

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(齊藤)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

食品中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化された試料を調製し、分析に供する必要がある。また、試料調製中に農薬等が分解することにより濃度が低下する場合、残留濃度を過小評価する可能性があるため、試料調製中の農薬等の減少を抑制することも重要である。本研究では、適切な試料調製方法及び試料の均質性を評価する指標の提案を目的とし、以下の2点について検討を行った。

[1]農産物を対象とした試料の均質性が分析結果に与える影響の評価と均質性評価指標の提案
均質化状態及び試料秤取量が残留農薬分析に与える影響を評価し、試料均質化状態の評価方法及び指標を設定することを目的に、農薬を散布して栽培したブロッコリーを用いて粗大な固形物が残存する粗粉碎試料、固形物が微細な微粉碎試料及び凍結粉碎試料を調製し検討を行った。その結果、均質化が不十分で粗大な固形物を多く含む粗粉碎試料での分析値は微細な均質化試料よりも低くなる傾向が確認された。特にマラチオンは、粗粉碎試料で顕著に分析値が低くなった。この傾向は、果菜類のトマト（令和4年度）及び葉菜類のハウレンソウ（令和5年度）の結果とも合致した。各農薬での分析値の変動は10%以下と小さく、均質化の程度及び秤取量が与える影響は不明瞭であったものの、微粉碎試料の20g秤取時の分析値を基準とした相対濃度の全農薬での変動を用いて評価したところ、分析値の変動と秤取量の間には負の相関関係が確認され、秤取量が少なくなるほど変動が大きくなることが確認された。試験用篩を用いた試料均質性の評価では、微細に均質化された試料は目開き1mm篩を約90%通過可能であった。トマト及びハウレンソウと同様であったことから、これが十分な均質化状態の目安となると考えられた。

[2]畜水産物における適切な試料調製方法の提案と凍結粉碎法の有用性の検証

残留農薬等検査においては、常温磨砕法により試料調製を行うことが多い。しかし、常温磨砕法では、一部の農薬等が試料中の酵素やその他の試料成分との反応等により分解し、濃度が低下することが知られている。これに対し、凍結粉碎法による試料調製では試料温度を低温に保つことができるため、農薬等の分解を抑制できる可能性が高い。本研究では、牛及び豚の肝臓に農薬等を添加後、常温磨砕法または凍結粉碎法により試料調製し、回収率を比較することで、凍結粉碎法による農薬等の減少抑制効果を検証した。その結果、常温磨砕法では酵素や試料成分との反応等により減少しやすい農薬等においても、凍結粉碎法を用いることで減少を抑制できる場合があることが示された。一般に、分析法の妥当性を添加回収試験により評価する際は、試料調製から抽出までの間に生じる農薬等の減少を考慮して評価するため、農薬等を添加後30分間放置した後に抽出操作を開始する。しかし、本検討結果から、均質化後の試料に添加し30分間放置した場合よりも、試料調製中に生じる農薬等の減少の方が大きくなる場合があることが示された。このため、添加回収試験において良好な回収率が得られたとしても、実際の検査においては残留濃度を過小評価する可能性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

国立医薬品食品衛生研究所 非常勤職員 齋藤 真希

A. 研究目的

食品中に残留する農薬等の分布は不均一であることから、精確な分析結果を得るためには、十分に均質化された試料を調製し、分析に供する必要がある。また、試料調製中に農薬等が分解等により減少する場合、残留濃度が過小評価されるおそれがあるため、試料調製中の農薬等の減少を抑制することも重要である。そこで本課題では、適切な試料調製方法及び試料の均質性の評価指標を提案することを目的として、以下の2点について検討を行った。

[1] 農産物を対象とした試料の均質性が分析結果に与える影響の評価と均質性評価指標の提案

試料の均質化状態及び試料秤取量が残留農薬分析に与える影響を評価し、さらに試料均質化状態の評価指標を設定することを目的とした。令和4年度は果菜類のトマト、令和5年度は葉菜類のホウレンソウを供試作物とした^{1,2)}。トマトにおいて、作物の不十分な均質化は分析値の正確度及び精度を低下させる可能性が示唆され、試料秤取量が少ないほどその影響は大きくなる傾向を確認した。ホウレンソウにおいても同様の傾向が確認されたが、トマトと比較して均質化状態及び秤取量の少量化が分析結果に与える影響は小さかった。また、両作物ともに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 篩に負荷した際の通過率が90%となることが目安となると考えられた。本年度は、トマト及びホウレンソウと形質が異

なる花野菜であるブロッコリーを供試作物として、同様の調査を実施した。

[2] 畜水産物における適切な試料調製方法の提案と凍結粉碎法の有用性の検証

畜産物において、凍結粉碎法による試料調製が農薬等の減少抑制に有効であるかを検証することを目的とした。残留農薬等検査においては、一般に常温磨砕法により試料調製が行われているが、一部の農薬等は試料調製の際に分解等により濃度が低下し、過小評価の原因となることが知られている。試料調製中の損失の主な要因には、試料成分への吸着、酵素や他の試料成分との反応による分解、光分解、揮散などがある。このうち、吸着や分解を抑制する方法としては、酸(リン酸、塩酸等)や緩衝液、抗酸化剤などを添加して試料調製する方法があるが、一斉分析法においては他の農薬等の安定性への影響や抽出効率の低下等が懸念される。一方、ドライアイスや液体窒素を用いた凍結粉碎によって試料調製する方法は、他の農薬等の安定性や抽出効率に影響することなく、試料調製中の農薬等の分解等を抑制できる可能性が高い。そこで本研究では、常温磨砕法によって生じる農薬等の減少が、凍結粉碎法によってどの程度抑制されるかを検討し、凍結粉碎法の有用性を検証した。

B. 研究方法

[1] 農産物を対象とした試料の均質性が分析結果に与える影響の評価と均質性評価指標の提案

1. 圃場試験の概要

供試試料は日本植物防疫協会 茨城研究所にて、ブロッコリー(品種:ハイツ SP)を露地栽培した。供試農薬製剤7種ならびにその有効成分名、含有率、散布液の希釈率をTable 1に示す。各農

薬製剤は 2024 年 10 月 27 日及び 11 月 4 日に 300 L/10 a 相当量をブロッコリーに 2 回混用散布した。最終散布 1 日後の 11 月 5 日に約 6 kg (279 g/個) の試料 (処理区試料) を収穫し、分析機関である残留農薬研究所に冷蔵便で速やかに送付した。なお、11 月 6 日に農薬を散布せずに栽培した約 2.5 kg の試料 (無処理区試料) を収穫し、分析機関に送付した。なお、本試験試料は、農薬製剤ラベル表示に準拠しない使用方法で農薬が散布された調査研究用試料である。

2. 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(大阪府)

イミダクロプリド標準品： 99.1%，富士フイルム和光純薬株式会社(大阪府)

マラソン標準品： 96.4%，富士フイルム和光純薬株式会社(大阪府)

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(大阪府)

フルフェノクスロン標準品： 97.90%，Dr. Ehrenstorfer (Germany)

フルベンジアミド標準品： 99.6%，富士フイルム和光純薬株式会社 (大阪府)

ペルメトリン標準品： 99.73%，Dr. Ehrenstorfer(Germany)

3. 供試試料

作物名： ブロッコリー

分析部位： 花蕾 (葉を除去したもの)

4. 残留分析方法

4.1 試薬及び機器

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，東京都)

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/NH₂ 積層ミニカラム：

ENVI-CARB/LC-NH₂, 500 mg/500 mg/6 mL(シグマアルドリッチジャパン 合同会社，東京都)

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

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，東京都)

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，京都府)，
Triple Quad 4500 (AB Sciex, USA)

データ処理装置： Analyst (AB Sciex)

4.2 機器及び装置の操作条件

4.2.1. 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

4.2.2. 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：ジノテフラン，マラチオン，
イミダクロプリド，ダイアジノン，
フルフェノクスロン，ペルメトリン

負モード： フルベンジアミド
イオンスプレー電圧： 正モード：5500 V，

負モード: -4500 V

イオン化温度: 650°C

コリジョンガス: N₂

イオン検出法: MRM 法

MS パラメーターを Table 2 に示す。

4.3. 標準溶液の調製

4.3.1 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、フルベンジアミド及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。

4.3.2 検量線用標準溶液及び検量線の作成

1) イミダクロプリド、マラチオン、ダイアジノン及びフルベンジアミド (溶媒検量線)

4.3.1 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 及び 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、ダイアジノン及びフルベンジアミド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及びペルメトリン (マトリックス検量線)

4.3.1 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 及び 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 及び 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

釈した任意の農薬無添加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

クスロン及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。

4.4. 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。

4.4.1 抽出

均質化試料 (1.00, 2.00, 5.00, 10.0 及び 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。

4.4.2. GCB/NH₂ 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/NH₂ 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。

4.4.3. 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、抽出液及び試験溶液は冷蔵暗所に保管した。

4.5. 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 及び分析試料の最高検出濃度を超える 5 mg/kg (ジノテフラン, イマダクロプリド, マラチオン, フルフェノクスロン, フルベンジアミド及びペルメトリン) または 15 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。

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

市販品ブロッコリー約 1 kg を蕾と茎に切り分けた。蕾は約 3×3 cm に細切り、茎は縦に 4 分割した後、約 2 cm に細切した。それらをミキサーに移し、常温条件で 0.5, 1, 2 及び 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. 凍結粉碎試料の調製

市販品ブロッコリー約 1 kg を 5.1 項を同様の方法で蕾と茎に分けて細切した後、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) を粉碎しパウダー状にし、凍結したブロッコリー試料に加え混合した。添加したドライ

アイス量は、既報^{3, 4)}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。ドライアスを混合した凍結ブロッコリー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。凍結粉碎後の試料を 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 晩かけてドライアスを昇華した。なお、ミキサーの外表面には断熱材を巻き、試料秤取用の器具及びビーカーは予冷したものを使用した。また、凍結したブロッコリー試料 (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

市販のブロッコリー約 1 kg を 5.1 項を同様の方法で蕾と茎に分けて細切した後、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』及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. 微粉碎試料及び凍結粉碎試料

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。

$$\text{通過率 (\%)} = (\text{試料負荷重量} - \text{残渣重量}) / \text{試料負荷重量} \times 100$$

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、微粉碎試料及び凍結粉砕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 及び 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。なお、全ての試料はスパーテルを用いて秤取し、凍結粉砕試料秤取時は、予冷したものを使用した。

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及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。

7. 部位別の残留濃度の比較

圃場施設で栽培した処理区試料 1.2 kg を 5.1 項と同様の方法で蕾と茎に分けて細切し、それぞれの部位ごとの重量を測定した。各部位ごとにミキサーで 4 分間均質化した後、各均質化試料の中層

から、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。

[2] 畜水産物における適切な試料調製方法の提案と凍結粉砕法の有用性の検証

1. 試料

牛の筋肉(オーストラリア産)、牛の肝臓(国産)及び豚の肝臓(国産)はインターネットを介して購入した。

2. 試薬及び試液

(1) 有機溶媒及び試薬

アセトニトリル、ヘキサンは関東化学製の残留農薬試験用、水、メタノール及びアセトニトリル(LC-MS/MS 測定用)は関東化学製の LC/MS 用を用いた。無水硫酸ナトリウムは富士フイルム和光純薬製の残留農薬試験用、酢酸は富士フイルム和光純薬製の精密分析用、ギ酸は富士フイルム和光純薬製の特級を用いた。

(2) 固相ミニカラム

固相ミニカラムは、オクタデシルシリル化シリカゲル(ODS)ミニカラム Smart-SPE C18-50(充填剤量 50 mg) 及び Smart-SPE C18-30(充填剤量 30 mg) (いずれもアイステイサイエンス製)を用いた。

3. 装置

磨砕装置は Robot Coupe BLIXER-3D(エフ・エム・アイ製)を用いた。ホモジナイザーは Polytron PT 10-35 GT(Kinematica 製)を用いた。振とう機は SR-2DW(タイテック製)、遠心分離機はフロア型冷却遠心機 S700FR(久保田商事製)を使用した。自動前処理装置は残留農薬分析用自動前処理装置 ST-L400(アイステイサイエンス製)を使用した。

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 2000 V; ヒーター温度 450°C(300°C); カーテンガス N₂, 35 psi; ネブライザーガス ドライエアー, 70 psi; ターボガス ドライエアー, 80 psi; コリジョンガス N₂, 7

(2)LC 条件

カラム Inertsustain AQ-C18(内径 2.1 mm, 長さ 100 mm, 粒子径 1.9 µm, ジーエルサイエンス製); カラム温度 40°C; 注入量 2 µL; 移動相 0.1%gls ギ酸(A 液)及び 0.1%ギ酸・アセトニトリル溶液(B 液); 流速 0.3 mL/min; グラジエント条件 0 分(A:B=98:2)→15 分(A:B=30:70)→15.01 分(A:B=5:95)→20 分(A:B=5:95)→20.01 分(A:B=98:2)

5. 試験溶液の調製

(1)抽出

抽出は, 通知一斉試験法「LC/MS による動物用医薬品等の一斉試験法I(畜水産物)」に従って以下のように行った。

試料 10.0 g に *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 50 mL, *n*-ヘキサン 50 mL 及び酢酸 1 mL を加え, 約 1 分間ホモジナイズした後, 無水硫酸ナトリウム 20 g を加えてさらに約 1 分間ホモジナイズした。毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離した後, *n*-ヘキサン層を捨て, アセトニトリル層を採った。残留物にアセトニトリル 50 mL を加えて約 1 分間ホモジナイズし, 上記と同様に遠心分離した。アセトニトリル層を採り, 先のアセトニトリル層と合わせ, アセトニトリルを加えて正確に 100mL(抽出液)とした。抽出液をバイアルに入れ, 自動前処理装置にセットした。

(2)自動前処理装置を用いた精製

精製は分担課題 2「公示試験法の精製操作の簡便化・迅速化及び自動化に向けた検討」で開発した自動前処理装置を用いた方法で行った。(た

だし, 2 段目の C₁₈ミニカラムは充填剤量 30 mg のものを用いた。)

C₁₈(50 mg)ミニカラムの下に C₁₈(30 mg)ミニカラムをノズルを挟んで連結し, アセトニトリル 1 mL でコンディショニングした。次に, ノズルから水 0.2 mL を注入しながら, アセトニトリル/水(9:1)1 mL でコンディショニングした。この連結カラムに抽出液 2 mL を負荷した。このとき, ノズルから水 0.4 mL を注入し, 一段目のミニカラムからの溶出液を希釈して二段目のミニカラムに負荷した。ノズルから水 0.2 mL を注入しながら, アセトニトリル/水(9:1)0.5 mL を注入し, 一段目のミニカラムからの溶出液を希釈して二段目のミニカラムに負荷し, 溶出した。得られた溶出液を 0.1 vol%ギ酸で 4 mL に定容し, 試験溶液とした。感度が十分得られる場合は 10 倍希釈して測定を行った。

6. 農薬等の添加後放置時間の回収率への影響の検討

牛の筋肉, 牛の肝臓及び豚の肝臓の常温磨砕試料を用いて, 農薬等の添加後放置時間の回収率への影響を以下のように検討した。検討対象は Table 6 に示した 65 化合物とした。

牛の筋肉, 牛の肝臓及び豚の肝臓の各検体 500 g を 2 分間常温磨砕法により均質化した。得られた試料 10.0 g を量り採り(3 個), 標準溶液 1 µg/mL を 1 mL 添加した。これを室温で 0, 15, 30 及び 60 分放置後, 「5. 試験溶液の調製」に従って分析を行った。定量はマトリックス検量線法により行った。

7. 試料温度の回収率への影響の検討

常温試料における回収率は, 「6. 農薬等の添加後放置時間の回収率への影響の検討」で得られた放置時間 30 分の結果を用いた。

凍結試料における回収率は次のように求めた。牛の筋肉, 牛の肝臓及び豚の肝臓の各検体 500 g

(約 100 g を 5 個)を粉砕機に入れ、ドライアイス 300 g を加えて直ちに 10 秒間粉砕した。これに、さらにドライアイス 300 g を加えて直ちに 10 秒間粉砕した。その後、さらにドライアイス 150 g を加えて直ちに 100 秒間粉砕した。(ドライアイスの合計使用量は検体重量の約 1.5 倍量(約 750 g), 粉砕時間は合計 2 分間)得られた試料を PP 容器(250 mL 容)に入れ、蓋を緩めた状態で冷凍庫に入れて一晩静置し、ドライアイスを気化させた。試料 10.0 g を量り採り(3 個), 標準溶液 1 $\mu\text{g/mL}$ を 1 mL 添加した。これを冷凍庫で 30 分間放置後、「5. 試験溶液の調製」に従って分析を行った。定量はマトリックス検量線法により行った。

8. 試料調製方法による回収率への影響の検討

(1)凍結粉砕法

粉砕機の容器に検体を正確に 500 g(約 100 g を 5 個程度)になるように量り入れた。検体に混合標準溶液(0.05 mg/mL)を 1 mL 及び Cefapirin 標準溶液(0.1 mg/mL)0.5 mL を添加後、ドライアイス 300 g を加えて直ちに 10 秒間粉砕した。これに、さらにドライアイス 300 g を加えて直ちに 10 秒間粉砕した。その後、さらにドライアイス 150 g を加えて直ちに 100 秒間粉砕した。(ドライアイスの合計使用量は検体重量の約 1.5 倍量(約 750 g), 粉砕時間は合計 2 分間)得られた試料を PP 容器(250 mL 容)に入れ、蓋を緩めた状態で冷凍庫に入れ一晩静置し、ドライアイスを気化させた。試料 10.0 g を量り採り(5 個), 「5. 試験溶液の調製」に従って分析を行った。なお、定量はマトリックス検量線法により行った。

(2)常温磨砕法

粉砕機の容器に検体を正確に 500 g(約 100 g を 5 個程度)になるように量り入れた。検体に混合標準溶液(0.05 mg/mL)を 1 mL 及び Cefapirin 標準溶液(0.1 mg/mL)0.5 mL を添加後、2 分間常温磨

砕法により均質化した。得られた試料 10.0 g を量り採り(5 個), 「5. 試験溶液の調製」に従って分析を行った。なお、農薬等を添加後、抽出溶媒を加えるまでの時間は 30 分であった。なお、定量はマトリックス検量線法により行った。

C. 研究結果及び考察

[1]農産物を対象とした試料の均質性が分析結果に与える影響の評価と均質性評価指標の提案

1. 圃場試験の概要

茨城県で露地栽培されたブロッコリーに 7 種の農薬製剤を 2 回混用散布した後、最終散布 1 日後に採取した花蕾を供試試料とした。試料受領時に撮影した作物写真を Fig. 1 に示す。供試試料の平均個体重量は約 279 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。

2. 分析法の妥当性評価

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。

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。

2.3. 回収率

回収率の算出結果を Table 3 に示す。市販品の微粉砕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、89～109%であり、その併行相対標準偏差 (RSDr) は 6%以下であった。0.5 mg/kg 添加試料での平均回収率は、87～104%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、フルベンジアミド及びペルメトリンの 5 mg/kg 添加試料での平均回収率は、84～109%であり、RSDr は 10%以下であった。ダイアジノンの 15 mg/kg 添加試料での平均回収率は、109%であり、RSDr は 5%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。なお、マトリックス効果が－12～－32%認められたジノテフラン、フルフェノクスロン及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 (Table 4 参照)。

3. 試料均質化状態の評価

3.1. 均質化時間及び均質化温度の比較

常温でのミキサー稼働時間別のブロッコリー均質化状態を Fig 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、繊維質が多く硬い茎より、比較的柔らかい蕾の方が短時間の均質化でも微細になりやすいことを確認した。これら観察結果から、0.5 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。

凍結粉碎したブロッコリー試料の調製作業時及び解凍時における状態を Fig 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－11.2℃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℃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℃であった。冷凍庫内でのドライアイス昇華

後では－18.1℃まで上昇した。均質化後の試料は－50℃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。

3.2. 均質化評価用試験篩の目開き及び通過手法の比較

ヘラ処理及び流水洗浄処理による篩通過時の様子を Fig 4、ヘラ処理及び流水洗浄処理後における篩上試料の状態を Fig 5、各均質化試料のヘラ処理及び流水洗浄処理における目開き 1 mm または 2 mm 篩の平均通過率を Fig 6、異なる 2 名の作業員間の通過率の差を Fig 7 に示す。

均質化したブロッコリー試料のヘラ処理後における平均通過率 (作業員間の通過率の差) は、粗粉碎試料の 1 mm 篩で 7% (4%)、2 mm 篩で 36% (8%)、微粉碎試料の 1 mm 篩で 41% (10%)、凍結粉碎試料の 1 mm 篩で 19% (6%) であった。流水洗浄処理における平均通過率 (作業員間の通過率の差) は、粗粉碎試料を 2 mm 篩、微粉碎試料を 1 mm 篩、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 81% (0%)、89% (1%)、94% (0%) となった。一方、粗粉碎試料の 1 mm 篩負荷時では、洗浄時間 8 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結果である。この現象は粗粉碎試料の 2 mm 篩での洗浄時間 1 分間でも生じているが、洗浄時間 2 分間以降では篩上の試料が篩を通過し、平均通過率は増加している。このことから、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篩の目詰まりは生じに

くいと考えられる。その後、洗浄 9 分以降で通過率は正の値を示し、最終的に洗浄時間 10 分間での平均通過率は 5% (2%) となった。

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 篩及び微粉碎試料及び凍結粉碎試料の 1 mm 篩における平均通過率は、ヘラ処理よりも最終洗浄時間での流水洗浄処理で 45%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等へ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 (Fig 5)。しかし、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 2%とわずかであり、流水洗浄処理よりもヘラ処理で高くなった。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、2 名の作業員間での通過率の差は、ヘラ処理では 4~10%であるのに対して、流水洗浄処理では 0~2%と小さかった (Fig 7)。したがって、一定流速の流水を用いた処理では作業員によって差が生じにくいことが示唆された。

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 1 mm 未満の微細な残渣を正確に通過させることが可能であり、異なる作業員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。そして、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 89%、凍結粉碎試料で 94%であることから、微細に均質化された試料は参考規定^{5,6)}で示される目開き 1 mm 篩を約 90%通過可能であった。

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 Table 5 に示す。平均濃度は、粗粉碎、微粉碎及び凍結粉碎試料において、ジノテフランで 1.70~1.77, 1.94~2.03 及び 1.80~1.88 mg/kg, イミダクロプリドで 1.72~1.86, 1.96~2.03 及び 1.85~1.94 mg/kg, マラチオンで 0.48~0.51, 0.76~0.80 及び 0.70~0.74 mg/kg, ダイアジノンで 6.47~6.88, 6.90~7.63 及び 6.61~7.12 mg/kg, フルフェノクスロンで 0.42~0.45, 0.45~0.53 及び 0.42~0.50 mg/kg, フルベンジアミドで 1.78~1.84, 1.98~2.09 及び 1.66~1.74 mg/kg, ペルメトリンで 1.50~1.56, 1.53~1.82 及び 1.40~1.73 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⁷⁾。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^{8,9)}。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、微粉碎試料での 20 g 秤取時の平均濃度に対する各農薬及び 7 種農薬全体での平均相対濃度を Fig 8 に示す。

各農薬における平均相対濃度は、微粉試料>凍結粉碎試料>粗粉碎試料の順で低くなる傾向を示した。特に、粗粉碎試料におけるマラチオンでは、微粉試料及び凍結粉碎試料よりも顕著に低くなった。マラチオンの相対濃度が、粗粉碎試料において低くなる傾向は、トマト及びホウレンソウを供試作物とした場合にも確認されている^{1,2)}。さらに、7 種農薬全体で評価した際の平均相対濃度も個別農薬と同様に微粉試料>凍結粉碎試料>粗粉碎試料の順で低くなる傾向を示した。

粗粉碎試料、微粉碎試料及び凍結粉碎試料における各農薬の分析値の変動 (RSD 値) を Fig 9 に示す。RSD 値は、どの試料でも 10%以下であり、

均質化の程度及び秤取量が与える影響は不明瞭であった。そこで、包括的な変動評価を実施するために、各農薬の検体 20 g 秤取時の分析値で補正した相対濃度の全農薬での総平均 RSD 値を算出した (Fig. 10)。総平均 RSD 値は、微粉試料 < 凍結粉碎試料 < 粗粉碎試料の順に大きくなる傾向を示し、微粉試料及び凍結粉碎では秤取量が少なくなるほど大きくなった。

5. 遠心分離後の沈殿物と上澄み液の比較

分取した粗粉碎試料及び微粉試料をそれぞれ遠心分離したが、沈殿と上澄み液に分離しなかったため、両画分中における農薬濃度の分別分析は実施できなかった。これまでの研究に供試したトマト及びハウレンソウの水分含有率は、それぞれ 94.0%及び 92.4%であるのに対してブロッコリーでは 86.2%と低い¹⁰⁾。そして、ブロッコリーの組織体は比較的保水性が高く、均質化の過程で細胞外に溶出する水分量が少ないため、遠心分離による分別が困難であったと考えられる。

6. 部位別の残留濃度の比較

各部位での農薬濃度にそれぞれの部位の重量を乗じて重量に換算した。農薬重量の各部位での比率から、ブロッコリーの 1 個体における各部位への農薬分布率を算出した (Fig. 11)。蕾と茎の重量比は 43:57 であり、個体中では茎の占める割合が蕾よりもわずかに多かった。一方で、各農薬の分布率は、蕾において 98~100%となり、農薬の種類に関わらずほとんどが蕾に分布していた。ブロッコリーは蕾が傘状で、且つ葉が茎を覆う形状であり、散布された農薬は主に蕾と葉部に付着し、茎には付着しなかったと考えられる。この結果より、高濃度で農薬が残留する蕾の分析試料への秤取割合が、分析値の変動に影響を与えと考えられる。

[2] 畜水産物における適切な試料調製方法の提

案と凍結粉碎法の有用性の検証

1. 農薬等の添加後放置時間の回収率への影響

常温磨砕法により調製した試料中で農薬等がどの程度減少するかを検討するため、牛の筋肉、牛の肝臓及び豚の肝臓の常温磨砕試料に農薬等を添加後、室温で放置し、放置時間による回収率への影響を検討した。添加後の放置時間は 0, 15, 30, 60 分とした。検討対象化合物は Table 6 に示した 65 化合物とした。いずれの化合物も抽出液に添加した場合の回収率は 80%以上であり、精製以降の操作での損失はほとんどないものと考えられた。結果を Table 6 及び Fig. 13~Fig. 15 に示す。放置時間 30 分で回収率が 70%未満となった化合物は、牛の筋肉では 4 化合物、牛の肝臓では 12 化合物、豚の肝臓では 14 化合物であり、いずれかの食品で 70%未満となった化合物は 16 化合物であった。このうち、Carbaryl, Fenobucarb, Propoxur 及び Sulfantran は、牛の肝臓では 30 分後の回収率が 75%以上であったのに対し、豚の肝臓ではいずれも 50%未満となった。一方、Sulfaquinolaxline は、豚の肝臓では 79%の回収率を示したが、牛の肝臓では 47%と低値になった。これらの結果から、牛と豚の肝臓では試料中の酵素やその他の成分の違いにより、農薬等の分解等のしやすさが異なることが示唆された。いずれかの食品で 30 分後の回収率が 70%未満となった 16 化合物のうち、放置時間 0 分と 30 分の回収率に有意差 (Benjamini-Hochberg 法による FDR (false discovery rate) 補正後の q 値 < 0.01) が認められた化合物は、牛の筋肉ではなかったが、牛の肝臓では 8 化合物、豚の肝臓では 14 化合物であった。これらの化合物は放置時間中に試料中の酵素やその他の試料成分との反応等により減少したものと考えられた。一方、牛筋肉中の Cefapirin や Neospiramycin 等、放置時間 0 分と 30 分の回収率に有意差が認められな

かった化合物は添加直後に分解等が生じたか、抽出操作中の損失が考えられた。

2. 試料温度の回収率への影響

試料温度が回収率に与える影響を評価するため、常温磨砕により調製した試料(常温試料)及び凍結粉碎により調製した試料(凍結試料)に農薬等を添加し、それぞれ室温または-30℃で 30 分間放置後、抽出操作を開始し、得られた回収率を比較した。牛の筋肉の結果を Fig. 16 に示す。常温試料で回収率が 70 % 未満となった化合物は Cefapirin , Neospiramycin , Spiramycin 及び Tylosin であったが、いずれも凍結試料の回収率との有意な差($q < 0.01$)は認められなかった。このため、これらの化合物は試料を低温にしても回収率の低下を抑制することは困難であると考えられた。

牛の肝臓の結果を Fig. 17 に示す。常温試料で回収率が 70 % 未満となった化合物のうち、Ethopabate , Josamycin , Leucomycin A5 , Neospiramycin , Spiramycin , Sulfaquinoxaline , Tetrachlorvinphos 及び Tylosin は、いずれも凍結試料の回収率と有意な差($q < 0.01$)が認められ、試料を低温にすることにより回収率が向上した。しかしながら、常温試料で回収率が 70 % 未満となった化合物のうち、Cefapirin , Di-*n*-propyl isocinchomeronate , Neospiramycin , Spiramycin 及び Tylosin は凍結試料においても回収率が 70 % 未満にとどまったことから、一部の化合物では試料を低温にしても、回収率の低下を完全には抑制することはできないことが示唆された。

豚の肝臓の結果を Fig. 18 に示す。牛の肝臓と同様に、常温試料で回収率が 70 % 未満となった化合物のうち、2-Acetylamino-5-nitrothiazole , Azamethiphos , Cefapirin , Fenobucarb , Josamycin , Leucomycin A5 , Neospiramycin , Propoxur , Spiramycin , Sulfantran , Tetrachlorvinphos 及び

Tylosin は、いずれも凍結試料の回収率と有意な差($q < 0.01$)が認められ、試料を低温にすることにより回収率が向上した。しかしながら、常温試料で回収率が 70 % 未満となった化合物のうち、Cefapirin , Di-*n*-propyl isocinchomeronate , Leucomycin A5 , Neospiramycin , Spiramycin 及び Tylosin は凍結試料においても回収率が 70 % 未満にとどまったことから、牛の肝臓と同様に、一部の化合物では試料を低温にしても、回収率の低下を完全には抑制できないことが示唆された。

以上の結果から、牛及び豚の肝臓においては一部の農薬を除き、試料温度を下げることにより、放置中に生じる農薬等の減少を抑制できることが示された。したがって、凍結粉碎法による試料調製を行えば、試料調製中の農薬等の減少を抑制できる可能性が高いことが示唆された。

3. 試料調製方法による回収率への影響

凍結粉碎法による試料調製の農薬等の減少抑制効果を検証するため、試料調製前の検体(牛及び豚の肝臓)に農薬等を添加後、凍結粉碎法または常温磨砕法により試料調製し、得られた回収率を比較した。検討対象化合物は、「2. 試料温度の回収率への影響」で、牛または豚の肝臓において常温試料で低回収率($> 70\%$)となった化合物の中から 11 化合物(Group 1)及びいずれの食品においても良好な回収率($> 70\%$)が得られた化合物の中から 10 化合物(Group 2)を選定した(Table 7 及び Table 8)。なお、常温磨砕法の場合は、検体に農薬等を添加後、抽出操作を開始するまでの時間が 30 分となるようにした。牛の肝臓の結果を Fig. 19 及び Table 7、豚の肝臓の結果を Fig. 20 及び Table 8 に示した。Group 2 の農薬等については、常温磨砕法及び凍結粉碎法のいずれで試料調製を行っても $> 70\%$ の回収率が得られ、試料調製中の大きな減少は見られなかった。一方、Group 1

の農薬等では、常温磨砕法で試料調製を行うと回収率が 70%以下となり、ほとんどの農薬等において「2. 試料温度の回収率への影響」で常温試料に添加した場合と比較して回収率が低下した (Table 9)。これは農薬等を試料調製前に添加したことで、試料中の酵素や試料成分と接触しやすくなり、分解等が進行したためと考えられた。凍結粉砕法で試料調製した場合も、Group 1 の一部の農薬等では凍結試料に添加した場合と比べて回収率が低下した (Table 10)。例えば、牛の肝臓における Azamethiphos, Ethopabate 及び Tetrachlorvinphos, 豚の肝臓中の Azamethiphos 及び Propoxur では、凍結試料に添加した場合の回収率は 86%以上であったのに対し、試料調製前に農薬等を添加した場合の回収率は 70%未満であった。一般に、農薬等の分析法の妥当性を添加回収試験によって評価する際には、試料調製から抽出開始までの間に生じる減少を考慮して評価するため、農薬等を試料に添加後、30 分間放置した後に抽出を開始する方法が用いられる。しかし、本検討結果から、均質化後の試料に農薬等を添加して 30 分間放置した場合よりも、試料調製中の減少の方が大きい場合があることが示された。したがって、添加回収試験で良好な回収率が得られた方法を用いても、実際の検査においては残留濃度を過小評価する可能性があると考えられた。

牛の肝臓中の 2-Acetylamino-5-nitrothiazole, Carbaryl, Fenobucarb, Propoxur 及び Sulfantran, 豚の肝臓中の 2-Acetylamino-5-nitrothiazole, Carbaryl, Ethopabate, Fenobucarb, Sulfantran 及び Tetrachlorvinphos は、検体に添加後、常温磨砕法により試料調製した場合、低回収率 (70%未満) であったが、凍結粉砕法により試料調製することによって回収率が 70%以上となり、統計的な有意差 ($q < 0.01$) が認められた。

一方、牛の肝臓中の Tetrachlorvinphos 及び豚の肝臓中の Propoxur は、凍結粉砕法により回収率が改善したものの、回収率は 60%台であり、十分に減少を抑制することはできなかった。また、牛の肝臓中の Azamethiphos, Cefapirin, Di-n-propyl isocinchomeronate, Ethopabate 及び Tylosin, 豚の肝臓中の Azamethiphos, Cefapirin, Di-n-propyl isocinchomeronate 及び Tylosin は凍結粉砕法においても回収率が 40%未満であり、試料調製中の減少を抑制することができなかった。これらは Azamethiphos (牛及び豚の肝臓) 及び Ethopabate (牛の肝臓) を除き、凍結試料に添加した場合も低回収率であり、抽出液に添加した場合はいずれの化合物も回収率が良好 ($> 80\%$) であったことから、Azamethiphos 及び Ethopabate を除き、試料調製中に加え、抽出操作中においても損失が生じている可能性が考えられた。特に、極性が高い Cefapirin は抽出溶媒であるアセトニトリルやヘキサンへの溶解性が低く、牛の筋肉の凍結試料に添加した場合も低回収率となったことから (Fig. 16), 抽出段階での損失が低回収率の主原因であることが示唆された。

以上の結果から、牛及び豚の肝臓において、常温磨砕法による試料調製では農薬等が酵素や試料成分との反応等により減少しやすい化合物であっても、凍結粉砕法による試料調製を行うことで減少を抑制できる場合があることが示された。ただし、凍結粉砕のみでは減少を十分に抑制できない化合物も存在するため、試料調製方法や抽出条件の検討を含めた対応が必要であると考えられた。

D. 結論

[1] 農産物を対象とした試料の均質性が分析結果に与える影響の評価と均質性評価指標の提案

農薬を散布して栽培したブロッコリーを用

いた調査の結果、均質化が不十分で粗大な固形物を多く含む試料での分析値は相対的に低くなった。特にマラチオンでは、他の均質化試料と比較して顕著に低くなった。この傾向は、トマト及びホウレンソウを供試試料とした研究結果とも一致することから、不十分な均質化が分析結果に与える影響は、農薬の種類によって異なることが確認された。このように均質化の影響を受けやすい農薬については、試料の不十分な均質化が、残留農薬濃度の過小評価リスクを招くことが示唆された。

これまで調査結果から、分析値の変動は、ホウレンソウ<ブロッコリー<トマトの順に大きくなり、変動の大小は作物種により異なることが確認された (Fig 12)。また、均質化の程度に関わらず、秤取量と分析値の変動は負の相関関係を示し、秤取量が少ないほど変動が大きくなることが確認された。そして、各均質化試料の篩通過率から、微細に均質化した試料の約90%が目開き 1 mm 篩を通過することが確認されたことから、これが十分微細に均質化された試料の目安と位置付けた。なお、この均質化評価の目安は、トマト及びホウレンソウでの調査結果と合致した。

[2] 畜水産物における適切な試料調製方法の提案と凍結粉碎法の有用性の検証

畜産物における試料調製時の農薬等の減少について、常温磨砕法と凍結粉碎法での回収率の比較を通じて、凍結粉碎法による減少抑制効果を検討した。牛及び豚の肝臓を対象とした検討の結果、常温磨砕法により試料調製を行うと、試料中の酵素やその他の試料成分との反応等により、一部の農薬等では大幅な減少が生じた。一方で、凍結粉碎法による試料調製を行うことにより、農薬等によっては、これらの減少を抑制できることが示され

た。ただし、凍結粉碎のみでは減少を十分に抑制できない化合物も存在することから、留意が必要である。

一般に、分析法の妥当性を添加回収試験により評価する際は、農薬等を添加後 30 分間の放置を経て抽出操作を開始する方法が用いられる。この目的の一つは、試料調製から抽出までの間に生じる農薬等の減少を考慮して評価するためである。しかし、本研究の結果から、均質化後の試料に添加し 30 分間放置した場合よりも、試料調製中に生じる農薬等の減少の方が大きくなる場合があることが示された。このため、添加回収試験において良好な回収率が得られたとしても、実際の検査においては残留濃度を過小評価する可能性があると考えられた。

【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品の試料均質性に関する調査, 試験番号 IET 22-1019)
- 2) 令和 5 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品の試料均質性に関する調査, 試験番号 IET 23-1004)
- 3) 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碎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).
- 4) 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

(2025 年 2 月 18 日閲覧)

5) 飼料の公定規格:

<http://www.famic.go.jp/ffis/feed/kokuji/k51n75>

6.html (2024 年 2 月 27 日閲覧)

6) 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

(2025 年 2 月 18 日閲覧)

7) D. J. MacLachlana and D. Hamiltonb:

Pest Manag Sci. **67**, 609–615 (2011).

8) S. J. Lehotay, and J.M. Cook: *J. Agric. Food Chem.*, **63**, 4395-4404 (2015).

9) 志田 (齊藤) 静夏, 根本了, 穂山浩:

日本食品化学学会誌, **27**, 135-140 (2020).

10) 文部科学省: 日本食品標準成分表 2020 年版 (八訂)

E. 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, 田口貴章, 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ハウレンソウを用いた調査～, 第 41 回農薬環境科学・第 47 回農薬残留分析合同研究会, (2024.11.11)

2) 志田 (齊藤) 静夏: 残留農薬等分析における試料調製と抽出について, 令和 6 年度食品衛生登録検査機関協会 残留農薬等研修会 (2025.1.31)

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Table 1. 農薬製剤の散布条件

製剤名 (商品名)	有効成分名 (略号)	有効成分 含量 (%)	希釈 倍率
アルバリン顆粒水溶剤	ジノテフラン (DIN)	20	2000
アドマイヤーフロアブル	イミダクロプリド (IMI)	20	2000
マラソン乳剤	マラチオン (MAL)	50	1000
ダイアジノン乳剤	ダイアジノン (DIA)	40	700
カスケード乳剤	フルフェノクスロン (FLU)	10	4000
フェニックス顆粒水和剤	フルベンジアミド (FLB)	20	2000
アディオン乳剤	ペルメトリン (PER)	20	2000

Table 2. 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
ペルメトリン	51	27	8	407.9	183.1
フルベンジアミド	-90	-46	-1	680.9	254.1



Fig. 1.1 作物写真(無処理区)



Fig. 1.2 作物写真(処理区)

Table 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	FLB	PER
0.01	99 [2]	89 [2]	109 [5]	106 [6]	106 [4]	93 [5]	106 [2]
0.5	96 [1]	99 [3]	94 [5]	90 [4]	95 [2]	104 [4]	87 [1]
5	98 [2]	105 [5]	105 [5]	—	102 [10]	109 [7]	84 [5]
15	—	—	—	109 [5]	—	—	—

Table 4. マトリックス効果

マトリックス効果 (%)						
DIN	IMI	MAL	DIA	FLU	FLB	PER
−33	−13	−4	−1	−27	+2	−12

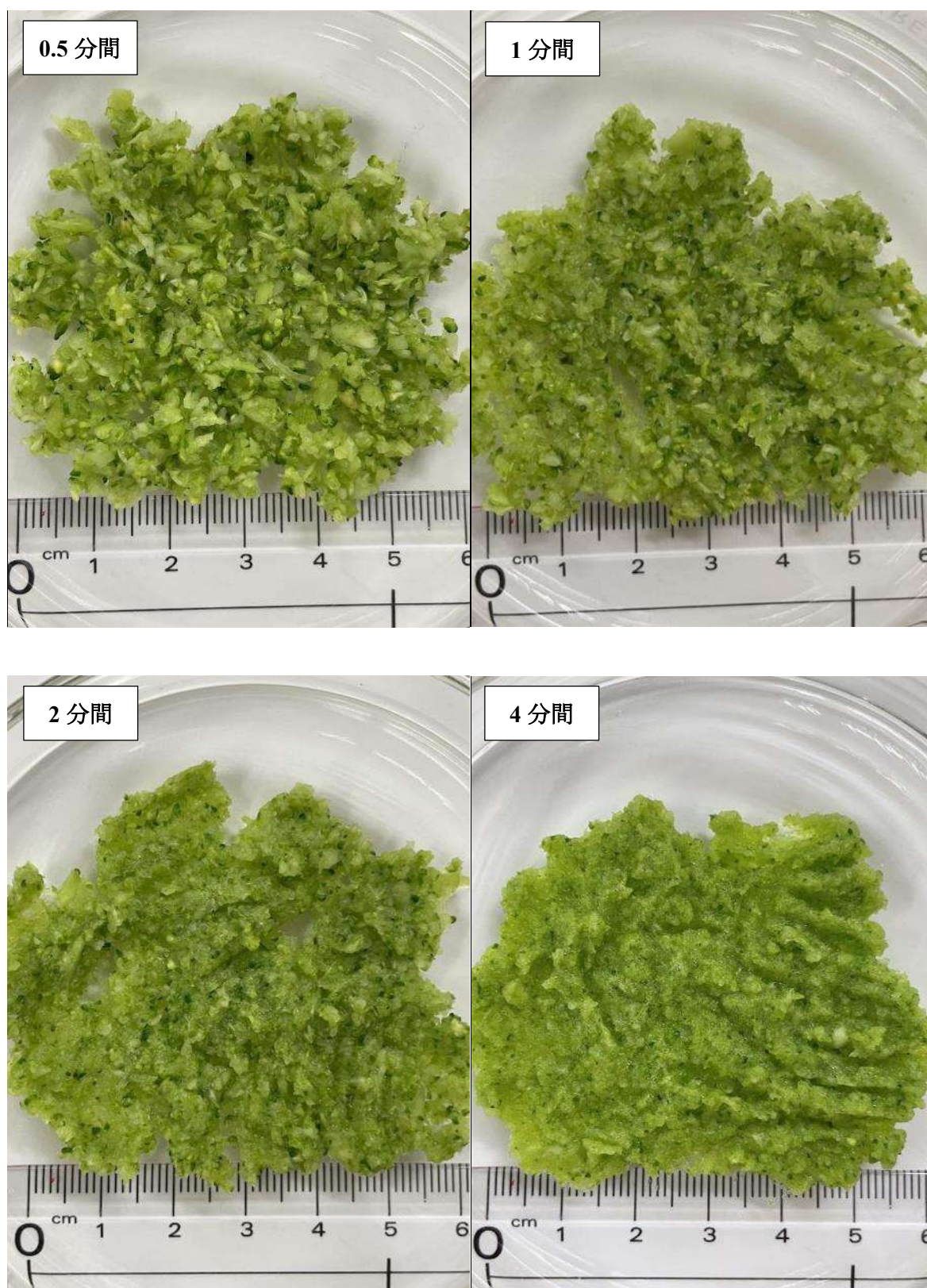


Fig 2. ミキサー稼働時間別のブロッコリー均質化状態（常温操作）



Fig 3. 凍結粉碎試料の均質化状態（左：調製作業時，右：解凍時）



Fig 4. ヘラ処理（左）及び流水洗浄処理（右）による篩通過時の様子

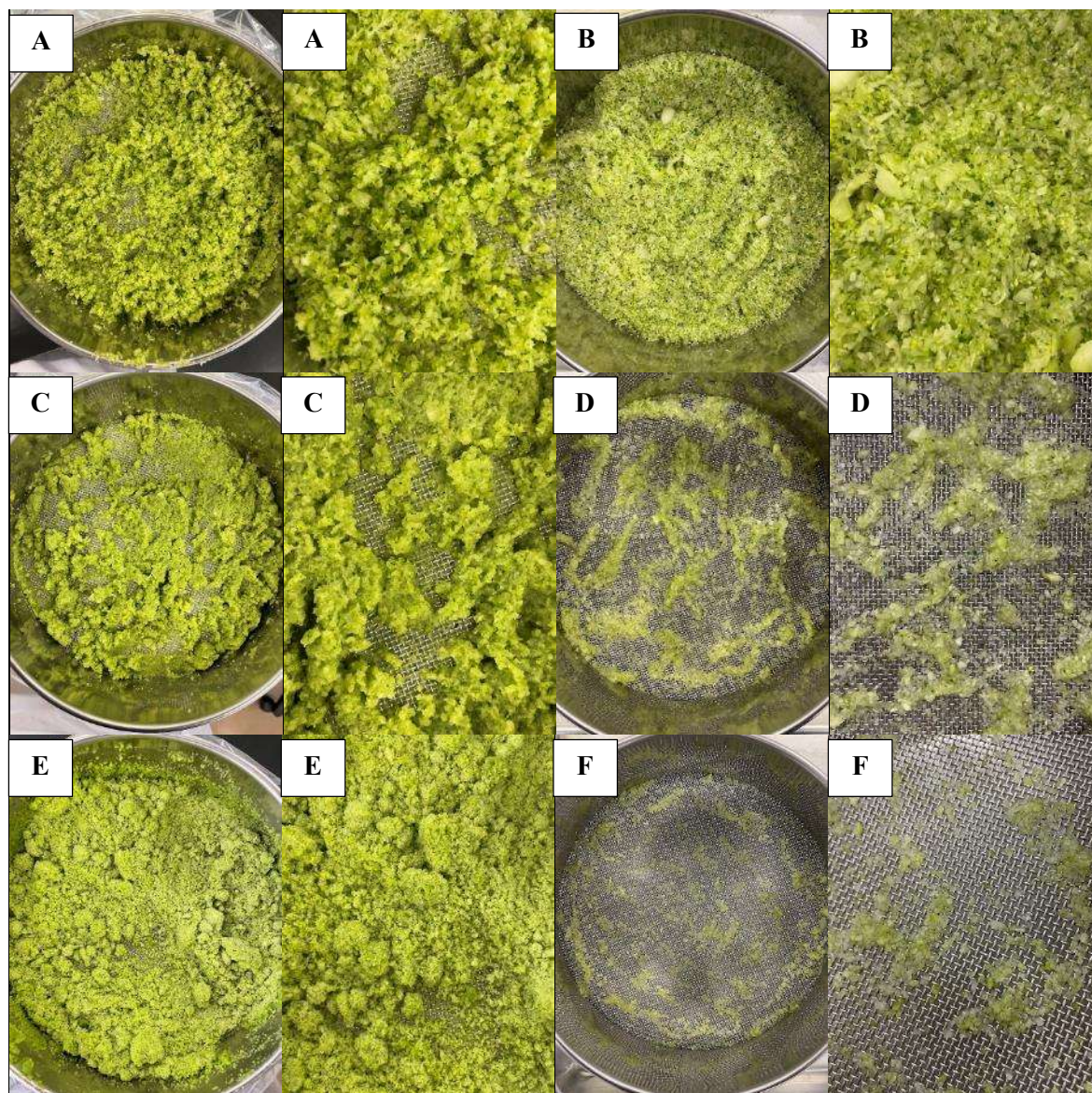


Fig 5. へラ処理及び流水洗浄処理後における篩上試料の状態

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
(左:全体写真, 右:拡大写真)

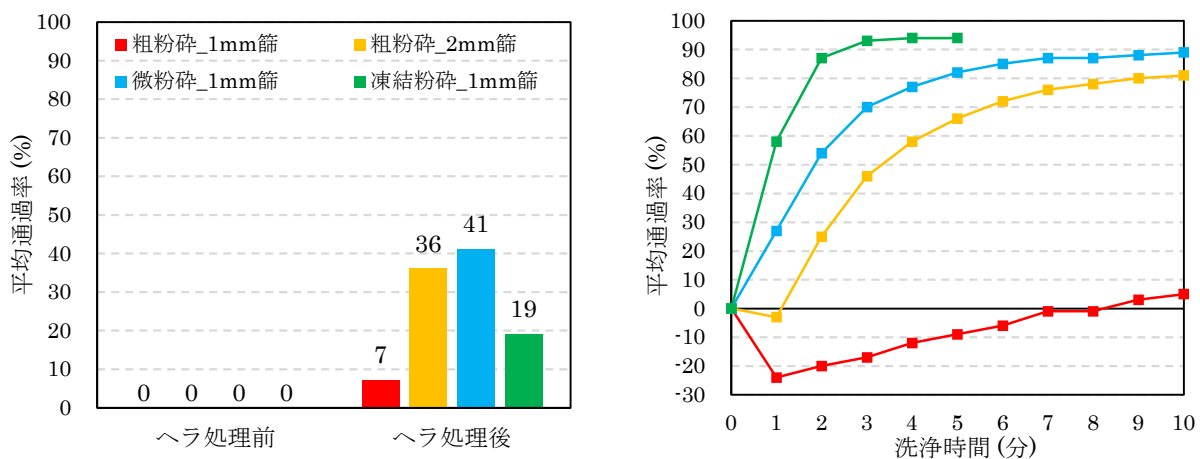


Fig 6. ヘラ処理時 (左) 及び流水洗浄処理時 (右) の篩通過率

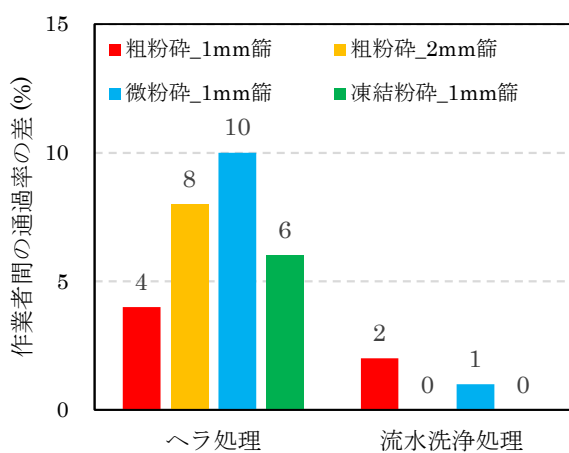


Fig 7. 異なる2名の作業員間の篩通過率の差

Table 5.1 分析結果(粗粉碎試料)

農薬	平均濃度 (mg/kg) [SD (mg/kg)]									
	20g		10g		5g		2g		1g	
DIN	1.70	[0.050]	1.76	[0.061]	1.77	[0.030]	1.74	[0.028]	1.76	[0.074]
IMI	1.72	[0.063]	1.81	[0.055]	1.86	[0.073]	1.79	[0.022]	1.77	[0.071]
MAL	0.51	[0.029]	0.49	[0.033]	0.49	[0.032]	0.48	[0.027]	0.49	[0.012]
DIA	6.70	[0.388]	6.70	[0.345]	6.88	[0.323]	6.61	[0.384]	6.47	[0.174]
FLU	0.45	[0.025]	0.42	[0.011]	0.44	[0.036]	0.44	[0.014]	0.43	[0.038]
FLB	1.81	[0.058]	1.84	[0.081]	1.78	[0.070]	1.82	[0.095]	1.83	[0.119]
PER	1.52	[0.040]	1.52	[0.098]	1.56	[0.051]	1.55	[0.072]	1.50	[0.032]

n=6

Table 5.2. 分析結果(微粉碎試料)

農薬	平均濃度 (mg/kg) [SD (mg/kg)]									
	20g		10g		5g		2g		1g	
DIN	1.96	[0.038]	1.94	[0.016]	1.98	[0.061]	2.01	[0.024]	2.03	[0.078]
IMI	1.96	[0.080]	1.99	[0.035]	2.03	[0.053]	2.03	[0.064]	2.03	[0.047]
MAL	0.76	[0.026]	0.79	[0.033]	0.80	[0.036]	0.78	[0.038]	0.78	[0.033]
DIA	7.34	[0.253]	7.63	[0.163]	7.36	[0.300]	7.30	[0.255]	6.90	[0.540]
FLU	0.53	[0.012]	0.48	[0.026]	0.47	[0.031]	0.47	[0.023]	0.45	[0.033]
FLB	2.06	[0.064]	1.98	[0.067]	2.09	[0.102]	2.07	[0.085]	2.07	[0.086]
PER	1.82	[0.010]	1.63	[0.081]	1.61	[0.059]	1.64	[0.057]	1.53	[0.068]

n=6

Table 5.3 分析結果(凍結粉碎試料)

農薬	平均濃度 (mg/kg) [SD (mg/kg)]									
	20g		10g		5g		2g		1g	
DIN	1.80	[0.026]	1.88	[0.019]	1.88	[0.054]	1.85	[0.059]	1.83	[0.055]
IMI	1.85	[0.032]	1.91	[0.055]	1.94	[0.024]	1.86	[0.083]	1.86	[0.115]
MAL	0.74	[0.037]	0.74	[0.074]	0.70	[0.032]	0.72	[0.050]	0.70	[0.025]
DIA	6.93	[0.267]	7.12	[0.312]	6.74	[0.176]	6.62	[0.233]	6.61	[0.224]
FLU	0.50	[0.014]	0.46	[0.025]	0.44	[0.021]	0.43	[0.010]	0.42	[0.022]
FLB	1.74	[0.055]	1.74	[0.034]	1.74	[0.061]	1.66	[0.066]	1.68	[0.050]
PER	1.73	[0.036]	1.59	[0.027]	1.51	[0.034]	1.49	[0.027]	1.40	[0.070]

n=6

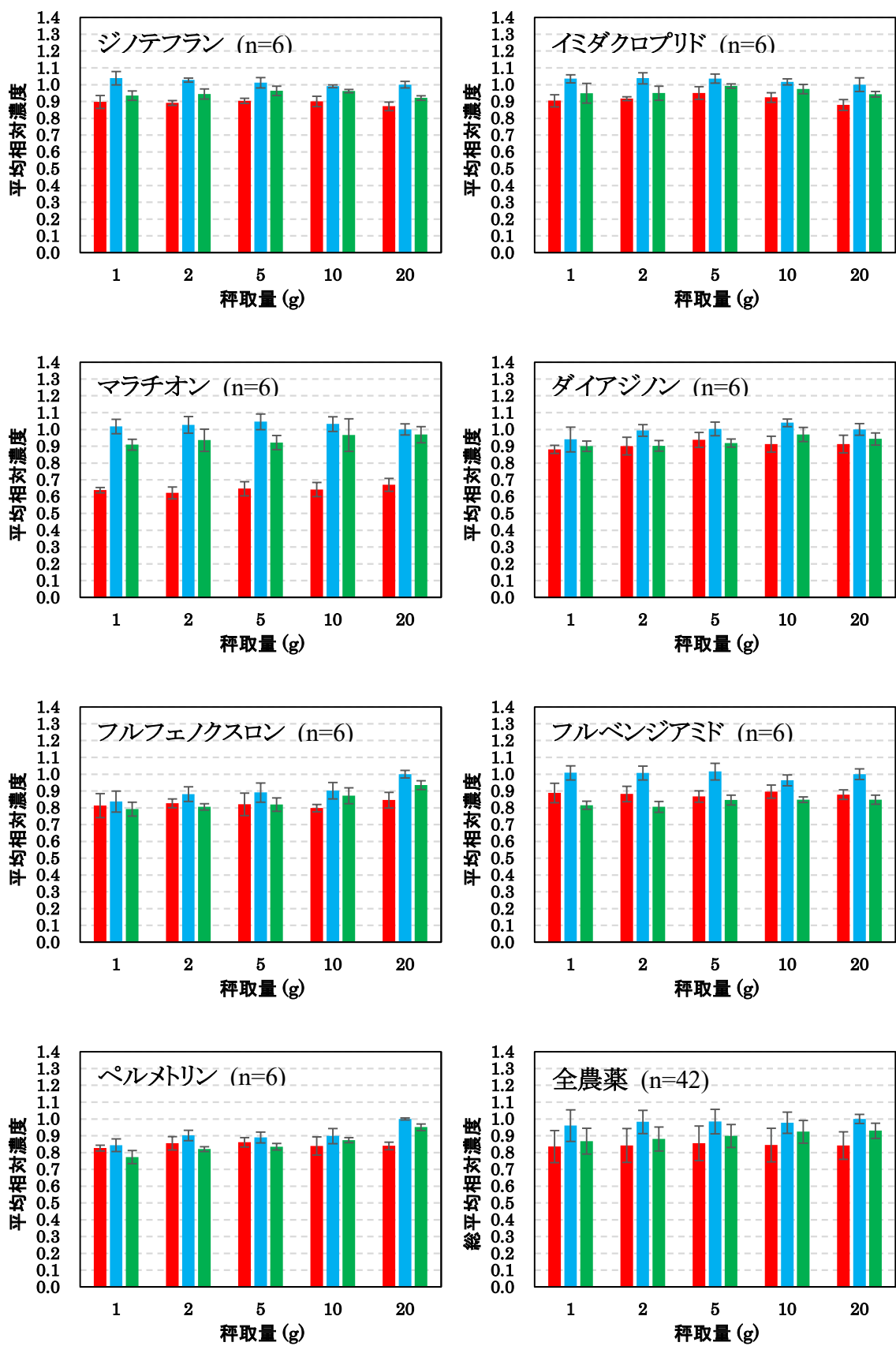


Fig 8. 秤取量別の相対濃度

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

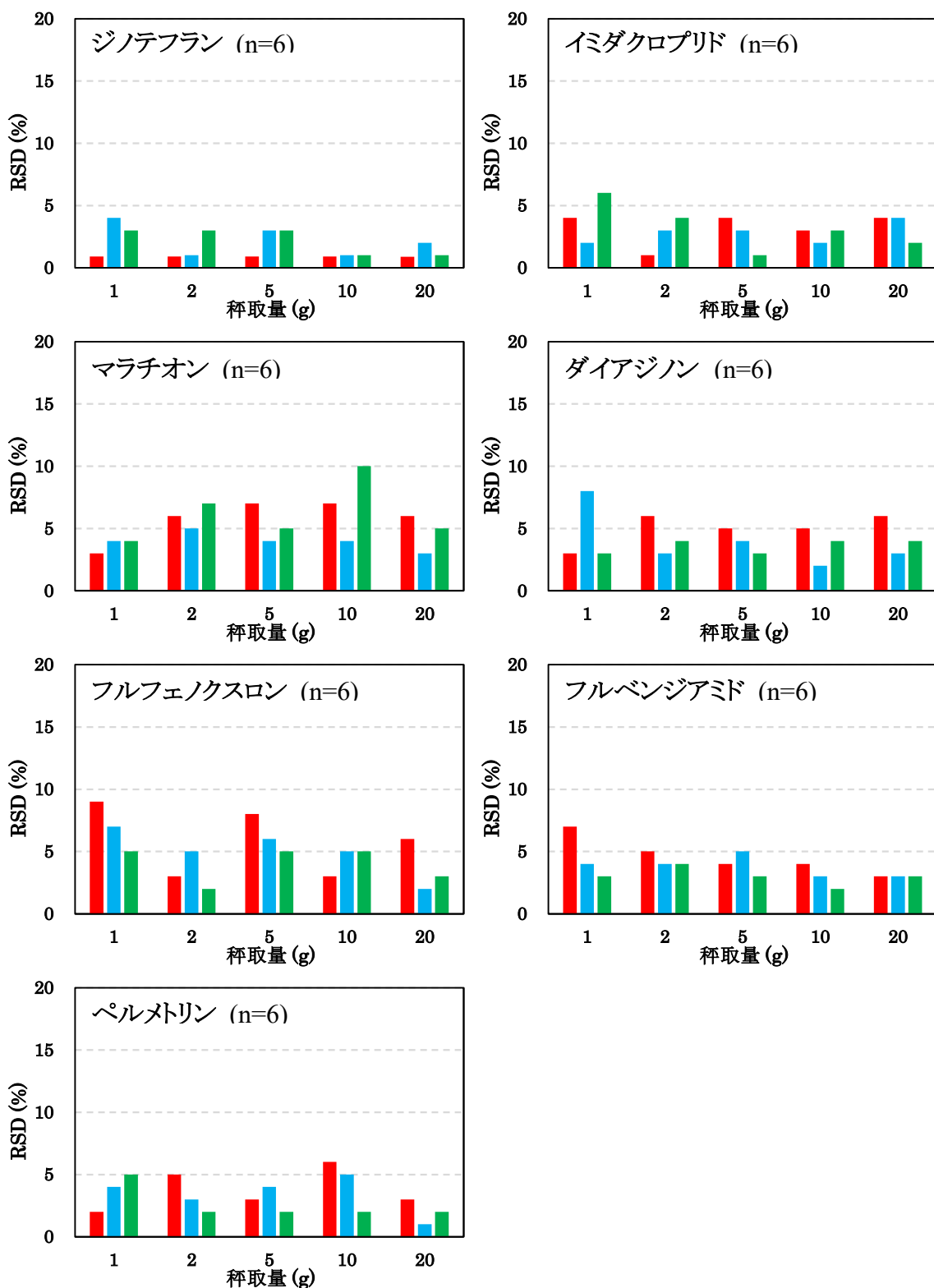


Fig 9. 秤取量別の分析値の変動

■:粗粉碎試料, ■:微粉碎試料, ■:凍結粉碎試料

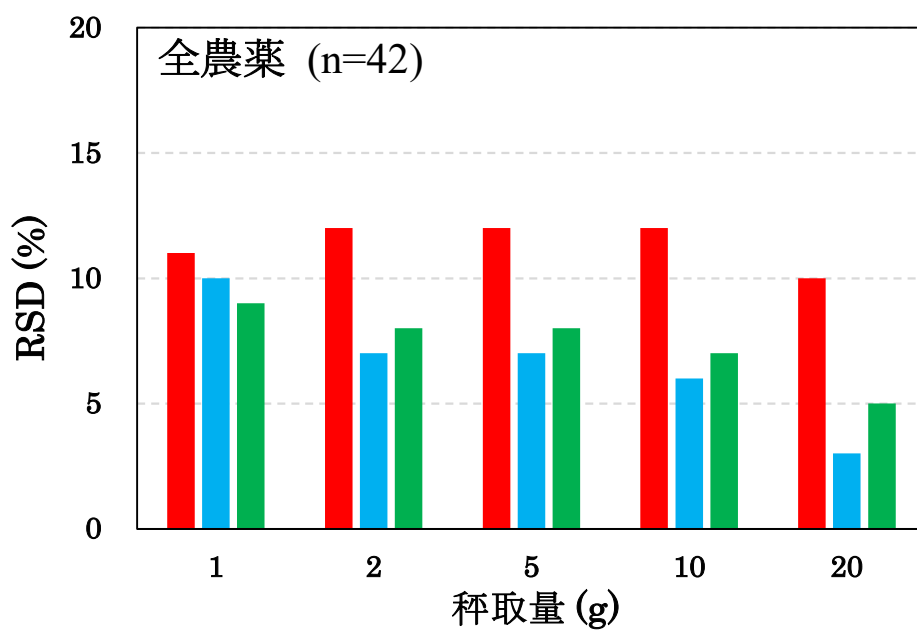


Fig. 10. 7 種農薬全体での秤取量別相対濃度の変動

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

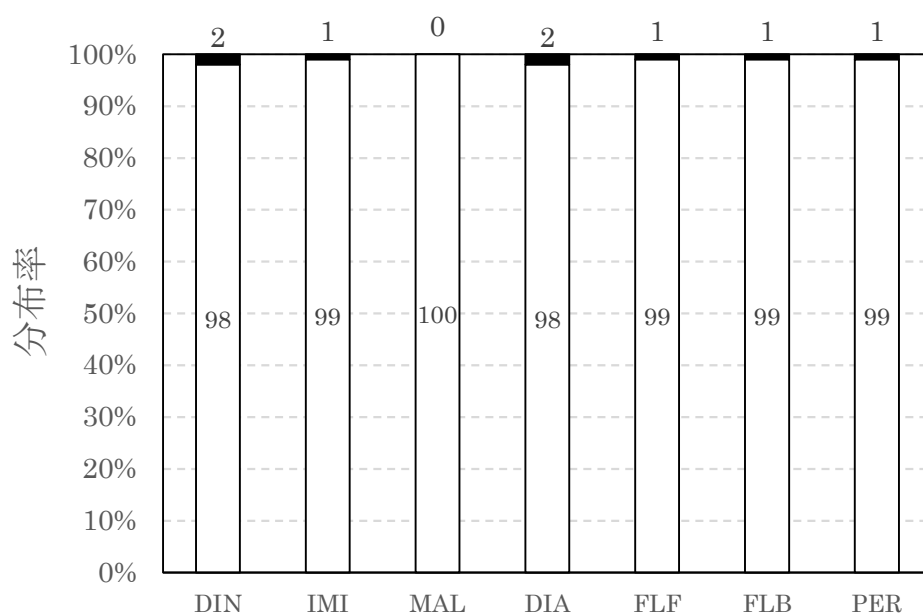


Fig. 11. 各農薬の茎及び蕾における分布率

(□:蕾, ■:茎)

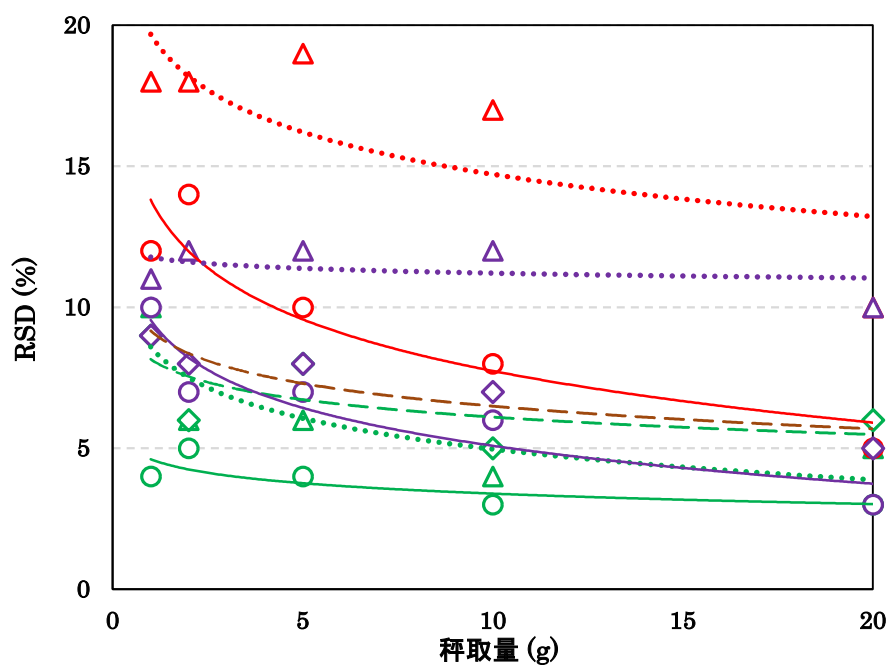


Fig. 12. トマト、ハウレンソウ及びブロッコリーでの秤取量変化に伴う分析値変動の比較

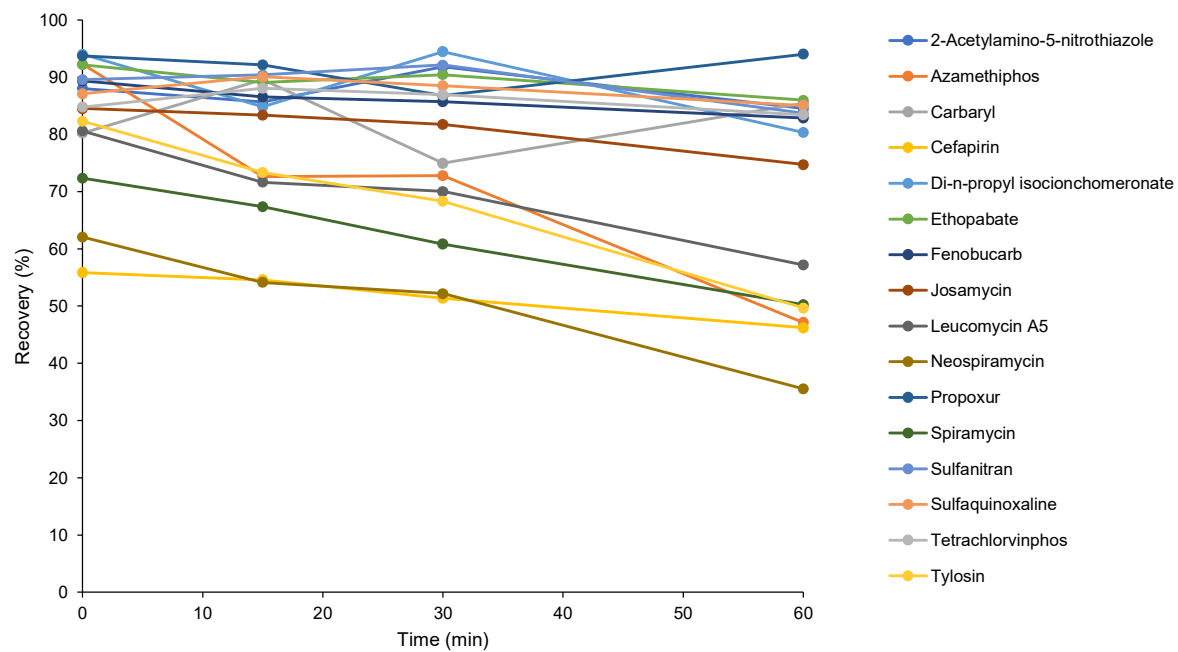


Fig. 13. 農薬等の添加後放置時間の回収率¹への影響(牛の筋肉)

¹ n=3

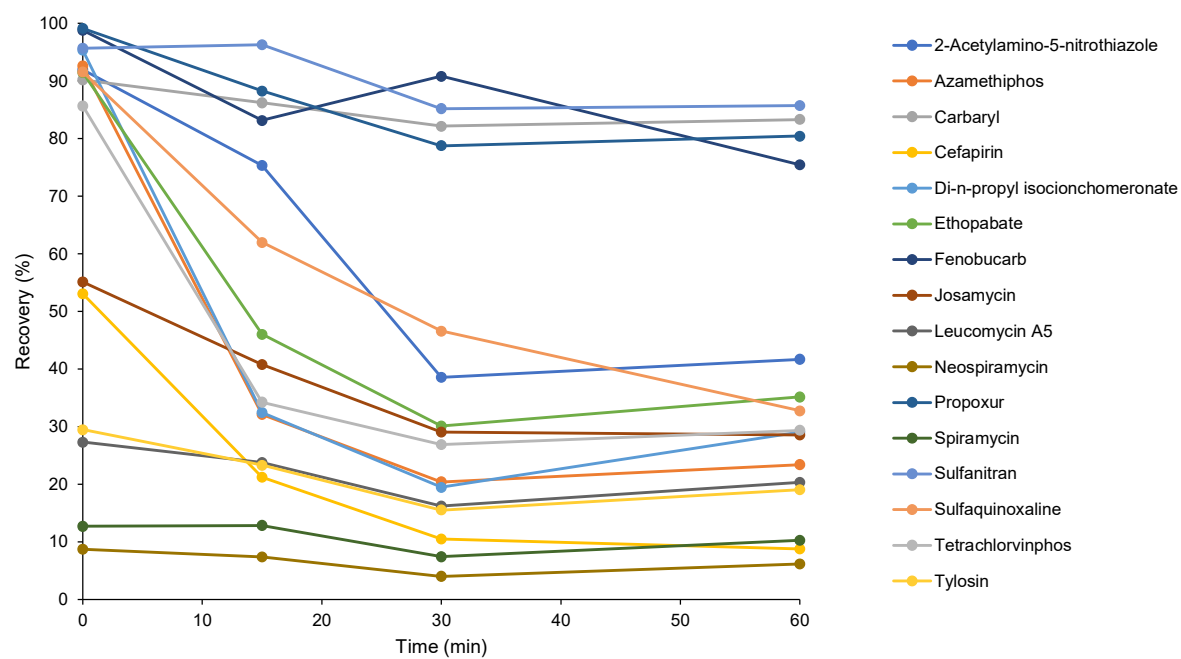


Fig. 14. 農薬等の添加後放置時間の回収率¹への影響(牛の肝臓)

¹ n=3

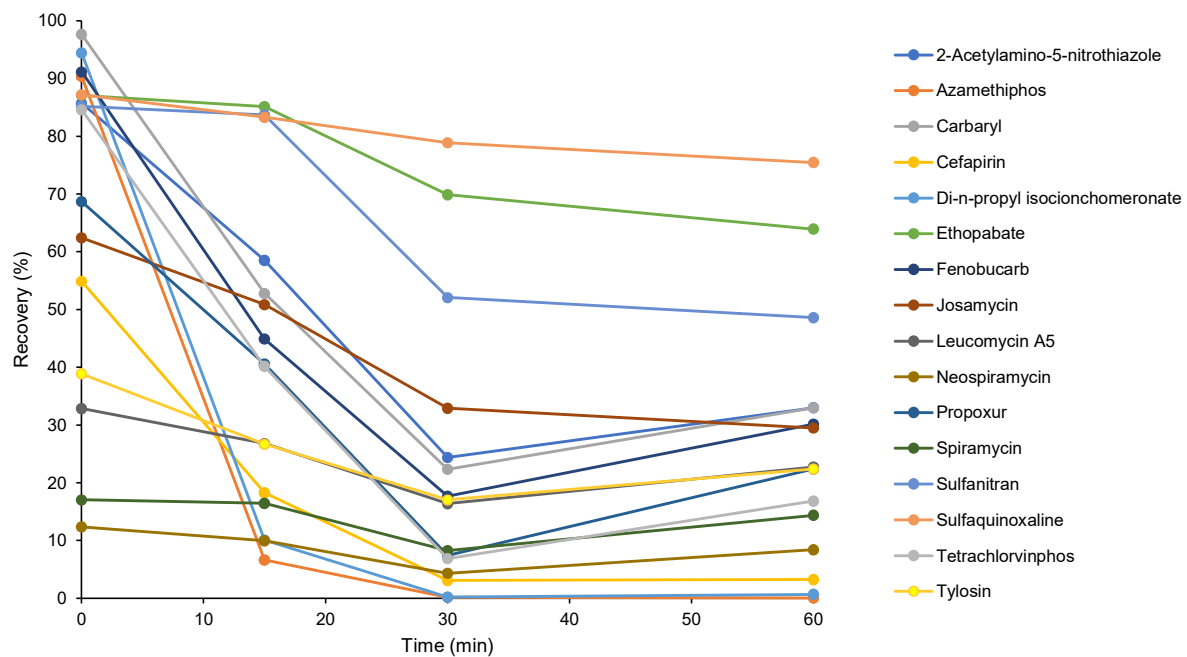


Fig. 15. 農薬等の添加後放置時間の回収率¹への影響(豚の肝臓)

¹ n=3

Table 6. 添加後放置時間 0 分及び 30 分の平均回収率¹, p 値, q 値

化合物	牛の筋肉				牛の肝臓				豚の肝臓			
	平均回収率 (%)		p値	FDR補正後 q値	平均回収率 (%)		p値	FDR補正後 q値	平均回収率 (%)		p値	FDR補正後 q値
	放置時間0分	放置時間30分			放置時間0分	放置時間30分			放置時間0分	放置時間30分		
2-Acetylaminio- 5-nitrothiazole	88	92	0.530	1.00	92	39	0.002	0.11	86	24	<0.001	<0.01
Azamethiphos	92	73	0.003	0.10	93	20	<0.001	0.02	90	0	<0.001	<0.01
Carbaryl	82	75	0.378	1.00	90	82	0.152	1.00	98	22	0.002	0.05
Cefapirin	56	51	0.527	1.00	53	10	<0.001	<0.01	55	3	<0.001	<0.01
Ciprofloxacin	81	78	0.775	1.00	73	77	0.409	1.00	76	75	0.896	1.00
Clostebol	87	91	0.530	1.00	90	76	0.005	0.06	96	74	0.002	0.02
Danofloxacin	85	85	0.927	1.00	90	83	0.280	1.00	82	81	0.913	1.00
Diaveridine	93	94	0.774	1.00	86	80	0.016	0.13	85	81	0.109	0.89
Difloxacin	85	85	0.986	1.00	88	82	0.123	0.89	86	87	0.820	1.00
Di-n-propyl isocinchomeronate	94	94	0.865	1.00	95	19	<0.001	<0.01	94	0	<0.001	<0.01
Enrofloxacin	88	90	0.766	1.00	84	82	0.502	1.00	83	87	0.264	1.00
Erythromycin	85	85	0.953	1.00	89	86	0.482	1.00	89	87	0.609	1.00
Ethopabate	92	90	0.733	1.00	91	30	0.001	<0.01	87	70	0.002	<0.01
Fenobucarb	89	86	0.799	1.00	99	91	0.083	0.38	91	18	<0.001	<0.01
Flumequine	95	94	0.657	1.00	95	93	0.181	0.78	98	99	0.592	1.00
Josamycin	85	82	0.675	1.00	55	29	0.002	<0.01	62	33	<0.001	<0.01
Leucomycin A5	81	70	0.096	0.37	27	16	0.028	0.11	33	16	<0.001	<0.01
Marbofloxacin	85	88	0.614	1.00	85	79	0.047	0.17	88	86	0.414	1.00
Methylprednisolone	84	85	0.804	1.00	99	71	0.018	0.06	84	91	0.361	1.00
Miloxacin	94	93	0.913	1.00	93	77	0.036	0.12	91	74	<0.001	<0.01
Nalidixic acid	96	97	0.828	1.00	96	94	0.219	0.68	94	97	0.165	0.51
Neospiramycin	62	52	0.118	0.35	9	4	0.022	0.06	12	4	<0.001	<0.01
Norfloxacin	76	77	0.861	1.00	67	71	0.086	0.24	76	77	0.784	1.00
Ofloxacin	85	84	0.874	1.00	84	82	0.093	0.25	87	82	0.166	0.45
Orbifloxacin	83	84	0.916	1.00	84	82	0.551	1.00	86	79	0.156	0.41
Ormetoprim	81	82	0.852	1.00	79	79	0.944	1.00	82	78	0.055	0.14
Oxolinic acid	88	88	0.963	1.00	88	85	0.334	0.80	89	86	0.271	0.65
Piromidic acid	95	95	0.931	1.00	96	93	0.126	0.29	96	96	0.799	1.00
Prednisolone	87	84	0.797	1.00	95	73	<0.001	<0.01	87	80	0.145	0.33
Propoxur	94	87	0.658	1.00	99	79	0.040	0.09	69	7	<0.001	<0.01
Pyrimethamine	83	86	0.650	1.00	81	79	0.467	0.98	79	77	0.348	0.73
Sarafloxacin	83	85	0.791	1.00	77	74	0.268	0.54	82	80	0.647	1.00
Spiramycin	72	61	0.119	0.23	13	7	0.065	0.13	17	8	<0.001	<0.01
Sulfabenzamide	86	88	0.801	1.00	91	88	0.202	0.39	85	84	0.705	1.00
Sulfabromomethazine	90	93	0.696	1.00	92	89	0.542	1.00	86	82	0.290	0.54
Sulfacetamide	98	99	0.859	1.00	93	87	0.307	0.55	88	84	0.153	0.28
Sulfachloropyridazine	86	91	0.449	0.79	90	86	0.102	0.18	91	85	0.116	0.20
Sulfadiazine	92	94	0.705	1.00	92	90	0.487	0.83	87	78	0.026	0.04
Sulfadimethoxine	93	96	0.551	0.92	96	94	0.407	0.68	89	91	0.497	0.83
Sulfadimidine	87	88	0.847	1.00	91	88	0.201	0.33	84	86	0.156	0.25
Sulfadoxine	92	93	0.934	1.00	94	91	0.299	0.47	93	90	0.207	0.33
Sulfaethoxypyridazine	87	90	0.714	1.00	95	90	0.079	0.12	88	86	0.741	1.00
Sulfaguanidine	91	90	0.874	1.00	84	81	0.150	0.23	82	74	0.235	0.35
Sulfamerazine	86	89	0.715	1.00	92	88	0.047	0.07	87	81	0.005	<0.01
Sulfamethoxazole	92	93	0.873	1.00	91	85	0.064	0.09	89	86	0.448	0.65
Sulfamethoxypyridazine	89	93	0.575	0.81	94	90	0.331	0.47	89	93	0.123	0.17
Sulfamonomethoxine	88	92	0.520	0.72	95	92	0.503	0.70	84	85	0.907	1.00
Sulfanilamide	92	88	0.622	0.84	93	88	0.277	0.37	91	97	0.254	0.34
Sulfantran	90	92	0.718	0.95	96	85	0.329	0.44	85	52	<0.001	<0.01
Sulfapyridine	85	87	0.639	0.83	90	85	0.145	0.19	92	86	0.067	0.09
Sulfaguinoxaline	87	89	0.816	1.00	92	47	<0.001	<0.01	87	79	0.029	0.04
Sulfathiazole	87	87	0.879	1.00	88	84	0.254	0.32	86	86	0.922	1.00
Sulfatroxazole	90	91	0.836	1.00	92	87	0.121	0.15	91	90	0.849	1.00
Sulfisomidine	88	90	0.663	0.80	94	92	0.629	0.76	89	79	0.447	0.54
Sulfisoxazole	90	90	0.930	1.00	95	79	0.005	<0.01	90	79	0.007	<0.01
Sulfisozole	91	92	0.899	1.00	89	86	0.426	0.49	87	87	0.986	1.00
Temephos	88	87	0.821	0.94	87	78	0.183	0.21	82	85	0.539	0.61
Tetrachlorvinphos	85	87	0.755	0.85	86	27	<0.001	<0.01	85	7	<0.001	<0.01
α-Trenbolone	95	96	0.698	0.71	97	94	0.025	0.02	95	96	0.022	0.02
β-Trenbolone	82	85	0.688	0.69	88	80	0.235	0.24	82	77	0.001	<0.01
Tiamulin	86	88	0.749	0.83	94	87	0.209	0.23	93	82	0.808	0.89
Tilmicosin	89	86	0.694	0.75	90	86	0.316	0.34	88	73	0.225	0.24
Trimethoprim	88	89	0.894	0.95	89	87	0.506	0.54	84	82	0.609	0.65
Tylosin	82	68	0.063	0.07	29	16	0.005	<0.01	39	17	<0.001	<0.01
Zeranol	89	93	0.430	0.44	92	81	0.118	0.12	88	86	0.805	0.83

¹ n=3

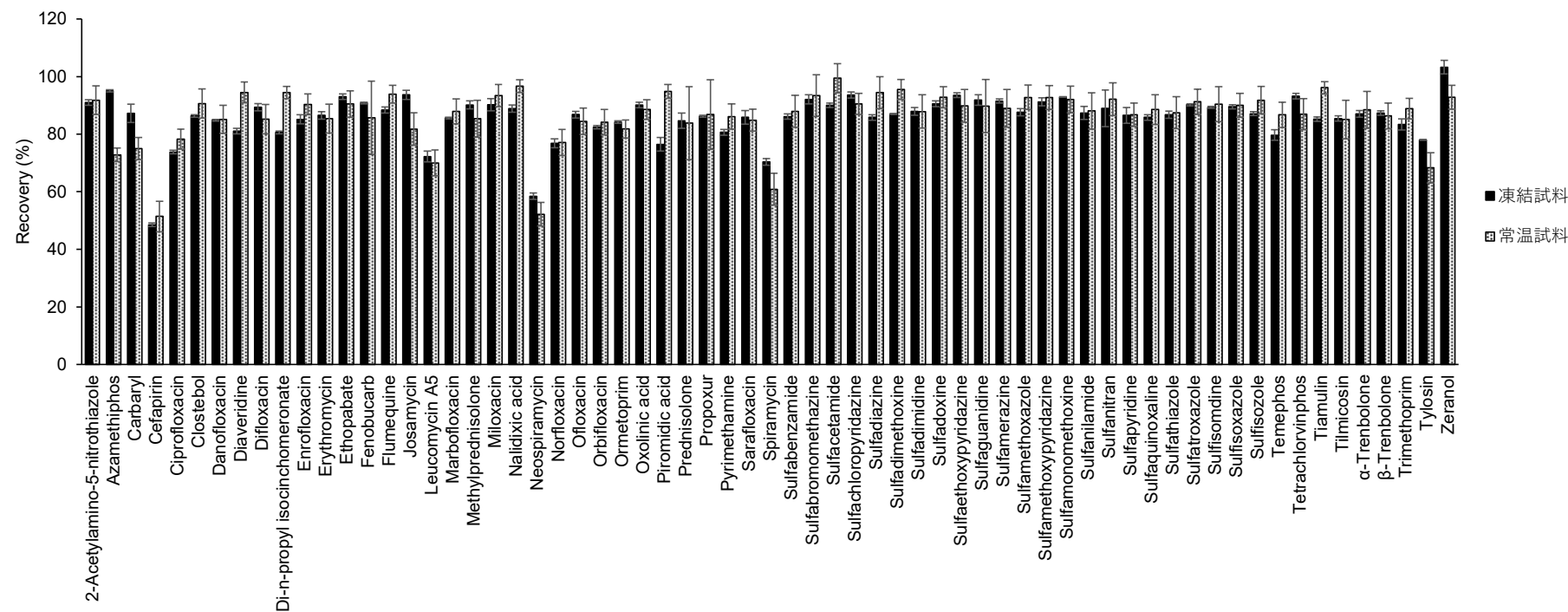


Fig. 16. 凍結試料及び常温試料からの農薬等の平均回収率^{1,2}(牛の筋肉)

¹ 試料に農薬等を添加し, 30 分放置(凍結試料は-30℃, 常温試料は室温)した後, 抽出操作を開始した

² n=3

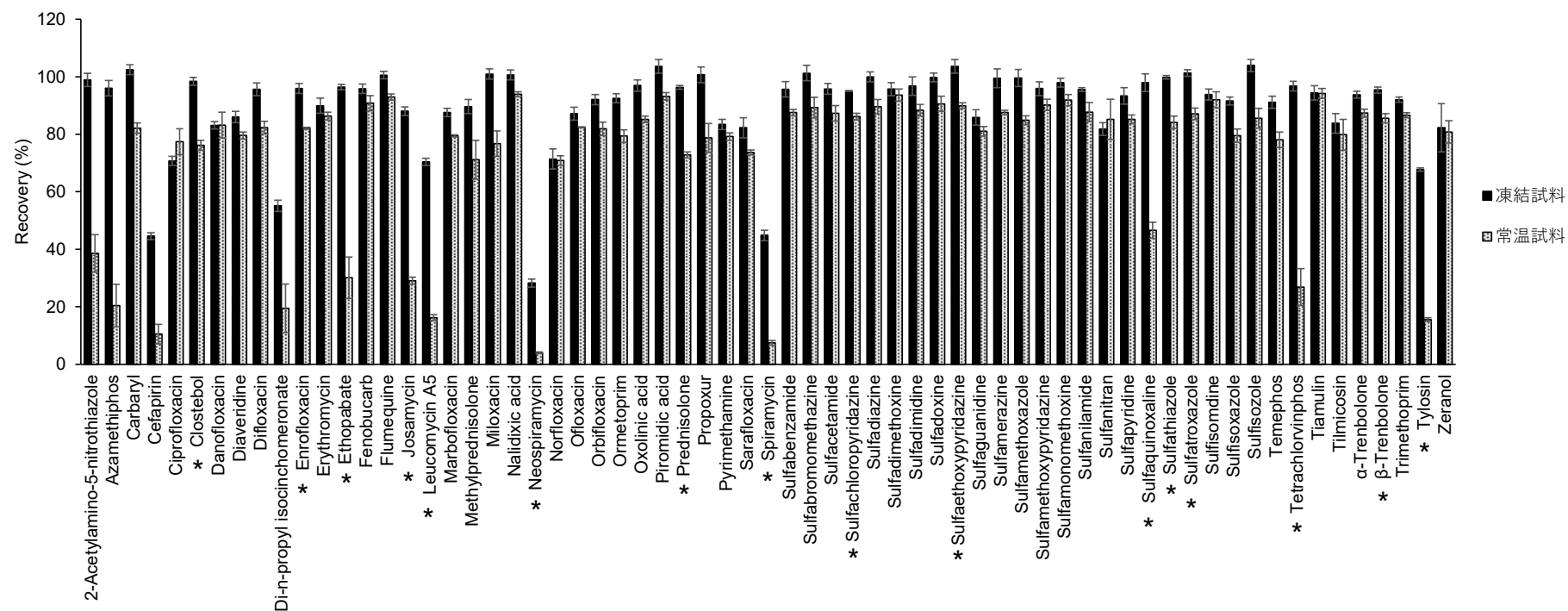


Fig. 17. 凍結試料及び常温試料からの農薬等の平均回収率^{1,2}(牛の肝臓)

¹ 試料に農薬等を添加し, 30 分放置(凍結試料は-30℃, 常温試料は室温)した後, 抽出操作を開始した

² n=3

³ * $q < 0.01$

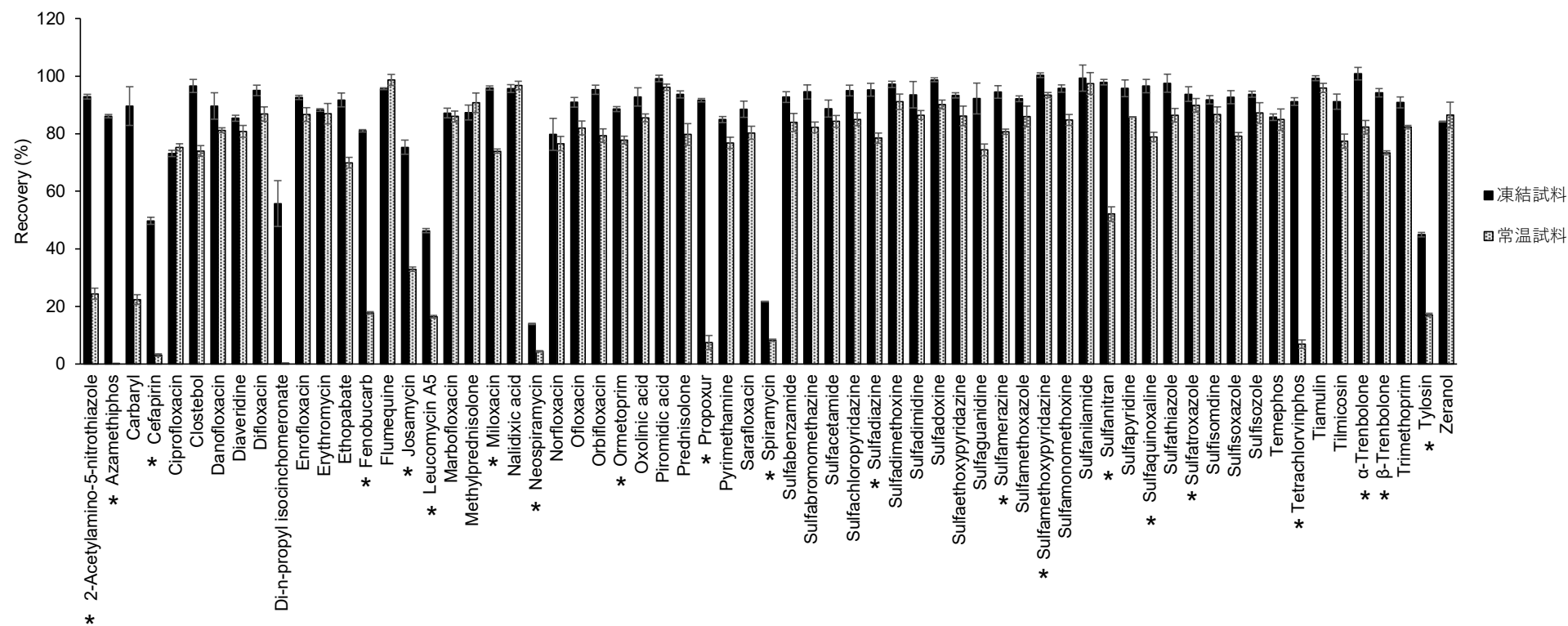


Fig. 18. 凍結試料及び常温試料からの農薬等の平均回収率^{1,2}(豚の肝臓)

¹ 試料に農薬等を添加し、30分放置(凍結試料は-30℃、常温試料は室温)した後、抽出操作を開始した

² n=3

³ *は $q < 0.01$

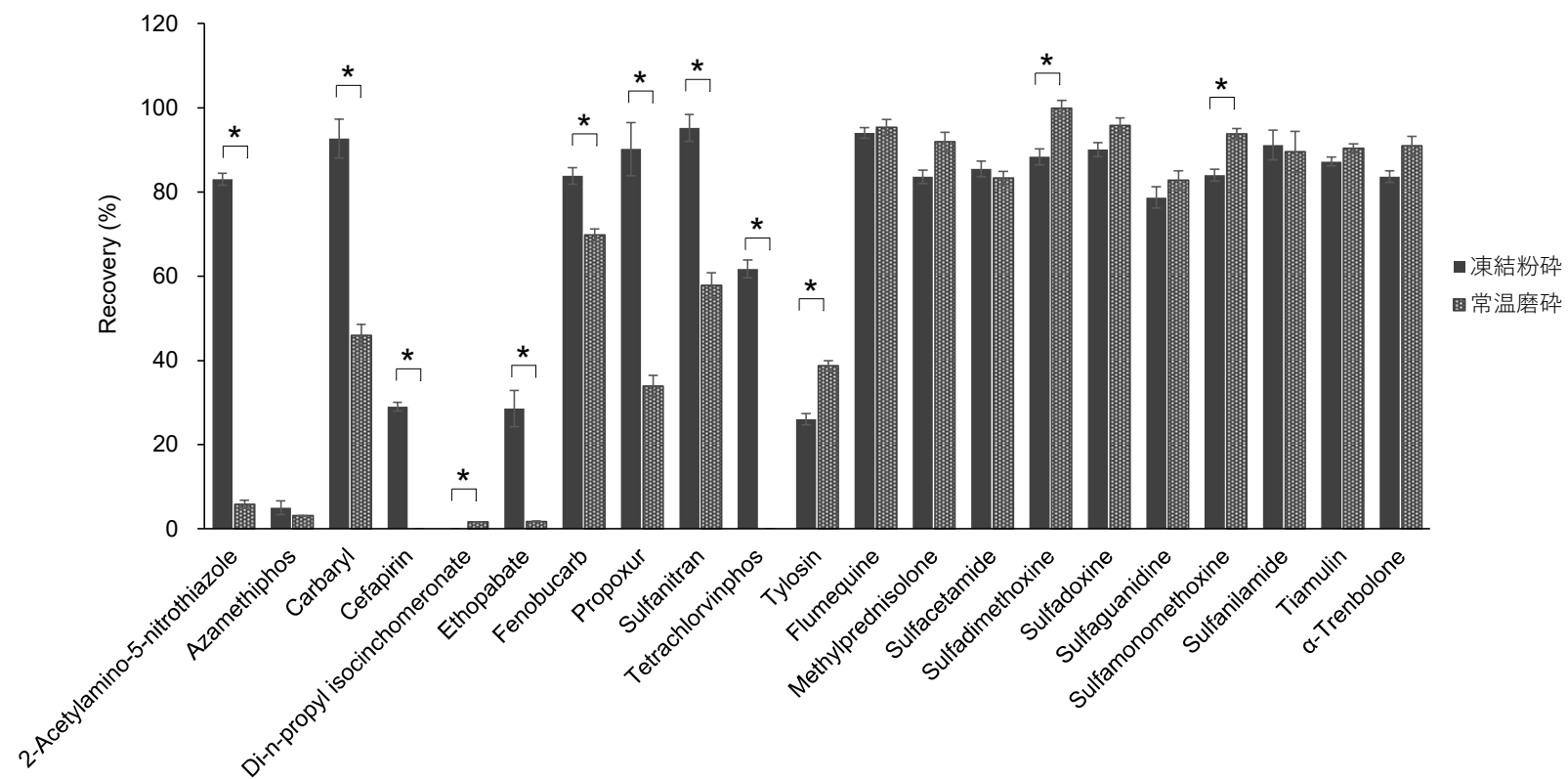


Fig. 19. 常温磨砕法及び凍結粉碎法による試料調製における平均回収率^{1,2}(牛の肝臓)

¹ n=5

² *は $q < 0.01$

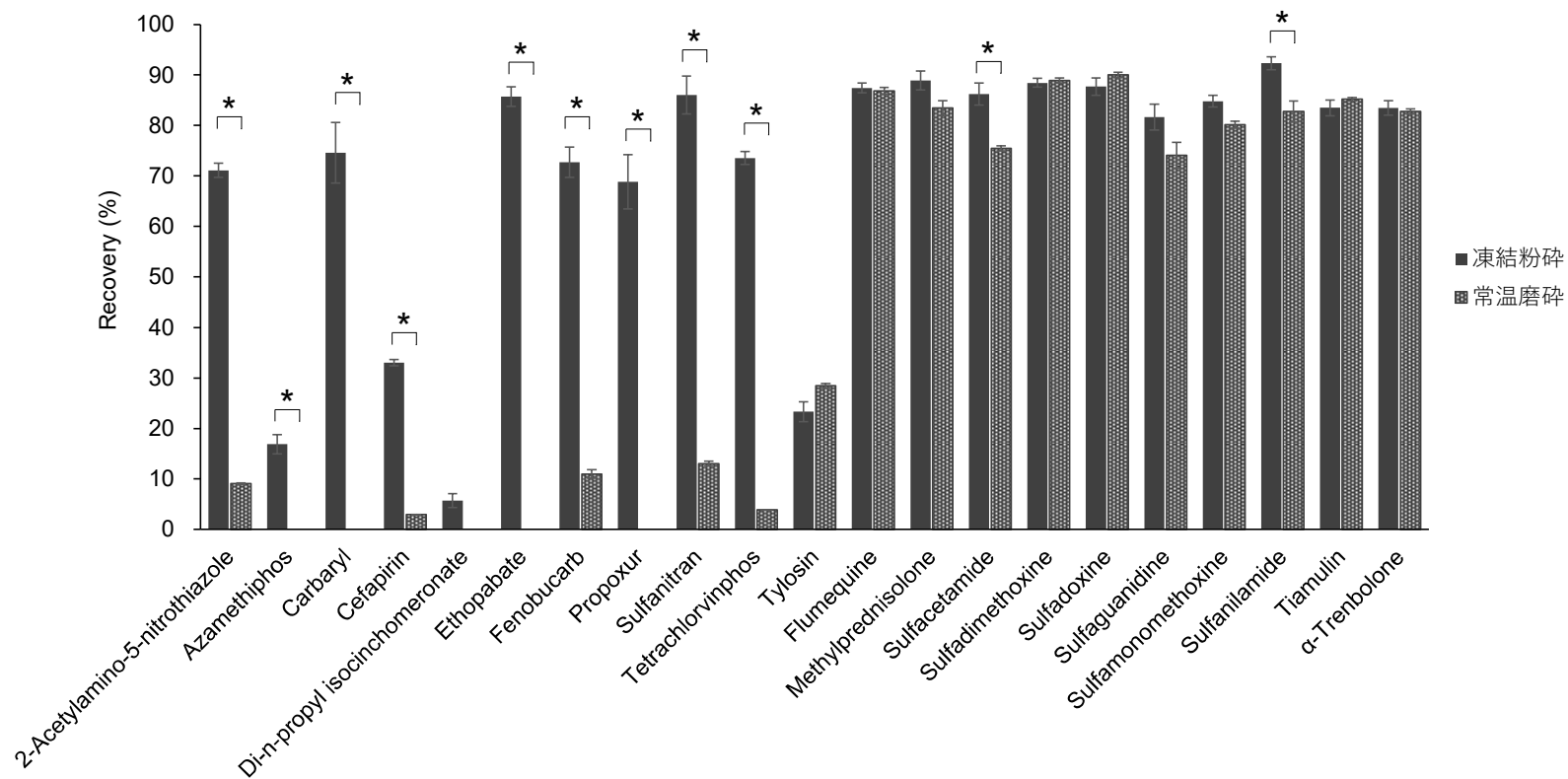


Fig. 20. 常温磨砕法及び凍結粉碎法による試料調製における平均回収率^{1,2}(豚の肝臓)

¹ n=5

² *は $q < 0.01$

Table 7. 常温磨砕法及び凍結粉砕法による試料調製における平均回収率¹(牛の肝臓)及び p 値, q 値

		回収率(%)		回収率(%)	p値	FDR補正後 q値
		凍結粉砕	常温磨砕	の差		
Group 1	2-Acetylamino-5-nitrothiazole	83	6	77	<0.001	<0.01
	Azamethiphos	5	3	2	0.273	1.00
	Carbaryl	93	46	47	<0.001	<0.01
	Cefapirin	29	0	29	<0.001	<0.01
	Di- <i>n</i> -propyl isocinchomeronate	0	2	2	<0.001	<0.01
	Ethopabate	29	2	27	<0.001	<0.01
	Fenobucarb	84	70	14	<0.001	<0.01
	Propoxur	90	34	56	<0.001	<0.01
	Sulfanitran	95	58	37	<0.001	<0.01
	Tetrachlorvinphos	62	0	62	<0.001	<0.01
	Tylosin	26	39	13	<0.001	<0.01
Group 2	Flumequine	94	95	1	0.568	1.00
	Methylprednisolone	84	92	8	0.017	0.04
	Sulfacetamide	86	83	2	0.392	0.75
	Sulfadimethoxine	88	100	12	0.003	<0.01
	Sulfadoxine	90	96	6	0.049	0.08
	Sulfaguanidine	79	83	4	0.261	0.39
	Sulfamonomethoxine	84	94	10	0.001	<0.01
	Sulfanilamide	91	90	1	0.792	1.00
	Tiamulin	87	90	3	0.066	0.07
	α-Trenbolone	84	91	7	0.024	0.02

¹ n=5

Table 8. 常温磨砕法及び凍結粉砕法による試料調製における平均回収率¹(豚の肝臓)及び p 値, q 値

		回収率 (%)		回収率の差	p値	FDR補正後 q値
		凍結粉砕	常温磨砕			
Group 1	2-Acetylamino-5-nitrothiazole	71	9	62	<0.001	<0.01
	Azamethiphos	17	0	17	<0.001	<0.01
	Carbaryl	75	0	75	<0.001	<0.01
	Cefapirin	33	3	30	<0.001	<0.01
	Di- <i>n</i> -propyl isocinchomeronate	6	0	6	0.003	0.01
	Ethopabate	86	0	86	<0.001	<0.01
	Fenobucarb	73	11	62	<0.001	<0.01
	Propoxur	69	0	69	<0.001	<0.01
	Sulfanitran	86	13	73	<0.001	<0.01
	Tetrachlorvinphos	74	4	70	<0.001	<0.01
	Tylosin	23	28	5	0.036	0.04
Group 2	Flumequine	87	87	0	0.641	1.00
	Methylprednisolone	89	83	6	0.051	0.12
	Sulfacetamide	86	75	11	0.002	<0.01
	Sulfadimethoxine	88	89	1	0.640	1.00
	Sulfadoxine	88	90	2	0.236	0.38
	Sulfaguanidine	82	74	8	0.070	0.10
	Sulfamonomethoxine	85	80	5	0.009	0.01
	Sulfanilamide	92	83	9	0.005	<0.01
	Tiamulin	83	85	2	0.316	0.35
	α -Trenbolone	83	83	0	0.654	0.65

¹ n=5

Table 9. 試料調製前と試料調製後に農薬等を添加した場合の回収率の比較(常温磨砕法)

	化合物	牛の肝臓				豚の肝臓			
		回収率		p値	q値	回収率		p値	q値
		A	B			A	B		
Group 1	2-Acetylamino-5-nitrothiazole	6	39	0.001	0.01	9	24	<0.001	<0.01
	Azamethiphos	3	20	0.018	0.10	0	0	—	—
	Carbaryl	46	82	<0.001	<0.01	0	22	<0.001	<0.01
	Cefapirin	0	10	0.005	0.01	3	3	0.698	1.00
	Di-n-propyl isocionchomeronate	2	19	0.028	0.06	0	0	—	—
	Ethopabate	2	30	0.002	<0.01	0	70	<0.001	<0.01
	Fenobucarb	70	91	<0.001	<0.01	11	18	0.001	<0.01
	Propoxur	34	79	<0.001	<0.01	0	7	0.006	0.01
	Sulfanitran	58	85	0.006	0.01	13	52	<0.001	<0.01
	Tetrachlorvinphos	0	27	0.001	<0.01	4	7	0.029	0.03
	Tylosin	39	16	<0.001	<0.01	28	17	<0.001	<0.01
Group 2	Flumequine	95	96	0.705	1	87	93	0.002	0.02
	Methylprednisolone	92	90	0.760	1	83	71	0.060	0.30
	Sulfacetamide	83	97	0.057	0.19	75	87	0.001	<0.01
	Sulfadimethoxine	100	99	0.801	1	89	94	0.034	0.08
	Sulfadoxine	96	96	0.986	1	90	91	0.797	1
	Sulfaguanidine	83	91	0.247	0.41	74	81	0.106	0.18
	Sulfamonomethoxine	94	95	0.489	0.70	80	92	0.001	<0.01
	Sulfanilamide	90	93	0.661	0.83	83	88	0.230	0.29
	Tiamulin	90	96	0.069	0.08	85	94	0.001	<0.01
	α -Trenbolone	91	93	0.573	0.57	83	87	0.010	0.01

A 検体に農薬等を添加後、常温磨砕法により試料調製した場合の回収率

B 常温磨砕法により調製した試料に農薬等を添加した場合の回収率

Table 10. 試料調製前と試料調製後に農薬等を添加した場合の回収率の比較(凍結粉碎法)

	化合物	牛の肝臓				豚の肝臓			
		回収率		p値	q値	回収率		p値	q値
		C	D			C	D		
Group 1	2-Acetylamino-5-nitrothiazole	83	99	0.001	0.01	71	93	<0.001	<0.01
	Azamethiphos	5	96	<0.001	<0.01	17	86	<0.001	<0.01
	Carbaryl	93	102	0.176	0.65	75	90	0.159	0.58
	Cefapirin	29	45	<0.001	<0.01	33	50	<0.001	<0.01
	Di-n-propyl isocionchomeronate	0	55	<0.001	<0.01	6	56	<0.001	<0.01
	Ethopabate	29	96	<0.001	<0.01	86	92	0.104	0.19
	Fenobucarb	84	96	0.006	0.01	73	81	0.081	0.13
	Propoxur	90	101	0.272	0.37	69	92	0.019	0.03
	Sulfanitran	95	82	0.026	0.03	86	98	0.056	0.07
	Tetrachlorvinphos	62	97	<0.001	<0.01	74	91	<0.001	<0.01
	Tylosin	26	68	<0.001	<0.01	23	45	<0.001	<0.01
Group 2	Flumequine	94	88	0.021	0.21	87	101	0.000	<0.01
	Methylprednisolone	84	90	0.032	0.16	89	90	0.825	1
	Sulfacetamide	86	90	0.120	0.40	86	96	0.027	0.09
	Sulfadimethoxine	88	87	0.612	1	88	96	0.012	0.03
	Sulfadoxine	90	91	0.843	1	88	100	0.003	0.01
	Sulfaguanidine	79	92	0.011	0.02	82	86	0.327	0.54
	Sulfamonomethoxine	84	93	0.004	<0.01	85	98	0.001	<0.01
	Sulfanilamide	91	87	0.474	0.59	92	96	0.127	0.16
	Tiamulin	87	85	0.223	0.25	83	94	0.007	0.01
	α -Trenbolone	84	87	0.150	0.15	83	94	0.003	<0.01

C 検体に農薬等を添加後、凍結粉碎法により試料調製した場合の回収率

D 凍結粉碎法により調製した試料に農薬等を添加した場合の回収率