

表 3 $PA_{Mstd}/PA_{Sstd} \times 100$ 値

- (a) 検討対象農薬等(本体)・LC 条件①、(b) 検討対象農薬等(本体)・LC 条件②、
 (c) d 標識体・LC 条件①、(d) d 標識体・LC 条件②、
 (e) ^{13}C 標識体・LC 条件①、(f) ^{13}C 標識体・LC 条件②

(a)

	ピーク面積比×100			
	牛の脂肪	牛乳	牛の肝臓	はちみつ
SDZ	97	116	94	41
SMZ	100	104	86	46
TBZ	107	108	86	64
TMP	114	108	107	79

(b)

	ピーク面積比×100			
	牛の脂肪	牛乳	牛の肝臓	はちみつ
SDZ	93	102	84	32
SMZ	94	104	76	41
TBZ	103	96	70	44
TMP	93	99	56	45

(c)

	ピーク面積比×100			
	牛の脂肪	牛乳	牛の肝臓	はちみつ
SDZ- d_4	96	135	94	42
SMZ- d_4	100	106	86	46
TBZ- d_6	107	107	86	63
TMP- d_3	107	97	99	64
TMP- d_9	109	78	106	52

表 3 $PA_{Mstd}/PA_{Sstd} \times 100$ 値 (続き)

(d)

	ピーク面積比 × 100			
	牛の脂肪	牛乳	牛の肝臓	はちみつ
SDZ- d_4	91	99	82	29
SMZ- d_4	96	103	72	37
TBZ- d_6	104	90	72	44
TMP- d_3	105	92	83	72
TMP- d_9	101	59	66	48

(e)

	ピーク面積比 × 100			
	牛の脂肪	牛乳	牛の肝臓	はちみつ
SDZ- $^{13}C_6$	94	115	91	34
SMZ- $^{13}C_6$	95	104	80	41
TBZ- $^{13}C_6$	102	105	87	64
TMP- $^{13}C_3$	97	100	97	70

(f)

	ピーク面積比 × 100			
	牛の脂肪	牛乳	牛の肝臓	はちみつ
SDZ- $^{13}C_6$	87	100	79	24
SMZ- $^{13}C_6$	86	101	68	32
TBZ- $^{13}C_6$	92	92	74	49
TMP- $^{13}C_3$	87	90	66	54

Ⅱ. 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 志田(齊藤)静夏

食品中残留農薬等の安全性確保に関する研究

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 志田(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

残留農薬検査において実施可能な簡便かつ高精度な標準添加法による定量法について検討した。検量点の数及び添加濃度の定量精度に与える影響について検討するため、代表的な 15 農薬のマトリックス添加標準溶液(10 ng/mL)を用いて、様々な検量点数(1~6 点)及び添加濃度(初期濃度の 0.25、0.5、1、2、4 及び 8 倍)で濃度を推定し、定量性を比較した。その結果、添加濃度を初期濃度の 1~4 倍として 1 点標準添加法で定量を行うことにより、良好な結果が得られた。本検討結果を基に、残留農薬分析における標準添加法の性能評価方法及び評価基準について提案した。

A. 研究目的

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では、測定におけるマトリックスの影響により、精確な分析値を得ることが困難な場合がある。このような場合には、追加精製を行い、夾雑成分を除去すれば、マトリックスの影響の軽減が可能であるが、手間と時間を要してしまう。追加精製を行わず、マトリックスの影響を補正し、精確な分析値を求める方法としては、①安定同位体標識標準品を用いた内標準法、②マトリックス検量線法(マトリックス添加標準溶液を用いた絶対検量線法)、③標準添加法等がある。

①安定同位体標識標準品を用いた内標準法は、物性が分析対象化合物とほぼ同じ安定同位体標識標準品を用いる方法で、簡便にマトリックスの影響の補正が可能である。しかし、多くの農薬については安定同位体標識標準品が市販されておらず、市販されていても高価なものが多い。また、他の化合物の安定同位体標識標準品を用いて補正した報告もあるが、物性が異なる化合物を用いてマトリ

ックスの影響を補正できる保証はない。

②マトリックス検量線法は、広く使用されている方法であり、検体と全く同じブランク試料を用いれば、理論的にはマトリックスの影響を完全に補正することができる。しかしながら、一般に、検体と同じブランク試料を入手することは非常に困難である。

これに対し、③標準添加法は、標準品やブランク試料を必要としない。この方法の欠点としては、検量線が直線であり、且つ、原点付近を通らなければ適用できないことが挙げられる。また、一般に、標準添加法は検量点の数が多く、且つ、濃度範囲が広い方が精確な分析値が得られるとされており、

¹⁾他の方法よりも多くの試験溶液を必要とすることや、既知濃度の分析対象化合物を添加した試験溶液を調製するのが煩雑等の問題点がある。加えて、食品中の残留農薬分析において標準添加法で定量を行うことにより、どの程度精確な分析値が得られるかや、検量点の数や添加濃度が定量精度に与える影響についての報告はほとんどなく、残留農薬分析における標準的な使用方法や性能

評価方法・評価基準も示されていない。

本研究では、GC-MS/MS を用いた食品中の残留農薬分析において、測定でのマトリックスの影響を補正し、精確な分析値を得る方法として、標準添加法を検討した。従来法のように、既知濃度の分析対象化合物を添加した試験溶液を複数調製・測定する方法では煩雑であることから、残留農薬検査においても実施可能な簡便且つ高精度な方法を検討した。また、本検討結果を基に、残留農薬分析における標準添加法の性能評価方法及び評価基準を提案した。

B. 研究方法

1. 試料

オレンジ及び玄米は東京都内の小売店、茶(煎茶)はインターネットで購入した。

オレンジはフードカッターで細切均一化したものを用いた。茶及び玄米は、試料を 425 μm の標準網ふるいに通るように遠心粉碎機を用いて粉碎し均一化したものを用いた。

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

表 1 に検討に用いた農薬を示した。各農薬標準品は、aldrin、 α -BHC 及び coumaphos は Dr. Ehrenstorfer 社、cypermethrin は Riedel-de Haën 社、

chlorfenvinphos、chlorpyrifos、dimethoate、permethrin、phosmet 及び thiobencarb は Sigma-Aldrich 社、isoxathion 及び pyributicarb は林純薬工業(株)、diazinon、fenitrothion 及び tetraconazole は和光純薬工業(株)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 製の Mega Bond Elut C18(充てん量 1000 mg)を用いた。グラファイトカーボン/エチレンジアミン-N-プロピルシリル化シリカゲル(GC/PSA)積層ミニカラムは、ジーエルサイエンス社製の InertSep GC/PSA(充てん量 500mg/500 mg)を用いた。シリカゲルミニカラムは、ジーエルサイエンス社製の InertSep SI(充てん量 1000 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_2HPO_4) 52.7 g 及びリン酸二水素カリウム(KH_2PO_4) 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°C (1 min) - 25°C/min - 125°C (0 min) - 10°C/min - 300°C (8.5 min)； 注入口温度 260°C； トランスファーライン温度 280°C； イオン源温度 260°C； キャリヤーガス ヘリウム； キャリヤーガス流量 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

(1) 抽出

オレンジは試料 20.0 g を量り採った。玄米は試料 10.0 g に水 20 mL を加え、30 分間放置した。茶は試料 5.00 g に水 20 mL を加え、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 (オレンジ 4 g 相当、玄米 2 g 相当、茶 1 g 相当) を採り、塩化ナトリウム 10 g 及びリン酸緩衝液 (0.5 mol/L, pH 7.0) 20 mL を加えて 10 分間振とう後、毎分 3000 回転で 5 分間遠心分離を行った。

ODS ミニカラム (1000 mg) 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°C 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た。オレンジ及び玄米の場合は、残留物をアセトニトリル/トルエン (3:1) 2 mL に溶解した。茶の場合は、

残留物にアセトニトリル 3 mL を加え、約 1 分間超音波処理して溶解後、トルエン 1 mL を加えてさらに約 1 分間超音波処理を行い、よく混合した。

(2) 精製

① オレンジ及び玄米の場合

グラファイトカーボン/PSA 積層ミニカラム (500 mg/500 mg) にアセトニトリル/トルエン (3:1) 10 mL を注入し、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 (負荷液と合わせて 22 mL) を注入した。全溶出液を 40°C 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、残留物をアセトン/ヘキサン (1:1) (オレンジ 4 mL、玄米 2 mL) に溶解したものを試験溶液 (試料 1 g 相当/mL) とした。

② 茶の場合

(i) グラファイトカーボン/PSA 積層ミニカラム精製

グラファイトカーボン/PSA 積層ミニカラム (500 mg/500 mg) にアセトニトリル/トルエン (3:1) 10 mL を注入し、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) 18 mL (負荷液と合わせて 22 mL) を注入した。全溶出液を 40°C 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、残留物をアセトン/ヘキサン (3:7) 2 mL に溶解した。

(ii) シリカゲルミニカラム精製

シリカゲルミニカラム (1000 mg) にアセトン/ヘキサン (3:7) 10 mL を注入し、流出液は捨てた。(i) で得られた溶液を注入した後、アセトン/ヘキサン (3:7) 13 mL を注入した。全溶出液を採り、40°C 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、残留物をアセトン/ヘキサン (1:1) 1 mL に溶解したものを試験溶液 (試料 1 g 相当/mL) とした。

6. マトリックス検量線の作成

ブランク試験溶液 100 µL をバイアルに採り、窒

素気流により溶媒を除去した後、残留物を2、5、10、20、50及び100 ng/mLの濃度の混合標準溶液100 µLに溶解してマトリックス添加標準溶液とした。それぞれ2 µLをGC-MS/MSに注入して、ピーク面積を用いて検量線を作成した。

7. マトリックスの影響の評価

2、5、10、20、50、100及び200 ng/mLの濃度のマトリックス添加標準溶液と溶媒標準溶液を交互に各3回測定した。各濃度での溶媒標準溶液のピーク面積に対するマトリックス添加標準溶液のピーク面積の比を求めてマトリックスの測定への影響を評価した。

8. 標準添加法の検討

①試験溶液の調製

ブランク試験溶液8 mLを採り、窒素気流により溶媒を除去した後、残留物を10 ng/mLの混合標準溶液8 mLに溶解して、初期濃度10 ng/mLの試験溶液(試料中濃度0.01 ppm相当)とした。これを用いて、表2に示した方法で標準添加法のための試験溶液(無添加試験溶液、添加試験溶液)を調製した。

②2点以上の標準添加法

①で作成した無添加試験溶液及び添加試験溶液(2個以上)をGC-MS/MSに注入し、添加濃度を横軸、ピーク面積を縦軸として、関係線を作成した。無添加試験溶液から得られたピーク面積に相当する濃度(推定濃度)は、関係線を横軸との交点から求めた。

③1点標準添加法

①で作成した無添加試験溶液及び添加試験溶液(1個)をGC-MS/MSに注入し、以下の式で無添加試験溶液から得られたピーク面積に相当する濃度(推定濃度、 C_{sample})を求めた。

$$C_{\text{sample}} = C_{\text{added}} \times A_{\text{sample}} / (A_{\text{sample+added}} - A_{\text{sample}})$$

ただし、 C_{added} は添加濃度、 A_{sample} は無添加試験溶液から得られたピーク面積、 $A_{\text{sample+added}}$ は添加試験溶液から得られたピーク面積

C. 研究結果及び考察

1. 検討農薬の選定

検討農薬は表1に示した15農薬(有機塩素系殺虫剤: aldrin、 α -BHC、有機リン系殺虫剤: chlorfenvinphos、chlorpyrifos、coumaphos、diazinon、dimethoate、fenitrothion、isoxathion、phosmet、ピレスロイド系殺虫剤: cypermethrin、permethrin、チオカーバメイト系除草剤: pyributicarb、thiobencarb、及びトリアゾール系殺菌剤: tetraconazole)を用いた。標準添加法では、定量を妨害するピークが認められる場合は適用できない。そこで、ブランク試験溶液を測定し、妨害ピークの有無を確認したところ、オレンジに残留が認められたchlorpyrifos(約0.05 ppm、基準値1 ppm)を除き、妨害ピークは認められなかったか、認められても妨害ピークの面積が評価濃度(10 ng/mL)の標準溶液のピーク面積の1%未満であり、標準添加法を検討する上で問題ないと考えられた。なお、オレンジにおいてchlorpyrifosは評価対象外とした。

2. 検量線

標準添加法は、マトリックス検量線が直線であり、且つ、原点付近を通らなければ適用できない。^{2~4)}そこで茶のマトリックス添加標準溶液を用いて検討農薬について、2~100 ng/mLの濃度範囲で検量線を作成し、直線性及びy切片について確認した(表3)。その結果、全ての農薬で決定係数 r^2 が0.998以上となり、良好な直線性が得られた。y切片は、評価濃度である10 ng/mLの標準溶液のピーク面積の-9.9~+7.5%となった。マトリックス検量線のy切片が評価濃度(標準添加法での無添加試験溶液の濃度)のピーク面積の±10%未満であ

る場合、標準添加法により得られる濃度は約9~11 ng/mL (10 ng/mL を100%とすると、約90~110%)となる。したがって、標準添加法を使用する場合、マトリックス検量線の y 切片が評価濃度のピーク面積の±10%未満であることが望ましいと考えられる。今回検討した農薬はすべて±10%未満となったため、以降の検討を行うこととした。

3. マトリックスの影響

マトリックスの影響が濃度によって異なる場合、標準添加法を適用すると、精確な分析値が得られない可能性がある。そこで、濃度によってマトリックスの影響がどの程度異なるのかを検討した。2、5、10、20、50、100 及び 200 ng/mL 濃度の溶媒標準溶液と同濃度のマトリックス添加標準溶液を交互に3回測定して、溶媒標準溶液に対するマトリックス添加標準溶液のピーク面積比を求めた(図1)。その結果、低濃度程、ピーク面積比が大きくなり、マトリックスの影響が大きかった。マトリックスの影響を大きく受けていた phosmet では、10 ng/mL 及びその10倍濃度の100 ng/mL のピーク面積比がそれぞれ1.66 及び1.28 となり、大きく異なった。一方、マトリックスの影響をあまり受けていなかった α -BHC は、10 ng/mL 及び100 ng/mL のピーク面積比がそれぞれ1.15 及び1.10 となり、大きな差は認められなかった。これらの結果から、化合物によってはマトリックスの影響が濃度によって大きく異なる場合があることが示唆された。したがって、標準添加法で定量する際は、初期濃度付近の狭い濃度範囲で適用するのがよいと考えられた。

3. 検量点数及び添加濃度の影響

標準添加法では、全濃度域にわたって不確かさが同程度で直線性が良好であれば、範囲が広く、検量点の数が多いほど、推定値の精確さは向上するとされている。しかし、検量点の数を増やすためには、既知濃度の分析対象化合物を添加した

試験溶液を複数調製する必要があり、煩雑である。また、残留農薬分析においては最終試験溶液量が1 mL 程度と少ない場合が多く、多点での標準添加法を行うためには、試験溶液を再度、調製する必要がある。

標準添加法における検量点の数及び添加濃度について、日本工業規格①JIS K 0114「ガスクロマトグラフィー通則」、②JIS K 0114「ガスクロマトグラフィー通則」及び③「JIS K0124:2011 高速液体クロマトグラフィー通則」においては、以下のように記載されている。

①JIS K 0114「ガスクロマトグラフィー通則」²⁾では、「分析種を添加した試料のピーク面積が分析種を添加しなかった試料のピーク面積の3倍程度以内となるよう、分析種の添加量を加減する。」としている。また、②JIS K 0123「ガスクロマトグラフィー質量分析通則」³⁾においては、「添加量は、分析種を添加した試料の分析種のピーク面積(又はピーク高さ)が分析種を添加しない試料の分析種のピーク面積(又はピーク高さ)の2倍程度以内になるように調製する。」としている。③JIS K0124:2011 高速液体クロマトグラフィー通則⁴⁾においては、添加濃度についての規定はなく、検量点は「3点以上」としている。

また、EU の残留農薬分析のガイドライン「SANCO/12571/2013」⁵⁾においては、回収率の補正を目的とした標準添加法を行う際は、「試料を3個以上に分け、1個はそのまま、他2個以上に既知濃度の化合物を添加する」と記載されており、添加濃度は「推定濃度の1~5倍」としている。

このように、規格・ガイドラインによって標準添加法の検量点の数や添加濃度は異なっている。また、食品中の残留農薬分析において標準添加法で定量を行うことにより、どの程度精確な分析値が得られるかや、検量点の数や添加濃度が定量精度に

どの程度影響するのかについての報告はほとんどない。そこで、マトリックス添加試験溶液を用いて、検量点の数や添加濃度の分析値への影響について検討した。

①検量点の数

茶のマトリックス添加標準溶液(初期濃度 10 ng/mL)を用いて、検量点の数を1~6点とし、初期濃度を推定した。添加濃度は1点:10 ng/mL、2点:10及び20 ng/mL、3点:10、20及び40 ng/mL、4点:10、20、40及び80 ng/mL、5点:5、10、20、40及び80 ng/mL、6点:2.5、5、10、20、40及び80 ng/mLとした。推定濃度の結果を図2に、関係線を図3示した。その結果、1点では推定濃度が8.8(SD±1.1)~10.5(SD±1.2) ng/mLとなったのに対し、6点では10.4(SD±1.6)~13.5(SD±1.4) ng/mLとなり、検量点の数が多い程、理論値(10 ng/mL)からのずれが大きくなった。ばらつき(標準偏差、SD)は、検量点の数による大きな違いは認められなかった。標準添加法での関係線は、検討した全ての農薬において、1点を用いた場合よりも、6点を用いた場合の方が傾きが小さかった(図3)。これは、高濃度ではマトリックスの影響を受けにくく、低濃度よりも濃度に対するピーク面積の比が小さいことが原因と考えられた。

一般に、標準添加法では検量点の数が多い程、推定値の精確さが向上するとされているが、本検討の結果、食品中の残留農薬分析においては、検量点の数が増加しても精確さは向上せず、1点の方が理論値に近くなることが示された。多点での標準添加法を行う際の添加試験溶液の調製の煩雑さや、試験溶液量の制約も考え合わせると、残留農薬検査においては1点で標準添加法を行う方がよいと考えられた。

②添加濃度

添加濃度の分析値に対する影響について検討

するため、茶のマトリックス添加標準溶液を用いて、添加濃度を初期濃度(10 ng/mL)の1/4、1/2、1、2、4及び8倍濃度(それぞれ2.5、5、10、20、40及び80 ng/mL)として初期濃度を推定した(図4)。その結果、添加濃度が初期濃度の1~4倍で最も理論値(10 ng/mL)に近く、初期濃度と同濃度では8.8(SD±1.1)~10.5(SD±1.2) ng/mL、2倍濃度では9.7(SD±1.1)~11.7(SD±0.01) ng/mLとなった。一方、添加濃度が初期濃度の1/4倍濃度の場合は、推定濃度が8.7(SD±2.4)~14.9(SD±5.7) ng/mLとなり、理論値からのずれが大きく、ばらつきも大きかった。添加濃度が初期濃度の1/2倍濃度の場合においても1~4倍濃度と比較して理論値からのずれ及びばらつきが若干、大きかった。これは、添加濃度が初期濃度よりも低い(1倍未満)場合、測定の実差によって関係線が大きく振れ(図5)、ばらつきが大きくなったものと考えられた。添加濃度が初期濃度の8倍濃度の場合には、ばらつきは小さいものの、添加濃度1~4倍濃度と比較して推定濃度の理論値からのずれが若干大きく(10.1~12.3 ng/mL)、検討農薬の多くで理論値よりも大きい値となった。これは、「①検量点の数」で述べたように、高濃度ではマトリックスの影響を受けにくく、関係線の傾きが小さくなることが原因と考えられた(図3)。

図6及び7にオレンジ及び玄米のマトリックス添加標準溶液を用いて検討した結果を示した。茶の場合と同様に、添加濃度が初期濃度の1~4倍濃度で良好な結果が得られ、1/4~1/2倍濃度では理論値からのずれやばらつきが大きかった。

以上のように、添加濃度を初期濃度1~4倍程度として1点標準添加法を行うことにより精確な分析値が得られた。残留農薬分析においては、濃度によってマトリックスの影響が大きく異なる化合物/食品もあることから、添加濃度は初期濃度の1~2

倍程度が望ましいと考えられる。

4. 性能評価方法・基準及び使用方法の提案

以上の検討結果を踏まえ、GC-MS (MS)を用いて 1 点標準添加法で定量を行う際の性能評価方法及び評価基準について以下のように提案する。

(1) 性能評価方法

溶媒標準溶液を用いた絶対検量線法により、妥当性評価試験を実施し、マトリックスの影響によって真度の目標値を満たさなかった化合物について、1 点標準添加法の適用を検討する。

各試料溶液から一定量の溶液を 2 個採取する。1 個に既知濃度の標準溶液、もう 1 個に同量の溶媒を加え、それぞれ添加試験溶液及び無添加試験溶液とし、GC-MS/MS に注入する。

無添加試験溶液から得られたピーク面積に相当する濃度 (C_{sample}) を式(1)から求める。

$$C_{\text{sample}} = C_{\text{added}} \times A_{\text{sample}} / (A_{\text{sample+added}} - A_{\text{sample}}) \quad (1)$$

ただし、 C_{added} は添加濃度、 A_{sample} は無添加試験溶液から得られたピーク面積、 $A_{\text{sample+added}}$ は添加試験溶液から得られたピーク面積

添加濃度は、評価濃度の 1~2 倍程度とする。各化合物について、(2)の性能パラメーターを求め、それぞれの評価基準に適合していることを確認する。

(2) 評価基準

① 選択性

ブランク試料を試験法に従って試験し、定量を妨害するピークがないことを確認する。妨害ピークを認める場合は、妨害ピークの面積が評価濃度の標準溶液から得られるピーク面積の 1/100 未満であること。

② 真度、併行精度及び室内精度

妥当性評価ガイドラインの目標値を満たすこと。

③ 定量限界

無添加試験溶液から得られるピークは $S/N \geq 10$ であること。

④ 検量線

マトリックス検量線の決定係数 (r^2) が 0.990 以上であり、原点を通るか、y 切片の絶対値が評価濃度のマトリックス添加標準溶液から得られるピークの面積の $\pm 10\%$ 未満であること。

(3) 使用方法

(2) の評価基準を満たした化合物について、絶対検量線から求めた分析値が基準値 (判定濃度) 以上であると推定された場合に 1 点標準添加法を行う。

各試料溶液から一定量の溶液を 2 個採取する。1 個に既知濃度の標準溶液、もう 1 個に同量の溶媒を加え、それぞれ添加試験溶液及び無添加試験溶液とし、GC-MS/MS に注入し、式(1)を用いて無添加試験溶液から得られたピーク面積に相当する濃度を求める。

添加濃度は、無添加試験溶液中の濃度の 1~2 倍程度とする。(添加試験溶液から得られるピーク面積が無添加試験溶液から得られるピーク面積の 2~3 倍程度となる濃度。)

GC-MS/MS 測定では、溶媒標準溶液から得られるピーク面積に対するマトリックス添加標準溶液から得られるピーク面積の比が 1.00~2.00 程度となる場合が多い。このため、標準添加法を行う際の添加濃度は、溶媒標準溶液を用いた絶対検量線法から求めた濃度とすれば、添加試験溶液から得られるピーク面積は無添加試験溶液から得られるピーク面積の 2~3 倍 (無添加試験溶液中の濃度の 1~2 倍) となる。

なお、得られた濃度の 1~2 倍が添加濃度とならなかった場合は、得られた濃度を添加して、再度、

標準添加法による定量を行い、分析値を求めるのがよいと考えられる。

D. 結論

GC-MS/MS を用いた残留農薬分析に適した標準添加法による簡便且つ高精度な定量法の検討を行った。検量点の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結果、添加濃度を初期濃度の 1~4 倍として 1 点標準添加法を行えば、精確な分析値が得られることが示された。また、本検討結果を基に性能評価方法及び基準について提案した。

E. 参考文献

1) J. N. Miller, J. C. Miller, 宗森信、佐藤寿邦訳、データのとり方とまとめ方ー分析化学のための統計学とケモメトリックス、第 2 版、共立出版(2004)

pp.148-150.

2) JIS K 0114:2012「ガスクロマトグラフィー通則」

3) JIS K 0123:2006「ガスクロマトグラフィー質量分析通則」

4) JIS K 0124:2011「高速液体クロマトグラフィー通則」

5) SANCO/12571/2013、Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed.

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1 GC-MS/MS 測定条件

Compound	Retention time (min)	Quantification			Confirmation		
		Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion (<i>m/z</i>)	Collision energy (eV)	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion (<i>m/z</i>)	Collision energy (eV)
Aldrin	14.6	262.8	228.0	20	262.8	193.0	24
α -BHC	11.7	181.0	145.0	14	218.9	183.0	8
Chlorfenvinphos	15.10, 15.31	323.0	267.1	14	267.0	159.0	14
Chlorpyrifos	14.46	314.0	258.0	14	196.9	169.0	14
Coumaphos	20.79	226.0	163.1	18	362.1	226.1	14
Cypermethrin	21.51, 21.61, 21.69, 21.73	163.0	127.0	8	181.1	152.0	20
Diazinon	12.54	199.1	135.1	14	179.1	137.1	20
Dimethoate	12.03	229.0	87.0	8	125.0	79.0	8
Fenitrothion	14.16	277.1	260.2	8	260.0	125.0	14
Isoxathion	16.81	177.1	130.1	14	313.1	177.1	8
Permethrin	20.65, 20.78	163.0	127.0	8	183.1	153.1	14
Phosmet	18.86	160.1	77.0	20	160.1	133.0	14
Pyributicarb	18.56	181.1	108.0	14	165.1	108.0	12
Tetraconazole	14.66	336.1	218.2	14	336.1	204.2	20
Thiobencarb	14.52	257.1	100.1	14	100.1	72.0	8

表 2 標準添加法の試験溶液の調製方法

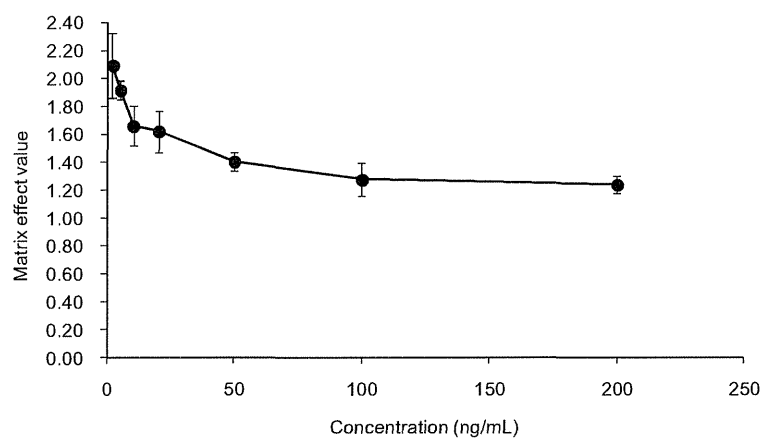
	Initial*	Added					
Ratio of the added concentration to the initial concentration	-	0.25	0.5	1	2	4	8
Volume of sample extract (μL)	100	100	100	100	100	100	100
Added concentration of pesticide standard (ng/mL)	-	25	50	100	200	400	800
Added volume of pesticide standard (μL)	-	10	10	10	10	10	10
Resulting mass of pesticide added (ng)	-	0.25	0.5	1	2	4	8
Added volume of solvent (μL)	10	-	-	-	-	-	-
Final volume (μL)	110	110	110	110	110	110	110
Final concentration (ng/mL)	9	11	14	18	27	45	82

初期濃度*: 10 ng/mL

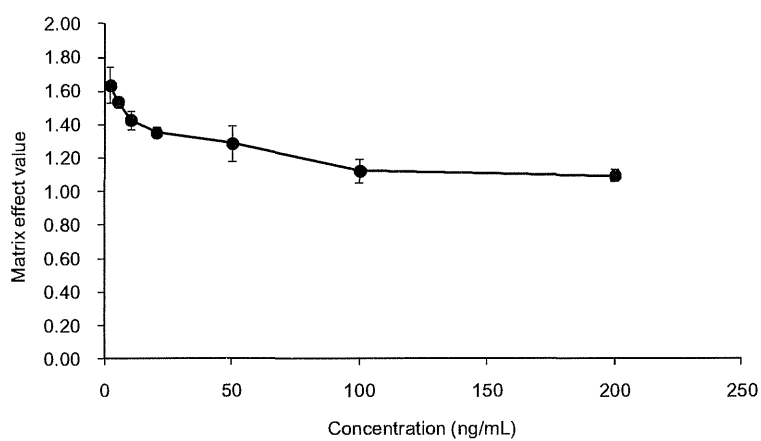
表3 茶マトリックス添加標準溶液の検量線の傾き、y切片、決定係数(r^2)、及び10 ng/mLのピーク面積に対するy切片の比

	Slope	y-Intercept	r^2	y-Intercept/ Peak area (10 ng/mL) ×100 (%)
Aldrin	9619996	-4124	0.9996	-4.8
α -BHC	80022474	58112	0.9999	7.0
Chlorfenvinphos	49665830	7616	0.9996	1.5
Chlorpyrifos	31292930	-11045	0.9983	-4.1
Coumaphos	18037556	-10395	0.9999	-6.0
Cypermethrin	119715959	86601	0.9999	6.9
Diazinon	37358349	20138	0.9999	5.3
Dimethoate	36137315	-30912	0.9999	-9.9
Fenitrothion	51904582	1887	0.9995	0.4
Isoxathion	66030278	-21447	0.9996	-3.5
Permethrin	102991430	78872	0.9998	7.5
Phosmet	173479973	258	0.9996	0.0
Pyributicarb	649303067	93853	0.9998	1.5
Tetraconazole	7702653	-3345	0.9997	-5.0
Thiobencarb	60529821	38163	1.0000	5.9

(a)



(b)



(c)

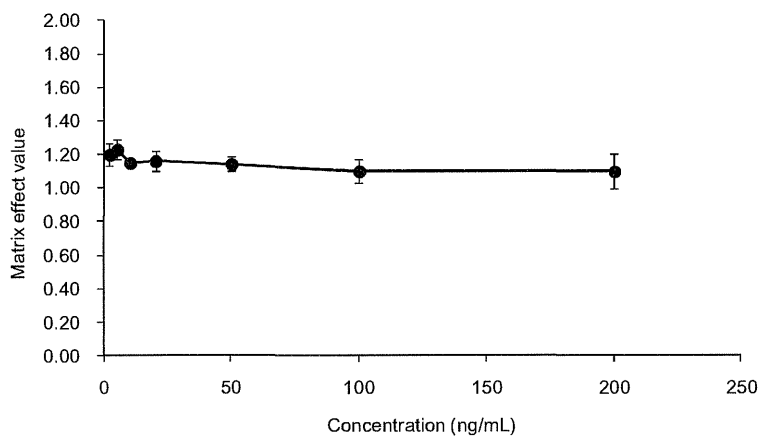


図1 マトリックスの影響と濃度の関係

(a) Phosmet、(b) Pyributicarb、(c) α -BHC

Matrix effect value : マトリックス添加標準溶液のピーク面積/溶媒標準溶液のピーク面積

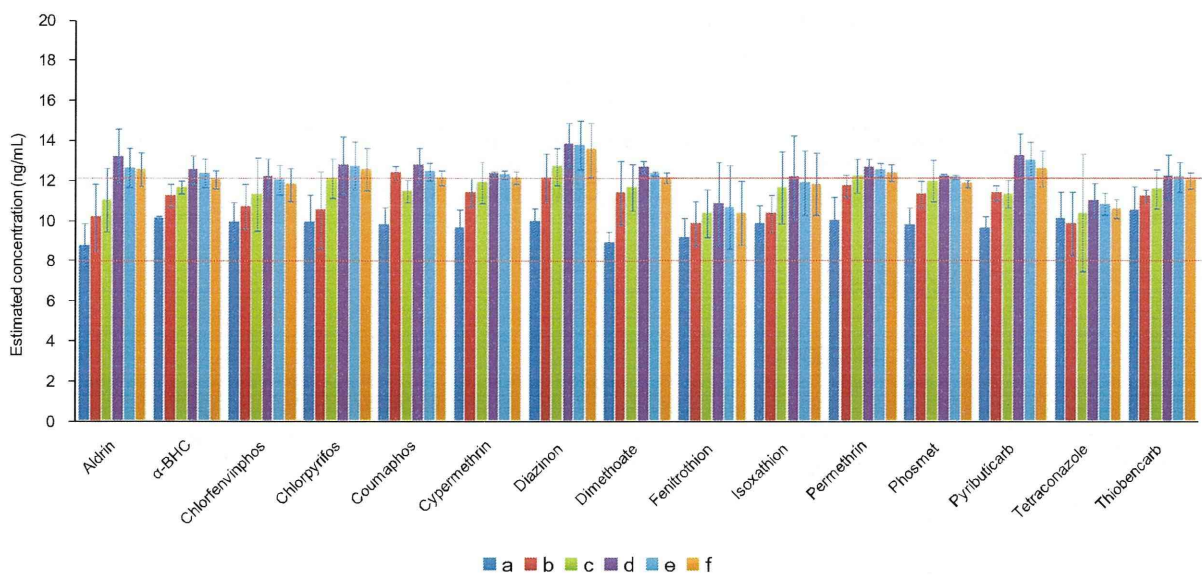
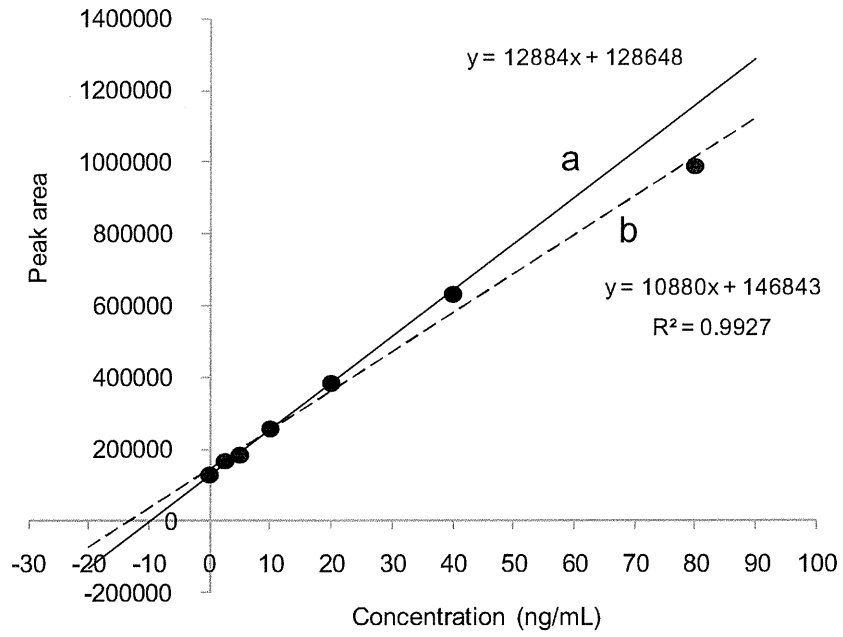


図2 標準添加法(茶マトリックス添加標準溶液、初期濃度 10 ng/mL)による推定濃度

- a) 1点:10 ng/mL、b) 2点:10 及び 20 ng/mL、c) 3点:10、20 及び 40 ng/mL、d) 4点:10、20、40 及び 80 ng/mL、e) 5点:5、10、20、40 及び 80 ng/mL、f) 6点:2.5、5、10、20、40 及び 80 ng/mL

a) Aldrin



b) α -BHC

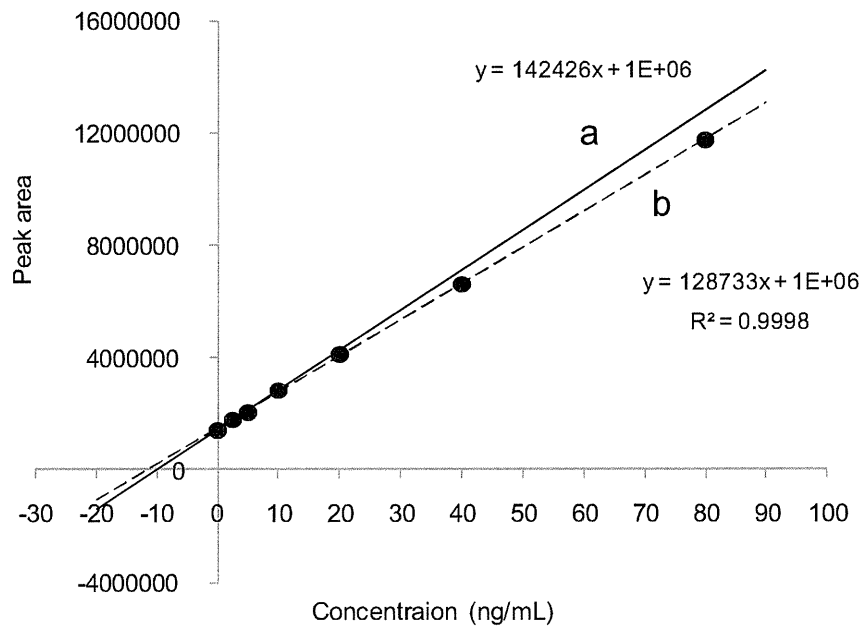
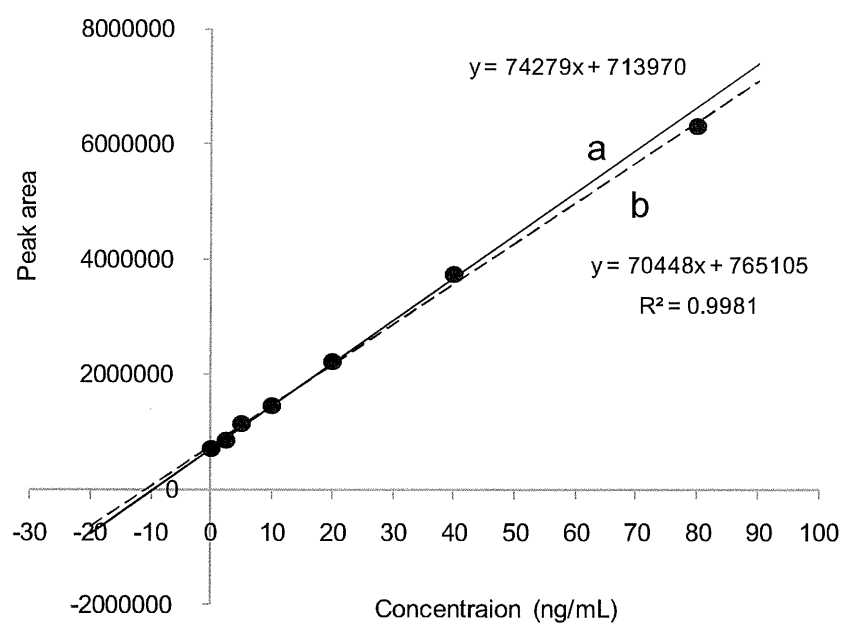


図3 標準添加法での代表的な関係線(初期濃度 10 ng/mL、茶)
 添加濃度 a) 1点: 10 ng/mL、b) 6点: 2.5、5、10、20、40 及び 80 ng/mL

c) Chlorfenvinphos



d) Chlorpyrifos

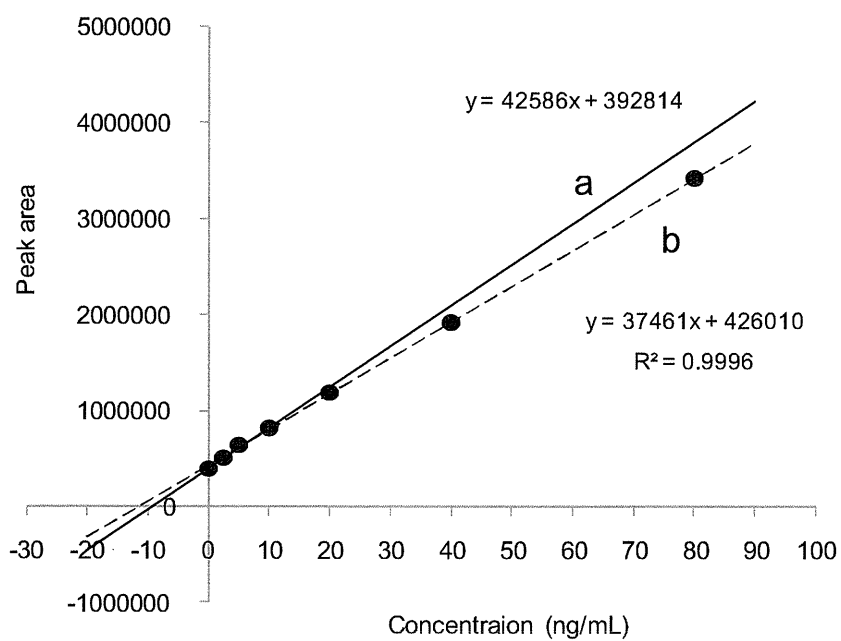
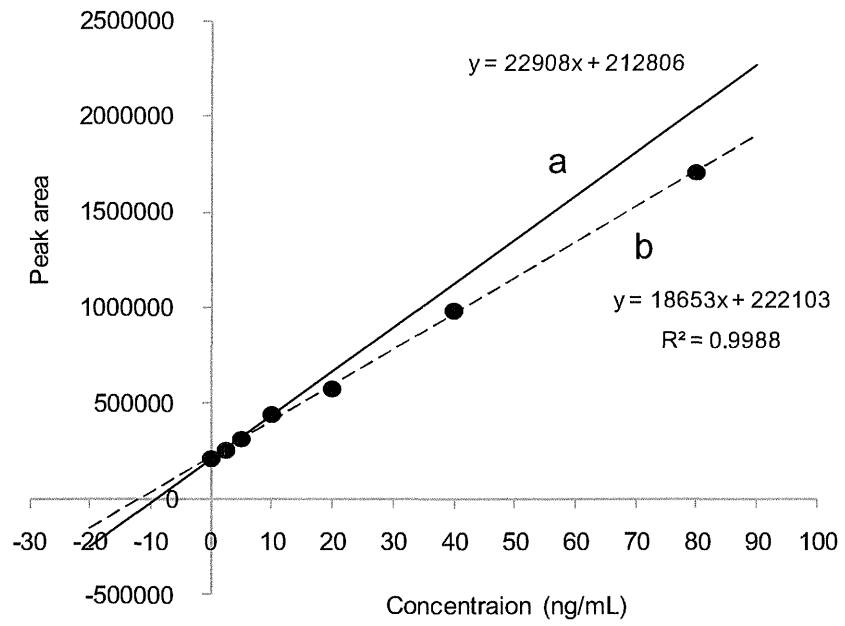


図 3 (つづき)

e) Coumaphos



f) Cypermethrin

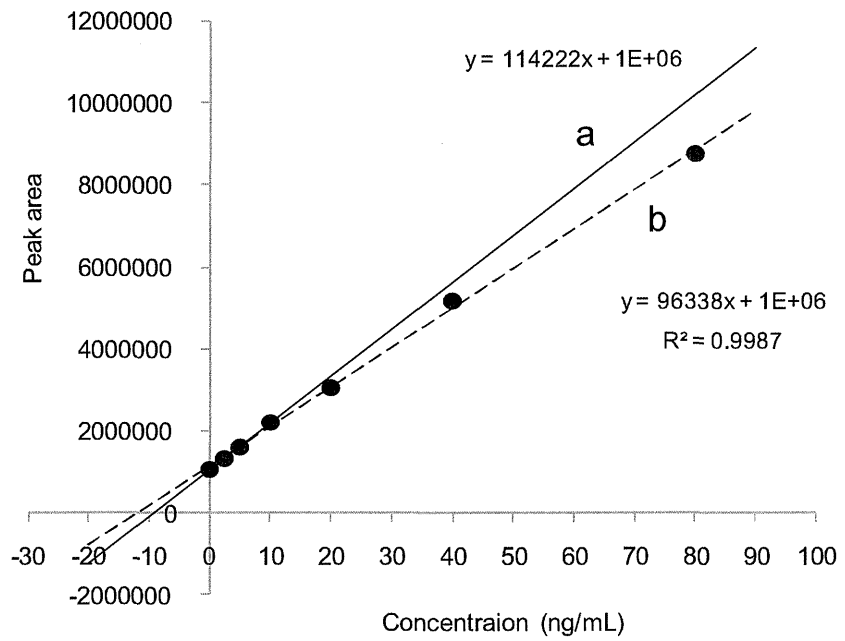
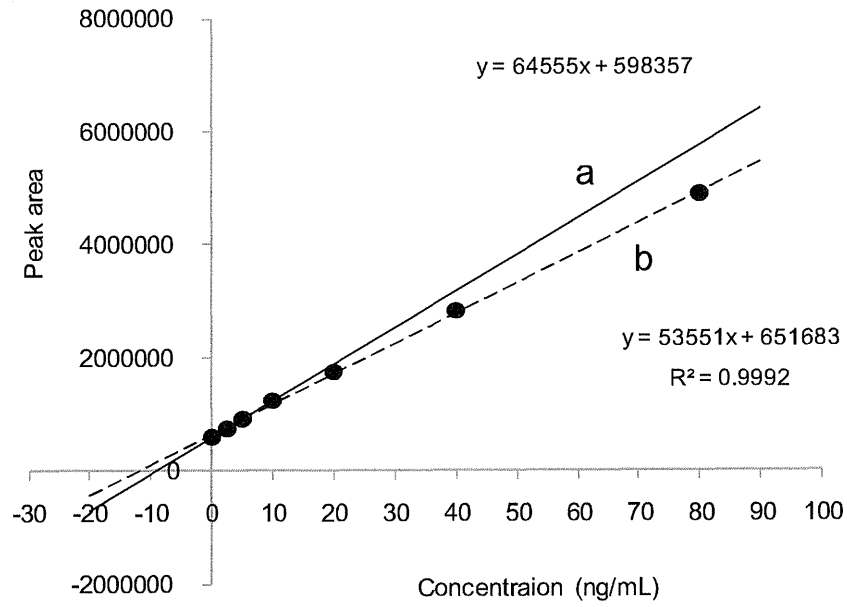


図3 (つづき)

g) Diazinon



h) Dimethoate

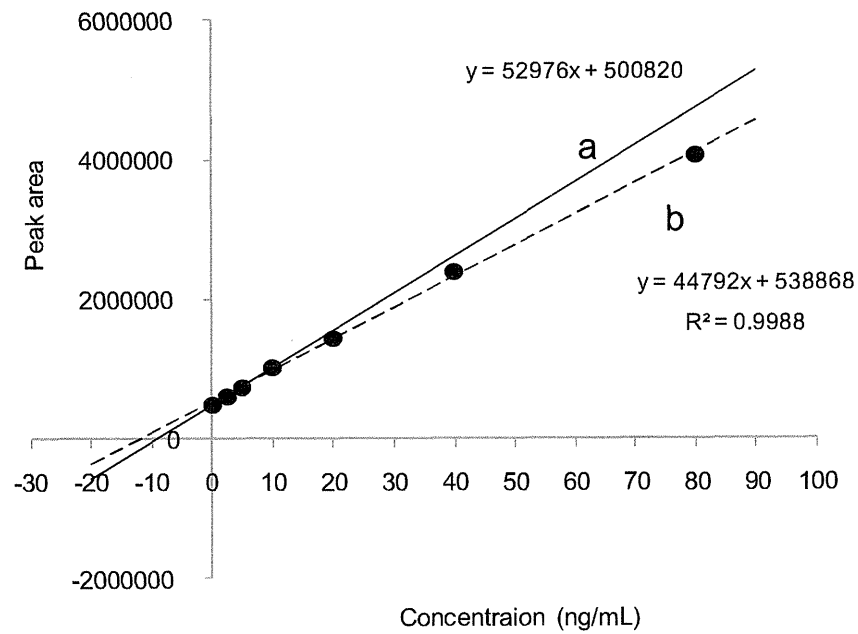


図3 (つづき)