

厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)
平成 22 年度分担研究報告書

畜水産物中残留動物用医薬品及び農薬の包括的スクリーニング分析法の開発

研究分担者 坂井 隆敏 国立医薬品食品衛生研究所 食品部主任研究官

研究要旨

検査機関におけるより効率的な検査体制の確立を目的として、畜水産物に基準値が設定されている動物用医薬品及び農薬(農薬等)の包括的スクリーニング分析法の開発を試みた。

初年度である平成22年度は、種々の畜水産物から可能な限り多くの農薬等を効率的に抽出可能な抽出方法の開発を中心に検討を行った。その結果、抽出溶媒としてアセトンを用いることにより、融解・再固化した牛の脂肪から幅広い物性の農薬等を脂肪とともに効率的に抽出することが可能であった。また、脱脂方法としてアセトニトリル/ヘキサン分配及び C18 ミニカラム精製について詳細に検討したところ、抽出脂肪等を効果的に除去することができ、幅広い物性の農薬等に適用可能であった。

A. 研究目的

平成 18 年 5 月 29 日、食品に残留する農薬、飼料添加物及び動物用医薬品(農薬等)に関するポジティブリスト制度が施行された。本制度の導入に伴い、農薬、動物用医薬品それぞれに対する一斉試験法の研究・開発がなされ、今日までに動物用医薬品について3種類、農薬について5種類の一斉試験法が通知されている。現在、各検査機関においては、これら通知試験法に準拠した分析法を用いて食品中の残留農薬等の検査が実施されている。これら通知試験法の分析対象化合物は、当然ではあるが、動物用医薬品一斉試験法であれば動物用医薬品、農薬一斉試験法であれば農薬であり、動物用医薬品一斉試験法で農薬が、また農薬一斉試験法で動物用医薬品が分析可能であるかについては、ほとんど検討がなされていない。

一方、動物用医薬品はもとより、農薬の中にも畜水産物に基準値が設定されているものがあるため(約 300 農薬)、畜水産物については動物

用医薬品及び農薬の両方を分析する必要がある。しかしながら、上述のように、現行の一斉試験法は動物用医薬品もしくは農薬のどちらか一方のみが分析対象であるため、畜水産物を検査する場合、現状では動物用医薬品一斉試験法及び農薬一斉試験法を用いて2度の分析を行う必要がある。

動物用医薬品と農薬は、使用対象や使用方法・目的などは当然異なるが、食品中に残留した場合には、どちらも人の健康を損なうおそれのある化学物質である。したがって、分析対象となる食品が同じであれば、同一の方法で動物用医薬品と農薬とを分析することが可能であると考えられる。動物用医薬品及び農薬を同時に分析できる方法が開発されれば、現在それぞれの試験法で行われている検査を一回の検査に短縮できる為、より効率的な食品の検査が可能になると考えられる。

本研究では、検査機関におけるより効率的な検査体制の確立を目的として、畜水産物に基準

値が設定されている動物用医薬品及び農薬を対象として、これらの包括的一斉スクリーニング分析法の開発を試みた。

初年度である平成 22 年度は、種々の畜水産物から可能な限り多くの農薬等を効率的に抽出可能な抽出方法の開発を中心に検討を行った。

B. 研究方法

種々の畜水産物中の残留農薬等を効率的に分析するためには、様々な物性の農薬等を試料から効率的に抽出し、複雑な試料マトリックスを効果的に除去する方法の開発が必要である。初年度である平成 22 年度は、種々の畜水産物試料から、可能な限り多くの農薬等を効率的に抽出可能な抽出方法について検討した。

①検討対象化合物の選択

畜水産物に基準値が設定されている農薬等は 600 程度あるが、これら全てを用いて検討することは効率的ではないため、以下のように検討対象化合物を選択した。すなわち、畜水産物に基準値が設定されている農薬等について、log Pow 値を指標として、低極性から高極性まで偏りなく、動物用医薬品 61 化合物、農薬 86 化合物及び農薬且つ動物用医薬品として使用される薬品(農薬兼動物薬) 17 化合物、合計 164 化合物を選択した。

②LC-MS/MS 測定条件の検討

選択した検討対象化合物の液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析計(LC-MS/MS)における測定条件を検討した。すなわち、各検討対象化合物の標準溶液を LC-MS/MS に注入し、プリカーサーイオン及びプロダクトイオンの選択、並びにコーン電圧及びコリジョンエネルギーの最適化を行った。

③抽出溶媒の検討

均一化した牛の脂肪 5.00 g を量り採り、メタノール、エタノール、アセトンもしくは *n*-ヘキサンをそれぞれ 50 mL 加えてホモジナイズし、固体脂肪の分散性を確認した。次いで、ホモジナイズ後の試料を毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離し、各上澄液を採った。40℃以下で各上澄液の溶媒を除去した後の残留物量を測定し、各溶媒を用いた際の抽出脂肪量とした。

④アセトニトリル/ヘキサン分配による脱脂効果及び検討対象化合物の回収率の調査

ホモジナイズした牛の脂肪に *n*-ヘキサンを加えてホモジナイズ及び遠心分離し、上澄液を 40℃以下で溶媒除去し、得られた残留物を抽出脂肪とした。抽出脂肪 5.00 g を量り採り、アセトニトリル/ヘキサン分配を行った。すなわち、抽出脂肪に、アセトニトリル 30 mL 及び *n*-ヘキサン 30 mL、アセトニトリル 30 mL 及びアセトニトリル飽和 *n*-ヘキサン 30 mL、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL 及び *n*-ヘキサン 30 mL、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL 及びアセトニトリル飽和 *n*-ヘキサン 30 mL をそれぞれ加えて振とうし、アセトニトリル層を採った。*n*-ヘキサン層にアセトニトリルもしくは *n*-ヘキサン飽和アセトニトリルを加え、再度振とうし、アセトニトリル層を採った。アセトニトリル層を合わせ、40℃以下で溶媒を除去し、残留物量を測定し、残存脂肪量を求めた。

また、各検討対象化合物の 1 µg/mL 標準溶液 20 µL について、先と同様にアセトニトリル/ヘキサン分配を行った。アセトニトリル層から溶媒を除去し、得られた残留物をアセトニトリル及び水(1:1)混液に溶解して 2 mL とした。この 10 µL を LC-MS/MS に注入し、アセトニトリル層中の各検討対象化合物の回収率を求めた。

⑤C18 ミニカラムによる脱脂効果の検討

C18 ミニカラム(InertSep C18, 1,000 mg, GL

Sciences 製)を用いて、各検討対象化合物の溶出条件の検討及び脱脂精製効果の確認を行った。すなわち、予めアセトニトリルもしくはメタノールを通液した C18 ミニカラムに、各検討対象化合物 0.004 µg/mL 溶液(アセトニトリル)を 5 mL 注入後、アセトニトリルもしくはメタノールを注入した。全溶出液を採り、40°C以下で溶媒を除去した後、残留物をアセトニトリル及び水(1:1)混液中に溶解して 2 mL とした。これを LC-MS/MS に注入し、溶出液中の各検討対象化合物の回収率を求めた。

また、脱脂効果の確認は、以下の通り行った。抽出脂肪 0.2 g を採り、アセトニトリル 5 mL を加えて懸濁させた。これを、予めメタノール 5 mL 及びアセトニトリル 5 mL を順次通液した C18 ミニカラムに負荷した後、更にメタノール 5 mL を注入した。全溶出液を採り、40°C以下で溶媒を除去した後、残留物量を測定した。

⑥固体脂肪からの検討対象化合物の抽出

均一化した牛の脂肪 5.00 g を量り採り、40°Cで融解した後、各検討対象化合物の 1 µg/mL 標準溶液を 50 µL 添加し、攪拌後-30°Cで 30 分間放置して再固化させた。これに、アセトン 50 mL を加えてホモジナイズし、毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離した。上澄液を採り、残留物にアセトン 30 mL を加えてホモジナイズし、上記と同様に遠心分離した。上澄液を合わせ、アセトンを加えて正確に 100 mL とし、この 40 mL を採った。40°C以下で溶媒を除去した後、残留物に *n*-ヘキサン 30 mL 及び *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL を加えて振とうした。アセトニトリル層を採り、*n*-ヘキサン層に *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL を加えて振とうした。アセトニトリル層を採り、先のアセトニトリル層と合わせ、40°C以下で約 5 mL まで濃縮した。これを、予めメタノール 5 mL

及びアセトニトリル 5 mL を通液した C18 ミニカラム(1,000 mg)に注入し、更にメタノール 10 mL を注入した。全溶出液を採り、40°C以下で溶媒を除去した後、残留物にアセトニトリル及び水(1:1)混液を加えて 2 mL とし、これを試験溶液とした。試験溶液 10 µL を LC-MS/MS に注入し、各検討対象化合物の回収率を求めた。

⑦装置及び測定条件

・HPLC

高速液体クロマトグラフ: Acquity UPLC (Waters 製)

分析カラム: Inertsil ODS-4 HP(内径 3 mm, 長さ 150 mm, 粒子径 3 µm, GL Sciences 製)

カラム温度: 40°C

移動相: 10 mmol/L 酢酸アンモニウム水溶液 (pH 4.5) (A 液) 及びアセトニトリル (B 液)

グラジエント条件(*t*: 時間(分)): t_0 , B=1%; t_5 , B=1%; t_{35} , B=100%; t_{40} , B=100%; $t_{40.1}$, B=1%; t_{50} , B=1%

流速: 0.4 mL/min

注入量: 10 µL

・質量分析

質量分析計: Acquity TQ Detector (Waters 製)

ソース温度: 150°C

脱溶媒温度: 400°C

窒素ガス流量: 800 L/hr

コーンガス流量: 50 L/hr

キャピラリー電圧: 1.0 kV

イオン化法: エレクトロスプレーイオン化法

本研究で用いた各検討対象化合物の測定条件等を表 1 に示した。

(倫理面への配慮)

人、動物を研究対象としていないため特に倫理面の問題はない。

C. 研究結果

①LC-MS/MS における測定

選択した検討対象化合物について、LC-MS/MS測定条件の最適化を行った。その結果、選択した全ての検討対象化合物において、0.01 $\mu\text{g/mL}$ の標準溶液を測定した際に得られるピークは $S/N \geq 10$ であった。また、各検討対象化合物の 0.0025 $\mu\text{g/mL}$, 0.005 $\mu\text{g/mL}$, 0.0075 $\mu\text{g/mL}$, 0.01 $\mu\text{g/mL}$, 0.012 $\mu\text{g/mL}$ 及び 0.015 $\mu\text{g/mL}$ 標準溶液を LC-MS/MS で測定し、得られたピーク面積から検量線を作成したところ、相関係数(r)が 0.995 以上であった化合物数は 145, $0.985 < r < 0.995$ の化合物数は 16, 0.985 以下の化合物数は 3 であった。

②抽出溶媒の検討

均一化した牛の脂肪 5.00 g に、メタノール、エタノール、アセトンもしくは n -ヘキサンをそれぞれ 50 mL 加えてホモジナイズしたところ、メタノールでは脂肪が均一に分散した状態になるまでに多少の時間を要するものの、全ての検討溶媒で脂肪を均一に分散させることが可能であった。

また、抽出脂肪量については、メタノール、エタノール、アセトン及び n -ヘキサンでそれぞれ 0.18 g, 1.41 g, 4.44 g 及び 4.47 g であった(表 2)。

③アセトニトリル/ヘキサン分配について

アセトニトリル及び n -ヘキサン、アセトニトリル及びアセトニトリル飽和 n -ヘキサン、 n -ヘキサン飽和アセトニトリル及び n -ヘキサン、 n -ヘキサン飽和アセトニトリル及びアセトニトリル飽和 n -ヘキサンを用いてアセトニトリル/ヘキサン分配を行った際のアセトニトリル層中の残存脂肪量は、それぞれ 36.5 mg, 37.3 mg, 30.3 mg 及び 30.5 mg であった(表 3)。

各アセトニトリル/ヘキサン分配において、アセ

トニトリル層中の回収率が 70%以上であった検討対象化合物数は、それぞれ 146, 148, 148 及び 149 であり、アセトニトリル層中の回収率の中央値(%)及び平均値(%)は、それぞれ 84.9%及び 83.7%, 88.1%及び 86.5%, 89.6%及び 88.6%, 88.7%及び 87.9%であった(表 4)。

また、分配操作後に得られた各 n -ヘキサン層の液量を表 5 に示した。

④C18 ミニカラム精製について

C18 ミニカラムからの各検討対象化合物の溶出挙動を調査したところ、溶出溶媒としてメタノールを用いることにより、各検討対象化合物をより効率的に溶出可能であることが示された(表 6)。更に、メタノールを溶出溶媒として用いた際の溶出液量について検討した結果、10 mL 以上の液量で検討対象化合物の 90%を良好に溶出可能であることが示された(表 7)。

また、抽出脂肪 0.2 g (200 mg) をアセトニトリルに懸濁してミニカラムに負荷及びメタノール 10 mL を通液した結果、全溶出液中の残留物量は 0.4 mg であった。

⑤固体脂肪からの検討対象化合物の回収率について

絶対検量線法により定量した場合、回収率 70~120%の検討対象化合物数は 93 であった。絶対検量線法により得られた回収率を、マトリックス添加標準溶液と溶媒標準溶液のピーク面積比を用いて補正したところ、補正回収率 70~120%の検討対象化合物数は 141 であった(表 8)。

各検討対象化合物について、固体脂肪からの回収率と保持時間の関係を図 1 に、補正回収率と保持時間の関係を図 2 に示した。

D. 考察

①LC-MS/MS 測定における検討対象化合物の

測定感度等について

選択した検討対象化合物について、LC-MS/MS 測定条件の最適化を行い、0.01 $\mu\text{g/mL}$ 標準溶液を測定した結果、選択した全ての検討対象化合物におけるピークは $S/N \geq 10$ であった。このことから、分析法の濃縮倍率が 1 倍以上の場合には、選択した検討対象化合物のほとんどが、一律基準値である 0.01 ppm (mg/kg) の濃度レベルでの定量が可能であることが推察された。

また、0.0025~0.015 $\mu\text{g/mL}$ の標準溶液から得られたピーク面積を用いて検量線を作成した場合、相関係数 0.995 以上であった化合物は、全 164 化合物中 145 化合物であり、多くの検討対象化合物において 0.01 ppm の濃度レベルで正確な定量が可能であることが推察された。

②抽出溶媒の検討について

牛の脂肪 5.00 g にメタノール、エタノール、アセトンもしくは *n*-ヘキサンをそれぞれ 50 mL 加えてホモジナイズしたところ、アセトンもしくは *n*-ヘキサンにおいては、筋などを除くほとんどの脂肪が溶液中に溶解し、メタノールもしくはエタノールにおいては、脂肪はほとんど溶解しないものの、微細な粒子として均一に溶媒中に分散した。したがって、上記の溶媒を用いた場合には、試料と溶媒は効率的に接触するため、目的化合物が溶媒に溶解可能であれば、試料と溶媒との間で効率的な分配が可能、すなわち試料から溶媒中に効率的に目的化合物を抽出することが可能であることが推察された。

一方、溶媒中に抽出された抽出脂肪量は、アセトンで 4.44 g (88.84%)、*n*-ヘキサンで 4.47 g (89.47%)、メタノールで 0.18 g (3.57%) 及びエタノールで 1.41 g (28.13%) であった。したがって、アセトンもしくは *n*-ヘキサンを用いた場合には、筋

などの不溶性成分を除くほとんどの脂肪を溶解・抽出することが可能であり、メタノールもしくはエタノールを用いた場合には、脂肪そのものはほとんど抽出されないことが示された。

以上の結果から、検討した溶媒が目的化合物を溶解可能であれば、アセトンもしくは *n*-ヘキサンを用いた場合には、脂肪とともに目的化合物を抽出することが可能であると考えられた。一方、メタノールもしくはエタノールを用いた場合には、脂肪そのものはほとんど抽出することなく、目的化合物を抽出することが可能であると考えられた。

ここで、目的化合物の極性等について考慮すると、低極性化合物は一般的に脂肪組織に蓄積され易いことから、脂肪の溶解性が良好であったアセトンもしくは *n*-ヘキサンは、これら低極性化合物を十分に溶解・抽出することが可能であると考えられた。一方、脂肪をほとんど溶解しないメタノールもしくはエタノールは、これら低極性化合物を十分に溶解・抽出できない可能性が高いことが推察された。

次に、高極性化合物の溶解性等について考えると、アセトンは非プロトン性の極性溶媒であるため、比較的極性の高い化合物も溶解可能であると考えられ、また、水と任意の割合で混和するため、乳などの液体試料との混和性も良好であると推察された。一方、*n*-ヘキサンは、無極性溶媒であるため高極性化合物の溶解性が悪く、また、水とは混和しないため、液体試料からの化合物の抽出に対して適用が困難であることが推察された。

以上の結果及び考察から、種々の畜水産物から、低極性から高極性まで幅広い物性の検討対象化合物を効率的に抽出するための抽出溶媒としては、脂肪の溶解性が高く、低極性化合

物を脂肪とともに抽出することが可能であると考えられ、且つ、液体試料との混和性も良好であり、高極性化合物の溶解性も高いと考えられたアセトンを選択した。

続いて、上記のように抽出溶媒として選択したアセトンを用いることにより、脂肪からどの程度の検討対象化合物を抽出可能であるかを調査するに当たって、多量の脂肪等が試験溶液に残存した場合には、LC-MS/MSにおける検討対象化合物の測定の妨害となることから、まず、効果的な脱脂方法の検討を行った。

③アセトニトリル/ヘキサン分配について

アセトニトリル及び *n*-ヘキサン、アセトニトリル及びアセトニトリル飽和 *n*-ヘキサン、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル及び *n*-ヘキサン、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル及びアセトニトリル飽和 *n*-ヘキサンを用いてアセトニトリル/ヘキサン分配を行った際のアセトニトリル層中の残存脂肪量は、それぞれ 36.5 mg, 37.3 mg, 30.3 mg 及び 30.5 mg であった。また、分配後の *n*-ヘキサン層の液量については、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリルを用いた場合には液量の増減は確認されなかったが、*n*-ヘキサンを飽和していないアセトニトリルを用いた場合には、7 mL 程度液量が減少することが確認された。

以上の結果から、アセトニトリルについては、*n*-ヘキサンで飽和していない場合には、分配操作中にアセトニトリルに *n*-ヘキサンが溶け込み、溶け込んだ *n*-ヘキサンに溶解した脂肪等もアセトニトリル層に分配されることにより、脱脂効果が低下することが推察された。一方、*n*-ヘキサンについては、アセトニトリルでの飽和の有無に関わらず、脱脂効果及び分配後の *n*-ヘキサン層の液量に差は認められなかった。また、分配時のアセトニトリル層中における各検

討対象化合物の回収率については、70~120%の回収率が得られる化合物数にはほとんど差が認められなかったが、回収率の中央値及び平均値は *n*-ヘキサン飽和アセトニトリルを用いた場合の方が若干高いことが示された。

以上の結果及び考察から、本法におけるアセトニトリル/ヘキサン分配では、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル及び *n*-ヘキサンを用いて分配操作を行った。

④C18 ミニカラム精製について

C18 ミニカラムからの各検討対象化合物の溶出挙動について調査した。すなわち、脂肪をほとんど溶解しないことから高い脱脂効果が期待できるアセトニトリル及びメタノールを用いて、ミニカラムからの各検討対象化合物の回収率を比較した。

溶出溶媒については、アセトニトリルを用いた場合と比較して、メタノールを用いた場合の方が各検討対象化合物を良好に溶出可能であることが示された。

一方、検討対象化合物をミニカラムに負荷する際の溶媒については、アセトニトリルとメタノールで検討対象化合物の回収率に差は認められなかった。

アセトニトリル/ヘキサン分配後に本ミニカラム精製を行うことを考慮すると、分配後のアセトニトリル層から完全に溶媒を除去し、メタノールに溶媒置換後カラムに負荷するよりも、アセトニトリル層を濃縮してカラムに負荷する方が検討対象化合物の分解を低減することが可能であり、また、揮散し易い化合物の損失も抑えることが可能であると推察された。よって、ミニカラムに負荷する際の溶媒としてはアセトニトリルを選択した。

次いで、各検討対象化合物をミニカラムから効率的に溶出させるために必要なメタノールの液

量について検討した。C18 ミニカラムに、アセトニトリル 5 mL に溶解した各検討対象化合物を負荷し、メタノール 5 mL, 10 mL 及び 15 mL を通液した結果、70%以上の回収率が得られた化合物数はメタノール 5 mL の場合 142(全化合物の 87%), 10 mL の場合 149(91%)及び 15 mL の場合 150(92%)であった。このことから、C18 ミニカラムから検討対象化合物を効率的に溶出させるためには、10 mL のメタノールを通液する必要があることが示された。

以上の結果及び考察から、C18 ミニカラムを用いた追加の脱脂精製操作は、アセトニトリル/ヘキサン分配後のアセトニトリル層を約 5 mL まで濃縮してミニカラムに負荷し、更にメタノール 10 mL を通液する操作とした。

なお、上記の方法により、抽出脂肪 0.2 g(200 mg)の精製効果を調査した結果、溶出液中の残留物量は僅か 0.4 mg(負荷した抽出脂肪の 0.2%)であり、高い脱脂効果が得られることが確認された。

⑤固体脂肪からの検討対象化合物の回収率について

これまでに検討した抽出法及び精製法を組合せ、脂肪からの各検討対象化合物の回収率を調査した。すなわち、融解後に各検討対象化合物を添加し、再固化した脂肪について、アセトン抽出、アセトニトリル/ヘキサン分配及び C18 ミニカラム精製を行い、得られた試験溶液中の各検討対象化合物の回収率を求めた(n=3)。

各検討対象化合物について、検量線を作成し、絶対検量線法により定量した場合には、回収率 70~120%の検討対象化合物数は 93(全検討対象化合物の 57%)、回収率 70%未満の検討対象化合物数は 44(全検討対象化合物の 27%)であった。アセトニトリル/ヘキサン分配もしくは

C18 ミニカラム精製のいずれかの操作において回収率が 70%未満となった検討対象化合物数は 17(全検討対象化合物の 10%)であったことから、およそ 27 の検討対象化合物については融解・再固化した脂肪からの抽出が不十分、もしくは、LC-MS/MS での測定の際に脂肪由来の夾雑成分の影響を受け、結果として回収率が低く算出されている可能性があることが示唆された。

そこで、検討対象化合物を添加していないブランク試料について同様の抽出及び精製操作を行い、得られたブランク試験溶液に検討対象化合物を添加することにより、マトリックス添加標準溶液(0.01 ppm 相当)を調製した。調製したマトリックス添加標準溶液を LC-MS/MS で測定したところ、回収率 70~120%の検討対象化合物数は 89(全検討対象化合物の 54%)、回収率 70%未満の検討対象化合物数は 45(全検討対象化合物の 27%)であったことから、多くの検討対象化合物が測定の際にイオン化阻害を受けていることが確認された。

各検討対象化合物について、溶媒標準溶液及びマトリックス添加標準溶液で得られたピーク面積の比(マトリックス添加標準溶液/溶媒標準溶液)を求め、添加回収試験で得られた回収率を補正したところ、補正回収率 70~120%の検討対象化合物数は 141(全検討対象化合物の 86%)であった。

なお、検討対象化合物のうち 16 化合物については補正回収率が 120%を超える結果となったが、マトリックス添加標準溶液の測定結果のみでは回収率を完全に補正しきれなかったことが原因として考えられた。また、補正回収率 70%未満の化合物数は 7 であり、精製操作における回収率が 70%未満となった化合物数(17)よりも少ないことから、いくつかの化合物については、脂

肪由来のマトリックス成分が共存することにより、アセトニトリル層への分配率が増加した、もしくは C18 ミニカラムからの溶出が改善されたことが推察された。

各検討対象化合物について、固体脂肪からの回収率を保持時間に対してプロットしたところ保持時間が 30 分よりも長い検討対象化合物において低回収率となる傾向が確認された。一方、補正回収率を保持時間に対してプロットした場合には、保持時に関わらず補正回収率は概ね 75～120%の範囲内であった。このことから、アセトン抽出により、幅広い物性の検討対象化合物を固体脂肪から効率的に抽出可能であることが示唆された。また、保持時間が 30 分よりも長い検討対象化合物の多くは、分析カラムから同時に溶出される脂肪由来マトリックス成分によるイオン化阻害を受けていることが推察された。

以上の結果から、抽出溶媒としてアセトンを用いることにより、低極性から高極性まで幅広い物性の農薬等を固体脂肪から効率的に抽出することが可能であることが示された。一方で、幅広い物性の農薬等とともに、試料由来のマトリックス成分も同時に抽出され、これらは LC-MS/MS 測定における各農薬等の定量結果に大きく影響を及ぼす可能性があることから、畜水産試料由来マトリックス成分の効果的な除去方法の確立及び分析法への追加が必須であることが示された。

E. 結論

検査機関におけるより効率的な検査体制の確

立を目的として、畜水産物に基準値が設定されている動物用医薬品及び農薬を対象として、これらの包括的一斉スクリーニング分析法の開発を試みた。

初年度である平成 22 年度は、種々の畜水産物から可能な限り多くの農薬等を効率的に抽出可能な抽出方法の開発を中心に検討を行った。

抽出溶媒としてアセトンを用いることにより、融解・再固化した牛の脂肪から幅広い物性の農薬等を脂肪とともに効率的に抽出することが可能であることが示された。

また、アセトニトリル/ヘキサン分配及び C18 ミニカラム精製により、農薬等とともに抽出した脂肪等を効果的に除去することが可能であることが示された。

絶対検量線法により求めた回収率 70～120%の検討対象化合物は 50%程度、マトリックス添加標準溶液の測定結果を用いて算出した補正回収率 70～120%の検討対象化合物は 86%であったことから、多くの検討対象化合物が測定の際にマトリックスの影響を受けていることが示唆された。

次年度は、検討対象化合物の測定において影響を及ぼす、試料由来マトリックス成分の効果的な精製方法の確立について検討を行う予定である。

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1 検討対象化合物の測定条件等
イオン化モード +;ESI ポジティブ, -;ESI ネガティブ

化合物名	保持時間 (分)	分子量	イオン化 モード	プリカーサー イオン	コーン電圧 (V)	プロダクトイオン (定量)	コリジョンエネルギー (定量, eV)	プロダクトイオン (定性)	コリジョンエネルギー (定性, eV)
アザペロン	18.2	327.4	+	328	30	165	20	123	40
アシナルオルフェン	20.3	361.7	-	360	10	316	10	195	40
アセタミズプリド	17.4	222.7	+	223	30	126	20	99	40
アノキシストロピン	25.8	403.4	+	404	20	372	10	329	30
アベルメクチン-B1a (E体)	32.4	873.1	+	891	20	305	30	145	50
アミトラズ代謝物	14.4	162.2	+	163	30	107	20	77	40
アメトリン	24.4	227.3	+	228	40	186	20	96	30
アルドキシカルブ	13.3	222.3	+	223	20	148	10	86	30
アンピシリン	11.2	349.4	+	350	30	106	20	160	10
イソキサフルトール	25.7	359.3	-	358	20	79	20	64	50
イソフェンホス	30.2	345.4	+	346	20	245	10	217	20
イソフェンホスオキソン	24.8	329.3	+	330	20	229	10	201	20
イソプロチオラン	27.1	290.4	+	291	20	189	20	145	30
イベルメクチン	35.2	875.1	+	893	50	307	30	569	20
イマザリル	24.2	297.2	+	297	40	159	20	123	60
インドキサカルブ	29.9	527.8	+	528	30	203	50	150	30
エトキサゾール	32.7	359.4	+	360	30	141	30	113	60
エトキシスルプロン	22.8	398.4	+	399	30	261	20	304	20
エトパバート	18.7	237.3	-	236	40	192	20	132	30
エプリノメクチン	30.7	914.0	+	915	20	186	20	154	40
エマメクチンB1a (8,9-Z異性体)	27.7	1008.3	+	887	40	158	30	82	60
エマメクチンB1a (E体)	26.8	1008.3	+	887	40	158	30	82	60
エマメクチンB1b (8,9-Z異性体)	27.8	994.2	+	873	30	158	40	144	30
エマメクチンB1b (E体)	26.0	994.2	+	873	50	158	30	82	50
エリスロマイシン	18.6	733.9	+	735	30	158	30	576	20

表1 検討対象化合物の測定条件等(続き)

イオン化モード +;ESI ポジティブ, -;ESI ネガティブ

化合物名	保持時間 (分)	分子量	イオン化 モード	プリカーサー イオン	コーン電圧 (V)	プロダクトイオン (定量)	コロジエンエネルギー ギ一(定量, eV)	プロダクトイオン (定性)	コロジエンエネルギー ギ一(定性, eV)
オキサミル	13.4	219.3	+	237	20	72	10	218	30
オキシクロザニド	26.6	401.5	-	400	30	176	30	364	20
オキシデメトンメチル	12.9	246.3	+	247	30	169	10	109	30
オキシベンダゾール	20.6	249.3	+	250	30	218	20	176	30
オルメトプリム	14.5	274.3	+	275	40	123	20	259	30
オレアンドマイシン	18.0	686.9	+	689	30	158	30	544	20
カラゾロール	17.5	298.4	+	299	40	116	20	167	50
カルバリル	22.2	201.2	+	202	20	145	10	127	30
カルフェントラゾリエチル	28.0	412.2	+	412	40	346	20	280	30
カルベンダジム	16.3	191.2	+	192	40	160	20	105	40
カルボスルファン	35.2	380.6	+	381	30	118	20	160	20
キシラジン	15.7	220.3	+	221	40	90	20	164	20
キノキシフエン	31.5	308.1	+	308	50	162	50	197	30
クマホス	29.3	362.8	+	363	40	227	30	307	20
クレンブテロール	15.8	277.2	+	277	20	203	20	132	30
クロキサシリン	19.0	434.9	+	468	30	160	20	178	30
クロキントセツトメキシル	30.7	335.8	+	336	30	238	20	192	30
クロサンテル	30.2	663.1	-	661	60	127	50	315	30
クロルスロン	19.0	380.7	-	380	40	344	10	242	30
ジアベリジン	13.4	260.3	+	261	40	245	30	123	20
ジクロキサシリン	20.3	469.3	+	502	30	160	20	212	30
ジスルホトンスルホン体	24.5	306.4	+	307	20	153	10	97	30
ジニトルミド	17.3	225.2	-	224	20	181	10	77	30
ジノセブ	23.9	240.2	-	239	40	194	20	134	50
ジノテルブ	24.7	240.2	-	239	40	207	20	207	20

表1 検討対象化合物の測定条件等(続き)

イオン化モード +;ESI ポジティブ, -;ESI ネガティブ

化合物名	保持時間 (分)	分子量	イオン化 モード	プリカーサー イオン	コーン電圧 (V)	プロダクトイオン (定量)	プロダクトイオン (定性)	コリジョンエネルギー (定量, eV)	コリジョンエネルギー (定性, eV)
シプロニル	28.2	225.3	+	226	30	93	108	30	30
シマジン	20.2	201.7	+	202	30	132	104	20	30
ジメトエート	17.1	229.3	+	230	20	125	79	20	30
ジヨサマイシン	22.9	828.0	+	829	40	174	109	40	50
スルファジミジン	15.5	278.3	+	279	30	186	124	20	20
スルファジメトキシシン	19.2	310.3	+	311	40	156	92	20	30
スルファドキシシン	17.4	310.3	+	311	30	156	92	20	30
スルファニトラン	21.2	335.3	-	334	50	136	107	30	40
スルファペンズアミド	17.3	276.3	+	277	40	156	92	10	30
スルファメトキシピリダジン	15.6	280.3	+	281	30	156	92	20	30
スルファモイルダブソン	16.5		+	311	40	108	80	20	40
スルファモノメトキシシン	16.4	280.3	+	281	30	156	92	20	30
セトキシジム	31.2	327.5	+	328	20	178	107	20	40
センデュラマイシン	32.1	873.1	+	891	30	629	393	30	30
ダイアジノン	29.4	304.4	+	305	30	169	97	20	30
チアクロプリド	19.0	252.7	+	253	40	126	90	20	40
チアペンダゾール	17.8	201.3	+	202	50	131	175	30	20
5-ヒドロキシチアペンダゾール	14.2	217.3	+	218	50	191	147	20	30
チアムリン	20.7	493.7	+	494	30	192	119	20	40
チアメトキサム	14.9	291.7	+	292	20	211	181	10	20
チオジカルブ	20.9	354.5	+	355	30	88	108	10	20
チオファネート	23.8	370.5	+	371	30	151	93	20	50
チオファネートメチル	20.8	342.4	+	343	30	151	93	20	50
チオベンカルブ	29.5	257.8	+	258	30	125	89	20	60
テコキネート	30.8	417.5	-	416	50	275	200	20	40

表1 検討対象化合物の測定条件等(続き)
イオン化モード +;ESIポジティブ, -;ESIネガティブ

化合物名	保持時間 (分)	分子量	イオン化 モード	プリカーサー イオン	コーン電圧 (V)	プロダクトイオン (定量)	コリジョンエネルギー (定量, eV)	プロダクトイオン (定性)	コリジョンエネルギー (定性, eV)
テトラクロロルビンホス	27.0	366.0	+	367	30	127	10	206	50
テプフェノジド	27.7	352.5	+	353	30	133	20	105	50
テフルベンズロン	29.7	381.1	-	379	20	339	10	196	20
ドラメクチン	33.8	899.1	+	917	20	331	20	145	40
トリアジメノール	24.2	295.8	+	296	20	70	10	57	50
トリアジメホソ	25.9	293.8	+	294	30	69	20	57	50
トリアゾホス	27.2	313.3	+	314	30	162	20	119	40
トリクラベンダゾール	28.3	359.7	+	361	50	346	30	274	40
トリブホス	33.9	314.5	+	315	30	169	20	113	20
トリフルミゾール	29.1	345.8	+	346	20	278	10	179	50
トリフロキシストロピン	30.2	408.4	+	409	20	186	20	145	50
トリフロキシスルプロン	22.1	436.3	+	438	30	182	20	139	40
トリベレナミン	18.5	291.8	+	256	20	211	10	119	30
トリメトプリアム	13.9	290.3	+	291	40	230	20	123	30
トルフェナム酸	26.0	261.7	-	260	30	216	10	-	-
ナイカルバジン	25.5	302.3	-	301	20	137	10	107	30
ナフシリン	18.4	414.5	+	415	20	199	10	171	40
ノルフルラゾン	23.2	303.7	+	304	50	284	20	160	30
ピペロニルブトキシド	31.0	338.4	+	356	20	177	10	119	40
ピメトロジン	12.8	217.2	+	218	30	105	20	78	40
ピラクロストロピン	29.2	387.8	+	388	20	194	10	163	30
ピラクロホス	28.7	360.8	+	361	40	257	20	138	40
ピラゾホス	29.1	373.4	+	374	40	222	20	194	30
ピラントル	14.5	206.3	+	207	60	150	30	136	30
ピリダベン	33.5	364.9	+	365	20	147	30	309	10

表1 検討対象化合物の測定条件等(続き)
イオン化モード +;ESI ポジティブ, -;ESI ネガティブ

化合物名	保持時間 (分)	分子量	イオン化 モード	プリカーサー イオン	コーン電圧 (V)	プロダクトイオン (定量)	プロダクトイオン ギー(定量, eV)	プロダクトイオン (定性)	コリジョンエネルギー ギー(定性, eV)
ビロブキシフェン	31.8	321.4	+	322	20	96	20	134	20
ピリミカルブ	21.6	238.3	+	239	30	72	20	182	20
ピリミホスメチル	30.3	305.3	+	306	40	108	30	164	20
ピリメタミン	17.4	246.7	+	249	40	177	30	233	30
ピルリマイシン	15.9	411.0	+	411	30	112	30	263	20
ファミフェール	25.1	325.3	+	326	30	217	20	93	30
フェナミホス	25.3	303.4	+	304	30	217	20	202	40
フェノキサプロブエチル	30.3	361.8	+	362	40	288	20	121	30
フェノブカルブ	24.9	207.3	+	208	20	95	20	77	40
フェンピロキシメート(E体)	31.3	421.5	+	422	20	366	20	138	30
フェンピロキシメート(Z体)	32.6	421.5	+	422	20	366	20	138	30
フェンブコナゾール	26.6	336.8	+	337	30	125	30	70	20
フェンブピロピモルフ	30.6	303.5	+	304	50	147	30	117	60
フェンヘキサミド	25.8	302.2	+	302	40	97	20	143	30
フェンメデイブアム	24.9	300.3	+	318	20	136	30	168	10
プトロキシジム	30.9	399.5	+	400	30	138	20	354	20
ブラジクアンテル	23.2	312.4	+	313	30	203	20	83	30
フラムプロップメチル	26.8	335.8	+	336	20	105	20	77	50
プリミスルフロンメチル	23.2	468.3	+	469	30	254	20	199	20
フルアズロン	31.0	506.2	+	506	40	349	20	158	20
フルトラニル	27.2	323.3	+	324	30	262	20	242	30
フルバリネート(各異性体の和)	34.3	502.9	-	474	30	169	20	93	40
フルフェナセツト	27.3	363.3	+	364	20	152	20	124	30
フルベンダゾール	21.5	313.3	+	314	40	282	20	123	40
ブレドニゾロン	18.4	360.5	-	329	40	295	20	280	20

表 1 検討対象化合物の測定条件等(続き)

イオン化モード +;ESI ポジティブ, -;ESI ネガティブ

化合物名	保持時間 (分)	分子量	イオン化 モード	プリカーサー イオン	コーン電圧 (V)	プロダクトイオン (定量)	プロダクトイオン (定性)	コリジョンエネルギー (eV)	コリジョンエネルギー (定性)
プロクロラズ	27.5	376.7	+	376	20	308	70	10	30
プロピコナゾール	27.3	342.2	+	342	30	159	69	30	20
プロフェノホス	30.2	373.6	+	375	30	305	128	20	50
プロベタンホス	27.5	281.3	-	280	20	110	170	20	20
プロボキスル	21.3	209.2	+	210	20	111	93	20	30
プロメトリン	26.4	241.4	+	242	40	158	200	20	20
プロモキシニル	18.6	276.9	-	276	40	81	79	20	20
ヘキサジノン	18.8	252.3	+	253	20	171	85	20	30
ペナラキシル	28.2	325.4	+	326	30	148	91	20	50
ペンジルペニシリン	16.4	356.4	+	367	20	160	114	20	40
ペンスルフロンメチル	23.5	410.4	+	411	30	149	182	20	20
ペンダイオカルブ	21.5	223.2	+	224	20	109	167	20	10
ペンフラカルブ	31.0	410.5	+	411	30	195	252	30	10
ホキシム	29.8	298.3	+	299	20	104	216	30	20
ホスメット	25.9	317.3	+	318	20	160	133	20	40
マデユラマイシン	36.0	934.2	+	935	40	629	647	30	20
マラカイトグリーン	24.0	329.5	+	329	50	313	208	40	40
マラチオン	27.1	330.4	+	331	20	127	99	10	20
メシリナム	13.2	325.4	+	326	30	167	139	20	30
メソミル	14.0	162.2	+	163	20	88	106	10	10
メチダチオン	25.3	302.3	+	303	20	145	85	10	20
メトキシフェノジド	26.6	368.5	-	367	30	149	105	20	30
メトスラム	22.1	418.3	+	418	50	175	140	30	50
メトスルフロンメチル	17.7	381.4	+	382	30	167	135	20	30
メビンホス (E体)	16.1	224.2	+	225	20	127	109	20	30

表 1 検討対象化合物の測定条件等(続き)

イオン化モード +;ESI ポジティブ, -;ESI ネガティブ

化合物名	保持時間 (分)	分子量	イオン化 モード	プリカーサー イオン	コーン電圧 (V)	プロダクトイオン (定量)	コリジョンエネルギー (定量, eV)	プロダクトイオン (定性)	コリジョンエネルギー (定性, eV)
メピンホス (Z体)	17.8	224.2	+	225	20	127	20	109	30
メフエンピルジエチル	29.4	373.2	+	373	30	327	10	160	30
メロキシカム	19.4	351.4	+	352	30	115	20	141	20
モネンシン	35.4	670.9	+	694	20	676	40	462	60
セラントル	15.1	220.4	+	221	40	123	40	150	30
ラクトパミン	14.5	301.4	+	302	20	284	10	164	20
ラフオキサニド	32.1	626.0	-	624	60	127	50	345	40
リファキシミン	24.9	785.9	+	787	10	755	20	151	40
リンコマイシン	12.6	406.5	+	407	30	126	30	-	-
ルフェスロン	31.1	511.2	-	509	20	326	20	175	40
レバミゾール	13.2	204.3	+	205	60	178	20	91	30
ロイコマラカイトグリーン	33.5	330.5	+	331	40	239	30	223	60
ロベニジン	25.8	370.7	+	334	40	155	20	138	20
ワルファリン	23.7	308.3	+	309	30	163	20	121	40

表 2 各溶媒における固体脂肪の分散性及び溶解性

	固体脂肪の分散性	固体脂肪の溶解性	
		抽出脂肪量 (g)	抽出脂肪 (%)
メタノール	均一に分散するまで 多少の時間を要する	0.18	3.6
エタノール	速やかに分散	1.41	28.1
アセトン	速やかに分散	4.44	88.8
n-ヘキサン	速やかに分散	4.47	89.5

表3 アセトニトリル/ヘキサン分配における脱脂効果

	脱脂効果	
	残存脂肪量 (mg)	残存脂肪 (%)
アセトニトリル及び n -ヘキサン	36.5	0.73
アセトニトリル及びアセトニトリル飽和 n -ヘキサン	37.3	0.75
n -ヘキサン飽和アセトニトリル及び n -ヘキサン	30.3	0.61
n -ヘキサン飽和アセトニトリル及びアセトニトリル飽和 n -ヘキサン	30.5	0.61

表 4 アセトニトリル/ヘキサン分配における検討対象化合物の回収率

	回収率70～120% の化合物数	回収率の 中央値(%)	回収率の 平均値(%)
アセトニトリル及び n -ヘキサン	146	84.9	83.7
アセトニトリル及びアセトニトリル飽和 n -ヘキサン	148	88.1	86.5
n -ヘキサン飽和アセトニトリル及び n -ヘキサン	148	89.6	88.6
n -ヘキサン飽和アセトニトリル及びアセトニトリル飽和 n -ヘキサン	149	88.7	87.9

表 5 アセトニトリル/*n*-へキサン分配後の *n*-へキサンの液量

	分配後の <i>n</i> -へキサン層の液量	
	抽出脂肪(5.00 g)有り	抽出脂肪無し
アセトニトリル及び <i>n</i> -へキサン	28 mL	23 mL
アセトニトリル及びアセトニトリル飽和 <i>n</i> -へキサン	28 mL	23 mL
<i>n</i> -へキサン飽和アセトニトリル及び <i>n</i> -へキサン	35 mL	30 mL
<i>n</i> -へキサン飽和アセトニトリル及びアセトニトリル飽和 <i>n</i> -へキサン	35 mL	30 mL

表 6 検討対象化合物の C18 ミニカラムからの溶出挙動-①

	回収率70～120% の化合物数	回収率の 中央値 (%)	回収率の 平均値 (%)
アセトニトリル溶液5 mLを負荷後, アセトニトリル5 mLで溶出	121	83.9	73.2
アセトニトリル溶液5 mLを負荷後, メタノール5 mLで溶出	142	84.9	80.9
メタノール溶液5 mLを負荷後, メタノール5 mLで溶出	144	85.1	82.0