調査・資料

食品衛生法告示イナベンフィド試験法の評価

(平成 13 年 3 月 2 日受理)

佐々木久美子^{*1,†} 辰 濃 隆^{*2} 中村宗知^{*3} 穴 沢 昭^{*4}
 今 澤 剛^{*5} 宇都宮 領^{*6} 寺 澤 真 二^{*7} 長田はるみ^{*8}
 金子正堅^{*9} 豊田正武^{*1}

Method-performance Studies of Notified Analytical Method for Inabenfide

Kumiko SASAKI^{*1,†}, Takashi TATSUNO^{*2}, Munetomo NAKAMURA^{*3}, Akira ANAZAWA^{*4},
 Tsuyoshi IMAZAWA^{*5}, Osamu UTSUNOMIYA^{*6}, Shinji TERASAWA^{*7}, Harumi OSADA^{*8},
 Masakata KANEKO^{*9} and Masatake TOYODA^{*1}

(*¹National Institute of Health Sciences: 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan;

*²Japan Food Hygiene Association: 2-6-1, Jingumae, Shibuya-ku, Tokyo 150-0001, Japan;

*³Japan Food Research Laboratories: 6-11-10, Nagayama, Tama-shi, Tokyo 206-0025,

Japan; *⁴Tokyo Health Service Association: 1-2, Ichigaya-Sadohara, Shinjuku-ku,

Tokyo 162-8402, Japan; *⁵Tokyo Kenbikyoin Foundation Center of Food &

Environmental Sciences: 44-1, Nihonbashi Hakozaiki-cho, Chuo-ku, Tokyo

103-0015, Japan; *⁶Japan Inspection Association of Food and Food

Industry Environment: 2-15, Kitanakatori, Naka-ku, Yokohama-shi

231-0003, Japan; *⁷Japan Oilstuff Inspectors' Corporation: 1-10-4,

Mikagetsukamachi, Higashinada-ku, Kobe 658-0044, Japan;

*⁸Japan Frozen Foods Inspection Corporation: 2-12-9,

Sachiura, Kanazawa-ku, Yokohama 236-0003, Japan;

*⁹Japan Grain Inspection Association: 2-17-3, Arai

Ichikawa-shi, Chiba 272-0144, Japan;

† Corresponding author)

Method-performance studies were conducted for the notified revised analytical method of inabenfide in unpolished rice. Six laboratories analyzed unpolished rice spiked with 0.05 $\mu\text{g/g}$ of inabenfide in replicate. Mean recovery from rice was 85.0%. Repeatability relative standard deviation value was 4.2% and reproducibility relative standard deviation value was 8.1%. The detection limits were 0.002~0.01 $\mu\text{g/g}$.

(Received March 2, 2001)

Key words: イナベンフィド inabenfide; 告示試験法 notified analytical method; 試験法評価 method-performance study; 共同実験 interlaboratory study; 併行再現性 repeatability; 室間再現性 reproducibility

緒 言

植物成長調整剤イナベンフィドは平成 5 年に食品衛生法食品成分規格で玄米に対して 0.05 ppm の残留基準値と試験法が定められた¹⁾が、平成 13 年 2 月の告示²⁾で試験法が改正された。旧試験法は試験溶液調製に有害性の高い

有機溶媒であるベンゼン、クロロホルム及びジクロロメタンを使用する上、GC-ECD で定量するためにクロロアセチル化を要する煩雑な方法であった¹⁾。新試験法はこれらの溶媒を使用せず、HPLC でイナベンフィドを直接定量する方法である。

† 連絡先:

*¹ 国立医薬品食品衛生研究所: 〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

*² 日本食品衛生協会: 〒150-0001 東京都渋谷区神宮前 2-6-1

*³ 日本食品分析センター多摩研究所: 〒206-0025 東京都多摩市永山 6-11-10

*⁴ 東京都予防医学協会: 〒162-8402 東京都新宿区市谷砂土原町 1-2

*⁵ 東京顕微鏡院食と環境の科学センター: 〒103-0015 東京都中央区日本橋箱崎町 44-1

*⁶ 食品環境検査協会: 〒231-0003 横浜市中区北仲通 2-15

*⁷ 日本油料検定協会総合分析センター: 〒658-0044 神戸市東灘区御影塚町 1-10-4

*⁸ 日本冷凍食品検査協会: 〒236-0003 横浜市中区幸浦 2-12-9

*⁹ 日本穀物検定協会中央研究所: 〒272-0144 千葉県市川市新井 2-17-3

新試験法に従って、6 分析機関で玄米への添加回収実験を行い、回収率の平均値、併行再現性及び室間再現性を評価したので報告する。更に、LC/MS による測定例を示した。

実験方法

1. 分析法

分析法は告示試験法²⁾に従った。

1.1 試薬

イナベンフィド標準溶液：イナベンフィドをアセトンに溶解し、アセトンで希釈して $1\mu\text{g/mL}$ の添加回収実験用標準溶液を、アセトニトリルで希釈して検量線用標準溶液を調製した。

n-ヘキサン（ヘキサン）、アセトン、酢酸エチル及び無水硫酸ナトリウム：残留農薬試験用試薬を使用した。

アセトニトリル：高速液体クロマトグラフィー用試薬を使用した。

フロリジル PR：粒径 $150\sim 250\mu\text{m}$ のものを 130°C で 12 時間以上活性化して使用した。

1.2 試料

添加回収実験に使用した玄米は各分析機関がそれぞれ市販品などを入手した。

1.3 装置

高速液体クロマトグラフ：L6000 型ポンプ+L4200 型 UV 検出器（(株)日立製作所製）、ガリバーシリーズ（日本分光(株)製）、HP 1100（Hewlett Packard 社製）、LC-6A 型ポンプ+SPD-6AV 型検出器（(株)島津製作所製）又は LC-10AD 型ポンプ+SPD-6AV 型、SPD-10A 型検出器（(株)島津製作所製）を使用した。

液体クロマトグラフ/質量分析計：1100 MSD（Hewlett Packard 社製）

1.4 HPLC 測定条件

カラム：Inertsil ODS-3（ジーエルサイエンス(株)製）、Wakosil II 5C18HG（和光純薬工業(株)製）、Develosil ODS-HG-5（野村化学(株)製）、Pegasil ODS（(株)センシュー科学製）、又は Mightysil RP-18（関東化学(株)製）、いずれも内径 4.6 mm 、長さ 250 mm 、粒径 $5\mu\text{m}$

カラム温度： 40°C （2 機関は室温及び 35°C ）

検出波長： 270 nm

移動相：アセトニトリルと水の混合比を (35:65)~(50:50) に調製した。

流速： 1.0 mL/min

注入量： $10\sim 30\mu\text{L}$

1.5 LC/MS 測定条件

カラム：Inertsil ODS-3（ジーエルサイエンス(株)製）、内径 2.1 mm 、長さ 250 mm 、粒径 $5\mu\text{m}$

カラム温度： 40°C

検出波長： 270 nm

移動相：アセトニトリル-0.5% 酢酸 (50:50)

流速： 0.2 mL/min

注入量： $1\mu\text{L}$

イオンモード：ESI (negative)

フラグメンター電圧： 100 V

ドライガス：窒素、 10 L/min

V-キャップ電圧： 3500 V

SIM 測定イオン： m/z 337.2, 339.2

1.6 試験溶液の調製

粉碎した玄米 20.0 g に水 40 mL を加えて 2 時間放置後、アセトン 100 mL を加えて抽出し、吸引ろ過した。この残留物にアセトン-水 (7:3) 100 mL を加えて抽出し、吸引ろ過を行い、先のろ液と合わせ、 40°C 以下で約 70 mL に濃縮した。これを 2 mol/L 塩酸 150 mL で分液漏斗に移し、ヘキサン 100 mL 及び 50 mL で 2 回洗浄した。水層に 5 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を加えて pH 7 に調整し、酢酸エチル-ヘキサン (1:4) 100 mL 及び 50 mL で 2 回抽出した。抽出液を合わせ、無水硫酸ナトリウムで脱水した後、 40°C 以下で濃縮乾固し、残留物をアセトン-ヘキサン (3:17) 5 mL に溶解した。

フロリジル 5 g をヘキサンで湿式充填し、その上に無水硫酸ナトリウム約 5 g を積層したカラム（内径 15 mm ）に、上記の溶液を負荷し、アセトン-ヘキサン (3:17) 40 mL で洗浄した。更にアセトン-ヘキサン (1:4) 100 mL で溶出し、溶出液を 40°C 以下で減圧濃縮、乾固し、残留物をアセトニトリルに溶解し、正確に 2 mL としたものを試験溶液とした。

1.7 定量

試験溶液 $10\sim 30\mu\text{L}$ を高速液体クロマトグラフに注入し、ピーク高法（分析機関 A）又はピーク面積法により定量を行った。各機関が用いた検量線用標準溶液は、 $0.05\sim 5\mu\text{g/mL}$ の濃度範囲の 3~6 点であった。

2. 共同実験

共同実験は IUPAC のプロトコル³⁾を参考に、試験室数：6（プロトコルでは最低 8、高価な機器や特別な試験室を必要とするなどの事情がある場合は 5）、繰り返し数：2 とした。イナベンフィドの残留基準値は玄米以外の作物には設定されていないため、試験数は 1（プロトコルでは 5）とした。

すなわち、6 分析機関で玄米についてイナベンフィドの添加回収実験を行った。粉碎した玄米に標準溶液 ($1\mu\text{g/mL}$) 1 mL を添加し、1 時間後に抽出を開始した。無添加 1 試料及び添加 2 試料を分析し、回収率を求めた。なお、試験溶液調製時の転溶操作において厳密な pH 調整が必要か、pH 6.5~8.0 の条件でも転溶が可能であるかを検討するため、転溶時の pH を 6.5 及び 7.0 とした場合について試験し、回収率を比較した。又、1 分析機関では pH 8.0 についても試験した。

3. 実験結果の統計処理

得られた 12 個（6 分析機関 $\times$ 2 個）の回収率の値を AOAC の統計処理マニュアル⁴⁾に従って解析し、回収率の平均値、併行再現性及び室間再現性を求めた。解析に際

Fig. 1. High performance liquid chromatograms of sample solutions prepared from control unpolished rice (A) and spiked rice with inabenfide (0.05 µg/g) (B)

HPLC conditions: column, Develosil ODS-HG-5 (4.6 mm×250 mm); mobile phase, acetonitrile-water (40 : 60); flow rate, 1.0 mL/min; column temp., 35°C; detection, UV 270 nm; injection volume, 20 µL

して、「はずれ値」の棄却は行わなかった。再現性評価の基準として Horwitz の式⁵⁾を使用した。

結果及び考察

分析機関 A では無添加試料からイナベンフィド 0.0024 µg/g (pH 7.0 で転溶時), 0.005 µg/g (同 pH 6.5) に相当するピークが検出されたので, 添加試料の分析値からこれらを差し引いて回収率を求めた。他の 5 機関で分析した玄米からはイナベンフィドに相当するピークは検出されなかった。

各機関で求めたイナベンフィド回収率とそれらの平均値, 併行再現性の相対標準偏差 (RSD_r) 及び室間再現性の相対標準偏差 (RSD_R) を Table 1 に示した。

回収率は転溶時の pH が 7.0 では 77.5~98.0% (平均 85.0%), pH 6.5 では 74.6~102% (平均 85.9%), pH 8.0 では 83.4%であった。いずれの pH でも回収率は良好

Table 1. Recovery of Inabenfide Spiked to Unpolished Rice¹⁾

Laboratory	Recovery (%)				
	pH 7.0 ²⁾		pH 6.5		pH 8.0
A	80.4	81.8	81.2	80.0	83.4
B	98.0	96.0	102	98.0	—
C	84.0	87.4	85.5	83.4	—
D	79.8	80.2	76.7	74.6	—
E	77.5	83.3	96.3	85.6	—
F	81.0	91.0	81.0	86.4	—
Mean (%)	85.0		85.9		—
Repeatability (RSD _r , %)	4.2		4.4		—
Reproducibility (RSD _R , %)	8.1		10.4		—

¹⁾ Unpolished rice was spiked with 0.05 µg/g of inabenfide.

²⁾ Acetone extract was adjusted at pH 7.0, 6.5, or 8.0 before extraction with ethylacetate-hexane (1 : 4).

Fig. 2. LC/MS (SIM) chromatograms of sample solutions prepared from control unpolished rice (A) and spiked rice with inabenfide (0.05 µg/g) (B), monitored at m/z 337.2 (①) and 339.2 (②)

Fig. 3. Mass spectrum of inabenfide by LC/MS
Scan (m/z 100~400), fragmenter voltage: 100 V, ion mode: ESI (negative)

であり、転溶時の pH のわずかな差は回収率に影響を与えなかった。

pH 7.0 及び pH 6.5 のときの回収率の RSD_R はそれぞれ 8.1% と 10.4%, RSD_r は 4.2% と 4.4% であった。一般に $0.05 \mu\text{g/g}$ レベルの分析値の RSD_R は、Horwitz の式⁵⁾に従えば 25% であり、 RSD_r は RSD_R の $1/2 \sim 2/3$ といわれている。今回得られた RSD_R 及び RSD_r はいずれもこれらより小さく、併行再現性、室間再現性ともに良好と評価できる。

$0.05 \mu\text{g/g}$ のイナベンフィドを添加した玄米試験溶液のクロマトグラムを Fig. 1 に示した。いずれの機関においても玄米成分に由来する大きな妨害ピークは認められなかった。

標準溶液のクロマトグラムから S/N 比が 3 を示す値を求め、試料 20 g 中の濃度に換算した値を検出限界としたとき、各機関の検出限界値は $0.002 \sim 0.01 \mu\text{g/g}$ (平均 $0.006 \mu\text{g/g}$) であった。厚生労働省の通知⁶⁾ではイナベンフィドの検出限界値は 0.005 ppm であることから、各機関ともほぼこれを満足できるものと考えられる。

$0.05 \mu\text{g/g}$ のイナベンフィドを添加した玄米試験溶液の LC/MS (SIM) のクロマトグラムを Fig. 2 に、イナベンフィド標準品のマススペクトルを Fig. 3 に示した。

LC/MS (SIM) による標準溶液の検出限界は $0.05 \mu\text{g/mL}$ であり、 $0.05 \sim 0.5 \mu\text{g/mL}$ の濃度範囲で検量線に直線

性が認められたことから、玄米中の基準値レベルのイナベンフィドが定量可能であることが確認された。

謝 辞

本研究は厚生省生活衛生局（現・厚生労働省医薬局食品保健部）の汎用農薬分析調査研究費により、食品衛生指定検査機関協会・技術検討委員会（残留農薬作業部会）の協力で実施した。関係各位に深謝いたします。

文 献

- 1) 厚生省告示第 68 号 (1993) “食品、添加物などの規格基準の一部を改正する件” 平成 5 年 3 月 4 日。
- 2) 厚生労働省告示第 56 号 (2001) “食品、添加物などの規格基準の一部を改正する件” 平成 13 年 2 月 26 日。
- 3) Horwitz, W., Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies. *Pure Appl. Chem.*, **67**, 331-343 (1995).
- 4) Youden, W. J., Steiner, E. H., “Statistical manual of the Association of Official Analytical Chemists”, Arlington, 1975, p. 72-83. (ISBN 0-935584-15-3)
- 5) Pocklington, W. D., Harmonized protocols for the adoption of standardized analytical methods and for the presentation of their performance characteristics. *Pure Appl. Chem.*, **62**, 149-162 (1990).
- 6) 厚生労働省食基発第 4 号 (2001) “食品、添加物などの規格基準の一部改正について” 平成 13 年 2 月 26 日。