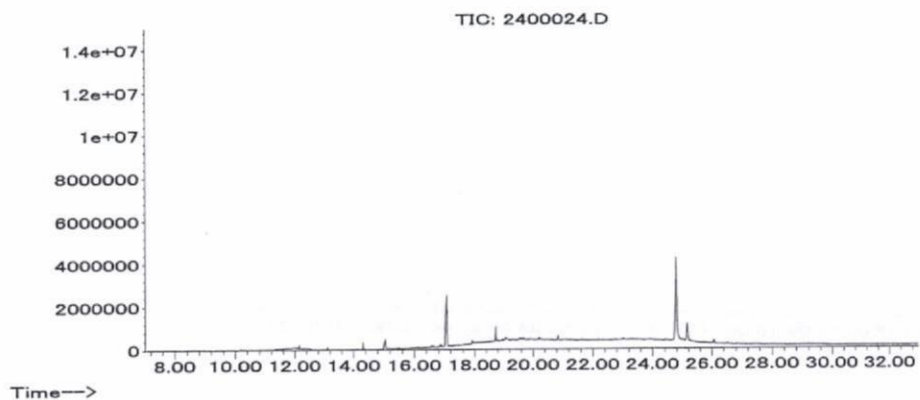


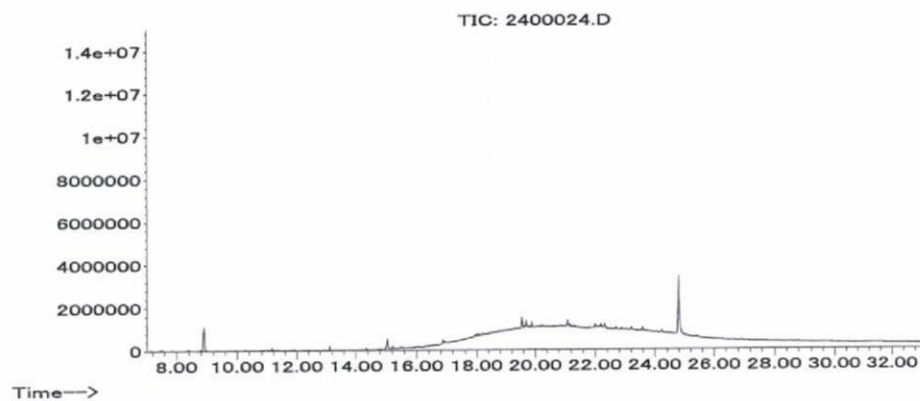
えび

Abundance



うなぎ

Abundance



鮭

Abundance

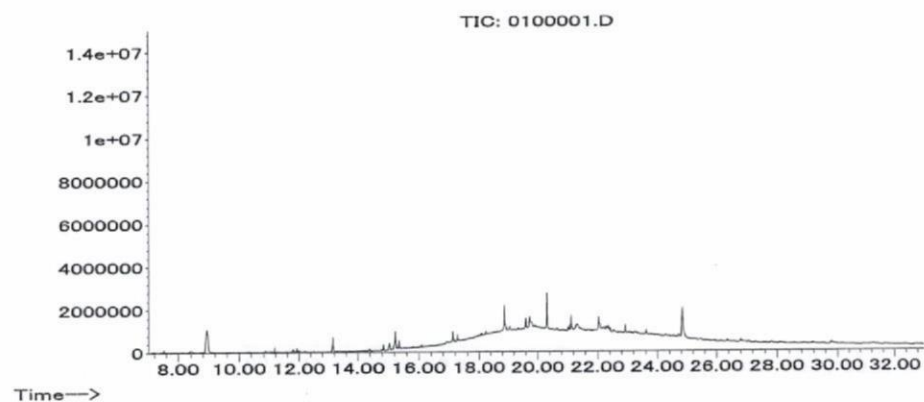
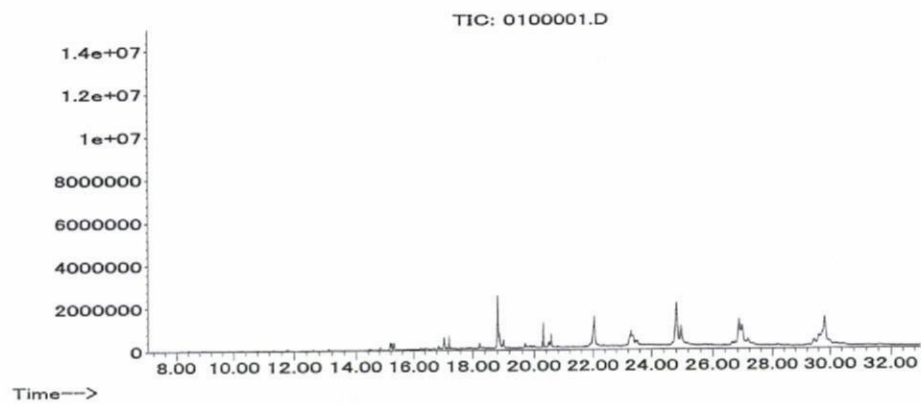


図 8. ブランク試料のトータルイオンクロマトグラム の例 (GC・MS) (続き)

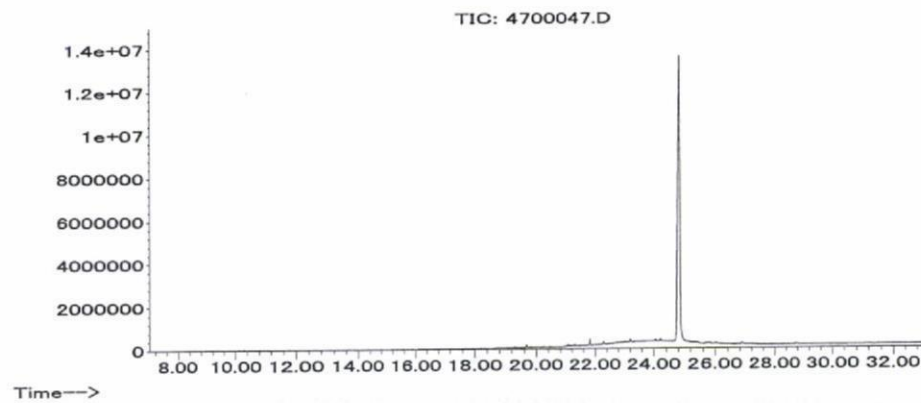
牛乳

Abundance



鶏卵

Abundance



はちみつ

Abundance

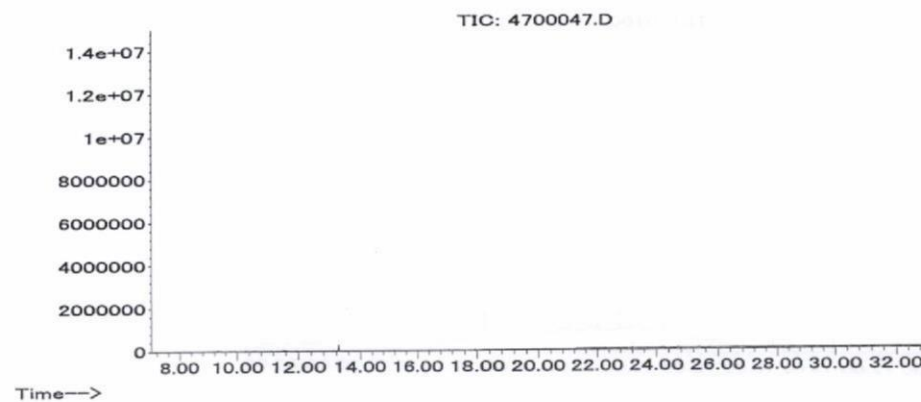


図 8. ブランク試料のトータルイオンクロマトグラムの例 (GC-MS) (続き)

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 20 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. 畜水産食品中残留農薬分析法の開発：

2.2 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）

厚生労働省科学研究費補助金(食品の安心・安全確保推進研究事業)

II. 平成 20 年度分担研究報告書

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 一律基準適用畜水産食品中残留農薬分析法の開発:

2.2 LC-MS

分担研究者 小田中芳次 財団法人 残留農薬研究所 化学部残留担当部長

研究要旨

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) の適用性を、前年度までの検討実施時点において標準品が未入手、もしくは GC-MS 測定の適用を想定して LC-MS 測定は未検証であった計 11 成分について検証した。7 種畜水産物試料 (牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、えび、うなぎ、牛乳、鶏卵) を用いた妥当性評価 (0.01 mg/kg ならびに 0.1 mg/kg の 2 濃度添加) において、最終的に当該分析法の適用が可能と判断された分析対象は、キノクラミン、シクロキシジム、ベンゾフェナップ及びアイオキシニルの 4 成分であった。

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

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

上記の一律基準が適用される農薬の内、LC 測定に適したものの約 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 ~19 年度の検討においては、*n*-ヘキサン共存下アセトニトリル抽出を行う新規一斉試験法案の抽出条件に関する基礎検討を行い、次いで約 100 種農薬を分析対象として実試料への適用性を検証した。その結果、適切に LC-MS による一斉測定が可能と判断された分析対象は 85 成分であり、その内、64 成分について当該分析法の適用が可能であると判断された。本年度は、前年度までの検討において標準品が入手できなかった成分、もしくは GC-MS 測定の適用を想定して LC-MS 測定が未検証であった 11 成分について、新規一斉試験法案の追加検証を実施した。

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、

B. 研究方法

1. 検討対象成分

以下の条件により選別された 14 成分を検討対象成分とした (表 1)。その内、アザフェニジン、アミノエトキシビニルグリシンおよびポリオキシシン D については、標準品が入手出来なかったため、最終的な分析対象は 11 成分とした。

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成分 (121 種農薬、別表 1 参照)。

b. a の内、前年度までに未検討の成分。

c. 前年度までの検討において、GC-MS 測定の適用を想定して LC-MS 測定では未検証で、その物理的・化学的性質から LC-MS 測定の適用が可能であると考えられる成分。

2. 検討概要

はじめに、分析対象成分について LC-MS スペクトルを採取し、測定に関する適性を評価した。次いで、コントロール試料 (畜水産物試料を含まない水試料) を用いた添加回収率を確認した後、各分析対象成分について、検量線、7 種畜水産物試料 (牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、うなぎ、えび、牛乳、鶏卵) での妥当性評価及びマトリックスの影響に関するデータを採取し、分析対象成分の新規一斉試験法案の適用性を検証した。

3. 農薬標準品

分析対象とした農薬標準品の入手先、及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

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

一般試薬及び有機溶媒は、特級品またはそれに準ずる等級、または残留農薬試験用を使用した。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。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)。

7. 標準溶液の調製

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 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。

8. 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。

8.1.1. 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 0.1 mg/kg 及び 0.01 mg/kg の添加回収用試料を調製した。添加回収率の算出は，各試料及び各濃度において 3 反復で行った。

8.1.2. 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（鶏卵試料にて実施）。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。

8.1.3. 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°C 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。

8.1.4. 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。

8.1.4.1. 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。

移動層，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

8.1.4.2. 質量分析計

イオン化方式：エレクトロスプレー
(ESI)。乾燥ガス温度：350℃。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
ー電圧：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)

8.1.5. マススペクトルの確認

分析対象とした 11 成分の個別標準溶液
(10 mg/L) を調製し，フローインジェク
ションによるスキャン測定を行い，各成分
のマススペクトルを得た。フローインジェ
クション分析は，5 mmol/L 酢酸アンモニ
ウム含有の水/メタノール(1:1, v/v)混液を
流速 0.2 mL/min で流して，各標準溶液 5
μL を注入して操作した。これに基づき，各
分析対象成分の定量イオンを設定し，第
8.1.4 項の操作条件の LC-MS に注入した。

その際，注入溶液には保持時間の指標とし
てイソキサフルトール標準品を混合し，各
分析対象成分の相対保持時間を次式により
求めた (表 2)。

$$\text{相対保持時間} = \frac{\text{ターゲットの保持時間(min)}}{\text{イソキサフルトール保持時間(min)}}$$

8.1.6. 最小検出量の算出

最小検出量評価用の各標準溶液は，各農
薬成分の検出感度に応じて，S/N<10 と
なるように標準溶液を適切に希釈 (0.0005～
0.1 μg/mL) して使用した。各農薬成分の
モニタリングイオンのノイズ幅 (N: ベー
スラインノイズの最大値と最小値の差の
2/5) 及び各農薬成分のピーク高さ (S:
ベースラインの中央値からピークトップま
で) から最小検出量 (S/N=3) 及び測定限
界 (S/N=10) を求めた。

8.1.7. 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 及び 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 8.1.4 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。

8.1.8. 回収率の算出

試料溶液を第 8.1.4 項の操作条件の
LC-MS に注入して，ピーク面積を測定し，
各分析対象成分の添加濃度に対する回収率

を算出した。

8.1.9. 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

8.1.10. 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。

8.1.11. 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. LC-MS 測定

1.1. MS スペクトル

フローインジェクション法により得られた分析対象 11 成分の MS スペクトルを解析した結果、トリクロロ酢酸ナトリウム塩については MS スペクトルが不明瞭で解析困難であった。また、キノメチオナート及びポリオキシシン B については、感度不足であったため、測定困難であると判断して分析対象成分から除外した。残り 8 成分について、第 8.1.4 項の条件で LC-MS 測定を行い、各成分の保持時間を確認した (表 2)。

1.2. LC-MS 測定条件

各分析対象成分の保持時間、相対保持時間、測定モード、定量イオン、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。各分析対象成分の MS スペクトルを図 1 に示す。

1.2.1. 最小検出量

最小検出量を求める際に使用した各分析対象成分のマスキングマトグラムを図 2 に、各分析対象成分の最小検出量及び測定限界の算出値を表 2 に示す。

対象 8 成分の機器の検出感度から予測した測定限界 (5 μ L 注入, S/N=10) は、ジクロフルアニド (0.05 ng) 及びカスガマイシン (0.1 ng) 以外は 0.025 ng 以下であった (表 2)。本試験においては定量限界 0.01 mg/kg を確保しなければならない為、試料量、希釈率、注入量から計算される各分析対象成分の要求感度は測定限界として 0.025 ng となる。

1.2.2. コントロール試料の分析

検討試料を含まない各分析対象成分 1 mg/kg 相当を精製水に添加したコントロー

ル試料を用いて回収率を求めた結果は、56～94%であった(表 3, PSA ミニカラムにおける分画状況も示す)。カスガマイシンについては試薬ブランクのクロマトグラム上に測定上障害となる夾雑物ピークが存在し、回収率を求めることが出来なかった。このため、以降の分析対象成分からカスガマイシンは除外した。

1.2.3. 検量線および回帰式

7 種の分析対象試料での回収率 (0.1 mg/kg 添加) 算出時に作成した検量線の回帰式における傾き、切片及び相関係数 (r^2) を表 4 にまとめた。また、各分析対象成分の検量線の一例を図 1 に示す。

回帰式の相関係数 (r^2) は、全試料で 0.995 以上となった。なお、0.01 mg/kg 添加の回収率を評価する為に必要な測定感度 (最小検出量として 0.025 ng) は、分析対象 7 成分全てにおいて検出可能であった。

2. 実試料への適用

2.1. 添加回収率の算出

各分析対象成分を 0.1 mg/kg 及び 0.01 mg/kg 相当添加した 7 種の畜水産物試料 (牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、うなぎ、えび、牛乳及び鶏卵) での回収の算出結果を表 5-1～5-7 に示す。また、0.01 mg/kg 相当添加の各分析対象試料別のマスクロマトグラムの例を図 2 に示す。

2.2. 回収率の状況

0.1 mg/kg 添加回収率の平均値を表 6-1 にまとめた。平均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キノクラミン、ベン

ゾフェナップ及びアイオキシニルの 3 成分であった。また、牛脂肪のみやや回収率が不良 (平均 68%) となったが、シクロキシジムもほぼ良好な回収率が得られた。残りの成分の内、ジフルフェンゾピル及びフルカルバゾンナトリウム塩は、幾つかの試料においては良好な回収率が得られたものの、全体的には回収不良と判断された。ジクロフルアニドは全ての試料において回収不良であった。

0.01 mg/kg 添加回収率の平均値を表 6-2 にまとめた。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キノクラミン、ベンゾフェナップ及びアイオキシニルの 3 成分であった。また、牛乳のみやや回収率が不良 (平均 67%) であったが、シクロキシジムもほぼ良好な回収率が得られた。残りの成分の内、ジフルフェンゾピルおよびフルカルバゾンナトリウム塩は、幾つかの試料においては良好な回収率が得られたものの、全体的には回収不良と判断された。ジクロフルアニドは全ての試料において回収不良であった。

2.3. 変動係数

回収率の標準偏差パーセント (RSD) については、分析検討試料および添加濃度にかかわらず、最大でも 13% であり、許容範囲内であった (表 5-1～5-7 参照、ほとんどの場合において回収率が 0% となった、ジクロフルアニドは除く)。なお、回収率の RSD については、検討対象試料間における明瞭な差は認められなかった。

2.4. 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 7 に示す。キノクラミン, シクロキシジム, ジクロフルアニド, ベンゾフェナップ及びアイオキシニルについては, 全ての試料において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, えびにおけるジクロフルアニドのみ A/B=1.22)。ジフルフェンゾピルについては, えびのみで抑制効果, 牛の筋肉, 牛乳および鶏卵においては増感効果が認められた。フルカルバゾンナトリウム塩については牛の脂肪以外の全ての検討対象試料で増感効果が認められた。

2.5. ブランク試料の妨害状況

牛の脂肪におけるフルカルバゾンナトリウム塩について, その保持時間に若干のピークが認められたが, その他の検討対象試料ならびに分析対象成分については, 測定に影響を及ぼす夾雑成分ピーク等は認められなかった。

D. 考察

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 7 測定 (7 種検討対象試料の各測定時に作成した検量線) において良好 ($r^2 > 0.995$) な直線性を示した。

0.01mg/kg 添加の回収率を算出する為に必要な最小検出量 (0.025 ng) は, 分析法の評価対象 7 成分について, 全ての検討対象試料の測定時において検出可能であった。但し, 溶媒調製標準溶液から得られたクロマトグラムについての視認に基づく判断で

あり, 実測した S/N 比からの算定値に基づくものではない。

コントロール試料の分析による確認においては, カスガマイシンの試薬ブランクのクロマトグラム上に測定障害となる夾雑物ピークが存在し, 回収率を求めることが出来ず, 以降の分析対象成分から除外した。

2. 回収率の評価

回収率の統計解析結果を表 8 に示す。分析法の適用性を判断する基準として, 中央値が 70~120% の範囲内にあり, 且つ 7 種試料の内 4 例以上の平均回収率が 70~120% の範囲内にあることを適合条件とした場合, 0.1 mg/kg 及び 0.01 mg/kg 添加のいずれにおいても良好と評価されたのはキノクラミン, シクロキシジム, ベンゾフェナップおよびアイオキシニルの 4 成分であった。

3. マトリックス効果の評価

7 種試料のマトリックスと各分析対象成分の組み合わせにおけるマトリックス効果の評価したところ, ジフルフェンゾピル及びフルカルバゾンナトリウム塩において顕著な影響が認められた。同一分析対象成分であっても, 検討対象試料の相違により相反する効果 (ピーク面積の抑制, ion suppression あるいはピーク面積の増強, ion enhancement) が認められたことから, 各試料固有の夾雑成分の影響が推察された。ジフルフェンゾピル及びフルカルバゾンナトリウム塩は, PSA 精製の第 2 画分に溶出する成分であるが, 前年度の検討においても当該画分に溶出する分析対象成分について同様にマトリックス効果が顕著な傾向が

認められていた。

3. 総括

アセトニトリル及び *n*-ヘキサンによる抽出法を採用した新規一斉試験法案の適用性を、前年度までに未検討の 11 成分について検証した。7 種畜水産物試料での妥当性評価の結果、最終的に、キノクラミン、シクロキシジム、ベンゾフェナップ及びアイオキシニルの 4 成分について、当該分析法の適用が可能と判断した（表 9 参照）。

E. 結論

アセトニトリル及び *n*-ヘキサンによる抽出を採用した「LC-MS による農薬の新規一斉試験法案（畜水産物）」の 11 種分析対象成分（前年度までに未検討のもの）に対する適用性を検討した。その内、当該試験法を行なうために必要な感度及び分離能が得られ、LC-MS 測定が可能であった分析対象は 8 成分であった。そして、コントロール試料での回収率が良好であった分析対象は 7 成分であった。7 種の畜水産物試料（牛の筋肉、脂肪、肝臓、えび、うなぎ、牛乳、鶏卵）について、定量限界相当濃度（0.01 mg/kg）での当該試験法が適用可能であると判断された分析対象は 4 成分であった。

F. 参考文献

- 1) 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（平成 17 年 1 月 24 日付け食安発第 0124001 号厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知）
- 2) アゾキシストロピン、クミルロン及びシ

メコナゾール試験法（厚生労働省；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，畜水産物）

G. 健康危険情報

なし

H. 研究発表

- 1) 畜水産物中残留農薬を対象とした一斉試験法の検証－アセトニトリル・*n*-ヘキサン抽出法の適用性－，藤田眞弘，長田拓也，浜野浩子，矢島智成，大山和俊，飯島和昭，小田中芳次，佐藤清，加藤保博：第 32 回農薬残留分析研究会，宮崎市（2008 年 11 月）

I. 知的財産権の出願・登録状況

なし

図表の一覧

- 表 1. 検討対象成分
- 表 2. LC-MS 情報
- 表 3. コントロール試料の検討結果
- 表 4. 検量線の確認
- 表 5. 添加回収試験結果
- 表 6. 添加回収率の平均値一覧
- 表 7. 溶媒 STD とマトリックス STD の比較
- 表 8. 平均回収率の統計解析
- 表 9. 結果一覧

図 1. マススペクトルおよび検量線

図 2. 最小検出量評価, 標準品, 回収試料のマスキングマトグラム

付図 1. 新規一斉試験法案, 分析工程の概要

別表 1. 畜水産物に暫定基準を設定しない農薬一覧

別表 2. 検討対象試料情報

表 1. 検討対象成分

品目名	イオン化不良*	測定不良**	備考
アイオキシニル			
アザフェニジン			標準品入手困難
アミノエトキシビニルグリシン			標準品入手困難
カスガマイシン(塩酸塩)		x	
キノクラミン			
キノメチオナート	x		
シクロキシジム			
ジクロフルアニド			
ジフルフェンゾピル			
トリクロロ酢酸ナトリウム塩	x		
フルカルバゾンナトリウム塩			
ベンゾフェナップ			
ポリオキシシン D			標準品入手困難
ポリオキシシン B	x		
イソキサフルトール***			

※ 検討対象として14成分を選択

* イオン化不良の為、検討対象から除外したもの(3成分)

** クロマトグラム不良の為、検討対象から除外したもの(1成分)

*** リテンションタイムの指標成分(精製しない)

表 3. コントロール試料の検討結果

PSAの 溶出画分	分析対象	添加濃度 (mg/kg)	コントロール試料 0.1 mg/kg添加 回収率(%)
PSA-1	キノクラミン	0.1	90
PSA-1	シクロキシジム	0.1	72
PSA-1	ジクロフルアニド	0.1	69
PSA-1	ベンゾフェナップ	0.1	93
PSA-2	アイオキシニル	0.1	94
PSA-2	カスガマイシン塩酸塩	0.1	夾雑ピークと判別不能
PSA-2	ジフルフェンゾピル	0.1	73
PSA-2	フルカルバゾンナトリウム塩	0.1	56

表 4. 検量線の確認 (0.75~0.125 ng)

分析対象	牛の筋肉		牛の脂肪		牛の肝臓		うなぎ	
	傾き	切片	傾き	切片	傾き	切片	傾き	切片
キノクラミン	418162	-1905	101058	-43	413187	-1640	251372	6117
シクロキシジム	155541	92	107617	10	146881	-947	128511	3217
ジクロフルアニド	158974	1535	100779	1135	154206	-113	147167	1088
ベンゾフェナゾップ	1199460	22904.4	589515	6040.0	1182600	16559	1116230	23103.2
アイオキシニル	895972	2146	730979	8320	831692	4364	826082	859
ジフルフェンゾピル	203606	-613	82674	41.3	195864	-733	102716	-997
フルカルバソナトリウム塩	156428	193	62232	163	170137	330	98356	153
total = 8 compounds		$r^2 > 0.995$	$r^2 > 0.995$		$r^2 > 0.995$		$r^2 > 0.995$	

分析対象	えび		牛乳		鶏卵	
	傾き	切片	傾き	切片	傾き	切片
キノクラミン	279627	-1578	496570	523	424201	4970
シクロキシジム	130801	-827	127316	-4117	153190	-2363
ジクロフルアニド	141760	342	149379	3624	157485	-315
ベンゾフェナゾップ	1151930	15911.48	1437810	34804.2	1115160	42446.7
アイオキシニル	766095	4506	832292	-210	933132	6506
ジフルフェンゾピル	100088	-2056	207117	389	245549	3797
フルカルバソナトリウム塩	104226	-133	284224	2193	196672	2217
total = 8 compounds		$r^2 > 0.995$	$r^2 > 0.995$		$r^2 > 0.995$	

表5 添加回収率結果

添加濃度 (mg/kg)	Blank値 (mg/kg)	牛の筋肉 回収率(%)						添加濃度 (mg/kg)	牛の筋肉 回収率(%)					
		1	2	3	平均	SD	RSD		1	2	3	平均	SD	RSD
0.1	ND	81	85	84	83	2.1	3	0.01	83	81	82	82	1.0	1
0.1	ND	77	79	77	78	1.2	1	0.01	83	81	75	80	4.2	5
0.1	ND	ND	ND	ND	ND	-	-	0.01	ND	ND	ND	ND	-	-
0.1	ND	87	89	87	88	1.2	1	0.01	93	96	92	94	2.1	2
0.1	ND	88	89	90	89	1.0	1	0.01	89	94	91	91	2.5	3
0.1	ND	67	70	69	69	1.5	2	0.01	56	61	60	59	2.6	4
0.1	ND	55	57	57	56	1.2	2	0.01	64	63	62	63	1.0	2

添加濃度 (mg/kg)	Blank値 (mg/kg)	牛の脂肪 回収率(%)						添加濃度 (mg/kg)	牛の脂肪 回収率(%)					
		1	2	3	平均	SD	RSD		1	2	3	平均	SD	RSD
0.1	ND	93	93	94	93	0.6	1	0.01	104	99	97	100	3.6	4
0.1	ND	67	67	69	68	1.2	2	0.01	67	75	71	71	4.0	6
0.1	ND	50	42	49	47	4.4	9	0.01	31	33	42	35	5.9	17
0.1	ND	88	91	91	90	1.7	2	0.01	95	89	88	91	3.8	4
0.1	ND	93	95	88	92	3.6	4	0.01	92	97	99	96	3.6	4
0.1	ND	86	89	89	88	1.7	2	0.01	87	89	88	88	1.0	1
0.1	ND	77	82	74	78	4.0	5	0.01	178	190	173	180	8.7	5

添加濃度 (mg/kg)	Blank値 (mg/kg)	牛の肝臓 回収率(%)						添加濃度 (mg/kg)	牛の肝臓 回収率(%)					
		1	2	3	平均	SD	RSD		1	2	3	平均	SD	RSD
0.1	ND	77	82	78	79	2.6	3	0.01	77	75	77	76	1.2	2
0.1	ND	81	82	81	81	0.6	1	0.01	75	79	74	76	2.6	3
0.1	ND	ND	ND	ND	ND	-	-	0.01	ND	ND	ND	ND	-	-
0.1	ND	82	85	80	82	2.5	3	0.01	77	82	79	79	2.5	3
0.1	ND	86	90	89	88	2.1	2	0.01	83	86	85	85	1.5	2
0.1	ND	77	83	82	81	3.2	4	0.01	66	74	71	70	4.0	6
0.1	ND	60	61	61	61	0.6	1	0.01	59	71	66	65	6.0	9

添加濃度 (mg/kg)	Blank値 (mg/kg)	うなぎ 回収率(%)						添加濃度 (mg/kg)	うなぎ 回収率(%)					
		1	2	3	平均	SD	RSD		1	2	3	平均	SD	RSD
0.1	ND	88	85	86	86	1.5	2	0.01	90	90	89	90	0.6	1
0.1	ND	75	74	73	74	1.0	1	0.01	78	76	74	76	2.0	3
0.1	ND	3	2	2	2	0.6	29	0.01	ND	ND	ND	ND	-	-
0.1	ND	84	86	85	85	1.0	1	0.01	91	91	89	90	1.2	1
0.1	ND	91	91	93	92	1.2	1	0.01	95	94	91	93	2.1	2
0.1	ND	80	82	84	82	2.0	2	0.01	92	87	87	89	2.9	3
0.1	ND	66	68	66	67	1.2	2	0.01	79	62	78	73	9.5	13

添加濃度 (mg/kg)	Blank値 (mg/kg)	えび 回収率(%)						添加濃度 (mg/kg)	えび 回収率(%)					
		1	2	3	平均	SD	RSD		1	2	3	平均	SD	RSD
0.1	ND	90	85	90	88	2.9	3	0.01	80	114	106	100	17.8	18
0.1	ND	84	87	89	87	2.5	3	0.01	85	86	80	84	3.2	4
0.1	ND	ND	ND	ND	ND	-	-	0.01	ND	ND	ND	ND	-	-
0.1	ND	86	85	75	82	6.1	7	0.01	82	82	81	82	0.6	1
0.1	ND	91	94	91	92	1.7	2	0.01	88	89	87	88	1.0	1
0.1	ND	134	147	143	141	6.7	5	0.01	114	118	130	121	8.3	7

表6-1. 0.1 mg/kg添加回収率の平均値一覧

PSA 溶出画分	分析対象	平均回収率(%)						
		牛の筋肉	牛の脂肪	牛の肝臓	うなぎ	えび	牛乳	鶏卵
PSA-1	キノクラミン	83	93	79	86	88	77	88
PSA-1	シクロキシジム	78	68	81	74	87	70	83
PSA-1	ジクロフルアニド	ND	47	ND	2	ND	ND	ND
PSA-1	ベンゾフェナップ	88	90	82	85	82	90	87
PSA-2	アイオキシニル	89	92	88	92	92	92	90
PSA-2	ジフルフェンゾビル	69	88	81	82	141	54	46
PSA-2	フルカルバゾンナトリウム塩	56	78	61	67	70	47	44

表6-2. 0.01 mg/kg添加回収率の平均値一覧

PSA 溶出画分	分析対象	平均回収率(%)						
		牛の筋肉	牛の脂肪	牛の肝臓	うなぎ	えび	牛乳	鶏卵
PSA-1	キノクラミン	82	100	76	90	100	80	93
PSA-1	シクロキシジム	80	71	76	76	84	67	88
PSA-1	ジクロフルアニド	ND	35	ND	ND	ND	ND	ND
PSA-1	ベンゾフェナップ	94	91	79	90	82	93	92
PSA-2	アイオキシニル	91	96	85	93	88	92	95
PSA-2	ジフルフェンゾビル	59	88	70	89	121	49	48
PSA-2	フルカルバゾンナトリウム塩	63	180	65	73	74	47	52

表 7. 溶媒STDとマトリックスSTDの比較

PSA 溶出画分	分析対象	①牛の筋肉			②牛の脂肪			③牛の肝臓			④うなぎ		
		A	B	A/B	A	B	A/B	A	B	A/B	A	B	A/B
PSA-1	キノクラミン	210402.6	214841	0.98	50771.1	52317.8	0.97	20511.2	195724	1.05	132188	132321	1
PSA-1	シクロキシジム	75608.6	87377.05	0.86	52813.1	55361.9	0.95	72105.3	79649.8	0.91	69786.35	74446.25	0.94
PSA-1	ジクロフルアニド	80286.2	82202.45	0.98	51354	51285.6	1	76507.2	74506.8	1.03	73986.16	76443.85	0.97
PSA-1	ベンゾフェナップ	622200.6	644244.5	0.97	295371	290005	1.02	608076	599744	1.01	574303	581007.5	0.99
PSA-2	アイオキシニル	448590.6	484424.5	0.93	374778	374491	1	428975	433264	0.98	409727.5	412017	0.99
PSA-2	ジフルフェンゾビル	102035.6	89600.85	1.14	42489.6	40857.7	1.04	99247.3	95488	1.04	49085.8	47810.8	1.03
PSA-2	フルカルバゾンナトリウム塩	77814.85	57375.1	1.35	80757.7	28907.7	1.06	84100	61427.1	1.37	48620.7	38758.15	1.25

PSA 溶出画分	分析対象	⑤えび			⑥牛乳			⑦鶏卵		
		A	B	A/B	A	B	A/B	A	B	A/B
PSA-1	キノクラミン	136463.6	142325	0.96	250873	228684	1.1	222854	235207	0.95
PSA-1	シクロキシジム	64368.1	67154.7	0.96	61761.2	65924.1	0.94	72106	78712	0.92
PSA-1	ジクロフルアニド	70445.75	67591.55	1.22	78660.5	80018.2	0.98	76868.5	83978	0.92
PSA-1	ベンゾフェナップ	589919.6	559713.5	1.05	763271	786534	1.04	608818	623626	0.98
PSA-2	アイオキシニル	384513	412731	0.93	426183	425381	1	477189	496856	0.96
PSA-2	ジフルフェンゾビル	48790.1	85945.8	0.57	108795	71677.4	1.52	127995	85629	1.49
PSA-2	フルカルバゾンナトリウム塩	51373.3	43882.9	1.17	147167	97803	1.51	99408.1	66021.6	1.51

表 8. 平均回収率の統計解析

PSA 溶出画 分	分析対象	添加回収濃度 0.1 mg/kg							平均値-中央値
		平均値	最小値	25p%	中央値	75p%	最大値	例数	
PSA-1	キノクラミン	85	77	81	86	88	93	7	-1
PSA-1	シクロキシジム	77	68	72	78	82	87	7	-1
PSA-1	ジクロフルアニド	-	ND	-	-	-	47	-	-
PSA-1	ベンゾフェナップ	86	82	84	87	89	90	7	-1
PSA-2	アイオキシニル	91	88	90	92	92	92	7	-1
PSA-2	ジフルフェンゾピル	80	46	62	81	85	141	7	-1
PSA-2	フルカルバゾンナトリウム塩	60	44	52	61	69	78	7	-1

PSA 溶出画 分	分析対象	添加回収濃度 0.01 mg/kg							平均値-中央値
		平均値	最小値	25p%	中央値	75p%	最大値	例数	
PSA-1	キノクラミン	89	76	81	90	97	100	7	-1
PSA-1	シクロキシジム	77	67	74	76	82	88	7	1
PSA-1	ジクロフルアニド	-	ND	-	-	-	35	-	-
PSA-1	ベンゾフェナップ	89	79	86	91	93	94	7	-2
PSA-2	アイオキシニル	91	85	90	92	94	96	7	-1
PSA-2	ジフルフェンゾピル	75	48	54	70	89	121	7	5
PSA-2	フルカルバゾンナトリウム塩	79	47	58	65	74	180	7	14

表 9. 結果一覧

PSA 溶出画分			PSA-1	PSA-1	PSA-1	PSA-1	PSA-2	PSA-2	PSA-2
分析対象	添加濃度 (mg/kg)	キノクラミン	シクロキシジム	ジクロフルアニド	ベンゾフェナップ	アイオキシニル	ジフルフェンゾピル	フルカルバゾンナトリウム	
		ACRINATHRIN	ACIBENZOLAR-S-METHYL	ANILOFOS	4-AMINO-PYRIDINE	ALLIDOCHLOR	ISOURON	IPROVALICAR B	
平均回収率 (%) n=3	筋肉	0.1	83	78	ND	88	89	69	56
		0.01	82	80	ND	94	91	59	63
	脂肪	0.1	93	68	47	90	92	88	78
		0.01	100	71	35	91	96	88	180
	肝臓	0.1	79	81	ND	82	88	81	61
		0.01	76	76	ND	79	85	70	65
	うなぎ	0.1	86	74	2	85	92	82	67
		0.01	90	76	ND	90	93	89	73
	えび	0.1	88	87	ND	82	92	141	70
		0.01	100	84	ND	82	88	121	74
	乳	0.1	77	70	ND	90	92	54	47
		0.01	80	67	ND	93	92	49	47
	卵	0.1	88	83	ND	87	90	46	44
		0.01	93	88	ND	92	95	48	52
	平均回収率の分布	総平均値	87	77	-	88	91	78	70
		最小値	76	67	ND	79	85	46	44
25p%		81	72	-	83	89	55	53	
中央値		87	77	-	89	92	76	64	
75p%		92	83	-	91	92	88	72	
最大値		100	88	47	94	96	141	180	
例数		14	14	-	14	14	14	14	
平均値-中央値	0	0	-	-1	-1	2	6		
判定 ^{b)}		A	A	C	A	A	C	C	

[表中の記号]

ND: 不検出

^{a)} 平均回収率の総平均値, 最小値, 25p%: 25パーセンタイル値, 中央値, 75p%: 75パーセンタイル値, 平均回収率の例数.

^{b)} 平均回収率の中央値による判定基準. A: 70~120%, B-1: 121~200%, B-2: 50~69%, C: >200, <50, 例数10未満, または検量線の直線性が著しく不良な成分.

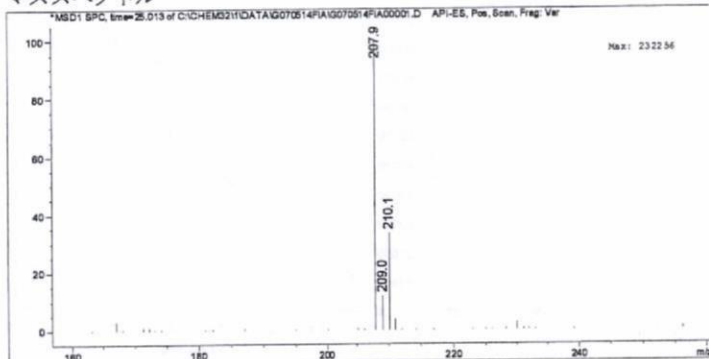
別表1 畜水産物に暫定基準を設定しない農薬一覧

No.	検討対象農薬名	英名	購入先	純度または標準溶液濃度	一併法GC/MS	一併法LC/MS	通知等GC/MS	告示等GC/MS	告示LO	告示吸光	GC/MS検討対象
1	アイオキシニル	IOXYNIL	Dr.Ehrens torfer	99.0%		1	1				1
2	アイオキシニルオクタノエート	IOXYNIL OCTANOATE	シグマ	99.0%							1
3	アクリナトリン	ACRINATHRN	Dr.Ehrens torfer	96.0%	1	1					1
4	アザコナゾール	AZACONAZOLE	Dr.Ehrens torfer	96.5%	1	1					1
5	アザフェニジン	AZAFENIDIN	標準品入手困難			1					1
6	アジベンゾフル-5-メチル	ACIBENZOLAR-S-METHYL	Dr.Ehrens torfer	99.5%		1			1		1
7	アジムスルフロン	AZIMSULFURON	和光純薬工業	99.7%		1			1		1
8	アセトクロール	ACETOCHLOR	Dr.Ehrens torfer	92.0%	1	1					1
9	アニラジン	ANILAZINE	関東化学	99.9%						1	1
10	アニロホス	ANILOFOS	Dr.Ehrens torfer	96.5%		1			1		1
11	アミノエトキシビニルグリシン	AMINOETHOXYVINYLGLYCINE	標準品入手困難								1
12	4-アミノピリジン	4-AMINOPYRIDINE	和光純薬工業	100%							1
13	アラニカルブ	ALANYCARB	和光純薬工業	99.1%				1			1
14	アリドクロール	ALLIDOCHLOR	Dr.Ehrens torfer	99.0%			1				1
15	イザゾホス	ISAZ OFOS	シグマ	94.4%	1	1					1
16	イソウロン	ISOURON	林純薬工業	99.5%			1				1
17	イソキサジフェンエチル	ISOXADIFEN-ETHYL	Dr.Ehrens torfer	10ng/mL/知ベケン	1	1					1
18	イソキサチオン	ISOXATHION	関東化学	99.2%	1	1					1
19	イプロバリカルブ	IPROVALICARB	シグマ	98.1%		1			1		1
20	イプロベンホス	IPROBENFOS	関東化学	99.9%	1	1					1
21	イマザキン	IMAZAQUIN	関東化学	99.4%		1					1
22	イマザメタベンズメチルエステル	IMAZAMETHABENZ METHYL ESTER	シグマ	97.3%	1	1					1
23	イミノクタジン	IMINOCTADINE	関東化学	99.6%						1	
24	イミベンコナゾール	IMIBENCONAZOLE	関東化学	99.9%	1	1					1
25	ユニコナゾールP	UNICONAZOLE P	林純薬工業	99.9%	1	1					1
26	エタルフルラリン	ETHALFLURALIN	Dr.Ehrens torfer	96.5%	1	1					1
27	エチクローゼート	ETHYCHLOZATE	関東化学	99.6%		1					1
28	エトフェンプロックス	ETOFENPROX	林純薬工業	99.3%	1	1	1				1
29	塩酸ホルメタネート	FORMETANATE HYDROCHLORIDE	シグマ	99.6%		1					1
30	エンドタル	ENDOTHAL	Dr.Ehrens torfer	97.5%							1
31	オキサジキシル	OXADXYL	Dr.Ehrens torfer	99.5%	1	1					1
32	オキシカルボキシン	OXYCARBOXIN	Dr.Ehrens torfer	99.0%		1			1		1
33	オキシ銅	OXINE-COPPER	和光純薬工業	100%							1
34	オリザリン	ORYZALIN	Dr.Ehrens torfer	97.0%	1	1			1		1
35	オルトフェニルフェノール	2-PHENYLPHENOL	関東化学	99.9%					1		1
36	カスガマイシン	KASUGAMYCIN	Dr.Ehrens torfer	80.0%							1
37	カルタップ、ベンスルタップ及びチオシクラム	CARTAP, BENSULTAP, THIOCYCLAM					1				1
38	キナルホス	QUINALPHOS	Dr.Ehrens torfer	96.5%	1	1					1
39	キノクラミン	QUINOCLAMINE	和光純薬工業	99.9%	1	1					1
40	キノメチオネート	QUINOMETHIONAT	Dr.Ehrens torfer	96.0%			1				1
41	クロゾリネート	CHLOROZOLINATE	Accu standard	100ppm/メタノール	1						1
42	クロプロップ	CLOPROP	Dr.Ehrens torfer	99.0%		1	1				1
43	クロマゾン	CLOMAZONE	Dr.Ehrens torfer	94.5%	1	1					1
44	クロマフェノジド	CHROMAFENOZIDE	和光純薬工業	99.8%		1			1		1
45	クロメプロップ	CLOMEPROP	林純薬工業	99.2%		1			1		1
46	クロランスラムメチル	CLOLANSULAM-METHYL	林純薬工業	99.9%		1					1
47	クロリムロンエチル	CHLORIMURON-ETHYL	Dr.Ehrens torfer	97.0%		1			1		1
48	クロルエトキシホス	CHLORETHOXYFOS	Dr.Ehrens torfer	96.0%	1	1					1
49	クロルプロファム	CHLORPROPHAM	関東化学	99.3%	1	1					1
50	酸化プロピレン	PROPYLENE OXIDE									1
51	シアゾファミド	CYAZOFAMID	Dr.Ehrens torfer	96.5%		1			1		1
52	シアナジン	CYANAZINE	関東化学	98.9%	1	1					1
53	シアノホス	CYANOPHOS	関東化学	99.6%	1	1					1
54	シアニ化水素	HYDROGEN CYANIDE									1
55	ジオキサチオン	DIOXATHION	和光純薬工業	95.3%	1						1
56	シクロエート	CYCLOATE	Dr.Ehrens torfer	97.0%		1					1
57	シクロキシジム	CYCLOXYDIM	Dr.Ehrens torfer	97.0%							1
58	ジクロスラム	DICLOSULAM	Dr.Ehrens torfer	96.8%		1					1
59	ジクロトホス	DICROTOPHOS	Dr.Ehrens torfer	96.0%	1						1
60	ジクロフェンチオン	DICHLORFENTHION	関東化学	99.9%	1	1					1

別表2 検討対象試料情報

試料名 (区分)	前処理方法	備考 (産地等)
牛筋肉 (筋肉)	可能な限り脂肪層を除き、細切した後 ミンサー(孔径2.5mm)にて均質化したもの。	冷凍牛・もも肉(総量約1kg) (オーストラリア産)
牛脂肪 (脂肪)	可能な限り筋肉層を除き、細切した後 ミンサー(孔径2.5mm)にて均質化したもの。	冷凍牛・レバー(総量約1kg) (オーストラリア産)
牛肝臓 (肝臓)	細切した後、ミンサーにて均質化したもの。	冷凍牛・脂肪(総量約500g) (オーストラリア産)
うなぎ (魚介類)	消化管を除いた全部を細切した後、 ミンサーにて均質化したもの。	活魚(総量約1kg、200g/匹) (国産)
えび (甲殻類)	全部をそのまま細切した後、 ミンサーにて均質化したもの。	有頭甘えび(総量約800g、10g/匹) (カナダ産)
牛乳 (乳)	市販品をそのまま分析に供した。	1Lパック (国産)
鶏卵 (卵)	殻を除いた後、ミンサーで卵白と卵黄を 均質化したもの。	Mサイズ(総量約600g、61g/個) (国産)

マススペクトル



検量線

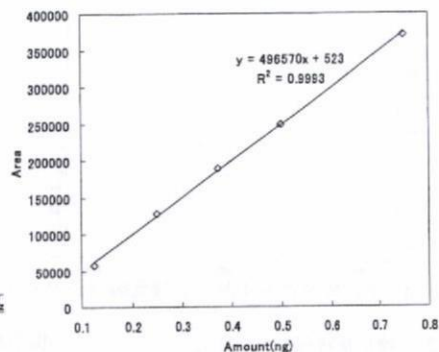
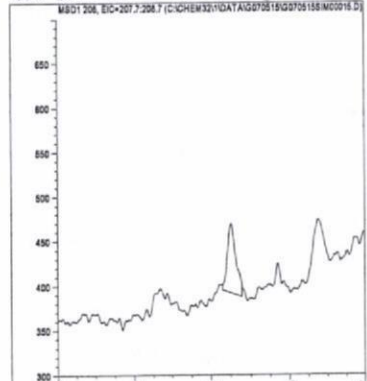
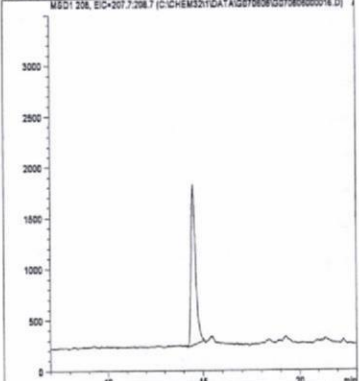


図 1. マススペクトルおよび検量線 (キノクラミン)

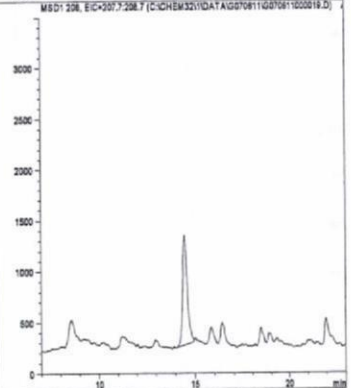
最小検出量評価 (0.0005ng)



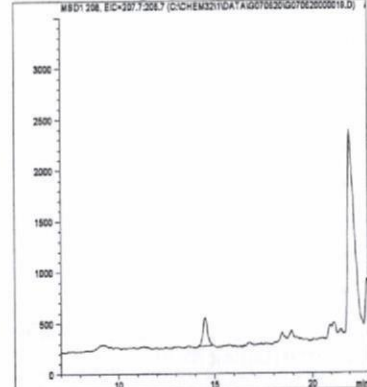
標準品 (0.05ng)



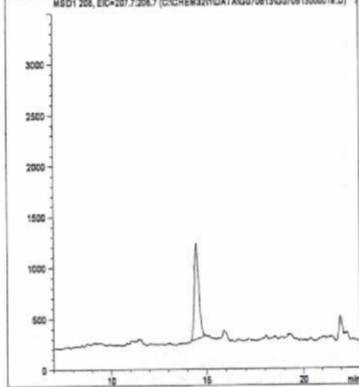
筋肉 (0.01mg/kg 添加)



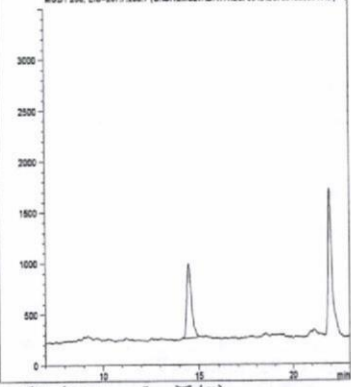
脂肪 (0.01mg/kg 添加)



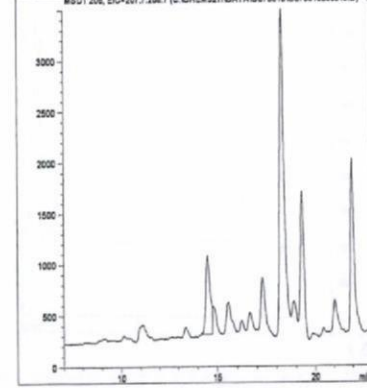
肝臓 (0.01mg/kg 添加)



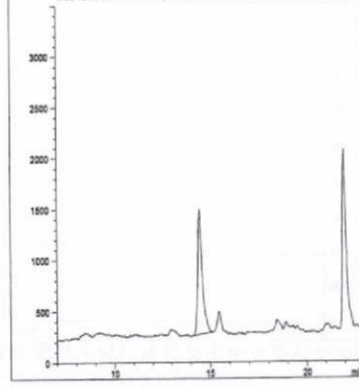
うなぎ (0.01mg/kg 添加)



えび (0.01mg/kg 添加)



牛乳 (0.01mg/kg 添加)



卵 (0.01mg/kg 添加)

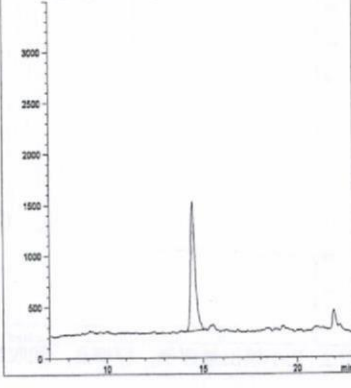
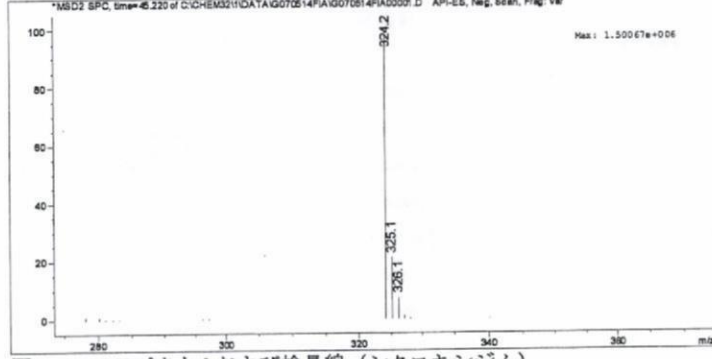


図2. 最小検出量評価, 標準品, 回収試料のマスクロマトグラム (キノクラミン)
マススペクトル



検量線

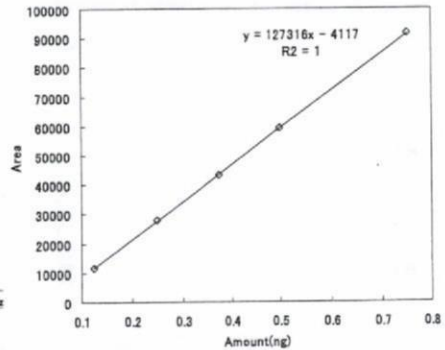
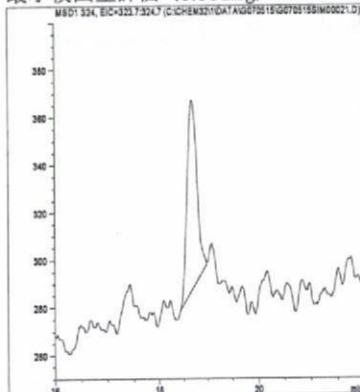
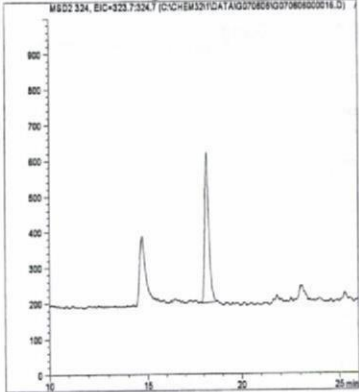


図1. マススペクトルおよび検量線 (シクロキシジム)

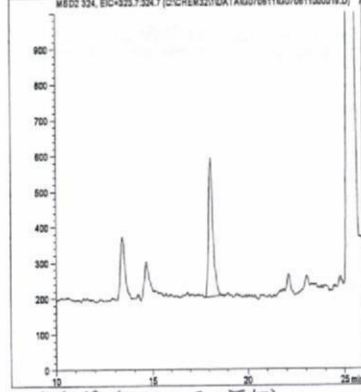
最小検出量評価 (0.001ng)



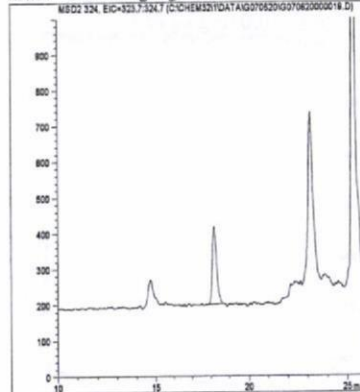
標準品 (0.05ng)



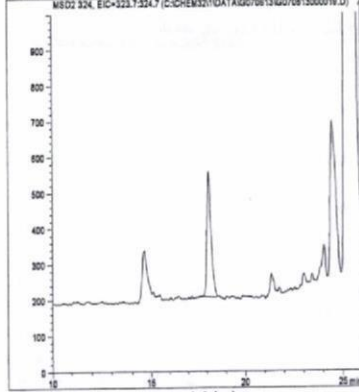
筋肉 (0.01mg/kg 添加)



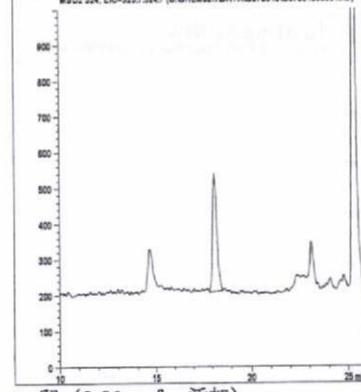
脂肪 (0.01mg/kg 添加)



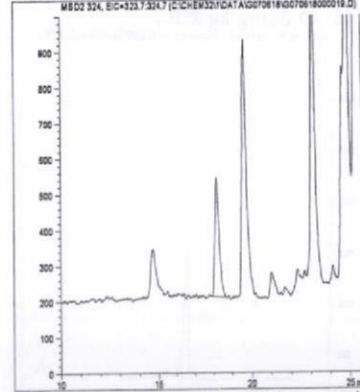
肝臓 (0.01mg/kg 添加)



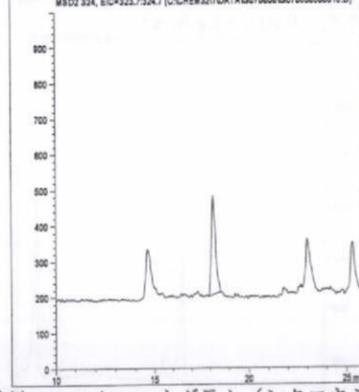
うなぎ (0.01mg/kg 添加)



えび (0.01mg/kg 添加)



牛乳 (0.01mg/kg 添加)



卵 (0.01mg/kg 添加)

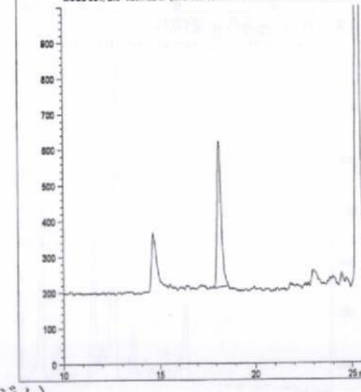


図2. 最小検出量評価, 標準品, 回収試料のマスクロマトグラム (シクロキシジム)