

食品衛生基準科学研究費補助金

食品安全科学研究事業

食品中残留農薬等の試験法開発における
課題の解決に向けた研究

令和6年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 田口 貴章

(国立医薬品食品衛生研究所)

令和7（2025）年3月

目 次

I. 総括研究報告

食品中残留農薬等の試験法開発における課題の解決に向けた研究（田口 貴章）----- 1

A. 研究目的

B. 研究方法

1. 全体概要

2. 分担研究について

C. 研究結果及び考察

課題1 残留農薬等分析における試料調製方法の検討

課題2 公示試験法の精製操作の簡便化・迅速化及び自動化に向けた検討

課題3 前処理と分析装置のオンライン化を目指した半自動分析法の確立

D. 結論

E. 健康危機情報

F. 研究発表

G. 知的財産権の出願・登録状況

II. 分担研究報告

課題 1. 残留農薬等分析における試料調製方法の検討（志田 静夏）----- 16

A. 研究目的

B. 研究方法

C. 研究結果及び考察

D. 結論

E. 研究発表

F. 知的財産権の出願・登録状況

課題 2. 公示試験法の精製操作の簡便化・迅速化及び自動化に向けた検討（志田 静夏）----- 56

A. 研究目的

B. 研究方法

C. 研究結果及び考察

D. 結論

E. 研究発表

F. 知的財産権の出願・登録状況

課題 3. 前処理と分析装置のオンライン化を目指した半自動分析法の確立（亀山 浩）----- 71

- A. 研究目的
- B. 研究方法
- C. 研究結果
- D. 考察
- E. 結論
- F. 健康危機情報
- G. 研究発表
- H. 知的財産権の出願・登録状況

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

----- 88

食品衛生基準科学研究費補助金（食品安全科学研究事業）
令和 6 年度 総括研究報告書

食品中残留農薬等の試験法開発における課題の解決に向けた研究

研究代表者 田口 貴章（国立医薬品食品衛生研究所 食品部・第一室長）

研究要旨

食品の残留農薬等検査において、我が国の公示試験法は精製度が高いため、夾雑成分の影響を受け難く測定装置への負担も少ないが、操作時間が長い、溶媒等の使用量が多い等の難点がある。残留農薬等検査では、分析結果の信頼性の向上が求められている一方、検査の効率化、迅速化、コスト削減も望まれている。本研究では、農薬等の検出を困難にする夾雑物を含む食品や、特定の食品に含まれると検出困難な農薬等について高感度かつ高精度な測定法等を確立すると共に、分析結果の信頼性向上及び検査の迅速化を目的とし、以下の検討を行った。

課題 1 残留農薬等分析における試料調製方法の検討

食品中の残留農薬等の分布は不均一であるため、精確な分析値を得るには均質な試料を調製後、分析に供する必要がある。「農産物における試料調製方法及び試料の均質性が分析結果へ与える影響」では、農薬を散布して栽培したブロッコリーを用いて粗大な固形物が残存する粗粉碎試料、固形物が微細な微粉碎試料及び凍結粉碎試料を調製し検討を行った。その結果、均質化が不十分で粗大な固形物を多く含む粗粉碎試料での分析値は微細な均質化試料よりも低くなる傾向が確認された。試験用篩を用いた試料均質性の評価では、微細に均質化された試料は目開き 1 mm 篩を約 90%通過可能であった。トマト及びハウレンソウと同様であったことから、これが十分な均質化状態の目安となると考えられた。また、「畜水産物における試料調製方法の検討」では、牛及び豚の肝臓に農薬等を添加後、常温磨砕法または凍結粉碎法により試料調製し、回収率を比較することで、凍結粉碎法による農薬等の減少抑制効果を検証した。その結果、常温磨砕法では酵素や試料成分との反応等により減少しやすい農薬等においても、凍結粉碎法を用いることで減少を抑制できる場合があることが示された。

課題 2 公示試験法の精製操作の簡便化・迅速化及び自動化に向けた検討

残留農薬等検査において使用頻度が高い公示試験法（通知一斉試験法等）の精製操作について、ミニカラムの充填剤量や使用溶媒量等の少量化、濃縮操作の省略等を検討し、簡便化を図るとともに、操作時間の短縮、さらに確立した方法の自動化を検討する。本年度は、通知一斉試験法「LC/MS による動物用医薬品等の一斉試験法Ⅰ（畜水産物）」の精製方法を簡便化し、より夾雑成分の除去効果の高い方法へ改良し、妥当性を確認した。

課題 3 前処理と分析装置のオンライン化を目指した半自動分析法の確立

我が国からの食品輸出促進のための食品の衛生管理手法の国際調和及びその推進のため、精製操作から LC-MS/MS 分析までをオンライン化し半自動化を検討した。本年度は、大豆中の Gly、Glu 及び代謝物の LC-MS/MS を用いた 5 成分一斉分析法のオンライン化を行った。またほうれんそうを対象として、LC-MS/MS を用いたネオニコチノイド系農薬 17 成分を一斉分析する方法を開発し、実試料への適用を試みた。試料中の各農薬が MRL または一律基準値(0.01 ppm)になるよう添加した添加回収

試験の結果、真度、併行精度、室内再現精度ともに概ね目標値に収まる良好な結果が得られた。本法を市販ほうれんそう 9 試料に適用し分析を行ったところ、本法は、ほうれんそう中のネオニコチノイド系農薬の分析法として適用可能であると示唆された。

本研究における本年度の研究体制

- ・田口貴章（国立医薬品食品衛生研究所 食品部・第一室長）[代表]
- ・志田静夏（国立医薬品食品衛生研究所 食品部・第三室長）[分担]
- ・穂山浩（星薬科大学 薬学部薬品分析化学研究室・教授）[分担]
- ・齋藤真希（国立医薬品食品衛生研究所 食品部）[協力]
- ・望月龍（国立医薬品食品衛生研究所 食品部）[協力]
- ・伊藤里恵（星薬科大学 薬学部薬品分析化学研究室）[協力]
- ・岩崎雄介（星薬科大学 薬学部薬品分析化学研究室）[協力]
- ・勝本叶香（星薬科大学 薬学部薬品分析化学研究室）[協力]
- ・原野幹久（星薬科大学 薬学部薬品分析化学研究室）[協力]
- ・野村昂聖（星薬科大学 薬学部薬品分析化学研究室）[協力]
- ・藤田優麻（星薬科大学 薬学部薬品分析化学研究室）[協力]
- ・佐々野僚一（星薬科大学大学院、アイスティサイエンス社）
- ・堤智昭（国立医薬品食品衛生研究所 食品部）[協力]
- ・菊地博之（国立医薬品食品衛生研究所 食品部）[協力]
- ・坂井隆敏（国立医薬品食品衛生研究所 食品部）[協力]

A. 研究目的

食品の残留農薬等検査において、我が国の公示試験法は精製度が高いため、夾雑成分の影響を受け難く測定装置への負担も少ないが、操作時間が

長い、溶媒等の使用量が多い等の難点がある。残留農薬等検査では、分析結果の信頼性の向上が求められている一方、検査の効率化、迅速化、コスト削減も望まれている。本研究では、農薬等の検出を困難にする夾雑物を含む食品や、特定の食品に含まれると検出困難な農薬等について高感度かつ高精度な測定法等を確立すると共に、分析結果の信頼性向上及び検査の迅速化を目的とし、以下の検討を行った。

課題 1 残留農薬等分析における試料調製方法の検討

食品に残留する農薬等の分布は不均一であるため、精確な分析値を得るには均質な試料を調製後、分析に供する必要がある。しかしながら、十分に均質な試料状態を規定するために必要な科学的知見や、ミキサーを用いた試料調製法の性能評価に関する報告事例は少ない。

【1】農産物を対象とした試料の均質性が分析結果に与える影響の評価と均質性評価指標の提案

令和4年度は果菜類のトマト、令和5年度は葉菜類のほうレンソウを供試作物とした。トマトにおいて、作物の不十分な均質化は分析値の正確度及び精度を低下させる可能性が示唆され、試料秤取量が少ないほどその影響は大きくなる傾向を確認した。ほうレンソウにおいても同様の傾向が確認されたが、トマトと比較して均質化状態及び秤取量の少量化が分析結果に与える影響は小さかった。また、両作物ともに試料の十分な均質化状態の判断指標として、均質化した試料を目開き1 mm 篩に負荷した際の通過率が90%となること目安となると考えられた。本年度は、トマト及びほうレンソウと形質が異なる花野菜であるブロッコリーを供試作物として、同様の調査を実施した。

[2] 畜水産物における適切な試料調製方法の提案と凍結粉碎法の有用性の検証

畜産物において、凍結粉碎法による試料調製が農薬等の減少抑制に有効であるかを検証することを目的とした。残留農薬等検査においては、一般に常温磨砕法により試料調製が行われているが、一部の農薬等は試料調製の際に分解等により濃度が低下し、過小評価の原因となることが知られている。試料調製中の損失の主な要因には、試料成分への吸着、酵素や他の試料成分との反応による分解、光分解、揮散などがある。このうち、吸着や分解を抑制する方法としては、酸（リン酸、塩酸等）や緩衝液、抗酸化剤などを添加して試料調製する方法があるが、一斉分析法においては他の農薬等の安定性への影響や抽出効率の低下等が懸念される。一方、ドライアイスや液体窒素を用いた凍結粉碎によって試料調製する方法は、他の農薬等の安定性や抽出効率に影響することなく、試料調製中の農薬等の分解等を抑制できる可能性が高い。そこで本研究では、常温磨砕法によって生じる農薬等の減少が、凍結粉碎法によってどの程度抑制されるかを検討し、凍結粉碎法の有用性を検証した。

課題 2 公示試験法の精製操作の簡便化・迅速化及び自動化に向けた検討

食品中の残留農薬等の一斉試験法（通知一斉試験法）として「LC/MS による農薬等の一斉試験法 I（農産物）」等が公示されているが、溶媒や試薬の使用量が多く、操作時間も長いため、試験法の簡便化・迅速化が望まれている。本研究では、通知一斉試験法の抽出方法は変更せず、精製方法のみを改良することにより、規格基準への適否判定に用いることができる簡便・迅速な一斉分析法を確立することを目的とした。

試薬や溶媒を少量化するとともに、一連の精製操作の自動化を図ることとした。本年度は、通知一斉試験法「LC/MS による動物用医薬品等の一斉試験法 I（畜水産物）」の精製操作を改良し、確立した分析法の性能を評価した。

課題 3 前処理と分析装置のオンライン化を目指した半自動分析法の確立

我が国からの食品輸出促進のための食品の衛生管理手法の国際調和及びその推進のため、高毒性農薬及びネオニコチノイド農薬等を対象として、抽出は QuEChERS 法等の国際的に汎用されている方法と同じ溶媒を用い、その後の精製操作を変更すると共に精製操作から LC-MS/MS 分析までをオンライン化し半自動化を検討することで、迅速、簡便で、高感度かつ高精度な残留農薬等検査法の確立を目指す。本年度は、ネオニコチノイド系農薬は、ニコチンに類似した構造を持つ殺虫剤であり、国内外で広く使用されている。農薬・作物ごとに MRL（残留基準値）が設定され、MRL を超えた作物の販売や流通は禁止されている。近年日本で輸出入された農作物において MRL を上回るネオニコチノイド系農薬が検出された違反事例が報告されており、食品の安全確保に向けた簡便かつ迅速な分析法の開発が必要となっている。

公定法の分析は煩雑で前処理に時間を要することや、使用する溶媒量が多いこと等への懸念があり、これらを改善した迅速で簡便な一斉分析法が必要とされている。ほうれんそう中の複数のネオニコチノイド系農薬を同時分析した例は存在するが、日本の MRL を反映した例はないため、本研究では日本におけるほうれんそうの MRL に沿った分析法の開発を行った。ほうれんそうから残留農薬分析の前処理に一般的に用いられる方法である QuEChERS 法の抽出法と固相抽出法を組み合わせた方法を用いて抽出・精製を検討した。そして LC-MS/MS を使用し、ネオニコチノイド系農薬とそれらの代謝物 17 成分を一斉分析する方法の開発を試みた。

B. 研究方法

1. 全体概要

研究は、残留農薬等試験法開発の専門家で構成される班会議を開催し、各課題の目標、計画、進捗等について議論し、実施した。

班会議の参加者と開催状況は以下の通り。

【参加者】

- ・田口 貴章（国立医薬品食品衛生研究所 食品部 第一室長）
- ・志田 静夏（国立医薬品食品衛生研究所 食品部 第三室長）
- ・亀山 浩（星薬科大学 薬学部薬品分析化学研究室 教授）
- ・伊藤 里恵（星薬科大学 薬学部薬品分析化学研究室 準教授）
- ・根本 了（国立医薬品食品衛生研究所 食品部主任研究官）
- ・菊地 博之（国立医薬品食品衛生研究所 食品部 主任研究官）
- ・林 亜紀子（消費者庁 食品衛生基準審査課 残留農薬等基準審査室 室長）
- ・中村 俊輔（消費者庁 食品衛生基準審査課 残留農薬等基準審査室 専門官）
- ・正木 紀子（消費者庁 食品衛生基準審査課 残留農薬等基準審査室 審査官）
- ・渡辺 寿子（消費者庁 食品衛生基準審査課 残留農薬等基準審査室 専門官）
- ・堤 智昭（国立医薬品食品衛生研究所 食品部部長）

【開催状況】

- ・令和6年7月10日（木）（オンライン）
- ・令和7年2月14日（火）（オンライン）

2. 分担研究について

課題 1 残留農薬等分析における試料調製方法の検討

【1】農産物を対象とした試料の均質性が分析結果に与える影響の評価と均質性評価指標の提案

1. 分析標準物質

ジノテフラン、イミダクロプリド、マラソン、

ダイアジノン、フルフェノクスロン、フルベンジアミド、ペルメトリン。

2. 供試試料

作物名：ブロッコリー

分析部位：花蕾（葉を除去したもの）

3. 残留分析方法

分析操作は、厚生労働省通知の「LC/MSによる農薬等の一斉試験法I(農産物)」に準拠して実施した。なお、抽出方法を除き、精製の省略や定量時の機器条件の変更など一部の方法は改変した。

4. 試料均質化状態の評価

4.1. 常温での均質化時間の比較

市販品ブロッコリーを蕾と茎に切り分けそれぞれ細切した。それらをミキサーに移し、常温条件で0.5, 1, 2及び4分間均質化したものの一部をシャーレに分取し、その状態を観察した。

4.2. 凍結粉碎試料の調製

市販品ブロッコリーを4.1項を同様の方法で蕾と茎に分けて細切した後、冷凍庫に保管して凍結した。ミキサーで固形状ドライアイス(試料0.5倍量)を粉碎しパウダー状にし、凍結したブロッコリー試料に加え混合した。続いて、ドライアイスで予冷したミキサーに、ドライアスを混合した凍結ブロッコリー試料の約半量を予冷した入れ、数秒間均質化した。その半量を予冷したミキサーに入れ、数秒間均質化した。残りの試料をミキサーに入れ、さらに4分間均質化した。凍結粉碎後の試料を、完全に密閉しない状態で冷凍庫に入れ、1晩かけてドライアスを昇華した。

4.3. 均質化評価用試験篩の目開きの大きさおよび通過手法の比較

市販のブロッコリーを4.1項と同様の方法で蕾と茎に分けて細切した後、常温のミキサーで均質化して、粗大な固形物が残存する『粗粉碎試料』及び固形物が微細な状態である『微粉碎試料』をそれぞれ調製した。また、4.2項と同様の方法で『凍結粉碎試料』を調製した。調製した微粉碎試料または凍結粉碎試料250gを目開き1mm篩に負荷し、約5分間静置後に篩上の残渣重量を測定した。また、粗粉碎試料250gを目開き1mmま

たは 2 mm 篩に負荷し、ヘラ処理または流水洗浄処理を実施して通過率を算出した。

5. 各検討に用いる分析用試料の秤取

5.1 分析試料の秤取量および試料静置の影響

圃場施設で栽培した処理区試料の粗粉碎試料、微粉碎試料及び凍結粉粉碎試料を均質化直後にそれぞれ 2 L ビーカーに充填した。各試料の中層から、1.00, 2.00, 5.00, 10.0 及び 20.0 g の分析試料を各 6 点秤取し、それらの農薬濃度を分析した。

5.2 遠心分離後の沈殿物と上澄み液の比較

よく混和した処理区の粗粉碎試料及び微粉碎試料の中層から、分析試料 20.0 g を各 2 点秤取し、遠心分離 (10000×g, 10 分, 20°C) した。

6 部位別の残留濃度の比較

圃場施設で栽培した処理区試料 1.2 kg を 4.1 項と同様の方法で蕾と茎に分けて細切し、それぞれの部位ごとの重量を測定した。各部位ごとにミキサーで 4 分間均質化した後、各均質化試料の中層から、20.0 g の分析試料を各 6 点秤取し、それらの農薬濃度を分析した。

各検討の詳細な内容については分担研究報告書を参照されたい。

[2] 畜水産物における適切な試料調製方法の提案と凍結粉砕法の有用性の検証

1. 食品

牛の筋肉 (オーストラリア産)、牛の肝臓 (国産) 及び豚の肝臓 (国産) はインターネットを介して購入した。

2. 装置

粉碎機は Robot Coupe BLIXER-3D (エフ・エム・アイ製) を用いた。

3. 試験溶液の調製

(1) 抽出

抽出は、通知一斉試験法「LC/MS による動物用医薬品等の一斉試験法 I (畜水産物)」に従って行った。

(2) 自動前処理装置を用いた精製

精製は分担課題 2「公示試験法の精製操作の簡便化・迅速化及び自動化に向けた検討」で開発した

自動前処理装置を用いた方法で行った。

4. 農薬等の添加後放置時間の回収率への影響の検討

牛の筋肉、牛の肝臓及び豚の肝臓の常温磨砕試料を用いて、農薬等の添加後放置時間の回収率への影響を以下のように検討した。検討対象は 65 化合物とした。

5. 試料温度の回収率への影響の検討

常温試料における回収率及び凍結試料における回収率を求めた。

6. 試料調製方法による回収率への影響の検討

凍結粉砕法により均質化した試料 10.0 g を量り採り (5 個)、「3. 試験溶液の調製」に従って分析を行った。なお、定量はマトリックス検量線法により行った。また、常温磨砕法により均質化した試料 10.0 g を量り採り (5 個)、「5. 試験溶液の調製」に従って分析を行った。なお、農薬等を添加後、抽出溶媒を加えるまでの時間は 30 分であった。なお、定量はマトリックス検量線法により行った。

各操作の詳細については分担研究報告書を参照されたい。

課題 2 公示試験法の精製操作の簡便化・迅速化及び自動化に向けた検討

1. 試料

牛筋肉 (モモ肉)、牛肝臓、牛脂肪及び牛乳はインターネットを介して購入した。牛筋肉、牛肝臓及び牛脂肪は磨砕装置を用いて細切均一化したものを用いた。

2. 分析対象化合物

動物用医薬品標準溶液は林純薬工業製の PL 動物薬 LC/MS Mix 1 及び Mix 2、富士フイルム和光純薬製の動物用医薬品混合標準液 (マクロライド) 並びに動物用医薬品混合標準液 (ホルモン剤) を用いた。

3. 試験溶液の調製

(1) 抽出

抽出は通知一斉試験法「LC/MS による動物用医薬品等の一斉試験法 I（畜水産物）」に従って行った。

(2) 精製

次の操作を、自動前処理装置を用いて行った。C18-50 ミニカラム 2 個をノズルを挟んで連結した。これにアセトニトリル 1 mL を負荷し、コンディショニングした後、ノズルから水 0.2 mL を注入しながら、アセトニトリル/水 (9/1) 1 mL を負荷し、コンディショニングした。続いてノズルから水 0.4 mL を注入しながら、抽出液 2 mL を負荷した後、ノズルから水 0.2 mL を注入しながら、アセトニトリル/水 (9/1) 0.5 mL を負荷し、溶出した。得られた溶出液を 0.1 vol% ギ酸で 4 mL に定容し、試験溶液とした。

各操作の詳細については分担研究報告書を参照されたい。

課題 3 前処理と分析装置のオンライン化を目指した半自動分析法の確立

1. 分析対象化合物

アセタミプリド、イミダクロプリド、ジノテフラン、チアメトキサム、クロチアニジン、チアクロプリド、チアクロプリド-アミド、フロニカミド、TFNG、TFNA、ニテンピラム、CPMA、CPMF、スルホキサフロル（異性体混合品）、エチプロール、フィプロニル、フルピラジフロル。

2. 測定装置および LC-MS/MS 最適条件

分析法の開発にあたり、高速液体クロマトグラフ-タンデム質量分析計 (LC-MS/MS) を使用した。高速液体クロマトグラフ部分は全て島津製作所社製でポンプは LC-30AD 等、タンデム質量分析計部は島津製作所社製の LCMS-8060 を使用した。分析用のカラムは InertSustain ODS-3 (150 mm × 2.1 mm, 3 μm, GL Sciences 製) を使用した。注入する試料と移動相の初期濃度の溶媒組成比の違いを緩和すべく、オートサンプラーの共注入設定を用いて 4 μL の注入に伴い 40 μL の水を共注入した。移動相の流速は 0.2 mL/min で、B conc. 5% (0-1 min) -99% (13-20 min) -5% (20-30 min) のグラ

ジエント溶出で測定した。MS/MS は ESI (エレクトロスプレーイオン化 (Electrospray ionization)) 法でイオン化し、フィプロニルはネガティブモード、その他の成分はポジティブモードを用いて MRM (多重反応モニタリング (Multiple reaction monitoring)) で測定した。

3. 抽出

ほうれんそうを液体窒素で凍結させ粉砕機を用いて粉砕し、10 g を量りとした。アセトニトリル 10 mL を加え、振とうした。続いて混合塩 2.5 g を加え、振とうした。さらに硫酸マグネシウム 4.0 g を加え、振とうした後、遠心分離しその上澄液を試料抽出液とした。

4. 精製

固相カートリッジは PBX-20 mg、PSA-30 mg、PBX-20 mg の順番で連結した。アセトン及びアセトニトリルを順次通液してコンディショニングを行った。一番下に連結した PBX-20 mg を外し、PBX-20 mg、PSA-30 mg を連結したものに、抽出液の上相 500 μL を分取して負荷した後、アセトニトリル水溶液 500 μL を通液した。溶出液はすべて試験管にとり、超純水 500 μL を加えた。コンディショニングの後に外した PBX-20 mg に、試験管内の溶液を全量負荷し、溶出液は上と異なる試験管で受けた。元の試験管にアセトニトリル水溶液 500 μL を加え、固相カートリッジに試験管内の溶液を全量負荷した。溶出液は 2 つ目の試験管で受け、全量 2 mL を測定用溶液とした。

各操作の詳細については分担研究報告書を参照されたい。

C. 研究結果及び考察

課題 1 残留農薬等分析における試料調製方法の検討

[1] 農産物を対象とした試料の均質性が分析結果に与える影響の評価と均質性評価指標の提案

1. 圃場試験の概要

茨城県で露地栽培されたブロッコリーに 7 種の農薬製剤を 2 回混用散布した後、最終散布 1 日後

に採取した花蕾を供試試料とした。供試試料の平均個体重量は約 279 g であり、栽培地域の農業慣行に従った適切な作物試料であった。

2. 分析法の妥当性評価

各分析対象農薬の妥当性確認時に作成した検量線の直線性は、相関係数 0.99 以上と良好であった。市販品の無添加試料における各分析対象農薬の分析結果は、全て定量限界未満であり、クロマトグラム上の各分析対象農薬の保持時間に定量限界相当量の 30%を超える妨害ピークは認められず、選択性に問題は認められなかった。

市販品の微粉碎試料に各分析対象農薬を 0.01 mg/kg 添加した試料からの平均回収率は、89～109%であり、その併行相対標準偏差 (RSDr) は 6%以下であった。0.5 mg/kg 添加試料での平均回収率は、87～104%であり、RSDr は 5%以下であった。ジノテフラン等の 5 mg/kg 添加試料、及びダイアジノンの 15 mg/kg 添加試料からの平均回収率と RSDr も規定の範囲内の結果であった。

3. 試料均質化状態の評価

3.1. 均質化時間及び均質化温度の比較

均質化時間が長くなるに伴い固形物が微細になり、繊維質が多く硬い茎より、比較的柔らかい蕾の方が短時間の均質化でも微細になりやすいことを確認した。観察結果から、0.5 分間均質化した試料を目視で明らかな粗大な固形物が確認できる『粗粉碎試料』とした。また、4 分間均質化した試料を大きな固形物が見られず、弊所の通常分析と同程度の微細状態に均質化されていると判断し、これを『微粉碎試料』とした。

ドライアイス共存下でミキサー均質化した『凍結粉碎試料』は、常温状態のミキサーで 4 分間均質化した微粉碎試料と同様に大きな固形物が見られず、試料が微細な状態まで均質化されることを確認した。また、試料温度は、均質化前の細切した凍結状態で -11.2°C であった。その後、ドライアイスの添加により温度計の計測可能下限温度である -50°C まで低下し、ミキサーでの均質化後の試料温度も変わらず -50°C であった。冷凍庫内でのドライアイス昇華後では -18.1°C まで上昇

した。均質化後の試料は -50°C と十分に低温に保たれており、パウダー状態であったことから、ドライアイスの添加量は適切であったと考えられる。

3.2. 均質化評価用試験篩の目開き及び通過手法の比較

均質化したブロッコリー試料のヘラ処理後における平均通過率 (作業者間の通過率の差) は、粗粉碎試料の 1 mm 篩で 7% (4%), 2 mm 篩で 36% (8%), 微粉碎試料の 1 mm 篩で 41% (10%), 凍結粉碎試料の 1 mm 篩で 19% (6%) であった。流水洗浄処理における平均通過率 (作業者間の通過率の差) は、粗粉碎試料を 2 mm 篩、微粉碎試料を 1 mm 篩、凍結粉碎試料を 1 mm 篩に負荷した場合、洗浄時間が長くなるに従い増加し、最終洗浄時間での平均通過率は、それぞれ 81% (0%), 89% (1%), 94% (0%) となった。一方、粗粉碎試料の 1 mm 篩負荷時では、洗浄時間 8 分間まで篩への試料負荷重量よりも残渣重量が大きくなったため通過率は負の値を示した。これは、篩の網目に粗大な固形物が目詰まりした状態で流水による洗浄を実施したことで、水が篩上に保持され残渣重量が増加した結果である。

ヘラ処理と流水洗浄処理の各篩通過手法を比較すると、粗粉碎試料の 2 mm 篩及び微粉碎試料及び凍結粉碎試料の 1 mm 篩における平均通過率は、ヘラ処理よりも最終洗浄時間での流水洗浄処理で 45%以上高くなった。これは、ヘラ処理で篩を通過できなかった篩の網目等へ付着した微細な残渣が、流水洗浄処理では洗い流せることに起因すると考えられた。しかし、粗粉碎試料の 1 mm 篩負荷時での通過手法による平均通過率の差は 2%とわずかであり、流水洗浄処理よりもヘラ処理で高くなった。負荷試料が粗大かつ篩の目開きが細かい場合は、篩の網目の目詰まりにより流水洗浄処理時においても微細残渣の通過が阻害されている可能性が考えられた。

以上の結果から、ヘラ処理よりも流水洗浄処理の方が、本来、篩に残らない 1 mm 未満の微細な残渣を正確に通過させることが可能であり、異な

る作業員間での再現性が高いことから、均質化試料の通過率評価方法として適切であると考えられた。そして、流水洗浄処理での 1 mm 篩における平均通過率は微粉碎試料で 89%、凍結粉碎試料で 94%であることから、微細に均質化された試料は参考規定^{5,6)}で示される目開き 1 mm 篩を約 90% 通過可能であった。

4. 分析試料秤取量の影響

異なる重量 (1~20 g) で分析試料を秤取した際の各農薬の平均濃度を求め、粗粉碎、微粉碎及び凍結粉碎試料について比較した。

同一散布条件での農作物中の各農薬の残留レベルは、散布液中の農薬濃度に依存するため、各農薬の分析値をそのまま総合解析は困難である。また、分析試料量の少量化は、分析値の真度のズレや精度の低下を招くことが知られている。そこで、分析試料秤取量の影響を横断的に評価するために、微粉碎試料での 20 g 秤取時の平均濃度に対する各農薬及び 7 種農薬全体での平均相対濃度を求めた。

各農薬における平均相対濃度は、微粉試料>凍結粉碎試料>粗粉碎試料の順で低くなる傾向を示した。特に、粗粉碎試料におけるマラチオンでは、微粉試料及び凍結粉碎試料よりも顕著に低くなった。マラチオンの相対濃度が、粗粉碎試料において低くなる傾向は、トマト及びホウレンソウを供試作物とした場合にも確認されている。さらに、7 種農薬全体で評価した際の平均相対濃度も個別農薬と同様に微粉試料>凍結粉碎試料>粗粉碎試料の順で低くなる傾向を示した。

粗粉碎試料、微粉碎試料及び凍結粉碎試料における各農薬の分析値の変動 (RSD 値)は、どの試料でも 10%以下であり、均質化の程度及び秤取量を与える影響は不明瞭であった。そこで、包括的な変動評価を実施するために、各農薬の検体 20 g 秤取時の分析値で補正した相対濃度の全農薬での総平均 RSD 値 を算出した。総平均 RSD 値は、微粉試料<凍結粉碎試料<粗粉碎試料の順に大きくなる傾向を示し、微粉試料及び凍結粉碎では秤取量が少なくなるほど大きくなった。

5. 遠心分離後の沈殿物と上澄み液の比較

分取した粗粉碎試料及び微粉試料をそれぞれ遠心分離したが、沈殿と上澄み液に分離しなかったため、両画分中における農薬濃度の分別分析は実施できなかった。これまでの研究に供試したトマト及びホウレンソウの水分含有率は、それぞれ 94.0%及び 92.4%であるのに対してブロッコリーでは 86.2%と低い。そして、ブロッコリーの組織体は比較的保水性が高く、均質化の過程で細胞外に溶出する水分量が少ないため、遠心分離による分別が困難であったと考えられる。

6. 部位別の残留濃度の比較

各部位での農薬濃度にそれぞれの部位の重量を乗じて重量に換算した。農薬重量の各部位での比率から、ブロッコリーの 1 個体における各部位への農薬分布率を算出した (Fig. 11)。蕾と茎の重量比は 43 : 57 であり、個体中では茎の占める割合が蕾よりもわずかに多かった。一方で、各農薬の分布率は、蕾において 98~100%となり、農薬の種類に関わらずほとんどが蕾に分布していた。ブロッコリーは蕾が傘状で、且つ葉が茎を覆う形状であり、散布された農薬は主に蕾と葉部に付着し、茎には付着しなかったと考えられる。この結果より、高濃度で農薬が残留する蕾の分析試料への秤取割合が、分析値の変動に影響を与えると考えられる。

各結果の詳細については分担研究報告書を参照されたい。

[2] 畜水産物における適切な試料調製方法の提案と凍結粉碎法の有用性の検証

1. 農薬等の添加後放置時間の回収率への影響

常温磨砕法により調製した試料中で農薬等がどの程度減少するかを検討するため、牛の筋肉、牛の肝臓及び豚の肝臓の常温磨砕試料に農薬等を添加後、室温で放置し、放置時間による回収率への影響を検討した。添加後の放置時間は 0, 15, 30, 60 分とした。検討対象化合物は 65 化合物とした。いずれの化合物も抽出液に添加した場合の回収率は 80%以上であり、精製以降の操作での損

失はほとんどないものと考えられた。放置時間 30 分で回収率が 70%未満となった化合物は、牛の筋肉では 4 化合物、牛の肝臓では 12 化合物、豚の肝臓では 14 化合物であり、いずれかの食品で 70%未満となった化合物は 16 化合物であった。また、牛と豚の肝臓では試料中の酵素やその他の成分の違いにより、農薬等の分解等のしやすさが異なることが示唆された。いずれかの食品で 30 分後の回収率が 70%未満となった 16 化合物のうち、放置時間 0 分と 30 分の回収率に有意差 (Benjamini-Hochberg 法による FDR (false discovery rate) 補正後の q 値 <0.01) が認められた化合物は、牛の筋肉ではなかったが、牛の肝臓では 8 化合物、豚の肝臓では 14 化合物であった。これらの化合物は放置時間中に試料中の酵素やその他の試料成分との反応等により減少したものと考えられた。一方、牛筋肉中の Cefapirin や Neospiramycin 等、放置時間 0 分と 30 分の回収率に有意差が認められなかった化合物は添加直後に分解等が生じたか、抽出操作中の損失が考えられた。

2. 試料温度の回収率への影響

試料温度が回収率に与える影響を評価するため、常温磨砕により調製した試料 (常温試料) 及び凍結粉砕により調製した試料 (凍結試料) に農薬等を添加し、それぞれ室温または -30°C で 30 分間放置後、抽出操作を開始し、得られた回収率を比較した。牛の筋肉の常温試料で回収率が 70%未満となった化合物は Cefapirin 等 4 化合物であったが、いずれも凍結試料の回収率との有意な差 ($q<0.01$) は認められなかった。このため、これらの化合物は試料を低温にしても回収率の低下を抑制することは困難であると考えられた。

牛の肝臓の常温試料で回収率が 70%未満となった化合物のうち、Ethopabate 等 8 化合物は、いずれも凍結試料の回収率と有意な差 ($q<0.01$) が認められ、試料を低温にすることにより回収率が向上した。しかしながら、常温試料で回収率が 70%未満となった化合物のうち、Cefapirin 等 5 化合物は凍結試料においても回収率が 70%未満に

とどまったことから、一部の化合物では試料を低温にしても、回収率の低下を完全には抑制することはできないことが示唆された。

豚の肝臓で、牛の肝臓と同様に、常温試料で回収率が 70%未満となった化合物のうち、2-Acetylamino-5-nitrothiazole 等 12 化合物は、いずれも凍結試料の回収率と有意な差 ($q<0.01$) が認められ、試料を低温にすることにより回収率が向上した。しかしながら、常温試料で回収率が 70%未満となった化合物のうち、Cefapirin 等 6 化合物は凍結試料においても回収率が 70%未満にとどまったことから、牛の肝臓と同様に、一部の化合物では試料を低温にしても、回収率の低下を完全には抑制できないことが示唆された。

以上の結果から、牛及び豚の肝臓においては一部の農薬等を除き、試料温度を下げることにより、放置中に生じる農薬等の減少を抑制できることが示された。したがって、凍結粉砕法による試料調製を行えば、試料調製中の農薬等の減少を抑制できる可能性が高いことが示唆された。

3. 試料調製方法による回収率への影響

凍結粉砕法による試料調製の農薬等の減少抑制効果を検証するため、試料調製前の検体 (牛及び豚の肝臓) に農薬等を添加後、凍結粉砕法または常温磨砕法により試料調製し、得られた回収率を比較した。検討対象化合物は、「2. 試料温度の回収率への影響」で、牛または豚の肝臓において常温試料で低回収率 ($>70\%$) となった化合物の中から 11 化合物 (Group 1) 及びいずれの食品においても良好な回収率 ($>70\%$) が得られた化合物の中から 10 化合物 (Group 2) を選定した。なお、常温磨砕法の場合は、検体に農薬等を添加後、抽出操作を開始するまでの時間が 30 分となるようにした。Group 2 の農薬等については、常温磨砕法及び凍結粉砕法のいずれで試料調製を行っても 70%以上の回収率が得られ、試料調製中の大きな減少は見られなかった。一方、Group 1 の農薬等では、常温磨砕法で試料調製を行うと回収率が 70%以下となり、ほとんどの農薬等において「2. 試料温度の回収率への影響」で常温試料に添加し

た場合と比較して回収率が低下した。これは農薬等を試料調製前に添加したことで、試料中の酵素や試料成分と接触しやすくなり、分解等が進行したためと考えられた。凍結粉碎法で試料調製した場合も、Group 1 の一部の農薬等では凍結試料に添加した場合と比べて回収率が低下した。一般に、農薬等の分析法の妥当性を添加回収試験によって評価する際には、試料調製から抽出開始までの間に生じる減少を考慮して評価するため、農薬等を試料に添加後、30 分間放置した後に抽出を開始する方法が用いられる。しかし、本検討結果から、均質化後の試料に農薬等を添加して 30 分間放置した場合よりも、試料調製中の減少の方が大きい場合があることが示された。したがって、添加回収試験で良好な回収率が得られた方法を用いても、実際の検査においては残留濃度を過小評価する可能性があると考えられた。

牛の肝臓中の 2-Acetylamino-5-nitrothiazole 等 5 化合物、豚の肝臓中の 2-Acetylamino-5-nitrothiazole 等 6 化合物は、検体に添加後、常温磨砕法により試料調製した場合、低回収率（70%未満）であったが、凍結粉碎法により試料調製することによって回収率が 70%以上となり、統計的な有意差（ $q < 0.01$ ）が認められた。

一方、牛の肝臓中の Tetrachlorvinphos 及び豚の肝臓中の Propoxur は、凍結粉碎法により回収率が改善したものの、回収率は 60%台であり、十分に減少を抑制することはできなかった。また、牛の肝臓中の Azamethiphos 等 5 化合物、豚の肝臓中の Azamethiphos 等 4 化合物は凍結粉碎法においても回収率が 40%未満であり、試料調製中の減少を抑制することができなかった。これらは Azamethiphos（牛及び豚の肝臓）及び Ethopabate（牛の肝臓）を除き、凍結試料に添加した場合も低回収率であり、抽出液に添加した場合はいずれの化合物も回収率が良好（ $> 80\%$ ）であったことから、Azamethiphos 及び Ethopabate を除き、試料調製中に加え、抽出操作中においても損失が生じている可能性が考えられた。特に、極性が高い Cefapirin は抽出溶媒であるアセトニトリルやヘキ

サンへの溶解性が低く、牛の筋肉の凍結試料に添加した場合も低回収率となったことから、抽出段階での損失が低回収率の主要原因であることが示唆された。

以上の結果から、牛及び豚の肝臓において、常温磨砕法による試料調製では農薬等が酵素や試料成分との反応等により減少しやすい化合物であっても、凍結粉碎法による試料調製を行うことで減少を抑制できる場合があることが示された。ただし、凍結粉碎のみでは減少を十分に抑制できない化合物も存在するため、試料調製方法や抽出条件の検討を含めた対応が必要であると考えられた。

各結果の詳細については分担研究報告書を参照されたい。

課題 2 公示試験法の精製操作の簡便化・迅速化及び自動化に向けた検討

1. 試験溶液調製方法の検討

(1) ミニカラムの検討

本検討ではキノロン剤、サルファ剤、ホルモン剤、マクロライド系抗生物質等の 54 化合物を対象とした。抽出は通知一斉試験法「LC/MS による動物用医薬品等の一斉試験法 I（畜水産物）」に従って行った。本試験法の抽出方法はヘキサン及びアセトニトリルの混液を用いてホモジナイズ抽出し、ヘキサン層を除去してアセトニトリル層を採取する方法であるため、大部分の脂質は抽出時に除去される。しかしながら、抽出液中にも低極性夾雑成分が多く含まれていることから、通知一斉試験法と同様に、 C_{18} ミニカラムを用いて低極性夾雑成分を除去することとした。使用する有機溶媒量を削減するため、精製に供する抽出液量は 2 mL（試料 0.2 g 相当）とし、充填剤量 50 mg の C_{18} ミニカラム（C18-50）を用いることとした。通知一斉試験法ではミニカラムへの負荷前に溶媒を除去し極性の高い溶媒に置換するが、操作の簡便化の観点から、そのような操作は行わない方が望ましい。また、負荷液中の夾雑成分に対して充填剤量が不足すると過負荷となり、精製効果が低

下する恐れがある。このため、ミニカラムを2個用いた2段精製を検討した。すなわち、抽出液（アセトニトリル溶液）を希釈や濃縮をせずにそのまま1段目のC18-50ミニカラムに負荷することで脂質成分を概ね除去し、2段目のカラムでノズルから水系溶媒を加えることにより溶媒の極性を上げて様々な夾雑成分を除去することとした。2段目のミニカラムにはC18-30, C18-50, PBX, PLS-3, AXi及びPSAを検討した。

予備検討として、牛筋肉のブランク抽出液に混合標準溶液を0.01 µg/mL (0.1ppm 相当) となるように添加し、種々のミニカラムでの回収率及びマトリックスの影響を求めた。その結果、2段目にもC₁₈ミニカラム (C18-30 又は C18-50) を用いた場合、ほとんどの化合物において良好な回収率が得られた。その他の種々の検討の結果から、牛筋肉で良好な結果が得られたC18-30, C18-50, AXi及びPSAミニカラムについて牛肝臓、牛脂肪及び牛乳での回収率及びマトリックスの影響を確認した。その結果、マトリックスの影響を補正した回収率はいずれのミニカラムを用いた場合も概ね良好で、マトリックスの影響は、牛肝臓ではAXi、牛脂肪及び牛乳ではC18-50で小さく、精製効果が高いことが示唆された。これらの結果から、本研究では1段目と2段目の両方にC18-50を用いることとした。

(2) ノズルから加える水の量の検討

①抽出液負荷時の水量

「(1) ミニカラムの検討」では、1段目のC18-50ミニカラムに抽出液を負荷する際、ノズルから水を0.4 mLを加え、1段目のミニカラムからの溶出液を希釈して2段目のC18-50ミニカラムに負荷した。この時、ノズルから加える水の量を増加させれば精製効果が向上する可能性があると考え、水量を0.8 mLに増加させた場合の回収率および精製効果を検討した。その結果、水量を増加させても回収率の低下は認められなかった。しかし、マトリックスの影響については、水0.4 mLを用いた場合と比較して改善がみられず、抽出液負荷時にノズルから加える水の量を増加させても精製

効果の向上は期待できないことが示唆された。これらの結果から、抽出液負荷時にノズルから加える水の量は0.4 mLとした。

②アセトニトリル/水 (9/1) での溶出時の水量

「(1) ミニカラムの検討」では、1段目のC18-50ミニカラムに抽出液を負荷した後、アセトニトリル/水 (9/1) 0.5 mLで溶出する際に、ノズルから水0.2 mLを加え、1段目のミニカラムからの溶出液を希釈して2段目のC18-50ミニカラムに負荷した。この時も、ノズルから加える水の量を増加させることで、精製効果が向上する可能性があると考え、水量を0.4 mLに増加させた場合の回収率及び精製効果を検討した。その結果、水0.2 mLを加えた場合と比べて特段の改善がみられなかった。このため、1段目のC18-50ミニカラムからアセトニトリル/水 (9/1) で溶出する際にノズルから加える水の量は0.2 mLとした。

(3) 確立した精製方法

確立した精製方法では、1段目のC18-50ミニカラムに抽出液（アセトニトリル溶液）をそのまま負荷し、アセトニトリル/水 (9/1) で溶出することにより、低極性夾雑成分が多く含まれる牛脂肪のような試料においても目詰まりを防ぎ、低極性夾雑成分を効果的に除去することができた。また、2段目のミニカラムへの過負荷を防ぎ、精製効果の低下を抑制できたと考えられる。さらに、1段目と2段目のC₁₈ミニカラムの間にノズルを配置し、ノズルから水を注入して溶出液を希釈し、極性を高めた溶液を2段目のミニカラムに負荷する方法としたことにより、2段目のミニカラムでの精製効果が向上したものと考えられた。

2. 妥当性評価

本研究で確立した自動前処理装置を用いた動物用医薬品一斉分析法の妥当性評価を、「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン（食安発1224第1号，平成22年12月24日）」に従い実施した。牛筋肉、牛肝臓、牛脂肪及び牛乳を用い、添加濃度0.01 ppm、1名が1日1回2併行の試験を5日間実施する試験計画

とした。なお、「(1) ミニカラムの検討」で用いた 54 化合物のうちスルファニルアミドはピーク形状の不良により定量が困難であった。また、ゼラノールは感度が低く、ピーク面積の再現性が得られなかった。このため、上記の 2 化合物を除いた 52 化合物を評価対象とした。

評価対象化合物のいずれにおいても、ブランク試料におけるピーク面積は添加試料におけるピーク面積の 1/10 未満であり、選択性に問題はなかった。真度及び精度の目標値（真度 70～120%、併行精度 25%未満、室内精度 30%未満）を満たす化合物数（全化合物数に対する割合）は、牛筋肉で 45 (87%)、牛肝臓で 41 (79%)、牛脂肪で 48 (92%)、牛乳で 47 (90%) であり、本分析法により約 8 割以上の化合物を精確に定量できることが分かった。

ダノフロキサシンは全ての食品で真度が 120% を超過していた。マルボフロキサシンでは牛筋肉及び牛乳、オフロキサシンでは牛の肝臓及び牛乳において真度が 120%以上となり、マトリックス効果も比較的大きかった。エリスロマイシンについては、真度が目標値を下回り、かつ精度の不良傾向がみられた。エリスロマイシンは酸性溶液中での分解が報告されており、ギ酸を含む試験溶液調製後、LC-MS/MS に注入するまでに分解したことが低真度やばらつきの原因であると考えられた。牛肝臓においてロイコマイシン A5、ネオスピラマイシン I、スピラマイシン I、スルファキノキサリン及びタイロシンの真度が極端に低かった。いずれもマトリックスの影響は小さく、イオン化抑制が原因ではないと考えられた。スルファキノキサリンについては詳細な原因が不明であるが、熱変性させた牛肝臓においては真度が良好という報告から、肝臓における代謝機構の関与が示唆されている。クロステボルも牛肝臓において真度がやや低かった。また、ロイコマイシン A5、ネオスピラマイシン I、スピラマイシン I 及びタイロシンについては牛筋肉及び牛脂肪においても真度が 56～76%とやや低い値となった。これらもマトリックスの影響は小さく、抽出液に添加した場

合の回収率（マトリックスの影響を補正した回収率）は良好であったことから、試料に標準溶液を添加後の放置時間中または抽出操作中に減少したものと考えられた。チルミコシンに関しては真度が目標値を超過していたが、マトリックスの影響は小さいことから、原因は不明でありさらなる検討が必要である。

各結果の詳細については分担研究報告書を参照されたい。

課題 3 前処理と分析装置のオンライン化を目指した半自動分析法の確立

1. MS/MS 条件の検討

17 成分それぞれの標準溶液を用いて MRM 条件の最適化を行った。検討の結果、フィプロニルではネガティブモード、その他の成分ではポジティブモードで良好な感度が得られた。

2. 移動相の検討

本研究でも先行研究と同様に水系移動相にギ酸を添加することとしたが、先行研究と同様の濃度である 0.1%のギ酸を添加したところ、TFNG、TFNA のピーク形状が不良であった。そのため、ギ酸濃度を 0.01%、0.02%、0.1%で添加した場合、またギ酸を添加しない場合で検討を行った。CPMF は 0.1%よりも 0.02%で良好なピーク形状が得られた。TFNG はギ酸を添加しない場合、0.01%、0.02%で添加した場合でそれぞれ複数のピークが見られ、ピーク形状も不良であった。TFNA は、ピーク強度が他のギ酸濃度の添加時に比べて低いものの、0.02%で添加した場合で最もテーリングやリーディング抑えられた。したがって、水系移動相は 0.02%ギ酸含有 0.5 mM 酢酸アンモニウム水溶液、有機系移動相は 0.5 mM 酢酸アンモニウム・メタノール溶液を最適条件とした。

3. 絶対検量線による直線性の確認と定量限界の決定

最適化した LC 条件、MS 条件を用いて絶対検量線による直線性の確認を行った。17 成分の混合

標準液を用いて、1.25、2.5、5.0、10、20 µg/kg の範囲で検量線を作成し、決定係数を算出した。その結果、全成分で $R^2 = 0.9996$ 以上の直線性を示したため、直線性は良好であると判断した。また、検量線の下限值である 1.25 µg/kg を本分析法の定量限界値とした。

4. 固相カートリッジによる精製の検討

今回用いた方法は、アセトニトリルで目的成分の抽出を行ったのち、粉末の代わりに PSA や C₁₈ が充填された固相カートリッジを用いて精製を行う。精製方法の最適条件を検討するにあたり、カートリッジは PSA-30 mg、PSA-50 mg、PBX-20 mg、C₁₈-30 mg を用いた。抽出液（アセトニトリル相）を、PBX と PSA を連結した固相に負荷し、夾雑成分の除去と目的成分の溶出を行ったのち、アセトニトリル水溶液を通液することで目的成分の溶出を行った。

固相カートリッジについての検討は、ほうれんそうでの添加回収試験を行い回収率によって評価した。

極性が比較的低い色素を主に PB で除去する目的から、PBX は2個使用することとし、1個目の PBX に連結させるものとして、PSA-50 mg を用いて検討を行った。結果は5成分が目標値範囲外となった。希釈倍率が低いことによるマトリックス効果による影響と、陰イオン交換系である PSA にカルボキシ基を持つ TFNA、CPMA が相互作用し、固相に保持されたためであると考えた。

極性の低い色素の除去能を向上させるべく、PBX に連結させる固相カートリッジを PSA ではなく、無極性のシリカ系固相である C₁₈ を用いる方法を試みた。この方法では TFNG、TFNA を回収することが出来なかった。この理由として、C₁₈ の固相表面に存在する残留シラノール基とカルボキシ基が相互作用しているためであると考えた。

そのため、PBX-20 mg と C₁₈-30 mg の連結固相に抽出液を負荷・溶出したのち、洗浄液であるアセトニトリル水溶液に 2%ギ酸を加えて固相への

通液を行う方法を試みた。これにより TFNG、TFNA の回収率は改善したが、回収率が 120%以上となる成分が洗浄液に酸を加えなかった場合に比べて増加した。酸を加えると酸性の目的成分が回収しやすくなる一方で、目的成分だけでなく夾雑成分も固相から溶出され、夾雑成分によるイオン化の増強が起こることが考えられた。したがって、C₁₈ 固相カートリッジを用いることは適当でないと判断した。

再び PSA での検討を行い、PSA-30 mg を用いて回収率を算出した。15 成分が目標範囲内に収まり、概ね良好な結果が得られた。PSA の充填量を低下させたことで回収率が向上したことから、PSA を使用せず（PSA-なし）PBX のみで精製を行なう方法を試みた。PSA を使用しない場合、14 成分の回収率が目標範囲内に収まった。PSA-30 mg を用いた場合と PSA-なしの場合とで、回収率に大きな違いは見られなかった。

ほうれんそうへ各農薬成分の MRL 濃度相当の添加を行い、PSA-50 mg、PSA-30 mg、PSA-なしの場合で比較を行った。個別の MRL が設定されている成分とされていない成分では希釈の倍率が異なるため、個別の MRL が設定されている成分のみを対象とした。PSA-50 mg を用いた場合は 10 成分のうち 7 成分、PSA-30 mg を用いた場合は 9 成分、PSA-なしの場合は 4 成分で回収率が目標範囲内となった。PSA-30 mg を用いた場合と PSA-なしの場合において、0.01 mg/kg では回収率に大きな違いは見られなかったが、MRL 相当濃度の添加を行った際には PSA-なしの場合で 120%を超過する成分が多かった。PSA-なしの場合に比べ PSA を使用した場合の方が色素の除去能も高くなり、目的成分の回収と夾雑成分の除去を同時に行うことが可能となった。これらの結果から精製に使用する固相カートリッジは、PBX-20 mg と PSA-30 mg を連結したものと、単独の PBX-20 mg とした。

5. 抽出溶媒の検討

ほうれんそう中から目的の農薬成分を抽出する際に使用するアセトニトリルについて検討を行った。ほうれんそう 10 g 中で 0.01 mg/kg となるように標品を添加し、抽出溶媒のアセトニトリル 10 mL を加えたのち、ぎ酸原液 100 μ L 加えた。回収率は 10 成分で目標範囲内に収まったが、回収率が 120% 以上となる成分が増加していた。固相カートリッジの検討と同様に、酸を加えるとカルボキシ基を有する目的成分が回収しやすくなる一方で、夾雑成分もほうれんそう中から抽出されてしまい、イオン化の増強に繋がるという弊害が起きると考察した。

6. マトリックス効果の算出

添加回収試験で用いた有機栽培ほうれんそうを用いて ME (マトリックス効果 (Matrix effect)) の算出を行うため、抽出液への標準品の添加を行った。

0.01 mg/kg 相当の添加を想定した場合は、目標範囲内の回収率の成分が最も多く得られたのは PSA-なしの場合の 15 成分であった。

個別の MRL 濃度相当の添加を想定した場合には、固相カートリッジ PSA の種類ごとにマトリックス効果を算出したところ、目標範囲内の回収率の成分が最も多く得られたのは PSA-30 mg を用いた場合であり、全成分で目標範囲内に収まった。回収率も PSA-30 mg を用いた場合に良好であったため、使用する固相カートリッジは PSA-30 mg とした。

7. 妥当性評価試験

最適化した LC-MS/MS 条件、サンプルの前処理条件を用いて、厚生労働省のガイドラインに基づき妥当性評価試験を行った。測定対象物を含まないほうれんそうブランクを測定したところ、妨害するピークは検出されなかったため、選択性は十分であると判断した。

ほうれんそうへ添加した標準品の濃度は、MRL が設定されている成分については MRL 濃度、

MRL が設定されていない成分については一律基準である 0.01 mg/kg となるように添加した。

8. 妥当性の確認

得られたクロマトグラムから回収率を算出し、統計処理を一元配置分散分析で行い併行精度および室内再現精度を算出した。MRL が設定されている農薬成分について、フルピラジフロンを除く 9 成分の回収率が目標値範囲内となり、併行精度、室内再現精度は全成分で目標値を満たしていた。

MRL が設定されていない農薬成分について、回収率は 4 成分が目標値範囲内となり、併行精度は全成分、室内再現精度は CPMF を除く 6 成分が目標値を満たしていた。

以上のことから、MRL が設定されている成分、されていない成分それぞれにおいて概ねガイドラインの目標値範囲内に収まる良好な真度と精度が得られ、本分析法の妥当性が確認された。

9. 実試料への適用

本分析法を市販ほうれんそう試料の分析に適用した。国産のほうれんそう試料 A (有機栽培表示) (国産 A)、試料 B (冷凍) (国産 B)、試料 C (国産 C)、中国産の表記があるほうれんそう (冷凍) (中国冷凍) を分析対象とした。いずれも基準値以下であった。親化合物だけでなく代謝物も検出されたことから、代謝物を網羅した分析が必須であることが考えられる。以上のことから、本分析法はほうれんそうの実試料の分析に適用可能であると示唆された。

D. 結論

課題 1 残留農薬等分析における試料調製方法の検討

[1] 農産物を対象とした試料の均質性が分析結果に与える影響の評価と均質性評価指標の提案

農薬を散布して栽培したブロッコリーを用いた調査の結果、均質化が不十分で粗大な固形物を多く含む試料での分析値は相対的に低くなった。

特にマラチオンでは、他の均質化試料と比較して顕著に低くなった。この傾向は、トマト及びハウレンソウを供試試料とした研究結果とも一致することから、不十分な均質化が分析結果に与える影響は、農薬の種類によって異なることが確認された。このように均質化の影響を受けやすい農薬については、試料の不十分な均質化が、残留農薬濃度の過小評価リスクを招くことが示唆された。これまで調査結果から、分析値の変動は、ハウレンソウ<ブロッコリー<トマトの順に大きくなり、変動の大小は作物種により異なることが確認された (Fig 12)。また、均質化の程度に関わらず、秤取量と分析値の変動は負の相関関係を示し、秤取量が少ないほど変動が大きくなることが確認された。そして、各均質化試料の篩通過率から、微細に均質化した試料の約 90%が目開き 1 mm 篩を通過することが確認されたことから、これが十分微細に均質化された試料の目安と位置付けた。なお、この均質化評価の目安は、トマト及びハウレンソウでの調査結果と合致した。

[2] 畜水産物における適切な試料調製方法の提案と凍結粉碎法の有用性の検証

畜産物における試料調製時の農薬等の減少について、常温磨砕法と凍結粉碎法での回収率の比較を通じて、凍結粉碎法による減少抑制効果を検討した。牛及び豚の肝臓を対象とした検討の結果、常温磨砕法により試料調製を行うと、試料中の酵素やその他の試料成分との反応等により、一部の農薬等では大幅な減少が生じた。一方で、凍結粉碎法による試料調製を行うことにより、農薬等によっては、これらの減少を抑制できることが示された。ただし、凍結粉碎のみでは減少を十分に抑制できない化合物も存在することから、留意が必要である。

一般に、分析法の妥当性を添加回収試験により評価する際は、農薬等を添加後 30 分間の放置を経て抽出操作を開始する方法が用いられる。この目的の一つは、試料調製から抽出までの間に生じる農薬等の減少を考慮して評価するためである。しかし、本研究の結果から、均質化後の試料に添

加し 30 分間放置した場合よりも、試料調製中に生じる農薬等の減少の方が大きくなる場合があることが示された。このため、添加回収試験において良好な回収率が得られたとしても、実際の検査においては残留濃度を過小評価する可能性があると考えられた。

課題 2 公示試験法の精製操作の簡便化・迅速化及び自動化に向けた検討

通知一斉試験法「LC/MS による動物用医薬品等の一斉試験法 I (畜水産物)」の精製操作を改良し、簡便かつ迅速な分析法を確立した。本分析法は通知一斉試験法に従って調製した抽出液を、自動前処理装置を用いて C₁₈ ミニカラム (充填剤量 50 mg) で 2 段階精製し、夾雑成分を除去した後、LC-MS/MS で測定する方法である。牛筋肉、牛肝臓、牛脂肪及び牛乳を用いて、52 化合物を対象に添加濃度 0.01 ppm で妥当性評価を行った結果、約 8 割以上の化合物で妥当性評価ガイドラインの目標値を満たした。本分析法は、通知一斉試験法と抽出条件が同一であるため、抽出効率に起因する分析値の差異は生じず、規格基準への適否判定に用いることができる方法である。また、一連の精製操作は通知一斉試験法に比べ小スケールであり、使用する試薬及び溶媒の使用量を大幅に削減することができた。さらに、自動前処理装置を用いることで、操作時間を短縮でき、分析担当者の熟練度に依存しない精度の高い分析が可能であることから、分析の効率化が期待できる方法である。

課題 3 前処理と分析装置のオンライン化を目指した半自動分析法の確立

ほうれんそうを対象として、LC-MS/MS を用いたネオニコチノイド系農薬 17 成分を一斉分析する方法を開発し、実試料への適用を試みた。基準値が設定されている農薬については、いずれも良好な選択性と直線性が得られ、真度、併行精度、室内再現精度ともに概ね目標値に収まる良好な結果が得られた。本法を市販ほうれんそう 9 試料に適用し分析を行ったところ、イミダクロプリド、

ジノテフラン、フロニカミドとその代謝物 2 成分、スルホキサフロル、フィプロニル、クロチアニジン、フルピラジフロロン等の農薬成分が各基準値内の濃度で検出された。本法は、ほうれんそう中のネオニコチノイド系農薬の分析法として適用可能であると示唆された。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Sasano R, Sekizawa J, Saito I, Harano M, Katsumoto K, Ito R, Iwasaki Y, Taguchi T, Tsutsumi T, Akiyama H, Simultaneous Determination of Glyphosate, Glufosinate and their Metabolites in Soybeans using Solid-phase Analytical Derivatization and LC-MS/MS Determination. Food Chem. X, 2024; 24, Article 101806.
2. 田口貴章、堤智昭. 食品中に残留する農薬等有害物質の規制と試験法の現状と課題. Yakugaku Zasshi. 2025;145(2): 93-94.
3. 田口貴章. 残留農薬等試験法の概要. Yakugaku Zasshi. 2025;145(2):101-104.

2. 学会発表

1. 佐々野僚一、穂山浩、関澤純平、原野幹久、勝本叶香、斎藤勲、田口貴章、堤智昭、伊藤里恵、岩崎雄介：オンライン固相誘導体化-LC-MS/MS による大豆中のグリホサート、グルホシネートおよびそれら代謝物の分析法の開発. 日本食品化学学会 第 30 回学術大会 (2024 年 5 月 24 日)
2. 勝本叶香、佐々野僚一、島三記絵、原野幹久、野村昂聖、藤田優麻、岩崎雄介、伊藤里恵、田口貴章、堤智昭、穂山浩：LC-MS/MS を用いたほうれんそう中ネオニコチノイド系農薬とその代謝物の一斉分析法の開発. 日本食

品衛生学会 第 120 回学術講演会 (2024 年 11 月 7 日)

3. 曳埜忍、島田京佳、矢島智成、飯島和昭、田口貴章、志田 (齊藤) 静夏：残留農薬分析における試料均質性の指標の検討～圃場で農薬散布して栽培したほうれんそうを用いた調査～. 第 41 回農薬環境科学・第 47 回農薬残留分析合同研究会, (2024 年 11 月 11 日)
4. 志田 (齊藤) 静夏：残留農薬等分析における試料調製と抽出について. 令和 6 年度食品衛生登録検査機関協会 残留農薬等研修会 (2025 年 1 月 31 日)
5. 野村昂聖、勝本叶香、原野幹久、藤田優麻、佐々野僚一、岩崎雄介、伊藤里恵、田口貴章、堤智昭、穂山浩：LC-MS/MS を用いたトウモロコシ中グリホサートおよびグルホシネートとその代謝物の一斉分析法の開発. 日本薬学会 第 145 年会 (2025 年 3 月 27 日)
6. 藤田優麻、野村昂聖、勝本叶香、原野幹久、佐々野僚一、島三記絵、岩崎雄介、伊藤里恵、田口貴章、堤智昭、穂山浩：LC-MS/MS を用いたいちご中ネオニコチノイドとその代謝物の一斉分析法の開発. 日本薬学会 第 145 年会 (2025 年 3 月 27 日)

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

課題1. 残留農薬等分析における試料調製方法の検討

研究分担者 志田(齊藤)静夏 国立医薬品食品衛生研究所 食品部第三室長

研究要旨

食品中に残留する農薬等の分布は不均一であるため、精確な分析値を得るには十分に均質化された試料を調製し、分析に供する必要がある。また、試料調製中に農薬等が分解することにより濃度が低下する場合、残留濃度を過小評価する可能性があるため、試料調製中の農薬等の減少を抑制することも重要である。本研究では、適切な試料調製方法及び試料の均質性を評価する指標の提案を目的とし、以下の2点について検討を行った。

[1]農産物を対象とした試料の均質性が分析結果に与える影響の評価と均質性評価指標の提案
均質化状態及び試料秤取量が残留農薬分析に与える影響を評価し、試料均質化状態の評価方法及び指標を設定することを目的に、農薬を散布して栽培したブロッコリーを用いて粗大な固形物が残存する粗粉碎試料、固形物が微細な微粉碎試料及び凍結粉碎試料を調製し検討を行った。その結果、均質化が不十分で粗大な固形物を多く含む粗粉碎試料での分析値は微細な均質化試料よりも低くなる傾向が確認された。特にマラチオンは、粗粉碎試料で顕著に分析値が低くなった。この傾向は、果菜類のトマト（令和4年度）及び葉菜類のハウレンソウ（令和5年度）の結果とも合致した。各農薬での分析値の変動は10%以下と小さく、均質化の程度及び秤取量が与える影響は不明瞭であったものの、微粉碎試料の20g秤取時の分析値を基準とした相対濃度の全農薬での変動を用いて評価したところ、分析値の変動と秤取量の間には負の相関関係が確認され、秤取量が少なくなるほど変動が大きくなることが確認された。試験用篩を用いた試料均質性の評価では、微細に均質化された試料は目開き1mm篩を約90%通過可能であった。トマト及びハウレンソウと同様であったことから、これが十分な均質化状態の目安となると考えられた。

[2]畜水産物における適切な試料調製方法の提案と凍結粉碎法の有用性の検証

残留農薬等検査においては、常温磨砕法により試料調製を行うことが多い。しかし、常温磨砕法では、一部の農薬等が試料中の酵素やその他の試料成分との反応等により分解し、濃度が低下することが知られている。これに対し、凍結粉碎法による試料調製では試料温度を低温に保つことができるため、農薬等の分解を抑制できる可能性が高い。本研究では、牛及び豚の肝臓に農薬等を添加後、常温磨砕法または凍結粉碎法により試料調製し、回収率を比較することで、凍結粉碎法による農薬等の減少抑制効果を検証した。その結果、常温磨砕法では酵素や試料成分との反応等により減少しやすい農薬等においても、凍結粉碎法を用いることで減少を抑制できる場合があることが示された。一般に、分析法の妥当性を添加回収試験により評価する際は、試料調製から抽出までの間に生じる農薬等の減少を考慮して評価するため、農薬等を添加後30分間放置した後に抽出操作を開始する。しかし、本検討結果から、均質化後の試料に添加し30分間放置した場合よりも、試料調製中に生じる農薬等の減少の方が大きくなる場合があることが示された。このため、添加回収試験において良好な回収率が得られたとしても、実際の検査においては残留濃度を過小評価する可能性があると考えられた。

研究協力機関

一般財団法人残留農薬研究所

研究協力者

国立医薬品食品衛生研究所 非常勤職員 齋藤
真希

A. 研究目的

食品中に残留する農薬等の分布は不均一であることから、精確な分析結果を得るためには、十分に均質化された試料を調製し、分析に供する必要がある。また、試料調製中に農薬等が分解等により減少する場合、残留濃度が過小評価されるおそれがあるため、試料調製中の農薬等の減少を抑制することも重要である。そこで本課題では、適切な試料調製方法及び試料の均質性の評価指標を提案することを目的として、以下の2点について検討を行った。

[1] 農産物を対象とした試料の均質性が分析結果に与える影響の評価と均質性評価指標の提案

試料の均質化状態及び試料秤取量が残留農薬分析に与える影響を評価し、さらに試料均質化状態の評価指標を設定することを目的とした。令和4年度は果菜類のトマト、令和5年度は葉菜類のホウレンソウを供試作物とした^{1,2)}。トマトにおいて、作物の不十分な均質化は分析値の正確度及び精度を低下させる可能性が示唆され、試料秤取量が少ないほどその影響は大きくなる傾向を確認した。ホウレンソウにおいても同様の傾向が確認されたが、トマトと比較して均質化状態及び秤取量の少量化が分析結果に与える影響は小さかった。また、両作物ともに試料の十分な均質化状態の判断指標として、均質化した試料を目開き1 mm 篩に負荷した際の通過率が90%となることが目安となると考えられた。本年度は、トマト及びホウレンソウと形質が異

なる花野菜であるブロッコリーを供試作物として、同様の調査を実施した。

[2] 畜水産物における適切な試料調製方法の提案と凍結粉碎法の有用性の検証

畜産物において、凍結粉碎法による試料調製が農薬等の減少抑制に有効であるかを検証することを目的とした。残留農薬等検査においては、一般に常温磨砕法により試料調製が行われているが、一部の農薬等は試料調製の際に分解等により濃度が低下し、過小評価の原因となることが知られている。試料調製中の損失の主な要因には、試料成分への吸着、酵素や他の試料成分との反応による分解、光分解、揮散などがある。このうち、吸着や分解を抑制する方法としては、酸(リン酸、塩酸等)や緩衝液、抗酸化剤などを添加して試料調製する方法があるが、一斉分析法においては他の農薬等の安定性への影響や抽出効率の低下等が懸念される。一方、ドライアイスや液体窒素を用いた凍結粉碎によって試料調製する方法は、他の農薬等の安定性や抽出効率に影響することなく、試料調製中の農薬等の分解等を抑制できる可能性が高い。そこで本研究では、常温磨砕法によって生じる農薬等の減少が、凍結粉碎法によってどの程度抑制されるかを検討し、凍結粉碎法の有用性を検証した。

B. 研究方法

[1] 農産物を対象とした試料の均質性が分析結果に与える影響の評価と均質性評価指標の提案

1. 圃場試験の概要

供試試料は日本植物防疫協会 茨城研究所にて、ブロッコリー(品種:ハイツ SP)を露地栽培した。供試農薬製剤7種ならびにその有効成分名、含有率、散布液の希釈率をTable 1に示す。各農

薬製剤は 2024 年 10 月 27 日及び 11 月 4 日に 300 L/10 a 相当量をブロッコリーに 2 回混用散布した。最終散布 1 日後の 11 月 5 日に約 6 kg (279 g/個) の試料 (処理区試料) を収穫し、分析機関である残留農薬研究所に冷蔵便で速やかに送付した。なお、11 月 6 日に農薬を散布せずに栽培した約 2.5 kg の試料 (無処理区試料) を収穫し、分析機関に送付した。なお、本試験試料は、農薬製剤ラベル表示に準拠しない使用方法で農薬が散布された調査研究用試料である。

2. 分析標準物質

ジノテフラン標準品： 99.8%，富士フイルム和光純薬株式会社(大阪府)

イミダクロプリド標準品： 99.1%，富士フイルム和光純薬株式会社(大阪府)

マラソン標準品： 96.4%，富士フイルム和光純薬株式会社(大阪府)

ダイアジノン標準物質： 99.5%，富士フイルム和光純薬株式会社(大阪府)

フルフェノクスロン標準品： 97.90%，Dr. Ehrenstorfer (Germany)

フルベンジアミド標準品： 99.6%，富士フイルム和光純薬株式会社 (大阪府)

ペルメトリン標準品： 99.73%，Dr. Ehrenstorfer(Germany)

3. 供試試料

作物名： ブロッコリー

分析部位： 花蕾 (葉を除去したもの)

4. 残留分析方法

4.1 試薬及び機器

アセトニトリル，トルエン，メタノール：

残留農薬試験用 (関東化学株式会社，東京都)

メタノール： LC/MS 用 (関東化学株式会社)

酢酸アンモニウム： 特級 (関東化学株式会社)

水： PURELAB Chorus System

(ELGA LabWater, UK) で精製した水

GCB/NH₂ 積層ミニカラム：

ENVI-CARB/LC-NH₂, 500 mg/500 mg/6 mL(シグマアルドリッチジャパン 合同会社，東京都)

ミキサー： ロボクーブ Blixer 5-Plus

(株式会社エフ・エム・アイ，東京都)

ホモジナイザー： PT3100D (KINEMATICA AG, Switzerland)

超音波洗浄機： FU-80C

(アイワ医科工業株式会社，東京都)

液体クロマトグラフ・質量分析計 (LC-MS/MS)：

Nexera X2 System

(株式会社島津製作所，京都府)，

Triple Quad 4500 (AB Sciex, USA)

データ処理装置： Analyst (AB Sciex)

4.2 機器及び装置の操作条件

4.2.1. 高速液体クロマトグラフの操作条件

カラム： ACQUITY UPLC BEH C18

(Waters Co., USA)，

内径 2.1 mm，長さ 100 mm，粒径 1.7 µm

溶離液： 5 mmol/L 酢酸アンモニウム／

5 mmol/L 酢酸アンモニウム含有

メタノール (v/v)，90:10 — 5.0 min —

5:95 (4 min 保持)

流量： 0.3 mL/min

カラム温度： 40°C

注入量： 5 µL

4.2.2. 質量分析計の操作条件

イオン化法： エレクトロスプレーイオン化法 (ESI)

正モード：ジノテフラン，マラチオン，

イミダクロプリド，ダイアジノン，

フルフェノクスロン，ペルメトリン

負モード： フルベンジアミド

イオンスプレー電圧： 正モード：5500 V，

負モード: -4500 V

イオン化温度: 650°C

コリジョンガス: N₂

イオン検出法: MRM 法

MS パラメーターを Table 2 に示す。

4.3. 標準溶液の調製

4.3.1 標準原液の作成

ジノテフラン、イミダクロプリド、マラチオン、ダイアジノン、フルフェノクスロン、フルベンジアミド及びペルメトリンの分析標準物質 10.0 mg (純度補正值) をそれぞれ 50 mL 容メスフラスコに精秤し、アセトニトリルで定容して 200 mg/L の標準原液を調製した。

4.3.2 検量線用標準溶液及び検量線の作成

1) イミダクロプリド、マラチオン、ダイアジノン及びフルベンジアミド (溶媒検量線)

4.3.1 項で作成した各標準原液を等量ずつ混合し、アセトニトリルで段階的に希釈して 0.2 mg/L 混合標準溶液を調製し、さらにメタノールで希釈して 0.08 mg/L 混合標準溶液を作成した。この混合標準溶液をメタノール/水 (50:50, v/v) 混液で希釈して、0.00012, 0.0004, 0.0008, 0.002, 0.004 及び 0.008 mg/L の混合標準溶液を調製した。これらの混合標準溶液を LC-MS/MS に注入して、データ処理装置を用いてイミダクロプリド、マラチオン、ダイアジノン及びフルベンジアミドのピーク面積を測定し、横軸に濃度、縦軸にピーク面積をとって各検量線を作成した。

2) ジノテフラン、フルフェノクスロン及びペルメトリン (マトリックス検量線)

4.3.1 項で作成した各標準原液を等量ずつ混合し、アセトニトリルで段階的に希釈して 2 mg/L 混合標準溶液を調製した。この混合標準溶液をメタノール/水 (50:50, v/v) 混液で希釈して、0.0024, 0.008, 0.016, 0.04, 0.08 及び 0.16 mg/L の混合

標準溶液を調製した。これらの混合標準溶液

25 µL と任意の農薬無添加試料の試験溶液

475 µL をそれぞれ混合して、0.00012, 0.0004,

0.0008, 0.002, 0.004 及び 0.008 mg/L のマトリックス

混合標準溶液を調製した。検量線の範囲外となり

試験溶液を希釈して測定する場合は、同様に希

釈した任意の農薬無添加試料の試験溶液を用い

てマトリックス混合標準溶液を調製した。これらのマ

トリックス混合標準溶液を LC-MS/MS に注入して、

データ処理装置を用いてジノテフラン、フルフェノ

クスロン及びペルメトリンのピーク面積を測定し、横

軸に濃度、縦軸にピーク面積をとって各検量線を

作成した。

4.4. 分析操作

分析操作は、厚生労働省通知の「LC/MS による農薬等の一斉試験法I (農産物)」に準拠して実施した。なお、抽出方法を除き、精製の省略や定量時の機器条件の変更など一部の方法は改変した。

4.4.1 抽出

均質化試料 (1.00, 2.00, 5.00, 10.0 及び 20.0 g) を三角フラスコにはかりとり、アセトニトリル 50 mL を加え、ホモジナイザーで 1 分間磨砕抽出した。抽出物をろ紙を敷いた桐山漏斗で吸引ろ過した。ろ紙上の残渣を三角フラスコに戻し、アセトニトリル 20 mL を加え、再度ホモジナイザーで 1 分間磨砕抽出した。ホモジナイザーのシャフトをアセトニトリル 10 mL で洗浄し、抽出物に合わせた。抽出物を同様に吸引ろ過し、ろ液を合わせてアセトニトリルで 100 mL に定容した。

4.4.2. GCB/NH₂ 積層ミニカラム精製

試料 0.2 g 相当量となるよう抽出液の一部 (1~20 mL) を分取した後、約 1 mL まで減圧濃縮した (抽出液分取量 1 mL は除く)。これら溶液をアセトニトリル/トルエン (3:1, v/v) 混液 10 mL で予め前処理した GCB/NH₂ 積層ミニカラムに負荷した。

続いて、アセトニトリル／トルエン (3:1, v/v) 混液 20 mL をミニカラムに負荷した。全ての負荷液を分取した後、減圧濃縮して最後は窒素気流下で溶媒を留去した。

4.4.3. 定量

前項の残留物をメタノール／水 (50:50, v/v) 混液 5 mL で溶解 (超音波処理) し、その溶液を LC-MS/MS に注入してピーク面積を求め、検量線を用いて試料中の各分析対象農薬の残留濃度を算出した。検量線範囲外となる場合は同混液でさらに希釈した。なお、実験操作中を除き、抽出液及び試験溶液は冷蔵暗所に保管した。

4.5. 分析法の妥当性評価

各分析対象農薬の定量限界相当濃度 0.01 mg/kg, 0.5 mg/kg 及び分析試料の最高検出濃度を超える 5 mg/kg (ジノテフラン, イマダクロプリド, マラチオン, フルフェノクスロン, フルベンジアミド及びペルメトリン) または 15 mg/kg (ダイアジノン) 添加試料による回収率の算出結果 (各添加濃度 5 連で実施), ならびに市販品の無添加試料の測定結果により、採用する分析法の妥当性を確認した。

5. 試料均質化状態の評価

5.1. 常温での均質化時間の比較

市販品ブロッコリー約 1 kg を蕾と茎に切り分けた。蕾は約 3×3 cm に細切り、茎は縦に 4 分割した後、約 2 cm に細切した。それらをミキサーに移し、常温条件で 0.5, 1, 2 及び 4 分間均質化した。各均質化時点で、試料の一部をシャーレに分取し、その状態を観察した。

5.2. 凍結粉碎試料の調製

市販品ブロッコリー約 1 kg を 5.1 項を同様の方法で蕾と茎に分けて細切した後、冷凍庫に保管して凍結した。ミキサーで固形状ドライアイス 500 g (試料 0.5 倍量) を粉碎しパウダー状にし、凍結したブロッコリー試料に加え混合した。添加したドライ

アイス量は、既報^{3, 4)}を参考に設定した。続いて、固形状ドライアイス約 100 g をミキサーで約 10 秒均質化してミキサー容器を予冷した。ドライアスを混合した凍結ブロッコリー試料の約半量を予冷したミキサーに入れ、数秒間均質化した。残りの試料をミキサーに入れ、さらに 4 分間均質化した。凍結粉碎後の試料を 2 L ビーカーに移し、完全に密閉しない状態で冷凍庫に入れ、1 晩かけてドライアスを昇華した。なお、ミキサーの外表面には断熱材を巻き、試料秤取用の器具及びビーカーは予冷したものを使用した。また、凍結したブロッコリー試料 (ドライアイス添加前), 均質化前後の試料, ドライアイス昇華後の試料の温度をそれぞれ測定した。

5.3. 均質化評価用試験篩の目開きの大きさおよび通過手法の比較

5.3.1. 均質化試料の調製

市販のブロッコリー約 1 kg を 5.1 項を同様の方法で蕾と茎に分けて細切した後、常温のミキサーで均質化して、粗大な固形物が残存する『粗粉碎試料』及び固形物が微細な状態である『微粉碎試料』をそれぞれ調製した。また、5.2 項と同様の方法で『凍結粉碎試料』を調製した。

5.3.2. 微粉碎試料及び凍結粉碎試料

5.3.1 項で調製した微粉碎試料または凍結粉碎試料 250 g を目開き 1 mm 篩に負荷し、約 5 分間静置後に篩上の残渣重量を測定した。続いて、ヘラ処理または流水洗浄処理後に残渣重量を測定した。ヘラ処理は、シリコン製のヘラでの加圧により試料を通過させ、処理は 10 分間実施した。流水洗浄処理は、水道の蛇口にゴムホース (内径 12 mm) を接続し、流量 4~5 L/min に調整した水道水で篩上の残渣を洗浄し、篩を通過させた。その際、洗浄時間 1 分間毎に、篩に付着した余分な水分を除去した後の篩上の残渣重量を測定した。通過率が一定に達するま

で洗浄を実施し、最長洗浄時間は 10 分間とした。各処理前後での残渣重量から以下の式に従い通過率を算出した。なお、各実験はそれぞれ 2 名の作業員で実施した。

$$\text{通過率 (\%)} = (\text{試料負荷重量} - \text{残渣重量}) / \text{試料負荷重量} \times 100$$

5.3.3. 粗粉碎試料

5.3.1 項で調製した粗粉碎試料 250 g を目開き 1 mm または 2 mm 篩に負荷し、5.3.2 項と同様の方法でヘラ処理または流水洗浄処理を実施して通過率を算出した。なお、各実験はそれぞれ 2 名の作業員で実施した。

6. 各検討に用いる分析用試料の秤取

6.1 分析試料の秤取量の影響

圃場施設で栽培した処理区試料の粗粉碎試料、微粉碎試料及び凍結粉砕試料を均質化直後にそれぞれ 2 L ビーカーに充填した。各試料の中層から、1.00、2.00、5.00、10.0 及び 20.0 g の分析試料を各 6 点秤取し、それらの農薬濃度を分析した。分析試料は、秤取ごとにビーカー内の試料をよく混和した後に操作した。なお、全ての試料はスパーテルを用いて秤取し、凍結粉砕試料秤取時は、予冷したものを使用した。

6.2 遠心分離後の沈殿物と上澄み液の比較

よく混和した処理区の粗粉碎試料及び微粉碎試料の中層から、分析試料 20.0 g を各 2 点秤取し、遠心分離 (10000×g, 10 分, 20°C) した。

7. 部位別の残留濃度の比較

圃場施設で栽培した処理区試料 1.2 kg を 5.1 項と同様の方法で蕾と茎に分けて細切し、それぞれの部位ごとの重量を測定した。各部位ごとにミキサーで 4 分間均質化した後、各均質化試料の中層

から、20.0 g の分析試料を各 6 点秤取し、それらの農薬濃度を分析した。

[2] 畜水産物における適切な試料調製方法の提案と凍結粉砕法の有用性の検証

1. 試料

牛の筋肉(オーストラリア産)、牛の肝臓(国産)及び豚の肝臓(国産)はインターネットを介して購入した。

2. 試薬及び試液

(1) 有機溶媒及び試薬

アセトニトリル、ヘキサンは関東化学製の残留農薬試験用、水、メタノール及びアセトニトリル(LC-MS/MS 測定用)は関東化学製の LC/MS 用を用いた。無水硫酸ナトリウムは富士フイルム和光純薬製の残留農薬試験用、酢酸は富士フイルム和光純薬製の精密分析用、ギ酸は富士フイルム和光純薬製の特級を用いた。

(2) 固相ミニカラム

固相ミニカラムは、オクタデシルシリル化シリカゲル(ODS)ミニカラム Smart-SPE C18-50(充填剤量 50 mg) 及び Smart-SPE C18-30(充填剤量 30 mg) (いずれもアイステイサイエンス製)を用いた。

3. 装置

磨砕装置は Robot Coupe BLIXER-3D(エフ・エム・アイ製)を用いた。ホモジナイザーは Polytron PT 10-35 GT(Kinematica 製)を用いた。振とう機は SR-2DW(タイテック製)、遠心分離機はフロア型冷却遠心機 S700FR(久保田商事製)を使用した。自動前処理装置は残留農薬分析用自動前処理装置 ST-L400(アイステイサイエンス製)を使用した。

LC-MS/MS は Nexera X3(島津製作所製)及び Triple Quad 7500(Sciex 製)を使用した。データ解析は Sciex OS(Sciex 製)を用いて行った。

4. 測定条件

(1)MS 条件

イオン化法 ESI(+)及び ESI(-); イオンスプレー電圧 2000 V; ヒーター温度 450°C(300°C); カーテンガス N₂, 35 psi; ネブライザーガス ドライエアー, 70 psi; ターボガス ドライエアー, 80 psi; コリジョンガス N₂, 7

(2)LC 条件

カラム Inertsustain AQ-C18(内径 2.1 mm, 長さ 100 mm, 粒子径 1.9 µm, ジーエルサイエンス製); カラム温度 40°C; 注入量 2 µL; 移動相 0.1%ギ酸(A 液)及び 0.1%ギ酸・アセトニトリル溶液(B 液); 流速 0.3 mL/min; グラジエント条件 0 分(A:B=98:2)→15 分(A:B=30:70)→15.01 分(A:B=5:95)→20 分(A:B=5:95)→20.01 分(A:B=98:2)

5. 試験溶液の調製

(1)抽出

抽出は, 通知一斉試験法「LC/MS による動物用医薬品等の一斉試験法I(畜水産物)」に従って以下のように行った。

試料 10.0 g に *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 50 mL, *n*-ヘキサン 50 mL 及び酢酸 1 mL を加え, 約 1 分間ホモジナイズした後, 無水硫酸ナトリウム 20 g を加えてさらに約 1 分間ホモジナイズした。毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離した後, *n*-ヘキサン層を捨て, 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 を加えて約 1 分間ホモジナイズし, 上記と同様に遠心分離した。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, アセトニトリルを加えて正確に 100mL(抽出液)とした。抽出液をバイアルに入れ, 自動前処理装置にセットした。

(2)自動前処理装置を用いた精製

精製は分担課題 2「公示試験法の精製操作の簡便化・迅速化及び自動化に向けた検討」で開発した自動前処理装置を用いた方法で行った。(た

だし, 2 段目の C₁₈ミニカラムは充填剤量 30 mg のものを用いた。)

C₁₈(50 mg)ミニカラムの下に C₁₈(30 mg)ミニカラムをノズルを挟んで連結し, アセトニトリル 1 mL でコンディショニングした。次に, ノズルから水 0.2 mL を注入しながら, アセトニトリル/水(9:1)1 mL でコンディショニングした。この連結カラムに抽出液 2 mL を負荷した。このとき, ノズルから水 0.4 mL を注入し, 一段目のミニカラムからの溶出液を希釈して二段目のミニカラムに負荷した。ノズルから水 0.2 mL を注入しながら, アセトニトリル/水(9:1)0.5 mL を注入し, 一段目のミニカラムからの溶出液を希釈して二段目のミニカラムに負荷し, 溶出した。得られた溶出液を 0.1 vol%ギ酸で 4 mL に定容し, 試験溶液とした。感度が十分得られる場合は 10 倍希釈して測定を行った。

6. 農薬等の添加後放置時間の回収率への影響の検討

牛の筋肉, 牛の肝臓及び豚の肝臓の常温磨砕試料を用いて, 農薬等の添加後放置時間の回収率への影響を以下のように検討した。検討対象は Table 6 に示した 65 化合物とした。

牛の筋肉, 牛の肝臓及び豚の肝臓の各検体 500 g を 2 分間常温磨砕法により均質化した。得られた試料 10.0 g を量り採り(3 個), 標準溶液 1 µg/mL を 1 mL 添加した。これを室温で 0, 15, 30 及び 60 分放置後, 「5. 試験溶液の調製」に従って分析を行った。定量はマトリックス検量線法により行った。

7. 試料温度の回収率への影響の検討

常温試料における回収率は, 「6. 農薬等の添加後放置時間の回収率への影響の検討」で得られた放置時間 30 分の結果を用いた。

凍結試料における回収率は次のように求めた。牛の筋肉, 牛の肝臓及び豚の肝臓の各検体 500 g

(約 100 g を 5 個)を粉砕機に入れ、ドライアイス 300 g を加えて直ちに 10 秒間粉砕した。これに、さらにドライアイス 300 g を加えて直ちに 10 秒間粉砕した。その後、さらにドライアイス 150 g を加えて直ちに 100 秒間粉砕した。(ドライアイスの合計使用量は検体重量の約 1.5 倍量(約 750 g), 粉砕時間は合計 2 分間)得られた試料を PP 容器(250 mL 容)に入れ、蓋を緩めた状態で冷凍庫に入れて一晩静置し、ドライアイスを気化させた。試料 10.0 g を量り採り(3 個), 標準溶液 1 $\mu\text{g/mL}$ を 1 mL 添加した。これを冷凍庫で 30 分間放置後、「5. 試験溶液の調製」に従って分析を行った。定量はマトリックス検量線法により行った。

8. 試料調製方法による回収率への影響の検討

(1)凍結粉砕法

粉砕機の容器に検体を正確に 500 g(約 100 g を 5 個程度)になるように量り入れた。検体に混合標準溶液(0.05 mg/mL)を 1 mL 及び Cefapirin 標準溶液(0.1 mg/mL)0.5 mL を添加後、ドライアイス 300 g を加えて直ちに 10 秒間粉砕した。これに、さらにドライアイス 300 g を加えて直ちに 10 秒間粉砕した。その後、さらにドライアイス 150 g を加えて直ちに 100 秒間粉砕した。(ドライアイスの合計使用量は検体重量の約 1.5 倍量(約 750 g), 粉砕時間は合計 2 分間)得られた試料を PP 容器(250 mL 容)に入れ、蓋を緩めた状態で冷凍庫に入れ一晩静置し、ドライアイスを気化させた。試料 10.0 g を量り採り(5 個), 「5. 試験溶液の調製」に従って分析を行った。なお、定量はマトリックス検量線法により行った。

(2)常温磨砕法

粉砕機の容器に検体を正確に 500 g(約 100 g を 5 個程度)になるように量り入れた。検体に混合標準溶液(0.05 mg/mL)を 1 mL 及び Cefapirin 標準溶液(0.1 mg/mL)0.5 mL を添加後、2 分間常温磨

砕法により均質化した。得られた試料 10.0 g を量り採り(5 個), 「5. 試験溶液の調製」に従って分析を行った。なお、農薬等を添加後、抽出溶媒を加えるまでの時間は 30 分であった。なお、定量はマトリックス検量線法により行った。

C. 研究結果及び考察

[1]農産物を対象とした試料の均質性が分析結果に与える影響の評価と均質性評価指標の提案

1. 圃場試験の概要

茨城県で露地栽培されたブロッコリーに 7 種の農薬製剤を 2 回混用散布した後、最終散布 1 日後に採取した花蕾を供試試料とした。試料受領時に撮影した作物写真を Fig. 1 に示す。供試試料の平均個体重量は約 279 g であり、栽培地域の農業慣行に従った適切な作物試料であった。

2. 分析法の妥当性評価

2.1. 検量線の直線性

各分析対象農薬の妥当性確認時に作成した検量線の直線性は、相関係数 0.99 以上と良好であった。

2.2. 選択性

市販品の無添加試料における各分析対象農薬の分析結果は、全て定量限界未満であった。クロマトグラム上の各分析対象農薬の保持時間に定量限界相当量の 30%を超える妨害ピークは認められなかった。よって、当該分析法の選択性に問題は認められなかった。

2.3. 回収率

回収率の算出結果を Table 3 に示す。市販品の微粉砕試料を用いた各分析対象農薬を 0.01 mg/kg 添加した試料での平均回収率は、89～109%であり、その併行相対標準偏差 (RSDr) は 6%以下であった。0.5 mg/kg 添加試料での平均回収率は、87～104%であり、RSDr は 5%以下であっ

た。ジノテフラン、イミダクロプリド、マラチオン、フルフェノクスロン、フルベンジアミド及びペルメトリンの 5 mg/kg 添加試料での平均回収率は、84～109%であり、RSDr は 10%以下であった。ダイアジノンの 15 mg/kg 添加試料での平均回収率は、109%であり、RSDr は 5%であった。以上のように、全ての添加濃度においてどの分析対象農薬も規定の範囲内の結果であった。なお、マトリックス効果が－12～－32%認められたジノテフラン、フルフェノクスロン及びペルメトリンについては、マトリックス検量線を採用した (Table 4 参照)。

3. 試料均質化状態の評価

3.1. 均質化時間及び均質化温度の比較

常温でのミキサー稼働時間別のブロッコリー均質化状態を Fig 2 に示す。均質化時間が長くなるに伴い固形物が微細になり、繊維質が多く硬い茎より、比較的柔らかい蕾の方が短時間の均質化でも微細になりやすいことを確認した。これら観察結果から、0.5 分間均質化した試料を目視で明らかな粗大な固形物が確認できる『粗粉碎試料』とした。また、4 分間均質化した試料を大きな固形物が見られず、弊所の通常分析と同程度の微細状態に均質化されていると判断し、これを『微粉碎試料』とした。

凍結粉碎したブロッコリー試料の調製作業時及び解凍時における状態を Fig 3 に示す。ドライアイス共存下でミキサー均質化した『凍結粉碎試料』は、常温状態のミキサーで 4 分間均質化した微粉碎試料と同様に大きな固形物が見られず、試料が微細な状態まで均質化されることを確認した。また、試料温度は、均質化前の細切した凍結状態で－11.2℃であった。その後、ドライアイスの添加により温度計の計測可能下限温度である－50℃まで低下し、ミキサーでの均質化後の試料温度も変わらず－50℃であった。冷凍庫内でのドライアイス昇華

後では－18.1℃まで上昇した。均質化後の試料は－50℃と十分に低温に保たれており、パウダー状態であったことから、ドライアイスの添加量は適切であったと考えられる。

3.2. 均質化評価用試験篩の目開き及び通過手法の比較

ヘラ処理及び流水洗浄処理による篩通過時の様子を Fig 4、ヘラ処理及び流水洗浄処理後における篩上試料の状態を Fig 5、各均質化試料のヘラ処理及び流水洗浄処理における目開き 1 mm または 2 mm 篩の平均通過率を Fig 6、異なる 2 名の作業員間の通過率の差を Fig 7 に示す。

均質化したブロッコリー試料のヘラ処理後における平均通過率 (作業員間の通過率の差) は、粗粉碎試料の 1 mm 篩で 7% (4%)、2 mm 篩で 36% (8%)、微粉碎試料の 1 mm 篩で 41% (10%)、凍結粉碎試料の 1 mm 篩で 19% (6%) であった。流水洗浄処理における平均通過率 (作業員間の通過率の差) は、粗粉碎試料を 2 mm 篩、微粉碎試料を 1 mm 篩、凍結粉碎試料を 1 mm 篩に負荷した場合、洗浄時間が長くなるに従い増加し、最終洗浄時間での平均通過率は、それぞれ 81% (0%)、89% (1%)、94% (0%) となった。一方、粗粉碎試料の 1 mm 篩負荷時では、洗浄時間 8 分間まで篩への試料負荷重量よりも残渣重量が大きくなったため通過率は負の値を示した。これは、篩の網目に粗大な固形物が目詰まりした状態で流水による洗浄を実施したことで、水が篩上に保持され残渣重量が増加した結果である。この現象は粗粉碎試料の 2 mm 篩での洗浄時間 1 分間でも生じているが、洗浄時間 2 分間以降では篩上の試料が篩を通過し、平均通過率は増加している。このことから、篩の目開きが 2 mm と大きい場合や試料が微細に均質化されている場合には篩の目詰まりは生じに

くいと考えられる。その後、洗浄 9 分以降で通過率は正の値を示し、最終的に洗浄時間 10 分間での平均通過率は 5% (2%) となった。

ヘラ処理と流水洗浄処理の各篩通過手法を比較すると、粗粉碎試料の 2 mm 篩及び微粉碎試料及び凍結粉碎試料の 1 mm 篩における平均通過率は、ヘラ処理よりも最終洗浄時間での流水洗浄処理で 45%以上高くなった。これは、ヘラ処理で篩を通過できなかった篩の網目等へ付着した微細な残渣が、流水洗浄処理では洗い流せることに起因すると考えられた (Fig 5)。しかし、粗粉碎試料の 1 mm 篩負荷時での通過手法による平均通過率の差は 2%とわずかであり、流水洗浄処理よりもヘラ処理で高くなった。負荷試料が粗大かつ篩の目開きが細かい場合は、篩の網目の目詰まりにより流水洗浄処理時においても微細残渣の通過が阻害されている可能性が考えられた。また、2 名の作業員間での通過率の差は、ヘラ処理では 4~10%であるのに対して、流水洗浄処理では 0~2%と小さかった (Fig 7)。したがって、一定流速の流水を用いた処理では作業員によって差が生じにくいことが示唆された。

以上の結果から、ヘラ処理よりも流水洗浄処理の方が、本来、篩に残らない 1 mm 未満の微細な残渣を正確に通過させることが可能であり、異なる作業員間での再現性が高いことから、均質化試料の通過率評価方法として適切であると考えられた。そして、流水洗浄処理での 1 mm 篩における平均通過率は微粉碎試料で 89%、凍結粉碎試料で 94%であることから、微細に均質化された試料は参考規定^{5,6)}で示される目開き 1 mm 篩を約 90%通過可能であった。

4. 分析試料秤取量の影響

異なる重量 (1~20 g) で分析試料を秤取した際の各農薬の平均濃度を Table 5 に示す。平均濃度は、粗粉碎、微粉碎及び凍結粉碎試料において、ジノテフランで 1.70~1.77, 1.94~2.03 及び 1.80~1.88 mg/kg, イミダクロプリドで 1.72~1.86, 1.96~2.03 及び 1.85~1.94 mg/kg, マラチオンで 0.48~0.51, 0.76~0.80 及び 0.70~0.74 mg/kg, ダイアジノンで 6.47~6.88, 6.90~7.63 及び 6.61~7.12 mg/kg, フルフェノクスロンで 0.42~0.45, 0.45~0.53 及び 0.42~0.50 mg/kg, フルベンジアミドで 1.78~1.84, 1.98~2.09 及び 1.66~1.74 mg/kg, ペルメトリンで 1.50~1.56, 1.53~1.82 及び 1.40~1.73 mg/kg であった。

同一散布条件での農作物中の各農薬の残留レベルは、散布液中の農薬濃度に依存するため、各農薬の分析値をそのまま総合解析は困難である⁷⁾。また、分析試料量の少量化は、分析値の真度のズレや精度の低下を招くことが知られている^{8,9)}。そこで、分析試料秤取量の影響を横断的に評価するために、微粉碎試料での 20 g 秤取時の平均濃度に対する各農薬及び 7 種農薬全体での平均相対濃度を Fig 8 に示す。

各農薬における平均相対濃度は、微粉試料>凍結粉碎試料>粗粉碎試料の順で低くなる傾向を示した。特に、粗粉碎試料におけるマラチオンでは、微粉試料及び凍結粉碎試料よりも顕著に低くなった。マラチオンの相対濃度が、粗粉碎試料において低くなる傾向は、トマト及びホウレンソウを供試作物とした場合にも確認されている^{1,2)}。さらに、7 種農薬全体で評価した際の平均相対濃度も個別農薬と同様に微粉試料>凍結粉碎試料>粗粉碎試料の順で低くなる傾向を示した。

粗粉碎試料、微粉碎試料及び凍結粉碎試料における各農薬の分析値の変動 (RSD 値) を Fig 9 に示す。RSD 値は、どの試料でも 10%以下であり、

均質化の程度及び秤取量が与える影響は不明瞭であった。そこで、包括的な変動評価を実施するために、各農薬の検体 20 g 秤取時の分析値で補正した相対濃度の全農薬での総平均 RSD 値を算出した (Fig. 10)。総平均 RSD 値は、微粉試料<凍結粉碎試料<粗粉碎試料の順に大きくなる傾向を示し、微粉試料及び凍結粉碎では秤取量が少なくなるほど大きくなった。

5. 遠心分離後の沈殿物と上澄み液の比較

分取した粗粉碎試料及び微粉試料をそれぞれ遠心分離したが、沈殿と上澄み液に分離しなかったため、両画分中における農薬濃度の分別分析は実施できなかった。これまでの研究に供試したトマト及びハウレンソウの水分含有率は、それぞれ 94.0%及び 92.4%であるのに対してブロッコリーでは 86.2%と低い¹⁰⁾。そして、ブロッコリーの組織体は比較的保水性が高く、均質化の過程で細胞外に溶出する水分量が少ないため、遠心分離による分別が困難であったと考えられる。

6. 部位別の残留濃度の比較

各部位での農薬濃度にそれぞれの部位の重量を乗じて重量に換算した。農薬重量の各部位での比率から、ブロッコリーの 1 個体における各部位への農薬分布率を算出した (Fig. 11)。蕾と茎の重量比は 43:57 であり、個体中では茎の占める割合が蕾よりもわずかに多かった。一方で、各農薬の分布率は、蕾において 98~100%となり、農薬の種類に関わらずほとんどが蕾に分布していた。ブロッコリーは蕾が傘状で、且つ葉が茎を覆う形状であり、散布された農薬は主に蕾と葉部に付着し、茎には付着しなかったと考えられる。この結果より、高濃度で農薬が残留する蕾の分析試料への秤取割合が、分析値の変動に影響を与えと考えられる。

[2] 畜水産物における適切な試料調製方法の提

案と凍結粉碎法の有用性の検証

1. 農薬等の添加後放置時間の回収率への影響

常温磨砕法により調製した試料中で農薬等がどの程度減少するかを検討するため、牛の筋肉、牛の肝臓及び豚の肝臓の常温磨砕試料に農薬等を添加後、室温で放置し、放置時間による回収率への影響を検討した。添加後の放置時間は 0, 15, 30, 60 分とした。検討対象化合物は Table 6 に示した 65 化合物とした。いずれの化合物も抽出液に添加した場合の回収率は 80%以上であり、精製以降の操作での損失はほとんどないものと考えられた。結果を Table 6 及び Fig. 13~Fig. 15 に示す。放置時間 30 分で回収率が 70%未満となった化合物は、牛の筋肉では 4 化合物、牛の肝臓では 12 化合物、豚の肝臓では 14 化合物であり、いずれかの食品で 70%未満となった化合物は 16 化合物であった。このうち、Carbaryl, Fenobucarb, Propoxur 及び Sulfantran は、牛の肝臓では 30 分後の回収率が 75%以上であったのに対し、豚の肝臓ではいずれも 50%未満となった。一方、Sulfaquinoxaline は、豚の肝臓では 79%の回収率を示したが、牛の肝臓では 47%と低値になった。これらの結果から、牛と豚の肝臓では試料中の酵素やその他の成分の違いにより、農薬等の分解等のしやすさが異なることが示唆された。いずれかの食品で 30 分後の回収率が 70%未満となった 16 化合物のうち、放置時間 0 分と 30 分の回収率に有意差 (Benjamini-Hochberg 法による FDR (false discovery rate) 補正後の q 値 <0.01) が認められた化合物は、牛の筋肉ではなかったが、牛の肝臓では 8 化合物、豚の肝臓では 14 化合物であった。これらの化合物は放置時間中に試料中の酵素やその他の試料成分との反応等により減少したものと考えられた。一方、牛筋肉中の Cefapirin や Neospiramycin 等、放置時間 0 分と 30 分の回収率に有意差が認められな

かった化合物は添加直後に分解等が生じたか、抽出操作中の損失が考えられた。

2. 試料温度の回収率への影響

試料温度が回収率に与える影響を評価するため、常温磨砕により調製した試料(常温試料)及び凍結粉碎により調製した試料(凍結試料)に農薬等を添加し、それぞれ室温または-30℃で 30 分間放置後、抽出操作を開始し、得られた回収率を比較した。牛の筋肉の結果を Fig. 16 に示す。常温試料で回収率が 70 % 未満となった化合物は Cefapirin , Neospiramycin , Spiramycin 及び Tylosin であったが、いずれも凍結試料の回収率との有意な差($q < 0.01$)は認められなかった。このため、これらの化合物は試料を低温にしても回収率の低下を抑制することは困難であると考えられた。

牛の肝臓の結果を Fig. 17 に示す。常温試料で回収率が 70 % 未満となった化合物のうち、Ethopabate , Josamycin , Leucomycin A5 , Neospiramycin , Spiramycin , Sulfaquinoxaline , Tetrachlorvinphos 及び Tylosin は、いずれも凍結試料の回収率と有意な差($q < 0.01$)が認められ、試料を低温にすることにより回収率が向上した。しかしながら、常温試料で回収率が 70 % 未満となった化合物のうち、Cefapirin , Di-*n*-propyl isocinchomeronate , Neospiramycin , Spiramycin 及び Tylosin は凍結試料においても回収率が 70 % 未満にとどまったことから、一部の化合物では試料を低温にしても、回収率の低下を完全には抑制することはできないことが示唆された。

豚の肝臓の結果を Fig. 18 に示す。牛の肝臓と同様に、常温試料で回収率が 70 % 未満となった化合物のうち、2-Acetylamino-5-nitrothiazole , Azamethiphos , Cefapirin , Fenobucarb , Josamycin , Leucomycin A5 , Neospiramycin , Propoxur , Spiramycin , Sulfantran , Tetrachlorvinphos 及び

Tylosin は、いずれも凍結試料の回収率と有意な差($q < 0.01$)が認められ、試料を低温にすることにより回収率が向上した。しかしながら、常温試料で回収率が 70 % 未満となった化合物のうち、Cefapirin , Di-*n*-propyl isocinchomeronate , Leucomycin A5 , Neospiramycin , Spiramycin 及び Tylosin は凍結試料においても回収率が 70 % 未満にとどまったことから、牛の肝臓と同様に、一部の化合物では試料を低温にしても、回収率の低下を完全には抑制できないことが示唆された。

以上の結果から、牛及び豚の肝臓においては一部の農薬を除き、試料温度を下げることにより、放置中に生じる農薬等の減少を抑制できることが示された。したがって、凍結粉碎法による試料調製を行えば、試料調製中の農薬等の減少を抑制できる可能性が高いことが示唆された。

3. 試料調製方法による回収率への影響

凍結粉碎法による試料調製の農薬等の減少抑制効果を検証するため、試料調製前の検体(牛及び豚の肝臓)に農薬等を添加後、凍結粉碎法または常温磨砕法により試料調製し、得られた回収率を比較した。検討対象化合物は、「2. 試料温度の回収率への影響」で、牛または豚の肝臓において常温試料で低回収率($> 70\%$)となった化合物の中から 11 化合物(Group 1)及びいずれの食品においても良好な回収率($> 70\%$)が得られた化合物の中から 10 化合物(Group 2)を選定した(Table 7 及び Table 8)。なお、常温磨砕法の場合は、検体に農薬等を添加後、抽出操作を開始するまでの時間が 30 分となるようにした。牛の肝臓の結果を Fig. 19 及び Table 7、豚の肝臓の結果を Fig. 20 及び Table 8 に示した。Group 2 の農薬等については、常温磨砕法及び凍結粉碎法のいずれで試料調製を行っても $> 70\%$ の回収率が得られ、試料調製中の大きな減少は見られなかった。一方、Group 1

の農薬等では、常温磨砕法で試料調製を行うと回収率が 70%以下となり、ほとんどの農薬等において「2. 試料温度の回収率への影響」で常温試料に添加した場合と比較して回収率が低下した (Table 9)。これは農薬等を試料調製前に添加したことで、試料中の酵素や試料成分と接触しやすくなり、分解等が進行したためと考えられた。凍結粉砕法で試料調製した場合も、Group 1 の一部の農薬等では凍結試料に添加した場合と比べて回収率が低下した (Table 10)。例えば、牛の肝臓における Azamethiphos, Ethopabate 及び Tetrachlorvinphos, 豚の肝臓中の Azamethiphos 及び Propoxur では、凍結試料に添加した場合の回収率は 86%以上であったのに対し、試料調製前に農薬等を添加した場合の回収率は 70%未満であった。一般に、農薬等の分析法の妥当性を添加回収試験によって評価する際には、試料調製から抽出開始までの間に生じる減少を考慮して評価するため、農薬等を試料に添加後、30 分間放置した後に抽出を開始する方法が用いられる。しかし、本検討結果から、均質化後の試料に農薬等を添加して 30 分間放置した場合よりも、試料調製中の減少の方が大きい場合があることが示された。したがって、添加回収試験で良好な回収率が得られた方法を用いても、実際の検査においては残留濃度を過小評価する可能性があると考えられた。

牛の肝臓中の 2-Acetylamino-5-nitrothiazole, Carbaryl, Fenobucarb, Propoxur 及び Sulfantran, 豚の肝臓中の 2-Acetylamino-5-nitrothiazole, Carbaryl, Ethopabate, Fenobucarb, Sulfantran 及び Tetrachlorvinphos は、検体に添加後、常温磨砕法により試料調製した場合、低回収率 (70%未満) であったが、凍結粉砕法により試料調製することによって回収率が 70%以上となり、統計的な有意差 ($q < 0.01$) が認められた。

一方、牛の肝臓中の Tetrachlorvinphos 及び豚の肝臓中の Propoxur は、凍結粉砕法により回収率が改善したものの、回収率は 60%台であり、十分に減少を抑制することはできなかった。また、牛の肝臓中の Azamethiphos, Cefapirin, Di-n-propyl isocinchomeronate, Ethopabate 及び Tylosin, 豚の肝臓中の Azamethiphos, Cefapirin, Di-n-propyl isocinchomeronate 及び Tylosin は凍結粉砕法においても回収率が 40%未満であり、試料調製中の減少を抑制することができなかった。これらは Azamethiphos (牛及び豚の肝臓) 及び Ethopabate (牛の肝臓) を除き、凍結試料に添加した場合も低回収率であり、抽出液に添加した場合はいずれの化合物も回収率が良好 ($> 80\%$) であったことから、Azamethiphos 及び Ethopabate を除き、試料調製中に加え、抽出操作中においても損失が生じている可能性が考えられた。特に、極性が高い Cefapirin は抽出溶媒であるアセトニトリルやヘキサンへの溶解性が低く、牛の筋肉の凍結試料に添加した場合も低回収率となったことから (Fig. 16), 抽出段階での損失が低回収率の主原因であることが示唆された。

以上の結果から、牛及び豚の肝臓において、常温磨砕法による試料調製では農薬等が酵素や試料成分との反応等により減少しやすい化合物であっても、凍結粉砕法による試料調製を行うことで減少を抑制できる場合があることが示された。ただし、凍結粉砕のみでは減少を十分に抑制できない化合物も存在するため、試料調製方法や抽出条件の検討を含めた対応が必要であると考えられた。

D. 結論

[1] 農産物を対象とした試料の均質性が分析結果に与える影響の評価と均質性評価指標の提案

農薬を散布して栽培したブロッコリーを用

いた調査の結果、均質化が不十分で粗大な固形物を多く含む試料での分析値は相対的に低くなった。特にマラチオンでは、他の均質化試料と比較して顕著に低くなった。この傾向は、トマト及びホウレンソウを供試試料とした研究結果とも一致することから、不十分な均質化が分析結果に与える影響は、農薬の種類によって異なることが確認された。このように均質化の影響を受けやすい農薬については、試料の不十分な均質化が、残留農薬濃度の過小評価リスクを招くことが示唆された。

これまで調査結果から、分析値の変動は、ホウレンソウ<ブロッコリー<トマトの順に大きくなり、変動の大小は作物種により異なることが確認された (Fig 12)。また、均質化の程度に関わらず、秤取量と分析値の変動は負の相関関係を示し、秤取量が少ないほど変動が大きくなることが確認された。そして、各均質化試料の篩通過率から、微細に均質化した試料の約90%が目開き 1 mm 篩を通過することが確認されたことから、これが十分微細に均質化された試料の目安と位置付けた。なお、この均質化評価の目安は、トマト及びホウレンソウでの調査結果と合致した。

[2] 畜水産物における適切な試料調製方法の提案と凍結粉碎法の有用性の検証

畜産物における試料調製時の農薬等の減少について、常温磨砕法と凍結粉碎法での回収率の比較を通じて、凍結粉碎法による減少抑制効果を検討した。牛及び豚の肝臓を対象とした検討の結果、常温磨砕法により試料調製を行うと、試料中の酵素やその他の試料成分との反応等により、一部の農薬等では大幅な減少が生じた。一方で、凍結粉碎法による試料調製を行うことにより、農薬等によっては、これらの減少を抑制できることが示され

た。ただし、凍結粉碎のみでは減少を十分に抑制できない化合物も存在することから、留意が必要である。

一般に、分析法の妥当性を添加回収試験により評価する際は、農薬等を添加後 30 分間の放置を経て抽出操作を開始する方法が用いられる。この目的の一つは、試料調製から抽出までの間に生じる農薬等の減少を考慮して評価するためである。しかし、本研究の結果から、均質化後の試料に添加し 30 分間放置した場合よりも、試料調製中に生じる農薬等の減少の方が大きくなる場合があることが示された。このため、添加回収試験において良好な回収率が得られたとしても、実際の検査においては残留濃度を過小評価する可能性があると考えられた。

【参考文献】

- 1) 令和 4 年度 食品中残留農薬等の試験法開発における課題の解決に向けた研究
(残留農薬研究所担当課題:残留農薬分析に供する生鮮農産品の試料均質性に関する調査, 試験番号 IET 22-1019)
- 2) 令和 5 年度 食品中残留農薬等の試験法開発における課題の解決に向けた研究
(残留農薬研究所担当課題:残留農薬分析に供する生鮮農産品の試料均質性に関する調査, 試験番号 IET 23-1004)
- 3) 志田 (齊藤) 静夏, 齋藤真希, 根本了, 堤智昭, 果実における試料調製方法の検討:ドライアイスまたは液体窒素を用いた凍結粉碎法と常温磨砕法の比較:
第 45 回農薬残留分析研究会要旨集, (2022).
- 4) EU Reference Laboratories for Residues of Pesticides. Quick Method for the Analysis of Highly Polar Pesticides in Food Involving

Extraction with Acidified Methanol and LC or IC MS/MS Measurement I. Food of Plant Origin (QuPpe PO Method):

https://www.quppe.eu/quppe_doc.asp

(2025 年 2 月 18 日閲覧)

5) 飼料の公定規格:

<http://www.famic.go.jp/ffis/feed/kokuji/k51n75>

6.html (2024 年 2 月 27 日閲覧)

6) EU Reference Laboratories for Residues of Pesticides. ANALYTICAL QUALITY CONTROL AND METHOD VALIDATION PROCEDURES FOR PESTICIDE RESIDUES ANALYSIS IN FOOD AND FEED. SANTE 11312/2021 v2:

https://food.ec.europa.eu/system/files/2023-11/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_2021-11312.pdf

(2025 年 2 月 18 日閲覧)

7) D. J. MacLachlana and D. Hamiltonb:

Pest Manag Sci. **67**, 609–615 (2011).

8) S. J. Lehotay, and J.M. Cook: *J. Agric. Food*

Chem., **63**, 4395-4404 (2015).

9) 志田 (齊藤) 静夏, 根本了, 穂山浩:

日本食品化学学会誌, **27**, 135-140 (2020).

10) 文部科学省: 日本食品標準成分表 2020 年版 (八訂)

E. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) 曳埜忍, 島田京佳, 矢島智成, 飯島和昭, 田口貴章, 志田 (齊藤) 静夏: 残留農薬分析における試料均質性の指標の検討～圃場で農薬散布して栽培したハウレンソウを用いた調査～, 第 41 回農薬環境科学・第 47 回農薬残留分析合同研究会, (2024.11.11)

2) 志田 (齊藤) 静夏: 残留農薬等分析における試料調製と抽出について, 令和 6 年度食品衛生登録検査機関協会 残留農薬等研修会 (2025.1.31)

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Table 1. 農薬製剤の散布条件

製剤名 (商品名)	有効成分名 (略号)	有効成分 含量 (%)	希釈 倍率
アルバリン顆粒水溶剤	ジノテフラン (DIN)	20	2000
アドマイヤーフロアブル	イミダクロプリド (IMI)	20	2000
マラソン乳剤	マラチオン (MAL)	50	1000
ダイアジノン乳剤	ダイアジノン (DIA)	40	700
カスケード乳剤	フルフェノクスロン (FLU)	10	4000
フェニックス顆粒水和剤	フルベンジアミド (FLB)	20	2000
アディオン乳剤	ペルメトリン (PER)	20	2000

Table 2. MS パラメーター

分析対象物質	DP (V)	CE (V)	CXP (V)	プリカーサー イオン (m/z)	プロダクト イオン (m/z)
ジノテフラン	51	17	10	203.1	129.1
イミダクロプリド	61	21	6	256.0	209.0
マラチオン	44	17	6	331.0	127.1
ダイアジノン	45	31	2	305.0	169.0
フルフェノクスロン	101	27	6	489.1	158.1
ペルメトリン	51	27	8	407.9	183.1
フルベンジアミド	-90	-46	-1	680.9	254.1



Fig. 1.1 作物写真(無処理区)



Fig. 1.2 作物写真(処理区)

Table 3. 妥当性の確認結果

添加濃度 (mg/kg)	平均回収率 (%) [RSDr (%)]						
	DIN	IMI	MAL	DIA	FLU	FLB	PER
0.01	99 [2]	89 [2]	109 [5]	106 [6]	106 [4]	93 [5]	106 [2]
0.5	96 [1]	99 [3]	94 [5]	90 [4]	95 [2]	104 [4]	87 [1]
5	98 [2]	105 [5]	105 [5]	—	102 [10]	109 [7]	84 [5]
15	—	—	—	109 [5]	—	—	—

Table 4. マトリックス効果

マトリックス効果 (%)						
DIN	IMI	MAL	DIA	FLU	FLB	PER
−33	−13	−4	−1	−27	+2	−12

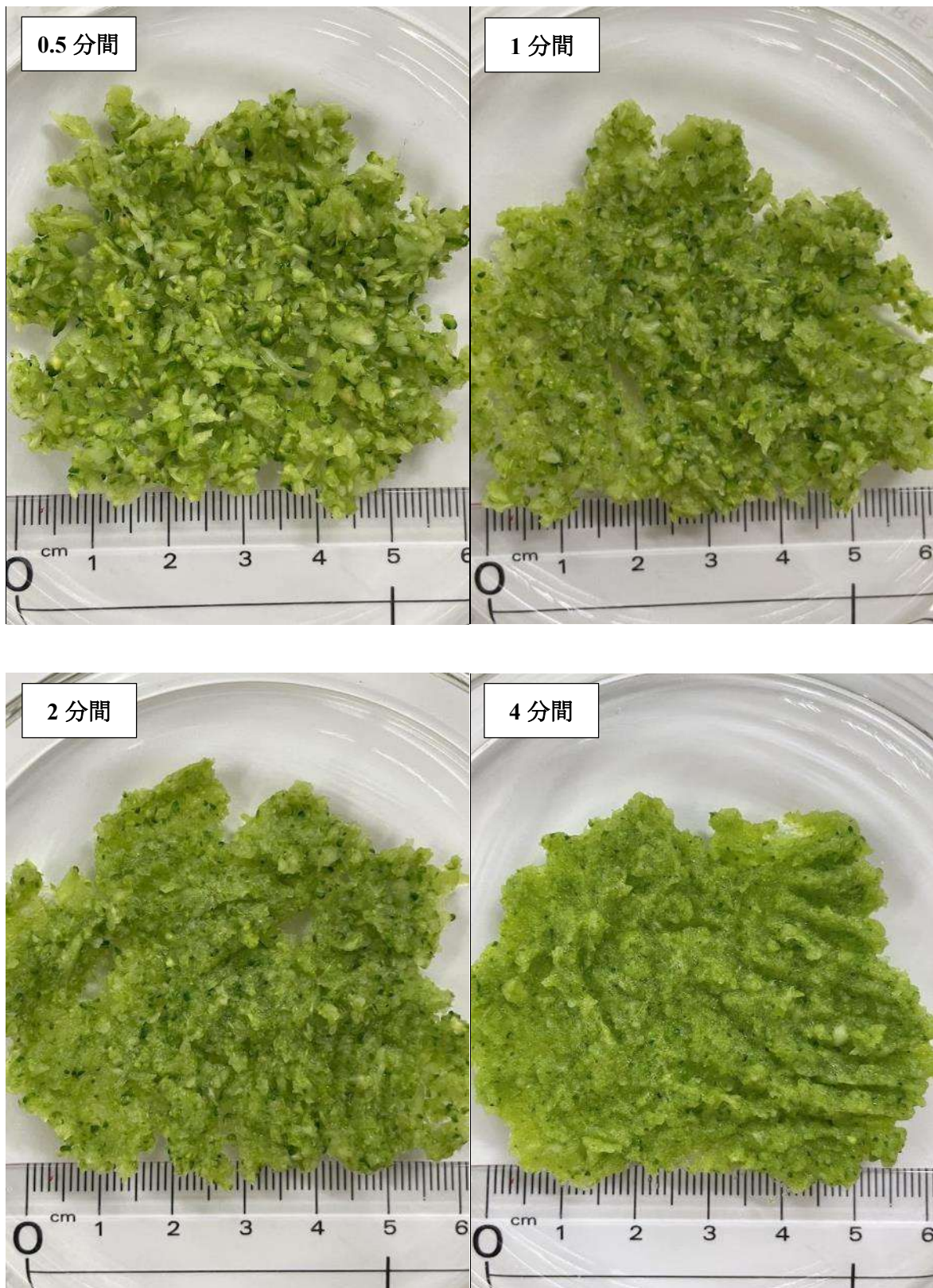


Fig 2. ミキサー稼働時間別のブロッコリー均質化状態（常温操作）



Fig 3. 凍結粉碎試料の均質化状態（左：調製作業時，右：解凍時）



Fig 4. ヘラ処理（左）及び流水洗浄処理（右）による篩通過時の様子

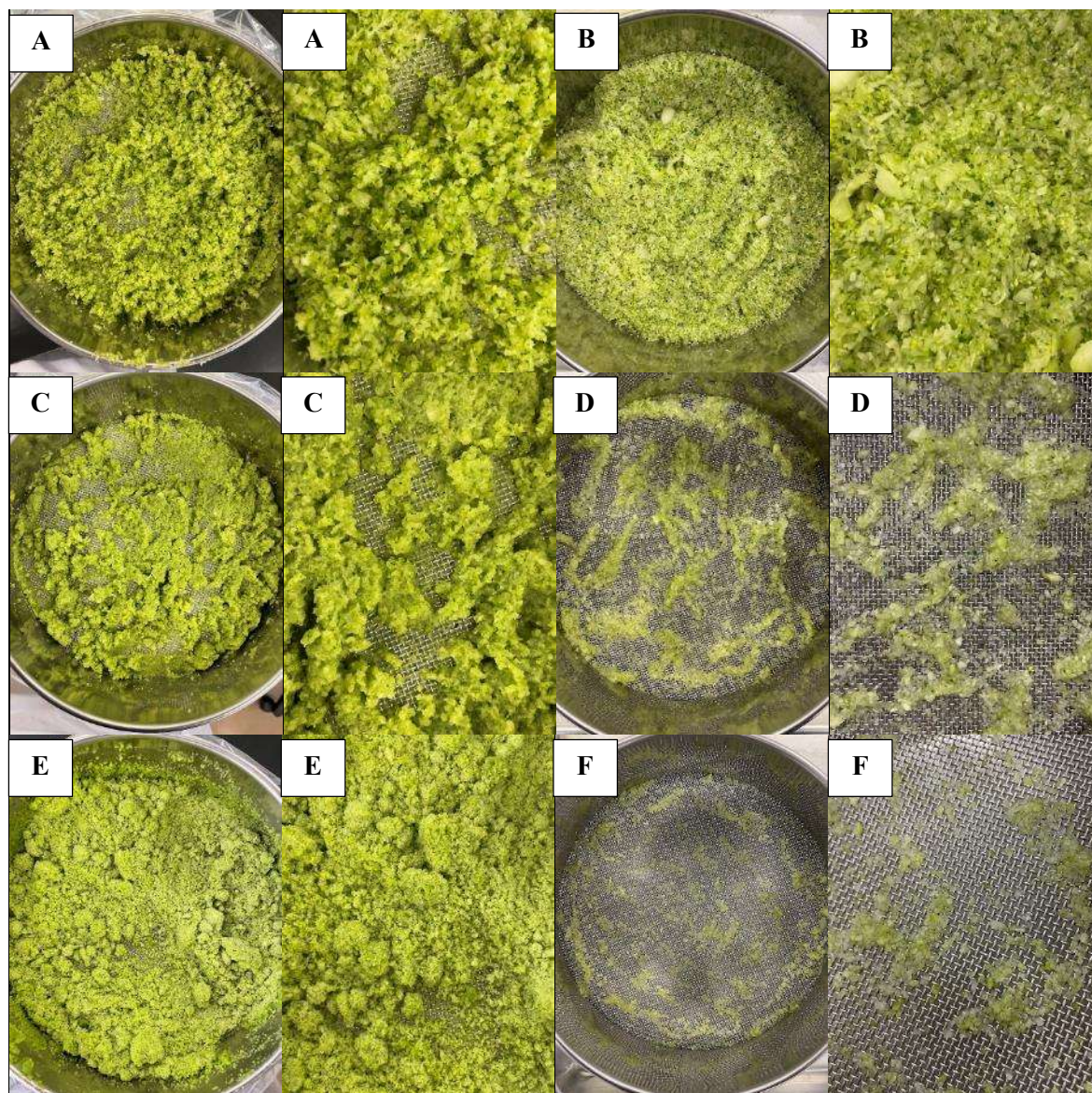


Fig 5. ヘラ処理及び流水洗浄処理後における篩上試料の状態

A:粗粉碎試料のヘラ処理, B:粗粉碎試料の流水洗浄処理, C:微粉碎試料のヘラ処理,
D:微粉碎試料の流水洗浄処理, E:凍結碎試料のヘラ処理, F:凍結碎試料の流水洗浄処理
(左:全体写真, 右:拡大写真)

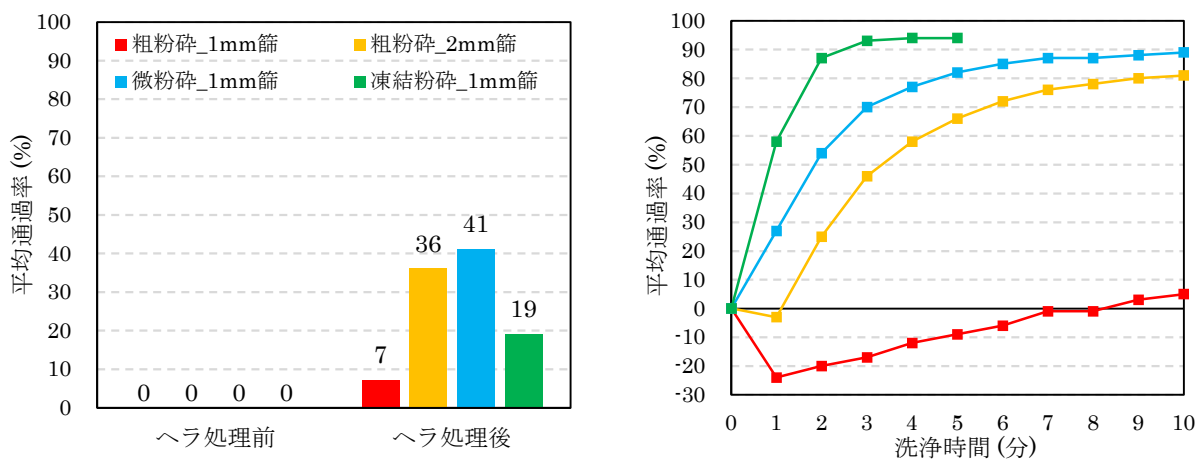


Fig 6. ヘラ処理時 (左) 及び流水洗浄処理時 (右) の篩通過率

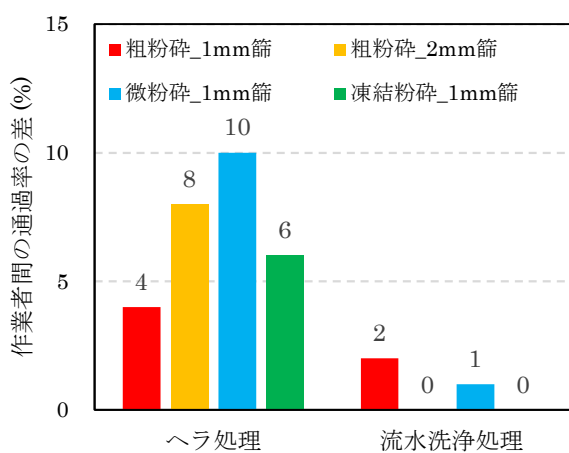


Fig 7. 異なる2名の作業員間の篩通過率の差

Table 5.1 分析結果(粗粉碎試料)

農薬	平均濃度 (mg/kg) [SD (mg/kg)]									
	20g		10g		5g		2g		1g	
DIN	1.70	[0.050]	1.76	[0.061]	1.77	[0.030]	1.74	[0.028]	1.76	[0.074]
IMI	1.72	[0.063]	1.81	[0.055]	1.86	[0.073]	1.79	[0.022]	1.77	[0.071]
MAL	0.51	[0.029]	0.49	[0.033]	0.49	[0.032]	0.48	[0.027]	0.49	[0.012]
DIA	6.70	[0.388]	6.70	[0.345]	6.88	[0.323]	6.61	[0.384]	6.47	[0.174]
FLU	0.45	[0.025]	0.42	[0.011]	0.44	[0.036]	0.44	[0.014]	0.43	[0.038]
FLB	1.81	[0.058]	1.84	[0.081]	1.78	[0.070]	1.82	[0.095]	1.83	[0.119]
PER	1.52	[0.040]	1.52	[0.098]	1.56	[0.051]	1.55	[0.072]	1.50	[0.032]

n=6

Table 5.2. 分析結果(微粉碎試料)

農薬	平均濃度 (mg/kg) [SD (mg/kg)]									
	20g		10g		5g		2g		1g	
DIN	1.96	[0.038]	1.94	[0.016]	1.98	[0.061]	2.01	[0.024]	2.03	[0.078]
IMI	1.96	[0.080]	1.99	[0.035]	2.03	[0.053]	2.03	[0.064]	2.03	[0.047]
MAL	0.76	[0.026]	0.79	[0.033]	0.80	[0.036]	0.78	[0.038]	0.78	[0.033]
DIA	7.34	[0.253]	7.63	[0.163]	7.36	[0.300]	7.30	[0.255]	6.90	[0.540]
FLU	0.53	[0.012]	0.48	[0.026]	0.47	[0.031]	0.47	[0.023]	0.45	[0.033]
FLB	2.06	[0.064]	1.98	[0.067]	2.09	[0.102]	2.07	[0.085]	2.07	[0.086]
PER	1.82	[0.010]	1.63	[0.081]	1.61	[0.059]	1.64	[0.057]	1.53	[0.068]

n=6

Table 5.3 分析結果(凍結粉碎試料)

農薬	平均濃度 (mg/kg) [SD (mg/kg)]									
	20g		10g		5g		2g		1g	
DIN	1.80	[0.026]	1.88	[0.019]	1.88	[0.054]	1.85	[0.059]	1.83	[0.055]
IMI	1.85	[0.032]	1.91	[0.055]	1.94	[0.024]	1.86	[0.083]	1.86	[0.115]
MAL	0.74	[0.037]	0.74	[0.074]	0.70	[0.032]	0.72	[0.050]	0.70	[0.025]
DIA	6.93	[0.267]	7.12	[0.312]	6.74	[0.176]	6.62	[0.233]	6.61	[0.224]
FLU	0.50	[0.014]	0.46	[0.025]	0.44	[0.021]	0.43	[0.010]	0.42	[0.022]
FLB	1.74	[0.055]	1.74	[0.034]	1.74	[0.061]	1.66	[0.066]	1.68	[0.050]
PER	1.73	[0.036]	1.59	[0.027]	1.51	[0.034]	1.49	[0.027]	1.40	[0.070]

n=6

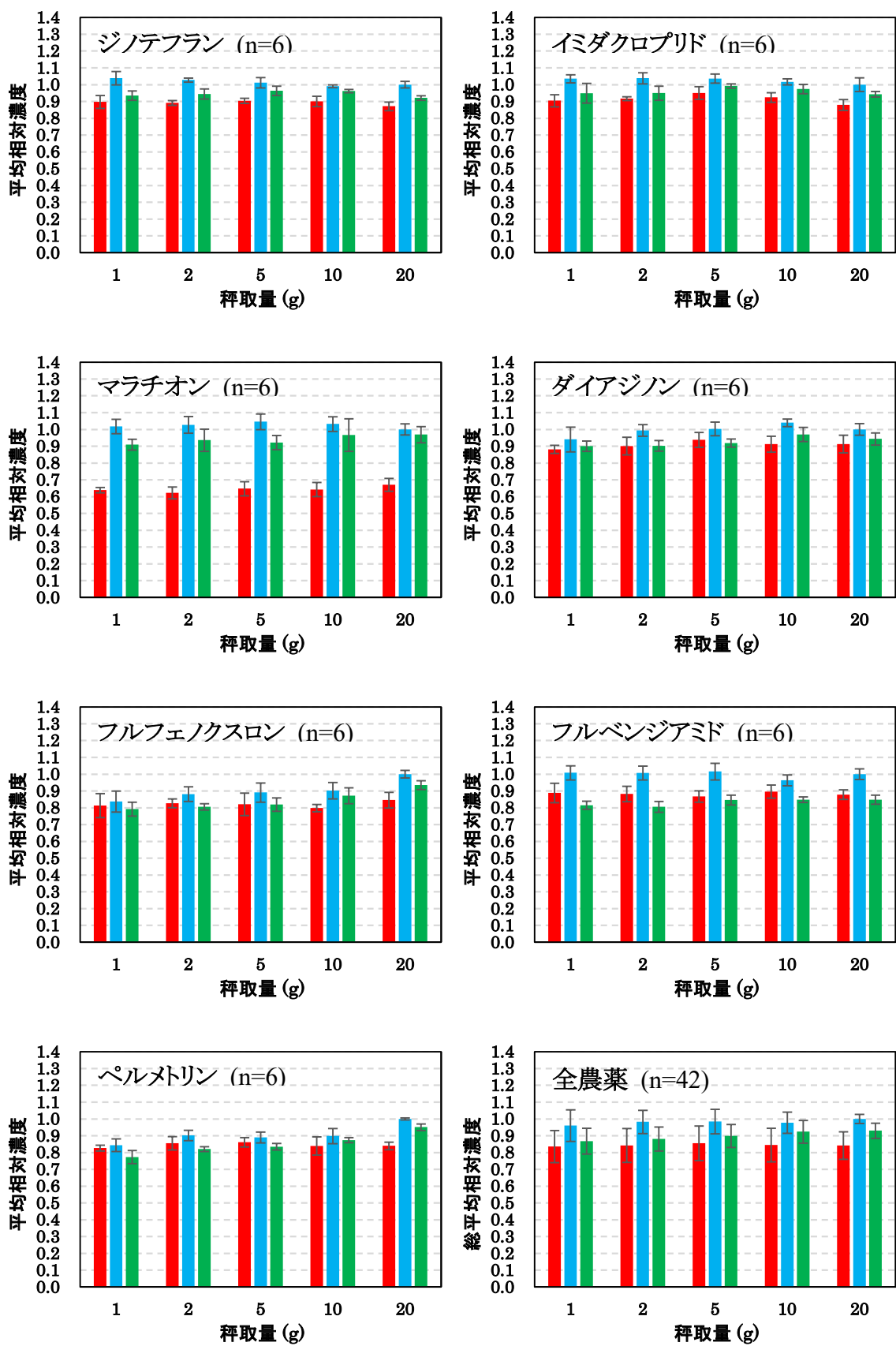


Fig 8. 秤取量別の相対濃度

微粉碎試料における 20 g 秤取時の平均濃度に対する相対濃度,

■:粗粉碎試料, ■:微粉碎試料, ■:凍結粉碎試料

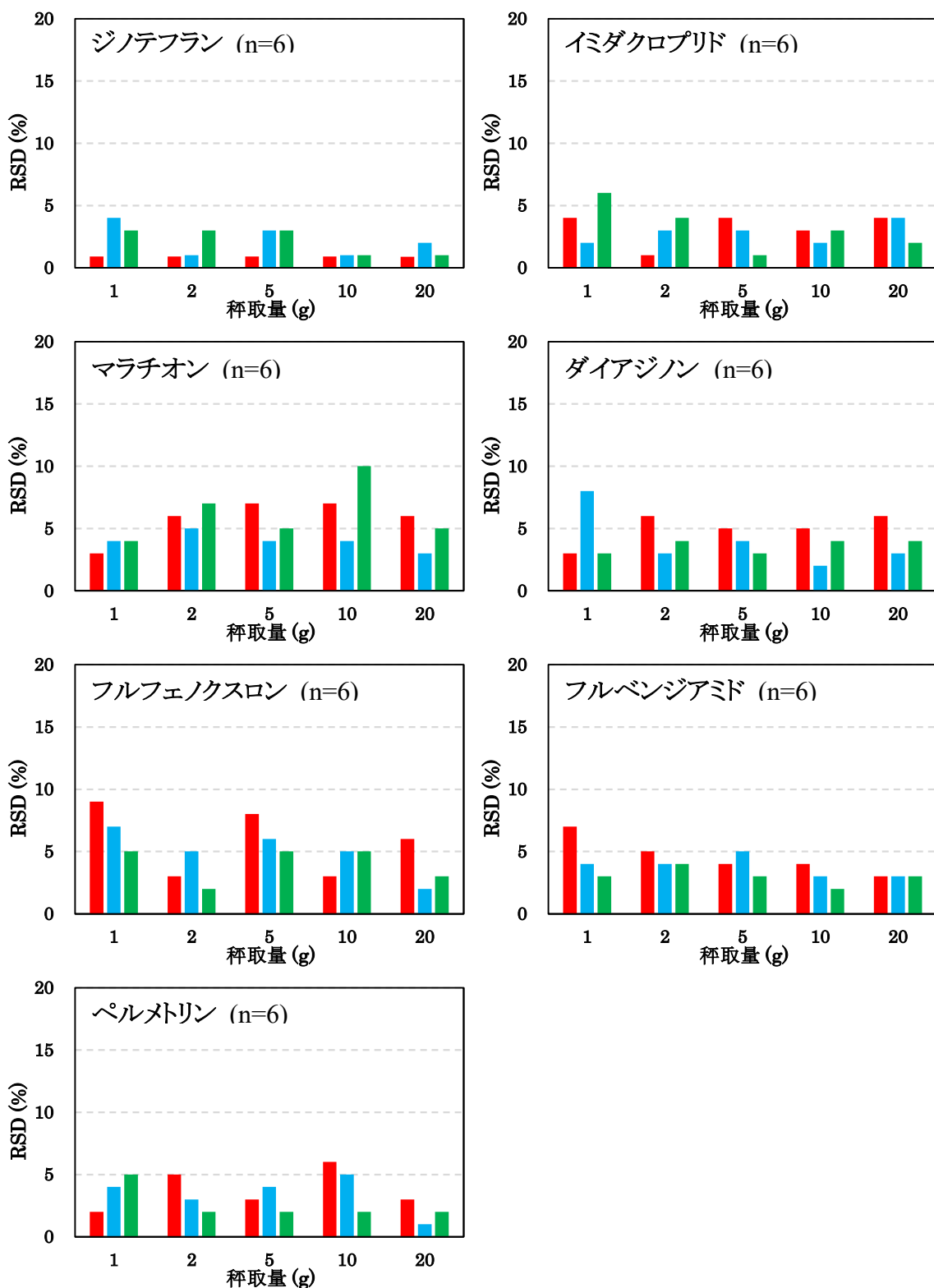


Fig 9. 秤取量別の分析値の変動

■:粗粉碎試料, ■:微粉碎試料, ■:凍結粉碎試料

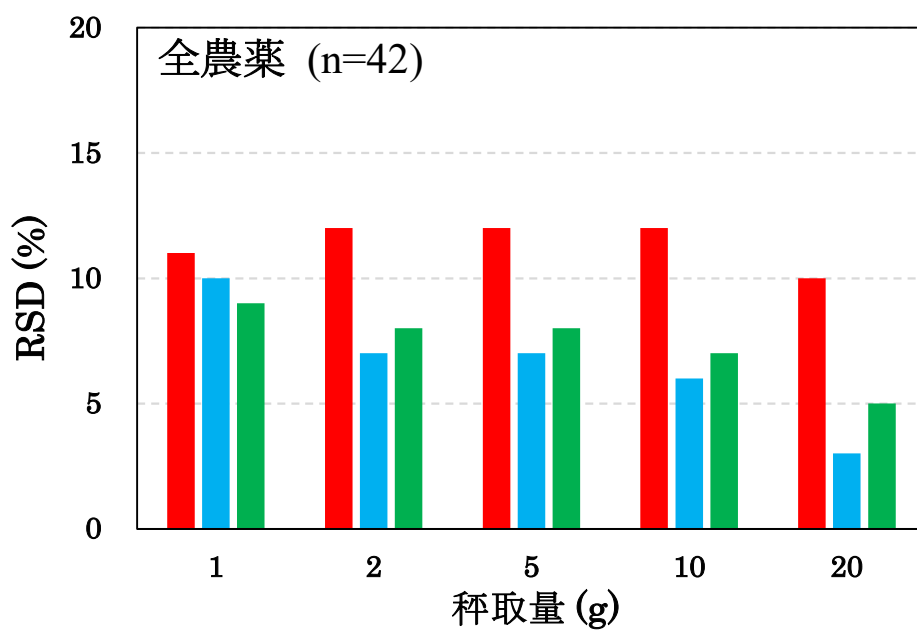


Fig. 10. 7 種農薬全体での秤取量別相対濃度の変動

微粉碎試料における 20 g 秤取時の平均濃度で補正した相対濃度,

■:粗粉碎試料, ■:微粉碎試料, ■:凍結粉碎試料

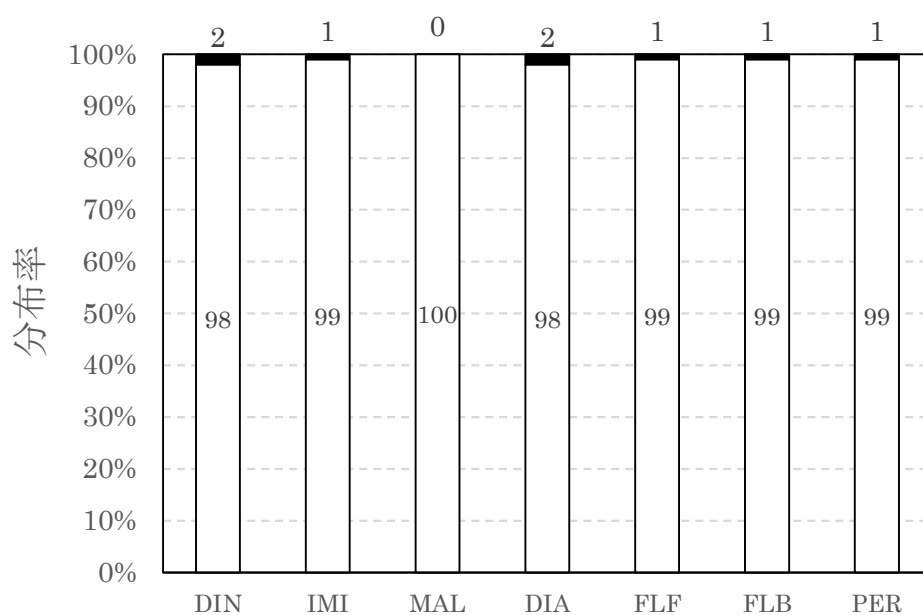


Fig. 11. 各農薬の茎及び蕾における分布率

(□:蕾, ■:茎)

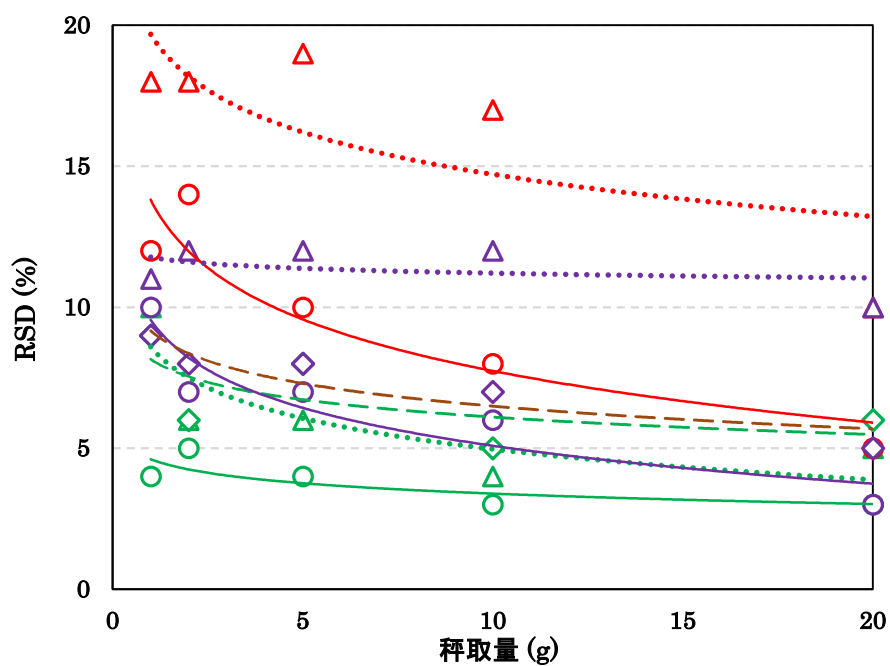


Fig. 12. トマト、ハウレンソウ及びブロッコリーでの秤取量変化に伴う分析値変動の比較

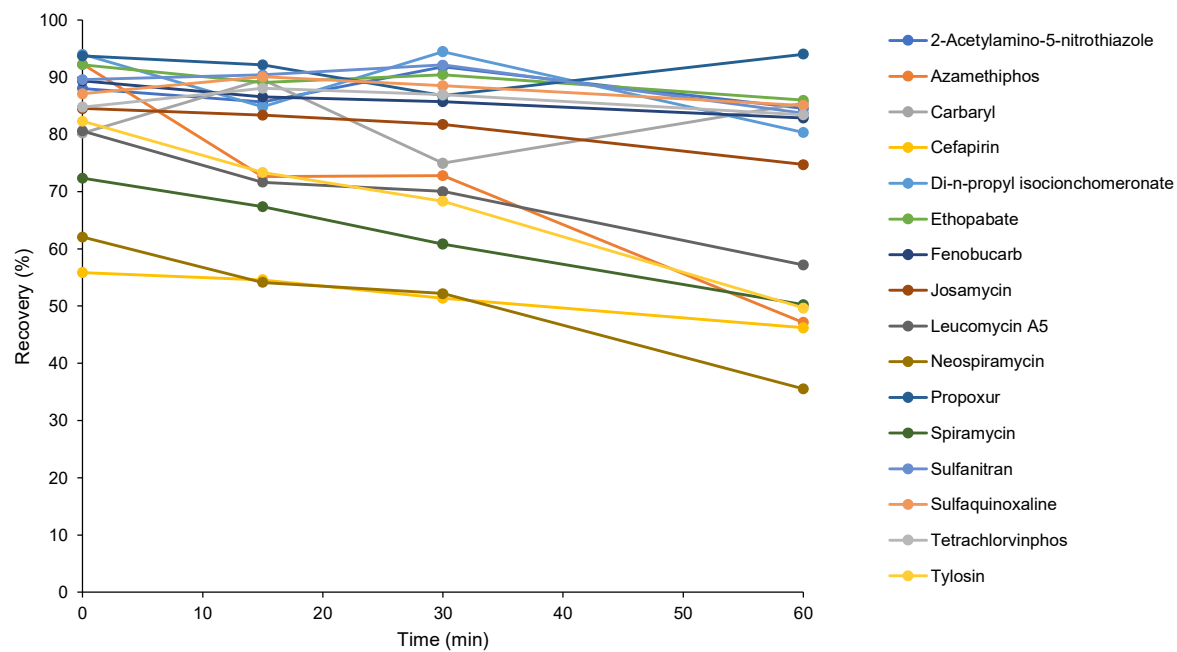


Fig. 13. 農薬等の添加後放置時間の回収率¹への影響(牛の筋肉)

¹ n=3

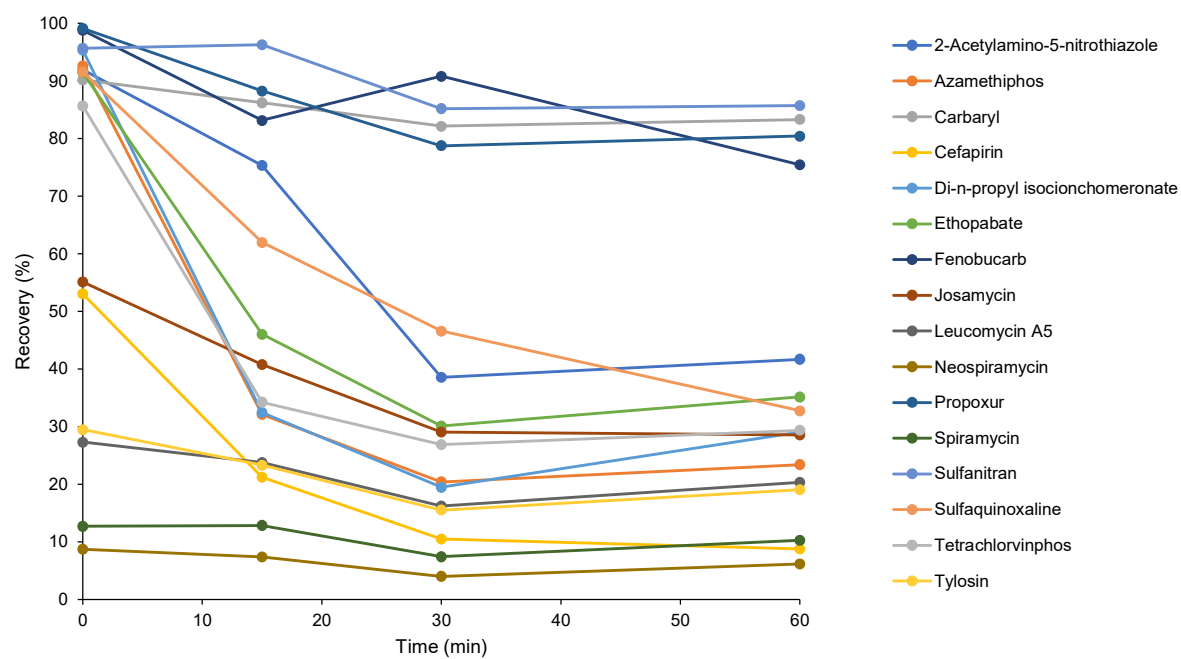


Fig. 14. 農薬等の添加後放置時間の回収率¹への影響(牛の肝臓)

¹ n=3

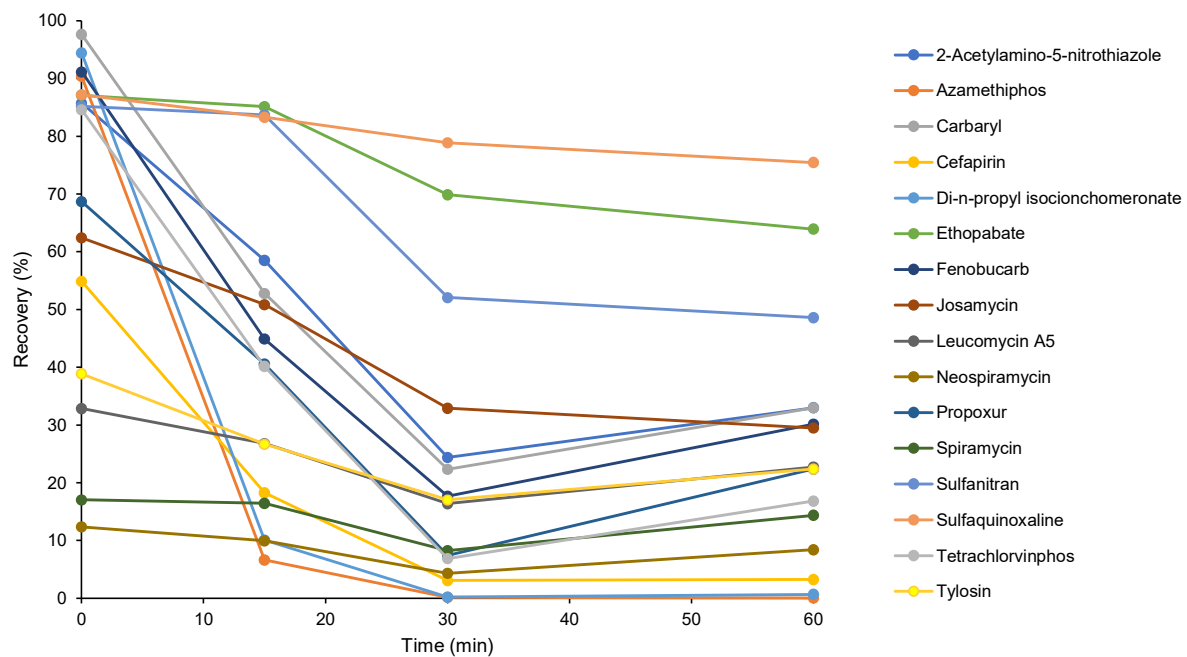


Fig. 15. 農薬等の添加後放置時間の回収率¹への影響(豚の肝臓)

¹ n=3

Table 6. 添加後放置時間 0 分及び 30 分の平均回収率¹, p 値, q 値

化合物	牛の筋肉				牛の肝臓				豚の肝臓			
	平均回収率 (%)		p値	FDR補正後 q値	平均回収率 (%)		p値	FDR補正後 q値	平均回収率 (%)		p値	FDR補正後 q値
	放置時間0分	放置時間30分			放置時間0分	放置時間30分			放置時間0分	放置時間30分		
2-Acetylaminio- 5-nitrothiazole	88	92	0.530	1.00	92	39	0.002	0.11	86	24	<0.001	<0.01
Azamesthiphos	92	73	0.003	0.10	93	20	<0.001	0.02	90	0	<0.001	<0.01
Carbaryl	82	75	0.378	1.00	90	82	0.152	1.00	98	22	0.002	0.05
Cefapirin	56	51	0.527	1.00	53	10	<0.001	<0.01	55	3	<0.001	<0.01
Ciprofloxacin	81	78	0.775	1.00	73	77	0.409	1.00	76	75	0.896	1.00
Clostebol	87	91	0.530	1.00	90	76	0.005	0.06	96	74	0.002	0.02
Danofloxacin	85	85	0.927	1.00	90	83	0.280	1.00	82	81	0.913	1.00
Diaveridine	93	94	0.774	1.00	86	80	0.016	0.13	85	81	0.109	0.89
Difloxacin	85	85	0.986	1.00	88	82	0.123	0.89	86	87	0.820	1.00
Di-n-propyl isocinchomeronate	94	94	0.865	1.00	95	19	<0.001	<0.01	94	0	<0.001	<0.01
Enrofloxacin	88	90	0.766	1.00	84	82	0.502	1.00	83	87	0.264	1.00
Erythromycin	85	85	0.953	1.00	89	86	0.482	1.00	89	87	0.609	1.00
Ethopabate	92	90	0.733	1.00	91	30	0.001	<0.01	87	70	0.002	<0.01
Fenobucarb	89	86	0.799	1.00	99	91	0.083	0.38	91	18	<0.001	<0.01
Flumequine	95	94	0.657	1.00	95	93	0.181	0.78	98	99	0.592	1.00
Josamycin	85	82	0.675	1.00	55	29	0.002	<0.01	62	33	<0.001	<0.01
Leucomycin A5	81	70	0.096	0.37	27	16	0.028	0.11	33	16	<0.001	<0.01
Marbofloxacin	85	88	0.614	1.00	85	79	0.047	0.17	88	86	0.414	1.00
Methylprednisolone	84	85	0.804	1.00	99	71	0.018	0.06	84	91	0.361	1.00
Miloxacin	94	93	0.913	1.00	93	77	0.036	0.12	91	74	<0.001	<0.01
Nalidixic acid	96	97	0.828	1.00	96	94	0.219	0.68	94	97	0.165	0.51
Neospiramycin	62	52	0.118	0.35	9	4	0.022	0.06	12	4	<0.001	<0.01
Norfloxacin	76	77	0.861	1.00	67	71	0.086	0.24	76	77	0.784	1.00
Ofloxacin	85	84	0.874	1.00	84	82	0.093	0.25	87	82	0.166	0.45
Orbifloxacin	83	84	0.916	1.00	84	82	0.551	1.00	86	79	0.156	0.41
Ormetoprim	81	82	0.852	1.00	79	79	0.944	1.00	82	78	0.055	0.14
Oxolinic acid	88	88	0.963	1.00	88	85	0.334	0.80	89	86	0.271	0.65
Piromidic acid	95	95	0.931	1.00	96	93	0.126	0.29	96	96	0.799	1.00
Prednisolone	87	84	0.797	1.00	95	73	<0.001	<0.01	87	80	0.145	0.33
Propoxur	94	87	0.658	1.00	99	79	0.040	0.09	69	7	<0.001	<0.01
Pyrimethamine	83	86	0.650	1.00	81	79	0.467	0.98	79	77	0.348	0.73
Sarafloxacin	83	85	0.791	1.00	77	74	0.268	0.54	82	80	0.647	1.00
Spiramycin	72	61	0.119	0.23	13	7	0.065	0.13	17	8	<0.001	<0.01
Sulfabenzamide	86	88	0.801	1.00	91	88	0.202	0.39	85	84	0.705	1.00
Sulfabromomethazine	90	93	0.696	1.00	92	89	0.542	1.00	86	82	0.290	0.54
Sulfacetamide	98	99	0.859	1.00	93	87	0.307	0.55	88	84	0.153	0.28
Sulfachloropyridazine	86	91	0.449	0.79	90	86	0.102	0.18	91	85	0.116	0.20
Sulfadiazine	92	94	0.705	1.00	92	90	0.487	0.83	87	78	0.026	0.04
Sulfadimethoxine	93	96	0.551	0.92	96	94	0.407	0.68	89	91	0.497	0.83
Sulfadimidine	87	88	0.847	1.00	91	88	0.201	0.33	84	86	0.156	0.25
Sulfadoxine	92	93	0.934	1.00	94	91	0.299	0.47	93	90	0.207	0.33
Sulfaethoxypyridazine	87	90	0.714	1.00	95	90	0.079	0.12	88	86	0.741	1.00
Sulfaguanidine	91	90	0.874	1.00	84	81	0.150	0.23	82	74	0.235	0.35
Sulfamerazine	86	89	0.715	1.00	92	88	0.047	0.07	87	81	0.005	<0.01
Sulfamethoxazole	92	93	0.873	1.00	91	85	0.064	0.09	89	86	0.448	0.65
Sulfamethoxypyridazine	89	93	0.575	0.81	94	90	0.331	0.47	89	93	0.123	0.17
Sulfamonomethoxine	88	92	0.520	0.72	95	92	0.503	0.70	84	85	0.907	1.00
Sulfanilamide	92	88	0.622	0.84	93	88	0.277	0.37	91	97	0.254	0.34
Sulfantran	90	92	0.718	0.95	96	85	0.329	0.44	85	52	<0.001	<0.01
Sulfapyridine	85	87	0.639	0.83	90	85	0.145	0.19	92	86	0.067	0.09
Sulfaguinoxaline	87	89	0.816	1.00	92	47	<0.001	<0.01	87	79	0.029	0.04
Sulfathiazole	87	87	0.879	1.00	88	84	0.254	0.32	86	86	0.922	1.00
Sulfatroxazole	90	91	0.836	1.00	92	87	0.121	0.15	91	90	0.849	1.00
Sulfisomidine	88	90	0.663	0.80	94	92	0.629	0.76	89	79	0.447	0.54
Sulfisoxazole	90	90	0.930	1.00	95	79	0.005	<0.01	90	79	0.007	<0.01
Sulfisozole	91	92	0.899	1.00	89	86	0.426	0.49	87	87	0.986	1.00
Temephos	88	87	0.821	0.94	87	78	0.183	0.21	82	85	0.539	0.61
Tetrachlorvinphos	85	87	0.755	0.85	86	27	<0.001	<0.01	85	7	<0.001	<0.01
α-Trenbolone	95	96	0.698	0.71	97	94	0.025	0.02	95	96	0.022	0.02
β-Trenbolone	82	85	0.688	0.69	88	80	0.235	0.24	82	77	0.001	<0.01
Tiamulin	86	88	0.749	0.83	94	87	0.209	0.23	93	82	0.808	0.89
Tilmicosin	89	86	0.694	0.75	90	86	0.316	0.34	88	73	0.225	0.24
Trimethoprim	88	89	0.894	0.95	89	87	0.506	0.54	84	82	0.609	0.65
Tylosin	82	68	0.063	0.07	29	16	0.005	<0.01	39	17	<0.001	<0.01
Zeranol	89	93	0.430	0.44	92	81	0.118	0.12	88	86	0.805	0.83

¹ n=3

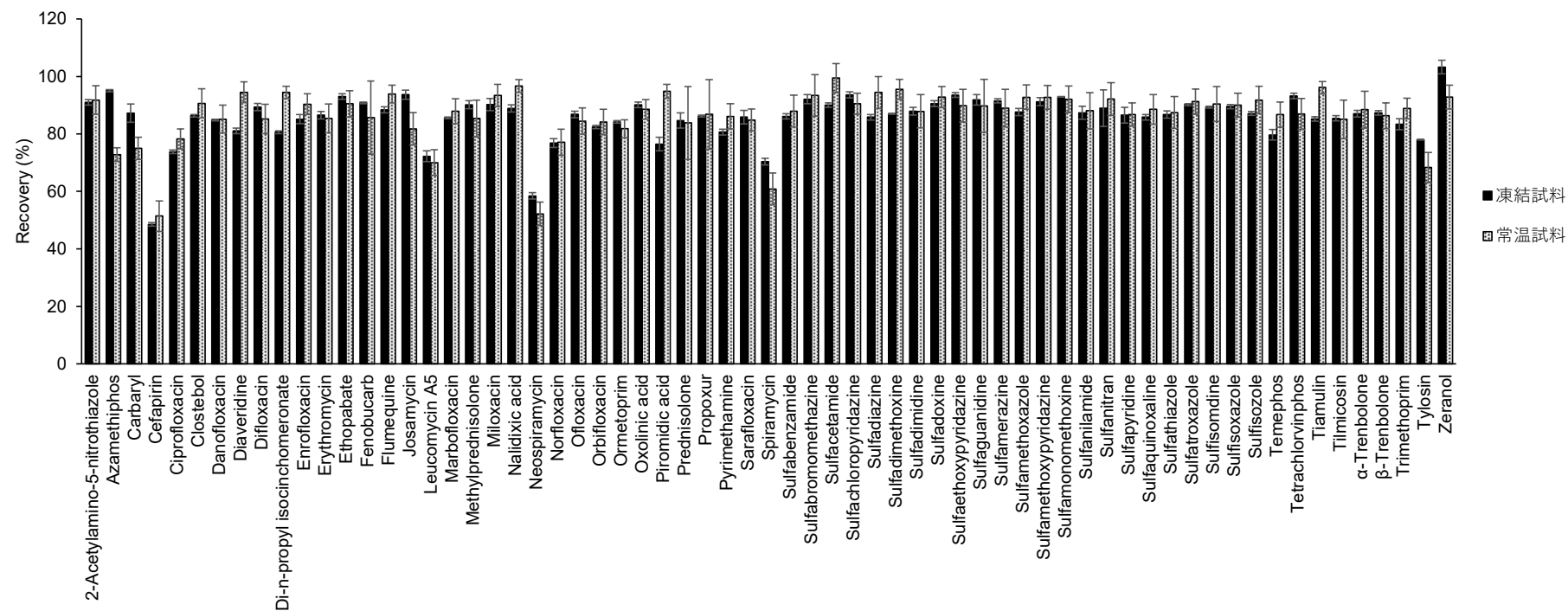


Fig. 16. 凍結試料及び常温試料からの農薬等の平均回収率^{1,2}(牛の筋肉)

¹ 試料に農薬等を添加し, 30 分放置(凍結試料は-30℃, 常温試料は室温)した後, 抽出操作を開始した

² n=3

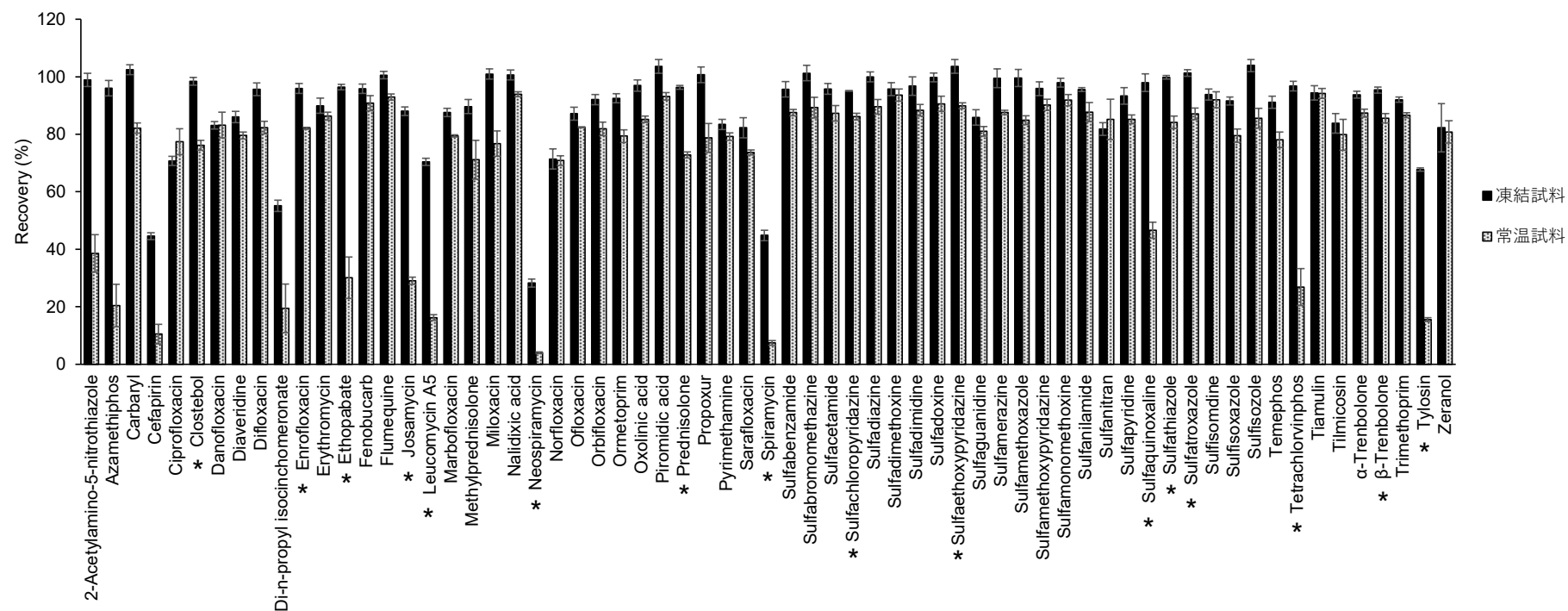


Fig. 17. 凍結試料及び常温試料からの農薬等の平均回収率^{1,2}(牛の肝臓)

¹ 試料に農薬等を添加し, 30 分放置(凍結試料は-30℃, 常温試料は室温)した後, 抽出操作を開始した

² n=3

³ * $q < 0.01$

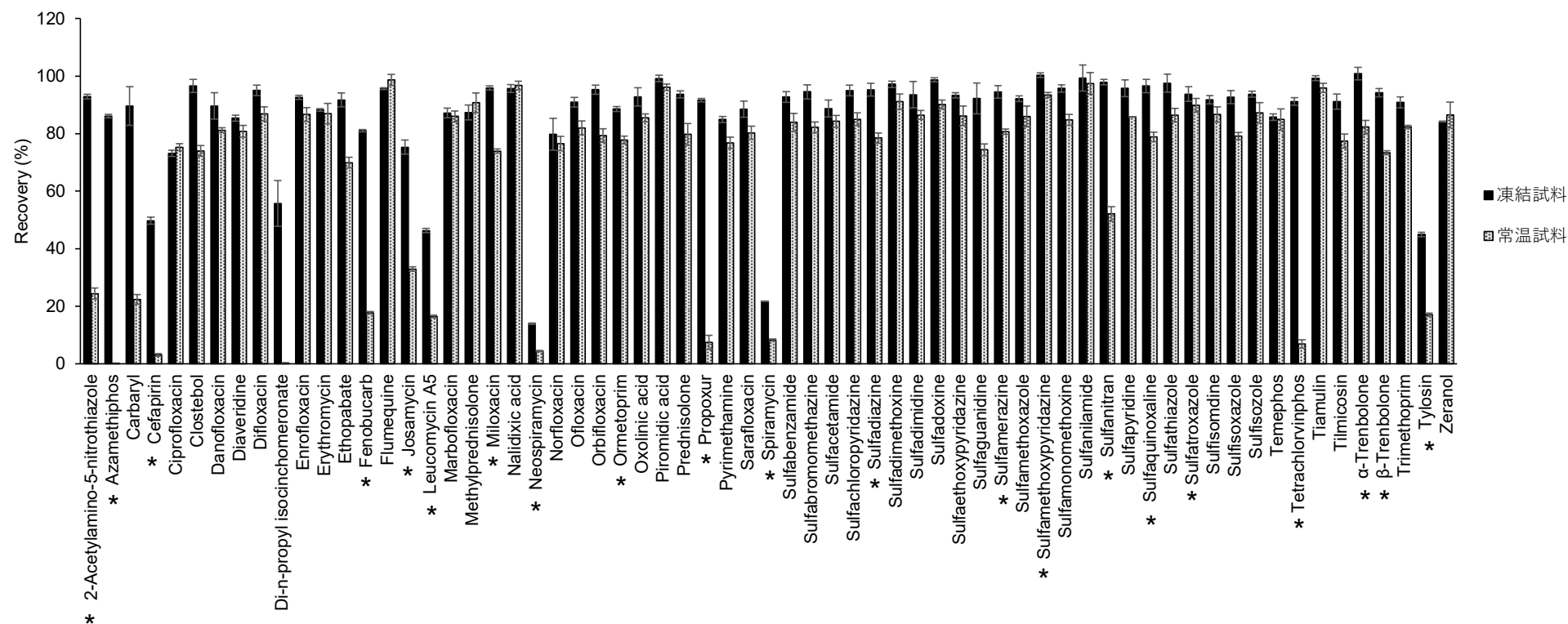


Fig. 18. 凍結試料及び常温試料からの農薬等の平均回収率^{1,2}(豚の肝臓)

¹ 試料に農薬等を添加し、30分放置(凍結試料は-30℃、常温試料は室温)した後、抽出操作を開始した

² n=3

³ *は $q < 0.01$

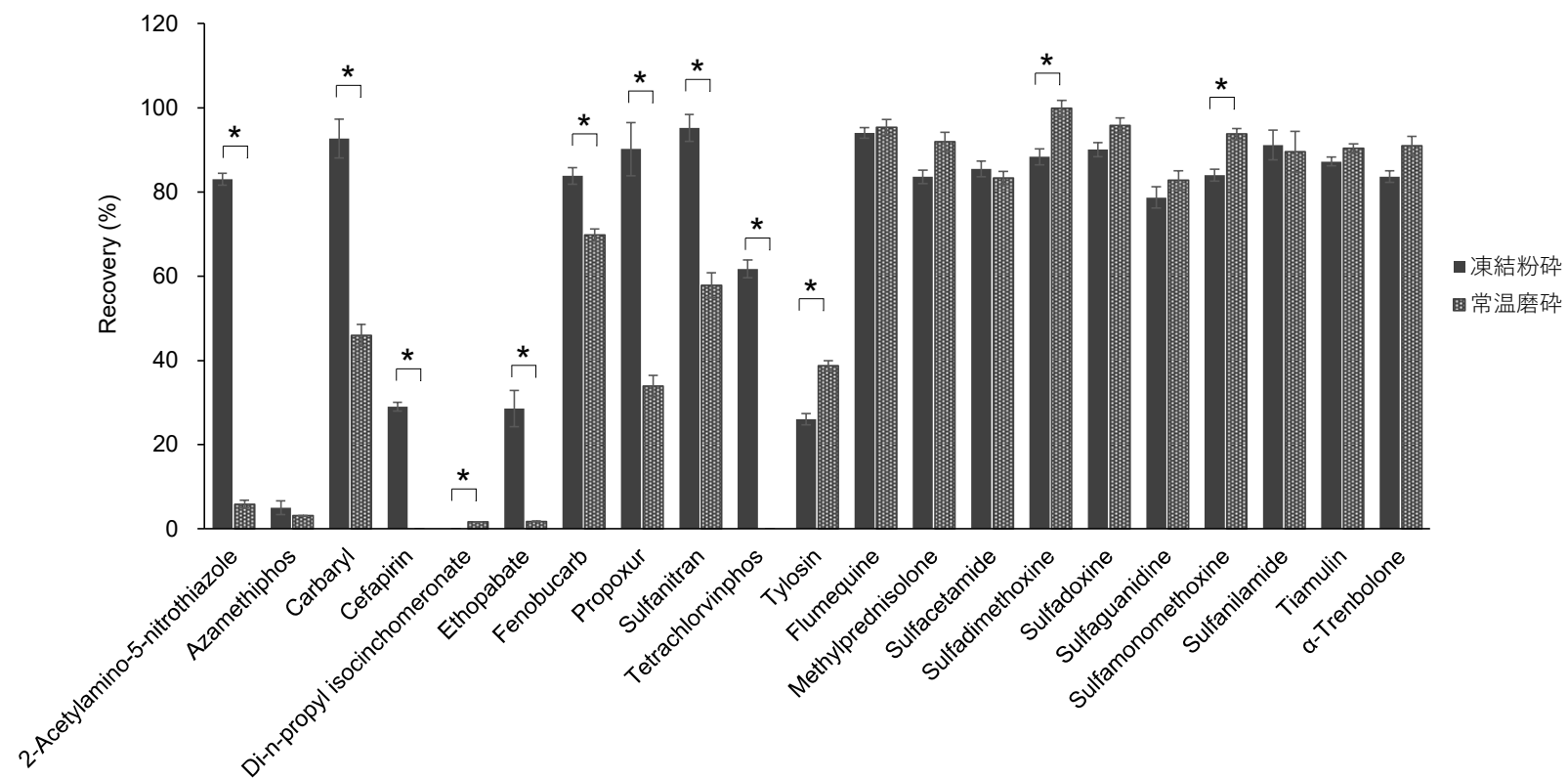


Fig. 19. 常温磨砕法及び凍結粉碎法による試料調製における平均回収率^{1,2}(牛の肝臓)

¹ n=5

² *は $q < 0.01$

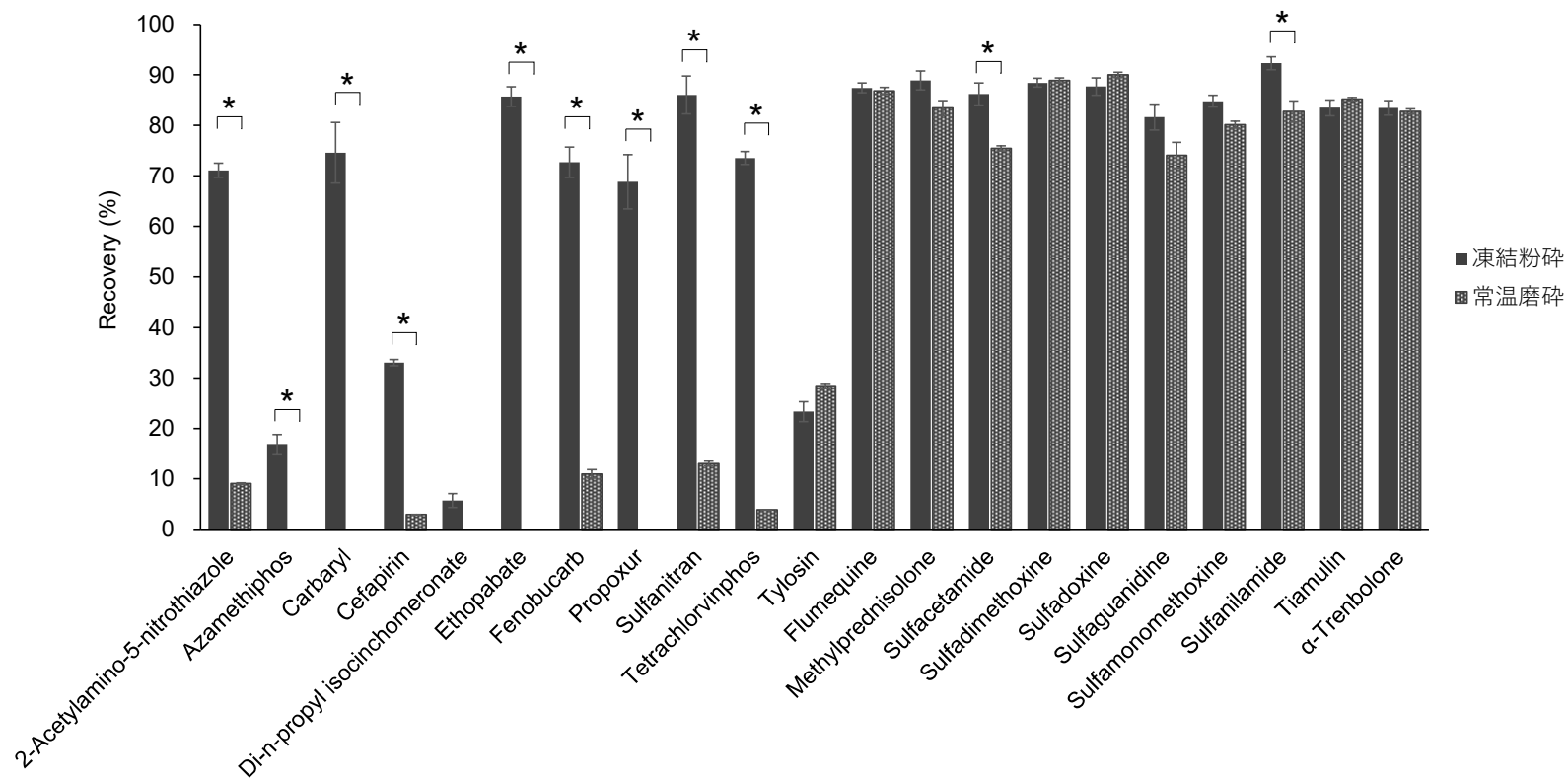


Fig. 20. 常温磨砕法及び凍結粉碎法による試料調製における平均回収率^{1,2}(豚の肝臓)

¹ n=5

² *は $q < 0.01$

Table 7. 常温磨砕法及び凍結粉砕法による試料調製における平均回収率¹(牛の肝臓)及び p 値, q 値

		回収率(%)		回収率(%)	p値	FDR補正後 q値
		凍結粉砕	常温磨砕	の差		
Group 1	2-Acetylamino-5-nitrothiazole	83	6	77	<0.001	<0.01
	Azamethiphos	5	3	2	0.273	1.00
	Carbaryl	93	46	47	<0.001	<0.01
	Cefapirin	29	0	29	<0.001	<0.01
	Di- <i>n</i> -propyl isocinchomeronate	0	2	2	<0.001	<0.01
	Ethopabate	29	2	27	<0.001	<0.01
	Fenobucarb	84	70	14	<0.001	<0.01
	Propoxur	90	34	56	<0.001	<0.01
	Sulfanitran	95	58	37	<0.001	<0.01
	Tetrachlorvinphos	62	0	62	<0.001	<0.01
	Tylosin	26	39	13	<0.001	<0.01
Group 2	Flumequine	94	95	1	0.568	1.00
	Methylprednisolone	84	92	8	0.017	0.04
	Sulfacetamide	86	83	2	0.392	0.75
	Sulfadimethoxine	88	100	12	0.003	<0.01
	Sulfadoxine	90	96	6	0.049	0.08
	Sulfaguanidine	79	83	4	0.261	0.39
	Sulfamonomethoxine	84	94	10	0.001	<0.01
	Sulfanilamide	91	90	1	0.792	1.00
	Tiamulin	87	90	3	0.066	0.07
	α -Trenbolone	84	91	7	0.024	0.02

¹ n=5

Table 8. 常温磨砕法及び凍結粉砕法による試料調製における平均回収率¹(豚の肝臓)及び p 値, q 値

		回収率 (%)		回収率の差	p値	FDR補正後 q値
		凍結粉砕	常温磨砕			
Group 1	2-Acetylamino-5-nitrothiazole	71	9	62	<0.001	<0.01
	Azamethiphos	17	0	17	<0.001	<0.01
	Carbaryl	75	0	75	<0.001	<0.01
	Cefapirin	33	3	30	<0.001	<0.01
	Di- <i>n</i> -propyl isocinchomeronate	6	0	6	0.003	0.01
	Ethopabate	86	0	86	<0.001	<0.01
	Fenobucarb	73	11	62	<0.001	<0.01
	Propoxur	69	0	69	<0.001	<0.01
	Sulfanitran	86	13	73	<0.001	<0.01
	Tetrachlorvinphos	74	4	70	<0.001	<0.01
	Tylosin	23	28	5	0.036	0.04
Group 2	Flumequine	87	87	0	0.641	1.00
	Methylprednisolone	89	83	6	0.051	0.12
	Sulfacetamide	86	75	11	0.002	<0.01
	Sulfadimethoxine	88	89	1	0.640	1.00
	Sulfadoxine	88	90	2	0.236	0.38
	Sulfaguanidine	82	74	8	0.070	0.10
	Sulfamonomethoxine	85	80	5	0.009	0.01
	Sulfanilamide	92	83	9	0.005	<0.01
	Tiamulin	83	85	2	0.316	0.35
	α-Trenbolone	83	83	0	0.654	0.65

1 n=5

Table 9. 試料調製前と試料調製後に農薬等を添加した場合の回収率の比較(常温磨砕法)

	化合物	牛の肝臓				豚の肝臓			
		回収率		p値	q値	回収率		p値	q値
		A	B			A	B		
Group 1	2-Acetylamino-5-nitrothiazole	6	39	0.001	0.01	9	24	<0.001	<0.01
	Azamethiphos	3	20	0.018	0.10	0	0	—	—
	Carbaryl	46	82	<0.001	<0.01	0	22	<0.001	<0.01
	Cefapirin	0	10	0.005	0.01	3	3	0.698	1.00
	Di-n-propyl isocionchomeronate	2	19	0.028	0.06	0	0	—	—
	Ethopabate	2	30	0.002	<0.01	0	70	<0.001	<0.01
	Fenobucarb	70	91	<0.001	<0.01	11	18	0.001	<0.01
	Propoxur	34	79	<0.001	<0.01	0	7	0.006	0.01
	Sulfanitran	58	85	0.006	0.01	13	52	<0.001	<0.01
	Tetrachlorvinphos	0	27	0.001	<0.01	4	7	0.029	0.03
	Tylosin	39	16	<0.001	<0.01	28	17	<0.001	<0.01
Group 2	Flumequine	95	96	0.705	1	87	93	0.002	0.02
	Methylprednisolone	92	90	0.760	1	83	71	0.060	0.30
	Sulfacetamide	83	97	0.057	0.19	75	87	0.001	<0.01
	Sulfadimethoxine	100	99	0.801	1	89	94	0.034	0.08
	Sulfadoxine	96	96	0.986	1	90	91	0.797	1
	Sulfaguanidine	83	91	0.247	0.41	74	81	0.106	0.18
	Sulfamonomethoxine	94	95	0.489	0.70	80	92	0.001	<0.01
	Sulfanilamide	90	93	0.661	0.83	83	88	0.230	0.29
	Tiamulin	90	96	0.069	0.08	85	94	0.001	<0.01
	α -Trenbolone	91	93	0.573	0.57	83	87	0.010	0.01

A 検体に農薬等を添加後、常温磨砕法により試料調製した場合の回収率

B 常温磨砕法により調製した試料に農薬等を添加した場合の回収率

Table 10. 試料調製前と試料調製後に農薬等を添加した場合の回収率の比較(凍結粉碎法)

	化合物	牛の肝臓				豚の肝臓			
		回収率		p値	q値	回収率		p値	q値
		C	D			C	D		
Group 1	2-Acetylamino-5-nitrothiazole	83	99	0.001	0.01	71	93	<0.001	<0.01
	Azamethiphos	5	96	<0.001	<0.01	17	86	<0.001	<0.01
	Carbaryl	93	102	0.176	0.65	75	90	0.159	0.58
	Cefapirin	29	45	<0.001	<0.01	33	50	<0.001	<0.01
	Di-n-propyl isocionchomeronate	0	55	<0.001	<0.01	6	56	<0.001	<0.01
	Ethopabate	29	96	<0.001	<0.01	86	92	0.104	0.19
	Fenobucarb	84	96	0.006	0.01	73	81	0.081	0.13
	Propoxur	90	101	0.272	0.37	69	92	0.019	0.03
	Sulfanitran	95	82	0.026	0.03	86	98	0.056	0.07
	Tetrachlorvinphos	62	97	<0.001	<0.01	74	91	<0.001	<0.01
	Tylosin	26	68	<0.001	<0.01	23	45	<0.001	<0.01
Group 2	Flumequine	94	88	0.021	0.21	87	101	0.000	<0.01
	Methylprednisolone	84	90	0.032	0.16	89	90	0.825	1
	Sulfacetamide	86	90	0.120	0.40	86	96	0.027	0.09
	Sulfadimethoxine	88	87	0.612	1	88	96	0.012	0.03
	Sulfadoxine	90	91	0.843	1	88	100	0.003	0.01
	Sulfaguanidine	79	92	0.011	0.02	82	86	0.327	0.54
	Sulfamonomethoxine	84	93	0.004	<0.01	85	98	0.001	<0.01
	Sulfanilamide	91	87	0.474	0.59	92	96	0.127	0.16
	Tiamulin	87	85	0.223	0.25	83	94	0.007	0.01
	α -Trenbolone	84	87	0.150	0.15	83	94	0.003	<0.01

C 検体に農薬等を添加後、凍結粉碎法により試料調製した場合の回収率

D 凍結粉碎法により調製した試料に農薬等を添加した場合の回収率

課題 2. 公示試験法の精製操作の簡便化・迅速化及び自動化に向けた検討
研究分担者 志田(齊藤) 静夏 国立医薬品食品衛生研究所 食品部第三室長

研究要旨

通知一斉試験法「LC/MS による動物用医薬品等の一斉試験法 I (畜水産物)」の精製方法を簡便化し、より夾雑成分の除去効果の高い方法へ改良した。本分析法は、通知一斉試験法の抽出方法に従って調製した抽出液を、自動前処理装置を用いて C₁₈ ミニカラム (充填量 50 mg) による 2 段階精製を行った後、LC-MS/MS で測定する方法である。牛筋肉、牛肝臓、牛脂肪及び牛乳を用いて、52 化合物を対象に添加濃度 0.01 ppm で妥当性評価を行った結果、約 8 割以上の化合物において妥当性評価ガイドラインの選択性、真度及び精度の目標値を満たした。確立した分析法は通知一斉試験法と抽出条件が同一であるため、抽出効率に起因する分析値の差異は生じず、規格基準への適否判定に用いることができる方法である。また、通知一斉試験法と比べ、精製に用いる試薬や溶媒の使用量を大幅に削減でき、さらに自動化によって、分析担当者の熟練度に起因するばらつきを抑制し、操作時間の短縮と分析の効率化が期待できる方法である。

研究協力者

望月 龍 (国立医薬品食品衛生研究所 食品部)

ある。さらに精製に供する抽出液量が多いため、充填量が 1,000 mg の C₁₈ ミニカラムを用いており、使用する溶媒量が多い。

研究協力機関

株式会社アイスティサイエンス

一方、諸外国では QuEChERS 法が広く用いられている。QuEChERS 法は、農産物中の残留農薬の一斉分析法として開発された方法であるが、近年では畜産物中の残留動物用医薬品等の分析にも応用されている。この方法は、通知一斉試験法と比較して操作が簡便で操作時間が短いという利点があるが、分散固相抽出で精製する方法であるため、夾雑成分の除去が不十分であり、マトリックスの影響を受けやすく、測定装置に対する負担が大きい。また、アセトニトリルを抽出溶媒として使用するため、特に脂質の多い試料では抽出効率が低い可能性が高い。このため、通知一斉試験法と QuEChERS 法では分析値に差異が生じる恐れがある。

A. 研究目的

畜水産物中の残留動物用医薬品一斉試験法として「LC/MS による動物用医薬品等の一斉試験法 I (畜水産物)」(通知一斉試験法) が公示されている。本試験法はヘキサン共存下アセトニトリルで抽出後、抽出液を C₁₈ ミニカラムで精製する方法である。公示試験法としては比較的簡便な方法であるものの、溶媒除去操作が 2 回あることに加え、ミニカラムのコンディショニング、負荷、溶出といった一連の操作を手作業で行う必要があるため、煩雑である。また、本試験法は C₁₈ ミニカラム 1 個のみで精製する方法であるため、精製効果が低いという問題も

そこで本研究では通知一斉試験法「LC/MS による動物用医薬品等の一斉試験法 I (畜水産

物)」の抽出方法は変更せずに、精製方法を改良することで、簡便で規格基準の適否判定に用いることができる分析法を確立することを目的とした。溶媒除去操作を省略し、自動前処理装置を導入することで操作を簡便化するとともに、夾雑成分の除去効果が高く、使用溶媒量も少ない方法を検討した。

B. 研究方法

1. 試料

牛筋肉（モモ肉）、牛肝臓、牛脂肪及び牛乳はインターネットを介して購入した。牛筋肉、牛肝臓及び牛脂肪は磨砕装置を用いて細切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

試験溶液調製用の水は超高純度蒸留水精製装置で蒸留したもの、アセトニトリル及びヘキサンは関東化学製の残留農薬・PCB 試験用を用いた。LC-MS/MS 測定用の水及びアセトニトリルは関東化学製の LC/MS 用を用いた。無水硫酸ナトリウムは富士フイルム和光純薬製の残留農薬・PCB 試験用、酢酸は富士フイルム和光純薬製の精密分析用、ギ酸は富士フイルム和光純薬製の LC/MS 用を用いた。

(2) 動物用医薬品標準溶液

動物用医薬品標準溶液は林純薬工業製の PL 動物薬 LC/MS Mix 1 及び Mix 2、富士フイルム和光純薬製の動物用医薬品混合標準液（マクロライド）並びに動物用医薬品混合標準液（ホルモン剤）を用いた。

(3) 精製ミニカラム

精製ミニカラムは、オクタデシルシリル化シリカゲル (ODS) ミニカラム (Smart-SPE C18-50; 50 mg 及び Smart-SPE C18-30; 30 mg)、スチレン・ジビニルベンゼン親水性/疎水性ポリマー (PBX) ミニカラム (Smart-SPE PBX-20; 20 mg)、N 含有メタクリレート・スチレン・ジビニルベンゼンポリマー (PLS-3) ミニカラム (Smart-SPE PLS3-20; 20 mg)、ポリスチレン・ジビニルベンゼンミックスモード強陰イオン交換 (AXi) ミニカラム (Smart-SPE AXi3-20; 20 mg) 及びエチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲル (PSA) ミニカラム (Smart-SPE PSA-30; 30 mg) (いずれもアイスティサイエンス製) を用いた。

3. 装置

磨砕装置は Grindomix GM200 (Verder Scientific 製) を用いた。ホモジナイザーは Polytron PT 10-35 GT (Kinematica 製) を用いた。振とう機は SR-2DW (タイテック製)、遠心分離機はフロア型冷却遠心機 S700FR (久保田商事製) を使用した。自動前処理装置は残留農薬分析用自動前処理装置 ST-L400 (アイスティサイエンス製) を使用した。

LC-MS/MS は Nexera X3 (島津製作所製) 及び Triple Quad 7500 (Sciex 製) を使用した。データ解析は Sciex OS (Sciex 製) を用いて行った。

4. 測定条件

(1) LC 条件

カラム : InertSustain AQ-C18 (内径 2.1 mm, 長さ 100 mm, 粒子径 2 μ m, ジーエルサイエンス製)

カラム温度 : 40°C

注入量 : 3 μ L (分析法検討時は 2 μ L)

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

流速：0.3 mL/min

グラジエント条件：

0 分 (A:B=98:2) →15 分 (A:B=30:70) →15.01 分 (A:B=5:95) →20 分 (A:B=5:95) →20.01 分 (A:B=98:2)

(2) MS 条件

イオン化法：ESI (+)及び ESI (-)

イオンスプレー電圧：2,000 V

ヒーター温度：450°C

カーテングス：N₂, 35 psi

ネブライザーガス：ドライエアー，70 psi

ターボガス：ドライエアー，80 psi

コリジョンガス：N₂, 7 a.u.

5. 試験溶液調製方法

試験溶液調製方法の概要を図 1 に示す。

(1) 抽出

抽出は通知一斉試験法「LC/MS による動物用医薬品等の一斉試験法 I (畜水産物)」に従って行った。試料 10.0 g に *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 50 mL, *n*-ヘキサン 50 mL 及び酢酸 1 mL を加え、約 1 分間ホモジナイズした後、無水硫酸ナトリウム 20 g を加えてさらに約 1 分間ホモジナイズした。毎分 3,000 回転 (1,932 x g) で 5 分間遠心分離した後 *n*-ヘキサン層を捨て、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 を加えて約 1 分間ホモジナイズし、上記と同様に遠心分離した。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、アセトニトリルを加えて正確に 100 mL (抽出液) とした。

(2) 精製

次の操作を、自動前処理装置を用いて行った (図 1)。C18-50 ミニカラム 2 個をノズルを挟んで連結した。これにアセトニトリル 1 mL を負荷し、コンディショニングした後、ノズルから水 0.2 mL を注入しながら、アセトニトリル/水 (9/1) 1 mL を負荷し、コンディショニングした。続いてノズルから水 0.4 mL を注入しながら、抽出液 2 mL を負荷した後、ノズルから水 0.2 mL を注入しながら、アセトニトリル/水 (9/1) 0.5 mL を負荷し、溶出した。

得られた溶出液を 0.1 vol%ギ酸で 4 mL に定容し、試験溶液とした。

C. 研究結果及び考察

1. 試験溶液調製方法の検討

(1) ミニカラムの検討

本検討ではキノロン剤、サルファ剤、ホルモン剤、マクロライド系抗生物質等の 54 化合物を対象とした。抽出は通知一斉試験法「LC/MS による動物用医薬品等の一斉試験法 I (畜水産物)」に従って行った。本試験法の抽出方法はヘキサン及びアセトニトリルの混液を用いてホモジナイズ抽出し、ヘキサン層を除去してアセトニトリル層を採取する方法であるため、大部分の脂質は抽出時に除去される。しかしながら、抽出液中にも低極性夾雑成分が多く含まれていることから、通知一斉試験法と同様に、C₁₈ ミニカラムを用いて低極性夾雑成分を除去することとした。使用する有機溶媒量を削減するため、精製に供する抽出液量は 2 mL (試料 0.2 g 相当) とし、充填剤量 50 mg の C₁₈ ミニカラム (C18-50) を用いることとした。C₁₈ ミニカラムで精製する場合、負荷液の極性を高めることで精製効果が向上するが、脂質が多い試料に水等

を加えて極性を上げると、夾雑成分が不溶化し、ミニカラムが目詰まりする恐れがある。通知一斉試験法ではミニカラムへの負荷前に溶媒を除去し極性の高い溶媒に置換するが、操作の簡便化の観点から、そのような操作は行わない方が望ましい。また、負荷液中の夾雑成分に対して充填剤量が不足すると過負荷となり、精製効果が低下する恐れがある。このため、ミニカラムを2個用いた2段精製を検討した。すなわち、抽出液（アセトニトリル溶液）を希釈や濃縮をせずにそのまま1段目のC18-50ミニカラムに負荷することで析出の恐れがある脂質成分を概ね除去し、2段目のカラムでノズルから水系溶媒を加えることにより溶媒の極性を上げて様々な夾雑成分を除去することとした。2段目のミニカラムにはC18-30、C18-50、PBX、PLS-3、AXi及びPSAを検討した。牛の筋肉での回収率及びマトリックス効果を表1に示す。検討した精製方法の概要を図2に示した。予備検討として、牛筋肉のブランク抽出液に混合標準溶液を0.01 µg/mL (0.1ppm 相当) となるように添加し、種々のミニカラムでの回収率及びマトリックスの影響を求めた (表1)。その結果、2段目にもC₁₈ミニカラム (C18-30 又は C18-50) を用いた場合、ほとんどの化合物において良好な回収率が得られた。陰イオン交換ミニカラムであるAXi及びPSAを用いた場合は、マトリックスの影響を補正した回収率は良好であったものの、C₁₈ミニカラム (C18-30 及び C18-50) と比べてエリスロマイシン、ロイコマイシンA5及びネオスピラマイシン等でマトリックスの影響が大きかった。ポリマー系ミニカラムであるPBX及びPLS-3を用いた場合も、マトリックスの影響を補正した回収率は概ね良好であったが、半数以上の化合物がマトリックスの影

響を大きく受けていたことから、これらのミニカラムでは夾雑成分を十分に除去できないことが示唆された。以上の結果から、牛筋肉で良好な結果が得られたC18-30、C18-50、AXi及びPSAミニカラムについて牛肝臓、牛脂肪及び牛乳での回収率及びマトリックスの影響を確認した。その結果、マトリックスの影響を補正した回収率はいずれのミニカラムを用いた場合も概ね良好であった (表2~4)。マトリックスの影響は、牛肝臓ではAXi、牛脂肪及び牛乳ではC18-50で小さく、精製効果が高いことが示唆された。これらの結果から、本研究では1段目と2段目の両方にC18-50を用いることとした。

(2) ノズルから加える水の量の検討

①抽出液負荷時の水量

「(1) ミニカラムの検討」では、1段目のC18-50ミニカラムに抽出液を負荷する際、ノズルから水を0.4 mLを加え、1段目のミニカラムからの溶出液を希釈して2段目のC18-50ミニカラムに負荷した。この時、ノズルから加える水の量を増加させれば精製効果が向上する可能性があると考え、水量を0.8 mLに増加させた場合の回収率および精製効果を検討した (表5)。その結果、水量を増加させても回収率の低下は認められなかった。しかし、マトリックスの影響については、水0.4 mLを用いた場合と比較して改善がみられず、抽出液負荷時にノズルから加える水の量を増加させても精製効果の向上は期待できないことが示唆された。これらの結果から、抽出液負荷時にノズルから加える水の量は0.4 mLとした。

②アセトニトリル/水 (9/1) での溶出時の水量

「(1) ミニカラムの検討」では、1段目のC18-50ミニカラムに抽出液を負荷した後、アセトニ

トリル/水 (9/1) 0.5 mL で溶出する際に、ノズルから水 0.2 mL を加え、1 段目のミニカラムからの溶出液を希釈して 2 段目の C18-50 ミニカラムに負荷した。この時も、ノズルから加える水の量を増加させることで、精製効果が向上する可能性があると考え、水量を 0.4 mL に増加させた場合の回収率及び精製効果を検討した (表 6)。その結果、水 0.2 mL を加えた場合と比べて特段の改善がみられなかった。このため、1 段目の C18-50 ミニカラムからアセトニトリル/水 (9/1) で溶出する際にノズルから加える水の量は 0.2 mL とした。

(3) 確立した精製方法

確立した精製方法を図 1 に示す。1 段目の C18-50 ミニカラムに抽出液 (アセトニトリル溶液) をそのまま負荷し、アセトニトリル/水 (9/1) で溶出することにより、低極性夾雑成分が多く含まれる牛脂肪のような試料においても目詰まりを防ぎ、低極性夾雑成分を効果的に除去することができた。また、2 段目のミニカラムへの過負荷を防ぎ、精製効果の低下を抑制できたと考えられる。さらに、1 段目と 2 段目の C₁₈ ミニカラムの間にノズルを配置し、ノズルから水を注入して溶出液を希釈し、極性を高めた溶液を 2 段目のミニカラムに負荷する方法としたことにより、2 段目のミニカラムでの精製効果が向上したものと考えられた。

2. 妥当性評価

本研究で確立した自動前処理装置を用いた動物用医薬品一斉分析法の妥当性評価を、「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン (食安発 1224 第 1 号, 平成 22 年 12 月 24 日)」に従い実施した。牛筋肉、牛肝臓、牛脂肪及び牛乳を用い、添加濃度 0.01

ppm, 1 名が 1 日 1 回 2 併行の試験を 5 日間実施する試験計画とした。なお、「(1) ミニカラムの検討」で用いた 54 化合物のうちスルファニルアミドはピーク形状の不良により定量が困難であった。また、ゼラノールは感度が低く、ピーク面積の再現性が得られなかった。このため、上記の 2 化合物を除いた 52 化合物を評価対象とした。真度、併行精度、室内精度及びマトリックス効果を表 7 に示す。評価対象化合物のいずれにおいても、ブランク試料におけるピーク面積は添加試料におけるピーク面積の 1/10 未満であり、選択性に問題はなかった。真度及び精度の目標値 (真度 70~120%, 併行精度 25% 未満, 室内精度 30% 未満) を満たす化合物数 (全化合物数に対する割合) は、牛筋肉で 45 (87%), 牛肝臓で 41 (79%), 牛脂肪で 48 (92%), 牛乳で 47 (90%) であり、本分析法により約 8 割以上の化合物を精確に定量できることが分かった。ダノフロキサシンは全ての食品で真度が 120% を超過していた。キノロン系抗菌薬は金属とキレートを形成することが知られており、ダノフロキサシンが分析カラムに吸着した影響も考えられた。すなわち、ダノフロキサシンがカラム内部の金属面に結合する度合いが、夾雑成分が存在する添加試料やマトリックス標準溶液では夾雑成分の存在しない溶媒標準溶液と比べて抑えられるために、同じ濃度でも前者のピーク面積が後者のピーク面積よりも大きくなったことが原因であると考えられた。マルボフロキサシンでは牛筋肉及び牛乳、オフロキサシンでは牛の肝臓及び牛乳において真度が 120% 以上となり、マトリックス効果も比較的大きかったが、これらも同様の理由であると考えられた。エリスロマイシン A については、真度が目標値を下回り、かつ精度の不良傾向がみら

れた。エリスロマイシン A は酸性溶液中での分解が報告されており¹⁾、ギ酸を含む試験溶液調製後、LC-MS/MS に注入するまでに分解したことが低真度やばらつきの原因であると考えられた。牛肝臓においてロイコマイシン A5、ネオスピラマイシン I、スピラマイシン I、スルファキノキサリン及びタイロシンの真度が極端に低かった。いずれもマトリックスの影響は小さく、イオン化抑制が原因ではないと考えられた。また、牛肝臓抽出液に添加した場合の回収率（マトリックスの影響を補正した回収率）は良好であったことから（表 2）、試料に標準溶液を添加後の放置時間中または抽出操作中に分解等により減少したものと考えられた。スピラマイシン I については豚肝臓中でシステインと反応してチアゾリジン誘導体に変換されることが報告されており、その機構は、マクロラクトン環に結合しているアルデヒド基とシステインが反応することによる²⁾。ネオスピラマイシン I、ロイコマイシン A5 及びタイロシンも同様のアルデヒド基を有することから、スピラマイシン I と同様のチアゾリジン誘導体への変換反応が推察された。大きな室内精度は、その変換の程度が試験日によって変動したことが原因であると考えられた。スルファキノキサリンについては詳細な原因が不明であるが、熱変性させた牛肝臓においては真度が良好という報告から、肝臓における代謝機構の関与が示唆されている³⁾。

クロステボルも牛肝臓において真度がやや低かった。また、ロイコマイシン A5、ネオスピラマイシン I、スピラマイシン I 及びタイロシンについては牛筋肉及び牛脂肪においても真度が 56～76%とやや低い値となった。これらもマトリックスの影響は小さく、抽出液に添加し

た場合の回収率（マトリックスの影響を補正した回収率）は良好であったことから（表 1～3）、試料に標準溶液を添加後の放置時間中または抽出操作中に減少したものと考えられた。

チルミコシンに関しては真度が目標値を超過していたが、マトリックスの影響は小さいことから、原因は不明でありさらなる検討が必要である。

参考文献

- 1) Kim, Y. H., Heinze, T. M., Beger, R., Pothuluri, J. V., Cerniglia, C. E. A kinetic study on the degradation of erythromycin A in aqueous solution. *Int. J. Pharm.*, 2004, **271**, 63–76.
- 2) Mourier, P., Brun, A. Study of the metabolism of spiramycin in pig liver. *J. Chromatogr. B*, 1997, **704**, 197–205.
- 3) 大木翔平, 小林浩. LC-MS/MS 法による畜産物中の動物用医薬品一斉試験法の検討. 山梨衛環研年報, 2015, **59**, 32–39.

D. 結論

通知一斉試験法「LC/MS による動物用医薬品等の一斉試験法 I（畜水産物）」の精製操作を改良し、簡便かつ迅速な分析法を確立した。本分析法は通知一斉試験法に従って調製した抽出液を、自動前処理装置を用いて C₁₈ ミニカラム（充填剤量 50 mg）で 2 段階精製し、夾雑成分を除去した後、LC-MS/MS で測定する方法である。牛筋肉、牛肝臓、牛脂肪及び牛乳を用いて、52 化合物を対象に添加濃度 0.01ppm で妥当性評価を行った結果、約 8 割以上の化合物で妥当性評価ガイドラインの目標値を満たした。本分析法は、通知一斉試験法と抽出条件が同一であるため、抽出効率に起因する分析値の差異は生

じず，規格基準への適否判定に用いることができる方法である．また，一連の精製操作は通知一斉試験法に比べ小スケールであり，使用する試薬及び溶媒の使用量を大幅に削減することができた．さらに，自動前処理装置を用いることで，操作時間を短縮でき，分析担当者の熟練度に依存しない精度の高い分析が可能であることから，分析の効率化が期待できる方法である．

E. 研究発表

1. 論文発表

なし

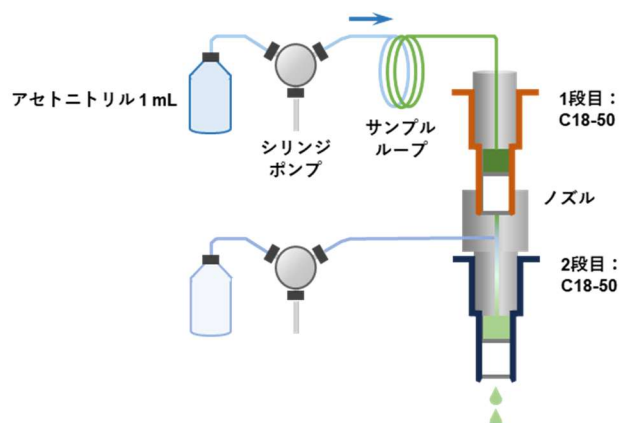
2. 学会発表

なし

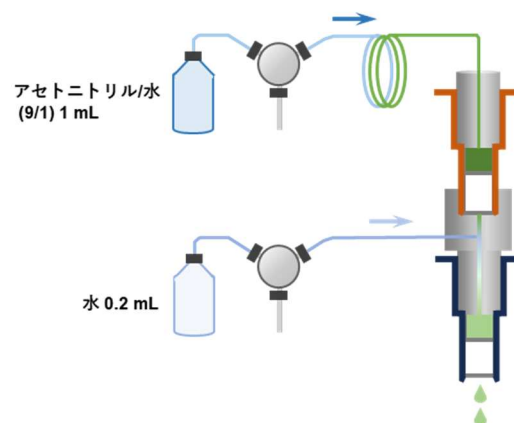
F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

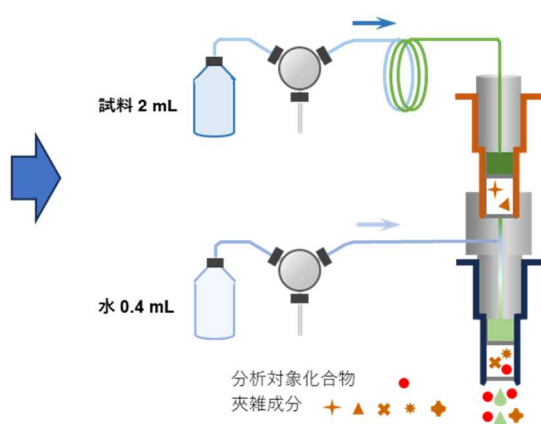
(1) コンディショニング1



(2) コンディショニング2



(3) 試料負荷



(4) 溶出

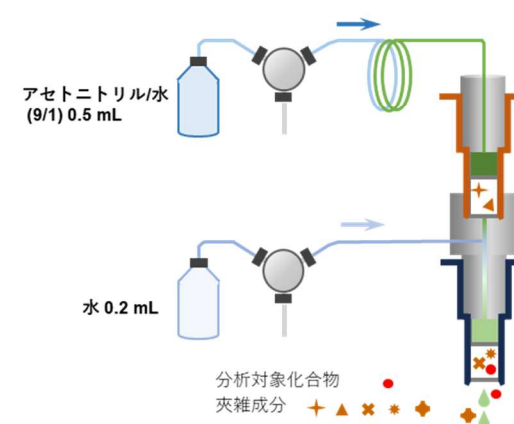


図1 確立した精製方法の概要

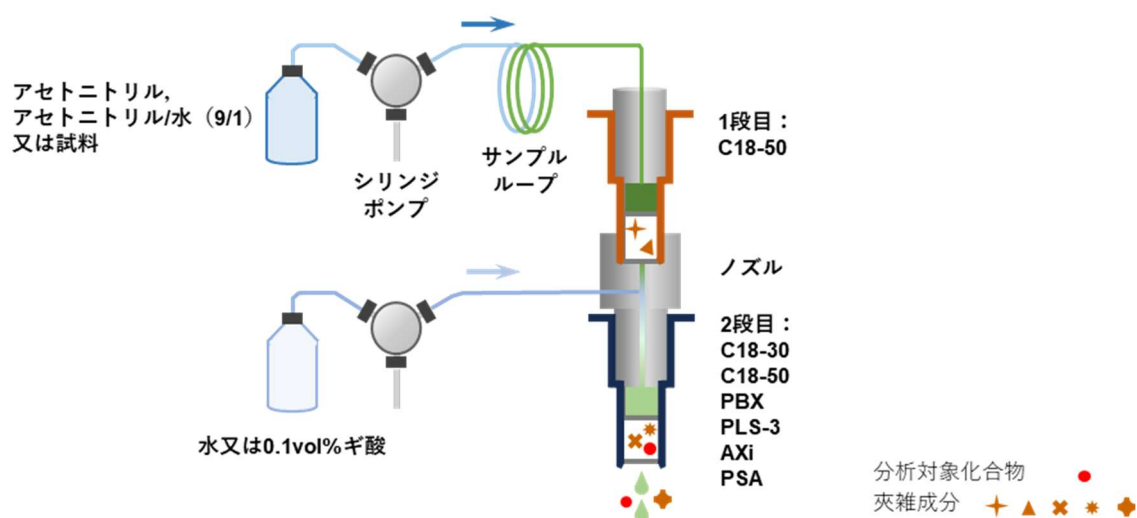


図2 検討した精製方法の概要. ノズルから2段目のカラムに流す溶媒は, C18-30, C18-50, PBS 又は PLS-3 の場合は水, AXi 又は PSA の場合は 0.1vol%ギ酸とした.

表1 ミニカラム検討結果(牛筋肉, %). 網掛け部分は目標値(回収率: 70~120%, マトリックス効果: -20~+20%)から外れたものを示す($n=1$).

SSTD: 溶媒標準溶液, MSTD: マトリックス標準溶液, ME: マトリックス効果

	C18-50+C18-30			C18-50+C18-50			C18-50+PBX			C18-50+PLS-3			C18-50+AXI			C18-50+PSA		
	recovery (vs. SSTD)	recovery (vs. MSTD)	ME	recovery (vs. SSTD)	recovery (vs. MSTD)	ME	recovery (vs. SSTD)	recovery (vs. MSTD)	ME	recovery (vs. SSTD)	recovery (vs. MSTD)	ME	recovery (vs. SSTD)	recovery (vs. MSTD)	ME	recovery (vs. SSTD)	recovery (vs. MSTD)	ME
Ciprofloxacin	98.2	95.9	+2.4	86.3	87.9	-1.8	72.4	98.6	-23.6	72.8	91.2	-22.9	91.6	92.4	-0.8	93.4	88.5	+5.5
Clostebol	92.5	94.9	-2.5	90.1	96.4	-6.5	129.7	102.0	+22.5	100.8	73.5	+81.0	89.9	93.0	-3.3	90.5	91.3	-0.9
Danofloxacin	98.9	91.5	+8.1	85.7	89.8	-4.6	83.7	103.9	-25.7	79.8	99.6	-10.3	93.7	95.4	-1.8	96.1	88.1	+9.0
Diaveridine	95.8	98.9	-3.1	88.4	97.5	-9.3	73.0	96.1	-24.2	68.7	87.8	-20.4	85.8	89.4	-4.1	89.4	89.6	-0.2
Difloxacin	101.4	94.9	+6.9	87.3	96.7	-9.6	90.2	101.1	-13.4	82.0	92.6	-9.8	93.6	91.5	+2.3	97.7	90.7	+7.8
Enrofloxacin	98.2	93.7	+4.8	85.2	89.5	-4.8	68.5	95.6	-28.7	63.9	82.7	-21.4	87.5	83.7	+4.5	95.3	89.7	+6.2
Erythromycin A	101.0	93.4	+8.2	91.4	89.5	+2.1	70.1	97.2	-20.4	59.2	78.8	-12.7	142.1	86.7	+64.0	168.4	85.1	+97.8
Flumequine	96.7	96.3	+0.4	94.2	94.5	-0.3	128.9	100.1	+20.2	95.3	75.8	+47.2	97.6	95.8	+1.9	98.5	97.2	+1.4
Leucomycin A5	109.7	112.2	-2.3	101.6	106.4	-4.5	67.1	112.7	-40.6	47.5	74.5	-36.9	66.5	110.4	-39.8	66.8	105.5	-36.6
Marbofloxacin	103.5	94.7	+9.2	89.1	90.1	-1.1	74.2	98.3	-23.3	72.1	84.0	-10.8	93.0	89.7	+3.7	97.9	92.4	+5.9
Methylprednisolone	95.8	89.1	+7.6	94.9	97.5	-2.7	89.0	88.9	-4.9	90.8	88.5	-1.3	81.4	86.3	-5.7	89.2	89.6	-0.5
Miloxacin	101.4	99.7	+1.8	90.4	95.6	-5.4	129.4	109.2	+9.7	97.6	82.7	+32.1	95.5	92.8	+2.9	101.7	97.6	+4.2
Nalidixic acid	100.0	101.4	-1.4	94.0	98.6	-4.6	130.7	111.5	+13.0	104.0	82.5	+49.1	98.0	95.2	+2.9	100.4	99.4	+1.0
Neospiramycin I	102.3	99.2	+3.1	95.4	104.0	-8.3	85.7	93.5	-13.4	78.1	84.4	-10.2	71.0	97.0	-26.8	72.0	99.1	-27.4
Norfloxacin	86.6	89.2	-2.9	77.8	87.3	-10.9	73.6	91.3	-21.4	75.9	87.6	-16.7	80.8	86.7	-6.8	83.4	87.5	-4.7
Ofloxacin	96.5	94.7	+1.9	84.7	94.4	-10.3	76.2	100.6	-26.0	72.7	89.8	-18.2	88.4	85.4	+3.6	94.7	90.1	+5.1
Orbifloxacin	94.8	88.9	+6.6	90.7	95.8	-5.3	75.5	103.9	-29.5	63.3	85.2	-22.3	87.8	87.8	-0.0	91.8	93.4	-1.8
Ormetoprim	97.7	96.9	+0.8	89.1	94.8	-6.0	73.9	97.2	-24.2	69.3	87.1	-20.8	87.4	85.0	+2.8	94.9	89.8	+5.7
Oxolinic acid	99.2	95.7	+3.7	86.3	97.0	-11.0	139.8	112.0	+13.4	97.0	78.0	+36.4	94.5	85.1	+11.0	105.5	96.4	+9.5
Piromidic acid	96.7	99.8	-3.1	94.3	96.5	-2.3	131.4	110.5	+13.9	96.7	79.6	+37.0	101.1	97.3	+3.9	99.0	97.8	+1.2
Prednisolone	89.9	87.9	+2.2	83.5	94.4	-11.6	84.7	102.1	-18.6	67.4	83.6	-13.3	102.2	103.8	-1.5	108.4	98.4	+10.2
Pyrimethamine	93.1	94.9	-1.9	86.6	92.0	-5.9	79.7	96.2	-16.6	75.5	86.9	-12.1	89.1	86.5	+3.0	98.0	93.6	+4.7
Sarafloxacin	105.9	94.7	+11.8	88.4	92.1	-4.1	80.5	98.3	-18.7	76.6	92.5	-10.7	83.3	81.9	+1.7	93.6	88.8	+5.5
Spiramycin I	107.9	101.2	+6.7	97.5	99.6	-2.1	74.5	90.5	-20.0	71.9	84.1	-16.1	75.1	108.1	-30.6	76.1	93.9	-19.0
Sulfabenzamide	97.2	98.0	-0.8	89.7	94.3	-4.9	144.4	107.3	+12.3	100.7	75.6	+78.4	89.6	88.5	+1.3	97.9	93.2	+5.0
Sulfabromomethazine	97.0	96.0	+1.0	88.3	93.3	-5.4	144.9	105.5	+11.1	90.8	69.0	+76.5	91.1	92.3	-1.3	92.1	90.3	+2.0
Sulfachloropyridazine	98.8	102.3	-3.4	87.4	93.9	-6.9	142.7	101.8	+26.7	101.9	73.2	+66.9	87.6	86.3	+1.6	96.1	92.4	+3.9
Sulfadiazine	98.2	97.8	+0.4	89.1	93.0	-4.2	132.1	107.4	+15.5	107.1	88.1	+35.8	91.2	92.3	-1.2	93.0	92.3	+0.8
Sulfadimethoxine	97.1	97.1	+0.0	92.2	98.3	-6.1	148.2	108.9	+20.8	97.6	69.8	+66.5	95.2	94.0	+1.3	97.2	96.0	+1.3
Sulfadimidine	97.9	95.7	+2.3	90.0	91.9	-2.1	102.2	98.0	+3.3	90.6	85.5	+10.3	88.4	89.5	-1.2	93.6	93.7	-0.1
Sulfadoxine	100.2	100.8	-0.6	93.5	96.5	-3.2	126.2	105.2	+12.6	104.7	86.4	+40.5	95.3	93.7	+1.7	96.9	95.4	+1.5
Sulfaethoxypyridazine	103.1	101.6	+1.5	93.2	94.5	-1.3	127.1	104.4	+13.1	105.4	85.3	+43.0	93.0	94.9	-2.0	93.2	91.3	+2.1
Sulfaguanidine	74.1	102.8	-27.9	68.2	83.6	-18.5	21.7	43.3	-49.5	38.2	102.5	-61.5	75.2	80.5	-6.6	73.1	78.1	-6.4
Sulfamerazine	91.1	97.0	-6.1	90.6	96.5	-6.1	124.6	102.3	+12.1	101.3	91.2	+23.6	91.6	92.5	-1.0	90.4	85.6	+5.7
Sulfamethoxazole	98.8	100.0	-1.2	91.2	99.3	-8.2	151.1	111.0	+18.7	104.5	78.0	+69.8	89.8	91.4	-1.7	93.7	88.2	+6.1
Sulfamethoxypyridazine	92.0	96.9	-5.0	83.4	99.4	-16.1	134.3	106.5	+13.1	109.8	86.5	+46.3	86.9	94.4	-7.9	87.9	88.7	-0.9
Sulfamonomethoxine	95.2	94.9	+0.3	90.1	98.9	-8.9	130.4	106.3	+25.3	116.7	86.6	+53.2	91.8	91.1	+0.8	97.2	92.8	+4.6
Sulfanilamide	63.6	86.9	-26.9	68.1	107.3	-36.6	73.8	98.8	-37.3	53.3	90.4	-36.9	65.4	91.1	-28.3	73.4	99.6	-26.2
Sulfapyridine	97.4	98.5	-1.1	90.9	96.1	-5.5	117.6	110.9	-5.5	96.4	87.4	+25.1	93.4	93.8	-0.5	93.8	90.4	+3.8
Sulfaguinoxaline	97.9	98.5	-0.6	91.3	93.5	-2.4	145.9	110.0	+15.2	106.1	79.3	+68.8	90.0	87.9	+2.3	91.8	88.0	+4.3
Sulfathiazole	97.7	97.3	+0.4	88.8	92.8	-4.4	116.8	104.8	+10.6	100.2	84.6	+28.2	90.9	94.8	-4.0	92.3	90.2	+2.3
Sulfatroxazole	97.2	98.0	-0.9	91.2	97.4	-6.4	141.2	104.0	+23.5	104.4	78.5	+67.6	91.2	96.8	-5.8	93.7	95.0	-1.4
Sulfisomidine	95.7	95.8	-0.2	90.3	97.9	-7.8	78.2	101.5	-24.8	69.3	89.7	-20.4	89.0	98.6	-9.7	88.1	90.5	-2.7
Sulfisoxazole	101.6	100.1	+1.5	90.5	96.7	-6.4	145.5	103.3	+17.6	103.6	78.8	+62.6	88.7	89.5	-0.9	96.1	88.9	+8.1
Sulfisozole	93.6	89.7	+4.4	87.5	92.2	-5.1	149.6	100.9	+33.2	116.9	78.1	+69.4	88.8	96.1	-7.6	94.5	97.2	-2.8
Sulfacetamide	105.9	98.4	+7.5	96.1	96.7	-0.6	79.5	99.1	-32.4	57.9	84.5	-17.6	85.4	98.5	-13.3	97.2	101.5	-4.2
Tiamulin	99.9	102.6	-2.6	94.1	96.6	-2.6	90.0	98.5	-10.0	75.3	83.1	-4.9	97.9	95.8	+2.2	98.9	98.6	+0.3
Tilmicosin	100.1	89.0	+12.5	88.2	91.0	-3.0	68.6	82.5	-21.2	63.8	81.9	-20.3	90.3	90.4	-0.1	91.3	84.0	+8.7
Trimethoprim	97.1	91.3	+6.4	91.8	96.9	-5.2	74.8	97.8	-22.2	71.4	91.5	-20.1	89.2	90.5	-1.5	93.3	94.7	-1.5
Tylosin	102.3	103.1	-0.7	89.3	96.0	-7.0	63.6	93.5	-34.7	54.1	81.7	-32.4	80.7	99.1	-18.6	76.9	91.5	-16.0
α -Trenbolone	93.4	94.7	-1.4	85.4	93.1	-8.2	116.8	106.0	+8.7	96.9	84.1	+22.5	91.0	92.6	-1.8	87.1	88.9	-2.0
β -Trenbolone	96.8	93.5	+3.6	86.3	93.2	-7.4	121.0	107.7	+5.9	95.4	82.6	+28.4	90.1	91.9	-1.9	96.4	94.7	+1.8
Sulfantran	97.6	90.5	+7.9	83.4	93.8	-11.0	144.7	111.3	-16.7	61.6	53.9	+78.7	90.2	84.8	+6.3	103.8	101.9	+1.9
Zeranol	90.1	99.2	-9.1	73.6	87.0	-15.5	292.5	203.2	+15.7	105.0	73.5	-0.4	101.1	91.8	+10.1	95.9	93.1	+3.1

表2 ミニカラム検討結果（牛肝臓，％）．網掛け部分は目標値（回収率：70～120％，マトリックス効果：-20～+20％）から外れたものを示す（ $n=1$ ）．SSTD: 溶媒標準溶液，MSTD: マトリックス標準溶液，ME: マトリックス効果

	C18-30			C18-50			AXi			PSA		
	recovery (vs. SSTD)	recovery (vs. MSTD)	ME	recovery (vs. SSTD)	recovery (vs. MSTD)	ME	recovery (vs. SSTD)	recovery (vs. MSTD)	ME	recovery (vs. SSTD)	recovery (vs. MSTD)	ME
Ciprofloxacin	98.6	97.1	+1.6	74.4	99.4	-25.1	86.7	90.8	-4.5	105.2	87.9	+19.6
Clostebol	87.3	94.3	-7.5	83.6	93.6	-10.6	95.4	98.0	-2.7	94.2	90.3	+4.3
Danofloxacin	96.5	86.8	+11.1	63.3	93.0	-31.9	103.3	91.8	+12.5	126.8	107.1	+18.4
Diaveridine	91.0	90.6	+0.4	89.7	98.1	-8.5	88.0	93.7	-6.1	96.0	97.5	-1.6
Difloxacin	88.7	90.6	-2.1	73.8	97.1	-24.0	94.8	97.8	-3.1	102.5	90.9	+12.8
Enrofloxacin	95.9	90.8	+5.6	74.5	96.2	-22.5	94.4	96.6	-2.3	111.4	93.2	+19.5
Erythromycin A	91.6	91.1	+0.7	86.0	91.7	-6.3	80.8	86.7	-6.8	84.5	94.6	-10.6
Flumequine	94.4	97.3	-3.0	82.8	99.0	-16.4	96.9	98.4	-1.5	106.1	94.8	+11.9
Leucomycin A5	182.2	155.5	+17.2	121.5	112.7	+7.8	126.0	119.3	+5.6	195.6	114.4	+70.9
Marbofloxacin	89.6	91.2	-1.8	70.9	97.2	-27.1	92.7	89.5	+3.6	98.4	92.4	+6.4
Methylprednisolone	93.3	100.8	-7.4	81.2	95.6	-15.0	96.8	97.4	-0.7	100.0	84.2	+18.7
Miloxacin	93.9	96.7	-2.9	78.6	98.1	-19.9	92.4	100.7	-8.2	106.3	94.0	+13.0
Nalidixic acid	89.6	92.0	-2.7	88.2	98.5	-10.5	94.8	99.0	-4.2	102.9	98.5	+4.5
Neospiramycin I	123.9	115.8	+7.0	84.9	96.7	-12.2	105.4	99.3	+6.2	139.1	110.0	+26.5
Norfloxacin	98.3	99.2	-0.9	66.2	100.9	-34.4	79.8	85.2	-6.3	124.2	92.7	+34.1
Ofloxacin	85.8	88.5	-3.1	70.2	95.3	-26.3	92.0	95.9	-4.0	104.5	95.9	+9.0
Orbifloxacin	89.0	91.3	-2.6	83.5	97.2	-14.0	95.3	94.9	+0.4	91.8	93.5	-1.8
Ormetoprim	95.1	97.8	-2.8	91.4	98.7	-7.3	88.3	94.1	-6.1	94.8	93.3	+1.6
Oxolinic acid	89.2	93.1	-4.1	69.6	92.7	-25.0	88.8	96.7	-8.2	109.9	90.4	+21.6
Piromidic acid	92.0	97.0	-5.1	87.9	98.9	-11.0	95.6	102.7	-7.0	94.4	98.1	-3.8
Prednisolone	90.4	96.7	-6.5	79.3	99.9	-20.7	88.0	95.9	-8.3	104.2	97.5	+6.9
Pyrimethamine	95.0	99.1	-4.2	92.2	93.6	-1.4	89.3	93.8	-4.8	99.1	98.7	+0.4
Sarafloxacin	94.2	93.1	+1.1	76.1	94.9	-19.8	90.5	90.1	+0.4	97.8	98.3	-0.4
Spiramycin I	135.3	115.9	+16.8	88.9	95.8	-7.2	95.4	93.5	+2.0	140.3	105.9	+32.5
Sulfabenzamide	91.4	94.8	-3.6	91.1	93.6	-2.7	88.6	91.1	-2.7	89.1	95.2	-6.4
Sulfabromomethazine	98.4	97.1	+1.4	91.7	97.4	-5.9	94.2	88.4	+6.5	126.8	102.0	+24.2
Sulfachloropyridazine	91.6	95.3	-3.8	83.5	98.2	-14.9	97.8	96.3	+1.5	106.2	87.9	+20.8
Sulfadiazine	91.1	99.0	-8.0	85.3	96.0	-11.2	93.2	93.6	-0.4	100.2	93.5	+7.1
Sulfadimethoxine	99.1	99.9	-0.8	90.8	97.0	-6.4	97.4	101.3	-3.9	96.1	91.5	+5.1
Sulfadimidine	100.9	98.3	+2.6	98.0	102.0	-3.9	93.3	96.1	-2.9	105.5	93.5	+12.8
Sulfadoxine	96.4	98.7	-2.3	93.7	99.1	-5.4	94.5	97.3	-2.9	100.6	93.3	+7.8
Sulfaethoxypyridazine	97.7	98.4	-0.7	86.9	104.3	-16.7	92.9	94.1	-1.3	99.2	93.4	+6.2
Sulfaguanidine	74.5	96.0	-22.4	84.2	91.8	-8.2	71.4	95.5	-25.2	88.8	94.7	-6.3
Sulfamerazine	100.0	98.0	+2.0	89.3	104.2	-14.3	85.3	85.5	-0.2	109.0	94.8	+15.0
Sulfamethoxazole	94.3	93.9	+0.4	85.3	96.4	-11.5	89.2	95.8	-6.9	89.5	90.9	-1.5
Sulfamethoxypyridazine	94.6	97.0	-2.5	95.3	101.5	-6.1	102.5	100.0	+2.5	111.1	88.4	+25.8
Sulfamonomethoxine	105.3	93.9	+12.2	85.3	86.9	-1.9	91.6	97.4	-6.0	105.1	95.5	+10.0
Sulfanilamide	96.1	101.8	-5.6	79.6	97.7	-18.5	85.3	95.0	-10.1	90.5	90.9	-0.4
Sulfapyridine	94.8	96.7	-2.0	91.4	98.6	-7.3	96.3	96.0	+0.3	103.4	91.0	+13.7
Sulfaquinoxaline	93.9	92.1	+2.0	85.1	90.1	-5.6	92.4	99.9	-7.5	99.6	99.3	+0.4
Sulfathiazole	98.0	87.4	+12.1	91.0	98.6	-7.6	93.9	98.1	-4.2	103.9	90.1	+15.3
Sulfatroxazole	93.9	95.3	-1.4	82.8	96.0	-13.7	89.0	93.5	-4.8	102.8	92.1	+11.6
Sulfisomdine	92.5	95.0	-2.7	93.3	99.2	-5.9	95.3	97.5	-2.2	94.2	96.3	-2.2
Sulfisoxazole	94.7	97.2	-2.6	84.1	93.2	-9.8	96.5	98.2	-1.7	101.4	89.6	+13.2
Sulfisozole	97.8	98.0	-0.1	90.5	93.0	-2.7	94.3	97.2	-3.1	93.9	98.2	-4.4
Sulfacetamide	92.1	95.6	-3.7	86.4	95.1	-9.2	89.3	97.6	-8.5	88.6	93.2	-5.0
Tiamulin	96.7	100.2	-3.5	100.3	98.3	+2.0	97.4	100.7	-3.3	96.9	98.9	-1.9
Tilmicosin	101.5	92.8	+9.4	87.9	96.4	-8.8	94.1	91.0	+3.4	99.5	89.8	+10.8
Trimethoprim	89.3	89.4	-0.1	91.5	91.6	-0.2	89.8	94.8	-5.3	98.6	95.5	+3.3
Tylosin	118.0	115.7	+1.9	87.9	96.9	-9.3	108.6	101.1	+7.5	124.8	105.1	+18.8
α -Trenbolone	85.0	92.7	-8.3	78.6	99.6	-21.1	90.7	91.0	-0.4	102.7	94.2	+9.0
β -Trenbolone	86.3	95.1	-9.2	72.2	94.4	-23.5	84.0	92.3	-9.0	98.7	94.8	+4.1
Sulfanitran	113.3	104.4	+8.6	111.0	101.4	+9.5	98.6	92.2	+7.0	93.7	75.2	+24.6
Zeranol	86.7	101.0	-14.1	86.1	97.6	-11.8	78.8	96.2	-18.0	81.5	92.6	-12.0

表3 ミニカラム検討結果（牛脂肪，％）．網掛け部分は目標値（回収率：70～120%，マトリックス効果：-20～+20％）から外れたものを示す（ $n=1$ ）．SSTD: 溶媒標準溶液，MSTD: マトリックス標準溶液，ME: マトリックス効果

	C18-30			C18-50			AXi			PSA		
	recovery (vs. SSTD)	recovery (vs. MSTD)	ME	recovery (vs. SSTD)	recovery (vs. MSTD)	ME	recovery (vs. SSTD)	recovery (vs. MSTD)	ME	recovery (vs. SSTD)	recovery (vs. MSTD)	ME
Ciprofloxacin	95.9	97.3	-1.4	86.0	82.3	+4.5	77.6	88.2	-12.1	84.2	94.4	-10.8
Clostebol	91.1	93.5	-2.5	94.7	92.3	+2.6	77.1	91.2	-15.4	77.4	92.8	-16.6
Danofloxacin	95.2	94.8	+0.4	104.3	94.3	+10.6	77.1	98.9	-22.0	73.3	88.1	-16.9
Diaveridine	97.7	99.6	-2.0	94.3	88.5	+6.5	86.5	90.1	-4.0	87.9	95.8	-8.3
Difloxacin	89.5	97.0	-7.7	94.8	89.3	+6.2	86.9	89.2	-2.5	83.7	88.5	-5.4
Enrofloxacin	93.2	92.6	+0.6	95.6	89.3	+7.1	75.8	87.1	-12.9	81.4	94.4	-13.8
Erythromycin A	71.0	86.1	-17.6	71.4	81.4	-12.3	38.2	71.2	-46.3	65.7	87.4	-24.8
Flumequine	93.8	101.7	-7.8	93.1	92.5	+0.7	80.3	90.1	-11.0	81.8	95.0	-13.9
Leucomycin A5	172.1	146.4	+17.6	110.1	99.7	+10.4	150.6	96.3	+56.4	146.3	95.4	+53.4
Marbofloxacin	92.5	94.2	-1.9	96.4	93.5	+3.1	79.5	91.5	-13.0	81.5	92.6	-12.0
Methylprednisolone	97.7	106.1	-7.9	94.7	90.7	+4.4	83.5	87.5	-4.6	86.2	89.5	-3.6
Miloxacin	94.6	99.6	-5.0	92.7	91.9	+0.9	74.4	87.1	-14.6	75.8	88.4	-14.2
Nalidixic acid	92.6	99.3	-6.7	92.5	95.8	-3.4	79.1	89.9	-12.1	82.3	96.1	-14.4
Neospiramycin I	124.3	119.7	+3.9	92.2	80.5	+14.5	92.6	87.0	+6.4	91.9	86.5	+6.3
Norfloxacin	91.1	96.5	-5.6	88.5	83.4	+6.2	93.3	90.2	+3.5	85.4	87.9	-2.8
Ofloxacin	85.7	87.1	-1.7	96.7	90.2	+7.2	79.4	85.9	-7.7	85.6	94.5	-9.4
Orbifloxacin	91.7	98.0	-6.5	93.2	90.9	+2.5	76.3	83.5	-8.6	80.9	95.2	-15.0
Ormetoprim	95.3	95.3	-0.0	91.6	88.0	+4.1	91.8	91.8	+0.0	93.4	98.3	-5.0
Oxolinic acid	91.4	99.3	-7.9	90.6	90.8	-0.2	72.2	79.5	-9.2	80.1	95.7	-16.4
Piromidic acid	92.9	98.8	-6.0	95.7	97.2	-1.5	89.0	95.8	-7.1	85.3	94.5	-9.8
Prednisolone	95.1	105.2	-9.6	98.7	93.3	+5.9	76.5	81.6	-6.2	79.0	92.0	-14.2
Pyrimethamine	95.0	95.8	-0.9	90.2	87.2	+3.4	87.1	87.9	-0.9	90.8	99.5	-8.7
Sarafloxacin	90.5	93.9	-3.6	92.3	89.2	+3.4	89.7	81.2	+10.5	87.0	88.7	-1.9
Spiramycin I	123.4	107.6	+14.7	88.9	81.1	+9.6	92.6	83.9	+10.4	89.9	81.0	+10.9
Sulfabenzamide	92.6	99.3	-6.8	91.2	93.7	-2.6	83.1	88.8	-6.4	87.6	94.6	-7.4
Sulfabromomethazine	92.9	104.7	-11.3	94.3	97.3	-3.1	75.7	86.2	-12.2	81.5	93.0	-12.4
Sulfachloropyridazine	94.4	103.0	-8.3	99.1	92.3	+7.4	88.2	91.6	-3.7	90.9	91.4	-0.5
Sulfadiazine	87.1	101.2	-13.9	91.5	92.8	-1.4	79.9	95.9	-16.6	81.4	89.3	-8.9
Sulfadimethoxine	96.6	98.7	-2.1	97.1	97.0	+0.1	84.0	88.6	-5.1	84.1	95.1	-11.6
Sulfadimidine	104.0	105.0	-1.0	99.1	95.4	+3.8	88.4	93.9	-5.8	88.7	94.2	-5.9
Sulfadoxine	95.8	98.8	-3.0	92.5	95.0	-2.6	91.4	92.7	-1.3	92.3	101.1	-8.7
Sulfaethoxypyridazine	92.6	90.2	+2.7	91.8	91.1	+0.8	84.4	88.5	-4.6	87.0	96.9	-10.2
Sulfaguanidine	110.2	102.1	+7.9	103.1	92.1	+12.0	103.9	93.4	+11.2	108.0	100.2	+7.8
Sulfamerazine	93.6	93.8	-0.2	104.0	93.2	+11.6	90.3	85.2	+6.0	89.5	93.2	-3.9
Sulfamethoxazole	93.5	98.7	-5.2	94.7	96.7	-2.1	75.3	83.7	-10.0	77.6	95.2	-18.5
Sulfamethoxypyridazine	94.3	99.5	-5.2	90.6	92.8	-2.4	95.5	92.6	+3.1	95.9	91.7	+4.6
Sulfamonomethoxine	104.5	97.6	+7.1	93.0	93.5	-0.6	84.5	86.6	-2.4	87.4	86.3	+1.3
Sulfanilamide	112.9	101.6	+11.2	97.0	89.7	+8.1	80.0	97.5	-17.9	87.2	103.2	-15.5
Sulfapyridine	90.2	104.2	-13.4	97.8	93.6	+4.4	91.3	94.4	-3.3	91.2	92.3	-1.1
Sulfaquinoxaline	95.2	100.4	-5.2	95.3	91.1	+4.6	76.4	94.7	-19.4	72.0	84.6	-14.9
Sulfathiazole	101.4	99.9	+1.5	101.3	92.9	+9.0	87.6	91.4	-4.1	85.9	87.7	-2.1
Sulfatroxazole	94.2	104.4	-9.8	98.2	91.8	+7.0	82.4	91.0	-9.5	79.0	89.2	-11.4
Sulfisomdine	95.2	100.5	-5.3	92.9	94.2	-1.4	84.3	99.2	-15.0	87.2	105.8	-17.6
Sulfisoxazole	96.8	103.6	-6.6	100.5	94.5	+6.3	84.8	88.3	-4.0	89.9	97.6	-7.9
Sulfisozole	96.8	94.6	+2.3	94.7	90.4	+4.7	79.7	92.5	-13.8	83.4	92.5	-9.8
Sulfacetamide	102.3	103.8	-1.5	97.7	93.2	+4.8	75.4	97.0	-22.3	78.1	97.9	-20.2
Tiamulin	95.1	96.7	-1.6	94.8	96.9	-2.1	91.8	92.6	-0.9	93.0	95.8	-2.9
Tilmicosin	103.1	91.7	+12.5	81.5	76.2	+6.8	70.7	73.4	-3.7	82.1	83.1	-1.2
Trimethoprim	94.5	97.2	-2.8	93.6	90.9	+3.0	88.7	95.1	-6.7	90.7	94.2	-3.7
Tylosin	114.7	110.0	+4.3	98.8	92.8	+6.4	99.4	89.6	+11.0	100.1	97.8	+2.3
α -Trenbolone	90.9	105.7	-13.9	95.1	98.1	-3.1	80.1	88.2	-9.2	77.7	95.3	-18.4
β -Trenbolone	92.0	100.7	-8.6	91.7	91.1	+0.7	76.4	85.9	-11.1	81.5	105.4	-22.7
Sulfanitran	123.8	107.2	+15.5	78.9	86.6	-8.8	85.7	79.4	+7.9	99.0	88.9	+11.5
Zeranol	96.0	104.7	-8.2	84.8	98.7	-14.1	79.4	90.0	-11.8	93.7	103.7	-9.6

表4 ミニカラム検討結果 (牛乳, %). 網掛け部分は目標値 (回収率: 70~120%, マトリックス効果: -20~+20%) から外れたものを示す ($n=1$). SSTD: 溶媒標準溶液, MSTD: マトリックス標準溶液, ME: マトリックス効果

	C18-30			C18-50			AXi			PSA		
	recovery (vs. SSTD)	recovery (vs. MSTD)	ME	recovery (vs. SSTD)	recovery (vs. MSTD)	ME	recovery (vs. SSTD)	recovery (vs. MSTD)	ME	recovery (vs. SSTD)	recovery (vs. MSTD)	ME
Ciprofloxacin	94.1	97.8	-3.9	90.4	89.6	+1.0	103.2	90.7	+13.7	93.8	93.9	-0.1
Clostebol	94.3	103.9	-9.3	94.5	96.1	-1.7	79.6	91.0	-12.6	80.5	100.9	-20.3
Danofloxacin	103.0	100.6	+2.3	100.4	85.0	+18.1	98.2	92.0	+6.7	89.8	90.3	-0.5
Diaveridine	91.8	96.9	-5.2	93.7	92.5	+1.4	90.9	93.5	-2.8	91.4	98.0	-6.7
Difloxacin	92.0	95.9	-4.0	102.8	96.8	+6.2	99.3	95.8	+3.7	89.4	94.7	-5.6
Enrofloxacin	95.0	93.8	+1.2	99.8	92.0	+8.5	91.0	92.7	-1.8	87.9	93.8	-6.3
Erythromycin A	90.3	93.3	-3.2	96.7	95.0	+1.7	51.1	74.4	-31.3	83.0	98.2	-15.5
Flumequine	95.3	100.9	-5.5	102.9	100.1	+2.8	96.8	95.6	+1.2	87.5	97.9	-10.6
Leucomycin A5	194.0	166.7	+16.4	129.6	120.1	+7.9	195.2	115.4	+69.2	186.9	112.5	+66.1
Marbofloxacin	104.2	92.1	+13.2	111.7	88.7	+25.9	96.0	87.3	+9.9	95.0	101.3	-6.2
Methylprednisolone	97.4	103.5	-5.9	97.5	92.5	+5.4	91.9	96.0	-4.3	86.7	104.6	-17.2
Miloxacin	93.8	98.8	-5.1	104.9	95.6	+9.7	90.5	95.5	-5.2	85.1	101.4	-16.1
Nalidixic acid	91.9	98.7	-6.9	96.1	96.8	-0.7	94.3	96.2	-2.0	86.2	96.0	-10.3
Neospiramycin I	146.3	137.5	+6.4	114.2	106.8	+6.9	118.1	94.4	+25.1	104.3	93.4	+11.8
Norfloxacin	95.7	102.2	-6.4	107.5	95.3	+12.7	119.9	90.8	+32.0	100.1	91.9	+9.0
Ofloxacin	92.6	100.2	-7.6	103.0	93.3	+10.4	90.0	93.8	-4.1	87.5	97.2	-10.0
Orbifloxacin	90.7	94.7	-4.2	92.8	93.2	-0.5	87.2	88.8	-1.9	88.0	105.0	-16.2
Ormetoprim	92.0	96.5	-4.6	94.3	104.5	-9.7	92.9	92.9	+0.1	91.3	92.8	-1.6
Oxolinic acid	89.6	98.4	-8.9	103.1	96.8	+6.5	89.4	87.4	+2.2	84.5	98.0	-13.7
Piromidic acid	92.2	96.7	-4.6	94.2	99.0	-4.8	94.0	97.0	-3.1	90.2	99.0	-8.9
Prednisolone	88.9	98.4	-9.7	97.5	92.9	+4.9	83.5	91.7	-9.0	78.3	102.4	-23.5
Pyrimethamine	90.9	92.8	-2.1	92.7	90.7	+2.2	93.8	92.0	+2.0	95.8	100.5	-4.6
Sarafloxacin	101.0	104.5	-3.3	94.8	92.2	+2.8	115.8	98.3	+17.9	106.4	92.2	+15.5
Spiramycin I	143.8	129.2	+11.3	104.3	100.6	+3.7	127.9	104.7	+22.2	111.1	107.0	+3.8
Sulfabenzamide	91.5	101.9	-10.2	93.8	103.7	-9.6	82.1	88.7	-7.4	78.0	91.1	-14.4
Sulfabromomethazine	88.8	100.1	-11.3	95.7	98.1	-2.4	97.0	99.0	-2.0	88.7	101.1	-12.3
Sulfachloropyridazine	91.6	99.4	-7.8	98.6	99.0	-0.4	95.0	92.6	+2.6	95.7	112.1	-14.7
Sulfadiazine	88.0	92.7	-5.1	95.4	92.2	+3.5	87.2	93.3	-6.5	89.6	99.2	-9.7
Sulfadimethoxine	98.9	102.3	-3.3	94.9	97.8	-3.0	95.0	101.0	-5.9	89.7	98.9	-9.3
Sulfadimidine	98.8	100.6	-1.8	96.3	96.1	+0.2	93.4	104.9	-11.0	85.8	96.1	-10.7
Sulfadoxine	94.8	99.0	-4.3	94.9	97.7	-2.9	101.8	100.5	+1.3	96.0	99.4	-3.4
Sulfaethoxypyridazine	94.7	98.9	-4.2	93.3	91.3	+2.3	90.2	93.9	-3.9	90.2	97.0	-7.1
Sulfaguanidine	96.7	96.0	+0.8	102.3	126.2	-19.0	92.9	108.2	-14.2	90.7	101.0	-10.2
Sulfamerazine	93.3	100.3	-7.0	97.7	88.7	+10.2	95.4	88.6	+7.7	96.2	102.3	-6.0
Sulfamethoxazole	88.6	96.2	-7.9	91.9	99.2	-7.3	87.1	95.6	-8.8	82.8	100.7	-17.8
Sulfamethoxypyridazine	86.3	91.2	-5.3	88.3	90.1	-2.0	107.6	114.8	-6.2	104.1	106.0	-1.8
Sulfamonomethoxine	105.6	105.0	+0.5	97.0	99.7	-2.7	87.1	86.9	+0.2	88.1	102.2	-13.8
Sulfanilamide	93.5	94.1	-0.7	91.3	90.6	+0.8	62.8	84.8	-26.0	69.1	124.3	-44.4
Sulfapyridine	91.0	99.3	-8.4	105.2	88.1	+19.4	108.0	94.6	+14.1	101.9	103.1	-1.2
Sulfaquinoxaline	89.9	97.0	-7.3	95.3	92.6	+2.9	89.6	102.5	-12.6	83.5	107.8	-22.5
Sulfathiazole	97.4	92.8	+4.9	97.0	92.3	+5.1	93.4	90.9	+2.7	89.1	103.6	-14.0
Sulfatroxazole	95.6	103.3	-7.5	100.6	98.1	+2.5	91.5	93.7	-2.4	88.7	98.5	-10.0
Sulfisomidine	93.7	95.7	-2.1	94.9	95.6	-0.7	82.7	95.3	-13.2	84.9	105.0	-19.2
Sulfisoxazole	101.7	110.9	-8.3	101.6	93.8	+8.3	86.6	85.6	+1.2	87.7	52.9	+65.8
Sulfisozole	97.9	101.9	-3.9	88.3	94.7	-6.8	83.2	93.2	-10.7	84.3	101.2	-16.7
Sulfacetamide	97.7	100.6	-2.9	96.3	94.9	+1.5	64.4	91.0	-29.2	68.2	114.0	-40.2
Tiamulin	97.0	100.0	-3.0	95.5	97.3	-1.8	94.5	98.3	-3.9	95.1	100.3	-5.3
Tilmicosin	110.3	104.9	+5.1	94.1	85.9	+9.6	82.8	94.8	-12.7	86.1	96.9	-11.2
Trimethoprim	91.7	99.6	-8.0	93.3	90.9	+2.6	92.4	92.1	+0.4	93.4	99.5	-6.2
Tylosin	116.8	113.8	+2.6	104.5	99.7	+4.8	116.9	99.7	+17.3	105.1	96.0	+9.6
α -Trenbolone	85.2	94.9	-10.2	90.4	94.0	-3.8	96.0	95.4	+0.7	85.0	96.7	-12.1
β -Trenbolone	92.7	98.2	-5.6	99.3	102.4	-3.0	87.4	91.5	-4.5	80.3	96.7	-17.0
Sulfanitran	113.5	114.1	-0.5	91.3	101.8	-10.3	105.8	104.5	+1.3	95.8	95.0	+0.9
Zeranol	93.9	100.8	-6.8	84.6	89.7	-5.7	89.5	108.0	-17.1	91.2	90.9	+0.3

表5 負荷時に加える水の量の検討結果（牛筋肉，％）．網掛け部分は目標値（回収率：70～120%，マトリックス効果：-20～+20％）から外れたものを示す（ $n=1$ ）．SSTD: 溶媒標準溶液，MSTD: マトリックス標準溶液，ME: マトリックス効果．水0.4 mLの結果は表1のC18-50+C18-50を引用

	水0.4 mL			水0.8 mL		
	recovery (vs. SSTD)	recovery (vs. MSTD)	ME	recovery (vs. SSTD)	recovery (vs. MSTD)	ME
Ciprofloxacin	86.3	87.9	-1.8	106.3	105.6	+0.7
Clostebol	90.1	96.4	-6.5	97.1	96.4	+0.7
Danofloxacin	85.7	89.8	-4.6	104.0	94.2	+10.4
Diaveridine	88.4	97.5	-9.3	97.9	101.7	-3.7
Difloxacin	87.3	96.7	-9.6	100.2	91.0	+10.1
Enrofloxacin	85.2	89.5	-4.8	104.2	95.9	+8.6
Erythromycin A	91.4	89.5	+2.1	167.9	96.7	+73.7
Flumequine	94.2	94.5	-0.3	107.1	95.9	+11.7
Leucomycin A5	101.6	106.4	-4.5	97.6	97.6	-0.0
Marbofloxacin	89.1	90.1	-1.1	102.7	97.3	+5.5
Methylprednisolone	94.9	97.5	-2.7	95.5	96.3	-0.9
Miloxacin	90.4	95.6	-5.4	123.6	99.5	+24.2
Nalidixic acid	94.0	98.6	-4.6	104.4	101.4	+3.0
Neospiramycin I	95.4	104.0	-8.3	92.7	103.3	-10.3
Norfloxacin	77.8	87.3	-10.9	105.1	105.8	-0.7
Ofloxacin	84.7	94.4	-10.3	98.8	96.7	+2.1
Orbifloxacin	90.7	95.8	-5.3	103.1	98.7	+4.5
Ormetoprim	89.1	94.8	-6.0	100.7	100.2	+0.4
Oxolinic acid	86.3	97.0	-11.0	121.3	92.8	+30.6
Piromidic acid	94.3	96.5	-2.3	92.2	101.1	-8.9
Prednisolone	83.5	94.4	-11.6	83.8	97.2	-13.8
Pyrimethamine	86.6	92.0	-5.9	95.9	98.5	-2.6
Sarafloxacin	88.4	92.1	-4.1	101.6	92.6	+9.7
Spiramycin I	97.5	99.6	-2.1	109.6	105.5	+3.9
Sulfabenzamide	89.7	94.3	-4.9	101.7	106.9	-4.9
Sulfabromomethazine	88.3	93.3	-5.4	98.8	99.5	-0.7
Sulfachloropyridazine	87.4	93.9	-6.9	96.0	100.3	-4.3
Sulfadiazine	89.1	93.0	-4.2	94.6	101.5	-6.8
Sulfadimethoxine	92.2	98.3	-6.1	101.4	102.4	-0.9
Sulfadimidine	90.0	91.9	-2.1	98.2	104.4	-5.9
Sulfadoxine	93.5	96.5	-3.2	97.2	101.2	-4.0
Sulfaethoxypyridazine	93.2	94.5	-1.3	100.5	105.2	-4.5
Sulfaguanidine	68.2	83.6	-18.5	85.9	118.7	-27.6
Sulfamerazine	90.6	96.5	-6.1	96.6	96.0	+0.7
Sulfamethoxazole	91.2	99.3	-8.2	99.9	102.1	-2.1
Sulfamethoxypyridazine	83.4	99.4	-16.1	93.9	98.7	-4.8
Sulfamonomethoxine	90.1	98.9	-8.9	97.9	99.1	-1.2
Sulfanilamide	68.1	107.3	-36.6	66.4	96.0	-30.8
Sulfapyridine	90.9	96.1	-5.5	95.3	99.0	-3.7
Sulfaquinolaxaline	91.3	93.5	-2.4	97.7	98.7	-1.0
Sulfathiazole	88.8	92.8	-4.4	99.4	102.7	-3.3
Sulfatroxazole	91.2	97.4	-6.4	96.0	98.8	-2.8
Sulfisomdine	90.3	97.9	-7.8	97.9	102.8	-4.8
Sulfisoxazole	90.5	96.7	-6.4	101.2	103.1	-1.9
Sulfisozole	87.5	92.2	-5.1	91.4	95.5	-4.3
Sulfacetamide	96.1	96.7	-0.6	77.1	98.9	-22.1
Tiamulin	94.1	96.6	-2.6	97.5	97.3	+0.2
Tilmicosin	88.2	91.0	-3.0	103.9	100.6	+3.3
Trimethoprim	91.8	96.9	-5.2	97.8	97.4	+0.4
Tylosin	89.3	96.0	-7.0	103.0	104.5	-1.4
α -Trenbolone	85.4	93.1	-8.2	94.4	99.2	-4.8
β -Trenbolone	86.3	93.2	-7.4	102.4	100.3	+2.1
Sulfanitran	83.4	93.8	-11.0	108.0	117.6	-8.2
Zeranol	73.6	87.0	-15.5	95.3	97.1	-1.9

表6 負荷時に加える水の量の検討結果（牛筋肉，％）．網掛け部分は目標値（回収率：70～120%，マトリックス効果：-20～+20％）から外れたものを示す（ $n=1$ ）．SSTD: 溶媒標準溶液，MSTD: マトリックス標準溶液，ME: マトリックス効果．水0.2 mLの結果は表1のC18-50+C18-50を引用

	水0.2 mL			水0.4 mL		
	recovery (vs. SSTD)	recovery (vs. MSTD)	ME	recovery (vs. SSTD)	recovery (vs. MSTD)	ME
Ciprofloxacin	86.3	87.9	-1.8	95.0	89.7	+6.0
Clostebol	90.1	96.4	-6.5	91.2	86.7	+5.2
Danofloxacin	85.7	89.8	-4.6	94.7	80.6	+17.5
Diaveridine	88.4	97.5	-9.3	95.0	93.6	+1.5
Difloxacin	87.3	96.7	-9.6	103.3	95.6	+8.0
Enrofloxacin	85.2	89.5	-4.8	95.2	89.7	+6.1
Erythromycin A	91.4	89.5	+2.1	154.4	78.5	+96.9
Flumequine	94.2	94.5	-0.3	108.3	97.2	+11.5
Leucomycin A5	101.6	106.4	-4.5	84.3	97.9	-13.9
Marbofloxacin	89.1	90.1	-1.1	103.4	90.0	+14.8
Methylprednisolone	94.9	97.5	-2.7	93.0	91.3	+1.9
Miloxacin	90.4	95.6	-5.4	111.0	93.6	+18.6
Nalidixic acid	94.0	98.6	-4.6	101.6	96.0	+5.8
Neospiramycin I	95.4	104.0	-8.3	85.2	97.4	-12.5
Norfloxacin	77.8	87.3	-10.9	93.3	85.3	+9.4
Ofloxacin	84.7	94.4	-10.3	96.7	89.8	+7.8
Orbifloxacin	90.7	95.8	-5.3	98.5	89.0	+10.8
Ormetoprim	89.1	94.8	-6.0	91.0	98.7	-7.8
Oxolinic acid	86.3	97.0	-11.0	119.7	93.9	+27.5
Piromidic acid	94.3	96.5	-2.3	89.6	95.9	-6.6
Prednisolone	83.5	94.4	-11.6	86.8	96.3	-9.8
Pyrimethamine	86.6	92.0	-5.9	88.9	89.3	-0.5
Sarafloxacin	88.4	92.1	-4.1	100.5	93.4	+7.6
Spiramycin I	97.5	99.6	-2.1	81.7	93.6	-12.7
Sulfabenzamide	89.7	94.3	-4.9	93.9	92.4	+1.6
Sulfabromomethazine	88.3	93.3	-5.4	98.8	93.8	+5.3
Sulfachloropyridazine	87.4	93.9	-6.9	93.1	89.5	+4.0
Sulfadiazine	89.1	93.0	-4.2	96.6	94.3	+2.5
Sulfadimethoxine	92.2	98.3	-6.1	98.6	95.9	+2.8
Sulfadimidine	90.0	91.9	-2.1	100.8	94.7	+6.4
Sulfadoxine	93.5	96.5	-3.2	98.2	95.5	+2.8
Sulfaethoxypyridazine	93.2	94.5	-1.3	97.7	91.7	+6.6
Sulfaguanidine	68.2	83.6	-18.5	71.8	96.4	-25.5
Sulfamerazine	90.6	96.5	-6.1	100.1	97.4	+2.7
Sulfamethoxazole	91.2	99.3	-8.2	99.3	93.9	+5.8
Sulfamethoxypyridazine	83.4	99.4	-16.1	91.6	95.5	-4.1
Sulfamonomethoxine	90.1	98.9	-8.9	96.6	90.4	+6.8
Sulfanilamide	68.1	107.3	-36.6	72.0	103.7	-30.6
Sulfapyridine	90.9	96.1	-5.5	102.0	94.7	+7.7
Sulfaquinoxaline	91.3	93.5	-2.4	96.2	94.9	+1.4
Sulfathiazole	88.8	92.8	-4.4	90.1	89.6	+0.6
Sulfatroxazole	91.2	97.4	-6.4	97.2	95.6	+1.7
Sulfisomdine	90.3	97.9	-7.8	95.8	93.8	+2.1
Sulfisoxazole	90.5	96.7	-6.4	102.3	93.4	+9.5
Sulfisozole	87.5	92.2	-5.1	96.4	96.1	+0.3
Sulfacetamide	96.1	96.7	-0.6	85.3	101.4	-15.9
Tiamulin	94.1	96.6	-2.6	96.5	95.3	+1.3
Tilmicosin	88.2	91.0	-3.0	89.0	81.1	+9.8
Trimethoprim	91.8	96.9	-5.2	98.2	93.2	+5.4
Tylosin	89.3	96.0	-7.0	90.5	89.1	+1.6
α -Trenbolone	85.4	93.1	-8.2	92.4	90.3	+2.3
β -Trenbolone	86.3	93.2	-7.4	98.9	95.1	+3.9
Sulfanitran	83.4	93.8	-11.0	86.5	88.0	-1.7
Zeranol	73.6	87.0	-15.5	81.9	81.4	+0.5

表 7 妥当性評価結果 (%). 網掛け部分は目標値 (真度 : 70~120%, 併行精度 : 25%未満, 室内精度 : 30%未満, マトリックス効果 : -20~+20%) から外れたものを示す. ME: マトリックス効果

	牛筋肉				牛肝臓				牛脂肪				牛乳			
	真度	併行精度	室内精度	ME	真度	併行精度	室内精度	ME	真度	併行精度	室内精度	ME	真度	併行精度	室内精度	ME
Ciprofloxacin	88.1	7.0	7.6	15.9	80.7	4.5	6.3	-15.8	74.5	7.6	10.0	5.4	105.6	3.8	4.3	16.2
Clostebol	89.8	3.7	4.0	0.3	60.5	2.2	11.9	-7.0	83.8	3.2	6.2	1.6	89.2	2.5	2.7	3.3
Danofloxacin	136.4	3.1	5.5	32.3	146.8	5.6	15.6	13.4	120.6	5.5	5.5	13.6	148.3	7.4	7.8	26.8
Diaveridine	82.1	2.8	3.1	3.8	79.8	2.0	2.0	-8.9	85.5	2.7	4.7	1.7	89.7	2.6	2.8	1.7
Difloxacin	105.6	6.3	8.0	0.8	104.8	3.7	5.6	-8.6	101.0	3.7	7.8	1.7	107.4	4.3	4.4	9.2
Enrofloxacin	106.6	3.6	4.8	7.9	110.9	2.2	6.1	-2.8	104.0	5.5	6.6	0.3	109.7	3.2	3.2	8.2
Erythromycin A	92.1	6.7	18.5	12.3	63.4	4.6	51.9	-6.7	71.8	5.1	24.7	-7.4	64.6	31.1	32.9	4.9
Flumequine	101.8	3.9	8.0	5.8	103.5	3.1	10.2	-8.4	97.4	4.9	10.4	-3.7	105.0	6.1	6.4	3.4
Leucomycin A5	62.5	2.9	8.3	-1.1	14.5	4.6	41.3	-10.1	76.1	2.8	15.1	0.3	79.9	4.8	5.1	2.9
Marbofloxacin	123.2	3.9	5.1	17.8	112.7	4.2	5.7	6.4	110.6	2.8	6.8	10.0	141.8	4.9	5.1	25.6
Methylprednisolone	91.0	6.5	6.5	6.8	80.6	4.7	4.7	-2.5	89.2	4.1	7.3	-4.9	90.8	3.8	3.8	-6.6
Miloxacin	101.6	3.7	11.0	1.0	94.8	3.3	16.1	-10.0	97.5	3.9	9.6	-9.8	109.8	8.8	9.3	3.8
Nalidixic acid	104.0	2.7	9.8	4.5	105.2	2.2	8.2	-7.3	95.3	4.5	9.9	-3.5	106.7	6.9	7.3	2.3
Neospiramycin I	63.3	1.3	7.9	9.2	6.9	8.4	103.8	3.1	60.5	5.1	11.2	7.0	105.8	9.8	10.4	-2.9
Norfloxacin	86.3	4.0	5.6	16.7	78.8	2.9	7.6	-13.6	79.4	5.2	12.8	5.8	103.8	4.7	4.8	5.1
Ofloxacin	113.6	3.8	3.8	15.6	114.8	1.1	1.9	-3.0	110.6	4.1	7.3	7.9	123.5	3.9	4.1	5.0
Orbifloxacin	99.7	3.9	4.9	4.9	95.4	4.5	4.5	-11.5	96.8	3.2	7.0	-2.2	101.7	3.2	3.3	-1.9
Ormetoprim	86.0	3.6	3.7	1.3	79.9	3.0	3.0	-5.9	85.3	3.0	5.1	-1.7	87.2	3.1	3.2	-3.2
Oxolinic acid	98.5	2.7	12.9	0.5	100.8	2.3	11.5	-12.8	97.2	5.4	12.5	-5.8	108.9	9.9	10.4	4.4
Piromidic acid	104.4	5.3	8.0	5.5	106.4	3.0	7.2	-9.3	97.0	4.9	9.7	-1.5	106.4	6.4	6.8	2.1
Prednisolone	90.2	3.4	3.4	5.0	79.3	5.5	5.5	-11.6	88.4	2.3	8.0	1.6	90.0	5.4	5.7	6.3
Pyrimethamine	80.7	2.0	3.7	1.1	75.7	4.1	5.1	-11.7	84.3	2.8	5.8	4.3	87.3	1.9	1.9	-0.3
Sarafloxacin	98.2	5.9	11.5	12.8	88.7	5.8	8.8	-2.6	83.1	3.5	7.1	-0.7	104.4	5.1	5.2	2.3
Spiramycin I	63.6	5.9	7.1	5.9	9.7	5.9	60.4	-6.1	60.3	3.8	11.7	5.4	92.3	3.8	4.0	2.9
Sulfabenzamide	88.6	3.1	4.6	3.1	87.8	3.1	5.5	-6.7	89.2	4.0	7.2	0.8	90.5	2.3	2.5	1.4
Sulfabromomethazine	88.7	2.0	3.6	-1.5	102.5	2.5	13.7	3.9	87.6	3.5	6.1	1.4	89.0	2.9	2.9	-6.1
Sulfachloropyridazine	89.8	5.2	5.2	5.5	88.8	3.1	3.9	-9.9	88.6	3.8	6.3	1.8	87.6	3.2	3.2	2.3
Sulfadiazine	89.9	3.5	4.8	4.0	91.5	3.5	3.5	-6.7	91.3	3.7	7.5	1.2	97.6	1.8	1.8	13.2
Sulfadimethoxine	89.9	3.3	5.1	0.4	89.4	4.2	4.2	-7.3	90.2	4.1	8.3	-0.7	88.4	2.4	2.5	2.6
Sulfadimidine	88.0	2.7	5.9	0.2	92.9	2.8	5.5	-8.2	90.4	0.5	7.0	7.0	90.1	5.1	5.1	5.1
Sulfadoxine	90.0	2.5	4.0	0.5	90.0	2.3	3.2	-7.3	90.1	2.6	7.3	-2.0	88.3	3.2	3.4	0.9
Sulfathoxypyridazine	90.8	2.6	5.1	6.5	89.1	2.6	3.5	-7.1	89.9	2.8	6.2	3.0	86.6	3.1	3.2	-2.9
Sulfaguanidine	88.6	10.1	12.8	10.3	106.6	8.3	16.7	29.3	90.6	8.4	8.4	0.2	87.7	9.2	9.7	-16.3
Sulfamerazine	91.5	4.5	5.2	2.5	88.3	1.8	3.7	-5.7	91.1	3.3	6.1	5.6	89.1	2.6	2.6	-3.1
Sulfamethoxazole	90.3	4.5	6.9	4.0	87.3	2.7	4.2	-8.5	90.7	4.0	6.5	-1.1	88.0	3.7	3.8	-5.8
Sulfamethoxypyridazine	74.0	2.3	10.7	-9.4	91.2	3.2	3.2	-10.3	91.1	2.6	6.6	2.1	88.7	4.3	4.5	3.3
Sulfamonomethoxine	90.2	2.3	5.4	1.3	89.4	3.7	4.7	-10.3	89.7	3.0	5.9	-2.0	89.4	3.8	3.9	4.8
Sulfapyridine	89.8	2.7	4.4	2.2	91.1	3.4	3.4	-7.9	88.7	5.3	7.6	-0.4	104.4	5.9	6.2	4.8
Sulfaquinolaxaline	88.2	2.9	4.8	1.0	10.3	5.8	42.6	-6.6	88.3	4.4	7.7	-1.1	85.3	3.7	3.8	-0.2
Sulfathiazole	88.2	2.6	4.1	2.5	91.7	3.6	4.3	-3.8	89.6	4.2	6.2	-1.2	90.5	3.5	3.7	0.7
Sulfatroxazole	90.4	2.8	4.7	0.3	90.0	2.9	4.7	-8.6	90.6	2.5	7.0	-0.4	88.1	2.6	3.0	5.1
Sulfisomdine	89.7	2.4	4.0	0.2	94.4	3.0	3.0	-7.1	90.5	2.3	6.4	1.5	93.5	3.2	3.2	5.3
Sulfisoxazole	88.2	2.7	5.1	-1.0	84.3	2.6	4.9	-10.9	89.9	4.1	7.6	-3.5	88.2	2.6	2.7	0.5
Sulfisozole	89.8	5.1	5.6	-4.7	85.5	3.7	4.9	-11.9	90.9	2.6	4.1	7.5	89.0	4.5	4.6	-5.8
Sulfacetamide	88.6	4.8	6.6	-0.8	77.6	1.8	4.6	-10.0	89.4	4.2	7.9	-1.1	91.2	3.5	3.6	5.9
Tiamulin	89.1	3.4	3.8	1.3	82.2	2.0	5.9	-8.6	86.7	2.7	6.1	0.8	88.0	1.4	1.4	-1.1
Tilmicosin	124.1	6.2	14.9	32.8	129.7	3.2	24.2	-4.4	89.5	2.8	9.3	10.5	128.6	22.5	23.8	-4.5
Trimethoprim	85.5	3.7	4.0	4.3	85.2	3.8	4.3	0.6	87.2	1.3	6.2	0.1	97.6	5.5	5.7	0.8
Tylosin	56.3	3.5	8.9	-1.2	13.0	7.0	61.7	29.7	65.7	2.3	16.2	-0.2	80.3	8.4	8.8	3.4
α -Trenbolone	85.8	5.7	5.7	-0.1	84.0	8.1	10.0	-15.1	85.0	4.1	6.8	5.0	88.0	2.4	2.4	-0.4
β -Trenbolone	84.3	3.6	3.9	-6.0	70.5	4.9	14.4	-22.2	84.1	2.8	5.9	-1.7	88.5	3.5	3.6	0.9
Sulfanitran	89.0	13.3	17.2	13.5	79.7	10.0	18.8	4.9	88.0	10.3	25.1	17.6	85.3	14.6	15.4	13.5

食品衛生基準科学研究費補助金(食品安全科学研究事業)
「食品中残留農薬等の試験法開発における課題の解決に向けた研究」
分担研究報告書（令和 6 年度）
研究代表者 田口貴章（国立医薬品食品衛生研究所）

課題 3 前処理と分析装置のオンライン化を目指した半自動分析法の確立

研究分担者 穂山 浩（星薬科大学薬学部）

研究要旨 ほうれんそうを対象として、LC-MS/MS を用いたネオニコチノイド系農薬 17 成分を一斉分析する方法を開発し、実試料への適用を試みた。アセタミプリド、イミダクロプリド、チアメトキサム、チアメトキサム代謝物(クロチアニジン)、ジノテフラン、チアクロプリド、チアクロプリド代謝物(チアクロプリドアミド)、ニテンピラム、ニテンピラム代謝物(CPMA、CPMF)、フロニカミド、フロニカミド代謝物(TFNG、TFNA)、フィプロニル、エチプロール、フルピラジフロンの 17 成分を測定物質とした。凍結粉碎したほうれんそう 10 g に対し、QuEChERS 抽出法と固相抽出法(SPE)を組み合わせた方法で抽出・精製を行った。固相カートリッジ Smart-SPE PBX および PSA を連結して使用し、夾雑成分を除去して得られた溶出液を LC-MS/MS で測定した。添加回収試験は試料中の各農薬が MRL または一律基準値(0.01 ppm)になるよう添加した。各成分の MRM は検討した移動相条件で最適化を行った。ほうれんそう中の夾雑成分を効率よく除去すべく、PBX と PSA を組み合わせた SPE による精製方法を確立した。妥当性評価試験を実験者 2 人、1 日 2 併行、3 日間で実施した。基準値が設定されている農薬については、いずれも良好な選択性と直線性が得られ、真度、併行精度、室内再現精度ともに概ね目標値に収まる良好な結果が得られた。本法を市販ほうれんそう 9 試料に適用し分析を行ったところ、イミダクロプリド、ジノテフラン、フロニカミドとその代謝物 2 成分、スルホキサフロル、フィプロニル、クロチアニジン、フルピラジフロンの農薬成分が各基準値内の濃度で検出された。本法は、ほうれんそう中のネオニコチノイド系農薬の分析法として適用可能であると示唆された。

協力研究者 伊藤里恵、岩崎雄介、勝本叶香、原野幹久、野村昂聖、藤田優麻（星薬科大学薬学部）、佐々野僚一（星薬科大学薬学部、アイスティサイエンス社）

A. 研究目的

我が国からの食品輸出促進のための食品の衛生管理手法の国際調和及びその推進のため、高毒性農薬及びネオニコチノイド農薬等を対象として、抽出は QuEChERS 法等の国際的に汎用されている方法と同じ溶媒を用い、その後の精製操作を変更すると共に精製操作から LC-MS/MS 分析ま

でをオンライン化し半自動化を検討することで、迅速、簡便で、高感度かつ高精度な残留農薬等検査法の確立を目指す。ネオニコチノイド系農薬 (Fig. 1) は、ニコチンに類似した構造を持つ殺虫剤であり、国内外で広く使用されている。農薬・作物ごとに MRL (残留基準値) が設定され、MRL を超えた作物の販売や流通は禁止されている。近年日本で輸出入された農作物において MRL を上回るネオニコチノイド系農薬が検出された違反事例が報告されており、食品の安全確保に向けた簡便かつ迅速な分析法の開発が必要となっている。

公定法の分析は煩雑で前処理に時間を要することや、使用する溶媒量が多いこと等への懸念があり、これらを改善した迅速で簡便な一斉分析法が必要とされている。ほうれんそう中の複数のネオニコチノイド系農薬を同時分析した例は存在するが、日本の MRL を反映した例はないため、本研究では日本におけるほうれんそうの MRL に沿った分析法の開発を行った。

測定対象物質は、代表的なネオニコチノイド系農薬であるアセタミプリド、イミダクロプリド、ジノテフラン、チアメトキサム、チアメトキサム代謝物（クロチアニジン）、チアクロプリド、チアクロプリド代謝物（チアクロプリド-アミド）、ニテンピラム、ニテンピラム代謝物（CPMA (Z)-2-[[[(6-Chloropyridin-3-yl)methyl](ethyl)amino]-2-(methyylimino)acetic acid]、CPMF ((E)-N-[(6-Chloropyridin-3-yl)methyl]-N-ethyl-N'-methylformimidamide)) の 10 成分に加え、ネオニコチノイド系農薬に類似した骨格構造を持ち、同様に殺虫剤として作用するピリジンカルボキシアミド系のフロニカミド、フロニカミド代謝物（TFNG ([4-(Trifluoromethyl)nicotinoyl]glycine)、TFNA (4-(Trifluoromethyl)nicotinic acid))、スルホキシミン系のスルホキサフロール、ブテノライド系のフルピラジフロンの 7 成分を測定対象物質とした (Fig. 1)。ニテンピラムは植物中で代謝されて CPMA となり、さらに代謝されて CPMF となる。これらの代謝物は不安定な化合物であることから、ニテンピラムの個別分析法の公定法では CPMA をアセトン条件下で 90 分間、50°C で加熱して CPMF にし、CPMF はトリエチルアミン中で 30 分間、50°C で加熱して CPF (N-[(6-Chloropyridin-3-yl)methyl]-N-ethylformamide) にする。最終的に生成した CPF をニテンピラムに換算し、ニテンピラムとの合算値で濃度を算出する (Fig. 2)。

本年度は、ほうれんそうから残留農薬分析の前処理に一般的に用いられる方法である QuEChERS 法の抽出法と固相抽出法を組み合

わせた方法を用いて抽出・精製を検討した。そして LC-MS/MS を使用し、ネオニコチノイド系農薬とそれらの代謝物 17 成分を一斉分析する方法の開発を試みた。

B. 研究方法

1. 使用試薬

アセタミプリド (98.0%)、イミダクロプリド (98.0%)、ジノテフラン (99.0%)、チアメトキサム (99.0%)、クロチアニジン (99.0%)、チアクロプリド (97.0%)、チアクロプリド-アミド (98.0%)、フロニカミド (98.0%)、TFNG (98.0%)、TFNA (98.0%)、ニテンピラム (99.0%)、CPMA (95.0%)、CPMF (90.0%)、スルホキサフロール (異性体混合品, 98.0%)、エチプロール (98%)、フィプロニル (98.0%)、フルピラジフロンの (≤100%)、アセトニトリル (LC-MS 用)、メタノール (HPLC 用)、ぎ酸 (98.0%)、酢酸アンモニウム (97.0%)、硫酸マグネシウム (無水, 99.0%)、塩化ナトリウム (99.5%)、くえん酸水素二ナトリウム 1.5 水和物 (97.0~103.0%)、くえん酸三ナトリウム二水和物 (99.0%)

2. 使用器具

1.5 mL チューブ (イナ・オブティカ社製)、50 mL チューブ (VIORAMO 社製)、50 mL チューブ用遠心分離機 (KUBOTA 社製 Model 2410)、固相カートリッジ C18、PSA、PBX (アイスティサイエンス社製 Smart-SPE)

3. 試薬の調製

一律基準である 0.01 mg/kg 相当の添加回収試験用として、各試薬 10 mg をアセトニトリル水溶液 (アセトニトリルと水を体積比 2:1 で調製) に溶解し、1000 mg/kg となるように標準溶液を調製した。調製したこれらの溶液を各 10 µL ずつ分注し、アセトニトリル水溶液で全量 10 mL として、各成分が 1 mg/kg となる混合標準溶液を調製した。

また、MRL 濃度相当添加での添加回収試験用と

して、各試薬 2 mg をアセトニトリルに溶解し、それぞれ 1000 mg/kg となるように調製した。

移動相添加用の酢酸アンモニウムは 1.927 g を水に溶解して 50 mL に定容し、0.5 M に調製した。試料の前処理のための塩は、塩化ナトリウム、くえん酸三ナトリウム二水和物、くえん酸水素二ナトリウム 1.5 水和物の 3 種類の試薬を重量比 2:2:1 の割合で量りとり乳鉢を用いて均一にし、混合塩とした。

4. 測定措置と LC-MS/MS 条件

分析法の開発にあたり、高速液体クロマトグラフ-タンデム質量分析計 (LC-MS/MS) を使用した。高速液体クロマトグラフ部分は全て島津製作所社製で、ポンプは LC-30AD、オートサンプラーは SIL-30AC、カラムオーブンは CTO-20AC を使用し、タンデム質量分析計部は島津製作所社製の LCMS-8060 を使用した。ネブライザーガス流量は 3 L/min、ドライイングガス流量は 10 L/min、ヒーティングガス流量は 10 L/min、インターフェイス温度は 400°C、脱溶媒温度は 150°C、ヒートブロック温度は 350°C で設定した。分析用のカラムは InertSustain ODS-3 (150 mm × 2.1 mm, 3 μm, GL Sciences 製) を使用した。測定はカラムの平衡化と洗浄時間を含め 30 分で行った。オートサンプラーの温度は 4°C、カラムオーブンの温度は 40°C、注入量は 4 μL で設定した。注入する試料と移動相の初期濃度の溶媒組成比の違いを緩和すべく、オートサンプラーの共注入設定を用いて 4 μL の注入に伴い 40 μL の水を共注入した。移動相の流速は 0.2 mL/min で、B conc. 5% (0-1 min) -99% (13-20 min) -5% (20-30 min) のグラジエント溶出で測定した。MS/MS は ESI (エレクトロスプレーイオン化 (Electrospray ionization)) 法でイオン化し、フィプロニルはネガティブモード、その他の成分はポジティブモードを用いて MRM (多重反応モニタリング (Multiple reaction monitoring)) で測定した。

5. 抽出

ほうれんそうを液体窒素で凍結させ粉砕機を用いて粉砕し、10 g を 50 mL ポリプロピレンチューブに量りとった。アセトニトリル 10 mL を加え、手での振とうとタッチミキサーによる振とうを各 10 秒ずつ行った。

混合塩 2.5 g を加え、手での振とうとタッチミキサーによる振とうを各 10 秒ずつ行った。硫酸マグネシウム 4.0 g を加え、手での振とうとタッチミキサーによる振とうを各 10 秒ずつ行った。1930 × g で遠心分離を 5 分間行い、試料抽出液とした。

6. 精製

固相カートリッジは PBX-20 mg、PSA-30 mg、PBX-20 mg の順番で連結した。アセトン 2 mL を通液させたのち、アセトニトリル水溶液 2 mL を通液して固相カートリッジのコンディショニングを行った。一番下に連結した PBX-20 mg を外し、PBX-20 mg、PSA-30 mg で連結している固相に、抽出液の上相 500 μL を分取して負荷し、加圧によって溶出した。溶出液は試験管で受けた。

固相カートリッジにアセトニトリル水溶液 500 μL を通液し、加圧によって溶出した。試験管に超純水 500 μL を加えたのち、パスツールピペットで 3 回ピペッティングを行った。はじめに連結して使用しなかった PBX-20 mg に試験管内の溶液を全量負荷し、加圧によって溶出した。溶出液は上とは異なる試験管で受けた。元の試験管にアセトニトリル水溶液 500 μL を加えパスツールピペットで 3 回ピペッティングを行い、固相カートリッジに試験管内の溶液を全量負荷した。溶出液は 2 つ目の試験管で受け、全量 2 mL を測定用溶液とした。

7. 統計処理

Microsoft Office and Business 2016 の Excel を用いて 2 群間の比較は t 検定、3 群間以上の比較は tukey 検定によって統計処理を行った。また、同様のソフトを用いて妥当性評価試験時の回収率か

ら算出する併行精度および室内再現精度は一元配置分散分析により算出した。

C. 研究結果

1. MS/MS 条件の検討

アセトニトリル水溶液で 1000 mg/kg にした標準溶液を、17 成分それぞれアセトニトリル水溶液で 10 µg/kg に希釈し、MRM 条件の最適化を行った。各 10 µg/kg 標準溶液を FIA 法と ESI 法を用いて MS/MS に導入し、スキャンモードでプリカーサーイオンの探索を行った。ESI 法のポジティブモード、ネガティブモードそれぞれで測定を行い、得られたプリカーサーイオンからプロダクトイオンの探索を行った。得られたプリカーサーイオンとプロダクトイオンの組み合わせを用いて、Q1 での電圧、CE、Q2 での電圧の最適化を行った。得られた MRM 条件を用いて、混合標準溶液をアセトニトリル水溶液で希釈し 2.5 µg/kg に調製した。これを分離カラムで測定し、ピーク形状や感度の高さから定量イオンと定性イオンを確定した。

ピークが確認できなかったものや感度やピーク形状が不良であった成分については、プリカーサーイオンの変更やプロダクトイオンの探索、電圧の最適化を再度行った。Cl 原子や N 原子をもつ成分があることから、精密質量を参考にしてプリカーサーイオンを設定し、プロダクトイオンの探索と各電圧の最適化を行った。

以上の検討の結果、フィプロニルではネガティブモード、その他の成分ではポジティブモードで良好な感度が得られた。

2. 移動相の検討

本研究でも先行研究と同様に水系移動相にギ酸を添加することとしたが、先行研究と同様の濃度である 0.1%のギ酸を添加したところ、TFNG、TFNA のピーク形状が不良であった。そのため、ギ酸濃度を 0.01%、0.02%、0.1%で添加した場合、またギ酸を添加しない場合で検討を行った。

CPMF は 0.1%よりも 0.02%で良好なピーク形状が得られた。TFNG はギ酸を添加しない場合、0.01%、0.02%で添加した場合でそれぞれ複数のピークが見られ、ピーク形状も不良であった。TFNA は、ピーク強度が他のギ酸濃度の添加時に比べて低いものの、0.02%で添加した場合で最もテーリングやリーディング抑えられた。したがって、水系移動相は 0.02%ギ酸含有 0.5 mM 酢酸アンモニウム水溶液、有機系移動相は 0.5 mM 酢酸アンモニウム・メタノール溶液を最適条件とした。

最適化した移動相条件を用いて、各 2.5 µg/kg の混合標準溶液を測定した際の 17 成分のクロマトグラムを Fig. 3 に示す。

3. 絶対検量線による直線性の確認と定量限界の決定

最適化した LC 条件、MS 条件を用いて絶対検量線による直線性の確認を行った。17 成分の混合標準液を用いて、1.25、2.5、5.0、10、20 µg/kg の範囲で検量線を作成し、決定係数を算出した。その結果、全成分で $R^2 = 0.9996$ 以上の直線性を示したため、直線性は良好であると判断した。また、検量線の下限值である 1.25 µg/kg を本分析法の定量限界値とした。

4. 固相カートリッジによる精製の検討

LC-MS/MS で測定をするにあたり、ほうれんそう中に含まれる夾雑物がマトリックス効果を引き起こし、測定の妨げになるのではないかと考えた。そこで前処理の 1 段階目として QuEChERS 法を用いた目的成分の抽出と夾雑成分の除去を行った。

極性の高い夾雑成分とほうれんそう中の水分を下相（水相）に移行させ、目的成分と比較的極性の低い夾雑成分を上相（アセトニトリル相）に移行させることで抽出を行った。今回用いた方法は、アセトニトリルで目的成分の抽出を行ったのち、粉末の代わりに PSA や C₁₈が充填された固相

カートリッジを用いて精製を行う。精製方法の最適条件を検討するにあたり、カートリッジは PSA-30 mg、PSA-50 mg、PBX-20 mg、C18-30 mg を用いた。QuEChERS 法により得られた抽出液（アセトニトリル相）を、PBX と PSA を連結した固相に負荷し、夾雑成分の除去と目的成分の溶出を行ったのち、アセトニトリル水溶液を通液することで目的成分の溶出を行った。

固相カートリッジについての検討は、ほうれんそうでの添加回収試験を行い回収率によって評価した。

極性が比較的低い色素を主に PBX で除去する目的から、PBX は 2 個使用することとし、1 個目の PBX に連結させて使用する PSA について検討を行った。

まず、PSA-50 mg を用いて検討を行った。結果は 5 成分が目標値範囲外となった。この理由としては、希釈倍率が低いことによるマトリックス効果による影響と、陰イオン交換系である PSA にカルボキシ基を持つ TFNA、CPMA が相互作用し、固相に保持されたためであると考え、これらが保持されない固相を使用する必要があると判断した。

極性の低い色素の除去能を向上させるべく、PBX に連結させる固相カートリッジを PSA ではなく、無極性のシリカ系固相である C18 を用いる方法を試みた。この方法では TFNG、TFNA を回収することが出来なかった。この理由として、C18 の固相表面に存在する残留シラノール基とカルボキシ基が相互作用しているためであると考えた。

そのため、PBX-20 mg と C18-30 mg の連結固相に抽出液を負荷・溶出したのち、洗浄液であるアセトニトリル水溶液に 2%ギ酸を加えて固相への通液を行う方法を試みた。これにより TFNG、TFNA の回収率は改善したが、回収率が 120%以上となる成分が洗浄液に酸を加えなかった場合に比べて増加した。酸を加えると酸性の目的成分

が回収しやすくなる一方で、目的成分だけでなく夾雑成分も固相から溶出され、夾雑成分によるイオン化の増強が起こることが考えられた。したがって、今回の精製方法として、C18 固相カートリッジを用いることは適当でないと判断した。

再び PSA での検討を行い、PSA-30 mg を用いて回収率を算出した。15 成分が目標範囲内に収まり、概ね良好な結果が得られた。PSA の充填量を低下させたことで回収率が向上したことから、PSA を使用せず（PSA-なし）PBX のみで精製を行なう方法を試みた。

PSA を使用しない場合、14 成分の回収率が目標範囲内に収まった。PSA-30 mg を用いた場合と PSA-なしの場合とで、回収率に大きな違いは見られなかった。

そこで、ほうれんそうへ各農薬成分の MRL 濃度相当の添加を行い、PSA-50 mg、PSA-30 mg、PSA-なしの場合で比較を行った。個別の MRL が設定されている成分とされていない成分では希釈の倍率が異なるため、個別の MRL が設定されている成分のみを対象とした。PSA-50 mg を用いた場合は 10 成分のうち 7 成分、PSA-30 mg を用いた場合は 9 成分、PSA-なしの場合は 4 成分で回収率が目標範囲内となった。PSA-30 mg を用いた場合と PSA-なしの場合において、0.01 mg/kg では回収率に大きな違いは見られなかったが、MRL 相当濃度の添加を行った際には PSA-なしの場合で 120%を超過する成分が多かった（Table 1）。

また、PSA-なしの場合に比べ PSA を使用した場合の方が色素の除去能も高くなり、目的成分の回収と夾雑成分の除去を同時に行うことが可能となった。これらの結果から精製に使用する固相カートリッジは、PBX-20 mg と PSA-30 mg を連結したものと、単独の PBX-20 mg とした。

5. 抽出溶媒の検討

ほうれんそう中から目的の農薬成分を抽出する際に使用するアセトニトリルについて検討を

行った。先述の固相カートリッジの検討にて得た結果より、抽出の際にも酸を加えることでカルボキシ基を有する目的成分が分子型となり、それらが水相よりもアセトニトリル相に移行する割合が高くなることで最終的な回収率が高くなると予想した。ほうれんそう 10 g 中で 0.01 mg/kg となるように標準溶液を添加し、抽出溶媒のアセトニトリル 10 mL を加えたのち、ぎ酸原液 100 μ L 加えた。回収率は 10 成分で目標範囲内に収まったが、回収率が 120%以上となる成分が増加していた (Table 2)。固相カートリッジの検討と同様に、酸を加えるとカルボキシ基を有する目的成分が回収しやすくなる一方で、夾雑成分もほうれんそう中から抽出されてしまい、イオン化の増強に繋がるという弊害が起きることが分かった。

6. マトリックス効果の算出

添加回収試験で用いた有機栽培ほうれんそうを用いて ME (マトリックス効果 (Matrix effect)) の算出を行った。

添加回収試験において、ほうれんそうに 0.01 mg/kg 相当の添加を行った場合と個別の MRL 濃度相当の添加を行った場合とでは希釈倍率が異なるため、最終溶液に含まれるマトリックスの絶対量は異なる。その点を考慮し、抽出液への標準溶液の添加を行った。

0.01 mg/kg 相当の添加を想定した場合は、目標範囲内の回収率の成分が最も多く得られたのは PSA-なしの場合の 15 成分であり、回収率の結果と一致していなかった (Table 3)。

個別の MRL 濃度相当の添加を想定した場合には、固相カートリッジ PSA の種類ごとにマトリックス効果を算出したところ、目標範囲内の回収率の成分が最も多く得られたのは PSA-30 mg を用いた場合であり、全成分で目標範囲内に収まった (Table 4)。回収率も PSA-30 mg を用いた場合に良好であったため、使用する固相カートリッジは PSA-30 mg とした。

7. 妥当性評価試験

最適化した LC-MS/MS 条件、サンプルの前処理条件を用いて妥当性評価試験を行った。厚生労働省のガイドラインに基づき、選択性、回収率、精度、定量限界について確認を行った。測定対象物を含まないほうれんそうブランクを測定したところ、妨害するピークは検出されなかったため、選択性は十分であると判断した。各 17 成分の標準溶液、ほうれんそうブランク、ほうれんそう添加時のクロマトグラムを Fig. 4、Fig. 5 に示す。

ほうれんそうへ添加した標準溶液の濃度は、1. 個別の MRL が設定されている成分について、ほうれんそう中の添加濃度が MRL と同等の濃度になるように添加する方法、2. 個別の MRL が設定されていない成分について、ほうれんそう中の添加濃度が一律基準である 0.01 mg/kg になるように添加する方法の 2 パターンでの試験を行った。

最適化した LC 条件、MS 条件を用いて、目的対象物質を含まないほうれんそうブランクを測定したところ、妨害するピークは確認できず選択性は十分であった。

8. 妥当性の確認

得られたクロマトグラムから回収率を算出し、統計処理を一元配置分散分析で行い併行精度および室内再現精度を算出した。個別の MRL が設定されている農薬成分について、結果は、回収率はフルピラジフロンを除く 9 成分が目標値範囲内となり、併行精度、室内再現精度は全成分で目標値を満たしていた。

個別の MRL が設定されていない農薬成分について、結果は、回収率は 4 成分が目標値範囲内となり、併行精度は全成分、室内再現精度は CPMF を除く 6 成分が目標値を満たしていた。

以上のことから、MRL が設定されている成分、されていない成分それぞれにおいて概ねガイドラインの目標値範囲内に収まる良好な真度と精

度が得られ、本分析法の妥当性が確認された。

8. 実試料への適用

本分析法を市販ほうれんそう試料の分析に適用した。国産のほうれんそう試料 A（有機栽培表示）（国産 A）、試料 B（冷凍）（国産 B）、試料 C（国産 C）、中国産の表記があるほうれんそう（冷凍）（中国冷凍）を分析対象とした。いずれも基準値以下であった（Table 5）。親化合物だけでなく代謝物も検出されたことから、代謝物を網羅した分析が必須であることが考えられる。以上のことから、本分析法のほうれんそうへの適用性があると示唆された。

D. 考察

ほうれんそうは、残留農薬分析の前処理に一般的に用いられる方法である QuEChERS 抽出法と、固相抽出法を組み合わせた方法で抽出・精製を行った。LC-MS/MS 条件の検討に加え、ほうれんそうの前処理における固相カートリッジの検討を行った。その結果、ポリマー系固相である PBX（充填量 20 mg）と陰イオン交換系固相である PSA（充填量 30 mg）を連結したもの、さらに PBX（充填量 20 mg）を使用して段階的に精製を行なうことで夾雑成分を除去し、先行研究では測定対象としていなかったフロニカミドとその代謝物である TFNG、TFNA をガイドラインの目標値範囲内となる値で回収することが可能となった。最適化した条件で行った妥当性評価試験では、個別の MRL が設定されている農薬成分、されていない農薬成分ともに概ねガイドラインの目標値範囲内となり、本分析法の妥当性が示唆された。

本分析法を市販のほうれんそうに適用したところ、有機栽培表示の国産 A からはいずれの成分も検出されなかった。国産 B からはジノテフラン、TFNA、国産 C からはフロニカミド、TFNG、TFNA、中国産からはイミダクロプリド、スルホキサフロル、CPMF が検出された。いずれも MRL 以下であった。

本分析法はほうれんそう中のネオニコチノイド系農薬を簡便かつ迅速に一斉分析することが可能であり、市場に出回るほうれんそうの安全性を確保するための有用な方法となることが期待される。今後は、本法を応用して他の野菜やいちご等の果実への適用を目指し、市販の農作物に残留するネオニコチノイド系農薬の調査を行いたいと考えている。

E. 結論

ほうれんそうを対象として、LC-MS/MS を用いたネオニコチノイド系農薬 17 成分を一斉分析する方法を開発し、実試料への適用を試みた。基準値が設定されている農薬については、いずれも良好な選択性と直線性が得られ、真度、併行精度、室内再現精度ともに概ね目標値に収まる良好な結果が得られた。本法を市販ほうれんそう 9 試料に適用し分析を行ったところ、イミダクロプリド、ジノテフラン、フロニカミドとその代謝物 2 成分、スルホキサフロル、フィプロニル、クロチアニジン、フルピラジフロロン等の農薬成分が各基準値内の濃度で検出された。本法は、ほうれんそう中のネオニコチノイド系農薬の分析法として適用可能であると示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Sasano R, Sekizawa J, Saito I, Harano M, Katsunoto K, Ito R, Iwasaki Y, Taguchi T, Tsutsumi T, Akiyama H, Simultaneous Determination of Glyphosate, Glufosinate and their Metabolites in Soybeans using Solid-phase Analytical Derivatization and LC-MS/MS Determination, Food Chem X, 2024; 24, Article 101806

2. 学会発表

1. 佐々野僚一、穂山浩、関澤純平、原野幹久、勝本叶香、斎藤勲、田口貴章、堤智昭、伊藤

里恵、岩崎雄介、オンライン固相誘導体化-LC-MS/MS による大豆中のグリホサート、グルホシネートおよびそれら代謝物の分析法の開発 2024 年 5 月 24 日、日本食品化学学会第 30 回学術大会

2. 勝本叶香、佐々野僚一、島三記絵、原野幹久、野村昂聖、藤田優麻、岩崎雄介、伊藤里恵、田口貴章、堤智昭、穂山浩、LC-MS/MS を用いたほうれんそう中ネオニコチノイド系農薬とその代謝物の一斉分析法の開発、2024 年 11 月 7 日、第 120 回日本食品衛生学会学術講演会
3. 野村昂聖、勝本叶香、原野幹久、藤田優麻、佐々野僚一、岩崎雄介、伊藤里恵、田口貴章、堤智昭、穂山浩、LC-MS/MS を用いたトウモロコシ中グリホサートおよびグルホシネートとその代謝物の一斉分析法の開発、2025 年 3 月 27 日、日本薬学会第 145 年会
4. 藤田優麻、野村昂聖、勝本叶香、原野幹久、佐々野僚一、島三記絵、岩崎雄介、伊藤里恵、田口貴章、堤智昭、穂山浩、LC-MS/MS を用いたいちご中ネオニコチノイドとその代謝物の一斉分析法の開発、2025 年 3 月 27 日、日本薬学会第 145 年会

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Table 1

Analytes	Recovery (%)		
	PSA-50 mg	PSA-30 mg	PSA-なし
Acetamiprid	77	113	84
Imidacloprid	114	114	118
Dinotefuran	125	93	129
Thiamethoxam	124	115	125
Clothianidin	113	117	113
Flonicamid	129	99	126
TFNG	93	106	108
TFNA	109	96	126
Sulfoxaflor	107	94	123
Flupyradifurone	118	141	128

固相カートリッジごとの回収率（個別 MRL 濃度相当添加）

Table 2

Analytes	Mean (%)	RSD (%)
Acetamiprid	101	25
Imidacloprid	136	13
Dinotefuran	97	14
Thiamethoxam	131	17
Clothianidin	131	13
Flonicamid	130	15
TFNG	99	7
TFNA	80	13
Sulfoxaflor	100	23
Flupyradifurone	134	21
Thiacloprid	88	9
Thiacloprid-amide	112	14
Nitenpyram	92	3
CPMA	105	31
CPMF	156	19
Fipronil	101	2
Ethiprole	131	2

酸を添加した溶媒で抽出を行った回収率（各 0.01 mg/kg 相当添加）

Table 3

Analytes	ME (%)			
	PSA-50 mg	PSA-30 mg	PSA-なし	PSA-30 mg (ぎ酸)
Acetamiprid	85	86	89	88
Imidacloprid	120	140	110	140
Dinotefuran	72	86	77	146
Thiamethoxam	89	107	108	141
Clothianidin	119	121	99	132
Flonicamid	92	116	98	147
TFNG	69	107	105	115
TFNA	81	110	97	120
Sulfoxaflor	58	83	93	83
Flupyradifurone	89	122	96	126
Thiacloprid	76	92	95	94
Thiacloprid-amide	91	113	94	115
Nitenpyram	94	113	98	140
CPMA	90	123	106	154
CPMF	42	55	44	93
Ethiprole	89	99	87	134
Fipronil	119	93	85	110

固相カートリッジごとの ME% (各 0.01 mg/kg 相当添加)。一番右：ぎ酸を加えたアセトニトリルで抽出を行った。

Table 4

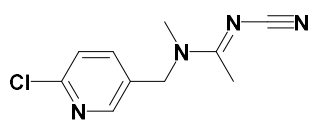
Analytes	ME (%)		
	PSA-50 mg	PSA-30 mg	PSA-なし
Acetamiprid	83	101	87
Imidacloprid	117	99	121
Dinotefuran	135	100	136
Thiamethoxam	126	104	125
Clothianidin	112	98	113
Flonicamid	141	108	133
TFNG	114	100	118
TFNA	130	98	135
Sulfoxaflor	116	99	143
Flupyradifurone	93	96	96

固相カートリッジごとの ME% (個別 MRL 濃度相当添加)

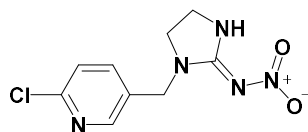
Table 5

Analytes	定量値 (mg/kg)			
	国産 A	国産 B	国産 C	中国冷凍
Acetamiprid	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Imidacloprid	N.D.	N.D.	N.D.	0.01
Dinotefuran	N.D.	0.03	N.D.	N.D.
Thiamethoxam	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Clothianidin	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Flonicamid	N.D.	N.D.	0.25	N.D.
TFNG	N.D.	N.D.	0.04	N.D.
TFNA	N.D.	0.03	0.08	N.D.
Sulfoxaflor	N.D.	N.D.	N.D.	0.01
Flupyradifurone	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Thiacloprid	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Thiacloprid-amide	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Nitenpyram	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
CPMA	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
CPMF	N.D.	N.D.	N.D.	0.01
Ethiprole	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Fipronil	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

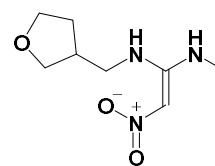
市販ほうれんそうの分析結果。N.D. (not determined) は定量限界値 (1.25 µg/kg) 以下を示す。



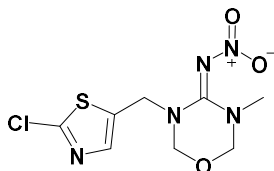
Acetamiprid



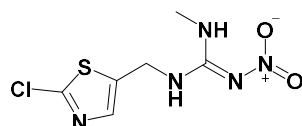
Imidacloprid



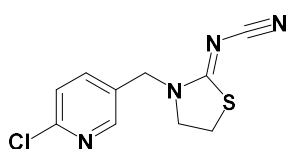
Dinotefuran



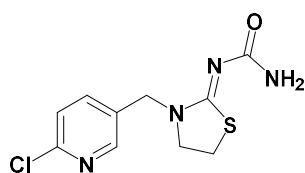
Thiamethoxam



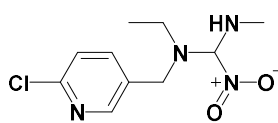
Clothianidin



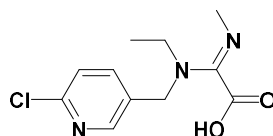
Thiachloprid



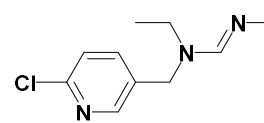
Thiachloprid-amide



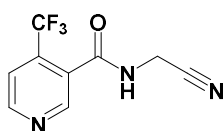
Nitenpyram



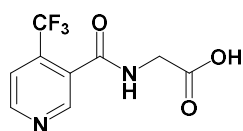
CPMA



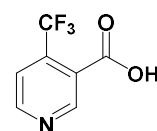
CPMF



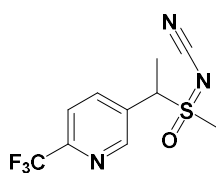
Flonicamid



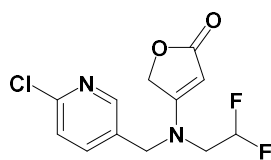
TFNG



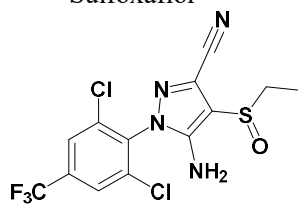
TFNA



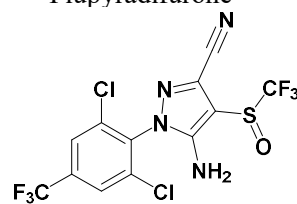
Sulfoxaflor



Flupyradifurone



Ethiprole



Fipronil

Fig. 1. 測定対象物質 17 成分の構造式

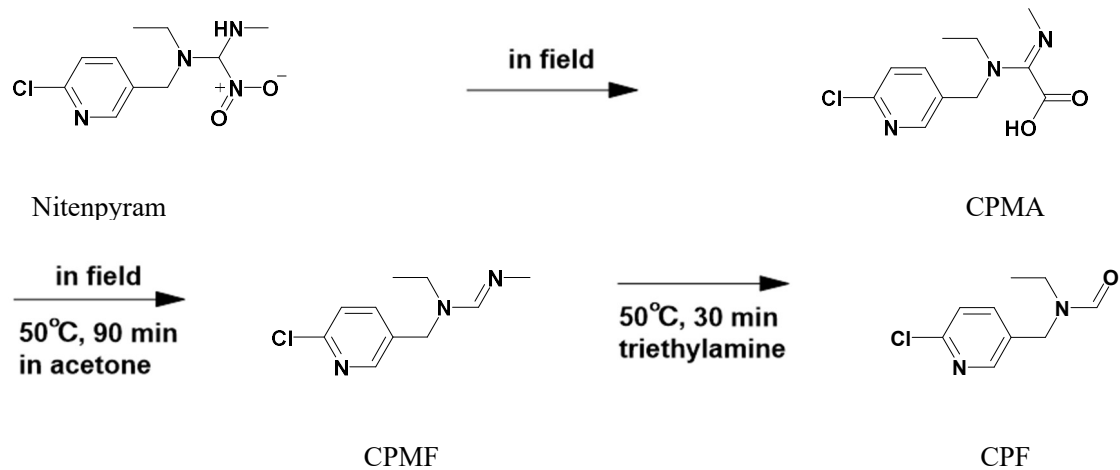


Fig. 2. ニテンピラムの変換

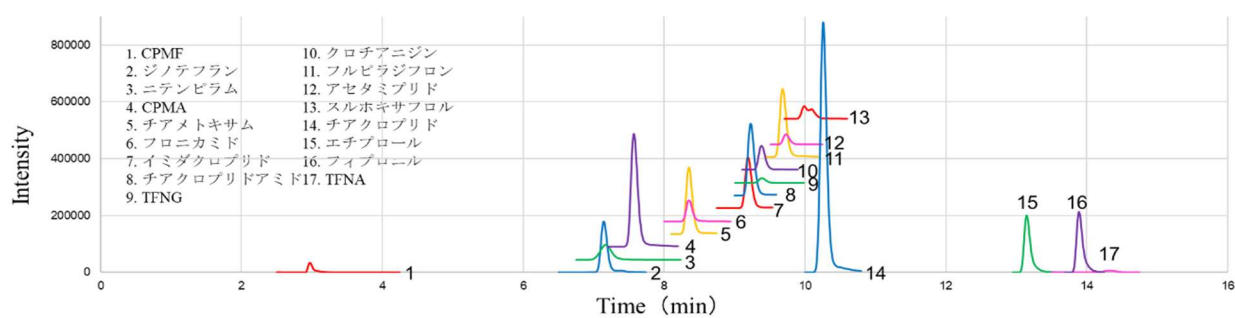
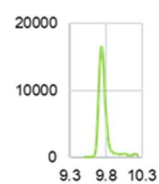
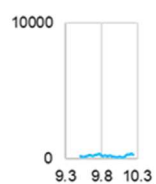
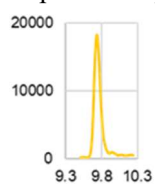
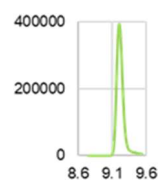
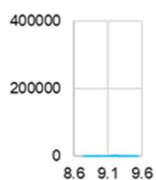
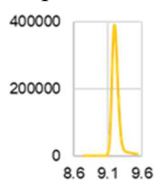


Fig. 3. 17 成分混合標準溶液のクロマトグラム（各 2.5 $\mu\text{g/kg}$ ）
化合物によってピークの色を変えている。

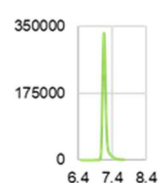
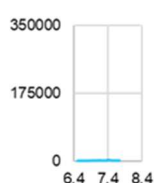
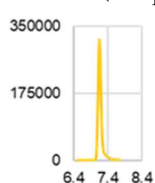
Acetamiprid (1.5 ppb)



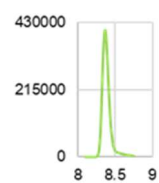
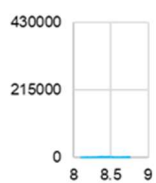
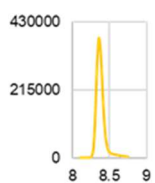
Imidacloprid (7.5 ppb)



Dinotefuran (7.5 ppb)



Thiamethoxam (5 ppb)



Clothianidin (20 ppb)

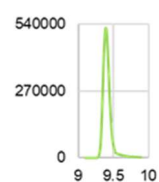
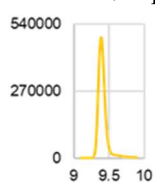
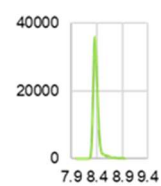
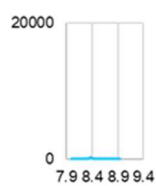
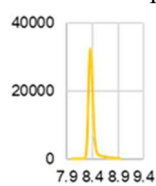
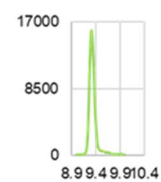
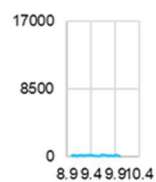
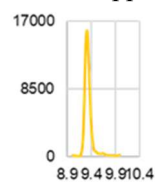


Fig. 4. 個別 MRL 濃度相当添加時のクロマトグラム。左（橙色）：個別 MRL の標準溶液（測定時、添加濃度から最終 2000 倍希釈）のクロマトグラム。中央（水色）：ほうれんそう blanks のクロマトグラム。右（緑色）：個別 MRL 濃度相当の添加を行ったほうれんそうのクロマトグラム。縦軸は強度、横軸は時間（分）を示す。

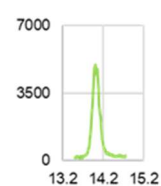
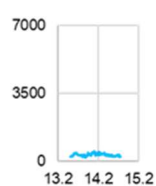
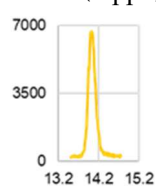
Flonicamid (1.5 ppb)



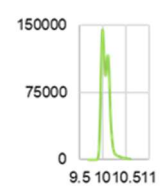
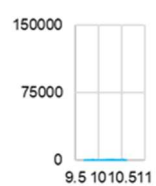
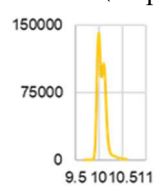
TFNG (4 ppb)



TFNA (4 ppb)



Sulfoxaflor (10 ppb)



Flupyredifurone (15 ppb)

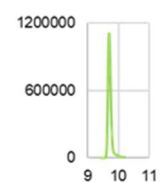
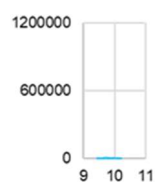
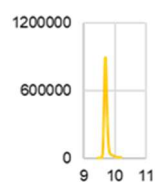


Fig. 4. (continued)

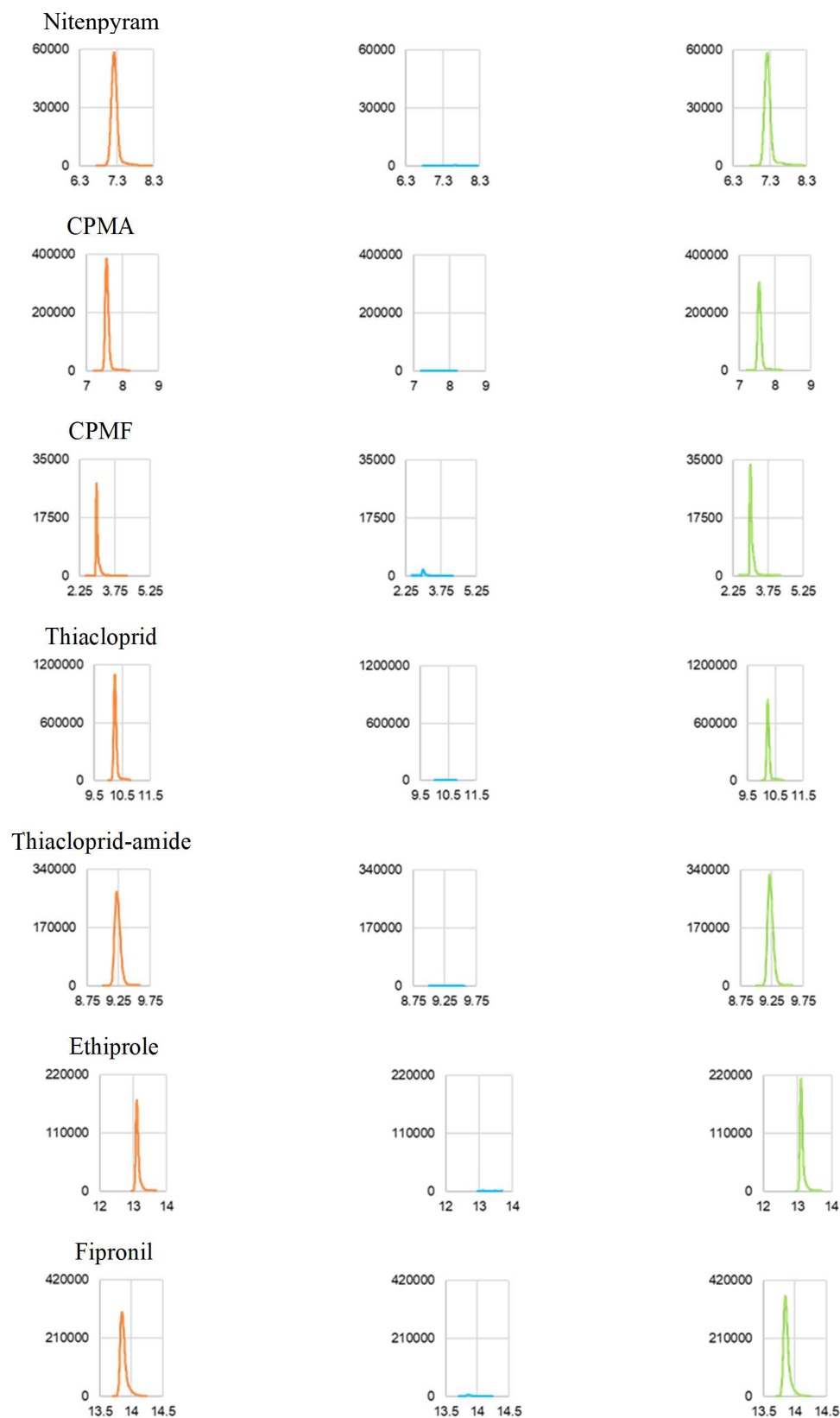


Fig. 5. 0.01 mg/kg 相当添加時のクロマトグラム。左（橙色）：各 0.01 mg/kg（測定時 2.5 μ g/kg）の標準溶液のクロマトグラム。中央（青色）：ほうれんそうブランクのクロマトグラム。右（緑色）：各 0.01 mg/kg 相当の添加を行ったほうれんそうのクロマトグラム。縦軸は強度、横軸は時間（分）を示す。

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Sasano, R., Sekizawa, J., Saito, I., Harano, M., Katsumoto, K., Ito, R., Iwasaki, Y., Taguchi, T., Tsutsumi, T., Akiyama, H.	Simultaneous Determination of Glyphosate, Glufosinate and their Metabolites in Soybeans using Solid- phase Analytical Derivatization and LC- MS/MS Determination	Food Chem. X	24	Article 101806	2024
田口貴章、堤智 昭	食品中に残留する農薬 等有害物質の規制と試 験法の現状と課題	Yakugaku Zasshi	145(2)	93-94	2025
田口貴章	残留農薬等試験法の概 要	Yakugaku Zasshi	145(2)	101-104	2025

消費者庁長官 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 本間 正充

次の職員の令和6年度食品衛生基準科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品衛生基準科学研究費補助金（食品安全科学研究事業）
2. 研究課題名 食品中残留農薬等の試験法開発における課題の解決に向けた研究
3. 研究者名 （所属部署・職名） 食品部・第一室長
- （氏名・フリガナ） 田口 貴章・タグチ タカアキ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入（※1）		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査（※2）
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針（※3）	☐	☒	☐		☐
	☐	☐	☐		☐
	☐	☐	☐		☐
その他、該当する倫理指針があれば記入すること（指針の名称：）	☐	☒	☐		☐

（※1）当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他（特記事項）

（※2）未審査に場合は、その理由を記載すること。
（※3）廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 消費者庁の行う食品安全分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 ☒ 無 ☐ （無の場合はその理由：）
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 ☒ 無 ☐ （無の場合は委託先機関：）
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 ☒ 無 ☐ （無の場合はその理由：）
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 ☐ 無 ☒ （有の場合はその内容：）

（留意事項） ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

消費者庁長官 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 本間 正充

次の職員の令和6年度食品衛生基準科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品衛生基準科学研究費補助金（食品安全科学研究事業）
2. 研究課題名 食品中残留農薬等の試験法開発における課題の解決に向けた研究
3. 研究者名 （所属部署・職名） 食品部・第三室長
- （氏名・フリガナ） 志田 静夏・シダ シズカ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入（※1）		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査（※2）
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針（※3）	☐	☒	☐		☐
	☐	☐	☐		☐
	☐	☐	☐		☐
その他、該当する倫理指針があれば記入すること（指針の名称：）	☐	☒	☐		☐

（※1）当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他（特記事項）

（※2）未審査に場合は、その理由を記載すること。
（※3）廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 消費者庁の行う食品安全分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 ☒ 無 ☐ （無の場合はその理由：）
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 ☒ 無 ☐ （無の場合は委託先機関：）
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 ☒ 無 ☐ （無の場合はその理由：）
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 ☐ 無 ☒ （有の場合はその内容：）

（留意事項） ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

消費者庁長官 殿

機関名 星薬科大学
所属研究機関長 職 名 学長
氏 名 牛島 俊和

次の職員の令和6年度食品衛生基準科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品衛生基準科学研究費補助金（食品安全科学研究事業）
2. 研究課題名 食品中残留農薬等の試験法開発における課題の解決に向けた研究（22KA1009）
3. 研究者名 （所属部署・職名） 薬学部薬品分析化学研究室・教授
（氏名・フリガナ） 穂山 浩 （アキヤマ ヒロシ）

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入（※1）		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査（※2）
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針（※3）	☐	☒	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐	☒	☐		☐
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	☐	☒	☐		☐
その他、該当する倫理指針があれば記入すること（指針の名称： ）	☐	☒	☐		☐

（※1）当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他（特記事項）

（※2）未審査に場合は、その理由を記載すること。
（※3）廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 ☒ 無 ☐ （無の場合はその理由： ）
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 ☒ 無 ☐ （無の場合は委託先機関： ）
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 ☒ 無 ☐ （無の場合はその理由： ）
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 ☐ 無 ☒ （有の場合はその内容： ）

（留意事項） ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。