

質量数を考慮すると、SDZ- $d_4$ 、SDZ- $^{13}C_6$ 、SMXZ- $d_4$ 、SMXZ- $^{13}C_6$ 、TBZ- $^{13}C_6$  及び TMP- $^{13}C_3$  のプロダクトイオンは、プロトン付加イオンから  $d$  もしくは  $^{13}C$  標識されていない部分が脱離したイオンであると推察された。TBZ- $d_6$  のプロダクトイオンは 6 つのうち 1 つの  $d$  標識部分が脱離したイオンであると推察された。また、TMP- $d_3$  のプロダクトイオンは全ての  $d$  標識部分が脱離したものの、TMP- $d_9$  のプロダクトイオンは一部の  $d$  標識部分が脱離したものであると推察された。更に、各検討対象農薬等及び対応する安定同位体について設定された測定イオンは、プリカーサーイオンとプロダクトイオンを組み合わせるとそれぞれ異なることから、測定イオンの切り替えの際に他のイオンを測り込むことがなければ、各検討対象農薬等及び対応する安定同位体を特異的に検出することが可能であると考えられた。

### ②LC-MS/MS における測定について

設定した LC-MS/MS 測定条件下で、各検討対象農薬等及び対応する安定同位体 10 ng/mL の混合標準溶液を 5 併行で測定したところ、全ての検討対象農薬等及び対応する安定同位体において保持時間の変動は無いことが確認された。また、ピーク面積値についても、全ての検討対象農薬等及び対応する安定同位体において 6 RSD%未満の良好な併行精度が得られた。このことから、設定した LC-MS/MS 条件を用いて各検討対象農薬等及び対応する安定同位体を測定することにより、保持時間やピーク面積値など、検討対象農薬等と対応する安定同位体における測定の際の違いの有無を明らかにすることが可能であると考えられた。

### ③保持時間について

設定した LC-MS/MS 測定条件において各検討対象農薬等及び対応する安定同位体を測定した結果、若干ではあるが、検討対象農薬等よりも、対応する安定同位体の方が保持時間が短いことが

確認された。また、TMP- $d_3$  及び TMP- $d_9$  の保持時間の比較などから、安定同位体の標識数の増加に伴い、保持時間はより短くなる傾向が確認された。更に、TBZ- $d_6$  及び TBZ- $^{13}C_6$  の保持時間の比較などから、安定同位体の標識数が同じであれば、 $^{13}C$  標識安定同位体よりも  $d$  標識安定同位体の方が保持時間が短くなる傾向が確認された。これらのことから、検討対象農薬等と対応する安定同位体の保持時間の差は、安定同位体の標識の種類や数に依存して変化すると考えられた。また、グラジエントにおけるアセトニトリル比率の勾配が異なる 3 種類のグラジエント条件(条件①:2.5%/分で増加、条件②:3.3%/分で増加、条件③:4.0%/分で増加)を用いて測定を行った結果、勾配の増加に伴い、保持時間が短くなる傾向が確認された。更に、勾配の増加に伴い、検討対象農薬等と対応する安定同位体の保持時間の差が小さくなる傾向が確認された。これらの結果から、使用する安定同位体の標識の種類や標識数、使用する LC 条件によっては、分析対象である農薬等と対応する安定同位体の保持時間が大きく異なる可能性があることが示唆された。

測定の際の試料マトリックスの影響を効率的に補正する場合にも、安定同位体による内標準法の適用も一つの有用な手段であると考えられる。ただし、このような場合に精確な補正を行うためには、分析対象農薬等と使用する安定同位体が、測定の際に同等のマトリックスの影響を受けている必要がある。分析対象農薬等と安定同位体の保持時間が同じ場合には、同等のマトリックスの影響を受けていることが予想されるが、保持時間が異なる場合には、どの程度の保持時間の違いでマトリックスの影響の程度が異なるかについては不明である。

以上のように、使用する安定同位体や測定条件によっては、農薬等と安定同位体の保持時間が大

大きく異なる可能性があり、また、このような保持時間の違いは補正の精度に大きく影響する可能性があることが推察された。したがって、次年度においては、実際の食品マトリックスの存在下で測定を行い、検討対象農薬等と対応する安定同位体の保持時間の違いが、精確な補正にどの程度影響するかについて検討する必要があると考えられた。

#### ④検討対象農薬等のピーク面積値に及ぼす安定同位体中の不純物の影響について

安定同位体による内標準法を使用する場合、検体に一定濃度の安定同位体を添加して分析を行う。したがって、使用する安定同位体中に標識されていない化合物、すなわち分析対象となる農薬等そのものが含まれていれば、分析対象となる農薬等について得られる分析値は、実際の値よりも高い値となる。

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の高濃度の標準溶液(1 µg/mL)をそれぞれ測定し、安定同位体中の検討対象農薬等の含有の有無を確認した。その結果、本研究で使用した安定同位体の中で検討対象農薬等そのものに由来するピーク面積値が最も大きかったものはTMP- $d_3$ であったが、1 µg/mLのTMP標準溶液の測定で得られたピーク面積値の0.4%程度であった。その他の安定同位体については、検討対象農薬等そのものに由来するピークはほとんど検出されない、もしくは検出された場合であっても1 µg/mLの検討対象農薬等標準溶液の測定で得られたピーク面積値の0.1%未満であった。

仮に、本研究で使用したTMP- $d_3$ を用いた内標準法でTMPの分析を行い、1 µg/g相当のTMP- $d_3$ を添加したとすると、検体中の実際のTMP濃度が10 ng/gであった場合には、添加したTMP- $d_3$ 由来のTMPが加算され、分析値としては13 ng/g程度の値が得られることとなる。TMP- $d_3$ の添加濃度を

100 ng/gとした場合には、TMP- $d_3$ 由来のTMPを加味しても分析値は10.3 ng/g程度となることから、添加するTMP- $d_3$ の分析値に対する影響は小さくなると予想される。

以上のような結果及び考察から、安定同位体による内標準法を使用する場合には、予め、使用する安定同位体中の分析対象農薬等の有無、含まれる場合にはどの程度含まれるかを確認し、検体中の実際の分析対象農薬等の濃度に影響が無い濃度の安定同位体を添加することが重要であると考えられた。

実際の分析においては、検体中にどの程度の分析対象化合物が含まれているかを事前に把握することは出来ない。したがって、使用する安定同位体中に含まれる分析対象化合物の量を予め確認していた場合であっても、実際に添加する安定同位体濃度を決定し難いことも考えられる。一方、食品中残留農薬等分析においては、一般的には「当該食品に含まれる当該農薬等の量が、当該食品に設定された当該農薬等の基準値を超過しているか否か」が焦点となるため、基準値に近い濃度を精確に求めることが必要である。したがって、食品中残留農薬等分析において、安定同位体による内標準法を使用する場合には、各食品に設定された分析対象農薬等の基準値に相当する濃度の安定同位体を添加して分析を行うことが妥当と考えられた。

#### ⑤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、全ての検討対象農薬等について、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、調製したマトリッ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。

#### ⑥絶対検量線法による回収率

絶対検量線法により、調製したマトリックス添加標準溶液中の各検討対象農薬等を定量した。マトリッ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場合、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。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ッ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①では 100%に近い回収率となり、測定の際に試料マトリッ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②及び③では 80%程度の回収率となり、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示唆された。TBZ については、グラジエント条件①及び③で回収率 80%程度、グラジエント条件②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ックスの影響が最も大きいことが示唆された。なお、調製したマトリッ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、同一のマトリックス添加標準溶液を、グラジエント条件①→②→③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ックスの影響が大きいと考えられた。

絶対検量線法により添加回収試験溶液を定量した場合には、特にはちみつ試料及び牛の肝臓試料において良好な回収率が得られなかった。絶対検量線法において良好な回収率が得られない原因としては、各分析操作における損失(抽出効

率が悪い、濃縮操作における揮散や分解など)、もしくは測定の際の試料マトリックスの影響が考えられる。得られた回収率と  $PA_{Mstd}/PA_{Sstd} \times 100$  値を比較した場合、これらの値は概ね一致することから、絶対検量線法による定量において良好な回収率が得られなかった主な原因としては、測定の際の試料マトリックスの影響によるものと推察された。ただし、はちみつ試料においては、 $PA_{Mstd}/PA_{Sstd} \times 100$  値よりも回収率が低いことから、濃縮操作中の分解などにより実際の回収率が低下している可能性もあることが推察された。

#### ⑦内標準法による回収率

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農薬等を定量した。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①における TMP (TMP- $d_6$  使用時、108%)、グラジエント条件②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%に近い値とされ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、 $^{13}\text{C}$  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、 $^{13}\text{C}$  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。

内標準法により添加回収試験溶液を定量した場合、絶対検量線法よりも良好な回収率が得られた。ただし、d 標識体を用いた内標準法の場合、はちみつ試料における TMP などのように、一部の試料と検討対象農薬等の組み合わせにおいては良好な回収率が得られない場合もあることが確認された。良好な回収率(補正回収率)が得られない原因を調査するため、マトリックス添加標準溶液を調製し、 $\text{PA}_{\text{Mstd}}/\text{PA}_{\text{Sstd}} \times 100$  値を算出した。得られた値を比較・考察した結果、良好な補正回収率が得られない場合には、検討対象農薬等(本体)で得られる値と安定同位体で得られる値が大きく異なることが示された。算出した値( $\text{PA}_{\text{Mstd}}/\text{PA}_{\text{Sstd}} \times 100$  値)は、測定の際の試料マトリックスの影響の程度であるため、この値が検討対象農薬等(本体)と安定同位体で異なる場合には、測定の際に受ける試料マトリックスの影響が異なり、測定の際の試料マトリックスの影響を正確に補正することが出来ず、結果として良好な補正回収率が得られないことが推察された。言い換えれば、分析対象化合物と対応する安定同位体のマトリックス添加標準溶液を調製・測定し、これらの試料マトリックスの影響の程度が同等であれば、測定の際の試料マトリックスの影響については正確な補正が可能であると考えられた。また、一部の試料と検討対象農薬等の組み合わせにおいては、絶対検量線法による回収率と  $\text{PA}_{\text{Mstd}}/\text{PA}_{\text{Sstd}} \times 100$  値が異なり、分析操作中の損失等が推察されたが、内標準法、特に  $^{13}\text{C}$  標識体を用いた内標準法による補正回収率は良好であった。

一般的には、分析法を開発する上で、著しく回収率が低下する条件(抽出溶媒、濃縮条件、ミニカラム精製条件など)は選択しないと考えられるため、分析操作中の損失等が分析値に与える影響はそれ程大きくないと予想されるが、安定同位体を用いた内標準法により、分析操作中の損失等も補正可能であることが推察された。

⑧安定同位体を用いた内標準法により正確な分析値を得るために留意すべき事項

平成 25~27 年度の検討結果から、安定同位体を用いた内標準法で定量した場合であっても、正確な分析値が得られない場合があることが示された。安定同位体を用いた内標準法で正確な分析値が得られない主な原因としては、測定の際の試料マトリックスの影響を正確に補正できていない事が考えられた。言い換えれば、測定の際の試料マトリックスの影響を正確に補正できれば、正確な分析値が得られる可能性が高いと考えられた。

本研究における検討結果から、安定同位体を用いた内標準法により正確な分析値を得るために留意すべき事項等について、以下に取り纏めた。

・使用する安定同位体の純度及び添加濃度

まず、使用する予定の安定同位体を LC-MS(/MS)で測定し、安定同位体の不純物等が分析対象化合物の分析値に影響を及ぼさないことを確認する。安定同位体の添加濃度については、分析対象化合物と対応する安定同位体が相互に影響し合わない適切な濃度を選択する(当該分析対象化合物の当該食品における残留基準値と同濃度が望ましいと考えられる)。

・使用する安定同位体の種類及び LC 条件

使用する予定の安定同位体を LC-MS(/MS)で測定し、分析対象化合物と対応する安定同位体の保持時間が一致、もしくは出来る限り近接するような

安定同位体及び LC 条件を選択する。

・測定の際の試料マトリックスの影響の確認

マトリックス添加標準溶液を調製・測定し、「マトリックス添加標準溶液におけるピーク面積値/溶媒標準溶液におけるピーク面積値×100の値」が、分析対象化合物と安定同位体で同等であることを確認する。

## E. 結論

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、種々の検討を実施した。

使用する測定条件、安定同位体の種類や添加濃度などによっては、安定同位体を用いた内標準法により定量した場合であっても、精確な分析値が得られない場合があることが明示された。安定同

位体を用いた内標準法により精確な分析値を得るためには、①分析対象化合物の測定値に影響を及ぼさない安定同位体及び添加濃度の選択、②分析対象化合物と同等の試料マトリックスの影響を受ける安定同位体及び LC 条件の選択、③分析対象化合物と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ることの確認が必要であると考えられた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

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-トリメキシ基 |                    |

表 2 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の MS/MS 条件

|                  | 分子量   | プリカーサー<br>イオン( $m/z$ ) | プロダクト<br>イオン( $m/z$ ) | コロン電圧<br>(V) | CE* <sup>1</sup><br>(eV) |
|------------------|-------|------------------------|-----------------------|--------------|--------------------------|
| SDZ              | 250.3 | 251                    | 156                   | 30           | 15                       |
| SDZ- $d_4$       | 254.3 | 255                    | 160                   | 30           | 15                       |
| SDZ- $^{13}C_6$  | 256.2 | 257                    | 162                   | 30           | 15                       |
| SMXZ             | 253.3 | 254                    | 156                   | 30           | 15                       |
| SMXZ- $d_4$      | 257.3 | 258                    | 160                   | 30           | 15                       |
| SMXZ- $^{13}C_6$ | 259.2 | 260                    | 162                   | 30           | 15                       |
| TBZ              | 201.3 | 202                    | 175                   | 50           | 28                       |
| TBZ- $d_6$       | 207.3 | 208                    | 180                   | 50           | 28                       |
| TBZ- $^{13}C_6$  | 207.3 | 208                    | 181                   | 50           | 28                       |
| TMP              | 290.3 | 291                    | 230                   | 45           | 25                       |
| TMP- $d_3$       | 293.3 | 294                    | 230                   | 45           | 25                       |
| TMP- $^{13}C_3$  | 293.3 | 294                    | 233                   | 45           | 25                       |
| TMP- $d_9$       | 299.4 | 300                    | 234                   | 45           | 25                       |

\*1 CE: コリジョンエネルギー

表 3 検討対象農薬等及び対応する安定同位体の保持時間等

|                  | グラジエント条件①<br>(勾配 2.5%/分) |       |       | グラジエント条件②<br>(勾配 3.3%/分) |       |      | グラジエント条件③<br>(勾配 4.0%/分) |       |      |
|------------------|--------------------------|-------|-------|--------------------------|-------|------|--------------------------|-------|------|
|                  | 保持時間<br>(分)              | 差(分)  | 差(秒)  | 保持時間<br>(分)              | 差(分)  | 差(秒) | 保持時間<br>(分)              | 差(分)  | 差(秒) |
| SDZ              | 14.02                    | —     | —     | 13.05                    | —     | —    | 12.46                    | —     | —    |
| SDZ- $d_4$       | 13.94                    | -0.08 | -4.8  | 13.01                    | -0.04 | -2.4 | 12.42                    | -0.04 | -2.4 |
| SDZ- $^{13}C_6$  | 14.02                    | 0     | 0     | 13.05                    | 0     | 0    | 12.46                    | 0     | 0    |
| SMXZ             | 19.76                    | —     | —     | 17.52                    | —     | —    | 16.22                    | —     | —    |
| SMXZ- $d_4$      | 19.67                    | -0.09 | -5.4  | 17.48                    | -0.04 | -2.4 | 16.18                    | -0.04 | -2.4 |
| SMXZ- $^{13}C_6$ | 19.72                    | -0.04 | -2.4  | 17.52                    | 0     | 0    | 16.22                    | 0     | 0    |
| TBZ              | 14.40                    | —     | —     | 13.18                    | —     | —    | 12.46                    | —     | —    |
| TBZ- $d_6$       | 14.28                    | -0.12 | -7.2  | 13.10                    | -0.08 | -4.8 | 12.38                    | -0.08 | -4.8 |
| TBZ- $^{13}C_6$  | 14.36                    | -0.04 | -2.4  | 13.14                    | -0.04 | -2.4 | 12.42                    | -0.04 | -2.4 |
| TMP              | 14.87                    | —     | —     | 13.47                    | —     | —    | 12.63                    | —     | —    |
| TMP- $d_3$       | 14.78                    | -0.09 | -5.4  | 13.43                    | -0.04 | -2.4 | 12.59                    | -0.04 | -2.4 |
| TMP- $^{13}C_3$  | 14.82                    | -0.05 | -3.0  | 13.43                    | -0.04 | -2.4 | 12.63                    | 0     | 0    |
| TMP- $d_9$       | 14.70                    | -0.17 | -10.2 | 13.35                    | -0.12 | -7.2 | 12.55                    | -0.08 | -4.8 |

表 4 各測定溶液と各測定イオンで得られるピーク面積値の関係

|  | ピーク面積値         |                                       |  |
|--|----------------|---------------------------------------|--|
|  | SDZ<br>1 µg/mL | SDZ- <i>d</i> <sub>4</sub><br>1 µg/mL | SDZ- <sup>13</sup> C <sub>6</sub><br>1 µg/mL |
| SDZ測定イオン( <i>m/z</i> 251→ <i>m/z</i> 156)                                | 882648         | 361                                   | ND   |
| SDZ- <i>d</i> <sub>4</sub> 測定イオン( <i>m/z</i> 255→ <i>m/z</i> 160)        | 302            | 589043                                | 398  |
| SDZ- <sup>13</sup> C <sub>6</sub> 測定イオン( <i>m/z</i> 257→ <i>m/z</i> 162) | ND             | 28536                                 | 889566                                       |

|  | ピーク面積値          |  |   |
|--|-----------------|--|---|
|  | SMXZ<br>1 µg/mL | SMXZ- <i>d</i> <sub>4</sub><br>1 µg/mL | SMXZ- <sup>13</sup> C <sub>6</sub><br>1 µg/mL |
| SMZ測定イオン( <i>m/z</i> 254→ <i>m/z</i> 156)                                | 1194163         | 183                                    | 330   |
| SMZ- <i>d</i> <sub>4</sub> 測定イオン( <i>m/z</i> 258→ <i>m/z</i> 160)        | 643             | 1060817                                | 794   |
| SMZ- <sup>13</sup> C <sub>6</sub> 測定イオン( <i>m/z</i> 260→ <i>m/z</i> 162) | 36              | 46492                                  | 1140044                                       |

|  | ピーク面積値         |                                       |  |
|--|----------------|---------------------------------------|--|
|  | TBZ<br>1 µg/mL | TBZ- <i>d</i> <sub>6</sub><br>1 µg/mL | TBZ- <sup>13</sup> C <sub>6</sub><br>1 µg/mL |
| TBZ測定イオン( <i>m/z</i> 202→ <i>m/z</i> 175)                                | 1621936        | 325                                   | 1037   |
| TBZ- <i>d</i> <sub>6</sub> 測定イオン( <i>m/z</i> 208→ <i>m/z</i> 180)        | 34             | 872134                                | 24133  |
| TBZ- <sup>13</sup> C <sub>6</sub> 測定イオン( <i>m/z</i> 208→ <i>m/z</i> 181) | 34             | 328719                                | 1486423                                      |

|  | ピーク面積値         |                                       |  |                                       |
|--|----------------|---------------------------------------|--|---------------------------------------|
|  | TMP<br>1 µg/mL | TMP- <i>d</i> <sub>3</sub><br>1 µg/mL | TMP- <sup>13</sup> C <sub>3</sub><br>1 µg/mL | TMP- <i>d</i> <sub>9</sub><br>1 µg/mL |
| TMP測定イオン( <i>m/z</i> 291→ <i>m/z</i> 230)                                | 769943         | 3385                                  | ND   | ND                                    |
| TMP- <i>d</i> <sub>3</sub> 測定イオン( <i>m/z</i> 294→ <i>m/z</i> 230)        | 178            | 668048                                | 1697   | ND                                    |
| TMP- <sup>13</sup> C <sub>3</sub> 測定イオン( <i>m/z</i> 294→ <i>m/z</i> 233) | 577            | 54090                                 | 694065                                       | ND                                    |
| TMP- <i>d</i> <sub>9</sub> 測定イオン( <i>m/z</i> 300→ <i>m/z</i> 234)        | ND             | ND                                    | ND   | 821120                                |

表 5 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①<br>(勾配2.5%/分) | グラジエント条件②<br>(勾配3.3%/分) | グラジエント条件③<br>(勾配4.0%/分) |
| SDZ  | 95                      | 84                      | 82                      |
| SMXZ | 96                      | 99                      | 93                      |
| TBZ  | 84                      | 66                      | 82                      |
| TMP  | 96                      | 84                      | 82                      |

表 6 絶対検量線法による試験溶液中の各検討対象農薬等の回収率

(a) LC 条件①、(b) LC 条件②

(a)

|     | 回収率(%) |     |      |      |
|-----|--------|-----|------|------|
|     | 牛の脂肪   | 牛乳  | 牛の肝臓 | はちみつ |
| SDZ | 91     | 108 | 88   | 30   |
| SMZ | 92     | 103 | 78   | 38   |
| TBZ | 102    | 106 | 86   | 55   |
| TMP | 106    | 109 | 99   | 45   |

(b)

|     | 回収率(%) |    |      |      |
|-----|--------|----|------|------|
|     | 牛の脂肪   | 牛乳 | 牛の肝臓 | はちみつ |
| SDZ | 84     | 99 | 76   | 23   |
| SMZ | 87     | 99 | 67   | 31   |
| TBZ | 100    | 96 | 68   | 39   |
| TMP | 104    | 76 | 53   | 34   |

表 7 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①<br>(勾配2.5%/分) | グラジエント条件②<br>(勾配3.3%/分) | グラジエント条件③<br>(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-d9(TMP- $d_9$ 使用) | 108                     | 101                     | 96                      |

表 8  $^{13}\text{C}$  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①<br>(勾配2.5%/分) | グラジエント条件②<br>(勾配3.3%/分) | グラジエント条件③<br>(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 9 内標準法による回収率

(a) d 標識体使用・LC 条件①、(b) d 標識体使用、LC 条件②、  
 (c) <sup>13</sup>C 標識体使用・LC 条件①、(d) <sup>13</sup>C 標識体使用・LC 条件②

(a)

|                                    | 回収率(%) |     |      |      |
|------------------------------------|--------|-----|------|------|
|                                    | 牛の脂肪   | 牛乳  | 牛の肝臓 | はちみつ |
| SDZ(SDZ- <i>d</i> <sub>4</sub> 使用) | 101    | 86  | 101  | 102  |
| SMZ(SMZ- <i>d</i> <sub>4</sub> 使用) | 102    | 99  | 100  | 103  |
| TBZ(TBZ- <i>d</i> <sub>6</sub> 使用) | 100    | 101 | 99   | 102  |
| TMP(TMP- <i>d</i> <sub>3</sub> 使用) | 101    | 102 | 104  | 118  |
| TMP(TMP- <i>d</i> <sub>9</sub> 使用) | 111    | 96  | 106  | 136  |

(b)

|                                    | 回収率(%) |     |      |      |
|------------------------------------|--------|-----|------|------|
|                                    | 牛の脂肪   | 牛乳  | 牛の肝臓 | はちみつ |
| SDZ(SDZ- <i>d</i> <sub>4</sub> 使用) | 100    | 103 | 103  | 106  |
| SMZ(SMZ- <i>d</i> <sub>4</sub> 使用) | 101    | 101 | 107  | 113  |
| TBZ(TBZ- <i>d</i> <sub>6</sub> 使用) | 100    | 109 | 98   | 100  |
| TMP(TMP- <i>d</i> <sub>3</sub> 使用) | 101    | 84  | 69   | 71   |
| TMP(TMP- <i>d</i> <sub>9</sub> 使用) | 147    | 128 | 98   | 107  |

(c)

|   | 回収率(%) |     |      |      |
|---|--------|-----|------|------|
|   | 牛の脂肪   | 牛乳  | 牛の肝臓 | はちみつ |
| SDZ(SDZ- <sup>13</sup> C <sub>6</sub> 使用) | 102    | 98  | 99   | 102  |
| SMZ(SMZ- <sup>13</sup> C <sub>6</sub> 使用) | 101    | 101 | 102  | 109  |
| TBZ(TBZ- <sup>13</sup> C <sub>6</sub> 使用) | 101    | 101 | 101  | 103  |
| TMP(TMP- <sup>13</sup> C <sub>3</sub> 使用) | 103    | 103 | 104  | 106  |

(d)

|   | 回収率(%) |     |      |      |
|---|--------|-----|------|------|
|   | 牛の脂肪   | 牛乳  | 牛の肝臓 | はちみつ |
| SDZ(SDZ- <sup>13</sup> C <sub>6</sub> 使用) | 100    | 100 | 98   | 105  |
| SMZ(SMZ- <sup>13</sup> C <sub>6</sub> 使用) | 100    | 99  | 102  | 111  |
| TBZ(TBZ- <sup>13</sup> C <sub>6</sub> 使用) | 95     | 101 | 104  | 100  |
| TMP(TMP- <sup>13</sup> C <sub>3</sub> 使用) | 104    | 106 | 104  | 108  |

表 10 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 (平成 26 年度)

|                  | $PA_{Mstd}/PA_{Sstd} \times 100$ 値 |                         |                         |
|------------------|------------------------------------|-------------------------|-------------------------|
|                  | グラジエント条件①<br>(勾配2.5%/分)            | グラジエント条件②<br>(勾配3.3%/分) | グラジエント条件③<br>(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 11 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(平成 27 年度)

- (a) 検討対象農薬等(本体)・LC 条件①、(b) 検討対象農薬等(本体)・LC 条件②、  
 (c) d 標識体・LC 条件①、(d) d 標識体・LC 条件②、(e)  $^{13}C$  標識体・LC 条件①、  
 (f)  $^{13}C$  標識体・LC 条件②

(a)

|     | ピーク面積比×100 |     |      |      |
|-----|------------|-----|------|------|
|     | 牛の脂肪       | 牛乳  | 牛の肝臓 | はちみつ |
| SDZ | 97         | 116 | 94   | 41   |
| SMZ | 100        | 104 | 86   | 46   |
| TBZ | 107        | 108 | 86   | 64   |
| TMP | 114        | 108 | 107  | 79   |

(b)

|     | ピーク面積比×100 |     |      |      |
|-----|------------|-----|------|------|
|     | 牛の脂肪       | 牛乳  | 牛の肝臓 | はちみつ |
| SDZ | 93         | 102 | 84   | 32   |
| SMZ | 94         | 104 | 76   | 41   |
| TBZ | 103        | 96  | 70   | 44   |
| TMP | 93         | 99  | 56   | 45   |

(c)

|            | ピーク面積比×100 |     |      |      |
|------------|------------|-----|------|------|
|            | 牛の脂肪       | 牛乳  | 牛の肝臓 | はちみつ |
| SDZ- $d_4$ | 96         | 135 | 94   | 42   |
| SMZ- $d_4$ | 100        | 106 | 86   | 46   |
| TBZ- $d_6$ | 107        | 107 | 86   | 63   |
| TMP- $d_3$ | 107        | 97  | 99   | 64   |
| TMP- $d_9$ | 109        | 78  | 106  | 52   |

(d)

|            | ピーク面積比×100 |     |      |      |
|------------|------------|-----|------|------|
|            | 牛の脂肪       | 牛乳  | 牛の肝臓 | はちみつ |
| SDZ- $d_4$ | 91         | 99  | 82   | 29   |
| SMZ- $d_4$ | 96         | 103 | 72   | 37   |
| TBZ- $d_6$ | 104        | 90  | 72   | 44   |
| TMP- $d_3$ | 105        | 92  | 83   | 72   |
| TMP- $d_9$ | 101        | 59  | 66   | 48   |

(e)

|                 | ピーク面積比×100 |     |      |      |
|-----------------|------------|-----|------|------|
|                 | 牛の脂肪       | 牛乳  | 牛の肝臓 | はちみつ |
| SDZ- $^{13}C_6$ | 94         | 115 | 91   | 34   |
| SMZ- $^{13}C_6$ | 95         | 104 | 80   | 41   |
| TBZ- $^{13}C_6$ | 102        | 105 | 87   | 64   |
| TMP- $^{13}C_3$ | 97         | 100 | 97   | 70   |

(f)

|                 | ピーク面積比×100 |     |      |      |
|-----------------|------------|-----|------|------|
|                 | 牛の脂肪       | 牛乳  | 牛の肝臓 | はちみつ |
| SDZ- $^{13}C_6$ | 87         | 100 | 79   | 24   |
| SMZ- $^{13}C_6$ | 86         | 101 | 68   | 32   |
| TBZ- $^{13}C_6$ | 92         | 92  | 74   | 49   |
| TMP- $^{13}C_3$ | 87         | 90  | 66   | 54   |

## Ⅱ. 分担研究報告

### 1. 精確な定量法の確立

#### 2) 標準添加法を用いた精確な定量法の検討

研究分担者 志田(齊藤)静夏

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

2) 標準添加法を用いた精確な定量法の検討

研究分担者 志田(齊藤)静夏 国立医薬品食品衛生研究所 食品部主任研究官

**研究要旨**

残留農薬検査においても実施可能な簡便かつ高精度な標準添加法による定量法について検討した。平成 25 年度は、標準添加法における検量点の数及び添加濃度の定量精度に与える影響について予備検討を行った。平成 27 年度は、代表的な 15 農薬のマトリックス添加標準溶液を用いて、様々な検量点数(1～6 点)及び添加濃度(初期濃度の 0.25、0.5、1、2、4 及び 8 倍)で初期濃度を推定し、定量性を比較した。その結果、添加濃度を初期濃度の 1～4 倍として 1 点標準添加法で定量を行うことにより、精確な分析値が得られることが示された。本検討結果を基に、性能評価方法及び評価基準について提案した。

**A. 研究目的**

食品中の残留農薬分析のように複雑な夾雑成分の共存下での微量分析では、測定におけるマトリックスの影響により、精確な分析値を得ることが困難な場合がある。このような場合には、追加精製を行い、夾雑成分を除去すれば、マトリックスの影響の軽減が可能であるが、手間と時間を要してしまう。追加精製を行わず、マトリックスの影響を補正し、精確な分析値を求める方法としては、①安定同位体標識標準品を用いた内標準法、②マトリックス検量線法(マトリックス添加標準溶液を用いた絶対検量線法)、③標準添加法等がある。

①安定同位体標識標準品を用いた内標準法は、物性が分析対象化合物とほぼ同じ安定同位体標識標準品を用いる方法で、簡便にマトリックスの影響の補正が可能である。しかし、多くの農薬については安定同位体標識標準品が市販されておらず、市販されていても高価なものが多い。また、他の化合物の安定同位体標識標準品を用いて補正した

報告もあるが、物性が異なる化合物を用いてマトリックスの影響を補正できる保証はない。

②マトリックス検量線法は、広く使用されている方法であり、検体と全く同じブランク試料を用いれば、理論的にはマトリックスの影響を完全に補正することができる。しかしながら、一般に、検体と同じブランク試料を入手することは非常に困難である。

これに対し、③標準添加法は、標準品やブランク試料を必要としない。この方法の欠点としては、検量線が直線であり、且つ、原点付近を通らなければ適用できないことが挙げられる。また、一般に、標準添加法は検量点の数が多く、且つ、濃度範囲が広い方が精確な分析値が得られるとされており、<sup>1)</sup>他の方法よりも多くの試験溶液を必要とすることや、既知濃度の分析対象化合物を添加した試験溶液を調製するのが煩雑等の問題点がある。加えて、食品中の残留農薬分析において標準添加法で定量を行うことにより、どの程度精確な分析値が得られるかや、検量点の数や添加濃度が定量精

度に与える影響についての報告はほとんどなく、残留農薬分析における標準的な使用方法や性能評価方法・評価基準も示されていない。

本研究では、GC-MS/MS を用いた食品中の残留農薬分析において、測定でのマトリックスの影響を補正し、精確な分析値を得る方法として、標準添加法を検討した。平成 25 年度は、標準添加法における検量点の数及び添加濃度の定量精度に与える影響について予備検討を行った。平成 27 年度は、代表的な 15 農薬のマトリックス添加標準溶液を用いて、様々な検量点数及び添加濃度で初期濃度を推定し、定量性を比較した。また、本検討結果を基に、残留農薬分析における標準添加法の性能評価方法及び評価基準を提案した。

## B. 研究方法

### 1. 試料

オレンジ、玄米及び大豆は東京都内の小売店、茶(煎茶)はインターネットで購入した。

オレンジはフードカッターで細切均一化したものを用いた。茶、玄米及び大豆は、試料を 425  $\mu\text{m}$  の標準網ふるいに通るように遠心粉碎機を用いて粉碎し均一化したものを用いた。

### 2. 試薬及び試液

#### (1) 有機溶媒及び試薬

試験溶液の調製に用いたアセトニトリル、アセトン、トルエン及びヘキサンは関東化学(株)製の残留農薬試験用試薬、水は超高純度蒸留水精製装置で蒸留したものを用いた。塩化ナトリウムは、和光純薬工業(株)製の残留農薬試験用試薬を用いた。リン酸水素二カリウム及びリン酸二水素カリウムは、和光純薬工業(株)製の特級を用いた。ろ紙は桐山製作所製 No.5B、ケイソウ土は和光純薬工業(株)製のセライト 545 を用いた。

#### (2) 農薬標準品及び標準溶液

検討に用いた農薬を表 1-1(平成 25 年度、予備検討)及び表 1-2(平成 27 年度)に示した。各農薬標準品は、林純薬工業(株)、関東化学(株)、和光純薬工業(株)、Sigma-Aldrich 社、Dr. Ehrenstorfers 社及び Riedel-de Haën 社及び AccuStandard 社の残留農薬試験用試薬を用いた。標準原液(1000 mg/L)は、各農薬 10 mg を精秤し、ヘキサン(ヘキサンへの溶解性が低い場合はアセトン/ヘキサンの混合溶媒)10 mL に溶解して調製した。混合標準溶液は、各農薬の標準原液を混合し、アセトン/ヘキサン(1:1)で適宜希釈して調製した。

#### (3) 精製ミニカラム

オクタデシルシリル化シリカゲル(ODS)ミニカラムは、Agilent 製の Mega Bond Elut C18(充てん量 1000 mg)を用いた。グラファイトカーボン/エチレンジアミン-N-プロピルシリル化シリカゲル(GC/PSA)積層ミニカラムは、ジーエルサイエンス社製の InertSep GC/PSA(充てん量 500mg/500 mg)を用いた。シリカゲルミニカラムは、ジーエルサイエンス社製の InertSep SI(充てん量 1000 mg)を用いた。

#### (4) 0.5 mol/L リン酸緩衝液(pH7.0)の調製

リン酸水素二カリウム( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) 52.7 g 及びリン酸二水素カリウム( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 30.2 g を量り採り、水約 500 mL に溶解し、1 mol/L 水酸化ナトリウムまたは 1 mol/L 塩酸を用いて pH を 7.0 に調整した後、水を加えて 1 L とした。

### 3. 装置

GC-MS/MS は、ガスクロマトグラフ Trace1310、オートサンプラー TriPlus RSH 及び質量分析計 TSQ8000(ThermoFisher Scientific 製)を使用した。

### 4. 測定条件

カラム DB-5ms(内径 0.25 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25  $\mu\text{m}$ 、Agilent 社製); ガードカラム 不活性キ

ャピラー(内径 0.25 mm、長さ 2 m、Agilent 社製); ライナー 不活性化処理済みのシングルテーパ付ライナーに石英ウールを充填したもの; カラム温度 50°C (1 min) – 25°C/min – 125°C (0 min) – 10°C/min – 300°C (8.5 min); 注入口温度 260°C; トランスファーライン温度 280°C; イオン源温度 260°C; キャリヤーガス ヘリウム; キャリヤーガス流量 1 mL/min; 注入法 ホットニードル法(Pre-injection time 5 s、Post-injection time 0.5 s); 注入量 2 µL; イオン化法 EI(+); 測定モード SRM(selected reaction monitoring); 測定イオン、コリジョンエネルギー及び保持時間 表 1-1 (平成 25 年度)及び表 1-2(平成 27 年度)に示した。

## 5. ブランク試験溶液の調製

### (1) 抽出

オレンジは試料 20.0 g を量り採った。玄米及び大豆は試料 10.0 g に水 20 mL を加え、30 分間放置した。茶は試料 5.00 g に水 20 mL を加え、30 分間放置した。これにアセトニトリル 50 mL を加え、約 1 分間ホモジナイズした後、ケイソウ土を約 1 cm の厚さに敷いたろ紙を用いて吸引ろ過した。残留物を採り、アセトニトリル 20 mL を加え、上記と同様にホモジナイズした後、吸引ろ過した。得られたろ液を合わせ、アセトニトリルを加えて正確に 100 mL とした。

抽出液 20 mL (オレンジ 4 g 相当、玄米及び大豆 2 g 相当、茶 1 g 相当)を採り、塩化ナトリウム 10 g 及びリン酸緩衝液(0.5 mol/L、pH 7.0) 20 mL を加えて 10 分間振とう後、毎分 3000 回転で 5 分間遠心分離を行った。

ODS ミニカラム(1000 mg)にアセトニトリル 10 mL を注入し、流出液は捨てた。このカラムに上記のアセトニトリル層を注入し、さらにアセトニトリル 5 mL を注入した。全溶出液を採り、40°C以下で約 1 mL

まで減圧濃縮後、窒素気流により溶媒を除去した。オレンジ、玄米及び大豆の場合は、残留物をアセトニトリル/トルエン(3:1) 2 mL に溶解した。茶の場合は、残留物にアセトニトリル 3 mL を加え、約 1 分間超音波処理して溶解後、トルエン 1 mL を加えてさらに約 1 分間超音波処理を行い、よく混合した。

### (2) 精製

#### ①オレンジ、玄米及び大豆の場合

グラファイトカーボン/PSA 積層ミニカラム(500 mg/500 mg)にアセトニトリル/トルエン(3:1) 10 mL を注入し、流出液は捨てた。このカラムに(1)で得られた溶液を注入した後、アセトニトリル/トルエン(3:1) 20 mL (負荷液と合わせて 22 mL)を注入した。全溶出液を 40°C以下で約 1 mL まで減圧濃縮後、窒素気流により溶媒を除去し、残留物をアセトン/ヘキサン(1:1) (オレンジ 4 mL、玄米及び大豆 2 mL)に溶解したものを試験溶液(試料 1 g 相当/mL)とした。

#### ②茶の場合

##### (i) グラファイトカーボン/PSA 積層ミニカラム精製

グラファイトカーボン/PSA 積層ミニカラム(500 mg/500 mg)にアセトニトリル/トルエン(3:1) 10 mL を注入し、流出液は捨てた。このカラムに(1)で得られた溶液を注入した後、アセトニトリル/トルエン(3:1) 18 mL (負荷液と合わせて 22 mL)を注入した。全溶出液を 40°C以下で約 1 mL まで減圧濃縮後、窒素気流により溶媒を除去し、残留物をアセトン/ヘキサン(3:7) 2 mL に溶解した。

##### (ii) シリカゲルミニカラム精製

シリカゲルミニカラム(1000 mg)にアセトン/ヘキサン(3:7) 10 mL を注入し、流出液は捨てた。(i)で得られた溶液を注入した後、アセトン/ヘキサン(3:7) 13 mL を注入した。全溶出液を採り、40°C以下で約 1 mL まで、減圧濃縮後、窒素気流により溶媒を除去し、残留物をアセトン/ヘキサン(1:1) 1

mLに溶解したものを試験溶液(試料1g相当/mL)とした。

## 6. マトリックス検量線の作成

ブランク試験溶液 100  $\mu$ L をバイアルに採り、窒素気流により溶媒を除去した後、残留物を2、5、10、20、50及び100 ng/mLの濃度の混合標準溶液100  $\mu$ L に溶解してマトリックス添加標準溶液とした。それぞれ2  $\mu$ L をGC-MS/MSに注入して、ピーク面積を用いて検量線を作成した。

## 7. マトリックスの影響の評価

2、5、10、20、50、100及び200 ng/mLの濃度のマトリックス添加標準溶液と溶媒標準溶液を交互に各3回測定した。各濃度での溶媒標準溶液のピーク面積に対するマトリックス添加標準溶液のピーク面積の比を求めてマトリックスの測定への影響を評価した。

## 8. 標準添加法の検討

### ①試験溶液の調製

ブランク試験溶液 8 mL を採り、窒素気流により溶媒を除去した後、残留物を 10 ng/mL の混合標準溶液 8 mL に溶解して、初期濃度 10 ng/mL の試験溶液(試料中濃度 0.01 ppm 相当)とした。これを用いて、表 2-1(平成 25 年度)及び表 2-2(平成 27 年度)に示した方法で標準添加法のための試験溶液(無添加試験溶液、添加試験溶液)を調製した。

### ②2点以上の標準添加法

①で作成した無添加試験溶液及び添加試験溶液(2個以上)をGC-MS/MSに注入し、添加濃度を横軸、ピーク面積を縦軸として、関係線を作成した。無添加試験溶液から得られたピーク面積に相当する濃度(推定濃度)は、関係線を横軸との交点から求めた。

### ③1点標準添加法

①で作成した無添加試験溶液及び添加試験溶

液(1個)をGC-MS/MSに注入し、以下の式で無添加試験溶液から得られたピーク面積に相当する濃度(推定濃度、 $C_{\text{sample}}$ )を求めた。

$$C_{\text{sample}} = C_{\text{added}} \times A_{\text{sample}} / (A_{\text{sample+added}} - A_{\text{sample}})$$

ただし、 $C_{\text{added}}$ は添加濃度、 $A_{\text{sample}}$ は無添加試験溶液から得られたピーク面積、 $A_{\text{sample+added}}$ は添加試験溶液から得られたピーク面積

## C. 研究結果及び考察

### 1. 予備検討

標準添加法における検量点数及び添加濃度の定量精度に与える影響について予備検討を行うため、大豆のマトリックス標準溶液(10 ng/mL)を用いて、表 2-1 に示した Vial 1~6 を調製し、それぞれ 3 回測定して、標準添加法により初期濃度を推定した。結果を表 3 に示した。その結果、検量点が 5 点の場合、標準添加法から求めた初期濃度は 7.0~9.1 ng/mL と低い濃度となった。一方、初期量と同量(10 ng)を添加して 1 点で求めた場合の推定濃度は 8.5~10.5 ng/mL となり、良好な結果が得られた。初期量の 3 倍量(30 ng)を添加して 1 点で求めた場合の推定濃度は、5 点で求めた場合よりは高いものの、7.8~9.3 ng/mL となり、やや低い濃度となった。これらの結果から、初期濃度に近い 1 点を用いた場合の方が、多数の検量点を用いた場合よりも良好な結果が得られると考えられた。

### 2. 検討農薬の選定

予備検討の結果を踏まえ、表 1-2 に示した 15 農薬(有機塩素系殺虫剤: aldrin、 $\alpha$ -BHC、有機リン系殺虫剤: chlorfenvinphos、chlorpyrifos、coumaphos、diazinon、dimethoate、fenitrothion、isoxathion、phosmet、ピレスロイド系殺虫剤: cypermethrin、permethrin、チオカーバメイト系除草