

## . 分担研究報告

1. 精確な定量法の確立
- 2) 標準添加法を用いた精確な定量法の検討

研究分担者 齊籐静夏



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)  
平成 25 年度分担研究報告書

1. 精確な定量法の確立  
2) 標準添加法を用いた精確な定量法の検討

研究分担者 齊藤静夏 国立医薬品食品衛生研究所 食品部主任研究官

**研究要旨**

残留農薬等分析に適した標準添加法による精確な定量法の検討を行った。検討にあたっては、大豆マトリックス標準溶液を用いて検量点数や添加濃度の定量精度に与える影響について評価した。その結果、初期濃度に近い 1 点を複数回繰り返し測定した場合の方が、多数の検量点を用いた場合よりも良好な結果が得られた。

**A. 研究目的**

食品に残留する農薬等(農薬、動物用医薬品および飼料添加物)に関するポジティブリスト制度が平成 18 年 5 月に施行され、現在約 800 品目の農薬等に基準値が設定されている。食品の安全確保のためには、これらの膨大な数の品目について精確かつ効率的に分析値を求める必要がある。

食品中の残留農薬分析のように、複雑な夾雑成分の共存下での微量分析においては、食品中のマトリックスの影響(マトリックス効果)により、精確な分析値を得ることが困難な場合がある。解決方法としては、安定同位体標識標準品を用いた内標準法による定量や、標準添加法による定量が提案されているが、食品中の残留農薬等検査における標準的実施方法や性能評価基準はない。

本研究では、残留農薬分析における「精確な定量法」について検討を行った。すなわち、残留農薬検査においても実施可能な簡便かつ高精度な標準添加法による定量法とその評価方法を確立するため、本年度はマトリックス標準溶液を用いて検量点数や添加濃度の定量精度に与える影響について検討した。

**B. 研究方法**

**1. 試料**

市販の大豆を遠心粉砕機で粉砕して、425  $\mu\text{m}$  の標準網ふるいに通したものをを用いた。

**2. 試薬及び試液**

(1) 有機溶媒及び試薬

試験溶液の調製に用いたアセトニトリル、アセトン、トルエン及びヘキサンは関東化学(株)製の残留農薬試験用試薬、水は超高純度蒸留水精製装置で蒸留したものをを用いた。塩化ナトリウムは、和光純薬工業(株)製の残留農薬試験用試薬を用いた。リン酸水素二カリウム及びリン酸二水素カリウムは、和光純薬工業(株)製の特級を用いた。ろ紙は桐山製作所製 No.5B、ケイソウ土は和光純薬工業(株)製のセライト 545 を用いた。

(2) 農薬標準品及び標準溶液

検討に用いた農薬を表 1 に示した。各農薬標準品は、林純薬工業(株)、関東化学(株)、和光純薬工業(株)、Sigma-Aldrich 社、Dr. Ehrenstorfers 社及び Riedel-de Haën 社及び AccuStandard 社の残留農薬試験用試薬を用いた。標準原液(1000 mg/L)は、各農薬 10 mg を精秤し、ヘキサン(ヘキサンへの溶解性が低い場合はアセトン/ヘキサンの混合溶媒)10 mL に溶解して調製した。混合標準溶液は、各農薬の標準原液を混合し、アセトン/ヘキサン(1:1)で適

宜希釈して調製した。

### (3) 精製ミニカラム

オクタデシルシリル化シリカゲル(ODS)ミニカラムは、Agilent社製 Mega Bond Elut C18(担体量 1000 mg)を用いた。グラファイトカーボン/アミノプロピルシリル化シリカゲル(NH<sub>2</sub>)積層ミニカラムは、ジーエルサイエンス社製の InertSep GC/NH<sub>2</sub>(充てん量 500mg/500 mg)を用いた。

(4) 0.5 mol/L リン酸緩衝液(pH7.0)の調製  
リン酸水素二カリウム(K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)52.7 g 及びリン酸二水素カリウム(KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)30.2 gを量り採り、水約 500 mL に溶解し、1 mol/L 水酸化ナトリウムまたは 1 mol/L 塩酸を用いて pH を 7.0 に調整した後、水を加えて 1 L とした。

### 3. 装置

GC-MS/MS は、ガスクロマトグラフ Trace1310、オートサンプラー TriPlus RSH 及び質量分析計 TSQ8000(ThermoFisher Scientific 製)を使用した。

### 4. 測定条件

カラム DB-5ms(内径 0.25 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25 μm、Agilent 社製)；ガードカラム 不活性キャピラリー(内径 0.25 mm、長さ 2 m、Agilent 社製)；ライナー 不活性化処理済みのシングルテーパ付ライナーに石英ウールを充填したもの；カラム温度 50 (1 min) - 25 /min - 125 (0 min) - 10 /min - 300 (8.5 min)；注入口温度 260 ；トランスファーライン温度 280 ；イオン源温度 260 ；キャリアーガス ヘリウム；キャリアーガス流量 1 mL/min；注入法 ホットニードル法(Pre-injection time 5 s、Post-injection time 0.5 s)；注入量 2 μL；イオン化法 EI (+)；測定モード SRM(selected reaction monitoring)；測定イオン、コリジョンエネルギー及び保持時間 表 1 に示した。

### 5. ブランク試験溶液の調製

通知「農薬等の GC-MS 一斉試験法」において、及び を変更した以外は当該試験法に従って試験溶液を調製した。

塩析後、遠心分離(毎分 3000 回転、5 分間)

を行った。

ODS ミニカラム精製の溶出溶媒量を 5 mL とした。

#### (1) 抽出

試料 10.0 g を量り採り、水 20 mL を加えて 30 分間放置した。これにアセトニトリル 50 mL を加え、約 1 分間ホモジナイズした後、ケイソウ土を約 1 cm の厚さに敷いたろ紙を用いて吸引ろ過した。残留物を採り、アセトニトリル 20 mL を加え、上記と同様にホモジナイズした後、吸引ろ過した。得られたろ液を合わせ、アセトニトリルを加えて正確に 100 mL とした。

抽出液 20 mL を採り、塩化ナトリウム 10 g 及び 0.5 mol/L リン酸緩衝液(pH 7.0)20 mL を加えて 10 分間振とう後、遠心分離(毎分 3000 回転、5 分間)を行った。

ODS ミニカラムにアセトニトリル 10 mL を注入し、流出液は捨てた。このカラムに上記のアセトニトリル層を注入し、さらにアセトニトリル 5 mL を注入した。全溶出液を採り、40 以下で約 1 mL まで減圧濃縮後、窒素気流により溶媒を除去し、残留物をアセトニトリル/トルエン(3:1)2 mL に溶解した。

#### (2) 精製

グラファイトカーボン/NH<sub>2</sub> 積層ミニカラムにアセトニトリル/トルエン(3:1)を 10 mL 注入し、流出液は捨てた。このカラムに(1)で得られた溶液を注入した後、アセトニトリル/トルエン(3:1)20 mL (うち 2 mL で 3 回容器を洗浄した)を注入した。全溶出液を採り、40 以下で約 1 mL まで減圧濃縮後、窒素気流により溶媒を除去し、最終試験溶液の濃度が試料 1.0 g 相当/mL となるように残留物をアセトン/ヘキサン(1:1)で溶解した。5 サンプルについて調製し、試験溶液を合わせた。

### 6. 試験溶液の調製

ブランク試験溶液 8 mL を採り、濃縮乾固した後、残留物を 0.01 μg/mL(試料中濃度 0.01 ppm 相当)の混合標準溶液 8 mL に溶解してマトリックス標準溶液とし、表 2 に示した Vial 1~6 の試

験溶液を調製した。

### C. 研究結果及び考察

標準添加法における検量点数(1~5点)及び添加濃度の定量精度に与える影響について検討をするため、大豆のマトリックス標準溶液(10 ng/mL)を用いて、表2に示した Vial 1~6を調製し、それぞれ3回測定して、標準添加法により初期濃度を推定した。結果を表3、検量線を図1に示した。その結果、検量点が5点の場合は、検討した23化合物はいずれも、決定係数が  $r^2 > 0.99$  となり、良好な直線性が得られた。しかしながら、標準添加法から求めた初期濃度は7.0~9.1 ng/mLと低い濃度となった。一方、初期量と同量(10 ng)を添加して1点で求めた場合の推定濃度は8.5~10.5 ng/mLとなり、良好な結果が得られた。初期量の3倍量(30 ng)を添加して1点で求めた場合の推定濃度は、5点で求めた場合よりは高いものの、7.8~9.3 ng/mLとなり、やや低い濃度となった。これらの結果から、初期濃度に近い1点を複数回繰り返し測定した場合の

方が、多数の検量点を用いた場合よりも良好な結果が得られると考えられたことから、今後様々な食品で確認する予定である。

### D. 結論

大豆マトリックス標準溶液を用いて検量点数及び添加濃度の定量精度に与える影響について検討した。今後、様々な食品を用いて検討し、残留農薬検査において実施可能な標準的な方法を確立するとともに、その性能評価基準について検討する予定である。

### E. 研究発表

#### 1. 論文発表

なし

#### 2. 学会発表

なし

### F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1 標準添加法の検討に用いた農薬の GC-MS/MS 測定条件

Compound	Retention time	Quantitation ion			Confirmation ion		
		Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	collision energy (eV)	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	collision energy (eV)
Acetochlor	13.51	223.1	132.1	14	223.1	147.1	14
Aldrin	14.6	262.8	193.0	24	262.8	228.0	20
Atrazine	12.15	200.1	122.1	10	215.1	200.2	10
Azaconazole	16.68	217.0	173.0	20	172.9	145.0	20
Azoxystrobin	23.71	344.1	329.3	18	388.1	360.3	8
-BHC	12.96	218.9	183.0	8	181.0	145.0	14
Chlorpyrifos	14.46	314.0	258.0	14	196.9	169.0	14
Cypermethrin	21.51,21.61,21.69,21.73	163.0	127.0	8	181.1	152.0	20
Cyproconazole	16.88	222.1	125.0	20	224.1	127.0	20
p,p'-DDT	17.98	235.0	165.1	20	237.0	165.1	20
EPN	18.89	157.0	110.0	14	169.1	141.0	8
Epoiconazole	18.49	192.0	138.0	14	192.0	111.0	20
Ethion	17.24	231.0	128.9	20	231.0	175.0	14
Fluvalinate	22.60, 22.68	250.1	200.2	18	252.1	200.2	18
Isoprocarb	9.81	136.1	121.1	10	121.1	103.0	10
Lenacil	17.9	153.1	136.1	14	153.1	110.0	14
Malathion	14.32	173.1	127.0	8	127.1	99.0	8
Myclobutanil	16.53	179.1	125.0	20	288.2	179.1	14
Propoxur	10.61	152.1	110.0	8	110.1	82.0	20
Simeconazole	13.68	195.1	75.0	14	211.1	121.0	14
Thiobencarb	14.52	257.1	100.1	14	100.1	72.0	8
Tri-allate	12.95	268.1	184.0	14	270.1	186.0	20
Trifloxystrobin	17.72	222.1	190.2	8	190.1	130.0	8

表 2 標準添加法の試験溶液の調製方法

	Vial 1	Vial 2	Vial 3	Vial 4	Vial 5	Vial 6
Volume of sample extract <sup>1)</sup> (μL)	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Added volume of standard solution (200 ng/mL) (μL)	0	25	50	75	100	150
Resulting mass of added pesticide (ng)	0	5	10	15	20	30
Added volume of solvent <sup>2)</sup> (μL)	150	125	100	75	50	0
Final volume (μL)	1150	1150	1150	1150	1150	1150

1) Approximate (estimated) residue level: 10 ng/mL

2) Acetone/hexane (1:1)

表 3 標準添加法による大豆マトリックス標準溶液(初期濃度 10 ng/mL)の推定濃度 (ng/mL)

	One-point calibration									
	5 <sup>1)</sup>		10 <sup>1)</sup>		15 <sup>1)</sup>		20 <sup>1)</sup>		30 <sup>1)</sup>	
	Ave.	RSD(%)	Ave.	RSD(%)	Ave.	RSD(%)	Ave.	RSD(%)	Ave.	RSD(%)
Acetochlor	11.5	1.5	9.6	17.3	9.6	2.9	9.1	5.5	8.9	3.7
Aldrin	9.6	11.3	10.1	7.0	9.6	12.3	9.2	2.3	9.1	5.2
Atrazine	11.3	16.8	9.5	17.2	9.6	9.0	9.1	6.5	9.3	8.7
Azaconazole	10.2	11.3	9.2	4.0	8.9	2.6	8.4	3.0	8.4	2.6
Azoxystrobin	11.5	13.5	10.3	7.6	9.4	3.5	8.9	6.2	8.6	0.8
–BHC	11.0	11.1	10.5	12.9	9.5	7.7	9.1	7.5	9.2	8.9
Chlorpyrifos	9.7	3.9	9.5	4.3	8.4	5.8	8.5	4.8	8.1	10.4
Cypermethrin	10.0	6.6	9.6	5.1	9.0	4.0	8.7	5.7	8.7	3.8
Cyproconazole	10.3	19.4	9.3	8.3	8.8	2.7	8.5	5.0	8.4	3.6
p,p'-DDT	9.9	4.3	9.8	11.8	8.5	3.1	8.0	6.8	7.8	2.9
EPN	10.7	14.5	9.9	12.5	9.0	7.5	8.7	8.3	8.6	5.0
Epoxiconazole	9.6	10.7	9.1	7.4	8.6	3.7	8.3	5.3	8.3	4.5
Ethion	10.0	12.6	9.3	7.8	8.7	4.9	8.2	6.8	8.1	5.3
Fluvalinate	9.4	6.1	9.3	5.6	8.7	4.6	8.4	3.3	8.4	3.0
Isoprocarb	10.5	4.3	10.3	7.4	9.5	2.4	9.3	6.0	9.3	3.1
Lenacil	10.4	13.9	9.9	11.9	9.3	7.6	8.8	12.4	8.8	7.3
Malathion	9.4	16.2	8.9	10.1	8.4	11.6	8.2	9.7	8.4	6.8
Myclobutanil	10.2	4.4	9.6	5.8	8.9	0.6	8.6	0.8	8.6	3.2
Propour	9.8	7.5	9.8	8.0	8.9	2.2	8.5	5.7	8.3	5.0
Simeconazole	8.8	6.7	8.5	6.7	8.5	8.6	8.3	8.3	8.3	6.0
Thiobencarb	9.8	13.8	9.2	16.1	8.6	2.1	8.2	5.9	8.6	5.3
Triallate	9.7	12.8	9.6	8.1	9.2	5.8	8.9	4.0	8.7	2.7
Trifloxystrobin	10.1	20.4	8.9	7.6	8.4	8.2	8.3	8.3	8.5	5.5

<sup>1)</sup> 添加量 (ng)

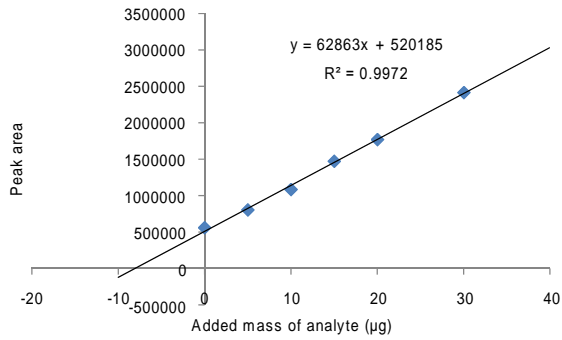


表 3 (つづき)

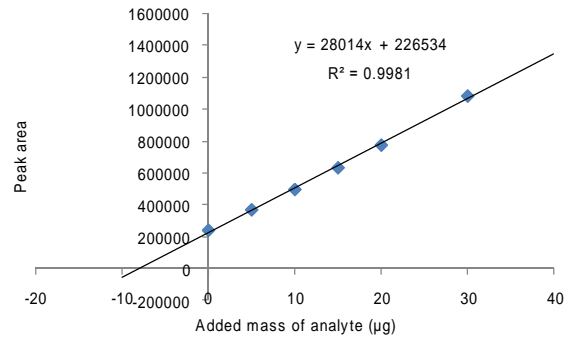
	Two-point calibration				Three-point calibration		Four-point calibration		Five-point calibration	
	5+10 <sup>1)</sup>		10+20 <sup>1)</sup>		5+10+20 <sup>1)</sup>		5+10+20+30 <sup>1)</sup>		5+10+15+20+30 <sup>1)</sup>	
	Ave.	RSD(%)	Ave.	RSD(%)	Ave.	RSD(%)	Ave.	RSD(%)	Ave.	RSD(%)
Acetochlor	10.9	9.4	8.6	5.8	8.3	7.0	7.8	5.3	7.9	6.8
Aldrin	10.2	7.2	8.9	1.1	9.0	1.9	8.6	7.9	8.7	6.5
Atrazine	9.6	12.2	8.7	5.6	8.5	4.4	8.9	4.0	8.9	4.0
Azaconazole	9.1	3.1	8.1	4.3	7.8	6.4	7.6	4.5	8.1	7.2
Azoxystrobin	10.1	7.0	8.4	10.2	8.1	12.0	7.6	6.9	7.7	3.6
-BHC	10.4	14.2	8.7	6.3	8.5	7.4	8.4	8.7	9.1	4.9
Chlorpyrifos	9.5	5.0	8.2	5.9	8.1	7.7	7.3	17.8	7.6	21.0
Cypermethrin	9.5	4.9	8.4	6.4	8.2	6.5	8.1	4.0	8.0	12.6
Cyproconazole	9.2	7.2	8.2	5.4	7.9	7.8	7.7	3.6	7.7	2.4
p,p'-DDT	9.8	13.1	7.3	5.7	7.2	7.5	6.7	3.5	7.0	6.1
EPN	9.7	12.8	8.3	7.6	8.0	6.8	7.8	3.0	8.0	2.2
Epoxiconazole	9.1	7.0	8.0	5.8	7.8	5.2	7.7	5.1	8.0	1.7
Ethion	9.2	7.2	7.9	7.1	7.6	7.2	7.3	6.4	7.6	3.0
Fluvalinate	9.2	5.5	8.1	5.9	8.0	6.9	7.8	1.9	8.0	3.1
Isoprocarb	10.2	7.9	9.0	6.0	8.8	6.7	8.7	4.9	9.0	1.6
Lenacil	9.9	11.7	8.4	13.4	8.2	13.1	8.0	5.5	8.2	5.5
Malathion	8.8	9.1	7.7	9.7	7.5	8.2	7.9	5.0	8.2	1.5
Myclobutanil	9.5	6.1	8.2	2.0	7.9	2.3	7.9	6.5	8.2	0.6
Propour	9.8	8.2	7.9	7.3	7.8	7.5	7.5	6.4	7.7	1.1
Simeconazole	8.4	7.2	8.0	8.6	7.8	10.2	8.1	9.9	8.6	4.1
Thiobencarb	9.1	17.3	7.6	4.7	7.4	7.1	8.1	3.8	8.1	3.7
Triallate	9.6	10.0	8.6	7.4	8.5	6.9	8.2	3.5	8.4	2.2
Trifloxystrobin	8.8	11.5	7.9	11.3	7.6	5.9	8.0	6.4	8.5	3.1

1) 添加量 (ng)

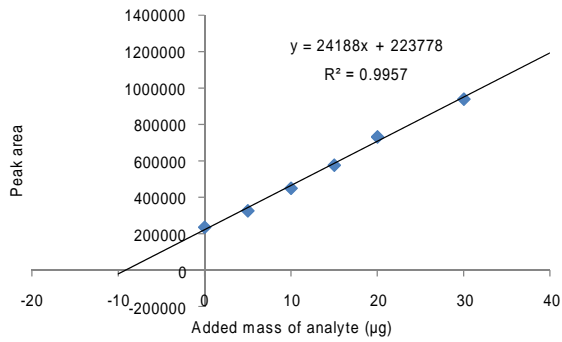
### Acetochlor



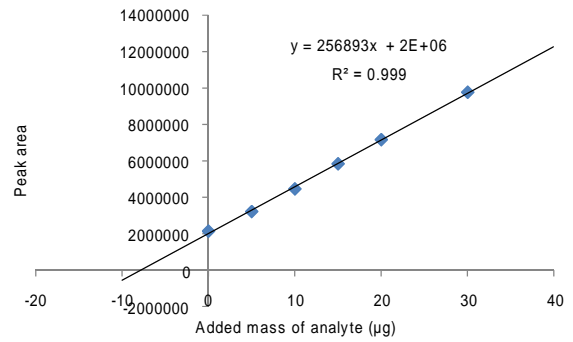
### Aldrin



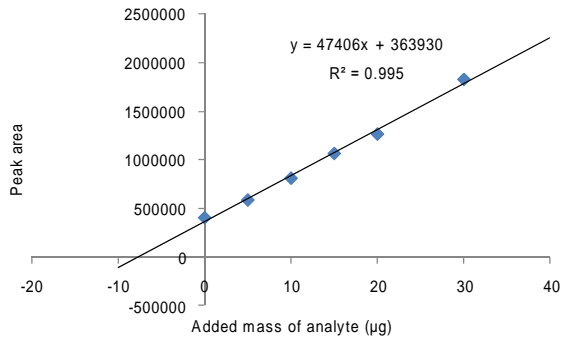
### Atrazine



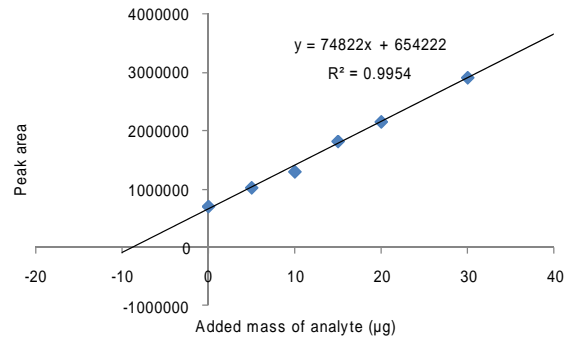
### Azaconazole



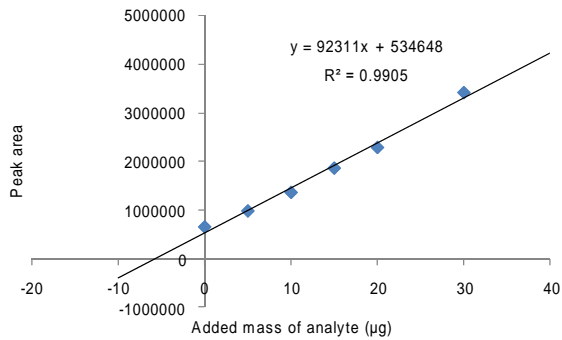
### Azoxystrobin



### γ-BHC



### Chlorpyrifos



### Cypermethrin

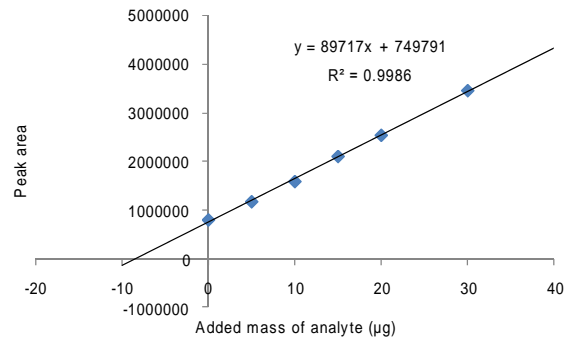
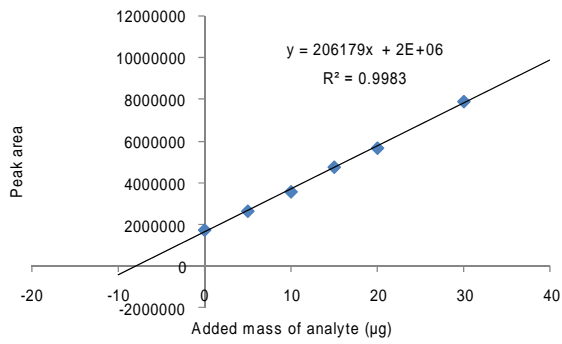
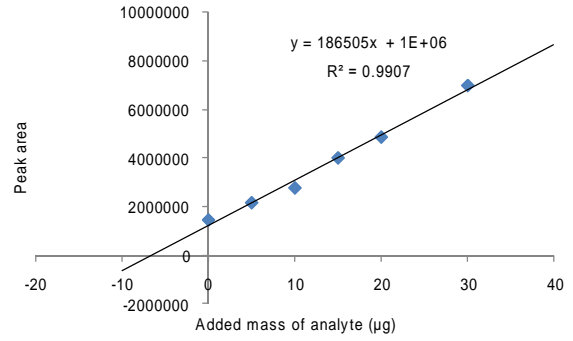


図1 標準添加法での検量線(初期濃度 10 ng/mL、大豆)

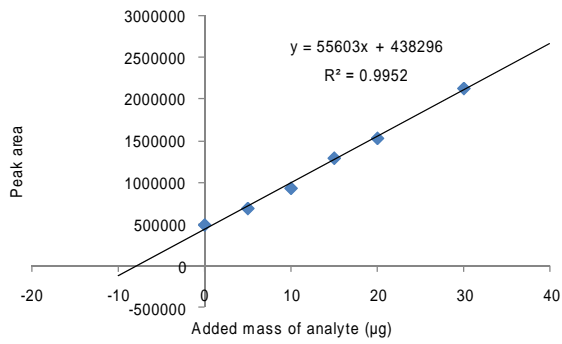
### Cyproconazole



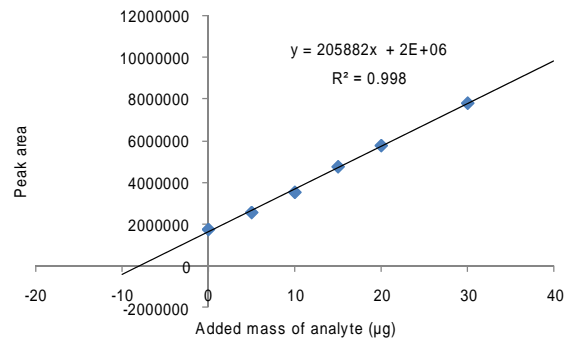
### p,p'-DDT



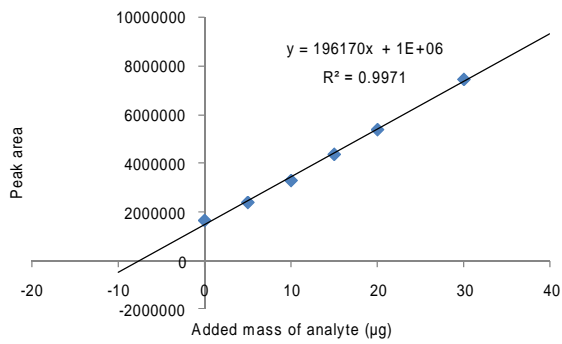
### EPN



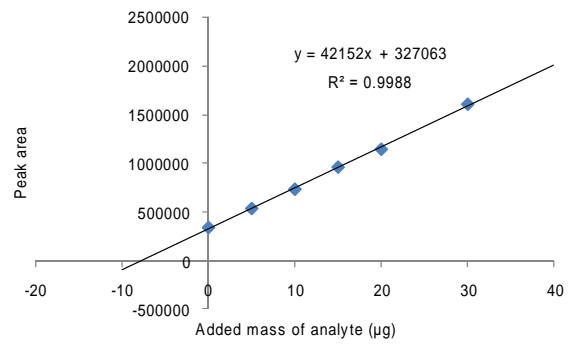
### Epoxiconazole



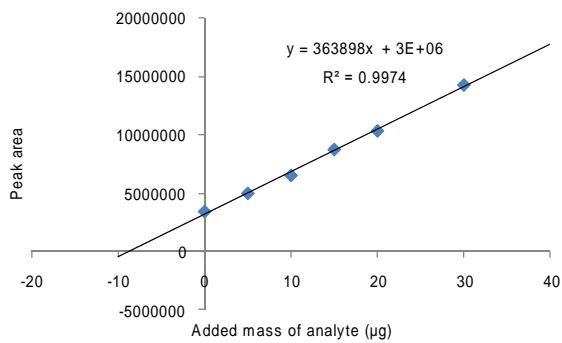
### Ethion



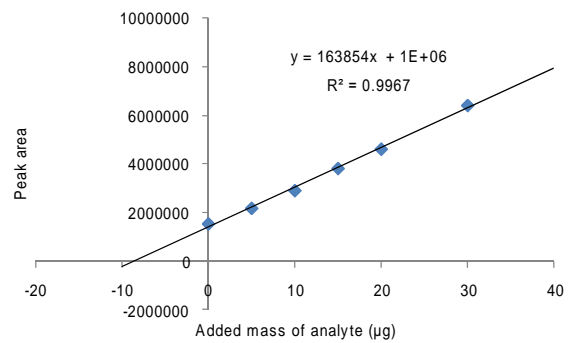
### Fluvalinate



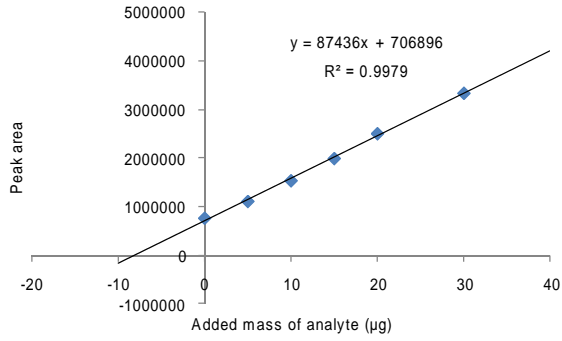
### Isoprocarb



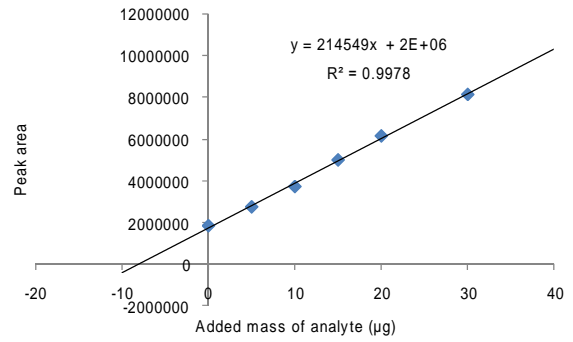
### Lenacil



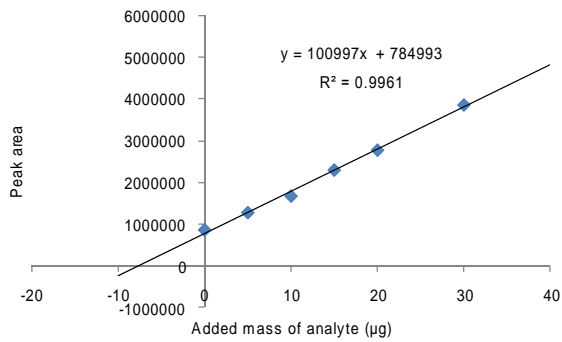
### Malathion



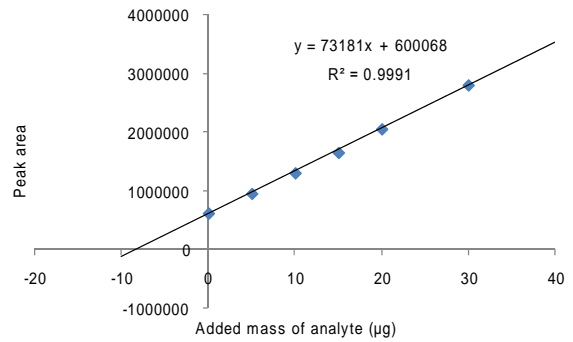
### Myclobutanil



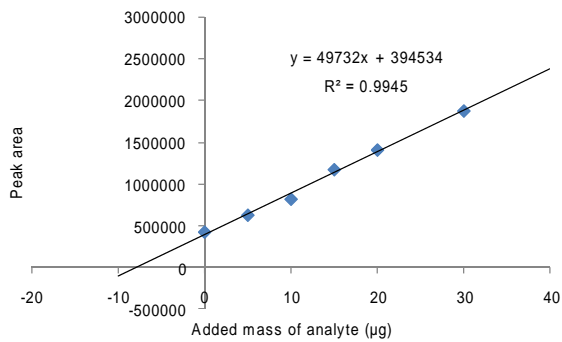
### Propoxur



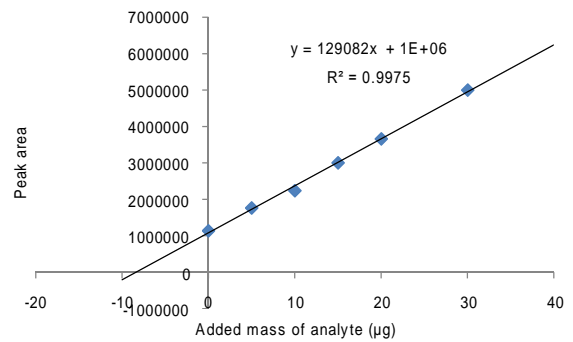
### Simeconazole



### Thiobencarb



### Tri-allate



### Trifloxystrobin

