

2016 年度

中部大学博士（応用生物学）学位論文

食品から意図的・非意図的に摂取される
化学物質を対象とした分析技術の開発

2017 年 3 月

中部大学大学院 応用生物学研究科

藤 吉 智 治

目次

第1章 本研究の背景

1.1 食品中の化学物質分析	1
1.2 残留農薬分析	9
1.3 食品添加物分析	16
1.4 食品中の化学物質分析における課題	19
1.5 本研究の目的	21
引用文献	23

第2章 GC-MSによる食品中残留農薬分析におけるマトリクス効果

低減に関する研究

2.1 緒言	27
2.2 実験方法	29
2.3 結果及び考察	36
2.4 結言	55
引用文献	56

第3章 吸光光度計による迅速な食品中保存料分析に関する研究

3.1 緒言	58
3.2 実験方法	60
3.3 結果及び考察	65
3.4 結言	79
引用文献	81

第4章 総括

4.1 本研究の目的	83
4.2 GC-MS による食品中残留農薬分析におけるマトリクス効果低減に 関する研究	85
4.3 吸光光度計による迅速な食品中保存料分析に関する研究	86
4.4 結語	87
投稿論文	89
1. 本研究に関わる投稿論文	
2. その他の投稿論文	
謝辞	91

第 1 章 本研究の背景

1.1 食品中の化学物質分析

1.1.1 食品と化学物質

食品中の化学物質の分析は、食品由来の成分分析と、本来は食品に含まれない物質の分析に分けられる。前者はタンパク質、炭水化物、脂質、ビタミンなどの食品を構成する主要な成分を分析対象とした分析であり、後者は農薬、動物用医薬品、カビ毒、食品添加物等の外部要因により食品に含有（残留）する物質を分析対象としている。食品分析の主な目的は食品の食品衛生法への適合性を確認することである。栄養成分は食品表示法に基づいた適切な成分表示が求められ、残留農薬や食品添加物はそれぞれ残留基準、使用基準に適合しなければならない。残留基準、使用基準は化学物質の毒性評価をもとに算出した一日摂取許容量（acceptable dairy intake : ADI）を超えないよう設定されている。ADIは無毒性量を安全係数 100 で除して求める[Figure 1.1]。

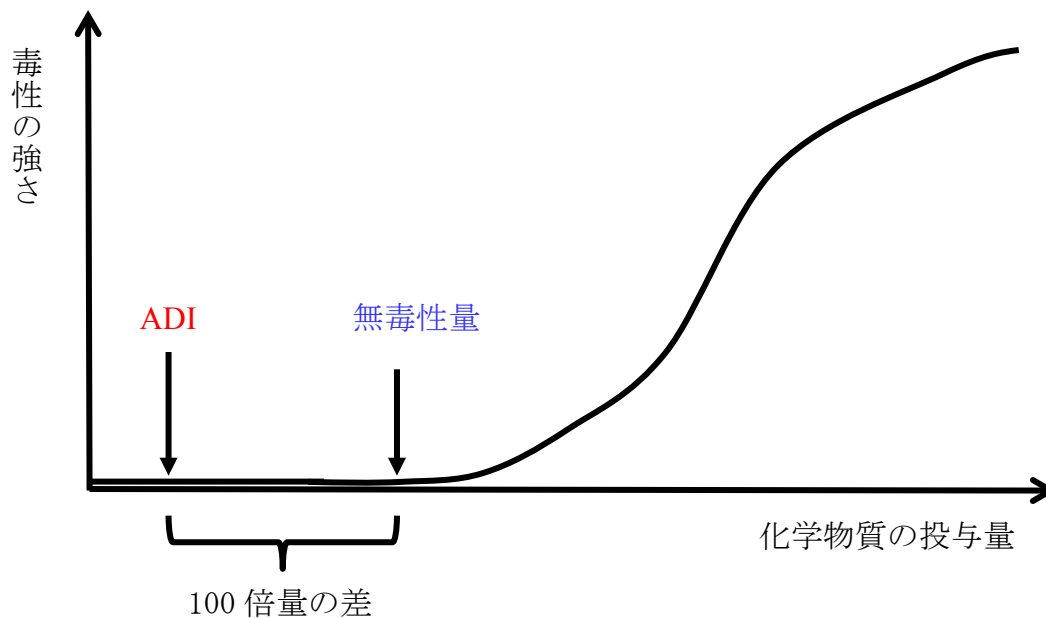


Figure 1.1 Determination of the ADI value based on toxicity evaluation.

農薬は農産物の収量向上、生産者の労力削減に必要な化学物質であるが、農薬を使用することにより農産物への農薬の残留が生じる。消費者は農薬が残留した食品の購入は出来る限り避けたいものであるが、販売されている農産物に使用された農薬や、その残留量を購入時に把握することができないため、農薬は食品を介して非意図的に摂取される化学物質である。その一方で、食品添加物は何らかの有効性を得るために食品へ添加される化学物質であり、添加の有無は食品表示から確認することができる。食品添加物の摂取を避けたい場合は無添加の食品を選択することが可能であるため、食品添加物は意図的に摂取する化学物質と考えることができる[Figure 1.2]。

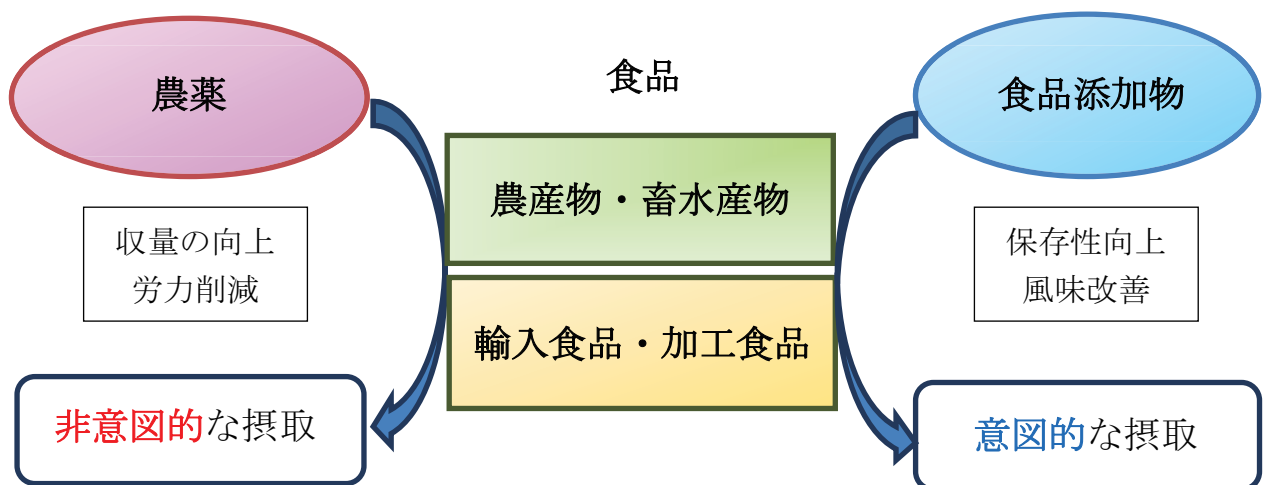


Figure 1.2 Chemical substances intentionally and unintentionally ingested from foods.

非意図的、意図的に関わらず残留農薬や食品添加物は人為的に使用する化学物質であり、これらは食品を介して人体に摂取されるため、過剰摂取による健康被害を防止する観点から食品中の含量を監視することは重要である。食品中の化学物質量を正確に確認するためには、分析機器を用いた定量分析が必要である。

1.1.2 分析の手順

食品中の化学物質分析の流れは、試料の均一化、抽出、精製、測定に大別される[Figure 1.3]。

① 試料の均一化



検査部位の採取



粉碎

②抽出

振とう
ホモジナイズ



分析対象物質の抽出

③精製

LLE



食品マトリクスの除去

SPE



④測定・解析



GC-MS



LC-MS

分析対象物質の検出・定量

Figure 1.3 Outline of chemical substances analysis in foods.

「試料の均一化」は、試料から検査部位を取り出し、粉碎して均一化する工程である。分析対象物質が食品中に均一に存在することは稀であり、検査部位によって濃度差が生じる。残留農薬は主に作物の表面に局在化して残留するため、収穫した作物間の固体差も生じる。分析対象物質の局在化や試料の固体差を考慮して、分析結果が試料全体を代表する結果となるよう試料を均一化することは分析の成否を分ける重要な操作である。均一化の過程で粉碎時の熱や試

料由来の成分により分析対象物質が分解する可能性があるため、化学物質の物性を考慮して適切な処理を実施しなければならない。

「抽出」は分析対象物質を試料から抽出溶媒へ移行させる操作である。抽出溶媒は分析対象物質を溶解し、かつ試料への浸透性を有する溶媒を選択する必要がある、一般的には水和性の高いアセトンやアセトニトリルなどの有機溶媒が用いられる。試料に抽出溶媒を加え、振とう機やホモジナイザーを用いて試料と溶媒を接触させることで抽出する。近年では超臨界流体を用いた抽出法も採用されている。超臨界流体は溶媒気化による抽出に利点があり、有機溶媒による抽出と比較して夾雑成分の抽出量を抑えることができるため、その後の精製操作を簡略化することが可能である。[1-3]。

「精製」は分析対象物質以外の成分を除去する操作である。抽出により得られた抽出液中には食品由来の食品成分（マトリクス）が多量に存在しているが、食品マトリクスは全て分析上の妨害物質となり、添加回収試験における回収率の低下、誤検出や測定不能の要因となる。分析対象物質に対して食品マトリクス量が多いほど、分析結果に与える影響は大きくなるため、信頼性の高い結果を得るためにはできる限り食品マトリクスを除去しなければならない。食品中の化学物質分析に用いられる主な精製法として液液抽出法（liquid liquid extraction : LLE）、固相抽出法（solid phase extraction : SPE）が挙げられる。LLEとSPEの基本的な原理は、二相間での溶質の分配に基づくものである。LLEの基本操作をFigure 1.4に示す。LLEは混じり合わない二相の溶媒間における物質の分配により抽出を行う方法であり、最も一般的に行われるのは水溶性抽出液から有機溶媒へ分析対象物質を移行させる操作である。分配平衡に達する時間を早めるため振とう操作を繰り返し、静置して溶媒を分離した後、有機溶媒層を採取する。LLEにより抽出液中に含まれる糖類などの水溶性夾雑成分、及び

水分を除去できる。SPE では溶媒に溶解した分析対象物質と固相抽出剤との間で物理的相互作用を利用して抽出を行う。SPE の基本操作を Figure 1.5 に示す。コンディショニングにより固相抽出剤を溶媒和させた後、試料抽出液を注入して分析対象物質を固相抽出剤に保持させる。洗浄では、分析対象物質を保持させた状態で固相抽出剤から夾雑成分を洗い流す。溶出では、固相抽出剤から分析対象物質を解離させ、得られた溶出液を次工程へ供する。SPE は回収率、選択性、迅速性、簡便性に優れており、LLE と比較して溶媒使用量が少ないため環境配慮型の手法であり、現在の食品分析の前処理法として主流となっている方法である。SPE に用いる固相抽出剤の分離モードは主に吸着、分配、イオン交換である。吸着及び分配モードでは親水性及び親油性相互作用、イオン交換モードでは静電相互作用の原理を利用して物質を抽出する。精製後、測定に使用する機器に適した溶媒で溶解させたものを測定用の試験溶液とする。

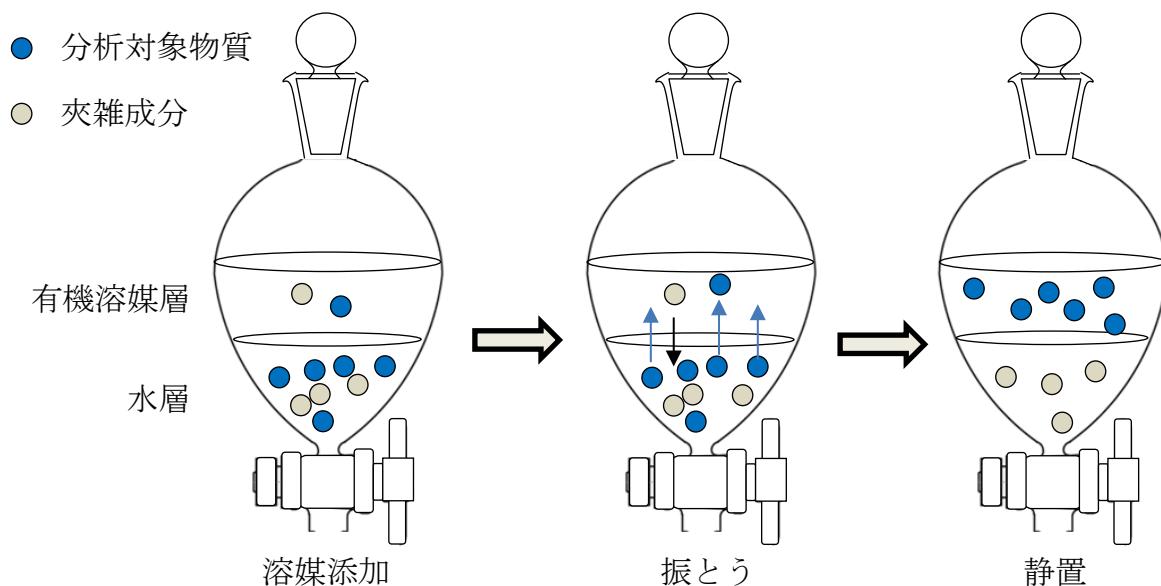


Figure 1.4 Operation procedure of LLE.

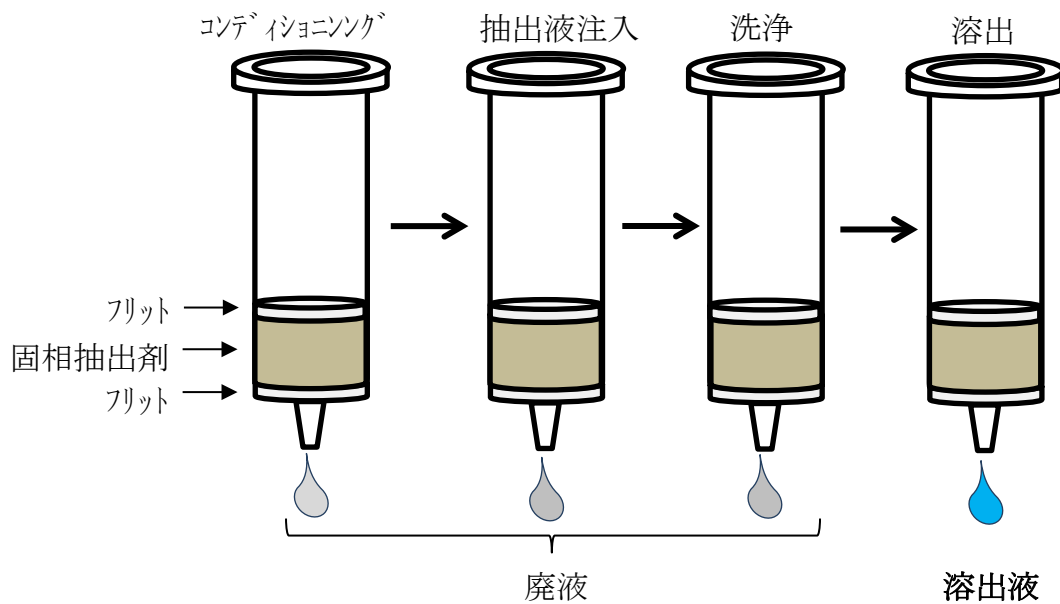


Figure 1.5 Operation procedure of SPE.

「測定」では、残留農薬及び食品添加物を対象とした分析の場合、主な測定機器としてガスクロマトグラフィー (gas chromatography : GC)、高速液体クロマトグラフィー (high performance liquid chromatography : HPLC) や、それらと質量分析計 (mass spectrometry : MS) とのハイフネーション技術を使用する。前処理の精製によって試験溶液中の食品マトリクスを完全に除去することは困難であるため、クロマトグラフィーにより目的物質と食品マトリクスを分離する必要がある。機器に注入した試験溶液中の物質は分析カラム上でクロマトグラフィーにより分離され、カラムから溶出した物質は検出器によって検知される。検出器の応答値は物質の濃度に比例するため、濃度既知の標準物質を用いることにより定量分析が可能である。GC、HPLC では分析カラムからの溶出時間 (保持時間) が標準物質と一致することにより定性判断が可能であるが、多成分分析においては保持時間のみでは定性判断が困難であるため、検出器には物質固有の質量を検出可能な質量分析計が必須である。

1.1.3 食品流通における化学物質分析の役割

我が国は食糧自給率が約 40%であり[4]、食糧の大部分を海外からの輸入食品に頼らざるを得ない状況である。毎年、多くの食品を海外から輸入しており、輸入届出件数は年々増加傾向である[Figure. 1.6]。

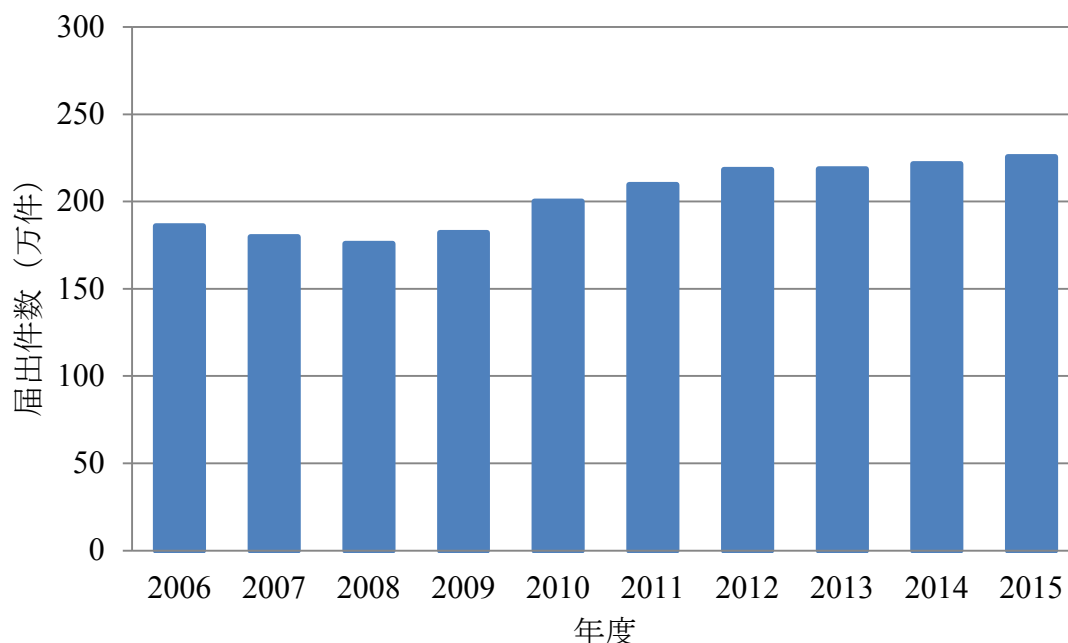


Figure 1.6 Number of import notification of foods in each year.

海外では、我が国において未承認の農薬や食品添加物が使用されている可能性があるため、検疫所では輸入食品に対するモニタリング検査を実施することにより、食品衛生法不適合の食品が国内に流通することを未然に防いでいる。厚生労働省が公表している平成 27 年度のモニタリング検査実績[5]によると、違反件数の内訳は残留農薬（残留動物薬含む）が約 22%、食品添加物が約 15%である。両者を合わせると全体の約 40%を占めており、輸入食品において残留農薬及び食品添加物は食品衛生上、重要な監視対象物質であるといえる。輸入食品に含まれる化学物質の分析は、国内の安全な食品流通に重要な役割を果たしているが、現実的に全ての輸入食品を検査することは不可能であるため、検疫

所では一定の違反率が得られるよう過去の実績をもとに統計的に検査数を決定している。既に国内流通している輸入食品や国産食品に対しては地方自治体の保健所や衛生研究所が収去検査を実施している。収去検査により、食品衛生法不適の食品が確認された場合は商品回収、廃棄等の措置がとられる。検疫所や地方自治体の行政機関だけでなく、食品事業者や受託分析機関においても分析は実施される。食品事業者は、食品表示法や社内規格への適合性を確認する目的で分析を実施しているが、自社分析では分析できない物質や、第三者機関の分析結果を要する場合には検査機関へ分析を依頼することになる。検査機関では様々な食品の分析依頼に対応する必要があるため、難易度の高い試料や分析対象物質に対して試験法の妥当性確認を実施しながら技術向上に努めている。

消費者が安全な食品を安心して入手できる市場を整備するためには、信頼性の高い分析技術の進歩が不可欠であり、食品中の化学物質分析は国内に流通する食品の安全性確保に重要な役割を果たしている。

1.2 残留農薬分析

1.2.1 残留農薬に関する規制

従来、我が国においては特定の食品に対して指定された農薬のみ残留基準が定められており、原則、規制が無い状態で規制対象とする農薬のみを示したリストであったため、ネガティブリスト制度と呼ばれていた。2002年には中国産冷凍ハウレンソウから基準値（当時、我が国の基準値は 0.01 ppm）を超過したクロルピリホスが検出されたことが大きな社会問題となった。この問題は、輸出国との基準値の相違によるものであり、輸入食品に対する残留農薬の監視が重要であることを示した事例である。そのため、国内においても残留農薬に対する規制強化の動きが加速し、2006年にポジティブリスト制度が施行されるに至った[Figure 1.7]。

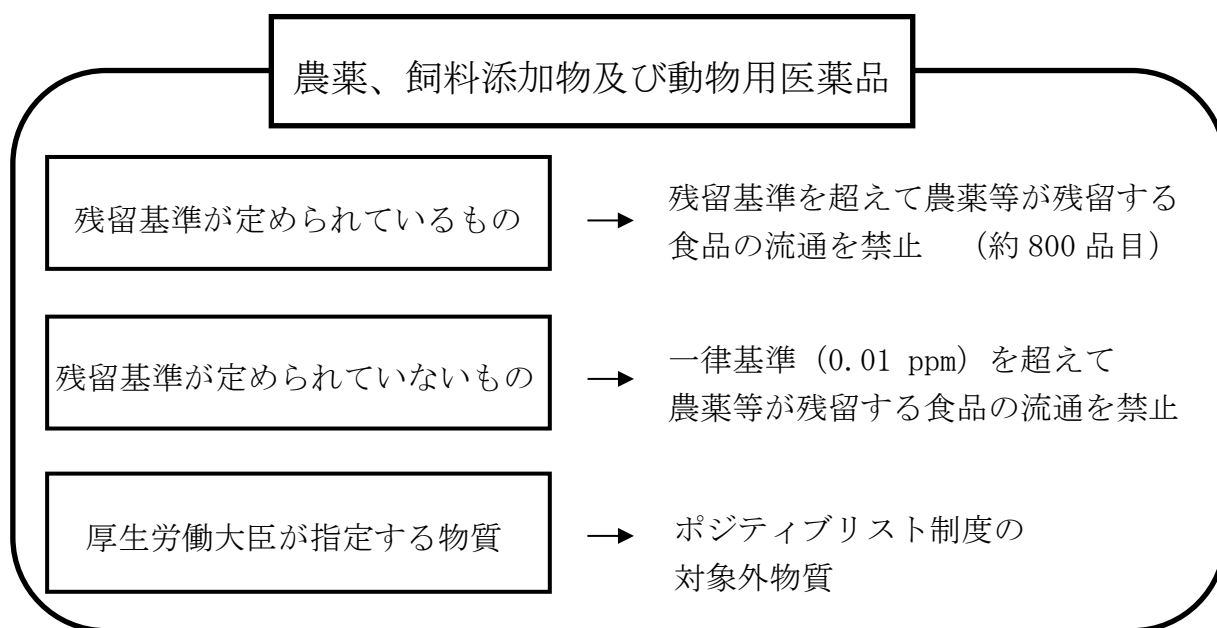


Figure 1.7 Outline of positive list system for agricultural chemical residues in foods.

ポジティブリスト制度では、原則、全ての農薬等（農薬、動物用医薬品、飼料添加物）が規制対象となり、基準値が設定されていない農薬等については一

律基準（0.01 ppm）が適用された。制度の導入により規制対象物質の大幅な増加と一律基準への対応が必要となり、残留農薬等に対して厳しい管理が要求されることとなった。

1.2.2 残留農薬分析の変遷

農薬は多種多様な化学物質の総称である。その性質は水溶性、又は脂溶性の高い物質、酸性物質、塩基性物質など、個々の農薬によって様々である。ネガティブリスト制度の時代は、規制対象農薬が限定的であったため有機リン系農薬、有機塩素系農薬のように、物理化学的性質が類似した農薬群を対象とした系統別分析法が主流であった。当時の測定機器はガスクロマトグラフィー（GC）、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）が主流であり、含リン系農薬、含硫黄系農薬は GC-FPD[6-8]、含ハロゲン系農薬は GC-ECD[9-12]、含窒素系農薬は GC-FTD（NPD）[13-14]、有紫外吸収農薬は HPLC-UV[15-17]、有蛍光性農薬は HPLC-FL[18-19]が測定機器として使用された。

ポジティブリスト制度の施行による規制対象農薬の大幅な増加に伴い、様々な農薬を網羅的に分析する必要性から、残留農薬分析は多成分一斉分析法が主流となった。当時の主力機器は GC-MS であり、精製法が限定的な一斉分析においては、試験溶液中の食品成分が分析上の妨害となることが多く、測定機器の分離能、選択性は良好な結果を得るために重要な要素であった。そのため、選択性に優れた GC-MS/MS 及び LC-MS/MS が急速に普及した。残留農薬一斉分析法の一般的な分析手順は、アセトニトリル等の極性溶媒を用いて食品から目的成分を抽出する。抽出液には食品由来のマトリクス成分が多量に含まれているため、LLE、SPE による精製法を用いて食品成分を除去した後、得られた溶液を GC-MS(/MS)又は LC-MS/MS へ注入する方法である[20-22]。農薬の多くは分子量

1000 未満の低分子化合物であるため、分子量を指標として物質を分離するゲル浸透クロマトグラフィー（gel permeation chromatography : GPC）を用いた精製法は脂質や色素等の高分子化合物の除去に有効である[23-25]。

我が国では厚生労働省から一斉試験法及び個別試験法の通知法が公示されているが、必ずしも全ての食品において良好な結果が得られるとは限らないため、事前に妥当性確認を実施しなければならない。残留農薬分析では大量の有機溶媒を使用し、溶媒の濃縮と置換を繰り返さなければならない。そのため、費用と時間を要するだけでなく、有機溶媒の使用による環境負荷も懸念されている。近年、より簡易で迅速な一斉分析法として QuEChERS 法（Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe : QuEChERS）が報告された[26]。QuEChERS 法は溶媒使用量が少なく、濃縮操作が不要であるため、簡易かつ迅速な多成分一斉分析法として世界中で急速に拡大した。現在では改良法が AOAC 法や EN 法に採用されており、国際的な試験法として認知されている。

1.2.3 残留農薬分析の課題

残留農薬分析における最も重要な課題は食品マトリクスの影響による分析精度の低下であり、世界中でその解決法についての研究が進められている。

GC、GC-MS による残留農薬分析では、マトリクス成分の影響により目的成分のピーク強度の増加が生じ、定量精度が著しく低下することが大きな課題である。この現象は「マトリクス効果」と呼ばれており、D.R Erney らによって GC におけるマトリクス効果が最初に報告された[27]。GC におけるマトリクス効果の原理を Figure1.8 に示す。

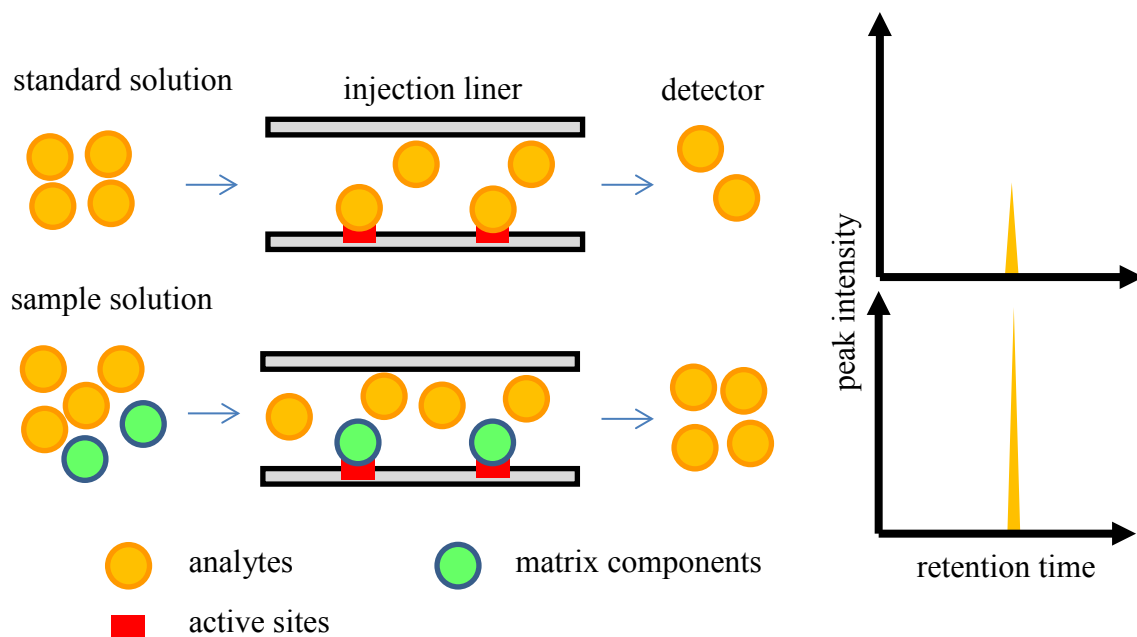


Figure 1.8 Illustration of the cause of matrix induced chromatographic enhancement effect in GC system.

標準溶液の測定では注入口ガラスライナー表面やカラム液相上に存在するシラノール基や金属イオン等の活性部位を介した目的成分の吸着、分解により検出器への到達量が減少するのに対し、試料溶液ではマトリクス成分が活性部位を隠蔽することにより、目的成分の検出器への到達量が増加することによるピーク強度の増大である。このため、溶媒標準溶液で作成した検量線を定量に用いた場合には正誤差を引き起こすこととなり、定量値、及び回収率の信頼性が乏しく、精度の低い分析結果を得ることになる。活性部位はガラスライナー表面やカラム液相上に存在するシラノール基や金属イオンだけでなく、試料溶液の測定を繰り返すことにより、試料由来の不揮発性成分がGC内に蓄積したものが新たな活性部位となる場合がある。この結果、目的成分の測定感度が低下し、マトリクス効果が増加する要因となる。マトリクス効果は目的成分の化学構造や、マトリクス成分の種類、目的成分とマトリクス成分との存在比によっても

挙動が異なるとの報告もある[28-29]。また、近年ではマトリクス効果の要因となる食品成分に注目した研究成果も報告されている[30-31]。

マトリクス効果に関する研究報告によりそのメカニズムの解明が進んではいるが、分析対象とする食品や測定する目的成分によりマトリクス効果の挙動は異なる。よって、分析目的に合わせて単一の方法で解決することは非常に困難であるため、従来からマトリクス効果を低減する様々な手法が検討されている。

マトリクス効果を解決するためには、マトリクス成分と測定機器内の活性部位を完全に除去することが必要である。しかしながら、マトリクス成分の徹底的な除去を目的とした精製の追加は、目的成分の回収率低下の要因となるうえに、労力とコストが増大するため現実的ではない。活性部位の低減には注入口のガラスライナー、イオン源の不活性化処理が有効であるが、高度に不活性化処理が施されたイオン源を用いてもマトリクス効果を完全に抑えることは困難である[32]。測定機器をできる限り不活性度の高い状態で維持するためには頻繁なメンテナンスが必要となるが、労力とコストの増加、メンテナンスに伴う機器の稼働停止により分析効率の著しい低下を招く。このような背景からマトリクス効果を低減する手法として精製の追加、測定機器の不活性状態の維持は現実的ではない[33]。従来から用いられてきたマトリクス効果低減法は①マトリクス標準溶液による検量線の作成、②内部標準物質の添加、③GC 注入方式の変更、④アナライトプロテクタントの添加が挙げられる。

マトリクス標準溶液を用いた定量法は、試料溶液と同一のマトリクスを含む標準溶液を測定することにより、マトリクスに由来する標準溶液と試料溶液のピーク強度差を打ち消すことができるため効果が高い[34]。しかしながら、分析対象とする食品全てにおいて試料溶液を大量に調製しなければならないこと、一斉分析においては測定対象となる全ての成分が含まれていない試料を入手し

なければならぬことから、労力、コストの増大が避けられず、実用的ではない。

内部標準物質の添加は目的成分の一部の元素を安定同位体で置換した物質を用いて、目的成分の測定結果を補正することにより、マトリクス効果の影響を排除する手法である。内部標準物質は非常に高価であることと、入手可能な農薬は限定されるため、一斉分析で用いることは困難である。

GC 注入方式の改良による手法（オンカラム注入、PTV 注入装置、パルスドスプリットレス）も試みられている[35-36]。これらの方法は目的成分が活性部位と接する時間をできる限り短時間とすることを目的としている。

アナライトプロテクタントを用いた方法は、マトリクス効果に対して簡易に低減効果が得られる方法としていくつかの研究成果が報告されている[37-41]。アナライトプロテクタントは疑似的なマトリクス成分として考えられており、活性部位との水素結合能を有する高極性化合物が選択されている。また、一斉分析においては幅広い保持時間に溶出する各農薬に適用するため、農薬が溶出する保持時間を網羅するよう保持時間の異なる複数の試薬を混合することにより、多成分の農薬に対してマトリクス効果の低減に有効であるとされている。

食品マトリクスによる分析精度の低下はLC-MSによる分析においても生じる[42-44]。LC-MSでは、マトリクスが共存することによりイオン化部において目的物質のイオン化効率が変化し、同濃度の標準溶液と比較して目的物質のイオン化が促進、または阻害が生じることにより、ピーク強度の増減が生じる。GCにおけるマトリクス効果と原理は異なるが、分析精度の低下を引き起こすため重要な課題である。LC-MSにおけるマトリクス効果の低減法においても試験溶液中の食品マトリクスを除去することが最も有効であるが、現実的な解決策としては①内部標準物質の添加、②マトリクス標準溶液による検量線の作成、③

試験溶液の希釈[45]が挙げられる。LC-MS においては測定機器の高感度化が進んでおり、測定感度が得られる範囲内で試験溶液を希釈することにより十分な効果が得られる場合もある。

1.3 食品添加物分析

1.3.1 食品添加物に関する規制

食品添加物は、食品衛生法において食品の製造過程、又は食品の加工若しくは保存の目的で、食品に添加、混和、浸潤その他の方法によって使用するものと定義されている。食品添加物は、保存料、酸化防止剤、着色料、香料など、食品の腐敗を抑え保存性を向上させるもの、食品の風味や外観をより魅力的にするものなど、食品価値を向上させる目的で様々な用途の化学物質が使用される。

食品添加物に関する現在の規制は 1995 年の食品衛生法改正に基づいたものであるが、それ以前には、食品添加物は化学的合成品とそれ以外の食品添加物（天然添加物）に分類されており、化学的合成品は指定物質のみが食品添加物として使用可能であった。また、化学的合成品以外の食品添加物は天然添加物として分類され、原則、使用に関して規制されていなかった。1955 年に粉ミルクに使用された pH 安定剤に不純物として砒素が含まれていたことにより、多数の健康障害が発生した。この事件を契機に食品添加物の規制が大きく前進することとなった。

現在、我が国で認められている食品添加物は、指定添加物、既存添加物、天然香料、一般飲食物添加物の 4 種類に分類される。食品添加物は科学的に安全性が認められた物質であり、効果を得るためには一定量以上の添加が必要であるが、過剰摂取は健康への影響が懸念される。食品添加物は食品価値を向上させるために意図的に添加する化学物質であり、摂取することが前提となる。そのため、食品添加物は厚生労働大臣により指定された物質のみが使用可能であり、食品添加物は成分規格、使用基準、表示基準など、様々な基準が設けられている[Figure 1.9]。成分規格は食品添加物中の不純物による健康被害を防ぐため

のものであり、個別に成分規格が定められている。成分規格には、添加物の純度のほか、製造する際に生じる副産物や有害な砒素及び重金属の含有量の上限值などがあり、成分規格に不適合の添加物は使用、販売が禁止されている。使用基準では食品への使用可能な限量が定められており、使用基準のある食品添加物については、食品の種類ごとに使用基準が定められている。

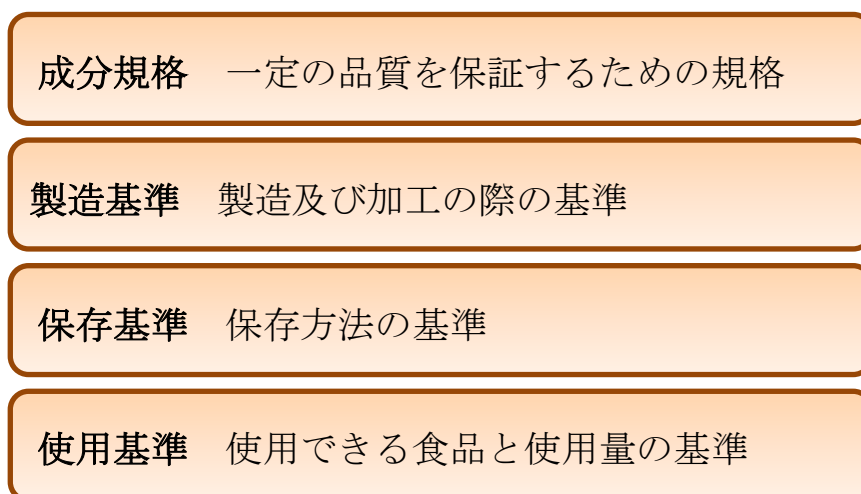


Figure 1.9 Standards and criteria for food additives.

1.3.2 食品添加物の分析法

食品添加物の分析においても食品由来の成分と分析対象物質の分離が重要であることは残留農薬分析と同様である。食品添加物は残留農薬と比較して食品中の濃度が高いことから、高感度機器を必要とせずに GC や HPLC で分析が可能である。しかしながら、加工食品は調味料、エキスなど複雑な食品マトリクスを有する食品も多いため、測定時に夾雑成分の影響により妨害ピークによって測定不能となる場合がある。そのため、妨害成分の影響回避や、検出時の確認測定のために GC-MS や LC-MS が利用されている。厚生労働省より示されているソルビン酸や安息香酸の試験法[46]では、水蒸気蒸留法による抽出の後、ソ

ルビン酸は HPLC による測定、安息香酸は LC-MS による測定方法が示されている。保存料であるソルビン酸、及び安息香酸は世界中で使用されており、食品中のソルビン酸、安息香酸の分析法は、HPLC 法[47-50]、TLC 法[51]、GC 法[52]などが報告されている。その他の分析法としては、キャピラリー電気泳動[53-54]、近赤外分光法[55]、超臨界流体クロマトグラフィー[56]を用いた方法が報告されている。

1.3.3 食品添加物分析の課題

加工食品は便利で種類が豊富なため、日常生活において身近な食品となっており、消費者は安価で安全な食品を求めている。食品事業者はこうした要求に応えるべく企業努力により原価削減を試みているが、食品添加物を使用するにあたり、使用基準への適合性を管理しなければならない。ソルビン酸、安息香酸の試験法のように、前処理に水蒸気蒸留法、測定機器にクロマトグラフィーを用いる分析方法では前処理に多大な労力と時間が必要であり、高価な測定機器の導入が必要である。食品事業者は分析費用の増大を商品価格に転嫁せざるをえない。このような背景から、分析現場においては複雑な食品マトリクスを有する加工食品に適用可能な迅速分析法が求められている。

1.4 食品中の化学物質分析における課題

残留農薬分析、食品添加物分析の目的は規格基準への適合性を判定することであり、信頼性の高い分析結果に精度・確度は重要な要素である。分析結果によって基準値不適合となれば、食品事業者は食品の回収や廃棄の対応に追われ、多大な労力と費用を消費することになる。残留農薬分析及び食品添加物分析における課題は上述の通りであるが、分析対象物質によらず食品中の化学物質分析において精度・確度と同様に重要な要素は時間と価格である。精度・確度、時間、価格は分析上の重要な要素であると同時に、分析現場における永続的な課題として認識されている[Figure 1.10]。

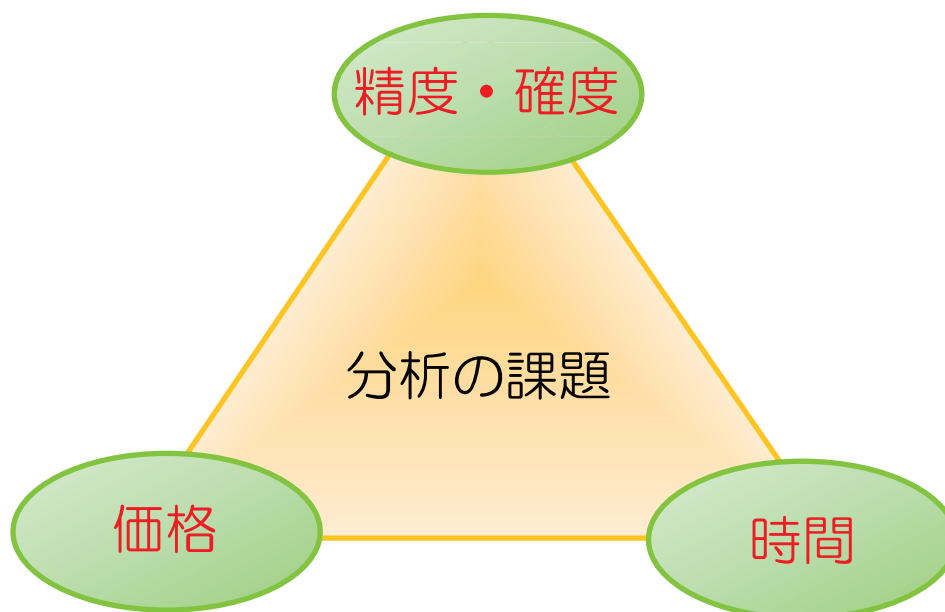


Figure 1.10 Important factors for chemical substances analysis in foods.

時間は分析結果を得るために必要な時間である。現代の食品流通においては出荷と消費のサイクルが短く、生鮮食品においては出荷後、数日以内に消費されることが多い。信頼性の高い分析結果を得るために多大な時間を要している、食品が消費された後に結果が判明することになり、本来の目的を達成する

ことができない。よって、分析結果に要する時間は目的に見合うものでなければならぬ。食品を試料とする分析においては、分析精度低下の要因となる食品マトリクスを除去する精製、及び分析対象物質と食品マトリクスをクロマトグラフィーの原理により分離する GC、HPLC による測定に時間を要する。試料抽出液を直接、分析機器へ注入して目的濃度の結果が得られることが理想であるが、革新的な技術開発が無い限り実現化は困難であろう。

価格は分析に要する費用のことである。分析技術者の人件費、試薬代、測定機器の購入費及びメンテナンス費などは、全て分析を実施するために必要な費用であり、これらの合計価格を食品事業者であれば商品価格、分析機関であれば分析価格に転嫁しなければならない。分析価格が食品原価を大幅に上回るようでは食品市場の高騰につながり、消費者にとっては死活問題である。安全な食品を安価に安定供給するためにも、分析費用はできる限り抑えなければならない。

分析現場においては分析者の知識と経験の蓄積、技術力向上が不可欠である。分析で用いる測定機器は検出器の応答により得られる電気信号をデジタル処理により数値として出力する装置であり、測定結果の良否を識別することはできない。最終的に結果を判断するのは人であり、分析者は機器から得られた結果が妥当であるかを判断する能力が要求される。前処理時の異常、食品マトリクスの影響、測定機器の状態等、様々な要因が分析結果に影響を与えるが、結果に潜む異常を察知するためには知識と技術だけでなく、経験も重要な要素である。

食品中の化学物質分析において価値のある分析結果とは、精度・確度、時間、価格のバランスが良好な状態で得られた結果であり、どれか1つが欠けても本来の分析目的を果たすことができない。従って、精度・確度、時間、価格のバ

ランスが整った分析法の確立は、食品分析現場における永遠の命題となる。

1.5 本研究の目的

本研究では、食品中の化学物質分析の課題である精度・確度、時間、価格を改善する分析技術の開発、評価を実施することにより、安全な食品の流通に貢献することを目的としている。食品を介した化学物質の摂取が避けられない現代の食糧事情を鑑みると、食品中に含まれる化学物質を迅速に分析することは重要であり、安全な食品流通に不可欠である。食糧となる農産物、畜水産物、加工食品は食品として利用できる時間的制約が存在する。人類が生存するためには安定的な食糧確保が必要であり、食品の生産と消費を永続的に繰り返さなければならない。その解決策として、農薬、動物用医薬品による生産量の向上、食品添加物による保存性の向上が図られ、いずれの化学物質も我々に多大な恩恵をもたらしている。その一方で、化学物質である以上、過剰摂取による健康被害には十分留意しなければならない。

本研究で評価した分析技術は、食品マトリクスに起因して生じる分析上の課題を解決する手法である。第2章ではGC-MSを用いた残留農薬分析におけるマトリクス効果の低減を目的として、GCキャリアガス中へ活性部位への吸着能が高い保護剤を連続的に導入する方法を評価した。GC-MSによる残留農薬分析では、マトリクス効果により定量値を過大評価することにより著しく確度が低下する。マトリクス効果により生じる理論濃度との差をME (%)として評価し、本法による確度の改善について評価した。GCキャリアガス中へ保護剤を導入する方法は、キャリアガス配管に装置を接続した後は流路を切り替えるだけであり、従来法と比較して時間と労力の低減が期待される。

第3章では食品添加物である保存料の迅速分析法の開発を試みた。食品添加物分析では加工食品全般が分析対象となるため、食品マトリクスは生鮮食品とは比較にならないほど多様性に富んでいる。分析対象物質として保存料の安息香

酸、ソルビン酸を選定した。これらの保存料は、国内においては透析による前処理法が示されているが、透析は多大な時間を要することが課題である。また、食品添加物の測定機器として頻繁に使用されている GC、HPLC は装置自体が高額であり、クロマトグラフィーによる食品マトリクスと目的物質の分離には時間を要するため、測定時間の短縮が望まれる。本研究では、精製法に迅速透析が可能なマイクロダイアリシス法を用い、測定機器は短時間での測定が可能な分光光度計を用いた迅速分析法の確立を検討した。マイクロダイアリシスは高分子の食品マトリクスの除去に有効であり、処理時間と使用溶媒量の大幅な削減が期待される。分光光度計による定量では、吸収スペクトルを高次微分処理することにより食品マトリクスの影響を低減する手法を用いた。分光光度計は GC や HPLC と比較して安価な装置であり、短時間で測定可能なため価格と時間の改善に有効である。また、本法による定量結果と従来法である HPLC を用いた結果との相関を確認することにより、迅速分析法の定量精度を確認した。

残留農薬分析及び食品添加物分析の課題解決により、食品の流通と消費サイクルに見合う分析体制の構築を実現し、食品衛生の向上、安全な食品の流通に貢献することが最大の目標である。

引用文献

1. S. R. Rissato, *Journal of Chromatography A*, 1048, (2004), 153–159.
2. M. A. Rahman. *Agriculture and biology journal of north america*, 1, (2010), 548-555.
3. T. A. Berger, B. K. Berger. *Chromatographia*. 76, (2013), 393–399.
4. 農林水産省ホームページ 平成 27 年度食糧自給率について
http://www.maff.go.jp/j/zyukyu/zikyu_ritu/012.html
5. 厚生労働省ホームページ 平成 27 年度輸入食品監視指導計画に基づく監視指導結果 <http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000135055.html>
6. G. Dugo. *Food Control*, 16, (2005), 435-438.
7. S. Wang. *Chromatographia*, 69, (2009), 79-84.
8. Y. Liu. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 89, (2012), 1057–1061.
9. M. V. Russo, G. Goretti, A. Liberti. *Chromatographia*, 35, (1993), 290-294.
10. A. G. Frenich, J. L. M. Vidal, M. M. Frías, F. Olea-Serrano, N. Olea, L. C. Rodriguez. *Chromatographia*, 57, (2003), 213–220.
11. J. Wang, M. M. Kliks, S. Jun, Q. X. Li. *Food Research International*, 43, (2010), 2329–2334
12. F. Eissa, S. El-Sawi, N. El-Hoda Zidan. *Polish Journal of Environmental Studies*, 23, (2014), 1573-1580.
13. E. Amakawa, H. Sato, Y. Aoyagi, K. Yasuda. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, 44, (2003), 161-167.
14. D. Lambropoulou, T. Sakellarides, T. Albanis. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 368, (2000), 616–623.
15. M. J. Jongen, R. Engel, L. H. Leenheers. *Journal of Analytical Toxicology*, 15,

- (1991), 30-34.
16. Y. Gou, R. Eisert, J. Pawliszyn. *Journal of Chromatography A*, 873, (2000), 137–147.
 17. F. Al-Rimawi. *International Journal of Advances in Chemistry*, 2, (2014), 1-8.
 18. K. M. Hill, R. H. Hollowell, L. A. D. Cortivo. *Analytical Chemistry*, 56, (1984), 2465–2468.
 19. J. H. Borges, L. M. Ravelo-Pérez, E. M. Hernández-Suárez, A. Carnero, M. Á. Rodríguez-Delgado. *Chromatographia*, 67, (2008), 69–75.
 20. J. Fillion. *Journal of AOAC International*, 83, (2000), 698-713.
 21. A. G. Sánchez. *Analytica Chimica Acta*, 558, (2006), 53–61.
 22. D. A. Lambropoulou. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389, (2007), 1663-1683.
 23. S. Rossi. *Journal of Chromatography A*, 905, (2001), 223-232.
 24. Guo-Fang Pang. *Journal of Chromatography A*, 1125, (2006), 1–30.
 25. S. Shuling. *Food Control*, 18, (2007), 448–453
 26. M. Anastassiades. *Journal of AOAC International*, 86, (2003), 412-431.
 27. D.R. Erney. *Journal of Chromatography*, 638, (1993), 57-63.
 28. J. Hajslova, K. Holadova, V. Kocourek, J. Poustka, M. Godula, Petr Cuhra, Milan Kempny. *Journal of Chromatography A*, 800, (1998), 283–295.
 29. S. S. Freitas, F. M. Lancas. *Journal of Separation Science*, 32, (2009), 3698–3705.
 30. K. Sugitate, S. Nakamura, N. Orikata, K. Mizukoshi, M. Nakamura, A. Toriba, K. Hayakawa. *Journal of Pesticide Science*, 37, (2012), 156–163.
 31. K. Sugitate, M. Saka, T. Serino, S. Nakamura, A. Toriba, K. Hayakawa. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, (2012), 10226–10234.

32. K. Sugitate, H. Anazawa, S. Nakamura, N. Orikata, K. Mizukoshi, M. Nakamura, A. Toriba, K. Hayakawa. *Journal of Pesticide Science*, 37, (2012), 148-155.
33. F. J. Schenck, S. J. Lehotay. *Journal of Chromatography A*, 868, (2000), 51–61.
34. D. R. Erney, T. M. Pawlowski, C. F. Poole. *Journal of High Resolution Chromatography*, 20, (1997), 375–378.
35. J. Zrostlíková, J. Hajšlová, M. Godula, K. Maštovská. *Journal of Chromatography A*, 937, (2001), 73-86.
36. M. Godula, J. Hajšlová and K. Alterová, *Journal of High Resolution Chromatography*, 22, (1999), 395-402.
37. M. Anastassiades, K. Maštovská, S. J. Lehotay. *Journal of Chromatography A*, 1015, (2003), 163
38. K. Maštovská, S. J. Lehotay, M. Anastassiades. *Analytical Chemistry*, 77, (2005), 8129-8137.
39. X. Xu, L. Li, W. Zhong, Y. He. *Analytical Letters*, 42, (2009), 2578-2591.
40. Y. Wang, H. Jina, S. Mab, J. Lua, R. Lina. *Journal of Chromatography A*, 1218, (2011), 334-342.
41. Y. Li, X. Chen, C. Fan, G. Pang. *Journal of Chromatography A*, 1266, (2012), 131-142.
42. L. Lucini, G. P. Molinari. *Journal of Chromatographic Science*, 49, (2011), 709-714.
43. A. Krueve, A. Künnapas, K. Herodes, I. Leito. *Journal of Chromatography A*, 1187, (2008), 58–66.
44. D. A. Ahumada, A. M. Zamudio, J. C. España. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 23, (2012), 661-669.

45. H. Stahnke, S. Kittlaus, G. Kempe, L. Alder. *Analytical chemistry*, 84, (2012), 1474–1482.
46. 食安基発 0528 第 3 号 別添 2 平成 22 年 5 月 28 日「食品中の食品添加物分析法」の改正について
47. F. J.M Mota, I. M.P.L.V.O Ferreira, S. C. Cunha, M Beatriz, P.P Oliveira. *Food Chemistry*, 82, (2003), 469–473.
48. S.A.V T. founi, M.C.F. Toledo. *Food Control*, 13, (2002), 117–123.
49. I. García, M.C. Ortiz, L. Sarabia, C. Vilches, E. Gredilla. *Journal of Chromatography A*, 992, (2003), 11–27.
50. M. Ding, J. Peng, S. Ma, Y. Zhang. *Food Chemistry*, 183, (2015), 26–29.
51. B. Mandrou, F. Bressolle. *Journal of the Association of Official Agricultural Chemists*, 63, (1980), 675-678.
52. Z. Pan, L. Wang, W. Mo, C. Wang, W. Hu, J. Zhang. *Analytica Chimica Acta*, 545, (2005), 218–223.
53. R. Wei, W. Li, L. Yang, Y. Jiang, T. Xie. *Talanta*, 83, (2011), 1487–1490.
54. A. C. O. Costa, L. S. Perfeito, M. F.M. Tavares, G. A. Micke. *Journal of Chromatography A*, 1204, (2008), 123–127.
55. Y. Wang, C. Ni, M. Zhao, Y. Liu. *Journal of Food Processing and Preservation*, 37, (2013), 1043–1048.
56. T. A. Berger, B. K. Berger. *Chromatographia*, 76, (2013), 393–399.

第2章 GC-MSによる食品中残留農薬分析における マトリクス効果低減に関する研究

2.1 緒言

GC-MSによる食品中の残留農薬分析において、マトリクス効果は定量値を過大評価する要因となり、著しく定量精度を低下させる。マトリクス効果はガラスインサートの表面、カラム液相上に存在する活性部位（主にシラノール基）を介した測定対象物質の吸着、分解により生じる。マトリクス効果はGC-MSの状態によっても変化し、試験溶液の注入によりガラスインサートやカラム先端部に蓄積した難揮発性マトリクスが新たな活性部位となる[1]。現在のところ、GC-MSにおけるマトリクス効果を低減する方法として主流となっているのは、標準溶液中に疑似マトリクスとしてアナライトプロテクタント（保護剤）を添加する方法である[2-7]。保護剤は、保護剤の保持時間付近の農薬に対して効果が得られるため、多成分一斉分析においては分析対象物質の保持時間を網羅する保護剤を選定しなければならない。ポリエチレングリコール 300（PEG300）はポリマー重合体であり、分子量の異なるPEGが幅広い保持時間に溶出するため、保護剤として広く使用されている[2-5]。しかしながら、PEG300の繰り返し注入によりGCカラムの劣化が生じるため、カラムをGC注入口側の先端部分から順次、切断しなければならない[2]。他の保護剤としては、高極性物質であるエチルグリセロール、グルコノラクトン、ソルビトールの混合溶液が使用される[1]。これらの保護剤は、水やアセトニトリルなどの高極性溶媒を用いて溶解しなければならないが、水やアセトニトリルの気化体積が大きいため、GCへの注入量が制限される。また、水はGCカラム、質量分析計を劣化させるため、で

きる限り注入しないことが望ましい。

筆者らは過去の研究で GC キャリアガス中へ気化させたモディファイアーを導入する装置を評価しており、本装置を用いてモディファイアーを大量に導入することによりカラムの保持特性が変化することを報告した [8]。この導入装置を用いて GC キャリアガス中へ微量の保護剤を連続導入することにより、GC-MS による残留農薬一斉分析においてカラムの劣化や保持特性に影響することなく、マトリクス効果が低減できると考えた。なお、本研究で論じるマトリクス効果は活性部位への物質吸着により生じるマトリクス効果である。

保護剤の添加法は事前に試薬調製、及び標準溶液へ試薬添加の操作が必要であるが、保護剤導入法はキャリアガス流路の切り替えのみで効果が得られるため、操作が簡便であることも大きな利点である。

本研究では、保護剤にエチレングリコールを用い、キャリアガス中へエチレングリコールを導入することによりマトリクス効果に与える影響を評価した。また、GC-MS の状態によりマトリクス効果は変化するため、実験にはメンテナンス後の GC-MS 及び汚染状態の GC-MS を用いた。

2.2 実験方法

2.2.1 試薬及び試液

アセトニトリル及びトルエン（残留農薬分析用）は和光純薬工業（大阪）より入手した。アセトン及びヘキサン（残留農薬分析用）は関東化学（東京）より入手した残留農薬分析用を使用した。塩化ナトリウム（試薬特級）及びリン酸二水素カリウム（試薬特級）はナカライテスク（京都）より入手した。

無水硫酸ナトリウム（残留農薬分析用）、エチレングリコール、エタノールアミン、及びメルカプトエタノール（試薬特級）は和光純薬工業より入手した。リン酸水素二カリウム（試薬特級）は関東化学より入手した。

InertSep C18 ミニカラム は GL サイエンスより、Supelclean ENVI-Carb/NH₂ ミニカラムはシグマアルドリッチジャパンより入手した。

0.5 mol/L リン酸緩衝溶液 (pH 7.0) はリン酸水素二カリウム 52.7 g 及びリン酸二水素カリウム 30.2 g を水 500 mL に溶解し、1 mol/L 水酸化ナトリウム又は 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。アセトニトリル：トルエン (3 : 1) 混液はアセトニトリル 75 mL にトルエン 25 mL を混合した。

農薬混合標準溶液 PL-1-1（各農薬 20 µg/mL）は和光純薬工業より入手した。測定用混合標準溶液は農薬混合標準溶液 PL-1-1 をアセトン：ヘキサン (1:1) 混液で希釈して 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2 mg/L の濃度で調製した。

2.2.2 試験溶液の調製方法

ハウレンソウ、オレンジ、玄米、大豆は市販の量販店より入手した。各試料はフードプロセッサーで均一化した。試験溶液の調製は厚生労働省通知「GC/MS による農薬等の一斉試験法(農産物)」に従った[9]。

試験法のフローを Figure 2.1 に示す。ハウレンソウとオレンジは 20 g を秤量し、50 mL のアセトニトリルを加え、2 分間ホモジナイズした後、アセトニトリルで 100 mL に定容した。抽出液を 20 mL を分取し、塩化ナトリウム 10 g 及び 0.5 mol/L リン酸緩衝溶液 (pH 7.0) を 20 mL 加えて 10 分間振とうした。静置後、上層のアセトニトリル層を濃縮し、残留物をアセトニトリル：トルエン (3:1) 混液 3 mL に溶解した。試料液を Supelclean ENVI-Carb/NH₂ ミニカラムへ注入し、さらにアセトニトリル：トルエン (3:1) 混液 17 mL (計 20 mL) を注入後、すべての溶出液を濃縮し、アセトン：ヘキサン (1:1) 混液 4 mL で溶解したものを試験溶液とした (試料 1 g/mL)。

玄米及び大豆は 10 g を秤量し、水を 20 mL を加え 15 分放置した後、50 mL のアセトニトリルを加え、2 分間ホモジナイズした後、アセトニトリルで 100 mL に定容した。抽出液を 20 mL を分取し、塩化ナトリウム 10 g 及び 0.5 mol/L リン酸緩衝溶液 (pH 7.0) を 20 mL 加えて 10 分間振とうした。静置後、上層のアセトニトリル層を InertSep C18 ミニカラムへ注入し、さらにアセトニトリル 2 mL を注入後、すべての溶出液を濃縮した。残留物をアセトニトリル：トルエン (3:1) 混液 3 mL に溶解した。試料液を Supelclean ENVI-Carb/NH₂ ミニカラムへ注入し、さらにアセトニトリル：トルエン (3:1) 混液 17 mL (計 20 mL) を注入後、すべての溶出液を濃縮し、アセトン：ヘキサン (1:1) 混液 2 mL で溶解したものを試験溶液とした (試料 1 g/mL)。

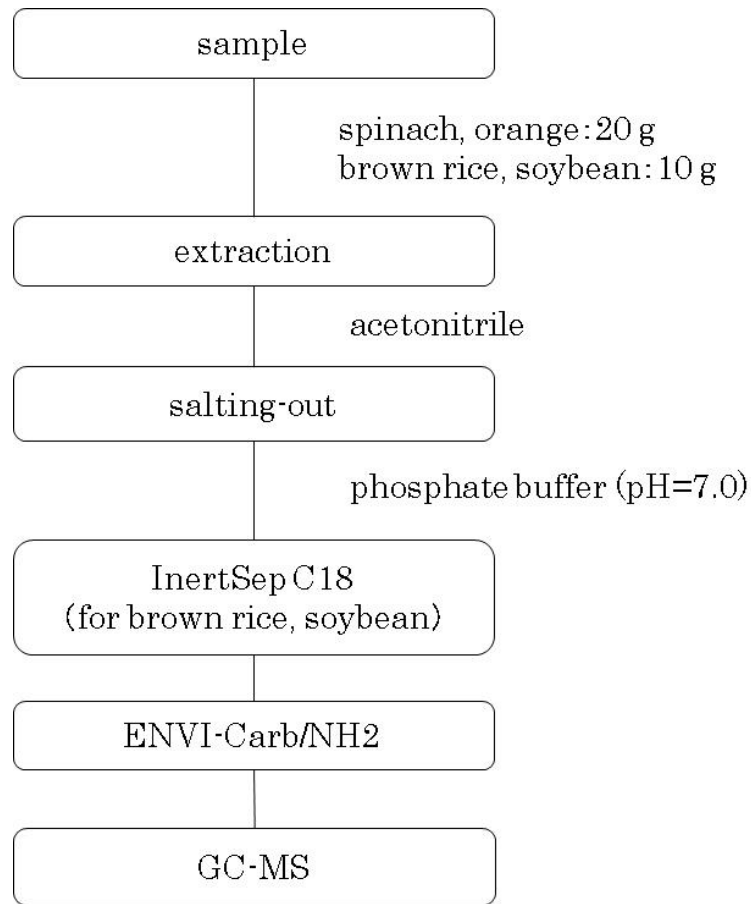


Figure 2.1 Flow chart of sample preparation.

2.2.3 GC-MS 測定条件

GC-MS 測定条件①

GC 部 : GC-2010 【島津製作所製 (京都)】

MS 部 : QP-2010 【島津製作所製 (京都)】

プレカラム : 不活性化キャピラリーカラム 【長さ 2 m、内径 0.25 mm、GL サイエンス製 (東京)】

カラム : DB-5MS 【長さ 30 m、内径 0.25 mm、膜厚 0.25 μ m、アジレントテクノロジー製 (USA)】

注入口 : 250°C

注入方式：パルスドスプリットレス（200 kPa、1分）

オープン昇温条件：

60°C（1分保持）→ 25°C/min → 150°C → 10°C/min → 300°C（10分保持）

トランスファーライン：280°C

イオン源：250°C

イオン化：EI

測定モード：SIM

注入量：2 μL

キャリアガス：He（1.0 mL/min）

測定対象物質と測定イオンを Table 2.1 に示した。

GC-MS 測定条件②

GC 部：HP 6890 【アジレントテクノロジー製】

MS 部：QP-2010 【アジレントテクノロジー製】

イオン源：230°C

その他の条件は GC-MS 測定条件①に従った。

Table 2.1 List of analytes.

analytes	Chemical formula	LogP	Monitor ion (m/z)
omethoate	C ₅ H ₁₂ NO ₄ PS	-0.7	156
trifluralin	C ₁₃ H ₁₆ F ₃ N ₃ O ₄	5.3	306
dimethoate	C ₅ H ₁₂ NO ₃ PS ₂	0.7	87
atrazine	C ₈ H ₁₄ ClN ₅	2.7	200
terbufos	C ₉ H ₂₁ O ₂ PS ₃	4.5	231
tefluthrine	C ₁₇ H ₁₄ ClF ₇ O ₂	6.4	177
chlorpyrifos-methyl	C ₇ H ₇ Cl ₃ NO ₃ PS	4.0	286
spiroxamine	C ₁₈ H ₃₅ NO ₂	2.9	100
terbutryn	C ₁₀ H ₁₉ N ₅ S	3.7	226
malathion	C ₁₀ H ₁₉ O ₆ PS ₂	2.8	173
thiobencarb	C ₁₂ H ₁₆ ClNOS	4.2	100
fenpropimorph	C ₂₀ H ₃₃ NO	4.5	128
pendimethalin	C ₁₃ H ₁₉ N ₃ O ₄	5.2	252
penconazole	C ₁₃ H ₁₅ Cl ₂ N ₃	3.7	248
procymidone	C ₁₃ H ₁₁ Cl ₂ NO ₂	3.3	283
methidathion	C ₆ H ₁₁ N ₂ O ₄ PS ₃	2.6	145
fenamiphos	C ₁₃ H ₂₂ NO ₃ PS	3.3	303
oxadiazon	C ₁₅ H ₁₈ Cl ₂ N ₂ O ₃	5.3	175
kresoxim-methyl	C ₁₈ H ₁₉ NO ₄	3.4	116
chlorfenapyr	C ₁₅ H ₁₁ BrClF ₃ N ₂ O	4.8	247
endosulfan-β	C ₉ H ₆ Cl ₆ O ₃ S	4.8	195
norflurazon	C ₁₂ H ₉ ClF ₃ N ₃ O	2.5	303
diflufenican	C ₁₉ H ₁₁ F ₅ N ₂ O ₂	4.2	266
bifenthrin	C ₂₃ H ₂₂ ClF ₃ O ₂	6.6	181
azinphos-methyl	C ₁₀ H ₁₂ N ₃ O ₃ PS ₂	3.0	160
fenarimol	C ₁₇ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O	3.7	139
permethrin(cis, trans)	C ₂₁ H ₂₀ Cl ₂ O ₃	6.1	183
cyfluthrin	C ₂₂ H ₁₈ Cl ₂ FNO ₃	6.0	163
flucythrinate	C ₂₆ H ₂₃ F ₂ NO ₄	4.7	199
fluvalinate	C ₂₆ H ₂₂ ClF ₃ N ₂ O ₃	3.9	250

2.2.4 保護剤導入装置

保護剤導入装置の外観、及び概略図を Figure 2.2 に示す。保護剤導入保護剤導入装置はステンレス製であり、チャンバー内には 1 mL のエチレングリコールを浸したアクリルファイバーを充填した。保護剤導入装置は GC-MS キャリアガス配管へ接続し、バルブによりガス流路を切替することにより、保護剤導入の有無を調整できる。保護剤導入装置は室温下で稼働させた。保護剤導入時の測定は、エチレングリコール導入後、エチレングリコールの測定イオン (m/z 31、62) を観察し、ベースラインが安定していることを確認してから開始した。

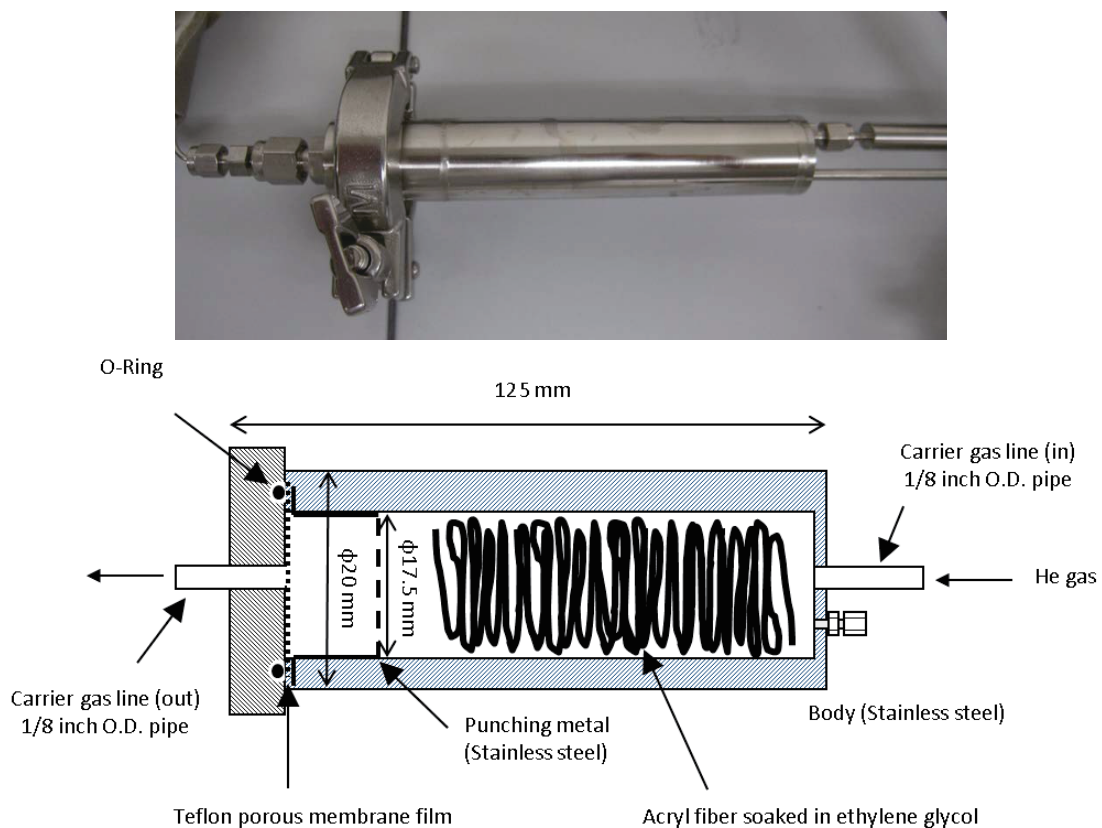


Figure 2.2 Schematic diagram of the generator of ethylene glycol.

2.2.5 マトリクス効果の評価

アセトン：ヘキサン（1：1）混液、及び試験溶液で調製した標準溶液 0.1 g/mL、（以下、前者を標準溶液、後者をマトリクス標準溶液とする）を GC-MS へ注入した。なお、試験溶液の調製に用いた試料はあらかじめ農薬が残留していないことを確認した。

GC-MS への試験溶液の注入は以下の順番で、保護剤未導入、及び保護剤導入それぞれの場合において実施した。汚染状態の GC-MS における測定は、試験溶液を連続 100 回注入した後の GC-MS を用いて実験を行った。

<測定の順番>

- ① 標準溶液を注入（連続 5 回）
- ② マトリクス標準溶液を注入（連続 5 回）
- ③ アセトン：ヘキサン（1：1）混液を注入（連続 2 回）

（注入した試験溶液の影響が次測定に及ばないようにするための測定）

測定結果より各測定対象物質のピーク面積平均値（n=5）を算出し、次式によりマトリクス効果を ME(%)として算出した。

$$ME(\%) = A1/A2 \times 100$$

A1：マトリクス標準溶液のピーク面積平均値

A2：標準溶液のピーク面積平均値

2.3 結果及び考察

2.3.1 保護剤の選定

マトリクス効果の低減に最適な保護剤を検討した。保護剤の選定のポイントは、低分子、低蒸気圧、高極性物質である[10]。低分子は測定対象物質の測定イオンと干渉しないこと、低蒸気圧は保護剤によるGC-MSの汚染を低減すること、高極性物質は活性部位となるシラノール基との親和性を考慮している。本実験において検討した保護剤を Table 2.2 に示す。

Table 2.2 List of compounds as analyte protectant.

compound	molecular weight	vapor pressure* at 20°C (Pa)
Ethylene glycol	62	7
Ethanolamine	61	53
mercaptoethanol	78	130

* National Institute of Health Sciences (<http://www.nihs.go.jp/ICSC/>)

各物質を 1 mL 含浸させたアクリルファイバーを保護剤導入装置に充填し、アセトン：ヘキサン（1:1）混液で調製した標準溶液を連続 5 回測定し、保護剤未導入、及び保護剤導入それぞれの場合の測定結果を比較した。

エチレングリコールを導入した結果、全ての測定対象物質のピーク強度が増加した。Figure 2.3 にエチレングリコール導入によるピーク強度の増加率を示す。

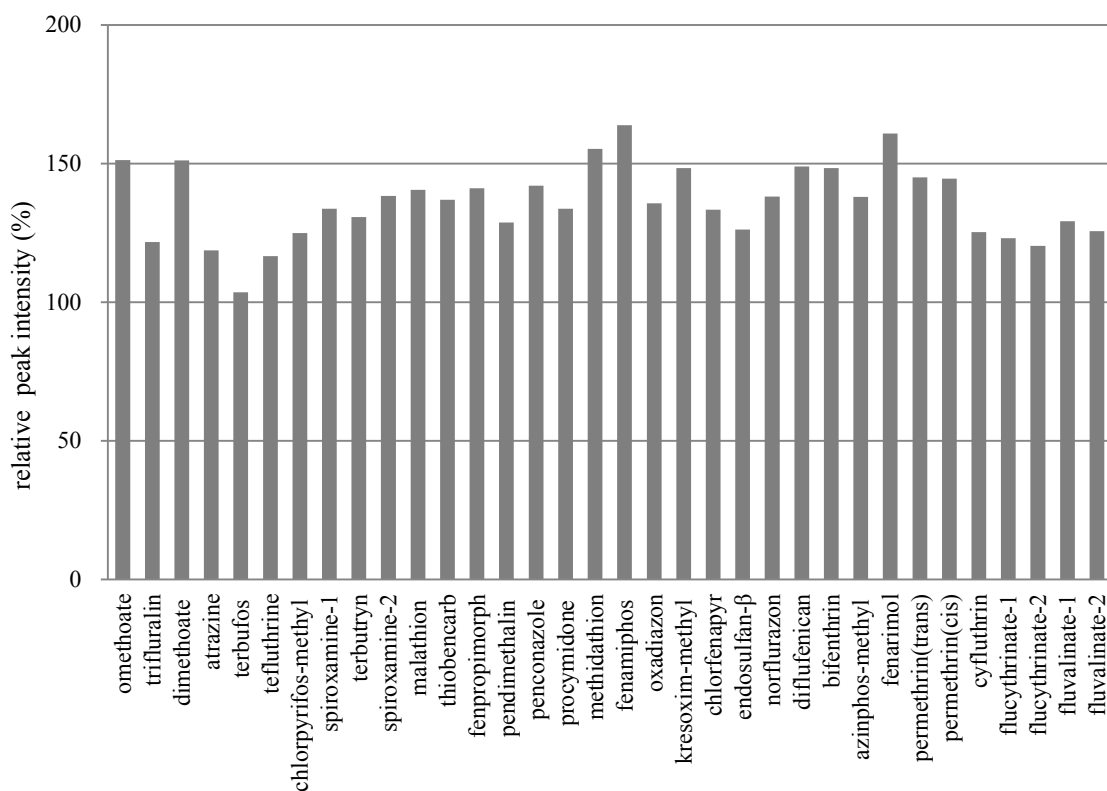


Figure 2.3 Enhanced peak intensity of analytes with ethylene glycol.

農薬によって増加率は異なり、増加率が高い傾向にある農薬は有機リン系農薬、ピレスロイド系農薬であった。ヒドロキシル基 (—OH 基)、アミノ基 (アミド) (—R—NH—)、アゾール (—N=) の構造を有する化合物はマトリクス効果を受けやすく、特に有機リン系農薬はマトリクス効果の影響が大きい農薬であること報告されており [7,11-12]、本実験の結果は過去の報告とも一致する結果であった。また、ピーク強度増加率と Log P との相関を確認したが、相関は確認されなかった [Figure 2.4]。エチレングリコールによるピーク強度の増加は農薬の保持時間、極性に依存しないことが確認され、検討した農薬の中では有機リン系農薬で高い効果が得られた。これらの結果は、キャリアガス中のエチレングリコールにより GC 内の活性部位を介した測定対象物質の吸着が抑えられ、検出

器（質量分析計）に到達する量が増加したためであると考えられる。本方法はイオン源にエチレングリコールを導入し続けるため、イオン源の汚染が懸念されたが、数カ月間メンテナンスは不要であった。

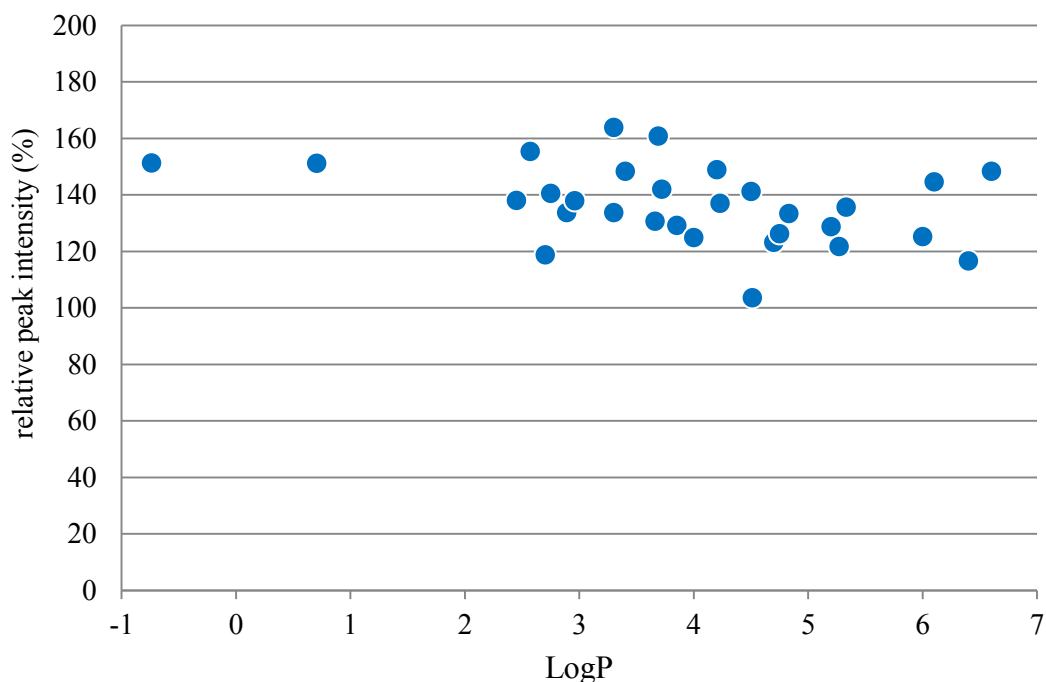


Figure 2.4 Correlation between peak intensity and LogP with ethylene glycol.

モノエタノールアミン、メルカプトエタノール、それぞれを保護剤として導入した結果においては全ての測定対象物質のピーク強度が低下した。また、数週間以内にイオン源のメンテナンスが必要であった。メルカプトエタノールはGC内への残留が顕著であり、保護剤導入停止後もクロマトグラムよりメルカプトエタノールの存在が確認された。エチレングリコールは保護剤導入停止後、数時間でGC内より排出可能であった。GC内に残留したメルカプトエタノールは有機溶媒によるキャリアガス配管洗浄を実施しなければ除去することができなかった。

検討した保護剤の中ではエチレングリコールが最も良好な結果が得られたため、以降の実験においては保護剤にエチレングリコールを使用した。エチレングリコールを導入した場合の GC-MS クロマトグラムを Figure 2.5 に示す。

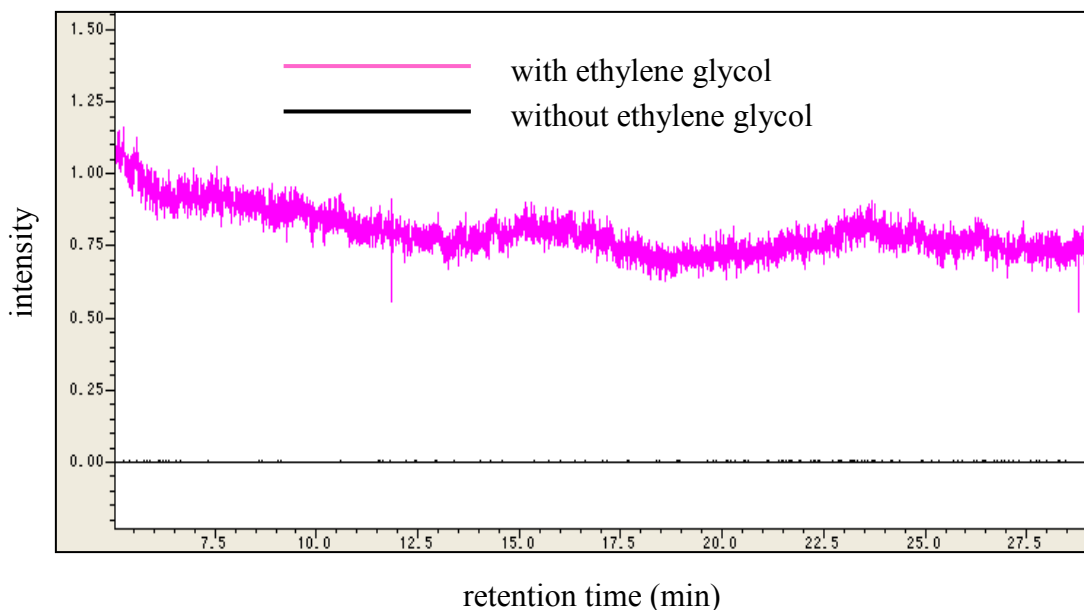


Figure 2.5 Chromatogram of GC-MS with ethylene glycol. (monitor ion : m/z 62).

2.3.2 保護剤としてのエチレングリコール導入によるマトリクス効果の低減

マトリクス効果はマトリクスの種類によっても影響の程度が異なるため、食品成分の特性が異なる複数の試料を用いて検討を進めた。厚生労働省より通知された妥当性評価ガイドライン [13] では、野菜、果実、穀類等の農産物における食品成分の特徴が分類されており、各分類で代表的な作物例が示されている。ガイドラインを参考として、実験では試料にホウレンソウ、オレンジ、玄米を選択した。ホウレンソウは色素成分が豊富であり、オレンジは柑橘果実特有の精油分を含み、玄米は野菜、果実と比較して水分が少なく、炭水化物が多く含まれる。

GC キャリアガス中へ導入したエチレングリコールがマトリクス効果に与える影響を評価するため、ホウレンソウ、オレンジ及び玄米の試験溶液を用いて検討した。その結果、エチレングリコールを導入することにより、ホウレンソウ [Figure 2.6 A]、オレンジ [Figure 2.7 A] 及び玄米 [Figure 2.8 A] の試験溶液において、すべての農薬のマトリクス効果が低減した。一般的に保護剤として使用される PEG300 のような親水性化合物は、保持時間の遅い農薬に対しては効果が低いとされている [1]。本研究では、保護剤として単一物質であるエチレングリコールを使用し、保持時間によらず全ての農薬のマトリクス効果を低減することができた。しかし、保持時間の遅い農薬に対しては効果が低く、完全にマトリクス効果を抑えることができなかった。

エチレングリコールによるマトリクス効果の低減は、エチレングリコールの導入量に依存する可能性が考えられる。気化するエチレングリコール量は保護剤導入装置のチャンバーの温度設定により制御できるため、室温、及び 60°C、それぞれの温度条件にて GC-MS へ導入されるエチレングリコール量を計測した。その結果、チャンバー温度を 60°C に設定することで GC-MS へ導入されるエチレングリコール量は増加した [Table 2.3]。この条件にてメンテナンス後の GC-MS を用いてホウレンソウ抽出液を用いてマトリクス効果に与える影響を評価したが、マトリクス効果の低減効果は室温で実施した結果と同等であった [Figure 2.9]。また、エチレングリコールの導入を止めた後、長期間にわたり GC-MS にエチレングリコール残存することが確認された。この現象はエチレングリコールを室温で導入した場合には見られなかった現象である。これらの理由から、以降の実験においてチャンバー温度は室温とした。

次に、試験溶液を連続 100 回注入後の汚染状態の GC-MS を用いた実験を行った。汚染状態の GC-MS では装置内に蓄積した食品マトリクスが新たな活性部位

となる。エチレングリコール未導入の測定では、メンテナンス後の GC-MS と比較して標準溶液の測定でピーク形状の劣化、測定感度の低下、及びマトリクス効果の増大が生じた。エチレングリコールを導入した測定では、マトリクス効果はメンテナンス後の GC-MS で観察されたマトリクス効果と同レベルにまで抑えられた [Figure 2.6 B]。同様の結果はオレンジ [Figure 2.7 B]、玄米 [Figure 2.8 B] の場合 においても確認された。これらの結果は、キャリアガス中へエチレングリコールを導入することにより、長期間にわたりマトリクス効果を低減可能であることを示した。また、低減効果は汚染状態の GC-MS において高くなることが確認された。

Table 2.3 The amount of ethylene glycol introduced to the GC-MS system

Chamber temperature	amount of ethylene glycol
ambient	4.2 µg/h
60 °C	5.2 µg/h

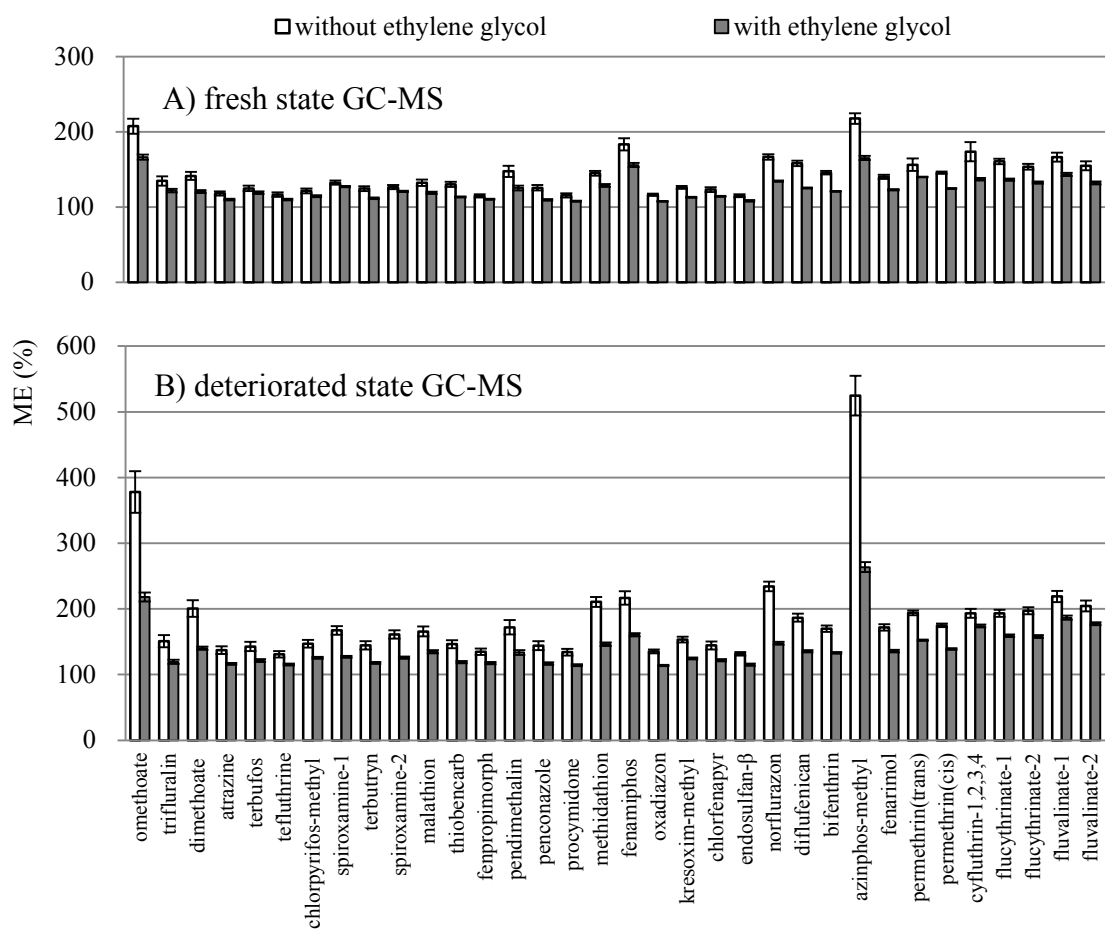


Figure 2.6 Effect of introduction of ethylene glycol on matrix effects (n=5) of spinach extracts on a fresh state GC-MS (A) and a deteriorated state GC-MS (B). The analytes ordered by increasing retention time.

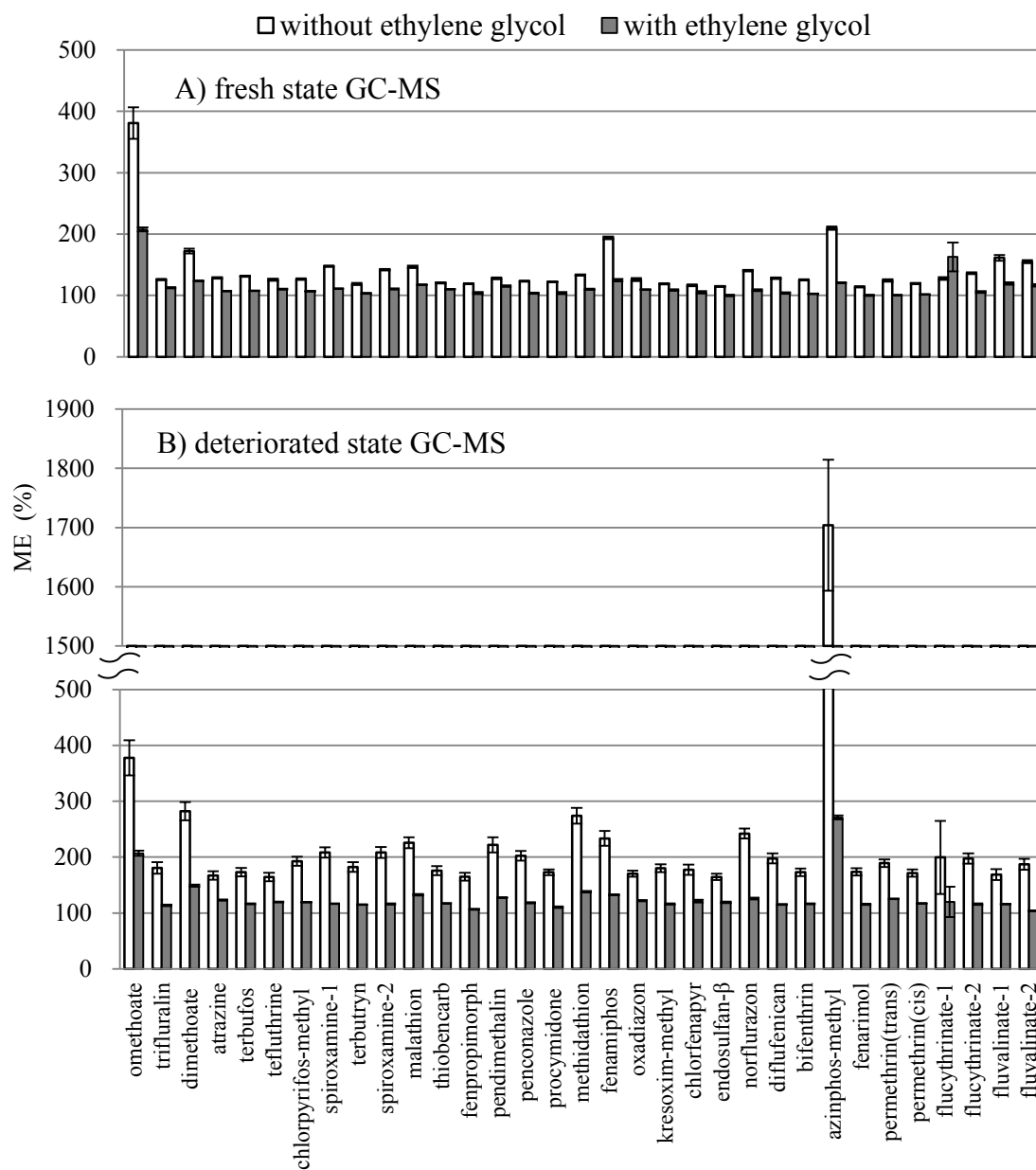


Figure 2.7 Effect of introduction of ethylene glycol on matrix effects (n=5) of orange extracts on a fresh state GC-MS (A) and a deteriorated state GC-MS (B). The analytes ordered by increasing retention time.

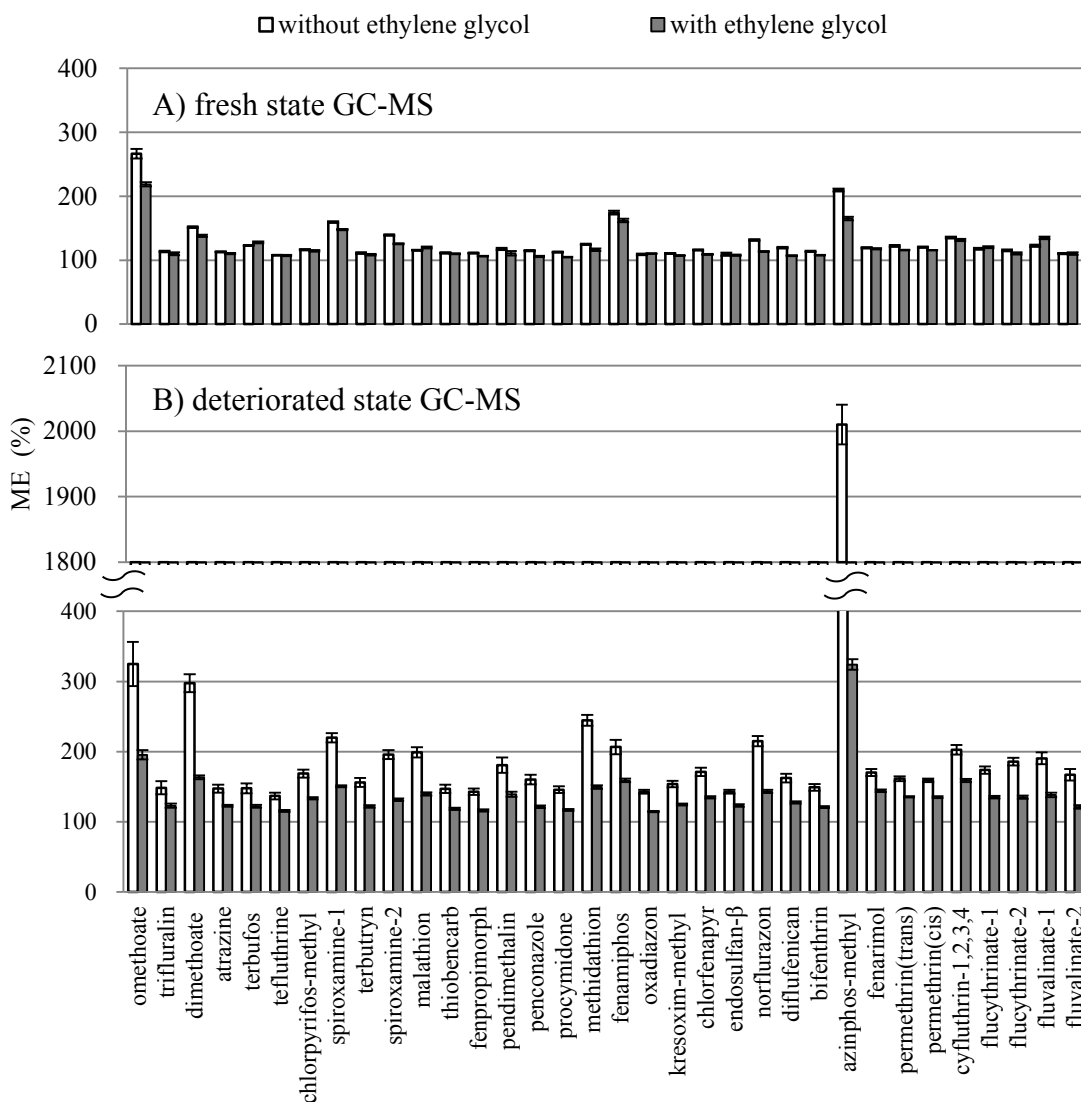


Figure 2.8 Effect of introduction of ethylene glycol on matrix effects (n=5) of brown rice extracts on a fresh state GC-MS (A) and a deteriorated state GC-MS (B). The analytes ordered by increasing retention time.

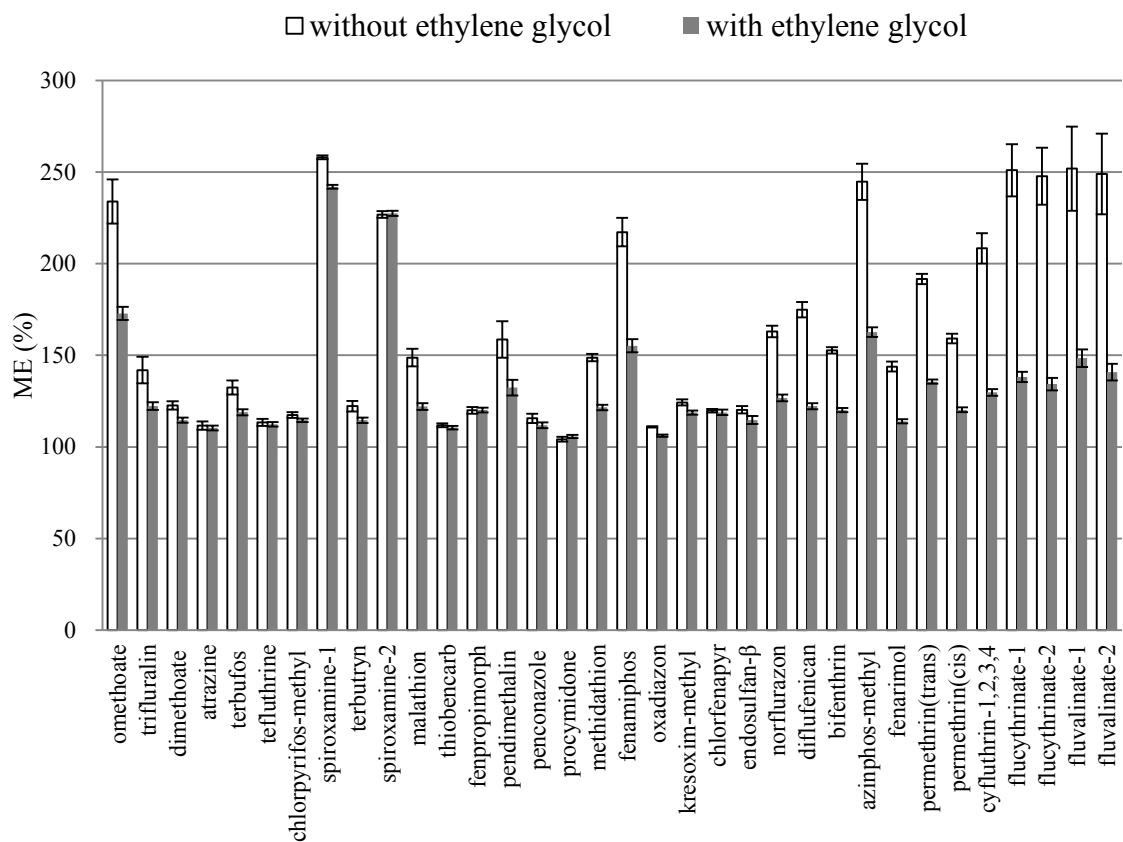


Figure 2.9 Effect of introduction of ethylene glycol on matrix effects (n=5) of spinach extracts on a fresh state GC-MS at chamber temperature 60°C. The analytes ordered by increasing retention time.

2.3.3 エチレングリコール導入による定量精度の評価

キャリアガス中へのエチレングリコール導入により定量精度に与える影響を評価するため、メンテナンス後の GC-MS、及び汚染状態の GC-MS を用いて検量線を作成した [Table 2.4]。

Table 2.4 Effect of ethylene glycol on calibration curves of pesticides on various pollution states of GC-MS.

analytes	fresh state GC-MS						deteriorated state GC-MS					
	without ethylene glycol			with ethylene glycol			without ethylene glycol			with ethylene glycol		
	Slope	Intercept	r ²	Slope	Intercept	r ²	Slope	Intercept	r ²	Slope	Intercept	r ²
omethoate	489557	-3480	0.998	784419	-4296	0.999	236474	-3030	0.993	510549	-3067	1.000
trifluralin	539936	-321	1.000	638760	-161	1.000	460477	-763	1.000	565378	-1572	1.000
dimethoate	1039362	-2572	1.000	1443667	-3948	1.000	749084	-5094	0.998	1184112	-1655	0.996
atrazine	670903	-100	1.000	831204	359	1.000	561383	-1818	0.999	692352	-963	1.000
terbufos	658162	-5309	0.998	784614	-6396	0.998	681935	-3369	0.999	815478	-3880	0.999
tefluthrine	2157434	4297	1.000	2674121	3468	1.000	1831132	-107	1.000	2371538	-404	1.000
chlorpyrifos-methyl	666278	2584	0.999	937650	1839	1.000	752738	-2365	0.999	954457	-714	1.000
spiroxamine	1684973	1048	0.999	2067545	8892	0.997	3245332	-4329	1.000	5997267	-29030	0.998
terbutryn	784747	-256	1.000	1010233	-432	1.000	616088	-1702	1.000	825533	-1278	1.000
malathion	631170	-899	1.000	791438	-694	1.000	436680	-2745	0.998	628184	-2012	1.000
thiobencarb	2338366	-2576	1.000	3097303	-4644	1.000	1963877	-4706	1.000	3034705	-4016	1.000
fenpropimorph	4711362	-1150	1.000	6364600	-2372	1.000	4610305	-3971	1.000	7492746	-10427	1.000
pendimethalin	438325	-1782	0.998	564735	-1474	0.999	411896	-2736	0.998	546587	-2435	0.999
penconazole	1040781	-106	1.000	1365362	146	1.000	761912	-2591	1.000	1070916	-1704	1.000
procymidone	439279	751	1.000	598389	1100	1.000	382204	-704	1.000	535068	-771	1.000
methidathion	1341570	-2125	1.000	1918883	-2876	1.000	1028420	-8108	0.998	1806168	-6573	1.000
fenamiphos	396729	-5572	0.993	570984	-7572	0.994	355143	-3623	0.995	645675	-4712	1.000
oxadiazon	697298	1058	1.000	897711	1682	0.999	618420	-164	1.000	840166	512	1.000
kresoxim-methyl	1508033	1091	1.000	2011926	-593	1.000	1248335	-2163	1.000	2010192	-1652	1.000
chlorfenapyr	79964	143	1.000	107756	128	1.000	67888	-71	1.000	87588	-16	1.000
endosulfan-β	94512	210	1.000	118076	113	1.000	87889	-120	0.999	113082	117	1.000
norflurazon	504322	-940	0.999	730107	-1204	1.000	384714	-2339	0.999	590358	-1590	1.000
diflufenican	1901179	-1977	0.999	2651353	-533	1.000	1449951	-5334	0.999	2289633	-2792	1.000
bifenthrin	2736143	-2826	0.999	3590886	-1483	1.000	2018806	-3893	1.000	3168410	166	1.000
azinphos-methyl	481428	-3573	0.997	642395	-3770	0.998	190478	-3357	0.980	402728	-2265	1.000
fenarimol	717094	-647	0.999	977995	-154	1.000	625522	-2024	0.999	1015219	-1776	1.000
permethrin	3629676	-6117	0.999	4580487	-8119	1.000	2894497	-9664	0.999	4022178	-2361	1.000
cyfluthrin	423085	-1417	0.997	527527	-1668	1.000	367646	-2848	0.998	546245	-1688	1.000
flucythrinate	797564	-3677	0.998	899734	-3027	0.999	555541	-4188	0.997	753382	-2833	0.999
fluvalinate	1045569	-6144	0.997	1163107	-4088	0.999	693962	-6251	0.995	975070	-3742	0.999

メンテナンス後の GC-MS ではフェナミホスを除き、エチレングリコールの導入の有無によって検量線の相関係数に大きな差は見られなかった。汚染状態の GC-MS では、多くの農薬でエチレングリコール未導入の場合は相関係数が低下したが、エチレングリコールの導入により相関係数は改善した。特に、有機リン系農薬であるオメトエート、アジンホスメチルにおいては顕著な改善が確認された。オメトエート、アジンホスメチルの検量線を Figure2.10 に示す。GC-MS 内の活性部位による分析対象物質の吸着量が一定であるならば、低濃度域ほど測定感度低下の影響が相対的に顕著となり、検量線は二次曲線となる。実験結果より、GC キャリアガスへエチレングリコールを導入することにより活性部位への分析対象物質の吸着が抑えられ、検量線の直線性が改善したと考えられる。エチレングリコールの導入により長期にわたり良好な直線性を得ることができ、定量精度の維持が可能であるため、GC-MS のメンテナンス頻度の低減につながると考えられた。

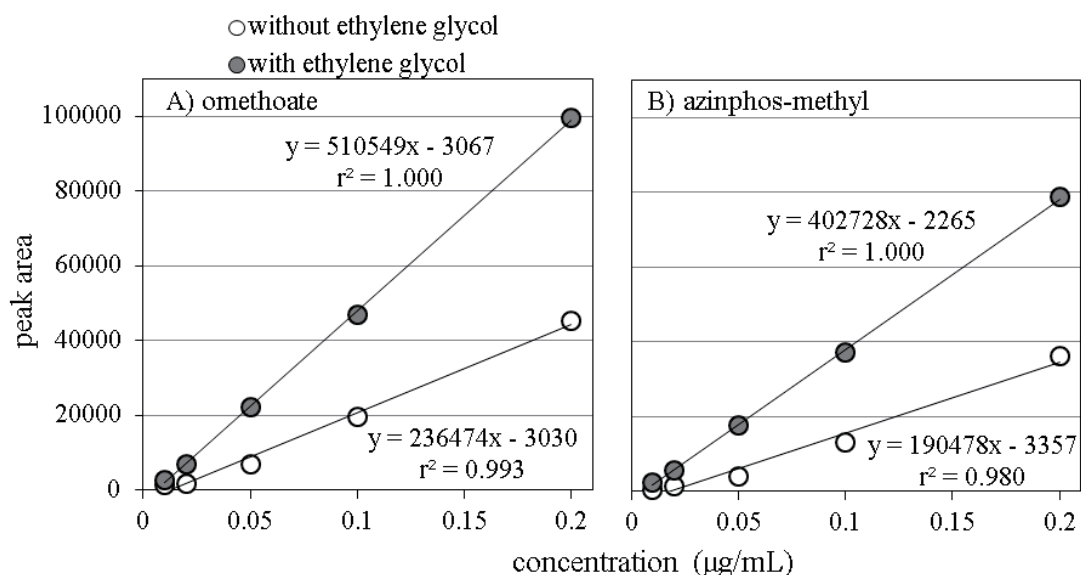


Figure 2.10 Improvement of linearity of calibration curves for omethoate (A) and azinphos-methyl (B) on a deteriorated state GC-MS by introducing ethylene glycol.

2.3.4 エチレングリコール導入による GC-MS 分離性能の評価

エチレングリコールは高極性物質のため、キャリアガス中へ導入することによりカラム液相と農薬の間の相互作用が変化し、農薬の保持時間が変化する可能性が懸念される。そのため、筆者はエチレングリコールを含むキャリアガスが GC-MS の分離性能にどのような影響を与えるかを検討した。0.1 mg/L の農薬標準溶液をエチレングリコール未導入、導入それぞれの条件で測定することにより、各農薬の保持時間と理論段数を算出した [Table 2.5]。

Table 2.5 Evaluation of GC-MS performance by introducing ethylene glycol. “N” means number of theoretical plates.

analytes	without ethylene glycol				with ethylene glycol			
	Retention time / min	RSD / %	N	RSD / %	Retention time / min	RSD / %	N	RSD / %
omethoate	9.159	2.8×10^{-2}	4.3×10^5	3.5	9.154	2.5×10^{-2}	4.2×10^5	2.5
trifluralin	9.753	4.6×10^{-3}	6.3×10^5	3.3	9.745	0	6.2×10^5	3.9
dimethoate	10.524	6.7×10^{-3}	5.2×10^5	2.1	10.516	1.2×10^{-2}	5.4×10^5	2.0
atrazine	10.700	4.2×10^{-3}	6.4×10^5	3.6	10.694	0	6.3×10^5	0.9
terbufos	10.991	4.1×10^{-3}	6.8×10^5	2.0	10.983	5.0×10^{-3}	6.8×10^5	3.6
tefluthrine	11.298	4.8×10^{-3}	8.1×10^5	2.9	11.289	4.9×10^{-3}	7.7×10^5	1.4
chlorpyrifos-methyl	12.036	3.7×10^{-3}	7.4×10^5	1.6	12.028	3.7×10^{-3}	7.4×10^5	0.8
spiroxamine-1	12.150	1.4×10^{-2}	7.9×10^5	4.5	12.143	5.8×10^{-3}	8.0×10^5	1.8
spiroxamine-2	12.656	2.2×10^{-2}	8.4×10^5	2.1	12.645	0	8.3×10^5	3.1
terbutryn	12.610	6.6×10^{-3}	7.4×10^5	2.3	12.603	6.6×10^{-3}	8.5×10^5	2.1
malathion	12.779	4.3×10^{-3}	9.4×10^5	3.0	12.771	4.3×10^{-3}	9.0×10^5	2.6
thiobencarb	12.994	6.9×10^{-3}	8.5×10^5	2.9	12.985	4.2×10^{-3}	8.7×10^5	0.8
fenpropimorph	13.066	6.4×10^{-3}	9.4×10^5	3.0	13.058	0	9.4×10^5	3.0
pendimethalin	13.576	6.6×10^{-3}	9.7×10^5	5.2	13.567	3.3×10^{-3}	9.7×10^5	1.7
penconazole	13.720	5.2×10^{-3}	9.0×10^5	2.2	13.711	4.0×10^{-3}	9.2×10^5	2.3
procymidone	13.967	3.9×10^{-3}	9.9×10^5	1.9	13.958	3.2×10^{-3}	1.0×10^6	5.9
methidathion	14.204	5.9×10^{-3}	1.0×10^6	2.9	14.195	3.2×10^{-3}	9.6×10^5	0.7
fenamiphos	14.558	9.2×10^{-3}	1.1×10^6	6.5	14.553	5.7×10^{-3}	1.1×10^6	1.8
oxadiazon	14.852	4.8×10^{-3}	1.2×10^6	5.7	14.844	3.0×10^{-3}	1.2×10^6	0.7
kresoxim-methyl	14.994	4.7×10^{-3}	1.2×10^6	2.5	14.986	3.0×10^{-3}	1.2×10^6	6.3
chlorfenapyr	15.157	3.6×10^{-3}	1.2×10^6	7.9	15.148	7.5×10^{-3}	1.2×10^6	2.7
endosulfan-β	15.691	5.7×10^{-3}	1.1×10^6	3.3	15.682	2.9×10^{-3}	1.1×10^6	3.3
norflurazon	16.214	5.2×10^{-3}	1.1×10^6	3.1	16.210	3.4×10^{-3}	1.2×10^6	1.6
diffufencan	16.659	6.8×10^{-3}	1.4×10^6	1.6	16.651	2.7×10^{-3}	1.5×10^6	3.4
bifenthrin	17.253	4.1×10^{-3}	1.6×10^6	5.9	17.245	3.2×10^{-3}	1.6×10^6	1.4
azinphos-methyl	18.076	3.0×10^{-3}	1.4×10^6	3.3	18.069	3.0×10^{-3}	1.5×10^6	2.9
fenarimol	18.531	3.0×10^{-3}	1.6×10^6	5.2	18.523	2.4×10^{-3}	1.5×10^6	2.1
permethrin(trans)	19.081	5.7×10^{-3}	1.8×10^6	1.5	19.072	2.9×10^{-3}	1.9×10^6	5.1
permethrin(cis)	19.207	3.7×10^{-3}	1.9×10^6	2.7	19.198	0	1.9×10^6	2.5
cyfluthrin-1	19.602	6.7×10^{-3}	2.0×10^6	4.4	19.594	3.6×10^{-3}	2.0×10^6	4.7
cyfluthrin-2	19.698	6.6×10^{-3}	1.9×10^6	2.3	19.691	2.8×10^{-3}	2.0×10^6	7.8
cyfluthrin-3	19.762	5.5×10^{-3}	1.7×10^6	13.4	19.755	2.8×10^{-3}	1.8×10^6	5.1
cyfluthrin-4	19.804	8.7×10^{-3}	1.7×10^6	14.5	19.801	1.8×10^{-2}	1.6×10^6	5.5
flucythrinate-1	20.125	6.1×10^{-3}	2.0×10^6	3.4	20.117	2.2×10^{-3}	2.1×10^6	4.0
flucythrinate-2	20.341	7.0×10^{-3}	1.9×10^6	4.1	20.333	4.1×10^{-3}	2.0×10^6	3.4
fluvalinate-1	21.133	7.2×10^{-3}	1.7×10^6	4.0	21.122	4.0×10^{-3}	1.8×10^6	2.6
fluvalinate-2	21.212	6.1×10^{-3}	1.7×10^6	1.5	21.202	3.9×10^{-3}	1.7×10^6	2.7

エチレングリコールによりピーク強度は各農薬の平均値で約 1.36 倍となり、理論段数は未導入の場合とほとんど差がみられなかった。エチレングリコール導入により各農薬の保持時間はわずかに短くなったが、分離性能に影響するほどではなく、従来と同じ測定条件を適用できる範囲内であった。保持時間が短くなった原因は、キャリアガス中に含まれる微量のエチレングリコールがモデルイファイアーとして機能し、各農薬の溶出を促進したためと考えられる。

次に、質量分析計への影響を確認した。エチレングリコールをイオン源へ導入し続けることにより各農薬のイオン化に影響を与え、フラグメンテーションのパターンが変化する可能性がある。エチレングリコール導入時に各農薬のマススペクトルを確認したところ、全ての農薬においてマススペクトルに目立った変化は確認されなかった。マススペクトルの例として、オメトエートのマススペクトルを Figure 2.11 に示す。

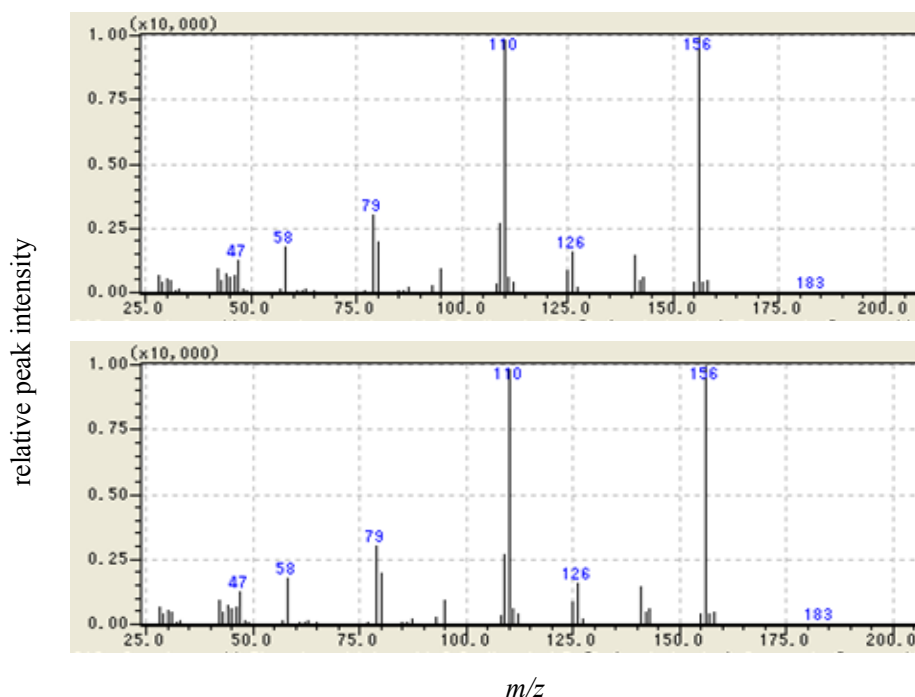


Figure 2.11 Mass spectrum of omethoate with ethylene glycol (A) and standard mass spectrum on NIST (B).

保護剤を使用する場合、ガラスインサート、注入口側のカラム先端部、イオン源への蓄積に注意しなければならない。化学的特徴がエチレングリコールと類似している PEG は残留農薬分析において、測定溶液に添加する保護剤として使用されている。PEG は重合度により平均分子量が異なるが、残留農薬分析では平均分子量 300 の PEG300 が使用される。しかしながら、PEG300 を含む試験溶液を長期間注入することによりカラム性能が低下することが課題であり、PEG300 の注入により低下したカラム性能は、注入口側のカラム先端より長い範囲で切断、除去しないと改善しない。一般的に保護剤添加法で用いられている保護剤の GC への導入量は、PEG300 ではおよそ 1 μg であり、エチルグリセロール、グルコノラクトン、ソルビトールを混合した保護剤添加では 24 μg である [Table 2.6]。本実験で用いた保護剤導入装置によるエチレングリコールの導入量は、室温で稼働させた場合は 4.2 μg /時間である。エチレングリコールの導入量は、PEG300 の添加法と比較すると量が多いが、少なくとも 6 カ月はカラムの先端部を切断する必要がなかった。対照的に、PEG300 を使用した場合は GC 内に高分子の PEG が蓄積し、カラム性能の低下によるピーク形状の劣化、及びピーク強度の低下が生じた。この結果は、GC-MS による残留農薬一斉分析において保護剤導入法の利点を示した結果であるといえる。

Table 2.6 Amount of analyte protectants added to sample solution

analyte protectant	amount of protectant (/injection)
PEG300	0.5 – 1.5 μg *
Ethylglycerol, gulonolactone, sorbitol	24 μg **

* Syokuhineiseigaku zasshi, 49 (2008) 403 ; Analytical Letters, 42 (2009) 2578

** Analytical Chemistry, 77 (2005) 8129

次に、保護剤がピーク形状に与える影響を検討した。GC は試験溶液の注入を繰り返すことにより、装置内に試料由来の汚れが蓄積する。蓄積した汚れが新たな活性部位となりマトリクス効果が増加する。活性部位が増加することにより、標準溶液ではピーク形状の異常、感度の低下が引き起こされる。汚染状態の GC-MS において標準溶液を注入、保護剤無し、及び保護剤有り（エチレングリコール又は PEG300）、それぞれの場合のオメトエートのクロマトグラムを Figure 2.12 に示す。

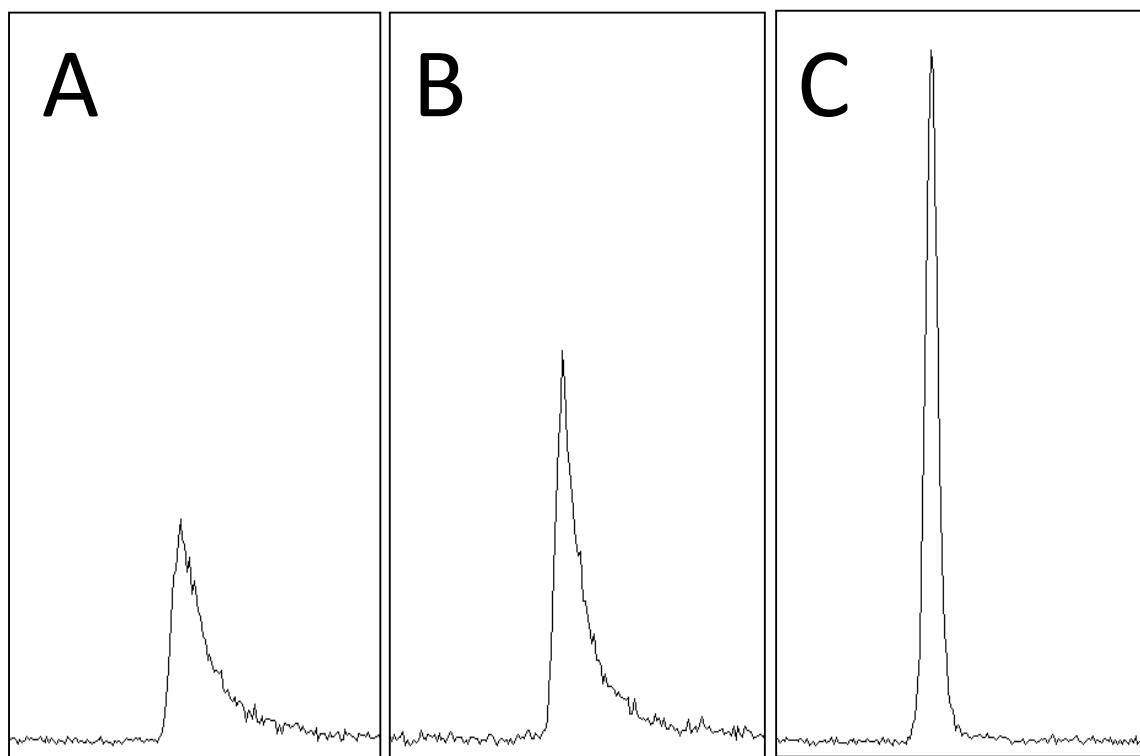


Figure 2.12 Comparison of peak shape and intensity of 0.1 µg/mL omethoate (m/z 156) obtained injection in solvent solution (A) without and with ethylene glycol (B) and PEG300 (C) on deteriorated state GC-MS.

保護剤無しの場合はピークテーリングが認められるが、キャリアガス中にエチレングリコールを導入した場合の標準溶液においては、ピーク強度は増加したが、ピーク形状に変化は確認されなかった。PEG300 を添加した標準溶液ではピーク強度が増加し、ピーク形状が改善した。保護剤によるマトリクス効果の低減は、保護剤の活性部位との反応性、及び活性部位に対する保護剤の量が重要であると考えられる。エチレングリコール、PEG はいずれも官能基にヒドロキシル基を有するため、活性部位との反応機構は類似していると考えられる。エチレングリコールはキャリアガス中に一定量で存在すると考えられるが、PEG300 は試験溶液中に含まれるため、GC 注入後、カラム分離により PEG が分離され分子量に応じた複数のピークが生じる。PEG 由来のピークが溶出する時間付近は活性部位に対する保護剤の量がエチレングリコールと比較して相対的に多くなると考えられる。PEG300 を添加した標準溶液ではオメトエートの保持時間付近に PEG のピークが溶出するため、ピーク形状が改善したと考えられる。

2.3.5 保護剤添加法と保護剤導入法によるマトリクス効果の比較

これまでの実験結果より、キャリアガス中への保護剤導入法は簡易かつ低コストで効果が得られることから、残留農薬分析におけるマトリクス効果低減法として有効であると考えられる。しかしながら、これまでに従来法と比較した知見はない。キャリアガス中への保護剤導入法の有効性を評価するため、従来からマトリクス効果低減法として用いられてきた PEG を試験溶液に添加する方法と比較した。また、GC-MS の機種による効果の差を検証するため、アジレントテクノロジー製の GC-MS を用いてエチレングリコールによるマトリクスの低減効果を評価した。

試験溶液にはホウレンソウ、オレンジ、玄米、大豆の抽出液を用い、キャリアガス中へエチレングリコールを導入する方法、及び試験溶液中に PEG300 を添加する方法、それぞれの方法によるマトリクス効果の低減効果を評価した。PEG300 を添加した結果、ほぼ全ての農薬でマトリクス効果が低減したが、フルシトリネート、フルバリネートはマトリクス効果が増加した。一方で、キャリアガス中にエチレングリコールを導入した場合は全ての農薬でマトリクス効果が低下した [Figure 2.13 A]。さらに、GC-MS の機種による効果の差を評価するため、ホウレンソウ抽出液を用いて同様の実験を行った。その結果、PEG300 は GC-MS の機種によらず保持時間の遅い農薬に対してマトリクス効果の低減効果が低い傾向が確認された [Figure 2.13 B]。PEG300 によりフルシトリネート、フルバリネートのマトリクス効果が増加した原因は、PEG300 により溶媒混合標準溶液のピーク強度が低下したためである。しかし、GC-MS の機種を変更した場合には感度低下は生じなかった。これは GC-MS の機種に依存した結果であると考えられるため、明確な要因を特定することは困難である。キャリアガス中にエチレングリコールを導入した結果では、農薬の保持時間、GC-MS の機種によらず PEG300 と同等以上のマトリクス効果の低減効果が得られた。保護剤によるマトリクス効果の低減は、保護剤が溶出する時間付近において効果が高い。PEG300 を添加した場合は、PEG 由来の複数のピークが溶出する範囲内に効果が限定されるのに対し、キャリアガス中に保護剤を導入する方法では分析中、常に保護剤が存在する状態であるため、農薬の保持時間によらず効果が得られることが利点である。従って、キャリアガス中へエチレングリコールを導入する方法は PEG300 を添加する方法の欠点を補うことが可能であり、食品中の残留農薬一斉分析において有効な方法であることが確認された。

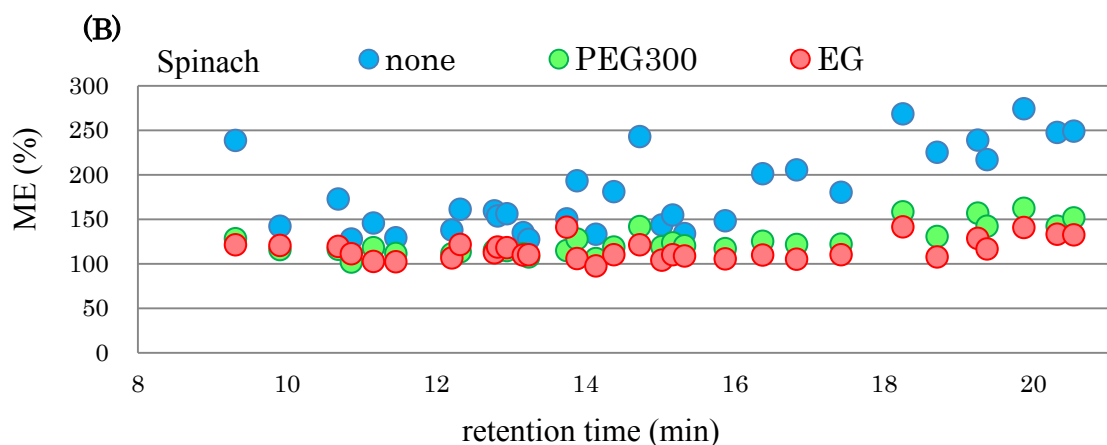
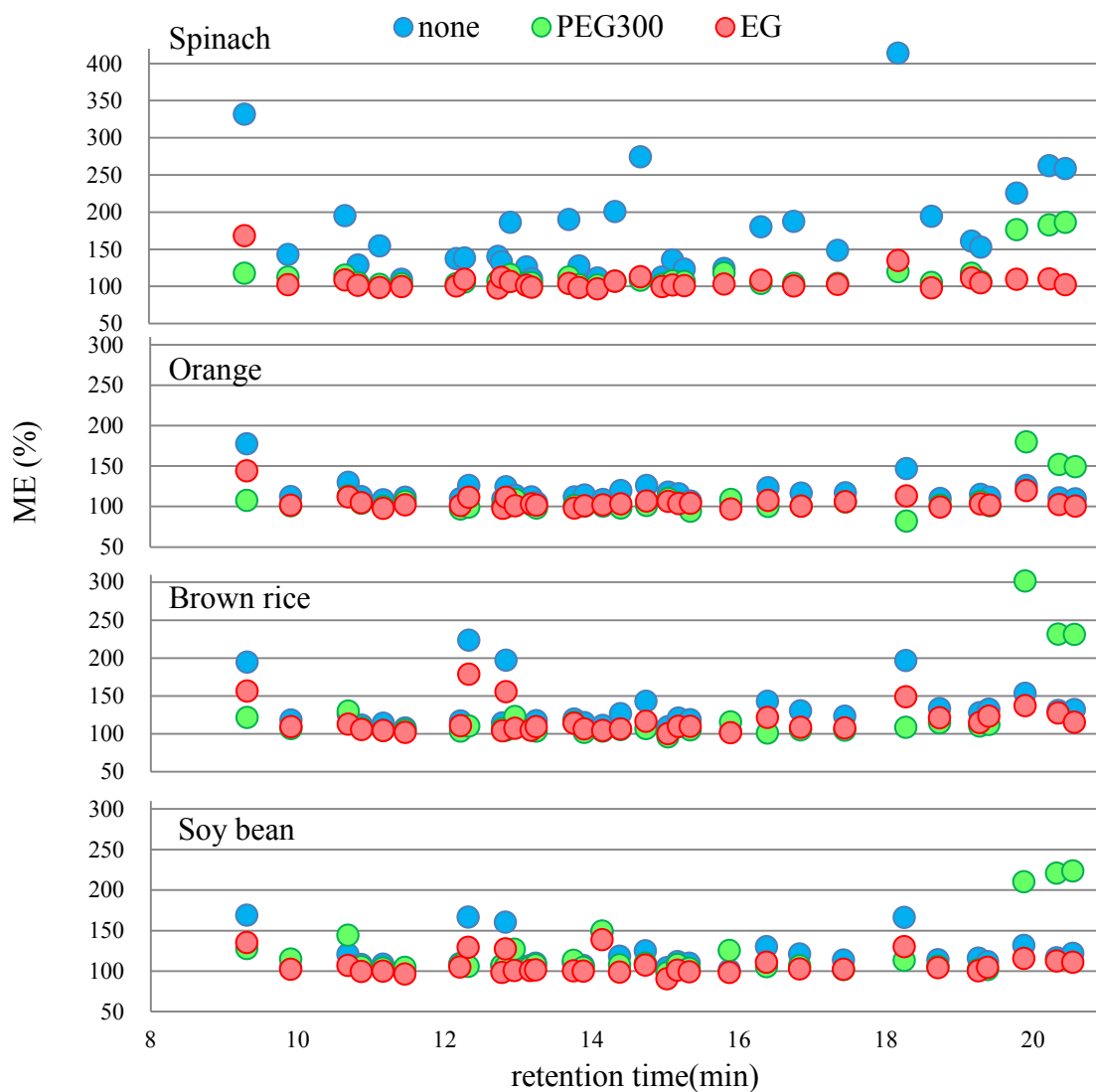


Figure 2.13 Compensation of the matrix effects (n=5) of agricultural product extracts by without and with analyte protectants on GC-MS QP-2010 (A) and HP6890 (B). none : without analyte protectant, PEG300 : polyethylene glycol 300, EG : ethylene glycol.

2.4 結言

本章では、GC キャリガス中に保護剤としてエチレングリコールを連続的に導入することによるマトリクス効果の低減を目的として研究を行った。農産物を試料として検討した結果、エチレングリコールを導入することにより全ての農薬でマトリクス効果が低減した。試験溶液の注入を繰り返した汚染状態のGC-MSにおいては、メンテナンス後と同等のマトリクス効果にまで低減することができた。さらに、従来から保護剤として用いられているPEG300と比較して、同等のマトリクス効果の低減が確認された。本方法によりマトリクス効果による定量誤差を低減できるため、確度の改善に大きく貢献すると考えられた。また、注入口、カラム、イオン源は分析中、常にエチレングリコールが導入されるが、長期間の導入においてもGC-MSの分離性能に影響はみられなかった。エチレングリコールにより保持時間は短くなったが、その差は軽微であり、従来の測定条件を適用できる範囲内である。これらの結果より、保護剤導入装置は長期間GC-MSの分離性能に影響を与えることなく、マトリクス効果を低減することを示した。保護剤導入装置はキャリアアガス配管に接続するだけで使用可能であり、試薬調製も必要ないため、従来法と比較して時間と価格の削減が可能である。

GC-MSを用いた食品中の残留農薬分析において、キャリアガス中へエチレングリコールを導入する方法は、GC-MSの状態に関わらず長期間にわたりマトリクス効果を低減することが可能である。本方法は確度の改善、及び時間と価格の削減を可能とする技術である。本研究により保護剤導入装置は分残留農薬分析における新たなマトリクス効果低減法として有効な方法であることを明らかにした。

引用文献

1. K. Maštovská, S.J. Lehotay, M. Anastassiades. *Analytical Chemistry*, 77, (2005), 8129-8137.
2. M. Anastassiades, K. Maštovská, S. J. Lehotay. *Journal of Chromatography A*, 1015, (2003), 163-184.
3. X. Xu, L. Li, W. Zhong, Y. He. *Analytical Letters*, 42, (2009), 2578-2591.
4. Y. Li, X. Chen, C. Fan, G. Pang. *Journal of Chromatography A*, 1266, (2012), 131-142.
5. N. Chen, H. Gao, N. Ye, Q. Zhong, Z. Xiong, X. Gu. *American Journal of Analytical Chemistry*, 3, (2012), 33-39.
6. Y. Wang, H. Jin, S. Ma, J. Lu, R. Lin. *Journal of Chromatography A*, 1218, (2011), 334-342.
7. C. Sánchez-brunete, B. Albero, G. Martín, J.L. Tadeo. *Analytical Sciences*, 21, (2005), 1291-1296.
8. H. Ito, T. Sugiura, H. Nagai, A. Murase, S. Kodama, Y. Inoue, A. Yamamoto, K. Hayakawa. *Chromatography*, 28, (2007), 25-28.
9. 食安発第 0124001 号 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知 「食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について」別添 「GC/MS による農薬等の一斉試験法（農産物）」
10. M.M. Rahman, J. Park, A.M.A. El-Aty, J. Choi, S. Cho, A. Yang, K.H. Park, J. Shim. *Journal of Separation Science*, 36, (2013), 203-211.
11. J. Hajšlová, K. Holadová, V. Kocourek, J. Poustka, M. Godula, P. Cuhra, M. Kempný. *Journal of Chromatography A*, 800, (1998), 283-295.
12. S.S. Freitas, F.M. Lancas. *Journal of Separation Science*, 32, (2009), 3698-3705.

13. 食安発 1224 第 1 号 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知 別添「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインの一部改正について」

第3章 吸光光度計による迅速な食品中保存料分析に関する研究

3.1 緒言

近年、食品製造技術の進歩に伴い、消費者の食嗜好にあわせた多種多様な加工食品が流通している。食品は熱、湿度、光などの環境条件や、微生物増殖による栄養成分の変質、腐敗により経時的に品質が低下するため、食品価値の維持、流通範囲の拡大には長期間の品質保持が重要な課題となる。食品添加物の保存料は微生物による栄養成分の変質、腐敗の遅延や、環境条件による食品成分の化学変化を防止する目的で使用され、食品の保存性を向上させる。しかしながら、保存料の過剰摂取は人体に対して有害であり、アレルギー性皮膚炎等の疾患を引き起こすことが知られている [1-2]。ソルビン酸、安息香酸は抗菌作用を有し、カビや酵母の増殖を抑えるため、幅広い食品に使用されており [3-7]、医薬品、化粧品等にも使用されている。我が国においては一部の食品においてソルビン酸で 0.005~3.0 g/kg、安息香酸で 0.60~2.5 g/kg の使用基準が設定されている。

食品中に含まれる化学物質の分析において信頼性の高い分析結果を得るためには、目的成分以外の食品成分を除去する適切な精製法の選択が重要である。最近の報告では、保存料分析に関する精製法として水蒸気蒸留法が採用されているが [8]、水蒸気蒸留法は前処理に労力と時間を要する。ソルビン酸、安息香酸は分子量 200 未満の低分子化合物であるため、分子量を指標にした GPC による精製法は有効であると考えられる。GPC は食品中の残留農薬分析においては脂質や色素等の高分子化合物の除去に有効な精製法として用いられている [9-11]。しかしながら、GPC は高価なカラム及び大量の有機溶媒が必要であり、

処理時間が比較的長いため、コストと時間が課題となる。分子量を指標とした別の精製法として透析法が挙げられるが、一般的な透析法は透析時間に長時間を要し[12]、透析により試料溶液が希釈されるため、濃縮操作が必要であることから、前処理に長時間を要することが課題である。過去の研究では、透析をオンライン装置化することにより透析時間を短縮する手法が報告されている[13-14]。山本研究室では、オンライン透析装置が食品分析の精製法として有効かつ迅速な方法であることを明らかにしている [15]。迅速な透析法は食品中の低分子化合物を対象とした分析に有効な精製方法であり、複数の研究者らが食品中の硝酸塩、糖類、有機酸を対象とした透析法を報告している [12,16-17]。これまでに、山本研究室で開発したオンライン透析装置を食品添加物分析に利用した例は無く、低分子化合物である保存料の分析においても有効であると考えられる。また、食品添加物は使用基準に適合する範囲内で添加することが前提であり、食品事業者の品質管理を目的にした分析を想定した場合、迅速分析法の開発にあたっては、既存法と同等の精度・確度が得られれば十分に目的を達成できると考えられる。

本研究では、分析現場で有用な保存料の迅速分析法の開発を目指し、マイクロダイアリスと分光光度計を組み合わせた方法の評価を行った。分光光度計は GC や HPLC と比較して安価であり、測定時間の大幅な短縮が可能である。分光光度計により得られる吸収スペクトルは食品マトリクスの影響を受けやすいため、定量にはスペクトルの高次微分処理を用いる新たな手法を評価した。また、迅速分析法の精度・確度が既存法と同等であるかを評価するため、保存料分析で多用されている HPLC 法の結果との比較を行った。

3.2 実験方法

3.2.1 試薬及び試液

アセトニトリル (HPLC 用) はシグマアルドリッチジャパン (東京) より入手した。ソルビン酸 (試薬特級)、安息香酸 (試薬特級)、塩化水素 (試薬特級) 及び塩化ナトリウム (試薬特級) は和光純薬工業 (大阪) より入手した。無水硫酸マグネシウム (試薬特級) は純正化学 (東京) より入手した。透析膜として用いたナイロン膜、PTFE 膜、PVDF 膜はアドバンテック東洋 (東京) より入手した。その他の試薬は全て和光純薬工業より入手した。

試液に用いた純水は東レ製 LV408 超純水製造装置で製造したものをを用いた。安息香酸及びソルビン酸の標準原液 (10,000 mg/L) は 100 mg をアセトニトリルで 10 mL に調製した。実験に用いた標準溶液は適宜、アセトニトリルで希釈したものをを用いた。

3.2.2 試験溶液の調製方法

加工食品及び清涼飲料水は市販の量販店より入手した。試験溶液の調製に用いた試験法のフローを Figure 3.1 に示す。

<固形食品>

細切した試料 5.0 g をポリプロピレン製遠心チューブに秤量し、15 mL の 1% (w/v) 炭酸水素ナトリウム溶液を加えてホモジナイズした後、抽出溶媒で 25 mL に定容した。定容液を 10,000 rpm で 3 分間の遠心分離を行い、上清の 10 mL を別のポリプロピレン製遠心チューブに移した後、1 M 塩酸 2 mL、塩化ナトリウム 5 g、及びアセトニトリル 20 mL を加えた。この混合溶液をボルテックスミキサーで 90 秒間混合した後、アセトニトリル層を無水硫酸マグネシウムで脱水したものを透析用試料溶液とした。

<清涼飲料水>

試料 2.0 g をポリプロピレン製遠心チューブに秤量し、1 M 塩酸 2 mL、純水 8 mL、塩化ナトリウム 5 g、及びアセトニトリル 20 mL を加えた。以降の操作は固形試料と同様の操作を実施した。

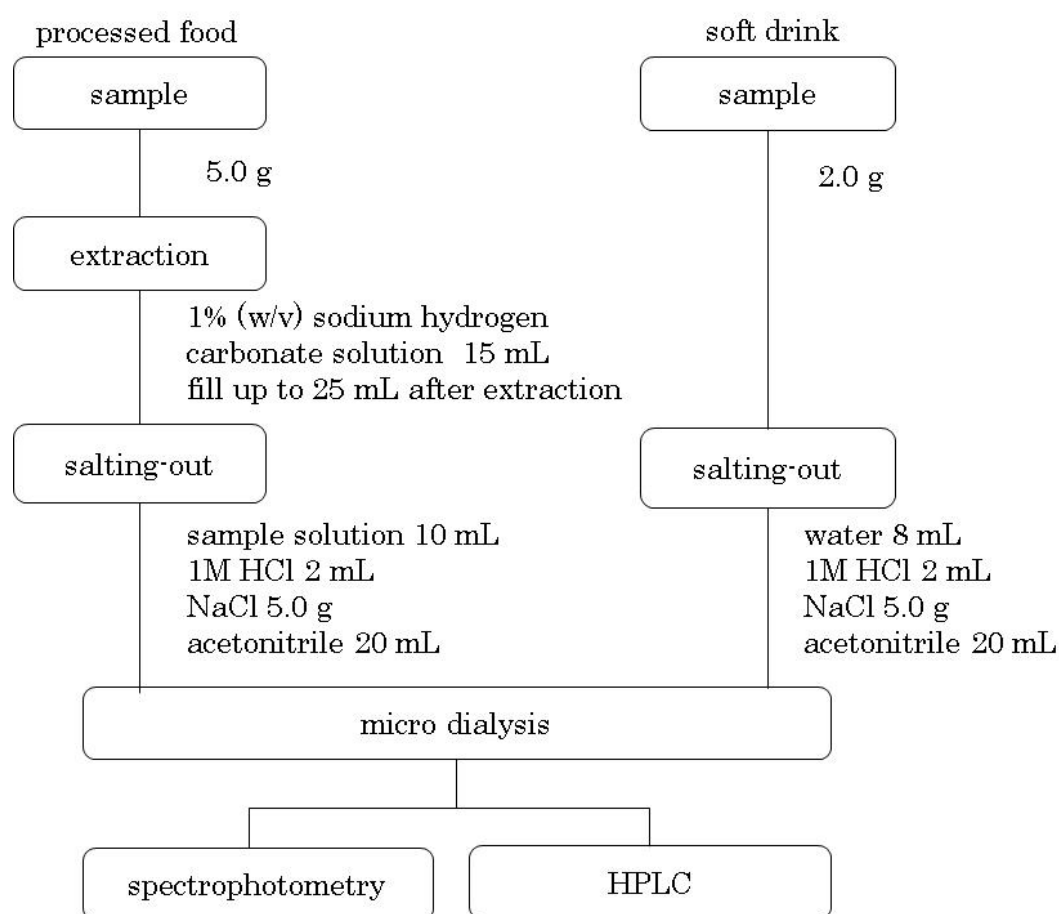


Figure 3.1 Flow chart of sample preparation.

3.2.3 マイクロダイアリシス装置

ダイアリシス装置はダイアリシスセルと 2 台のメルクエスト製インフュージョンポンプ FP-1100 で構成した。ダイアリシスセルはメトローム製のイオン分析用 (製品番号 6.2729.100) を使用したが、アクリル製のため有機溶媒耐性が低い。

そのため、本実験用に PEEK 製のダイアリシスセルを作成した。ダイアリシスセルは渦状の溝を有する 2 つのセルブロックがナイロン膜で隔てられている。ナイロン膜は直径 47 mm、孔径 $0.2\ \mu\text{m}$ 、厚さ $150\sim 187\ \mu\text{m}$ のものを使用した。試料溶液側、透析溶液側の各セルの溝は約 $120\ \mu\text{L}$ の容量を有している。マイクロダイアリシス装置の概略図を Figure 3.2 に示す。試料溶液及び透析溶液の流速は $0.5\ \text{mL}/\text{min}$ に設定した。透析開始後 1 分間は装置平衡化のための送液とし、透析溶液は廃棄した。その後 4 分間の透析溶液を捕集し、試験溶液とした。透析により試料溶液と透析溶液の間で濃度平衡に達するため、透析率 50% (透析溶液が試料溶液濃度に対して 50%濃度) を透析完了とした。

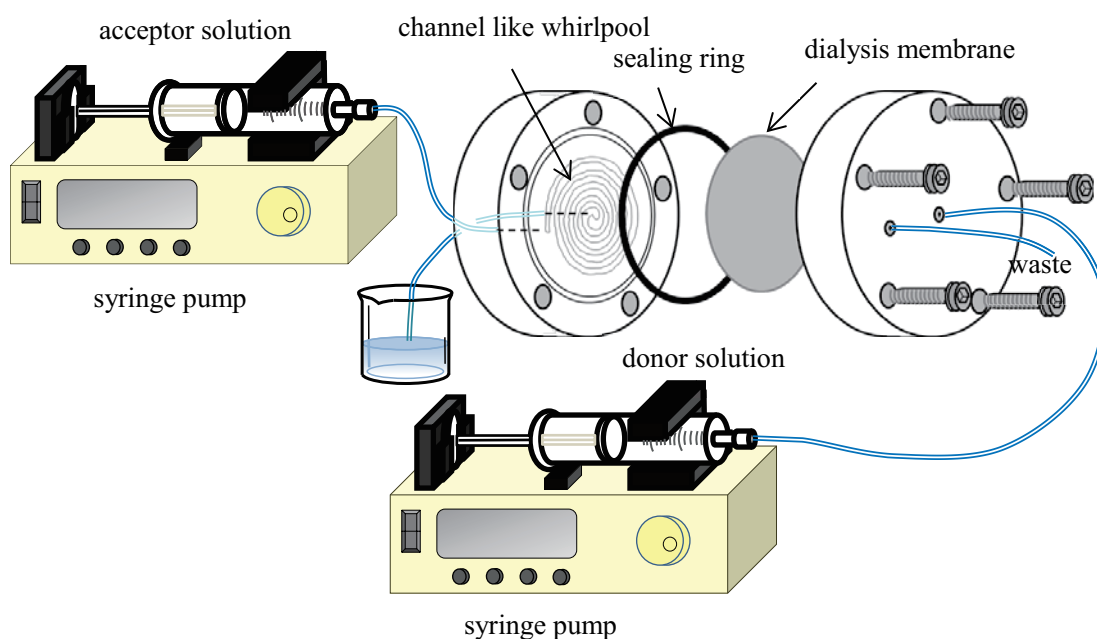


Figure 3.2 Cross-sectional diagram of the dialysis cell assembly and schematic diagram of micro-dialysis system.

3.2.4 分光光度計測定条件

分光光度計：UVmini-1240【島津製作所製（京都）】

測定で得られた吸収波長はエクセルシート上で Savitzky-Golay 法 [18] に基づいた多項式処理による微分計算を行った。

3.2.5 HPLC 測定条件

HPLC：Prominence 20AD【島津製作所製（京都）】

カラム：COSMOSIL 5C18-PAQ【長さ 25 cm、内径 4.6 mm、粒子径 5 μm、ナカライテスク製（京都）】

カラムオーブン：40°C

検出波長：安息香酸 230 nm

ソルビン酸 260 nm

移動相：アセトニトリル：5 mM リン酸（40：60）混液

流速：1.0 mL/min

3.2.6 LC-MS/MS 測定条件

HPLC 部：Prominence UFLC 20AD【島津製作所製（京都）】

MS 部：API3200 QTRAP【AB SCIEX 製】

カラム：Inetsil ODS-4【長さ 15 cm、内径 2.1 mm、粒子径 3 μm、GL サイエンス製（東京）】

カラムオーブン：40°C

移動相：A：0.1%ギ酸

B：アセトニトリル

グラジエント条件：

B (%) : 5 (0 min) → 30 (1 min) → 95 (15 min) → 95 (20min)

流速 : 0.2 mL/min

イオン化法 : ESI (+)

測定モード : MRM

3.3 結果及び考察

3.3.1 透析膜による分子ふるい効果の評価

分光光度計、HPLC による食品中の保存料分析において、試験溶液中に含まれる食品マトリクスは定量精度低下の要因となる。透析は分子量を指標とした物質の分離が可能であり、脂質や色素等の高分子化合物の除去に有効な精製法である。透析による食品マトリクスの除去効果は透析膜の孔径、膜厚に依存するため、食品中の安息香酸、ソルビン酸の分析に最適な透析条件の検討を行った。

最初に、安息香酸、ソルビン酸の透析に必要な時間、及び透析溶液を検討した。実験方法は透析膜にナイロン膜を用いて、アセトニトリルで調製した安息香酸、ソルビン酸の標準溶液を試料溶液として透析を行い、経時的に透析率を確認した。透析溶液を検討するため、含水アセトニトリルでも同様の実験を実施した。なお、透析溶液は試料溶液と同じ溶媒を用いた。結果を Figure 3.3 に示す。

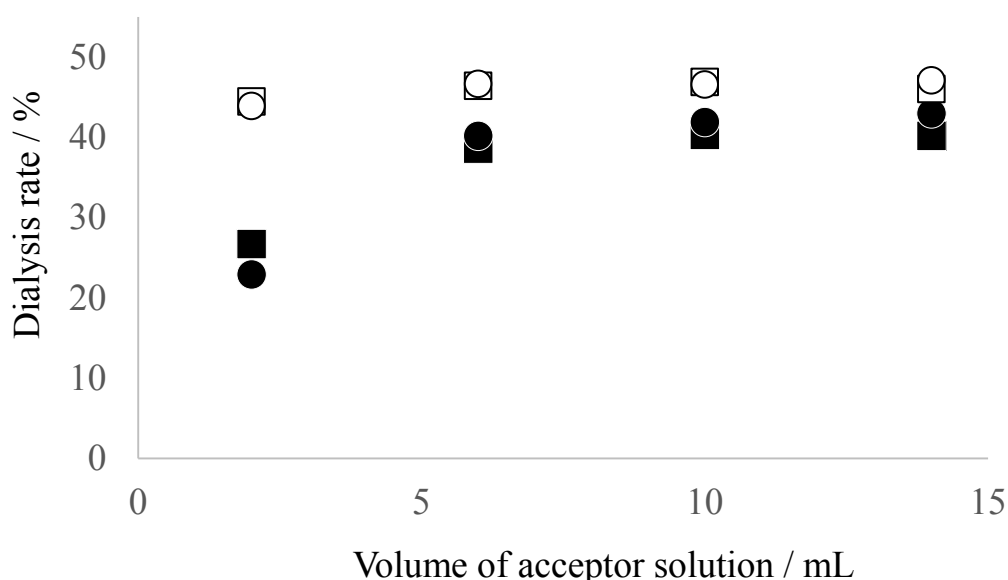


Figure 3.3 Effect of dialysis solution on the dialysis time.

Symbol assignment; circle, benzoic acid; square, sorbic acid; open symbol, dialysis with acetonitrile; closed symbol, dialysis with water.

透析溶液にアセトニトリルを用いた場合、安息香酸、ソルビン酸は透析開始から 2 分後には透析率が平衡に達したが、含水アセトニトリルの場合は 2 倍以上の時間を要した。この結果は、安息香酸の拡散係数が水中よりもアセトニトリル中の方が大きいとする研究報告と一致した [19]。これらの実験結果より、透析溶液にアセトニトリルを用いることで、保存料の透析は約 2 分で平衡に達することが明らかとなった。

次に、透析溶液にアセトニトリルを用いた透析により除去される分子量範囲を確認するため、透析膜の検討を行った。検討に用いた透析膜及びサイズを Table 3.1 に、各透析膜の分子ふるい効果を確認するための指標物質（農薬、動物用医薬品、色素）を Table 3.2 に示す。

Table 3.1 Parameters of dialysis membranes used in this study.

	Pore size / μm	Diameter / mm	Thickness / μm
Nylon	0.2	47	150-187
	0.1	47	100 \pm 15
PTFE (hydrophilic)	0.2	47	35
PVDF (hydrophilic)	0.22	47	125
polycarbonate	0.2	47	10

Table 3.2 Probe substances to evaluate dialysis.

substance	M.W.
flavone	222
Lumichrome	242
Sulfapyridine	249
Azinphos-methyl	317
Cloquintocet-mexyl	335
Riboflavin	376
Azoxystrobin	403
Indoxacarb	527
Novobiocin	612
Glycerol Dioleate	621
Fucoxanthin	659
Spinosyn A	731
Brilliant Blue FCF	793
Bio-Red protein Assay Dye Reagent	833
Chlorophyll-a	893
Tylosin	917
Rose Bengal B	1018

Figure 3.4 に示したように、透析膜に孔径 0.2 μm のナイロン膜を用いた場合、分子量約 700 付近より透析率が低下し、分子量 1000 以上の物質は透析により大部分が除去されると推定される結果が得られた。色素、ノボビオシンのような平面構造を有する物質は、ナイロン膜によりほぼ完全に除去された。透析後のナイロン膜を確認した結果、色素類の吸着により試料溶液側の膜表面に渦状の色素痕が観察されたことから、これらの物質は膜吸着により除去されたと考えられた。例として、赤色 105 号を透析した後のナイロン膜を Figure 3.5 に示す。

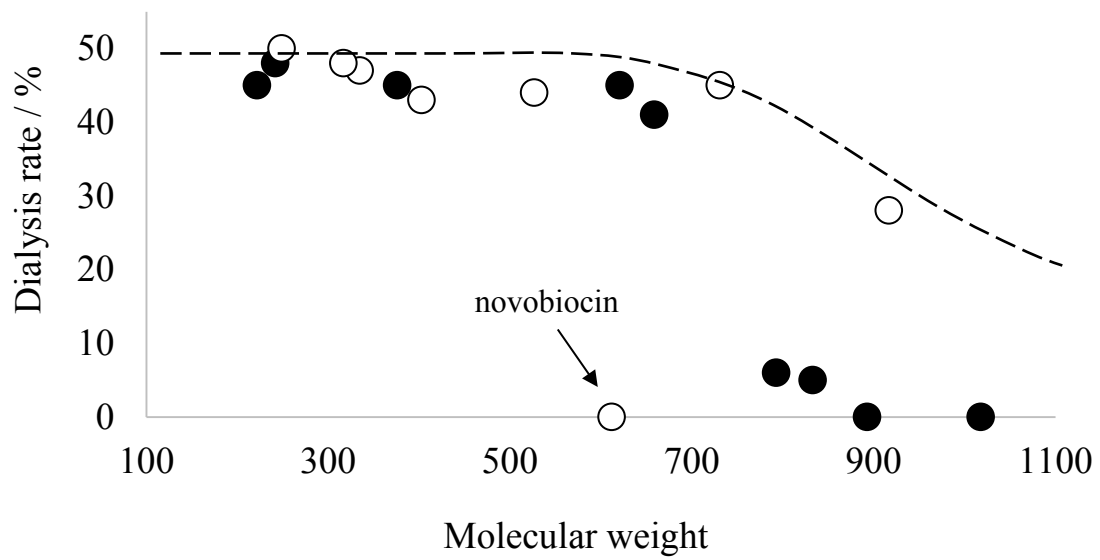


Figure 3.4 Molecular weight exclusion limit of nylon membrane.
 Symbol assignment; open circle, pesticides and animal drugs; closed circle, pigments.



Figure 3.5 Adsorption of Rose Bengal B on nylon membrane after dialysis.

透析膜の孔径を検討する比較実験として孔径 0.1 μm のナイロン膜を用いて同様の評価を行ったが、孔径を小さくしても除去される分子量範囲の縮小は確認されず、透析時間が増加する結果となった [Figure 3.6]。PTFE の実験結果では、実験に用いた指標物質では明確に除去可能な分子量範囲を確認することができなかった。PVDF の実験結果では、平面構造を有する数種類の物質に対して透析による除去が確認された [Figure 3.7]。これらの結果は、主に膜厚の差がもたらした結果であると推測され、次いで膜の疎水性相互作用が関与していると考えられる。ポリカーボネートはアセトニトリルに対する溶媒耐性が低く、評価不能であった。

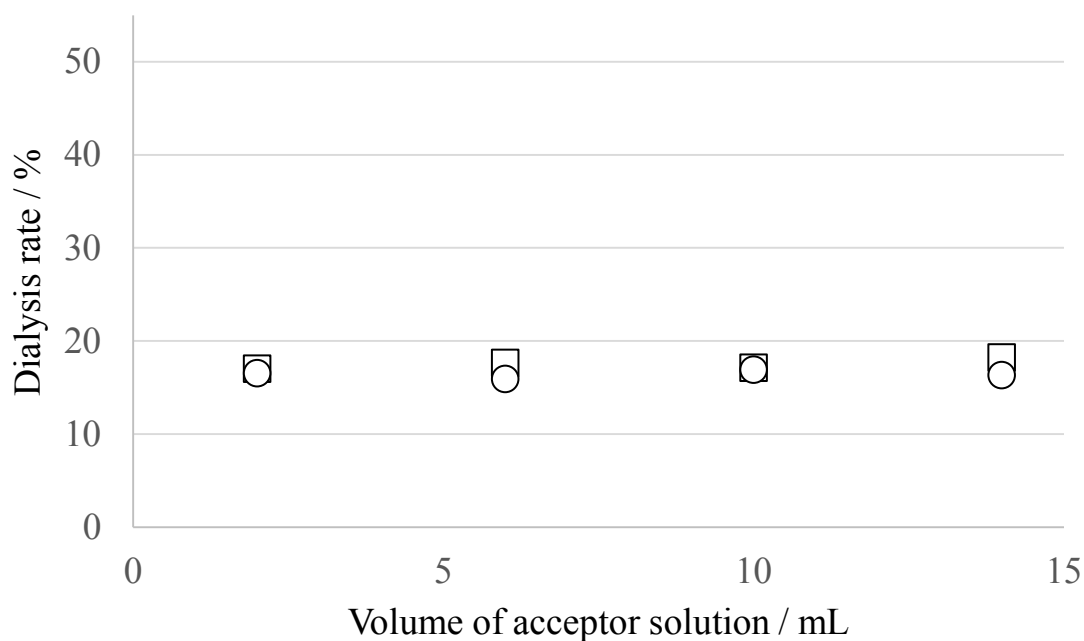


Figure 3.6 The dialysis rates of benzoic acid and sorbic acid by Nylon membrane with pore size 0.1 μm . Symbol assignation; circle, benzoic acid; square, sorbic acid; open symbol, dialysis with acetonitrile.

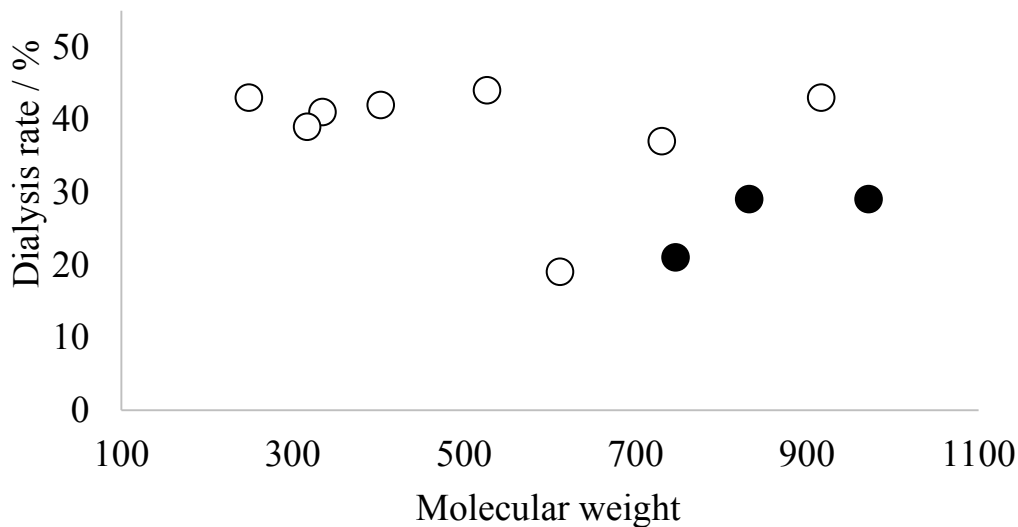


Figure 3.7 Molecular weight exclusion limit of PVDF membrane.

Symbol assignment; open circle, pesticides and animal drugs; closed circle, pigments.

安息香酸、ソルビン酸の透析実験では透析溶液に水が含まれると透析時間が長くなる結果が得られたが、他の物質についての挙動を確認するため、Table 3.3 に示した様々な農薬、動物用医薬品（農薬等）を用いて同様の実験を実施した。実験方法はアセトニトリル、及びアセトニトリル：水（1:1）混液の各溶媒を用いて 0.1 mg/L に調製した農薬等混合標準溶液を孔径 0.2 μm のナイロン膜で透析し、透析開始後 2 分間に得られる透析溶液を LC-MS/MS にて測定した。透析溶液にアセトニトリル：水（1:1）混液を用いた場合、全ての農薬等で透析率が低下した[Figure 3.8]。この結果から、農薬等においても水を含む透析溶液では透析に時間を要することが明らかとなった。

Table 3.3 List of pesticides and animal drugs.

substance	M.W	substance	M.W
Methomyl	163	Allethrin	302
Thiabendazole	201	Sulfadoxine	310
Fenobucarb	207	Sulfadimethoxine	310
Aldicarb	208	Azinphos-methyl	317
Dimethirimol	209	Pyrifthalid	318
Sulfacetamide	214	Iprovalicarb	320
Xylazine	220	Azamethiphos	324
Chloridazon	221	Cyazofamid	324
Sulfisozole	239	Famphur	325
Pyrimethamine	248	Cloquintocet-mexyl	335
Clothianidin	249	Danofloxacin	357
Sulfapyridine	249	Florfenicol_NH4	357
Sulfadiazine	250	Isoxaflutole	359
Thiacloprid	252	Prednisolone	360
Sulfamethoxazole	253	Hydrocortisone	362
Ferimzone (E),(Z)	254	Anilofos	367
Sulfathiazole	255	Methoxyfenozide	368
Trichlorfon	255	Furathiocarb	382
Diaveridine	260	Chromafenozide	394
Sulfamerazine	264	Azoxystrobin	403
Ormetoprim	274	Lincomycin	406
Sulfabenzamide	276	Cyflufenamid	412
Clenbuterol	276	Benzofenap	430
Sulfisomidine	278	Pyrazolynate	438
Sulfadimidine	278	Temephos	465
Sulfachlorpyridazine	280	Butafenacil	474
Sulfaethoxypyridazine	284	Tiamulin	493
Trimetoprim	290	Indoxacarb	527
Thiamethoxam	291	Novobiocin	612
Naproanilide	291	Monensin	670
Simeconazole	293	Spinosyn A	731
Sulfaquinoxaline	300	Tilmicosin	868
Flutriafol	301	Emamectin B1a	885
Fenoxycarb	301	Tylosin	917

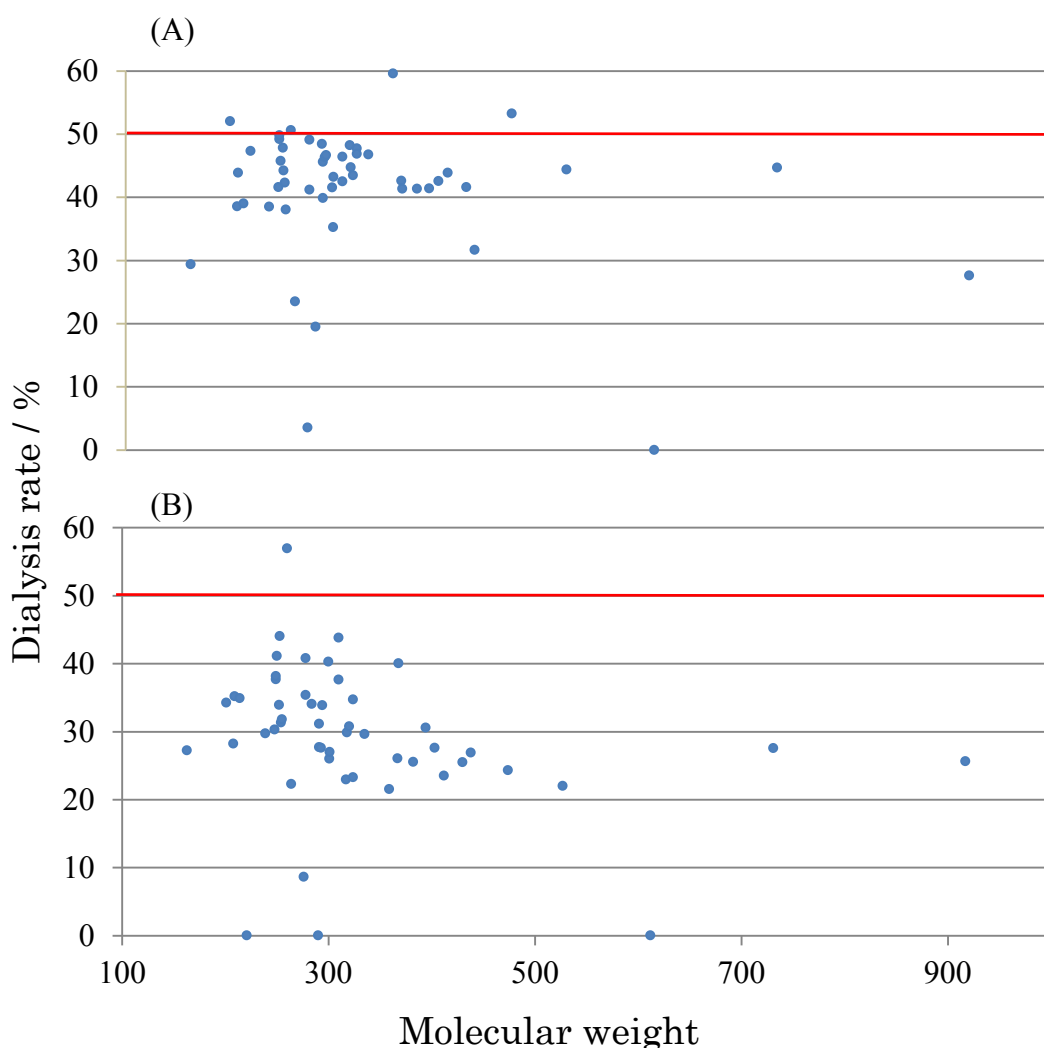


Figure 3.8 Dialysis rates of pesticide and animal drug by nylon membrane with acetonitrile (A), and water : acetonitrile (1:1) (B).

透析による物質の分離は透析膜の孔径、膜厚に依存する。先の実験結果では、ナイロン膜において分子量 700 付近より分子ふるい効果が確認されたが、孔径を縮小しても分子量範囲に変化は見られなかった。そこで、膜厚を厚くすることにより透析除去される分子量が小さくなるかを検討するため、ナイロン膜を 2 枚及び 3 枚重ねて透析を実施した。実験方法はアセトニトリルを用いて 0.1 mg/L に調製した農薬等混合標準溶液を孔径 0.2 μm のナイロン膜で透析し、透析開始後 2 分間に得られる透析溶液を LC-MS/MS にて測定した。その結果、各農薬の

透析率は分子量に依存することなく膜厚の大きさに比例して低下した[Figure 3.9]。膜厚を大きくしても除去される分子量範囲に変化は確認されず、透析時間が長くなったため、膜厚を大きくする利点はないと判断した。

これらの実験結果より、検討した膜の中では孔径 0.2 μm のナイロン膜が最適な透析膜であると考えられ、以降の実験には透析膜にナイロン膜を使用した。

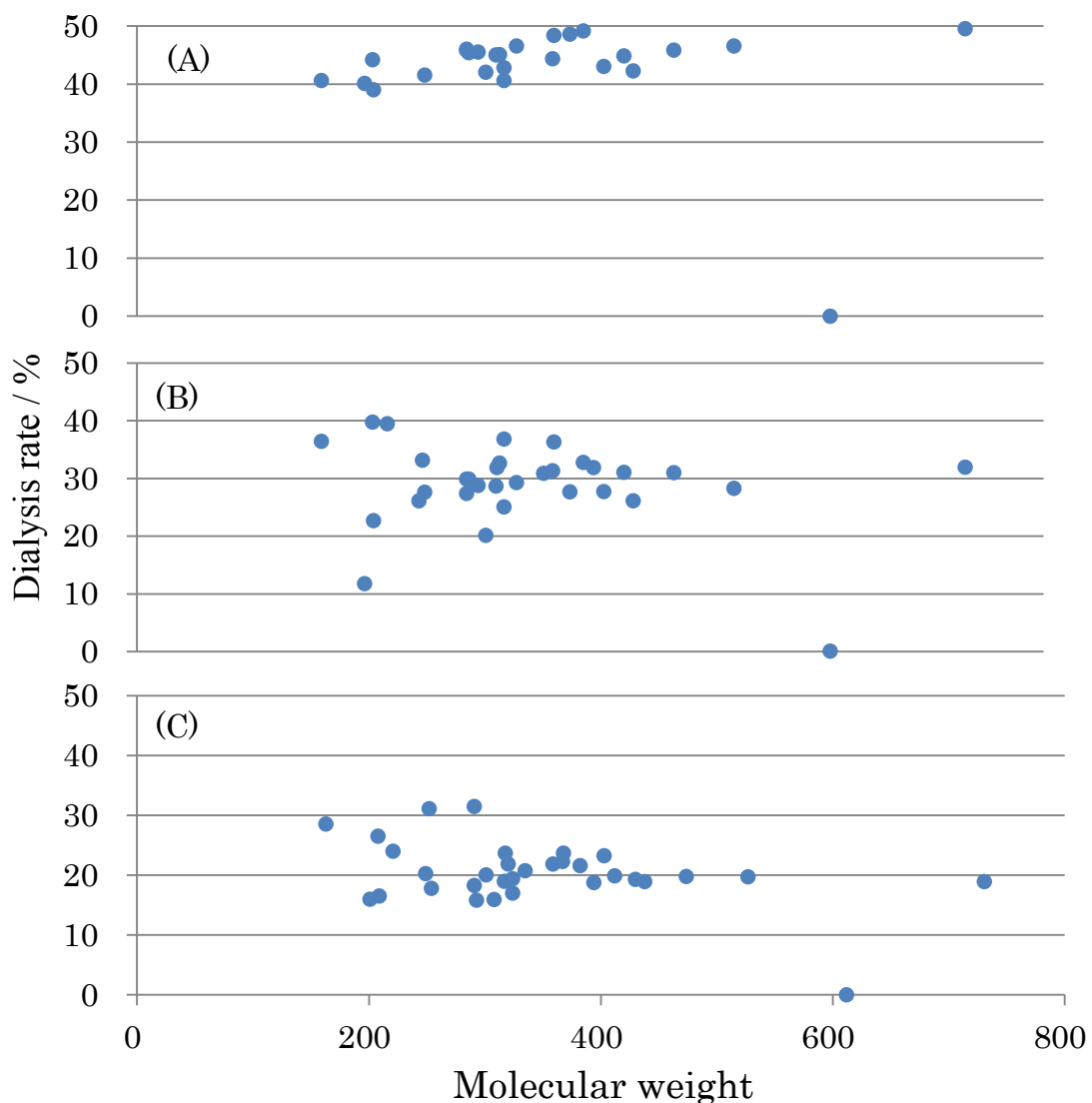


Figure 3.9 Dialysis rates of pesticide and animal drug by nylon membrane with acetonitrile. The number of membranes in dialysis cell I is one (A), two (B), and three (C).

3.2.2 微分処理を用いた分光光度法による安息香酸、ソルビン酸の定量

安息香酸、ソルビン酸の最大吸収波長はそれぞれ 230 nm、260 nm であり、分光光度計により測定が可能である。しかしながら、分光光度計による安息香酸、ソルビン酸の測定は試験溶液中の食品マトリクスが妨害成分となり、測定結果に大きな影響を与える。食品マトリクスによる影響を低減するため、マイクロダイアリシス法と微分処理を用いた分光光度法 [20] を組み合わせた分析法の評価を行った。

Figure 3.10 に Savitzky-Golay 法 [18] を用いて、安息香酸、ソルビン酸の吸収スペクトルを 0 次～4 次まで微分処理した結果を示す。全ての吸収波長の頂点は、1 次数高い微分処理をした波長の X 軸交点と一致しており、微分処理が適切に行われていることが確認できる。保存料の定量には微分スペクトルの振幅を用いた。定量に用いた振幅は、安息香酸は 4 次微分で得られた 242 nm から 252 nm の間の振幅、ソルビン酸も 4 次微分で得られた 260 nm から 275 nm の間の振幅である。本法により作成した検量線は、安息香酸で 0～10 mg/L、ソルビン酸で 0～4 mg/L の範囲内でそれぞれ直線性を示した。試験溶液濃度がこれらの値を超過した場合は吸光度が 1 を超えるため、定量精度が低下した。よって、透析で得られた試験溶液中の濃度がこの範囲内となるようアセトニトリルで適宜、希釈して測定した。

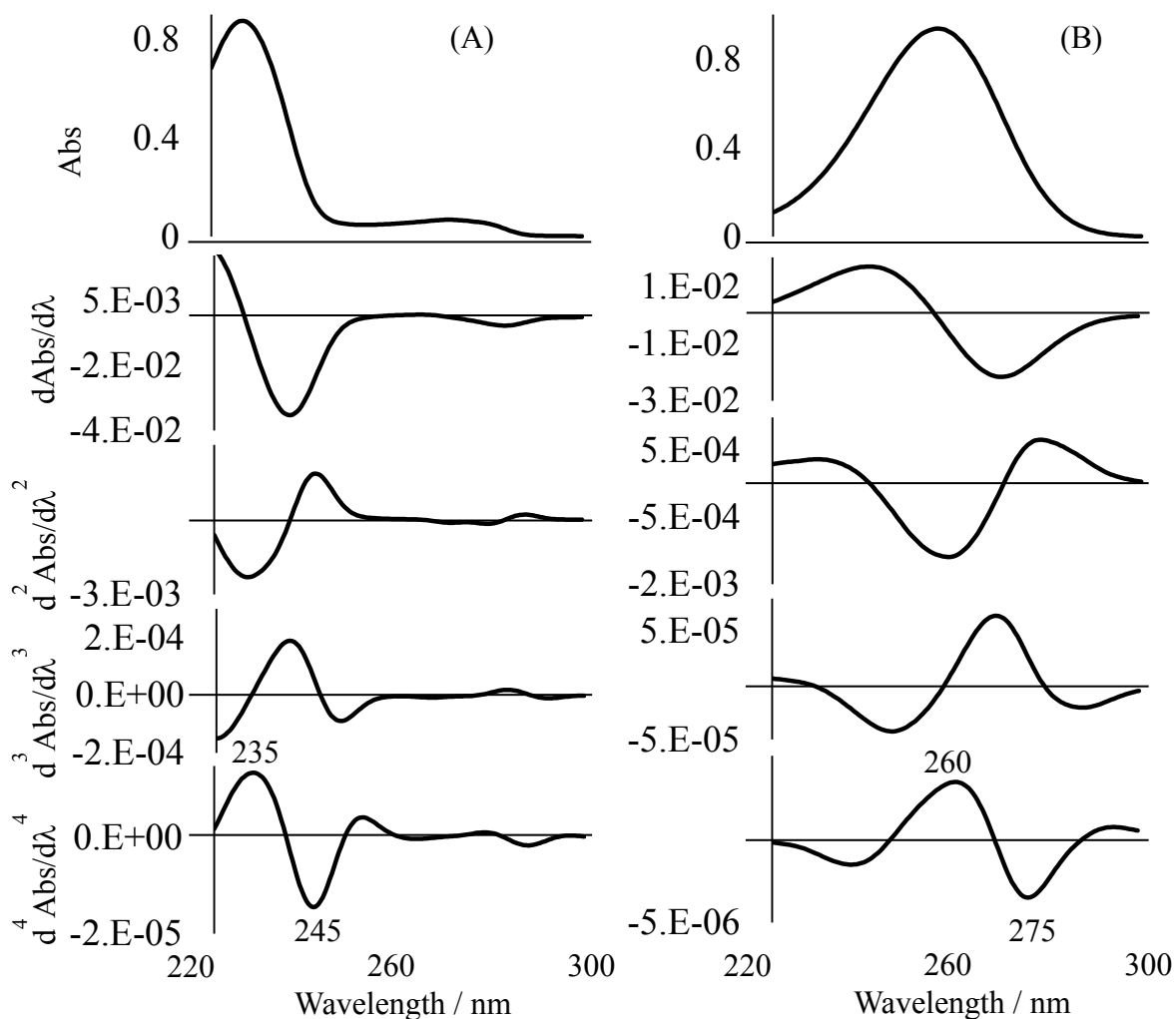


Figure 3.10 Derivative spectra of benzoic acid (A) and sorbic acid (B) obtained by the multilinear least-squares fitting method.

Figure 3.11 に、しじみ佃煮の透析溶液、及び標準溶液の各スペクトルにおける微分処理結果を示す。しじみ佃煮の透析溶液では、マトリクスの影響により吸収波長のベースラインが標準溶液と異なっているが [Figure 3.11 A]、4 次微分後のスペクトルでは 260 nm 以上の振幅でほぼ一致する結果となった [Figure 3.11 B]。この結果より、吸収波長の高次微分処理により、マトリクスの影響が効果的に除去されることが明らかとなった。

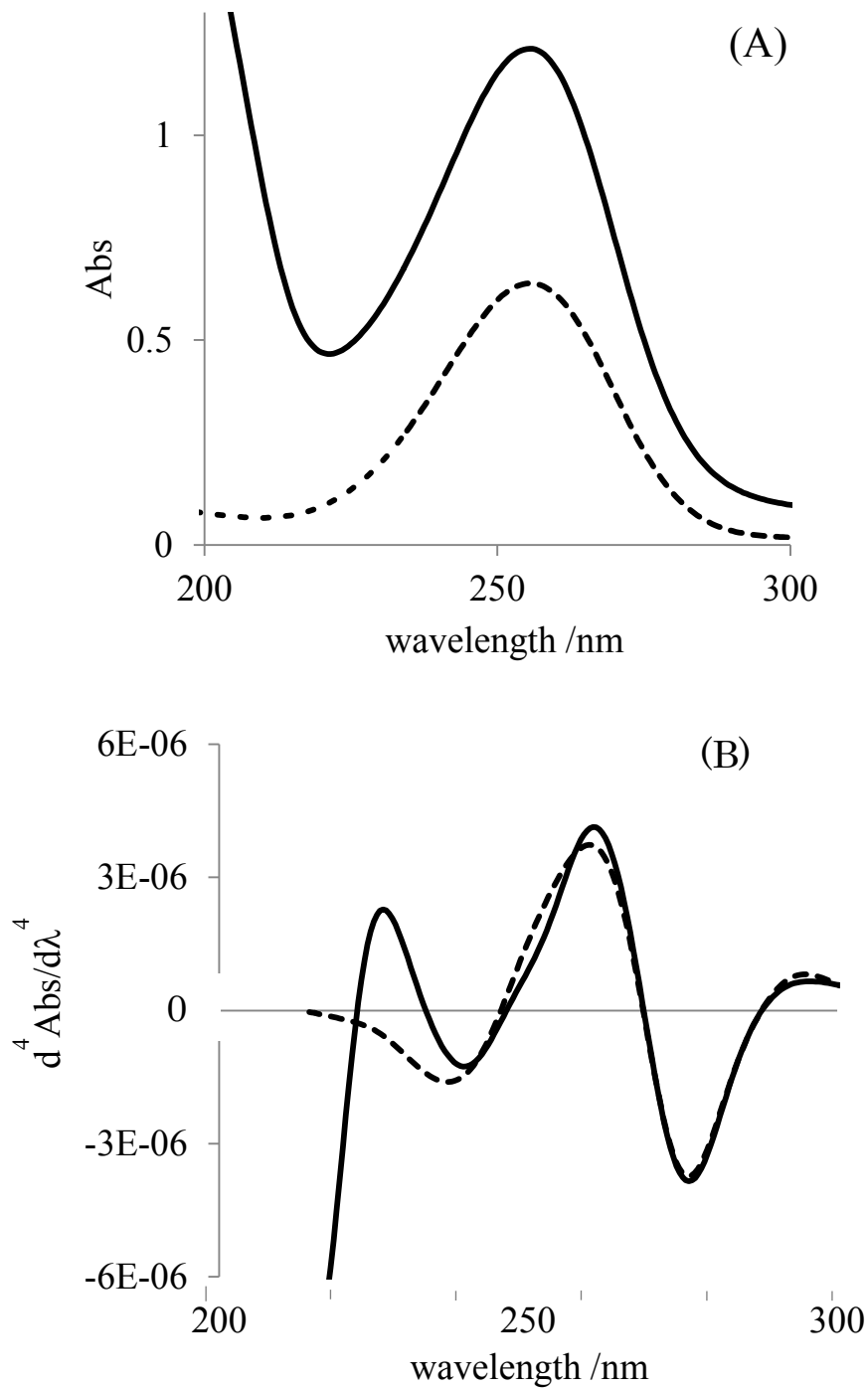


Figure 3.11 UV absorbance (A) and fourth-derivative (B) spectra of the dialysate of preservable food boiled down in soy sauce sample (solid line) and sorbic acid (dotted line).

3.2.3 分光光度法の妥当性評価

マイクロダイアリシス法と微分処理を用いる分光光度法を組み合わせた分析法から得られる定量値が妥当な結果であるかを検証するため、本分析法を様々な加工食品に適用し、HPLC法で得られる結果と比較した。試料には16種類の加工食品（畜産加工品、佃煮、清涼飲料水、漬物）を用いた。Figure 3.12に分光光度法とHPLC法で得られた結果の相関図を示す。その結果、安息香酸、ソルビン酸、いずれの保存料においても相関係数0.97以上の良好な相関性が得られた。直線の傾きは安息香酸、ソルビン酸でそれぞれ0.990と1.023であった。

次に、本試験法を用いた添加回収試験を実施した。試料あたり500 mg/kgの濃度で評価した結果、回収率は安息香酸で90～100%、ソルビン酸で78～96%の範囲内であった。回収率の範囲が広がった要因は、マイクロダイアリシス装置に用いた2台のインフュージョンポンプの送液時の圧力差によると考えられるため、精度の改善には高精度のインフュージョンポンプが必要である。

これらの結果より、マイクロダイアリシス装置と微分処理による分光光度法を組み合わせた分析法は、加工食品中の安息香酸、ソルビン酸の簡易かつ迅速な分析法として適用可能であることが明らかとなった。

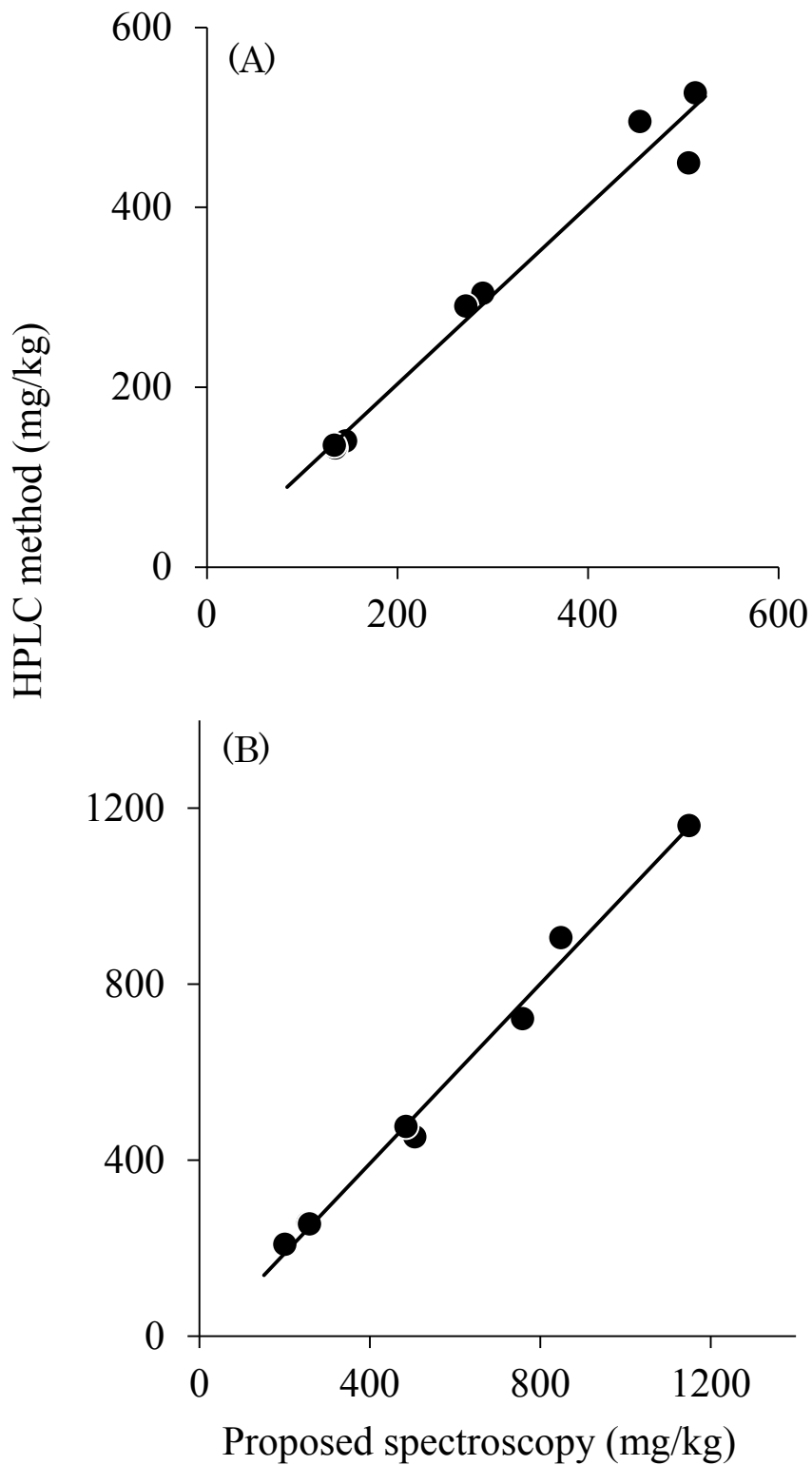


Figure 3.12 Correlation between the HPLC method and the derivative spectroscopy combined with micro-dialysis system. (A) benzoic acid, (B) sorbic acid.

3.4 結言

本章では、食品中の安息香酸、ソルビン酸の迅速かつ簡易な分析法の開発を目的として研究を行った。分析法開発の課題は迅速かつ簡易な精製法と測定法の確立であり、精製法にはマイクロダイアリシス、測定法には高次微分処理を用いる分光光度法を用いた。

透析膜にナイロン膜を用いるマイクロダイアリシス法を検討したところ、透析による分子ふるいの境界は分子量 1000~2000 の範囲内に存在すると考えられた。また、色素のような平面構造を有する物質は分子量依存的に吸着・除去され、分子量 700 を超える色素は完全に除去可能であった。透析溶液にアセトニトリルを用いた場合、安息香酸、ソルビン酸の透析は 2 分以内に完了した。これらの結果より、透析膜にナイロン膜を用いたマイクロダイアリシス法により、食品抽出液に含まれる安息香酸及びソルビン酸と、色素等の高分子マトリクスを迅速に分離可能であることが明らかとなった。次に、透析により得られた試験溶液へ高次微分処理を用いる分光光度法の適用を試みた。分光光度計では試験溶液の吸光度を測定するため、試験溶液中に含まれる食品マトリクスが分析対象物質の吸光度に干渉することにより定量精度が低下する。本実験結果においても透析溶液から得られた吸収スペクトルを定量に用いた結果では、安息香酸、ソルビン酸の最大吸収波長付近に吸収を持つ食品マトリクスの影響により定量は困難であった。しかし、吸収スペクトルを高次微分処理して得られる波形の振幅を定量に用いたところ、微分処理に伴い食品マトリクスの影響が低減された。加工食品及び清涼飲料水を試料として本分析法を適用した結果、安息香酸、ソルビン酸とも 4 次微分で良好な定量結果を得ることができた。また、これらの結果を HPLC 法で得られた結果と比較したところ、両者の間に良好な相関性が確認された。添加回収試験の結果では、試料によって回収率に 20%以

上の差が認められた。回収率の差はマイクロダイアリス装置に用いたシリンジポンプの送液精度に起因したものであると考えられ、高精度の分析には装置改良が必要である。

本研究により、マイクロダイアリス法による精製、及び高次微分処理を用いる分光光度法を組み合わせた保存料の迅速分析法を開発した。開発した迅速分析法は HPLC 法と同等の定量結果が得られるため、精度・確度は従来法と同等であると考えられた。また、マイクロダイアリス法は透析時間、試薬類を大幅に削減することが可能であり、分光光度計は装置価格が安価、かつ短時間で測定が可能であるため、時間、価格は従来法より優れていると考えられる。

引用文献

1. R. Walker. *Food Additives & Contaminants*, 7, (1990), 671-676.
2. M.G. Soni, G.A. Burdock, S.L. Taylor, N.A. Greenberg. *Food and Chemical Toxicology*, 39, (2001), 513–532.
3. C.M.Lino, A.Pena. *Food Chemistry*, 121, (2010), 503–508.
4. V. A. Lozano, J.M. Camiña, M.S. Boeris, E.J. Marchevsky. *Talanta*, 73, (2007), 282–286.
5. I. Techakriengkrai, R. Surakarnkul. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20, (2007), 220–225.
6. C. Guarino, F. Fuselli, A.L. Mantia, L. Longo. *Food Chemistry*, 127, (2011), 1294–1299.
7. H. M. Pylypiw, M.T. Grether. *Journal of Chromatography A*, 883, (2000), 299–304.
8. C.Y. Mak, Y.L. Wong, C.S. Mok, S.M. Choi. *Analytical Methods*, 4, (2012), 3674-3678.
9. S. Rossi, A.P. Dalpero, S. Ghini, R. Colombo, A.G. Sabatini, S. Girotti. *Journal of Chromatography A*, 905, (2001), 223-232.
10. A.G. Sánchez, N.R. Martos, E. Ballesteros. *Analytica Chimica Acta*, 558, (2006), 53–61.
11. G. Pang, Y. Cao, J. Zhang, C. Fan, Y. Liu, X. Li, G. Jia, Z. Li, Y. Shi, Y. Wu, T. Guo. *Journal of Chromatography A*, 1125, (2006), 1–30.
12. S. Tahara, T. Fujiwara, A. Yasui, C. Hayafuji, C. Kosayashi, Y. Uematsu. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, 55, (2014), 13-18.
13. O. Kritsunankul, J. Jakmunee. *Talanta*, 84, (2011), 1342-1349.
14. F. Verillon, F. Qian, P. Rasquin. *Analytical Sciences*, 7, (1991), 1511-1517.

15. Y. Nakashima, S. Suzuki, M. Yamazaki, Y. Inoue, Y. Fukatsu, A. Yamamoto. *Analytical Sciences*, 27, (2011), 889-892.
16. Y. Fang, H. Chen, Z. Gao, X. Jing. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 82, (2002), 1-6.
17. E. Vérette, F. Qian, F. Mangani. *Journal of Chromatography A*, 705, (1995), 195-203.
18. A. Savitzky, M.J.E. Golay. *Analytical Chemistry*, 36, (1964), 1627-1636.
19. H. Song, Y. Vanderheyden, E. Adams, G. Desmet, D. Cabooter. *Journal of Chromatography A*, 1455, (2016), 102–112.
20. A. Yamamoto, A. Matsunaga, M. Ohto, E. Mizukami, K. Hayakawa, M. Miyazaki. *Analyst*, 120, (1995), 377-380.

第4章 総括

4.1 本研究の目的

我が国は食糧の大部分を海外からの輸入食品に依存している。輸入食品では我が国で未登録の農薬、食品添加物が使用されている可能性があるため、検疫所では輸入食品に対するモニタリング検査を実施しており、食品衛生法不適合の食品が国内に流通することを未然に防いでいる。国内においては、農産物の収量向上、生産者の労力削減を目的として農薬が使用されている。農薬は農産物の生育時期に使用される化学物質であり、食品中への残留は望まれていない。消費者は農産物の農薬使用履歴、農薬の残留量を確認できないため、農薬等を非意図的に摂取している。食品中の残留農薬はポジティブリスト制度により、原則、全ての農薬等に基準値が設定され、厳しく規制されている。食品添加物は食品の保存性向上、外観や風味の改善を目的として使用されている。消費者は食品表示により食品添加物の使用の有無を判断できるため、食品添加物は意図的に摂取される化学物質である。食品添加物は摂取されることが前提の化学物質であるため、安全性は十分に確認されているが、過剰摂取による健康被害を防止するため、食品への使用基準が定められている。残留農薬分析、食品添加物分析の目的は食品衛生法で定められた規格基準への適合性を判定することである。食品衛生法不適合の食品は、流通、販売等が禁止されているため、食品事業者は食品の回収や廃棄の対応に追われ、多大な労力と費用を費やすことになる。信頼性の高い分析結果に高い精度は必須の要素であるが、価値のある分析結果とは、精度・確度、時間、価格のバランスが良好な状態で得られた結果であり、どれか1つが欠けても本来の分析目的を果たすことができない。現代の食品流通においては出荷と消費のサイクルが短く、生鮮食品においては出

荷後、数日以内に消費されることが多い。分析結果を得るために多大な時間を要しているのは、食品が消費された後に結果が判明することになり、本来の目的を達成することができない。また、分析に要する費用が食品原価を大幅に上回るようでは食品価格の高騰につながる。このような状況から、精度・確度、時間、価格のバランスが整った分析法の確立は、食品分析現場における永遠の命題となっている。

本研究では、食品中の化学物質分析の課題である精度・確度、時間、価格を改善する分析技術の開発、評価を実施することにより、安全な食品の流通に貢献することを目的としている。残留農薬分析ではマトリクス効果による定量精度低下の改善を目的として、GC キャリアガス中にエチレングリコールを導入する方法によるマトリクス効果の低減を評価した。食品中の保存料分析では、前処理、及び測定に要する時間と価格の削減を課題として、マイクロダイアリスを用いた精製と分光光度計を組み合わせた迅速かつ簡易な分析法の確立を目指した。

4.2 GC-MS による食品中残留農薬分析におけるマトリクス効果低減に関する研究

第2章ではGCキャリアガス中に保護剤としてエチレングリコールを導入する方法により、マトリクス効果の低減を評価した。農産物を試料として評価した結果、検討した全ての農薬でマトリクス効果が低減した。GCでは試験溶液の注入を繰り返すことにより、GC内に蓄積した食品マトリクスが新たな活性部位となるためマトリクス効果が増大する。このような汚染状態のGC-MSによる測定においても、エチレングリコールの導入によりメンテナンス後のGC-MSと同程度までマトリクス効果が低減されることが確認され、確度の改善を達成することができた。保護剤としてPEG300を用いた保護剤添加法と、本法によるマトリクス効果の低減効果を比較した結果、両者で同等の結果が得られた。保護剤添加法では、GC内への保護剤の蓄積によるカラム劣化が課題となる。本法ではエチレングリコールを連続的にGC-MSへ導入するため、カラム液相と分析対象物質との相互作用、及びイオン化におけるフラグメンテーションに影響を与えることが懸念された。エチレングリコールの導入により、検討した全ての分析対象物質の保持時間がわずかに短くなったが、検量線の直線性は良好であり、定量精度に影響は無いと考えられた。また、各農薬のマスペクトルに顕著な変化は確認されず、保護剤導入によるカラム劣化も認められなかった。これらの結果より、GC-MSを用いた食品中の残留農薬分析において、キャリアガス中へエチレングリコールを導入する方法は、GC-MSの状態に関わらずマトリクス効果を低減可能であり、長期間にわたり定量精度を維持できることが明らかとなった。保護剤導入装置によるキャリアガス中への保護剤の導入は簡易かつ低コストで実施できることも利点である。本研究により、保護剤導入装置は残留農薬分析における新たなマトリクス効果低減法として有効な方法であることを明ら

かにした。

4.3 吸光光度計による迅速な食品中保存料分析に関する研究

第 3 章では食品中の安息香酸、ソルビン酸の迅速かつ簡易な分析法の開発を目的とした。分析法開発の課題は迅速かつ簡易な精製法と測定法の確立であり、解決策として精製法にマイクロダイアリシス、測定法に高次微分処理を用いる分光光度法を組み合わせた分析法を評価した。マイクロダイアリシス法は、従来の透析法と比較して時間、試薬類を大幅に削減することが可能である。分光光度計は GC、HPLC と比較して短時間での測定が可能であり、装置価格も安価である。透析膜にナイロン膜を用いるマイクロダイアリシス法を検討したところ、色素のような平面構造を有する物質は分子量依存的に吸着・除去され、分子量 700 を超える色素は完全に除去可能であった。透析溶液にアセトニトリルを用いた場合、安息香酸、ソルビン酸の透析は 2 分以内に完了することを確認した。これらの結果からマイクロダイアリシス法により、食品抽出液に含まれる安息香酸及びソルビン酸と、色素等の高分子マトリクスを迅速に分離可能であることが明らかとなった。次に、高次微分処理を用いる分光光度法の適用を試みた。吸収スペクトルを高次微分処理して得られる波形の振幅を定量に用いたところ、微分処理を繰り返すことにより食品マトリクスの影響が低減され、良好な結果を得ることができた。加工食品及び清涼飲料水を用いた検討において、4 次微分処理により得られた定量結果は HPLC 法の結果と高い相関性を示した。添加回収試験では試料間の回収率に 20%以上の差が認められ、インフュージョンポンプの送液精度改善が課題として残ったが、マイクロダイアリシス装置による精製、及び高次微分処理を用いる分光光度法を組み合わせることにより、従来法と同等の精度・確度を有した迅速かつ簡易な分析法を構築することができた。

4.4 結語

本研究では、食品中の化学物質分析における永続的な課題である精度・確度、時間、価格を改善する分析技術の開発、評価を実施することにより、安全な食品の流通に貢献することを目的として研究を行った。

食品中の化学物質分析において、分析精度を低下させる主要因は試料由来の食品マトリクスであるため、食品マトリクスに起因する分析課題を解決する分析法の確立を目指した。GC-MSによる残留農薬分析では、マトリクス効果により標準溶液と試験溶液で目的成分のピーク強度に差が生じるため、定量精度が著しく低下する。この問題を解決するためには、食品マトリクス、及びGC内に存在する活性部位を完全に除去しなければならないが、時間と価格を考慮すると非現実的である。本研究によりGCキャリアガス中に保護剤として導入したエチレングリコールが、GC内の活性部位に吸着してマトリクス効果を低減する新たな手法を確立した。食品添加物分析ではGC、HPLCのようなクロマトグラフィーを用いた分析が主流であるが、試験溶液中の食品マトリクスが測定上の妨害物質となり検出誤認や結果判別不能の要因となる。本研究により、安息香酸、ソルビン酸の分析において、ナイロン膜を用いたマイクロダイアリスにより食品マトリクス中から安息香酸、ソルビン酸を迅速に分離する精製法を確立した。分光光度計で得られる吸収スペクトルは高次微分処理により食品マトリクスの影響が抑えられ、従来法と同等の定量結果が得られることを明らかにした。マイクロダイアリス法と分光光度法を組み合わせることにより、食品中の保存料における迅速分析法を確立した。

本研究で得られた知見は、分析現場を取り巻く重要な課題である精度・確度、

時間、価格の改善に貢献するものである。しかしながら、食品と化学物質の組み合わせは無数に存在するため、本研究結果が必ずしも全ての食品分析に適用できるとは限らない。農薬及び食品添加物はいずれも安定した食糧確保に大きく貢献する化学物質である。現代の食糧事情においては、食品を介した化学物質の摂取が避けられないため、適切な使用方法を遵守しなければならない。化学物質の適切な使用を確認する手段として科学的根拠に基づいた食品中の化学物質分析は重要な役割を果たしている。分析現場が抱える課題は山積しているが、食品分析に携わる分析者として、今後も課題を解決する新規の技術開発に取り組み、安全、安心な食品流通の実現に貢献していきたいと考えている。

投稿論文

1. 本研究に関わる投稿論文

- 1) Evaluation of the matrix effect on GC-MS with carrier gas containing ethylene glycol as an analyte protectant

Tomoharu Fujiyoshi, Takahito Ikami, Takashi Sato, Koji Kikukawa, Masato Kobayashi, Hiroshi Ito, Atsushi Yamamoto

Journal of Chromatography A, 1434 (2016) 136–141

- 2) GC-MS による食品中の残留農薬一斉分析におけるキャリアガス中への保護剤導入法の評価

藤吉 智治, 伊神 貴仁, 佐藤 孝史, 菊川 浩史, 小林 政人,

伊藤 宏, 山本 敦

中部大学 生物機能開発研究所 紀要 2016 年投稿

- 3) Direct quantitation of the preservatives benzoic and sorbic acid in processed foods using derivative spectrophotometry combined with micro dialysis

Tomoharu Fujiyoshi, Takahito Ikami, Koji Kikukawa, Masato Kobayashi, Rina Takai, Daisuke Kozaki, Atsushi Yamamoto

Food Chemistry (2017 年 1 月 投稿中)

2. その他の投稿論文

- 1) ポジティブリスト制度 10 年目を迎えて

藤吉 智治

New Food Industry (2016) Vol.58 No.6 p19-23

謝辞

本研究を進めるにあたり、終始有益なご指導ご鞭撻をいただきました、中部大学応用生物学部食品栄養科学科 山本 敦 教授に深謝いたします。また、丁寧なご助言ご指導をいただきました、中部大学応用生物学部 鈴木 茂 教授並びに石田 康行 教授に感謝いたします。

本研究における保護剤導入法、マイクロダイアリシス法及び分光光度法による評価に多大なご協力をいただきました、中部大学大学院応用生物学研究科博士前期課程 伊神 貴仁 様に深謝いたします。

本研究における保護剤導入法の基盤技術であるモディファイア装置に関して多大なるご指導ご助言をいただきました株式会社豊田中央研究所 伊藤 宏様に感謝いたします。また、保護剤導入法を用いた残留農薬分析に関して多大なるご指導並びにご助言をいただきました一般財団法人食品分析開発センター SUNATEC 菊川 浩史 氏、並びに佐藤 孝史 氏に深謝いたします。

本研究を進めるにあたり、多大なご協力を頂きました中部大学応用生物学部食品栄養科学科山本研究室の卒業生、並びに在校生の皆様に感謝いたします。

本研究の実施にあたり多大なる支援をしていただきました一般財団法人食品分析開発センターSUNATEC 小林 政人 氏に深謝いたします。

最後に、終始にわたり多大なる理解と協力をいただき、精神的に大きく支えてくれた家族に深い感謝の意を表して謝辞といたします。