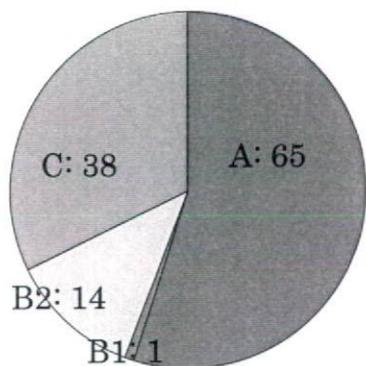
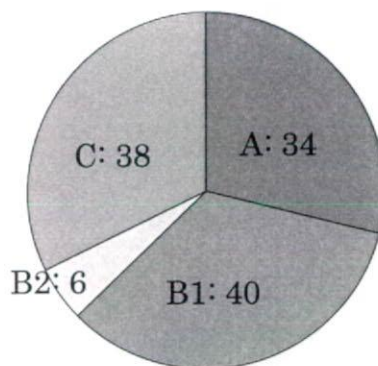


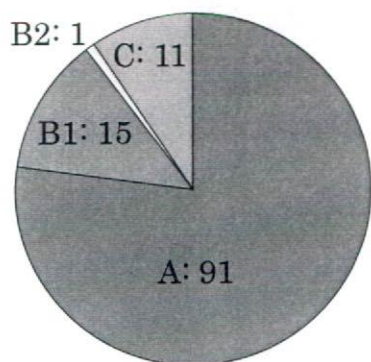
図 8-1. 平成 18 年度の添加濃度別再評価： 平均回収率の試料別の農薬成分



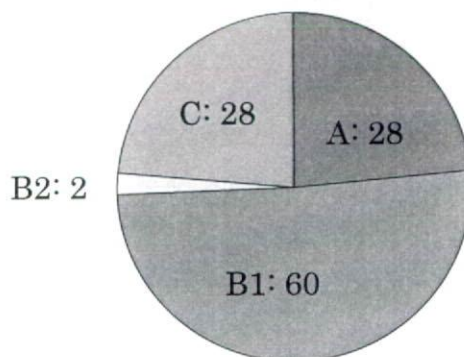
えび 0.1 mg/kg 添加



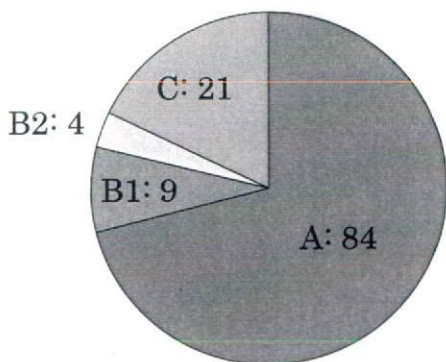
えび 0.01 mg/kg 添加



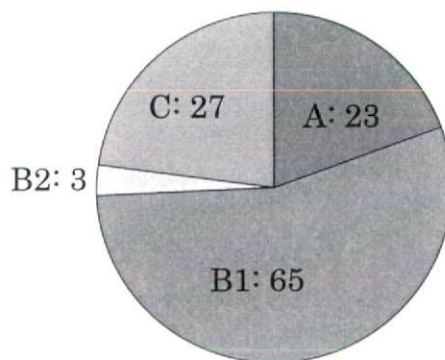
乳 0.1 mg/kg 添加



乳 0.01 mg/kg 添加



卵 0.1 mg/kg 添加



卵 0.01 mg/kg 添加

図 8-2. 平成 18 年度の添加濃度別再評価： 平均回収率の試料別の農薬成分数評価基準（分析対象 121 成分中の A 及び B-1 の該当成分のみを表示）

A: 70・120%, (a: 乳, 卵のみ可), B1: 121-200%, B2: 50-69%, C: <49%, >201%

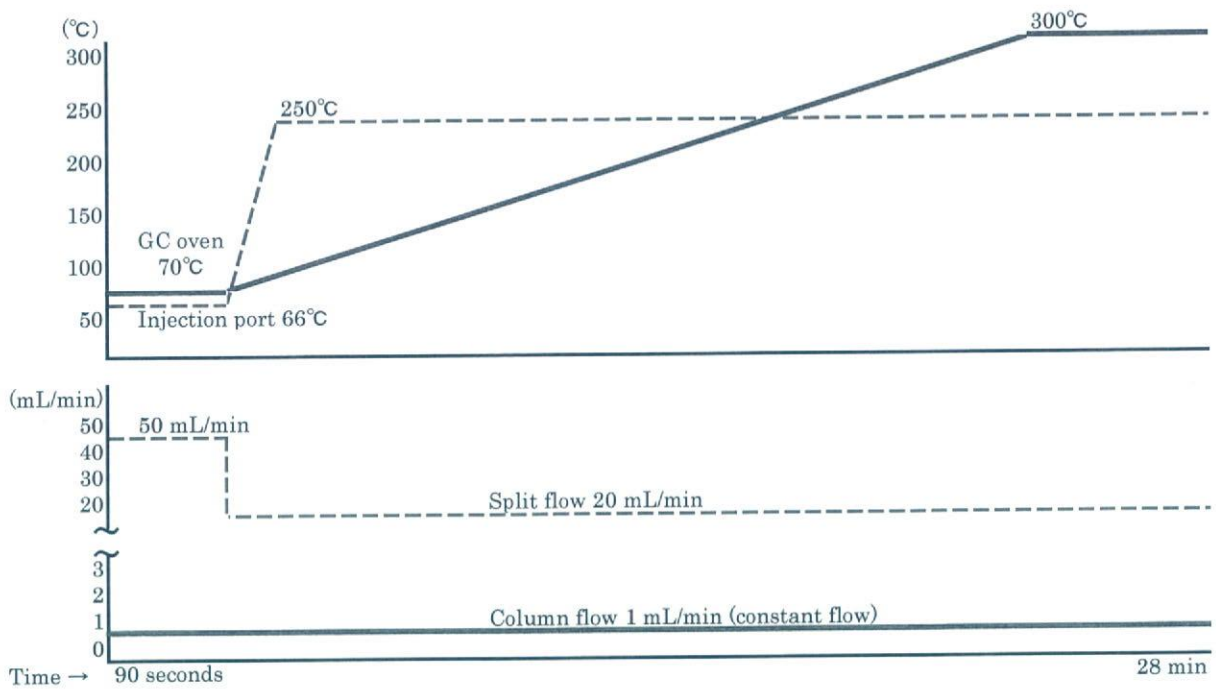
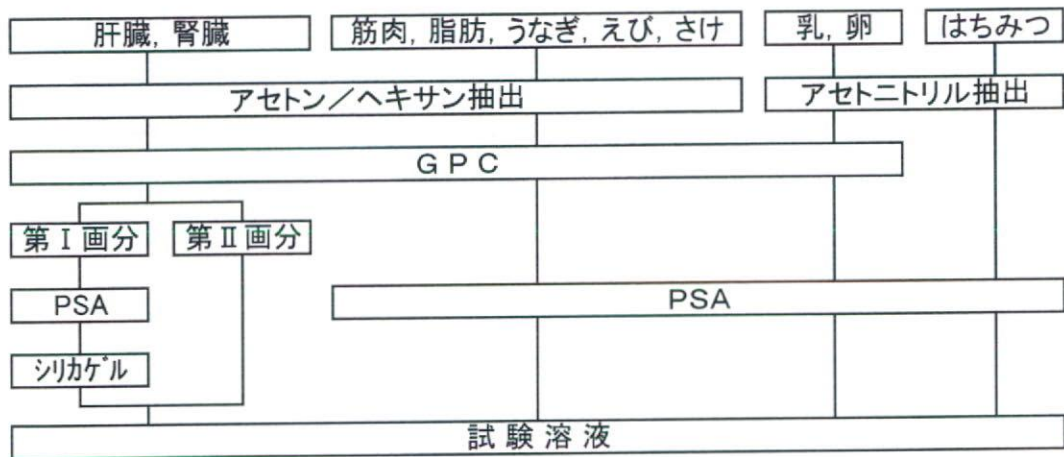
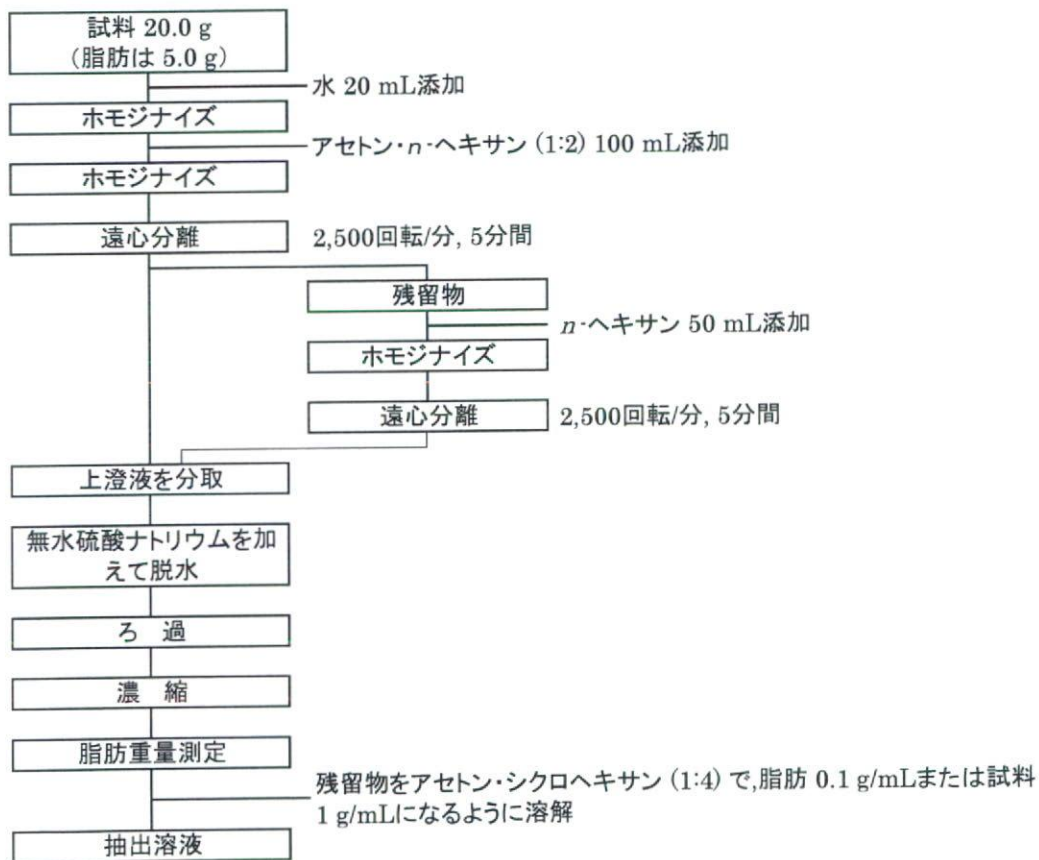


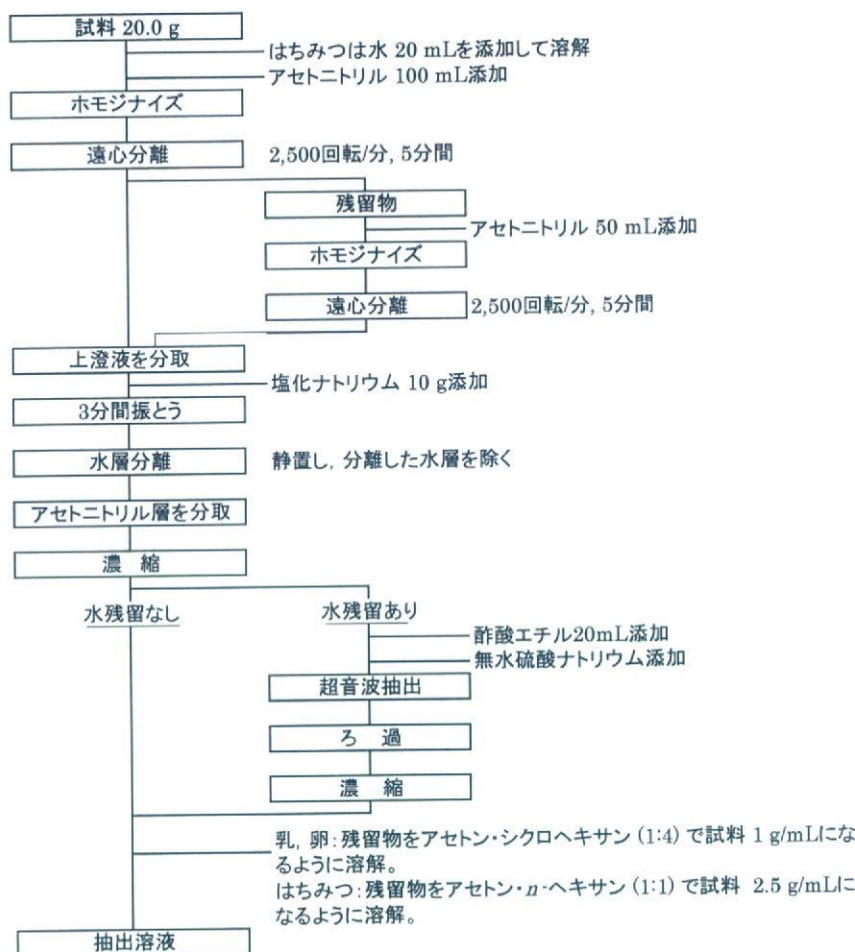
図 9. PTV-GC/MS の温度及びガス制御プログラム



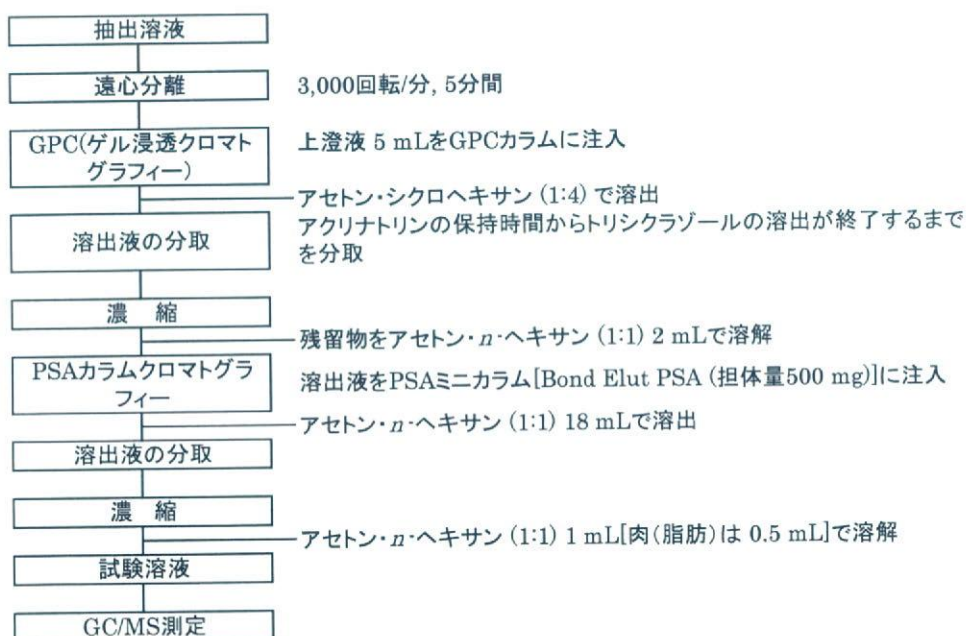
付図 1. GC/MS による通知一斉分析法（畜水産品）の全体概要



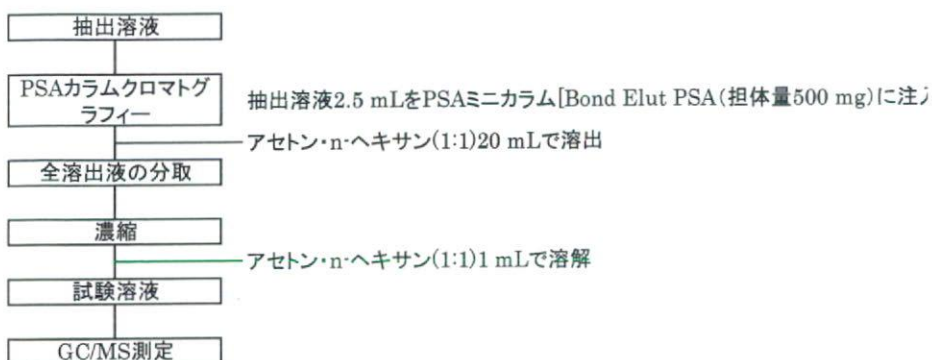
付図 2. 筋肉, 脂肪, 肝臓, 腎臓及び魚介類の抽出工程の概要



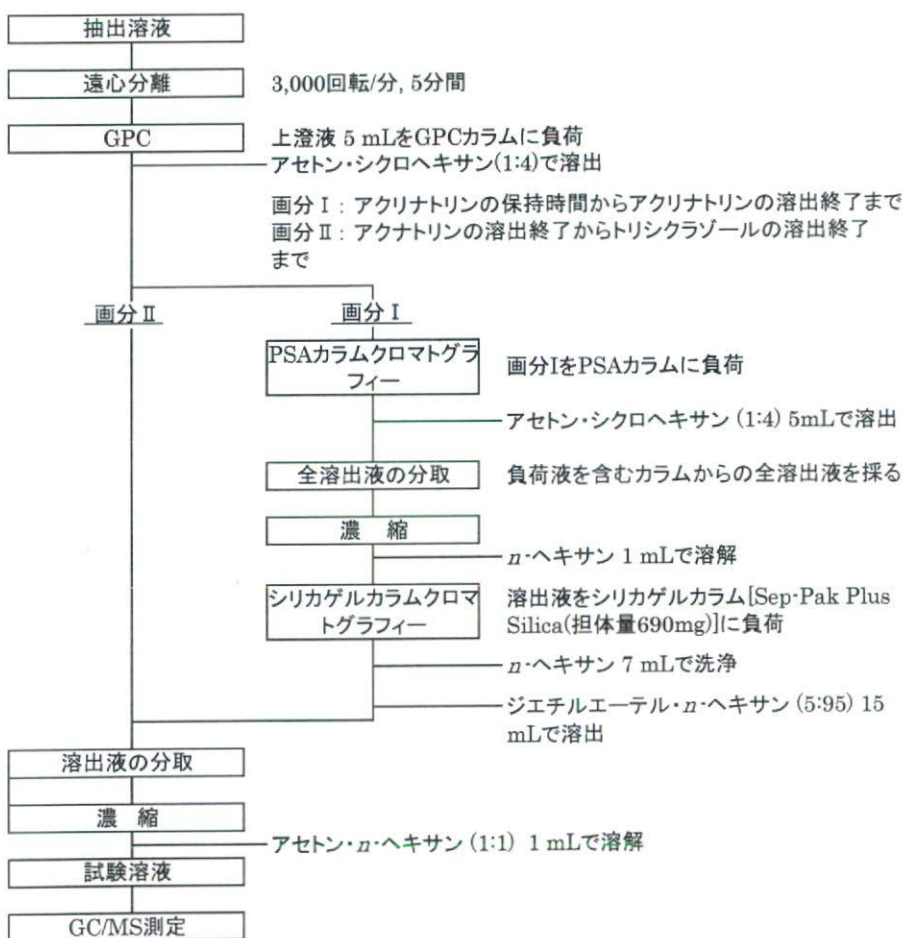
付図 3. 乳, 卵及びはちみつの抽出工程の概要



付図 4. 精製及び定量工程の概要 (肝臓, 腎臓及びはちみつを除く)



付図 5. はちみつの精製及び定量工程の概要



付図 6. 肝臓及び腎臓の精製及び定量工程の概要

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）

Ⅱ．平成 19 年度分担研究報告書

食品中に残留する農薬等におけるリスク管理手法の精密化に関する研究

2.2 畜水産食品中残留農薬分析法の開発：

LC/MS による分析

分担研究者 小田中芳次
(財団法人 残留農薬研究所)

食品中に残留する農薬等のリスク管理手法の精密化に関する研究:

2.2 畜水産食品中残留農薬分析法の開発:LC/MS

分担研究者 小田中芳次 財団法人 残留農薬研究所 化学部残留第 1 研究室長

研究要旨

畜水産食品に残留基準の設定されていない約 200 種農薬成分の分析法を開発する一環として、LC/MS による新規一斉試験法案(アセトニトリル・*n*-ヘキサン抽出法)の適用性について検証した。7 種試料(牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、えび、うなぎ、牛乳、鶏卵)を用いた添加回収試験(0.01 mg/kg ならびに 0.1 mg/kg の 2 濃度)を実施した結果、適用が可能と判断された分析対象成分数は 64 であった。この試験法における、脂肪分に含まれる農薬成分の抽出効率を、牛の脂肪を用いて確認したところ、問題は認められなかった。また、農薬数成分を投与したラットの肝臓を用い、実残留農薬成分の抽出効率を確認したところ、既存一斉試験法(LC/MS による農薬等の一斉試験法;アセトン・*n*-ヘキサン抽出)と新規一斉試験法案の検出値に有意な差は認められなかった。

研究協力者

藤田真弘 残留農薬研究所化学部残留第 1 研究室主任研究員

長田拓也 残留農薬研究所化学部残留第 1 研究室

浜野浩子 残留農薬研究所化学部残留第 1 研究室

市川千種 残留農薬研究所化学部残留第 1 研究室

検査対象とすることが困難な状況にあり、その試験法の開発が急務となっている。本研究の目的は、食の安全を確保するため、上記の一律基準が適用される農薬のうち LC 分析に適したもの約 120 種について、それらの試験法を開発することである。平成 18 年度(初年度)の検討では、所定の条件において LC/MS 測定が可能であると判断される成分を選別し(85 成分)、コントロール試料(畜水産物試料を含まない水試料)を用いて LC/MS による農薬等の一斉試験法¹⁾(以下、既存一斉試験法と呼ぶ)の抽出段階(アセトン・*n*-ヘキサン抽出)における回収率の確認を行った。その結果、85 成分中 43 成分が水層に留まり、相当数の農薬成分が有機溶媒層に抽出されないことが明らかとなった。そこで、本年度は、抽出時点での損失を最小限に抑える観点か

A. 研究目的

ポジティブリスト制度の下で約 270 種の農薬については畜水産食品にも残留基準が定められており、その分析法も概ね公示されているが、基準を定めず、一律基準が適用される約 200 種の農薬については試験法が提示されていない(平成 18 年 4 月 1 日時点)。このため、それらの農薬については

ら、既存一斉試験法と異なる試験法（抽出法）が必要であると考え、アセトニトリル及び *n*-ヘキサンによる抽出法が採用された、畜水産物に対するアゾキシストロピン等試験法²⁾の、多成分一斉試験法としての適用性を検討することとした。この試験法は、抽出時の溶媒としてアセトニトリルおよび *n*-ヘキサンを用いることにより、極性の高い成分に対する回収率が確保され、且つ畜水産食品マトリックス特有の油脂分に対しても配慮がなされた方法である。抽出以降の精製操作も、C₁₈およびPSA ミニカラムを用いた、比較的広範囲の成分に適用可能な方法となっている。なお、同試験法は、現在厚生労働省において、多成分一斉分析法としての適用性を検証する作業が進められている（この為、以下同試験法を新規一斉試験法案と呼ぶ）。

但し、この新規一斉試験法案の問題点として、畜水産食品に対する抽出法としての実績が無いことが指摘されており、実残留農薬成分に対する抽出効率が十分であることの検証が求められている。本研究においては、牛脂肪に添加封入した場合と表面添加の場合の回収率比較による検証、並びに農薬成分を投与したラットの肝臓を新規一斉試験法案と既存一斉試験法で分析して測定値を比較する検証により、抽出効率の保証を目指した。

B. 研究方法

1. 検討対象成分

前年度の検討において、以下の条件により選別された 85 成分を検討対象成分とした。抽出効率の確認（第 8.2 項）における対象成分は各項目においてその都度示す。

a. 畜水産物に暫定基準値が設定されていない農薬で一斉試験法¹⁾の適用性が未検証の 197 種の内、既存情報から LC 測定の適用事例があるものと、測定方法が確認出来なかったもの（121 種農薬成分、別表 1 参照）。

b. a のうち、同試験法の LC/MS 測定条件において、MS スペクトルが明瞭で、必要な感度を有し、ピーク形状、試薬ブランク上の妨害ピークの影響等、クロマトグラム上の問題がないもの（85 種農薬成分、表 1 参照。マススペクトルを図 1 に再録した）。

2. 検討概要

以下に示す 3 種の検討を実施した。

検討①「新規一斉試験法案における対象成分の抽出状況」

各農薬の新規一斉試験法案における抽出段階の回収率を、コントロール試料（畜水産物試料を含まない水試料）を用いて調査した。

検討②「抽出効率の確認」

牛脂肪およびラット肝臓を用いて、各試料マトリックス組織内に取り込まれた農薬（実残留物）について、その抽出効率を確認した。

検討③「新規一斉試験法案の適用性検証」

各農薬について、検量線、7 種の畜水産物（牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、うなぎ、えび、牛乳、鶏卵）での回収試験及びマトリックスの影響に関するデータを採取し、検討対象農薬の新規一斉試験法案の適用性を検証した。

3. 農薬標準品

検討対象とした農薬標準品の入手先、およびその純度または溶液濃度は別表 1 にまとめて示す。

4. 検討対象試料

4.1. 検討①の対象試料

水を用いたコントロール試料による検討(第 8.1.1 項)。

4.2. 検討②の対象試料

第 4.3 項に示した脂肪および以下に示すラット(飼育, 農薬投与の後, 肝臓を摘出)。

Sprague-Dawley 系 (SD(IGS)/Cr1) SPF/VAF 動物, 雌(入荷時 10 週齢, 馴化 8 日間, 日本チャールズリバー産)

4.3. 検討③の対象試料

市販の 7 種の畜水産物を, 別表 2 に従い前処理したものを検討対象試料とした。

5. 試薬

一般試薬および有機溶媒は特級品またはそれに準ずる等級のもの, または残留農薬試験用のものを使用した。水は, 日本ミリポア・リミテッド製の Milli-Q 純水製造装置で調製した高純度水を用いた。

イソキサフルトール分析用標準品, Dr. Ehrenstorfer 製。CMC (carboxymethyl cellulose): 和光純薬工業製。HPC (hydroxy propylcellulose): 和光純薬工業製。コーンオイル: 和光純薬工業製。オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム (以降, C18 ミニカラムと略): Bond Elut C18, 1 g/6 mL (Varian 製)。エチレンジアミン-N-プロピルシリル化シリカゲルミニカラム (以降, PSA ミニカラムと略): Bond Elut

PSA, 500 mg/3 mL (Varian 製)。

6. 装置

電子天秤: AG245 型, PG4002-S 型他 (メトラー・トレド製)。ミンサー: EH-8802 (トレーディングセンター製)。ミキサー: MX-V100 (松下電器産業製)。ホモジナイザー: ポリトロン (Kinematica 製)。遠心分離機: KUBOTA 7930 (株式会社久保田製作所製)。1100 LC-MSD システム (Agilent Technologies 製, 1100 シリーズ LC/MSD.SL, ChemStation ワークステーション)。

以下は検討②において使用。

ゲル浸透クロマトグラフ精製装置 (島津製作所製, SCL-10APvp コントローラー, SIL-10AP オートサンプラー, LC-6AD ポンプ, CTO-10Avp カラムオープン, SPD-10AVvp UV-VIS 検出器, FRC-10A フラクションコレクター, Class VP ワークステーション)。Quattro Premier LC/MS/MS システム (Waters 製, 2795 Solvent Management System, Quattro Premier タンデム四重極質量分析計, MassLynx ワークステーション)。

7. 標準溶液の調製

7.1. 検討①および③で用いる標準溶液

各標準品 50 mg 相当量を, それぞれ別々の 50 mL 容のメスフラスコに量り取り, アセトンまたはアセトニトリルに溶解し定容として 1000 mg/L の各標準原液を調製した (溶液として入手した標準品を除く, 別表 1 参照)。これらの標準原液の一定量を表 2 に示した測定グループ別に 50 mL 容のメスフラスコに量り取り, アセトニト

リルで希釈して各成分 10 mg/L 濃度の混合標準溶液を調製した。

7.2. 検討②で用いる標準溶液

牛脂肪による検討（第 8.2.1 項）においては第 7.1 項の標準溶液および同様に調製したジメトエート、エトフェンプロックス、フェンピロキシメート E 体、シペルメトリンおよびクロルフルアズロンの標準溶液を用いた。ラット肝臓による検討（第 8.2.2 項）については別途示す。

8. 分析操作

8.1. 検討①における分析操作

コントロール試料（畜水産物試料を含まない水試料）を用いて、新規一斉試験法案における対象農薬成分の抽出状況を確認した。詳細を以降に記す。

8.1.1. 添加回収用試料の調製

精製水 20.0 g をナス型フラスコに量りとり、第 7 項で調製した 10 mg/L 濃度の各混合標準溶液 1.0 mL を添加し、40℃以下で濃縮して溶媒を除去した。これを抽出段階における回収率確認のための試料とした。

8.1.2. 抽出（抽出段階における回収率確認）

試料（水約 20mL：第 8.1.1 項参照）に 0.01 mol/L 塩酸 10 mL を加え、ホモジナイズした後、アセトニトリル 50 mL、*n*-ヘキサン 25 mL 及びセライト 3 g を加え、さらにホモジナイズし、吸引ろ過した。アセトニトリル層を分取し、ろ別したセライト及び *n*-ヘキサン層をフラスコに戻し、0.01 mol/L 塩酸 5 mL 及びアセトニトリル 25 mL を加えてホモジナイズした後、吸引

ろ過した。アセトニトリル層を合わせて、更にアセトニトリルを加えて 100 mL に定容し、その 2 mL をナス型フラスコに分取し、40℃以下で濃縮して溶媒を除去した後、メタノール 2 mL に溶解した（アセトニトリル・水層検液）。また、*n*-ヘキサン層の 1 mL をナス型フラスコに分取し、40℃以下で濃縮して溶媒を除去した後、メタノール 4 mL に溶解した（*n*-ヘキサン層検液）。

8.1.3. LC/MS の操作条件

LC/MS の操作条件は、既存一斉試験法に従った。

8.1.3.1. 高速液体クロマトグラフ

カラム：XTerra MS C18 (Waters 製、内径 2.1 mm、長さ 150 m、粒径 3.5 μm。流速：0.2 mL/min。注入量：5 μL。カラム温度：40℃。溶離液、グラジエント条件：下記参照。

Solvent A: 5 m mol/L 酢酸アンモニウム含有水

Solvent B: 5 m mol/L 酢酸アンモニウム含有メタノール

time(min)	A(%)	B(%)
0	85	15
1	60	40
3.5	60	40
6	50	50
8	45	55
17.5	5	95
30	5	95
30	85	15

8.1.3.2. 質量分析計

イオン化方式：エレクトロスプレー

(ESI), 正イオンモード。乾燥ガス温度: 350°C。乾燥ガス流量: 12 L/min。ネブライザー圧力: 50 psi。イオン導入電圧: 3000 V。フラグメンタ電圧: 50~250V。定量測定モード: 選択イオン検出法 (SIM, 各農薬成分の定量イオンは表 2 を参照)

8.1.4. 回収率の算出

試料検液を第 8.1.3 項の操作条件の LC/MS に注入して、ピーク面積を測定した。また、第 7 項の混合標準溶液をメタノールで希釈して調製した 0.1 mg/L の標準溶液を同様に測定し、そのピーク面積との比較により各農薬成分の添加濃度に対する回収率を算出した。

8.2. 検討②における分析操作

8.2.1. 牛脂肪における抽出効率の確認

以下に示す方法により、牛脂肪組織内部に取り込まれた農薬成分の抽出効率を検証した。検討対象農薬成分として、前項の 85 成分の他、親油性との関係を検証する為に 5 成分 (ジメトエート, エトフェンプロックス, フェンピロキシメート E 体, シペルメトリンおよびクロルフルアズロン) を追加した。

8.2.1.1. 回収用試料の調製

均質化した牛脂肪 (第 4.3 項) の 5.00 g を三角フラスコに量りとり、40°C 以下の水浴下で脂肪を溶解させ、ここに 1 mg/L 濃度の添加用混合標準溶液 0.5 mL (第 7 および 8.3.1 項, 追加 5 成分についても同様に扱った) を添加した。フラスコを緩やかに振り混ぜる操作を上記水浴下で行い、農薬成分を試料全体に拡散させると同時に溶

媒を揮散させた。試料よりメタノールのおいを感じられなくなった時点で、フラスコを室温下に放置し、脂肪を固化させて、抽出効率測定用の試料とした。また、比較対照用として、第 8.3.1 項の方法による添加回収用試料を用意した。

8.2.1.2. 抽出, 精製および測定

第 8.2.1.1 項の試料について、新規一斉試験法による抽出, 精製および測定 (第 8.3 項, 追加 5 成分についても同様に扱った) を行い、各農薬成分の添加濃度に対する回収率を算出した。また、同様の試料について、既存一斉試験法を適用し、比較参照用とした。通知一斉試験法の概要を付図 2 に示す (詳細は省略)。

8.2.2. ラット肝臓による抽出効率の比較

以下に示す方法により、試料マトリックスからの、農薬成分の新規一斉試験法および既存一斉試験法における抽出効率を比較した。

8.2.2.1. 農薬を投与したラット肝臓試料の調製

第 4.2 項のラットを 2 頭ずつ 4 区に分け、以下の農薬を投与した。投与量, 投与区分等は各成分の毒性情報を基に設定し、懸濁溶液は各成分の懸濁状態が良好となるものを選択した。農薬成分の情報を表 3 に示す。A: メパニピリム, フェノキシカルブ, ペンシクロン, フルオメツロンおよびヘキサコナゾール標準品の各 80 mg を 5% CMC 水溶液に懸濁して 8 mL 定容とし、50 mg/kg 量を投与。

B: イプロバリカルブ, ニテンピラム, フルフェノクスロンおよびベンスリド標準品

の各 80 mg をコーンオイルに懸濁して 8 mL 定容とし、50 mg/kg 量を投与。

C：ジメトエート標準品の 48 mg を 3% HPC 水溶液に懸濁して 8 mL 定容とし、30 mg/kg 量を投与。

D：ピリミジフェン標準品の 32 mg を 5% CMC 水溶液に懸濁して 8 mL 定容とし、20 mg/kg 量を投与。

加えて、無処理区として 11 頭を用意した（コントロールおよび回収、予備試料として）。投与後、A および B 区は 2 時間後に、C および D 区は 1 時間後に屠殺して肝臓を摘出し、計量の後、分析まで氷冷下に置いた。動物の体重と投与液量および摘出した肝臓の重量等を表 4 に示した。摘出した肝臓試料の全て（A、B、C および D 区の各 2 頭分）を三角フラスコに合わせ、氷冷下ホモジナイザーで均一化し、200 mL 容の三角フラスコに 10 g を 2 点（新規一斉試験法案用）、200 mL 容のガラス製遠沈管に 10 g を 2 点（既存一斉試験法用）量りとした。新規一斉試験法案を適用する 2 点については、0.01 mol/L 塩酸 10 mL、アセトニトリル 50 mL、*n*-ヘキサン 25 mL 及びセライト 3 g を加え、既存一斉試験法を適用する 2 点については、水 20 mL とアセトン及び *n*-ヘキサン（1:2, v/v）混液 100 mL を加え、氷冷下でホモジナイズした。溶媒等の投入およびホモジナイズは、4 試料同時に実施した（4 台のホモジナイザーを用い 4 人で同時に処理）。以下、新規一斉試験法案及び既存一斉試験法に従い精製の操作を行った（但し、最終液量の最低量は 20 mL）。

8.2.2.2. 測定

試料マトリックスの影響を出来る限り避

けるために、より高感度で選択性の高いタンデム四重極質量分析計（LC/MS/MS）を用いて第 8.2.2.1 項の検液を測定し、残留濃度を算出した。

8.2.2.2.1. 高速液体クロマトグラフ

カラム：XTerra MS C18（Waters 製）、内径 2.1 mm、長さ 150 m、粒径 3.5 μm。流速：0.2 mL/min。注入量：5 μL。カラム温度：40°C。溶離液、グラジエント条件：下記参照。

Solvent A： 5 m mol/L 酢酸アンモニウム含有水

Solvent B： 5 m mol/L 酢酸アンモニウム含有メタノール

time(min)	A(%)	B(%)
0	85	15
0.6	60	40
2.1	60	40
3.6	50	50
4.8	45	55
10.5	5	95
18	5	95
18	85	15

8.2.2.2.2. 質量分析計

イオン化方式：エレクトロスプレー（ESI）、正イオンモード。脱溶媒ガス(N₂)温度：350°C。脱溶媒ガス流量：800 L/h。コーンガス(N₂)流量：50 L/h。ソースブロック温度：120°C。キャピラリ電圧：3.8 kV。コーン電圧：10~40V。コリジョン電圧：10~30 V(Ar ガス使用)。定量測定モード：Multiple Reaction Monitoring(MRM)、各農薬成分の定量イオンは表 3 を参照

8.2.2.3. 検量線の作成

メパニピリム、フェノキシカルブ、ペンシクロン、フルオメツロン、ヘキサコナゾール、イプロバリカルブ、ニテンピラム、フルフェノクスロン、ベンスリド、ジメトエートおよびピリミジフェンについて、第7.1項同様に混合標準溶液を調製した。これをメタノールで希釈し、各分析成分濃度が0.0005, 0.001, 0.01, 0.02 および0.04 mg/L の検量線用の混合標準溶液を調製した。その混合標準溶液の5 µLを第8.2.2.2項の操作条件のLC/MS/MSに注入し、各分析対象成分のマスキングクロマトグラムを解析してピーク面積値を求めた。各分析対象成分の重量を横軸に、同ピーク面積値を縦軸にとり、絶対検量線法により各検量線を作成した。

8.3. 検討③における分析操作

新規一斉試験法案の分析工程の概要を付図1に示し、分析操作の詳細を以降に記す。

8.3.1. 添加回収用試料の調製

第7項で調製した混合標準溶液をメタノールで希釈して、1 mg/L および 0.1 mg/L 濃度の添加用混合溶液を調製した。均質化した試料 10.0 g (脂肪の場合は 5.00 g) を三角フラスコに量りとり、各添加用混合標準溶液 1.0 mL (脂肪の場合は 0.5 mL) を添加して 30 分間放置し、添加濃度 0.01 mg/kg 及び 0.1 mg/kg の添加回収用試料とした。各試料、各濃度あたり 3 反復で試験を行った。

8.3.2. 抽出

試料に 0.01 mol/L 塩酸 10 mL を加え、

ホモジナイズした後、アセトニトリル 50 mL, *n*-ヘキサン 25 mL 及びセライト 3 g を加え、さらにホモジナイズし、吸引ろ過した。ろ液の分離が悪い場合は、1000×*g* (2500 rpm) で 5 分間遠心分離し、アセトニトリル層を分取した (卵試料にて実施)。セライト上の残留物及び *n*-ヘキサン層をフラスコに戻し、0.01 mol/L 塩酸 5 mL 及びアセトニトリル 25 mL を加えてホモジナイズした後、吸引ろ過し、アセトニトリル層を上記の容器に合わせた。これに、アセトニトリルを加えて 100 mL に定容した。

この抽出液 20 mL (試料 2 g 相当、脂肪は 1 g 相当) を分液ロートに採り、塩化ナトリウム 3 g を加え、振とう機を用いて 5 分間激しく振り混ぜた後、静置し、分離した水層を除去した。振とう後の分離が悪い場合は、1000×*g* (2500 rpm) で 5 分間遠心分離し、水層を取り除いた (えび試料にて実施)。アセトニトリル層を C18 ミニカラムに注入し、次いでアセトニトリル 2 mL を注入し、負荷液、洗液を含むカラムからの全溶出液を採り、40°C 以下で濃縮して溶媒を除去した。

この残留物にアセトン・*n*-ヘキサン (1:1) 2 mL を加えて溶解した。

8.3.3. 精製

先の溶液を PSA ミニカラムに注入した後、容器をアセトン・*n*-ヘキサン (1:1, v/v) 1 mL で洗い、洗液をカラムに注入する操作を 3 回繰り返した。更に、同混液 17 mL をカラムに注入し、負荷液、洗液を含むカラムからの全溶出液を採取した (PSA 第 1 画分)。次いでギ酸・メタノール (2:98) 10 mL をカラムに注入し、溶出液を採取し

た (PSA 第 2 画分)。これらの溶出液をそれぞれ 40℃以下で濃縮し、溶媒を除去した。残留物をメタノール 2 mL (脂肪の場合は 1 mL) に溶解し、これを試験溶液とした。

8.3.4. LC/MS の操作条件

第 8.1.3 項に従う。

8.3.5. 検量線の作成

各混合標準溶液をメタノールで希釈し、各分析成分濃度が 0.005, 0.01, 0.025, 0.05, 0.075, 0.1 および 0.15 mg/L の検量線用の混合標準溶液を調製した。その混合標準溶液の 5 μL を第 8.1.3 項の操作条件の LC/MS に注入し、各分析対象成分のマスクロマトグラムを解析してピーク面積値を求めた。各分析対象成分の重量を横軸に、同ピーク面積値を縦軸にとり、絶対検量線法により各検量線を作成した。

8.3.6. 回収率の算出

試料溶液を第 8.1.3 項の操作条件の LC/MS に注入して、ピーク面積を測定し、各農薬成分の添加濃度に対する回収率を算出した。

8.3.7. 定量測定時の注入順序

各試験溶液は、ブランク試料 (BL)、検量線用標準溶液 (STD)、添加回収試料 (R) 及びマトリックス添加標準溶液 (マトリックス STD) を次の順序で注入した。

注入順序： BL-1 → STD-0.025 → BL-2 → STD-0.05 → R0.1-1 → STD-0.075 → R0.1-2 → STD-0.1 → R0.1-3 → STD-0.15 → マトリックス STD-a →

STD-0.1-a → マトリックス STD-b → STD-0.1-b → R0.01-1 → STD-0.01 → R0.01-2 → STD-0.005 → R0.01-3 → STD-0.025

8.3.8. ブランク試料

ブランク試料の 2 回の測定のうち、BL-1 は LC/MS 装置を安定させるための起爆注入用とし、BL-2 をバックグラウンド解析用とした。

8.3.9. マトリックス標準溶液

マトリックス標準溶液の 2 回測定 (マトリックス STD-a, b) の平均値と検量線用標準溶液の 2 回測定 (STD-0.1-a, b) の平均値との比を求めた。なお、マトリックス標準溶液は、ブランク試験溶液 1 mL をナス型フラスコにとり、窒素気流下で溶媒留去した後、0.1 mg/L 濃度の検量線用標準溶液 1 mL に溶解して調製した。

C. 研究結果

1.1. 新規一斉試験法案における対象成分の抽出状況(検討①)

各農薬成分 1 mg/kg 相当を精製水に添加した、分析試料を含まないコントロール試料を用いて、抽出段階における回収率を確認した。(表 5)。その結果、85 成分中、アセトニトリル及び水層に 70%以上抽出されたものは 78 成分、50%以上抽出されたものは 81 成分であった。一方、*n*-ヘキサン層に 50%以上残留したものはプロモホスエチル 1 成分であった。*n*-ヘキサン層に 20%以上残留したものはアイオキシニルオクタノエート、アクリナトリン、アシベンゾラル-S-メチル、シクロエートおよびト

ラルコキシジムの5成分であった。

1.2. 抽出効率の確認(検討②)

1.2.1. 牛脂肪における抽出効率の確認

新規一斉試験法案(アセトニトリル・*n*-ヘキサン抽出法)を適用した際の、熔融脂肪中からの回収率と通常の添加回収率を表6に、双方を比較したプロットを図3に示す。アイオキシニルオクタノエート等、分析または測定自体に難がある(回収率が低い、感度が低い等)成分を除いて、双方の数値に有意な差は認められなかった。

同表には比較参照用として既存一斉試験法による回収結果も示した。調査した農薬成分の中で極性が比較的高いと考えられる物質(保持時間が18.6分以内)については、明らかに新規一斉分析法の方が高い値を示しており、極性の中程度の物質についても、両方法の結果は同等または新規法の方がやや高い例が多く見られており、新規一斉法の有用性が確認された。

1.2.2. ラット肝臓による抽出効率の比較

新規試験法案による分析値および既存一斉試験法による分析値の一覧を表7に示す。ピリミジフェンは両試験法において定量限界以下(<0.01 ppm, 0.008 ppm程度検出)となった。既存一斉試験法においてほとんど回収できないニテンピラム、回収率の低いジメトエートおよびイプロバリカルブ等は、それぞれ、それを反映した結果が得られている。

1.3. 新規一斉試験法案の適用性検証(検討③)

1.3.1. 分析工程(抽出から検液までの全工

程)における損失確認

各農薬成分1 mg/kg相当を精製水に添加した、分析試料を含まないコントロール試料を用いて、試薬ブランクの状況、分析工程での損失およびPSA ミニカラムにおける分画状況を確認した(表8)。

85成分のうち、回収率が70~120%(評価基準A)のものは73成分、121~200%(B-1)のものは3成分、50~69%(B-2)のものは4成分、50%未満(C-2)のものは5成分であった。

PSA ミニカラムにおける分画状況は、第1画分は62成分、第2画分は23成分となった。

これら85成分について、試薬ブランクのクロマトグラム上には、測定上障害となる妨害ピーク等は認められなかった。

1.3.2. LC/MS 測定条件

各農薬成分のグループ分け、保持時間、保持指標、モニターイオン、最小検出量及び測定限界のLC/MS測定情報は、表2にまとめた。85種の農薬成分は、PSA ミニカラムの画分とMS測定モード(ポジティブ/ネガティブ)の組み合わせにより、4グループに分けて測定した。更にPSA第1画分・ポジティブモード測定のグループは対象成分が多いため、2グループに分割した(但し、表中では区別していない)。添加回収試験はグループ毎に行ったが、PSA第1画分・ポジティブモード測定のグループ、PSA第2画分・ポジティブモード測定のグループは、それぞれ同一分析試料に同時添加した。同様に、PSA第1画分・ネガティブモード測定のグループ、PSA第2画分・ネガティブモード測定のグループにつ

いても、同時添加して分析操作を進めた。

1.3.3. 検量線および回帰式

7種の分析対象試料の回収率(0.1mg/kg添加)算出時に作成した検量線の回帰式における傾き、切片および相関係数(r^2)を表9にまとめた。また、各農薬成分の検量線の一例を図1に示す(図1には、前年度検討におけるマススペクトルを併記再録した)。

回帰式の相関係数(r^2)は、全7試料で0.995以上となったものが63成分、6試料で0.995以上のものが14成分、5試料で0.995以上のものが3成分(アシベンゾラル-S-メチル、ミルベメクチンA4、ピラゾスルフロンエチル)、4試料で0.995以上のものが1成分(4-アミノピリジン)、2試料で0.995以上のものが2成分(プロパモカルブ、フロラスラム)、1試料でのみ0.995以上のものが1成分(プロモホスエチル)であり、スルフェントラゾンについては全ての試料において不良(0.995未満)であった(表10)。

0.01mg/kg添加の回収率を算出する為に設定した最小検出量(0.025ng)は、予測値(表2, 18年度検討)にかかわらず、全85成分、各試料の測定時において検出可能であった。但し、これは実測上のS/N比から算定したものではなく、視認による判断に基づくものである。

1.3.4. 添加回収率の算出

7種の畜水産物(牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、うなぎ、えび、牛乳及び鶏卵)に各成分を0.1mg/kg及び0.01mg/kg相当添加した時の回収結果を表11-1~11-7

に示す。また、0.01mg/kg相当添加の各分析対象試料別のマスクロマトグラムを図2に示す。ただし、0.01mg/kgレベルでの検出が困難であったり、回収率に著しい問題があった農薬成分については、0.1mg/kg相当添加試料のマスクロマトグラムを示す。

1.3.4.1. 0.1mg/kg 添加

0.1mg/kg添加では、54(えび)~70成分(牛乳)の回収率が良好な範囲内(70~120%)であった(表12)。

回収率の評価基準を70~120%(A)とした場合、全7試料で回収率が良好であったのは41成分であり、6試料で12成分、5試料で4成分、4試料で6成分、3試料で7成分、2試料で1成分、1試料で2成分がそれぞれ良好であった。また、全7試料において回収率が不良(<70%, >120%)となったものは12成分あった(表13の上段)。

回収率の評価基準を70~200%(A+B-1)とした場合は、全7試料に適応可であったものが43成分であり、6試料では12成分、5試料では3成分、4試料では6成分、3試料では7成分、1試料では2成分がそれぞれ適用可能であった。また、全7試料で適応不可(<70%, >200%)であったものは12成分あった(表13の中段)。

回収率の評価基準をさらに拡大し、50~200%(A+B-1+B-2)とした場合は、全7試料に適応可であったものが59成分であり、6試料では5成分、5試料では6成分、4試料では4成分、3試料では3成分、2試料では4成分、1試料では2成分がそれぞれ適用可能であった。また、全7試料に適応不可(<50%, >200%)が2成分あった(表13の下段)。

1.3.4.2. 0.01 mg/kg 添加

0.01 mg/kg 添加で、49 (えび) ~67 成分 (牛の筋肉) の回収率が良好な範囲内 (70 ~120%) であった (表 14)。

回収率の評価基準を 70~120% (A) とした場合、全 7 試料で回収率が良好であったのは 33 成分であり、6 試料で 18 成分、5 試料で 9 成分、4 試料で 5 成分、3 試料で 4 成分、2 試料で 5 成分、1 試料で 4 成分がそれぞれ良好であった。また、全 7 試料において回収率が不良 (<70%, >120%) となったものは 7 成分あった (表 15 の上段)。

回収率の評価基準を 70~200% (A + B-1) とした場合は、全 7 試料に適応可であったものは 36 成分、6 試料では 16 成分、5 試料では 9 成分、4 試料では 5 成分、3 試料では 3 成分、2 試料では 5 成分、1 試料では 4 成分がそれぞれ適応可能であった。また、全 7 試料で適応不可 (<70%, >200%) であったものは 7 成分あった (表 15 の中段)。

回収率の評価基準をさらに拡大し、50~200% (A + B-1 + B-2) とした場合は、全 7 試料に適応可であったものは 48 成分、6 試料では 15 成分、5 試料では 2 成分、4 試料では 6 成分、3 試料では 6 成分、2 試料では 5 成分、1 試料では 1 成分がそれぞれ適応可能であった。また、全 7 試料で適応不可 (<50%, >200%) であったものは 2 成分あった (表 15 の下段)。

1.3.4.3. 変動係数

表 16 に回収率の標準偏差パーセント (RSD) の算出結果を試料別にまとめて示

す。0.1 mg/kg 添加の回収率 (n=3) の変動 (RSD) は、79 (えび) ~84 成分 (牛乳) が 20%以下の許容範囲内であった。0.01 mg/kg 添加の回収率の変動は、73 (えび) ~82 成分 (牛の肝臓) が 30%以下の許容範囲内であった。

回収率の変動係数については、試料間における明瞭な差は認められなかった。

1.3.5. マトリックス効果

通常の標準溶液 (A) とマトリックス調製標準溶液 (B) のピーク面積の比較結果を表 17 に示す。また、その集計結果を表 18 および 19 にまとめた。分析対象試料毎の標準溶液に対するマトリックス調製標準溶液の比率 (A/B) をみると、58 (えび) ~71 成分 (牛の筋肉) ではマトリックス効果がほとんど認められなかった (基準 0.90 ~1.10, 表 18)。これに対して、1 (牛の筋肉, うなぎ, 鶏卵) ~6 成分 (えび) については、その比率が 1.5 以上もしくは 0.5 未満 (不検出もしくは妨害成分の影響で評価不能を含む) であり著しい影響が認められた。

マトリックス効果の評価基準を比率 (A/B) で 0.90~1.10 とした場合、全 7 試料で影響が認められないものが 43 成分であり、以下、6 試料では 13 成分、5 試料では 8 成分、4 試料では 6 成分、3 試料では 4 成分、2 試料では 2 成分であった。また、全 7 試料で影響を受ける場合 (<0.90, >1.10) が 9 成分であった (表 19 の上段)。

評価基準を 0.80~1.20 とした場合は、全 7 試料で範囲内となるものが 58 成分であり、更に基準を 0.50~1.50 と拡大した場合は、75 成分が範囲内となった (表 19 の中、

下段)。

1.3.6. ブランク試料の妨害状況

7種の畜水産物(牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、うなぎ、えび、牛乳及び鶏卵)の各ブランク試料については、各測定対象成分の保持時間付近に夾雑成分のピークが検出されることがあり、一部で対象成分の定量が不可能となる場合があった。夾雑成分のピークは、分析対象成分のピークとは形状が異なる場合や、山脈状に連続している場合がほとんどであった。表 11 においては、比較的明瞭なピークについてはブランク値(夾雑成分の測定値)を掲載したが、これらは回収率の算出値には反映させなかった。

D. 考察

1. 新規一斉試験法案における対象成分の抽出状況(検討①)

前年度の検討において、既存一斉試験法のアセトンおよび *n*-ヘキサン抽出では、有機層に抽出されずに水層(廃棄画分)に残留する成分が多数認められ、本検討における対象成分に関しては、その適用性に問題があることが示唆された。新規一斉試験法案の場合、アセトニトリル及び水層(続く塩析操作により水を除去)への抽出となり、これに油性夾雑物の除去および抽出に際する補助的な役割を持つと考えられる *n*-ヘキサン(廃棄画分)が加えられている。本検討における対象成分は、最終的な測定方法が LC/MS であることから予想されるように、比較的水溶性の高い成分が多く含まれている。従って、新規一斉試験法案の

抽出法においても *n*-ヘキサン層に分配される成分は少なく、回収率 70%を基準として 85 成分中 78 成分がアセトニトリル及び水層に抽出された。以上の結果から、本研究における主たる分析法として新規一斉試験法案を採用することとし、その抽出効率(実残留試料からの農薬成分の抽出効率)を確認した上で(検討②)、実際の試料マトリックス存在下における適用性を検証することとした(回収および無添加試料の分析、検討③)。

2. 抽出効率の確認(検討②)

2.1. 牛脂肪における抽出効率の確認

脂肪をアセトニトリルに溶かすことは困難であることから、新規一斉試験法案における抽出では、牛脂肪中の農薬成分は脂肪と共に *n*-ヘキサンに溶解し、次いでアセトニトリルに分配されると考えられる。実際に抽出が可能であることを確認するために、溶融した牛脂肪に農薬成分を混合して再度固化させた試料からの回収率と、通常の添加回収率(表面添加の回収率)を比較した。その結果、分析法における損失が明らかな成分や、測定感度不足あるいは夾雑物ピークの存在により安定した測定が困難な成分を除いて双方の回収率はほぼ同等であった。組織内からの回収率が添加回収率を下回った場合が数成分において観察されたが、その差は最大 20%程度であり、問題とはならないと考えられる。逆に上回る例も同様に観察されたことから、これらの数値には分析の誤差が含まれると予想される。以上、抽出溶媒であるアセトニトリルとの親和性が最も低いと考えられる牛脂肪マトリックスにおける検討の結果から、新

規一斉試験法案の、試料マトリックスからの農薬成分の抽出効率に問題がないことが確認できた。

1.2.2. ラット肝臓による抽出効率の比較

既存一斉試験法と新規一斉試験法案の双方により実残留試料（数種の農薬成分を経口投与したラットの摘出肝臓）を分析し、測定濃度を比較した。この際、既存一斉試験法の抽出効率は、極性の低い農薬については、保証されたものであるという前提に基づき、新規一斉試験法案の抽出効率を評価した。実験動物を用いており、試験規模は限定的なものとなったが、①両分析法で良好な回収率が確保できる成分が含まれていること、②成分の極性に幅を持たせること、③農薬の種類（系統）が偏らないこと、④急性毒性(LD50)がそれ程強くなく、肝臓で適当な濃度の残留が見込めることを指標として 11 種の農薬成分を選択し、抽出効率に関して全体的な評価が可能となるよう配慮した。投与量は各成分の毒性情報に基づき、出来るだけ高濃度の残留値が得られることを目指して設定した。試験の結果、既存一斉試験法では回収率が極端に低い、比較的高極性な 2 成分（ニテンピラムおよびジメトエート）を除き、新規一斉試験法案による測定値は既存一斉試験法のそれに近似した。また、分析法の回収率との関係が反映されているものと推察されるが、新規一斉試験法案による測定値が既存一斉試験法を多少上回る場合が幾つか観察され、その逆はほぼ認められなかった。以上のことから、新規一斉試験法案について、実残留農薬成分の抽出効率に問題がないことが示され、また、比較的高極性な成分に対す

る優位性が示唆された。

3. 新規一斉試験法案の適用性検証(検討③)

3.1. LC/MS 測定

0.1mg/kg 添加の回収率を算出するために作成した検量線 (0.75~0.125 ng) は、全体的に良好な直線性を示し、全 7 測定 (7 種試料の各測定時に作成した検量線) において良好 ($r^2 > 0.995$) であったものが 63 成分となった。しかしながら、全 7 測定の内、その半数以上 (4 例以上) において問題が認められたプロパモカルブ、プロモホスエチル、フロラスラム及びブスルフェントラゾンの 4 成分については、LC/MS 測定における定量性に難があると判断された。

その他の分析対象成分の検量線は、ほぼ原点付近を通過し、最小検出量付近での定量性も良好であると判断されたが、4-アミノピリジンについては、3 測定で相関係数が 0.995 未満であったことから、分析に際しては定量性について注意が必要であると考えられる。また、メチオカルブについては、傾きが著しく緩やかで面積軸が原点から大きく外れる傾向が認められたが、直線性には問題が認められなかった。

0.01mg/kg 添加の回収率を算出する為に設定した最小検出量 (0.025 ng) は、予測定にかかわらず、全 85 成分、各試料の測定時において検出可能であった。但し、これは視認に基づく判断であり、実測上の S/N 比からの算定値に基づくものではない。

3.2. 回収試験結果

回収率の統計解析結果を表 20 に示す。また、その総合評価を表 21 にまとめた。