

試料：野菜類 20.0 g

↓ アセトン 100, 50 mL

↓ ホモジナイズ

↓ 吸引ろ過

↓ アセトン留去

↓ 飽和塩化ナトリウム 100 mL

↓ 酢酸エチル-ヘキサン (1:4) 100, 50 mL

酢酸エチル・ヘキサン層

↓ 脱水：無水硫酸ナトリウム，溶媒留去

↓ アセトン-ヘキサン (1:1) 5 mL

シリカゲルカラム

↓ アセトン-ヘキサン (1:1) 100 mL 溶出

↓ 溶媒留去

↓ アセトン 5 mL

試験溶液

↓

GC-FPD

フローチャート 2 クロルピリホス個別試験法

試料 10 g

↓ 水 100 mL

↓ 遠心分離

水層

↓

LC/MS

フローチャート 3 LC/MS によるサイクラミン酸の定量

試料 10 g

↓ 水 100 mL

↓ 遠心分離

水層 10 mL

↓

C18+SAX ミニカラム

↓ 水 10 mL 洗浄

SAX ミニカラム

↓ 希塩酸 10 mL 溶出

溶出液

↓ ヘキサン 5 mL

↓ 2.5%Cl₂ 溶液 1 mL

↓ 振とう

ヘキサン層

↓ 5%NaHCO₃ 溶液 25 mL

↓ 振とう

ヘキサン層

↓

試験溶液

↓

HPLC-UV (314 nm)

フローチャート 4 HPLC-UV によるサイクラミン酸の定量

表1 GC/MSによるほうれんそう中の農薬等の一斉試験法による添加回収率

定量法 試行 No.	添加回収率 (%、添加量各 0.02 ppm 相当)			
	絶対検量線法		マトリックス検量線法	
	1	2	1	2
クロルピリホス	119.1	177.6	101.2	78.4
フルトラニル	134.2	200.2	106.2	78.1
マラチオン	126.0	181.8	95.6	79.0

表2 GC/MSによるにんじん中の農薬等の一斉試験法による添加回収率 1

定量法	添加回収率 (%、添加量各 0.02 ppm 相当)		
	絶対 検量線法	マトリックス 検量線法	標準溶液 添加法
クロルピリホス	164.2	125.7	95.2
フルトラニル	201.3	138.0	95.4
マラチオン	201.2	122.6	106.9

表3 GC/MSによるにんじん中の農薬等の一斉試験法による添加回収率 2

定量法	添加回収率 (%、添加量各 0.2 ppm 相当)		
	絶対 検量線法	マトリックス 検量線法	標準溶液 添加法
クロルピリホス	115.1	107.6	92.3
フルトラニル	158.9	147.5	91.1
マラチオン	130.0	120.1	92.6

表 4 個別試験法 (GC-FPD) によるクロルピリホスの添加回収率

試料 No.	添加回収率 (%、 添加量各 0.02 ppm 相当)
1	104.5
2	102.3
3	96.4
4	99.1
5	94.3
6	102.2
7	97.0
8	102.9
9	98.9
10	98.6
平均	99.6
RSD (%)	3.28%

表 5 LC/MS によるサイクラミン酸の添加回収率

RSD 試料 No.	添加回収率 (%、添加量各 20 ppm 相当)				平均
	1	2	3	4	
(%)					
絶対検量線法 20.5	82.3	84.3	91.1	124.4	95.5
標準溶液添加法 2.04	102.3	101.0	97.6	99.3	100.1

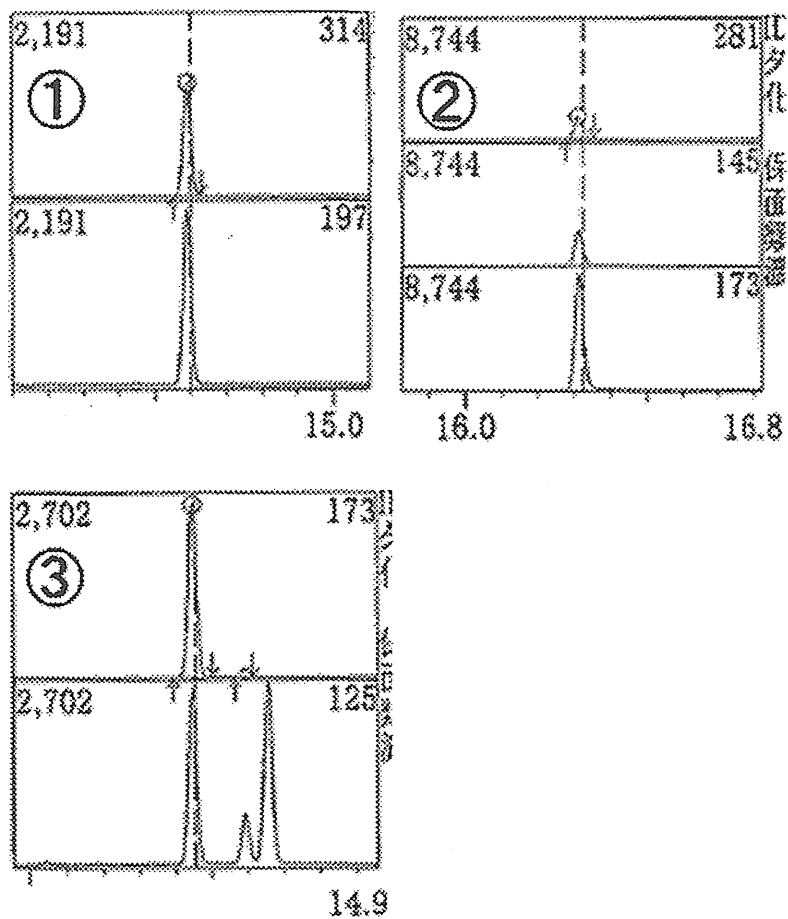


図1 GC/MSによる農薬等の一斉試験法によるクロマトグラム
 ①クロルピリホス、②フルトラニル、③マラチオン

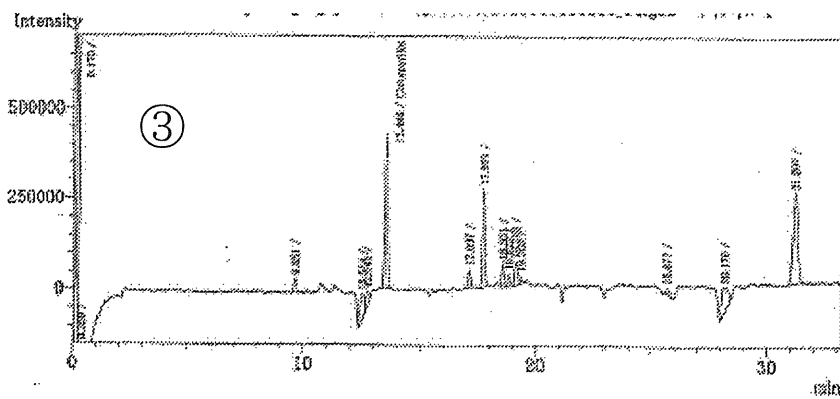
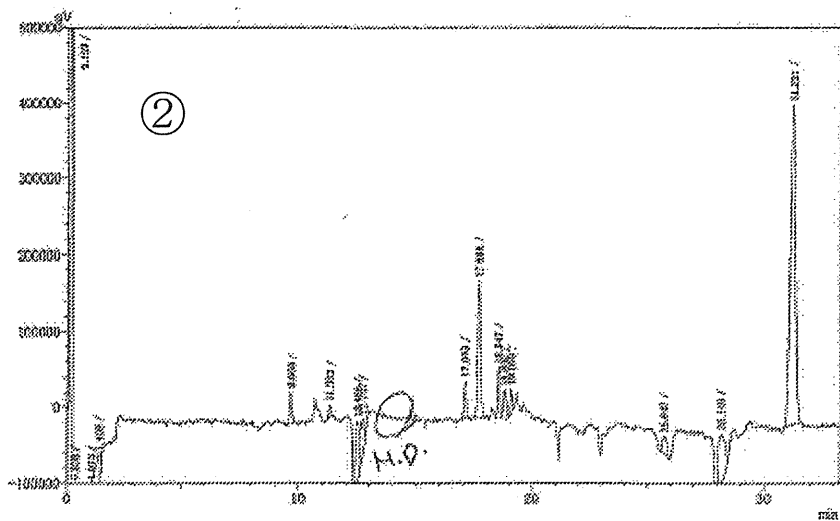
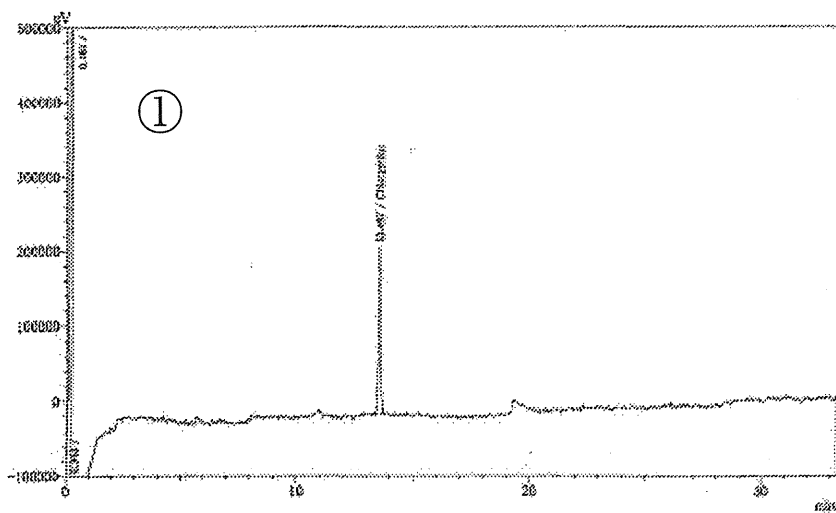
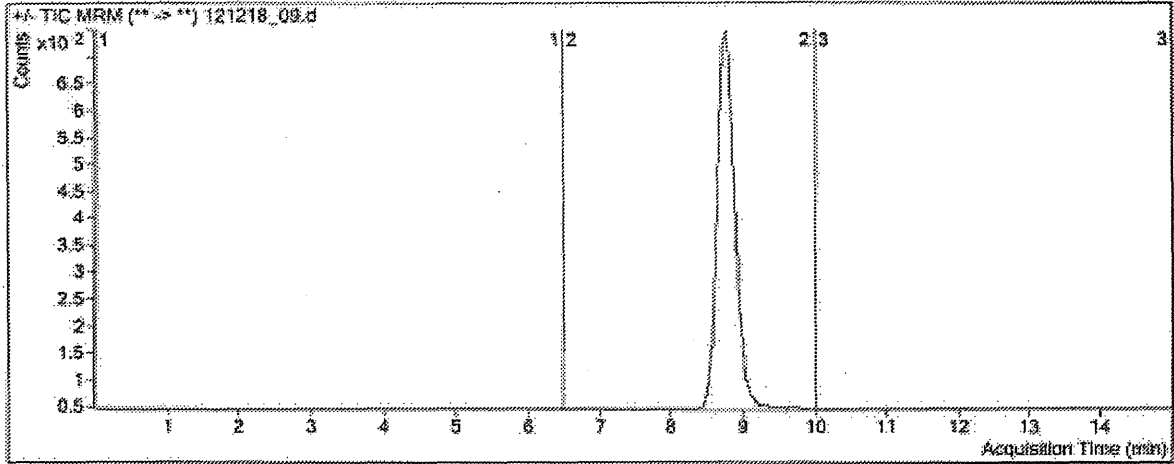


図2 個別試験法によるクロルピリホスのクロマトグラム
 ① 標準溶液、②無添加試験溶液、③標準添加試験溶液

サンプルのクロマトグラム



定量結果

化合物	RT	レスポンス	濃度
Cycla	8.787	11871	273.3023

化合物のグラフィック

Target Compound Cycla

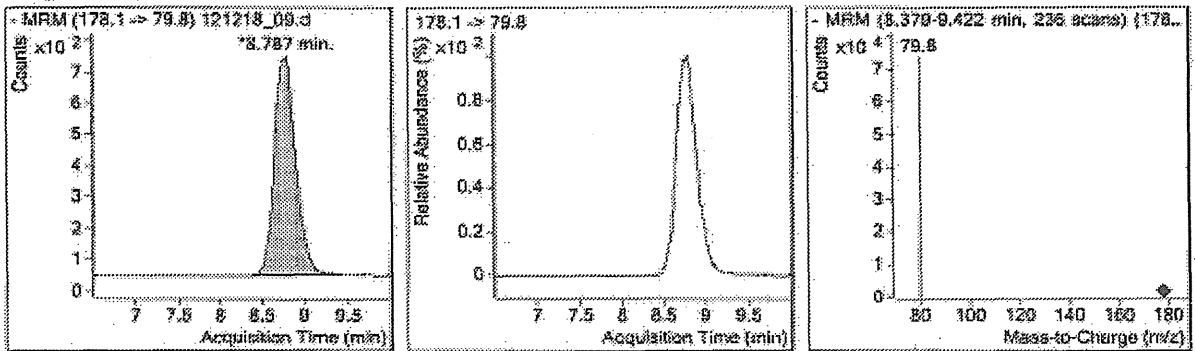


図 3 LC/MS によるサイクラミン酸のクロマトグラム

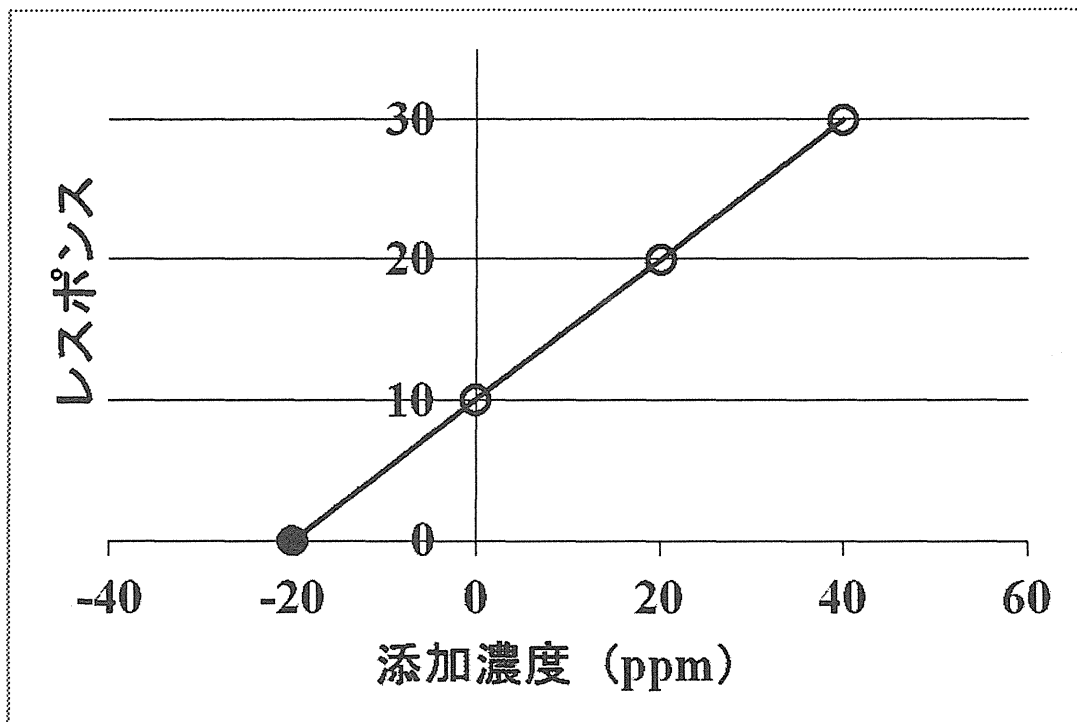


図4 標準希釈法の概念図

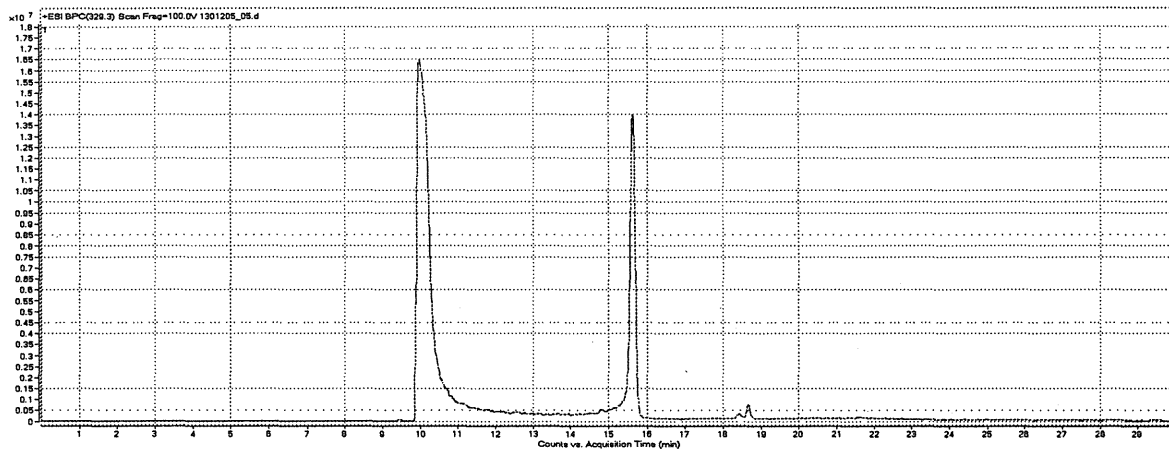


図5 MG標準品 (10 µg/mL) のトータルイオンクロマトグラム

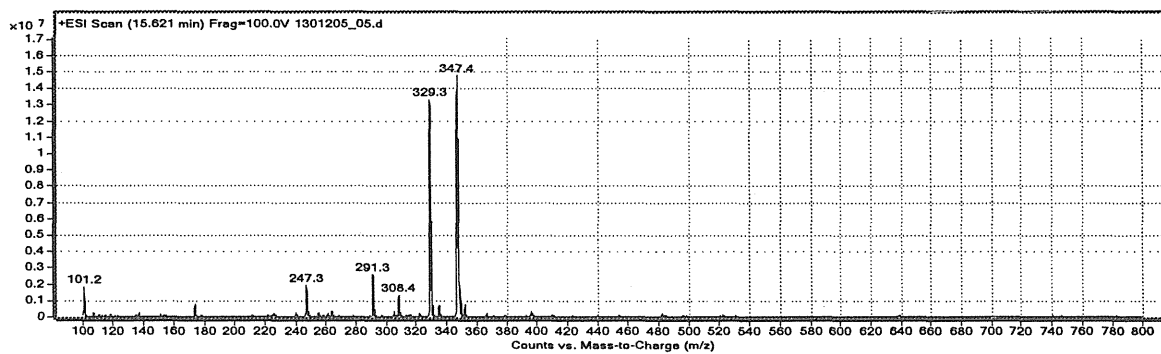


図6 MG標準品 (10 µg/mL、保持時間 15.6 分) の質量スペクトル

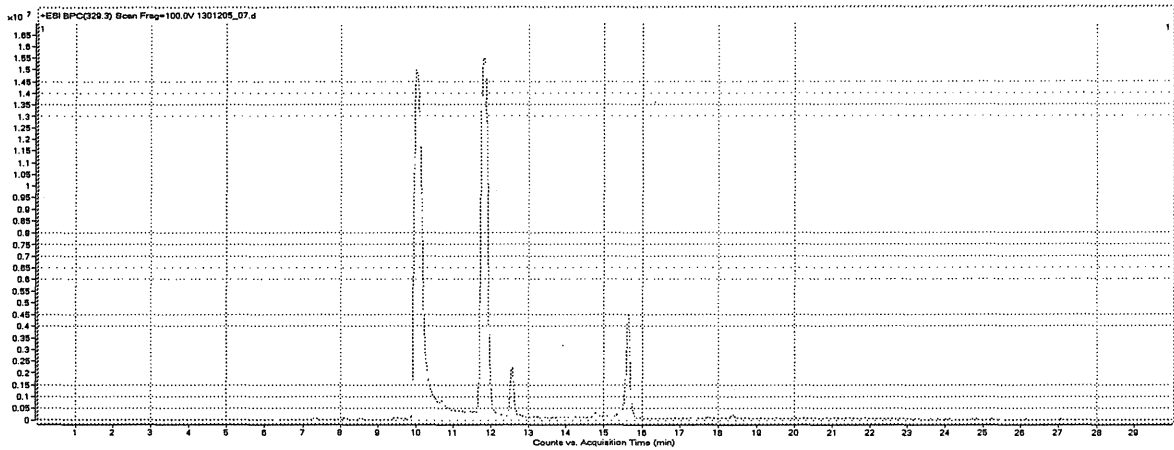


図7 MG標準品+0.2%SO₂水溶液、6時間後のトータルイオンクロマトグラム

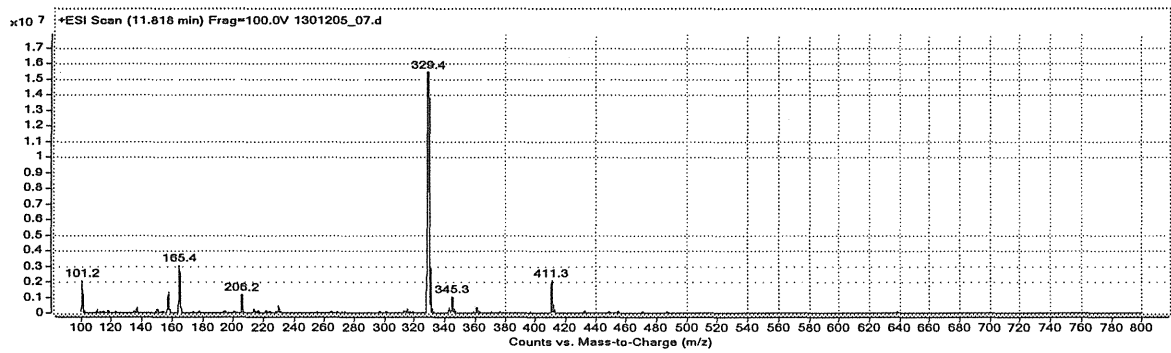


図8 図7保持時間11.8分の質量スペクトル

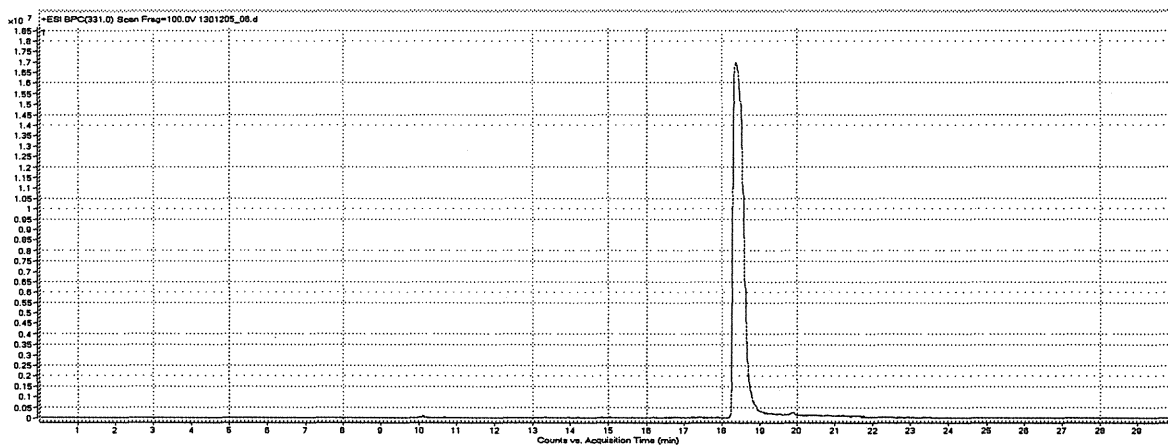


図9 LMG 標準品 (10 μg/mL) のトータルイオンクロマトグラム

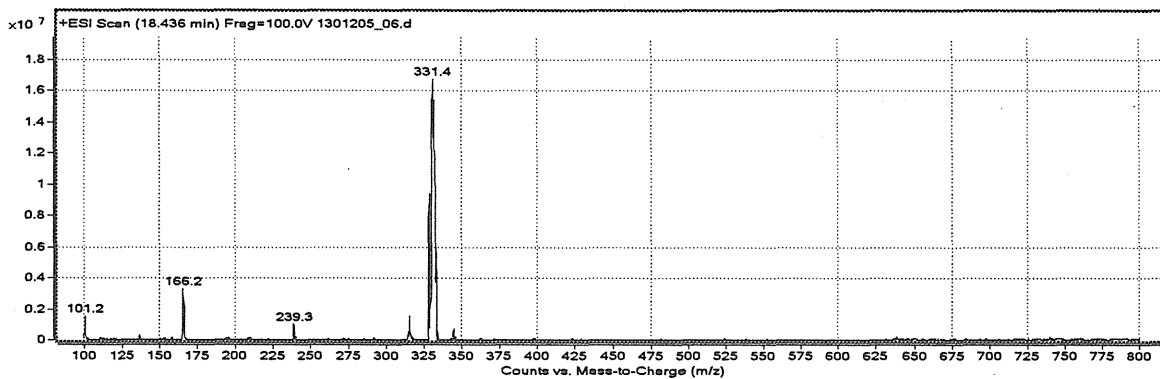


図10 図9 保持時間 18.4 分の質量スペクトル

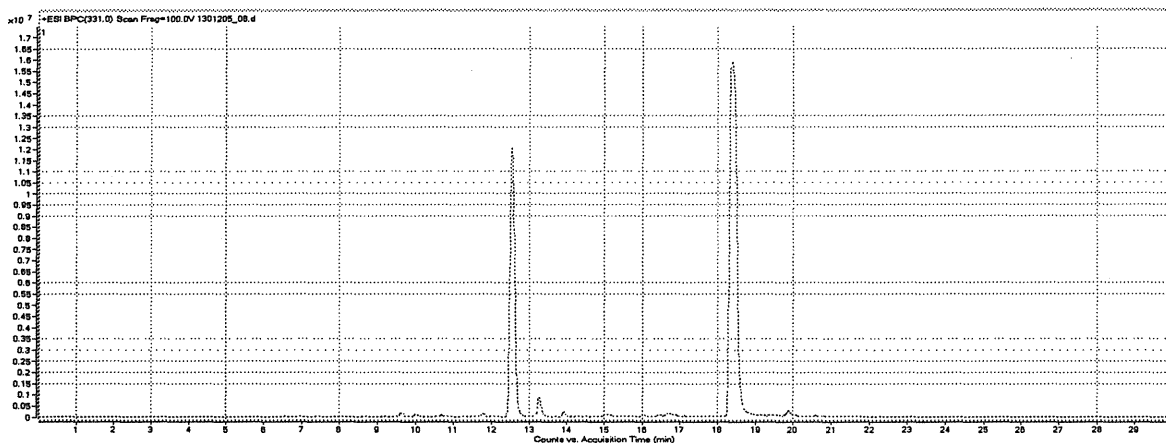


図 11 LMG 標準品 + 0.2%SO₂ 水溶液、6 時間後のトータルイオンクロマトグラム

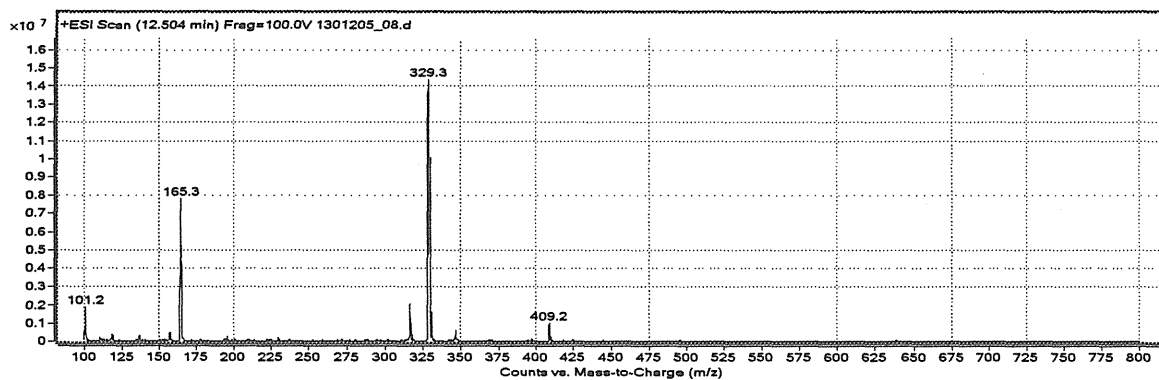


図 12 図 10 保持時間 12.5 分の質量スペクトル

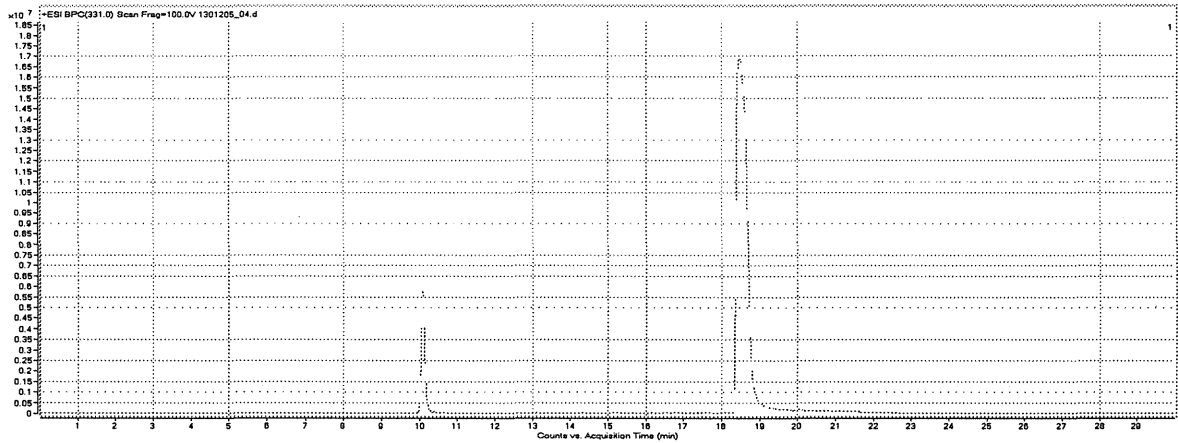


図 13 LMG 標準品 + 0.2% H₂O₂ 水溶液、6 時間後のトータルイオンクロマトグラム

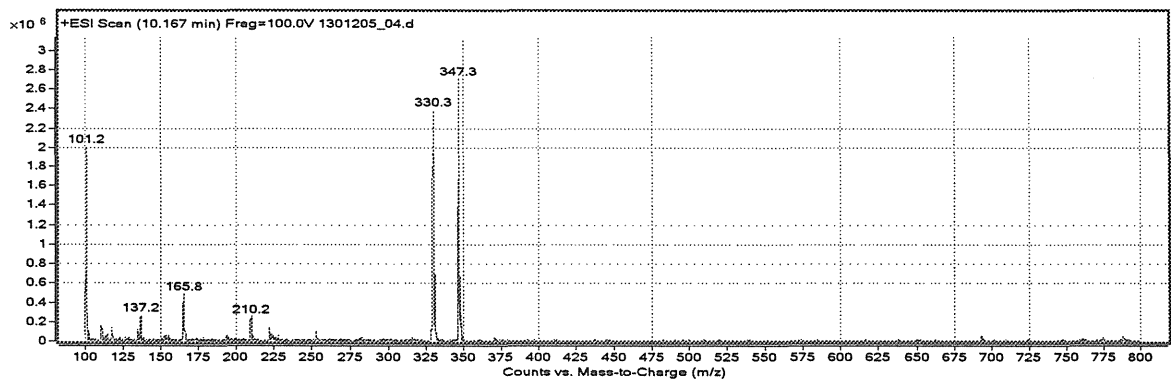


図 14 図 13 保持時間 10.2 分の質量スペクトル

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)

検査機関の信頼性確保に関する研究

平成 25 年度 分担研究報告書

外部精度管理調査試料の高信頼性分析に関する研究

分担研究者 鎗田 孝

検査機関の信頼性確保に関する研究

分担研究報告書

外部精度管理調査試料の高信頼性分析に関する研究

主任研究者	小島 幸一	(一財) 食品薬品安全センター 秦野研究所 所長
分担研究者	鎗田 孝	(独) 産業技術総合研究所 上級主任研究員
協力研究者	大竹 貴光	(独) 産業技術総合研究所 主任研究員

研究要旨

食品の安全性を確保するためには、試験・検査等の信頼性の確保が重要である。そのため、食品衛生法に基づく検査機関には外部精度管理調査への参加が求められている。一方、技能試験に関する国際規格である ISO/IEC 17043 では、技能試験の付与値の不確かさをより小さくする方法として、絶対測定法による決定が挙げられている。そこで、外部精度管理調査試料中の農薬を精確よく分析する方法を確立し、同調査の信頼性をより向上させることを目的として、同位体希釈質量分析法 (IDMS) の適用を検討した。

IDMS の精確さの評価として、平成 17 年 1 月 24 日付け食安発第 0124001 号の通知試験法（一斉試験法）をベースとした IDMS 法について、外部精度管理調査試料の基材（検討中を含む）を用いた添加回収試験を行った。また、実際の外部精度管理調査試料の分析として、同法を含む IDMS 法 2 法によって平成 25 年度に実施した残留農薬検査 I の調査試料を分析し、その結果を参加機関の分析結果などと比較した。

9 種類の農薬を対象とした添加回収試験では、一般的な添加回収試験における結果と比較して、IDMS による測定値は真度および精度とも良好であった。その理由として、IDMS では試料の前処理過程における分析対象農薬の回収率（損失）が補正されたためと考えられた。また、マトリックスマッチングを施した校正標準液を用いることにより、より真度の高い測定が可能であることも示された。

一方、平成 25 年度外部精度管理調査試料の分析では、分析対象農薬であるフェントロチオンとクロルピリホスの両方について、IDMS による分析値は、調査試料の調製における添加濃度に一致した。また、分析値の不確かさは、参加機関間の標準偏差に対して、25%以下と充分小さかった。

以上の結果から、IDMS は外部精度管理調査試料中の分析対象農薬の精確分析に有効な方法であると考えられた。

- A. 研究目的
- | | |
|--------------------------------------|--|
| 食品の安全性を確保するためには、試験・検査等の信頼性の確保が重要である。 | そのため、食品衛生法に基づく検査機関には様々な分析精度管理が求められており、その一つとして外部精度管理調査へ |
|--------------------------------------|--|

の参加が求められている。一方、外部精度管理調査を含む一般的な技能試験では、参加機関の合意値によって付与値を決定することが一般的である。これに対し、技能試験に関する国際規格である ISO/IEC 17043: 2010 では、付与値の不確かさをより小さくする方法として、絶対測定法による決定が挙げられている。同位体希釈質量分析法 (IDMS) は、分析対象化合物の安定同位体置換化合物 (標識体) を内標準に用いた定量法であり、極めて精確な (正確で精度がよい) 分析が求められる認証標準物質の認証値の決定などにも採用されている方法である。そこで、外部精度管理調査試料中の農薬を精確に分析する方法を確立することにより、同調査の信頼性をより向上させることを目的として、IDMS による農薬の精確分析を検討した。

B. 研究方法

IDMS の精確さの評価として、平成 17 年 1 月 24 日付け食安発第 0124001 号の通知試験法 (一斉試験法) をベースとした IDMS 法について、外部精度管理調査試料の基材 (検討中を含む) を用いた添加回収試験を行った。測定対象農薬とその標識体のピーク面積比の変動を基に、IDMS の精確さを評価するとともに、マトリックス効果の影響も評価した。

また、実際の外部精度管理調査試料の分析として、前述の分析法と、別途妥当性を評価した分析法 (食安発第 0124001 号の通知試験法 (個別試験法) をベースとした IDMS 法) によって、平成 25 年度に実施した残留農薬検査 I の調査試料を

分析し、その結果を参照値や参加機関の結果と比較した。

1. 試料基材および試薬

(1) 試料

外部精度管理調査試料の基材 (検討中を含む) であるとうもろこしペースト、にんじんペースト、枝豆ペースト、かぼちゃペーストと、平成 25 年度外部精度管理調査 (残留農薬検査 I) の調査試料であるとうもろこしペーストは、食品薬品安全センター秦野研究所より提供された。

(2) 標準品

測定対象農薬の高純度標準品として和光純薬工業製シマジン、ダイアジノン、フェニトロチオン、マラチオン、クロルピリホス、イソキサチオン、エトフェンプロックス、関東化学製チオベンカルブ、および林純薬工業製イソプロチオランを用いた。標識体の標準品として、林純薬工業製ダイアジノン-d₁₀、フェニトロチオン-d₆、クロルピリホス-d₁₀、イソプロチオラン-d₄、イソキサチオン-d₁₀、エトフェンプロックス-d₅、および CDN Isotopes 製マラチオン-d₆、シマジン-d₆、チオベンカルブ-d₁₀ を用いた。シリジスパイク標準品として、GL サイエンス製アラクロールを用いた。

(3) 試薬

アセトニトリル (以下 AN)、アセトン (以下 Ac)、トルエン (以下 To1)、酢酸エチル (以下 EA)、ヘキサン (以下 Hex)、無水炭酸ナトリウムは関東化学製ポリ塩化ビフェニル・残留農薬分析用を用い、他の試薬は試薬級を用いた。水は

超純水を用いた。

2. 試料添加溶液、内標準溶液、シリンジスパイク溶液、校正標準液

(1) IDMS の精確さ評価用

9 種類の分析対象農薬およびその標識体を、各々の濃度が $5.68 \mu\text{g/g}$ となるように Ac に希釈し、試料添加溶液とした。また、アラクロール $0.238 \mu\text{g/g}$ を含む Ac 溶液を調製し、シリンジスパイク溶液とした。次に、試料添加溶液とシリンジスパイク溶液を混合することにより、測定対象農薬およびその標識体各 $1.25 \mu\text{g/g}$ 、アラクロール $0.186 \mu\text{g/g}$ を含む校正標準液（マトリックス無）を調製した。さらに、後述の分析法 1 によって検討基材を前処理して調製したブランク溶液を、窒素気流で濃縮した後に校正標準液（マトリックス無）に転溶し、校正標準液（マトリックス有）を調製した。

(2) 外部精度管理調査試料分析用

フェニトロチオン- d_6 $7.988 \mu\text{g/g}$ 、クロルピリホス- d_{10} $3.614 \mu\text{g/g}$ を含む Ac 溶液を調製し、内標準溶液とした。また、Ac 中にアラクロール $19.47 \mu\text{g/g}$ を含むシリンジスパイク溶液 A を調製し、さらにこの一部を Ac に希釈して $0.450 \mu\text{g/g}$ としたシリンジスパイク溶液 B を調製した。次に、Ac 中にフェニトロチオン $14.11 \mu\text{g/g}$ 、クロルピリホス $7.336 \mu\text{g/g}$ を含む農薬混合液を調製し、これと内標準溶液、シリンジスパイク溶液 A を合わせて Ac に希釈し、フェニトロチオン $1.413 \mu\text{g/g}$ 、クロルピリホス $0.739 \mu\text{g/g}$ 、フェニトロチオン-

d_6 $1.698 \mu\text{g/g}$ 、クロルピリホス- d_{10} $0.7087 \mu\text{g/g}$ 、アラクロール $0.476 \mu\text{g/g}$ を含む校正標準基液を調製した。さらに、後述の分析法 1 および分析法 2 によってとうもろこしの検討基材を前処理して調製したブランク溶液を、各々窒素気流で濃縮した後に校正標準基液に転溶し、校正標準液（外部精度管理調査試料分析用）を調製した。以上の調製は質量比混合法によって行った。

3. 分析方法

IDMS の精確さの評価は分析法 1 について行った。また、外部精度管理調査試料の分析には分析法 1 および分析法 2 を適用した。各々の概要を図 1 に示すとともに、詳細を以下に記す。

(1) 分析法 1

試料 5 g に試料添加溶液 0.55 mL または内標準溶液 0.4 mL を加えて静置した後、水 20 mL を加え 15 分間放置した。これに AN 50 mL を加えて細砕した後、吸引ろ過した。ろ紙上の残留物に AN 20 mL を加えて細砕した後、吸引ろ過した。合わせたろ液から約 40 mL を分画し、塩化ナトリウム (NaCl) 10 g 及および 0.5 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.0) 20 mL を加え、 10 分間振とうした。とうもろこしペーストおよび枝豆ペーストの分析においては、あらかじめ AN 10 mL でコンディショニングした Agilent Technologies 製 Bond Elut C18 固相抽出カートリッジ (1 g) を用いて、前記の AN 層と AN 2 mL を処理する操作を行った。得られた処理液を無水硫酸ナトリウムによって脱水し濃縮・乾固した後、AN/Tol (3:1) 混液 2 mL に溶解した。

Supelco製ENVI-Carb/LC-NH₂固相抽出カートリッジ (500 mg/500 mg) をAN/Tol (3:1) 混液10 mLでコンディショニングした後、前述の抽出液を注入し、さらにAN/Tol (3:1) 混液20 mLを注入した。全溶出液を1 mL以下に濃縮し、Ac 10 mLを加えた後再度1 mL以下に濃縮し、Ac 5 mLを加えた後に溶媒を除去した。残留物をシリンジスパイク溶液1 mL (精確さ評価の場合) またはシリンジスパイク溶液B 0.8 mL (外部精度管理調査試料分析の場合) に溶解したものを試験溶液とした。

得られた試験溶液中の分析対象農薬をGC/MSによって測定した。測定条件は以下に示す。装置：7890/5975C GC/MS システム (Agilent Technologies 製)、カラム：DB-5MS (Agilent Technologies 製)、カラム温度：50°Cで1分間保持した後、+25°C/分で125°Cまで昇温し、さらに+10°C/分で300°Cまで昇温し、6.5分間保持、注入口温度：220°C、検出器温度：230°C (イオン源)、注入方式：スプリットレス、キャリアガス：ヘリウム、注入量：1 μL、イオン化条件：EI、定量に用いた m/z：201 (シマジン)、211 (シマジン-d₆)、304 (ダイアジノン)、314 (ダイアジノン-d₁₀)、277 (フェニトロチオン)、283 (フェニトロチオン-d₆)、158 (マラチオン)、164 (マラチオン-d₆)、314 (クロルピリホス)、324 (クロルピリホス-d₁₀)、257 (チオベンカルブ)、267 (チオベンカルブ-d₁₀)、290 (イソプロチオラン)、294 (イソプロチオラン-d₄)、313 (イソキサチオン)、323 (イソキサチオン-d₁₀)、163 (エトフェンプロックス)、168 (エ

トフェンプロックス-d₅)、160 (アラコロール)

(2) 分析法 2

試料5 gに内標準溶液0.4 mLを加えて静置した後、Ac 70 mLを加えて3分間細砕し、ケイソウ土を敷いたろ紙で吸引ろ過した。残留物にAc 50 mLを加え3分間細砕した後、同様に操作して得られたろ液を合わせた。Acを除去した後、あらかじめ飽和NaCl溶液100 mLを入れた分液漏斗に移し、ナス型フラスコを洗ったEA/Hex (1:4) 混液100 mLを合わせた。これを5分間振とうし、静置した。水層を分離後、EA/Hex (1:4) 混液50 mLを加えて同様に振とうし、得られたEAおよびHex層を合わせた。無水硫酸ナトリウムによって脱水した後、EAとHexを除去した。残留物にHex 30 mLを加え分液漏斗に移した後、Hex飽和AN 30 mLを加えて5分間振とうして静置した。Hex層にHex飽和AN 30 mLを加えて同様の操作を2回繰り返す、得られたAN層を合わせて濃縮・乾固し、残留物をAc/Hex (1:1) 混液5 mLに溶解させた。Agilent Technologies製シリカゲル固相抽出カートリッジ (5 g) に無水硫酸ナトリウム5 gを加え、Hex/Ac(1:1)混液10 mLでコンディショニングした後、得られた抽出液を注入し、さらにHex/Ac(1:1)混液100 mLを注入した。溶出液を濃縮・乾固した後に少量のAcに溶解し、シリンジスパイク溶液A40 μLと合わせ、窒素気流下で約2 mLに濃縮したものを試験溶液とした。

得られた試験溶液中の分析対象農薬をGC/MSによって測定した。測定条件は以下に示す。装置：6890/5973 GC/MS システム (Agilent Technologies 製)、カラ

ム : DB-35MS (Agilent Technologies 製)、カラム温度 : 50°C で 1 分間保持した後、+25°C/分で 125°C まで昇温し、さらに +10°C/分で 300°C まで昇温し、6.5 分間保持、注入口温度 : 220°C、検出器温度 : 230°C (イオン源)、注入方式 : スプリットレス、キャリアガス : ヘリウム、注入量 : 1 μL、イオン化条件 : EI、定量に用いた m/z : 277 (フェニトロチオン)、283 (フェニトロチオン-d₆)、314 (クロルピリホス)、324 (クロルピリホス-d₁₀)、160 (アラクロール)

4. 評価方法

農薬濃度は次式から求めた。

$$C = F_e \times \frac{R_s}{R_c} \times \frac{F_c \times M_c \times C_c \times P \times M_{sp(s)}}{M_s \times M_{sp(c)}} \quad (1)$$

ただし、 C : 試料中の農薬濃度、 F_e : 前処理の精度に関わる係数 (= 1)、 R_s : 試験溶液測定における分析対象農薬の標識体に対する面積比、 R_c : 校正標準液測定における分析対象農薬の標識体に対する面積比、 F_c : 校正標準液調製のばらつきに関わる係数 (= 1)、 M_c : 校正標準液中の農薬混合液の質量、 C : 農薬混合液中の測定対象農薬の高純度標準品の濃度、 P : 測定対象農薬の高純度標準品の純度、 $M_{sp(s)}$: 試料に添加した内標準溶液の質量、 M_s : 試料量、 $M_{sp(c)}$: 校正標準液中の内標準溶液の質量、である。その不確かさは、(1)式の各項の不確かさを評価し、これらを合成して求めた。

(倫理面への配慮)

食の安全・安心に係わる研究であり、特に倫理面への配慮を必要としなかった。実験者および環境への配慮としては、有害な溶媒 (ベンゼン等) を使用しなかった。

C. D. 研究結果および考察

1. IDMS の精確さの評価

4 種の基材を用いて評価した IDMS の精確さの評価結果と、分析対象農薬の回収率を表 1~4 に示す。分析対象農薬の回収率は、添加した農薬量に対して 76~93%であったのに対し、IDMS による測定値は校正標準液 (マトリックス有) を用いた場合で 99.3~102.8%、校正標準液 (マトリックス無) を用いた場合で 87.5~100.5%であった。標識体を内標準に用いる IDMS では、試料の前処理過程における分析対象農薬の回収率 (損失) が補正されるために、真度の高い分析値が得られたものと考えられた。一方、併行精度についても、分析対象農薬の回収率測定ではおよそ 4%以下であったのに対し、IDMS 測定の併行精度はほとんど分析対象農薬について 1.5%以下であり、IDMS の方がより良好な再現性が得られた。以上から、IDMS を適用することにより、外部精度管理調査試料中の分析対象農薬を精確に分析できることが示された。

なお、IDMS では GC/MS 測定におけるマトリックス効果も補正できると考えられているが、表 1~4 に示したように、校正標準液のマトリックスの有無によって異なる分析結果が得られた。得られたピークの一例として、にん

じん基材中のイソキサチオンとその標識体のクロマトグラムを図 2 に示す。他の測定試料と比較して、校正標準液（マトリックス無）では標識体のピークが相対的に小さくなる傾向があった。その原因は明らかではないが、IDMS を適用した場合でも、マトリックスマッチングを施した校正標準液を用いた方が、より真度の高い分析結果が得られるものと考えられた。

2. 外部精度管理調査試料の分析

前項で正確さを確認した分析法 1 と、別途正確さを確認した分析法 2 によって、平成 25 年度外部精度管理調査（残留農薬検査 I）の調査試料を分析した。代表的なクロマトグラムを図 3 に示す。また、得られた結果を図 4 にまとめた。フェニトロチオンの分析値は分析法 1 が $0.476\sim 0.499 \mu\text{g/g}$ 、分析法 2 が $0.488\sim 0.506 \mu\text{g/g}$ 、クロルピリホスの分析値は分析法 1 が $0.244\sim 0.252 \mu\text{g/g}$ 、分析法 2 が $0.237\sim 0.244 \mu\text{g/g}$ であり（すべて $n=5$ ）、両法の結果はほぼ一致していた。そこで、分析法毎に(1)式の F_c 、 R_s 、 R_c 、 $M_{sp(s)}$ 、 M_s に係わる不確かさから算出した合成標準不確かさを重みとして、重み付け平均値とその不確かさを算出した。その結果はフェニトロチオン： $(0.495\pm 0.019) \mu\text{g/g}$ 、クロルピリホス： $(0.245\pm 0.014) \mu\text{g/g}$ （重み付け平均値±拡張不確かさ(包含係数：2)）であった。

以上の結果を外部精度管理調査の結果と比較した（図 4）。調査試料の調製における分析対象農薬の添加濃度は、フェ

ニトロチオンが $0.5 \mu\text{g/g}$ 、クロルピリホスが $0.24 \mu\text{g/g}$ であり、IDMS による分析結果はこれと良く一致した。一方、外部精度管理調査の参加機関の結果から決定した付与値（ 2σ 処理後の従来方式による）は、フェニトロチオンが $(0.458\pm 0.123) \mu\text{g/g}$ 、クロルピリホスが $(0.224\pm 0.057) \mu\text{g/g}$ （平均値±標準偏差の 2 倍）であった。IDMS による分析値はこれより約 8%高かった。この原因としては、参加機関のほとんどが、試料前処理における分析対象農薬の回収率（損失）を補正していないためと考えられた。また、参加機関間のばらつき（標準偏差）に対して、IDMS による分析結果の不確かさはフェニトロチオン：15%、クロルピリホス：25%であり、IDMS による分析値の不確かさは充分小さいことが示された。

E. 結論

IDMS を適用することにより、外部精度管理調査試料中の分析対象農薬 9 種類を真度と併行精度が良く分析することができた。また、平成 25 年度外部精度管理調査（残留農薬検査 I）の調査試料を分析した結果、同法によって真度が高くかつ不確かさが小さい分析値を得られることを確認した。以上の結果から、IDMS は外部精度管理調査試料中の分析対象農薬の精確分析に有効な方法であると考えられた。

F. 健康危険情報

なし