

※ 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 23 年度

食品に残留する農薬等の成分である物質
(スピロテトラマト) (農産物及び畜水産物) の
試験法開発事業報告書

スピロテトラマト試験法の検討結果

[緒言]

1. 目的及び試験法の検討方針

スピロテトラマトはバイエル クロップサイエンス株式会社によって開発された環状ケトエノール構造を有する殺虫剤であり、作用機作は昆虫に対してアセチルCoAカルボキシラーゼ阻害することによる脂質合成の阻害である。

「薬事食品衛生審議会 食品衛生分科会報告書」に記載されている規制対象物質及び残留基準値案を踏まえ、試験法の開発を行った。スピロテトラマトは比較的不安定な物質のため、一斉分析法や既存の他の個別試験法の適用確認は実施せず、作物残留試験の方法を参考とし、新規に個別試験法を検討した。

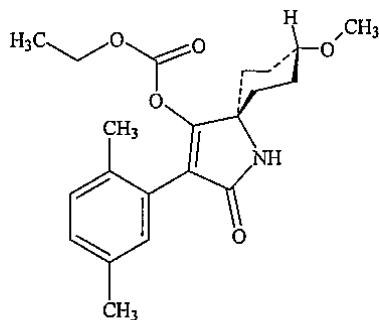
1) 規制対象物質

- ・スピロテトラマト
- ・シス-3-(2,5-ジメチルフェニル)-4-ヒドロキシ-8-メトキシ-1-アザスピロ[4.5]デカ-3-エン-2-オン
(以下、「代謝物 M1」という。)

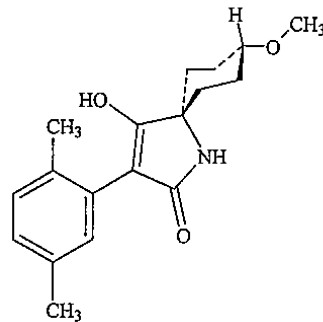
2. 分析対象化合物の構造式、物理化学的性質、基準値等に関する情報

1) 構造式及び物理化学的性質

スピロテトラマト



代謝物M1



化学式：C₂₁H₂₇NO₅

分子量：373.5

化学名 (IUPAC)：cis-4-(ethoxycarbonyloxy)-8-methoxy-3-(2,5-xilyl)-1-azaspiro[4.5]dec-3-en-2-one

外 観：ベージュ粉末

融 点：142°C

蒸気圧：5.6×10⁻⁶ mPa (20°C)、1.5×10⁻⁵ mPa (25°C)

溶解性：水 29.9 mg/L (pH7、20°C)

アセトン 100~120、エタノール 44、酢酸エチル 67、ジクロロメタン >600、ジメチルスルホキシド 200~300、トルエン 60、ヘキサン 0.055、(以上 g/L、20°C)

オクタノール/水分配係数：log Pow=2.51 (pH4及び7)、2.50 (pH9)

安定性：加水分解半減期；pH4 32.5日 (25°C)

；pH7 8.6日 (25°C)

；pH9 0.32日 (25°C)

(出典：The e-Pesticide Manual 15th ed.,ver.5.2)

代謝物M1

化学式：C₁₈H₂₃NO₃

分子量：301.4

化学名（IUPAC）：cis-3-（2,5-dimethylphenyl）-4-hydroxy-8-methoxy-1-azaspiro[4.5]dec-3-en-2-one

外 観：ベージュ粉末

溶解性：水 0.09（pH5）、2.7（pH7）、28（pH9）（以上 g/L、20℃）

オクタノール/水分配係数：log Pow=2.0（pH5）、0.3（pH7）、-1.3（pH9）

安定性：pH4、pH7、pH9において加水分解に対し安定

（出典：バイエルクロップサイエンス株式会社提供資料）

2) 基準値

①農産物（抜粋）

玄米	一律基準 ^{*1, *2}
大豆	一律基準 ^{*1} → 5 ppm ^{*2}
らっかせい	一律基準 ^{*1, *2}
ほうれんそう	7 ppm ^{*1, *2}
キャベツ	0.3 ppm ^{*1} → 2 ppm ^{*2}
ばれいしょ	0.8 ppm ^{*1} → 1 ppm ^{*2}
オレンジ	1 ppm ^{*1, *2}
りんご	0.7 ppm ^{*1, *2}
なす	1 ppm ^{*1} → 2 ppm ^{*2}
茶	一律基準 ^{*1, *2}

*1 施行通知 食安発1020第1号（平成22年10月20日）

*2 施行通知 食安発1228第4号（平成24年12月28日）

②畜水産物

牛、豚及びその他の陸棲哺乳類に属する動物の筋肉	0.02 ppm
牛、豚及びその他の陸棲哺乳類に属する動物の脂肪	0.02 ppm
牛、豚及びその他の陸棲哺乳類に属する動物の肝臓	0.02 ppm
牛、豚及びその他の陸棲哺乳類に属する動物の腎臓	0.02 ppm
牛、豚及びその他の陸棲哺乳類に属する動物の食用部分	0.02 ppm

なお、試験法検討中に施行通知 食安発 1228 第 4 号（平成 24 年 12 月 28 日）により基準値が変更されたが、本報告書では、施行通知 食安発 1020 第 1 号（平成 22 年 10 月 20 日）で示された基準値に基づいて検討を行った。

[実験方法]

1. 試料

1) 購入先

うなぎは愛知県の業者から、しじみは熊本県の業者から、その他の試料については都内のスーパーにて購入した。

2) 試料の採取方法

（農産物）

①玄米は425 μmの標準網ふるいを通るように粉碎し均一化した。

- ②大豆は425 μmの標準網ふるいを通るように粉碎し均一化した。
- ③らっかせいは殻を除き、2 mmのふるいを通るように粉碎し均一化した。
- ④ほうれんそうはひげ根及び変質葉を除き、細切後300 gを量り、5 vol%ギ酸90 gを加えブレンダーを用いて磨砕均一化した。
- ⑤キャベツは外側変質葉及びしんを除き、細切後300 gを量り、5 vol%ギ酸90 gを加えブレンダーを用いて磨砕均一化した。
- ⑥ばれいしょは泥を水で軽く洗い落とし、細切後300 gを量り、5 vol%ギ酸90 gを加えブレンダーを用いて磨砕均一化した。
- ⑦オレンジは細切後300 gを量り、5 vol%ギ酸90 gを加えブレンダーを用いて磨砕均一化した。
- ⑧りんごは花おち、しん及び果梗の基部を除き細切後300 gを量り、5 vol%ギ酸90 gを加えブレンダーを用いて磨砕均一化した。
- ⑨茶は425 μmの標準網ふるいを通るように粉碎し均一化した。
- ⑩なすはへたを除き、細切後300 gを量り、5 vol%ギ酸90 gを加えブレンダーを用いて磨砕均一化した。

(畜水産物)

- ①牛の筋肉は脂肪層を除き、細切後100 gを量り、5 vol%ギ酸含有 {エタノール及び水 (1 : 1) } 混液30 gを加えブレンダーを用いて磨砕均一化した。
- ②牛の脂肪は筋肉部を除き、細切後100 gを量り、5 vol%ギ酸含有 {エタノール及び水 (1 : 1) } 混液30 gを加えブレンダーを用いて磨砕均一化した。
- ③牛の肝臓は細切後100 gを量り、5 vol%ギ酸含有 {エタノール及び水 (1 : 1) } 混液30 gを加えブレンダーを用いて磨砕均一化した。
- ④さけは可食部 (皮を含む) を細切後100 gを量り、5 vol%ギ酸含有 {エタノール及び水 (1 : 1) } 混液30 gを加えブレンダーを用いて磨砕均一化した。
- ⑤うなぎは、活鰻を使用し、頭部を除いた可食部 (内臓、骨及び皮を含む) を細切均一化後100 gを量り、5 vol%ギ酸含有 {エタノール及び水 (1 : 1) } 混液30 gを加えブレンダーを用いて磨砕均一化した。
- ⑥しじみは、貝殻を除き細切均一化後100 gを量り、5 vol%ギ酸含有 {エタノール及び水 (1 : 1) } 混液30 gを加えブレンダーを用いて磨砕均一化した。
- ⑦牛乳は全体をよく混合して均一化した。
- ⑧鶏卵は、殻を除き卵白と卵黄をよく混合し100 gを量り、5 vol%ギ酸含有 {エタノール及び水 (1 : 1) } 混液30 gを加えブレンダーを用いて磨砕均一化した。
- ⑨はちみつは百花蜜を使用し、よく混合して均一化した。
- ⑩豚の筋肉は脂肪層を除き、細切後100 gを量り、5 vol%ギ酸含有 {エタノール及び水 (1 : 1) } 混液30 gを加えブレンダーを用いて磨砕均一化した。

2. 試薬・試液

1) 標準品

スピロテトラマト標準品：純度99.2 % (企業より提供品)

代謝物M1標準品：純度99.1 % (企業より提供品)

2) 試薬

アセトン、エタノール、メタノール：残留農薬試験用 (関東化学製)

アセトニトリル：高速液体クロマトグラフ用 (関東化学製)

ギ酸：試薬特級（関東化学製）

ケイソウ土：セライト545（関東化学製）

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム：InertSep C18（充てん量1 g、ジーエルサイエンス製）

グラファイトカーボンミニカラム：Supelclean ENVI-Carb（充てん量250 mg、シグマアルドリッチジャパン製）

3) 標準溶液、試液の調製方法

①標準溶液の調製方法

標準原液：スピロテトラマト標準品10 mgを精秤し、アセトンで溶解して200 mg/L溶液を調製した。

代謝物M1標準品10 mgを精秤し、アセトンで溶解して200 mg/L溶液を調製した。

検量線用混合標準溶液：スピロテトラマト及び代謝物M1標準原液をアセトニトリル及び0.02 vol%ギ酸（1：1）混液で混合希釈し、スピロテトラマト0.000125～0.0075 mg/L及び代謝物M10.0001～0.006 mg/Lの濃度の混合溶液を調製した。

添加用標準溶液：スピロテトラマト標準原液をアセトンで希釈して0.1、0.2、6、14、16、20及び140 mg/L溶液を調製した。代謝物M1標準原液をアセトンで希釈して0.08、0.16、4.8、11.2、12.8、16及び112 mg/L溶液を調製した。

②試液の調製方法

5 vol%ギ酸：ギ酸50 mLに水を加えて混合し、1000 mLとした。

5 vol%ギ酸含有 {エタノール及び水（1：1）} 混液：ギ酸50 mLにエタノール及び水（1：1）混液を加えて混合し、1000 mLとした。

2 vol%ギ酸：ギ酸20 mLに水を加えて混合し、1000 mLとした。

0.02 vol%ギ酸：2 vol%ギ酸10 mLに水を加えて混合し、1000 mLとした。

2 vol%ギ酸含有メタノール：ギ酸4 mLにメタノールを加えて混合し、200 mLとした。

0.02 vol%ギ酸含有メタノール：2 vol%ギ酸含有メタノール5 mLにメタノールを加えて混合し、500 mLとした。

アセトニトリル及び0.02 vol%ギ酸（1：1）混液：アセトニトリル500 mL及び0.02 vol%ギ酸500 mLを混合した。

エタノール及び水（1：1）混液：エタノール500 mL及び水500 mLを混合した。

0.02 vol%ギ酸及びメタノール（7：3）混液：0.02 vol%ギ酸700 mL及びメタノール300 mLを混合した。

3. 装置

ブレンダー：パワーブレンダーMX2050（BRAUN製）、Oster Blender（OSAKA CHEMICAL製）

ホモジナイザー：ウルトラタラックスT-25ベーシック（イカ・ジャパン製）

ロータリーエバポレーター：R-200（柴田科学製）等

LC-MS/MS

	型式	会社
MS 装置	API-3200	AB SCIEX
LC 装置	Agilent1200	Agilent Technologies
データ処理	Analyst	AB SCIEX

4. 測定条件

LC 条件	
カラム	TSK-gel ODS-100V サイズ：内径 2.0 mm、長さ 150 mm、粒子径 5 µm

	会社：東ソー株式会社																				
移動相流速 (mL/min)	0.2																				
注入量 (μL)	5																				
カラム温度 (°C)	40																				
移動相	A液：0.02 vol%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>65</td> <td>35</td> </tr> <tr> <td>1.0</td> <td>65</td> <td>35</td> </tr> <tr> <td>11.0</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>14.0</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>14.1</td> <td>65</td> <td>35</td> </tr> </tbody> </table>			時間 (分)	A液 (%)	B液 (%)	0.0	65	35	1.0	65	35	11.0	5	95	14.0	5	95	14.1	65	35
時間 (分)	A液 (%)	B液 (%)																			
0.0	65	35																			
1.0	65	35																			
11.0	5	95																			
14.0	5	95																			
14.1	65	35																			
MS 条件																					
測定モード	MS/MS、SRM (選択反応モニタリング)																				
イオン化モード	ESI (+)																				
キャピラリ電圧 (V)	5000																				
脱溶媒温度 (°C)	600																				
脱溶媒ガス	窒素 70 psi																				
コリジョンガス	窒素																				
定量イオン (m/z)	スピロテトラマト： +374→216[コーン電圧：41 (V)、コリジョンエネルギー：49 (eV)] 代謝物 M1： +302→216[コーン電圧：56 (V)、コリジョンエネルギー：43 (eV)]																				
定性イオン (m/z)	スピロテトラマト： +374→302[コーン電圧：41 (V)、コリジョンエネルギー：21 (eV)] 代謝物 M1： +302→270[コーン電圧：56 (V)、コリジョンエネルギー：23 (eV)]																				
保持時間の目安	スピロテトラマト：11分 代謝物 M1：8分																				

5. 定量

スピロテトラマト標準品及び代謝物M1標準品をアセトンに溶解し、200 mg/Lの標準原液を調製した。この溶液をアセトニトリル及び0.02 vol %ギ酸 (1 : 1) 混液で希釈し、スピロテトラマトは0.0075、0.00625、0.005、0.00375、0.0025、0.0015、0.00125、0.001、0.00075、0.000625、0.0005、0.000375、0.00025、0.000125 mg/L、代謝物M1は0.006、0.005、0.004、0.003、0.002、0.0012、0.001、0.0008、0.0006、0.0005、0.0004、0.0003、0.0002、0.0001 mg/Lの濃度の混合溶液を調製した。標準溶液5 μLをLC-MS/MSに注入し、得られたピーク面積から絶対検量線法で検量線を作成した。試験溶液5 μLをLC-MS/MSに注入し、得られたピーク面積と作成した検量線からスピロテトラマト及び代謝物M1の量を算出した。なお、検量線は一律基準値添加濃度を評価する0.000125 mg/L (0.000625 ng) ~0.00075 mg/L (0.00375 ng) {代謝物M1は0.0001 mg/L (0.0005 ng) ~0.0006 mg/L (0.003 ng)} と基準値添加濃度を評価する0.00125 mg/L (0.00625 ng) ~0.0075 mg/L (0.0375 ng) {代謝物M1は0.001 mg/L (0.005 ng) ~0.006 mg/L (0.03 ng)} の濃度範囲で作成し、さらに基準値添加試料については、検量線に範囲内に収まるように、ほうれんそうは試験溶液を70倍希釈、キャベツは3倍希釈、ばれいしょは8倍希釈、オレンジ及びなすは10倍希釈、りんごは7倍希釈した後に注入した。

6. 添加試料の調製

1) 農産物

玄米、大豆及びらっかせい {添加濃度：0.01 (代謝物M1 0.008) ppm} : 試料10.0 gに添加用標準溶液0.1 (代謝物M1 0.08) mg/Lを1 mL添加し、よく混合した後、30分間放置した。

ほうれんそう {添加濃度：7 (代謝物M1 5.6) ppm} : 細切後の試料300 gに5 vol%ギ酸90 gを加え、ホモジナイズして均一化後、試料20.0 g相当量に添加用標準溶液140 (代謝物M1 112) mg/Lを1 mL添加し、よく混合した後、30分間放置した。

キャベツ {添加濃度：0.3 (代謝物M1 0.24) ppm} : 細切後の試料300 gに5 vol%ギ酸90 gを加え、ホモジナイズして均一化後、試料20.0 g相当量に添加用標準溶液6 (代謝物M1 4.8) mg/Lを1 mL添加し、よく混合した後、30分間放置した。

ばれいしょ {添加濃度：0.8 (代謝物M1 0.64) ppm} : 細切後の試料300 gに5 vol%ギ酸90 gを加え、ホモジナイズして均一化後、試料20.0 g相当量に添加用標準溶液16 (代謝物M1 12.8) mg/Lを1 mL添加し、よく混合した後、30分間放置した。

オレンジ及びなす {添加濃度：1 (代謝物M1 0.8) ppm} : 細切後の試料300 gに5 vol%ギ酸90 gを加え、ホモジナイズして均一化後、試料20.0 g相当量に添加用標準溶液20 (代謝物M1 16) mg/Lを1 mL添加し、よく混合した後、30分間放置した。

りんご {添加濃度：0.7 (代謝物M1 0.56) ppm} : 細切後の試料300 gに5 vol%ギ酸90 gを加え、ホモジナイズして均一化後、試料20.0 g相当量に添加用標準溶液14 (代謝物M1 11.2) mg/Lを1 mL添加し、よく混合した後、30分間放置した。

茶 {添加濃度：0.01 (代謝物M1 0.008) ppm} : 試料5.00 gに添加用標準溶液0.1 (代謝物M1 0.08) mg/Lを0.5 mL添加し、よく混合した後、30分間放置した。

2) 畜水産物

牛の筋肉、牛の肝臓及び豚の筋肉 {添加濃度：0.02 (代謝物M1 0.016) ppm} : 細切後の試料100 gに5 vol%ギ酸含有 {エタノール及び水 (1:1)} 混液30 gを加え、ホモジナイズして均一化後、試料10.0 g相当量に添加用標準溶液0.2 (代謝物M1 0.16) mg/Lを1 mL添加し、よく混合した後、30分間放置した。

牛の脂肪 {添加濃度：0.02 (代謝物M1 0.016) ppm} : 細切後の試料100 gに5 vol%ギ酸含有 {エタノール及び水 (1:1)} 混液30 gを加え、ホモジナイズして均一化後、試料5.00 g相当量に添加用標準溶液0.2 (代謝物M1 0.16) mg/Lを0.5 mL添加し、よく混合した後、30分間放置した。

さけ、うなぎ、しじみ及び鶏卵 {添加濃度：0.01 (代謝物M1 0.008) ppm} : 細切後の試料100 gに5 vol%ギ酸含有 {エタノール及び水 (1:1)} 混液30 gを加え、ホモジナイズして均一化後、試料10.0 g相当量に添加用標準溶液0.1 (代謝物M1 0.08) mg/Lを1 mL添加し、よく混合した後、30分間放置した。

牛乳及びはちみつ {添加濃度：0.01 (代謝物M1 0.008) ppm} : 試料10.0 gに添加用標準溶液0.1 (代謝物M1 0.08) mg/Lを1 mL添加し、よく混合した後、30分間放置した。

7. 試験溶液の調製

スピロテトラマト及び代謝物M1を試料から酸性下でアセトン抽出し、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム及びグラファイトカーボンミニカラムで精製した後、LC-MS/MSで定量及び確認した。

1) 抽出 (農産物)

① 穀類、豆類及び種実類の場合

試料10.0 gを200 mL遠心管に量り採り、2 vol%ギ酸20 mLを加え混合し、30分間放置した。これにアセトン100 mLを加え、ホモジナイズした後、ケイソウ土を厚さ約1 cmに敷いたろ紙（直径60 mm、No. 4、桐山製作所製）を用いて吸引ろ過し、200 mL容メスフラスコに採取した。ろ紙上の残留物にアセトン50 mLを加えてホモジナイズした後、上記と同様にろ過した。得られたろ液を合わせて、アセトンで正確に200 mLとした。この2 mLを50 mL遠心管に採り、0.02 vol%ギ酸20 mLを加えた。

② 茶の場合

試料5.00 gを200 mL遠心管に量り採り、2 vol%ギ酸20 mLを加え混合し、30分間放置した。これにアセトン100 mLを加え、ホモジナイズした後、ケイソウ土を厚さ約1 cmに敷いたろ紙（直径60 mm、No. 4、桐山製作所製）を用いて吸引ろ過し、200 mL容メスフラスコに採取した。ろ紙上の残留物にアセトン50 mLを加えてホモジナイズした後、上記と同様にろ過した。得られたろ液を合わせて、アセトンで正確に200 mLとした。この4 mLを50 mL遠心管に採り、ロータリーエバポレーターを用いて40℃以下で約1 mLまで濃縮した後、アセトン1 mLを加え混合し、0.02 vol%ギ酸20 mLを加えた。

③ 果実及び野菜の場合

試料300 gに5 vol%ギ酸90 gを加え、ホモジナイズして均一化後、試料20.0 g相当量を200 mL遠心管に量り採り、これにアセトン100 mLを加え、ホモジナイズした後、ケイソウ土を厚さ約1 cmに敷いたろ紙（直径60 mm、No. 4、桐山製作所製）を用いて吸引ろ過し、200 mL容メスフラスコに採取した。ろ紙上の残留物にアセトン50 mLを加えてホモジナイズした後、上記と同様にろ過した。得られたろ液を合わせて、アセトンで正確に200 mLとした。この2 mLを50 mL遠心管に採り、0.02 vol%ギ酸20 mLを加えた。

2) 抽出（畜水産物）

① 筋肉、肝臓、鶏卵及び魚介類の場合

試料100 gに5 vol%ギ酸含有 {エタノール及び水 (1 : 1) } 混液30 gを加え、ホモジナイズして均一化後、試料10.0 g相当量を200 mL遠心管に量り採り、これにアセトン100 mLを加え、ホモジナイズした後、ケイソウ土を厚さ約1 cmに敷いたろ紙（直径60 mm、No. 4、桐山製作所製）を用いて吸引ろ過し、200 mL容メスフラスコに採取した。ろ紙上の残留物にアセトン50 mLを加えてホモジナイズした後、上記と同様にろ過した。得られたろ液を合わせて、アセトンで正確に200 mLとした。この2 mLを50 mL遠心管に採り、0.02 vol%ギ酸20 mLを加えた。

② 脂肪の場合

試料100 gに5 vol%ギ酸含有 {エタノール及び水 (1 : 1) } 混液30 gを加え、ホモジナイズして均一化後、試料5.00 g相当量を200 mL遠心管に量り採り、これにアセトン100 mLを加え、ホモジナイズした後、ケイソウ土を厚さ約1 cmに敷いたろ紙（直径60 mm、No. 4、桐山製作所製）を用いて吸引ろ過し、200 mL容メスフラスコに採取した。ろ紙上の残留物にアセトン50 mLを加えてホモジナイズした後、上記と同様にろ過した。得られたろ液を合わせて、アセトンで正確に200 mLとした。この4 mLを50 mL遠心管に採り、ロータリーエバポレーターを用いて40℃以下で約1 mLまで濃縮した後、アセトン1 mLを加え混合し、0.02 vol%ギ酸20 mLを加えた。

③ 牛乳の場合

試料10.0 gを200 mL遠心管に量り採り、2 vol%ギ酸20 mLを加え、混合した。これにアセトン100 mLを加え、ホモジナイズした後、ケイソウ土を厚さ約1 cmに敷いたろ紙（直径60 mm、No. 4、桐山製作

所製) を用いて吸引ろ過し、200 mL容メスフラスコに採取した。ろ紙上の残留物にアセトン50 mLを加えてホモジナイズした後、上記と同様にろ過した。得られたろ液を合わせて、アセトンで正確に200 mLとした。この2 mLを50 mL遠心管に採り、0.02 vol%ギ酸20 mLを加えた。

④はちみつの場合

試料10.0 gを200 mL遠心管に量り採り、2 vol%ギ酸20 mLを加え、溶解した。これにアセトン100 mLを加え、ホモジナイズした後、ケイソウ土を厚さ約1 cmに敷いたろ紙(直径60 mm、No. 4、桐山製作所製)を用いて吸引ろ過し、200 mL容メスフラスコに採取した。ろ紙上の残留物に2 vol%ギ酸10 mL及びアセトン50 mLを加えてホモジナイズした後、上記と同様にろ過した。得られたろ液を合わせて、アセトンで正確に200 mLとした。この2 mLを50 mL遠心管に採り、0.02 vol%ギ酸20 mLを加えた。

3) 精製

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム [InertSep C18 (1 g)] に0.02 vol%ギ酸含有メタノール及び0.02 vol%ギ酸各5 mLを順次注入し、流出液は捨てた。グラファイトカーボンミニカラム [Supelclean ENVI-Carb (250 mg)] に0.02 vol%ギ酸含有メタノール5 mLを注入し、流出液は捨てた。オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムに2) で得られた溶液を注入した後、さらに0.02 vol%ギ酸及びメタノール(7:3) 混液10 mLを注入し、流出液は捨てた。次いで、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムの下部にグラファイトカーボンミニカラムを接続し、0.02 vol%ギ酸含有メタノール15 mLを注入し、溶出液を50 mL遠心管に採り、ロータリーエバポレーターを用いて40 °C以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物をアセトニトリル及び0.02 vol%ギ酸(1:1) 混液に溶解し、正確に2 mL(果実及び野菜は4 mL)としたものを試験溶液とした。

[分析法フローチャート]

農産物

秤 取

- | 穀類、豆類及び種実類：試料10.0 gに2 vol%ギ酸20 mLを加え30分間放置
- | 果実及び野菜：試料300 gに5 vol%ギ酸90 gを加え、磨砕均一化後、試料20.0 g
- | 相当を量り採る
- ↓ 茶：試料5.00 gに2 vol%ギ酸20 mLを加え30分間放置

アセトン抽出

- | アセトン100 mLを加え、ホモジナイズ
- | 吸引ろ過
- | 残留物にアセトン50 mLを加え、ホモジナイズ
- | 吸引ろ過
- | ろ液を合わせて、アセトンで正確に200 mLとする
- | 茶以外：2 mL分取し、2 vol%ギ酸20 mLを加える
- ↓ 茶：抽出液4 mL分取

濃 縮（茶のみ実施）

- ↓ 約1 mLまで減圧濃縮後、アセトン1 mLを加え混合し、2 vol%ギ酸20 mLを加える

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム（1 g）及びグラファイトカーボンミニカラム（250 mg）精製

- | オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム（0.02 vol%ギ酸含有メタノール及び0.02 vol%ギ酸各5 mLで洗浄済）に注入
- | 0.02 vol%ギ酸及びメタノール（7：3）混液10 mLで洗浄
- | オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムの下部にグラファイトカーボンミニカラム（0.02 vol%ギ酸含有メタノール5 mLで洗浄済）を接続
- ↓ 0.02 vol%ギ酸含有メタノール15 mLで溶出

濃縮（溶媒除去）

- | 穀類、豆類、種実類及び茶：残留物をアセトニトリル及び0.02 vol%ギ酸（1：1）混液2 mLに溶解
- ↓ 果実及び野菜：残留物をアセトニトリル及び0.02 vol%ギ酸（1：1）混液で4 mLに溶解

試験溶液

↓

LC-MS/MS定量

5 µL注入

畜水産物

秤 取

- | 脂肪、牛乳及びはちみつ以外：試料100 gに5 vol%ギ酸含有 {エタノール及び水 (1 : 1) }
- | 30 gを加え、磨砕均一化後、試料10.0 g相当を量り採る
- | 脂肪：試料100 gに5 vol%ギ酸含有 {エタノール及び水 (1 : 1) } 混液30 gを加え、磨砕均一化後、試料5.00 g相当を量り採る
- | 牛乳：試料10.0 gに2 vol%ギ酸20 mLを加え、混合する
- ↓ はちみつ：試料10.0 gに2 vol%ギ酸20 mLを加え、溶解する

アセトン抽出

- | アセトン100 mLを加え、ホモジナイズ
- | 吸引ろ過
- | 残留物にアセトン50 mL (はちみつは2 vol%ギ酸10 mL及びアセトン50 mL) を加え、ホモジナイズ
- | 吸引ろ過
- | ろ液を合わせて、アセトンで正確に200 mLとする
- | 脂肪以外：2 mL分取し、2 vol%ギ酸20 mLを加える
- ↓ 脂肪：抽出液4 mL分取

濃 縮 (脂肪のみ実施)

- ↓ 約1 mLまで減圧濃縮後、アセトン1 mLを加え混合し、2 vol%ギ酸20 mLを加える

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム (1 g) 及びグラファイトカーボンミニカラム (250 mg) 精製

- | オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム (0.02 vol%ギ酸含有メタノール及び0.02 vol%ギ酸各5 mLで洗浄済) に注入
- | 0.02 vol%ギ酸及びメタノール (7 : 3) 混液10 mLで洗浄
- | オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムの下部にグラファイトカーボンミニカラム (0.02 vol%ギ酸含有メタノール5 mLで洗浄済) を接続
- ↓ 0.02 vol%ギ酸含有メタノール15 mLで溶出

濃縮 (溶媒除去)

- ↓ 残留物をアセトニトリル及び0.02 vol%ギ酸 (1 : 1) 混液で2 mLに溶解

試験溶液

↓

LC-MS/MS定量

5 µL注入

8. マトリックス添加標準溶液の調製

1) 定量限界相当濃度 (定量限界の推定用)

ほうれんそう、キャベツ、ばれいしょ、オレンジ、りんご、なす、牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓及び豚の筋肉はブランク試験溶液から1 mL分取し溶媒を除去した後、スピロテトラマト0.0005 mg/L及び代謝物M1 0.0004 mg/Lの混合標準溶液1 mLに溶解したものを、マトリックス添加標準溶液とした。

2) 添加回収試験における回収率100%相当濃度 (試料マトリックスの測定への影響用)

玄米、大豆、らっかせい、茶、うなぎ、さけ、しじみ、牛乳、鶏卵及びはちみつはブランク試験溶液から1 mL分取し溶媒を除去した後、スピロテトラマト0.0005 mg/L及び代謝物M1 0.0004 mg/Lの混合標準溶液1 mLに溶解したものをマトリックス添加標準溶液とした。ほうれんそうは70倍希釈したブラ

ンク試験溶液、キャベツは3倍希釈したブランク試験溶液、ばれいしょは8倍希釈したブランク試験溶液、なす及びオレングジは10倍希釈したブランク試験溶液、りんごは7倍希釈したブランク試験溶液から1 mL分取し溶媒を除去した後、スピロテトラマト0.005 mg/L及び代謝物M1 0.004 mg/Lの混合標準溶液1 mLに溶解したものを、牛の筋肉、牛の脂肪及び牛の肝臓はブランク試験溶液から1 mL分取し溶媒を除去した後、スピロテトラマト0.001 mg/L及び代謝物M1 0.0008 mg/Lの混合標準溶液1 mLに溶解したものをマトリックス添加標準溶液とした。

[結果及び考察]

1. 測定条件の検討

1) MS条件の検討

スピロテトラマト及び代謝物M1はESI (+) モードでの測定が可能であった。

スピロテトラマトのESI (+) モード測定時のマススペクトルを図1に示した。その結果から、基準ピークとして374が得られたので、スピロテトラマトのプロトン付加分子 (m/z 374 $[M+H]^+$) をプリカーサーイオンとした。また、 m/z 374をプリカーサーイオンとした場合のプロダクトイオンスペクトルを図2に示した。強度として m/z 216のプロダクトイオンが強く、次いで m/z 302であったため、 m/z 216を定量用イオン、 m/z 302を定性用イオンとした。

代謝物M1のESI (+) モード測定時のマススペクトルを図3に示した。その結果から、基準ピークとして302が得られたので、代謝物M1のプロトン付加分子 (m/z 302 $[M+H]^+$) をプリカーサーイオンとした。また、 m/z 302をプリカーサーイオンとした場合のプロダクトイオンスペクトルを図4に示した。強度として m/z 216のプロダクトイオンが強く、次いで m/z 270であったため、 m/z 216を定量用イオン、 m/z 270を定性用イオンとした。

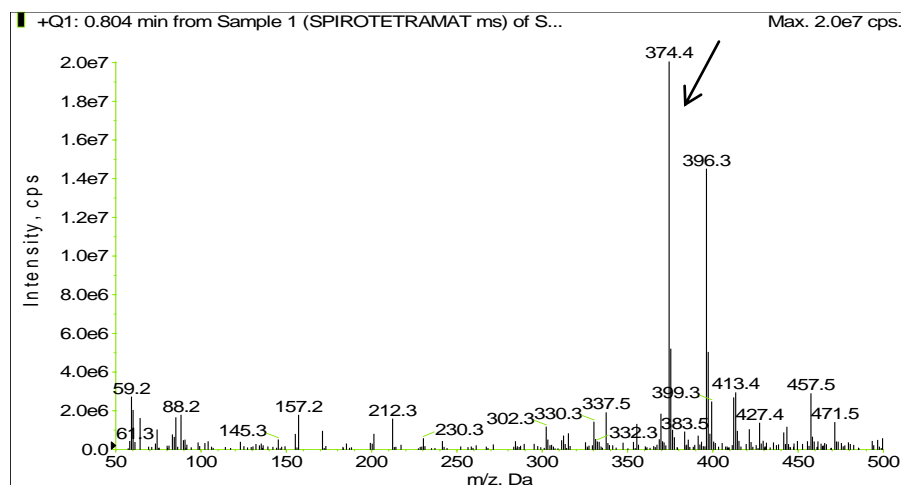


図1 スピロテトラマトのマススペクトル

スキャン範囲：50～500 m/z

測定条件：ESI (+)、CV=41 (CV：コーン電圧)

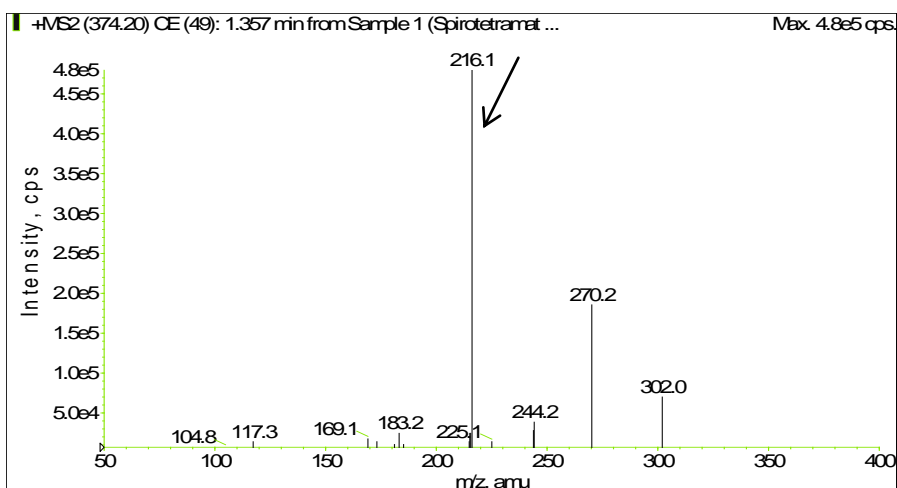


図 2-1 スピロテトラマトのプリカーサーイオン m/z 374 のプロダクトイオンスペクトル (定量用)
 スキャン範囲 : 50~400 m/z
 測定条件 : ESI (+)、CV=41、CE=49 (CV : コーン電圧、CE : コリジョンエネルギー)

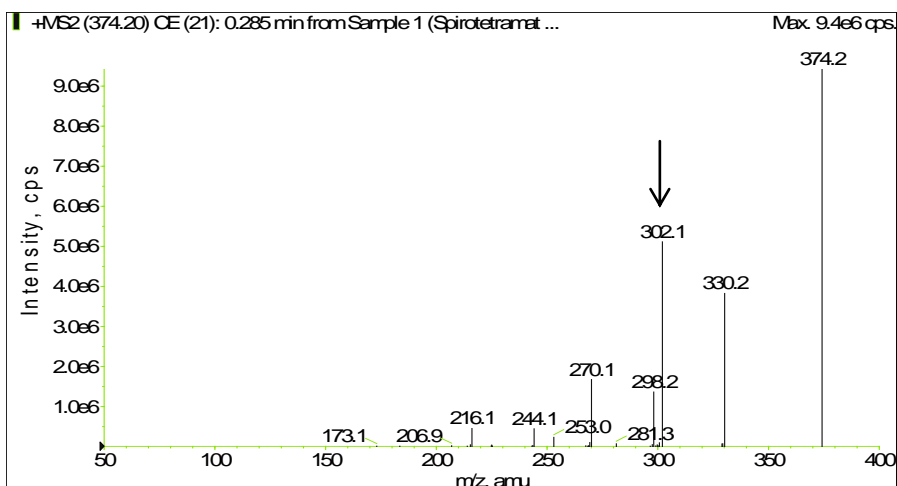


図 2-2 スピロテトラマトのプリカーサーイオン m/z 374 のプロダクトイオンスペクトル (定性用)
 スキャン範囲 : 50~400 m/z
 測定条件 : ESI (+)、CV=41、CE=21 (CV : コーン電圧、CE : コリジョンエネルギー)

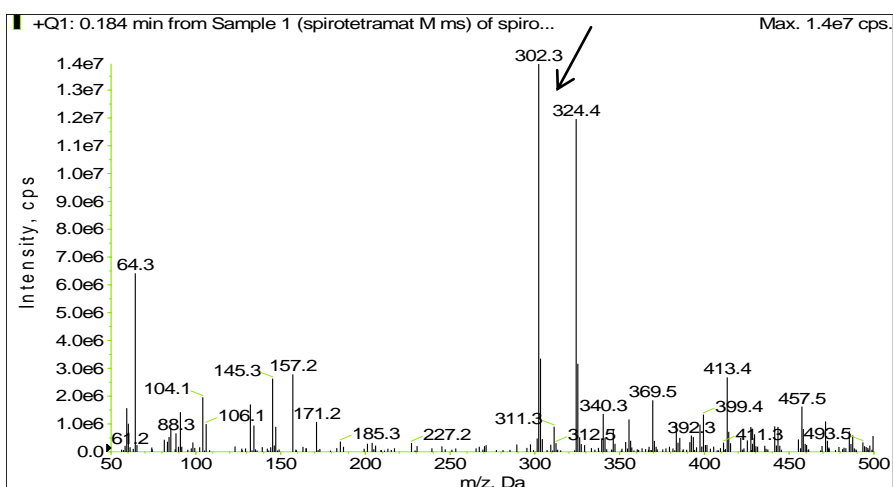


図 3 代謝物 M1 のマススペクトル
 スキャン範囲 : 50~500 m/z
 測定条件 : ESI (+)、CV=56 (CV : コーン電圧)

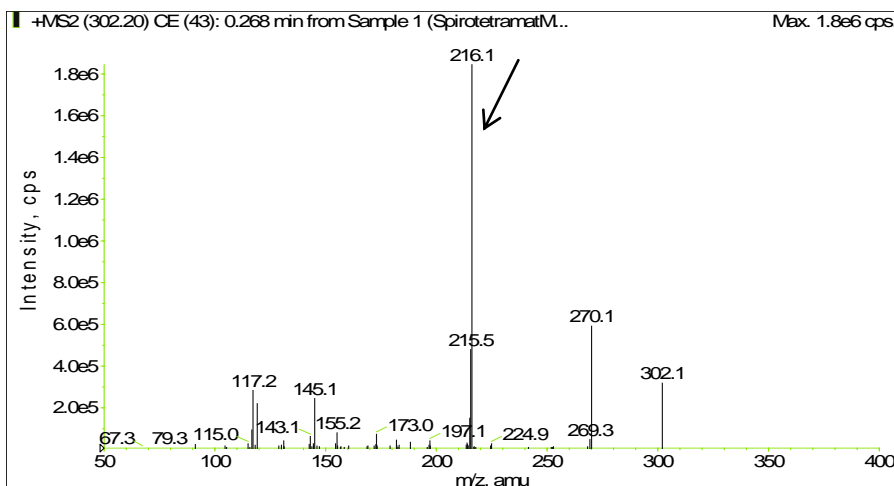


図 4-1 代謝物 M1 のプリカーサーイオン m/z 302 のプロダクトイオンスペクトル (定量用)
 スキャン範囲 : 50~400 m/z
 測定条件 : ESI (+)、CV=56、CE=43 (CV : コーン電圧、CE : コリジョンエネルギー)

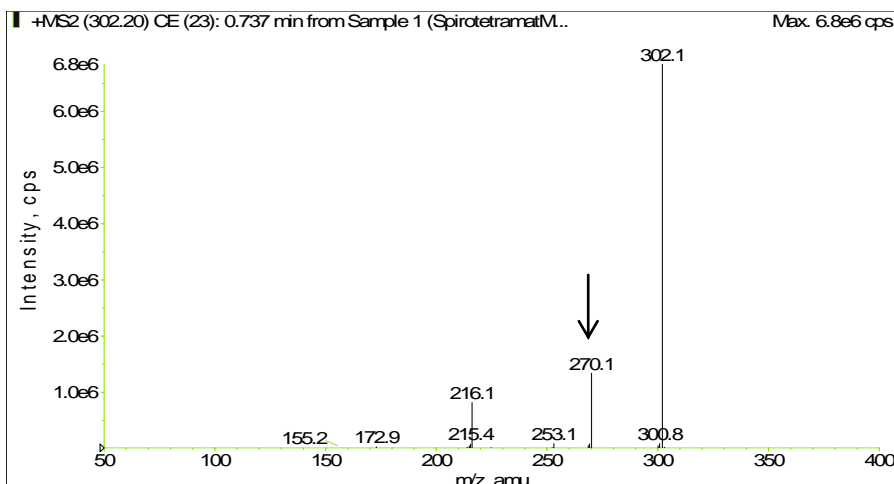


図 4-2 代謝物 M1 のプリカーサーイオン m/z 302 のプロダクトイオンスペクトル (定性用)
 スキャン範囲 : 50~310 m/z
 測定条件 : ESI (+)、CV=56、CE=23 (CV : コーン電圧、CE : コリジョンエネルギー)

2) LC条件の検討

分離カラムについて、TSK-gel ODS-100V (内径 2.0 mm、長さ 150 mm、粒子径 5 μm) を、移動相について、酢酸アンモニウム溶液及びアセトニトリルの混液並びにギ酸及びアセトニトリルの混液を用いて検討を行った。酢酸アンモニウム溶液及びアセトニトリルの混液では代謝物M1の保持が弱いため、移動相には0.02 vol%ギ酸溶液及びアセトニトリルを用いることとした。

3) 検量線

図5にスピロテトラマト及び代謝物M1の検量線の例を示した。0.000125 mg/L (0.000625 ng) ~0.0075 mg/L (0.00375 ng) {代謝物M1は0.0001 mg/L (0.0005 ng) ~0.0006 mg/L (0.003 ng)} 及び0.00125 mg/L (0.00625 ng) ~0.0075 mg/L (0.0375 ng) {代謝物M1は0.001 mg/L (0.005 ng) ~0.006 mg/L (0.03 ng)} の濃度範囲で作成した検量線の相関係数は、いずれも0.999以上であり良好な直線性を示した。

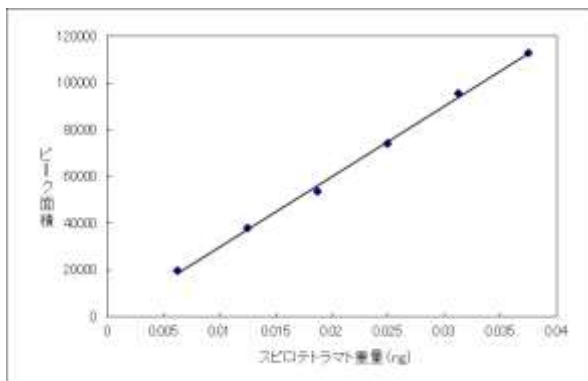


図 5-1 スピロテトラマト検量線例 1 (m/z 374→216)

データ処理装置設定条件の一例

機種 (メーカー) : Analyst

(AB SCIEX製)

ピークの定量方法 : ピーク面積法

検量線の種類 : 最小二乗法

検量線基準ピークの重量 : 0.00625 ng~0.0375 ng

傾き (a) : $a=3016666.4$

切片 (b) : $b=-560.7$

R : 0.999

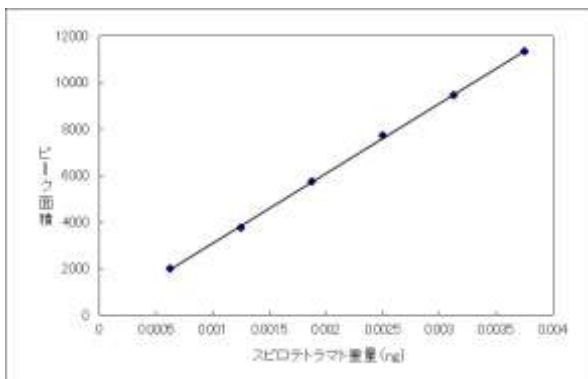


図 5-2 スピロテトラマト検量線例 2 (m/z 374→216)

データ処理装置設定条件の一例

機種 (メーカー) : Analyst

(AB SCIEX製)

ピークの定量方法 : ピーク面積法

検量線の種類 : 最小二乗法

検量線基準ピークの重量 : 0.000625 ng~0.00375 ng

傾き (a) : $a=3005459.6$

切片 (b) : $b=81.5$

R : 0.999

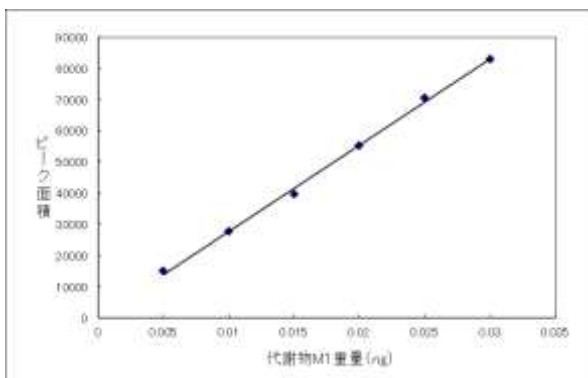


図5-3 代謝物M1の検量線例1 (m/z 302→216)

データ処理装置設定条件の一例

機種 (メーカー) : Analyst

(AB SCIEX製)

ピークの定量方法 : ピーク面積法

検量線の種類 : 最小二乗法

検量線基準ピークの重量 : 0.006 ng~0.03 ng

傾き (a) : $a=2756681.6$

切片 (b) : $b=167.1$

R : 0.999

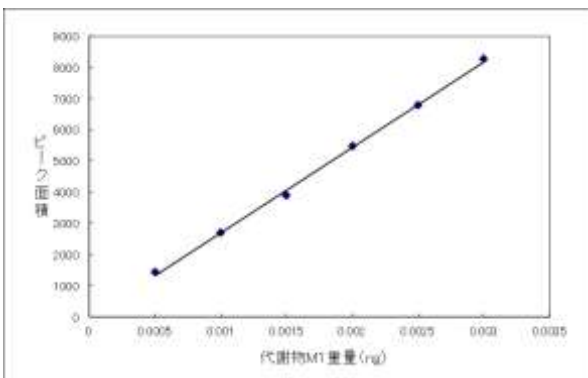


図5-4 代謝物M1の検量線例2 (m/z 302→216)

データ処理装置設定条件の一例

機種 (メーカー) : Analyst

(AB SCIEX製)

ピークの定量方法 : ピーク面積法

検量線の種類 : 最小二乗法

検量線基準ピークの重量 : 0.0006 ng~0.003 ng

傾き (a) : $a=2740137.0$

切片 (b) : $b=-48.0$

R : 0.999

4) 定量限界

定量限界の算出結果を以下に示した。

①農産物（穀類、豆類、種実類及び茶の場合）

0.01 mg/kg [(2 mL/0.1 g^{*1}) × (0.0025 ng/5 μL)]

代謝物M1のスピロテトラマトとしての定量限界

0.01 mg/kg > 0.00991 mg/kg [(2 mL/0.1 g^{*1}) × (0.002 ng/5 μL) × 1.239^{*2}]

*¹ 5.00 g × 4 mL/200 mL (茶の場合)

10.0 g × 2 mL/200 mL (茶以外の場合)

*² スピロテトラマトの分子量373.45/代謝物M1の分子量301.39

②農産物（果実及び野菜の場合）

0.01 mg/kg [(4 mL/0.2 g^{*3}) × (0.0025 ng/5 μL)]

代謝物M1のスピロテトラマトとしての定量限界

0.01 mg/kg > 0.00991 mg/kg [(4 mL/0.2 g^{*3}) × (0.002 ng/5 μL) × 1.239^{*2}]

*³ 20.0 g × 2 mL/200 mL

③畜水産物

0.01 mg/kg [(2 mL/0.1 g^{*4}) × (0.0025 ng/5 μL)]

代謝物M1のスピロテトラマトとしての定量限界

0.01 mg/kg > 0.00991 mg/kg [(2 mL/0.1 g^{*4}) × (0.002 ng/5 μL) × 1.239^{*2}]

*⁴ 5.00 g × 4 mL/200 mL (脂肪の場合)

10.0 g × 2 mL/200 mL (脂肪以外の場合)

2. 試験溶液調製法の検討

1) 抽出方法の検討

①抽出溶媒について

作物残留試験や乳牛における残留試験では、スピロテトラマト及び代謝物M1をギ酸含有アセトニトリルを用いて抽出しているが、本試験法では、畜水産物の脂肪との混和性を考慮し、ギ酸酸性下でアセトンを用いて抽出をすることとした。農産物についてもギ酸酸性下アセトン抽出とした。

②試料調製について

試料にスピロテトラマト及び代謝物M1を別々に添加し30分間放置後、アセトン及び0.1 vol%ギ酸(4:1)混液を用いて抽出したところ、いくつかの食品においてスピロテトラマトから代謝物M1への分解が認められた。そのため、酸を添加して調製する方法を検討した。

脂肪の調製において、ギ酸水溶液を加えたところ、脂肪と水が分離してしまったため、畜水産物については試料100 gに対して30 gの割合で、ギ酸含有 {エタノール及び水 (1:1)} 混液を加えることとした。加えるギ酸の濃度については、一番分解率の高かった肝臓を用いて検討した。肝臓10 gに対して各濃度のギ酸含有 {エタノール及び水 (1:1)} 混液を3 g加え、[実験方法] 7の分析法に従って分析を行い、回収率を表1に示した。その時の調製試料中のギ酸濃度を()内に示した。また、スピロテトラマトの回収率と、代謝物M1へ分解した量をスピロテトラマトに換算した回収率を合わせて100%としたときの、ギ酸の各濃度での代謝物M1への分解率を図6に示した。

ギ酸の濃度が4 vol% (調製試料中のギ酸濃度は約0.9 vol%) 以上で分解が十分抑えられたため、本試験では5 vol%ギ酸含有 {エタノール及び水 (1:1)} 混液 (調製試料中のギ酸濃度は約1.2 vol%) を加えて試験することとした。牛乳及びはちみつ以外の畜水産物100 gに対し、5 vol%ギ酸含有 {エタ

ノール及び水 (1:1) } 混液30 gを加えホモジナイズして均一化した。その調製試料において [実験方法] 7の分析法に従って分析を行った結果、分解が抑えられ、スピロテトラマト及び代謝物M1の回収率は良好であったため、この方法を採用した。牛乳及びはちみつについては、抽出時の試料中のギ酸濃度が酸調製試料と同程度 (約1.3 vol%) となるように、2 vol%ギ酸を20 mL加えた後、アセトンで抽出することとした。

農産物についても、大豆において添加後30分間で分解が見られたため、乾物試料へ入れる水20 mLに対するギ酸濃度の確認を行い、回収率を表2に示した。スピロテトラマトの回収率と代謝物M1へ分解した量をスピロテトラマトに換算した回収率を合わせて100 %としたときの、ギ酸の各濃度での代謝物M1への分解率を図7に示した。

ギ酸濃度が1 vol% (調製試料中のギ酸濃度は約0.7 vol %) 以上で分解が十分抑えられたため、乾物試料については、調製した試料に、牛乳及びはちみつと同濃度の2 vol%ギ酸水溶液20 mL (調製試料中のギ酸濃度は約1.3 vol%) を入れアセトンで抽出する方法を採用した。農作物において調製が必要な試料については、乾物試料の抽出時のギ酸濃度と同程度 (1.2 vol%) となるように、試料1 kgに対し、5 vol%ギ酸溶液を300 g g加え、ホモジナイズして均一化した試料をアセトンで抽出する方法を採用した。本検討では、サンプルサイズを落とし、試料300 gに対し、5 vol%ギ酸溶液を90 g添加し調製した試料について試験した。

表1 肝臓におけるギ酸の各濃度での回収率 (%)

	ギ酸濃度 {エタノール及び水 (1:1) 混液に対する濃度}											
	() 内は試料中のギ酸濃度											
	0 vol%		0.5 vol%		2 vol%		4 vol%		5 vol%		10 vol%	
	n=1	n=2	n=1	n=2	n=1	n=2	n=1	n=2	n=1	n=2	n=1	n=2
スピロテトラマト	0.9	0.9	21	30	81	84	103	108	98	103	96	101
*1	120	115	87	80	25	23	1.9	2.7	1.5	1.6	1.2	1.1
代謝物M1	104		98		99		-		97		100	

スピロテトラマト添加濃度 : 0.1 µg

肝臓試料 : 10 g相当

*1 スピロテトラマトを添加し、代謝物M1へ分解した量をスピロテトラマトに換算した回収率

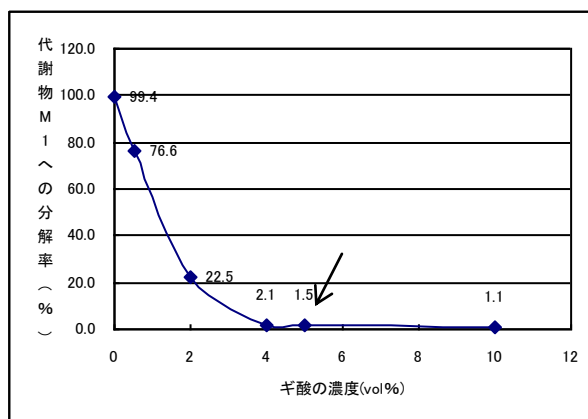


図6 スピロテトラマトの肝臓におけるギ酸の各濃度での分解率 (n=2の試験の平均) (%)

表2 大豆におけるギ酸の各濃度での回収率 (%)

	ギ酸濃度					
	() 内は試料中のギ酸濃度					
	0 vol%	0.02 vol%	0.1 vol%	1 vol%	2 vol%	5 vol%
		(0.01 vol%)	(0.06 vol%)	(0.7 vol%)	(1.3 vol%)	(3.3 vol%)
スピロテトラマト	82	91	98	100	112	98
*1	20	18	13	3.2	2.8	1.9

スピロテトラマト添加濃度 : 0.1 µg

大豆試料 : 10 g相当

*1 スピロテトラマトを添加し、代謝物M1 へ分解した量をスピロテトラマトに換算した回収率

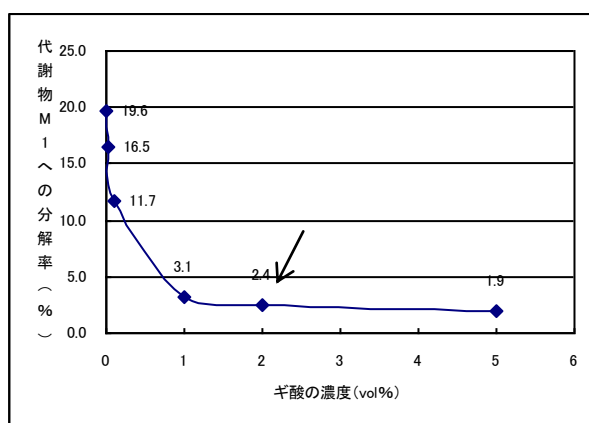


図7 スピロテトラマトの 大豆におけるギ酸の各濃度での分解率 (%)

2) 濃縮操作について

カートリッジカラムからの溶出試験を行った際、代謝物M1の回収率の低下が見られることがあったため検討を行ったところ、過酷な濃縮操作により回収率が低下することが確認された。

代謝物M1 0.08 µg (0.02 vol%ギ酸含有メタノール2 mLに溶解したもの) を、減圧濃縮し、液がなくなった後、さらに10分間減圧濃縮をし、アセトニトリル及び0.02 vol%ギ酸 (1 : 1) 混液で2 mLに溶解したところ、回収率は40 %であった。そのため、代謝物M1の溶出試験は濃縮操作を行わずにメスフラスコを用いて定容とした。また、玄米及びはちみつについて [実験方法] 7. 試験溶液の調製に従って添加回収試験を実施し、カラム精製後の試験溶液の濃縮操作の確認をした。カラム精製後の試験溶液を約0.5 mLまで減圧濃縮し、その後窒素乾固したところ、玄米の回収率は96 %、はちみつの回収率は100 %であり、回収率の低下は見られなかった。カラム精製後の試験溶液を減圧濃縮し、液がなくなった後、さらに10分間減圧濃縮を続けたところ、玄米の回収率は73 %、はちみつの回収率は86 %であった。過酷に濃縮したことで少し回収率の低下が見られたが、試料共存下では、通常の濃縮操作における回収率の低下は見られないため、濃縮操作の省略は行わずに、濃縮操作には注意して行うこととした。なおスピロテトラマト本体については、過酷な濃縮操作を行っても回収率の低下は確認されなかった。

3) 精製方法の検討

作物残留試験では、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムにスピロテトラマト及び代謝物M1

を0.02 vol%ギ酸20 mLで負荷した後、アセトニトリル及び0.02 vol%ギ酸（1：9）混液10 mLで洗浄し、アセトニトリル及び0.02 vol%ギ酸（13：7）混液10 mLで代謝物M1、アセトニトリル及び0.02 vol%ギ酸（1：1）混液10 mLでスピロテトラマトを溶出させ、代謝物M1についてはさらにグラファイトカーボンミニカラムによる精製を行っている。今回この方法で試験した結果、茶においてスピロテトラマトのイオン化促進が見られ、スピロテトラマトについてもグラファイトカーボンミニカラムによる精製が必要と考えられた。また脂肪においては、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム溶出で詰まり回収率の低下が見られた。そのため、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムへの負荷量を下げて、スピロテトラマトと代謝物M1の同時溶出の精製法を検討することとした

①オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムの溶出状況

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムをメタノール及び0.02 vol%ギ酸各5 mLで予備洗浄した後、スピロテトラマト0.1 µg及び代謝物M1 0.08 µgを0.02 vol%ギ酸20 mLで負荷した。溶出状況を表3に示した。スピロテトラマト及び代謝物M1は0.02 vol%ギ酸及びメタノール混液（7：3）10 mLでは溶出せず、0.02 vol%ギ酸及びメタノール（3：7）混液10 mLで溶出することが可能であった。

表3 オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムからの溶出状況（%）

	0.02 vol% ギ酸		0.02 vol%ギ酸及びメタノール						合計	
	20 mL	10 mL	(4：0)	(7：3)	(3：2)	(1：1)	(2：3)	(3：7)		(1：4)
			10 mL	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL		10 mL
スピロテトラマト	0	0	0	0	0	0	6	96	0	102
代謝物M1	0	0	0	15	69	7	tr	0	0	91

InertSep C18、充てん量 1 g、ジーエルサイエンス製

添加量：スピロテトラマト0.1 µg、代謝物M1 0.08 µg

②グラファイトカーボンミニカラムの溶出状況

グラファイトカーボンミニカラムを0.02 vol%ギ酸含有メタノール5 mLで予備洗浄した後、スピロテトラマト0.1 µg及び代謝物M1 0.08 µgを0.02 vol%ギ酸含有メタノールで負荷、溶出したときの溶出状況を表4に示した。スピロテトラマト及び代謝物M1は0.02 vol%ギ酸含有メタノール15 mLで溶出することが可能であった。

表4 グラファイトカーボンミニカラムからの溶出状況（%）

	0.02 vol%ギ酸含有メタノール			合計
	0-10 mL(負荷)	10-15 mL	15-20 mL	
スピロテトラマト	70	35	tr	105
代謝物 M1	99	0	0	99

ENVI-Carb、充てん量250 mg、シグマアルドリッチジャパン製

添加量：スピロテトラマト0.1 µg、代謝物M1 0.08 µg

③オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム及びグラファイトカーボンミニカラムの溶出状況

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムを0.02 vol%ギ酸含有メタノール及び0.02 vol%ギ酸各5 mLで予備洗浄し、グラファイトカーボンミニカラムを0.02 vol%ギ酸含有メタノール5 mLで予備洗浄した。オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムにスピロテトラマト0.1 µg及び代謝物M1 0.08 µgを0.02 vol%ギ酸20 mLで負荷した。次いで、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムを0.02 vol%ギ酸及びメタノール混液（7：3）10 mLで洗浄した後、下部にグラファイトカーボンミニカラムを接続し、両者のカラムより0.02 vol%ギ酸含有メタノール15 mLで溶出したときの溶出状況を表5に示した。

スピロテトラマト及び代謝物M1は、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムから0.02 vol%ギ酸及びメタノール混液（7：3）10 mLでは溶出せず、下部にグラファイトカーボンミニカラムを接続した後、両者のカラムより0.02 vol%ギ酸含有メタノール15 mLで溶出されたため、この方法を採用した。

表5 オクタデシルシリル化シリカゲル^{*1}及びグラファイトカーボン^{*2}連結ミニカラムからの溶出状況（%）

	0.02 vol%ギ酸及びメタノール（7：3） ^{*3}			合計
	0-10 mL	0-15 mL	15-20 mL	
スピロテトラマト	0	104	0	104
代謝物 M1	tr	98	0	98

*1 InertSep C18、充てん量1 g、ジーエルサイエンス製

*2 ENVI-Carb、充てん量250 mg、シグマアルドリッチジャパン製

*3 オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム

*4 オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム及びグラファイトカーボンミニカラム

供試量：スピロテトラマト 0.1 µg、代謝物 M1 0.08 µg

3. 添加回収試験

農産物は玄米、大豆、らっかせい、ほうれんそう、キャベツ、ばれいしょ、オレンジ、りんご及び茶の9項目になすを加えた10食品を用いて、畜水産物は牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、さけ、うなぎ、しじみ、牛乳、鶏卵、はちみつ及び豚の筋肉の10食品を用いて、[実験方法] 7. 試験溶液の調製に従って添加回収試験を実施した。

添加回収試験における回収率100%相当の溶媒標準溶液、各食品のブランク試料及び添加試料の代表的なクロマトグラムを図8、10、12及び14に示した。また、各食品のブランク試料のスキャン測定による代表的なトータルイオンクロマトグラムを図16に示した。

1) 選択性

農産物の選択性の結果を表6-1に、畜水産物の選択性の結果を表6-2に示した。検討した何れの試料においてもスピロテトラマト及び代謝物M1の定量を妨害するようなピークは認められず、選択性は良好であった。

表6-1 農産物の選択性の評価

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	基準値 ^{*1} (ppm)	添加濃度 ^{*2} (ppm)	妨害ピークの許容範囲		ピーク面積(高さ) ^{*3}				選択性の評価 ^{*4}	備考	
						評価対象濃度 (ppm)	判定基準	面積又は高さの別	ブランク試料 (a)	標準溶液 ^{*5} (b)	面積(高さ)比 (a)/(b)			
1	スピロテトラマト	玄米	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		大豆	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		らっかせい	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		ほうれんそう	0.01	7	7	基準値	7	< 0.100	面積	0		#DIV/0!	○	
		キャベツ	0.01	0.3	0.3	基準値	0.3	< 0.100	面積	0		#DIV/0!	○	
		ばいりいよ	0.01	0.8	0.8	基準値	0.8	< 0.100	面積	0		#DIV/0!	○	
		オレンジ	0.01	1	1	基準値	1	< 0.100	面積	0		#DIV/0!	○	
		りんご	0.01	0.7	0.7	基準値	0.7	< 0.100	面積	0		#DIV/0!	○	
		茶	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		なす	0.01	1	1	基準値	1	< 0.100	面積	0		#DIV/0!	○	
2	代謝物M1(親物質)	玄米	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		大豆	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		らっかせい	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		ほうれんそう	0.01	7	7	基準値	7	< 0.100	面積	0		#DIV/0!	○	
		キャベツ	0.01	0.3	0.3	基準値	0.3	< 0.100	面積	0		#DIV/0!	○	
		ばいりいよ	0.01	0.8	0.8	基準値	0.8	< 0.100	面積	0		#DIV/0!	○	
		オレンジ	0.01	1	1	基準値	1	< 0.100	面積	0		#DIV/0!	○	
		りんご	0.01	0.7	0.7	基準値	0.7	< 0.100	面積	0		#DIV/0!	○	
		茶	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		なす	0.01	1	1	基準値	1	< 0.100	面積	0		#DIV/0!	○	

*1 基準値は、基準値未設定の場合には一律基準(0.01 ppm)を用いる。
 2 添加濃度と評価対象濃度が異なる場合(定量限界と基準値との関係が、『定量限界<基準値<定量限界×3』となる場合には、『』が表示される。『*』が表示された分析対象化合物は、添加濃度と評価対象濃度が異なるため、別途、定量限界濃度相当のマトリックス添加標準溶液を調製して評価する。
 *3 ブランク試料及び標準溶液の順に測定した結果から評価する。(必要に応じて起爆注入を行う。)
 *4 試料中の濃度が「評価対象濃度(基準値濃度又は定量限界濃度)」相当になるように、ブランク試料の試験溶液で調製した標準溶液(マトリックス添加標準溶液)を用いる。ブランク試料に妨害ピークが観察されなかった場合には、標準溶液のピーク面積(高さ)は求めなくても良い。
 *5 面積(高さ)比が、妨害ピークの許容範囲の判定基準に適合する場合には「○」、適合しない場合には「×」を記載する。

表6-2 畜水産物の選択性の評価

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	基準値 ^{*1} (ppm)	添加濃度 ^{*2} (ppm)	妨害ピークの許容範囲		ピーク面積(高さ) ^{*3}				選択性の評価 ^{*4}	備考	
						評価対象濃度 (ppm)	判定基準	面積又は高さの別	ブランク試料 (a)	標準溶液 ^{*5} (b)	面積(高さ)比 (a)/(b)			
1	スピロテトラマト	牛の筋肉	0.01	0.02	0.02	* 定量限界	0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		牛の脂肪	0.01	0.02	0.02	* 定量限界	0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		牛の肝臓	0.01	0.02	0.02	* 定量限界	0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		さかな	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		うなぎ	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		しじみ	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		牛乳	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		鶏卵	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		はちみつ	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		豚の筋肉	0.01	0.02	0.02	* 定量限界	0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
2	代謝物M1(親物質)	牛の筋肉	0.01	0.02	0.02	* 定量限界	0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		牛の脂肪	0.01	0.02	0.02	* 定量限界	0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		牛の肝臓	0.01	0.02	0.02	* 定量限界	0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		さかな	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		うなぎ	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		しじみ	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		牛乳	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		鶏卵	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		はちみつ	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		豚の筋肉	0.01	0.02	0.02	* 定量限界	0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	

*1 基準値は、基準値未設定の場合には一律基準(0.01 ppm)を用いる。
 2 添加濃度と評価対象濃度が異なる場合(定量限界と基準値との関係が、『定量限界<基準値<定量限界×3』となる場合には、『』が表示される。『*』が表示された分析対象化合物は、添加濃度と評価対象濃度が異なるため、別途、定量限界濃度相当のマトリックス添加標準溶液を調製して評価する。
 *3 ブランク試料及び標準溶液の順に測定した結果から評価する。(必要に応じて起爆注入を行う。)
 *4 試料中の濃度が「評価対象濃度(基準値濃度又は定量限界濃度)」相当になるように、ブランク試料の試験溶液で調製した標準溶液(マトリックス添加標準溶液)を用いる。ブランク試料に妨害ピークが観察されなかった場合には、標準溶液のピーク面積(高さ)は求めなくても良い。
 *5 面積(高さ)比が、妨害ピークの許容範囲の判定基準に適合する場合には「○」、適合しない場合には「×」を記載する。

2) 真度、精度及び定量限界

農産物の真度及び併行精度の検討結果を表7-1に示した。キャベツを除きスピロテトラマトの真度は86~115%、併行精度は2~4%であり、目標値を十分に満たした。キャベツについては併行精度が10%

となり、わずかに目標値を満たすことができなかつたが、 $n=1$ の回収率83%は $n=2\sim n=5$ の回収率の結果から棄却可能な結果と思われ、棄却後の真度は106%、併行精度は3%であることから試験法の性能には問題ないと思われた。代謝物M1の真度は83~102%、併行精度は0~7%であり、目標値を十分に満たした。玄米、大豆、らっかせい及び茶については、S/N比の平均値はスピロテトラマト252~339、代謝物M1 92~128であり $S/N \geq 10$ を十分に満たした。

畜水産物の真度及び併行精度の検討結果を表7-2に示した。スピロテトラマトの真度は95~108%、併行精度は1~4%であり、目標値を十分に満たした。代謝物M1の真度は83~104%、併行精度は2~13%であり、目標値を十分に満たした。さけ、うなぎ、しじみ、牛乳、鶏卵及びはちみつについては、S/N比の平均値はスピロテトラマト250~472、代謝物M1 145~176であり $S/N \geq 10$ を十分に満たした。

添加濃度が定量限界濃度と異なる試料について、定量限界の推定を行った結果を表8-1及び表8-2に示した。また、定量限界の推定における代表的なクロマトグラムを図9、11、13及び15に示した。農産物のS/N比の平均値はスピロテトラマト404~519、代謝物M1 205~260であり $S/N \geq 10$ を十分に満たした。畜水産物のS/N比の平均値はスピロテトラマト281~398、代謝物M1 167~192であり $S/N \geq 10$ を十分に満たした。

表7-1 農産物の真度、精度及び定量限界の評価

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	基準値 ^{*1} (ppm)	添加濃度 (ppm)	定量限界の評価 ^{**}	検量線					回収率(%)					真度 (%)	併行精度 (RSD%)	S/N比 ^{**}			備考
							傾斜	切片	r ² 値	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5	Max	Min			平均値			
1	大豆(大豆)	玄米	0.01	0.01	0.01	*	288420	-128	0.993	96	94	93	89	93	93	3	338	310	329			
		大豆	0.01	0.01	0.01	*	288420	-128	0.993	93	90	87	87	85	88	2	305	285	300			
		らっかせい	0.01	0.01	0.01	*	288417	84	0.994	88	80	83	84	85	88	4	355	323	339			
		ほうれんそう	0.01	7	7	*	381696	-561	0.998	93	86	84	81	83	84	3				#CND		
		キャベツ	0.01	0.3	0.3	*	384513	-1717	0.998	83	106	104	109	103	101	10				#CND		
		ばれいしょ	0.01	0.8	0.8	*	384513	-1717	0.998	87	94	90	85	83	90	4				#CND		
		オレシジ	0.01	1	1	*	378168	-667	0.999	102	107	102	108	106	105	3				#CND		
		りんご	0.01	0.7	0.7	*	384513	-1717	0.998	90	93	84	90	84	92	2				#CND		
		茶	0.01	0.01	0.01	*	380940	82	1.000	107	116	115	110	120	115	4	203	300	252			
2	大豆(緑豆)	玄米	0.01	0.01	0.01	*	288245	63	0.998	97	80	80	87	82	89	7	128	118	128			
		大豆	0.01	0.01	0.01	*	288245	63	0.998	98	90	106	107	95	100	7	121	118	120			
		らっかせい	0.01	0.01	0.01	*	288250	-13	0.998	99	100	89	99	99	99	0	129	118	123			
		ほうれんそう	0.01	7	7	*	278682	167	0.998	86	86	100	98	89	88	4				#CND		
		キャベツ	0.01	0.3	0.3	*	282489	-1328	0.998	92	88	81	105	83	84	7				#CND		
		ばれいしょ	0.01	0.8	0.8	*	282489	-1328	0.998	78	83	86	88	84	83	5				#CND		
		オレシジ	0.01	1	1	*	282730	-1134	0.997	103	104	90	99	89	100	4				#CND		
		りんご	0.01	0.7	0.7	*	282489	-1328	0.998	86	85	88	88	84	88	2				#CND		
		茶	0.01	0.01	0.01	*	278895	193	0.998	102	105	97	99	108	102	4	90	94	92			

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

表7-2 畜水産物の真度、精度及び定量限界の評価

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	基準値 ^{*1} (ppm)	添加濃度 (ppm)	定量限界の評価 ^{**}	検量線					回収率(%)					真度 (%)	併行精度 (RSD%)	S/N比 ^{**}			備考
							傾斜	切片	r ² 値	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5	Max	Min			平均値			
1	大豆(大豆)	牛の筋肉	0.01	0.02	0.02	*	238808	204	1.000	98	97	99	97	99	98	1				#CND		
		牛の脂肪	0.01	0.02	0.02	*	307280	618	0.997	105	102	103	104	88	102	3				#CND		
		牛の肝臓	0.01	0.02	0.02	*	238808	204	1.000	106	105	104	100	88	103	3				#CND		
		さけ	0.01	0.01	0.01	*	318883	-258	0.997	97	94	93	94	95	95	2	438	348	392			
		うなぎ	0.01	0.01	0.01	*	318883	-258	0.997	102	105	102	107	106	105	2	258	242	250			
		しじみ	0.01	0.01	0.01	*	346272	-188	1.000	88	105	107	102	106	103	3	367	336	352			
		牛乳	0.01	0.01	0.01	*	308888	81	0.999	102	108	108	108	109	107	3	381	363	372			
		鶏卵	0.01	0.01	0.01	*	302372	-166	1.000	98	98	88	93	105	95	4	413	340	381			
		ほろあつ	0.01	0.01	0.01	*	308888	81	0.999	103	110	105	110	109	108	3	485	448	472			
		豚の筋肉	0.01	0.02	0.02	*	287889	516	0.997	103	102	100	104	106	103	2				#CND		
		2	大豆(緑豆)	牛の筋肉	0.01	0.02	0.02	*	238786	697	0.998	94	97	93	92	102	95	4				#CND
				牛の脂肪	0.01	0.02	0.02	*	256884	324	0.997	74	81	86	82	73	83	13				#CND
牛の肝臓	0.01			0.02	0.02	*	207888	697	0.998	108	105	97	105	106	104	4				#CND		
さけ	0.01			0.01	0.01	*	278137	-18	0.999	92	98	91	90	83	81	8	178	175	178			
うなぎ	0.01			0.01	0.01	*	278137	-18	0.999	117	88	102	97	103	104	7	174	159	172			
しじみ	0.01			0.01	0.01	*	244333	230	0.998	87	80	88	81	86	82	4	172	126	149			
牛乳	0.01			0.01	0.01	*	338811	-238	0.994	88	86	86	84	92	87	3	145	144	145			
鶏卵	0.01			0.01	0.01	*	244333	238	0.999	95	95	91	108	88	97	7	179	148	162			
ほろあつ	0.01			0.01	0.01	*	246887	160	0.998	108	93	87	86	81	81	11	168	165	167			
豚の筋肉	0.01			0.02	0.02	*	256884	324	0.997	100	102	105	106	104	103	2				#CND		

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

表8-1 農産物の定量限界の推定

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	基準値 ^{*1} (ppm)	添加濃度 (ppm)	定量限界の評価 ^{**}	標準溶液濃度 [†] (mg/L)	ピーク面積(%) ^{‡4}					S/N比					平均値	備考			
								面積又は高さの比	ブランク%	マトリックス添加標準溶液	溶媒標準溶液	n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均			n=1	n=2	
1	大豆(大豆)	玄米	0.01	0.01	0.01	*	0.005	面積	0	7588	7432	7510	7023	7102	7062	466	390	428	429	#CND		
		大豆	0.01	0.01	0.01	*	0.005	面積	0	9503	9625	9609	9076	9152	9114	526	503	515	516	#CND		
		らっかせい	0.01	0.01	0.01	*	0.005	面積	0	8127	8177	8152	8370	8637	8804	420	407	414	414	#CND		
		ほうれんそう	0.01	7	7	*	0.005	面積	0	10400	10238	10319	9945	9880	9817	523	515	519	518	#CND		
		キャベツ	0.01	0.3	0.3	*	0.005	面積	0	9450	8825	8642	8679	8894	8837	481	483	482	482	#CND		
		ばれいしょ	0.01	0.8	0.8	*	0.005	面積	0											#CND		
		オレシジ	0.01	1	1	*	0.005	面積	0											#CND		
		りんご	0.01	0.7	0.7	*	0.005	面積	0											#CND		
		茶	0.01	0.01	0.01	*	0.005	面積	0											#CND		
		なす	0.01	1	1	*	0.005	面積	0	8452	8360	8376	8536	8623	8676	430	436	437	437	#CND		
		2	大豆(緑豆)	玄米	0.01	0.01	0.01	*	0.005	面積	0											#CND
				大豆	0.01	0.01	0.01	*	0.005	面積	0											#CND
らっかせい	0.01			0.01	0.01	*	0.005	面積	0											#CND		
ほうれんそう	0.01			7	7	*	0.005	面積	0	8806	8643	8728	8882	8748	8806	205	205	205	205	#CND		
キャベツ	0.01			0.3	0.3	*	0.005	面積	0	7001	7188	7089	7187	6925	7055	285	226	261	243	#CND		
ばれいしょ	0.01			0.8	0.8	*	0.005	面積	0	8880	8885	8640	8811	7029	8883	382	362	362	362	#CND		
オレシジ	0.01			1	1	*	0.005	面積	0	7177	7061	7114	7339	7435	7387	188	234	99	211	#CND		
りんご	0.01			0.7	0.7	*	0.005	面積	0	8515	8325	8420	8678	8631	8884	283	257	280	280	#CND		
茶	0.01			0.01	0.01	*	0.005	面積	0											#CND		
なす	0.01			1	1	*	0.005	面積	0	8438	8475	8482	8671	8493	8883	203	220	98	212	#CND		

*1 基準値は、基準値未設定の場合には一律基準(0.01 ppm)を用いる。
 *2 定量限界の推定を行う対象(添加濃度と定量限界濃度と異なる場合)には、#*が表示される。
 † 試料中の濃度が定量限界相違濃度となるように、ブランク試料の試験溶液で調製した標準溶液(マトリックス添加標準溶液)及び溶媒で調製した標準溶液(溶媒標準溶液)を併用する。
 ‡4 マトリックス添加標準溶液及び溶媒標準溶液の濃度に交互に2回以上測定する。(必要に応じて標準注入を行う。)
 ‡5 ブランクにピークが認められた場合は、マトリックス添加標準溶液のピーク面積を差し引いた値を用いる。
 ‡6 マトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積(又は高さ)の比(%)を求める。

表8-2 畜水産物の定量限界の推定

No	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	基準値 ¹⁾ (ppm)	添加濃度 (ppm)	定量限界 の推定 ²⁾	標準溶液 濃度 ³⁾ (mg/L)	ピーク面積(高さ) ⁴⁾									5%点		平均値		備考			
								面積又は 高さの別	プランク ⁵⁾	マトリックス添加標準溶液 ⁶⁾			溶媒標準溶液			n=1	n=2	平均	n=1	n=2		平均	ピーク面積 比(%) ⁷⁾	5%点
										n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均									
1	ピロテトラマ	牛の筋肉	0.01	0.02	0.02	*	0.0005	面積	0	5143	5319	5231	5434	5369	5401	5360	299	299	57	547				
		牛の脂肪	0.01	0.02	0.02	*	0.0005	面積	0	5033	5001	5017	5789	5794	5797	429	259	59	394					
		牛の肝臓	0.01	0.02	0.02	*	0.0005	面積	0	5712	5664	5688	5655	5517	5566	263	276	102	391					
		卵	0.01	0.01	0.01								0								#C(M)	#C(M)		
		うなぎ	0.01	0.01	0.01								0								#C(M)	#C(M)		
		しじみ	0.01	0.01	0.01								0								#C(M)	#C(M)		
		牛乳	0.01	0.01	0.01								0								#C(M)	#C(M)		
		鶏卵	0.01	0.01	0.01								0								#C(M)	#C(M)		
		はちみつ	0.01	0.01	0.01								0								#C(M)	#C(M)		
		豚の筋肉	0.01	0.02	0.02	*	0.0005	面積	0	8457	8213	8365	8593	8395	8482	369	429	59	399					
2	代謝物M1(糖換算)	牛の筋肉	0.01	0.02	0.02	*	0.0005	面積	0	9505	4319	4412	4843	4016	4732	194	150	90	175					
		牛の脂肪	0.01	0.02	0.02	*	0.0005	面積	0	4320	4304	4312	4495	4370	4419	191	164	90	176					
		牛の肝臓	0.01	0.02	0.02	*	0.0005	面積	0	5028	4806	4917	4779	4514	4647	172	161	105	187					
		卵	0.01	0.01	0.01								0							#C(M)	#C(M)			
		うなぎ	0.01	0.01	0.01								0							#C(M)	#C(M)			
		しじみ	0.01	0.01	0.01								0							#C(M)	#C(M)			
		牛乳	0.01	0.01	0.01								0							#C(M)	#C(M)			
		鶏卵	0.01	0.01	0.01								0							#C(M)	#C(M)			
		はちみつ	0.01	0.01	0.01								0							#C(M)	#C(M)			
		豚の筋肉	0.01	0.02	0.02	*	0.0005	面積	0	6575	6273	6424	6739	6539	6657	199	187	90	192					

*1 基準値は、基準値未設定の場合には一律基準(0.01 ppm)を用いる。
 *2 定量限界の推定は、添加濃度と定量限界濃度とが異なる場合(例えば、*3)が表される。
 *3 試料中の濃度が定量限界相当濃度(あるいは、プランク試料の試験濃度で調製した標準溶液(マトリックス添加標準溶液)及び溶媒で調製した標準溶液(溶媒標準溶液)を作成する。
 *4 マトリックス添加標準溶液及び溶媒標準溶液の濃度(交互)に2回以上測定する。(必要に応じて記録注入を行う。)
 *5 プランク値(ピークが認められた場合には、マトリックス添加標準溶液の値はプランク値を差し引いた値を用いる。
 *6 マトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積(又は高さ)の比(%)を求める。

3) 試料マトリックスの測定への影響

試料マトリックスの測定への影響について検討した結果を表9-1及び9-2に示した。添加回収試験における回収率100%相当濃度になるように調製したマトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積比を求めた。農産物の面積比はスピロテトラマト0.96~1.06、代謝物M1 0.96~1.05であり、測定への影響はないものと考えられた。畜水産物の面積比はスピロテトラマト0.95~1.06、代謝物M1 0.94~1.07であり、測定への影響はないものと考えられた。

添加回収試験における真度を表9-1及び9-2で求めたピーク面積比で除して補正真度を求め、表10-1、10-2に示した。農産物の補正真度はスピロテトラマト82~109%、代謝物M1 85~104%であり、畜水産物の補正真度はスピロテトラマト96~113%、代謝物M1 83~102%であり、試料マトリックスの測定への影響と真度との間に矛盾は見られなかった。

表9-1 農産物の試料マトリックスの測定への影響

No	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	基準値 ¹⁾ (ppm)	添加濃度 (ppm)	標準溶液 濃度 ²⁾ (mg/L)	ピーク面積(高さ) ³⁾									備考
							面積又は 高さの別	プランク ⁴⁾	マトリックス添加標準溶液 ⁵⁾			溶媒標準溶液			ピーク面積 比(高さ) ⁶⁾	
									n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均		
1	代謝物M1	玄米	0.01	0.01	0.01	0.0005	面積	0	4884	5072	4978	4872	4960	4931	1.01	
		大豆	0.01	0.01	0.01	0.0005	面積	0	5266	5597	5481	5329	5115	5222	1.05	
		らっきょう	0.01	0.01	0.01	0.0005	面積	0	5324	5291	5303	5211	5243	5327	1.01	
		ほうれんそう	0.01	7	7	0.005	面積	0	71679	70623	71251	68902	67902	69442	1.04	
		キャベツ	0.01	0.3	0.3	0.005	面積	0	77932	77075	77454	77196	79653	76575	0.99	
		ばれいしょ	0.01	0.8	0.8	0.005	面積	0	80459	82519	81489	82910	83218	83014	0.98	
		オレシシ	0.01	1	1	0.005	面積	0	84527	82392	83459	86994	86601	86808	0.98	
		りんご	0.01	0.7	0.7	0.005	面積	0	67458	67724	67591	68112	67482	66797	1.01	
		茶	0.01	0.01	0.01	0.0005	面積	0	7787	7759	7763	7302	7379	7340	1.00	
		なす	0.01	1	1	0.005	面積	0	96917	97241	96529	97772	96139	96956	1.00	
2	代謝物M1(糖換算)	玄米	0.01	0.01	0.01	0.0005	面積	0	3919	4023	3971	4130	4114	4122	0.96	
		大豆	0.01	0.01	0.01	0.0005	面積	0	4464	4805	4634	4536	4616	4576	0.99	
		らっきょう	0.01	0.01	0.01	0.0005	面積	0	4256	4181	4218	4352	4403	4376	0.98	
		ほうれんそう	0.01	7	7	0.005	面積	0	53631	52614	53122	53457	53792	53625	0.99	
		キャベツ	0.01	0.3	0.3	0.005	面積	0	63228	62392	62810	61765	62407	62091	1.01	
		ばれいしょ	0.01	0.8	0.8	0.005	面積	0	64520	64522	64521	65674	65803	65820	0.99	
		オレシシ	0.01	1	1	0.005	面積	0	63505	64593	64029	66020	67013	66971	0.96	
		りんご	0.01	0.7	0.7	0.005	面積	0	52689	52944	52817	54924	54897	54910	0.96	
		茶	0.01	0.01	0.01	0.0005	面積	0	6654	6089	6372	5517	5515	5586	1.05	
		なす	0.01	1	1	0.005	面積	0	67048	67086	67063	68761	67910	68336	0.99	

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

表9-2 畜水産物の試料マトリックスの測定への影響

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	基準値 ^{*1} (ppm)	添加濃度 (ppm)	標準溶液濃度 ^{*2} (mg/L)	ピーク面積(高さ) ^{*3}									備考
							面積又は高さの別	ブランク ^{*4}	マトリックス添加標準溶液 ^{*5}			溶液標準溶液 ^{*6}			ピーク面積(高さ)比 ^{*7}	
									n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均		
1	スチロトラト	牛の筋肉	0.01	0.02	0.02	0.001	面積	0	11682	11309	11496	11246	11675	11461	1.00	
		牛の脂肪	0.01	0.02	0.02	0.001	面積	0	11688	11460	11574	12007	11535	11771	0.98	
		牛の肝臓	0.01	0.02	0.02	0.001	面積	0	12315	12455	12365	12037	12370	12204	1.01	
		さけ	0.01	0.01	0.01	0.0005	面積	0	7274	7063	7169	7261	7282	7382	0.98	
		うなぎ	0.01	0.01	0.01	0.0005	面積	0	7645	7774	7710	7310	7249	7290	1.08	
		しじみ	0.01	0.01	0.01	0.0005	面積	0	8978	8802	8889	8678	8728	8704	1.02	
		牛乳	0.01	0.01	0.01	0.0005	面積	0	9885	9954	9920	10217	10160	10188	0.97	
		鶏卵	0.01	0.01	0.01	0.0005	面積	0	8550	8731	8690	8708	8830	8919	0.98	
		ほちみつ	0.01	0.01	0.01	0.0005	面積	0	8188	8217	8208	8708	8520	8614	0.95	
		豚の筋肉	0.01	0.02	0.02	0.001	面積	0	11062	11721	11396	11481	11482	11482	0.99	
		豚の脂肪	0.01	0.02	0.02	0.001	面積	0	8570	8591	8480	8983	8686	8684	0.95	
2	代謝物M1(親換算)	牛の筋肉	0.01	0.02	0.02	0.001	面積	0	8761	8908	8830	8617	9081	8854	1.00	
		牛の脂肪	0.01	0.02	0.02	0.001	面積	0	9807	9429	9618	8937	9231	9094	1.05	
		牛の肝臓	0.01	0.02	0.02	0.001	面積	0	5405	5348	5378	5758	5548	5651	0.95	
		さけ	0.01	0.01	0.01	0.0005	面積	0	5758	6014	5886	5473	5538	5505	1.07	
		うなぎ	0.01	0.01	0.01	0.0005	面積	0	6704	6308	6508	6904	6878	6841	0.94	
		しじみ	0.01	0.01	0.01	0.0005	面積	0	7301	7340	7321	7428	7270	7349	1.00	
		牛乳	0.01	0.01	0.01	0.0005	面積	0	6467	6264	6365	6318	6391	6354	1.00	
		鶏卵	0.01	0.01	0.01	0.0005	面積	0	6393	6578	6484	6740	6711	6736	0.96	
		ほちみつ	0.01	0.01	0.01	0.0005	面積	0	10009	10390	10199	9642	10297	10070	1.01	
		豚の筋肉	0.01	0.02	0.02	0.001	面積	0	10009	10390	10199	9642	10297	10070	1.01	

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

表 10-1 農産物の補正真度

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	基準値 ^{*1} (ppm)	添加濃度 (ppm)	真度 (%)	ピーク面積比 (%)	補正真度 (%)	備考
1	スチロトラト	玄米	0.01	0.01	0.01	93	1.01	92	
		大豆	0.01	0.01	0.01	86	1.05	82	
		らっかせい	0.01	0.01	0.01	88	1.01	87	
		ほうれんそう	0.01	7.	7.	94	1.04	90	
		キャベツ	0.01	0.3	0.3	101	0.99	102	
		ばれいしょ	0.01	0.8	0.8	90	0.98	91	
		オレンジ	0.01	1.	1.	105	0.96	109	
		りんご	0.01	0.7	0.7	92	1.01	91	
		茶	0.01	0.01	0.01	115	1.06	108	
		なす	0.01	1.	1.	102	1.00	102	
		2	代謝物M1(親換算)	玄米	0.01	0.01	0.01	89	0.96
大豆	0.01			0.01	0.01	100	0.99	101	
らっかせい	0.01			0.01	0.01	99	0.96	103	
ほうれんそう	0.01			7.	7.	96	0.99	97	
キャベツ	0.01			0.3	0.3	94	1.01	93	
ばれいしょ	0.01			0.8	0.8	83	0.98	85	
オレンジ	0.01			1.	1.	100	0.96	104	
りんご	0.01			0.7	0.7	86	0.96	90	
茶	0.01			0.01	0.01	102	1.05	97	
なす	0.01			1.	1.	93	0.98	95	

表 10-2 畜水産物の補正真度

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	基準値* (ppm)	添加濃度 (ppm)	真度 (%)	ピーク面積比 (%)	補正真度 (%)	備 考
1	スピロテトラマト	牛の筋肉	0.01	0.02	0.02	88	1.00	88	
		牛の脂肪	0.01	0.02	0.02	102	0.98	104	
		牛の肝臓	0.01	0.02	0.02	103	1.01	101	
		さけ	0.01	0.01	0.01	95	0.98	96	
		うなぎ	0.01	0.01	0.01	105	1.06	99	
		しじみ	0.01	0.01	0.01	103	1.02	101	
		牛乳	0.01	0.01	0.01	107	0.97	110	
		鶏卵	0.01	0.01	0.01	99	0.99	100	
		はちみつ	0.01	0.01	0.01	108	0.95	113	
		豚の筋肉	0.01	0.02	0.02	103	0.99	104	
2	代謝物M1 (親換算)	牛の筋肉	0.01	0.02	0.02	95	0.95	100	
		牛の脂肪	0.01	0.02	0.02	83	1.00	83	
		牛の肝臓	0.01	0.02	0.02	104	1.05	99	
		さけ	0.01	0.01	0.01	91	0.95	95	
		うなぎ	0.01	0.01	0.01	104	1.07	97	
		しじみ	0.01	0.01	0.01	90	0.94	96	
		牛乳	0.01	0.01	0.01	87	1.00	87	
		鶏卵	0.01	0.01	0.01	97	1.00	97	
		はちみつ	0.01	0.01	0.01	91	0.96	94	
		豚の筋肉	0.01	0.02	0.02	103	1.01	102	

4. 考察

試料に、スピロテトラマト及び代謝物M1を別々に添加し30分間放置後、抽出したところ、スピロテトラマトから代謝物M1への分解が認められた。そのため、酸を添加して調製する方法を検討し、畜水産物100 gに対し、5 vol%ギ酸含有 {エタノール及び水 (1 : 1) } 混液30 gを加えホモジナイズして均一化した試料をアセトンで抽出したところ、分解が十分に抑えられたため、この方法を採用とした。調製不要の牛乳及びはちみつについては、抽出時の試料中のギ酸濃度が酸調製試料と同程度となるように、2 vol%ギ酸を20 mL加えた後、アセトンで抽出することとした。

農産物についても、大豆において分解が認められたため、検討を行い、乾物試料については調製試料に2 vol%ギ酸20 mLを入れアセトンで抽出する方法を採用した。調製が必要な試料については、試料1 kgに対し、5 vol%ギ酸溶液を300 g添加しホモジナイズして均一化した試料をアセトンで抽出することとした。

精製については、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムのみの精製ではイオン化促進が起こり、精製不十分であった。グラファイトカーボンミニカラムを追加することにより良好な結果が得られたため、グラファイトカーボンミニカラムを追加することとした。

移動相については、酢酸アンモニウム溶液及びアセトニトリルの混液並びにギ酸及びアセトニトリルの混液を用いて検討を行った。酢酸アンモニウム溶液及びアセトニトリルの混液では代謝物M1の保持が弱かったため、移動相には0.02 vol%ギ酸溶液及びアセトニトリルを用いることとした。

開発した方法を用いて、玄米等10食品の添加回収試験を行った結果、選択性は良好で何れの試料においても測定を妨害するようなピークは認められず、真度はスピロテトラマト86~115%、代謝物M183~102%、併行精度はスピロテトラマト2~10%、代謝物M1 0~7%の良好な結果が得られたことから、本試験法は、穀類、豆類、種実類、果実、野菜及び茶等の農産物に適応可能であると考えられた。また、牛の筋肉等10食品の添加回収試験を行った結果、選択性は良好で何れの試料においても妨害ピークは認められず、真度は真度はスピロテトラマト95~108%、代謝物M1 83~104%、併行精度はスピロテトラマト1~4%、代謝物M1 2~13%の良好な結果が得られたことから、本試験法は、陸棲哺乳類に属する動物の筋肉、脂肪及び肝臓並びに、魚介類、鶏卵、はちみつ等の畜水産物に適応可能であると考えられた。

[結論]

農産物及び畜水産物中のスピロテトラマト試験法として、スピロテトラマト及び代謝物M1を試料からギ酸酸性下でアセトン抽出し、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム及びグラファイトカーボンミニカラムで精製した後、LC-MS/MSで定量及び確認する方法を開発した。

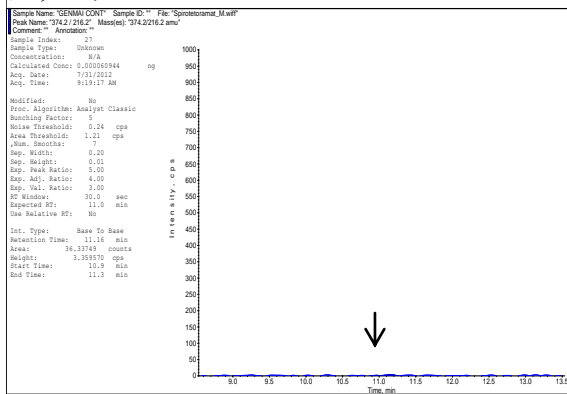
開発した試験法を玄米、大豆、らっかせい、ほうれんそう、キャベツ、ばれいしょ、オレンジ、りんご、茶及びなすの10食品適用した結果、選択性は良好で何れの試料においても妨害ピークは認められず、真度はスピロテトラマト86～115%、代謝物M1 83～102%、併行精度はスピロテトラマト2～10%、代謝物M1 0～7%の良好な結果が得られた。牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、さけ、うなぎ、しじみ、牛乳、鶏卵、はちみつ及び豚の筋肉の10食品に適用した結果、選択性は良好で何れの試料においても妨害ピークは認められず、真度はスピロテトラマト95～108%、代謝物M1 83～104%、併行精度はスピロテトラマト1～4%、代謝物M1 2～13%の良好な結果が得られた。また、定量限界として、0.01 mg/kgを設定可能であることが確認された。

[参考文献]

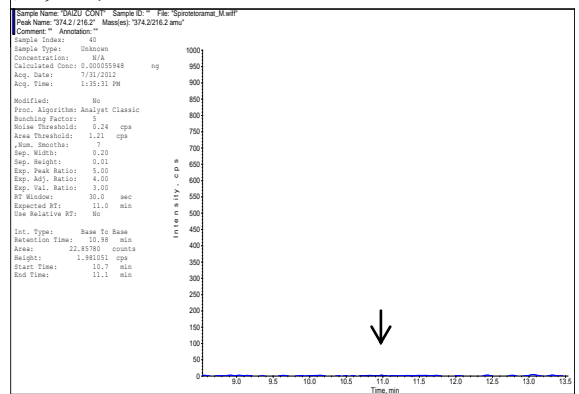
バイエルクロップサイエンス株式会社提供資料（代謝物M1の物性情報で引用）

スピロテトラマトの添加回収試験におけるクロマトグラム（農産物）

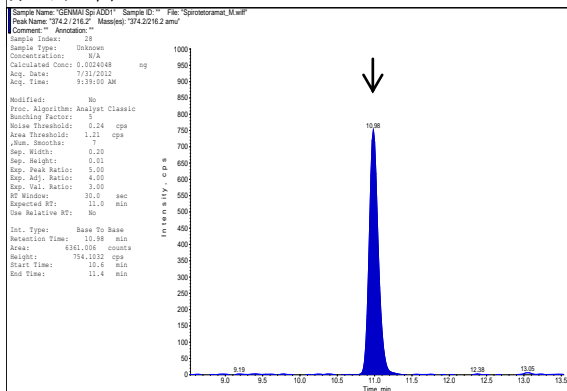
ブランク



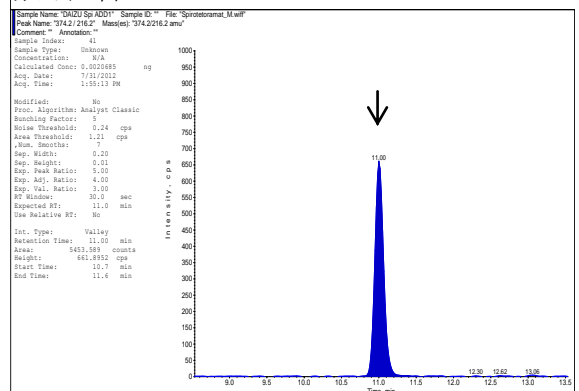
ブランク



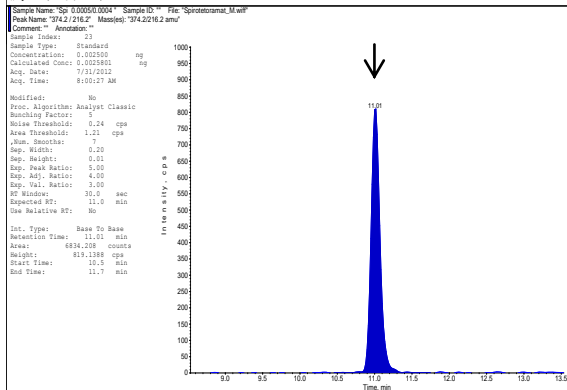
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

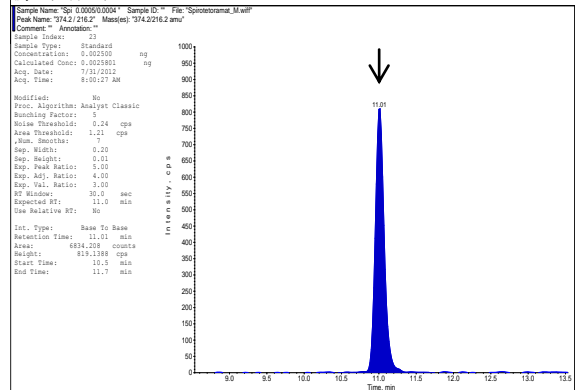
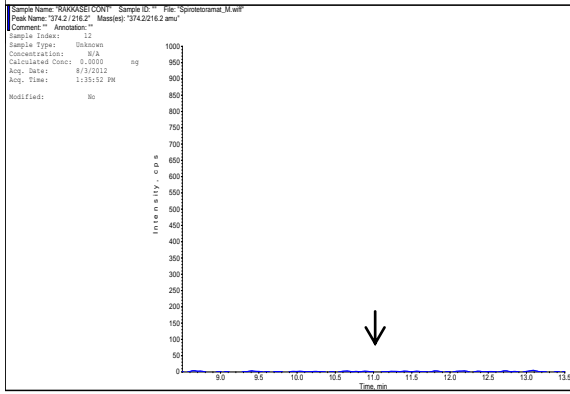


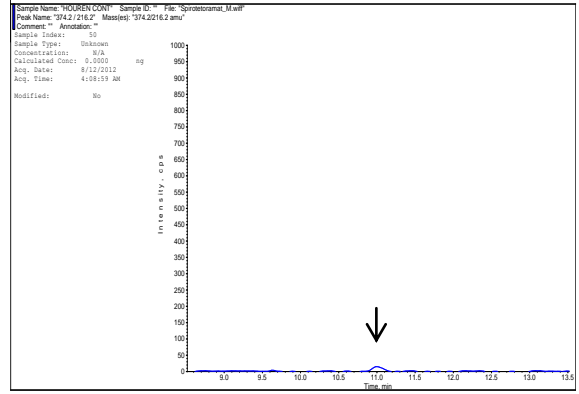
図 8-1 玄米の SRM クロマトグラム
 スピロテトラマト ($m/z +374 \rightarrow 216$)
 添加濃度 : 0.01 ppm

図 8-2 大豆の SRM クロマトグラム
 スピロテトラマト ($m/z +374 \rightarrow 216$)
 添加濃度 : 0.01 ppm

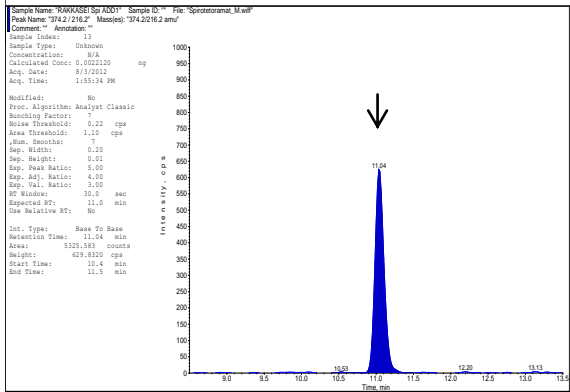
ブランク



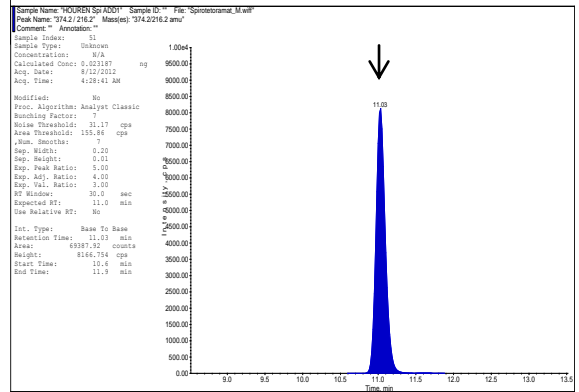
ブランク



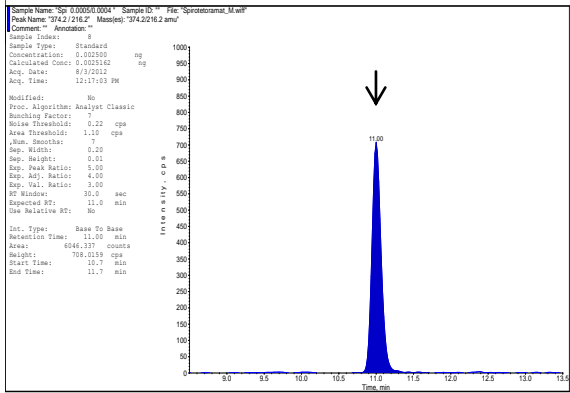
添加試料



添加試料 70倍希釈



標準溶液



標準溶液

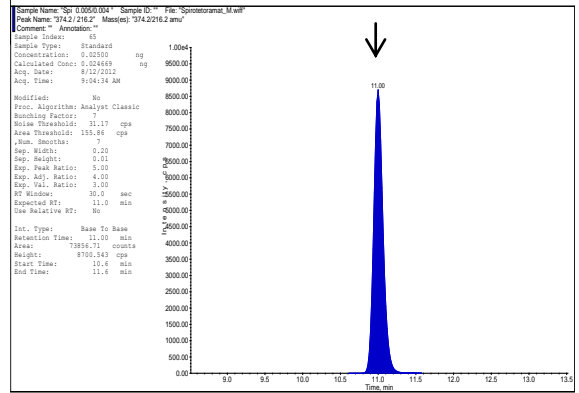
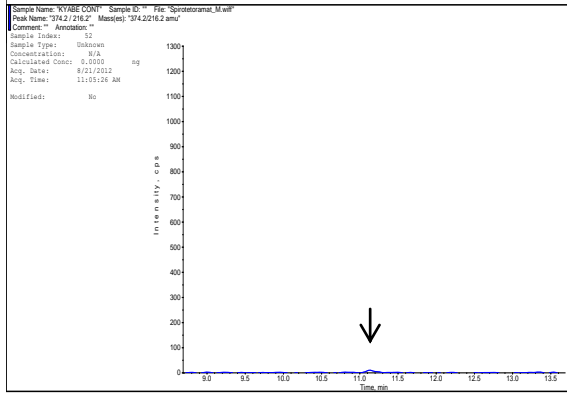


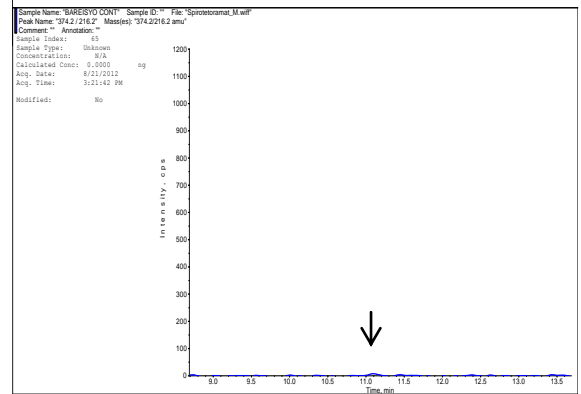
図 8-3 らっかせいの SRM クロマトグラム
 スピロテトラマト ($m/z +374 \rightarrow 216$)
 添加濃度 : 0.01 ppm

図 8-4 ほうれんそうの SRM クロマトグラム
 スピロテトラマト ($m/z +374 \rightarrow 216$)
 添加濃度 : 7 ppm

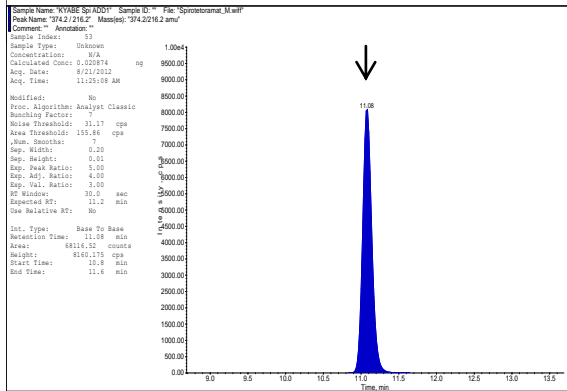
ブランク



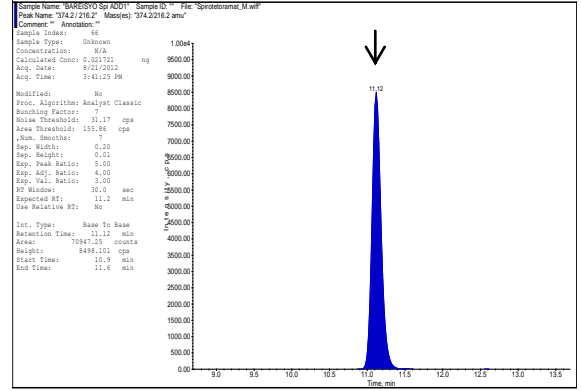
ブランク



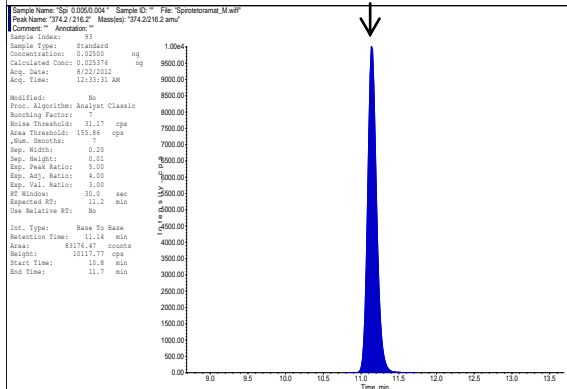
添加試料 3 倍希釈



添加試料 8 倍希釈



標準溶液



標準溶液

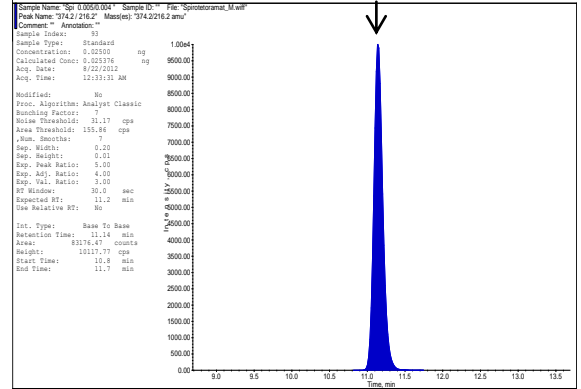


図 8-5 キャベツの SRM クロマトグラム
 スピロテトラマト ($m/z +374 \rightarrow 216$)
 添加濃度 : 0.3 ppm

図 8-6 ばれいしょの SRM クロマトグラム
 スピロテトラマト ($m/z +374 \rightarrow 216$)
 添加濃度 : 0.8 ppm

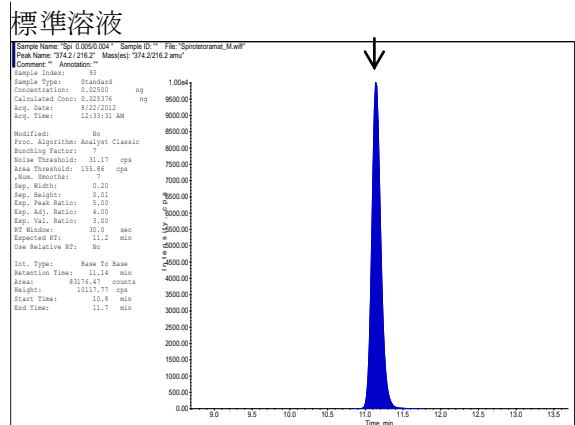
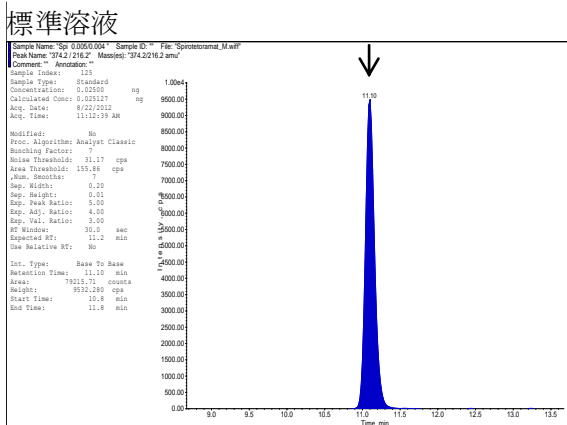
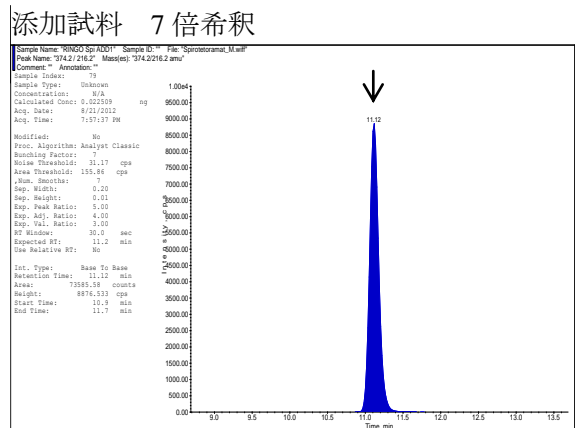
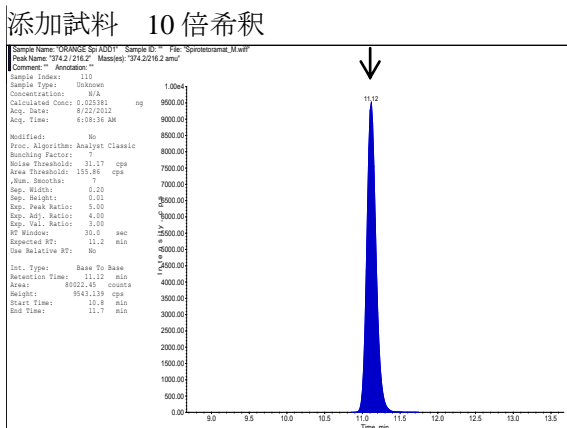
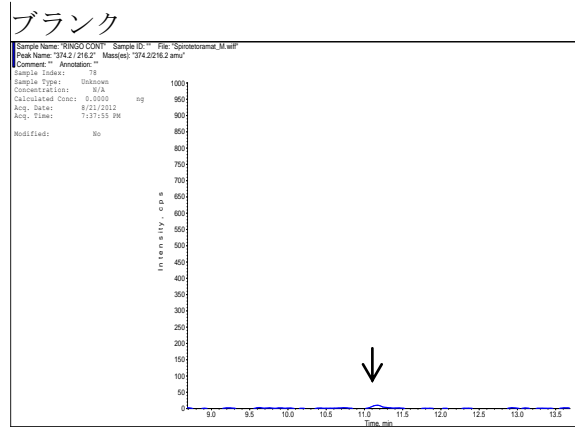
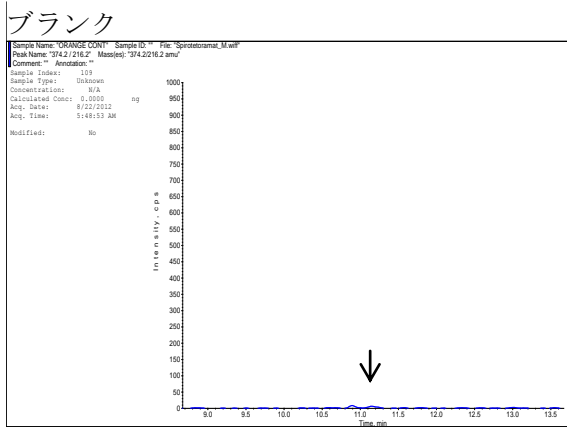
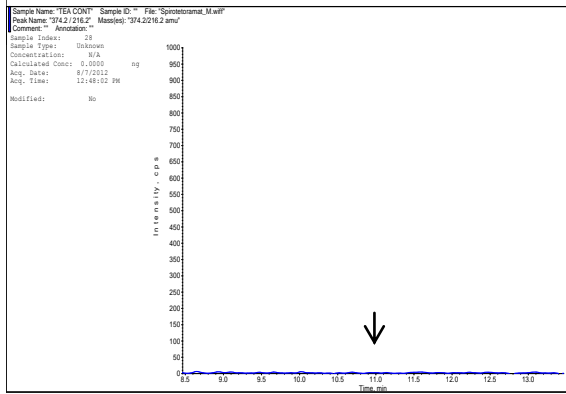


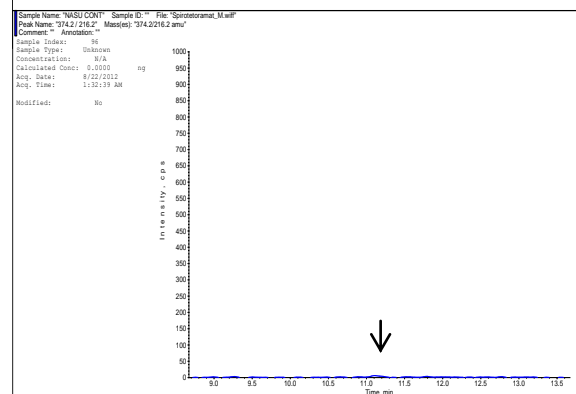
図 8-7 オレンジの SRM クロマトグラム
 スピロテトラマト ($m/z +374 \rightarrow 216$)
 添加濃度: 1 ppm

図 8-8 りんごの SRM クロマトグラム
 スピロテトラマト ($m/z +374 \rightarrow 216$)
 添加濃度: 0.7 ppm

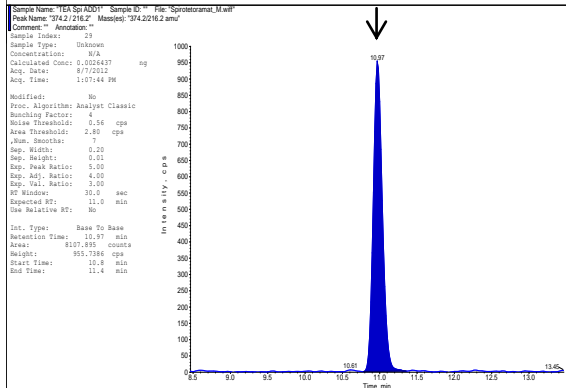
ブランク



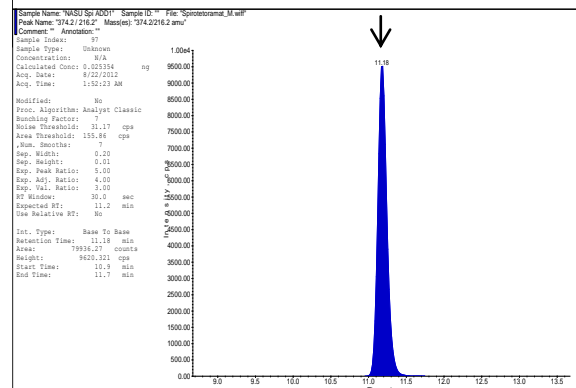
ブランク



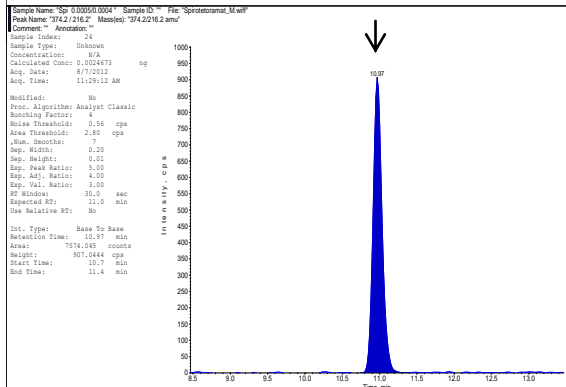
添加試料



添加試料 10 倍希釈



標準溶液



標準溶液

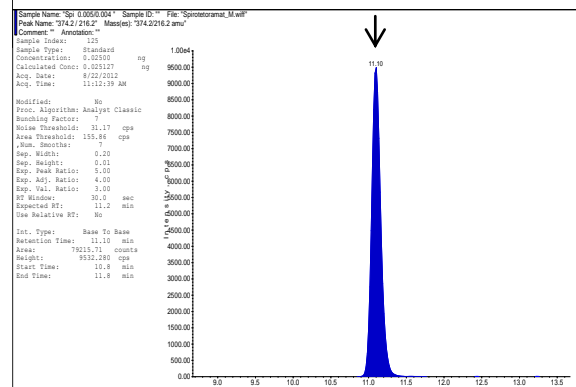
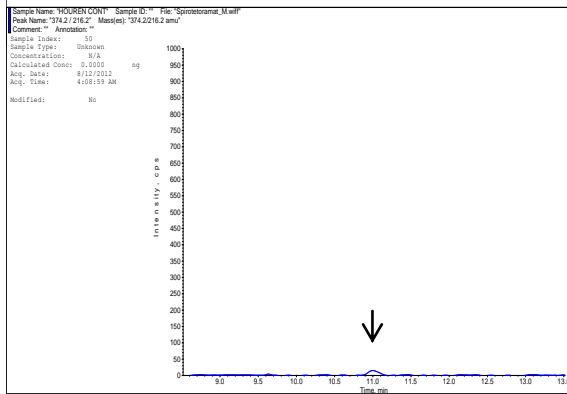


図 8-9 茶の SRM クロマトグラム
 スピロテトラマト ($m/z +374 \rightarrow 216$)
 添加濃度 : 0.01 ppm

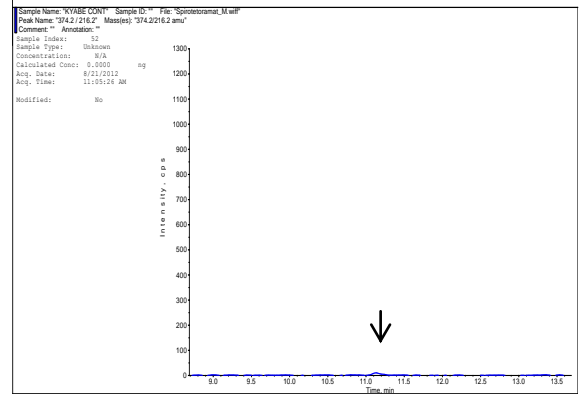
図 8-10 なすの SRM クロマトグラム
 スピロテトラマト ($m/z +374 \rightarrow 216$)
 添加濃度 : 1 ppm

スピロテトラマトの定量限界の推定におけるクロマトグラム（農産物）

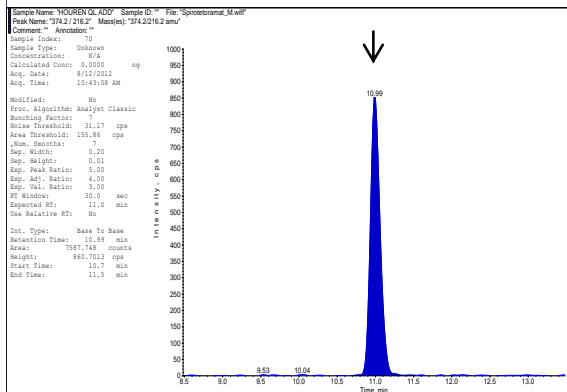
ブランク



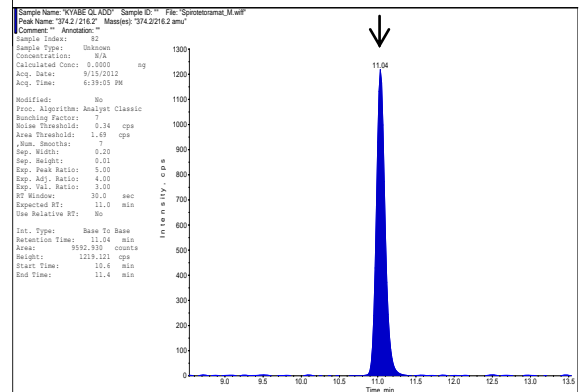
ブランク



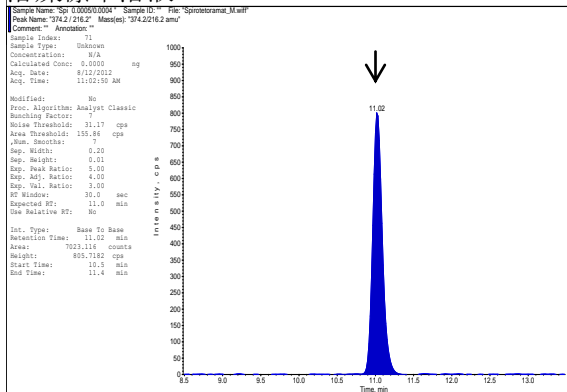
マトリックス添加標準溶液



マトリックス添加標準溶液



溶媒標準溶液



溶媒標準溶液

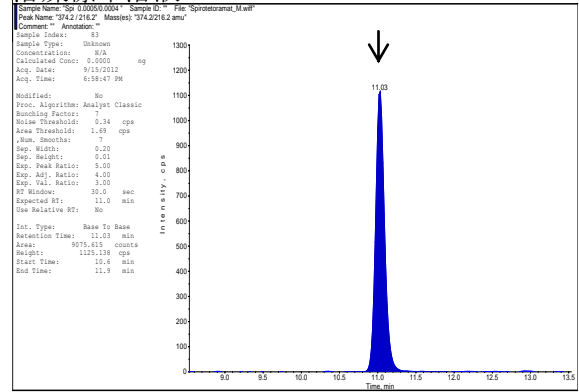
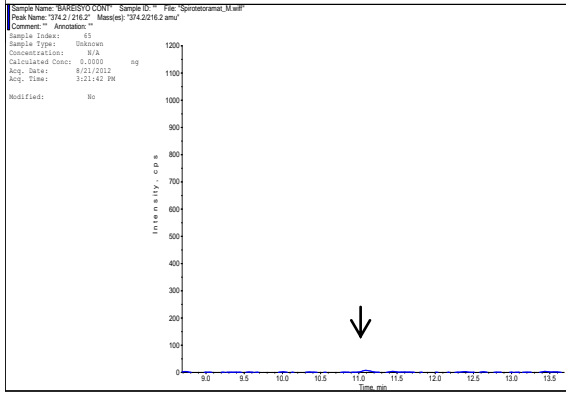


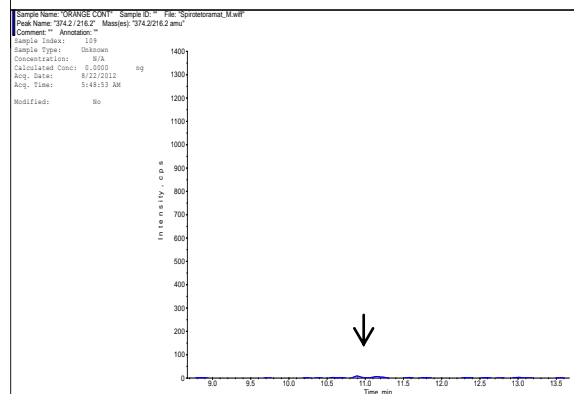
図-9-1 ほうれんそうの SRM クロマトグラム
 スピロテトラマト ($m/z +374 \rightarrow 216$)
 試料中 0.01 ppm 相当

図-9-2 キャベツの SRM クロマトグラム
 スピロテトラマト ($m/z +374 \rightarrow 216$)
 試料中 0.01 ppm 相当

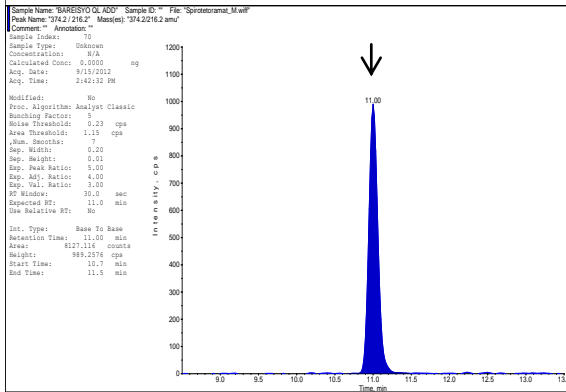
ブランク



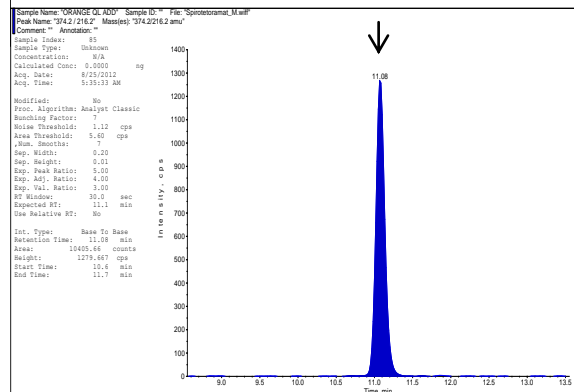
ブランク



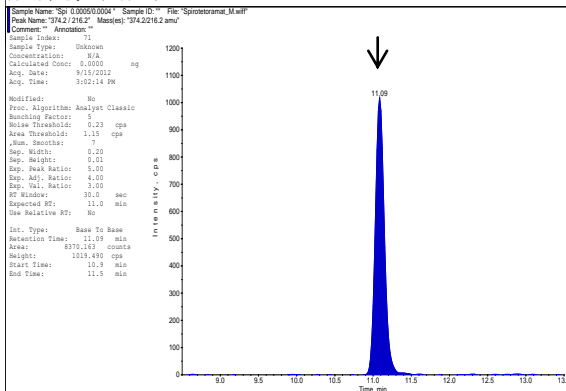
マトリックス添加標準溶液



マトリックス添加標準溶液



溶媒標準溶液



溶媒標準溶液

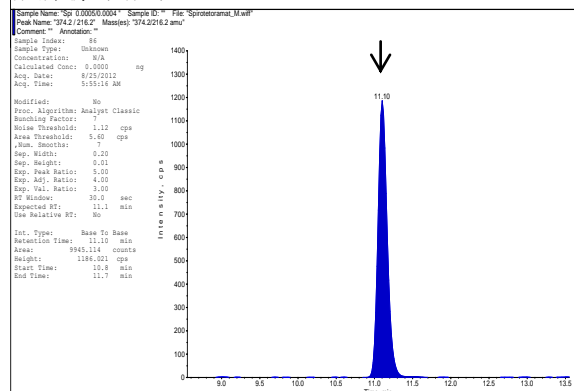


図 9-3 ばれいしょの SRM クロマトグラム
 スピロテトラマト ($m/z +374 \rightarrow 216$)
 試料中 0.01 ppm 相当

図 9-4 オレンジの SRM クロマトグラム
 スピロテトラマト ($m/z +374 \rightarrow 216$)
 試料中 0.01 ppm 相当

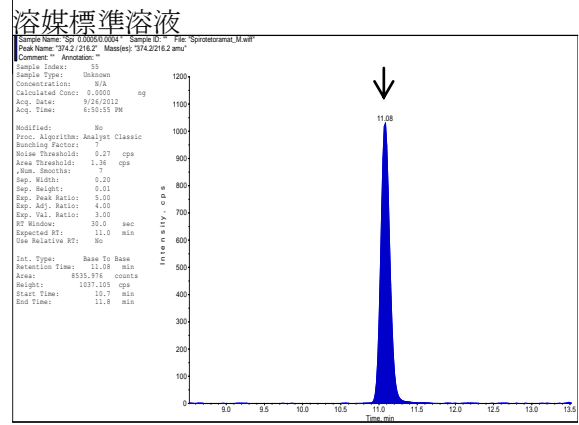
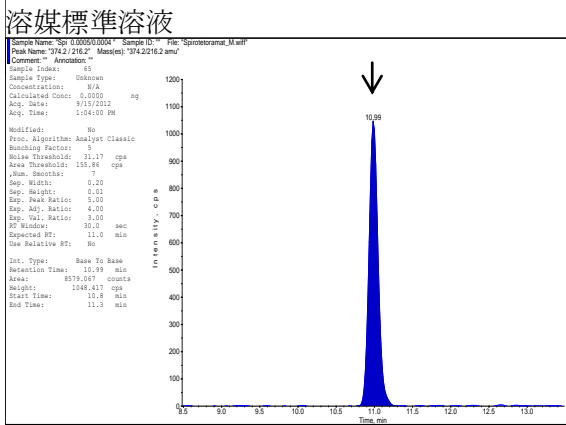
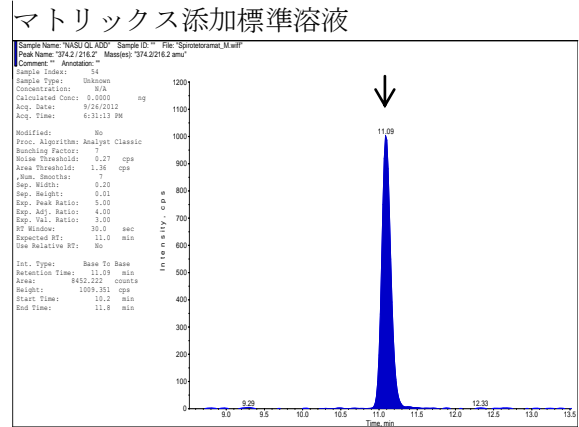
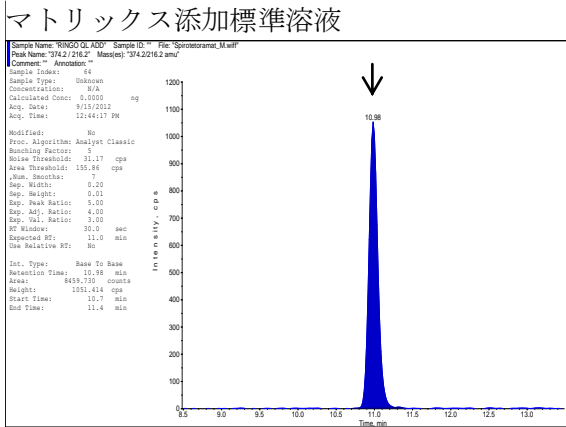
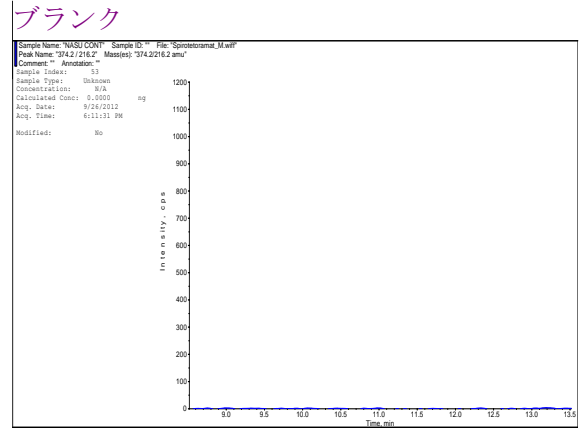
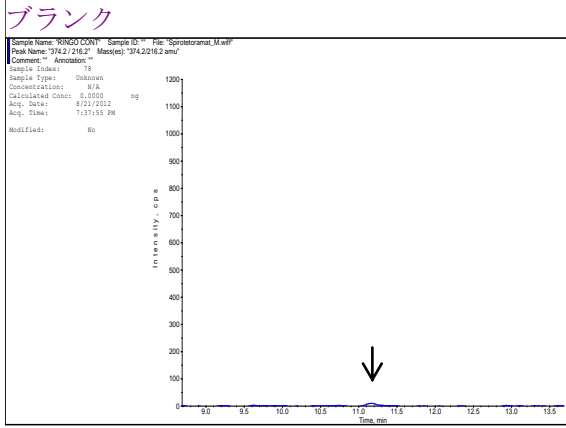
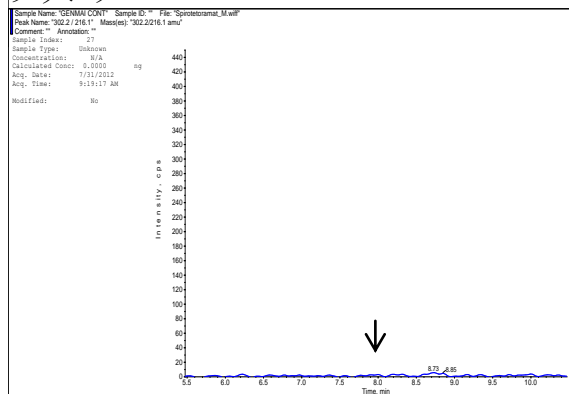


図 9-5 りんごの SRM クロマトグラム
スピロテトラマト ($m/z +374 \rightarrow 216$)
試料中 0.01 ppm 相当

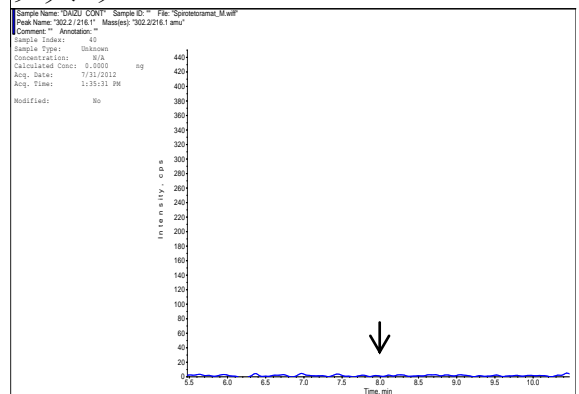
図 9-6 なすの SRM クロマトグラム
スピロテトラマト ($m/z +374 \rightarrow 216$)
試料中 0.01 ppm 相当

代謝物M1の添加回収試験におけるクロマトグラム（農産物）

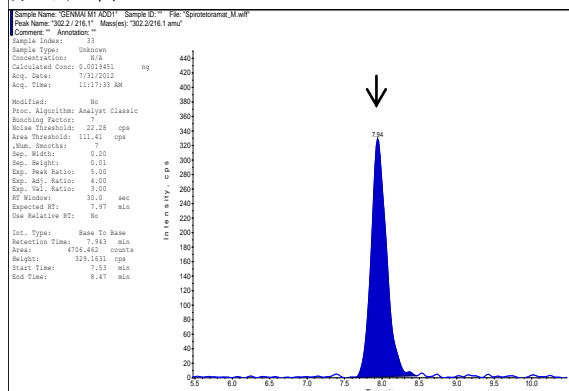
ブランク



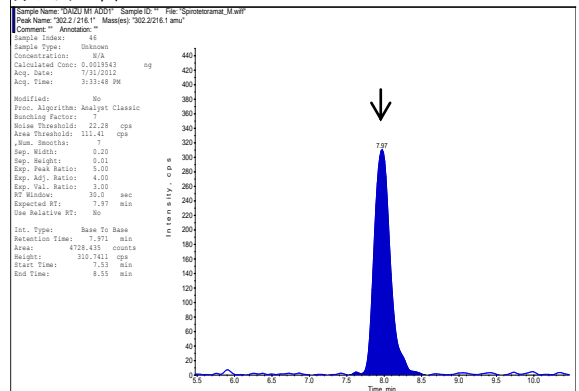
ブランク



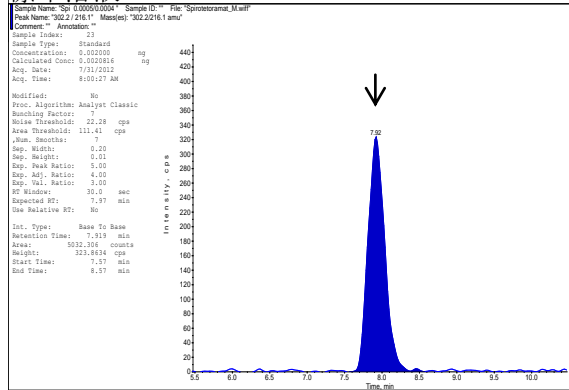
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

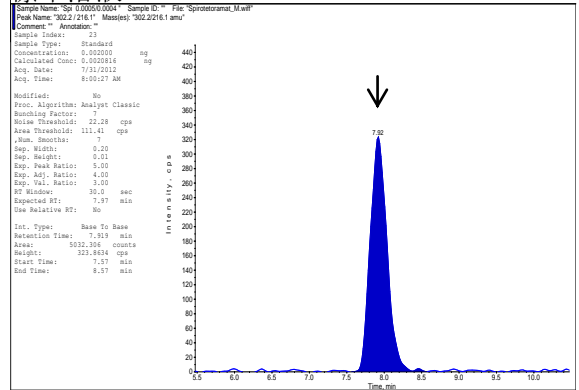
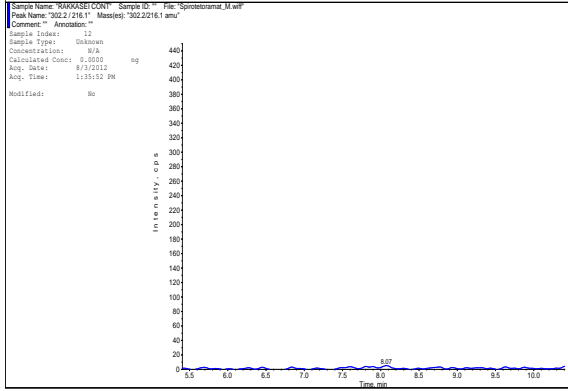


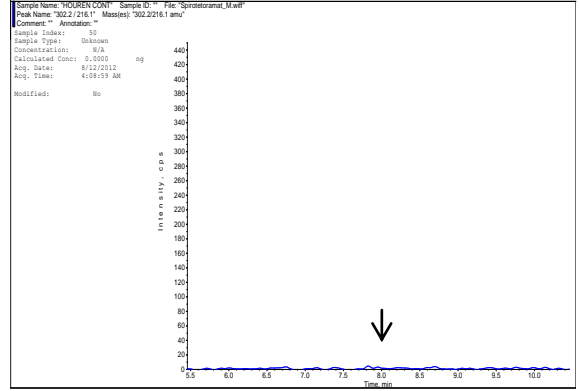
図 10-1 玄米の SRM クロマトグラム
 代謝物 M1 ($m/z +302 \rightarrow 216$)
 添加濃度 : 0.01 ppm

図 10-2 大豆の SRM クロマトグラム
 代謝物 M1 ($m/z +302 \rightarrow 216$)
 添加濃度 : 0.01 ppm

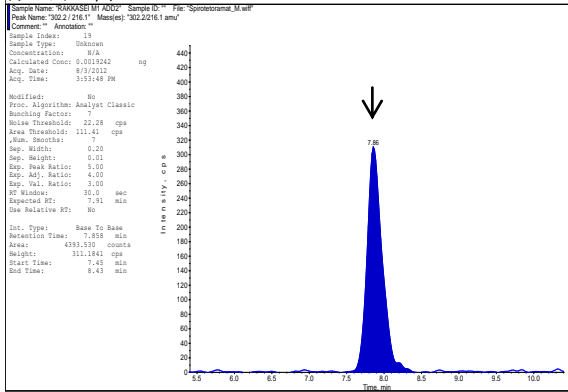
ブランク



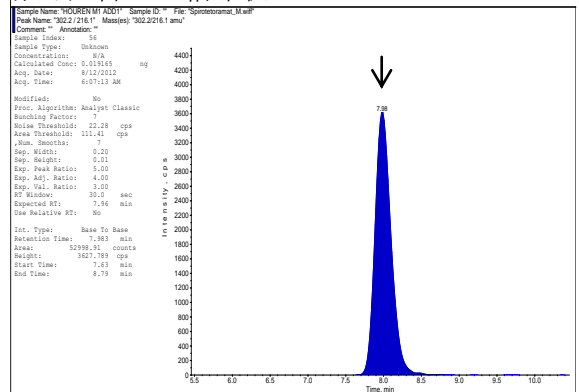
ブランク



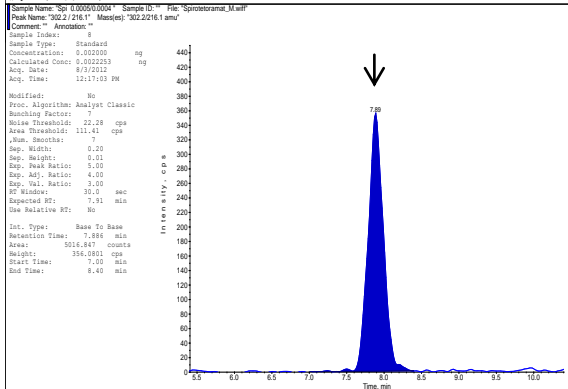
添加試料



添加試料 70倍希釈



標準溶液



標準溶液

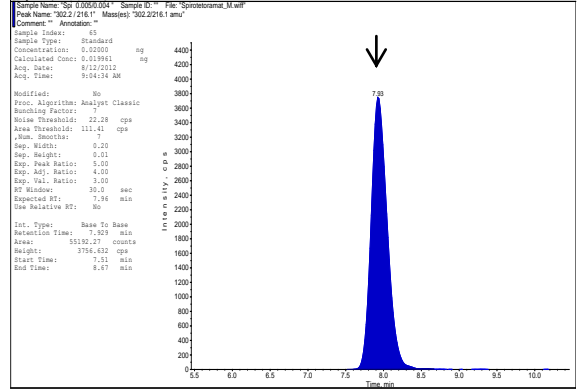
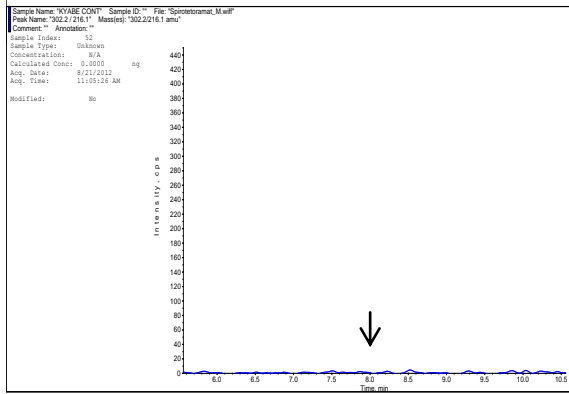


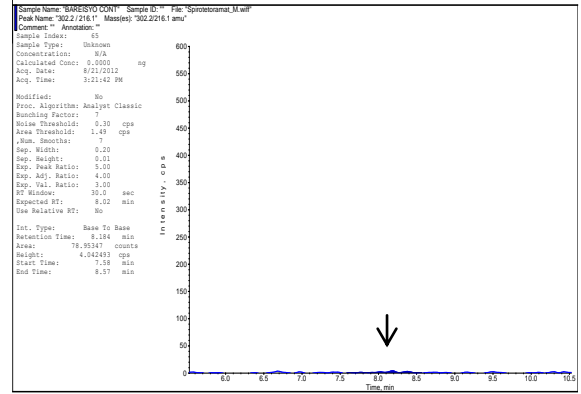
図 10-3 らっかせいの SRM クロマトグラム
 代謝物 M1 ($m/z + 302 \rightarrow 216$)
 添加濃度 : 0.01 ppm

図 10-4 ほうれんそうの SRM クロマトグラム
 代謝物 M1 ($m/z + 302 \rightarrow 216$)
 添加濃度 : 7 ppm

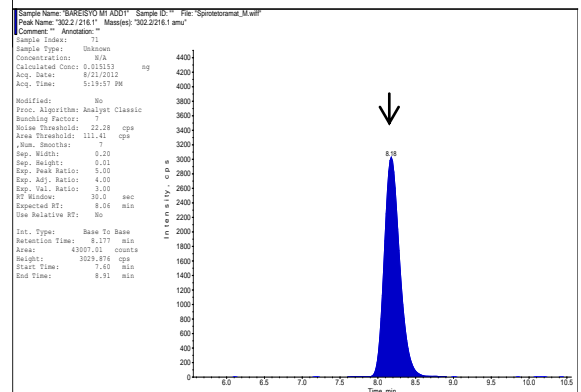
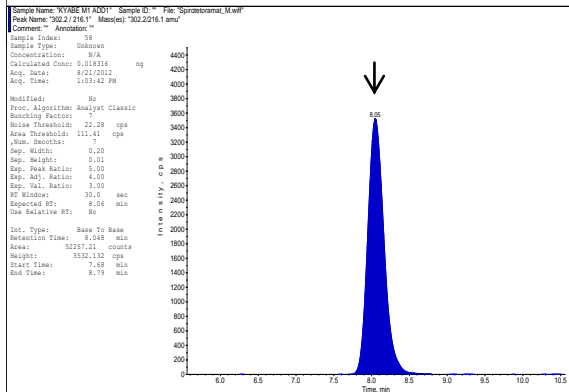
ブランク



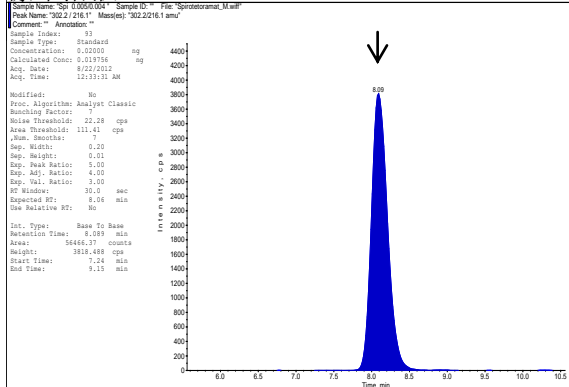
ブランク



添加試料 3 倍希釈添加試料 8 倍希釈



標準溶液



標準溶液

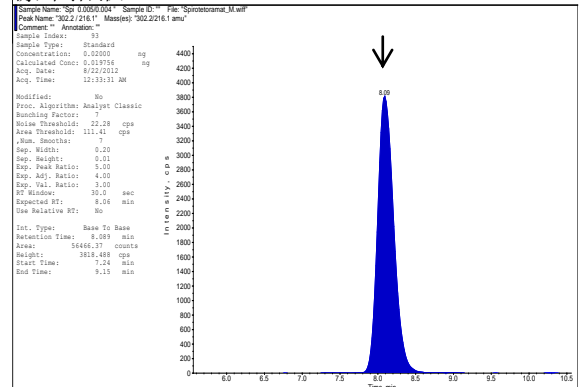
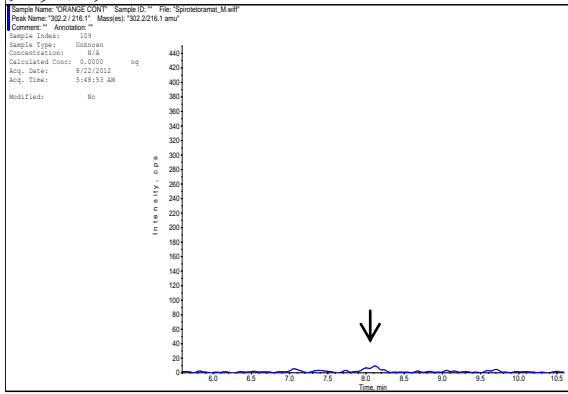


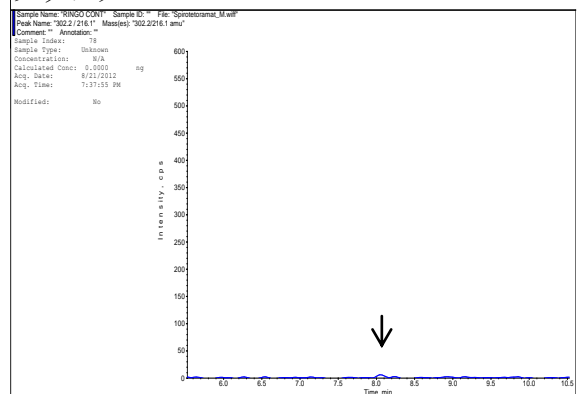
図 10-5 キャベツの SRM クロマトグラム
 代謝物 M1 ($m/z +302 \rightarrow 216$)
 添加濃度 : 0.3 ppm

図 10-6 ばれいしよの SRM クロマトグラム
 代謝物 M1 ($m/z +302 \rightarrow 216$)
 添加濃度 : 0.8 ppm

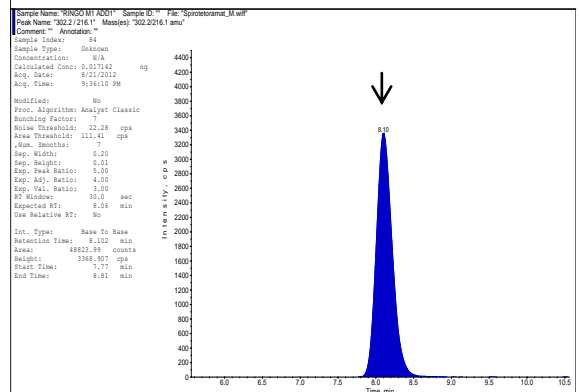
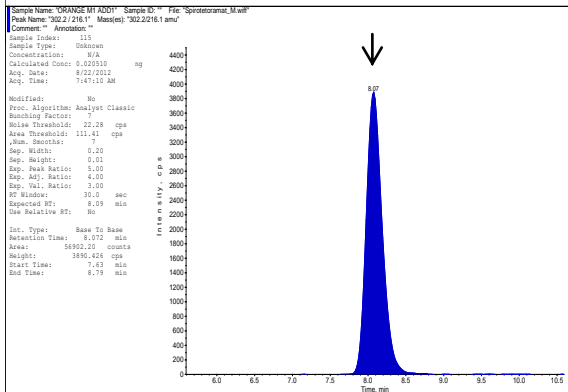
ブランク



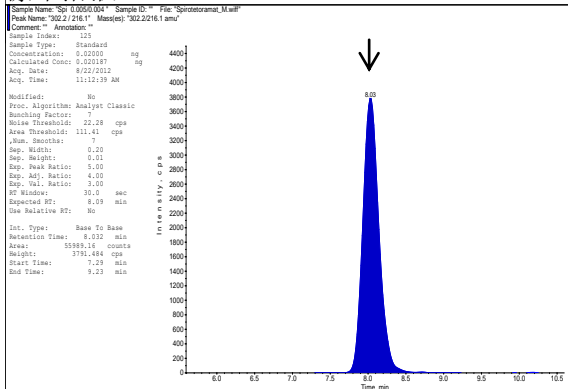
ブランク



添加試料 10 倍希釈添加試料 7 倍希釈



標準溶液



標準溶液

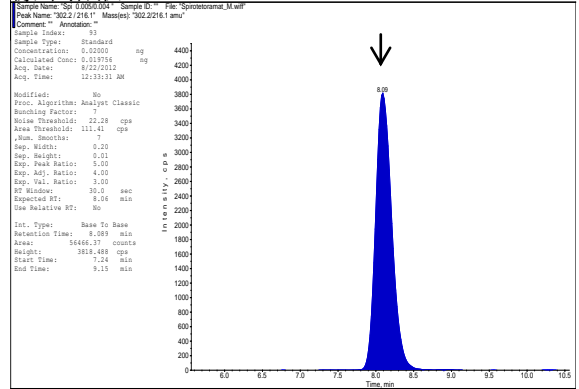
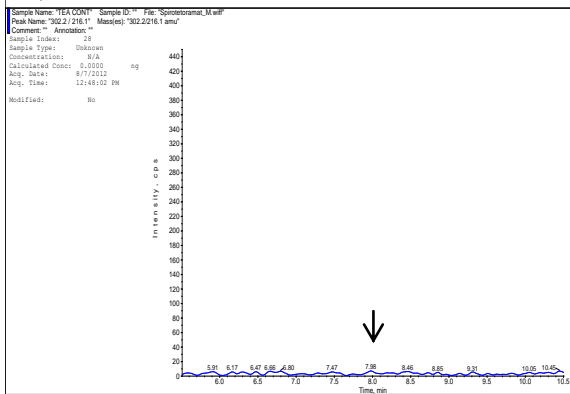


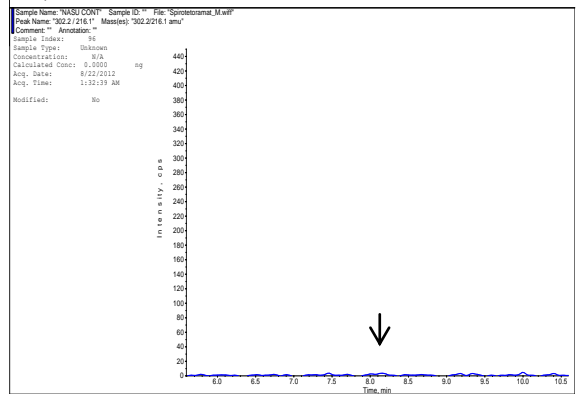
図 10-7 オレンジの SRM クロマトグラム
 代謝物 M1 ($m/z +302 \rightarrow 216$)
 添加濃度: 1 ppm

図 10-8 りんごの SRM クロマトグラム
 代謝物 M1 ($m/z +302 \rightarrow 216$)
 添加濃度: 0.7 ppm

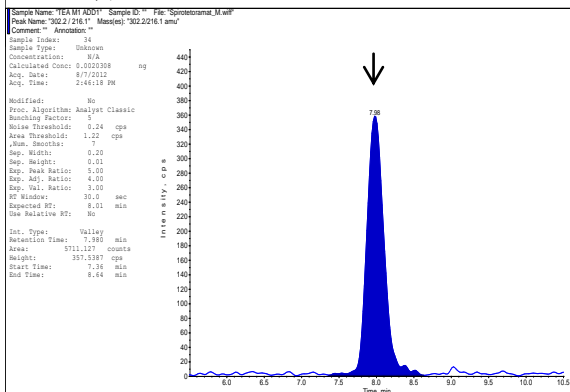
ブランク



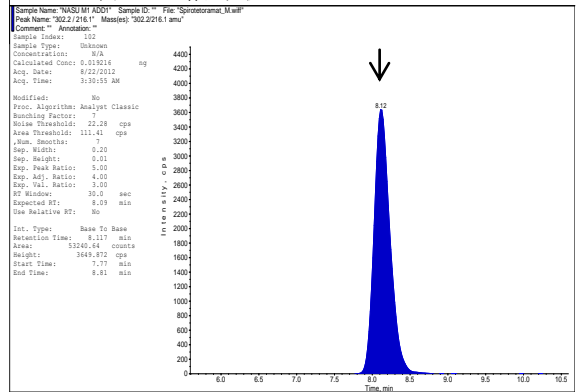
ブランク



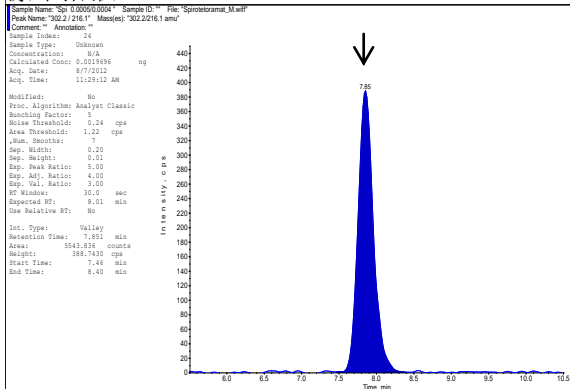
添加試料



添加試料 10 倍希釈



標準溶液



標準溶液

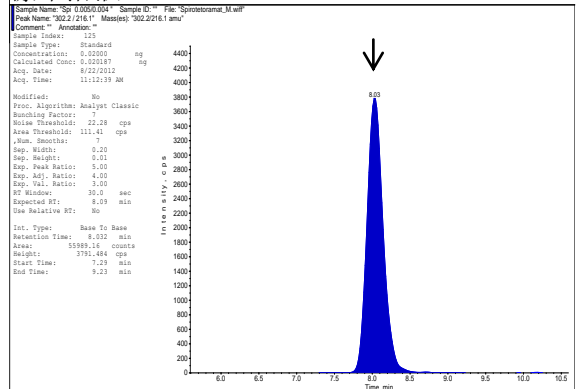
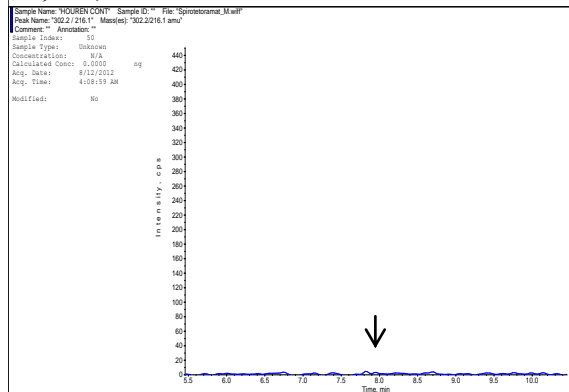


図 10-9 茶の SRM クロマトグラム
 代謝物 M1 ($m/z +302 \rightarrow 216$)
 添加濃度: 0.01 ppm

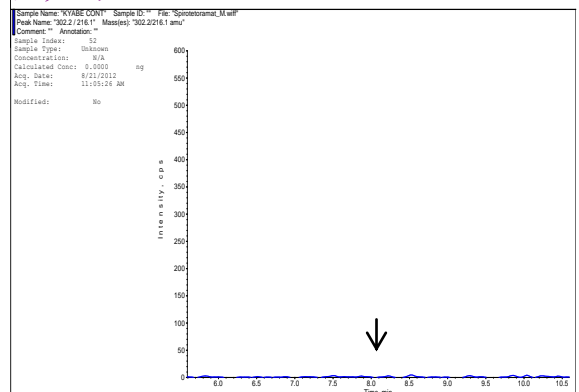
図 10-10 茶の SRM クロマトグラム
 代謝物 M1 ($m/z +302 \rightarrow 216$)
 添加濃度: 1 ppm

代謝物M1の定量限界の推定におけるクロマトグラム（農産物）

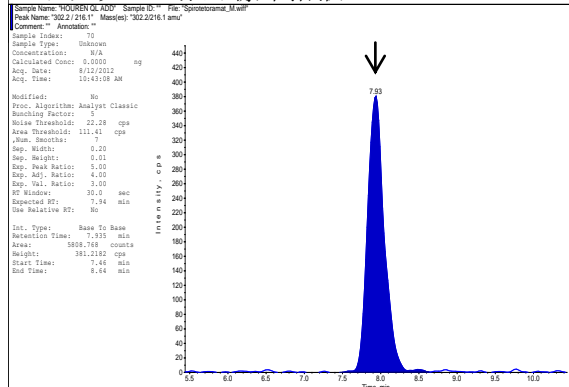
ブランク



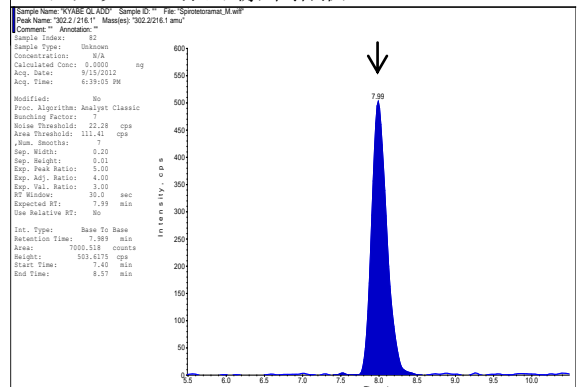
ブランク



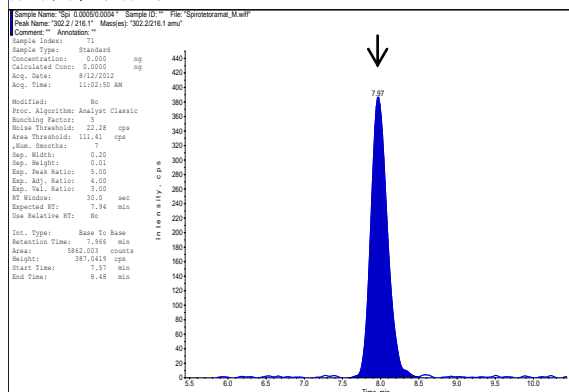
マトリックス添加標準溶液



マトリックス添加標準溶液



溶媒標準溶液



溶媒標準溶液

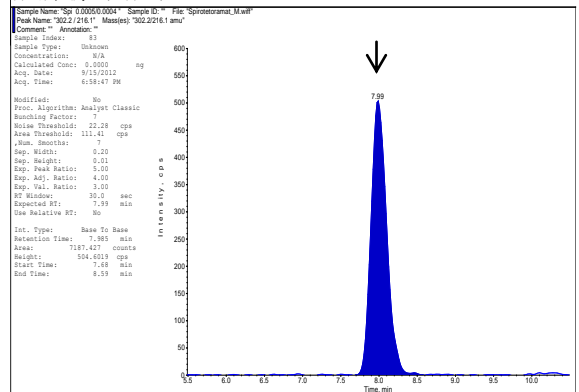
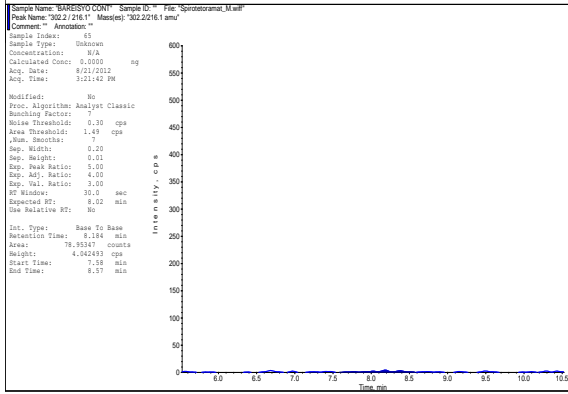


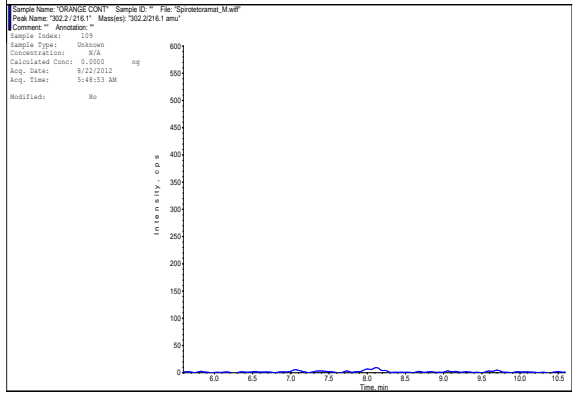
図 11-1 ほうれんそうの SRM クロマトグラム
代謝物 M1 ($m/z +302 \rightarrow 216$)
試料中 0.01 ppm 相当

図 11-2 キャベツの SRM クロマトグラム
代謝物 M1 ($m/z +302 \rightarrow 216$)
試料中 0.01 ppm 相当

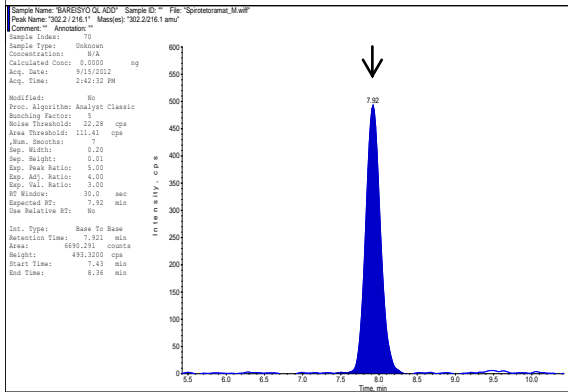
ブランク



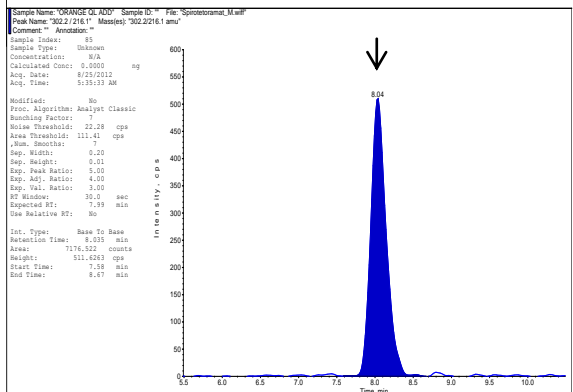
ブランク



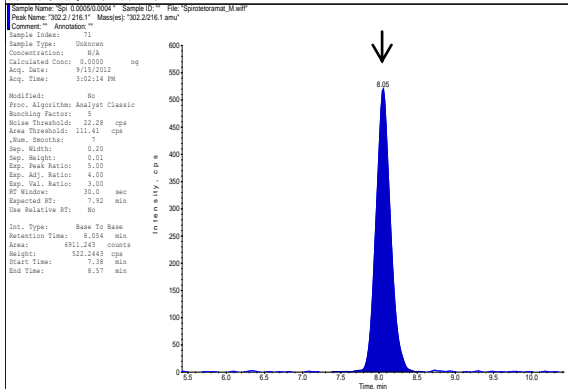
マトリックス添加標準溶液



マトリックス添加標準溶液



溶媒標準溶液



溶媒標準溶液

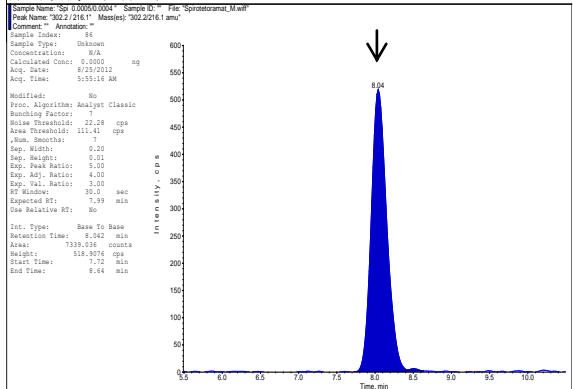
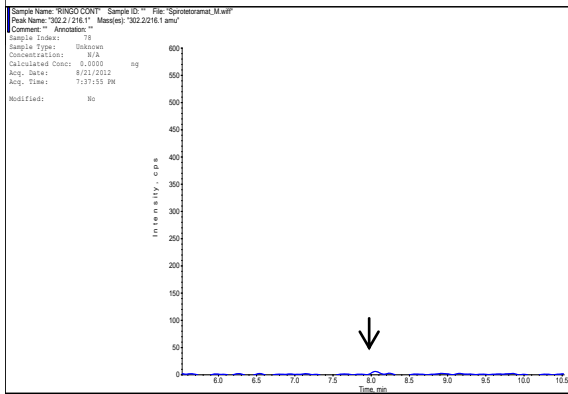


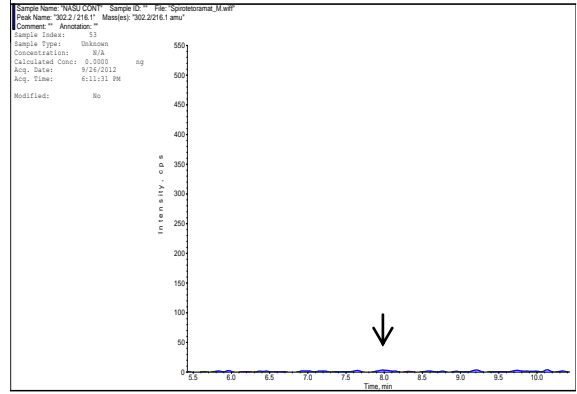
図 11-3 ばれいしょの SRM クロマトグラム
 代謝物 M1 ($m/z + 302 \rightarrow 216$)
 試料中 0.01 ppm 相当

図 11-4 オレンジの SRM クロマトグラム
 代謝物 M1 ($m/z + 302 \rightarrow 216$)
 試料中 0.01 ppm 相当

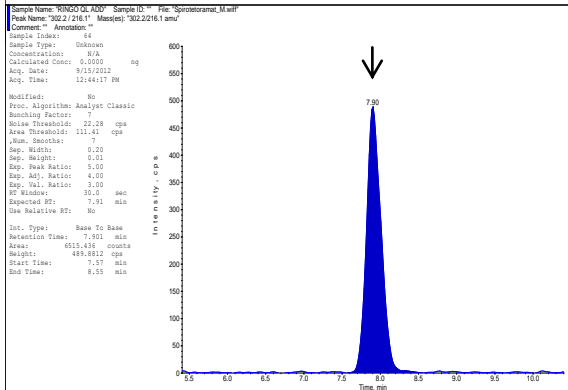
ブランク



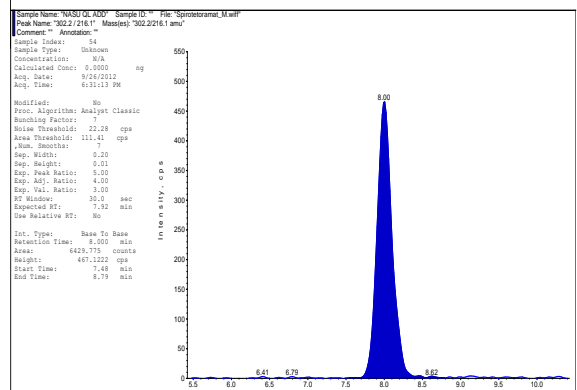
ブランク



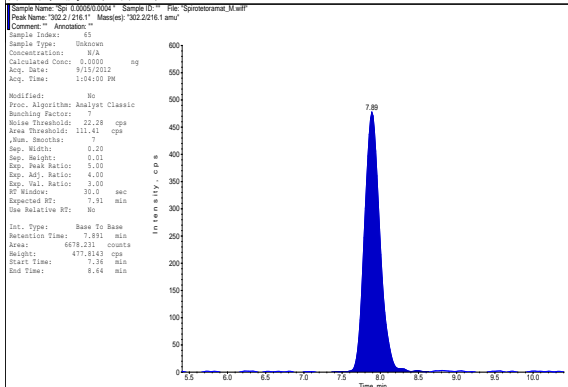
マトリックス添加標準溶液



マトリックス添加標準溶液



溶媒標準溶液



溶媒標準溶液

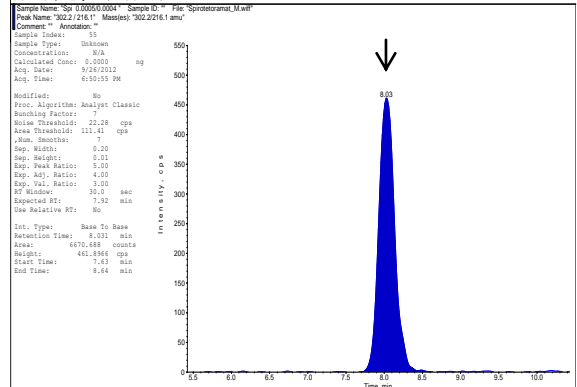
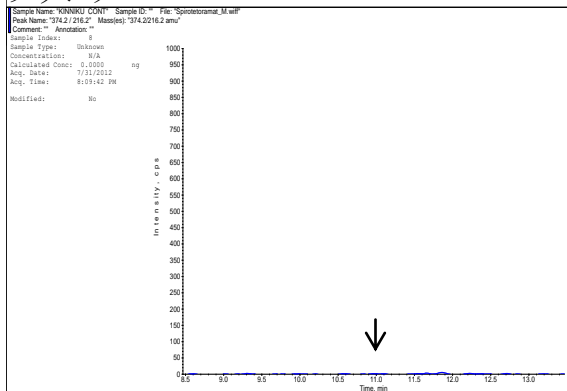


図 11-5 りんごの SRM クロマトグラム
 代謝物 M1 ($m/z + 302 \rightarrow 216$)
 試料中 0.01 ppm 相当

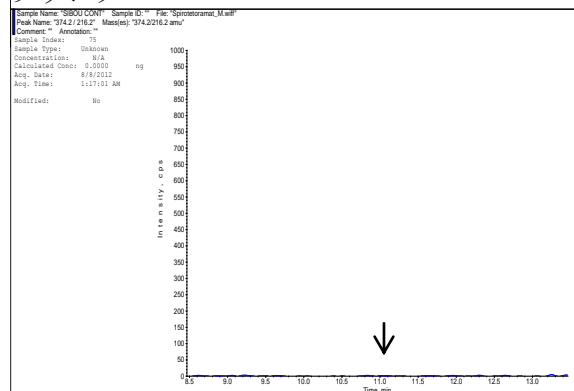
図 11-6 なすの SRM クロマトグラム
 代謝物 M1 ($m/z + 302 \rightarrow 216$)
 試料中 0.01 ppm 相当

スピロテトラマトの添加回収試験におけるクロマトグラム (畜水産物)

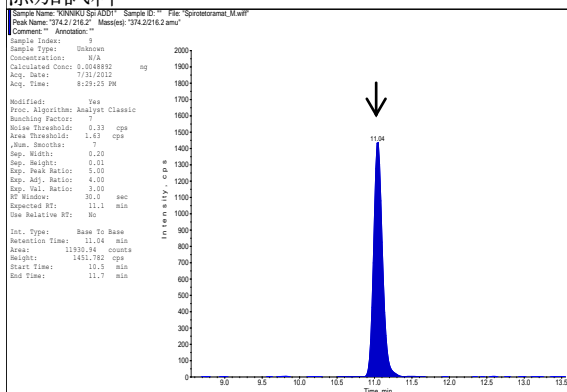
ブランク



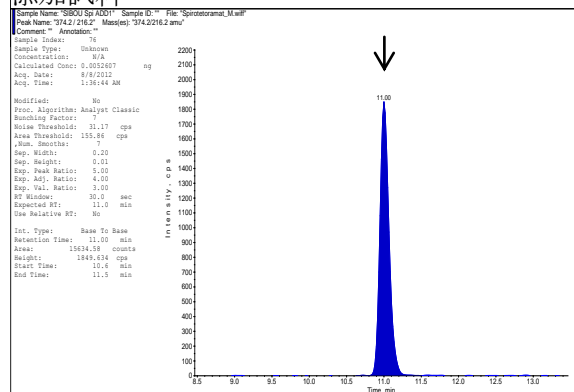
ブランク



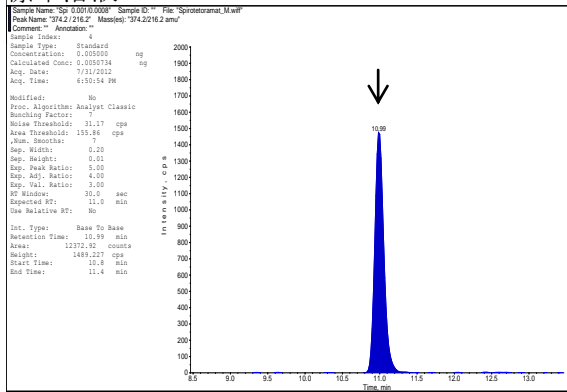
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

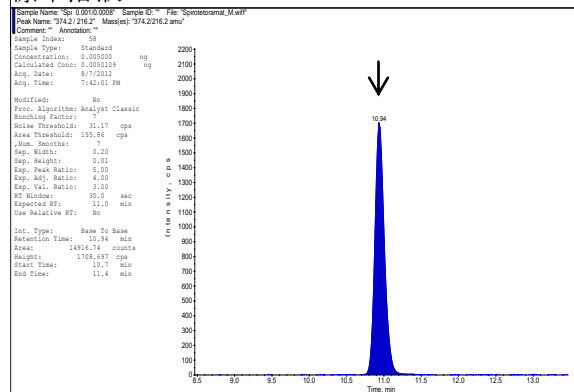
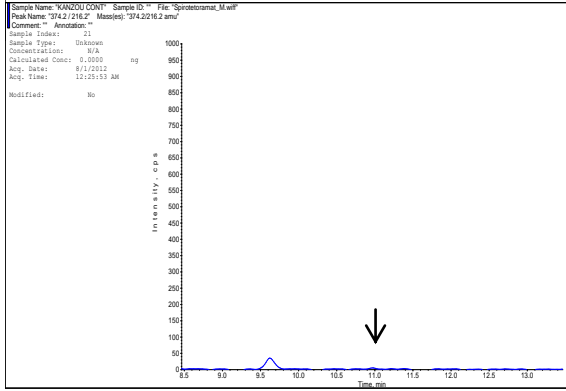


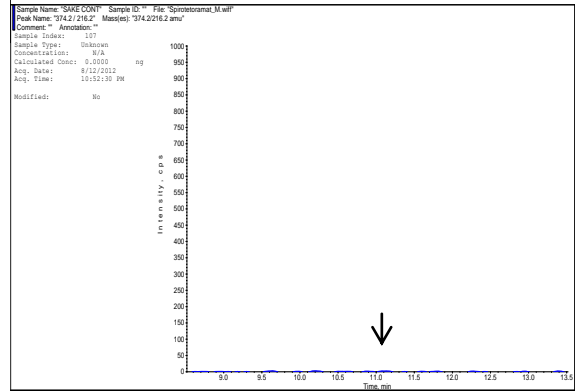
図 12-1 牛の筋肉の SRM クロマトグラム
 スピロテトラマト ($m/z +374 \rightarrow 216$)
 添加濃度: 0.02 ppm

図 12-2 牛の脂肪の SRM クロマトグラム
 スピロテトラマト ($m/z +374 \rightarrow 216$)
 添加濃度: 0.02 ppm

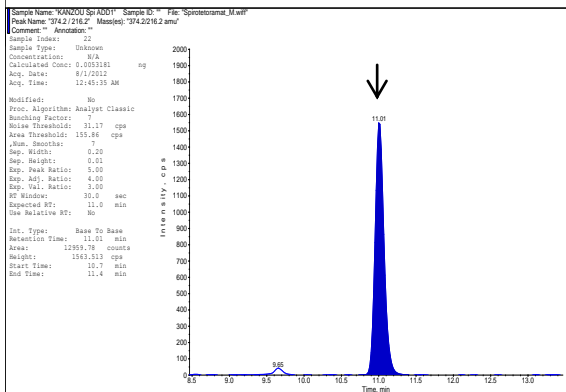
ブランク



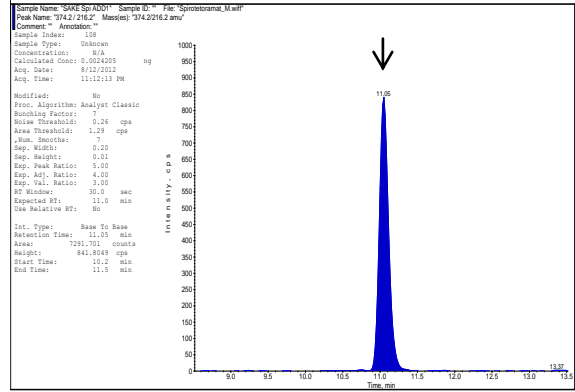
ブランク



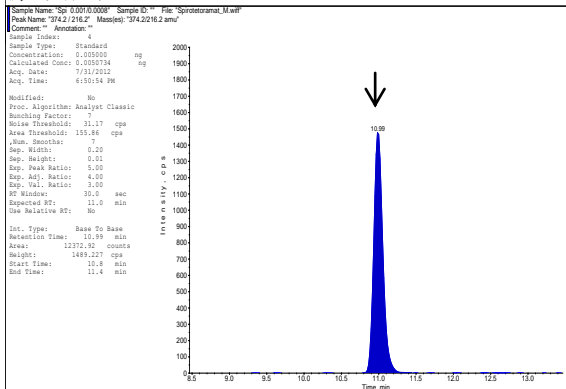
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

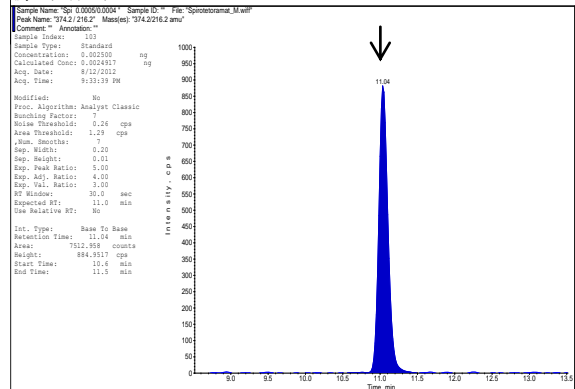
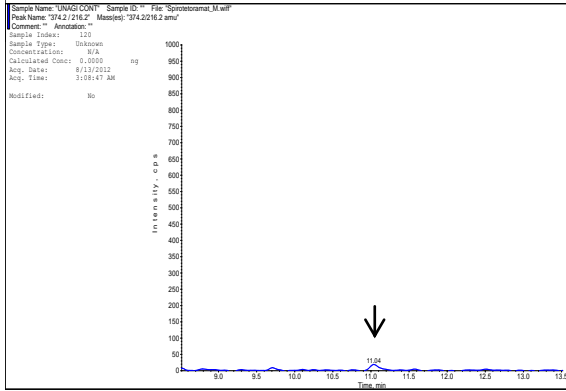


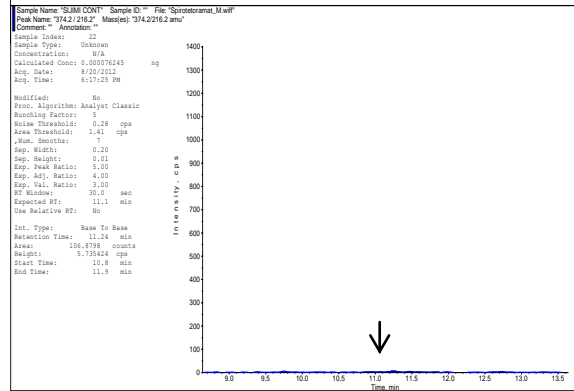
図 12-3 牛の肝臓の SRM クロマトグラム
 スピロテトラマト ($m/z +374 \rightarrow 216$)
 添加濃度 : 0.02 ppm

図 12-4 さけの SRM クロマトグラム
 スピロテトラマト ($m/z +374 \rightarrow 216$)
 添加濃度 : 0.01 ppm

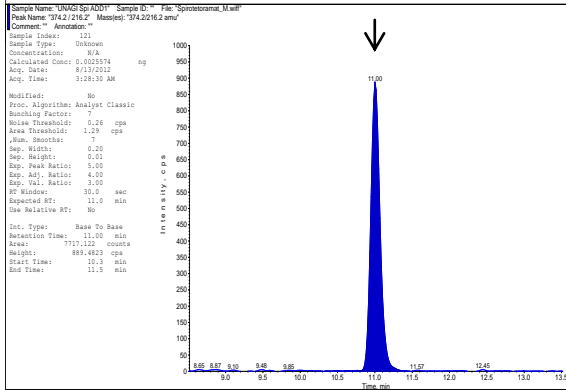
ブランク



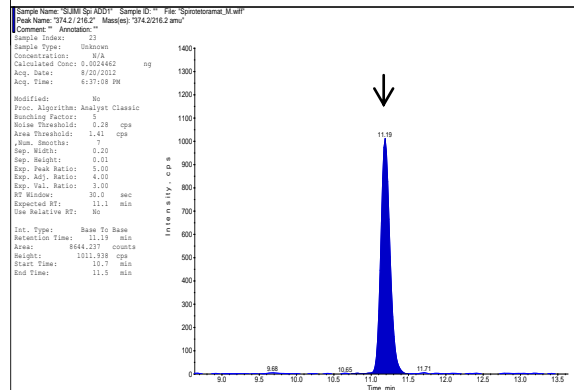
ブランク



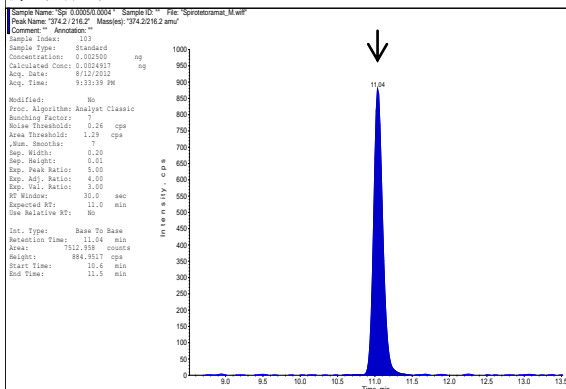
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

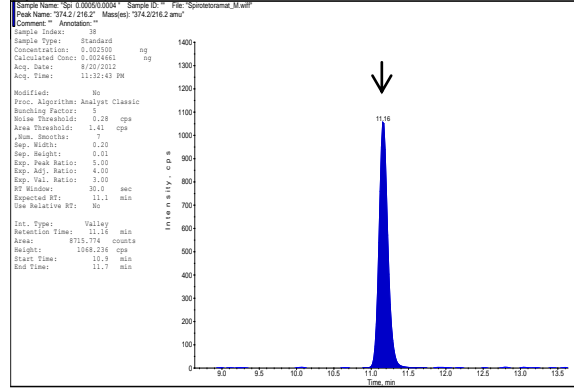
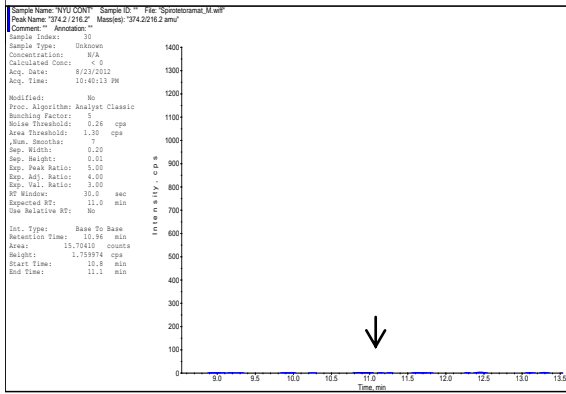


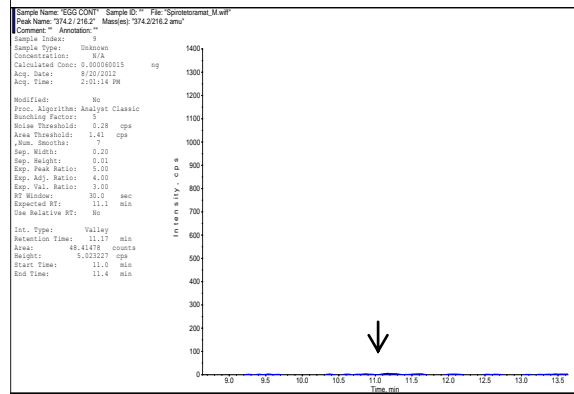
図 12-5 うなぎの SRM クロマトグラム
 スピロテトラマト ($m/z +374 \rightarrow 216$)
 添加濃度 : 0.01 ppm

図 12-6 しじみの SRM クロマトグラム
 スピロテトラマト ($m/z +374 \rightarrow 216$)
 添加濃度 : 0.01 ppm

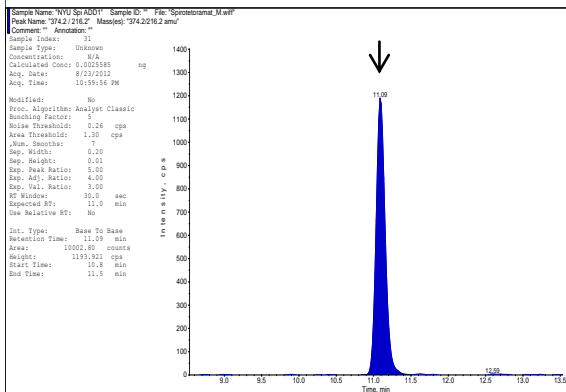
ブランク



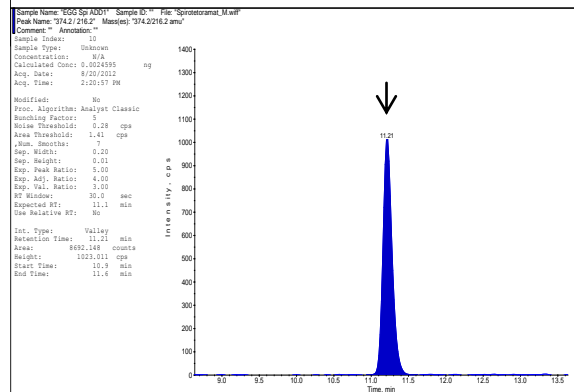
ブランク



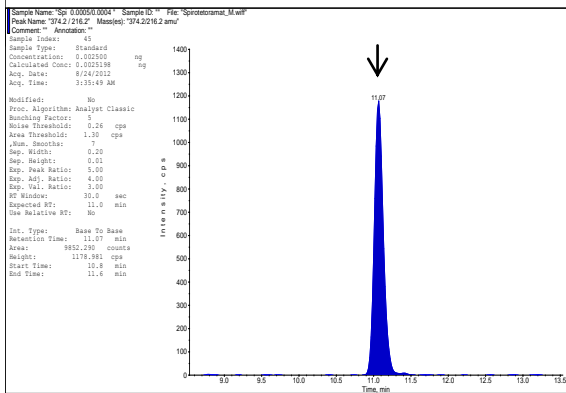
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

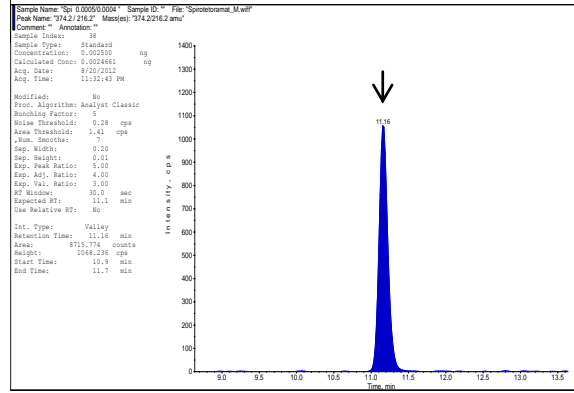
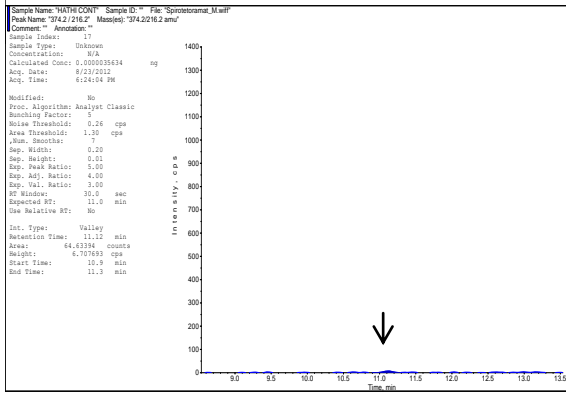


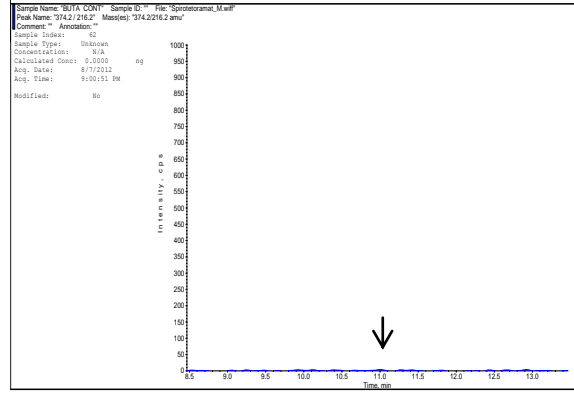
図 12-7 牛乳の SRM クロマトグラム
 スピロテトラマト ($m/z +374 \rightarrow 216$)
 添加濃度 : 0.01 ppm

図 12-8 鶏卵の SRM クロマトグラム
 スピロテトラマト ($m/z +374 \rightarrow 216$)
 添加濃度 : 0.01 ppm

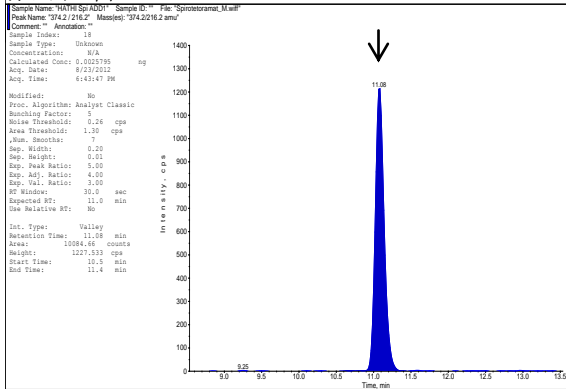
ブランク



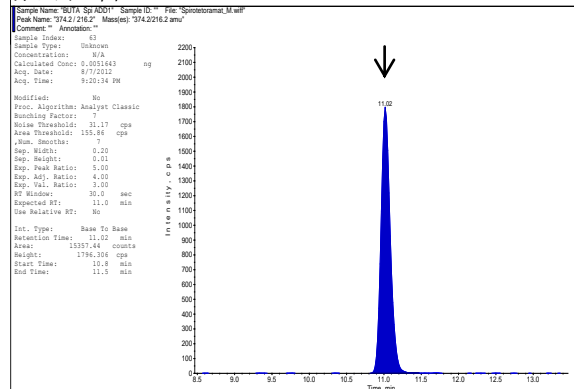
ブランク



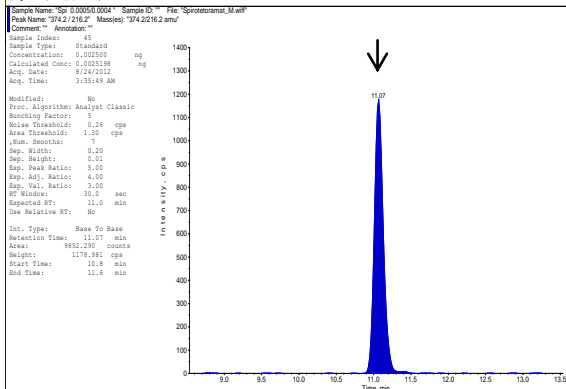
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

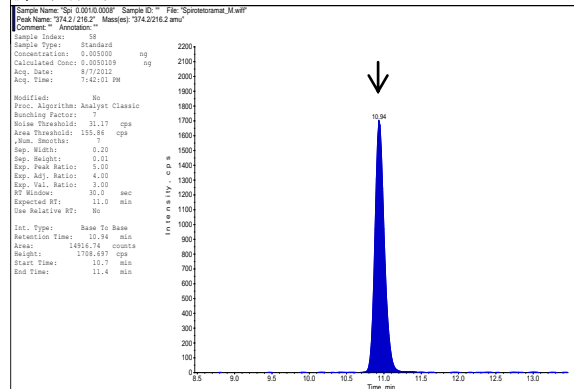
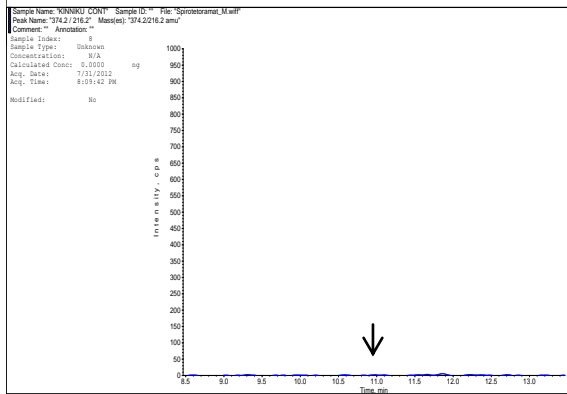


図 12-9 はちみつの SRM クロマトグラム
 スピロテトラマト ($m/z +374 \rightarrow 216$)
 添加濃度 : 0.01 ppm

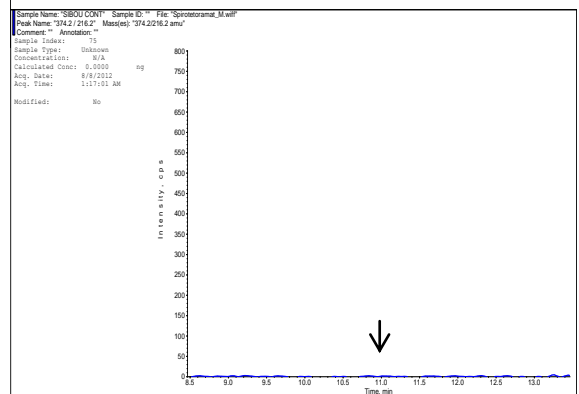
図 12-10 豚の筋肉の SRM クロマトグラム
 スピロテトラマト ($m/z +374 \rightarrow 216$)
 添加濃度 : 0.02 ppm

スピロテトラマトの定量限界の推定におけるクロマトグラム (畜水産物)

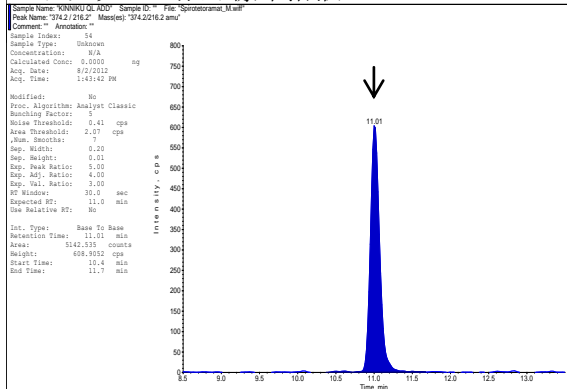
ブランク



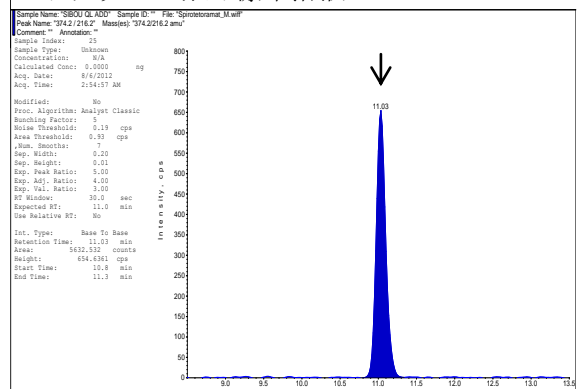
ブランク



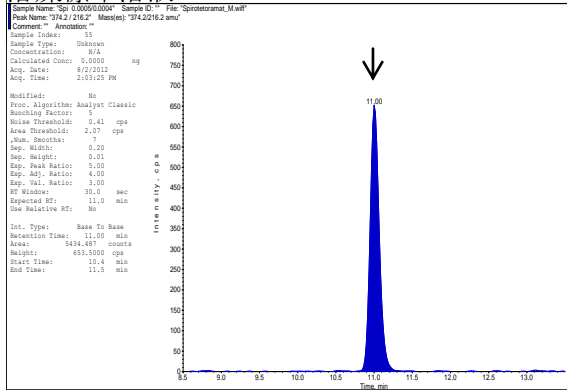
マトリックス添加標準溶液



マトリックス添加標準溶液



溶媒標準溶液



溶媒標準溶液

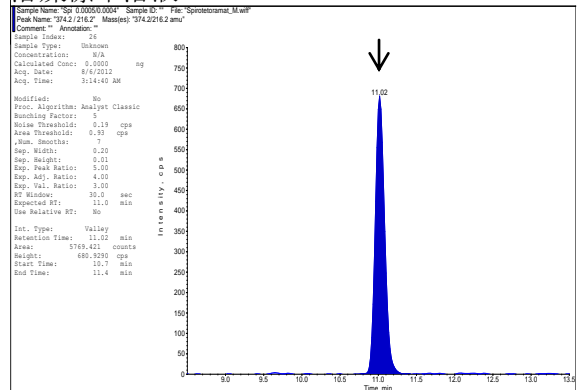
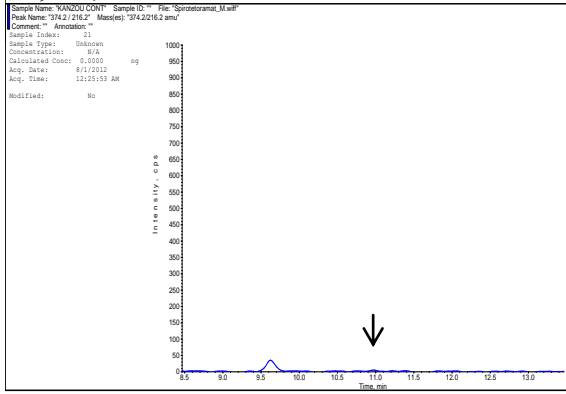


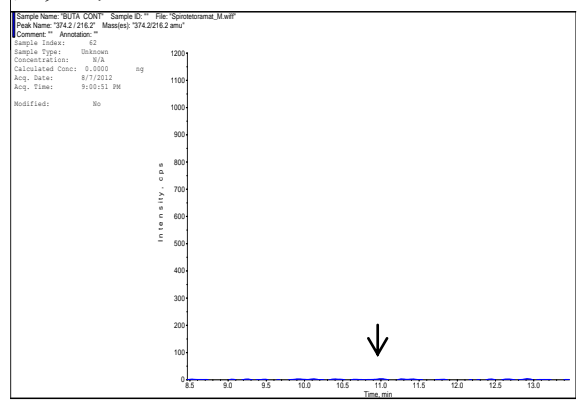
図 13-1 牛の筋肉の SRM クロマトグラム
 スピロテトラマト ($m/z +374 \rightarrow 216$)
 試料中 0.01 ppm 相当

図 13-2 牛の脂肪の SRM クロマトグラム
 スピロテトラマト ($m/z +374 \rightarrow 216$)
 試料中 0.01 ppm 相当

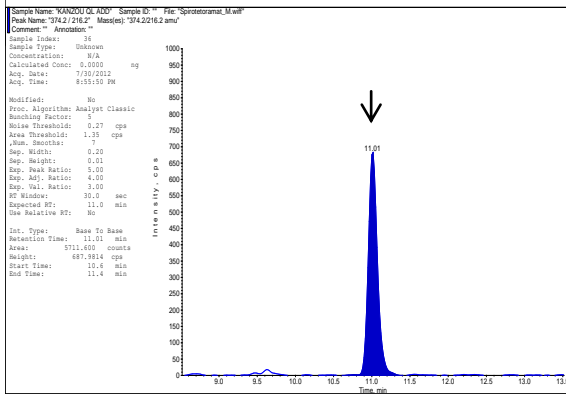
ブランク



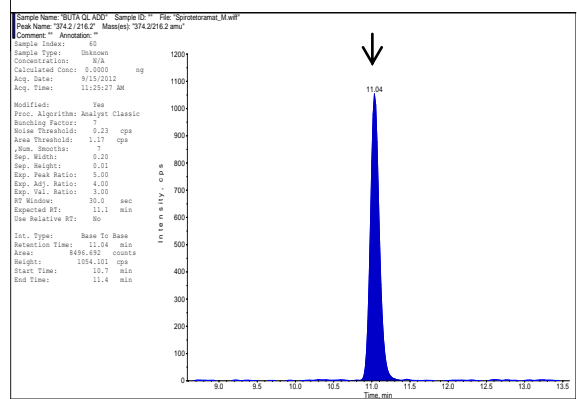
ブランク



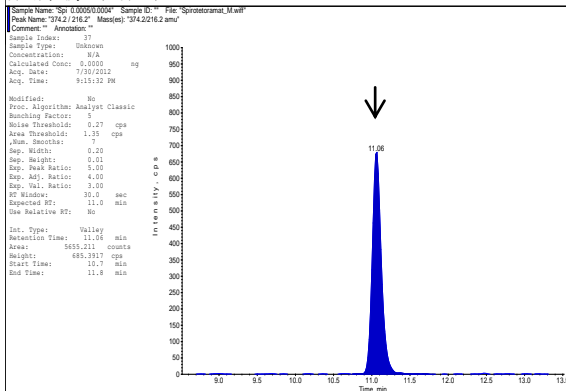
マトリックス添加標準溶液



マトリックス添加標準溶液



溶媒標準溶液



溶媒標準溶液

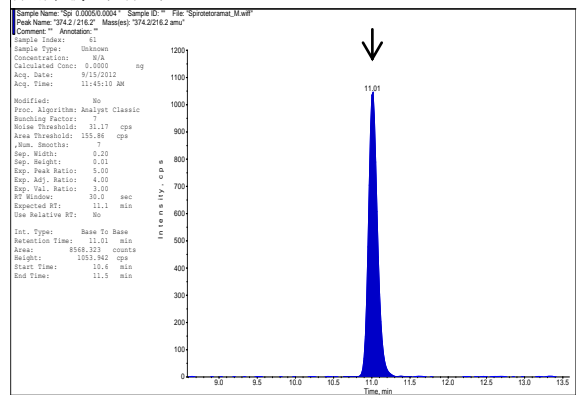
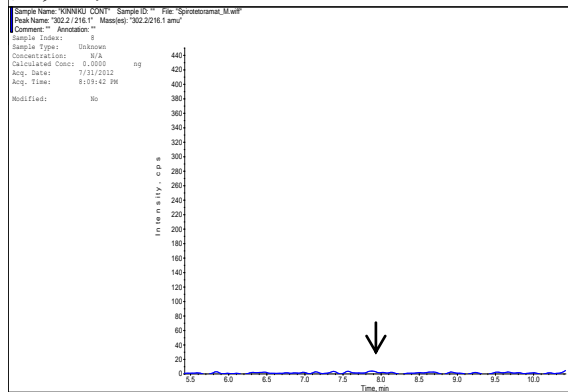


図 13-3 牛の肝臓の SRM クロマトグラム
スピロテトラマト ($m/z +374 \rightarrow 216$)
試料中 0.01 ppm 相当

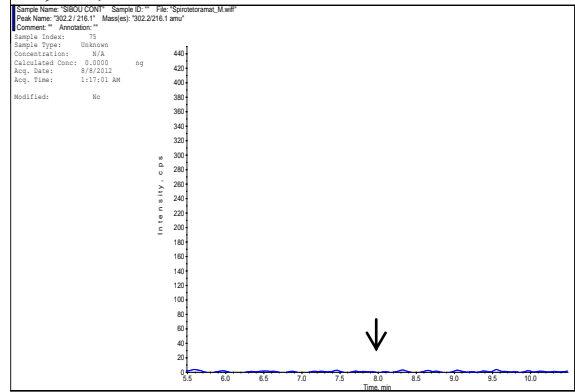
図 13-4 豚の筋肉の SRM クロマトグラム
スピロテトラマト ($m/z +374 \rightarrow 216$)
試料中 0.01 ppm 相当

代謝物M1の添加回収試験におけるクロマトグラム (畜水産物)

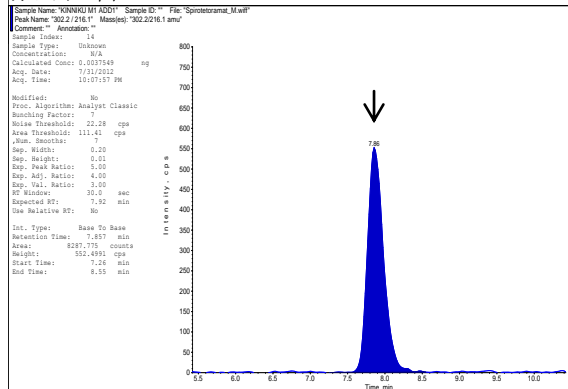
ブランク



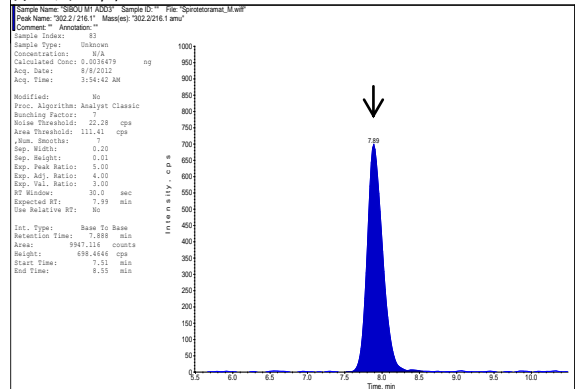
ブランク



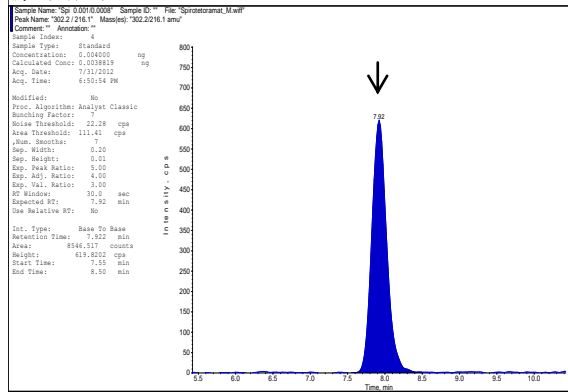
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

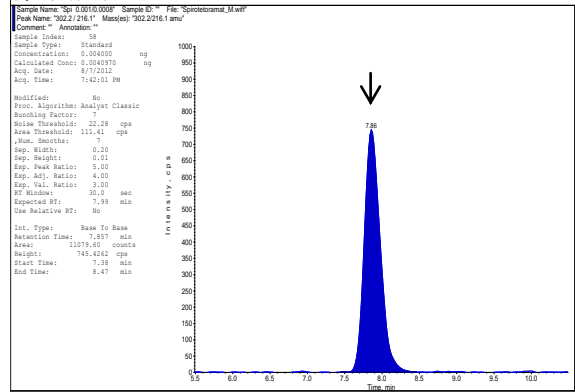
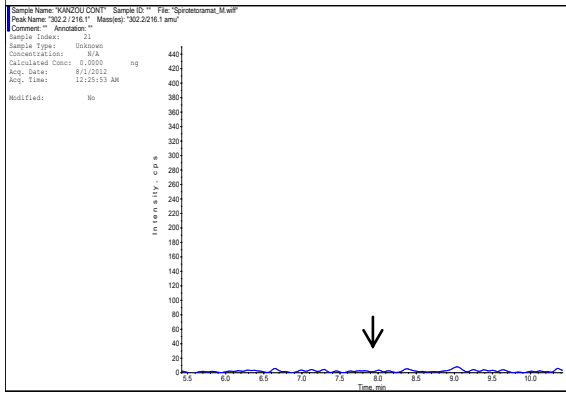


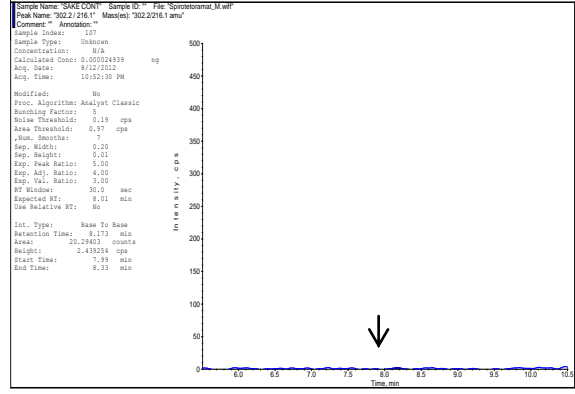
図 14-1 牛の筋肉の SRM クロマトグラム
 代謝物 M1 ($m/z +302 \rightarrow 216$)
 添加濃度: 0.02 ppm

図 14-2 牛の脂肪の SRM クロマトグラム
 代謝物 M1 ($m/z +302 \rightarrow 216$)
 添加濃度: 0.02 ppm

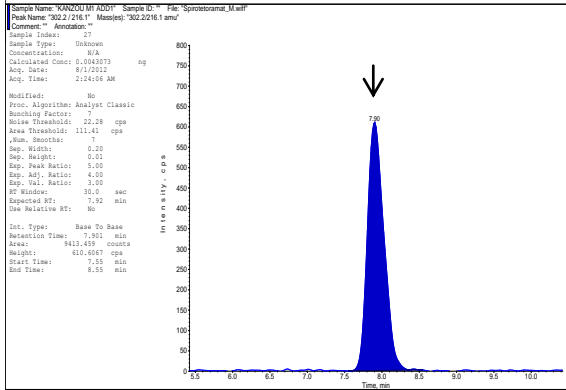
ブランク



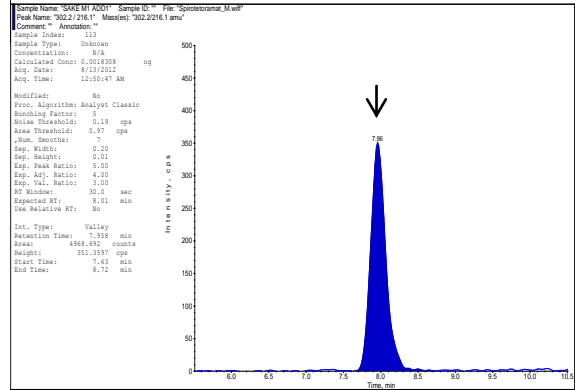
ブランク



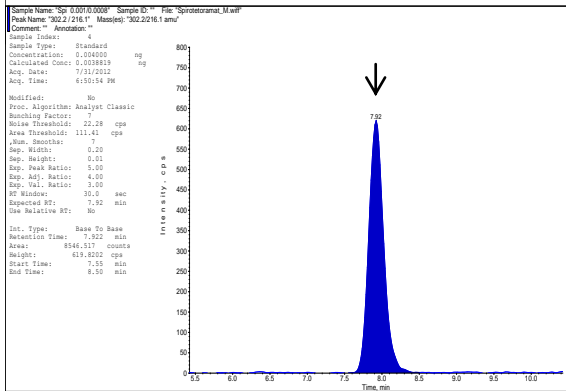
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

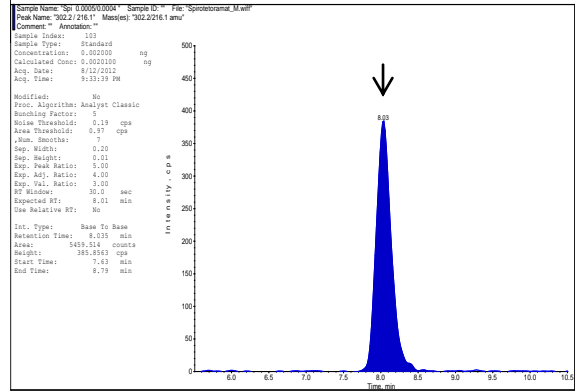
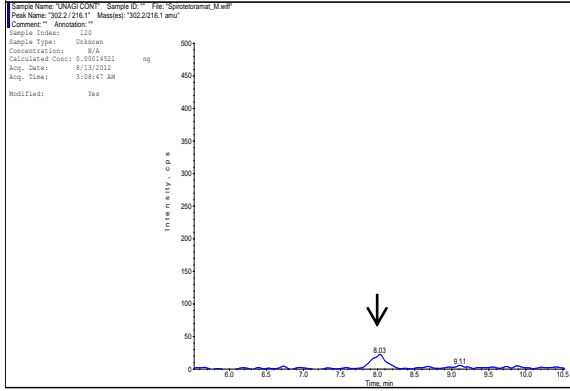


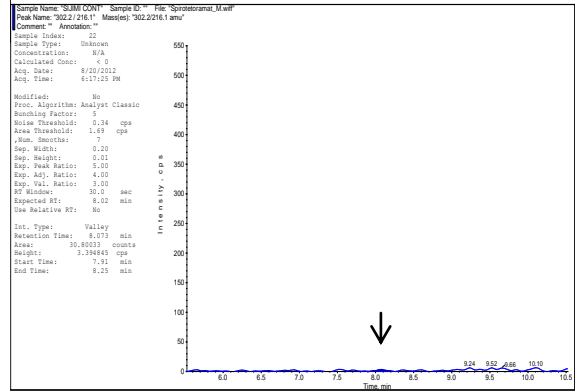
図 14-3 牛の肝臓の SRM クロマトグラム
 代謝物 M1 (m/z +302→216)
 添加濃度 : 0.02 ppm

図 14-4 さけの SRM クロマトグラム
 代謝物 M1 (m/z +302→216)
 添加濃度 : 0.01 ppm

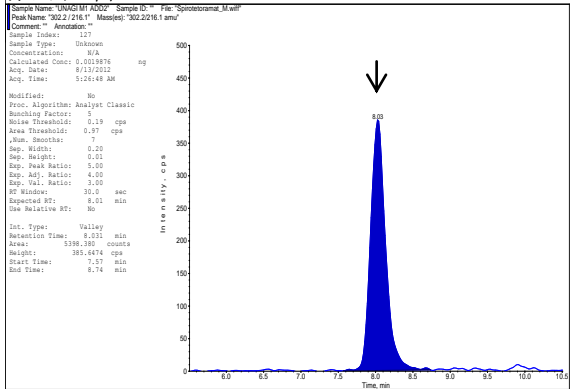
ブランク



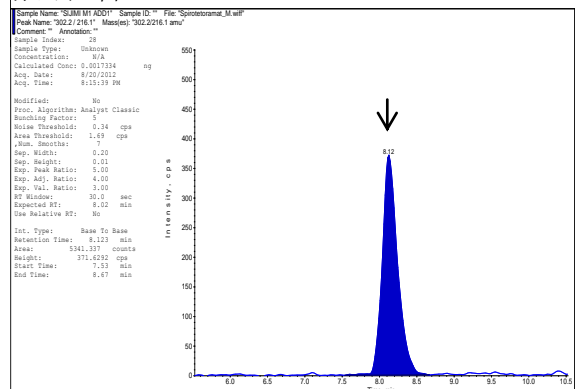
ブランク



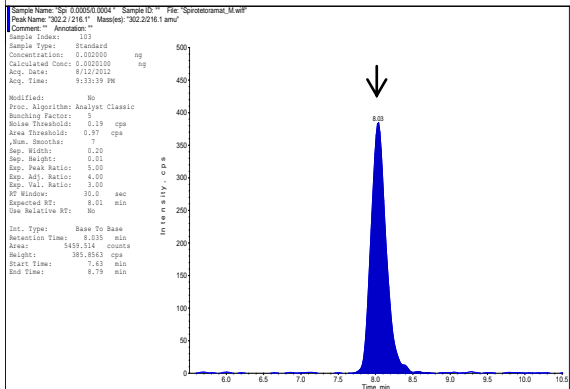
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

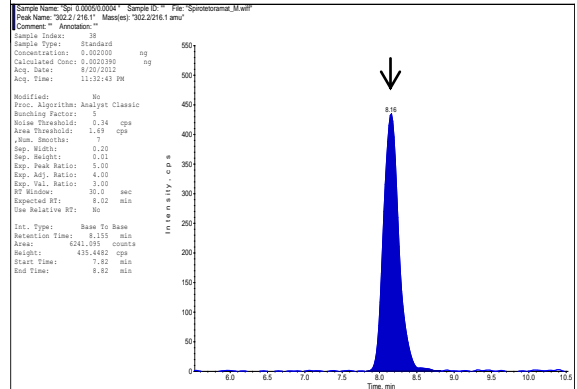
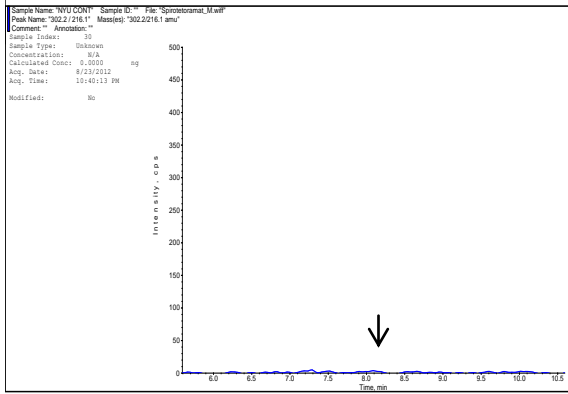


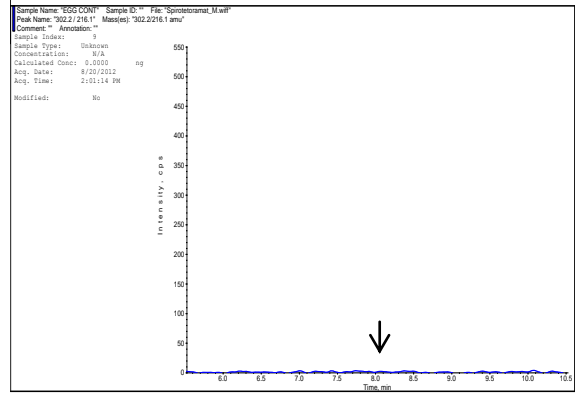
図 14-5 うなぎの SRM クロマトグラム
 代謝物 M1 ($m/z + 302 \rightarrow 216$)
 添加濃度 : 0.01 ppm

図 14-6 しじみの SRM クロマトグラム
 代謝物 M1 ($m/z + 302 \rightarrow 216$)
 添加濃度 : 0.01 ppm

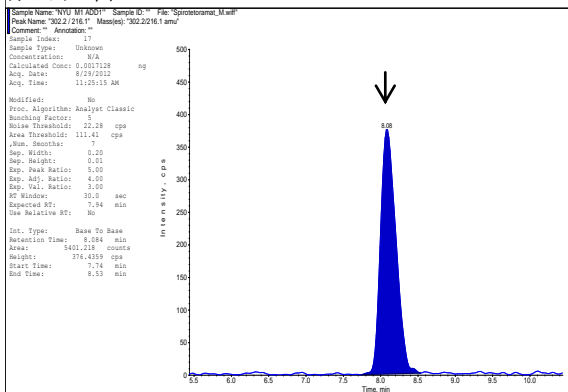
ブランク



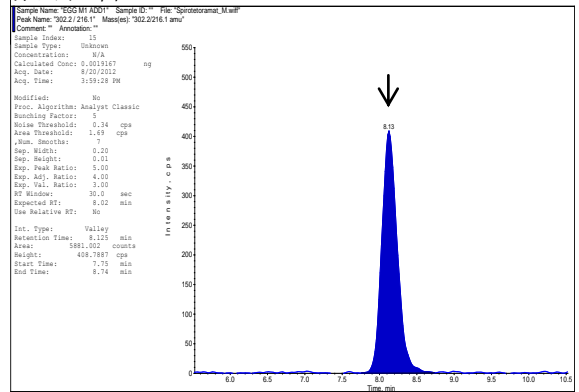
ブランク



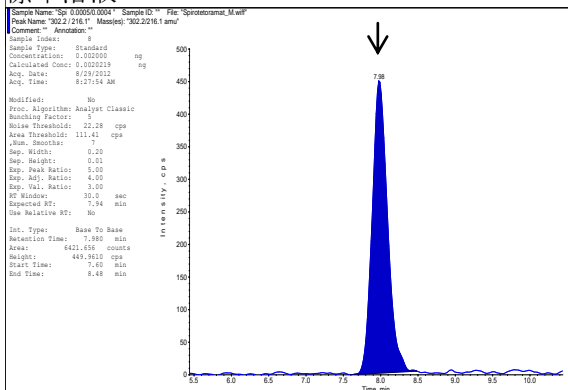
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

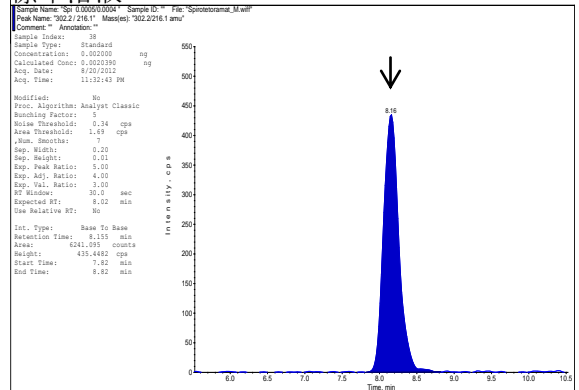
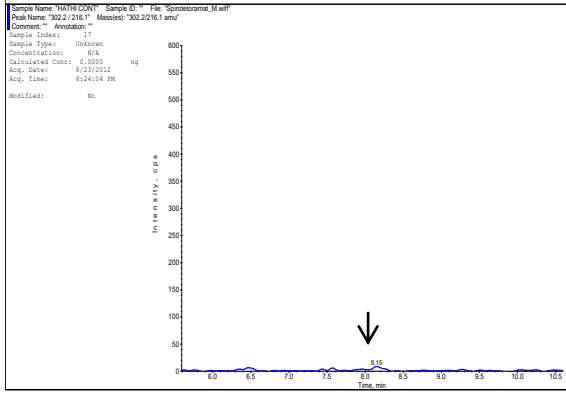


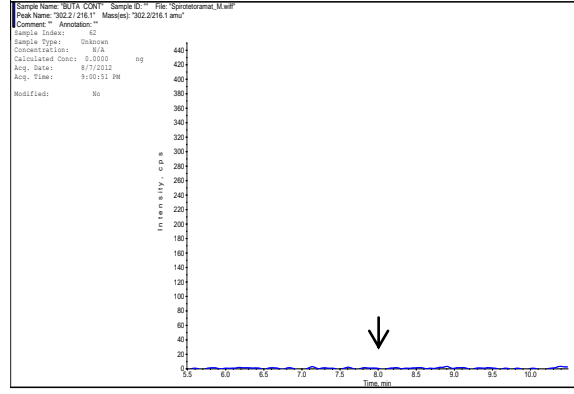
図 14-7 牛乳の SRM クロマトグラム
 代謝物 M1 ($m/z + 302 \rightarrow 216$)
 添加濃度 : 0.01 ppm

図 14-8 鶏卵の SRM クロマトグラム
 代謝物 M1 ($m/z + 302 \rightarrow 216$)
 添加濃度 : 0.01 ppm

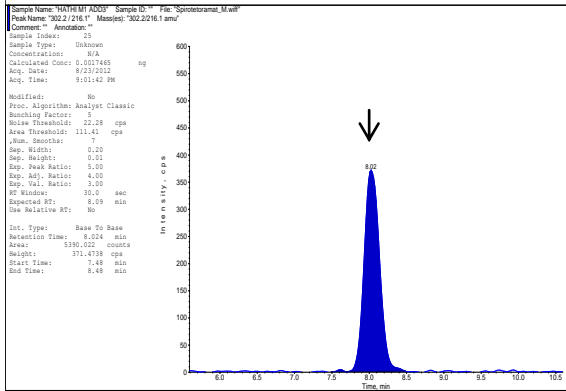
ブランク



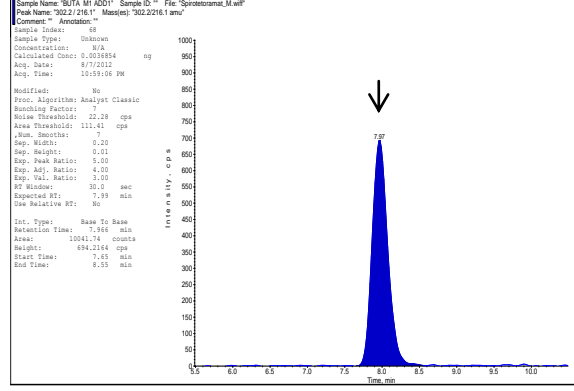
ブランク



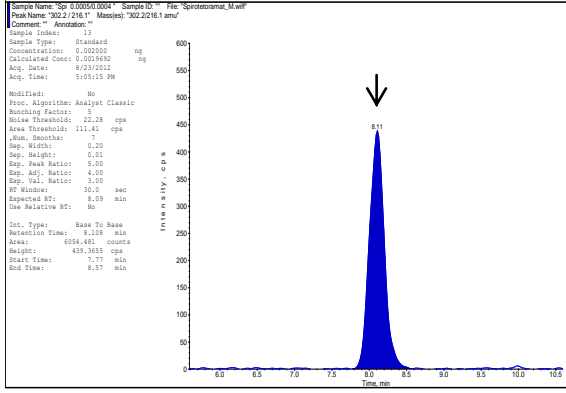
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

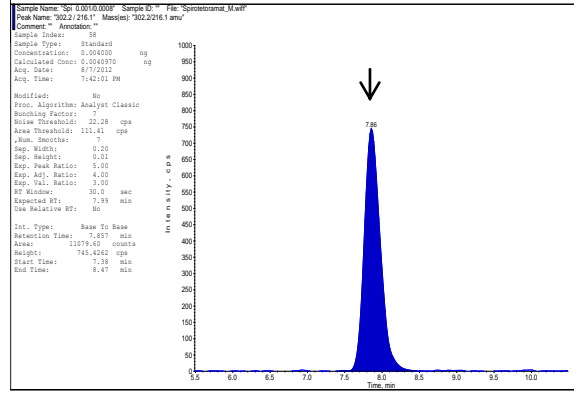
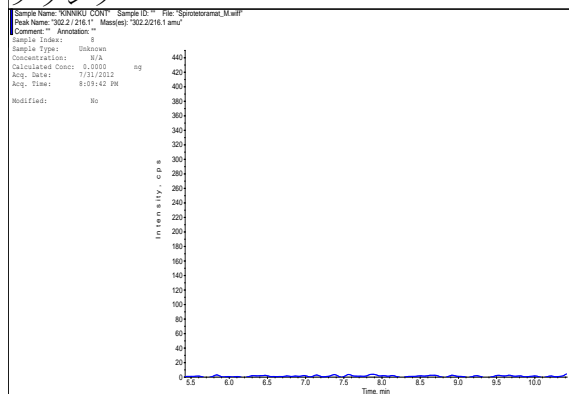


図 14-9 はちみつの SRM クロマトグラム
 代謝物 M1 ($m/z + 302 \rightarrow 216$)
 添加濃度 : 0.01 ppm

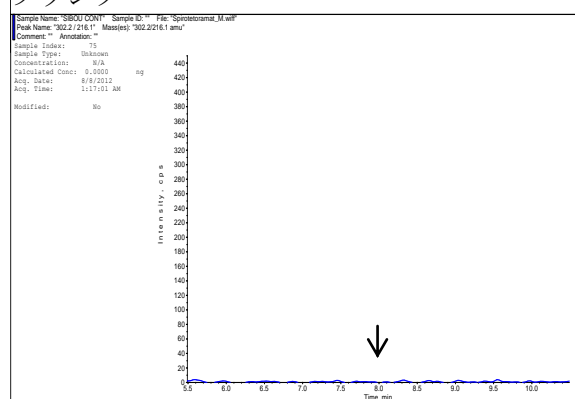
図 14-10 豚の筋肉の SRM クロマトグラム
 代謝物 M1 ($m/z + 302 \rightarrow 216$)
 添加濃度 : 0.02 ppm

代謝物M1の定量限界の推定におけるクロマトグラム (畜水産物)

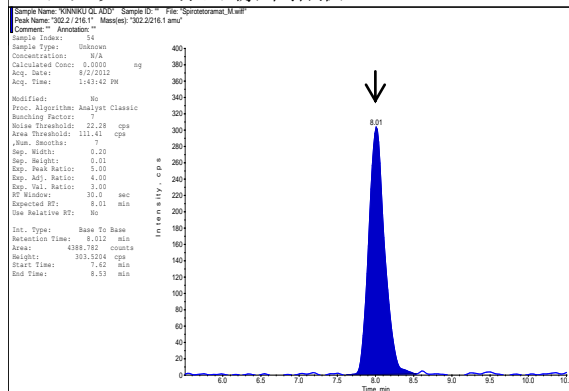
ブランク



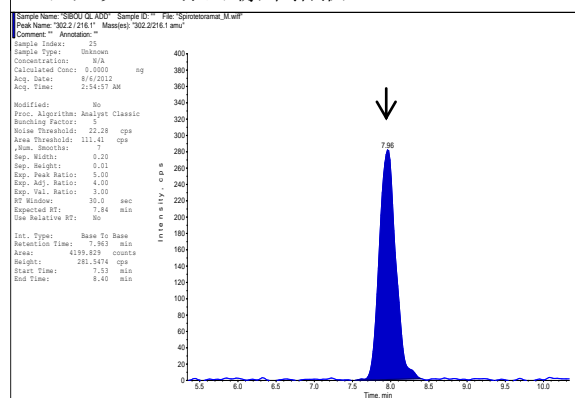
ブランク



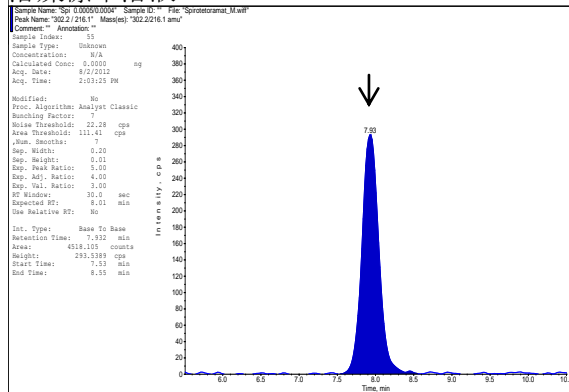
マトリックス添加標準溶液



マトリックス添加標準溶液



溶媒標準溶液



溶媒標準溶液

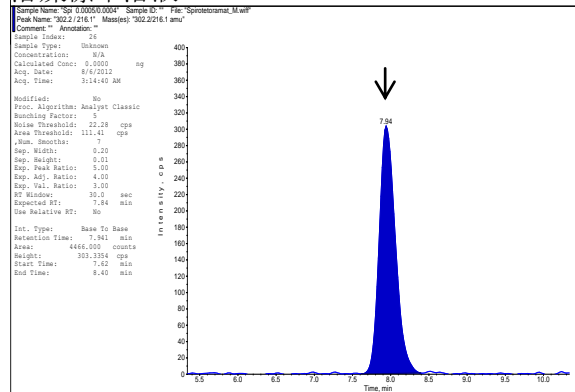


図 15-1 牛の筋肉の SRM クロマトグラム
 代謝物 M1 ($m/z +302 \rightarrow 216$)
 試料中 0.01 ppm 相当

図 15-2 牛の脂肪の SRM クロマトグラム
 代謝物 M1 ($m/z +302 \rightarrow 216$)
 試料中 0.01 ppm 相当

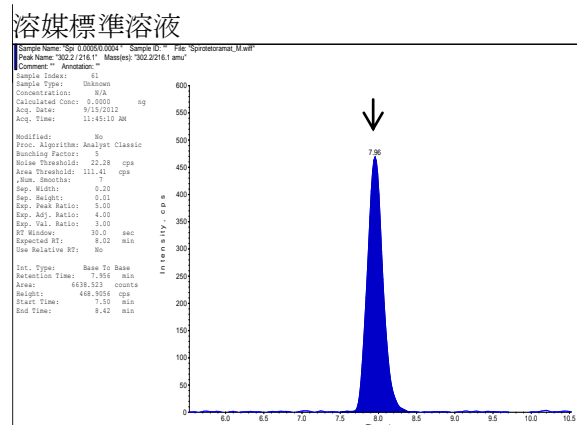
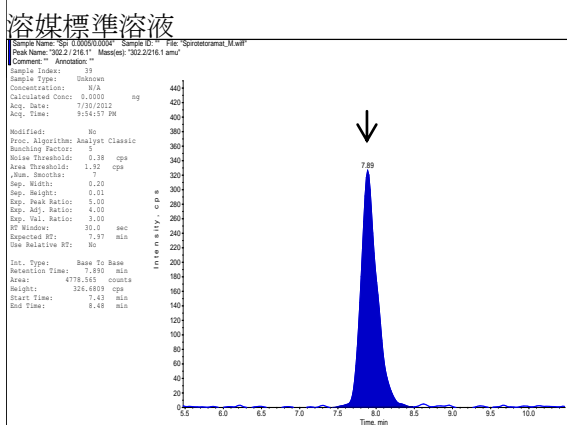
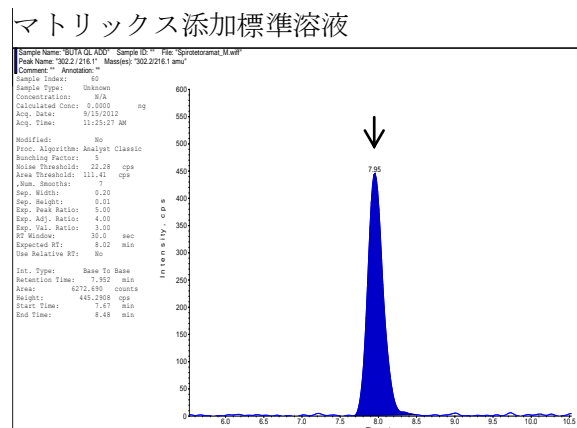
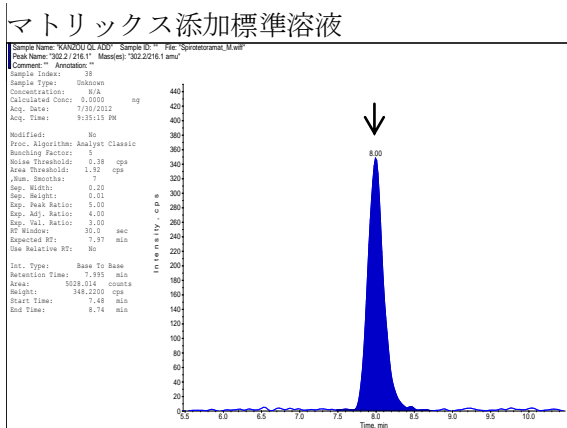
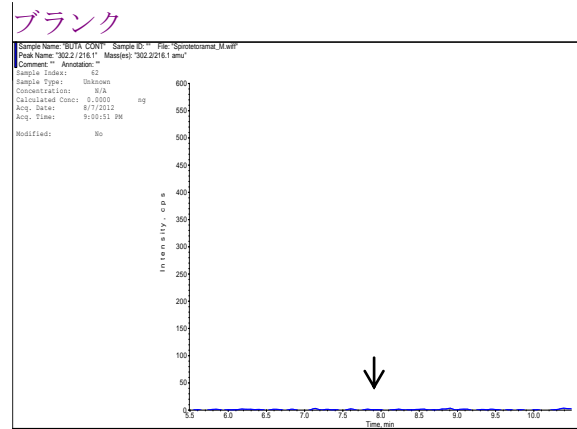
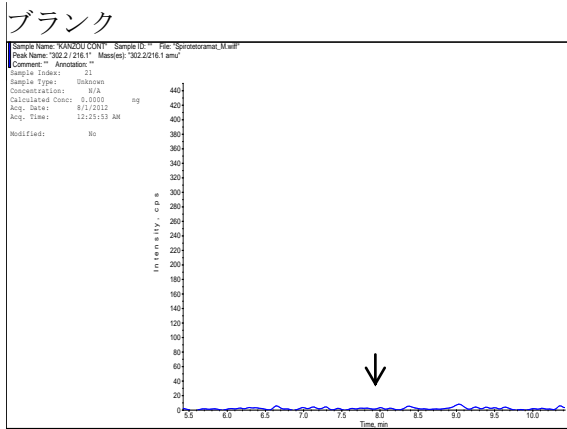
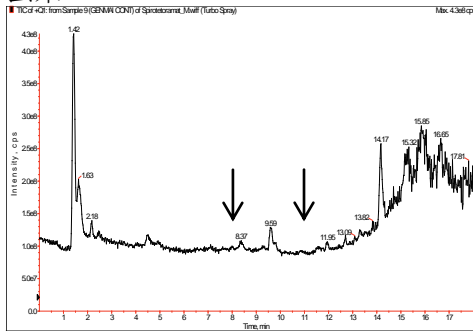


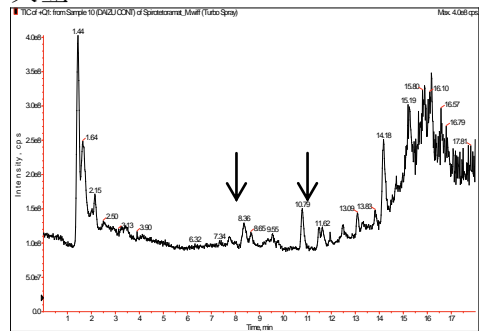
図 15-3 牛の肝臓の SRM クロマトグラム
 代謝物 M1 (m/z +302→216)
 試料中 0.01 ppm 相当

図 15-4 豚の筋肉の SRM クロマトグラム
 代謝物 M1 (m/z +302→216)
 試料中 0.01 ppm 相当

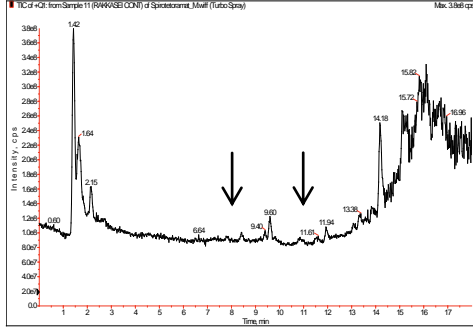
玄米



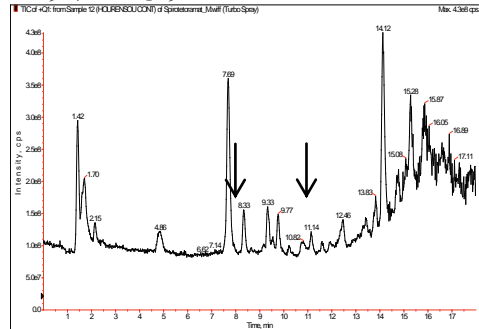
大豆



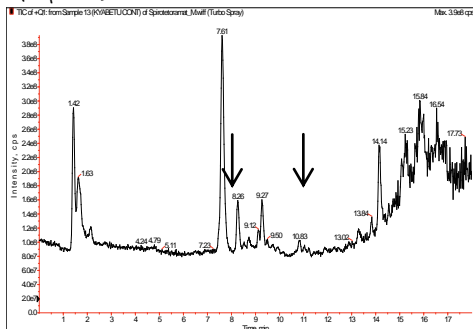
らっかせい



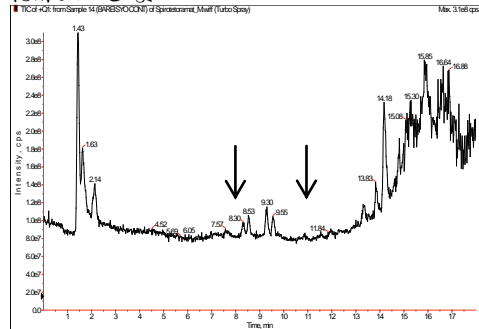
ほうれんそう



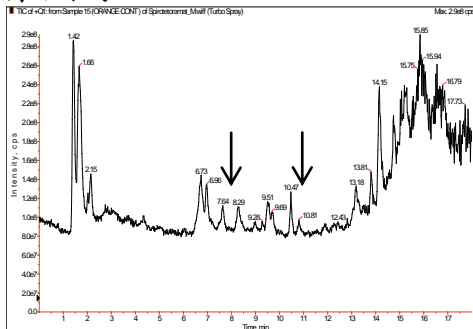
キャベツ



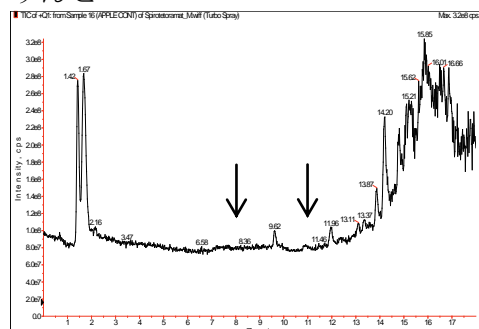
ばれいしょ



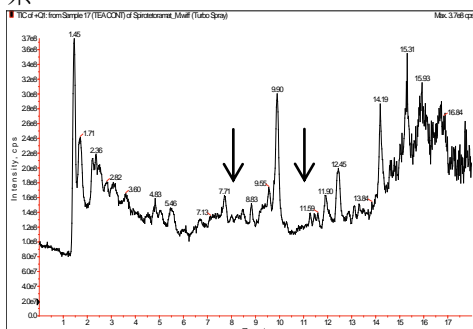
オレンジ



りんご



茶



なす

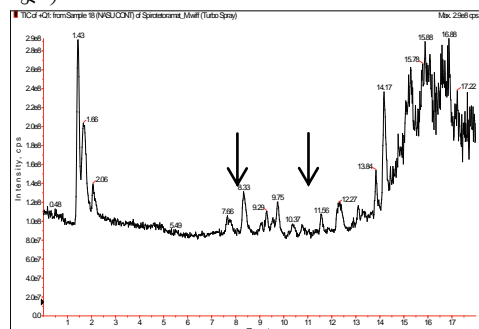
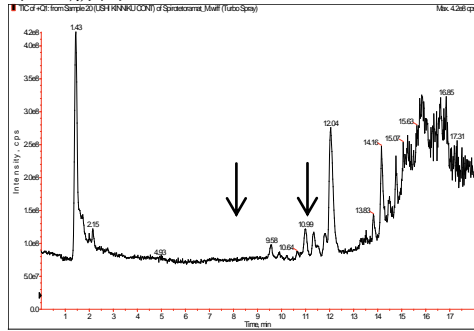
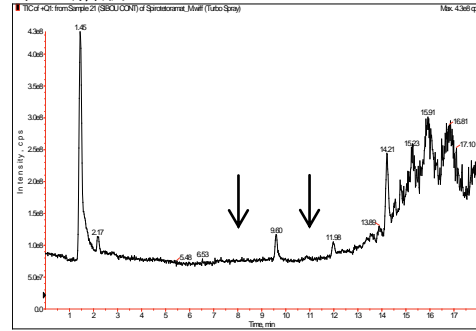


図 16-1 ブランク試料のトータルイオンクロマトグラム
(スキャン範囲：50～1000 m/z、コーン電圧：41 (V))

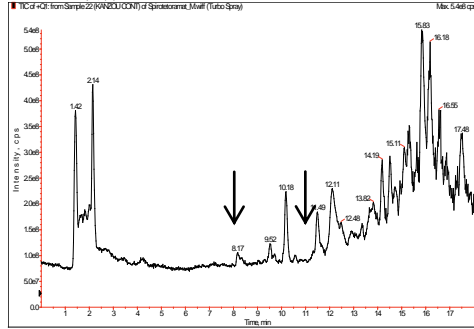
牛の筋肉



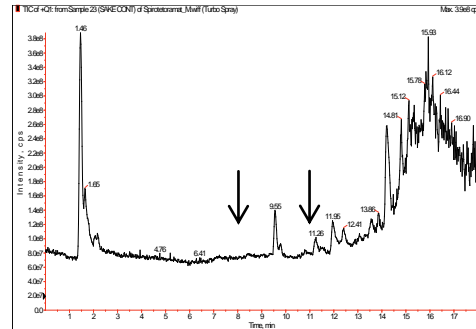
牛の脂肪



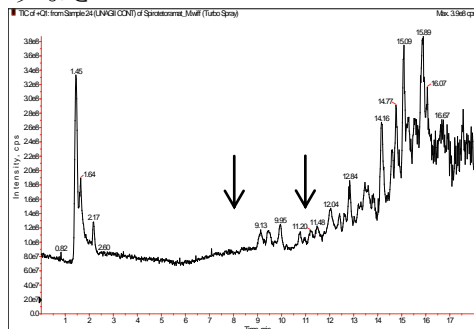
牛の肝臓



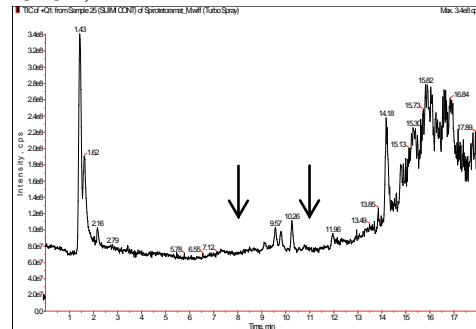
さけ



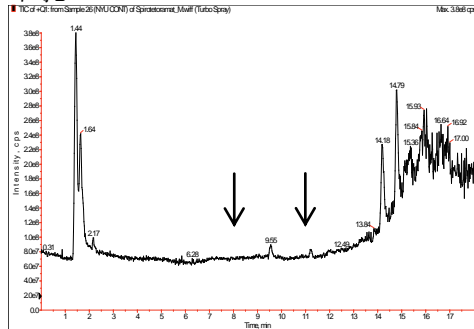
うなぎ



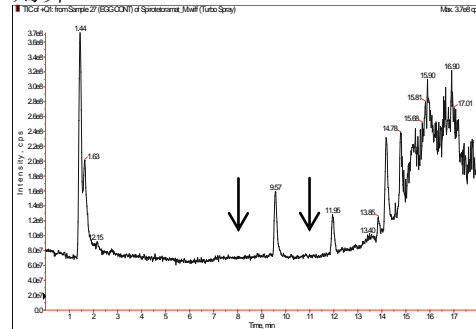
しじみ



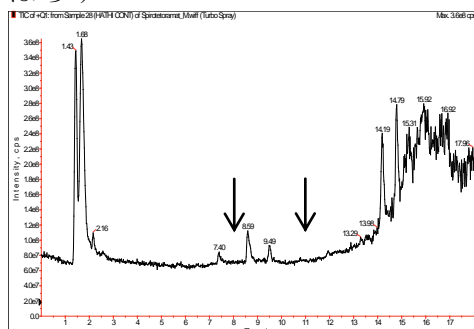
牛乳



鶏卵



はちみつ



豚の筋肉

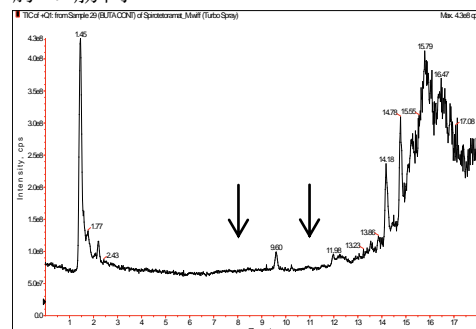


図 16-2 ブランク試料のトータルイオンクロマトグラム
(スキャン範囲: 50~1000 m/z、コーン電圧: 41 (V))