

4. 山形県特産果物類の残留農薬検査における凍結粉碎法の適用検討と均一性評価

○篠原 秀幸 (山形県衛生研究所)

【研究目的】

食品中の残留農薬検査では、試料となる作物中の農薬成分の分布が部位により異なるため、分析試料をサンプリングする際の均一性が重要となる。しかし、果物類は室温での均一化方法（以下、室温粉碎法）では果皮等の固形分と果実由来の水分が分離することがある。そこで、本研究では山形県特産果物類を対象に、固形分と水分が分離しにくいとの報告があるドライアイスを用いた均一化方法（以下、凍結粉碎法）を検討し、試料の均一性を評価する。

【研究の必要性】

現在、当研究所における野菜・果実類の残留農薬検査では、試料約 1 kg を室温粉碎法で均一化した後、厚生労働省の公示試験法（GC/MS による農薬等の一斉試験法（農産物））に従い分析試料として 20.0 g をサンプリングしている¹⁾。このとき、試料が適切に均一化されていることを前提としている。しかし、検査部位に果皮を含む果物類を室温粉碎法で均一化した場合、果皮や果実、種子で硬さの違い等の理由により粉碎が不十分になり、一定時間が経過した際に比重の違いによりそれらが分離することがある。このような試料ではサンプリングした分析試料の組成に偏りが生じ、定量精度が低下するおそれがある。一方、凍結粉碎法ではドライアイス等で試料を凍結した後に均一化することで試料が粉末状になり、固形分と水分の分離が抑制できると報告されている^{2,3)}。

山形県の特産品としておうとう等の果物類が挙げられ、県外からも高い評価を受けている。これら特産果物のさらなる安全性確保に主眼を置き、果物類を対象とした残留農薬検査の精度向上のため、凍結粉碎法を用いた均一化方法の検討が必要と考えた。

【研究計画】

山形県特産果物類 5 品目（ぶどう、西洋なし、かき、りんご、おうとう）を対象に室温粉碎法および凍結粉碎法により均一化を行い、試料の均一性について、外観、粒度分布を比較し、評価する。加えて、収穫後の果物に農薬を添加した試料（以下、模擬残留試料）を作製し、各均一化法で処理した後、含まれる農薬成分の分析値を一元配置分散分析および変動係数により均一性を評価する。

1. 試料の均一化方法

1.1 フードプロセッサー

クイジナート社製 DLC-NXJ2SS を用いる。

1.2 室温粉砕法

試料を室温にてフードプロセッサーで粉砕、均一化する。

1.3 凍結粉砕法

千葉ら、佐々野らの方法を参考に試料と等量のドライアイスを混合した後、フードプロセッサーで粉砕、均一化する^{2,3)}。フードプロセッサーは室温粉砕法と同じものを使用する。

1.4 凍結粉砕法における均一化時間の検討

粒度分布を指標に最適化を行う。

2. 均一性の評価

2.1 外観

各均一化法で処理した試料の外観について、果物の種子や果皮等の固形分と果実に由来する水分の分離を目視で確認する。

2.2 粒度分布

各均一化法で処理した試料について、粒度分布測定装置を用いて粒径範囲 0.02~2000 μm の粒度分布を測定する。得られた粒度分布を統計的手法によって解析、果物毎に均一化法間で比較する。

2.3 一元配置分散分析および変動係数

山形県内で市販または生産された果物と市販の農薬製剤7種類（トレファノサイド、ダズバン乳剤、マラソン乳剤、ゴーゴーサン、ストロビーフロアブル、コテツフロアブル、テルスターフロアブル）を用いて模擬残留試料を作製し、各均一化法で処理する。均一化した試料から複数回分取、試験溶液調製を行った後にガスクロマトグラフ質量分析計（以下、GC-MS）で分析し、各農薬成分のクロマトグラムからピーク面積を求める。得られた測定結果に対し、一元配置分散分析および変動係数を算出して均一性を評価する。

【実施内容・結果】

1. 凍結粉砕法における均一化時間の検討

ぶどうをモデル試料として、試料約 1 kg を凍結粉砕法により均一化した^{2,3)}。均一化開始から 5、10、20、30 分経過後に試料を分取し、測定装置（日機装製 マイクロトラック MT3300Ex II）で粒度分布を測定した。得られた粒度分布についてシャピロ・ウィルク検定を行い各分布の正規性を確認したところ、すべての粒度分布で正規性が棄却された。そこで、ノンパラメトリック検定であるクラスカル-ウォリス検定により分布の差を比較した。その結果、各均一化時間における粒度分布に差はなかった。外観では均一化時間 5 分で試料全体が粉末状に均一化されており、それ以降では変化がなかった。よって、本検討では均一化時間を 5 分とした。なお、室温粉砕法における均一化時間も 5 分とした。

2. 均一性の評価

2.1 試料の外観

室温粉碎法による均一化では特にぶどう、西洋なしで固形分と水分の分離が顕著だった。かき、おうとうは果実に粘性があり、室温で粉碎すると一部が塊状となり、細かく粉碎することが困難だった。りんごは固形分と水分の顕著な分離はなかったが果皮の一部が粉碎されずに残っていた。

一方、凍結粉碎法で処理した場合には全ての果物が粉末状に均一化され、固形分と水分の分離は見られなかった。ただし、おうとうでは試料の一部が塊状になっていた。

2.2 粒度分布

各均一化方法により処理した試料約 1 kg から約 10 g 秤量し、測定試料とした。試料は十分に混和した後、測定装置（1. と同一機器）で粒度分布を測定した（図 1）。得られた全ての粒度分布についてシャピロ・ウィルク検定により正規性を確認した。その結果、全ての粒度分布で正規性が棄却されたため、ノンパラメトリック検定であるコルモゴロフ=スミルノフ検定を用いて果物毎に均一化方法間の粒度分布を比較した²⁾。優位水準 0.01 で分布形状に差があったのはかき、りんごだった。全ての果物において、室温粉碎法と比べ凍結粉碎法で均一化した際に粒径が小さい粒子の頻度が増加する傾向があった。

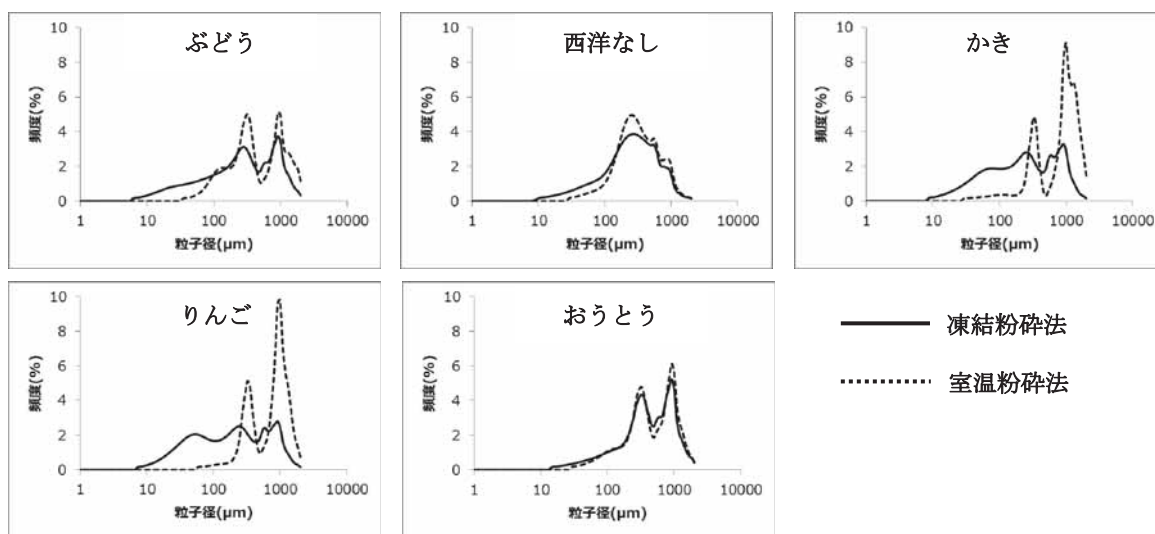


図 1 各作物における均一化法間の粒度分布の比較

2.3 一元配置分散分析および変動係数

水 1500 mL に農薬製剤 7 種をそれぞれ 0.5 mL ずつ加えて攪拌した。藤田らの方法を参考にこの薬液に果物約 3 kg を 5 秒間浸漬した後、薬液をよく切って 2 日間自然乾燥し、模擬残留試料とした⁴⁾。これを食品衛生検査指針を参考に可食部を分離した後、無作為に約 1 kg ずつ 2 回分取し、各均一化方法で処理した。

均一化した試料約 1 kg を等量ずつ 10 分割し、そのうち 5 分割を無作為に選択、それぞれから 10.0 g ずつ 2 回分取した。各均一化方法で計 10 試料について試験溶液を調製した後 (図 2)、GC-MS で分析、各農薬成分のクロマトグラムからピーク面積を求めた。その測定結果を農薬成分それぞれについて一元配置分散分析によって区分間の変動/区分内の変動から分散比 F を求め、区分数 5、併行数 2、有意水準 5 % に対する棄却限界値 (5.192) と比較した^{5,6)}。加えて、10 試料の変動係数を算出し、均一化法間で比較した。

室温粉碎法ではおうとう 1 成分、凍結粉碎法ではおうとうを含む 3 試料延べ 8 成分で分散比 F が棄却限界値以上であった (表 1)。変動係数はほぼ全ての対象作物および農薬成分で室温粉碎法に比べ凍結粉碎法の方が小さい傾向を示した (表 2)。

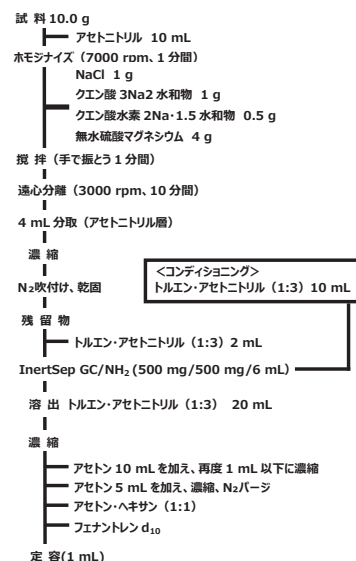


図 2 試験溶液の調製方法

表 1 各作物における均一化法間の分散比 F の比較

農薬成分	分散比 F									
	ぶどう		西洋なし		かき		りんご		おうとう	
	凍結	室温	凍結	室温	凍結	室温	凍結	室温	凍結	室温
トリフルアリン	0.803	1.203	1.484	1.233	0.817	0.817	0.479	0.432	4.095	1.809
マラチオン	1.245	0.562	2.679	1.405	0.234	1.186	5.919	0.868	1.382	7.249
クロルピリホス	1.505	1.197	1.705	1.507	0.233	1.591	11.848	0.446	15.380	1.606
ベンディメタリン	0.075	1.041	3.259	1.771	0.199	2.259	5.965	0.419	12.650	1.711
クロキシムメチル	2.911	0.576	1.031	0.714	0.599	3.865	1.652	1.439	1.696	4.243
クロルフェナピル	3.102	0.418	2.420	1.191	0.234	1.562	2.833	0.612	6.340	1.298
ピフェントリン	3.102	0.553	5.875	0.964	0.432	1.268	1.553	0.630	5.296	2.836

*下線:棄却限界値(5.192)以上となった項目

表 2 各作物における均一化法間の変動係数 CV% の比較

農薬成分	変動係数 CV%									
	ぶどう		西洋なし		かき		りんご		おうとう	
	凍結	室温	凍結	室温	凍結	室温	凍結	室温	凍結	室温
トリフルアリン	4.0	14	4.9	10	15	37	6.1	13	14	19
マラチオン	2.9	10	4.4	12	13	25	12	14	7.7	13
クロルピリホス	3.8	15	6.8	16	13	24	14	15	11	15
ベンディメタリン	2.5	16	6.9	18	13	27	10	17	13	16
クロキシムメチル	3.6	16	5.2	7.5	15	10	11	13	6.0	7.8
クロルフェナピル	4.4	17	5.5	14	13	19	10	15	11	13
ピフェントリン	2.1	15	5.1	25	11	17	10	16	16	10

【考察と今後の課題】

室温粉碎法による均一化では、特にぶどうや西洋なしでは果皮と果実の硬度差が大きく水分量が多いため、果皮等の固形分が分離しやすい。一方、凍結粉碎法では試料中の水分を凍結させることにより、水分と固形分の分離を抑制している。また、凍結により試料部位間の硬度差が小さくなるため、果皮をより細かく粉碎できるようになり、均一性の向上に寄与すると推察される。ただし、おうとうを凍結粉碎した際に目視で試料の一部が塊状になっていたことから、粉碎条件を調整する必要があると考えられる。凍結粉碎法では基本的に試料を粉碎前に凍結するが、荒木らの報告によると、作物やフードプロセッサの性能によっては試料の一部が粉碎されずに塊状に残ることがある⁷⁾。その場合、試料を予備凍結せずにドライアイスと共に均一化すると改善する可能性があり、作物によっては凍

結方法を変更する必要がある。

一元配置分散分析で、凍結粉碎法の方が室温粉碎法より分散比Fが棄却限界値を超える農薬成分が多かった。この理由として、分散比Fを算出する際の区分間および区分内の変動の大きさが影響していると考えられる。変動係数は凍結粉碎法の方が室温粉碎法の場合よりもサンプリングした10試料のピーク面積のばらつきが小さく、分散分析における区分間および区分内の変動も小さくなる傾向があった。しかし、分散比を求めると、各変動の値が小さいために両者の差が大きく影響し、分散比Fが棄却限界値を超える場合があったと推察される。

今回、山形県の特産果物を対象に凍結粉碎法による均一化の検討を行い、得られた試料の均一性を評価した。凍結粉碎法はサンプリングに伴うピーク面積のばらつきが小さく、定量精度が高い可能性が示唆された。よって、果物類の残留農薬検査において凍結粉碎法を用いることで、より正確な検査結果が得られ、食の安全を担保するのに寄与すると考えられる。また、サンプリング精度の向上により、分析の小スケール化、ひいてはおうとうなどの単価が高い果物類での分析コストの削減が可能となる。今後は他の作物および農薬成分でも検討を行い、検査への導入を目指していく。

【参考文献】

- 1) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知、食安発第0124001号、平成17年1月24日。
- 2) 千葉美子 他、宮城県保健環境センター年報、33、41-45、2015。
- 3) 佐々野遼一 他、食品衛生学会第106回学術講演会要旨集。
- 4) 藤田俊一 他、植物防疫、67、55-61、2013。
- 5) 起橋雅浩 他、食品衛生学雑誌、51、253-257、2010。
- 6) 宮本伊織 他、大同生命厚生事業団主催平成27年度地域保健福祉研究助成 研究報告。
- 7) 荒木啓佑 他、平成28年川崎市健康安全研究所年報、105-107。

【経費使途明細】

使 途	金 額
ガスクロマトグラフ消耗品（バイアル等）	77,112 円
標準液	7,344 円
固相抽出カラム	102,600 円
試料購入費	17,559 円
農薬購入費	16,343 円
溶媒、試薬、実験材料等（ドライアイス ガス関係を含む）	66,932 円
粒度分布測定費用	12,110 円
合 計	300,000 円
大同生命厚生事業団助成金	300,000 円