

. 分担研究報告

1. 精確な定量法の確立

安定同位体標識標準品による内標準法を用いた
精確な定量法の検討

研究分担者 坂井隆敏

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 26 年度 分担研究報告書

食品中残留農薬等の安全性確保に関する研究

1. 精確な定量法の確立

安定同位体標識標準品による内標準法を用いた精確な定量法の検討

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

食品中残留農薬等分析における安定同位体標識標準品を用いた内標準法の標準的使用法及び評価基準を確立することを目的として、牛の肝臓試料を用いて調製したマトリックス添加標準溶液を LC-MS/MS で測定し、絶対検量線法及び内標準法で定量して両者の結果を比較した。得られた結果から、内標準法を用いて測定の際の試料マトリックスの影響を補正する場合に留意すべき条件等について検討及び考察した。

A. 研究目的

食品に残留する農薬等(農薬、動物用医薬品及び飼料添加物)に関するポジティブリスト制度の導入に伴い、現在約 820 品目を超える農薬等に基準値が設定されている。食品の安全性を確保するためには、膨大な数の残留農薬等进行分析し、精確かつ効率的に分析値を求める必要がある。しかしながら、分析する食品は多種多様であり、農薬等の中には測定の際に食品由来の夾雑成分の影響を受け易いものや、分析操作中に分解・揮散するものなどもあり、精確な分析値を求めることが困難な場合がある。

このような場合には、追加精製や分解等の防止処理などの検討を行うが、時間と手間を要する。精製等の操作を追加することなく、効率的に精確な分析値を求める手法として、安定同位体標識標準品(以下、安定同位体と略す。)による内標準法などの使用が提案されているが、これら手法を使用するための標準的な方法や評価基準などは示されておらず、また、どの程度まで精確な分析値が得られるかなどの詳細な情報は

ほとんど無い。

このように、標準的な方法や評価基準などが示されていない中でも、安定同位体による内標準法が使用されている理由としては、分析対象化合物である農薬等と対応する安定同位体は、質量数が異なることを除けば同一の物質であり、安定同位体を使用しさえすれば、どのような場合であっても精確な補正が可能、すなわち、分析対象農薬等の精確な分析値を得ることが可能と考えられているためと思われる。安定同位体による内標準法が使用されている文献等では、添加回収試験において分析対象化合物の補正後の回収率が 100%に近い値となっているものも多く、このような場合には、実際の分析においても内標準法で補正することにより精確な分析値が得られる可能性が高いと考えられる。一方で、添加回収試験における補正回収率が 100%に近い値となっていないものもあり、このような場合には、実際の分析においても精確な分析値が得られない可能性が高いと考えられる。

以上のような理由から、本研究では、安定同

位体による内標準法を食品中残留農薬等分析に適用するに当たり、精確な分析値を得るために必要な標準的使用方法及び評価方法の確立について検討する。

初年度である平成 25 年度は、先ず、検討対象化合物を液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計(LC-MS/MS)で測定し、安定同位体の標識同位体の種類や数、測定条件など、内標準法を適用する上で精確な定量に影響を及ぼす可能性がある因子について考察した。

平成 26 年度は、LC-MS/MS 測定の際の試料マトリックスの影響を内標準法で精確に補正する場合に考慮すべき条件等を明らかにすることを目的として、牛の肝臓試料を用いて調製したマトリックス添加標準溶液を LC-MS/MS で測定し、絶対検量線法及び内標準法で得られた結果を比較・考察した。

B. 研究方法

検討対象農薬等及び安定同位体

検討対象農薬等は、平成 25 年度と同様、スルファジミジン、スルファメトキサゾール、チアベンダゾール及びトリメトプリムを用いた。なお、これら農薬等は、以降それぞれ SDZ、SMXZ、TBZ 及び TMP と略して記載した。

また、対応する安定同位体についても、平成 25 年度と同様、重水素(d)標識もしくは炭素¹³C(¹³C)標識された、SDZ-*d*₄、SDZ-¹³C₆、SMXZ-*d*₄、SMXZ-¹³C₆、TBZ-*d*₆、TBZ-¹³C₆、TMP-*d*₃、TMP-¹³C₃、TMP-*d*₉を選択して用いた(表 1)。

標準原液及び標準溶液の調製

選択した検討対象農薬等及び対応する安定同位体について、それぞれ 1 mg/mL の標準原液を調製した。次いで、調製した標準原液を 0.1 vol% ギ酸及び 0.1 vol% ギ酸・アセトニトリル溶液

(1:1)混液を用いて希釈・混合し、必要な濃度の標準溶液もしくは混合標準溶液を調製した。

タンデム型質量分析条件の設定

調製した標準溶液を用いて、タンデム型質量分析計(MS/MS)における測定条件の最適化を行った。すなわち、各検討対象農薬等及び対応する安定同位体の 100 ng/mL 標準溶液をそれぞれフローインジェクション分析で 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、コーン電圧及びコリジョンエネルギー等の測定パラメーターを最適化した。

液体クロマトグラフィー測定条件

液体クロマトグラフ(LC)における測定条件は、平成 25 年度に検討・設定した 3 つの条件を使用した。

LC-MS/MS 測定

設定した LC-MS/MS 測定条件を用いて溶媒標準溶液及びマトリックス添加標準溶液を測定し、各検討対象農薬等及び対応する安定同位体のピーク面積を求めた。

得られたピーク面積から、絶対検量線法及び内標準法により、調製したマトリックス添加標準溶液中の各検討対象化合物の濃度を求めた。

マトリックス添加標準溶液の調製

マトリックス添加標準溶液は、以下に示す方法により調製した。

均一化した牛の肝臓試料 10.0 g を採り、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 50 mL 及び *n*-ヘキサン 50 mL を加えてホモジナイズした。無水硫酸ナトリウム 20 g を加えて再度ホモジナイズした後、毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離した。*n*-ヘキサン層を除去し、アセトニトリル層を採った。残留物に、アセトニトリル 50 mL を加えてホモジナイズ及び遠心分離後、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、アセトニトリル

を加えて 100 mL に定容した。この 20 mL (試料 2.00 g 相当量) を採り、40 以下で濃縮し、溶媒を除去した。

得られた残留物に、0.02 mg/L の各検討対象農薬等及び対応する安定同位体を含む標準溶液 1 mL を添加して溶解し、これをマトリックス添加標準溶液とした。

なお、上記の標準溶液の代わりに、0.1 vol% ギ酸及び 0.1 vol% ギ酸・アセトニトリル溶液 (1:1) 混液 1 mL を加えて溶解したものを、ブランク試験溶液とした。

定量

マトリックス添加標準溶液中の各検討対象農薬等の定量は、以下の通り行った。

絶対検量線法による定量においては、各検討対象農薬等について 0.01 mg/L、0.015 mg/L、0.02 mg/L、0.025 mg/L 及び 0.03 mg/L の溶媒標準溶液を調製後、それぞれ LC-MS/MS で測定し、得られたピーク面積値から検量線を作成した。次に、マトリックス添加標準溶液を LC-MS/MS で同様に測定し、各検討対象農薬等のピーク面積値から、溶液中の含有量 (回収率) を求めた。

内標準法による定量においては、上記の絶対検量線法による定量で用いたものと同濃度の溶媒標準溶液に、安定同位体を 0.02 mg/L となるように添加した標準溶液を調製した。それぞれの標準溶液を LC-MS/MS で測定し、各検討対象農薬等のピーク面積値と対応する安定同位体のピーク面積値の比を算出し、検量線を作成した。次に、マトリックス添加標準溶液を測定し、各検討対象農薬等のピーク面積値と対応する安定同位体のピーク面積値の比から、溶液中の含有量 (回収率) を求めた。

装置及び測定条件

以下に、研究で使用した装置及び測定条件

を示した。

・LC

高速液体クロマトグラフ : Acquity UPLC (Waters 製)

分析カラム : L-column2 ODS (内径 3 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 µm、化学物質評価研究機構製)

カラム温度 : 40

移動相 : 0.1 vol% ギ酸 (A 液) 及び 0.1 vol% ギ酸・アセトニトリル溶液 (B 液)

グラジエント条件 (t: 時間 (分))

t₀, B=1%; t₅, B=1%; t₃₀, B=63.5%; t_{30.1}, B=99%; t₃₅, B=99%; t_{35.1}, B=1%; t₄₅, B=1%

グラジエント条件 (t: 時間 (分))

t₀, B=1%; t₅, B=1%; t₂₅, B=67%; t_{25.1}, B=99%; t₃₀, B=99%; t_{30.1}, B=1%; t₄₀, B=1%

グラジエント条件 (t: 時間 (分))

t₀, B=1%; t₅, B=1%; t₂₀, B=61%; t_{20.1}, B=99%; t₂₅, B=99%; t_{25.1}, B=1%; t₃₅, B=1%

流速 : 0.4 mL/分

注入量 : 1 µL

・質量分析

MS/MS : Xevo TQ-S (Waters 製)

ソース温度 : 150

脱溶媒温度 : 600

窒素ガス流量 : 1000 L/hr

コーンガス流量 : 150 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 (ポジティブイオンモード)

C. 研究結果

検量線

調製した標準溶液を LC-MS/MS で測定し、得られたピーク面積値 (内標準法の場合は、各検討対象農薬等のピーク面積値と対応する安定同位体のピーク面積値の比) から検量線を作成したところ、全ての検討対象農薬等について、全ての LC 条件下で、決定係数は 0.99 以上と良好であった。

ブランク試験溶液の測定

先ず、ブランク試験溶液を調製して LC-MS/MS で測定した。その結果、検討対象農薬等及び対応する安定同位体に由来するピーク、並びにこれらの定量を妨害するピークは確認されなかった。

絶対検量線法による回収率

調製したマトリックス添加標準溶液中の各検討対象農薬等を、絶対検量線法で定量した場合の回収率を表 2 に示した。

マトリックス添加標準溶液においては、調製後の溶液中で検討対象農薬等が安定に存在し、測定の際に試料マトリックスの影響が無ければ、得られる回収率は 100% の近似値となる。

表 2 に示されるように、検討対象農薬等の種類や測定の際の LC 条件によっては、回収率が 100% に近い値とならず、測定の際に試料マトリックスの影響を受けていることが推察された。

内標準法による回収率

調製したマトリックス添加標準溶液中の各検討対象農薬等を、対応する安定同位体を用いた内標準法で定量した場合の回収率を表 3 及び表 4 に示した。

対応する安定同位体を用いた内標準法により、測定の際の試料マトリックスの影響を精確に補正することが出来れば、得られる回収率は 100% の近似値となる。

表 3 に示されるように、d 標識した安定同位体を用いた場合には、検討対象農薬等の種類や測定の際の LC 条件によっては、回収率が 100% に近い値とならない場合があることが確認された。一方、表 4 に示されるように、¹³C 標識した安定同位体を用いた場合には、各検討対象農薬等について、各 LC 条件下で、100% に近い回収率が得られた。

マトリックス添加標準溶液中と溶媒標準溶液中におけるピーク面積

測定の際の試料マトリックスの影響の有無を確認するため、各検討対象農薬等及び対応する安定同位体について、溶媒標準溶液におけるピーク面積値とマトリックス添加標準溶液におけるピーク面積値の比を算出した。

すなわち、マトリックス添加標準溶液を測定して得られたピーク面積値 (PA_{Mstd}) を、0.02 mg/L の溶媒標準溶液を測定して得られたピーク面積値 (PA_{Std}) で除し、100 を乗じた値 ($PA_{Mstd}/PA_{Std} \times 100$ 値) を算出し、各検討対象農薬等及び対応する安定同位体が測定の際に受ける試料マトリックスの影響の指標とした。

結果を表 5 に示した。

保持時間

表 6 に、各 LC 条件下における各検討対象農薬等及び対応する安定同位体の保持時間を示した。

表 6 に示されるように、各 LC 条件下において、各検討対象農薬等と対応する ¹³C 標識安定同位体の保持時間はほとんど一致していた。

一方、d 標識体については、数秒程度ではあるものの、対応する各検討対象農薬等よりも早く溶出することが確認された。

D. 考察

検量線

調製した標準溶液を測定して作成した検量線は、絶対検量線法用の検量線及び内標準法用の検量線ともに、全ての検討対象化合物について、全ての LC 条件下で決定係数 0.99 以上と良好であった。このことから、調製したマトリクス添加標準溶液を測定して得られた各検討対象農薬等の定量結果は、概ね信頼性の高い値であると考えられた。

ブランク試験溶液の測定

ブランク試験溶液を調製して測定した結果、検討対象農薬等及び対応する安定同位体由来するピークは確認されなかった。このことから、本研究で使用した牛の肝臓試料には、検討対象農薬等及び対応する安定同位体は含まれていないことが確認された。また、各検討対象農薬等及び安定同位体のピーク近傍には、これらの定量を妨害するピークは確認されなかった。

以上の結果から、調製したマトリクス添加標準溶液の測定で得られた各検討対象農薬等及び対応する安定同位体のピークは、全て添加した化合物に由来するものと考えられた。

絶対検量線法による回収率

絶対検量線法により、調製したマトリクス添加標準溶液中の各検討対象農薬等を定量した結果、表 2 に示される回収率となった。

マトリクス添加標準溶液においては、抽出や精製など、溶液の調製工程における損失が無いため、調製後の溶液中で検討対象農薬等が安定に存在し、且つ測定の際に試料マトリクスの影響が無ければ、得られる回収率は 100% の近似値となる。

SMXZ については、各 LC 条件において 100% に近い回収率となり、測定の際に試料マトリクスの影響をほとんど受けていないことが示

唆された。

SDZ 及び TMP については、グラジエント条件では 100% に近い回収率となり、測定の際に試料マトリクスの影響をほとんど受けていないことが示唆されたものの、グラジエント条件及び では 80% 程度の回収率となり、測定の際に試料マトリクスの影響を受けていることが示唆された。

TBZ については、グラジエント条件及び で回収率 80% 程度、グラジエント条件 で回収率 70% 程度となり、本研究で用いた検討対象農薬等の中では、測定の際に受ける試料マトリクスの影響が最も大きいことが示唆された。なお、調製したマトリクス添加標準溶液中で分解等により濃度が減少している可能性も考えられたが、同一のマトリクス添加標準溶液を、グラジエント条件 の順序で測定しており、回収率がそれぞれ 84% 66% 82% と推移していることから、低回収率が得られた原因は、溶液中での減少によるものではなく、測定の際の試料マトリクスの影響が大きいためと考えられた。

内標準法による回収率

一般的な内標準法は、抽出から測定まで、全ての分析工程において分析対象化合物の濃度を精確に補正可能として使用されていると考えられる。本研究では、先ず、測定の際の試料マトリクスの影響を精確に補正可能であるかについて検討することを目的として、マトリクス添加標準溶液を調製、測定した。

内標準法により、調製したマトリクス添加標準溶液中の各検討対象農薬等を定量した結果、表 3 及び表 4 に示される回収率となった。

内標準法により、測定の際の試料マトリクスの影響を精確に補正可能であれば、得られる回収率は 100% の近似値となるが、d 標識安定同

位体を用いた場合には、グラジエント条件 における TMP(TMP- d_9 使用時、108%)、グラジエント条件 における SDZ(92%)、TBZ(89%)及び TMP(TMP- d_3 使用時、112%)など、検討対象農薬等の種類やグラジエント条件によっては、回収率が100%に近い値とならない場合があることが確認された。

このような場合、実際の検査において内標準法を用いて定量した場合であっても、得られた定量値は実際の濃度と異なり、偽陰性や疑陽性といった望ましくない結果を与える可能性があると考えられた。

マトリックス添加標準溶液中の検討対象農薬等を内標準法で定量した場合、測定の際の試料マトリックスの影響を精確に補正することができれば、すなわち、検討対象農薬等と対応する安定同位体が同等の試料マトリックスの影響を受けていれば、得られる回収率は100%に近い値となる。100%に近い回収率が得られない場合もあったことから、検討対象農薬等と対応する安定同位体が同等の試料マトリックスの影響を受けていない場合もあることが推察された。

一方、表4に示されるように、 ^{13}C 標識安定同位体を用いた場合には、各検討対象農薬等について、各グラジエント条件下で、100%に近い回収率が得られた。このことから、 ^{13}C 標識安定同位体については、対応する各検討対象農薬等と同等の試料マトリックスの影響を受けていることが推察された。

マトリックス添加標準溶液中と溶媒標準溶液中のピーク面積比

測定の際にどの程度の試料マトリックスの影響を受けているかを確認するために、 $\text{PA}_{\text{Mstd}}/\text{PA}_{\text{Sstd}} \times 100$ 値を算出した。

各検討対象農薬等及び対応する安定同位体

の $\text{PA}_{\text{Mstd}}/\text{PA}_{\text{Sstd}} \times 100$ 値は、表5に示されるとおりであった。

各検討対象農薬等の $\text{PA}_{\text{Mstd}}/\text{PA}_{\text{Sstd}} \times 100$ 値については、当然のことではあるが、表2に示された絶対検量線法による各検討対象農薬等の回収率とほとんど同様の値となった。

各検討対象農薬等に対応する d 標識安定同位体については、グラジエント条件 における SDZ- d_4 (92%)、TBZ- d_6 (73%) 及び TMP- d_3 (77%)など、それぞれ対応する各検討対象農薬等の $\text{PA}_{\text{Mstd}}/\text{PA}_{\text{Sstd}} \times 100$ 値 (SDZ:84%、TBZ:67%及び TMP:85%)と異なる値が得られた。これらの検討対象農薬等については、マトリックス添加標準溶液を内標準法で定量した際の回収率が100%に近い値となっていなかった (SDZ:92%、TBZ:89%及び TMP(TMP- d_3 使用時):112%)。これらの結果から、グラジエント条件等によっては、内標準法を用いても精確な定量値が得られない場合もあり、精確な定量値を得るためには、分析対象化合物と対応する安定同位体が同程度の試料マトリックスの影響を受ける条件下で測定することが必須であると考えられた。

一方、 ^{13}C 標識安定同位体の $\text{PA}_{\text{Mstd}}/\text{PA}_{\text{Sstd}} \times 100$ 値については、グラジエント における TMP- $^{13}\text{C}_3$ を除いて、検討対象農薬等の $\text{PA}_{\text{Mstd}}/\text{PA}_{\text{Sstd}} \times 100$ 値と同様の値であった。これらの結果から、TMP- $^{13}\text{C}_3$ を除く ^{13}C 標識安定同位体については、測定の際、対応する検討対象農薬等と同程度の試料マトリックスの影響を受けており、その結果、内標準法で定量した際には100%に近い回収率が得られたものと推察された。

なお、TMP- $^{13}\text{C}_3$ については、グラジエント条件 において、 $\text{PA}_{\text{Mstd}}/\text{PA}_{\text{Sstd}} \times 100$ 値が88%であり、TMPの $\text{PA}_{\text{Mstd}}/\text{PA}_{\text{Sstd}} \times 100$ 値(97%)と同程度

の値が得られなかったものの、マトリックス添加標準溶液を内標準法で定量した場合の回収率は 100%に近い値であった。このような結果が得られた原因としては、測定機器の感度変動や測定間における試料マトリックスの影響の違いなどが考えられたが、TMP- $^{13}\text{C}_3$ のピーク面積値と TMP のピーク面積値の減少の程度が同等であったため、内標準法で定量した場合には良好な回収率が得られたものと推察された。

保持時間

各グラジエント条件における各検討対象農薬等及び対応する安定同位体の保持時間を表 6 に示した。また、マトリックス添加標準溶液の測定における各検討対象農薬等及び対応する安定同位体のクロマトグラムを図 1～図 4 に示した。

表 6 及び図 1～図 4 に示されるように、各グラジエント条件において、各検討対象農薬等と対応する ^{13}C 標識安定同位体の保持時間はほとんど一致していた。これらの結果から、3～6 程度の標識数の ^{13}C 標識安定同位体は、対応する各検討対象農薬等と同時に分析カラムから溶出していることが確認された。これに伴い、質量分析において試料マトリックスの影響があった場合であっても、検討対象農薬等と安定同位体が同等の影響を受けるため、内標準法で定量した場合には試料マトリックスの影響が補正された精確な定量値が得られる可能性が高いと考えられた。

一方、d 標識安定同位体は、数秒程度ではあるが対応する検討対象農薬等よりも早く溶出することが確認された。これらの結果から、各検討対象農薬等と対応する d 標識安定同位体は分析カラムから同時には溶出せず、試料マトリックス成分の溶出時間や量などによっては、質量分析において検討対象農薬等と対応する安定同

位体が同等の影響を受けず、内標準法で定量した場合であっても精確に試料マトリックスの影響を補正できず、精確な定量値が得られない場合もあることが示唆された。

本検討で得られた結果をグラジエント条件ごとに比較すると、溶出溶媒であるアセトニトリルの濃度の増加の勾配が大きくなる程、質量分析における試料マトリックスの影響は増加し、各検討対象農薬等と対応する d 標識安定同位体の保持時間の差は減少し、内標準法により定量したマトリックス添加標準溶液中の各検討対象農薬等の回収率は 100%に近い値となる傾向が確認された。

アセトニトリル濃度の増加勾配が小さい場合、検討対象農薬等と試料マトリックス成分との分離は良いが、各検討対象農薬等と対応する d 標識安定同位体も分離され、質量分析における試料マトリックスの影響の程度に違いが生じることが、内標準法で定量した際に精確な定量値が得られない原因となることが推察された。

一方、アセトニトリル濃度の増加勾配が大きい場合、検討対象農薬等と試料マトリックス成分との分離が悪く、質量分析における試料マトリックスの影響は大きくなるが、各検討対象農薬等と対応する d 標識安定同位体の分離も悪くなるため、質量分析において受ける試料マトリックスの影響の程度が近くなり、結果として内標準法により定量した場合には精確な定量値を得る可能性が高くなると推察された。

以上のことから、d 標識安定同位体を用いた内標準法により定量する場合には、質量分析における試料マトリックスの影響が大きくなる可能性はあるものの、出来る限り溶出溶媒の濃度の増加勾配を大きくし、分析対象化合物と対応する安定同位体の保持時間の差が小さい条件で

測定することが良いと考えられた。

E. 結論

研究初年度である平成 25 年度は、検討対象農薬等及び対応する安定同位体を LC-MS/MS で測定し、得られた結果を基に、安定同位体を用いた内標準法を使用した際に、分析結果に影響を及ぼし得る条件や因子等について考察した。本年度は、牛の肝臓試料から調製したマトリックス添加標準溶液を 3 つの異なるグラジエント条件下で測定し、絶対検量線法及び内標準法で定量して得られた結果を比較・解析することで、

内標準法を用いて精確な分析値を得るために必要な条件等を考察した。

平成 27 年度は、種々の畜水産物を対象として添加回収試験を実施し、内標準法による定量をどの程度まで適用可能であるかを検証する。

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1 本研究で使用した検討対象農薬等及び対応する安定同位体

	分子量	記載純度 (%)	純度算出方法	標識位置	標識位置 (推定)
SDZ	250.3	99.8	HPLC		
SDZ- d_4	254.3	99.9	記載無し	記載無し	フェニル基
SDZ- $^{13}C_6$	256.2	99.7	HPLC	フェニル基	
SMXZ	253.3	99.0	HPLC		
SMXZ- d_4	257.3	97.4	記載無し	記載無し	フェニル基
SMXZ- $^{13}C_6$	259.2	99.3	HPLC	フェニル基	
TBZ	201.3	99.9	GC		
TBZ- d_6	207.3	98.0	HPLC	記載無し	全てのC-H結合
TBZ- $^{13}C_6$	207.3	97.1	記載無し	フェニル基	
TMP	290.3	100.0	HPLC		
TMP- d_3	293.3	99.6	atom%D	4-メトキシ基	
TMP- $^{13}C_3$	293.3	99.0	記載無し	記載無し	ピリミジン環 (4つの炭素の内の3つ)
TMP- d_9	299.4	99.9	HPLC	3,4,5-トリメトキシ基	

表 2 絶対検量線法によるマトリックス添加標準溶液中の各検討対象農薬等の回収率

	回収率(%)		
	グラジエント条件 (勾配2.5%/分)	グラジエント条件 (勾配3.3%/分)	グラジエント条件 (勾配4.0%/分)
SDZ	95	84	82
SMXZ	96	99	93
TBZ	84	66	82
TMP	96	84	82

表 3 d 標識安定同位体を用いた内標準法によるマトリックス添加標準溶液中の
各検討対象農薬等の回収率

	回収率 (%)		
	グラジエント条件 (勾配2.5%/分)	グラジエント条件 (勾配3.3%/分)	グラジエント条件 (勾配4.0%/分)
SDZ (SDZ- d_4 使用)	96	92	106
SMXZ (SMXZ- d_4 使用)	100	99	100
TBZ (TBZ- d_6 使用)	97	89	98
TMP (TMP- d_3 使用)	104	112	100
TMP- d_9 (TMP- d_9 使用)	108	101	96

表 4 ^{13}C 標識安定同位体を用いた内標準法によるマトリックス添加標準溶液中の
各検討対象農薬等の回収率

	回収率 (%)		
	グラジエント条件 (勾配2.5%/分)	グラジエント条件 (勾配3.3%/分)	グラジエント条件 (勾配4.0%/分)
SDZ (SDZ- $^{13}\text{C}_6$ 使用)	100	102	102
SMXZ (SMXZ- $^{13}\text{C}_6$ 使用)	102	102	101
TBZ (TBZ- $^{13}\text{C}_6$ 使用)	100	100	100
TMP (TMP- $^{13}\text{C}_3$ 使用)	101	100	100

表 5 各検討対象農薬等及び対応する安定同位体の $PA_{Mstd}/PA_{Sstd} \times 100$ 値

	$PA_{Mstd}/PA_{Sstd} \times 100$ 値		
	グラジエント条件 (勾配2.5%/分)	グラジエント条件 (勾配3.3%/分)	グラジエント条件 (勾配4.0%/分)
SDZ	94	84	82
SDZ- d_4	100	92	79
SDZ- $^{13}C_6$	91	82	82
SMXZ	97	99	95
SMXZ- d_4	96	99	95
SMXZ- $^{13}C_6$	98	98	93
TBZ	84	67	80
TBZ- d_6	88	73	82
TBZ- $^{13}C_6$	83	68	80
TMP	96	85	81
TMP- d_3	97	77	81
TMP- d_9	95	86	88
TMP- $^{13}C_3$	88	84	77

表 6 各検討対象農薬等及び対応する安定同位体の保持時間

	グラジエント条件 (勾配2.5%/分)			グラジエント条件 (勾配3.3%/分)			グラジエント条件 (勾配4.0%/分)		
	保持時間 (分)	差(分)	差(秒)	保持時間 (分)	差(分)	差(秒)	保持時間 (分)	差(分)	差(秒)
SDZ	12.15	/	/	11.47	/	/	11.05	/	/
SDZ- d_4	12.09	-0.06	-3.6	11.41	-0.06	-3.6	11.01	-0.04	-2.4
SDZ- $^{13}C_6$	12.15	0	0	11.47	0	0	11.05	0	0
SMXZ	17.94	/	/	16.00	/	/	14.88	/	/
SMXZ- d_4	17.89	-0.05	-3.0	15.96	-0.04	-2.4	14.85	-0.03	-1.8
SMXZ- $^{13}C_6$	17.94	0	0	16.00	0	0	14.88	0	0
TBZ	12.18	/	/	11.28	/	/	10.75	/	/
TBZ- d_6	12.12	-0.06	-3.6	11.22	-0.06	-3.6	10.69	-0.06	-3.6
TBZ- $^{13}C_6$	12.18	0	0	11.28	0	0	10.75	0	0
TMP	12.71	/	/	11.63	/	/	11.03	/	/
TMP- d_3	12.68	-0.03	-1.8	11.61	-0.02	-1.2	11.00	-0.03	-1.8
TMP- d_9	12.61	-0.10	-6.0	11.55	-0.08	-4.8	10.95	-0.08	-4.8
TMP- $^{13}C_3$	12.71	0	0	11.63	0	0	11.03	0	0

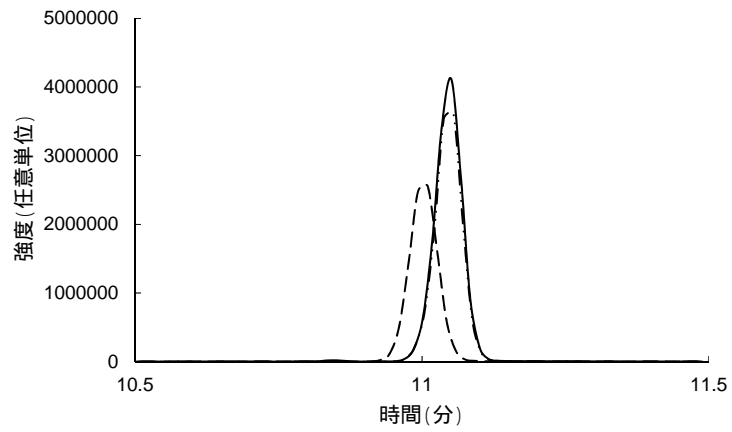
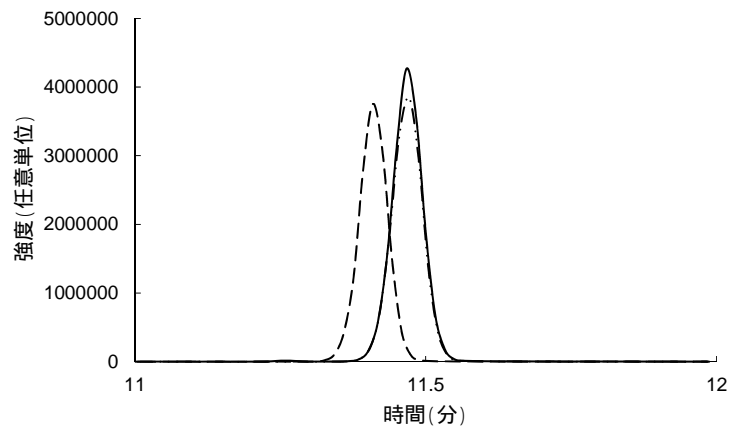
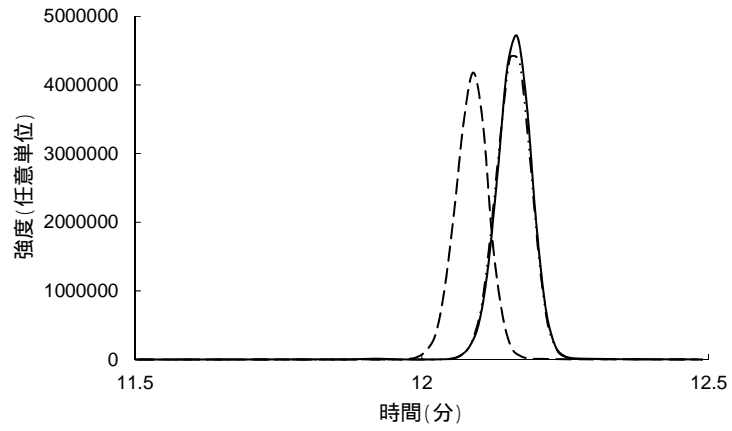


図1 マトリックス添加標準溶液中のSDZ、SDZ- d_4 及びSDZ- $^{13}C_6$ のクロマトグラム
 — :SDZ、 — — — :SDZ- d_4 、 - · - · - :SDZ- $^{13}C_6$
 上: グラジエント条件
 中: グラジエント条件
 下: グラジエント条件

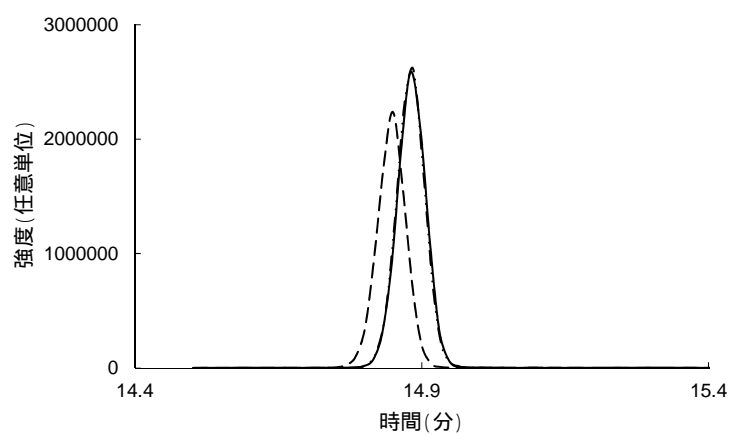
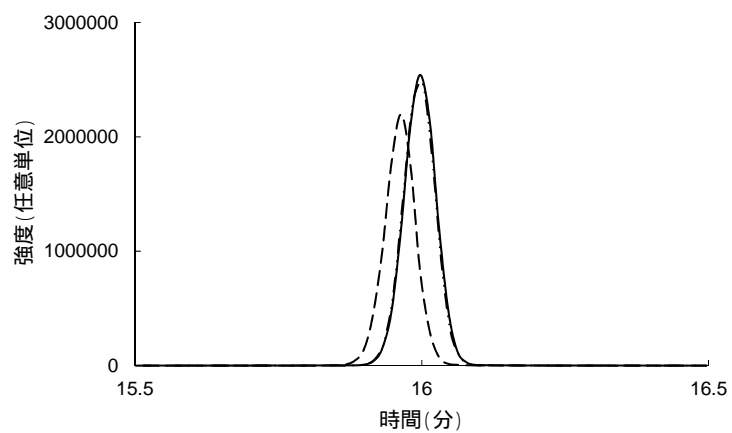
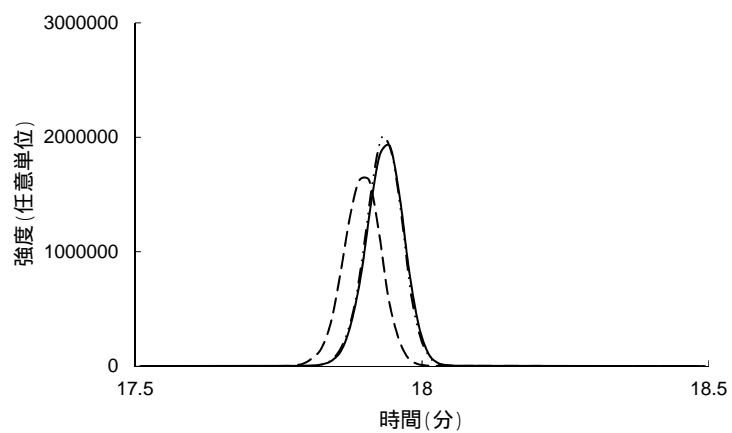


図2 マトリックス添加標準溶液中の SMXZ、SMXZ- d_4 及び SMXZ- $^{13}C_6$ のクロマトグラム
 — : SMXZ、 — — — : SMXZ- d_4 、 - · - · : SMXZ- $^{13}C_6$
 上: グラジエント条件
 中: グラジエント条件
 下: グラジエント条件

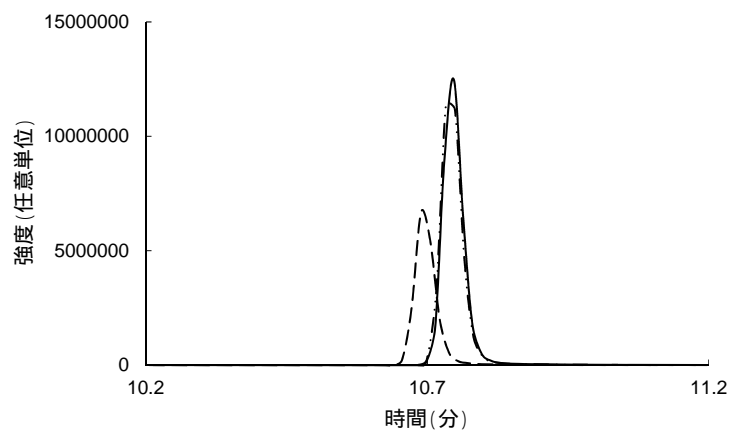
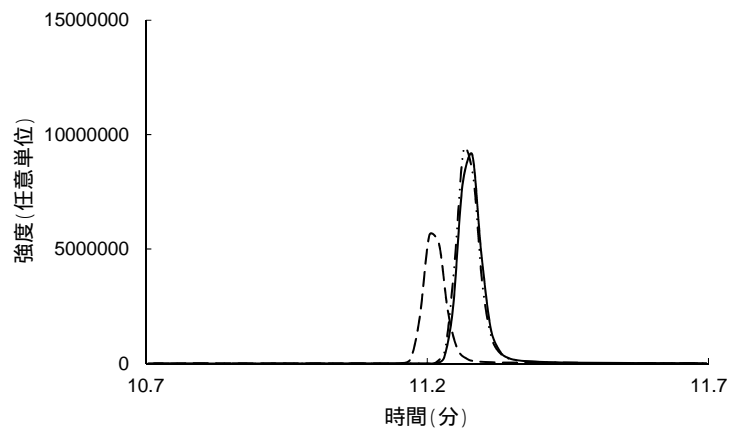
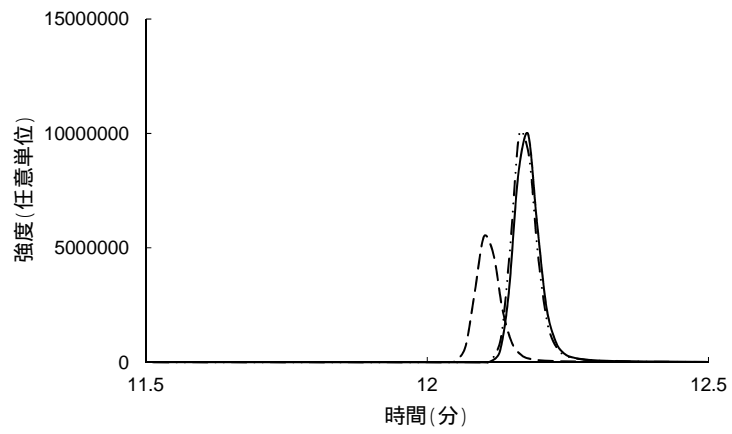


図3 マトリックス添加標準溶液中のTBZ、TBZ- d_4 及びTBZ- $^{13}C_6$ のクロマトグラム
 ———:TBZ、 :TBZ- d_4 、 - - - -:TBZ- $^{13}C_6$
 上:グラジエント条件
 中:グラジエント条件
 下:グラジエント条件

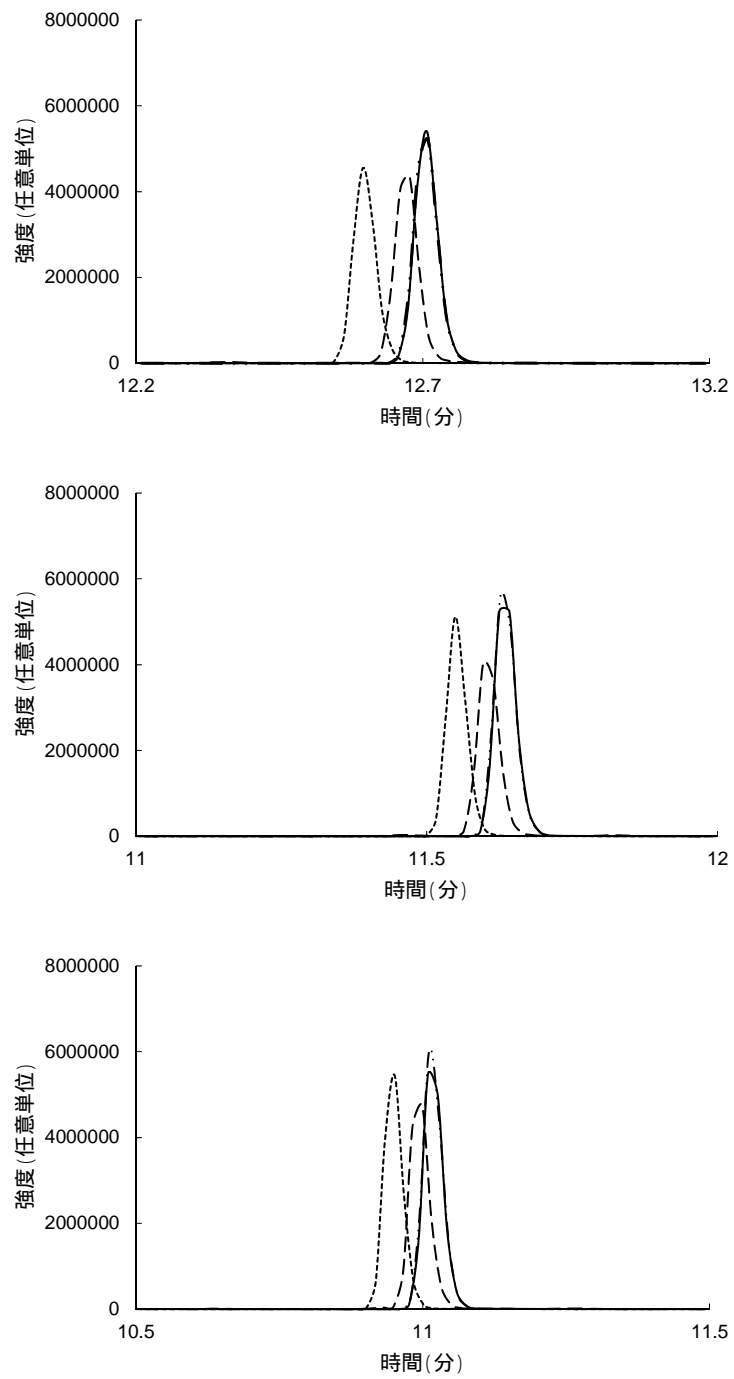


図 4 マトリックス添加標準溶液中の TMP、TMP- d_3 、TMP- d_9 及び TMP- $^{13}C_3$ のクロマトグラム
 ——— : TMP、 - - - - : TMP- d_3 、 - - - - : TMP- d_9 、 - · - · - : TMP- $^{13}C_3$
 上: グラジエント条件
 中: グラジエント条件
 下: グラジエント条件