

令和5年度 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）

食品衛生検査施設等の検査の信頼性確保に関する研究

研究分担報告書

食品添加物試験法及び動物用医薬品試験法の開発に関する研究

| | | |
|-------|-------|----------------------|
| 研究代表者 | 渡辺 卓穂 | (一財) 食品薬品安全センター秦野研究所 |
| 研究分担者 | 今井 浩一 | 埼玉県衛生研究所 |
| 研究協力者 | 茂呂 紀寛 | 埼玉県衛生研究所 |

研究要旨

サイクラミン酸及びその塩類は、我が国では使用が認められていない指定外添加物（甘味料）である。各検査機関は、厚生労働省から通知された試験法等に基づきサイクラミン酸及びその塩類の分析を実施し、その分析値の信頼性を確保するため精度管理を実施している。精度管理の手法の一つとして外部精度管理調査があるが、近年、サイクラミン酸及びその塩類を対象としたものは実施されていない。そこで、本研究では精度管理調査用試料を作製し、パイロットスタディを実施した。併せて、昨年度検討したサイクラミン酸通知試験法の改良法及び新規誘導体化剤を用いた分析法についても検討した。

パイロットスタディ用のたくあん漬け試料の品質評価を実施し、均質性及び安定性に問題がなく、本試料がパイロットスタディに十分に使用可能であることを確認した。パイロットスタディは、12の参加機関に対して調査用試料を配布し、報告値を解析した。昨年度の検討において、サイクラミン酸通知試験法の水抽出後におけるホモジナイズ操作の追加により、回収率の向上が確認された。そこで、その有用性を確認するためコラストアディを実施したところ、ホモジナイズ操作による影響は、その抽出法により異なり、透析法では回収率が低下し、水抽出法では向上した。さらに、サイクラミン酸の誘導体化に要する時間が添加回収試験での回収率に影響を及ぼすことが確認され、誘導体化剤を加えてから水層を除去するまでに要する時間により、回収率の低下が認められた。新規誘導体化剤を用いた分析法については、液-液分配による精製工程を追加することで夾雑ピークの影響を受けずに測定することが可能となった。

A. 研究目的

サイクラミン酸（以下「CY」という。）、サイクラミン酸ナトリウム（以下「CY-Na」という。）及びサイクラミン酸カルシウム

は、日本では使用が禁止されている甘味料である。しかし、諸外国では甘味料として使用されているため、輸入された食品からCY類が検出され、食品衛生法違反となる事

例が報告されている。厚生労働省の違反事例速報によれば、令和5年度はケーキ類、スナック菓子及びレトルト殺菌食品等からCY類が検出されている¹⁾。

CY類の検査法については、平成15年8月29日付け食安監発第0829009号「サイクラミン酸に係る試験法について」の別添や、令和5年10月23日付け健生食基発1023第1号及び健生食監発1023第1号「食品中の食品添加物分析法」の改正について」の別添6（以下「通知試験法」という。）が示されている。通知試験法の流れは図1のとおり。通知試験法は、試料からCYを抽出し、硫酸酸性下で次亜塩素酸ナトリウム溶液と反応させN,N-ジクロロシクロヘキシルアミンに誘導体化し、紫外可視吸光度検出器付液体クロマトグラフ（以下「HPLC」という。）で測定する方法である。

各検査機関は、通知試験法等を基に標準作業手順書を策定し、分析を実施している。そして、得られた分析値の信頼性を確保するため、精度管理を実施している。精度管理の手段のひとつとして外部精度管理調査が挙げられるが、近年、CY類を対象とした外部精度管理調査は行われていない。そこで、外部精度管理調査の一助とするため、本研究ではCY-Naを添加した精度管理調査用試料（以下「調査用試料」という。）を調製し、外部精度管理のパイロットスタディを実施することとした。

昨年度の検討において、たくあん漬けを用いた添加回収試験では水抽出後にホモジナイズ工程を追加することにより回収率が向上することが示唆されたことから、その有用性について確認するためコラボスタディを実施した。

また、添加回収試験における回収率がCYの誘導体化に要する時間と関連している可能性が考えられたことから、通知試験法におけるCYの各誘導体化工程における所要時間に対する回収率への影響について検討した。

昨年度、通知試験法と異なる誘導体化剤を用いた分析法（以下「新規分析法」という。）として、試料から抽出したCYを塩酸と過酸化水素でシクロヘキシルアミンに分解した後、水酸化ナトリウム塩基性下で塩化ベンゾイルと反応させN-シクロヘキシルベンズアミドに誘導体化し、HPLCで測定する方法を検討した。しかしながら、分析対象物質であるN-シクロヘキシルベンズアミドは230 nm付近に強い吸収を持つが、測定波長230 nmを用いて測定したところ、夾雑ピークが多く、より夾雑ピークの少ない254 nmで測定することとした。そこで、230 nmでの測定を可能とするため、新規分析法について改良を検討し、添加回収試験を実施した。

B. 方法

1. 試薬等

サイクラミン酸ナトリウム標準品：純度100.4%（富士フィルム和光純薬製）

蒸留水：高速液体クロマトグラフィー用（関東化学製）

アセトニトリル：高速液体クロマトグラフィー用（関東化学製）

塩酸：特級（関東化学製）

過酸化水素水（30%）：特級（富士フィルム和光純薬製）

塩化ナトリウム：特級（富士フィルム和光純薬製）

水酸化ナトリウム：特級（富士フィルム
和光純薬製）

塩化ベンゾイル：特級（富士フィルム和
光純薬製）

トリエチルアミン：特級（富士フィルム
和光純薬製）

逆相固相抽出カラム：Sep-Pak Vac
tC18 1 g/6 cc（Waters製）

強陰イオン交換固相抽出カラム：
Sep-Pak Vac Accell QMA 500 mg/6 cc
（Waters製）

2. 標準原液・標準溶液の調製

CY標準原液：CYの濃度が1000 µg/mLとな
るようにCY-Na標準品112.0mgを精秤し、水
を加えて正確に100 mLとした。

CY標準溶液：CYの濃度が100 µg/mLとな
るようにCY標準原液を水で希釈して調製
した。

検量線用標準溶液：CY標準溶液を適宜希
釈し、0.5～50 µg/mLの溶液を調製した。

添加用標準溶液：CY標準原液を使用した。

3. 機器

ホモジナイザー：ヒスコトロン NS-52
（マイクロテック・ニチオン製）

遠心機：Model 4000（久保田商事製）

分析機器：1260 Infinity 2（Agilent製）

4. HPLC分析条件

1) 調査用試料の作製及び通知試験法の追
加検討

移動相：アセトニトリル・水（70:30）

カラム温度：40℃

カラム：TSKgel ODS-80Ts

4.6mm×15cm(5µm)（東ソー製）

流速：1.0 mL/分

注入量：20 µL

測定波長：314 nm

2) 新規分析法の改良

移動相：アセトニトリル・水（60:40）

カラム温度：40℃

カラム：ZORBAX Eclipse Plus C18

4.6mm×25 cm（5 µm）（Agilent製）※

※ 定量を妨害する夾雑ピークを分離
するため、新規分析法では通知試験
法のものより長いカラムを使用した。

流速：1.0 mL/分

注入量：20 µL

測定波長：230 nm

5. 検量線及び定量

検量線用標準系列は、CYの濃度が0.5、1、
2、10、20、50 µg/mLとなるようにCY標準溶液
を水で希釈して調製した。定量は、絶対検量
線法により実施した。

6. 調査用試料の作製方法の検討

1) 基材

たくあん漬け（販売者：イオン株式会社）

2) 浸漬手順

調査用試料の浸漬手順は、平成23年度厚
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「食品外部
精度管理調査における適正調査試料作製
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－」
2) 及び平成24年度同報告書「食品衛生外部
精度管理調査適正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－」³⁾にて

実施された大根漬けにソルビン酸を添加する研究に基づいて実施した。すなわち、たくあん漬け(長さ約10~15 cmの円柱状)は、縦長方向に4分割した。浸漬液は、CYとして0.2 g/kgとなるようにCY-Naに水を加えて調製した。そして、基材対浸漬液比が1:1(w/w)となるように4°Cで浸漬した。

3) 浸漬期間

浸漬期間は、1、2、3、7、14、21、28、84日間とした。浸漬後、たくあん漬けを浸漬液から取り出し、外皮、外皮を除く外表面及び中心部の3部位に分け、それぞれのCY濃度を分析した。あわせて、たくあん漬けを取り出した後の浸漬液のCY濃度も分析した。

4) 試作品の品質評価

たくあん漬けを同重量の浸漬液(CYとして0.2 g/kg)に7日間浸漬し、浸漬液から取り出し、フードプロセッサーで細切均一化し、試作品とした。試作品のCY濃度を分析し、その結果を安定性試験の0日間とした。同様に試料を作製し、-20°Cにて保管した。保管期間は、28日間、56日間、84日間とした。冷凍保管後、CY濃度を分析し、安定性を確認した。試験溶液の調製は、通知試験法に従って、試料を水で抽出した後、1分間ホモジナイズ抽出し、定容し、誘導体化して測定した。なお、固相精製工程は、昨年度の検討において、たくあん漬けを用いた添加回収試験にて回収率低下が確認されたため、固相による精製工程は省略した。試験溶液調製法の概略を図2に示す。

7. 外部精度管理調査のパイロットスタディ

1) 調査用試料の作製

たくあん漬けを7日間浸漬し、浸漬液から取り出し、フードプロセッサーで細切均一化した。これを配布用容器(ポリスチレン/ポリエチレン製容器)に300 g程度分注し、発送まで-20°Cで保管した。

2) 調査用試料の品質評価

作製した調査用試料の均質性は、調査試料を作製・発送するまでの間に全調査用試料から10個の容器を無作為に抽出し、各容器から2部位を採取し、それぞれについて測定を行った後、一元分散分析することにより判断した。なお、均質性試験の結果を安定性試験の0日間のものとした。

また、調査用試料の安定性は、報告期限日以降に残存試料10個に対してCY濃度を分析し、上記の0日間の結果と比較することにより判定した。

3) パイロットスタディの実施

パイロットスタディの募集は令和5年11月~12月に行い、参加機関は計12機関であった。12月20日、調査用試料を宅配便(冷凍)にて、実施要領を電子メールにて送付した。分析結果の報告は令和6年2月29日までとした。

4) 報告結果の統計解析方法

報告結果は、一般財団法人食品薬品安全センター秦野研究所が実施している食品衛生外部精度管理調査⁴⁾に倣い、従来方式(算術平均値および標準偏差を用いた評価方法)とロバスト方式(*Huberのproposal 2*による方法)で統計解析した。

従来方式の手法では、データクリーニング(添加濃度の1/10以下及び10倍以上の報告値を含む機関の除外)後、 \bar{X} - R 管理図及び z -スコアによる解析を実施した。なお、本課題における \bar{X} 管理図では、総平均値の70%

及び120%をそれぞれ下部管理限界線（以下「LCL」という。）及び上部管理限界線（以下「UCL」という。）とした。

ロバスト方式の手法では、まずデータクリーニングを行い、次いで2次スクリーニングとしてメジアン・クリーニング（メジアン±メジアン×50%の範囲を超えたデータの除外）を行った後、Huberのproposal 2の推定方式⁵⁾⁶⁾による統計解析をMicrosoft Excelにより実施した。また、比較検証にはAMC開示のプログラムRobstat. xla Version 1.0を用いた。

なお、今回は小規模なパイロットスタディ（試験所数：12）であることから、その統計解析結果についてはあくまでも参考データに留めるものとした。

8. ホモジナイズ抽出に関するコラボスタディ（追加検討）

昨年度の検討により、たくあん漬けを用いた添加回収試験では水で抽出した後、ホモジナイズ抽出工程を追加することにより回収率が向上することが確認された。そこで、抽出工程にホモジナイズ操作を追加することで測定値に差異が生じるか否か検討した。抽出法として透析法を用いていた参加機関には、透析膜チューブに移す前にホモジナイズ抽出工程を、また、水抽出法を用いていた参加機関には、沸騰水浴での加熱と定容操作の間にホモジナイズ抽出工程を追加して分析するよう依頼した。コラボスタディの報告結果の判定は、パイロットスタディの報告結果との比較により行った。

9. 誘導体化時間の検討（追加検討）

添加回収試験において、CYの誘導体化に要する時間が回収率に影響を及ぼす可能性が考えられた。そこで、回収率に影響を及ぼす原因を究明するため、誘導体化における各工程において試料を静置する時間を設け、その回収率への影響を比較した。

CYとして0.1 g/kgの水溶液を調製し、誘導体化における7つのタイミング（①次亜塩素酸ナトリウム試薬を入れた後、②1分間激しく振とうした後、③遠心分離した後、④水層を除去した後、⑤炭酸水素ナトリウム溶液を加えた後、⑥1分間振とうした後及び⑦遠心分離した後）のうちいずれか1つにおいて、室温にて30分（①～③は10分も実施）静置の工程を設け、影響を確認した。併せて、冷蔵庫にて30分静置を行う検討も行い、結果を比較した。検討した誘導体化における試料を静置する工程箇所の概略を図3に示す。

10. 新規分析法の改良

1) 試料

埼玉県内で市販されていたオレンジジュース、ブルーベリージャム、りんごゼリー及びチョコレートを用いた。

2) 試験溶液の調製

試料10 gを量り採り、水70 mLを加えて沸騰水浴中で必要に応じてガラス棒等で攪拌しながら15分間加熱した。冷却後、水を加えて正確に100 mLとした後、抽出液の一部を採取し、3,500 rpm、10分間遠心分離して上澄液10 mLを量り採り、Sep-Pak Vac tC18 (1 g/6 cc) 及びSep-Pak Vac Accell QMA (500 mg/6 cc) をこの順番に接続したものに負荷した。負荷液を捨てた後、水 10 mLで洗浄した。Sep-Pak Vac tC18 (1 g/6

cc) を除去した後、Sep-Pak Vac Accell QMA (500 mg/6 cc) を塩酸(1→100)10 mLで溶出させ、その溶出液を塩酸(1→100)で10 mLとして抽出液とした。

抽出液2 mLに8 mol/L塩酸0.5 mL及び3%過酸化水素水0.5 mLを加えて、沸騰水浴中で30分間加熱した。この分解液全量に塩化ナトリウム1 g、5 mol/L水酸化ナトリウム水溶液2 mL及びアセトニトリル5 mLを加え、1分間振とうし、3,500 rpm、5分間遠心分離した。アセトニトリル層を採取し、0.1(v/v)%トリエチルアミン含有アセトニトリル溶液100 µL及び0.1(v/v)%塩化ベンゾイル含有アセトニトリル溶液200 µLを加え混和した。アセトニトリルを加え全量を6 mLとし、これを精製水で正確に10 mLとしたものを試験溶液とした。その概略を図4に示す。

3) 添加回収試験

添加用標準溶液をオレンジジュース、ブルーベリージャム、りんごゼリー及びチョコレートに4食品に添加し、3併行の添加回収試験を実施した。添加濃度は、令和6年3月8日付け厚生食基発0308第1号厚生食監発0308第1号「食品中の食品添加物分析法の妥当性確認ガイドライン」の作成及び「第2版食品中の食品添加物分析法」の改正について別添1「食品中の食品添加物分析法の妥当性確認ガイドライン」(以下「妥当性ガイドライン」という。)に基づき、試料中20 µg/gとした。

C. D. 研究結果および考察

1. 浸漬期間の検討

たくあん漬けの浸漬期間によるCY濃度の経時変化の結果を表1~4及び図5に示し

た。

浸漬期間1日目における3部位のCY濃度は、外皮で 0.0853 ± 0.0128 g/kg、外皮を除く外表面で 0.0797 ± 0.0150 g/kg、中心部で 0.0844 ± 0.0144 g/kgであり、たくあん漬けを取り出した後の浸漬液のCY濃度 0.126 ± 0.00376 g/kgより大幅に低かった。

その後、3部位の濃度は経時的に増加し、浸漬期間7日間におけるCY濃度は、外皮で 0.0973 ± 0.00137 g/kg、外皮を除く外表面で 0.101 ± 0.00290 g/kg、中心部で 0.100 ± 0.00244 g/kgとなり、いずれの部位にも均等にCYが浸透したと考えられた。また、たくあん漬けを取り出した後の浸漬液についてもCY濃度を測定したところ、 0.100 ± 0.00355 g/kgであり、たくあん漬けの各部位とほぼ同濃度であった。

浸漬期間7日目以降における3部位の濃度は、概ね一定であり、浸漬期間84日目におけるCY濃度は、外皮で 0.0992 ± 0.00131 g/kg、外皮を除く外表面で 0.0976 ± 0.00172 g/kg、中心部で 0.0985 ± 0.00604 g/kg、たくあん漬けを取り出した後の浸漬液で 0.0954 ± 0.00281 g/kgであった。

以上の結果より、調査用試料の作製にあつては、浸漬期間を7日間とすることとした。

2. 試作品の品質評価

試作品のCY濃度は表5に示したとおり 0.100 ± 0.00254 g/kgとなり、良好な結果が得られた。試作品の冷凍保管における安定性試験の結果を表6及び図6に示した。試料のCY濃度は、冷凍保存28日目で 0.0984 ± 0.00274 g/kg、56日目で

0.981±0.00141 g/kg、84日目で0.0985±0.000499 g/kgとなった。

試作品作製0日目におけるCY濃度を100%として28日目、56日目及び84日目での安定性を算出したところ、それぞれ98.1%、97.8%、98.1%となった。以上の結果より、冷凍保管84日間における安定性は保持されていると判断した。

3. 外部精度管理調査のパイロットスタディ

1) 調査用試料の品質評価

調査用試料の均質性試験の結果を表7、安定性試験の結果を表8に示した。均質性試験の結果(0日目)を一元配置分散分析によって評価したところ、測定値が0.0980±0.00215 g/kg、相対標準偏差(RSD(%))が2.2であり、容器間のばらつきは有意ではなく(P値>0.05)、調査用試料は十分に均質と判断した。

また、安定性試験の結果(82日目)は、測定値が0.0971±0.00212 g/kgであり、均質性試験での結果を100%として安定性を算出したところ、99.1%となった。このため、調査用試料は、調査期間中安定であったと判断した。

2) パイロットスタディ結果

I 結果の報告

すべての参加機関から期限内に結果を受領した。

II 参加機関の検査法

参加全12機関の抽出法は、透析法が3機関、水抽出法が9機関であった。分析機器は、HPLCを使用した機関が10機関であり、液体クロマトグラフ質量分析計(以下「LC-MS」という。)を使用した機関と液体クロマト

グラフタンデム質量分析計(以下「LC-MS/MS」という。)を使用した機関が各1機関であった。LC-MSを使用した機関とLC-MS/MSを使用した機関は、どちらも水抽出法を採用し、CYを誘導体化せずに測定していた。

参加機関が適用した分析法のうち、特徴的な事例を以下に記す。

i) 透析法

水酸化ナトリウム水溶液を透析内液及び透析外液とした機関が1機関あった。

ii) 水抽出法

水抽出を行う前、試料に水を加えて1分間振とうした機関が1機関あった。水抽出時の水量を通知試験法より多くした機関が3機関(70~100 mL)あった。加熱中にスパーテル等を用いて攪拌した機関が5機関あった。加熱後、水酸化ナトリウム水溶液でpH調整してからメスアップした機関が1機関あった。固相精製を実施しなかった機関が3機関(LC-MSを使用した機関とLC-MS/MSを使用した機関を含む)あった。

III 報告値の解析結果

報告値の解析結果について表10及び11、図7~10に示す。従来方式では、参加全12機関においてデータクリーニングで除外された機関はなかった。全機関の平均値±標準偏差は0.0947±0.00875 g/kg(RSD(%):9.2)であった。 \bar{X} 管理図では管理限界線外の機関は認められなかったが(図7)、 R 管理図で UCR (0.0137 g/kg)を超えた機関は1機関(0.0155 g/kg)確認された(図8)。また、 z -スコアの絶対値が3以上の機関は認められなかった(図9)。

一方、ロバスト方式では、データクリーニング及びメジアン・クリーニングで除外された機関はなかった。全機関のロバスト平均値±ロバスト標準偏差は 0.0948 ± 0.00823 g/kg (RSD(%):8.7)であった。 z -スコアの絶対値が3以上の機関は認められなかったが、2以上3未満の機関は1機関(-2.05)認められた(図10)。

従来方式にて P 管理図で UCR を超えた機関とロバスト方式にて z -スコアの絶対値が2以上であった機関は同一の機関であった。ただし、当該機関からの報告値は、妥当性ガイドラインにおける真度及び精度の目標値(真度(%):70~120、併行精度(RSD(%))<10)を満たしていた。

4. ホモジナイズ抽出に関するコラボスタディ

各参加機関の分析法の抽出工程にホモジナイズ操作を追加することで測定値に差異が生じるか否か検討したところ、抽出法によってその影響が異なるものとなった。

まず、透析法ではホモジナイズ抽出操作を実施した場合の平均値は 0.0948 ± 0.00724 g/kgで、ホモジナイズ抽出操作を実施しなかった場合の平均値 0.101 ± 0.00910 g/kgと比較すると93.7%となり、平均値が低下した。その原因として、ホモジナイズ抽出工程による試料の損失が考えられた。参加機関から試料をホモジナイズすることで透析膜へ入れる際に試料量の損失が生じたとの意見が寄せられた。通知試験法では試料を約20 mLの透析内液と混和し、少量の透析内液を用いて透析膜チューブ内に移すこととなっている

ため、ホモジナイズ抽出工程において透析膜チューブに移す際のホモジナイザーや器具の洗いこみに使用できる透析内液の液量も少量となり、十分な回収が困難になったものと考えられる。ホモジナイズ抽出工程が回収率に負の影響を及ぼす結果となったことから、ホモジナイズ抽出工程は透析法に不向きであると考えられた。

一方、水抽出法では、ホモジナイズ抽出操作を実施した場合の平均値は 0.0948 ± 0.00725 g/kgで、ホモジナイズ抽出操作を実施しなかった場合の平均値 0.0925 ± 0.00796 g/kgと比較すると102.5%となり、有意な差があった($p < 0.05$)。なお、平均値の向上が微増にとどまった要因として、まず透析法と同様にホモジナイズ抽出工程による試料の損失が考えられた。また、ホモジナイズ抽出工程による操作性の悪化も要因として考えられた。操作性については、複数の協力機関から「ホモジナイズ抽出工程で試料を微細にすることで抽出液が懸濁液となり、その後の上澄み採取時や固相精製時に障害となった」旨の意見が寄せられた。以上より、抽出工程後のホモジナイザー等の洗いこみや抽出液のろ過・遠心分離といった工程を設けるなど、ホモジナイズ抽出工程をより有用とするためには更なる改良を施す必要があるものと考えられた。

そして、各参加機関が通知試験法から様々な工夫を加えていたことも平均値を微増に留めた大きな要因と考えられた。昨年度の研究においても、水抽出時の水量増加や攪拌が添加回収試験における回収率向上につながることを確認された。本コラボスタディにおいても、複数の機関が水添

加量の増加や攪拌といったCYの抽出を良好にする手段を講じたことにより、ホモジナイズ抽出工程の影響が小さくなったものと考えられた。今回の各参加機関の分析法を参考に抽出時の改良について、引き続き検討することが回収率の更なる向上に繋がるものとする。

5. 誘導体化時間の検討

CYの誘導体化反応時間と回収率との検討結果を図11及び表11に示す。

まず室温での静置について、①次亜塩素酸ナトリウム試薬を入れた後から③遠心分離した後水層を除去した後までにおける静置では、経時的に回収率が低下していた。最も回収率を低下させたのは②1分間激しく振とうした後の静置であり、10分では77.9%、30分では48.7%であった。また、静置時間が長いほど回収率のばらつきも大きくなった。一方、④水層を除去した後以降の静置は回収率にほとんど影響を与えなかった。次に冷蔵での静置について、いずれの段階においても回収率に影響はみられなかった。

以上より、室温下での誘導体化では、水層を除去するまでに要する時間の長さがCYの回収率に影響することが確認された。回収率の低下やばらつき防止のため、水層除去までの工程を迅速に実施することが必要であると考えられた。また、試料数が多く処理に時間を要する場合や、処理中にやむを得ず試料を静置しなければならない場合は、試料を冷蔵保管することが望ましいものと考えられた。

標準溶液と同様、試料マトリックス存在下においても、誘導体化剤を投入してから

水層を除去するまでに要する時間が回収率に影響を及ぼしているか否かについて、たくあん漬け試料を用いて検討した。その結果、上記①と②の間に静置工程（30分）を設けた場合、3併行での添加回収試験の回収率は79.9%であった。試料マトリックス存在下においても誘導体化での水層を除去するまでに要する時間がCYの回収率に影響することが確認された。

なお、本現象の要因として、CYの誘導体であるN,N-ジクロロシクロヘキシルアミンの揮散が考えられたが、本研究においては原因の断定には至らなかった。

6. 新規分析法の改良

新規分析法の改良前後のクロマトグラムを図12に示す。液-液分配工程の導入により夾雑ピークを大きく軽減することができ、230 nmでの測定が可能と考えられた。

オレンジジュース、ブルーベリージャム、りんごゼリー及びチョコレート4食品を試料に用いて、10. 新規分析法の改良 2) 試験溶液の調製に従って3併行の添加回収試験（添加濃度：試料中20 µg/g）を実施した。各食品のブランク試料及び添加試料の代表的なクロマトグラムを図13に示した。検討した何れの試料においても、ブランク試料にCYの定量を妨害するピークは認められなかった。添加回収試験における真度及び併行精度の検討結果を表12に示した。オレンジジュース、ブルーベリージャム、りんごゼリー及びチョコレートの4試料の平均回収率は、それぞれ99.2%、100.4%、102.0%及び104.6%であり、すべての試料において良好な回収率であった。

N-シクロヘキシルベンズアミドは230 nm

付近に強い吸収を持つ。昨年度の検討では、液-液分配工程を実施しなかったため、夾雑ピークが多かったことから、夾雑ピークの少ない254 nmを用いて測定することとした。本検討では、液-液分配による精製工程を追加することで230 nmでの測定が可能となり、254 nmでの測定に比べ測定感度が上昇した。

7. 今後の展望

外部精度管理調査のパイロットスタディでは、調査用試料を冷凍した。これは、たくあん漬けを浸漬液から取り出して冷蔵保管すると1週間程度でカビが生えたためである。カビ発生を防止するための手段の一つとして、保存料の添加が考えられる。たくあん漬けに保存料を添加することについては、本研究の基となった平成23年度及び平成24年度の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）分担研究報告書にて、ソルビン酸を用いて検討なされている。このソルビン酸をCYと併せてたくあん漬けに添加することができれば、調査用試料の基材としての安定性を向上させ、かつ検査項目も増やすことができるため、より有用な調査用試料を作製できるものとする。

新規分析法の改良では、定量限界値に関する検討として定量限界濃度での添加回収試験やそのクロマトグラムにおけるS/Nの確認を行う予定である。また、検討した4食品以外の食品を用いた添加回収試験を実施し、新規分析法の性能評価について引き続き検討する予定である。

E. 結論

たくあん漬けを基材としてCYの精度管理調査用試料作製を試みた。その結果、7日間の浸漬でたくあん漬けの部位毎のCY濃度を均一化でき、また、作成した試料を84日間冷凍保管した際の安定性も良好であった。以上より、たくあん漬けはCYの外部精度管理調査用試料に適応できる可能性が示唆された。

精度管理調査のパイロットスタディ調査用試料の均質性及び安定性は良好であった。また、参加機関の報告値は、従来方式およびロバスト方式で解析した。

サイクラミン酸試験法におけるホモジナイズ抽出工程の追加は、透析法では回収率を低下させ、水抽出法では向上させた。水抽出法における回収率をより向上させるため、ホモジナイズ抽出工程には更なる改良が必要と考えられた。

CYの誘導体化については、誘導体化剤を投入してから水層を除去するまでの工程に時間をかけることで回収率が低下した。試験溶液の調製時は、誘導体化の所要時間にも配慮することが重要と示唆された。

昨年度検討した新規分析法に液-液分配工程を導入することにより、夾雑ピークを大幅に軽減することができた。検討した何れの試料においても、ブランク試料のクロマトグラムに定量を妨害するピークは認められなかった。さらに、ブルーベリージャム等の4食品を用いた添加回収試験の回収率は良好であった。

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

参考文献

1) 違反事例 | 厚生労働省

https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunit suite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/yun yu_kanshi/ihan/index.html

2) 小島幸一、鈴木達也、渡辺卓穂、高坂

典子：平成23年度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「食品外部精度管理調査における適正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－」（2012）

3) 小島幸一、渡辺卓穂、鈴木達也、高坂典子：平成24年度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「食品衛生外部精度管理調査適正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－」（2013）

4) 一般社団法人食品薬品安全センター 秦野研究所：「2022年度 食品衛生外部精度管理調査結果報告書」（2023）

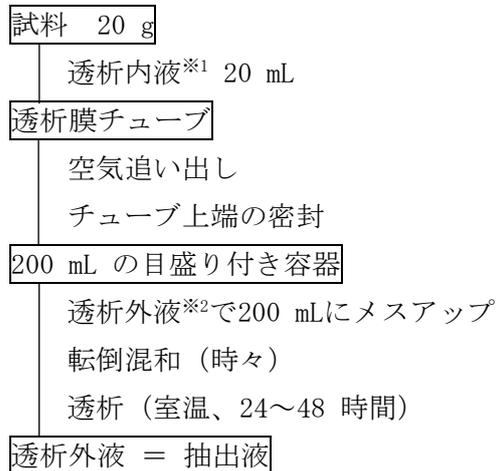
5) Analytical Methods Committee, Robust Statistics – How Not to Reject Outliers Part 1. Basic Concepts, Analyst, Vol. 114, 1693-1697(1998)

6) Huber, P. J., Robust Estimation of a Location Parameter, The Annals of Mathematical Statistics, Vol. 35, No. 1, 73-101(1964)

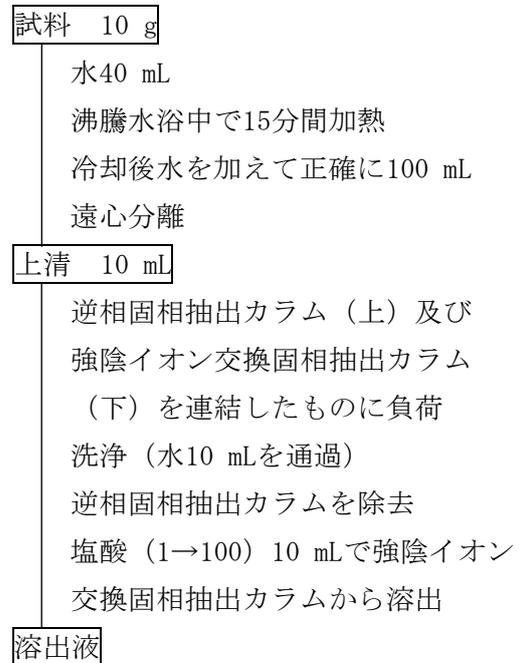
以下 図表等

図1 サイクラミン酸及びその塩類の分析法（通知試験法）

a 透析法



b 水抽出法



抽出液 10 mL 又は 溶出液全量

硫酸（1→2） 2 mL

ヘキサン 5 mL

次亜塩素酸ナトリウム試薬 1 mL

激しく1分間振とう

遠心分離

水層を除去

ヘキサン層

5 w/v %炭酸水素ナトリウム溶液 25 mL

1分間振とう

遠心分離

試験溶液

※1 透析内液：塩化ナトリウム 100 g を 0.01 mol/L 塩酸に溶解して 1000 mL としたもの

※2 透析外液：0.01 mol/L 塩酸

図2 精度管理調査用試料の作製における分析法

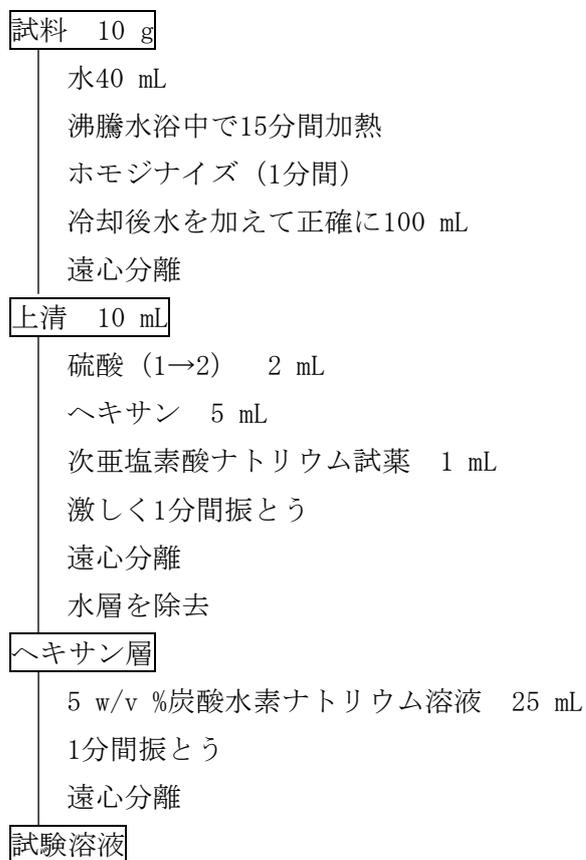


図3 誘導体化における試料の静置のタイミング

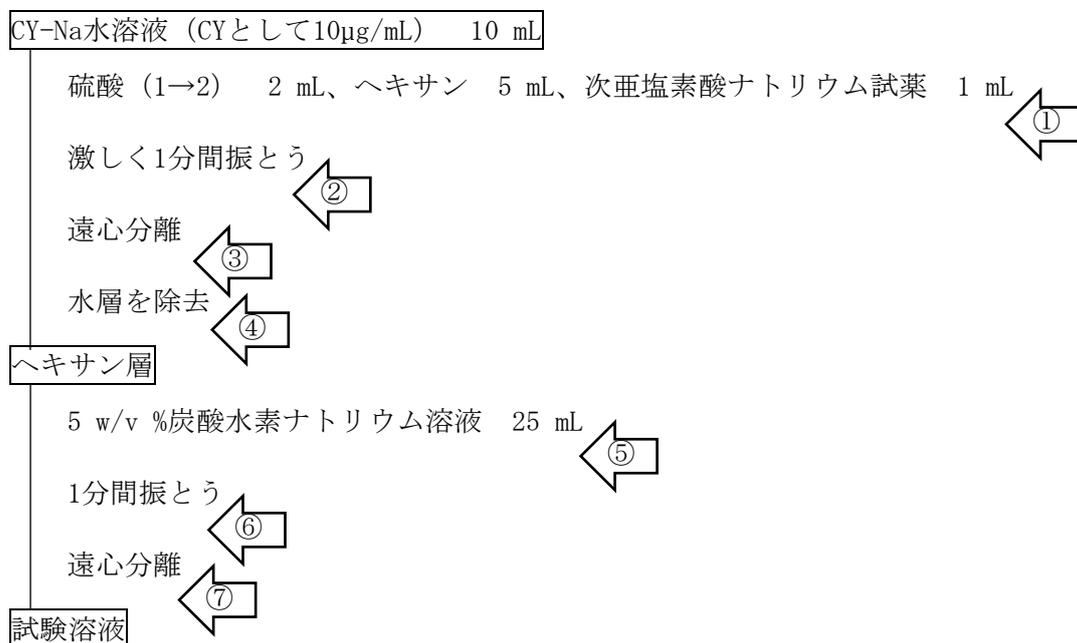


図 4 新規分析法の改良法

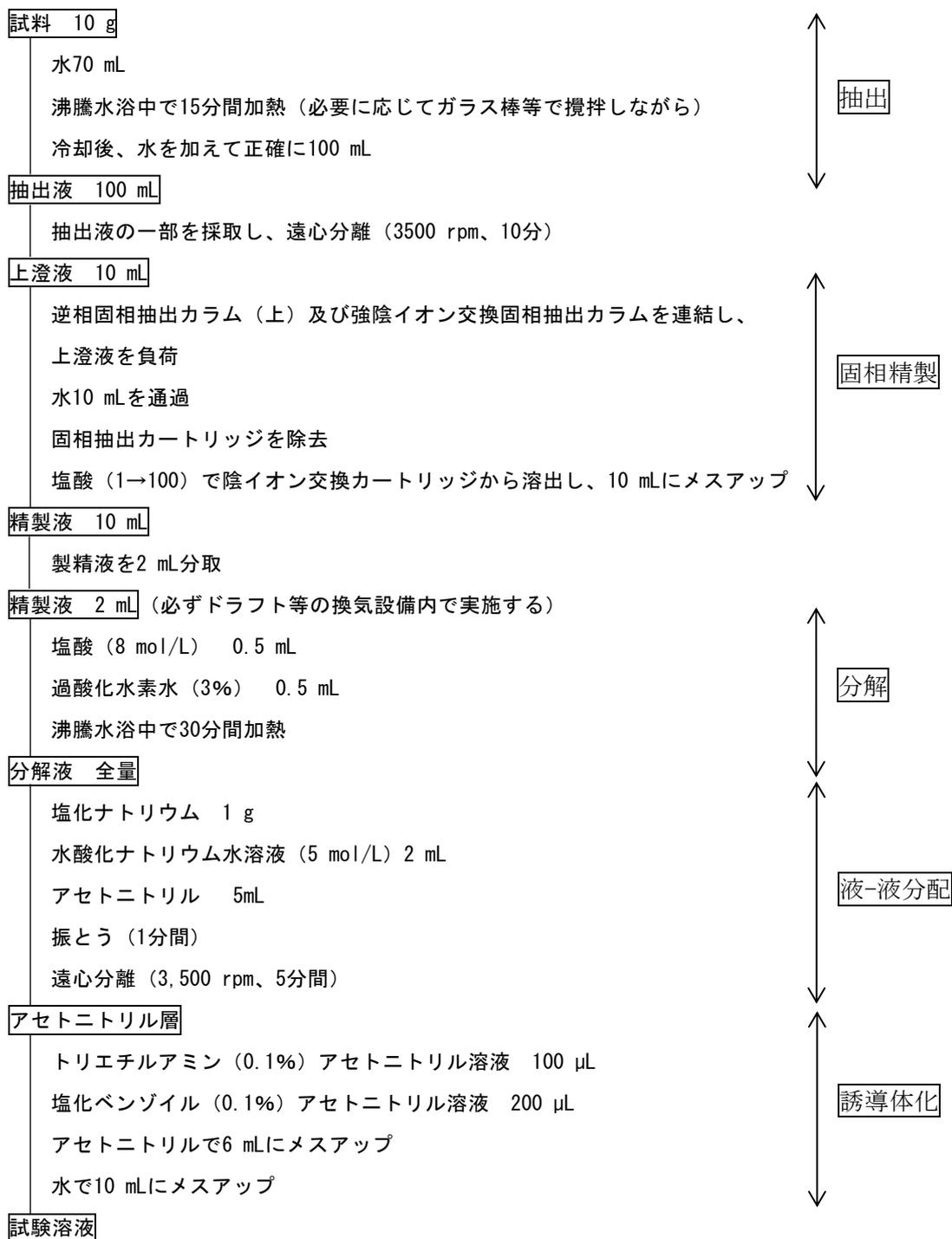


表 1 たくあん漬け（外皮）の CY 濃度の経時変化

| 浸漬期間 | 1 日目 | 2 日目 | 3 日目 | 7 日目 | 14 日目 | 21 日目 | 28 日目 | 84 日目 |
|------------|--------|---------|---------|---------|---------|----------|---------|---------|
| 平均値 (g/kg) | 0.0853 | 0.0866 | 0.0964 | 0.0973 | 0.0980 | 0.0998 | 0.0978 | 0.0992 |
| SD (%) | 0.0128 | 0.00229 | 0.00480 | 0.00137 | 0.00125 | 0.000916 | 0.00195 | 0.00131 |
| RSD (%) | 15.1 | 2.6 | 5.0 | 1.4 | 1.3 | 0.9 | 2.0 | 1.3 |
| 回収率 (%) | 85.3 | 86.6 | 96.4 | 97.3 | 98.0 | 99.8 | 97.8 | 99.2 |

(n =5)

表 2 たくあん漬け（外皮を除く外表面）の CY 濃度の経時変化

| 浸漬期間 | 1 日目 | 2 日目 | 3 日目 | 7 日目 | 14 日目 | 21 日目 | 28 日目 | 84 日目 |
|------------|--------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 平均値 (g/kg) | 0.0797 | 0.0879 | 0.0993 | 0.1006 | 0.0999 | 0.102 | 0.101 | 0.0976 |
| SD (g/kg) | 0.0150 | 0.00407 | 0.00295 | 0.00290 | 0.00399 | 0.00169 | 0.00136 | 0.00172 |
| RSD (%) | 18.8 | 4.6 | 3.0 | 2.9 | 4.0 | 1.7 | 1.3 | 1.8 |
| 回収率 (%) | 79.7 | 87.9 | 99.3 | 100.6 | 99.9 | 102.1 | 101.2 | 97.6 |

(n =5)

表 3 たくあん漬け（中心部）の CY 濃度の経時変化

| 浸漬期間 | 1 日目 | 2 日目 | 3 日目 | 7 日目 | 14 日目 | 21 日目 | 28 日目 | 84 日目 |
|------------|--------|---------|---------|---------|---------|----------|---------|---------|
| 平均値 (g/kg) | 0.0884 | 0.0980 | 0.103 | 0.100 | 0.0986 | 0.102 | 0.101 | 0.0985 |
| SD (g/kg) | 0.0144 | 0.00279 | 0.00242 | 0.00243 | 0.00228 | 0.000400 | 0.00146 | 0.00604 |
| RSD (%) | 16.3 | 2.8 | 2.3 | 2.4 | 2.3 | 0.4 | 1.4 | 6.1 |
| 回収率 (%) | 88.4 | 98.0 | 103.5 | 100.5 | 98.6 | 102.3 | 101.0 | 98.5 |

(n =5)

表 4 たくあん漬けを取り出した後の浸漬液の CY 濃度の経時変化

| 浸漬期間 | 1 日目 | 2 日目 | 3 日目 | 7 日目 | 14 日目 | 21 日目 | 28 日目 | 84 日目 |
|------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 平均値 (g/kg) | 0.126 | 0.108 | 0.103 | 0.100 | 0.0990 | 0.100 | 0.0983 | 0.0954 |
| SD (g/kg) | 0.00376 | 0.00343 | 0.00324 | 0.00355 | 0.00183 | 0.00421 | 0.00157 | 0.00281 |
| RSD (%) | 3.0 | 3.2 | 3.1 | 3.6 | 1.9 | 4.2 | 1.6 | 2.9 |
| 回収率 (%) | 126.4 | 108.4 | 103.3 | 100.0 | 99.0 | 99.7 | 98.3 | 95.4 |

(n =5)

図5 たくあん漬けの部位毎のCY濃度の経時変化

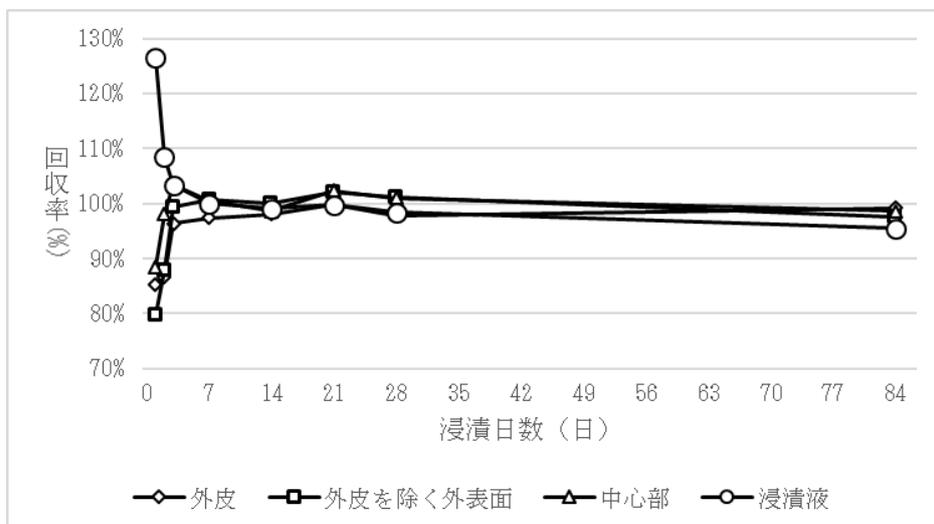


表 5 試作品の CY 濃度

| | 結果 |
|------------|---------|
| 平均値 (g/kg) | 0.100 |
| SD (g/kg) | 0.00254 |
| RSD (%) | 2.5 |
| 回収率 (%) | 100.3 |

(n =5)

表 6 試作品の冷凍保管における安定性試験結果

| 保管期間 | 0 日目 | 28 日目 | 56 日目 | 84 日目 |
|-----------------------|---------|---------|---------|----------|
| 平均値 (g/kg) | 0.100 | 0.0984 | 0.0981 | 0.0985 |
| SD (g/kg) | 0.00254 | 0.00274 | 0.00141 | 0.000499 |
| RSD (%) | 2.5 | 2.78 | 1.44 | 0.51 |
| 安定性確認時の濃度/0 日目の濃度 (%) | | 98.1 | 97.8 | 98.1 |

(n =5)

図 6 試作品の冷凍保管における安定性試験結果

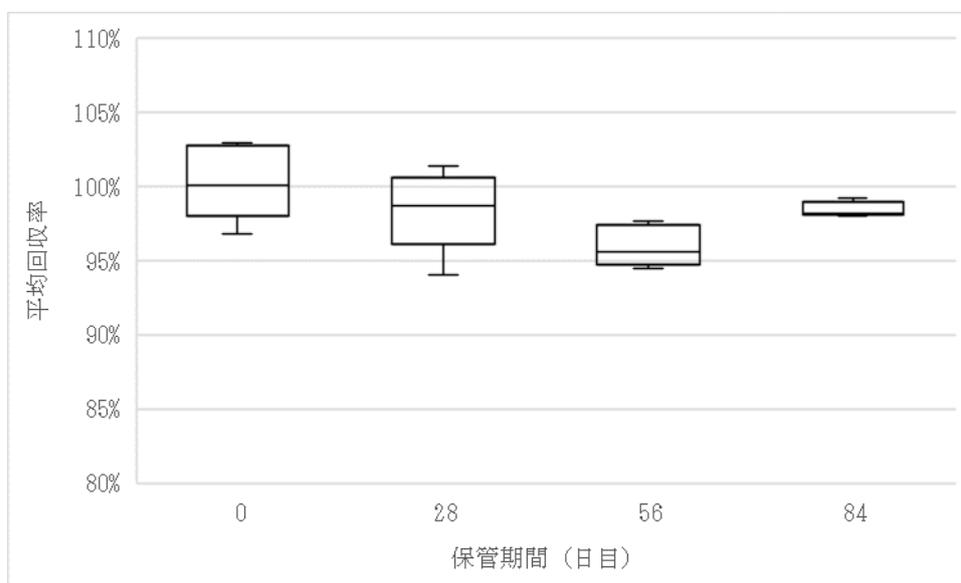


表 7 調査用試料の品質評価 (0 日目)

| | 結果 |
|----------------------------------|---------|
| 平均値 (g/kg) | 0.0980 |
| SD (g/kg) | 0.00215 |
| RSD (%) | 2.2 |
| <i>F</i> 値 | 1.20 |
| <i>F</i> 値に対する有意確率 (<i>P</i> 値) | 0.958 |
| 有意水準 5%点 | 3.02 |

F 値の自由度は (9, 10)

表 8 調査用試料の安定性試験結果 (82 日目)

| | 結果 |
|-------------------------|---------|
| 平均値 (g/kg) | 0.0971 |
| SD (g/kg) | 0.00212 |
| RSD (%) | 2.2 |
| 安定性確認時の濃度/均質性確認時の濃度 (%) | 99.1 |

表9 従来方式による解析結果

| | | |
|--------------------|----------------------------------------------------------|-------|
| 回収機関数 | 12 | |
| データクリーニングによる除外 | なし | |
| データ数 (有効機関数) | 12 | |
| 平均値 (g/kg) | 0.0947 | |
| 標準偏差 (g/kg) | 0.00875 | |
| \bar{X} 管理図による評価 | $LCL : 0.0663 \text{ g/kg}$ 、 $UCL : 0.114 \text{ g/kg}$ | |
| | $\bar{x} < LCL$ | 0 機関 |
| | $LCL \leq \bar{x} \leq UCL$ | 12 機関 |
| | $UCL < \bar{x}$ | 0 機関 |
| R 管理図による評価 | $UCL : 0.0137 \text{ g/kg}$ | |
| | $\bar{x} < LCL$ | 0 機関 |
| | $LCL \leq \bar{x} \leq UCL$ | 11 機関 |
| | $UCL < \bar{x}$ | 1 機関 |
| z -スコアによる評価 | $ z\text{-スコア} < 2$ | 12 機関 |
| | $2 \leq z\text{-スコア} < 3$ | 0 機関 |
| | $3 \leq z\text{-スコア} $ | 0 機関 |

LCL : 下部管理限界線、 UCL : 上部管理限界線

表10 ロバスト方式による解析結果

| | | |
|------------------|-----------------------------|-------|
| メジアン・クリーニングによる除外 | なし | |
| データ数 (有効機関数) | 12 | |
| ロバスト平均値 (g/kg) | 0.0948 | |
| ロバスト標準偏差 (g/kg) | 0.00823 | |
| z -スコアによる評価 | $ z\text{-スコア} < 2$ | 11 機関 |
| | $2 \leq z\text{-スコア} < 3$ | 1 機関 |
| | $3 \leq z\text{-スコア} $ | 0 機関 |

図7 従来方式での \bar{X} 管理図

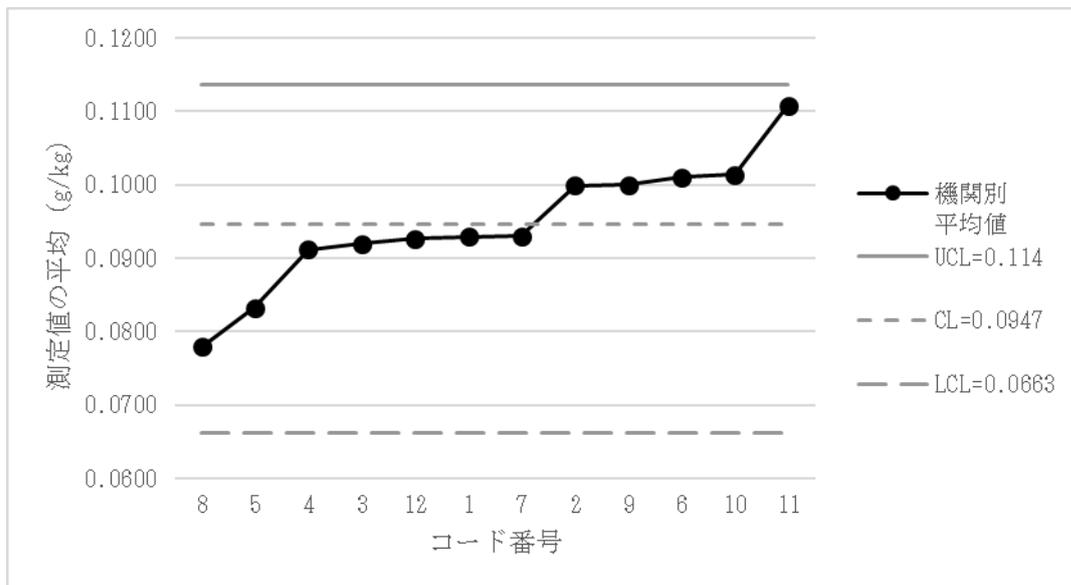


図8 従来方式でのR管理図

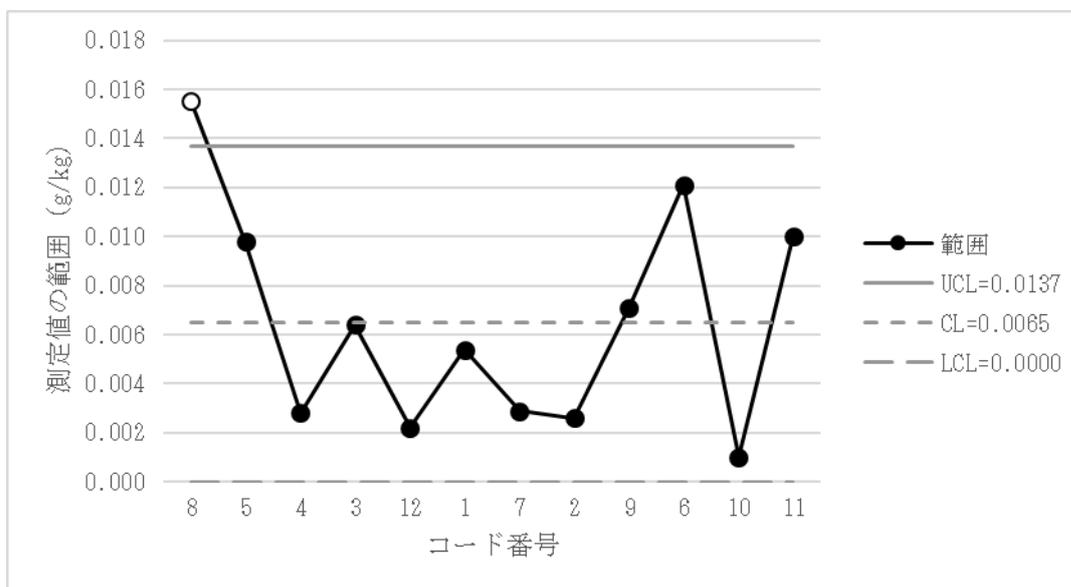


図9 従来方式での z-スコア

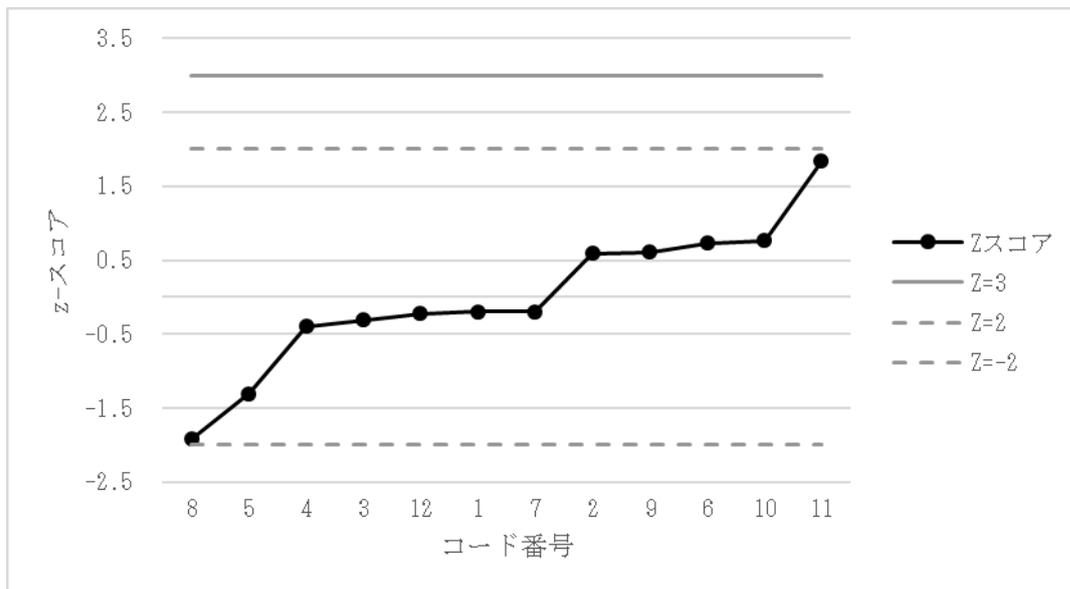


図10 ロバスト方式での z-スコア

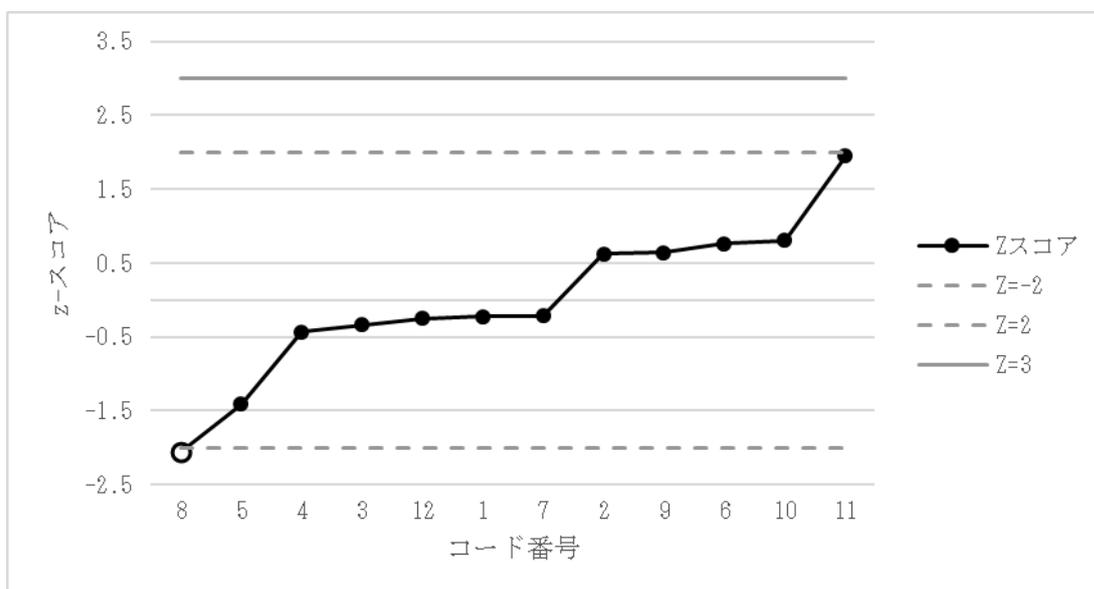


表 11 誘導体化における試料の静置と平均値

(0.1 g/kg にて検出)

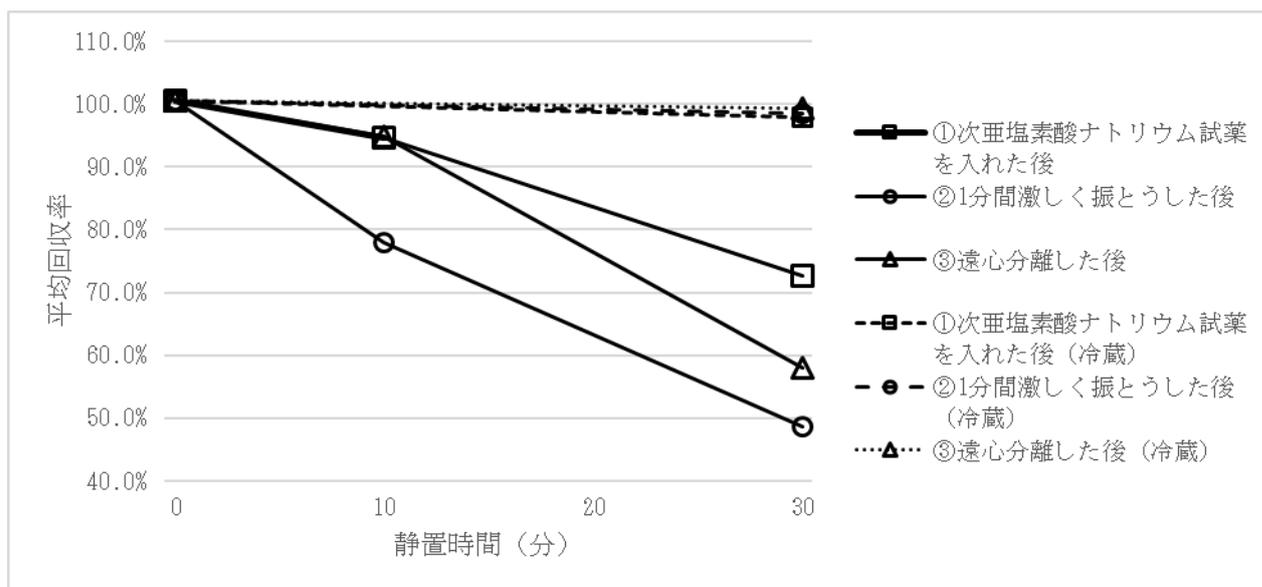
| 静置時間 | 0 分間 | 10 分間 | 30 分間 | 冷蔵 30 分間 |
|--------------------|------------------|--------------------|---------------------|---------------------|
| ①次亜塩素酸ナトリウム試薬を入れた後 | | 0.0947 ±0.00359 | 0.0727 ±0.0112 | 0.0979 ±0.000341 |
| ②1分間激しく振とうした後 | | 0.0779 ±0.00489 | 0.0487 ±0.00899 | 0.0986 ±0.000560 |
| ③遠心分離した後 | | 0.0948 ±0.00189 | 0.0581 ±0.00373 | 0.0994 ±0.000737 |
| ④水層を除去した後 | 0.101 ±0.0014 | N. T. | 0.0965 ±0.000166 | 0.0996 ±0.00109 |
| ⑤炭酸水素ナトリウム溶液を加えた後 | | N. T. | 0.0988 ±0.000792 | 0.0998 ±0.000646 |
| ⑥1分間振とうした後 | | N. T. | 0.0998 ±0.000982 | 0.0989 ±0.000665 |
| ⑦遠心分離した後 | | N. T. | 0.100 ±0.00128 | 0.100 ±0.00112 |

(n =3)

(g/kg)

N. T. : Not Tested

図 11 誘導体化における試料の静置と平均回収率 (①~③のみ)



(n =3)

図 12 新規分析法の改良前後のクロマトグラム

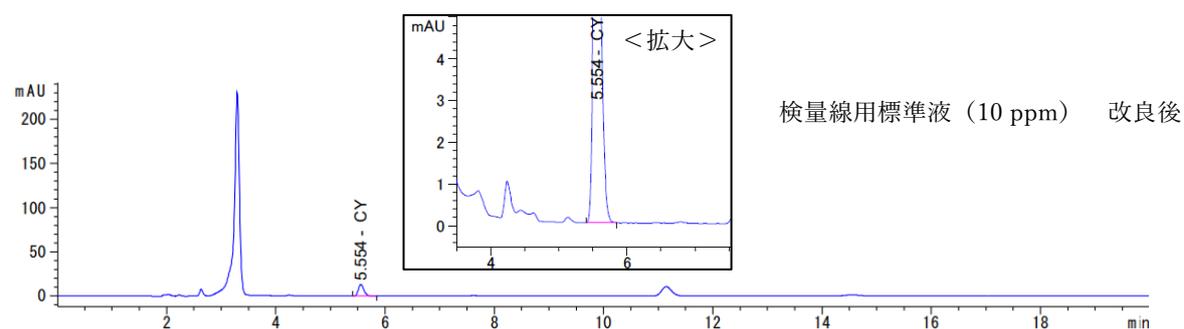
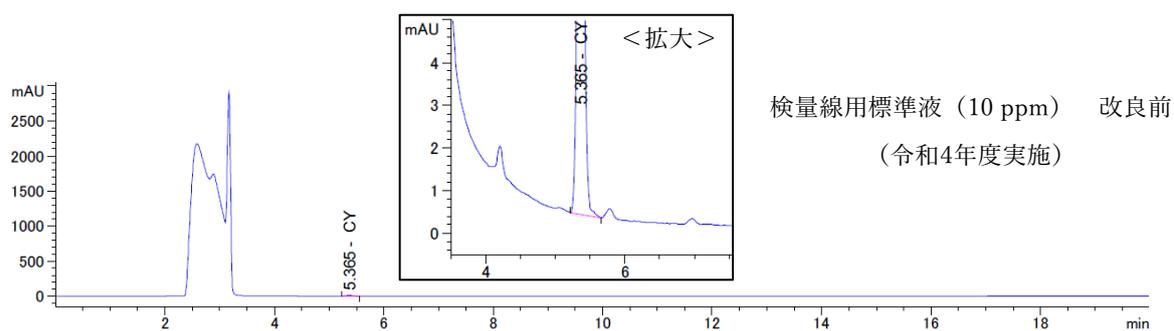
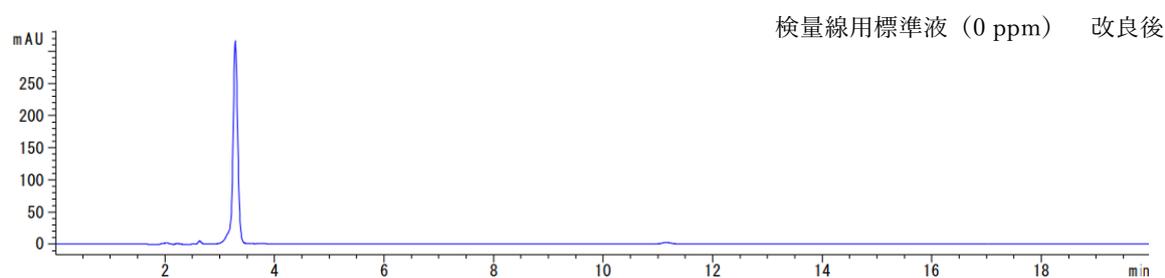
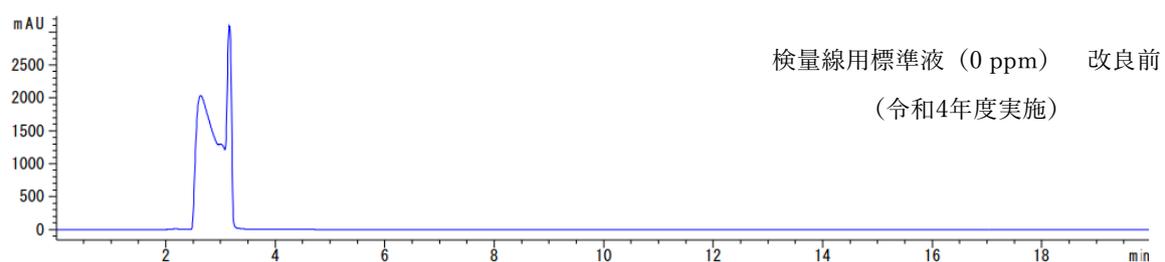
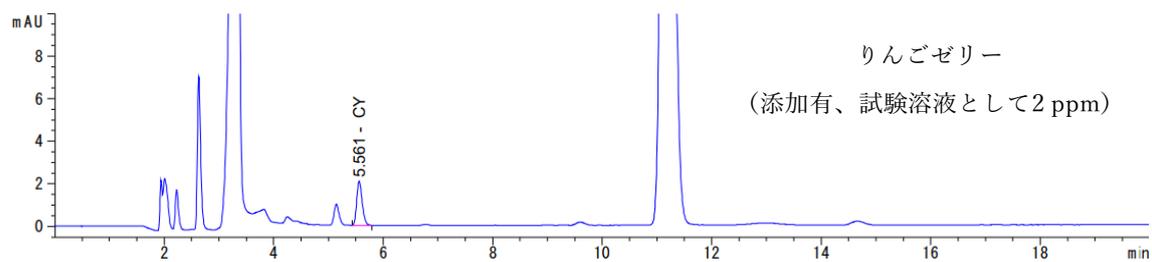
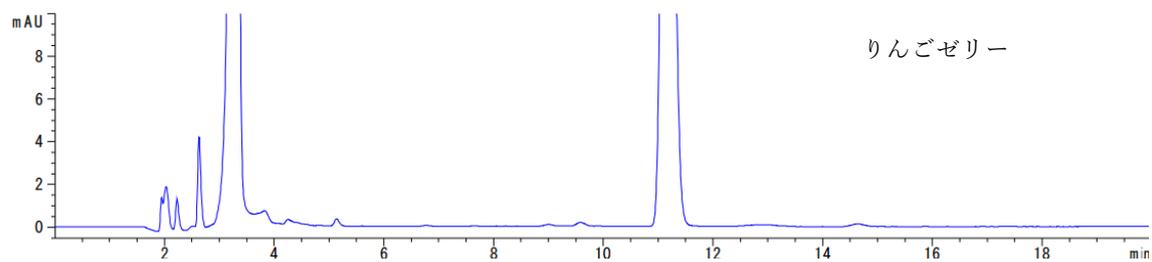
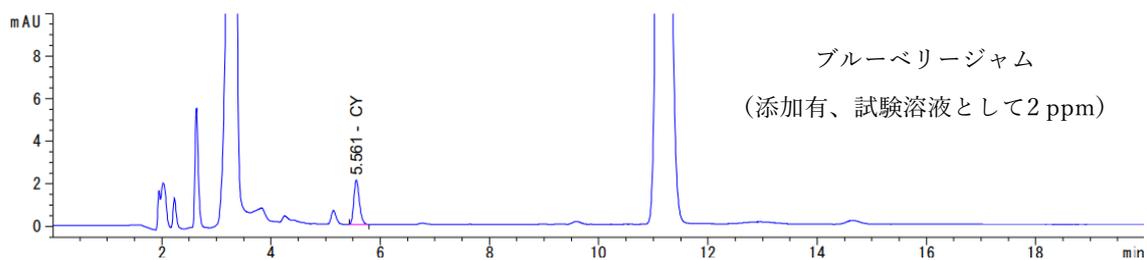
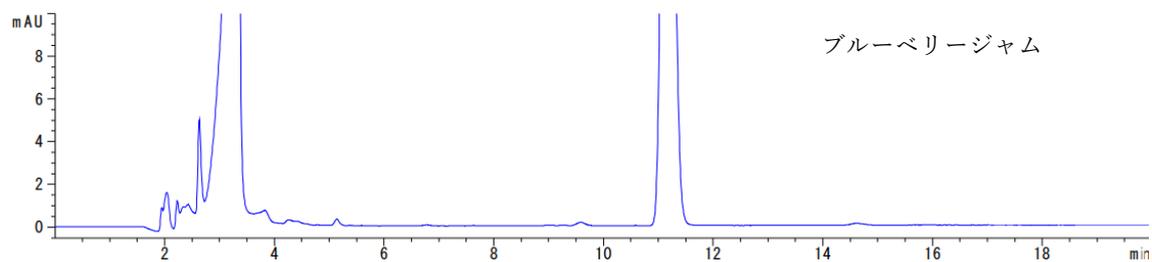


図 13 新規分析法（改良後）のクロマトグラム



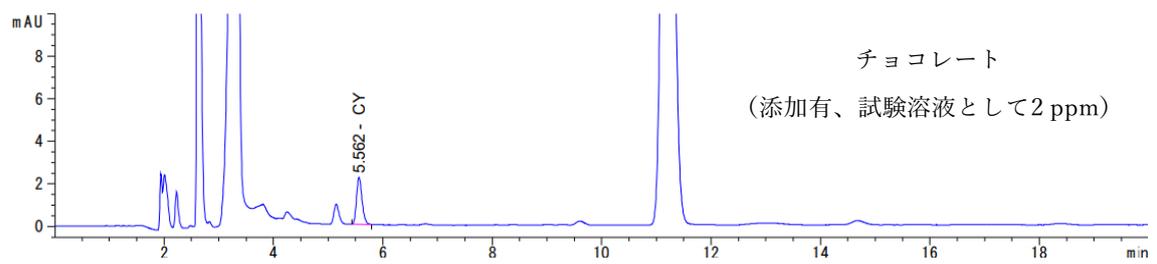
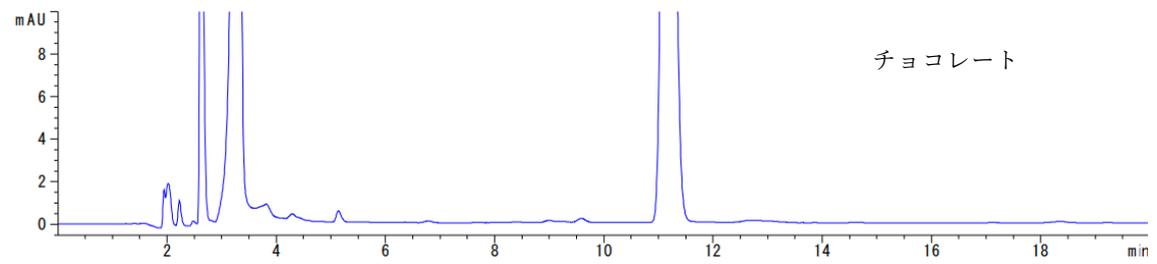
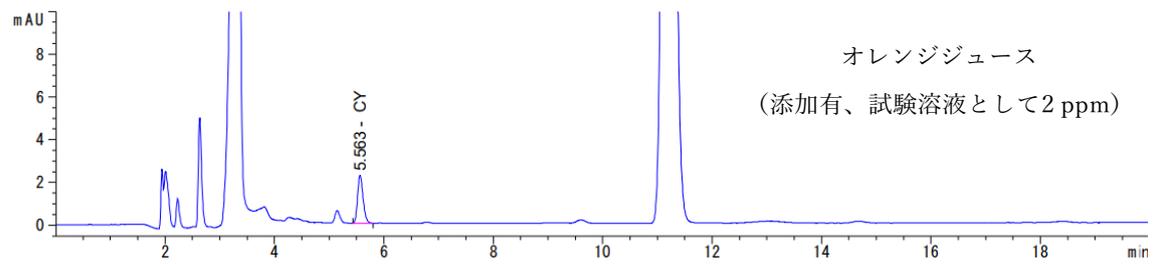
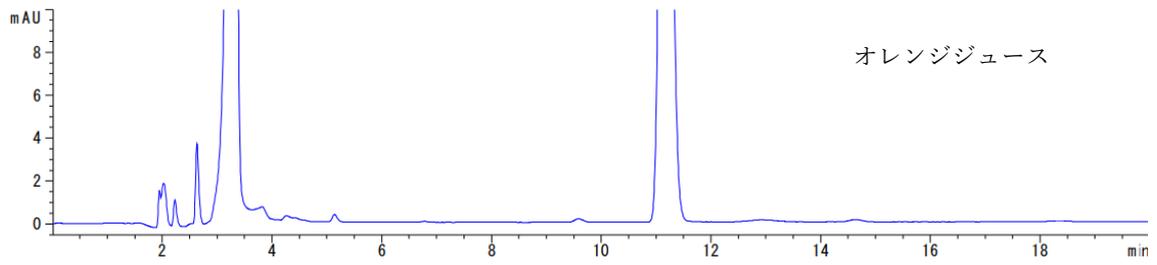


表 12 新規分析法における添加回収試験結果 (0.02 g/kg にて検出)

| 検体 | ブルーベリー ジャム | りんごゼリー | オレンジ ジュース | チョコレート |
|-----------|---------------|---------|--------------|---------|
| 平均値(g/kg) | 0.0198 | 0.0201 | 0.0204 | 0.0209 |
| SD(g/kg) | 0.000862 | 0.00218 | 0.00126 | 0.00179 |
| RSD(%) | 4.3 | 10.9 | 6.2 | 8.6 |
| 回収率(%) | 99.2 | 100.4 | 102.0 | 104.6 |

($n=3$)