

製)、カラム温度：50℃で1分間保持した後、+25℃/分で125℃まで昇温し、さらに+10℃/分で300℃まで昇温し、6.5分間保持、注入口温度：220℃、検出器温度：230℃（イオン源）、注入方式：スプリットレス、キャリアガス：ヘリウム、注入量：1μL、イオン化条件：EI、定量に用いた m/z：169（EPN）、174（EPN- $d_5$ ）、314（クロルピリホス）、324（クロルピリホス- $d_{10}$ ）、160（アラクロール）

#### 4. 評価方法

##### (1) マトリックス効果の検証

標識体に対する分析対象農薬の含有量比と面積比との関係を表した検量線を作成し、その傾き等からマトリックス効果の影響を評価した。

##### (2) 外部精度管理調査試料の分析

次式から農薬濃度を求めた。

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

ただし、 $C$ ：試料中の農薬濃度、 $F_c$ ：前処理の精度に関わる係数（= 1）、 $R_s$ ：試料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、 $R_c$ ：検量線用液Bの測定における分析対象農薬の標識体に対する面積比、 $F_c$ ：検量線用液Bの調製ばらつきに関わる係数（= 1）、 $M_c$ ：検量線用液B中の農薬混合液の質量、 $C_c$ ：農薬混合液中の測定対象農薬の高純度標準品の濃度、 $P$ ：分析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、 $M_{sp(c)}$ ：検量線用液B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。

#### （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、特に有害な溶媒（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. マトリックス効果の検証

MF 検量線溶液AとMM 検量線溶液Aのそれぞれについて検量線を作成した。その結果を図1に示す。各対象農薬とその標識体の含有比と、両者の面積比は良好な直線関係（ $R^2 > 0.999$ ）を示した。一方で、ほとんどの対象農薬について、MF 検量線溶液Aを用いて作成した検量線の方が、MM 検量線溶液Aを用いて作成した検量線よりも傾きは大きくなり、特にフェニトロチオンとイソキサチオンでは15%以上も大きくなった。IDMSの検量線の傾きが試料マトリックスに包括的に影響されるという事象は、報告者が知る限りこれまでに報告はなかった。MF 検量線溶液AとMM 検量線溶液AのSIMクロマトグラムの例を図2に示す（両検量線溶液中の農薬濃度は同じ）。検量線の傾きの差が大きい農薬ほど、MF 検量線溶液Aの測定における標識体ピークの強度が、測定対象農薬のピーク強度に対して相対的に小さくなることが確認され、両化合物の同位体平衡が完全には成立していないことが示唆された。昨年度の本研究において、マトリックスのない検量

線溶液を用いた場合には IDMS における回収率が低くなることを報告したが、本研究の結果は、その原因を明らかにしたものである。

GC におけるマトリックス効果は、GC 装置内での分析対象物質の不可逆的な吸着に起因し、特に試料注入孔の寄与が大きいと考えられている。そこで、スプリットレス注入法よりも吸着が少ないと考えられるオンカラム注入法を適用し、図 1 と同様な検量線を作成した。スプリットレス注入法とオンカラム注入法による検量線の傾きの比 (MF 検量線溶液 A に対する MM 検量線溶液 A の比) を表 1 に示す。注入方式の違いによって傾きの比が異なることから、注入孔において分析対象農薬とその標識体の吸着様相が異なっていることが示された。ただし、オンカラム注入法を用いた場合でも、検量線の傾きが 1 より明らかに大きい農薬もあり、注入孔以外への吸着も無視できないと考えられた。

以上のように、標識体を内標準に用いた IDMS においても、マトリックス効果の影響を完全に排除することは困難であった。そのため IDMS においても、マトリックスマッチングした検量線溶液を用いることが、高信頼性分析のために有効であることが示された。

## 2. 外部精度管理調査試料の分析

前項で精確さを確認した分析法 1 と、別途精確さを確認した分析法 2 によって、平成 26 年度外部精度管理調査 (残留農薬検査 I) の調査試料を分析した。代表的なクロマトグラムを図 3 と図 4 に

示す。また、得られた定量値を図 5 と図 6 にまとめる。クロルピリホスの定量値は分析法 1 が 40.30~41.53  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、分析法 2 が 41.06  $\mu\text{g}/\text{kg}$  及び 41.78  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、EPN の定量値は分析法 1 が 231.5~240.8  $\mu\text{g}/\text{g}$ 、分析法 2 が 240.6  $\mu\text{g}/\text{g}$  及び 246.2  $\mu\text{g}/\text{g}$  であり (分析法 1 :  $n=5$ 、分析法 2 :  $n=2$ )、両法の結果はほぼ一致していた。そこで、分析法毎に (1) 式の  $F_c$ 、 $R_s$ 、 $R_c$ 、 $M_{sp(s)}$ 、 $M_s$  に係わる不確かさから算出した合成標準不確かさを重みとして、重み付け平均値とその不確かさを算出したところ、クロルピリホス :  $(41.2 \pm 1.7) \mu\text{g}/\text{kg}$ 、EPN :  $(241 \pm 15) \mu\text{g}/\text{kg}$  (重み付け平均値  $\pm$  拡張不確かさ (包含係数 : 2)) であった。

以上の結果を外部精度管理調査の結果と比較した (図 5、図 6)。調査試料の調製における分析対象農薬の添加濃度は、クロルピリホスが 40  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、EPN が 240  $\mu\text{g}/\text{kg}$  であり、IDMS による定量結果はこれと良く一致した。一方、外部精度管理調査の参加機関の結果から決定した付与値 ( $2\sigma$  処理後の従来方式による) とその標準偏差の 2 倍は、クロルピリホスが  $(37.027 \pm 7.978) \mu\text{g}/\text{kg}$ 、EPN が  $(214.064 \pm 61.672) \mu\text{g}/\text{kg}$  であった。IDMS による定量値はこれよりクロルピリホスについて 11%、EPN について 12% 高かった。また、その原因として、参加機関のほとんどが試料前処理における分析対象農薬の回収率 (損失) を補正していないためと考えられた。一方、参加機関間の報告値のばらつき (標準偏差) に対して、IDMS による定量値の不確かさはクロルピリホスについて

21 %、EPN について 25 %であり、IDMS の不確かさは充分小さいことが示された。

#### E. 結論

マトリックスマッチング法を適用した IDMS によって、食品マトリックス中農薬を精確に分析することが可能になった。また、この方法によって平成 26 年度外部精度管理調査（残留農薬検査 I）の調査試料を分析した結果、同法によって真度が高くかつ不確かさが小さい分析値を得られることを確認した。以上の結果から、本法は外部精度管理調査試料中の分析対象農薬の高信頼性分析に有効な定量法であると考えられた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) 鎗田孝、大竹貴光、青柳嘉枝、黒岩孝義芳、沼田雅彦、高津章子（産業技術総合研究所）：Proficiency testing for determination of pesticide residues in soybean: comparison of assigned values from participants' results and isotope-dilution mass spectrometric determination、*Talanta*、Vol. 132、pp. 269-277、2014

##### 2. 学会発表

1) 鎗田孝、大竹貴光、青柳嘉枝（産業技術総合研究所）、高坂典子、鈴木達也、渡辺卓穂（食品薬品安全センター）：同位体希釈質量分析法による食品衛生外部精

度管理調査試料（残留農薬分析用）の分析、2014年度AOAC International日本セクション年次大会、東京、2014

2) 鎗田孝、大竹貴光、青柳嘉枝（産業技術総合研究所）：安定同位体標識内部標準を用いた残留農薬分析におけるマトリックス効果の影響、第37回農薬残留分析研究会、仙台、2014

3) 大竹貴光、鎗田孝、青柳嘉枝、沼田雅彦、高津章子（産業技術総合研究所）：農薬残留玄米試料を用いた技能試験結果の概要、第37回農薬残留分析研究会、仙台、2014

#### 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

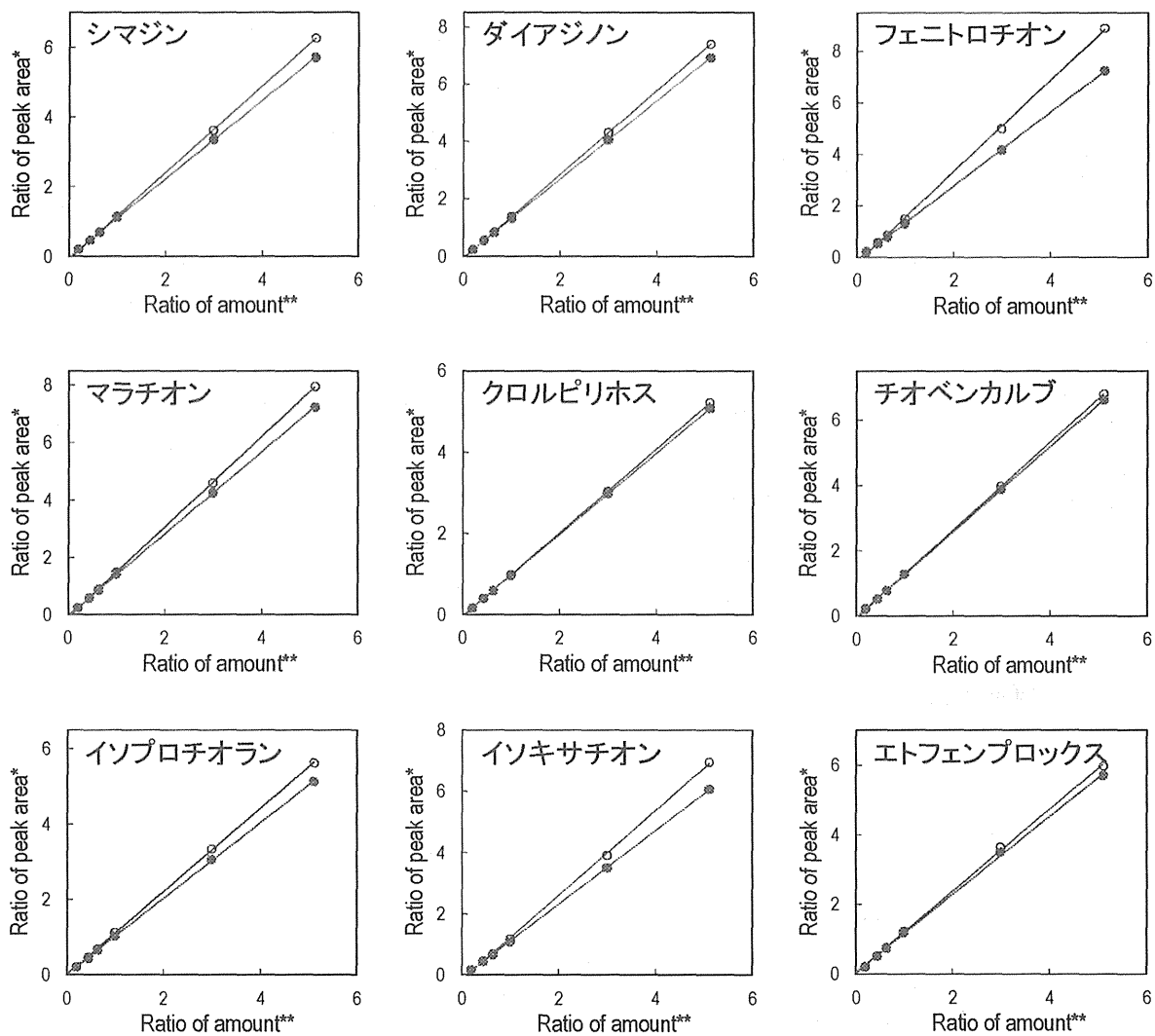


図1 IDMSにおける検量線の比較

\* 標識体に対する分析対象農薬のピーク面積比

\*\* 標識体に対する分析対象農薬の含有量比

○:マトリックスのない検量線溶液(MF検量線溶液A)

●:とうもろこしペーストの前処理液でマトリクスマッチングした検量線溶液(MM検量線溶液A)

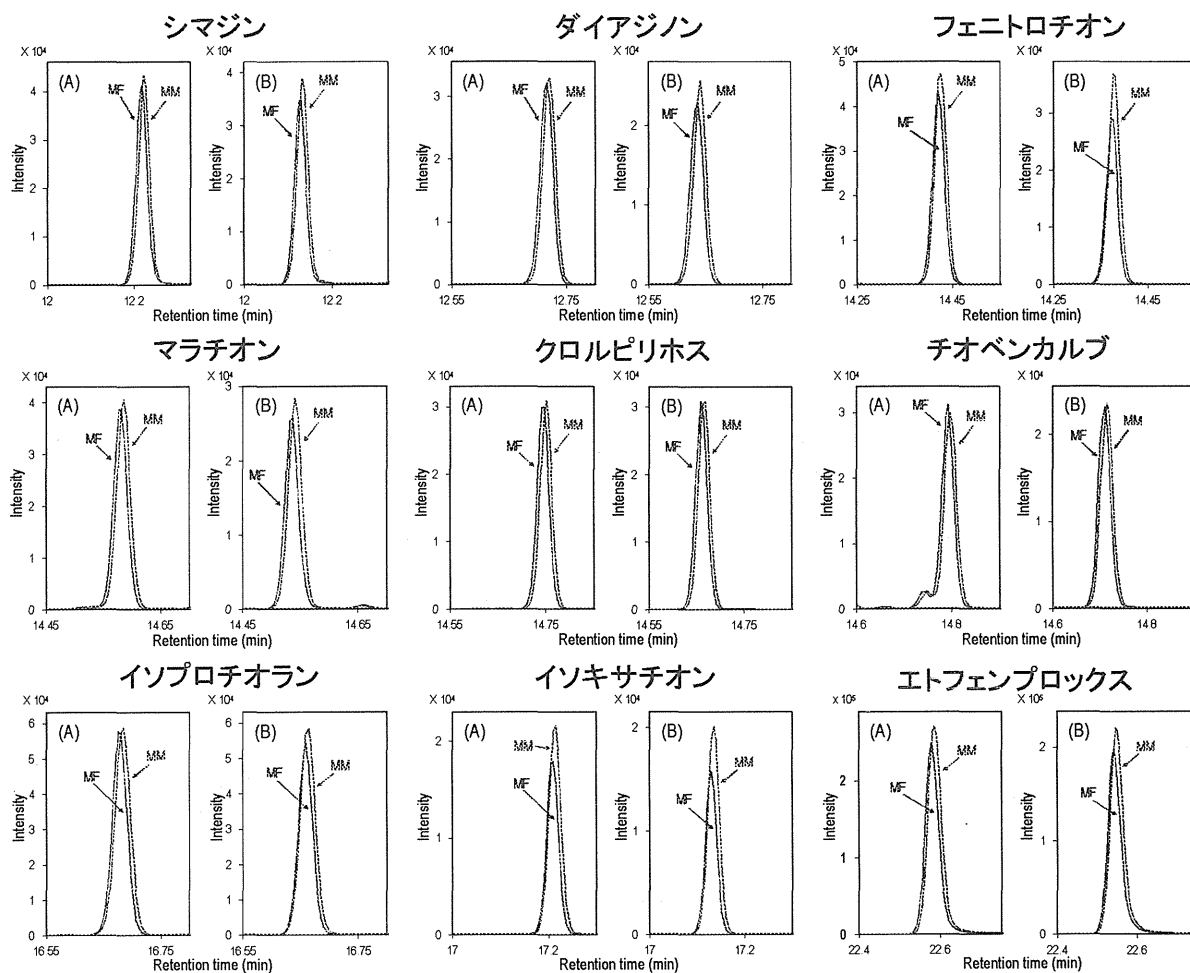


図2 SIMクロマトグラムの比較

(A)は分析対象農薬、(B)は標識体のクロマトグラムを示す

MF:マトリックスのない検量線溶液(MF検量線溶液A)

MM:とうもろこペーストの前処理液でマトリックスマッチングした検量線溶液(MM検量線溶液A)

表1 IDMSの検量線の傾きに及ぼす試料注入方式の影響

	スプリットレス注入	オンカラム注入
シマジン	1.10	1.11
ダイアジノン	1.07	1.03
フェニトロチオン	1.23	1.14
マラチオン	1.10	1.05
クロルピリホス	1.03	1.04
チオベンカルブ	1.03	1.02
イソプロチオラン	1.10	1.04
イソキサチオン	1.15	1.08
エトフェンプロックス	1.05	1.02

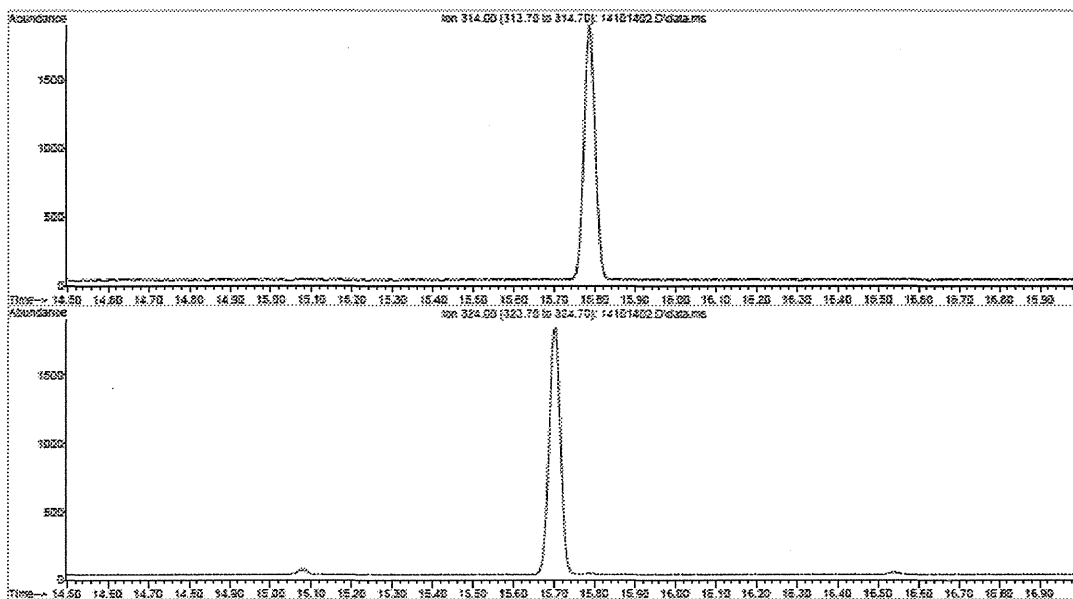


図3 外部精度管理調査試料中クロルピリホスのGC/MSクロマトグラム (分析法1)  
 上段：クロルピリホス、下段：クロルピリホス- $d_{10}$

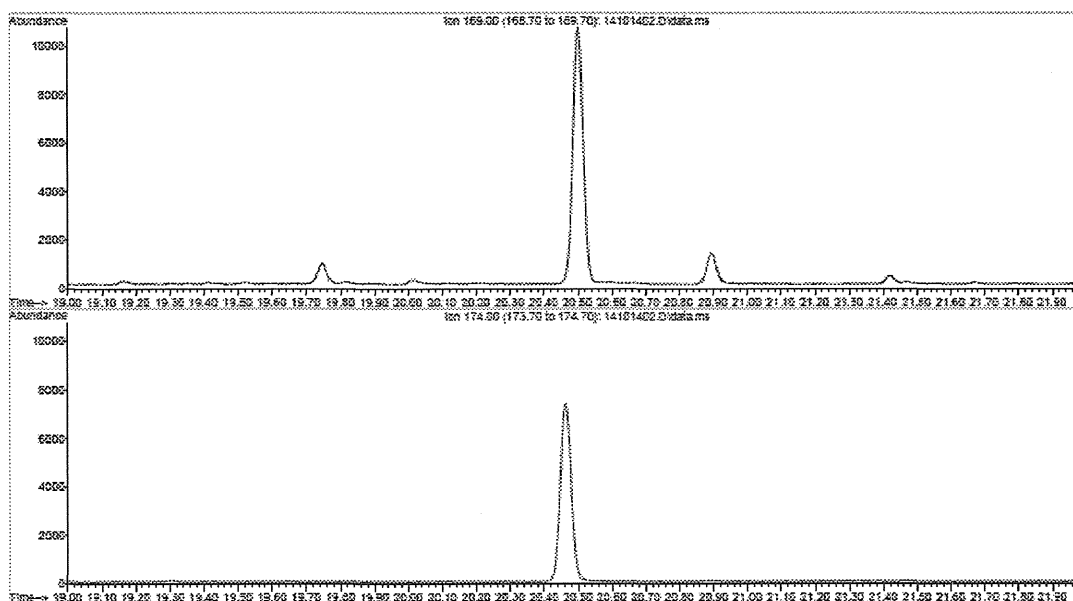


図4 外部精度管理調査試料中EPNのGC/MSクロマトグラム (分析法1)  
 上段：EPN、下段：EPN- $d_5$

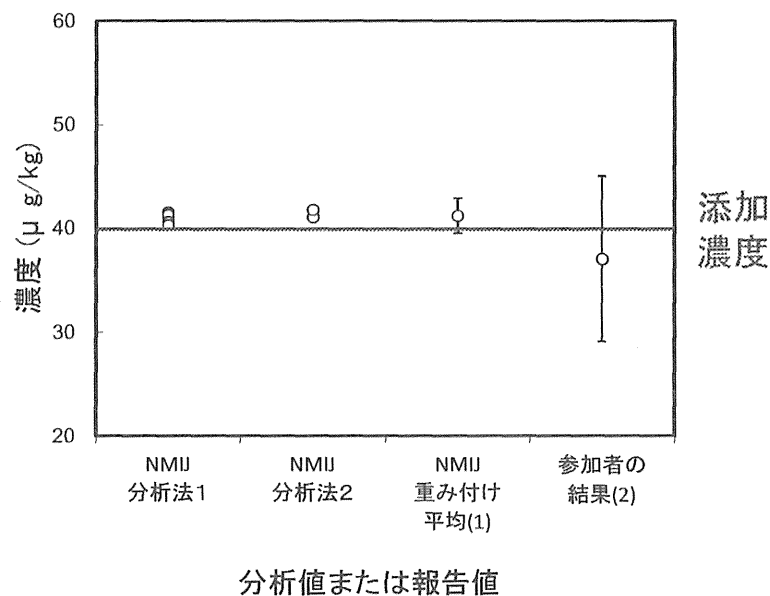


図5 外部精度管理調査試料中クロルピリホスの分析結果の比較  
 (1) 平均±拡張不確かさ ( $k=2$ )、(2)  $2\sigma$  処理後の従来方式：平均±標準偏差の2倍

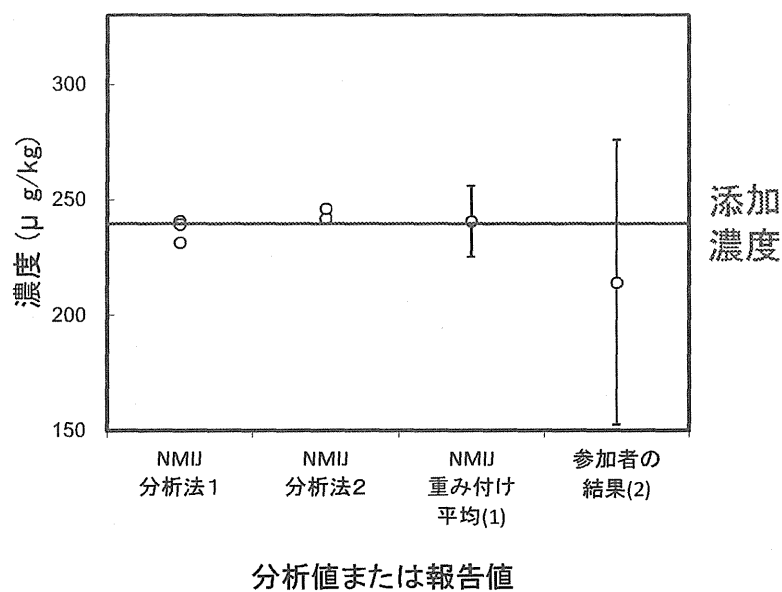


図6 外部精度管理調査試料中EPNの分析結果の比較  
 (1) 平均±拡張不確かさ ( $k=2$ )、(2)  $2\sigma$  処理後の従来方式：平均±標準偏差の2倍



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 26 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、カビ毒検査)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）  
— 理化学検査のための適正調査試料の作製検討 —

主任研究者	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
	佐藤 夏岐	（一財）食品薬品安全センター秦野研究所 研究員
	池田 真季	（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、新規基材の開発も課題である。そこで、今年度はこれらの必須項目を満たす残留農薬検査に関する調査試料の作製を試みた。

固体試料の基材として、米類（玄米および精米）の適用性を検討した。農薬添加溶媒に酢酸エチルを用い、米類を浸漬後、浸漬溶媒を留去し得られた米類を乾燥・粉碎することで、添加農薬濃度が均一となることから、これまでに明らかとなっている。その検討の中で、農薬濃度を経日的に測定した結果、約半年～1年の間で、濃度が半減する現象があったことから、今年度は、玄米および精米のそれぞれ新米ならびに古米に4種農薬（ダイアジノン、クロルピリホス、マラチオンおよびフェニトロチオン）を添加し、それらの冷蔵保存における安定性を検討した。また、米類成分の農薬に及ぼす影響として、加熱の有無による安定性の違いを検討した。その結果、非加熱の米類に添加した農薬は、いずれも、農薬添加後経日的に緩い減少傾向を示したものの、30日間で添加濃度に対し、80%以上の回収率が得られた。

精米および玄米を比較すると、いずれの農薬でも添加後30日間において玄米の方が精米より添加濃度に対する回収率が高い傾向があり、マラチオンを除き、他の3種の農薬は、添加後30日間においても約90%の回収率が得られた。新米および古米の比較では、精米および玄米ともに顕著な差は認められなかった。一方、加熱した米類に添加した農薬はいずれの米類も農薬添加後、経日的に顕著な減少傾向を示し、すべての米類のクロルピリホスおよび玄米のフェニトロチオンを除いて、30日間ですべてが80%以下となった。精米および玄米を比較すると、いずれの農薬で添加後30日間において、非加熱の米類と同様に玄米の方が精米より添加濃度に対する

回収率が高い傾向があった。しかしながら、添加後 30 日においては、クロルピリホスおよびフェニトロチオンを除く他の 2 種については、添加濃度に対し約 80% 以下の回収率であった。また、新米および古米の比較では、精米および玄米ともに顕著な差は認められなかった。これらのことから、加熱処理を施した米類への農薬添加は、農薬の安定性の観点からは適さないことが明らかとなった。

また、上記固体試料とは別に、これまでのほうれんそうやにんじんなど水分含量が高い従来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。4 種農薬（ダイアジノン、クロルピリホス、マラチオンおよびフェニトロチオン）を添加したところ、従来の野菜ペーストと同様の混合法では、いずれの農薬も均一性が得られなかったことから、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%および 20%）および油分添加（添加量：2%、5%および 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、今年度は、これらの冷凍保存における安定性（0、1、2、3、6 および 9 か月間）を検討した。その結果、いずれの基材および農薬で、経日的に減少傾向を示し概ね 3 か月間は、約 80% 以上の回収率が得られたが、その後、水分 20% では著しく回収率が減少し、また油分 10% では、全体的にばらつきが大きかった。すべての農薬について、いずれの基材でも均一性は確保できたが、上記理由から、水分 20% および油分 10% は適さないことが明らかとなった。

#### 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、今年度は残留農薬検査を対象とした検討を行った。

#### B. 研究方法

今年度は、残留農薬検査に使用する調査試料として、玄米および精米を選択して 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。この他、これまでのほうれんそうやにんじんなど水分含量が高い従来の野菜ペーストに加えて枝豆ペーストについても検討を加えた。

##### 1. 試料基材および試薬

###### 1) 試料基材

市販の玄米および精米のそれぞれ新米（平成 26 年産）ならびに古米（平成 22 年産）、以下、米類、枝豆ペースト（新進）

###### 2) 標準品

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

(Dr. Ehrenstorfer GmbH)

### 3) 試薬

蒸留水、アセトニトリル (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) 試料作製用使用機器

ブリクサー5 プラス (エフ・エム・アイ、以下、ブリクサー)、遠心粉砕機

(Retsch)、送風型定温乾燥器 (ウィンディオーブン WF0-601SD)

### 2) 試料抽出用機器

オムニミキサー (日本精機)、減圧濃縮器 (東京理化工械)

### 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)

### 4) 測定条件

カラム : DB-210 (内径 0.25 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25  $\mu$ m)、カラム流量 : 2.5 mL/min、カラム温度 : 60°C で 2 分間保持し、その後毎分 10°C で昇温し、200°C に到達後 10 分間保持、注入口温度 : 250°C、検出器温度 : 250°C、キャリアガス : ヘリウム

## 3. 試料作製

### 1) 玄米および精米

基材成分の農薬に対する影響の確認として、玄米および精米それぞれの古米な

らびに新米を用い、加熱処理の有無の違いについて、添加農薬の回収率および安定性を検討した。

加熱処理を行う場合は、条件を 60°C で 6 時間とし、加熱後、室温まで放冷し、以下の操作を行った。

基材である米類をそれぞれ遠心粉砕機で粉砕、粉末化後、直ちに 10 g をそれぞれ量り採り、添加用農薬混合標準液 (ダイアジノン、クロルピリホスおよびマラチオン 1  $\mu$ g/mL、フェニトロチオン 2  $\mu$ g/mL、アセトン溶液) 1 mL を正確に加え、試料に十分浸潤させた (理論値 : ダイアジノン、クロルピリホスおよびマラチオン 0.1  $\mu$ g/g、フェニトロチオン 0.2  $\mu$ g/g)。また、同様に粉砕、粉末化した米類それぞれに、添加用農薬混合標準液の代わりにアセトン 1 mL を添加し、ブランク試料とした。

これらの試料について、各農薬の回収率および冷蔵保存 (加熱した米類については 0、5、10、20、30 および 60 日間、非加熱の米類は 0、5、10、20 および 30 日間) における安定性を検討した (各 n=3)。

### 2) 枝豆

前年度までに、枝豆ペーストを基材として用いることの適用性を検討した結果、農薬を均一に添加混合できる条件が、明らかとなった。枝豆ペーストに農薬を直接添加した場合は、均一性が確保できず、水あるいは油分を適量添加することで均一性が得られることから、水分および油分として大豆油を添加し、均質化した基材に農薬標準液を添加したものについて、冷凍保存による安定性 (0、1、2、

3、6 および9か月間) を評価した。

ブリクサーを用いて均質化した枝豆ペースト2kgに、水を5%、10%および20%、ならびに大豆油を2%、5%および10%となるように各々添加後、ブリク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  $\mu\text{g/mL}$ 、マラチオンおよびフェニトロチオン100  $\mu\text{g/mL}$ 、アセトン溶液) 10 mLを正確に加え、更に、ブリクサーを用いて混合した。各々 100 gを量りとり、容器に入れ冷凍保存した

(理論値:ダイアジノン0.01  $\mu\text{g/g}$ 、クロルピリホス0.3  $\mu\text{g/g}$ 、マラチオンおよびフェニトロチオン0.5  $\mu\text{g/g}$ )。また、同様に前処理をした枝豆ペーストに水5%、10% および20%、ならびに大豆油を2%、5%および10%となるように各々添加後、添加用農薬混合標準液の代わりにアセトンを添加し、同様に操作して得られた試料を、水5%、10% および20%、および油2%、5%および10%ブランク試料とした。これらの、冷凍保存における安定性を検討した。

#### 4. 試験方法

測定操作は、「食品衛生検査指針 残留農薬編(2003)」に準じた。

試料10.0 gを量り採り、アセトン100 mLで1回、更に50 mLで2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。濃縮物に飽和塩化ナトリウム溶液100 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°C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、玄米およ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、アセトニトリル層を合わせた後、アセトニトリルを留去した。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) 玄米および精米

米類を農薬添加溶媒に浸漬後、浸漬溶媒を留去し、得られた米類を乾燥・粉碎する作製方法により、添加農薬の均質性が得られることが、これまでに明らかになった。しかしながら、作製後、約6ヶ月～1年の時点で、添加農薬の濃度が半減する現象が見られたことから、今年度は、それらが米成分に由来する可能性の確認として、粉碎・粉末化した米類に農薬を添加し冷蔵保存におけるそれらの経日的安定性（農薬添加後加熱した米類については0、5、10、20、30および60日間、非加熱の米類は0、5、10、20および30日間）を検討した。併せて、米自体が持つ酵素等が影響を与える可能性を考慮して、それらを失活させる目的で、同種の米類を加熱後、農薬を添加し、その後の冷蔵保存による安定性（農薬添加後0、5、10、20および30日間）を検討した。なお、それぞれの測定時点および米の種類に応じてブランク試料についても同時に測定を行ったところ、一部の時点および農薬において基材由来のピークが出現したため、それらを差し引いて回収率の算出を行った。

その結果、非加熱の米類に添加した農薬は、いずれも、農薬添加後経日的に緩い減少傾向を示したものの、30日間で添加濃度に対し、80%以上の回収率であった（表1～4、図1～4）。

精米および玄米を比較すると、いずれの農薬でも添加後30日において玄米の方が精米より添加濃度に対する回収率がわずかに高い傾向があり、マラチオンを

除き、他の3種の農薬は、添加後30日間においても添加濃度に対し約90%の回収率が得られた。

新米および古米の比較では、精米および玄米ともに顕著な差は認められなかった。

また、農薬の中では、クロルピリホスがいずれの米の種類でも比較的安定した回収を示し、特に玄米の古米および新米とも添加後30日間で90%以上の良好な回収が得られた。また、フェントロチオンは、玄米の古米および新米において添加後30日間で90%以上の良好な回収を示した。

一方、加熱した米類に添加した農薬は、いずれの米類も農薬添加後、経日的に顕著な減少傾向を示した（表5～8、図5～8）。

精米および玄米を比較すると、いずれの農薬でも添加後30日間において、非加熱の米類と同様に玄米の方が精米より添加濃度に対する回収率が高い傾向があった。しかしながら、添加後30日においては、クロルピリホスおよびフェントロチオンを除く他の2種については、添加濃度に対し約80%以下の回収率であった。

また、農薬の中では、非加熱の米類と同様にクロルピリホスがいずれの米の種類でも比較的安定した回収を示し、玄米の古米および新米とも添加後30日間で80%以上の回収が得られた。非加熱の米類では、フェントロチオンが、良好な回収を示したことに反し、加熱した米類では、添加後60日で約80%以下にまで減少した。

加熱処理をした米類の方が、非加熱の米類と比較し、概して減少傾向が著しく、添加農薬の安定を図るには適さないと考えられた。米中酵素は、50~60℃においても活性化する場合もあり、今回の加熱条件では完全に失活できない可能性も考えられるが、60℃以上の加熱をした場合、糖質、脂質およびタンパク質等の更なる変性・変質が予測されることから、より苛酷な加熱条件を検討することは難しいと考えられる。

今回の実験では、非加熱の米類において、添加後30日間では、農薬の著しい減少傾向は認められずこれまでの結果に反しているが、約半年から1年で半減した試料は、酢酸エチルの農薬標準液に浸漬し、乾燥後、粉碎機を用いることで、若干の熱負荷がある点などが異なり、作製条件を考慮した安定性の確認も必要である。一般的には、今回使用した有機りん系農薬は、アルカリには不安定だが、酸には比較的安定とされている。今回の安定性の確認を目的とした試験設定と酢酸エチル溶液にて添加した場合の試料とで農薬の安定性に大きく影響を及ぼす要因があるかについても精査する必要があると考えられた。

今後は、60日以降も継続して安定性を検討することと併せて、農薬を添加する際に用いる溶媒の種類についても、均一性のみでなく、安定性の観点からも確認を行う。

## 2) 枝豆

先の米類などの固体試料とは別に、これまでの野菜ペーストに加えて新たに枝

豆ペースト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に、基材に農薬混合標準液を添加し混合（試料中追加濃度：ダイアジノン0.01 $\mu$ g/g、クロルピリホス0.3 $\mu$ g/g、およびマラチオンおよびフェニトロチオン0.5 $\mu$ g/g）したところ、いずれの農薬も均一性が得られなかったことから、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試み、水分添加（5%、10%および20%）および油分添加（2%、5%および10%）のいずれも良好な均一性が得られている。そこで、今年度は、それらの冷凍保存における安定性を検討し、適切な水分あるいは油分の添加量を選択することとした。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も同時に測定を行ったところ、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影響を及ぼすものはなかったが、冷凍保存9か月間で油分2%および5%については、ダイアジノンの保持時間付近にブランク試料由来の妨害ピークが出現し、測定が困難となった。また、油分10%については、冷凍保存9か月間で4種農薬すべての保持時間付近にブランク試料由来の妨害ピークが出現し、測定が困難となった。

水分添加基材については、作製後9か月までの間、いずれの農薬のいずれの測定時点でも、F値が有意水準5%点の3.020未満であり、安定して良好な均一性を示す結果が得られたが、水分添加量の異なる3条件とも、4種農薬で添加量

に対する回収率は、減少傾向であった。特に、水分を20%添加した場合はダイアジノンの回収率が作製後6か月以降で急激に低下し、回収率が比較的安定であったクロルピリホスも9か月で回収率が80%以下となった(表9~11、図9~11)。

油分添加基材については、作製後9か月までの間、いずれの農薬のいずれの測定時点でも、F値が有意水準5%点の3.020未満であり、安定して良好な均一性を示す結果が得られたが、水分添加基材と同様に、添加量の異なる3条件とも、4種農薬で添加量に対する回収率は、減少傾向であった。油分の添加量の違いによる回収率および安定性の明らかな差は見られなかったが、油分10%については、均一性はあるものの概して測定値のバラツキがやや大きく、さらには冷凍保存9か月間で4種農薬すべての保持時間付近にブランク試料由来の妨害ピークが出現し、測定が困難となった。また本来の枝豆の成分とは脂質の点において異なることから、油分10%添加基材は適切ではないと考えられた(表12~14、図12~14)。

## 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の作製を目的とし、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. 玄米および精米

新たに、固体試料である穀類の粉末試

料を基材として、玄米および精米の適用の可能性を検討したところ、非加熱の玄米において比較的安定した添加農薬の回収が得られた。また、古米あるいは新米で、回収率および安定性に顕著な差が見られなかったことから、随時市販品を購入し作製できることが明らかとなった。今後数か月~6か月程度までさらなる安定性を確認する必要がある。

## 2. 枝豆

枝豆ペーストを基材として試料作製を試みた結果、枝豆自体が本来もつ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、良好な均一性および安定性が得られた。

実試料化に向けて、今後は、凍結融解安定性および60~100kgの実作製量に応じた作製方法の検討が必要である。

## 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



表1 非加熱精米の古米に添加した各種農薬の安定性

測定時点につき、各 n=3

添加農薬		冷蔵保存日数(日)				
		0	5	10	20	30
ダイアジノン	平均値(μg/g)	0.0940	0.0975	0.0928	0.0873	0.0873
	RSD(%)	1.5	1.1	2.3	3.9	1.7
	回収率(%)	94.0	97.5	92.8	87.3	87.3
クロルピリホス	平均値(μg/g)	0.0979	0.0929	0.0898	0.0926	0.0907
	RSD(%)	0.9	1.1	3.3	5.6	3.8
	回収率(%)	97.9	92.9	89.8	92.6	90.7
マラチオン	平均値(μg/g)	0.0961	0.0876	0.0825	0.0859	0.081
	RSD(%)	1.7	0.8	2.1	5.7	4.7
	回収率(%)	96.1	87.6	82.5	85.9	81.0
フェントロチオン	平均値(μg/g)	0.195	0.189	0.175	0.173	0.174
	RSD(%)	1.6	0.4	2.9	6.6	1.3
	回収率(%)	97.5	94.5	87.5	86.5	87.0

表2 非加熱精米の新米に添加した各種農薬の安定性

測定時点につき、各 n=3

添加農薬		冷蔵保存日数(日)				
		0	5	10	20	30
ダイアジノン	平均値(μg/g)	0.0924	0.0889	0.0917	0.0924	0.0872
	RSD(%)	4.6	3.5	3.1	1.6	2.8
	回収率(%)	92.4	88.9	91.7	92.4	87.2
クロルピリホス	平均値(μg/g)	0.0894	0.0905	0.0966	0.0965	0.092
	RSD(%)	4.4	3.9	0.9	2.7	1.1
	回収率(%)	89.4	90.5	96.6	96.5	92.0
マラチオン	平均値(μg/g)	0.0926	0.0855	0.0865	0.0804	0.0804
	RSD(%)	4.1	2.5	0.8	2.5	4.7
	回収率(%)	92.6	85.5	86.5	80.4	80.4
フェントロチオン	平均値(μg/g)	0.184	0.182	0.185	0.177	0.171
	RSD(%)	5.4	2.5	0.6	4.1	1.1
	回収率(%)	92.0	91.0	92.5	88.5	85.5

表3 非加熱玄米の古米に添加した各種農薬の安定性

測定時点につき、各 n=3

添加農薬		冷蔵保存日数(日)				
		0	5	10	20	30
ダイアジノン	平均値(μg/g)	0.0935	0.0938	0.0955	0.0929	0.0917
	RSD(%)	1.9	2.1	3.5	0.5	0.6
	回収率(%)	93.5	93.8	95.5	92.9	91.7
クロルピリホス	平均値(μg/g)	0.0919	0.0917	0.0936	0.0912	0.0916
	RSD(%)	1.5	2.7	2.5	1.5	1.5
	回収率(%)	91.9	91.7	93.6	91.2	91.6
マラチオン	平均値(μg/g)	0.0828	0.0793	0.0800	0.0873	0.0882
	RSD(%)	1.2	2.8	3.5	3.1	1.7
	回収率(%)	82.8	79.3	80.0	87.3	88.2
フェントロチオン	平均値(μg/g)	0.186	0.191	0.192	0.184	0.193
	RSD(%)	1.5	1.6	3.5	1.1	1.0
	回収率(%)	93.0	95.5	96.0	92.0	96.5

表4 非加熱玄米の新米に添加した各種農薬の安定性

測定時点につき、各 n=3

添加農薬		冷蔵保存日数(日)				
		0	5	10	20	30
ダイアジノン	平均値(μg/g)	0.0971	0.0955	0.0983	0.0922	0.0971
	RSD(%)	1.7	2.1	0.6	1.7	2.2
	回収率(%)	97.1	95.5	98.3	92.2	97.1
クロルピリホス	平均値(μg/g)	0.0936	0.0925	0.0944	0.0899	0.0946
	RSD(%)	1.9	3.6	1.5	0.7	2.7
	回収率(%)	93.6	92.5	94.4	89.9	94.6
マラチオン	平均値(μg/g)	0.0899	0.0812	0.0840	0.0847	0.0921
	RSD(%)	3.4	1.4	3.0	2.0	3.5
	回収率(%)	89.9	81.2	84.0	84.7	92.1
フェントロチオン	平均値(μg/g)	0.191	0.194	0.192	0.184	0.194
	RSD(%)	1.9	3.8	2.0	0.3	2.1
	回収率(%)	95.5	97.0	96.0	92.0	97.0

表5 加熱精米の古米に添加した各種農薬の安定性

測定時点につき、各 n=3

添加農薬		冷蔵保存日数(日)					
		0	5	10	20	30	60
ダイアジノン	平均値(μg/g)	0.0957	0.0960	0.0869	0.0820	0.0763	0.0743
	RSD(%)	4.0	3.1	0.8	1.7	3.5	3.1
	回収率(%)	95.7	96.0	86.9	82.0	76.3	74.3
クロルピリホス	平均値(μg/g)	0.0948	0.0951	0.0882	0.0814	0.0870	0.0824
	RSD(%)	2.3	3.6	0.6	3.6	3.4	0.6
	回収率(%)	94.8	95.1	88.2	81.4	87.0	82.4
マラチオン	平均値(μg/g)	0.0850	0.0871	0.0749	0.0694	0.0712	0.0643
	RSD(%)	2.0	2.3	0.8	3.3	5.5	3.0
	回収率(%)	85.0	87.1	74.9	69.4	71.2	64.3
フェントロチオン	平均値(μg/g)	0.198	0.197	0.168	0.153	0.157	0.146
	RSD(%)	0.8	25.0	1.3	5.4	5.3	3.2
	回収率(%)	99.0	98.5	84.0	76.5	78.5	73.0

表6 加熱精米の新米に添加した各種農薬の安定性

測定時点につき、各 n=3

添加農薬		冷蔵保存日数(日)					
		0	5	10	20	30	60
ダイアジノン	平均値(μg/g)	0.0864	0.0960	0.0916	0.0854	0.0772	0.0818
	RSD(%)	1.5	3.1	2.5	5.7	3.5	2.7
	回収率(%)	86.4	96.0	91.6	85.4	77.2	81.8
クロルピリホス	平均値(μg/g)	0.0875	0.0934	0.0938	0.0864	0.0877	0.0875
	RSD(%)	4.9	2.2	1.5	6.8	2.7	0.9
	回収率(%)	87.5	93.4	93.8	86.4	87.7	87.5
マラチオン	平均値(μg/g)	0.0844	0.0766	0.0749	0.0694	0.0649	0.0582
	RSD(%)	5.2	2.9	0.8	3.3	1.2	2.0
	回収率(%)	84.4	76.6	74.9	69.4	64.9	58.2
フェントロチオン	平均値(μg/g)	0.197	0.195	0.174	0.162	0.155	0.143
	RSD(%)	0.9	2.1	1.2	8.4	1.4	1.0
	回収率(%)	98.5	97.5	87.0	81.0	77.5	71.5

表7 加熱玄米の古米に添加した各種農薬の安定性

測定時点につき、各 n=3

添加農薬		冷蔵保存日数(日)					
		0	5	10	20	30	60
ダイアジノン	平均値(μg/g)	0.0946	0.0968	0.0943	0.0826	0.0803	0.0809
	RSD(%)	2.3	3.2	1.9	3.5	0.8	1.1
	回収率(%)	94.6	96.8	94.3	82.6	80.3	80.9
クロルピリホス	平均値(μg/g)	0.0884	0.0927	0.0957	0.0803	0.0911	0.0895
	RSD(%)	7.6	2.5	1.1	3.8	2.7	1.7
	回収率(%)	88.4	92.7	95.7	80.3	91.1	89.5
マラチオン	平均値(μg/g)	0.0839	0.0806	0.0827	0.0759	0.0805	0.0715
	RSD(%)	5.7	0.7	2.8	0.9	4.9	1.2
	回収率(%)	83.9	80.6	82.7	75.9	80.5	71.5
フェントロチオン	平均値(μg/g)	0.196	0.212	0.187	0.169	0.182	0.165
	RSD(%)	0.3	2.1	1.3	4.0	3.4	2.2
	回収率(%)	98.0	106	93.5	84.5	91.0	82.5

表8 加熱玄米の新米に添加した各種農薬の安定性

測定時点につき、各 n=3

添加農薬		冷蔵保存日数(日)					
		0	5	10	20	30	60
ダイアジノン	平均値(μg/g)	0.0966	0.0966	0.0846	0.0874	0.0814	0.0921
	RSD(%)	4.4	3.0	0.5	2.9	2.4	2.1
	回収率(%)	96.6	96.6	84.6	87.4	81.4	92.1
クロルピリホス	平均値(μg/g)	0.0809	0.0883	0.0882	0.0914	0.0919	0.0842
	RSD(%)	1.0	4.3	1.9	2.0	0.2	3.3
	回収率(%)	80.9	88.3	88.2	91.4	91.9	84.2
マラチオン	平均値(μg/g)	0.0941	0.0742	0.0702	0.0776	0.0777	0.0637
	RSD(%)	3.3	7.5	3.4	1.0	1.3	5.7
	回収率(%)	94.1	74.2	70.2	77.6	77.7	63.7
フェントロチオン	平均値(μg/g)	0.195	0.201	0.170	0.184	0.184	0.165
	RSD(%)	0.4	6.0	1.7	1.1	1.7	2.2
	回収率(%)	97.5	101	85.0	92.0	92.0	82.5