

※本報告書は、試験法開発における検討結果をまとめたものであり、試験法の実施に際して参考として下さい。なお、報告書の内容と通知または告示試験法との間に齟齬がある場合には、通知または告示試験法が優先することをご留意ください。

平成 22 年度

食品に残留する農薬等の成分である物質の
試験法開発事業報告書

オラキンドックス及びカルバドックス
試験法（畜水産物）

オラキンドックス及びカルバドックス試験法（畜水産物）の検討結果

[緒言]

1. 目的及び試験法の検討方針

オラキンドックスは、豚の成長促進や豚赤痢及び細菌性下痢症の防止を目的として使用される抗菌剤である。「薬事食品衛生審議会 食品衛生分科会報告書」に記載されている規制対象物質及び残留基準案を踏まえ、試験法の開発を行った。また、同じキノキサリン系合成抗菌剤であるカルバドックスとの同時分析法を検討した。また、試験法の開発にあたっては、オラキンドックスはその代謝物である3-メチルキノキサリン-2-カルボン酸（MQCA）が、カルバドックスはその代謝物であるキノキサリン-2-カルボン酸（QCA）がそれぞれ規制対象物質となっていることから、MQCA及びQCAを分析対象とした。

なお、定量限界の目標値は0.001 ppmとした。

1) 規制対象物質

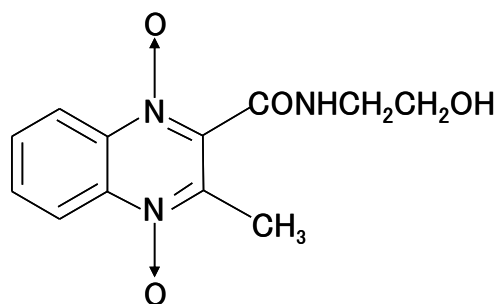
3-メチルキノキサリン-2-カルボン酸（以下「MQCA」と略す）

キノキサリン-2-カルボン酸（以下「QCA」と略す）

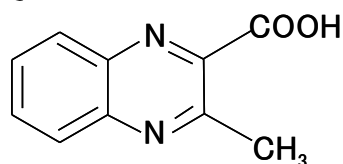
2. 分析対象化合物の構造式、物理化学的性質及び基準値等に関する情報

1) 構造式及び物理化学的性質

オラキンドックス



MQCA



化学式：C₁₀H₈N₂O₂

分子量：188.18

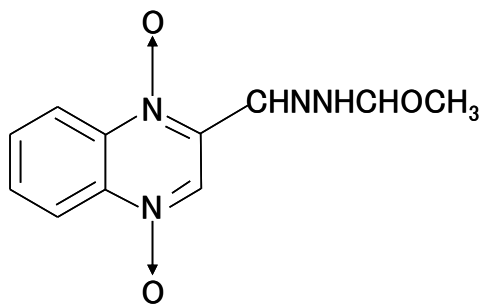
化学名（IUPAC）：3-Methyl-quinoxaline-2-carboxylic Acid

外 観：Light red Powder

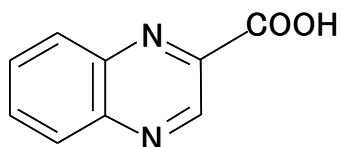
オクタノール/水分配係数：log P_{ow}=1.656

（出典：SIGMA-ALDRICH SAFETY DATA SHEET）

カルバドックス



QCA



化学式：C₉H₆N₂O₂

分子量：174.16

化学名 (IUPAC)：2-Quinoxalinecarboxylic Acid

外 観：白色～褐色粉末又は塊

融 点：約208℃

溶解性：温水、アルコール、クロロホルム、アセトンに溶ける

オクタノール/水分配係数：log P_{ow}=1.456(ACD)

(出典：和光純薬工業 MATERIAL SAFETY DATA SHEET及び
www.chemspider.com/Chemical-Structure.87301.html)

2) 基準値

オラキンドックス

全食品：不検出

カルバドックス

全食品：不検出

[実験方法]

1. 試料

1) 購入先

都内のスーパー及び中卸し業者から購入した。購入した試料は全て国産のものを使用した。

2) 試料の採取方法

- ①豚の筋肉：可能な限り脂肪層を除き、細切均一化した。
- ②豚の脂肪：可能な限り筋肉部を除き、細切均一化した。
- ③豚の肝臓：全体を細切均一化した。
- ④鶏卵：殻を除き卵白と卵黄を合わせてよく混合し均一化した。
- ⑤牛乳：全体をよく混合して均一化した。
- ⑥うなぎ：活鰻を使用し、頭部を除いた可食部（内臓、骨及び皮を含む）を細切均一化した。
- ⑦さけ：可食部（皮を含む）を細切均一化した。
- ⑧しじみ：貝殻を除き細切均一化した。
- ⑨はちみつ：百花蜜を使用し、よく混合して均一化した。
- ⑩鶏の筋肉：可能な限り脂肪層を除き、細切均一化した。

2. 試薬・試液

1) 標準品

MQCA標準品（純度96%、Tronrto Research Chemicals製）

QCA標準品（純度99.9%、和光純薬工業製）

2) 試薬

酢酸エチル、*n*-ヘキサン、メタノール（以上、残留農薬試験用）

25%アンモニア水、塩酸、ギ酸、酢酸、水酸化カリウム（以上、試薬特級）

無水硫酸ナトリウム（PCB分析用）

スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラム：InertSep PLS-2

（充てん量500 mg、ジーエルサイエンス製）

エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラム：InertSep PSA

（充てん量500 mg、ジーエルサイエンス製）

弱塩基性陰イオン交換樹脂ミニカラム：Oasis WAX（充てん量150 mg、Waters製）

3) 標準溶液、試液の調製方法

①標準溶液の調製方法

標準原液：MQCA及びQCA標準品10 mgを精密に量り、それぞれメタノールに溶解した後、100 mLに定容し、標準原液を調製した。

検量線用標準溶液：MQCA及びQCA標準原液を混合し、水及びメタノール（1：1）混液で適宜希釈して0.00025～0.0015 mg/L溶液を数点調製した。

添加用標準溶液：MQCA及びQCA標準原液を混合し、メタノールで適宜希釈して0.1 mg/L溶液を調製した。

②試液の調製方法

2 mol/L水酸化カリウムメタノール溶液

水酸化カリウム56.11 gを量り採り、メタノールを加えて溶解し、500 mLとした。

3 mol/L塩酸

水300 mL及び塩酸100 mLを混合した。

水及びメタノール（1：10）混液

水10 mL及びメタノール100 mLを混合した。

ギ酸及びメタノール（1：500）混液

ギ酸0.2 mL及びメタノール100 mLを混合した。

ギ酸及びメタノール（3：97）混液

ギ酸30 mL及びメタノール970 mLを混合した。

25%アンモニア水及びメタノール（1：19）混液

25%アンモニア水5 mL及びメタノール95 mLを混合した。

水及びメタノール（1：1）混液

水50 mL及びメタノール50 mLを混合した。

3. 装置

ホモジナイザー：ウルトラタラックスT-25ベーシック（イカ・ジャパン製）

ロータリーエバポレーター：R-200（柴田科学製）等

LC-MS/MS：

	型式	会社
MS	Quattro premier XE	Waters
LC	Alliance 2795	Waters
データ処理	TargetLynx V4.1	Waters

4. 測定条件

LC 条件																		
カラム	Atlantis T3 サイズ：内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 µm 会社：Waters																	
移動相流速 (mL/min)	0.2																	
注入量 (µL)	5																	
カラム温度 (°C)	40																	
移動相	A液：0.1 vol%酢酸 B液：アセトニトリル																	
グラジエント条件	<table border="1"><thead><tr><th>時間(分)</th><th>A液(%)</th><th>B液(%)</th></tr></thead><tbody><tr><td>0.0</td><td>95</td><td>5</td></tr><tr><td>15.0</td><td>50</td><td>50</td></tr><tr><td>15.1</td><td>5</td><td>95</td></tr><tr><td>20.0</td><td>5</td><td>95</td></tr></tbody></table>			時間(分)	A液(%)	B液(%)	0.0	95	5	15.0	50	50	15.1	5	95	20.0	5	95
時間(分)	A液(%)	B液(%)																
0.0	95	5																
15.0	50	50																
15.1	5	95																
20.0	5	95																
MS 条件																		
測定モード	MS/MS、SRM（選択反応モニタリング）																	
イオン化モード	ESI（+）																	
キャピラリ電圧 (V)	3000																	
ソース温度 (°C)	120																	
脱溶媒温度 (°C)	500																	
コーンガス	窒素、50 L/hr																	
脱溶媒ガス	窒素、800 L/hr																	
コリジョンガス	アルゴン、0.2 mL/min																	

定量イオン (m/z)	測定対象物質	イオン (m/z)	コーン電圧 (V)	コリジョンエネルギー (eV)
	MQCA	+189→145	20	18
	QCA	+175→129	20	18
定性イオン (m/z)	測定対象物質	イオン (m/z)	コーン電圧 (V)	コリジョンエネルギー (eV)
	MQCA	+189→143	20	18
	QCA	+175→102	20	30
保持時間の目安	MQCA : 10.7分 QCA : 10.5分			

5. 定量

MQCA及びQCA標準品をそれぞれメタノールに溶解し、100 mg/Lの標準原液を調製した。各標準溶液を混合後、水及びメタノール (1 : 1) 混液で希釈し、0.00025、0.0005、0.00075、0.001、0.00125、0.0015 mg/Lの濃度の標準溶液を調製した。標準溶液5 μ LをLC-MS/MSに注入し、得られたピーク面積から絶対検量線法で検量線を作成した。試験溶液5 μ LをLC-MS/MSに注入し、得られたピーク面積と作成した検量線からMQCA及びQCAの含量を算出した。

6. 添加試料の調製

筋肉、肝臓、鶏卵、牛乳、うなぎ、さけ、しじみ及びはちみつ (添加濃度 : 0.001 ppm相当) : 試料10.0 gに添加用標準溶液0.1 mg/L (メタノール溶液) を0.1 mL添加しよく混合した後、30分間放置した。

脂肪 (添加濃度 : 0.001 ppm相当) : 試料5.00 gに添加用標準溶液0.1 mg/Lを0.05 mL添加しよく混合した後、30分間放置した。

7. 試験溶液の調製

はちみつ以外の試料については、MQCA及びQCAを試料から水酸化カリウムメタノール溶液で加水分解及び抽出し、塩酸酸性下でスチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラムで精製した後、ヘキサソで洗浄、酢酸エチルに転溶し、エチレンジアミン-N-プロピルシリル化シルカゲルミニカラム及び弱塩基性陰イオン交換樹脂ミニカラムで精製した後、LC-MS/MSで定量及び確認した。はちみつについては、MQCA及びQCAを試料から塩酸酸性下メタノールで抽出し、酢酸エチルに転溶、エチレンジアミン-N-プロピルシリル化シルカゲルミニカラム及び弱塩基性陰イオン交換樹脂ミニカラムで精製した後、LC-MS/MSで定量及び確認した。

1) 抽出

① はちみつ以外の場合

筋肉、肝臓、腎臓、魚介類、乳及び卵は試料10.0 g、脂肪は試料5.00 gを200 mL遠心管に量り採り、2 mol/L水酸化カリウムメタノール溶液20 mLを加え、還流冷却器を取り付けて、85°Cの水浴中で2時間加熱した後、放冷した。これにメタノール60 mLを加え、10分間激しく振とうした後、ケイソウ土を厚さ約5 mmに敷いたろ紙 (直径60 mm、GFP、桐山製作所製) を用いて吸引ろ過し、200 mL容メスフラスコに採取した。ろ紙上のケイソウ土をメタノール20 mLで洗い、先のろ液に洗液を合わせて、メタノールで正確に200 mLとした後、20 mLを100 mLなす形フラスコに採り、3 mol/L塩酸2 mLを加えた。

② はちみつの場合

試料10.0 gを200 mL遠心管に量り採り、水20 mLを加えて溶かし、塩酸0.5 mLを加えた。これにメタノール100 mLを加え、1分間ホモジナイズした後、ケイソウ土を厚さ約5 mmに敷いたろ紙（直径60 mm、GFP、桐山製作所製）を用いて吸引ろ過し、200 mL容メスフラスコに採取した。ろ紙上の残留物にメタノール50 mLを加えてホモジナイズした後、上記と同様にろ過した。ろ紙上の残留物にメタノール50 mLを加えホモジナイズした後、上記と同様にろ過した。得られたろ液を合わせて、メタノールで正確に200 mLとした。抽出液20 mLを300 mL分液漏斗に採り、水100 mLを加え、酢酸エチル50 mLで3回振とう抽出した。抽出液を300 mL三角フラスコに採り、無水硫酸ナトリウムを加えて時々振り混ぜながら15分間放置した。200 mLなす形フラスコにろ過した後、ろ液を40°C以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物にギ酸及びメタノール（1：500）混液5 mLを加えて溶かした。

2) 精製

① はちみつ以外の場合

a) スチレンジビニルベンゼン共重合体カラムクロマトグラフィー

スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラム（500 mg）に水及びメタノール（1：10）混液10 mLを注入し、流出液は捨てた。このカラムに1) ①で得られた溶液を注入、次いで水及びメタノール（1：10）混液6 mLで容器を洗いこみながら注入し、溶出液を50 mL遠心管に合わせた後、100 mL分液漏斗に移し、ヘキサン20 mLで2回振とうしてヘキサン層は捨てた。次いでメタノール層を300 mL分液漏斗に移し、水100 mLを加え、酢酸エチル50 mLで3回振とう抽出した。抽出液を300 mL三角フラスコに採り、無水硫酸ナトリウムを加えて時々振り混ぜながら15分間放置した。200 mLなす形フラスコにろ過した後、ろ液を40°C以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物にギ酸及びメタノール（1：500）混液5 mLを加えて溶かした。

b) エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シルカゲルカラムクロマトグラフィー

エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シルカゲルミニカラム（500 mg）にギ酸及びメタノール（1：500）混液10 mLを注入し、流出液は捨てた。このカラムに2) ① a) で得られた溶液を注入、さらにギ酸及びメタノール（1：500）混液5 mLで容器を洗いこみながら注入し、流出液は捨てた。次いでギ酸及びメタノール（3：97）混液20 mLを注入し、溶出液を50 mL遠心管に採り、40°C以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物にギ酸及びメタノール（3：97）混液2 mLを加えて溶かし、水3 mLを加え、よく混合した。

c) 弱塩基性陰イオン交換樹脂カラムクロマトグラフィー

弱塩基性陰イオン交換樹脂ミニカラム（150 mg）にメタノール及び水各5 mLを順次注入し、流出液は捨てた。このカラムに2) ① b) で得られた溶液を注入し、流出液は捨てた。次いで水5 mLで容器を洗いこみながら注入し、流出液は捨てた。さらにメタノール10 mLを注入し流出液を捨てた後、25%アンモニア水及びメタノール（1：19）混液5 mLを注入し、溶出液を50 mL遠心管に採り、40°C以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物を水及びメタノール（1：1）混液に溶解し、脂肪以外は正確に1 mL、脂肪は正確に0.5 mLとしたものを試験溶液とした。

② はちみつの場合

a) エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シルカゲルカラムクロマトグラフィー

エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シルカゲルミニカラム（500 mg）にギ酸及びメタノール

(1 : 500) 混液10 mLを注入し、流出液は捨てた。このカラムに1) ②で得られた溶液を注入、さらにギ酸及びメタノール (1 : 500) 混液5 mLで容器を洗いこみながら注入し、流出液は捨てた。次いでギ酸及びメタノール (3 : 97) 混液20 mLを注入し、溶出液を50 mL遠心管に採り、40°C以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物にギ酸及びメタノール (3 : 97) 混液2 mLを加えて溶かし、水3 mLを加え、よく混合した。

b) 弱塩基性陰イオン交換樹脂カラムクロマトグラフィー

弱塩基性陰イオン交換樹脂ミニカラム (150 mg) にメタノール及び水各5 mLを順次注入し、流出液は捨てた。このカラムに2) ② a) で得られた溶液を注入し、流出液は捨てた。次いで水5 mLで容器を洗いこみながら注入し、流出液は捨てた。さらにメタノール10 mLを注入し流出液を捨てた後、25% アンモニア水及びメタノール (1 : 19) 混液5 mLを注入し、溶出液を50 mL遠心管に採り、40°C以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物を水及びメタノール (1 : 1) 混液に溶解し、正確に1 mLとしたものを試験溶液とした。

[分析法フローチャート]

はちみつ以外

秤 取

| 脂肪以外：試料10.0 gを採取

↓ 脂肪：試料5.00 gを採取

加水分解及び抽出

| 2 mol/L水酸化カリウムメタノール溶液20 mLを加え、85°Cで2時間加熱後、放冷

| メタノール60 mLを加え、10分間激しく振とう

| 吸引ろ過。ろ紙上のケイソウ土をメタノール20 mLで洗浄。

| メタノールで正確に200 mLとする

↓ 抽出液20 mL分取、3 mol/L塩酸2 mLを加える

スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラム [InertSep PLS-2(500 mg)]

| 水及びメタノール (1 : 10) 混液10 mLで予備洗浄

| 抽出溶液を注入

| 水及びメタノール (1 : 10) 混液6 mLで溶出

↓ 負荷液及び溶出液をとる

ヘキサン洗浄

| *n*-ヘキサン20 mL加え、5分間振とうし、

↓ *n*-ヘキサン層を捨てる (2回繰り返す)

酢酸エチル転溶

| 水100 mLを加え、混合

| 酢酸エチル50 mL加え、5分間振とうし、酢酸エチルを採取 (3回繰り返す)

| 酢酸エチルを合わせて、無水硫酸ナトリウムを加えて脱水

| 無水硫酸ナトリウムをろ別し、ろ液を減圧濃縮、窒素乾固

↓ ギ酸及びメタノール (1 : 500) 混液5 mLを加え、溶解

エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラム [InertSep PSA(500 mg)]

| ギ酸及びメタノール (1 : 500) 混液10 mLで予備洗浄

| 試料溶液を負荷

| ギ酸及びメタノール (1 : 500) 混液5 mLで洗浄

| ギ酸及びメタノール (3 : 97) 混液20 mLで溶出

| 溶出液を減圧濃縮、窒素乾固

| ギ酸及びメタノール (3 : 97) 混液2 mLを加え、溶解

↓ 水3 mLを加え、混合

弱塩基性陰イオン交換樹脂ミニカラム [Oasis WAX(150 mg)]

| メタノール及び水各5 mLで予備洗浄

| 試料溶液負荷

| 水5 mL及びメタノール10 mLで洗浄

| 25%アンモニア水及びメタノール (1 : 19) 混液5 mLで溶出

| 溶出液を減圧濃縮、窒素乾固

| 脂肪以外：水及びメタノール (1 : 1) 混液で正確に1 mLとし、試験溶液とする

↓ 脂肪：水及びメタノール (1 : 1) 混液で正確に0.5 mLとし、試験溶液とする

LC-MS/MS定量

5 µL注入

はちみつ

秤 取

- | 試料10.0 gを採取
- | 水20 mLを加え、溶解
- ↓ 塩酸0.5mL加える

抽 出

- | メタノール100 mLを加え、1分間ホモジナイズ
- | 吸引ろ過、ろ紙上の残留物にメタノール50 mLを加え、1分間ホモジナイズ
- | 吸引ろ過
- | ろ液を合わせ、メタノールで正確に200 mLとする
- ↓ 抽出液20 mL分取

酢酸エチル転溶

- | 水100 mLを加え、混合
- | 酢酸エチル50 mL加え、5分間振とうし、酢酸エチルを採取（3回繰り返す）
- | 酢酸エチルを合わせて、無水硫酸ナトリウムを加えて脱水
- | 無水硫酸ナトリウムをろ別し、ろ液を減圧濃縮、窒素乾固
- ↓ ギ酸及びメタノール（1：500）混液5 mLを加え、溶解

エチレンジアミン-N-プロピルシリル化シリカゲルミニカラム

- | ギ酸及びメタノール（1：500）混液10 mLで予備洗浄
- | 試料溶液を負荷
- | ギ酸及びメタノール（1：500）混液5 mLで洗浄
- | ギ酸及びメタノール（3：97）混液20 mLで溶出
- | 溶出液を減圧濃縮、窒素乾固
- | ギ酸及びメタノール（3：97）混液2 mLを加え、溶解
- ↓ 水3 mLを加え、混合

弱塩基性陰イオン交換樹脂ミニカラム

- | メタノール及び水各5 mLで予備洗浄
- | 試料溶液負荷
- | 水5 mL及びメタノール10 mLで洗浄
- | 25%アンモニア水及びメタノール（1：19）混液5 mLで溶出
- | 溶出液を減圧濃縮、窒素乾固
- ↓ 水及びメタノール（1：1）混液で正確に1 mLとし、試験溶液とする

LC-MS/MS定量

5 μ L注入

8. マトリックス添加標準溶液の調製

ブランク試験溶液から0.2 mL分取し溶媒を除去した後、0.001 mg/Lの標準溶液0.2 mLに溶解したものを、マトリックス添加標準溶液とした。

[結果及び考察]

1. 測定条件の検討

1) MS条件の検討

MQCA及びQCAはESI (+) 及びESI (-) 両方のモードでの測定が可能であったが、使用した装置ではESI (-) モードの感度が良くなく、また、ESI (-) モードでは移動相に酸が入ることによりイオン化抑制される傾向があったため、ESI (+) モードを採用した。

MQCAのESI (+) モード測定時のマススペクトルを図1に示した。その結果から、MQCAのプロトン付加分子 (m/z 189 [M+H]⁺) をプリカーサーイオンとした。 m/z 189をプリカーサーイオンとした場合のプロダクトイオンスペクトルを図2に示した。 m/z 189をプリカーサーイオンとした場合、プロダクトイオン m/z 145及び143が検出された。

夾雑成分の影響からESI (+) モードでの m/z 189→145を定量用測定イオン、 m/z 189→143を定性用測定イオンとした。

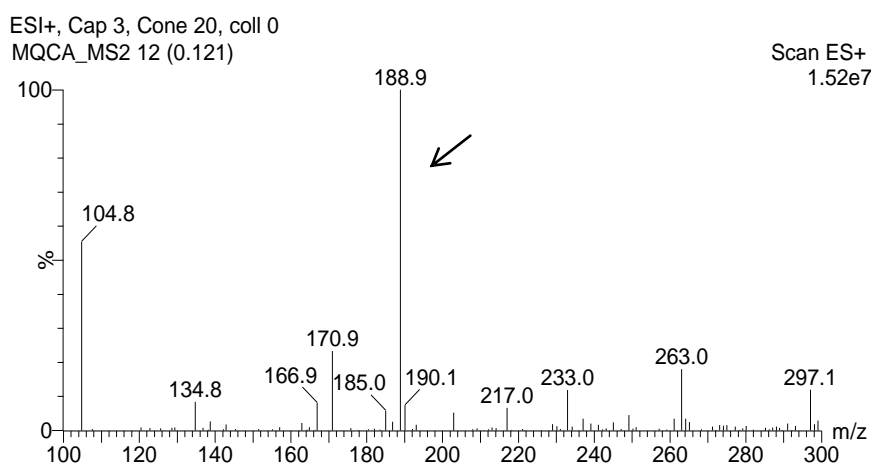


図1 MQCA のマススペクトル
スキャン範囲：100～300 m/z
測定条件：ESI+、CV=20 V
(CV : cone voltage)

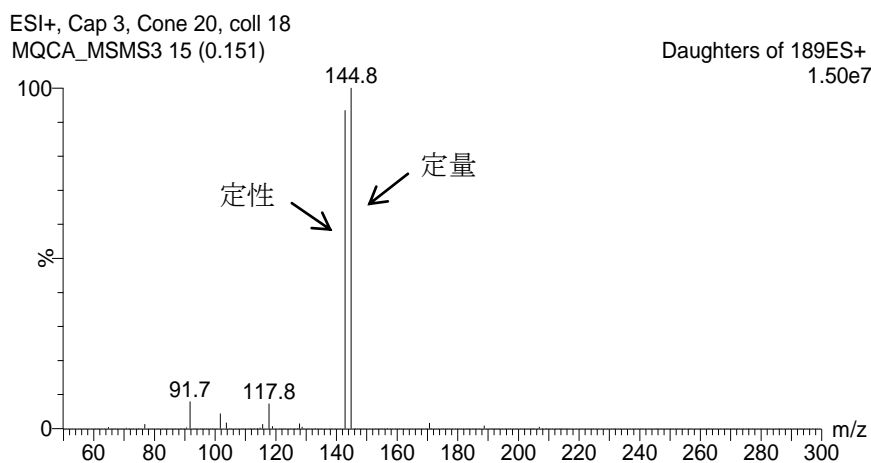


図2 MQCA のプロダクトスキャンスペクトル (定量及び定性用)
プリカーサーイオン： m/z 189
スキャン範囲：50～300 m/z
測定条件：ESI+、CV=20 V、CE=18 eV
(CV : cone voltage、CE : collision energy)

QCAのESI (+) モード測定時のマススペクトルを図3に示した。その結果から、QCAのプロトン付加分子 (m/z 175 $[M+H]^+$) をプリカーサーイオンとした。 m/z 175をプリカーサーイオンとした場合のプロダクトイオンスペクトルを図4及び5に示した。 m/z 175をプリカーサーイオンとした場合、プロダクトイオン m/z 129及び102が検出された。

以上のこと及び実試料測定時の感度よりESI (+) モードでの m/z 175→129を定量用測定イオン、 m/z 175→102を定性用測定イオンとした。

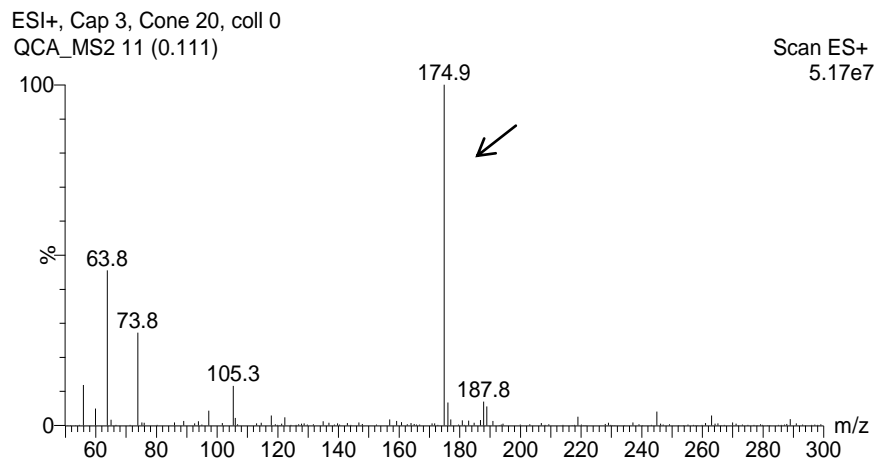


図3 QCA のマススペクトル
スキャン範囲：50～300 m/z
測定条件：ESI+、CV=20 V
(CV : cone voltage)

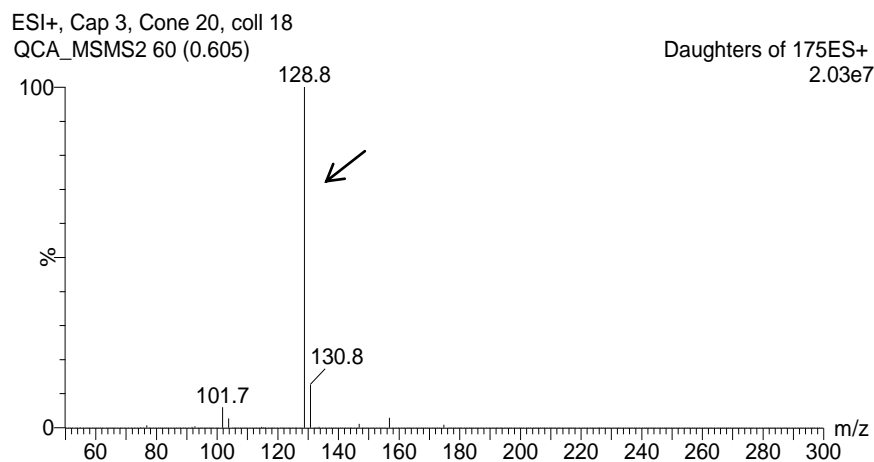


図4 QCA のプロダクトスキャンスペクトル (定量用)
プリカーサーイオン： m/z 175
スキャン範囲：50～300 m/z
測定条件：ESI+、CV=20 V、CE=18 eV
(CV : cone voltage、CE : collision energy)

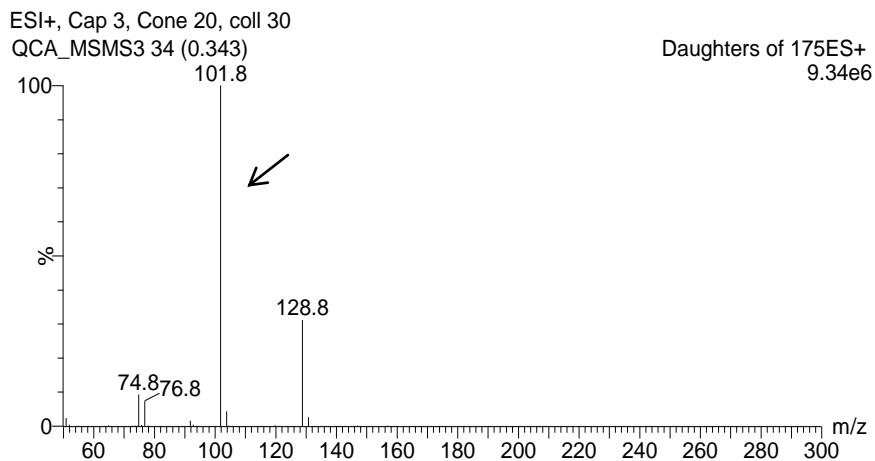


図5 QCA のプロダクトスキャンスペクトル (定性用)
 プリカーサーイオン : m/z 175
 スキャン範囲 : 50~300 m/z
 測定条件 : ESI+, CV=20 V、CE=30 eV
 (CV : cone voltage、CE : collision energy)

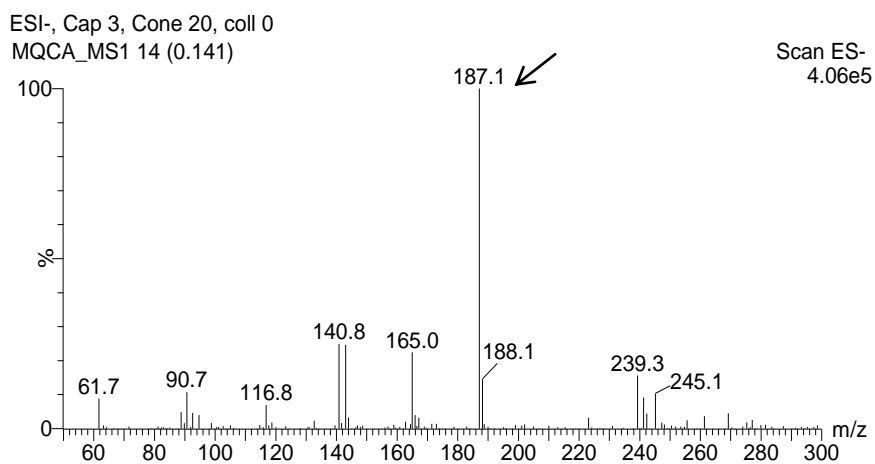


図6 MQCA のマススペクトル
 スキャン範囲 : 50~300 m/z
 測定条件 : ESI-, CV=20 V
 (CV : cone voltage)

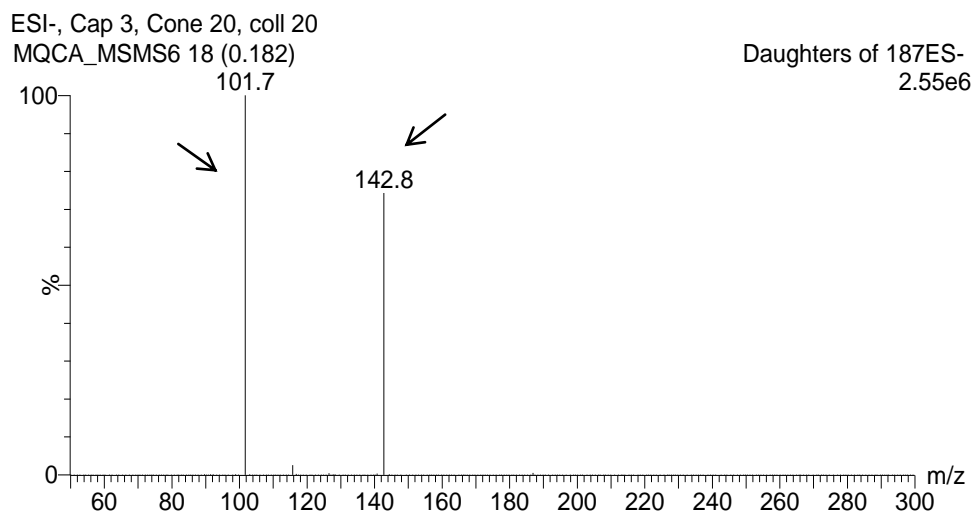


図7 MQCA のプロダクトスキンスペクトル
 プリカーサーイオン : m/z 187
 スキャン範囲 : 50~300 m/z
 測定条件 : ESI-, CV=20 V、CE=20 eV
 (CV : cone voltage、CE : collision energy)

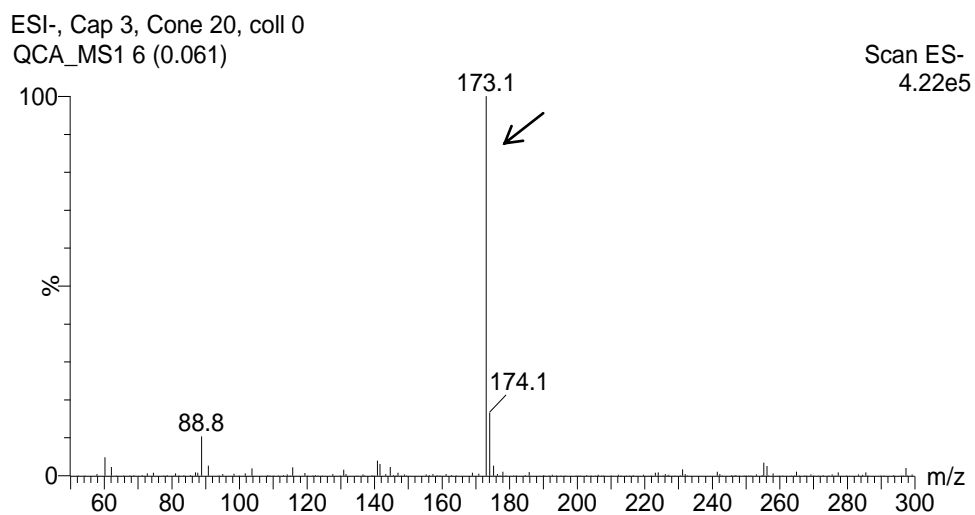


図8 QCA のマススペクトル
 スキャン範囲 : 50~300 m/z
 測定条件 : ESI-, CV=20 V
 (CV : cone voltage)

ESI-, Cap 3, Cone 20, coll 18
QCA_MSMS5 9 (0.091)

Daughters of 173ES-
3.15e6

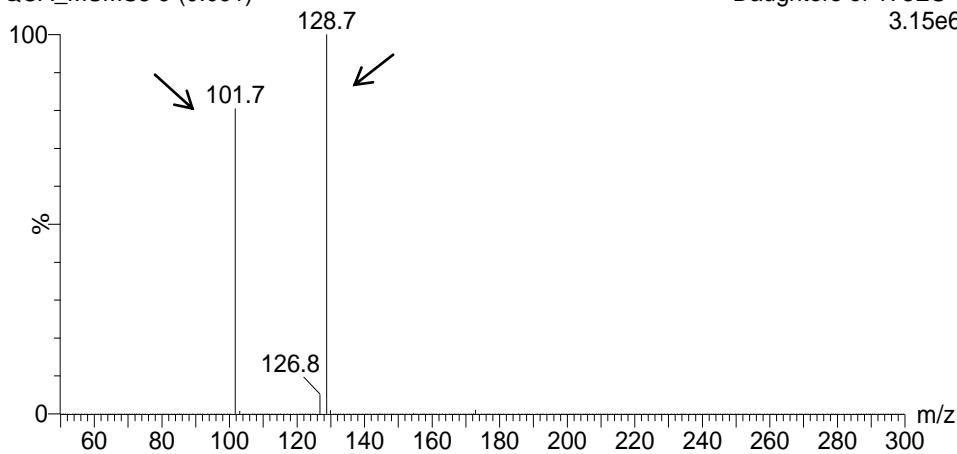


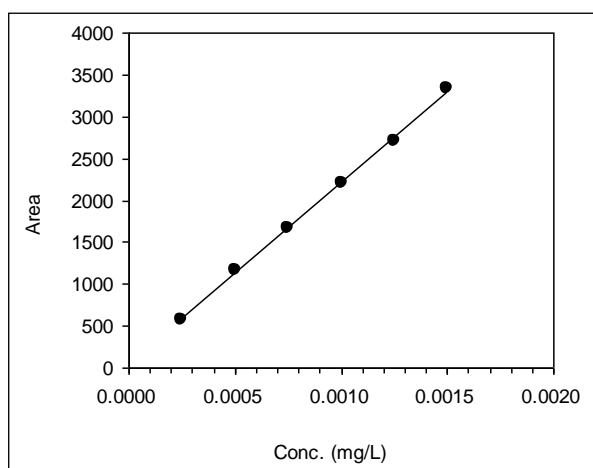
図9 QCAのプロダクトスキンスペクトル
プリカーサーイオン： m/z 173
スキャン範囲：50～300 m/z
測定条件：ESI-、CV=20 V、CE=18 eV
(CV：cone voltage、CE：collision energy)

2) LC 条件の検討

分離カラムについて、Mightysil RP-18GP (内径 2.0 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μ m)、Inertsil ODS-4、InertSustain C18及びAtlantis T3 (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μ m) を、移動相について、酢酸、酢酸アンモニウム溶液、アセトニトリル及びメタノールを用いて検討を行った。分離カラムについては、検討したカラムの中ではAtlantis T3がピーク形状、分離とも良好であった。また、移動相については、酢酸アンモニウム溶液より酢酸溶液を用いた方が、またメタノールよりアセトニトリルを用いた方がピーク形状、分離、再現性及び感度のいずれも良好な結果が得られたので、カラムはAtlantis T3 (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μ m) を、移動相には0.1 vol%酢酸溶液及びアセトニトリルを用いることとした。

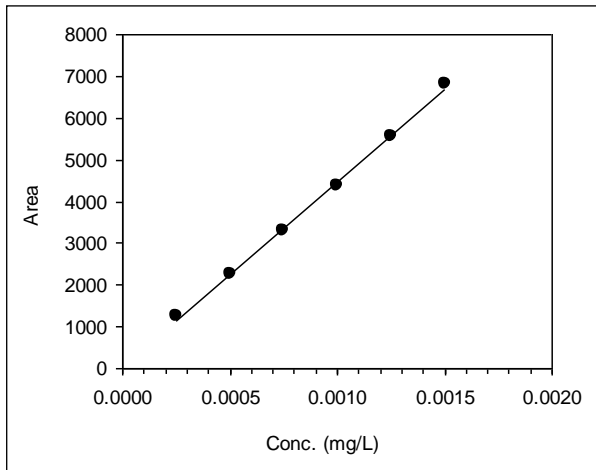
3) 検量線

図10にMQCAの検量線、また図11にQCAの検量線の例を示した。0.00025 mg/L (0.0125 ng) ～ 0.0015 mg/L (0.0075 ng) の濃度範囲で作成した検量線は、良好な直線性を示した。



データ処理装置設定条件の一例
機種 (メーカー)：TargetLynx (Waters製)
ピークの定量方法：ピーク面積法
検量線の種類：最小二乗法
検量線基準ピークの重量：0.00125 ng～0.0075 ng
傾き (a)： $a=2171657$
切片 (b)： $b=44$
 R^2 ：0.998

図10 MQCA 検量線例 (m/z 189→145)



データ処理装置設定条件の一例
機種（メーカー）：TargetLynx（Waters製）
ピークの定量方法：ピーク面積法
検量線の種類：最小二乗法
検量線基準ピークの重量：0.00125 ng～0.0075 ng
傾き（a）：a=4429703
切片（b）：b=56
 R^2 ：0.998

図 11 QCA 検量線例 (m/z 175→129)

4) 定量限界

定量限界の算出結果を以下に示した。

脂肪以外の場合

$$0.001 \text{ mg/kg} \left[(1 \text{ mL}/1 \text{ g}^{*1}) \times (0.005 \text{ ng}/5 \text{ }\mu\text{L}) \right]$$

*1 10.0 g×20 mL/200 mL

脂肪の場合

$$0.001 \text{ mg/kg} \left[(0.5 \text{ mL}/0.5 \text{ g}^{*2}) \times (0.005 \text{ ng}/5 \text{ }\mu\text{L}) \right]$$

*2 5.00 g×20 mL/200 mL

2. 試験溶液調製法の検討

1) 抽出方法及び加水分解の検討

参考文献 3) のカルバドックスの筋肉の試験法が試料 5 g に 3 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 10 mL を加えて、95～100℃ で 30 分間加熱して抽出する方法である。この方法を参考にして脂肪以外は 10 g、脂肪は 5 g を採り、3 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 20 mL を加え、100℃ で加熱したところ、脂肪は油分が分離して試験続行不能となってしまったため、脂肪を十分に溶解できるメタノールを用いアルカリ溶液を調製することとした。この溶液は、メタノールへの溶解度を考慮し、水酸化カリウムを用いることとした。また、水溶液からメタノール溶液に変更したことにより、加水分解時の温度が 95～100℃ ではメタノールが沸騰し溶液の量が減る可能性があるため、85℃ に下げた。なお、MQCA 及び QC A 各 0.5 μg を 2 mol/L 水酸化カリウムメタノール溶液 20 mL に添加し、加熱時間について検討した結果を表 1 に示した。85℃ で 3 時間加熱しても良好な回収率が得られ、また実試料を用いて加水分解操作をしたところ十分に溶解するのに要した時間は 2 時間程度であった。以上の結果より、加水分解は 2 mol/L 水酸化カリウムメタノール溶液 20 mL を用い、85℃ で 2 時間加熱する方法を採用した。なお、加熱中は使用した容器（200 mL 遠心管）の 1/3～1/2 程度までの発泡が認められた。

なお、水酸化カリウムメタノール溶液による加水分解は、結合しているタンパク質から MQCA、QC A を遊離させる目的で行った。はちみつ以外の試料では、加水分解溶液は固形物がない抽出液となるため、抽出回数は 1 回とした。はちみつではタンパク質に結合していないこと及び、はちみつが本試験法の加温条件ではカラメル状になり試験不能となってしまったため、はちみつでは加水分解を実施せず、溶媒による抽出を行い抽出回数は 2 回とした。

表1 加水分解時間の確認 (%)

	加水分解時間		
	1 時間	2 時間	3 時間
MQCA	94	93	85
QCA	98	101	92

2) 溶媒濃縮乾固時の安定性の確認

MQCA及びQCA各0.5 µgを、アセトン、アセトニトリル、ヘキサン、酢酸エチル、メタノール各50 mLに添加し、①ロータリーエバポレーターで約1 mLまで濃縮し、緩やかに窒素乾固した②ロータリーエバポレーターで約1 mLまで濃縮し、窒素で乾固した後さらに5分間窒素を吹き付けた③ロータリーエバポレーターで乾固するまで濃縮し、さらに5分間減圧した後、緩やかに窒素乾固した。結果を表2に示した。この結果より、溶媒及び濃縮方法による濃縮乾固の差はなかった。

表2 溶媒濃縮乾固時の安定性の確認 (%)

	MQCA			QCA		
	①	②	③	①	②	③
アセトン	93	93	94	102	99	99
アセトニトリル	94	86	91	99	92	100
ヘキサン	96	93	96	104	102	106
酢酸エチル	98	100	96	106	110	109
メタノール	93	89	105	100	93	111

3) 転溶の検討

MQCA及びQCA各0.5 µgを、0.2 mol/L水酸化カリウムメタノール溶液20 mLに3mol/L塩酸2 mLを加えて酸性にしたものに添加し、ヘキサン20 mLで2回振とう抽出、続いて水100 mLを加え、酢酸エチル50 mLで3回振とう抽出を行った結果を表3に示した。MQCA及びQCAはヘキサン2回抽出では回収がなく、酢酸エチル3回抽出で良好な回収が得られたため、酸性下でヘキサン洗浄は20 mLで2回、酢酸エチル転溶は50 mLで3回行うこととした。

表3 ヘキサン及び酢酸エチルへの転溶 (%)

	ヘキサン		酢酸エチル			合計
	20 mL	20 mL	50 mL	50 mL	50 mL	
	(1 回目)	(2 回目)	(1 回目)	(2 回目)	(3 回目)	
MQCA	0	tr	50	36	6	92
QCA	0	0	54	39	7	100

4) カラム精製の検討

① スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラムによる精製

実試料において加水分解及び抽出後にヘキサンによる洗浄、酢酸エチルによる転溶を行う際、ゲル化したエマルジョンを形成しやすく、試験続行が困難となるため、スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラムでの精製について検討した。カラムを水及びメタノール (1 : 10) 10 mLで予備洗浄した後、加水分解後に200 mLに定容した溶液20 mLを分取し、3 mol/L塩酸2 mLを加えpH1以下に調整した後、MQCA及びQCA各0.5 µgを添加、混合してカラムに負荷し、水及びメタノール (1 : 10) 混液で溶出させた。溶出状況を表4に示した。負荷液、水及びメタノール (1 : 10) 混液6 mLの溶出で良好な結果が得られたため、この条件を採用した。

表4 スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラムからの溶出状況 (%)

	負荷液+ 水及びメタノール (1 : 10) 0-6 mL	水及びメタノール (1 : 10) 6-9 mL
	MQCA	104
QCA	92	0

InertSep PLS-2 (充てん量500 mg、ジーエルサイエンス製)

添加量 : 0.5 µg

②エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムによる精製

エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムでの精製について検討した。カラムをメタノール10 mLで予備洗浄した後、MQCA及びQCA各0.5 µgをメタノールで負荷、次いでギ酸及びメタノールの比率を変え順次溶出させた。溶出状況を表5-1に示した。

表5-1 エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムからの溶出状況 (%)

	メタノール		ギ酸及びメタノール				合計
	0-10 mL	(0.2 : 100)	(0.5 : 100)	(1 : 99)	(2 : 98)		
		0-10 mL	0-10 mL	0-10 mL	0-10 mL		
MQCA	0	0	0	61	24	85	
QCA	0	0	0	5	92	97	

InertSep PSA (充てん量500 mg、ジーエルサイエンス製)

添加量 : 0.5 µg

上記の結果を基にさらに溶出の検討をした。エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムをギ酸及びメタノール (1 : 500) 混液10 mLで予備洗浄した後、MQCA及びQCA各0.5 µgをギ酸及びメタノール (1 : 500) 混液で負荷、ギ酸及びメタノール (3 : 97) で溶出したときの溶出状況を表5-2に示した。ギ酸及びメタノール (1 : 500) 混液10 mLでは溶出せず、ギ酸及びメタノール (3 : 97) 混液20 mLで良好な回収率が得られたため、この条件を採用した。

表5-2 エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムからの溶出状況 (%)

	ギ酸及びメタノール				合計	
	(1 : 500)	(3 : 97)				
	0-10 mL	0-20 mL	20-30 mL	30-40 mL		
MQCA	0	104	tr	0	104	
QCA	0	100	tr	tr	100	

InertSep PSA (充てん量500 mg、ジーエルサイエンス製)

添加量 : 0.5 µg

③弱塩基性陰イオン交換樹脂ミニカラムによる精製

弱塩基性陰イオン交換樹脂ミニカラムとしてOasis WAXを用い精製についての検討をした。このカラムはPSAカラムと同様陰イオン交換カラムである。PSAは実試料において主に色素の除去効果が得られたが、Oasis WAXではメタノール洗浄時に油分の除去効果が得られた。カラムをメタノール及び水各5 mLで予備洗浄した後、MQCA及びQCA各0.5 µg をギ酸及びメタノール (3 : 97) 混液2 mLに溶解し、水3 mLを加えて負荷した後、水、メタノール及び25%アンモニア水及びメタノール (1 : 19) 混液で溶出したときの溶出状況を表6に示した。負荷液、水5 mL及びメタノール10 mLでは溶出せず、25%アンモニア水及びメタノール (1 : 19) 5 mLで良好な回収率が得られたため、この条件を採用し

た。

表6 弱塩基性陰イオン交換樹脂ミニカラムからの溶出状況 (%)

負荷液		25%アンモニア水及びメタノール (1:19)				合計	
		水	メタノール		25%アンモニア水及びメタノール		
		0-5 mL	0-5 mL	5-10 mL	0-5 mL		5-10 mL
MQCA	0	0	0	0	109	0	109
QCA	0	0	0	0	101	0	101

Oasis WAX (充てん量150 mg、Waters製)

添加量: 0.5 µg

3. 添加回収試験

豚の筋肉、豚の脂肪、豚の肝臓、鶏卵、牛乳、はちみつ、うなぎ、さけ、しじみ及びはちみつの9品目に鶏の筋肉を加えた10食品を用いて、[実験方法] 7. 試験溶液の調製に従って添加回収試験を実施した。

添加回収試験における回収率100%相当の溶媒標準溶液、各食品のブランク試料及び添加試料の代表的なクロマトグラムを図12-1~10に示した。また、各食品のブランク試料のスキャン測定による代表的なトータルイオンクロマトグラムを図13に示した。

1) 選択性

選択性の結果を表7に示した。10品目何れの試料においてもMQCA及びQCAの定量を妨害するようなピークは認められず選択性は良好であった。

表7 選択性の評価

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	基準値 ^{*1} (ppm)	添加濃度 ^{*2} (ppm)	妨害ピークの許容範囲			ピーク面積(高さ) ^{*3}				選択性の評価 ^{*5}	備考
						評価対象濃度 (ppm)	判定基準	面積又は高さの別	ブランク試料 (a)	標準溶液 ^{*4} (b)	面積(高さ)比 (a)/(b)			
1	MQCA	豚の筋肉	0.001	0.001	0.001	定量限界	0.001	< 0.333	面積	0	1531	0.000	○	
2		豚の脂肪	0.001	0.001	0.001	定量限界	0.001	< 0.333	面積	0	1746	0.000	○	
3		豚の肝臓	0.001	0.001	0.001	定量限界	0.001	< 0.333	面積	0	2024	0.000	○	
4		鶏卵	0.001	0.001	0.001	定量限界	0.001	< 0.333	面積	0	1919	0.000	○	
5		牛乳	0.001	0.001	0.001	定量限界	0.001	< 0.333	面積	0	2065	0.000	○	
6		はちみつ	0.001	0.001	0.001	定量限界	0.001	< 0.333	面積	0	2672	0.000	○	
7		うなぎ	0.001	0.001	0.001	定量限界	0.001	< 0.333	面積	0	2517	0.000	○	
8		さけ	0.001	0.001	0.001	定量限界	0.001	< 0.333	面積	0	2238	0.000	○	
9		しじみ	0.001	0.001	0.001	定量限界	0.001	< 0.333	面積	0	2198	0.000	○	
10		鶏の筋肉	0.001	0.001	0.001	定量限界	0.001	< 0.333	面積	0	1473	0.000	○	
11	QCA	豚の筋肉	0.001	0.001	0.001	定量限界	0.001	< 0.333	面積	0	2031	0.000	○	
12		豚の脂肪	0.001	0.001	0.001	定量限界	0.001	< 0.333	面積	266	3530	0.082	○	
13		豚の肝臓	0.001	0.001	0.001	定量限界	0.001	< 0.333	面積	516	4257	0.138	○	
14		鶏卵	0.001	0.001	0.001	定量限界	0.001	< 0.333	面積	0	3166	0.000	○	
15		牛乳	0.001	0.001	0.001	定量限界	0.001	< 0.333	面積	0	4148	0.000	○	
16		はちみつ	0.001	0.001	0.001	定量限界	0.001	< 0.333	面積	198	4223	0.049	○	
17		うなぎ	0.001	0.001	0.001	定量限界	0.001	< 0.333	面積	227	4537	0.053	○	
18		さけ	0.001	0.001	0.001	定量限界	0.001	< 0.333	面積	0	3210	0.000	○	
19		しじみ	0.001	0.001	0.001	定量限界	0.001	< 0.333	面積	406	4392	0.102	○	
20		鶏の筋肉	0.001	0.001	0.001	定量限界	0.001	< 0.333	面積	0	1897	0.000	○	

*1 基準値は、基準値未設定の場合には一律基準(0.01 ppm)を用いる。

2 添加濃度と評価対象濃度が異なる場合(定量限界と基準値との関係が、『定量限界<基準値<定量限界×3』となる場合)には、『』が表示される。『*』が表示された分析対象化合物は、添加濃度と評価対象濃度が異なるため、別途、定量限界濃度相当のマトリックス添加標準溶液を調製して評価する。

*3 ブランク試料及び標準溶液の順に測定した結果から評価する。(必要に応じて乾燥注入を行う。)

*4 試料中の濃度が「評価対象濃度(基準値濃度又は定量限界濃度)」相当になるように、ブランク試料の試験溶液で調製した標準溶液(マトリックス添加標準溶液)を用いる。ブランク試料に妨害ピークが観察されなかった場合には、標準溶液のピーク面積(高さ)は求めなくても良い。

*5 面積(高さ)比が、妨害ピークの許容範囲の判定基準に適合する場合には「○」、適合しない場合には「×」を記載する。

2) 真度、精度及び定量限界

真度及び併行精度の検討結果を表8に示した。MQCAの真度は72.1~94.7%、併行精度は2.3~11.8%、

QCAの真度は71.6~96.9%、併行精度は2.4~16.8%であり、目標値を十分に満たした。MQCAのS/N比の平均値は24.6~88.8、QCAのS/N比の平均値は16.3~119.2であり $S/N \geq 10$ を十分に満たした。

表8 真度、精度及び定量限界の評価

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	基準値 ^{*1} (ppm)	添加濃度 (ppm)	定量限界の評価 ²	検量線			回収率(%)					真度 (%)	併行精度 (RSD%)	S/N比 ^{*3}			備考
							傾き	切片	r ² 値	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5			Max.	Min.	平均値	
1	MQCA	豚の筋肉	0.001	0.001	0.001		1611897	-105	0.9975	89.1	96.9	89.1	83.8	103.3	92.4	8.3	66.5	60.0	63.3	
2		豚の脂肪	0.001	0.001	0.001		1720743	44	0.9987	83.8	84.5	91.7	92.3	95.6	89.6	5.8	42.3	36.3	39.3	
3		豚の肝臓	0.001	0.001	0.001		2168874	-62	0.9973	73.1	83.7	81.6	82.0	77.1	79.5	5.4	71.2	47.1	59.2	
4		鶏卵	0.001	0.001	0.001		1752537	142	0.9966	91.8	98.5	93.4	72.8	99.5	91.2	11.8	36.6	32.4	34.5	
5		牛乳	0.001	0.001	0.001		2045063	-22	0.9980	79.9	72.3	83.7	81.7	83.2	80.2	5.8	44.8	37.9	41.4	
6		はちみつ	0.001	0.001	0.001		2636640	6	0.9993	72.7	70.8	71.7	70.8	74.8	72.1	2.3	110.8	61.8	86.3	
7		うなぎ	0.001	0.001	0.001		2340777	-3	0.9916	90.5	87.1	85.4	80.7	81.1	85.0	4.8	74.5	88.8	81.6	
8		さけ	0.001	0.001	0.001		2182149	-72	0.9957	87.4	98.1	101.7	84.9	101.6	94.7	8.5	46.9	39.6	43.2	
9		しじみ	0.001	0.001	0.001		2171657	44	0.9989	94.1	87.0	79.1	72.6	82.9	83.2	9.8	24.6	45.9	35.3	
10		鶏の筋肉	0.001	0.001	0.001		1553726	-44	0.9984	72.0	77.5	84.1	84.9	97.5	83.2	11.5	50.6	45.5	48.0	
11	QCA	豚の筋肉	0.001	0.001	0.001		2128549	-70	0.9974	79.5	96.1	85.6	94.3	91.9	89.5	7.7	58.8	45.4	52.1	
12		豚の脂肪	0.001	0.001	0.001		3549177	-37	0.9988	79.1	76.8	89.7	96.0	87.4	85.8	9.2	76.2	91.0	83.6	
13		豚の肝臓	0.001	0.001	0.001		4289320	-109	0.9981	78.0	77.8	69.1	79.1	76.3	76.1	5.3	55.1	47.3	51.2	
14		鶏卵	0.001	0.001	0.001		2912823	105	0.9931	100.8	96.0	112.1	78.2	97.5	96.9	12.6	49.4	147.0	98.2	
15		牛乳	0.001	0.001	0.001		4068617	3	0.9971	71.2	70.3	73.7	73.0	69.8	71.6	2.4	29.5	30.8	30.2	
16		はちみつ	0.001	0.001	0.001		4234491	-101	0.9988	80.6	76.0	75.1	73.6	76.0	76.3	3.4	74.5	82.8	78.6	
17		うなぎ	0.001	0.001	0.001		4504594	15	0.9990	81.0	87.9	77.4	78.5	82.4	81.4	5.1	61.1	56.7	58.9	
18		さけ	0.001	0.001	0.001		3512890	-139	0.9933	93.8	100.0	100.1	94.1	92.8	96.2	3.7	69.4	64.7	67.0	
19		しじみ	0.001	0.001	0.001		4429763	56	0.9982	75.6	69.7	71.9	71.0	70.5	71.7	3.2	18.0	16.3	17.2	
20		鶏の筋肉	0.001	0.001	0.001		1882640	64	0.9984	71.5	69.0	81.3	94.8	100.9	83.5	16.8	73.9	56.8	65.3	

*1 基準値は、基準値未設定の場合には一律基準(0.01 ppm)を用いる。
 *2 添加濃度が定量限界濃度と異なる場合には、『※』が表示される。その場合には、S/N比の算出は不要であるが、別途、定量限界の推定を行う。
 *3 得られた回収率の中で最大値を与えるピーク(Max.)及び最小値を与えるピーク(Min.)のそれぞれのS/N比を求める。

3) 試料マトリックスの測定への影響

試料マトリックスの測定への影響について検討した結果を表9に示した。添加回収試験における回収率100%相当濃度になるように調製したマトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積比を求めた。面積比はMQCAが0.91~1.08、QCAが0.82~1.04であり、MQCAについては測定への影響はないものと考えられるが、QCAでは一部の食品でイオン化阻害の傾向が見受けられた。なお、イオン化阻害の影響を低減させるためには、より高感度な装置を用いて、試験溶液を希釈して測定する方法などが考えられる。

表9 試料マトリックスの測定への影響

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	基準値 ^{*1} (ppm)	添加濃度 (ppm)	標準溶液濃度 ^{*2} (mg/L)	ピーク面積(高さ) ^{*3}										備考
							面積又は高さの別	ブランク ^{*4}	マトリックス添加標準溶液 ^{*5}			溶媒標準溶液			ピーク面積(高さ)比 ^{*6}		
									n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均			
1	MQCA	豚の筋肉	0.001	0.001	0.001	0.001	面積	0	1525	1398	1461.2	1565	1452	1508.4	0.97		
2		豚の脂肪	0.001	0.001	0.001	0.001	面積	0	1875	1755	1814.8	1803	1858	1830.5	0.99		
3		豚の肝臓	0.001	0.001	0.001	0.001	面積	0	1810	1898	1854.0	2008	1991	1999.4	0.93		
4		鶏卵	0.001	0.001	0.001	0.001	面積	0	1823	1714	1768.6	1971	1909	1940.2	0.91		
5		牛乳	0.001	0.001	0.001	0.001	面積	0	2090	2039	2064.3	2099	1960	2029.4	1.02		
6		はちみつ	0.001	0.001	0.001	0.001	面積	0	2738	2850	2794.1	2474	2719	2596.7	1.08		
7		うなぎ	0.001	0.001	0.001	0.001	面積	0	2218	2175	2196.7	2462	2256	2359.0	0.93		
8		さけ	0.001	0.001	0.001	0.001	面積	0	2104	1903	2003.3	2086	1953	2019.5	0.99		
9		しじみ	0.001	0.001	0.001	0.001	面積	0	2012	2006	2008.8	2207	2220	2213.3	0.91		
10		鶏の筋肉	0.001	0.001	0.001	0.001	面積	0	1482	1454	1467.9	1339	1459	1398.9	1.05		
11	QCA	豚の筋肉	0.001	0.001	0.001	0.001	面積	0	2053	2104	2078.1	2047	2018	2032.5	1.02		
12		豚の脂肪	0.001	0.001	0.001	0.001	面積	266	4015	3941	3712.2	3876	3724	3799.7	0.98		
13		豚の肝臓	0.001	0.001	0.001	0.001	面積	516	4229	3796	3496.0	4263	4220	4241.2	0.82		
14		鶏卵	0.001	0.001	0.001	0.001	面積	0	3088	2900	2994.0	2967	2796	2881.7	1.04		
15		牛乳	0.001	0.001	0.001	0.001	面積	0	3939	3452	3695.4	4206	4107	4156.7	0.89		
16		はちみつ	0.001	0.001	0.001	0.001	面積	198	4523	4695	4411.3	3989	4681	4335.4	1.02		
17		うなぎ	0.001	0.001	0.001	0.001	面積	227	4449	4576	4285.7	4877	4607	4742.3	0.90		
18		さけ	0.001	0.001	0.001	0.001	面積	0	3445	3026	3235.6	3213	3378	3295.3	0.98		
19		しじみ	0.001	0.001	0.001	0.001	面積	447	4180	4460	3873.2	4136	4249	4192.9	0.92		
20		鶏の筋肉	0.001	0.001	0.001	0.001	面積	0	2028	1991	2009.6	2019	2024	2021.3	0.99		

*1 基準値は、基準値未設定の場合には一律基準(0.01 ppm)を用いる。
 *2 添加回収試験における回収率100%相当濃度になるように、ブランク試料の試験溶液で調製した標準溶液(マトリックス添加標準溶液)及び溶媒で調製した標準溶液(溶媒標準溶液)を作成する。
 *3 マトリックス添加標準溶液及び溶媒標準溶液の順に交互に2回以上測定した結果から評価する。(必要に応じて乾燥注入を行う。)
 *4 ブランクにピークが認められた場合には、マトリックス添加標準溶液の値はブランク値を差し引いた値を用いる。
 *5 マトリックス添加標準溶液は試験当日のブランク試料の試験溶液を用いて調製する。
 *6 マトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積(又は高さ)の比を求める。

4. 考察

参考文献3)の試験法を参考に、はちみつ以外の試料については水酸化カリウムメタノール溶液で加水分解及び抽出した。

転溶操作前に抽出液を分取、塩酸酸性下でスチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラムによる精製が可能であった。

転溶操作は精製後の溶液からヘキサン20 mL2回ではヘキサンに抽出することはできず、水100 mLを

加えた後は酢酸エチル50 mL3回で十分に抽出することができたため、ヘキサンで洗浄した後、酢酸エチルへ転溶する方法を採用した。

また、はちみつについてはメタノールで抽出し、酢酸エチルへ転溶する方法を採用した。

精製カラムとしてはエチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラム及び弱陰イオン樹脂ミニカラムを用いた。

開発した方法を用いて、豚の筋肉等10食品の添加回収試験を行った結果、MQCA及びQCAの選択性は良好で何れの試料においても測定を妨害するようなピークは認められなかった。MQCAの真度は72.1~94.7%、併行精度は2.3~11.8%の良好な結果が得られたことから、本試験法は、MQCAについては筋肉、脂肪、肝臓、鶏卵、牛乳、魚介類、はちみつ等の畜水産物に適用可能であると判断された。QCAの真度は71.6~96.9%、併行精度は2.4~16.8%の良好な結果が得られたが、試料マトリックス測定において一部の食品にややイオン化阻害の傾向が見受けられた。

[結論]

畜水産物中のMQCA及びQCA試験法として、はちみつ以外は試料を水酸化カリウムメタノール溶液で加水分解した後、MQCA及びQCAを抽出し、塩酸酸性下でスチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラムで精製した後、ヘキサンで洗浄、酢酸エチルに転溶する。また、はちみつについては、MQCA及びQCAを試料から塩酸酸性下でメタノールで抽出し、酢酸エチルに転溶する。エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラム及び弱塩基性陰イオン交換樹脂ミニカラムで精製し、LC-MS/MSで定量及び確認する方法を開発した。

開発した試験法を豚の筋肉、豚の脂肪、豚の肝臓、鶏卵、牛乳、はちみつ、うなぎ、さけ、しじみ及び鶏の筋肉の10食品に適用した結果、MQCA及びQCAの選択性は良好で何れの試料においても妨害ピークは認められず、MQCAの真度は72.1~94.7%、併行精度は2.3~11.8%の良好な結果が得られたため、定量限界として、0.001 mg/kgを設定可能であることが確認された。また、QCAの真度は71.6~96.9%、併行精度は2.4~16.8%の良好な結果が得られたが、試料マトリックス測定において、豚の肝臓以外は良好な結果であったが、豚の肝臓でややイオン化阻害の傾向が見受けられた。

[参考文献]

- 1) 食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法
「HPLCによる動物用医薬品等の一斉試験法I（畜水産物）試験法」
- 2) 厚生労働省告示第370号
「カルバドックス試験法」
- 3) 「Determination of Carbadox Metabolite by GC/ECD」 Revision:02
United States Department of Agriculture Food Safety and Inspection Service, Office of Public Health Science

[クロマトグラム]

MQCA 及び QCA の添加回収試験における代表的なクロマトグラム

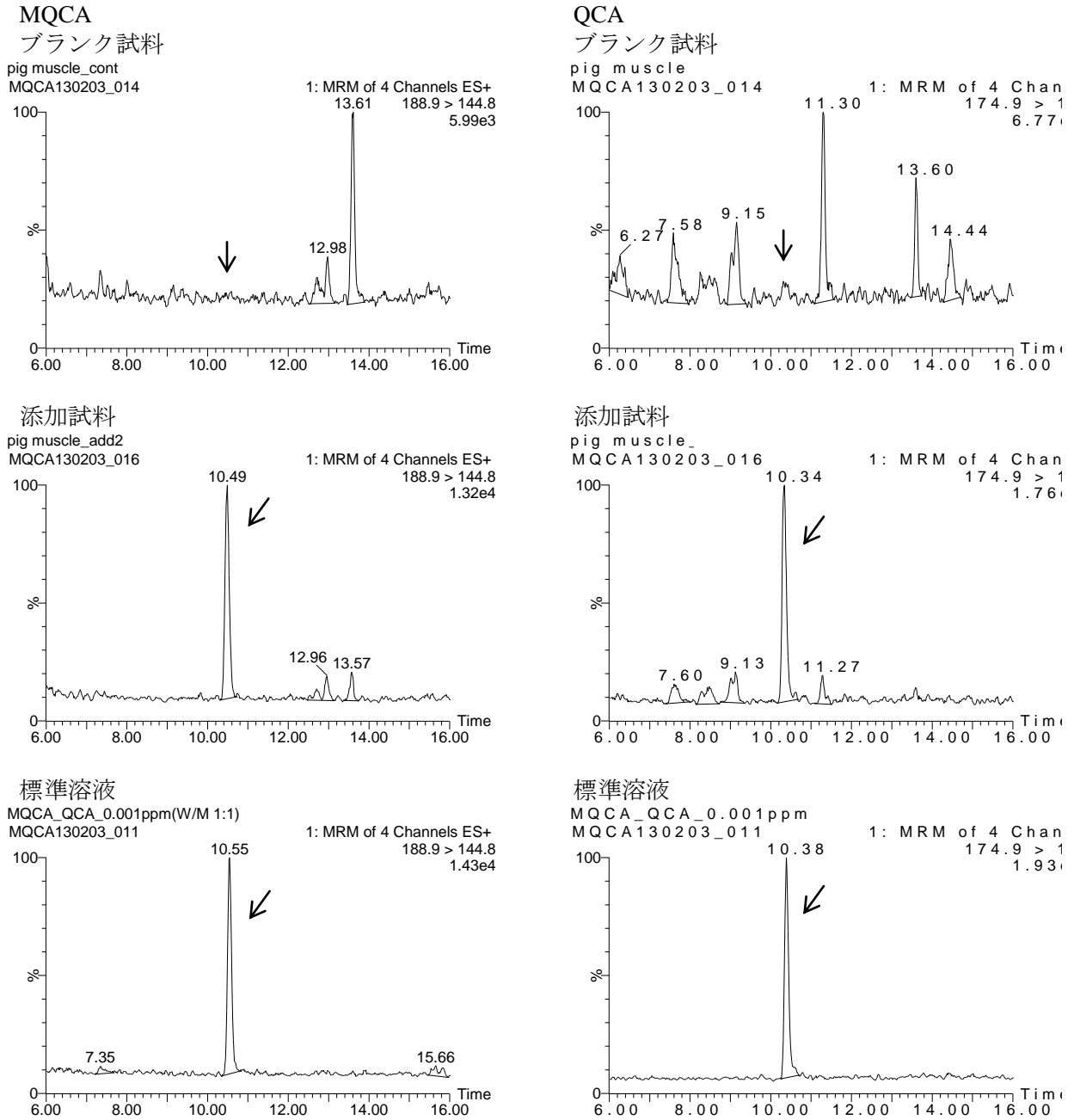


図 12-1 豚の筋肉の SRM クロマトグラム
MQCA (m/z 189→145)
QCA (m/z 175→129)
添加濃度 : 0.001 ppm

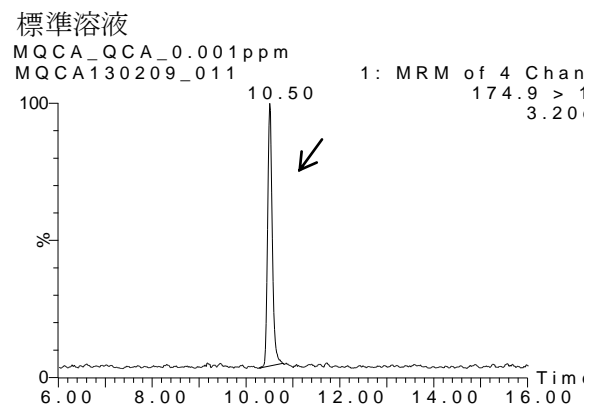
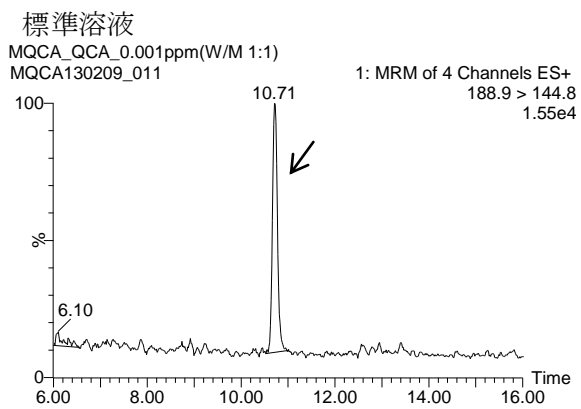
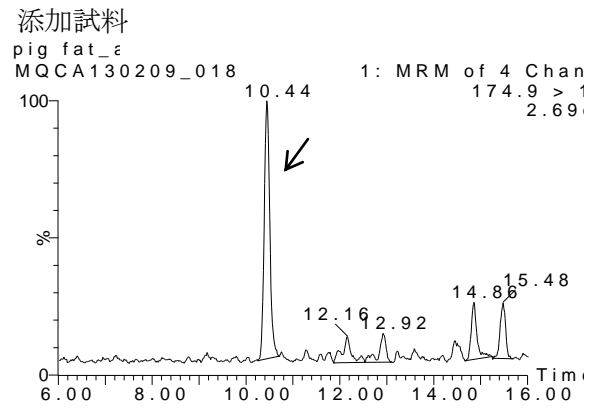
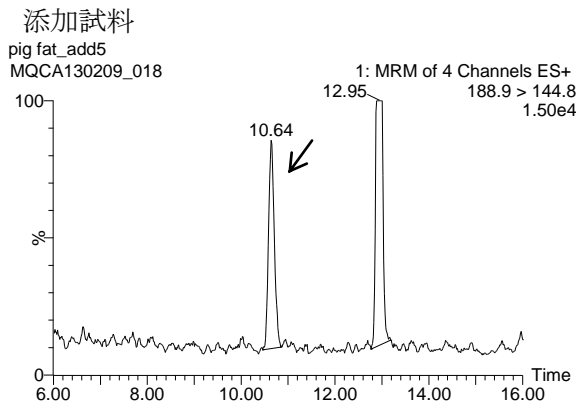
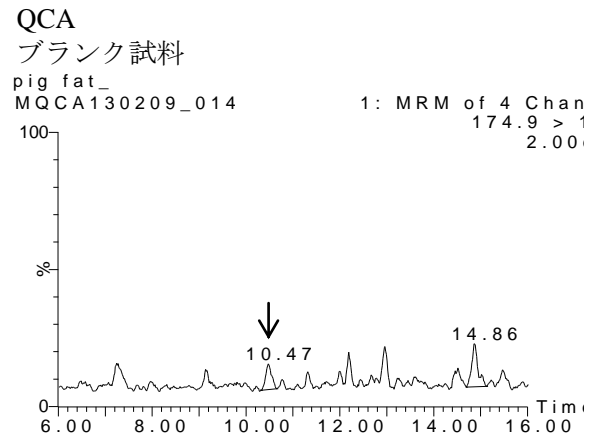
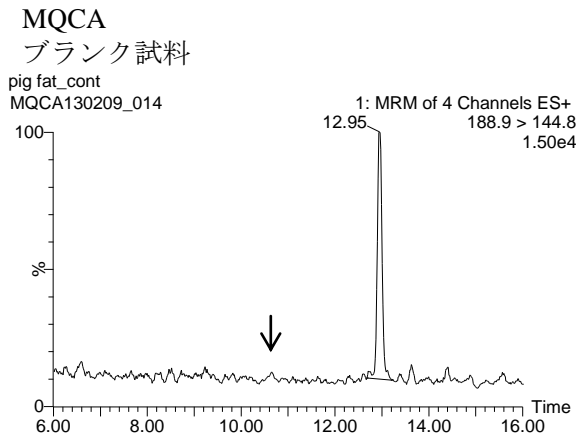


図 12-2 豚の脂肪の SRM クロマトグラム
 MQCA (m/z 189→145)
 QCA (m/z 175→129)
 添加濃度 : 0.001 ppm

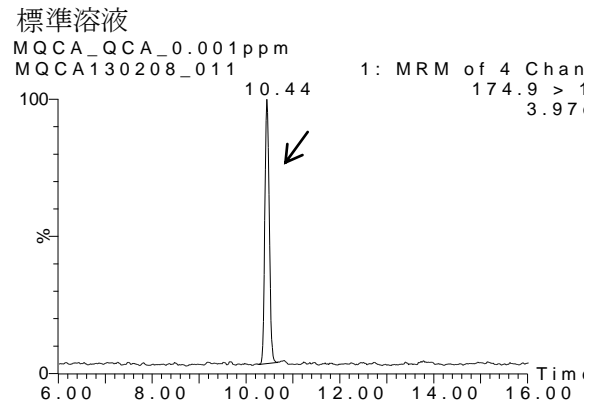
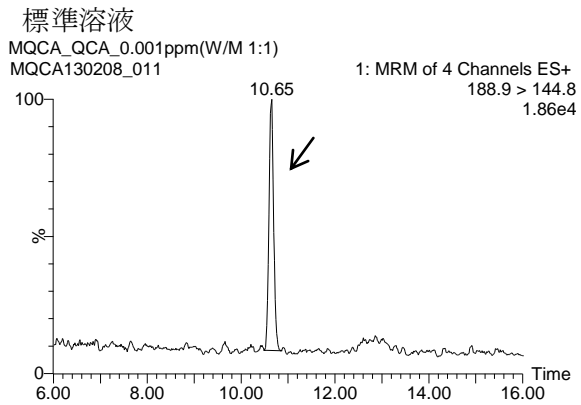
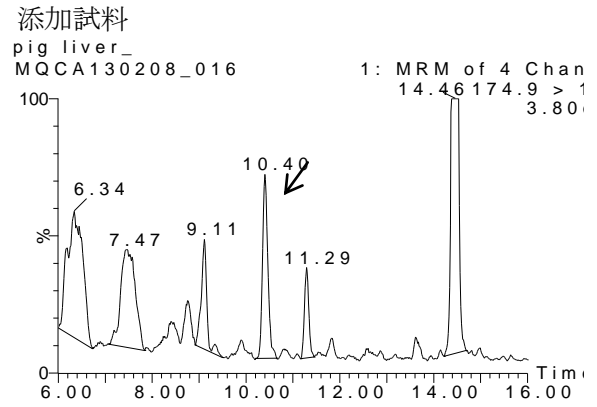
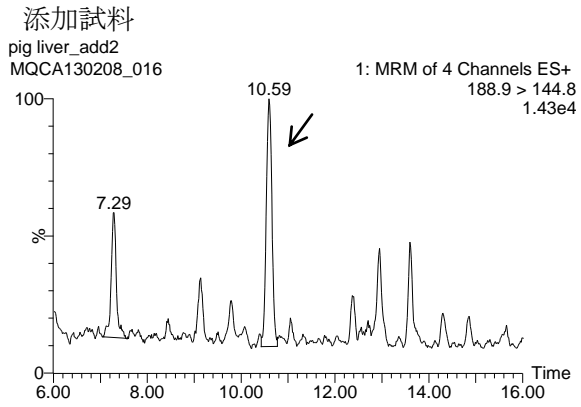
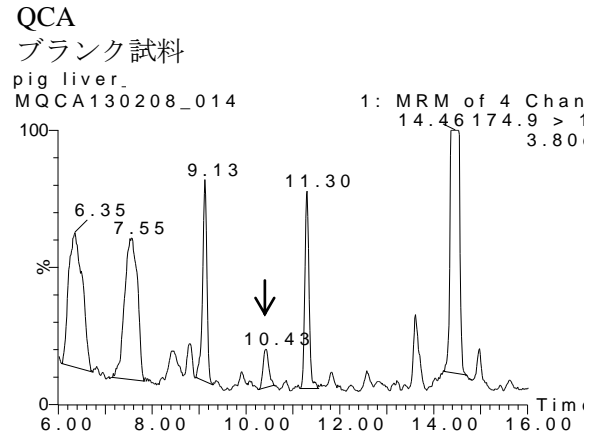
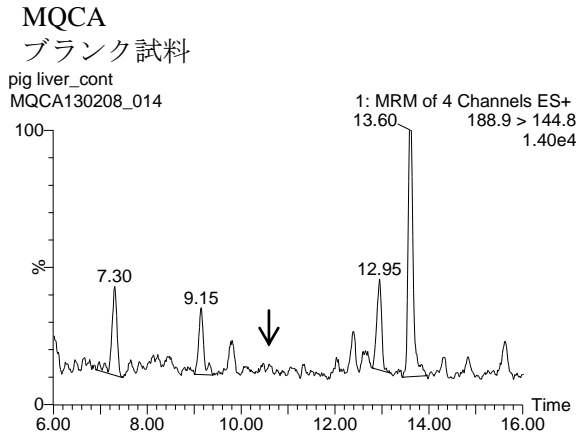


図 12-3 豚の肝臓のSRMクロマトグラム
 MQCA (m/z 189→145)
 QCA (m/z 175→129)
 添加濃度 : 0.001 ppm

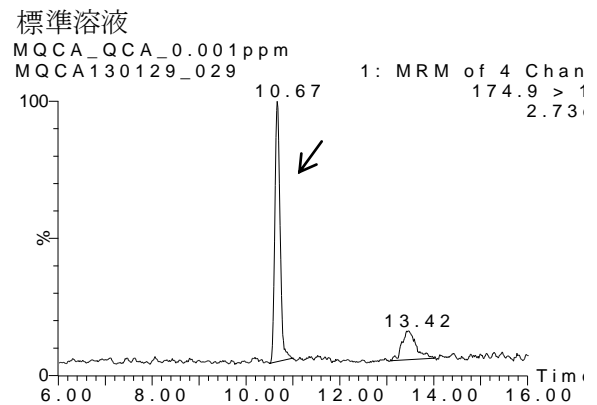
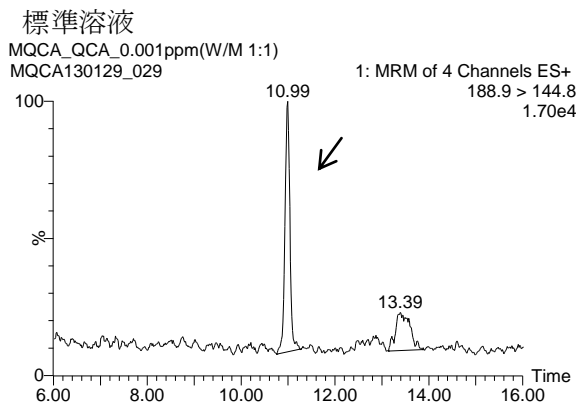
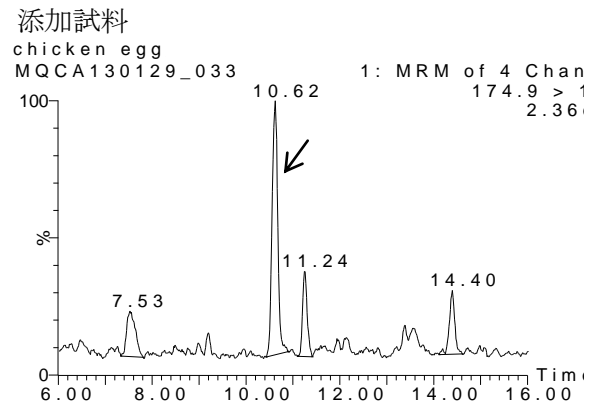
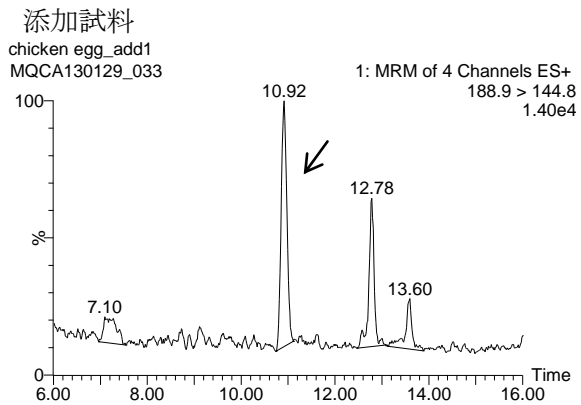
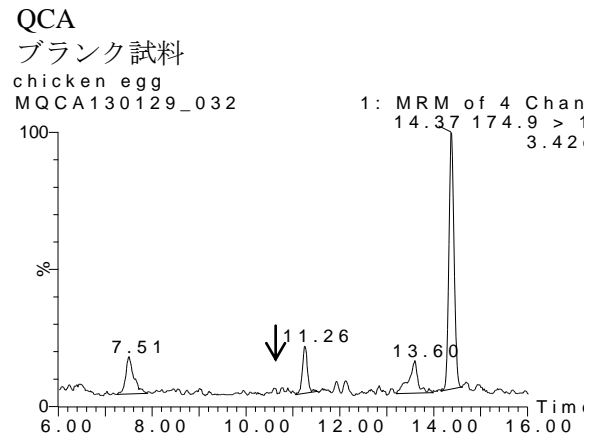
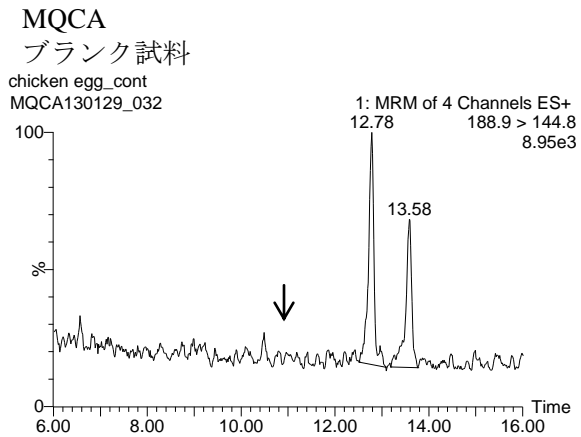


図 12-4 鶏卵の SRM クロマトグラム
 MQCA (m/z 189→145)
 QCA (m/z 175→129)
 添加濃度 : 0.001 ppm

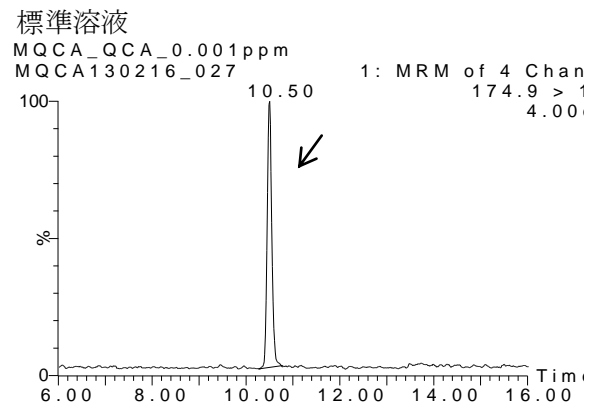
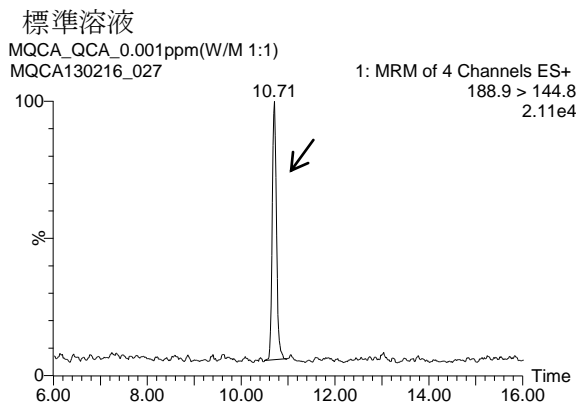
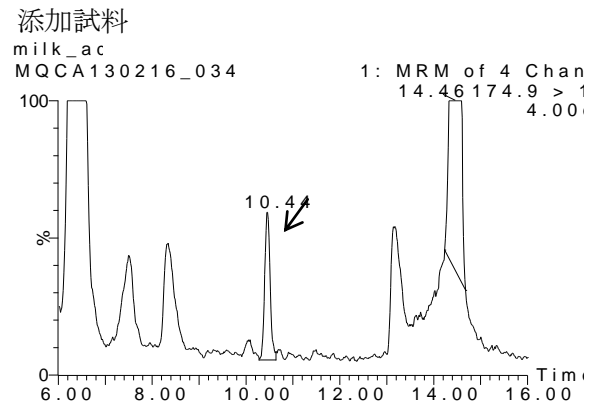
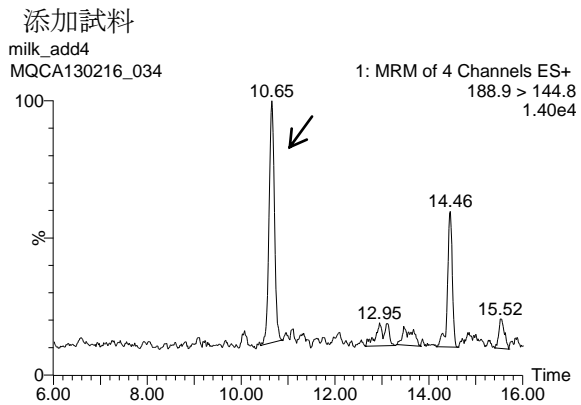
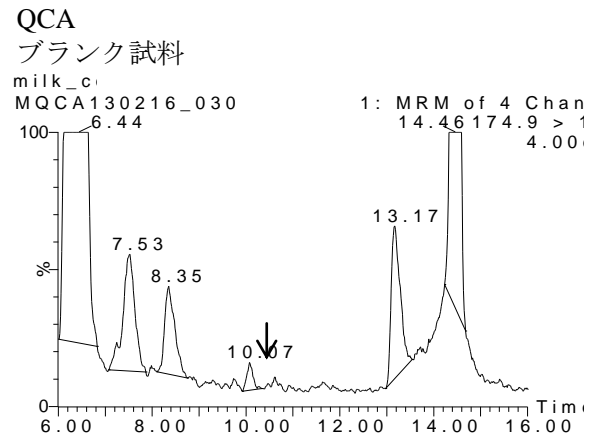
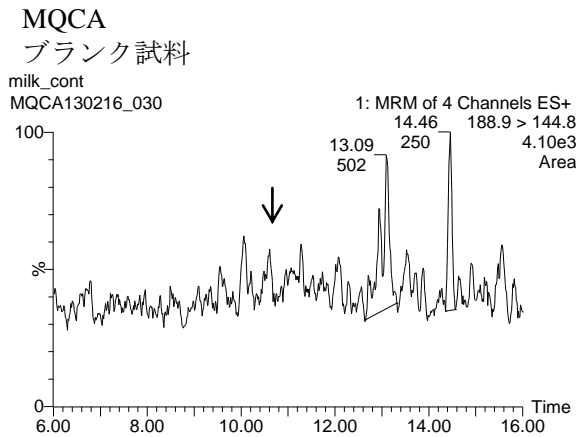


図 12-5 牛乳の SRM クロマトグラム
 MQCA (m/z 189→145)
 QCA (m/z 175→129)
 添加濃度 : 0.001 ppm

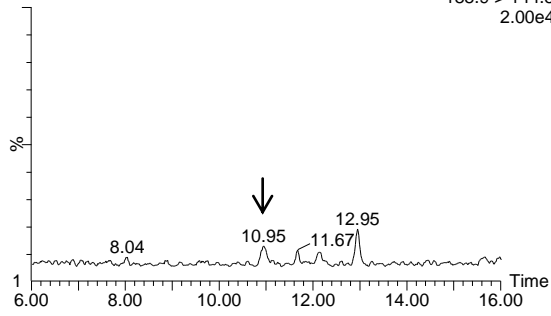
MQCA

ブランク試料

honey_cont

MQCA130406_012

1: MRM of 4 Channels ES+
188.9 > 144.8
2.00e4



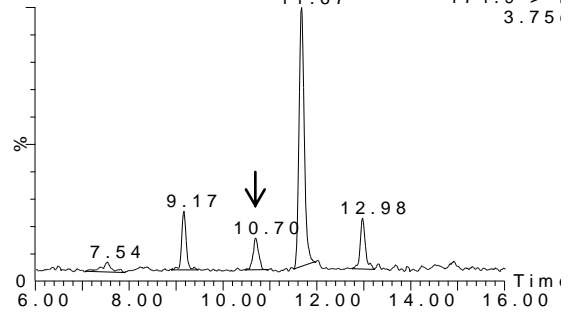
QCA

ブランク試料

honey_c

MQCA130406_012

1: MRM of 4 Chan
174.9 > 1
3.75e4

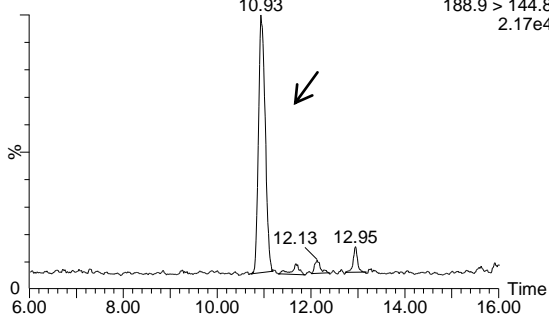


添加試料

honey_add4

MQCA130406_016

1: MRM of 4 Channels ES+
188.9 > 144.8
2.17e4

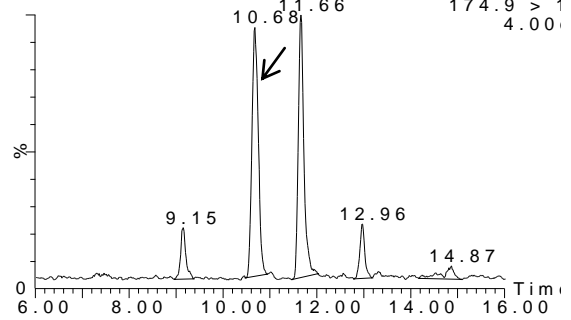


添加試料

honey_a

MQCA130406_016

1: MRM of 4 Chan
174.9 > 1
4.00e4

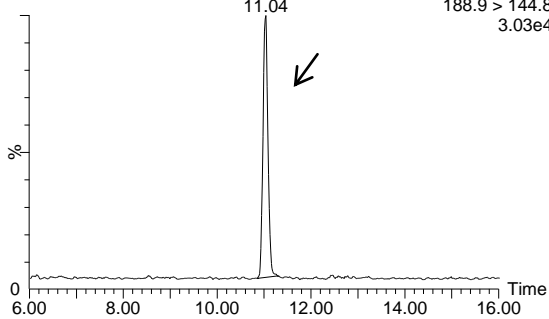


標準溶液

MQCA_QCA_0.001ppm(W/M 1:1)

MQCA130406_009

1: MRM of 4 Channels ES+
188.9 > 144.8
3.03e4



標準溶液

MQCA_QCA_0.001ppm

MQCA130406_009

1: MRM of 4 Chan
174.9 > 1
4.92e4

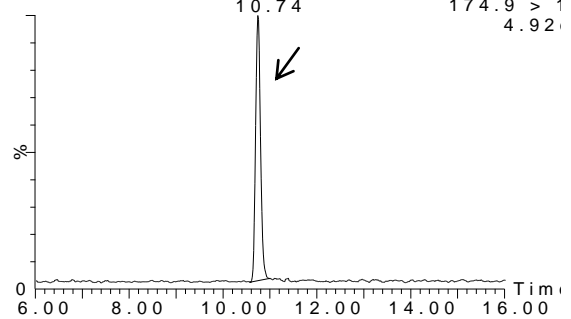


図 12-6 はちみつの SRM クロマトグラム

MQCA (m/z 189→145)

QCA (m/z 175→129)

添加濃度 : 0.001 ppm

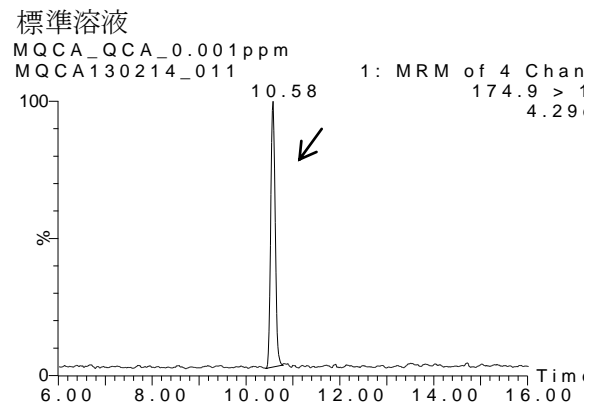
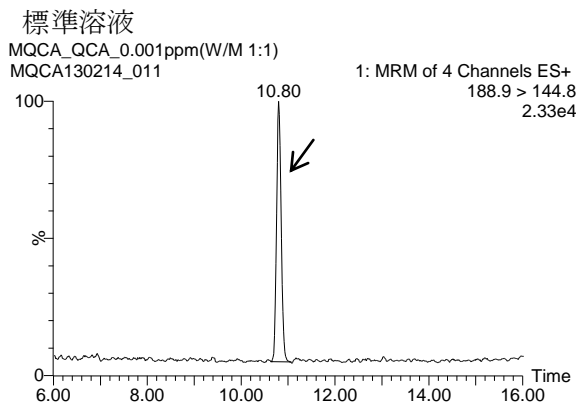
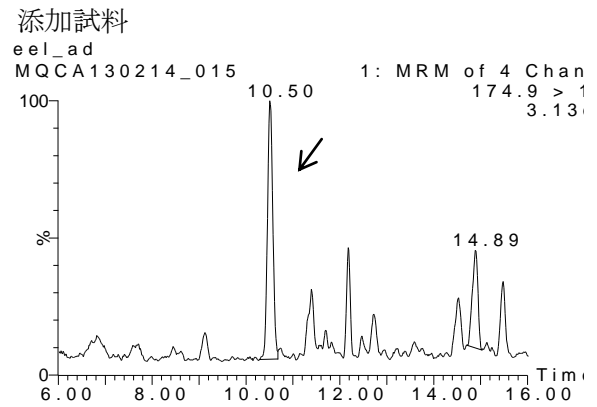
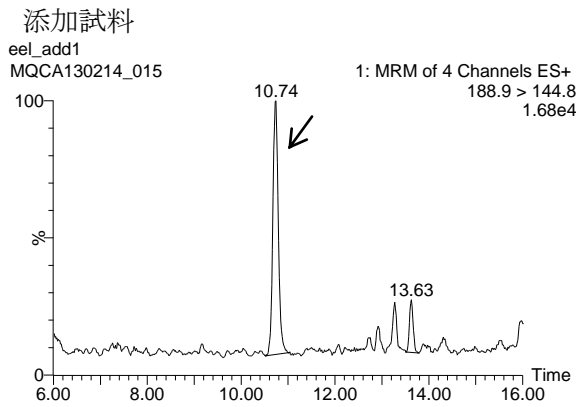
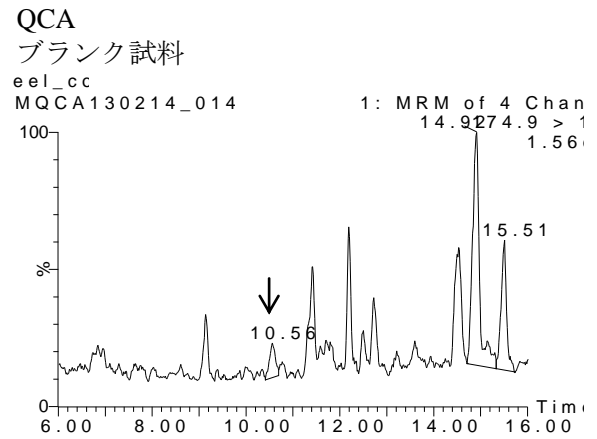
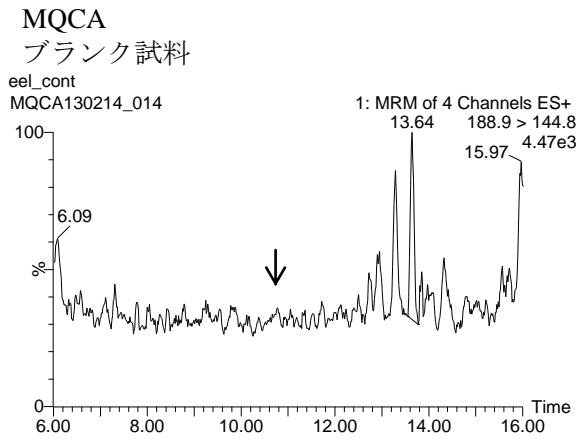
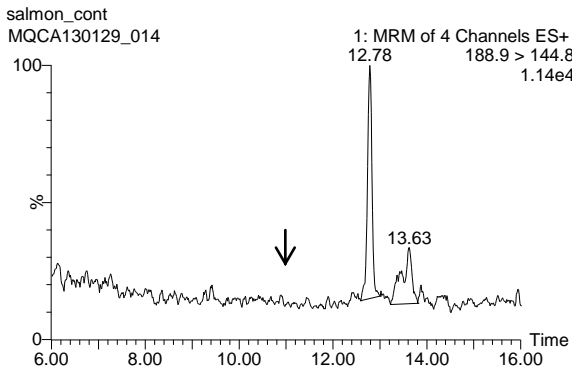
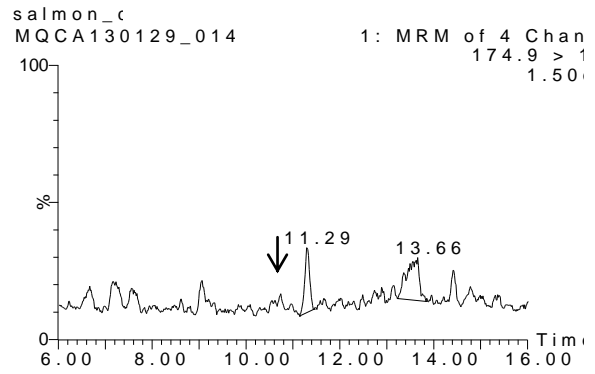


図 12-7 うなぎの SRM クロマトグラム
 MQCA (m/z 189→145)
 QCA (m/z 175→129)
 添加濃度 : 0.001 ppm

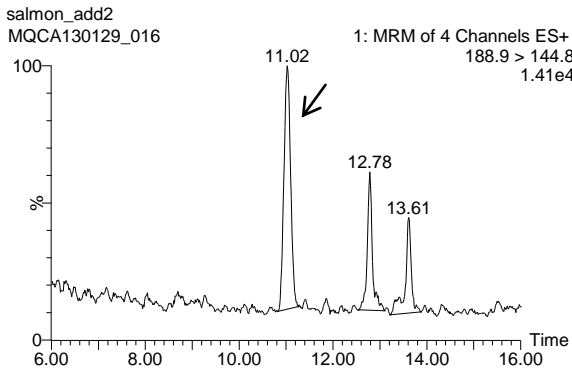
MQCA
 ブランク試料



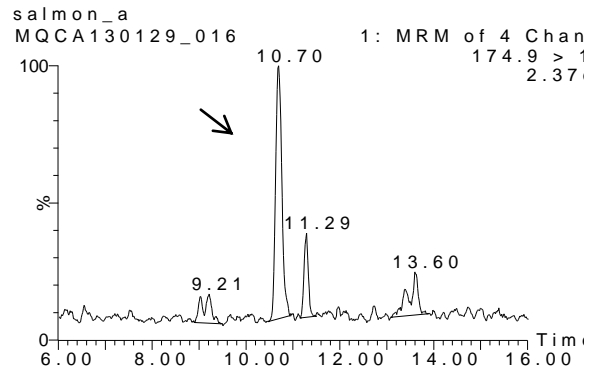
QCA
 ブランク試料



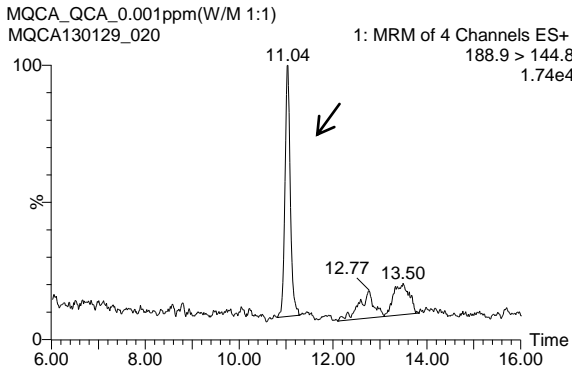
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

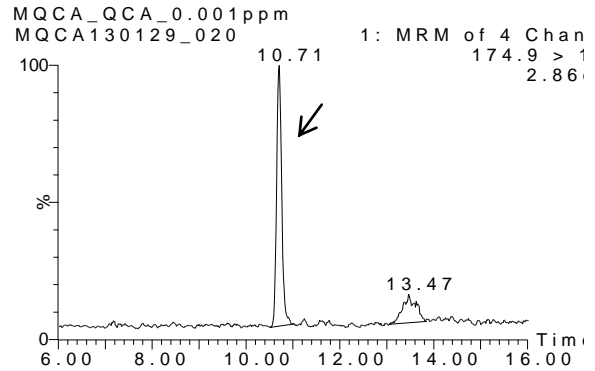


図 12-8 さけの SRM クロマトグラム
 MQCA (m/z 189→145)
 QCA (m/z 175→129)
 添加濃度 : 0.001 ppm

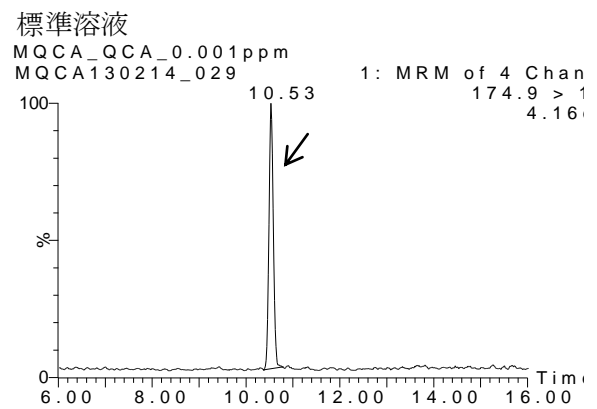
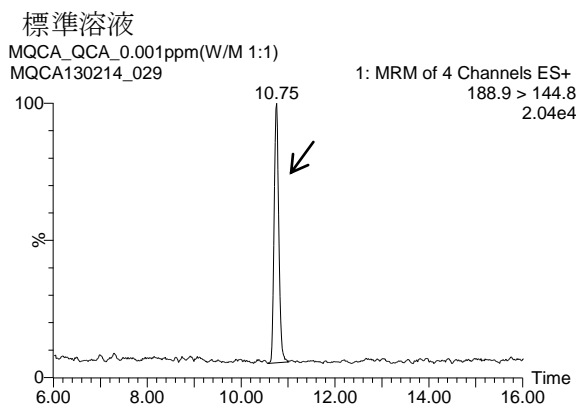
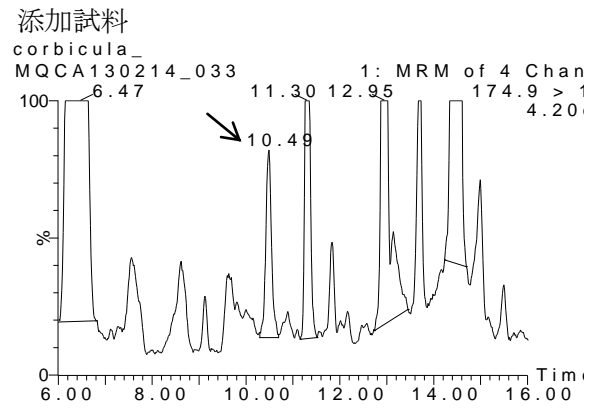
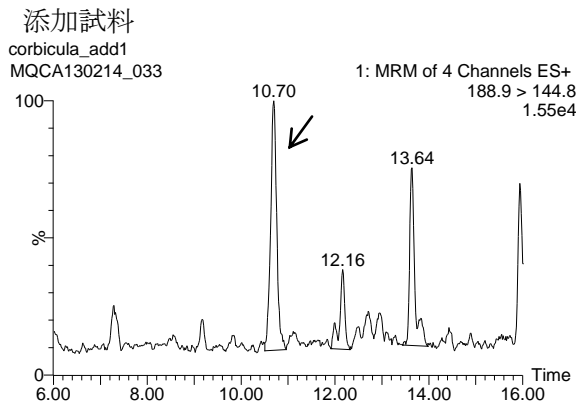
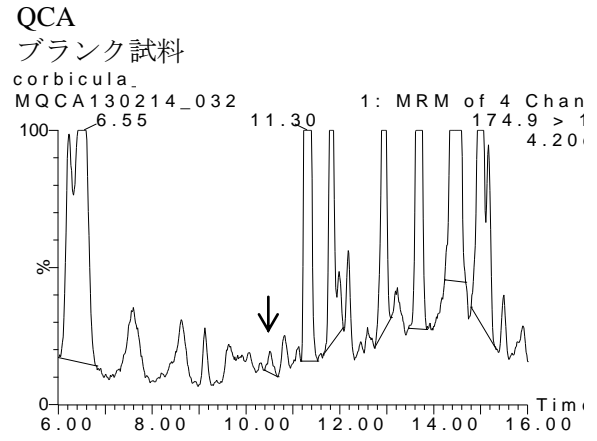
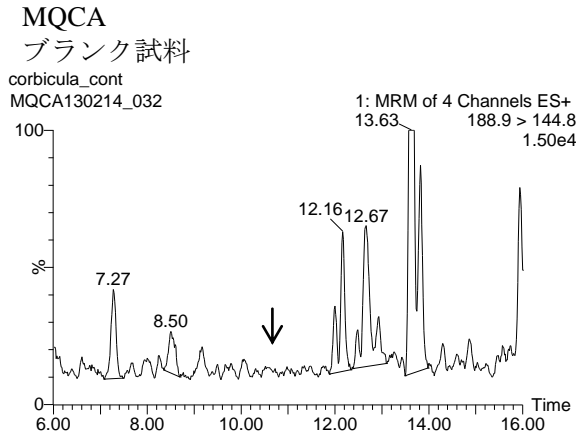


図 12-9 しじみの SRM クロマトグラム
 MQCA (m/z 189→145)
 QCA (m/z 175→129)
 添加濃度 : 0.001 ppm

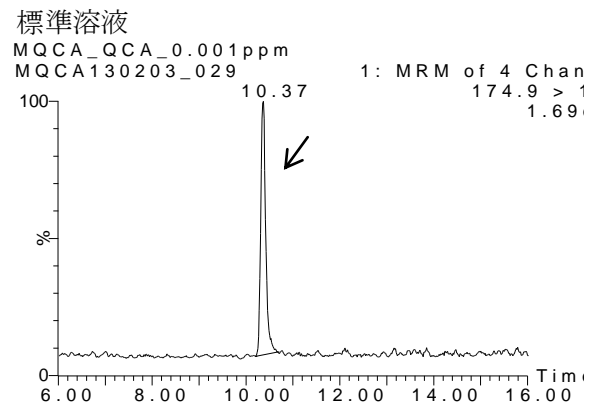
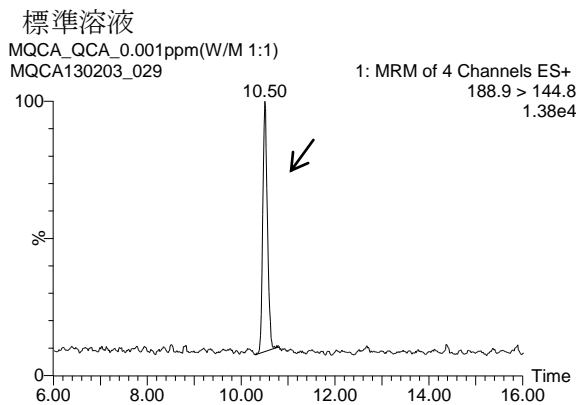
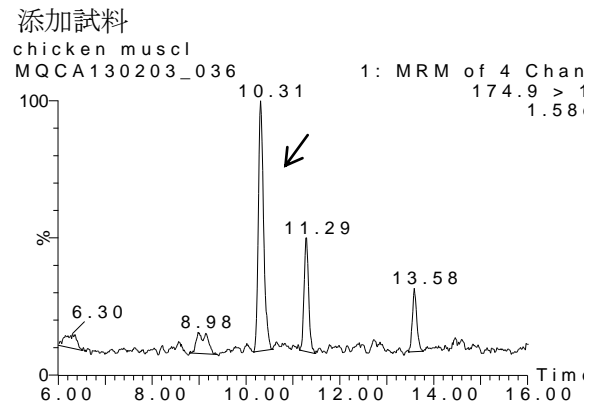
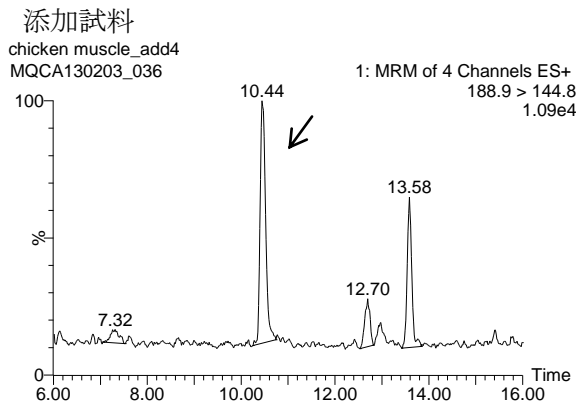
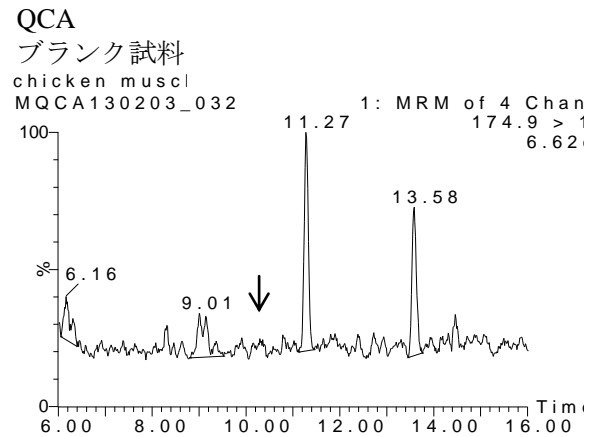
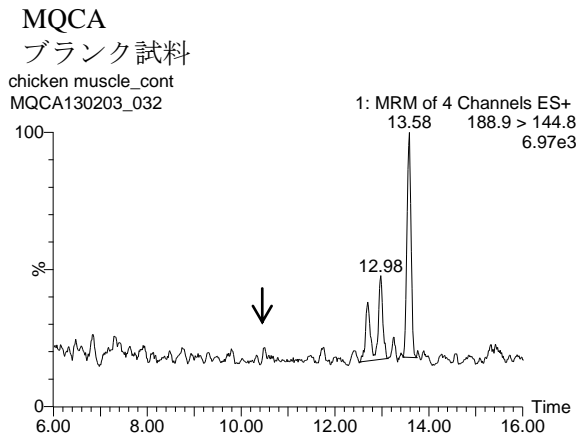


図 12-10 鶏の筋肉の SRM クロマトグラム
 MQCA (m/z 189→145)
 QCA (m/z 175→129)
 添加濃度 : 0.001 ppm

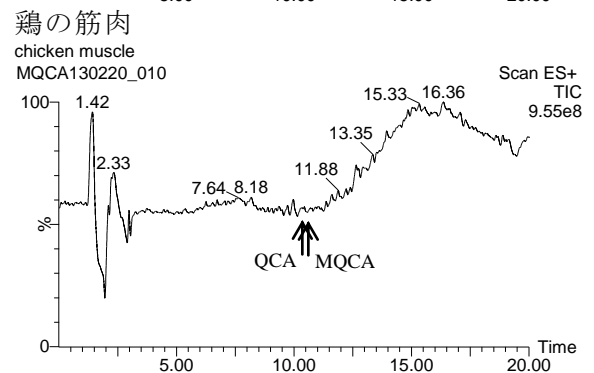
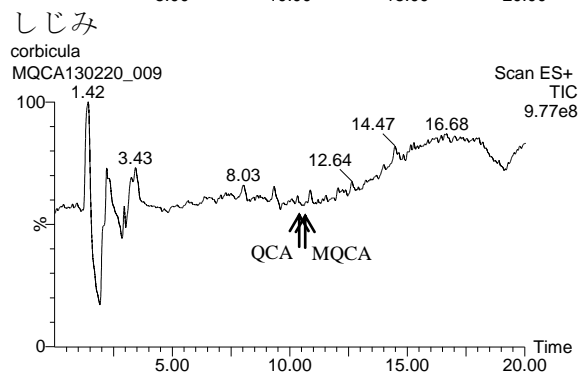
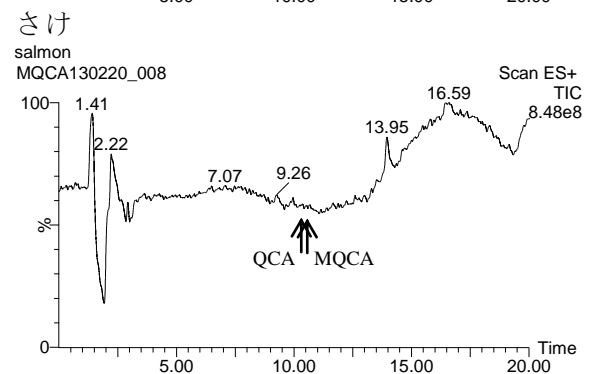
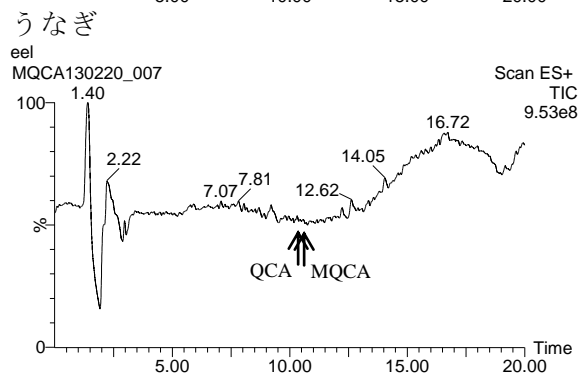
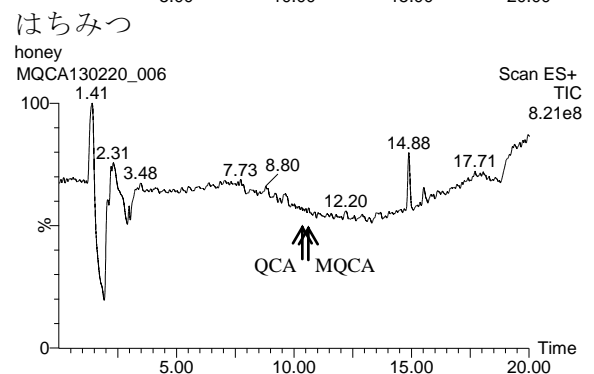
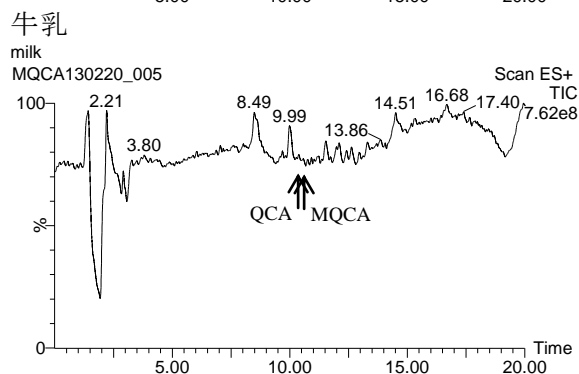
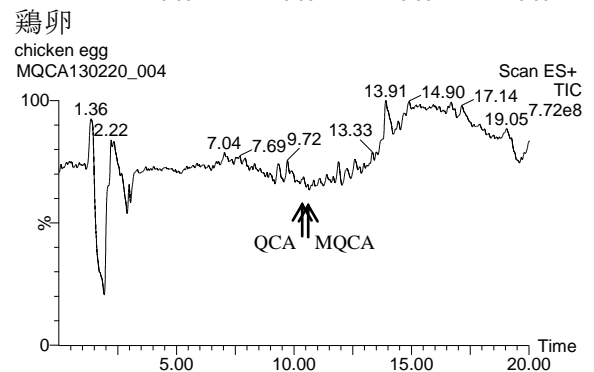
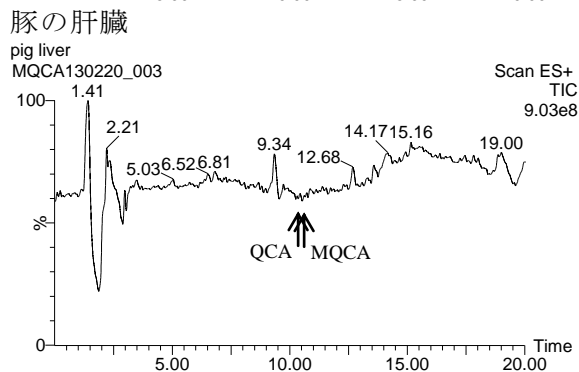
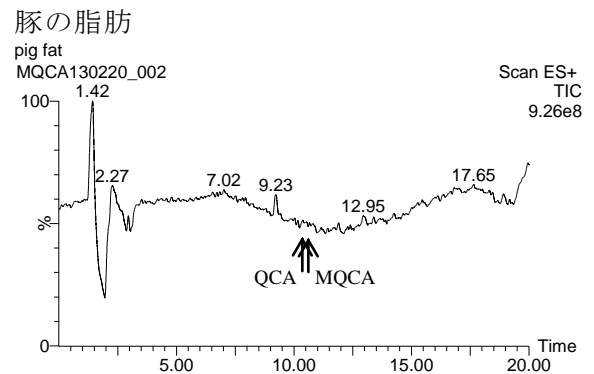
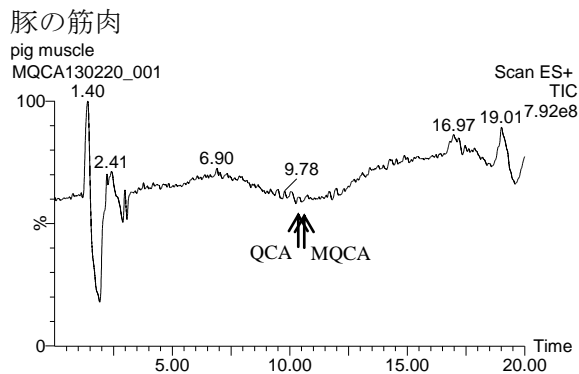


図 13 ブランク試料のトータルイオンクロマトグラム (スキャン範囲 : 50~1000 m/z)