

令和4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 部長
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。

今年度は、昨年度の再現性を確認することを目的として、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。

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。

今年度は、昨年度の再現性を確認することを目的として、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、これまでの本研究で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、昨年度と同様に、環境負荷の低い自動抽出法である超臨界流体抽出法（SFE）を利用した分析も実施した。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おり、昨年度本研究でも評価した結果から、今年度もマトリックスマッチング法を適用したIDMSによって分析を行った。

B. 研究方法

昨年度、高精度化し、妥当性を評価した一斉試験法と SFE 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℃）、2（100℃）、3（80℃）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

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℃）、2（100℃）、3（80℃）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（Tol）、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、残留農薬検査用玄米試料の分析のため、以下のように溶液を調製した。

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。

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(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。

3. 分析方法

残留農薬検査用玄米試料中の農薬分析には、以下の分析法 1, 2 を用いた。

(1) 分析法 1 (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 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 AN 10

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 AN 2 mL を通液する処理を行った。得られた処理液を無水 Na_2SO_4 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 $^{\circ}\text{C}$ で 2 分間保持した後、+20 $^{\circ}\text{C}$ /分で 160 $^{\circ}\text{C}$ まで昇温し、さらに +7 $^{\circ}\text{C}$ /分で 300 $^{\circ}\text{C}$ まで昇温し、10 分間保持、注入口温度：250 $^{\circ}\text{C}$ 、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 ：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、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 A 0.13 mL を加えて静置した。これに約 10 g の Na_2SO_4 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- CO_2 、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。全抽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高速液体クロマトグラフ／タンデム質量分析計 (LC/MS/MS) によって測定した。測定条件は、以下の通りである。装置：ACQUITY UPLC-Xevo TQ system (Waters 製)、カラム：L-column3 C18 (粒子径：3 μm 、カラムサイズ：150 mm \times 2.1 mm i. d.、化学物質評価研究機構製)、カラム温度：40 °C、試料注入量：4 μL 、溶離液 A：1 mM 酢酸アンモニウム水溶液、溶離液 B：1 mM 酢酸アンモニウムメタノール溶液、流量：0.2 mL/min、グラジエ

ント条件：溶離液 A の割合を 85% から 1 分間で 60% に減少させた後、60% で 2.5 分間保持し、-4%/分で 50% まで減少させ、次に -2.5%/分で 45% まで減少させ、さらに -4.2%/分で 5% まで減少させた後に 7.5 分間保持した。イオン化方法：ESI、キャピラリー電圧：3.0 kV、コーン電圧：20~30 V、コリジョンエネルギー：15~30 eV、イオン源温度：150 °C、脱溶媒温度：650 °C、定量に用いた m/z (プリカーサーイオン→プロダクトイオン)：350→97 (クロルピリホス)、360→99 (クロルピリホス- d_{10})、305→169 (ダイアジノン)、315→170 (ダイアジノン- d_{10})、278→125 (フェニトロチオン)、284→131 (フェニトロチオン- d_6)、331→127 (マラチオン)、337→127 (マラチオン- d_6)、270→162 (アラクロール)

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。

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

ここで、 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) 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

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1, 2（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1, 2）を用いて、調製時の回収率を計算した結果を表3, 4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概ね一致していたことが示され、本研究の分析法により信頼性が高い分析値が得られたと考えられる。また、噴霧温度の各条件の分析結果を比較してみると、添加濃度に対する回収率は80 °Cでもっとも高く、58%から69%であった。農薬別に見てみると、どの噴霧温度でもダイアジノンの回収率が一番低く、フェニトロチオンが一番高かった（クロルピリホスとマラチオンは同程度であった）。どの農薬でも、120 °Cでの回収率がもっとも低くなったのは昨年度と同じ傾向であったが、80 °Cと100 °Cは傾向が異なっていた。噴霧温度を確定させるためには、今後、さらなる検討が必要だと考えられる。

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。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、マラチオンの回収率を昨年度の結果と比較すると、どの農薬でも、120 °Cでの回収率がもっとも低くなったのは同じ傾向であったが、80 °Cと100 °Cは傾向が異なっ

ていた。噴霧温度を確定させるためには、今後、さらなる検討が必要だと考えられる。

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

1) 中村圭介、大竹貴光、羽成修康：玄米中の有機りん系農薬，ピレスロイド系農薬，及びジチオラン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118回学術講演会、長崎、2022

2) 大竹貴光、青柳嘉枝、鎗田孝：凍結粉碎した穀類試料中の冷凍条件における農薬の安定性評価、第45回日本農薬学会農薬残留分析研究会、香川（ハイブリッド開催）、2022

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	0.055 ± 0.0002	0.062 ± 0.0001	0.066 ± 0.0003
ダイアジノン	0.164 ± 0.001	0.191 ± 0.001	0.230 ± 0.001
フェニトロチオン	0.117 ± 0.001	0.130 ± 0.001	0.139 ± 0.0003
マラチオン	0.107 ± 0.001	0.122 ± 0.001	0.132 ± 0.001

表2 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	0.051 ± 0.004	0.064 ± 0.002	0.067 ± 0.001
ダイアジノン	0.163 ± 0.006	0.184 ± 0.008	0.228 ± 0.006
フェニトロチオン	0.120 ± 0.003	0.128 ± 0.005	0.142 ± 0.005
マラチオン	0.105 ± 0.005	0.121 ± 0.002	0.133 ± 0.004

表3 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	55.1 ± 0.2	61.8 ± 0.1	66.1 ± 0.2
ダイアジノン	41.1 ± 0.4	47.7 ± 0.5	57.5 ± 0.3
フェニトロチオン	58.7 ± 0.5	65.1 ± 0.5	69.4 ± 0.2
マラチオン	53.3 ± 0.4	61.0 ± 0.8	66.2 ± 0.5

表4 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	51.5 ± 4.1	63.8 ± 1.6	67.2 ± 1.3
ダイアジノン	40.7 ± 1.4	46.1 ± 1.9	57.1 ± 1.4
フェニトロチオン	60.0 ± 1.5	63.8 ± 2.6	71.1 ± 2.6
マラチオン	52.6 ± 2.7	60.3 ± 0.9	66.4 ± 1.8

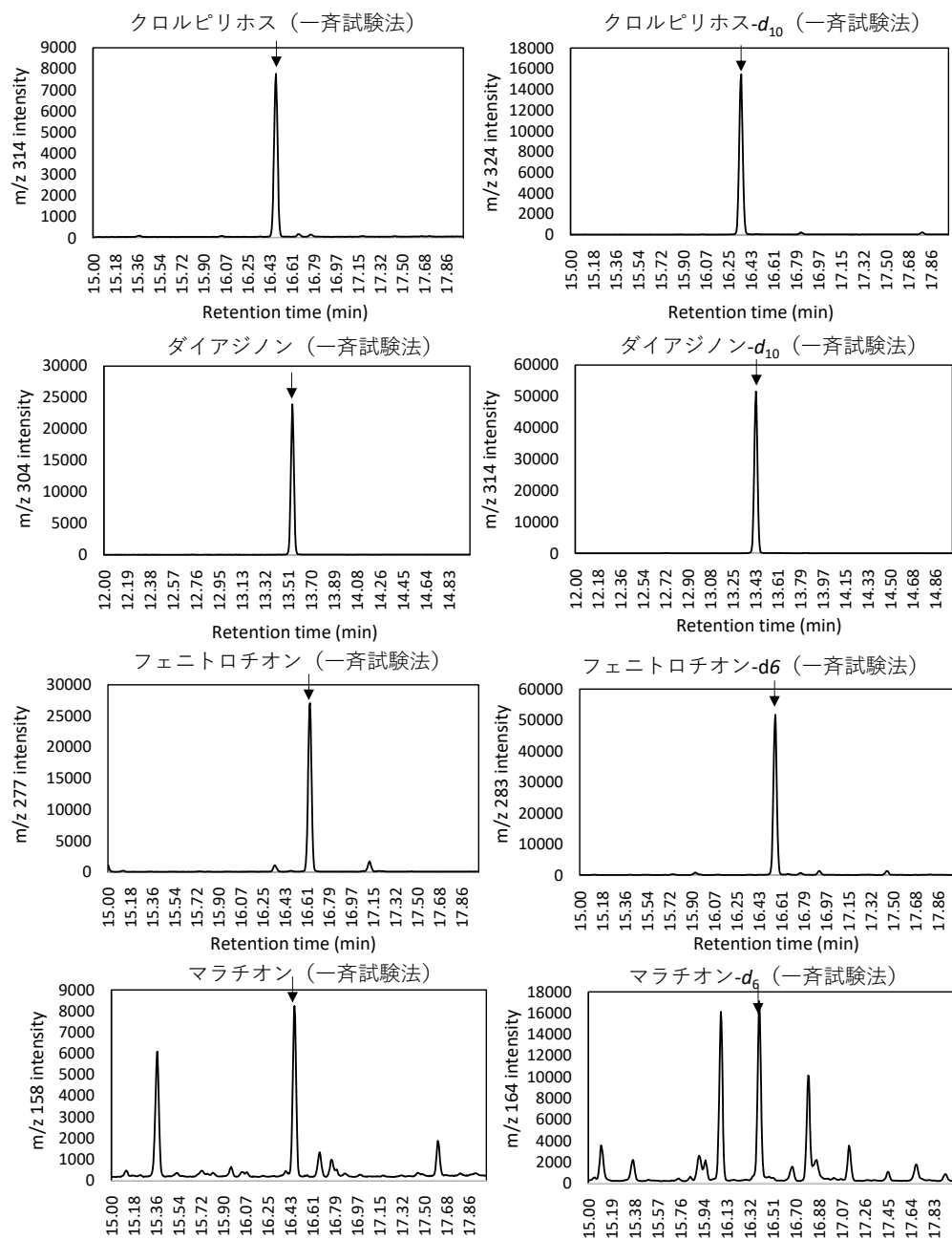


図1 一斉試験法によって得られた残留農薬検査用玄米試料中の対象農薬のGC/MSクロマトグラム

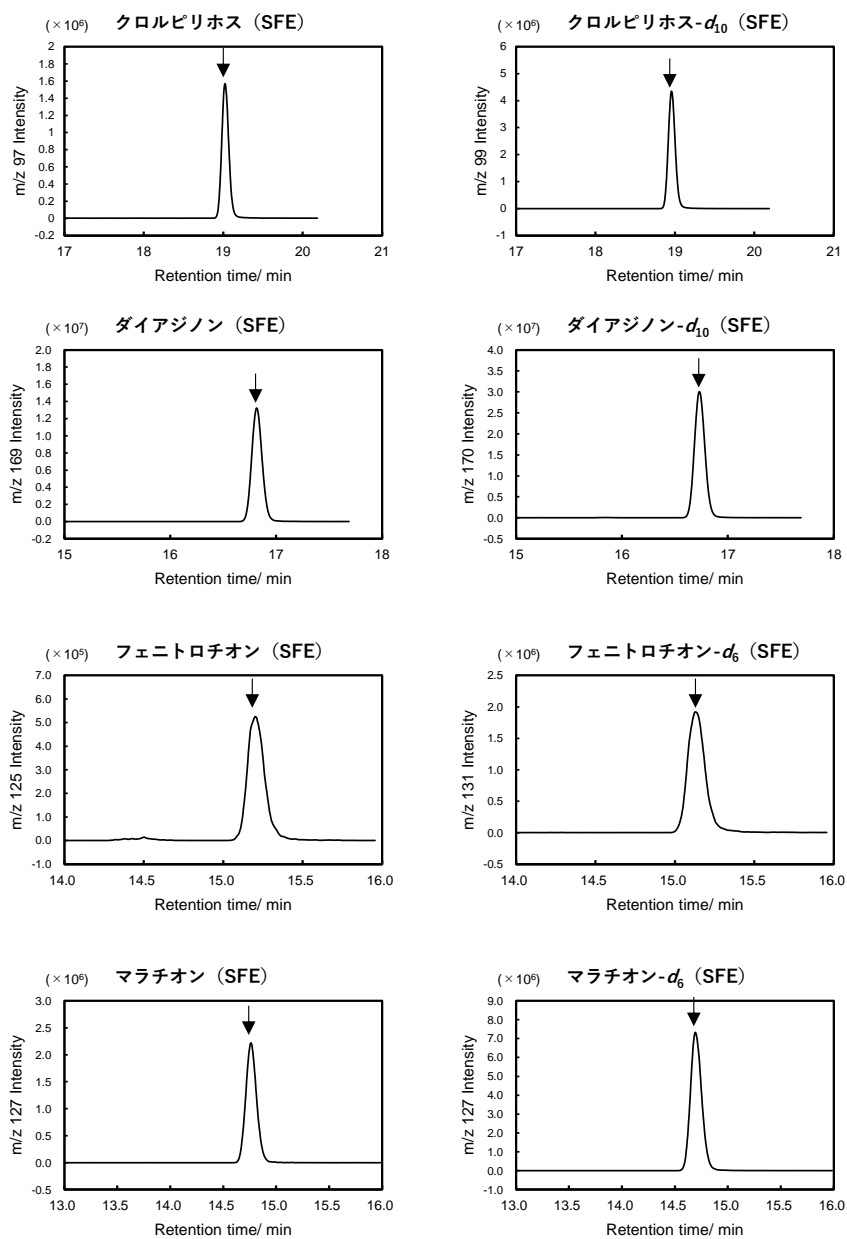


図 2 SFE 法によって得られた残留農薬検査用玄米試料中の対象農薬の LC/MS/MS クロマトグラム