

図 34 6 機関の実験 E の相対検量線 (農薬/PHN-d10)

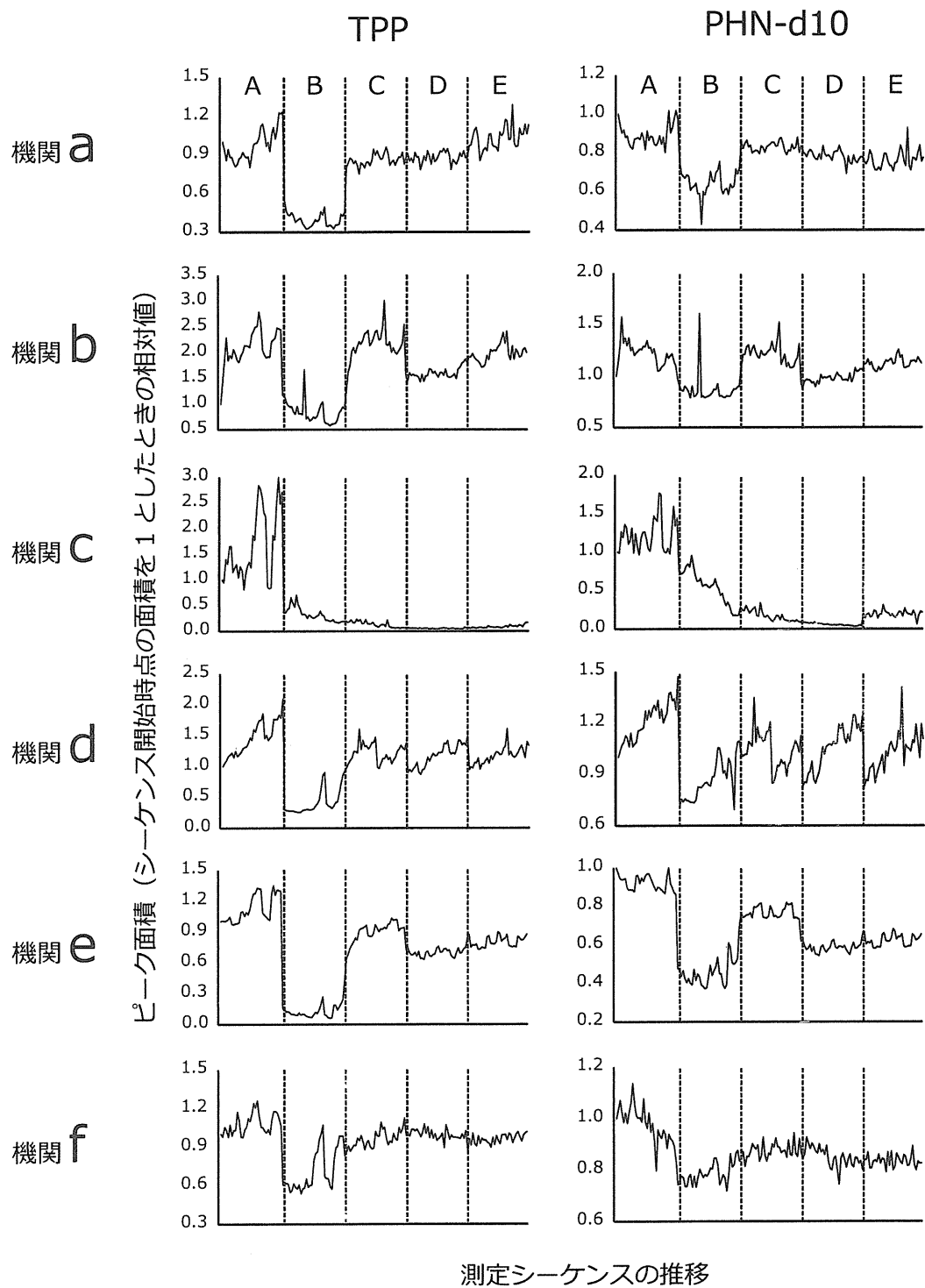


図 35 実験 A~E における各機関の IS ピーク面積の変化

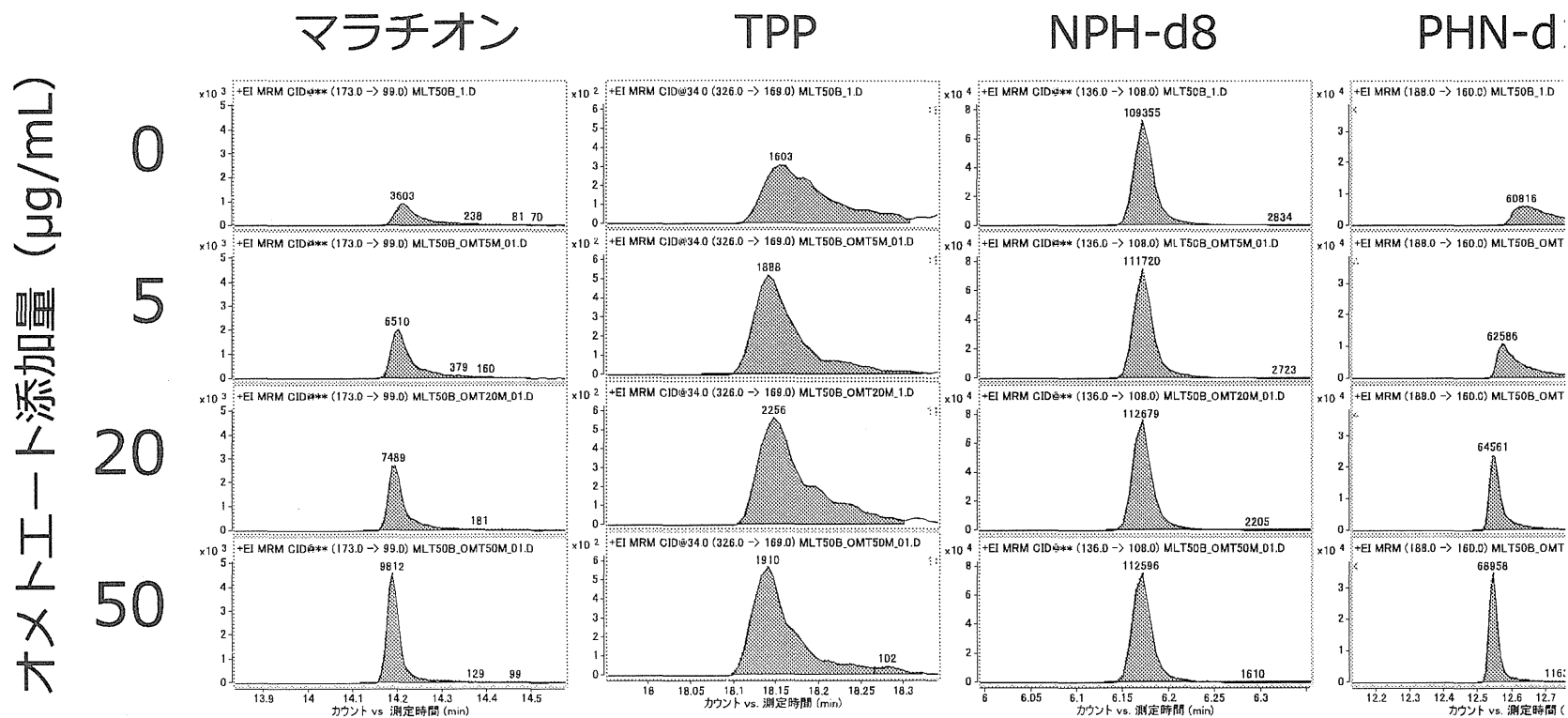


図 36 各濃度のオメトエート添加時のマラチオンおよび 4 種 IS のピーク応答の変化 (大阪府の事後検討の結果)

いずれも各 50 ng/mL のマラチオンおよび IS を含む 50%A/H 溶液

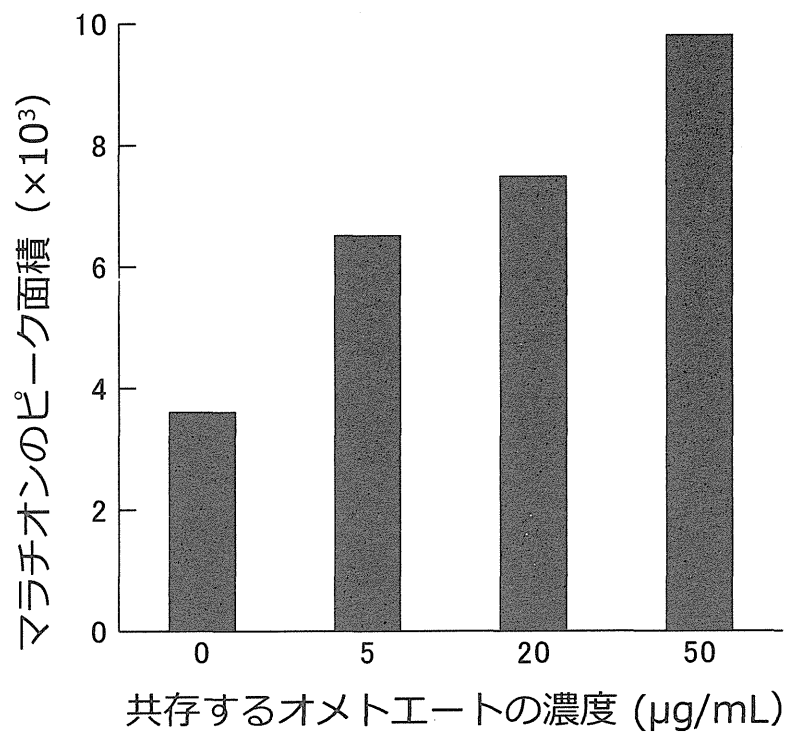


図 37 各濃度のオメトエート添加時の馬拉チオンのピーク面積の変化
(大阪府の事後検討の結果)

いずれも 50 ng/mL の馬拉チオンおよび 4 種 IS を含む 50%A/H 溶液

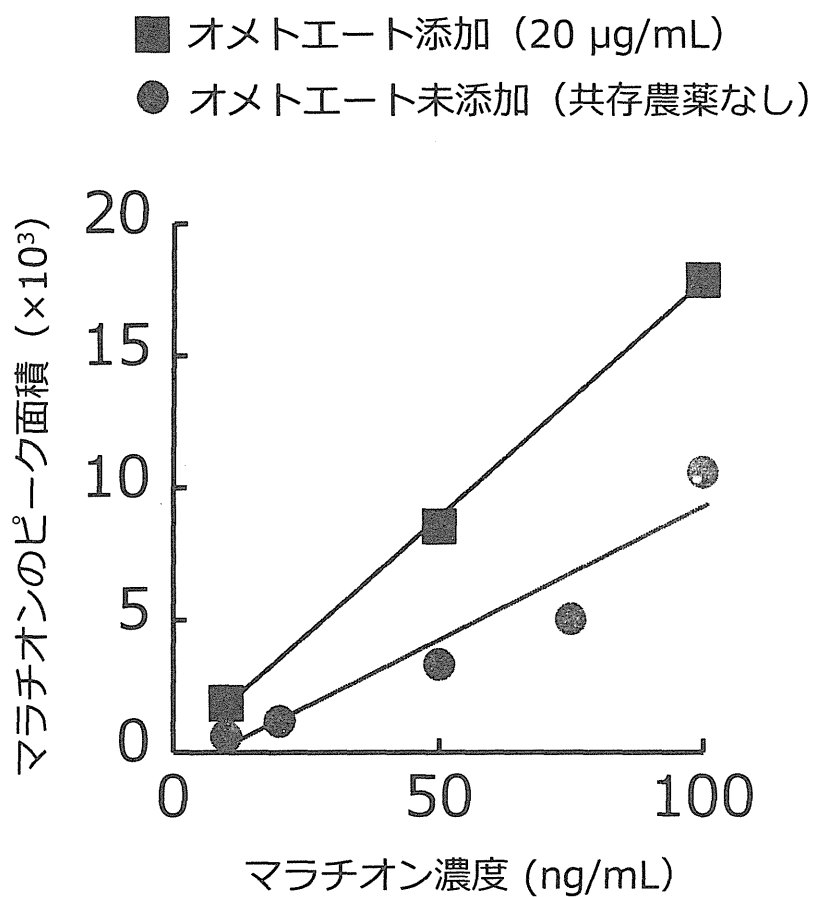


図 38 高濃度のオメトエート添加による馬拉チオンの絶対検量線の傾きの変化 (大阪府の事後検討の結果)

いずれも 50 ng/mL の 4 種 IS を含む 50%A/H 溶液

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 27 年度 研究分担報告書

食品中に残留するマイコキシン分析に係る精度管理体制の
構築に関する研究

研究分担者 齊藤 貢一

平成 27 年度 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

研究分担報告書

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

研究代表者	渡辺 卓穂	(一財) 食品薬品安全センター
研究分担者	斉藤 貢一	星薬科大学 薬品分析化学教室
研究協力者	伊藤 里恵	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。更に、公定法よりも測定感度の向上を目指して、若干の改良を行うと共に、精度管理用の試料 (香辛料) を作製し、複数の外部検査機関に配布して分析法の外部精度管理試験を試みた。当該試験は現在実施中であり、結果は次年度に報告する予定である。

また、2015 年 7 月 23 日に乳中のアフラトキシン M_1 の規制値が設定されたことを受け、特に今後の規制値設定が予想される乳製品 (チーズ) においても、香辛料中の総 AFs と同様に SPDE 法と固相蛍光誘導体化法を用いた新たな分析法の構築を検討した。本研究で開発された方法は、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、現行の公定法に代わる微量分析が可能な信頼性の高い分析方法を示すことが可能となった。

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、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、香辛料のような夾雑物が多い試料ではクリーンアップが不十分となる。また、従来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。

昨年度までの本研究事業において、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法を併用した分析法を構築した。本年度は、構築した AFs の微量分析法について、実試料における測定感度向上を目指して若干の改良を行うと共に、精度管理用の試料 (香辛料) を作製し、複数の外部検査機関に配布して分析法の外部精度管理試験を実施することとした。

また、2015 年 7 月 23 日に乳中のアフラトキシン M₁ (AFM₁) の規制値が設定され、2016 年 1 月 23 日から適用されることになった。

そこで、今後の規制値設定が予想される乳製品 (チーズ) においても、その対策としてこれまでに構築した香辛料中の AFs 分析法を基にして新たに実用的な試験法を検討した。

B. 研究方法

(1) 総 AFs 改良抽出操作

粉碎均一化した試料 (白コショウ) 3.0 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 0.3 g と精製水およびメタノール (1:4) 混液 12 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、水を加えて全量を 15 mL にメスアップした。5 mL を量り採り、7% TritonX-100 水溶液を加えて正確に 10 mL とし、十分混合した後、遠心分離 (5000×g、5 分間) し、上清 8 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、イムノアフィニティーカートリッジ (AFLAKING) 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) 改良抽出操作」で調製した試料抽出液が入った 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。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。

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、検出器には日本分光FP-2020を用い、励起波長は365 nm、蛍光波長は450 nm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) 外部精度管理試験

市販の白コショウにAFsを添加し、精度管理試験用の標準試料(高濃度と低濃度)を調製した。本試験に参加協力してもらう検査機関に当該試料と実験に必要な試薬類を配布し、測定を依頼した。

(6) AFM₁分析法

試料には、東京都内で市販されているプロセスチーズ(“雪印メグミルク 6P チーズ”、

“雪印メグミルク ベビーチーズ”、“明治十勝細切りチーズ”、“森永乳業 KRAFT 切れてるチーズ”)4種類を用いた。

抽出操作としては、細切した試料10 gを50 mL容のポリプロピレン製遠沈管に取り、これにアセトニトリル/メタノール/精製水混液(60:10:30, v/v)40 mLを加えてホモジナイズし、精製水で50 mLにメスアップした。十分混合した後、遠心分離(3000×g、5分間)し、上清5 mLをPBS 15 mLで希釈したものを試料抽出液とした。

SPDE操作方法は、上記(2)に準じて行った。

固相蛍光誘導体化法の操作方法は、上記(3)に準じ、調製した固相の懸濁液をキャップチューブ™に移動させ、固相内の水分を除去するために、遠心分離(2500×g、20秒間)した。流出液が入った2.0 mL容のマイクロチューブを取り外して新たなものに交換した後、キャップチューブ™にTFA 200 µLを添加し、SPDE器具を天地逆の状態にして30秒間ボルテックスミキサーで攪拌し、その状態のまま40℃のアルミブロックヒーター上で20分間放置した。その後、SPDE器具の天地を元に戻した後、遠心分離(2500×g、20秒間)し、ろ液をTFA溶出液として分取した。更に、溶出液として精製水/アセトニトリル混液(80:20, v/v)0.8 mLを加えて固相を再び分散させ、上記と同様に遠心分離後、先のTFA溶出液200 µLと合わせて全量を1 mLとし、その100 µLをHPLC-FLで測定した。

AFM₁測定(HPLC-FL)は、上記(4)とほぼ同様であるが、移動相には精製水/アセトニトリル混液(80:20, v/v)を用い、蛍光検出器の励起波長は365 nm、蛍光波長は435 nmとした。

C. D. 研究結果および考察

(1) 総 AFs 改良抽出操作

厚生労働省の公定検査法では、抽出操作の際に、試料中の AFs を振とう抽出後、精製水または PBS を用いて抽出液を希釈する。しかし、香辛料では油脂性成分が多いため、精製水などで希釈をしたときに、水に不溶性油脂性成分が沈殿し、この沈殿物に AFs が吸着することで回収率の低下を招いてしまうことがある。そのため、香辛料を試料とする際には、脂溶性成分への吸着を防ぐために、界面活性剤として 8% Tween20 水溶液を用いて希釈することが推奨されている。

本研究においても、界面活性剤の有効性を検討した結果、非イオン性界面活性剤である TritonX-100 を用いた時に、8% Tween20 に比べて若干ではあったが良好な回収率が得られたことから、TritonX-100 を希釈溶媒として採用した。

また希釈溶媒を添加した際に生じる不溶物量について検討したところ、希釈後に残存するメタノールの含有率が高くなるほど不溶物が少なくなることが判明した。しかし、メタノール濃度が上昇すると今度はイムノアフィニティーゲルに対して変性などの影響が出ることから、AFLAKING におけるメタノール使用上限濃度である 40% となるように希釈溶媒 (TritonX-100) を加えることとした。そのことを踏まえた上で、測定感度の向上を目指して、試料採取量、抽出溶媒量および希釈溶媒量について検討し、上記「B. 研究方法 (1) 総 AFs 改良抽出操作」で示した方法を採用した。

(2) 外部精度管理試験

構築した方法について、妥当性を確認す

るために精度管理用試料を調製して外部機関による外部精度管理試験を行った。現在、総参加機関数 8 機関にて精度管理試験を実施中である。結果については平成 28 年度内には判明すると思われ、28 年度の報告書にて結果の詳細を明らかにする予定である。

(3) AFM₁ 分析法の検討

3-1) 固相の検討

従来の SPE 法では、イムノアフィニティーゲル中の気泡の存在やカラムへの試料負荷速度の変動が、AFM₁ の回収率減少を招く可能性があった。また、ほとんどの操作を開放系で行うため、実験者への AFM₁ の曝露が危惧されるなどの問題点があった。そこで本研究では、このような問題点を克服するために総 AFs 分析と同様に SPDE 法を採用した。

SPDE 法で使用する固相の種類について、Oasis[®]HLB とイムノアフィニティーゲルを用いて比較検討した。その結果、Oasis[®]HLB を用いてプロセスチーズの試料抽出液をクリーンアップした際、夾雑物の妨害ピークが AFM₁ のピークと重なってしまい、測定が困難となった。他方、イムノアフィニティーゲルを用いた場合、AFM₁ のピークが妨害ピークと重なることもなく、良好なクロマトグラムと高い回収率を得られたため、SPDE 法で用いる固相としてイムノアフィニティーゲルを採用した (Fig. 1)。

3-2) 固相蛍光誘導体化法の最適化

固相蛍光誘導体化法は、固相に目的物質が保持された状態で誘導体化を行う方法であり、溶媒除去の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う利点がある。そこで本研究では、すでに構築した総 AFs 分析法および公定法を参

考にして、固相蛍光誘導体化法の至適条件を検討した。

TFAの添加量について50~300 µLの範囲で検討した。その結果、200 µLを添加した際に最も高い反応性が得られたことから、TFAの添加量は200 µLを採用した。次に、反応時間について、5~40分の範囲で検討したところ、20分で最も高い反応性が得られたことから、反応時間は20分を採用した。また、反応温度について、常温(25℃)~70℃の範囲で検討したところ、40℃において最も高い反応性が得られたことから、反応温度は40℃を採用した。

3-3) 移動相の検討

HPLC-FLの移動相として精製水/アセトニトリル混液(75:25, v/v)を用いたところ、AFM₁のピークが妨害ピークと重なってしまった(Fig. 2-A)。一般に、移動相の有機溶媒濃度の低下に伴って保持時間が延長することから、アセトニトリルの濃度を下げ、精製水/アセトニトリル混液(80:20, 82:18, v/v)という2つの組成を検討した(Fig. 2-B, C)。その結果、どちらの組成においてもAFM₁のピークと妨害ピークを分離することができ、良好なクロマトグラムが得られた。なお、保持時間は前者が11.05分、後者が12.55分であり、測定にかかる時間を考慮して、移動相は精製水/アセトニトリル混液(80:20, v/v)を採用した。

(4) 分析法バリデーション

分析法バリデーションの概要をTable 1に示す。検出限界(LOD; S/N=3)は0.01 ng/mL、定量限界(LOQ; S/N>10)は0.03 ng/mLであった。検量線を作成したところ0.03~5.0 ng/mLの濃度範囲で良好な直線性が得られた。

(5) 添加回収試験

本法のチーズへの適用性を評価するため、1日3検体 計5日間で添加回収試験を行った。添加濃度については、コーデックス委員会の規制値0.5 µg/kgを網羅できる高濃度(1 ng/mL)と低濃度(0.1 ng/mL)に設定した。回収率、併行精度および室内精度については、一元配置分散分析法で統計解析した。その結果、高濃度では約93%、低濃度では約91%の良好な回収率が得られた。更に、併行精度および室内精度はどちらの濃度でも5~7%と高い再現性が得られた(Table 2)。

(6) 実態調査

本法を用いて、国産のチーズ(雪印メグミルク 6P チーズ、雪印メグミルク ベビーチーズ、明治 十勝細切りチーズ、森永乳業 KRAFT 切れてるチーズ)4検体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AFM₁は検出限界未満であった。

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、精度管理試験を実施した。現在検査を実施中であり、本報告書において結果を述べることはできなかったが、来年度の報告書においてその結果を明らかにする予定である。

また、乳中のAFM₁分析については、規制

値が平成 28 年 1 月 23 日から適用されることから、先を見通した対策として、特に乳製品であるチーズを対象とした新たに実用的な試験法を検討した。

その結果、これまでに構築した香辛料中の AFs 分析法を基にして、SPDE 法と固相蛍光誘導体化法を併用した分析法を構築した。これにより、クリーンアップ中に蛍光誘導体化を行うことができ、誘導体化の前に必要だった窒素乾固が不要となり、操作の簡便化と操作時間の短縮に繋がった。また、従来法に比べて実験環境の閉鎖性が高くなり、実験者への AFM₁ 曝露が低減され、実用性の高い AFM₁ の分析法を構築することができた。本法のチーズへの適用性を評価するため、高濃度 (1 ng/mL) と低濃度 (0.1 ng/mL) において添加回収試験を行った。その結果、高濃度では約 93%、低濃度では約 91% の良好な回収率が得られた。更に、併行精度および室内精度はどちらの濃度でも 5~7% と高い再現性が得られた。以上の結果から、本法は従来法の様々な問題点を克服し、チーズ中の AFM₁ の残留分析に有用であることが示唆された。

本研究を実施することにより、現行の公定法に代わる微量分析が可能な信頼性の高い分析方法を示すことが可能となり、食品衛生に大いに寄与することが期待される。

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

細川真依、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 によるチーズ中アフラトキシン M₁ の残留分析；日本薬学会第 135 年会（2015 年 3 月、神戸）

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

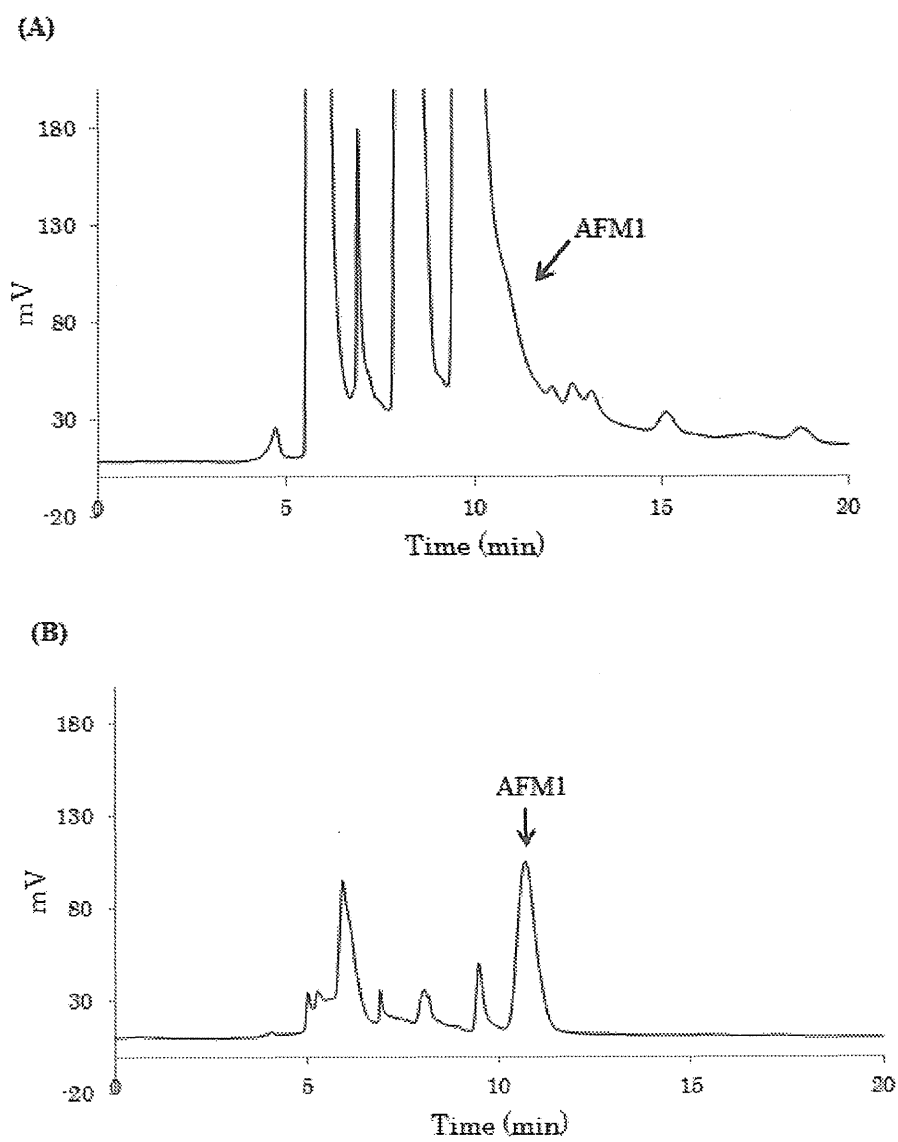


Fig.1 チーズ (AFM₁ : 1 ng/mL 添加) のクロマトグラム
 (A) Oasis®HLB (B) イムノアフィニティーゲル

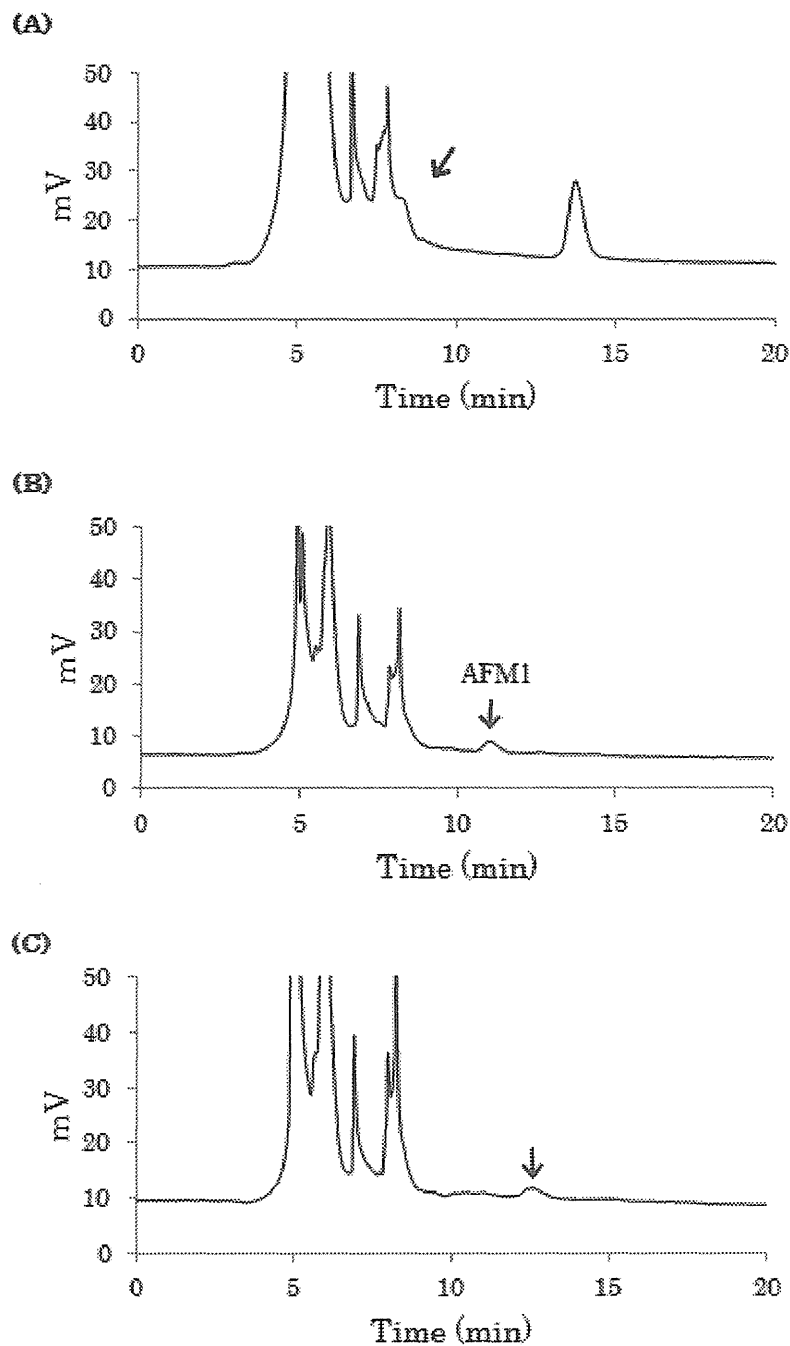


Fig. 2 チーズ(AFM₁: 0.02 ng/mL 添加)のクロマトグラム

- 移動相組成 : (A) 精製水/アセトニトリル混液 (75:25, v/v)
 (B) 精製水/アセトニトリル混液 (80:20, v/v)
 (C) 精製水/アセトニトリル混液 (82:18, v/v)

Table 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)	濃度範囲 (ng/mL)	相関係数 (<i>r</i>)
AFM ₁	0.01	0.03	0.03~5.0	0.999

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

添加量(ng/mL)	回収率(%)	併行精度(%)	室内精度(%)
			6.4
添加量 ¹ (ng/mL)	回収率 ^{93.6} (%)	併行精度 ^{6.0} (%)	室内精度 ^{6.9} (%)
0.1	91.1	4.8	6.4
1	93.6	6.0	6.9

(n=3×5)

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 27 年度 研究分担報告書

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

研究分担者 鎗田 孝

平成 27 年度 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
研究分担報告書

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

研究代表者	渡辺 卓穂	(一財) 食品薬品安全センター 秦野研究所 部長
研究分担者	鎗田 孝	(国研) 産業技術総合研究所 上級主任研究員
研究協力者	大竹 貴光	(国研) 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）の適用を検討している。

昨年度までの検討において、食品中残留農薬分析に IDMS を適用した場合でも、検量線（傾き）が試料中のマトリックスに影響されることを明らかにした。さらに、その対処策を検討し、マトリックスマッチング法の適用が有効であることを示した。そこで本年度は、マトリックスマッチング法を適用した IDMS によって、平成 27 年度外部精度管理調査試料を分析することにより、その妥当性を検証した。その結果、分析対象農薬であるクロルピリホスとマラチオンの両方において、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 14 %と充分小さかった。

一方、近年 QuEChERS 法などの簡易分析法が残留農薬分析に導入されており、外部精度管理調査においても多くの検査機関によって適用されている。しかし、農薬が残留した実試料からの抽出能力が十分であるかがしばしば問題となるため、IDMS 法を適用して QuEChERS 法の抽出能力を精密に評価した。その結果、検討した 3 種類の農薬について、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）と同等の分析値が得られることを確認した。

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ている。昨年度までの検討において、食品中残留農薬分析にIDMSを適用した場合でも、検量線（傾き）が試料中のマトリックスに影響されることを明らかにした。さらに、その対処策を検討し、マトリックスマッチング法の適用が有効であることを示した。そこで本年度は、マトリックスマッチング法を適用したIDMSによって、平成27年度外部精度管理調査試料を分析することにより、その妥当性を検証した。

一方、近年QuEChERS法などの簡易分析法が残留農薬分析に導入されており、外部精度管理調査においても多くの検査機関が適用している。しかし、同法は抽出過程においてホモジナイズなどの高効率な抽出操作を行わないために、農薬が残留した実試料からの抽出能力が十分であるかが問題となっている。そこで、3種類の農薬が残留した玄米を対象試料に用いてQuEChERS法の抽出力を精密に評価した。

B. 研究方法

(1) 外部精度管理調査試料の分析

平成 17 年 1 月 24 日付け食安発第 0124001 号の通知試験法における一斉試験法と個別試験法をベースとした IDMS 法 2 法によって、平成 27 年度に実施した残留農薬検査 I の調査試料（ほうれんそうペースト）を分析した。得られた結果は、試料調製における農薬の添加濃度や参照値と比較した。

(2) QuEChERS 法の評価

対象農薬が残留した玄米粉末を QuEChERS 法によって分析し、一斉試験法による分析値と比較した。抽出前に分析対象農薬の標識体を添加する IDMS を適用することにより、両分析法の抽出能力を精密に比較した。

1. 試料基材および試薬

(1) 試料

平成 27 年度外部精度管理調査（残留農薬検査 I）の調査試料であるほうれんそう試料と、その基材であるほうれんそうペーストは、食品薬品安全センター秦野研究所より提供された。QuEChERS 法の評価には、産業技術総合研究所が平成 27 年度に実施した技能試験の比較試料である玄米粉末を用いた。対象農薬を含まない玄米試料には市場流通品を用いた。

(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クロルピリホス、マラチオン、エトフェンプロックス、チアメトキサム、フェニトロチオンを用いた。標識体の標準品として、林純薬工業製クロルピリホス- d_{10} 、エトフェンプロックス- d_5 、フェニトロチオン- d_6 、CDN Isotopes

製マラチオン- d_6 、および Fluka 製チア
メトキサム- d_3 を用いた。シリンジスパ
イク標準品として CIL 製イミダクロプリ
ド- d_4 と 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 Na_2SO_4 は
関東化学製ポリ塩化ビフェニル・残留農
薬分析用を用いた。メタノール (MeOH)
は関東化学製ポリ塩化ビフェニル・残留
農薬分析用または LC-MS 分析用を用い
た。QuEChERS 法で用いた PSA、グラファ
イトカーボンブラック、C18 は Agilent
Technologies 社製のものを用いた。他
の試薬は試薬級を用い、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) 外部精度管理調査試料の分析用

マラチオン- d_6 とクロルピリホス- d_{10}
を含む Ac 溶液を調製し、内標準溶液 A
とした。また、アラクロールを Ac に溶
解したアラクロール溶液 A を調製し、さ
らにこの一部を Ac に希釈してシリンジ
スパイク溶液 A を調製した。一方、マ
ラチオンとクロルピリホスを Ac に溶解
させ農薬混合溶液 A を調製した。さら
に、農薬混合溶液 A、内標準溶液 A、
アラクロール溶液 A、Ac を混合すること
により、検量線溶液 A を調製した。検
量線溶液 A 中の各成分濃度は、3 (1) およ
び

3 (2) に示す前処理法によってほうれん
そう試料を処理して得られる試料溶液中
の各農薬濃度と等しくなるように調節し
た。

次に、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ほう
れんそうペーストを、3 (1) および 3 (2)
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検量線溶液 A
(分析法 1 用、分析法 2 用) を調製し
た。

(2) QuEChERS 法の評価用

エトフェンプロックス- d_5 とフェニ
トロチオン- d_6 を含む Ac 溶液を調製し、
内標準溶液 B とした。また、アラクロ
ールを Ac に溶解したアラクロール溶
液 B を調製し、さらにこの一部を Ac
に希釈してシリンジスパイク溶液 B を
調製した。一方、エトフェンプロクス
とフェニトロチオンを Ac に溶解させ
農薬混合溶液 B を調製した。さらに、
農薬混合溶液 B、内標準溶液 B、アラ
クロール溶液 B、Ac を混合すること
により、検量線溶液 B を調製した。検
量線溶液 B 中の各成分濃度は、3 (3)
および 3 (4) に示す前処理法によ
って玄米粉末 (比較試料) を処理して
得られる試料溶液中の各農薬濃度と
等しくなるように調整した。

一方、チアメトキサム- d_3 を MeOH
に溶解して内標準溶液 C を調製した。
また、イミダクロプリド- d_4 を Ac
に溶解した内標準溶液 C を調製し、
さらにこの一部を MeOH に希釈して
シリンジスパイク溶液 C を調製した。
一方、チアメトキサムを

MeOH に溶解しチアメトキサム溶液を調製し、これと内標準溶液 C、イミダクロプリド- d_4 溶液、MeOH を混合することにより、検量線溶液 C を調製した。検量線溶液 C 中の各成分濃度は、3 (3) および 3 (4) に示す前処理法によって玄米試料を処理して得られる試料溶液中の各農薬濃度と等しくなるように調整した。

次に、あらかじめ分析対象農薬とその標識体含有しないことを確認した玄米試料を 3 (3) および 3 (4) 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、前述の検量線溶液 B および検量線溶液 C に溶解させることにより、マトリックスマッチ検量線溶液 B (分析法 3 用、分析法 4 用) およびマトリックスマッチ検量線溶液 C (分析法 3 用、分析法 4 用) を調製した。

3. 分析方法

外部精度管理調査試料 (ほうれんそう) の分析には分析法 1 と分析法 2 を適用した。QuEChERS 法の評価においては玄米粉末 (比較試料) を分析法 3 によって分析し、比較のために一斉試験法に準拠した分析法 4 によっても分析した。詳細を以下に記す。

(1) 分析法 1

ほうれんそう試料 5 g に内標準溶液 A を 0.5 mL を加えて静置した。これに水 20 mL を加えて 15 分静置した後、AN 50 mL を加えて細碎し、吸引ろ過した。ろ紙上の残留物に AN 20 mL を加えて細碎した後、吸引ろ過した。合わせたろ液から約 40 mL を分画し、NaCl 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。この抽出液に無水 Na_2SO_4 を加えて脱水し濃縮・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。残留物を 0.8 mL のシリンジスパイク溶液 A 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 (30 m × 0.25 mm、膜厚 0.25 μm 、Agilent Technologies 製)、カラム温度：50 $^{\circ}\text{C}$ で 1 分間保持した後、+25 $^{\circ}\text{C}/\text{分}$ で 125 $^{\circ}\text{C}$ まで昇温し、さらに +10 $^{\circ}\text{C}/\text{分}$ で 300 $^{\circ}\text{C}$ まで昇温し、6.5 分間保持、注入口温度：220 $^{\circ}\text{C}$ 、検出器温度：230 $^{\circ}\text{C}$ (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 ：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})、160 (アラクロール)。

(2) 分析法 2

ほうれんそう試料 5 g に内標準溶液 A を 0.5 mL を加えて静置した後、Ac 70 mL を加えて 3 分間細碎し、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 分間細碎した後、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、