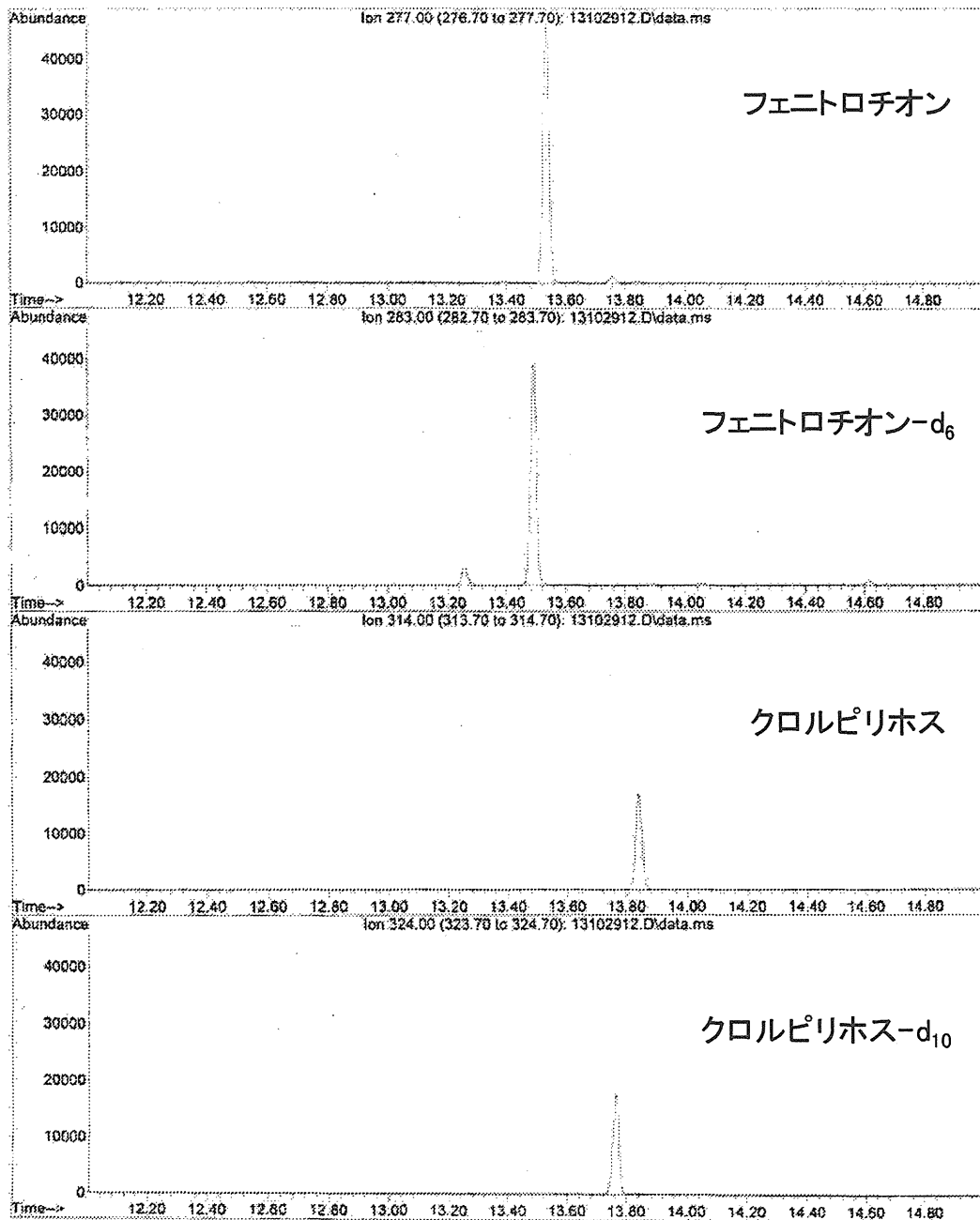


図3 外部精度管理調査試料（とうもろこしペースト）のGC/MSクロマトグラムの例
 （分析法1によって得られたクロマトグラム）

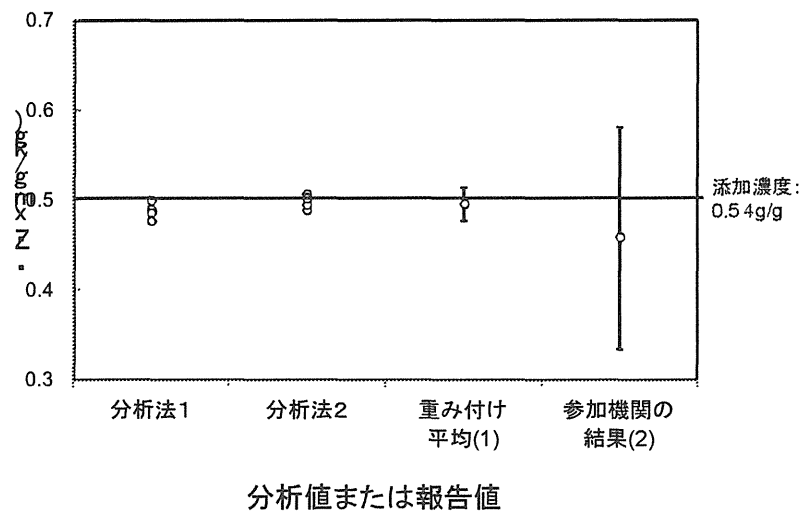


図4 外部精度管理調査試料（とうもろこしペースト）中
フェントロチオンの分析結果の比較

(1) 平均±拡張不確かさ ($k=2$)、(2) 2σ 処理後の従来方式：平均±標準偏差の2倍

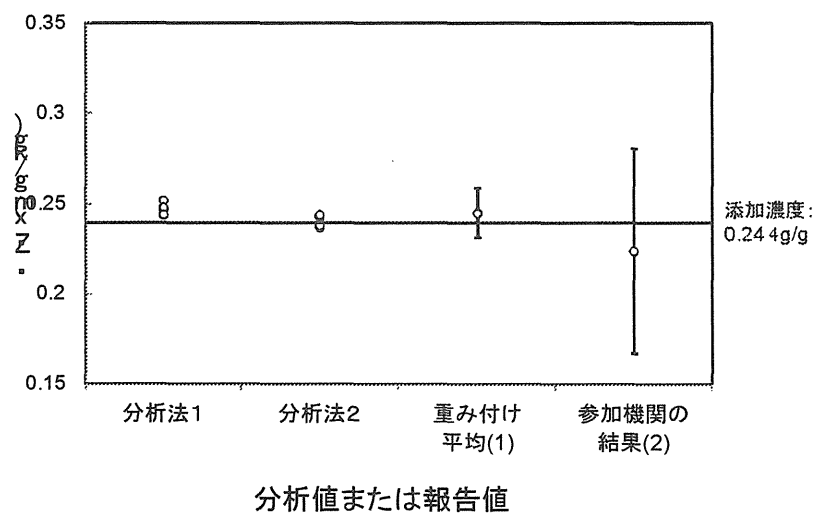


図5 外部精度管理調査試料（とうもろこしペースト）中
クロルピリホスの分析結果の比較

(1) 平均±拡張不確かさ ($k=2$)、(2) 2σ 処理後の従来方式：平均±標準偏差の2倍

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 25 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	（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	（一財）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	（一財）食品薬品安全センター秦野研究所 室長
	高坂 典子	（一財）食品薬品安全センター秦野研究所 研究員
	大向 志帆	（一財）食品薬品安全センター秦野研究所 研究員

研究要旨

精度管理調査を行う上で、適正な調査試料作製は非常に重要であり、調査対象項目の濃度の均一性及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食品添加物検査及び残留農薬検査に関する調査試料の作製を試みた。

食品添加物検査用調査試料については、今年度新たに果実ペースト（いちご及びバナナ）、魚肉製品（鮭フレーク）及び魚肉練り製品（しんじょう及びかまぼこ）を基材として用い、着色料として酸性タール色素（許可色素）、また保存料としてソルビン酸及びパラオキシ安息香酸エステル類（パラオキシ安息香酸エチル、パラオキシ安息香酸プロピル、パラオキシ安息香酸イソプロピル、パラオキシ安息香酸ブチル、パラオキシ安息香酸イソブチルの計 5 物質）を添加し、作製を試みた。その結果、酸性タール色素は、いずれの基材においても抽出及び精製において基材成分の妨害を受けることなく、すべての添加色素が正しく検出された。保存料の検査用に、上記果実ペースト及び魚肉練り製品の適用性を検討した結果、果実ペーストは、いちご及びバナナのいずれでも PHBA エチルを除くすべての保存料で冷蔵保存試料においては良好な均一性が得られた。冷凍保存試料については、部分的に凍結箇所が偏在し、これが原因と考えられる保存料濃度のばらつきが認められ、試料配布時の形態については冷蔵保存品が適切であると考えられた。魚肉練り製品の市販品であるしんじょうへのソルビン酸カリウムの添加は、冷蔵及び冷凍保存のいずれでも均一性が得られ、実試料化の可能性があると考えられた。一方、魚肉練り製品として、魚のすり身（生）を基材に用い、ソルビン酸カリウムを添加混合後、分包し、加熱処理する方法での作製を試みた。その結果、魚のすり身へのソルビン酸カリウムの添加混合においては、加熱前試料にて良好な均一性が確保できたが、加熱

工程において、ソルビン酸濃度にばらつきを生じることが示唆され、今後は、実作製時において、加熱工程条件の検討が必要である。

残留農薬検査用調査試料については、基材として玄米の適用性を、昨年度検討した。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・粉碎することで作製する方法を採用した。4種農薬（ダイアジノン、クロルピリホス、マラチオン及びフェニトロチオン）を添加し、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結果、それらの均一性は得られなかった。そこで、今年度は、それらの均一化をさらに検討した。粉体用混合機であるロックンミキサーを用いて3回にわたり混合と均一性試験を繰り返したが、十分に均一にできなかった。さらに、遠心粉碎器を用いて再粉碎したところ、いずれの添加農薬も概ね均一な濃度となり、フィルターを用いた遠心型の粉碎機で粉碎する方法が有効であることが明らかとなった。また、上記固体試料とは別に、これまでの野菜ペーストに加えて新たに枝豆を基材とした調査試料の作製を検討した。従来の野菜ペーストと同様の混合法では、4種農薬（ダイアジノン、クロルピリホス、マラチオン及びフェニトロチオン）を添加したところ、いずれの農薬も均一性が得られなかった。そこで、基材に水分あるいは油分を添加し均質なペースト基材を作製後、農薬混合標準液を添加する方法を検討した。その結果、水分添加（添加量：5%、10%及び20%）及び油分添加（添加量：2%、5%及び10%）のいずれでも、添加したすべての農薬において、良好な均一性が得られ、枝豆を基材として適用できる可能性が示唆された。

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・内部精度管理が重要な項目である。この精度管理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、食品添加物検査及び残留農薬検査を対象とした検討を行った。

B. 研究方法

食品添加物検査として、着色料の基材には果実ペースト、魚肉製品及び魚肉練り製品を、また保存料（ソルビン酸及びパラオキシ安息香酸エステル類）の基材には、果実ペースト、魚肉練り製品を、また、別に魚肉練り製品には市販品への添加ではなく魚のすり身（生）を用いた加熱加工からの試料作製を新たに試みた。

残留農薬検査に使用する調査試料として、玄米、精米に4種の農薬を添加し、固体試料の基材として穀類粉末の利用の可能性を検討した。また、これまでの野菜ペーストに加えて新たに枝豆ペーストについても基材として検討を加えた。

1. 試料基材および試薬

1) 食品添加物

1)-1 着色料

(1) 試料材料

①果実ペースト

ホイップテースト ストロベリー (ナリヅカ)、ホイップテースト バナナ NEW (ナリヅカ)

②魚肉製品及び魚肉練り製品

鮭フレーク、しんじょう、かまぼこ

(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)、食用赤色 106 号 (以下、R106)、食用青色 1 号 (以下、B1)、食用青色 2 号 (以下、B2)、食用黄色 4 号 (以下、Y4)、食用黄色 5 号 (以下、Y5)、及び食用緑色 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、R105 及び R106 (和光特級、和光純薬工業)、R102、B1、Y4 及び Y5 (和光一級、和光純薬工業)、B2 (試薬特級、和光純薬工業)、G3 (和光純薬工業)

(4) 試薬

日本薬局方注射用水 (以下、水) (光製薬)、28%アンモニア水及びアセトニトリル (試薬特級、関東化学)、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-ブタノール及びメタノール (試薬特級、和光純薬工業)、ポリアミド C-100 (カラムクロマトグラフ用、和光純薬工業)、HPTLC シリカゲル 60、TLC シリカゲル 60 RP-18 F254S 及び 50 HPTLC Plates Cellulose (Merck)

1)-2 保存料

(1) 試料材料

①果実ペースト

ホイップテースト ストロベリー (ナリヅカ)、ホイップテースト バナナ NEW (ナリヅカ)

②魚肉練り製品

しんじょう、魚すり身 (かまぼこ原料として)

(2) 標準品

パラオキシ安息香酸 (以下、PHBA) イソブチル、PHBA イソプロピル、PHBA エチル、PHBA ブチル、PHBA プロピル、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)

2) 残留農薬

(1) 試料材料

玄米、精米、枝豆ペースト

(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 (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)、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)

2. 使用機器および測定条件

1) 食品添加物

1)-1 着色料

(1) 試料作製用使用機器

ロボ・クープブリークサー5プラス (容器容量: 3.5 L、以下ブリークサー) (エフ・エム・アイ)、ハンドミキサー NK-H3-P (ナショナル)

(2) 試料抽出用機器

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

(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 F254S: 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)

1)-2 保存料 (ソルビン酸)

(1) 試料作製用混合機

① 果実ペースト

ロボ・クープブリークサー5プラス (容器容量: 3.5 L、以下ブリークサー) (エフ・エム・アイ)、ハンドミキサー NK-H3-P (ナショナル)

② 魚肉練り製品

餅つき機 AFC-296 (東芝)、送風定温乾燥器 ウィンディオープン WFO-450SD (東京理化学器械)

(2) 試料抽出用機器

水蒸気蒸留装置 (前田製作所)

(3) 測定機器

高速液体クロマトグラフ (以下 HPLC): Prominence (島津製作所)

(4) 測定条件

カラム: Inertsil ODS-3V (内径 4.6 mm、長さ 150 及び 250 mm、粒子径 5 μ m)、移動相 (ソルビン酸): 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)、移動相: (ソルビン酸及びパラオキシ安息香酸 (以下、PHBA) エステル類): メタノール・水・0.2 mol/L リン酸緩衝液 (pH4.0) (2:17:1) 及びメタノール・水・0.2 mol/L リン酸緩衝液 (pH4.0) (14:5:1) によるグラジエント溶離、流速: 1.0 mL/min、カラム温度: 40°C、測定波長: 260 nm

2) 残留農薬

(1) 試料作製用使用機器及び器材

ブリークサー (エフ・エム・アイ)、ロックミキサー RM-10G (愛知電機)、遠心粉碎機 (Retsch)、分析粉碎器 R-8 (以下、小型粉碎器) (日本理化学器械)、減圧濃縮器 (東京理化学器械)、粉体攪拌用フラスコ (旭製作所)

(2) 試料抽出用機器

オムニミキサー (日本精機)、減圧濃縮器 (東京理化学器械)

(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 μ m)、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

3. 試料作製

1) 食品添加物

1)-1 着色料

(1) 果実ペースト

いちごペースト及びバナナペーストを用い、許可されているタール色素12色を添加し、それらが検出可能であることを確認した。また、冷蔵及び冷凍保存し、保存条件の影響についての確認を行った。

いちごペースト及びバナナペーストを用い、各々ハンドミキサーを用い均質化した。12色素液（水溶液、添加濃度各20 μ g/g）を加え、ハンドミキサーで混合した。各々200 gを量りとり、容器に入れ冷蔵及び冷凍した。

(2) 魚肉製品及び魚肉練り製品

① しんじょう及びかまぼこ

ブリグサーを用いてしんじょう及びかまぼこをペーストにした後、12色素液（水溶液、添加濃度各20 μ g/g）を添加し、よく混合した。各々200 gを量りとり、容器に入れ冷蔵及び冷凍した。

② 鮭フレーク

鮭フレークを量りとり、同量の12色素液（水溶液、色素濃度各20 μ g/mL）に一晩浸漬し、水揚げした後容器に分注し、冷蔵及び冷凍した。

1)-2 保存料

(1) 果実ペースト

いちごペースト及びバナナペーストを

用い、保存料各種を添加し、それらが定量用の調査試料として適用できるかを確認した。保存料として、ソルビン酸カリウム及びPHBAエステル類（PHBAイソブチル、PHBAイソプロピル、PHBAエチル、PHBAブチル及びPHBAプロピル）を用いた。また、冷蔵及び冷凍保存し、保存条件の影響について確認を行った。

いちごペースト及びバナナペーストを採取し、各々ハンドミキサーを用い均質化した。ソルビン酸及びPHBAエステル類（添加濃度：ソルビン酸カリウムとして各0.335 g/kg、ソルビン酸として各0.25 g/kg、PHBAエステル類各0.1 g/kg）を加え、ハンドミキサーで混合した。各々200 gを量りとり、容器に入れ冷蔵及び冷凍保存した。

(2) 魚肉練り製品

① しんじょう

ブリクサーを用いてしんじょうをペーストにした後、ソルビン酸（添加濃度：ソルビン酸カリウムとして各0.335 g/kg、ソルビン酸として各0.25 g/kg）を添加し、よく混合した。各々200 gを量りとり、容器に入れ冷蔵及び冷凍保存した。

② かまぼこ

餅つき機を用いて魚すり身（生）を混練した後、ソルビン酸（添加濃度：ソルビン酸カリウムとして各1.34 g/kg、ソルビン酸として各1 g/kg）を添加し、再び良く混練し、必要個数に分けた。このすり身について均一性を確認した後、餅つき機の「蒸し」機能またはウィンディーオープンにより、すり身を加熱してかまぼことし、それぞれチャック付ポリ袋に入れて冷蔵保存した。すり身の混合で

は1 kg及び3 kgに対してソルビン酸カリウムを添加し、餅つき機の混合による均一性を確認した。さらに、餅つき機の「蒸し」機能を利用してすり身を蒸した場合の一個体内のソルビン酸の分布、並びに、餅つき機内の配置位置による均一性を確認した。また、ウィンディーオープンでは、設定温度を110℃とし、合計20個のすり身をオープン内に配置し、加熱した時のソルビン酸の分布について検討した。

2) 残留農薬

(1) 玄米及び精米

①農薬添加玄米試料の均一化の検討

平成24年度において、以下の方法で作製した玄米試料を用い、10バッチの試料を合わせ、ロックミキサーを用いて混合し、混合毎に均一性試験を行った。なお、混合は合計3回行った。その後、更に遠心粉碎機を用いて再粉碎し、均一性試験を行った。

粉体攪拌用フラスコ(2 L容、以下、粉体フラスコ)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(ダイアジノン、クロルピリホス及びマラチオン10 $\mu\text{g/mL}$ 、フェニトロチオン20 $\mu\text{g/mL}$ 、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、24時間浸漬後、浸漬溶媒を減圧乾固し、さらに室温下で3日間乾燥し、小型粉碎を用いて粉碎後、均一性検討用試料(試料溶媒留去後理論値：ダイアジノン、クロルピリホス及びマラチオン0.1 $\mu\text{g/g}$ 、フェ

ニトロチオン0.2 $\mu\text{g/g}$)とした。作製した試料は、ジップロックに入れ、冷蔵保存(6~10℃)した。

②バッチ間の均一性の検討(精米)

粉体フラスコ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(ダイアジノン、クロルピリホス及びマラチオン10 $\mu\text{g/mL}$ 、フェニトロチオン20 $\mu\text{g/mL}$ 、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、精米600 gを量り入れ、同様に5分間、回転混合した後、以下、①玄米の均一性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作製試料とし(溶媒留去後理論値：ダイアジノン、クロルピリホス及びマラチオン0.1 $\mu\text{g/g}$ 、フェニトロチオン0.2 $\mu\text{g/g}$)、均一性試験を行った。更に遠心粉碎機を用いて再粉碎し、均一性試験を行った。なお、浸漬溶液を減圧乾固後、内容物を取り出した後の粉体フラスコ内壁面の残渣をヘキサン50 mLで5回洗い込み、これらを合わせて減圧濃縮し、10 mLとした溶液について、各農薬濃度を測定した。

(2) 枝豆

枝豆ペーストを用いて、標準液を均一に添加混合する条件として、水及び油分として大豆油を添加した試料材料に標準液を添加し、均一性を評価した。

ブrikサーを用いて均質化した枝豆ペースト2kgに、水を0%、5%、10%及び20%、ならびに大豆油を0%、2%、5%及び10%となるように各々添加後、更にブrikサーを用いて均質化した。これに添加用農薬混合標準液(ダイアジノン2

$\mu\text{g/mL}$ 、クロルピリホス $60\ \mu\text{g/mL}$ 、マラチオン及びフェニトロチオン $100\ \mu\text{g/mL}$ 、アセトン溶液) $10\ \text{mL}$ を正確に加え、更に、ブリクサーを用いて混合した。各々 $200\ \text{g}$ を量りとり、容器に入れ冷凍保存し、均一性検討用試料(理論値:ダイアジノン $0.01\ \mu\text{g/g}$ 、クロルピリホス $0.3\ \mu\text{g/g}$ 、マラチオン及びフェニトロチオン $0.5\ \mu\text{g/g}$)とした。また、同様に前処理をした枝豆ペーストに水 5% 、 10% 及び 20% 、ならびに大豆油を 2% 、 5% 及び 10% となるように各々添加後、添加用農薬混合標準液は添加せずに同様に操作し、得られた試料を、水 5% 、 10% 及び 20% 、及び油 2% 、 5% 及び 10% ブランク試料とした。

4. 試験方法

1) 食品添加物

1)-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 $20\ \text{g}$ をとり、 $50\ \text{mL}$ の水、 $50\text{v/v}\%$ 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 $20\ \text{mL}$ 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($\text{pH}3\sim 4$)とし、良く混和した。次にポリアミド $0.6\ \text{g}$ 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)及び水で洗った。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。残留物に水 $1\ \text{mL}$ 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 $1.5\ \text{cm}$ のところに、試料液及び定性用標準液($1000\ \mu\text{g/mL}$)を直径約 $3\ \text{mm}$ 以下になるように、 $1\ \text{cm}$ 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 $0.5\sim 1\ \text{cm}$ を展開溶媒に浸し展開した。展開終了後、試料液及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。

1)-2 保存料

測定操作は、「食品中の食品添加物分析法」食安基発0528第4号(平成22年5月28日)の別添2に準じた。

(1) 果実ペースト

冷蔵保存品は試料約 $15\ \text{g}$ を、冷凍保存品は試料約 $5\ \text{g}$ を精密に量り、それぞれ水 $150\ \text{mL}$ を加えて混和し、酒石酸溶液(15→100) $10\ \text{mL}$ 及び食塩 $80\ \text{g}$ を加えた。これを、毎分約 $5\sim 10\ \text{mL}$ の留出速度で水蒸気蒸留に付し、留液をとり $500\ \text{mL}$ とした後、HPLC(UV)で測定した。

(2) 魚肉練り製品

各試料について、しんじょう及びすり身はそのまま、すり身から加熱して作製したかまぼこは均質化した後、各々約 $5\ \text{g}$ を精密に量り、精製水約 $150\ \text{mL}$ を加えて混和した後、酒石酸溶液(15→100) $10\ \text{mL}$ 及び食塩 $80\ \text{g}$ を加えた。これを、

毎分約5~10 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。

2) 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。

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、アセトン100、50及び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℃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。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℃以下で酢酸エチル/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、玄米及び精米試料の測定においては、試料採取後、水20 mLを加え2時間膨潤させた後、アセトンによる抽出操作を行った。また、酢酸エチル/n-ヘキサンを留去後、以下の操作を行った。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、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、玄米及び精米中の各農薬の定量にはマトリックス添加検量線を、また枝豆中の定量には絶対検量線を用いた。

(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。実験者及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. 食品添加物

1) 着色料

新基材として、果実ペースト (いちご及びバナナ) を用いた試料中の着色料の定性試験用調査試料の作製を試みた。

許可されている酸性タール色素12物質を、それぞれの基材に加えて混合し、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、精製において基材の妨害を受けることなく、添加色素が正しく検出された。果実ペーストは、やや粘性が高く、混合が不完全となることが懸念されたが、n=5の試料いずれからも、同様の色調及び色度のスポットが得られた。

魚肉製品として、鮭フレークを検討した。鮭フレークは脂質が25~30%あり、アルミニウムレーキを用いた油性溶液による標準溶液添加の必要性が予測されたが、今回の水溶液での色素標準溶液の添加でも、色素が全体に浸透し、定性試験用試料として適用できると考えられた。

魚肉練り製品であるしんじょう及びかまぼこなどの高タンパク質食品からは、キサントゲン系色素がタンパクとの吸着により検出されにくい事例が知られているが、本研究での市販品への添加においては、抽出に特に問題はみられなかった。

2) 保存料

2)-1 果実ペースト

均一性試験は、作製後、冷蔵及び冷凍保存した各 10 容器につき $n=2$ でソルビン酸及び PHBA エステル類の濃度を測定した。その結果、いちごペースト及びバナナペーストとも、冷蔵保存条件時の PHBA エチルでは均一性が得られなかったが、その他の添加した保存料については、いずれも F 値が有意水準 5% 点である 3.020 未満となり、均一性が認められた (表 1、図 1~2)。しかし回収率において、PHBA エチルで全試料とも 50% 付近、また、冷蔵保存品における PHBA プロピルが約 60%、PHBA イソブチルが 80% 弱と、やや低かったため、冷凍保存品の前処理では、試料量を 15 g から 5 g へと変更して抽出した。その結果、PHBA プロピルは約 70%、PHBA イソブチルは約 90% と、ともに回収率が改善したが、PHBA エチルではほとんど変化がなかった。PHBA エチル及び PHBA プロピルの市場での使用実態がほとんど無い事、また、今回測定した回収率の観点から、これら 2 物質を除き、実試料化に向けては、ソルビン酸、PHBA イソプロピル、PHBA ブチル、PHBA イソブチルの 4 種の保存料を対象に、ペースト中の安定性を検討することで十分と考えられた。また、冷凍試料の外観において、凍結部

分と非凍結部分で斑になった。これは、試料の糖度が高いこと、また増粘剤の使用などが原因と考えられた。また、特に PHBA エステル類において、冷凍試料で F 値が 1 未満となる傾向が見られたことも、この凍結のばらつきにより、1 容器間で濃度差が大きくなったことが原因である可能性が考えられた。これらの事から、果実ペーストの保存条件は冷蔵とし、今後、長期保存安定性の確認が必要である。

2)-2 魚肉練り製品

① しんじょう

既に調査試料として実現化した大根漬けに続く固体試料として、市販品のしんじょうにソルビン酸カリウムを添加し、均一性を確認した (表 2)。その結果、冷蔵保存、冷凍保存のいずれにおいても均一性が得られたことから、実試料化が可能と考えられた。

② かまぼこ

餅つき機の混練機能を利用して、魚のすり身 (生) にソルビン酸カリウムを添加した。1 回の混練を、すり身 1 kg としたところ、均一性が確認できたため、3 kg と 1 回の混練の量を増やしたが、いずれにおいても餅つき機の混練機能により、すり身中のソルビン酸が均一となることが確認できた (表 3)。

次に、この均一となったすり身を用いて加熱工程の検討を行った。まず、餅つき機の「蒸し」機能を利用してかまぼこを作製し、ソルビン酸の均一性を確認した (表 4)。均一となったすり身を 3 つに分け、それぞれラップに包み、餅つき機の臼部に立てて配置し (図 3、A・B・C)、

約30分蒸してかまぼことした。この蒸し上がったかまぼこA、B、Cをそれぞれ個体ごとに6分割し（図4）、一個体内での均一性を確認した。その結果、A、B、Cそれぞれの個体内でのソルビン酸の分布にばらつきはなかったが、A、B、Cの3個体間（それぞれの分割部位1～6について、各n=2の平均値を1データとした）では、不均一であった。この時、A、B、Cそれぞれの上部だけの解析では、ばらつきは少なく、一方、蒸気接触が高いと考えられる下部についてはばらつきが大きく、均一性が得られなかった。このことから、蒸し位置によるすり身と蒸気接触の差異が不均一の原因と考えられたため、餅つき機の「蒸し」機能の利用は難しいと判断した。

そこで、ウィンディーオープンを用いて加熱し、かまぼこの作製を試みた。オープンで110℃に設定し、オープン付属の棚板に、チャック付袋20個に小分けしたすり身を直接設置した（図5(a)）が、約30分加熱後に、一部の袋で内圧が上がり破裂する現象が見られ、また、すり身の一部に棚板との接触部分に焦げ付きが発生した。そのため、全試料をオープンから出し、チャック付袋からすり身を取り出し、改めてサランラップに包み直した。また、焦げ付き防止のため、金属製金網カゴに載せ（図5(b)）、再び30分程度加熱してかまぼこを作製した。その結果を表5に、また分散分析結果を表6に示した。なお、下段の試料No. 6については、n=2測定のうち、1測定値が明らかに他より数値が低く、棄却検定を行った結果、有意差を認めため、試料No. 6の

測定結果を除外して分散分析を行った。その結果、下段についてのみ、均一性が得られたが、配置の前後の別や全試料での解析では均一性が得られず、全体的にばらついた結果となった。この原因としては、前述の通り、加熱中に包装や設置位置を変えたこと、また設置位置と加熱温度の違いなどが考えられる。したがって、今後は加熱容器の選別を含め、加熱条件及び試料数を増やし、再度、オープン内の温度分布等を検討することが必要である。

2. 残留農薬

平成24年度と同様にして調製した。10バッチの試料を合わせてロッキングミキサーを用いて混合し、混合毎に均一性試験を行った。混合は合計3回行ったところ、1回の混合でマラチオンを除く3種の農薬は均一となったが2回の混合においてもマラチオンは均一にならなかった。3回目の混合では、均一性を示すF値は有意水準5%点より小さくなったが、マラチオンを除く3農薬のF値は1を著しく下回り、容器内の濃度差が大きいことが示唆された（図6）。その後、更に遠心粉砕機を用いて再粉砕したところ、いずれの農薬においても良好な均一性が得られた（表7、図7）。小型粉砕器は、単に粉砕するのみで、フィルターを通さないため、粒子径にばらつきを生じる可能性がある。一方、再粉砕に用いた遠心粉砕機は、1.0 mmのフィルターを用いた遠心型の粉砕機であり、粒子径がある程度均一となる。本作製法では、農薬成分は主に米粒表面に吸着していると

考えられ、胚乳部までは浸透していない可能性が高い。そのため、より粒子径を小さくかつ均一にする必要があることが示唆された。

同様にして、精米についても農薬添加溶媒に浸漬後、浸漬溶媒を留去し、得られた精米を乾燥・粉砕する方法で、粉末試料を作製し、均一性試験を行ったところ、小型遠心器による粉砕では、均一性が得られなかった（表8）。そこで、ロッキングミキサーによる混合を行わず、遠心粉砕機による再粉砕を行ったところ、概ね良好な均一性が得られた（表8）。精米の作製は、浸漬溶液を減圧乾固する際、微細な粒子が内容物の突沸を招き、細心の注意が必要であったことから、実試料作製の上では、玄米試料の方が、減圧乾固の工程が扱いやすいと考えられた。

また、浸漬溶液を減圧乾固後、内容物を取り出した後の粉体プラスチック内壁面の残渣について、各農薬濃度を測定した結果、10個の粉体プラスチック間でばらつきはあったが、いずれの農薬も添加量の約5~7%が微細の粒子とともに粉体プラスチック内壁面に残留していた（表9）。今後、添加量を示す際、数値の取扱いを検討する必要がある。

以上のことから、農薬検査用調査試料として、固体試料である穀類の粉末試料は、遠心粉砕機を用いることで均一化が可能であり（表8）、これらの適用は大いに可能性があるが、上記の検討をする際、混合及び均一性試験を順次行ったため、約2か月の期間を要した。その間で、均一性を確保することはできたが、

一方で、回収率が玄米及び精米とも経時的にいずれの農薬も減少する傾向が見られた（表7~8、図6）。これは、玄米及び精米成分が影響している可能性があり、試料中酵素の不活化など、今後は粉末試料中における安定性確保の検討が必要である。

新たに枝豆を基材とした調査試料の作製では、従来の野菜ペーストと同様に、基材に農薬混合標準液を添加し混合（試料中添加濃度：ダイアジノン0.01 $\mu\text{g}/\text{g}$ 、クロルピリホス0.3 $\mu\text{g}/\text{g}$ 、及びマラチオン及びフェニトロチオン0.5 $\mu\text{g}/\text{g}$ ）したところ、いずれの農薬も均一性が得られなかった。そこで、基材に水分あるいは油分を添加し均質なペースト基材を作製後、農薬混合標準液を添加する方法を検討した。

その結果、水分添加においては、0%、5%、10%及び20%の含量で作製したところ、0%ではF値がクロルピリホスの1.889を除き、いずれの農薬も約3.4から5.1と大きい値を示したが、5%~20%の水を添加することで、F値は、いずれの農薬も有意水準5%点より小さくなり、均一性が得られた。回収率や相対標準偏差などを考慮すると、水分添加濃度は10%が適切であると考えられた（図8）。

油分添加においては、0%、2%、5%及び10%の含量で作製したところ、0%では上述のとおりF値がクロルピリホスを除き、いずれの農薬も有意水準5%点より大きい値を示したが、2%~10%の油分（大豆油）を添加することで、F値は、いずれの農薬も有意水準5%点より

小さくなり、均一性が得られた。回収率や相対標準偏差などを考慮すると、油分添加濃度は2%~10%が適切であると考えられた(図9)。なお、水分あるいは油分をそれぞれの濃度に応じて添加したブランク試料について、得られたクロマトグラムでは、いずれの添加農薬の測定にも影響を及ぼす因子はなかった。

水分あるいは油分の添加が枝豆ペーストに農薬を均一に混合する際有効であることが示唆され、今後、これらの冷凍保存安定性及び凍結融解安定性を検討する必要がある。

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及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. 食品添加物

1) 着色料

新基材として、果実ペースト、魚肉製品(鮭フレーク)及び魚肉練り製品(しんじょう、かまぼこ)を用いた定性検査用調査試料の作製を検討した。その結果、固体・半固体試料として、いずれの基材も適用できることが示唆された。高タンパク質食品あるいは高脂質食品を想定した調査試料として、今年度検討した基材はいずれも有効であると考えられた。

2) 保存料

2)-1 果実ペースト

果実ペーストを基材として、ソルビン酸及びPHBAエステル類の添加試料作製を試みた。その結果、外観及び均一性試験の結果から、保存条件は冷蔵保存が適していると判断した。また、市場での使用実態及び今回の得られた回収率の観点から、ソルビン酸、PHBA イソプロピル、PHBA ブチル、PHBA イソブチルの4種の保存料について調査試料の添加が期待できるため、今後は、実試料配布に向けての冷蔵保存での長期保存安定性を検討する必要がある。

2)-2 魚肉練り製品

①しんじょう

基材として市販のしんじょうへの添加試料を作製したところ、冷蔵保存、冷凍保存のいずれにおいても良好な均一性が得られた。今後は、実試料配布を考え、冷凍保存条件での長期保存安定性及び凍結融解安定性について、検討する必要がある。

②かまぼこ

基材として市販の魚のすり身(生)へ添加し、それを加熱して試料を作製した。加熱前は均一性があることは確認できたが、今回の加熱方法では、加熱後の均一性が得られていない。そのため、今後は加熱時の容器等も含め、再度、加熱条件について検討する必要がある。

2. 残留農薬

新たに、固体試料である穀類の粉末試料を基材として、玄米及び精米の適用の可能性を検討した。その結果、玄米あるいは精米を粉体フラスコ中で農薬添加溶媒(酢酸エチル溶液)に浸漬後、浸漬溶

媒を留去し、得られた米を乾燥・遠心粉砕することで作製する方法により、良好な均一性が得られることが明らかとなったが、安定性は、作製後数か月で、約10～20%の農薬濃度の減少が予測され、今後は、安定性を確保する方法の検討が必要である。固体試料での長期安定性が確保できれば、今後は内部精度管理用試料としての適用も可能と考える。

また、野菜ペーストとして枝豆を基材として試料作製を試みた結果、水分あるいは油分を適宜添加し均質な基材とした後、農薬を添加混合することで、良好な均一性が得られた。

実試料化に向けて、今後は、さらに冷凍保存安定性及び凍結融解安定性の確認が必要である。

3. その他
なし

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

渡辺卓穂、高坂典子、鈴木達也、小島幸一：食品衛生外部精度管理調査のための残留動物用医薬品調査試料の作製検討について：日本食品化学学会第19回総会・学術大会, 名古屋, 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