

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を加えて振とうし、得られたEAおよびHex層を合わせた。無水Na₂SO₄によって脱水した後、EAとHexを除去し、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Na₂SO₄ 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AN/Tol (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 mg/500 mg) をAN/Tol (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/Tol (3:1) 混液20 mLを注入した。全溶出液を1 mL以下に濃縮し、Ac10 mLを加えて再度1 mL以下に濃縮し、Ac5 mLを加えた後に溶媒を除去した。残留物を2 mLのシリンジスパイク溶液Aに溶解し、試料溶液とした。

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。測定条件は、カラムに Agilent Technologies 製 DB-35MS (30 m×0.25 mm、膜厚 0.25 μm) を用いた以外は分析法1と同じである。

(3) 分析法 3

玄米粉末 (比較試料) 5 gに内標準溶液B0.4 mLおよび内標準溶液C0.4 mLを加えて静置した。水10 mLを加えてさらに15分間静置し、AN10 mLを加えて1分間振とう (手振り) した。これに4 gのMgSO₄、1 g

のNaClを加え、セラミックホモジナイザーを用いて1分間振とう (手振り) した。この抽出液を4000 rpmで5分間遠心分離し、上澄み液 (6 mL) に300 mgのPSA、45 mgのグラファイトカーボンブラック、300 mgのC18、900 mgのMgSO₄を加え、1分間振とう (手振り) した。再度4000 rpmで5分間遠心分離した後、上澄み液を分画し、窒素を用いて乾固した。これにAc2 mLを加えた後1 mLずつ分画し、窒素を用いて乾固した後、それぞれをシリンジスパイク溶液Bとシリンジスパイク溶液Cに転溶して試料溶液 (GC用) および試料溶液 (LC用) とした。

試料溶液 (GC用) 中のエトフェンプロックスとフェニトロチオンをGC/MSによって測定した。測定条件は以下の通り。装置：6890/5973C GC/MSシステム (Agilent Technologies製)、カラム：DB-35MS (30 m×0.25 mm、膜厚0.25 μm、Agilent Technologies製)、カラム温度：50 °Cで1分間保持した後、+20 °C/分で180 °Cまで昇温し、さらに+5 °C/分で300 °Cまで昇温し、10分間保持、注入口温度：220 °C、検出器温度：230 °C (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：1 μL、イオン化条件：EI、定量に用いたm/z：163 (エトフェンプロックス)、168 (エトフェンプロックス-d₅)、277 (フェニトロチオン)、283 (フェニトロチオン-d₆)、160 (アラクロール)。

一方、試料溶液 (LC用) 中のチアメトキサムをLC/MSによって測定した。測定条件は以下の通り。装置：1260LC/6120MSシステム (Agilent Technologies製)、カラ

ム：Zorbax Eclipse Plus C18 (150 mm×2.1 mm、粒径 3.5 μm、Agilent Technologies製)、カラム温度：40 ℃、溶離液A：5 mmol/L 酢酸アンモニウム水溶液、溶離液B：5 mmol/L 酢酸アンモニウム-メタノール (体積割合) 溶液、グラジエント条件：15 %B (0分) →40 %B (1分) →40 %B (3.5分) →50 %B (3.6分～6分) →55 %B (6.1分～8分) →95 %B (8.1分～17.5分) →95 %B (30分) →15 %B (30.1分～35分) 注入量：5 μL、イオン化条件：ESI、定量に用いたm/z：211 (チアメトキサム)、214 (チアメトキサム-d₃)、213 (イミダクロプリド-d₄)。

(4) 分析法 4

玄米粉末 (比較試料) 3 gに内標準溶液B0.4 mLおよび内標準溶液C0.4 mLを加えて静置した、これに水10 mLを加えて15分静置した後、AN25 mLを加えて細砕し、吸引ろ過した。ろ紙上の残留物にAN10 mLを加えて細砕した後、吸引ろ過した。これにNaCl10 gと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。その後、あらかじめAN10 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、振とうによって得られたAN層とAN2 mLを通液する処理を行った。得られた処理液を無水Na₂SO₄によって脱水し濃縮・乾固した後、AN/Tol (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 mg/500 mg) をAN/Tol (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/Tol (3:1) 混液20 mLを注入した。全溶出液を乾固して得られた残さを

Ac5 mLに溶解させ、これを2.5 mLずつ分画し、窒素を用いて乾固した。得られた抽出物をそれぞれシリジスパイク溶液Bとシリジスパイク溶液Cに転溶して試料溶液 (GC用) および試料溶液 (LC用) とした。

試料溶液 (GC用) 中のエトフェンプロックスとフェニトロチオンをGC/MSによって、また試料溶液 (LC用) 中のチアメトキサムをLC/MSによって測定した。測定条件は、分析法3と同じである。

4. 評価方法

(1) 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A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Aの調製ばらつきに関わる係数 (= 1)、 M_c ：検量線用液A中の農薬混合液Aの質量、 C_c ：農薬混合液A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Aの質量、 M_s ：試料量、 $M_{sp(c)}$ ：検量線用液A中の内標準溶液Aの質量、である。なお、マトリックスマッチ検量線溶液Aを用いて算出した測定結果を本分析の分析値 (報告値) としたが、比較のために検量線溶液Aを用いた測定結果も算出した。

(2) QuEChERS 法の評価

(1) 式に準じて QuEChERS 法（分析法 3）と一斉試験法（分析法 4）による分析値を算出し、両者を比較することにより各抽出法の正確さを評価した。なお、マトリックスマッチ検量線溶液 B およびマトリックスマッチ検量線溶液 C を用いて得た測定値による比較を行ったが、マトリックス効果が測定値に与える影響を検討するために、検量線溶液 B および検量線溶液 C を用いた測定値も算出した。

（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. 外部精度管理調査試料の分析

分析法 1 と分析法 2 によって、平成 27 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。分析法 1 によって得られた代表的なクロマトグラムを図 1 と図 2 に示す。また、定量値を図 3 と図 4 にまとめる。クロルピリホスの定量値は分析法 1 が 20.4~21.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、分析法 2 が 19.4~21.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、マラチオンの定量値は分析法 1 が 795~849 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、分析法 2 が 790~823 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であり ($n=5$)、両法の結果はほぼ一致していた。

各分析法について、(1) 式の各要因の不確かさを基に得られた分析値の合成標準不確かさを算出した。その結果を表 1~4 にまとめる。ここで、 F_c 、 R_s 、 R_c 、

$M_{\text{sp}(s)}$ 、 M_s 以外の要因は分析法 1 と分析法 2 で共通である。そこで、前記 5 要因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：(20.8 \pm 0.9) $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、マラチオン：(814 \pm 30) $\mu\text{g}/\text{kg}$ （重み付け平均値 \pm 拡張不確かさ（包含係数：2））であった。なお、マトリックスマッチングを行っていない検量線溶液 A を用いて算出した測定値は、クロルピリホスが分析法 1 で 20.4~21.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、分析法 2 で 19.1~21.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、マラチオンが分析法 1 で 754~805 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、分析法 2 が 747~792 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であり、マトリックスマッチ検量線溶液 A との結果と比べて特にマラチオンの測定結果に偏りが生じることが確認された。この傾向は、昨年度の本研究の結果を支持するものであった。

以上の結果を外部精度管理調査の結果と比較した（図 3、図 4）。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 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、マラチオンが 800 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であり、IDMS による定量結果はこれと一致した。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（ 2σ 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 (20.115 \pm 6.422) $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、マラチオンが (739.322 \pm 21.4784) $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった。マラチオンについては、IDMS による定量値はこれより 10 % 高く、平成 25 年度および平成 26 年度における結果の同様であった、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、クロルピリホスについては、参加機関の結果から決定した付与値と、IDMS の結果や調製値とはほぼ一致していた。研究の目的から外れるために、本研究ではその原因の解明は行わなかった。しかし、外部精度管理における参加者の分析値の傾向を把握するためにも、その原因を解明することは意義深い。

なお、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とマラチオンとも 14 %であり、IDMS の不確かさは充分小さいことが示された。

2. QuEChERS 法の評価

QuEChERS 法と一斉試験法によって得られた定量値を図 5 に示す。クリーンアップや GC/MS および LC/MS 過程では分析対象農薬とその標識体の中で同位体平衡が成り立っていると考えられることから、両分析結果の差は、抽出過程での抽出能力の差に起因していると考えられる。実験の結果から、両分析値に有意な差はなく、簡易分析法にもかかわらず QuEChERS 法によって正確な分析値が得られることが示された。なお、マトリックスマッチングしていない検量線 B を用いた場合、GC/MS で定量するエトフェンプロックスとフェニトロチオンについて、各々 13 %と 22 %定量値が低くなった。QuEChERS 法は一斉試験法よりも精製効果が低いと考えられたため、IDMS においてもマトリックス効果の影響をより強く受ける可能性がある。QuEChERS 法によってより精確な IDMS 分析を行うた

めは、今後マトリックス効果に関するより詳細な検討が必要である。

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、平成 27 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。これより、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。一方、IDMS 法を適用することにより、日本の検査機関においても広く適用されている QuEChERS 法の抽出能力を精密に評価した。その結果、検討した農薬について一斉試験法の同等の抽出能力が認められたことから、同法の正確さが確認できた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 鎗田孝、青柳嘉枝、大竹貴光（産業技術総合研究所）：Evaluation of the impact of matrix effect on quantification of pesticides in foods by gas chromatography-mass spectrometry using isotope-labeled internal standards、Journal of Chromatography A、Vol. 1396、pp. 109-116、2015

2. 学会発表

1) 鎗田孝、大竹貴光、青柳嘉枝、沼田

雅彦、高津章子（産業技術総合研究所）：
玄麦残留農薬分析に関する技能試験にお
ける2種類の付与値の比較、2015年度AOAC
International日本セクション年次大会、
東京、2015

2) 大竹貴光、鎗田孝（産業技術総合研
究所）：QuEChERS法と一斉試験法による玄
米中農薬の定量値の比較、第110回日本食
品衛生学会学術講演会、京都、2015

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

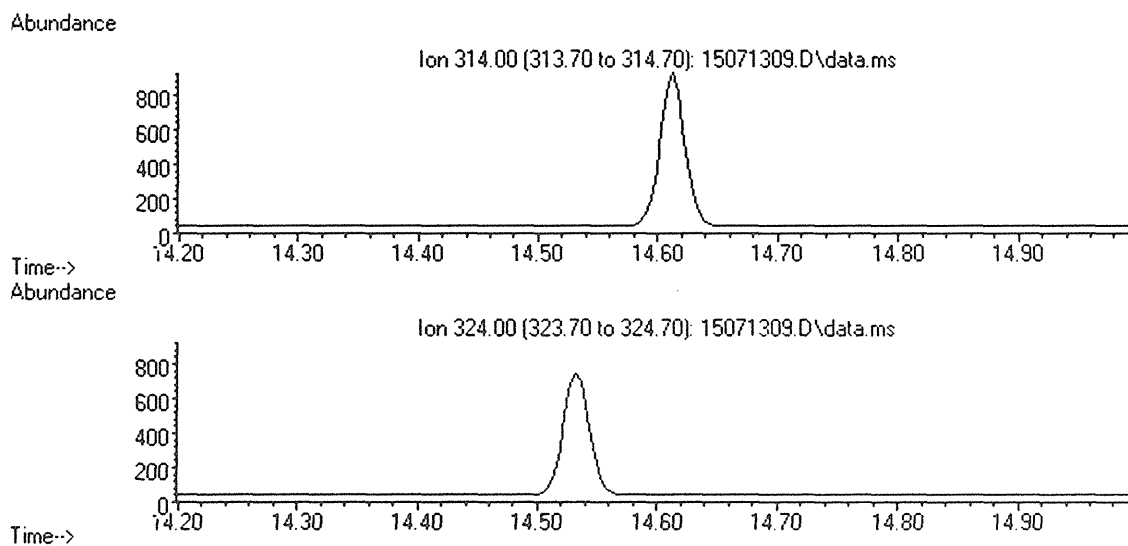


図1 外部精度管理調査試料中クロルピリホスのGC/MSクロマトグラム (分析法1)
 上段：クロルピリホス、下段：クロルピリホス- d_{10}

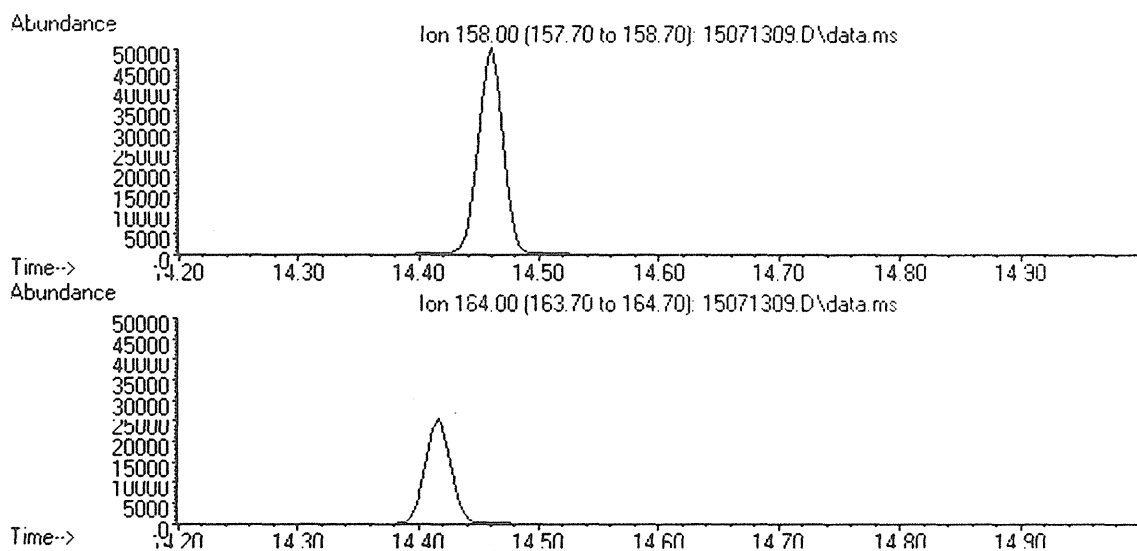


図2 外部精度管理調査試料中マラチオンのGC/MSクロマトグラム (分析法1)
 上段：マラチオン、下段：マラチオン- d_6

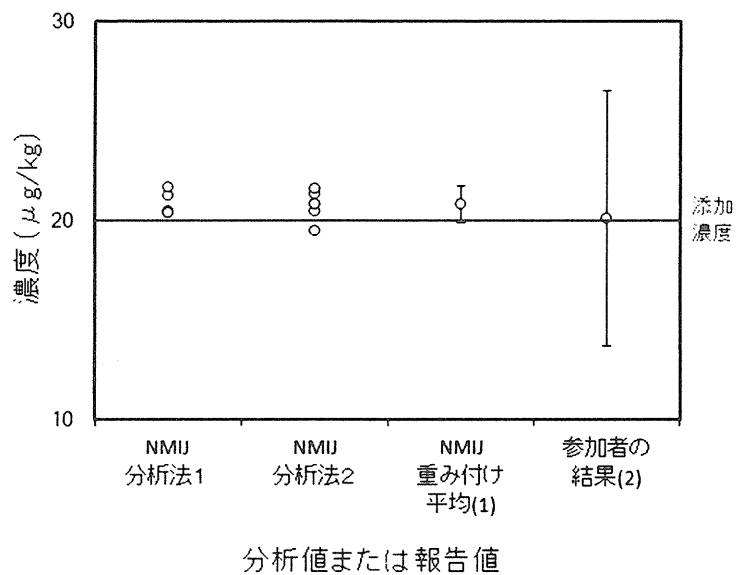


図3 外部精度管理調査試料中クロルピリホスの分析結果の比較
 (1) 平均±拡張不確かさ ($k=2$)、(2) 平均±標準偏差の2倍 (暫定値)

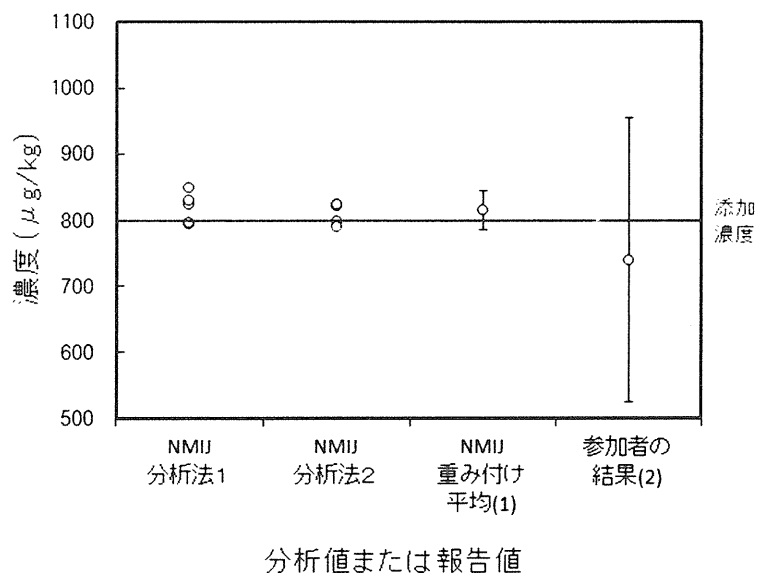


図4 外部精度管理調査試料中EPNの分析結果の比較
 (1) 平均±拡張不確かさ ($k=2$)、(2) 平均±標準偏差の2倍 (暫定値)

表1 分析法1によるクロルピリホスの分析値に関する不確かさ

要因	x_i	$u(x_i)$	単位	$ \delta f / \delta x_i u(x_i)$
F_e	1	0.0121		0.2519
R_s / R_c	0.9066	0.0088		0.2014
F_c	1	0.0167		0.3475
M_c	0.3770	0.0001	g	0.0078
C_c	1520.3	0.6	$\mu\text{g}/\text{kg}$	0.0088
P	0.995	0.003	kg/kg	0.0628
$M_{\text{SD}(s)}$	0.3914	0.0003	g	0.0181
M_s	5.0330	0.0001	g	0.0006
$M_{\text{SD}(c)}$	1.9313	0.0001	g	0.0015
C	20.8		$\mu\text{g}/\text{kg}$	
u_c	0.5		$\mu\text{g}/\text{kg}$	

各要因の量記号は(1)式の通り

表2 分析法2によるクロルピリホスの分析値に関する不確かさ

要因	x_i	$u(x_i)$	単位	$ \delta f / \delta x_i u(x_i)$
F_e	1	0.0135		0.2789
R_s / R_c	0.9002	0.0243		0.5587
F_c	1	0.0167		0.3461
M_c	0.3770	0.0001	g	0.0078
C_c	1520.3	0.6	$\mu\text{g}/\text{kg}$	0.0088
P	0.995	0.003	kg/kg	0.0625
$M_{\text{SD}(s)}$	0.3907	0.0003	g	0.0181
M_s	5.0096	0.0001	g	0.0006
$M_{\text{SD}(c)}$	1.9313	0.0001	g	0.0015
C	20.7		$\mu\text{g}/\text{kg}$	
u_c	0.7		$\mu\text{g}/\text{kg}$	

各要因の量記号は(1)式の通り

表3 分析法1によるマラチオンの分析値に関する不確かさ

要因	x_i	$u(x_i)$	単位	$ \delta f / \delta x_i u(x_i)$
F_c	1	0.0118		9.6197
R_s / R_c	1.1445	0.0117		8.3559
F_c	1	0.0153		12.5505
M_c	0.3770	0.0001	g	0.3071
C_c	47647.5	19.9	$\mu\text{g}/\text{kg}$	0.3413
P	0.989	0.005	kg/kg	4.1390
$M_{\text{sp}(s)}$	0.3914	0.0003	g	0.7128
M_s	5.0330	0.0001	g	0.0230
$M_{\text{sp}(c)}$	1.9313	0.0001	g	0.0599
C	819		$\mu\text{g}/\text{kg}$	
u_c	18		$\mu\text{g}/\text{kg}$	

各要因の量記号は式(1)式の通り

表4 分析法2によるマラチオンの分析値に関する不確かさ

要因	x_i	$u(x_i)$	単位	$ \delta f / \delta x_i u(x_i)$
F_c	1	0.00845		6.8563
R_s / R_c	1.1308	0.0052		3.7146
F_c	1	0.0153		12.4359
M_c	0.3770	0.0001	g	0.3043
C_c	47647.5	19.9	$\mu\text{g}/\text{kg}$	0.3382
P	0.989	0.005	kg/kg	4.1012
$M_{\text{sp}(s)}$	0.3907	0.0003	g	0.7076
M_s	5.0096	0.0001	g	0.0229
$M_{\text{sp}(c)}$	1.9313	0.0001	g	0.0594
C	811		$\mu\text{g}/\text{kg}$	
u_c	15		$\mu\text{g}/\text{kg}$	

各要因の量記号は(1)式の通り

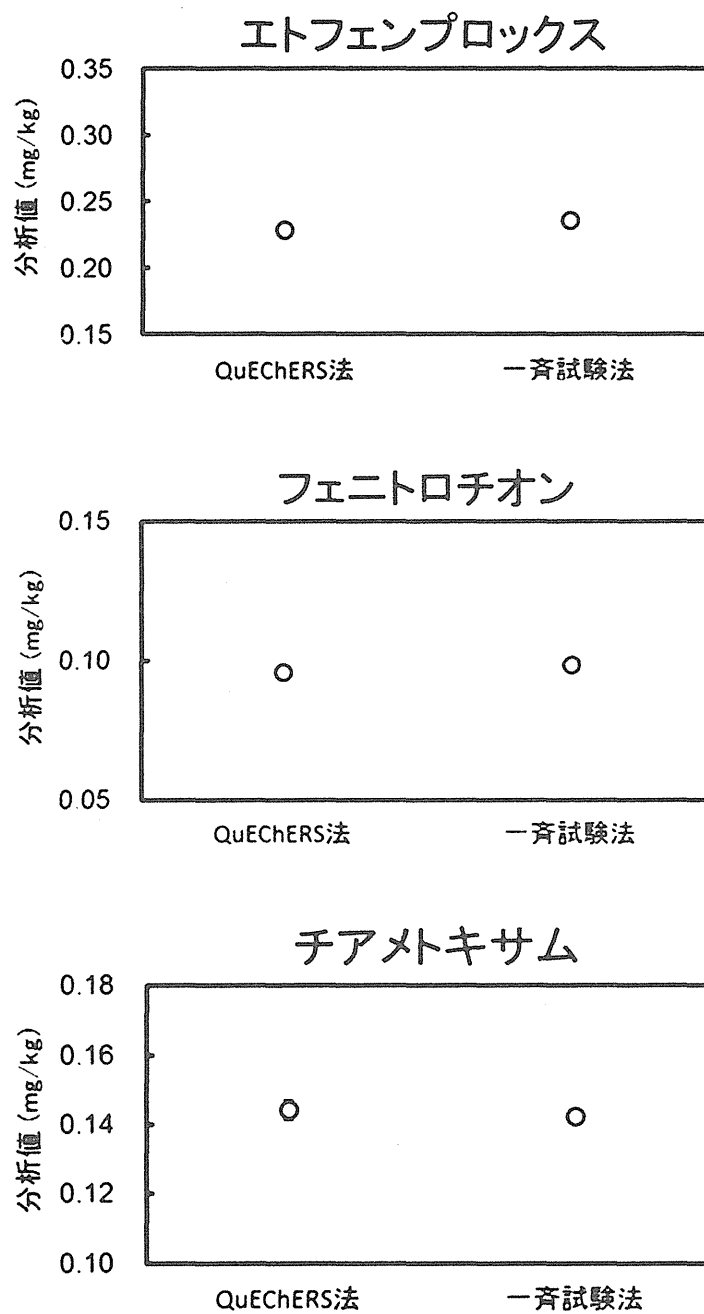


図5 QuEChERS法と一斉試験法による玄米中農薬の定量値の比較
平均±標準偏差 (QuEChERS法：n=3、一斉試験法：n=4)

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 27 年度 研究分担報告書

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

研究分担者 渡辺 卓穂

平成 27 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）
検査機関の信頼性確保に関する研究
研究分担報告書

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—

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 部長
研究協力者	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
	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、新規基材の開発も課題である。そこで昨年度に引き続き、これらの必要事項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。

新たに固体試料の基材として、米類（玄米及び精米）の適用性を引き続き検討した。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・粉碎することで、添加農薬濃度が均一となることが、これまでに明らかとなっている。外部精度管理調査においては、作製後一定期間の安定性が求められ、その間の保存条件として、昨年度に引き続き冷蔵及び今年度は新たに冷凍条件下での安定性を検討した。冷蔵保存については、玄米及び精米のそれぞれ新米ならびに古米を用い、農薬の添加濃度（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 $\mu\text{g/g}$ 、フェントロチオン 0.2 $\mu\text{g/g}$ ）に対する回収率を測定し安定性を検討した。その結果、農薬添加後 0 日～360 日間の冷蔵保存においては、添加した農薬の種類により減少率は異なるものの、概ね 90 日間はいずれの米類及び農薬で 80%以上の回収率を示し、その後は、150 日を経過すると農薬により著しく回収率が低下する現象が見られた。精米及び玄米を比較すると、いずれの農薬でも玄米の方が精米より添加濃度に対する回収率が高くより長期の安定性があり、ダイアジノン及びクロルピリホスについては添加後 180 日間においても約 80%の回収率が得られた。フェントロチオンは、添加後 90 日、またマラチオンは 60 日を経過後、回収率が 80%以下となった。新米及び古米の比較では、精米において新米の方が 4 種農薬ともわずかに高い回収率を示したが、玄米では差はほとんど認められなかった。一方、冷凍保存においては、添加後 120 日間において精米及び玄米ともに 80%以上の回収率が得られ、いずれの種類でも、冷凍保存の方が冷蔵保存より添加濃度に対する回収率が高い傾向があった。以上のことから、米を基材とした残留農薬検査用試料としては、玄米

を用い、保存は冷凍条件下で行うことで、適用可能であると考えられた。

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が多い従来の野菜ペーストに加えて、これらと比較してたんぱく質及び脂質量が高い枝豆を基材とした調査試料の作製を引き続き検討した。4種農薬（ダイアジノン、クロルピリホス、マラチオン及びフェニトロチオン）の添加を検討したところ、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、これに農薬混合標準液を添加する方法で良好な均一性が得られることが昨年度までに明らかとなっており、今年度は、これらの凍結融解（3回）の安定性及び解凍後冷蔵保存の安定性（14日間）を検討し、水あるいは油の添加剤種類及びその添加濃度を決定することとした。その結果、水分5%及び10%ならびに油分2%及び5%添加試料ともに3回の凍結融解では概ね安定した回収率が得られ、繰り返し凍結融解することの影響は認められなかった。一方、冷蔵保存（14日間）安定性は、概しては油分添加試料の方が水分添加試料よりも減少傾向が著しく、水分添加試料の方が適していると考えられた。また水分量では、5%よりも10%の方が4種農薬ともより高く、14日間保存において安定した回収率が得られた。以上の結果から、枝豆を基材とした試料作製では水分を10%添加し、農薬を添加混合する方法が適用できると考えられた。

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。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となり、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。また、試料の基材にもバリエーションが必要であり、新たな基材について検査対象物質の濃度が均一で安定な調査試料の開発を行っているところである。昨年に引き続き、残留農薬試料としては初めての固体試料として米類を、またこれまでのほうれんそうやにんじんなど水分が多い従来の野菜ペーストに加えて、これらと比較してたんぱく質及び脂質量の高い枝豆ペーストについても検討を行うこととした。米の粉碎試料は、農薬添

加後の安定性を冷蔵及び冷凍条件下で精米及び玄米のそれぞれ古米ならびに新米について検討を行い、実作製及び保存における適切な条件を見出すことを目的として行った。

また、枝豆については、昨年までに水分及び油分を添加することで均一な試料を作製できることが明らかとなっており、今年度は添加物として水分あるいは油分いずれの選択及びその濃度を確定するため、凍結融解（3回）の安定性及び融解後冷蔵保存（14日間）した場合の安定性を考慮し、最終的に適切な条件を見出すことを目的とした。

1. 試料基材及び試薬

1) 試料基材

市販の玄米及び精米のそれぞれ新米（収穫年：平成26年供試年産の新米には該

当しないが、研究開始時点で新米として入手、呼称として新米とする）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）、大豆油（和光一級、和光純薬工業）

2. 使用機器及び測定条件

1) 試料作製用使用機器

ブ里克サー5 プラス（エフ・エム・アイ、以下、ブ里克サー）、遠心粉碎機（Retsch）

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）

4) 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－ガス：ヘリウム

3. 試料作製

1) 玄米及び精米

(1) 冷蔵保存における安定性（回収率）の評価

前年度（平成 26 年度）から引き続き、基材成分の農薬に対する影響の確認として、玄米及び精米それぞれの古米ならびに新米を用い、冷蔵保存における添加農薬の安定性（回収率）を検討した。なお、前年度は、加熱処理後の米についてもその適用性を検討したが、非加熱米と比較して加熱処理後に添加した試料の方が添加農薬濃度が経日的に減少傾向が著しかったことから、今年度は非加熱米の検討のみを行った。

基材である米類をそれぞれ遠心粉碎機で粉碎、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、クロルピリホス及びマラチオン 1 μ g/mL、フェニトロチオン 2 μ 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、クロルピリホス及びマラチオン 0.1 μ g/g、フェニトロチオン 0.2 μ g/g）。また、同様に粉碎、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、各農薬の回収率及び冷蔵保存（0、5、10、20、30、60、90、150、180、270 及び 360 日間）における安定性（回収率）を検討した（各 n=3）。

(2) 冷凍保存における安定性（回収率）

の評価

玄米及び精米それぞれの古米を用い、冷凍保存における添加農薬の安定性（回収率）を検討した。なお、先行して行っている冷蔵保存安定性検討とは別に、同時期に農薬を添加し冷蔵保存した試料についても、比較評価した。

(1)と同様に、農薬添加試料及びブランク試料を作製した。

これらの試料について、各農薬の回収率及び冷凍保存及び冷蔵保存（0、14、34、60、90及び120日間）における安定性を検討した（各n=3）。

2) 枝豆

昨年度までの検討結果より、枝豆ペーストに水を5%または10%添加、及び大豆油を2%または5%添加することにより、良好な均一性及び冷凍保存安定性が得られることが明らかとなった。そこで、今年度はそれらの条件から最適な濃度を決定するため、作製した試料の繰り返し3回の凍結融解及び融解後の冷蔵保存（14日間）における添加農薬の安定性（回収率）を検討した。

ブrikサーを用いて均質化した枝豆ペースト2kgに、水を5%及び10%、ならびに大豆油を2%及び5%となるように各々添加後、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 mLを正確に加え、更に、ブrik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 $0.3\mu\text{g/g}$ 、マラチオン及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、水を5%及び10%、ならびに大豆油を2%及び5%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%及び10%、及び油2%及び5%ブランク試料とした。これらの、凍結融解（3回）及び冷蔵保存（水添加は0、1、3、7、10及び14日間、油添加は0、1、5、7及び14日間）における安定性を検討した（各n=3）。

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回繰り返して、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、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。

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. 研究結果及び考察

1) 玄米及び精米

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、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（精米及び玄米のそれぞれ新米ならびに古米）に農薬を添加し冷蔵保存条件下での経日的安定性（農薬添加後0、5、10、20、30、60、90、150、180、270及び360日間）を検討した。その結果、精米については新米及び古米のいずれにおいても4種農薬すべてが約80%の回収率を確保でき

る期間は、添加後90日までであり、90日を経過後、クロルピリホスを除く3種の農薬とも減少傾向が見られ、270日においてはいずれの農薬も概ね50%以下の回収率となった。精米においては、わずかに古米より新米の方が4種農薬とも高い回収率を示した。これは、何らかの米成分の変化が影響していると考えられるが、影響因子の特定はできていない。玄米においては、新米及び古米での安定性の差はほとんど見られなかった。概した傾向は、精米より玄米の方が、より高い安定性を示した（図1～4）。

一方、冷凍保存における安定性（0、14、34、60、90及び120日間）を検討したところ、精米及び玄米ともに明らかに冷蔵よりも冷凍保存の方が高い安定性を示し、さらに精米より玄米の方が良好な安定性が得られた（図5、6）。精米においては特にマラチオン及びフェニトロチオンの2農薬が冷凍と冷蔵保存で顕著な差が認められた。玄米は、4種農薬とも120日間保存時点で80%以上の回収率を示しており、外部精度管理調査において配布する上での必要な期間は安定性を確保できると考えられた。

なお、それぞれの測定時点及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、一部の時点及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。

今後は、冷凍保存について120日以降も継続して安定性を検討することと併せて、外部精度管理調査で配布する際の必要量の作製ができるシステムの確立と、

その方法でも均一性の確認が必要である。

2) 枝豆

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 $0.01\mu\text{g/g}$ 、クロルピリホス $0.3\mu\text{g/g}$ 、及びマラチオン及びフェニトロチオン $0.5\mu\text{g/g}$ ）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で良好な均一性を得ることができた。回収率の点で、20%水分添加及び10%油分添加を除き、水分5%及び10%ならびに油分2%及び5%について、添加剤の選択及び濃度を決定するために繰り返し3回の凍結融解の安定性及び融解後冷蔵保存における安定性を確認した。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。

その結果、油分添加の2試料についてダイアジノンが2回の凍結融解で回収率の減少傾向が認められたが他の試料及び農薬についてはいずれも繰り返し3回の凍結融解の影響は認められなかった（図7~10）。

一方、冷蔵保存（水添加は0、1、3、7、10及び14日間、油添加は0、1、5、7及び14日間）における安定性を検討したところ、概して水分添加の方が油分添加より良好な安定性を示した。水分の添加量については10%添加の方が4種農薬とも良好な回収率を示した（図11~

14）。

以上の結果から、枝豆ペーストについては、添加剤には水を用い、その添加量は10%が適切であると判断できた。

公定法においては、枝豆は豆類ではなく野菜の分類となり、脱脂工程が求められていない。しかしながら、枝豆は4%程度の脂質を含有しており、その上でも、本来の枝豆の成分とは脂質の点において異なる油分を添加することは好ましくない。今年度、水分添加において良好な結果が得られたので、今後は米の作製と同様に外部精度管理調査で配布する際の必要量の作製ができるシステムの確立と、その方法により得られた試料の均一性の確認が必要である。

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。新たな基材を開発することも併せて必要であり、今年度これらの事項を満たす調査試料の作製を目的とし、作製方法及び保存条件等を検討し、以下の結論を得た。

1. 玄米及び精米

新たに、固体試料である穀類の粉末試料を基材として、残留農薬検査のための試料作製を玄米及び精米のそれぞれ新米ならびに古米を用いて検討したところ、基材には玄米を使用し、保存は冷凍条件下で行うことで、適用できることが示唆された。

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、枝豆自体が本来含有する水分を10%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冷凍保存により必要な安定性期間を確保することが可能であることが示唆された。

実試料化に向けて、今後は、60～100kgの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

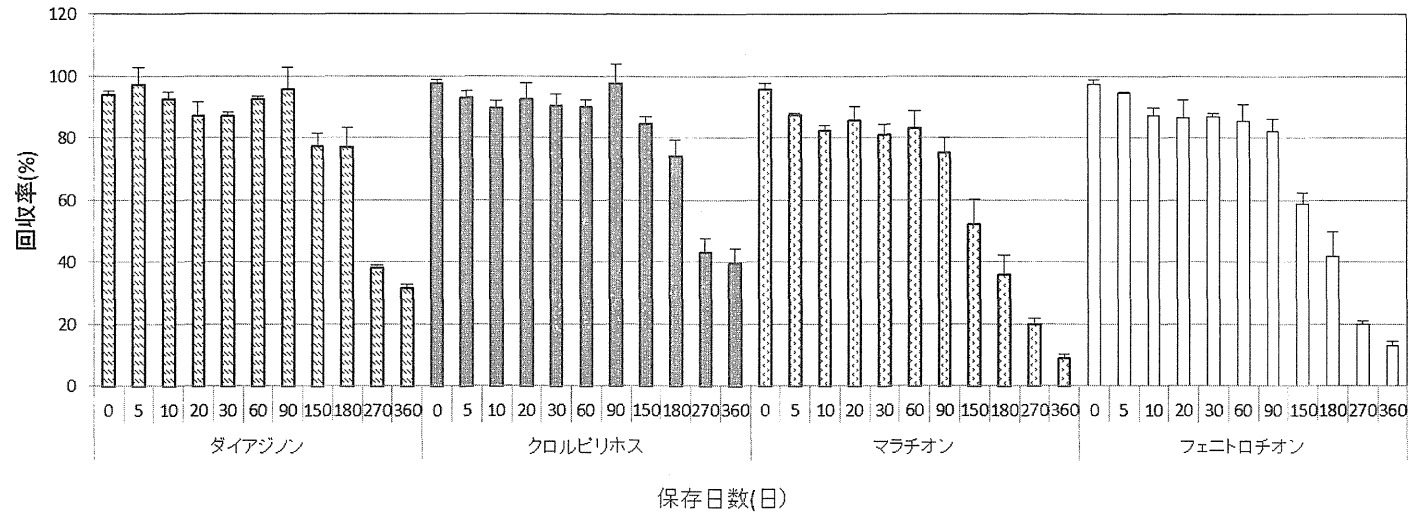


図1 精米(古米)に添加した各種農薬の冷蔵における回収率測定結果 (各時点n=3)

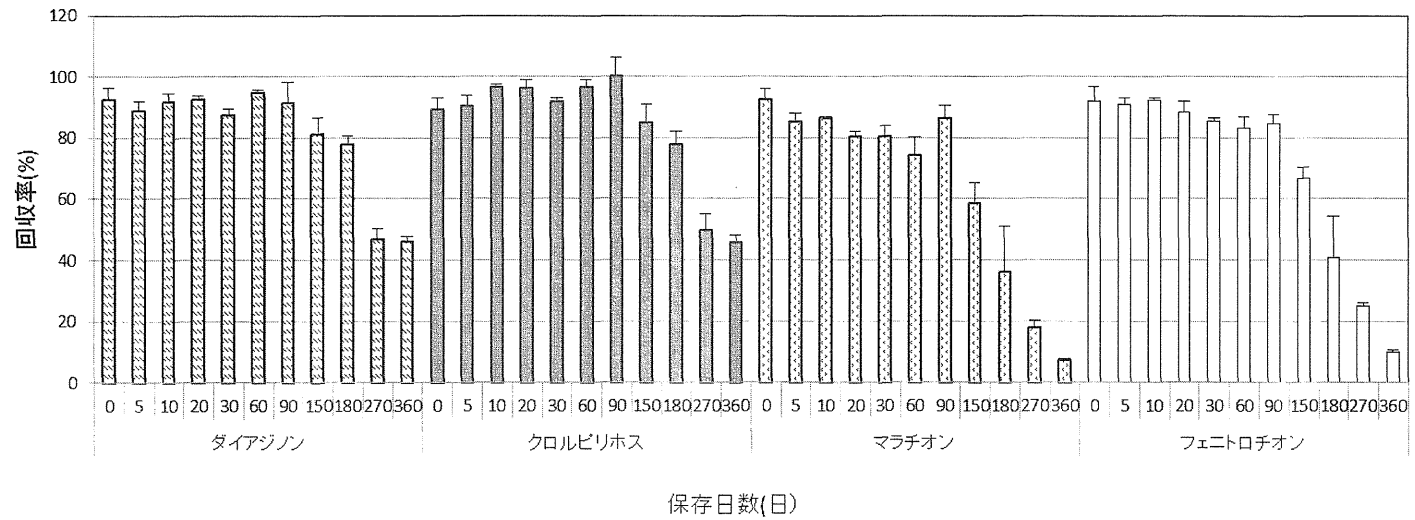


図2 精米(新米)に添加した各種農薬の冷蔵における回収率測定結果 (各時点n=3)

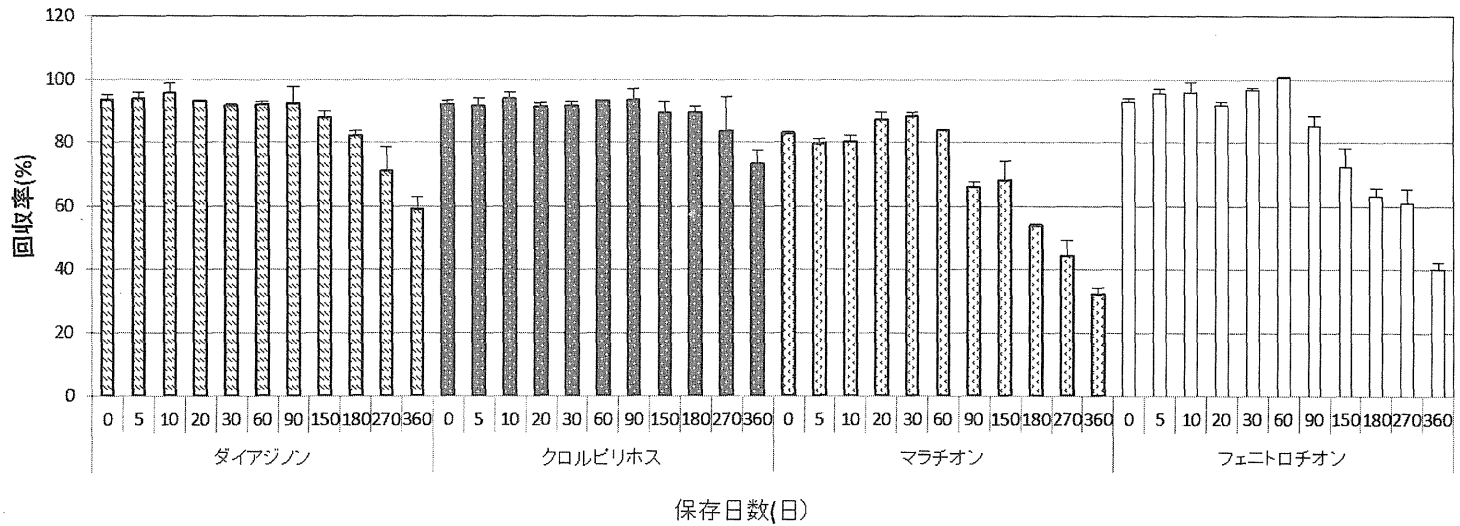


図3 玄米(古米)に添加した各種農薬の冷蔵における回収率測定結果 (各時点n=3)

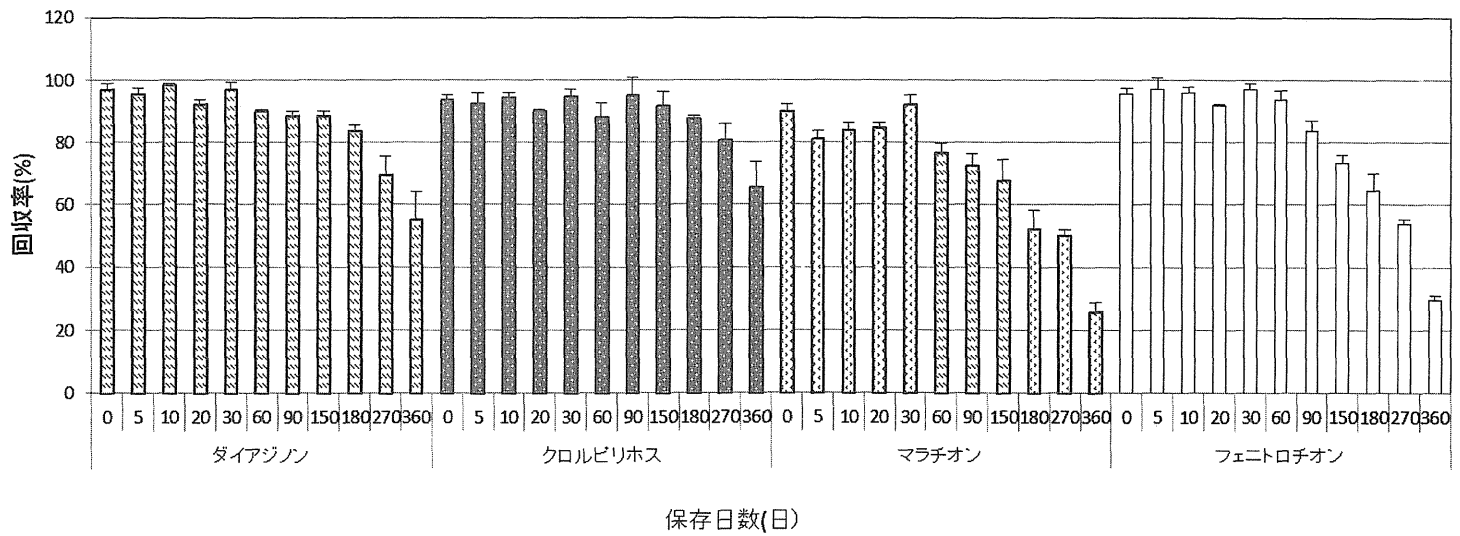


図4 玄米(新米)に添加した各種農薬の冷蔵における回収率測定結果 (各時点n=3)