

令和3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）

食品衛生検査施設等の検査の信頼性確保に関する研究

研究分担報告書

分析法の開発及び高精度化と外部精度管理試料への適用

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 副所長
研究分担者	大竹 貴光	(国研) 産業技術総合研究所 主任研究員
研究協力者	中村 圭介	(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正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。

今年度は、食品薬品安全センター 秦野研究所がスプレードライヤにより開発した残留農薬検査用玄米試料中のクロルピリホス、ダイアジノン、フェニトロチオン、マラチオンを対象とし、同位体希釈質量分析法（IDMS）を用いて高精度化した「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）」および環境負荷の低い自動抽出法である超臨界流体抽出法（SFE）を利用した分析法により分析値を付与した。なお本法を適用するにあたり、添加回収試験により正確さを精密に評価し、対象農薬について一斉試験法と SFE 法で同等の分析値が得られることも確認した。

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 (JIS Q 17043:2011) 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。

今年度も引き続き、食品薬品安全センター秦野研究所がスプレードライヤにより開発した残留農薬検査用玄米試料中のクロルピリホス、ダイアジノン、フェニトロチオン、マラチオンを対象とし、IDMSを用いて高精度化した「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)」により、正確な分析値を付与することを目的とした。加えて、環境負荷の低い自動抽出法である超臨界流体抽出法(SFE)を利用した分析法の条件検討を行い、SFEでも玄米試料の分析を行うことを目的とした。また分析値を付与するにあたり、添加回収試験により正確さを精密に評価した。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が過去の研究で明らかとなっているため、この評価において、マトリックスマッチング法を適用したIDMSの正確さについても検討した。

B. 研究方法

(1) 添加回収試験による一斉試験法およびSFE法の評価

対象農薬が検出下限以下であることを確認した、市場流通品のブランク玄米を粉碎したものを試料とし、そこに対象農薬であるクロルピリホス、ダイアジノン、フェニトロチオン、マラチオンをポ

ジティブリストの基準濃度値(クロルピリホス、ダイアジノン、マラチオン: 0.1 mg/kg, フェニトロチオン: 0.2 mg/kg)になるように添加した。本試料を、IDMSを適用した一斉試験法およびSFE法によって分析を行い、得られた結果を解析して各分析法の正確さを精密に評価・比較した。

(2) 残留農薬検査用玄米試料の分析

(1)で評価した分析法を用いて、食品薬品安全センター秦野研究所がスプレードライヤにより開発した残留農薬検査用玄米試料(Lot 1 (120 °C), 2 (100 °C), 3 (80 °C)の3種, 温度は噴霧温度を示す)中の対象農薬を分析した。得られた結果は、試料調製における農薬の添加濃度等と比較した。

1. 試料基材および試薬

(1) 試料

添加回収試験による一斉試験法およびSFE法の評価には、粉碎して粉末とした市場流通品の玄米を用いた。分析により、当該玄米試料中の対象農薬は検出下限以下であることを確認した。また、食品薬品安全センター秦野研究所がスプレードライヤにより開発した残留農薬検査用玄米試料(Lot 1 (120 °C), 2 (100 °C), 3 (80 °C)の3種, 温度は噴霧温度を示す)も分析対象とした。

(2) 標準品

測定対象農薬の高純度標準品として、富士フィルム和光純薬製ダイアジノン、フェニトロチオン、マラチオン(以上TraceSure)、クロルピリホス(Traceable Reference Material)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} 、フェニトロチオン- d_6 、Toronto Research Chemicals 製マラチオン- d_6 とダイアジノン- d_{10} を用いた。シリンジスパイク標準品としてジーエル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 (To1)、メタノール (Me)、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。他の試薬は試薬グレードを用い、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) 添加回収試験による一斉試験法およびSFE法の評価用

クロルピリホス- d_{10} 、ダイアジノン- d_{10} 、フェニトロチオン- d_6 、マラチオン- d_6 を含む Ac 溶液を調製し、内標準溶液 A とした。アラクロールを Ac に溶解した溶液を調製し、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、クロルピリホス、ダイアジノン、フェニトロチオン、マラチオンを 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 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製した。

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玄米試料を 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-1 (一斉試験法用) および A-2 (SFE 法用) を調製した。

(2) 残留農薬検査用玄米試料の分析用

(1) と同様に、内標準溶液 B、農薬混合溶液 B、アラクロール溶液 B、検量線溶液 B、マトリックスマッチ検量線溶液 B-1 (一斉試験法用) および B-2 (SFE 法用) を調製した。なお、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残留農薬検査用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製した。

3. 分析方法

添加回収試験による一斉試験法の評価では分析法 1 を、SFE 法の評価では分析法 2 を用いて玄米中の農薬を分析し、各分析法の評価を行った。また、残留農薬検査用玄米試料中の農薬分析には分析法 3, 4 を用いた。

(1) 分析法 1 (一斉試験法、添加回収試験)

玄米試料 3 g に農薬混合溶液 A 0.4 mL および内標準溶液 A 0.4 mL を加えて静置した。これに水 10 mL を加えて 15 分静置した後、AN 25 mL を加えて細砕し、吸引ろ過した。ろ紙上の残留物に AN 10 mL を加えて細砕した後、吸引ろ過した。これに NaCl 110 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、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、振とうによって得られた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Na₂SO₄によって脱水し濃縮・乾固した後、AN/To1 (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/To1 (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/To1 (3:1) 混液20 mLを注入した。全溶出液を乾固して得られた残さをアラクロール溶液A 0.5 mLに溶解させ、試料溶液とした。

試料溶液中の対象農薬を、GC/MS によって測定した。測定条件は以下の通りである。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 °Cで2分間保持した後、+20 °C/分で160 °Cまで昇温し、さらに+7 °C/分で300 °Cまで昇温し、10分間保持、注入口温度：250 °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*：314 (クロルピリホス)、324 (クロルピリホス-*d*₁₀)、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)、285 (マラチオン)、291 (マラチオン-*d*₆)、188 (アラクロール)。

(2) 分析法 2 (SFE 法、添加回収試験)

玄米試料 1 g に農薬混合溶液 A0.15 mL および内標準溶液 A0.15 mL を加えて静置した。これに約 10 g の Na₂SO₄ を加え、ステンレス製の 15 mL 抽出管 (日本分光製) に試料を導入し、日本分光製の超臨界抽出装置 (ポンプ 1：PU-2080-CO₂、ポンプ 2：PU-2080 Plus、ミキサー：MX-2080-32、オーブン：CO-2065 Plus、背圧調整弁：BP-2080 Plus) を用いて抽出を行った。抽出条件は以下の通りである；溶媒：25%(v/v)Me/超臨界二酸化炭素、温度：80 °C、圧力：25 MPa、溶媒流量：2.5 mL/min、抽出時間：20 min。抽出液を、抽出装置出口に接続した ODS カラム (日本分光製、PES-10-1/16) に通液した後、ナス型フラスコに回収した。回収した抽出液を、あらかじめ AN/To1 (3:1) 混液 10 mL でコンディショニングした Supelco 製 ENVI-Carb/LC-NH₂ 固相抽出カートリッジ (500 mg/500 mg) に注入し、さらに AN/To1 (3:1) 混液 20 mL を注入した。全溶出液を乾固して得られた残さをアラクロール溶液 A 0.2 mL に溶解させ、試料溶液とした。

試料溶液中の対象農薬を GC/MS によって測定した。測定条件は、分析法 1 と同じである。

(3) 分析法 3 (一斉試験法、残留農薬検査用玄米試料の分析)

残留農薬検査用玄米試料 3 g に内標準溶液 B0.4 mL を加えて静置した。これより後の工程は、分析法 1 と同様に実施した。

(4) 分析法 4 (SFE 法、残留農薬検査用玄米試料の分析)

残留農薬検査用玄米試料 1 g に内標準溶液 B0.15 mL を加えて静置した。これより

後の工程は、分析法2と同様に実施した。

4. 評価方法

(1) 農薬濃度の算出

3 で示した分析方法で得られた結果を基に、以下の式によって農薬濃度を算出した。

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

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 ：試料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 ：検量線溶液の測定における分析対象農薬の標識体に対する面積比、 M_c ：検量線溶液中の農薬混合液の質量、 C_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 ：分析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、 $M_{sp(c)}$ ：検量線溶液中の内標準溶液の質量、である。

(2) 添加回収試験による一斉試験法およびSFE法の評価

式(1)に準じて一斉試験法（分析法1）およびSFE法（分析法2）による分析値を算出した。得られた結果を、玄米試料への添加濃度（クロルピリホス、ダイアジノン、マラチオン：0.1 mg/kg、フェニトロチオン：0.2 mg/kg）と比較することにより、各分析法の正確さを評価した。なお、マトリックスマッチ検量線溶液 A-1（一斉試験法用）および A-2（SFE法用）を用いた測定結果により評価を行ったが、比較のために、検量線溶液 A を用いた測定結果も算出した。

(3) 残留農薬検査用玄米試料の分析

式(1)に準じて一斉試験法（分析法3）およびSFE法（分析法4）による分析値を算出した。得られた結果は、試料調製における農薬の添加濃度等と比較した。

（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、特に有害な溶媒（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. 一斉試験法の評価

分析法1で得られた定量値と調製値の比を表1に示す。この結果から、本方法によって調製値通りの分析値が得られることが示された。また各農薬の標識体の回収率も、95～101%と良好であった。なお、マトリックスマッチングを行っていない検量線溶液 A を用いた場合の算出結果は、クロルピリホスが102%、ダイアジノンが96%、フェニトロチオンが89%、マラチオンが98%であり、マトリックスマッチ検量線溶液 A-1 との結果と比べてフェニトロチオンの測定結果に偏りが生じることが確認された。よって、マトリックスマッチ検量線を用いて定量することが適切であると考えられた。

2. SFE法の評価

SFE法は、抽出溶媒として超臨界流体を用いる抽出法であり、抽出操作の自動化が可能であることから、食品試料のみならず、環境試料や生体試料などを対象として、使用されている。また、抽出溶

媒として主に超臨界二酸化炭素を用いるため、その他の有機溶媒を用いる抽出法と比較して環境への負荷が低いという特徴がある。さらに、同じく超臨界流体を用いた機器分析法である超臨界流体クロマトグラフ-質量分析法とオンライン接続することで、抽出から測定までを一括で行えるシステムも開発されており、国内で今後普及する可能性が高いことから、本研究においては食品中の正確な農薬分析の検討に用いた。SFE 法（分析法 2）で得られた定量値と調製値の比を、表 1 に示す。この結果から、SFE 法によっても調製値通りの分析値が得られることが示された。さらに、各農薬の標識体の回収率も、72~83 %と良好であった。これより、本研究で対象とした玄米中の農薬に対して、SFE 法によって十分に対象農薬が抽出され、正確な分析値が得られることが示された。なお一斉試験法と同様に、マトリックスマッチングしていない検量線 A を用いた場合の比も算出した。計算の結果、クロルピリホスが 103 %、ダイアジノンが 99 %、フェニトロチオンが 96 %、マラチオンが 96 %であり、マトリックスマッチ検量線溶液 A-2 との結果と比べてクロルピリホスとフェニトロチオンの測定結果に若干の偏りが生じることが確認された。結果的には一斉試験法と大きな差は見られず、SFE 法においてもマトリックスマッチ検量線を用いて定量することが適切であるという結果が得られた。

3. 残留農薬検査用玄米試料の分析

食品薬品安全センター秦野研究所より提供された残留農薬検査用玄米試料の、

Lot 1 (120 °C), 2 (100 °C), 3 (80 °C) (温度は噴霧温度を示す) の 3 種類に含まれる対象農薬を、一斉試験法および SFE 法によって分析した。得られた結果を表 2, 3 (マトリックスマッチ検量線を使用) に、代表的なクロマトグラムを図 1, 2 に示す。これらより、クロマトグラムにおいて対象農薬のピークに夾雑物による妨害が見られず、一斉試験法と SFE 法の定量結果もよく一致していた。食品薬品安全センター秦野研究所によると、添加濃度はクロルピリホス: 0.1, ダイアジノン: 0.4, フェニトロチオン: 0.2, マラチオン: 0.2 (単位は mg/kg) であり、調製時の回収率は 45~75 %程度と予想されるということであった (農薬の種類によって回収率は異なる)。本研究で得られた結果 (表 2, 3) を用いて、調製時の回収率を計算した結果を表 4, 5 に示す。これより、一斉試験法および SFE 法の分析結果が、添加濃度と調製時の回収率から予測される濃度の範囲とよく一致していたことが示された。以上より、玄米中の対象農薬について、本研究で検討した方法により信頼性が高い分析値が得られたと考えられる。

E. 結論

IDMS を用いて高精度化した一斉試験法と SFE 法の正確さを、添加回収試験により精密に評価し、対象農薬について両方法で同等の分析値が得られることが確認できた。このとき、マトリックスマッチ検量線を用いることが適切であることも示された。これらの分析法によって、食品薬品安全センター秦野研究所が調製し

た玄米試料中農薬に正確な分析値を付与
することができた。

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

1) 中村圭介、大竹貴光、羽成修康：ネギ中のネオニコチノイド系農薬分析における超臨界流体抽出法の評価、日本食品衛生学会第117回学術講演会、Web開催、2021

2) 中村圭介、大竹貴光、羽成修康：Evaluation of the automatic extraction techniques for the determination of neonicotinoid pesticides in green onion、The 2021 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem2021)、Web開催、2021

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

表1 一斉試験法およびSFE法による添加回収試験の結果

対象農薬	調製値に対する分析値の比 (平均値±標準偏差, n=4, %)	
	一斉試験法	SFE 法
クロルピリホス	99.6±0.9	100.0±0.6
ダイアジノン	99.7±0.3	100.2±0.5
フェニトロチオン	97.3±1.6	99.4±0.6
マラチオン	98.8±2.8	98.9±1.5

表2 一斉試験法によって得られた残留農薬検査用玄米試料中の農薬濃度 (平均値±標準偏差, n=3, mg/kg)

対象農薬	Lot 1	Lot 2	Lot 3
クロルピリホス	0.058 ± 0.002	0.068 ± 0.001	0.066 ± 0.001
ダイアジノン	0.186 ± 0.006	0.250 ± 0.004	0.248 ± 0.002
フェニトロチオン	0.118 ± 0.003	0.143 ± 0.004	0.137 ± 0.003
マラチオン	0.108 ± 0.004	0.134 ± 0.002	0.131 ± 0.002

表3 SFE法によって得られた残留農薬検査用玄米試料中の農薬濃度 (平均値±標準偏差, n=3, mg/kg)

対象農薬	Lot 1	Lot 2	Lot 3
クロルピリホス	0.059 ± 0.002	0.069 ± 0.001	0.068 ± 0.002
ダイアジノン	0.187 ± 0.005	0.248 ± 0.002	0.254 ± 0.008
フェニトロチオン	0.112 ± 0.003	0.137 ± 0.002	0.137 ± 0.003
マラチオン	0.103 ± 0.003	0.134 ± 0.004	0.133 ± 0.003

表4 一斉試験法の分析結果を基にした試料調製時の回収率 (平均値±標準偏差, n=3, %)

対象農薬	Lot 1	Lot 2	Lot 3
クロルピリホス	58.3 ± 2.5	68.8 ± 1.1	65.5 ± 1.5
ダイアジノン	46.5 ± 1.6	62.6 ± 1.0	62.0 ± 0.4
フェニトロチオン	59.2 ± 1.6	71.6 ± 2.0	68.4 ± 1.7
マラチオン	53.8 ± 2.0	67.1 ± 1.1	65.6 ± 0.9

表5 SFE法の分析結果を基にした試料調製時の回収率 (平均値±標準偏差, n=3, %)

対象農薬	Lot 1	Lot 2	Lot 3
クロルピリホス	59.2 ± 1.5	69.0 ± 0.8	68.2 ± 2.0
ダイアジノン	46.8 ± 1.2	62.1 ± 0.6	63.5 ± 2.0
フェニトロチオン	56.2 ± 1.6	68.7 ± 1.0	68.7 ± 1.8
マラチオン	51.4 ± 1.7	67.1 ± 2.1	66.3 ± 1.7

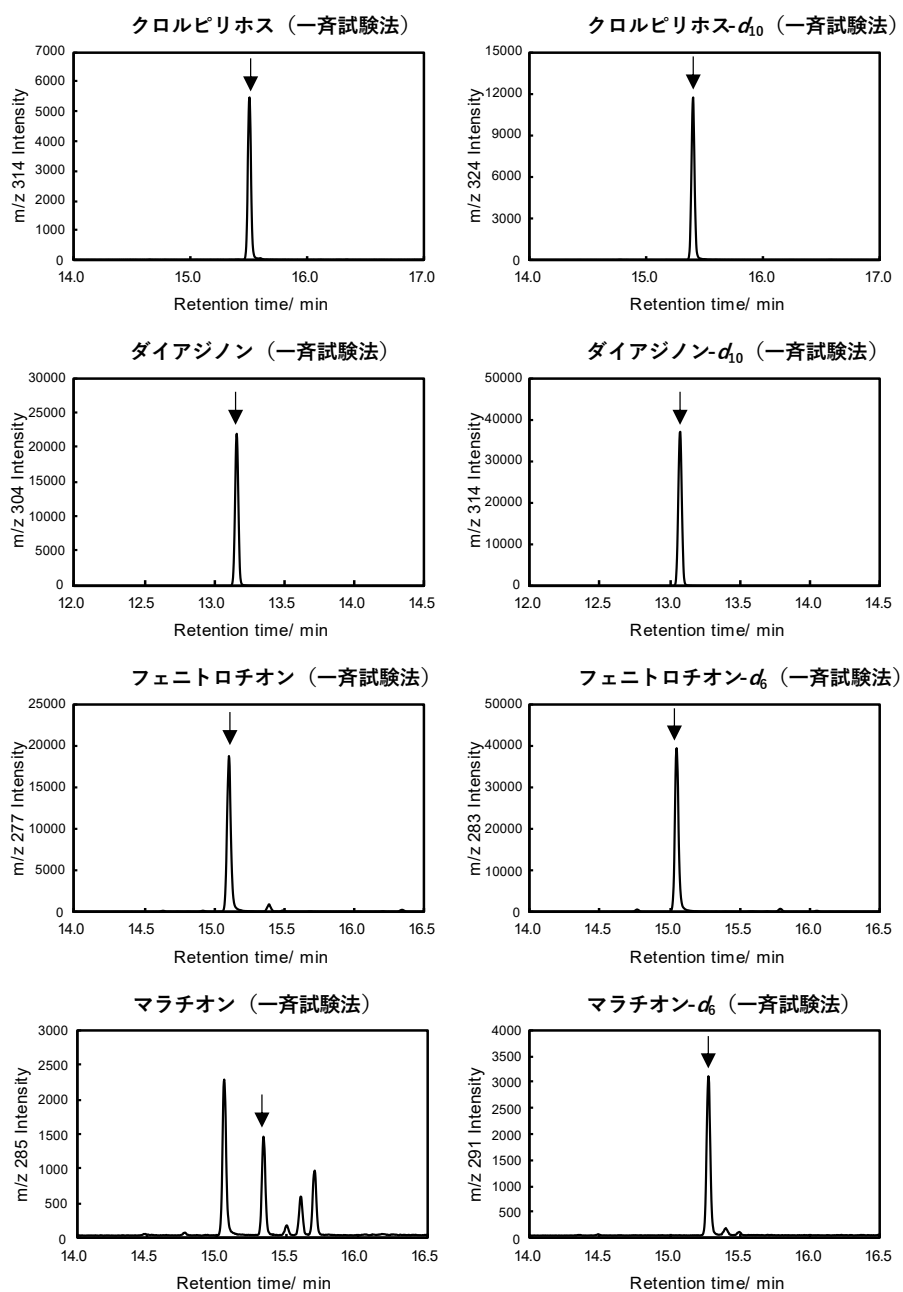


図1 一斉試験法によって得られた残留農薬検査用玄米試料中の対象農薬のGC/MSクロマトグラム

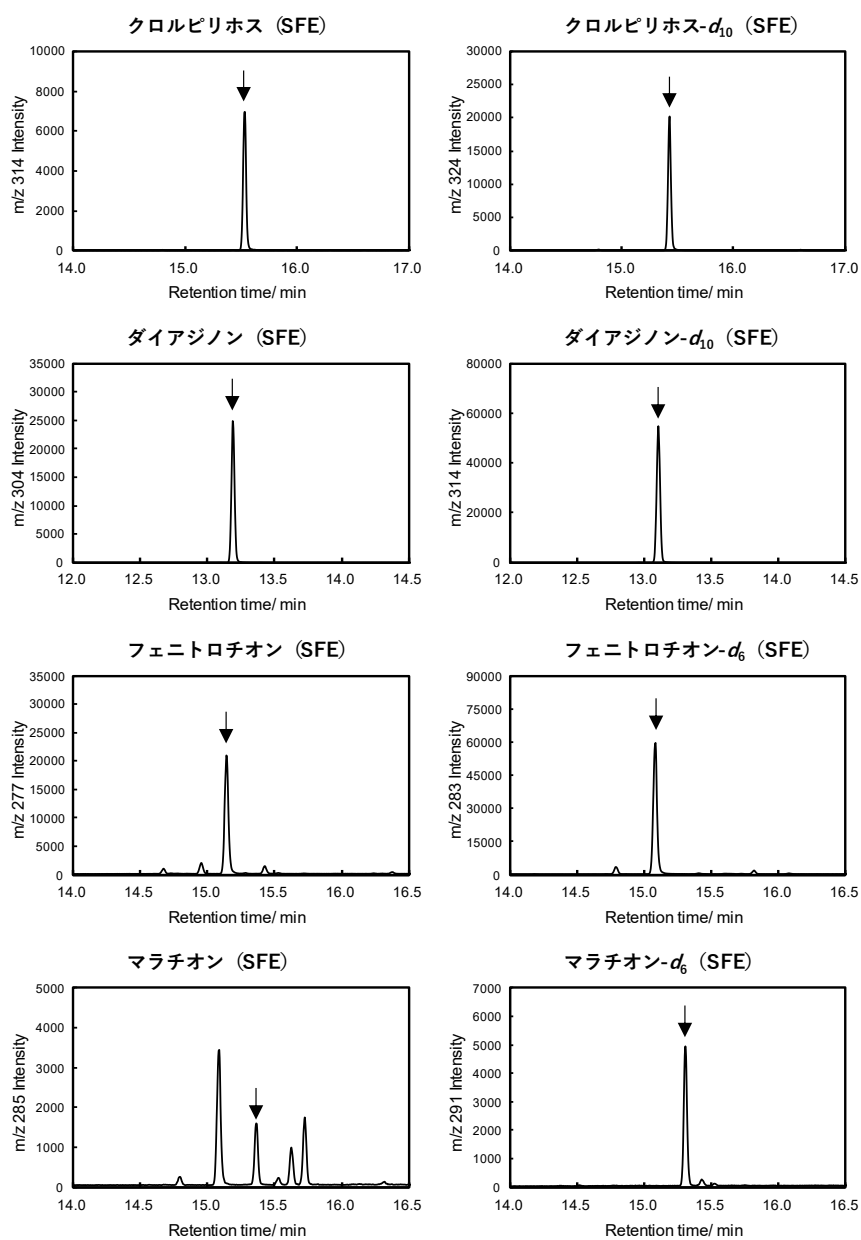


図 2 SFE 法によって得られた残留農薬検査用玄米試料中の対象農薬の GC/MS クロマトグラム