

令和 4 ～ 5 年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
令和 6 年度 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 4 年度～ 6 年度 総合研究報告書

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. 総合研究報告

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

C. 結果と考察

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. (総合) 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） ----- 12

A. 研究目的

B. 研究方法

C. 研究結果及び考察

D. 結論

E. 参考文献

F. 研究発表

G. 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） ----- 106

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（穂山 浩） ----- 158

A. 研究目的

B. 研究方法

C. 研究結果

D. 考察

E. 結論

F. 健康危害情報

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

----- 187

令和 4-5 年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
令和 6 年度 食品衛生基準科学研究費補助金（食品安全科学研究事業）
総合研究報告書

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。「[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」では、農薬を散布して栽培した農産物（トマト、ホウレンソウ、ブロッコリー）を用いて試料の均質性が分析結果に与える影響を検討した。均質化の程度が不十分で粗大な固形物を多く含む粗粉碎試料と、固形物が微細になるまで十分に均質化した微粉碎試料を調製し、分析値を比較した結果、粗粉碎試料では分析値が相対的に低くなった。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。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。加えて、いずれの作物においても、均質化状態の評価方法として「目開き 1 mm の篩に負荷した際の通過率」を指標とする手法を提案し、「通過率 90%以上」を十分微細に均質化された試料の目安と位置付けた。

また、「[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」では、畜水産物を対象に凍結粉碎による試料調製法を確立した。うなぎ等の一部の水産物では、凍結粉碎法で試料調製を行っても、皮や骨の均質化が不十分となる課題も認められたが、多くの食品では常温磨砕法よりも試料粒子が細くなる傾向が見られた。加えて、牛及び豚の肝臓を用いた検討から、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した。

1年目は「LC/MSによる農薬等の一斉試験法Ⅰ（農産物）」の精製方法を改良することにより、簡便な一斉分析法を検討した。本分析法で添加回収試験を行った結果、玄米、りんご及びキャベツでは検討農薬の9割以上で目標値を満たし、食品によっては改良法の方が通知一斉試験法よりも適用できる農薬が多いことが示された。

2年目は「GC/MSによる農薬等の一斉試験法（農産物）」の精製方法のみを改良することにより、簡便・迅速な一斉分析法を検討した。玄米、大豆、キャベツ、ほうれんそう、ばれいしょ、りんご、オレンジ及び茶を用いて、151化合物を対象に添加濃度0.01 ppmで妥当性評価試験を行った結果、大豆では検討農薬の87%、その他の食品では93%以上で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。

3年目は「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。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、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。

確立した分析法はいずれも、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。

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。

1年目は、誘導体化を行わずに逆相カラムと陰イオンカラムの混合モードカラムを用いて、蜂蜜中の残留グリホサート、グルホシネート、およびそれらの代謝物*N*-アセチルグリホサート（Gly-A）、3-メチルホスフィニコプロピオン酸（MPPA）、*N*-アセチルグルホシネート（Glu-A）を同時定量する液体クロマトグラフ-タンデム質量分析法（LC-MS/MS）を開発した。開発した方法にて、グリホサートとGly-Aを25 µg/kg、グルホシネートとMPPAとGlu-Aを5 µg/kg添加した蜂蜜試料を用いて妥当性評価を行った結果、良好な回収率（86-106%）と精度（<10%）を示した。開発したメソッドの定量限界は、グリホサートで5 µg/kg、Gly-Aで2µg/kg、グルホシネート、MPPA、Glu-Aは1 µg/kgとなった。

2年目は固相カートリッジ中での*N*-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-*N*-methyltrifluoroacetamide（MTBSTFA）による簡便で迅速な誘導体化を行い、大豆中のグリホサート、グルホシネート、Gly-A、MPPA、Glu-Aを同時定量するLC-MS/MSを開発した。基準値レベルの妥当性評価を行った結果、回収率は97-108%、併行精度は2-5%、室内再現精度4-9%となりガイドラインの目標値（回収率70-120%、併行精度10%未満、室内再現精度15%未満）を満たした。

3年目は、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18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、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。

本研究における研究体制

- ・ 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]
- ・ 根本了（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]
- ・ 神田真軌（東京都健康安全研究センター 食品化学部）[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り、検体全体を十分に均質化しなければ、精確な分析値を得ることはできない。また、試料調製中に分解、揮散、吸着等により減少する場合、残留濃度を過小評価するおそれがあるため、試料調製中の減少を抑制する必要がある。本研究では、試料の均質性が分析結果に与える影響及び試料調製方法による試料調製中の農薬等の減少程度の差異について調査し、適切な試料調製方法や試料の均質性の指標を提案することを目的とし、以下の2つの検討を行った。

[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

[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

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

我が国では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）」や「GC/MSによる

農薬等の一斉試験法（農産物）」等が公示されている。これらの一斉試験法はホモジナイズ抽出後、ミニカラム等を用いて精製する方法であり、精製度が比較的高いため、夾雑成分の影響を受けにくく、測定装置への負担も少ない。その一方、溶媒や試薬の使用量が多く、操作時間も長い。そのため、試験法の簡便化・迅速化が望まれている。

海外では QuEChERS 法と呼ばれる一斉分析法が残留農薬等検査で汎用されている。本分析法は振とう抽出後、固相分散法で精製する方法であり、我が国の通知一斉試験法と比べ操作時間が短く、簡便である。しかしその反面、精製が不十分であり、夾雑成分の影響を受けやすく、装置への負担も大きい。加えて、試料に対する抽出溶媒量が少なく、且つ、振とう抽出であるため、脂質の多い食品中の低極性農薬など、食品と農薬等の組み合わせによっては通知一斉試験法と比べて抽出効率が低いことが指摘されている。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。

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。1年目は通知一斉試験法「LC/MSによる農薬等の一斉試験法I（農産物）」、2年目は「GC/MSによる農薬等の一斉試験法（農産物）」、3年目は「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、高極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る方法を用いて抽出・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、A. 研究目的に示した3つの課題について、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。

班会議の開催状況は以下の通り。

- ・令和4年9月7日（金）（オンライン）
- ・令和5年7月13日（木）（オンライン）

- ・令和6年2月6日(火)(オンライン)
- ・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

各研究課題の方法の概要を以下に示すが、詳細については各研究課題の(総合)分担研究報告書を参照されたい。

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

試料の均質性の指標を得ることを目的に、管理された圃場で農薬を散布して栽培したトマト、ハウレンソウ、ブロッコリーを用いて試料の均質化状態が分析結果に与える影響を検討した。分析値の変動及び秤取量と分析値の変動についても検証した。加えて、均質化した試料の試料調製用篩の通過率についても検討した。

[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

畜水産物(牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、豚の筋肉、豚の脂肪、鶏の筋肉、あゆ、えび、うなぎ及びさけ)を対象に、凍結粉砕による試料調製法を確立した。

凍結粉砕法による試料調製中の農薬等の減少抑制効果を検証するため、検体に農薬を添加し、常温磨砕法及び凍結粉砕法で試料調製を行って回収率を比較した。

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

本課題では残留農薬等検査において使用頻度が高い通知一斉試験法の精製操作について、簡便化を図るとともに、確立した方法の自動化を検討した。

1年目は、通知一斉試験法「LC/MSによる農薬等の一斉試験法I(農産物)」の精製操作を改良し、簡便化・迅速化した。通知一斉試験法の抽

出方法で得られた抽出液の一部をそのまま ODS ミニカラム(50 mg)及び PSA ミニカラム(30 mg)を連結したカラムで精製し、LC-MS/MSで測定する方法を確立した。

2年目は、通知一斉試験法「GC/MSによる農薬等の一斉試験法(農産物)」の精製操作を改良し、簡便化・迅速化した。一連の精製操作は自動前処理装置を用いて行った。

3年目は、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、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。

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年目は誘導体化を行わずに逆相カラムと陰イオンカラムの混合モードカラムを用いて、蜂蜜中の残留グリホサート、グルホシネート、およびそれらの代謝物 Gly-A、MPPA、Glu-A を同時定量する LC-MS/MS 法を開発・検討を行った。

2年目は *N*-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-*N*-methyltrifluoroacetamid (MTBSTFA) による簡便で迅速な固相誘導体化を行い、大豆中の Gly、Gly-A 及び Glu、Glu-A、MPPA の LC-MS/MS を用いた 5 成分一斉分析法の開発を行った。また、輸入大豆飼料への適用を検討した。

3年目は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。

C. 研究結果と考察

本研究によって得られた成果を以下に示す。詳細については各研究課題の(総合)分担研究報告書を参照されたい。

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

管理された圃場で農薬を散布して栽培したトマト、ホウレンソウ、ブロッコリーを用いて試料の均質化状態が分析結果に与える影響を検討した。その結果、均質化が不十分で粗大な固形物を多く含む試料では分析値が相対的に低くなった。特にマラチオンでは、粗粉碎試料の方が微粉碎試料と比較して顕著に低くなった。この傾向は、いずれの作物においても見られたことから、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。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、残留濃度の過小評価リスクを招くことが示唆された。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。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。加えて、いずれの作物においても微細に均質化した試料の約 90%が目開き 1 mm の篩を通過することが確認されたことから、均質化状態の客観的な評価方法として「目開き 1 mm の篩に負荷した際の通過率」を指標とする手法を提案し、「通過率 90%以上」を十分微細に均質化された試料の目安と位置付けた。

[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

畜水産物を対象に、凍結粉碎による試料調製法を確立した。凍結粉碎法の方が、常温磨砕法よりも試料粒子が細くなる傾向が見られた。ただし、うなぎ等の一部の魚種では、凍結粉碎法で試料調製を行っても皮や骨の均質化が不十分となる課題も認められた。

凍結粉碎法による試料調製中の農薬等の減少抑制効果を検証するため、検体に農薬を添加し、

常温磨砕法及び凍結粉碎法で試料調製を行って回収率を比較した。その結果、牛及び豚の肝臓では、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

本課題では残留農薬等検査において使用頻度が高い通知一斉試験法の精製操作について、簡便化を図るとともに、確立した方法の自動化を検討した。

通知一斉試験法「LC/MS による農薬等の一斉試験法 I (農産物)」の精製操作を改良し、簡便化・迅速化した。確立した方法は通知一斉試験法の抽出方法で得られた抽出液の一部をそのまま ODS ミニカラム (50 mg) 及び PSA ミニカラム (30 mg) を連結したカラムで精製し、LC-MS/MS で測定する方法である。確立した精製方法は、通知一斉試験法で採用されている塩析や濃縮操作を省略し、ミニカラムの充填量を約 1/20 にした。これにより、操作時間が大幅に短

縮しただけではなく、溶媒・試薬の使用量や分析にかかるコストを削減することができた。

通知一斉試験法「GC/MSによる農薬等の一斉試験法(農産物)」の精製操作を改良し、簡便化・迅速化した。使用する溶媒量を削減するため、精製に供する抽出量を通知一斉試験法の1/20にした。抽出液をそのままC₁₈ミニカラムに負荷し、アセトニトリル/水(9:1)で溶出することで、低極性夾雑成分を除去することができた。また、一段目のC₁₈(30 mg)ミニカラムからの溶出液に塩化ナトリウム溶液を混合後、二段目のC₁₈(50 mg)ミニカラムで精製することで、高極性夾雑成分を除去することができたため、塩析を省略することが可能となった。さらに、PSAミニカラム精製を行うことで、酸性夾雑成分やC₁₈ミニカラム精製では除くことができなかった色素を除去することができ、茶のように色素が多い食品においてもグラファイトカーボンミニカラムによる精製は不要であった。濃縮は、GC-MS/MS装置の感度に応じ、最終試験溶液の濃縮倍率を変更する場合のみ行うこととした。一連の精製操作は自動前処理装置を用いて行った。以上により、操作時間が大幅に短縮しただけではなく、精製における溶媒・試薬の使用量を削減することができた。

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、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。

開発した分析法は、通知一斉試験法と抽出条件が同一であり、抽出効率に起因する分析値の差異は生じないため、規格基準の適否判定に用いることができる方法である。加えて、本精製

操作は自動前処理装置で行うことができるため、検査担当者の熟練度等による個人差が生じにくく、検査の効率化が期待できる方法と考えられた。

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

1年目は誘導体化を行わずに逆相カラムと陰イオンカラムの混合モードカラムを用いて、蜂蜜中の残留グリホサート、グルホシネート、およびそれらの代謝物Gly-A、MPPA、Glu-Aを同時定量するLC-MS/MS法を開発・検討を行った。開発した方法にて、グリホサートとGly-Aを25 µg/kg、グルホシネートとMPPAとGlu-Aを5 µg/kg添加した蜂蜜試料を用いて妥当性評価を行った結果、良好な回収率(86-106%)と精度(<10%)を示した。開発したメソッドの定量限界は、グリホサートで5 µg/kg、Gly-Aで2 µg/kg、グルホシネート、MPPA、Glu-Aは1 µg/kgとなった。

2年目はN-(tert-Butyldimethylsilyl)-N-methyltrifluoroacetamid(MTBSTFA)による簡便で迅速な固相誘導体化を行い、大豆中のGly、Gly-A及びGlu、Glu-A、MPPAのLC-MS/MSを用いた5成分一斉分析法の開発を行った。基準値レベルの妥当性評価を行った結果、回収率は97-108%、併行精度は2-5%、室内再現精度4-9%となりガイドラインの目標値(回収率70-120%、併行精度10%未満、室内再現精度15%未満)を満たした。オンライン化も検討し妥当性が確認された。また、輸入大豆飼料への適用を検討した。本分析法は迅速、簡便かつ信頼性のある分析法であり、基準値監視のモニタリングや原材料の品質管理の有用的な方法として期待される。

3年目は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。今後オンライン化を検討する予定である。

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農産物（トマト、ハウレンソウ、ブロッコリー）を用いて試料の均質性が分析結果に与える影響を検討した。均質化の程度が不十分で粗大な固形物を多く含む粗粉碎試料と、固形物が微細になるまで十分に均質化した微粉碎試料を調製し、分析値を比較した結果、粗粉碎試料では分析値が相対的に低くなった。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。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。加えて、いずれの作物においても、均質化状態の評価方法として「目開き 1 mm の篩に負荷した際の通過率」を指標とする手法を提案し、「通過率 90% 以上」を十分微細に均質化された試料の目安と位置付けた。

[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

畜水産物を対象に、凍結粉碎による試料調製法を確立した。凍結粉碎の方が、常温磨砕法よりも試料粒子が細くなる傾向が見られた。

ただし、うなぎ等の一部の魚種では、凍結粉碎法で試料調製を行っても皮や骨の均質化が不十分となる課題も認められた。

凍結粉碎法による試料調製中の農薬等の減少抑制効果を検証するため、検体に農薬を添加し、常温磨砕法及び凍結粉碎法で試料調製を行って回収率を比較した。その結果、牛及び豚の肝臓では、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

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した。

1 年目は「LC/MS による農薬等の一斉試験法 I（農産物）」の精製方法を改良することにより、簡便な一斉分析法を検討した。本分析法で添加回収試験を行った結果、玄米、りんご及びキャ

ベツでは検討農薬の 9 割以上で目標値を満たし、食品によっては改良法の方が通知一斉試験法よりも適用できる農薬が多いことが示された。

2 年目は「GC/MS による農薬等の一斉試験法（農産物）」の精製方法のみを改良することにより、簡便・迅速な一斉分析法を検討した。玄米、大豆、キャベツ、ほうれんそう、ばれいしょ、りんご、オレンジ及び茶を用いて、151 化合物を対象に添加濃度 0.01 ppm で妥当性評価試験を行った結果、大豆では検討農薬の 87%、その他の食品では 93%以上で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。

3 年目は「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。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、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。

確立した分析法はいずれも、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。

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。

1 年目は、誘導体化を行わずに逆相カラムと陰イオンカラムの混合モードカラムを用いて、蜂蜜中の残留グリホサート、グルホシネート、およびそれらの代謝物 *N*-アセチルグリホサート

(Gly-A)、3-メチルホスフィニコプロピオン酸 (MPPA)、*N*-アセチルグルホシネート (Glu-A) を同時定量する液体クロマトグラフ-タンデム質量分析法 (LC-MS/MS) を開発した。開発した方法にて、グリホサートと Gly-A を 25 µg/kg、グルホシネートと MPPA と Glu-A を 5 µg/kg 添加した蜂蜜試料を用いて妥当性評価を行った結果、良好な回収率 (86-106%) と精度 (<10%) を示した。開発したメソッドの定量限界は、グリホサートで 5 µg/kg、Gly-A で 2µg/kg、グルホシネート、MPPA、Glu-A は 1 µg/kg となった。

2 年目は固相カートリッジ中での *N*-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-*N*-methyltrifluoroacetamide (MTBSTFA) による簡便で迅速な誘導体化を行い、大豆中のグリホサート、グルホシネート、Gly-A、MPPA、Glu-A を同時定量する LC-MS/MS を開発した。基準値レベルの妥当性評価を行った結果、回収率は 97-108%、併行精度は 2-5%、室内再現精度 4-9%となりガイドラインの目標値 (回収率 70-120%、併行精度 10%未満、室内再現精度 15%未満) を満たした。

3 年目は、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 18 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、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。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Torii, A., Seki, Y., Arimoto, C., Hojo, N., Iijima, K., Nakamura, K., Ito, R., Yamakawa, H., Akiyama, H., Development of a simple and reliable LC-MS/MS method to simultaneously detect walnut and almond as specified in food allergen labelling regulations in processed foods. *Current Research in Food Science*, 2023; **6**, 100444.
2. Sasano R., Ito R., Kusumoto M., Sekizawa J., Akiyama H. Simultaneous determination of glyphosate, glufosinate, and their metabolites in honey using liquid chromatography-tandem mass spectrometry and solid-phase extraction. *Anal. Sci.*, 2023; **39**, 1023-1031.
3. 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.
4. 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.
5. 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. 志田（齊藤）静夏：残留農薬等分析における試料調製について. 第 59 回全国衛生化学技術協議会年会（2022 年 11 月 1 日）
2. 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砕法と常温磨砕法の比較. 第 45 回農薬残留分析研究会（2022 年 11 月 24 日）

3. 佐々野 遼一、伊藤 里恵、楠本真宏、関澤 純平、穠山 浩：LC-MS/MS による蜂蜜中のグリホサート、グルホシネートおよびそれら代謝物の分析法の開発. 第 9 回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム（2023 年 9 月 16 日）
4. 曳埜忍、島田京佳、矢島 智成、飯島和昭、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トマトを用いた調査～. 日本食品衛生学会 第 119 回学術講演会（2023 年 10 月 12 日）
5. Hiroshi Akiyama、Yoshinari Suzuki、Tomoaki Tsutsumi: International Conference on Food Safety and 38th KoSFos Annual Meeting.（2023 年 11 月 30 日）
6. 志田（齊藤）静夏：残留農薬検査における課題と展望－検査部位の国際整合化、試料調製法及び抽出法について－. 第 21 回食品安全フォーラム（2023 年 12 月 8 日）
7. 田口貴章：残留農薬等試験法の概要、日本薬学会 第 144 年会（2024 年 3 月 29 日）
8. 原野幹久、佐々野 遼一、関澤 純平、勝本叶香、伊藤 里恵、岩崎 雄介、穠山 浩：LC-MS/MS による大豆中のグリホサート、グルホシネート及びそれら代謝物の分析法の開発. 日本薬学会 第 144 年会（2024 年 3 月 30 日）
9. 佐々野 遼一、穠山浩、関澤純平、原野幹久、勝本叶香、齋藤勲、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）
10. 勝本叶香、佐々野 遼一、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、穠山浩：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)

11. 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 年 11 月 11 日)
12. 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)
13. 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)

14. 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

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

令和4-5年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
令和6年度 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
（総合）分担研究報告書

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な試料を調製後、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、揮散、吸着等により減少する場合、残留濃度を過小評価するおそれがあるため、試料調製中の減少を抑制する必要がある。本研究では、試料の均質性が分析結果に与える影響及び試料調製方法による試料調製中の農薬等の減少程度の差異について調査し、適切な試料調製方法や試料の均質性の指標を提案することを目的とし、以下の2つの検討を行った。

[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

農薬を散布して栽培した農産物（トマト、ホウレンソウ、ブロッコリー）を用いて試料の均質性が分析結果に与える影響を検討した。均質化の程度が不十分で粗大な固形物を多く含む粗粉碎試料と、固形物が微細になるまで十分に均質化した微粉碎試料を調製し、分析値を比較した結果、粗粉碎試料では分析値が相対的に低くなった。特にマラチオンでは、粗粉碎試料の方が微粉碎試料と比較して顕著に低くなった。この傾向は、いずれの作物においても見られたことから、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。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、残留濃度の過小評価リスクを招くことが示唆された。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。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。加えて、いずれの作物においても微粉碎試料の約90%が目開き1mmの篩を通過することが確認されたことから、均質化状態の評価方法として「目開き1mmの篩に負荷した際の通過率」を指標とする手法を提案し、「通過率90%以上」を十分微細に均質化された試料の目安と位置付けた。

[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

畜水産物を対象に凍結粉碎による試料調製法を確立した。うなぎ等の一部の水産物では、凍結粉碎法で試料調製を行っても、皮や骨の均質化が不十分となる課題も認められたが、多くの食品では常温磨砕法よりも試料粒子が細くなる傾向が見られた。凍結粉碎法の試料調製中の農薬等の減少抑制効果を検証するため、牛及び豚の肝臓に農薬等を添加後、常温磨砕法及び凍結粉碎法により試料調製し、回収率を比較した。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。したがって、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 齋藤真希

国立医薬品食品衛生研究所 根本 了

A. 研究目的

食品に残留する農薬等の分布は不均一であり、検体全体を十分に均質化しなければ、精確な分析値を得ることはできない。また、試料調製中に分解、揮散、吸着等により減少する場合、残留濃度を過小評価するおそれがあるため、試料調製中の減少を抑制する必要がある。本研究では、試料の均質性が分析結果に与える影響及び試料調製方法による試料調製中の農薬等の減少程度の差異について調査し、適切な試料調製方法や試料の均質性の指標を提案することを目的とし、以下の2つの検討を行った。

[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

[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

圃場で散布された農薬は、作物表面や内部に均一に残留しているわけではないため、検体全体を十分に均質化しなければ、精確な分析値を得ることはできない。このため、残留農薬分析では試料調製によって得られた試料が十分に均質であることを確認することが望ましい。しかしながら、残留農薬検査では、分析法（抽出から測定まで）の妥当性については評価しているものの、試料調製の評価はほとんど行われていない。これは、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の報告が非常に少なく、試料の均質化状

態の評価指標が確立していないことが一因である。

本研究では農産物を対象として試料の均質性が分析結果に与える影響を検討した上で、試料の均質性の評価方法及び十分に均質化された試料の目安を提案することを目的とした。1年目は果菜類であるトマト、2年目は葉菜類であるホウレンソウ、3年目は花野菜であるブロッコリーを用いて検討を行った。

[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

残留農薬等分析では常温磨砕法により試料調製を行うことが多い。しかし、食品によっては常温磨砕法では均質化が困難な場合がある。また、一部の農薬等は、試料調製中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、酵素やその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、凍結粉碎法では常温磨砕法よりも微細に粉碎できる可能性がある。また、凍結粉碎法では他の農薬等の安定性や抽出効率に影響を与えることなく、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、本研究では畜産物を対象として、凍結粉碎法を確立するとともに、その有用性について検証することを目的とした。1年目は畜産物、2年目は水産物を対象に凍結粉碎法による試料調製を検討した。3年目は、試料調製中に生じる農薬等の減少の抑制に凍結粉碎法が有効であるかを検証した。

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

a 令和4年度： トマト

1. 圃場試験の概要

日本植物防疫協会高知試験場にて、トマト（品種：モモタロウ）を施設栽培した。2023年1月4日および11日に表A-1の条件で農薬製剤300L/10a相当量を2回混用散布した。最終散布1日後に約8kg（160g/個）の試料（処理区試料）を収穫した。また、1月4日の農薬散布前に約2.5kgの試料（無処理区試料）を収穫した。

2. 分析対象物質

供試農薬製剤の有効成分（ジノテフラン、マラチオン、テブコナゾール、フルベンジアミド、ブプロフェジン、フェンピロキシメート、ペルメトリン）

3. 分析標準物質

ジノテフラン標準品（99.8%；富士フィルム和光純薬製）、マラチオン標準品（98.33%；Dr. Ehrenstorfer製）、テブコナゾール標準品（98.6%；富士フィルム和光純薬製）、フルベンジアミド標準品（99.2%；富士フィルム和光純薬製）、ブプロフェジン標準品（99.4%；富士フィルム和光純薬製）、(E)-フェンピロキシメート標準品（98.41%；Dr. Ehrenstorfer製）、ペルメトリン標準品（99.73%；Dr. Ehrenstorfer製）

4. 試薬

アセトニトリル、トルエン、メタノール：残留農薬試験用（関東化学製）

メタノール：LC/MS用（関東化学製）

酢酸アンモニウム：特級（関東化学製）

水：PURELAB Flex System（Veolia Water Solutions & Technologies）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製）

5. 装置

ミキサー：ロボクーブ Blixer 5-Plus（エフ・エム・アイ製）

ホモジナイザー：PT3100D（KINEMATICA AG製）

超音波洗浄機：FU-80C（アイワ医科工業製）

液体クロマトグラフ・質量分析計（LC-MS/MS）：Nexera X2 System（島津製作所製）、

Triple Quad 4500（AB Sciex製）

データ処理：Analyst（AB Sciex製）

6. 測定条件

高速液体クロマトグラフ：表A-2

質量分析計：表A-3

MSパラメーター：表A-4

7. 標準溶液の調製

7.1 標準原液の作成

ジノテフラン、マラチオン、テブコナゾール、フルベンジアミド、フェンピロキシメートおよびペルメトリンの分析標準物質10.0mg（純度補正值）をそれぞれ50mL容メスフラスコに精秤し、アセトニトリルで定容して200mg/Lの標準原液を調製した。ブプロフェジンの分析標準物質10.0mg（純度補正值）を50mL容メスフラスコに精秤し、アセトンで定容して200mg/Lの標準原液を調製した。

7.2 検量線用標準溶液および検量線の作成

1) ジノテフラン、マラチオン、テブコナゾール、フルベンジアミド、ブプロフェジンおよびフェンピロキシメート（溶媒検量線）

7.1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0.2mg/L混合標準溶液を調製し、さらにメタノールで希釈して0.08mg/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および0.008mg/Lの混合標準溶液を調製し、LC-MS/MSで測定した。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) ペルメトリン（マトリックス検量線）

7.1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2mg/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 および 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 と任意のブランク試料の試験溶液 475 μL をそれぞれ混合して、0.00012、0.0004、0.0008、0.002、0.004 および 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ブランク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 で測定し、横軸に濃度、縦軸にピーク面積をとって検量線を作成した。

8. 分析操作

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。

8.1 抽出

均質化試料（1.00、2.00、5.00、10.0 および 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。

8.2. GCB/NH₂ 積層ミニカラム精製

抽出液 1、2、4、10 および 20 mL（各秤取量ともに試料 0.2 g 相当量）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）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）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。

8.3. 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、抽出液および試験溶液は冷蔵暗所に保管した。

9. 分析法の妥当性評価

市販品試料を用いた各分析対象農薬の定量限界相当濃度 0.01 mg/kg、0.5 mg/kg および分析試料の最高検出濃度を超える 1 mg/kg 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および無処理区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。

10. 常圧加熱乾燥法による固形物含有率の測定方法

アルミカップを 105°C に設定した恒温乾燥機内で 1 時間乾燥後に、デシケーター内で室温に戻して重量を測定した。重量を測定したアルミカップに 1.00、2.00、5.00、10.0、20.0 g±10% の試料を秤取した。これらを 105°C に設定した恒温乾燥機内で 6 時間乾燥後に、デシケーター内で室温に戻して重量を測定した。重量の測定には精密天秤を使用し、小数点以下 4 桁までの重量を測定した。乾燥後の試料重量を秤取試料重量で除して、固形物含有率を算出した。

11. 試料均質化状態の検討

11.1. 均質化時間の比較

市販品トマト（産地：茨城県、品種：惚れ惚れ）約 2.5 kg のヘタを除去し縦十字に 4 分割した後、ミキサーで 0.5、1、2 および 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。

11.2. 均質化評価用試験篩の比較

11.1 項のトマトおよび別品種の市販品トマト（産地：群馬県、品種：夏美人）それぞれ約 2 kg のヘタを除去し細切後、ミキサーで短時間均質化して粗大固形物が残る均質化が不十分な試料（粗粉碎試料）を調製した。粗粉碎試料を約 1 kg

ずつ 2 つに分割し、それぞれの重量を記録した。それらを目開き 1 mm または 2 mm の試験用篩に負荷し、ヘラを用いて裏ごしする要領で通過させ、通過物の重量を測定した。なお、ヘラは先端が柔らかいものを使用し、ヘラ処理時の加圧により固形物が必要以上に篩を押し通らないように力加減に注意した。また、次式より通過物の重量評価による通過率を算出した。

通過物重量評価での通過率 (%)

$$= \frac{\text{篩通過物重量}}{\text{試料負荷重量}} \times 100$$

11.3. 試験篩の通過手法の比較

11.3.1. 均質化試料の調製

圃場施設で栽培した無処理区試料および処理区試料それぞれ約 2 kg のヘタを除去し細切後、ミキサーで均質化して、固形物が十分に均質化された微粉碎試料および粗粉碎試料をそれぞれ調製した。

11.3.2. ヘラ処理

前項で調製した無処理区の微粉碎試料および処理区の粗粉碎試料を約 500 g はかり取り、重量を記録した。それらを目開き 1 mm の試験用篩に負荷し、約 5 分間静置した後に通過物重量および篩上の残渣重量を測定した。続いて、ヘラを使用した方法 (11.2 項参照) で均質化試料を篩に通過させ、通過物重量および篩上の残渣重量を測定した。篩上の残渣重量は、残渣を含んだ篩の重量から事前に測定した篩重量を減算することで求めた。また、11.2 項と同様の方法で算出した通過物重量評価での通過率に加えて、次式より残渣重量評価での通過率を算出した。

残渣重量評価での通過率 (%)

$$= \frac{(\text{試料負荷重量} - \text{残渣重量})}{\text{試料負荷重量}} \times 100$$

11.3.3. 流水洗浄処理

11.3.1 項で調製した無処理区の微粉碎試料および粗粉碎試料を約 500 g はかり取り、重量を記録した。500 mL の水を加え混合した後、目開き 1 mm の試験用篩に負荷し、約 5 分間静置した後に篩上の残渣重量を測定した。続いて、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 に調製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拭きあげた後の篩上の残渣重量を測定し、残渣重量評価での篩通過率を算出した。

12. 分析用試料の秤取

12.1 試料秤取量および試料静置の影響

均質化直後に 2L ビーカーに充填した処理区の微粉碎試料および粗粉碎試料それぞれの中層から、1.00、2.00、5.00、10.0 および 20.0 g の検体を各 6 点秤取し、それらの農薬濃度を分析した。さらに、同時点における中層より 1.00、2.00、5.00、10.0 および 20.0 g±10% の検体を各 6 点秤取し、固形物含有率を測定した。試料秤取は、秤取ごとにビーカー内の試料をよく混和した後に実施した。ビーカー内の両均質化試料を 1 時間静置した後、上層、中層および下層から 20.0 g の検体を各層 2 点ずつ秤取し、それらの農薬濃度を分析した。同時点での上層、中層および下層から 20.0 g±10% の検体を各層 2 点ずつ秤取し、固形物含有率を測定した。なお、全ての検体秤取時には、先端口径 8 mm の駒込ピペットを使用し、静置後の秤取時には秤取器具で各層を混和しないように注意しながら試料採取を実施した。

12.2 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微粉碎試料および粗粉碎試料の中層から、20.0 g の検体を各 2 点秤取し、遠心分離 (10000×g、10 分、20°C) した。傾斜法により沈殿と上澄み液に分画し、両画分中の農薬濃度を分析した。

12.3 篩分別後の残渣と通過物の比較

11.3.2 項のヘラ処理により、処理区の粗粉碎試料約 2 kg を篩上の残渣と通過物に分別した。分別した両試料から、それぞれ 20.0 g の検体を各 6 点秤取し、農薬濃度を分析した。

b 令和 5 年度： ほうれんそう

1. 分析標準物質

ジノテフラン標準品：99.8% (富士フィルム和光純薬株式会社)

イミダクロプリド標準品：99.5% (富士フィルム和光純薬株式会社)

マラソン標準品：97.2% (富士フィルム和光純薬株式会社)

ダイアジノン標準物質：99.5% (富士フィルム和光純薬株式会社)

フルフェノクスロン標準品：98.19% (Dr. Ehrenstorfer)

(E)-フェンピロキシメート標準品：98.41% (Dr. Ehrenstorfer)

ペルメトリン標準品：99.73% (Dr. Ehrenstorfer)

2. 供試試料

作物名：ほうれんそう

分析部位：茎葉 (赤色根部を含み、ひげ根及び変質葉を除去したもの)

3. 残留分析方法

3.1. 試薬および機器

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)

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)

ミキサー：ロボクープ Blixer 5-Plus (株式会社エフ・エム・アイ)

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)

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)、Triple Quad 4500 (AB Sciex, USA)

データ処理装置：Analyst (AB Sciex)

3.2. 機器および装置の操作条件

3.2.1. 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

保持時間：ジノテフラン：2.6 min、イミダクロプリド：3.6–3.7 min、マラチオン：5.5–5.6 min、ダイアジノン：6.0 min、フルフェノクスロン：6.5 min、フェンピロキシメート：6.6–6.7 min、ペルメトリン：7.1 および 7.3 min

3.2.2. 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

イオンスプレー電圧：5500 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：表 B-1

3.3. 標準溶液の調製

3.3.1 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、フェンピロキシメートおよ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。

3.3.2 検量線用標準溶液および検量線の作成

1) イミダクロプリド、マラチオン、ダイアジノンおよびフェンピロキシメート (溶媒検量線)

3.3.1 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 および 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、ダイアジノンおよびフェンピロキシメート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およびペルメトリン (マトリックス検量線)

3.3.1 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、0.004、0.08 および 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 μ L と任意の農薬無添加試料の試験溶液 475 μ L をそれぞれ混合して、0.00012、0.0004、0.0008、0.002、0.004 および 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ブランク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およ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。

3.4. 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。

3.4.1 抽出

均質化試料 (1.00、2.00、5.00、10.0 および 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。

3.4.2. 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。

3.4.3. 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、抽出液および試験溶液は冷蔵暗所に保管した。

3.5. 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 および分析試料の最高検出濃度を超える 15 mg/kg (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およびペルメトリン) または 50 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。(表 B-2)

4. 固形物含有率の測定

アルミカップを 105°C に設定した恒温乾燥機内で 1 時間乾燥後に、デシケーター内で室温に戻して重量を測定した。重量を測定したアルミカップに分析試料を秤取した。これらを 105°C に設定した恒温乾燥機内で約 7 時間乾燥後に、デシケーター内で室温に戻して重量を測定した。重量の測定には精密天秤を使用し、小数点以下 4 桁までの重量を測定した。乾燥後の試料重量を秤取試料重量で除して、固形物含有率を算出した。

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

市販品ほうれんそう約1 kgを2~3 cmに細切した後、常温のミキサーで0.5、1、2 および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

市販品ほうれんそう約1 kgを2~3 cmに細切した後、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、凍結したほうれんそう試料に加え混合した。添加したドライアイス量は、既報⁷⁾⁸⁾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。ドライアイスと混合した凍結ほうれんそう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晩かけてドライアイス昇華した。なお、ミキサーの外表面には断熱材を巻き、試料秤取用の器具およびビーカーは予冷したものを使用した。また、凍結したほうれんそう試料(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

市販品ほうれんそう約1 kgを2~3 cmに細切した後、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』およ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. 微粉碎試料および凍結粉碎試料

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。

通過率 (%) = (試料負荷重量 - 残渣重量) / 試料負荷重量 × 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、微粉碎試料およ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 および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。粗粉碎試料および微粉碎試料については均質化試料を1時間静置した後、上層、中層および下層から20.0 gの分析試料を各層2点ずつ秤取し、それらの農薬濃度を分析した。また、同時点での上層、中層および下層から20.0 g±10%の分析試料を各層2点ずつ秤取し、4項の方法に従い固形物含有率を測定した。なお、粗粉碎および微粉碎試料は先端口径8 mmの駒込ピペットで秤取し、静置後の秤取時には各層を混和しないように注意しながら分析試料を採取した。凍結粉砕試料は、予冷したスパーテルを用いて秤取した。

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および微粉碎試料の中層から、分析試料 20.0 g を各 2 点秤取りし、遠心分離 (10000×g、10 分、20°C) した。傾斜法により沈殿と上澄み液に分画し、両画分中の重量および農薬濃度を分析した。

6.3 篩分別後の残渣と通過物の比較

処理区の粗粉碎試料約 1 kg を目開き 1 mm 篩に負荷し、ヘラ処理により篩上の残渣と通過物に分別した。両試料から、それぞれ 20.0 g の分析試料を各 6 点秤取りし、農薬濃度を分析した。

c 令和 6 年度： ブロッコリー

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、散布液の希釈率を表 C-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%、富士フィ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%、富士フィルム和光純薬株式会社(大阪府)

マラソン標準品： 96.4%、富士フィ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%、富士フィ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%、富士フィ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 パラメーターを表 C-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、0.004、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) 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 に細切し、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^{7、8)}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。ドライアイス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 晩かけてドライアイス昇華した。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

a (令和4年度) 及び b (令和5年度)

1. 食品

牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、豚の筋肉、豚の脂肪、鶏の筋肉、あゆ、えび、うなぎ及びさけを用いた。

2. 冷却剤

液化炭酸ガス (純度 >99.5 vol%) 及び液体窒素 (純度 >99.99%) は鈴木商館から購入した。ドライアイスは、液化炭酸ガスボンベ (サイホン付) にドライアイス製造装置 (アイスティーサイエンス製) を接続し、用時調製した。

3. 装置

粉砕機は Robot Coupe BLIXER-3D (エフ・エム・アイ製: 回転数 3000 rpm、容器容量 3.7 L) を用いた。なお、Robot Coupe BLIXER-3D に付属しているプラスチック製の蓋スクレーパーアーム Assy 及びハンドルは、硬い試料を粉砕すると破損することがあるため、使用しなかった。試料温度の測定は、精密型デジタル温度計 SK-810PT (佐藤計量器製作所製) に低温センサ S810PT-30 を接続して使用した。

4. 試料調製

検体約 500 g を約 2.5 cm 角にカットし、常温磨砕法 (A) 及び凍結粉砕法 (B~D) の各方法で試料調製した。

A. 常温磨砕法

カットした検体約 500 g を全量、粉砕機に入れ、120 秒間磨砕した。

B. 凍結粉砕法 (液体窒素・凍結方式)

①ステンレスビーカーに液体窒素を約 2 L 入れ、カットした検体約 500 g を加えた。

②①の液体窒素が 500 mL 程度となったら、液体窒素をさらに約 2 L 加え、合計 4 分間冷却した。

③液体窒素約 100 mL を粉砕機に入れ、約 5 秒間運転し、粉砕機を冷却した。

④②で得られた凍結試料の約半量を粉砕機に入れ、10 秒間粉砕した。

⑤残りの凍結試料を粉砕機に加え、さらに 110 秒間粉砕した。

C. 凍結粉砕法 (ドライアイス・予冷方式)

①カットした検体約 500 g 及び検体重量の 1.1 倍量のドライアイス (約 550 g) を予冷用容器 (プラスチック製) に入れ、蓋を被せ (密閉せずに)、3 分間予冷した。なお、予冷容器に入れる際は、予冷に用いるドライアイスの約半量を入れた後、検体を加え、その上に残り半量のドライアイスを加えた。また、予冷中は、約 30 秒毎に 5 秒間程度、容器を振り、よく混合した。

②粉砕機にドライアイス 100 g (粉砕機冷却用) を入れ、約 5 秒間運転し、粉砕機を冷却した。

③①で得られたドライアイス混合試料の約半量を粉砕機に入れ、10 秒間粉砕した。

④残りのドライアイス混合試料を粉砕機に加え、さらに110秒間粉砕した。

D. 凍結粉砕法（ドライアイス・予備凍結方式）

①カットした検体約500gをフリーザーバッグに入れた。これを冷凍庫（-30℃）で一晩静置し、凍結した。

②粉砕機にドライアイス100g（粉砕機冷却用）を入れ、約5秒間運転し、粉砕機を冷却した。

③①で得られた凍結試料の約半量を粉砕機に入れ、10秒間粉砕した。

④残りの凍結試料及び検体重量の0.5倍量のドライアイス（約250g）を加え、110秒間粉砕した。

c 令和6年度

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ィルム和光純薬製の残留農薬試験用、酢酸は富士フィルム和光純薬製の精密分析用、ギ酸は富士フィ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50mg）及び Smart-SPE C18-30（充填剤量30mg）（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 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) 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℃（300℃）；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2.1mm、長さ100mm、粒子径1.9μm、ジューエルサイエンス製）；カラム温度 40℃；注入量 2μL；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 0.3mL/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10.0gに *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル50mL、*n*-ヘキサン50mL及び酢酸1mL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20g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50mL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。検討対象は表 C-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 µg/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

a 令和4年度

1. 圃場試験の概要

高知県で施設栽培されたトマトに6種農薬製剤(分析対象物質7種)を2回混用散布した後、1日後に採取し、供試試料とした。試料受領時に撮影した作物写真を図A-1に示す。供試試料の平均個体重量は160g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および無処理区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表A-5に示す。各分析対象農薬を0.01mg/kg添加した試料での平均回収率は、87~102%であり、その併行相対標準偏差(RSDr)は5%以下であった。0.5mg/kg添加試料での平均回収率は、88~104%であり、RSDrは8%以下であった。1mg/kg添加試料での平均回収率は、97~105%であり、RSDrは4%以下であった。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。

3. 試料均質化状態の評価

3.1. 均質化時間の比較

ミキサーの稼働時間別のトマト均質化状態を図A-2に示す。均質化時間が長くなるにつれ、固形物(果肉、果皮および種子)が微細になることを確認した。4分間均質化した試料では、大きな固形物が見られず、十分に均質化された試料

(微粉碎試料)であると判断した。また、目視で明らかな固形物が確認できる0.5分間均質化した試料を不適切試料(粗粉碎試料)とした。

3.2. 均質化評価用試験篩の比較

目開き2mm篩における粗粉碎試料の通過率は89および92%であり、粗大固形物を含む多くの均質化試料が篩を通過した(図A-3)。一方、目開き1mm篩での通過率は77および80%であり、均質化が不十分な固形物は篩を通過しなかった。したがって、試料中の固形物が、十分微細に均質化されているか評価するためには、参考規定^{1,2)}で示される目開き1mm篩の使用が適切であると考えられる。

3.3. 篩通過手法の比較

ヘラ処理および流水洗浄処理時の様子を図A-4、篩通過時における均質化試料および篩上の試料状態を図A-5および図A-6に示す。また、ヘラ処理および流水洗浄処理時における目開き1mm篩の通過率を図A-7に示す。

ヘラ処理の前後どちらの時点でも、残渣重量評価および通過物重量評価による通過率の差は、均質化の程度に関わらず2%以下であった。したがって、篩上に残った残渣の重量および篩を通過した試料の重量どちらを通過率の評価に用いても大きな差異がないことを確認した。以降では、流水洗浄処理に合わせて、残渣重量で評価した通過率を比較した。

ヘラ処理後の通過率は、粗粉碎試料で63%、微粉碎試料で95%となった。流水洗浄処理時の通過率は、洗浄時間が長くなるに従い増加し、粗粉碎試料で5分間、微粉碎試料で4分間の洗浄で凡そ一定となった。それらの時点での微粉碎試料および粗粉碎試料の通過率は、それぞれ69%および99%であった。処理方法に関わらず微粉碎試料および粗粉碎試料における通過率は同程度となり、十分に均質化した試料は目開き1mm篩を90%以上通過させることが可能であった。また、均質化の状態に関わらず流水洗浄処理ではヘラ処理よりも通過率が高くなった。これは、ヘラ処理で篩を通過できなかった網目に付着した残渣や粗大

固形物に付着した微細な残渣を、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る（図 A-5-C、D および図 A-6）。

4. 試料秤取量の影響

異なる重量の試料を秤取した際の各農薬の平均濃度は、微粉碎試料および粗粉碎試料において、ジノテフランで 0.200~0.209 および 0.187~0.194 mg/kg、マラチオンで 0.159~0.169 および 0.091~0.130 mg/kg、テブコナゾールで 0.178~0.213 および 0.145~0.199 mg/kg、フルベンジアミドで 0.152~0.167 および 0.152~0.174 mg/kg、プロフェジンで 0.288~0.331 および 0.271~0.322 mg/kg、フェンピロキシメートで 0.052~0.067 および 0.051~0.058 mg/kg、ペルメトリンで 0.146~0.203 および 0.137~0.157 mg/kg であった。微粉碎試料および粗粉碎試料における対応する試料秤取量ごとの各農薬の分析値（n=6）を Mann-Whitney の U 検定により解析すると、試料秤取量 20 g では異なる母集団とみなされる農薬数は 2 農薬であったが、秤取重量の減少に伴いその数は増加し、2 g 秤取時では 6 農薬となった（表 A-6）。試料秤取量 1 g では該当する農薬は 3 農薬となったが、試料の秤取重量を少量化するほど、均質化の程度が分析値に与える影響が有意に増大することが示唆された。

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³⁾。また、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^{4) 5)}。そこで、試料秤取量の影響を横断的に評価するために、微粉碎試料および粗粉碎試料における試料 20 g 秤取時の平均濃度に対する各農薬および全農薬での平均相対濃度を図 A-8 に示す。フルベンジアミドを除き、同一の試料秤取量における平均相対濃度は、粗粉碎試料の方が微粉碎試料よりも低い傾向を示した。特に、マラチオンおよびテブコナゾールではこの傾向が顕著であり、マラチオンでは最大 1.8 倍、テブコナゾールでは最大 1.2 倍の差が生じた。同様の微粉碎試料よりも粗粉碎試料

で分析値が低くなる傾向は、全農薬の相対濃度においても確認された。微粉碎試料および粗粉碎試料における各農薬の分析値の変動（RSD 値）を図 A-9 に示す。ジノテフランおよびフルベンジアミドを除き、試料秤取量が同一である場合は、微粉碎試料よりも粗粉碎試料でその値が大きくなる傾向が見られた。つまり、均質化が不十分な場合は、試料中で農薬が偏在化しており、秤取する試料部位によって分析値に変動が生じる危険性を内包することが示唆させた。この傾向は、個別の農薬での分析値変動の総平均においても確認されている（図 A-10）。一方で、個別農薬の結果では検体の秤取量の差異による分析値変動への影響は不明瞭であった。そこで、それぞれの農薬の特性に関わらない包括的な変動評価を実施するために、各農薬の試料 20 g 秤取時の分析値で補正した相対濃度の全薬での変動を算出した（図 A-11）。相対濃度の変動は、微粉碎試料および粗粉碎試料の両試料とも試料の秤取量を少量化するほど増大する傾向が確認され、その程度は粗粉碎試料の方が微粉碎試料よりも大きくなった。試料の秤取量を、微粉碎試料では 2 g 以下、粗粉碎試料では 10 g 以下にした際に、全分析対象農薬での相対濃度の変動は顕著に増加した。

試料 20 g 秤取時の平均固形物含有率で補正した際の各秤取量における平均相対値を図 A-12 に示す。粗粉碎試料での 20 g および 10 g 試料のうちそれぞれ 1 点において容器破損に伴い秤取試料の外部への流出が確認されたため、それら試料は解析から除外し、残り 5 点の分析値で結果を取り纏めた。それぞれの試料秤取量における平均相対値は、微粉碎試料よりも粗粉碎試料で低くなる傾向が見られた。これは、粗粉碎試料の秤取試料における均質化が不十分な果肉などの粗大固形物が水分を含有するため、秤取した検体重量に対する水分の割合が多くなることに起因すると考えられる。微粉碎試料よりも粗粉碎試料で相対値が低くなる傾向は、固形物含有率と農薬濃度の分析値で類似していた。

5. 試料静置の影響

微粉碎試料および粗粉碎試料を1時間静置した後、異なる三層から秤取した試料中の濃度を均質化直後の20g秤取試料中濃度で補正した相対濃度を図A-13、同時点における異なる三層間の平均分析値の変動を図A-14、均質化直後における20g秤取試料中の固形物含有率で補正した各層での相対値を図A-15に示す。

均質化の程度に関わらず、ジノテフランの相対濃度は、上層、中層および下層で凡そ同程度となり、三層間の分析値の変動も3%以下と顕著に低かった。よって、ジノテフランは静置後も均質化試料中に概ね均一に分布していることが確認された。しかし、その他の農薬は、下層<中層<上層の順に相対濃度が高くなった。また、それぞれの農薬の相対濃度は、下層では均質化の程度に関わらず同程度であったが、上層と中層では微粉碎試料よりも粗粉碎試料で低くなった。これらの影響により異なる三層における各農薬の分析値変動は微粉碎試料よりも粗粉碎試料で小さくなった。さらに、どの農薬でも同一の層から秤取した検体2点の分析値の差は、均質化の程度に関わらず顕著な差は見られなかった。つまり、秤取する層による相対濃度が異なる場合でも、各層内の農薬濃度は凡そ均一であることが示唆された。

固形物含有率の相対値は、下層<中層<上層の順で高くなり、上層および中層の相対値は微粉碎試料よりも粗粉碎試料で低くなった。これらの傾向は、微粉碎試料および粗粉碎試料中の各層におけるジノテフランを除く各農薬の相対濃度分布と合致していることから、固形物の均質化試料内での偏在化が分析値の変動に影響を与えていることが示唆された。さらに、静置後における均質化試料の分離の様子を確認すると粗粉碎試料では下層に液体が沈降した層がわずかにみられる程度であったが、微粉碎試料では明らかに下層に液層が厚く形成されていた(図A-16)。このことは、先にも述べたように粗粉碎試料では粗大固形物が水分を含有していると考えられるため、微粉碎試料よりも均質化試料中の液体画分が少なく、下層に形成される液層が薄くなったと推察され

る。以上のことから、粗粉碎試料では水分が粗大固形物中に含有され、固形物と液体画分の割合の差が小さく、それら画分の上層、中層および下層への分離が微粉碎試料よりも緩慢であったため、異なる三層間での農薬分析値の差も小さくなったと考えられる。

6. 遠心分離後の沈殿物と上澄み液の比較

よく混和した微粉碎試料および粗粉碎試料の中層から秤取した検体より遠心分離して得た沈殿と上澄み液中の各農薬の存在率を図A-17に示す。微粉碎試料および粗粉碎試料の沈殿と上澄み液の重量比は、それぞれ21:79および32:68であり、粗粉碎試料で沈殿画分が多くなった。これは、粗粉碎試料の沈殿画分中における粗大な固形物が水分を内包しているため、微粉碎試料に比べて液相が少ないことに起因すると考えられる。しかし、各農薬の沈殿および上澄み液への存在率は、均質化の程度によらず概ね同程度であった。ジノテフランの存在率は、両画分の重量比と類似しており、上澄み液と沈殿に凡そ均等に分布していることを確認した。その他の農薬は沈殿への存在率が上澄み液よりも高くなり、ブプロフェジンを除き、農薬の極性が低くなるほど沈殿への存在率が増加する傾向が確認された。粉碎試料および粗粉碎試料におけるブプロフェジンを除く各農薬の n -オクタノール/水分分配係数($\log P_{ow}$)と沈殿中の存在率の間には、強い正の相関が確認された(図A-18)。したがって、ジノテフランのような顕著に極性の高い農薬を除き、農薬は液相よりも固形物へ分布することを確認した。5項において、静置後の均質化試料でジノテフランを除く農薬の相対濃度が、固形物含有率が高い上層で高くなり、固形物含有率が低く水分が多い下層で低くなったことは、固形物へ農薬が偏在化する性質由来することが示唆された。この調査結果は、ブドウにおける調査結果と同様であった⁶⁾。

7. 篩分別後の残渣と通過物の比較

粗粉碎試料を目開き1mmの試験篩に通過させた後の篩上残渣および通過物中における各農薬の存在率を図A-19に、両画分での分析値の変動

を図 A-20 に示す。篩通過後の残渣および通過物の重量比は 37:63 となり、篩上の残渣には粗大な固形物が、通過物には水分に加えて篩を通過した微細な固形物が含まれていた。ジノテフランは、両画分の重量比と類似した存在率を示した。つまり、残渣と通過物に凡そ均等に分布していた。分画した試料中にジノテフランが均一に分布する傾向は、遠心分離後の沈殿と上澄み液への存在率からも確認されている。その他の農薬は、残渣に 43~62%が分布していた。遠心分離による分別後の農薬分布の傾向と異なり、農薬の極性が低くなるほど、固形物を多く含む篩上の残渣への存在率増加は見られなかった。各農薬における分析値の変動は、通過物よりも残渣で大きくなった。特に、ジノテフランを除く農薬での残渣における分析値変動は、顕著に大きくなった。残渣では水分量が少ないため、試料内で農薬が均一に広がらず、秤取した検体への不均一な農薬の取り込みが変動に影響を与えた要因だと考えられる。

供試トマト試料は農薬を茎葉散布して、最終散布 1 日後に収穫したことから、残留農薬は主に果皮上に分布していると考えられるので、多くの農薬は液相よりも果皮を含む沈殿相に分布したものと推察された。一方、ジノテフランのような極性農薬は、水溶性が高いため、均質化工程で試料中の水分に可溶して均質化試料全体に分布したと考えられた。そして、篩と遠心分離で分別した際の分布傾向の違いから、トマトの果皮は、弾性を有する果肉と同程度に微細化され、篩上の堆積物と通過物での存在比に差異が無かったものと推察された。

b 令和 5 年度

1.1. 圃場試験の概要

高知県で施設栽培されたほうれんそうに 7 種の農薬製剤を 2 回混用散布した後、最終散布 1 日後に採取した茎葉を供試試料とした。試料受領時に撮影した作物写真を図 B-1 に示す。供試試料の平均個体重量は約 35 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。

1.2. 分析法の妥当性評価

1.2.1 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。

1.2.2 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。

1.2.3 回収率

回収率の算出結果を表 B-3 に示す。市販品の微粉碎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、84~104%であり、その併行相対標準偏差 (RSDr) は 8%以下であった。0.5 mg/kg 添加試料での平均回収率は、89~110%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、フェンピロキシメートおよびペルメトリンの 15 mg/kg 添加試料での平均回収率は、88~109%であり、RSDr は 7%以下であった。ダイアジノンの 50 mg/kg 添加試料での平均回収率は、102%であり、RSDr は 1%であった。さらに、無処理区の粗粉碎試料を用いた 0.5 mg/kg 添加試料での平均回収率は、90~105%であり、その RSDr は 5%以下であった。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。また、0.5 mg/kg 添加濃度において、試料の均質化状態が、添加回収率の算出結果に影響しないことを確認した。なお、マトリックス効果が -19~-32%認められたジノテフラン、フルフェノクスロンおよ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 (表 B-4)。

1.3. 試料均質化状態の評価

1.3.1. 均質化時間および均質化温度の比較

常温でのミキサー稼働時間別のほうれんそう均質化状態を図 B-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、繊維質が多い茎よ

り比較的柔らかい葉の方が微細になりやすいことを確認した。これら観察結果から、1 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。

凍結粉碎した試料の解凍時における状態を図 B-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ていることを確認した。また、試料温度は、均質化前の細切した凍結状態で -19.3°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。その後、冷凍庫内でのドライアイス昇華後では -24.0°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。

1.3.2. 均質化評価用試験篩の目開きおよび通過手法の比較

ヘラ処理および流水洗浄処理による篩通過時の様子を図 B-4、ヘラ処理および流水洗浄処理後における篩上試料の状態を図 B-5、各均質化試料のヘラ処理および流水洗浄処理における目開き1 mm または2 mm 篩の通過率を図 B-6 に示す。ヘラ処理後における平均通過率（各作業員での値）は、粗粉碎試料の1 mm 篩で16%（12 または 20%）、2 mm 篩で56%（52 または 59%）、微粉碎試料の1 mm 篩で56%（42 または 71%）、凍結粉碎試料の1 mm 篩で84%（80 または 89%）であった。流水洗浄処理における通過率は、粗粉碎試料を2 mm 篩、微粉碎試料および凍結粉碎試料を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84%（81 または 87%）、94%（94 または 95%）および97%（両者とも 97%）となった。一方で、粗粉碎試料の1

mm 篩負荷時では、洗浄時間4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ことに起因すると考えられる。この現象は粗粉碎試料の1 mm 篩負荷時のみで生じていることから、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生じないと考えられる。洗浄4分以降で通過率は増加していき、最終的に洗浄時間10分間での平均通過率は17%（16 または 18%）となった。さらに、試験圃場で栽培されたほうれんそう試料についても各均質化試料の流水洗浄処理を用いた篩通過率を1連で確認した。粗粉碎試料、微粉碎試料および凍結粉碎試料の1 mm 篩負荷時における通過率は、最終洗浄時間でそれぞれ22%、98%および98%となり、市販品を用いた際と同程度の通過率であった。これら結果から、流水洗浄処理では使用する作物試料に関わらず、試料の均質化状態を評価可能であることが確認された。

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 篩および微粉碎試料の1 mm 篩における平均通過率は、ヘラ処理よりも流水洗浄処理で28%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への付着物や粗大な固形物に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（図 B-5）。凍結粉碎試料の1 mm 篩負荷時における平均通過率は、ヘラ処理よりも流水洗浄処理で13%高くなり、上記の条件での結果と同様の傾向を示した。しかしながら、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1%とわずかであった。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、作業員間での通過率の差は、微粉碎試料を1 mm 篩に負荷してヘラ処理した際が最も大きく作業員間で29%も差異が生じた。ヘラ処理では、作業

者のヘラでの加圧具合によって通過率が大きく異なることが確認された。一方で、定速の流水により試料を篩に通過させる流水洗浄処理では、作業による通過率の差はいずれの条件でも 6%以下と小さくなった。

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、篩に残らない微細な残渣を正確に通過可能であり、異なる作業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。さらに、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 94%、凍結粉碎試料で 97%であることから、微細に均質化された試料は参考規定^{1, 2)}で示される目開き 1 mm 篩を 90%以上通過可能であった。また、均質化の程度が異なる試料が調製できたことが確認された。

1.4. 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表 B-5 に示す。平均濃度は、粗粉碎、微粉碎および凍結粉碎試料において、ジノテフランで 5.53~5.62、6.00~6.40 および 5.78~6.20 mg/kg、イミダクロプリドで 3.76~3.82、3.93~4.23 および 3.82~4.03 mg/kg、マラチオンで 1.77~1.83、2.06~2.21 および 2.26~2.52 mg/kg、ダイアジノンで 14.28~14.77、15.20~15.81 および 14.81~15.58 mg/kg、フルフェノクスロンで 2.16~2.44、2.49~2.63 および 2.61~2.70 mg/kg、フェンピロキシメートで 3.01~3.10、3.06~3.24 および 3.07~3.18 mg/kg、ペルメトリンで 3.97~4.92、4.80~5.30 および 4.81~5.04 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³⁾。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^{5, 6)}。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、微粉碎試料および粗粉碎試料における 20 g 秤取時の平均濃度に対する各農薬および全農薬での平均相対濃度を図 B-7 に示す。

微粉碎試料および凍結粉碎試料における平均相対濃度は、マラチオンを除き分析試料の秤取重量に関わらず概ね同程度であった。一方で、粗粉碎試料の平均相対濃度は、これら試料よりも低い傾向を示した。粗大な固形物が残る粗粉碎試料で相対濃度が低くなる傾向は、昨年度に実施したトマトでの分析結果とも一致する。マラチオンにおける平均相対濃度は、粗粉碎試料<微粉碎試料<凍結粉碎試料の順で大きくなる傾向を示し、他の農薬と異なる傾向であった。さらに、全農薬で評価した際の平均相対濃度は、微粉碎試料および凍結粉碎試料で概ね同程度であり、粗粉碎試料で低くなる傾向を示した。次に、粗粉碎試料、微粉碎試料および凍結粉碎試料における各農薬の分析値の変動 (RSD 値) を図 B-8 に示す。ペルメトリン以外の農薬における RSD 値は、微粉碎試料および凍結粉碎試料では分析試料の秤取量に関わらず 5%以下と小さかった。粗粉碎試料では、分析試料を 1 または 2 g 秤取した場合に、RSD 値が 5%を超える農薬が見られた。一方で、ペルメトリンは、均質化の程度に関わらず、いずれの秤取量においても RSD 値が大きく、粗粉碎試料および凍結粉碎試料では全ての秤取重量で 5%以上となった。さらに、それぞれの農薬の特性に関わらない包括的な変動評価を実施するために、各農薬の微粉碎試料および粗粉碎試料における 20 g 秤取時の分析値で補正した相対濃度の全薬での変動を算出した (図 B-9)。凍結粉碎法により調製した試料は、常温で均質化した試料と比較して均質性が高くなり、分析値の変動が小さくなるとの報告がある。しかしながら、本研究では全ての秤取量において、凍結粉碎試料の RSD 値が最も大きくなり、試料均質性の向上は認められなかった。この原因の一つとしては、マラチオンでの相対濃度が明らかに大きかったことが影響したと考えられた。また、凍結粉碎法は、トマトやぶどうのような微細な均質化が困難で農薬の残留性が高い果皮を有する作物への適応時において均質性向上が期待される。一方で、ほうれんそうのような植物体の大部分が比較的柔らかい葉で構成され

る葉菜類では常温での均質化で十分に微細な試料が得られ、さらに固形物と液体への明確な分離が生じにくいため均質性の向上効果が明確に認められなかったと考えられる。

1.5. 試料静置の影響

粗粉碎試料および微粉碎試料を1時間静置した後に上層、中層および下層から秤取した試料中の固形物含有率を図 B-10、静置後の各均質化試料の状態を図 B-11 に示す。固形物含有率は、下層<中層<上層の順で高くなり、下層と上層間での差は粗粉碎試料よりも微粉碎試料で大きくなった。また、静置後の均質化試料では、下層に濃い緑色の液相が薄く形成され、液相は粗粉碎試料よりも微粉碎試料で厚くなった。これらの結果より、均質化試料は静置により上部に固形物が、下部に液体が分離することが確認された。粗粉碎試料では粗大な固形物が水分を含有しているため、微粉碎試料よりも均質化試料中の液体画分が少なく、下層に形成される液層が薄くなったと推察される。これらの試料分離傾向は、昨年度試験のトマトと同様であったが、ほうれんそうの方が試料の固相と液相の分離が緩慢であった。

粗粉碎試料および微粉碎試料を1時間静置した後に異なる三層から秤取した分析試料中の濃度を均質化直後の粗粉碎試料および微粉碎試料の20g 秤取試料中濃度で補正した相対濃度を図 B-12、同時点における異なる三層間の平均分析値の変動を図 B-13 に示す。ジノテフラン、イミダクロプリドおよびフェンピロキシメートの相対濃度は、均質化の程度に関わらず上層、中層および下層で概ね同程度となり、三層間の分析値の変動も3%以下と顕著に低かった。したがって、これらの農薬は静置後も均質化試料中に概ね均一に分布していることが確認された。一方で、それ以外の農薬は、下層と比較して、上層および中層で濃度が高くなった。静置後の均質化試料では、上部に固形物が、下部に液体が分布することから、これらの農薬は固形物への分布が多いため上層または中層での農薬濃度が高くなったと推察される。また、いずれの農薬でも各層における相対濃度は、

粗粉碎試料よりも微粉碎試料で低くなった。この傾向は、均質化直後の分析結果と同様であった。さらに、同一層より秤取した分析試料2点の分析値は類似する傾向が見られた。つまり、秤取する層間での相対濃度が異なる場合でも、各層内の農薬濃度は概ね均一であることが示唆された。これらの静置後試料の分析値に関しても、昨年度試験のトマトと同様の傾向を示したが、試料分離が顕著に見られたトマトより、ほうれんそうの方が各層間での分析値の差は小さかった。

1.6. 遠心分離後の沈殿物と上澄み液の比較

よく混和した微粉碎試料の中層から秤取した分析試料を遠心分離により分画した沈殿と上澄み液中の各農薬の存在率を図 B-14 に示す。粗粉碎試料については、遠心分離により試料が分離せず、上澄み液が分取できなかった。粗粉碎試料は、粗大な固形物が水分を内包しているため液体画分が少なかったと考えられる。各画分への分離が可能であった微粉碎試料における沈殿と上澄み液の重量比は40:60であった。ジノテフランおよびイミダクロプリドの存在率は、両画分の重量比と類似しており、上澄み液と沈殿に概ね均等に分布していることを確認した。その他の農薬は沈殿への存在率が上澄み液よりも高くなり、農薬の極性が低くなるほど沈殿への存在率が増加する傾向が確認された。各農薬の n -オクタノール/水分分配係数 ($\log P_{ow}$) と沈殿中の存在率の間には、強い正の相関が確認された (図 B-15)。したがって、ジノテフランやイミダクロプリドのような顕著に極性の高い農薬を除き、農薬は液相より固形物へ分布しやすいことを確認した。1.5項において、ジノテフランおよびイミダクロプリドは静置後の均質化試料中で各層間に均一に分布し、マラチオン、ダイアジノン、フルフェノクスロンおよびペルメトリンは固形物含有率が低く水分が多い下層で低くなったことは、固形物へ農薬が偏在する性質に由来することが示唆された。しかし、フェンピロキシメートについては、遠心分離による分画では固形物への存在率が高かったが、静置後試料中では各層に均一に分布しており、他の農薬

と異なる傾向を示した。均質化試料中における農薬の分布が固形物への偏在性に由来する結果は、ぶどうを用いた報告⁹⁾や昨年度のトマトでの結果と一致する。

1.7. 篩分別後の残渣と通過物の比較

粗粉碎試料を目開き 1 mm の試験篩に通過させた後の篩上残渣および通過物中における各農薬の存在率を図 B-16、両画分での分析値の変動を図 B-17 に示す。篩通過後の残渣および通過物の重量比は 80:20 となり、篩上の残渣には粗大な固形物が、通過物には水分に加えて篩を通過した微細な固形物 (<1 mm) が含まれていた。残渣への各農薬の存在率は、76~85%であり、残渣の重量比率と類似する傾向を示した。つまり、農薬の物理化学的な性状に関わらず、いずれの農薬も残渣と通過物に概ね均等に分布していた。遠心分離後の沈殿と上澄み液への分布においてジノテフラン、イミダクロプリドは同様の傾向を示した。しかし、マラチオン、ダイアジノン、フルフェノクスロン、フェンピロキシメートおよびペルメトリンは固形物を多く含む沈殿画分への存在率が高くなった。しかしながら、篩による分別後の固形物が多い残渣への同様の偏在は見られなかった。ほうれんそうに茎葉散布された農薬は、表面積の大きい葉に多く付着していると推察される。さらに、常温での均質化時には繊維質の茎よりも葉の方が微細になりやすい傾向が観察されていることから、篩分別時に粗粉碎試料中の比較的細くなった葉試料は水分と共に篩を通過したと考えられる。高濃度で農薬が残留する葉部が水分と共に篩通過物に含まれていたことが、篩分別後の各試料中濃度を均一にした要因の一つだと考えられる。一方で、遠心分離後の上澄み液には固形物がほとんど含まれていなかったことから、固形物を多く含む沈殿画分への農薬分布に各農薬の log Pow が顕著に反映されたと考えられる。また、篩により分別したそれぞれの試料における各農薬の分析値の変動は、全ての農薬で通過物よりも残渣で大きくなった。残渣は水分量が少ないため、試料内で農薬が均一に広がらず、秤取した分析試料への

不均一な農薬の取り込みが変動に影響を与えた要因と考えられる。

c 令和 6 年度

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図 C-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表 C-3 に示す。市販品の微粉碎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(表 C-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図 C-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図 C-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°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

ヘラ処理及び流水洗浄処理による篩通過時の様子を図 C-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図 C-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 篩の平均通過率を図 C-6、異なる2名の作業者間の通過率の差を図 C-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(図 C-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名の作業者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(図 C-7)。したがって、一定流速の

流水を用いた処理では作業者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、異なる作業者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^{1, 2)}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表C-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³⁾。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^{4, 5)}。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図C-8に示す。

各農薬における平均相対濃度は、微粉碎試料>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、微粉碎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碎試料>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)を図C-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と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(図C-10)。総平均RSD値は、微粉碎試料<凍結粉碎試料<粗粉碎試料の順に大きくなる傾向を示し、微粉碎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碎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⁹⁾。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(図C-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られられる。

[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砕法の有用性の検証

a 令和4年度

令和3年度厚生労働科学研究「食品や環境からの農薬等の摂取量の推計と国際標準を導入するための研究」の分担課題「検査部位の変更が残留農薬等の検査及び分析結果に及ぼす影響と対処法の検討」では果実を用いて3種類の凍結粉砕法〔液体窒素・凍結方式(B)、ドライアイス・予冷方式(C)及びドライアイス・予備凍結方式(D)〕の操作手順を確立し、試料の粉砕状況を常温磨砕法(A)と比較した。本研究では、果実を用いて確立した方法が畜産物(牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、豚の筋肉、豚の脂肪及び鶏の筋肉)に適用できるか検討を行った。なお、試料の均質性は試料調製法に加え、使用する粉砕機、刃の形状、回転数、粉砕時間、検体量等によって大きく異なることから、本研究では果実の方法を確立する際に用いた以下の条件で行うこととした。

粉砕機： 残留農薬等の検査で汎用されている Robot Coupe BLIXER-3D (回転数 3000 rpm)

運転時間： 120 秒間

検体量： 500 g

検体の大きさ： 約 2.5 cm 角

1. 凍結粉砕法による試料調製法の検討

① 液体窒素を用いた凍結粉砕法(B)

畜産物(牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、豚の筋肉、豚の脂肪及び鶏の筋肉) 500 g を 2.5 cm 角にカットし、液体窒素を加えて凍結させた。凍結に必要な液体窒素量は、果実では 3~4 L であったのに対し、畜産物では 4~5 L 程度であった。いずれの食品も液体窒素に浸して 4 分間放置することにより、中心部まで完全に凍結した。液体窒素で凍結した検体は極めて低温となるため、液体窒素の非存在下で 120 秒間粉砕しても融解は認められなかった。しかし、粉砕直後の試料温度は -55~-38℃ となり、果実(キウイ-69℃)と比べてやや

高かった(表 A-7)。畜産物を液体窒素で凍結すると果実と比べて硬くなるため、粉砕時に熱が発生し、粉砕後の試料温度が高くなったものと考えられた。

② ドライアイスを用いた凍結粉砕法(C及びD)

ドライアイスを用いた凍結粉砕法(C及びD)は、いずれもドライアイスの存在下で粉砕する方法である。投入したドライアイスは粉砕中に昇華し、減少するが、粉砕中にドライアイスが不足した場合、試料温度が上昇し、試料が融解する恐れがある。一方、粉砕時にドライアイスが大過剰投入した場合、粉砕後にドライアイスが昇華させるのに時間を要することに加え、刃と試料が接触しにくくなることにより、試料の均質性の低下を招く。果実の場合は、ドライアイス・予冷方式(C)では検体量の 1.1~1.2 倍量、ドライアイス・予備凍結方式(D)では 0.5~0.6 倍量が適切と考えられた。そこで、ドライアイス・予冷方式(C)では検体量の 1.1 倍量、ドライアイス・予備凍結方式(D)では 0.5 倍量のドライアイスを用いて畜産物を粉砕した。なお、ドライアイス・予冷方式(C)、ドライアイス・予備凍結方式(D)のいずれにおいても粉砕前にドライアイス 100 g を粉砕機に入れて約 10 秒間運転し、粉砕機を冷却することとした。その結果、ドライアイス・予冷方式(C)ではいずれの食品も問題なく、粉砕することができた。一方、冷凍庫で凍結した検体は非常に硬くなるため、ドライアイス・予備凍結方式(D)では粉砕が困難であり、特に豚及び鶏の筋肉では運転中に刃の回転が停止し、粉砕することができなかった。ドライアイス・予備凍結方式(D)で粉砕する場合は粉砕する検体の大きさを 2.5 cm 未満にする必要があると考えられた。表 A-7 に試料調製後の温度を示した。果実ではいずれの食品も約 -78℃ であったが、畜産物では果実よりも若干温度が高い傾向が見られ、畜産物の方が粉砕時に発熱しやすいものと考えられた。これらの結果から、畜産物ではドライアイス・予冷方式(C)は検体量の 1.2 倍量、ドライアイス・予備凍結方式(D)は 0.6 倍量のドライアイスを用いるのが良いと考えられた。

なお、常温磨砕法で畜産物を均質化すると 24～40℃となるため、熱によって分解しやすい農薬等を分析する際は凍結粉砕法で試料調製するのがよいと考えられた。

2. 常温磨砕法との比較

畜産物を常温磨砕した試料及び凍結粉砕後融解した試料はいずれも粘性が高く、粉砕状況を比較するのが困難であった（図 A-21）。そこで、得られた試料を用いて抽出操作を行った後、1 mm のふるいを通し、ふるい上の残渣を比較した。抽出は試料 10.0 g にアセトン 50 mL（1 回）を加えて、ホモジナイズ（1 分間）または振とう（5 分間）により行った。その結果、常温磨砕法よりも凍結粉砕法、振とう抽出よりもホモジナイズ抽出の方が抽出後の残渣の粒子が小さくなる傾向が見られた（図 A-22）。凍結粉砕法同士では大きな差は認められなかった。

b 令和 5 年度

令和 4 年度確立した畜産物の試料調製方法が水産物（あゆ、えび、うなぎ及びさけ）に適用できるか検討を行うこととした。なお、試料の均質性は試料調製法に加え、使用する粉砕機、刃の形状、回転数、粉砕時間、検体量等によって大きく異なることから、本研究では果実や畜産物の方法を確立する際に用いた以下の条件で行うこととした。

粉砕機： 残留農薬等の検査で汎用されている Robot Coupe BLIXER-3D（回転数 3000 rpm）
運転時間： 120 秒間
検体量： 500 g

1. 試料調製方法の検討

あゆ、えび、うなぎ及びさけを 2 cm 角にカットし、各方法で試料調製した。令和 4 年度確立した畜産物の方法と同様に、液体窒素・凍結方式では冷却剤として液体窒素を 4 L、ドライアイス・予冷方式及びドライアイス・予備凍結方式ではドライアイスそれぞれ検体量の 1.2 倍量及び 0.6 倍量用いた。その結果、あゆ及びえびではいずれの方法でも問題なく、粉砕機を運転することができた。一方、うなぎ及びさけではいずれの凍結粉砕

法でも、運転中に刃の回転が停止し、粉砕することができなかった。これは、凍結した検体が刃と粉砕機の壁面・底面の間に挟まることにより、刃が回転できなくなったことが原因と考えられた。そこで、検体の大きさを 1 cm 角としてうなぎ及びさけを凍結粉砕したところ、いずれの方法でも刃の回転が停止することなく、粉砕することができた。昨年度検討した豚や鶏の筋肉についても、ドライアイス・予備凍結方式では検体の大きさを 2.5 cm 角とすると粉砕が困難であった。これらの結果から、畜水産物を粉砕する場合は、1 cm 角以下にカットしてから凍結粉砕するのがよいと考えられた。

表 B-6 に試料調製直後の試料温度を示した。液体窒素・凍結方式では-51～-35℃となった。本方法は、粉砕前に液体窒素で検体を凍結した後、液体窒素の非存在下で 120 秒間粉砕する方法であるが、液体窒素で凍結した検体は極めて低温となるため、粉砕中の融解は認められなかった。しかしながら、果実を液体窒素・凍結方式で粉砕した場合と比べて試料温度がやや高くなった。液体窒素で凍結すると、水産物の方が果実と比べて硬くなるため、粉砕時に熱が発生し、粉砕後の試料温度が高くなったものと考えられた。

ドライアイス・予冷方式ではいずれの食品も-78～-75℃となり、ドライアイスの昇華温度とほぼ一致した。ドライアイス・予備凍結方式ではうなぎやさけは-70℃以下となったが、検体の大きさを 2 cm 角としたあゆ及びえびではそれぞれ-36℃及び-46℃となった。2 cm 角の検体を冷凍庫で凍結すると非常に硬くなり、1 cm 角の検体よりも粉砕時に熱が発生しやすいためと考えられた。なお、常温磨砕法で均質化した場合、試料温度は 24～33℃となったため、熱によって分解しやすい農薬等を分析する際は凍結粉砕法で試料調製するのがよいと考えられた。

2. 各試料調製方法での粉砕状況の比較

粉砕直後の粉砕容器の様子を図 B-18 に示した。凍結粉砕法で調製した試料はいずれの食品もパウダー状になり、均質であるように見えた。しか

し、融解すると、食品によっては粉碎されていない大きい皮や骨等も認められた (図 B-18)。このため、融解後の試料を比較することとした。

あゆ及びえびは試料調製方法間で大きな違いは認められず、1 cm×1 cm 以上の大きな粒子は確認できなかった。一方、うなぎ及びさけでは、いずれの方法でも粉碎されていない 1 cm×1 cm 以上の皮や骨が認められ、常温磨砕法の方が凍結粉砕法よりも大きな皮が見られた。

いずれの試料も粘性が高く、1 cm×1 cm 以上の皮や骨以外を比較するのは困難であった。そこで、得られた試料を用いて抽出操作を行った後、目開き 1 mm のふるいを通し、ふるい上の残渣を比較することとした。抽出は試料 10.0 g にアセトン 50 mL を加えてホモジナイズ (1 分間) または振とう (5 分間) することにより行った。なお、抽出操作はいずれも 1 回とした。その結果、あゆ及びえびでは振とう抽出よりもホモジナイズ抽出の方が抽出後の残渣の粒子が小さくなる傾向が見られた (図 B-19)。また、えびでは常温磨砕法より凍結粉砕法の方が残渣の粒子が小さくなる傾向が見られた。一方、あゆでは抽出法 (ホモジナイズ/振とう) や試料調製法 (常温磨砕法/凍結粉砕法) による大きな差は認められなかった。うなぎ及びさけを凍結粉砕した試料では、振とう抽出後も 1 cm×1 cm 以上の大きい皮が見られた。また、凍結粉砕した試料をホモジナイズ抽出したところ、ポリトロン刃の刃に皮等が絡まって回転が途中で停止し、操作が困難であった。常温磨砕した試料では、抽出時に刃の回転が停止することなく、ホモジナイズを行うことができたが、大きな皮は細くならなかった。常温磨砕した試料で、ホモジナイズ抽出の際に回転が停止しなかったのは、凍結粉砕した試料よりも皮が大きいため、ポリトロン刃の刃に絡まりにくかったためと考えられた。これらの結果から、うなぎ及びさけは凍結粉砕法、常温磨砕法のいずれも、均質化が不十分と考えられた。試料粒子の大きさは抽出効率や分析値のばらつきに大きく影響する可能性がある。このため、常温磨砕法、凍結粉砕法のいずれも粉砕時間を長

くする等により、均質性をさらに向上させる必要があると考えられた。

c 令和 6 年度

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。検討対象化合物は表 C-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。結果を表 C-6 及び図 C-13～図 C-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°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。牛の筋肉の結果を図 C-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。

牛の肝臓の結果を図 C-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。

豚の肝臓の結果を図 C-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 (表 C-7 及び表 C-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。牛の肝臓の結果を図 C-19 及び表 C-7、豚の肝臓の結果を図 C-20 及び表 C-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 (表 C-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 (表 C-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 (図 C-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トマト、ホウレンソウ、ブロッコリーを用いて試料の均質化状態が分析結果に与える影響を検討した。その結果、均質化が不十分で粗大な固形物を多く含む試料では分析値が相対的に低くなった。特にマラチオンでは、粗粉砕試料の方が微粉砕試料と比較して顕著に低くなった。この傾向は、いずれの作物においても見られたことから、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。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、残留濃度の過小評価リスクを招くことが示唆された。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 (図 C-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。加えて、いずれの作物においても微細に均質化した試料の約 90%が目開き 1 mm の篩を通過することが確認されたこと

から、均質化状態の客観的な評価方法として「目開き 1 mm の篩に負荷した際の通過率」を指標とする手法を提案し、「通過率 90%以上」を十分微細に均質化された試料の目安と位置付けた。

[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

畜水産物を対象に、凍結粉碎による試料調製法を確立した。凍結粉碎法の方が、常温磨砕法よりも試料粒子が細くなる傾向が見られた。ただし、うなぎ等の一部の魚種では、凍結粉碎法で試料調製を行っても皮や骨の均質化が不十分となる課題も認められた。

凍結粉碎法による試料調製中の農薬等の減少抑制効果を検証するため、検体に農薬を添加し、常温磨砕法及び凍結粉碎法で試料調製を行って回収率を比較した。その結果、牛及び豚の肝臓では、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。

E. 参考文献

- 1) 飼料の公定規格：
<http://www.famic.go.jp/ffis/feed/kokuji/k51n756.html>
(2023年2月28日閲覧)
- 2) 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)
- 3) D. J. MacLachlana and D. Hamiltonb: Pest Manag Sci. 67、609–615 (2011) .
- 4) S. J. Lehotay、 and J.M. Cook: J. Agric. Food Chem.、63、4395-4404 (2015) .
- 5) 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) .
- 6) S. Hikino、 T. Yajima、 M. Sakasai、 D. Kobayashi、 K. Iijima and K. Ohyama: J. Pestic. Sci. 44、162–170 (2019) .
- 7) 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).
- 8) 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)
- 9) 文部科学省：日本食品標準成分表 2020 年版 (八訂)

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. 志田（齊藤）静夏：残留農薬等分析における試料調製について．第 59 回全国衛生化学技術協議会年会（2022 年 11 月 1 日）
2. 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（2022 年 11 月 24 日）
3. 曳埜忍、島田京佳、矢島 智成、飯島和昭、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トマトを用いた調査～．日本食品衛生学会 第 119 回学術講演会（2023 年 10 月 12 日）
4. 志田（齊藤）静夏：残留農薬検査における課題と展望－検査部位の国際整合化、試料調製法及び抽出法について－．第 21 回食品安全フォーラム（2023 年 12 月 8 日）
5. 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 年 11 月 11 日）
6. 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）

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 A-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
マラソン乳剤	マラチオン (MAL)	50	2000
オンリーワンフロアブル	テブコナゾール (TEB)	20	2000
フェニックス顆粒水和剤	フルベンジアミド (FLB)	20	2000
アプロードエースフロアブル	ブプロフェジン (BUP)	20	1000
アプロードエースフロアブル	フェンピロキシメート (FEN)	4	1000
アディオン乳剤	ペルメトリン (PEL)	20	2000

表 A-2. 測定条件 (高速液体クロマトグラフ)

カラム	ACQUITY UPLC BEH C18 (Waters 製) 内径 2.1 mm、長さ 100 mm、粒径 1.7 μm
移動相	5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 / 5 mmol/L 酢酸アンモニウム含有メタノール溶液 (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	10 μL
保持時間	ジノテフラン : 約 2.5 min、マラチオン : 約 5.5 min、 テブコナゾール : 約 5.9 min、フルベンジアミド : 5.7 min、 ブプロフェジン : 約 6.4 min、フェンピロキシメート : 約 6.7 min、 ペルメトリン : 約 7.1 および 7.3 min

表 A-3. 測定条件 (質量分析計)

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、テブコナゾール、 ブプロフェジン、フェンピロキシメート、 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	N ₂
イオン検出法	MRM 法

表 A-4. 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 (<i>m/z</i>)	プロダクトイオン (<i>m/z</i>)
ジノテフラン	51	17	10	203.1	129.1
マラチオン	44	17	6	331.0	127.1
テブコナゾール	41	39	6	308.1	70.1
ブプロフェジン	46	21	6	306.2	116.2
フェンピロキシメート	96	23	6	422.2	366.0
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

表 A-5. 妥当性の確認結果

分析対象農薬	平均回収率 (%) [RSDr (%)]		
	0.01 mg/kg 添加	0.5 mg/kg 添加	1 mg/kg 添加
ジノテフラン	87 [3]	103 [2]	100 [2]
マラチオン	102 [4]	98 [8]	105 [2]
テブコナゾール	93 [5]	100 [1]	103 [2]
フルベンジアミド	94 [2]	104 [3]	105 [4]
ブプロフェジン	94 [1]	98 [2]	103 [2]
フェンピロキシメート	95 [3]	100 [3]	102 [2]
ペルメトリン	89 [5]	88 [6]	97 [2]

n = 5

表 A-6. 各試料秤取量での微粉碎試料および粗粉碎試料の分析値に対する Mann-Whitney の U 検定結果

	試料秤取量 (g)				
	20	10	5	2	1
ジノテフラン	○	×	×	×	×
マラチオン	×	×	×	×	×
テブコナゾール	○	○	×	×	○
フルベンジアミド	○	○	×	○	○
ブプロフェジン	○	○	×	×	×
フェンピロキシメート	×	×	○	×	○
ペルメトリン	○	○	○	×	○
No. of ×	2	3	5	6	3

× : 有意差あり (p<0.05)、○ : 有意差なし

図 A-1. 作物写真

図 A-1.1. 無処理区



図 A-1.2. 処理区 (受領試料の半量)



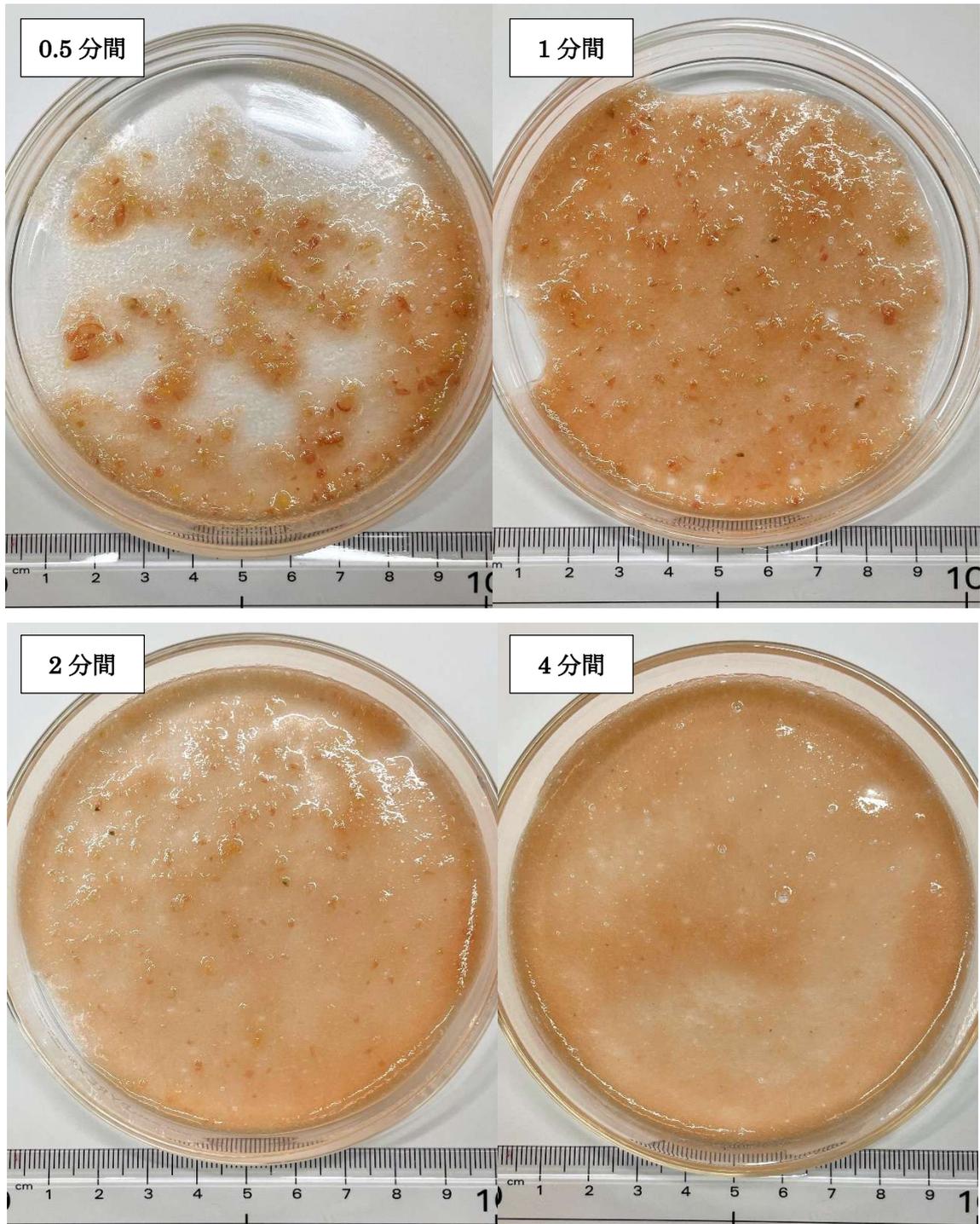


図 A-2. ミキサーの稼働時間別のトマト均質化状態

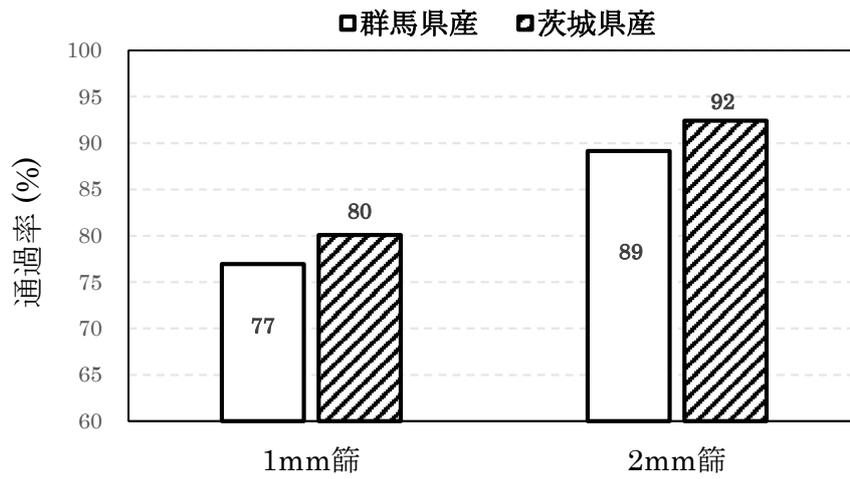


図 A-3. 目開きの異なる篩における粗粉碎試料の通過率

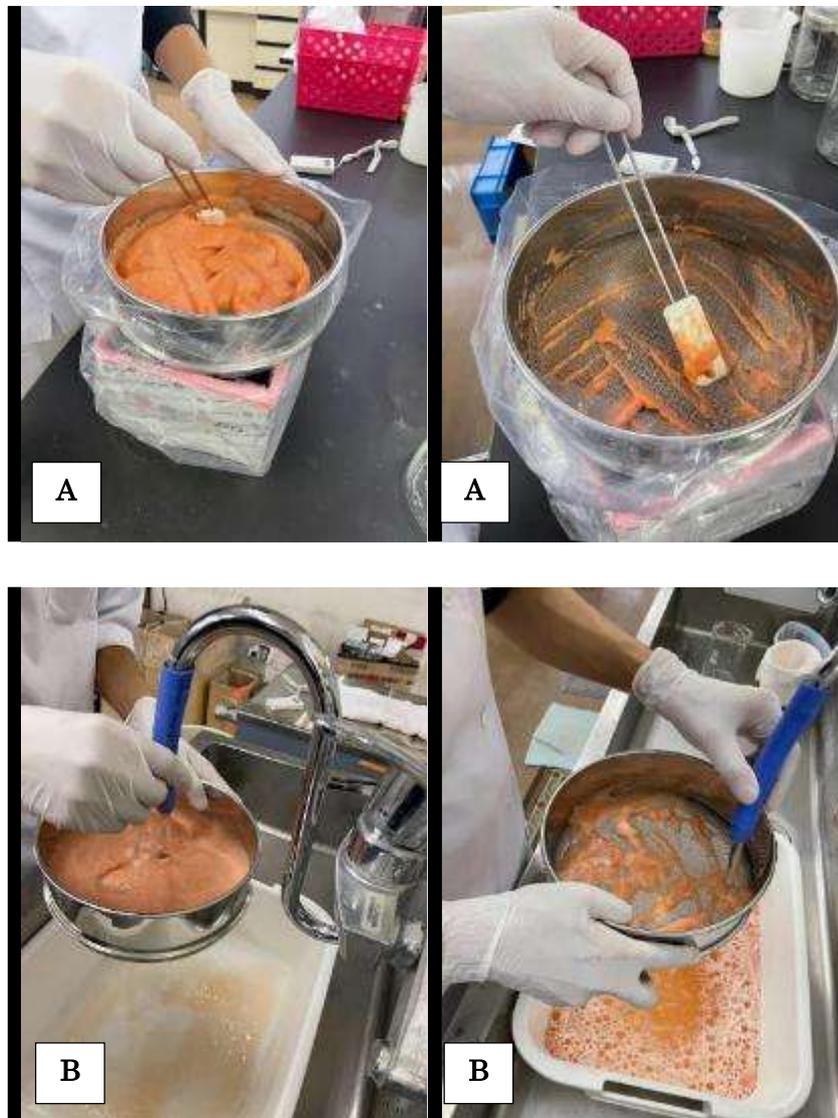


図 A-4. ヘラ処理および流水洗浄処理による篩通過時の様子
(A：ヘラ処理、B：流水洗浄処理)

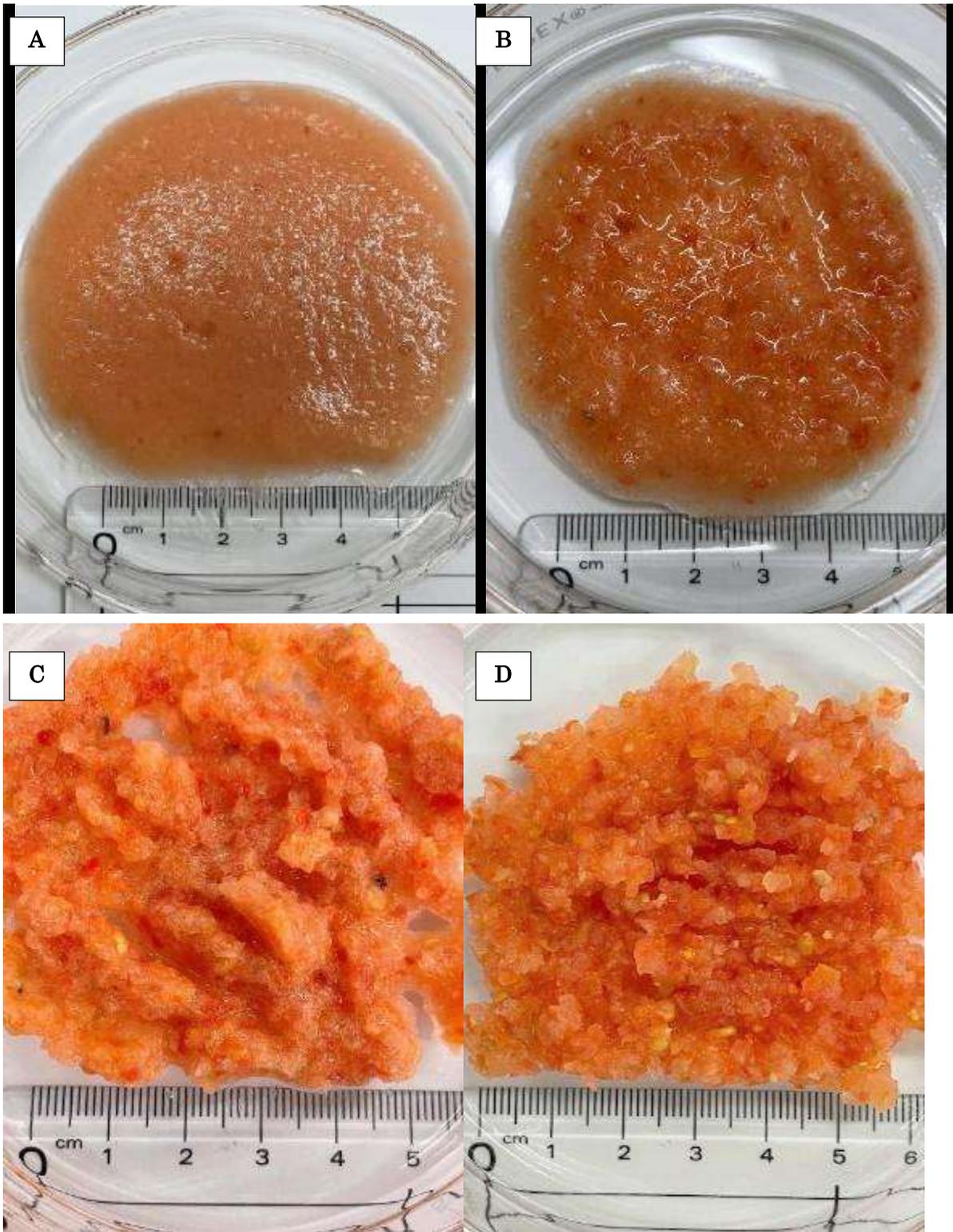


図 A-5. 篩の通過前後における均質化試料の状態

(A：篩通過前の微粉碎試料、B：篩通過前の粗粉碎試料、C：ヘラ処理後における粗粉碎試料の篩上残渣、D：流水洗浄処理後における粗粉碎試料の篩上残渣)

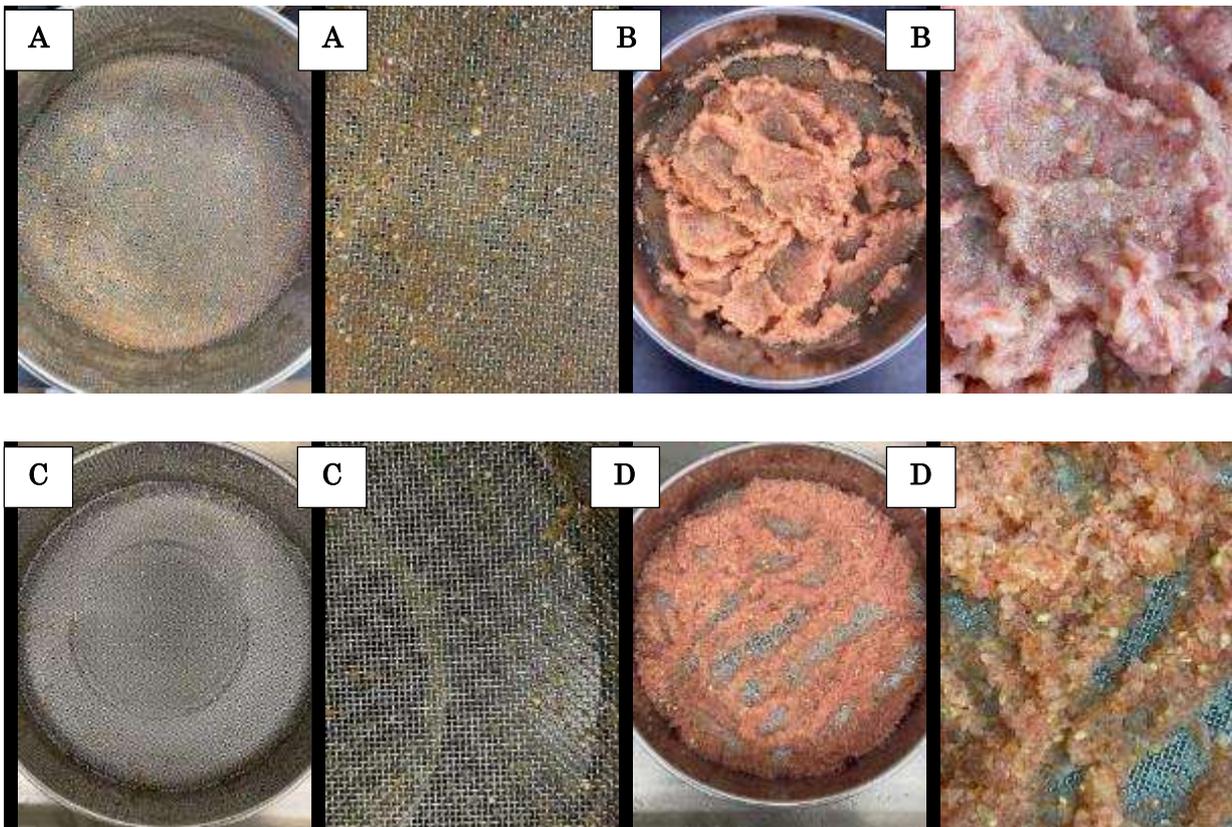


図 A-6. ヘラ処理および流水洗浄処理後における篩上試料の状態

(A : 微粉碎試料のヘラ処理、 B : 粗粉碎試料のヘラ処理、
C : 微粉碎試料の流水洗浄処理、 D : 粗粉碎試料の流水洗浄処理)

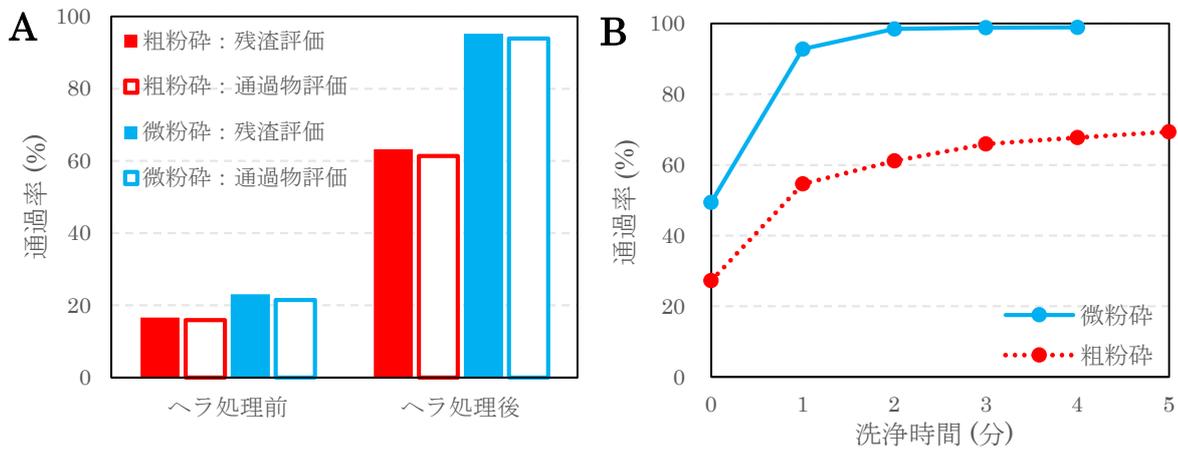


図 A-7. ヘラ処理および流水洗浄処理における目開き 1 mm 篩の通過率

(A : ヘラ処理、 B : 流水洗浄処理)

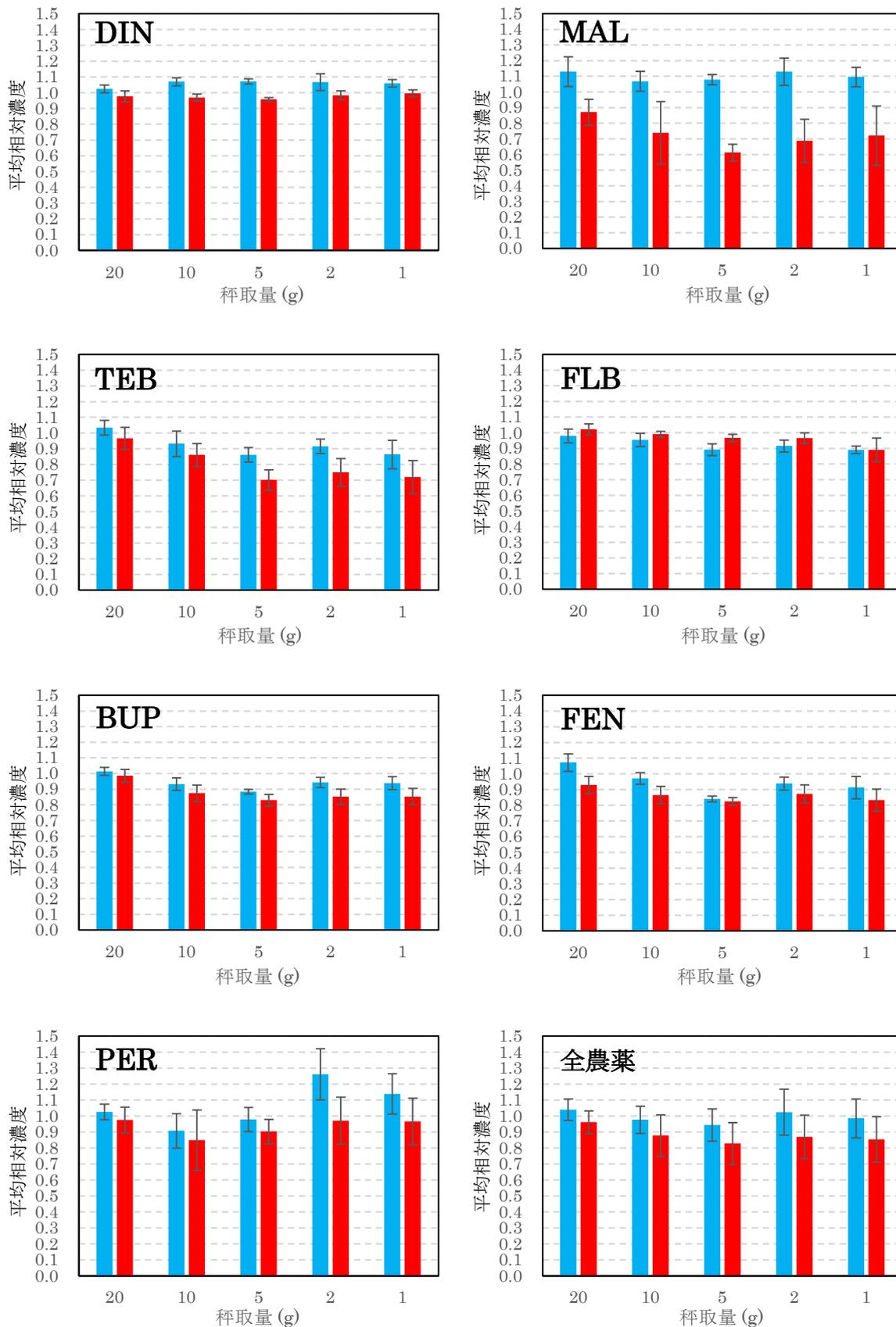


図 A-8. 各農薬および全農薬での平均相対濃度

(検体 20 g 秤取時の平均濃度に対する相対濃度、■：微粉碎試料、■：粗粉碎試料)

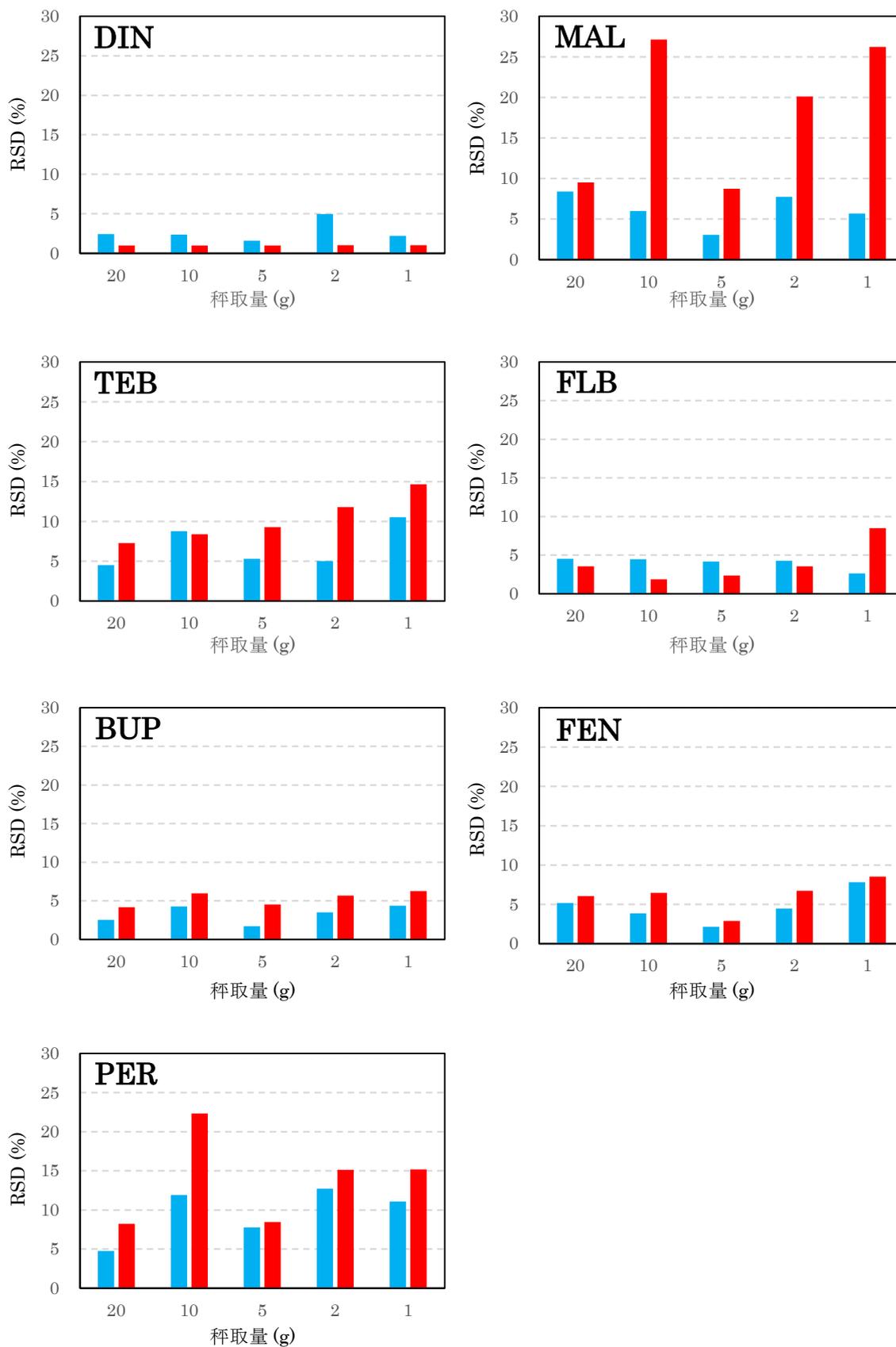


図 A-9. 各農薬における分析値の変動
 (■ : 微粉碎試料、■ : 粗粉碎試料)

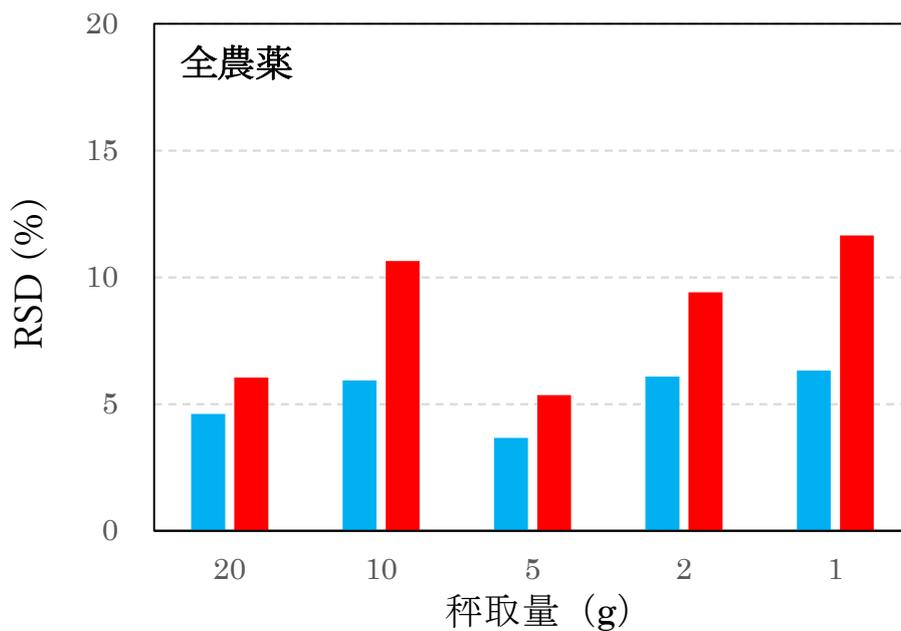


図 A-10. 農薬別の分析値変動の総平均

(■ : 微粉碎試料、■ : 粗粉碎試料)

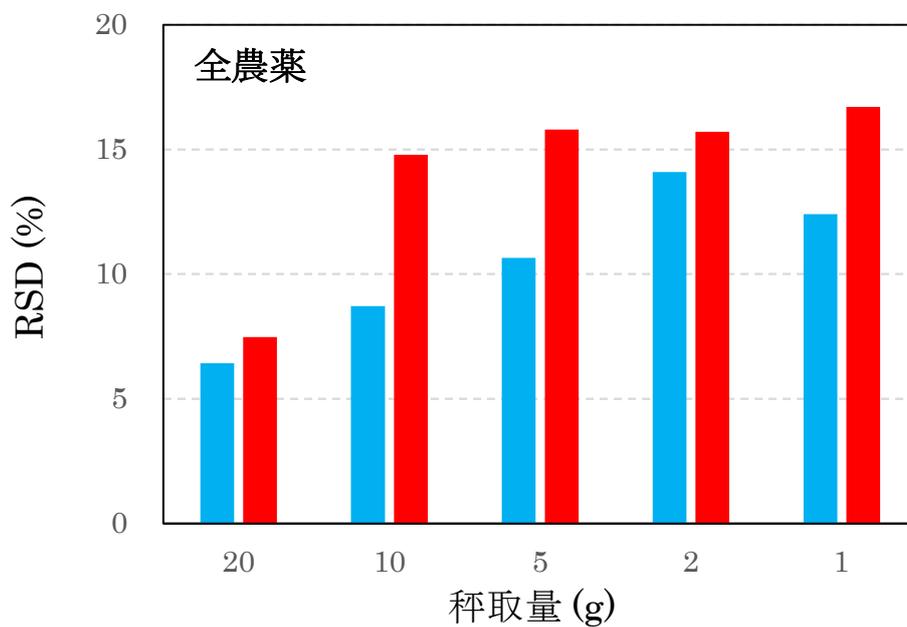


図 A-11. 各農薬における相対濃度の全農薬での変動

(検体 20 g 秤取時の平均濃度で補正した相対濃度、■ : 微粉碎試料、■ : 粗粉碎試料)

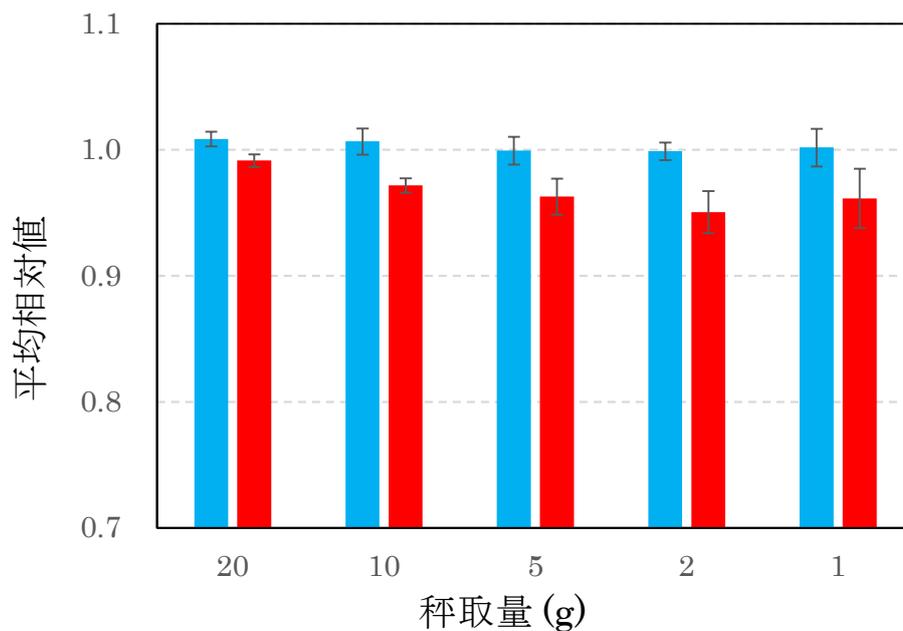


図 A-12. 固形物含有率の平均相対値

(検体 20 g 秤取時の平均固形物含有率に対する相対値、■：微粉碎試料、■：粗粉碎試料)

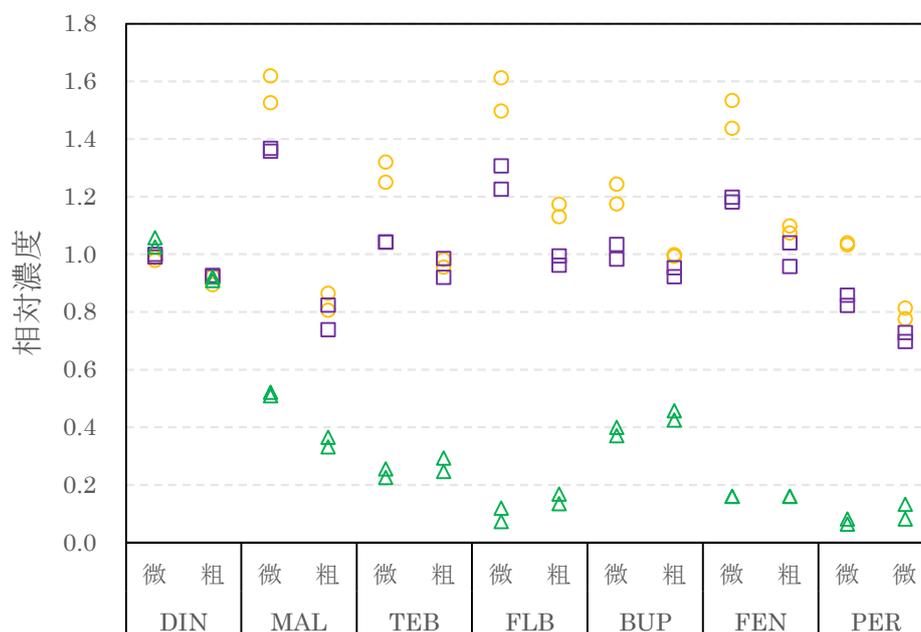


図 A-13. 異なる三層における相対濃度

(均質化直後の検体 20 g 秤取試料中濃度で補正した相対濃度、
微：微粉碎試料、粗：粗粉碎試料、○：上層、□：中層、△：下層)

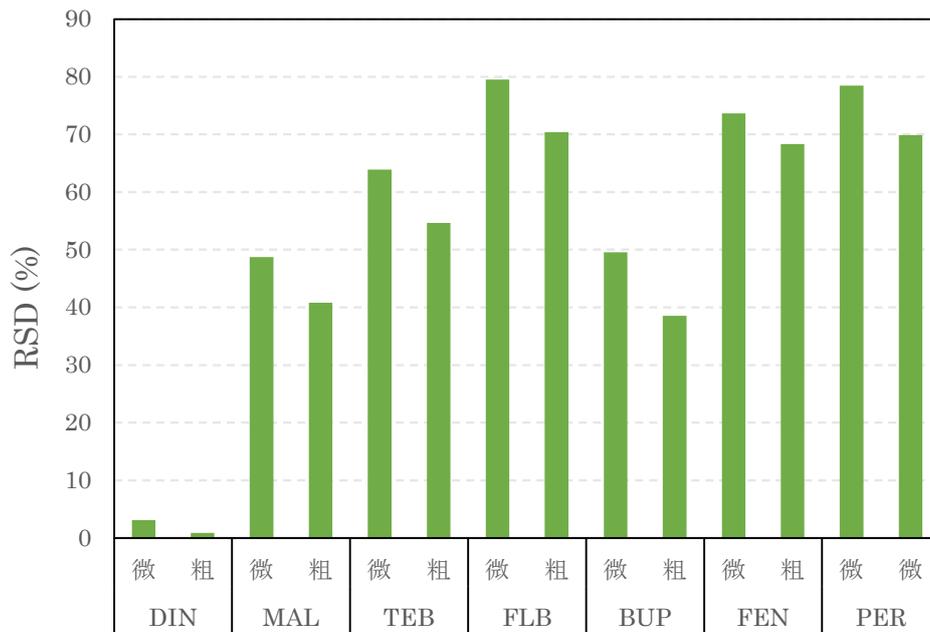


図 A-14. 異なる三層における平均分析値の変動
(微：微粉碎試料、粗：粗粉碎試料)

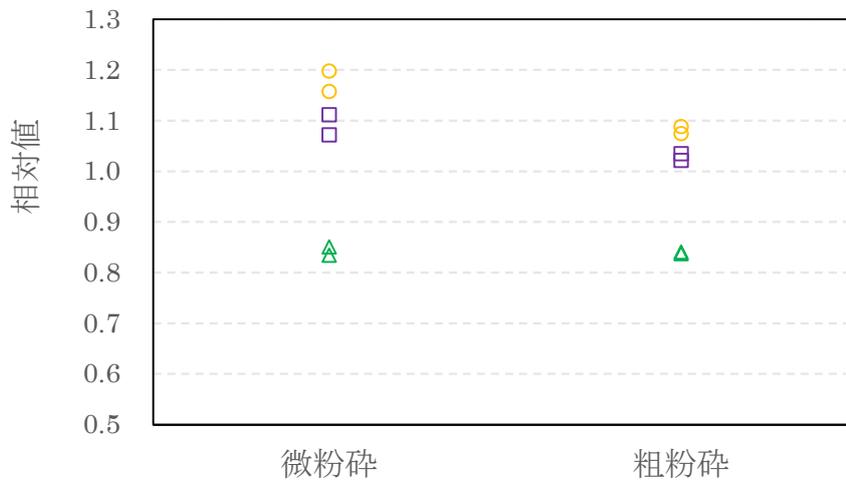


図 A-15. 異なる三層における固形物含有率の相対値
(均質化直後の検体 20 g 秤取試料中の固形物含有率で補正した相対値、
○：上層、□：中層、△：下層)

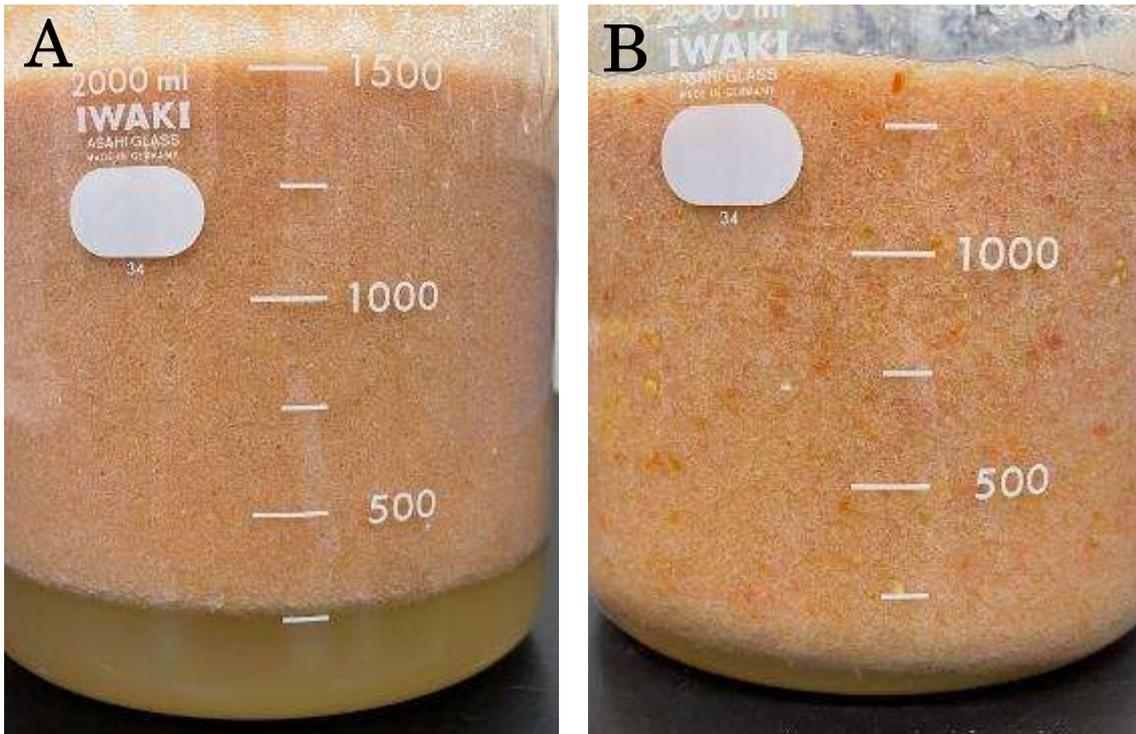


図 A-16. 均質化試料を 1 時間静置した後の状態
(A : 微粉碎試料、B : 粗粉碎試料)

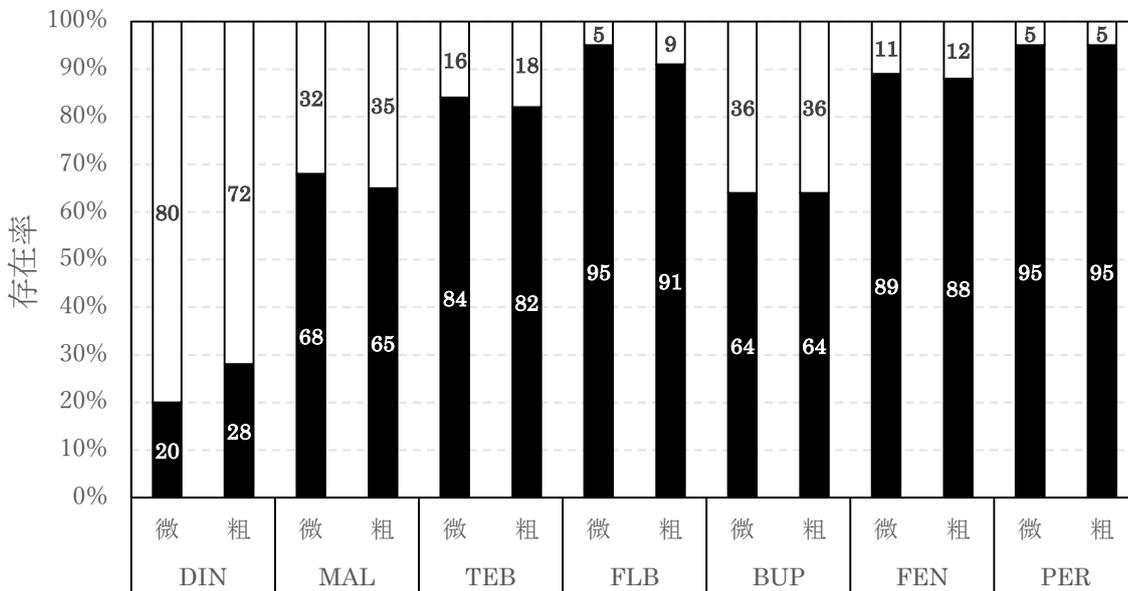


図 A-17. 遠心分離により分画した沈殿と上澄み液中の農薬存在率
(微：微粉碎試料、粗：粗粉碎試料、■：沈殿、□：上澄み液)

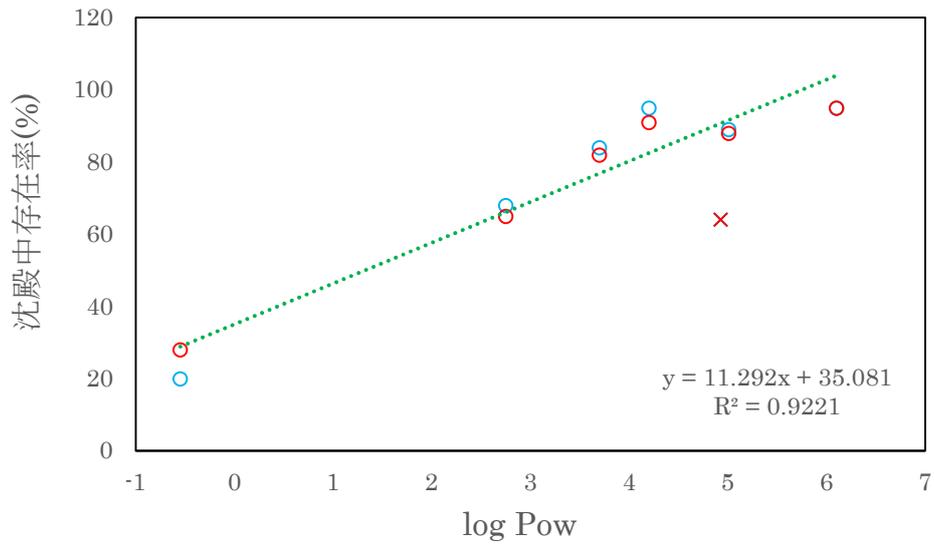


図 A-18. 各農薬の極性と沈殿中存在率の関係

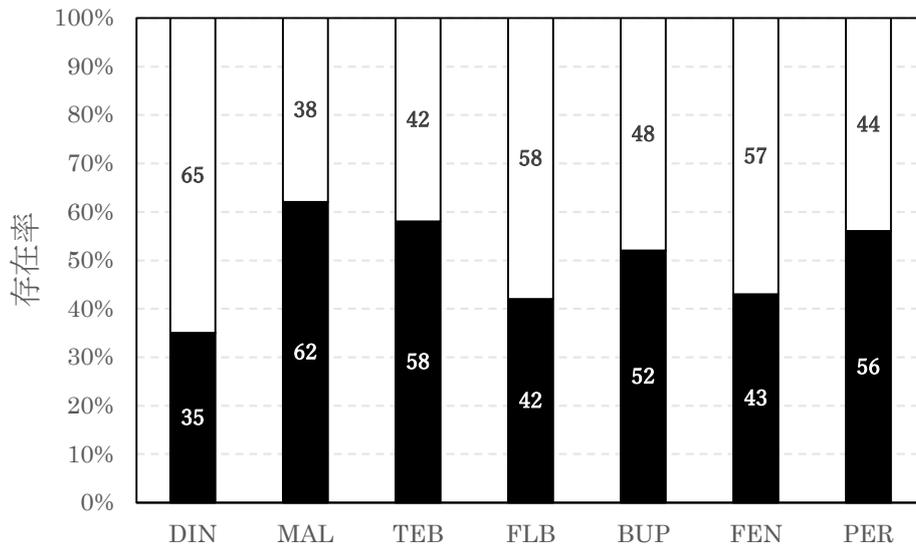


図 A-19. 粗粉碎試料を目開き 1 mm の試験篩に通過させた後の篩上残渣および通過物中における各農薬の存在率 (■：篩上残渣、□：通過物)

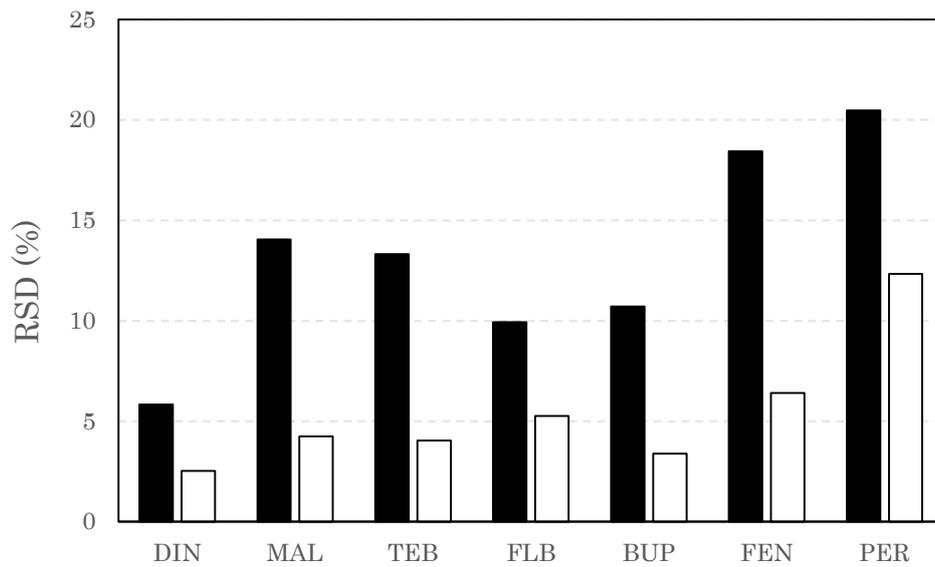


図 A-20. 粗粉碎試料を目開き 1 mm の試験篩に通過させた後の篩上残渣および通過物中における各農薬の分析値変動 (■：篩上残渣、□：通過物)

無処理区



処理区



図 B-1. 作物写真

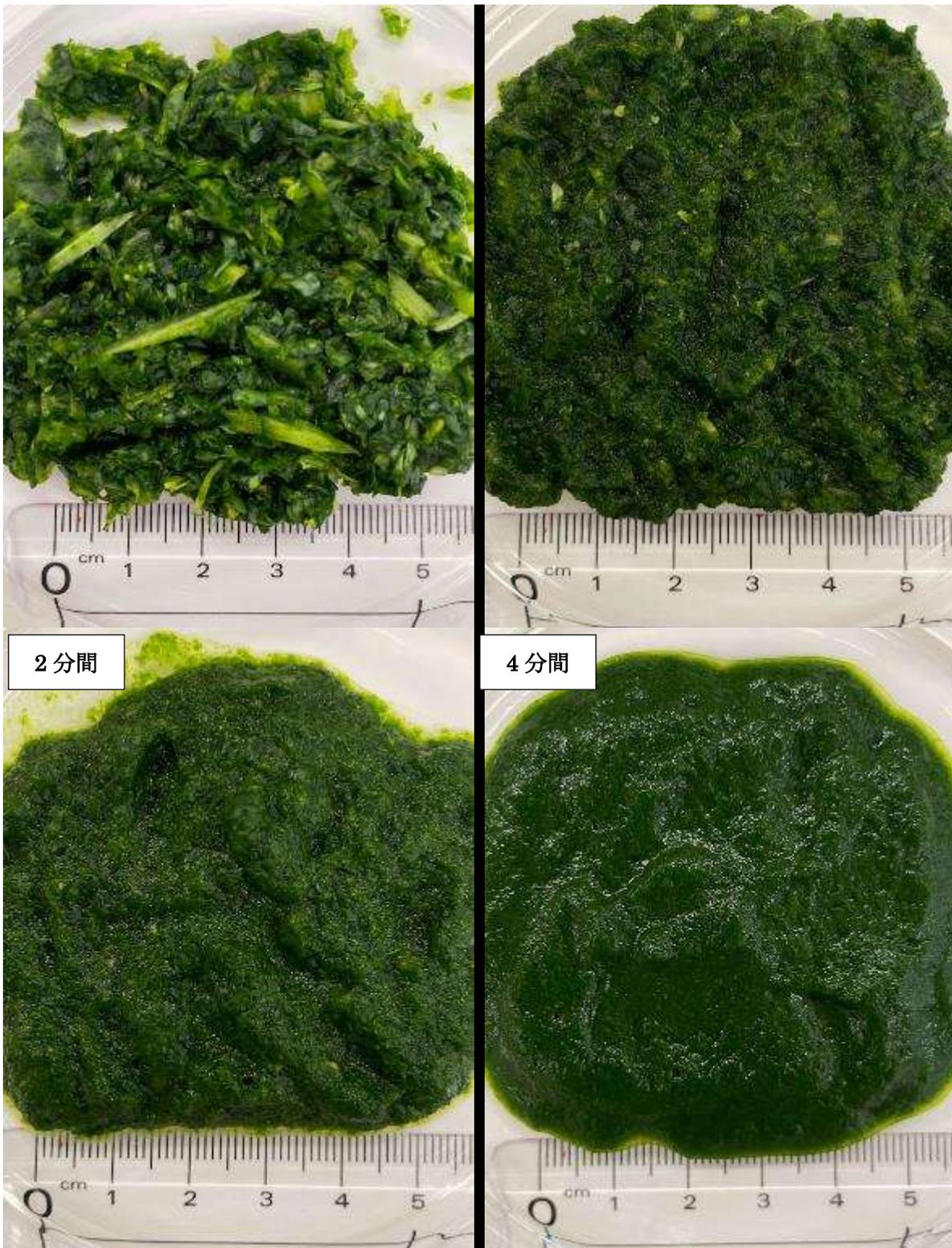


図 B-2. 常温でのミキサー稼働時間別のほうれんそう均質化状態



図 B-3. 凍結粉碎試料の解凍時における状態



図 B-4. ヘラ処理 (左) および流水洗浄処理 (右) による篩通過時の様子

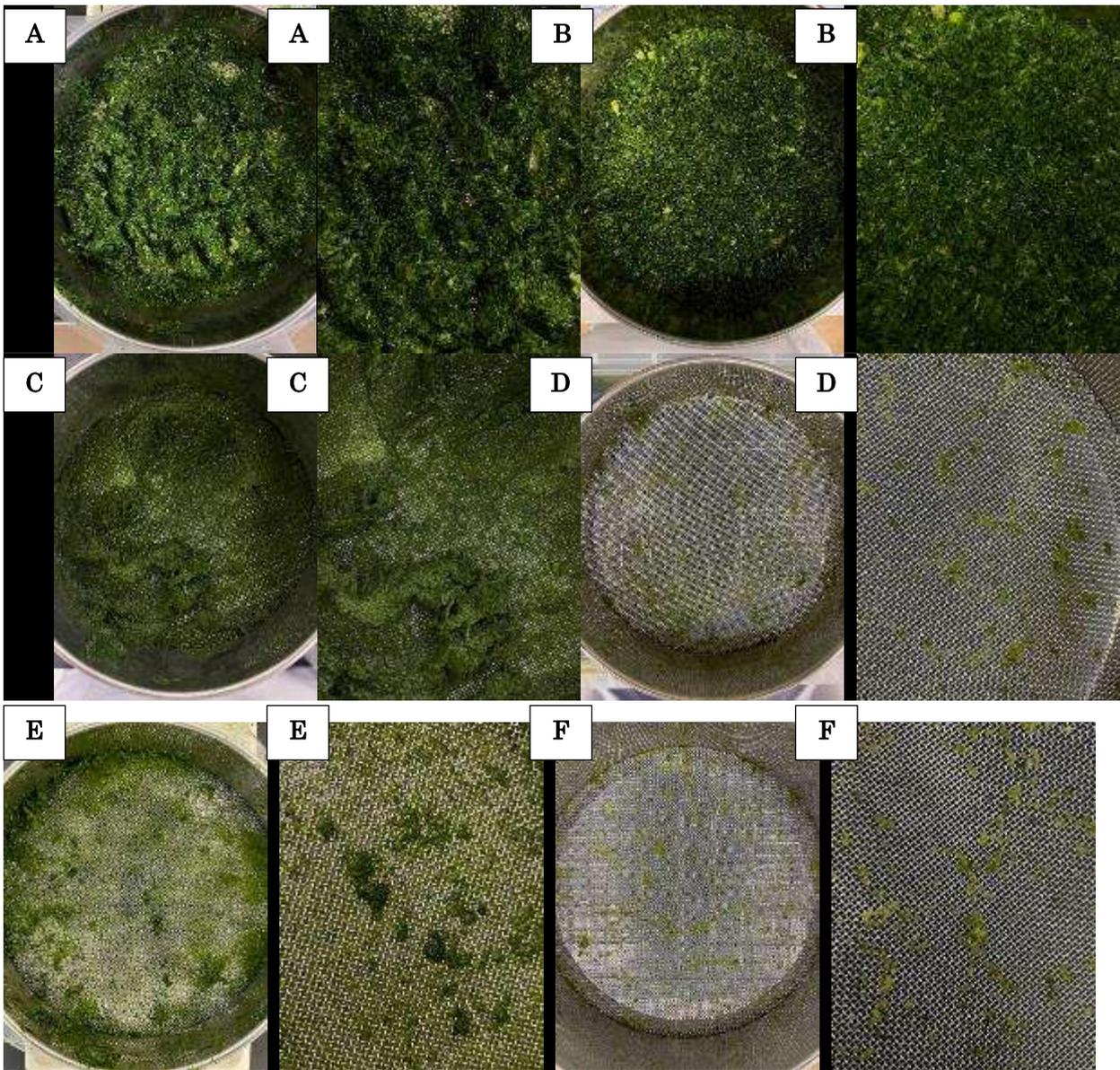


図 B-5. ヘラ処理および流水洗浄処理後における篩上試料の状態

(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)

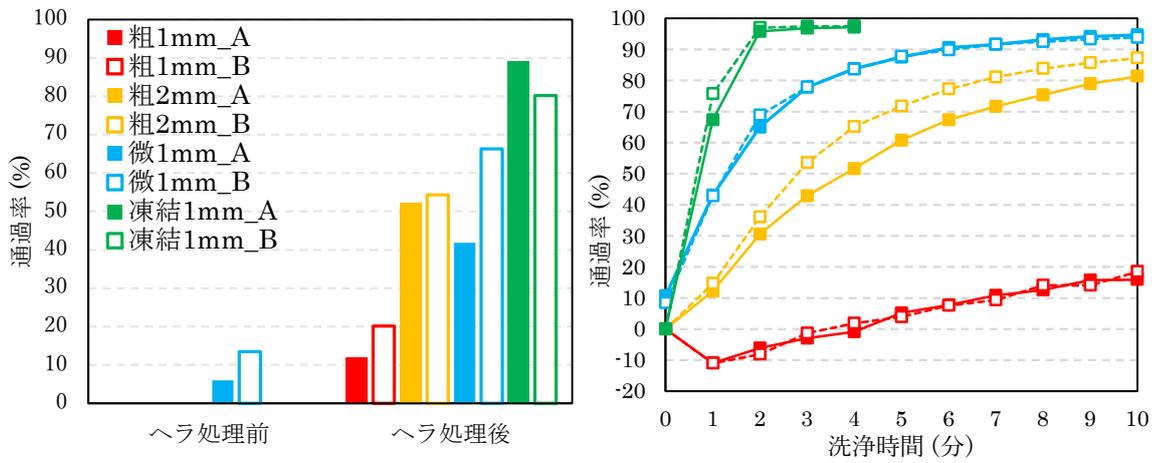


図 B-6. ヘラ処理時 (左) および流水洗浄処理時 (右) の篩通過率

(粗：粗粉碎試料、微：微粉碎試料、1 mm：目開き 1 mm 篩、2 mm：目開き 2 mm 篩、A：作業者 A、B：作業者 B)

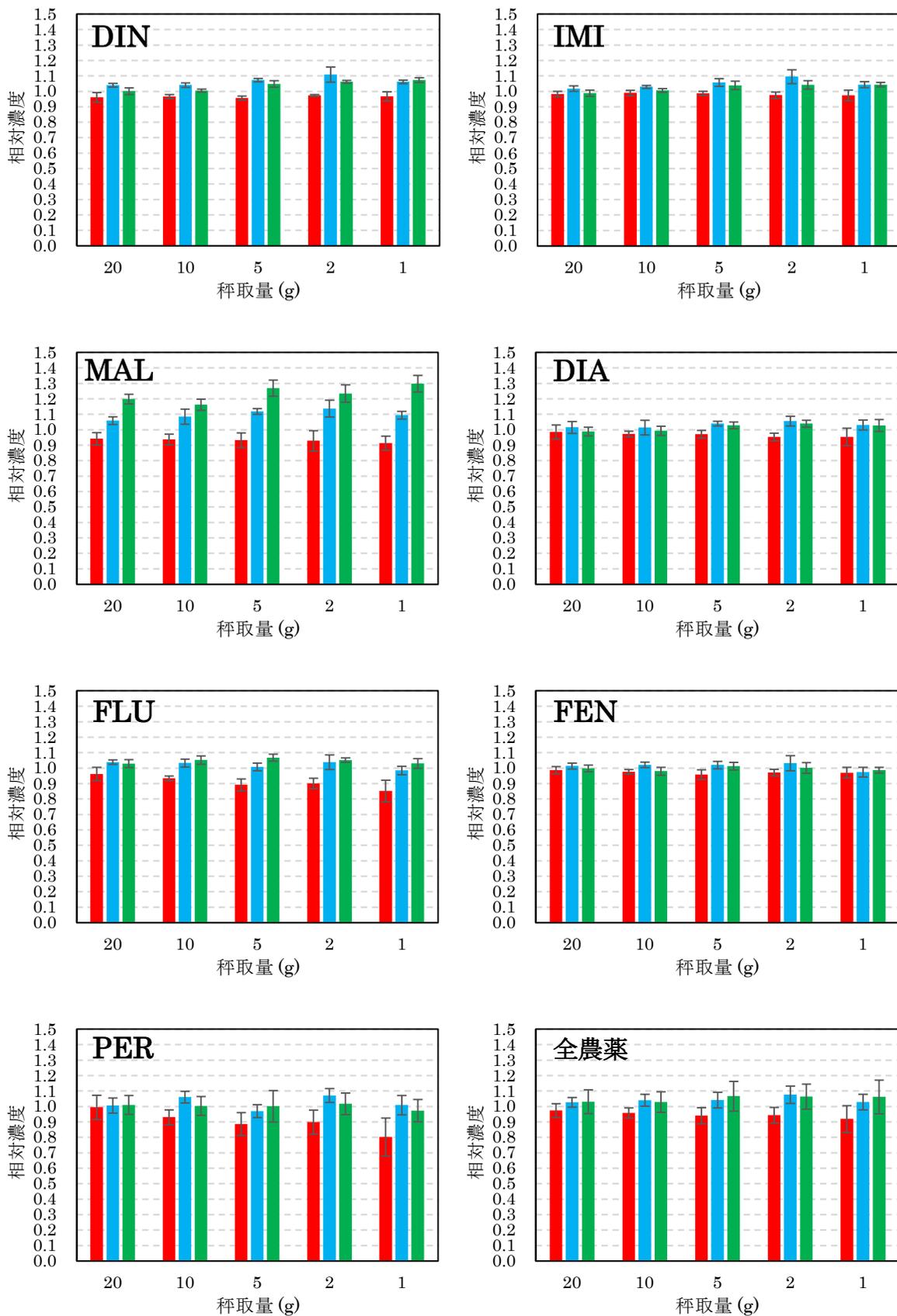


図 B-7. 各農薬および全農薬での平均相対濃度

(粗粉碎試料および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)

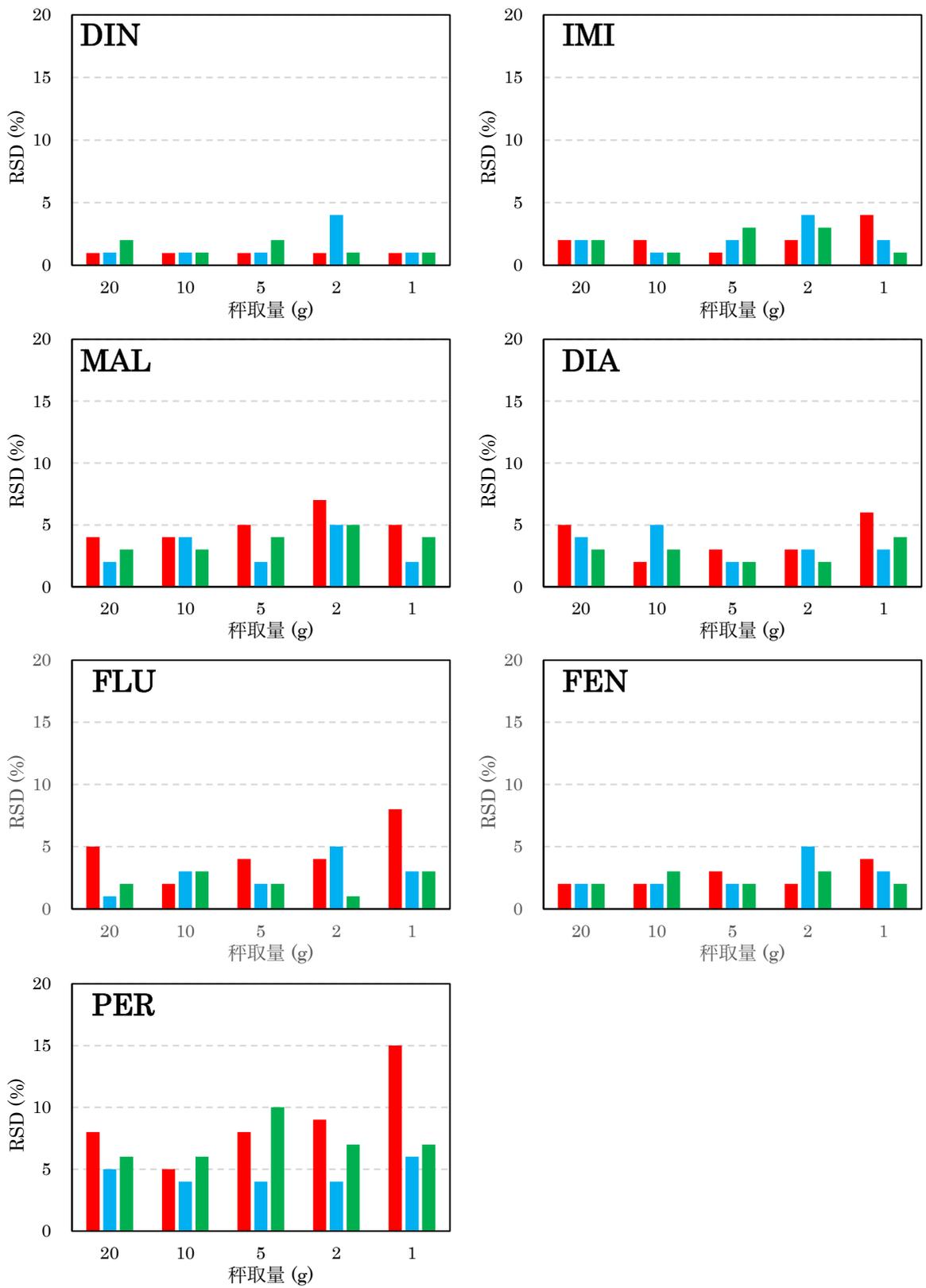


図 B-8. 各農薬における分析値の変動

(■ : 粗粉碎試料、■ : 微粉碎試料、■ : 凍結粉碎試料)

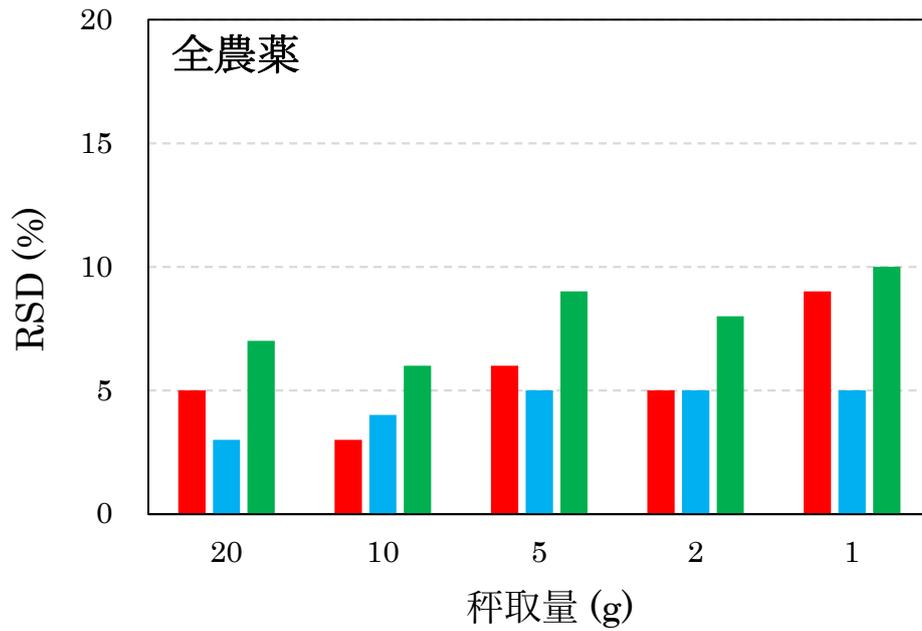


図 B-9. 各農薬における相対濃度の全農薬での変動
 (粗粉碎試料および微粉碎試料における 20 g 秤取時の平均濃度で補正した相対濃度、
 ■ : 粗粉碎試料、■ : 微粉碎試料、■ : 凍結粉碎試料)

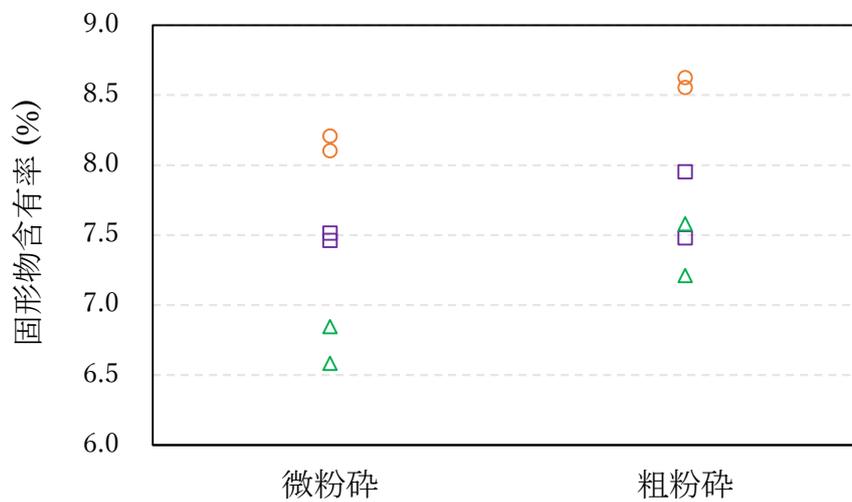


図 B-10. 試料を 1 時間静置後に異なる三層から秤取した試料における固形物含有率
 (○ : 上層、□ : 中層、△ : 下層)

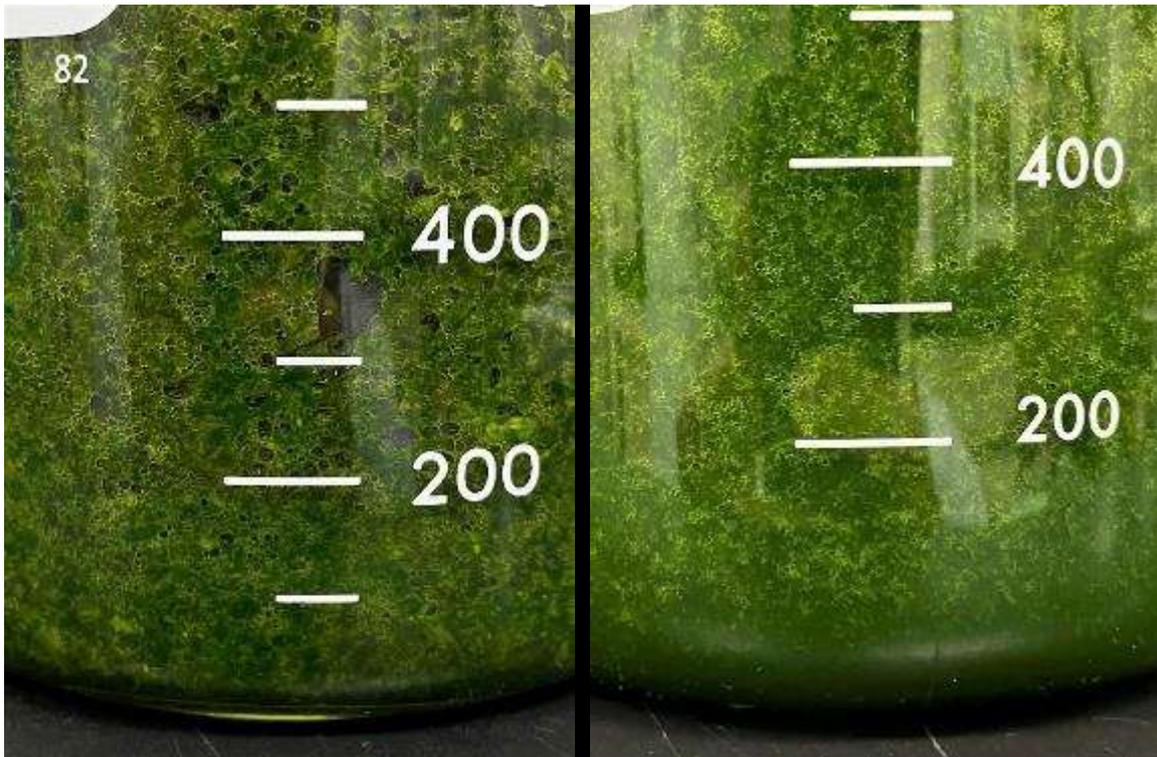


図 B-11. 均質化試料を 1 時間静置した後の状態
(左：粗粉碎試料、右：微粉碎試料)

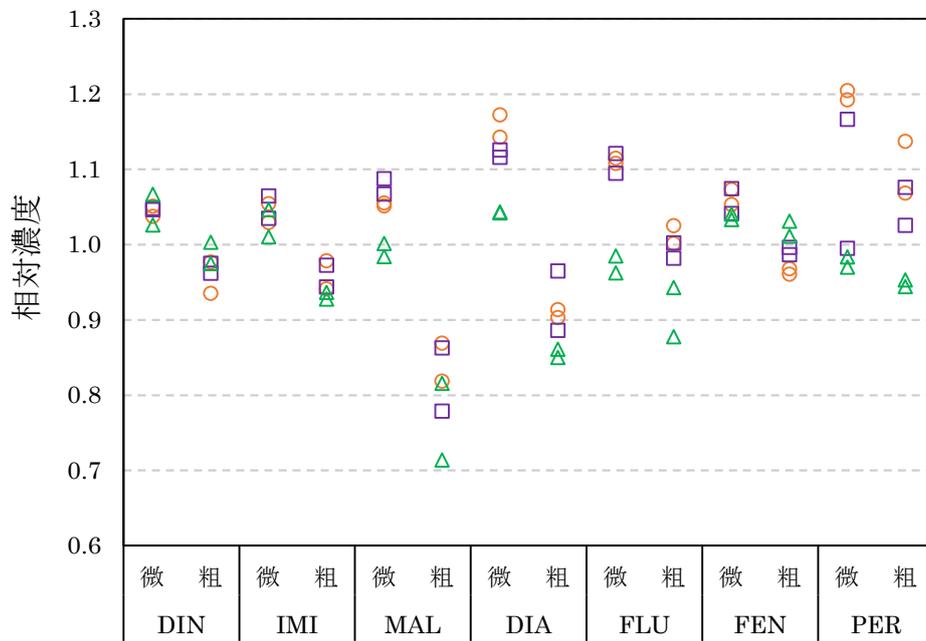


図 B-12. 異なる三層における相対濃度

(均質化直後における粗粉碎試料および微粉碎試料の 20 g 秤取試料中濃度で補正した相対濃度、微：微粉碎試料、粗：粗粉碎試料、○：上層、□：中層、△：下層)

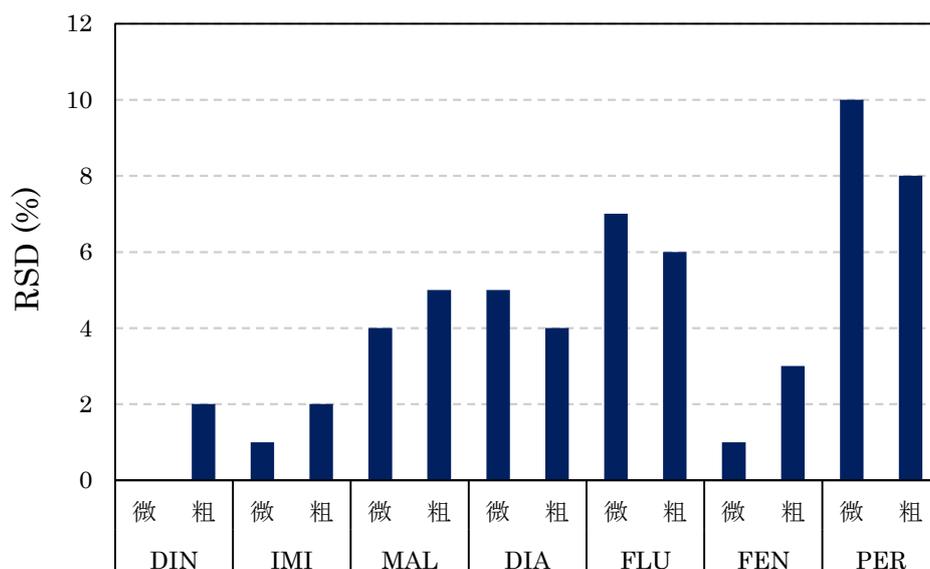


図 B-13. 異なる三層における平均分析値の変動
(微：微粉砕試料、粗：粗粉砕試料)

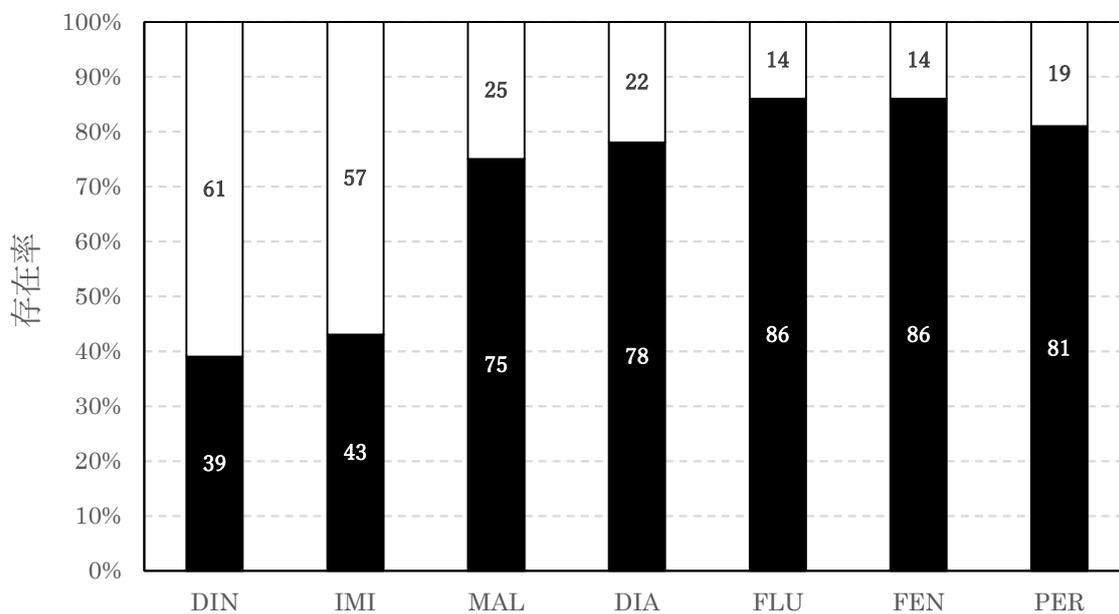


図 B-14. 微粉砕試料を遠心分離により分画した沈殿と上澄み液中の農薬存在率
(■：沈殿、□：上澄み液)

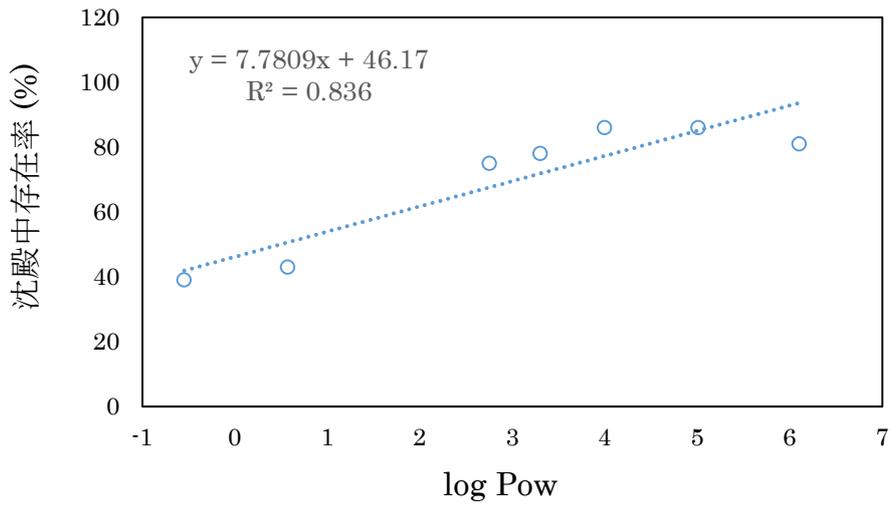


図 B-15. 各農薬の極性と沈殿中存在率の関係

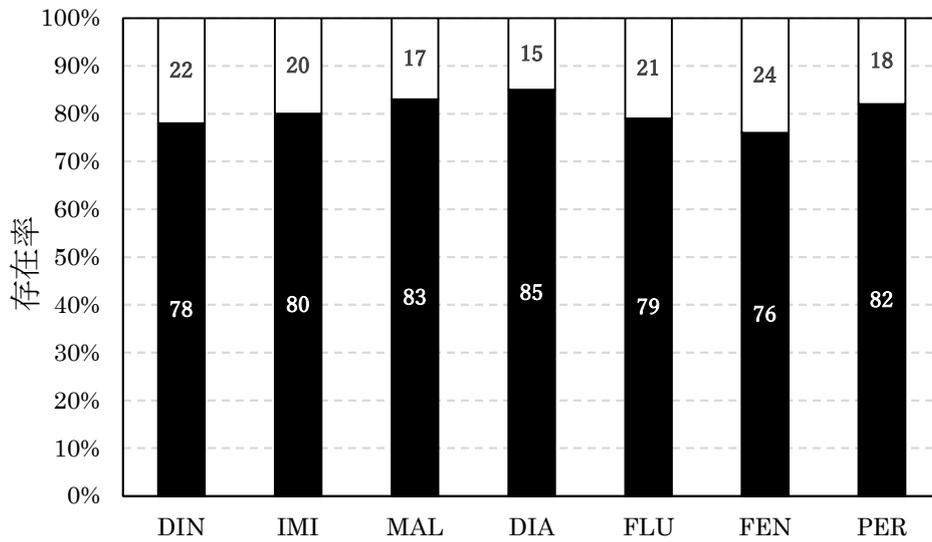


図 B-16. 粗粉碎試料を目開き 1 mm の試験篩に通過させた後の篩上残渣および通過物における各農薬の存在率 (■：篩上残渣、□：通過物)

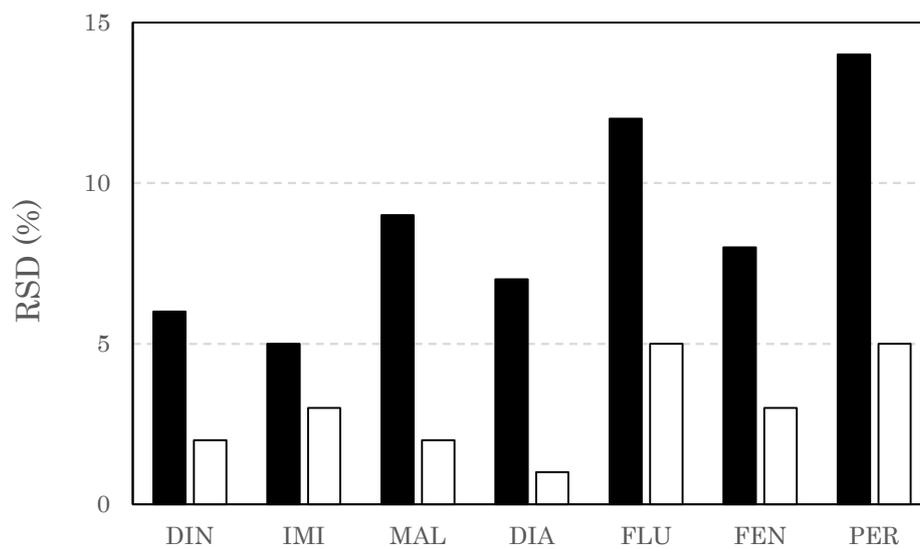


図 B-17. 粗粉碎試料を目開き 1 mm の試験篩に通過させた後の篩上残渣および通過物中における各農薬の分析値変動 (■：篩上残渣、□：通過物)

表 B-1 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 (<i>m/z</i>)	プロダクト イオン (<i>m/z</i>)
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
フェンピロキシメート	96	23	6	422.2	366.0
ペルメトリン	51	27	8	407.9	183.1

表 B-2 真度および精度の評価基準

添加濃度 (mg/kg)	平均回収率 (%)	併行相対標準偏差 (%)
0.01 以下	60~120	30
0.01 超~0.1 以下	70~120	20
0.1 超~1.0 以下	70~110	15
1.0 超	70~110	10

表 B-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	FEN	PER
0.01 ^a	104 [4]	97 [6]	97 [6]	97 [8]	91 [5]	84 [5]	88 [4]
0.5 ^a	110 [3]	105 [3]	105 [3]	96 [4]	95 [4]	99 [2]	89 [5]
0.5 ^b	99 [3]	102 [3]	101 [4]	90 [5]	100 [2]	105 [3]	94 [3]
15 ^a	102 [3]	99 [3]	108 [2]	—	88 [1]	109 [1]	92 [7]
50 ^a	—	—	—	102 [1]	—	—	—

n=5

^a 市販品の微粉碎試料を使用

^b 無処理区の粗粉碎試料を使用

表 B-4. マトリックス効果

マトリックス効果 (%)						
DIN	IMI	MAL	DIA	FLU	FEN	PER
-32	-3	-1	-3	-19	-5	-23

表 B-5. 分析結果

表 B-5-1. 粗粉碎試料

農藥	平均濃度 (mg/kg) [SD (mg/kg)]									
	20g		10g		5g		2g		1g	
DIN	5.55	[0.178]	5.58	[0.081]	5.53	[0.075]	5.62	[0.030]	5.59	[0.168]
IMI	3.79	[0.067]	3.82	[0.067]	3.81	[0.052]	3.76	[0.080]	3.76	[0.134]
MAL	1.83	[0.077]	1.82	[0.066]	1.81	[0.092]	1.81	[0.128]	1.77	[0.090]
DIA	14.8	[0.693]	14.6	[0.278]	14.6	[0.382]	14.3	[0.374]	14.3	[0.846]
FLU	2.44	[0.110]	2.37	[0.037]	2.26	[0.097]	2.28	[0.084]	2.16	[0.177]
FEN	3.10	[0.072]	3.06	[0.049]	3.01	[0.097]	3.05	[0.067]	3.04	[0.108]
PER	4.92	[0.388]	4.60	[0.240]	4.38	[0.365]	4.45	[0.383]	3.97	[0.608]

n=6

表 B-5-2. 微粉碎試料

農藥	平均濃度 (mg/kg) [SD (mg/kg)]									
	20g		10g		5g		2g		1g	
DIN	6.00	[0.070]	6.01	[0.081]	6.20	[0.067]	6.40	[0.283]	6.13	[0.064]
IMI	3.93	[0.066]	3.97	[0.037]	4.08	[0.095]	4.23	[0.175]	4.03	[0.075]
MAL	2.06	[0.047]	2.11	[0.095]	2.17	[0.035]	2.21	[0.105]	2.13	[0.049]
DIA	15.2	[0.581]	15.2	[0.714]	15.6	[0.237]	15.8	[0.472]	15.5	[0.479]
FLU	2.63	[0.035]	2.62	[0.066]	2.55	[0.063]	2.63	[0.120]	2.49	[0.070]
FEN	3.18	[0.060]	3.20	[0.056]	3.20	[0.075]	3.24	[0.155]	3.06	[0.099]
PER	4.98	[0.244]	5.25	[0.185]	4.80	[0.205]	5.30	[0.221]	4.99	[0.309]

n=6

表 B-5-3. 凍結粉碎試料

農藥	平均濃度 (mg/kg) [SD (mg/kg)]									
	20g		10g		5g		2g		1g	
DIN	5.78	[0.127]	5.80	[0.056]	6.05	[0.119]	6.13	[0.057]	6.20	[0.088]
IMI	3.82	[0.076]	3.88	[0.045]	4.01	[0.108]	4.02	[0.106]	4.03	[0.057]
MAL	2.33	[0.061]	2.26	[0.071]	2.47	[0.101]	2.40	[0.109]	2.52	[0.105]
DIA	14.8	[0.411]	14.9	[0.450]	15.4	[0.327]	15.6	[0.341]	15.4	[0.577]
FLU	2.61	[0.064]	2.66	[0.070]	2.70	[0.058]	2.66	[0.037]	2.61	[0.078]
FEN	3.13	[0.069]	3.07	[0.081]	3.18	[0.077]	3.14	[0.108]	3.09	[0.058]
PER	5.00	[0.300]	4.97	[0.301]	4.95	[0.506]	5.04	[0.343]	4.81	[0.357]

n=6

表 C-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 (%)	希積 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
アディオオン乳剤	ペルメトリン (PER)	20	2000

表 C-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



図. C-1.1 作物写真 (無処理区)



図. C-1.2 作物写真 (処理区)

表 C-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]	—	—	—

表 C-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

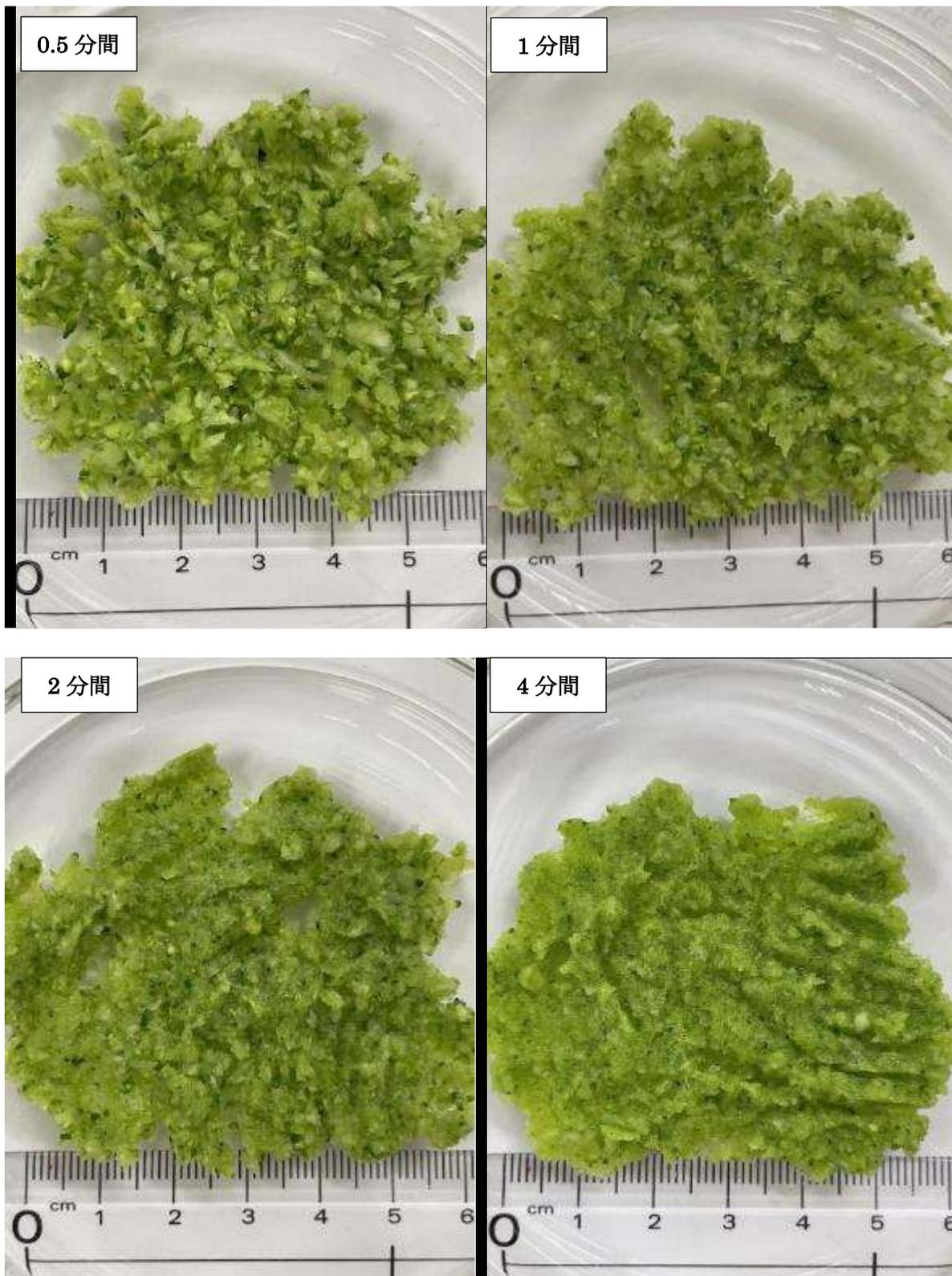


図 C-2. ミキサー稼働時間別のブロッコリー均質化状態（常温操作）



図 C-3. 凍結粉碎試料の均質化状態 (左：調製作業時、右：解凍時)



図 C-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

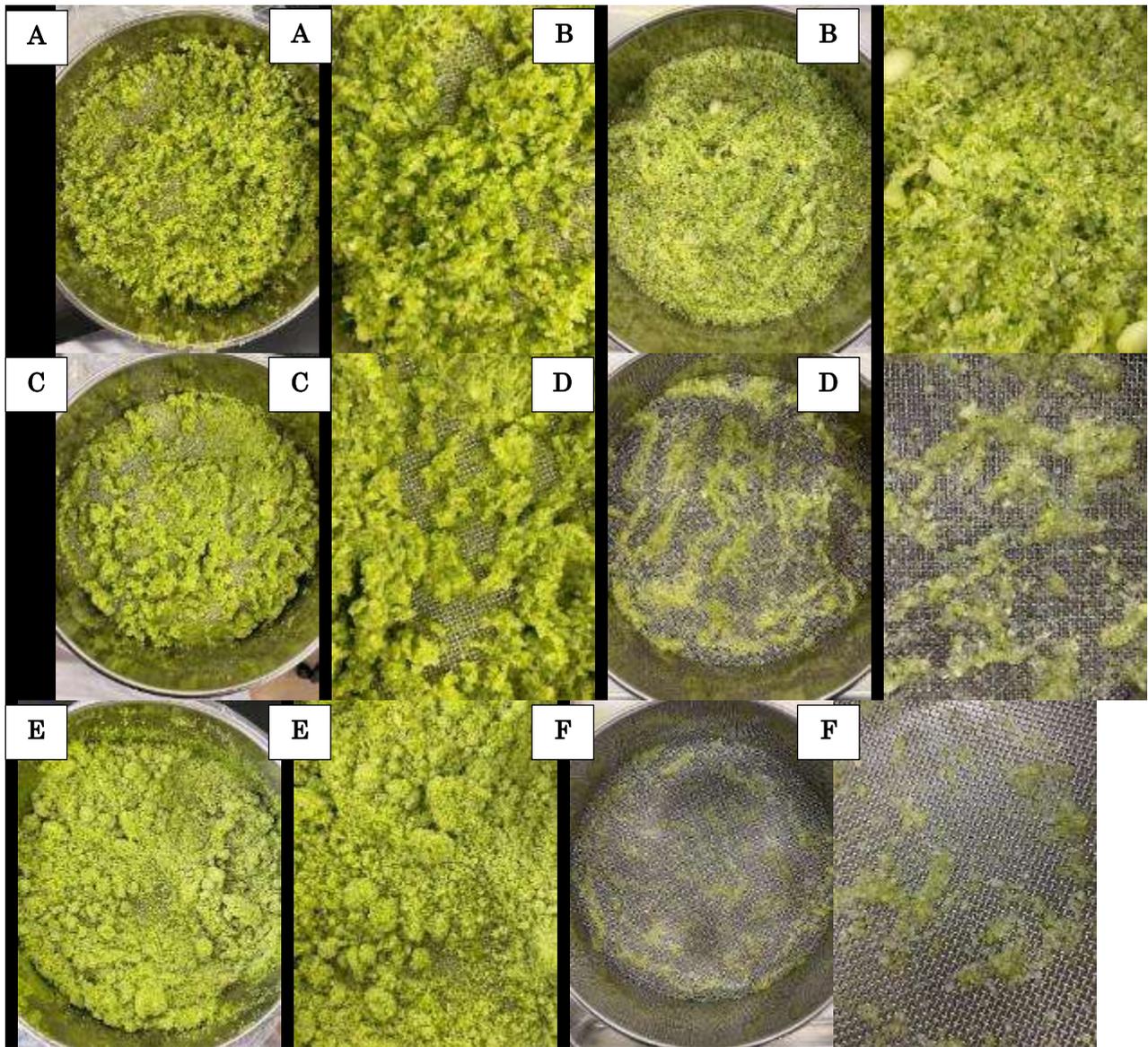


図 C-5. ヘラ処理及び流水洗浄処理後における篩上試料の状態

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)

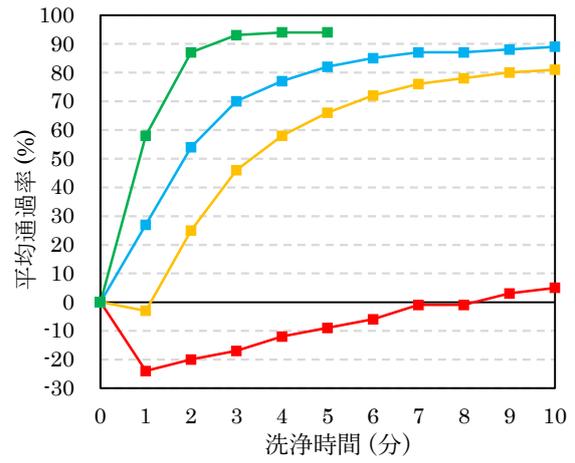
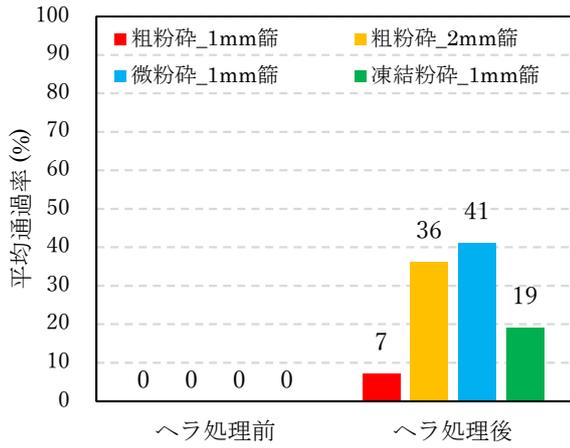


図 C-6. へラ処理時 (左) 及び流水洗浄処理時 (右) の篩通過率

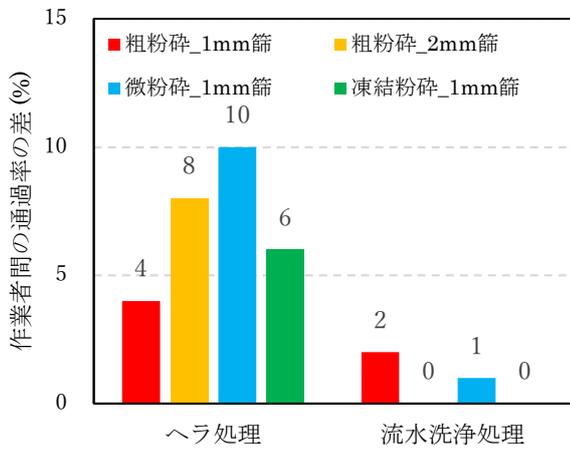


図 C-7. 異なる2名の作業員間の篩通過率の差

表 C-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

表 C-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

表 C-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

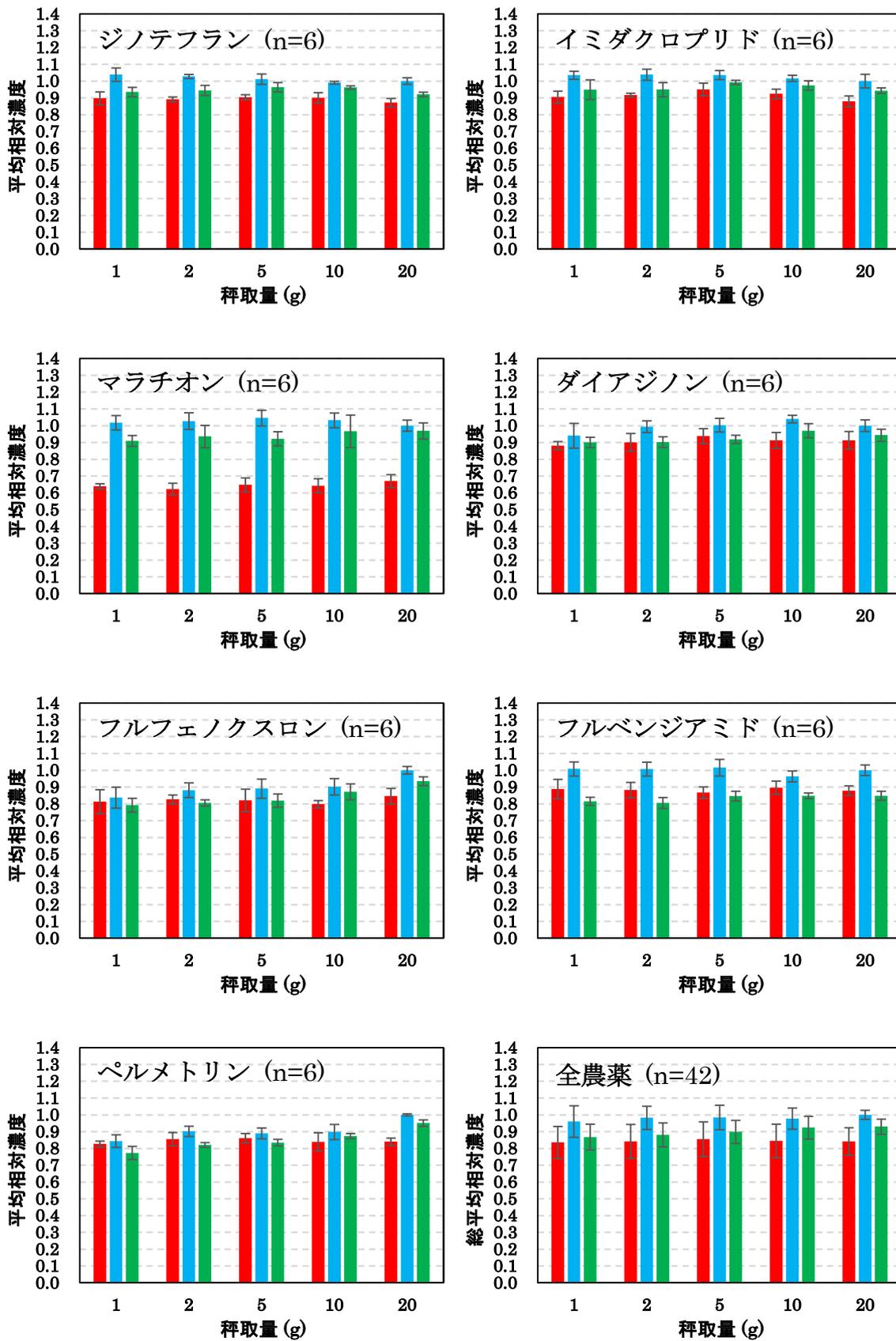


図 C-8. 秤取量別の相対濃度

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

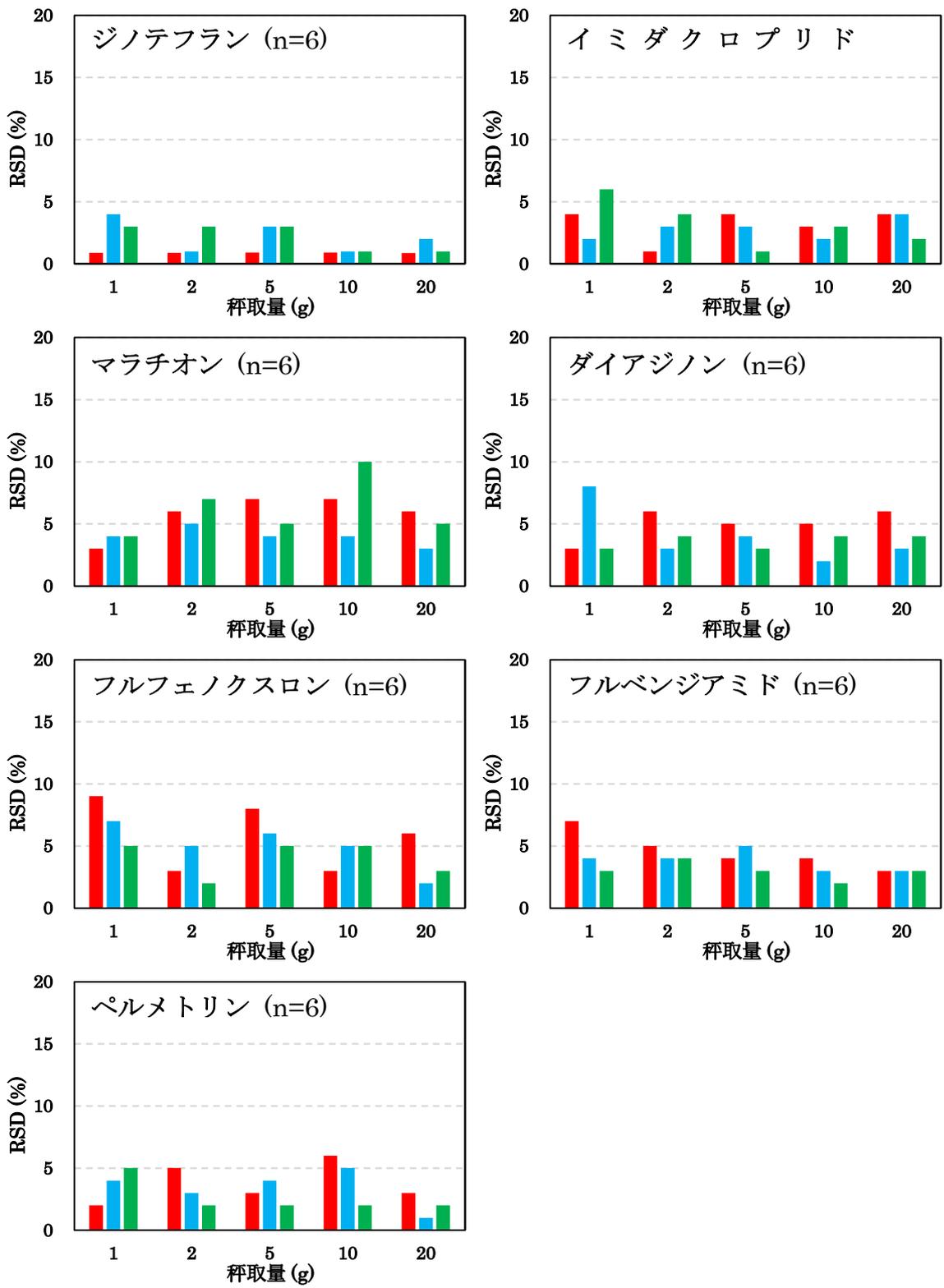


図 C-9. 称取量別の分析値の変動
 ■ : 粗粉碎試料、■ : 微粉碎試料、■ : 凍結粉碎試料

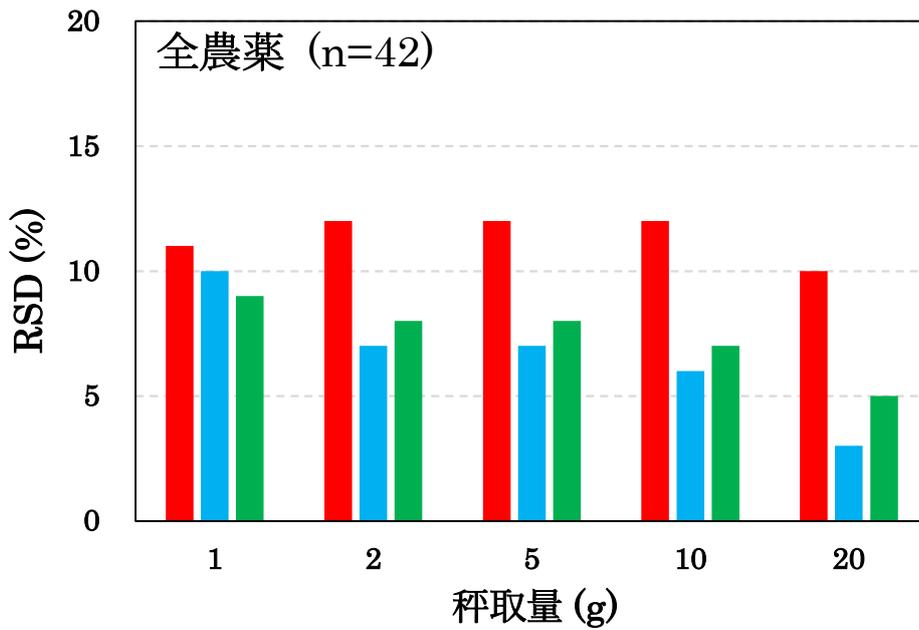


図. C-10. 7種農薬全体での秤取量別相対濃度の変動

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

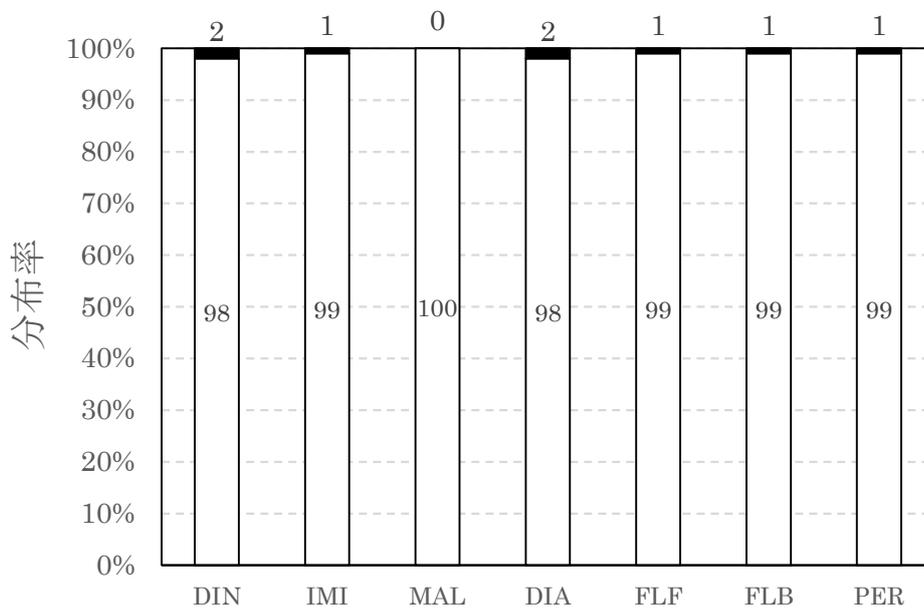
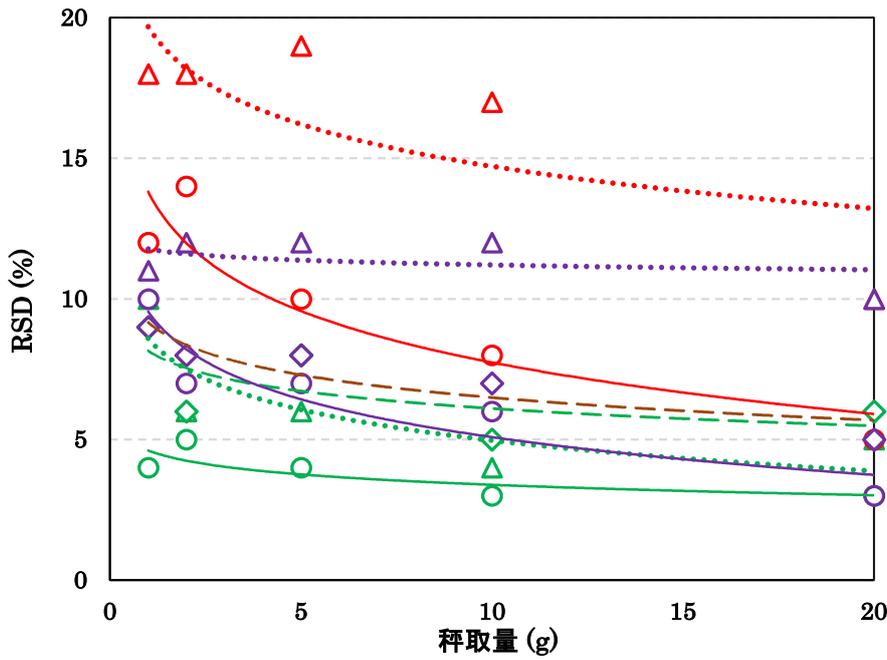


図. C-11. 各農薬の茎及び蕾における分布率

(□ : 蕾、■ : 茎)



△	トマト	粗粉碎	$y = -2.158\ln(x) + 19.68$	R= -0.712
○	トマト	微粉碎	$y = -2.64\ln(x) + 13.813$	R= -0.909
△	ハウレンソウ	粗粉碎	$y = -1.575\ln(x) + 8.5938$	R= -0.831
○	ハウレンソウ	微粉碎	$y = -0.533\ln(x) + 4.6096$	R= -0.766
◇	ハウレンソウ	凍結粉碎	$y = -0.892\ln(x) + 8.1554$	R= -0.653
△	ブロッコリー	粗粉碎	$y = -0.247\ln(x) + 11.776$	R= -0.332
○	ブロッコリー	微粉碎	$y = -1.941\ln(x) + 9.5513$	R= -0.931
◇	ブロッコリー	凍結粉碎	$y = -1.162\ln(x) + 9.1661$	R= -0.922

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

表 A-7 調製直後の試料温度 (°C)

試料調製法	牛筋肉	豚筋肉	鶏筋肉	牛脂肪	豚脂肪	牛肝臓
常温磨砕法	38	36	40	24	28	25
凍結粉砕法 (液体窒素・凍結方式)	-52	-50	-52	-39	-38	-55
凍結粉砕法 (ドライアイス・予冷方式)	-74	-56	-64	-78	-78	-67
凍結粉砕法 (ドライアイス・予備凍結方式)	-66	—	—	-74	-61	-74

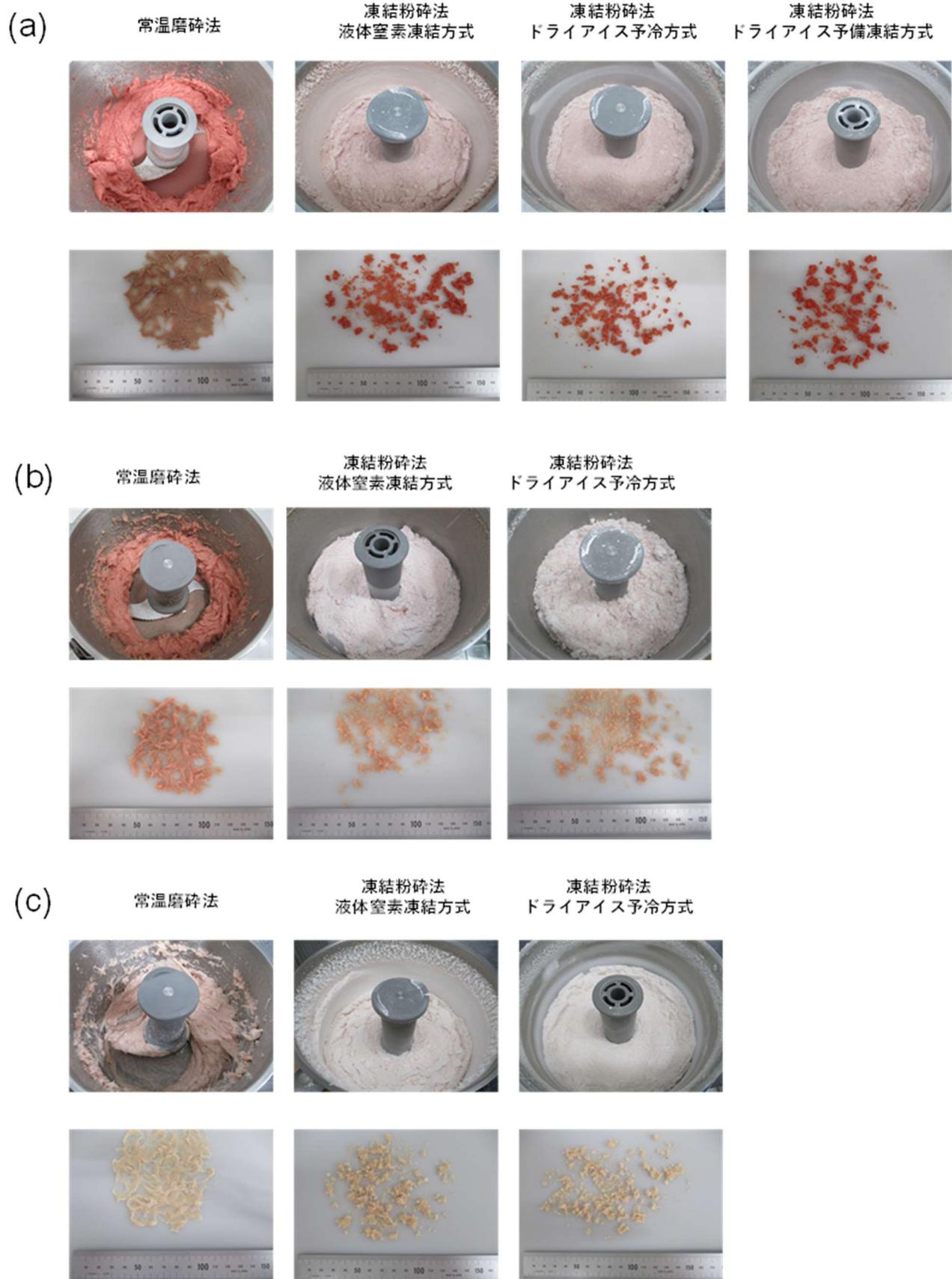


図 A-21. 試料調製後の粉砕状況

(a) 牛の筋肉、(b) 豚の筋肉、(c) 鶏の筋肉、(d) 牛の脂肪、(e) 豚の脂肪、(f) 牛の肝臓

(d)

常温磨砕法

凍結粉砕法
液体窒素凍結方式

凍結粉砕法
ドライアイス予冷方式

凍結粉砕法
ドライアイス予備凍結方式



(e)

常温磨砕法

凍結粉砕法
液体窒素凍結方式

凍結粉砕法
ドライアイス予冷方式

凍結粉砕法
ドライアイス予備凍結方式



(f)

常温磨砕法

凍結粉砕法
液体窒素凍結方式

凍結粉砕法
ドライアイス予冷方式

凍結粉砕法
ドライアイス予備凍結方式



図 A-21. (つづき)

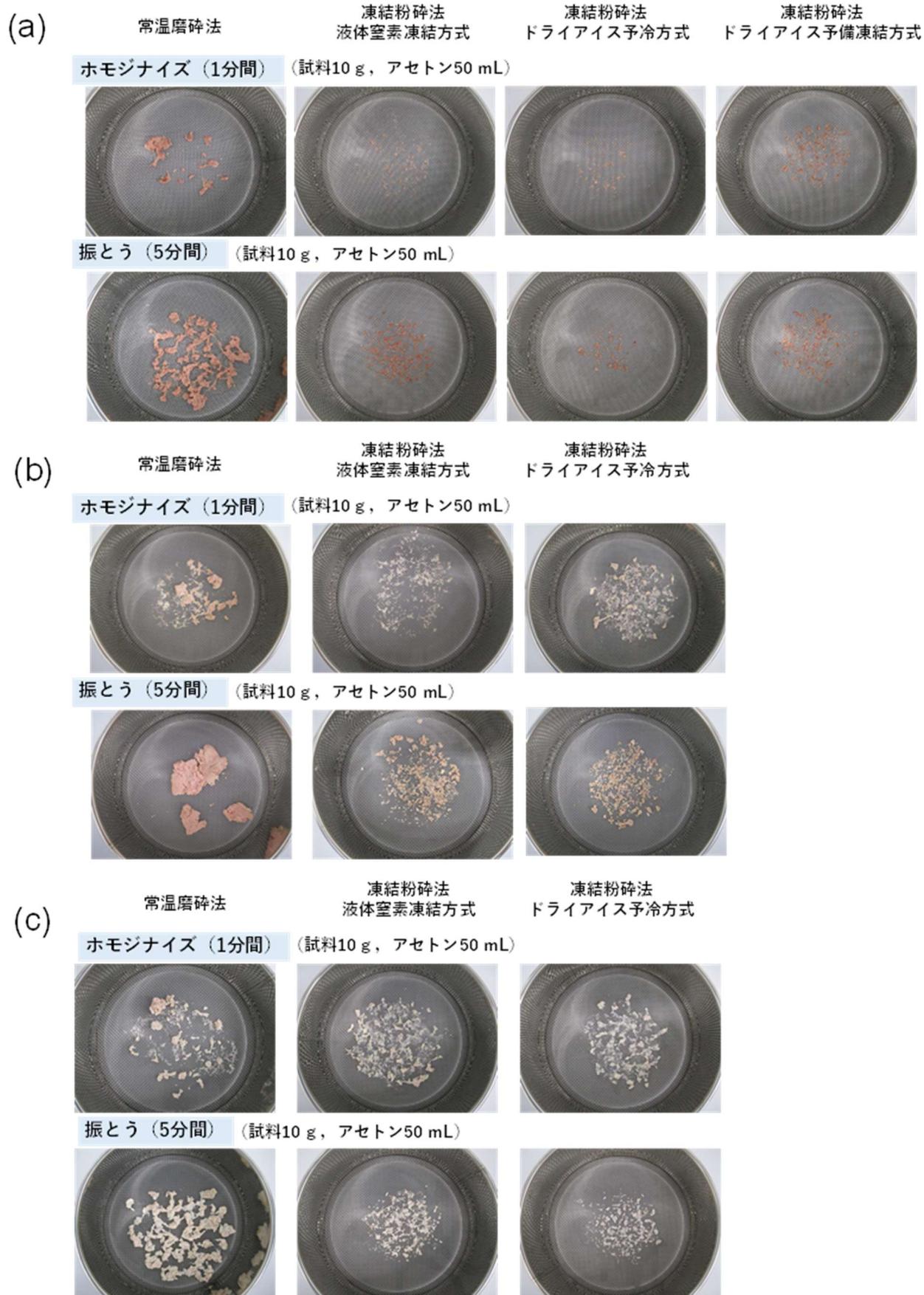
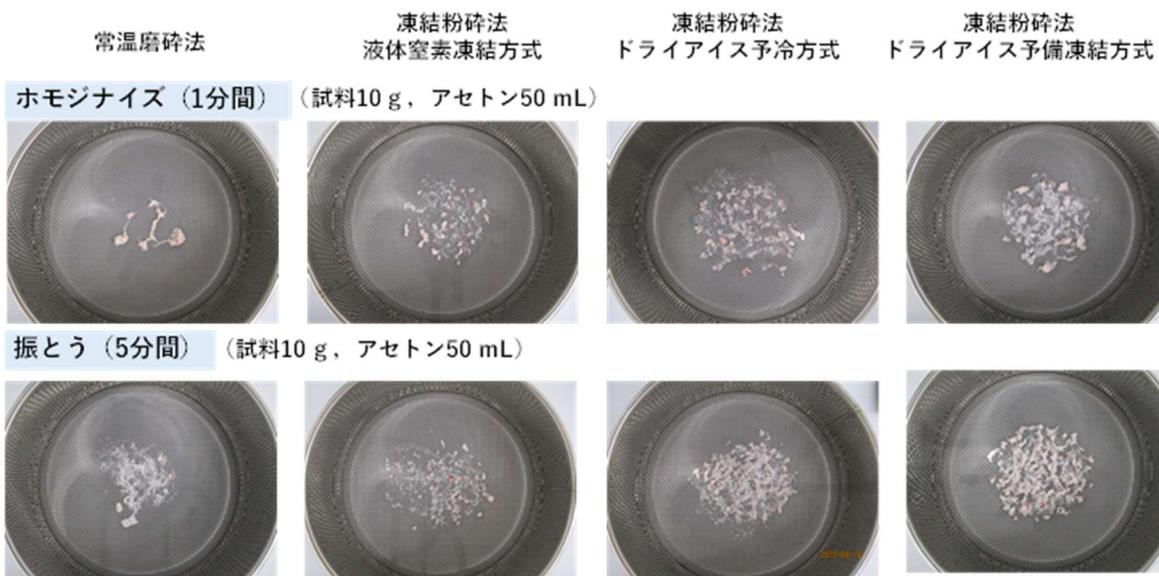


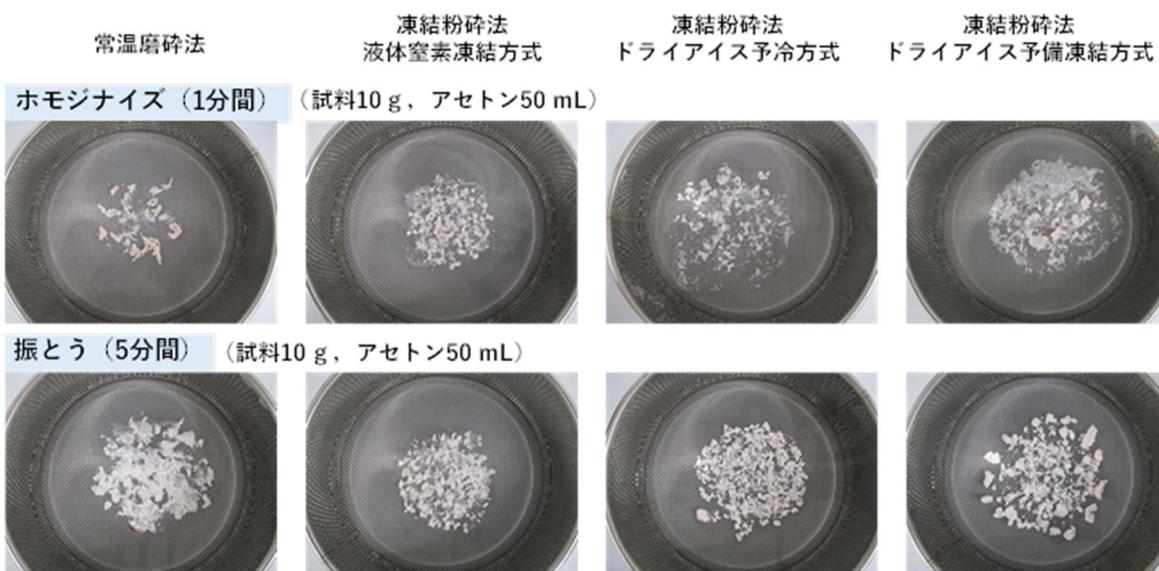
図 A-22. ホモジナイズまたは振とう抽出後の残渣

(a) 牛の筋肉、(b) 豚の筋肉、(c) 鶏の筋肉、(d) 牛の脂肪、(e) 豚の脂肪、(f) 牛の肝臓

(d)



(e)



(f)

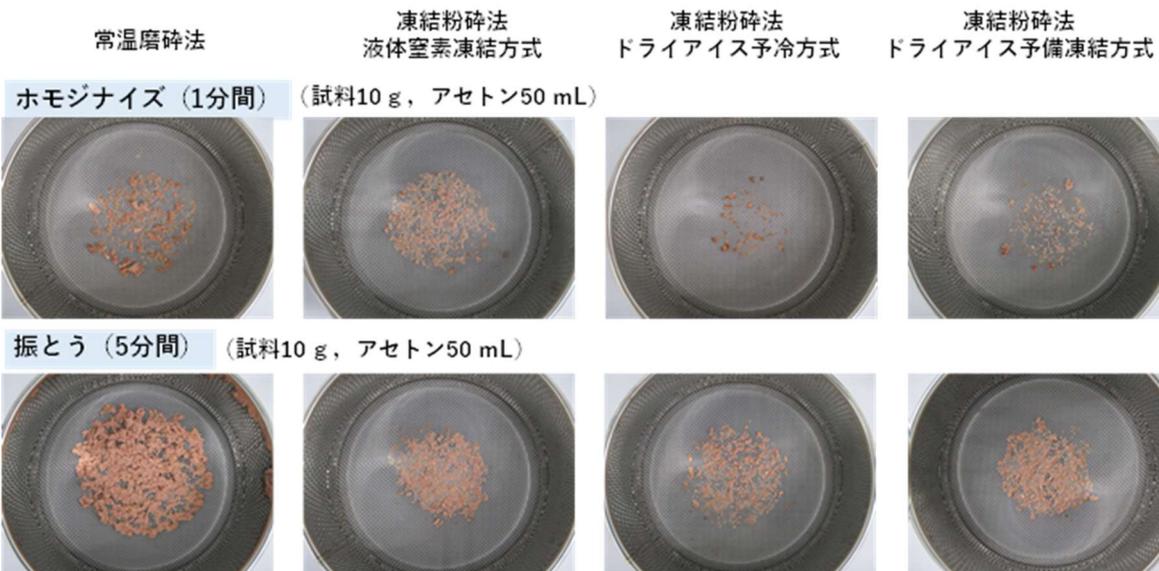


図 A-22. (つづき)

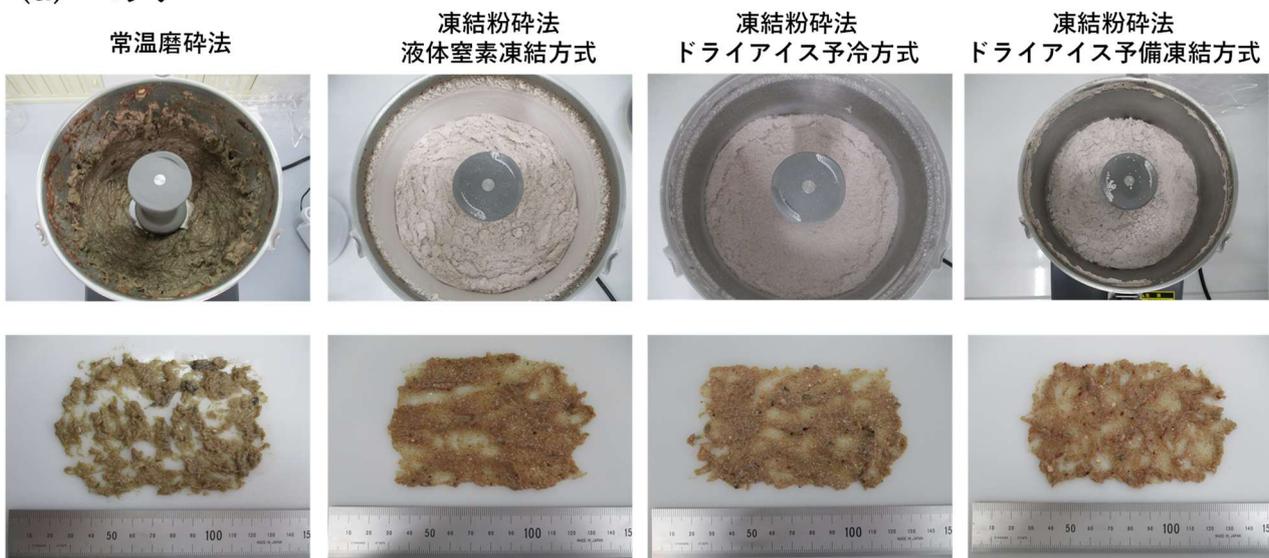
表 B-6. 調製直後の試料温度 (°C)

試料調製法	あゆ ¹	えび ¹	うなぎ ²	さけ ²
常温磨砕法	30.4	26.6	32.9	23.5
凍結粉砕法 (液体窒素・凍結方式)	-42.8	-50.6	-34.7	-44.7
凍結粉砕法 (ドライアイス・予冷方式)	-75.8	-78.4	-77.1	-74.8
凍結粉砕法 (ドライアイス・予備凍結方式)	-36.0	-46.0	-70.9	-73.9

¹ 検体の大きさ : 2 cm

² 検体の大きさ : 1 cm

(a) あゆ



(b) えび

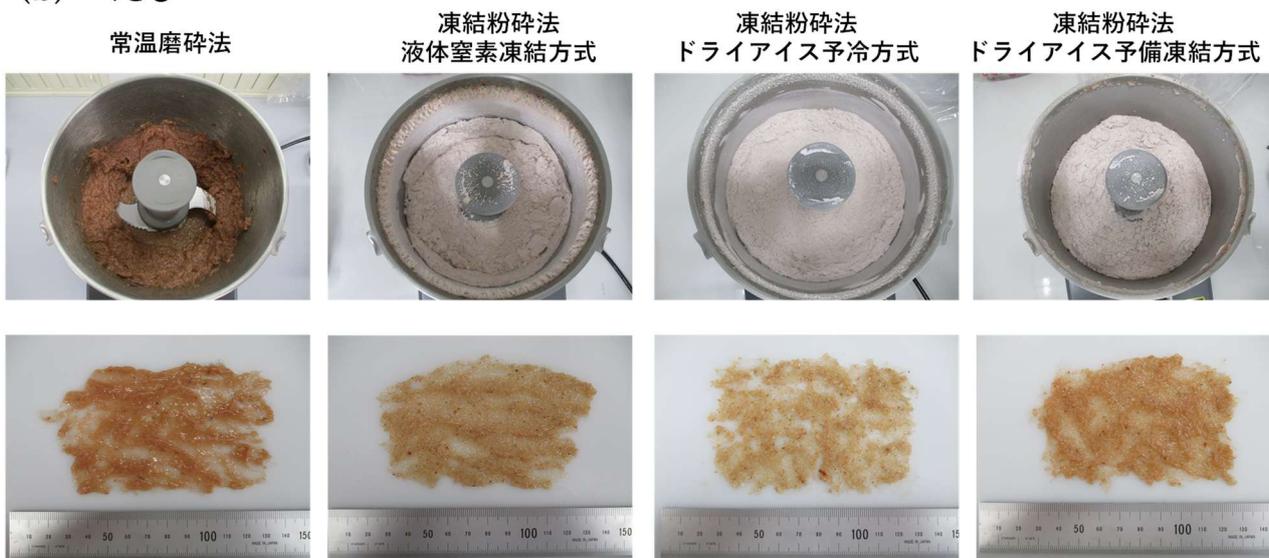


図 B-18. 試料調製後の粉砕状況

(c) うなぎ
常温磨砕法



凍結粉砕法
液体窒素凍結方式



凍結粉砕法
ドライアイス予冷方式



凍結粉砕法
ドライアイス予備凍結方式



(d) さけ
常温磨砕法



凍結粉砕法
液体窒素凍結方式



凍結粉砕法
ドライアイス予冷方式



凍結粉砕法
ドライアイス予備凍結方式

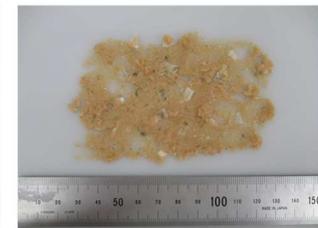


図 B-18. (つづき)

(a) あゆ

常温磨砕法

凍結粉砕法
液体窒素凍結方式

凍結粉砕法
ドライアイス予冷方式

凍結粉砕法
ドライアイス予備凍結方式

ホモジナイズ (1分間) (試料10 g, アセトン50 mL × 3回)



振とう (5分間) (試料10 g, アセトン50 mL × 3回)



(b) えび

常温磨砕法

凍結粉砕法
液体窒素凍結方式

凍結粉砕法
ドライアイス予冷方式

凍結粉砕法
ドライアイス予備凍結方式

ホモジナイズ (1分間) (試料10 g, アセトン50 mL × 3回)



振とう (5分間) (試料10 g, アセトン50 mL × 3回)



図 B-19. ホモジナイズまたは振とう抽出後の残渣

(c) うなぎ
常温磨砕法

凍結粉砕法
液体窒素凍結方式

凍結粉砕法
ドライアイス予冷方式

凍結粉砕法
ドライアイス予備凍結方式

ホモジナイズ (1分間) (試料10 g, アセトン50 mL × 3回)



-1



-1

振とう (5分間) (試料10 g, アセトン50 mL × 3回)



(d) さけ
常温磨砕法

凍結粉砕法
液体窒素凍結方式

凍結粉砕法
ドライアイス予冷方式

凍結粉砕法
ドライアイス予備凍結方式

ホモジナイズ (1分間) (試料10 g, アセトン50 mL × 3回)



-1

-1

-1

振とう (5分間) (試料10 g, アセトン50 mL × 3回)



図 B-19. (つづき)

¹ ホモジナイズ抽出操作を行うことができなかった

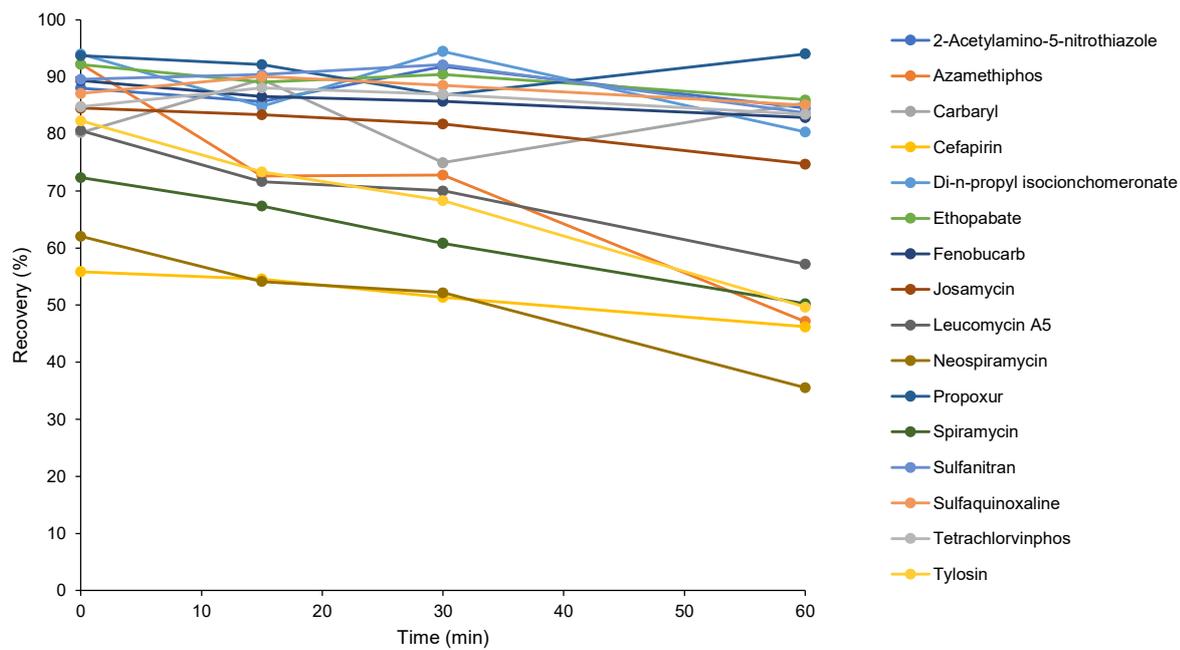


図. C-13. 農薬等の添加後放置時間の回収率¹への影響（牛の筋肉）

¹ n=3

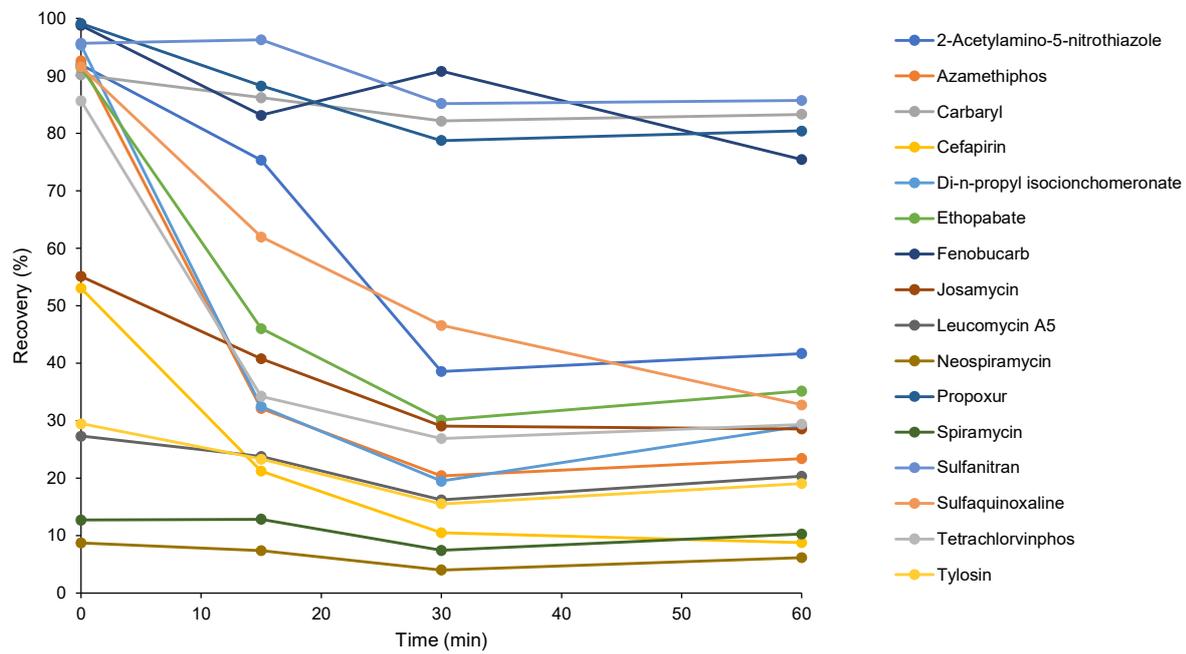


図. C-14. 農薬等の添加後放置時間の回収率¹への影響（牛の肝臓）

¹ n=3

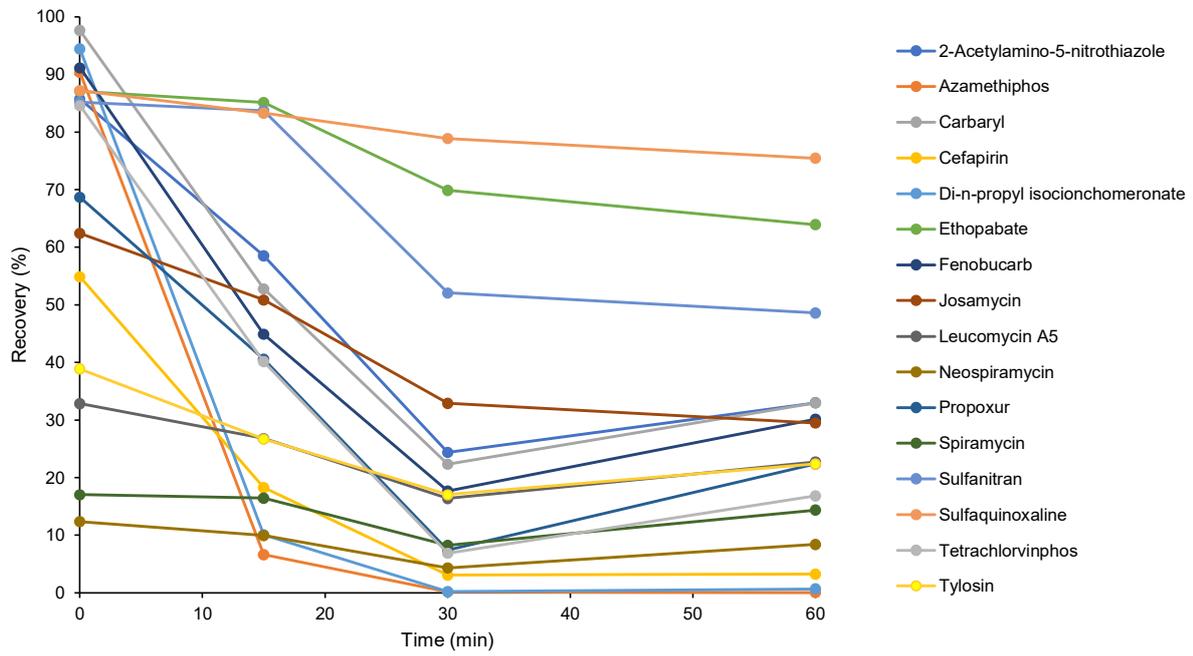


図. C-15. 農薬等の添加後放置時間の回収率¹への影響 (豚の肝臓)

¹ n=3

表 C-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-Acetylamino-5-nitrothiazole	88	92	0.530	1.00	92	39	0.002	0.11	86	24	<0.001	<0.01
Azamephosphos	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 isochinomerate	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
Norfloracin	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	0.288	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
Sulfathoxyridazine	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
Sulfamethoxyridazine	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
Sulfaquinoxaline	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
Sulfatrazole	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	87	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

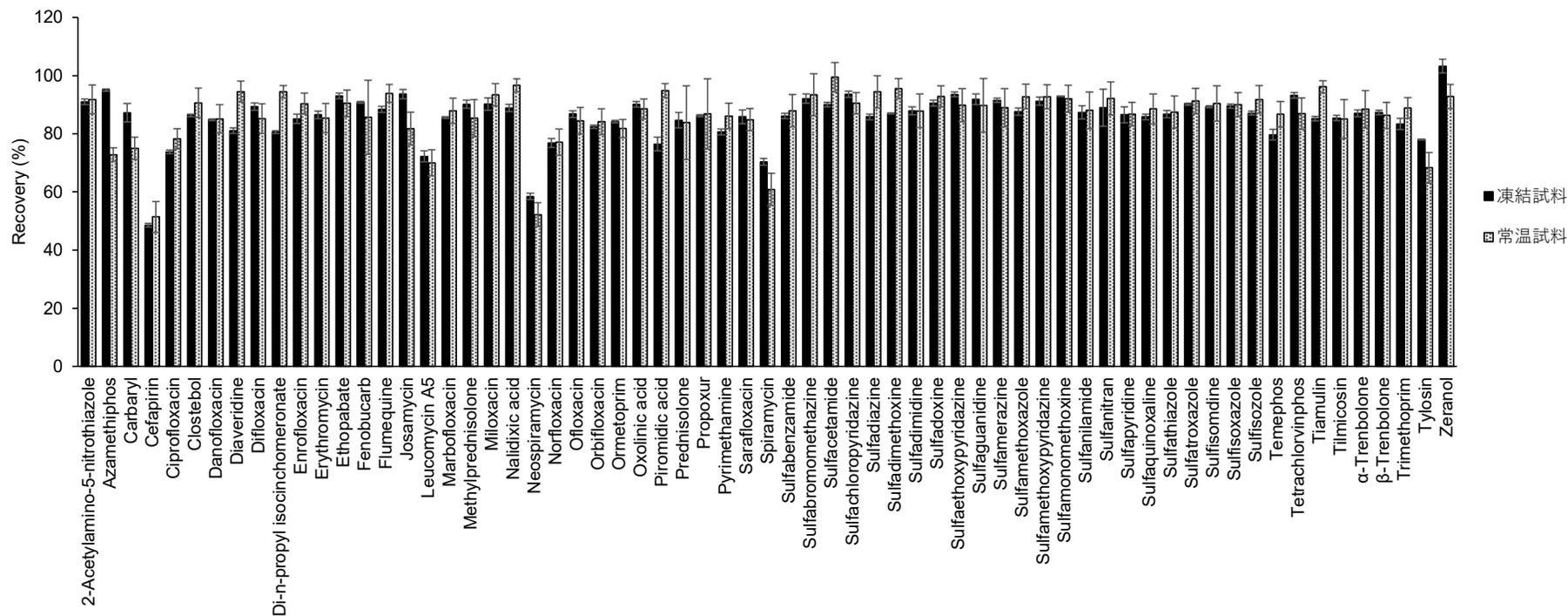


図. C-16. 凍結試料及び常温試料からの農薬等の平均回収率^{1,2} (牛の筋肉)

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

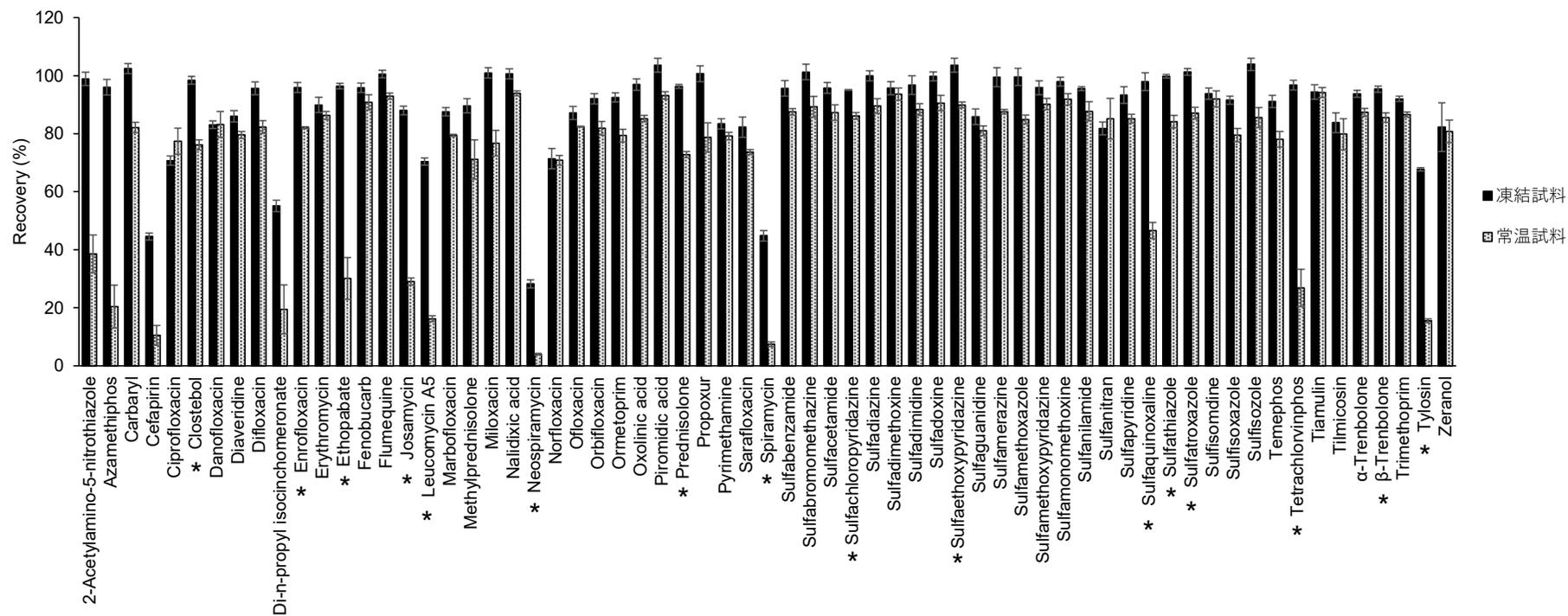


図. C-17. 凍結試料及び常温試料からの農薬等の平均回収率^{1,2} (牛の肝臓)

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

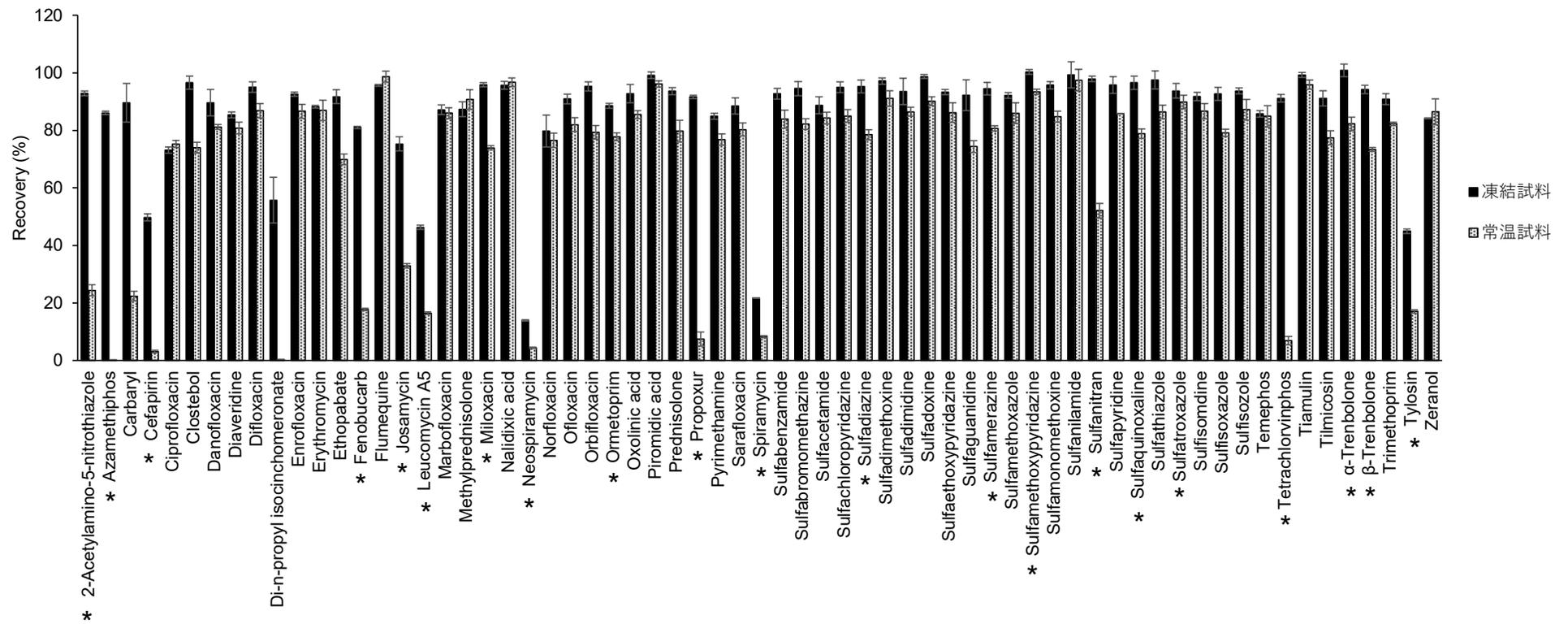


図. C-18. 凍結試料及び常温試料からの農薬等の平均回収率^{1,2} (豚の肝臓)

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 $q < 0.01$

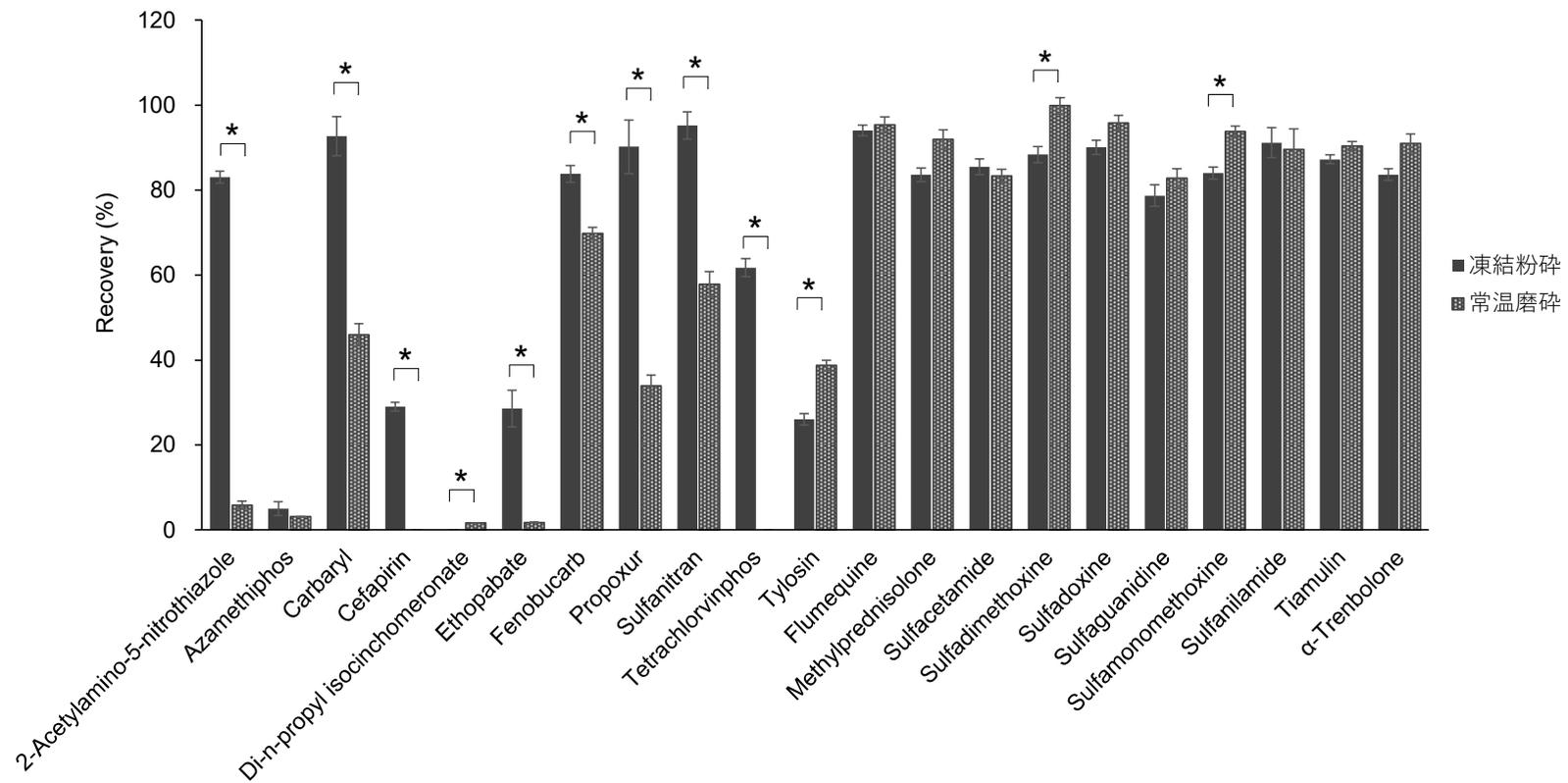


図. C-19. 常温磨砕法及び凍結粉砕法による試料調製における平均回収率^{1,2} (牛の肝臓)

¹ n=5

² *は $q < 0.01$

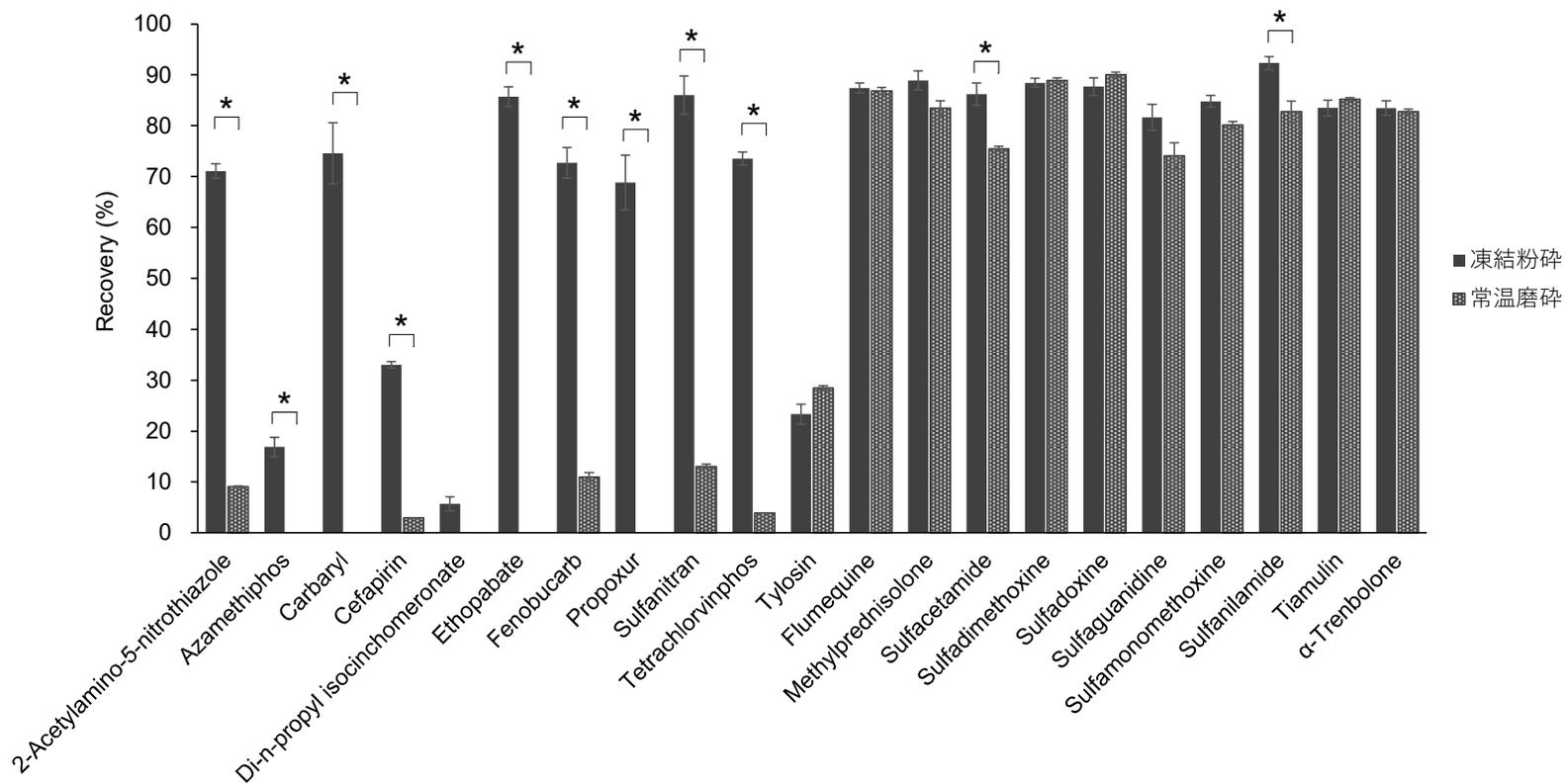


図. C-20. 常温磨砕法及び凍結粉砕法による試料調製における平均回収率^{1,2} (豚の肝臓)

¹ n=5

² *は $q < 0.01$

表 C-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(%) の差	p値	FDR補正後 q値
		凍結粉砕	常温磨砕			
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

表 C-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

表 C-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

表 C-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

令和 4-5 年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
令和 6 年度 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
（総合）分担研究報告書

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

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）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、確立した方法の自動化を検討した。

[1] LC-MS/MS による残留農薬等一斉分析法

LC-MS/MS を用いた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「LC/MS による農薬等の一斉試験法I（農産物）」の精製方法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な一斉分析法を検討した。確立した方法は通知一斉試験法の抽出方法で得られた抽出液の一部をそのまま ODS ミニカラム（50 mg）及び PSA ミニカラム（30 mg）を連結したカラムで精製し、LC-MS/MS で測定する方法である。添加回収試験を行った結果、大豆及びほうれんそうではマトリックスの影響により検討農薬の 2 割以上で真度の目標値を満たさなかった。一方、玄米、りんご及びキャベツでは検討農薬の 9 割以上で目標値を満たし、食品によっては改良法の方が通知一斉試験法よりも適用できる農薬が多いことが示された。本分析法は通知一斉試験法と抽出条件が同一であり、抽出効率に起因する分析値の差異は生じないことから、目標値を満たさなかった一部の農薬/食品を除き、規格基準への適否判定に用いることができる方法と考えられた。

[2] GC-MS/MS による残留農薬等一斉分析法

GC-MS/MS を用いた食品中の残留農薬一斉試験法（通知一斉試験法）として「GC/MS による農薬等の一斉試験法（農産物）」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、精製方法を改良することにより、通知一斉試験法と同等の分析値が得られ、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検討した。本分析法は①C₁₈ ミニカラムで低極性夾雑成分を除去後、②溶出液を食塩水で希釈して別の C₁₈ ミニカラムで精製することにより、高極性夾雑成分を除去し、③PSA ミニカラムで酸性夾雑成分や色素を除去した後、GC-MS/MS で測定する方法である。一連の精製操作は自動前処理装置を用いて行った。玄米、大豆、キャベツ、ほうれんそう、ばれいしょ、りんご、オレンジ及び茶を用いて、151 化合物を対象に添加濃度 0.01 ppm で妥当性評価試験を行った結果、大豆では検討農薬の 87%、その他の食品では 93%以上で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り、抽出効率に起因する分析値の差異は生じないため、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て精製における溶媒・試薬の使用量が少なく、操作時間も短いため、

検査の効率化が期待できる方法と考えられた。

[3] LC-MS/MS による残留動物用医薬品等一斉分析法

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。

3 年目は、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、フルピラジフロロン、スルホキサフロルの 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。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、スルホキサフロロン、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。オンライン化は今後検討する予定である。

研究協力者

齋藤真希 (国立医薬品食品衛生研究所 食品部)

望月龍 (国立医薬品食品衛生研究所 食品部)

研究協力機関

株式会社アイスティサイエンス

A. 研究目的

我が国では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)」や「GC/MS による農薬等の一斉試験法 (農産物)」等が公示されている。これらの一斉試験法はホモジナイズ抽出後、ミニカラム等を用いて精製する方法であり、精製度が比較的高いため、夾雑成分の影響を受けにくく、測定装置への負担も少ない。その一方、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。

海外では QuEChERS 法と呼ばれる一斉分析法が残留農薬等検査で汎用されている。本分析法は

振とう抽出後、固相分散法で精製する方法であり、我が国の通知一斉試験法と比べ操作時間が短く、簡便である。しかしその反面、精製が不十分であり、夾雑成分の影響を受けやすく、装置への負担も大きい。加えて、試料に対する抽出溶媒量が少なく、且つ、振とう抽出であるため、脂質の多い食品中の低極性農薬など、食品と農薬等の組み合わせによっては通知一斉試験法と比べて抽出効率が低いことが指摘されている。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。

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。1年目は通知一斉試験法「LC/MSによる農薬等の一斉試験法Ⅰ（農産物）」、2年目は「GC/MSによる農薬等の一斉試験法（農産物）」、3年目は「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。

B. 研究方法

[1] LC-MS/MSによる残留農薬等一斉分析法

1. 試料

りんご、キャベツ及びびほうれんそうは東京都内の小売店で購入した。大豆及び玄米はインターネットを介して購入した。大豆及び玄米は、425 µmの標準網ふるいに通るように遠心粉碎機で粉碎したものをを用いた。りんご、キャベツ及びびほうれんそうは磨砕装置を用いて細切均一化したものをを用いた。

2. 試薬及び試液

(1) 有機溶媒及び試薬

アセトニトリルは関東化学製の残留農薬試験用、LC-MS/MS測定用の水及びメタノールは関東化学製のLC/MS用を用いた。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を

用いた。酢酸アンモニウム、リン酸水素二カリウム及びリン酸二水素カリウムは富士フィルム和光純薬製の特級を用いた。ろ紙はアドバンテック製の定量ろ紙 No.5A、ケイソウ土は富士フィルム和光純薬製のセライト 545 を用いた。

(2) 農薬標準溶液

農薬標準溶液は林純薬工業製の PL2005 農薬 LC/MS Mix 4~7, 11, 12 及び STQ 法用農薬混合標準溶液を用いた。

(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), 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), トリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲル (SAX) ミニカラム (Smart-SPE SAX-30 ; 30 mg) 及びグラファイトカーボンミニカラム (Smart-SPE GCK-20 ; 20 mg) (いずれもアイスティサイエンス製) を用いた。

(4) 0.5 mol/L リン酸緩衝液 (pH7.0)

リン酸水素二カリウム (K_2HPO_4) 52.7 g 及びリン酸二水素カリウム (KH_2PO_4) 30.2 g を量り採り、水約 500 mL に溶解し、1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液または 1 mol/L 塩酸を用いて pH を 7.0 に調整した後、水を加えて 1 L とした。

3. 装置

遠心粉碎機は ZM200 (Verder Scientific 製)、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) MS 条件

イオン化法 ESI (+) 及び ESI (-); イオン
スプレー電圧 2500 V; ヒーター温度 350°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,
70 psi; コリジョンガス N₂, 7

(2) LC 条件

カラム Inertsustain C18 (内径 2.1 mm, 長さ 100
mm, 粒子径 2 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 5
mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 (A 液) 及び 5
mmol/L 酢酸アンモニウム・メタノール溶液 (B
液); 流速 0.3 mL/min; グラジエント条件 0
分 (A : B=98 : 2) →10 分 (A : B=5 : 95) →15
分 (A : B=5 : 95) →15.1 分 (A : B=1 : 99) →20
分 (A : B=1 : 99) →20.1 分 (A : B=98 : 2)

5. 試料調製

(1) 果実・野菜の場合

試料 20.0 g にアセトニトリル 50 mL を加え, 約
1 分間ホモジナイズした後, ケイソウ土を約 1 cm
の厚さに敷いたろ紙を用いて吸引ろ過した. 残留
物を採り, アセトニトリル 20 mL を加え, 上記と
同様にホモジナイズした後, 吸引ろ過した. 得ら
れたろ液を合わせ, アセトニトリルを加えて正確
に 100 mL (抽出液) とした.

抽出液約 2 mL をバイアルに入れ, 自動前処理
装置にセットし, 一連の精製操作を自動で行った
(「(3) 自動前処理」参照). 得られた溶液に水を
加えて 2 mL に定容し, 試験溶液とした.

(2) 穀類・豆類の場合

試料 10.0 g に水 20 mL を加え, 30 分間放置し
た. これにアセトニトリル 50 mL を加え, 約 1 分
間ホモジナイズした後, ケイソウ土を約 1 cm の
厚さに敷いたろ紙を用いて吸引ろ過した. 残留物
を採り, アセトニトリル 20 mL を加え, 上記と同
様にホモジナイズした後, 吸引ろ過した. 得られ
たろ液を合わせ, アセトニトリルを加えて正確に
100 mL (抽出液) とした.

抽出液約 2 mL をバイアルに入れ, 自動前処理
装置にセットし, 一連の精製操作を自動で行った

(「(3) 自動前処理」参照). 得られた溶液に水を
加えて 2 mL に定容し, 試験溶液とした.

(3) 自動前処理

ODS (50 mg) ミニカラムの下に PSA (30 mg)
ミニカラムを連結し, アセトニトリル及びアセト
ニトリル/水 (4 : 1) で順次コンディショニングし
た. これに抽出液 1 mL を負荷した後, アセトニ
トリル/水 (9 : 1) 0.5 mL で溶出した

[2] GC-MS/MS による残留農薬等一斉分析法

1. 試料

キャベツ, ほうれんそう, ばれいしょ, りんご
及びオレンジは東京都内の小売店で購入した. 玄
米, 大豆及び茶はインターネットを介して購入し
た. 玄米, 大豆及び茶は, 425 µm の標準網ふるい
に通るように遠心粉碎機で粉碎したものをを用い
た. キャベツ, ほうれんそう, ばれいしょ, りん
ご及びオレンジは磨砕装置を用いて細切均一化
したものをを用いた.

2. 試薬及び試液

(1) 有機溶媒及び試薬

アセトニトリル, アセトン及びヘキサンは関東
化学製の残留農薬試験用, 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をを用い
た. 塩化ナトリウムは富士フィルム和光純薬製の
残留農薬試験用試薬を用いた. ろ紙はアドバンテ
ック製の定量ろ紙 No.5A, ケイソウ土は富士フイ
ルム和光純薬製のセライト 545 をを用いた.

(2) 農薬標準溶液

林純薬工業, 関東化学, 富士フィルム和光純薬,
Chem Service, LGC standards, Honeywell Riedel-de-
Haen 及び Merck 製の残留農薬試験用試薬を用い
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 (30 mg 及び 50 mg ;
それぞれ Smart-SPE C18-30 及び Smart-SPE C18-
50), 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

遠心粉碎機は ZM200 (Verder Scientific 製), 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。

GC-MS/MS はガスクロマトグラフ 7890 (Agilent Technologies 製) 及び質量分析計 Xevo TQ-XS (Waters 製) を使用した。

4. 測定条件

カラム DB-5ms (内径 0.25 mm, 長さ 30 m, 膜厚 0.25 μm : Agilent Technologies 製)

ガードカラム Rxi ガードカラム (フューズドシリカチューブ, 内径 0.25 mm, 長さ 2 m : Restek 社製)

ライナー Topaz (シングルテーパー付, ウール入り : Restek 製)

カラム温度 50°C (1 min) - 25°C/min - 125°C (0 min) - 10°C/min - 300°C (10 min)

キャリアーガス 窒素

キャリアーガス流量 1.5 mL/min

注入方式 パルスドスプリットレス

注入量 2 μL

注入口温度 260°C

トランスファーライン温度 300°C

イオン源温度 150°C

イオン化モード APCI (+)

コロナ電流 2 μA

コーンガス流量 270 L/h

AUX ガス流量 300 L/h

メイクアップガス流量 300 mL/min

コリジョンガス アルゴン

測定モード 選択反応モニタリング (SRM)

5. 試験溶液の調製

試験溶液の調製方法の概要を図 2-1 に示した。

(1) 果実・野菜の場合

試料 20.0 g にアセトニトリル 50 mL を加え, 約 1 分間ホモジナイズした後, ケイソウ土を約 1 cm の厚さに敷いたろ紙を用いて吸引ろ過した。残留物を採り, アセトニトリル 20 mL を加え, 上記と同様にホモジナイズした後, 吸引ろ過した。得られたろ液を合わせ, アセトニトリルを加えて正確に 100 mL (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) 穀類・豆類の場合

試料 10.0 g に水 20 mL を加え, 30 分間放置した。これにアセトニトリル 50 mL を加え, 約 1 分間ホモジナイズした後, ケイソウ土を約 1 cm の厚さに敷いたろ紙を用いて吸引ろ過した。残留物を採り, アセトニトリル 20 mL を加え, 上記と同様にホモジナイズした後, 吸引ろ過した。得られたろ液を合わせ, アセトニトリルを加えて正確に 100 mL (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。

(3) 茶の場合

試料 5.00 g に水 20 mL を加え, 30 分間放置した。これにアセトニトリル 50 mL を加え, 約 1 分間ホモジナイズした後, ケイソウ土を約 1 cm の厚さに敷いたろ紙を用いて吸引ろ過した。残留物を採り, アセトニトリル 20 mL を加え, 上記と同様にホモジナイズした後, 吸引ろ過した。得られたろ液を合わせ, アセトニトリルを加えて正確に 100 mL (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。

(4) 自動前処理

以下の精製は自動前処理装置を用いて行った (図 2-1 及び図 2-2)。

C₁₈ (30 mg : 一段目) ミニカラムの下にノズル及び C₁₈ (50 mg : 二段目) ミニカラムを連結し, アセトン及びアセトニトリル/水 (9 : 1) 各 1 mL で順次コンディショニングした。これに抽出液 1 mL を負荷した後, アセトニトリル/水 (9 : 1) 0.6 mL を注入した。この溶出液 (負荷液を含む) を, ノズルから注入した 10 w/v%塩化ナトリウム溶液 25 mL で希釈しながら C₁₈ (50 mg) に負荷し, 溶

出液は捨てた。ノズルからさらに水 1 mL を注入し、C₁₈ (50 mg) ミニカラムを洗浄した。C₁₈ (30 mg) ミニカラムを取り外した後、C₁₈ (50 mg) ミニカラムを窒素気流下で 2 分間乾燥させた。

PSA (30 mg) ミニカラムをアセトン及びアセトン/ヘキサン (15 : 85) 各 1 mL でコンディショニングし、前述の C₁₈ (50 mg) ミニカラムの下部に連結した。この連結カラムにアセトン/ヘキサン (15 : 85) 1 mL を注入し、溶出液を得た。果実・野菜の場合は、得られた溶液にアセトン/ヘキサン (15 : 85) を加えて 1 mL に定容し、試験溶液とした。穀類、豆類及び茶の場合は得られた溶液を窒素乾固し、アセトン/ヘキサン (15 : 85) 0.5 mL (茶の場合は 0.25 mL) を加えて溶解し、試験溶液とした。

[3] LC-MS/MS による動物用医薬品等一斉分析法

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ィルム和光純薬製の残留農薬・PCB 試験用、酢酸は富士フィルム和光純薬製の精密分析用、ギ酸は富士フィルム和光純薬製の 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、富士フィ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) (いずれもアイステイサイエンス製) 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) LC 条件

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

カラム温度 : 40°C

注入量 : 3 μL (分析法検討時は 2 μL)

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 3-1 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 3-1)。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] LC-MS/MS による残留農薬等一斉分析法

1. 試験溶液調製方法の検討

(1) 抽出

本検討では簡便且つ規格基準への適否判定に用いることができる一斉分析法の開発を目的とした。このため、抽出は通知一斉試験法「LC/MS による農薬等の一斉試験法I (農産物)」に従って行い、果実・野菜 (試料 20.0 g) ではアセトニトリル (1 回目 50 mL, 2 回目 20 mL) で 2 回ホモジナイズ、穀類・豆類 (試料 10.0 g) では水 (20 mL) を加えて膨潤した後、アセトニトリル (1 回目 50 mL, 2 回目 20 mL) で 2 回ホモジナイズして抽出することとした。

(2) 塩析

通知一斉試験法は、抽出後、抽出液の一部を塩析し、果実・野菜の場合はグラファイトカーボン及び陰イオン交換ミニカラム (NH₂ または PSA) で精製、穀類・豆類の場合は ODS ミニカラムで精製後、グラファイトカーボン及び陰イオン交換ミニカラムで精製する方法である。この操作のうち、塩析では抽出液中の水及び高極性夾雑成分を除去することができる。しかし、本操作を行うと高極性の農薬も水層に移行する可能性がある。そこで、通知一斉試験法と同様の方法で塩析を行い、各農薬の回収率を求めた。その結果、検討農薬の 1 割弱で回収率が 80%未満となり、極性が比較的高い農薬は水層に移行し、回収率が低下することが確認された。塩析は一部の農薬が低回収率になることに加え、振とうやアセトニトリル層の採取等に時間を要し、やや煩雑であることから、塩析を行わない方法を検討することとした。

(3) ミニカラムによる精製

塩析を行わずに抽出液の一部をそのまま、または溶媒を置換後、ミニカラムに負荷して精製する方法を検討した。ミニカラムは通知一斉試験法で用いられている ODS, グラファイトカーボン及び陰イオン交換ミニカラムを検討した。なお、通知一斉試験法では陰イオン交換カラムとしてアミノプロピル基を有する NH₂ またはエチレンジアミン-*N*-プロピル基を有する PSA が用いられるが、回収率に大きな差がないこと及び一般に精製効果は PSA の方が高いと考えられていることから、PSA を用いて検討することとした。また、通知一

斉試験法では用いられていないが、トリメチルアミノプロピル基を有し、PSA より強い陰イオン交換ミニカラムである SAX も検討することとした。通知一斉試験法では、抽出液 20 mL (果実・野菜の場合は試料 4 g 相当、穀類・豆類の場合は試料 2 g 相当) を精製に供し、ODS ミニカラムは充填剤量 1 g, グラファイトカーボン及び陰イオン交換ミニカラムはそれぞれ 500 mg を用いることとなっている。一方、本検討では抽出液 1 mL (通知一斉試験法の 1/20 量; 果実・野菜の場合は試料 0.2 g 相当、穀類・豆類の場合は試料 0.1 g 相当) をミニカラムに負荷することとしたため、ODS ミニカラムの充填剤量は 50 mg, グラファイトカーボン及び陰イオン交換ミニカラムは 25 mg とすれば充填剤量当たりの負荷量が通知一斉試験法と同じになる。このため、本検討では ODS ミニカラムは充填剤量 50 mg, グラファイトカーボン及び陰イオン交換ミニカラムは 20~30 mg のものを用いて検討することとした。

抽出液中のアセトニトリル/水の比率は食品に含まれる水分及び抽出前の膨潤の有無によって異なるが、いずれの食品も (8:2) ~ (9:1) 程度と考えられる。逆相系のミニカラムで精製する場合、アセトニトリルの比率が低いと溶出されにくいいため、抽出液をそのままミニカラムに負荷する方法を検討する場合は、抽出液のアセトニトリル/水の比率が (8:2) と想定してミニカラムからの溶出状況を確認することとした。まず、ODS ミニカラムを用いてアセトニトリル/水 (8:2) 1 mL で負荷し、アセトニトリル/水 (8:2), アセトニトリル/水 (9:1), アセトニトリル/水 (19:1) またはアセトニトリル 0.5 mL で溶出する方法を検討した。その結果、*silaflofen* は溶出溶媒アセトニトリル/水 (8:2) 及びアセトニトリル/水 (9:1) でそれぞれ 20 及び 57% と低値となったが、アセトニトリル/水 (19:1) 及びアセトニトリルでは 92% 以上の良好な回収率が得られた。いずれの溶媒を用いても *emamectin B1a*, *propamocarb*, *spinosyn A*, *spinosyn D*, *spiroxamine* 及び *tridemorph* の回収率は 50% 以下となり、アセトニトリル比率を上げて

も回収率は向上しなかった。これらの農薬はいずれも比較的低極性であり、特にマトリックス非存在下では溶出しにくいものと考えられた。その他の農薬は溶媒によらず 80% 以上の良好な回収率が得られた。

陰イオン交換カラムである PSA からの回収率を確認した。ODS と同様、アセトニトリル/水 (8:2) 1 mL で負荷し、アセトニトリル/水 (8:2), アセトニトリル/水 (9:1), アセトニトリル/水 (19:1) またはアセトニトリル 0.5 mL で溶出した。その結果、アセトニトリル/水 (8:2) を溶出溶媒として用いたとき、*tridemorph* で 78% となったが、その他の溶媒ではいずれの農薬も 80% 以上の良好な回収率が得られた。また、SAX を用いた場合も、アセトニトリル/水 (8:2) 1 mL で負荷し、アセトニトリル/水 (9:1) 0.5 mL で溶出することによっていずれの農薬も 80% 以上の良好な回収率が得られた。

ODS-PSA の連結カラムからの回収率を確認した。アセトニトリル/水 (8:2) 1 mL で負荷し、アセトニトリル/水 (9:1) 0.5 mL で溶出した結果、ODS で低回収率となった *silaflofen*, *emamectin B1a*, *propamocarb*, *spinosyn A*, *spinosyn D*, *spiroxamine* 及び *tridemorph* を除き、いずれの農薬も 80% 以上の良好な回収率が得られた。

これらの結果から、ODS, PSA, SAX 及び ODS-PSA を用いる場合はいずれもアセトニトリル/水 (8:2) 1 mL で負荷し、アセトニトリル/水 (9:1) 0.5 mL で溶出することとした。

グラファイトカーボンミニカラムを用いてアセトニトリル/水 (8:2) 1 mL で負荷し、アセトニトリル/水 (9:1) またはアセトニトリル 0.5 mL で溶出して、各農薬の回収率を確認した。その結果、いずれも検討農薬の 3 割以上で回収率 70% 未満となり、特に平面構造を有する農薬で溶出されにくい傾向が確認された。そこで、アセトニトリル/水 (8:2) 1 mL またはアセトニトリル/トルエン (3:1) 1 mL で負荷し、アセトニトリル/トルエン (3:1) 1 mL で溶出した結果、9 割以上の農薬で 70% 以上の回収率が得られた。

通知一斉試験法と同様に、グラファイトカーボンの下に PSA を連結し、回収率を確認した。負荷溶媒はアセトニトリル/水 (8 : 2) 1 mL またはアセトニトリル/トルエン (3 : 1) 1 mL、溶出溶媒はアセトニトリル/トルエン (3 : 1) 1 mL とした。その結果、9 割以上の農薬で 70% 以上の回収率が得られた。アセトニトリル/トルエン (3 : 1) 1 mL で負荷した方が若干、回収率 80% 以上の農薬が多かった。

(4) 色素の除去効果

クロロフィル等の色素が多いほうれんそうを用いてグラファイトカーボン-PSA での色素除去効果を確認した。①ほうれんそう抽出液 1 mL を負荷し、アセトニトリル/トルエン (3 : 1) 1 mL で溶出する方法と、②ほうれんそう抽出液 (1 mL) の溶媒をアセトニトリル/トルエン (3 : 1) に置換後、負荷し、アセトニトリル/トルエン (3 : 1) 1 mL で溶出する方法を検討した。その結果、①及び②のいずれも緑色色素は除去され、溶出液は黄色となり、負荷溶媒による差は認められなかった (図 1-1 (a))。

グラファイトカーボンミニカラム精製はクロロフィル等の色素の除去に有効であるが、ODS や陰イオン交換 (PSA 及び SAX) ミニカラムによる精製でも用いる溶媒によっては色素を除去することが可能である。そこで、ほうれんそうの抽出液 (1 mL) を用いて、ODS、PSA 及び SAX の各カラム、ODS-PSA 及び ODS-PSA-SAX の各連結カラムに負荷し、アセトニトリル/水 (9 : 1) で溶出して色素の除去効果を確認した。その結果、PSA や SAX では溶出液が緑色となり、用いた負荷・溶出溶媒では色素除去効果は低いことが示唆された。一方、ODS や ODS-PSA、ODS-PSA-SAX では黄色となり (図 1-1 (b))、グラファイトカーボン-PSA からの溶出液 (図 1-1 (a)) とほぼ同じ色の溶液が得られた。クロロフィル等の緑色色素は極性が低いものが多いため、アセトニトリル/水 (9 : 1) を溶出溶媒として用いると ODS から溶出せず、グラファイトカーボンと同程度の色素除去効果を示したものと考えられた。グラファイトカーボ

ンミニカラムから農薬を溶出するためにはトルエンを用いる必要があるが、ODS-PSA ではトルエンは不要であるため、ODS-PSA で精製を行うこととした。

(5) マトリックスの影響の比較

大豆を ODS、PSA 及び SAX の各ミニカラム、ODS-PSA 及び ODS-PSA-SAX の各連結カラムを用いて精製し、マトリックスの影響を比較した。なお、マトリックスの影響は溶媒標準溶液に対するマトリックス標準溶液のピーク面積比を求めて評価した。その結果、ODS よりも PSA や SAX の方が <0.8 または >1.2 となった化合物数が少なく、精製効果が高いことが示された (図 1-2)。また、PSA や SAX ミニカラムを単独で使用した場合と ODS-PSA または ODS-PSA-SAX の連結カラムでは <0.8 または >1.2 となった化合物数に大きな差は見られなかった。これらの結果から、大豆においてマトリックスの影響を低減するためには PSA または SAX を使用するのが良いと考えられた。

(6) 塩析の精製効果の検証

ODS 及び PSA の連結カラムを用いて精製 [アセトニトリル/水 (8 : 2) で負荷、アセトニトリル/水 (9 : 1) で溶出] を行う場合、抽出液に含まれる酸性夾雑成分及び比較的低極性の夾雑成分は除去できると考えられるが、中性～塩基性の高極性夾雑成分は除去できない。高極性夾雑成分の大部分は通知一斉試験法で採用されている塩析を行えば除去可能と考えられる。そこで、塩析で高極性夾雑成分を除去することによってマトリックスの影響が低減できるか検討を行った。図 1-3 に溶媒標準溶液に対するマトリックス標準溶液のピーク面積比が <0.8 または >1.2 となる化合物数を示した。玄米では、塩析の有無で <0.8 または >1.2 となる化合物数に大きな差は見られなかった。一方、大豆やほうれんそうでは塩析を行うことによって <0.8 または >1.2 となる化合物数が減少し、高極性夾雑成分の除去がマトリックスの影響の低減に効果があることが示唆された。図 1-4 に回収率への影響 (溶媒標準溶液を用いて定量)

を示した。大豆では塩析を行うことにより回収率 80%以上の化合物数が増加した。これに対し、ほうれんそうでは塩析を行うと高極性農薬の回収率が低下したため、回収率 80%以上の化合物数が減少した。これらの結果から、塩析を行うことにより、食品によってはマトリックスの影響が低減するものの、一部の農薬では回収率が低下すること及び前述したように時間を要し、操作が煩雑であることから塩析は行わないこととした。

以上の検討結果から、通知一斉試験法と同じ方法で抽出した後、抽出液の一部 (1 mL) を ODS 及び PSA の連結カラムで精製する方法を確立した。本精製操作は非常に簡便であり、手作業でも迅速に行うことができるが、より簡便化を図るため、一連の精製操作を自動前処理装置で行うこととした。自動前処理装置では 1 検体 7 分 (ノズル洗浄を含む) で精製操作を行うことができ、終夜運転も可能であるため、検査の効率化が可能である。

2. 添加回収試験

確立した分析法を用いて、玄米、大豆、りんご、キャベツ及びほうれんそうについて添加濃度 0.01 ppm で 5 併行の添加回収試験を行った。玄米中の dinotefuran (残留濃度 0.01 ppm, 基準値 2 ppm), りんご中の carbendazim (残留濃度 0.01 ppm, 基準値 3 ppm), cyprodinil (残留濃度 0.04 ppm, 基準値 5 ppm) 及び thiacloprid (残留濃度 0.008 ppm, 基準値 2 ppm), ほうれんそう中の mandipropamid (残留濃度 0.04 ppm, 基準値 25 ppm) の残留が認められたため、評価対象外とした。なお、いずれも基準値未満であった。添加回収試験結果を表 1-1 及び図 1-5 に示した。玄米中の quinalphos で妨害ピークが認められた以外はいずれの食品/農薬等においても選択性の目標値を満たした。玄米、りんご及びキャベツでは検討農薬の 9 割以上で真度及び精度の目標値を満たした。一方、大豆及びほうれんそうでは検討農薬の 2 割以上で真度の目標値を満たさなかった。添加回収試験で真度の目標値を満たさなかった農薬の多くがマトリックスの影響が原因と考えられた (図 1-6)。

比較のため、通知一斉試験法でマトリックスの影響及び回収率を求めた。その結果、いずれの食品も検討農薬の 9 割以上で溶媒標準溶液に対するマトリックス標準溶液のピーク面積比が 0.8~1.2 となり、大豆やほうれんそうでは改良法よりもマトリックスの影響が小さかった (図 1-7)。また、大豆及びほうれんそうでは通知一斉試験法の方が改良法よりも回収率 70~120%の範囲の化合物数が多かった (図 1-8)。通知一斉試験法は、塩析及びグラファイトカーボンミニカラム精製があるため、改良法と比べて高極性夾雑成分や平面構造を有する夾雑成分の精製効果が高いものと考えられた。しかしながら、通知一斉試験法では塩析操作があるため高極性農薬の回収率が低く、玄米、りんご及びキャベツのような夾雑成分が比較的少ない食品では回収率 70~120% (溶媒標準溶液による定量) の範囲の化合物数が改良法と比べて少なかった。これらの結果から、食品によっては改良法の方が通知一斉試験法よりも適用できる農薬が多いことが示された。

[2] GC-MS/MS による残留農薬等一斉分析法

1. 測定条件

本検討では GC-MS/MS で測定可能な農薬を対象とした。測定は高感度な測定が可能な APCI 法を用いて行った。EI 法では通常、キャリアーガスとしてヘリウムを用いるが、APCI 法ではヘリウムの代わりに窒素を用いても大きな感度低下は見られないため、窒素を用いた。最終試験溶液は、試料中濃度が 0.01 ppm のとき、0.002 µg/mL となるように試験溶液の調製方法を検討した。

2. 試験溶液調製方法の検討

(1) 抽出

本検討では簡便且つ規格基準への適否判定に用いることができる一斉分析法を開発することを目的とした。このため、抽出は通知一斉試験法「GC/MS による農薬等の一斉試験法 (農産物)」に従って行い、果実・野菜 (試料 20.0 g) ではアセトニトリル (1 回目 50 mL, 2 回目 20 mL) で 2 回ホモジナイズ、穀類・豆類 (試料 10.0 g) では

水 (20 mL) を加えて膨潤した後、アセトニトリル (1 回目 50 mL, 2 回目 20 mL) で 2 回ホモジナイズ、茶 (試料 5.00 g) では水 (20 mL) を加えて膨潤した後、アセトニトリル (1 回目 50 mL, 2 回目 20 mL) で 2 回ホモジナイズを行い、抽出することとした。

(2) 精製

GC-MS/MS を用いて食品中の残留農薬を測定する際、マトリックスの影響を受けずに定量するためには測定前に脂質等の低極性夾雑成分や、高極性夾雑成分、酸性夾雑成分、色素等を除去する必要がある。通知一斉試験法は塩析により高極性夾雑成分を除去した後、ODS ミニカラムで低極性夾雑成分を除去し (穀類, 豆類, 茶の場合), PSA 及びグラファイトカーボンで酸性夾雑成分及び色素を除く方法であり、海外で広く用いられている QuEChERS 法よりも精製効果が高いと考えられる。しかしながら、通知一斉試験法は精製に供する抽出液量が多いため、充填剤量が 500~1000 mg のミニカラムを用いており、使用する溶媒量も多い。また、塩析や、沸点が比較的高い水やトルエンを濃縮・乾固する操作があるため、時間を要する。そこで、溶媒や試薬の使用量を削減するとともに、操作時間の短縮を図ることとした。また、一連の精製操作を自動前処理装置を用いて行うことができるよう検討した。

①低極性夾雑成分の除去方法の検討

低極性夾雑成分を除去するため、C₁₈ ミニカラム精製を検討した。操作時間を短縮するため、濃縮は行わず、抽出液をそのままミニカラムに負荷することとした。また、精製に用いるミニカラムの充填剤量を削減するため、精製に供する抽出液量を 1 mL (通知一斉試験法の 1/20) とし、C₁₈ ミニカラムは充填剤量 30 mg (通知一斉試験法の約 1/33) のものを用いることとした。通知一斉試験法では塩析後のアセトニトリル層を C₁₈ ミニカラムに負荷し、アセトニトリルで溶出する。しかし、本条件では農薬とともに多くの低極性夾雑成分も溶出してしまう可能性が高い。そこで、C₁₈ ミニカラム精製における溶出溶媒/溶媒量の農薬回収

率及び精製効果への影響について検討した。溶出溶媒としてアセトニトリル/水 (8 : 2), (9 : 1),

(19 : 1) 及びアセトニトリルを用いて溶出溶媒量 0.1~1 mL で農薬の回収率を確認した。図 2-3 に極性が低い silafluofen (log P_{ow} 8.2) の回収率を示した。アセトニトリル/水 (8 : 2) 0.6 mL では低回収率 (約 70%) であったが、アセトニトリル/水 (9 : 1), (19 : 1) 及びアセトニトリルでは 0.5 mL 以上で良好な回収率 (≥95%) が得られた。C₁₈ ミニカラムからの溶出溶媒としてアセトニトリル/水 (9 : 1), アセトニトリル/水 (19 : 1) 及びアセトニトリル (いずれも 0.6 mL) を用いて、図 2-1 に従って (C₁₈ ミニカラム (一段目) からの溶出溶媒/溶媒量を除く) 大豆のブランク試験溶液を調製し、GC- (EI) MS でスキャン測定して TIC クロマトグラムを比較した。その結果、アセトニトリル/水 (9 : 1) 及び (19 : 1) の方がアセトニトリルよりも精製効果が高いことが示された (図 2-4)。アセトニトリル/水 (9 : 1) 及び (19 : 1) では TIC クロマトグラムに大きな違いは認められなかった。溶出に用いるアセトニトリル量が多いと、後述する二段目の C₁₈ ミニカラム精製での洗浄の際に農薬が保持されず、溶出されやすくなってしまふことから、アセトニトリル/水 (9 : 1) 0.6 mL で溶出することとした。なお、本条件で低回収率 (<80%, マトリックス存在下) となったのは fenpropimorph (75%) のみであった。

②高極性夾雑成分の除去方法の検討

通知一斉試験法では塩析により、高極性夾雑成分を除去する方法を採用しているが、操作がやや煩雑である。そこで、①で得られた溶出液を水または塩化ナトリウム溶液で希釈しながら、C₁₈ ミニカラム (二段目) に負荷することで、農薬は保持させ、高極性夾雑成分のみ溶出して除去し、その後、保持した農薬を低極性溶媒で溶出する方法を検討した。なお、C₁₈ ミニカラム (二段目) への負荷・洗浄の際、充填剤量が多いカラムを用いた方が農薬をカラムに保持させやすいと考えられたため、C₁₈ ミニカラムは充填剤量 50 mg のものを用いた。溶出液を希釈する際は、水よりも塩化

ナトリウム溶液を用いた方が、塩析効果により農薬が C₁₈ ミニカラム（二段目）に保持されやすくなるものと推測された。そこで、希釈溶媒として水、5 w/v%塩化ナトリウム溶液及び 10 w/v%塩化ナトリウム溶液を検討した。C₁₈ ミニカラム（二段目）からの溶出にはアセトン/ヘキサン（15 : 85）1 mL を用いた。

ほうれんそう抽出液に農薬を添加し、C₁₈ ミニカラム（一段目）に負荷した。溶出液に 10 w/v%塩化ナトリウム溶液 25 mL を加えて希釈しながら、C₁₈ ミニカラム（二段目）に負荷し、水で洗浄後、アセトン/ヘキサン（15 : 85）1 mL で溶出した。その結果、cyanazine, dimethoate, lenacil, fenpropimorph, oxadixyl, phosphamidon 及び propoxur で回収率 70%未満となったが(図 2-5-1), その他の農薬では良好な回収率が得られた。低回収率の農薬のうち、fenpropimorph は①で述べたように C₁₈ ミニカラム（一段目）から十分溶出されないことが主な原因と考えられた。一方、cyanazine, dimethoate, lenacil, oxadixyl, phosphamidon 及び propoxur は比較的極性の高い農薬 (log P_{ow} ≤ 2.1) であるため、C₁₈ ミニカラム（二段目）での負荷・洗浄の際に一部溶出してしまふことが原因と考えられた。これらの農薬は希釈溶媒として水を用いると回収率が 1~26%低下したことから(図 2-5-1), 希釈溶媒として 10 w/v%塩化ナトリウム溶液を用いると塩析効果によって若干回収率が向上することが確認された。また、ピレスロイド系農薬 (fluvalinate, permethrin 等) や有機塩素系農薬 (DDT, DDE 等) は、希釈する溶媒を 10 w/v%塩化ナトリウム溶液から水に変更すると回収率が低下した(図 2-5-2)。これらの農薬は低極性であるため、水のみで希釈するとミニカラムの内壁または充填剤に吸着し、アセトン/ヘキサン（15 : 85）を加えても溶出されにくくなることが示唆された。

以上の結果から、C₁₈ ミニカラム（一段目）からの溶出液を 10 w/v%塩化ナトリウム溶液で希釈しながら、C₁₈ ミニカラム（二段目）に負荷し、水で洗浄後、低極性溶媒で農薬を溶出することとした。

なお、本条件で低回収率となる農薬 (fenpropimorph を除く) は、昨年度確立した LC-MS/MS を用いた一斉分析法で分析が可能であった。

③酸性夾雑成分及び色素の除去方法の検討

酸性夾雑成分を除去するため、②で得られた C₁₈ ミニカラム (50 mg ; 二段目) の下に PSA ミニカラム (30 mg) を接続し、農薬を C₁₈ ミニカラムから溶出するとともに、PSA ミニカラムで精製する方法を検討した。まず、C₁₈ ミニカラム (50 mg) の下に PSA ミニカラム (30 mg) を接続し、アセトン/ヘキサン (15 : 85) で負荷・溶出したところ (負荷及び溶出溶媒量 1 mL), 比較的極性が高い dimethoate (42%) 及び oxadixyl (63%) を除き、良好な回収率が得られた。次に、ほうれんそう抽出液に農薬を添加し、図 2-1 に従って (PSA の溶出溶媒/溶媒量を除く) 試験溶液を調製し、PSA の溶出溶媒及び溶媒量による回収率への影響を検討した。溶出溶媒/溶媒量はアセトン/ヘキサン (15 : 85), (20 : 80), (25 : 75) 及び (30 : 70) 0.6~1 mL を検討した。図 2-6 に各溶媒での azoxystrobin の回収率を示した。アセトン/ヘキサン (15 : 85) 及び (20 : 80) では 1 mL で溶出することにより 90%以上の回収率が得られた。また、アセトン/ヘキサン (25 : 75) では 0.8 mL 以上、アセトン/ヘキサン (30 : 70) では 0.7 mL 以上で溶出することにより、90%以上の回収率が得られた。

C₁₈ ミニカラム (30 mg ; 一段目) からの回収率が低い農薬や C₁₈ ミニカラム (50 mg ; 二段目) への負荷及び洗浄の際に溶出してしまう高極性農薬を除き、アセトン/ヘキサン (15 : 85) 1 mL を溶出溶媒として用いた場合に PSA ミニカラムから十分溶出せず、低回収率となるのは fludioxonil のみであった。fludioxonil はアセトン/ヘキサン (20 : 80) では 1 mL, アセトン/ヘキサン (25 : 75) では 0.9 mL 以上、アセトン/ヘキサン (30 : 70) では 0.7 mL 以上で溶出した場合、80%以上の回収率が得られた (図 2-7)。

図 2-8 に各溶出溶媒を用いて得られたほうれんそうのブランク試験溶液の写真を示した。溶出溶媒のアセトン濃度を高くするほど、試験溶液の色が濃くなり、色素が溶出することが示された。

これらの結果から、fludioxonil を除き高い回収率が得られ、精製効果も高いアセトン/ヘキサン (15 : 85) 1 mL で溶出することとした。なお、本溶出条件では、茶においても試験溶液は薄い黄色であったことから、グラファイトカーボンによる追加精製は不要と考えられた。

確立した試験溶液の調製方法を図 2-1 に示した。グラファイトカーボンを精製に用いる場合、平面構造を有する農薬を溶出させるため、トルエンを溶出溶媒として用いる必要があり、濃縮操作に時間がかかるが、本方法はグラファイトカーボン精製を行わない方法であるため、操作時間を短縮することができた。

2. 妥当性評価試験

玄米、大豆、キャベツ、ほうれんそう、ばれいしょ、りんご、オレンジ及び茶について添加濃度 0.01 ppm で 1 日 2 併行、5 日間の妥当性評価試験を行った。キャベツ中の etofenprox (残留濃度 0.01 ppm, 基準値 0.9 ppm), tolclofos methyl (残留濃度 0.006 ppm, 基準値 2 ppm), りんご中の acrinathrin (残留濃度 0.004 ppm, 基準値 0.7 ppm), cypermethrin (残留濃度 0.006 ppm, 基準値 2 ppm) 及び tebufenpyrad (残留濃度 0.006 ppm, 基準値 1 ppm), オレンジ中の fludioxonil (残留濃度 0.2 ppm, 基準値 10 ppm), pyrimethanil (残留濃度 0.4 ppm, 基準値 10 ppm), 茶中の etoxazole (残留濃度 0.004 ppm, 基準値 15 ppm) の残留が認められたため、評価対象外とした。なお、いずれも基準値未満であった。妥当性評価試験結果を表 2-1 及び図 2-9 に示した。大豆中の triadimenol 及び茶中の isoprocarb で妨害ピークが認められた以外はいずれの食品/農薬の組み合わせにおいても妥当性評価ガイドラインの選択性の目標値を満たした。真度、併行精度、室内精度及び選択性の目標値を満たしたのは、玄米 151 中 142 化合物 (94%), 大豆 151 中 132 化合物 (87%), キャベツ 149 中 140 化

合物 (94%), ほうれんそう 151 中 143 化合物 (95%), ばれいしょ 151 中 141 化合物 (93%), りんご 148 中 140 化合物 (95%), オレンジ 149 中 142 化合物 (95%), 茶 150 中 139 化合物 (93%) であった。いずれの食品/農薬の組み合わせも真度は 120% 以下であった。

マトリックスの測定への影響を表 2-2 及び図 2-10 に示した。茶において一部の農薬でマトリックスの影響が大きかったものの、その他の食品/農薬では大きな影響はなく、本方法は精製効果が高いことが示された。茶の deltamethrin を除き、溶媒標準溶液に対するマトリックス標準溶液のピーク面積比は 0.8 以上であった。したがって、茶の deltamethrin (真度 62%) を除き、真度が <70% となり、妥当性評価ガイドラインの目標値を満たさなかった化合物はいずれもマトリックスの影響が原因ではないと考えられた。

全ての食品で真度が低かった農薬を表 2-3 に示した。fludioxonil は PSA ミニカラムから十分溶出されないことが原因と考えられた。一方、fludioxonil 以外の農薬は極性が比較的高いことから ($\log P_{ow}$ が 2.1 以下)、二段目の C_{18} への負荷及び洗浄の際に溶出することが原因と考えられた。なお、 $\log P_{ow}$ が 2.1 未満であっても dimethenamid ($\log P_{ow}$ 1.9), fosthiazate ($\log P_{ow}$ 1.7), metalaxyl ($\log P_{ow}$ 1.8) は良好な回収率が得られたことから、 $\log P_{ow}$ 1~2 程度の農薬が二段目の C_{18} に保持されるか否かは $\log P_{ow}$ の情報のみでは判別できないと考えられた。

大豆では、これらの農薬に加えて $\log P_{ow}$ が 5.4 以上の低極性の農薬の回収率が低かった (2-4)。これらの農薬を大豆抽出液に添加して回収率を求めたところ、いずれの農薬も良好な回収率が得られたことから、アセトニトリル (1 回目 50 mL, 2 回目 20 mL) を抽出溶媒として用いると大豆のような脂質の多い試料から十分に回収できないものと考えられた。これらの低極性農薬を抽出する場合は、アセトニトリル量を多くするか、アセトンなどの溶媒を用いる必要があると考えられた。

[3] LC-MS/MS による残留動物用医薬品等一斉分析法

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 3-1 に示す．検討した精製方法の概要を図 3-2 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 3-1）．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 A，ロイコマイシン A5 及びネオスピラマイシン I 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 3-2～3-4）．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 3-5）．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つ

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 3-6)。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 3-1 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 3-7 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 3-2）、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 3-1～3-3）、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

本課題では残留農薬等検査において使用頻度が高い通知一斉試験法の精製操作について、簡便化を図るとともに、確立した方法の自動化を検討した。

[1] LC-MS/MS による残留農薬等一斉分析法

通知一斉試験法「LC/MS による農薬等の一斉試験法I（農産物）」の精製操作を改良し、簡便化・迅速化した。確立した方法は通知一斉試験法の抽出方法で得られた抽出液の一部をそのまま ODS ミニカラム (50 mg) 及び PSA ミニカラム (30 mg) を連結したカラムで精製し、LC-MS/MS で測定する方法である。確立した精製方法は、通知一斉試験法で採用されている塩析や濃縮操作を省略し、ミニカラムの充填剤量を約 1/20 にした。これにより、操作時間が大幅に短縮しただけではなく、溶媒・試薬の使用量や分析にかかるコストを削減することができた。本分析法は、通知一斉試験法と抽出条件が同一であり、抽出効率に起因する分析値の差異は生じないため、規格基準の適否判定に用いることができる方法である。また、本精製操作は自動前処理装置で行うことができるため、検査担当者の熟練度等による個人差が生じにくく、検査の効率化が期待できる方法である。

[2] GC-MS/MS による残留農薬等一斉分析法

通知一斉試験法「GC/MS による農薬等の一斉試験法（農産物）」の精製操作を改良し、簡便化・迅速化した。使用する溶媒量を削減するため、精製に供する抽出液量を通知一斉試験法の 1/20 にした。抽出液をそのまま C₁₈ ミニカラムに負荷し、アセトニトリル/水 (9:1) で溶出することで、低極性夾雑成分を除去することができた。また、一

段目の C₁₈ (30 mg) ミニカラムからの溶出液に塩化ナトリウム溶液を混合後、二段目の C₁₈ (50 mg) ミニカラムで精製することで、高極性夾雑成分を除去することができたため、塩析を省略することができた。さらに、PSA ミニカラム精製を行うことで、酸性夾雑成分や C₁₈ ミニカラム精製では除くことができなかった色素を除去することができ、茶のように色素が多い食品においてもグラフアイトカーボンミニカラムによる精製は不要であった。濃縮は、GC-MS/MS 装置の感度に応じ、最終試験溶液の濃縮倍率を変更する場合のみ行うこととした。一連の精製操作は自動前処理装置を用いて行った。以上により、操作時間が大幅に短縮しただけではなく、精製における溶媒・試薬の使用量を削減することができた。

玄米、大豆、キャベツ、ほうれんそう、ばれいしょ、りんご、オレンジ及び茶を用いて、151 化合物を対象に添加濃度 0.01 ppm で妥当性評価試験を行った。その結果、大豆では検討農薬の 87%、その他の食品では 93%以上で妥当性評価ガイドラインの目標値を満たした。なお、極性が比較的高い農薬は、二段目の C₁₈ ミニカラムでの負荷・洗浄の際に溶出し、真度が低くなる傾向が見られたが、これらの農薬は昨年度確立した LC-MS/MS を用いた一斉分析法で分析が可能である。本分析法は、通知一斉試験法と抽出条件が同一であり、抽出効率に起因する分析値の差異は生じないため、規格基準の適否判定に用いることができる方法である。加えて、本精製操作は自動前処理装置で行うことができるため、検査担当者の熟練度等による個人差が生じにくく、検査の効率化が期待できる方法と考えられた。

[3] LC-MS/MS による残留動物用医薬品等一斉分析法

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り、抽出効率に起因する分析値の差異は生じないため、規格基準への適否判定に用いることができる。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

志田(齊藤)静夏, 齋藤真希, 古宮友恵, 田口貴章, 堤智昭: GC-MS/MS を用いた残留農薬一斉試験法の簡便化の検討～通知一斉試験法の精製方法の改良～, 日本食品衛生学会第 119 回学術講演会 (2023.10.12)

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1-1 添加回収試験結果

	玄米		大豆		りんご		キャベツ		ほうれんそう	
	真度	併行精度 (RSD%)	真度	併行精度 (RSD%)	真度	併行精度 (RSD%)	真度	併行精度 (RSD%)	真度	併行精度 (RSD%)
2-(1-Naphthyl)acetamide	88	3.9	75	3.2	93	5.6	93	3.5	87	3.5
3-Hydroxycarbofuran	91	1.9	89	7.9	90	5.7	94	4.4	93	4.2
Abamectin	75	10.3	72	11.2	82	9.6	74	8.4	89	7.9
Acephate	95	2.6	82	3.1	91	6.2	93	2.3	78	2.4
Acetamidrid	93	2.1	63	3.2	85	7.0	93	2.0	85	2.9
Aldicarb	102	7.9	74	8.7	77	5.5	86	9.4	81	9.6
Aldicarb sulfoxide	91	2.6	85	2.0	91	3.1	94	4.2	89	4.3
Aldoxycarb	89	6.5	84	9.0	95	6.3	98	3.3	87	4.5
Ametryn	90	4.5	90	8.3	85	7.1	99	2.4	84	5.3
Anilofos	82	5.0	80	7.2	86	12.1	93	5.5	87	9.2
Atrazine	98	4.6	81	2.3	86	6.8	98	4.5	94	7.3
Azamethiphos	89	6.2	58	5.1	92	7.2	95	2.7	86	2.8
Azinphos methyl	94	3.9	50	2.9	88	2.0	67	3.2	86	6.2
Azoxystrobin	83	4.0	71	3.8	85	8.5	89	5.1	77	5.5
Bendiocarb	94	4.4	102	1.8	88	5.8	102	2.2	82	3.9
Benzofenap	89	2.4	85	15.7	83	6.7	94	4.4	68	6.6
Bitertanol	88	6.6	68	5.0	77	8.1	81	8.4	58	5.4
Boscalid	86	2.1	39	7.8	85	10.6	77	5.5	79	6.9
Bromacil	92	4.9	46	1.4	80	2.5	59	1.9	74	3.5
Butafenacil	87	5.1	77	9.6	85	14.9	88	3.2	80	8.3
Butamifos	88	6.9	87	4.2	81	4.7	85	2.6	74	5.3
Cafenstrole	81	6.4	71	5.9	84	8.1	82	2.7	70	6.2
Carbaryl	90	7.5	100	6.1	97	2.5	99	2.1	85	4.0
Carbendazim	91	3.1	73	8.8	—	—	82	4.9	83	5.7
Carbofuran	112	5.2	88	7.6	87	5.6	98	5.0	120	6.1
Carboxin	83	6.0	71	3.1	78	4.5	60	4.0	54	6.5
Carpropamid	99	3.1	66	6.7	83	12.3	87	2.1	78	7.4
Chlorfluazuron	83	8.1	46	8.1	75	9.4	75	6.5	57	6.5
Chloridazon	92	2.5	74	5.9	101	3.8	92	4.8	89	3.0
Chloroxuron	93	7.5	77	8.7	86	10.7	93	3.0	79	6.7
Chromafenozide	87	4.2	76	6.9	83	3.8	86	4.7	82	5.8
Clofencet	41	6.7	61	2.3	65	9.6	76	7.1	74	7.2
Clofentezine	90	5.9	81	8.6	80	5.7	83	6.4	71	6.8
Clomeprop	90	9.4	76	12.5	81	13.7	85	3.6	59	4.2
Cloquintocet mexyl	86	9.1	87	14.7	98	13.9	92	6.7	83	7.9
Clothianidin	94	2.9	35	5.3	92	1.4	61	2.9	75	5.4
Coumaphos	87	1.8	85	6.1	79	10.5	88	6.4	82	9.8
Cumyluron	85	6.7	73	7.0	86	8.2	86	4.9	72	4.7
Cyanazine	88	7.2	18	5.7	88	5.7	87	3.5	79	7.1
Cyazofamid	91	5.2	57	4.7	84	4.7	80	4.1	78	4.6
Cyflufenamid	84	3.9	83	12.2	85	4.6	89	4.9	79	4.1
Cymoxanil	93	5.4	64	4.1	89	7.5	87	5.3	55	5.7
Cyproconazole	80	5.0	35	3.3	86	5.5	75	5.0	64	2.7
Cyprodinil	89	5.3	84	8.8	—	—	87	4.0	83	10.8
Daimuron	86	5.1	75	10.2	89	10.8	90	5.0	83	5.3
Demeton-S-methyl sulfoxide	97	3.9	89	9.6	91	9.7	100	4.7	96	3.1
Dicrotophos	90	3.6	101	13.6	107	7.5	100	8.1	99	10.3
Difenoconazole	92	5.2	71	6.2	85	5.5	86	2.9	53	6.7
Diflubenzuron	84	7.9	46	12.9	83	6.0	72	1.2	72	5.0
Dimethirimol	89	5.8	65	2.3	77	8.5	77	6.5	81	9.2
Dimethoate	99	2.6	81	6.7	87	4.7	90	4.7	90	2.2
Dimethomorph (E, Z)	87	3.6	74	7.2	89	4.9	84	3.1	78	6.9
Dinotefuran	—	—	82	2.7	89	7.6	92	2.3	84	1.8
Diuron	77	4.2	87	6.8	100	5.6	92	5.1	92	5.7
Emamectin B1a	30	14.7	52	13.5	74	13.6	76	18.1	87	8.4
Epoxiconazole	90	7.7	86	3.6	93	14.4	93	4.9	88	8.3
Ethiofencarb	85	7.3	74	3.1	83	5.3	74	4.5	70	2.0
Ethiprole	94	14.5	51	21.3	89	19.9	84	9.3	90	8.7
Etobenzanid	86	5.5	62	8.2	77	13.6	78	4.9	64	4.0
Etoxazole	93	4.6	82	7.7	91	6.8	99	5.8	90	3.9
Fenamidone	85	9.7	49	7.2	88	4.6	85	3.0	85	9.1
Fenamiphos	89	7.1	82	7.5	94	8.8	87	5.8	81	3.4
Fenbuconazole	88	5.3	54	7.6	81	5.8	81	2.7	74	6.9
Fenobucarb	91	4.5	87	7.1	89	6.6	96	4.5	86	3.2
Fenoxaprop ethyl	94	7.3	94	8.5	80	9.9	88	3.8	73	5.4

表 1-1 (つづき)

	玄米		大豆		りんご		キャベツ		ほうれんそう	
	真度	併行精度 (RSD%)	真度	併行精度 (RSD%)	真度	併行精度 (RSD%)	真度	併行精度 (RSD%)	真度	併行精度 (RSD%)
Fenoxycarb	87	4.8	53	7.5	82	9.8	90	7.1	76	6.6
Fenpyroximate E	92	2.9	71	3.2	79	5.6	81	7.3	66	6.3
Fenpyroximate Z	84	3.6	60	4.2	83	4.4	80	4.6	74	3.1
Fensulfotion	84	4.7	70	2.6	84	9.9	84	4.4	78	7.6
Ferimzone E	89	7.7	75	9.0	86	5.3	88	4.9	84	4.8
Fipronil	61	10.1	168	11.8	97	9.9	101	10.5	120	12.0
Fonicamid	93	4.1	77	7.0	95	6.5	40	3.4	85	2.6
Fluacrypyrim	84	7.0	92	5.8	86	5.9	92	2.6	68	6.4
Fluazifop-butyl	102	4.6	81	4.0	88	6.2	76	6.5	78	7.8
Fluazinam	89	21.5	218	12.8	104	8.6	31	5.4	146	22.2
Fludioxonil	94	13.3	74	11.7	85	8.4	88	3.4	73	11.7
Flufenacet	89	6.7	71	8.7	87	7.9	86	4.5	78	4.4
Fluridone	91	3.4	67	10.5	87	6.7	91	2.9	85	3.0
Flusilazole	91	6.6	54	7.4	96	6.9	70	2.6	72	4.0
Flutolanil	84	6.5	71	4.7	93	10.3	82	2.6	79	5.0
Fosthiazate	87	4.1	76	10.0	91	4.8	98	6.4	83	6.5
Furametpyr	88	6.8	71	1.5	87	9.0	83	4.6	81	6.9
Furathiocarb	56	6.9	65	18.7	83	16.2	75	5.2	22	15.4
Hexaconazole	89	4.9	43	9.3	71	4.2	79	2.7	61	7.4
Hexazinone	90	4.3	76	3.8	84	3.8	88	3.3	83	3.9
Hexythiazox	93	5.1	56	13.4	71	8.5	70	2.4	48	3.8
Imazalil	108	4.8	82	11.1	84	9.5	65	7.7	60	10.2
Imazamethabenz methyl	92	5.6	74	1.9	80	8.5	88	4.4	83	1.9
Imibenconazole	80	7.3	77	6.7	86	13.4	84	2.4	44	9.9
Imidacloprid	89	2.6	49	3.3	103	3.7	98	4.8	93	5.3
Indanofan	84	9.6	54	9.4	86	5.0	85	9.6	82	7.4
Indoxacarb	87	3.5	71	6.3	90	9.4	83	9.9	70	6.2
Iprobenfos	97	6.6	103	6.6	92	8.7	104	2.4	86	2.9
Iprovalicarb	90	8.9	78	5.1	88	11.3	88	5.0	82	4.8
Isoprocab	87	4.6	104	10.3	89	8.9	100	3.0	94	12.1
Isoprothiolane	90	7.6	85	12.5	86	6.7	86	2.7	85	6.7
Isoxaflutole	71	3.4	64	7.5	83	5.2	87	5.3	75	5.6
Isoxathion oxon	34	21.4	36	17.2	79	10.5	66	10.4	48	8.3
Lactofen	83	5.0	73	11.5	87	12.7	76	3.8	52	8.5
Lenacil	84	5.5	26	6.1	78	5.8	75	4.0	68	3.3
Linuron	92	5.3	73	4.8	82	6.5	85	4.0	83	4.6
Lufenuron	84	14.8	46	18.0	67	22.4	65	16.9	72	30.2
Mandipropamid	93	10.3	88	0.7	76	7.4	93	9.5	—	—
Mefenacet	91	5.4	74	10.9	79	6.0	83	5.3	83	4.8
Mepanipyrim	91	6.8	82	11.1	89	7.5	91	7.6	84	5.5
Metalaxyl	93	4.7	73	6.7	91	8.0	87	3.9	80	4.0
Metconazole	83	4.3	58	8.6	79	8.8	86	3.5	64	4.8
Methabenzthiazuron	91	4.6	62	7.2	87	3.0	87	2.6	79	6.8
Methamidophos	94	2.8	74	2.4	94	2.7	63	2.4	73	1.2
Methidathion	85	3.0	71	12.8	81	9.9	88	6.6	86	9.8
Methiocarb	86	8.0	65	9.8	82	6.5	83	3.4	73	6.3
Methoxyfenozide	85	8.5	60	4.5	83	9.1	85	4.2	78	2.9
Methyl demeton	101	5.0	59	5.8	89	2.9	84	5.1	78	11.4
Mevinphos	98	2.7	89	7.9	100	5.0	93	5.3	100	6.3
Monocrotophos	94	7.9	91	8.2	109	18.6	92	5.9	108	8.2
Monolinuron	87	5.4	81	4.8	87	6.7	88	3.4	83	1.9
Myclobutanil	89	2.9	45	6.9	80	9.5	77	5.3	85	8.2
Naproanilide	89	7.0	44	7.0	87	5.3	86	5.5	73	4.4
Napropamide	86	3.3	81	8.7	90	12.9	92	5.2	83	4.7
Nitenpyram	95	6.1	87	7.7	95	4.5	87	2.4	86	5.7
Norflurazon	87	5.6	69	10.3	83	3.4	80	6.4	80	2.8
Novaluron	96	6.3	79	7.9	89	7.4	85	5.6	74	5.2
Omethoate	92	2.4	82	2.9	91	4.5	93	2.5	83	3.0
Oryzalin	92	28.1	56	17.4	93	14.0	78	8.9	72	14.4
Oxadixyl	93	3.5	86	3.7	91	5.3	93	6.5	99	5.0
Oxamyl	92	5.7	81	2.1	91	4.6	90	3.7	92	3.9
Oxaziclonefone	95	5.0	88	8.0	82	10.0	95	4.0	76	5.3
Pacllobutrazol	86	5.6	46	7.3	83	4.6	78	3.6	78	3.6
Penconazole	84	5.6	38	4.5	81	7.1	86	4.6	85	5.5
Pencycuron	89	4.5	83	4.8	84	5.5	88	6.9	74	3.9

表 1-1 (つづき)

	玄米		大豆		りんご		キャベツ		ほうれんそう	
	真度	併行精度 (RSD%)	真度	併行精度 (RSD%)	真度	併行精度 (RSD%)	真度	併行精度 (RSD%)	真度	併行精度 (RSD%)
Pentoxazone	75	9.0	85	30.5	86	8.7	99	12.3	74	11.5
Phenmedipham	89	3.8	55	4.9	81	7.9	82	3.3	53	4.4
Phosphamidon	90	3.9	75	3.6	85	7.8	99	3.6	90	5.3
Phoxim	83	6.1	89	8.9	85	4.8	81	3.1	76	5.9
Pirimicarb	87	5.6	80	13.9	85	9.5	83	1.9	77	4.0
Pretilachlor	92	7.4	86	5.6	88	4.8	99	4.4	85	9.8
Prochloraz	85	3.6	83	3.7	75	12.4	88	4.0	75	8.1
Profenofos	97	3.5	82	2.9	77	8.2	98	2.5	56	6.9
Prometryn	92	1.9	89	6.0	90	4.1	85	8.7	88	4.1
Propamocarb	78	4.7	71	7.9	94	4.3	90	3.2	91	5.5
Propaquizafop	57	6.7	91	6.3	85	7.0	81	6.9	65	3.7
Propetamphos	92	14.1	77	12.0	84	11.7	88	5.3	86	13.4
Propiconazole	81	8.6	60	5.1	80	9.9	85	5.8	80	5.9
Propoxur	90	7.5	72	4.5	87	4.9	73	4.4	83	2.9
Pyraclonil	86	9.2	71	7.3	90	3.9	83	5.3	83	5.4
Pyraclostrobin	89	8.3	91	5.9	97	5.7	93	3.0	78	3.2
Pyrazolynate	86	8.6	79	7.1	94	5.8	79	10.3	54	6.7
Pyridaben	75	2.4	61	5.4	88	13.6	86	3.3	78	6.7
Pyriftalid	91	4.3	71	6.2	85	8.2	79	6.5	86	6.6
Pyrimethanil	86	8.2	134	18.5	91	4.5	94	4.2	98	7.6
Pyroquilon	91	5.7	95	5.4	102	8.6	98	4.6	83	4.6
Quinalphos	96*	11.0	84	7.3	89	7.6	87	4.3	82	6.1
Quinoclamine	87	3.2	35	7.7	85	2.7	73	3.6	44	1.5
Quizalofop ethyl	81	4.8	80	3.5	91	2.9	84	4.4	65	2.1
Sethoxydim 1	90	4.1	38	12.9	58	8.4	64	4.3	62	7.1
Sethoxydim 2	71	6.5	63	5.7	86	5.5	67	3.3	70	5.9
Silaflluofen	56	3.2	43	10.3	64	7.2	63	6.7	37	4.7
Simazine	91	2.0	88	4.2	85	7.7	97	4.3	93	8.3
Simeconazole	88	7.1	55	6.5	87	8.5	88	4.2	84	9.7
Simetryn	89	5.8	69	4.2	87	8.0	83	5.5	79	7.5
Spinosyn A	41	7.3	46	4.3	84	3.6	67	3.4	69	6.5
Spinosyn D	26	14.2	34	7.2	79	5.7	58	3.3	65	6.7
Spirodiclofen	64	7.8	75	8.6	82	17.3	85	4.4	67	4.4
Spiroxamine	14	12.4	27	9.1	90	5.9	57	5.7	71	6.3
TCMTB	11	27.1	20	15.9	89	6.9	64	3.8	0	-
Tebuconazole	82	6.4	44	4.4	83	5.1	81	5.5	70	9.0
Tebufenozide	82	5.0	69	2.3	89	7.3	71	5.0	74	6.6
Tebuthiuron	88	6.9	71	4.4	95	3.8	88	2.9	83	6.3
Teflubenzuron	86	4.5	71	12.5	88	10.0	82	5.4	73	7.8
Tetrachlorvinphos	94	9.7	72	16.1	82	18.0	83	5.3	74	12.7
Tetraconazole	83	6.6	51	8.4	93	4.5	84	5.5	72	10.9
Thiabendazole	94	4.4	67	7.2	87	7.6	91	3.2	87	3.0
Thiacloprid	94	7.4	77	7.0	-	-	84	4.8	88	2.8
Thiamethoxam	96	5.8	96	2.2	101	9.2	73	4.4	99	4.6
Thifluzamide	87	12.1	57	18.2	89	12.8	92	8.4	82	7.1
Thiobencarb	90	7.6	92	5.3	87	4.1	89	3.2	91	2.1
Tolfenpyrad	66	5.9	68	2.5	84	12.0	80	4.5	57	5.2
Tralkoxydim	95	7.5	36	6.9	59	4.4	83	8.0	74	3.1
Triadimefon	84	6.3	46	1.9	81	11.1	78	4.1	74	1.9
Triadimenol	79	5.1	45	6.7	80	4.0	76	3.1	64	2.8
Triazophos	85	9.2	89	6.7	89	3.3	86	7.7	84	6.1
Trichlorfon	81	5.6	39	9.9	90	6.3	78	3.8	15	9.2
Tricyclazole	91	7.3	74	8.4	87	9.9	93	5.2	86	5.6
Tridemorph	0	-	0	-	70	4.2	15	10.7	22	9.8
Trifloxystrobin	88	9.8	91	10.3	80	4.3	94	4.8	76	9.8
Triflumizole	87	7.4	84	8.6	76	6.1	85	2.3	70	4.8
Triflumizole Metabolite FA-1-1	87	1.3	73	11.0	82	6.1	91	6.9	82	4.7
Triflumuron	85	2.9	58	24.5	79	16.0	92	6.4	74	14.3
Triticonazole	95	6.4	58	8.2	81	4.2	88	1.4	79	8.5
Vamidothion	102	5.5	87	5.2	98	6.9	92	3.6	96	8.2
XMC	88	4.8	94	5.6	90	6.0	98	3.4	92	3.6

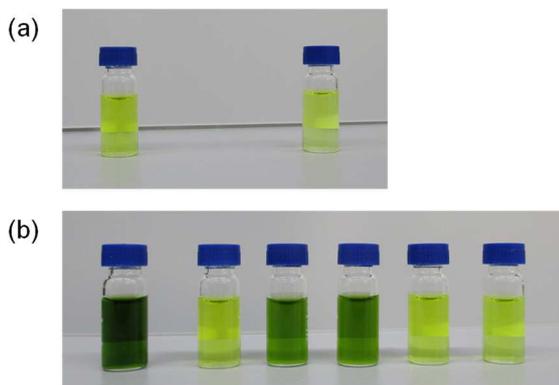


図 1-1 ミニカラム精製によるほうれんそうの色素除去効果

(a) グラファイトカーボン/PSA ミニカラム精製

負荷溶媒： 左から アセトニトリル/水 (8 : 2)、アセトニトリル/トルエン (3 : 1)

溶出溶媒： アセトニトリル/トルエン (3 : 1)

(b) ODS、PSA、SAX、ODS-PSA 及び ODS-PSA-SAX の各ミニカラムによる精製

左から ①抽出液、②ODS 精製、③PSA 精製、④SAX 精製、⑤ODS-PSA 精製、⑥ODS-PSA-SAX

精製

負荷溶媒 アセトニトリル/水 (8 : 2)

溶出溶媒 アセトニトリル/水 (9 : 1)

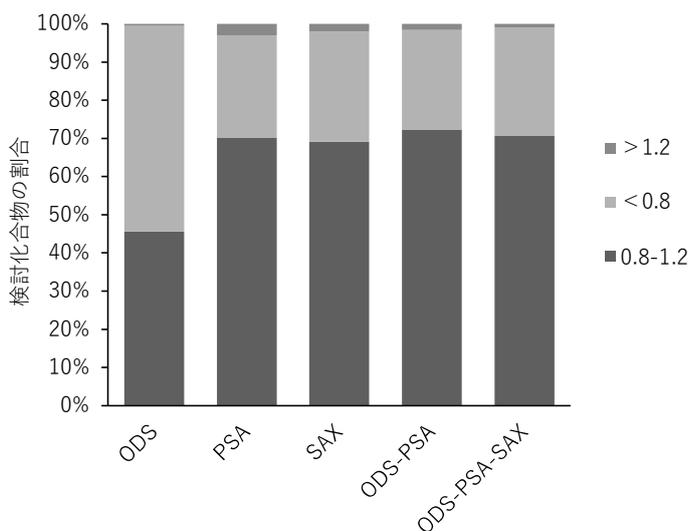


図 1-2 精製ミニカラムとマトリックスの影響 (大豆) *

*溶媒標準溶液に対するマトリックス標準溶液のピーク面積比

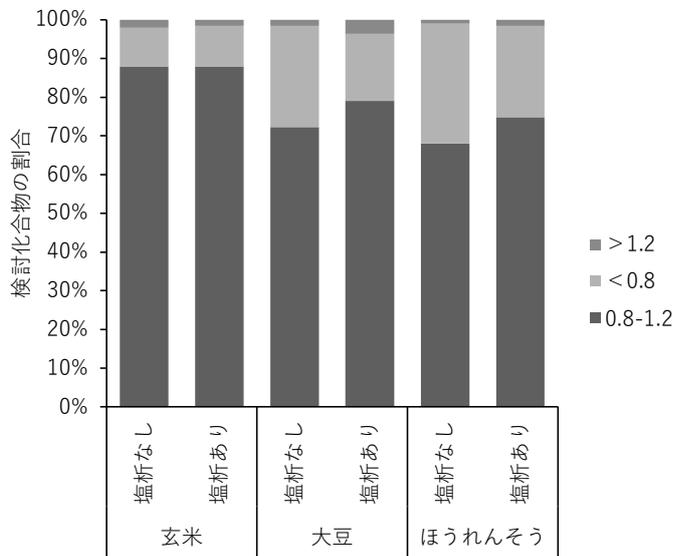


図 1-3 塩析の有無でのマトリックスの影響*

*溶媒標準溶液に対するマトリックス標準溶液のピーク面積比

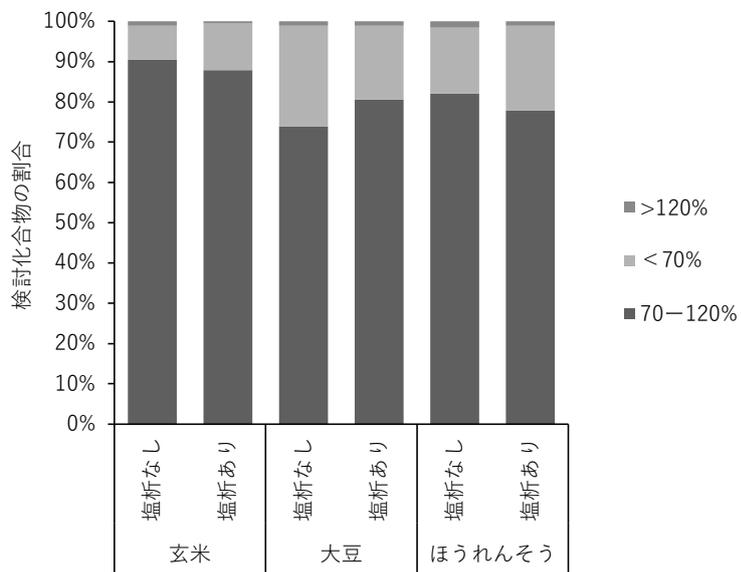


図 1-4 塩析の有無での回収率への影響

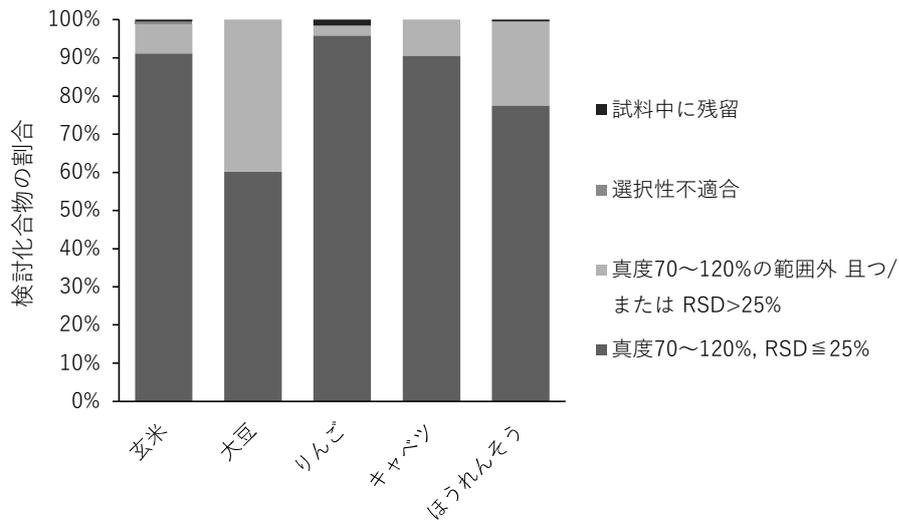


図 1-5 添加回収試験結果

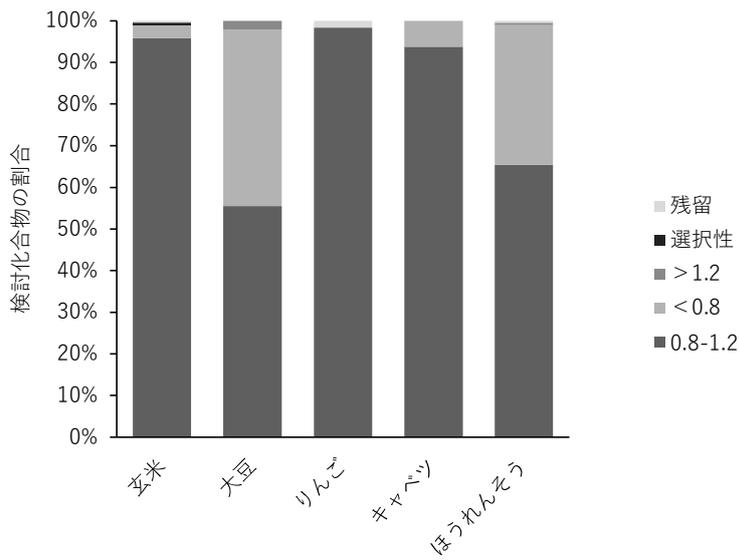


図 1-6 マトリックスの影響*

*溶媒標準溶液に対するマトリックス標準溶液のピーク面積比

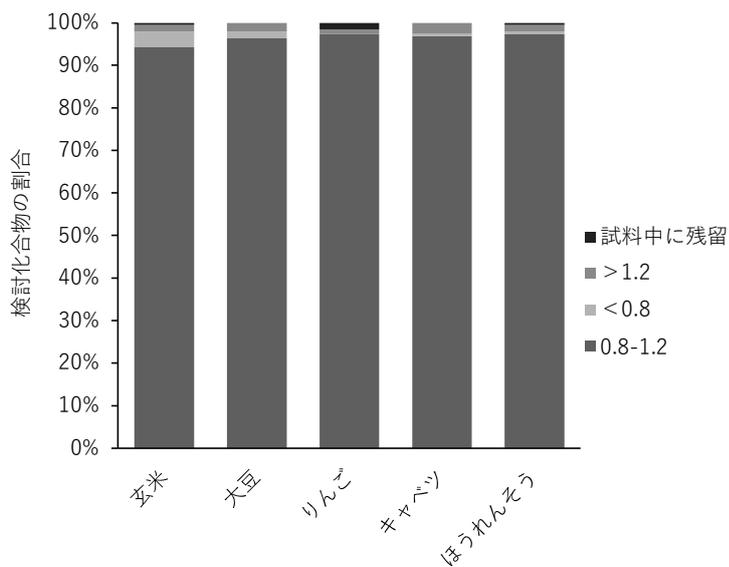


図 1-7 通知一斉試験法でのマトリックスの影響*

*溶媒標準溶液に対するマトリックス標準溶液のピーク面積比

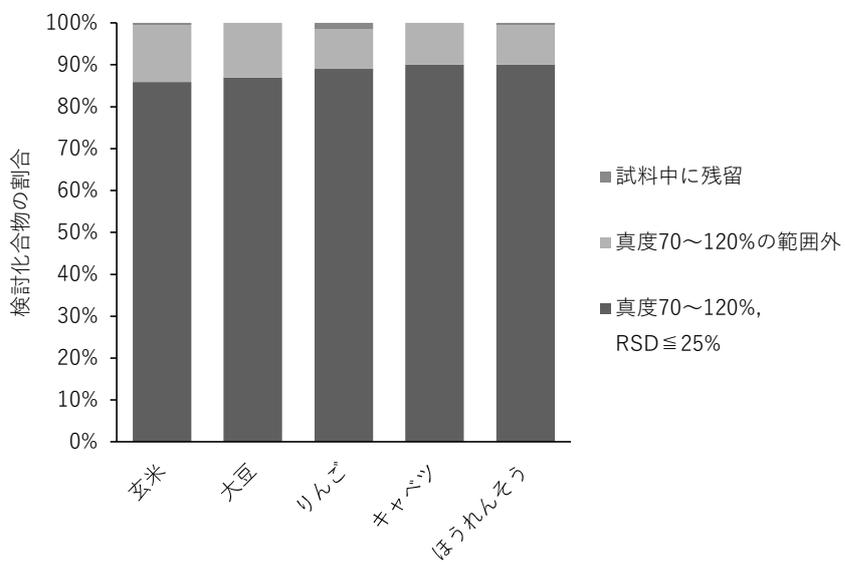


図 1-8 通知一斉試験法での添加回収試験結果

表 2-1-1 妥当性評価試験結果（玄米、大豆、キャベツ、ほうれんそう）

	玄米			大豆			キャベツ			ほうれんそう		
	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)
Acetochlor	91	5	6	91	6	6	86	3	4	88	3	6
Acrinathrin	94	4	5	80	6	7	89	4	5	90	3	9
Alachlor	91	4	5	92	6	6	85	3	6	85	8	8
Aldrin	86	4	5	57	10	13	83	4	5	83	5	8
Ametryn	72	6	6	73	6	6	68	5	6	71	6	10
Atrazine	79	8	10	77	6	9	70	4	6	70	8	11
Azinphos methyl	104	3	5	104	5	8	91	6	6	93	7	7
Azoxystrobin	86	3	4	82	5	5	83	4	4	82	3	3
α -BHC	87	5	5	84	5	7	86	3	6	88	2	7
β -BHC	89	4	4	84	5	6	84	4	5	85	5	8
γ -BHC	90	3	7	88	6	8	86	5	6	91	3	10
δ -BHC	93	7	7	89	6	7	87	5	5	90	3	7
Benalaxyl	92	5	6	92	5	5	88	3	3	89	6	8
Benfluralin	91	4	6	81	4	7	86	2	4	87	4	6
Benfuresate	90	5	5	89	6	6	84	4	5	87	4	9
Benoxacor	90	7	7	92	7	7	85	4	5	87	7	8
Bifenox	99	8	8	95	4	7	86	4	5	90	4	10
Bifenthrin	90	3	5	66	8	11	86	6	6	84	4	5
Bromobutide	90	3	4	92	6	7	84	4	5	85	6	8
Bromopropylate	92	3	5	86	5	9	84	6	6	89	8	10
Bupirimate	84	5	5	80	4	5	77	3	5	79	7	9
Buprofezin	86	5	5	76	7	7	81	5	5	82	4	8
Butachlor	90	2	3	85	4	6	86	3	4	87	8	8
Butamifos	96	5	5	89	5	5	87	4	4	89	4	8
Cadusafos	93	5	5	93	7	7	89	4	4	92	6	9
Cafenstrole	69	4	5	98	4	5	88	5	5	91	7	8
Chlordane (<i>cis</i>)	90	5	5	68	5	9	84	4	5	88	5	6
Chlordane (<i>trans</i>)	91	5	5	68	7	10	84	4	5	89	3	6
Chlorfenapyr	91	5	7	90	8	8	85	4	5	89	7	12
Chlorfenvinphos	94	3	3	94	3	4	86	3	5	90	3	8
Chlorpropham	95	3	5	93	6	7	91	4	6	92	3	7
Chlorpyrifos	93	5	5	85	4	6	86	5	5	91	3	9
Chlorpyrifos methyl	96	7	7	91	8	8	89	2	5	89	5	8
Chlorthal dimethyl	93	3	5	91	5	6	87	6	6	93	4	10
Clomazone	89	6	6	89	8	8	84	3	7	89	5	8
Cyanazine	47	10	12	46	11	11	50	5	6	40	9	14
Cyfluthrin	95	5	5	84	6	7	88	4	4	90	3	7
Cyhalothrin	90	6	6	80	6	7	88	3	3	87	5	8
Cypermethrin	94	4	4	80	5	7	87	3	3	86	2	3
Cyprodinil	83	3	4	79	5	6	76	4	4	79	3	7
<i>p,p'</i> -DDD	93	4	4	76	6	6	85	5	5	90	3	6
<i>p,p'</i> -DDE	87	4	5	57	8	12	87	2	3	89	4	7
<i>o,p'</i> -DDT	87	7	7	56	4	8	83	4	8	84	4	8
<i>p,p'</i> -DDT	93	5	5	66	5	8	84	5	5	86	5	6
Deltamethrin	90	6	9	78	4	6	83	5	5	80	3	10
Diazinon	89	4	5	86	6	6	85	4	4	87	5	7
Dichloran	89	6	7	88	6	6	84	6	7	86	5	10
Dieldrin	87	8	8	81	9	13	91	11	16	93	5	8
Diflufenican	94	5	5	90	4	6	85	2	2	91	4	6
Dimethametryn	84	1	5	80	6	6	79	4	4	78	4	6

表 2-1-1 (つづき)

	玄米			大豆			キャベツ			ほうれんそう		
	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)
Dimethenamid	88	6	6	92	6	8	85	3	4	85	8	8
Dimethoate	2	18	144	4	6	44	7	5	71	4	4	57
Dimethylvinphos (E)	93	4	4	92	3	4	86	6	6	88	4	6
Dimethylvinphos (Z)	94	4	4	94	5	7	87	4	5	92	5	7
Disulfoton	90	4	4	84	7	7	82	3	5	87	3	8
EPN	99	5	6	91	7	7	87	7	7	84	6	8
Edifenphos	98	5	6	86	5	7	89	6	6	95	3	10
α -Endosulfan	93	7	7	80	7	9	88	4	5	90	6	9
β -Endosulfan	91	4	4	83	6	6	86	2	5	90	4	11
Endrin	92	4	4	77	4	8	84	6	6	89	3	7
Esprocarb	92	6	6	89	9	9	89	5	5	90	6	8
Ethion	93	3	3	84	7	7	87	4	4	88	2	8
Ethoprophos	93	4	4	91	6	7	88	4	5	91	6	6
Etofenprox	92	5	6	72	8	12	—*	—*	—*	88	5	10
Etoazole	92	5	6	83	7	8	86	6	6	87	6	6
Fenarimol	78	4	6	76	6	6	77	4	4	77	6	7
Fenitrothion	96	2	3	96	6	6	89	4	5	90	4	6
Fenoxanil	95	3	4	91	4	6	87	5	5	92	3	7
Fenpropathrin	91	7	7	82	7	7	87	5	5	86	5	5
Fenpropimorph	41	6	6	37	8	8	48	4	8	50	6	10
Fenvalerate	94	4	4	80	7	9	87	3	3	87	2	8
Fipronil	92	3	3	91	4	4	89	6	6	92	7	12
Flamprop methyl	91	3	3	91	7	7	86	5	5	90	8	9
Flucythrinate	96	4	4	86	6	7	87	4	4	89	2	8
Fludioxonil	37	6	6	32	15	15	36	8	10	44	28	28
Fluquinconazole	87	3	4	89	4	6	85	5	5	84	7	7
Flutolanil	90	4	4	86	5	5	86	4	4	87	2	8
Fluvalinate	94	5	6	77	7	9	89	3	3	88	3	7
Fosthiazate	83	9	9	82	8	8	80	8	8	79	10	12
Fthalide	98	4	5	97	4	6	88	4	6	94	7	11
Heptachlor	87	5	5	66	5	7	85	4	5	86	7	7
Heptachlor epoxide A	92	3	3	81	8	8	85	3	4	86	2	7
Heptachlor epoxide B	91	4	4	81	7	8	84	5	5	87	6	8
Hexachlorobenzene	76	4	5	50	11	13	82	5	6	85	5	8
Indoxacarb	96	4	4	96	4	7	93	5	5	87	4	5
Iprobenfos	93	5	5	95	7	7	89	3	5	90	3	5
Isofenphos	92	5	7	92	7	7	87	6	6	92	3	9
Isofenphos oxon	91	3	3	89	5	5	87	7	7	91	8	8
Isoproc carb	90	10	10	93	12	13	79	7	11	85	4	8
Isoprothiolane	91	5	5	88	5	6	88	4	6	90	5	8
Isoxathion	97	5	6	93	5	8	89	6	7	94	3	7
Kresoxim methyl	92	6	8	91	6	7	89	6	6	88	6	11
Lenacil	50	9	12	49	16	16	53	7	7	49	14	14
Malathion	86	6	6	94	5	6	90	4	4	91	8	8
Mefenacet	97	3	3	98	5	5	92	8	8	96	9	10
Mefenpyr diethyl	94	3	5	91	4	5	88	3	4	90	6	8
Mepronil	94	3	5	92	5	5	86	4	5	90	4	7
Metalaxyl	84	10	10	85	8	8	78	4	6	82	7	11
Methidathion	97	3	3	99	6	6	91	6	6	91	11	11
Methoxychlor	97	3	3	88	6	8	86	3	4	88	5	10

表 2-1-1 (つづき)

	玄米			大豆			キャベツ			ほうれんそう		
	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)
Metolachlor	91	4	4	94	5	6	87	5	5	88	8	8
Oxadiazon	93	4	4	85	4	6	86	2	4	87	5	8
Oxadixyl	36	15	15	40	13	15	44	3	8	33	7	11
Paclobutrazol	83	5	5	73	9	9	80	5	5	83	8	8
Parathion	94	5	5	92	6	7	87	4	6	90	5	7
Parathion methyl	95	6	7	97	6	6	88	6	7	92	2	7
Penconazole	86	2	4	83	4	4	82	4	5	82	5	6
Pendimethalin	95	3	5	84	5	6	85	5	5	90	4	7
Permethrin	92	7	7	73	7	10	87	4	4	90	3	4
Phenothrin	90	6	6	70	5	10	87	5	5	85	4	7
Phenthoate	109	6	8	110	7	9	93	5	7	98	8	9
Phosalone	100	4	4	98	6	6	88	6	6	96	2	6
Phosmet	94	4	5	97	7	9	89	4	4	91	10	10
Phosphamidon	53	14	15	52	10	13	56	8	8	48	7	11
Piperonyl butoxide	95	3	4	92	5	5	91	6	6	93	3	8
Pirimiphos methyl	88	5	5	83	5	5	81	2	4	85	6	9
Procymidone	91	4	6	77	6	6	85	6	6	88	5	5
Profenofos	96	5	5	92	6	6	89	6	6	91	7	7
Prometryn	79	3	5	78	4	4	75	4	5	76	5	6
Propiconazole	92	3	4	87	4	4	84	5	5	87	5	6
Propoxur	62	10	13	58	12	12	57	11	11	53	10	14
Propyzamide	90	7	7	93	8	8	87	5	6	88	10	13
Prothiofos	94	5	5	74	6	9	86	4	6	89	4	8
Pyraclufos	107	4	4	106	5	8	93	6	6	96	3	5
Pyraflufen ethyl	89	3	4	91	8	8	80	5	5	90	5	5
Pyributicarb	93	7	7	84	7	7	86	3	4	88	5	6
Pyridaben	91	2	2	80	5	7	86	4	4	86	4	9
Pyrimethanil	80	4	6	78	4	4	73	4	8	72	3	7
Pyriminobac methyl (E)	90	3	5	90	6	6	87	5	5	87	3	6
Pyriminobac methyl (Z)	90	5	6	88	4	4	85	5	5	87	6	12
Pyriproxyfen	93	4	4	84	8	10	88	4	4	89	10	10
Quinalphos	96	3	3	93	6	6	87	4	5	92	3	8
Quinoxifen	90	3	4	78	4	7	84	3	3	86	2	8
Quintozene	86	6	6	74	6	9	86	2	5	90	2	6
Silafluofen	89	6	6	57	10	12	85	4	4	83	4	6
Tebufenpyrad	91	4	4	87	5	6	88	5	5	92	5	9
Tefluthrin	90	6	6	76	5	9	86	4	6	89	6	6
Terbufos	90	4	4	84	6	8	87	4	6	89	5	10
Tetrachlorvinphos	97	3	3	95	4	4	89	6	6	93	7	8
Tetradifon	94	3	4	84	4	7	86	3	5	89	3	6
Thenylchlor	94	5	6	93	6	6	86	3	3	87	6	6
Thiobencarb	94	5	5	93	5	6	88	4	5	91	5	8
Tolclofos methyl	95	5	5	94	8	8	—*	—*	—*	92	7	9
Triadimefon	92	5	5	90	6	8	85	6	6	88	6	12
Triadimenol	78	1	3	—**	—**	—**	74	3	3	80	8	8
Triallate	87	6	6	79	7	7	87	5	5	88	8	9
Triazophos	103	5	5	97	4	6	91	3	6	94	5	6
Tribuphos	95	6	7	85	8	10	88	5	5	89	8	8
Trifloxystrobin	92	7	7	95	8	9	90	5	5	90	9	10
Trifluralin	90	5	5	82	6	6	85	3	5	85	6	7
Vinclozolin	91	4	5	90	5	6	87	4	5	88	5	8

*試料中に残留

**妨害

表 2-1-2 妥当性評価試験結果 (ばれいしょ、りんご、オレンジ、茶)

	ばれいしょ			りんご			オレンジ			茶		
	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)
Acetochlor	87	6	6	89	3	5	83	4	4	89	2	5
Acrinathrin	87	5	5	—*	—*	—*	93	5	6	87	4	7
Alachlor	87	5	8	88	4	6	84	4	4	87	3	5
Aldrin	84	5	9	86	7	9	79	6	7	67	8	8
Ametryn	69	3	4	68	5	12	66	4	11	71	6	6
Atrazine	73	5	5	79	5	11	74	4	9	81	4	5
Azinphos methyl	86	5	6	92	3	8	96	5	5	107	4	10
Azoxystrobin	86	3	5	89	3	10	91	3	3	80	6	6
α -BHC	87	3	7	87	3	7	84	4	4	93	4	5
β -BHC	86	3	7	86	5	7	85	5	6	95	6	6
γ -BHC	86	3	8	87	5	6	83	5	5	97	4	6
δ -BHC	87	3	4	88	4	7	87	4	5	100	3	4
Benalaxyl	88	2	7	92	3	7	89	3	4	92	3	4
Benfluralin	85	3	7	89	4	9	82	5	5	87	5	5
Benfuresate	85	6	6	88	7	8	83	6	6	90	4	7
Benoxacor	87	3	6	88	4	7	82	5	5	81	5	7
Bifenox	85	4	7	89	5	8	85	5	7	96	6	7
Bifenthrin	90	5	7	92	5	9	87	8	8	76	5	5
Bromobutide	85	5	7	86	6	9	82	6	6	90	6	6
Bromopropylate	87	5	6	87	6	8	88	7	7	87	5	6
Bupirimate	81	3	5	82	3	10	80	3	5	81	4	5
Buprofezin	79	6	6	81	3	4	79	5	5	77	6	6
Butachlor	86	6	6	89	6	9	84	7	7	86	9	9
Butamifos	86	3	5	89	2	5	86	6	6	89	2	7
Cadusafos	90	5	7	94	5	9	90	5	7	99	5	5
Cafenstrole	90	5	5	95	2	9	98	6	6	103	3	7
Chlordane (<i>cis</i>)	83	4	5	86	5	5	81	5	5	78	6	6
Chlordane (<i>trans</i>)	85	4	6	88	4	4	82	5	5	78	5	6
Chlorfenapyr	94	4	8	91	9	12	86	8	13	89	11	12
Chlorfenvinphos	90	5	6	92	4	11	90	5	7	92	4	5
Chlorpropham	89	1	8	92	3	8	90	3	3	100	4	4
Chlorpyrifos	87	5	9	91	4	7	85	5	5	84	1	5
Chlorpyrifos methyl	88	4	8	89	5	5	89	6	7	92	6	7
Chlorthal dimethyl	87	5	8	88	3	7	85	5	5	88	10	10
Clomazone	88	2	5	90	4	6	81	6	7	92	6	7
Cyanazine	47	3	7	45	4	35	46	7	8	45	10	10
Cyfluthrin	86	3	4	91	3	7	91	2	5	87	5	7
Cyhalothrin	89	4	6	98	7	14	88	3	5	84	6	7
Cypermethrin	85	4	6	—*	—*	—*	89	4	4	85	4	7
Cyprodinil	78	5	7	80	6	10	77	3	4	79	5	7
<i>p,p'</i> -DDD	86	6	9	87	2	11	85	5	5	87	7	7
<i>p,p'</i> -DDE	86	3	4	87	2	8	81	5	5	72	8	8
<i>o,p'</i> -DDT	83	3	7	87	3	6	78	7	7	70	7	8
<i>p,p'</i> -DDT	88	2	7	89	5	6	82	4	4	78	7	8
Deltamethrin	84	3	6	90	3	6	88	3	4	62	5	9
Diazinon	84	5	7	87	4	9	82	4	5	89	9	9
Dichloran	84	3	6	87	4	8	83	6	6	100	5	5
Dieldrin	85	11	11	89	11	17	84	4	9	82	10	14
Diflufenican	87	2	5	90	3	8	91	4	4	93	4	4
Dimethametryn	79	5	7	81	5	8	79	6	6	79	7	7

表 2-1-2 (つづき)

	ばれいしょ			りんご			オレンジ			茶		
	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)
Dimethenamid	88	3	8	91	3	8	83	5	5	91	4	7
Dimethoate	6	7	23	4	9	58	4	7	76	4	4	53
Dimethylvinphos (E)	87	3	6	90	2	7	87	4	4	93	3	6
Dimethylvinphos (Z)	89	6	7	91	4	10	89	5	5	93	5	7
Disulfoton	72	4	9	90	5	9	89	3	5	83	5	5
EPN	85	5	8	89	6	7	84	6	6	89	8	8
Edifenphos	88	2	6	89	3	6	95	5	7	97	6	7
α -Endosulfan	84	4	7	87	4	8	85	6	7	83	7	7
β -Endosulfan	86	3	6	89	2	6	83	5	5	88	6	6
Endrin	83	5	8	87	4	4	84	4	4	83	6	10
Esprocarb	90	6	9	91	7	9	93	4	6	88	7	9
Ethion	85	4	6	89	4	6	84	4	4	80	4	5
Ethoprophos	90	2	5	93	5	10	86	4	6	102	4	4
Etofenprox	88	4	7	89	5	7	87	3	6	81	5	7
Etoxazole	88	8	8	89	6	8	88	6	7	—*	—*	—*
Fenarimol	78	5	6	80	3	6	80	5	6	79	3	4
Fenitrothion	87	4	8	89	3	9	85	4	4	97	3	6
Fenoxanil	91	2	4	91	2	6	88	4	4	90	3	4
Fenpropathrin	85	3	6	91	3	8	87	5	5	84	5	5
Fenpropimorph	46	7	7	72	6	10	73	3	3	36	6	9
Fenvalerate	88	3	5	90	3	7	91	4	4	87	3	7
Fipronil	92	5	6	93	8	12	92	7	7	91	5	6
Flamprop methyl	87	4	5	89	4	8	84	3	4	91	4	4
Flucythrinate	89	5	6	94	4	5	94	3	4	88	3	7
Fludioxonil	36	5	9	40	12	14	—*	—*	—*	34	11	13
Fluquinconazole	84	4	6	89	3	6	86	4	4	88	3	6
Flutolanil	87	3	5	90	3	6	86	7	7	87	6	6
Fluvalinate	89	2	5	93	3	5	94	5	5	85	4	8
Fosthiazate	77	3	6	85	6	12	88	5	8	83	5	8
Fthalide	88	1	5	89	3	7	88	5	5	100	4	5
Heptachlor	84	6	7	88	4	7	84	5	8	73	3	5
Heptachlor epoxide A	86	4	9	86	4	7	81	4	5	80	6	6
Heptachlor epoxide B	87	5	9	87	6	9	80	7	7	83	7	7
Hexachlorobenzene	86	3	7	85	4	5	80	4	4	70	4	4
Indoxacarb	91	3	5	98	3	8	106	3	6	94	4	10
Iprobenfos	88	3	4	91	3	9	92	4	4	101	5	6
Isofenphos	88	5	7	92	4	8	86	6	6	88	3	6
Isofenphos oxon	86	5	7	92	3	11	91	5	6	86	6	6
Isoprocarb	88	8	10	90	4	16	78	9	13	—**	—**	—**
Isoprothiolane	87	5	9	90	5	9	85	5	5	91	6	6
Isoxathion	88	4	7	92	3	7	93	5	5	98	6	10
Kresoxim methyl	87	8	8	89	5	5	83	4	4	90	6	6
Lenacil	50	7	7	58	6	11	51	7	14	50	9	9
Malathion	90	5	8	93	5	9	88	6	6	93	6	8
Mefenacet	87	5	5	94	3	5	93	4	4	104	5	5
Mefenpyr diethyl	85	3	7	90	5	6	90	4	5	91	6	6
Mepronil	87	5	5	91	4	7	93	4	5	98	4	4
Metalaxyl	79	6	8	86	4	13	81	6	8	84	4	6
Methidathion	88	5	6	92	5	8	88	6	6	103	5	7
Methoxychlor	84	6	6	90	3	5	85	6	6	86	3	3

表 2-1-2 (つづき)

	ばれいしょ			りんご			オレンジ			茶		
	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)
Metolachlor	87	5	8	90	7	9	85	6	7	93	3	6
Oxadiazon	83	3	9	88	2	6	85	3	4	84	8	8
Oxadixyl	39	6	7	43	5	7	39	7	13	31	9	10
Paclobutrazol	78	2	5	85	5	7	83	3	4	80	4	4
Parathion	86	5	7	89	4	7	86	6	6	93	5	7
Parathion methyl	89	3	8	92	3	8	86	6	7	96	6	7
Penconazole	83	3	7	83	6	7	87	5	5	85	3	3
Pendimethalin	85	4	5	89	3	8	80	4	4	84	7	7
Permethrin	88	3	5	92	5	9	88	3	3	84	5	7
Phenothrin	87	4	8	92	3	8	87	7	7	73	8	8
Phenthoate	86	7	7	90	2	9	86	5	7	98	5	15
Phosalone	88	6	6	90	5	8	91	5	5	95	5	7
Phosmet	88	5	5	91	6	9	92	7	7	102	7	7
Phosphamidon	51	4	8	55	4	10	55	6	7	57	10	27
Piperonyl butoxide	89	6	8	94	3	7	92	4	6	91	6	7
Pirimiphos methyl	80	2	8	83	4	10	78	3	3	81	5	6
Procymidone	86	4	5	87	3	7	83	3	5	91	3	5
Profenofos	87	4	6	90	2	9	88	4	4	93	5	6
Prometryn	78	3	5	78	3	8	73	6	6	76	6	7
Propiconazole	86	5	5	88	4	6	90	4	5	85	4	5
Propoxur	55	5	5	59	7	10	50	6	8	61	7	15
Propyzamide	87	4	7	90	7	11	84	5	5	99	5	5
Prothiofos	83	8	11	92	6	12	86	7	7	79	8	8
Pyraclufos	92	5	6	97	3	5	107	4	7	110	3	9
Pyraflufen ethyl	61	9	12	91	4	5	90	5	7	91	6	6
Pyributicarb	87	2	4	91	4	7	85	3	3	85	6	6
Pyridaben	85	4	7	91	2	8	86	4	5	83	5	8
Pyrimethanil	74	2	4	73	2	8	—*	—*	—*	85	3	5
Pyriminobac methyl (E)	90	4	7	89	4	6	90	5	5	86	6	6
Pyriminobac methyl (Z)	88	3	5	90	4	4	85	5	5	86	7	7
Pyriproxyfen	87	3	6	93	6	9	86	6	6	90	5	7
Quinalphos	87	3	6	89	5	7	86	5	5	91	7	7
Quinoxifen	82	3	6	84	4	7	83	4	4	84	4	5
Quintozene	84	3	8	86	6	8	84	4	4	87	5	5
Silafluofen	87	5	7	88	5	5	87	6	6	78	5	8
Tebufenpyrad	89	6	7	—*	—*	—*	87	4	4	87	6	6
Tefluthrin	86	5	6	89	5	8	85	5	5	81	6	6
Terbufos	82	5	8	90	6	11	85	4	6	87	5	6
Tetrachlorvinphos	87	7	10	92	5	10	92	4	5	98	4	6
Tetradifon	87	3	5	88	5	7	83	7	7	88	8	8
Thenylchlor	88	4	5	89	3	7	86	3	3	93	8	8
Thiobencarb	90	5	5	91	4	9	87	5	5	92	6	8
Tolclofos methyl	86	8	10	92	6	10	85	5	6	94	7	9
Triadimefon	85	6	7	87	6	10	86	3	5	91	6	8
Triadimenol	76	3	3	80	2	10	81	5	5	72	9	9
Triallate	85	3	8	89	7	9	84	4	5	87	5	6
Triazophos	89	4	6	93	1	8	99	5	6	102	3	7
Tribuphos	89	5	8	91	4	9	85	6	6	86	7	9
Trifloxystrobin	89	8	8	94	6	8	91	6	7	93	9	9
Trifluralin	85	3	7	89	3	8	81	5	5	83	6	6
Vinclozolin	88	4	7	88	5	10	83	4	4	88	6	8

*試料中に残留

**妨害

表 2-2 試料マトリックスの測定への影響 (溶媒標準溶液に対するマトリックス標準溶液のピーク面積比)

	玄米	大豆	キャベツ	ほうれんそう	ばれいしょ	りんご	オレンジ	茶
Acetochlor	1.06	1.08	0.99	1.06	1.05	1.03	1.00	1.03
Acrinathrin	1.04	1.05	1.03	1.08	1.02	—*	1.08	1.05
Alachlor	1.07	1.07	1.02	1.07	1.01	1.02	1.02	1.03
Aldrin	1.06	1.02	1.01	1.04	1.06	1.03	0.99	0.99
Ametryn	1.07	1.03	1.01	1.11	1.04	1.03	1.04	1.07
Atrazine	1.16	1.11	1.02	1.08	1.11	1.09	1.08	1.14
Azinphos methyl	1.20	1.18	1.15	1.17	1.09	1.09	1.18	1.26
Azoxystrobin	1.10	1.08	1.04	1.10	1.07	1.04	1.18	1.10
α -BHC	1.03	1.02	1.01	1.05	1.08	1.04	1.01	1.15
β -BHC	1.05	1.08	1.02	1.06	1.07	1.02	1.02	1.17
γ -BHC	1.04	1.01	1.00	1.11	1.06	1.01	1.04	1.15
δ -BHC	1.05	1.07	0.99	1.09	1.08	1.03	1.02	1.16
Benalaxyl	1.09	1.02	1.01	0.98	1.06	1.07	1.04	1.03
Benfluralin	1.06	1.02	1.00	1.05	1.10	1.04	1.01	1.12
Benfuresate	1.03	1.04	1.02	1.07	1.07	1.06	1.04	1.06
Benoxacor	1.07	1.04	1.01	1.05	1.05	1.01	1.01	1.02
Bifenox	1.14	1.10	1.06	1.11	1.06	1.08	1.07	1.15
Bifenthrin	1.03	1.01	1.00	1.05	1.05	1.01	1.00	1.02
Bromobutide	1.07	1.05	1.00	1.11	1.07	1.01	1.04	1.06
Bromopropylate	1.12	1.05	0.99	1.02	1.08	1.04	1.00	1.11
Bupirimate	1.08	1.03	0.96	1.09	1.03	1.01	1.04	1.10
Buprofezin	1.06	1.03	1.00	1.04	1.10	1.01	1.00	1.03
Butachlor	1.03	0.99	1.03	1.02	1.06	1.04	1.02	1.01
Butamifos	1.09	1.02	1.06	1.06	1.02	1.00	1.06	1.00
Cadusafos	1.10	1.07	1.00	1.06	1.07	1.04	1.04	1.15
Cafenstrole	1.14	1.11	1.08	1.12	1.12	1.13	1.16	1.17
Chlordane (<i>cis</i>)	1.03	1.01	0.98	1.04	1.06	1.03	1.01	0.99
Chlordane (<i>trans</i>)	1.05	1.01	1.00	1.07	1.06	1.05	1.00	1.05
Chlorfenapyr	1.05	1.06	1.00	1.05	1.04	1.08	1.06	1.01
Chlorfenvinphos	1.08	1.04	1.04	1.07	1.10	1.04	1.06	1.09
Chlorpropham	1.11	1.08	1.09	1.13	1.09	1.11	1.11	1.21
Chlorpyrifos	1.09	1.04	1.01	1.05	1.08	1.06	1.04	1.11
Chlorpyrifos methyl	1.05	1.08	1.01	1.09	1.08	1.05	1.07	1.08
Chlorthal dimethyl	1.06	1.06	1.00	1.09	1.08	1.03	1.02	1.06
Clomazone	1.05	1.05	1.03	1.08	1.07	1.02	1.03	1.07
Cyanazine	1.10	1.08	1.00	1.04	1.09	1.06	1.09	1.12
Cyfluthrin	1.09	1.04	1.04	1.04	1.08	1.05	1.06	1.06
Cyhalothrin	1.06	1.03	1.01	1.03	1.07	1.05	1.05	1.00
Cypermethrin	1.07	1.08	1.03	1.07	1.07	—*	1.08	1.04
Cyprodinil	1.05	1.03	1.01	1.06	1.11	1.05	1.05	1.07
<i>p,p'</i> -DDD	1.10	1.04	1.07	1.09	1.14	1.03	1.03	1.09
<i>p,p'</i> -DDE	1.04	1.01	1.02	1.06	1.06	1.07	1.05	1.02
<i>o,p'</i> -DDT	1.04	0.94	0.98	1.04	1.04	1.02	1.00	0.95
<i>p,p'</i> -DDT	1.03	1.04	1.05	1.06	1.04	1.08	1.00	1.07
Deltamethrin	1.01	1.04	0.99	0.92	1.05	1.03	1.08	0.72
Diazinon	1.06	1.02	1.02	1.09	1.09	1.04	1.03	1.08
Dichloran	1.10	1.12	1.07	1.12	1.10	1.09	1.08	1.33
Dieldrin	1.04	1.07	0.99	1.06	1.03	1.01	0.91	1.07
Diflufenican	1.12	1.06	1.05	1.08	1.10	1.05	1.10	1.10
Dimethametryn	1.12	1.06	1.01	1.07	1.08	1.01	1.02	1.08

表 2-2 (つづき)

	玄米	大豆	キャベツ	ほうれんそう	ばれいしょ	りんご	オレンジ	茶
Dimethenamid	1.08	1.10	1.00	1.04	1.06	1.01	1.00	1.09
Dimethoate	1.11	1.11	1.08	1.11	1.08	1.08	1.06	1.22
Dimethylvinphos (E)	1.08	1.09	1.02	1.14	1.08	1.05	1.09	1.05
Dimethylvinphos (Z)	1.10	1.12	1.02	1.09	1.09	1.05	1.05	1.11
Disulfoton	1.04	1.06	1.02	1.06	1.13	1.07	1.07	1.14
EPN	1.09	1.03	1.07	1.01	1.05	1.02	0.98	1.07
Edifenphos	1.14	1.13	1.05	1.10	1.12	1.04	1.12	1.10
α -Endosulfan	1.10	1.03	0.95	1.02	1.07	1.03	1.02	1.09
β -Endosulfan	1.03	1.00	1.00	1.07	1.08	1.02	1.00	1.04
Endrin	1.05	1.01	1.03	1.04	1.04	1.00	1.06	1.06
Esprocarb	1.10	1.10	1.00	1.09	1.06	1.03	1.07	1.06
Ethion	1.08	1.01	1.01	1.08	1.08	1.08	1.01	1.05
Ethoprophos	1.09	1.06	1.00	1.07	1.10	1.04	1.03	1.18
Etofenprox	1.07	1.03	—*	1.06	1.09	1.04	1.07	1.06
Etozazole	1.08	1.03	0.99	1.11	1.10	1.08	1.06	1.10
Fenarimol	1.07	1.02	1.02	1.05	1.08	1.02	1.07	1.07
Fenitrothion	1.10	1.09	1.03	1.10	1.08	1.07	1.08	1.14
Fenoxanil	1.07	1.07	1.02	1.07	1.07	1.07	1.05	1.07
Fenpropathrin	1.08	1.04	1.03	1.05	1.04	1.06	1.02	1.03
Fenpropimorph	1.02	0.99	1.01	1.01	1.08	1.02	1.00	1.05
Fenvalerate	1.10	1.07	1.05	1.06	1.08	1.03	1.09	1.05
Fipronil	1.08	1.07	0.99	1.09	1.10	1.04	1.06	1.10
Flamprop methyl	1.05	1.01	1.00	1.05	1.06	1.04	1.02	1.02
Flucythrinate	1.10	1.06	1.01	1.08	1.06	1.08	1.13	1.08
Fludioxonil	1.14	1.12	1.07	1.11	1.09	1.07	—*	1.15
Fluquinconazole	1.04	1.07	1.01	1.04	1.07	1.05	1.10	1.07
Flutolanil	1.09	1.02	1.02	1.10	1.07	1.04	1.06	1.09
Fluvalinate	1.10	1.08	1.04	1.06	1.10	1.07	1.09	1.05
Fosthiazate	1.20	1.16	1.09	1.15	1.10	1.08	1.19	1.16
Fthalide	1.11	1.10	1.06	1.09	1.06	1.06	1.04	1.15
Heptachlor	1.05	1.01	1.01	1.05	1.10	1.02	1.02	1.06
Heptachlor epoxide A	1.06	1.00	0.99	1.07	1.06	1.06	1.04	1.05
Heptachlor epoxide B	1.03	1.02	1.03	1.03	1.05	1.02	1.00	1.04
Hexachlorobenzene	1.09	1.05	1.03	1.09	1.04	1.05	1.04	1.13
Indoxacarb	1.15	1.11	1.11	1.06	1.10	1.11	1.19	1.14
Iprobenfos	1.09	1.08	1.06	1.12	1.09	1.07	1.05	1.21
Isofenphos	1.05	1.06	1.03	1.06	1.04	1.08	1.04	1.05
Isofenphos oxon	1.13	1.15	1.04	1.11	1.10	1.03	1.07	1.10
Isoprocarb	1.18	1.15	0.98	1.02	1.09	1.03	0.96	—**
Isoprothiolane	1.06	1.03	1.04	1.07	1.07	1.02	1.03	1.05
Isoxathion	1.14	1.10	1.09	1.12	1.10	1.07	1.18	1.19
Kresoxim methyl	1.10	0.98	1.00	1.04	1.01	1.02	1.03	1.02
Lenacil	1.11	1.09	1.06	1.12	1.11	1.08	1.09	1.14
Malathion	1.14	1.06	1.02	1.07	1.07	1.06	1.03	1.06
Mefenacet	1.18	1.11	1.06	1.11	1.10	1.11	1.09	1.22
Mefenpyr diethyl	1.05	1.03	1.04	1.08	1.08	1.09	1.08	1.02
Mepronil	1.12	1.09	1.01	1.11	1.10	1.08	1.13	1.15
Metalaxyl	1.10	1.06	0.99	1.08	1.08	1.06	1.01	1.11
Methidathion	1.14	1.11	1.08	1.14	1.08	1.07	1.08	1.16
Methoxychlor	1.11	1.06	1.01	1.04	1.07	1.08	1.02	1.09

表 2-2 (つづき)

	玄米	大豆	キャベツ	ほうれんそう	ばれいしょ	りんご	オレンジ	茶
Metolachlor	1.07	1.06	1.00	1.04	1.07	1.04	0.97	1.08
Oxadiazon	1.07	1.01	1.03	1.03	1.03	1.03	1.08	0.99
Oxadixyl	1.08	1.13	0.99	1.07	1.07	1.02	1.04	1.06
Paclobutrazol	1.10	1.07	1.03	1.03	1.08	1.03	1.04	1.07
Parathion	1.05	1.00	1.04	1.09	1.07	1.02	1.02	1.02
Parathion methyl	1.14	1.10	1.05	1.08	1.10	1.07	1.08	1.11
Penconazole	1.09	1.02	0.99	1.04	1.07	1.04	1.08	1.06
Pendimethalin	1.09	1.03	1.06	1.08	1.05	1.00	1.02	1.06
Permethrin	1.09	1.06	1.02	1.08	1.10	1.05	1.09	1.14
Phenothrin	1.07	1.01	1.03	1.06	1.08	1.08	1.05	0.94
Phenthoate	1.25	1.19	1.05	1.12	1.11	1.04	1.07	1.11
Phosalone	1.10	1.09	1.05	1.08	1.08	1.05	1.12	1.14
Phosmet	1.18	1.05	1.07	1.08	1.10	1.09	1.14	1.16
Phosphamidon	1.13	1.15	1.06	1.11	1.07	1.06	1.13	1.14
Piperonyl butoxide	1.12	1.10	1.08	1.13	1.09	1.04	1.08	1.10
Pirimiphos methyl	1.06	1.06	1.02	1.08	1.07	1.04	1.02	0.99
Procymidone	1.04	0.88	1.01	1.09	1.04	1.00	1.05	1.09
Profenofos	1.12	1.06	1.02	1.09	1.06	1.03	1.06	1.09
Prometryn	1.09	1.02	1.01	1.12	1.07	0.99	1.07	0.98
Propiconazole	1.09	1.06	1.01	1.09	1.07	1.05	1.07	1.09
Propoxur	1.19	1.18	1.06	1.16	1.12	1.09	1.06	1.32
Propyzamide	1.12	1.12	1.02	1.10	1.07	1.06	1.03	1.17
Prothiofos	1.13	1.06	0.98	1.01	1.09	1.07	1.03	1.07
Pyraclofos	1.20	1.19	1.11	1.19	1.09	1.14	1.18	1.30
Pyraflufen ethyl	1.12	1.07	1.03	1.14	1.08	1.08	1.08	1.06
Pyributicarb	1.03	1.05	1.02	1.03	1.07	1.05	1.07	1.07
Pyridaben	1.06	1.04	1.00	1.00	1.05	1.03	1.04	0.99
Pyrimethanil	1.13	1.14	1.07	1.14	1.12	1.07	—*	1.24
Pyriminobac methyl (E)	1.06	1.02	1.03	1.07	1.07	1.05	1.07	1.05
Pyriminobac methyl (Z)	1.06	1.01	1.00	1.05	1.08	1.05	1.05	1.02
Pyriproxyfen	1.10	1.06	1.02	1.07	1.11	1.06	1.04	1.11
Quinalphos	1.08	1.08	1.04	1.08	1.08	1.06	1.06	1.07
Quinoxifen	1.08	1.02	1.06	1.07	1.06	1.03	1.08	1.09
Quintozene	1.05	1.04	1.03	1.08	1.09	1.04	1.03	1.14
Silafluofen	1.08	1.02	1.03	1.05	1.11	1.02	1.07	1.07
Tebufenpyrad	1.07	0.98	1.06	1.14	1.07	—*	1.06	1.04
Tefluthrin	1.01	0.99	1.00	1.07	1.04	1.01	1.03	1.09
Terbufos	1.06	1.04	1.01	1.08	1.08	1.04	1.07	1.07
Tetrachlorvinphos	1.17	1.08	1.03	1.10	1.09	1.08	1.06	1.14
Tetradifon	1.04	1.01	1.01	1.03	1.04	1.04	1.04	1.11
Thenylchlor	1.07	1.06	1.03	1.03	1.06	1.03	1.04	1.04
Thiobencarb	1.05	1.07	1.05	1.13	1.13	1.06	1.06	1.07
Tolclofos methyl	1.13	1.06	—*	1.05	1.08	1.04	1.01	1.15
Triadimefon	1.12	1.05	1.01	1.08	1.07	1.04	1.03	1.10
Triadimenol	1.11	—**	1.04	1.10	1.10	1.09	1.10	1.05
Triallate	1.05	1.06	0.99	1.01	1.09	1.03	1.03	1.10
Triazophos	1.19	1.12	1.10	1.16	1.09	1.08	1.18	1.24
Tribuphos	1.06	1.11	1.01	1.09	1.09	1.08	1.05	1.11
Trifloxystrobin	1.10	1.04	0.99	1.07	1.06	1.07	1.05	1.11
Trifluralin	1.06	1.02	1.00	1.04	1.06	1.01	0.99	1.11
Vinclozolin	1.06	1.06	0.99	1.09	1.08	1.04	1.05	1.03

*試料中に残留

**妨害

表 2-3 妥当性評価試験において検討した全ての食品で真度が低かった農薬とその logP_{ow}

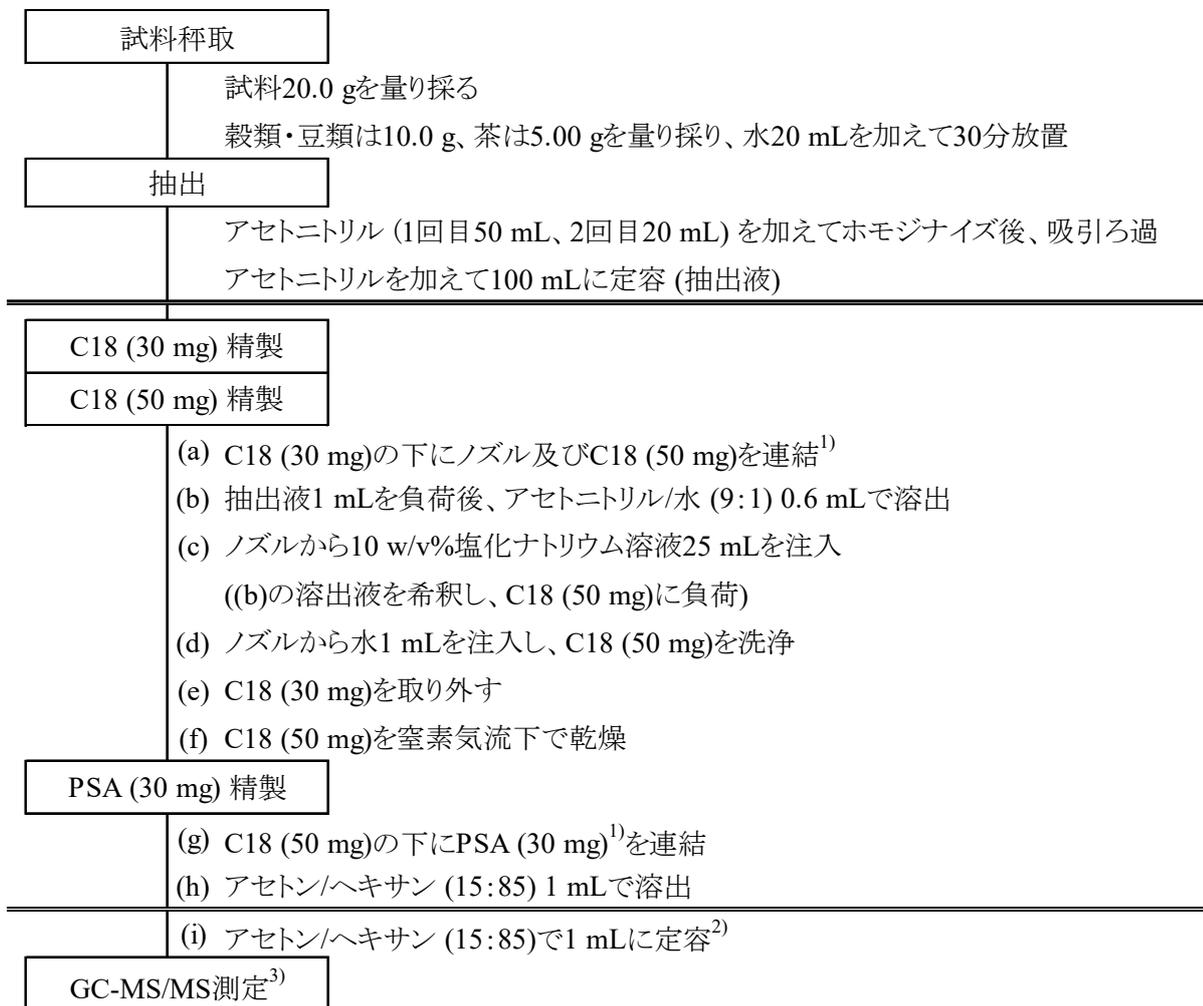
農薬	log P _{ow}
Oxadixyl	0.7
Dimethoate	0.8
Phosphamidon	0.8
Propoxur	1.6
Lenacil	1.7
Cyanazine	2.1
Fludioxonil	4.1

表 2-4 妥当性評価試験において大豆のみ真度が低かった農薬とその logP_{ow}

農薬	①	②	log P _{ow}
Heptachlor	66	89	5.4
Hexachlorobenzene	50	82	5.7
Chlordane (<i>trans</i>)	68	94	5.9
Chlordane (<i>cis</i>)	68	94	6.2
Bifenthrin	66	100	>6.0
<i>o,p'</i> -DDT	56	92	6.8
<i>p,p'</i> -DDT	66	89	6.9
<i>p,p'</i> -DDE	57	95	7.0
Silafluofen	57	89	8.2

①妥当性評価試験における真度 (%)

②抽出液に添加した場合の回収率 (%)



1)使用溶媒でコンディショニング

2)茶及び穀類・豆類では窒素乾固後、それぞれアセトン/ヘキサン (15:85) 0.25及び0.5 mLに溶解

3)APCI法(キャリアーガス: 窒素)

図 2-1 精製方法の概要

精製は自動前処理装置を用いて行った。

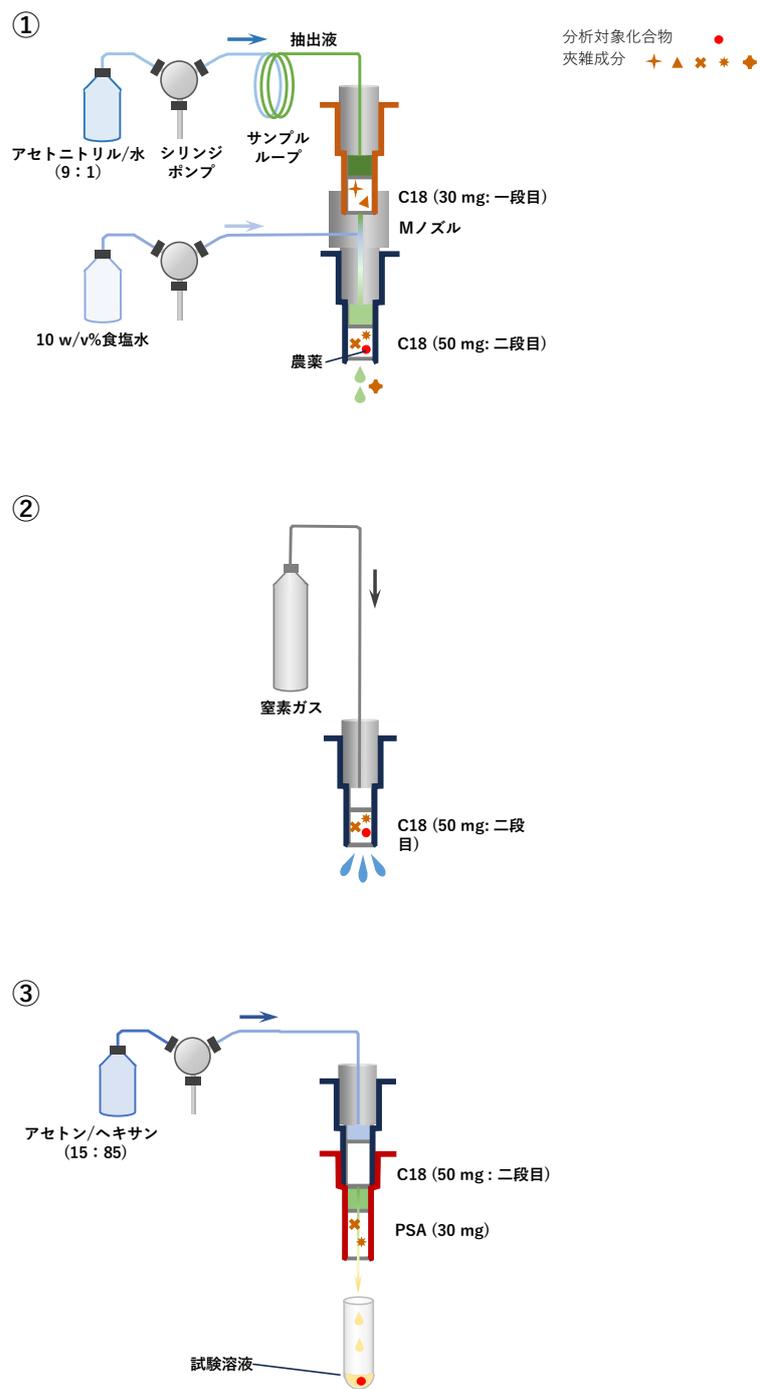


図 2-2 自動前処理装置による精製

① : 図 1 (a) ~ (d)

② : 図 1 (e) ~ (f)

③ : 図 1 (g) ~ (i)

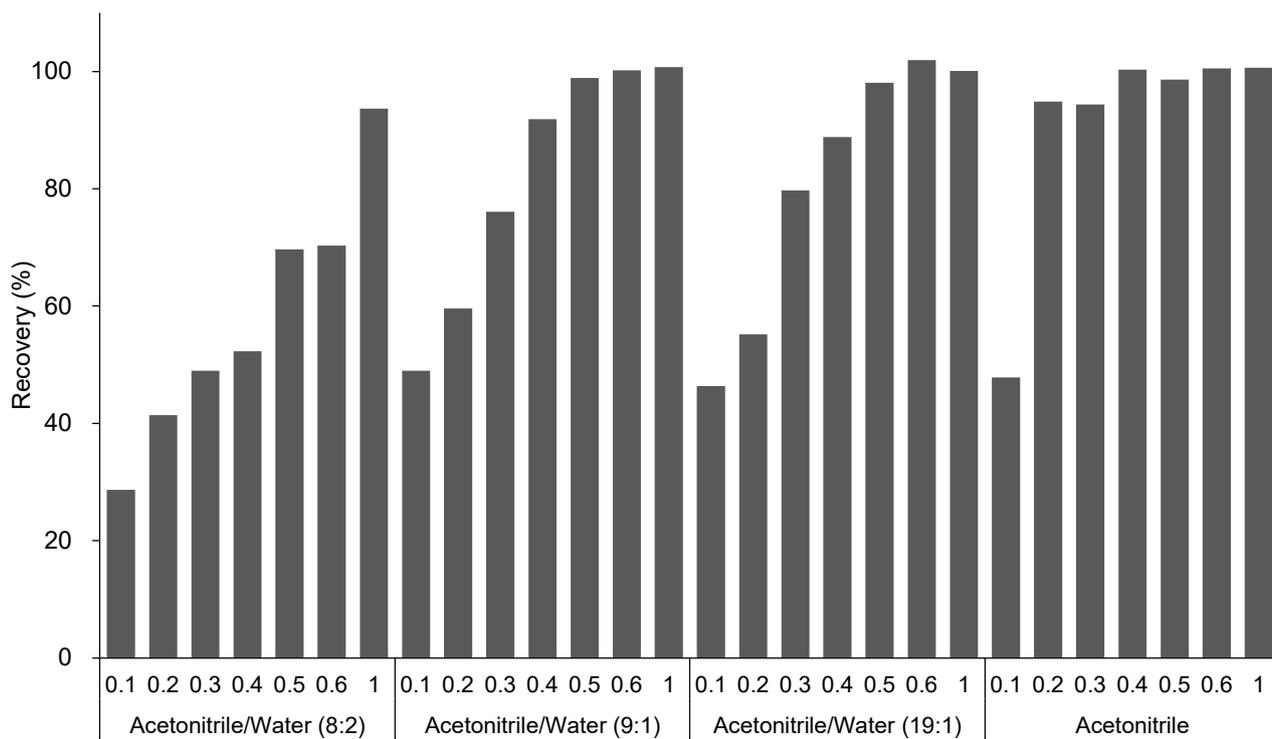


図 2-3 ODS ミニカラムからの溶出溶媒/溶媒量と silafluofen の回収率* (%)

*マトリックス非存在下での回収率

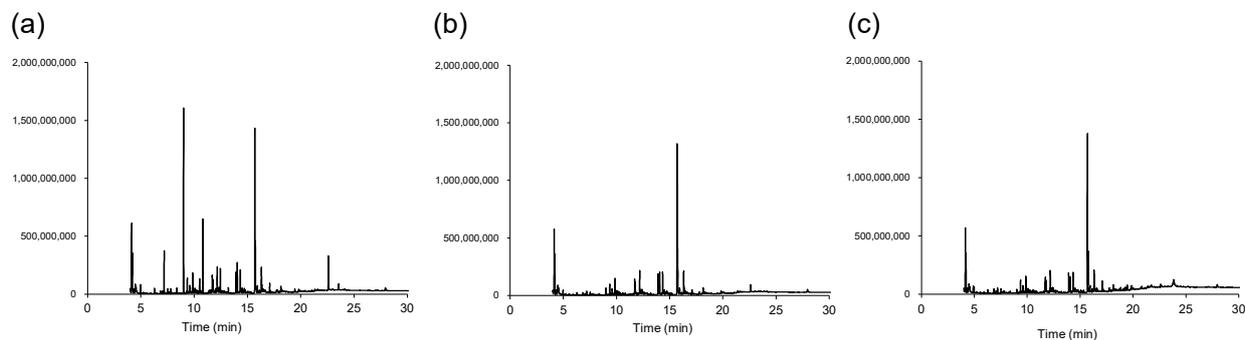


図 2-4 大豆のブランク試験溶液の TIC クロマトグラム*

大豆抽出液に農薬を添加し、図 1 (C₁₈ ミニカラム (一段目) からの溶出溶媒及び溶媒量を除く) に従って試験溶液を調製した。

C₁₈ ミニカラム (一段目) からの溶出溶媒及び溶媒量 (a) アセトニトリル 0.6 mL、(b) アセトニトリル/水 (19 : 1) 0.6 mL、(c) アセトニトリル/水 (9 : 1) 0.6 mL

*GC- (EI) MS、スキャン範囲 m/z 40-500

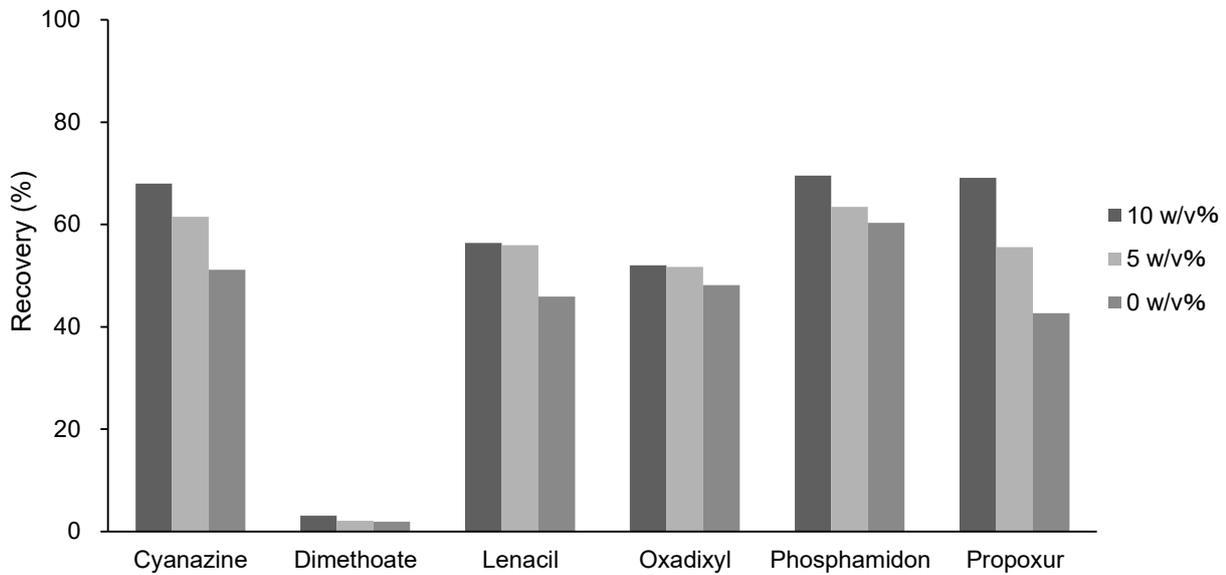


図 2-5-1 C₁₈ (50 mg) からの溶出液の希釈に用いる塩化ナトリウム溶液濃度 (0 w/v%、5 w/v%、10 w/v%) と農薬の回収率 (%)

ほうれんそう抽出液に農薬を添加し、図 1 に従って試験溶液を調製した。ただし、塩化ナトリウム溶液の濃度は 0 w/v%、5 w/v% 及び 10 w/v% とし、PSA ミニラカムによる精製は省略した。

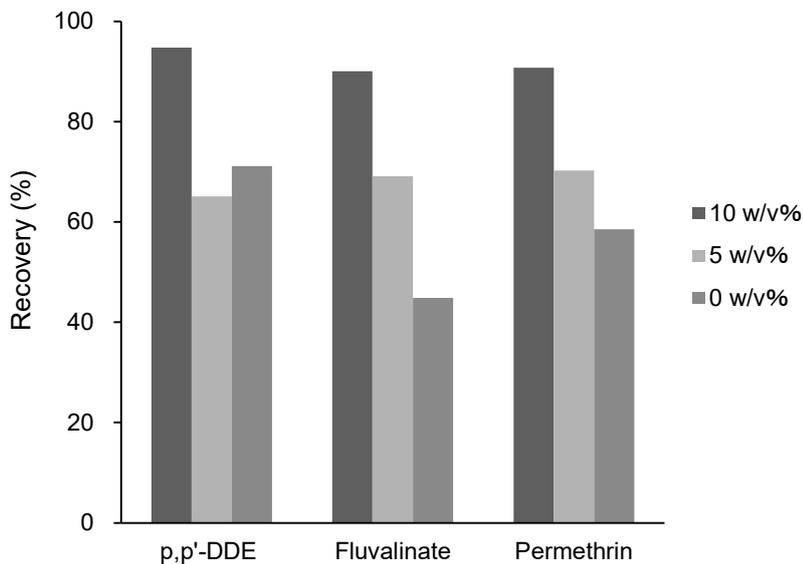


図 2-5-2 C₁₈ (50 mg) からの溶出液の希釈に用いる塩化ナトリウム溶液濃度 (0 w/v%、5 w/v%、10 w/v%) と農薬の回収率 (%)

ほうれんそう抽出液に農薬を添加し、図 1 に従って試験溶液を調製した。ただし、塩化ナトリウム溶液の濃度は 0 w/v%、5 w/v% 及び 10 w/v% とし、PSA ミニラカムによる精製は省略した。

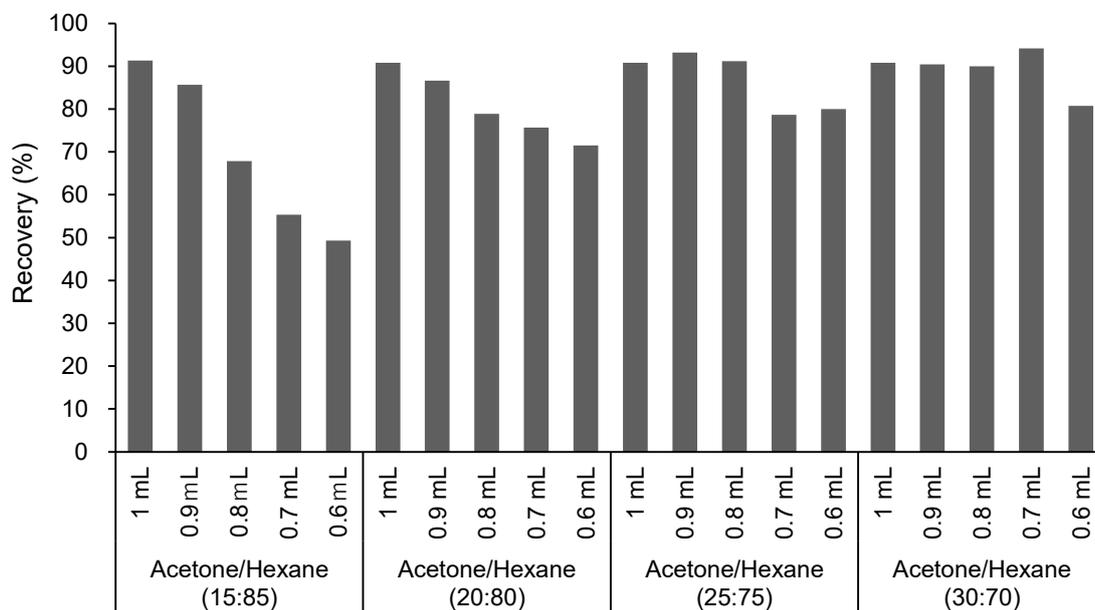


図 2-6 PSA ミニカラムからの溶出溶媒/溶媒量と azoxystrobin の回収率 (%)

ほうれんそう抽出液に農薬を添加し、図 1 (PSA ミニカラムからの溶出溶媒及び溶媒量を除く) に従って試験溶液を調製した。

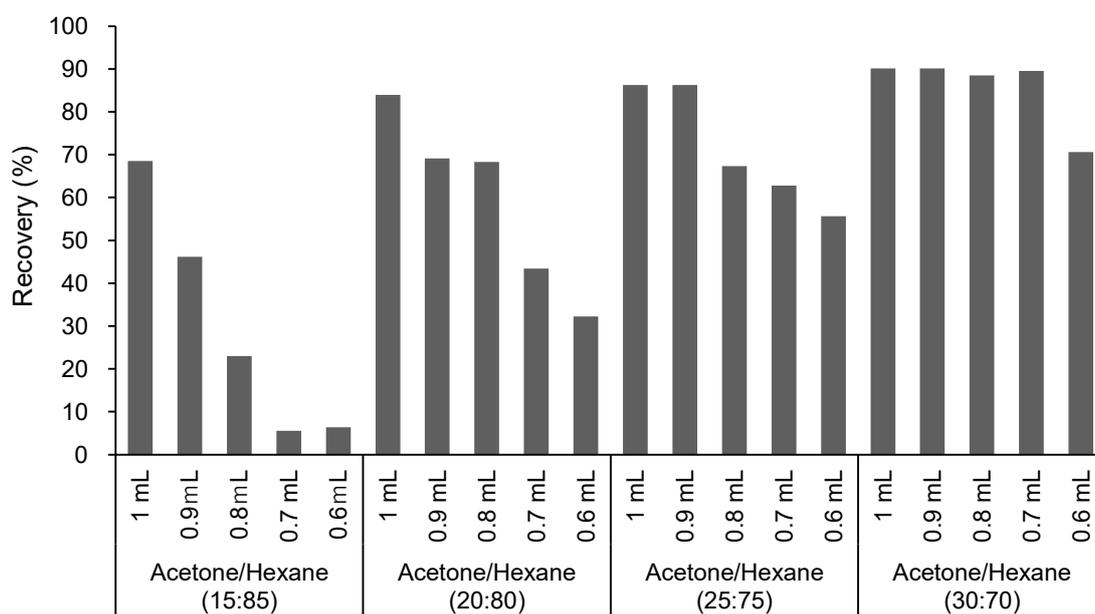


図 2-7 PSA ミニカラムからの溶出溶媒/溶媒量と fludioxonil の回収率 (%)

ほうれんそう抽出液に農薬を添加し、図 1 (PSA ミニカラムからの溶出溶媒及び溶媒量を除く) に従って試験溶液を調製した。

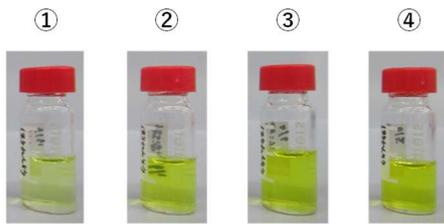


図 2-8 ほうれんそうのブランク試験溶液

ほうれんそう抽出液に農薬を添加し、図 1 に従って試験溶液を調製した。ただし、PSA ミニカラムからの溶出には①アセトン/ヘキサン (15:85)、②アセトン/ヘキサン (20:80)、③アセトン/ヘキサン (25:75)、④アセトン/ヘキサン (30:70) 各 1 mL を用いた。

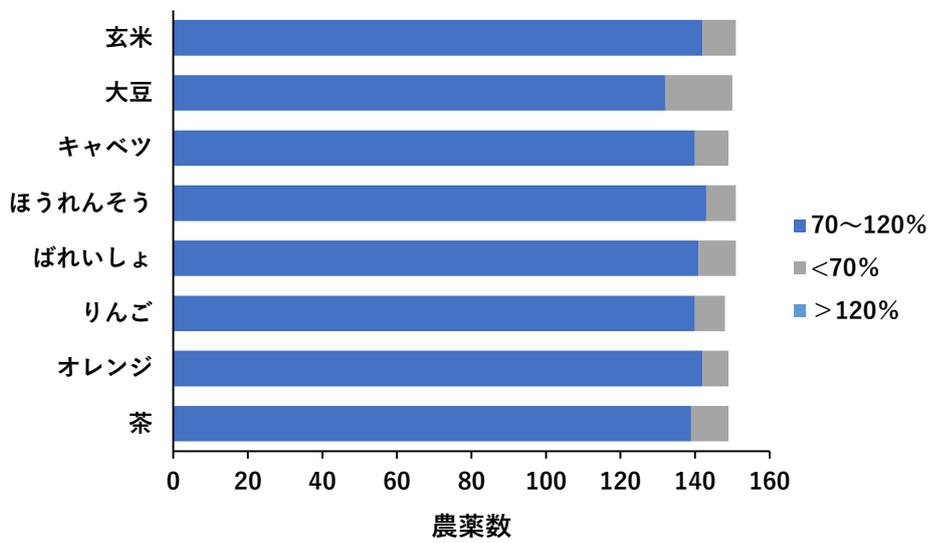


図 2-9-1 妥当性評価試験結果（真度）

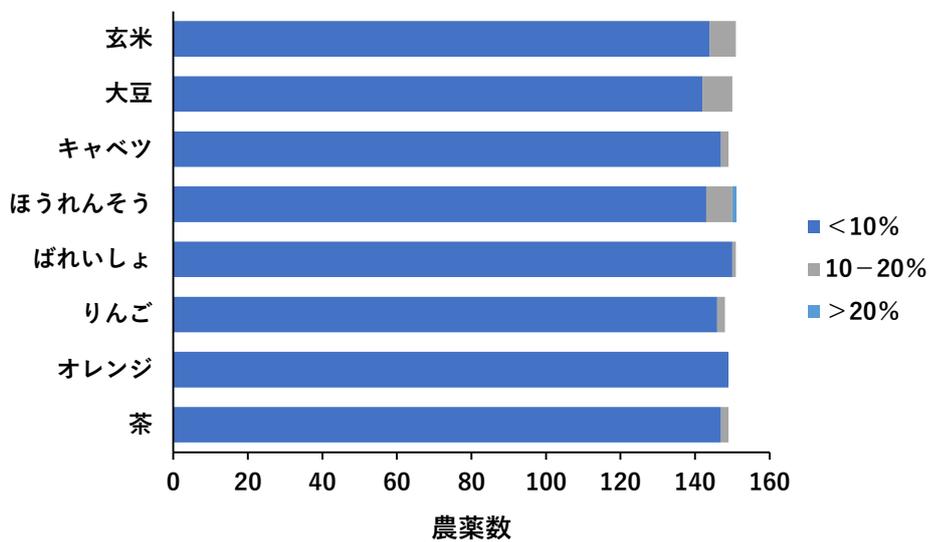


図 2-9-2 妥当性評価試験結果（併行精度）

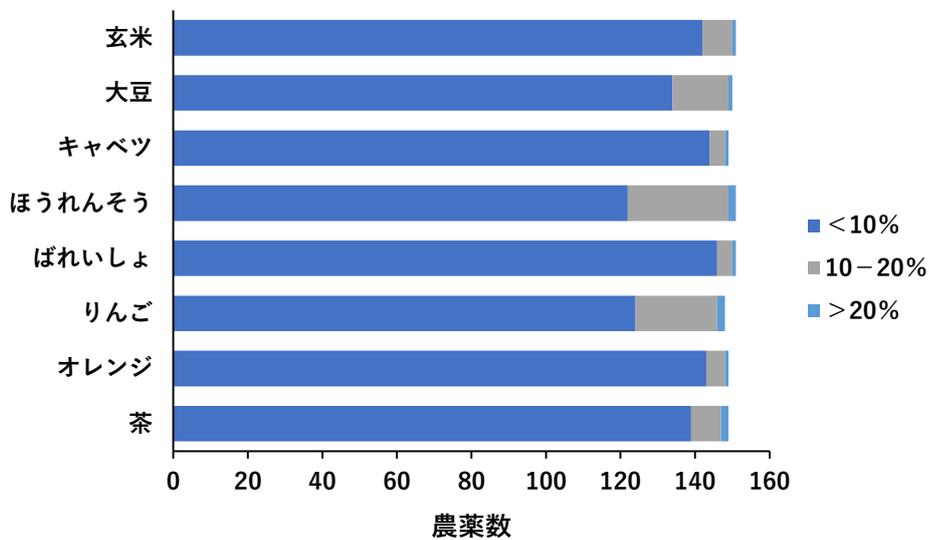


図 2-9-3 妥当性評価試験結果（室内精度）

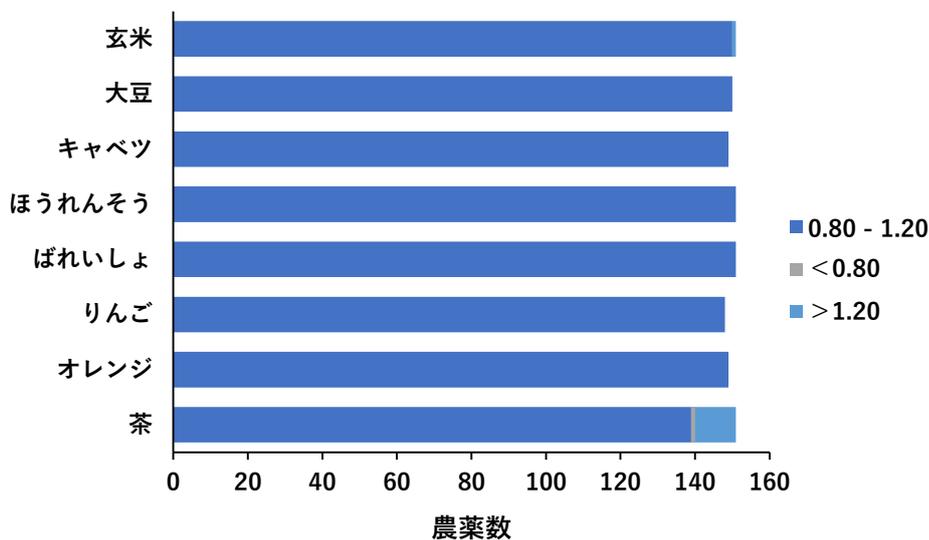
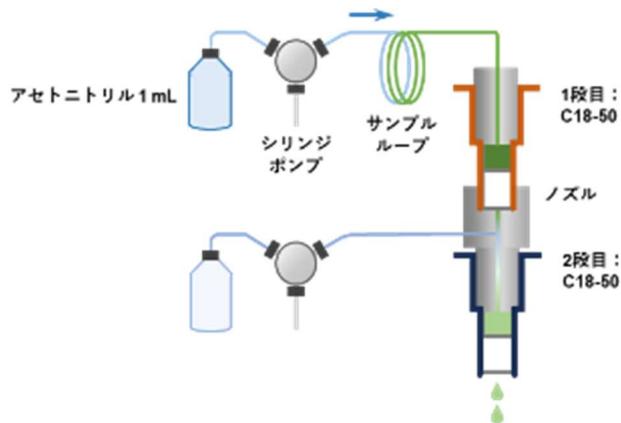


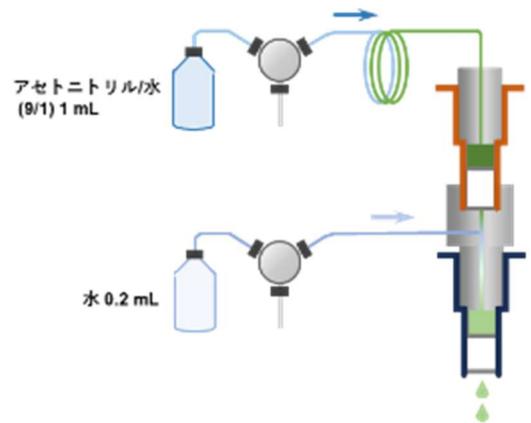
図 2-10 試料マトリックスの測定への影響

*溶媒標準溶液に対するマトリックス標準溶液のピーク面積比

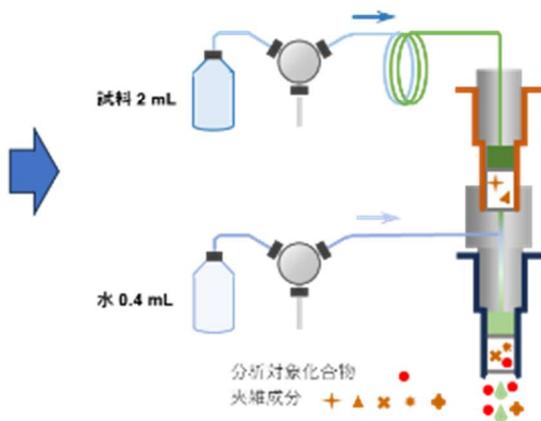
(1) コンディショニング1



(2) コンディショニング2



(3) 試料負荷



(4) 溶出

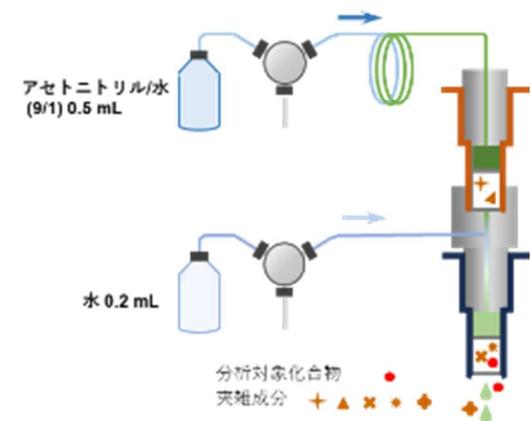


図 3-1 確立した精製方法の概要

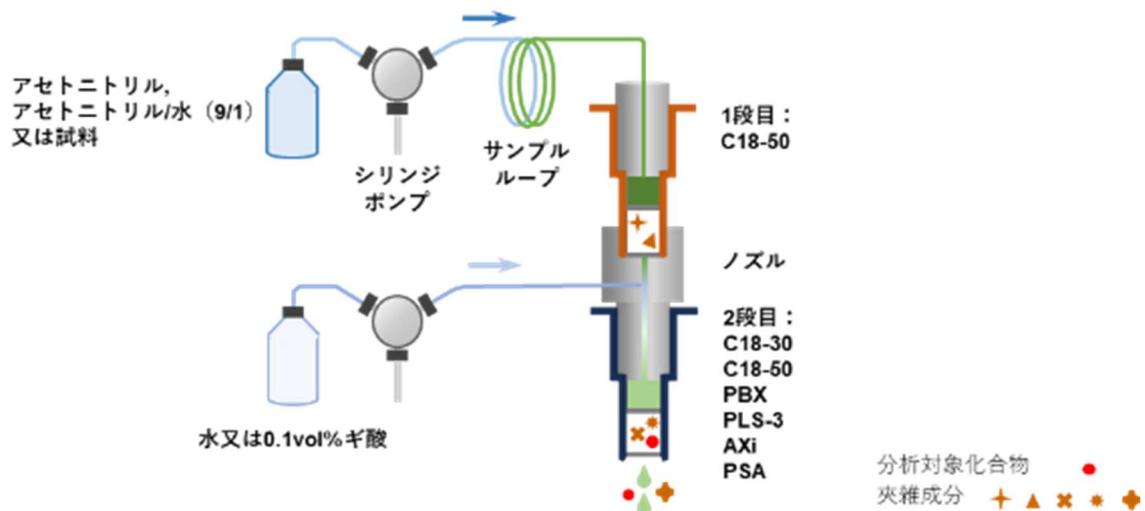


図 3-2 検討した精製方法の概要. ノズルから 2 段目のカラムに流す溶媒は、C18-30、C18-50、PBS 又は PLS-3 の場合は水、AXi 又は PSA の場合は 0.1vol%ギ酸とした.

表 3-1 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															
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
Diffloxacin	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
Sulfaethoxyypyridazine	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
Sulfamethoxyypyridazine	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
Sulfapyridine	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
Sulfatrazole	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
Sulfanitran	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 3-2 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									
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
Sulfisomidine	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 3-3 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									
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
Sulfaguandine	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
Sulfisomidine	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 3-4 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									
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 3-5 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
Sulfamethoxypridazine	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
Sulfaquinoxaline	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 3-6 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
Sulfamethoxypridazine	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 3-7 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
Marbopfoxacin	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
Sulfaethoxypyridazine	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
Sulfaguandine	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
Sulfamethoxyipyridazine	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
Sulfaquinoxaline	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
Sulfisomidine	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

令和 4-5 年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
令和 6 年度 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
（総合）分担研究報告書

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 薬学部薬品分析化学研究室・教授）

研究要旨

1 年目は、誘導体化を行わずに逆相カラムと陰イオンカラムの混合モードカラムを用いて、蜂蜜中の残留グリホサート、グルホシネート、およびそれらの代謝物 *N*-アセチルグリホサート (Gly-A)、3-メチルホスフィニコプロピオン酸 (MPPA)、*N*-アセチルグルホシネート (Glu-A) を同時定量する液体クロマトグラフ-タンデム質量分析法 (LC-MS/MS) を開発した。蜂蜜サンプルから水抽出し、逆相 C₁₈ カートリッジカラムと陰イオン交換 NH₂ カートリッジカラムを使用し、LC-MS/MS で定量した。グリホサート、Glu-A、Gly-A、MPPA は脱プロトン化に基づくマイナスイオンモードで検出し、グルホシネートはポジティブイオンモードで検出した。グルホシネート、Glu-A、MPPA は 1~20 µg/kg の濃度範囲で、グリホサート、Gly-A は 5~100 µg/kg の濃度範囲で検量線を算出した。いずれの検量線の決定係数は 0.993 よりも高かった。開発した方法にて、グリホサートと Gly-A を 25 µg/kg、グルホシネートと MPPA と Glu-A を 5 µg/kg 添加した蜂蜜試料を用いて妥当性評価を行った。5 µg/kg は最大残留基準値に基づいている。妥当性評価の結果、良好な回収率 (86-106%) と精度 (<10%) を示した。開発したメソッドの定量限界は、グリホサートで 5 µg/kg、Gly-A で 2 µg/kg、グルホシネート、MPPA、Glu-A は 1 µg/kg となった。

2 年目は固相カートリッジ中での *N*-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-*N*-methyltrifluoroacetamide (MTBSTFA) による簡便で迅速な誘導体化を行い、大豆中のグリホサート、グルホシネート、Gly-A、MPPA、Glu-A を同時定量する LC-MS/MS を開発した。水抽出後にアセトニトリルで除タンパク後、AXs 固相カートリッジを用いた固相抽出で夾雑成分を除去し、イオン化阻害の影響を最小限にするように精製した。Gly、Gly-A は 0.1-2 ng/g の範囲で、Glu、Glu-A、MPPA は 0.02-0.4 ng/g の範囲で検量線を作成したところ、決定係数 (R^2) は 0.994 以上の良好な直線性を示した。定量下限値は S/N 比=10 を基に Gly 類が 0.05 mg/kg、Glu 類が 0.1 mg/kg と算出した。我が国における大豆の Gly の基準値は Gly-A との総和で 20 mg/kg であり、Glu の基準値は Glu-A および MPPA と合算で 2 mg/kg である。基準値レベルの妥当性評価のため Gly 類は各 5 mg/kg、Glu 類は各 0.5 mg/kg となるように大豆へ添加し、回収率、併行精度および室内再現精度を算出した。回収率は 97-108%、併行精度は 2-5%、室内再現精度 4-9% となりガイドラインの目標値 (回収率 70-120%、併行精度 10%未満、室内再現精度 15%未満) を満たした。抽出液をセット後の半自動化オンライン化分析も検討し、妥当性を確認した。

3 年目は、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、スルホキサ

フロルの 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。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。オンライン化は今後検討する予定である。

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）、田口貴章、堤智昭（国立医薬品食品衛生研究所）、佐々野僚一（星薬科大学大学院、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、高極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。1 年目は蜂蜜中の残留グリホサート、グルホシネート、およびそれらの代謝物 *N*-アセチルグリホサート (Gly-A)、3-メチルホスフィニコプロピオン酸(MPPA)、*N*-アセチルグルホシネート (Glu-A) (Fig.1) の分析法の開発、2 年目は大豆中のグリホサート、グルホシネート、Gly-A、MPPA、Glu-A の分析法の開発とオンライン化の検討、3 年目は、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. 試薬・器具

標品の Gly (98.9%)、Glu (残留農薬試験用)、MPPA (残留農薬試験用)、Gly-A は富士フィルム和光純薬社製を使用した。Glu-A はフナコシ社製を使用した。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%)、フルピラジフロロン ($\leq 100\%$)、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%) を用いた。

誘導体化試薬の MTBSTFA (97%) と MTBSTFA+1%TBDMS ($\geq 95\%$) は Merck 社製を

使用した。移動相や緩衝塩等の ACN (HPLC 用)、MeOH (HPLC 用)、酢酸アンモニウム (特級、97%)、酢酸 (特級、99%) は富士フィルム和光純薬社製を使用した。食用丸大豆試料は北海道産、アメリカ産、カナダ産および中国産を使用した。飼料用大豆かすはアメリカ産・ブラジル産混合、カナダ産を使用し、食用加工大豆はアメリカ産を使用した。蜂蜜製品およびほうれんそうに関してはスーパーで購入したものをういた。

2. 前処理に使用した装置および器具

1.5 mL チューブは WATSON 社製 50 mL チューブは VIORAMO 社製、50 mL チューブ用遠心分離機は KUBOTA 社製 (Model 2410) 振とう機は社製、1.5 mL チューブ用遠心分離機は eppendorf 社製 (MiniSpin) を使用した。精製に使用した固相カートリッジはすべてアイスティサイエンス社製の SPE-Presh 型を用いた。連結させる際に下側になる固相カートリッジは SPE-Flash 型を用いた。ネオニコチノイド類分析の固相カートリッジ C18、PSA、PBX (アイスティサイエンス社製 Smart-SPE) はアイスティサイエンス社製を用いた。

3. 測定装置および LC-MS/MS 最適条件

対象物質の分析には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。液体クロマトグラフは島津製作所製の LC-30AD のポンプと SIL30AC のオートサンプラーを使用し、タンデム質量分析計は島津製作所製の LCMS-8060 を使用した。蜂蜜分析に関しては、UHPLC PEEK InertSustain AX-C18 カラム (2.1 mm i.d.×100 mm, 5 μm; GL Sciences, Tokyo, Japan) を用いて行った。大豆に関しては分析カラムには InertSustain C18 (2.1 mm i.d.×150 mm, 3 μm; GL Sciences, Tokyo, Japan) を使用した。カラム温度は 30°C に設定し、サンプルクーラー内は 4°C に設定した。ほうれんそうのネオニコチノイド類の分析用のカラムは、InertSustain ODS-3 (2.1 mm i.d.×150 mm, 3 μm; GL Sciences, Tokyo, Japan) を使用した。

蜂蜜中の分析に関しては、移動相は、水/アセトニトリル (3/1、v/v) 中の 2% ギ酸および 0.1% 酢酸を移動相 A として、アセトニトリル中の 1% ギ酸および 0.1% 酢酸を移動相 B として構成し、0 分から 2 分まで 95%B、3 分で 10%B まで直線、6 分保持、1 分で 95% に戻す。次の注入の前に、システムを 3 分間再平衡化した。流量は 0.3 mL/min に設定し、クロマトグラフィーの総運転時間 (注入から注入まで) は 15 分であった。大豆分析の HPLC 条件は、移動相には 0.2 mM 酢酸アンモニウム-MeOH を流速 0.2 mL/min で送液し、6 分間のアイソクラティック溶出によって対象物質の分離と分析を行った。MS のイオン化モードはエレクトロスプレーイオン (ESI) 化法のポジティブイオンモードで Multiple reaction monitoring (MRM) を用いて分析した (Table 1)。

4. 抽出精製方法

4.1. 蜂蜜製品の抽出と精製

蜂蜜試料 (室温) 10 g を 50 mL ポリプロピレン遠沈管に秤量し、30 mL の超純水に手で十分に振とうして溶解・混合した。さらに超純水を約 15 mL 加え、全量を 50 mL とした。1930×g (3500 rpm) で 5 分間遠心分離した後、上清 1 mL を、メタノール/水 (1/1) 1 mL と 0.02% 酢酸溶液 1 mL で調整した C₁₈ カートリッジと NH₂ カートリッジを組み合わせた SPE カートリッジ (上側に Smart-SPE C18 (30 mg)、下側に Smart-SPE NH₂ (30 mg)) に充填した。負荷されたサンプルが結合したカートリッジを通過した後、カートリッジを 0.02% 酢酸溶液 0.5 mL で洗浄し、C₁₈ カートリッジを切り離した。NH₂ カートリッジを 1 mL の 1% 酢酸溶液で洗浄して不純物を除去し、1 mL の 0.02% 酢酸水溶液で洗浄した。0.07% アンモニア水溶液 0.9 mL で NH₂ カートリッジから分析対象物を溶出した。溶出液は 0.5% クエン酸と 0.2% リン酸を含む 20% 酢酸溶液 50 μL に加えた。最後に水を加え、全量を 1 mL とした。

4.2. 大豆試料の抽出の精製

凍結粉碎した大豆試料 1 g を 50 mL ポリプロピレン遠沈管に秤量し、5 mL の超純水を加え、5 分間振とうした。その後 50%ACN 水溶液を 5 mL 加えて全量 10 mL とし、振とう後、1930×g で 5 分間遠心分離を行った。上清 0.4 mL と ACN 0.6 mL を混合し、5 分静置後、1930×g で 5 分間遠心分離を行い除タンパクした。上清 0.025 mL と 10%ACN 水溶液 0.975 mL を混合し、試料抽出液とした。固相カートリッジは Presh-AXs (第 4 級アミン) を用いた。10%ACN 水溶液 0.1 mL でコンディショニングした後に試料抽出液を 0.05 mL 負荷した。0.02%酢酸水溶液 0.1 mL で洗浄後、ACN 0.1 mL で固相中の水を取り除き、脱水を行った。脱水後、10%MTBSTFA-ACN 0.1 mL によって固相中で誘導体化を行い、事前に ACN 0.4 mL を添加したバイアルへ溶出、ボルテックスを 10 秒間行った後に LC-MS/MS にて分析を行った。標準液の誘導体化については試料抽出液の処理と同様の方法を使用して負荷、10%ACN 水溶液による洗浄、脱水、誘導体化および溶出を行い、LC-MS/MS にて分析を行った。

4.3. ほうれんそうの抽出と精製

ほうれんそうを液体窒素で凍結させ粉碎機を用いて粉碎し、10 g を 50 mL ポリプロピレンチューブに量り取る。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 秒ずつ行う。

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 秒ずつ行う。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 秒ずつ行う。1930 × g で遠心分離を 5 分間行い、試料抽出液とする。

固相カートリッジは PBX-20 mg、PSA-30 mg、PBX-20 mg の順番で連結する。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う。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、加圧によって溶出する。溶出液は試験管で受ける。

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、加圧によって溶出する。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う。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、加圧によって溶出する。溶出液は先ほどとは異なる試験管で受ける。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する。溶出液は 2 つ目の試験管で受け、全量 2 mL を測定用溶液とする。

5. 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. 研究結果及び考察

1. 蜂蜜中のグリホサート類の分析

1.1. カラムと移動相の最適化

極性が高く、様々な物理化学的性質を持つ 5 種類の分析対象物を同時に分析するために、いくつもの陰イオン交換カラムを検討した。検討したカラムのうち、TSK gel Super IC-AP と UHPLC PEEK InertSustain Ax-C18 カラムが最も良い結果を得たが、メーカーマニュアルによると、TSK gel Super IC-AP は移動相のアセトニトリルが高い条件では適していない。また、陰イオン交換カラム (TSK gel Super IC-AP) を用いて分離した場合、他の化合物が 3.5~5.4 分で検出されるにもかかわらず、N-アセチルグリホサートのピークが 15 分近く観察されたため、同時分析には適さないと考えた。そこで、UHPLC PEEK InertSustain Ax-C18 カラムを逆相と陰イオン交換の混合モードで検討したが、最初の移動相条

件を用いた場合、Gly-A に関しては満足のいく結果ではなかった。Gly-A の溶出が非常に遅く、ピークの半値幅が広がり、感度不足が懸念された。しかし、移動相に 0.1%の酢酸を加えることで、安定した測定結果を得ることができた。さらに、LC 系では、金属の存在によりピークテーリングが発生するため、金属を含まないカラムを使用し、ステンレス (SUS : 鋼材使用ステンレス) 製の LC ラインを可能な限り PEEK チューブに切り替えた。LC-MS/MS 分析における MRM モードは、標準試料とハチミツ試料を用いて最適化した。

1.2. はちみつの試料調製と分析対象物の定量

まず、抽出液の pH (pH3~8、0.5M 塩酸溶液または 1M 水酸化ナトリウム溶液の添加により調整) が、SPE 洗浄後の蜂蜜サンプルからの分析対象物の回収率に及ぼす影響を検討した。抽出液の pH を変えても、SPE 洗浄後の分析物の回収率に差はなかった。また、超純水で抽出したハチミツ抽出液の pH は 3.5~4.5 であった。SPE カートリッジカラムを用いた蜂蜜からのグリホサート、グルホシネートおよびその代謝物の洗浄方法を検討した。ハチミツサンプルには、検出を妨害する単糖類や多糖類がいくつか含まれているため、クリーンアップステップでこれらの糖類や他の妨害物質を除去することを試みた。抽出物の 1 mL アリコート、あらかじめ 1 mL のメタノール/水 (1/1) および 1 mL の 0.02%酢酸溶液で調整した C₁₈ (30 mg) および NH₂ (30 mg) カートリッジと同時に組み合わせた SPE カートリッジに負荷した。結合したカートリッジを 0.02%酢酸溶液 0.5 mL で洗浄した。ハチミツ試料中の色素や脂肪酸などの低極性不純物は、C₁₈ カラムに吸着させて除去した。極性の高いアニオン性リン酸基を持つ NH₂ カラムには、すべての分析対象物が保持されると考えられた。アミノ酸などの塩基性妨害物質は、これらの固相に保持されず、除去された。アニオン性不純物のような酸性物質は、分析対象物とともに NH₂ カラムで保持された。そこで、C₁₈ カラムを取り

外し、NH₂ カラムを酢酸溶液で洗浄することで酸性物質を除去した。分析対象物は、NH₂ カラムから溶出溶媒で溶出した。NH₂ カラムからの溶出溶媒中の NH₄OH の濃度 (0.017, 0.035, 0.07%) を最適化した。0.017%の NH₄OH を溶出溶媒に用いた場合、グルホシネート以外の分析対象物の回収率は 20%未満であった。NH₄OH の濃度に依存して回収率は向上した。0.07%の NH₄OH を溶出液として使用した場合、すべての分析対象物についてほぼ 100%の回収率が得られた。したがって、0.07%を溶出用 NH₄OH の最適濃度とした。NH₄OH 濃度を上げて pH を上げると、NH₂ のイオン性が低下し (NH₃⁺が NH₂に変化)、リン酸基を持つ目的物質が NH₂ カラムから剥離して溶出されることがある。洗浄溶媒の酢酸濃度 (0.1、0.2、0.5、1.0%) を最適化した。SPE カラムの洗浄溶媒として酢酸の濃度を変えても分析物の回収率に大きな影響はなかったため、洗浄溶媒として 1%酢酸を使用した。さらに、酢酸の濃度を上げて pH を下げると酸性物質の解離が抑制されるため、NH₂ カラムから酸性物質が洗い流された。溶出液に 0.5%クエン酸および 0.2%リン酸溶液を含む 20%酢酸溶液 50μL を加えて酸性にし、水の添加により一定容量 1mL に調製した。

1.3. マトリックス効果の検証

アカシア蜂蜜 (中国産) を用いて、マトリックス効果 (%ME) を算出した。ME は、サンプルマトリックス中の分析対象物の反応を、抽出溶媒中の分析対象物の反応で割った値に 100 を乗じた値として算出されます。マトリックスの影響がない場合、ME は 100%となる。グリホサートは ME=114%、グルホシネートは ME=102%、これらの化合物の代謝物は ME=88~100%と算出された。過去の論文で蜂蜜分析における ME を 130~150% (グリホサート)、50% (グルホシネート) と推定されているため、我々の前処理方法によって ME は最小化された。しかし、前処理プロセスの最適化において、干渉物質を多く含む精製度の低い試料が MS に混入する可能

性がある。そこで、LC-MS/MS の汚染を防ぐために、別の分析方法 (GC/MS) を用いて妨害物質の除去を確認し、提案した SPE 手法による妨害物質 (糖や有機酸など) の除去を明確にした。

1.4. 妥当性評価試験結果

グルホシネート、Glu-A、MPPA では 1~20 µg/kg、グリホサート、Gly-A では 5~100 µg/kg の範囲で求めた検量線の決定係数 (R^2) は 0.993 以上となった (Fig. 2)。開発したメソッドの選択性は十分であると判断した。日本および EU における蜂蜜中のグリホサートの MRL 値である 50 µg/kg (グリホサート : 25 µg/kg、Gly-A : 25 µg/kg) を添加し、同様にグルホシネートの MRL 値である 10 µg/kg を吟味し、15 µg/kg (グルホシネート : 5 µg/kg、MPPA : 5 µg/kg、Glu-A : 5 µg/kg) 添加した。

その結果、グリホサートと Gly-A について真度 104~106%、RSD3.3~6.5%、グルホシネート、MPPA、Glu-A については真度 86~110%、RSD2.1~4.2%を示した (Table 2)。これらの値は、日本の妥当性評価試験法 (厚生労働省 2010 年版) で定められた真正度 (70~120%) と精度 (10 µg/kg で <25%、100 µg/kg で <15%) の基準の許容範囲内である。定量限界 (LOQ) は、グリホサートと Gly-A がそれぞれ 5 および 2 µg/kg、グルホシネート、MPPA および Glu-A がそれぞれ 1 µg/kg と推定された。

1.5. ハチミツ試料への適用

残留除草剤および代謝物の検出レベルに関する情報を得るため、日本で購入した市販のハチミツ 5 検体について、提案した方法を用いてグリホサート、Gly-A、グルホシネート、MPPA および Glu-A の定量化を試みた。その結果、カナダ産のサンプルからはグリホサート (26 µg/kg)、グルホシネート (2.8 µg/kg)、Glu-A (1.9 µg/kg) が検出された (Table 3)。市販のハチミツから Glu-A が検出されたという報告は、調査した限りいまままでにないと考えている。したがって、グリホサートおよびグルホシネートについて、

輸入蜂蜜サンプルをさらに監視することが必要である。

2. 大豆試料中のグリホサート類の分析

2.1. 固相誘導体化による LC-MS/MS 条件の最適化

2.1.1. 固相誘導体化反応と MS 条件の検討

条件検討混合標準液を用いて、MTBSTFA 試薬によって固相誘導体化を行い、Gly 類 5 µg/L および Glu 類 0.5 µg/L に調製し、MRM 条件の最適化を行った。本研究で用いたシリル化反応はケイ素原子に OH 基上の酸素が攻撃し、5 配位の間体を経て、酸素に *tert*-Butyldimethylsilane (TBDMS) が置換する反応である (Fig. 3)。本研究では、陰イオン交換固相カートリッジに測定対象物質を保持させた後に、脱水を行い、誘導体化試薬溶液を通すことで固相誘導体化を行うこととした。誘導体化させた各標準液をフローインジェクションにより、エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法で MS に導入し、スキャンモードとプロダクトイオンスキャンモードで分析を行うことによって、誘導体化した標準液のイオン化条件の最適化を行った。ESI 法のポジティブ、ネガティブイオンモードで比較を行った結果、すべての標準液においてポジティブイオンモードで高い感度を得た。その後、誘導体化標準液のプリカーサーイオン、プロダクトイオン、電圧等の最適化を行った (Table 4)。

2.1.2. 移動相の検討

シリル化反応後の化合物は加水分解を起こすことが報告されている。このため、移動相に酸や水を入れることなく有機溶媒のみで検討を行う必要があると考えた。条件検討用混合標準液を用いて、移動相として主に使用される MeOH および ACN を選択した時のそれぞれのピーク面積値から感度および精度を算出し、比較検討を行った。その結果、ACN は MeOH に比べて Gly、Gly-A、及び MPPA において有意に感度が高かったが、どちらも精度が良好でなかった。この結果を踏まえて、イオン化を安定させるた

めに酢酸アンモニウムを移動相に添加することを考えた。酢酸アンモニウムは ACN に溶けないため MeOH に溶かし、酢酸アンモニウム MeOH の移動相で感度、精度、添加濃度について同様の誘導体化標準液を用いて再検討した。その結果、酢酸アンモニウムを添加することで Glu 類の感度が ACN に比べて有意に向上し、さらに精度も向上した。また、添加濃度は 0.2 mM の時に高感度を示した。感度が高く、精度が安定した 0.2 mM 酢酸アンモニウム-MeOH を移動相の最適条件とした。

2. 2. 高極性農薬と誘導体化試薬の反応条件の最適化

2. 2. 1. 誘導体化試薬の検討

シリル化反応はケイ素の置換基によって反応性や精度が変化する。ケイ素にメチル基が 3 つ結合した Trimethylsilyl (TMS) 化が最も反応しやすく、分解もしやすい。先行研究において TMS 化標品と TBDMS 化標品の MS スペクトルを比較したところ、TBDMS 化標準液の MS スペクトルの感度が高い結果を示している。仮に本研究で TMS 化試薬を用いた場合に、すでに最適化した移動相の MeOH によって分解すると推測した。このため、加水分解への安定性も考慮に入れて固相中での反応速度も高い TBDMS 化試薬を用いた。先行研究において、TBDMCS と塩基による反応によって誘導体化反応が触媒され、反応性を高めるため、GC-MS 分析においては MTBSTFA に 1%TBDMCS が加わった試薬を用いる分析法が多く報告されている。そこで、MTBSTFA 試薬と 1%TBDMCS+MTBSTFA 試薬による反応速度や感度について検討を行った。その結果、どちらの試薬を使っても迅速に誘導体化は可能であったが、1%TBDMCS が添加されている群において Gly および Glu が分解し、感度が不十分となった。これは、誘導体化後に生成する塩化物イオンがケイ素と親和性が高いため、塩基として誘導体化後標品と反応し分解を促していると考えた。このため、MTBSTFA 試薬を最適誘導体化試薬とした。

2. 2. 2. 誘導体化試薬の固相カートリッジ中での反応時間と希釈溶媒の検討

MTBSTFA による固相誘導体化方法は報告されていないことから、固相中での反応時間、希釈溶媒や溶出後の時間経過による安定性を検討した。はじめに、固相カートリッジ中で誘導体化試薬液負荷後の即座に溶出する検体と 5 分放置した後に溶出する検体を比較した。その結果、固相カートリッジ中に保持している標準品と誘導体化試薬は即時に反応することが判明した。溶液負荷後の固相中で放置すると誘導体化試薬および溶媒が揮発する可能性があったため、誘導体化試薬液負荷後、即座に溶出することを最適な条件とした。次に誘導体化後に希釈する溶媒を MeOH および ACN として安定性の比較検討を行った。希釈溶媒として比較した MeOH は誘導体化してから測定する毎に低下し、誘導体化後 90 分で 0 分比べて Gly および Gly-A において、大きな感度低下が確認された。対して、ACN は誘導体化してから 90 分経過しても安定であり、また 24 時間経過しても大きく感度は低下しなかった。この結果から、連続分析を行う場合には、希釈液は ACN を最適条件とした。

2. 2. 3. 固相誘導体化による迅速化と高感度化

従来の誘導体化法での問題点は反応時間や反応温度、溶媒除去等である。測定対象物質の従来法として、FMOC-Cl、オルト酢酸トリメチル、3,6-dimethoxy-9-phenyl-9H-carbazole-1-sulfonyl chloride (DPCS-Cl) 等数多くの誘導体化試薬による分析法が開発されている。しかし、反応温度が高い条件が多く反応時間も長いことが課題とされている。また、オルト酢酸トリメチルによる誘導体化では減圧乾固で溶媒を除くことから溶媒除去に時間を要している。そこで、本研究の固相誘導体化によって反応温度や反応時間の比較評価を行った。その結果、本研究での固相誘導体化法によって反応時間は数秒、反応温度は室温 (25°C) で行えたことから、本分析法は従来法よりも簡便で迅速であることが明らかとなった。さらに、はちみつに適用した非誘導体

化法と固相誘導体化法による感度の差を 5 µg/L 混合誘導体化標準液により評価を行ったところ、非誘導体化法と比べて Gly : 3208 倍、Gly-A : 308 倍、Glu : 3 倍、Glu-A : 75 倍、MPPA : 23 倍もの感度向上が見られたため、MTBSTFA の誘導体化によって高感度化を可能にした。

2.3. 大豆の前処理の最適化

2.3.1. 抽出条件の検討

大豆の栄養成分はタンパク質、炭水化物、脂質で約 8.5 割を占める。その中でもタンパク質は約 40% を占め、その多くが水溶性を示すことから、目的対象物質に混在し、マトリックスとしてイオン化阻害を起こすことが考えられる。そこで、ACN による除タンパクを試みた。はじめに、凍結粉碎大豆 1 g に混合標品溶液の濃度が Gly、Gly-A: 5 µg/g、Glu、Glu-A、MPPA: 0.5 µg/g となるように添加し、室温で 30 分浸透させた。その後、超純水 10 mL を加え、振とう、遠心分離 (1920×g) を各 5 分ごとに行い水抽出した。水抽出液 0.5 mL と ACN 0.5 mL にて除タンパクを行った。除タンパク後の溶液を希釈し、AXs 固相カートリッジに通し、誘導体化を行うことで回収率 ((標品添加検体-検体ブランク/標準液) × 100 (%)) および併行精度 (回収率標準偏差/回収率平均 × 100 (%)) を算出した。その結果、グリホサートおよびグルホシネートの回収率が 120% を超え、グルホシネートについては精度も若干低かった。このことから、除タンパク効率が悪いと考え、除タンパク時の ACN を 0.8 mL、超純水を 0.2 mL に変更し、同様の誘導体化方法によって回収率と併行精度を算出した。その結果、Gly の回収率が 40% まで低下してしまい、除タンパク時の ACN 量が過剰であると考えた。そこで、水抽出を 2 段階に分け、1 段階目は超純水 5 mL、2 段階目は 50% ACN 水溶液 5 mL 加えて水抽出と軽度の除タンパクを行った。その後、抽出液 0.4 mL と ACN 0.6 mL による除タンパク質を行い、同様の誘導体化法によって回収率と精度を算出した。その結果、すべての対象物質において 70-120% に収まる良好な平均回収率を

示したが、個々で見ると回収率が 120% を超えている検体や併行精度も 10% に近い結果を示した。このことからタンパク質以外にイオン化に影響を与えるマトリックスが残留し、回収率や精度を低下すると考え、精製によって良好な回収率と精度の算出を目指した。

2.3.2. 陰イオン交換型固相カートリッジの検討

目的対象物質は中性の水溶液中において、リン酸基やカルボキシ基がイオン型となり負電荷を持つ。このことから、陰イオン交換型固相カートリッジに保持させることが可能と考えたが、使用する官能基によって保持の強さやマトリックスの精製力等が異なるため固相カートリッジの検討が必要であると推測した。また、陰イオン交換官能基に加えて疎水性官能基や陽イオン交換官能基を混合で持つ固相カートリッジは目的対象物質の性質上、保持力の悪化の可能性があると考え、陰イオン交換官能基のみで構成される固相カートリッジについて誘導体化標品を用いて感度および精度の比較検討を行った。比較検討を行った固相カートリッジはシリカゲル担体にアミノプロピル基 (-CH₂CH₂CH₂NH₂) を結合させた NH₂ 固相カートリッジとポリマー担体に 4 級アミン (-N(CH₃)₃⁺) を結合させた AXs 固相カートリッジの 2 種類である。検討の結果、すべての対象物質において AXs を使用した方が NH₂ 使用時に比べて有意に高値を示し、精度も高くなった。この現象は、負荷の際に目的対象物質が NH₂ へ保持せずに溶出したと思われた。AXs 固相カートリッジ中の官能基の窒素は NH₂ 固相カートリッジ中の官能基の窒素よりもカチオン性が高いため測定対象物質が強く保持し、誘導体化できたと考えた。このため、シリカゲル担体の固相カートリッジを使用することは避け、感度と精度が共に良好であったポリマー担体の AXs 固相カートリッジを使用することとした。

2.3.3. 疎水性保持型固相カートリッジによる精製の検討

大豆抽出後のマトリックスには、脂質（レシチン）や不溶性食物繊維等が含まれていることから、はじめに疎水性物質除去による回収率および精度の向上を試みた。そこで、疎水性物質等を保持する C₁₈ 固相カートリッジや親水性および疎水性物質をバランスよく保持する PBX（担体：ポリスチレンジビニルベンゼン）固相カートリッジ（上側）と AXs 固相カートリッジ（下側）を連結し、上側の C₁₈ および PBX には疎水性の夾雑物質を AXs には目的対象物質を保持させることによる回収率と併行精度を算出した。保持したマトリックスを誘導体化並びに溶出させないために、固相誘導体化や溶出を行う際には、連結している C₁₈ および PBX を外し、固相の充填がない空の固相カートリッジを連結させ誘導体化を行った。その結果、C₁₈-AXs（連結）および PBX-AXs で精製を行うことで回収率が低下した。原因として、C₁₈ および PBX への対象物質の保持が考えられる。C₁₈ はシリカゲルに炭素を 18 個結合させた構造を取り、すべてのシリカゲルに反応することはなく、シラノールとして残留している場合が多い。このため、高極性を示す対象物質がシラノールとの水素結合やイオン結合によって保持すると考えた。また、PBX については親水性物質と親和性を示すことから対象物質を保持すると考えた。シラノール活性は酸性側で抑制できることから、負荷前のコンディショニングにおいて酢酸水溶液の添加を行ったが、回収率は依然低い状態であったため疎水性保持型固相カートリッジ以外の精製を考えた。

2.3.4. 酢酸洗浄による精製の検討

抽出後の溶液には水溶性ビタミンであるナイアシン（ニコチン酸）、パントテン酸や他の酸性物質を含んでいると考えた。これら物質は構造中に OH 基を有し、中性条件下の水溶中では負電荷を持つことから AXs 固相カートリッジにイオン結合することが考えられる。これらのマトリックスがイオン化促進や精度の低下を起こしていると考え、選択的に除去を考えた。そこで、

固相カートリッジ洗浄工程で酢酸による酸洗浄を行うこととした。酢酸濃度を 0.02%、0.1% に設定し、感度と精度を検討した結果、0.1% の時に Gly 類が有意に高くなり、Glu、Glu-A は 0.02% の時に有意に高くなった。Glu 類の感度は Gly 類に比べて低いことから、感度低下を抑える目的で、0.02% 酢酸水溶液を最適条件とした。最適化した抽出、精製条件で回収率を算出したところ、回収率、併行精度共に良好な結果を示した。最適化した条件で妥当性評価試験を行うこととした。

2.4. 妥当性評価試験の実施

これまで LC 条件、MS 条件および誘導体化試薬について最適化を行った。最適化した方法で誘導体化標準液の段階希釈による絶対検量線を算出し、直線性の評価を行った。Gly、Gly-A は 0.1-2 μg/L の範囲で Glu、Glu-A、MPPA は 0.02-0.4 μg/L の範囲で検量線を作成し、決定係数を確認した。この結果、R²=0.994 以上の直線性を示したことから、直線性は良好と判断した。

北海道産の無農薬大豆を用いて、マトリックス効果を算出した。マトリックス効果は一般的にブランク前処理後溶液に標準液を添加し、目的対象物質の標準液で割った値に 100 を乗じた値で算出し、その値が 80-120% 内に収まることで無視できるとされている。しかし、本研究では標準液を固相カートリッジに通して誘導体化しているため、大豆ブランク溶出後に直接添加することができない。標準品を誘導体化させ大豆ブランク中に添加することはできるが、バイアル中での誘導体化試薬濃度が大豆ブランク添加群と誘導体化標準液で差が起ることから正確に比較することが困難であると考えた。そこで、大豆ブランク抽出液および混合標準液はどちらも固相カートリッジを通して誘導体化しているため、固相カートリッジ中での影響は無視できると考えた。このため、抽出後の溶液に混合標準液を添加し、誘導体化を行ったピーク面積値を各誘導体化標準液のピーク面積値で割った値に 100 を乗じてマトリックス効果を算出し

た。その結果、93.1-104.7%に収まる良好な数値を示し、先行研究のマトリックス効果と比較しても良好な数値であったことから、しっかりと妨害物質を除外できると考えた。

最適化した方法を用いて、選択性、回収率、精度および定量限界について検討した。評価方法については、厚生労働省のガイドラインに基づき試験者2人、1日2併行、3日間で実施した。最適化した方法で目的対象物質を含まない大豆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ると判断した。日本における大豆中のGlyの規制値はGly-Aと合算して20 mg/Lであり、Gluの規制値はGlu-AおよびMPPAと合算して2 mg/Lである。ガイドラインにおいては基準値もしくは基準値の半分を添加すると記載されていたため、Gly類は各5 mg/L、Glu類は各0.5 mg/Lとなるように大豆へ添加し、同濃度となるように調製した誘導体化標準液とのピーク面積値で回収率を算出した。得られたピークデータから回収率を算出し、その回収率を一元配置分散分析法で統計処理し、併行精度および室内再現精度を算出した。その結果、回収率、併行精度および室内再現精度共に妥当性評価ガイドラインの基準値(回収率70-120%、併行精度10%未満、室内再現精度15%未満)を満たした(Table 5)。また、定量下限値はSN比=10より、Gly類0.05 mg/L、Glu類0.1 mg/Lと算出した。以上の結果から、本研究で開発した分析法の妥当性が確認された。

2.5. 前処理からLC-MS/MS測定までのオンライン化への検討

機械工学と食品衛生化学を融合し、食品中の有害物質の微量分析の固相抽出自動化とともに、LC-MS/MSと連結し、両者のオンライン化を目指した方法の確立を検討した。本方法を確立することにより、食品中の残留農薬等の検査を、迅速かつ精確に測定することが可能となる。また信頼性の高い測定が可能となることから、検査機関の国際的認証化についても作業効率の大幅な改善に貢献する。

従来のオンライン固相抽出自動化 LC-MS/MS法は医薬品試料や臨床試料に使用されている。オンライン固相抽出自動化のメリットは、前処理から測定まで全自動、検体の取り間違いがない、固相からの溶出液を全量HPLCへ導入するため高感度分析が可能となる等の利点がある。しかし、食品試料の微量分析には報告例が少ない。従来のSPF-LC-MS/MSは固相カートリッジに分析対象物質を保持後、溶出する時にそのまま固相カートリッジをHPLCのラインに組み込み、移動相を用いて固相から溶出しながら、HPLCカラムへ導入していく工程から作成されている。この方式は、以下のような欠点が考えられる。①溶出液に移動相を用いているため、固相の種類や溶出液(移動相)の選定に制限がかかる。②固相からの溶出液をpH調整できない。③前処理に誘導体化を組み込みにくい。④HPLCに組み込んで溶出液で溶出するため、急激に固相カートリッジに高圧がかかり、固相カートリッジと配管の接続部から漏れる可能性がある。分析対象物質の保持や精製においては前処理方法を開発することで上記の欠点を解決した。

確立したオンライン法の真度、精度を評価するために、GlyとGly-Aを各5 mg/kg、Glu、Glu-AおよびMPPAを0.5 mg/kg添加した大豆試料を用いて添加回収試験を行った。妥当性評価試験の結果、良好な真度(回収率70-120%)と室内再現精度(<10%)を示した。

2.6. 大豆への適用

開発した分析法を用いて、食用丸大豆、食用加工大豆、飼料用大豆への適用を行い、信頼性と実用性について評価を行うこととした。対象として、食用丸大豆(北海道産、アメリカ産、カナダ産、中国産)4サンプル、食用加工大豆(アメリカ産)1サンプル、飼料用丸大豆(アメリカ産GM、Non-GM各3サンプル、アメリカ産5サンプル、ブラジル産3サンプル)、飼料用大豆粕(アメリカ・ブラジル産混合)1サンプルについて検量線を引き、測定を行った。その結果、食用

丸大豆および加工大豆では 5 成分は検出限界未満であった。しかし、飼料用丸大豆および大豆粕ではサンプル毎に Gly、Glu および Glu-A の定量限界以上で定量でき、定量値を得た (Table 6)。ガイドラインにおいて飼料用大豆の Gly の基準値は Gly-A との総和で 9 mg/L と定められているため、基準値を下回る結果を示した。また、日本において飼料用大豆中の Glu は基準値が定められていないため、食用大豆の基準値以上となる結果を示した。

定量結果から、アメリカで生産されている大豆は Gly 耐性 CP4EPSPS (アセチル化体を生成しない) ×Glu 耐性アセチル化酵素のハイブリッド型大豆が主流となっており、ブラジルでは Gly 耐性 CP4EPSPS が主流になっていることが示唆された。さらに、飼料用大豆から Glu-A を定量した報告はない。本研究の分析法において大豆への適用性が示唆された。

また、確立した分析法を用いて飼料用大豆試料から基準値未満の Gly、Glu、Glu-A が検出された。以上より、本分析法は、迅速、簡易、信頼性のある自動化分析法で、大豆中の Gly、Glu およびそれらの代謝物の同時定量に適用可能と思われる。

3. 1. ほうれんそうのネオニコチノイド系農薬分析

3. 1. 1. MS/MS 条件の検討

アセトニトリル水溶液で 1000 mg/kg にした標品を、17 成分 (Fig. 4) 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 標品を FI 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、混合標品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。

3. 1. 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 MeOH を最適条件とした (Fig. 5)。

3. 1. 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。

3.2. 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、ギ酸原液 100 µL 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ことが分かった。

3.3. 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。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 7)。

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。

3.4. 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 成分であり、回収率の結果と一致していなかった (Table 8)。

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。

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 9)。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。

3.5. 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 (Fig. 6, Fig. 7)。

ほうれんそうへ添加した標品の濃度は、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。

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。

3.6. 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 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 10)。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

1. 蜂蜜中のグリホサート類の分析

誘導体化を行わずに逆相カラムと陰イオンカラムの混合モードカラムを用いて、蜂蜜中の残留グリホサート、グルホシネート、およびそれらの代謝物 *N*-アセチルグリホサート (Gly-A)、3-メチルホスフィニコプロピオン酸 (MPPA)、*N*-アセチルグルホシネート (Glu-A) を同時定量する液体クロマトグラフ-タンデム質量分析法 (LC-MS/MS) を開発・検討を行った。標的分析物は、水を用いてハチミツサンプルから抽出し、逆相 C₁₈ カートリッジカラムと陰イオン交換 NH₂ カートリッジカラムを使用し、LC-MS/MS で定量した。グリホサート、Glu-A、Gly-A、MPPA は脱プロトン化に基づくマイナスイオンモードで検出し、グルホシネートはポジティブイオンモードで検出した。グルホシネート、Glu-A、MPPA は 1~20 µg/kg の濃度範囲で、グリホサート、Gly-A は 5~100 µg/kg の濃度範囲で検量線

を算出した。いずれの検量線の決定係数 (R²) は 0.993 よりも高かった。

開発した方法にて、グリホサートと Gly-A を 25 µg/kg、グルホシネートと MPPA と Glu-A を 5 µg/kg 添加した蜂蜜試料を用いて妥当性評価を行った。5 µg/kg は最大残留基準値に基づいている。妥当性評価の結果、良好な回収率 (86-106%) と精度 (<10%) を示した。開発したメソッドの定量限界は、グリホサートで 5 µg/kg、Gly-A で 2 µg/kg、グルホシネート、MPPA、Glu-A は 1 µg/kg となった。

これらの結果から、開発した方法は、日本の最大残留基準値に準拠したハチミツ中の残留グリホサート、グルホシネートおよびその代謝物の定量に適用可能であることが示唆された。さらに、提案した方法をハチミツ試料の分析に適用したところ、グリホサート、グルホシネート、Glu-A が一部のサンプルで検出された。開発した方法は、蜂蜜中の残留グリホサート、グルホシネートおよびそれら代謝物の規制モニタリングに有用な方法になると考えられる。

2. 大豆試料のグリホサート類の分析

Gly、Glu およびその代謝物は構造中にリン酸基やカルボキシ基を持つことから高極性を示す。この性質により抽出精製に時間を要すことやイオン化効率が悪く感度が低いといった問題がある。従来法においても有害な有機溶媒や煩雑な操作が必要であった問題点があった。本研究では、MTBSTFA を用いた固相誘導体化 LC-MS/MS 法によって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迅速で簡便で、有害溶媒を用いない分析法の開発を行った。本研究では移動相や LC カラム、イオン化条件等の LC-MS/MS 条件の検討、除タンパクや夾雑成分の除去等の前処理を検討し、感度や精度について最適化を行った。また、最適化した固相誘導体化法を用いることで、加水分解の防止や迅速性を向上させるとともに、測定対象物質を高極性から低極性化することで再現性の向上、高感度化を行うことで高倍率希釈によるマトリックスの

大幅低減を可能にした。最適化した条件で添加回収試験を行ったところ、平均回収率 97-108%、併行精度 2-5%、室内再現精度 4-9%を示す良好な結果を示したため、本分析法の妥当性を確認した。

開発した分析法を各国の食用丸大豆、食用加工大豆および飼料用大豆に適用したところ、飼料用大豆においてサンプル毎に Gly、Glu、Glu-A の定量値を確認した。定量結果から、アメリカで生産されている大豆は CP4EPSPS が導入されている Gly 耐性×アセチル化酵素が導入されている Glu 耐性のスタック品種が主流となっており、ブラジルでは CP4EPSPS 導入の Gly 耐性が主流になっていることが示唆された。さらに、飼料用大豆から Glu-A を定量した報告はない。以上のことから、本分析法の信頼性や適用性を示した。

本分析法は迅速、簡便かつ信頼性のある分析法であり、基準値監視のモニタリングや原材料の品質管理の有用的な方法として期待される。今後は定量値を確認した大豆の遺伝子解析や大豆以外の GM 作物としてトウモロコシ、ナタネ等の Gly、Glu およびそれらの代謝物の一斉分析法を開発するとともに更なる迅速化と再現性の向上を求めて全自動固相抽出-LC-MS/MS によるオンライン測定を行うことを目指している。

3. ほうれんそうのネオニコチノイド系農薬分析

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、市場に流通してい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、本法のオンライン化の半自動化と、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

1 年目は誘導体化を行わずに逆相カラムと陰イオンカラムの混合モードカラムを用いて、蜂蜜中の残留グリホサート、グルホシネート、およびそれらの代謝物 Gly-A、MPPA、Glu-A を同時定量する LC-MS/MS 法を開発・検討を行った。

2 年目は *N*-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-*N*-methyltrifluoroacetamid (MTBSTFA) による簡便で迅速な固相誘導体化を行い、大豆中の Gly、Gly-A 及び、Glu、Glu-A、MPPA の LC-MS/MS を用いた 5 成分一斉分析法の開発を行った。オンライン化も検討し妥当性が確認された。また、輸入大豆飼料への適用を検討した。本分析法は迅速、簡便かつ信頼性のある分析法であり、基準値監視のモニタリングや原材料の品質管理の有用的な方法として期待される。

3年目は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。今後オンライン化を検討する予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Torii, A., Seki, Y., Arimoto, C., Hojo, N., Iijima, K., Nakamura, K., Ito, R., Yamakawa, H., Akiyama, H., Development of a simple and reliable LC-MS/MS method to simultaneously detect walnut and almond as specified in food allergen labelling regulations in processed foods. *Current Research in Food Science*, 2023; **6**, 100444.
2. Sasano R., Ito R., Kusumoto M., Sekizawa J., Akiyama H. Simultaneous determination of glyphosate, glufosinate, and their metabolites in honey using liquid chromatography-tandem mass spectrometry and solid-phase extraction. *Anal. Sci.*, 2023; **39**, 1023-1031.
3. 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. 学会発表
 1. 佐々野 遼一、伊藤 里恵、楠本真宏、関澤純平、穂山 浩 : LC-MS/MS による蜂蜜中のグリホサート、グルホシネートおよびそれら代謝物の分析法の開発. 第9回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム (2023年9月16日)
 2. Hiroshi Akiyama, Yoshinari Suzuki, Tomoaki Tsutsumi: International Conference on Food Safety and 38th KoSFos Annual Meeting. (2023年11月30日)
 3. 原野幹久、佐々野 遼一、関澤 純平、勝本叶香、伊藤 里恵、岩崎 雄介、穂山 浩 : LC-MS/MS による大豆中のグリホサート、グルホシネート及びそれら代謝物の分析法の開発. 日本薬学会 第144年会 (2024年3月30日)
 4. 佐々野 遼一、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)
 5. 勝本叶香、佐々野 遼一、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)
 6. 野村昂聖、勝本叶香、原野幹久、藤田優麻、佐々野 遼一、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)

7. 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、穠山浩: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)

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. Optimized LC-MS/MS (MRM) parameters for target analytes

Analytes	Retention time (min)	MW	Pos. or Precursor ion		Product ion (m/z)	CE (eV)
			Neg.	(m/z)		
MPPA	4.636	152	Neg.	151	107	16
			Neg.	151	133	14
Glufosinate	4.659	181	Pos.	182	119	21
			Pos.	182	136	15
<i>N</i> -acetylglufosinate (Glu-A)	4.980	223	Neg.	222	136	21
			Neg.	222	59	15
Glyphosate	5.503	169	Neg.	168	63	24
			Neg.	168	150	13
<i>N</i> -acetylglyphosate (Gly-A)	6.817	211	Neg.	210	150	12
			Neg.	210	124	18

Transition in ***bolded italics*** used for quantitation

Pos.: positive, Neg.: negative

CE: collision energy

Table 2. Validation results of the proposal method in honey sample

No.	Analyte	Spike level	Trueness ^a	RSDr ^b	RSD _{WR} ^c
		µg/kg	%	%	%
1	MPPA	5	102	2.1	6.1
2	Glufosinate	5	86	3.7	9.3
3	Glu-A	5	110	4.2	6.8
4	Glyphosate	25	106	6.5	8.5
5	Gly-A	25	104	3.3	4.2

n = 2 × 3 operators × 2 days

^a Mean recovery rates

^b Relative standard deviation of repeatability

^c Relative standard deviation of within-laboratory reproducibility

Table 3. Determination of analytes in honey samples

Honey	MPPA	Glufosinate	Glu-A	Glyphosate	Gly-A
Sunflower, Ukraine	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Acacia, China	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Lotus flower, China	N.D.	1.1	N.D.	5.5	N.D.
Canada	N.D.	2.8	1.9	26.4	N.D.
Mexico	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Japan	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
LOQ	1.0	1.0	1.0	5.0	2.0

Unit: µg/kg

N.D. (not determined) は定量限界値（グリホサート: 5 µg/kg, Gly-A: 2 µg/kg、グルホシネート、MPPA および Glu-A: 1 µg/kg）以下を示す。

Table 4. MTBSTFA と各標準液の MRM transition

Analytes*1	MW (誘導体化後)	MRM transition Q1>Q3 *2	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
Gly- 3TBDMS	511	512>311 512>295	-20 -26	-25 -32	-15 -14
Gly-A- 3TBDMS	553	554>311 554>352	-20 -28	-30 -25	-12 -28
Glu- 2TBDMS	409	410>195 410>179	-25 -22	-35 -32	-21 -21
Glu-A- 2TBDMS	451	452>195 452>250	-14 -24	-42 -32	-21 -27
MPPA- 2TBDMS	381	382>249 382>151	-14 -18	-21 -34	-27 -30

Table 5. 添加回収試験 (% , n=2×2 人×3 日間)

	Gly	Gly-A	Glu	Glu-A	MPPA
平均回収率	97	108	99	98	99
併行精度	5	2	4	2	5
室内再現精度	8.8	8.0	9.4	3.5	7.6

Table 6. 飼料用丸大豆、大豆かすの定量値 (mg/L)

産地・特徴	Gly	Gly-A	Glu	Glu-A	MPPA
GM-1	0.97	N.D.	N.D.	2.00	N.D.
GM-2	1.50	N.D.	N.D.	1.22	N.D.
GM-3	1.25	N.D.	N.D.	1.91	N.D.
Non. GM-1	N.D.	N.D.	0.26	N.D.	N.D.
Non. GM-2	N.D.	N.D.	0.29	N.D.	N.D.
Non. GM-3	N.D.	N.D.	0.24	N.D.	N.D.
アメリカ-1	0.41	N.D.	N.D.	0.31	N.D.
アメリカ-2	0.37	N.D.	N.D.	0.57	N.D.
アメリカ-3	0.44	N.D.	N.D.	0.85	N.D.
アメリカ-4	0.36	N.D.	N.D.	0.58	N.D.
アメリカ-5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
ブラジル-1	3.39	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
ブラジル-2	1.05	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
ブラジル-3	1.42	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
アメリカ・ ブラジル-粕	1.73	N.D.	N.D.	0.28	N.D.

* N.D. (not determined) は定量限界値 (Gly 類 0.05 mg/L、Glu 類 0.1 mg/L) 以下を示す。

Table 7. 固相カートリッジごとの回収率（個別 MRL 濃度相当添加）

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

Table 8. 固相カートリッジごとの ME%（各 0.01 mg/kg 相当添加）

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

一番右：ぎ酸を加えたアセトニトリルで抽出を行った。

Table 9. 固相カートリッジごとの ME% (個別 MRL 濃度相当添加)

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

Table 10. 市販ほうれんそうの分析結果

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.

N.D. (not determined) は定量限界値 (1.25 µg/kg) 以下を示す。

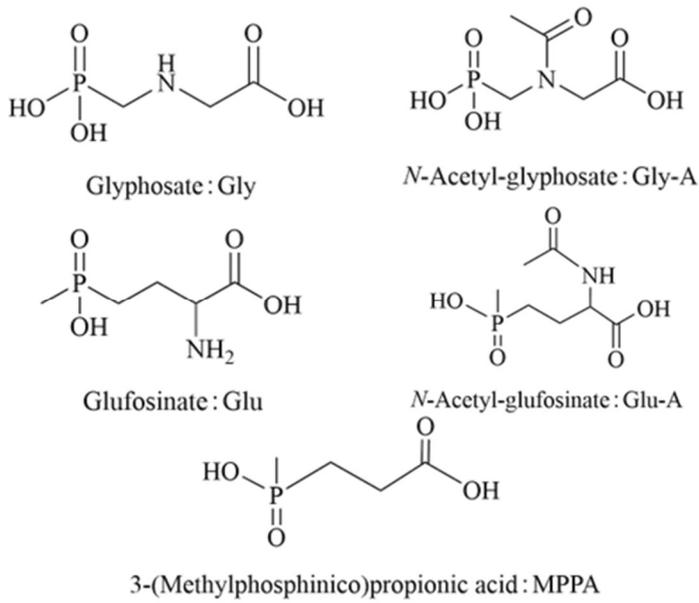


Fig. 1. Gly 類および Glu 類の構造式

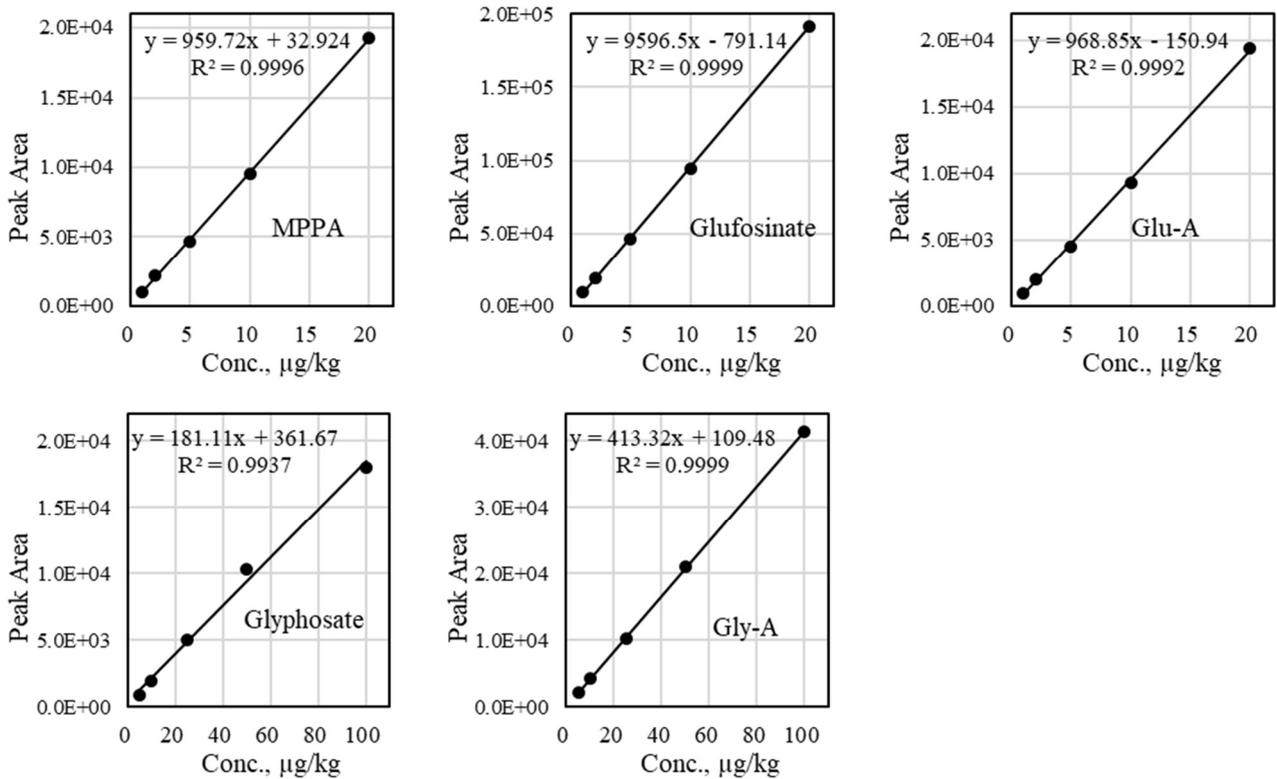


Fig. 2. Calibration curves for analytes

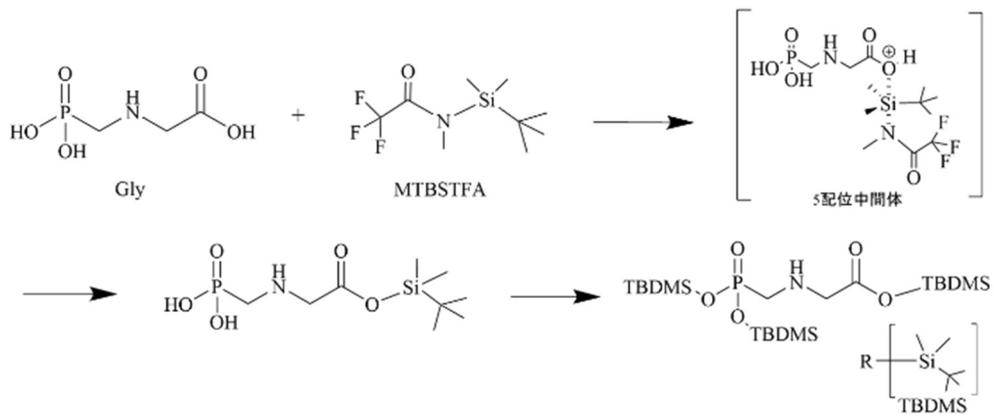
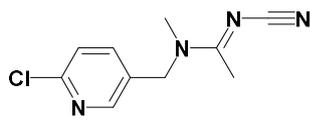
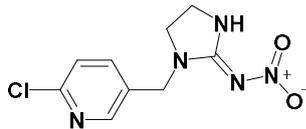


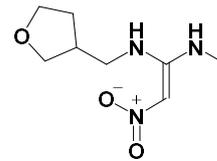
Fig. 3. Gly と MTBSTFA との反応式



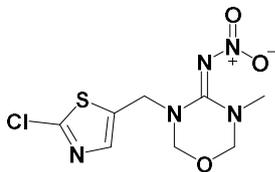
Acetamiprid



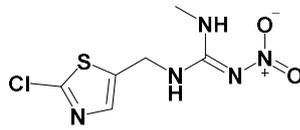
Imidacloprid



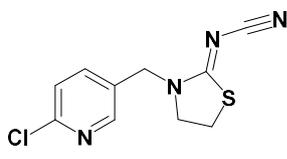
Dinotefuran



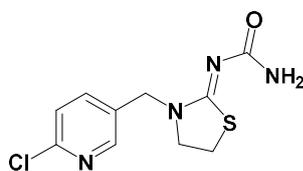
Thiamethoxam



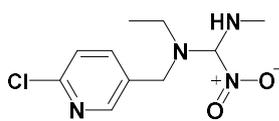
Clothianidin



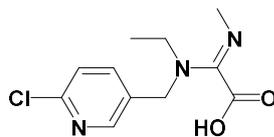
Thiachloprid



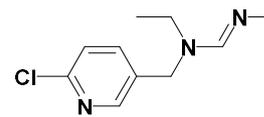
Thiachloprid-amide



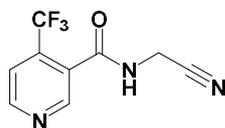
Nitenpyram



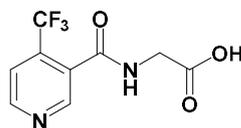
CPMA



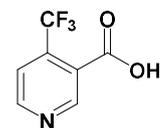
CPMF



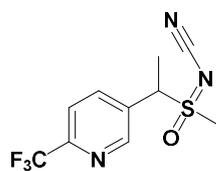
Flonicamid



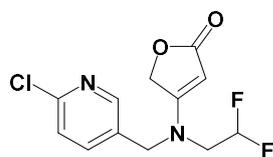
TFNG



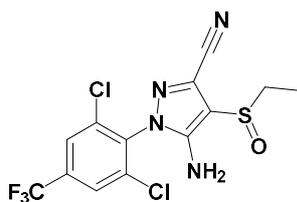
TFNA



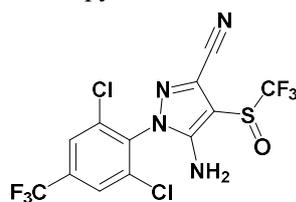
Sulfoxaflor



Flupyradifurone



Ethiprole



Fipronil

Fig. 4. 測定対象物質 17 成分の構造式

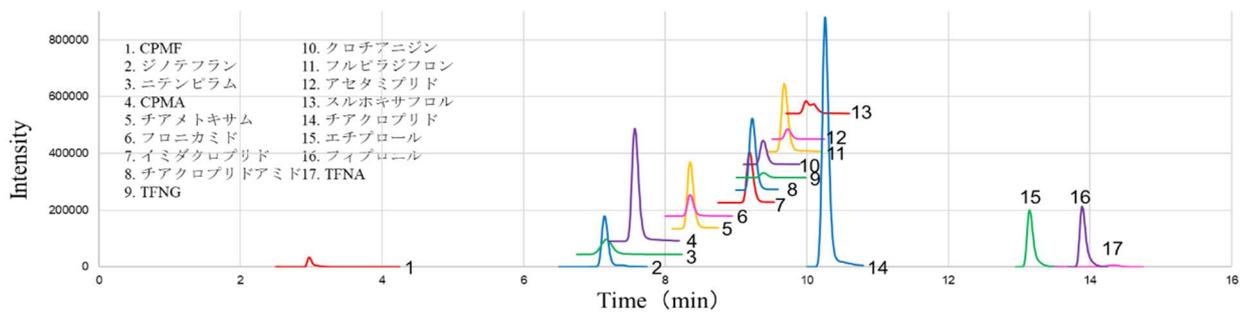
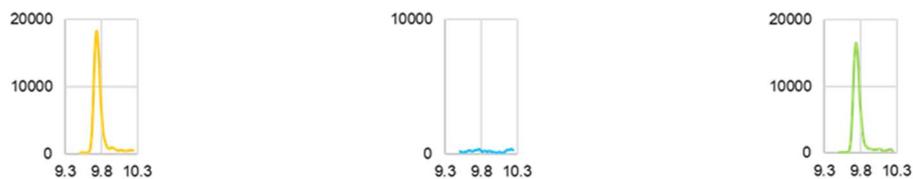
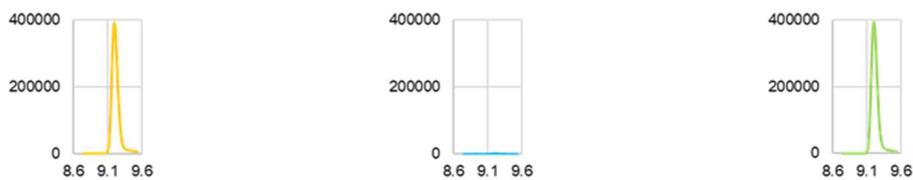


Fig. 5. 17成分混合標準溶液のクロマトグラム（各 2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）
 化合物によってピークの色を変えている。

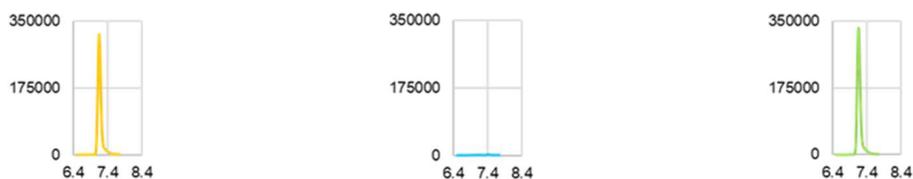
Acetamiprid (1.5 ppb)



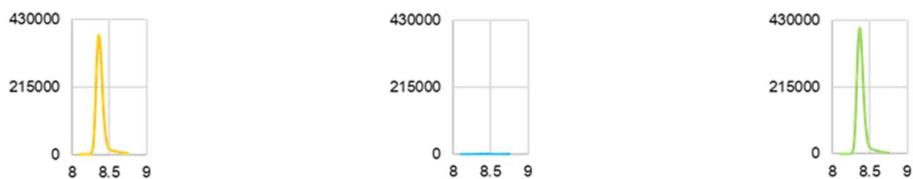
Imidacloprid (7.5 ppb)



Dinotefuran (7.5 ppb)



Thiamethoxam (5 ppb)



Clothianidin (20 ppb)

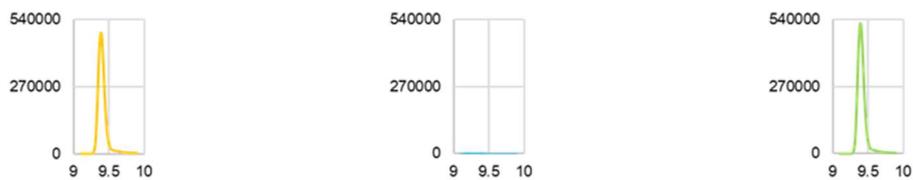
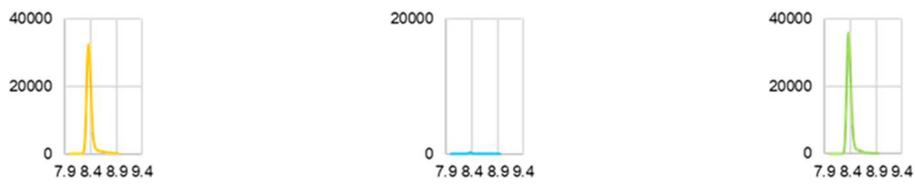
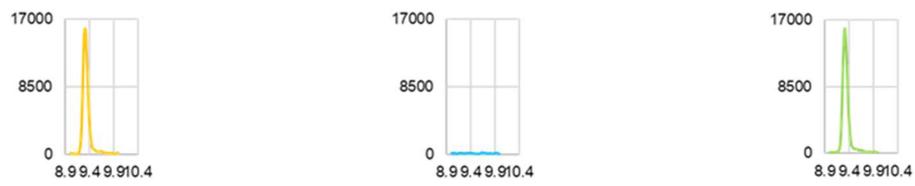


Fig. 6. 個別 MRL 濃度相当添加時のクロマトグラム。左 (橙色) : 個別 MRL の標準溶液 (測定時、添加濃度から最終 2000 倍希釈) のクロマトグラム。中央 (水色) : ほうれんそうブランクのクロマトグラム。右 (緑色) : 個別 MRL 濃度相当の添加を行ったほうれんそうのクロマトグラム。縦軸は強度、横軸は時間 (分) を示す。

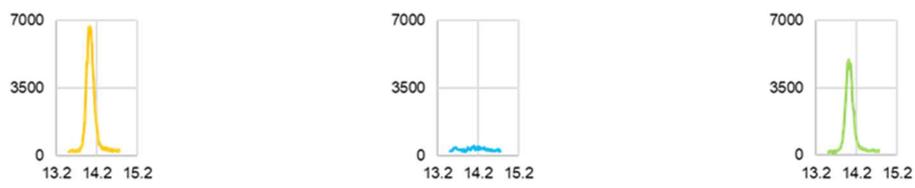
Flonicamid (1.5 ppb)



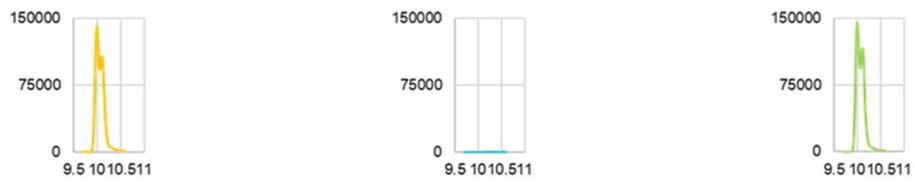
TFNG (4 ppb)



TFNA (4 ppb)



Sulfoxaflor (10 ppb)



Flupyredifurone (15 ppb)

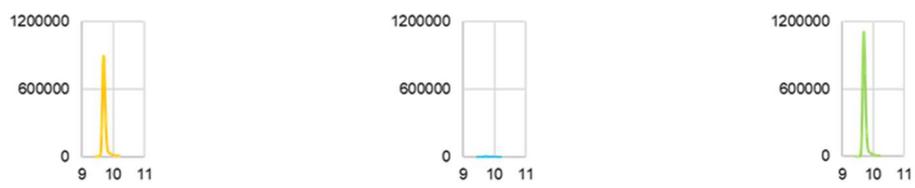


Fig. 6. (continued)

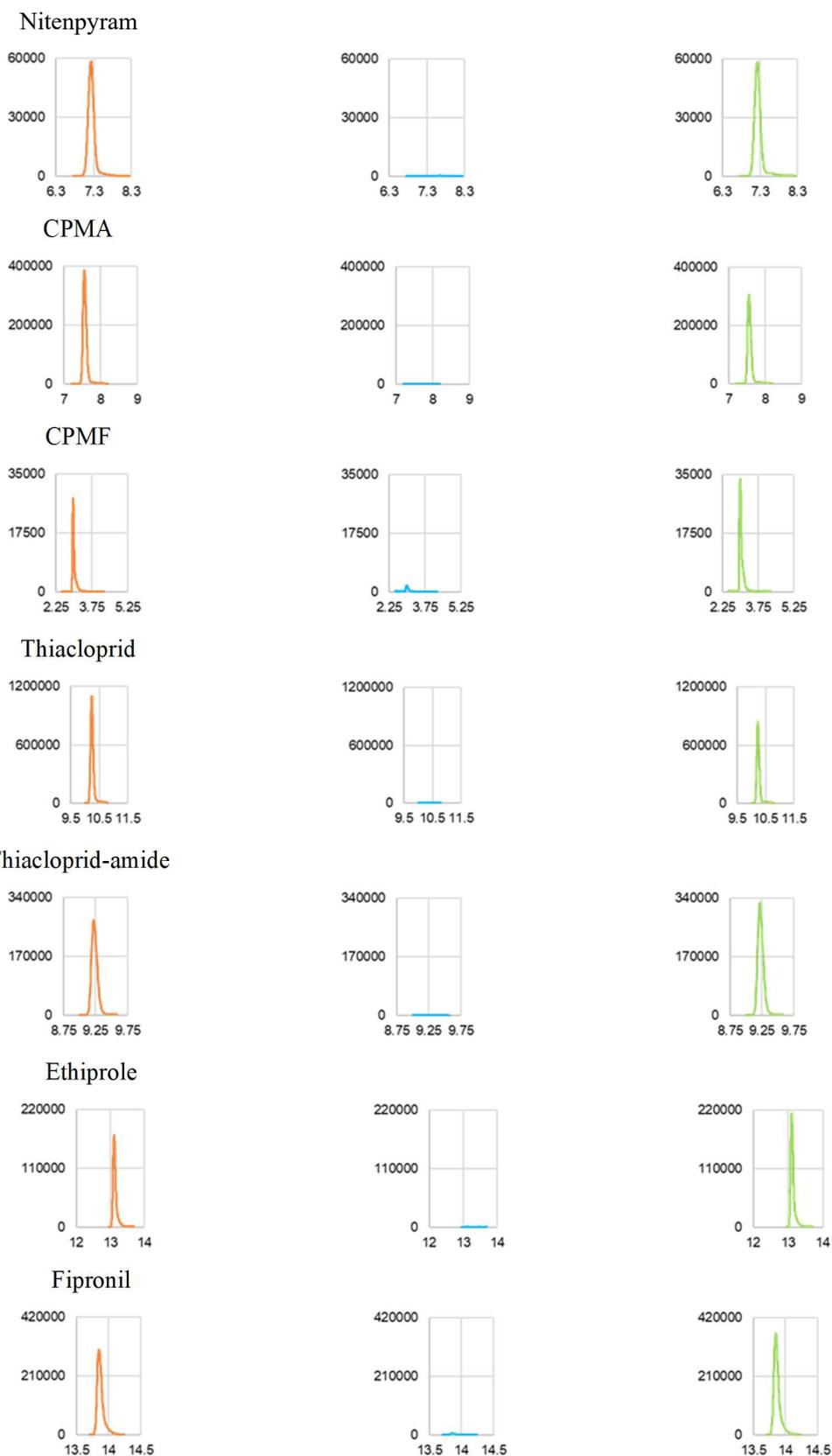


Fig. 7. 0.01 mg/kg 相当添加時のクロマトグラム。左 (橙色) : 各 0.01 mg/kg (測定時 2.5 μ g/kg) の標準溶液のクロマトグラム。中央 (青色) : ほうれんそうブランクのクロマトグラム。右 (緑色) : 各 0.01 mg/kg 相当の添加を行ったほうれんそうのクロマトグラム。縦軸は強度、横軸は時間 (分) を示す。

別添 4

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
該当なし							

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
Torii, A., Seki, Y., Arimoto, C., Hojo, N., Iijima, K., Nakamura, K., Ito, R., Yamakawa, H., Akiyama, H.	Development of a simple and reliable LC-MS/MS method to simultaneously detect walnut and almond as specified in food allergen labelling	Current Research in Food Science	6	100444	2023
Sasano, R., Ito, R., Kusumoto, M., Sekizawa, J., Akiyama, H.	Simultaneous determination of glyphosate, glufosinate, and their metabolites in honey using liquid chromatography-tandem mass spectrometry and solid-phase extraction	Anal. Sci.	39	1023-1031	2023
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）	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
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：）	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

（※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 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

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 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> （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 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> （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 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> （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 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> （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)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
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:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※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 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

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 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (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 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (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 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (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 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (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）	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
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	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
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：)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

（※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 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

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 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (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 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (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 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (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 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (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。