

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態勢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残留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。平成 22 年度は種々の畜水産物から可能な限り多種多様な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。平成 23 年度は広範囲な農薬等に適用可能であり、且つ、種々の畜水産物中の試料マトリックス成分を効果的に除去可能なミニカラム精製条件の確立を中心に検討を行った。平成 24 年度は開発した分析法について、畜水産物 10 食品(牛の筋肉、鶏の筋肉、牛の肝臓、牛の脂肪、牛乳、鶏卵、ウナギ、サケ、しじみ及びはちみつ)における添加回収試験を実施し、種々の畜水産物に対する適用性を評価した。以上のような検討から、種々の畜水産物に適用可能な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を開発した。

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二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態勢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農薬及び動物用医薬品を対象として、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。

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。

平成 23 年度は、可能な限り多くの農薬等に適用可能であり、且つ、種々の畜水産物中の試料マトリックス成分を効果的に除去可能なミニカラム精製条件の確立を中心に検討を行った。

平成 24 年度は、開発検討した分析法の種々の畜水産物に対する適用性を評価することを目的として、畜水産物 10 食品(牛の筋肉、鶏の筋肉、牛の肝臓、牛の脂肪、牛乳、鶏卵、ウナギ、サケ、しじみ及びはちみつ)を用いた添加回収試験を実施した。

B. 研究方法

種々の畜水産物中の残留農薬及び動物用医薬品の包括的な分析法を開発するためには、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可能な方法の開発が不可欠である。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、並びにアセトニトリル/ヘキサン分配及びオクタデシルシリル化シリカゲル(C18)ミニカラムを用いた脱脂精製法について検討した。平成 23 年度は、種々の畜水産物中の複雑な試料マトリックスを効果的に除去可能な精製方法について検討した。次いで、検討した抽出法及び精製法を組合せた分析法

を構築し、平成 24 年度は、畜水産物 10 食品を対象とした添加回収試験を実施し、得られた結果から、開発検討した分析法の適用性を評価した。

①対象化合物(開発)

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分析法の開発検討を行うことは効率的ではないため、以下のように分析法開発における対象化合物(対象化合物(開発))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(表 1)。

②対象化合物(適用性確認)

平成 24 年度に実施した、開発した分析法の種々の畜水産物に対する適用性の確認を目的とした添加回収試験においては、畜水産物に基準値が設定されている農薬等のうち、液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計(LC-MS/MS)を用いた測定において良好な測定感度が得られた農薬 206 化合物、動物用医薬品 145 化合物、合計 351 化合物を用いた(表 2)。

③LC-MS/MS 測定条件の検討

対象化合物の LC-MS/MS における測定条件を検討した。すなわち、各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等の最適化を行った。

④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、各有機層を採った。40℃以下で濃縮し、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。

⑤アセトニトリル/ヘキサン分配による脱脂効果及び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、有機層を採った。得られた有機層を40℃以下で濃縮し、溶媒を除去後、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、各対象化合物(開発)の1 mg/L標準溶液20 µLについて、上記と同様にアセトニトリル/ヘキサン分配を行った。アセトニトリル層を40℃以下で濃縮し、溶媒を除去後、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対象化合物(開発)の回収率を求めた。

⑥C18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、各対象化合物(開発)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、各対象化合物(開発)0.004 mg/L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℃以下で濃縮し、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、溶出液中の各対象化合物(開発)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℃以下で濃縮し、溶媒を除去した後、残留物量を測定した。

⑦固体脂肪からの対象化合物の抽出

均一化した牛の脂肪5.00 gを量り採り、40℃で融解した後、各対象化合物(開発)の1 mg/L標準溶液を50 µL添加し、攪拌後-30℃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。有機層を採り、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。有機層を合わせ、アセトンを加えて正確に100 mLとし、この40 mLを採った。40℃以下で濃縮し、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℃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、各対象化合物(開発)の回収率を求めた。

⑧グラファイトカーボン(GCB)ミニカラム精製条件の検討

GCB ミニカラム(Supelclean ENVI-Carb SPE Tubes、250 mg、SUPELCO 製)を用いて、各対象化合物(開発)の溶出条件の検討及び精製効果の確認を行った。すなわち、予め各 GCB ミニカラム溶出液 20 mL を通液して平衡化した GCB ミニカラムに、各対象化合物(開発)0.002 mg/L 溶液(各 GCB ミニカラム溶出液)を 5 mL 注入後、更に各 GCB ミニカラム溶出液 20 mL を注入した。全溶出液を採り、40°C以下で濃縮し、溶媒を除去した後、残留物をアセトニトリル及び 20 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液(pH 4.5)(1:1)混液に溶解して 2 mL とした。これを LC-MS/MS に注入し、GCB ミニカラムからの各対象化合物(開発)の回収率を求めた。

また、畜水産物中の色素等の試料マトリックスの除去効果の確認は、以下の通り行った。畜水産物の中でも色素等の夾雑物が多いと考えられる鶏卵、サケ及びしじみを用い、各試料 10.0 g を量り採り、2 vol%酢酸溶液 10 mL を加えて攪拌した後、アセトン 100 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。有機層を採り、残留物にアセトン 50 mL を加えてホモジナイズし、上記と同様に遠心分離した。有機層を採り、先の有機層と合わせ、アセトンを加えて正確に 200 mL とし、この 10 mL を採った。これにアセトニトリル飽和 *n*-ヘキサン及び *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル各 30 mL ずつを加えて振とう、静

置後、アセトニトリル層を採った。*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、静置後、アセトニトリル層を採り、先に得られたアセトニトリル層と合わせ、40°C以下で約 1 mL まで濃縮した。これを、予めアセトニトリル及び 20 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液(pH 4.5)(9:1)混液 10 mL を通液して平衡化した C18 ミニカラム(InertSep C18、1,000 mg、GL Sciences 製)に注入し、更に同混液 10 mL を注入した。全溶出液を採り、40°C以下で濃縮し、溶媒を除去した後、残留物に各 GCB ミニカラム溶出液 5 mL を加えて溶解した。これを、予め各 GCB ミニカラム溶出液 20 mL を通液して平衡化した GCB ミニカラムに注入し、更に各 GCB ミニカラム溶出液 20 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 20 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液(pH 4.5)(1:1)混液 1 mL を加えて溶解した。

⑨シリカゲル(SI)ミニカラム精製条件の検討

SI ミニカラム(InertSep SI、500 mg、GL Sciences 製)を用いて、各対象化合物(開発)の溶出条件の検討及び精製効果の確認を行った。

すなわち、予め各 SI ミニカラム溶出液 10 mL を通液して平衡化したシリカゲルミニカラムに、各対象化合物(開発)0.002 mg/L 溶液(各 SI ミニカラム溶出液)を 5 mL 注入後、更に各 SI ミニカラム溶出液 20 mL を注入した。全溶出液を採り、40°C以下で濃縮し、溶媒を除去した後、残留物をアセトニトリル及び 20 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液(pH 4.5)(1:1)混液に溶解して 2 mL とした。これを LC-MS/MS に注入し、SI ミニカラムからの各対象化合物(開発)の回収率を求めた。

また、試料マトリックスの除去効果は、牛の肝臓試料を用いた添加回収試験結果から考察した。

⑩添加回収試験(開発)

試料は牛の脂肪、牛の筋肉及び牛の肝臓を用い、各対象化合物(開発)が試料中濃度 0.01 mg/kg となるように添加し、3 併行の添加回収試験を実施した。

牛の脂肪は、均一化後 10.0 g を量り採り、40℃で加温して融解した後、各対象化合物(開発)1 mg/L 標準溶液を100 µL 添加し、攪拌後-30℃で 30 分間放置して再固化させた。これに、エタノール及び酢酸(9:1)混液 10.0 g を添加し、攪拌後室温で 30 分間放置した。牛の筋肉及び肝臓については、適量を量り採り、等量のエタノール及び酢酸(9:1)混液を加えて均一化後、各検討対象化合物 1 mg/L 標準溶液を 100 µL 添加・攪拌し、室温で 30 分間放置した。放置後の試料にアセトン 100 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。有機層を採り、残留物にアセトン 50 mL を加えてホモジナイズし、上記と同様に遠心分離した。有機層を採り、先の有機層と合わせ、アセトンを加えて正確に 200 mL とし、この 10 mL を採った。これに *n*-ヘキサン及び *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル各 30 mL ずつを加えて振とう、静置後、アセトニトリル層を採った。*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、静置後、アセトニトリル層を採り、先に得られたアセトニトリル層と合わせ、40℃以下で約 1 mL まで濃縮した。これを、予めアセトニトリル及び 20 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液(pH 4.5)(9:1)混液 10 mL を通液して平衡化した C18 ミニカラムに注入し、更に同混液 10 mL を注入した。全溶出液を採り、40℃以下で濃縮し、溶媒を除去した後、残留物に酢酸エチル、トルエン及びメタノール(8:1:1)混液 5 mL を加えて溶解した。これを、予め同混液 20 mL を通液して平衡化した GCB ミニカラム

に注入し、更に同混液 20 mL を注入した。全溶出液を採り、40℃以下で濃縮し、溶媒を除去した後、残留物に酢酸エチル、*n*-ヘキサン及びメタノール(2:2:1)混液 5 mL を加えて溶解した。これを、予め同混液 10 mL を通液して平衡化した SI ミニカラムに注入し、更に同混液 20 mL を注入した。全溶出液を採り、40℃以下で溶媒を除去した後、残留物にアセトニトリル及び 20 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液(pH 4.5)(1:1)混液 1 mL を加えて溶解したものを試験溶液とした。

なお、試験溶液中の各対象化合物(開発)の回収率(%)は以下のように求めた。各濃度の標準溶液(アセトニトリル及び 20 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液(pH 4.5)(1:1)混液)それぞれ 5 µL を LC-MS/MS に注入し、ピーク面積から各対象化合物(開発)の検量線を作成した。次いで、試験溶液 5 µL を LC-MS/MS に注入し、得られたピーク面積から絶対検量線法により各対象化合物(開発)の試験溶液中濃度を算出した。得られた試験溶液中濃度の平均値と添加濃度の比から各対象化合物(開発)の回収率(%)を求めた。

⑪開発検討した分析法

試料にアセトン 100 mL 及び酢酸 1 mL を加えてホモジナイズ後、遠心分離した。有機層を採り、残留物にエタノール及び水(1:1)混液 10 mL を加えて攪拌した後、アセトン 50 mL 及び酢酸 1 mL を加えてホモジナイズ及び遠心分離した。有機層を採り、先の有機層と合わせ、アセトンを加えて正確に 200 mL とした。この 10 mL を採り、40℃以下で約 1 mL まで濃縮した。なお、はちみつの場合は、溶媒を除去した後、残留物をアセトニトリル及び 20 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液(pH 4.5)(9:1)混液 2 mL に溶解し、アセトニトリ

ル/ヘキサン分配は省略した。濃縮液に *n*-ヘキサン 30 mL を加えた後、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL ずつで 3 回振とう抽出した。アセトニトリル層を合わせ、40°C 以下で濃縮し、溶媒を除去した。残留物をアセトニトリル及び 20 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 (pH 4.5) (9:1) 混液 2 mL に溶解した。これを予めアセトニトリル 5 mL、アセトニトリル及び 20 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 (pH 4.5) (9:1) 混液 5 mL を順次通液して平衡化した C18 ミニカラムに注入し、さらにアセトニトリル及び 20 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 (pH 4.5) (9:1) 混液 15 mL を注入し、全溶出液を採った。溶出液を 40°C 以下で濃縮し、溶媒を除去した後、得られた残留物を酢酸エチル、トルエン及びメタノール (2:1:2) 混液 2 mL に溶解した。これを、GCB ミニカラム/SI ミニカラム連結カラムに注入し、さらに酢酸エチル、トルエン及びメタノール (2:1:2) 混液 15 mL を注入した後、GCB ミニカラムを取り外し、SI ミニカラムに酢酸エチル、トルエン及びメタノール (2:1:2) 混液 5 mL を注入した。なお、GCB ミニカラムは予め酢酸エチル、トルエン及びメタノール (2:1:2) 混液 15 mL を、SI ミニカラムは酢酸エチル、トリエチルアミン、トルエン及びメタノール (40:1:20:40) 混液 10 mL、酢酸エチル、トルエン及びメタノール (2:1:2) 混液 5 mL を順次注入して平衡化した。全溶出液を採り、40°C 以下で濃縮し、溶媒を除去した後、得られた残留物をアセトニトリル及び 20 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 (pH 4.5) (1:1) 混液 1 mL に溶解したものを試験溶液とした。

⑫ 添加回収試験 (適用性確認)

対象食品は、食品の成分等を考慮して、牛の筋肉、鶏の筋肉、牛の肝臓、牛の脂肪、牛乳、鶏卵、ウナギ、サケ、しじみ及びはちみつの 10 食品を選択して用いた。

各対象食品 10.0 g を採り、エタノール及び水 (1:1) 混液 10 mL を加えてよく攪拌した後、各対象食品中の濃度が 0.01 mg/kg となるように対象化合物 (適用性確認) を添加してよく攪拌したものを添加試料とした。各食品について 5 個の添加試料を作成し、上記の分析法に従って試験溶液を調製した。

各対象化合物の回収率 (%) は次のように求めた。各濃度の対象化合物 (適用性確認) の溶媒標準溶液それぞれ 5 µL を LC-MS/MS に注入し、得られたピーク面積から各対象化合物 (適用性確認) の検量線を作成した。次いで、添加回収試験溶液 5 µL を LC-MS/MS に注入し、得られたピーク面積から絶対検量線法により各対象化合物 (適用性確認) の添加回収試験溶液中の濃度を算出した。得られた濃度の平均値の添加濃度に対する比を求め、これを各対象化合物 (適用性確認) の回収率 (%) とした。

⑬ 試料マトリックスの測定への影響の確認

LC-MS/MS 測定において、試料マトリックスが各対象化合物 (適用性確認) の測定値に及ぼす影響について、以下のように確認した。

まず、ブランク試料 (対象化合物を添加していない各対象食品) について、上記の分析法に従って抽出、精製操作を行った。GCB ミニカラム及び SI ミニカラム精製後の溶出液を 40°C 以下で濃縮し、溶媒を除去した後、得られた残留物を検量線作成用混合標準溶液 (各対象化合物 (適用性確認) 0.005 mg/L) 1 mL に溶解したものをマトリックス添加混合標準溶液とした。

マトリックス添加混合標準溶液及び検量線作成用混合標準溶液 (各対象化合物 (適用性確認) 0.005 mg/L) それぞれ 5 µL を LC-MS/MS に注入し、各対象化合物 (適用性確認) のピーク面積を得た。検量線作成用混合標準溶液のピーク面

積 (PA_{SS}) に対するマトリックス添加混合標準溶液のピーク面積 (PA_{MS}) の比 (PA_{MS}/PA_{SS}) を算出し、試料マトリックスが各対象化合物 (適用性確認) の測定値に及ぼす影響を確認した。

⑭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: 20 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)):

t₀, B=1%; t₅, B=1%; t₃₅, B=100%;

t₄₀, B=100%; t_{40.1}, B=1%; t₅₀, B=1%

流速: 0.4 mL/min

注入量: 5 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: 1.5 kV

イオン化法: エレクトロスプレーイオン化法

(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必要としなかった。

C. 研究結果

①LC-MS/MS における測定

選択した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、0.005

mg/L 標準溶液を測定した際に S/N ≥ 10 のピークが得られた化合物は、農薬で 206 化合物、動物用医薬品で 145 化合物、合計 351 化合物であった。

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 3)。

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 4)。

また、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% 以上であった対象化合物 (開発) の数は、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 5)。

④C18 ミニカラム精製について

C18 ミニカラムからの各対象化合物 (開発) 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、各対象化合物 (開発) 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 以上の液量で対象化合物(開発)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%の対象化合物(開発)の数は 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%の対象化合物(開発)数は 141 であった(表 7)。

各対象化合物(開発)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。

⑥GCB ミニカラム精製について

種々の溶出溶媒を用いて、GCB ミニカラムからの各対象化合物(開発)の溶出挙動を調査した。その結果、アセトン及び *n*-ヘキサン(1:1)混液では 110 化合物について良好な回収率(70%~120%)が得られた。トルエンを加えた溶出液であるアセトン、トルエン及び *n*-ヘキサン(10:1:9)混液では 125 化合物、アセトン及びトルエン(9:1)混液では 135 化合物について良好な回収率が得られた。また、メタノールを加えた溶出液であるアセトン、トルエン及びメタノール(8:1:1)混液では 145 化合物、酢酸エチル、トルエン及びメタノール(8:1:1)混液では 144 化合物について良好な回収率が得られた(表 8)。

また、鶏卵、サケ及びしじみについて、GCB ミ

ニカラム精製による色素等夾雑物の除去効果を視覚的に確認した。各試料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った際に得られた溶液の色は、鶏卵、サケ及びしじみでそれぞれ淡黄色、淡橙色及び淡黄色であった。一方、GCB ミニカラム精製を追加して得られた溶液は、鶏卵、サケ及びしじみともにほとんど無色透明であった。

⑦SI ミニカラム精製について

種々の溶出溶媒を用いて、SI ミニカラムからの各対象化合物(開発)の溶出挙動を調査した。その結果、アセトンを溶出溶媒として用いた場合には 118 化合物、アセトニトリルの場合は 106 化合物、メタノールの場合は 142 化合物について良好な回収率(70%~120%)が得られた。また、アセトン、*n*-ヘキサン及びメタノール(1:3:1)混液では 138 化合物、酢酸エチル、*n*-ヘキサン及びメタノール(2:2:1)混液では 137 化合物について良好な回収率が得られた(表 9)。

また、牛の肝臓試料を用いた添加回収試験を行い、SI ミニカラム精製の効果を確認した。その結果、アセトン、*n*-ヘキサン及びメタノール(1:3:1)混液、もしくは酢酸エチル、*n*-ヘキサン及びメタノール(2:2:1)混液を用いることにより、比較的良好なカラム回収率及び精製効果が得られた。

⑧添加回収試験(開発)

牛の脂肪においては 92 化合物で 70%~120%の回収率が得られ、回収率 70%以下の化合物数は 42、回収率 120%以上の化合物数は 20 であった。牛の筋肉においては 100 化合物で 70%~120%の回収率が得られ、回収率 70%以下の化合物数は 36、回収率 120%以上の化合物数は 18 であった。また、牛の肝臓においては 90 化合物で 70%~120%の回収率が得られ、回

収率 70%以下の化合物数は 37、回収率 120%以上の化合物数は 27 であった(表 10)。なお、検討した 3 試料全てにおいて 70%~120%の回収率が得られた化合物数は 77 であった。

⑨添加回収試験(適用性確認)

畜水産物の中から食品の成分等を考慮して選択した 10 食品(牛の筋肉、鶏の筋肉、牛の肝臓、牛の脂肪、牛乳、鶏卵、ウナギ、サケ、しじみ及びはちみつ)を用いて添加試料を作成し、5 併行の添加回収試験を実施した。結果は以下の通りであった(表 11 及び表 12)。

・牛の筋肉

農薬については、回収率 50%以上の化合物数は 195(95%)、回収率 70%~120%の化合物数は 190(92%)であった。動物用医薬品については、回収率 50%以上の化合物数は 121(83%)、回収率 70%~120%の化合物数は 114(79%)であった。各対象化合物の保持時間と回収率の関係を図 9 に示した。

なお、回収率 50%以上の化合物については、フェノキシメチルペニシリン(回収率 51%、併行精度 20.3%)を除いて、併行精度 20%未満であった。

・鶏の筋肉

農薬については、回収率 50%以上の化合物数は 199(97%)、回収率 70%~120%の化合物数は 190(92%)であった。動物用医薬品については、回収率 50%以上の化合物数は 123(85%)、回収率 70%~120%の化合物数は 117(81%)であった。各対象化合物の保持時間と回収率の関係を図 10 に示した。

なお、回収率 50%以上の化合物については、全て併行精度 20%未満であった。

・牛の肝臓

農薬については、回収率 50%以上の化合物

数は 192(93%)、回収率 70%~120%の化合物数は 171(83%)であった。動物用医薬品については、回収率 50%以上の化合物数は 123(85%)、回収率 70%~120%の化合物数は 107(74%)であった。各対象化合物の保持時間と回収率の関係を図 11 に示した。

なお、回収率 50%以上の化合物については、全て併行精度 20%未満であった。

・牛の脂肪

農薬については、回収率 50%以上の化合物数は 193(94%)、回収率 70%~120%の化合物数は 175(85%)であった。動物用医薬品については、回収率 50%以上の化合物数は 116(80%)、回収率 70%~120%の化合物数は 106(73%)であった。各対象化合物の保持時間と回収率の関係を図 12 に示した。

なお、回収率 50%以上の化合物については、フェノキシメチルペニシリン(回収率 59%、併行精度 25.0%)を除いて、併行精度 20%未満であった。

・牛乳

農薬については、回収率 50%以上の化合物数は 196(95%)、回収率 70%~120%の化合物数は 189(92%)であった。動物用医薬品については、回収率 50%以上の化合物数は 118(81%)、回収率 70%~120%の化合物数は 114(79%)であった。各対象化合物の保持時間と回収率の関係を図 13 に示した。

なお、回収率 50%以上の化合物については、全て併行精度 20%未満であった。

・鶏卵

農薬については、回収率 50%以上の化合物数は 194(94%)、回収率 70%~120%の化合物数は 179(87%)であった。動物用医薬品については、回収率 50%以上の化合物数は 122(84%)、

回収率 70%~120%の化合物数は 117(81%)であった。各対象化合物の保持時間と回収率の関係を図 14 に示した。

なお、回収率 50%以上の化合物については、全て併行精度 20%未満であった。

・ウナギ

農薬については、回収率 50%以上の化合物数は 196(95%)、回収率 70%~120%の化合物数は 177(86%)であった。動物用医薬品については、回収率 50%以上の化合物数は 124(86%)、回収率 70%~120%の化合物数は 114(79%)であった。各対象化合物の保持時間と回収率の関係を図 15 に示した。

なお、回収率 50%以上の化合物については、全て併行精度 20%未満であった。

・サケ

農薬については、回収率 50%以上の化合物数は 197(96%)、回収率 70%~120%の化合物数は 182(88%)であった。動物用医薬品については、回収率 50%以上の化合物数は 124(86%)、回収率 70%~120%の化合物数は 112(77%)であった。各対象化合物の保持時間と回収率の関係を図 16 に示した。

なお、回収率 50%以上の化合物については、インドキサカルブ(回収率 89%、併行精度 25.3%)、セファピリン(回収率 55%、併行精度 25.1%)及びセファレキシシ(回収率 67%、併行精度 27.1%)を除いて、併行精度 20%未満であった。

・しじみ

農薬については、回収率 50%以上の化合物数は 193(94%)、回収率 70%~120%の化合物数は 169(82%)であった。動物用医薬品については、回収率 50%以上の化合物数は 126(87%)、回収率 70%~120%の化合物数は 116(80%)で

あった。各対象化合物の保持時間と回収率の関係を図 17 に示した。

なお、回収率 50%以上の化合物については、ピコリナフェン(回収率 52%、併行精度 24.5%)及びフェノキシメチルペニシリン(回収率 62%、併行精度 20.6%)を除いて、併行精度 20%未満であった。

・はちみつ

農薬については、回収率 50%以上の化合物数は 197(96%)、回収率 70%~120%の化合物数は 188(91%)であった。動物用医薬品については、回収率 50%以上の化合物数は 121(83%)、回収率 70%~120%の化合物数は 94(65%)であった。各対象化合物の保持時間と回収率の関係を図 18 に示した。

なお、回収率 50%以上の化合物については、プレドニゾロン(回収率 56%、併行精度 25.6%)を除いて、併行精度 20%未満であった。

・農薬

検討した 10 食品中 8 食品以上で、回収率 50%以上の化合物数は 192(93%)、回収率 70%~120%の化合物数は 174(84%)であった。9 食品以上で、回収率 50%以上の化合物数は 188(91%)、回収率 70%~120%の化合物数は 164(80%)であった。また、検討 10 食品全てにおいて、回収率 50%以上の化合物数は 181(88%)、回収率 70%~120%の化合物数は 125(61%)であった。

・動物用医薬品

検討した 10 食品中 8 食品以上で、回収率 50%以上の化合物数は 121(83%)、回収率 70%~120%の化合物数は 109(75%)であった。9 食品以上で、回収率 50%以上の化合物数は 116(80%)、回収率 70%~120%の化合物数は 98(68%)であった。また、検討 10 食品全てにおい

て、回収率 50%以上の化合物数は 99(68%)、回収率 70%~120%の化合物数は 59(41%)であった。

⑩試料マトリックスの測定への影響について

各対象化合物及び各対象食品について、検量線作成用混合標準溶液のピーク面積(PA_{SS})に対するマトリックス添加混合標準溶液のピーク面積(PA_{MS})の比(PA_{MS}/PA_{SS})を算出し、試料マトリックスが各対象化合物の測定値に及ぼす影響を確認した。以下に結果を示した(表 13 及び表 14)。

・牛の筋肉

農薬については、 PA_{MS}/PA_{SS} 0.5 以上の化合物数は 202(98%)、 PA_{MS}/PA_{SS} 0.7~1.2 の化合物数は 199(97%)であった。動物用医薬品については、 PA_{MS}/PA_{SS} 0.5 以上の化合物数は 145(100%)、 PA_{MS}/PA_{SS} 0.7~1.2 の化合物数は 145(100%)であった。各対象化合物の保持時間と PA_{MS}/PA_{SS} の関係を図 19 に示した。

・鶏の筋肉

農薬については、 PA_{MS}/PA_{SS} 0.5 以上の化合物数は 205(99%)、 PA_{MS}/PA_{SS} 0.7~1.2 の化合物数は 200(97%)であった。動物用医薬品については、 PA_{MS}/PA_{SS} 0.5 以上の化合物数は 145(100%)、 PA_{MS}/PA_{SS} 0.7~1.2 の化合物数は 143(99%)であった。各対象化合物の保持時間と PA_{MS}/PA_{SS} の関係を図 20 に示した。

・牛の肝臓

農薬については、 PA_{MS}/PA_{SS} 0.5 以上の化合物数は 205(99%)、 PA_{MS}/PA_{SS} 0.7~1.2 の化合物数は 191(93%)であった。動物用医薬品については、 PA_{MS}/PA_{SS} 0.5 以上の化合物数は 143(99%)、 PA_{MS}/PA_{SS} 0.7~1.2 の化合物数は 135(93%)であった。各対象化合物の保持時間と PA_{MS}/PA_{SS} の関係を図 21 に示した。

・牛の脂肪

農薬については、 PA_{MS}/PA_{SS} 0.5 以上の化合物数は 206(100%)、 PA_{MS}/PA_{SS} 0.7~1.2 の化合物数は 204(99%)であった。動物用医薬品については、 PA_{MS}/PA_{SS} 0.5 以上の化合物数は 145(100%)、 PA_{MS}/PA_{SS} 0.7~1.2 の化合物数は 145(100%)であった。各対象化合物の保持時間と PA_{MS}/PA_{SS} の関係を図 22 に示した。

・牛乳

農薬については、 PA_{MS}/PA_{SS} 0.5 以上の化合物数は 204(99%)、 PA_{MS}/PA_{SS} 0.7~1.2 の化合物数は 199(97%)であった。動物用医薬品については、 PA_{MS}/PA_{SS} 0.5 以上の化合物数は 145(100%)、 PA_{MS}/PA_{SS} 0.7~1.2 の化合物数は 144(99%)であった。各対象化合物の保持時間と PA_{MS}/PA_{SS} の関係を図 23 に示した。

・鶏卵

農薬については、 PA_{MS}/PA_{SS} 0.5 以上の化合物数は 205(99%)、 PA_{MS}/PA_{SS} 0.7~1.2 の化合物数は 195(95%)であった。動物用医薬品については、 PA_{MS}/PA_{SS} 0.5 以上の化合物数は 145(100%)、 PA_{MS}/PA_{SS} 0.7~1.2 の化合物数は 143(99%)であった。各対象化合物の保持時間と PA_{MS}/PA_{SS} の関係を図 24 に示した。

・ウナギ

農薬については、 PA_{MS}/PA_{SS} 0.5 以上の化合物数は 204(99%)、 PA_{MS}/PA_{SS} 0.7~1.2 の化合物数は 191(93%)であった。動物用医薬品については、 PA_{MS}/PA_{SS} 0.5 以上の化合物数は 145(100%)、 PA_{MS}/PA_{SS} 0.7~1.2 の化合物数は 141(97%)であった。各対象化合物の保持時間と PA_{MS}/PA_{SS} の関係を図 25 に示した。

・サケ

農薬については、 PA_{MS}/PA_{SS} 0.5 以上の化合物数は 203(99%)、 PA_{MS}/PA_{SS} 0.7~1.2 の化合物

数は 189 (92%) であった。動物用医薬品については、 PA_{MS}/PA_{SS} 0.5 以上の化合物数は 145 (100%)、 PA_{MS}/PA_{SS} 0.7~1.2 の化合物数は 140 (97%) であった。各対象化合物の保持時間と PA_{MS}/PA_{SS} の関係を図 26 に示した。

・しじみ

農薬については、 PA_{MS}/PA_{SS} 0.5 以上の化合物数は 201 (98%)、 PA_{MS}/PA_{SS} 0.7~1.2 の化合物数は 185 (90%) であった。動物用医薬品については、 PA_{MS}/PA_{SS} 0.5 以上の化合物数は 145 (100%)、 PA_{MS}/PA_{SS} 0.7~1.2 の化合物数は 141 (97%) であった。各対象化合物の保持時間と PA_{MS}/PA_{SS} の関係を図 27 に示した。

・はちみつ

農薬については、 PA_{MS}/PA_{SS} 0.5 以上の化合物数は 204 (99%)、 PA_{MS}/PA_{SS} 0.7~1.2 の化合物数は 196 (95%) であった。動物用医薬品については、 PA_{MS}/PA_{SS} 0.5 以上の化合物数は 143 (99%)、 PA_{MS}/PA_{SS} 0.7~1.2 の化合物数は 134 (92%) であった。各対象化合物の保持時間と PA_{MS}/PA_{SS} の関係を図 28 に示した。

・農薬

検討した 10 食品中 8 食品以上で、 PA_{MS}/PA_{SS} 0.5 以上の化合物数は 204 (99%)、 PA_{MS}/PA_{SS} 0.7~1.2 の化合物数は 190 (92%) であった。9 食品以上で、 PA_{MS}/PA_{SS} 0.5 以上の化合物数は 204 (99%)、 PA_{MS}/PA_{SS} 0.7~1.2 の化合物数は 184 (89%) であった。また、検討 10 食品全てにおいて、 PA_{MS}/PA_{SS} 0.5 以上の化合物数は 195 (95%)、 PA_{MS}/PA_{SS} 0.7~1.2 の化合物数は 156 (76%) であった。

・動物用医薬品

検討した 10 食品中 8 食品以上で、 PA_{MS}/PA_{SS} 0.5 以上の化合物数は 145 (100%)、 PA_{MS}/PA_{SS} 0.7~1.2 の化合物数は 141 (97%) であった。9 食

品以上で、 PA_{MS}/PA_{SS} 0.5 以上の化合物数は 145 (100%)、 PA_{MS}/PA_{SS} 0.7~1.2 の化合物数は 141 (97%) であった。また、検討 10 食品全てにおいて、 PA_{MS}/PA_{SS} 0.5 以上の化合物数は 143 (99%)、 PA_{MS}/PA_{SS} 0.7~1.2 の化合物数は 120 (83%) であった。

D. 考察

①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 (88.8%)、*n*-ヘキサンで 4.47 g (89.5%)、メタノールで 0.18 g (3.6%) 及びエタノールで 1.41 g (28.1%) 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農薬等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採用した。

②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対象化合物(開発)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、本分析法におけるアセトニトリル/ヘキサン分配は、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル及び *n*-ヘキサンを用いる方法を採用した。

③C18 ミニカラム精製について

C18 ミニカラムからの各対象化合物(開発)の溶出挙動について調査した。まず、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と考えられたアセトニトリル及びメタノールを溶出溶媒として検討した。

その結果、メタノールを用いた方が、より多くの対象化合物をカラムから良好に溶出可能であることが示された。脱脂効果については、アセトニトリルとメタノールのいずれの溶出溶媒を用いた場合でも、高い精製効果が得られることが確認された。

しかしながら、メタノールを溶出溶媒とした場合、脂肪以外の夾雑成分については精製効果が低いことが確認された。

溶出溶媒について追加検討した結果、アセトニトリル及び 20 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 (pH 4.5) (9:1) 混液を用いることにより、対象化合物の多くをカラムから効率的に溶出可能であり、また、脂肪以外の夾雑成分についても比較的良好的な精製効果が確認されたことから、C18 ミニカラム精製における溶出溶媒としては、アセトニトリル及び 20 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 (pH 4.5) (9:1) 混液を採用した。

④固体脂肪からの農薬等の回収率について

検討した抽出法及び脱脂精製法を組合せ、脂肪からの各対象化合物(開発)の回収率を調査した。すなわち、融解後に各対象化合物(開発)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対象化合物(開発)の回収率を求めた(n=3)。

各対象化合物(開発)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%の対象化合物数は 93(全対象化合物の 57%)、回収率 70%未満の対象化合物数は 44(全対象化合物の 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%未満となった対象化合物数は 17(全対象化合物の 10%)であったことから、およそ 27 の対象化合物

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、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 mg/kg 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%の対象化合物数は 89(全対象化合物の 54%)、回収率 70%未満の対象化合物数は 45(全対象化合物の 27%)であったことから、多くの対象化合物が測定の際にイオン化障害を受けていることが確認された。

各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%の対象化合物数は 141(全対象化合物の 86%)であった。

なお、検討化合物のうち 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、保持時間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。

⑤GCB ミニカラム精製について

種々の畜水産物中の農薬等を効率的且つ高精度に分析するためには、試験溶液中の畜水産物由来の夾雑成分を効果的に除去する必要がある。しかしながら、平成 22 年度に検討した脱脂精製法(アセトニトリル/ヘキサン分配及び C18 ミニカラム精製)だけでは、鶏卵、サケ及びしじみ等の試料で得られる試験溶液は有色であり、色素等の夾雑成分の除去効果が低いことが確認された。そこで、色素等夾雑成分の除去を目的とした GCB ミニカラム精製の追加について検討した。

まず、種々の溶出溶媒を用いた際の各対象化合物(開発)の GCB ミニカラムからの回収率を調査した。GCB ミニカラムの溶出溶媒として一般的に用いられているアセトンと *n*-ヘキサン(1:1)混液(アセトン及び *n*-ヘキサン(1:1)混液を用いて各対象化合物(開発)の回収率を調査したところ、70%以上の回収率が得られた対象化合物数は 110 であり、約 7 割の対象化合物に対して適用可能であることが確認された。GCB ミニカラムからの回収が悪い化合物については、溶出液にトルエンを追加することにより回収が改善される場合があることから、トルエンを追加した溶出液(アセトン、トルエン及び *n*-ヘキサン(10:1:9)混液)を用いた際の回収率を確認した。その結果、良好な回収率が得られる対象化合物数は 125 となり、GCB ミニカラムからの溶出が改善されたことが示された。なお、溶出液中のトルエンの比率については、20%程度のトルエン比率の溶出液を用いた場合、ミニカラムからの溶出は余り改善されず、また、溶出液中のトルエンの除去に長時間を要した。検討の結果、各化合物のミニカラムからの回収率及び溶媒除去に要する時間を考慮すると、溶出液中のトルエン比率は 1 割程度が適切であり、アセトン及びトルエン(9:1)混液を溶出液として用いた場合、良好な回収率が得られる化合物数は 135 であった。しかしながら、GCB ミニカラムからの回収率について、各対象化合物の保持時間に対して回収率をプロットした場合、農薬についてはほとんど全ての化合物で良好な回収率が得られているのに対し(図 3)、動物用医薬品では保持時間の短い化合物、すなわち高極性化合物の一部の回収率が低いことが示された(図 4)。これら高極性化合物の溶解性等を考慮し、高極性溶媒であるメタノールを追加した溶出液(アセトン、トルエン及びメタノール

ル(8:1:1)混液)を用いた場合には、保持時間の短い動物用医薬品の溶出が改善され(図5)、良好な回収率が得られる対象化合物数も増加した。

GCB ミニカラム精製による色素等夾雑物の除去効果については、鶏卵、サケ及びしじみを用いて試験溶液を調製し、得られた試験溶液の色から視覚的に確認した。各試料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って得られた試験溶液は淡橙色(サケ)や淡黄色(鶏卵及びしじみ)であったが、GCB ミニカラム精製を追加することにより、得られる試験溶液はほとんど無色透明となったことから、本精製操作により色素等の夾雑物を効果的に除去可能であったことが推察された。

なお、牛の脂肪、筋肉及び肝臓試料を用いた添加回収試験においては、上記のアセトン、トルエン及びメタノール(8:1:1)混液よりは若干少ないものの、多くの検討対象化合物において良好な回収率が得られたこと、また、以降のシリカゲルミニカラム精製を考慮すると、高極性の夾雑物を溶解し難い溶出液を使用することが望ましいと考えられたことから、酢酸エチル、トルエン及びメタノール(8:1:1)混液を用いた。

更に、様々な試料マトリックスの溶解性等を考慮して溶出溶媒を改良について追加検討を行い、GCB ミニカラム溶出液には酢酸エチル、トルエン及びメタノール(2:1:2)混液を採用した。

⑥SIミニカラム精製について

上記のGCBミニカラム精製により、色素等の夾雑物を効果的に除去することが可能であった。しかしながら、牛の肝臓試料を用いて添加回収試験を行い、得られた試験溶液をLC-MS/MSにて測定したところ、70%~120%の回収率が得られた検討対象化合物は少なく、脂肪類や色素

等以外の夾雑成分も、測定の際、検討対象化合物のイオン化等に大きく影響を与えていることが推察された。特に、保持時間が短い高極性化合物について回収率120%を超えるものが多かったことから、高極性夾雑物の除去を目的としてSIミニカラム精製の追加について検討した。

まず、種々の溶出溶媒を用いた際の各対象化合物(開発)のSIミニカラムからの回収率を調査した。アセトン及びアセトニトリルを用いて各対象化合物の回収率を調査したところ、70%以上の回収率が得られた化合物数はそれぞれ118及び106であり、約7割の対象化合物に対して適用可能であることが確認された。SIミニカラムからの回収率について、各対象化合物の保持時間に対して回収率をプロットした場合、農薬については多くの化合物で良好な回収率が得られているのに対し(図6)、動物用医薬品では多くの化合物がミニカラムからほとんど溶出されていないことが確認された(図7)。溶出溶媒としてメタノールを用いた場合には、動物用医薬品の溶出が改善され(図8)、良好な回収率が得られる対象化合物数は増加したものの、牛の肝臓試料における回収率はほとんど改善されなかったことから、対象化合物の測定に影響を与える夾雑物も同様に溶出され、これら夾雑物の精製効果は低いことが推察された。

これら夾雑物の除去効果を高めるためには極性の低い溶媒を溶出液として使用することが効果的であるが、当然ながら用いる溶出液の極性を低下させることによりSIミニカラムから良好に溶出される化合物数も減少することが予想された。種々の溶媒の組合せ及び混合比率について検討した結果、アセトン、*n*-ヘキサン及びメタノール(1:3:1)混液、もしくは酢酸エチル、*n*-ヘキサン及びメタノール(2:2:1)混液を用いることに

より、比較的多くの対象化合物に適用可能であり、且つ牛の肝臓試料由来の夾雑物を比較的良好に除去可能であることが確認された。

なお、以後の牛の脂肪、筋肉及び肝臓試料を用いた添加回収試験においては、上記2つの溶出液のうち、混液の極性がより低いと考えられる酢酸エチル、*n*-ヘキサン及びメタノール(2:2:1)混液を選択して用いた。

更に、分析法の効率化・省力化を考慮して溶出溶媒の改良を検討した結果、GCB ミニカラムの溶出溶媒として採用した酢酸エチル、トルエン及びメタノール(2:1:2)混液を用いた場合であっても、良好なカラム回収率及び精製効果が得られたことから、SI ミニカラム溶出液にも酢酸エチル、トルエン及びメタノール(2:1:2)混液を採用し、GCB ミニカラム/SI ミニカラム連結カラムを用いた精製法を採用した。

⑦添加回収試験(適用性確認)

本研究において開発検討した分析法について、種々の畜水産物への適用性を確認するために、食品の成分等を考慮して選択した畜水産物 10 食品(牛の筋肉、鶏の筋肉、牛の肝臓、牛の脂肪、牛乳、鶏卵、ウナギ、サケ、しじみ及びはちみつ)を用いた添加回収試験を実施した。

農薬については、対象化合物(206 化合物)の 90%以上が、各対象食品において回収率 50%以上であった。また、対象 10 食品中 9 食品以上で回収率 50%以上の結果が得られた化合物は、対象化合物の 91%であった。動物用医薬品については、対象化合物(145 化合物)の 80%以上が各対象食品において回収率 50%以上であり、対象 10 食品中 9 食品以上で回収率 50%以上の結果が得られた化合物は対象化合物の 80%であった。

以上のように、本研究で開発検討した分析法

は、0.01 mg/kg の添加濃度で、多くの対象食品、並びに多くの対象化合物において 50%以上の回収率が得られたことから、種々の畜水産物中の多くの農薬及び動物用医薬品を効率的に検出可能であると推察された。したがって、本法は畜水産物中に 0.01 mg/kg 以上の濃度で残留する農薬及び動物用医薬品の包括的スクリーニング分析法として有用であると考えられた。

また、対象 10 食品中 9 食品以上で回収率 70%~120%の範囲内の化合物数は、農薬で 168(対象化合物の 80%)、動物用医薬品で 98(対象化合物の 68%)であった。併行精度については、回収率 70%~120%の結果が得られた対象化合物/対象食品の組合せのうち、インドキサカルブ・サケ(回収率 89%、併行精度 25.3%)を除いて 20%未満であり、比較的良好的な精度を有していることが確認された。したがって、良好な回収率及び併行精度が得られたこれらの対象化合物/対象食品の組合せについては、定量性も良好であると推察されることから、残留基準値の適合判定を行うための分析法としても使用できる可能性が高いと考えられた。

⑧試料マトリックスの測定への影響について

各対象化合物及び各対象食品について、検量線作成用混合標準溶液のピーク面積(PA_{SS})に対するマトリックス添加混合標準溶液のピーク面積(PA_{MS})の比(PA_{MS}/PA_{SS})を求め、測定の際に各試料マトリックスが各対象化合物の測定値に及ぼす影響を調査した。

検討 10 食品中 9 食品以上で PA_{MS}/PA_{SS} が 0.7~1.2 の範囲内であった対象化合物数は、農薬で 184(対象化合物の 89%)、動物用医薬品で 141(対象化合物の 97%)であった。したがって、開発検討した分析法で採用した精製操作により、種々の畜水産物中の試料マトリックスを効果的

に除去可能であり、LC-MS/MS 測定において、多くの対象化合物が試料マトリックスの影響を大きく受けることなく測定可能であると推察された。

PA_{MS}/PA_{SS}が 1.2 以上の対象化合物／対象食品の組合せも若干確認されたが、これらの組合せは回収率も同様に高い値を示した。したがって、これらの化合物／食品については、抽出から精製工程における損失は少なく、測定の際に試料マトリックスの影響を受けていると推察された。これらの化合物／食品の組合せについては、0.01 mg/kg 以上の濃度で残留している場合であっても検出されない、すなわち偽陰性の結果を与える可能性は低いため、スクリーニングを目的とした分析には使用可能であると考えられた。しかしながら、ここで得られた測定値は、実際の残留濃度よりも大きく見積もられている可能性が高いため、適切な定量値が得られる分析法を用いた確認が必須であると考えられた。

また、PA_{MS}/PA_{SS}が 0.5 未満の化合物／食品の組合せも幾つか確認された。これらの組合せについては、偽陰性の結果を与える可能性が高いと考えられるため。本報告で開発検討した分析法は適用できず、他の適切な結果が得られる分析法を用いて分析を実施する必要があると考えられた。

一方、PA_{MS}/PA_{SS}の値は各対象食品において良好であるにも関わらず、回収率が低い化合物も確認された。このような結果が得られた化合物は、データは示していないが、本分析法で用いた精製ミニカラムからの回収率が良好でないものがほとんどであった。したがって、これらの化合物については、試料からの抽出が良好であっても、精製工程において回収率が著しく低下するため、本報告で開発検討した分析法の適用は困難と考えられた。

E. 結論

検査機関におけるより効率的な検査態勢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農薬及び動物用医薬品を対象として、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。

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。

平成 23 年度は、色素等夾雑物及び高極性夾雑物の除去を目的としたミニカラム精製法を中心に検討を行った。GCB ミニカラムの溶出液を検討することにより、多くの検討対象化合物に適用可能、且つ色素等夾雑物を効果的に除去可能な精製法を確立した。また、SI ミニカラムの溶出液を検討することにより、多くの検討対象化合物に対して適用可能であり、高極性夾雑物の除去効果を有した精製法を確立した。

平成 24 年度は、平成 22 年度及び 23 年度に検討した抽出法及び精製法に改良を加え、これらを組み合わせた分析法を構築した後、種々の畜水産物に対する適用性を評価することを目的として、畜水産物 10 食品を用いた添加回収試験を実施した。その結果、多くの対象化合物／対象食品の組合せにおいて回収率 50%以上の結果が得られ、測定時の試料マトリックスの影響を大きく受ける化合物／食品の組合せは少なか

ったことから、本研究で開発検討した分析法は、種々の畜水産物中の残留農薬及び動物用医薬品の包括的スクリーニング分析法として有用であると考えられた。また、回収率 70%~120%、且つ併行精度も良好であった化合物/食品の組合せも多く、これらの組合せについては、残留基準値の適合判定を行うための分析法としても使

用できる可能性が高いと考えられた。

F. 研究発表

なし

G. 知的所有権の取得状況

なし。

表1 対象化合物(開発)①

No.	化合物名(動物用医薬品)	No.	化合物名(動物用医薬品)
1	アザペロン	41	ピリメタミン
2	アンピシリン	42	ピルリマイシン
3	イベルメクチン	43	ファミフル
4	エトパベート	44	プラジクアンテル
5	エプリノメクチン	45	フルベンダゾール
6	エリスロマイシン	46	プレドニゾロン
7	オキシクロザニド	47	プロペタンホス
8	オキシベンダゾール	48	ベンジルペニシリン
9	オルメトプリム	49	マデュラマイシン
10	オレアンドマイシン	50	マラカイトグリーン
11	カラゾロール	51	メシリナム
12	キシラジン	52	メロキシカム
13	クマホス	53	モネンシン
14	クレンブテロール	54	モランテル
15	クロキサシリン	55	ラクトパミン
16	クロサンテル	56	ラフォキサニド
17	クロルスロン	57	リファキシミン
18	ジアベリジン	58	リンコマイシン
19	ジクロキサシリン	59	レバミゾール
20	ジニトルミド	60	ロイコマラカイトグリーン
21	ジョサマイシン	61	ロベニジン
22	スルファジミジン	No.	化合物名(農薬兼動物薬)
23	スルファジメトキシ	1	アベルメクチン(B1a、E体)
24	スルファドキシ	2	イソプロチオラン
25	スルファニトラン	3	エマメクチン(B1a、E体)
26	スルファベンズアミド	4	エマメクチン(B1a、Z体)
27	スルファメトキシピリダジン	5	エマメクチン(B1b、E体)
28	スルファモイルダブソン	6	エマメクチン(B1b、Z体)
29	スルファモノメトキシ	7	ダイアジノン
30	センデュラマイシン	8	チアベンダゾール
31	チアムリン	9	5-ヒドロキシチアベンダゾール
32	デコキネート	10	テフルベンズロン
33	ドラメクチン	11	ピペロニルブトキシド
34	トリクラベンダゾール	12	フェノブカルブ
35	トリペレナミン	13	フルアズロン
36	トリメトプリム	14	フルバリネート
37	トルフェナム酸	15	プロポキスル
38	ナイカルバジン	16	ホキシム
39	ナフシリン	17	ワルファリン
40	ピランテル		