

図 27 機関 f のえだまめの定量結果

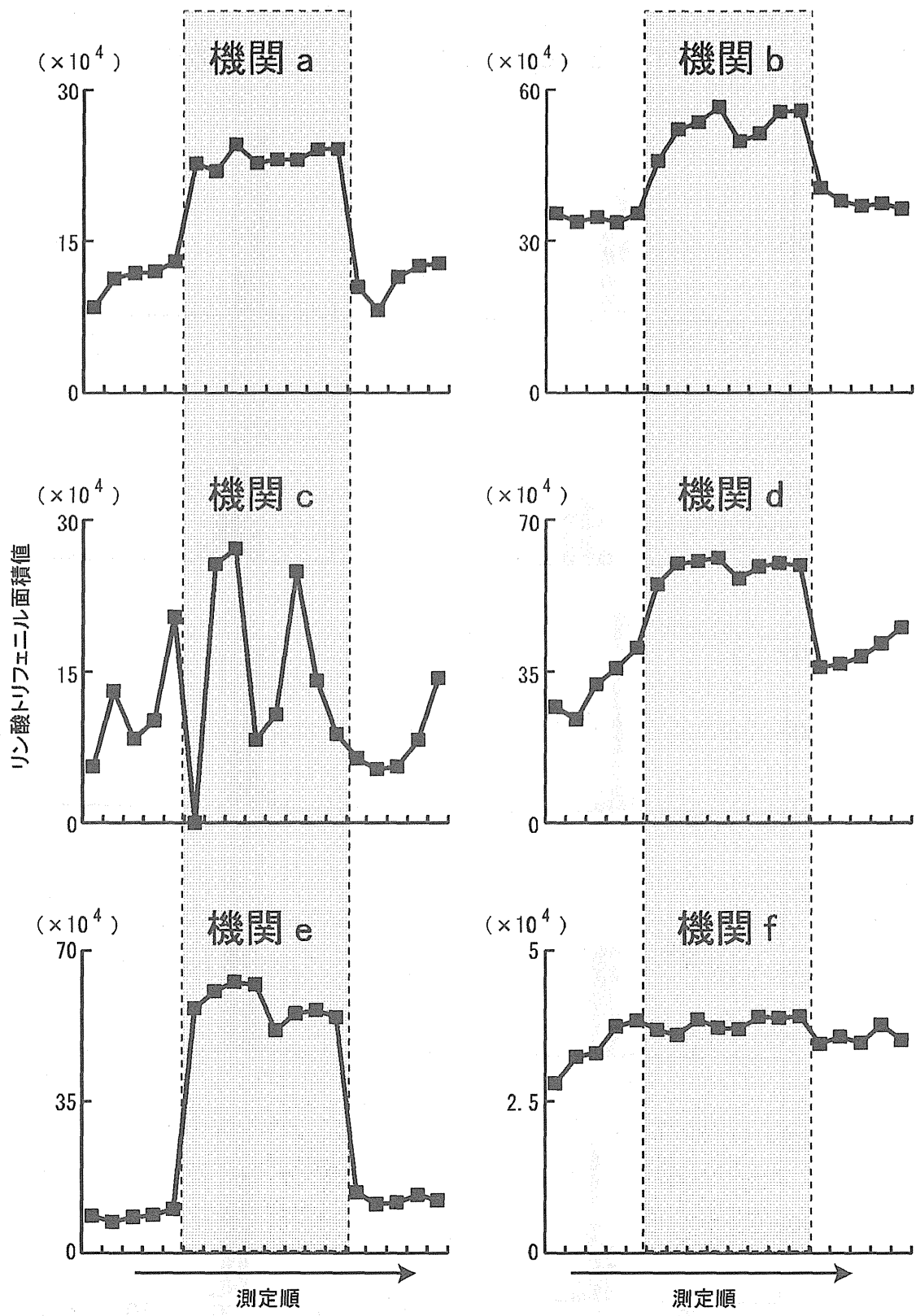


図 28 検量線 B 測定時のリン酸トリフェニルの面積値の推移
 (点線枠内のみ試料サンプル、その他は溶媒標準溶液)

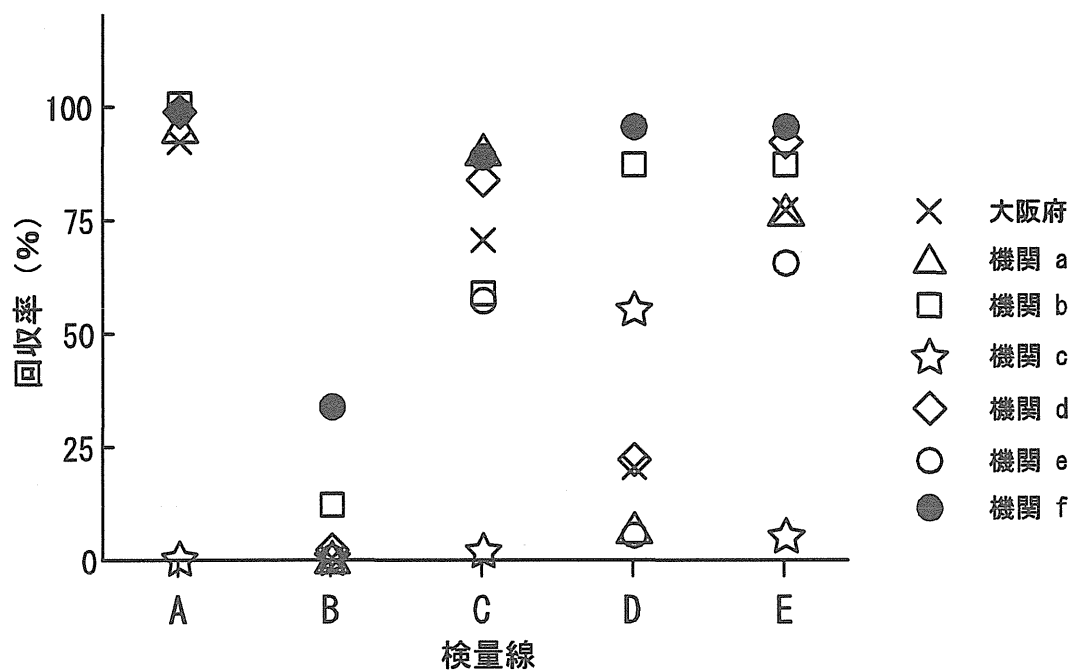


図 29 回収率 100±10%を示す農薬の割合
えだまめ (IS 補正なし)

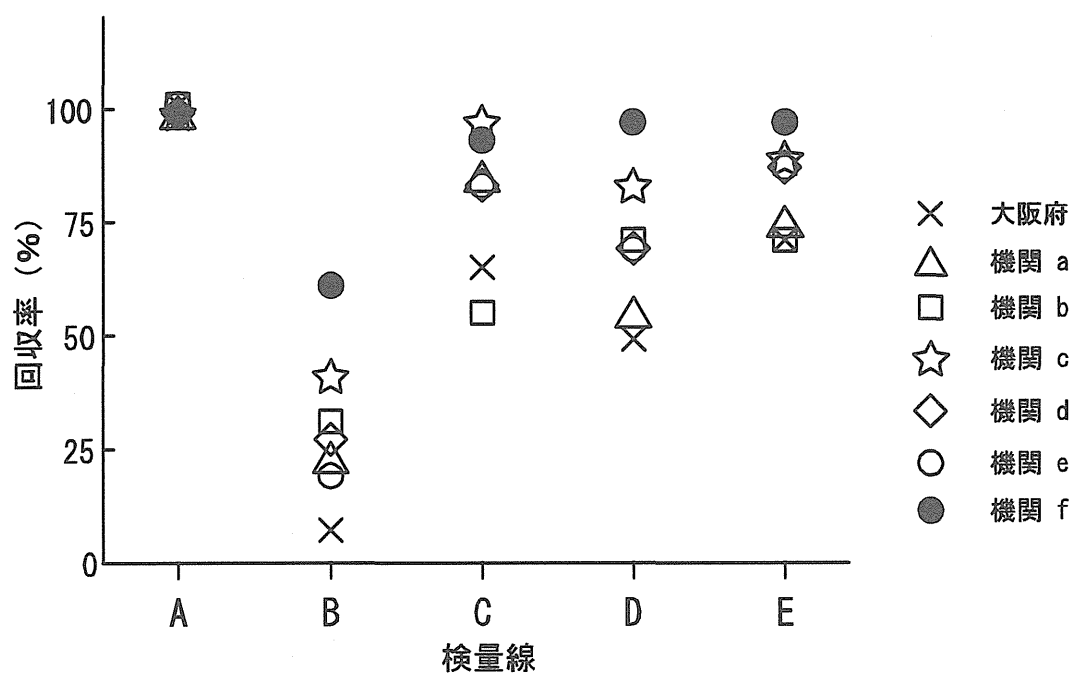


図 30 回収率 100±10%を示す農薬の割合
えだまめ (IS 補正あり)

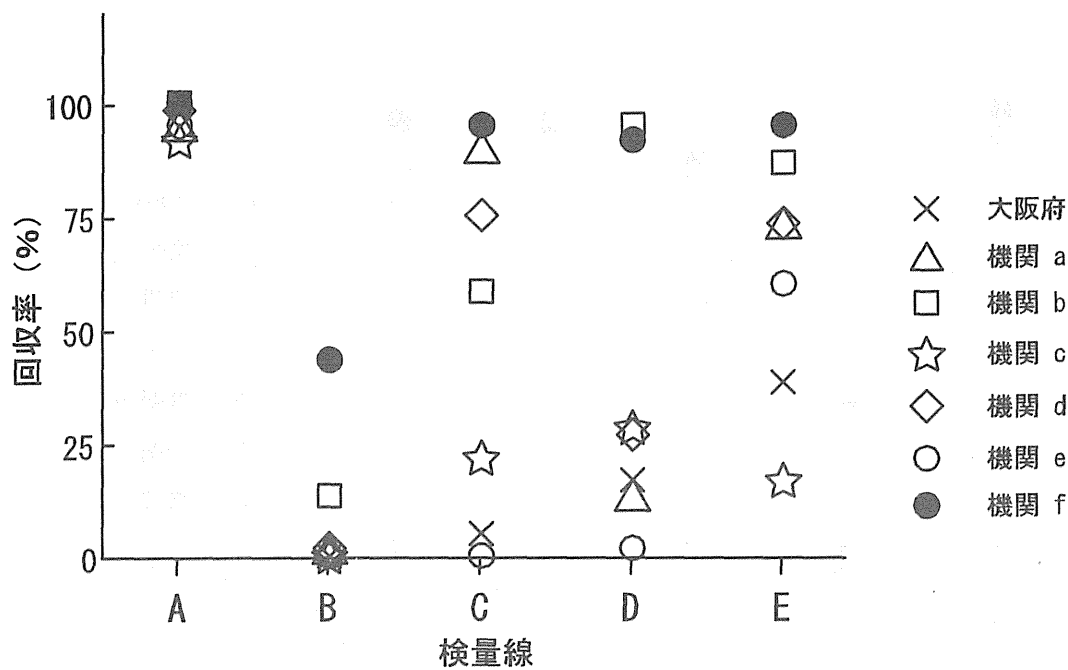


図 31 回収率 100±10%を示す農薬の割合
ほうれん草 (IS 補正なし)

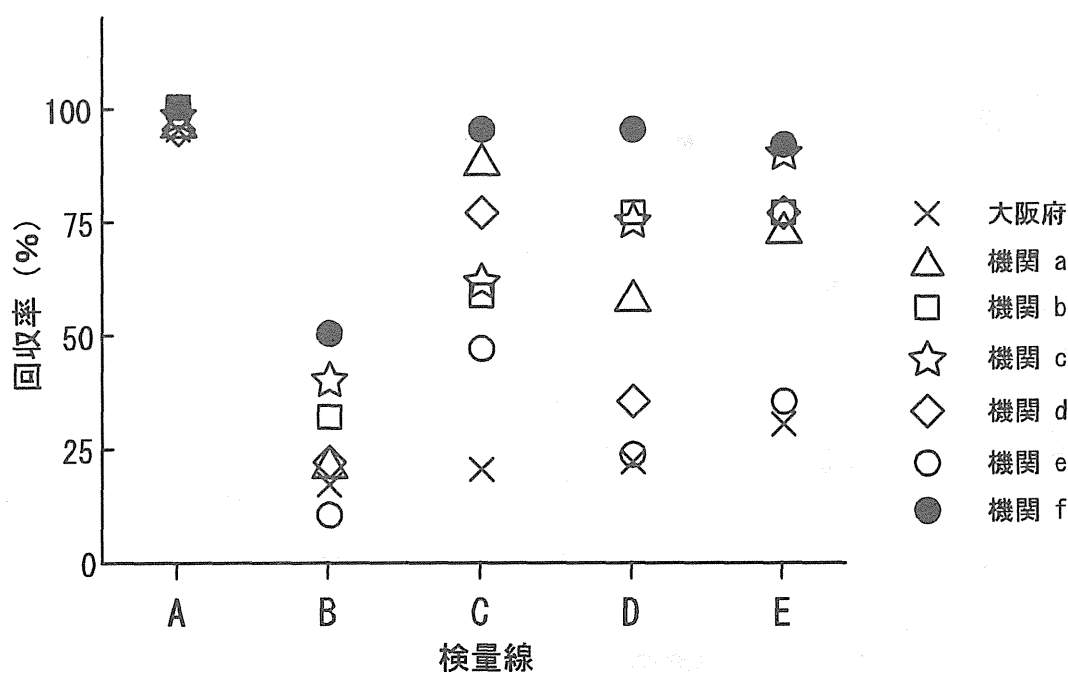


図 32 回収率 100±10%を示す農薬の割合
ほうれん草 (IS 補正あり)

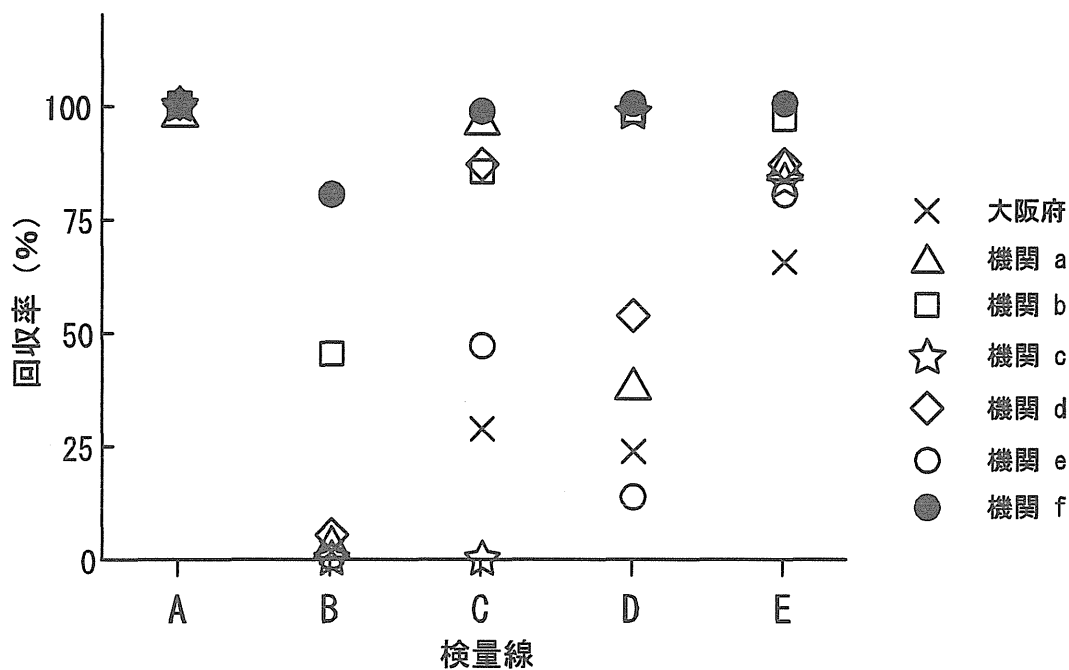


図 33 回収率 100±20%を示す農薬の割合
ほうれん草 (IS 補正なし)

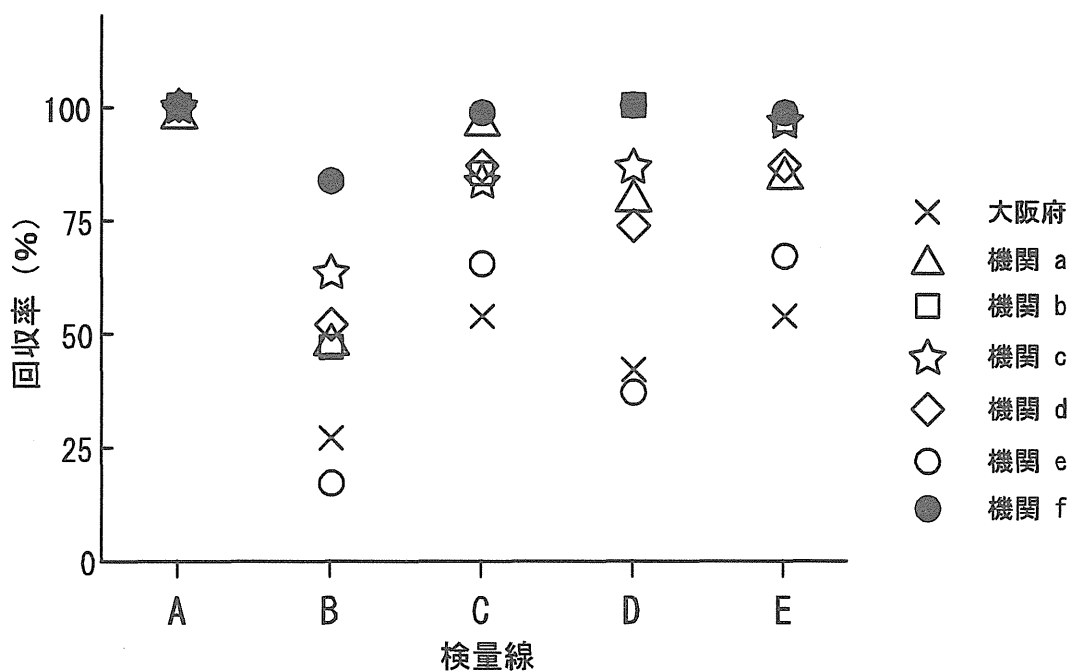


図 34 回収率 100±20%を示す農薬の割合
ほうれん草 (IS 補正あり)

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 26 年度 分担研究報告書

食品中に残留するマイコトキシン分析に係る精度管理体制の
構築に関する研究

分担研究者 齊藤 貢一

検査機関の信頼性確保に関する研究

分担研究報告書

食品中に残留するマイコトキシン分析に関する精度管理体制の構築に関する研究：固相分散抽出法および固相蛍光誘導体化法を用いた HPLC による食品中アフラトキシンの微量分析とその精度管理

主任研究者 渡辺 卓穂 (一財) 食品薬品安全センター
分担研究者 斉藤 貢一 星薬科大学 薬品分析化学教室

研究要旨

食品中アフラトキシン (AFs) の微量分析に際して、従来法では操作が煩雑であることや実験者への AFs の曝露が危惧されるといった問題点があった。そこで本研究では、前処理法として固相分散抽出 (SPDE) 法および固相蛍光誘導体化法を併用することで、クリーンアップ中に蛍光誘導体化を行うことが可能となり、操作の簡便化かつ迅速化を達成することができた。また、構築した方法は、従来法に比べて閉鎖性の高い実験手法で行えることから、実験者への AFs の曝露が低減された。更に、実試料を用いて添加回収試験を行ったところ、75~84%の回収率が得られ、併行精度および室内精度は共に 5%前後と高い再現性が得られた。また、いずれの試料においても AFs の検出限界 (MDL) は 0.14~0.29 ng/g であり、夾雑物による妨害ピークが少ない良好なクロマトグラムが得られた。構築した AFs の微量分析法を、東京都内で市販されている、とうもろこし、落花生、白コショウおよび黒コショウの分析に適用して実態調査を行ったところ、いずれの試料においても AFs は検出限界以下であった。しかし、AFs に関しては現在でも輸入食品から微量ながら検出される事例が続いていることから、今後も実態調査を続けていく必要があると考えられる。

A. 研究目的

近年、日本では食料自給率の低下に伴い、60%以上の食料を海外からの輸入に頼っている。そのため、輸入時の流通過程や保管時の品質管理が不十分な場合、食品の変質やカビの発生などが懸念される。カビの中にはコウジカビやアオカビなど発酵食品の製造に必要とされる有益なものもあるが、

他方、カビ自体が病気やアレルギーの原因となるものや、ガンや肝障害など疾病の原因になるマイコトキシンを産生する有害なカビもある。マイコトキシンの一種であるアフラトキシン (AFs) は、*Aspergillus* 属が産生するカビ毒で、主に AFB₁、AFB₂、AFG₁ および AFG₂ などがある。実際、外国産とうもろこし、落花生および香辛料などの輸入

食品から AFs が検出される事例が報告されている。AFs の毒性としては、肝機能障害や肝細胞ガン、遺伝毒性などが挙げられ、特に AFB₁ は、天然物質中で最も強い発ガン性物質とも言われている。そのため、日本では全食品に対して、総 AFs (AFB₁、AFB₂、AFG₁ および AFG₂) で 10 µg/kg 以下に規制されている。しかし、食品中に残留する AFs が微量でも、発ガンのリスクは無視できないことから、規制値付近あるいはその濃度以下で AFs が残留している食品をモニタリングするためにも、簡便・迅速且つ精度の高い、食品中 AFs の微量分析法が必要とされている。

従来の AFs の分析法としては、試料中の AFs を有機溶媒抽出後、シリカゲルカラム、多機能カラム (逆相系樹脂、陰イオン交換樹脂および陽イオン交換樹脂の混合物を充填したもの)、またはイムノアフィニティーカラムを用いてクリーンアップし、更に AFs をトリフルオロ酢酸 (TFA) を用いて蛍光誘導体に変換した後、HPLC-FL (蛍光検出) 法により測定する方法が行われてきた。しかしこの方法では、抽出操作が煩雑であること、誘導体化の際に時間を要してしまうこと、また実験者への AFs の曝露が危惧されるといった問題がある。

そこで本研究では、これらの問題を解決するために、前処理法として、イムノアフィニティーゲルを用いた固相分散抽出 (SPDE) 法および固相蛍光誘導体化法を併用した分析法の構築を検討した。また、構築した AFs の微量分析法を、検出事例の多い、とうもろこしと落花生に、また夾雑物が多い白コショウおよび黒コショウの分析に適用した。

B. 研究方法

(1) 抽出操作

試料には、東京都内で市販されているとうもろこし (アメリカ産およびフランス産)、落花生 (中国産および日本産)、白コショウ (インドネシア産、スリランカ産およびマレーシア産) および黒コショウ (インド産、スリランカ産およびマレーシア産) を用いた。

ハンドミキサーにより粉碎均一化した試料 2.5 g を 50 mL 容のポリプロピレン製遠沈管に取り、これに塩化ナトリウム 0.25 g と精製水およびメタノール (1:4) 混液 10 mL を加え、30 分間振とう機を用いて振とう抽出した。抽出溶液を桐山ロートで吸引ろ過し、ろ液 5 mL を量り採り、7% TritonX 水溶液 (とうもろこしおよび落花生は PBS) を加えて正確に 25 mL とした。十分混合した後、遠心分離 (5000×g、5 分間) し、上清 10 mL を試料抽出液とした。

(2) SPDE 法によるクリーンアップ

固相抽出用ゲル (以下、固相と略) を調製するため、予め、カートリッジからイムノアフィニティーゲルを全量取り出し、PBS 1 mL に懸濁させた。この懸濁液を「(1) 抽出操作」で作製した抽出液 10 mL が入った 15 mL の遠沈管に添加した。試料中に固相を分散させるためにボルテックスミキサーにより 30 秒間攪拌させた後、遠心分離 (2500×g、20 秒間) を行い、固相と液相を分離させた (図 1)。次にマイクロピペットにより液相を取り除き、洗浄液として PBS 6 mL を加えて固相を再度分散させ、同様の操作を行った。その後、精製水 6 mL を加え、同様の手順で固相を再度洗浄後、液相を 1 mL 程

度残して除去した。

(3) 固相蛍光誘導体化

予め遠心ろ過フィルター「@ろ過™」の上部にキャップ付きチューブ「キャップチューブ™」を、下部に2.0 mL容のマイクロチューブを装着した(図2)。

固相蛍光誘導体化法の操作方法は、「(2) SPDE法によるクリーンアップ」で調製した固相の懸濁液をマイクロピペットを用いてキャップチューブ™に移動させた。固相内の水分を除去するために、遠心分離(2500×g、20秒間)を行い、TFA 100 μLを添加後、ボルテックスミキサーで30秒間攪拌し、10分間暗所で放置した。その後、遠心分離(2500×g、20秒間)を行い、溶出液として精製水 900 μLで固相を分散させ同様に遠心分離後、先の溶出液(TFA 100 μL)と合わせ、その50 μLをHPLC-FLで測定した。

(4) AFs測定(HPLC-FL)

HPLCには、日立社製L-6300 Intelligent Pumpを、検出器には島津製作所製RF-10A_{XL}を用い、励起波長は365nm、蛍光波長は450nmとした。カラムには、化学物質評価研究機構製L-column2 ODS(250 mm×4.6 mm i.d., 5 μm)を用い、移動相にはアセトニトリル/メタノール/水=(1:3:6)を用いた。カラム温度は40℃、移動相流速は0.5 mL/min、試料注入量は50 μLとした。

(5) 精度管理試験(分析法バリデーション)

真度、併行精度および室内再現精度など分析法バリデーションのために、市販のとうもろこし、落花生、白コショウおよび黒コショウを対象として添加回収試験を行った。抽出・クリーンアップおよび蛍光誘導体化操作は上記(1)~(3)に準じて行なった。AFs添加濃度は1.0 ng/gとし、一日に3回

測定を繰り返し、これを5日間行って得られたデータを一元配置分散分析法で統計解析した。

C. D. 研究結果および考察

(1) 抽出・クリーンアップ・誘導体化法

クリーンアップとして本研究で検討したSPDE法とは、固相を試料液中に分散させ、クリーンアップを行う方法である。また、固相蛍光誘導体化法とは、固相にAFsが保持されている状態で固相を反応媒体として蛍光誘導体化を行う方法である。SPDE法および固相蛍光誘導体化法を併用するために、固相の種類および固相蛍光誘導体化の至適条件(反応時間、TFAの添加量および溶出液)を併せて検討した。まず、固相の種類についてはOasis® HLB、多機能カラムおよびイムノアフィニティーゲル(厚生労働省の公定検査法で推奨されている市販製品4種類)を用いて比較検討した。その結果、最も高いクリーンアップ効果および良好な回収率が得られ、且つ有機溶媒耐性に優れたイムノアフィニティーゲル(AFLAKING)を採用した。

なお、多機能カラムについては、夾雑物を固相に保持させ、目的物質を素通りさせるクリーンアップ法のため、誘導体化のために窒素気流下での溶媒除去が必要となり、実験者へのAFs曝露が危惧されることが考えられた。更に、この手法では、後述する固相に目的物質を保持させた状態で誘導体化する固相蛍光誘導体化法には適さなかった。

(2) 固相蛍光誘導体化

従来のTFAによるプレカラム蛍光誘導体化法では、試料抽出液をイムノアフィニテ

ィーカラムでクリーンアップした後に、溶出液を窒素気流下で溶媒除去する必要があるため、誘導体化の際に時間を要してしまうことや、クリーンアップ操作と同様に実験者への AFs 曝露が危惧されるといった問題点がある。このような問題点を克服する方法として固相誘導体化法が知られている。これは、固相に目的物質が保持されている状態で固相を反応媒体として誘導体化を行う方法である。この方法は、誘導体化にかかる時間が液相中で反応させた場合よりも固相中で反応させた場合の方が短くなることや、固相中で反応させた場合には、窒素気流下で溶媒除去する操作を省くことができるため、操作時間を短縮することができるといった利点がある。そこで本研究では、AFs を固相に保持させた状態で蛍光誘導体化する固相蛍光誘導体化法を採用し、その至適条件を検討した。

固相蛍光誘導体化の至適条件については、固相に TFA 100 μ L を添加し、反応時間を 0~15 分の範囲で検討した。その結果、5 分以内ではバラツキが大きかったため反応時間 10 分を採用した。TFA の添加量については 25~200 μ L の範囲で検討した結果、50 μ L 以下では固相全体に TFA を完全に浸透させることが困難だったが、100 μ L 以上で回収率はプラトーに達したため、100 μ L を採用した。溶出液については、従来のイムノアフィニティーゲルではアセトニトリルが汎用されているが、固相蛍光誘導体化後の溶出には精製水もしくは 25%以下の低いアセトニトリル濃度において高い回収率が得られたため、精製水を採用した。

(3) 分析法バリデーション

分析法バリデーションの概要を表 1 に示

す。AFs の検出限界 (LOD, S/N = 3) および定量限界 (LOQ, S/N > 10) はそれぞれ 0.06~0.11 ng/mL および 0.21~0.36 ng/mL であり、検量線を作成したところ、各 LOQ~10 ng/mL の範囲で良好な直線性が得られた。

本法の食品への適用性を評価するため、規制値よりも低い濃度 (1.0 ng/g) における添加回収試験を行った。その結果、とうもろこしでは約 80%、落花生、白コショウおよび黒コショウでは約 75%の回収率と、残留試験法としては十分に高い回収率が得られた。また、併行精度および室内精度は共に 5%前後と高い再現性が得られた (表 2)。

更に、方法検出限界 (MDL, S/N = 3) および方法定量限界 (MQL, S/N > 10) を算出したところ、いずれの試料においても AFs の MDL は 0.14~0.29 ng/g、MQL は 0.50~0.96 ng/g であった。

(4) クリーンアップ効果の比較

従来の食品中 AFs の微量分析において、穀類や豆類などのクリーンアップには多機能カラムが用いられてきた。そこで、多機能カラムを用いたクリーンアップ法と本法のイムノアフィニティーゲルを用いた SPDE 法によるクリーンアップ効果を比較検討した。試料には、油分が多く、夾雑物の除去が困難な落花生を用いた。多機能カラムには昭和電工社製 Autoprep MF-A1000 を用い、その操作は公定検査法に基づいて行った。その後、TFA を用いて蛍光誘導体化し、HPLC-FL で測定した。その結果、多機能カラムによるクリーンアップでは夾雑物由来の妨害ピークが AFB₁、AFB₂ および AFG₁ のピークと重なってしまい、定量が困難であった。他方、イムノアフィニティーゲルを用いた SPDE 法では、従来法と比較して夾雑物の影

響が少ない良好なクロマトグラムが得られた(図3)。

(5) 操作性(操作時間)の評価

従来、香辛料中 AFs の分析は、多機能カラムでは夾雑物を十分に除去できないため、イムノアフィニティーカラムを用いた固相抽出法によりクリーンアップした後、溶出液を窒素気流下で溶媒除去し、蛍光誘導体化が行われている。そこで、従来法(公定検査法)と、本研究で構築した SPDE 法と固相蛍光誘導体化法を併用した方法において、それぞれの操作性(操作時間)を比較検討した。試料には白コショウを用いた。その結果、従来法の操作では、クリーンアップ操作に 40 分、窒素乾固に 60 分、誘導体化に 20 分、合計で 120 分を要した。他方、SPDE 法と固相蛍光誘導体化法を併用した方法では、クリーンアップ操作に 30 分、誘導体化に 15 分、合計 45 分で操作を完了することができ、従来法に比べて 1 時間以上(75 分)も短縮することができたことから、構築した方法の操作性が優れていることを確認した。

(6) 実態調査

構築した前処理法を用いて、とうもろこし(アメリカ産 2 製品、フランス産 1 製品)、落花生(中国産 2 製品、日本産 1 製品)、白コショウ(インドネシア産 1 製品、スリランカ産 1 製品、マレーシア産 1 製品)および黒コショウ(インド産 1 製品、スリランカ産 1 製品、マレーシア産 1 製品)を対象として実態調査を行った。その結果、いずれの試料においても AFs は検出限界(0.14~0.29 ng/g)以下であった。しかし、AFs については、現在でも輸入食品からの検出事例が続いていることから、今後も実態調

査を続け、食品の安全性を確保する必要があると考えられる。

以上の結果から、本法は規制値(総 AFs で 10 ng/g (各濃度で 2.5 ng/g) 以下)より低濃度においても測定可能であることから、穀類、豆類および香辛料など様々な食品への適用が可能であると推察された。

E. 結論

食品中 AFs の分析に関して、従来の公定検査法では操作が煩雑であること、実験者への AFs の曝露が危惧されること、食品の種類によって夾雑物の種類や量が異なることから、前処理法を使い分けなければならないといった問題点があった。そこでこれらの問題点を克服するために、食品中 AFs の前処理法としてイムノアフィニティーゲルを用いた SPDE 法および固相蛍光誘導体化法を構築し、とうもろこし、落花生、白コショウおよび黒コショウへの適用性を評価した。

その結果、本法ではクリーンアップ中に蛍光誘導体化を行うことが可能となった。これにより、誘導体化の際に必要な窒素乾固の操作が不要となり、分析法の簡便化に繋がった。更に、本法では実験者への AFs の曝露が低減され、実用性の高い AFs の微量分析法を構築することができた。

以上の結果から、本法は従来法の様々な問題点を克服し、食品中 AFs の微量分析に有用であることが示唆された。本法は、マイコキシン汚染が懸念される様々な食品への対応が可能であり、食品衛生分野での貢献が期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

信本早耶、岩崎雄介、伊藤里恵、斉藤貢一；イムノアフィニティーゲルを用いた固相分散抽出法および固相蛍光誘導体化HPLC法による香辛料中アフラトキシンの残留分析；第57回日本薬学会関東支部大会（2013年10月）

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

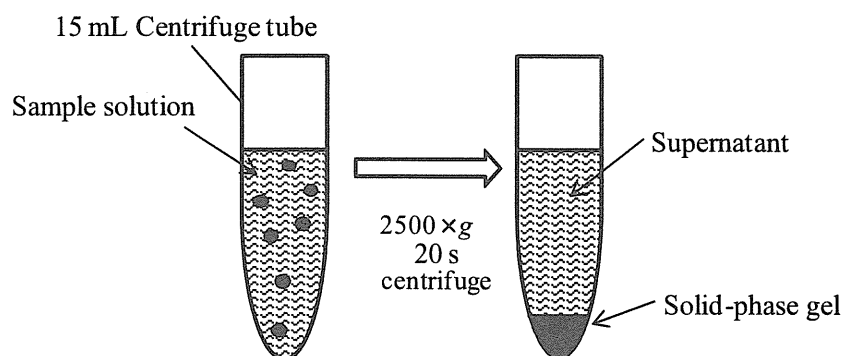


図 1 SPDE 操作 (15mL 遠沈管を使用)

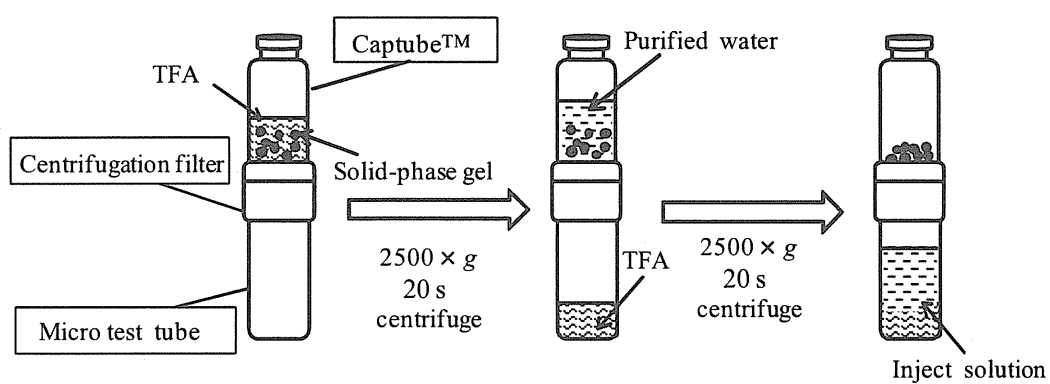


図 2 固相蛍光誘導体化の操作 (SPDE 器具を使用)

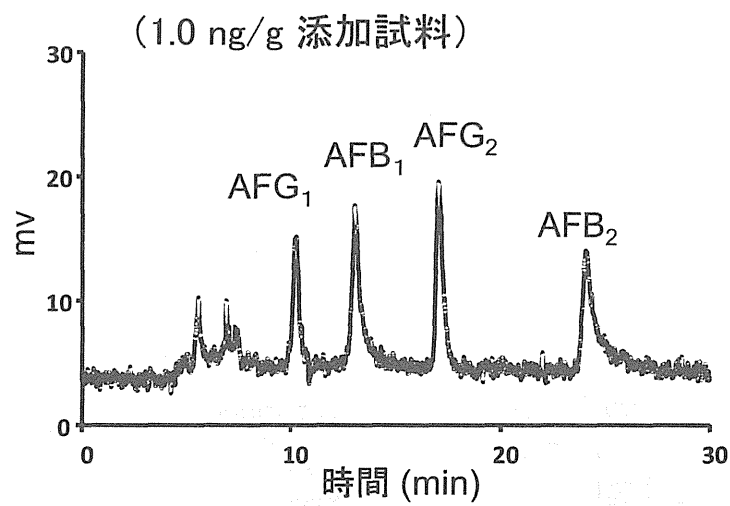
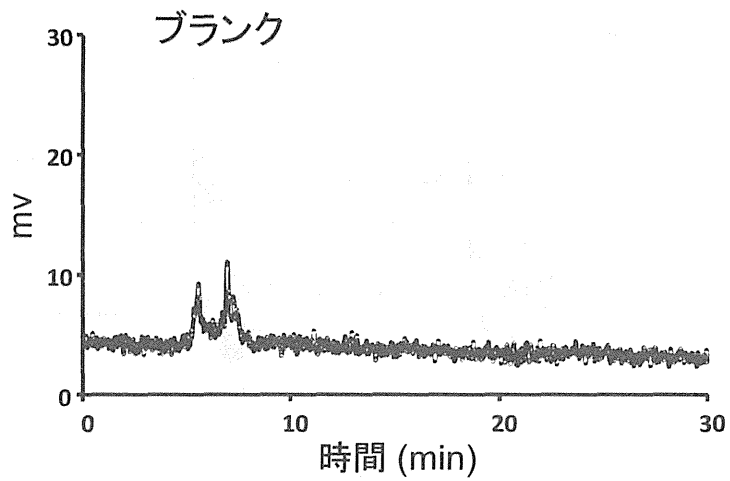


図3 HPLC-FL クロマトグラム (ブランクおよび標準品添加試料)

表1 分析法バリデーション結果 (検出限界、定量限界、直線性)

	LOD* (ng/mL)	LOQ** (ng/mL)	Linear range (ng/mL)	Correlation coefficient (<i>r</i>)
AFG ₁	0.08	0.28	0.28~10	0.999
AFB ₁	0.08	0.26	0.26~10	0.999
AFG ₂	0.06	0.21	0.21~10	0.999
AFB ₂	0.11	0.36	0.36~10	0.999

*LOD: Limit of detection (S/N = 3) **LOQ: Limit of quantification (S/N > 10)

表2 精度管理実験結果

試料	添加量 (ng/g)	回収率 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
とうもろこし	1.0	79.0~80.0	3.2~5.4	3.5~5.7
落花生	1.0	75.4~84.0	3.3~5.4	3.4~5.0
白コショウ	1.0	75.8~80.0	3.6~5.7	5.0~6.6
黒コショウ	1.0	75.2~78.4	2.5~4.0	3.9~5.0

(n = 3 × 5日間)

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 26 年度 分担研究報告書

同位体希釈質量分析法による残留農薬の

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

同位体希釈質量分析法による残留農薬の高信頼性分析に関する研究

主任研究者	渡辺 卓穂	(財) 食品薬品安全センター 秦野研究所 部長
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農薬の精確な分析法を確立し、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。

平成 25 年度外部精度管理調査試料の基材であるとうもろこしペーストを用いて、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）を前処理法とした IDMS におけるマトリックス効果の影響を検討した。その結果、分析対象農薬の多くにおいて、IDMS の検量線（傾き）が試料中のマトリックスの有無に影響されることが示された。また、IDMS では分析対象農薬の標識体（分子内の一部水素を重水素で置換したもの）を内標準に用いるが、この標識体が分析対象農薬よりも、より強くマトリックス効果の影響を受けることも示された。そのため、IDMS による高信頼性分析においては、マトリックスマッチング法の適用が有効であった。

そこで、マトリックスマッチング法を適用した IDMS によって、平成 26 年度外部精度管理調査試料を分析した。分析対象農薬であるクロルピリホスと EPN の両方について、本法による定量値は調査試料の調製濃度と一致していた。また、定量値の不確かさは、参加機関間の報告値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、マトリックスマッチングを適用した IDMS は、外部精度管理調査試料中の分析対象農薬の精確な分析に有効な方法であることが示された。

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多くの技能試験では、付与値として参加機関の分析結果から算出した合意値を採用し、この値を基準と

して各参加機関の技能評価を行う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) 分析を行うことができる方法である。そこで本研究では、同調査の信頼性をより向上させることを目的として、IDMS による食品中農薬の高信頼性分析を検討した。具体的には、IDMS における食品由来のマトリックス効果を検証するとともに、高精確化した IDMS を、平成 26 年度外部精度管理調査 (残留農薬検査 I) の調査試料分析に適用し、その妥当性を評価した。

B. 研究方法

(1) マトリックス効果の検証

IDMS におけるマトリックス効果を検証するために、マトリックスの有無別の検量線溶液を用いて検量線を作成し、その差異を検討した。その際、平成 25 年度外部精度管理調査試料 (残留農薬検査 I) の基材であったとうもろこしペーストを、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) に準拠して処理した前処理液を、マトリックスとして用いた。

(2) 外部精度管理調査試料の分析

前述の一斉試験法と、同通知における個別試験法をベースとした IDMS によって、平成 26 年度に実施した残留農薬検

査 I の調査試料 (かぼちゃペースト) 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

とうもろこしペースト、平成 26 年度外部精度管理調査 (残留農薬検査 I) の調査試料 (かぼちゃサンプル)、及びその基材であるかぼちゃペーストは、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、EPN、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- d_{10} 、フェニトロチオン- d_6 、クロルピリホス- d_{10} 、イソプロチオラン- d_4 、イソキサチオン- d_{10} 、エトフェンプロックス- d_5 、EPN- d_5 、および CDN Isotopes 製マラチオン- d_6 、シマジン- d_6 、チオベンカルブ- d_{10} を用いた。シリン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 (AN)、アセトン (Ac)、トルエン (Tol)、酢酸エチル (EA)、ヘキサン (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. 検量線溶液、内標準溶液、シリンジスパイク溶液

質量比混合法によって以下の溶液を調製した。

(1) マトリックス効果の検証用

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 62.5 mg/kg となるように Ac に希釈した。また、各標識体を 6.25 mg/kg となるように Ac に希釈した。両溶液と Ac を混合し、6種類の検量線溶液（マトリックス無、以下 MF 検量線溶液 A）を調製した。検量線溶液中の分析対象農薬の濃度は 0.25～6.25 mg/kg、各標識体の濃度は 1.25 mg/kg とした。

あらかじめ分析対象農薬とその標識体を含有しないことを確認したもろこしペーストを、3(1)に示す前処理法によって処理した。得られたブランク溶液を窒素気流で乾固し、MF 検量線溶液 A に溶解させることにより、マトリックスマッチングした検量線溶液（以下 MM 検量線溶液 A）を調製した。

(2) 外部精度管理調査試料の分析用

3.153 mg/kg の EPN- d_5 、0.5018 mg/kg のクロルピリホス- d_{10} を含む Ac 溶液を調製し、内標準溶液とした。また、Ac 中に 61.08 mg/kg を含むアラクロール溶液を調製し、さらにこの一部を Ac に希釈して 1.593 mg/kg としたシリンジスパイク溶液を調製した。次に、12.39 mg/kg の EPN、2.112 mg/kg のクロルピリホスを含む Ac 溶液（農薬混合溶液）を調製し、これと内標準溶液、アラクロール溶液、Ac を混合し、0.7846 mg/kg

の EPN、0.1338 mg/kg のクロルピリホス、0.8894 mg/kg の EPN- d_5 、0.1441 mg/kg のクロルピリホス- d_{10} 、1.520 mg/kg のアラクロールを含む混合溶液を調製した。

あらかじめ分析対象農薬とその標識体を含有しないことを確認したかぼちゃペーストを、3(1)に示す前処理法によって処理した。得られたブランク溶液を窒素気流で乾固し、前述の混合溶液に溶解させることにより、マトリックスマッチングした検量線溶液 B を調製した。

3. 分析方法

とうもろこしペーストの前処理及び測定と、外部精度管理調査試料の分析には分析法 1 を適用した。また、外部精度管理調査試料の分析は分析法 2 によっても行った。詳細を以下に記す。

(1) 分析法 1

とうもろこしペースト 5 g に水 20 mL を加え 15 分間放置した。また、外部精度管理調査試料 5 g に内標準溶液 0.5 mL を加えて静置した。これらに AN50 mL を加えて細砕した後、吸引ろ過した。ろ紙上の残留物に AN20 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 10 g と 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。その後とうもろこしペーストの抽出物には、あらかじめ AN10 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 AN2 mL を通液する処理を行った。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を加えて再度 1 mL以下に濃縮し、Ac 5 mLを加えた後に溶媒を除去した。とうもろこしペーストの処理液においては、残留物をAc 1 mLに溶解し、ブランク溶液とした。一方、外部精度管理調査試料においては、残留物をシリンジスパイク溶液 0.8 mLに溶解し、試料溶液とした。

得られた溶液中の分析対象農薬をGC/MSによって測定した。測定条件は以下の通り。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 μ L、イオン化条件：EI、定量に用いた m/z：169 (EPN)、174 (EPN- d_5)、201 (シマジン)、211 (シマジン- d_6)、304 (ダイアジノン)、314 (ダイアジノン- d_{10})、277 (フェニトロチオン)、283 (フェニトロチオン- d_6)、158 (マラチオン)、164 (マラチオン- d_6)、314 (クロルピリホス)、324 (クロルピリホス- d_{10})、257

(チオベンカルブ)、267 (チオベンカルブ- d_{10})、290 (イソプロチオラン)、294 (イソプロチオラン- d_4)、313 (イソキサチオン)、323 (イソキサチオン- d_{10})、163 (エトフェンプロックス)、168 (エトフェンプロックス- d_6)、160 (アラクロール)

(2) 分析法 2

試料 5 gに内標準溶液 0.5 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、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・乾固した後にシリンジスパイク溶液 1 mLに溶解し、試料溶液とした。

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。測定条件は以下の通り。装置：6890/5973 GC/MS システム (Agilent Technologies 製)、カラム：DB-35MS (Agilent Technologies