

資料3-1 LC-MS/MS 条件

機関名	A	B	C	D	E	F	G	H	I
メーカー	Agilent	Waters	Shimadzu	Waters	Waters	Shimadzu	Shimadzu	Shiseido	Waters
機種	HP1100シリーズ	Acquity UPLC	Prominence UPLC	Alliance2695	Acquity UPLC	Prominence	Prominence	Nanospace	Acquity UPLC
使用カラム販売元	Waters	Waters	Shiseido	Intakt	Waters	Waters	Waters	Shiseido	Waters
カラム名称	Atlantis C18	Xterra MS C18	Capcell Pak C18 AQ	Cadenza CD-C18	ACQUITY UPLC BEH C18	Xbridge ODS	Xterra MS C18	Capcell Pak C18 AQ	ACQUITY UPLC BEH C18
カラム粒子径	3µm	3.5µm	3µm	3µm	1.7µm	3.5µm	3µm	5µm	1.7µm
カラム内径	2.1mm	2.1mm	2mm	2mm	2.1mm	2.1mm	2.1mm	2mm	2.1mm
カラム長さ	100mm	150mm	150mm	100mm	100mm	150mm	150mm	150mm	100mm
移動相	A: 0.05%ギ酸含有 10mM酢酸アンモニウム 溶液 B: アセトニトリル	A: 5mM 酢酸アンモニウム水溶液 B: 5mM 酢酸アンモニウムメタノール 溶液	A: 10mM 酢酸アンモニウム水溶液 B: アセトニトリル	A: 1mM ギ酸アンモニウム水溶液 B: メタノール	A: 10mM ギ酸アンモニウム水溶液、 0.1%ギ酸 B: アセトニトリル	A: 5mM 酢酸アンモニウム水溶液 B: 5mM 酢酸アンモニウムメタノール 溶液	A: 5mM 酢酸アンモニウム含有水・ メタノール(95:5) A: 5mM 酢酸アンモニウム含有水・ メタノール(5:95) 濃度勾配 8%(分)	A: 10mM 酢酸アンモニウム水溶液 B: メタノール	A: 1mM ギ酸アンモニウム水溶液 B: メタノール
流速	0.2ml/min	0.2ml/min	0.2ml/min	0.2ml/min	0.2ml/min	0.2ml/min	0.2ml/min	0.2ml/min	0.2ml/min
インジェクション量	5µl	5µl	3µl	2µl	5µl	5µl	5µl	5µl	5µl
カラムオーブン温度	40°C	40°C	40°C	40°C	40°C	40°C	40°C	40°C	40°C
濃度勾配 8%(分)	10(0-2)→ 90(4-11)→ 10(11.01-18)	5(0)→ 90(15)→90(25)	10(0)→ 95(25-32)→ 10(32.01-45)	10(0-5)→ 95(15-22)→ 10(23-28)	濃度勾配 8%(分) 5(0-2)→85(10) →95(10.1-13) →5(13.01-17)	濃度勾配 8%(分) 15(0-6)→40(8.5)→60(11) →55(13)→95(22.5-45) →15(45.1-55.1)	濃度勾配 8%(分) 10(0)→50(15)→ 80(20)→ 95(22-30)	濃度勾配 8%(分) 5(0)→95(15-20) →5(20.1) →5(30)	濃度勾配 8%(分) 15(0) →95(10-15)

MS

機関名	A	B	C	D	E	F	G	H	I
メーカー	Applied Biosystems	Waters	Applied Biosystems	Applied Biosystems	Waters	Applied Biosystems	Applied Biosystems	Thermo	Waters
機種	API 4000	Quattro Premier XE	API 4000	API 3000	Quattro Premier XE	4000 Q TRAP	API 4000	Quantum ULTRA	Quattro Premier XE
イオン化モード	Positive	Positive	Turbo Spray(+)	Positive	Positive	Positive	Positive	Positive	Positive
イオンスプレイ電圧	5500V	1 000V	5500V	4000V	1000V	5500V	5000V	3000V	3000V
イオン源温度	600°C	120°C	600°C	500°C	120°C	450°C	400°C	300°C	120°C

資料3-2 LC-MS/MS測定イオン

農薬名	A (m/z)			B (m/z)			C (m/z)			D (m/z)			E (m/z)			F (m/z)			G (m/z)			H (m/z)			I (m/z)		
	Q1	Q3	Q1	Q1	Q3	Q1	Q1	Q3	Q1	Q3	Q1	Q3	Q1	Q3	Q1	Q3	Q1	Q3	Q1	Q3	Q1	Q3	Q1	Q3	Q1	Q3	
メタミドホス	142	94.1	141.82	93.45	142	112	142.1	94.1	141.74	93.77	142	124.9	142	124.9	142	124.9	142	124.9	142	94.2	141.97	94	141.7	93.6	141.7	93.6	
アセフエート	184.2	143	183.91	142.76	184	143	184.2	143.2	183.79	142.7	184	142.9	184	142.9	184	142.9	184	142.9	184	143.1	184	143	183.7	142.7	183.7	142.7	
ジメトエート	229.9	198.8	230.05	124.58	230	198.8	230.2	199.1	229.87	198.74	230	198.9	230	198.9	230	198.9	230	198.9	230	199.1	229.9	125	229.6	198.7	229.6	198.7	
トルクロホスメチル	301	125	301.02	174.69	301.1	125	301.2	269	300.87	124.67	301.1	269.1	301.1	269.1	301.1	269.1	301.1	269.1	301.1	125.1	300.9	268.9	300.7	124.6	300.7	124.6	
馬拉チオン	330.9	99	331.15	98.57	330.9	126.8	331.2	127.3	330.93	284.82	331.1	285	331.1	285	331.1	285	330.95	99	330.95	99	285	330.95	99	330.8	284.8	330.8	284.8
イソフエンホス	346.1	244.8	346.23	244.92	346.1	244.9	346.2	287.3	345.99	244.95	346.2	216.9	346.2	216.9	346.2	216.9	346.2	216.9	346.2	245	346	244.9	345.9	244.8	345.9	244.8	
エトプロホス	243.1	130.5	243.13	130.61	243.1	130.9	243.2	173.2	242.9	96.58	243	96.9	243	96.9	243	96.9	243	96.9	243	131	243	130.9	242.7	130.6	242.7	130.6	
エトリムホス	293.1	264.5	293.12	124.6	293.1	265	293.2	125.2	92.94	124.74	293.1	265.1	293	265	292.9	265	292.9	265	292.9	170.2	330.85	169.9	330.7	204.6	330.7	204.6	
ジメチルピホス	330.9	169.6	333.06	126.65	330.9	127	333.1	127.2	330.89	204.75	331	126.9	331.2	126.9	331.2	126.9	331.2	126.9	331.2	170.2	330.85	169.9	330.7	204.6	330.7	204.6	
エチフェンホス	310.9	283	311.15	282.92	311.1	282.9	311.3	283.2	310.9	108.77	311.1	111	311.4	109	310.95	283	310.8	108.6	310.8	108.6	109	310.95	283	310.8	108.6	310.8	108.6
ピラクロホス	360.9	137.8	361.15	256.9	361	256.8	361.2	257.1	360.9	137.81	361	257	361.2	138	360.9	256.9	360.8	137.6	360.8	137.6	138	360.9	256.9	360.8	137.6	360.8	137.6
フェノプロカルブ	208.2	95	208.15	94.59	208.2	95.2	208.3	152.3	207.96	151.87	208.1	152	208.2	95.2	225.2	95.1	207.8	151.6	207.8	95.2	225.2	95.1	207.8	151.6	207.8	151.6	
ベンダイオカルブ	224	167	224.1	108.88	224	109.1	224.2	167.3	223.93	108.79	224.1	167.1	224.1	167.1	224.1	167.1	223.8	108.6	223.8	167.1	224	109	223.8	108.6	223.8	108.6	
ピリミカープ	239.1	72.2	239.17	71.62	239.1	72.3	239.3	72.1	239.01	71.62	239.1	182.2	239.1	182.2	239.1	182.2	239.1	182.1	238.8	72.2	239.1	182.1	238.8	71.7	238.8	71.7	
カルバリル	202.3	145	202.04	144.88	202	144.9	202.3	145.3	201.88	144.89	202.1	145	202.2	145.2	202.2	145.2	201.8	144.7	201.8	145.2	202	145	201.8	144.7	201.8	144.7	

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 20 年度 分担研究報告書

食品中に含まれるマイコトキシン検査法の検討と
精度管理体制の構築に関する研究

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

食品中に含まれるマイコトキシン検査法の検討と精度管理体制の構築に関する研究

主任研究者	小島 幸一	(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

食品中に含まれる残留有害物質のうち低い安全性基準値の検査方法の検討と精度管理体制の構築に関する研究を行うため、食品中の有害化学物質であるカビ毒（マイコトキシン）を調査・研究対象として取り挙げた。本年度は、マイコトキシンの中でも未だ分析法が確立されていないことから調査報告例も少ないシクロピアゾン酸(CPA)に着目し、まずは汎用性の高い LC-UV を用いた分析法を構築し、更に、食品からの検出を想定して、定性能力の高い LC/TOF-MS を用いた同定のための分析法の構築を行った。

A. 研究目的

食品中への汚染が危惧される化学物質の中には、かなり以前に基準値が制定されたものがあるが、当時の分析方法の検出感度に比べて、最近では分析機器の進歩などにより、遙かに高感度に微量分析が行えるようになったものもある。そのため、実際の検査機関の現場では検出されるものの、基準値が制定された当時の（公定法に基づく感度の悪い）測定法に照らし合わせると、“検出下限値以下”と判定されるものが少なくない。その代表的な微量汚染化学物質として、アフラトキシンやパツリンなどカビ毒（マイコトキシン）が挙げられる。

シクロピアゾン酸(CPA)は、*Aspergillus* 属や *Penicillium* 属の菌が

産生するマイコトキシンの一種であり、肉、ピーナッツ、卵または飼料中などから検出されている。CPAはラット骨格筋の筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase を特異的に阻害し、これに共役する Ca^{2+} の能動輸送を抑制するといった生理活性を有している。また、中毒事例としては、これまでに七面鳥、ウズラ、犬など家畜や動物が数例報告されているが、ヒトにおいても中毒の疑いがある事例も報告されている。主な中毒症状としては、動物実験において体重減少、下痢および痙攣などの急性毒性を発現することや、ラット肝臓 GOT, GPT, γ -GTP 活性の増加をもたらすことが知られている。

更に、食品への汚染に関しては、毒性が高いアフラトキシンとの同時汚染が起

こることも報告されている。加えて近年、CPA がムレ肉発生原因の一つであるという報告もある。また、伝統的な醸造食品や白チーズの製造に使用されてきた菌に CPA 産生能があることや、CPA が鶏肉・鶏卵やヒツジ乳汁に移行・蓄積することも報告されている。そのため、CPA 摂取による健康被害が懸念される。

従来、アフラトキシンを始めとして、マイコトキシンの分析法は数多く報告されているが、CPA の分析報告は未だ少なく、また規制もされていない。そこで本研究では、今後の実態調査などに必要とされる、汎用性の高い LC-UV および定性能力の高い LC/TOF-MS を用いた同定のための CPA の分析法構築を試みた。

B. 研究方法

(1) LC-UV による測定法の検討

LC 装置には、HITACHI L-6300 ポンプおよび JASCO MD-910 多波長検出器を用いた。分析用カラムには、DIONEX 社製 Acclaim Mixed-Mode WAX-1 (4.6 mm i. d. x 150 mm) を、移動相にはアセトニトリル:25mM リン酸緩衝液 (pH6.0) = (7:3) を用いた。カラム温度は 40°C、移動相流速は 1 mL/min とし、試料注入量は 10 μ L とした (Fig. 1)。

(2) LC/TOF-MS による測定法の検討

LC には Waters 社製 alliance HT 2795 シリーズを、TOF-MS には Waters 社製 LCT Premier XE を用いた。LC カラムには、東京化成工業社製 TCI Dual ODS-AX 10 (2.0mm I. D. x 150 mm) を用い、カラム温度を 40°C とした。移動相には、アセトニトリル-ギ酸アンモニウム緩衝液 (pH6.0) = (7:3) を用い、流速を 0.2 mL/min とした。TOF-MS におけるイオン化にはエレクトロスプレーイオン化法のネガティブイオンモードを採用した。精密質量の補正には、lock mass 方式を採用

し、質量校正用標準物質としてロイシンエンケファリンを用いた。これらの操作条件を Table 1 に示した。

(3) 試料および試料調製法の検討

試料には、CPA 産生菌である *Penicillium commune* の数種の菌株について、温度条件を変えて培養した菌体および培養液を用いた。また、*Aspergillus* 属や *Penicillium* 属などのカビによる汚染が考えられる食品として調味料を用いた。菌体、培養液および調味料の抽出には有機溶媒による液-液抽出法を採用し、クリーンアップのための固相抽出カートリッジには、Waters Oasis MAX または MCX を用いた。

C. D. 研究結果および考察

(1) LC-UV および LC/TOF-MS による CPA 測定条件の検討

(a) LC-UV

CPA 標準品を用いて移動相の検討を行った。LC カラム (DIONEX 社製 Acclaim Mixed-Mode WAX-1) は、特性として逆相モードと陰イオン交換モードを併せ持つことから、移動相中の有機溶媒としてアセトニトリルを、他方、カウンターイオンとしてギ酸、酢酸またはリン酸を用いて CPA の溶出挙動を検討した。その結果、移動相としてギ酸アンモニウムまたは酢酸アンモニウム緩衝液を用いた場合には、CPA の保持時間は最短でも一時間以上となり、これらの緩衝液の使用は実用的ではなかった。

他方、リン酸緩衝液ではアセトニトリル:25mM リン酸緩衝液 (pH6)=7:3 において CPA の保持時間は約 12 分となり、その際、理論段数 7092 およびシンメトリー係数 0.83 と、分離状態も良好であった。検量線は 1.0 ppm~300 ppm の間で相関係数 (r)=0.999 の良好な直線性を得ることが

できた。(Fig. 2)。

(b) LC/TOF-MS

LC-UV で用いたリン酸緩衝液を用いる条件下では、MS への適用は困難であったので、MS を検出手段として用いる際には、LC カラムとして、Acclaim Mixed-Mode WAX-1 と同様に逆相モードと陰イオン交換モードの特性を併せ持つが、保持力の弱い Dual ODS-AX 10 を用いることにした。このカラムを用いて LC 条件を検討したところ、CPA は保持時間約 6.4 分(保持比 2.2)に溶出されることが分かった。MS の測定条件として、CPA 標準品のイオン化について検討したところ、エレクトロスプレーイオン化法を用いた場合、ネガティブイオンモードでもポジティブイオンモードでも検出は可能であったが、ネガティブイオンモードの方が、より高感度に検出されることが分かった。

(2) 試料前処理法の検討

実試料分析を想定して溶媒抽出および固相抽出による回収率の検討を行った。前処理方法として、溶媒抽出では酢酸エチル、ジエチルエーテル、クロロホルム等の有機溶媒を検討し、また液-液抽出法としても直接抽出する方法と、珪藻土カラムを用いる方法を検討した。その結果、いずれの溶媒を用いた場合でも、直接抽出法の方が珪藻土カラムを用いる方法に比べて高い回収率を示した。他方、有機溶媒としては酢酸エチルを用いた液-液抽出(直接抽出法)において回収率 99%を得た。また、CPA は酸性物質であることから、抽出時の液性を変化(pH1~9.5)させて抽出率を検討したところ、pH7 で最も高い回収率を示したことから、液-液抽出に際しては中性で行うこととした。

固相抽出では、Oasis HLB, MCX および MAX について検討した。逆相モードの HLB

において CPA は保持されなかったが、逆相モードと陰イオン交換モードを併せ持つ MAX, および逆相モードと陽イオン交換モードを併せ持つ MCX においていずれも保持され、1%ギ酸含有酢酸エチルで溶出した際に MAX では 80%, MCX では 52%の回収率を得た。これらの結果から CPA は疎水性相互作用だけでなく、固相抽出において陽イオンと陰イオン両方の性質を示す両イオン性物質と考えられたことから、実試料の抽出・クリーンアップに際して、溶媒抽出および固相抽出(MAX と MCX)を併用することで、効果的なクリーンアップができると考えられた。

(3) 菌体培養ろ液からの CPA の検出と同定

構築した分析法を試料に適用したところ、*Penicillium commune* の菌体と培養ろ液 11 検体中 5 検体において CPA の存在が疑われるピークが検出された(Table 2)。これらは LC/TOF-MS によって CPA と合致する精密質量が得られ、CPA であることを確認することができた。他方、調味料においては CPA は検出されなかった。

また、*Penicillium commune* には CPA を産生する株としない株あり、更に培養温度によっても CPA 産生に差が生じることが分かった。

E. 結論

今回の実験により、CPA の分析では LC-UV では汎用性の高いスクリーニング測定を行え、また、LC/TOF-MS を用いることで、より高精度な分析が行えることが示された。

本法を CPA 汚染が危惧される食品に適用することで安全性評価を行うことが可能となり、今後、実用的な分析法として活用されることが期待される。

F. 健康危険情報

なし

酸の分析, 日本薬学会第 129 年会 (2009
年 3 月, 京都)

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- (1) 齊藤貢一, 馬場奈美季, 岩崎雄介,
伊藤里恵, 細江智夫, 河合賢一, 中澤
裕之, LC/TOF-MS によるシクロピアゾン

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 |
| 3. その他 | なし |

- System
- ・Pump : L6300 Intelligent Pump (HITACHI)
 - ・Detector : PDA MD-910 (JASCO)
 - ・Column Oven : CO-2060 Plus (JASCO), 40°C
 - ・Column : Acclaim Mixed-Mode WAX-1 (DIONEX)
(4.6 mm I.D. x 150 mm)
 - ・Mobile phase : AcCN: 25mM phosphate buffer (pH6.0) = (7:3)
 - ・Flow rate : 1 mL/min
 - ・Inject vol. : 10 μ L

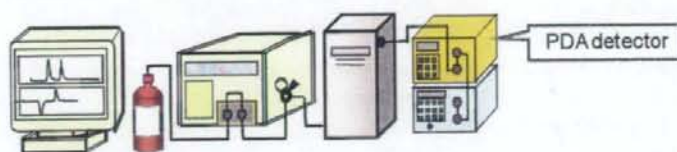


Fig.1 Schematic diagram and operating conditions for LC-UV method.

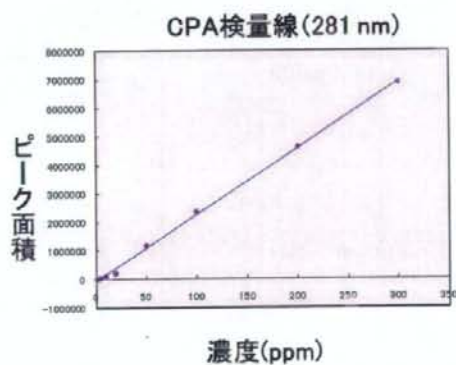


Fig.2 Calibration curve of CPA

Table 1. Operating conditions for LC/TOF-MS

LC system	: Waters alliance HT 2795 series
LC column	: TCI Dual-ODS AX10 (2.0 mm i.d. x 150 mm)
Column temperature	: 40 °C
Mobile phase	: Acetonitrile : 100 mM formate buffer (pH 6) (7 : 3)
Flow rate	: 0.2 mL/min
Injection volume	: 40 μ L
<hr/>	
MS system	: Waters LCT Premier XE
Resolution	: 10000
Ionization	: Electrospray Negative ion mode
Capillary voltage	: 2500 V
Con voltage	: -58 V
Drying gas flow rate	: N ₂ , 50L/hr
Drying gas temperature	: 350 °C
Ion source temperature	: 120 °C

Table 2. Content of CPA in culture filtrate and fungal pellet

Strain		CPA (mg)
<i>Penicillium commune</i>		
NBRC 5763	Fungal pellet	
	20°C	4.5
	25°C	2.1
	Culture filtrate	
	20°C	14.2
NBRC 6237	Fungal pellet	
	20°C	0.36
	25°C	0.27
NBRC 7746	Fungal pellet	ND
	Culture filtrate	ND
NBRC 7224	Fungal pellet	ND
	Culture filtrate	ND

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 20 年度 分担研究報告書

残留農薬・動物用医薬品などの試験に係る標準品の品質評価と
精度管理体制の構築に関する研究

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

残留農薬・動物用医薬品などの試験に係る標準品の品質評価と
精度管理体制の構築に関する研究

主任研究者	小島幸一	(財)食品薬品安全センター	所長
分担研究者	松木容彦	(社)食品衛生協会食品衛生研究所	副所長
協力研究者	小林文亮、伊藤慎啓、小林一夫	(社)食品衛生協会食品衛生研究所	
	中澤智子、佐々木裕子	(社)山梨県食品衛生協会	
	尾崎 巖	(社)埼玉県食品衛生協会	
	藤巻照久、赤星 猛	神奈川衛生研究所	
	竹田津 研	(株)関東化学	

研究要旨

本研究では、現在、残留農薬測定に使用されている混合標準溶液中での各農薬の安定性並びに各検査機関における個別分析の実施時の、分析担当者による個別農薬の標準液の調整時に汎用される溶液への各農薬の溶解性について調べることを目的とし、平成20年度は、下記の2課題について実施することとした。

研究実施課題

1. 残留農薬の一斉分析法として、行政試験で用いられている混合農薬標準品溶液中での農薬の安定性についての検討
2. 1. の混合標準液に使用されている各標準品を調査対象にして、個別残留農薬分析等で使用される農薬の溶解液への溶解性についての検討

本年度は、神奈川県衛生研究所が、課題1について、(社)日本食品衛生協会食品衛生研究所が、課題2について研究計画を作成した。また、関東化学(株)が、混合標準液調製に用いる残留農薬標準品原末の入手と混合標準溶液の調製並びに残余標準品原末の各担当検査機関への頒布を担当した。

本年度は、農薬標準品の販売メーカーや海外等からの残留農薬標準品の入手にかなりの時間を要したため、研究開始の着手が遅れ、本報告書では、混合標準品調製手法、安定性並びに溶解性についての研究実施計画と本研究の遂行により期待される成果等について報告する。

A. 研究目的

わが国における、食の安全・安心施策を推進するため、厚生労働省は、平成18年度に、ポジティブリスト制度を導入し、輸入食品に対しておよそ800種の残留農薬基準を設定した。また、検疫所並びに登録検査機関においては、海外から輸入される食品中の残留農薬レベルについてのモニタリング検査や輸入検査の実施を、また、地方自治体の衛生研究所等においては、国内市場の食品についての除去検査等の実施を、食の安全確保のリスク管理施策の一環として実施している。これらの検査の中でも、特に、輸入食品検査においては、違反の判定結果の精度の不確かさが2国間での貿易上の摩擦等が生じる危険性があることから、輸入食品検査に用いる検査法については、その精確さが厳しく求められている。

検査機関で得られる定量分析における検査結果は、基本的には、試薬メーカーで調製した標準液を用いるかあるいは試薬メーカーから購入した標準品を各自で調製して得られた標準液を用いて作成した検量線から求められることから、いずれの場合も、市販されている残留農薬標準品原末の純度¹⁾や安定性、あるいは、標準液調製時の溶解液への溶解性の良否、さらには、標準液の保存条件下での溶解性や安定性の良否は、検査結果の正確さに大きな影響を与えることとなる。

一方、検査機関では、混合農薬標準液についても独自で調製する場合も少なくないが、実際、各自調製した混合標準液中での各農薬の溶解性や安定性についての検証はほとんどなされないのが実状で

あり、また、厚生労働省の平成20年度食品安全行政講習会においては、国が開発した一斉分析法の留意点として、混合標準溶液中での農薬の安定性の検証が課題として挙げられており、混合標準溶液の安定性の検証の必要性が強く望まれている。

したがって、検査機関がより精確な検査結果を得るためには、試薬メーカー側からの使用者側への各残留農薬標準品の溶解液への溶解性や安定性に関する確かな情報の提供は責務であり、また、必須要件となる。

我々は、先に厚生労働省の委託試験として¹⁾、また、厚生労働科学補助金研究²⁾において、代表的な数十種の残留農薬標準品の純度試験を試みた結果、純度値が残留農薬分析用として要求されている標準品の純度規格を満たしていない標準品やメーカーの表示純度値とは異なる結果を示す標準品が数種認められ、標準品を提供する試薬メーカーでの表示の見直しや改善の必要性並びに標準品を使用している各検査機関への注意喚起の必要性について纏め、報告した。

そこで、平成20～22年度の本研究においては、課題1として、神奈川県行政の食品検査実施に係る検査実施標準作業書(SOPNo. 25-10-11502)に採用されている76種の標準品に着目し、調製した混合標準液調整液中での各農薬の安定性について、また、課題2として、上記混合標準液調製に用いた76種の残余各残留農薬を活用し、検査機関の分析者が汎用している溶解液への溶解性についての検討を併せて実施することとした。

B. 研究方法

1. 残留農薬混合標準液中での残留農薬標準品の安定性についての検討(課題1)

1-1) 残留農薬混合標準液の調製

今回、残留農薬混合標準液調製に用いた残留標準品、76種を表1-1~3に示した。

① 残留農薬混合標準液の調液(Fig. 1)

76種の農薬原料に関しては、試薬販売メーカーが試験成績書として示している各残留農薬原体の純度保証値に基づき、純度補正し、絶対濃度として10mg/L(アセトン/ヘキサン(1:1 v/v)に溶解)になるように濃度を調整した。

② 溶解溶媒

残留農薬試験・PCB試験用(5000倍濃縮)アセトン(Lot No. 010X1995)及びヘキサン(Lot. No. 102U1636)(関東化学(株)製)を使用した。

③ 残留農薬混合標準液の頒布

調製した残留農薬76種の混合標準液については、混合、均質化し、調製後、一定量(2mL)ずつアンプルに分注し、必要量を各協力研究者に頒布した。また、混合標準液調製時において残った残余の各残留農薬標準品原体は、溶解性の検討を担当する各協力検査機関での試験に用いた。

1-2) 混合標準液中での残留農薬の安定性に関する検討

① 残留農薬混合標準液

関東化学(株)により、1.1)に記した操作(Fig. 1)に従い調製した76種の残留農薬混合標準液を用いた。

② 試薬等

アセトン:残留農薬試験・PCB試験用(5000倍濃縮)

ヘキサン:残留農薬試験・PCB試験用(5000倍濃縮)

アセトニトリ/ヘキサン(1:1 v/v)混合液:アセトン及びヘキサンを1:1で混合した。

③ ガスクロマトグラフ質量分析計及び測定条件

i) ガスクロマトグラフ質量分析計:

西川計測社製精度管理・相対定量ソフトウェア NAGINATA を搭載したアジレント社製 Agilent 6890N GC 及び Agilent5975C MSD を使用した。

ii) NAGINATA 用測定条件

注入量: 2 μ L

注入方法: スプリットレス

注入口温度: 250 $^{\circ}$ C

キャリアガス: 定圧力モード

キャリアガス圧力: クロロピリホスメチルの保持時間が16.593分になるように自動校正

ページ時間: 2分

カラム: HP-5MS 30m \times 0.25mm \times 0.25 μ

L

昇温条件: 70 $^{\circ}$ C(2分) \rightarrow 25 $^{\circ}$ C/分 \rightarrow 150 $^{\circ}$ C \rightarrow 3 $^{\circ}$ C/分 \rightarrow 200 $^{\circ}$ C \rightarrow 8 $^{\circ}$ C/分 \rightarrow 280 $^{\circ}$ C(10分) \rightarrow 20 $^{\circ}$ C/分 \rightarrow 300 $^{\circ}$ C(0分)

ポストラン: 300 $^{\circ}$ C(5分)

GCインターフェイス温度: 280 $^{\circ}$ C

イオン源温度: 230 $^{\circ}$ C

四重極温度: 150 $^{\circ}$ C

測定モード: Scan (m/z 35~550)、

SIM

④ 試験法

絶対濃度として 10mg/L (アセトン/ヘキサン (1:1 v/v) に溶解) に調製した混合標準溶液を、-20℃、4℃及び 40℃の各保存温度で3ヶ月、6ヶ月及び 9ヶ月保存後、各保存液中の農薬を GC/MS で測定する。

⑤ 安定性の確認・評価方法

GC/MS は NAGINATA クライテリアサンブルにより、装置状態を一定水準に保つことができる。そのため、測定時期が異なっても機器の変動が一定の範囲内であると考えられ、各農薬は保存期間及び保存温度の設定条件毎に試料数を $n=5$ として面積値を測定する。評価方法は、繰り返しのある二元配置分散分析を行う。

2. 残留農薬標準品の汎用溶解液への溶解性についての検討 (課題2)

1) 残留農薬標準品

試験には、1-1) で得られた残余の残留農薬標準品原末を関東化学(株)から入手し、用いた。

2) 試薬

アセトニトリ/ヘキサン (1:1) 混合液: アセトニトリル及びヘキサンは、残留農薬分析用を使用した。

3) ガスクロマトグラフと分析条件 検査機関で用いたガスクロマトグラフと分析条件 (代表例)

ガスクロマトグラフ: 島津製作所
GC-2010

検出器: FID

カラム: DB-5 ID0.25mm x 30cm (0.25µm)

オープン温度: 50℃ (1min) --- 25℃
/min --- 125℃ --- 300℃ (10℃/min)

注入口温度: 250℃

検出器温度: 300℃

注入法: スプリットレス

4) 試験法

① 農薬標準原液の調製手順 (溶解性の確認用)

i) 農薬標準原液の調製

残留農薬標準品原体、10mg を精密にメスフラスコ (10mL) に秤量し ($n=3$)、アセトン/ヘキサン (1:1 v/v) に溶解 (タッチミキサーで約 20 秒間、攪拌) 後、定容 (1000µg/mL 相当) にし、農薬標準原液を作製する。ついで、農薬標準原液を遠心分離 (3000rpm x 15 分) 後、溶液をスクリーキャップ付きスピッツ管に移す。スピッツ管は、アルミホイルで全体を巻き、遮光して、4℃及び -20℃ 下で、1ヶ月、3ヶ月間、冷蔵庫又は冷凍庫に保管する。

なお、この農薬標準原液調製時点において、溶解状態を目視での確認を行う。

ii) 低濃度農薬標準液調製 (基準液)

初期調製時に、i) とは別に、残留農薬標準品原体、10mg をメスフラスコ (1000mL) に精密に秤量 ($n=3$) 後、アセトン/ヘキサン (1:1 v/v) で溶解 (約 30 秒間、手で振り、攪拌)、定容し、得られた希釈農薬標準液 (溶解性における比較基準液とする) を GC 測定 ($n=3$) に供する。

iii) GC/MS 測定による繰り返し測定における精度の確認

溶解性確認試験の開始に先立ち、安定性が高いことが知られている代表的な

農薬を用いて、 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ レベルのアセトン/ヘキサン溶解液を調製し、3日間の繰り返し測定 ($n=5$ 、3日間) を行い、室内精度を求める (相対標準偏差として2%以内を測定変動の許容基準の目安とする)。

iv) GC による保存農薬標準原液における溶解レベルについての確認

調製初期に作製した農薬標準原液 ($1000\mu\text{g}/\text{mL}$) については、スピッツ管へ採取した 0.5mL 溶液を、シリンジフィルター (メッシュ $20\mu\text{m}$) でろ過した後、また、 4°C 及び -20°C での保存した各農薬標準原液については、測定時 (1ヶ月、3ヶ月) ごとに、一旦、スピッツ管を室温状態に戻した後 (1時間程度室温放置後) に、標準原液の一部 (約 0.5mL) をそれぞれ採取し、この溶液をシリンジフィルター (メッシュ $20\mu\text{m}$) でろ過した後、アセトン/ヘキサン (1:1 v/v) で 100 倍に希釈、定容し、測定用試料 ($10\mu\text{g}/\text{mL}$ 相当) とする。この測定用試料を GC 測定 ($n=3$) に供する。

なお、保存液については、一旦、スピッツ管を室温状態に戻した後 (1時間程度室温放置後) に所定の 0.5mL を採取する。また、各 GC 測定に際しては、2. ④ iii) で繰り返し測定試験に用いた安定性の高い農薬の低濃度溶液 ($10\mu\text{g}/\text{mL}$ レベル、 4°C 保存) を併行して測定を行い ($n=3$)、各採取時期での機器感度の変動についても確認する。

v) 農薬標準原液の保存時の取り扱い
測定用溶液 0.5mL を採取した後の残りの農薬標準原液の保管操作に当たっては、それぞれ、採取後、速やかに 4°C 及び

20°C の保管庫へ戻し保管を継続する。

vi) 溶解性の評価と手順

a) 溶解性の比較

①農薬標準原液の調製初期、 4°C 及び -20°C 保存後 (1ヶ月、3ヶ月) の農薬標準原液それぞれについて、遠心分離後の又はフィルターろ過後に、結晶等の残渣物あるいは析出物等の有無を目視で確認する。

②試験開始時煮調製した農薬標準原液 ($1000\mu\text{g}/\text{mL}$) 及び各保存時期の農薬標準原液それぞれから採取した一定量の溶液 (0.5mL) を 100 倍希釈して得られる各測定用希釈標準液 ($10\mu\text{g}/\text{mL}$ レベル) と調製初期に、直接アセトン/ヘキサン (1:1) により 1000 倍希釈して得られた低濃調製溶液 ($10\mu\text{g}/\text{mL}$ レベル) との GC 測定結果 ($n=3$ 、ピーク面積) の比較を行う。

b) 溶解性の評価

調製初期の測定値 (ピーク面積) と各保存時期における保存液 (4°C 、 -20°C) のそれぞれの測定値 (ピーク面積) の差 (2%以上の時) の比較により溶解性の良否状態を評価する。各測定結果のばらつきが大きく、差の判定が明確に出来ない時には、有意差検定に付す。

C. D. 研究結果および考察

1. 残留農薬混合標準液中での残留農薬標準品の安定性についての検討 (課題 1)

1.-1) 残留農薬混合標準液の調液

当初、神奈川県の実地検査に係る検査実施標準作業書に採用されている農薬 8 種を対象に、混合標準液中での安定性

の検討を進めることを想定したが、これらの対象農薬には、化学物質審査規制法における第1種特定化学物質の8化合物 (*o,p'*-DDT、*p,p'*-DDT、アルドリン、エンドリン、ディルドリン、ヘプタクロル、ヘプタクロル-*exo*-エポキシド、ヘプタクロル-*endo*-エポキシド) が含まれており、これらの農薬は、国内での製造許可等の取得には多大な時間を要することから試験実施が困難と考えられ、今回は、これら8種の農薬成分を除いた76種を混合組成(表1-1~3)に設定した。混合液に用いる76種は、ポジティブリスト制度における一斉試験法に該当する農薬成分であり、既に各試薬メーカーから一部については混合標準液として販売されている成分であることから、各農薬原体の安定性については、メーカーで保証された範囲内で確保されていると考えて取り扱うこととした。

今回の76種の混合標準液の調製に当たっては、市販されている農薬標準品を原料に選定することとしたが、一部、純度の低い農薬標準品があり(28チオメトン純度46.0%)、この原料については、市販されている高純度の原料が入手困難であることから、入手可能なDr. Ehrenstorfer社品を使用することとした。その他の原料は純度90%以上を有する標準品を使用した。また、これらの農薬原料の純度は、残留農薬分析用の純度基準から外れ、かなり純度の低い農薬も含まれることから(純度98%以下:18種)、各試薬メーカーが提供している検査成績書に記載されている純度保証値に基づいて純度を補正し、各農薬ごと

に、実際の対象農薬の含有量が計算上、10mg/Lの濃度になるよう調液し、濃度の均質化を図った。(例えば、農薬標準品が純度90%の場合、11.1mg秤量して1Lに溶解する)。なお、通常、試薬メーカーにおいても残留農薬標準品の混合標準液の調製においてはこのような純度に基づく含量補正が行われる。

本調液方法(Fig. 1)に基づき、市販の農薬標準品76種を用いて各10mg/Lレベルの混合標準液を調製し、2mLアンプル、200本を得、安定性試験に供した。

1-2) 混合標準液中での残留農薬の安定性に関する検討

今回選択した76種の農薬は、厚生労働省の平成16年度農薬等一斉分析法で検討された農薬種で、0.1ppm添加回収実験の結果、適用可能とされた農薬から選択した農薬種であり、更に0.01ppmにおける添加回収追加実験でバリデーションを実施した農薬種でもあるが、現在、これらの混合標準溶液は市販されていない。

76種の農薬を一斉に分析する場合、保持時間が近接する76種の農薬をGC-FID等の個別検出器を用いての一斉分析は困難であることから、分離能が高く、定性分析能に優れたGC/MSを用いる事とした。

しかし、GC/MSは、イオン化の再現性が低いため、安定同位体のような適正な内部標準等の物質を使用しない場合には、定量における正確性には欠けることから、今回の混合農薬の安定性の検討には、精度管理・相対定量ソフトウェアのNAGINATAを搭載したGC/MSを用い定量性を高めることとした。

NAGINATA の特徴としては、

① 各測定成分の保持時間を一定に保つため、チューニング時に注入口圧力を変更する。その結果、SIM のグループ分けの変更及び解析メソッドの保持時間の変更が不用となる。

② マススペクトルの再現性を重視したチューニングを行うため、Scan 測定では、安定したマススペクトルが得られ、SIM 測定では定量イオンと確認イオンの比が安定する。

③ NAGINATA クライテリアサンプルにより、装置各部の劣化による化合物の吸着、汚染によるノイズレベル上昇等のチェックを行うことにより、装置状態を一定水準に保つことができる。

④ ①～③により、保持時間、イオン化、装置状態を一定に保ち、内標準法で測定を行うことにより、装置の日間変動を最小限に抑えることができる。

等であり、このような機能を備えた GC/MS を用いて測定し、また、測定データについては、SPSS (Statistical Package for Social Science) を用いて、繰り返しのある二元配置の分散分析による解析を行うこととした。

2. 残留農薬標準品の汎用溶解液への溶解性についての検討 (課題 2)

1-1) の残留農薬混合標準液調製において余った各農薬原体を用いて、検査機関で農薬の定量検査において汎用される溶媒への溶解性について調べることにした。また、使用した 76 種の農薬の溶

解液への溶解性の検討は、3 協力検査機関で分担、実施することとした。

今回、調査対象とした農薬 76 種は、一斉分析法に用いられる農薬ではあるが、必要に応じて検査機関ではこれらの農薬についての個別分析法での検査も実施されている。また、各検査機関においては、通常、分析者各自で、農薬原体を用いて標準液の調製を行っており、その手法としては、一旦、高濃度の各農薬の標準原液を作製し、各定量に際して、用事調製により低濃度の標準液を作製する、というような手順に従い標準液を使用するのが一般的である。したがって、溶解性試験においては、特に、農薬原体の高濃度標準原液作製時の溶解性に着目して調べることにした。また、溶解性の判定においては、溶解性試験に用いた原体を用い、直接、低濃度レベルの溶液 (10ug/mL) を調製した低濃度標準液と上述の標準原液として調製した高濃度溶液の希釈液との比較により評価を行うこととした。

農薬の定量分析に当たっては、GC/MS 測定では、NAGINATA を搭載し、機器の変動要因を相殺して測定データの変動を抑えたが、GC 測定時には、物理化学的に安定な適切な農薬 (繰り返し瘦軀定変動の指標農薬、日間変動の指標として) を選択して測定試料の前後に挿入し、この農薬の面積の変動により GC 検査機器の日間変動を確認 (正常稼働状態について確認) する事とした。また、日間変動の相対標準変動 (2~3% を想定) を基準として、高濃度標準液の溶解性について解析、評価を行うこととした。

E. 結論 (纏め)

今回の試験研究の特徴と試験結果から得られる期待される成果について以下に整理した。

1. 残留農薬混合標準液中での残留農薬標準品の安定性についての検討 (課題1)

1) 農薬の一斉分析において、市販の混合標準溶液には含まれないような検査対象を含めて測定することが必要な場合には、分析者自らが混合溶液の調製及びその溶液中での農薬の安定性についての確認が必要になることから、本検討結果は、検査機関の分析者に対して、安定性の確認試験等を行う上で貴重な情報が提供でき、しいては、検査の信頼性向上に寄与できる。

2) 一般的な標準液の保存条件下あるいは過酷な保存条件下での混合液中での各農薬の安定性に関わるデータが入手できることから、①試薬メーカーに対しては、混合標準液調整時における、調製時又は保存時における農薬の安定性に影響を与える要因に関する情報提供ができ、混合農薬標準品液の調製法や使用者への提供の見直しあるいは、今後より高品質な混合標準品の調製における貴重な情報提供が可能となる。②検査機関においては、試薬メーカーから購入する混合標準液の作製し方や品質管理の現状が把握できる。また、混合標準品の保管管理や定量時における精度管理上の注意を促すことができ、今後の各検査機関での精確な検査結果の確保にも繋がる。

2. 残留農薬標準品の汎用溶解液への溶解性についての検討 (課題2)

個別分析法を用い農薬検査を実施している各検査機関の現場において、農薬の標準原液や標準液を調製する時の溶解液への農薬の溶解性に関する情報の提供ができる。また、溶解状態の確認の必要性、重要性が認識でき、今後の各検査機関でのより精確な検査遂行に寄与できる。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表. 1-1 混合標準液の原料、原料純度及び目標仕込み量 (純度補正值)

No.	原 料	原料メーカー	Lot No.	純度 (%)	純度補正值 (mg)
1	<i>p, p'</i> -DDD	Dr. Ehrenstorfer	51021	98.0	30.6
2	<i>p, p'</i> -DDE	Dr. Ehrenstorfer	71205	98.5	30.5
3	α -BHC	Dr. Ehrenstorfer	70830	97.5	30.8
4	β -BHC	Dr. Ehrenstorfer	50405	98.4	30.5
5	γ -BHC	Dr. Ehrenstorfer	51031	98.5	30.5
6	δ -BHC	Dr. Ehrenstorfer	51128	99.0	30.3
7	アクリナトリン	Dr. Ehrenstorfer	70830	96.5	31.1
8	アラクロール	Dr. Ehrenstorfer	51102	99.5	30.2
9	イソプロカルブ	Dr. Ehrenstorfer	80118	99.5	30.2
10	エスプロカルブ	関東化学㈱	810X7110	99.9	30.0
11	エトプロホス	Dr. Ehrenstorfer	70402	93.0	32.3
12	カズサホス	Dr. Ehrenstorfer	80114	98.5	30.5
13	カフェンストロール	関東化学㈱	703X7102	99.5	30.2
14	キナルホス	Dr. Ehrenstorfer	80104	96.0	31.3
15	クレソキシムメチル	Dr. Ehrenstorfer	91129	98.0	30.6
16	クロルビリホス	Dr. Ehrenstorfer	60110	98.5	30.5
17	クロルフェンビンホス	Dr. Ehrenstorfer	70413	95.5	31.4
18	クロルプロファム	関東化学㈱	904X7110	99.6	30.1
19	クロルベンジレート	Dr. Ehrenstorfer	50503	96.5	31.1
20	ジエトフェンカルブ	Dr. Ehrenstorfer	50623	97.0	30.9
21	シハロトリン	和光純薬工業㈱	ALQ8567	99.7	30.1
22	シフルトリン	Dr. Ehrenstorfer	60303	97.5	30.8
23	シプロコナゾール	Dr. Ehrenstorfer	61117	99.0	30.3
24	シベルメトリン	Dr. Ehrenstorfer	70416	92.0	32.6
25	ジメトエート	Dr. Ehrenstorfer	70927	98.0	30.6
26	シメトリン	関東化学㈱	709X7106	99.8	30.1
27	ダイアジノン	Dr. Ehrenstorfer	70320	96.0	31.3
28	チオメトン	Dr. Ehrenstorfer	71010	46.0	65.2
29	チフルザミド	和光純薬工業㈱	ALM0728	100.0	30.0
30	テトラコナゾール	Dr. Ehrenstorfer	61114	98.0	30.6

表. 1-2 混合標準液の原料、原料純度及び目標仕込み量 (純度補正值)

No.	原料	原料メーカー	Lot No.	純度 (%)	純度補正值 (mg)
31	テニルクロール	関東化学㈱	011X1398	100.0	30.0
32	テブコナゾール	Dr. Ehrenstorfer	80418	98.8	30.4
33	テブフェンピラド	Dr. Ehrenstorfer	70629	99.5	30.2
34	テフルトリン	Dr. Ehrenstorfer	60207	98.0	30.6
35	デルタメトリン	Dr. Ehrenstorfer	71206	99.0	30.3
36	トラロメトリン	Dr. Ehrenstorfer	80228	90.5	33.1
37	トリアジメノール	Dr. Ehrenstorfer	61212	98.0	30.6
38	トリアゾホス	Dr. Ehrenstorfer	80131	78.0	38.5
39	トリフルラリン	関東化学㈱	012X1474	99.8	30.1
40	パクロプトラゾール	Dr. Ehrenstorfer	70618	98.5	30.5
41	パラチオンエチル	Dr. Ehrenstorfer	70606	99.0	30.3
42	パラチオンメチル	Dr. Ehrenstorfer	60120	98.5	30.5
43	ハルフェンブロックス	Dr. Ehrenstorfer	70309	98.5	30.5
44	ピテルタノール	Dr. Ehrenstorfer	81104	98.5	30.5
45	ピフェントリン	Dr. Ehrenstorfer	70821	99.5	30.2
46	ピラクロホス	関東化学㈱	906X7137	99.3	30.2
47	ピリプチカルブ	関東化学㈱	804X7105	99.6	30.1
48	ピリプロキシフェン	Dr. Ehrenstorfer	60720	99.0	30.3
49	ピリミノバックメチル (E体)	和光純薬工業㈱	TFS9854	99.7	30.1
50	ピリミノバックメチル (Z体)	和光純薬工業㈱	TFS9855	99.1	30.3
51	ピリミホスメチル	Dr. Ehrenstorfer	60505	99.0	30.3
52	フェナリモル	関東化学㈱	706X7101	99.9	30.0
53	フェニトロチオン	Dr. Ehrenstorfer	60920	98.0	30.6
54	フェンチオン	Dr. Ehrenstorfer	80714	97.3	30.8
55	フェントエート	Dr. Ehrenstorfer	71009	96.6	31.1
56	フェンバレレート	Dr. Ehrenstorfer	50630	98.0	30.6
57	フェンプロバトリン	Dr. Ehrenstorfer	70301	99.5	30.2
58	ブタクロール	関東化学㈱	909X1526	99.1	30.3