

201327001B

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23年度～平成25年度
総合研究報告書

一般財団法人 食品薬品安全センター秦野研究所

主任研究者 小島幸一

平成26年(2014年)5月

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23年度～平成25年度
総合研究報告書

一般財団法人 食品薬品安全センター秦野研究所
主任研究者 小 島 幸 一

平成26年(2014年)5月

目 次

I. 総合研究報告	
検査機関の信頼性確保に関する研究	1
小島 幸一	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	75
III. 研究成果の刊行物・別刷	83

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 23 年度～平成 25 年度

総合研究報告書

主任研究者 小島 幸一

平成 26 年（2014 年）5 月

総合研究報告書

検査機関の信頼性確保に関する研究

主任研究者 小島 幸一 一般財団法人食品薬品安全センター 秦野研究所 所長

研究要旨

輸入食品の急増や国内での流通食品の増加により、種々の食品を対象とした食品衛生検査が実施されている。食品の安全性を確保するためには、残留農薬、病原微生物、動物用医薬品、遺伝子組み換え食品、アレルギー性物質、貝毒などの汚染物質を含む多くの検査項目についてどの検査機関で実施しても同等の結果が得られることが必要である。そのためには、検査結果の信頼性を確保する必要性があり、このひとつとして精度管理が挙げられる。特に外部精度管理は、共通試料を各検査機関に配布した後、各検査機関で検査を実施し、この結果を集めて解析することにより、評価を行う。そのため、共通試料として用いる外部精度管理調査試料における均一性や安定性の担保、さらにはより実際の食材に近い調査試料の提供が求められる。すなわち、精度管理実施体制の整備や適正な精度管理用調査試料の開発と、これに付随した精度管理の実施は、検査機関における検査精度の確認や信頼性の確保に大きな役割を果たすこととなり、結果として食品の安心・安全の確保に対して大きく貢献するものとする。ここでは、平成23年度から平成25年度までの3年間に実施した以下の6研究課題、1. 加工食品中の残留農薬分析及び放射線照射検知の精度管理体制の構築に関する研究（尾花分担研究）、2. 食品中に残留するマイコトキシン分析に関する精度管理体制の構築に関する研究（中澤・斉藤分担研究）、3. 食品中に含まれる残留有害物質のうち低い安全性基準値の検査方法と精度管理体制の構築に関する研究（斉藤分担研究）、4. 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（村山分担研究）、5. 外部精度管理調査試料の高信頼性分析に関する研究（鎗田分担研究）、6. 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（渡辺分担研究）について報告した。

分担研究者名＝尾花裕孝（大阪府立公衆衛生研究所衛生化学部長）、斉藤貢一（星薬科大学教授）、中澤裕之（星薬科大学教授）、村山三徳（(公社)日本食品衛生協会食品衛生研究所化学試験部第一課長）、鎗田孝（(独)産業技術総合研究所上級主任研究員）、渡辺卓穂（(一財)食品薬品安全センター秦野研究所食品衛生事業部長）

A. 研究目的

ヒトの健康に悪影響を与える恐れのある様々な有害物質等を行政検査により検査、確認して国民の食生活に安全と安心を提供することは国民に対する食品安全確認行政の重要な課題である。その一貫として食品衛生に関わる検査施設の検査精度や検査成績の信頼性を確保することは必要不可欠である。特に食品衛生検査機関から提出される検査成績の信頼性を確保するためには、継続的にその検査精度を確認することが求められる。精度管理体制の充実を図ることは極めて重要であり、加えて農薬のポジティブリスト制の導入、残留農薬検査における試験法の妥当性確認ガイドラインが設定されるなど、一層の体制強化が求められている。

食品衛生法の一部改正に伴い導入された食品衛生検査機関に対する理化学的検査ならびに微生物学的検査の精度管理調査について、その進め方や得られた結果の基本的な評価方法を構築してきたが、いまだ十分とはいえず、とりわけ新規項目の検討や新規基材の選択と高品質な調査試料の作製などについては、継続した検討が必要である。

組換え DNA 技術応用食品検査では、標準品を持たない組換え DNA 技術応用食品も検出されており、標準プラスミドや組換えタンパク質を代用品とした検査法も導入されてきている。また、アレルギー関連物質検査についても 7 品目が指定されており、精度管理調査もさらに充実を図る必要がある。これらに加えて食品中に含まれる微量有害物質（マイコトキシン等）の分析法については、検査結果のばらつきを抑えることにより、その結果が信頼性の高いものとなる

ことに加え、国際的にも優れた水準の精度管理に関する検討と精度管理体制の構築が期待される。さらには、これらの検査対象物質を定量するにあたり、複雑な食品マトリックスの影響をどのように評価するかは、より正確な検査結果を得るうえでも非常に重要である。一方で、不確かさをより小さくする同位体希釈質量分析法による付与値の決定も必要となる。また、加工食品の安全性について社会的関心が高い中で、原材料の放射線照射の検知の有無を確実にする精度管理体制の強化も必要となる。

食品衛生検査に関わる精度管理体制の構築は、食品の広範囲な流通により国内外を問わず、その分析精度を確認するうえでますます重要な課題として認識されている。食品衛生検査に関わる精度管理用調査試料の作製に加えて、アレルギー物質検査ならびに組換え DNA 技術応用食品検査における精度管理体制の構築、加工食品の原材料に対する放射線照射の検知及びマイコトキシンの分析法と精度管理体制の整備については、信頼性確保の面からも急務である。

これらの検討結果は、精度管理システムの整備ならびに精度管理のための適正調査試料の作製検討とその提供に生かされ、食品衛生に関する検査機関から提出される検査成績の信頼性確保を一層充実させ、円滑な行政活動に資することが当研究班の目的である。

B. 研究方法

1 加工食品中の残留農薬分析及び放射線照射検知の精度管理体制の構築に関する研究（尾花分担研究）

大阪府立公衆衛生研究所において、精度

管理試料を調製し、協力機関へ配布して得られたデータを解析した。精度管理試験に参画した協力機関は、岩手県環境保健研究センター、愛知県衛生研究所、奈良県保健環境研究センター、堺市衛生研究所、和歌山県環境衛生研究センター、広島市衛生研究所、高知県衛生研究所（以上平成 23～25 年度）及び北九州市環境科学研究所（平成 23 年度）の 8 機関であった。大阪府立大学（平成 24、25 年度）は放射線照射施設の提供機関として参画した。

平成 23 年度は、加工食品の残留農薬分析における分析機器の再現性試験、外部精度管理試験及び基準適合性の判定の 3 試験を実施した。試験対象項目として、プロポキスル、カルバリル、ピリミカブ、フェノブカルブ、ジエトフェンカルブ、イソプロチオラン、プロピザミド、イソキサチオン及びチオベンカルブの 9 農薬を選択した。

測定機器は、タンデム型質量分析器付き液体クロマトグラフィー（LC-MS/MS）とした。再現性試験は、混合標準溶液を 5 回連続で測定し、ピーク面積比及びその平均値、標準偏差、変動係数並びに Z スコアを算出した。また、精度管理試料由来のマトリックス効果を検討するため、標準溶液のピーク面積に対するマトリックス標準溶液のピーク面積比率を算出し、使用する LC-MS/MS の分析精度及び真度、精度に及ぼすマトリックスの影響を評価した。

外部精度管理試験は、大豆、トマト、ロースハムを混合したポークビーンズとし、これを細切均一化した精度管理試料及び分別した原材料の分析精度を検討し、分別の手法が分析精度に及ぼす影響を評価した。農薬を添加する原材料は大豆（アグリシス

テム）とし、ポークビーンズは大豆 120 g、トマトピューレ（カゴメ：生鮮トマトを 3 倍濃縮）120 g 及び約 5 mm 角に細切したロースハム（伊藤ハム）12 g を混合して調製した。大豆への添加は、あらかじめ 100℃ で 24 時間乾燥させた大豆 2620 g を、農薬混合水溶液（各 0.1 ppm：10%アセトン水）10.8 L に冷蔵庫内で 72 時間浸漬して行った。基準適合性の判定は、外部精度管理試験で得た測定値を基に、法令に定める残留基準に照らして食品規格への適否を判定し、判定に及ぼす分別の手法の影響を評価した。

外部精度管理試験に用いた分析法は自由とした。抽出溶媒としてアセトニトリル+ヘキサンを用いたのは 2 機関、アセトニトリルは 7 機関であった。脱脂及び精製は、アセトニトリル-ヘキサン分配+C18+GCB/PSA は 1 機関、アセトニトリル-ヘキサン分配+C18+PSA は 1 機関、C18+GCB/PSA は 4 機関（1 機関はトマトピューレのみ GCB/PSA）、C18+PSA は 1 機関、GCB/NH₂ は 1 機関、ゲル浸透クロマトグラフィー（GPC）+シリカゲル+PSA は 1 機関が用いた。また、付与値決定のためにカルバリル-d7、フェノブカルブ-d3、イソキサチオン-d10 及びチオベンカルブ-d10 を使用した。

協力機関は、添加試料 1 容器の全量を採取し細切均一化した場合と、大豆、トマトを分別し細切均一化した場合の 2 例で、併行数を 5 として測定対象項目を測定した。各分析値は全量の場合は一律基準値、分別した場合は加工係数を乗じて大豆及びトマトにおける残留基準値と比較し、食品規格への適否を判定した。

試験結果の評価として、報告された測定値から、添加農薬の検出の有無、測定値の

平均値、平均回収率、標準偏差、変動係数、最大値、最小値、範囲及びZスコアを算出した。報告された分析値及び判定は、付与値に基づく判定との相違を比較した。平均回収率及び範囲は、Xbar-R 管理図を用いて、真度及び併行精度の評価を行った。Xbar 管理図において真度の適正域は、「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン」（平成 22 年 12 月 24 日付け食安発 1224 第 1 号）で、添加濃度に対する目標値とされる 70~120%を準用し、その管理限界線を下部管理限界（LCL）は 70%、上部管理限界（UCL）は 120%とした。R 管理図において併行精度の適正域は、その管理限界線を UCL は併行数 5 での管理図用係数 2.114 とした。Z スコアは、 $|Z| < 2$ を相対的な精度において良好と判断した。また、変動係数は 10%以内を良好と判断した。

平成 24 年度以降は加工食品中の放射線照射検知について実施した。平成 24 年度には 2-アルキルシクロブタノンの検知法を新たに開発し、協力機関において添加回収試験を実施した。この方法は通知試験法と比較して大幅に簡易・迅速化が実現でき、照射検知指標物質である 2-アルキルシクロブタノン類として 2-ドデシルシクロブタノン (2-DCB) 及び 2-テトラデシルシクロブタノン (2-TCB) を測定できた。試験法の概要は以下の通りとした。粉碎した試料をケイソウ土と混合してヘキサンで脂質を抽出し、濃縮後にアセトン/アセトニトリルに溶解して冷凍庫で放置し、脂質の大半を不溶状態にして遠心分離した。次に上清を濃縮後ヘキサンに溶解し、パストゥールピペットを利用したシリカゲルミニカラムで精製し、内部標準として 2-シクロヘキシルシクロヘキ

サノンを加えて質量分析器付きガスクロマトグラフ (GC-MS) で測定した。

精度管理試験に用いる試料として、平成 24 年度はハンバーグパテを、平成 25 年度はピーナッツバター、チーズ及びスモークサーモンを用いた。この他に平成 25 年度には常温長期保存試験を実施し、試料としてレトルト牛丼を使用した。これら試料の一部は、大阪府立大学の照射施設においてコバルト線源を用いてガンマ線照射を行った。照射線量の測定は試料間に挿入した複数のラジオクロミックフィルム (FWT 社製、FWT-60-1P) から算出した。平成 24 年度のハンバーグパテは非照射群 (黄)、低線量照射群 (赤 : 0.8 kGy)、高線量照射群 (青 : 2.0 kGy) の 3 種類を調製した。各試料には食用色素を加え、色調が均一になるまで混合したのち分割した。一元配置の分散分析により試料の均一性を確認した後に配布した。平成 25 年度はスモークサーモンを非照射試料、ピーナッツバター (1.2 kGy) と粉チーズ (1.6 kGy) を照射試料としてそれぞれ混合、分割して配布した。これらの精度管理試料は調製した後、協力機関へ発送するまで -20℃で保管した。なお、試料発送前と試験期間終了時に 2-DCB 及び 2-TCB 濃度を測定した。レトルト牛丼の一部は、平成 25 年の試験実施期間において照射後 8~10 ヶ月となるよう、平成 24 年 12 月に常温条件下でガンマ線照射を行った。照射の判別のため、照射レトルト牛丼 (2.7 kGy) には青シール、非照射レトルト牛丼には赤シールをそれぞれ貼付し、分析に使用するまで室温で保管した。

協力機関は平成 24 年度に添加回収試験を実施した。すなわち、抽出した脂質 0.2 g

に対して 50 ng/g となるよう 2-DCB 及び 2-TCB を添加し、併行数を 5 として GC-MS で測定し、回収率、標準偏差、変動係数を求めた。平成 24、25 年度には配布した外部精度管理試料 3 種をそれぞれ併行数 5 で測定し、脂肪当たり濃度、標準偏差、変動係数、範囲を求めた。各機関へは照射履歴、照射線量、アルキルシクロブタノン濃度等は示さず、ブラインド試験とした。平成 25 年度に実施した常温長期保存試験では、2 種類のレトルト牛丼を分析し、照射履歴の判定を行った。照射履歴の判定は厚生労働省通知試験法に準じて以下の判定項目を設定し、全てを満たす場合に陽性と判定した。

- (1) 標準溶液と同じ保持時間に、 m/z 98 及び m/z 112 に S/N 比 3 以上のピークを認める。
- (2) m/z 98 及び m/z 112 で観測されるピーク面積の比は、 m/z 98 において近似した面積を与える検量線用標準溶液ピークから得られる m/z 98 及び m/z 112 のピーク面積比の $\pm 20\%$ 以内である。
- (3) 保持時間付近で m/z 95 から m/z 115 の範囲でスキャン測定を行うとき、 m/z 98 及び m/z 112 が主要イオンである。
- (4) 上記 1 から 3 の項目を満たした場合の定量値が検量線用標準溶液の S/N 比 3 から求めた濃度以上である。

試験結果の評価として、各機関から報告された値について、基本統計量の算出を行い、外部精度管理試験においては度数分布表と \bar{X} -R 管理図の作成を行った。外部精度管理試験の目標値は中央値とし、報告値を昇順にした際の 4 番目、5 番目の平均値を使用した。 \bar{X} 管理図において真度の適正域は、「食品中に残留する農薬等に関する

試験法の妥当性評価ガイドライン」(平成 22 年 12 月 24 日付け食安発 1224 第 1 号)で、添加濃度に対する目標値とされる 70~120%を準用し、LCL は 70%、UCL は 120%として、この区域内を良好と判定した。R 管理図では管理限界の為の係数を $n=5$ の 2.114 とし、UCL を設定した。なお、これらの数値の計算には Microsoft Excel を使用した。

2 食品中に残留するマイコトキシンに関する精度管理体制の構築に関する研究(中澤・斉藤分担研究)

平成 23 年度は平成 14 年~20 年度にかけて農林水産省が行った「国産穀類中のかび毒含有実態調査」を基にして、これらの中から特に小麦(玄麦)と大麦(玄麦)中のデオキシニバレノール(DON)に関する平成 20 年度までの 7 年間分の調査結果を抜粋・統合して一覧表を作成し、データの再解析を行った。

平成 24 年度は、DON スクリーニング法として ELISA に着目し、DON 測定用 ELISA キットの選定を行った。ELISA には、市販キット『DON』(フロンティア研究所)及び『RIDASCREEN® DON』(R-Biopharm 社)を用いた。いずれの ELISA キットも、測定原理は抗 DON モノクローナル抗体を用いた直接競合法である。

前処理(抽出・クリーンアップ)の検討では、ビール 10 mL にハイフロスーパーセル 2 g、アセトニトリル 40 mL を加え、1 時間混合した。その後、減圧ろ過を行い、ろ液を濃縮乾固した。アセトニトリルと水の混合溶液(84 : 16) 10 mL で残留物を再溶解し、クリーンアップ用多機能カラム

MycoSep®#227 を用いて精製し、ELISA 用の試験溶液とした。GC/MS 法に供する際には、以下のようにトリメチルシリル (TMS) 化を行った。

上記の試験溶液から 1 mL を分取し、内標準物質 (IS) として 500 ppb の $^{13}\text{C}_{15}$ -DON を 200 μL 添加し、窒素乾固した。残留物に TMS 誘導体化試薬 (BSTFA : TMCS : TMSI = 3 : 2 : 3) 100 μL を加え、80°C で 1 時間反応させて TMS 化を行った。その後、ヘキサン 1000 μL と水 750 μL を加えて振とう抽出し、ヘキサン層を GC/MS 法の試験溶液とした。) GC/MS 法には Agilent 社製 GC6890 及び 5973MSD を使用した。GC カラムには DB-5MS (Agilent 社 ; 30 m \times 0.25 mm I. D. , 0.25 μm) を用い、昇温プログラムは 40°C (1 min) \rightarrow 20°C/min \rightarrow 280°C (3 min) \rightarrow 20°C/min \rightarrow 300°C (5 min) とした。DON の定量イオンを m/z 235、確認イオンを m/z 512、及び IS の定量用イオンを m/z 304 と設定し、SIM モードにて検出した。また、真度、併行精度、室内再現精度及び室間再現精度など分析法バリデーションを行うために、市販のビールを対象として添加回収試験を行った。抽出・クリーンアップ操作は上記前処理法に準じて行った。DON 添加濃度は高濃度 (100 ng/mL) 及び低濃度 (10 ng/mL) とし、真度、併行精度、室内再現精度を評価するために、一日に 2 回測定を併行して繰り返し、これを 5 日間行って得られたデータを一元配置分散分析法で統計解析した。

平成 25 年度は、室間再現精度を評価するために、同様に市販のビールに DON を添加した精度管理用標準試料 (高濃度試料 (100 ng/mL) 及び低濃度試料 (10 ng/mL)) を作製し、外部精度管理実験に参加する検査機

関には濃度を伏せた状態で (サンプル A 及びサンプル B として) 送付した。また、抽出・クリーンアップ操作は指定の方法とし、実験に必要なクリーンアップ用多機能カラム MycoSep®#227 及びハイフロスーパーセルも ELISA キット及び標準試料と共に各検査機関に配布した。なお、前処理による試料精製の有無による ELISA 測定への影響を調べるために、上記の前処理を行わずに、試料を水で希釈したものを直接 ELISA で測定する実験も並行して行うこととした。

3 食品中に含まれる残留有害物質のうち低い安全性基準値の検査方法と精度管理体制の構築に関する研究 (齊藤分担研究)

平成 23 年度は、簡便でフィールドで使える ELISA の開発を行った。シクロピアゾン酸 (CPA) に対するウサギポリクローナル抗体の作製は、W.Yu らの方法に準じて行った。すなわち、CPA と活性化 Keyhole limpet hemocyanin (KLH) とを反応させて CPA ポリクローナル抗体作製用の抗原 (CPA-KLH) を調製し、ウサギに Freund's Complete Adjuvant や Freund's Incomplete Adjuvant と等量混和したエマルジョンを数回投与した。その後、抗体価の上昇を ELISA にて確認し、抗 CPA 抗体として血清を得た。

CPA-KLH conjugate (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Carbonate Buffer pH8.5) 50 μL をマイクロプレートに加え、2 時間放置して固相化を行った。1% スキムミルク-PBS を 360 μL 加え、1 時間放置してブロッキングを行った後、0.02% Tween-20-PBS で 3 回洗浄を行い、CPA 測定用 ELISA プレートを作製した。ELISA プレートに希釈系列を 50 μL 及び第一抗体 (CPA ウサギ抗血清) を 100 μL 加え、1 時

間反応させた。希釈系列は、CPA 標準品 1000 ng/mL を調製し、この液を、適宜 PBS で希釈したものと、ブランクとしての PBS の、計 8 種類を用いた。反応後、B/F 分離を行い、第二抗体 (Anti Rabbit IgG(H+L)、HRP conjugate) を 100 μ L 加え 1 時間放置し、ウェルに結合した第一抗体に第二抗体を反応させた。その後、再び B/F 分離を行い、テトラメチルベンチジン (TMB) 100 μ L を加え、10 分間放置して発色させた後、1 N 硫酸 100 μ L を加え反応を停止し、直ちにプレートリーダーを用いて波長 450 nm で測定した。

試料として液状調味料(めんつゆ)を用いた。試料のクリーンアップとしては、①原液の希釈のみ、②液液抽出及び③液液抽出+固相抽出の 3 種類の手法をそれぞれ行った。原液の希釈は PBS で行い、また液液抽出では試料 5 mL の pH を 1N NaOH で 9.0 に調整し、精製水で 10 mL にメスアップし NaCl 5 g を加えた。酢酸エチル 10 mL を加えて振とう抽出し、5°C、10000 g で 5 分間遠心分離し、上清を回収した。この操作を 3 回繰り返す、合わせた上清を減圧濃縮により溶媒除去し、1%メタノールで再溶解した。固相抽出では、前記の 1%メタノールで再溶解したものを Oasis HLB カートリッジ (1 cc) を用いて固相抽出し、再び減圧濃縮により溶媒除去し、1%メタノール-PBS の混液で再溶解したものを測定用試料とした。

真度、併行精度及び室内再現精度など分析法バリデーションのために添加回収試験を行った。液状調味料としての原液を PBS で 10 倍希釈したものを測定用試料とした。CPA 添加濃度は 1000 ng/mL とし、一日に 2 回測定を併行して繰り返し、これを 5 日間行

って得られたデータを一元配置法で統計解析した。

平成 24 年度は、抽出・前処理方法を検討し、分析法バリデーションとして、精度管理のための併行再現精度及び室内再現精度について ELISA と LC-UV 法を併用して比較検討した。また、ELISA については、CPA conjugate を独自に調製し、市販品と性能比較も行った。すなわち、CPA のウサギポリクローナル抗体は、フロンティアサイエンス社から購入した。CPA conjugate は以下のように作製した； アセトン 0.25mL に CPA 2.5mg を溶解し、1,1-カルボニルジイミダゾール 2.5mL を加え、室温で 1 時間反応させた。その後、精製水 0.2 mL を加えて反応を停止させた。次に 0.1 M の炭酸水素ナトリウム溶液 0.5 mL で溶解したポリリジン 2.5 mg を加え、4°C で 24 時間攪拌した。その後、0.1M の PBS (pH 7.2) で 24 時間透析した後、1 mg/mL になるよう PBS で希釈・調製した。また、市販 CPA conjugate との比較検討を行った。CPA-ポリリジン conjugate (1 μ g/ml Carbonate Buffer pH8.5) 100 μ L をグライナー社製マイクロプレートに加え、2 時間放置して固相化を行った。1%スキムミルク-PBS を 360 μ L 加え、1 時間放置してブロッキングを行った後、0.02% Tween20-PBS で 3 回洗浄を行い、CPA 測定用 ELISA プレートを調製した。希釈系列は、CPA 標準品 1000 ng/mL を調製し、この液を、適宜 PBS で希釈 (1~1000 ng/mL) したものと、ブランクとしての PBS の、計 8 種類を用いた。ELISA プレートに希釈系列を 50 μ L 加え、続いて第一抗体 (CPA ウサギ抗血清 : 25000 倍希釈) を 100 μ L 加え、1 時間反応させた。反応後、B/F

分離を行い、第二抗体 (Anti Rabbit IgG(H+L)、HRP conjugate : 6000 倍希釈) を 100 μ L 加えて 1 時間放置し、ウェルに結合した第一抗体に第二抗体を反応させた。その後、再び B/F 分離を行い、TMB 100 μ L を加え、15 分間放置して発色させた後、1 N 硫酸 100 μ L を加えて反応を停止し、直ちにプレートリーダーを用いて波長 450 nm (リファレンス波長 590 nm) で吸光度を測定した。

LC 装置は、日立社製 655A-12 (HITACHI L-500 LC Controller 付き) を、検出器は島津製作所製 SPD-6AV を用い、測定波長は 220 nm とした。LC カラムには、DIONEX 社製 Acclaim[®] Mixed-Mode WAX-1 (4.6 mm i. d. \times 150 mm, 5 μ m) を用い、移動相にはアセトニトリル : 25 mM リン酸緩衝液 (pH6.0) = (7 : 3) を用いた。カラム温度は 40 $^{\circ}$ C、移動相流速は 1 mL/min とし、試料注入量は 20 μ L とした。

食品試料には、*Aspergillus* 属や *Penicillium* 属などのカビによる汚染が考えられるピーナッツを選択した。試料調製操作手順としては、抽出に高速溶媒抽出法 (ASE) を採用し、装置には DIONEX 社製 ASE-300 を用いた。ASE 用の抽出セル (33 mL 容) の底部に円筒ろ紙を挿入し、ハイフロースーパーセル (珪藻土) 約 1 g を積層した後、予めミルで粉碎した試料 2.5 g にハイフロースーパーセル 3.0 g を加えて混和したものを充填した。さらに、ハイフロースーパーセルを抽出セルの入り口部分まで満たし、ASE-300 に設置した。ASE 操作条件は、抽出溶媒 50% メタノール、抽出温度 25 $^{\circ}$ C (室温)、圧力 1500 psi とし、抽出サイクル 1 回とした。得られた抽出液を減圧下で乾固し、1 %

メタノール 1 mL で再溶解したものを固相分散抽出法 (SPDE) でクリーンアップした。SPDE の操作手順は以下に従った。SPDE の固相には Waters 社製 Oasis[®] HLB (30 mg) を用い、キャップチューブ内で分散後、@ろ過フィルター[™] でろ過 (2500 g, 10 sec) し、精製水で洗浄 (1 mL \times 3) 後、メタノールで溶出 (1 mL \times 3) した。この溶出液を減圧下で乾固した後、1 % メタノールで 1 mL に定容し、試験溶液とした。

真度、併行精度及び室内再現精度など分析法バリデーションのために添加回収試験を行った。食品試料には、ピーナッツを選択し、試料溶液の調製に従って調製した原液及び PBS で適宜希釈したものを測定用試料とし、ELISA 及び LC-UV を用いて測定した。CPA 添加濃度は 10 μ g/g とし、一日に 2 回測定を併行して繰り返し、これを 6 日間行って得られたデータを一元配置法で統計解析した。

4 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 (村山分担研究)

クロルピリホス、フルトラニル、マラチオンの定量に用いた試料として、測定対象農薬が残留していない冷凍ほうれんそうを用いた。ガスクロマトグラフ質量分析計 (QP2010Plus) は島津製作所製を用いた。カラムは DB-5MS (0.25 mm ϕ \times 30 m, 膜厚 0.25 μ m (Agilent J&W 製)) を使用した。また、クロルピリホス個別試験法には炎光度検出器付きガスクロマトグラフ (GC-2010) (島津製作所製) を用いた。カラムには DB-5 (0.53 mm ϕ \times 10 mm, 膜厚 1.5 μ m (Agilent J&W 製)) を使用した。

試験法は GC/MS による農薬等の一斉試験法（農産物）、厚生労働省通知法を用いた。すなわち、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 及び 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及びトルエン (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、アセトニトリル及びトルエン (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、アセトニトリル及びトルエン (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。残留物をアセトン及び 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。

クロルピリホス個別試験法は以下の操作法に従った。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。酢酸エチル及び 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、酢酸エチル及び n-ヘキサンの層を 300 mL の三角フラスコに移した。水層に酢酸エチル及び n-ヘキサン (1 : 4) 混液 50 mL を加え、上記と同様に操作して、酢酸エチル及び 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 以下で酢酸エチル及び n-ヘキサンを除去した。この残留物にアセトン及び 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用シリカゲル (粒径 63~200 μ m) 5 g をアセトン及び 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及び n-ヘキサン (1 : 1) 混液が残る程度までアセトン及び 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、アセトン及び 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℃以下でアセトン及び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。

サイクラミン酸の定量にはサイクラミン酸を含まない粉末食品を用いた。LC/MSによるサイクラミン酸の定量にはAgilent製液体クロマトグラフ質量分析計6460 Triple Quad LC/MSを用いた。また、HPLC-UV測定では島津製作所製LC-20A Seriesを用いた。LC/MSによるサイクラミン酸の定量は第2版食品中の食品添加物分析法2000変法に従った。すなわち、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(3000 rpm 5分間)後、上澄液を試験溶液とした。HPLC-UVによるサイクラミン酸の定量は第2版食品中の食品添加物分析法2000に従った。すなわち、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、遠心分離(3000 rpm 5分間)した。あらかじめメタノール10 mL及び蒸留水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→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

及び正確に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。

また、マラカイトグリーン(MG)及びロイコマラカイトグリーン(LMG)への食品添加物の影響は、0.2%亜硫酸水素ナトリウム及び0.2%過酸化水素水溶液をそれぞれ添加して混和後、LC/MSで変化を調べた。

5 外部精度管理調査試料の高信頼性分析に関する研究(鎗田分担研究)

平成17年1月24日付け食安発第0124001号の通知試験法(一斉試験法)をベースとした同位体希釈質量分析法(IDMS)の精確さの評価として、外部精度管理調査試料の基材(検討中を含む)を用いた添加回収試験を行った。測定対象農薬とその標識体のピーク面積比の変動を基に、IDMSの精確さの評価とともに、マトリックス効果の影響も評価した。また、実際の外部精度管理調査試料の分析として、前述の分析法と、別途妥当性を評価した分析法(食安発第0124001号の通知試験法(個別試験法)をベースとしたIDMS法)によって、平成25年度に実施した残留農薬検査Iの調査試料を分析し、その結果を参照値や参加機関の結果と比較した。

試料は、外部精度管理調査試料の基材(検討中を含む)であるとうもろこしペースト、にんじんペースト、枝豆ペースト、かぼちゃペーストと、平成25年度外部精度管理調査(残留農薬検査I)の調査試料

であるとうもろこしペーストは、食品薬品安全センター秦野研究所より提供された。

IDMS の精確さ評価用として、9 種類の分析対象農薬及びその標識体を、各々の濃度が $5.68 \mu\text{g/g}$ となるようにアセトン (Ac) に希釈し、試料添加溶液とした。また、アラクロール $0.238 \mu\text{g/g}$ を含む Ac 溶液を調製し、シリンジスパイク溶液とした。次に、試料添加溶液とシリンジスパイク溶液を混合することにより、測定対象農薬及びその標識体各 $1.25 \mu\text{g/g}$ 、アラクロール $0.186 \mu\text{g/g}$ を含む校正標準液 (マトリックス無) を調製した。さらに、後述の分析法 1 によって検討基材を前処理して調製したブランク溶液を、窒素気流で濃縮した後に校正標準液 (マトリックス無) に転溶し、校正標準液 (マトリックス有) を調製した。

外部精度管理調査試料分析用として、フェニトロチオン- d_6 $7.988 \mu\text{g/g}$ 、クロルピリホス- d_{10} $3.614 \mu\text{g/g}$ を含む Ac 溶液を調製し、内標準溶液とした。また、Ac 中にアラクロール $19.47 \mu\text{g/g}$ を含むシリンジスパイク溶液 A を調製し、さらにこの一部を Ac に希釈して $0.450 \mu\text{g/g}$ としたシリンジスパイク溶液 B を調製した。次に、Ac 中にフェニトロチオン $14.11 \mu\text{g/g}$ 、クロルピリホス $7.336 \mu\text{g/g}$ を含む農薬混合液を調製し、これと内標準溶液、シリンジスパイク溶液 A を合わせて Ac に希釈し、フェニトロチオン $1.413 \mu\text{g/g}$ 、クロルピリホス $0.739 \mu\text{g/g}$ 、フェニトロチオン- d_6 $1.698 \mu\text{g/g}$ 、クロルピリホス- d_{10} $0.7087 \mu\text{g/g}$ 、アラクロール $0.476 \mu\text{g/g}$ を含む校正標準基液を調製した。さらに、後述の分析法 1 及び分析法 2 によって

とうもろこしの検討基材を前処理して調製したブランク溶液を、各々窒素気流で濃縮した後に校正標準基液に転溶し、校正標準液 (外部精度管理調査試料分析用) を調製した。以上の調製は質量比混合法によって行った。

IDMS の精確さの評価は分析法 1 について行った。また、外部精度管理調査試料の分析には分析法 1 及び分析法 2 を適用した。

分析法 1 として、試料 5 g に試料添加溶液 0.55 mL または内標準溶液 0.4 mL を加えて静置した後、水 20 mL を加え 15 分間放置した。これに AN 50 mL を加えて細砕した後、吸引ろ過した。ろ紙上の残留物にアセトニトリル (AN) 20 mL を加えて細砕した後、吸引ろ過した。合わせたろ液から約 40 mL を分画し、塩化ナトリウム (NaCl) 10 g 及び 0.5 mol/L リン酸緩衝液 (pH7.0) 20 mL を加え、10 分間振とうした。とうもろこしペースト及び枝豆ペーストの分析においては、あらかじめ AN 10 mL でコンディショニングした Agilent Technologies 製 Bond Elut C18 固相抽出カートリッジ (1 g) を用いて、前記の AN 層と AN 2 mL を処理する操作を行った。得られた処理液を無水硫酸ナトリウムによって脱水し濃縮・乾固した後、AN/To1 (3:1) 混液 2 mL に溶解した。Supelco 製 ENVI-Carb/LC-NH2 固相抽出カートリッジ ($500 \text{ mg}/500 \text{ mg}$) を AN/To1 (3:1) 混液 10 mL でコンディショニングした後、前述の抽出液を注入し、さらに AN/To1 (3:1) 混液 20 mL を注入した。全溶出液を 1 mL 以下に濃縮し、Ac 10 mL を加えた後再度 1 mL 以下に濃縮し、Ac 5 mL を加えた後に

溶媒を除去した。残留物をシリンジスパイク溶液 1 mL (精確さ評価の場合) またはシリンジスパイク溶液 B 0.8 mL (外部精度管理調査試料分析の場合) に溶解したものを試験溶液とした。得られた試験溶液中の分析対象農薬を GC/MS によって測定した。

分析法 2 として、試料 5 g に内標準溶液 0.4 mL を加えて静置した後、Ac 70 mL を加えて 3 分間細砕し、ケイソウ土を敷いたろ紙で吸引ろ過した。残留物に Ac 50 mL を加え 3 分間細砕した後、同様に操作して得られたろ液を合わせた。Ac を除去した後、あらかじめ飽和 NaCl 溶液 100 mL を入れた分液漏斗に移し、ナス型フラスコを洗った EA/Hex (1:4) 混液 100 mL を合わせた。これを 5 分間振とうし、静置した。水層を分離後、EA/Hex (1:4) 混液 50 mL を加えて同様に振とうし、得られた EA 及び Hex 層を合わせた。無水硫酸ナトリウムによって脱水した後、EA と Hex を除去した。残留物に Hex 30 mL を加え分液漏斗に移した後、Hex 飽和 AN 30 mL を加えて 5 分間振とうして静置した。Hex 層に Hex 飽和 AN 30 mL を加えて同様の操作を 2 回繰り返し、得られた AN 層を合わせて濃縮・乾固し、残留物を Ac/Hex (1:1) 混液 5 mL に溶解させた。Agilent Technologies 製シリカゲル固相抽出カートリッジ (5 g) に無水硫酸ナトリウム 5 g を加え、Hex/Ac (1:1) 混液 10 mL でコンディショニングした後、得られた抽出液を注入し、さらに Hex/Ac (1:1) 混液 100 mL を注入した。溶出液を濃縮・乾固した後に少量の Ac に溶解し、シリンジスパイク溶液 A 40 μ L と合わせ、窒素気流下で約 2 mL に濃縮したものを試験溶液とした。得られ

た試験溶液中の分析対象農薬を GC/MS によって測定した。

評価法として、農薬濃度は次式から求めた。

$$C = F_e \times \frac{R_s}{R_c} \times \frac{F_c \times M_c \times C_c \times P \times M_{sp(s)}}{M_s \times M_{sp(c)}} \quad (1)$$

ただし、 C : 試料中の農薬濃度、 F_e : 前処理の精度に関わる係数 (= 1)、 R_s : 試験溶液測定における分析対象農薬の標識体に対する面積比、 R_c : 校正標準液測定における分析対象農薬の標識体に対する面積比、 F_c : 校正標準液調製のばらつきに関わる係数 (= 1)、 M_c : 校正標準液中の農薬混合液の質量、 C : 農薬混合液中の測定対象農薬の高純度標準品の濃度、 P : 測定対象農薬の高純度標準品の純度、 $M_{sp(s)}$: 試料に添加した内標準溶液の質量、 M_s : 試料量、 $M_{sp(c)}$: 校正標準液中の内標準溶液の質量、である。その不確かさは、(1) 式の各項の不確かさを評価し、これらを合成して求めた。

6 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 (渡辺分担研究)

6.1 理化学検査のための適正調査試料の作製:

残留動物用医薬品検査調査試料として、平成 23 年度は、鶏肉、豚肉に続いて牛肉を基材に用い検討した。市販の輸入牛肉 (ヒレ、バラ及びカタ肉) を 3 度挽いたミンチ肉に 10 種類のサルファ剤 [スルファジミジン (以下 SDD)、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）及びスルファキノキサリ
ン（以下 SQ）、スルファジアジン（以下 SDZ）、ス
ルフイソキサゾール（以下 SIX）] を添加
し、回収率、均一性及び安定性（冷凍保存
60 日）試験を行い、基材として牛肉の利
用を検討した（添加濃度：10 種類のサル
ファ剤いずれも 0.2 $\mu\text{g/g}$ ）。各部位のミ
ンチ肉をロボ・クープブrikサー5 プラス
（以下、ブrikサー）によりペーストにし、
これらに 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。混合標準溶液の代わりにメタノールを
用いて以下同様に操作しブランク試料を
作製した。また、各基材について、水分及
び脂質を測定した。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）」及び「食品衛生検査指針 理
化学編（2005）」に準じた。

平成 24 年度は、前年度に引続き牛肉試
料について、冷凍保存（ヒレ 58 日、カタ
60 日及びバラ 63 日）安定性、14 日間の冷
蔵保存（6 $^{\circ}\text{C}$ ～10 $^{\circ}\text{C}$ ）安定性（ヒレ肉のみ）
及び凍結融解（3 回繰り返し凍結融解）安
定性を同様の方法で検討した。

基材の牛肉は、市販の輸入牛肉（3 度挽
き）を、各標準品は食品分析用及び残留農
薬試験用を、メタノール、アセトニトリル
及び蒸留水は高速液体クロマトグラフ用
を、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は試薬特級をそ
れぞれ用いた。また、試料作製にはブrik
サーを、試料抽出用にはオムニミキサー及

び減圧濃縮器を、測定条件には HPLC：
LC-10A、検出器：SPD-10A、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 $^{\circ}\text{C}$ 、測定波長：268 nm を用いた。

食品添加物検査調査試料としては、着色
料の定性試験を検討した。

平成 23 年度は、固体試料としてゼリー
菓子を取り上げ、ゼラチン、水あめ、精製
白糖、トウモロコシ油及び水を用い、4 種
類の色調についてそれぞれゼラチン量の
異なる試料を作製し、添加色素の検出を確
認した。色調①（茶系）には食用赤色 40
号（約 40 $\mu\text{g/mL}$ ）、食用赤色 2 号（約 40 μ
 g/mL ）、食用緑色 3 号（約 16 $\mu\text{g/mL}$ ）及
び食用黄色 4 号（約 40 $\mu\text{g/mL}$ ）を、色調
②（赤系）には食用赤色 104 号（約 20 μ
 g/mL ）、食用赤色 105 号（約 8 $\mu\text{g/mL}$ ）、
食用黄色 4 号（約 40 $\mu\text{g/mL}$ ）及び食用赤
色 2 号（約 20 $\mu\text{g/mL}$ ）を、色調③（赤系）
には食用赤色 2 号（約 28 $\mu\text{g/mL}$ ）、食用
青色 1 号（約 4 $\mu\text{g/mL}$ ）、食用赤色 102 号
（約 8 $\mu\text{g/mL}$ ）及び食用赤色 105 号（約 8
 $\mu\text{g/mL}$ ）を、色調④（紫系）には食用赤色
104 号（約 8 $\mu\text{g/mL}$ ）、食用赤色 105 号（約
8 $\mu\text{g/mL}$ ）、食用赤色 3 号（約 8 $\mu\text{g/mL}$ ）、
食用赤色 102 号（約 40 $\mu\text{g/mL}$ ）及び食用黄
色 4 号（約 8 $\mu\text{g/mL}$ ）の組み合わせとし
た。水 75 mL をとり、ゼラチン 18 g 及び
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 及び
トウモロコシ油 2 g を量り、色素混合液（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%及び9.2%）。放冷後、200 gを量りとり、容器に入れ冷蔵した。

平成25年度は、果実ペースト（ホイップペーストストロベリー及びホイップペーストバナナ）、魚肉製品及び魚肉練り製品を基材に用い、酸性タール色素（許可色素）12種類を添加し、検出の確認をした。果実ペーストに12色素液（水溶液、添加濃度各20 µg/g）を加え、ハンドミキサーで混合し均質化した。容器に入れ冷蔵及び冷凍保存した。

魚肉製品には鮭フレークを用いた。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 µg/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。魚肉練り製品には、しんじょう及びかまぼこを用いた。ブrik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 µg/g）を添加し、よく混合した。容器に入れ冷蔵及び冷凍した。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。なお、試料からの抽出には水、50v/v%エタノール及びアンモニア・エタノール溶液を用いた。

試料作製には、湯浴 SB-55、ブrikサー及びハンドミキサーを、試料抽出用には卓上多本架遠心機 KN-70、湯浴 SB-55 を用いた。また薄層クロマトグラフィーには、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）の3条件を用いた。

試薬は、日本薬局方注射用水、28%アンモニア水、アセトニトリル、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は試薬特級を、ポリアミド C-100 はカラムクロマトグラフ用を、薄層板には HPTLC シリカゲル 60、TLC シリカゲル 60 RP-18 F254_s 及び 50 HPTLC Plates Cellulose を用いた。

食品添加物検査調査試料として、保存料の定量試験を検討した。

試料基材には、市販の大根漬け、ガムシロップ、ホイップペースト ストロベリー、ホイップペースト バナナ NEW、魚肉練り製品には、しんじょう、魚すり身（かまぼこ原料として）を用いた。

標準品は、ソルビン酸標準品（食品分析用）、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、添加用標準品として使用）

試薬は、蒸留水、メタノール及びアセトニトリルは HPLC 用、クエン酸一水塩及びクエン酸三ナトリウム二水塩は試薬特級を用いた。

試料作製用混合機は、漬物及びシロップ用にケミカルミキサー（TCM-W 型）及びロボ・クープブrikサー5 プラス（容器容量：3.5 L）を、果実ペースト用にハンドミキサー NK-H3-P を、魚肉練り製品用に餅つき機 AFC-296 及び送風定温乾燥器 ウィンディオープン WFO-450SD を用いた。

平成23年度は、固体試料として初めて

の試みである大根漬けを基材に用いソルビン酸を添加して各大根部位の均一性及び安定性を検討した。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。得られた試料の 3 部位（外皮、外皮を除く外表面及び中心部）についてそれぞれのソルビン酸濃度を測定した。

また、シロップを基材としたソルビン酸の定量試験用の検討を行った。市販のシロップにソルビン酸あるいはソルビン酸カリウムを、シロップ含有量はいずれも 50% とした溶液に添加して試料を作製し、冷蔵保存（30 及び 60 日間）安定性を検討した。さらに、シロップ基材の含有量の異なる試料（10、30 及び 50%）を作製し、同様に安定性を検討した（ソルビン酸濃度はいずれも 0.95 g/kg）。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 及び 0.75 g/kg に変えて、それぞれ試料を作製し、ソルビン酸濃度の異なる試料の安定性を検討した。

平成 24 年度は、前年度に引き続きこの大根漬け試料の固体部分のみについて、長期冷蔵保存安定性（冷蔵保存 3~135 日）を検討した。さらに基材対浸漬溶液比とソルビン酸濃度の関係を検討し、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、基材対浸漬液比が 1:1、1:1.5 及び 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。

平成 25 年度は、果実ペースト（いちご

及びバナナ）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。また、冷蔵及び冷凍保存し、保存条件の影響についても確認した。

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。

魚肉練り製品として、市販品のしんじょうを用い、ブレンダーでペーストにした後、ソルビン酸カリウム（添加濃度：ソルビン酸として 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。

また、市販品の魚肉練り製品（かまぼこ）を用いて添加混合するのとは別に、魚のすり身（生）を用い、加熱してかまぼこを作製する方法も試みた。

餅つき機を用いて魚すり身（生）を混練した後、ソルビン酸カリウム（ソルビン酸として 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、ウィンディーオーブンでは、設定温度を110°Cとし、合計20個のすり身をオーブン内に配置し、加熱した時のソルビン酸の分布について検討した。

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。

試料抽出には、水蒸気蒸留装置(前田製作所)、測定機器にはHPLC(LC-10A及びProminence)、検出器:SPD-10A、測定条件は、カラム:Inertsil ODS-3V(内径4.6mm、長さ150及び250mm、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・5mmol/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・0.2mol/Lリン酸緩衝液(pH4.0)(2:17:1)及びメタノール・水・0.2mol/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:1.0mL/min、カラム温度:40°C、測定波長:260nmを用いた。

残留農薬検査調査試料として、これまで使用してきた野菜ペーストの他、新たな基材を検討した。

試料材料には市販のマッシュポテト、蒸留水(HPLC用)、ペクチン、パールアガー(成分:ブドウ糖、ローストビーンガム、カラギナン及びリン酸二水素カリウム)を用いた。

標準品は、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、テルブホス(Dr. Ehrenstorfer GmbH、残留農薬分析用)を、試薬に蒸留水はHPLC用、アセトン、ヘキサン及び酢酸エチルは残留農薬・PCB試験用、塩化ナトリウム及び無水硫酸ナトリウムは試薬特級を用いた。

試料作製用には、ホットプレート(NP-6型)、電子レンジHD型(EM-A1)、ハンドミキサー(NK-H3-P)を、また、試料抽出用にはオムニミキサー、減圧濃縮器を用いた。

平成23年度は、マッシュポテトの基材としての利用を検討した。マッシュポテトの乾燥材料に水を添加して冷凍保存後、調査試料とする方法では、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(ペクチン及びパールアガー)を検討した。

ペクチン3g及び6gを量り、各々に水100mL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、溶液が熱い状態でマッシュポテトの調製に供した。また、パールアガー4.5g及び6gを量り、各々に水100mLを加え、電子レンジにより溶解した。溶解後、溶液が熱い状態でマッシュポテトの調製に供した。農薬添加マッシュポテトの調製は、以下の通りに行った。マッシュポテト45gを量り、水150mL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。前述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)10mL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250g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