

令和3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

外部精度管理調査プログラム用適正試料の改善と開発に関する研究

—スプレードライヤを用いた残留農薬用試料の開発(1)—

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	副所長
研究協力者	高坂 典子	(一財) 食品薬品安全センター秦野研究所	室長
	平林 尚之	(一財) 食品薬品安全センター秦野研究所	研究員
	久保田佳子	(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

初年度、玄米粉中の残留農薬については、100%アセトニトリルにダイアジノン、フェニトロチオン、マラチオン及びククロルピリホスを溶解させ、玄米粉を加え懸濁攪拌させ、スプレードライヤの噴霧温度（入口温度）を120℃、100℃、80℃で比較検討したが、回収率は5%～25%と非常に低かったことから、昨年度は、水を加え、80%アセトニトリル溶液、40%アセトニトリル溶液を検討した結果、水の量を増やすことで回収率が改善できることが分かった。今年度は、さらに水の量を増やし20%アセトニトリル溶液で作製検討した。作製条件は、これまでと同様に行い回収率を比較した。回収率は改善され、入り口温度が80℃のとき、いずれの農薬も回収率は70%以上であった。作製された試料は、課題5に供与した。

A. 研究目的

これまで技能試験プログラム用試料は実試料に近い湿試料を開発し作成していた。湿試料の場合、長時間にわたる安定性を維持することは非常に困難であった。野菜ペースト中の残留農薬や豚肉ペースト中の残留動物用医薬品などはその基材由来の成分や酵素などにより分解を受け易く、安定性を担保することが課題である。これら技能試験プログラム用試

料は、安定性ばかりではなく、均質性も求められ、両者を満たされなければ試料として用いることができない。一方、湿試料に比べ乾試料は安定性が良いことは知られており、安定性を期待する試料として紛体の乾試料を用いて技能試験も行われている。そこで、紛体の技能試験プログラム用試料の開発を目的とした。

乾燥した紛体の作製には、試料の分解を考慮すると凍結乾燥法が有力である

が、多量の試料を作製するためには向かない。また、紛体と紛体を混合しても、粒子径が同じでなければ均質なものはできない。そこで、液体原料を熱風中に噴霧して液滴の比表面積を増加させ短時間で水分を蒸発させる乾燥法であるスプレードライヤ（噴霧乾燥法）をこの技能試験プログラム用試料作製に応用できないか検討した。スプレードライヤは 20 世紀初めに脱脂粉乳の乾燥に用いられ発達した技術であり、種々の食品に応用されている。通常は液体原料に適用された技術であるが、我々は、玄米粉を用い、カドミウム溶液に懸濁させて作製条件の検討を行い、技能試験用試料として用いることができることを示した。今年度は、同一の玄米粉を用い、残留農薬用試料作製に応用し、基礎的検討を行った。

B. 方法

1. 試料基材および試薬

試料基材として自家製玄米粉（宮城ひとめぼれを粉砕した）を用いた。農薬（ダイアジノン標準品、フェニトロチオン標準品、マラチオン標準品、クロルピリホス標準品）はいずれも Dr.Ehrenstorfer 製を用いた。また、溶解、抽出にアセトニトリル（HPLC 用、富士フィルム和光純薬）、トルエン（富士フィルム和光純薬）、ヘキサン（残留農薬用、富士フィルム和光純薬）、アセトン（残留農薬用、富士フィルム和光純薬）および水（HPLC 用、富士フィルム和光純薬）を用いた。

2. 使用機器および測定条件

残留農薬標準品の秤量にはザルトリウス社製電子天秤（MSA225S100DI）を用い

た。農薬の測定には島津製作所社製 GC/MS-QP2010 を使用した。カラムは DB-5MS（Agilent J&W）を用い、以下の測定条件で行った。

GC/MS 測定条件

カラムオープン温度:50℃

気化室温度:250℃

注入モード:スプリットレス

サンプリング時間:1.5 分

線速度:47.2 cm/秒

スプリット比:15:1

温度プログラム:50℃ (1 分) ⇒125℃ (25℃/分) ⇒300℃ (10℃/分) 10 分

3. 標準溶液の調製

農薬の標準原液は、ダイアジノン、フェニトロチオン、マラチオンおよびクロルピリホスについて、それぞれの農薬標準原液を調製した。すなわち、各標準品を当該成績書の純度に基づき換算し、100.0 mg となるよう精密に量りとり、これにアセトンを加えて溶かし、正確に 100 mL として各農薬の標準原液（1000 µg/mL）とした。

4. 試料溶液の調製

GC/MS 用試料

試料 10.0 g に水 20 mL 加え、15 分間放置し、アセトニトリル 40 mL 添加し、3 分間ホモジナイズした。ホモジナイザー（GLH-115）のシャフトを少量のアセトニトリルで洗い、ホモジナイズした試料と合わせ、ホモジナイズした試料を吸引ろ過した（受器:100 mL 容メスフラスコ、桐山ロート、No. 5A ろ紙）。残渣をろ紙ごと回収（スパーテル、ピンセット等を用いて抽出容器に戻した）し、アセトニトリル 20 mL を添加、攪拌後、再

度3分間ホモジナイズした。シャフトを少量のアセトニトリルで洗い、ホモジナイズした試料と合わせ、吸引ろ過し、抽出容器内及び残渣をアセトニトリルで洗い込み、ろ液を全て合わせ、アセトニトリルで正確に100 mLとした。分液ロータリに抽出液20 mLを正確にとり、振とう機で10分間振とうした。30分以上静置した後、分離した下層(水)を除去し、予めC18ミニカラムをアセトニトリル10 mLでコンディショニングした。このカラムを吸引マニホールドにセットし、分離したアセトニトリル層を注入した。さらに、アセトニトリル2 mLを注入し、全溶出液を回収した。脱水後(15分間放置、この間3回程度振り混ぜた)、無水硫酸ナトリウムを綿栓ろ過によりろ別した(受器:100 mL容ナス型フラスコ)。得られたろ液を40°C以下(設定35°C)で濃縮乾固した。残留物にアセトニトリル及びトルエン(3:1)混液2 mLに溶解後、超音波処理した。精製には、予めGC/NH₂ミニカラムをアセトニトリル及びトルエン(3:1)混液10 mLでコンディショニングした。抽出液全量(約2 mL)をGC/NH₂カラムに負荷し(受器:50 mL容ナス型フラスコ)、ナス型フラスコ内をアセトニトリル及びトルエン(3:1)混液10 mLで洗い、この液をGC/NH₂カラムに負荷することを2回繰り返した(10 mL×2回)。次に溶出液を40°C以下(35°C設定)で1 mL以下に濃縮し、これにアセトン10 mLを加えて40°C以下(35°C設定)で1 mL以下に濃縮、再度アセトン5 mLを加えて濃縮した溶媒を除去した。残留物に

A/H混液2 mLを正確に加えて溶解後、超音波処理して試験溶液及び空試験溶液とし(試料基材1 g/mL相当)し、試料溶液及び空試料溶液は共栓試験管(10 mL容)に移し、測定日まで冷蔵庫で保管した。

5. 試料の作製

残留農薬用試料は自家製玄米粉を用い、玄米粉1 kgをアセトニトリルまたはアセトニトリル/水4 Lに懸濁させ、スプレードライヤに供した。

5. スプレードライヤによる玄米粉試料作製条件

作製検討に用いたスプレードライヤは大川原化工機株式会社製研究開発用窒素ガス密閉循環型スプレードライヤCL-8iを用いた。玄米粉懸濁溶液は事前に攪拌し、均一な懸濁溶液とし、原液タンクに移し、攪拌しながらペリスタポンプでアトマイザに2 kg/hで送液した。アトマイザにはロータリー式を用い、ディスクはMC-50型を使用した。回転数は20000 rpmに設定した。また、入り口温度は120°C、100°C、80°Cで作製温度を検討した。得られた玄米粉はマイクロトラックベル社製マイクロトラックMT3200を用い平均粒子径を測定した。また、得られた玄米粉はガスクロマトグラフ質量分析計で4種の農薬を測定した。また、作製した玄米粉は顕微鏡下で粒子の観察を行った。

(倫理面への配慮)

食品の安全に関する研究であり、倫理面への配慮をする必要はなかった。

C. D. 研究結果および考察

1. スプレードライヤによる玄米粉試料作製検討

技能試験用試料として残留農薬検査について検討した。残留農薬は水溶性のものは少なく、有機溶媒を用いた作製の検討となった。これまで用いたスプレードライヤはいずれも水溶液用であり、有機溶媒を用いる場合は、窒素ガス密閉循環型スプレードライヤがその作製には有効の装置である。本装置 CL-8i は予備検討に使用した L-8i の密閉系の装置であり、難水溶性物質の乾燥、造粒が可能であり、窒素循環させていることから酸化防止にもなり、残留農薬検査用試料作製には適した装置であると考えられた。そこで、前回まで基材としては重金属と同様の自家製玄米粉を用い、4種の農薬を図1に示すように試料作製した。図2には用いたスプレードライヤ CL-8i の外観を示す。本装置を用い、アトマイザーの回転数は 20000rpm とし、処理量は 2kg/h に設定し、入口温度を 120℃、100℃、80℃の3条件で検討を行った。前回用いた溶媒はアセトニトリルであり、玄米粉と懸濁させたとき玄米粉の沈降速度が速くペリスタポンプで上方へ送液中に玄米粉粒子が沈降するスピードが速く、微細な粒子が先に導入されて、大きな粒子が遅れて導入されることがわかった。また、吸い込み口を下げると、大きな粒子も導入されるため、回収量が多くなることも確認された。よって、攪拌や導入口の位置など検討する必要があることがわかった。重金属の作製において

は水を溶媒として用いたのに対して、農薬は有機溶媒を使用していることから玄米粉への溶媒の浸透度の違いがあり、農薬は玄米粉中への浸透は少なく、回収率が低くなったと考えられた。そこで、前年度は水を添加することで回収率が改善するか検討した。すなわち、80%アセトニトリル懸濁液に4種農薬（ダイアジノン、フェニトロチオン、マラチオン、クロルピリホス）を添加し、昨年度作製した条件で行った。その結果、それぞれの農薬の回収率は噴霧温度 80%で 25%～40%となり、噴霧温度を下げることで回収率は改善した。さらに 40%アセトニトリル懸濁液の場合、さらに回収率は高くなった。これらの結果を踏まえ、今年度はさらに水の添加を増やし 20%アセトニトリル懸濁液を用い検討を行った。検討条件はこれまでと同様の条件で行った。すなわち、アトマイザーの回転数：20000rpm、処理量 2kg/h、噴霧温度（入口温度）を 120℃、100℃、80℃で検討した。表1～4に各農薬の回収率の変化を示す。また、図3に噴霧温度と玄米粉中農薬の回収率を示す。今回はさらに水を加えたために、大きな粒子の玄米粉の沈降が少なかった。また、各噴霧温度においても 40%アセトニトリルを用いた時と比べて回収率は高くなり改善した。農薬の回収率は噴霧温度が下がるほど高くなった。これは、温度により農薬が分解または気散している可能性が示唆された。これも前回と同様の傾向が認められた。ダイアジノンは沸点が 120℃で添加農薬の中で一番沸点が低く、回収率も一番低かった。噴霧温度が 120℃のとき回

収率は47.5%となり、80℃では69.8%と回収率は劇的に改善した。一方、他の3農薬の回収率の挙動は、沸点がいずれも140℃以上であることからほぼ同じとなった。これは前回と同様の傾向であった。噴霧温度が80℃のとき回収率は70%~75%程になり、これまでで最も回収率が良好であった。以上のように、水の添加量を増やすことで回収率が改善したが、これ以上の水の添加は農薬の水の溶解性を考えると限界であると考えられた。何か溶解を補助するものを添加することでさらに水の添加量を増やすことも可能であるが実験系が複雑になることから本条件が最適であると考えられた。図4には自家製玄米粉の粒度分布と顕微鏡写真を示す。図5~7には噴霧温度を120℃から80℃まで変化させたときの粒度分布と顕微鏡写真を示す。前回の条件では、噴霧温度が下がるにつれて平均粒子径が小さくなったが、今回はほぼ同じであった。

以上より、作製溶媒の水の比率が大きくなると回収率も高くなり、また、噴霧温度を下げることで、さらに回収率が高くなることが分かった。さらに水の比率を高くすることは農薬の溶解性によるので、本条件が適正であると思われる。今後は本条件での再現性を確認する必要がある。

E. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

表1 噴霧温度によるダイアジノンの回収率の変化 (20%アセトニトリル)

Lot No.	試料溶液 番号	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>e</i>	<i>f</i>	調査試料中濃度 (g) ^{*1}	
		試験溶液中濃度 (ng/mL)	試料採取量 (g)	試料溶液定容量 (mL)	試料溶液採取量 (mL)	最終試験溶液量 (mL)	希釈率	$g = a*f*e/d*c/b/1000$ (μg/g)	
1 (120°C)	1-1	92.90323	10.027	100	20	2	2	0.185306133	0.185
	1-2	94.82663	10.035	100	20	2	2	0.188991789	0.188
	1-3	99.34631	10.043	100	20	2	2	0.1978419	0.197
	SD (μg/g)								0.006244998
									0.00624
	RSD (%)								3.2842105
									3.3
2 (100°C)	2-1*	139.26679	10.002	100	20	2	2	0.278477884	0.278
	2-2*	129.61868	10.005	100	20	2	2	0.259107806	0.259
	2-3*	129.97713	10.043	100	20	2	2	0.258841243	0.258
	SD (μg/g)								0.011269428
									0.0113
	RSD (%)								4.2641509
									4.3
3 (80°C)	3-1*	135.54152	10.043	100	20	2	2	0.269922374	0.269
	3-2*	143.41026	10.038	100	20	2	2	0.285734728	0.285
	3-3*	141.99973	10.020	100	20	2	2	0.283432595	0.283
	SD (μg/g)								0.008717798
									0.00872
	RSD (%)								3.125448
									3.1

表2 噴霧温度によるフェニトロチオンの回収率の変化 (20%アセトニトリル)

Lot No.	試料溶液 番号	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>e</i>	<i>f</i>	調査試料中濃度 (g)*1	
		試験溶液中濃度 (ng/mL)	試料採取量 (g)	試料溶液定容量 (mL)	試料溶液採取量 (mL)	最終試験溶液量 (mL)	希釈率	$g = a*f*e/d*c/b/1000$ (μg/g)	
1 (120°C)	1-1	58.22484	10.027	100	20	2	2	0.116136112	0.116
	1-2	59.55646	10.035	100	20	2	2	0.118697479	0.118
	1-3	63.21035	10.043	100	20	2	2	0.125879419	0.125
	SD (μg/g)								0.004725816
									0.00473
	RSD (%)								3.9416667
									3.9
2 (100°C)	2-1*	79.11733	10.002	100	20	2	2	0.158203019	0.158
	2-2	73.68078	10.005	100	20	2	2	0.147287916	0.147
	2-3	72.45477	10.043	100	20	2	2	0.144289097	0.144
	SD (μg/g)								0.007371115
									0.00737
	RSD (%)								4.9133333
									4.9
3 (80°C)	3-1	72.48685	10.043	100	20	2	2	0.144352982	0.144
	3-2*	76.00201	10.038	100	20	2	2	0.151428591	0.151
	3-3*	76.70595	10.020	100	20	2	2	0.153105689	0.153
	SD (μg/g)								0.004725816
									0.00473
	RSD (%)								3.1744966
									3.2

表3 噴霧温度によるマラチオンの回収率の変化 (20%アセトニトリル)

Lot No.	試料溶液 番号	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>e</i>	<i>f</i>	調査試料中濃度 (g)*1	
		試験溶液中濃度 (ng/mL)	試料採取量 (g)	試料溶液定容量 (mL)	試料溶液採取量 (mL)	最終試験溶液量 (mL)	希釈率	$g = a*f*e/d*c/b/1000$ (μg/g)	
1 (120°C)	1-1	52.11532	10.027	100	20	2	2	0.103949975	0.103
	1-2	53.78666	10.035	100	20	2	2	0.107198127	0.107
	1-3	56.92402	10.043	100	20	2	2	0.113360589	0.113
	SD (μg/g)								0.005033223 0.00503
	RSD (%)								4.6574074 4.7
2 (100°C)	2-1*	75.86752	10.002	100	20	2	2	0.151704699	0.151
	2-2	69.86697	10.005	100	20	2	2	0.139664108	0.139
	2-3	68.96018	10.043	100	20	2	2	0.137329842	0.137
	SD (μg/g)								0.007571878 0.00757
	RSD (%)								5.3309859 5.3
3 (80°C)	3-1	70.73012	10.043	100	20	2	2	0.140854565	0.140
	3-2	73.47464	10.038	100	20	2	2	0.146392987	0.146
	3-3	74.81082	10.020	100	20	2	2	0.149322994	0.149
	SD (μg/g)								0.004582576 0.00458
	RSD (%)								3.1586207 3.2

表4 噴霧温度によるクロルピリホスの回収率の変化 (20%アセトニトリル)

Lot No.	試料溶液 番号 (Lot No.)	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>e</i>	<i>f</i>	調査試料中濃度 (g) ^{*1}	
		試験溶液中濃度 (ng/mL)	試料採取量 (g)	試料溶液定容量 (mL)	試料溶液採取量 (mL)	最終試験溶液量 (mL)	希釈率	$g = a*f*e/d*c/b/1000$ (μg/g)	
1 (120°C)	1-1	28.50415	10.027	100	20	2	2	0.056854792	0.0568
	1-2	29.62863	10.035	100	20	2	2	0.059050583	0.0590
	1-3	30.96518	10.043	100	20	2	2	0.0616652	0.0616
	SD (μg/g)								0.0024028 0.00240
	RSD (%)								4.0609137 4.1
2 (100°C)	2-1	38.07941	10.002	100	20	2	2	0.076143591	0.0761
	2-2	35.63433	10.005	100	20	2	2	0.071233043	0.0712
	2-3	35.50728	10.043	100	20	2	2	0.070710505	0.0707
	SD (μg/g)								0.0029838 0.00298
	RSD (%)								4.0990371 4.1
3 (80°C)	3-1	35.90524	10.043	100	20	2	2	0.071503017	0.0715
	3-2	36.86035	10.038	100	20	2	2	0.073441622	0.0734
	3-3	36.50188	10.020	100	20	2	2	0.072858044	0.0729
	SD (μg/g)								0.0009849 0.000985
	RSD (%)								1.3567493 1.4

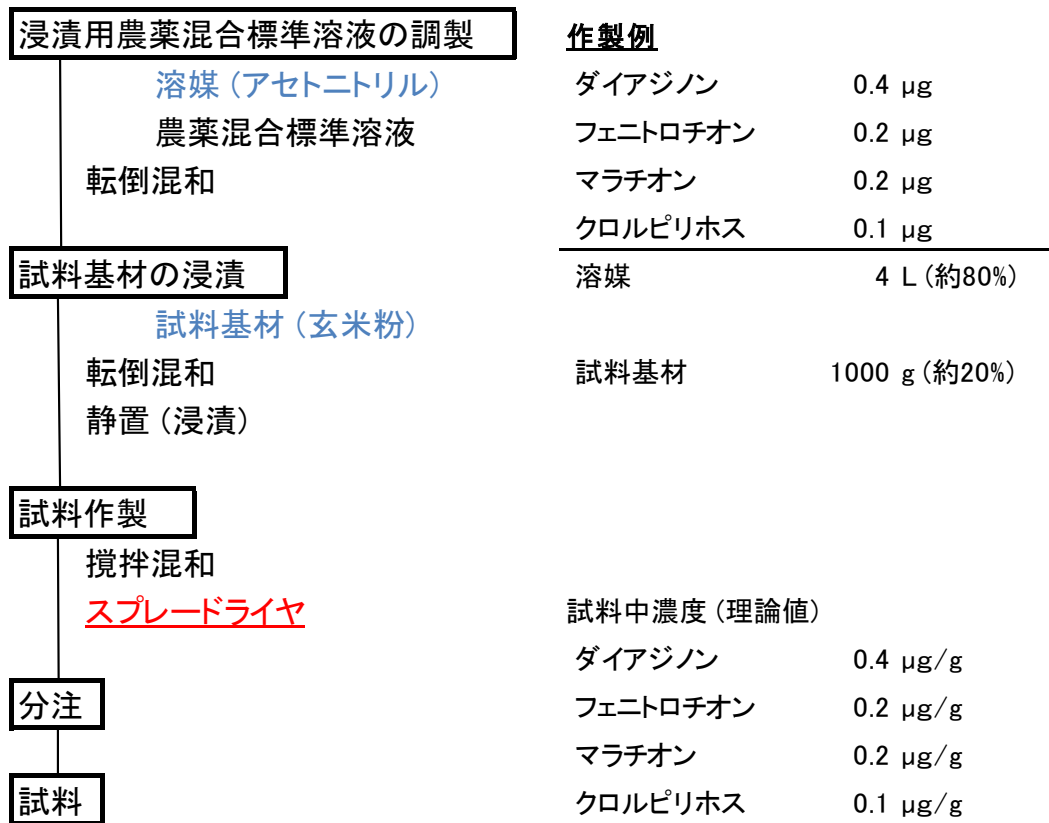


図1 スプレードライヤによる技能試験用残留農薬検査試料作製スキーム



図2 窒素ガス密閉循環型スプレードライヤCL-8iの外観

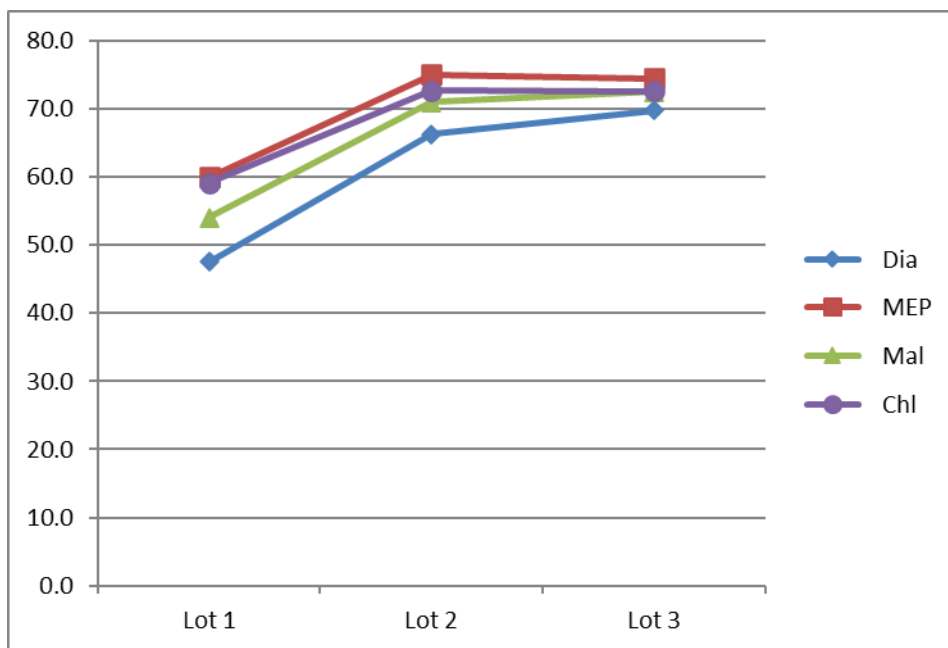


図3 噴霧温度と玄米粉中農薬の回収率の比較 (20%アセトニトリル)

Lot1:120°C、Lot2:100°C、Lot3:80°C

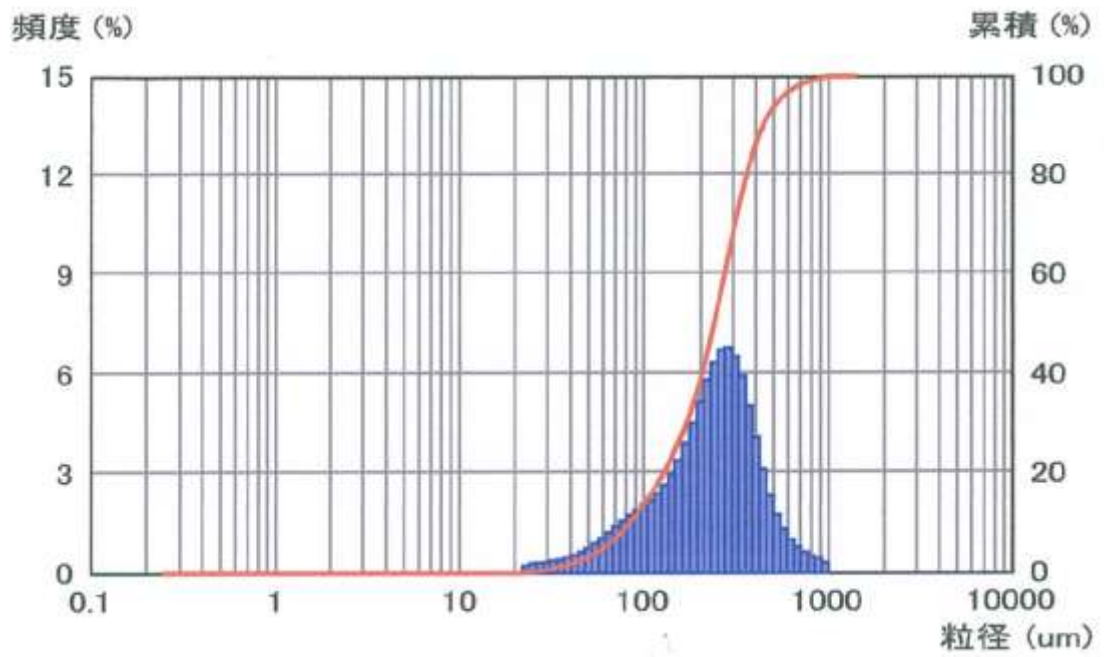


図4 自家製玄米粉の粒度分布と顕微鏡写真

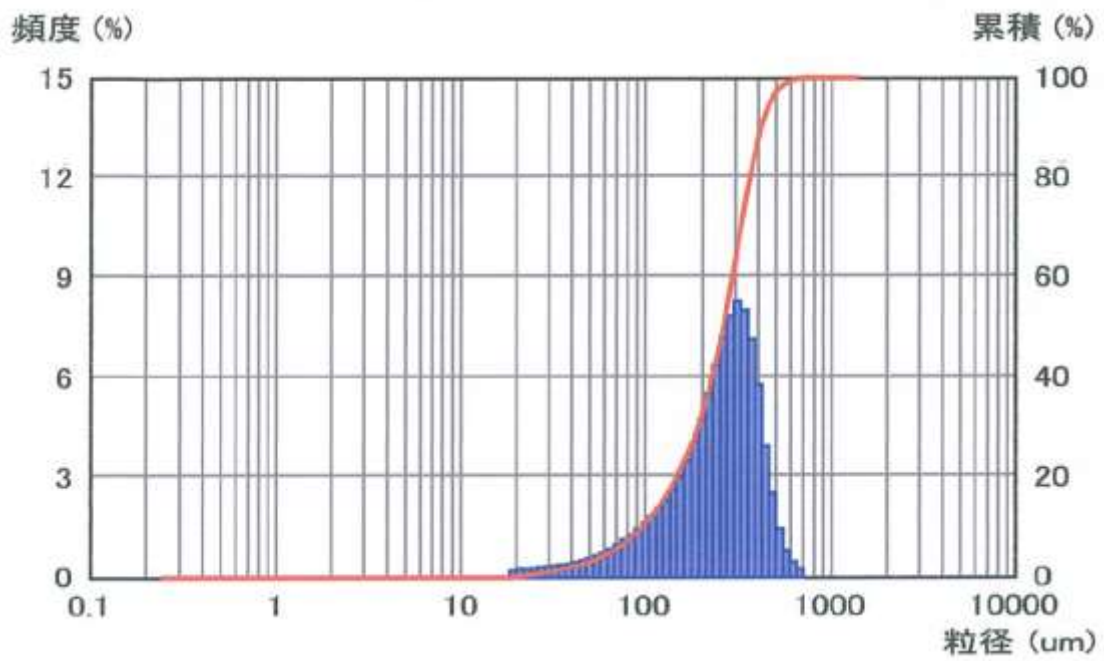
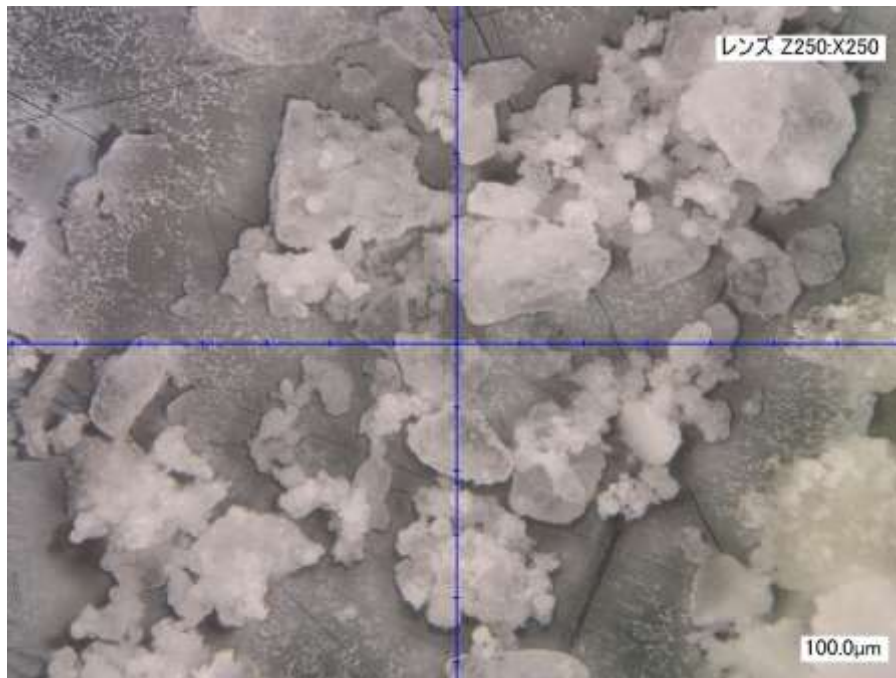


図5 120°Cで噴霧したときの粒度分布と顕微鏡写真

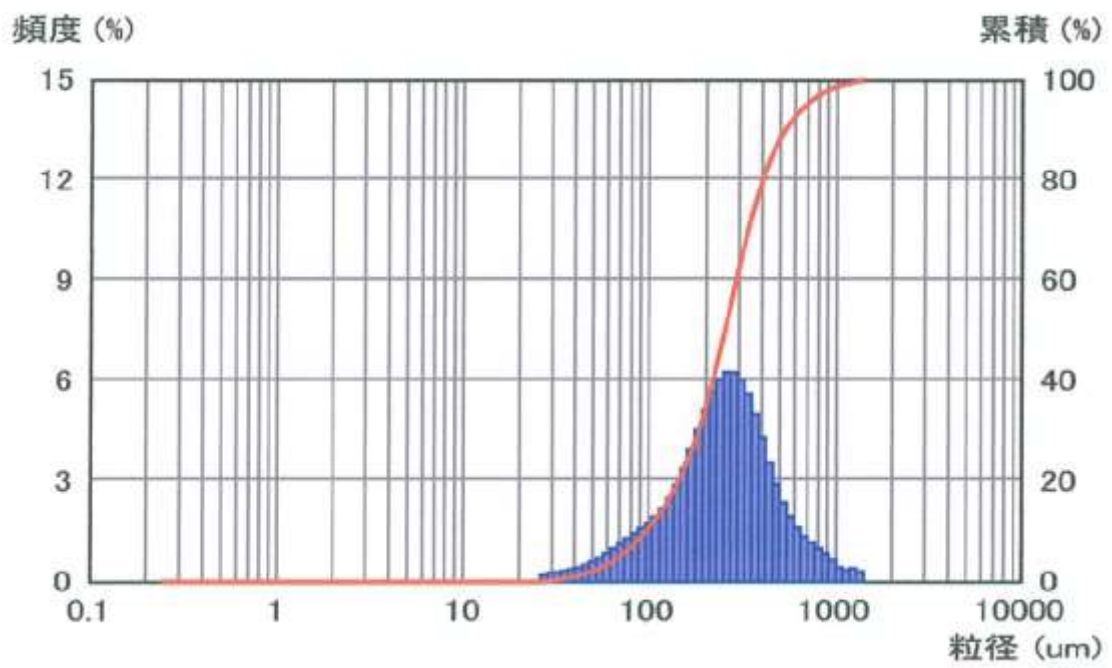
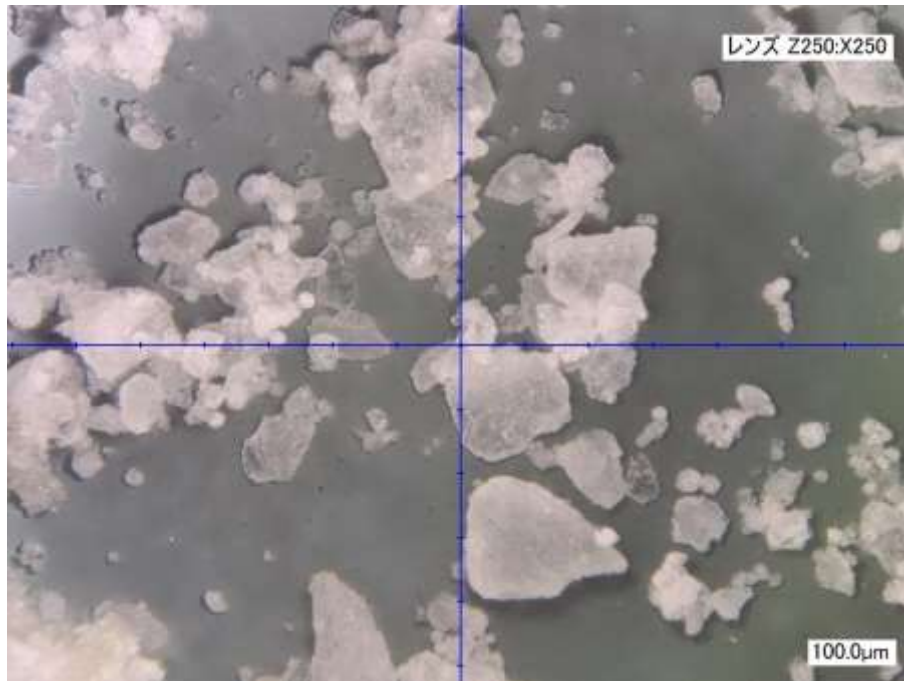


図6 100°Cで噴霧したときの粒度分布と顕微鏡写真

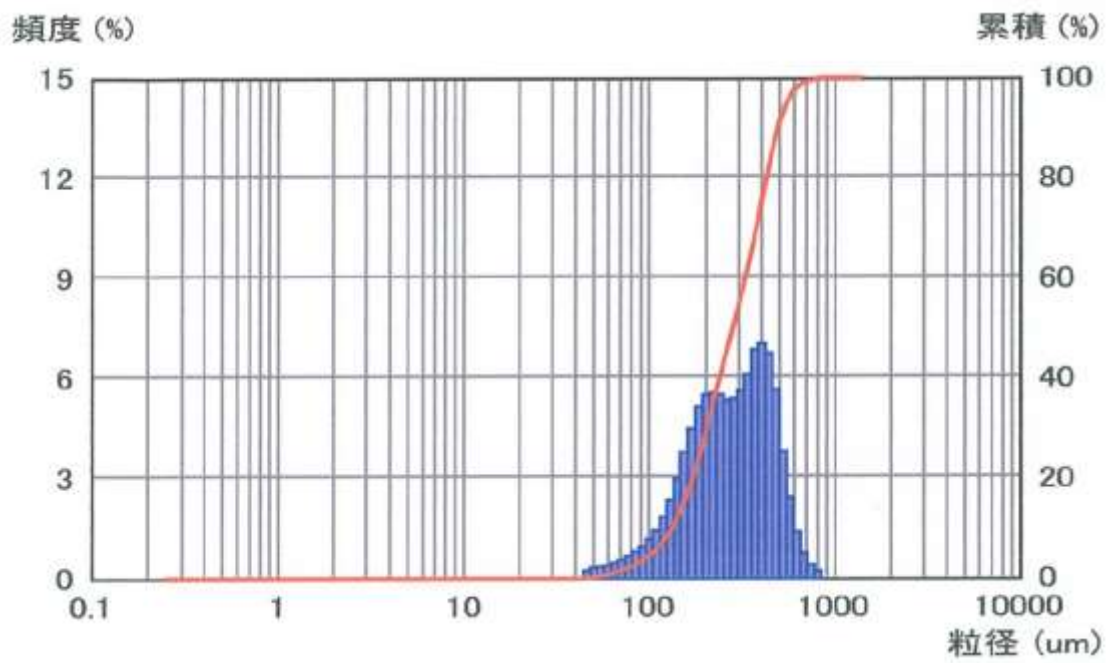
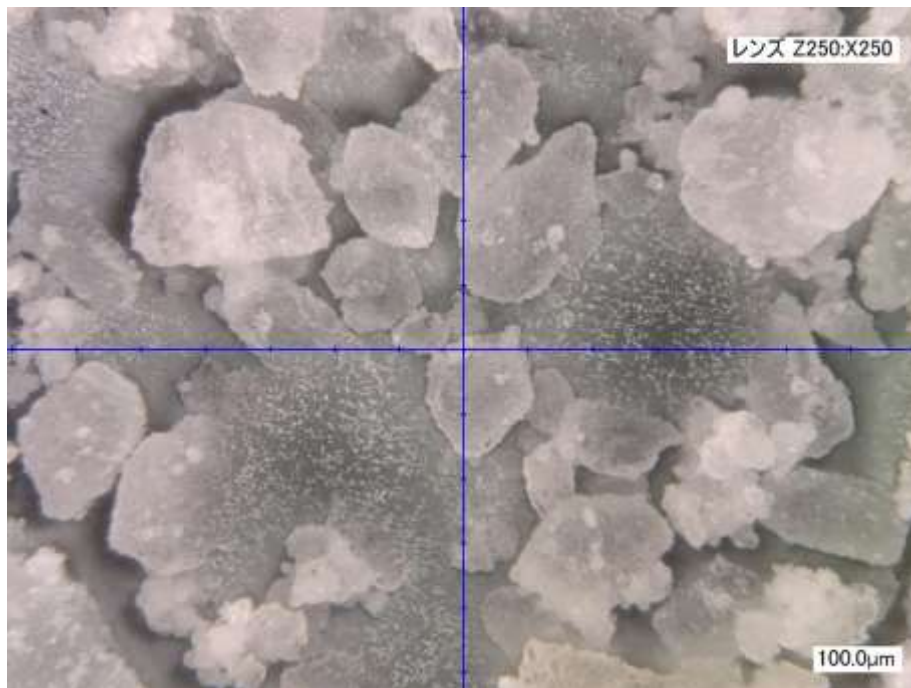


図7 80°Cで噴霧したときの粒度分布と顕微鏡写真