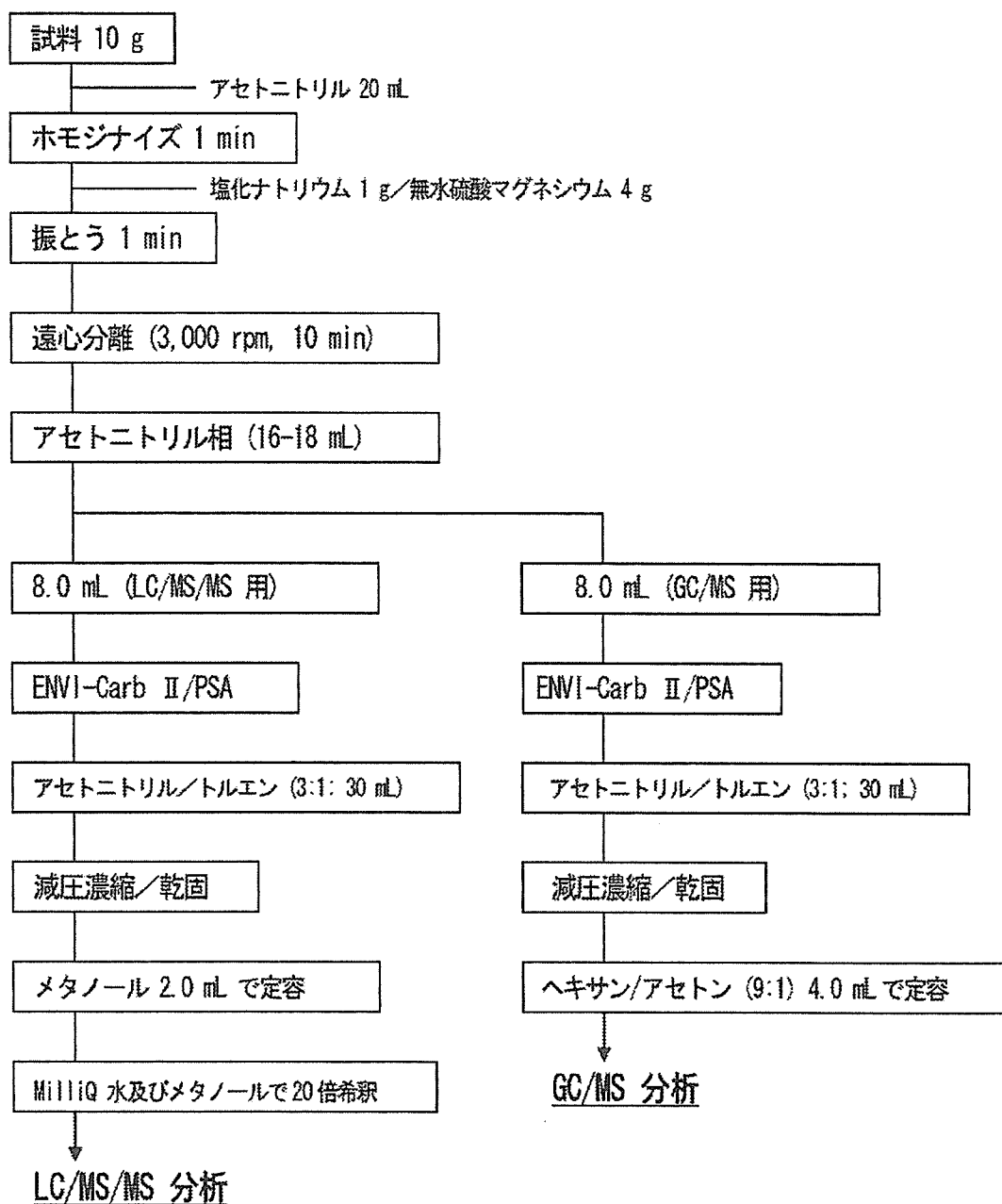


野菜, 果実	試料	20 g (2 μg/ml 混合標準アセトン溶液 1.0 ml を添加) (30分間放置)
	抽出	アセトニトリル 50 ml 4~5分間ホモジナイズ(ワーリンブレンダー)
	吸引ろ過	ろ紙上の残さにアセトニトリル 20 ml を加えてホモジナイズ ろ液(上清)にアセトニトリルを加え, 100 ml に定容
	塩析	抽出液 20 mL(試料 4 g 相当)をとる NaCl 8 g 0.5 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.0) 20 ml 振とう 5分間 水層を捨てる
	脱水	適量の無水硫酸ナトリウムを加えたカラムに通して脱水する (アセトニトリルで無水硫酸ナトリウムを洗う)
	濃縮	40°C以下で減圧濃縮(最後は, 窒素ガスで乾固する) 残さを 25%トルエン-アセトニトリル 2 ml に溶解
	ENVI-Carb/LC-NH ₂ カラム	スペルコ社製, 6 ml (500 mg/500 mg) 予め, 25%トルエン-アセトニトリル10 ml でコンディショニング 抽出液を負荷する 25%トルエン-アセトニトリル 20 ml で溶出 (20 ml のうちの 2~3 ml で洗い込む)
	濃縮	40°C以下で, 1 ml 以下に減圧濃縮 アセトン 10 ml を加え, 再度 1 ml 以下に濃縮する アセトン 5 ml を加え, 濃縮する 窒素ガスで乾固する アセトン-ヘキサン(1:1)で溶解して, 1 ml とする
	試験溶液 (1 ml/4 g)	
	GC/MS	

資料2-9 I 機関 分析スキーム



資料3 GC/MS 分析条件

GC

機関名	A	B	C	D	E	F	G	H	I
メーカー	Shimadzu	Shimadzu	Agilent	Agilent	Varian	SHIMADZU	Agilent	Agilent	Agilent
機種	GC-2010	GC2010	6890	HP6890	CP-3800	GC-17A	6890N	6890	6890N
使用カラムのメーカー	Restek	J&W	J&W	Agilent	J&W	J&W	Agilent (ガードカラム: RESTEK)	Agilent	Agilent
使用カラムの名称	Rtx-5ms	DB-5ms	DB-5ms	HP-5ms	DB-5msMSD	DB-5ms	HP-5ms (ガードカラム: Guard Column, 0.25mm)	DB-5ms+DG	HP-5ms
カラム内径	0.25mm	0.25mm	0.25mm	0.25mm	0.25mm	0.25mm	0.25mm	0.25mm	0.25mm
カラム長さ	30m	30m	30m	30m	30m	30m	約 30m (ガードカラム: 約2m)	30m	30m
カラム膜厚	0.25 μm	0.25 μm	0.25 μm	0.25 μm	250 μm	0.25 μm	0.25 μm	0.25 μm	0.25 μm
キャリアーガスの種類	He	He	He zero-U	He	He	He	He	He	He
流量制御の方法 (定圧or定流量)	定流量	定流量	定流量	定流量	定流量	定圧	定流量	定流量	定流量
流量または圧力	1.69 ml/min	1.2ml/min	1.0ml/min	1.0ml/min	1.0ml/min	圧力68kPa(2 min)→ 3kPa/min→150kPa(6.7 min)	1.2ml/min	1.5ml/min	1.0ml/min
注入方式	スプリットレス	スプリットレス(1min)	スプリットレス	Pulsed splitless	PTY	スプリットレス	スプリットレス	スプリットレス	スプリットレス
試料注入量	1.0 μL	2.0 μL	2.0 μL	2.0 μL	40 μL	2.0 μL	2.0 μL	2.0 μL	2.0 μL
注入口温度	280°C	250°C	250°C	250°C	53°C(1.5min)→200°C /min→260°C(40min)	290°C	280°C	250°C	250°C
昇温条件 (記入例: 50°C(1min)→25°C/min→125°C(0 min)→10°C/min→300°C(10 min))	50°C(1 min)→25°C /min→125°C(0 min)→10°C/min→300°C(10 min)	60°C(1min)→20°C /min→160°C→2°C /min→240°C→10°C /min→310°C(10min)	昇温条件 50°C(1min)→25°C /min→125°C→10°C /min→300°C(8.5min) ポストランタイム15min (300°C)	50°C(1min)→25°C /min→125°C→8°C /min→230°C→10°C /min→300°C(15min)	53°C(3min)→25°C/min→170°C→2°C/min→220°C→10°C/min→280°C(10min)	50°C(2 min)→20°C /min→120°C(0 min)→7°C/min→290°C(6.2 min)	70°C(2min)→25°C /min→150°C→3°C /min→200°C→8°C /min→280°C(11min)	50°C(1min)→25°C /min→125°C→10°C /min→300°C(10min)	50°C(1min)→25°C /min→125°C→10°C /min→300°C(6.5min)

MS

メーカー	A	B	C	D	E	F	G	H	I
メーカー	Shimadzu	Shimadzu	Agilent	Agilent	Varian	Shimadzu	Agilent	日本電子	Agilent
機種	QP2010	QP2010	5973N Inert	5972A	Saturn 2000	QP-5000	5973Network	JMS-AM SUN 200	5973Inert
イオンソース温度	280°C	300°C	300°C	280°C	280°C	270°C	250°C	250°C	250°C
イオン源温度	200°C	200°C	230°C	169°C	220°C	200°C	230°C	210°C	230°C
測定方式 (scan or SIM)	SCAN	SIM	SIM	SCAN	MSMS	SIM	SIM	SCAN	SIM

資料4 GC/MS測定イオン

Peak No.	和名	A		B		C		D		E		F		G		H		I		
		Ion(m/z)	GC/MS(EI)	Ion(m/z)	GC/MS(EI)	Ion(m/z)	GC/MS(EI)	Ion(m/z)	GC/MS(EI)	Ion(m/z)	GC/MS/MS(EI)	Ion(m/z)	GC/MS(EI)	Ion(m/z)	GC/MS(EI)	Ion(m/z)	GC/MS(EI)	Ion(m/z)	GC/MS(EI)	
1	プロピキスル	110	152	152.2	110.1	110	152	110	152	152	81	63	110	152	152	110	110	152	110	152
2	アトラン	215	200	200.1	215.1	200	215	200	215	215	122	132	200	215	200	215	200	215	200	215
3	テルブホス	231	288	231.0	288.1	231	288	231	288	231	175	203	231	288	231	288	231	288	231	288
4	プロピサミト	173	175	173.0	175.0	173	175	173	175	254	109	145	173	175	173	175	173	175	173	175
5	ダイアジノン	179	304	304.2	276.1	179	304	179	304	304	121	135	173	175	304	199	304	137	137	304
6	イロベンホス	204	91	204	91.1	204	91	204	91	204	141	204	204	91	204	288(91)	204	91	204	91
7	アセトクロール	223	162	223.1	174.1	146	223	162	223	223	146	181	146	146	223	146	146	223	146	223
8	クロルピリホスメチル	286	288	286	288	286	288	286	288	125	208	241	286	125	286	288	286	125	286	125
9	メタキシル	160	279	249.2	234.2	206	249	206	249	279	132	162	206	249	206	249	206	249	206	249
10	プロトリン	241	226	241.2	226.2	241	184	241	184	184	166	184	184	241	241	184	184	241	184	184
11	ピリホスメチル	290	305	305.2	290.2	290	305	290	305	305	151	262	290	305	290	305	290	305	290	305
12	フェトリチオン	277	260	260.1	277.1	277	260	277	260	260	260	277	277	260	277	260	277	260	277	260
13	マラチオン	173	127	173.1	127.1	173	127	173	127	125	99	117	173	125	173	125	173	125	173	125
14	クロルピリホス	314	286	314	316	314	197	314	197	197	258	286	314	197	314	197	314	197	314	197
15	チオベンカルブ	100	257	257.1	100.1	100	257	100	257	257	89	63	100	257	100	257	100	257	100	257
16	フェンチオン	278	169	278.1	169	278	125	278	125	125	135	151	278	169	278	169	278	169	278	169
17	アサライド	243	272	242.9	240.9	243	272	243	272	272	142	177	243	272	243	272	243	272	243	272
18	イソフェンホス	255	213	213	185	255	213	121	213	213	185	213	213	213	255	213	255(121)	213	255	213
19	フェナミホス	303	288	303.2	288.1	303	154	303	154	154	195	180	303	154	303	288	303	217	303	154
20	ナプロハミト	271	128	271.2	128.1	128	271	72	128	128	128	271	271	128	128	271	128	271	128	128
21	フルトニル	323	173	323.2	281.1	173	281	281	281	323	145	173	323	173	323	145	173	323	173	145
22	プロフェホス	339	374	339	337.1	208	337	208	337	339	267	309	339	337	339	337	339	337	339	139
23	プロフェン	172	305	305.2	172.1	172	175	305	175	172	132	117	105	172	172	305	105	172	172	305
24	エチオン	231	384	231	13.1	231	153	231	153	384	175	203	231	153	231	153	231	153	231	153
25	フルアガリリム	352	426	352.2	320.1	145	189	145	189	189	189	161	204	189	320	352	145	189	189	145
26	ピヘロホス	320	140	320.2	140.1	320	140	320	140	140	80	77	320	140	320	140	320	140	320	140
27	フェナリモル	219	251	330.1	251.1	219	330	139	330	330	75	111	219	330	219	330	219	330	219	330
28	シハルトリン	163	181	163.1	165.1	163	165	181	165	165	127	163	181	163	163	165(209)	181	163	163	181
29	フルトリネート	199	451	199.1	157.1	199	451	199	451	157	107	108	199	157	199	157	199	157	199	157
30	フェンハレレート	167	419	419.2	225.1	167	419	125	419	167	119	147	167	125	167	125	225(419)	167	125	419

資料5 LC/MS/MS 条件

HPLC	D	E	F	G	I
HPLC装置	Alliance2695 (Waters)	Agilent 1100	Shimadzu Prominence	NANOSPACE (資生堂)	1100Series(Agilent)
カラム	Cadenza CD-C18 (2.1 x 100mm) (Imtakt)	waters Atlantis d-C18 (2.1x150mm,3um)	Xterra MS C18 (3.5 μm, 2.1 x 150mm) (Waters)	CAPCELL PACK C18 MG II 5 μm 2.0mmID. x 150mm (資生堂)	Ascentis C18, 2.1 x 100mm, 3 μm(SPELCO)
移動層	A: 10mM酢酸アンモニウム+10mM酢酸水溶液 B: メタノール C: 水 グラジエント A%(min)=10 B%(min)=10(0) → 90(15) → 90(25) グラジエント B%(min)=90(0) → 30(3) → 10(12) → 10(32) → 90(32.1) → 90(36)	2mM酢酸アンモニウム+0.1%酢酸 メタノール グラジエント B%(min)=10(0) → 40(1) → 40(3.5) → 50(6) → 55(8) → 95(17.5) → 95(30)	A: 5mM酢酸アンモニウム含有水・メタノール(95:5) B: 5mM酢酸アンモニウム含有水・メタノール(5:95)	A: 10mM 酢酸アンモニウム水溶液 B) メタノール	A) 0.1%酢酸水溶液 B) 0.1%酢酸含有メタノール グラジエント: (B), 20 → 95(12min, linear) → 95% (8min, Hold)
流速 (ml/min)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.200
インジェクション量 (μl)	5	12	10	5.0	5.0
カラムオーブン温度 (°C)	40	40	40	40	40

MS	API3000 (Applied Biosystems)	API3000	API4000 (Applied Biosystems)	Quantum ULTRA(Thermo)	API3000 (Applied Biosystems)
質量分析装置	API3000 (Applied Biosystems)	API3000	API4000 (Applied Biosystems)	Quantum ULTRA(Thermo)	API3000 (Applied Biosystems)
イオン化モード	エレクトロスプレー正イオンモード (ESI+)	Positive	エレクトロスプレー正イオンモード (ESI+), 負イオンモード (ESI-)	エレクトロスプレー正イオンモード (ESI+)	エレクトロスプレー正イオンモード (ESI+)
イオンスプレー電圧 (V)	5500	5500	5500, -4500	3000	4000
イオン源温度 (°C)	550	550	700, 400	350	450

資料6 LC/MS/MS測定イオン

農薬名	D			E			F			G			I										
	MRMモニターイオン Q1	MRMモニターイオン Q3	測定時間 (分)	コリジョン 電圧 eV	測定時間 (分)	MRMモニターイオン Q1	MRMモニターイオン Q3	コリジョン 電圧 eV	測定時間 (分)	MRMモニターイオン Q1	MRMモニターイオン Q3	コリジョン 電圧 eV	測定時間 (分)	MRMモニターイオン Q1	MRMモニターイオン Q3	コリジョン 電圧 eV	測定時間 (分)						
か ぼ ち ゃ	アトラジン	216.18	174.2	15 ~ 24	25	216.2	174.0	25.0	14.9-15.5	216.0	174.0	25.0	0 ~ 30	216.0	174.0	15	0 ~ 35	216.2	174.1	15	8.0 ~ 18.0		
	アトラジン	216.18	96.2	15 ~ 24	35																		
	チオベンカルブ	258.22	125.2	15 ~ 24	25	258.1	125.1	23.0	19.2-19.8	258.1	125.0	25.0	0 ~ 30	258.0	125.0	18	0 ~ 35	258.0	125.1	18	8.0 ~ 18.0		
	チオベンカルブ	258.22	100.3	15 ~ 24	19																		
	プロフェジン	306.32	201.3	15 ~ 24	17	306.2	201.2	17.0	20.6-21.3	306.2	201.2	19.0	0 ~ 30	306.0	201.1	11	0 ~ 35	306.2	201.1	11	8.0 ~ 18.0		
	プロフェジン	306.32	116.2	15 ~ 24	23																		
	メタラキシル	280.28	220.3	15 ~ 24	19	280.1	220.2	19.0	14.5-15.3	280.1	220.0	21.0	0 ~ 30	280.0	192.1	16	0 ~ 35	280.1	220.2	16	8.0 ~ 18.0		
	メタラキシル	280.28	248.2	15 ~ 24	15																		
	エチオン	385.03	199.2	15 ~ 24	13	385.0	198.9	15	16.5-17.5	385.2	199.0	15.0	0 ~ 30	401.9	142.9	33	0 ~ 35	385.0	199.0	33	8.0 ~ 18.0		
	エチオン	385.03	143.1	15 ~ 24	35																		
に ん じ ん	プロピザミド	256.11	190.1	15 ~ 24	19	256.0	190.1	17	16.3-17.1	257.2	190.9	23.0	0 ~ 30	256.0	189.9	13	0 ~ 35	256.1	190.0	13	8.0 ~ 18.0		
	プロピザミド	256.11	173.1	15 ~ 24	29																		
	マラチオン	331.2	127.2	15 ~ 24	19	331.0	127.1	17	16.3-17.1	331.1	127.2	19.0	0 ~ 30	348.0	127.0	15	0 ~ 35	331.0	127.1	15	8.0 ~ 18.0		
	マラチオン	331.2	285.3	15 ~ 24	11																		
	メタラキシル	280.28	220.3	15 ~ 24	19	280.1	220.2	19	14.8-15.6	280.1	220.0	21.0	0 ~ 30	280.0	192.1	16	0 ~ 35	280.1	220.2	16	8.0 ~ 18.0		
	メタラキシル	280.28	248.2	15 ~ 24	15																		
ほ う れ ん そ う	クロルピリホス	349.94	97.1	15 ~ 24	49	352.0	199.8	14.0	21.7-22.3	351.8	199.9	27.0	0 ~ 30	351.8	199.8	19	0 ~ 35	351.9	97.0	19	8.0 ~ 18.0		
	クロルピリホス	349.94	198	15 ~ 24	25																		
	テルブホス	289.15	103.1	15 ~ 24	13	289.1	102.9	5.0	20.7-21.3	289.1	103.1	13.0	0 ~ 30	289.0	103.0	10	0 ~ 35	289.0	103.1	10	8.0 ~ 18.0		
	テルブホス	289.15	57.2	15 ~ 24	31																		
	フルシトリネート	469.36	412.5	15 ~ 24	17	462.0	412.0	11.0	21.7-22.3	450.3	423.0	-12.0	0 ~ 30	469.0	412.1	14	0 ~ 35	452.1	412.2	14	8.0 ~ 18.0		
	フルシトリネート	469.36	199.4	15 ~ 24	33																		
	メタラキシル	280.28	220.3	15 ~ 24	19	280.1	202.2	19.0	14.7-15.4	280.1	220.0	21.0	0 ~ 30	280.0	192.1	16	0 ~ 35	280.1	220.2	16	8.0 ~ 18.0		
	メタラキシル	280.28	248.2	15 ~ 24	15																		

厚生労働科学研究費補助金(食品の安心・安全確保推進研究事業)

「検査機関の信頼性確保に関する研究」

平成 18 年度

分担研究報告書

ベンゾフェノン類による環境・生体汚染モニタリングと分析法の精度評価
及び食品香料のキラル純度評価に関する研究

分担研究者 中澤 裕之

検査機関の信頼性確保に関する研究

分担研究報告書

ベンゾフェノン類による環境・生体汚染モニタリングと分析法の精度評価および
食品香料のキラル純度評価に関する研究

主任研究者	遠藤 明	(財)食品薬品安全センター
分担研究者	中澤 裕之	星薬科大学 薬品分析化学教室
協力研究者	斉藤 貢一	星薬科大学 薬品分析化学教室
協力研究者	伊藤 里恵	星薬科大学 薬品分析化学教室
協力研究者	岩崎 雄介	星薬科大学 薬品分析化学教室

研究要旨

ベンゾフェノン(BP)およびその誘導体の高感度で信頼性の高い分析法を構築し、環境・ヒト生体試料（尿）中の曝露状況調査を行うための高感度分析法について検討した。実試料の測定として多摩川(東京都)から採取した河川水(2 ヲ所)を測定したところ、数種類の BP 類が検出された。また、尿中 BPs の検出下限値は 0.1 ng/mL、定量下限値は 0.5 ng/mL と高感度であった。尿を試料として、添加回収試験(n=6)を行ったところ、全ての測定対象物質に対して、98~102%と良好な結果が得られた。実試料を測定した結果、BP-3 が N.D.~12.0 ng/mL、BP-10 が N.D.~1.5 ng/mL、BP-OH が N.D.~3.7 ng/mL と 3 物質が ng/mL レベルで検出され、恒常的に曝露されている可能性が示唆された。

また、香料の中でも食品香料は、他の香料に比べて生産量は大きく、それに伴って食品香料の品質保証の重要性は高まってきているが、食品香料の合成や精製過程における不純物が香料の劣化や異臭の原因発生となるなど問題点は多い。また、香料における光学異性体による香りへの影響も無視できない。そこで、本研究では厚生労働省が指定する食品香料の中でも、特に光学異性体の指定があるボルネオールについて純度試験およびキラル純度試験を行った。その結果、試薬純度は概ね表示どおりであり、また、表記名に R 体および S 体の指定がある標準品に関しては、概ね表示どおりの結果であった。

A. 研究目的

ベンゾフェノンおよびその誘導体（以下ベンゾフェノン類）は、保香剤および紫外線吸収剤として様々な化粧品や医薬品などに使われている化学物質で、内分泌攪乱作用の疑いがあるといわれている。生態系への汚染が懸念されていることから、水質汚濁防止法の要調査項目(300 物質)に登録されている。

河川水など環境試料への汚染状況調査については、最近になって報告され始めて来たが、生体試料や食品中への汚染状況調査は未だ十分に行われていない。特に化粧品や医薬品などの使用に際して経皮吸収によりヒトへの直接的な曝露も懸念されていることから、特にヒトに対する曝露状況とその汚染源を探求する調査は重要且つ必要で、早急に行う

べきものとする。そこで本研究では、ベンゾフェノン類の高感度で信頼性の高い分析法を構築し、ヒト生体試料(尿)中の曝露状況調査を行うための高感度分析法について検討した。

また、香料の中でも食品香料は国内生産量が6万トンを超え、他の合成香料や天然香料などよりも生産量は大きい。それに伴い食品香料の品質保証の重要性は高まってきている。しかし、食品香料の合成や精製過程における不純物が香料の劣化をもたらしたり、不純物それ自身が異臭を発生させたりするなど問題点は多い。また、香料における光学異性体による香りへの影響も無視できない。光学異性体によって香りが異なったり、香りを感知する濃度の閾値が異なったりするなど問題点がいくつか挙げられる。そこで、本研究では厚生労働省が指定する食品香料の中でも、特に光学異性体の指定があるボルネオールに着目した。

ボルネオールはR体が食品香料の指定であるにも関わらず、S体には防虫作用があり特に忌避剤として用いられている。また、ボルネオールの構造異性体であるイソボルネオールに関してもその生理作用は明らかとなっていない。

本研究では試薬会社の中でもシェアの大きい和光純薬工業株式会社、関東化学株式会社、シグマアルドリッチ株式会社の三社の製品であるボルネオールまたはイソボルネオールに関して純度試験およびキラル純度試験を行った。

B. 研究方法

検討課題(1) ベンゾフェノン類による環境、生体汚染モニタリングと分析法の精度評価

本年度の研究では、これまでに報告してきたビスフェノールAやノニルフェノールなどの微量環境汚染物質の分析法の応用として、スターバー抽出(SBSE)法を用いた河川水や尿などを測定対象とした、簡便かつ高感

度な分析法を構築した。分析対象物質としては、河川水では、ベンゾフェノン(BP)、2-hydroxy-4-methoxybenzophenone(BP-3)および2-hydroxy-4-methoxy-4-methylbenzophenone(BP-10)を選定し(Fig. 1)、また、尿試料では、上記3物質に加えて生体内代謝産物であるBenzhydrol(BP-OH)、2-Hydroxybenzophenone(2OH-BP)を加えた5物質とした。

試料として河川水は多摩川から採取したものをを用いた。バイアル瓶(20 ml)に河川水(10 ml)を採取し、サロゲート物質であるbenzophenone-d10を添加した。次に、ポリジメチルシロキサン(PDMS)がコーティングされたガラス製攪拌子を入れ、セプタムで密封した。1000 rpm、90分間攪拌を行なった後、PDMS攪拌子を取り出し、加熱脱着装置の搭載されたGC/MSで測定した。

尿試料は、測定直前に男性3人、女性3人から集めた。その尿1 mLに酢酸アンモニウム、β-グルクロニダーゼを加え脱抱合処理した後、精製水で全量を2 mLとした。次いで、PDMS攪拌子を加え、攪拌(500 rpm、60 min)した後、そのPDMS攪拌子を加熱脱着装置に導入し、TD-GC/MSにより測定した。

加熱脱着条件

装置：Gerstel社製TDS2加熱脱着装置、CIS4注入口 加熱脱着温度：20℃→60℃/min→250℃[5 min] 注入口温度：-150℃→12℃/s→300℃[10 min]

GC/MS分析条件

装置：Agilent社製6890N GC、Ultra ion source付き5973N MS カラム：J&W社製DB-5MS(0.25 mm×30 m、膜厚0.5 μm) オープン温度：60℃→15℃/min→300℃[4 min] インターフェイス温度：280℃ キャリアーガス：He 1.2 mL/min イオン化法：EI(70 eV) MSモニターイオン：m/z = 182, 105 (BP)、m/z = 192 (BP-d)、m/z = 227, 151 (BP-3)、m/z = 241, 151

(BP-10)、 $m/z = 184, 105$ (BP-OH)、 $m/z = 197, 198$ (2OH-BP)

検討課題(2) 食品香料の純度試験およびキラル純度試験

本研究の純度試験およびキラル純度試験の試験方法は、食品医薬品等リスク分析研究事業「市販農薬標準品の純度比較に関する研究」および厚生労働省告示第四百四十八号「香料のガスクロマトグラフィー」に基づいて行った。

試薬：和光純薬工業株式会社製「ボルネオール(75.4 %；試薬会社間い合わせ)」および「[(1S)-endo]-(-)-ボルネオール (97.0 %）」、関東化学株式会社製「ボルネオール(>70 %）」および「L(-)-ボルネオール(97 %；ACROS ORGANICS)」、シグマアルドリッチ株式会社製「[(1S)-endo]-(-)-ボルネオール (97 %）」および「(+)-ボルネオール (98 %）」および「イソボルネオール (95 %)」。(計 7 種)

純度試験：GC のキャリアガスには He を使用し、流量を 1.0 mL/min とした。分析カラムには DB-5ms (0.25 mm×30 m, 0.25 μ L) を用いて、注入量を 1 μ L としてスプリットレスモードで測定を行った。カラムオープンの昇温プログラムは以下のとおりである(40°C(1 min)→10°C/min→300°C (30 min))。

キラル純度試験：キャリアガスには He を使用し、流量を 1.0 mL/min とした。カラムには Astec 社製 Chiraldex B-DM (0.25 mm×30 m, 0.25 μ L) を用いた。注入量を 1 μ L としてスプリットレスモードで測定を行った。カラムオープンの昇温プログラムは以下のとおりである(40°C(1 min)→20°C/min→110°C(20min)→20°C/min→200°C(5 min))。

また、両試験法の測定装置については Agilent 社製 HP 6890 シリーズ ガスクロマトグラフィー - 水素炎イオン化検出器

(GC-FID)を用いた。

評価方法：各標準品を 100mg 正確に量とり、アセトン 100mL に溶解させ、これを被験溶液とした。各被験溶液について得られた GC のクロマトグラム上の被験物質および不純物ピークの総面積に対する被験物質面積比を求め、計 5 回の平均値を被験物質の含量(%)とした。

C. D. 研究結果および考察

検討課題(1) ベンゾフェノン類による環境、生体汚染モニタリングと分析法の精度評価

実試料の測定として、多摩川(東京都)から採取した河川水(2 ヶ所)を測定した(Table 1)。BP-10 は、両検体とも検出限界以下であったが、BP は、21.0 および 22.8 pg/ml であり、BP-3 は、8.9 および 12.9 pg/ml 検出された。本法は、極めて簡便かつ高感度であり、当該化学物質のモニタリングに有用であると示唆された。

尿中 BPs の検出下限値は 0.1 ng/mL、定量下限値は 0.5 ng/mL と高感度であった。検量線を作成した結果、相関係数が 0.993 以上の良好な直線性が得られた。尿を試料として、添加回収試験(n=6)を行ったところ、全ての測定対象物質に対して、98~102%と良好な結果が得られた。実試料を測定した結果、BP-3 が N.D.~12.0 ng/mL、BP-10 が N.D.~1.5 ng/mL、BP-OH が N.D.~3.7 ng/mL と 3 物質が ng/mL レベルで検出され、恒常的に曝露されている可能性が示唆された。(Table 2)

以上述べたように、ベンゾフェノン類のヒトへの残留調査を行うことにより、ヒトへの曝露状況レベルを把握することができる。現在は未だリスク評価が十分行われていないが、その理由の一つに測定方法の整備および精度管理システムが未だ不十分なことがその一因として挙げられる。特に血液や尿など生体試料中のベンゾフェノン類については、その残留量が極めて微量なことが予想され

るため、従来の測定方法では得られたデータの精度が問題視されることもあった。本研究において高感度且つ高精度な分析法を確立されれば、環境、食品、医薬品など様々な経路を通じた汚染を把握するために有効に活用されることが期待される。

検討課題(2) 食品香料の純度試験およびキラル純度試験

純度試験：和光純薬工業株式会社製「ボルネオール」 = 75.1 %、「[(1S)-endo]-(-)-ボルネオール」 = 97.8 %、関東化学株式会社製「ボルネオール」 = 75.1 %、「L(-)-ボルネオール」 = 98.1 %、シグマアルドリッチ株式会社製「[(1S)-endo]-(-)-ボルネオール」 = 98.2 %、「(+)-ボルネオール」 = 98.2 %、「イソボルネオール」 = 96.4 %であり、概ね表示どおりとなった(Table 3)。和光純薬工業株式会社製「ボルネオール」および関東化学株式会社製「ボルネオール」について、不純物の主な成分はイソボルネオールであると確認できた。これはボルネオールの合成過程で、カンファーを還元する際に生じてしまう物質である。

キラル純度試験：ボルネオールに関するキラル純度試験の結果は以下の通りである。和光純薬工業株式会社製「ボルネオール」 R 体 = 54.7 % S 体 = 45.3 %、「[(1S)-endo]-(-)-ボルネオール」 R 体 = 0.7 % S 体 = 99.3 %、関東化学株式会社製「ボルネオール」 R 体 = 52.8 % S 体 = 47.2 %、「L(-)-ボルネオール」 R 体 = 0.5 % S 体 = 99.5 %、シグマアルドリッチ株式会社製「[(1S)-endo]-(-)-ボルネオール」 R 体 = 0.9 % S 体 = 99.1 %、「(+)-ボルネオール」 R 体 = 99.8 % S 体 = 0.2 % (Fig. 2)。イソボルネオールに関するキラル純度試験の結果は以下の通りである。和光純薬工業株式会社製「ボルネオール」 = 47.0 % = 53.0 %、関東化学株式会社製「ボルネオール」 = 49.5 % = 55.5 %「イソボルネオール」 =

40.8 % = 59.2 % (Table 4)。和光純薬工業株式会社製「ボルネオール」および関東化学株式会社製「ボルネオール」についてはボルネオールおよびイソボルネオールそれぞれのラセミ体で存在していることが分かった。シグマアルドリッチ株式会社製「イソボルネオール」に関してはイソボルネオールがラセミ体で存在していることが確認できた。また表記名に R 体および S 体の指定がある標準品に関しては、概ね表示どおりの結果となった。

本研究では純度試験およびキラル純度試験において5回の測定を行っており、全ての試験において相対標準偏差(R.S.D.)を求めたところ1%以下となった。本研究の試験結果は精度が高く、信頼の高いものと判断できる。また、ボルネオール以外にも厚生労働省が光学異性体を指定する食品香料があり、これらについても純度試験およびキラル純度試験を行う必要があると推察される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kawaguchi, M., Ito, R., Endo, N., Sakui, N., Okanouchi, N., Saito, K., Sato, N., Nakazawa, H.; Stir bar sorptive extraction and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry for trace analysis of benzophenone and its derivatives in water sample, 2006 *Analytica Chimica Acta* 557 (1-2), 272-277

2. 学会発表

1) 本田英博、川口 研、岩崎雄介、伊藤里恵、斉藤貢一、中澤裕之、液相マイクロ抽出法を用いたGC/MSによる河川水中ベンゾフェノン類の測定、日本分析化学会 第55年会、2006年9月、(大阪)。

2) 本田英博、川口 研、遠藤直幸、岩崎雄介、伊藤里恵、斉藤貢一、中澤裕之、LC-MS/MS によるベンゾフェノン類の一斉分析法の検討、第 50 回日本薬学会関東支部大会、2006 年 10 月、(新潟)。

H. 知的所有権の取得状況

- | | |
|-----------|----|
| 1. 特許取得 | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 2. その他 | なし |

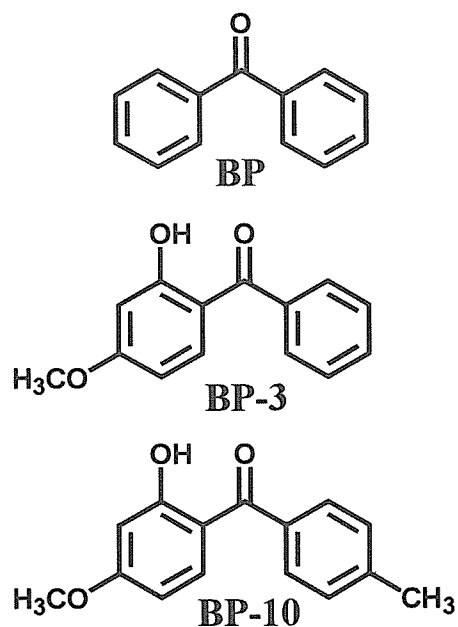


Fig. 1 Chemical structures of BPs

Table 1 Concentrations of BPs in river water samples

Compound	River water (pg ml ⁻¹)	
	A	B
BP	22.8	21.0
BP-3	12.9	8.9
BP-10	N.D.	N.D.

Table 2 Concentrations of BPs in human urine samples

ヒト尿中ベンゾフェノン類測定結果

	A	B	C	D	E	F
BP	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
BP-3	1.2	0.5	trace	trace	N.D.	N.D.
BP-10	N.D.	trace	N.D.	N.D.	1.5	trace
2OH-BP	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
BP-OH	3.7	0.5	0.4	trace	0.4	trace

N.D. : not detection

trace: below LOQ

濃度(ng/mL)

Table.3 各標準品の純度試験結果

	表記名	測定結果 (%)	表示 (%)	R.S.D. (%)
和光純薬	ボルネオール	75.1	(75.4)	0.2
	L-ボルネオール	97.8	97.0	0.1
Sigma-Aldrich	D-ボルネオール	98.2	98	0.1
	L-ボルネオール	98.2	97	0.1
	イソボルネオール	96.4	95	0.2
関東化学	ボルネオール	75.1	>70.0	0.4
	L-ボルネオール	98.1	97	0.3

n = 5

R.S.D. : Relative Standard Deviation

Table.4 各標準品のキラル純度試験結果

	表記名	ボルネオール		イソボルネオール	
		D体 (%)	L体 (%)	A(%)	B(%)
和光純薬	ボルネオール	54.7	45.3	47.0	53.0
	L-ボルネオール	0.7	99.3		
Sigma-Aldrich	D-ボルネオール	99.8	0.2		
	L-ボルネオール	0.9	99.1		
	イソボルネオール			40.8	59.2
関東化学	ボルネオール	52.8	47.2	44.5	55.5
	L-ボルネオール	0.5	99.5		

n = 5

n = 5

厚生労働科学研究費補助金(食品の安心・安全確保推進研究事業)

「検査機関の信頼性確保に関する研究」

平成 18 年度

分担研究報告書

市販農薬標準品の純度比較に関する研究

(その 1) 市販農薬標準品の純度比較に関する研究(1)

(その 2) 市販農薬標準品の純度比較に関する研究(2)

分担研究者 松木 容彦

検査機関の信頼性確保に関する研究

分担研究報告書

市販農薬標準品の純度比較に関する研究（1）

主任研究者	遠藤 明	（財）食品薬品安全センター
分担研究者	松木 容彦	（社）日本食品衛生協会食品衛生研究所
協力研究者	藤巻 照久	神奈川県衛生研究所
協力研究者	高橋 淳子	（財）食品薬品安全センター
協力研究者	藤代 良彦	（財）千葉県薬剤師会検査センター
協力研究者	小林 文亮	（社）日本食品衛生協会食品衛生研究所
協力研究者	伊藤 禎啓	（社）日本食品衛生協会食品衛生研究所
協力研究者	小林 保美	（社）日本食品衛生協会食品衛生研究所

研究要旨

ポジティブリスト制導入に伴い、特に輸入食品を中心として違反食品の検出のための農薬分析の一斉分析法並びに個別分析法等の検討が今も進められている。

わが国では、農薬分析法のために用いられる農薬標準物質の提供は、主に 3 社の試薬メーカーが中心になり提供している。提供する標準品には、平成 9 年の通知、「残留農薬分析用標準品の情報提供に関する指針について」によって、供給メーカーが扱う標準品の品質情報に関わる資料を使用者に提供することが義務付けられ、現在、市販されている標準品には、その標準品の純度が添付されている。また、我が国では、一般的に、公的試験に標準品を用いるとき、定められた純度以上のものを用いるという規格が設けられている。しかし、わが国での「純度」の表示や純度算出法に関する指針等は未だ示されていない。したがって、純度算出する方法はメーカーごとに異なることが多い。また、使用者が、メーカーが提示している表示純度が異なるため、検査を実施する際、異なるメーカーの純度の標準品を用いた時に検査結果が異なることになり、検査結果の信頼性が担保できない事態が生じたり、一方では、メーカーが用いた純度確認条件と異なる条件で検査した場合には、メーカーの提示資料には認められていない新たな不純物が検出され、表示純度が測定条件の違いにより異なってくる可能性が認められ、使用者に、表示純度の信頼性への不信感を抱かせるような問題も生じている。

本研究では、代表的メーカー、3 社の農薬標準品について、GC および HPLC を用い、純度測定を行い、各メーカーの表示純度との比較ならびに測定機器種の違いや測定条件の違いによる問題等について調べた。

A 研究目的

平成9年から平成11年度の3年間に亘り、3社のメーカー（林純薬工業、関東化学、和光純薬工業）が市販している農薬標準品29種について品質評価試験を実施した。その結果、各メーカーが添付資料に提示している表示純度に対する含量比がHPLC及びGC法ともに2%以上かけ離れた値を示した標準品は、全29種のうち数種確認された。また、GC法により良好な結果を与えた標準品の中にも測定波長を変化させた時、標準品の含量比が著しく低下した標準品も数種確認され、通常の検査条件では確認できない、標準品と吸収スペクトルが異なる不純物質の存在が認められた。

標準品の精度管理では、使用期限の設定など、標準品の劣化については基準化されているものの、純度については提供者側の認識に委ねられ、使用者側では余り注目されていない感がある。一方、各メーカーで選択する純度測定法は必ずしも同一ではなく、各社で使用機器、算出法、表示の仕方などが異なっている。そこで、本研究においては、できるだけ統一した分析条件下でHPLCとGCの両測定法により純度測定を行い、各メーカーの表示している純度との比較を試み、メーカー設定条件下での純度の信頼性について調べた。

B 研究方法

1 被験物質

本年度は、メトラクロール、メタミドホス、フルシトリネート、フェンバレレート、フェノブカルブ、トルクロホスメチル、ピラクロホス、メフェナセット、フルバリネート、ピリミジフェン、フェナリモル、テニクロール、デルタメトリン、ジフェノコナゾール、クロロプロファミ、イミベンコナゾール、アセタミ

プリド、エトプロホス、クロルフェンビンホス、ピリフェノックスの20物質に対して研究を実施した。

2 使用機器及び測定条件

(1) 使用機器

検出器の特性を考慮し、HPLC-紫外分光高度型検出器(UV)及び、GC-水素炎イオン化検出器(FID)を純度測定に用いることとした。また、HPLCに多波長検出器(PDA)を接続し、測定波長以外の波長で検出される不純物質の確認を行った。

(2) 測定条件

GC-FID

注入モード：スプリットレス

注入口温度：300℃

カラム：キャピラリカラム内径0.32mm、長さ30m、膜厚1.5μm

カラムオープン温度：180℃(1分)
→10℃/分→300℃(17分)

キャリアガス：ヘリウム

流量：1.0mL/分

注入量：1μL

なお、昇温プログラム中に被験物質が溶出しない場合は、必要に応じてキャリアガス流量を上げて対応した。また、溶出時間が早すぎる被験物質については、初期温度を下げて溶出時間の調節を行った。

HPLC-UV

カラム：Wako Pak Navi C-18 内径4.6mm、長さ250mm

カラム温度：40℃

移動相：10%アセトニトリル→90%アセトニトリルにリニアで20分かけてグラジエント後10分溶出。

流速：1.0mL/分

測定波長：各被験物質の極大波長及び200nm

注入量：20μL

多波長検出器：200-600nm

なお、このプログラム中に被験物質が溶出しないうちの場合、90%アセトニトリルで溶出するまで流しその溶出時間から10分モニタリングする。溶出時間が早すぎる場合には、グラジエント条件を変更し、溶出時間を調節する。また、測定極大波長は任意とし、必ずしもメーカーの測定波長とは一致しない。

3 標準溶液の調製

(1) 標準品の秤取

0.1 mg以下まで測定できる精密天秤を使用し、マイクロ秤量ロート(ホウ珪酸ガラス製)に約100 mgを精密に量りとる。但し、粘性が高い等の理由で、必要量が取れない場合においては、10 mgを下回らない範囲で、秤取量を減らした。

(2) 標準溶液(被験溶液)の調製

採取した標準品を各溶媒で100 mL容褐色メスフラスコに移し入れ、100 mLに定容し、1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 溶液を調製し、被験溶液とする。((1) で秤取量を減らしている場合には、それに応じて、定容量を変え、1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 溶液を調製する。)

通常、用いる溶解液は、GC測定用標準溶液では、アセトン、HPLC測定用標準溶液では、アセトニトリルとする。ただし、溶解できない場合には、その他の溶媒を用いて溶解性について検討する。

(3) 低濃度溶液の調製

3社のうち任意に選択した1社の被験溶液1 mLをホールピペットで100 mL容褐色メスフラスコに取り、各溶媒で定容する。さらに、そこから1 mLをホールピペットで100 mL容褐色メスフラスコに取り、各溶媒で定容し、被験溶液の1万分の1の低濃度溶液(0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)を調製した。原則として、低濃度溶液はSN10程度を満たすこと

とし、それより小さい場合には、0.5、1、2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と順次濃度を上げていき、SN10程度を満たす濃度の溶液を低濃度溶液と定める。

4 試験操作

(1) 測定濃度の決定

1) 直線性の確認

3社のうち任意に選択した1社の被験溶液を適宜希釈し、10~1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の溶液を調製して検量線を作成し、直線性を確認した。

2) 直線性が取れない場合の標準溶液の再調製

10~1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で直線性が取れない場合には、直線性の取れる範囲を確認し、直線性の取れる最も高い濃度の溶液を被験溶液とした。その場合、低濃度溶液は原則として被験溶液の1万分の1とし、SN10程度を満たすことが出来ないものについては、順次濃度を上げてSN10程度になる濃度を低濃度溶液とした。

(2) 測定方法

1) GCによる測定

低濃度溶液、3社の被験溶液の順で、それぞれ5回、GC-FIDによる測定を行った。被験溶液によるキャリーオーバーを事前に確認したがクロマトグラム上では見られなかったため、3社の被験物質の間以外は、溶媒のみによるブランクランは行わなかった。

2) HPLCによる測定

低濃度溶液、3社の被験溶液の順で、それぞれ5回、HPLC-UV-PDAによる測定を行った。被験溶液によるキャリーオーバーを事前に確認したがクロマトグラム上では見られなかったため、3社の被験物質の間以外は、溶媒のみによるブランクランは行わなかった。

(3) 試験結果の処理

1) SN比の算出法

被験物質ピークの前後30秒に現れるノイズの最大値(E1)と最小値(E2)との幅の2/5をノイズ幅(N)とする。一方、ノイズの中央値(C)をベースラインとし、ベースラインのノイズを元にピークトップ(D)を決めて、この幅をピーク高さ(S)とする。

2) 不純物質ピークの採否

各被験物質の低濃度溶液を5回繰り返し測定して得られたピーク面積の平均値を基準とし、それ以上の面積を有するピークを不純物として採用した。

3) 含量の計算

各被験溶液(1000 μ g/mL溶液)又は直線性を示すまで希釈した溶液について得られた、HPLC及びGCのクロマトグラム上の被験物質及び不純物質ピークの総面積に対する被験物質面積比を求め、5回の平均値を被験物質の含量(%)とした(表1)。

4) 含量比較

各標準品のHPLC及びGCによる測定より求められた純度と、各メーカーの純度表示値又は添付情報より得た標準品の純度表示値とを比較し、それらの表示値に対する含量比(%)を求めた(表2)。

C、D 結果及び考察

HPLC及びGC測定により得られた純度と各メーカーの純度表示値、厚生労働省の通知試験法中に示される純度の規格値を表1に、また、今回の純度の測定結果と各メーカーの純度表示値との比率を含量比として表2に示した。

今回メーカーにより提供されている標準品の純度表示値が通知試験法中に示す純度を満たしているか検証したところ、57被験物質(そのうち1被験物質は純度表示の記載なし)中47物質については、規格値を満たしていた。また、今回、

実施したHPLC及びGCの測定結果と通知法の規格値とを比較した場合には、HPLCでは57物質中48物質、GCでは56物質中45物質については通知法に示された純度規格を満たしていた。

今回の結果を、平成9~11年に実施した結果と比較すると、メーカーが提示している表示純度が通知試験法中に示されている純度規格値を満たしている割合は、ほとんど変わっていなかったが、HPLC及びGCにより得られた純度の結果に基づき平成9~11年の結果と比較すると、今回実施した結果の方が規格を満たしている割合は高く、純度規格適合の標準品が従来より増えていることが確認された。

次に、今回の純度測定結果から求めた含量比(HPLCまたはGCによる純度の測定結果/各メーカーの純度表示値)については、今回、純度を測定した結果のうち、約8割の純度測定結果が各メーカーの純度表示値と同等の純度(含量比 \pm 2%以内)を示した。

本研究での純度試験法においては、各メーカーの標準物質について、できるだけ同一の測定法で実施し、また、できるだけ多くの不純物が検出できるような条件を選択した。そのため、GCによる純度測定の際に、通常、メーカーが選択しているスプリット注入法に換え、スプリットレス注入法を採用した。その結果、今回、純度測定の対象に選んだ標準品には、特別、熱分解しやすいものは無いと思われるものの、スプリットレス注入法においてはスプリット法に比し試料の移動速度が遅く、さらに本研究では高濃度溶液を注入するため、注入された試料の全てがカラムに移行するまでに時間を要するため、一部の標準品については滞留時間が延びたことで熱分解が生じ、結果として、本来の純度より幾分低い純度を示し

ているものもある可能性が推測される。したがって、こうした分解要因を考慮に入れると、実際は、大部分の標準品は、メーカーの表示する純度とほぼ同等の純度の測定結果が得られていると推察される。なお、熱分解の有無についての詳細な検討は行っておらず、今後、注入法や温度条件等を変えるなどの追加試験を行い、さらに調査を加える予定である。

一方、HPLC分析においては、純度測定の際に選択した波長の違いにより、メーカーの表示純度とは異なる結果が得られた標準品も認められた。

その中で、フェノブカルブについて見ると、A社とB社では、ともにHPLC-UVを用いて純度表示をしているが、両社では、それぞれ異なる波長を用いて測定した結果を表示値としている。今回、我々の研究では、A社が選択した波長、260nmに近い262nmで純度測定した結果、A社の表示している純度は、今回実施した純度測定結果と同等であったのに対して、B社の表示している純度(波長:206nm)は、今回実施し、得られた純度結果に比し4%程度低かった。このように、標準品によっては、測定波長を変えたとき、目的物質と不純物質の強度比の変化が認められ、純度表示に際しては、事前の検討において、波長を変えて不純物質の有無について十分に調べることが重要であることが示された。なお、このクロマトグラム上検出された不純物の構造や吸光係数は不明ではあるため、上述の純度低下(4%)が必ずしも質量の低下として考えることは妥当ではないが、その標準品の構造特性に基づき、検査の際に一般的に用いられる波長での不純物に係わるデータの使用者への提示は必須と思われる。また、HPLCにより純度測定を行う場合には、検査に汎用される波長以外の波長でも不純物の確認を

行うなどの確認手順を新たに組入れる必要のあることが示された。

E 結論

今回、市販農薬標準品の純度試験を試みた結果、今回の測定結果と表示純度について比較したとき、一部の標準品については含量比の低下が見られたものの、概ね標準品の純度はメーカーが表示した値に近似した測定結果が得られた。また、平成9年の調査時に比べ、通知試験法に示された規格を満たしている標準品の割合が増えたことから、標準品の品質も向上していることが確認された。

検査機関において、検査結果の信頼性確保の観点から、標準品の管理について言及する時、多くの場合、標準品の純度よりも保存時の劣化の有無について注目される。しかし、定量分析において用いられる標準品は、測定の絶対的な尺度であるため、その純度は劣化の有無と同様に重要である。また、検査員は、通常、メーカーが表示している純度を信用して検査に用い、結果を算出していることから、メーカーは、標準品の純度を極力、正確に表示する必要がある。

今回の調査結果では、標準品の表示値の正確性や純度規格への適合性が概ね良好であることが示されたが、一方では、一部の標準品のHPLC測定において、測定条件の違いなどによってメーカーの表示純度と異なる結果が得られた標準品も数種見られた。化学物質の正確な純度を測定することは、一般的に困難であり、また、純度を測定するための統一された手法も示されていない現状では、メーカーとしては、できるだけ精製度の高い標準品を提供することが最善の方法であり、標準品としての純度表示を保証する最も確実な方法ではないだろうか。

しかし、標準品に含まれる複雑な組成