

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。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 (異性体混合物、98.0%)、エチプロール (98%)、フィプロニル (98.0%)、フルピラジフロンの (≦100%)、アセトニトリル (LC-MS 用)、メタノール (HPLC 用)、ぎ酸 (98.0%)、酢酸アンモニウム (97.0%)、硫酸マグネシウム (無水、99.0%)、塩化ナトリウム (99.5%)、くえん酸水素二ナトリウム 1.5 水和物 (97.0~103.0%)、くえん酸三ナトリウム二水和物 (99.0%) を用いた。

誘導体化試薬の MTBSTFA (97%) と MTBSTFA+1%TBDMS (≧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を用いた。

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、パストゥールピペットで 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 を加えパストゥールピペットで 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、いくつか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、調査した限りいまだ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 配位の中間体を経て、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 ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$) を結合させた NH_2 固相カートリッジとポリマー担体に 4 級アミン ($-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$) 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 NH_2 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 NH_2 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 NH_2 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ではなく、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、 $R^2=0.994$ 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、測定の妨げになるのではないかと考えた。そこで前処理の 1 段階目として QuEChERS 法を用いた目的成分の抽出と夾雑成分の除去を行った。

極性の高い夾雑成分とほうれんそう中の水分を下相（水相）に移行させ、目的成分と比較的極性の低い夾雑成分を上相（アセトニトリル相）に移行させることで抽出を行った。今回用いた方法は、アセトニトリルで目的成分の抽出を行ったのち、粉末の代わりに PSA や C₁₈ が充填された固相カートリッジを用いて精製を行う。精製方法の最適条件を検討するにあたり、カートリッジは PSA-30 mg、PSA-50 mg、PBX-20 mg、C₁₈-30 mg を用いた。QuEChERS 法により得られた抽出液（アセトニトリル相）を、PBX と PSA を連結した固相に負荷し、夾雑成分の除去と目

的成分の溶出を行ったのち、アセトニトリル水溶液を通液することで目的成分の溶出を行った。

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

極性が比較的低い色素を主に PBX で除去する目的から、PBX は 2 個使用することとし、1 個目の PBX に連結させて使用する PSA について検討を行った。PSA-50 mg を用いて検討を行った。結果は 5 成分が目標値範囲外となった。この理由としては、希釈倍率が低いことによるマトリックス効果による影響と、陰イオン交換系である PSA にカルボキシ基を持つ TFNA、CPMA が相互作用し、固相に保持されたためであると考え、これらが保持されない固相を使用する必要があると判断した。

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

そのため、PBX-20 mg と C₁₈-30 mg の連結固相に抽出液を負荷・溶出したのち、洗浄液であるアセトニトリル水溶液に 2%ギ酸を加えて固相への通液を行う方法を試みた。これにより TFNG、TFNA の回収率は改善したが、回収率が 120%以上となる成分が洗浄液に酸を加えなかった場合に比べて増加した。酸を加えると酸性の目的成分が回収しやすくなる一方で、目的成分だけでなく夾雑成分も固相から溶出され、夾雑成分によるイオン化の増強が起こることが考えられた。したがって、今回の精製方法として、C₁₈ 固相カートリッジを用いることは適当でないと判断した。

再び PSA での検討を行い、PSA-30 mg を用いて回収率を算出した。15 成分が目標範囲内に収まり、概ね良好な結果が得られた。PSA の充填

量を低下させたことで回収率が向上したことから、PSA を使用せず（PSA-なし）PBX のみで精製を行なう方法を試みた。

PSA を使用しない場合、14 成分の回収率が目標範囲内に収まった。PSA-30 mg を用いた場合と PSA-なしの場合とで、回収率に大きな違いは見られなかった。そこで、ほうれんそうへ各農薬成分の MRL 濃度相当の添加を行い、PSA-50 mg、PSA-30 mg、PSA-なしの場合で比較を行った。個別の MRL が設定されている成分とされていない成分では希釈の倍率が異なるため、個別の MRL が設定されている成分のみを対象とした。PSA-50 mg を用いた場合は 10 成分のうち 7 成分、PSA-30 mg を用いた場合は 9 成分、PSA-なしの場合は 4 成分で回収率が目標範囲内となった。PSA-30 mg を用いた場合と PSA-なしの場合において、0.01 mg/kg では回収率に大きな違いは見られなかったが、MRL 相当濃度の添加を行った際には PSA-なしの場合で 120%を超過する成分が多かった（Table 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る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。

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、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)

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 Neg.	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	CE (eV)
MPPA	4.636	152	Neg.	151	107	16
			Neg.	151	133	14
Glufosinate	4.659	181	Pos.	182	119	21
			Pos.	182	136	15
N-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
N-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 μg/kg	Trueness ^a %	RSD ^b %	RSD _{WR} ^c %
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。

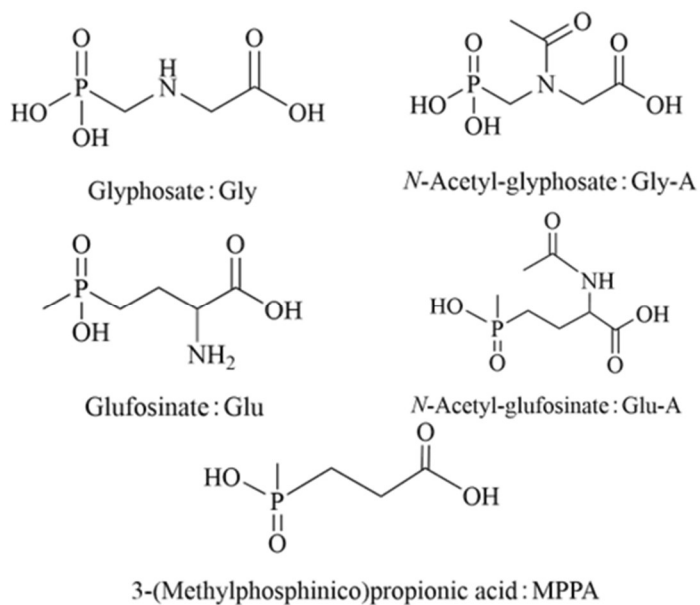


Fig. 1. Gly 類および Glu 類の構造式

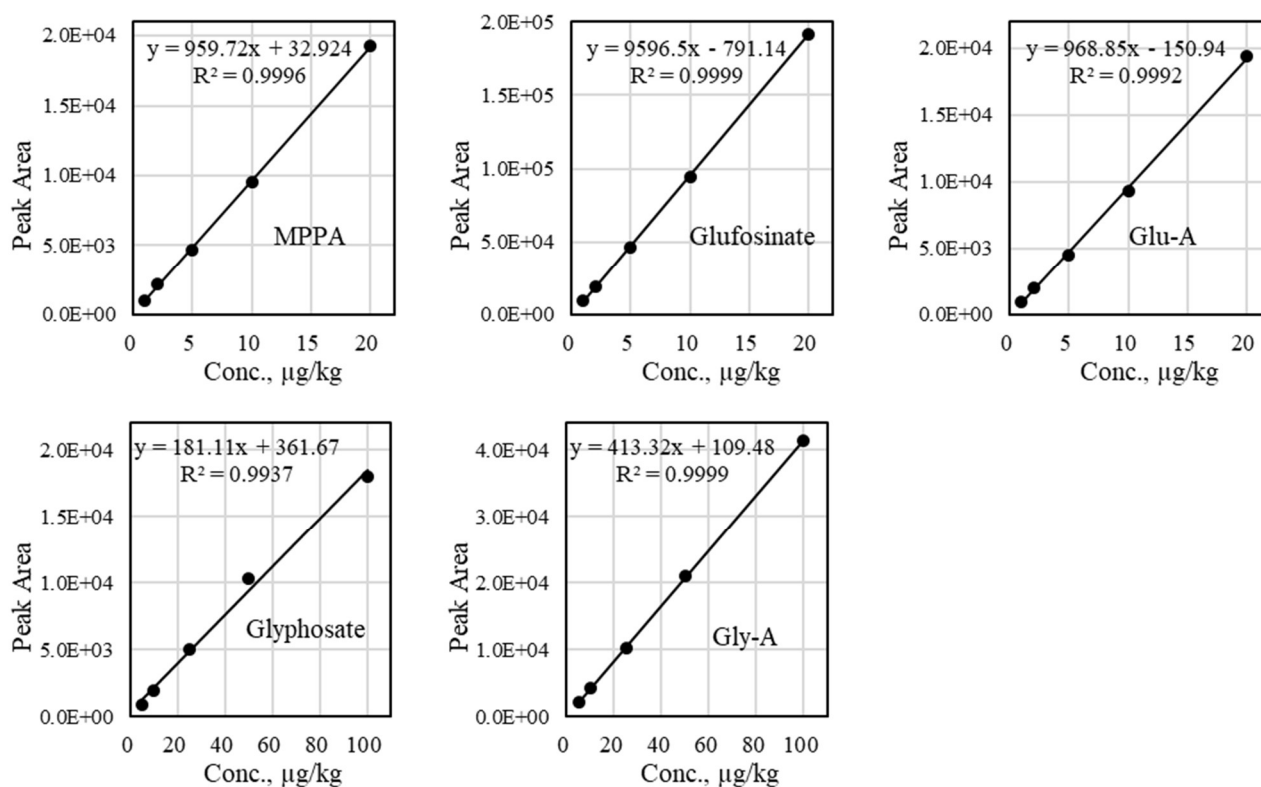


Fig. 2. Calibration curves for analytes

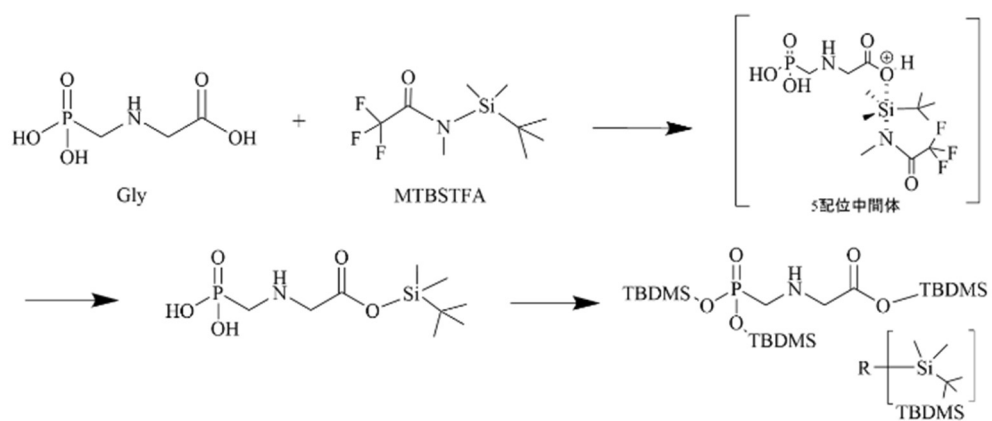
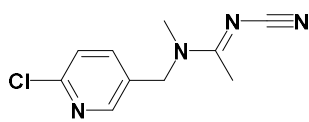
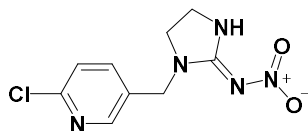


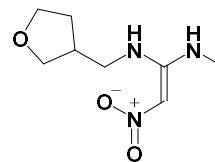
Fig. 3. Gly と MTBSTFA との反応式



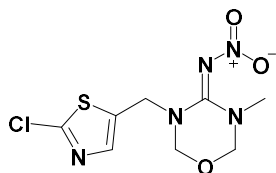
Acetamiprid



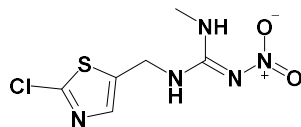
Imidacloprid



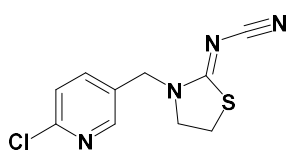
Dinotefuran



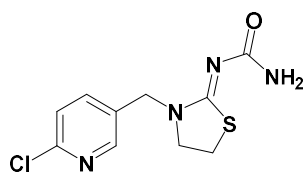
Thiamethoxam



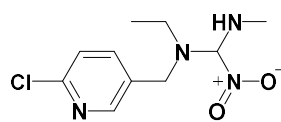
Clothianidin



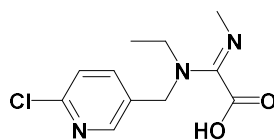
Thiacloprid



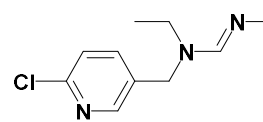
Thiacloprid-amide



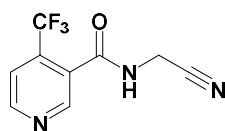
Nitenpyram



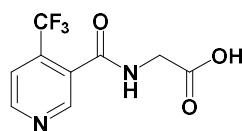
CPMA



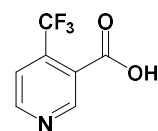
CPMF



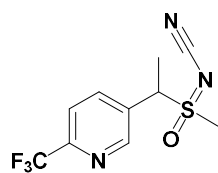
Flonicamid



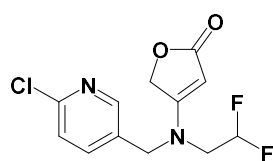
TFNG



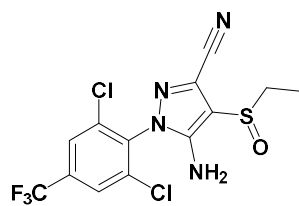
TFNA



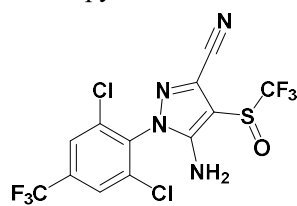
Sulfoxaflor



Flupyradifurone



Ethiprole



Fipronil

Fig. 4. 測定対象物質 17 成分の構造式

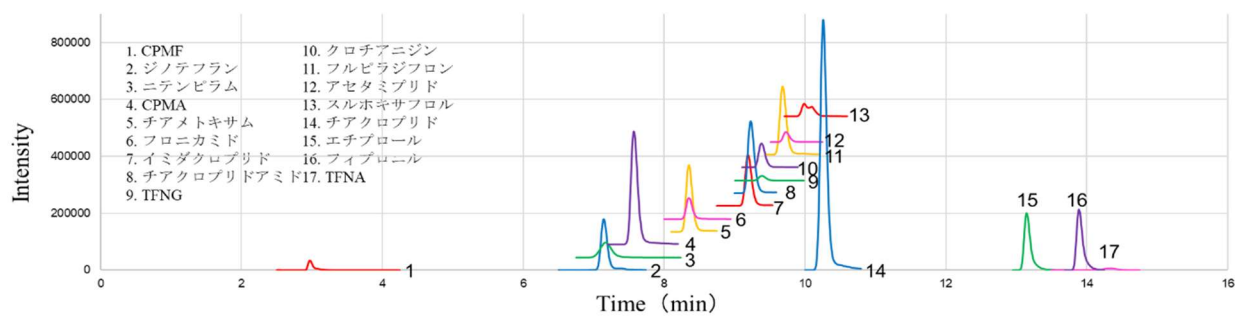
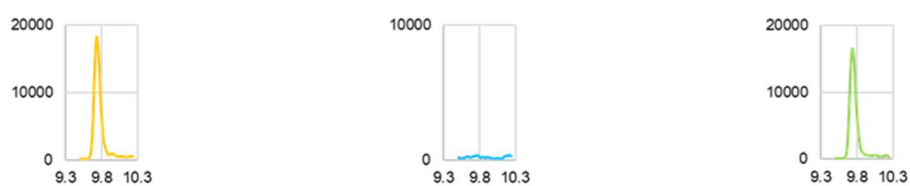
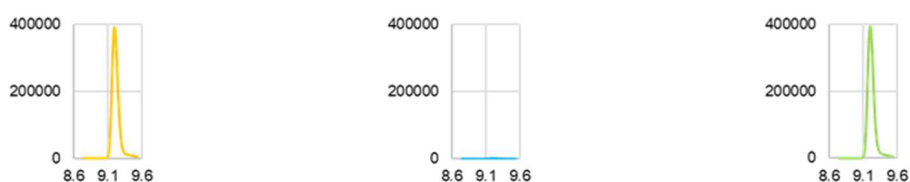


Fig. 5. 17 成分混合標準溶液のクロマトグラム（各 2.5 $\mu\text{g/kg}$ ）
化合物によってピークの色を変えている。

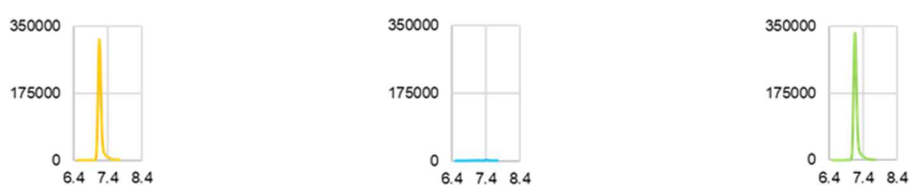
Acetamiprid (1.5 ppb)



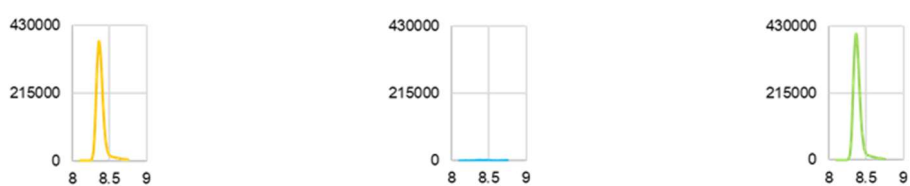
Imidacloprid (7.5 ppb)



Dinotefuran (7.5 ppb)



Thiamethoxam (5 ppb)



Clothianidin (20 ppb)

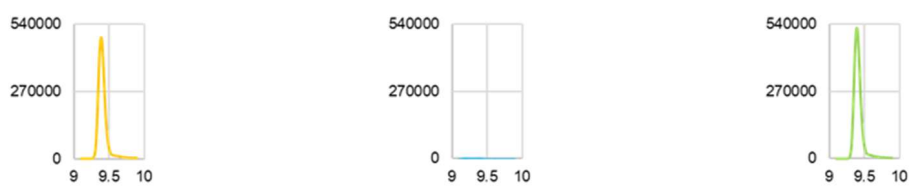
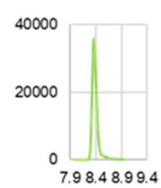
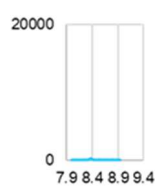
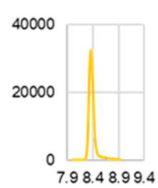
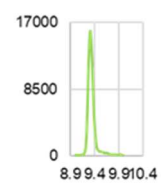
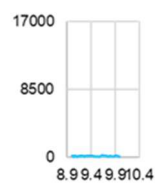
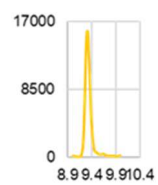


Fig. 6. 個別 MRL 濃度相当添加時のクロマトグラム。左（橙色）：個別 MRL の標準溶液（測定時、添加濃度から最終 2000 倍希釈）のクロマトグラム。中央（水色）：ほうれんそうブランクのクロマトグラム。右（緑色）：個別 MRL 濃度相当の添加を行ったほうれんそうのクロマトグラム。縦軸は強度、横軸は時間（分）を示す。

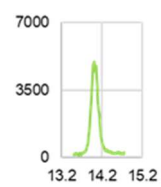
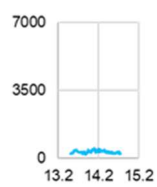
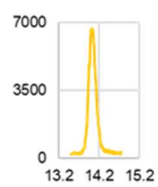
Flonicamid (1.5 ppb)



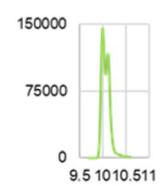
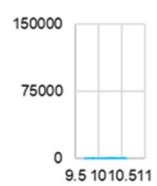
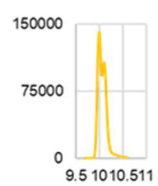
TFNG (4 ppb)



TFNA (4 ppb)



Sulfoxaflor (10 ppb)



Flupyredifurone (15 ppb)

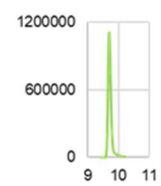
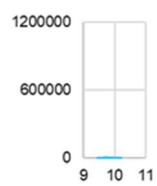
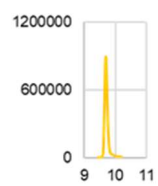


Fig. 6. (continued)

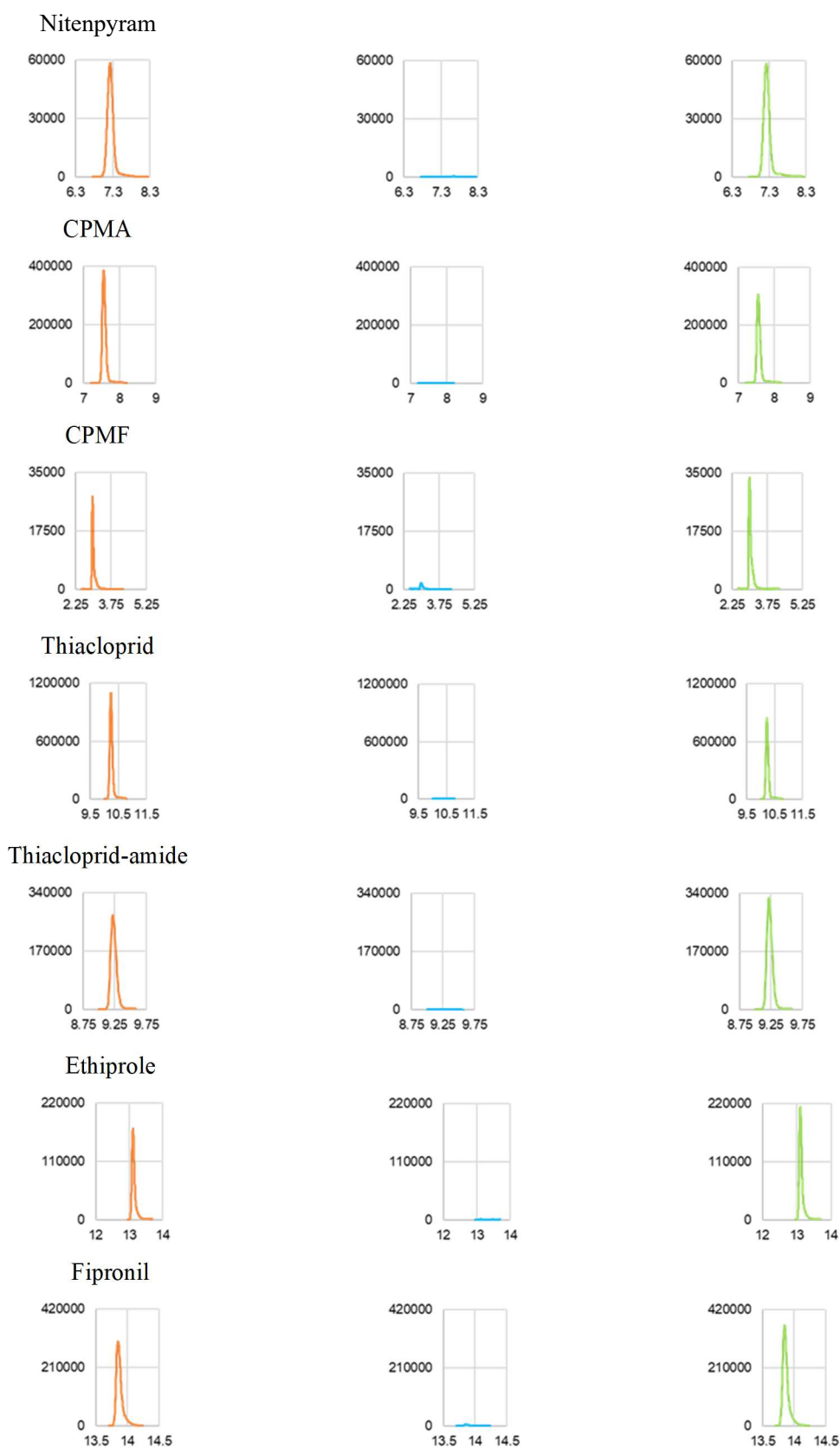


Fig. 7. 0.01 mg/kg 相当添加時のクロマトグラム。左（橙色）：各 0.01 mg/kg（測定時 2.5 μ g/kg）の標準溶液のクロマトグラム。中央（青色）：ほうれんそうブランクのクロマトグラム。右（緑色）：各 0.01 mg/kg 相当の添加を行ったほうれんそうのクロマトグラム。縦軸は強度、横軸は時間（分）を示す。