

令和 4-5 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）
 令和 6 年度 食品衛生基準科学研究費補助金（食品安全科学研究事業）
 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
 （総合）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（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。また、試料調製中に農薬等が分解、揮散、吸着等により減少する場合、残留濃度を過小評価するおそれがあるため、試料調製中の減少を抑制する必要がある。本研究では、試料の均質性が分析結果に与える影響及び試料調製方法による試料調製中の農薬等の減少程度の差異について調査し、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とし、以下の 2 つの検討を行った。

〔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

農薬を散布して栽培した農産物（トマト、ホウレンソウ、ブロッコリー）を用いて試料の均質性が分析結果に与える影響を検討した。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、分析値を比較した結果、粗粉碎試料では分析値が相対的に低くなった。特にマラチオンでは、粗粉碎試料の方が微粉碎試料と比較して顕著に低くなった。この傾向は、いずれの作物においても見られたことから、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。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、残留濃度の過小評価リスクを招くことが示唆された。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。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。加えて、いずれの作物においても微粉碎試料の約 90%が目開き 1 mm の篩を通過することが確認されたことから、均質化状態の評価方法として「目開き 1 mm の篩に負荷した際の通過率」を指標とする手法を提案し、「通過率 90%以上」を十分微細に均質化された試料の目安と位置付けた。

〔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

畜水産物を対象に凍結粉碎による試料調製法を確立した。うなぎ等の一部の水産物では、凍結粉碎法で試料調製を行っても、皮や骨の均質化が不十分となる課題も認められたが、多くの食品では常温磨砕法よりも試料粒子が細くなる傾向が見られた。凍結粉碎法の試料調製中の農薬等の減少抑制効果を検証するため、牛及び豚の肝臓に農薬等を添加後、常温磨砕法及び凍結粉碎法により試料調製し、回収率を比較した。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。したがって、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 齋藤真希

国立医薬品食品衛生研究所 根本 了

A. 研究目的

食品に残留する農薬等の分布は不均一であり、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。また、試料調製中に分解、揮散、吸着等により減少する場合、残留濃度を過小評価するおそれがあるため、試料調製中の減少を抑制する必要がある。本研究では、試料の均質性が分析結果に与える影響及び試料調製方法による試料調製中の農薬等の減少程度の差異について調査し、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とし、以下の2つの検討を行った。

〔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

〔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

圃場で散布された農薬は、作物表面や内部に均一に残留しているわけではないため、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。このため、残留農薬分析では試料調製によって得られた試料が十分に均質であることを確認することが望ましい。しかしながら、残留農薬検査では、分析法（抽出から測定まで）の妥当性については評価しているものの、試料調製の評価はほとんど行われていない。これは、十分に均質な試料状態を規定するために必要な科学的知見の報告が非常に少なく、試料の均質化状

態の評価指標が確立していないことが一因である。

本研究では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検討した上で、試料の均質性の評価方法及び十分に均質化された試料の目安を提案することを目的とした。1年目は果菜類であるトマト、2年目は葉菜類であるホウレンソウ、3年目は花野菜であるブロッコリーを用いて検討を行った。

〔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

残留農薬等分析では常温磨砕法により試料調製を行うことが多い。しかし、食品によっては常温磨砕法では均質化が困難な場合がある。また、一部の農薬等は、試料調製中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、酵素やその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、凍結粉碎法では常温磨砕法よりも微細に粉碎できる可能性がある。また、凍結粉碎法では他の農薬等の安定性や抽出効率に影響を与えることなく、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、本研究では畜産物を対象として、凍結粉碎法を確立するとともに、その有用性について検証することを目的とした。1年目は畜産物、2年目は水産物を対象に凍結粉碎法による試料調製を検討した。3年目は、試料調製中に生じる農薬等の減少の抑制に凍結粉碎法が有効であるかを検証した。

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

a 令和4年度： トマト

1. 圃場試験の概要

日本植物防疫協会高知試験場にて、トマト（品種：モモタロウ）を施設栽培した。2023年1月4日および11日に表A-1の条件で農薬製剤300 L/10 a相当量を2回混用散布した。最終散布1日後に約8 kg（160 g/個）の試料（処理区試料）を収穫した。また、1月4日の農薬散布前に約2.5 kgの試料（無処理区試料）を収穫した。

2. 分析対象物質

供試農薬製剤の有効成分（ジノテフラン、マラチオン、テブコナゾール、フルベンジアミド、ブプロフェジン、フェンピロキシメート、ペルメトリン）

3. 分析標準物質

ジノテフラン標準品（99.8%；富士フィルム和光純薬製）、マラチオン標準品（98.33%；Dr. Ehrenstorfer 製）、テブコナゾール標準品（98.6%；富士フィルム和光純薬製）、フルベンジアミド標準品（99.2%；富士フィルム和光純薬製）、ブプロフェジン標準品（99.4%；富士フィルム和光純薬製）、(E)-フェンピロキシメート標準品（98.41%；Dr. Ehrenstorfer 製）、ペルメトリン標準品（99.73%；Dr. Ehrenstorfer 製）

4. 試薬

アセトニトリル、トルエン、メタノール：残留農薬試験用（関東化学製）

メタノール：LC/MS 用（関東化学製）

酢酸アンモニウム：特級（関東化学製）

水：PURELAB Flex System（Veolia Water Solutions & Technologies）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製）

5. 装置

ミキサー：ロボクーブ Blixer 5-Plus（エフ・エム・アイ製）

ホモジナイザー：PT3100D（KINEMATICA AG 製）

超音波洗浄機：FU-80C（アイワ医科工業製）

液体クロマトグラフ・質量分析計（LC-MS/MS）：

Nexera X2 System（島津製作所製）、

Triple Quad 4500（AB Sciex 製）

データ処理：Analyst（AB Sciex 製）

6. 測定条件

高速液体クロマトグラフ：表A-2

質量分析計：表A-3

MS パラメーター：表A-4

7. 標準溶液の調製

7.1 標準原液の作成

ジノテフラン、マラチオン、テブコナゾール、フルベンジアミド、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。ブプロフェジンの分析標準物質10.0 mg（純度補正值）を50 mL 容メスフラスコに精秤し、アセトンで定容して200 mg/L の標準原液を調製した。

7.2 検量線用標準溶液および検量線の作成

1) ジノテフラン、マラチオン、テブコナゾール、フルベンジアミド、ブプロフェジンおよびフェンピロキシメート（溶媒検量線）

7.1 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、LC-MS/MS で測定した。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) ペルメトリン（マトリックス検量線）

7.1 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 μ L と任意のブランク試料の試験溶液 475 μ L 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 で測定し、横軸に濃度、縦軸にピーク面積をとって検量線を作成した。

8. 分析操作

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。

8.1 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。

8.2. GCB/NH₂ 積層ミニカラム精製

抽出液 1、2、4、10 および 20 mL（各称取量ともに試料 0.2 g 相当量）を分取した後、約 1 mL までは減圧濃縮した（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）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）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。

8.3. 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。

9. 分析法の妥当性評価

市販品試料を用いた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 1 mg/kg 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および無処理区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。

10. 常圧加熱乾燥法による固形物含有率の測定方法

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 1.00、2.00、5.00、10.0、20.0 g $\pm$ 10% の試料を秤取した。これらを 105°C に設定した恒温乾燥機内で 6 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。

11. 試料均質化状態の検討

11.1. 均質化時間の比較

市販品トマト（産地：茨城県、品種：惚れ惚れ）約 2.5 kg のヘタを除去し縦十字に 4 分割した後、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。

11.2. 均質化評価用試験篩の比較

11.1 項のトマトおよび別品種の市販品トマト（産地：群馬県、品種：夏美人）それぞれ約 2 kg のヘタを除去し細切後、ミキサーで短時間均質化して粗大固形物が残る均質化が不十分な試料（粗粉碎試料）を調製した。粗粉碎試料を約 1 kg

ずつ 2 つに分割し、それぞれの重量を記録した。それらを目開き 1 mm または 2 mm の試験用篩に負荷し、ヘラを用いて裏ごしする要領で通過させ、通過物の重量を測定した。なお、ヘラは先端が柔らかいものを使用し、ヘラ処理時の加圧により固形物が必要以上に篩を押し通らないように力加減に注意した。また、次式より通過物の重量評価による通過率を算出した。

通過物重量評価での通過率 (%)

$$= \frac{\text{篩通過物重量}}{\text{試料負荷重量}} \times 100$$

11.3. 試験篩の通過手法の比較

11.3.1. 均質化試料の調製

圃場施設で栽培した無処理区試料および処理区試料それぞれ約 2 kg のヘタを除去し細切後、ミキサーで均質化して、固形物が十分に均質化された微粉碎試料および粗粉碎試料をそれぞれ調製した。

11.3.2. ヘラ処理

前項で調製した無処理区の微粉碎試料および処理区の粗粉碎試料を約 500 g はかり取り、重量を記録した。それらを目開き 1 mm の試験用篩に負荷し、約 5 分間静置した後に通過物重量および篩上の残渣重量を測定した。続いて、ヘラを使用した方法（11.2 項参照）で均質化試料を篩に通過させ、通過物重量および篩上の残渣重量を測定した。篩上の残渣重量は、残渣を含んだ篩の重量から事前に測定した篩重量を減算することで求めた。また、11.2 項と同様の方法で算出した通過物重量評価での通過率に加えて、次式より残渣重量評価での通過率を算出した。

残渣重量評価での通過率 (%)

$$= \frac{(\text{試料負荷重量} - \text{残渣重量})}{\text{試料負荷重量}} \times 100$$

11.3.3. 流水洗浄処理

11.3.1 項で調製した無処理区の微粉碎試料および粗粉碎試料を約 500 g はかり取り、重量を記録した。500 mL の水を加え混合した後、目開き 1 mm の試験用篩に負荷し、約 5 分間静置した後に篩上の残渣重量を測定した。続いて、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 に調製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拭きあげた後の篩上の残渣重量を測定し、残渣重量評価での篩通過率を算出した。

12. 分析用試料の秤取

12.1 試料秤取量および試料静置の影響

均質化直後に 2L ビーカーに充填した処理区の微粉碎試料および粗粉碎試料それぞれの中層から、1.00、2.00、5.00、10.0 および 20.0 g の検体を各 6 点秤取し、それらの農薬濃度を分析した。さらに、同時点における中層より 1.00、2.00、5.00、10.0 および 20.0 g±10% の検体を各 6 点秤取し、固形物含有率を測定した。試料秤取は、秤取ごとにビーカー内の試料をよく混和した後に実施した。ビーカー内の両均質化試料を 1 時間静置した後、上層、中層および下層から 20.0 g の検体を各層 2 点ずつ秤取し、それらの農薬濃度を分析した。同時点での上層、中層および下層から 20.0 g±10% の検体を各層 2 点ずつ秤取し、固形物含有率を測定した。なお、全ての検体秤取時には、先端口径 8 mm の駒込ピペットを使用し、静置後の秤取時には秤取器具で各層を混和しないように注意しながら試料採取を実施した。

12.2 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微粉碎試料および粗粉碎試料の中層から、20.0 g の検体を各 2 点秤取し、遠心分離（10000×g、10 分、20℃）した。傾斜法により沈殿と上澄み液に分画し、両画分中の農薬濃度を分析した。

12.3 篩分別後の残渣と通過物の比較

11.3.2 項のヘラ処理により、処理区の粗粉碎試料約 2 kg を篩上の残渣と通過物に分別した。分別した両試料から、それぞれ 20.0 g の検体を各 6 点秤取し、農薬濃度を分析した。

b 令和 5 年度： ほうれんそう

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/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)

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 μ m
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 μ L

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：N₂

イオン検出法：MRM 法

MS パラメーター：表 B-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、0.004、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 μ L と任意の農薬無添加試料の試験溶液 475 μ L 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/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。

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越える 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 B-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. 凍結粉碎試料の調製

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) を粉碎しパウダー状にし、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⁷⁾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。ドライアイスを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 晩かけてドライアイスを昇華した。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 点秤取りし、遠心分離 (10000×g、10 分、20℃) 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 点秤取りし、農薬濃度を分析した。

c 令和 6 年度： ブロッコリー

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、散布液の希釈率を表 C-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℃

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 パラメーターを表 C-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、0.004、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) 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 に細切し、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^{7, 8)}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

a (令和4年度) 及び b (令和5年度)

1. 食品

牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、豚の筋肉、豚の脂肪、鶏の筋肉、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 (アイスティーマイエンズ製) 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 2.5 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 1.1 倍量のドライアイス (約 550 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℃）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 0.5 倍量のドライアイス（約 250 g）を加え、110 秒間粉砕した。

c 令和 6 年度

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ィルム和光純薬製の残留農薬試験用、酢酸は富士フィルム和光純薬製の精密分析用、ギ酸は富士フィ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）（いずれもアイスティサイエンス製）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（アイスティサイエンス製）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℃(300℃)；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、ジエールサイエンス製）；カラム温度 40℃；注入量 2 μL；移動相 0.1%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。検討対象は表 C-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 µg/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

a 令和 4 年度

1. 圃場試験の概要

高知県で施設栽培されたトマトに 6 種農薬製剤（分析対象物質 7 種）を 2 回混用散布した後、1 日後に採取し、供試試料とした。試料受領時に撮影した作物写真を図 A-1 に示す。供試試料の平均個体重量は 160 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および無処理区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表 A-5 に示す。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、87~102%であり、その併行相対標準偏差（RSDr）は 5%以下であった。0.5 mg/kg 添加試料での平均回収率は、88~104%であり、RSDr は 8%以下であった。1 mg/kg 添加試料での平均回収率は、97~105%であり、RSDr は 4%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。

3. 試料均質化状態の評価

3.1. 均質化時間の比較

ミキサーの稼働時間別のトマト均質化状態を図 A-2 に示す。均質化時間が長くなるにつれ、固形物（果肉、果皮および種子）が微細になることを確認した。4 分間均質化した試料では、大きな固形物が見られず、十分に均質化された試料

（微粉碎試料）であると判断した。また、目視で明らかな固形物が確認できる 0.5 分間均質化した試料を不適切試料（粗粉碎試料）とした。

3.2. 均質化評価用試験篩の比較

目開き 2 mm 篩における粗粉碎試料の通過率は 89 および 92%であり、粗大固形物を含む多くの均質化試料が篩を通過した（図 A-3）。一方、目開き 1 mm 篩での通過率は 77 および 80%であり、均質化が不十分な固形物は篩を通過しなかった。したがって、試料中の固形物が、十分微細に均質化されているか評価するためには、参考規定^{1, 2)}で示される目開き 1 mm 篩の使用が適切であると考えられる。

3.3. 篩通過手法の比較

ヘラ処理および流水洗浄処理時の様子を図 A-4、篩通過時における均質化試料および篩上の試料状態を図 A-5 および図 A-6 に示す。また、ヘラ処理および流水洗浄処理時における目開き 1 mm 篩の通過率を図 A-7 に示す。

ヘラ処理の前後どちらの時点でも、残渣重量評価および通過物重量評価による通過率の差は、均質化の程度に関わらず 2%以下であった。したがって、篩上に残った残渣の重量および篩を通過した試料の重量どちらを通過率の評価に用いても大きな差異がないことを確認した。以降では、流水洗浄処理に合わせて、残渣重量で評価した通過率を比較した。

ヘラ処理後の通過率は、粗粉碎試料で 63%、微粉碎試料で 95%となった。流水洗浄処理時の通過率は、洗浄時間が長くなるに従い増加し、粗粉碎試料で 5 分間、微粉碎試料で 4 分間の洗浄で凡そ一定となった。それらの時点での微粉碎試料および粗粉碎試料の通過率は、それぞれ 69%および 99%であった。処理方法に関わらず微粉碎試料および粗粉碎試料における通過率は同程度となり、十分に均質化した試料は目開き 1 mm 篩を 90%以上通過させることが可能であった。また、均質化の状態に関わらず流水洗浄処理ではヘラ処理よりも通過率が高くなった。これは、ヘラ処理で篩を通過できなかった網目に付着した残渣や粗大

固形物に付着した微細な残渣を、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る（図 A-5-C、D および図 A-6）。

4. 試料秤取量の影響

異なる重量の試料を秤取した際の各農薬の平均濃度は、微粉碎試料および粗粉碎試料において、ジノテフランで 0.200～0.209 および 0.187～0.194 mg/kg、マラチオンで 0.159～0.169 および 0.091～0.130 mg/kg、テブコナゾールで 0.178～0.213 および 0.145～0.199 mg/kg、フルベンジアミドで 0.152～0.167 および 0.152～0.174 mg/kg、ブプロフェジンで 0.288～0.331 および 0.271～0.322 mg/kg、フェンピロキシメートで 0.052～0.067 および 0.051～0.058 mg/kg、ペルメトリンで 0.146～0.203 および 0.137～0.157 mg/kg であった。微粉碎試料および粗粉碎試料における対応する試料秤取量ごとの各農薬の分析値（n=6）を Mann-Whitney の U 検定により解析すると、試料秤取量 20 g では異なる母集団とみなされる農薬数は 2 農薬であったが、秤取重量の減少に伴いその数は増加し、2 g 秤取時では 6 農薬となった（表 A-6）。試料秤取量 1 g では該当する農薬は 3 農薬となったが、試料の秤取重量を少量化するほど、均質化の程度が分析値に与える影響が有意に増大することが示唆された。

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³⁾。また、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^{4) 5)}。そこで、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試料 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 A-8 に示す。フルベンジアミドを除き、同一の試料秤取量における平均相対濃度は、粗粉碎試料の方が微粉碎試料よりも低い傾向を示した。特に、マラチオンおよびテブコナゾールではこの傾向が顕著であり、マラチオンでは最大 1.8 倍、テブコナゾールでは最大 1.2 倍の差が生じた。同様の微粉碎試料よりも粗粉碎試料

で分析値が低くなる傾向は、全農薬の相対濃度においても確認された。微粉碎試料および粗粉碎試料における各農薬の分析値の変動（RSD 値）を図 A-9 に示す。ジノテフランおよびフルベンジアミドを除き、試料秤取量が同一である場合は、微粉碎試料よりも粗粉碎試料でその値が大きくなる傾向が見られた。つまり、均質化が不十分な場合は、試料中で農薬が偏在化しており、秤取する試料部位によって分析値に変動が生じる危険性を内包することが示唆された。この傾向は、個別の農薬での分析値変動の総平均においても確認されている（図 A-10）。一方で、個別農薬の結果では検体の秤取量の差異による分析値変動への影響は不明瞭であった。そこで、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、各農薬の試料 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 A-11）。相対濃度の変動は、微粉碎試料および粗粉碎試料の両試料とも試料の秤取量を少量化するほど増大する傾向が確認され、その程度は粗粉碎試料の方が微粉碎試料よりも大きくなった。試料の秤取量を、微粉碎試料では 2 g 以下、粗粉碎試料では 10 g 以下にした際に、全分析対象農薬での相対濃度の変動は顕著に増加した。

試料 20 g 秤取時の平均固形物含有率で補正した際の各秤取量における平均相対値を図 A-12 に示す。粗粉碎試料での 20 g および 10 g 試料のうちそれぞれ 1 点において容器破損に伴い秤取試料の外部への流出が確認されたため、それら試料は解析から除外し、残り 5 点の分析値で結果を取り纏めた。それぞれの試料秤取量における平均相対値は、微粉碎試料よりも粗粉碎試料で低くなる傾向が見られた。これは、粗粉碎試料の秤取試料における均質化が不十分な果肉などの粗大固形物が水分を含有するため、秤取した検体重量に対する水分の割合が多くなることに起因すると考えられる。微粉碎試料よりも粗粉碎試料で相対値が低くなる傾向は、固形物含有率と農薬濃度の分析値で類似していた。

5. 試料静置の影響

微粉碎試料および粗粉碎試料を1時間静置した後、異なる三層から秤取した試料中の濃度を均質化直後の20g秤取試料中濃度で補正した相対濃度を図A-13、同時点における異なる三層間の平均分析値の変動を図A-14、均質化直後における20g秤取試料中の固形物含有率で補正した各層での相対値を図A-15に示す。

均質化の程度に関わらず、ジノテフランの相対濃度は、上層、中層および下層で凡そ同程度となり、三層間の分析値の変動も3%以下と顕著に低かった。よって、ジノテフラン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。しかし、その他の農薬は、下層<中層<上層の順に相対濃度が高くなった。また、それぞれの農薬の相対濃度は、下層では均質化の程度に関わらず同程度であったが、上層と中層では微粉碎試料よりも粗粉碎試料で低くなった。これらの影響により異なる三層における各農薬の分析値変動は微粉碎試料よりも粗粉碎試料で小さくなった。さらに、どの農薬でも同一の層から秤取した検体2点の分析値の差は、均質化の程度に関わらず顕著な差は見られなかった。つまり、秤取する層による相対濃度が異なる場合でも、各層内の農薬濃度は凡そ均一であることが示唆された。

固形物含有率の相対値は、下層<中層<上層の順で高くなり、上層および中層の相対値は微粉碎試料よりも粗粉碎試料で低くなった。これらの傾向は、微粉碎試料および粗粉碎試料中の各層におけるジノテフランを除く各農薬の相対濃度分布と合致していることから、固形物の均質化試料内での偏在化が分析値の変動に影響を与えていることが示唆された。さらに、静置後における均質化試料の分離の様子を確認すると粗粉碎試料では下層に液体が沈降した層がわずかにみられる程度であったが、微粉碎試料では明らかに下層に液層が厚く形成されていた（図A-16）。このことは、先にも述べたように粗粉碎試料では粗大固形物が水分を含有していると考えられるため、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。以上のことから、粗粉碎試料では水分が粗大固形物中に含有され、固形物と液体画分の割合の差が小さく、それら画分の上層、中層および下層への分離が微粉碎試料よりも緩慢であったため、異なる三層間での農薬分析値の差も小さくなったと考えられる。

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および粗粉碎試料の中層から秤取した検体より遠心分離して得た沈殿と上澄み液中の各農薬の存在率を図A-17に示す。微粉碎試料および粗粉碎試料の沈殿と上澄み液の重量比は、それぞれ21:79および32:68であり、粗粉碎試料で沈殿画分が多くなった。これは、粗粉碎試料の沈殿画分中における粗大な固形物が水分を内包しているため、微粉碎試料に比べて液相が少ないことに起因すると考えられる。しかし、各農薬の沈殿および上澄み液への存在率は、均質化の程度によらず概ね同程度であった。ジノテフランの存在率は、両画分の重量比と類似しており、上澄み液と沈殿に凡そ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、ブプロフェジンを除き、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。粉碎試料および粗粉碎試料におけるブプロフェジンを除く各農薬の 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A-18）。したがって、ジノテフランのような顕著に極性の高い農薬を除き、農薬は液相よりも固形物へ分布することを確認した。5項において、静置後の均質化試料でジノテフランを除く農薬の相対濃度が、固形物含有率が高い上層で高くなり、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化する性質由来することが示唆された。この調査結果は、ブドウにおける調査結果と同様であった⁶⁾。

7. 篩分別後の残渣と通過物の比較

粗粉碎試料を目開き1mm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A-19に、両画分での分析値の変動

を図 A-20 に示す。篩通過後の残渣および通過物の重量比は 37:63 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が含まれていた。ジノテフランは、両画分の重量比と類似した存在率を示した。つまり、残渣と通過物に凡そ均等に分布していた。分画した試料中にジノテフランが均一に分布する傾向は、遠心分離後の沈殿と上澄み液への存在率からも確認されている。その他の農薬は、残渣に 43~62%が分布していた。遠心分離による分別後の農薬分布の傾向と異なり、農薬の極性が低くなるほど、固形物を多く含む篩上の残渣への存在率増加は見られなかった。各農薬における分析値の変動は、通過物よりも残渣で大きくなった。特に、ジノテフランを除く農薬での残渣における分析値変動は、顕著に大きくなった。残渣では水分量が少ないため、試料内で農薬が均一に広がらず、秤取した検体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だと考えられる。

供試トマト試料は農薬を茎葉散布して、最終散布 1 日後に収穫したことから、残留農薬は主に果皮上に分布していると考えられるので、多くの農薬は液相よりも果皮を含む沈殿相に分布したものと推察された。一方、ジノテフランのような極性農薬は、水溶性が高いため、均質化工程で試料中の水分に可溶して均質化試料全体に分布したと考えられた。そして、篩と遠心分離で分別した際の分布傾向の違いから、トマトの果皮は、弾性を有する果肉と同程度に微細化され、篩上の堆積物と通過物での存在比に差異が無かったものと推察された。

b 令和 5 年度

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 B-1 に示す。供試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 B-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 B-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 B-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 B-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 B-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 B-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 B-6 に示す。ヘラ処理後における平均通過率（各作業員での値）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 B-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、作業員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員間で 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^{1), 2)}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 B-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、ペルメトリンで 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³⁾。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^{5, 6)}。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 B-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 B-8 に示す。ペルメト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、ペルメトリンは、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 B-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、凍結粉砕法は、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 B-10、静置後の各均質化試料の状態を図 B-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 B-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 B-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 B-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 B-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⁹⁾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 B-16、両画分での分析値の変動を図 B-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。

c 令和 6 年度

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図 C-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表 C-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、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 (表 C-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図 C-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図 C-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°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。冷凍庫内でのドライアイス昇華後では -18.1°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。

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図 C-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図 C-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 篩の平均通過率を図 C-6、異なる2名の作業員間の通過率の差を図 C-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 (図 C-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 (図 C-7)。したがって、一定流速の

流水を用いた処理では作業者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。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¹⁾、²⁾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表 C-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³⁾。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⁴⁾、⁵⁾。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図 C-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>粗粉砕試料の順で低くなる傾向を示した。特に、粗粉砕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、粗粉砕試料に

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。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>粗粉砕試料の順で低くなる傾向を示した。

粗粉砕試料、微粉砕試料及び凍結粉砕試料における各農薬の分析値の変動 (RSD 値) を図 C-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 (図 C-10)。総平均 RSD 値は、微粉試料<凍結粉砕試料<粗粉砕試料の順に大きくなる傾向を示し、微粉試料及び凍結粉砕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

分取した粗粉砕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ホ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⁹⁾。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 (図 C-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ると考えられる。

〔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砕法の有用性の検証

a 令和 4 年度

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 (B)、ドライアイス・予冷方式 (C) 及びドライアイス・予備凍結方式 (D)〕の操作手順を確立し、試料の粉砕状況を常温磨砕法 (A) と比較した。本研究では、果実を用いて確立した方法が畜産物（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）に適用できるか検討を行った。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

検体の大きさ： 約 2.5 cm 角

1. 凍結粉砕法による試料調製法の検討

① 液体窒素を用いた凍結粉砕法 (B)

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）500 g を 2.5 cm 角にカットし、液体窒素を加えて凍結させた。凍結に必要な液体窒素量は、果実では 3～4 L であったのに対し、畜産物では 4～5 L 程度であった。いずれの食品も液体窒素に浸して 4 分間放置することにより、中心部まで完全に凍結した。液体窒素で凍結した検体は極めて低温となるため、液体窒素の非存在下で 120 秒間粉砕しても融解は認められなかった。しかし、粉砕直後の試料温度は -55～-38℃ となり、果実（キウイ -69℃）と比べてやや

高かった（表 A-7）。畜産物を液体窒素で凍結すると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。

② ドライアイスを用いた凍結粉砕法 (C 及び D)

ドライアイスを用いた凍結粉砕法（C 及び D）は、いずれもドライアイスの存在下で粉砕する方法である。投入したドライアイスは粉砕中に昇華し、減少するが、粉砕中にドライアイスが不足した場合、試料温度が上昇し、試料が融解する恐れがある。一方、粉砕時にドライアイスは大過剰投入した場合、粉砕後にドライアイスを昇華させるのに時間を要することに加え、刃と試料が接触しにくくなることにより、試料の均質性の低下を招く。果実の場合は、ドライアイス・予冷方式 (C) では検体量の 1.1～1.2 倍量、ドライアイス・予備凍結方式 (D) では 0.5～0.6 倍量が適切と考えられた。そこで、ドライアイス・予冷方式 (C) では検体量の 1.1 倍量、ドライアイス・予備凍結方式 (D) では 0.5 倍量のドライアイスを用いて畜産物を粉砕した。なお、ドライアイス・予冷方式 (C)、ドライアイス・予備凍結方式 (D) のいずれにおいても粉砕前にドライアイス 100 g を粉砕機に入れて約 10 秒間運転し、粉砕機を冷却することとした。その結果、ドライアイス・予冷方式 (C) ではいずれの食品も問題なく、粉砕することができた。一方、冷凍庫で凍結した検体は非常に硬くなるため、ドライアイス・予備凍結方式 (D) では粉砕が困難であり、特に豚及び鶏の筋肉では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。ドライアイス・予備凍結方式 (D) で粉砕する場合は粉砕する検体の大きさを 2.5 cm 未満にする必要があると考えられた。表 A-7 に試料調製後の温度を示した。果実ではいずれの食品も約 -78℃ であったが、畜産物では果実よりも若干温度が高い傾向が見られ、畜産物の方が粉砕時に発熱しやすいものと考えられた。これらの結果から、畜産物ではドライアイス・予冷方式 (C) は検体量の 1.2 倍量、ドライアイス・予備凍結方式 (D) は 0.6 倍量のドライアイスを用いるのが良いと考えられた。

なお、常温磨砕法で畜産物を均質化すると 24～40℃となるため、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. 常温磨砕法との比較

畜産物を常温磨砕した試料及び凍結粉砕後融解した試料はいずれも粘性が高く、粉砕状況を比較するのが困難であった（図 A-21）。そこで、得られた試料を用いて抽出操作を行った後、1 mm のふるいを通し、ふるい上の残渣を比較した。抽出は試料 10.0 g にアセトン 50 mL（1 回）を加えて、ホモジナイズ（1 分間）または振とう（5 分間）により行った。その結果、常温磨砕法よりも凍結粉砕法、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 A-22）。凍結粉砕法同士では大きな差は認められなかった。

b 令和 5 年度

令和 4 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。令和 4 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 B-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 B-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、食品によっては粉碎されていない大きい皮や骨等も認められた（図 B-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碎されていない 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碎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 B-19）。また、えびでは常温磨砕法より凍結粉碎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/凍結粉碎法）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、ポリトロン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、ポリトロン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碎法、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、凍結粉碎法のいずれも粉碎時間を長

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。

c 令和 6 年度

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。検討対象化合物は表 C-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。結果を表 C-6 及び図 C-13～図 C-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、Sulfaquinoxaline 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）及び凍結粉砕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。牛の筋肉の結果を図 C-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。

牛の肝臓の結果を図 C-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。

豚の肝臓の結果を図 C-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-Acetylaminio-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等を除き、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、凍結粉砕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

凍結粉砕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、凍結粉砕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 (表 C-7 及び表 C-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。牛の肝臓の結果を図 C-19 及び表 C-7、豚の肝臓の結果を図 C-20 及び表 C-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砕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 (表 C-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 (表 C-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 Sulfanitran、豚の肝臓中の 2-Acetylamino-5-nitrothiazole、Carbaryl、Ethopabate、Fenobucarb、Sulfanitran 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 (図 C-16)、抽出段階での損失が低回収率の主要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トマト、ホウレンソウ、ブロッコリーを用いて試料の均質化状態が分析結果に与える影響を検討した。その結果、均質化が不十分で粗大な固形物を多く含む試料では分析値が相対的に低くなった。特にマラチオンでは、粗粉砕試料の方が微粉砕試料と比較して顕著に低くなった。この傾向は、いずれの作物においても見られたことから、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。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、残留濃度の過小評価リスクを招くことが示唆された。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 (図 C-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。加えて、いずれの作物においても微細に均質化した試料の約 90%が目開き 1 mm の篩を通過することが確認されたこと

から、均質化状態の客観的な評価方法として「目開き 1 mm の篩に負荷した際の通過率」を指標とする手法を提案し、「通過率 90%以上」を十分微細に均質化された試料の目安と位置付けた。

〔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

畜水産物を対象に、凍結粉碎による試料調製法を確立した。凍結粉碎法の方が、常温磨砕法よりも試料粒子が細くなる傾向が見られた。ただし、うなぎ等の一部の魚種では、凍結粉碎法で試料調製を行っても皮や骨の均質化が不十分となる課題も認められた。

凍結粉碎法による試料調製中の農薬等の減少抑制効果を検証するため、検体に農薬を添加し、常温磨砕法及び凍結粉碎法で試料調製を行って回収率を比較した。その結果、牛及び豚の肝臓では、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。

E. 参考文献

- 1) 飼料の公定規格：
<http://www.famic.go.jp/ffis/feed/kokuji/k51n756.html>
(2023 年 2 月 28 日閲覧)
- 2) 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)
- 3) D. J. MacLachlana and D. Hamilton: Pest Manag Sci. 67、609–615 (2011) .
- 4) S. J. Lehotay、and J.M. Cook: J. Agric. Food Chem.、63、4395-4404 (2015) .
- 5) 志田 (齊藤) 静夏、根本了、亀山浩：日本食品化学学会誌、27、135-140 (2020) .
- 6) S. Hikino、T. Yajima、M. Sakasai、D. Kobayashi、K. Iijima and K. Ohyama: J. Pestic. Sci. 44、162–170 (2019) .
- 7) 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).
- 8) 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)
- 9) 文部科学省：日本食品標準成分表 2020 年版 (八訂)

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. 志田（齊藤）静夏：残留農薬等分析における試料調製について．第 59 回全国衛生化学技術協議会年会（2022 年 11 月 1 日）
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碎法と常温磨砕法の比較．第 45 回農薬残留分析研究会（2022 年 11 月 24 日）
3. 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 年 10 月 12 日）
4. 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 年 12 月 8 日）
5. 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 年 11 月 11 日）
6. 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 年 1 月 31 日）

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 A-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
マラソン乳剤	マラチオン (MAL)	50	2000
オンリーワンフロアブル	テブコナゾール (TEB)	20	2000
フェニックス顆粒水和剤	フルベンジアミド (FLB)	20	2000
アプロードエースフロアブル	ブプロフェジン (BUP)	20	1000
アプロードエースフロアブル	フェンピロキシメート (FEN)	4	1000
アディオン乳剤	ペルメトリン (PEL)	20	2000

表 A-2. 測定条件 (高速液体クロマトグラフ)

カラム	ACQUITY UPLC BEH C18 (Waters 製) 内径 2.1 mm、長さ 100 mm、粒径 1.7 μ m
移動相	5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 / 5 mmol/L 酢酸アンモニウム含有メタノール溶液 (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	10 μ L
保持時間	ジノテフラン : 約 2.5 min、マラチオン : 約 5.5 min、 テブコナゾール : 約 5.9 min、フルベンジアミド : 5.7 min、 ブプロフェジン : 約 6.4 min、フェンピロキシメート : 約 6.7 min、 ペルメトリン : 約 7.1 および 7.3 min

表 A-3. 測定条件 (質量分析計)

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、テブコナゾール、 ブプロフェジン、フェンピロキシメート、 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	N ₂
イオン検出法	MRM 法

表 A-4. 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 (<i>m/z</i>)	プロダクトイオン (<i>m/z</i>)
ジノテフラン	51	17	10	203.1	129.1
マラチオン	44	17	6	331.0	127.1
テブコナゾール	41	39	6	308.1	70.1
ブプロフェジン	46	21	6	306.2	116.2
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
フルベンジアミド	-90	-46	-1	680.9	254.1

表 A-5. 妥当性の確認結果

分析対象農薬	平均回収率 (%) [RSDr (%)]		
	0.01 mg/kg 添加	0.5 mg/kg 添加	1 mg/kg 添加
ジノテフラン	87 [3]	103 [2]	100 [2]
マラチオン	102 [4]	98 [8]	105 [2]
テブコナゾール	93 [5]	100 [1]	103 [2]
フルベンジアミド	94 [2]	104 [3]	105 [4]
ブプロフェジン	94 [1]	98 [2]	103 [2]
フェンピロキシメート	95 [3]	100 [3]	102 [2]
ペルメトリン	89 [5]	88 [6]	97 [2]

n = 5

表 A-6. 各試料秤取量での微粉碎試料および粗粉碎試料の分析値に対する Mann-Whitney の U 検定結果

	試料秤取量 (g)				
	20	10	5	2	1
ジノテフラン	○	×	×	×	×
マラチオン	×	×	×	×	×
テブコナゾール	○	○	×	×	○
フルベンジアミド	○	○	×	○	○
ブプロフェジン	○	○	×	×	×
フェンピロキシメート	×	×	○	×	○
ペルメトリン	○	○	○	×	○
No. of ×	2	3	5	6	3

× : 有意差あり (p<0.05)、○ : 有意差なし

図 A-1. 作物写真

図 A-1.1. 無処理区



図 A-1.2. 処理区 (受領試料の半量)



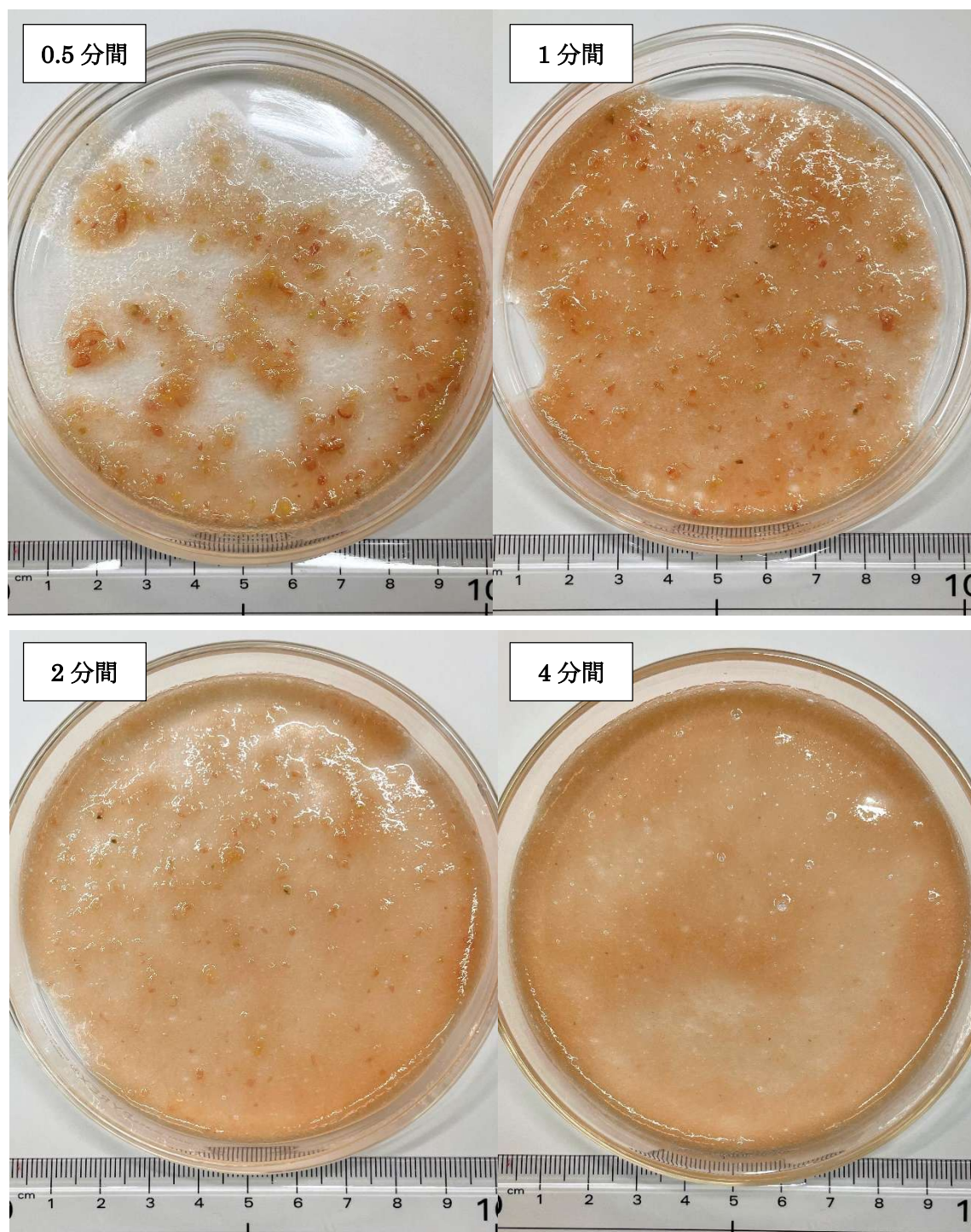


図 A-2. ミキサーの稼働時間別のトマト均質化状態

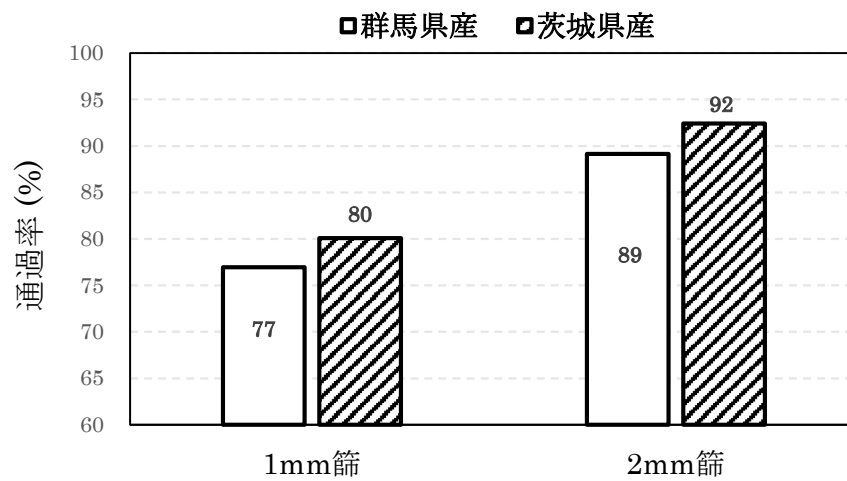


図 A-3. 目開きの異なる篩における粗粉碎試料の通過率

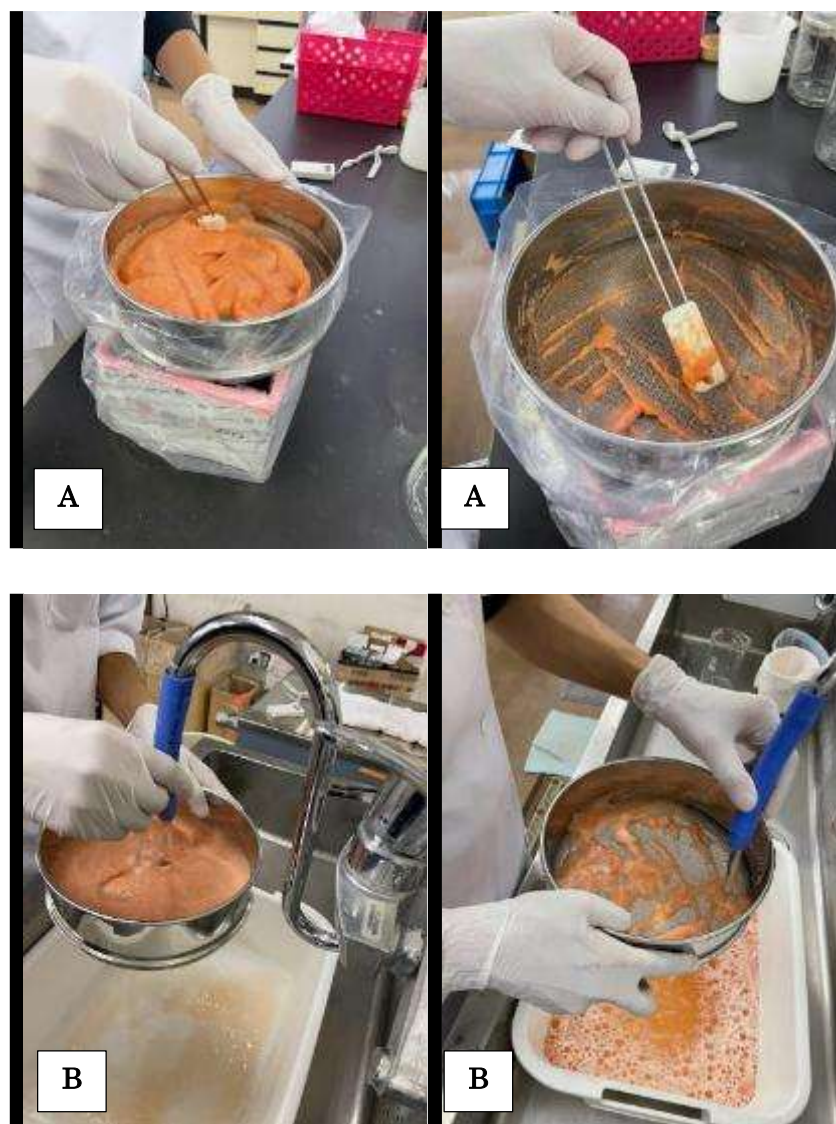


図 A-4. ヘラ処理および流水洗浄処理による篩通過時の様子
(A：ヘラ処理、B：流水洗浄処理)

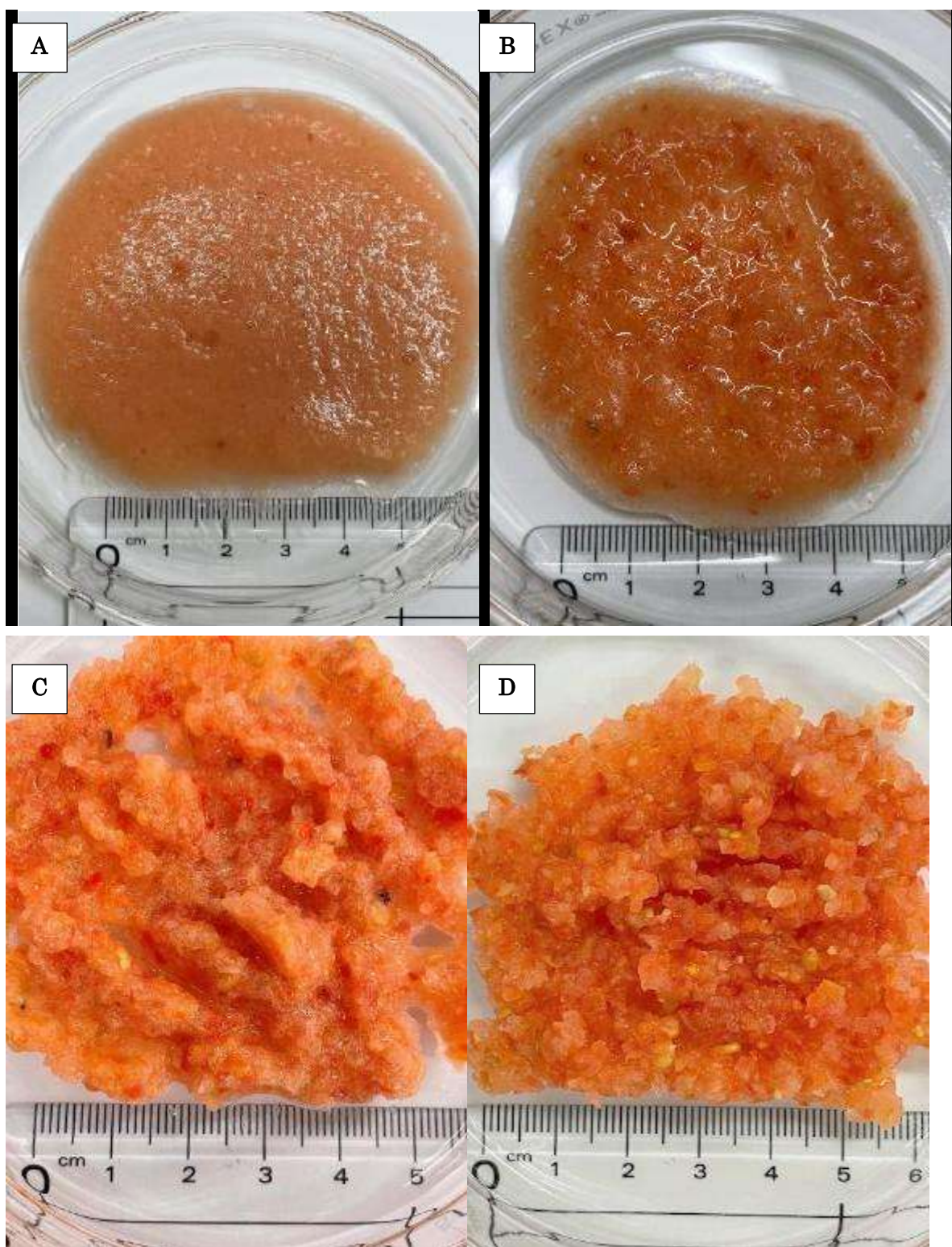


図 A-5. 篩の通過前後における均質化試料の状態

(A：篩通過前の微粉碎試料、B：篩通過前の粗粉碎試料、C：ヘパ処理後における粗粉碎試料の篩上残渣、D：流水洗浄処理後における粗粉碎試料の篩上残渣)

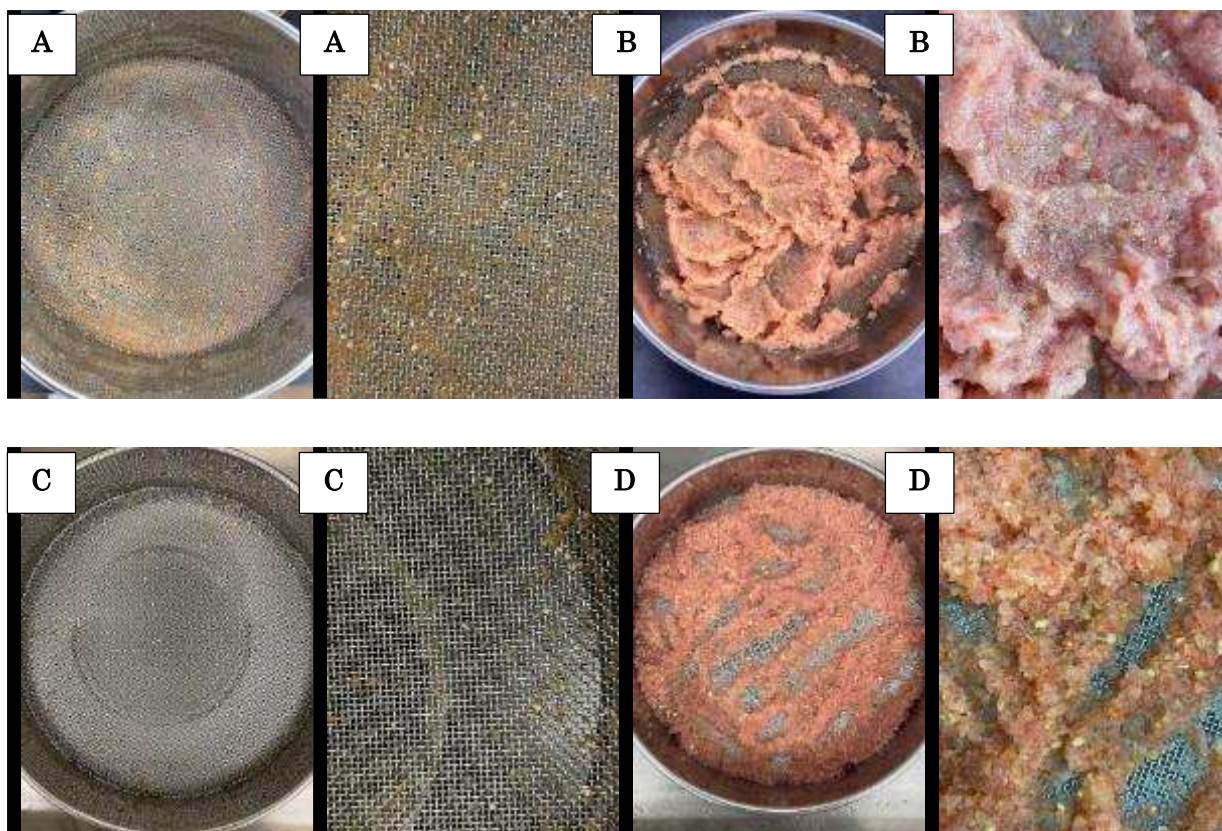


図 A-6. ヘラ処理および流水洗浄処理後における篩上試料の状態

(A：微粉碎試料のヘラ処理、 B：粗粉碎試料のヘラ処理、
C：微粉碎試料の流水洗浄処理、D：粗粉碎試料の流水洗浄処理)

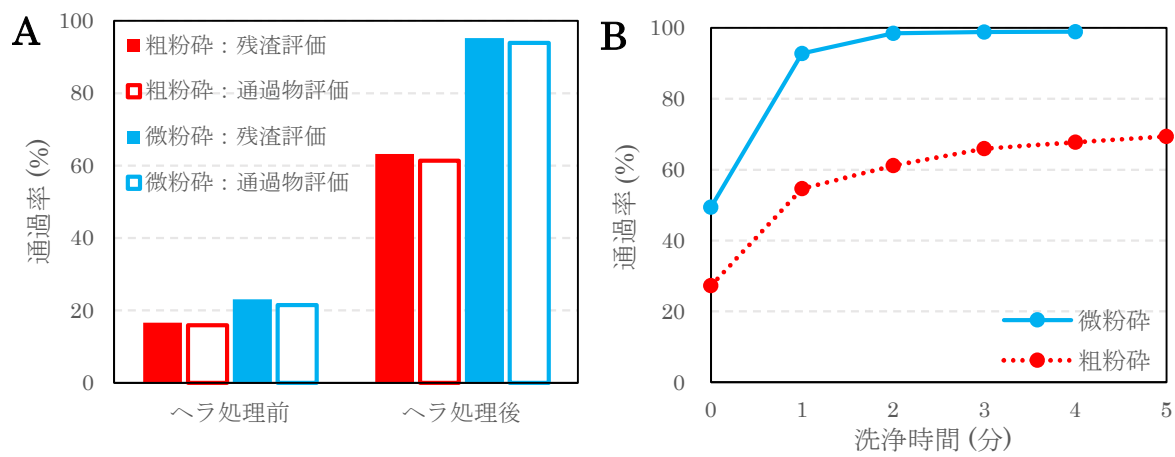


図 A-7. ヘラ処理および流水洗浄処理における目開き 1 mm 篩の通過率

(A：ヘラ処理、B：流水洗浄処理)

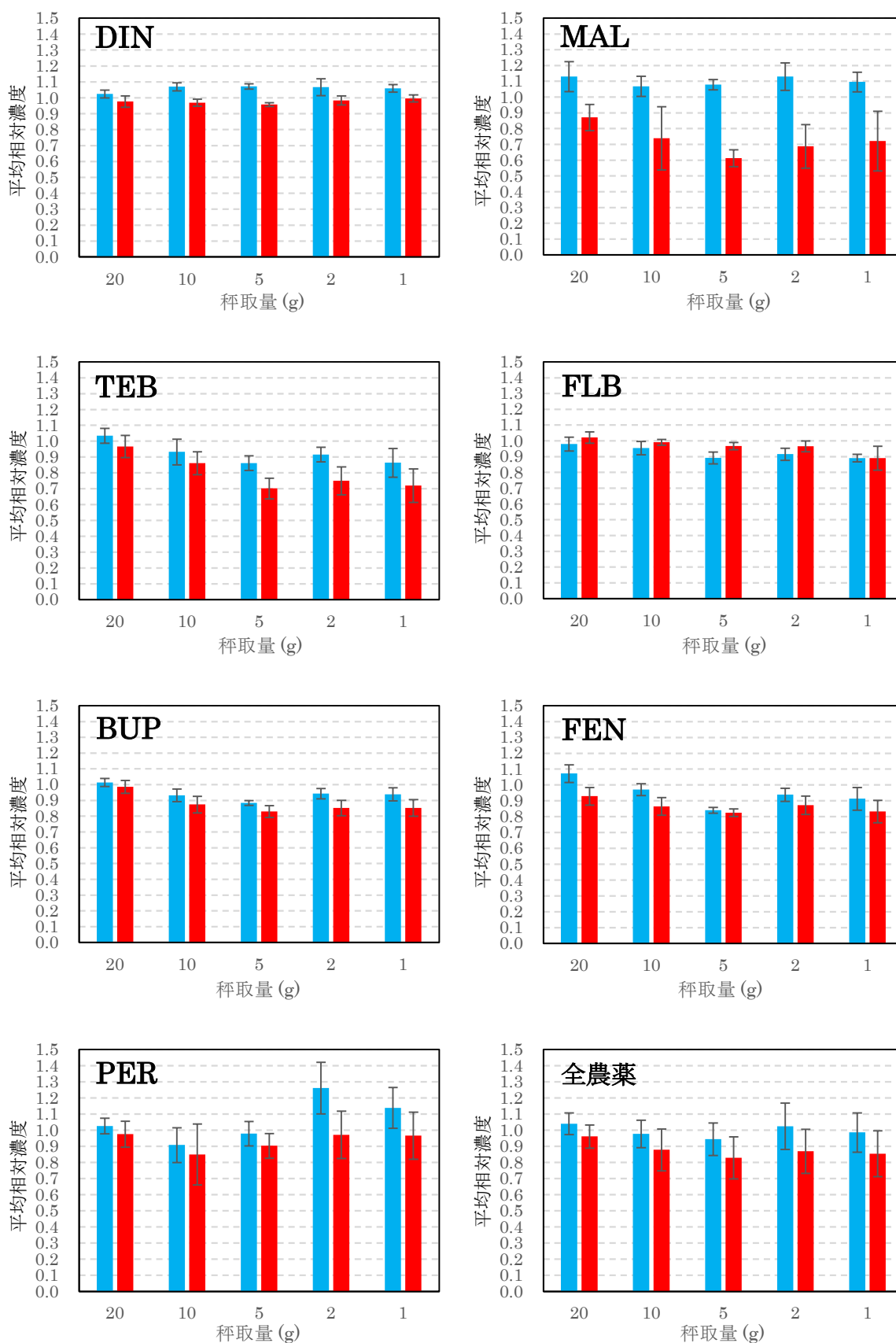


図 A-8. 各農薬および全農薬での平均相対濃度

(検体 20 g 秤取時の平均濃度に対する相対濃度、■：微粉碎試料、■：粗粉碎試料)

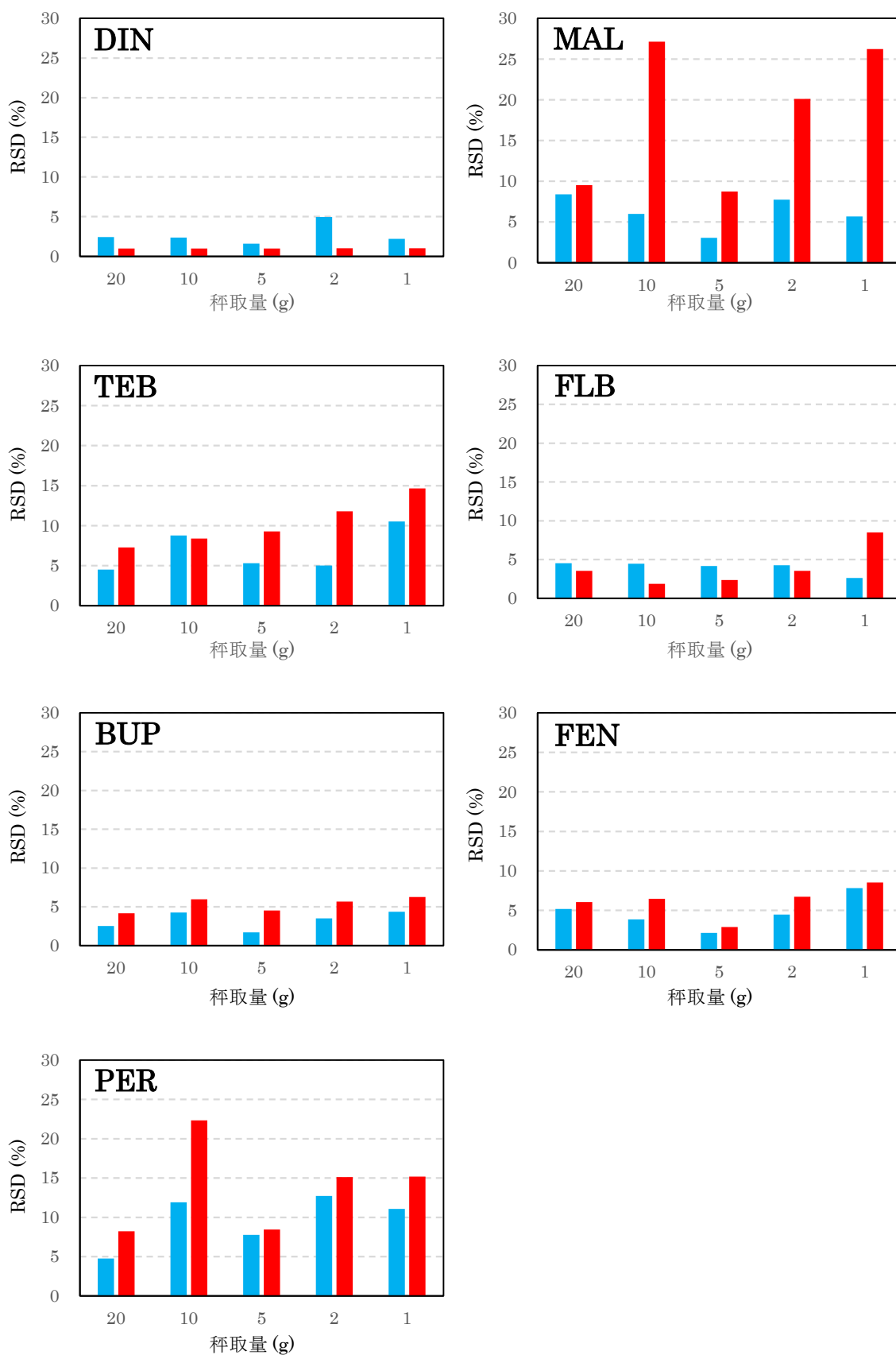


図 A-9. 各農薬における分析値の変動
(■：微粉碎試料、■：粗粉碎試料)

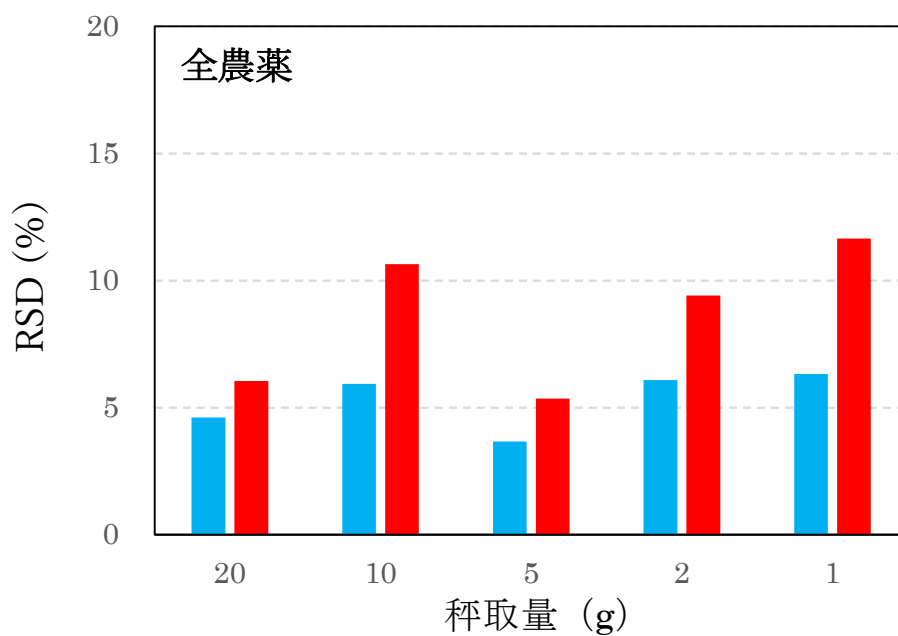


図 A-10. 農薬別の分析値変動の総平均

(■：微粉碎試料、■：粗粉碎試料)

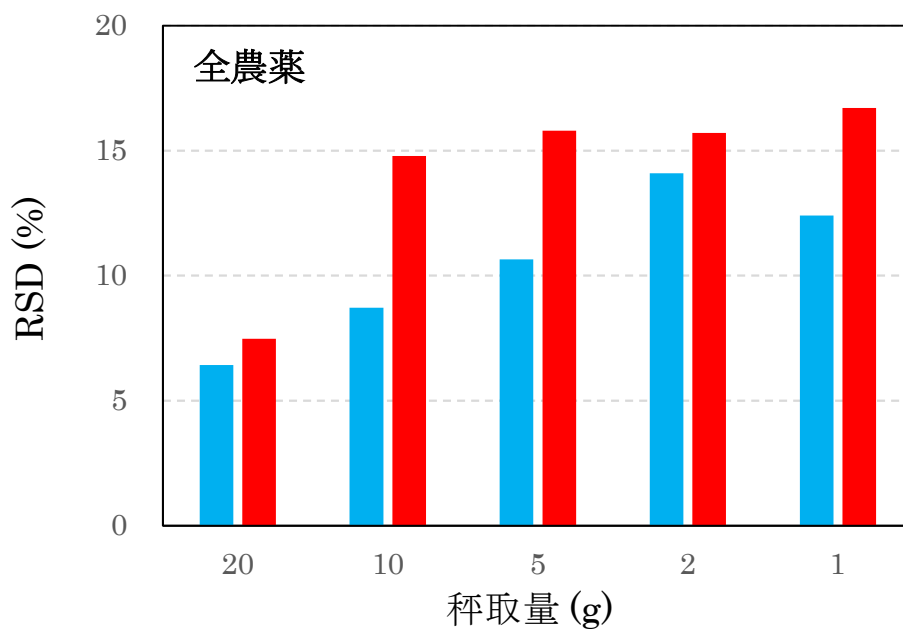


図 A-11. 各農薬における相対濃度の全農薬での変動

(検体 20 g 秤取時の平均濃度で補正した相対濃度、■：微粉碎試料、■：粗粉碎試料)

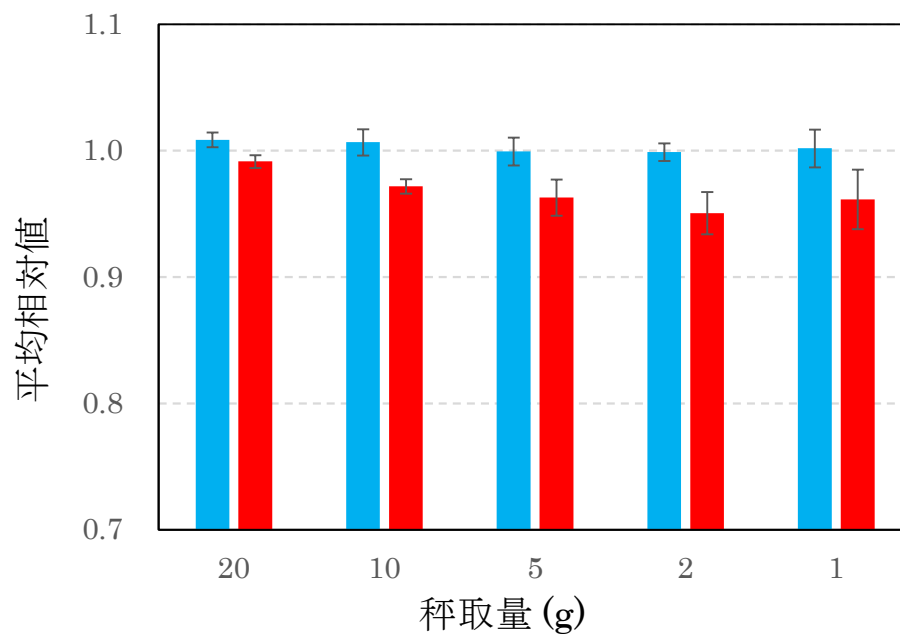


図 A-12. 固形物含有率の平均相対値

(検体 20 g 秤取時の平均固形物含有率に対する相対値、■：微粉碎試料、■：粗粉碎試料)

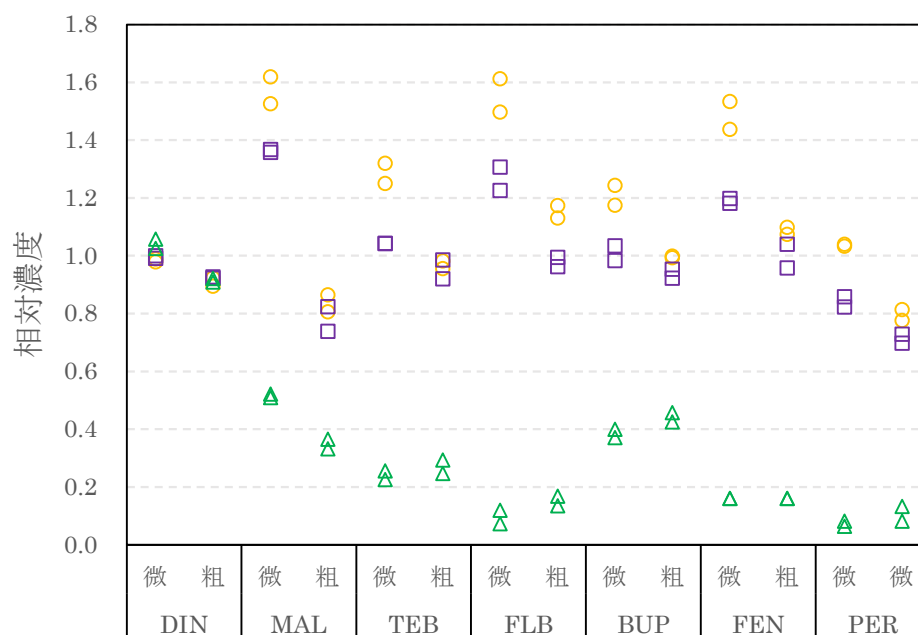


図 A-13. 異なる三層における相対濃度

(均質化直後の検体 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)

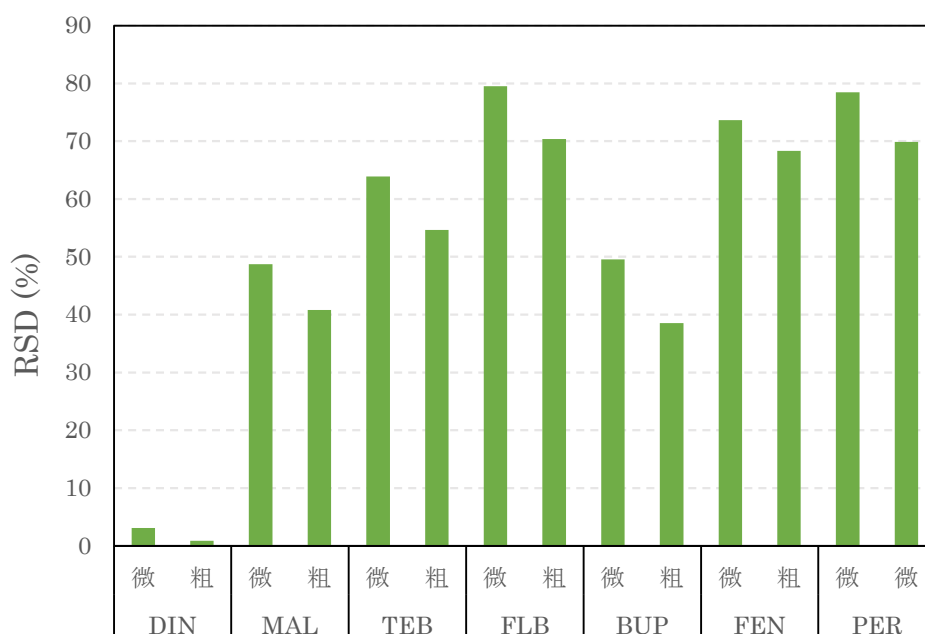


図 A-14. 異なる三層における平均分析値の変動
(微：微粉砕試料、粗：粗粉砕試料)

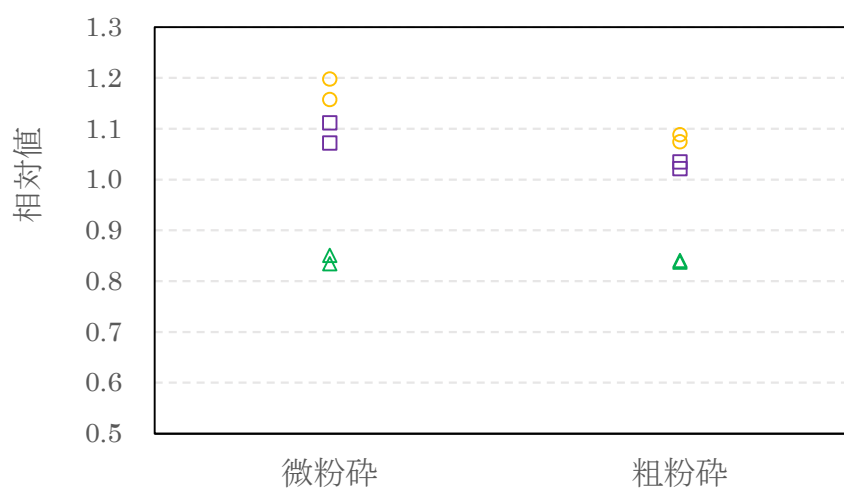


図 A-15. 異なる三層における固形物含有率の相対値
(均質化直後の検体 20 g 秤取試料中の固形物含有率で補正した相対値、
○：上層、□：中層、△：下層)

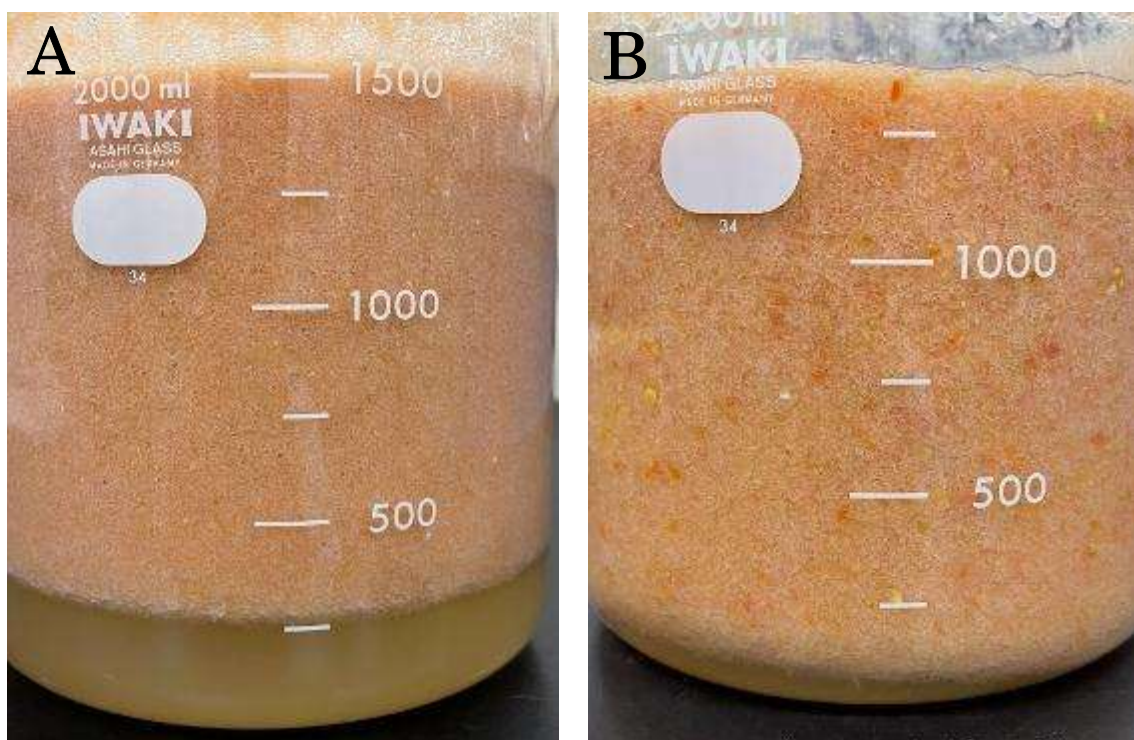


図 A-16. 均質化試料を 1 時間静置した後の状態
(A：微粉碎試料、B：粗粉碎試料)

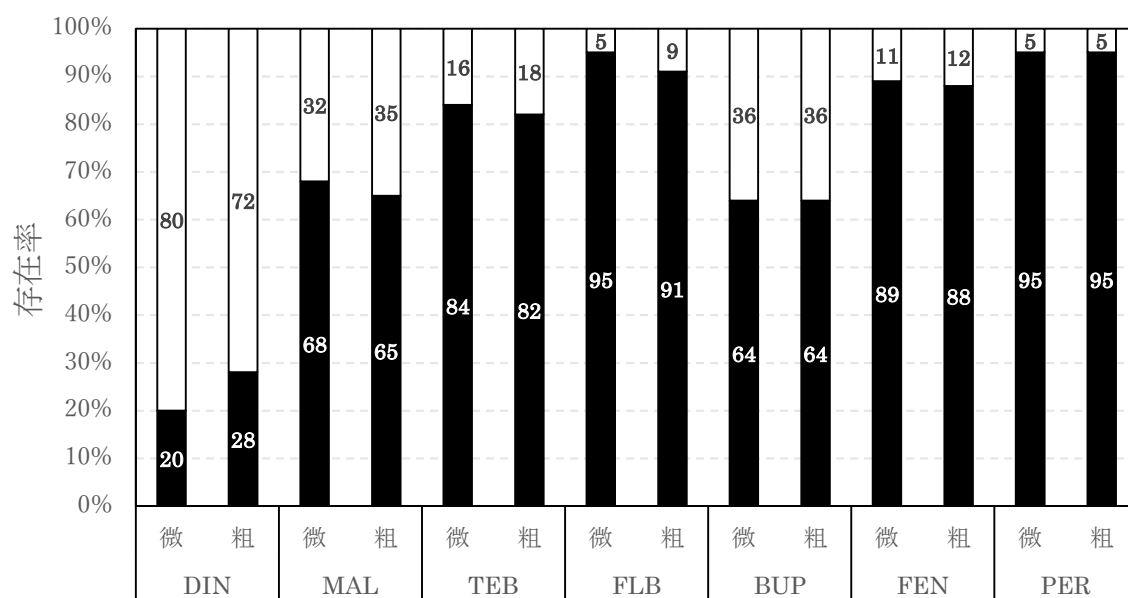


図 A-17. 遠心分離により分画した沈殿と上澄み液中の農薬存在率
(微：微粉碎試料、粗：粗粉碎試料、■：沈殿、□：上澄み液)

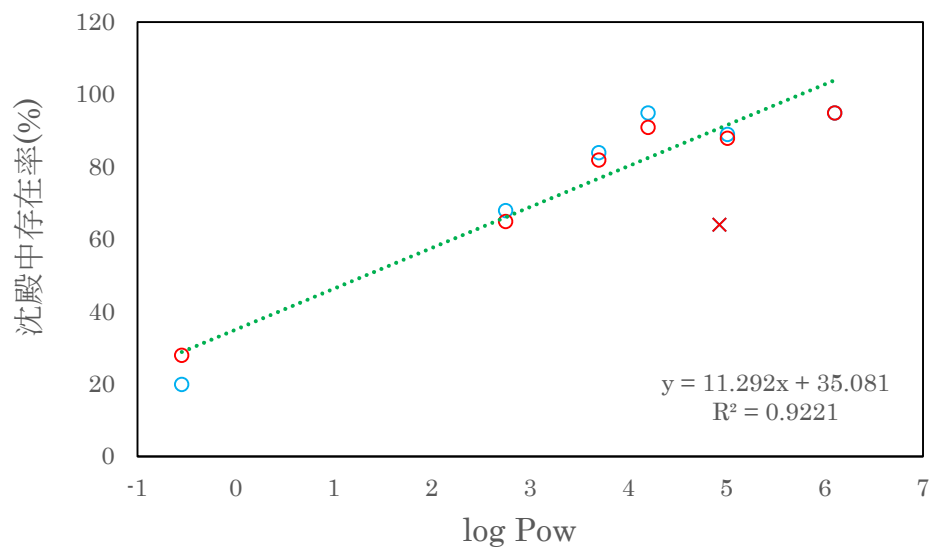


図 A-18. 各農薬の極性と沈殿中存在率の関係

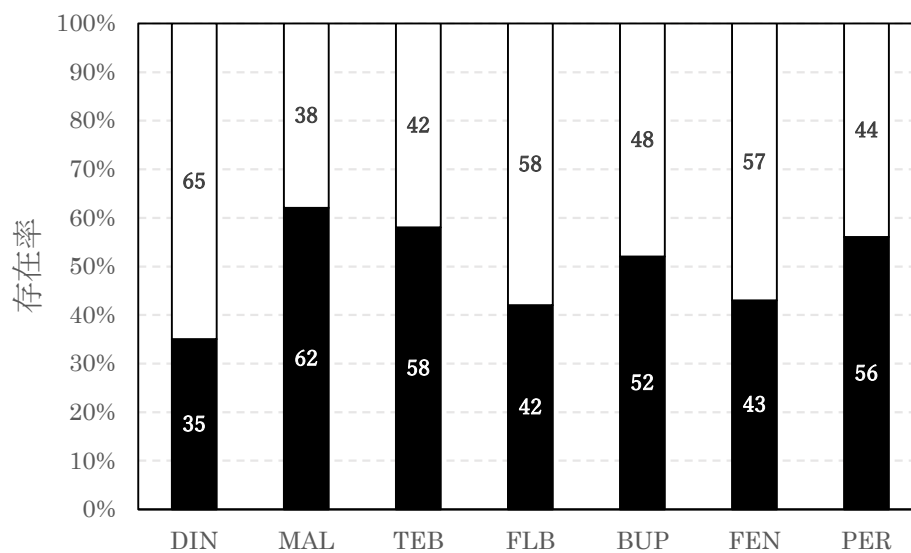


図 A-19. 粗粉碎試料を目開き 1 mm の試験篩に通過させた後の篩上残渣および通過物中における各農薬の存在率 (■：篩上残渣、□：通過物)

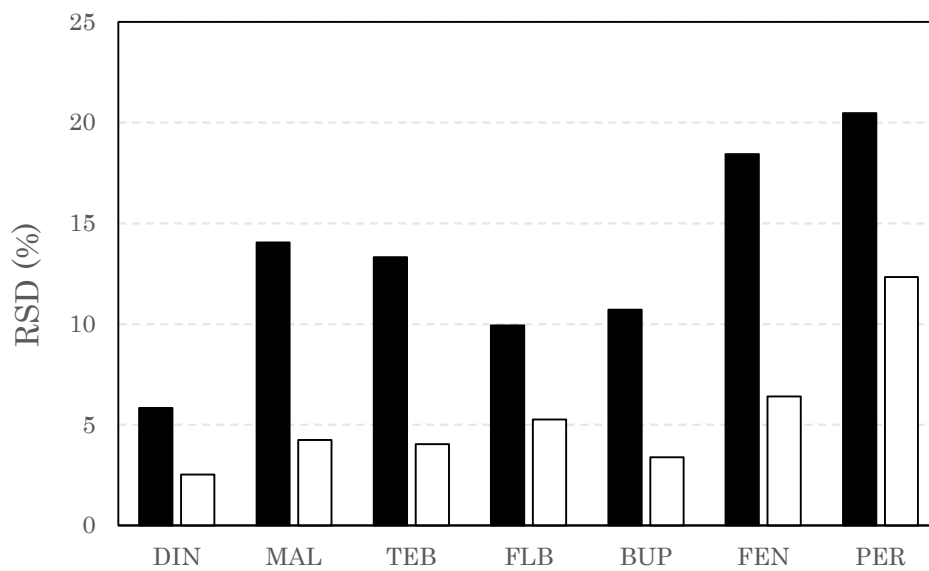


図 A-20. 粗粉碎試料を目開き 1 mm の試験篩に通過させた後の篩上残渣および通過物中における各農薬の分析値変動 (■：篩上残渣、□：通過物)

無処理区



処理区



図 B-1. 作物写真



図 B-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 B-3. 凍結粉碎試料の解凍時における状態



図 B-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

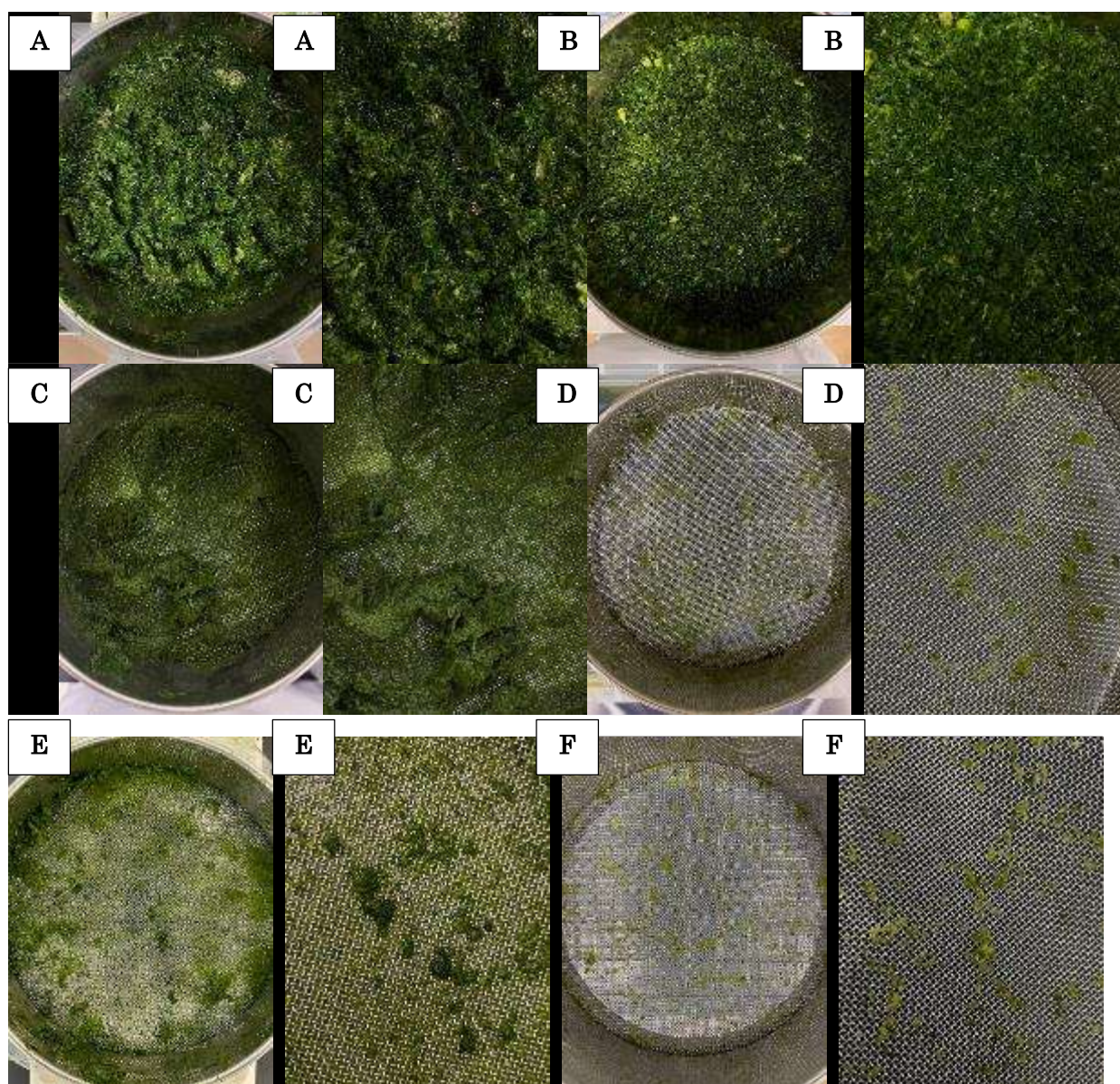


図 B-5. ヘラ処理および流水洗浄処理後における篩上試料の状態

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

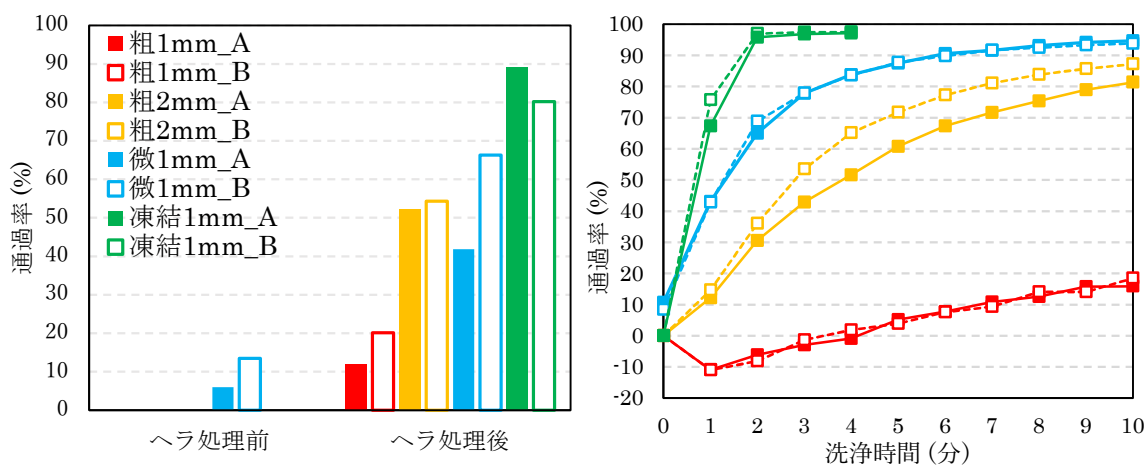


図 B-6. ヘラ処理時 (左) および流水洗浄処理時 (右) の篩通過率

(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)

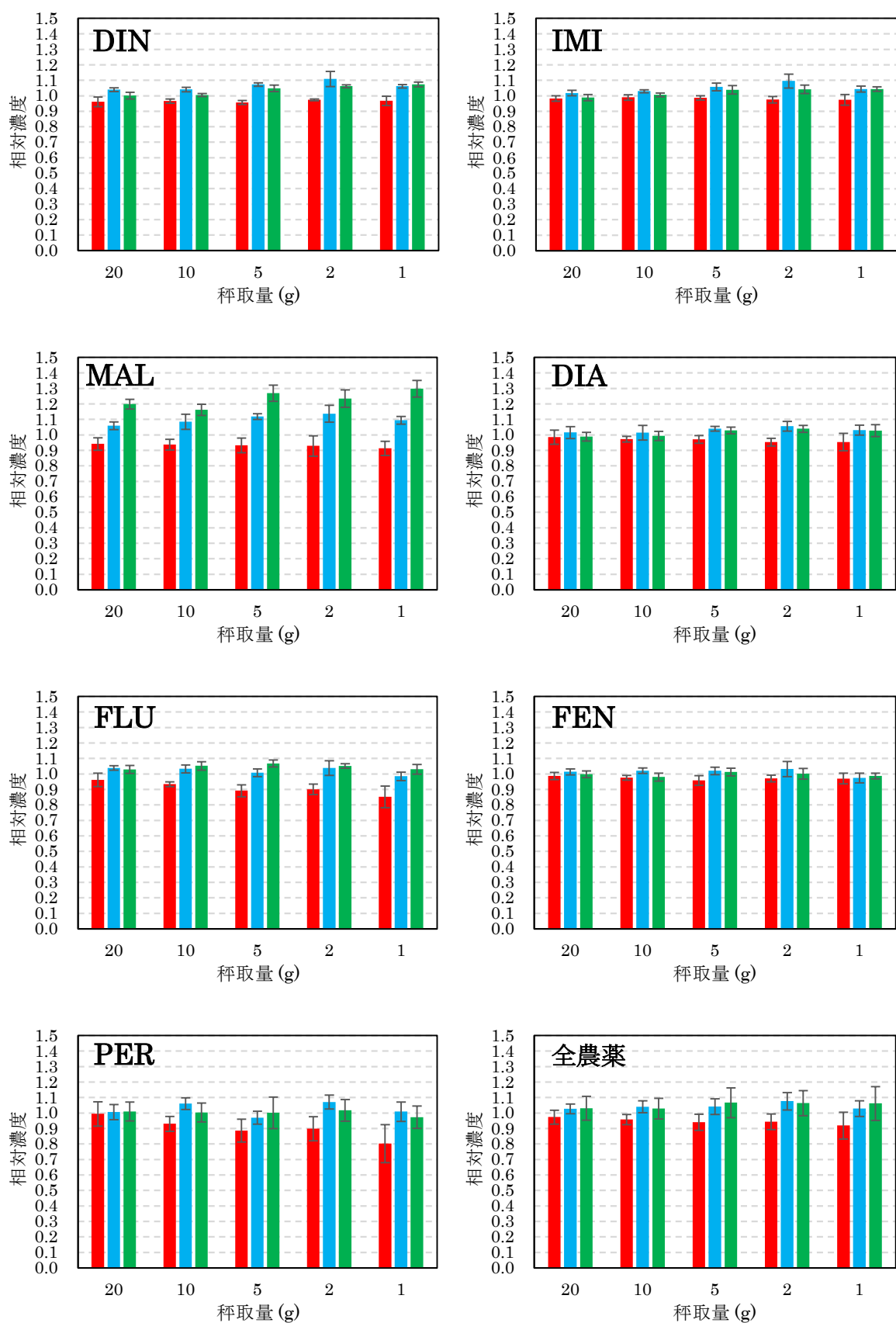


図 B-7. 各農薬および全農薬での平均相対濃度

(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)

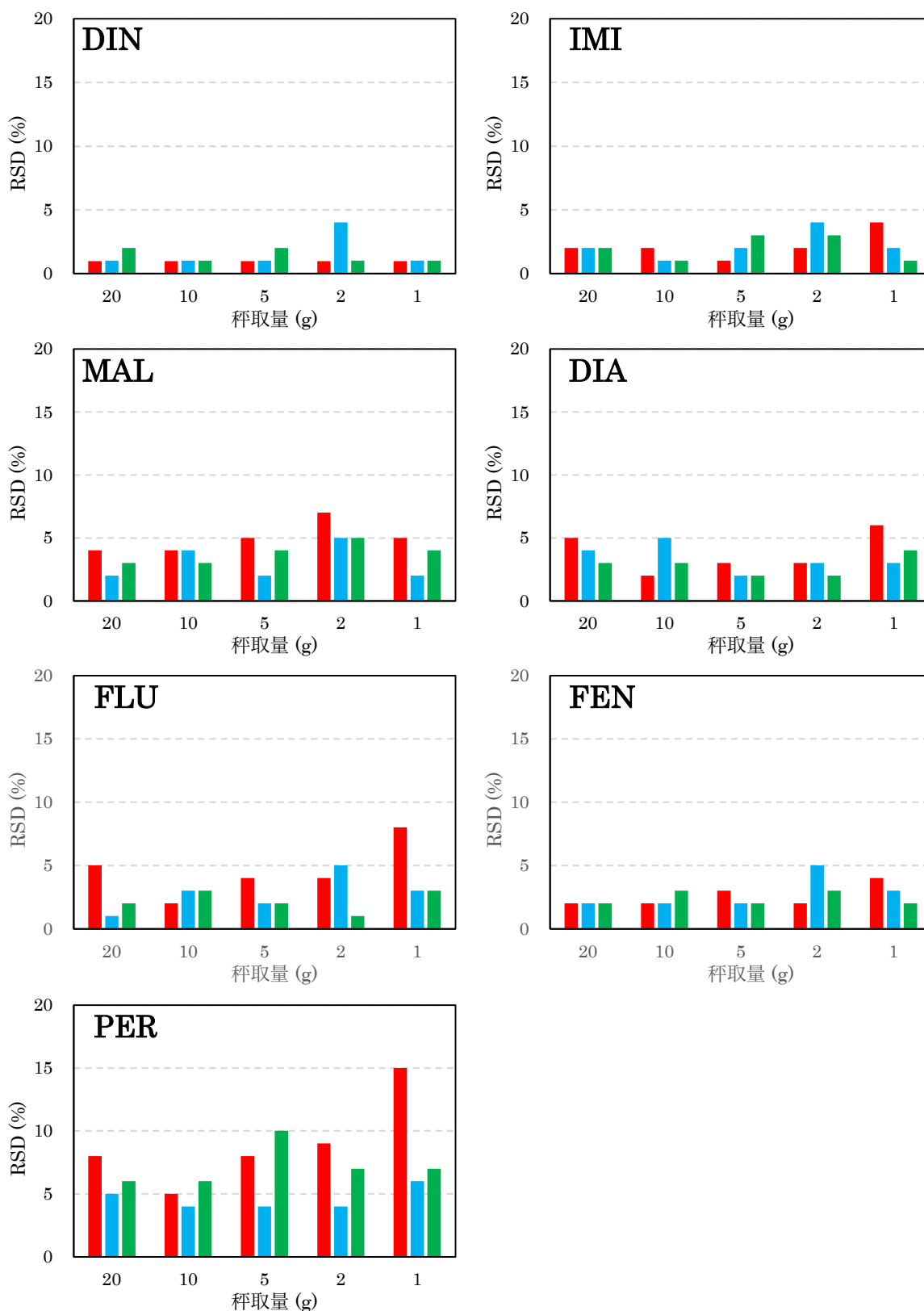


図 B-8. 各農薬における分析値の変動

(■ : 粗粉碎試料、■ : 微粉碎試料、■ : 凍結粉碎試料)

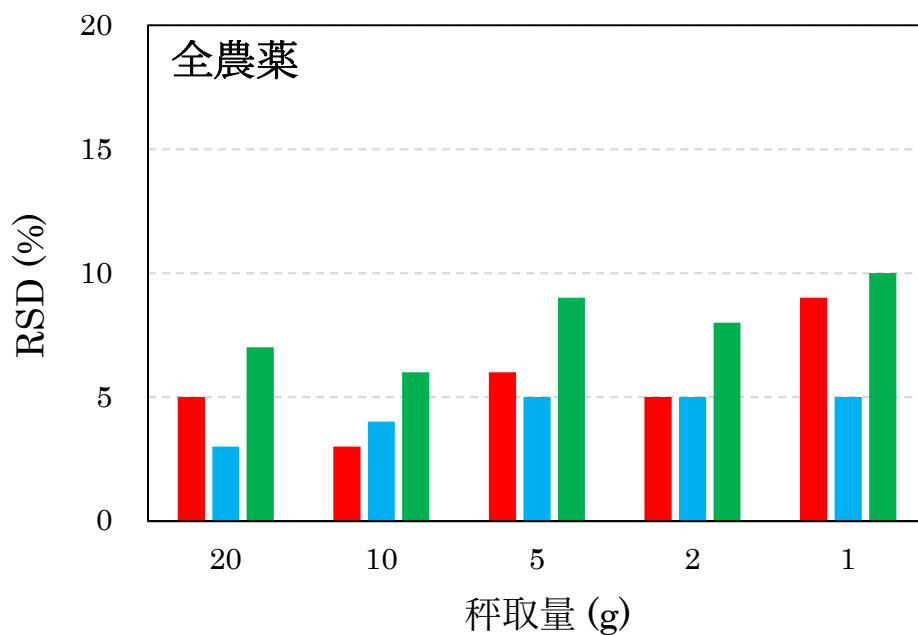


図 B-9. 各農薬における相対濃度の全農薬での変動
 (粗粉碎試料および微粉碎試料における 20 g 秤取時の平均濃度で補正した相対濃度、
 ■：粗粉碎試料、■：微粉碎試料、■凍結粉碎試料)

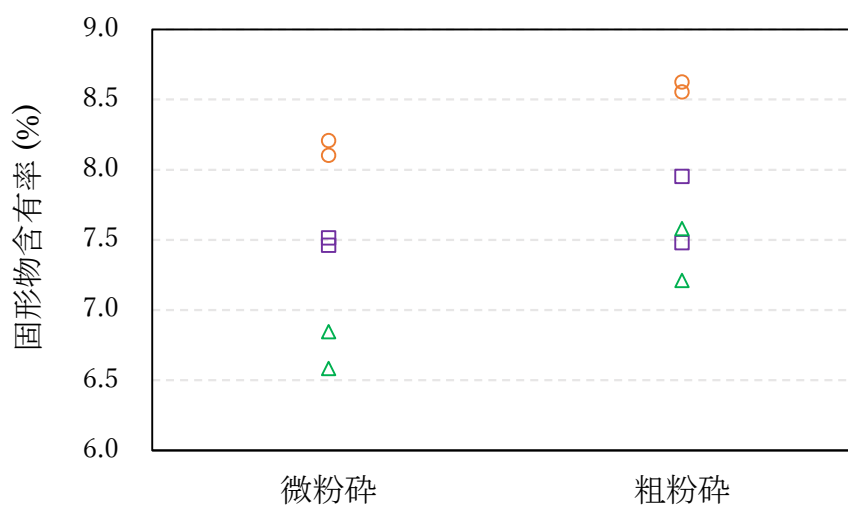


図 B-10. 試料を 1 時間静置後に異なる三層から秤取した試料における固形物含有率
 (○：上層、□：中層、△：下層)

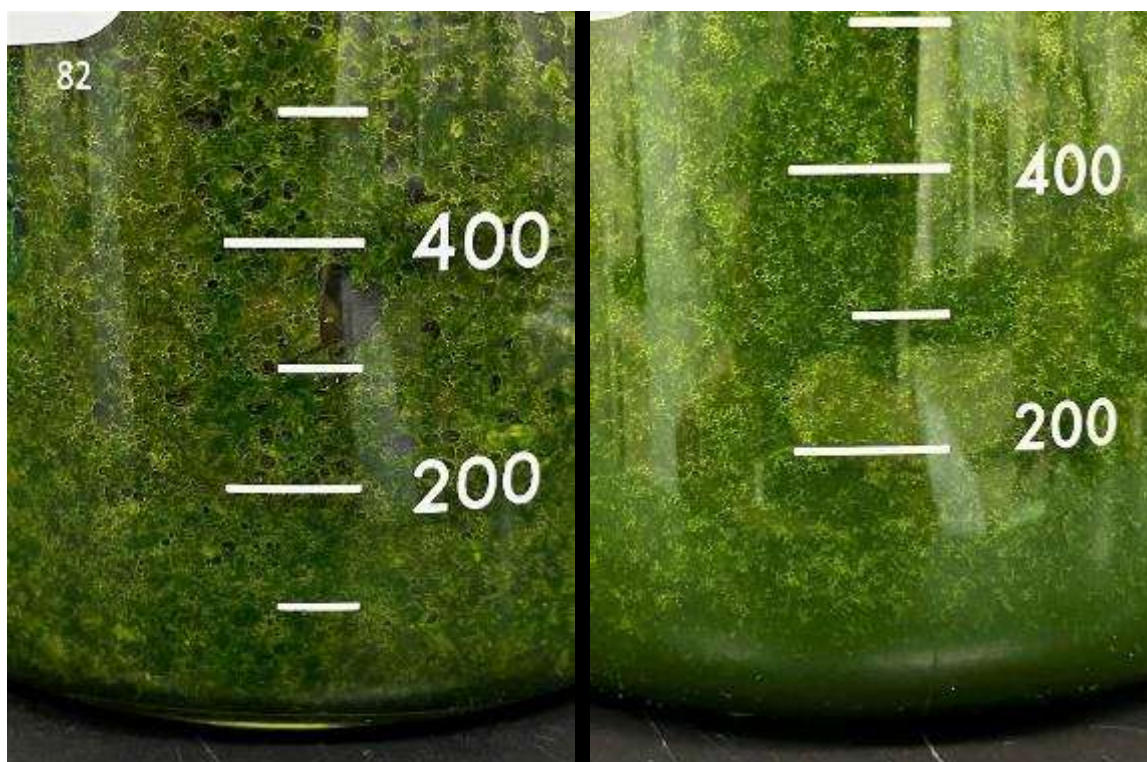


図 B-11. 均質化試料を 1 時間静置した後の状態
(左：粗粉碎試料、右：微粉碎試料)

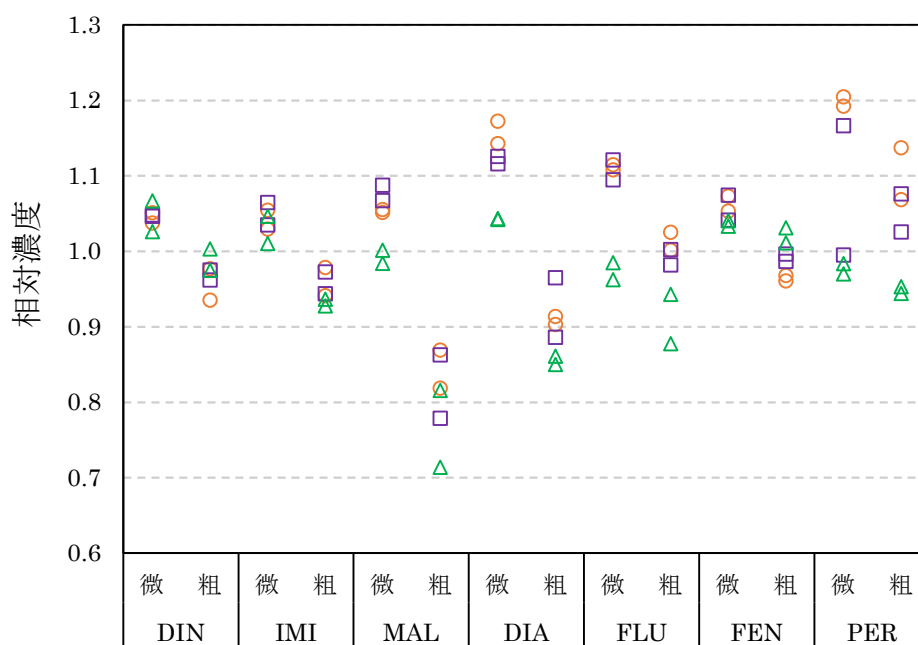


図 B-12. 異なる三層における相対濃度

(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)

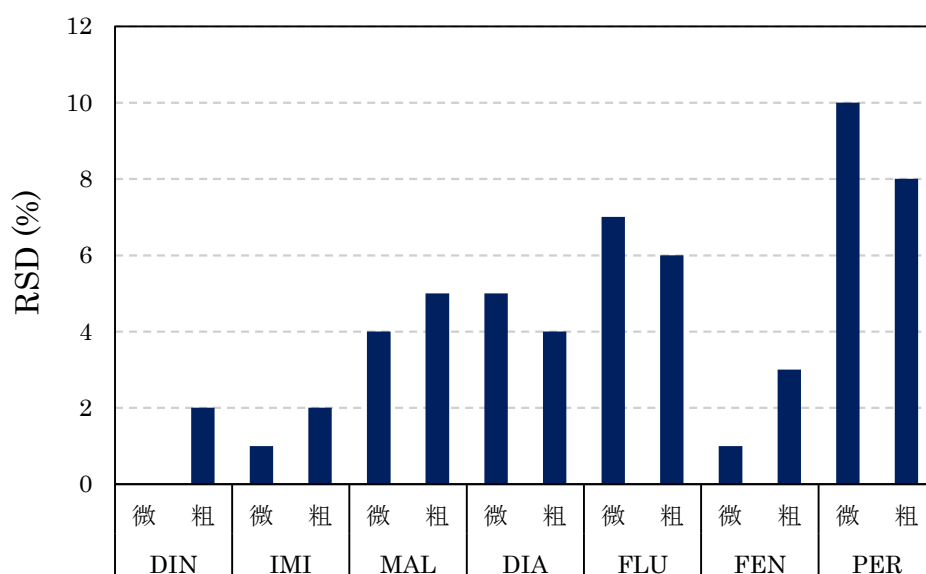


図 B-13. 異なる三層における平均分析値の変動
(微：微粉砕試料、粗：粗粉砕試料)

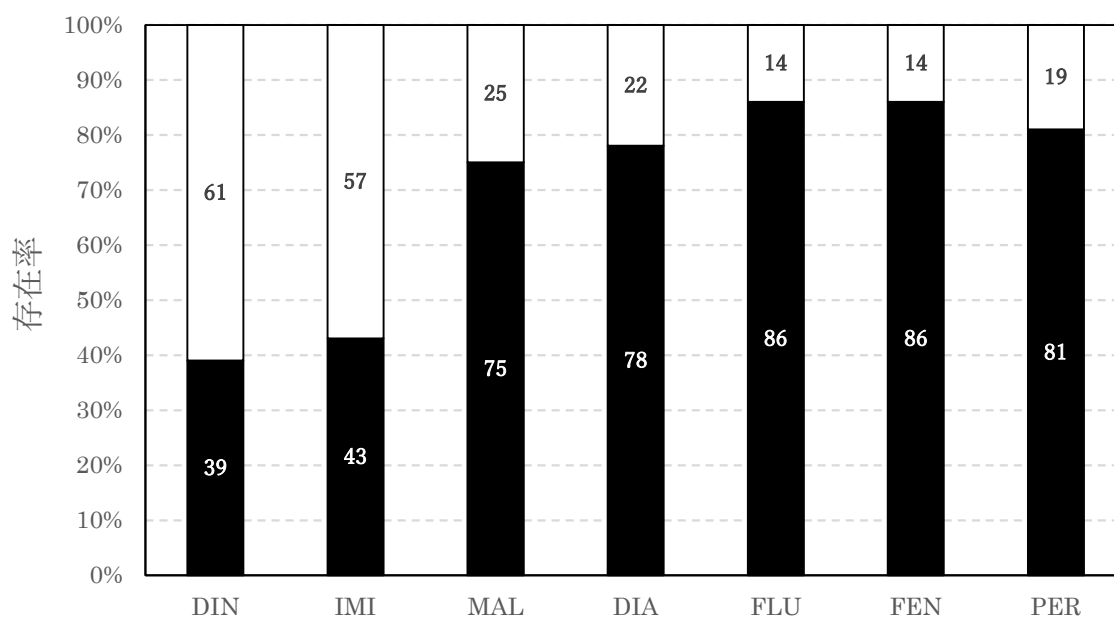


図 B-14. 微粉砕試料を遠心分離により分画した沈殿と上澄み液中の農薬存在率
(■：沈殿、□：上澄み液)

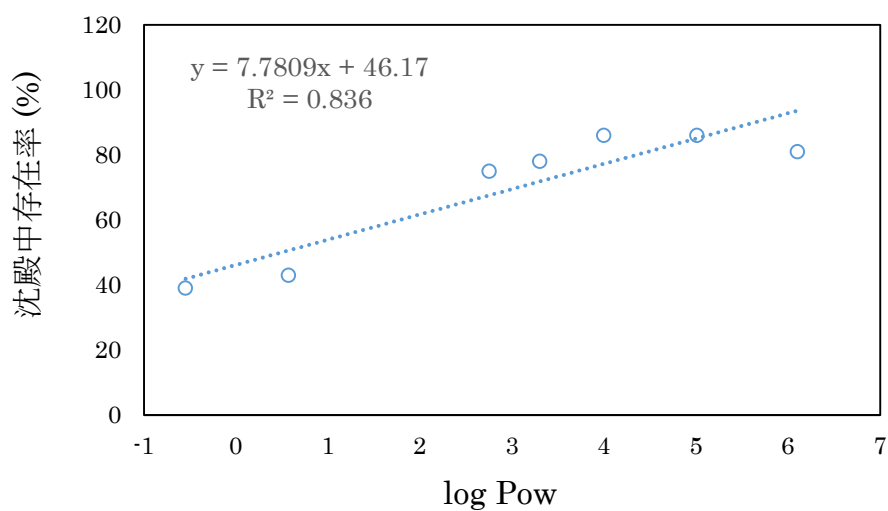


図 B-15. 各農薬の極性と沈殿中存在率の関係

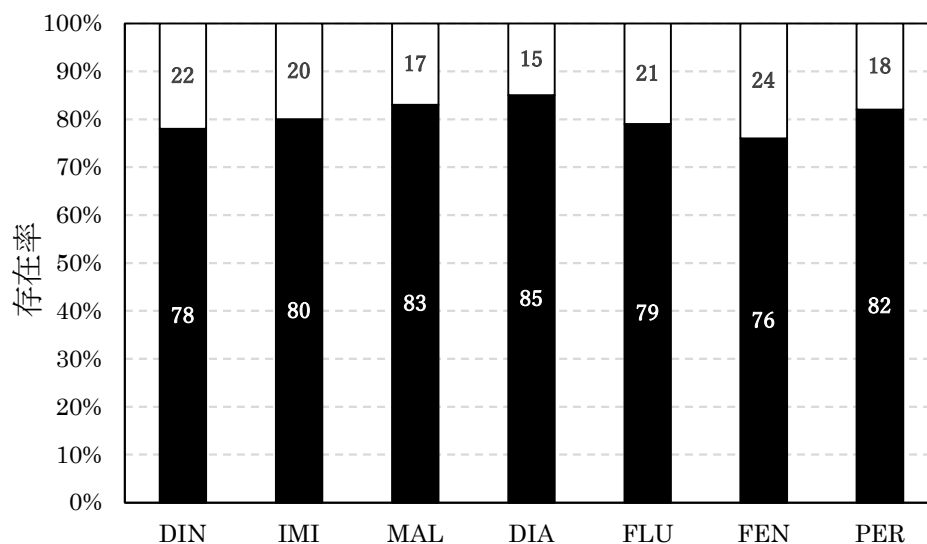


図 B-16. 粗粉碎試料を目開き 1 mm の試験篩に通過させた後の篩上残渣および通過物における各農薬の存在率 (■：篩上残渣、□：通過物)

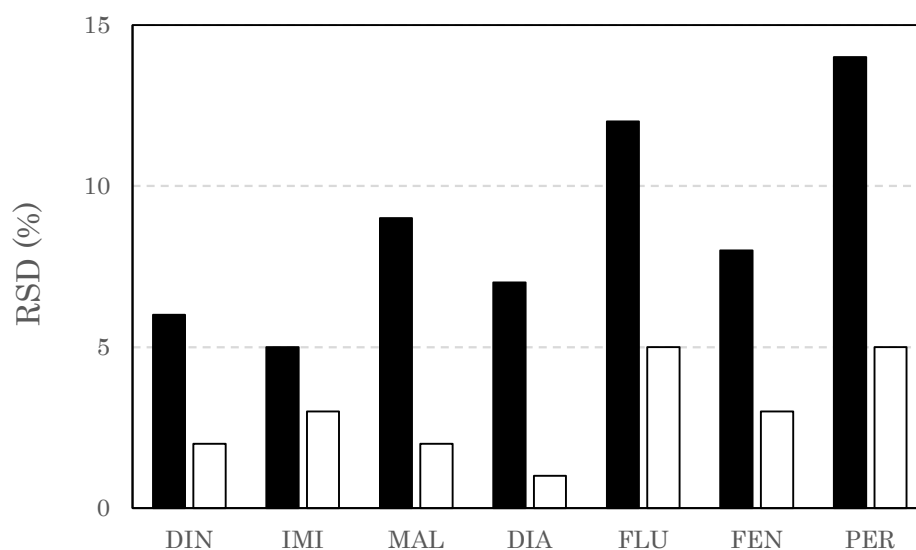


図 B-17. 粗粉碎試料を目開き 1 mm の試験篩に通過させた後の篩上残渣および通過物中における各農薬の分析値変動 (■：篩上残渣、□：通過物)

表 B-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 (<i>m/z</i>)	プロダクト イオン (<i>m/z</i>)
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 B-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 B-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 ^a	104 [4]	97 [6]	97 [6]	97 [8]	91 [5]	84 [5]	88 [4]
0.5 ^a	110 [3]	105 [3]	105 [3]	96 [4]	95 [4]	99 [2]	89 [5]
0.5 ^b	99 [3]	102 [3]	101 [4]	90 [5]	100 [2]	105 [3]	94 [3]
15 ^a	102 [3]	99 [3]	108 [2]	—	88 [1]	109 [1]	92 [7]
50 ^a	—	—	—	102 [1]	—	—	—

n=5

^a 市販品の微粉碎試料を使用^b 無処理区の粗粉碎試料を使用

表 B-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 B-5. 分析結果

表 B-5-1. 粗粉碎試料

農藥	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 B-5-2. 微粉碎試料

農藥	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 B-5-3. 凍結粉碎試料

農藥	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

表 C-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
アディオオン乳剤	ペルメトリン (PER)	20	2000

表 C-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



図. C-1.1 作物写真（無処理区）



図. C-1.2 作物写真（処理区）

表 C-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]	—	—	—

表 C-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

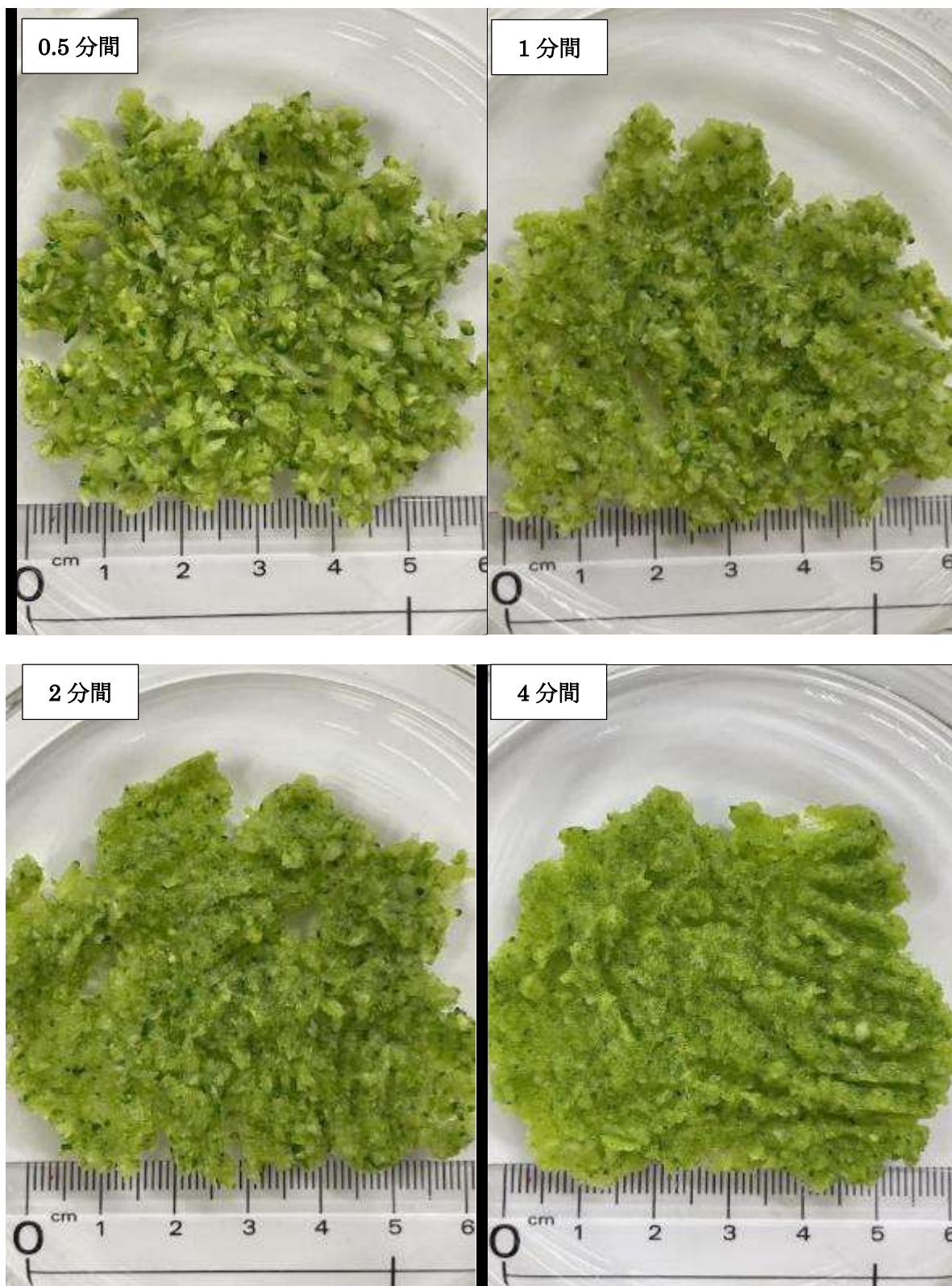


図 C-2. ミキサー稼働時間別のブロッコリー均質化状態（常温操作）



図 C-3. 凍結粉碎試料の均質化状態（左：調製作業時、右：解凍時）



図 C-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

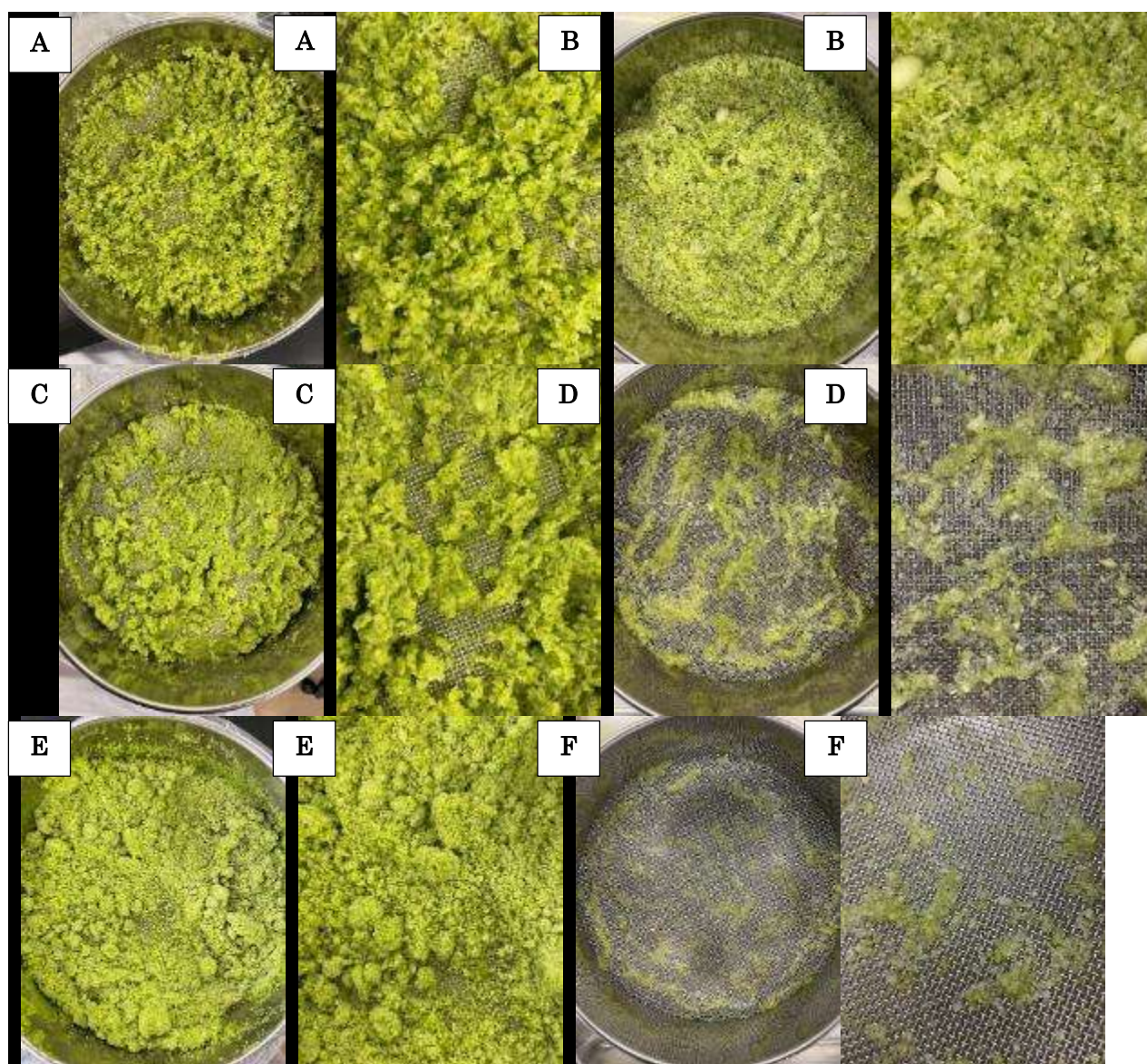


図 C-5. ヘラ処理及び流水洗浄処理後における篩上試料の状態

A : 粗粉碎試料のヘラ処理、B : 粗粉碎試料の流水洗浄処理、C : 微粉碎試料のヘラ処理、
D : 微粉碎試料の流水洗浄処理、E : 凍結碎試料のヘラ処理、F : 凍結碎試料の流水洗浄処理 (左 :
全体写真、右 : 拡大写真)

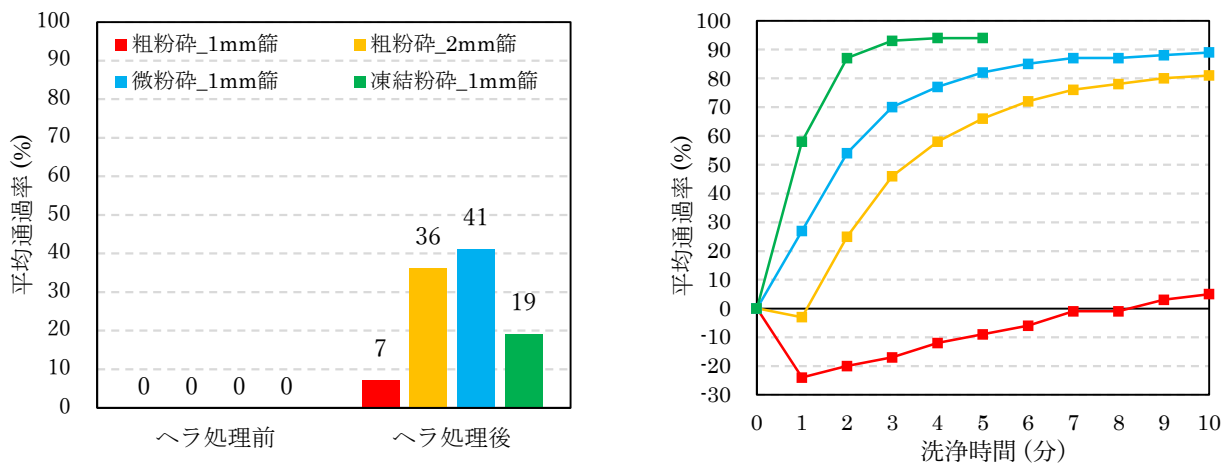


図 C-6. ヘラ処理時 (左) 及び流水洗浄処理時 (右) の篩通過率

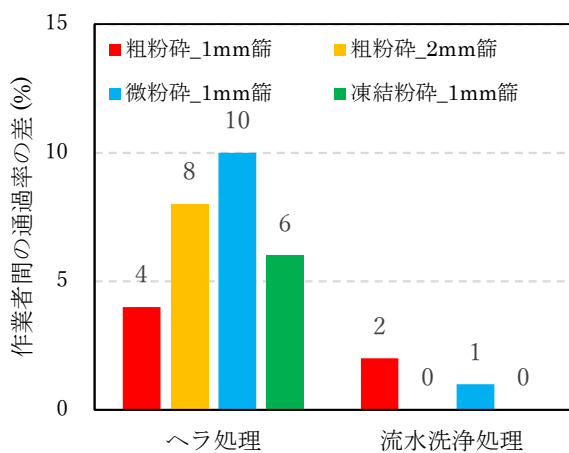


図 C-7. 異なる 2 名の作業員間の篩通過率の差

表 C-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

表 C-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

表 C-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

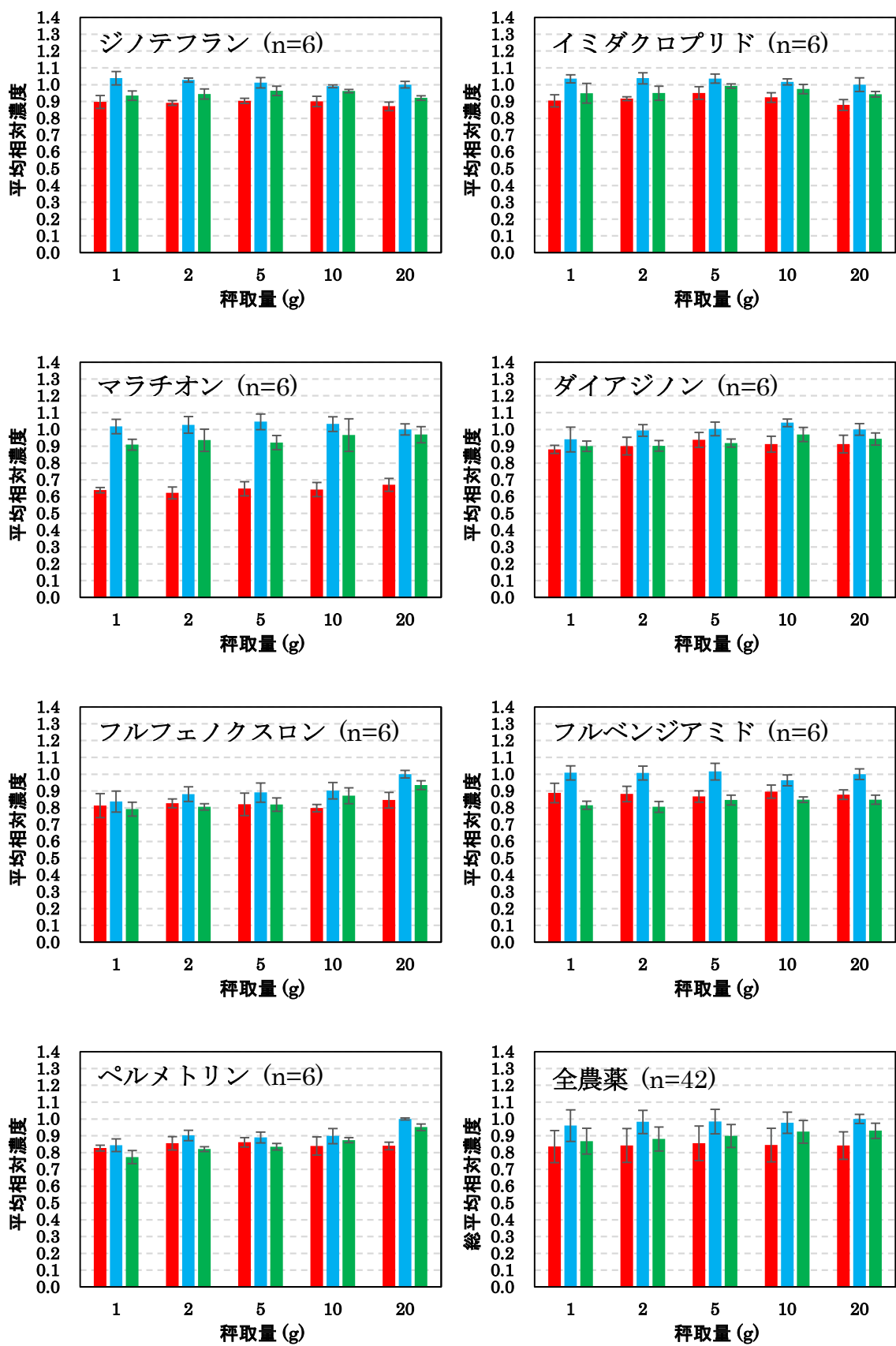


図 C-8. 秤取量別の相対濃度

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

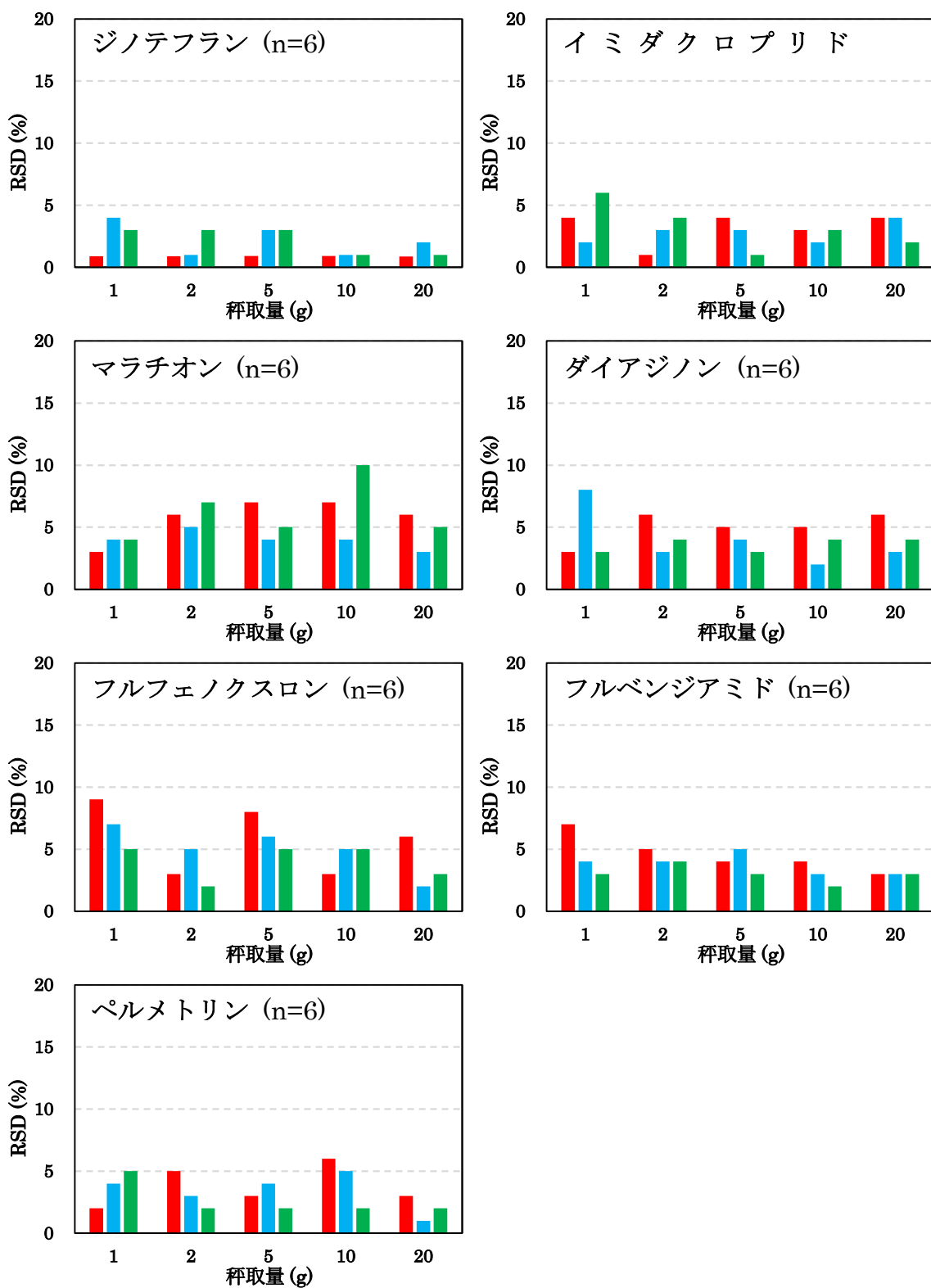


図 C-9. 秤取量別の分析値の変動

■ : 粗粉碎試料、■ : 微粉碎試料、■ : 凍結粉碎試料

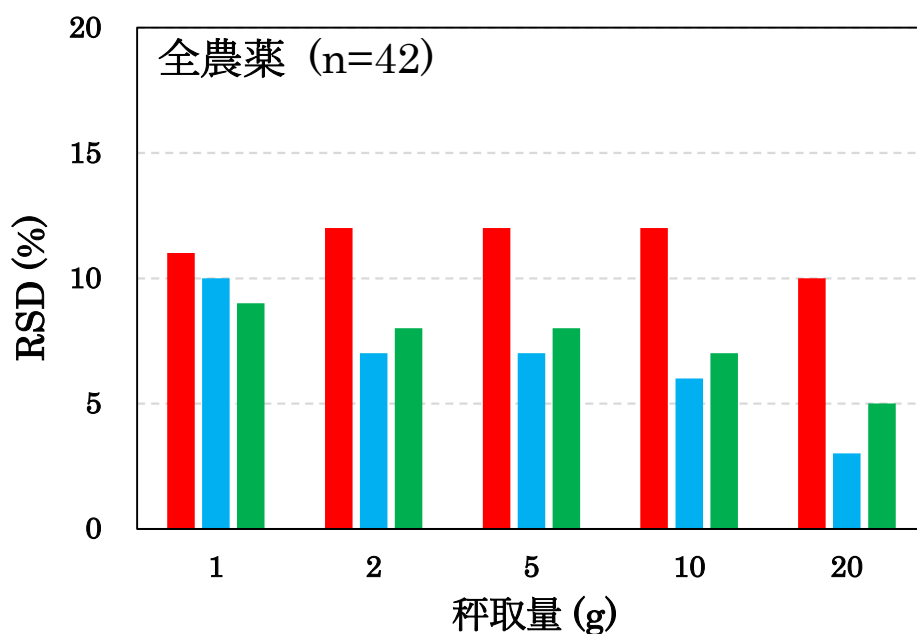


図. C-10. 7 種農薬全体での秤取量別相対濃度の変動

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

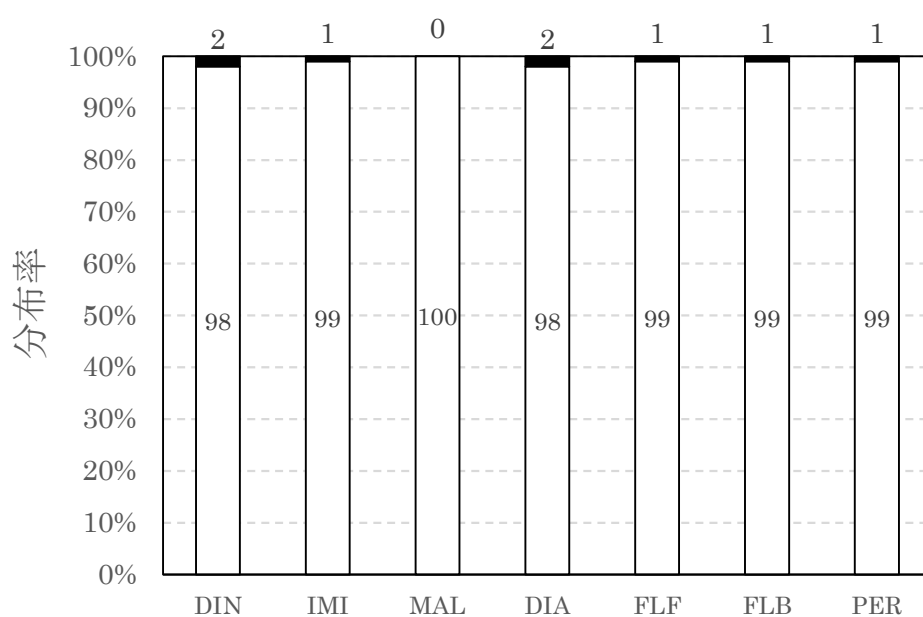
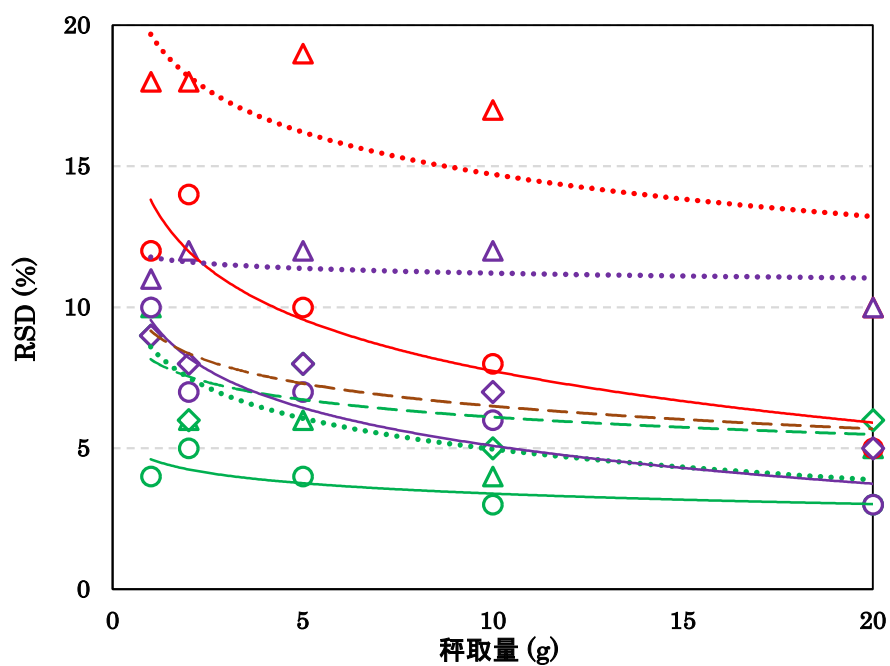


図. C-11. 各農薬の茎及び蕾における分布率

(□ : 蕾、■ : 茎)



△	トマト	粗粉碎	$y = -2.158\ln(x) + 19.68$	$R = -0.712$
○	トマト	微粉碎	$y = -2.64\ln(x) + 13.813$	$R = -0.909$
△	ハウレンソウ	粗粉碎	$y = -1.575\ln(x) + 8.5938$	$R = -0.831$
○	ハウレンソウ	微粉碎	$y = -0.533\ln(x) + 4.6096$	$R = -0.766$
◇	ハウレンソウ	凍結粉碎	$y = -0.892\ln(x) + 8.1554$	$R = -0.653$
△	ブロッコリー	粗粉碎	$y = -0.247\ln(x) + 11.776$	$R = -0.332$
○	ブロッコリー	微粉碎	$y = -1.941\ln(x) + 9.5513$	$R = -0.931$
◇	ブロッコリー	凍結粉碎	$y = -1.162\ln(x) + 9.1661$	$R = -0.922$

図. C-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

表 A-7 調製直後の試料温度 (°C)

試料調製法	牛筋肉	豚筋肉	鶏筋肉	牛脂肪	豚脂肪	牛肝臓
常温磨砕法	38	36	40	24	28	25
凍結粉砕法 (液体窒素・凍結方式)	-52	-50	-52	-39	-38	-55
凍結粉砕法 (ドライアイス・予冷方式)	-74	-56	-64	-78	-78	-67
凍結粉砕法 (ドライアイス・予備凍結方式)	-66	—	—	-74	-61	-74

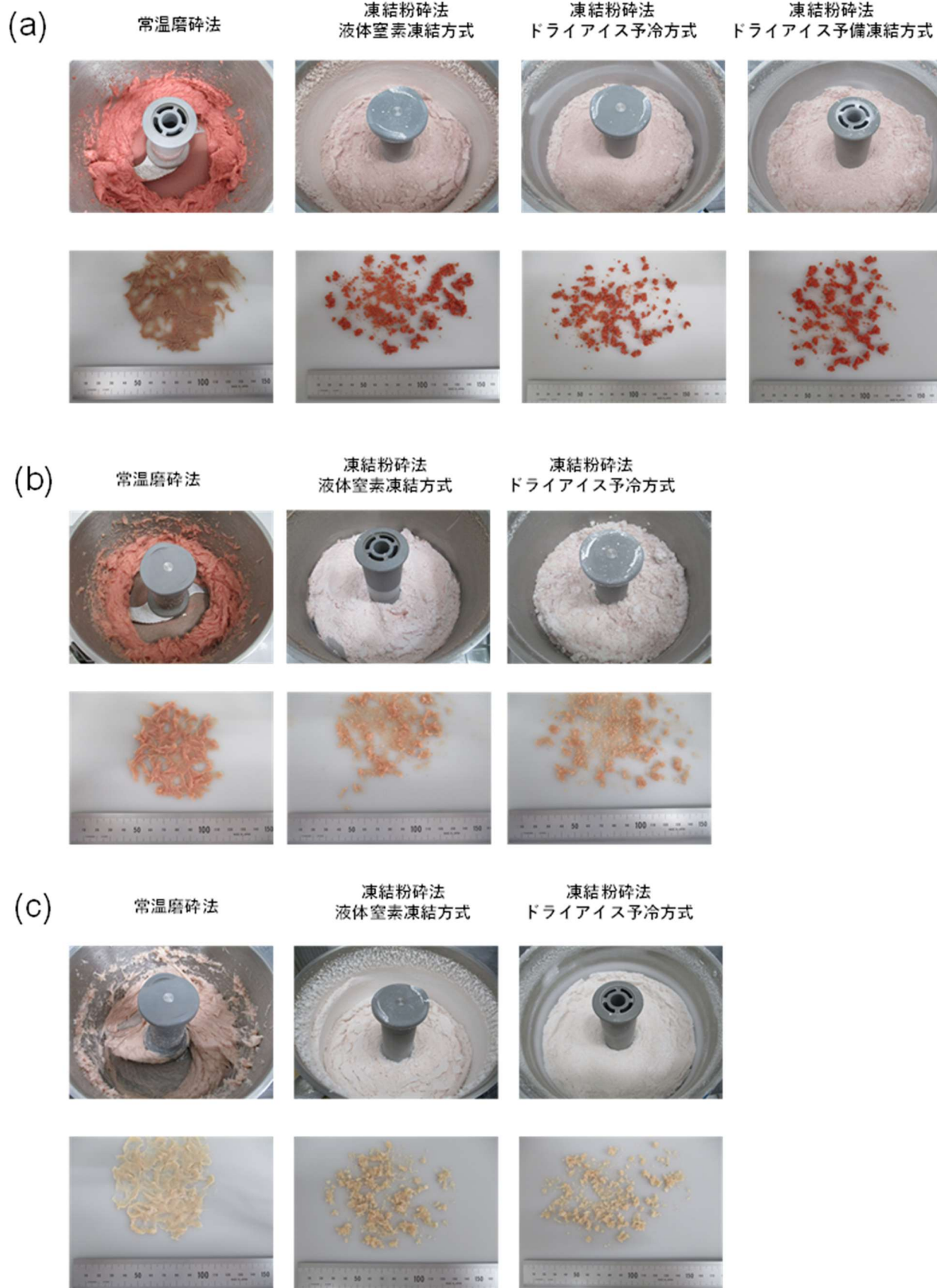


図 A-21. 試料調製後の粉砕状況

(a) 牛の筋肉、(b) 豚の筋肉、(c) 鶏の筋肉、(d) 牛の脂肪、(e) 豚の脂肪、(f) 牛の肝臓

(d)

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



(e)

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

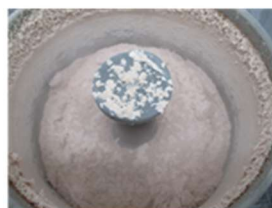


(f)

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



図 A-21. (つづき)

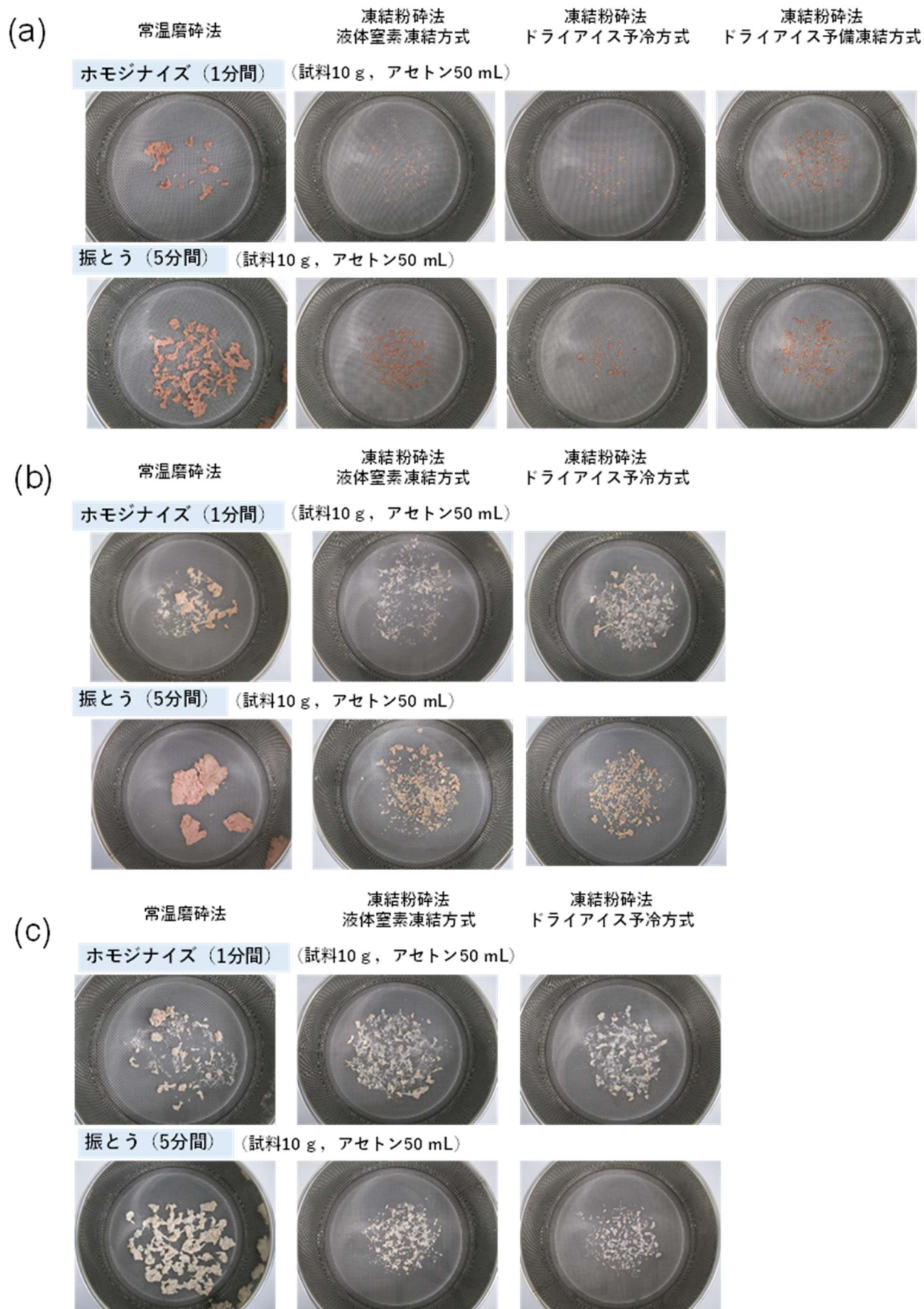


図 A-22. ホモジナイズまたは振とう抽出後の残渣

(a) 牛の筋肉、(b) 豚の筋肉、(c) 鶏の筋肉、(d) 牛の脂肪、(e) 豚の脂肪、(f) 牛の肝臓

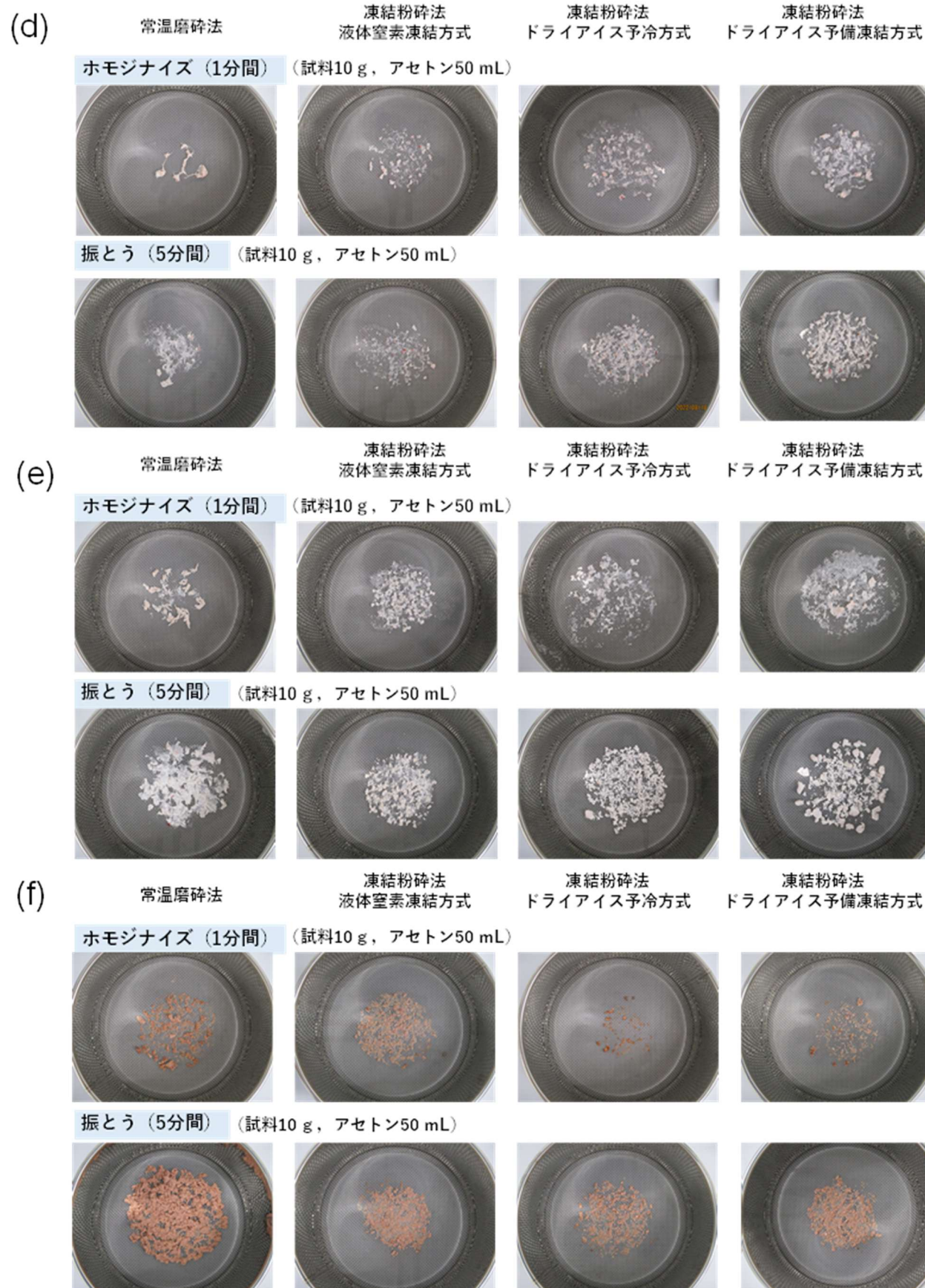


図 A-22. (つづき)

表 B-6. 調製直後の試料温度 (°C)

試料調製法	あゆ ¹	えび ¹	うなぎ ²	さけ ²
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

¹ 検体の大きさ : 2 cm

² 検体の大きさ : 1 cm

(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



(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



図 B-18. 試料調製後の粉砕状況

(c) うなぎ

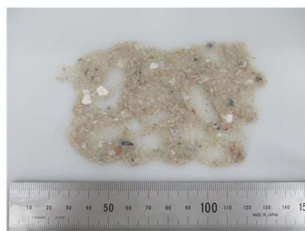
常温磨砕法



凍結粉碎法
液体窒素凍結方式



凍結粉碎法
ドライアイス予冷方式

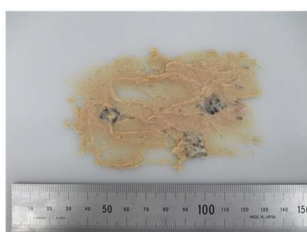


凍結粉碎法
ドライアイス予備凍結方式



(d) さけ

常温磨砕法



凍結粉碎法
液体窒素凍結方式



凍結粉碎法
ドライアイス予冷方式



凍結粉碎法
ドライアイス予備凍結方式



図 B-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 B-19. ホモジナイズまたは振とう抽出後の残渣

(c) うなぎ

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）



—1



—1

振とう（5分間）

（試料10 g，アセトン50 mL × 3回）



(d) さけ

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）



—1

—1

—1

振とう（5分間）

（試料10 g，アセトン50 mL × 3回）



図 B-19. （つづき）

¹ ホモジナイズ抽出操作を行うことができなかった

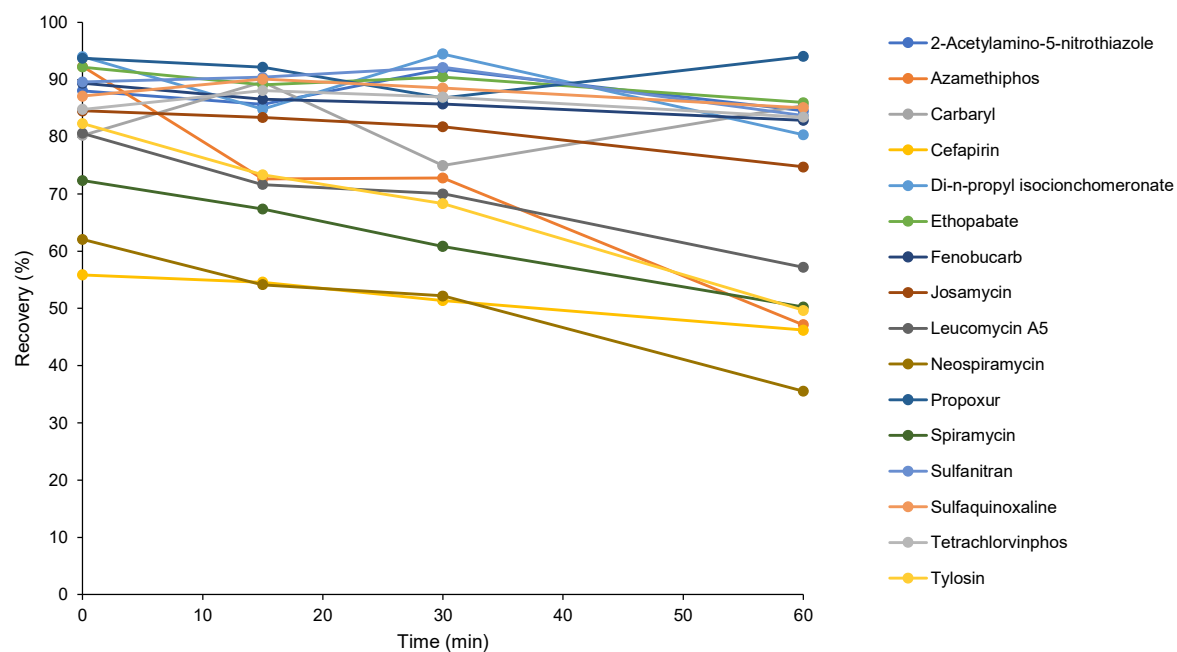


図. C-13. 農薬等の添加後放置時間の回収率¹への影響（牛の筋肉）

¹ n=3

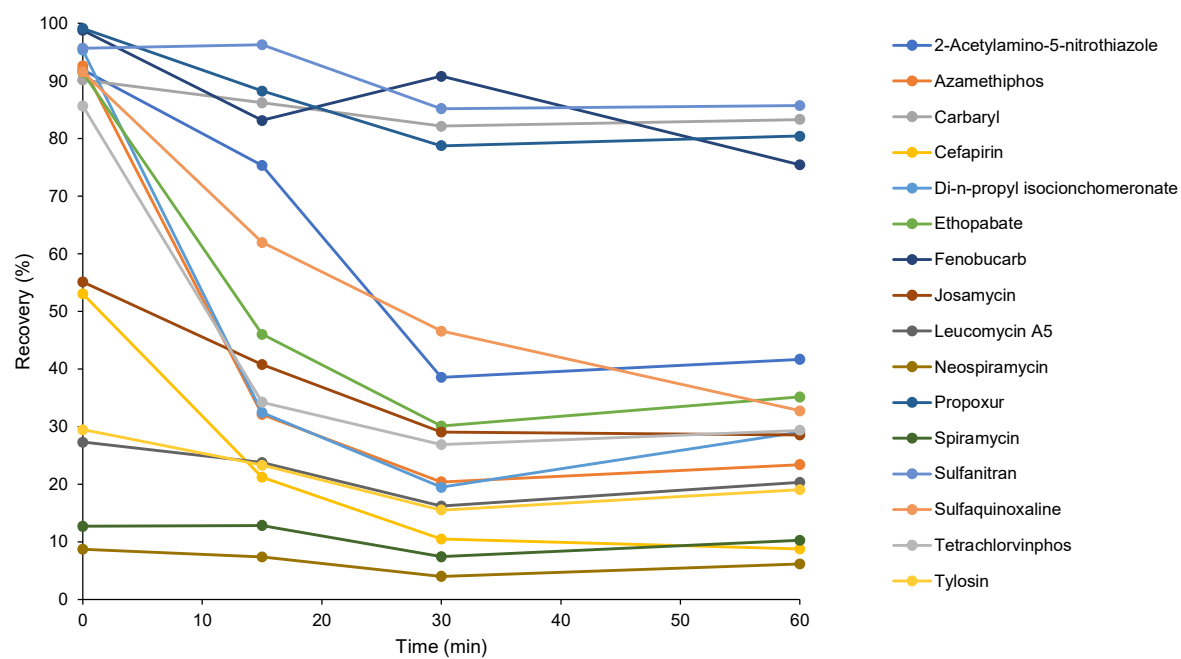


図. C-14. 農薬等の添加後放置時間の回収率¹への影響（牛の肝臓）

¹ n=3

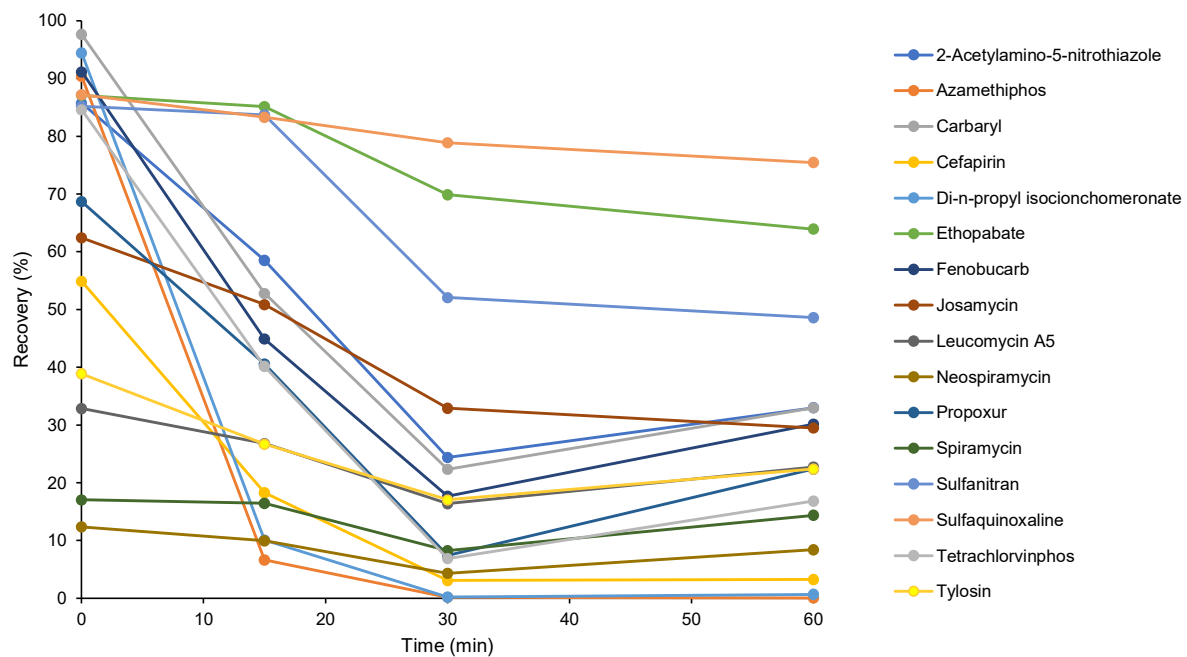


図. C-15. 農薬等の添加後放置時間の回収率¹への影響（豚の肝臓）

¹ n=3

表 C-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-Acetylmino-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
Sulfathoxypyridazine	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	87	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

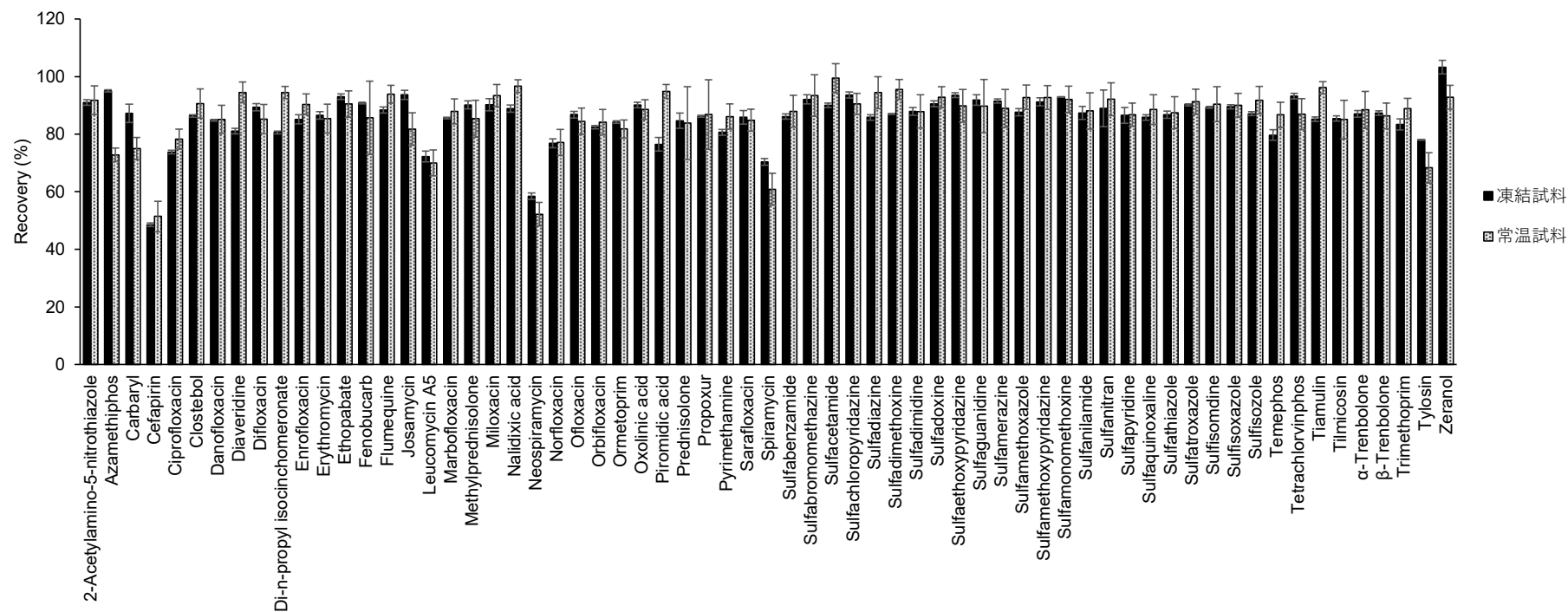


図. C-16. 凍結試料及び常温試料からの農薬等の平均回収率^{1,2} (牛の筋肉)

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

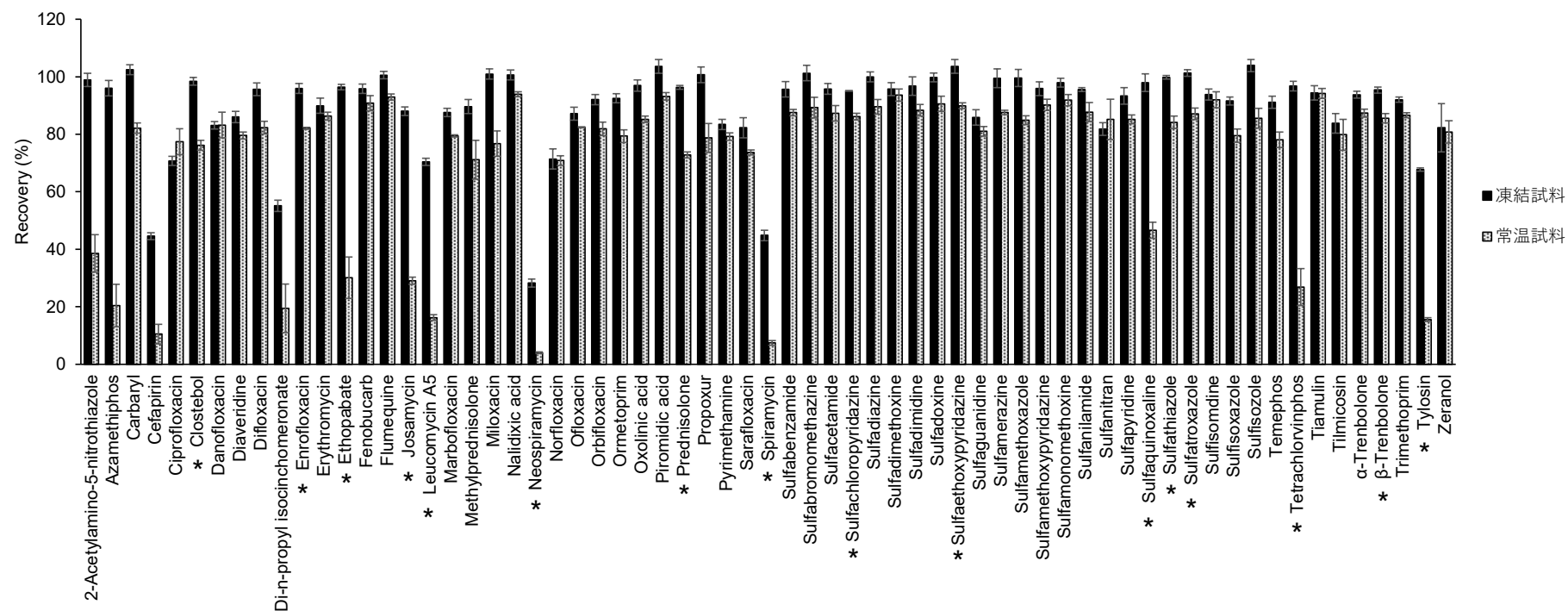


図. C-17. 凍結試料及び常温試料からの農薬等の平均回収率^{1,2} (牛の肝臓)

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 * $q < 0.01$

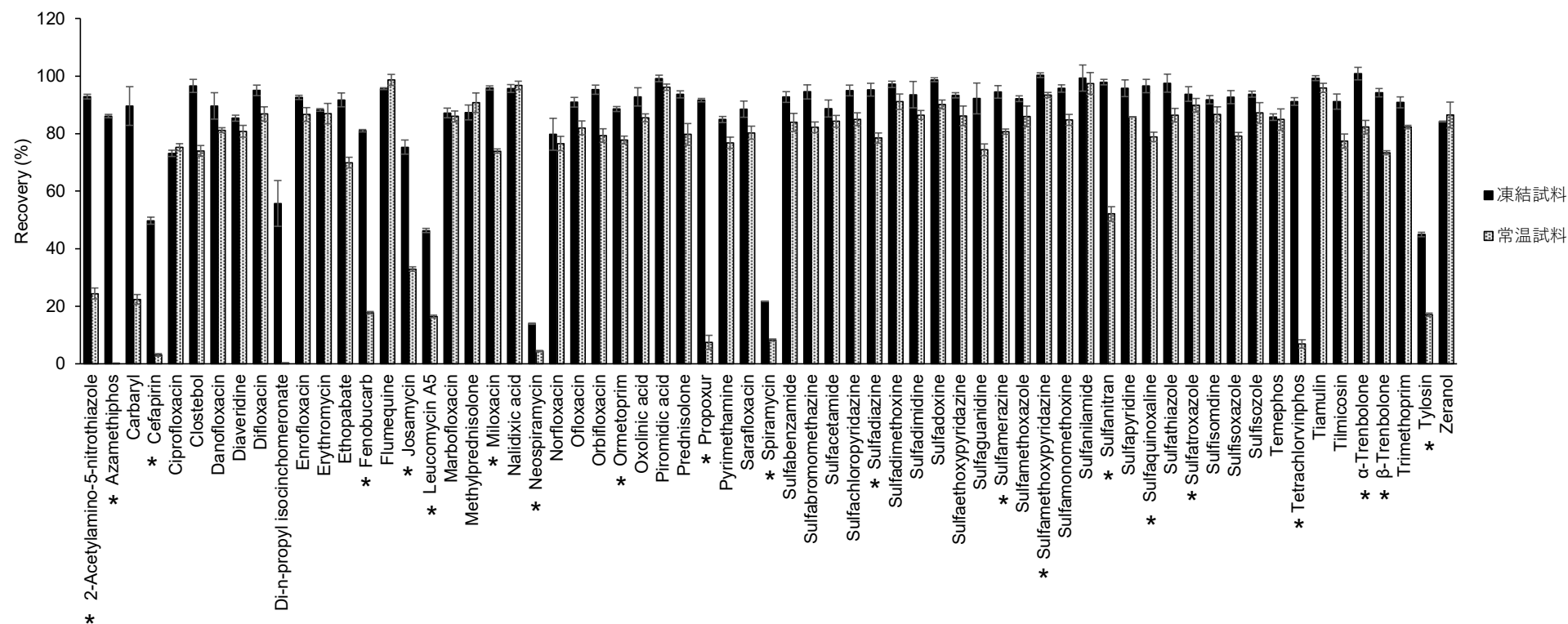


図. C-18. 凍結試料及び常温試料からの農薬等の平均回収率^{1,2} (豚の肝臓)

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 $q < 0.01$

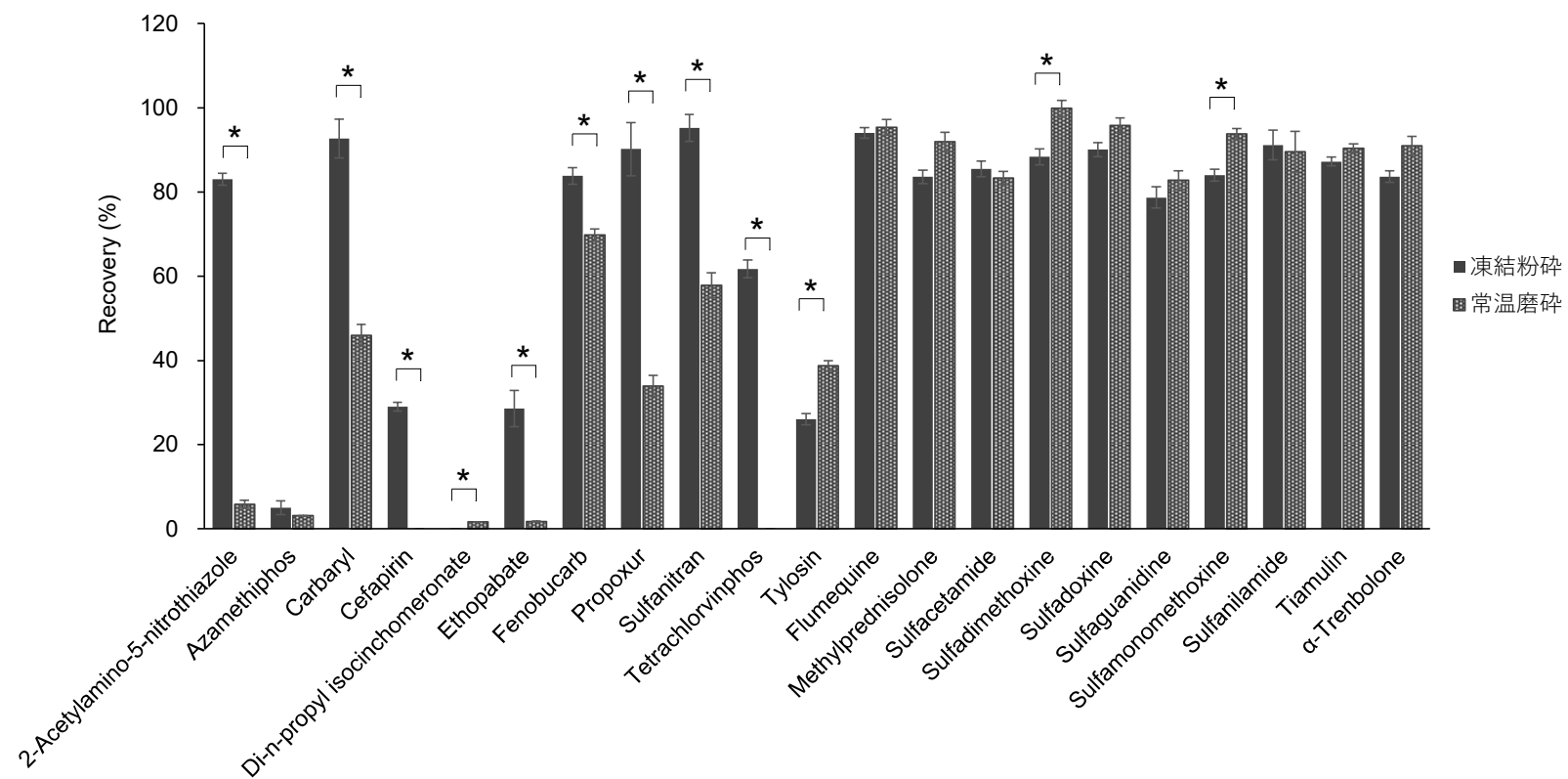


図. C-19. 常温磨砕法及び凍結粉砕法による試料調製における平均回収率^{1,2} (牛の肝臓)

¹ n=5

² *は $q < 0.01$

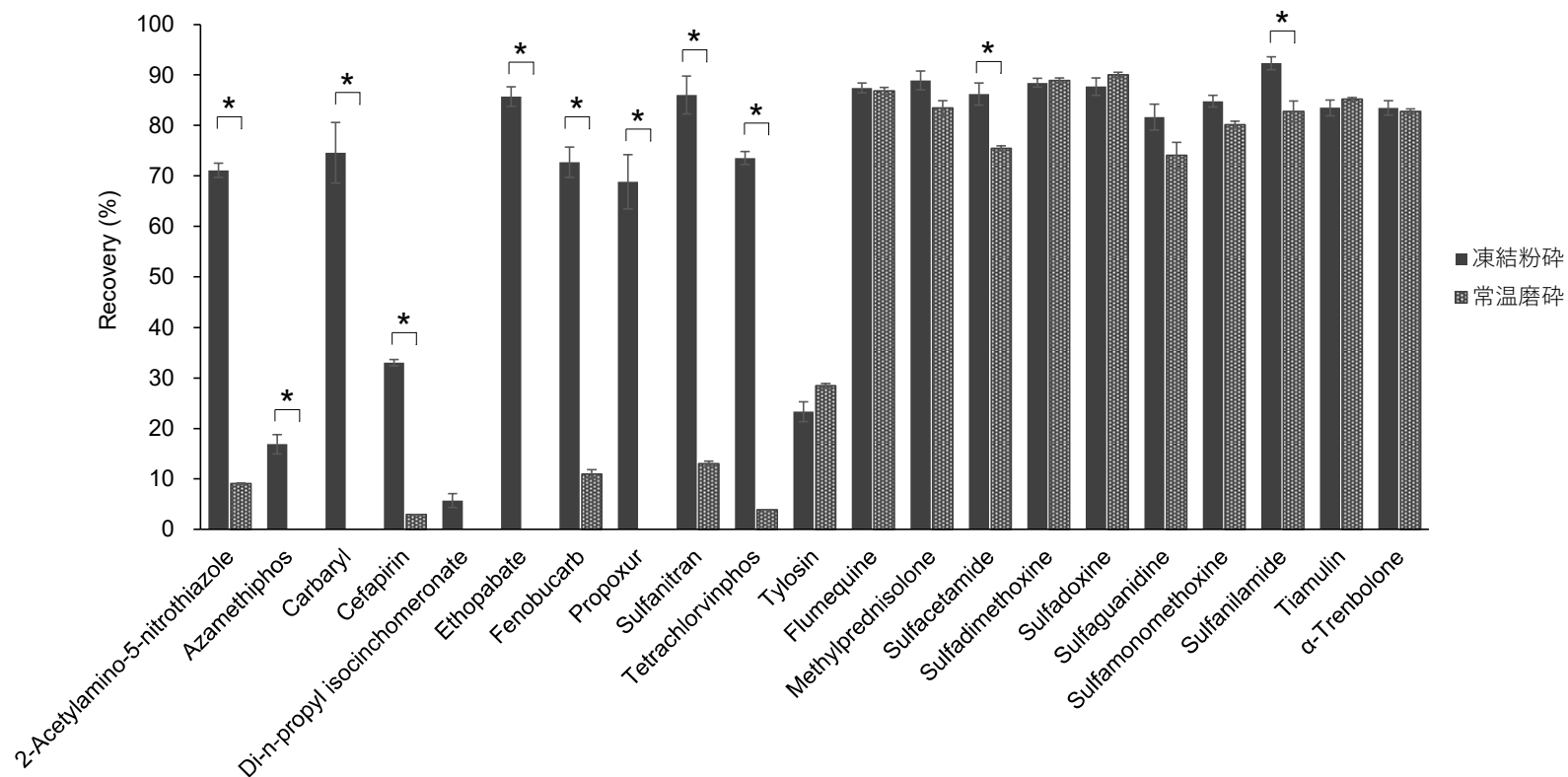


図. C-20. 常温磨砕法及び凍結粉碎法による試料調製における平均回収率^{1,2} (豚の肝臓)

¹ n=5

² *は $q < 0.01$

表 C-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

表 C-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

表 C-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

表 C-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