

Ⅱ. 分担研究報告

課題4. 検査部位の変更が残留農薬等の検査及び
分析結果に及ぼす影響と対処法の検討

研究分担者 根本 了

食品や環境からの農薬等の摂取量の推計と国際標準を導入するための研究
課題4. 検査部位の変更が残留農薬等の検査及び分析結果に及ぼす影響と対処法の検討

研究分担者 根本 了 国立医薬品食品衛生研究所 食品部第一室長

研究要旨

残留農薬等の検査における国内の現行の検査部位の一部は、国際基準であるCODEX基準と一致していない。検査部位の不一致は輸出入の際の係争の原因となるため、国際基準と整合を図る必要がある。国際基準の検査部位を採用した場合、現行の検査部位とは試料マトリックス等が異なるため、現行の試験操作や試料採取に影響を及ぼす可能性がある。本研究では、検査機関においてCODEX基準の検査部位を円滑に導入・運用するため、検査部位の変更によって起こり得る検査への影響や問題点を把握し、対処法を提案することを目的とした。本年度は検査部位が変更される果実を含めた10食品について、通常の常温磨砕法よりも均質な試料が得られる可能性が高い凍結粉砕法を用いた試料調製を検討した。3種類の凍結粉砕法(液体窒素・凍結方式、ドライアイス・予冷方式、ドライアイス・予備凍結方式)の操作手順を確立した後、試料の粉砕状況を常温磨砕法と比較した。その結果、柔軟性のある果皮は凍結粉砕法の方が微粒子となったのに対し、硬い種子や果皮は常温磨砕法の方が小さくなる傾向が認められ、食品によって均質化しやすい試料調製法が異なることが明らかとなった。また、農薬が残留した食品を凍結粉砕法及び常温磨砕法で試料調製し、分析値のばらつきを求めた結果、均質性が低い場合、少量の試料を分析に供すると農薬の分布によってはばらつきが大きくなることが示された。これらの結果から、食品によって適切な試料調製法を選択するのが望ましいと考えられた。

研究協力者

志田(齊藤)静夏(国立医薬品食品衛生研究所
食品部主任研究官)

坂井隆敏(国立医薬品食品衛生研究所
食品部主任研究官)

菊地博之(国立医薬品食品衛生研究所
食品部主任研究官)

A. 研究目的

国内の残留農薬等の検査における検査部位は『食品、添加物等の規格基準(昭和34年厚生省告示第370号)』に規定されているが、一部の食品はCODEX基準と一致していない。検査部位の不一

致は輸出入の際に係争の原因となるため、国際的な整合を図る必要がある。CODEX基準の検査部位を採用した場合、現行の検査部位とは試料マトリックス等が異なるため、試験操作や分析結果に影響を及ぼす可能性がある。そこで本研究では、検査機関における変更後の検査部位の円滑な導入及び運用を目的として、検査部位の変更によって起こり得る検査への影響や問題点を把握するとともに、それらの対処法について提案する。

令和3年度(2021年度)は、検査部位が変更される果実を含めた10食品について、通常の常温磨砕法よりも均質な試料が得られる可能性が高い凍結粉砕法を用いた試料調製を検討し、試料の

粉碎状況や分析値のばらつきを比較することを目的とした。

B. 研究方法

1. 食品

果実(みかん、びわ、もも、キウイ、すいか、まくわうり、メロン、トマト、ぶどう及びパイナップル)、大豆及びごまの種子(洗いごま及びいりごま)はインターネットを介して購入したものをを用いた。みかん、びわ、もも、キウイ、すいか、まくわうり及びメロンについては変更後の検査部位、トマト、ぶどう、パイナップル、大豆及びごまの種子は食品、添加物等の規格基準(昭和 34 年厚生省告示第 370 号)の第 1 食品の部 A 食品一般の成分規格に示された部位を試料調製した。

2. 試薬及び試液

(1) 有機溶媒及び試薬

アセトニトリル及びトルエンは関東化学製の残留農薬試験用、LC-MS/MS 測定用の水及びメタノールは関東化学製の LC/MS 用を用いた。試験溶液調製用の水は超高純度蒸留水精製装置で蒸留したものをを用いた。塩化ナトリウムは富士フィルム和光純薬製の残留農薬試験用、酢酸アンモニウム、リン酸水素二カリウム及びリン酸二水素カリウムは富士フィルム和光純薬製の特級を用いた。ろ紙はアドバンテック製の定量ろ紙 No.5A、ケイソウ土は富士フィルム和光純薬製のセライト 545 をを用いた。液化炭酸ガス(純度 > 99.5 vol%)及び液体窒素(純度 > 99.99%)は鈴木商館から購入した。ドライアイス、液化炭酸ガスボンベ(サイホン付)にドライアイス製造装置(アイスティーサイエンス製)を接続し、用時調製した。

(2) 農薬標準品及び標準溶液

アセタミプリド標準品(純度 99.9%)は林純薬工業製、イミダクロプリド標準品(純度 99.5%)は富士

フィルム和光純薬製、フルジオキシニル標準品(純度 99.6%)は富士フィルム和光純薬製、テブコナゾール標準品(純度 99.5%)は Merck 製の残留農薬試験用試薬を用いた。標準原液(1000 mg/L)は、各農薬 10 mg を精秤し、アセトニトリル 10 mL に溶解して調製した。検量線作成用の混合標準溶液は、各農薬の標準原液を混合し、メタノールで適宜希釈して調製した。

(3) 精製ミニカラム

グラファイトカーボン/エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲル(グラファイトカーボン/PSA)積層ミニカラムは InertSep GC/PSA (500 mg/500 mg/6 mL、ジーエルサイエンス製)を用いた。

(4) 0.5 mol/L リン酸緩衝液(pH7.0)

リン酸水素二カリウム(K_2HPO_4) 52.7 g 及びリン酸二水素カリウム(KH_2PO_4) 30.2 g を量り採り、水約 500 mL に溶解し、1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液または 1 mol/L 塩酸を用いて pH を 7.0 に調整した後、水を加えて 1 L とした。

3. 装置

粉碎機は Robot Coupe BLIXER-3D(エフ・エム・アイ製: 回転数 3000 rpm、容器容量 3.7 L)及び GM200(Verder Scientific 社)を用いた。なお、Robot Coupe BLIXER-3D に付属しているプラスチック製の蓋スクレーパーアーム Assy 及びハンドルは、硬い試料を粉碎すると破損することがあるため、使用しなかった。

水分測定は、水分計 MOC63u(島津製作所製)を用いて、標準乾燥自動停止モード(設定温度 120°C、停止条件:水分変化率 0.05%未満/30 秒)で行った。

試料温度の測定は、精密型デジタル温度計 SK-810PT(佐藤計量器製作所製)に低温センサ S810PT-30 を接続して使用した。

pH 測定は、卓上型 pH メータ F-72(堀場製作所

製)にスリーブ Touph 電極 9681S-10D(堀場製作所製)を接続したものをを用いて行った。

粒子径分布測定は、レーザ回折式粒子径分布測定装置 SALD-2300(島津製作所製)及び多機能サンプラ MS23(島津製作所製)を用いて測定を行った。

実験室内の温度及び湿度は、温湿度ロガーSK-L754 に分離センサ SK-L754-2 を接続して測定した。

LC-MS/MS は、Nexera X3(島津製作所製)及び Triple Quad 7500(Sciex 製)を使用した。データ解析は Sciex OS(Sciex 製)を用いて行った。

4. 測定条件

(1)MS 条件

イオン化法 ESI(+)及び ESI(-); イオンスプレー電圧 2500 V; ヒーター温度 350°C; カーテンガス N₂, 35 psi; ネブライザーガス ドライエアー, 80 psi; ターボガス ドライエアー, 80 psi; コリジョンガス N₂, 7; 測定イオン 表 1 に示した。

(2)LC 条件

カラム Inertsil ODS-4(内径 2.1 mm、長さ 100 mm、粒子径 2 µm、ジエールサイエンス製); カラム温度 40°C; 注入量 3 µL; 移動相 5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液(A 液)及び 5 mmol/L 酢酸アンモニウム・メタノール溶液(B 液); 流速 0.3 mL/min; グラジエント条件 0 分(A:B=90:10)→10 分(A:B=5:95)→15 分(A:B=5:95)→15.01 分(A:B=0:100)→20.00 分(A:B=0:100)→20.01 分(A:B=90:10); 保持時間 表 1 に示した。

5. 試料調製

検体約 500 g を約 2.5 cm 角にカットし、常温磨砕法(A)及び凍結粉砕法(B~D)の各方法で試料調製した。なお、びわ及びももの種子はいずれの方法でも粉砕が困難であったため、種子を除い

た後、試料調製を行った。

A. 常温磨砕法

カットした検体約 500 g を全量、粉砕機に入れ、120 秒間磨砕した。

B. 凍結粉砕法(液体窒素・凍結方式)

①ステンレスビーカー(5 L 容)に液体窒素を約 2 L 入れ、カットした検体約 500 g を加えた。

②①の液体窒素が 500 mL 程度となったら、液体窒素をさらに 1~2 L 加え、合計 4 分間冷却した。

③液体窒素約 200 mL を粉砕機に入れ、約 5 秒間運転し、粉砕機を冷却した。

④②で得られた凍結試料の約半量をステンレス製穴あきおたまを用いて粉砕機に入れ、10 秒間粉砕した。

⑤残りの凍結試料を穴あきおたまを用いて粉砕機に加え、110 秒間粉砕した。

C. 凍結粉砕法(ドライアイス・予冷方式)

①カットした検体約 500 g 及び検体重量の 1.1 倍量のドライアイス(約 550 g)を予冷用容器(プラスチック製)に入れ、蓋を被せ(密閉せず)、3 分間予冷した。なお、予冷容器に入れる際は、予冷に用いるドライアイスの約半量を入れた後、検体を加え、その上に残り半量のドライアイスを加えた。また、予冷中は、約 30 秒毎に 5 秒間程度、容器を振り、よく混合した。

②粉砕機にドライアイス 100 g(粉砕機冷却用)を入れ、約 10 秒間運転し、粉砕機を冷却した。

③①で得られたドライアイス混合試料の約半量を粉砕機に入れ、10 秒間粉砕した。

④残りのドライアイス混合試料を粉砕機に加え、110 秒間粉砕した。

D. 凍結粉砕法(ドライアイス・予備凍結方式)

①カットした検体約 500 g をフリーザーバッグに入れた。これを冷凍庫(-30°C)で一晩静置し、凍結した。

②粉砕機にドライアイス 100 g(粉砕機冷却用)を入れ、約 10 秒間運転し、粉砕機を冷却した。

③①で得られた凍結試料の約半量を粉砕機に入れ、10 秒間粉砕した。

④残りの凍結試料及び試料重量の 0.5 倍量のドライアイス(約 250 g)を加え、110 秒間粉砕した。

6. 粒子径分布測定

調製した試料の粒子径分布をレーザ回折法により測定した。各方法で調製した試料約 5 mL をビーカー(100 mL 容)に採取し、分散媒液(水)を約 95 mL 加えてよく混合したものを測定試料とした。予め、サンプルバスを分散媒液で満たし、液を循環させてブランク測定を行った後、測定試料の一部を適正濃度になるまで投入して測定を行った。試料の希釈操作は 3 回行い、希釈ごとに測定を 1 回行った。屈折率は 1.65-0.01i を用いた。

7. 分析値のばらつきの検討

農薬が残留したぶどう(巨峰、種子なし)を A~D の各方法により試料調製した。得られた試料を量り採り(試料量 5、10 及び 20 g:各 5 個)、試験溶液を調製後、LC-MS/MS で測定し、分析値及びそのばらつきを求めた。

8. 試験溶液の調製

通知一斉試験法「LC/MS による農薬等の一斉試験法 I (農産物)」に準じて以下のように調製した。

(1) 抽出及び塩析

A~D の各方法で調製した試料(5、10 及び 20 g、各 5 個)を量り採り、アセトニトリル 50 mL を加え、約 1 分間ホモジナイズした後、ケイソウ土を約 1 cm の厚さに敷いたろ紙を用いて吸引ろ過した。残留物を採り、アセトニトリル 20 mL を加え、上記と同様に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。

遠沈管(50 mL 容、PP 製)に、塩化ナトリウム 10 g 及びリン酸緩衝液 20 mL を入れた。これに抽出液(試料 0.2 g 相当: 試料量 5 g の場合は 4 mL、10 g の場合は 2 mL、20 g の場合は 1 mL)及びアセトニトリル(試料量 5 g の場合は 16 mL、10 g の場合は 18 mL、20 g の場合は 19 mL)を加え、10 分間振とう後、毎分 3000 回転で 5 分間遠心分離を行った。

(2) 精製

(1)で得られたアセトニトリル層を採り、40°C以下で約 1 mL まで減圧濃縮後、窒素気流により溶媒を除去し、残留物をアセトニトリル/トルエン(3:1)2 mL に溶解した。これを予めアセトニトリル/トルエン(3:1)10 mL でコンディショニングしたグラファイトカーボン/PSA 積層ミニカラム(500 mg/500 mg)に負荷した後、アセトニトリル/トルエン(3:1)20 mL で溶出した。全溶出液を 40°C以下で約 1 mL まで減圧濃縮後、窒素気流により溶媒を除去し、残留物をメタノール 1 mL に溶解したものを試験溶液(試料 0.2 g/mL)とした。

C. 研究結果及び考察

凍結粉砕法による試料調製では、通常行われている常温磨砕法よりも均質な試料が得られると考えられている。しかしながら、各試料調製法による均質性を比較した報告は非常に少ない。そこで本研究では、検査部位が変更される 7 食品(みかん、びわ、もも、キウイ、すいか、まくわうり及びメロン)に加えて、常温磨砕法では均質化が困難とされているトマト、ぶどう及びパイナップルについて、3 種類の凍結粉砕法[液体窒素・凍結方式(B)、ドライアイス・予冷方式(C)及びドライアイス・予備凍結方式(D)]の操作手順を確立した後、試料の粉砕状況や分析値のばらつきを常温磨砕法(A)と比較することとした。なお、試料の均質性は、試料調製法

に加えて、使用する粉砕機、刃の形状、回転数、粉砕時間、検体量等によって大きく異なることから、本研究では以下の条件に統一して検討を行うこととした。

粉砕機： 残留農薬等の検査で汎用されている Robot Coupe BLIXER-3D(回転数 3000 rpm)

運転時間： 120 秒間

検体量： 500 g

1. 凍結粉砕法による試料調製の検討

(1) 検体の大きさ

凍結粉砕法ではカットした検体を凍結した後、粉砕する。水分含量の多い果実等の食品では、凍結により検体が硬化するため、検体の大きさによっては粉砕が困難な場合がある。そこで、果実を対象とし、各試料調製法で磨砕/粉砕可能な検体の大きさについて検討した。その結果、常温磨砕法(A)では 4 cm 角以下の検体は磨砕可能であった。これに対し、凍結粉砕法 ドライアイス・予備凍結方式(D)では冷凍庫で凍結させた硬い検体を粉砕する必要があるため、3 cm 角以上では回転が停止する等粉砕が困難であった。凍結粉砕法 ドライアイス・予備凍結方式(D)で果実を粉砕する際は 2.5 cm 角以下が適切と考えられた。凍結粉砕法 ドライアイス・予冷方式(C)*では、予冷操作で検体の表面は凍結するものの、内部は凍結しないため、3 cm 角程度の検体の粉砕が可能であった。また、凍結粉砕法 液体窒素・凍結方式(B)では、液体窒素により完全に凍結するものの、脆化(ひび割れ等)するため、3 cm 角程度の検体を粉砕することが可能であった。

以上のことから、果実の試料調製においては、常温磨砕法(A)では 4 cm 角以下、凍結粉砕法 液体窒素・凍結方式(B)及びドライアイス・予冷方式(C)では 3 cm 角以下、凍結粉砕法 ドライアイス・予備凍結方式(D)では 2.5 cm 角以下が適切と

考えられた。本研究では試料調製法間での試料の均質性を比較するため、いずれの方法においても約 2.5 cm 角にカットした検体を用いることとした。

*粉砕前は半凍結状態であるが、ドライアイス存在下で粉砕中に凍結する。

(2) 冷却剤量

① ドライアイスを用いた凍結粉砕法(C及びD)

ドライアイスを用いた凍結粉砕法(C及びD)は、ドライアイスの存在下で粉砕する方法である。投入したドライアイスは粉砕中に昇華し、減少するが、粉砕中にドライアイスが不足した場合、試料温度が上昇し、試料が融解する恐れがある。一方、粉砕時にドライアイスが大過剰投入した場合、粉砕後にドライアイスが昇華させるのに時間を要することに加え、刃と試料が接触しにくくなることにより、試料の均質性の低下を招く。そこで、予冷方式(C)及び予備凍結方式(D)での適切なドライアイス量を検討した。その結果、予冷方式(C)では検体量の 1.1~1.2 倍量、予備凍結方式(D)では 0.5~0.6 倍量が適切と考えられた。本検討においては、予冷方式(C)は検体量の 1.1 倍量、予備凍結方式(D)は 0.5 倍量のドライアイスを用いることとした。また、これに加えて、予冷方式(C)、予備凍結方式(D)のいずれにおいても粉砕前にドライアイス 100 g を粉砕機に入れて約 10 秒間運転し、粉砕機を冷却することとした。なお、粉砕に必要なドライアイス量は、使用する粉砕機、粉砕時間、食品、検体量等によって異なるため、用いる粉砕条件で適切な量を検討する必要があると考えられる。

② 液体窒素を用いた凍結粉砕法(B)

いずれの食品(500 g、2.5 cm 角)も液体窒素を 3~4 L 加えて 4 分間放置することにより、中心部まで完全に凍結した。また、液体窒素で凍結した検体は極めて低温となるため、液体窒素の非存在下で 120 秒間粉砕しても、粉砕直後の試料温度は-

70～-60℃となり、融解は認められなかった。これらの結果から、カットした検体を液体窒素 3～4 L で凍結した後、液体窒素の非存在下で粉砕することとした。なお、粉砕機の冷却のため、粉砕前に液体窒素を 200 mL 程度粉砕機に入れて約 5 秒間運転することとした。

2. 粉砕状況及び粒子径分布

果実 10 食品を A～D の各方法で試料調製し、得られた試料の粉砕状況を比較した。凍結粉砕法 (B～D) で得られた試料は、いずれの食品もパウダー状であり、均質であるように見受けられた。しかしながら、融解すると比較的大きい粒子も認められたことから、粉砕した試料を融解後、各方法で得られた試料を比較することとした。

(1) 粉砕状況

①柔軟性のある果皮をもつ食品(トマト、ぶどう、みかん、びわ、もも)

常温磨砕法では均質化が難しいとされているトマトを試料調製した。その結果、常温磨砕法では 2 mm×2 mm 程度の果皮が多く見られた。一方、凍結粉砕法 (B～D) では 1 mm×1 mm 以上の果皮は認められなかった。凍結粉砕法 (B～D) で得られた試料を 1 mm の標準網ふるいに通したところ、ふるい上にはほとんど残らなかったが、常温磨砕法では観察されなかった種子が少量認められた。

トマトと同様に常温磨砕法では均質化が難しいとされているぶどう(巨峰、種子なし)の粉砕状況を図 3 に示した。常温磨砕法 (A) では 3 mm×3 mm 程度の果皮が多く残った。これに対し、凍結粉砕法 (B～D) では果皮も 1 mm×1 mm 以下に粉砕され、1 mm の標準網ふるい上にはほとんど残らなかった。

常温磨砕法においても、用いる装置によっては、ぶどうのような果皮を微細に磨砕することが可能と

推測された。そこで、Robot Coupe BLIXER-3D よりも高い回転数での運転が可能な GM200 を用いて常温磨砕し、粉砕状況を Robot Coupe BLIXER-3D と比較した。その結果、GM200 では果皮も 1 mm×1 mm 以下となり(図 2)、1 mm の標準網ふるいを通したところ、ふるい上にはほとんど残らなかった。この結果から、常温磨砕法では均質化が難しいとされているぶどうについても、粉砕機や粉砕条件によっては 1 mm×1 mm 以下の小さい粒子にすることが可能であることが示された。しかしながら、磨砕後の試料温度は Robot Coupe BLIXER-3D で 20℃、GM200 で 28℃となり、高回転数で運転すると試料温度が上昇することが確認された。揮散または熱分解しやすい農薬を分析する際は試料温度にも留意する必要があると考えられた。

みかんでは、常温磨砕法 (A) の方が凍結粉砕法 (B～D) よりも若干、果皮(外果皮、中果皮)と見られる粒子が多いようであった。凍結粉砕法間で比較すると、液体窒素を用いた凍結粉砕法 (B) の方が、ドライアイスを用いた凍結粉砕法 (C 及び D) よりも小さい粒子が多かった。

びわ及びももでは、A～D のいずれの方法でも種子を粉砕することはできなかった。このため、いずれも種子を除去した後、試料調製を行った。調製した試料を 1 mm の標準網ふるいに通したところ、いずれもふるい上にはほとんど残らなかった。各方法で得られた試料を比較したところ、液体窒素を用いた凍結粉砕法 (B) で大きい粒子が少ない傾向が見られた。

②硬い果皮及び種子をもつ食品(メロン、まくわうり、すいか)

メロンの粉砕状況を図 3 に示した。メロンは、トマトやぶどうとは異なり、常温磨砕法 (A) よりも凍結粉砕法 (B～D) において 1 mm×1 mm 以上の濃緑

色の果皮が多く見られた。また、種子についても凍結粉砕法(B~D)の方が常温磨砕法(A)よりも若干、大きい粒子が多かった。

まくわりでは、常温磨砕法(A)において1 mm×1 mm以上の濃黄色の果皮が多く見られた。これに対し、凍結粉砕法(B~D)では1 mm×1 mm以上の白色の種子が多く認められた。

すいかでは、ドライアイスを用いた凍結粉砕法(C及びD)において、種子や果皮(外果皮)の大きい粒子が多く認められた。また、常温磨砕法では1 mm×1 mm未満の果肉とみられる粒子が多く見られたのに対し、凍結粉砕法(B~D)で得られた試料はいずれも液状であり、肉眼では果肉の粒子は認められなかった。

③柔軟性のある果皮及び硬い種子をもつ食品(キウイ)

図4にキウイの粉砕状況を示した。常温磨砕法では1 mm×1 mm以上の茶色の果皮が多く見られたが、1 mm×1 mm以上の種子は認められなかった。これに対し、凍結粉砕法では1 mm×1 mm以上の果皮は認められず、1 mm×1 mm以上の種子が多く見られた。凍結粉砕法間で比較すると、液体窒素を用いた凍結粉砕法(B)よりもドライアイスを用いた凍結粉砕法(C及びD)の方が1 mm×1 mm以上の種子が多く見られた。

④その他の食品(パイナップル)

パイナップルでは、いずれの試料調製法でも1 mm×1 mm以上の果皮と見られる粒子が残り、試料調製法間で差異は認められなかった。

以上の結果から、ぶどう、トマト及びキウイ等の柔軟性のある果皮は、凍結粉砕法と比べ、常温磨砕法では均質化されにくいことが確認された。これらの果皮は、刃と接触しても切断されにくいためと考えられた。一方、硬い果皮(メロン及びすいか等)や種子(キウイ、すいか及びまくわり等)は、凍

結粉砕法では常温磨砕法と比べ、粉砕されにくいことがわかった。常温磨砕法では試料が液状となるものが多いが、凍結粉砕法では粉体であるため、流動性がやや低く、試料と刃が接触しにくいことが原因と考えられた。凍結粉砕法間(B~D)で比較すると、いずれの食品も液体窒素を用いた凍結粉砕法(B)の方が、ドライアイスを用いた凍結粉砕法(C及びD)よりも若干、粒子が小さい傾向が見られた。液体窒素を用いた凍結粉砕法(B)では、液体窒素によって脆化することに加え、ドライアイスを用いた凍結粉砕法(C及びD)とは異なり、冷却剤の非存在下で粉砕するため、刃と接触しやすく、小さい粒子に粉砕されやすいものと考えられた。

以上の結果から、食品によって均質化しやすい試料調製法は異なり、必ずしも凍結粉砕法の方が均質化しやすいとは言えないことが示された。

3. 分析値のばらつき

試料調製法による試料の均質性の違いを評価するため、農薬が残留した試料を用いて分析値のばらつきを比較した。予備検討により、アセタミプリド、イミダクロプリド、テブコナゾール及びフルジオキソニルが残留していることを確認したぶどう(巨峰、種子なし)をA~Dの各方法により試料調製し、得られた試料を5、10及び20 g(各5個)量り採り、B. 研究方法の『8. 試験溶液の調製』に従って試験溶液を調製後、LC-MS/MSで測定して分析値及びそのばらつきを求めた。その結果、分析に供する試料量を20 gとした場合、試料調製法間で分析値のばらつきに大きな差は認められず、いずれもRSD 11%以下であった(図7、表4)。分析に供する試料量を5 gとした場合においても、アセタミプリド及びイミダクロプリドは、試料調製法間で分析値のばらつきに大きな差は認められず、いずれもRSD 9%以下であった。テブコナゾール及びフル

ジオキソニルについても、凍結粉砕法(B~D)ではRSD 10%以下であった。しかしながら、常温磨砕法(A)ではテブコナゾールはRSD 17%、フルジオキソニルはRSD 20%となり、凍結粉砕法と比較してばらつきが大きかった。アセタミプリド及びイミダクロプリドは $\log P_{ow}$ がそれぞれ0.8及び0.57と比較的極性が高く、水溶性が高い(水溶解度はそれぞれ4.25及び0.61 g/L)のに対し、テブコナゾール及びフルジオキソニルは $\log P_{ow}$ がそれぞれ3.7及び4.12と極性が低く、水溶性が低い(水溶解度はそれぞれ0.036及び0.0018 g/L)ため、果皮に残留しやすい可能性がある。図1に示したように凍結粉砕法では1 mm×1 mm以上の粒子がほとんど認められなかったのに対し、常温磨砕法では3 mm×3 mm以上の果皮が多く見られたことから、常温磨砕法では果皮の均質性が低く、果皮に多く残留していた農薬の分析値のばらつきが大きくなったものと考えられた。これらの結果から、試料の均質性が低い場合、分析に供する試料量が少量であると、農薬の分布によっては分析値のばらつきが大きくなること示された。

本検討においては、常温磨砕法では均質化が難しいとされているぶどうを用いたが、前述のように、常温磨砕法よりも凍結粉砕法の方が大きい粒子が残る場合もあることから、他の食品でも検討が必要と考えられた。

4. 留意事項の検討

凍結粉砕法を行う上での主な懸念点として、1) 試料への冷却剤の残存、2) 結露や吸湿による試料中の水分含量の増加、3) (ドライアイスを用いた凍結粉砕法では)ドライアイス由来の二酸化炭素による試料pHの変化が挙げられる。そこで本研究ではこれら3点について検討した。

1) 試料への冷却剤の残存

①ドライアイスを用いた凍結粉砕法

ドライアイスを用いた凍結粉砕法で試料調製を行うと、粉砕直後の試料中にはドライアイスが残存している。試料採取時にドライアイスが大量に残存していた場合、正確に試料を秤量することができない。そこで、試料中のドライアイスが昇華したかどうかを判断する方法を検討することとした。粉砕後の試料の温度は、ドライアイスの残存量が減少すると上昇することから、試料温度を判断指標として用いることができるか検討した。キウイを用いてドライアイス・予冷方式(C)で凍結粉砕し、残存するドライアイスの割合と試料温度の関係を調べた。その結果、試料中のドライアイスの残存割合が2%以上の場合、試料温度は-79~-78°Cとなった(図8)。一方、2%未満の場合は、ドライアイスの割合が低くなるほど、試料温度が上昇し、1%では約-60°Cとなった。ドライアイスの残存割合が1%未満であれば、ドライアイスの残存に伴う試料の秤量誤差が分析値へ及ぼす影響はほとんどないものと考えられる。図8の結果から、-50°C以上の時、ドライアイスの残存割合は常に0.6%以下であったことから、「試料温度-50°C以上」を分析値への影響がほとんどない量までドライアイスが昇華したことを示す判断指標とすることができると考えられた。なお、試料温度が-50°C未満となり、ドライアイスが昇華させる必要がある場合は、粉砕機で追加粉砕するか、冷凍庫内で静置するのが良いと考えられた。

②液体窒素を用いた凍結粉砕法

本検討で確立した方法は、カットした検体を液体窒素で凍結後、凍結した検体のみを粉砕機に入れて粉砕する方法である。液体窒素の非存在下で粉砕するため、試料中に液体窒素は残存せず、粉砕直後に試料を採取しても問題はないと考えられる。

2) 吸湿・結露の影響

凍結粉砕法では、粉砕機及び試料を低温に保

ちながら粉砕を行うため、空気中の水分による試料の吸湿の可能性がある。また、空気中の水分はドライアイス自身にも結露すると考えられており、ドライアイスによる水分の持ち込みの可能性も指摘されている。そこで、水分含量の高いキウイと低い大豆及びごまの種子(洗いごま及びいりごま)を A～D の各方法で試料調製し、得られた試料の水分含量を比較した。その結果、凍結粉砕法(B～D)ではいずれの食品においても常温粉砕法と比較して 0.1～1% 高値を示した(表 5)。調製直後の試料温度を測定したところ、常温粉砕法ではキウイで 19℃であったのに対し、水分含量の低い食品では大豆:46℃、洗いごま:53℃、いりごま:59℃と粉砕時に発熱が見られた(表 6)。一方、凍結粉砕法では、いずれの食品も液体窒素を用いた凍結粉砕法(B):-69～-38℃、ドライアイスを用いた凍結粉砕法(C及びD):-79～-78℃と低温であった。これらの結果から、常温磨砕法よりも凍結粉砕法の方が水分含量が高値を示した原因として、①凍結粉砕法での吸湿、持ち込みの他に、②水分含量の低い食品では常温粉砕時に発生する熱による試料中水分の気化の可能性が考えられた。しかしながら、常温磨砕法と凍結粉砕法の水分含量の差は 2% 未満であることから、水分含量の変化による分析値への影響はほとんどないと考えられた。

3) ドライアイスを用いた凍結粉砕法における試料 pH への影響

ドライアイスを用いた凍結粉砕法では、試料調製の過程でドライアイス由来の二酸化炭素が試料に溶解し、試料の pH が低下する可能性が指摘されている。そこで、A～D の各方法で調製した試料の pH を測定し、比較した。その結果、いずれの食品においても凍結粉砕法(B～D)で得られた試料と常温磨砕法(A)で得られた試料の pH の差は±0.3 以内であり、ドライアイス由来の二酸化炭素によ

る試料の pH 変化はほとんどないことが示された(図 9)。

5. 果実を対象とした凍結粉砕法による試料調製の操作手順及び留意事項

Robot Coupe BLIXER-3D を使用して、果実 500 g を凍結粉砕法により試料調製する際の操作手順例とその留意事項を以下にまとめた。

(1) 液体窒素を用いた凍結粉砕法

①ステンレスビーカーに液体窒素を約 2 L 入れ、カットした検体¹500 g を加える。

②①の液体窒素が 500 mL 程度になったら、液体窒素をさらに 1～2 L 加え、合計 4 分間程度冷却する^{2,3}。

③液体窒素を 200 mL 程度粉砕機に入れ^{4,5}、約 5 秒間運転し、粉砕機を冷却する。

④②で得られた凍結試料の約半量を粉砕機に入れ⁶、10 秒間粉砕する。

⑤残りの凍結試料を粉砕機に加え、110 秒間粉砕する。

¹ 3 cm 角程度にカットするとよい。

² 凍結していない場合は液体窒素を少量加えてさらに冷却する。

³ 残った液体窒素は気化させる。

⁴ プラスチック製の部品には液体窒素が触れないように注意する。

⁵ ②で残った液体窒素を用いてもよい。

⁶ 凍結試料のみを粉砕機に入れる。粉砕機に液体窒素を大量に加えて運転すると、粉砕機から試料が噴き出す恐れがある。

(2) ドライアイスを用いた凍結粉砕法 I (予冷方式)

①カットした検体¹500 g 及び検体重量の 1.1 倍量のドライアイス(550 g)²を混合し³、3 分間予冷する。

②粉砕機にドライアイス 100 g(粉砕機冷却用)を入

れ、約 10 秒間運転し、粉砕機を冷却する。

③①で得られたドライアイス混合試料の約半量を粉砕機に入れ、10 秒間粉砕する。

④残りのドライアイス混合試料を粉砕機に加え、110 秒間粉砕する⁴。

¹ 3 cm 角程度にカットするとよい。

² 必要なドライアイス量は、使用する粉砕機、粉砕時間、食品、検体量等によって異なるため、適切なドライアイス量を検討する必要がある。

³ 容器に入れて予冷する場合は、用いるドライアイスの約半量を容器に入れた後、カットした検体を加え、さらにその上に残りのドライアイスを加えて、軽く蓋を被せるとよい。また、検体とドライアイスがよく混合するように、予冷中は約 30 秒毎に 5 秒間程度、容器を振るとよい。なお、容器は密閉しないこと。

⁴ 試料を採取する際、ドライアイスの残存量が多いと正確に秤量できない。試料温度が -50°C 未満の場合、ドライアイスが試料重量の 1%以上残存している可能性があるため、粉砕機で追加粉砕するか、冷凍庫内で静置することにより、ドライアイス进行昇華させる。なお、ドライアイスは昇華すると体積が増大するため、残存している可能性がある場合は、容器を密閉しないこと。

(3)ドライアイスを用いた凍結粉砕法 II(予備凍結方式)

①カットした検体 1500 g をフリーザーバッグに入れ、冷凍庫内で一晩静置し、凍結する。

②粉砕機にドライアイス 100 g(粉砕機冷却用)を入れ、約 10 秒間運転し、粉砕機を冷却する。

③①で得られた凍結試料の約半量を粉砕機に入れ、10 秒間粉砕する。

④残りの凍結試料及び試料重量の 0.5 倍量のドライアイス(250 g)²を加え、110 秒間粉砕する³。

¹ 凍結すると硬化するため、2.5 cm 角以下にカットするとよい。

² 必要なドライアイス量は、使用する粉砕機、粉砕時間、食品、検体量等によって異なるため、適切なドライアイス量を検討する必要がある。

³ 試料を採取する際、ドライアイスの残存量が多いと正確に秤量できない。試料温度が -50°C 未満の場合、ドライアイスが試料重量の 1%以上残存している可能性があるため、粉砕機で追加粉砕するか、冷凍庫内で静置することにより、ドライアイス进行昇華させる。なお、ドライアイスは昇華すると体積が増大するため、残存している可能性がある場合は、容器を密閉しないこと。

(4)その他の留意事項

①試料調製は実験室を適宜換気して行うこと。ドラフト内で行うのが望ましい。

②液体窒素またはドライアイスを使用する際は、凍傷に注意すること。

③粉砕機の容器、カッター刃、カッター刃のシャフト等はステンレス製を用いるのが望ましい。プラスチック製の部品は粉砕中に破損し、異物混入の原因となる恐れがある。

④ブロック状やペレット状のドライアイスは、水等の添加剤や異物が含まれている場合があるため、留意すること。

D. 結論

検査部位が変更される果実を含めた 10 食品について、通常の常温磨砕法よりも均質な試料が得られる可能性が高い凍結粉砕法を用いた試料調製を検討した。凍結粉砕法の操作手順を確立した後、試料の粉砕状況を常温磨砕法と比較した。その結果、食品によって均質化しやすい試料調製法は異なり、必ずしも凍結粉砕法の方が均質化しやすいとは言えないことが示された。また、農薬が

残留した食品を用いて分析値のばらつきを求めた結果、均質性が低い場合、少量の試料を分析に供すると農薬の分布によってはばらつきが大きくなることが示された。これらの結果から、食品によって適切な試料調製法を選択するのが望ましいと考えられた。

E. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1 保持時間及びMS条件

	保持時間 (分)	イオン化 モード	定量イオン (m/z)		EP (V)	CE (eV)	CXP (V)	定性イオン (m/z)		EP (V)	CE (eV)	CXP (V)
			プリカーサー イオン	プロダクト イオン				プリカーサー イオン	プロダクト イオン			
アセタミプリド	5.6	ESI (+)	223.0	126.0	10	27	10	223.0	90.0	10	49	10
イミダクロプリド	5.0	ESI (+)	256.0	209.0	10	21	10	256.0	175.0	10	25	10
テブコナゾール	9.6	ESI (+)	308.2	70.1	10	58	15	308.1	125.0	10	51	6
フルジオキシニル	8.9	ESI (-)	247.1	180.1	-10	-38	-19	247.1	126.0	-10	-40	-11

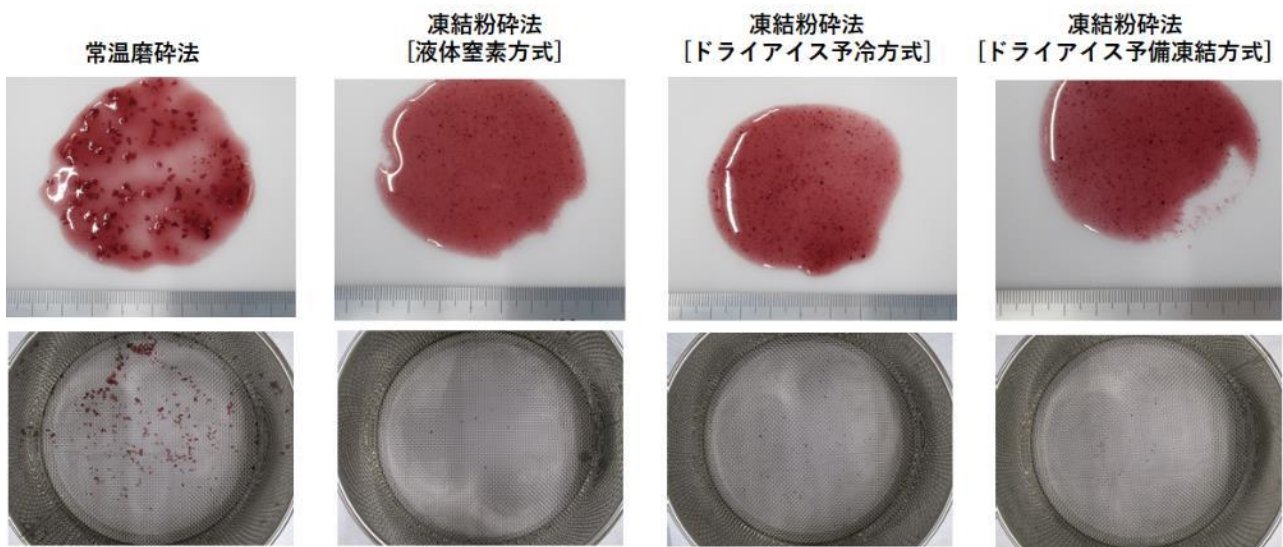


図1 粉砕状況

試料: ぶどう

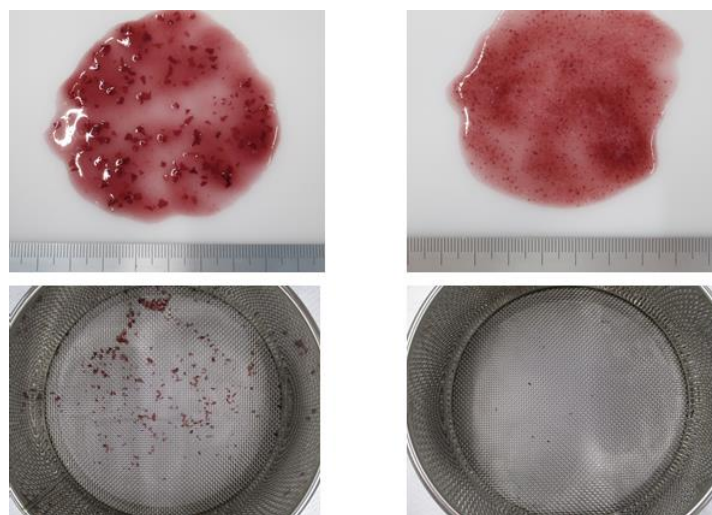


図2 粉砕状況

試料: ぶどう(巨峰、種子なし)

左: Robot Coupe Blixer 3D (3000 rpm で 120 秒間磨砕、検体量 500 g)

右: GM200 (3500 rpm 10 秒間磨砕後、7000 rpm で 110 秒間磨砕、検体量 250 g)

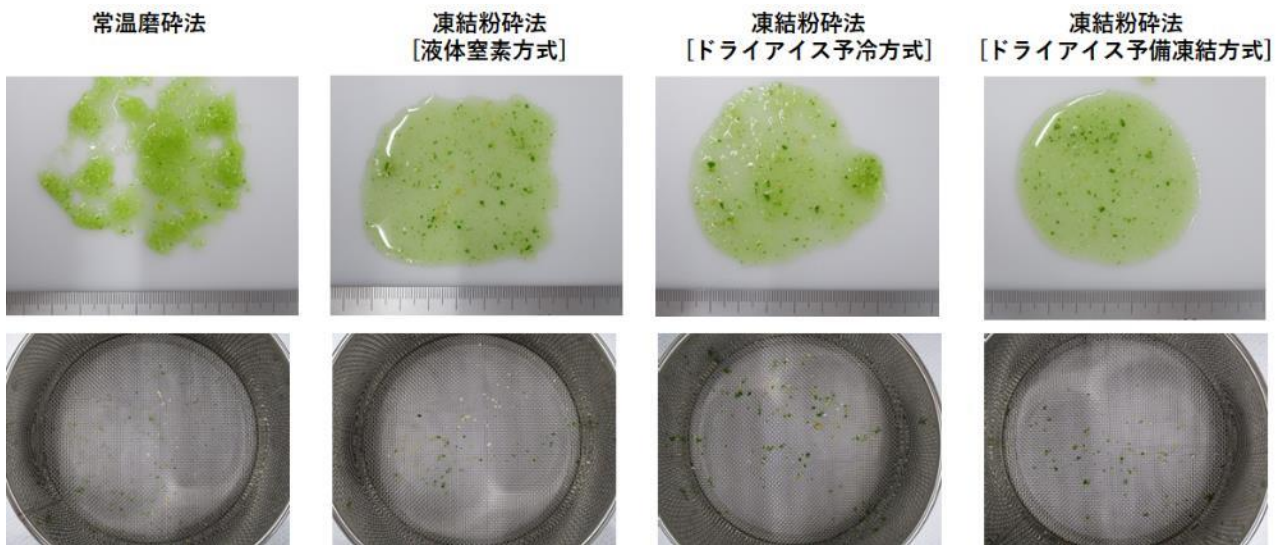


図 3 粉砕状況

試料: メロン

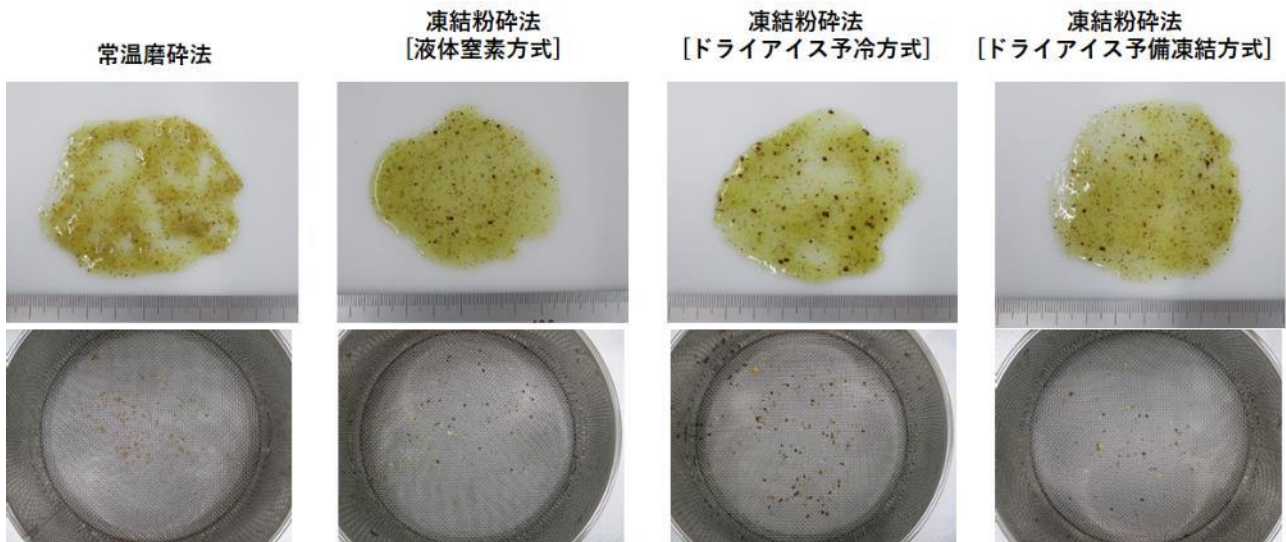


図 4 粉砕状況

試料: キウイ

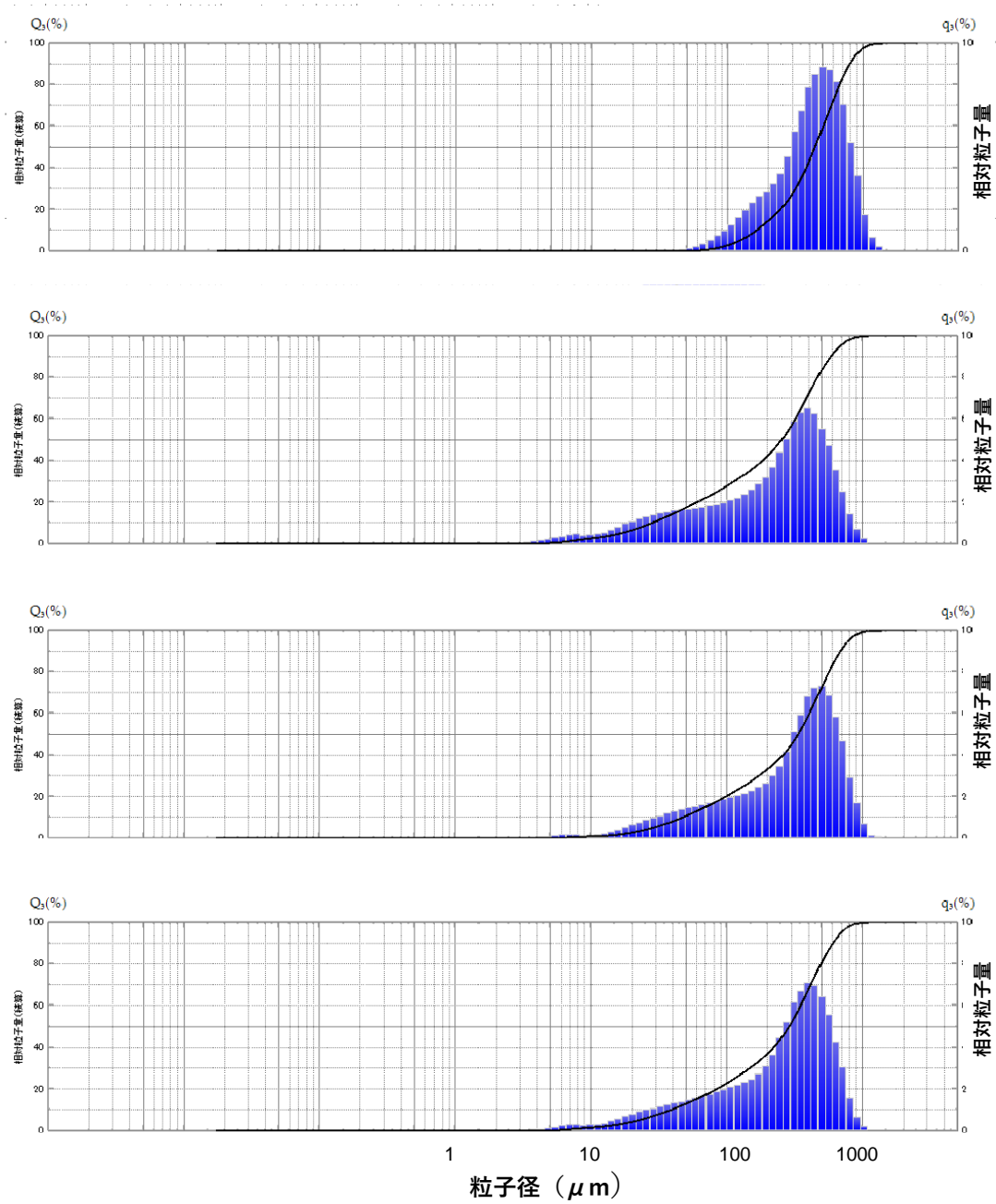


図 5 各試料調製法で得られたぶどう試料の粒子径分布

上から A. 常温磨砕法、B. 凍結粉砕法 液体窒素方式、C. 凍結粉砕法 ドライアイス・予冷方式、D. 凍結粉砕法 ドライアイス・予備凍結方式

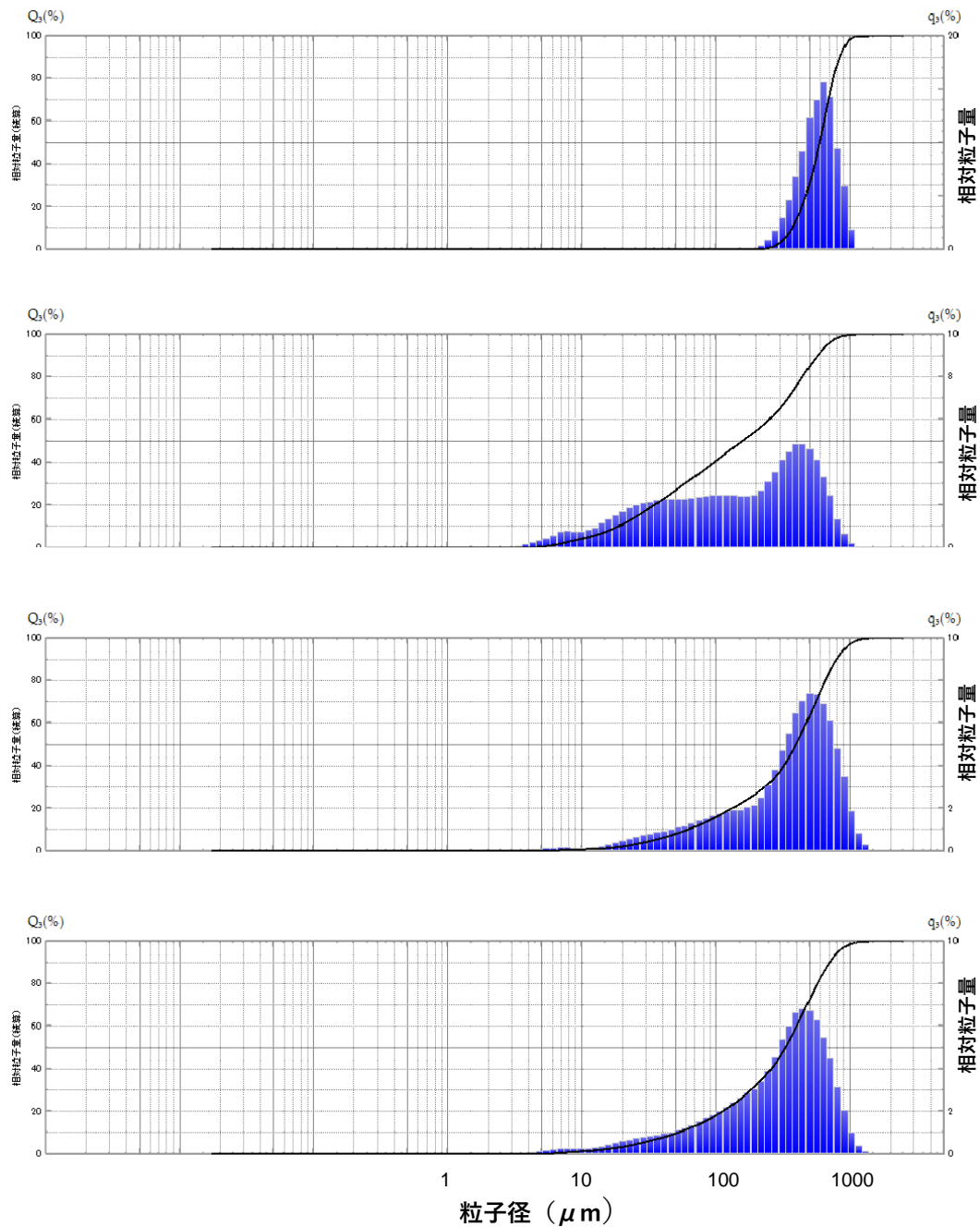


図 6 各試料調製法で得られたすいか試料の粒子径分布

上から A. 常温磨砕法、B. 凍結粉砕法 液体窒素方式、C. 凍結粉砕法 ドライアイス・予冷方式、D. 凍結粉砕法 ドライアイス・予備凍結方式

表 2 各試料調製法で得られたぶどう試料の平均径、10%径、50%径、90%径及びスパン

	粒度分布 (μm)				粒子径分布幅
	平均径	10%径	50%径	90%径	スパン
常温磨砕	386	156	430	780	1.45
凍結粉砕 液体窒素方式	167	26	245	575	2.24
凍結粉砕 ドライアイス・予冷方式	233	44	327	688	1.97
凍結粉砕 ドライアイス・予備凍結方式	193	35	274	591	2.03

n=3、平均値

スパン=(90%径-10%径)/50%径

表 3 各試料調製法で得られたすいか試料の平均径、10%径、50%径、90%径及びスパン

	粒度分布 (μm)				粒子径分布幅
	平均径	10%径	50%径	90%径	スパン
常温磨砕	566	369	584	844	0.81
凍結粉砕 液体窒素方式	117	18	144	547	3.69
凍結粉砕 ドライアイス・予冷方式	263	53	362	757	1.95
凍結粉砕 ドライアイス・予備凍結方式	234	48	315	699	2.07

n=3、平均値

スパン=(90%径-10%径)/50%径

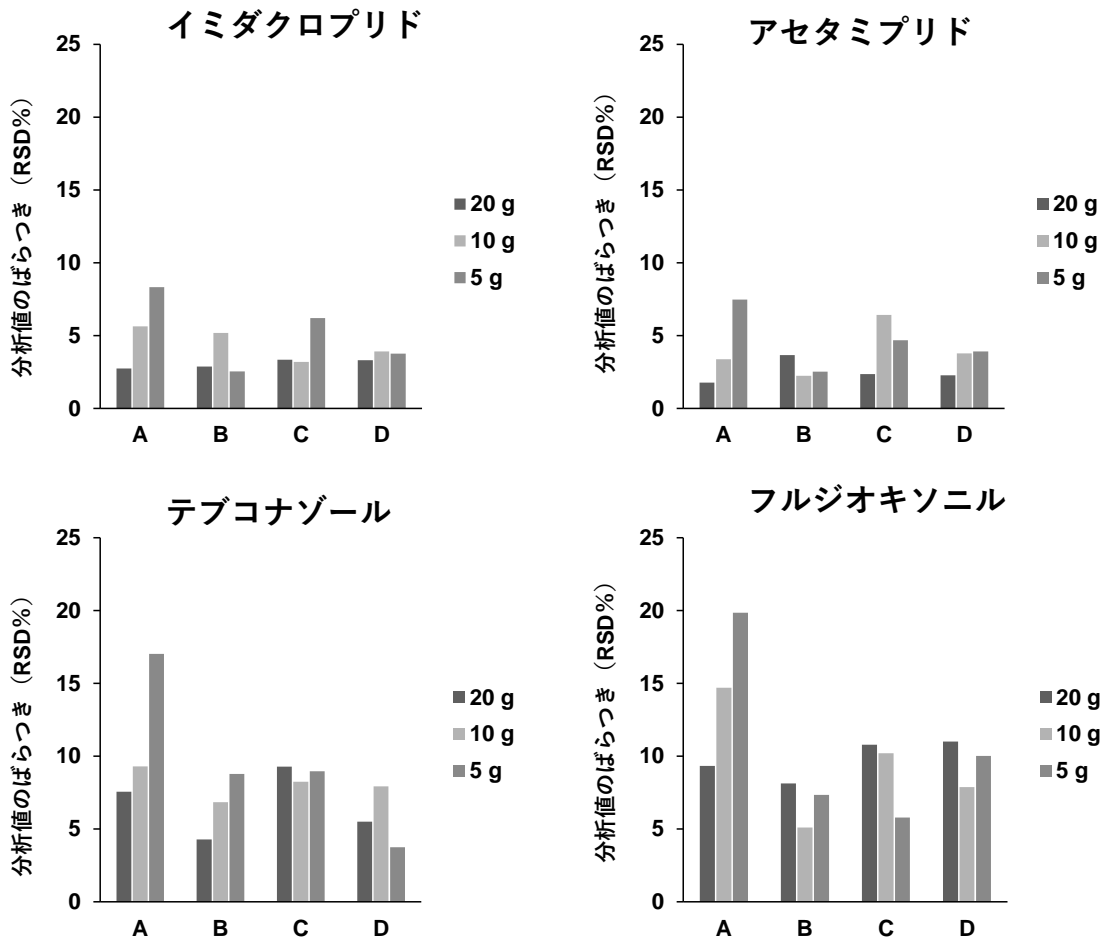


図7 分析値のばらつき

A. 常温磨砕法、B. 凍結粉砕法 液体窒素方式、C. 凍結粉砕法 ドライアイス・予冷方式、D. 凍結粉砕法 ドライアイス・予備凍結方式

表 4 各試料調製法で得られた分析値（平均値、ppb）

	試料調製法			
	A	B	C	D
イミダクロプリド	46	52	58	60
アセタミプリド	1.0	1.4	1.4	1.4
フルジオキシニル	24	17	22	20
テブコナゾール	134	125	157	140

A. 常温磨砕法、B. 凍結粉砕法 液体窒素方式、C. 凍結粉砕法 ドライアイス・予冷方式、D. 凍結粉砕法 ドライアイス・予備凍結方式

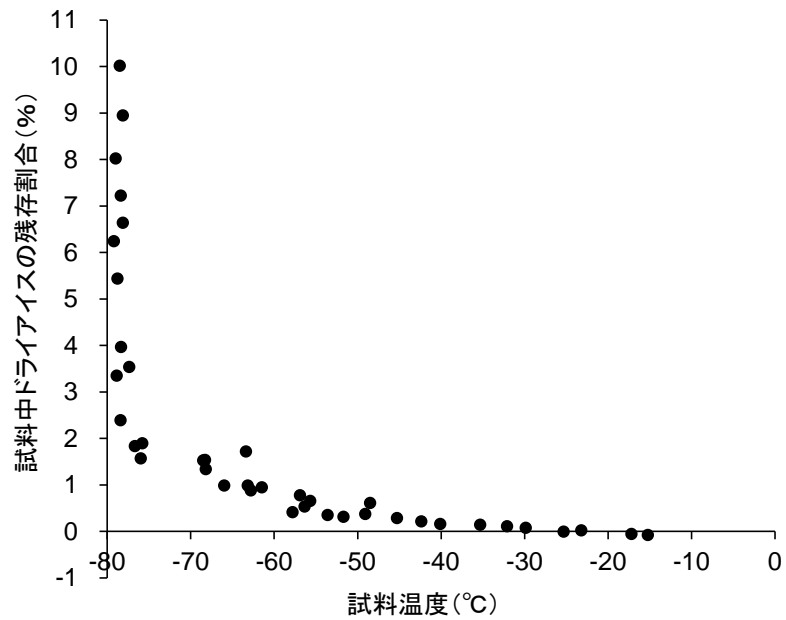


図 8 試料中に残存するドライアイスの割合と試料温度の関係

試料: キウイ

残存ドライアイス重量 = 粉碎後の容器、試料、ドライアイスの総重量 - (空の粉碎容器重量 + 試料重量)

試料中ドライアイスの残存割合 (%) = 残存ドライアイス重量 / (試料重量 + 残存ドライアイス重量) × 100

表 5 各試料調製法で得られた試料の水分含量(%)

	キウイ		大豆		洗いごま		いりごま	
	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差
常温磨砕法	82.38	0.07	12.80	0.08	3.72	0.11	0.73	0.09
凍結粉砕法 液体窒素・凍結方式	82.71	0.12	13.12	0.04	4.54	0.05	1.57	0.16
凍結粉砕法 ドライアイス・予冷方式	82.68	0.10	13.15	0.05	4.76	0.06	1.55	0.13
凍結粉砕法 ドライアイス・予備凍結方式	82.47	0.04	12.95	0.05	4.58	0.03	1.34	0.03

n=3

表 6 粉砕直後の試料温度(°C)

	試料調製法			
	A	B	C	D
キウイ	19	-69	-78	-78
大豆	46	-38	-78	-78
洗いごま	53	-48	-79	-78
いりごま	59	-43	-79	-79

室温 21~23°C、湿度 52~58%

A. 常温磨砕法、B. 凍結粉砕法 液体窒素方式、C. 凍結粉砕法 ドライアイス・予冷方式、D. 凍結粉砕法 ドライアイス・予備凍結方式

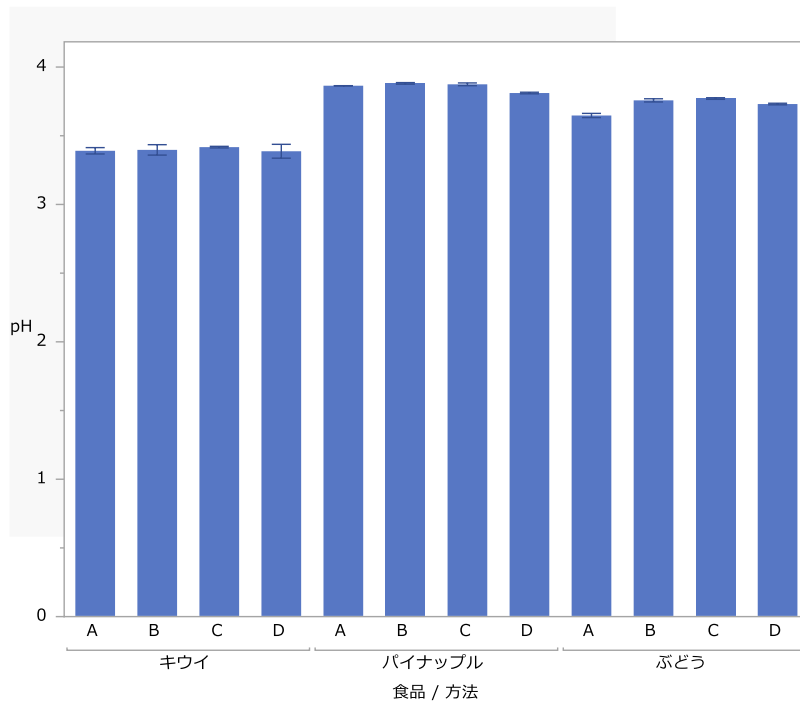


図 9-1 各試料調製法で得られた試料の pH

pH 3~4 の食品(キウイ、パイナップル、ぶどう)

A. 常温磨砕法、B. 凍結粉砕法 液体窒素方式、C. 凍結粉砕法 ドライアイス・予冷方式、D. 凍結粉砕法 ドライアイス・予備凍結方式

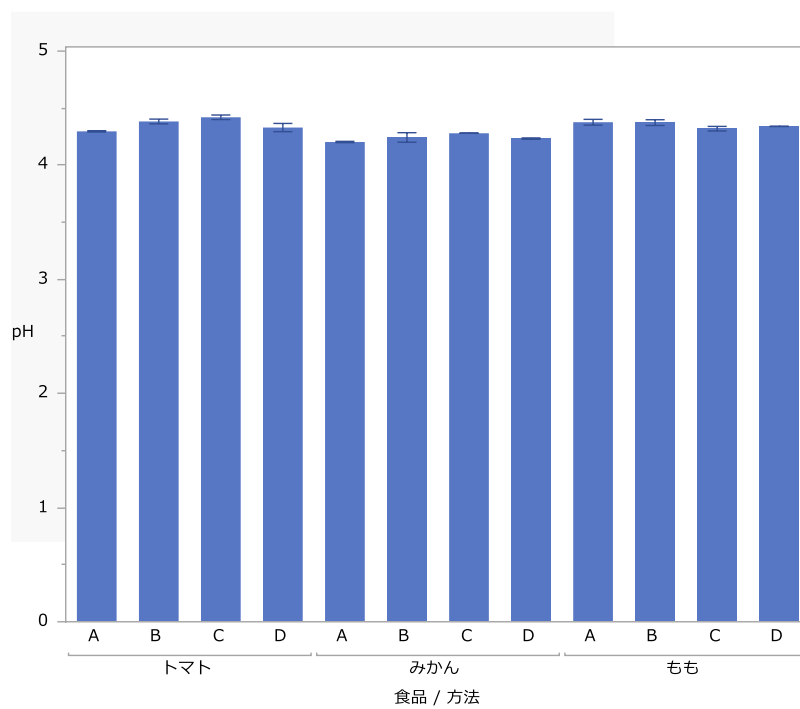


図 9-2 各試料調製法で得られた試料の pH

pH 4~5 の食品(トマト、みかん、もも)

A. 常温磨砕法、B. 凍結粉砕法 液体窒素方式、C. 凍結粉砕法 ドライアイス・予冷方式、D. 凍結粉砕法 ドライアイス・予備凍結方式

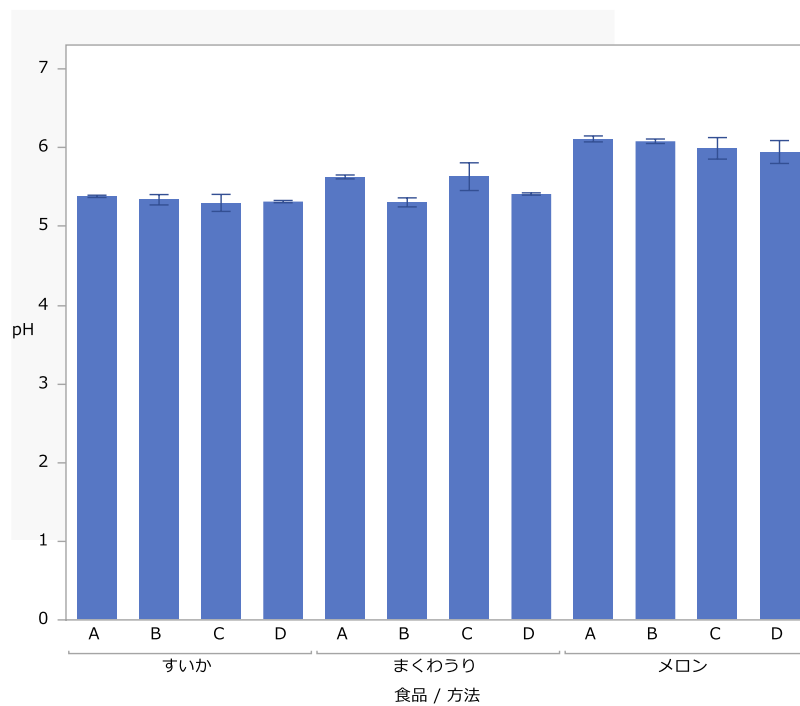


図 9-3 各試料調製法で得られた試料の pH

pH 5 以上の食品(すいか、まくわうり、メロン)

A. 常温磨砕法、B. 凍結粉砕法 液体窒素方式、C. 凍結粉砕法 ドライアイス・予冷方式、D. 凍結粉砕法 ドライア