

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)  
令和5年度 分担研究報告書

課題1. 残留農薬等分析における試料調製方法の検討

研究分担者 志田静夏 国立医薬品食品衛生研究所 食品部第三室長

**研究要旨**

食品に残留する農薬等の分布は不均一であるため、精確な分析値を得るには十分に均質な試料を調製後、分析に供する必要がある。本研究では、適切な試料調製方法及び試料の均質性の指標を提案することを目的とし、以下の2つの検討を行った。

[1] 農産物における試料調製方法及び試料の均質性が分析結果へ与える影響の検討

農薬が残留したほうれんそうを用いて均質化の程度が不十分で粗大な固形物を多く含む粗粉碎試料と、固形物が微細になるまで十分に均質化した微粉碎試料を調製し、分析結果に与える影響を調査した。その結果、均質化が不十分な試料での分析値は、微細な均質化試料と比較して相対的に低くなり、試料の不十分な均質化状態は残留農薬濃度を過小評価する可能性があることが示唆された。凍結粉碎した試料は、常温で均質化した試料よりも分析値の変動が生じにくいとの報告もあるが、本検討では凍結粉碎による均質性の向上は認められなかった。各均質化試料の篩通過率から、ほうれんそうにおける十分均質な試料の目安は「目開き 1 mm の篩に負荷したときの通過率が90%以上」と考えられた。なお、この目安は昨年度行ったトマトでの調査結果と合致した。

[2] 畜水産物における試料調製方法の検討

水産物を対象に3種類の凍結粉碎法[液体窒素・凍結方式, ドライアイス・予冷方式及びドライアイス・予備凍結方式]による試料調製を検討した。その結果、あゆやえびは、検体の大きさを1 cm 角以下にした方がよいものの、昨年度確立した畜産物の試料調製方法を適用できることが示された。一方、うなぎ及びさけでは、凍結粉碎法で粉碎しても大きい皮や骨が認められ、均質化が不十分と考えられた。今後、均質性をさらに向上させる方法を検討するとともに、試料粒子の大きさによる抽出効率や分析値のばらつきへの影響を検討する必要があると考えられた。

**研究協力機関**

一般財団法人残留農薬研究所

**研究協力者**

根本 了(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**

食品に残留する農薬等の分布は不均一である

ため、試料調製の際に検体全体を十分に均質化しなければ、精確な分析値を得ることはできない。残留農薬等検査を行う際は、事前に添加回収試験を実施し、用いる分析法の妥当性を評価するが、添加回収試験では抽出以降の操作のみ評価が可能であり、抽出以前の試料調製に関しては評価することができない。このため、試料調製方法の評価はほとんど行われていないのが現状である。そこで、

本課題では、適切な試料調製方法や試料の均質性の指標を提案することを目的に、以下の 2 つの検討を行うこととした。

[1] 農産物を対象として試料の均質性が分析結果に与える影響を調査し、適切な試料調製方法や試料均質性の指標を提案する

[2] 畜水産物の適切な試料調製方法を提案するため、凍結粉碎法による試料調製方法を確立し、その有用性の検証する

[1]については、昨年度、果菜類のトマトを供試作物として用いて、不十分な均質化は分析値の正確度および精度を低下させる可能性があること、試料秤取量が少ないほどその影響は大きくなる傾向があることを示した。また、試料の十分な均質化状態の判断指標として、均質化した試料を目開き 1 mm の篩に負荷した際の通過率が 90%以上となることが目安となることを示した。本年度は、トマトと形質が異なる葉菜類のほうれんそうを用いて均質化状態が異なる試料を調製し、均質化状態及び試料秤取量が分析結果に与える影響を調査した。また、篩の通過率による均質化状態の評価についても検討した。[2]については、昨年度、畜産物を対象に 3 種類の凍結粉碎法[液体窒素・凍結方式、ドライアイス・予冷方式及びドライアイス・予備凍結方式]の操作手順を確立した。本年度は水産物を対象に、これらの凍結粉碎法の適用性を検討した。

## B. 研究方法

[1] 農産物における試料調製方法及び試料の均質性が分析結果へ与える影響の検討

### 1. 分析標準物質

ジノテフラン標準品:99.8% (富士フイルム和光純薬株式会社)

イミダクロプリド標準品:99.5% (富士フイルム和光純薬株式会社)

マラソン標準品:97.2% (富士フイルム和光純薬株式会社)

ダイアジノン標準物質:99.5% (富士フイルム和光純薬株式会社)

フルフェノクスロン標準品:98.19% (Dr. Ehrenstorfer)

(E)-フェンピロキシメート標準品:98.41% (Dr. Ehrenstorfer)

ペルメトリン標準品:99.73% (Dr. Ehrenstorfer)

### 2. 供試試料

作物名:ほうれんそう

分析部位:茎葉 (赤色根部を含み、ひげ根及び変質葉を除去したもの)

### 3. 残留分析方法

#### 3.1. 試薬および機器

アセトニトリル, トルエン, メタノール:残留農薬試験用 (関東化学株式会社)

メタノール:LC/MS 用 (関東化学株式会社)

酢酸アンモニウム:特級 (関東化学株式会社)

水:PURELAB Chorus System (ELGA LabWater, UK) で精製した水

GCB/NH<sub>2</sub> 積層ミニカラム:ENVI-CARB/LC-NH<sub>2</sub>, 500 mg/500 mg/6 mL (シグマアルドリッチジャパン 合同会社)

ミキサー:ロボクーブ Blixer 5-Plus (株式会社エフ・エム・アイ)

ホモジナイザー:PT3100D (KINEMATICA AG, Switzerland)

超音波洗浄機:FU-80C (アイワ医科工業株式会社)

液体クロマトグラフ・質量分析計 (LC-MS/MS): Nexera X2 System (株式会社島津製作所), Triple Quad 4500 (AB Sciex, USA)

データ処理装置: Analyst (AB Sciex)

#### 3.2. 機器および装置の操作条件

### 3.2.1. 高速液体クロマトグラフの操作条件

カラム: ACQUITY UPLC BEH C18 (Waters Co., USA), 内径 2.1 mm, 長さ 100 mm, 粒径 1.7 μm

溶離液: 5 mmol/L 酢酸アンモニウム / 5 mmol/L 酢酸アンモニウム含有メタノール (v/v), 90:10 – 5.0 min – 5:95 (4 min 保持)

流量: 0.3 mL/min

カラム温度: 40°C

注入量: 5 μL

保持時間: ジノテフラン: 2.6 min, イミダクロプリド: 3.6 – 3.7 min, マラチオン: 5.5 – 5.6 min, ダイアジノン: 6.0 min, フルフェノクスロン: 6.5 min, フェンピロキシメート: 6.6 – 6.7 min, ペルメトリン: 7.1 および 7.3 min

### 3.2.2. 質量分析計の操作条件

イオン化法: エレクトロスプレーイオン化法 (ESI), 正モード

イオンスプレー電圧: 5500 V

イオン化温度: 650°C

コリジョンガス: N<sub>2</sub>

イオン検出法: MRM 法

MS パラメーター: 表 1

## 3.3. 標準溶液の調製

### 3.3.1 標準原液の作成

ジノテフラン, イミダクロプリド, マラチオン, ダイアジノン, フルフェノクスロン, フェンピロキシメートおよびペルメトリンの分析標準物質 10.0 mg (純度補正值) をそれぞれ 50 mL 容メスフラスコに精秤し, アセトニトリルで定容して 200 mg/L の標準原液を調製した。

### 3.3.2 検量線用標準溶液および検量線の作成

#### 1) イミダクロプリド, マラチオン, ダイアジノンおよびフェンピロキシメート (溶媒検量線)

3.3.1 項で作成した各標準原液を等量ずつ混合し, アセトニトリルで段階的に希釈して 0.2 mg/L 混

合標準溶液を調製し, さらにメタノールで希釈して 0.08 mg/L 混合標準溶液を作成した。この混合標準溶液をメタノール/水 (50:50, v/v) 混液で希釈して, 0.00012, 0.0004, 0.0008, 0.002, 0.004 および 0.008 mg/L の混合標準溶液を調製した。これらの混合標準溶液を LC-MS/MS に注入して, データ処理装置を用いてイミダクロプリド, マラチオン, ダイアジノンおよびフェンピロキシメートのピーク面積を測定し, 横軸に濃度, 縦軸にピーク面積をとって各検量線を作成した。

#### 2) ジノテフラン, フルフェノクスロンおよびペルメトリン (マトリックス検量線)

3.3.1 項で作成した各標準原液を等量ずつ混合し, アセトニトリルで段階的に希釈して 2 mg/L 混合標準溶液を調製した。この混合標準溶液をメタノール/水 (50:50, v/v) 混液で希釈して, 0.0024, 0.008, 0.016, 0.04, 0.08 および 0.16 mg/L の混合標準溶液を調製した。これらの混合標準溶液 25 μL と任意の農薬無添加試料の試験溶液 475 μL をそれぞれ混合して, 0.00012, 0.0004, 0.0008, 0.002, 0.004 および 0.008 mg/L のマトリックス混合標準溶液を調製した。検量線の範囲外となり試験溶液を希釈して測定する場合は, 同様に希釈した任意のブランク試料の試験溶液を用いてマトリックス混合標準溶液を調製した。これらのマトリックス混合標準溶液を LC-MS/MS に注入して, データ処理装置を用いてジノテフラン, フルフェノクスロンおよびペルメトリンのピーク面積を測定し, 横軸に濃度, 縦軸にピーク面積をとって各検量線を作成した。

## 3.4. 分析操作

分析操作は, 厚生労働省通知の「LC/MS による農薬等の一斉試験法I (農産物)」に準拠して実施した。なお, 抽出方法を除き, 精製の省略や定量時の機器条件の変更など一部の方法は改変した。

### 3.4.1 抽出

均質化試料 (1.00, 2.00, 5.00, 10.0 および 20.0 g) を三角フラスコにはかりとり、アセトニトリル 50 mL を加え、ホモジナイザーで 1 分間磨砕抽出した。抽出物をろ紙を敷いた桐山漏斗で吸引ろ過した。ろ紙上の残渣を三角フラスコに戻し、アセトニトリル 20 mL を加え、再度ホモジナイザーで 1 分間磨砕抽出した。ホモジナイザーのシャフトをアセトニトリル 10 mL で洗浄し、抽出物に合わせた。抽出物を同様に吸引ろ過し、ろ液を合わせてアセトニトリルで 100 mL に定容した。

### 3.4.2. GCB/NH<sub>2</sub> 積層ミニカラム精製

試料 0.2 g 相当量となるよう抽出液の一部 (1~20 mL) を分取した後、約 1 mL まで減圧濃縮した (抽出液分取量 1 mL は除く)。これら溶液をアセトニトリル/トルエン (3:1, v/v) 混液 10 mL で予め前処理した GCB/NH<sub>2</sub> 積層ミニカラムに負荷した。続いて、アセトニトリル/トルエン (3:1, v/v) 混液 20 mL をミニカラムに負荷した。全ての負荷液を分取した後、減圧濃縮して最後は窒素気流下で溶媒を留去した。

### 3.4.3. 定量

前項の残留物をメタノール/水 (50:50, v/v) 混液 5 mL で溶解 (超音波処理) し、その溶液を LC-MS/MS に注入してピーク面積を求め、検量線を用いて試料中の各分析対象農薬の残留濃度を算出した。検量線範囲外となる場合は同混液でさらに希釈した。なお、実験操作中を除き、抽出液および試験溶液は冷蔵暗所に保管した。

### 3.5. 分析法の妥当性評価

各分析対象農薬の定量限界相当濃度 0.01 mg/kg, 0.5 mg/kg および分析試料の最高検出濃度を超える 15 mg/kg (ジノテフラン, イミダクロプリド, マラチオン, フルフェノクスロンおよびペルメトリン) または 50 mg/kg (ダイアジノン) 添加試料に

よる回収率の算出結果 (各添加濃度 5 連で実施)、ならびに市販品の無添加試料の測定結果により、採用する分析法の妥当性を確認した。(表 2)

## 4. 固形物含有率の測定

アルミカップを 105°C に設定した恒温乾燥機内で 1 時間乾燥後に、デシケーター内で室温に戻して重量を測定した。重量を測定したアルミカップに分析試料を秤取した。これらを 105°C に設定した恒温乾燥機内で約 7 時間乾燥後に、デシケーター内で室温に戻して重量を測定した。重量の測定には精密天秤を使用し、小数点以下 4 桁までの重量を測定した。乾燥後の試料重量を秤取試料重量で除して、固形物含有率を算出した。

## 5. 試料均質化状態の評価

### 5.1. 常温での均質化時間の比較

市販品ほうれんそう約 1 kg を 2~3 cm に細切した後、常温のミキサーで 0.5, 1, 2 および 4 分間均質化した。各均質化時点で、試料の一部をシャーレに分取し、その状態を観察した。

### 5.2. 凍結粉砕試料の調製

市販品ほうれんそう約 1 kg を 2~3 cm に細切した後、冷凍庫に保管して凍結した。ミキサーで固形状ドライアイス 500 g (試料 0.5 倍量) を粉砕しパウダー状にし、凍結したほうれんそう試料に加え混合した。添加したドライアイス量は、既報<sup>2,3)</sup>を参考に設定した。続いて、固形状ドライアイス約 100 g をミキサーで約 10 秒均質化してミキサー容器を予冷した。ドライアイスと混合した凍結ほうれんそう試料の約半量を予冷したミキサーに入れ、数秒間均質化した。残りの試料をミキサーに入れ、さらに 4 分間均質化した。凍結粉砕後の試料を 2 L ビーカーに移し、完全に密閉しない状態で冷凍庫に入れ、1 晩かけてドライアイス昇華した。なお、ミキサーの外表面には断熱材を巻き、試料秤取用の器具およびビーカーは予冷したものを使用した。また、

凍結したほうれんそう試料 (ドライアイス添加前), 均質化前後の試料, ドライアイス昇華後の試料の温度をそれぞれ測定した。

### 5.3. 均質化評価用試験篩の目開きの大きさおよび通過手法の比較

#### 5.3.1. 均質化試料の調製

市販品ほうれんそう約 1 kg を 2~3 cm に細切した後, 常温のミキサーで均質化して, 粗大な固形物が残存する『粗粉碎試料』および固形物が微細な状態である『微粉碎試料』をそれぞれ調製した。また, 5.2 項と同様の方法で『凍結粉碎試料』を調製した。

#### 5.3.2. 微粉碎試料および凍結粉碎試料

5.3.1 項で調製した微粉碎試料または凍結粉碎試料 250 g を目開き 1 mm 篩に負荷し, 約 5 分間静置後に篩上の残渣重量を測定した。続いて, ヘラ処理または流水洗浄処理後に残渣重量を測定した。ヘラ処理は, シリコン製のヘラでの加圧により試料を通過させ, 処理は 10 分間実施した。流水洗浄処理は, 水道の蛇口にゴムホース (内径 12 mm) を接続し, 流量 4~5 L/min に調整した水道水で篩上の残渣を洗浄し, 篩を通過させた。その際, 洗浄時間 1 分間毎に, 篩に付着した余分な水分を除去した後の篩上の残渣重量を測定した。通過率が一定に達するまで洗浄を実施し, 最長洗浄時間は 10 分間とした。各処理前後での残渣重量から以下の式に従い通過率を算出した。なお, 各実験はそれぞれ 2 名の作業員で実施した。

通過率 (%) = (試料負荷重量 - 残渣重量) / 試料負荷重量 × 100

#### 5.3.3. 粗粉碎試料

5.3.1 項で調製した粗粉碎試料 250 g を目開き 1 mm または 2 mm 篩に負荷し, 5.3.2 項と同様の方法でヘラ処理または流水洗浄処理を実施

して通過率を算出した。なお, 各実験はそれぞれ 2 名の作業員で実施した。

## 6. 各検討に用いる分析用試料の秤取

### 6.1 分析試料の秤取量および試料静置の影響

圃場施設で栽培した処理区試料の粗粉碎試料, 微粉碎試料および凍結粉粉碎試料を均質化直後にそれぞれ 2 L ビーカーに充填した。各試料の中層から, 1.00, 2.00, 5.00, 10.0 および 20.0 g の分析試料を各 6 点秤取し, それらの農薬濃度を分析した。分析試料は, 秤取ごとにビーカー内の試料をよく混和した後に操作した。粗粉碎試料および微粉碎試料については均質化試料を 1 時間静置した後, 上層, 中層および下層から 20.0 g の分析試料を各層 2 点ずつ秤取し, それらの農薬濃度を分析した。また, 同時点での上層, 中層および下層から 20.0 g±10%の分析試料を各層 2 点ずつ秤取し, 4 項の方法に従い固形物含有率を測定した。なお, 粗粉碎および微粉碎試料は先端口径 8 mm の駒込ピペットで秤取し, 静置後の秤取時には各層を混和しないように注意しながら分析試料を採取した。凍結粉粉碎試料は, 予冷したスパーテルを用いて秤取した。

### 6.2 遠心分離後の沈殿物と上澄み液の比較

よく混和した処理区の粗粉碎試料および微粉碎試料の中層から, 分析試料 20.0 g を各 2 点秤取し, 遠心分離 (10000×g, 10 分, 20°C) した。傾斜法により沈殿と上澄み液に分画し, 両画分中の重量および農薬濃度を分析した。

### 6.3 篩分別後の残渣と通過物の比較

処理区の粗粉碎試料約 1 kg を目開き 1 mm 篩に負荷し, ヘラ処理により篩上の残渣と通過物に分別した。両試料から, それぞれ 20.0 g の分析試料を各 6 点秤取し, 農薬濃度を分析した。

## [2] 畜水産物における試料調製方法の検討

## 1. 食品

あゆ、えび、うなぎ及びさけを用いた。

## 2. 冷却剤

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。ドライアイスは、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(アイスティサイエンス製)を接続し、用時調製した。

## 3. 装置

粉砕機は Robot Coupe BLIXER-3D(エフ・エム・アイ製: 回転数 3000 rpm, 容器容量 3.7 L)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, 硬い試料を粉砕すると破損することがあるため, 使用しなかった。

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。

## 4. 試料調製

検体約 500 g を約 1 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。

### 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 程度になったら, 液体窒素をさらに約 2 L 加え, 合計 4 分間冷却した。

③液体窒素約 100 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粉砕機に入れ, 10 秒間粉砕した。

⑤残りの凍結試料を粉砕機に加え, さらに 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 1.2 倍量のドライアイス(約 600 g)を予冷用容器(プラスチック製)に入れ, 蓋を被せ(密閉せずに), 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 5 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, さらに 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 5 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検体重量の 0.6 倍量のドライアイス(約 300 g)を加え, 110 秒間粉砕した。

## C. 結果および考察

### [1] 農産物における試料調製方法及び試料の均質性が分析結果へ与える影響の検討

#### 1.1. 圃場試験の概要

高知県で施設栽培されたほうれんそうに 7 種の農薬製剤を 2 回混用散布した後, 最終散布 1 日後に採取した茎葉を供試試料とした。試料受領時に撮影した作物写真を図 1 に示す。供

試料の平均個体重量は約 35 g であり、栽培地域の農業慣行に従った適切な作物試料であった。

## 1.2. 分析法の妥当性評価

### 1.2.1 検量線の直線性

各分析対象農薬の妥当性確認時に作成した検量線の直線性は、相関係数 0.99 以上と良好であった。

### 1.2.2 選択性

市販品の無添加試料における各分析対象農薬の分析結果は、全て定量限界未満であった。クロマトグラム上の各分析対象農薬の保持時間に定量限界相当量の 30%を超える妨害ピークは認められなかった。よって、当該分析法の選択性に問題は認められなかった。

### 1.2.3 回収率

回収率の算出結果を表 3 に示す。市販品の微粉碎試料を用いた各分析対象農薬を 0.01 mg/kg 添加した試料での平均回収率は、84~104%であり、その併行相対標準偏差 (RSDr) は 8%以下であった。0.5 mg/kg 添加試料での平均回収率は、89~110%であり、RSDr は 5%以下であった。ジノテフラン、イミダクロプリド、マラチオン、フルフェノクスロン、フェンピロキシメートおよびペルメトリンの 15 mg/kg 添加試料での平均回収率は、88~109%であり、RSDr は 7%以下であった。ダイアジノンの 50 mg/kg 添加試料での平均回収率は、102%であり、RSDr は 1%であった。さらに、無処理区の粗粉碎試料を用いた 0.5 mg/kg 添加試料での平均回収率は、90~105%であり、その RSDr は 5%以下であった。以上のように、全ての添加濃度においてどの分析対象農薬も規定の範囲内の結果であった。また、0.5 mg/kg 添加濃度において、試料の均質化状態が、添加回収率の算出結果に影響しないことを確認した。なお、マトリックス効果が -19~-32%認められたジノテフラン、フルフェノクスロンお

よびペルメトリンについては、マトリックス検量線を採用した (表 4)。

## 1.3. 試料均質化状態の評価

### 1.3.1. 均質化時間および均質化温度の比較

常温でのミキサー稼働時間別のほうれんそう均質化状態を図 2 に示す。均質化時間が長くなるに伴い固形物が微細になり、繊維質が多い茎より比較的柔らかい葉の方が微細になりやすいことを確認した。これら観察結果から、1 分間均質化した試料を目視で明らかな粗大な固形物が確認できる『粗粉碎試料』とした。また、4 分間均質化した試料を大きな固形物が見られず、弊所の通常分析と同程度の微細状態に均質化されていると判断し、これを『微粉碎試料』とした。

凍結粉碎した試料の解凍時における状態を図 3 に示す。ドライアイス共存下でミキサー均質化した『凍結粉碎試料』は、常温状態のミキサーで 4 分間均質化した微粉碎試料と同様に大きな固形物が見られず、試料が微細な状態まで均質化されていることを確認した。また、試料温度は、均質化前の細切した凍結状態で -19.3°C であった。その後、ドライアイスの添加により温度計の計測可能下限温度である -50°C まで低下し、ミキサーでの均質化後の試料温度も変わらず -50°C であった。その後、冷凍庫内でのドライアイス昇華後では -24.0°C まで上昇した。均質化後の試料は -50°C と十分に低温に保たれており、パウダー状態であったことから、ドライアイスの添加量は適切であったと考えられる。

### 1.3.2. 均質化評価用試験篩の目開きおよび通過手法の比較

ヘラ処理および流水洗浄処理による篩通過時の様子を図 4、ヘラ処理および流水洗浄処理後における篩上試料の状態を図 5、各均質化試料のヘラ処理および流水洗浄処理における目開き 1 mm または 2 mm 篩の通過率を図 6 に示

す。ヘラ処理後における平均通過率 (各作業  
者での値) は,粗粉碎試料の 1 mm 篩で 16% (12  
または 20%), 2 mm 篩で 56% (52 または 59%), 微  
粉碎試料の 1 mm 篩で 56% (42 または 71%), 凍  
結粉碎試料の 1 mm 篩で 84% (80 または 89%)  
であった。流水洗浄処理における通過率は,粗  
粉碎試料を 2 mm 篩, 微粉碎試料および凍結粉  
碎試料を 1 mm 篩に負荷した場合, 洗浄時間が  
長くなるに従い増加し, 最終洗浄時間での平均  
通過率は, それぞれ 84% (81 または 87%), 94%  
(94 または 95%) および 97% (両者とも 97%) と  
なった。一方で, 粗粉碎試料の 1 mm 篩負荷時  
では, 洗浄時間 4 分間まで篩への試料負荷重量  
よりも残渣重量が大きくなったため通過率は  
負の値を示した。これは, 篩の網目に粗大な固  
形物が目詰まりした状態で流水による洗浄を  
実施したことで, 水が篩上に保持され残渣重量  
が増加したことに起因すると考えられる。この  
現象は粗粉碎試料の 1 mm 篩負荷時のみで生じ  
ていることから, 篩の目開きが 2 mm と大きい  
場合や試料が微細に均質化されている場合に  
は生じないと考えられる。洗浄 4 分以降で通過  
率は増加していき, 最終的に洗浄時間 10 分間  
での平均通過率は 17% (16 または 18%) となっ  
た。さらに, 試験圃場で栽培されたほうれんそ  
う試料についても各均質化試料の流水洗浄処  
理を用いた篩通過率を 1 連で確認した。粗粉碎  
試料, 微粉碎試料および凍結粉碎試料の 1 mm  
篩負荷時における通過率は, 最終洗浄時間でそ  
れぞれ 22%, 98% および 98% となり, 市販品を  
用いた際と同程度の通過率であった。これら結  
果から, 流水洗浄処理では使用する作物試料に  
関わらず, 試料の均質化状態を評価可能である  
ことが確認された。

ヘラ処理と流水洗浄処理の各篩通過手法を

比較すると, 粗粉碎試料の 2 mm 篩および微粉  
碎試料の 1 mm 篩における平均通過率は, ヘラ  
処理よりも流水洗浄処理で 28%以上高くなっ  
た。これは, ヘラ処理で篩を通過できなかった  
篩の網目への付着物や粗大な固形物に付着し  
た微細な残渣が, 流水洗浄処理では洗い流せる  
ことに起因すると考えられた (図 5)。凍結粉碎  
試料の 1 mm 篩負荷時における平均通過率は,  
ヘラ処理よりも流水洗浄処理で 13%高くなり,  
上記の条件での結果と同様の傾向を示した。し  
かしながら, 粗粉碎試料の 1 mm 篩負荷時での  
通過手法による平均通過率の差は 1%とわずか  
であった。負荷試料が粗大かつ篩の目開きが細  
かい場合は, 篩の網目の目詰まりにより流水洗  
浄処理時においても微細残渣の通過が阻害さ  
れている可能性が考えられた。また, 作業者間  
での通過率の差は, 微粉碎試料を 1 mm 篩に負  
荷してヘラ処理した際が最も大きく作業者間  
で 29%も差異が生じた。ヘラ処理では, 作業  
者のヘラでの加圧具合によって通過率が大きく  
異なることが確認された。一方で, 定速の流水  
により試料を篩に通過させる流水洗浄処理で  
は, 作業者による通過率の差はいずれの条件で  
も 6%以下と小さくなった。

以上の結果から, ヘラ処理よりも流水洗浄処  
理の方が, 本来, 篩に残らない微細な残渣を正  
確に通過可能であり, 異なる作業者間での再現  
性が高いことから, 均質化試料の通過率評価方  
法として適切であると考えられた。さらに, 流  
水洗浄処理での 1 mm 篩における平均通過率は  
微粉碎試料で 94%, 凍結粉碎試料で 97%である  
ことから, 微細に均質化された試料は参考規定<sup>4,5)</sup>  
で示される目開き 1 mm 篩を 90%以上通過可  
能であった。また, 均質化の程度が異なる試料  
が調製できたことが確認された。

#### 1.4. 分析試料秤取量の影響

異なる重量 (1~20 g) で分析試料を秤取した際の各農薬の平均濃度を表 5 に示す。平均濃度は、粗粉碎、微粉碎および凍結粉碎試料において、ジノテフランで 5.53~5.62, 6.00~6.40 および 5.78~6.20 mg/kg, イミダクロプリドで 3.76~3.82, 3.93~4.23 および 3.82~4.03 mg/kg, マラチオンで 1.77~1.83, 2.06~2.21 および 2.26~2.52 mg/kg, ダイアジノンで 14.28~14.77, 15.20~15.81 および 14.81~15.58 mg/kg, フルフェノクスロンで 2.16~2.44, 2.49~2.63 および 2.61~2.70 mg/kg, フェンピロキシメートで 3.01~3.10, 3.06~3.24 および 3.07~3.18 mg/kg, ペルメリンで 3.97~4.92, 4.80~5.30 および 4.81~5.04 mg/kg であった。

同一散布条件での農作物中の各農薬の残留レベルは、散布液中の農薬濃度に依存するため、各農薬の分析値をそのまま総合解析は困難である<sup>9)</sup>。また、分析試料量の少量化は、分析値の真度のズレや精度の低下を招くことが知られている<sup>7,8)</sup>。そこで、分析試料秤取量の影響を横断的に評価するために、微粉碎試料および粗粉碎試料における 20 g 秤取時の平均濃度に対する各農薬および全農薬での平均相対濃度を図 7 に示す。

微粉碎試料および凍結粉碎試料における平均相対濃度は、マラチオンを除き分析試料の秤取重量に関わらず概ね同程度であった。一方で、粗粉碎試料の平均相対濃度は、これら試料よりも低い傾向を示した。粗大な固形物が残る粗粉碎試料で相対濃度が低くなる傾向は、昨年度に実施したトマトでの分析結果とも一致する。マラチオンにおける平均相対濃度は、粗粉碎試料<微粉碎試料<凍結粉碎試料の順で大きくなる傾向を示し、他の農薬と異なる傾向であった。さらに、全農薬で評価した際の平均相対濃度は、微粉碎試料および凍結粉碎試料で概ね同程度であり、粗粉碎試料で

低くなる傾向を示した。次に、粗粉碎試料、微粉碎試料および凍結粉碎試料における各農薬の分析値の変動 (RSD 値) を図 8 に示す。ペルメリン以外の農薬における RSD 値は、微粉碎試料および凍結粉碎試料では分析試料の秤取量に関わらず 5%以下と小さかった。粗粉碎試料では、分析試料を 1 または 2 g 秤取した場合に、RSD 値が 5%を超える農薬が見られた。一方で、ペルメリンは、均質化の程度に関わらず、いずれの秤取量においても RSD 値が大きく、粗粉碎試料および凍結粉碎試料では全ての秤取重量で 5%以上となった。さらに、それぞれの農薬の特性に関わらない包括的な変動評価を実施するために、各農薬の微粉碎試料および粗粉碎試料における 20 g 秤取時の分析値で補正した相対濃度の全薬での変動を算出した (図 9)。凍結粉碎法により調製した試料は、常温で均質化した試料と比較して均質性が高くなり、分析値の変動が小さくなるとの報告がある。しかしながら、本研究では全ての秤取量において、凍結粉碎試料の RSD 値が最も大きくなり、試料均質性の向上は認められなかった。この原因の一つとしては、マラチオンでの相対濃度が明らかに大きかったことが影響したと考えられた。また、凍結粉碎法は、トマトやぶどうのような微細な均質化が困難で農薬の残留性が高い果皮を有する作物への適応時において均質性向上が期待される。一方で、ほうれんそうのような植物体の大部分が比較的柔らかい葉で構成される葉菜類では常温での均質化で十分に微細な試料が得られ、さらに固形物と液体への明確な分離が生じにくいいため均質性の向上効果が明確に認められなかったと考えられる。

#### 1.5. 試料静置の影響

粗粉碎試料および微粉碎試料を 1 時間静置した後に上層、中層および下層から秤取した試料中の固形物含有率を図 10、静置後の各均質化試料

の状態を図 11 に示す。固形物含有率は、下層<中層<上層の順で高くなり、下層と上層間での差は粗粉碎試料よりも微粉碎試料で大きくなった。また、静置後の均質化試料では、下層に濃い緑色の液相が薄く形成され、液相は粗粉碎試料よりも微粉碎試料で厚くなった。これらの結果より、均質化試料は静置により上部に固形物が、下部に液体が分離することが確認された。粗粉碎試料では粗大な固形物が水分を含有しているため、微粉碎試料よりも均質化試料中の液体画分が少なく、下層に形成される液層が薄くなったと推察される。これらの試料分離傾向は、昨年度試験のトマトと同様であったが、ほうれんそうの方が試料の固相と液相の分離が緩慢であった。

粗粉碎試料および微粉碎試料を 1 時間静置した後に異なる三層から秤取した分析試料中の濃度を均質化直後の粗粉碎試料および微粉碎試料の 20 g 秤取試料中濃度で補正した相対濃度を図 12、同時点における異なる三層間の平均分析値の変動を図 13 に示す。ジノテフラン、イミダクロプリドおよびフェンピロキシメートの相対濃度は、均質化の程度に関わらず上層、中層および下層で概ね同程度となり、三層間の分析値の変動も 3%以下と顕著に低かった。したがって、これらの農薬は静置後も均質化試料中に概ね均一に分布していることが確認された。一方で、それ以外の農薬は、下層と比較して、上層および中層で濃度が高くなった。静置後の均質化試料では、上部に固形物が、下部に液体が分布することから、これらの農薬は固形物への分布が多いため上層または中層での農薬濃度が高くなったと推察される。また、いずれの農薬でも各層における相対濃度は、粗粉碎試料よりも微粉碎試料で低くなった。この傾向は、均質化直後の分析結果と同様であった。さらに、同一層より秤取した分析試料 2 点の分析値は類似する傾向

が見られた。つまり、秤取する層間での相対濃度が異なる場合でも、各層内の農薬濃度は概ね均一であることが示唆された。これらの静置後試料の分析値に関しても、昨年度試験のトマトと同様の傾向を示したが、試料分離が顕著に見られたトマトより、ほうれんそうの方が各層間での分析値の差は小さかった。

#### 1.6. 遠心分離後の沈殿物と上澄み液の比較

よく混和した微粉碎試料の中層から秤取した分析試料を遠心分離により分画した沈殿と上澄み液中の各農薬の存在率を図 14 に示す。粗粉碎試料については、遠心分離により試料が分離せず、上澄み液が分取できなかった。粗粉碎試料は、粗大な固形物が水分を内包しているため液体画分が少なかったと考えられる。各画分への分離が可能であった微粉碎試料における沈殿と上澄み液の重量比は 40:60 であった。ジノテフランおよびイミダクロプリドの存在率は、両画分の重量比と類似しており、上澄み液と沈殿に概ね均等に分布していることを確認した。その他の農薬は沈殿への存在率が上澄み液よりも高くなり、農薬の極性が低くなるほど沈殿への存在率が増加する傾向が確認された。各農薬の *n*-オクタノール/水分配係数 ( $\log P_{ow}$ ) と沈殿中の存在率の間には、強い正の相関が確認された (図 15)。したがって、ジノテフランやイミダクロプリドのような顕著に極性の高い農薬を除き、農薬は液相より固形物へ分布しやすいことを確認した。1.5 項において、ジノテフランおよびイミダクロプリドは静置後の均質化試料中で各層間に均一に分布し、マラチオン、ダイアジノン、フルフェノクスロンおよびペルメトリンは固形物含有率が低く水分が多い下層で低くなったことは、固形物へ農薬が偏在する性質に由来することが示唆された。しかし、フェンピロキシメートについては、遠心分離による分画では固形物への存在率が高かったが、

静置後試料中では各層に均一に分布しており、他の農薬と異なる傾向を示した。均質化試料中における農薬の分布が固形物への偏在性に由来する結果は、ぶどうを用いた報告<sup>9)</sup>や昨年度のトマトでの結果と一致する。

### 1.7. 篩分別後の残渣と通過物の比較

粗粉碎試料を目開き1 mmの試験篩に通過させた後の篩上残渣および通過物中における各農薬の存在率を図16、両画分での分析値の変動を図17に示す。篩通過後の残渣および通過物の重量比は80:20となり、篩上の残渣には粗大な固形物が、通過物には水分に加えて篩を通過した微細な固形物(<1 mm)が含まれていた。残渣への各農薬の存在率は、76~85%であり、残渣の重量比率と類似する傾向を示した。つまり、農薬の物理化学的な性状に関わらず、いずれの農薬も残渣と通過物に概ね均等に分布していた。遠心分離後の沈殿と上澄み液への分布においてジノテフラン、イミダクロプリドは同様の傾向を示した。しかし、マラチオン、ダイアジノン、フルフェノクスロン、フェンピロキシメートおよびペルメトリンは固形物を多く含む沈殿画分への存在率が高くなった。しかしながら、篩による分別後の固形物が多い残渣への同様の偏在は見られなかった。ほうれんそうに茎葉散布された農薬は、表面積の大きい葉に多く付着していると推察される。さらに、常温での均質化時には繊維質の茎よりも葉の方が微細になりやすい傾向が観察されていることから、篩分別時に粗粉碎試料中の比較的細かくなった葉試料は水分と共に篩を通過したと考えられる。高濃度で農薬が残留する葉部が水分と共に篩通過物に含まれていたことが、篩分別後の各試料中濃度を均一にした要因の一つだと考えられる。一方で、遠心分離後の上澄み液には固形物がほとんど含まれていなかったことから、固形物を多く含む沈殿画分への農薬分布に

各農薬の log Pow が顕著に反映されたと考えられる。また、篩により分別したそれぞれの試料における各農薬の分析値の変動は、全ての農薬で通過物よりも残渣で大きくなった。残渣は水分量が少ないため、試料内で農薬が均一に広がらず、秤取した分析試料への不均一な農薬の取り込みが変動に影響を与えた要因と考えられる。

## [2] 畜水産物における試料調製方法の検討

令和3年度厚生労働科学研究「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」の分担課題「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」では果実を用いて3種類の凍結粉砕法[液体窒素・凍結方式, ドライアイス・予冷方式及びドライアイス・予備凍結方式]の操作手順を確立し、試料の粉砕状況を常温磨砕法と比較した。昨年度は、上記の果実の試料調製方法の畜産物(牛の筋肉, 牛の脂肪, 牛の肝臓, 豚の筋肉, 豚の脂肪及び鶏の筋肉)への適用性を検証し、冷却剤を増加し、粉砕に供する検体の大きさを小さくすることで畜産物にも適用できることを示した。本年度は、昨年度確立した畜産物の試料調製方法が水産物(あゆ, えび, うなぎ及びさけ)に適用できるか検討を行うこととした。なお、試料の均質性は試料調製法に加え、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、本研究では果実や畜産物の方法を確立する際に用いた以下の条件で行うこととした。

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. 試料調製方法の検討

あゆ, えび, うなぎ及びさけを2 cm 角にカットし、

各方法で試料調製した。昨年度確立した畜産物の方法と同様に、液体窒素・凍結方式では冷却剤として液体窒素を4 L、ドライアイス・予冷方式及びドライアイス・予備凍結方式ではドライアイスをそれぞれ検体量の1.2倍量及び0.6倍量用いた。その結果、あゆ及びえびではいずれの方法でも問題なく、粉砕機を運転することができた。一方、うなぎ及びさけではいずれの凍結粉砕法でも、運転中に刃の回転が停止し、粉砕することができなかった。これは、凍結した検体が刃と粉砕機の壁面/底面の間に挟まることにより、刃が回転できなくなったことが原因と考えられた。そこで、検体の大きさを1 cm角としてうなぎ及びさけを凍結粉砕したところ、いずれの方法でも刃の回転が停止することなく、粉砕することができた。昨年度検討した豚や鶏の筋肉についても、ドライアイス・予備凍結方式では検体の大きさを2.5 cm角とすると粉砕が困難であった。これらの結果から、畜水産物を粉砕する場合は、1 cm角以下にカットしてから凍結粉砕するのがよいと考えられた。

表6に試料調製直後の試料温度を示した。液体窒素・凍結方式では-51～-35℃となった。本方法は、粉砕前に液体窒素で検体を凍結した後、液体窒素の非存在下で120秒間粉砕する方法であるが、液体窒素で凍結した検体は極めて低温となるため、粉砕中の融解は認められなかった。しかしながら、果実を液体窒素・凍結方式で粉砕した場合と比べて試料温度がやや高くなった。液体窒素で凍結すると、水産物の方が果実と比べて硬くなるため、粉砕時に熱が発生し、粉砕後の試料温度が高くなったものと考えられた。

ドライアイス・予冷方式ではいずれの食品も-78～-75℃となり、ドライアイスの昇華温度とほぼ一致した。ドライアイス・予備凍結方式ではうなぎやさけは-70℃以下となったが、検体の大きさを2 cm角と

したあゆ及びえびではそれぞれ-36℃及び-46℃となった。2 cm角の検体を冷凍庫で凍結すると非常に硬くなり、1 cm角の検体よりも粉砕時に熱が発生しやすいためと考えられた。なお、常温磨砕法で均質化した場合、試料温度は24～33℃となったため、熱によって分解しやすい農薬等を分析する際は凍結粉砕法で試料調製するのがよいと考えられた。

## 2. 各試料調製方法での粉砕状況の比較

粉砕直後の粉砕容器の様子を図18に示した。凍結粉砕法で調製した試料はいずれの食品もパウダー状になり、均質であるように見えた。しかし、融解すると、食品によっては粉砕されていない大きい皮や骨等も認められた(図18)。このため、融解後の試料を比較することとした。

あゆ及びえびは試料調製方法間で大きな違いは認められず、1 cm×1 cm以上の大きな粒子は確認できなかった。一方、うなぎ及びさけでは、いずれの方法でも粉砕されていない1 cm×1 cm以上の皮や骨が認められ、常温磨砕法の方が凍結粉砕法よりも大きな皮が見られた。

いずれの試料も粘性が高く、1 cm×1 cm以上の皮や骨以外を比較するのは困難であった。そこで、得られた試料を用いて抽出操作を行った後、目開き1 mmのふるいを通し、ふるい上の残渣を比較することとした。抽出は試料10.0 gにアセトン50 mLを加えてホモジナイズ(1分間)または振とう(5分間)することにより行った。なお、抽出操作はいずれも1回とした。その結果、あゆ及びえびでは振とう抽出よりもホモジナイズ抽出の方が抽出後の残渣の粒子が小さくなる傾向が見られた(図19)。また、えびでは常温磨砕法より凍結粉砕法の方が残渣の粒子が小さくなる傾向が見られた。一方、あゆでは抽出法(ホモジナイズ/振とう)や試料調製法(常温磨砕法/凍結粉砕法)による大きな差は認められなか

った。うなぎ及びさけを凍結粉碎した試料では、振とう抽出後も1 cm×1 cm以上の大きい皮が見られた。また、凍結粉碎した試料をホモジナイズ抽出したところ、ポリロンの刃に皮等が絡まって回転が途中で停止し、操作が困難であった。常温磨砕した試料では、抽出時に刃の回転が停止することなく、ホモジナイズを行うことができたが、大きな皮は細かくならなかった。常温磨砕した試料で、ホモジナイズ抽出の際に回転が停止しなかったのは、凍結粉碎した試料よりも皮が大きいと、ポリロンの刃に絡まりにくかったためと考えられた。これらの結果から、うなぎ及びさけは凍結粉砕法、常温磨砕法のいずれも、均質化が不十分と考えられた。試料粒子の大きさは抽出効率や分析値のばらつきに大きく影響する可能性がある。このため、常温磨砕法、凍結粉砕法のいずれも粉砕時間を長くする等により、均質性をさらに向上させる必要があると考えられた。また、試料粒子の大きさによる抽出効率や分析値のばらつきへの影響を検討する必要があると考えられた。

#### D. 結論

##### [1] 農産物における試料調製方法及び試料の均質性が分析結果へ与える影響の検討

農薬が残留したほうれんそうを用いて均質化状態が異なる試料を調製し、分析結果に与える影響を調査した。その結果、均質化が不十分な試料での分析値は、微細な均質化試料と比較して相対的に低くなり、試料の不十分な均質化状態は残留農薬濃度を過小評価する可能性があることが示唆された。なお、均質化が不十分な試料で分析値が低くなる傾向は、昨年度のトマトを用いた調査と一致する。凍結粉碎した試料は常温で均質化した試料よりも分析値の変動が生じにくいとの報告もあるが、本研究結果からは凍結粉砕法による均質性の向

上は認められなかった。ほうれんそうは比較的分析値の変動が小さいことから、均質化が困難な作物を使用した調査を実施し、さらなる情報の蓄積が必要である。各均質化試料の篩通過率から、ほうれんそうにおける十分均質な試料の目安は「目開き1 mmの篩に負荷したときの通過率が90%以上」と考えられた。なお、この目安は昨年度行ったトマトでの調査結果と合致した。

##### [2] 畜水産物における試料調製方法の検討

水産物を対象に液体窒素及びドライアイスを用いた凍結粉砕法による試料調製を検討した。あゆ及びえびは、検体の大きさを1 cm角以下にした方がよいものの、昨年度確立した畜産物の方法を適用できることが示された。一方、うなぎ及びさけでは、凍結粉砕法で粉砕しても大きい皮や骨が認められ、均質化が不十分と考えられた。試料粒子の大きさは抽出効率や分析値のばらつきに大きく影響する可能性がある。今後、本方法を改良し、均質性を向上させるとともに、試料粒子の大きさによる抽出効率や分析値のばらつきへの影響を検討する必要があると考えられた。

#### E. 参考文献

- 1) 令和4年度 食品中残留農薬等の試験法開発における課題の解決に向けた研究 (残留農薬研究所担当課題: 残留農薬分析に供する生鮮農産物の試料均質性に関する調査, 試験番号 IET 22-1019)
- 2) 志田 (齊藤) 静夏, 齋藤真希, 根本了, 堤智昭, 果実における試料調製方法の検討: ドライアイスまたは液体窒素を用いた凍結粉砕法と常温磨砕法の比較: 第45回農薬残留分析研究会要旨集 (2022).
- 3) EU Reference Laboratories for Residues of Pesticides. Quick Method for the Analysis of

- Highly Polar Pesticides in Food Involving Extraction with Acidified Methanol and LC or IC MS/MS Measurement I. Food of Plant Origin (QuPPE PO Method):  
[https://www.quppe.eu/quppe\\_doc.asp](https://www.quppe.eu/quppe_doc.asp) (2024年2月27日閲覧)
- 4) 飼料の公定規格:  
<http://www.famic.go.jp/ffis/feed/kokuji/k51n756.html> (2024年2月27日閲覧)
- 5) EU Reference Laboratories for Residues of Pesticides. ANALYTICAL QUALITY CONTROL AND METHOD VALIDATION PROCEDURES FOR PESTICIDE RESIDUES ANALYSIS IN FOOD AND FEED. SANTE 11312/2021 v2:  
[https://food.ec.europa.eu/system/files/2023-11/pesticides\\_mrl\\_guidelines\\_wrkdoc\\_2021-11312.pdf](https://food.ec.europa.eu/system/files/2023-11/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_2021-11312.pdf) (2024年2月27日閲覧)
- 6) D. J. MacLachlana and D. Hamiltonb: *Pest Manag Sci.* **67**, 609–615 (2011).
- 7) S. J. Lehotay, and J.M. Cook: *J. Agric. Food Chem.*, **63**, 4395-4404 (2015).
- 8) 志田 (齊藤) 静夏, 根本了, 穉山浩: 日本食品化学学会誌, **27**, 135-140 (2020).
- 9) S. Hikino, T. Yajima, M. Sakasai, D. Kobayashi, K. Iijima and K. Ohyama: *J. Pestic. Sci.* **44**, 162–170 (2019).
- F. 研究発表**
- 1. 論文発表**  
なし
- 2. 学会発表**
- 1) 曳埜忍, 島田京佳, 矢島 智成, 飯島和昭, 志田 (齊藤) 静夏: 残留農薬分析における試料均質性の指標の検討～圃場で農薬散布して栽培したトマトを用いた調査～, 日本食品衛生学会第119回学術講演会 (2023.10.12)
- 2) 志田 (齊藤) 静夏: 残留農薬検査における課題と展望－検査部位の国際整合化, 試料調製法及び抽出法について－, 第21回食品安全フォーラム (2023.12.8)
- G. 知的財産権の出願・登録状況**  
なし

[1]農産物における試料調製方法及び試料の均質性が分析結果へ与える影響の検討

無処理区



処理区



図 1. 作物写真



図 2. 常温でのミキサー稼働時間別のほうれんそう均質化状態



図 3. 凍結粉碎試料の解凍時における状態



図 4. ヘラ処理 (左) および流水洗浄処理 (右) による篩通過時の様子

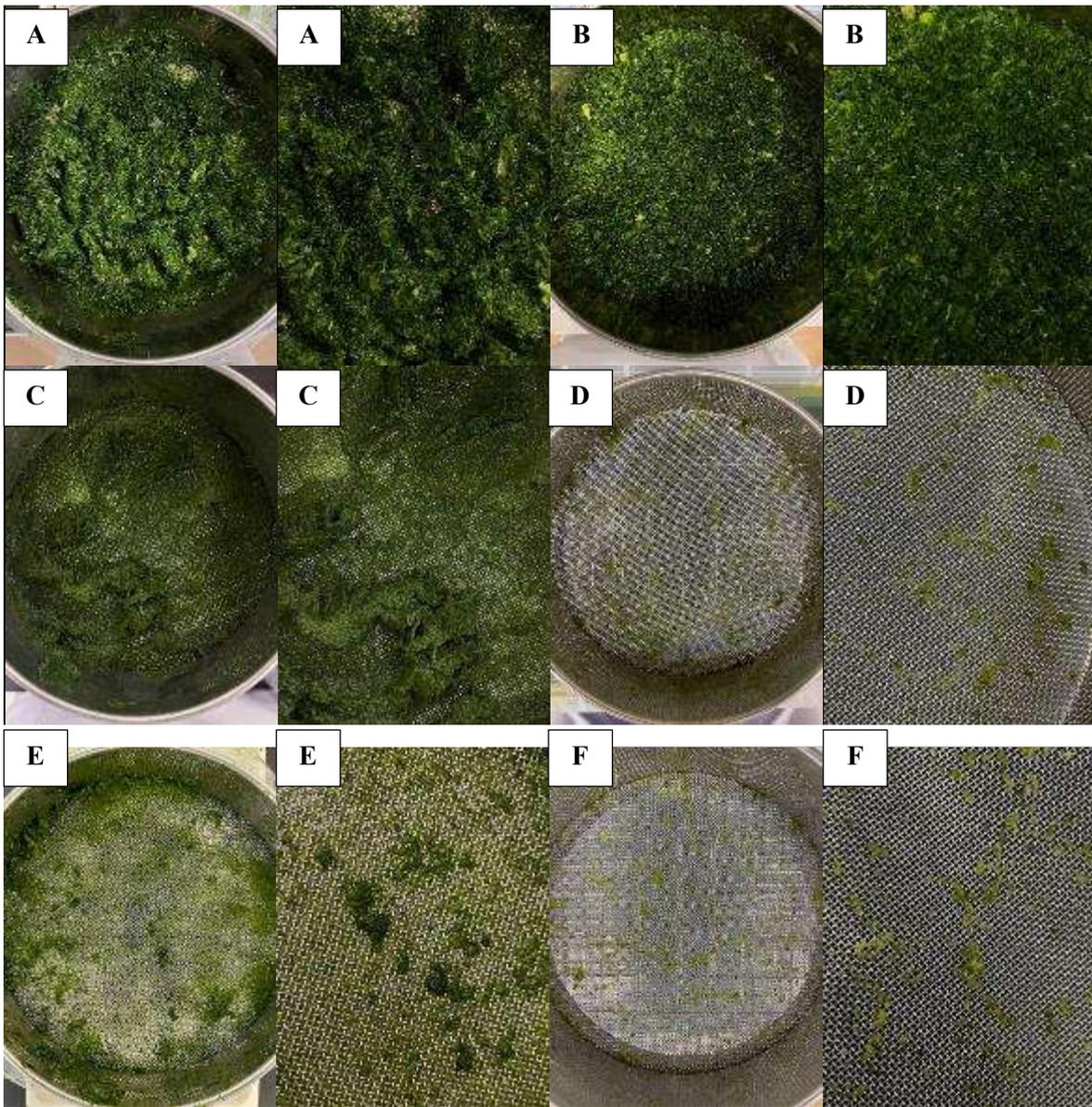


図 5. へラ処理および流水洗浄処理後における篩上試料の状態

(A:粗粉碎試料のへラ処理, B:粗粉碎試料の流水洗浄処理, C:微粉碎試料のへラ処理, D:微粉碎試料の流水洗浄処理, E:凍結碎試料のへラ処理, F:凍結碎試料の流水洗浄処理)

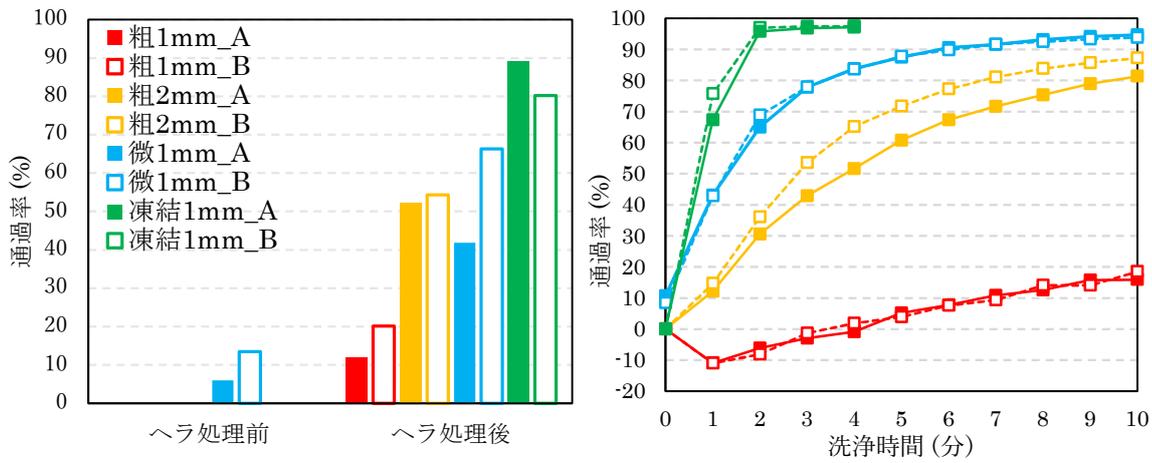


図 6. ヘラ処理時 (左) および流水洗浄処理時 (右) の篩通過率

(粗:粗粉碎試料, 微:微粉碎試料, 1 mm:目開き 1 mm 篩, 2 mm:目開き 2 mm 篩, A:作業者 A, B:作業者 B)

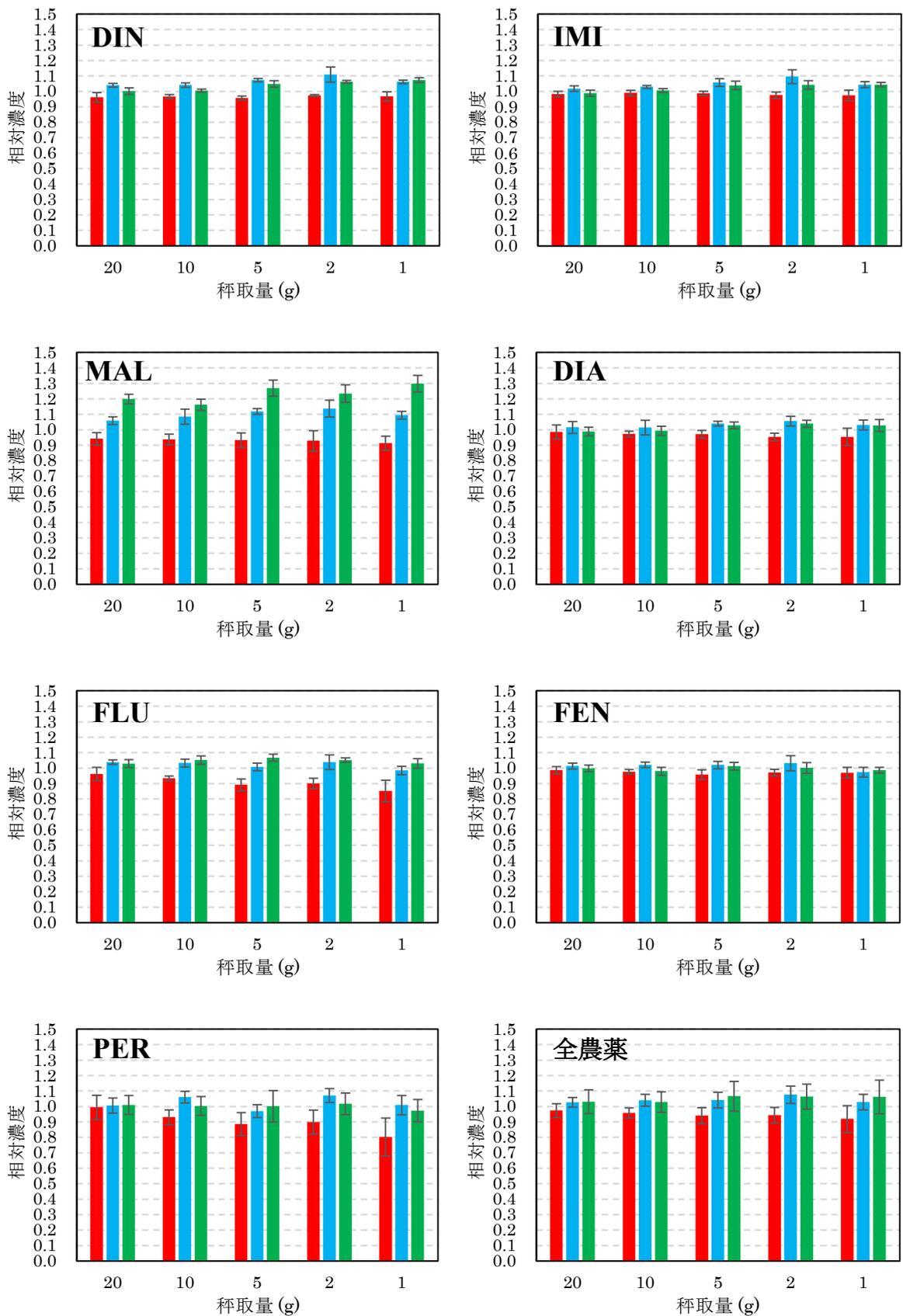


図 7. 各農薬および全農薬での平均相対濃度

(粗粉碎試料および微粉碎試料における 20 g 秤取時の平均濃度に対する相対濃度, ■:粗粉碎試料, ■:微粉碎試料, ■:凍結粉碎試料)

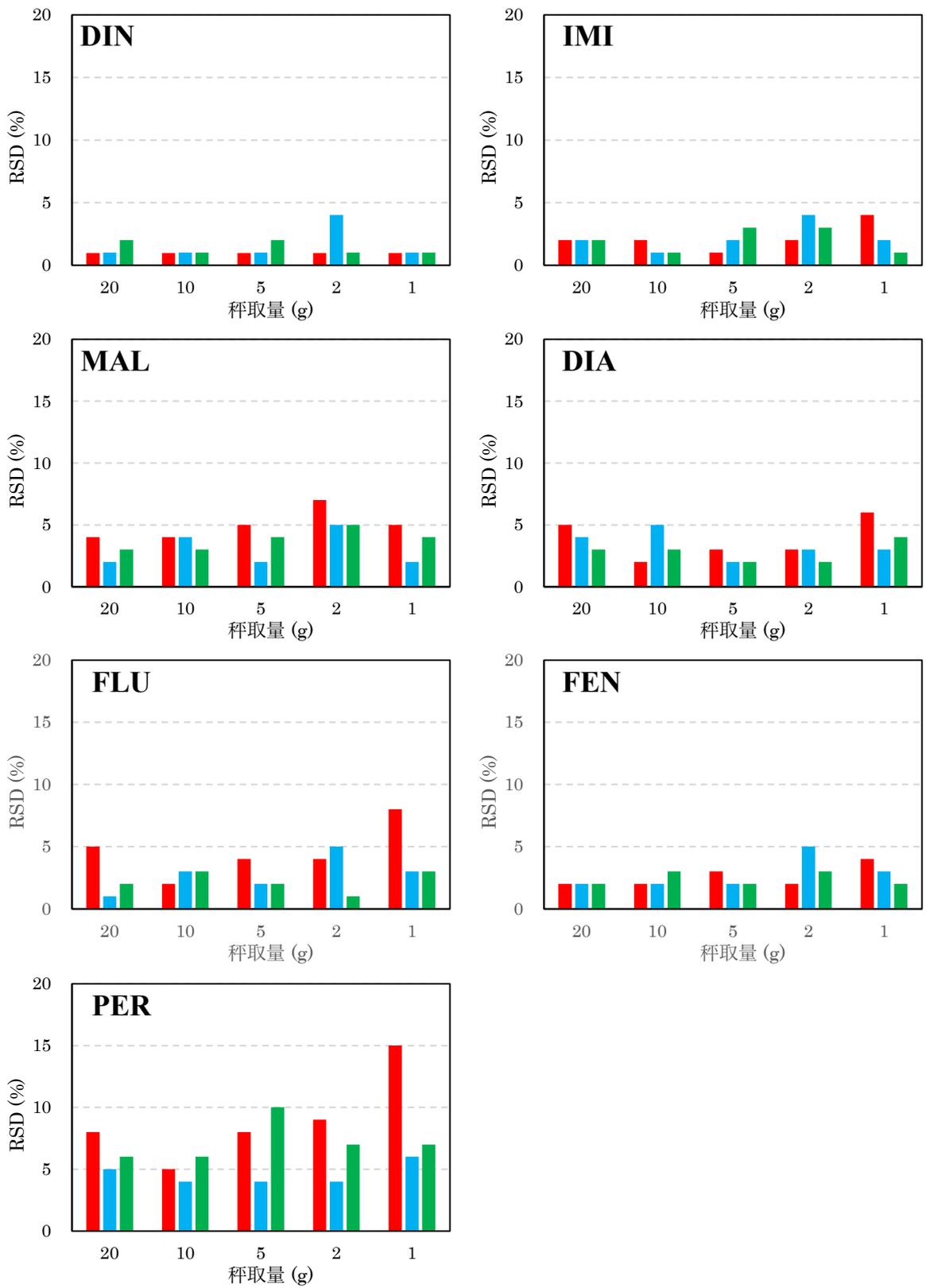


図 8. 各農薬における分析値の変動  
 (■:粗粉碎試料, ■:微粉碎試料, ■:凍結粉碎試料)

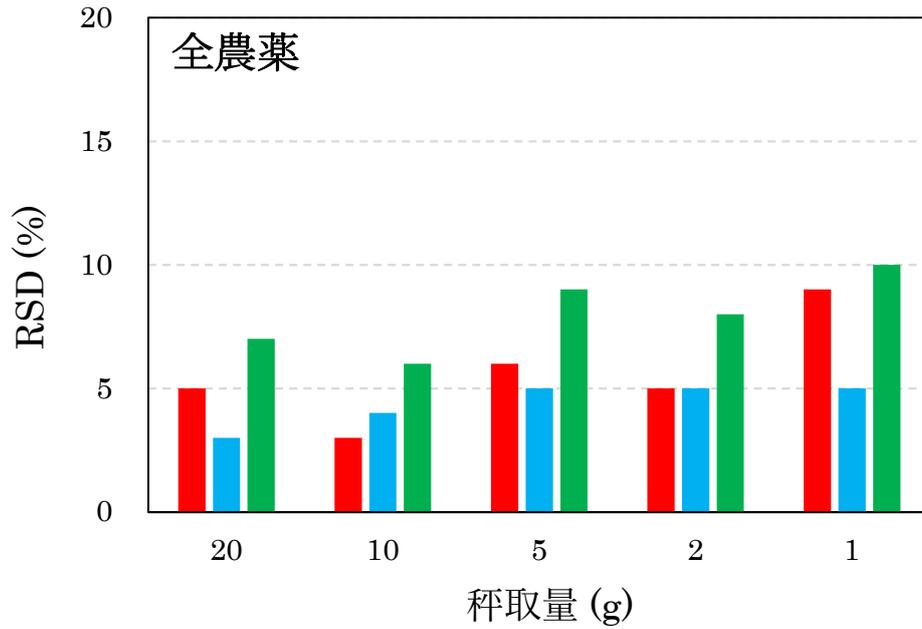


図 9. 各農薬における相対濃度の全農薬での変動  
 (粗粉碎試料および微粉碎試料における 20 g 秤取時の平均濃度で補正した相対濃度,  
 ■:粗粉碎試料, ■:微粉碎試料, ■:凍結粉碎試料)

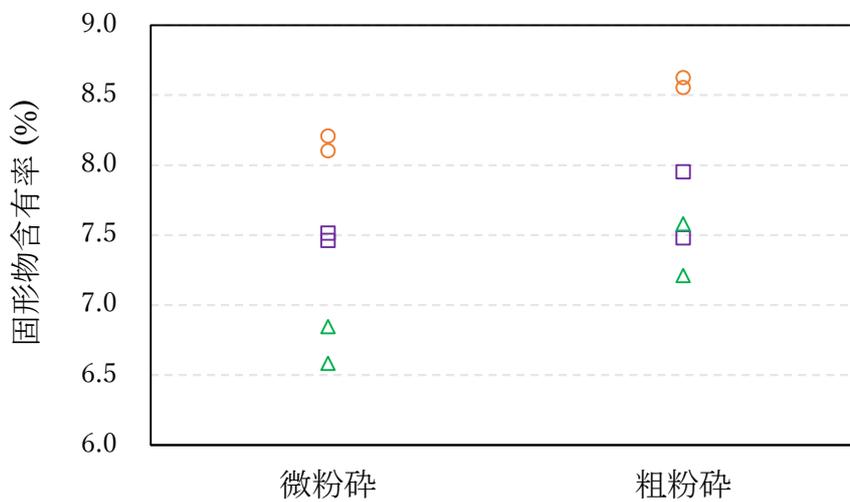


図 10. 試料を 1 時間静置後に異なる三層から秤取した試料における固形物含有率  
 (○:上層, □:中層, △:下層)

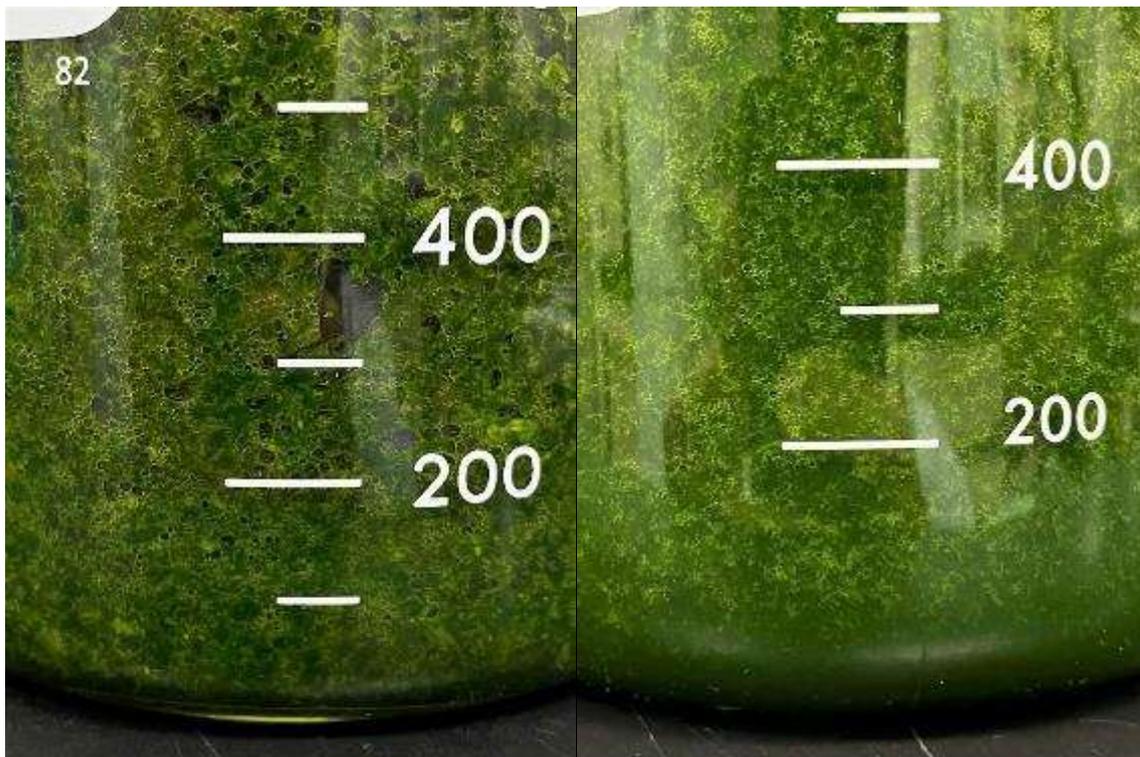


図 11. 均質化試料を 1 時間静置した後の状態  
(左:粗粉碎試料, 右:微粉碎試料)

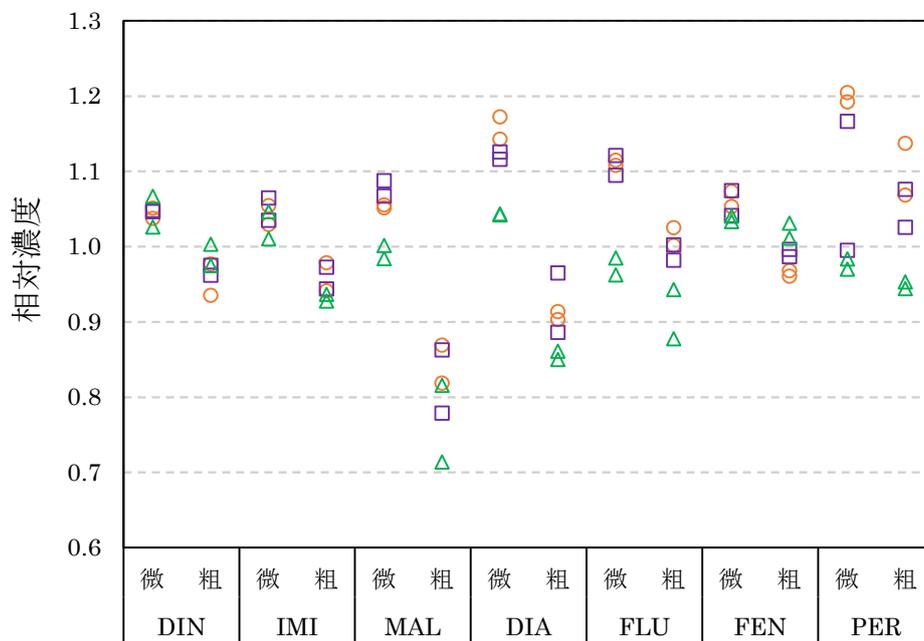


図 12. 異なる三層における相対濃度

(均質化直後における粗粉碎試料および微粉碎試料の 20 g 秤取試料中濃度で補正した相対濃度, 微:微粉碎試料, 粗:粗粉碎試料, ○:上層, □:中層, △:下層)

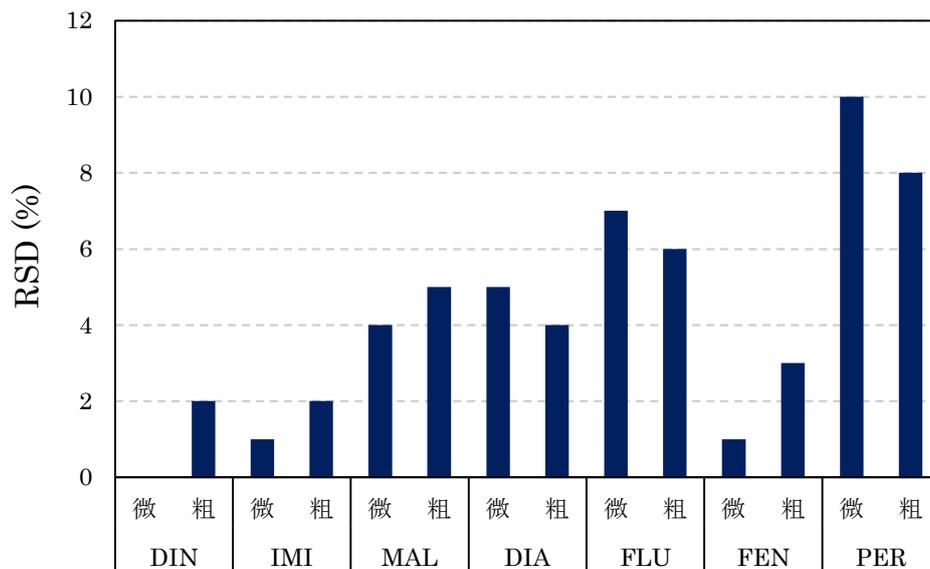


図 13. 異なる三層における平均分析値の変動  
(微:微粉砕試料, 粗:粗粉砕試料)

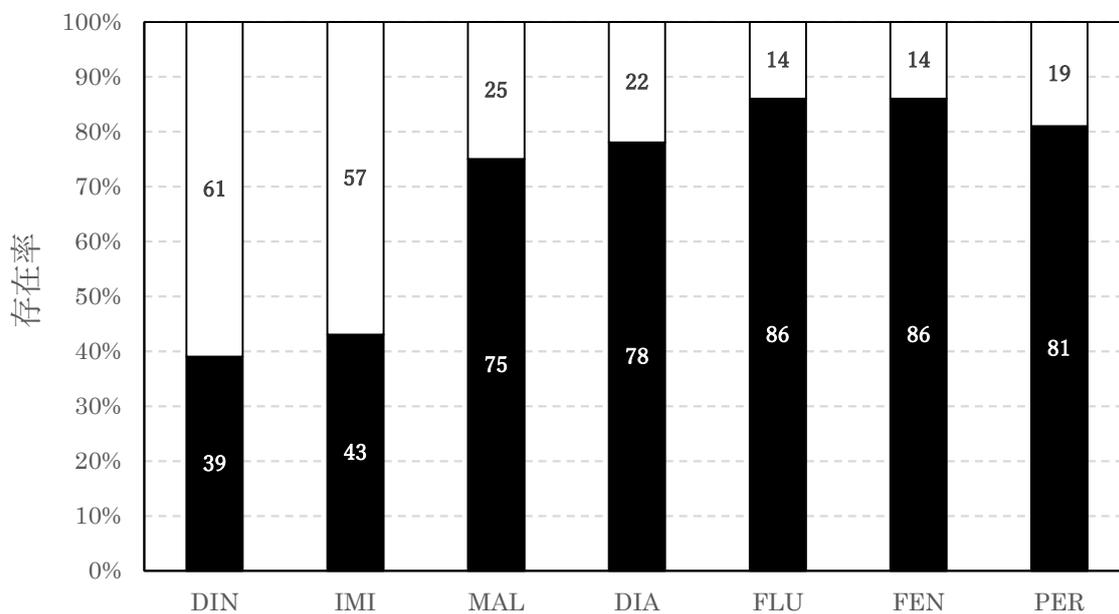


図 14. 微粉砕試料を遠心分離により分画した沈殿と上澄み液中の農薬存在率  
(■:沈殿, □:上澄み液)

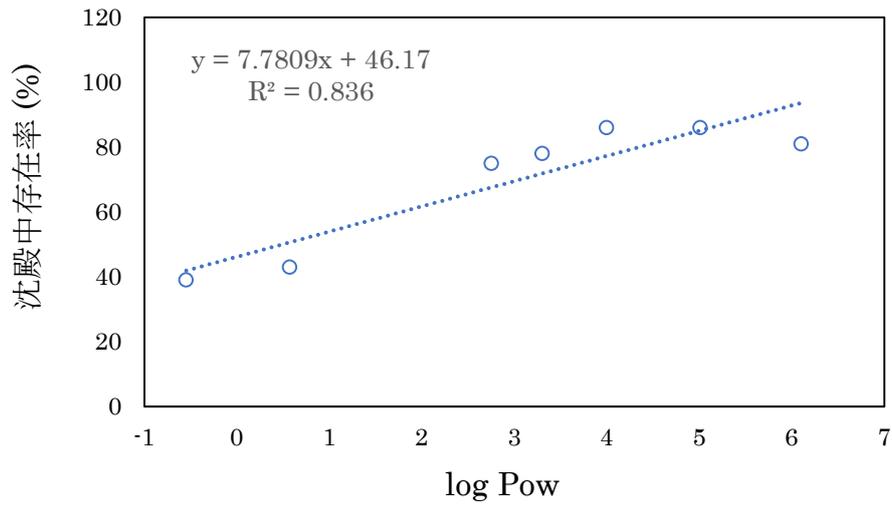


図 15. 各農薬の極性と沈殿中存在率の関係

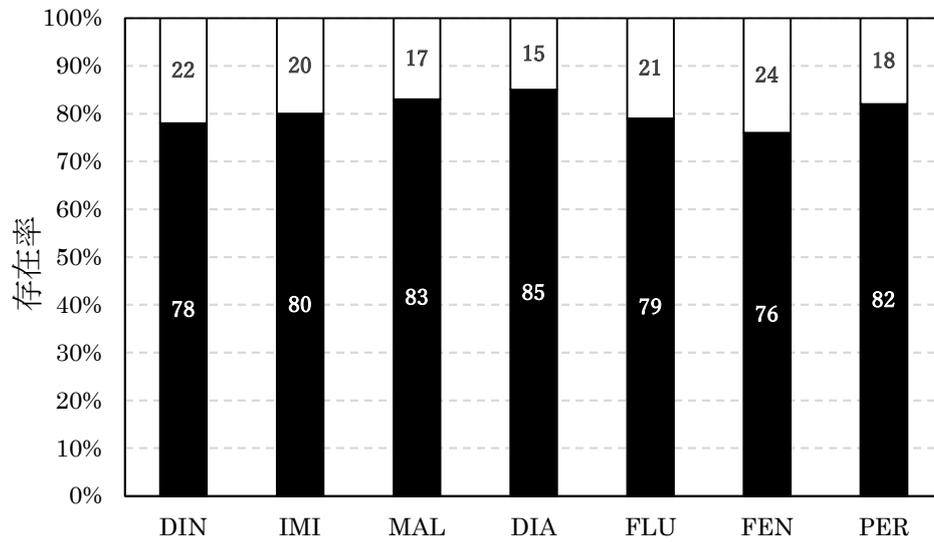


図 16. 粗粉碎試料を目開き 1 mm の試験篩に通過させた後の篩上残渣および通過物中における各農薬の存在率 (■:篩上残渣, □:通過物)

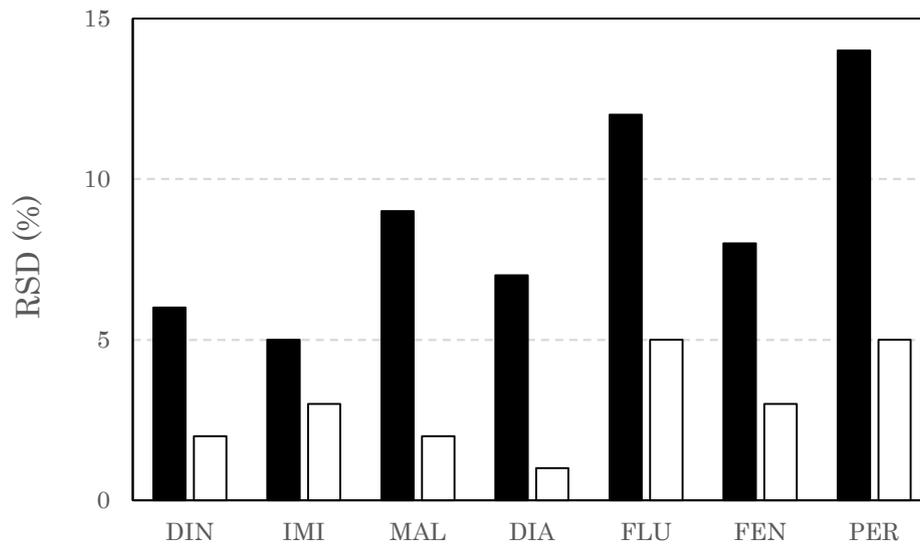


図 17. 粗粉碎試料を目開き 1 mm の試験篩に通過させた後の篩上残渣および通過物中における各農薬の分析値変動 (■: 篩上残渣, □: 通過物)

表 1 MS パラメーター

分析対象物質	DP (V)	CE (V)	CXP (V)	プリカーサー イオン (m/z)	プロダクト イオン (m/z)
ジノテフラン	51	17	10	203.1	129.1
イミダクロプリド	61	21	6	256.0	209.0
マラチオン	44	17	6	331.0	127.1
ダイアジノン	45	31	2	305.0	169.0
フルフェノクスロン	101	27	6	489.1	158.1
フェンピロキシメート	96	23	6	422.2	366.0
ペルメトリン	51	27	8	407.9	183.1

表 2 真度および精度の評価基準

添加濃度 (mg/kg)	平均回収率 (%)	併行相対標準偏差 (%)
0.01 以下	60~120	30
0.01 超~0.1 以下	70~120	20
0.1 超~1.0 以下	70~110	15
1.0 超	70~110	10

表 3. 妥当性の確認結果

添加濃度 (mg/kg)	平均回収率 (%) [ RSDr (%) ]						
	DIN	IMI	MAL	DIA	FLU	FEN	PER
0.01 <sup>a</sup>	104 [4]	97 [6]	97 [6]	97 [8]	91 [5]	84 [5]	88 [4]
0.5 <sup>a</sup>	110 [3]	105 [3]	105 [3]	96 [4]	95 [4]	99 [2]	89 [5]
0.5 <sup>b</sup>	99 [3]	102 [3]	101 [4]	90 [5]	100 [2]	105 [3]	94 [3]
15 <sup>a</sup>	102 [3]	99 [3]	108 [2]	—	88 [1]	109 [1]	92 [7]
50 <sup>a</sup>	—	—	—	102 [1]	—	—	—

n=5

<sup>a</sup> 市販品の微粉碎試料を使用

<sup>b</sup> 無処理区の粗粉碎試料を使用

表 4. マトリックス効果

マトリックス効果 (%)						
DIN	IMI	MAL	DIA	FLU	FEN	PER
-32	-3	-1	-3	-19	-5	-23

表 5. 分析結果

表 5-1. 粗粉碎試料

農薬	平均濃度 (mg/kg) [ SD (mg/kg) ]									
	20g		10g		5g		2g		1g	
DIN	5.55	[0.178]	5.58	[0.081]	5.53	[0.075]	5.62	[0.030]	5.59	[0.168]
IMI	3.79	[0.067]	3.82	[0.067]	3.81	[0.052]	3.76	[0.080]	3.76	[0.134]
MAL	1.83	[0.077]	1.82	[0.066]	1.81	[0.092]	1.81	[0.128]	1.77	[0.090]
DIA	14.8	[0.693]	14.6	[0.278]	14.6	[0.382]	14.3	[0.374]	14.3	[0.846]
FLU	2.44	[0.110]	2.37	[0.037]	2.26	[0.097]	2.28	[0.084]	2.16	[0.177]
FEN	3.10	[0.072]	3.06	[0.049]	3.01	[0.097]	3.05	[0.067]	3.04	[0.108]
PER	4.92	[0.388]	4.60	[0.240]	4.38	[0.365]	4.45	[0.383]	3.97	[0.608]

n=6

表 5-2. 微粉碎試料

農薬	平均濃度 (mg/kg) [ SD (mg/kg) ]									
	20g		10g		5g		2g		1g	
DIN	6.00	[0.070]	6.01	[0.081]	6.20	[0.067]	6.40	[0.283]	6.13	[0.064]
IMI	3.93	[0.066]	3.97	[0.037]	4.08	[0.095]	4.23	[0.175]	4.03	[0.075]
MAL	2.06	[0.047]	2.11	[0.095]	2.17	[0.035]	2.21	[0.105]	2.13	[0.049]
DIA	15.2	[0.581]	15.2	[0.714]	15.6	[0.237]	15.8	[0.472]	15.5	[0.479]
FLU	2.63	[0.035]	2.62	[0.066]	2.55	[0.063]	2.63	[0.120]	2.49	[0.070]
FEN	3.18	[0.060]	3.20	[0.056]	3.20	[0.075]	3.24	[0.155]	3.06	[0.099]
PER	4.98	[0.244]	5.25	[0.185]	4.80	[0.205]	5.30	[0.221]	4.99	[0.309]

n=6

表 5-3. 凍結粉碎試料

農薬	平均濃度 (mg/kg) [ SD (mg/kg) ]									
	20g		10g		5g		2g		1g	
DIN	5.78	[0.127]	5.80	[0.056]	6.05	[0.119]	6.13	[0.057]	6.20	[0.088]
IMI	3.82	[0.076]	3.88	[0.045]	4.01	[0.108]	4.02	[0.106]	4.03	[0.057]
MAL	2.33	[0.061]	2.26	[0.071]	2.47	[0.101]	2.40	[0.109]	2.52	[0.105]
DIA	14.8	[0.411]	14.9	[0.450]	15.4	[0.327]	15.6	[0.341]	15.4	[0.577]
FLU	2.61	[0.064]	2.66	[0.070]	2.70	[0.058]	2.66	[0.037]	2.61	[0.078]
FEN	3.13	[0.069]	3.07	[0.081]	3.18	[0.077]	3.14	[0.108]	3.09	[0.058]
PER	5.00	[0.300]	4.97	[0.301]	4.95	[0.506]	5.04	[0.343]	4.81	[0.357]

n=6

## [2] 畜水産物における試料調製方法の検討

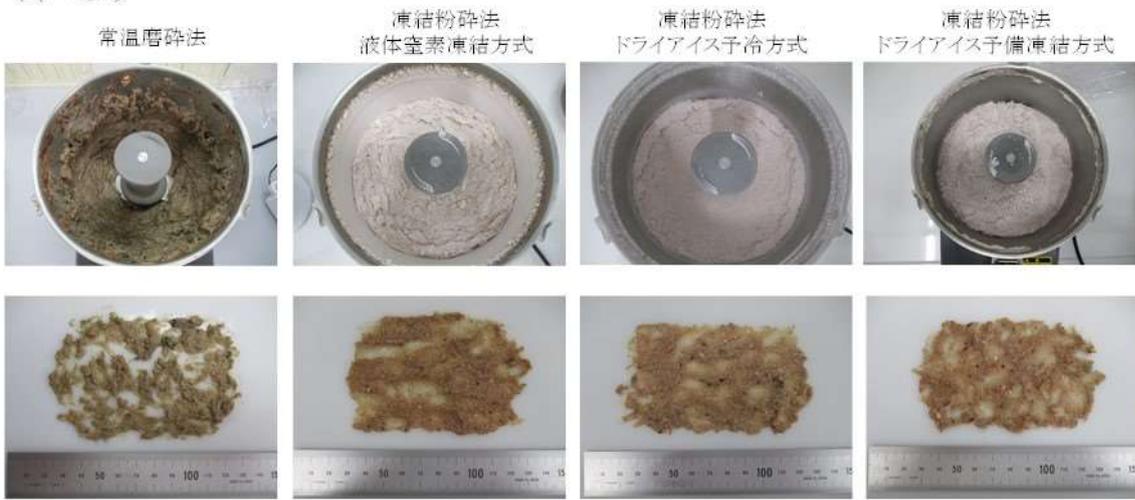
表 6. 調製直後の試料温度(°C)

試料調製法	あゆ <sup>1</sup>	えび <sup>1</sup>	うなぎ <sup>2</sup>	さけ <sup>2</sup>
常温磨砕法	30.4	26.6	32.9	23.5
凍結粉砕法(液体窒素・凍結方式)	-42.8	-50.6	-34.7	-44.7
凍結粉砕法(ドライアイス・予冷方式)	-75.8	-78.4	-77.1	-74.8
凍結粉砕法(ドライアイス・予備凍結方式)	-36.0	-46.0	-70.9	-73.9

<sup>1</sup> 検体の大きさ:2 cm

<sup>2</sup> 検体の大きさ:1 cm

(a) あゆ



(b) えび

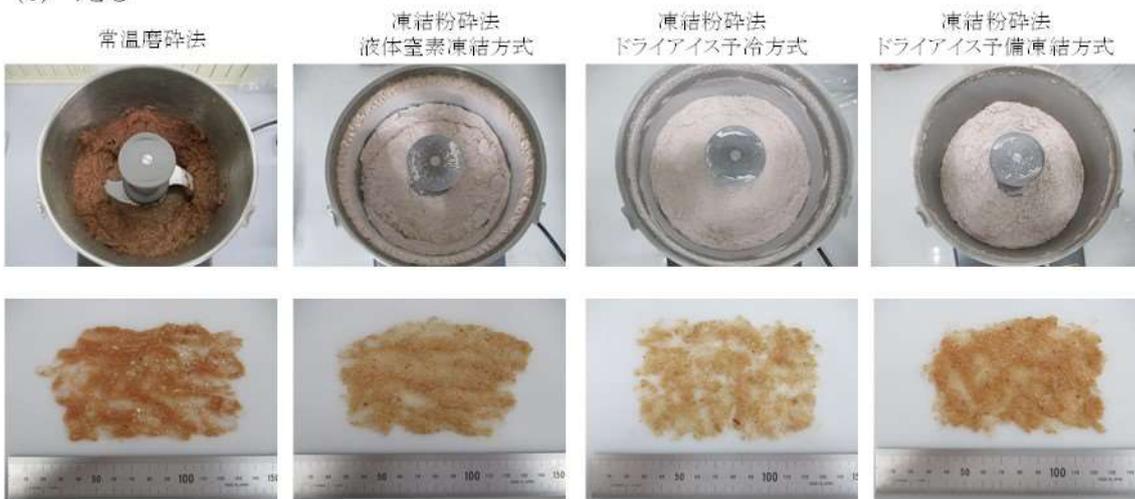
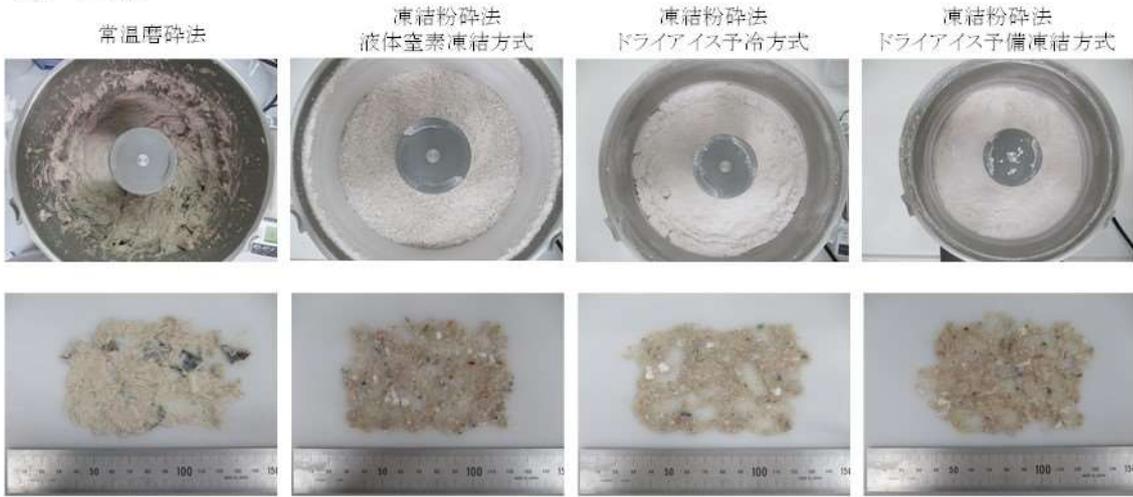


図 18. 試料調製後の粉砕状況

(c) うなぎ



(d) さけ

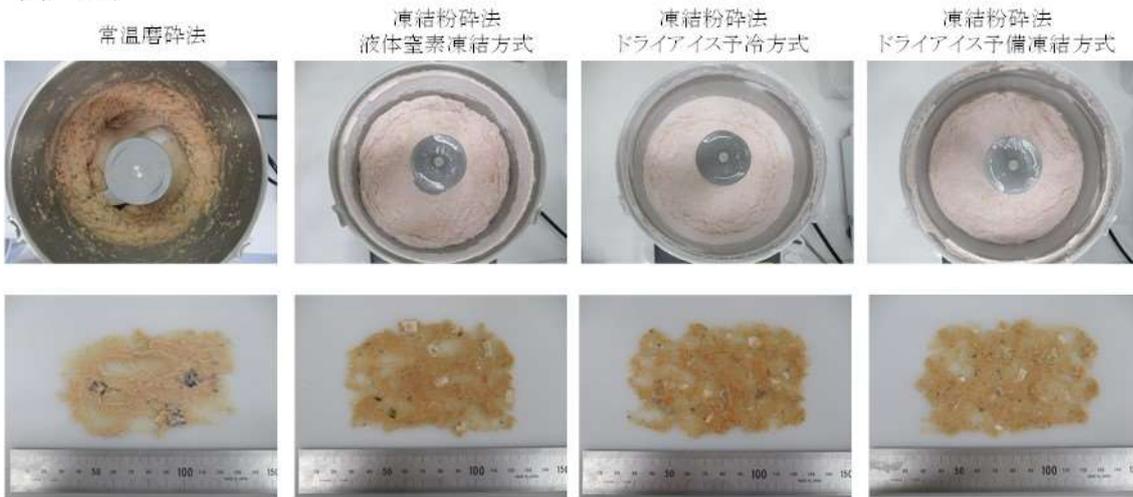


図 18. (つづき)

(a) あゆ

常温磨砕法

凍結粉砕法  
液体窒素凍結方式

凍結粉砕法  
ドライアイス予冷方式

凍結粉砕法  
ドライアイス予備凍結方式

ホモジナイズ (1分間)

(試料10 g, アセトン50 mL × 3回)



振とう (5分間)

(試料10 g, アセトン50 mL × 3回)



(b) えび

常温磨砕法

凍結粉砕法  
液体窒素凍結方式

凍結粉砕法  
ドライアイス予冷方式

凍結粉砕法  
ドライアイス予備凍結方式

ホモジナイズ (1分間)

(試料10 g, アセトン50 mL × 3回)



振とう (5分間)

(試料10 g, アセトン50 mL × 3回)



図 19. ホモジナイズまたは振とう抽出後の残渣

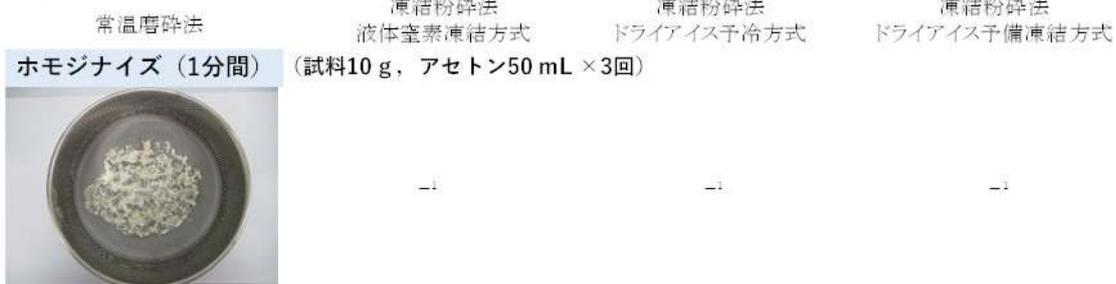
(c) うなぎ



振とう (5分間) (試料10 g, アセトン50 mL × 3回)



(d) さけ



振とう (5分間) (試料10 g, アセトン50 mL × 3回)



図 19. (つづき)

<sup>1</sup>ホモジナイズ抽出操作を行うことができなかった