

凍結粉碎法を用いた食品中の残留農薬分析における前処理法の検討

○竹林直希、吉岡健¹、櫻井正晃²、柴田憲太郎³、岡崎千里、湯浅全世

¹現：霞ヶ浦環境科学センター、²現：廃棄物規制課、³現：筑西保健所

要旨

食品に残留する農薬の分析において、予冷式ドライアイス凍結粉碎法を用いて試料調製を行った。得られた試料について、均一化の評価及び GC/MS/MS を用いた残留農薬分析を実施し、凍結粉碎の有効性について、従来の常温粉碎と比較し検討を行った。

キーワード：残留農薬、一斉試験法、凍結粉碎、試料調製、粒度分布

1.はじめに

食品中の残留農薬分析では、「食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について」¹⁾に示されているとおり、果実・野菜等の場合は、検体約 1kg を細切均一化し、20.0g の試料を採取し分析に用いている。

食品に残留する農薬は必ずしも均一に分布しておらず、試料採取における試料の均一性は、精確な分析値を得る上で非常に重要である。

近年、検体の粉碎に「凍結粉碎法」を用いることにより、試料の均一性が向上し、農薬の分析値のばらつきを抑えることができると報告されている²⁾。

また、食品の種類によっては、酵素作用などが原因で農薬が分解したり、粉碎時の熱で酵素反応が進み、食品由来の夾雑成分が増加し、分析値に影響を及ぼしたりすることがあるが、凍結粉碎ではこれらの影響を抑制する効果があると報告されている²⁾。

今回、予冷式ドライアイス凍結粉碎法を用いた均一化（以下「凍結粉碎」という。）を行い、

従来の常温におけるミキサーを用いた均一化（以下「常温粉碎」という。）と比較し、試料の均一化の評価及び GC/MS/MS を用いた残留農薬分析を実施したので報告する。

2.方法

2-1.試料

茨城県内で市販されているオレンジ、かぼちゃ、キャベツ、だいこんの根、たまねぎ、トマト、なす、にら、ねぎ、ばれいしょ、ほうれんそう、幕の内弁当及びレトルトカレー（計 13 種類）を用いた。なお、幕の内弁当及びレトルトカレーは多くの夾雑成分が含まれている食品と想定して選定した。

2-2.試薬等

農薬標準品は富士フィルム和光純薬（株）製の農薬混合標準液 PL-1-2、2-1、3-3、4-2、5-1 及び 6-3 を混合し、アセトン及び n-ヘキサン（1:1）混液で適宜希釈して以下の操作に用いた。計 227 成分を分析対象化合物とした（表 1）。その他使用した試薬等は既報³⁾のとおり。

表 1 分析対象化合物 (計 227 成分)

EPN	クロルフェンビンホス (Z)	デルタメトリン (異性体-1)	フェノチオカルブ	ペナラキシル
XMC	クロルプロファミ	デルタメトリン (異性体-2)	フェノトリン (異性体-1)	ペノキサコール
δ-BHC	クロルベンジレート	テルブトリン	フェノトリン (異性体-2)	ペルメトリン (異性体-1)
アクリナトリン (異性体-1)	シアナジン	テルブホス	フェンスルホチオン	ペルメトリン (異性体-2)
アクリナトリン (異性体-2)	シアノホス	トリアジメノール (異性体-1)	フェンチオン	ペンコナゾール
アザコナゾール	ジエトフェンカルブ	トリアジメノール (異性体-2)	フェントエート	ペンディメタリン
アジンホスメチル	ジクロシメット (異性体-1)	トリアジメホソ	フェンバレレート (異性体-1)	ペンフルラリン
アセタミプリド	ジクロシメット (異性体-2)	トリアゾホス	フェンバレレート (異性体-2)	ペンフレセート
アセトクロール	ジクロフェンチオン	トリアレート	フェンブコナゾール	ホサロン
アトラジン	ジクロホップメチル	トリシクラゾール	フェンプロバトリン	ホスチアゼート (異性体-1)
アニロホス	ジクロラン	トリブホス	フェンプロビモルブ	ホスチアゼート (異性体-2)
アメトリン	シハロトリン (異性体-1)	トリフルラリン	フサライド	ホスファミドン (異性体-1)
アラクロール	シハロトリン (異性体-2)	トリフロキシストロビン	ブタクロール	ホスファミドン (異性体-2)
アレスリン (異性体-1, 異性体-2)	シハロホップブチル	トルクロホスメチル	ブタミホス	ホスメット
アレスリン (異性体-3, 異性体-4)	ジフェナミド	トルフェンピラド	ブリメート	マラチオン
イソキサチオン	ジフェノコナゾール (異性体-1)	ナプロバミド	ブプロフェジン	ミクロブタニル
イソフェンホスオキソソ	ジフェノコナゾール (異性体-2)	ニトタールイソプロピル	フラムブロップメチル	メチダチオン
イソフェンホス	シフルトリン (異性体-1)	ノルフルラソ	フルアクリピリム	メトキシクロール
イソプロカルブ	シフルトリン (異性体-2)	パクロトラゾール	フルキンコナゾール	メトラクロール (R、S)
イソプロチオラン	シフルトリン (異性体-3)	パラチオン	フルシトリネート (異性体-1)	メピンホス (異性体-1)
イプロベンホス	シフルトリン (異性体-4)	パラチオンメチル	フルシトリネート (異性体-2)	メピンホス (異性体-2)
イマザメタベンズメチル (異性体-1)	ジフルフェニカン	ハルフェンブロックス	フルチアセットメチル	メフェナセット
イマザメタベンズメチル (異性体-2)	シプロコナゾール (異性体-1)	ビテルタノール (異性体-1)	フルトラニル	メフェノキサム
イミペンコナゾール脱ベンジル体	シプロコナゾール (異性体-2)	ビテルタノール (異性体-2)	フルバリネート (異性体-1)	メフェンビルジエチル
イミペンコナゾール	シベルメトリン (異性体-1)	ピフェノックス	フルバリネート (異性体-2)	メプロニル
ウニコナゾール-P	シベルメトリン (異性体-2)	ピフェントリン	フルミオキサジン	モノクロトホス
エスプロカルブ	シベルメトリン (異性体-3)	ピペロホス	フルミクロラックベンチル	レナシル
エタルフルラリン	シベルメトリン (異性体-4)	ビラクロホス	フルリドン	
エチオン	シマジソ	ピラゾホス	ブレチラクロール	
エディフェンホス	ジメタメトリン	ピラフルフェンエチル	プロシミドン	
エトキサゾール	ジメチルビンホス (Z)	ピリダフェンチオン	プロチオホス	
エトフェンブロックス	ジメテナミド	ピリダベン	プロバクロー	
エトプロホス	ジメトエート	ピリフェノックス (Z)	プロバジン	
オキサジアソソ	シメトリン	ピリフェノックス (E)	プロバニル	
オキサジキシル	ジメビベレート	ピリプチカルブ	プロバルギット (異性体-1)	
オキシフルオルフェン	スピロキサミン (異性体-1)	ピリプロキシフェン	プロバルギット (異性体-2)	
オメトエート	スピロキサミン (異性体-2)	ピリミノバクメチル (Z)	プロビコナゾール (異性体-1)	
カズサホス	ソキサミド分解物	ピリミノバクメチル (E)	プロビコナゾール (異性体-2)	
カフェンストロー	ソキサミド	ピリミホスメチル	プロビザミド	
カルボフラン	ターバシル	ピリメタニル	プロヒドロジャクモソ (異性体-1)	
キナルホス	ダイアジソ	ピレトリン I	プロヒドロジャクモソ (異性体-2)	
キノキシフェン	チオベンカルブ	ピレトリン IIa	プロフェノホス	
キノクラミン	テクナゼソ	ピレトリン IIb	プロボキスル	
キントゼソ	テトラクロルビンホス	ピロキノ	プロマシル	
クレソキシムメチル	テトラコナゾール	ピンクロゾリン	プロメトリン	
クロルタールジメチル	テトラジホソ	フィブロニル	プロモブチド	
クロルピリホス	テニルクロール	フェナミホス	プロモプロビレート	
クロルピリホスメチル	テブコナゾール	フェナリモル	プロモホス	
クロルフェナピル	テブフェンピラド	フェニトロチオン	ヘキサコナゾール	
クロルフェンビンホス (E体)	テフルトリン	フェノキサニル	ヘキサジソ	

2-3.装置及び測定条件

1) 粉碎機

常温粉碎は、ミキサー (パナソニック (株) 製 MX-152SP) を用いて行った。凍結粉碎は、専用の粉碎機 ((株) アイスティサイエンス製 フレストント FST-4000) を用いて行った。

2) ホモジナイザー

KINEMATICA 社製 PT10-35GT

3) 粒度分布測定装置

ベックマン・コールター (株) 製 Multisizer3 (茨城県産業技術イノベーションセンターの備品を借用)

粒子径測定範囲 : 8~240µm 及び 40~1,200µm

4) 画像解析

写真は顕微鏡用 USB カメラ ((株) 松電社製 HDCE-50B2T) を用いて撮影した。

試料をシャーレに採取し、位置を変えながら 1 試料当たり 10 枚撮影し、画像解析ソフト (ImageJ、オープンソースソフトウェア) により画像処理し、試料の粒子径及び粒度分布を調べた。

5) ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS/MS)

(株) 島津製作所製 GCMS-TQ8040 分析条件は表 2 のとおり。

表 2 GC/MS/MS 分析条件

カラム: SH-Rxi-5Sil MS (0.25mm×30m×0.25μm)
カラム温度: 50°C (1分) - 25°C/分 - 125°C (0分) - 10°C/分 - 300°C (15分)
キャリアガス: ヘリウム
注入口温度: 250°C
注入量: 1μL
イオン化モード: EI
測定方法: MRM
測定イオン: 既報 ³⁾ のとおり

2-4. 検量線の作成

10~400μg/mL の範囲で検量線用標準液を調製し、ピーク面積法で検量線を作成した。

2-5. 試料調製

1) 常温粉碎

各検体を必要に応じて包丁で3~4cm角にカットし、ミキサーで粉碎した。

2) 凍結粉碎

(株)アイスティサイエンスの予冷式ドライアイス凍結粉碎法⁴⁾に沿って実施した。

各検体を必要に応じて包丁で2~3cm角にカットし、概ね同量のドライアイスと合成樹脂製の袋の中で混和し、ドライアイスで予冷した専用の粉碎機で粉碎した。その後、試料を-30°Cの冷凍庫内で、ドライアイスが完全に昇華し、重量が一定になるまで静置した。

2-6. 試験溶液の調製

通知試験法「GC/MS による農薬等の一斉試験法 (農産物)」¹⁾に準拠し調製を行った (図1)。

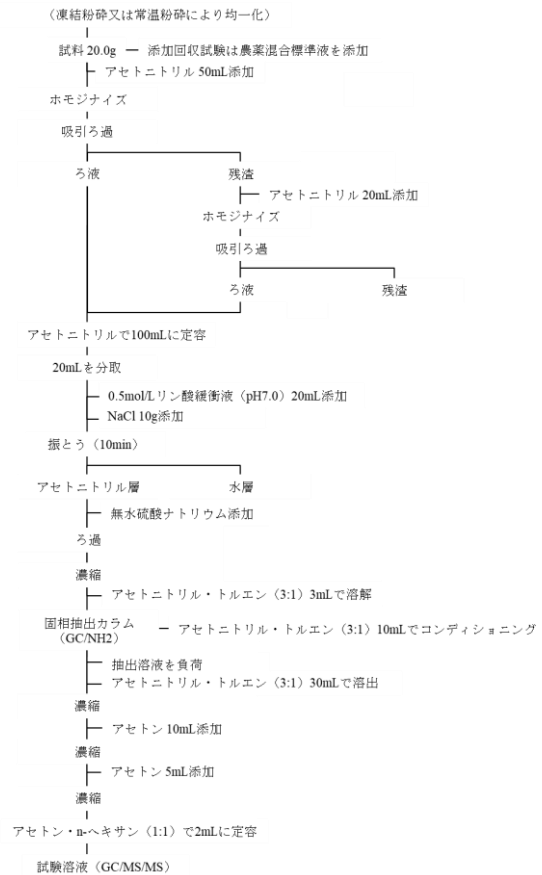


図 1 試験溶液の調製方法

2-7. 添加回収試験

各試料 20.0g を量りとり、添加濃度が 0.01μg/g になるよう農薬混合標準液 (0.2μg/mL) を添加し、30 分間放置した。その後、図 1 により試験溶液の調製を行った。

n=3 で平行試験を実施し、選択性、定量限界及び真度 (回収率) を評価した。評価目標値は、「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインの一部改正について」⁵⁾に従い、選択性はブランク試料を用いて定量を妨害するピークがないこと、定量限界はピークの S/N 比が 10 以上、真度 (回収率) は 70~120% を目標値とした。

2-8. 農薬疑似添加検体を用いた試料調製

添加濃度が 0.010~0.015μg/g になるよう、検

体の表面全体に均一に農薬混合標準液 (2µg/mL) を添加し、室温で約 24 時間放置した。その後、図 1 により試験溶液の調製を行った。

3.結果及び考察

3-1.凍結粉碎による試料調製

オレンジ、かぼちゃ及びびれいしょは、凍結による検体硬化のため、検体を 1~2cm 角に細かくカットしないと、粉碎機の刃に検体が刺さり、粉碎機が停止してしまい、処理に手間を要した。

3-2.凍結粉碎後ドライアイスが完全に昇華するまでの時間の検討

凍結粉碎後の各試料約 300~600g をビーカーに採取し、アルミ箔で軽く蓋をして-30℃の冷凍庫に移し、一定時間ごとに冷凍庫から取り出し、重量を測定したところ、凍結粉碎してから 24 時間経過するといずれの試料も重量が一定になり、ドライアイスが完全に昇華した (図 2)。

また、凍結粉碎により得られた試料の外観は、常温粉碎と比べて、いずれの食品もパウダー状であった。

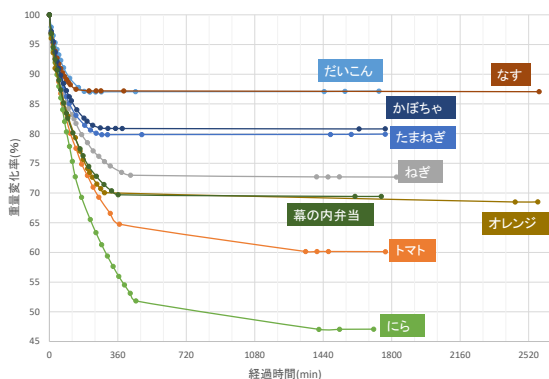


図 2 凍結粉碎後の重量変化

3-3.粒度分布測定装置を用いた粒度分布測定

4 種類の食品 (だいこんの根、たまねぎ、にら及びねぎ) について、粒度分布測定装置を用いて、試料の粒子径及び粒子数 (粒度分布) の測定を行った。

だいこんの根の 8~240µm における測定結果では、凍結粉碎の方が粒子径が小さい範囲 (10~20µm) に分布していた (図 3)。

なお、その他の食品では、試料の粒子径が装置の測定可能範囲より大きく、正確な測定結果が得られなかった。

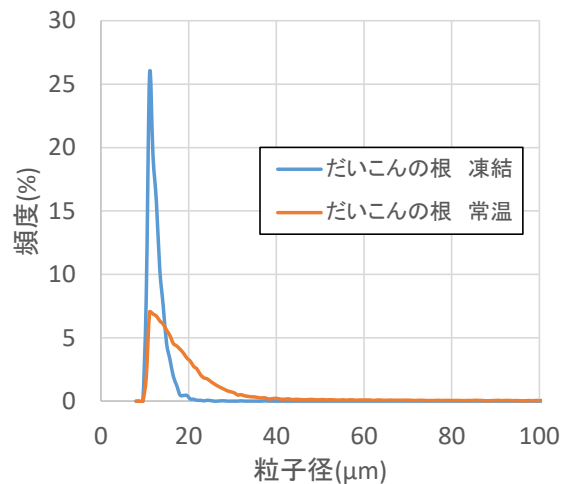


図 3 だいこんの根の粒度分布

3-4.画像解析による粒度分布評価

12 種類の食品 (オレンジ、かぼちゃ、キャベツ、だいこんの根、たまねぎ、なす、にら、ねぎ、ばれいしょ、ほうれんそう、幕の内弁当及びレトルトカレー) について、画像解析により、試料の粒度分布を評価した。

かぼちゃ、なす、にら及びねぎでは、凍結粉碎の方が粒子径 800µm を超える粒子の割合が低くなった (図 4 及び図 5)。

また、だいこんの根及びたまねぎでは、凍結粉碎と常温粉碎で粒度分布に有意な差は認められなかった (図 6 及び図 7) ため、常温粉碎でも凍結粉碎と同程度に均一化されていたと

考えられた。

その他の食品（オレンジ、キャベツ、ばれいしよ、ほうれんそう、幕の内弁当及びレトルトカレー）では、常温粉砕により得られた試料の粒子径が大きかったため、画像解析による評価が困難であった。

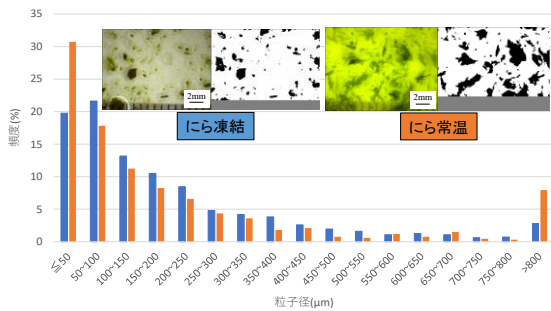


図4 にらの粒度分布

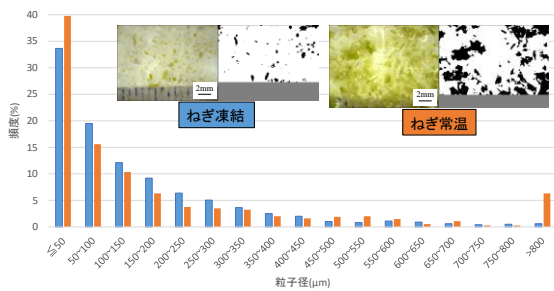


図5 ねぎの粒度分布

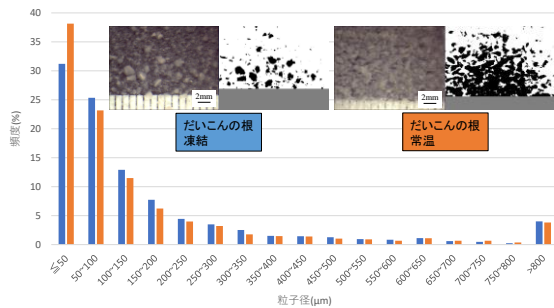


図6 だいこんの根の粒度分布

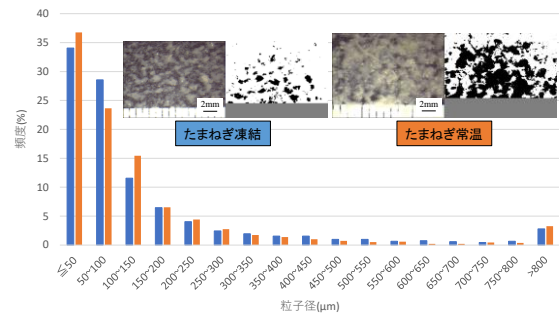


図7 たまねぎの粒度分布

3-5.GC/MS/MS を用いた残留農薬分析

12 種類の食品（オレンジ、かぼちゃ、キャベツ、だいこんの根、たまねぎ、なす、にら、ねぎ、ばれいしよ、ほうれんそう、幕の内弁当及びレトルトカレー）について、凍結粉砕又は常温粉砕により得られた試料をそれぞれ図 1 のとおり調製し、GC/MS/MS を用いた残留農薬分析を実施した。

3-5-1.食品中の夾雑成分に由来するピークの比較

たまねぎ、にら、ねぎ及びほうれんそうでは、凍結粉砕の方が食品中の夾雑成分に由来すると考えられるピークが比較的小さかった（図 8）。このことから、特にアリウム属野菜（たまねぎ、にら及びねぎ）において、凍結粉砕により夾雑成分の増加が抑制された可能性が示唆された。

また、オレンジ、かぼちゃ及びキャベツでは、凍結粉砕の方が夾雑成分由来のピークが小さくなる傾向であった。

なお、その他の食品では、夾雑成分のピークに有意な差は認められなかった。

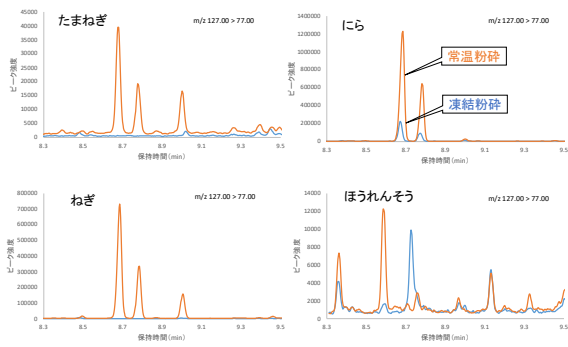


図8 たまねぎ、にら、ねぎ及び
ほうれんそうのピーク比較

3-5-2. 添加回収試験の結果について

分析対象化合物 227 成分のうち、適合であった成分数の割合を示した (表 3)。

表 3 分析対象化合物 227 成分のうち、
適合成分数の割合 (%)

食品の種類	粉砕法	選択性	定量限界	真度 (回収率) (添加濃度 0.01 µg/g)
オレンジ	凍結	93.8	88.1	78.4
	常温	92.1	87.2	61.7
かぼちゃ	凍結	96.5	92.1	95.2
	常温	96.0	91.2	93.4
キャベツ	凍結	95.6	90.3	69.2
	常温	96.0	90.3	89.0
だいこんの根	凍結	97.4	92.5	94.7
	常温	96.0	91.2	86.3
たまねぎ	凍結	97.8	91.2	80.6
	常温	96.5	91.6	77.1
なす	凍結	94.7	89.0	81.9
	常温	94.3	89.4	78.0
にら	凍結	95.6	90.7	70.9
	常温	96.0	91.2	56.4
ねぎ	凍結	96.9	90.7	85.5
	常温	92.1	91.2	56.8
ばれいしょ	凍結	93.4	87.2	81.9
	常温	93.4	89.4	84.1
ほうれんそう	凍結	94.3	88.5	55.1
	常温	89.9	92.1	39.2
幕の内弁当	凍結	96.0	92.1	82.8
	常温	94.7	91.2	70.5
レトルトカレー	凍結	93.0	88.5	81.9
	常温	93.0	89.0	93.0

オレンジ、にら、ねぎ、ほうれんそう及び幕の内弁当では、真度 (回収率) において、凍結粉砕の方が 10%ポイント以上高くなった。

反対に、キャベツ、レトルトカレーでは、真度 (回収率) において常温粉砕の方が 10%ポイント以上高くなった。

また、いずれの食品も、選択性及び定量限界では、差は 5%ポイント未満であった。

3-5-3. 変動係数による分析値のばらつきの比較

2 種類の食品 (オレンジ及びかぼちゃ) について、2-8 のとおり農薬を疑似添加した検体を用いて GC/MS/MS を用いた残留農薬分析を行った。

かぼちゃでは、分析対象化合物 227 成分中 155 成分で凍結粉砕の方が変動係数が小さくなり、分析値のばらつきを抑えられた。顕著な差が認められた主な 5 成分の結果を表 4 及び表 5 に示す。

オレンジでは、分析対象化合物 227 成分中 133 成分で凍結粉砕試料の方が変動係数が小さくなり、分析値のばらつきを抑えられた。顕著な差が認められた主な 4 成分の結果を表 6 及び表 7 に示す。

このことから、かぼちゃ及びオレンジでは、凍結粉砕の方がより均質な試料を調製可能であることが示唆された。

表4 かぼちゃ（凍結粉砕）の測定結果（n=5）

分析対象化合物	試料中の農薬濃度 (µg/g)					平均値 (µg/g)	標準偏差 (µg/g)	変動係数 (%)
	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5			
EPN	0.010	0.012	0.012	0.012	0.012	0.011	0.00055	4.8
クレソキシムメチル	0.010	0.011	0.011	0.010	0.010	0.010	0.00024	2.4
パラチオン	0.010	0.013	0.011	0.011	0.010	0.011	0.0011	9.6
パラチオンメチル	0.0095	0.0090	0.0085	0.0095	0.010	0.0093	0.00051	5.5
ピリミホスメチル	0.010	0.011	0.011	0.011	0.011	0.010	0.00031	3.0

表5 かぼちゃ（常温粉砕）の測定結果（n=5）

分析対象化合物	試料中の農薬濃度 (µg/g)					平均値 (µg/g)	標準偏差 (µg/g)	変動係数 (%)
	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5			
EPN	0.0090	0.011	0.010	0.011	0.012	0.011	0.0011	10
クレソキシムメチル	0.0065	0.0070	0.0070	0.0075	0.0080	0.0072	0.00051	7.0
パラチオン	0.0085	0.0085	0.011	0.012	0.013	0.011	0.0020	18
パラチオンメチル	0.0075	0.0085	0.0095	0.010	0.010	0.0091	0.0010	11
ピリミホスメチル	0.0080	0.0085	0.0080	0.0090	0.0095	0.0086	0.00058	6.8

表6 オレンジ（凍結粉砕）の測定結果（n=5）

分析対象化合物	試料中の農薬濃度 (µg/g)					平均値 (µg/g)	標準偏差 (µg/g)	変動係数 (%)
	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5			
クロルフェナビル	0.0060	0.0050	0.0030	0.0050	0.0050	0.0048	0.0010	20
ピリメタニル	0.0080	0.0080	0.0080	0.0080	0.0080	0.0080	0.0000093	0.12
フェントロチオン	0.010	0.010	0.010	0.010	0.011	0.010	0.00041	4.0
フェンプロバトリン	0.0060	0.0060	0.0050	0.0060	0.0060	0.0058	0.00040	6.9

表7 オレンジ（常温粉砕）の測定結果（n=5）

分析対象化合物	試料中の農薬濃度 (µg/g)					平均値 (µg/g)	標準偏差 (µg/g)	変動係数 (%)
	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5			
クロルフェナビル	0.0060	0.0070	0.0040	0.0060	0.0090	0.0064	0.0016	25
ピリメタニル	0.0090	0.010	0.0090	0.0080	0.010	0.0092	0.00075	8.1
フェントロチオン	0.010	0.012	0.0090	0.010	0.013	0.011	0.0015	14
フェンプロバトリン	0.0060	0.0080	0.0050	0.0070	0.0080	0.0068	0.0012	17

3-6. 試料の均質化工程への影響の比較

常温粉砕により得られた試料は、食品の種類によって程度は異なるが、試料の均質化工程において、ホモジナイザーの刃に絡まり、ピンセット等で取り除く必要があったが、凍結粉砕により得られた試料は、いずれの食品もホモジナイザーの刃に絡まらずに均質化することができた。

4. まとめ

- ・ 予冷式ドライアイス凍結粉砕法による試料調製を行い、いずれの食品もパウダー状の試料が得られた。
なお、一部の食品では、凍結により検体が硬化し、粉砕機の回転刃に検体が刺さり、粉砕機が停止し、処理に手間を要した。
- ・ 凍結粉砕後、-30℃の冷凍庫で約24時間経過すると、いずれの食品も試料からドライアイスが完全に昇華した。

- ・ 凍結粉碎により得られた試料は、ホモジナイザーの刃に絡まらずに試料を均質化することができた。
- ・ 試料の粒子径の大きさ及び粒子数の分布を調べたところ、食品の種類によって異なるが、凍結粉碎の方が粒子径が 800 μm を超える粒子の割合が低くなる傾向であった。
- ・ GC/MS/MS による残留農薬分析では、たまねぎ、にら、ねぎ及びほうれんそうにおいて、凍結粉碎の方が食品中の夾雑成分に由来すると考えられるピークが比較的小さくなった。
- ・ 添加回収試験(n=3)を実施したところ、オレンジ、にら、ねぎ、ほうれんそう及び幕の内弁当では、凍結粉碎の方が真度(回収率)において有意な向上が認められた。反対に、キャベツ及びレトルトカレーでは、常温粉碎の方が真度(回収率)は良好な結果であった。
- ・ 農薬疑似添加検体(オレンジ及びかぼちゃ)を用いた残留農薬分析の結果、凍結粉碎では、変動係数が小さくなる成分が増加し、分析値のばらつきを抑えることができたと推察された。

以上から、凍結粉碎では、均質な試料が得られ、より精度の高い分析が可能であることが推察されたが、食品の種類によってその有効性が異なるため、対象を拡大する際は更なる検証が必要である。

今後は、凍結粉碎が有効である一部の食品について、凍結粉碎法を用いた試料調製による残留農薬一斉試験法の妥当性評価試験を行い、行政検査への導入を検討していく。

5.文献

- 1) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長：食安発第 0124001 号、食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について（通知）、2005
- 2) 山崎由貴、志田静夏：食品中の残留農薬分析における凍結粉碎法の特徴とその有用性、食品衛生学雑誌、**62**、91-95（2021）
- 3) 吉岡健、櫻井正晃、柴田憲太朗、岡崎千里、立原幹子、湯浅全世：農産物中の残留農薬一斉試験法の妥当性評価について—平成 30 年度～令和 3 年度—、茨城県衛生研究所年報、**60**、48-66（2022）
- 4) 佐々野僚一、小西賢治、栢木春奈、斎藤勲：少量試料サンプリングのためのドライアイス凍結粉碎の検討、食品衛生学会第 106 回学術講演会、2013
- 5) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長：食安発第 1224 第 1 号、食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインの一部改正について（通知）、2010