

令和 5 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

残留農薬分析の外部精度管理に関する研究

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
研究分担者	大竹 貴光	（国研）産業技術総合研究所 主任研究員
研究協力者	中村 圭介	（国研）産業技術総合研究所 主任研究員

研究要旨

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ため、食品衛生法に基づく検査機関には外部精度管理調査への参加が求められている。一方、技能試験に関する国際規格である ISO/IEC 17043 では、技能試験の付与値の不確かさをより小さくする方法として、絶対測定法による決定が挙げられている。そこで、外部精度管理調査試料中の農薬分析のための精確な方法を確立し、同調査の信頼性をより向上させることを目的として本研究を行っている。具体的には、「国際単位系にトレーサブルな同位体希釈質量分析法（IDMS）を用いた方法」により得られた信頼性が高い分析値との比較を行うことで、同調査の参加者が、より正確に技能評価できる外部精度管理調査の実現を目指すことが目的である。

今年度は、食品薬品安全センター秦野研究所がスプレードライヤにより開発する残留農薬分析のための野菜試料の有効性を示すことを目的とし、IDMS を用いた方法により正確な分析値を付与した。これにより、試料調製のための噴霧条件決定に寄与した。また、前年度までに本研究で開発済の玄米試料を用いて、外部精度管理のパイロットスタディを実施することを目的とした。そのための準備として、まずは玄米試料中の農薬分析を行って得られた結果を基に、試料の均質性および試料中の農薬安定性を評価し、パイロットスタディに用いる試料として問題がないことを示した。また本パイロットスタディでは、参加者の中央値を用いた参照値だけでなく、われわれが IDMS による精確な分析値も参照値として付与した。これにより、より信頼性が高い参加者の技能評価を行うことができた。

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。そのため、食品衛生法に基づく検査機関には様々な分析精度管理が求められてお

り、その一つとして外部精度管理調査への参加が求められている。一方、外部精度管理調査を含む多くの技能試験では、付与値として参加機関の分析結果から算出した合意値を採用し、この値を基準と

して各参加機関の技能評価を行うことが一般的である。これに対し、技能試験に関する国際規格である ISO/IEC 17043: 2010 (JIS Q 17043: 2011) では、付与値の不確かさをより小さくする方法として、絶対測定法による決定が挙げられている。同位体希釈質量分析法 (IDMS) は、分析対象化合物の安定同位体置換化合物 (標識体) を内標準に用いた定量法であり、極めて精確な (正確で精度がよい) 分析を行うことができる方法である。そこで本研究では、同調査の信頼性をより向上させることを目的として、IDMSによる食品中農薬の高信頼性分析を用いた同調査の実施を検討している。

今年度はまず、食品薬品安全センター 秦野研究所がスプレードライヤにより開発する残留農薬分析のための野菜試料の有効性を示すために、ほうれんそう試料中のクロルピリホス、ダイアジノン、フェニトロチオン、マラチオンを対象とし、これまでの本研究で IDMS を用いて高精度化した「平成17年1月24日付け食安発第 0124001号の通知試験法 (一斉試験法)」により、正確な分析値を付与することを目的とした。加えて、環境負荷の低い自動抽出法である超臨界流体抽出法 (SFE) を利用した分析も実施し、一斉試験法による分析結果の妥当性確認のため、両分析法による分析値の比較も行った。また、前年度までに本研究で開発済である玄米試料を用いて、外部精度管理のパイロットスタディを実施することも目的とした。そのための準備として、玄米試料中の農薬分析を行って得られた結果を基に、試料の均質性および試料中の農薬安定性を

評価し、実際のパイロットスタディに使用できるか否かの判断を行った。その後、パイロットスタディ用の玄米試料中農薬に正確な分析値と不確かさを付与し、パイロットスタディの参加機関の分析値を解析した結果と、比較等を行った。

B. 研究方法

(1) 添加回収試験による、ほうれんそう分析のための一斉試験法の評価

対象農薬が検出下限以下であることを確認した、市場流通品のブランクほうれんそうを粉碎したものを試料とし、そこに対象農薬であるクロルピリホス、ダイアジノン、フェニトロチオン、マラチオンをポジティブリストの基準濃度値 (クロルピリホス: 0.1 mg/kg, ダイアジノン: 0.4 mg/kg, フェニトロチオン、マラチオン: 0.2 mg/kg) になるように添加した。本試料を、IDMS を適用した一斉試験法によって分析を行い、得られた結果を解析して各分析法の正確さを精密に評価・比較した。

(2) 残留農薬検査用ほうれんそう試料の分析

一斉試験法と SFE を用いて、食品薬品安全センター 秦野研究所がスプレードライヤにより開発した残留農薬検査用ほうれんそう試料中の対象農薬を分析した。一斉試験法では Lot 1 (100 °C, アセトニトリル 20 %) および 2 (80 °C, アセトニトリル 20 %) の 2 種 (温度は噴霧温度を示す)、SFE では Lot 1 (100 °C, アセトニトリル 20 %) の試料を分析した。また、噴霧温度は同じで、アセトニトリルを 20 % から 30 % にして調製した試料

(Lot 3: 100 °C, アセトニトリル 30 %, Lot 4: 80 °C, アセトニトリル 30 %) も、一斉試験法によって分析した。得られた結果は、試料調製における農薬の添加濃度等と比較した。

(3)パイロットスタディのための玄米試料の均質性評価

ISO Guide35 (標準物質—認証のための一般的及び統計的な原則) に基づき、食品薬品安全センター秦野研究所が調製した 117 本から無作為に選んだ 10 本について、2 回ずつ農薬濃度を分析した。分析法は、IDMS を適用した QuEChERS 法を用いた。

(4)パイロットスタディのための玄米試料中農薬の安定性評価

昨年度、本研究で分析を行った玄米試料中農薬 (スプレードライヤの噴霧温度は 100 °C の試料) を、約 1 年後に分析することで、長期安定性を評価した。分析には、IDMS を適用した一斉試験法を用いた。

(5)パイロットスタディ用玄米試料中農薬の値付け

(3) で均質性が確認された玄米試料中の対象農薬の濃度を分析した。分析には、IDMS を適用した一斉試験法、QuEChERS 法、STQ 法を用い、不確かさの算出も行った。

(6)残留農薬含有の玄米試料を用いた外部精度管理調査のパイロットスタディ

23 機関から参加申し込みがあった。これらの機関に対して、2024 年 2 月 16 日に、食品薬品安全センター秦野研究所より、試験試料を冷凍便により送付した (2024 年 2 月 19 日着とした)。参加機関

は、独立した分析 (試料の抽出及び精製、GC/MS 等による機器測定等) を 2 回行い、得られた結果と、適用した分析方法 (機器の校正に用いた校正用標準、抽出・精製法、測定法等) を報告することが求められた。最終的に 22 機関が、分析結果を報告した。

1. 試料基材および試薬

(1) 試料

①ほうれんそう分析

添加回収試験による一斉試験法の評価には、粉碎して粉末とした市場流通品のほうれんそうを用いた。分析により、当該ほうれんそう試料中の対象農薬は検出下限以下であることを確認した。また、食品薬品安全センター秦野研究所がスプレードライヤにより開発した残留農薬検査用ほうれんそう試料 (Lot 1 (100 °C、アセトニトリル 20 %)、2 (80 °C、アセトニトリル 20 %)、3 (100 °C、アセトニトリル 30 %)、4 (80 °C、アセトニトリル 30 %) の 4 種、温度は噴霧温度を示す) も分析対象とした。

②玄米分析

食品薬品安全センター秦野研究所がスプレードライヤにより開発した残留農薬検査用玄米試料 (噴霧温度は 100 °C) を用いた。

(2) 標準品

測定対象農薬の高純度標準品として、富士フイルム和光純薬製ダイアジノン、フェニトロチオン、マラチオン (以上 TraceSure)、クロルピリホス (Traceable Reference Material) を用いた。標識体

の標準品として、林純薬工業製クロルピリホス- d_{10} 、フェニトロチオン- d_6 、Toronto Research Chemicals 製マラチオン- d_6 とダイアジノン- d_{10} を用いた。シリジスパイク標準品としてジーエルサイエンス製アラクロールを用いた。

(3) 試薬

アセトニトリル (AN)、アセトン (Ac)、トルエン (Tol)、メタノール (Me)、無水 Na_2SO_4 は関東化学製ポリ塩化ビフェニル・残留農薬分析用を用いた。QuEChERS 法で用いた PSA、グラファイトカーボンブラック、C18 は Agilent Technologies 社製のものを用いた。他の試薬は試薬グレードを用い、水は超純水を用いた。

2. 検量線溶液、内標準溶液、シリジスパイク溶液

質量比混合法によって以下の溶液を調製した。

(1) 添加回収試験による一斉試験法の評価および残留農薬検査用試料の分析用 (ほうれんそう試料)

クロルピリホス- d_{10} 、ダイアジノン- d_{10} 、フェニトロチオン- d_6 、マラチオン- d_6 を含む Ac 溶液を調製し、内標準溶液 A とした。アラクロールを Ac に溶解した溶液を調製し、さらにこの一部を Ac に希釈してシリジスパイク溶液 A を調製した。一方、クロルピリホス、ダイアジノン、フェニトロチオン、マラチオンを Ac に溶解させ農薬混合溶液 A を調製した。さらに、農薬混合溶液 A、内標準溶液 A、アラクロール溶液 A、Ac を混合することにより、検量線溶液 A を調製し

た。検量線溶液 A の各成分濃度は、3(1)から 3(3)に示す前処理法によって、ほうれんそう試料を処理して得られる試料溶液中の各農薬濃度と等しくなるように調製した。

次に、あらかじめ分析対象農薬とその標識体を含有しないことを確認したほうれんそう試料を 3(1)から 3(3)に示す前処理法によって処理した。得られたブランク溶液を窒素気流で乾固し、前述の検量線溶液 A に溶解させることにより、マトリックスマッチ検量線溶液 A を調製した。

(2) 均質性および安定性の評価並びにパイロットスタディのための残留農薬含有玄米試料の分析用

(1)と同様に、内標準溶液 B、農薬混合溶液 B、アラクロール溶液 B、検量線溶液 B、マトリックスマッチ検量線溶液 B を調製した。なお、検量線溶液 B 中の各成分濃度は、3(4)と 3(5)に示す前処理法によって残留農薬含有玄米試料を処理して得られる試料溶液中の各農薬濃度と等しくなるように調製した。

3. 分析方法

添加回収試験による、ほうれんそうの一斉試験法の評価では分析法 1 を、残留農薬検査用ほうれんそう試料の分析では分析法 2 (一斉試験法) と 3 (SFE 法) を用いて農薬を分析した。また残留農薬含有の玄米試料中の農薬分析には、分析法 4 (一斉試験法) , 5 (QuEChERS 法) , 6 (STQ 法) を用いた。

(1) 分析法 1 (一斉試験法、添加回収試験、ほうれんそう試料の分析)

ほうれんそう試料0.5 gに農薬混合溶液A0.4 mLおよび内標準溶液A0.4 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。AN層を無水Na₂SO₄によって脱水し濃縮・乾固した後、AN/To1 (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/To1 (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/To1 (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アラクロール溶液A 0.5 mLに溶解させ、試料溶液とした。

試料溶液中の対象農薬を、GC/MS によって測定した。測定条件は以下の通りである。装置：7890/5975c GC/MS システム (Agilent Technologies 製)、カラム：DB-5ms (30 m×0.25 mm、膜厚0.25 μm、Agilent Technologies 製)、カラム温度：50 °Cで2分間保持した後、+20 °C/分で160 °Cまで昇温し、さらに+7 °C/分で300 °Cまで昇温し、10分間保持、注入口温度：250 °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*：314 (クロルピリホス)、324 (クロルピリホス-*d*₁₀)、304 (ダイアジノン)、314 (ダイアジノン-*d*₁₀)、277 (フェニトロチオン)、283 (フェニトロチオン-*d*₆)、158 (マラチオン)、164

(マラチオン-*d*₆)、160 (アラクロール)。

(2) 分析法2 (一斉試験法、残留農薬検査用ほうれんそう試料の分析)

残留農薬検査用ほうれんそう試料 0.5 gに内標準溶液A0.4 mLを加えて静置した。これより後の工程は、分析法1と同様に実施した。

(3) 分析法3 (SFE法、残留農薬検査用ほうれんそう試料の分析)

残留農薬検査用玄米試料 0.5 gに内標準溶液A0.4 mLを加えて静置した。これに約10 gのNa₂SO₄を加え、ステンレス製の15 mL抽出管 (日本分光製) に試料を導入し、日本分光製の超臨界抽出装置 (ポンプ1：PU-2080-CO₂、ポンプ2：PU-2080 Plus、ミキサー：MX-2080-32、オーブン：CO-2065 Plus、背圧調整弁：BP-2080 Plus) を用いて抽出を行った。抽出条件は以下の通りである；溶媒：25%(v/v)Me/超臨界二酸化炭素、温度：80 °C、圧力：25 MPa、溶媒流量：2.5 mL/min、抽出時間：20 min。抽出液を、抽出装置出口に接続したODSカラム (日本分光製、PES-10-1/16) に通液した後、ナス型フラスコに回収した。回収した抽出液を、あらかじめAN/To1 (3:1) 混液10 mLでコンディショニングしたSupelco製ENVI-Carb/LC-NH₂固相抽出カートリッジ (500 mg/500 mg) に注入し、さらにAN/To1 (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アラクロール溶液A 0.5 mLに溶解させ、試料溶液とした。

試料溶液中のフェニトロチオンをGC/MSで、クロルピリホス、ダイアジノ

ン、及びマラチオンを高速液体クロマトグラフ／タンデム質量分析計（LC/MS/MS）によって測定した。GC/MSの測定条件は分析法 1 と同じである。LC/MS/MS の測定条件は、以下の通りである。装置：LCMS-8030（島津製作所製）、カラム：L-column3 C18（粒子径：3 μm 、カラムサイズ：150 mm $\times$ 2.1 mm i. d.、化学物質評価研究機構製）、カラム温度：40 $^{\circ}\text{C}$ 、試料注入量：10 μL 、溶離液 A：2 mM 酢酸アンモニウム水溶液、溶離液 B：メタノール、流量：0.15 mL/min、グラジエント条件：溶離液 A の割合を 85% から 1.3 分間で 60% に減少させた後、60% で 3.3 分間保持し、 $-3\%/分$ で 50% まで減少させ、次に $-1.85\%/分$ で 45% まで減少させ、さらに $-3.2\%/分$ で 5% まで減少させた後に 10 分間保持した。イオン化方法：ESI、Q1 プレバイアス電圧：12 $\sim$ 26 V、Q3 プレバイアス電圧：11 $\sim$ 30 V コリジョンエネルギー：8 $\sim$ 35 eV、DL 温度：300 $^{\circ}\text{C}$ 、ヒートブロック温度：500 $^{\circ}\text{C}$ 、定量に用いた m/z （プリカーサーイオン $\rightarrow$ プロダクトイオン）：349.80 $\rightarrow$ 96.95（クロルピリホス）、360 $\rightarrow$ 98.95（クロルピリホス- d_{10} ）、304.90 $\rightarrow$ 169.05（ダイアジノン）、315.00 $\rightarrow$ 170.10（ダイアジノン- d_{10} ）、33.80 $\rightarrow$ 99.00（マラチオン）、336.90 $\rightarrow$ 99.00（マラチオン- d_6 ）、270.00 $\rightarrow$ 238.05（アラクロール）。

(4) 分析法 4（一斉試験法、残留農薬含有の玄米試料の分析）

残留農薬検査用玄米試料 3 g に内標準溶液 B0.4 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 NaCl 10 g と 0.5 mol/L リン酸緩衝液（pH 7.0）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 Na_2SO_4 によって脱水し濃縮・乾固した後、AN/To1（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/To1（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/To1（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アラクロール溶液 B 0.5 mL に溶解させ、試料溶液とした。

試料溶液中の対象農薬を GC/MS によって測定した。測定条件は、分析法 1 と同じである。

(5) 分析法 5（QuEChERS 法、残留農薬含有の玄米試料の分析）

玄米試料 1 g に内標準溶液 B0.4 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 MgSO_4 、1 g の NaCl を加え、1 分間振とう（手振り）した。この抽出液を 3500 rpm で 5 分間遠心分離し、上澄み液に固相剤を添加して 1 分間振とう（手振り）した。このとき固相剤として 300 mg の PSA、300 mg の C18、900 mg の MgSO_4 を加えた。再び 3500 rpm で 5 分間遠心分離した後、上澄み液を窒素により乾固した。

アラクロール溶液 B の 0.1 mL を添加して、GC/MS 測定用の試料溶液とした。

試料溶液中の対象農薬を GC/MS によって測定した。測定条件は、分析法 1 と同じである。ただし、夾雑物によってクロマトグラムのピークが妨害されるため、定量に用いた m/z のうち、マラチオンを 285, マラチオン- d_6 を 291 とした。

(6) 分析法 6 (STQ 法、残留農薬含有の玄米試料の分析)

玄米試料 1 g に内標準溶液 B0.4 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 $MgSO_4$ 、1 g の NaCl を加え、1 分間振とう (手振り) した。この抽出液を 3500 rpm で 5 分間遠心分離し、上澄み液 1 mL を分取し、あらかじめ Ac2 mL と AN2 mL でコンディショニングしたアイステイサイエンス製 C18 50 mg 固相抽出カートリッジを用いて通液し、AN0.2 mL で溶出した。得られた処理液に To10.4 mL を添加し、その試料を Ac2 mL と To1/AN (1:3) 2 mL でコンディショニングしたアイステイサイエンス製 GCS-20 mg/PSA-30 mg により精製した (溶出には To1/AN (1:3) 0.6 mL)。溶出液を乾固して得られた残さをアラクロール溶液 B 0.5 mL に溶解させ、試料溶液とした。

試料溶液中の対象農薬を GC/MS によって測定した。測定条件は、分析法 1 と同じである。ただし、夾雑物によってクロマトグラムのピークが妨害されるため、定量に用いた m/z のうち、マラチオンを 285, マラチオン- d_6 を 291 とした。

4. 評価方法

(1) 農薬濃度の算出

3 で示した分析方法で得られた結果を基に、以下の式によって農薬濃度を算出した。

$$C = F_e \times \frac{R_s}{R_c} \times \frac{M_c \times C_c \times P \times M_{sp(s)}}{M_s \times M_{sp(c)}} \quad (1)$$

ここで、 C : 試料中の農薬濃度、 F_e : 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 : 検量線溶液の測定における分析対象農薬の標識体に対する面積比、 M_c : 検量線溶液中の農薬混合液の質量、 C_c : 農薬混合液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の質量、 M_s : 試料量、 $M_{sp(c)}$: 検量線溶液中の内標準溶液の質量、である。

(2) 添加回収試験による一斉試験法の評価 (ほうれんそう試料)

式(1)に準じて一斉試験法 (分析法 1) による分析値を算出した。得られた結果を、ほうれんそう試料への添加濃度 (クロルピリホス: 0.1 mg/kg, ダイアジノン: 0.4 mg/kg, フェニトロチオン、マラチオン: 0.2 mg/kg) と比較することにより、一斉試験法の正確さを評価した。

(3) 残留農薬検査用ほうれんそう試料の分析

式(1)に準じて一斉試験法 (分析法 2) および SFE 法 (分析法 3) による分析値を算出した (SFE 法では、Lot 1 (100 °C) の試料のみ分析)。得られた結果は、試料調製における農薬の添加濃度

等と比較した。

(4)パイロットスタディに用いる玄米試料の均質性評価

式(1)に準じて QuEChERS 法（分析法 5）による分析値を算出した。得られた分析結果を分散分析して、農薬濃度の瓶間のばらつきを評価した。また、均質性に関する標準不確かさは ISO Guide 35: 2017 に従って求めた。

(5) パイロットスタディに用いる玄米試料中の農薬の安定性評価

式(1)に準じて一斉試験法（分析法 4）による分析値を算出した。昨年度に得られた定量結果と、今回得られた約 1 年間保管後の定量結果を比較して、各農薬の安定性を評価した。

(6)パイロットスタディ用玄米試料中農薬の値付け

不確かさは、式(1)の各項について評価した。校正用標準液やサロゲート溶液は分析法 1～3 を通じて同一のものを使用したため、式(1)における M_c 、 C_c 、 $M_{sp(c)}$ は分析法間で共通である。そこで、これらの不確かさの合成標準不確かさを $u(C_{com})$ とした。一方、 F_e 、 R_s/R_c 、 $M_{sp(s)}$ 、 M_s は適用した分析法あるいは測定毎に異なるために、これらの合成標準不確かさを $u(C_{ind,1})$ 、 $u(C_{ind,2})$ 、 $u(C_{ind,3})$ とした。ここで、添字の番号は分析法を示し、1 は一斉試験法、2 は QuEChERS 法、3 は STQ 法とした。 $u(C_{ind,1})$ 、 $u(C_{ind,2})$ 、 $u(C_{ind,3})$ の逆数を重みとして、分析法 1 と分析法 2、および 3 の平均値 C_{av} と、あわせて分析法毎に依存する項目の合成標準不確かさ $u(C_{ind})$ を算出した。分析法 1 と分析法 2 および 3 の結果の違いに関する不確か

さ $u(F_{method})$ として、一元配置分散分析により分析法間の標準偏差を求めた。さらに、 $u(C_{com})$ 、 $u(C_{ind})$ 、 $u(F_{method})$ を合成することにより、重み付き平均値の不確かさ $u(C_{av})$ を求めた。

(6) 残留農薬含有の玄米試料を用いた外部精度管理調査のパイロットスタディ

パイロットスタディの参加機関から得られた分析値を基に算出した中央値を、参照値として求めた。

（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) 添加回収試験による一斉試験法の評価（ほうれんそう試料）

分析法 1 で得られた定量値と調製値の比を表 1 に示す。この結果から、本方法によって調製値通りの分析値が得られることが示された。また各農薬の標識体の回収率も、91～94 %と良好であった（マトリックスマッチ検量線を使用）。よって、本方法によって残留農薬検査用ほうれんそう試料を用いた、農薬の噴霧条件検討のための分析を行っても問題ないことが示された。

(2) 残留農薬検査用ほうれんそう試料の分析によるスプレードライヤ条件決定への寄与

食品薬品安全センター秦野研究所より

提供された残留農薬検査用ほうれんそう試料の、Lot 1 (100 °C, AN20 %), 2 (80 °C, AN20 %), 3 (100 °C, AN30 %), 4 (80 °C, AN30 %) (温度は噴霧温度を示す) の 4 種類に含まれる対象農薬を、一斉試験法および SFE 法によって分析した (SFE 法では、Lot 1 の試料のみ分析)。得られた結果を表 2, 3 (マトリックスマッチ検量線を使用) に示す。これらより、一斉試験法と SFE 法の定量結果はよく一致しており、(1) での添加回収試験に加えて一斉試験法の妥当性を確認できた。

食品薬品安全センター秦野研究所によると、添加濃度はクロルピリホス:0.1 mg/kg, ダイアジノン:0.4 mg/kg, フェニトロチオン、マラチオン:0.2 mg/kg であった。本研究で得られた結果 (表 2) を用いて、調製時の回収率を計算した結果を表 4 に示す。これより、スプレードライヤの添加濃度に対する回収率の範囲は、80 °C (AN20 %) で 61 %から 78 %、100 °C (AN20 %) で 57 %から 74 %、80 °C (AN30 %) で 58 %から 76 %、100 °C (AN30 %) で 54 %から 74 %であった。昨年度までに、玄米試料でもスプレードライヤの条件検討を行ったが、玄米 (AN20 %) とほうれんそう (AN20 %) の結果の類似点は、以下の通りであった。①対象農薬のうち、フェニトロチオンの回収率が一番高かった。②各農薬において、100 °C よりも 80 °C の方が良い回収率が得られた。また、玄米 (AN20 %) とほうれんそう (AN20 %) の結果で異なる点は、以下の通りであった。①ほうれんそうでは、80 °C でのダ

イアジノンの回収率がクロルピリホスよりも高く (マラチオンと同程度であった)、クロルピリホスの回収率が一番低かった。②ほうれんそうでは、玄米に比べて多くの場合で回収率が上昇した (例えば、80 °C ではフェニトロチオンとダイアジノンで約 10 %上昇した)。さらに、ほうれんそう試料において AN を 30 %とした場合、AN20 %のときと比較すると、マラチオンを除いて AN20 %の回収率がやや高くなった。噴霧温度や AN 濃度を確定させるためには、以上の結果を用い、他の条件も考慮して (試料調製時に用いる装置の壁面に粉末試料が付いてしまう等の作業面での条件も含む)、課題 1 において最終的に決定する。

(3) パイロットスタディに用いる玄米試料の均質性評価

得られた分析結果を図 1 に示す。この結果を分散分析したところ、すべての対象農薬の瓶間濃度に統計的な有意差は見られず、試料が均質であることが示された。また、分散分析の結果を基に、瓶間

均質性標準偏差 $s_{bb} (= \frac{MS_{among} - MS_{within}}{n})$ と

測定 の ば ら つ き に 由 来 す る u_{bb}

$$(\sqrt{\frac{MS_{within}}{n}} + \sqrt{\frac{2}{vMS_{within}}}) \text{ を求めたところ、}$$

表 5 の通りであった。この結果から、均質性試験の不確かさは 0.58 %から 0.78 %と十分に小さく、パイロットスタディに用いるためには問題ない品質であることが示された。

(4) パイロットスタディに用いる玄米試料中の農薬の安定性評価

得られた結果を表 6 に示す。この結果

より、今回対象としたすべての農薬に対して、有意な濃度減少は見られなかった。よって、約 1 年間の安定性に問題ないことが示された。

(5)パイロットスタディ用玄米試料中農薬の値付け

各分析法によって得られた結果を用いて算出された、IDMS による精確な参照値と拡張不確かさを表 7 に示す。この値と、参加者の中央値を用いて算出された参照値の比較を、以下の(6)で行う。

(6) 残留農薬含有の玄米試料を用いた外部精度管理調査のパイロットスタディ

参加者の中央値を用いて算出された参照値を、表 8 に示す。表 7 に示した、IDMS によって得られた参照値と比較すると、よく一致していた。

E. 結論

IDMS を用いて高精度化した一斉試験法によって、食品薬品安全センター秦野研究所が調製したほうれんそう試料中農薬に精確な分析値を付与した。これは、スプレードライヤの噴霧条件を決定するための重要なデータとなる。最終的に噴霧温度や AN 濃度の条件を確定させるためには、他の条件も総合的に考慮して、課題 1 において決定する。玄米試料を用いた外部精度管理のパイロットスタディでは、試料中農薬の均質性と安定性を評価した。その結果、パイロットスタディに用いるには、十分優れた品質であったことが示された。また、この玄米試料を用いたパイロットスタディも実施した。参加者の中央値を用いた参照値だけでなく、われわれが、IDMS による精確な分析

値も参照値として付与した。これにより、より信頼性が高い参加者の技能評価を行うことができた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) ○Nakamura K., Otake T., and Hanari N: Quantitative determination of organophosphorus, pyrethroid, and dithiolane pesticide residues in brown rice using supercritical fluid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry., Journal of AOAC International, 106, 1532-1541 (2023)

2. 学会発表

1) 中村圭介、太竹貴光、羽成修康：超臨界流体抽出法を用いた玄米中農薬分析法の妥当性評価、第46回農薬残留分析研究会、長野、2023

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

表1 一斉試験法による添加回収試験の結果（ほうれんそう試料中農薬）

対象農薬	調製値に対する分析値の比 (平均値±標準偏差, n=4, %)
クロルピリホス	100.1±1.2
ダイアジノン	98.9±0.7
フェニトロチオン	99.4±0.4
マラチオン	100.1±0.6

表2 一斉試験法によって得られた残留農薬検査用ほうれんそう試料中の農薬濃度
(平均値±標準偏差, n=3, mg/kg, 温度は噴霧温度)

対象農薬	Lot 1 (100 °C, AN20 %)	Lot 2 (80 °C, AN20 %)	Lot 3 (100 °C, AN30 %)	Lot 4 (80 °C, AN30 %)
クロルピリホス	0.058±0.001	0.061±0.002	0.055±0.0002	0.058±0.001
ダイアジノン	0.226±0.001	0.271±0.003	0.217±0.002	0.244±0.007
フェニトロチオン	0.149±0.001	0.156±0.002	0.137±0.0006	0.143±0.004
マラチオン	0.133±0.005	0.135±0.005	0.147±0.003	0.152±0.004

表3 SFE法によって得られた残留農薬検査用ほうれんそう試料中の農薬濃度
(平均値±標準偏差, n=3, mg/kg)

対象農薬	Lot 1 (100 °C, AN20 %)
クロルピリホス	0.060±0.003
ダイアジノン	0.225±0.006
フェニトロチオン	0.148±0.006
マラチオン	0.131±0.004

表4 一斉試験法の分析結果を基にしたほうれんそう試料調製時の回収率
(平均値, n=3, %)

対象農薬	Lot 1 (100 °C, AN20 %)	Lot 2 (80 °C, AN20 %)	Lot 3 (100 °C, AN30 %)	Lot 4 (80 °C, AN30 %)
クロルピリホス	57.9	61.2	55.0	57.6
ダイアジノン	56.5	67.7	54.2	61.0
フェニトロチオン	74.3	78.0	68.4	71.4
マラチオン	66.6	67.4	73.6	76.2

表5 均質性評価試験における s_{bb} と u_{bb} (相対値)

対象農薬	s_{bb}	u_{bb}
クロルピリホス	0.00450	0.00583
ダイアジノン	0.00776	0.00369
フェニトロチオン	—	0.00705
マラチオン	—	0.00754

表6 玄米試料中農薬の安定性評価 (平均値±標準偏差, n=3, mg/kg)

対象農薬	分析日: 2022/8/15	分析日: 2023/7/26
クロルピリホス	0.062±0.0001	0.061±0.001
ダイアジノン	0.191±0.001	0.186±0.003
フェニトロチオン	0.130±0.001	0.130±0.001
マラチオン	0.122±0.001	0.125±0.003

表7 IDMSによる玄米試料中農薬の精確な参照値 (mg/kg)

対象農薬	参照値±拡張不確かさ
クロルピリホス	0.065±0.004
ダイアジノン	0.217±0.012
フェニトロチオン	0.138±0.008
マラチオン	0.138±0.008

(参照値の不確かさは、合成標準不確かさと包含係数 $k=2$ から決定された拡張不確かさであり、約95 %の信頼の水準をもつと推定される区間を示す)

表8 参加機関の分析結果から算出した参照値 (mg/kg)

対象農薬	参照値±NIQR
クロルピリホス	0.067±0.007
ダイアジノン	0.209±0.021
フェニトロチオン	0.140±0.016
マラチオン	0.141±0.021

(参照値には中央値を用いた。またNIQRは、正規四分位数範囲を示す)

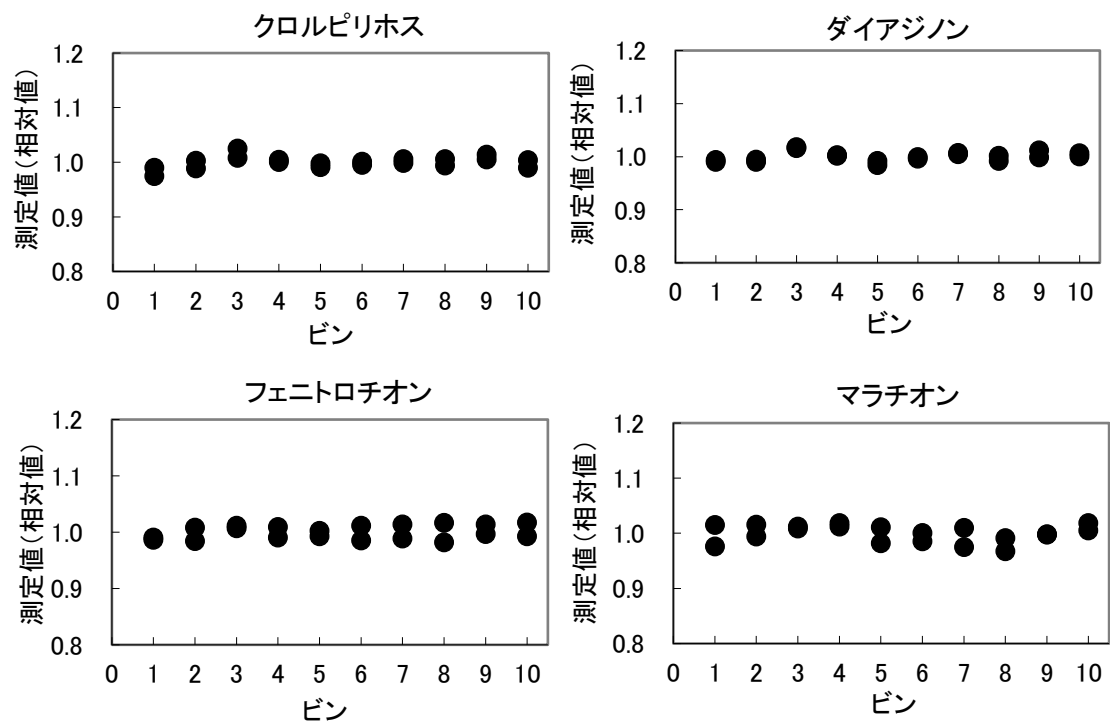


図1 均質性評価試験の結果