

## 令和2年度厚生労働行政推進調査事業費補助金 食品の安全確保推進研究事業

輸出先国のリスク管理に対応した残留農薬データ等の補完に関する研究

### 研究分担報告書

輸出可能性が高い農産品における残留物濃度の加工による変化に関する研究

研究分担者 荒川 史博

日本ハム株式会社 中央研究所

#### 研究要旨

農林水産物・食品の輸出を推し進める中で、農薬の最大残留基準値（MRL）の設定は一国の課題ではなく、多くの国で受け入れられるよう適切な根拠をもとに設定されるべきである。農薬等を使用して栽培された作物由来の農産品を原料とする農産加工品を対象に、精密な暴露量の推定や MRL 設定の必要性を判断するためには、個々の農産品と農薬等との組み合わせごとに、残留物等の加工による変化や加工後の濃度を明らかにする必要がある。そのために実施される研究は、加工試験と呼ばれるが、世界規模で輸出入される主要な農産加工品でしか実施されていない。

本研究課題では、我が国からの輸出可能性が高く特有の農産加工品の原料ともなる農産品を対象とした加工試験を実施する上で必要な条件検討を実施し、農薬の有効成分やそれらの代謝産物並びに分解物の加工による挙動に関するデータ解析を行うために、課題1で作製した農薬を投与して栽培した結果得られる農薬残留物を含むインカード試料を原料として加工試験を行い、加工工程での残留物の挙動を明らかにすることを目的とした。

本年度は、エトフェンプロックス、ジノテフランを散布した稲からこめ油の製造、炊飯試験を行いこれら農薬の加工係数及び物質収支（マスバランス）の算出を行った。

#### 研究協力者

渡邊 敬浩

国立医薬品食品衛生研究所安全情報部

山田 友紀子

国立医薬品食品衛生研究所安全情報部

築野 卓夫

築野食品工業株式会社

山中 崇

築野食品工業株式会社

中村 歩

一般財団法人 日本食品分析センター

渡邊 文子

一般財団法人 日本食品分析センター

## A. 研究目的

わが国は 1981 年から 30 年連続して貿易黒字が続く貿易立国であったが、2011 年の東日本大震災発生を機に貿易赤字を記録するようになった。財務省の令和 2 年度貿易統計（令和 3 年 4 月 19 日）によると、輸出額は 69 兆 4873 億円、輸入額は 68 兆 1803 億円となっており、輸出から輸入を差し引いた貿易収支は 1 兆 3070 億の黒字になると推計されている。貿易収支は 3 年ぶりの黒字になったものの、輸出額は 2 年連続の減少となっている。農林水産物の輸出額は 0.9 兆円、輸入額は 8.9 兆円で、純輸入額が 8.0 兆円にもなり、世界一の農林水産物純輸入国となっている。このような状況を是正するために令和 2 年 4 月に施行された「農林水産物及び食品の促進に関する法律」では、輸出拡大のための課題の 1 つとして「輸出先国の食品安全等の規制への対応」が挙げられている。例えば、国内の農産品等の輸出先国において、該当する品目に農薬等の MRL が設定されていない場合や、設定されていたとしてもその値が我が国に比べ低い場合がこれにあたり、世界規模で輸出入される主要な農産加工品でしか、加工試験は実施されていないのが現状である。

そこで本分担研究では、我が国からの輸出可能性は高いが OECD のガイドラインに加工係数の記載がない農産品の加工係数を算出することを目的とした。昨年

度は我が国の主要農産品である米を原料としたこめ油の加工係数の算出についてパイロットスケールでの試験を実施した。本年度は、昨年度の検討を踏まえて工業的に製造したこめ油及び日本国民の摂取量が多い炊飯米の加工試験を実施し、加工係数とマスバランスの算出を行った。

## B. 研究方法

### こめ油の製造

本分担研究では、精密な暴露量推定に資する科学的データを得るために、研究課題 1 で作製した脂溶性のエトフェンプロックス、水溶性のジノテフラン 2 種の薬剤を散布したインカード試料を用いて、こめ油製造時の加工係数を算出する。本年度の産業的なこめ油の製造は、築野食品工業株式会社に委託した。

圃場から稲の収穫、脱穀、乾燥、脱ぷまでの工程は東京農業大学で実施した。上記工程でインカード試料として 28.88 kg の玄米を得た。得られた玄米はこめ油の製造委託先である築野食品工業株式会社に冷蔵便で送付した。もみ殻は日本ハム（株）中央研究所に冷蔵で輸送し、到着後は冷凍保管した。稲わらについては圃場から日本ハム株式会社に直接輸送し、分析開始まで冷凍で保管した。

インカード試料である玄米を精米度合い 10 % で精米し 3.12 kg の米糠を得た。得られた米糠に対して 5 倍量に相当する約 15 kg のヘキサンを加えて、数時間攪拌し

米原油が溶解したヘキサン層を分取した。残った糠に対して当初糠の3分の1量に相当する1 kgのヘキサンを加え、数時間攪拌後、米原油が溶解したヘキサン層を分取し、上記と合一した後にヘキサンを除去し、米原油を得た。得られた米原油は340 gであった。この米原油に温水を加え混合しガム質を除去する脱ガム工程、ヘキサンを加えロウ分を除去する脱ロウ工程、水酸化ナトリウム処理による脱酸工程、酸性白土の処理による脱色工程及び240℃で533 Pa以下の状態で2時間水蒸気処理を行う脱臭工程を経てこめ油を精製した。本試験報告では市場に流通するこめ油に相当する試料を脱臭油と定義した。こめ油の精製は得られた米原油を等量に分け、2試行で行った。こめ油の製造のフローを図1に示した。また、加工試験と同じ工程の市販こめ油を購入し、コントロール試料とした。

### 炊飯試験

炊飯時の白米の研ぎ方は様々な方法があり、調査の結果一様に定義された方法はなかった。従って、白米の研ぎ方により加工係数に違いが生じるか検証するため、本研究では株式会社神明及び福井精米株式会社が推奨する2種の方法で白米を研ぎ、家庭用の炊飯器で炊飯を行った。

株式会社神明の方法を以下に記す。炊飯釜に約480 g(3合)の米を入れ、水1 Lを加え2~3回手早くかき混ぜ、水を捨てた。この操作をさらに2回繰返した。最

後に水を約550 mL加え、30分間浸漬し、家庭用炊飯器の標準モードで炊飯を行った。

福井精米株式会社の方法を以下に記す。ザルに約480 g(3合)の米を広げ、米全体に行き渡るように水2 Lを流しながら米を洗った。その後炊飯釜に米を移し、水1 Lを加え、2~3回手早くかき混ぜ、水を捨てた。最後に、水を約550 mL加え、30分間浸漬し、家庭用炊飯器の標準モードで炊飯を行った。

2種の方法で炊飯した試料は、農薬試験の抽出に供する前に、1.15倍の水を加え米粒が確認できなくなる程度まで粉碎操作を行った。

### インカード試料の分析

農薬の分析は一般財団法人日本食品分析センターへ委託した。本研究で実施する試験方法の性能は、インカード試料栽培時に農薬散布区と非散布区の境界で栽培、収穫した玄米を試料(以下、額縁試料)として用いた。

### 分析対象化合物

分析対象化合物は、ジノテフラン、エトフェンプロックス及びその代謝物であるエトフェンプロックスカルボキシとした。

### 分析対象品目

稲わら、粃殻、玄米、糠、脱脂糠、米原油、脱ガム油、脱ロウ油、脱酸油、脱色油、脱臭油、白米及び炊飯米の13品目を分析対象とした(表1)。

## 標準品

分析には以下の標準品を使用した。

エトフェンプロックス (Etofenprox) 標準品：純度 99.9 % (林純薬工業製)

エトフェンプロックスカルボキシ (2-(4-ethoxyphenyl)-2-methoxypropyl-3-phenoxybenzene) 標準品 (以下、 $\alpha$ -CO)：純度 98.7 % (Dr.Ehrenstorfer 製)

ジノテフラン (Dinotefuran) 標準品：純度 99.8 % (富士フィルム和光純薬製)

## 試薬

アセトン、アセトニトリル、酢酸エチル、ジエチルエーテル、ヘキサンは関東化学株式会社製の残留農薬試験用、メタノールは関東化学株式会社製の高速液体クロマトグラフ用を使用した。塩化ナトリウム、酢酸アンモニウムは関東化学株式会社製の特級を使用した。InertSep C18 (1 g)、InertSep k-solute 5 mL 用はジーエルサイエンス株式会社製、Sep-pak Long Florisil (910 mg) は Waters corporation 製を使用した。

## 試液の調製方法

ジエチルエーテル/ヘキサン混液 (1:9) は、ジエチルエーテル 100 mL とヘキサン 900 mL を混合又は同割合で混合し、調製した。ヘキサン飽和アセトニトリルは、アセトニトリル約 500 mL とヘキサン約 100 mL を混合し、5 分間振とう後静置してアセトニトリル層を分取し、調製した。水/メタノール混液 (1:1) は、メタノール 500 mL と水 500 mL を混合又は同割合で混合し、調製した。1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液は、酢酸アンモニウム

15.43 g を水に溶解し 200 mL とし、2 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液は、1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液 2 mL に水を加えて 1000 mL とし、調製した。

## 標準溶液の調製方法

### 標準原液調製法

エトフェンプロックス標準品 25 mg を精密に量り、50 mL 容全量フラスコに入れた。アセトンを加え、超音波処理をしながら溶解した後定容し、これをエトフェンプロックス標準原液 (500 mg/L) とした。ジノテフラン標準品 25 mg を精密に量り、エトフェンプロックスと同様に調製し、ジノテフラン標準原液 (500 mg/L) とした。 $\alpha$ -CO 標準品 5 mg を精密に量り、25 mL 容全量フラスコに入れた。アセトンを加え、超音波処理をしながら溶解した後定容し、これを $\alpha$ -CO 標準原液 (200 mg/L) とした。

### 希釈用標準溶液調製法

エトフェンプロックス及びジノテフランは標準原液 1 mL をアセトンで 25 mL に定容し、20 mg/L とした。 $\alpha$ -CO は標準原液 2 mL をアセトンで 20 mL に定容し、20 mg/L とした。

### 測定用標準溶液調製法

20 mg/L の標準溶液を用いて、0.0001 mg/L から 1 mg/L の範囲で希釈し、試料からの農薬の検出濃度に応じて検量線の範囲を選択した。標準溶液の濃度は表 2 に示す。

### 添加用混合標準溶液調製法

添加回収試験を行うための標準溶液は、試験試料、添加濃度に応じてアセトン、

メタノールを用いて適宜調製した。

#### 試験溶液の調製

試験溶液は、試料に応じて 3 種の調製方法を行った。一例として玄米の調製方法を以下に示す。

玄米 10.0 g を採取し、水 20 mL を加え 2 時間放置した。その後、アセトン 100 mL を加え、ホモジナイズ後吸引ろ過をした。ろ紙上の残留物にアセトン 50 mL を加え、再度ホモジナイズし、吸引ろ過をした。得られたろ液を合一し、アセトンで 200 mL に定容した。メタノール 5 mL 及び水 5 mL でコンディショニングした InertSep C18 (1 g) カラムに上記アセトン抽出液 8 mL と水 20 mL を混合した溶液を負荷後、水/メタノール混液 (1:1) を 10 mL 通液しカラムの洗浄を行った。その後メタノール 10 mL で溶出し、10 mL に定容した。メタノール定容液を 1 mL 分取し、減圧濃縮、窒素乾固を行いヘキサン 5 mL に再溶解した。これをあらかじめヘキサン 10 mL でコンディショニングした Sep-pak Long Florisil (910 mg) カラムに負荷し、ヘキサン 5 mL で洗浄しジエチルエーテル/ヘキサン混液 (1:9) 10 mL で溶出した。溶出液を減圧濃縮、窒素乾固を行い得られた残留物をメタノールを用いて 1 mL に定容した。これを適宜希釈し、LC-MS/MS による測定に供した。

その他の試料についての詳細な方法は図 2 に示した。

#### LC-MS/MS による測定条件

#### エトフェンプロックス及び $\alpha$ -CO

機種：LC 部；Nexera X2 (LC-30AD)

MS 部；LCMS-8050

解析ソフト：LabSolutions LCMS

(以上、島津製作所製)

カラム：InertSustain C18

内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒径 5  $\mu$ m

(ジーエルサイエンス株式会社製)

オープン温度：40  $^{\circ}$ C

移動相：

A 液；2 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液

B 液；メタノール

A 液：B 液 (13 : 87)

流量：0.2 mL/min

注 入 量：4  $\mu$ L

コリジョンガス：アルゴン

モニターイオン等：イオン化法、モニターイオン等の詳細は表 3 に示す。

#### ジノテフラン

機種：LC 部；Nexera X2 (LC-30AD)

MS 部；LCMS-8050

解析ソフト：LabSolutions LCMS

(以上、島津製作所製)

カラム：InertSustain C18

内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒径 5  $\mu$ m

(ジーエルサイエンス株式会社製)

オープン温度：40  $^{\circ}$ C

移動相：

A 液；2 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液

B 液；メタノール

A 液：B 液 (80 : 20)

流量：0.2 mL/min

注 入 量：2  $\mu$ L

コリジョンガス：アルゴン

モニターイオン等：イオン化法、モニターイオン等の詳細は表4に示す。

## C.D. 結果及び考察

### 保管設備の温度モニタリング

研究課題1で作製したインカード試料及び加工を行った試料は試験開始まで日本ハム（株）中央研究所にて保管した。保管を開始した2020年9月1日より、6時間毎に冷凍保管庫の温度モニタリングを行った。温度記録計は株式会社シロ産業のMI1TP-251-FRMを用いた。温度記録の結果を図3に示す。保存期間中の最も高い温度は-15.87℃、最も低い温度は-20.43℃であり、試料保管設備の温度は問題ない事が確認できた。

### こめ油の製造及び炊飯試験

本研究ではこめ油の産業的な製造における加工係数の算出に加えて製造過程でのマスバランスも合わせて確認することを目的としているため、図1で示す各工程の試料重量とその農薬濃度を測定した。玄米28.88kgから精米を行い米糠3.12kgと白米24.77kgを得た。白米は炊飯試験に供するまで冷凍庫で保管をした。得られた米糠からヘキサン抽出にて340gの米原油を得た。米原油から試験用試料として10g抜取り、残りの米原油を等分し、脱臭油までの工程を2試行で行った。2試行とも各工程で5gずつ試験用試料としてサンプリングを行った。米原油を温

水処理してガム層を除去した脱ガム油は156gであった。次にヘキサンによる脱ロウ処理を行った脱ロウ油は143gであった。その後、水酸化ナトリウム処理をした脱酸油は124g、酸性白土で処理をした脱色油は113gであった。最後に533Paの減圧下で240℃の水蒸気処理を2時間行った脱臭油の収量は105gであった。

農林水産省食料・農業・農村政策審議会食糧部会において纏められた資料「米をめぐる関係資料」（令和2年7月30日）において、国内の米の消費は67.3%が家庭内消費であると調査されていることから、炊飯米の加工は家庭用炊飯器を用いて行った。炊飯前の米の研ぎ方は、株式会社神明と福井精米株式会社が推奨する方法の2種で2試行の試験を実施した。その結果0.48kgの白米から、1.1kgの炊飯米が得られ、2種の方法による収量の違い、試行回数による収量の違いは無かった。また、コントロールは株式会社神明の方法で1試行実施した。

### 試験方法の性能評価

試験法の性能要求事項は、LOQが0.01mg/kg以下であること、添加回収率が70～120%の範囲内であること及び併行精度が20%未満であることを確認し、試験法としての妥当性を評価する。

表2で示した試験溶液と試験溶液の調製方法の項で示した抽出方法から、本研究で実施するエトフェンプロックス及び

$\alpha$ -CO の定量下限は、炊飯米では 0.002 mg/kg、その他の試料では 0.01 mg/kg であった。また、ジノテフランの定量下限は、全ての試料で 0.01 mg/kg であった。添加回収試験は炊飯米 5 試行、その他の試料は 3 試行実施した。添加濃度を表 4 に、添加回収試験の結果を表 5 に添加回収率一覧を表 6 に示した。併行精度は脱ガム油の $\alpha$ -CO で最も大きく 8.5 %であった。添加回収率は、エトフェンプロックスでは 80 ~ 106 %、 $\alpha$ -CO では 78 ~ 108 %、ジノテフランでは 98 ~ 117 %と薬剤、試料いずれの組合せにおいても性能評価要件を満たしていた。以上より、開発された方法は本研究に用いる分析法として妥当であると評価した。

#### こめ油及び炊飯米の加工係数とマスバランス

稲わら、籾殻、玄米、糠、脱脂糠、米原油、脱ガム油、脱ロウ油、脱酸油、脱色油、脱臭油、白米及び炊飯米の 13 品目について試験を行った。炊飯米は 2 試行実施した加工試験をそれぞれ独立で分析し、その他の試料については 2 試行で実施した加工試験の試料を分析前にそれぞれから等量を採取後合一し、1 試料とした。エトフェンプロックスの分析結果一覧を表 7.1、 $\alpha$ -CO の分析結果一覧を表 7.2、ジノテフランの分析結果一覧を表 7.3 に示した。

散布した薬剤の加工工程での挙動を確認するため各工程で得られた試料の収量

とその試料の分析値を乗じて得た薬剤量をマスバランスとして表 8 に示した。炊飯米のマスバランスは、得られた白米を全て炊飯したと仮定して計算した。さらに、加工品による精密な暴露量の推定を行うために玄米を RAC (raw agricultural commodities) として、こめ油製造時の加工係数、炊飯試験時の加工係数を算出した。加工係数はエトフェンプロックス、ジノテフランに加えて、エトフェンプロックスの代謝物である $\alpha$ -CO をエトフェンプロックス量に換算し、エトフェンプロックスと合算したものの 3 種を計算した。また、マスバランスについては加工の工程による挙動を可視化するために、こめ油と炊飯試験のフロー中にまとめ図 5 とした。

精米工程を経た糠と白米の結果から水溶性のジノテフランは大半が白米に局在していることが明らかとなった。糠に存在していたジノテフランはヘキサンの抽出による米原油の製造過程で全て脱脂糠に残り米原油へは移行しないことが確認できた。これは logPow-0.5 という水溶性の性質と一致した。また、JMPR の報告書によると pH11 や 13 のようなアルカリ条件下では、加水分解により 45 時間程度で半減し、pH4~9 の酸性から弱アルカリ性では安定であることが報告されている。今回の研究により通常の炊飯器で炊飯するような加熱条件では白米中に残ったジノテフランの 8 割程度は炊飯後の米に残

存することが確認された。

エトフェンプロックスについては玄米で4.072 mg、精米により米糠に1.657 mg、白米に0.803 mgと算出されたが、米糠以降の工程で確認されるエトフェンプロックスの量から考えると、原因は特定できていないが米糠中のエトフェンプロックスは本来の量よりも低く見積もられていると考えられる。こめ油の精製過程中的エトフェンプロックスのマスバランスは米原油の2.508 mg、温水処理による脱ガム油で2.340 mg、ヘキサン処理による脱ロウ油で2.196 mg、水酸化ナトリウム処理による脱酸油で1.954 mg、酸性白土の処理による脱色油で1.374 mgと米原油からは半分程度に減少はしているが、玄米を起点とした加工係数からみると米原油の53.9から脱色油の43.1まで大きな変化はなく、JMPRの報告書にある1N NaOH、1N HClで安定である事と一致した。エトフェンプロックスの量が大きく変化したのは533 Paの減圧下で240 °Cの水蒸気処理を2時間行う脱臭工程で、マスバランスでは脱色油の1.374 mgから脱臭油では0.433 mg、加工係数についても43.1から14.6と約30%に減少した。JMPRの報告書では、80 °Cで3ヶ月間安定、100 °Cにおいては部分的に分解すると示されており、蒸気圧下では熱に比較的安定であるが、減圧下での240 °C処理という特殊な条件下で加水分解されたと示唆された。

本年度は研究初年度ということもあり、

logPowが極端に大きいエトフェンプロックスと極端に小さいジノテフランで試験を行った。本研究の目的である輸出の促進に繋がるよう、来年度も引き続き、輸出可能性の高い加工品と薬剤の組合せを検討し、OECDのガイドラインに記載されるべきデータを取得できるよう、より精緻な研究を遂行していく必要がある。

## E. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

なし

別添資料等

表 1 試験試料の一覧

試料名	加工機関	保管機関	試験実施機関
稲わら	日本ハム(株)中央研究所	日本ハム(株)中央研究所	一般財団法人日本食品分析センター
粃殻	東京農業大学	日本ハム(株)中央研究所	一般財団法人日本食品分析センター
玄米	東京農業大学	日本ハム(株)中央研究所	一般財団法人日本食品分析センター
糠	築野食品工業株式会社	日本ハム(株)中央研究所	一般財団法人日本食品分析センター
白米	築野食品工業株式会社	日本ハム(株)中央研究所	一般財団法人日本食品分析センター
脱脂糠	築野食品工業株式会社	日本ハム(株)中央研究所	一般財団法人日本食品分析センター
米原油	築野食品工業株式会社	日本ハム(株)中央研究所	一般財団法人日本食品分析センター
脱ガム油	築野食品工業株式会社	日本ハム(株)中央研究所	一般財団法人日本食品分析センター
脱口ウ油	築野食品工業株式会社	日本ハム(株)中央研究所	一般財団法人日本食品分析センター
脱酸油	築野食品工業株式会社	日本ハム(株)中央研究所	一般財団法人日本食品分析センター
脱臭油	築野食品工業株式会社	日本ハム(株)中央研究所	一般財団法人日本食品分析センター
脱臭油	築野食品工業株式会社	日本ハム(株)中央研究所	一般財団法人日本食品分析センター
炊飯米	築野食品工業株式会社	日本ハム(株)中央研究所	一般財団法人日本食品分析センター
額縁試料	東京農業大学	日本ハム(株)中央研究所	一般財団法人日本食品分析センター

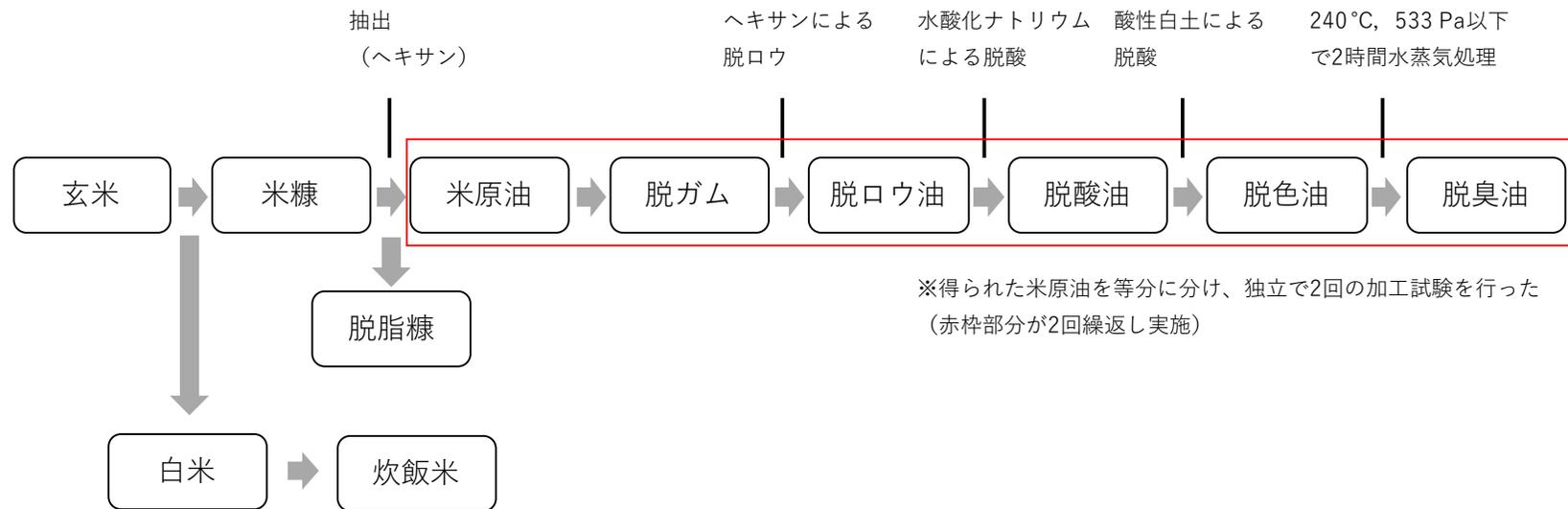


図1 こめ油と炊飯の加工試験フロー

表 2 測定用標準溶液

名称	調製濃度 (mg/L)	使用溶液	使用量 (mL)	定容量 (mL)
標準溶液 A	1	20 mg/L	各 1	20
標準溶液 B	0.05	標準溶液 A	1	20
標準溶液 C	0.01	標準溶液 B	4	20
標準溶液 D	0.008	標準溶液 B	4	25
標準溶液 E	0.006	標準溶液 C	6	10
標準溶液 F	0.004	標準溶液 C	4	10
標準溶液 G	0.002	標準溶液 C	2	10
標準溶液 H	0.001	標準溶液 C	1	10
標準溶液 I	0.0008	標準溶液 D	1	10
標準溶液 J	0.0006	標準溶液 E	1	10
標準溶液 K	0.0004	標準溶液 F	1	10
標準溶液 L	0.0002	標準溶液 G	1	10
標準溶液 M	0.0001	標準溶液 H	1	10

[調製溶媒…A：アセトン、B～M：メタノール]

①エトフェンプロックス及び $\alpha$ -CO

a. 玄米、白米、糠、脱脂糠、粃殻及び稲わら試験法

試料10.0 g (糠及び脱脂糠は2.0 g) 採取

水20 mL (稲わらは30 mL) を加え2時間放置  
アセトン100 mL (稲わらは120 mL) を加えホモジナイズ後、吸引ろ過  
ろ紙上の残留物にアセトン50 mLを加えホモジナイズ後、吸引ろ過  
得られたろ液を合わせアセトンで200 mLに定容

InertSep C18 (1 g)

(カラムを予め、メタノール5 mL及び水5 mLで洗浄)  
抽出液8 mL分取  
水20 mLを加え負荷、洗浄  
水及びメタノールの混液 (1:1) 10 mLで洗浄  
メタノール10 mLで溶出、メタノールで10 mL定容

Sep-pak Long Florisil (910 mg)

(予めヘキサン10 mLで洗浄)  
定容液1 mL (糠及び脱脂糠は5 mL) 分取  
減圧濃縮、窒素乾固、ヘキサン5 mLに溶解、負荷  
ヘキサン5 mLで洗浄  
ジエチルエーテル及びヘキサンの混液 (1:9) 10 mLで溶出  
減圧濃縮、窒素乾固

残留物

メタノールで1 mL定容  
インカード試料エトフェンプロックス：玄米及び糠は5倍希釈、  
粃殻は100倍希釈、稲わらは50倍希釈  
インカード試料 $\alpha$ -CO：粃殻は100倍希釈、稲わらは50倍希釈

LC-MS/MS注入

図 2-1 エトフェンプロックス及び $\alpha$ -CO の玄米、白米、糠、脱脂糠、粃殻及び稲わらに対する試験溶液の調製法

b. 炊飯米試験法

試料21.6 g (米飯10 g相当) 採取

アセトン100 mLを加えホモジナイズ後、吸引ろ過  
ろ紙上の残留物にアセトン50 mLを加えホモジナイズ後、吸引ろ過  
得られたろ液を合わせアセトンで200 mLに定容

InertSep C18 (1 g)

(カラムを予め、メタノール5 mL及び水5 mLで洗浄)  
抽出液8 mL分取  
水20 mLを加え負荷、洗浄  
水及びメタノールの混液 (1:1) 10 mLで洗浄  
メタノール10 mLで溶出、メタノールで10 mL定容

Sep-pak Long Florisil (910 mg)

(予めヘキサン10 mLで洗浄)  
定容液5 mL分取、減圧濃縮、窒素乾固  
ヘキサン5 mLに溶解、負荷  
ヘキサン5 mLで洗浄  
ジエチルエーテル及びヘキサンの混液 (1:9) 10 mLで溶出  
減圧濃縮、窒素乾固

残留物

メタノールで1 mL定容

LC-MS/MS注入

図 2-2 エトフェンプロックス及び $\alpha$ -CO の炊飯米に対する試験溶液の調製法

c. 米糠原油、脱ガム油、脱ロウ油、脱酸油、脱色油及び脱臭油試験法

試料1.0 g採取

アセトン50 mLを加え1分間超音波照射、10分間振とう  
綿栓ろ過、アセトンで100 mL定容

抽出液

10 mL分取  
減圧濃縮

残留物

ヘキサン30 mL及びヘキサン飽和アセトニトリル30 mLを加え  
5分間振とう

アセトニトリル層

ヘキサン層

ヘキサン飽和アセトニトリル30 mL  
5分間振とう

アセトニトリル層

ヘキサン層

減圧濃縮、窒素乾固

残留物

メタノールで2.5 mL定容

Sep-pak Long Florisil (910 mg)

(予めヘキサン10 mLで洗浄)

定容液1 mL分取、窒素乾固、ヘキサン5 mLに溶解、負荷  
ヘキサン5 mLで洗浄

ジエチルエーテル及びヘキサンの混液 (1:9) 10 mLで溶出

減圧濃縮、窒素乾固

残留物

メタノールで1 mL定容

インカード試料は40倍希釈

LC-MS/MS注入

図 2-3 エトフェンプロックス及び $\alpha$ -CO の米糠原油、脱ガム油、脱ロウ油、脱酸油、脱色油及び脱臭油に対する試験溶液の調製法

## ②ジノテフラン

### a. 玄米、白米、糠、脱脂糠、粃殻及び稲わら試験法

試料10.0 g (糠及び脱脂糠は2.0 g) 採取

水20 mL (稲わらは30 mL) を加え2時間放置  
アセトン100 mL (稲わらは120 mL) を加えホモジナイズ後、吸引ろ過  
ろ紙上の残留物にアセトン50 mLを加えホモジナイズ後、吸引ろ過  
得られたろ液を合わせアセトンで200 mLに定容

InertSep k-solute 5 mL用

抽出液0.8 mL (糠及び脱脂糠は4 mL) 分取  
糠及び脱脂糠のみ約0.5 mLまで減圧濃縮  
水3 mL及び塩化ナトリウム約1 gを加え負荷、5分間放置  
ヘキサン40 mLで洗浄  
酢酸エチル60 mLで溶出、減圧濃縮、窒素乾固

残留物

メタノールで1 mL定容  
インカード試料：玄米、精米及び糠は5倍希釈、脱脂糠は10倍希釈、  
粃殻は40倍希釈、稲わらは10倍希釈

LC-MS/MS注入

図 2-4 ジノテフランの玄米、白米、糠、脱脂糠、粃殻及び稲わらに対する試験溶液の調製法

b. 炊飯米試験法

試料21.6 g (米飯10 g相当) 採取

アセトン100 mLを加えホモジナイズ後、吸引ろ過  
ろ紙上の残留物にアセトン50 mLを加えホモジナイズ後、吸引ろ過  
得られたろ液を合わせアセトンで200 mLに定容

InertSep k-solute 5 mL用

抽出液0.8 mL分取  
水3 mL及び塩化ナトリウム約1 gを加え負荷、5分間放置  
ヘキサン40 mLで洗浄  
酢酸エチル60 mLで溶出、減圧濃縮、窒素乾固

残留物

メタノールで1 mL定容

LC-MS/MS注入

図 2-5 ジノテフランの炊飯米に対する試験溶液の調製法

c. 米糠原油、脱ガム油、脱ロウ油、脱酸油、脱色油及び脱臭油試験法

試料1.0 g採取

アセトン50 mLを加え1分間超音波照射、10分間振とう  
綿栓ろ過、アセトンで100 mL定容

抽出液

10 mL (試料 0.1 g相当) 分取  
減圧濃縮

残留物

ヘキサン30 mL及びヘキサン飽和アセトニトリル30 mLを加え  
5分間振とう

アセトニトリル層

ヘキサン層

ヘキサン飽和アセトニトリル30 mL  
5分間振とう

アセトニトリル層

ヘキサン層

減圧濃縮、窒素乾固

残留物

メタノールで2.5 mL定容

LC-MS/MS注入

図 2-6 ジノテフランの米糠原油、脱ガム油、脱ロウ油、脱酸油、脱色油及び脱臭油に対する試験溶液の調製法

表 3-1. エトフェンプロックス及びエトフェンプロックスカルボキシの測定条件

	イオン化法	プレカーサーイオン ( <i>m/z</i> )	プロダクトイオン ( <i>m/z</i> )	Q1 Pre Bias (V)	CE (eV)	保持時間の 目安 (分)
エトフェンプロックス	ESI (+)	394	177	-14	-16	11
$\alpha$ -CO* <sup>1</sup>	ESI (+)	408	177	-13	-14	9
$\alpha$ -CO* <sup>2</sup>	ESI (+)	408	107	-12	-45	9

\*1 米原油、脱ガム油、脱ロウ油、脱酸油、脱色油及び脱臭油

\*2 玄米、精米、糠、脱脂糠、粃殻、稲わら及び炊飯米

表 3-2. ジノテフランの測定条件

	イオン化法	プレカーサーイオン ( <i>m/z</i> )	プロダクトイオン ( <i>m/z</i> )	Q1 Pre Bias (V)	CE (eV)	保持時間の 目安 (分)
ジノテフラン	ESI (+)	203	113	-14	-12	5

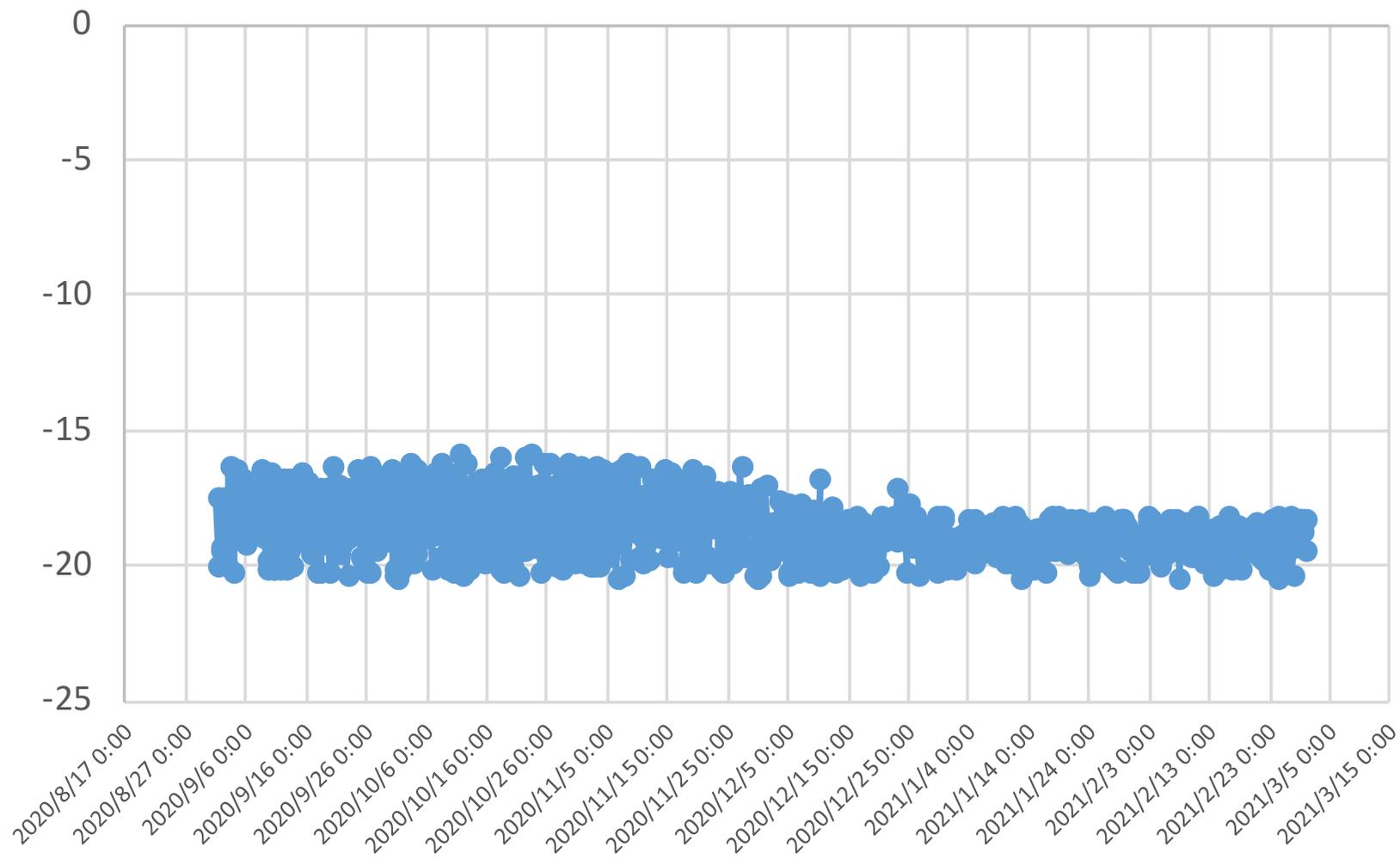


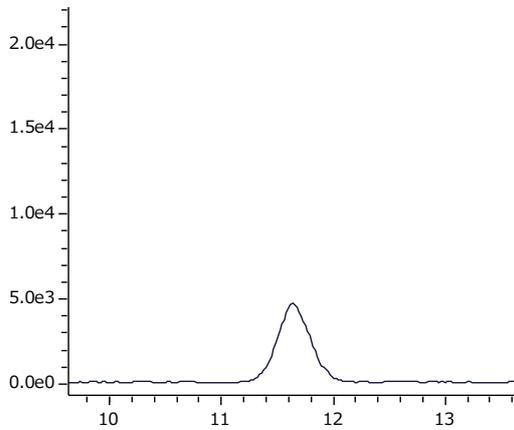
図3. インカード試料の保管冷凍庫の温度モニタリング

エトフェンプロックス標準溶液

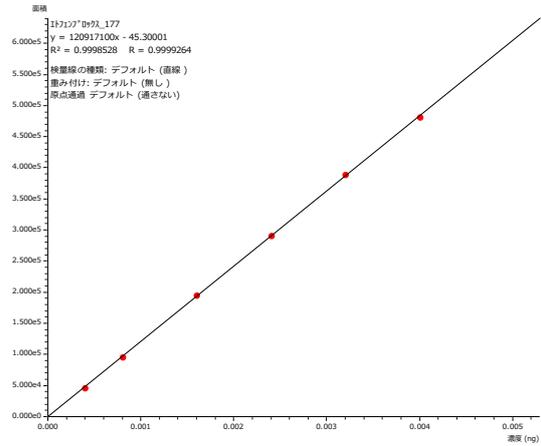
0.0002 mg/L

Q 394.25>177.35 (+)

4.73e3



低濃度検量線

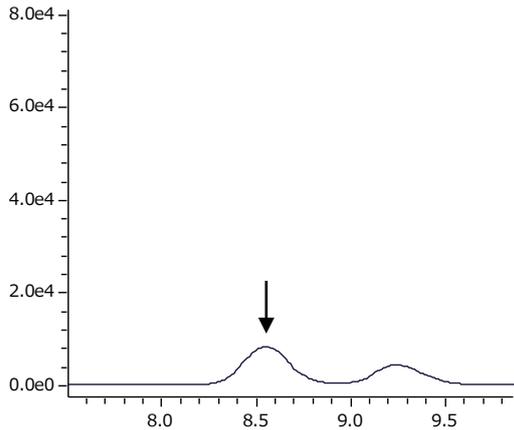


α-CO 標準溶液

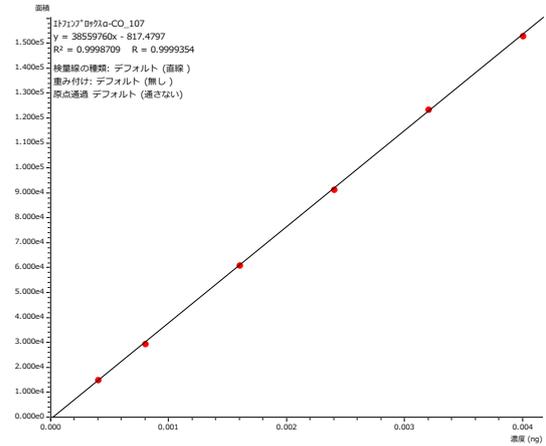
0.0006 mg/L

Q 408.00>177.30 (+)

8.38e3



低濃度検量線

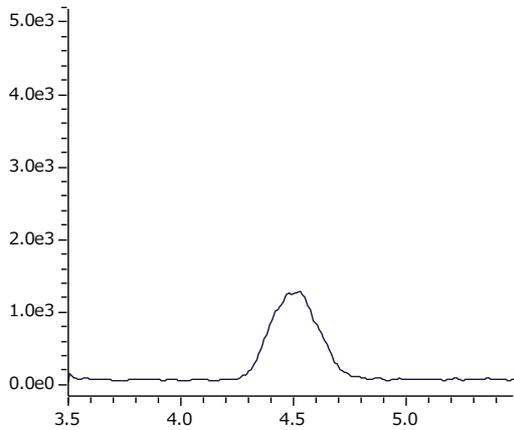


ジノテフラン標準溶液

0.0002 mg/L

Q 203.11>113.25 (+)

1.29e3



低濃度検量線

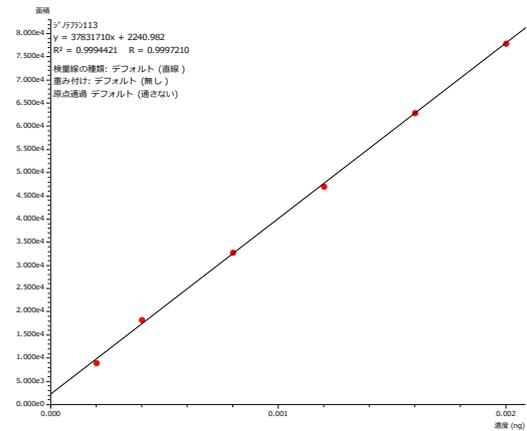


図 4 クロマトグラムと検量線の一例

表 4 添加回収試験における各試料への添加濃度一覧

試料名	稲わら	籾殻	玄米	糠	脱脂糠	米原油	脱ガム油	脱ロウ油	脱酸油	脱色油	脱臭油	白米	炊飯米
エトフェンプロックス	0.01	0.05	0.01	0.01	0.01	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.01	0.002
$\alpha$ -CO	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.01	0.002
ジノテフラン	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01

表 5-1 エトフェンプロックスの添加回収試験結果 (mg/kg)

試料名	稲わら	籾殻	玄米	糠	脱脂糠	米原油	脱ガム油	脱ロウ油	脱酸油	脱色油	脱臭油	白米	炊飯米
無添加	<LOQ	0.0542	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0.0365	0.0363	0.0374	0.0275	0.0233	<LOQ	<LOQ	<LOQ
添加1	0.0080	0.0949	0.0127	0.0142	0.0138	0.0943	0.0856	0.0897	0.0774	0.0685	0.0575	0.0092	0.00165
添加2	0.0080	0.0972	0.0125	0.0144	0.0145	0.0865	0.0894	0.0871	0.0756	0.0712	0.0556	0.0091	0.00171
添加3	0.0079	0.0944	0.0124	0.0143	0.0149	0.0863	0.0928	0.0858	0.0759	0.0726	0.0563	0.0087	0.00171
添加4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.00176
添加5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.00168
平均	0.0080	0.0955	0.0125	0.0143	0.0144	0.0890	0.0893	0.0875	0.0763	0.0708	0.0565	0.0090	0.00170
RSD(%)	0.7	1.6	1.2	0.7	3.9	5.1	4.0	2.3	1.3	2.9	1.7	2.9	2.0

表 5-2 a-CO の添加回収試験結果 (mg/kg)

試料名	稲わら	籾殻	玄米	糠	脱脂糠	米原油	脱ガム油	脱ロウ油	脱酸油	脱色油	脱臭油	白米	炊飯米
無添加	<LOQ	0.0158	<LOQ										
添加1	0.0081	0.0314	0.0104	0.0121	0.0108	0.0299	0.0256	0.0301	0.0285	0.0260	0.0253	0.0092	0.00182
添加2	0.0078	0.0319	0.0106	0.0120	0.0113	0.0258	0.0301	0.0285	0.0274	0.0263	0.0237	0.0088	0.00189
添加3	0.0076	0.0322	0.0100	0.0125	0.0122	0.0283	0.0293	0.0279	0.0269	0.0284	0.0238	0.0082	0.00178
添加4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.00186
添加5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.00172
平均	0.0078	0.0318	0.0103	0.0122	0.0114	0.0280	0.0283	0.0288	0.0276	0.0269	0.0243	0.0087	0.00183
RSD(%)	3.2	1.3	3.0	2.2	6.2	7.4	8.5	3.9	3.0	4.9	3.7	5.8	3.7

表 5-3 ジノテフランの添加回収試験結果 (mg/kg)

試料名	稲わら	籾殻	玄米	糠	脱脂糠	米原油	脱ガム油	脱ロウ油	脱酸油	脱色油	脱臭油	白米	炊飯米
無添加	<LOQ	0.0182	<LOQ										
添加1	0.0114	0.0384	0.0117	0.0163	0.0163	0.0116	0.0111	0.0114	0.0111	0.0106	0.0115	0.0118	0.0103
添加2	0.0114	0.0369	0.0118	0.0165	0.0166	0.0115	0.0110	0.0111	0.0108	0.0104	0.0116	0.0117	0.0109
添加3	0.0112	0.0381	0.0116	0.0161	0.0152	0.0115	0.0115	0.0111	0.0109	0.0103	0.0113	0.0117	0.0108
添加4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0106
添加5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0107
平均	0.0113	0.0378	0.0117	0.0163	0.0160	0.0115	0.0112	0.0112	0.0109	0.0104	0.0115	0.0117	0.0107
RSD(%)	1.0	2.1	0.9	1.2	4.6	0.5	2.4	1.5	1.4	1.5	1.3	0.5	2.2

表 7-1 エトフェンプロックスの試験結果 (mg/kg)

試料名	稲わら	籾殻	玄米	糠	脱脂糠	米原油	脱ガム油	脱ロウ油	脱酸油	脱色油	脱臭油	白米	炊飯米			
													神明1	神明2	福井1	福井2
試行1	4.83	20.4	0.139	0.536	0.0199	7.54	7.46	7.66	7.92	6.03	2.11	0.0338	0.0064	0.0063	0.0063	0.0066
試行2	4.95	20.5	0.139	0.524	0.0200	7.56	7.64	7.71	7.73	5.65	2.07	0.0319	0.0064	0.0062	0.0062	0.0067
試行3	4.97	20.2	0.144	0.534	0.0197	7.71	7.41	7.68	7.98	6.56	2.01	0.0314	0.0066	0.0065	0.0062	0.0067
平均	4.92	20.4	0.141	0.531	0.0199	7.60	7.50	7.68	7.88	6.08	2.06	0.0324	0.0065	0.0063	0.0062	0.0067
RSD(%)	1.5	0.8	2.1	1.2	0.8	1.2	1.6	0.3	1.7	7.5	2.4	3.9	1.8	2.4	0.9	0.9

表 7-2  $\alpha$ -CO の試験結果 (mg/kg)

試料名	稲わら	籾殻	玄米	糠	脱脂糠	米原油	脱ガム油	脱ロウ油	脱酸油	脱色油	脱臭油	白米	炊飯米			
													神明1	神明2	福井1	福井2
試行1	2.03	5.98	0.0297	0.126	< LOQ	1.80	1.69	1.80	1.94	1.63	1.00	0.0082	0.0018	0.0017	0.0018	0.0019
試行2	2.04	6.03	0.0285	0.124	< LOQ	1.85	1.84	1.92	1.90	1.48	1.02	0.0077	0.0017	0.0017	0.0017	0.0018
試行3	2.07	6.06	0.0299	0.127	< LOQ	1.76	1.63	1.82	1.91	1.75	0.98	0.0081	0.0018	0.0018	0.0017	0.0019
平均	2.05	6.02	0.0294	0.126	-	1.80	1.72	1.85	1.92	1.62	1.00	0.0080	0.0018	0.0017	0.0017	0.0019
RSD(%)	1.0	0.7	2.6	1.2	-	2.5	6.3	3.5	1.1	8.4	2.2	3.3	3.3	3.3	3.3	3.1

表 7-3 ジノテフランの試験結果 (mg/kg)

試料名	稲わら	籾殻	玄米	糠	脱脂糠	米原油	脱ガム油	脱ロウ油	脱酸油	脱色油	脱臭油	白米	炊飯米			
													神明1	神明2	福井1	福井2
試行1	1.21	5.11	0.352	0.547	1.000	< LOQ	0.394	0.143	0.151	0.150	0.150					
試行2	1.20	5.16	0.353	0.533	0.998	< LOQ	0.414	0.152	0.151	0.151	0.153					
試行3	1.20	5.13	0.349	0.540	1.000	< LOQ	0.411	0.148	0.154	0.149	0.154					
平均	1.20	5.13	0.351	0.540	0.999	-	-	-	-	-	-	0.406	0.148	0.152	0.150	0.152
RSD(%)	0.5	0.5	0.6	1.3	0.1	-	-	-	-	-	-	2.7	3.1	1.1	0.7	1.4

表 8 マスバランスの算出

試料名	収量 (kg)	エトフェンプロックス (mg/kg)	マスバランス (mg)	$\alpha$ -CO (mg/kg)	マスバランス (mg)	ジノテフラン (mg/kg)	マスバランス (mg)
玄米	28.88	0.141	4.072	0.0294	0.849	0.351	10.137
糠	3.12	0.531	1.657	0.126	0.393	0.540	1.685
脱脂糠	2.78	0.0199	0.055	0.0055*	0.0152*	0.999	2.777
米原油	0.330	7.60	2.508	1.80	0.594	-	-
脱ガム油	0.312	7.50	2.340	1.72	0.537	-	-
脱ロウ油	0.286	7.68	2.196	1.85	0.529	-	-
脱酸油	0.248	7.88	1.954	1.92	0.476	-	-
脱色油	0.226	6.08	1.374	1.62	0.366	-	-
脱臭油	0.210	2.06	0.433	1.00	0.210	-	-
白米	24.77	0.0324	0.803	0.0080	0.198	0.406	10.057
炊飯米*	56.76	0.0064	0.363	0.0018	0.102	0.151	8.571

炊飯米の収量は得られた白米を全て炊飯したと仮定した

表9 加工係数の算出

試料名	エトフェンプロックス logPow 6.9 (Mw:376.49) (mg/kg)	換算後 α-CO* (Mw:390.47) (mg/kg)	Pf (エトフェンプロックス)	Pf (エトフェンプロックス +換算後α-CO)	ジノテフラン logPow -0.5 (Mw:202.21) (mg/kg)	Pf (ジノテフラン)
玄米	0.141	0.0283	<b>1.0</b>	<b>1.0</b>	0.351	<b>1.0</b>
糠	0.531	0.1215	<b>3.77</b>	<b>3.85</b>	0.540	<b>1.54</b>
脱脂糠	0.0199	0.0053	<b>0.14</b>	<b>0.15</b>	0.999	<b>2.85</b>
米原油	7.60	1.74	<b>53.9</b>	<b>55.1</b>	-	-
脱ガム油	7.50	1.66	<b>53.2</b>	<b>54.1</b>	-	-
脱ロウ油	7.68	1.78	<b>54.5</b>	<b>55.9</b>	-	-
脱酸油	7.88	1.85	<b>55.9</b>	<b>57.5</b>	-	-
脱色油	6.08	1.56	<b>43.1</b>	<b>45.1</b>	-	-
脱臭油	2.06	0.964	<b>14.6</b>	<b>17.9</b>	-	-
白米	0.0324	0.0077	<b>0.23</b>	<b>0.24</b>	0.406	<b>1.16</b>
炊飯米	0.0064	0.0017	<b>0.05</b>	<b>0.05</b>	0.151	<b>0.43</b>

\*換算後α-CO: α-COの測定値に分子量換算をし、エトフェンプロックスとしての濃度に換算した

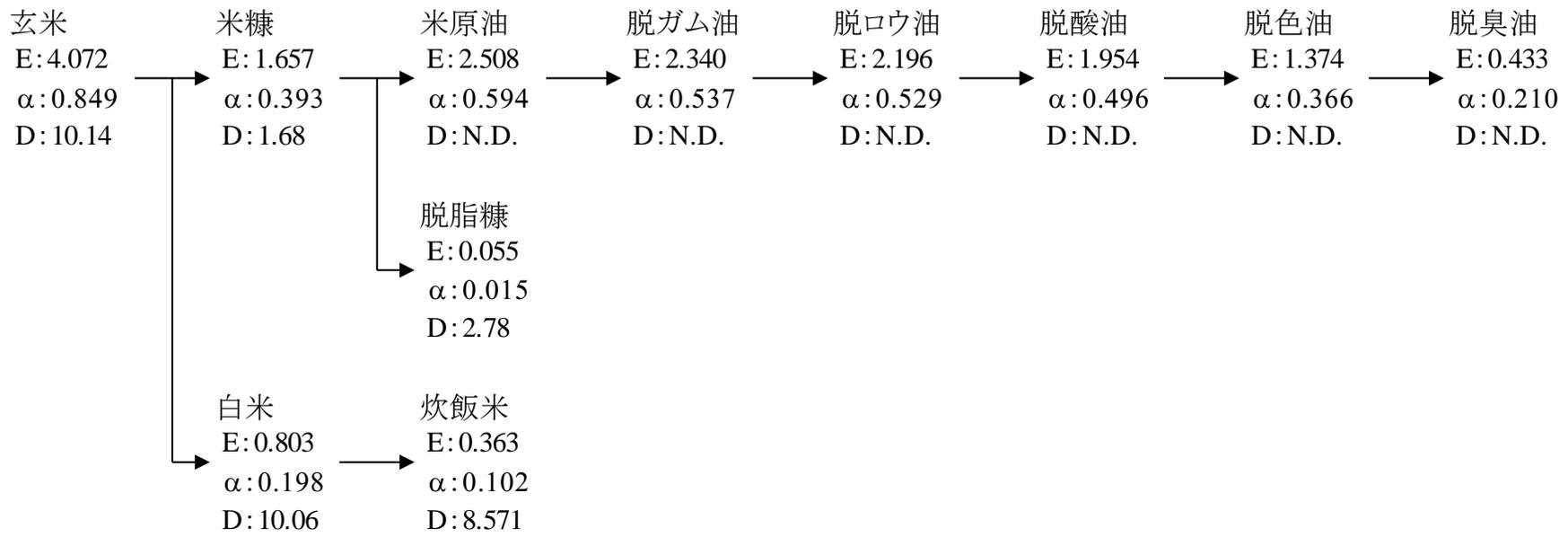


図5 マスバランスのフローチャート