

※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（ブ
ロチゾラム）の試験法開発事業

ブロチゾラム試験法（畜水産物）の検討結果

〔 緒言 〕

1. 目的及び試験法の検討方針

ブロチゾラムは、抗不安薬あるいは睡眠導入薬の研究の中から発見された 2-bromo-thieno-triazolo-1,4diazepine 誘導体である。人用医薬品としては睡眠導入剤として開発されているが、動物に対して食欲誘発作用を示すことから食欲不振改善の補助等を目的として開発され、我が国をはじめ欧米等で動物用医薬品として用いられている。

平成 15 年 5 月の食品衛生法の一部改正に基づき、食品中に残留する農薬等について、一定の量を超えて農薬等が残留する食品の販売等を原則禁止するポジティブ制度が導入され、平成 18 年 5 月に施行された。これに伴い、ブロチゾラムについて薬事法に基づく再審査申請に伴う残留基準が設定されるため、試験法を整備する必要がある。そこで、「薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会農薬・動物用医薬品部会報告書」に記載されている基準値案を踏まえ、ブロチゾラムの試験法を開発・整備することを目的とする。部会報告書により、ブロチゾラムについては、食品に含有されるものであってはならないとする食品規格を設定（牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛の腎臓、牛の食用部位及び乳を除く）することが適当であるとされた。また、開発する試験法の定量限界の目標値は、0.0005 mg/kg 以下とすることが求められている。

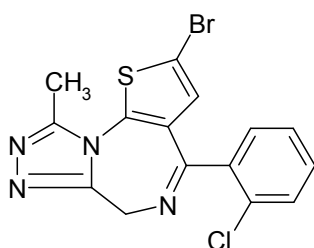
本検討においては、筋肉、脂肪、肝臓、腎臓及び魚介類についてはアセトン及び *n*-ヘキサン混液を用いた抽出方法、乳、卵及びはちみつについてはアセトニトリルを用いた抽出方法を検討した。また、精製法としてはオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム及びトリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲル/エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム等による精製を検討した。

【化学名】

2-Bromo-4-(2-chlorophenyl)-9-methyl-6H-1-thia-5,7,8,9a-tetraazacyclopenta[e]azulene(IUPAC)

2-Bromo-4-(2-chlorophenyl)-9-methyl-6H-thieno[3,2-f][1,2,4]triazolo[4,3a][1,4]diazepine(CAS)

【構造式】



2. 分析対象化合物の物理化学的性質

一般名	ブロチゾラム
CAS 番号	57801-81-7
分子式	C ₁₅ H ₁₀ BrClN ₄ S
分子量 ¹⁾	393.69
形状 ¹⁾	結晶性粉末～粉末
色 ¹⁾	白色～ほとんど白色
融点 (分解点) ¹⁾	212～214℃
安定性 ¹⁾	光により変質する
オクタノール/水分配係数 ²⁾	2.79
クロロホルム/水分配係数 ³⁾	1.01×10 ⁴ (pH 7.0)
溶解性 ³⁾	溶媒名：1 g を溶かすのに要する溶媒量 (mL) <ul style="list-style-type: none"> ・ 酢酸：2.4 ・ ジクロロメタン：6.1～6.3 ・ メタノール：62～65 ・ エタノール：111 ・ アセトン：109～110 ・ 2-ブタノン：107～109 ・ 無水ジエチルエーテル：3,700～3,720 ・ 水：10,000 以上
蒸気圧	-
酸塩基解離定数 ³⁾	pKa：2.1 (25℃、吸光度測定法)

出典：1)製品安全データシート (和光純薬工業株式会社)

2)ChemIDplus Advanced

(<http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/>、United States National Library of Medicine)

3)医薬品インタビューフォーム レンドルミン錠

(日本ベーリンガーインゲルハイム株式会社)

3. 基準値

暫定基準値 (平成 17 年 11 月 29 日付厚生労働省告示第 499 号による)

全食品： 0.001 ppm

基準値案 (平成 18 年 10 月 16 日付厚生労働省発食安第 1016003 号による)

牛の筋肉： 0.001 ppm

牛の脂肪： 0.002 ppm

牛の肝臓： 0.003 ppm

牛の腎臓： 0.002 ppm

牛の食用部分： 0.002 ppm

乳： 0.001 ppm

その他の食品： 不検出

定量限界の目標値： 0.0005 mg/kg 以下

[実験方法]

1. 試料

以下の市販の 10 食品を使用した。

- ・牛の筋肉
- ・牛の脂肪
- ・牛の肝臓
- ・さけ
- ・うなぎ
- ・しじみ
- ・牛乳
- ・鶏卵
- ・はちみつ (百花蜜)
- ・豚の筋肉

購入先： スーパーマーケット (うなぎ、しじみ以外) 購入地：埼玉県
 インターネット販売 (うなぎ (静岡県、鹿児島県他産)、しじみ (北海道産))

試料の前処理

- 牛の筋肉及び豚の筋肉 : 可能な限り脂肪層を除き、細切均一化した。
- 牛の脂肪 : 可能な限り筋肉層を除き、細切均一化した。
- 牛の肝臓 : 細切均一化した。
- さけ : 皮を含む可食部を細切均一化した。
- うなぎ : 皮、内臓を含む可食部を細切均一化した。
- しじみ : 殻を除去し、細切均一化した。
- 牛乳及びはちみつ : よく混合して均一化した。
- 鶏卵 : 殻を除去し、卵白と卵黄を合わせてよく混合し、均一化した。

2. 試薬・試液

1) 試薬

試薬	規格	メーカー
プロチゾラム標準品	高速液体クロマトグラフィ用、100% 融点 212~214°C	和光純薬工業 (株)
アセトニトリル	残留農薬試験用 300 倍 濃縮	関東化学 (株)
n-ヘキサン	残留農薬試験用 300 倍 濃縮	関東化学 (株)
アセトン	残留農薬試験用 300 倍 濃縮	関東化学 (株)
アセトニトリル	LC-MS 用	和光純薬工業 (株)
無水硫酸ナトリウム	特級	関東化学 (株)
塩化ナトリウム	特級	和光純薬工業 (株)
ギ酸	LC-MS 用	和光純薬工業 (株)
InertSep C18 ミニカラム	充填量 1 g	ジーエルサイエンス (株)
InertSep SAX/PSA ミニカラム	充填量 500 mg/500 mg	ジーエルサイエンス (株)
InertSep PSA ミニカラム	充填量 500 mg	ジーエルサイエンス (株)
InertSep SAX ミニカラム	充填量 500 mg	ジーエルサイエンス (株)
ケイソウ土 (セライト 545)		和光純薬工業 (株)

2) 試液

0.1vol%ギ酸 : ギ酸 1 mL を水で希釈し、1 L とした。

アセトニトリル・水 (1 : 1) 混液 : アセトニトリル (LC-MS 用) 500 mL に水 500 mL を加えて調製した。

3) 標準溶液

ブロチゾラム標準品 10 mg を精秤し、アセトニトリルに溶解して 10 mL に定容したものを 1000 mg/L 標準原液とした。この標準原液をアセトニトリル及び水 (1 : 1) 混液を用いて適宜希釈し、検量線作成用の 0.0005 mg/L ~ 0.01 mg/L 標準溶液を調製した。

なお、その他の添加試料や検討に用いた標準溶液についても、この標準原液を適切な溶媒 (各項目に記載) を用いて適宜希釈し、それぞれ設定濃度の標準溶液を調製した。

3. 装置

使用した装置の型式、構成等

	型 式	製 造 元
MS 装置	API4000	Applied Biosystems 社 (現エービーサイエックス社)
LC 装置	Agilent 1100	アジレントテクノロジー社
ホモジナイザー	マルチディスパーサー PB95	(株) エスエムテア

4. 測定条件

LC 条件																						
カラム	L-column2 ODS サイズ : 内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm 会社 : (一財) 化学物質評価研究機構																					
移動相流速 (mL/min)	0.20																					
注入量 (μL)	5																					
カラム温度 (°C)	40																					
移動相	A 液 : 0.1vol%ギ酸 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>70</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>15.0</td> <td>30</td> <td>70</td> </tr> <tr> <td>15.1</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>20.0</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>20.1</td> <td>70</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>25.0</td> <td>STOP</td> <td>STOP</td> </tr> </tbody> </table>	時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)	0.0	70	30	15.0	30	70	15.1	0	100	20.0	0	100	20.1	70	30	25.0	STOP	STOP
時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)																				
0.0	70	30																				
15.0	30	70																				
15.1	0	100																				
20.0	0	100																				
20.1	70	30																				
25.0	STOP	STOP																				

MS 条件	
測定モード	選択反応モニタリング (SRM)
イオン化モード	エレクトロスプレーイオン化法、ポジティブモード (ESI+)
Collision Gas	7.00 (単位なし)
Curtain Gas	50 psi
Ion Source Gas1	70 psi
Ion Source Gas2	80 psi
IonSpray Voltage	5500 V
TurboIonSpray Source 温度	600°C
定量イオン (m/z)	+395→314 (コリジョンエネルギー35 eV)
定性イオン (m/z)	+395→316 (コリジョンエネルギー35 eV)
保持時間 (min)	12.4

5. 定量

ブロチゾラム標準品のアセトニトリル・水 (1:1) 溶液 (0.00025~0.009 mg/L) を 6 点調製し、それぞれ 5 μ L を LC-MS/MS に注入し、ピーク面積法で検量線を作成した。この検量線を用い、絶対検量線法で定量した。

6. 試験溶液の調製

1) 抽出

①筋肉、脂肪、肝臓及び魚介類の場合

筋肉、肝臓及び魚介類の場合は、試料を細切均一化した後、その 10.0 g を量り採った。脂肪の場合は、試料を細切均一化した後、その 5.00 g を量り採った。量り採った試料に、添加後の濃度が各試料における基準値案と同じ濃度になるように調製した標準溶液を、表 1 に従ってホールピペットを用いて添加し、よく混合して 30 分放置したものを用いた。

これにアセトン及び *n*-ヘキサン混液 (1:1) 50 mL を加え、3 分間ホモジナイズした後、ケイソウ土を約 7 mm の厚さに敷いたろ紙を用いて吸引ろ過した。ろ紙上の残留物を採り、新たにアセトン及び *n*-ヘキサン混液 (1:1) 25 mL を加え、3 分間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、40°C 以下で約 15 mL まで濃縮した。これに飽和食塩水 100 mL を加え、酢酸エチル 100 mL 及び 50 mL で 2 回振とう抽出した。抽出液に無水硫酸ナトリウムを加えて脱水し、無水硫酸ナトリウムをろ別した後、40°C 以下で濃縮し、溶媒を除去した。

この残留物に *n*-ヘキサン 30 mL を加え、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL ずつで 2 回振とう抽出した。アセトニトリル層を合わせ、40°C 以下で約 5 mL まで濃縮した。

表 1 各試料への添加溶液 (筋肉、脂肪、肝臓及び魚介類)

試料	基準値案 (ppm)	試料量 (g)	添加溶液濃度 (μ g/mL)	添加量 (mL)
牛の筋肉	0.001	10.0	0.020	0.5
牛の脂肪	0.002	5.00	0.020	0.5
牛の肝臓	0.003	10.0	0.030	1.0
さけ	0.0005 (不検出)	10.0	0.010	0.5
うなぎ	0.0005 (不検出)	10.0	0.010	0.5
しじみ	0.0005 (不検出)	10.0	0.010	0.5
豚の筋肉	0.0005 (不検出)	10.0	0.010	0.5

注) 添加溶液: アセトンで調製した溶媒標準溶液

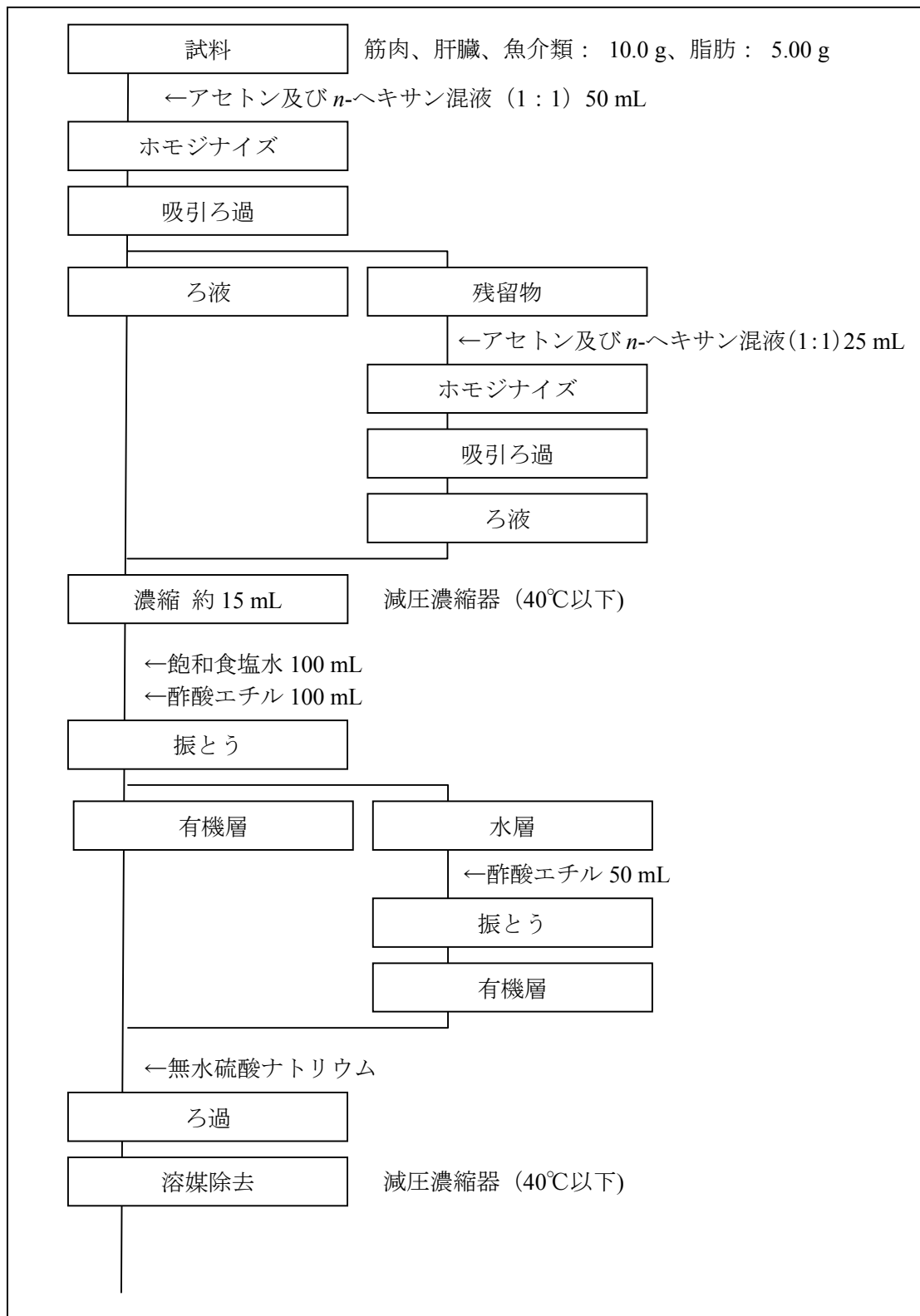


図1 抽出フローチャート（筋肉、脂肪、肝臓及び魚介類の場合）

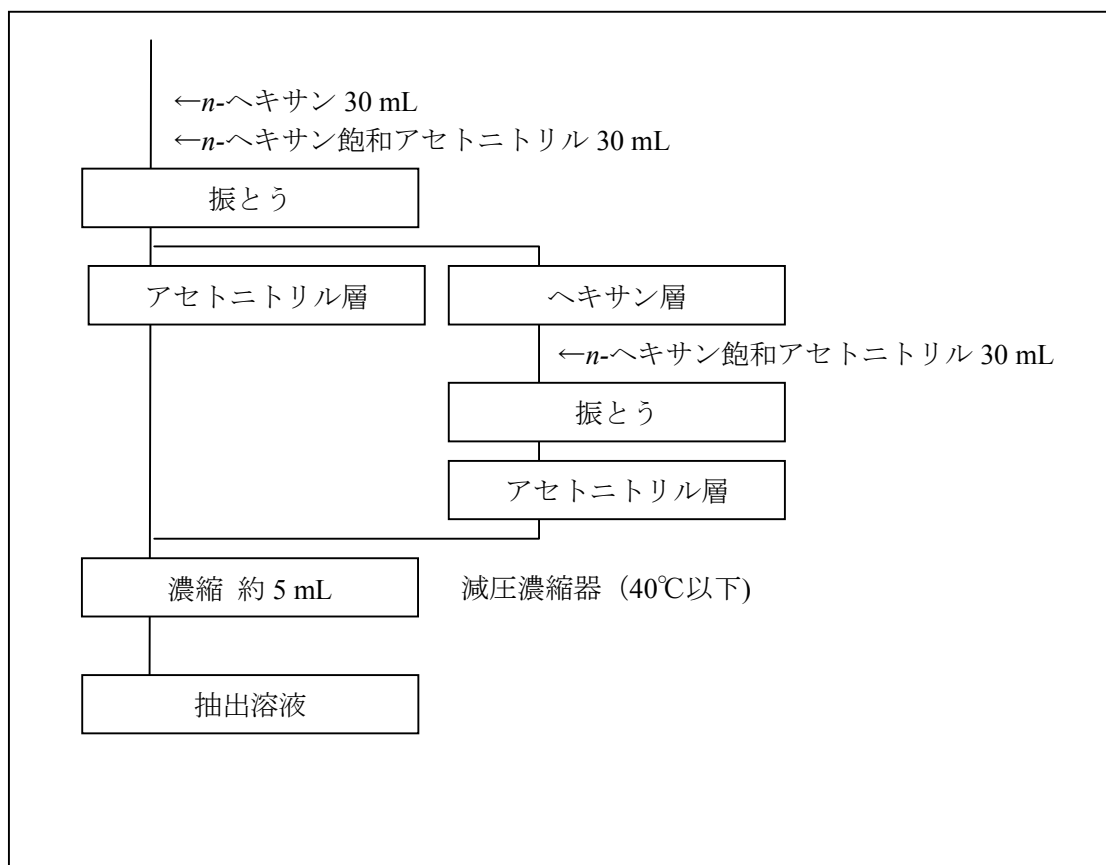


図1 抽出フローチャート つづき（筋肉、脂肪、肝臓及び魚介類の場合）

②牛乳、鶏卵及びはちみつの場合

牛乳及び鶏卵の場合は、試料を均一化した後、その 5.00 g を量り採った。はちみつの場合は、試料を均一化した後、その 5.00 g を量り採り、水 5 mL を加えて溶かした。添加試料とする場合には、量り採った試料（はちみつの場合は水添加前）に添加後の濃度が各試料における基準値案と同じ濃度になるように調製した標準溶液を、表 2 に従ってホールピペットを用いて添加し、よく混合して 30 分放置したものを用いた。

これにアセトニトリル 30 mL を加えて 3 分間ホモジナイズした後、毎分 2500 回転で 5 分間遠心分離し、アセトニトリル層を採った。残留物（はちみつの場合は残留物及び水層）にアセトニトリル 20 mL を加え、3 分間ホモジナイズした後、毎分 2500 回転で 5 分間遠心分離し、アセトニトリル層を採った。得られたアセトニトリル層を合わせ、これに無水硫酸ナトリウムを加えて脱水し、無水硫酸ナトリウムをろ別した後、40°C 以下で約 5 mL まで濃縮した。

表 2 各試料への添加溶液（乳、卵及びはちみつ）

試料	基準値案 (ppm)	試料量 (g)	添加溶液濃度 (mg/L)	添加量 (mL)
牛乳	0.001	5.00	0.010	0.5
鶏卵	0.0005 (不検出)	5.00	0.005	0.5
はちみつ	0.0005 (不検出)	5.00	0.005	0.5

注) はちみつ以外の添加溶液：アセトンで調製した溶媒標準溶液

はちみつの添加溶液：アセトニトリル及び水（1：1）混液で調製した溶媒標準溶液

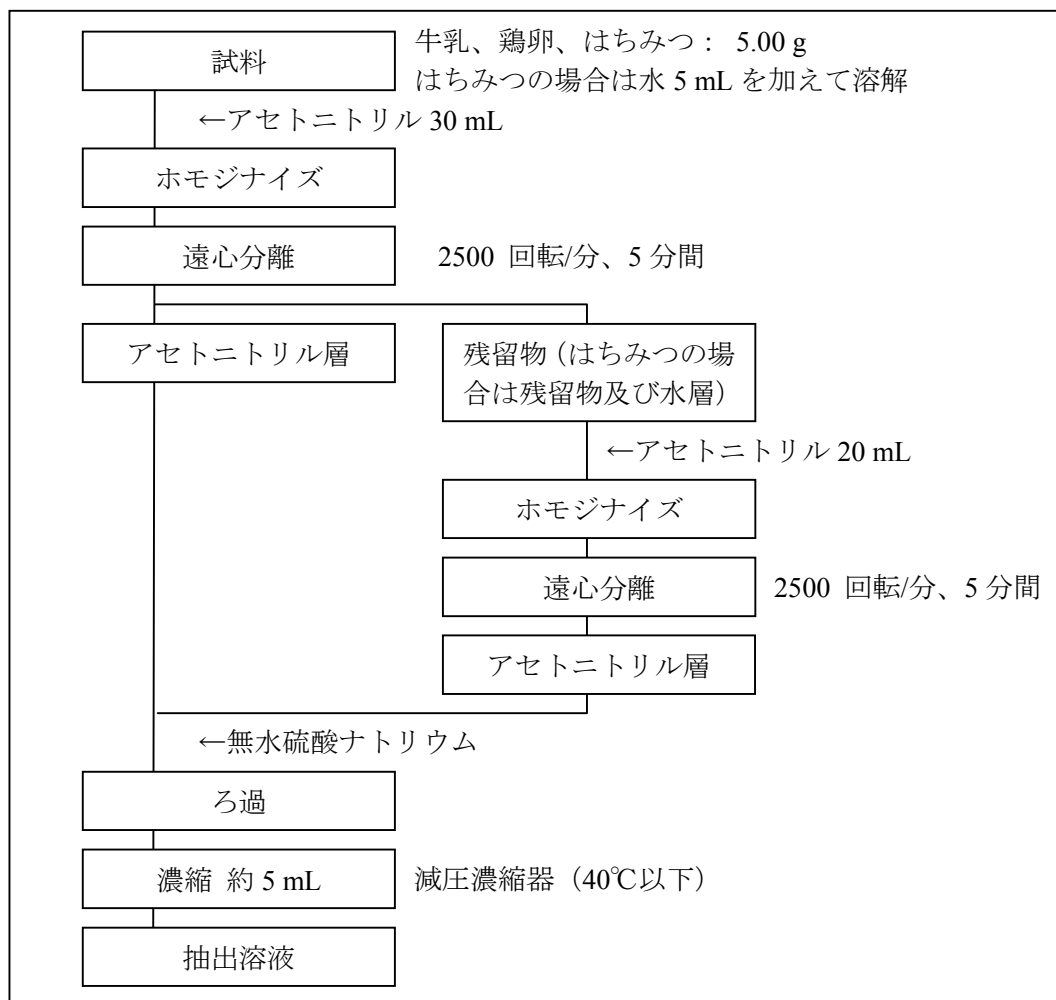


図2 抽出フローチャート（牛乳、鶏卵及びはちみつの場合）

2) 精製（共通）

上段に InertSep C18 ミニカラム（1 g）、下段に InertSep SAX/PSA ミニカラム（500 mg/500 mg）を連結し、アセトニトリル 10 mL を注入し、流出液は捨てた。この連結カラムに 1) で得た抽出液を注入し、さらにアセトニトリル 10 mL を注入して全溶出液を採り、40°C 以下で濃縮して溶媒を除去した。残留物にアセトニトリル及び水（1 : 1）混液 5 mL（脂肪、牛乳、卵及びはちみつの場合は 2.5 mL）を加えて溶かし、これを試験溶液とした。試験溶液中に不溶物が見られた場合は、遠心分離を用いて除去した。

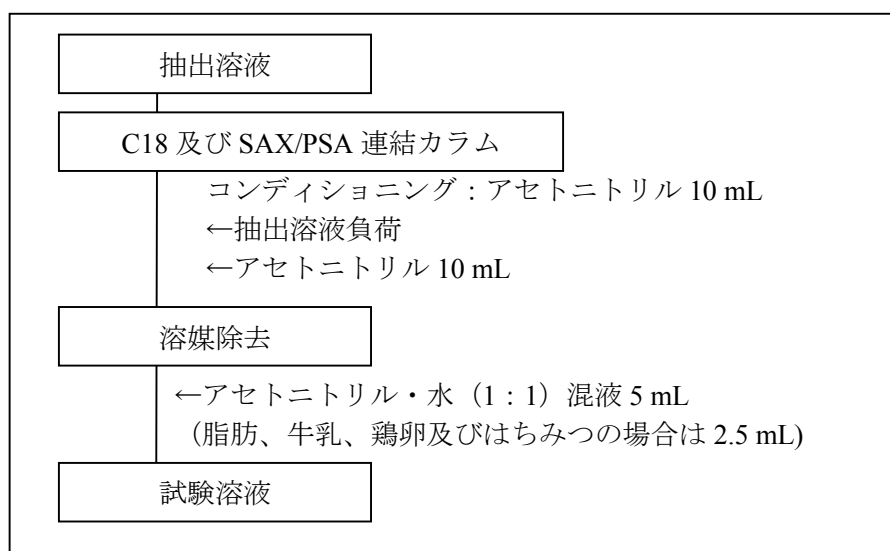


図3 精製フローチャート

7. マトリックス添加標準溶液の調製

添加回収試験における回収率が100%と仮定した場合に基準値案相当濃度となるよう、標準溶液をブランク試料の試験溶液（マトリックス添加標準溶液）及び溶媒（溶媒標準溶液）で調製し、溶媒標準溶液に対するマトリックス添加標準溶液のピーク面積の比を求めて、試料マトリックスの測定への影響について検討した。各標準溶液の詳細を以下に示す。

溶媒標準溶液 : 表3で示した濃度のアセトニトリル・水（1:1）標準溶液

マトリックス添加標準溶液 : 各ブランク試料の試験溶液 1 mL を 40°C以下で濃縮乾固した後、上記の溶媒標準溶液を 1 mL 添加して溶解した溶液

表3 各試料の標準溶液濃度

試料	標準溶液濃度 (mg/L)
牛の筋肉	0.002
牛の脂肪	0.004
牛の肝臓	0.006
さけ	0.001
うなぎ	0.001
しじみ	0.001
豚の筋肉	0.001
牛乳	0.002
鶏卵	0.001
はちみつ	0.001

[結果及び考察]

1. 測定条件の検討 (LC-MS/MS)

1) LC 条件

アセトニトリル及び 0.1vol%ギ酸の混液 (3 : 7) から (7 : 3) までの濃度勾配を 15 分間で実施する条件で測定した、アセトニトリル・水 (1 : 1) 混液で調製したブロチゾラム標準溶液 (0.005 mg/L) のクロマトグラムを図 4 に示す。ブロチゾラムはこの測定条件では 13 分付近にピークが認められた。

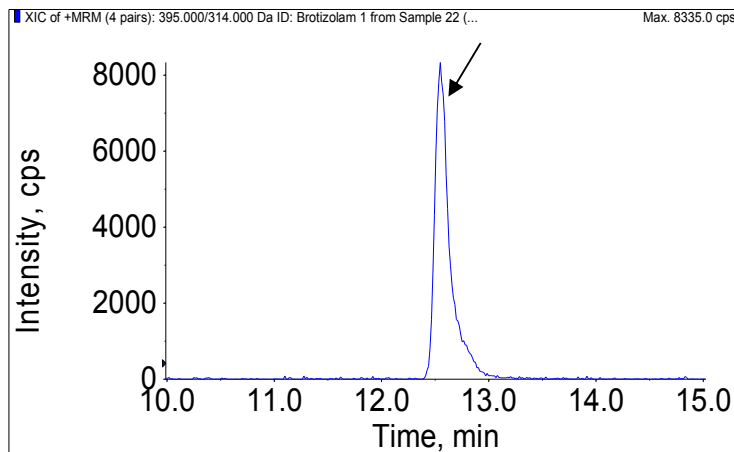


図 4 溶媒標準溶液 0.005 mg/L の SRM クロマトグラム (m/z 395→314)

2) MS 条件

① マススペクトル (スキャン測定)

IonSprayVoltage (ISV) を 4500、5000 及び 5500V とした際の、ブロチゾラムのマススペクトルをそれぞれ図 5~7 に示す。各 ISV 条件において、基準ピークとしてブロチゾラムのプロトン付加分子 $[M+H]^+$ である m/z 395 が検出された。このイオンを SRM 分析におけるプリカーサーイオンとし、ISV はこのイオンが最も高感度で検出された 5500 V とした。

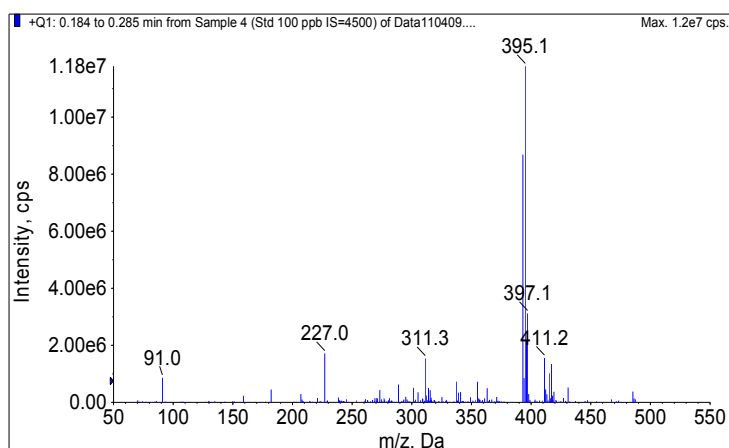


図 5 ブロチゾラムのマススペクトル
スキャン範囲 : 50~550 amu
測定条件 : ESI+, ISV=4500

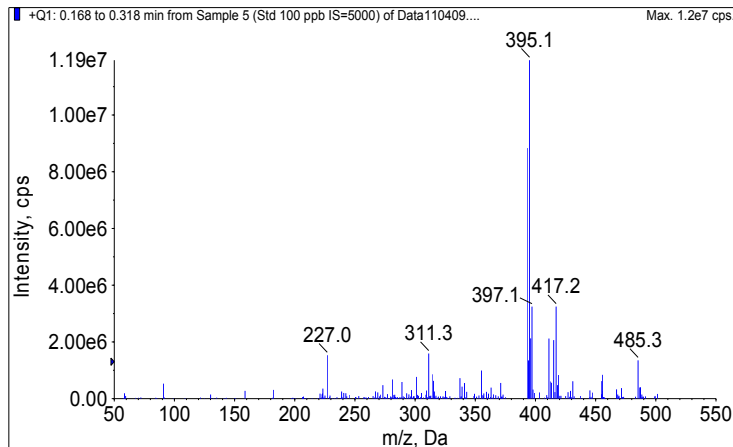


図 6 ブロチゾラムのマススペクトル
 スキャン範囲：50～550 amu
 測定条件：ESI+、ISV=5000

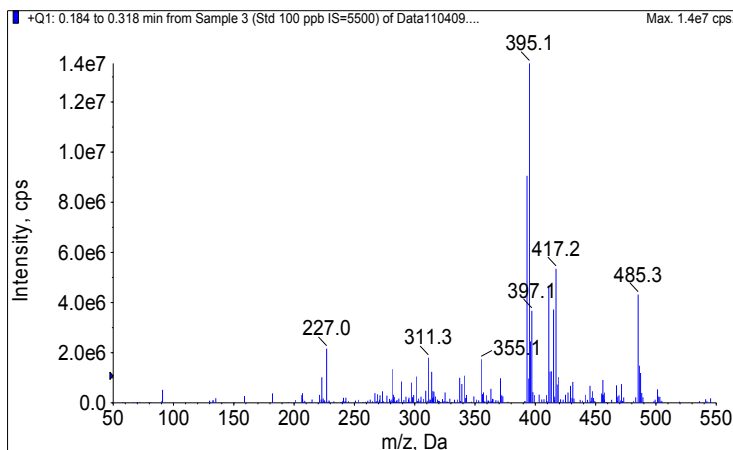


図 7 ブロチゾラムのマススペクトル
 スキャン範囲：50～550 amu
 測定条件：ESI+、ISV=5500

②プロダクトイオンスキャン測定

Collision energy (CE) 10、20、30、35 及び 40 eV における、 m/z 395 をプリカーサーイオンとしたプロダクトイオンスキャンのマススペクトルを図 8～12 に示す。各 CE において、 $[M-Br]^+$ と考えられる m/z 314 が最も高感度で検出されたため、このイオンを定量イオンとした。また、確認用イオンとして $[M-Br]^+$ の同位体イオンである m/z 316 を選択した。CE は、最も m/z 314 が高感度であった 35 eV とした。

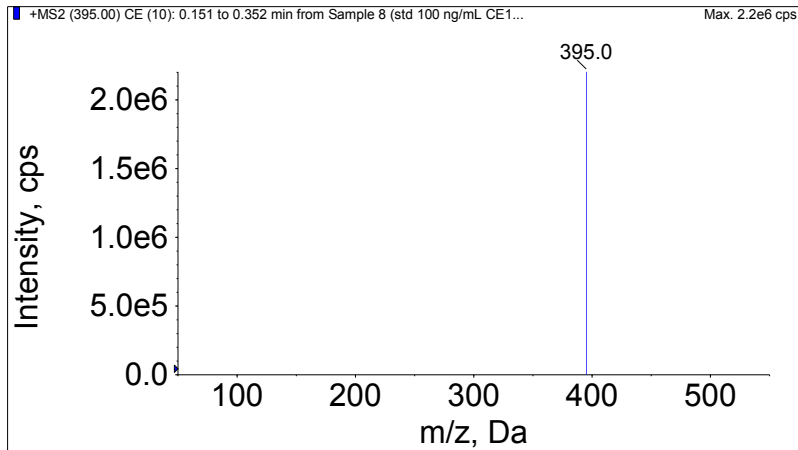


図 8 ブロチゾラムのプロダクトイオンスキャンスペクトル
 プリカーサーイオン : m/z 395
 測定条件 : ESI+, ISV=5500 V、CE=10 eV

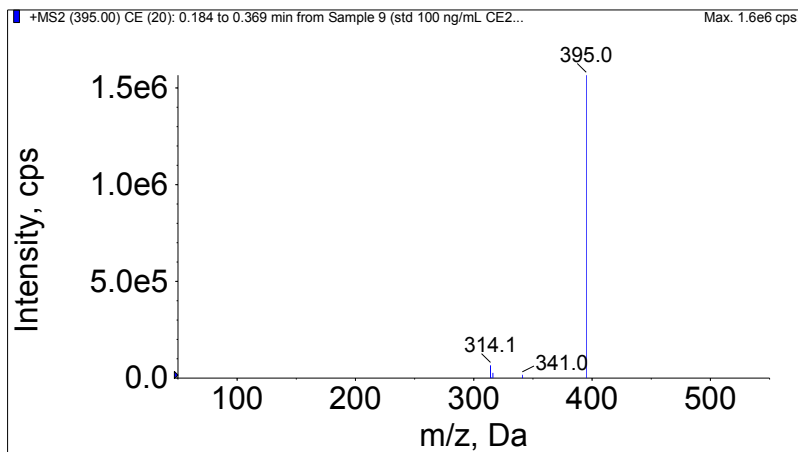


図 9 ブロチゾラムのプロダクトイオンスキャンスペクトル
 プリカーサーイオン : m/z 395
 測定条件 : ESI+, ISV=5500 V、CE=20 eV

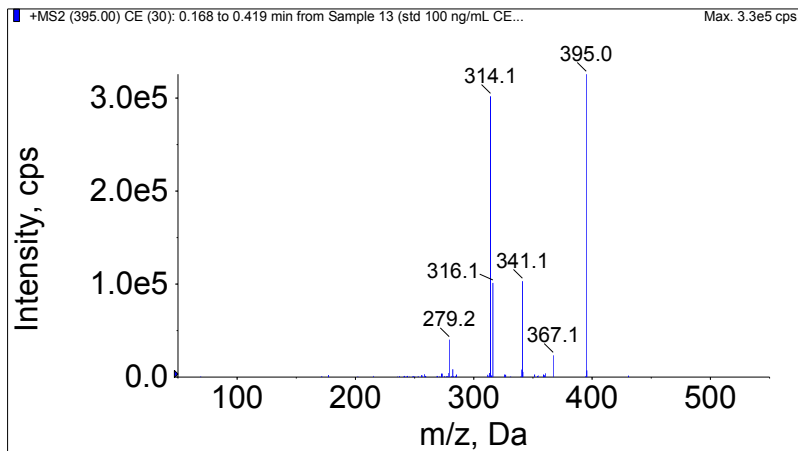


図 10 ブロチゾラムのプロダクトイオンスキャンスペクトル
 プリカーサーイオン : m/z 395
 測定条件 : ESI+, ISV=5500 V、CE=30 eV

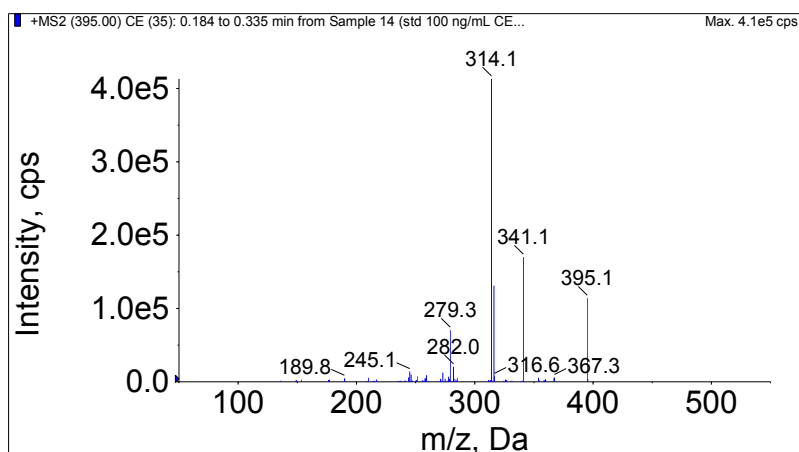


図 11 ブロチゾラムのプロダクトイオンキャンスペクトル
 プリカーサーイオン : m/z 395
 測定条件 : ESI+, ISV=5500 V、CE=35 eV

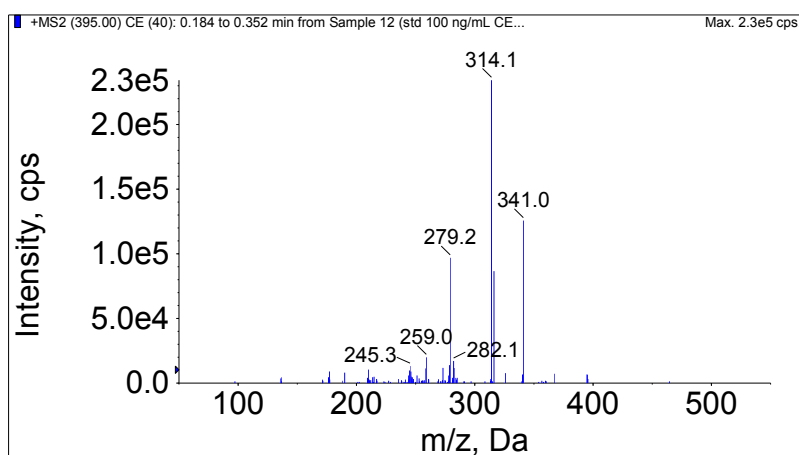


図 12 ブロチゾラムのプロダクトイオンキャンスペクトル
 プリカーサーイオン : m/z 395
 測定条件 : ESI+, ISV=5500 V、CE=40 eV

3) 検量線

図 13~16 にブロチゾラムの検量線の例を示した。0.00025~0.0015 mg/L、0.0005~0.003 mg/L、0.001~0.006 mg/L 及び 0.0015~0.009 mg/L の各濃度範囲で、それぞれ作成した検量線の相関係数はいずれも 0.995 以上の良好な直線性を示した。

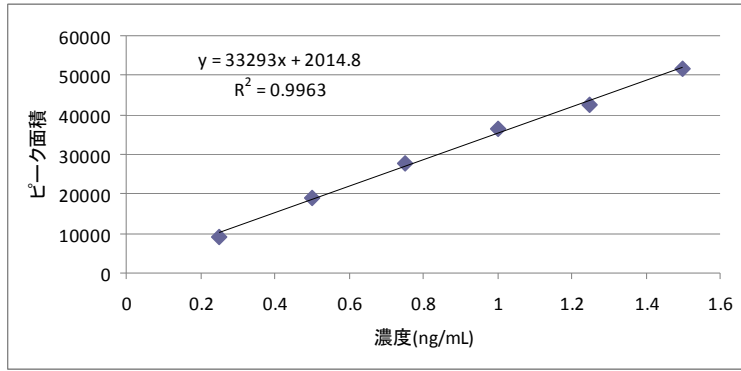


図 13 LC-MS/MS によるブロチゾラム検量線の測定例(0.00025~0.0015 mg/L)

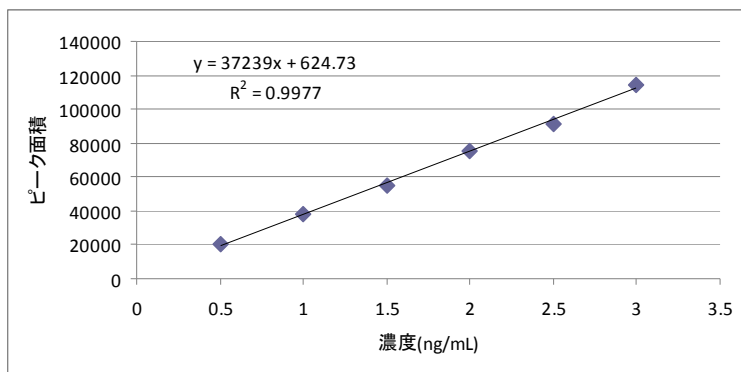


図 14 LC-MS/MS によるブロチゾラム検量線の測定例(0.0005~0.003 mg/L)

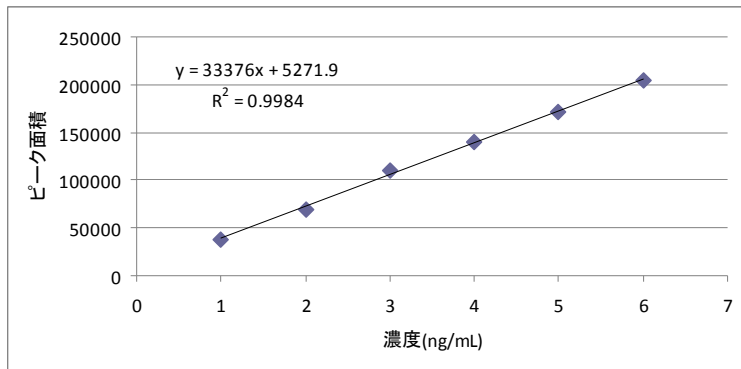


図 15 LC-MS/MS によるブロチゾラム検量線の測定例(0.001~0.006 mg/L)

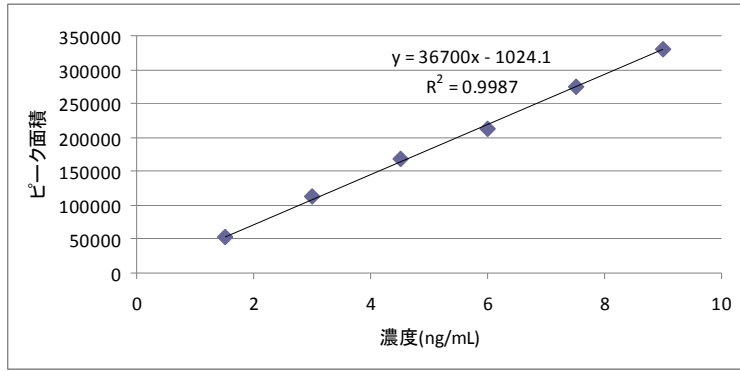


図 16 LC-MS/MS によるブロチゾラム検量線の測定例(0.0015~0.009 mg/L)

4) 定量限界

本試験法では 0.0005 mg/kg を目標定量下限値とした。溶媒標準溶液 0.001 mg/L (定量限界に相当) のクロマトグラムを図 17 及び図 18 に示す。また、S/N 比の計算結果を表 4 に示す。定量限界相当の溶媒標準溶液の m/z 395→314 (定量イオン) 及び m/z 395→316 (定性イオン) においてピーク強度 $S/N \geq 10$ の信号が得られた。

表 4 S/N 比計算結果

測定イオン	ピークの最大値 (Dmax)	ノイズの最大値 (E1)	ノイズの最小値 (E2)	ノイズの中央値 (C) *1	ピークトップ (D)	ピーク高さ (S)	ノイズ幅 (N)	S/N 比
m/z 395→314	2055	85	0	43	2038	1996	34.0	59
m/z 395→316	745	80	0	40	729	689	32.0	22

*1 E1 と E2 の平均値を使用。

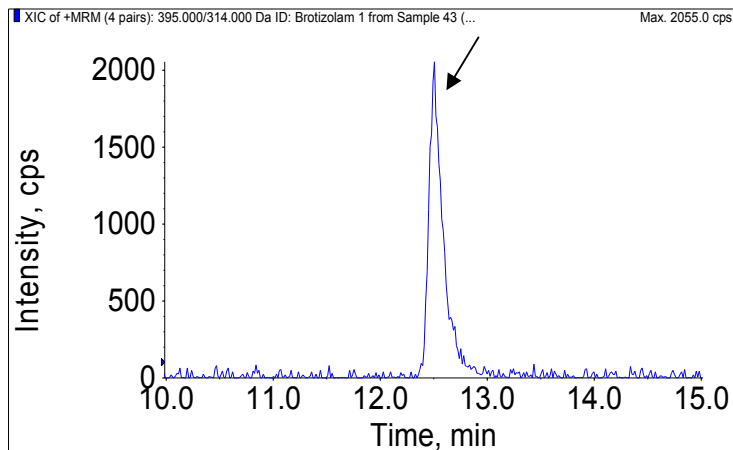


図 17 溶媒標準溶液 0.001 mg/L の SRM クロマトグラム (m/z 395→314 (定量イオン))

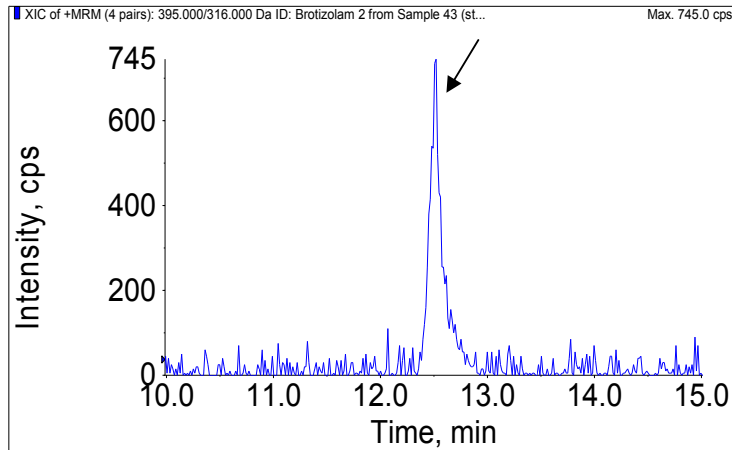


図 18 溶媒標準溶液 0.001 mg/L の SRM クロマトグラム (m/z 395→316 (定性イオン))

2. 試験溶液調製法の検討

1) 抽出方法の検討

①抽出溶媒の検討 1 (固体試料)

牛の筋肉を試料とし、抽出溶媒の検討を行った。対象とする抽出溶媒は、アセトン及び n -ヘキサン混液 (1 : 2) 並びにアセトン及び n -ヘキサン混液 (1 : 1) とした。試料を細切均一化した後、その 10.0 g を量り採り、アセトンで調製した標準溶液をホールピペットを用いて表 1 に従って添加し、よく混合して 30 分放置した。これに上記の抽出溶媒 30 mL をそれぞれ加え、3 分間ホモジナイズした後、ろ紙 (No.5B) を用いて吸引ろ過した。ろ紙上の残留物を採り、新たに抽出溶媒 30 mL を加え、3 分間ホモジナイズした後、吸引ろ過した。得られたろ液を 40°C 以下で濃縮し、残留物及び 5 mL 程度残った水層に n -ヘキサン 30 mL を加え、 n -ヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL ずつで 2 回振とう抽出した。抽出液を合わせ、これに無水硫酸ナトリウムを加えて脱水し、無水硫酸ナトリウムをろ別した後、40°C 以下で約 5 mL に濃縮した。以降は[実験方法]6. 試験溶液の調製と同様に操作して試験溶液を調製し、分析に供した。

結果を表 5 に示す。回収率はアセトン及び n -ヘキサン混液 (1 : 2) の約 90% に対し、アセトン及び n -ヘキサン混液 (1 : 1) は約 100% であり、アセトンの比率が高い場合により良好な回収率が得られた。

表 5 抽出溶媒検討結果 (試料：牛の筋肉、 $n=2$)

抽出溶媒	マトリックス影響 (%) *1	回収率 (%)			
		マトリックス補正有*2		マトリックス補正無	
		回収率	平均	回収率	平均
アセトン及び n -ヘキサン混液 (1 : 1)	100	104	104	104	103
		103		103	
アセトン及び n -ヘキサン混液 (1 : 2)	103	87.6	88.3	90.4	91.1
		89.0		91.8	

*1 マトリックス影響:マトリックス添加標準溶液の面積値を溶媒標準溶液の面積値で除した値に 100 を乗じて算出した。

*2 マトリックス添加標準溶液を基準として算出。

②抽出溶媒の検討 2 (固体試料)

抽出溶媒の検討 1 において抽出溶媒のアセトンの比率が高い場合により良好な回収率が得られていたことから、アセトンを抽出溶媒として添加回収試験を実施し、アセトン及び *n*-ヘキサン混液 (1 : 1) を使用した場合と比較した。検討用試料として、しじみ及び牛の脂肪を用いた。

各試料を細切均一化した後、その 10.0 g (脂肪は 5.00 g) を量り採った。各試料にアセトンで調製した標準溶液をホールピペットを用いて表 1 に従って添加し、よく混合して 30 分放置した。これに上記の抽出溶媒 60 mL をそれぞれ加え、3 分間ホモジナイズした後、ろ紙 (No.5B) を用いて吸引ろ過した。ろ紙上の残留物を採り、新たに抽出溶媒 60 mL を加え、3 分間ホモジナイズした後、吸引ろ過した。以降は[実験方法]6. 試験溶液の調製と同様に操作して試験溶液を調製し、分析に供した。

結果を表 6 に示す。しじみ、牛の脂肪共に抽出溶媒としてアセトンを用いた場合の回収率が低い結果となった。マトリックス補正を行った場合の回収率においても、牛の脂肪の回収率がアセトン抽出において低下した。また、牛の脂肪のアセトン抽出においては、図 19 のように過飽和となった脂肪分が析出している状況が見られ、この析出が回収率に何らかの影響を与えている可能性がある。しじみ試料のマトリックス補正した回収率は平均 96.3%であり、これに対してマトリックス補正無での回収率が 90.9%であったことから、負の試料マトリックス影響が認められた。これらの結果から、抽出溶媒としてアセトン及び *n*-ヘキサン混液 (1 : 1) を採用することとした。

表 6 抽出溶媒検討結果 (n=2)

試料	抽出溶媒	マトリックス影響 (%) *1	回収率 (%)			
			マトリックス補正有*2		マトリックス補正無	
			回収率	平均	回収率	平均
しじみ	アセトン及び <i>n</i> -ヘキサン 混液 (1 : 1)	102	93.1	93.2	94.8	94.9
			93.3		94.9	
	アセトン	94.1	95.1	96.3	89.9	90.9
			97.4		91.9	
牛の脂肪	アセトン及び <i>n</i> -ヘキサン 混液 (1 : 1)	96.0	96.4	96.7	92.5	92.8
			97.0		93.1	
	アセトン	97.3	88.1	88.5	85.7	86.1
			88.9		86.5	

*1 マトリックス影響:マトリックス添加標準溶液の面積値を溶媒標準溶液の面積値で除した値に 100 を乗じて算出した。

*2 マトリックス添加標準溶液を基準として算出。



図 19 アセトン抽出による抽出液（試料：牛の脂肪）

③セライトろ過条件の検討

本検討前に実施した一部の検討では吸引ろ過時にセライトを用いていなかったが、ろ過補助材として有用であるため使用することとし、セライトろ過条件についての検討を実施した。また、これまで採用していた固形試料の抽出液量(抽出1回目 60 mL、2回目 60 mL)は実施要領で定められている抽出溶媒量と異なっていたため、抽出溶媒量を実施要領に従った1回目 50 mL、2回目 25 mLに変更することとし、本検討もこの条件で実施した。

アセトン及び *n*-ヘキサン混液 (1 : 1) 50 mL にアセトンで調製した 10 ng/mL 標準溶液 1 mL を添加し、セライトを用いたろ過板 (ろ過板の作成方法は下記参照) を用いて吸引ろ過し、ろ液をナスフラスコに受けた。さらにアセトン及び *n*-ヘキサン混液 (1 : 1) 25 mL を吸引ろ過して同じナスフラスコに受け、得られた溶液を 40°C 以下で濃縮し、溶媒を除去した。残留物をアセトニトリル及び水混液 (1 : 1) に溶かして 10 mL に定容し、試験溶液とした。

<ろ過板の作成>

a 水で作成

No.5B ろ紙を内径 60 mm の桐山ロート上に置き、ポンプで吸引しながら抽出溶媒(アセトン及び *n*-ヘキサン(1 : 1)混液)で洗浄した。セライト約 7 g をビーカーに取り、超純水を加えて攪拌してスラリー状にしたものをろ紙上に入れ、わずかに吸引しながら桐山ロートを水平方向に回転させて均一な層とした。ほぼ液滴が落ちなくなるまで吸引し、ろ過板を作成した。

b 抽出溶媒で作成

No.5B ろ紙を内径 60 mm の桐山ロート上に置き、ポンプで吸引しながら抽出溶媒(アセトン及び *n*-ヘキサン(1 : 1)混液)で洗浄した。セライト約 7 g をビーカーに取り、抽出溶媒(アセトン及び *n*-ヘキサン(1 : 1)混液)を加えて攪拌してスラリー状にしたものをろ紙上に入れ、わずかに吸引しながら桐山ロートを水平方向に回転させて均一な層とした。ほぼ液滴が落ちなくなるまで吸引し、ろ過板を作成した。

c セライトなし

No.5B ろ紙を内径 60 mm の桐山ロート上に置き、ポンプで吸引しながら抽出溶媒(アセトン及び *n*-ヘキサン(1 : 1)混液)で洗浄した。

結果を表 7 に示す。いずれのろ過板の作成方法を用いた場合でも、回収率の低下は認められなかった。

表 7 セライトろ過条件検討結果 (n=3)

セライト条件	回収率 (%)	平均(%)	RSD(%)
a 水で作成	100	98.5	2
	96.8		
	106		
b 溶媒で作成	102	101	1
	101		
	101		
c セライトなし	100	-	-

④ろ過板の作成方法による回収率等への影響検討

③においてろ過板の作成方法によらず回収率の低下は認められなかったが、試料マトリックス存在下においては異なる挙動を示す可能性を考慮し、ろ過板の作成条件による回収率等への影響を検討した。

各試料を細切均一化した後、その 10.0 g (脂肪は 5.00 g) を量り採った。各試料にアセトンで調製した標準溶液をホールピペットを用いて表 1 に従って添加し、よく混合して 30 分放置した。これにアセトン及び *n*-ヘキサン混液 (1 : 1) 50 mL をそれぞれ加え、3 分間ホモジナイズした後、セライトを用いたろ過板 (No.5B、ろ過板の作成方法は③参照) を用いて吸引ろ過した。ろ紙上の残留物を採り、新たに抽出溶媒 25 mL を加え、3 分間ホモジナイズした後、吸引ろ過した。以降は[実験方法] 6. 試験溶液の調製と同様に操作して試験溶液を調製し、分析に供した。

詳細な結果を表 8~14 に、回収率、マトリックス影響補正回収率及びマトリックス影響のまとめを表 15、表 16 及び表 17 に示す。全ての試料及び条件において著しい回収率の低下は認められず、回収率は 70~120% の範囲内であった。また、RSD はいずれの試料・条件においても 10% 未満であった。本検討及び③の結果より、標準溶液及びマトリックス存在下のいずれにおいても、セライトへの吸着は認められなかった。ろ過板の作成条件による大きな差は無かったが、試験のコスト及び環境負荷を軽減するため、水による調製を採用することとした。また、溶媒抽出量 1 回目 50 mL、2 回目 25 mL の条件において十分にプロチゾラムが回収されていることが確認された。

表8 ろ過条件による回収率等への影響（試料：牛の筋肉）

セライト	マトリックス 影響(%)	回収率(%)					
		マトリックス補正有			マトリックス補正無		
		回収率	平均	RSD	回収率	平均	RSD
水で作成	106	87.9	89.3	2	92.9	94.4	2
		91.1			96.3		
		88.9			94.0		
溶媒で 作成	110	85.8	86.9	1	94.2	95.4	1
		87.9			96.4		
		87.0			95.5		
なし	108	88.0	90.6	-	95.0	97.8	-
		93.2			101		

*1 マトリックス影響：マトリックス添加標準溶液の面積値を溶媒標準溶液の面積値で除した値に100を乗じて算出した。

*2 マトリックス添加標準溶液を基準として算出。

表9 ろ過条件による回収率等への影響（試料：牛の脂肪）

セライト	マトリックス 影響(%)	回収率(%)					
		マトリックス補正有			マトリックス補正無		
		回収率	平均	RSD	回収率	平均	RSD
水で作成	99.3	89.2	93.5	4	88.6	92.9	4
		97.5			96.8		
		93.8			93.2		
溶媒で 作成	96.0	105	105	1	101	101	1
		104			100		
		106			102		
なし	98.4	95.1	97.7	-	93.6	96.2	-
		100			98.7		

*1 マトリックス影響：マトリックス添加標準溶液の面積値を溶媒標準溶液の面積値で除した値に100を乗じて算出した。

*2 マトリックス添加標準溶液を基準として算出。

表 10 ろ過条件による回収率等への影響 (試料：牛の肝臓)

セライト	マトリックス 影響(%)	回収率(%)					
		マトリックス補正有			マトリックス補正無		
		回収率	平均	RSD	回収率	平均	RSD
水で作成	96.1	91.7	93.3	3	88.1	89.7	3
		92.1			88.5		
		96.1			92.4		
溶媒で 作成	87.9	109	107	5	95.8	94.1	5
		101			89.1		
		111			97.4		
なし	98.7	97.9	100	-	93.7	95.7	-
		102			97.7		

*1 マトリックス影響：マトリックス添加標準溶液の面積値を溶媒標準溶液の面積値で除した値に 100 を乗じて算出した。

*2 マトリックス添加標準溶液を基準として算出。

表 11 ろ過条件による回収率等への影響 (試料：さけ)

セライト	マトリックス 影響(%)	回収率(%)					
		マトリックス補正有			マトリックス補正無		
		回収率	平均	RSD	回収率	平均	RSD
水で作成	94.3	85.3	91.1	6	80.5	85.9	6
		91.0			85.8		
		96.9			91.3		
溶媒で 作成	94.8	91.8	95.8	4	87.0	90.8	4
		95.7			90.7		
		99.9			94.7		
なし	97.7	94.9	94.6	-	92.7	92.4	-
		94.3			92.1		

*1 マトリックス影響：マトリックス添加標準溶液の面積値を溶媒標準溶液の面積値で除した値に 100 を乗じて算出した。

*2 マトリックス添加標準溶液を基準として算出。

表 12 ろ過条件による回収率等への影響 (試料：うなぎ)

セライト	マトリックス 影響(%)	回収率(%)					
		マトリックス補正有			マトリックス補正無		
		回収率	平均	RSD	回収率	平均	RSD
水で作成	95.1	91.4	95.3	5	86.9	90.7	5
		100			95.5		
		94.2			89.6		
溶媒で 作成	95.3	102	98.3	3	96.8	93.6	3
		95.1			90.6		
		98.1			93.4		
なし	96.9	90.2	92.1	-	87.4	89.3	-
		94.1			91.1		

*1 マトリックス影響：マトリックス添加標準溶液の面積値を溶媒標準溶液の面積値で除した値に 100 を乗じて算出した。

*2 マトリックス添加標準溶液を基準として算出。

表 13 ろ過条件による回収率等への影響 (試料：しじみ)

セライト	マトリックス 影響(%)	回収率(%)					
		マトリックス補正有			マトリックス補正無		
		回収率	平均	RSD	回収率	平均	RSD
水で作成	92.6	99.9	100	1	92.5	92.9	1
		101			93.8		
		99.5			92.4		
溶媒で 作成	103	86.9	92.6	5	89.2	95.1	5
		95.3			97.8		
		95.7			98.2		
なし	92.9	104	105	-	96.5	98.0	-
		107			99.4		

*1 マトリックス影響：マトリックス添加標準溶液の面積値を溶媒標準溶液の面積値で除した値に 100 を乗じて算出した。

*2 マトリックス添加標準溶液を基準として算出。

表 14 ろ過条件による回収率等への影響（試料：豚の筋肉）

セライト	マトリックス 影響(%)	回収率(%)					
		マトリックス補正有			マトリックス補正無		
		回収率	平均	RSD	回収率	平均	RSD
水で作成	102	86.1	91.0	9	87.6	92.6	9
		100			102		
		86.6			88.1		
溶媒で 作成	93.2	98.4	97.6	6	91.7	91.0	6
		103			96.0		
		91.5			85.3		
なし	93.7	94.8	98.6	-	88.9	92.4	-
		102			95.8		

*1 マトリックス影響：マトリックス添加標準溶液の面積値を溶媒標準溶液の面積値で除した値に100を乗じて算出した。

*2 マトリックス添加標準溶液を基準として算出。

表 15 平均回収率(上段)及びRSD(下段)まとめ—マトリックス補正有

(単位：%)

セライト	牛筋肉	牛脂肪	牛肝臓	さけ	うなぎ	しじみ	豚筋肉
水で作成	89	94	93	91	95	100	91
	2	4	3	6	5	1	9
溶媒で 作成	87	105	107	96	98	93	98
	1	1	5	4	3	5	6
なし	91	98	100	95	92	105	99
	-	-	-	-	-	-	-

表 16 平均回収率(上段)及びRSD(下段)まとめ—マトリックス補正無

(単位：%)

セライト	牛筋肉	牛脂肪	牛肝臓	さけ	うなぎ	しじみ	豚筋肉
水で作成	94	93	90	86	91	93	93
	2	4	3	6	5	1	9
溶媒で 作成	95	101	94	91	94	95	91
	1	1	5	4	3	5	6
なし	98	96	96	92	89	98	92
	-	-	-	-	-	-	-

表 17 マトリックス影響まとめ

(単位：%)

セライト	牛筋肉	牛脂肪	牛肝臓	さけ	うなぎ	しじみ	豚筋肉
水で作成	106	99	96	94	95	93	102
溶媒で 作成	110	96	88	95	95	103	93
なし	108	98	96	98	97	93	94

⑤液体試料の抽出

液体試料からの抽出条件検討を行った。液体試料からの抽出は液々分配と見なせるため、アセトニトリルを抽出溶媒とした。また、抽出操作の検討としてホモジナイズ抽出と、より簡便な操作である振とう抽出を実施し、結果を比較した。

牛乳及び鶏卵の場合は、試料を均一化した後、その 5.00 g を量り採った。はちみつの場合は、試料を均一化した後、その 5.00 g を量り採り、水 5 mL を加えて溶かした。添加試料とする場合には、量り採った試料（はちみつの場合は水添加前）に標準溶液を表 2 に従ってホールピペットを用いて添加し、よく混合して 30 分放置したものをを用いた。

これにアセトニトリル 30 mL を加えて 3 分間ホモジナイズ又は 5 分間振とうした後、毎分 2500 回転で 5 分間遠心分離し、アセトニトリル層を採った。残留物（はちみつの場合は残留物及び水層）にアセトニトリル 20 mL を加え、3 分間ホモジナイズ又は 5 分間振とうした後、毎分 2500 回転で 5 分間遠心分離し、アセトニトリル層を採った。得られたアセトニトリル層を合わせ、これに無水硫酸ナトリウムを加えて脱水し、無水硫酸ナトリウムをろ別した後、40℃以下で約 5 mL まで濃縮した。以降は[実験方法]6. 試験溶液の調製と同様に操作して試験溶液を調製し、分析に供した。

結果を表 18 及び表 19 に示す。いずれの試料の回収率も目標の範囲内であったが、振とう抽出と比較して、ホモジナイズ抽出の回収率がやや高い結果となったため、ホモジナイズ抽出を抽出法として採用した。

表 18 液状試料の添加回収試験結果（ホモジナイズ抽出）

試料	マトリックス影響 (%) *1	回収率 (%)				不溶物の有無
		マトリックス補正有*2		マトリックス補正無		
		回収率	平均	回収率	平均	
牛乳	106	94.2	96.5	99.5	102	有
		98.7		104		
鶏卵	94.0	103	102	97.2	95.7	有
		100		94.3		
はちみつ	99.7	95.0	95.4	94.6	94.9	なし
		95.8		95.3		

*1 マトリックス影響:マトリックス添加標準溶液の面積値を溶媒標準溶液の面積値で除した値に 100 を乗じて算出した。

*2 マトリックス添加標準溶液を基準として算出。

表 19 液状試料の添加回収試験結果（振とう抽出）

試料	マトリックス影響 (%) *1	回収率 (%)				不溶物の有無
		マトリックス補正有*2		マトリックス補正無		
		回収率	平均	回収率	平均	
牛乳	101	95.4	95.3	96.0	95.9	有
		95.1		95.7		
鶏卵	94.2	96.6	95.1	91.1	89.7	有
		93.6		88.4		
はちみつ	97.7	90.1	92.1	88.3	90.1	なし
		94.0		92.0		

*1 マトリックス影響:マトリックス添加標準溶液の面積値を溶媒標準溶液の面積値で除した値に 100 を乗じて算出した。

*2 マトリックス添加標準溶液を基準として算出。

2) 転溶溶媒の検討

①転溶溶媒検討

水 15 mL にアセトンで調製した 10 ng/mL 標準溶液 1 mL を添加した。これに 10%食塩水 100 mL 及び表 20 に示す各溶媒 100 mL をそれぞれ加え、5 分間振とうした。有機層を分取し、水層に新たに各溶媒 50 mL を加えて 5 分間浸透した。有機層を合わせ、これに無水硫酸ナトリウムを加えて脱水し、無水硫酸ナトリウムをろ別した後、40°C以下で濃縮・乾固した。残留物にアセトニトリル及び水混液 (1 : 1) 5 mL を加えて溶かし、それぞれ試験溶液とした。

表 20 に回収率を示す。*n*-ヘキサン及び酢酸エチル混液と酢酸エチルでは 90%の回収が得られているが、*n*-ヘキサンでは回収が得られなかった。この結果から、酢酸エチルを転溶溶媒として採用することとした。

表 20 転溶溶媒検討結果 (n=1)

転溶溶媒	回収率 (%)
<i>n</i> -ヘキサン	<2.5
<i>n</i> -ヘキサン及び酢酸エチル混液 (1 : 1)	90.5
酢酸エチル	91.2

②飽和食塩水を用いた転溶効率の検討

①における転溶操作の回収率は 90%程度であり、十分ではないと考えられた。そこで、転溶時に添加する食塩水を飽和食塩水とし、転溶操作の回収率を求めた。水 15 mL にアセトンで調製した 10 ng/mL 標準溶液 1 mL を添加し、これに飽和食塩水 100 mL 及び酢酸エチル 100 mL をそれぞれ加え、5 分間振とうした。有機層を分取し、水層に新たに酢酸エチル 50 mL を加えて 5 分間振とうした。有機層を合わせ、これに無水硫酸ナトリウムを加えて脱水し、無水硫酸ナトリウムをろ別した後、40°C以下で濃縮・乾固した。残留物にアセトニトリル及び水混液 (1 : 1) 5 mL を正確に加えて溶かし、試験溶液とした。

結果を表 21 に示す。回収率は 96.5%と改善したため、転溶時に添加する食塩水は飽和食塩水とした。

表 21 飽和食塩水を用いた転溶効率の検討結果 (n=2)

n	回収率 (%)
1	96.3
2	96.6
平均	96.5

③マトリックス存在下における転溶効率

1) ②の抽出検討において、マトリックス存在下における転溶効率についての検討も実施した。抽出溶媒としてアセトン及び *n*-ヘキサン混液 (1 : 1) を用いた条件(採用した条件)の結果を表 22 に再掲する。抽出後、約 15 mL まで濃縮した抽出液の組成は、水分量が比較的多いしじみと水分量が比較的小さい牛の脂肪では異なると考えられ、その後の転溶操作時の抽出効率に影響を与える可能性があったが、いずれの試料においても良好な回収率が得られたことから、マトリックス存在下においてもプロチゾラムが転溶操作により水層から有機層へ十分に抽出されていることが確認された。

表 22 抽出溶媒検討結果 (n=2)

試料	マトリックス影響 (%) *1	回収率 (%)			
		マトリックス補正有*2		マトリックス補正無	
		回収率	平均	回収率	平均
しじみ	102	93.1	93.2	94.8	94.9
		93.3		94.9	
牛の脂肪	96.0	96.4	96.7	92.5	92.8
		97.0		93.1	

*1 マトリックス影響:マトリックス添加標準溶液の面積値を溶媒標準溶液の面積値で除した値に 100 を乗じて算出した。

*2 マトリックス添加標準溶液を基準として算出。

3) 脱脂方法の検討

①アセトニトリル/ヘキサン分配 (脱脂) の検討

ヘキサン 30 mL にアセトンで調製した 10 ng/mL 標準溶液 1 mL を添加した。これにヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL を加えて 5 分間振とうし、アセトニトリル層を採り、濃縮・乾固した。残留物にアセトニトリル及び水混液 (1 : 1) 5 mL を正確に加えて溶かし、試験溶液とした。分配後のヘキサン層に新たにヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL ずつを加えて 2 回目及び 3 回目の分配を実施してアセトニトリル層をそれぞれ採り、1 回目と同様に操作して試験溶液とした。

表 23 に結果を示す。1 回目までの分配によりほぼ全量が回収されていたが、実際の試験操作では試料マトリックスの影響を考慮して、2 回の分配操作を行うこととした。

表 23 アセトニトリル/nヘキサン分配検討結果 (n=1)

分配回数	回収率 (%)
1	99.0
2	<2.5
3	<2.5

②InertSep C18 ミニカラム (1 g)

InertSep C18 ミニカラム (1 g) をアセトニトリル 10 mL でコンディショニングし、アセトニトリルで調製した溶媒標準溶液 (0.01 µg/mL) 5 mL を注入して溶出液を採り、溶出液中に溶出しているプロチゾラムを測定した。その後、アセトニトリルを 1 mL ずつ注入し、同様に各画分に溶出しているプロチゾラムを測定した。結果を表 24 に示す。負荷液溶出後の溶出 2 mL の画分までプロチゾラムが溶出していたため、2 mL 以上の溶出液が必要であることが確認された。

表 24 InertSep C18 ミニカラムからの溶出画分検討

画分	液量 (mL)	絶対量 (ng)	回収率 (%)	回収率累計 (%)
負荷液	5	42.5	85.1	85.1
1	1	7.7	15.5	101
2	1	1.3	2.7	103
3	1	<0.5	<1.0	103
4	1	<0.5	<1.0	103
5	1	<0.5	<1.0	103
6	1	<0.5	<1.0	103
7	1	<0.5	<1.0	103
8	1	<0.5	<1.0	103
9	1	<0.5	<1.0	103

4) 精製方法の検討

①InertSep SAX/PSA ミニカラム (500 mg/500 mg)

InertSep SAX/PSA ミニカラム (500 mg/500 mg) をアセトニトリル 10 mL でコンディショニングし、アセトニトリルで調製した溶媒標準溶液 (0.01 µg/mL) 5 mL を注入し、溶出液を全量採り、溶出液中に溶出しているブロチゾラムを測定した。その後、アセトニトリルを 1 mL ずつ注入し、同様に各画分に溶出しているブロチゾラムを測定した。結果を表 25 に示す。負荷液溶出後、溶出 3 mL まではブロチゾラムが検出されたが、それ以降は検出されなかった。

表 25 SAX/PSA ミニカラムからの溶出画分検討

画分	液量 (mL)	絶対量 (ng)	回収率 (%)	回収率累計 (%)
負荷液	5	36.1	72.2	72.2
1	1	10.6	21.2	93.4
2	1	3.7	7.3	101
3	1	0.5	1.1	102
4	1	<0.5	<1.0	102
5	1	<0.5	<1.0	102
6	1	<0.5	<1.0	102
7	1	<0.5	<1.0	102
8	1	<0.5	<1.0	102
9	1	<0.5	<1.0	102

②InertSep C18 (1 g) 及び InertSep SAX/PSA (500 mg/500 mg) 連結カラム

InertSep C18 ミニカラム (1 g) の下部に InertSep SAX/PSA ミニカラム (500 mg/500 mg) を接続した連結カラムをアセトニトリル 10 mL でコンディショニングし、アセトニトリルで調製した溶媒標準溶液 (0.01 µg/mL) 5 mL を連結カラムに注入し、溶出液をそれぞれ全量採り、溶出液中に溶出しているブロチゾラムを測定した。その後、連結カラムにアセトニトリルを 1 mL ずつ注入し、同様に各画分に溶出しているブロチゾラムを測定した。結果を表 26 に示す。溶出 7 mL の画分まで溶出していたため、ミニカラムのロット間での溶出特性のばらつきを考慮し、負荷液添加後 10 mL のアセトニトリルで溶出することとした。

表 26 連結カラム (InertSep C18 及び InertSep SAX/PSA) からの溶出画分検討

画分	液量 (mL)	絶対量 (ng)	回収率 (%)	回収率累計 (%)
負荷液	5	25.1	50.3	50.3
1	1	10.5	21.1	71.4
2	1	8.9	17.8	89.2
3	1	2.6	5.3	94.5
4	1	1.2	2.4	96.9
5	1	1.1	2.2	99.1
6	1	0.9	1.8	102
7	1	0.6	1.1	102
8	1	<0.5	<1.0	102
9	1	<0.5	<1.0	102

③固形試料を用いた連結カラム (InertSep C18 及び InertSep SAX/PSA) による精製効果検討

1) ④において実施した添加回収試験における、ろ過(セライト)板を水で作製した条件(採用条件)の結果を試験溶液中不溶物の有無及び着色の有無と共に表 27 にまとめた。

各試料精製後の C18 ミニカラム及び SAX/PSA ミニカラムには着色が認められ、カラムによって夾雑物が除去されていることが示唆された。さけ及びうなぎ試料では試験溶液中に不溶物が認められたため、遠心分離を行い上澄みを測定に用いた。また、牛の肝臓、さけ及びしじみ試料では着色が見られ、色素が除去できていないことが示唆されたが、マトリックス影響は 96.1、94.3 及び 92.6%であり、回収率は 80.5~93.8%で目標値の範囲内であった。また、その他の試料の回収率についても 86.9~96.8%であり、目標値を満たした。

表 27 固形試料の添加回収試験結果

試料	マトリックス影響 (%)	回収率(%)						試験溶液中の不溶物	着色
		マトリックス補正有			マトリックス補正無				
		回収率	平均	RSD	回収率	平均	RSD		
牛の筋肉	106	87.9	89.3	2	92.9	94.4	2	なし	なし
		91.1			96.3				
		88.9			94.0				
牛の脂肪	99.3	89.2	93.5	4	88.6	92.9	4	なし	なし
		97.5			96.8				
		93.8			93.2				
牛の肝臓	96.1	91.7	93.3	3	88.1	89.7	3	なし	黄
		92.1			88.5				
		96.1			92.4				
さけ	94.3	85.3	91.1	6	80.5	85.9	6	有	橙
		91.0			85.8				
		96.9			91.3				
うなぎ	95.1	91.4	95.3	5	86.9	90.7	5	有	なし
		100.4			95.5				
		94.2			89.6				
しじみ	92.6	99.9	100	1	92.5	92.9	1	なし	黄
		101			93.8				
		99.5			92.4				
豚の筋肉	102	86.1	91.0	9	87.6	92.6	9	なし	なし
		100			102				
		86.6			88.1				

*1 マトリックス影響：マトリックス添加標準溶液の面積値を溶媒標準溶液の面積値で除した値に 100 を乗じて算出した。

*2 マトリックス添加標準溶液を基準として算出。

④遠心分離操作時の冷却による影響

1) ④の検討において、試験溶液中に不溶物が認められたさけ及びうなぎ試料について、不溶物を取り除くための遠心分離操作を実施した。このとき試験溶液を均等に2等分し、それぞれ常温及び冷却条件での遠心分離に供して両条件における回収率を比較し、冷却による影響が認められるか検討を実施した。

結果を表 28 及び 29 に示す(常温の結果については 1) ⑤の結果の再掲)。また、表 30 に最終溶液における不溶物の再析出状況を示す。さけ及びうなぎの両試料について、回収率において冷却の影響は認められず、また、分析・保管中の再析出も認められなかったため、遠心分離操作は常温で実施することとした。

表 28 遠心分離時の冷却影響検討結果 (試料：さけ)

セライト	遠心分離	マトリックス影響(%)	回収率(%)					
			マトリックス補正有			マトリックス補正無		
			回収率	平均	RSD	回収率	平均	RSD
水調製	常温(25℃)	94.3	85.3	91.1	6	80.5	85.9	6
			91.0			85.8		
			96.9			91.3		
	冷却(5℃)	95.8	84.1	90.0	6	80.5	86.2	6
			92.2			88.3		
			93.8			89.8		
溶媒調製	常温(25℃)	94.8	91.8	95.8	4	87.0	90.8	4
			95.7			90.7		
			99.9			94.7		
	冷却(5℃)	96.3	88.7	93.2	5	85.4	89.7	5
			93.4			89.9		
			97.4			93.8		
なし	常温(25℃)	97.7	94.9	94.6	-	92.7	92.4	-
			94.3			92.1		
	冷却(5℃)	96.1	95.8	96.8	-	92.0	93.0	-
			97.7			93.9		

*1 マトリックス影響：マトリックス添加標準溶液の面積値を溶媒標準溶液の面積値で除した値に100を乗じて算出した。

*2 マトリックス添加標準溶液を基準として算出。

表 29 遠心分離時の冷却影響検討結果 (試料：うなぎ)

セライト	遠心分離	マトリックス影響(%)	回収率(%)					
			マトリックス補正有			マトリックス補正無		
			回収率	平均	RSD	回収率	平均	RSD
水調製	常温(25℃)	95.1	91.4	95.3	5	86.9	90.7	5
			100			95.5		
			94.2			89.6		
	冷却(5℃)	97.7	90.5	93.1	5	88.3	90.9	5
			98.7			96.4		
			90.0			87.9		
溶媒調製	常温(25℃)	95.3	102	98.3	3	96.8	93.6	3
			95.1			90.6		
			98.1			93.4		
	冷却(5℃)	93.6	101	99.4	1	94.2	93.0	1
			99.2			92.8		
			98.3			92.0		
なし	常温(25℃)	96.9	90.2	92.2	-	87.4	89.3	-
			94.1			91.1		
			91.8			88.0		
	冷却(5℃)	95.8	91.8	92.5	-	88.0	88.5	-
			93.2			89.0		

*1 マトリックス影響:マトリックス添加標準溶液の面積値を溶媒標準溶液の面積値で除した値に100を乗じて算出した。

*2 マトリックス添加標準溶液を基準として算出。

表 30 不溶物の再析出状況

試料	遠心分離	セライト	不溶物の有無			
			遠心分離前	調製直後*	HPLC オートサンプラー上(常温)	冷蔵庫保管時
さけ	常温(25℃)	水調製	有	無	無	無
		溶媒調製	有	無	無	無
		なし	有	無	無	無
	冷却(5℃)	水調製	有	無	無	無
		溶媒調製	有	無	無	無
		なし	有	無	無	無
うなぎ	常温(25℃)	水調製	有	無	無	無
		溶媒調製	有	無	無	無
		なし	有	無	無	無
	冷却(5℃)	水調製	有	無	無	無
		溶媒調製	有	無	無	無
		なし	有	無	無	無

* 遠心分離で不溶物を除いた直後

⑤液体試料を用いた連結カラム（InertSep C18 及び InertSep SAX/PSA）による精製効果

1) ⑤の抽出検討において、液体試料の InertSep C18 及び InertSep SAX/PSA による精製効果も検討した。結果を表 31 に再掲する。各試料精製後の C18 ミニカラム及び SAX/PSA ミニカラムには着色が認められ、カラムによって夾雑物が除去されていることが示唆された。牛乳及び鶏卵試料では試験溶液中に不溶物が認められたため、遠心分離を行い上澄みを測定に用いた。また、鶏卵試料では着色が見られ、色素が除去できていないことが示唆されたが、マトリックス影響は 95.7%であり、回収率は 94.3 及び 97.2%で目標値の範囲内であった。また、その他の試料の回収率は 94.6~104%であり、目標値を満たした。

表 31 液状試料の添加回収試験結果（ホモジナイズ抽出）

試料	マトリックス影響 (%) *1	回収率 (%)				不溶物の有無	着色
		マトリックス補正有*2		マトリックス補正無			
		回収率	平均	回収率	平均		
牛乳	106	94.2	96.5	99.5	102	有	なし
		98.7		104			
鶏卵	94.0	103	102	97.2	95.7	有	黄
		100		94.3			
はちみつ	99.7	95.0	95.4	94.6	94.9	なし	なし
		95.8		95.3			

*1 マトリックス影響：マトリックス添加標準溶液の面積値を溶媒標準溶液の面積値で除した値に 100 を乗じて算出した。

*2 マトリックス添加標準溶液を基準として算出。

5) その他の基礎データ

①脱水操作の検討

1) ①の試験操作において、抽出後の溶媒除去の際に試料由来の水分が残った。このとき、水層ごとアセトニトリル/ヘキサン分配に供したが、試料によって水分含量が異なることから、分配の効率に影響を与える可能性が考えられた。そこで、アセトニトリル/ヘキサン分配前に脱水操作を実施して、あらかじめ水分を除去する操作を検討した。試料としては牛の筋肉及び牛の脂肪を用いた。

試料を細切均一化した後、牛の筋肉は 10.0 g、牛の脂肪は 5.00 g を量り採り、アセトンで調製した標準溶液をホールピペットを用いて表 1 に従って添加し、よく混合して 30 分放置した。これに抽出溶媒 30 mL をそれぞれ加え、3 分間ホモジナイズした後、ろ紙 (No.5B) を用いて吸引ろ過した。ろ紙上の残留物を採り、新たに抽出溶媒 30 mL を加え、3 分間ホモジナイズした後、吸引ろ過してろ液を合わせた。このとき、牛の脂肪試料から得られたろ液には水層は見られなかったが、牛の筋肉試料から得られたろ液には分離した水層が見られた。このろ液に無水硫酸ナトリウムを加えて脱水し、無水硫酸ナトリウムをろ別したところ、牛の筋肉試料に見られた水層は消失した。脱水操作後のろ液を 40℃以下で濃縮し、溶媒を除去し、残留物に *n*-ヘキサン 30 mL を加え、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL ずつで 2 回振とう抽出した。抽出液を合わせ、これを 40℃以下で約 5 mL に濃縮した。以降は 6. 試験溶液の調製と同様に操作して試験溶液を調製し、分析に供した。

結果を表 32 に示す。牛の脂肪では約 95%の回収が得られているが、牛の筋肉では約 70%程度の回収率であった。このことから、牛の筋肉試料の抽出液に見られた分離した水層（試料由来の水分）に分配されていたプロチゾラムを、脱水操作によって損失していることが示唆されたため、脱脂操作を実施する前に転溶操作を行うこととした。

表 32 脱水操作の検討 (n=2)

試料	マトリックス影響 (%) *1	回収率 (%)			
		マトリックス補正有*2		マトリックス補正無	
		回収率	平均	回収率	平均
牛の筋肉	102	72.3	71.1	72.4	71.1
		69.9		69.8	
牛の脂肪	97.0	98.2	99.0	95.2	97.5
		99.7		96.7	

*1 マトリックス影響:マトリックス添加標準溶液の面積値を溶媒標準溶液の面積値で除した値に 100 を乗じて算出した。

*2 マトリックス添加標準溶液を基準として算出。

②InertSep PSA ミニカラム (500 mg)

InertSep PSA ミニカラム (500 mg) をアセトニトリル 10 mL でコンディショニングし、アセトニトリルで調製した溶媒標準溶液 (0.01 µg/mL) 5 mL を注入して溶出液を全量採り、溶出液中に溶出しているプロチゾラムを測定した。その後、アセトニトリルを 1 mL ずつ注入し、同様に各画分に溶出しているプロチゾラムを測定した。結果を表 33 に示す。抽出液溶出後の溶出 2 mL の画分までプロチゾラムが溶出していた。

表 33 PSA ミニカラムからの溶出画分検討

画分	液量 (mL)	絶対量 (ng)	回収率 (%)	回収率累計 (%)
負荷液	5	45.0	90.0	90.0
1	1	4.8	9.5	99.5
2	1	1.5	3.1	103
3	1	<0.5	<1.0	103
4	1	<0.5	<1.0	103
5	1	<0.5	<1.0	103
6	1	<0.5	<1.0	103
7	1	<0.5	<1.0	103
8	1	<0.5	<1.0	103
9	1	<0.5	<1.0	103

③InertSep SAX ミニカラム (500 mg)

InertSep SAX ミニカラム (500 mg) をアセトニトリル 10 mL でコンディショニングし、アセトニトリルで調製した溶媒標準溶液 (0.01 µg/mL) 5 mL を注入して溶出液を全量採り、溶出液中に溶出しているプロチゾラムを測定した。その後、アセトニトリルを 1 mL ずつ注入し、同様に各画分に溶出しているプロチゾラムを測定した。結果を表 34 に示す。抽出液溶出後の溶出 3 mL の画分までプロチゾラムが溶出していた。

表 34 SAX ミニカラムからの溶出画分検討

画分	液量 (mL)	絶対量 (ng)	回収率 (%)	回収率累計 (%)
負荷液	5	33.9	67.8	67.8
1	1	11.3	22.5	90.3
2	1	6.7	13.4	104
3	1	0.9	1.8	106
4	1	<0.5	<1.0	106
5	1	<0.5	<1.0	106
6	1	<0.5	<1.0	106
7	1	<0.5	<1.0	106
8	1	<0.5	<1.0	106
9	1	<0.5	<1.0	106

④InertSep C18 (1 g) 及び InertSep PSA (500 mg) 連結カラム

InertSep C18 ミニカラム (1 g) の下部に InertSep PSA ミニカラム (500 mg) を接続した連結カラムをアセトニトリル 10 mL でコンディショニングし、アセトニトリルで調製した溶媒標準溶液 (0.01 µg/mL) 5 mL を連結カラムに注入し、溶出液を全量採り、溶出液中に溶出しているプロチゾラムを測定した。その後、アセトニトリルを 1 mL ずつ注入し、同様に各画分に溶出しているプロチゾラムを測定した。結果を表 35 に示す。抽出液溶出後の溶出 3 mL の画分までプロチゾラムが溶出していた。

表 35 連結カラム (C18 及び PSA) からの溶出画分検討

画分	液量 (mL)	絶対量 (ng)	回収率 (%)	回収率累計 (%)
負荷液	5	30.0	60.0	60.0
1	1	9.1	18.1	78.1
2	1	5.5	10.9	97.0
3	1	2.1	4.3	101
4	1	<0.5	<1.0	101
5	1	<0.5	<1.0	101
6	1	<0.5	<1.0	101
7	1	<0.5	<1.0	101
8	1	<0.5	<1.0	101
9	1	<0.5	<1.0	101

⑤InertSep C18 (1 g) 及び InertSep SAX (500 mg) 連結カラム

InertSep C18 ミニカラム (1 g) の下部に InertSep SAX ミニカラム (500 mg) を接続した連結カラムをアセトニトリル 10 mL でコンディショニングし、アセトニトリルで調製した溶媒標準溶液 (0.01 µg/mL) 5 mL を注入して溶出液を全量採り、溶出液中に溶出しているプロチゾラムを測定した。その後、アセトニトリルを 1 mL ずつ注入し、同様に各画分に溶出しているプロチゾラムを測定した。結果を表 36 に示す。抽出液溶出後の溶出 5 mL の画分までプロチゾラムが溶出していた。

表 36 連結カラム (C18 及び SAX) からの溶出画分検討

画分	液量 (mL)	絶対量 (ng)	回収率 (%)	回収率累計 (%)
負荷液	5	10.9	21.8	21.8
1	1	10.5	20.9	42.7
2	1	9.1	18.2	60.9
3	1	7.8	15.6	76.5
4	1	7.7	15.4	91.9
5	1	1.5	3.0	94.9
6	1	<0.5	<1.0	94.9
7	1	<0.5	<1.0	94.9
8	1	<0.5	<1.0	94.9
9	1	<0.5	<1.0	94.9

⑥ InertSep SAX (500 mg) ミニカラム及び InertSep PSA (500 mg) ミニカラムによる精製検討
 牛の肝臓を試料とし、InertSep SAX (500 mg) 及び InertSep PSA (500 mg) ミニカラムによる精製効果を検討した。

試料を細切均一化した後、10.0 g を量り採り、量り採った試料に標準溶液を表 1 に従ってホールピペットを用いて添加し、よく混合して 30 分放置したものをを用いた。これらにアセトン及び *n*-ヘキサン混液 (1 : 1) 60 mL をそれぞれ加え、3 分間ホモジナイズした後、ろ紙 (No.5B) を用いて吸引ろ過した。ろ紙上の残留物を採り、新たにアセトン及び *n*-ヘキサン混液 (1 : 1) 60 mL を加え、3 分間ホモジナイズした後、吸引ろ過した。得られたろ液を 40°C 以下で約 15 mL まで濃縮した。これに飽和食塩水 100 mL を加え、酢酸エチル 100 mL 及び 50 mL で 2 回抽出して転溶した。抽出液に無水硫酸ナトリウムを加えて脱水し、無水硫酸ナトリウムをろ別した後、40°C 以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物に *n*-ヘキサン 30 mL を加え、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL ずつで 2 回振とう抽出した。抽出液を合わせ、40°C 以下で約 5 mL に濃縮した。

表 37 に示した各カラムにアセトニトリル 10 mL を注入し、流出液は捨てた。これらのカラムに抽出液を注入し、さらに表 37 に示した量のアセトニトリルを注入して全溶出液を採り、40°C 以下で濃縮して溶媒を除去した。残留物に 6.0 ng/mL 標準溶液 (アセトニトリル及び水混液) 5 mL を正確に加えて溶かし、これを試験溶液とし、LC-MS/MS 分析に供した。

結果を表 37 に示す。牛の肝臓における InertSep C18 のみ及び InertSep C18 及び InertSep SAX 連結カラムによる精製では、マトリックス影響はいずれも 120% を超えた。InertSep C18 及び InertSep PSA 連結カラムにおけるマトリックス影響は 94.9% であり、許容範囲内であった。

表 37 各種カラムを用いた精製検討 (試料: 牛の肝臓)

カラム	溶出アセトニトリル量 (mL)	マトリックス影響 (%)
InertSep C18 (1 g)	5	146
InertSep C18 (1 g) 及び InertSep SAX (500 mg)	10	126
InertSep C18 (1 g) 及び InertSep PSA (500 mg)	10	94.9

⑦ InertSep C18 及び InertSep PSA 連結カラムによる精製検討（固形試料）

⑥の結果より、牛の肝臓においては十分な精製が可能であった InertSep C18 及び InertSep PSA 連結カラムによる精製が、他の試料についても適用できるか検討を実施した。試料としては牛の肝臓以外の固形試料を用いた。

試料を細切均一化した後、10.0 g（牛の脂肪は 5.0 g）を量り採り、量り採った試料に標準溶液を表 1 に従ってホールピペットを用いて添加し、よく混合して 30 分放置したものを用いた。これらにアセトン及び *n*-ヘキサン混液（1：1）60 mL をそれぞれ加え、3 分間ホモジナイズした後、ろ紙（No.5B）を用いて吸引ろ過した。ろ紙上の残留物を採り、新たにアセトン及び *n*-ヘキサン混液（1：1）60 mL を加え、3 分間ホモジナイズした後、吸引ろ過した。得られたろ液を 40℃以下で約 15 mL まで濃縮した。これに飽和食塩水 100 mL を加え、酢酸エチル 100 mL 及び 50 mL で 2 回抽出して転溶した。抽出液に無水硫酸ナトリウムを加えて脱水し、無水硫酸ナトリウムをろ別した後、40℃以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物に *n*-ヘキサン 30 mL を加え、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL ずつで 2 回振とう抽出した。抽出液を合わせ、40℃以下で約 5 mL に濃縮した。

上段に InertSep C18 ミニカラム（1 g）、下段に InertSep PSA ミニカラム（500 mg）を連結し、アセトニトリル 10 mL を注入し、流出液は捨てた。この連結カラムに抽出液を注入し、さらにアセトニトリル 10 mL を注入して全溶出液を採り、40℃以下で濃縮して溶媒を除去した。残留物に表 3 に示した濃度の標準溶液（アセトニトリル及び水混液）5 mL（牛の脂肪は 2.5 mL）を正確に加えて溶かし、これを試験溶液とした。試験溶液に不溶物が見られた場合は、遠心分離でこれを除き、上澄みを LC-MS/MS 分析に供した。

結果を表 38 に示す。牛の筋肉、豚の筋肉及び牛の脂肪においてはマトリックス影響は見られなかったが、さけ、しじみ及びうなぎ試料におけるマトリックス影響が、85.9、84.1 及び 90.3%と大きかったため、精製には InertSep C18 及び InertSep SAX/PSA 連結カラムを用いることとした。

表 38 C18 及び PSA 連結カラムを用いた精製検討（試料：牛の肝臓）

試料	マトリックス影響 (%)
牛の筋肉	99.1
牛の脂肪	99.3
豚の筋肉	99.5
さけ	85.9
うなぎ	90.3
しじみ	84.1

⑧ 固形試料を用いた連結カラム（InertSep C18 及び InertSep SAX/PSA）による精製効果検討

試料を細切均一化した後、10.0 g（牛の脂肪は 5.00 g）を量り採り、量り採った試料に標準溶液を表 1 に従ってホールピペットを用いて添加し、よく混合して 30 分放置したものを用いた。これらにアセトン及び *n*-ヘキサン混液（1：1）60 mL をそれぞれ加え、3 分間ホモジナイズした後、ろ紙（No.5B）を用いて吸引ろ過した。ろ紙上の残留物を採り、新たにアセトン及び *n*-ヘキサン混液（1：1）60 mL を加え、3 分間ホモジナイズした後、吸引ろ過した。得られたろ液を 40℃以下で約 15 mL まで濃縮した。以降は[実験方法] 6. 試験溶液の調製と同様に操作して試験溶液を調製し、分析に供した。

結果を表 39 に示す。精製後の C18 ミニカラム及び SAX/PSA ミニカラムには着色が認められ、カラムによって夾雑物が除去されていることが示唆された。さけ及びうなぎ試料では

試験溶液中に不溶物が認められたため、遠心分離を行い、上澄みを測定に用いた。また、牛の肝臓、さけ及びしじみ試料では着色が見られ、色素が除去できていないことが示唆されたが、マトリックス影響は 107、95.1 及び 102%であり、回収率は 90.1～94.9%で目標値の範囲内であった。また、その他の試料の回収率についても 92.4～101%であり、目標値を満たした。

表 39 固形試料の添加回収試験結果

試料	マトリックス影響 (%) *1	回収率 (%)				試験溶液中の不溶物	着色
		マトリックス補正有*2		マトリックス補正無			
		回収率	平均	回収率	平均		
牛の筋肉	103	94.2	92.2	96.7	94.5	なし	なし
		90.1		92.4			
牛の脂肪	96.0	96.4	96.7	92.5	92.8	なし	なし
		97.0		93.1			
牛の肝臓	107	85.1	86.5	90.8	92.2	なし	黄
		87.9		93.7			
さけ	95.1	94.3	96.4	90.1	91.9	有	橙
		98.5		93.8			
うなぎ	101	98.0	98.3	99.2	99.4	有	なし
		98.5		99.6			
しじみ	102	93.1	93.2	94.8	94.9	なし	黄
		93.3		94.9			
豚の筋肉	103	98.6	98.4	101	101	なし	なし
		98.1		101			

*1 マトリックス影響:マトリックス添加標準溶液の面積値を溶媒標準溶液の面積値で除した値に 100 を乗じて算出した。

*2 マトリックス添加標準溶液を基準として算出。

3. 添加回収試験

試験は枝分かれ実験として実施し、分析者1名が同一の添加試料を1日2回、5日間分析した。

1) 選択性

各試料のブランク試料及びマトリックス添加標準溶液(各1日1回調製)を測定し、選択性を評価した。結果を表40、表41及び表42に示す。また、図20～29に各試料の代表的なブランク試料のSRMクロマトグラムを示す。全試料において妨害ピークの許容範囲の判定基準に適合した。

表40 選択性の評価(牛の筋肉、牛の脂肪及び牛の肝臓)

食品名	定量限界(ppb)	基準値(ppb)	添加濃度*1(ppb)		妨害ピークの許容範囲		日	ピーク面積			選択性の評価*3	
					評価対象濃度(ppb)	判定基準		ブランク試料(a)	標準溶液*2(b)	面積比(a)/(b)		
牛の筋肉	0.5	1	1	*	定量限界	0.5	< 0.333	1	0	37900	0	○
								2	0	27478	0	○
								3	0	26632	0	○
								4	0	37789	0	○
								5	0	37188	0	○
牛の脂肪	0.5	2	2		基準値	2.0	< 0.1	1	0	145601	0	○
								2	0	133673	0	○
								3	0	138174	0	○
								4	0	138867	0	○
								5	0	139231	0	○
牛の肝臓	0.5	3	3		基準値	3.0	< 0.1	1	0	226985	0	○
								2	0	213865	0	○
								3	0	213865	0	○
								4	0	214443	0	○
								5	0	225747	0	○

1 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。

*2 試料中の濃度が評価対象濃度相当になるように調製したマトリックス添加標準溶液。

*3 面積比が、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「×」が表示される。

表 41 選択性の評価(うなぎ、さけ、しじみ及び豚の筋肉)

食品名	定量限界 (ppb)	基準値 (ppb)	添加濃度*1 (ppb)		妨害ピークの許容範囲		日	ピーク面積			選択性の評価*3	
					評価対象濃度(ppb)	判定基準		ブランク試料(a)	標準溶液*2 (b)	面積比 (a)/(b)		
うなぎ	0.5	不検出	0.5		定量限界	0.5	< 0.333	1	0	31335	0	○
								2	0	32742	0	○
								3	0	35472	0	○
								4	0	34031	0	○
								5	0	33325	0	○
さけ	0.5	不検出	0.5		定量限界	0.5	< 0.333	1	0	33644	0	○
								2	0	32381	0	○
								3	0	34086	0	○
								4	0	36249	0	○
								5	0	39396	0	○
しじみ	0.5	不検出	0.5		定量限界	0.5	< 0.333	1	0	29265	0	○
								2	0	35800	0	○
								3	0	38415	0	○
								4	0	36110	0	○
								5	0	34354	0	○
豚の筋肉	0.5	不検出	0.5		定量限界	0.5	< 0.333	1	0	33193	0	○
								2	0	35043	0	○
								3	0	34987	0	○
								4	0	34758	0	○
								5	0	36219	0	○

1 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。

*2 試料中の濃度が評価対象濃度相当になるように調製したマトリックス添加標準溶液。

*3 面積比が、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「×」が表示される。

表 42 選択性の評価(鶏卵、牛乳及びはちみつ)

食品名	定量 限界 (ppb)	基準値 (ppb)	添加濃度*1 (ppb)		妨害ピークの許容範囲		日	ピーク面積			選択性 の 評価*3	
					評価対象濃度(ppb)	判定基準		ブランク 試料(a)	標準溶液*2 (b)	面積比 (a)/(b)		
鶏卵	0.5	不検出	0.5		定量限界	0.5	< 0.333	1	0	19523	0	○
								2	0	19658	0	○
								3	0	13797	0	○
								4	0	37393	0	○
								5	0	39865	0	○
牛乳	0.5	1	1	*	定量限界	0.5	< 0.333	1	0	19558	0	○
								2	0	20487	0	○
								3	0	28032	0	○
								4	0	27838	0	○
								5	0	28991	0	○
はちみつ	0.5	不検出	0.5		定量限界	0.5	< 0.333	1	0	24358	0	○
								2	0	24744	0	○
								3	0	34381	0	○
								4	0	39865	0	○
								5	0	39701	0	○

1 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。

*2 試料中の濃度が評価対象濃度相当になるように調製したマトリックス添加標準溶液。

*3 面積比が、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「×」が表示される。

2) 真度、精度及び定量限界の評価

1日2回、5日間分析した全試行(n=10)の平均値を真度とした。また、一元配置の分散分析により併行精度と室内精度を算出した。結果を表43、表44及び表45に示す。また、図20~29に各試料の代表的な添加試料及び標準溶液のSRMクロマトグラムを示す。真度は89~105%、併行精度は1~4RSD%、室内精度は2~8RSD%となり、いずれも目標値を満たした。

なお、牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓及び牛乳については、添加濃度と定量限界濃度が異なるため、別途定量限界の推定を行った。これらの試料の定量限界の推定結果を表46に、各S/N比の算出結果を表47に示す。また、図30~33に定量限界の推定における代表的なクロマトグラムを示す。評価対象濃度の全試料においてS/N比は48~315であり、S/N \geq 10を満たした。

表43 真度、精度及び定量限界の評価(牛の筋肉、牛の脂肪及び牛の肝臓)

食品名	定量限界 (ppb)	基準値 (ppb)	添加濃度 (ppb)	定量限界の評価 ^{*1}	日	検量線			回収率 (%)		真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)	S/N比		
						傾き	切片	r ² 値	n=1	n=2				Max.	Min.	平均値
牛の筋肉	0.5	1	1	*	1	36094	470	0.997	88	96	89	4	4	-	-	-
					2	35993	2577	0.999	84	87						
					3	35339	1523	1.000	87	90						
					4	36840	652	0.997	88	94						
					5	37239	625	0.998	87	85						
牛の脂肪	0.5	2	2	*	1	37059	770	0.999	96	100	97	4	5	-	-	-
					2	32481	2238	1.000	96	104						
					3	35320	673	0.999	90	90						
					4	35967	1183	1.000	100	92						
					5	33376	5272	0.998	98	101						
牛の肝臓	0.5	3	3	*	1	36968	1840	0.999	89	92	92	3	3	-	-	-
					2	34906	-105	0.998	92	90						
					3	34906	-105	0.998	92	90						
					4	37501	3712	0.997	98	93						
					5	37599	4055	0.994	97	92						

1 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。これらの試料ではS/N比の算出は不要であるが、別途、定量限界の推定を行った。

表 44 真度、精度及び定量限界の評価(うなぎ、さけ、しじみ及び豚の筋肉)

食品名	定量 限界 (ppb)	基準値 (ppb)	添加 濃度 (ppb)	定量 限界の 評価*1	日	検量線			回収率 (%)		真度 (%)	併行 精度 (RSD%)	室内 精度 (RSD%)	S/N 比		
						傾き	切片	r ² 値	n=1	n=2				Max.	Min.	平均値
うなぎ	0.5	不検出	0.5		1	30911	657	0.998	83	87	91	3	5	232	210	221
					2	34277	1184	0.995	93	93						
					3	35256	1089	0.999	86	92						
					4	33413	1804	0.998	95	93						
					5	34580	712	0.999	93	93						
さけ	0.5	不検出	0.5		1	33222	502	0.998	84	88	93	4	5	163	106	135
					2	32038	769	0.996	91	93						
					3	31803	829	0.999	98	93						
					4	34673	1396	0.996	98	93						
					5	35939	695	0.999	92	99						
しじみ	0.5	不検出	0.5		1	30900	1485	0.997	95	92	93	3	5	237	107	172
					2	33221	1746	0.996	88	91						
					3	36681	1699	0.995	92	87						
					4	33308	1084	0.999	96	90						
					5	32841	1205	0.997	100	99						
豚の筋肉	0.5	不検出	0.5		1	30756	1487	0.996	94	94	99	2	6	272	196	234
					2	34051	-373	0.996	102	98						
					3	30811	2307	0.995	105	104						
					4	34314	-106	0.999	105	103						
					5	33293	2015	0.996	93	90						

1 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。これらの試料では S/N 比の算出は不要であるが、別途、定量限界の推定を行った。

表 45 真度、精度及び定量限界の評価(鶏卵、牛乳及びはちみつ)

食品名	定量 限界 (ppb)	基準値 (ppb)	添加 濃度 (ppb)	定量 限界の 評価 ^{*1}	日	検量線			回収率 (%)		真度 (%)	併行 精度 (RSD%)	室内 精度 (RSD%)	S/N 比		
						傾き	切片	r ² 値	n=1	n=2				Max.	Min.	平均値
鶏卵	0.5	不検出	0.5		1	19028	57	0.995	98	97	98	2	2	48	141	94
					2	19040	170	0.998	96	97						
					3	15364	-56	0.999	101	97						
					4	36451	1444	0.997	98	97						
					5	38305	960	0.998	101	99						
牛乳	0.5	1	1	*	1	17244	12	0.997	108	111	105	4	8	-	-	-
					2	19338	419	0.998	108	113						
					3	24362	-257	0.997	104	109						
					4	25926	-709	0.996	102	97						
					5	25553	435	0.997	97	93						
はちみつ	0.5	不検出	0.5		1	23368	556	0.995	96	96	99	1	4	188	277	233
					2	22909	1065	1.000	104	104						
					3	35944	1791	0.998	96	96						
					4	38305	960	0.998	101	99						
					5	37769	1830	0.996	97	98						

1 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。これらの試料では S/N 比の算出は不要であるが、別途、定量限界の推定を行った。

表 46 定量限界の推定

食品名	定量 限界 (ppb)	基準値 (ppb)	添加 濃度 (ppb)	標準 溶液 濃度* ¹ (mg/L)	ピーク面積						S/N 比		平均値		
					ブランク	マトリックス添加 標準溶液* ²			溶媒標準溶液				面積 比* ³ (%)	S/N 比	
						n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均	n=1			n=2
牛の筋肉	0.5	1	1	0.001	0	37789	36703	37246	38665	38572	38619	144	186	96	165
牛の脂肪	0.5	2	2	0.001	0	35803	35624	35714	38376	38060	38218	133	144	93	138
牛の肝臓	0.5	3	3	0.001	0	32579	32674	32627	36255	35763	36009	95	118	91	106
牛乳	0.5	1	1	0.001	0	30706	30348	30527	26151	26061	26106	315	289	117	302

*1 試料中定量限界濃度に相当する各標準溶液濃度。

*2 ブランク値を差し引いた値。

*3 マトリックス添加標準用液の溶媒標準溶液に対するピーク面積の比 (%)。

表 47 S/N 比の算出

食品名	S/N 比を 求める 対象	濃度*2 (mg/L)	Max, n=1							Min, n=2							S/N 比	
			D _{max}	ノイズ			D	S	N	D _{max}	ノイズ			D	S	N	Max, n=1	Min, n=2
				E1	E2	C					E1	E2	C					
牛の筋肉	標準	0.001	5250	90	0	45	5232	5187	36	5270	70	0	35	5256	5221	28	144	186
牛の脂肪	標準	0.001	4845	90	0	45	4827	4782	36	4940	85	0	43	4923	4881	34	133	144
牛の肝臓	標準	0.001	4455	115	0	58	4432	4375	46	4295	90	0	45	4277	4232	36	95	118
鶏卵	添加試料	0.001	2075	105	0	53	2054	2002	42	2570	45	0	23	2561	2539	18	48	141
牛乳	標準	0.001	5060	40	0	20	5052	5032	16	4650	40	0	20	4642	4622	16	315	289
はちみつ	添加試料	0.001	3420	45	0	23	3411	3389	18	3345	30	0	15	3339	3324	12	188	277
うなぎ	添加試料	0.001	4670	50	0	25	4660	4635	20	3815	45	0	23	3806	3784	18	232	210
さけ	添加試料	0.001	5285	80	0	40	5269	5229	32	3870	90	0	45	3852	3807	36	163	106
しじみ	添加試料	0.001	4780	50	0	25	4770	4745	20	4575	105	0	53	4554	4502	42	237	107
豚の筋肉	添加試料	0.001	4930	45	0	23	4921	4899	18	4740	60	0	30	4728	4698	24	272	196

*1 D_{max} : ピークの最大値
 E1 : ノイズの最大値
 E2 : ノイズの最小値
 C : ノイズの中央値 (E1 と E2 の平均値を使用)
 D : ピークトップ
 S : ピーク高さ
 N : ノイズ幅

*2 試料中濃度が定量限界相当になるように調製したマトリックス添加標準溶液の濃度。

3) 試料マトリックスの測定への影響

添加回収試験における回収率 100%相当濃度のマトリックス添加標準溶液と溶媒標準溶液の測定結果から、試料マトリックスの測定への影響を評価した。結果を表 48、表 49 及び表 50 に示す。また、各ブランク試料の代表的な全イオン電流クロマトグラム(TICC)を図 34 に示す。

マトリックス添加標準溶液と溶媒標準溶液のピーク面積比は 0.89~1.03(牛乳試料:1.15)であった。マトリックス影響が最も大きかったのは牛乳試料であったが、図 34 の TICC において、ブロチゾラムのピーク位置にマトリックスのピークが検出されており、このマトリックスが影響していると考えられる。表 51 及び表 52 にマトリックス影響で補正した各試料の回収率を示す。牛乳試料の補正後の回収率は 84~98%となり、他の試料と比較して回収率が高くなった(101~109%)原因はマトリックス影響によるものと確認された。

表 48 試料マトリックスの測定への影響(牛の筋肉、牛の脂肪及び牛の肝臓)

食品名	定量限界 (ppb)	基準値 (ppb)	添加濃度 (ppb)	標準溶液濃度*1 (mg/L)	日	ピーク面積							
						ブランク	マトリックス添加標準溶液			溶媒標準溶液			ピーク面積比*2
							n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均	
牛の筋肉	0.5	1	1	0.002	1	0	72282	72956	72619	72362	71855	72109	1.01
					2	0	71594	70506	71050	71951	69754	70853	1.00
					3	0	71011	71086	71049	71169	70746	70958	1.00
					4	0	74664	74951	74808	74908	74795	74852	1.00
					5	0	72301	71008	71655	71399	72304	71852	1.00
牛の脂肪	0.5	2	2	0.004	1	0	145601	144181	144891	148135	145872	147004	0.99
					2	0	133637	136042	134840	133381	136618	135000	1.00
					3	0	138174	136042	137108	141967	140316	141142	0.97
					4	0	138867	138572	138720	136824	137295	137060	1.01
					5	0	139231	141715	140473	139776	135707	137742	1.02
牛の肝臓	0.5	3	3	0.006	1	0	226985	212638	219812	235724	208622	222173	0.99
					2	0	213865	214261	214063	223549	223048	223299	0.96
					3	0	213865	214261	214063	223549	223048	223299	0.96
					4	0	225747	228762	227255	242353	244515	243434	0.93
					5	0	225747	228762	227255	242353	244515	243434	0.93

*1 添加回収試験における回収率 100%相当濃度。

*2 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の比。

表 49 試料マトリックスの測定への影響(うなぎ、さけ、しじみ及び豚の筋肉)

食品名	定量 限界 (ppb)	基準値 (ppb)	添加 濃度 (ppb)	標準 溶液 濃度*1 (mg/L)	日	ピーク面積							
						ブランク	マトリックス添加標準溶液			溶媒標準溶液			ピーク 面積比*2
							n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均	
うなぎ	0.5	不検出	0.5	0.001	1	0	31335	30423	30879	34312	34797	34555	0.89
					2	0	32742	31290	32016	34411	32918	33665	0.95
					3	0	35472	35659	35566	37822	36989	37406	0.95
					4	0	34031	35734	34883	38424	35999	37212	0.94
					5	0	33325	33692	33509	35601	36320	35961	0.93
さけ	0.5	不検出	0.5	0.001	1	0	33644	34039	33842	35454	35379	35417	0.96
					2	0	32381	33371	32876	34929	34947	34938	0.94
					3	0	34086	34854	34470	33382	34162	33772	1.02
					4	0	36249	36482	36366	36718	35618	36168	1.01
					5	0	39396	39177	39287	37876	38574	38225	1.03
しじみ	0.5	不検出	0.5	0.001	1	0	29265	28796	29031	30894	32085	31490	0.92
					2	0	35800	35995	35898	39200	39213	39207	0.92
					3	0	38415	39678	39047	38711	41074	39893	0.98
					4	0	36110	36393	36252	34823	36580	35702	1.02
					5	0	34354	34716	34535	34968	33418	34193	1.01
豚の筋肉	0.5	不検出	0.5	0.001	1	0	33193	33122	33158	33724	33422	33573	0.99
					2	0	35043	34464	34754	35163	34538	34851	1.00
					3	0	34987	35464	35226	34920	34091	34506	1.02
					4	0	34758	34097	34428	34928	34493	34711	0.99
					5	0	36219	38318	37269	37632	37117	37375	1.00

*1 添加回収試験における回収率 100%相当濃度。

*2 マトリックス添加標準用液の溶媒標準溶液に対するピーク面積の比。

表 50 試料マトリックスの測定への影響(鶏卵、牛乳及びはちみつ)

食品名	定量 限界 (ppb)	基準値 (ppb)	添加 濃度 (ppb)	標準 溶液 濃度*1 (mg/L)	日	ピーク面積							
						ブランク	マトリックス添加標準溶液			溶媒標準溶液			ピーク 面積比*2
							n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均	
鶏卵	0.5	不検出	0.5	0.001	1	0	19523	21790	20657	18925	19589	19257	1.07
					2	0	19523	21790	20657	18925	19589	19257	1.04
					3	0	13797	14025	13911	13833	14690	14262	0.98
					4	0	37393	37649	37521	37256	37110	37183	1.01
					5	0	39865	39038	39452	38976	38112	38544	1.02
牛乳	0.5	1	1	0.002	1	0	39737	39419	39578	34841	35140	34991	1.13
					2	0	46279	49166	47723	40988	41955	41472	1.15
					3	0	55744	56899	56322	50212	50763	50488	1.12
					4	0	54412	56158	55285	48345	48864	48605	1.14
					5	0	58451	57832	58142	52486	52342	52414	1.11
はちみつ	0.5	不検出	0.5	0.001	1	0	24358	24744	24551	25360	24980	25170	0.98
					2	0	23053	24247	23650	25597	24211	24904	0.95
					3	0	34381	35488	34935	35684	36768	36226	0.96
					4	0	39865	39038	39452	38976	38112	38544	1.02
					5	0	39701	39171	39436	39229	36775	38002	1.04

*1 添加回収試験における回収率 100%相当濃度。

*2 マトリックス添加標準用液の溶媒標準溶液に対するピーク面積の比。

表 51 マトリックス影響で補正した回収率

食品名	添加濃度 (ppb)	日	ピーク面積比	マトリックス影響 補正後回収率		平均 (%)
				n=1	n=2	
牛の筋肉	1	1	1.01	88	95	88
		2	1.00	84	87	
		3	1.00	87	90	
		4	1.00	88	94	
		5	1.00	87	85	
牛の脂肪	2	1	0.99	98	101	97
		2	1.00	97	104	
		3	0.97	92	93	
		4	1.01	99	91	
		5	1.02	96	99	
牛の肝臓	3	1	0.99	90	93	97
		2	0.96	96	94	
		3	0.96	96	94	
		4	0.93	104	99	
		5	0.93	104	99	
うなぎ	0.5	1	0.89	93	98	97
		2	0.95	98	98	
		3	0.95	91	97	
		4	0.94	101	99	
		5	0.93	100	100	
さけ	0.5	1	0.96	88	92	94
		2	0.94	96	99	
		3	1.02	96	91	
		4	1.01	97	93	
		5	1.03	90	96	
しじみ	0.5	1	0.92	103	100	96
		2	0.92	97	100	
		3	0.98	94	89	
		4	1.02	94	89	
		5	1.01	99	98	
豚の筋肉	0.5	1	0.99	95	95	99
		2	1.00	103	98	
		3	1.02	102	102	
		4	0.99	106	104	
		5	1.00	94	90	
鶏卵	0.5	1	1.07	92	90	96
		2	1.04	92	93	
		3	0.98	104	99	
		4	1.01	97	96	
		5	1.02	99	97	
牛乳	1	1	1.13	96	98	92
		2	1.15	94	98	
		3	1.12	93	97	
		4	1.14	89	86	
		5	1.11	87	84	
はちみつ	0.5	1	0.98	98	99	100
		2	0.95	110	109	
		3	0.96	99	99	
		4	1.02	99	97	
		5	1.04	93	94	

① 添加回収試験の代表的なクロマトグラム

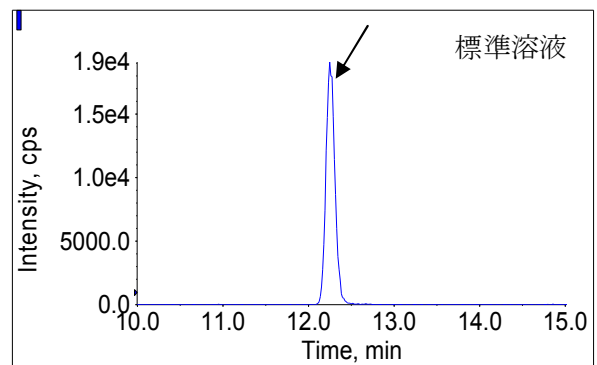
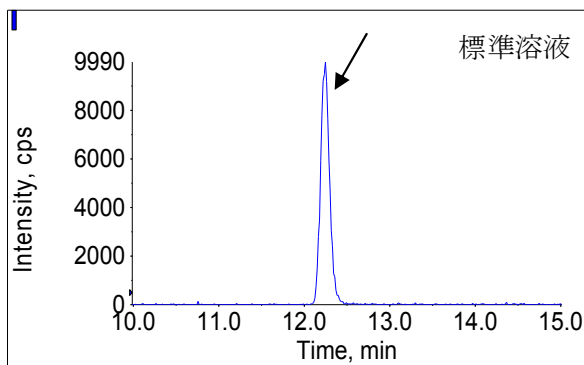
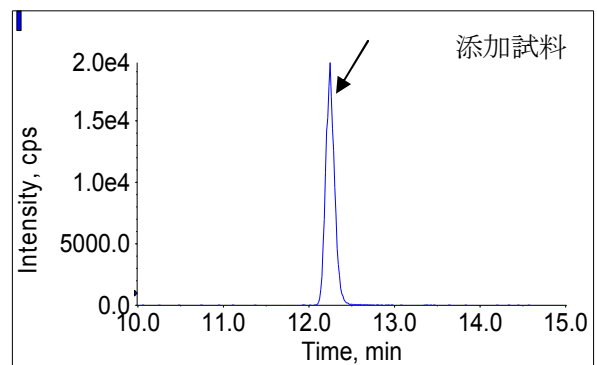
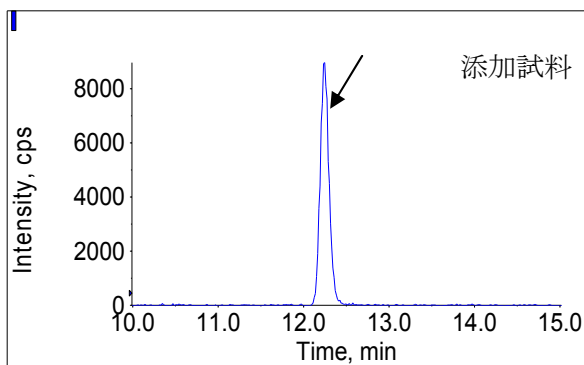
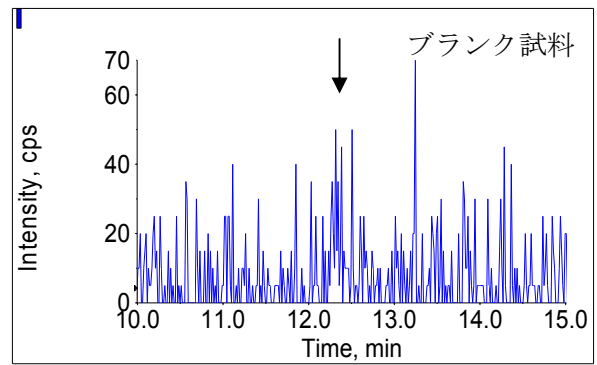
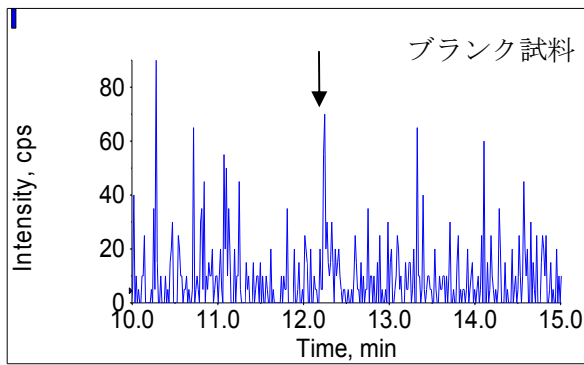


図 20 牛の筋肉の SRM クロマトグラム
(m/z 395→314)
添加濃度 : 0.001 ppm

図 21 牛の脂肪の SRM クロマトグラム
(m/z 395→314)
添加濃度 : 0.002 ppm

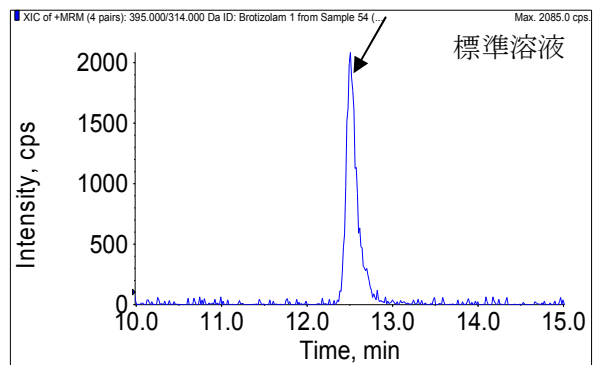
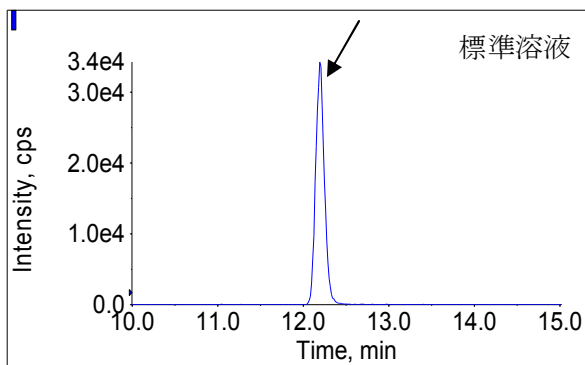
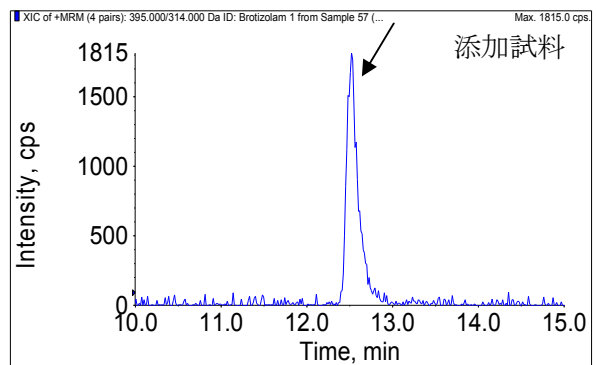
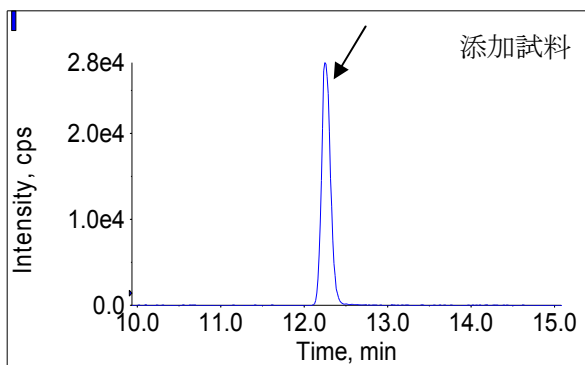
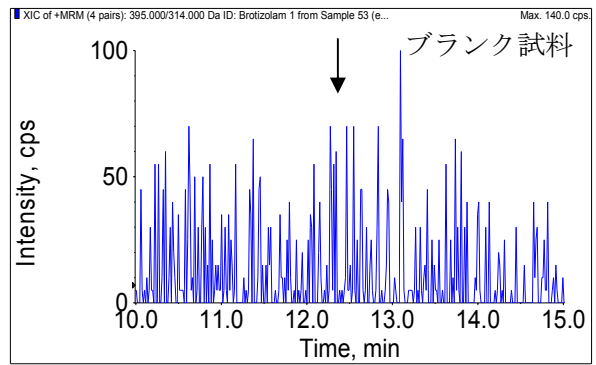
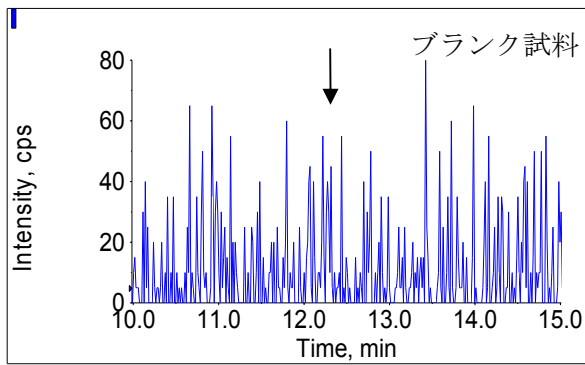


図 22 牛の肝臓の SRM クロマトグラム
(m/z 395→314)
添加濃度 : 0.003 ppm

図 23 鶏卵の SRM クロマトグラム
(m/z 395→314)
添加濃度 : 0.0005 ppm

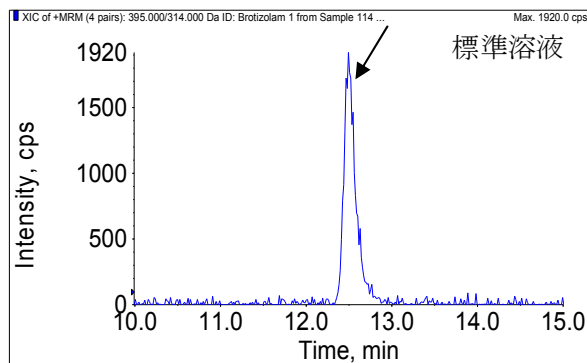
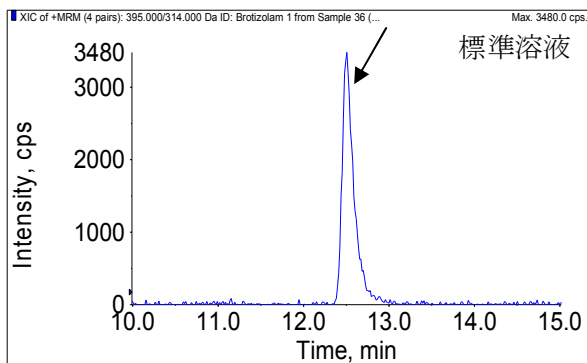
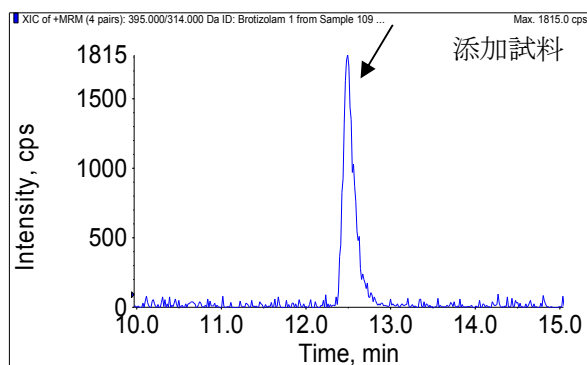
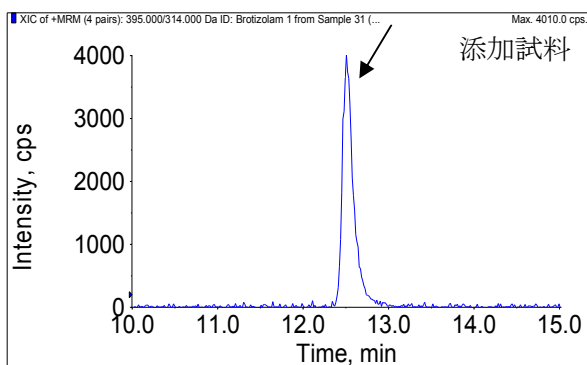
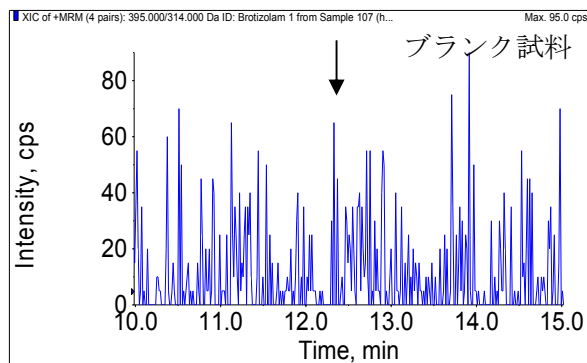
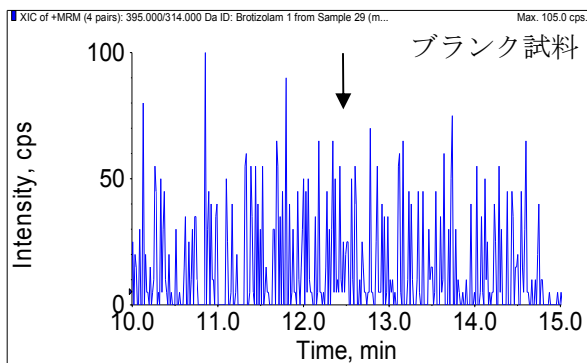


図 24 牛乳の SRM クロマトグラム
(m/z 395→314)
添加濃度 : 0.001 ppm

図 25 はちみつの SRM クロマトグラム
(m/z 395→314)
添加濃度 : 0.0005 ppm

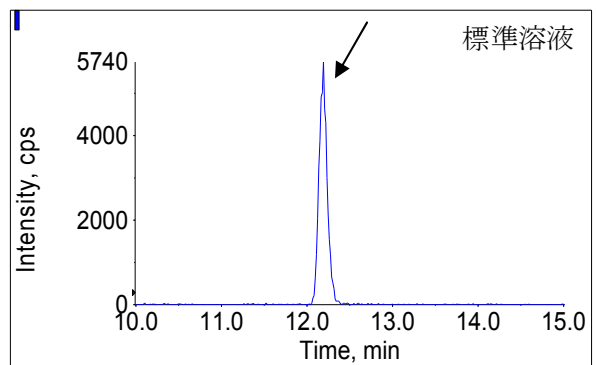
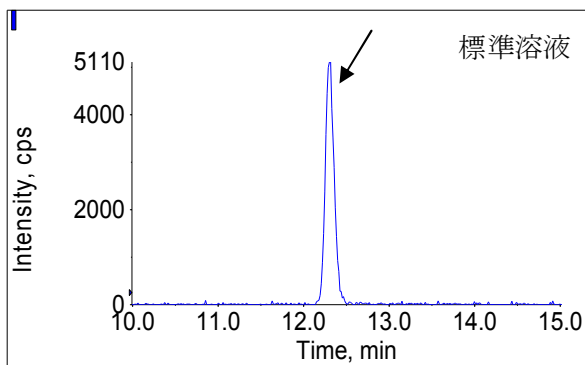
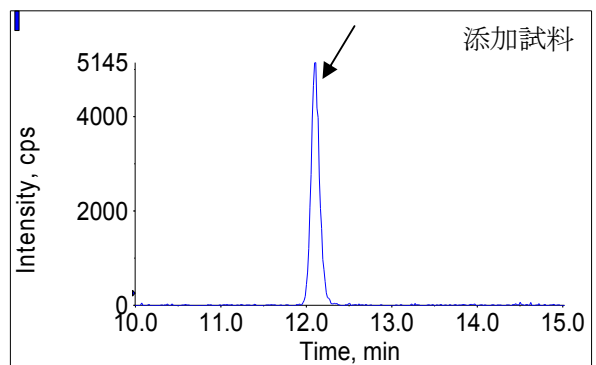
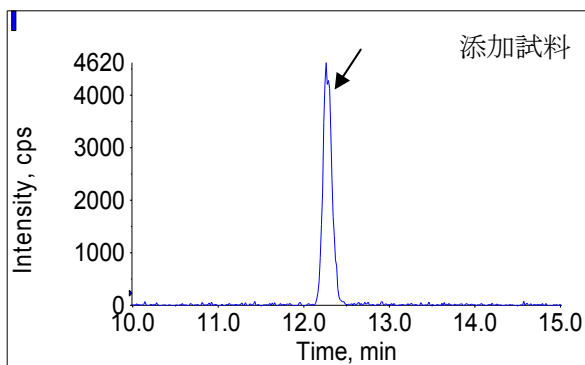
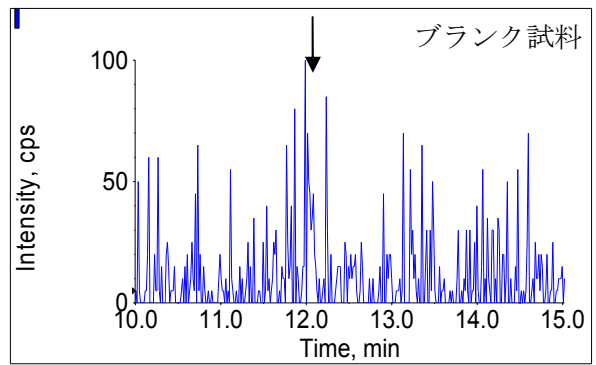
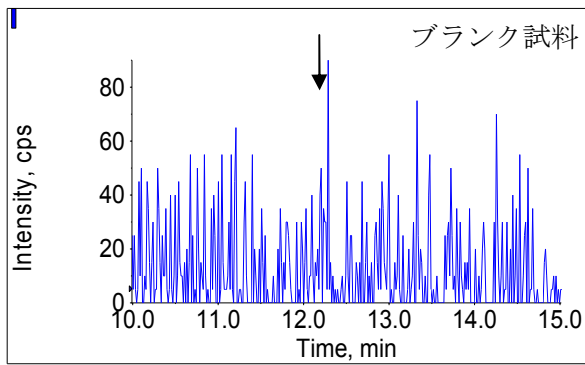


図 26 うなぎの SRM クロマトグラム
(m/z 395→314)
添加濃度 : 0.0005 ppm

図 27 さけの SRM クロマトグラム
(m/z 395→314)
添加濃度 : 0.0005 ppm

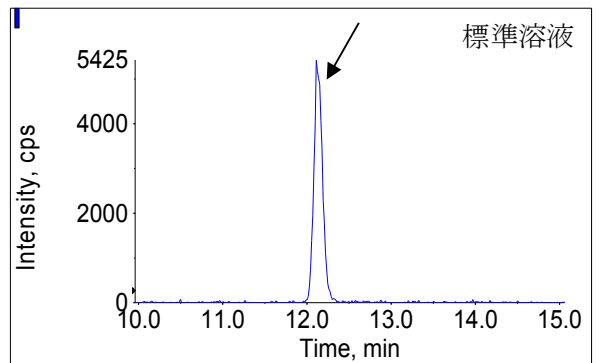
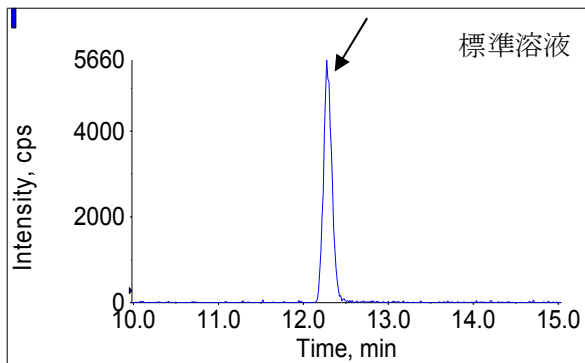
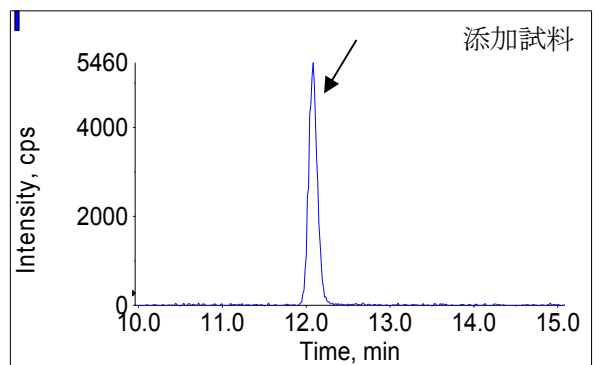
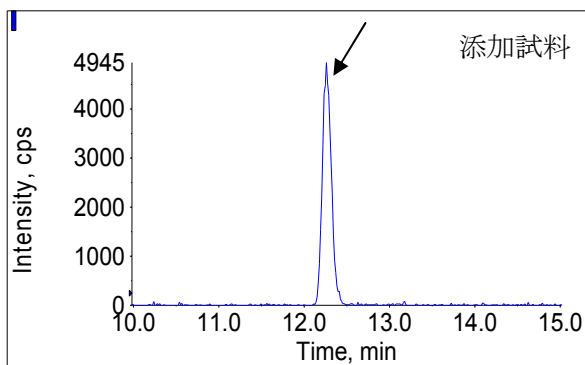
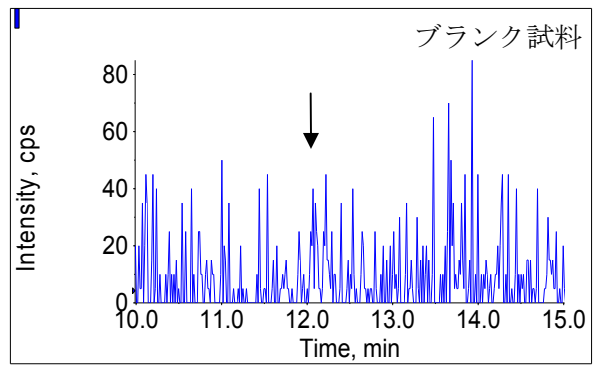
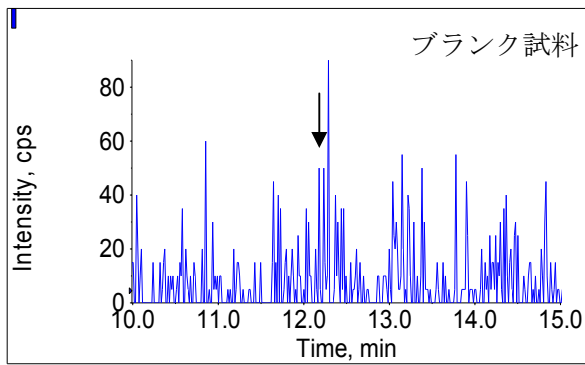


図 28 しじみの SRM クロマトグラム
(m/z 395→314)
添加濃度 : 0.0005 ppm

図 29 豚の筋肉の SRM クロマトグラム
(m/z 395→314)
添加濃度 : 0.0005 ppm

②定量限界の推定における代表的なクロマトグラム

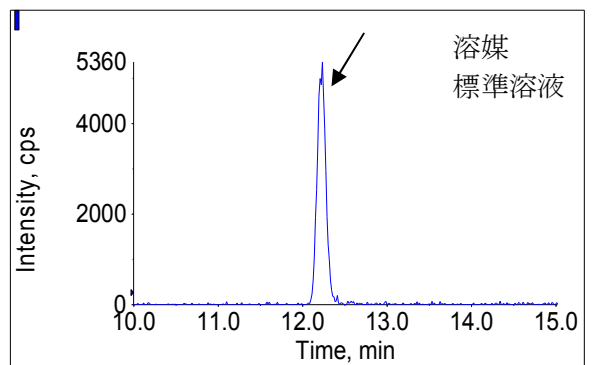
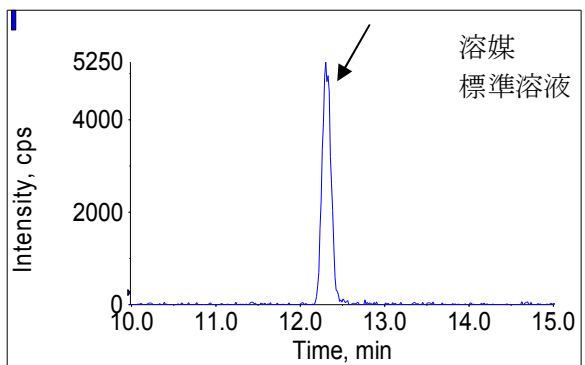
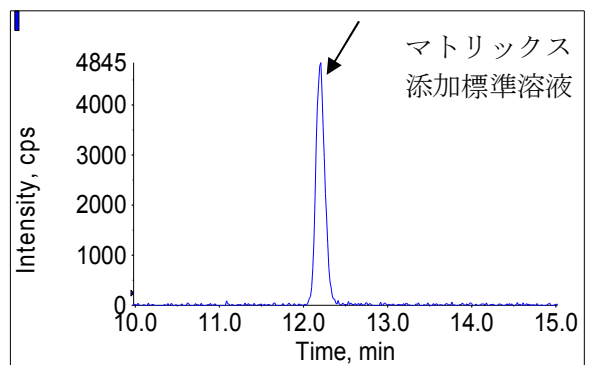
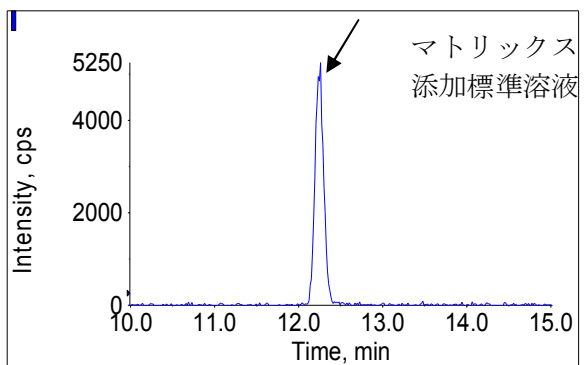
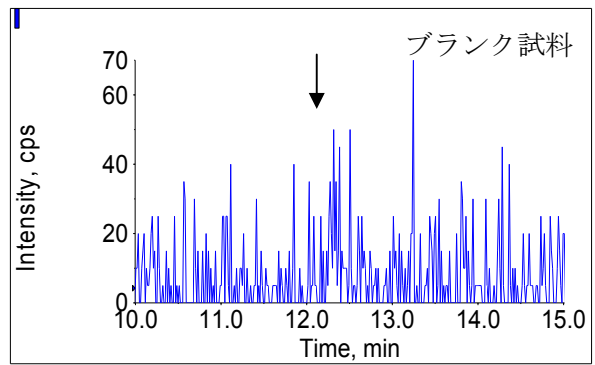
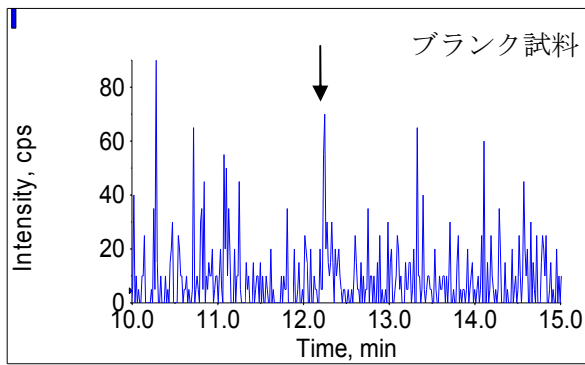


図 30 牛の筋肉の SRM クロマトグラム
(m/z 395→314)
試料中 0.0005 ppm 相当

図 31 牛の脂肪の SRM クロマトグラム
(m/z 395→314)
試料中 0.0005 ppm 相当

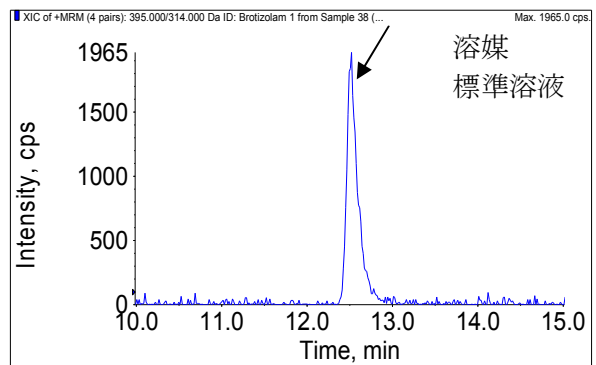
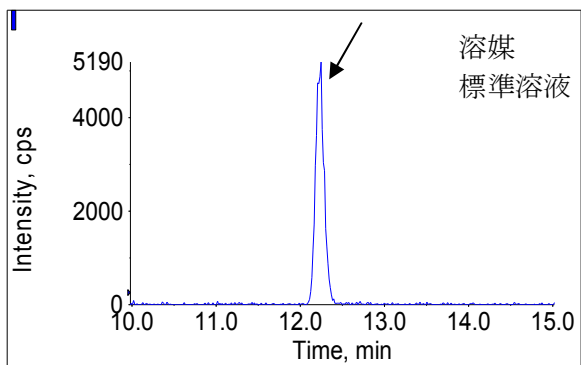
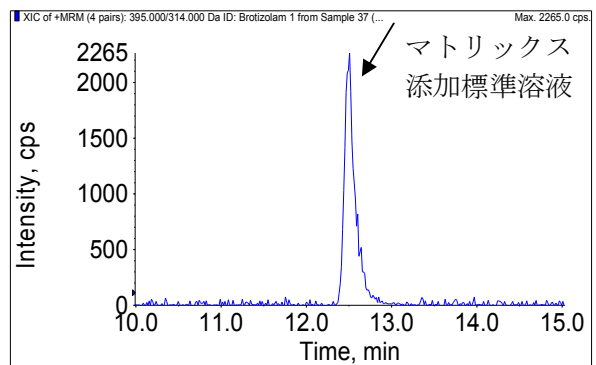
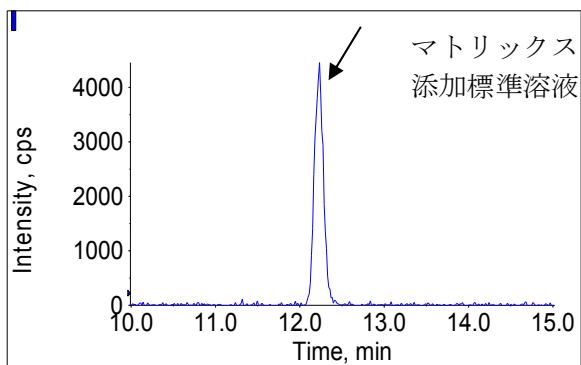
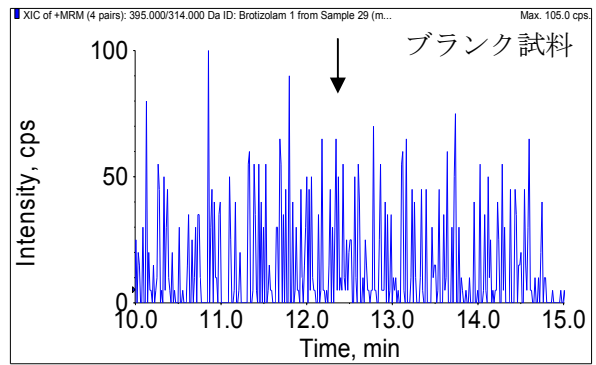
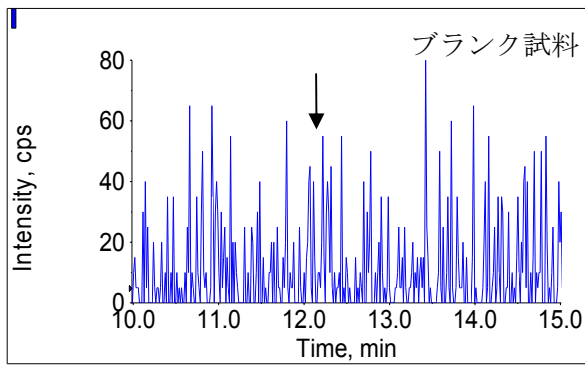


図 32 牛の肝臓の SRM クロマトグラム
(m/z 395→314)
試料中 0.0005 ppm 相当

図 33 牛乳の SRM クロマトグラム
(m/z 395→314)
試料中 0.0005 ppm 相当

③ ブランク試料の代表的な TICC

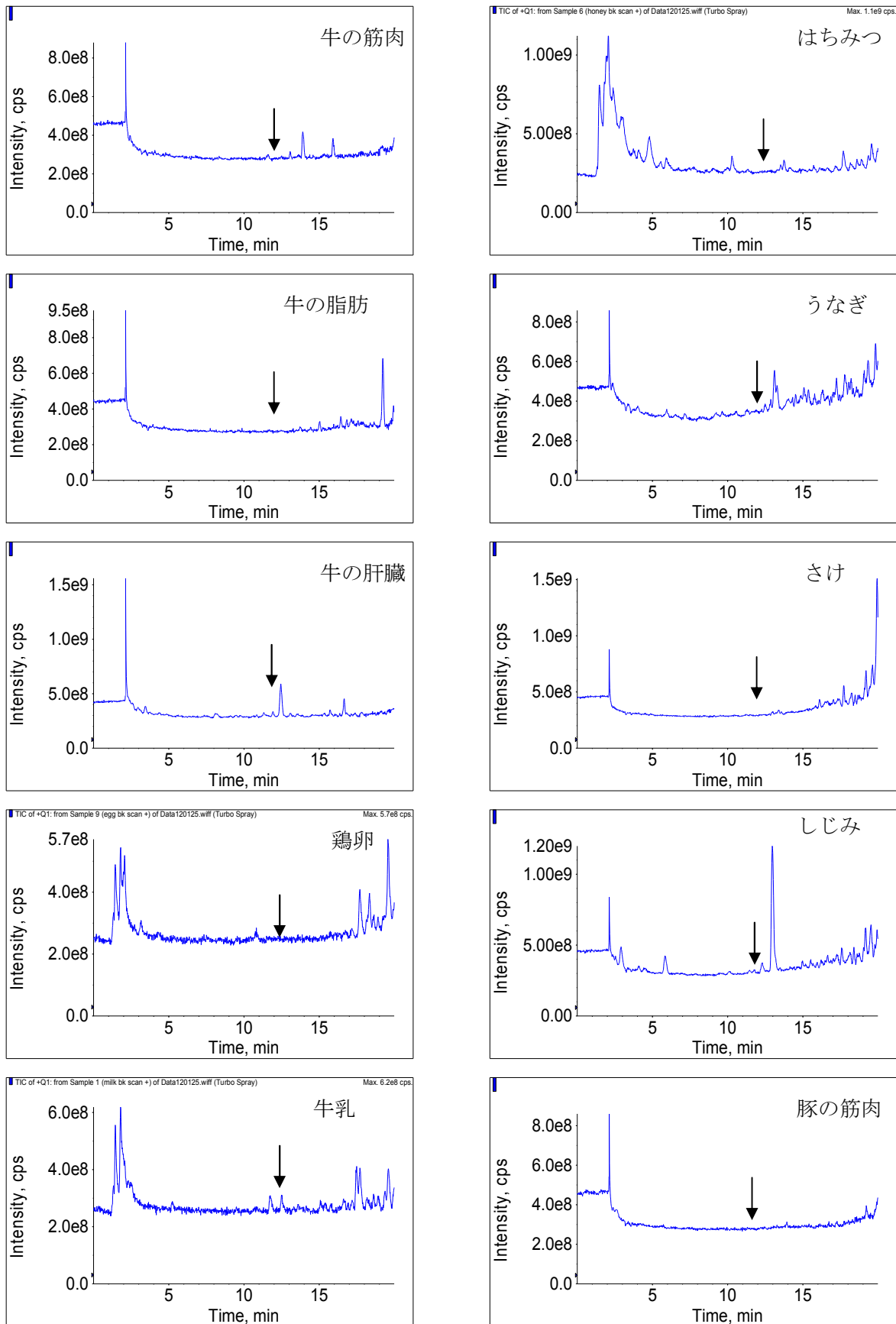


図 34 ブランク試料の TICC
(ESI+, スキャン範囲 50~550 amu)

4. その他の試験法検討に関連する事項

①精製で用いるミニカラムは、ロットや保存状態等により溶出挙動が変動する場合がありますので、予め標準品を用いて確認する。

②プロチザラムの LC-MS/MS 測定で、試験法開発時に使用したイオンを以下に示す。

定量イオン (m/z) : プリカーサーイオン 395、プロダクトイオン 314

定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン 395、プロダクトイオン 316

③試験溶液中に不溶物が見られる場合は遠心分離等で除去する。

5. 複数機関における室内検証試験

開発機関以外の 2 機関において、室内検証試験を実施した。試験は枝分かれ実験として実施し、分析者 1 名が同一の添加試料を 1 日 2 回、5 日間分析した。

1) 試験条件

①機関 1(一般財団法人 東京顕微鏡院)

a. 試料

以下の市販の 10 食品を使用した。

- | | |
|-------|--------------|
| ・牛の筋肉 | ・しじみ |
| ・牛の脂肪 | ・牛乳 |
| ・牛の肝臓 | ・鶏卵 |
| ・さけ | ・はちみつ (アカシア) |
| ・うなぎ | ・豚の筋肉 |

購入先： スーパーマーケット (しじみ以外) 購入地：東京都
インターネット販売 (しじみ (北海道産))

試料の前処理

- | | |
|------------|-------------------------------|
| 牛の筋肉及び豚の筋肉 | : 可能な限り脂肪層を除き、細切均一化した。 |
| 牛の脂肪 | : 可能な限り筋肉層を除き、細切均一化した。 |
| 牛の肝臓 | : 細切均一化した。 |
| さけ | : 皮を含む可食部を細切均一化した。 |
| うなぎ | : 皮、内臓を含む可食部を細切均一化した。 |
| しじみ | : 殻を除去し、細切均一化した。 |
| 牛乳及びはちみつ | : よく混合して均一化した。 |
| 鶏卵 | : 殻を除去し、卵白と卵黄を合わせてよく混合し均一化した。 |

b. 試薬

試薬	規格	メーカー
アセトニトリル	残留農薬試験用 5000 倍濃縮	関東化学 (株)
<i>n</i> -ヘキサン	残留農薬試験用 5000 倍濃縮	関東化学 (株)
アセトン	残留農薬試験用 5000 倍濃縮	和光純薬工業 (株)
アセトニトリル	LC-MS 用	関東化学 (株)
無水硫酸ナトリウム	特級	関東化学 (株)
塩化ナトリウム	特級	和光純薬工業 (株)
ギ酸	LC-MS 用	和光純薬工業 (株)
InertSep C18 ミニカラム	充填量 1 g	ジーエルサイエンス (株)
InertSep SAX/PSA ミニカラム	充填量 500 mg/500 mg	ジーエルサイエンス (株)
ケイソウ土 (セライト 545)		和光純薬工業 (株)

c. 試液

0.1vol%ギ酸

: ギ酸 1 mL を水で希釈し、1 L とした。

アセトニトリル・水 (1 : 1) 混液

: アセトニトリル (LC-MS 用) 500 mL に水 500 mL を加えて調製した。

d. 装置

使用した装置の型式、構成等

	型 式	製 造 元
MS 装置	API4000	Applied Biosystems 社 (現エービーサイエックス社)
LC 装置	Prominence	(株) 島津製作所
ホモジナイザー	バイオミキサー BM-2	(株) 日本精機製作所

e. 測定条件

LC 条件	
カラム	L-column2 ODS サイズ : 内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm 会社 : (一財) 化学物質評価研究機構
移動相流速 (mL/min)	0.20
注入量 (μL)	5
カラム温度 (°C)	40
移動相	A 液 : 0.1vol%ギ酸 B 液 : アセトニトリル

グラジエント条件	時間(分)	A液(%)	B液(%)
	0.0	70	30
	15.0	30	70
	15.1	0	100
	20.0	0	100
	20.1	70	30
	25.0	STOP	STOP

MS 条件	
測定モード	選択反応モニタリング (SRM)
イオン化モード	エレクトロスプレーイオン化法、ポジティブモード (ESI+)
Collision Gas	8.00 (単位なし)
Curtain Gas	50 psi
Ion Source Gas1	30 psi
Ion Source Gas2	50 psi
IonSpray Voltage	4500 V
TurboIonSpray Source 温度	500°C
定量イオン (m/z)	+395→314 (コリジョンエネルギー33 eV)
定性イオン (m/z)	+395→316 (コリジョンエネルギー33 eV)
保持時間 (min)	8.5

②機関2(一般財団法人 日本冷凍食品検査協会)

a. 試料

以下の市販の10食品を使用した。

- ・牛の筋肉
- ・牛の脂肪
- ・牛の肝臓
- ・さけ
- ・うなぎ
- ・しじみ
- ・牛乳
- ・鶏卵
- ・はちみつ(百花蜜)
- ・豚の筋肉

購入先： スーパーマーケット(うなぎ、さけ以外) 購入地：神奈川県
インターネット販売(うなぎ(国産)、さけ(北海道産))

試料の前処理

- 牛の筋肉及び豚の筋肉 : 可能な限り脂肪層を除き、細切均一化した。
- 牛の脂肪 : 可能な限り筋肉層を除き、細切均一化した。
- 牛の肝臓 : 細切均一化した。
- さけ : 皮を含む可食部を細切均一化した。
- うなぎ : 皮、内臓を含む可食部を細切均一化した。
- しじみ : 殻を除去し、細切均一化した。
- 牛乳及びはちみつ : よく混合して均一化した。
- 鶏卵 : 殻を除去し卵白と卵黄を合わせてよく混合し、均一化した。

b. 試薬

試薬	規格	メーカー
アセトニトリル	残留農薬試験用 300 倍濃縮	和光純薬工業 ((株))
<i>n</i> -へキサン	残留農薬試験用 300 倍濃縮	和光純薬工業 (株)
アセトン	残留農薬試験用 300 倍濃縮	関東化学 (株)
アセトニトリル	LC-MS 用	和光純薬工業 (株)
無水硫酸ナトリウム	特級	関東化学 (株)
塩化ナトリウム	特級	純正化学 (株)
ギ酸	LC-MS 用	和光純薬工業 (株)
InertSep C18 ミニカラム	充填量 1 g	ジーエルサイエンス (株)
InertSep SAX/PSA ミニカラム	充填量 500 mg/500 mg	ジーエルサイエンス (株)
ケイソウ土 (セライト 545)	—	和光純薬工業 (株)

c. 試液

0.1vol%ギ酸

: ギ酸 1 mL を水で希釈し、1 L とした。

アセトニトリル・水 (1 : 1) 混液

: アセトニトリル (LC-MS 用) 500 mL に水 500 mL を加えて調製した。

d. 装置

使用した装置の型式、構成等

	型 式	製 造 元
MS 装置	Quattro Micro	ウォーターズ社
LC 装置	Alliance 2695	ウォーターズ社
ホモジナイザー	バイオミキサー BM-2	(株) 日本精機製作所

e. 測定条件

LC 条件	
カラム	L-column2 ODS サイズ : 内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm 会社 : (一財) 化学物質評価研究機構
移動相流速 (mL/min)	0.20
注入量 (μL)	5
カラム温度 (°C)	40
移動相	A 液 : 0.1vol%ギ酸 B 液 : アセトニトリル

グラジエント条件	時間(分)	A液(%)	B液(%)
	0.0	70	30
	15.0	30	70
	15.1	0	100
	20.0	0	100
	20.1	70	30
	25.0	STOP	STOP

MS 条件	
測定モード	選択反応モニタリング (SRM)
イオン化モード	エレクトロスプレーイオン化法、ポジティブモード (ESI+)
キャピラリ電圧 (kV)	4.2
ソース温度 (°C)	120
脱溶媒温度 (°C)	400
脱溶媒ガス	窒素、800 L/Hr
コーンガス	窒素、50 L/Hr
コリジョンガス	アルゴン
定量イオン (m/z)	395→314 (コーン電圧: 31 V、コリジョンエネルギー: 21 eV)
定性イオン (m/z)	395→316 (コーン電圧: 31 V、コリジョンエネルギー: 21 eV)
保持時間 (min)	11.4

2) 結果

①選択性

各試料のブランク試料及びマトリックス添加標準溶液(各1日1回調製)を測定し、選択性を評価した。結果を表49～表58に示す。また、図35～54に各試料の代表的なブランク試料のSRMクロマトグラムを示す。両機関の全試料において妨害ピークの許容範囲の判定基準に適合した。

表 49 選択性の評価(牛の筋肉)

試料	定量限界 (ppb)	基準値 (ppb)	添加濃度*1 (ppb)		妨害ピークの許容範囲		機関	日	ピーク面積			選択性の評価*3	
					評価対象濃度(ppb)	判定基準			ブランク試料(a)	標準溶液*2 (b)	面積比 (a)/(b)		
牛の筋肉	0.5	1	1	*	定量限界	0.5	< 0.333	1	1	0	34390	0	○
									2	0	39540	0	○
									3	0	33710	0	○
									4	0	30800	0	○
									5	0	29440	0	○
								2	1	0	632	0	○
									2	0	626	0	○
									3	0	331	0	○
									4	0	830	0	○
									5	0	880	0	○

1 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。

*2 試料中の濃度が評価対象濃度相当になるように調製したマトリックス添加標準溶液。

*3 面積比が、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「×」が表示される。

表 50 選択性の評価(牛の脂肪)

試料	定量 限界 (ppb)	基準値 (ppb)	添加濃度*1 (ppb)		妨害ピークの許容範囲		機関	日	ピーク面積			選択性 の 評価*3	
					評価対象濃度(ppb)	判定基準			ブランク 試料(a)	標準溶液*2 (b)	面積比 (a)/(b)		
牛の脂肪	0.5	2	2	基準値	2.0	< 0.1		1	1	0	77680	0	○
									2	0	67080	0	○
									3	0	66740	0	○
									4	0	62590	0	○
									5	0	62940	0	○
								2	1	0	1248	0	○
									2	0	1208	0	○
									3	0	1359	0	○
									4	0	1626	0	○
									5	0	1770	0	○

表 51 選択性の評価(牛の肝臓)

試料	定量 限界 (ppb)	基準値 (ppb)	添加濃度*1 (ppb)		妨害ピークの許容範囲		機関	日	ピーク面積			選択性 の 評価*3	
					評価対象濃度(ppb)	判定基準			ブランク 試料(a)	標準溶液*2 (b)	面積比 (a)/(b)		
牛の肝臓	0.5	3	3	基準値	3.0	< 0.1		1	1	0	103900	0	○
									2	0	123500	0	○
									3	0	101800	0	○
									4	0	95490	0	○
									5	0	103900	0	○
								2	1	0	1778	0	○
									2	0	1055	0	○
									3	0	2564	0	○
									4	0	2581	0	○
									5	0	2592	0	○

表 52 選択性の評価(うなぎ)

試料	定量 限界 (ppb)	基準値 (ppb)	添加濃度*1 (ppb)		妨害ピークの許容範囲		機関	日	ピーク面積			選択性 の 評価*3	
					評価対象濃度(ppb)	判定基準			ブランク 試料(a)	標準溶液*2 (b)	面積比 (a)/(b)		
うなぎ	0.5	不検出	0.5		定量限界	0.5	< 0.333	1	1	0	17160	0	○
									2	0	16240	0	○
									3	0	16320	0	○
									4	0	18680	0	○
									5	0	20280	0	○
								2	1	0	436	0	○
									2	0	318	0	○
									3	0	442	0	○
									4	0	411	0	○
									5	0	436	0	○

表 53 選択性の評価(さけ)

試料	定量 限界 (ppb)	基準値 (ppb)	添加濃度*1 (ppb)		妨害ピークの許容範囲		機関	日	ピーク面積			選択性 の 評価*3	
					評価対象濃度(ppb)	判定基準			ブランク 試料(a)	標準溶液*2 (b)	面積比 (a)/(b)		
さけ	0.5	不検出	0.5		定量限界	0.5	< 0.333	1	1	0	20690	0	○
									2	0	18940	0	○
									3	0	18170	0	○
									4	0	22140	0	○
									5	0	23240	0	○
								2	1	0	303	0	○
									2	0	322	0	○
									3	0	426	0	○
									4	0	410	0	○
									5	0	443	0	○

表 54 選択性の評価(しじみ)

試料	定量 限界 (ppb)	基準値 (ppb)	添加濃度*1 (ppb)		妨害ピークの許容範囲		機関	日	ピーク面積			選択性 の 評価*3	
					評価対象濃度(ppb)	判定基準			ブランク 試料(a)	標準溶液*2 (b)	面積比 (a)/(b)		
しじみ	0.5	不検出	0.5		定量限界	0.5	< 0.333	1	1	0	17530	0	○
									2	0	18550	0	○
									3	0	19550	0	○
									4	0	21170	0	○
									5	0	20920	0	○
								2	1	0	502	0	○
									2	0	321	0	○
									3	0	425	0	○
									4	0	415	0	○
									5	0	430	0	○

表 55 選択性の評価(豚の筋肉)

試料	定量 限界 (ppb)	基準値 (ppb)	添加濃度*1 (ppb)		妨害ピークの許容範囲		機関	日	ピーク面積			選択性 の 評価*3	
					評価対象濃度(ppb)	判定基準			ブランク 試料(a)	標準溶液*2 (b)	面積比 (a)/(b)		
豚の筋肉	0.5	不検出	0.5		定量限界	0.5	< 0.333	1	1	0	18270	0	○
									2	0	17010	0	○
									3	0	16550	0	○
									4	0	19250	0	○
									5	0	19740	0	○
								2	1	0	358	0	○
									2	0	335	0	○
									3	0	422	0	○
									4	0	389	0	○
									5	0	457	0	○

表 56 選択性の評価(鶏卵)

試料	定量 限界 (ppb)	基準値 (ppb)	添加濃度* ¹ (ppb)		妨害ピークの許容範囲		機 関	日	ピーク面積			選 択 性 の 評 価* ³	
					評価対象濃度(ppb)	判定基準			ブランク 試料(a)	標準溶液* ² (b)	面積比 (a)/(b)		
鶏卵	0.5	不検出	0.5		定量限界	0.5	< 0.333	1	1	0	16810	0	○
									2	0	16250	0	○
									3	0	16140	0	○
									4	0	19950	0	○
									5	0	19560	0	○
								2	1	0	468	0	○
									2	0	366	0	○
									3	0	451	0	○
									4	0	455	0	○
									5	0	433	0	○

表 57 選択性の評価(牛乳)

試料	定量 限界 (ppb)	基準値 (ppb)	添加濃度* ¹ (ppb)		妨害ピークの許容範囲		機 関	日	ピーク面積			選 択 性 の 評 価* ³	
					評価対象濃度(ppb)	判定基準			ブランク 試料(a)	標準溶液* ² (b)	面積比 (a)/(b)		
牛乳	0.5	1	1	*	定量限界	0.5	< 0.333	1	1	0	33950	0	○
									2	0	44130	0	○
									3	0	31520	0	○
									4	0	29880	0	○
									5	0	33900	0	○
								2	1	0	839	0	○
									2	0	755	0	○
									3	0	868	0	○
									4	0	903	0	○
									5	0	892	0	○

表 58 選択性の評価(はちみつ)

試料	定量 限界 (ppb)	基準値 (ppb)	添加濃度*1 (ppb)		妨害ピークの許容範囲		機 関	日	ピーク面積			選 択 性 の 評 価*3	
					評価対象濃度(ppb)	判定基準			ブランク 試料(a)	標準溶液*2 (b)	面積比 (a)/(b)		
はちみつ	0.5	不検出	0.5		定量限界	0.5	< 0.333	1	1	0	17520	0	○
									2	0	20290	0	○
									3	0	15590	0	○
									4	0	18980	0	○
									5	0	17140	0	○
								2	1	0	335	0	○
									2	0	316	0	○
									3	0	443	0	○
									4	0	435	0	○
									5	0	469	0	○

② 真度、精度及び定量限界の評価

各機関において1日2回、5日間分析した全試行(n=10)の平均値を真度とした。また、一元配置の分散分析により併行精度と室内精度を算出した。結果を表59～68に示す。また、図35～54に各試料の代表的な添加試料及び標準溶液のSRMクロマトグラムを示す。機関1の真度は79～108%、併行精度は2～10RSD%及び室内精度は4～11RSD%であった。また、機関2の真度は81～87%、併行精度は3～8RSD%及び室内精度は6～14RSD%であり、いずれの機関においても全ての項目について目標値を満たした。

なお、牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓及び牛乳については、添加濃度と定量限界濃度が異なるため、別途定量限界の推定を行った。これらの試料の定量限界の推定結果を表69及び70に、各S/N比の算出結果を表71及び72に示す。また、図30～33に定量限界の推定における代表的なクロマトグラムを示す。両機関とも評価対象濃度の全試料においてS/N \geq 10を満たした。

表 59 真度、精度及び定量限界の評価(牛の筋肉)

食品名	定量 限界 (ppb)	基準値 (ppb)	添加 濃度 (ppb)	定量 限界の 評価*1	機 関	日	検量線			回収率 (%)		真度 (%)	併行 精度 (RSD%)	室内 精度 (RSD%)	S/N 比		
							傾き	切片	r ² 値	n=1	n=2				Max.	Min.	平均値
牛の筋肉	0.5	1	1	*	1	1	26754	1097	0.999	90	90	94	4	8	-	-	-
						2	21537	2463	0.998	91	97						
						3	23354	-111	0.998	93	100						
						4	13719	-540	0.998	86	83						
						5	12439	-424	0.999	101	106						
					2	1	343	-6	0.998	76	74	83	3	7	-	-	-
						2	336	5	0.999	80	81						
						3	183	-7	0.998	87	90						
						4	422	23	0.999	85	90						
						5	462	2	0.998	83	87						

表 60 真度、精度及び定量限界の評価(牛の脂肪)

食品名	定量 限界 (ppb)	基準値 (ppb)	添加 濃度 (ppb)	定量 限界の 評価*1	機 関	日	検量線			回収率 (%)		真度 (%)	併行 精度 (RSD%)	室内 精度 (RSD%)	S/N 比		
							傾き	切片	r ² 値	n=1	n=2				Max.	Min.	平均値
牛の脂肪	0.5	2	2	*	1	1	26602	828	1.000	93	103	96	4	9	-	-	-
						2	21326	2641	1.000	104	100						
						3	22949	265	0.999	106	103						
						4	14037	-1455	0.999	95	93						
						5	13634	-1090	0.998	82	86						
					2	1	338	-45	0.998	91	97	86	3	7	-	-	-
						2	311	-7	0.999	84	83						
						3	432	-184	0.993	80	80						
						4	442	-42	0.999	84	88						
						5	497	-18	0.999	89	84						

表 61 真度、精度及び定量限界の評価(牛の肝臓)

食品名	定量 限界 (ppb)	基準値 (ppb)	添加 濃度 (ppb)	定量 限界の 評価*1	機 関	日	検量線			回収率 (%)		真度 (%)	併行 精度 (RSD%)	室内 精度 (RSD%)	S/N 比		
							傾き	切片	r ² 値	n=1	n=2				Max.	Min.	平均値
牛の肝臓	0.5	3	3	*	1	1	26055	1465	0.999	92	96	99	3	5	-	-	-
						2	22460	-646	0.998	97	102						
						3	23752	-2595	0.999	101	104						
						4	13529	292	0.999	93	95						
						5	12590	-920	0.999	100	105						
					2	1	320	-56	1.000	78	76	83	7	12	-	-	-
						2	160	7	0.999	72	79						
						3	432	56	0.999	84	74						
						4	443	17	0.999	96	99						
						5	474	-88	1.000	95	81						

表 62 真度、精度及び定量限界の評価(うなぎ)

食品名	定量 限界 (ppb)	基準値 (ppb)	添加 濃度 (ppb)	定量 限界の 評価*1	機 関	日	検量線			回収率 (%)		真度 (%)	併行 精度 (RSD%)	室内 精度 (RSD%)	S/N 比		
							傾き	切片	r ² 値	n=1	n=2				Max.	Min.	平均値
うなぎ	0.5	不検出	0.5		1	1	18704	1	0.999	94	96	98	2	9	69	45	57
						2	12957	475	0.999	86	91						
						3	12764	-468	0.999	102	103						
						4	16121	-282	0.999	110	113						
						5	17927	-101	1.000	96	95						
					2	1	464	2	0.999	73	79	81	5	7	110	47	78
						2	348	4	0.999	79	78						
						3	456	-9	0.999	82	73						
						4	400	19	0.999	82	87						
						5	456	10	0.999	84	89						

表 63 真度、精度及び定量限界の評価(さけ)

食品名	定量 限界 (ppb)	基準値 (ppb)	添加 濃度 (ppb)	定量 限界の 評価*1	機 関	日	検量線			回収率 (%)		真度 (%)	併行 精度 (RSD%)	室内 精度 (RSD%)	S/N 比			
							傾き	切片	r ² 値	n=1	n=2				Max.	Min.	平均値	
さけ	0.5	不検出	0.5			1	1	18704	1	0.999	116	109	108	5	6	48	49	49
							2	12957	475	0.999	99	105						
							3	12764	-468	0.999	110	99						
							4	16121	-282	0.999	119	109						
							5	17927	-101	1.000	111	106						
						2	1	306	-6	0.997	94	81	86	7	7	38	34	36
							2	336	-2	0.999	80	83						
							3	438	2	0.999	80	85						
							4	420	-6	0.998	94	90						
							5	436	-3	0.998	93	80						

表 64 真度、精度及び定量限界の評価(しじみ)

食品名	定量 限界 (ppb)	基準値 (ppb)	添加 濃度 (ppb)	定量 限界の 評価*1	機 関	日	検量線			回収率 (%)		真度 (%)	併行 精度 (RSD%)	室内 精度 (RSD%)	S/N 比			
							傾き	切片	r ² 値	n=1	n=2				Max.	Min.	平均値	
しじみ	0.5	不検出	0.5			1	1	18704	1	0.999	97	107	97	5	6	98	58	78
							2	12957	475	0.999	95	89						
							3	12764	-468	0.999	91	95						
							4	16121	-282	0.999	98	104						
							5	17927	-101	1.000	93	101						
						2	1	441	-10	0.999	83	100	85	8	8	48	63	55
							2	326	-5	0.999	83	83						
							3	423	3	0.999	74	85						
							4	397	6	0.999	90	91						
							5	446	-10	0.999	85	81						

表 65 真度、精度及び定量限界の評価(豚の筋肉)

食品名	定量 限界 (ppb)	基準値 (ppb)	添加 濃度 (ppb)	定量 限界の 評価*1	機 関	日	検量線			回収率 (%)		真度 (%)	併行 精度 (RSD%)	室内 精度 (RSD%)	S/N 比			
							傾き	切片	r ² 値	n=1	n=2				Max.	Min.	平均値	
豚の筋肉	0.5	不検出	0.5			1	1	18704	1	0.999	87	90	91	3	9	55	42	48
							2	12957	475	0.999	90	83						
							3	12764	-468	0.999	100	101						
							4	16121	-282	0.999	96	99						
							5	17927	-101	1.000	83	83						
						2	1	359	7	0.999	81	83	87	4	6	91	45	68
							2	355	-7	1.000	89	84						
							3	469	-34	0.998	88	83						
							4	413	-3	1.000	95	87						
							5	425	3	0.999	93	91						

表 66 真度、精度及び定量限界の評価(鶏卵)

食品名	定量 限界 (ppb)	基準値 (ppb)	添加 濃度 (ppb)	定量 限界の 評価*1	機 関	日	検量線			回収率 (%)		真度 (%)	併行 精度 (RSD%)	室内 精度 (RSD%)	S/N 比			
							傾き	切片	r ² 値	n=1	n=2				Max.	Min.	平均値	
鶏卵	0.5	不検出	0.5			1	1	12854	428	0.999	87	94	90	10	11	47	57	52
							2	12764	-468	0.999	105	86						
							3	12700	-57	0.998	83	76						
							4	16121	-282	0.999	92	105						
							5	17927	-101	1.000	81	95						
						2	1	448	-16	0.999	92	87	85	5	6	67	48	58
							2	363	0	0.999	83	75						
							3	446	-13	0.999	86	83						
							4	432	8	0.999	86	89						
							5	439	2	0.999	81	88						

表 67 真度、精度及び定量限界の評価(牛乳)

食品名	定量限界 (ppb)	基準値 (ppb)	添加濃度 (ppb)	定量限界の評価*1	機関	日	検量線			回収率 (%)		真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)	S/N 比		
							傾き	切片	r ² 値	n=1	n=2				Max.	Min.	平均値
牛乳	0.5	1	1	*	1	1	21537	2463	0.998	86	89	89	3	4	-	-	-
						2	23354	-111	0.998	87	90						
						3	13719	-540	0.998	91	88						
						4	12439	-424	0.999	92	97						
						5	12546	101	0.998	84	90						
					2	1	365	103	0.997	95	92	86	4	7	-	-	-
						2	385	-43	1.000	77	83						
						3	429	-1	0.999	82	81						
						4	466	-10	0.999	89	84						
						5	478	-39	0.999	87	90						

表 68 真度、精度及び定量限界の評価(はちみつ)

食品名	定量限界 (ppb)	基準値 (ppb)	添加濃度 (ppb)	定量限界の評価*1	機関	日	検量線			回収率 (%)		真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)	S/N 比		
							傾き	切片	r ² 値	n=1	n=2				Max.	Min.	平均値
はちみつ	0.5	不検出	0.5		1	1	22636	1105	1.000	76	74	79	3	6	66	62	64
						2	23882	-249	1.000	80	76						
						3	12854	428	0.999	76	77						
						4	12764	-468	0.999	83	87						
						5	12700	-57	0.998	82	84						
					2	1	298	6	0.999	78	91	87	8	14	72	45	58
						2	342	-13	0.999	80	84						
						3	474	-27	0.999	103	112						
						4	445	-6	1.000	81	85						
						5	450	-8	1.000	86	72						

表 69 定量限界の推定(機関 1)

食品名	定量 限界 (ppb)	基準値 (ppb)	添加 濃度 (ppb)	標準 溶液 濃度* ¹ (mg/L)	ピーク面積						S/N 比		平均値		
					ブランク	マトリックス添加 標準溶液* ²			溶媒標準溶液				面積 比* ³ (%)	S/N 比	
						n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均	n=1			n=2
牛の筋肉	0.5	1	1	0.001	0	16070	16820	16445	16140	16350	16245	50	68	101	59
牛の脂肪	0.5	2	2	0.001	0	18130	18590	18360	17870	17660	17765	106	75	103	90
牛の肝臓	0.5	3	3	0.001	0	17820	18260	18040	17090	16650	16870	87	93	107	90
牛乳	0.5	1	1	0.001	0	17510	16070	16790	16560	16390	16475	54	43	102	49

*1 試料中定量限界濃度に相当する各標準溶液濃度。

*2 ブランク値を差し引いた値。

*3 マトリックス添加標準用液の溶媒標準溶液に対するピーク面積の比 (%)。

表 70 定量限界の推定(機関 2)

食品名	定量 限界 (ppb)	基準値 (ppb)	添加 濃度 (ppb)	標準 溶液 濃度* ¹ (mg/L)	ピーク面積						S/N 比		平均値		
					ブランク	マトリックス添加 標準溶液* ²			溶媒標準溶液				面積 比* ³ (%)	S/N 比	
						n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均	n=1			n=2
牛の筋肉	0.5	1	1	0.001	0	456	466	461	434	447	441	60	70	105	65
牛の脂肪	0.5	2	2	0.001	0	402	422	412	410	420	415	70	64	99	67
牛の肝臓	0.5	3	3	0.001	0	436	429	433	421	428	425	118	79	102	98
牛乳	0.5	1	1	0.001	0	440	439	440	436	444	440	217	76	100	147

*1 試料中定量限界濃度に相当する各標準溶液濃度。

*2 ブランク値を差し引いた値。

*3 マトリックス添加標準用液の溶媒標準溶液に対するピーク面積の比 (%)。

表 71 S/N 比の算出(機関 1)

食品名	S/N 比を 求める 対象	濃度*2 (mg/L)	Max, n=1							Min, n=2							S/N 比	
			D _{max}	ノイズ			D	S	N	D _{max}	ノイズ			D	S	N	Max, n=1	Min, n=2
				E1	E2	C					E1	E2	C					
牛の筋肉	標準	0.001	3328	160	0	80	3296	3216	64	3460	124	0	62	3435	3373	50	50	68
牛の脂肪	標準	0.001	3800	88	0	44	3782	3738	35	3664	120	0	60	3640	3580	48	106	75
牛の肝臓	標準	0.001	3676	104	0	52	3655	3603	42	3632	96	0	48	3613	3565	38	87	93
鶏卵	添加試料	0.001	3432	176	0	88	3397	3309	70	1796	76	0	38	1781	1743	30	47	57
牛乳	標準	0.001	3556	160	0	80	3524	3444	64	3452	192	0	96	3414	3318	77	54	43
はちみつ	添加試料	0.001	1948	72	0	36	1934	1898	29	2772	108	0	54	2750	2696	43	66	62
うなぎ	添加試料	0.001	3496	124	0	62	3471	3409	50	2072	112	0	56	2050	1994	45	69	45
さけ	添加試料	0.001	4012	200	0	100	3972	3872	80	2204	108	0	54	2182	2128	43	48	49
しじみ	添加試料	0.001	4004	100	0	50	3984	3934	40	2008	84	0	42	1991	1949	34	98	58
豚の筋肉	添加試料	0.001	2176	96	0	48	2157	2109	38	2940	168	0	84	2906	2822	67	55	42

*1 D_{max} : ピークの最大値
 E1 : ノイズの最大値
 E2 : ノイズの最小値
 C : ノイズの中央値 (E1 と E2 の平均値を使用)
 D : ピークトップ
 S : ピーク高さ
 N : ノイズ幅

*2 試料中濃度が定量限界相当になるように調製したマトリックス添加標準溶液の濃度。

表 72 S/N 比の算出(機関 2)

食品名	S/N 比を 求める 対象	濃度*2 (mg/L)	Max, n=1							Min, n=2							S/N 比	
			D _{max}	ノイズ			D	S	N	D _{max}	ノイズ			D	S	N	Max, n=1	Min, n=2
				E1	E2	C					E1	E2	C					
牛の筋肉	標準	0.001	3050	184	63	124	3026	2902	48	3410	191	74	133	3387	3254	47	60	70
牛の脂肪	標準	0.001	2430	151	69	110	2414	2304	33	2760	167	65	116	2740	2624	41	70	64
牛の肝臓	標準	0.001	2790	122	65	94	2779	2685	23	3030	157	65	111	3012	2901	37	118	79
鶏卵	添加試料	0.001	2640	162	69	116	2621	2506	37	1840	152	62	107	1822	1715	36	67	48
牛乳	標準	0.001	3210	98	62	80	3203	3123	14	2620	141	59	100	2604	2504	33	217	76
はちみつ	添加試料	0.001	3420	191	77	134	3397	3263	46	1970	166	63	115	1949	1835	41	72	45
うなぎ	添加試料	0.001	2690	117	58	88	2678	2591	24	2110	171	66	119	2089	1971	42	110	47
さけ	添加試料	0.001	1800	162	52	107	1778	1671	44	1870	199	72	136	1845	1709	51	38	34
しじみ	添加試料	0.001	2520	190	67	129	2495	2367	49	2070	142	64	103	2054	1951	31	48	63
豚の筋肉	添加試料	0.001	2760	139	66	103	2745	2643	29	2060	171	65	118	2039	1921	42	91	45

*1 D_{max} : ピークの最大値
 E1 : ノイズの最大値
 E2 : ノイズの最小値
 C : ノイズの中央値 (E1 と E2 の平均値を使用)
 D : ピークトップ
 S : ピーク高さ
 N : ノイズ幅

*2 試料中濃度が定量限界相当になるように調製したマトリックス添加標準溶液の濃度。

③試料マトリックスの測定への影響

添加回収試験における回収率 100%相当濃度のマトリックス添加標準溶液と溶媒標準溶液の測定結果から、試料マトリックスの測定への影響を評価した。結果を表 73～82 に示す。また、各ブランク試料の代表的な TICC を図 63 及び 64 に示す。

機関 1 のさけ試料においてピーク面積比が 1.16～1.24 となり高いマトリックス影響が認められたが、図 63 の TICC においてはプロチゾラムのピーク位置にマトリックスのピークは検出されていなかった。表 83～85 にマトリックス影響で補正した各試料の回収率を示す。機関 1 のさけ試料の補正後の回収率は 80～101%となり、補正前の回収率(99～119%)が高くなった原因はマトリックス影響によるものと確認された。

表 73 試料マトリックスの測定への影響(牛の筋肉)

食品名	定量 限界 (ppb)	基準値 (ppb)	添加 濃度 (ppb)	標準溶液 濃度*1 (mg/L)	機 関	日	ピーク面積							
							ブランク	マトリックス添加標準溶液			溶媒標準溶液			ピーク 面積比*2
								n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均	
牛の筋肉	0.5	1	1	0.002	1	1	0	33020	33550	33285	33880	33720	33800	0.98
						2	0	39540	37900	38720	37840	38770	38305	1.01
						3	0	33710	33950	33830	32600	32660	32630	1.04
						4	0	30800	31920	31360	30690	30330	30510	1.03
						5	0	29440	32180	30810	30880	32740	31810	0.97
					2	1	0	632	654	643	665	670	668	0.96
						2	0	626	645	636	679	688	684	0.93
						3	0	331	312	322	354	354	354	0.91
						4	0	830	841	836	867	896	882	0.95
						5	0	880	880	880	944	911	928	0.95

表 74 試料マトリックスの測定への影響(牛の脂肪)

食品名	定量 限界 (ppb)	基準値 (ppb)	添加 濃度 (ppb)	標準溶液 濃度*1 (mg/L)	機 関	日	ピーク面積							
							ブランク	マトリックス添加標準溶液			溶媒標準溶液			ピーク 面積比*2
								n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均	
牛の脂肪	0.5	2	2	0.004	1	1	0	77680	76480	77080	75450	73680	74565	1.03
						2	0	67080	64170	65625	62360	65260	63810	1.03
						3	0	66740	75240	70990	68970	69660	69315	1.02
						4	0	62590	66520	64555	60500	66010	63255	1.02
						5	0	62940	58380	60660	63130	62560	62845	0.97
					2	1	0	1248	1301	1275	1267	1337	1302	0.98
						2	0	1208	1232	1220	1270	1306	1288	0.95
						3	0	1359	1618	1489	1501	1789	1645	0.90
						4	0	1626	1642	1634	1748	1805	1777	0.92
						5	0	1770	1849	1810	2009	2057	2033	0.89

表 75 試料マトリックスの測定への影響(牛の肝臓)

食品名	定量 限界 (ppb)	基準値 (ppb)	添加 濃度 (ppb)	標準溶液 濃度*1 (mg/L)	機 関	日	ピーク面積							
							ブランク	マトリックス添加標準溶液			溶媒標準溶液			ピーク 面積比*2
								n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均	
牛の肝臓	0.5	3	3	0.006	1	1	0	104000	104300	104150	99320	99440	99380	1.05
						2	0	123500	120300	121900	119800	111500	115650	1.05
						3	0	101800	103900	102850	100100	101200	100650	1.02
						4	0	95490	96270	95880	93190	93560	93375	1.03
						5	0	103900	106500	105200	96350	109600	102975	1.02
					2	1	0	1778	1904	1841	1868	1809	1839	1.00
						2	0	1055	1055	1055	948	958	953	1.11
						3	0	2564	2629	2597	2681	2744	2713	0.96
						4	0	2581	2509	2545	2681	2679	2680	0.95
						5	0	2592	2652	2622	2738	2893	2816	0.93

表 76 試料マトリックスの測定への影響(うなぎ)

食品名	定量 限界 (ppb)	基準値 (ppb)	添加 濃度 (ppb)	標準溶液 濃度*1 (mg/L)	機 関	日	ピーク面積							
							ブランク	マトリックス添加標準溶液			溶媒標準溶液			ピーク 面積比*2
								n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均	
うなぎ	0.5	不検出	0.5	0.001	1	1	0	17520	17100	17310	17190	17660	17425	0.99
						2	0	16240	17080	16660	17380	16980	17180	0.97
						3	0	16320	17510	16915	16000	16960	16480	1.03
						4	0	18680	18200	18440	18470	16340	17405	1.06
						5	0	20280	19600	19940	19500	18450	18975	1.05
					2	1	0	436	429	433	469	490	480	0.90
						2	0	318	343	331	351	360	356	0.93
						3	0	442	407	425	449	456	453	0.94
						4	0	411	425	418	413	427	420	1.00
						5	0	436	446	441	464	469	467	0.95

表 77 試料マトリックスの測定への影響(さけ)

食品名	定量 限界 (ppb)	基準値 (ppb)	添加 濃度 (ppb)	標準溶液 濃度*1 (mg/L)	機 関	日	ピーク面積							
							ブランク	マトリックス添加標準溶液			溶媒標準溶液			ピーク 面積比*2
								n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均	
さけ	0.5	不検出	0.5	0.001	1	1	0	20670	20680	20675	17790	17090	17440	1.19
						2	0	18940	19900	19420	17060	16360	16710	1.16
						3	0	18170	18130	18150	15300	14070	14685	1.24
						4	0	22140	23470	22805	18260	20290	19275	1.18
						5	0	23240	20810	22025	18010	18120	18065	1.22
					2	1	0	303	284	294	294	320	307	0.96
						2	0	322	322	322	334	324	329	0.98
						3	0	426	397	412	428	443	436	0.94
						4	0	410	411	411	413	402	408	1.01
						5	0	443	423	433	421	432	427	1.02

表 78 試料マトリックスの測定への影響(しじみ)

食品名	定量 限界 (ppb)	基準値 (ppb)	添加 濃度 (ppb)	標準溶液 濃度*1 (mg/L)	機 関	日	ピーク面積							
							ブランク	マトリックス添加標準溶液			溶媒標準溶液			ピーク 面積比*2
								n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均	
しじみ	0.5	不検出	0.5	0.001	1	1	0	17530	18580	18055	17600	16850	17225	1.05
						2	0	18550	17830	18190	17890	17810	17850	1.02
						3	0	19550	17940	18745	17620	17930	17775	1.05
						4	0	21170	19680	20425	18580	18820	18700	1.09
						5	0	20920	19470	20195	17650	17620	17635	1.15
					2	1	0	502	462	482	425	410	418	1.15
						2	0	321	333	327	316	315	316	1.04
						3	0	425	403	414	427	401	414	1.00
						4	0	415	438	427	405	411	408	1.05
						5	0	430	475	453	437	465	451	1.00

表 79 試料マトリックスの測定への影響(豚の筋肉)

食品名	定量 限界 (ppb)	基準値 (ppb)	添加 濃度 (ppb)	標準溶液 濃度*1 (mg/L)	機 関	日	ピーク面積							
							ブランク	マトリックス添加標準溶液			溶媒標準溶液			ピーク 面積比*2
								n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均	
豚の筋肉	0.5	不検出	0.5	0.001	1	1	0	18270	17800	18035	17920	17680	17800	1.01
						2	0	17010	16470	16740	16430	16280	16355	1.02
						3	0	16550	17130	16840	16980	16680	16830	1.00
						4	0	19250	20390	19820	19330	20680	20005	0.99
						5	0	19740	20260	20000	19810	21090	20450	0.98
					2	1	0	358	383	371	371	350	361	1.03
						2	0	335	327	331	346	352	349	0.95
						3	0	422	408	415	436	408	422	0.98
						4	0	389	401	395	408	441	425	0.93
						5	0	457	413	435	424	441	433	1.01

表 80 試料マトリックスの測定への影響(鶏卵)

食品名	定量 限界 (ppb)	基準値 (ppb)	添加 濃度 (ppb)	標準溶液 濃度*1 (mg/L)	機 関	日	ピーク面積							
							ブランク	マトリックス添加標準溶液			溶媒標準溶液			ピーク 面積比*2
								n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均	
鶏卵	0.5	不検出	0.5	0.001	1	1	0	17670	17390	17530	16080	17270	16675	1.05
						2	0	16250	16230	16240	16420	16450	16435	0.99
						3	0	16140	15930	16035	16510	16500	16505	0.97
						4	0	19950	18670	19310	20080	19990	20035	0.96
						5	0	19560	19760	19660	20780	17770	19275	1.02
					2	1	0	468	424	446	430	417	424	1.05
						2	0	366	376	371	366	368	367	1.01
						3	0	451	454	453	434	430	432	1.05
						4	0	455	419	437	447	447	447	0.98
						5	0	433	435	434	449	457	453	0.96

表 81 試料マトリックスの測定への影響(牛乳)

食品名	定量 限界 (ppb)	基準値 (ppb)	添加 濃度 (ppb)	標準溶液 濃度*1 (mg/L)	機 関	日	ピーク面積							
							ブランク	マトリックス添加標準溶液			溶媒標準溶液			ピーク 面積比*2
								n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均	
牛乳	0.5	1	1	0.002	1	1	0	33940	33800	33870	33600	33740	33670	1.01
						2	0	44130	45030	44580	42420	41570	41995	1.06
						3	0	31520	32660	32090	30640	33880	32260	0.99
						4	0	29880	30880	30380	30680	31620	31150	0.98
						5	0	33900	32600	33250	34790	34170	34480	0.96
					2	1	0	839	886	863	834	861	848	1.02
						2	0	755	753	754	721	773	747	1.01
						3	0	868	893	881	868	892	880	1.00
						4	0	903	913	908	898	932	915	0.99
						5	0	892	911	902	918	938	928	0.97

表 82 試料マトリックスの測定への影響(はちみつ)

食品名	定量 限界 (ppb)	基準値 (ppb)	添加 濃度 (ppb)	標準溶液 濃度*1 (mg/L)	機 関	日	ピーク面積							
							ブランク	マトリックス添加標準溶液			溶媒標準溶液			ピーク 面積比*2
								n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均	
はちみつ	0.5	不検出	0.5	0.001	1	1	0	17540	16500	17020	17720	17370	17545	0.97
						2	0	20290	19540	19915	19270	19750	19510	1.02
						3	0	15590	16870	16230	15520	15630	15575	1.04
						4	0	18980	19090	19035	19030	18350	18690	1.02
						5	0	17140	17460	17300	16540	17910	17225	1.00
					2	1	0	335	337	336	306	296	301	1.12
						2	0	316	321	319	321	344	333	0.96
						3	0	443	458	451	441	441	441	1.02
						4	0	435	444	440	435	464	450	0.98
						5	0	469	428	449	444	424	434	1.03

表 83 マトリックス影響で補正した回収率(牛の筋肉、牛の脂肪及び牛の肝臓)

食品名	添加濃度 (ppb)	機関	日	ピーク面積 比	マトリックス影響 補正回収率		平均 (%)
					n=1	n=2	
牛の筋肉	1	1	1	0.98	91	91	93
			2	1.01	90	96	
			3	1.04	90	96	
			4	1.03	84	81	
			5	0.97	105	110	
		2	1	0.96	79	77	89
			2	0.93	86	87	
			3	0.91	96	99	
			4	0.95	90	95	
			5	0.95	88	92	
牛の脂肪	2	1	1	1.03	90	99	95
			2	1.03	101	97	
			3	1.02	103	101	
			4	1.02	93	92	
			5	0.97	85	89	
		2	1	0.98	93	99	93
			2	0.95	88	88	
			3	0.90	88	89	
			4	0.92	92	95	
			5	0.89	100	95	
牛の肝臓	3	1	1	1.05	88	92	95
			2	1.05	92	97	
			3	1.02	99	102	
			4	1.03	91	92	
			5	1.02	98	103	
		2	1	1.00	78	76	85
			2	1.11	65	71	
			3	0.96	88	77	
			4	0.95	101	105	
			5	0.93	102	87	

表 84 マトリックス影響で補正した回収率(うなぎ、さけ、しじみ及び豚の筋肉)

食品名	添加濃度 (ppb)	機関	日	ピーク面積 比	マトリックス影響 補正回収率		平均 (%)
					n=1	n=2	
うなぎ	0.5	1	1	0.99	94	97	96
			2	0.97	88	94	
			3	1.03	99	100	
			4	1.06	104	106	
			5	1.05	92	90	
		2	1	0.90	81	87	85
			2	0.93	85	84	
			3	0.94	87	78	
			4	1.00	83	87	
			5	0.95	88	94	
さけ	0.5	1	1	1.19	98	92	91
			2	1.16	85	90	
			3	1.24	89	80	
			4	1.18	101	92	
			5	1.22	91	87	
		2	1	0.96	99	85	88
			2	0.98	81	85	
			3	0.94	85	90	
			4	1.01	93	89	
			5	1.02	91	79	
しじみ	0.5	1	1	1.05	92	102	91
			2	1.02	93	87	
			3	1.05	86	90	
			4	1.09	90	96	
			5	1.15	81	88	
		2	1	1.15	72	87	82
			2	1.04	80	80	
			3	1.00	74	85	
			4	1.05	86	87	
			5	1.00	84	81	
豚の筋肉	0.5	1	1	1.01	86	89	91
			2	1.02	88	81	
			3	1.00	100	101	
			4	0.99	97	100	
			5	0.98	84	85	
		2	1	1.03	79	80	89
			2	0.95	94	88	
			3	0.98	90	84	
			4	0.93	102	93	
			5	1.01	93	91	

表 85 マトリックス影響で補正した回収率(牛の筋肉、牛の脂肪及び牛の肝臓)

食品名	添加濃度 (ppb)	機関	日	ピーク面積 比	マトリックス影響 補正回収率		平均 (%)
					n=1	n=2	
鶏卵	0.5	1	1	1.05	82	89	91
			2	0.99	106	87	
			3	0.97	86	79	
			4	0.96	96	109	
			5	1.02	79	93	
		2	1	1.05	88	82	84
			2	1.01	82	74	
			3	1.05	82	79	
			4	0.98	87	91	
			5	0.96	84	92	
牛乳	1	1	1	1.01	86	88	90
			2	1.06	82	84	
			3	0.99	91	89	
			4	0.98	94	100	
			5	0.96	87	93	
		2	1	1.02	94	90	86
			2	1.01	76	83	
			3	1.00	82	81	
			4	0.99	90	84	
			5	0.97	90	92	
はちみつ	0.5	1	1	0.97	78	77	78
			2	1.02	78	74	
			3	1.04	73	74	
			4	1.02	82	85	
			5	1.00	81	84	
		2	1	1.12	70	82	85
			2	0.96	83	87	
			3	1.02	101	109	
			4	0.98	83	87	
			5	1.03	83	70	

a 添加回収試験の代表的なクロマトグラム(機関 1)

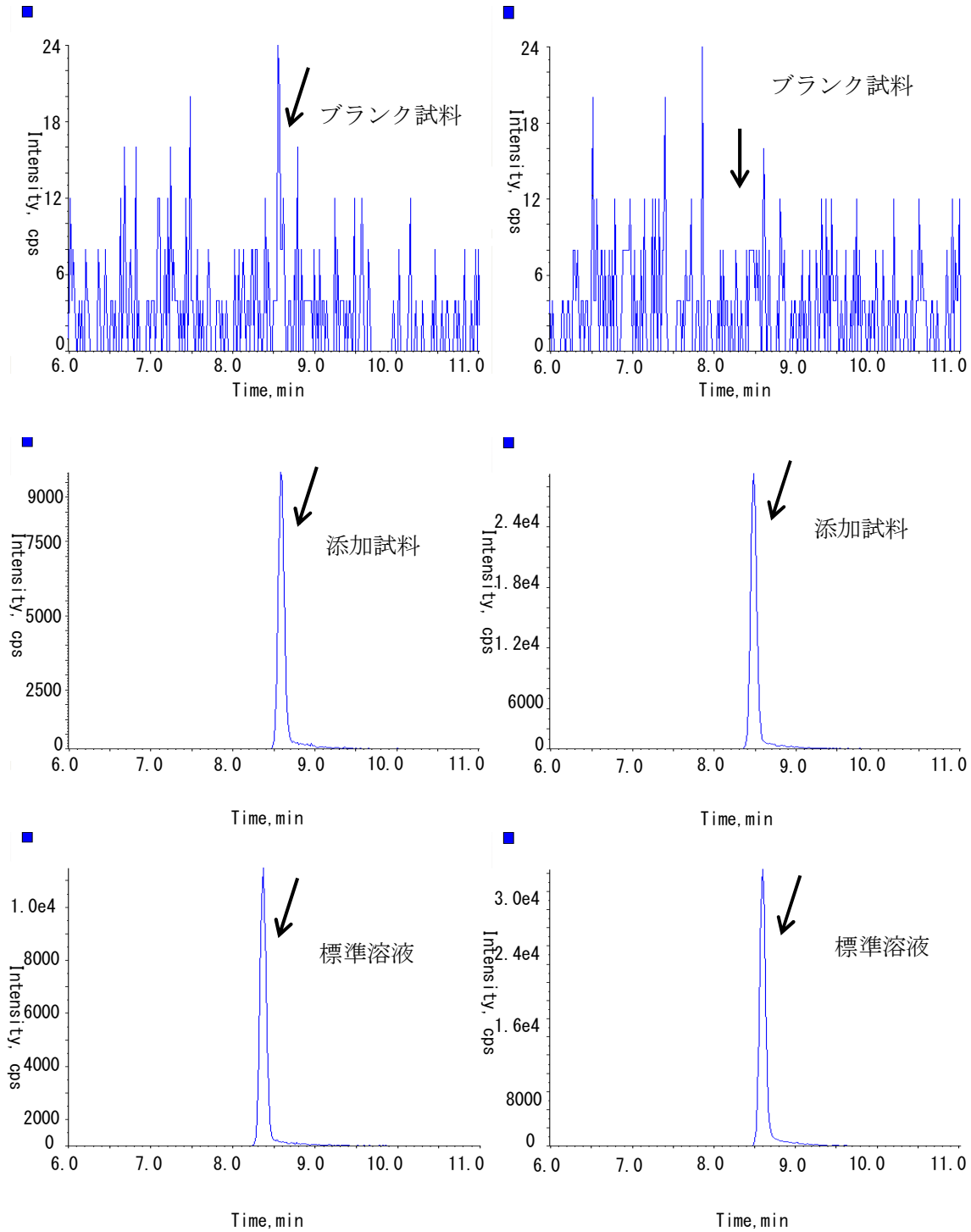


図 35 牛の筋肉の SRM クロマトグラム
(m/z 395→314)
添加濃度 : 0.001 ppm
(機関 1)

図 36 牛の肝臓の SRM クロマトグラム
(m/z 395→314)
添加濃度 : 0.003 ppm
(機関 1)

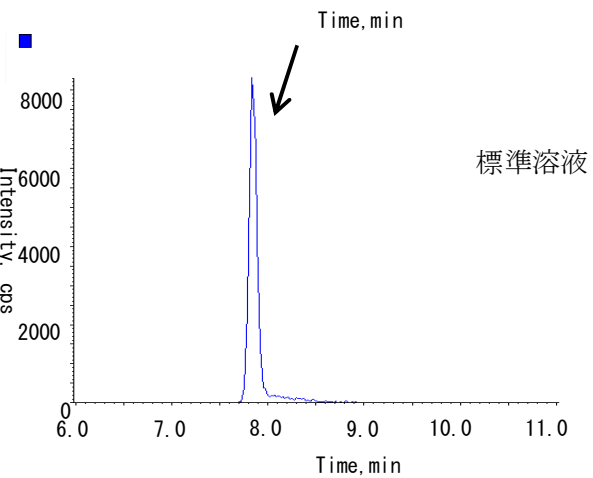
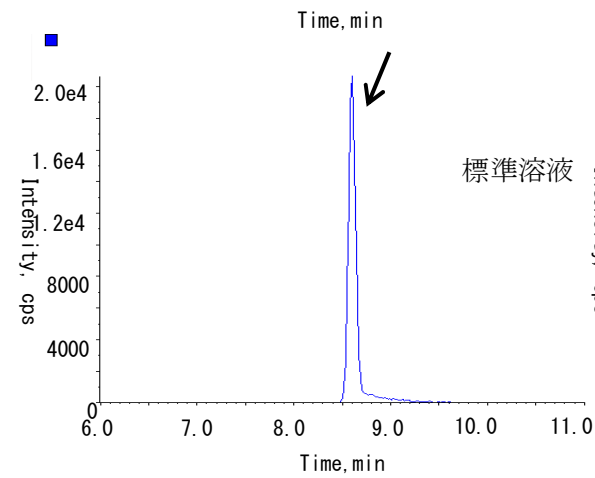
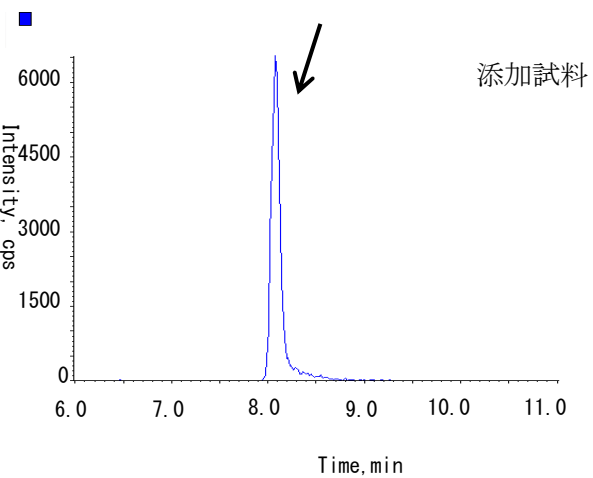
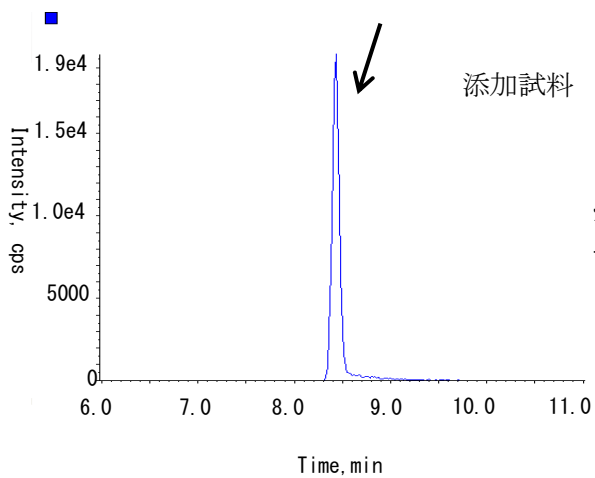
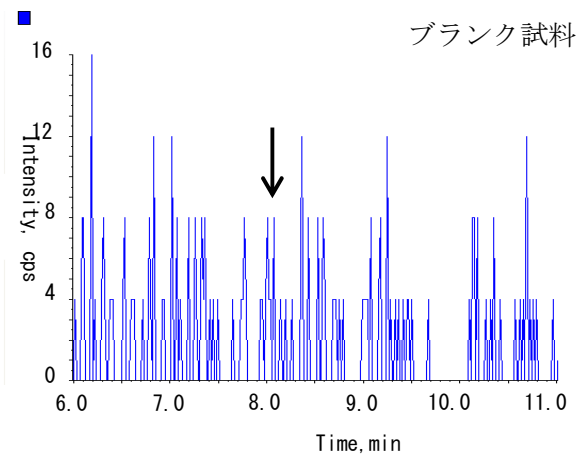
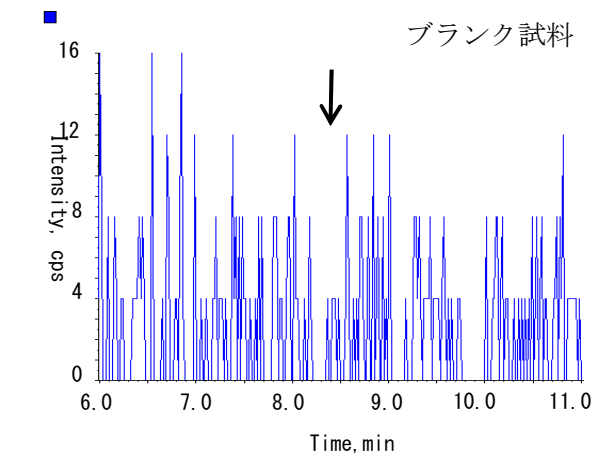


図 37 牛の脂肪の SRM クロマトグラム
(m/z 395→314)
添加濃度 : 0.002 ppm
(機関 1)

図 38 牛乳の SRM クロマトグラム
(m/z 395→314)
添加濃度 : 0.001 ppm
(機関 1)

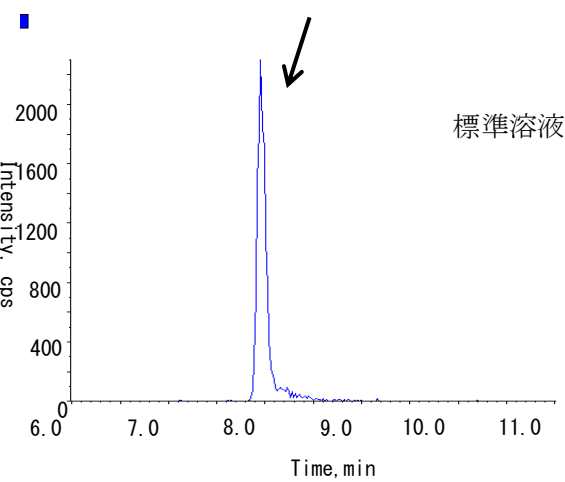
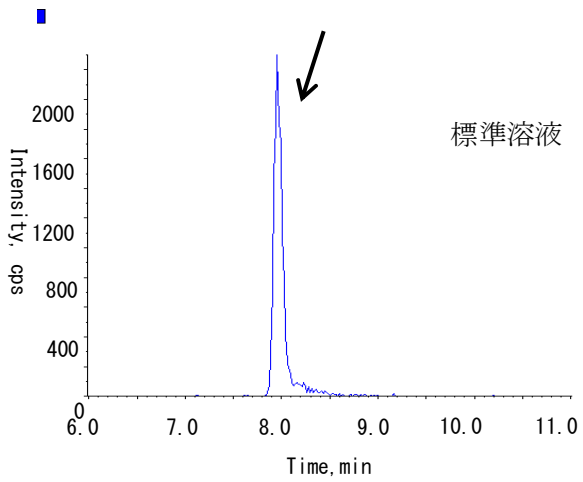
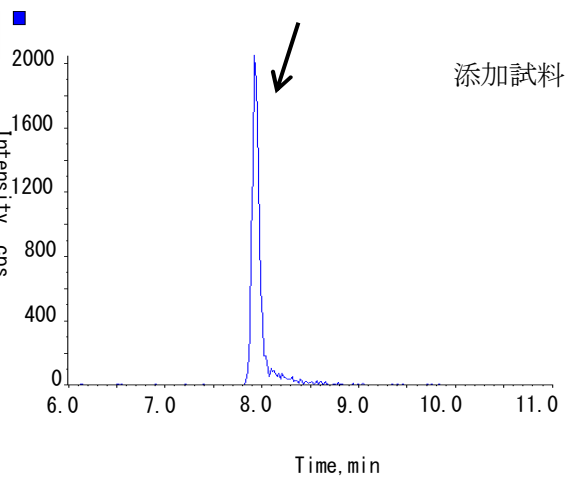
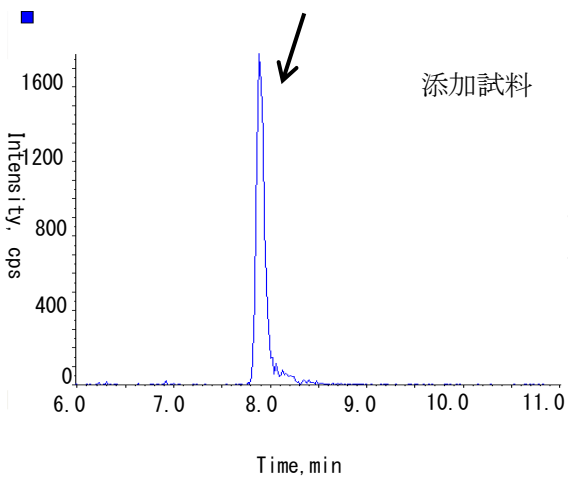
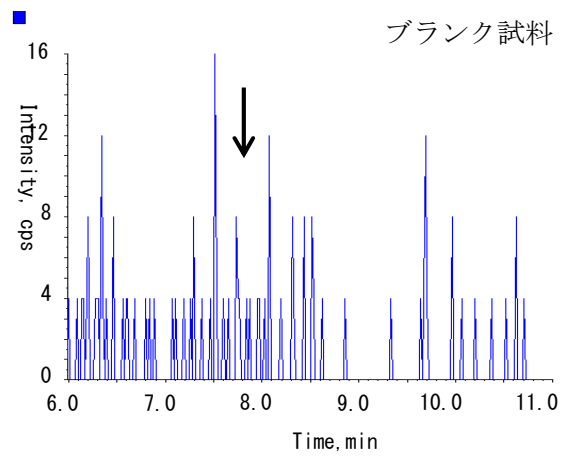
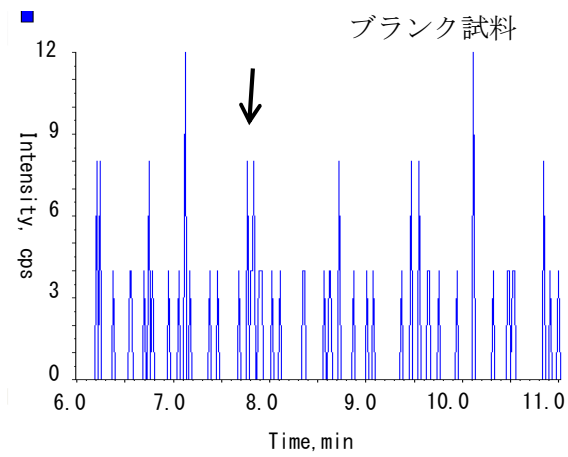


図 39 はちみつの SRM クロマトグラム
(m/z 395→314)
添加濃度 : 0.0005 ppm
(機関 1)

図 40 鶏卵の SRM クロマトグラム
(m/z 395→314)
添加濃度 : 0.0005 ppm
(機関 1)

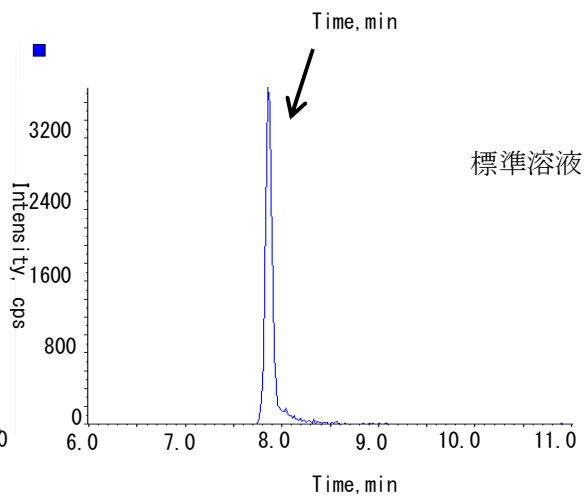
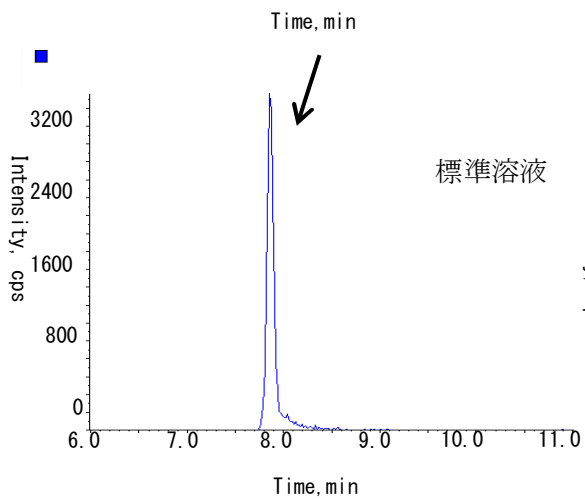
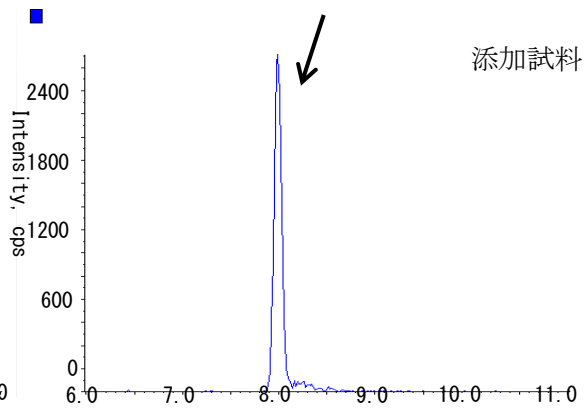
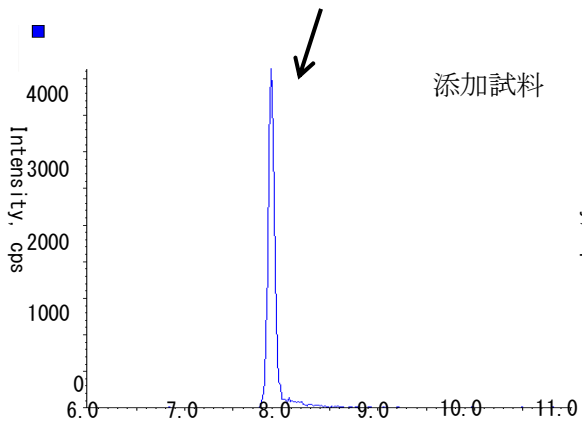
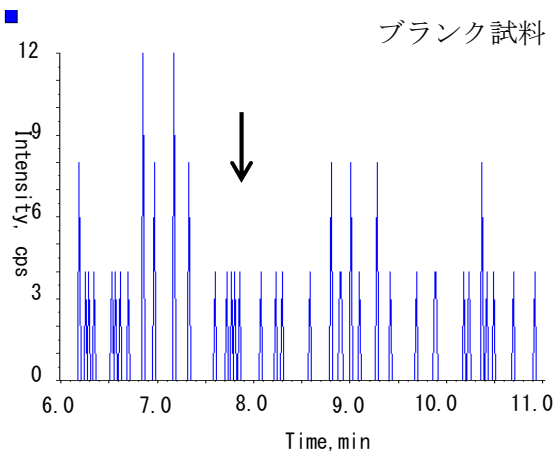
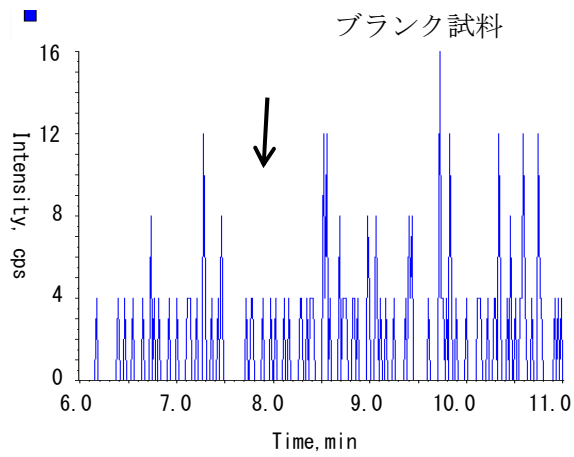


図 41 さけの SRM クロマトグラム
(m/z 395→314)
添加濃度 : 0.0005 ppm
(機関 1)

図 42 豚の筋肉の SRM クロマトグラム
(m/z 395→314)
添加濃度 : 0.0005 ppm
(機関 1)

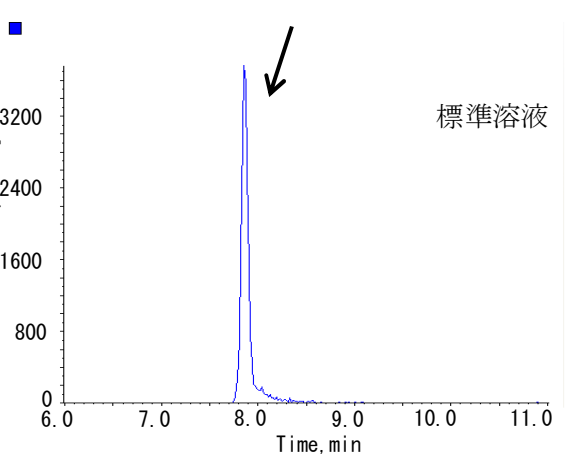
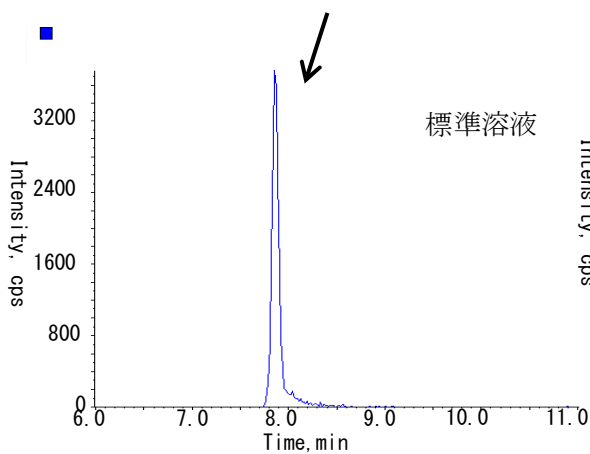
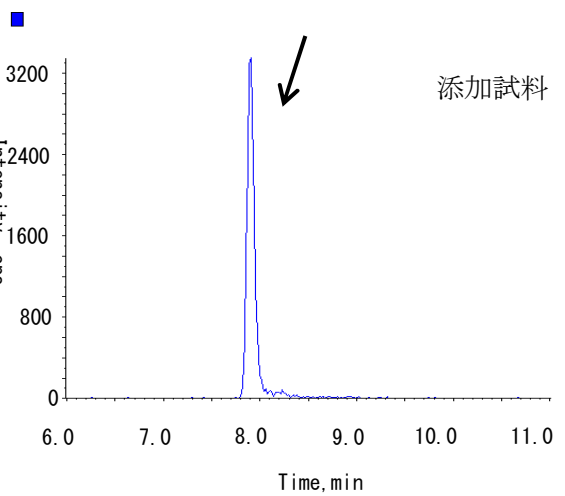
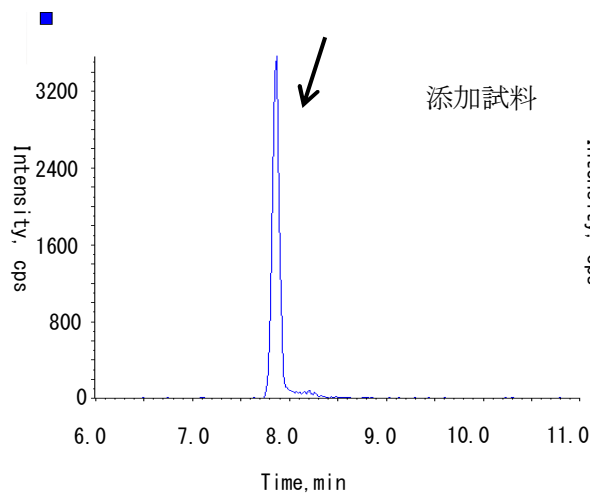
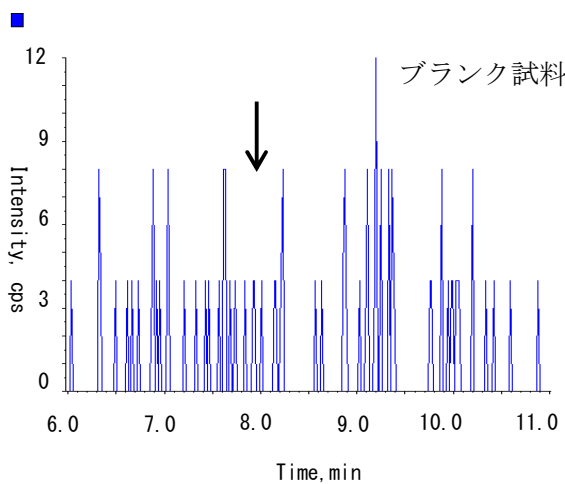
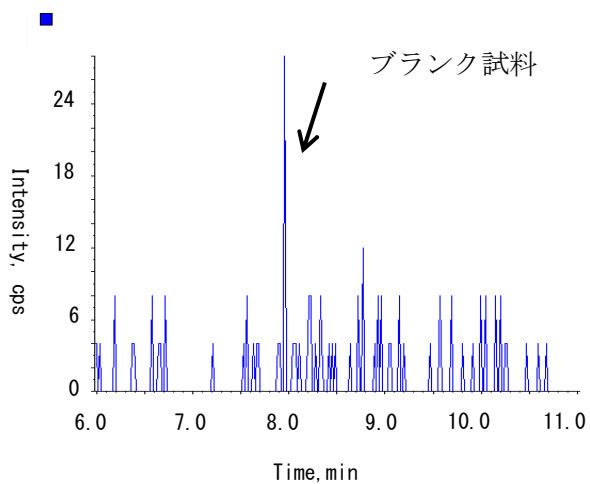


図 43 うなぎの SRM クロマトグラム
(m/z 395→314)
添加濃度 : 0.0005 ppm
(機関 1)

図 44 しじみの SRM クロマトグラム
(m/z 395→314)
添加濃度 : 0.0005 ppm
(機関 1)

b 添加回収試験の代表的なクロマトグラム(機関 2)

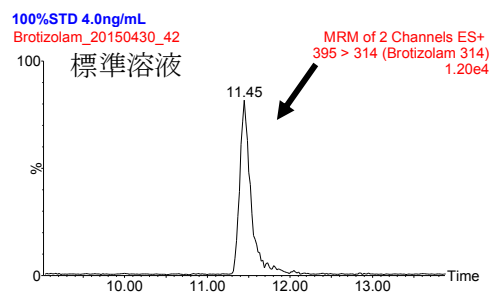
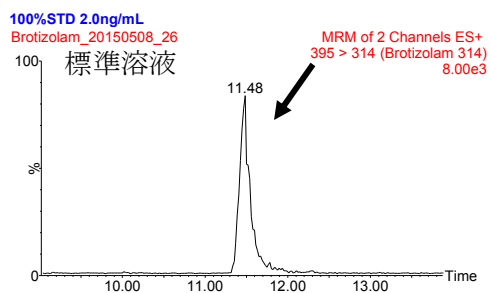
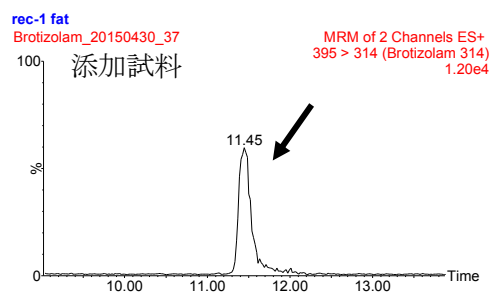
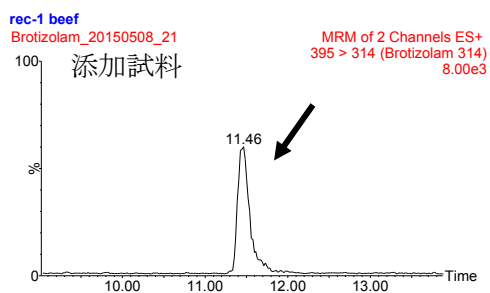
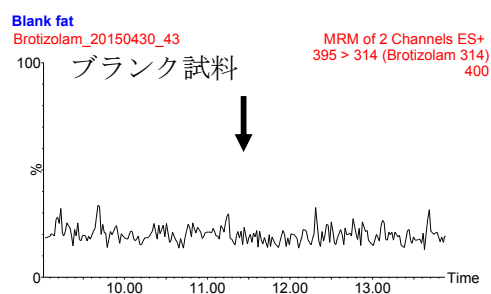
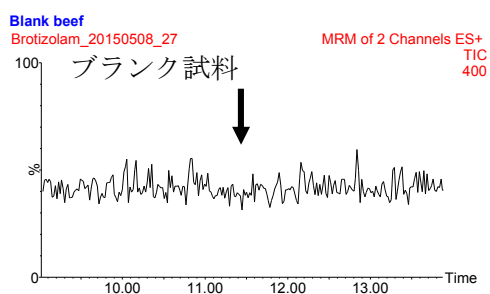


図 45 牛の筋肉の SRM クロマトグラム
(m/z 395→314)
添加濃度：0.001 ppm
(機関 2)

図 46 牛の脂肪の SRM クロマトグラム
(m/z 395→314)
添加濃度：0.002 ppm
(機関 2)

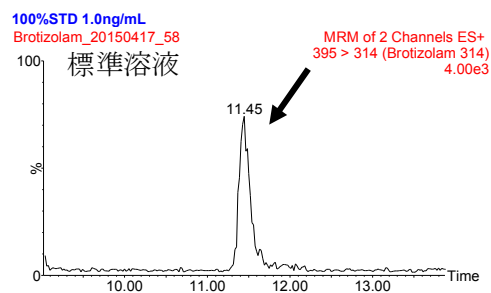
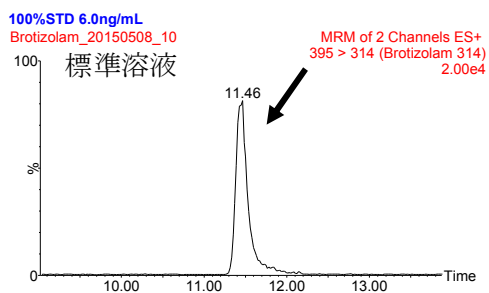
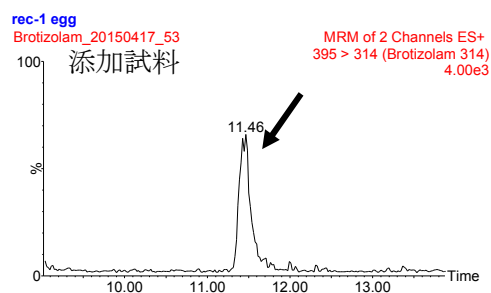
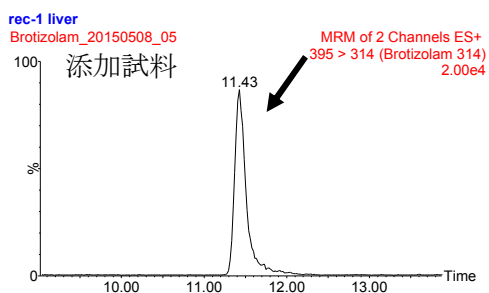
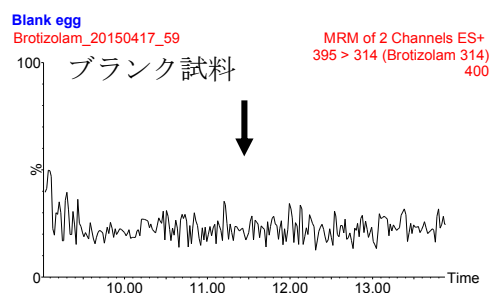
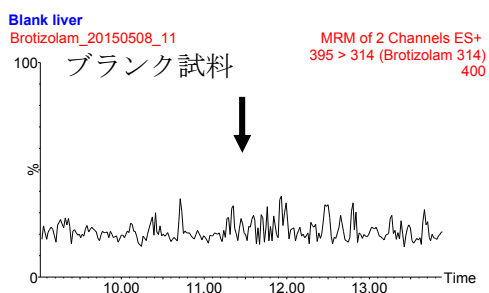


図 47 牛の肝臓の SRM クロマトグラフ
(m/z 395→314)
添加濃度 : 0.003 ppm
(機関 2)

図 48 鶏卵の SRM クロマトグラフ
(m/z 395→314)
添加濃度 : 0.0005 ppm
(機関 2)

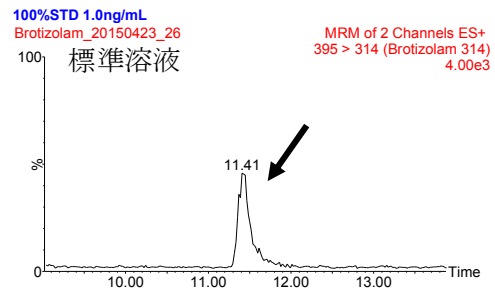
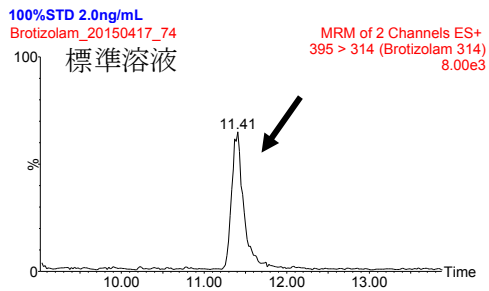
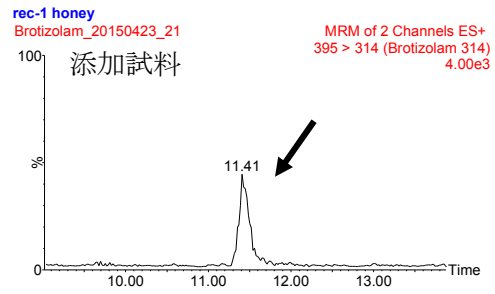
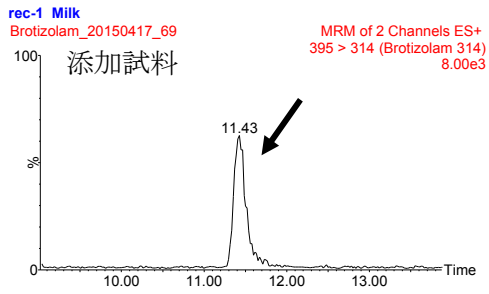
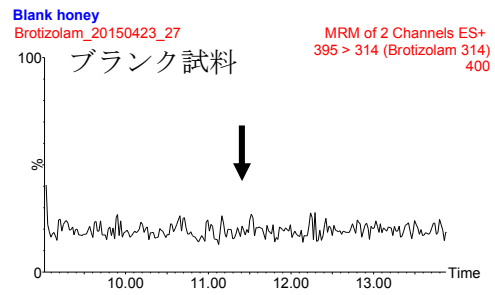
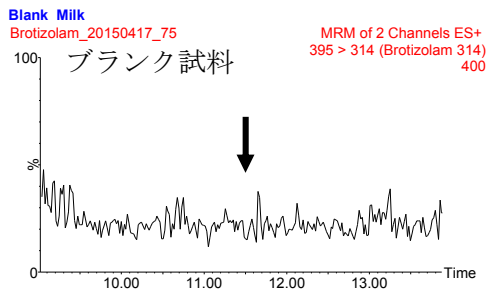


図 49 牛乳の SRM クロマトグラフ
(m/z 395→314)
添加濃度 : 0.001 ppm
(機関 2)

図 50 はちみつの SRM クロマトグラフ
(m/z 395→314)
添加濃度 : 0.0005 ppm
(機関 2)

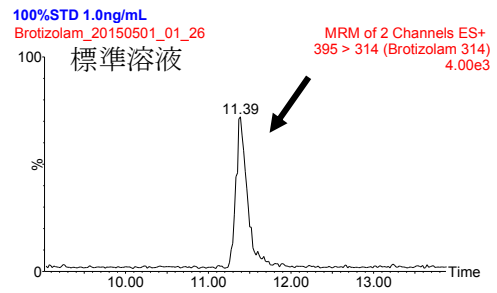
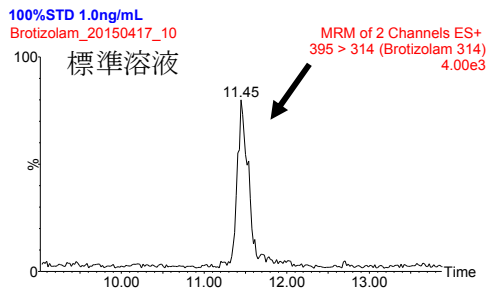
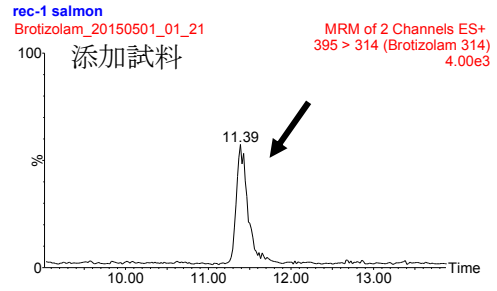
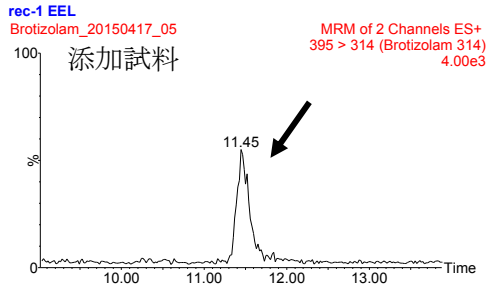
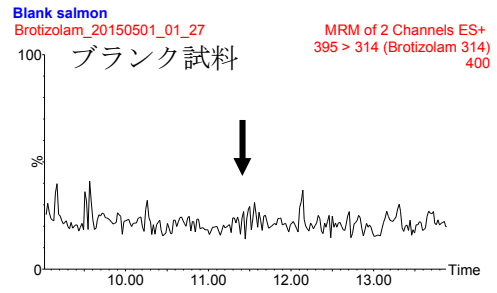
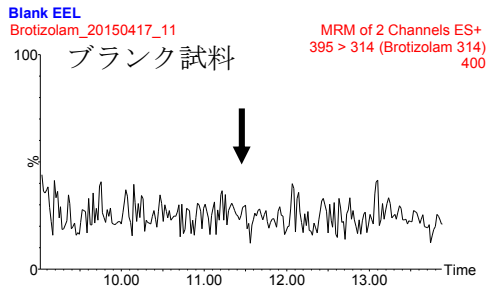


図 51 うなぎの SRM クロマトグラフ
(m/z 395→314)
添加濃度：0.0005 ppm
(機関 2)

図 52 さけの SRM クロマトグラフ
(m/z 395→314)
添加濃度：0.0005 ppm
(機関 2)

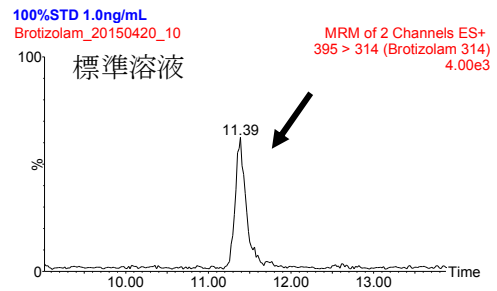
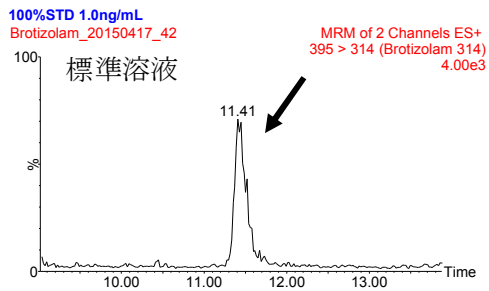
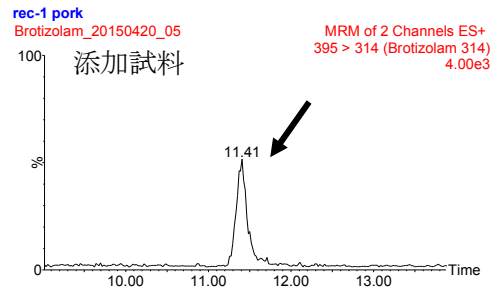
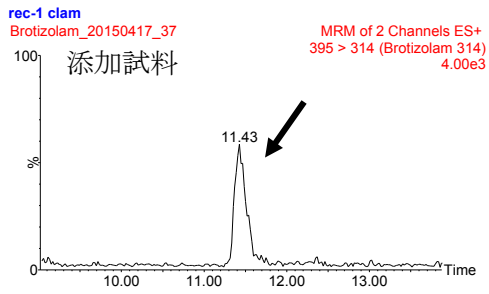
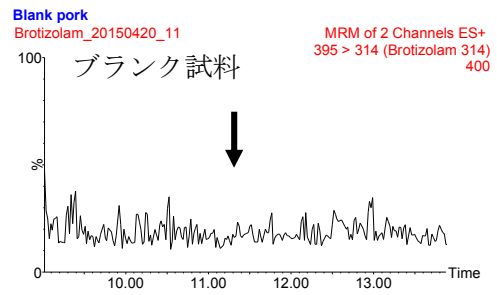
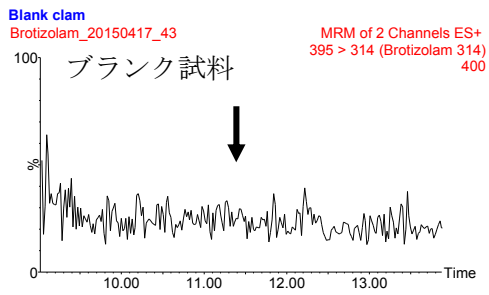


図 53 しじみの SRM クロマトグラフ
(m/z 395→314)
添加濃度 : 0.0005 ppm
(機関 2)

図 54 豚の筋肉の SRM クロマトグラフ
(m/z 395→314)
添加濃度 : 0.0005 ppm
(機関 2)

c 定量限界の推定における代表的なクロマトグラム(機関 1)

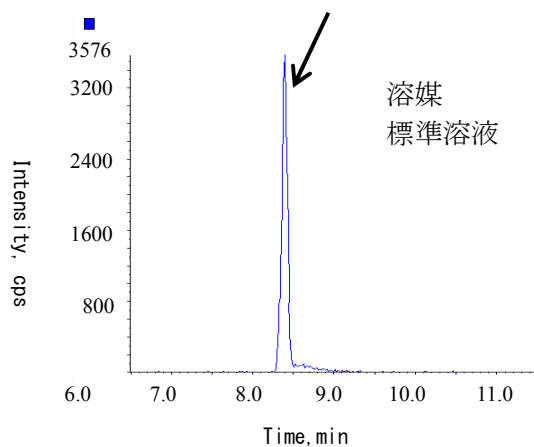
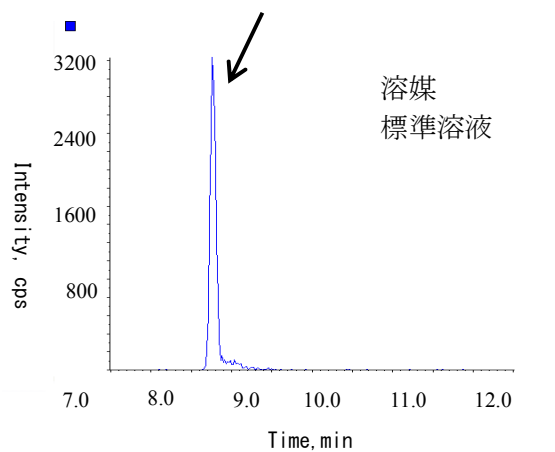
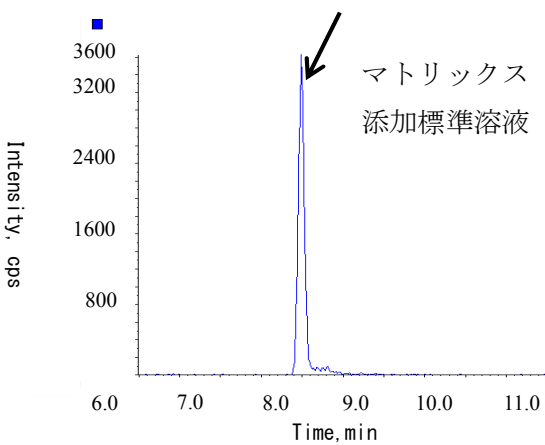
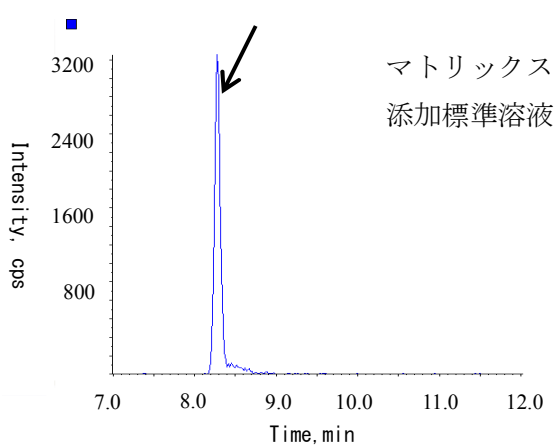
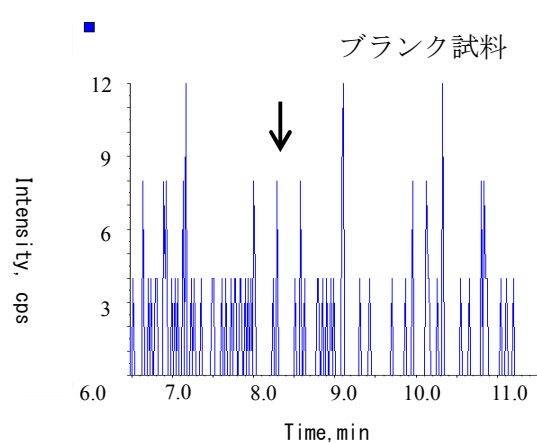
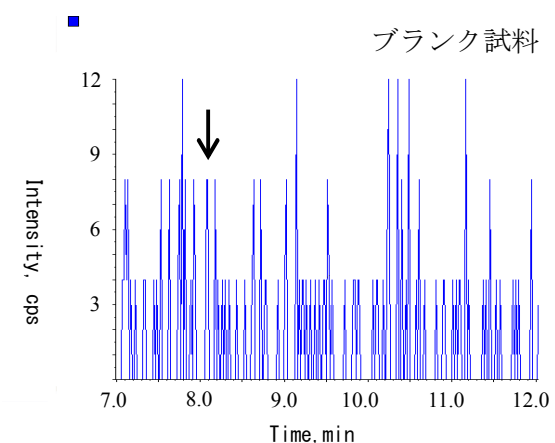


図 55 牛の筋肉の SRM クロマトグラム
(m/z 395→314)
試料中 0.0005 ppm 相当
(機関 1)

図 56 牛の肝臓の SRM クロマトグラム
(m/z 395→314)
試料中 0.0005 ppm 相当
(機関 1)

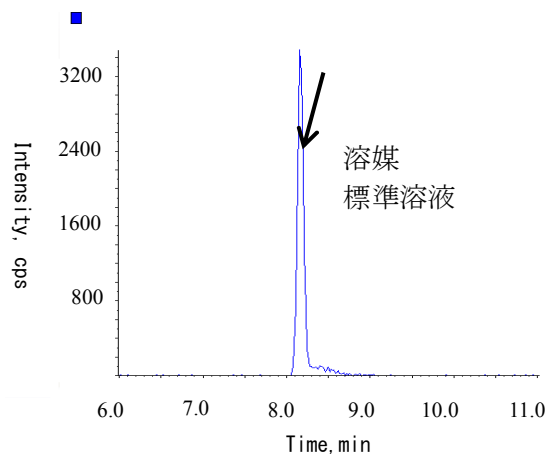
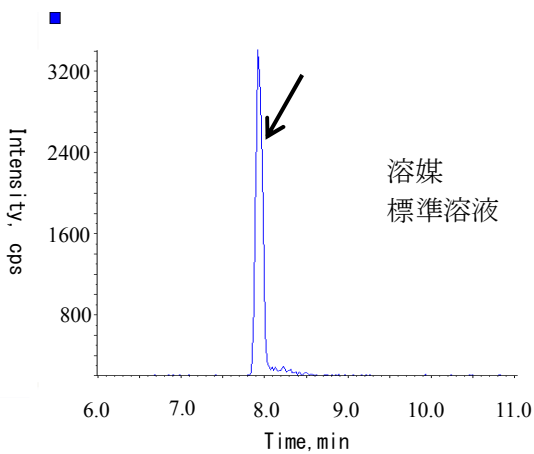
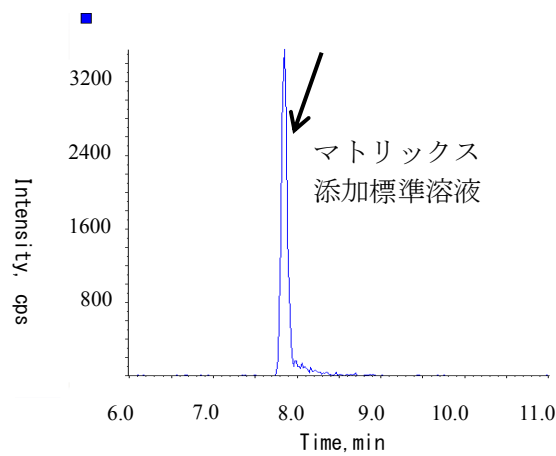
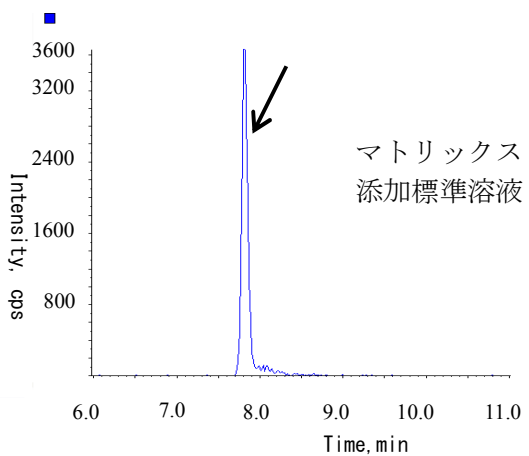
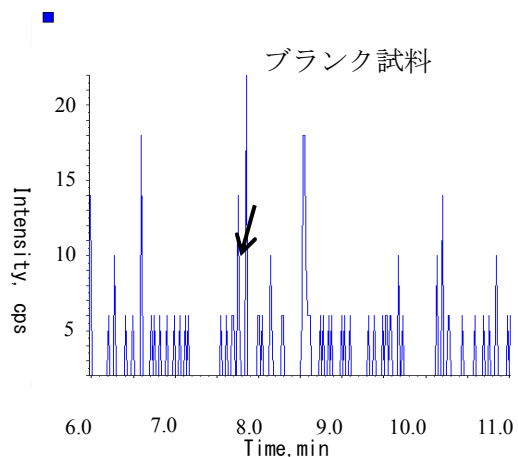
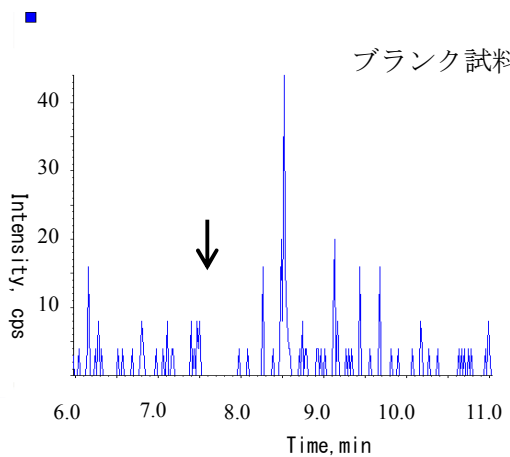


図 57 牛の脂肪の SRM クロマトグラム
(m/z 395→314)
試料中 0.0005 ppm 相当
(機関 1)

図 58 牛乳の SRM クロマトグラム
(m/z 395→314)
試料中 0.0005 ppm 相当
(機関 1)

d 定量限界の推定における代表的なクロマトグラム(機関 2)

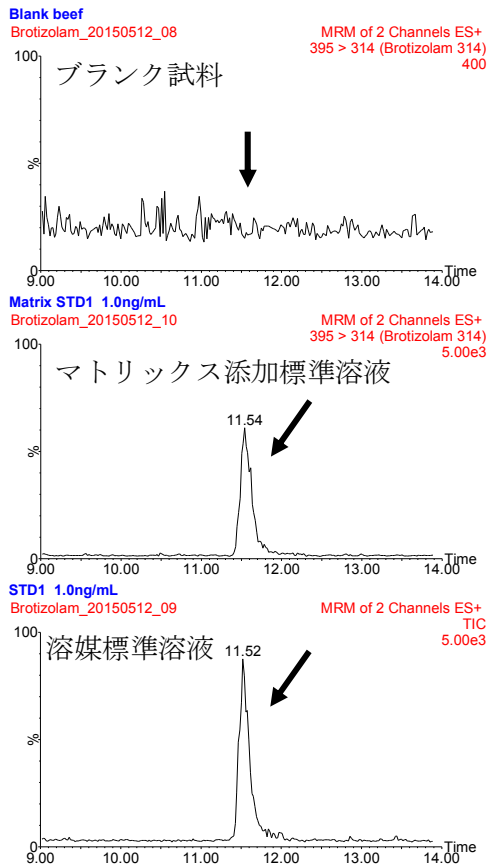


図 59 牛の筋肉の SRM クロマトグラム
(m/z 395→314)
試料中 0.0005 ppm 相当
(機関 2)

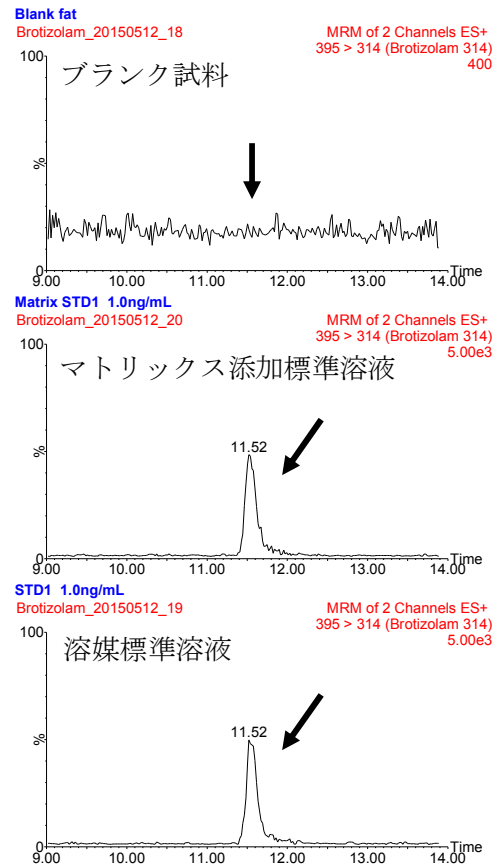


図 60 牛の脂肪の SRM クロマトグラム
(m/z 395→314)
試料中 0.0005 ppm 相当
(機関 2)

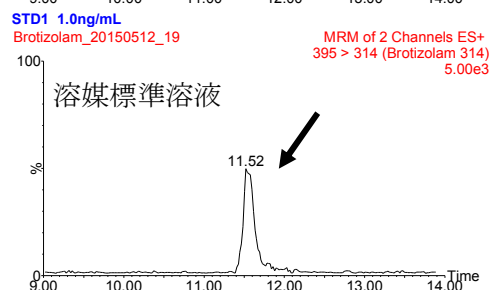
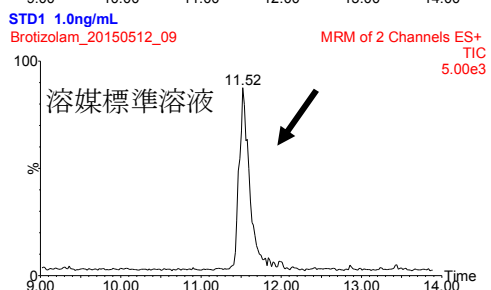
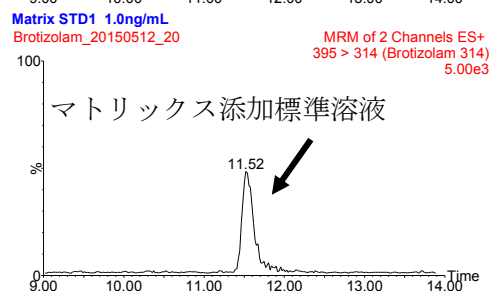
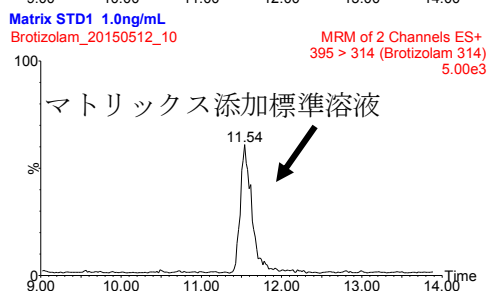
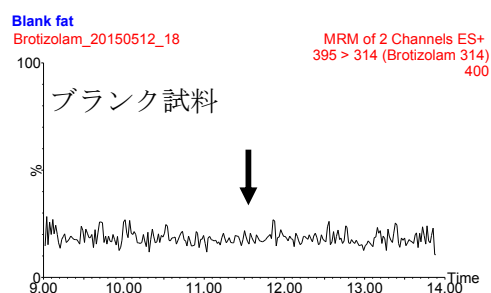
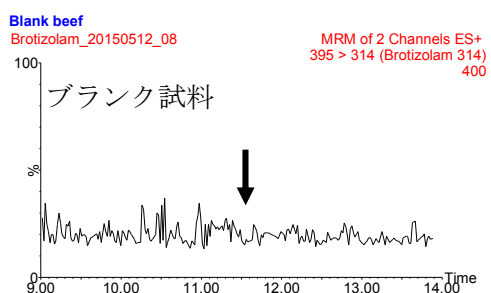


図 61 牛の肝臓の SRM クロマトグラフ
(m/z 395→314)
試料中 0.0005 ppm 相当
(機関 2)

図 62 牛乳の SRM クロマトグラフ
(m/z 395→314)
試料中 0.0005 ppm 相当
(機関 2)

e ブランク試料の代表的な TICC(機関 1)

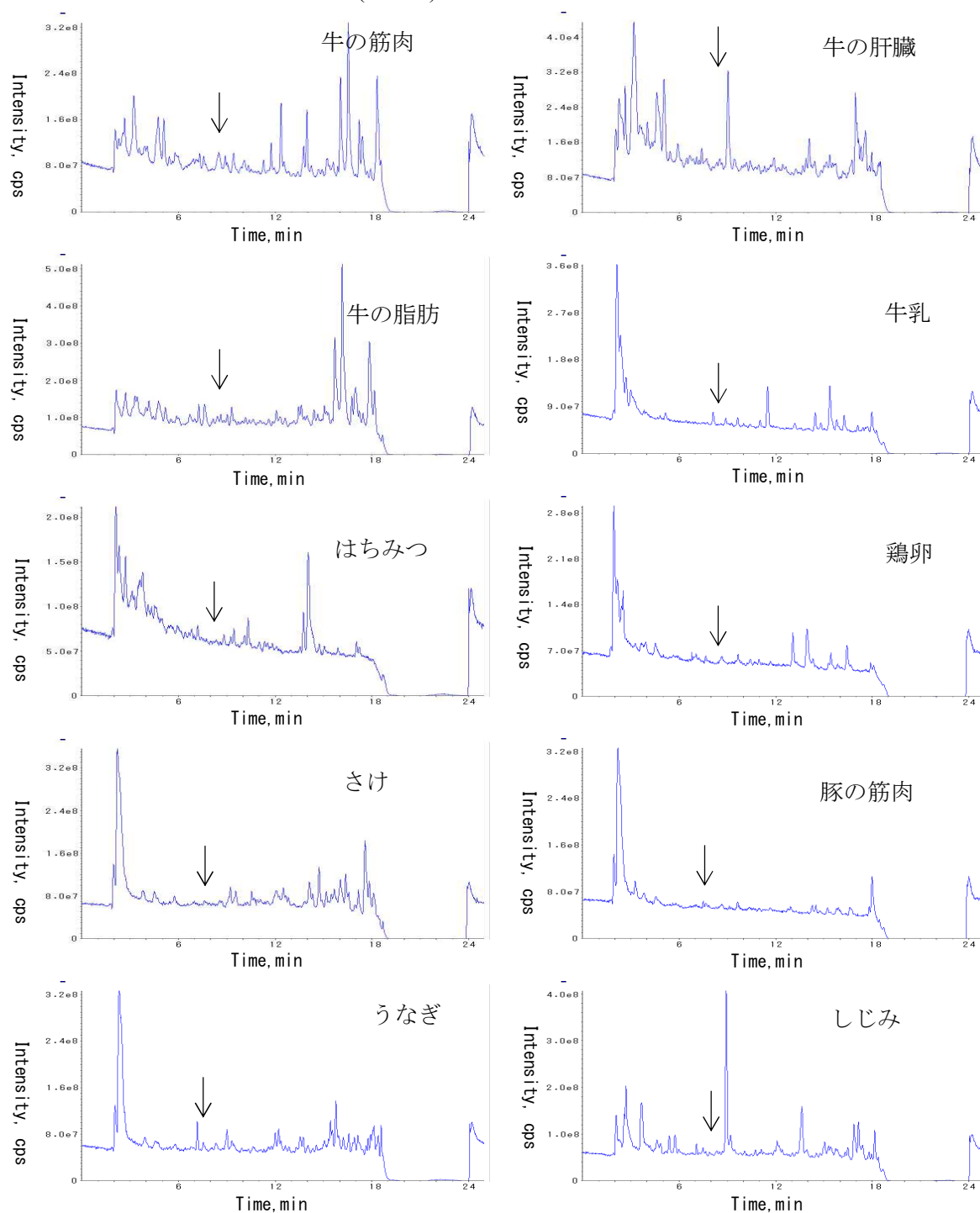


図 63 ブランク試料の TICC
(ESI+, スキャン範囲 : 50~1000 amu)
(機関 1)

f ブランク試料の代表的な TICC(機関 2)

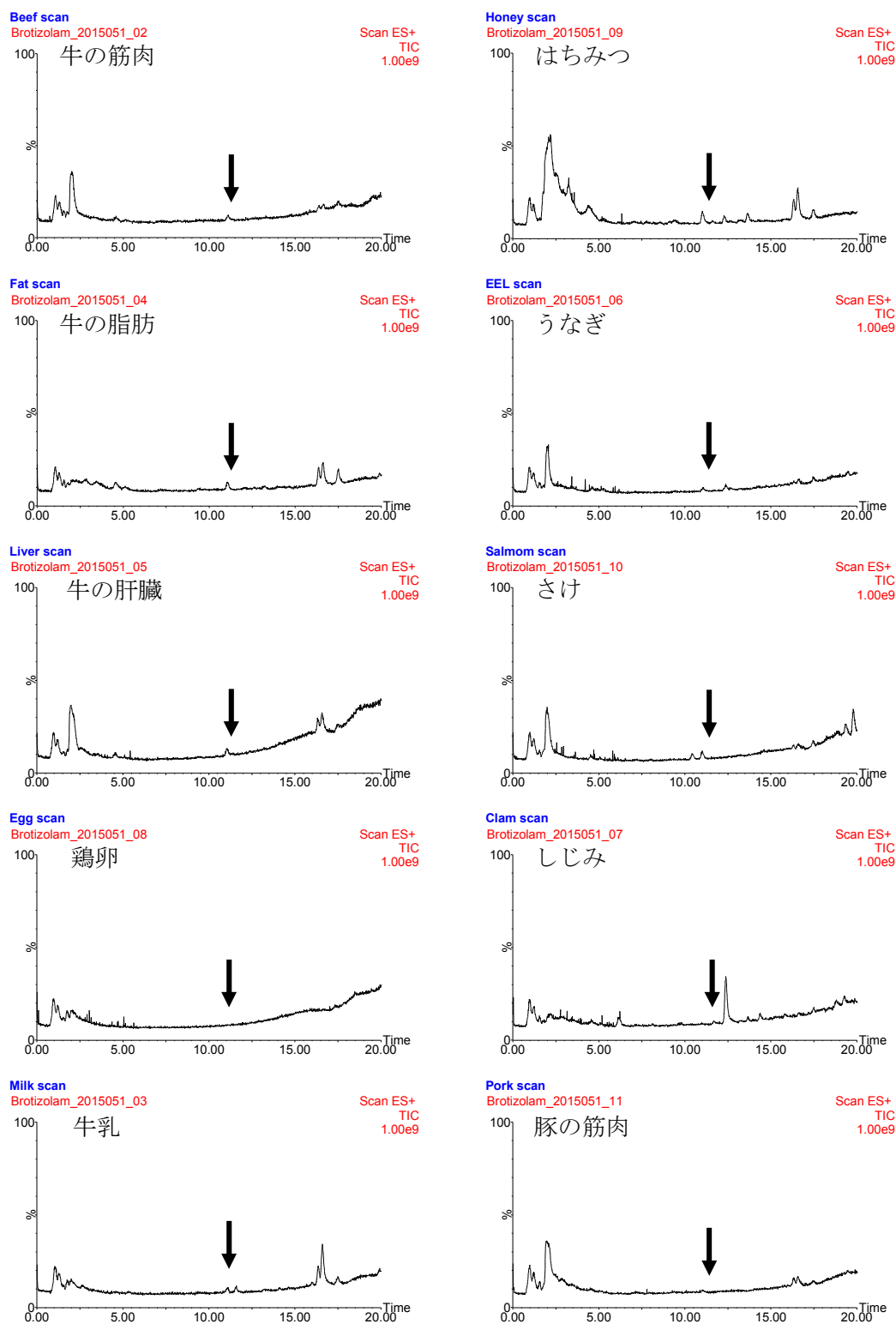


図 64 ブランク試料の TICC
(ESI+, スキャン範囲: 50~1000 amu)
(機関 2)

[結論]

LC-MS/MS を用いた畜水産物中のプロチゾラム試験法を開発した。プロチゾラムを試料からアセトン及び *n*-ヘキサン (1 : 1) 混液 (乳、卵及びはちみつの場合はアセトニトリル) で抽出し、InertSep C18 ミニカラム (1 g) と InertSep SAX/PSA (500 mg/500mg) ミニカラムで精製 (筋肉、脂肪、肝臓及び魚介類の場合は精製前に酢酸エチルへの転溶及びアセトニトリル/ヘキサン分配での脱脂を追加する) し、LC-MS/MS で測定した。

添加回収試験の結果、10 食品におけるプロチゾラムの真度は 89~105%、併行精度は 1~4RSD%、室内精度は 2~8RSD%であった。本試験法の定量限界は、0.0005 mg/kg である。

複数機関(全3機関)における精度検証試験のまとめを表 86 に示す。全機関における結果は真度 79~108%、併行精度 1~10RSD%、室内精度 2~14RSD% の範囲であり、全ての項目について目標値を満たした。

従って、本試験法により、畜水産物中のプロチゾラムを 0.0005 mg/kg (定量限界濃度) で精度良く分析することが可能であると判断した。

[参考文献]

なし

表 86 複数機関における検証試験結果まとめ

食品	基準値 (ppb)	添加 濃度 (ppb)	目標値			開発機関			機関 1			機関 2		
			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%)
牛の筋肉	1	1	70~120	30>	35>	89	4	4	94	4	8	83	3	7
牛の脂肪	2	2	70~120	25>	30>	97	4	5	96	4	9	86	3	7
牛の肝臓	3	3	70~120	25>	30>	92	3	3	99	3	5	83	7	12
鶏卵	不検出	0.5	70~120	30>	35>	98	2	2	90	10	11	85	5	6
牛乳	1	1	70~120	30>	35>	105	4	8	89	3	4	86	4	7
はちみつ	不検出	0.5	70~120	30>	35>	99	1	4	79	3	6	87	8	14
うなぎ	不検出	0.5	70~120	30>	35>	91	3	5	98	2	9	81	5	7
さけ	不検出	0.5	70~120	30>	35>	93	4	5	108	5	6	86	7	7
しじみ	不検出	0.5	70~120	30>	35>	93	3	5	97	5	6	85	8	8
豚の筋肉	不検出	0.5	70~120	30>	35>	99	2	6	91	3	9	87	4	6