

※本報告書は、試験法開発における検討結果を取り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下さい。

食品に残留する農薬等の成分である物質の 試験法開発事業報告書

シラフルオフェン試験法（畜水産物）

シラフルオフェン試験法(畜水産物)

[緒言]

1. 目的及び試験法の検討方針等

農薬成分であるシラフルオフェンは、1984年に日本(大日本除虫菊株式会社)で、1985年にドイツ(ヘキスト、現バイエルクロップサイエンス社)で、それぞれ独自に開発されたケイ素原子を有するピレスロイド系殺虫剤である。昆虫の神経膜のナトリウムイオン透過性を変化させ、最終的に神経線維の興奮伝導を抑制することにより作用する。

我が国においては1995年に初めて農薬登録され、農産物への適用拡大がなされてきた。また、ポジティブリスト制度導入の際に、暫定基準が設定された。さらに、農薬取締法に基づく畜水産物への適用拡大の申請を受け、食品安全委員会が動物等を用いた食品健康影響評価が実施された。

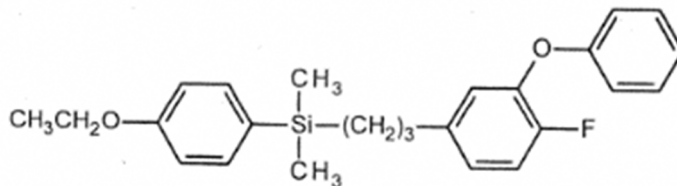
各種の毒性試験の結果において、発がん性、催奇形性及び遺伝毒性は認められなかったが、主に肝臓および精巣への影響が認められた。調査結果をもとに、一日摂取許容量(ADI)が設定されたのち、食品、添加物等の規格基準の一部改正(平成25年3月12日食安発0312第2号)にて、畜水産物の基準値が設定された。なお、農産物と同様に対象成分は親化合物のみとされている。

シラフルオフェンの試験法については、農産物では個別試験法が通知されているが、畜水産物では公示試験法が未整備である。また、畜水産物の一斉試験法においても対象成分として網羅されていない。そこで、本検討では、畜水産物を対象としたシラフルオフェンの個別試験法の開発を行った。

2. 分析対象化合物の構造式及び物理化学的性質

分析対象化合物: シラフルオフェン

構造式:



分子式: $C_{25}H_{29}FO_2Si$

分子量: 408.58

化学名: (4-Ethoxyphenyl)[3-(4-fluoro-3-phenoxyphenyl)propyl]dimethylsilane

CASNo.: 105024-66-6

外観: 無色透明、粘性のある液体

融点: $-40^{\circ}C$ 未満

蒸気圧: 2.5×10^{-6} Pa ($20^{\circ}C$)

溶解性: 水(pH 6.5) 0.001 mg/L

n-ヘキサン >300 g/L

トルエン >300 g/L

酢酸エチル >300 g/L

アセトン >300 g/L

メタノール 118 g/L

1-オクタノール/水分配係数(log Pow): logPow = 8.2($22^{\circ}C$)

解離定数(pKa): 構造上解離せず

安定性: 対熱、安定(発熱分解点 $400^{\circ}C$ 以上)

加水分解性 半減期 1年以上(25°C、pH5、7及び9)

水中光分解性 半減期 391-857時間(蒸留水、25°C、310 W/m²、290-800 nm)、
341-583時間(自然水、25°C、310 W/m²、290-800 nm)

[出典:シラフルオフен農薬抄録(独立行政法人農林水産消費安全技術センター)]

3. 基準値

食品	基準値 (ppm)
米(玄米)	0.3
大豆	0.1
かんしょ	0.1
えだまめ	2
その他野菜	0.1
みかん	0.2
なつみかんの果実全体	3
レモン	3
オレンジ(ネーブルオレンジを含む)	3
グレープフルーツ	3
ライム	3
その他のかんきつ類果実	3
りんご	3
日本なし	1
西洋なし	1
もも	0.1
かき	2
茶	80
その他のスパイス	10
牛の筋肉	1
豚の筋肉	1
その他の陸棲哺乳類に属する動物の筋肉	1
牛の脂肪	10
豚の脂肪	10
その他の陸棲哺乳類に属する動物の脂肪	10
牛の肝臓	2
豚の肝臓	2
その他の陸棲哺乳類に属する動物の肝臓	2
牛の腎臓	1
豚の腎臓	1
その他の陸棲哺乳類に属する動物の腎臓	1
牛の食用部分	2
豚の食用部分	2
その他の陸棲哺乳類に属する動物の食用部分	2

乳	2
鶏の筋肉	0.1
その他の家きんの筋肉	0.1
鶏の脂肪	1
その他の家きんの脂肪	1
鶏の肝臓	0.5
その他の家きんの肝臓	0.5
鶏の腎臓	0.1
その他の家きんの腎臓	0.1
鶏の食用部分	0.5
その他の家きんの食用部分	0.5
鶏の卵	1
魚介類	0.4

[出典: 添加物等の規格基準(昭和34年厚生省告示第370号) 第1食品 A食品一般成分規格 6]

[実験方法]

1. 試料

市販の牛の筋肉・脂肪・肝臓・乳、鶏の卵、しじみ、うなぎを用いた。以下に試料の採取方法を示した。

- 1) 筋肉は、可能な限り脂肪層を除き、細切均一化した。
- 2) 脂肪は、可能な限り筋肉層を除き、細切均一化した。
- 3) 肝臓は、細切均一化した。
- 4) 乳は、よく混合して均一化した。
- 5) 卵は、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。
- 6) しじみは、殻を除去し、得られたむき身を目の細かい金網にのせ、約 5 分間水切りを行ったものを細切均一化した。
- 7) うなぎは活鰻を使用し、頭を除いた可食部(内臓、骨及び皮を含む)を、細切均一化した。

2. 試薬・試液

シラフルオフェン標準品: 純度 99.5%(富士フィルム和光純薬製)

アセトン: 残留農薬・PCB 試験用(300 倍濃縮検定品)(富士フィルム和光純薬製)

n-ヘキサン: 残留農薬・PCB 試験用(300 倍濃縮検定品)(富士フィルム和光純薬製)

アセトニトリル: HPLC 用(富士フィルム和光純薬製)

メタノール: LC-MS 用(富士フィルム和光純薬製)

酢酸アンモニウム: 試薬特級(富士フィルム和光純薬製)

エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラム: Bond Elut PSA 500 mg/3 mL(アジレント製)

標準原液: シラフルオフェン標準品 50 mg を精秤し、アセトンで溶解して 1000 mg/L 溶液を調製した。

検量線用標準溶液: 標準原液をアセトニトリルで適宜希釈し、0.0005~0.003 mg/L 及び 0.005~0.03 mg/L の濃度の溶液を調製した。

添加用標準溶液: 標準原液をアセトンで希釈して 200 mg/L 溶液、及び 1 mg/L 溶液を調製した。

20 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液: 酢酸アンモニウム 1.54 g を水 1 L に溶解し調製した。

20 mmol/L 酢酸アンモニウム・メタノール溶液: 酢酸アンモニウム 1.54 g をメタノール 1 L に溶解し調製した。

3. 装置

超高速ホモジナイザー: T25 Digital ULTRA-TURRAX (IKA 製)

フードプロセッサー: MK-K61 (パナソニック製)

減圧多検体濃縮装置: Syncore Analyst 12 本用 (Büch 製)

遠心分離器: KUBOTA6200 (クボタ製)

純水製造装置: Elix essential MQ-a (メルクミリポア製)

LC-MS/MS:

装置	型式	メーカー
MS	6460	アジレント
LC	1260Infinity II	アジレント
データ処理	MassHunter	アジレント

4. 測定条件

LC-MS/MS

LC 条件			
カラム	InertSustain C18 HP (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm: (ジールサイエンス製))		
移動相流速 (mL/min)	0.30		
注入量 (μL)	2		
カラム温度 (°C)	40		
移動相	A 液: 20 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 B 液: 20 mmol/L 酢酸アンモニウム・メタノール溶液		
グラジエント条件	時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)
	0.0	40	60
	2.0	40	60
	5.0	2	98
	14.0	2	98
	14.1	40	60
	20.0	40	60
MS 条件			
測定モード	MS/MS (SRM)		
イオン化モード	ESI (+)		
キャピラリー電圧 (V)	3500		
ソース温度 (°C)	180		
脱溶媒温度 (°C)	180		
イオンソースガス	窒素、12 L/min、60 psi		
シーサーガス	窒素、12 L/min		
コリジョンガス	窒素 (MS/MS の場合)		
定量イオン (m/z)	MS/MS: 426.2→287.1 [フラグメンター電圧 100 V、コリジョンエネルギー 10 V]		
定性イオン □ (m/z)	MS/MS: 426.2→181.0 [フラグメンター電圧 100 V、コリジョンエネルギー 35 V]		
定性イオン □ (m/z)	MS/MS: 426.2→168.0 [フラグメンター電圧 100 V、コリジョンエネルギー 40 V]		
保持時間 (min)	11.0		

5. 定量

シラフルオフェン標準品 50.0 mg を精秤し、アセトン 50 mL に溶解して 1000 mg/L 溶液を調製した。この溶

液をアセトニトリルで希釈し、定量限界における添加試料の測定の際には、0.5、1、1.5、2、2.5、及び3 µg/Lの標準溶液を調製した。また、基準値添加試料の測定の際には、5、10、15、20、25、及び30 µg/Lの標準溶液を調製した。この溶液2 µLをLC-MS/MSに注入して、得られたピーク面積を用いて検量線を作成した。

試験溶液2 µLをLC-MS/MSに注入し、作成した検量線にて絶対検量線法によりシラフルオフェンの含量を算出した。

6. 添加試料の調製

添加濃度は、各食品の基準値、及び目標定量限界0.01 mg/kgで実施した。下表のとおり、添加用標準溶液をアセトンで調製し、試料10.0 gに添加した。なお、牛の脂肪については、あらかじめ湯煎し融解した状態にて添加した。その後、混合し30分間放置したのち使用した。

添加試料の調製（各食品10.0 gに添加）

評価濃度	添加試料						
	牛の筋肉	牛の脂肪	牛の肝臓	牛乳	鶏卵	しじみ	うなぎ
基準値	基準値 (ppm)						
	1	10	2	2	1	0.4	0.4
	200 mg/L 添加用標準溶液 添加量						
	50 µL	500 µL	100 µL	100 µL	50 µL	20 µL	20 µL
定量限界	定量限界 (mg/kg)						
	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
	1 mg/L 添加用標準溶液 添加量						
	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL

7. 試験溶液の調製

概要

シラフルオフェンを試料からアセトン及び*n*-ヘキサン(1:2)混液で抽出し、さらに*n*-ヘキサンで抽出した。アセトニトリル/ヘキサン分配により脱脂し、エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムで精製し、LC-MS/MSで定量及び確認した。

(1) 抽出

1) 筋肉・脂肪・肝臓、しじみ、うなぎの場合

試料10.0 gに水10 mLを加え、ホモジナイズしたのち、アセトン及び*n*-ヘキサン(1:2)混液50 mLを加えてホモジナイズし、毎分3,000回転で5分間遠心分離した。上層の有機層を採り、残留物に*n*-ヘキサン30 mLを加えホモジナイズし、同様の条件で遠心分離した。上層を採り、先の上層と合わせ、*n*-ヘキサンを加え正確に100 mLとした。

2) 牛乳、鶏卵の場合

試料10.0 gにアセトン及び*n*-ヘキサン(1:2)混液50 mLを加えてホモジナイズし、毎分3,000回転で5分間遠心分離した。上層の有機層を採り、残留物に*n*-ヘキサン30 mLを加えホモジナイズし、同様の条件で遠心分離した。上層を採り、先の上層と合わせ、*n*-ヘキサンを加え正確に100 mLとした。

(2) 脱脂操作 アセトニトリル/ヘキサン分配

100 mLに定容した抽出溶液を正確に10 mL(試料1 g相当)分取し、40°C以下で濃縮し、最後は室温で窒素パージを行い、溶媒を除去した。残留物に*n*-ヘキサン10 mLを加えて溶かした。

この溶液を*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル20 mLずつで2回振とう抽出し、さらに、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル10 mLで振とう抽出した。アセトニトリル層を合わせ40°C以下で濃縮し、最後は室温で窒素パージにより溶媒を除去した。この残留物を*n*-ヘキサンに5 mLに溶かした。

(3)精製 エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルカラム精製

エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラム[Bond Elut PSA(500 mg/3 mL)]に、あらかじめ *n*-ヘキサン 10 mL を注入し、流出液は捨てた。このカラムに、(2)で得られた試料溶液を注入したのち、*n*-ヘキサン 10 mL を注入し、試料溶液注入からの全溶出液を採り、これを 40°C以下で濃縮し、最後は室温で窒素パージにより溶媒を除去した。この残留物をアセトニトリルに溶解し、正確に 5 mL としたものを LC-MS/MS の試験溶液とした。

[分析法フローチャート]

秤 取

- ↓ 筋肉・脂肪・肝臓、しじみ、うなぎ：試料 10.0 g にあらかじめ水 10 mL を加えホモジナイズ
- ↓ 卵、乳：試料 10.0g

抽 出

- ↓ アセトン及び *n*-ヘキサン(1:2)混液 50 mL を加えホモジナイズ
- ↓ 遠心分離(毎分 3,000 回転、5 分間)
- ↓ 上層(有機層)を採る
- ↓ 残留物に *n*-ヘキサン 30 mL を加えホモジナイズ
- ↓ 遠心分離(毎分 3,000 回転、5 分間)
- ↓ 上層(有機層)を採り、先の上層と合わせる

定容 100 mL(*n*-ヘキサン)

- ↓ 正確に 10 mL 分取(試料 1 g 相当)

濃縮(溶媒除去)

- ↓ 残留物に *n*-ヘキサン 10 mL を加えて溶かす

アセトニトリル/*n*-ヘキサン分配

- ↓ *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 20 mL ずつで 2 回振とう抽出
- ↓ さらに *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 10 mL で振とう抽出

アセトニトリル層

↓

濃縮(溶媒除去)

- ↓ 残留物を *n*-ヘキサン 5 mL に溶かす

エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルカラム精製[Bond Elut PSA (500 mg/3 mL)]

- ↓ あらかじめ *n*-ヘキサン 10 mL を注入し流出液は捨てる
- ↓ 試料溶液を注入したのち *n*-ヘキサン 10 mL を注入
- ↓ 試料溶液の注入からの全溶出液を採取する

濃縮(溶媒除去)

- ↓ 残留物をアセトニトリルに溶解し正確に 5 mL とする

↓

定容 5 mL(試験溶液)

- ↓ (試験溶液 5 mL は、試料 1 g に相当、前処理の希釈率 5 倍)

8. マトリックス添加標準溶液の調製

回収率 100%相当濃度の 10 倍濃度の標準溶液 100 μL を窒素ページにより溶媒除去した。そこへブランク試験溶液を加え正確に 1 mL と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) タンデム質量分析における測定イオン及び測定パラメータの選択

タンデム質量分析計における対象化合物の測定イオンの選択及び測定条件の最適化を試みた。すなわち、スキャン測定及びプロダクトイオンスキャン測定を行い、イオンソース温度、測定イオンの選択、フラグメンター電圧及びコリジョンエネルギーの最適化を行った。

なお、シラフルオフェン(分子量 408.58)のプリカーサーイオンとして、多くの報告⁷⁾では、ESI(+)モードにおけるアンモニウムイオン付加分子(m/z 426)が選択されている。そこで、アンモニウムイオン付加分子が生成し易いよう、条件検討の際には、20 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液及び20 mmol/L 酢酸アンモニウム・メタノール溶液(1:4)を移動相として用いた。分離カラムは装着せず、フローインジェクションにより、シラフルオフェンの標準溶液(10 mg/L)をLC-MS/MSに2 μL ずつ連続注入し、フラグメンター電圧及びコリジョンエネルギーのパラメータの最適化を行った。

最適な条件を検討するために、まずイオンソース温度の最適化を行った。使用した装置では、イオンソース温度300 $^{\circ}\text{C}$ 付近では、アンモニウム付加体が感度良く検出しなかった。温度を低くしていくと、感度が上昇していく傾向が見られた。検討の結果、イオンソース温度180 $^{\circ}\text{C}$ において、感度、再現性ともに良好な条件を得ることができた。

本条件にて連続注入によるスキャン測定を行い、フラグメンター電圧を検討したところ100 Vで感度良好なマススペクトルが得られた(図1)。以上の結果から、シラフルオフェンのアンモニウム付加分子 (m/z 426.2 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$)をプリカーサーイオンとした。

m/z 426.2をプリカーサーイオンとし、プロダクトイオンスキャン測定を連続注入により実施した。得られたプロダクトイオンのシグナルの強度をもとに、 m/z 426.2 \rightarrow 287.1(コリジョンエネルギー10 V)を定量用イオンに(図2)、また m/z 426.2 \rightarrow 181.0(コリジョンエネルギー35 V)及び m/z 426.2 \rightarrow 168.0(コリジョンエネルギー40 V)を定性用イオン(図3、図4)とした。

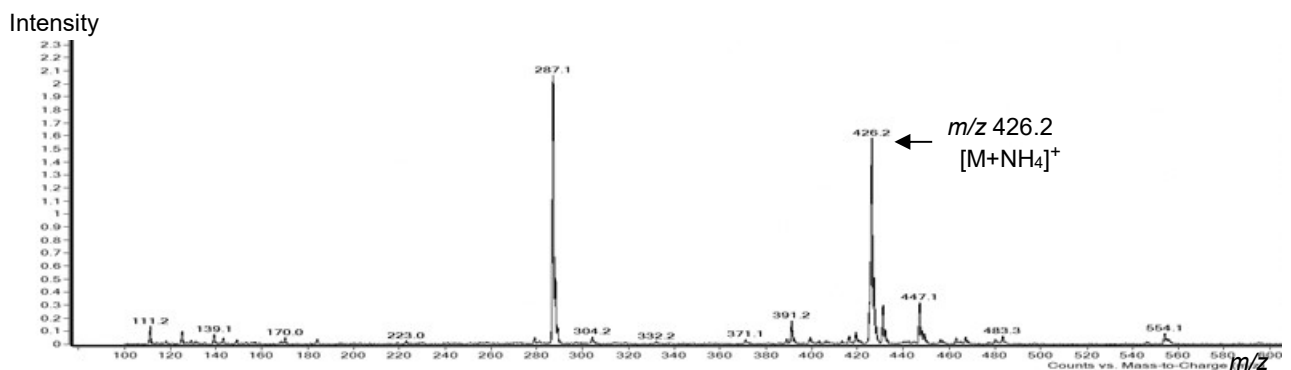


図 1. シラフルオフェンのスキャンスペクトル

スキャン範囲: 100-1000amu(図では100-600amuの範囲を表示)

測定条件: ESI(+), フラグメンター100 V

シラフルオフェン標準溶液 10 mg/L、2 μL 注入

Intensity

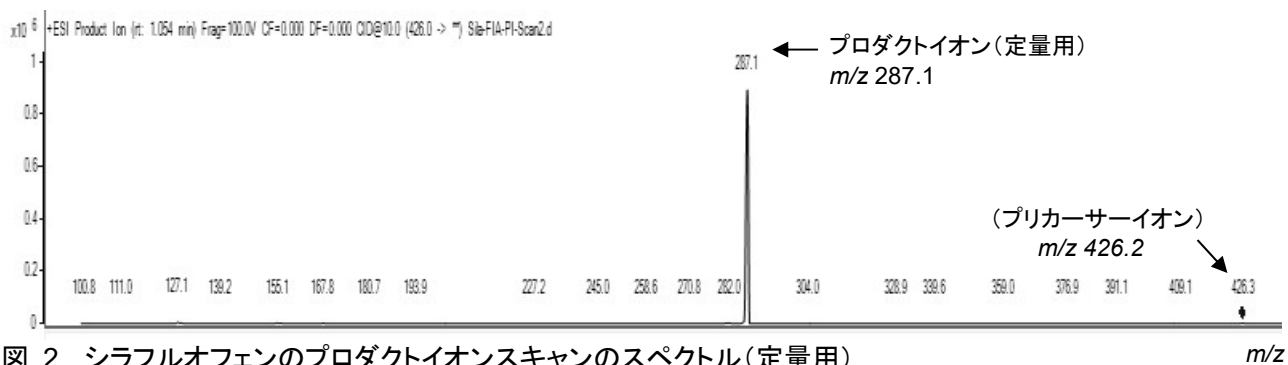


図 2. シラフルオフェンのプロダクトイオンスキャンのスペクトル(定量用)

(定量用)プリカーサーイオン: m/z 426.2 \rightarrow 287.1

測定条件: ESI(+), コリジョンエネルギー10 V

シラフルオフェン標準溶液 10 mg/L、2 μ L注入

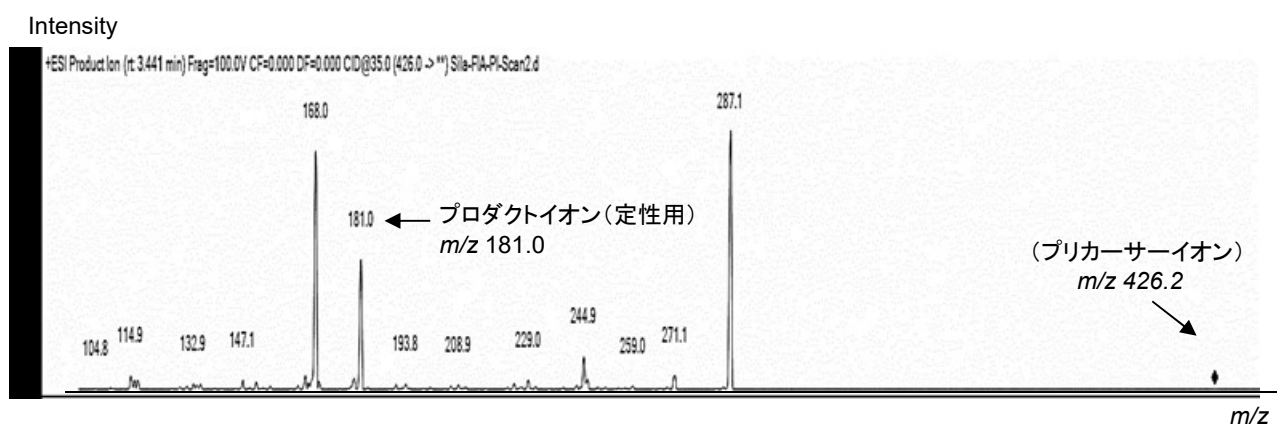


図 3. シラフルオフェンのプロダクトイオンスキャンのスペクトル(定性用)

(定性用)プリカーサーイオン: m/z 426.2 \rightarrow 181.0

測定条件: ESI(+), コリジョンエネルギー35 V

シラフルオフェン標準溶液 10 mg/L、2 μ L注入

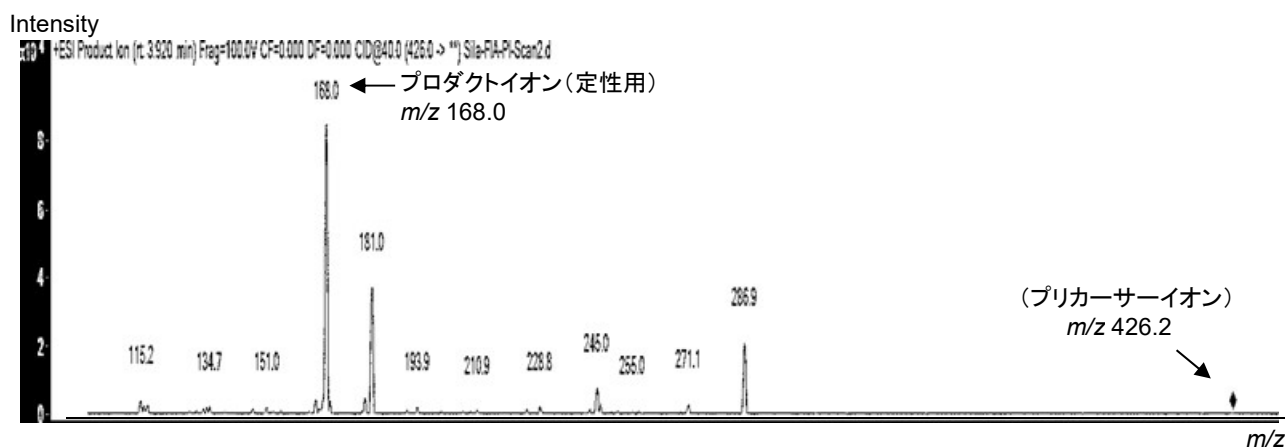


図 4. シラフルオフェンのプロダクトイオンスキャンのスペクトル(定性用)

(定性用)プリカーサーイオン: m/z 426.2 \rightarrow 168.0

測定条件: ESI(+), コリジョンエネルギー40 V

シラフルオフェン標準溶液 10 mg/L、2 μ L注入

(2)LC条件の検討

シラフルオフェンは極めて疎水性が高く、逆相系 HPLC 条件では有機溶媒比率をかなり上昇させないと、分離カラムから溶出できなかった。さらに、上述の(1)で示したとおり、アンモニウムイオン付加分子をプリカーサーイオンとして選択しており、安定的なイオン化に配慮する必要があった。

以上のことから、有機溶媒には酢酸アンモニウムが溶解し易いメタノールを選択することとした。酢酸アンモニウム濃度は、通知試験法(LC/MS による農薬等の一斉試験法Ⅲ(畜水産物))でも適用されている 20 mmol/L とした。

標準溶液を用いて分離条件を検討したところ、良好な感度、再現性及びピーク形状が得られたため、酸の添加及び pH の調整は、不要であると判断した。なお、分離カラムは、一般的な C18 カラム(InertSustain C18 HP、内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm、ジーエルサイエンス製)を用いた。また、試験溶液中のマトリックスをカラムから適切に排除するため、グラジエントモードを適用した。

上述の[実験方法] 4. 測定条件に記載した条件にて、分離状況を確認したところ(図 5、図 6)、溶媒ベースの標準溶液については、良好なピーク形状、再現性及び感度を得ることができた。

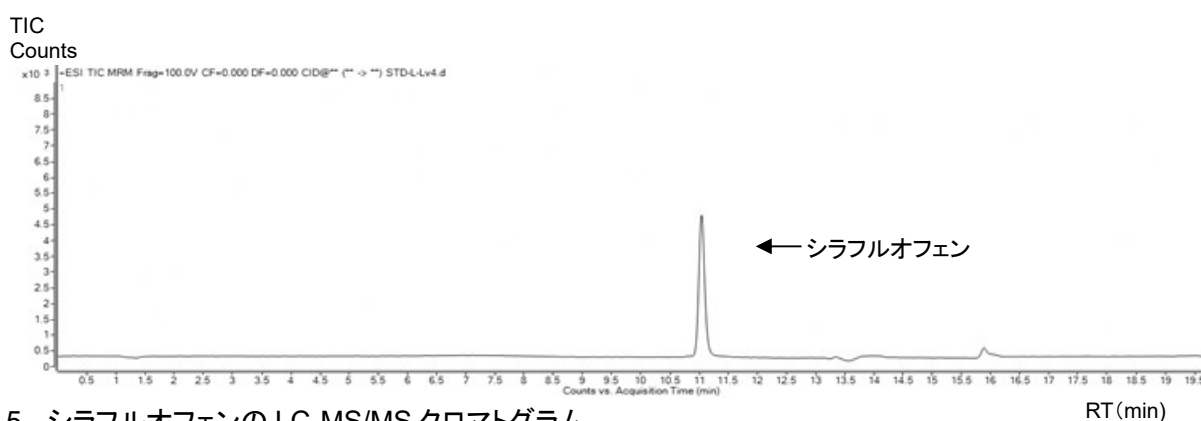


図 5. シラフルオフェンの LC-MS/MS クロマトグラム
SRMモード(TIC) シラフルオフェン標準溶液(アセトニトリル溶液) 2 μg/L、2 μL 注入

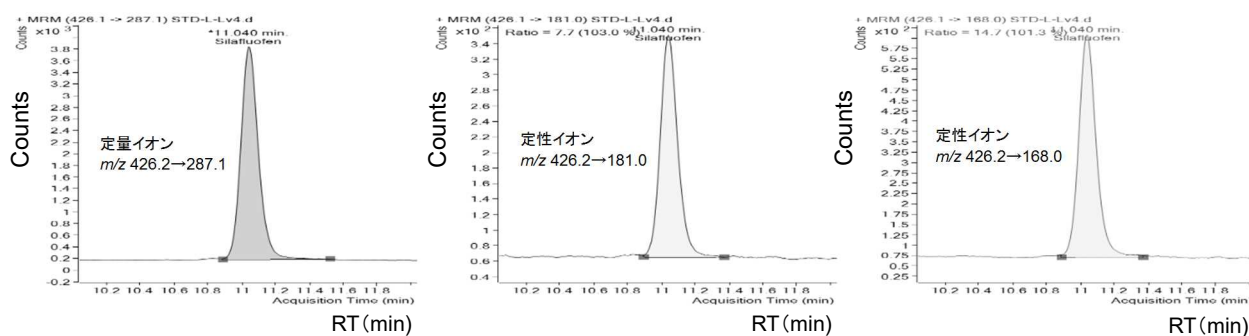


図 6. シラフルオフェンの LC-MS/MS クロマトグラム
SRM モード(イオン抽出) シラフルオフェン標準溶液(アセトニトリル溶液) 2 μg/L、2 μL 注入

(3) 検量線

図 7 にシラフルオフェンの検量線の例を示した。0.5 μg/L ~ 3 μg/L(注入量 2 μL)の濃度範囲で作成した検量線の決定係数は、 R^2 0.999 以上であり良好な直線性を示した。

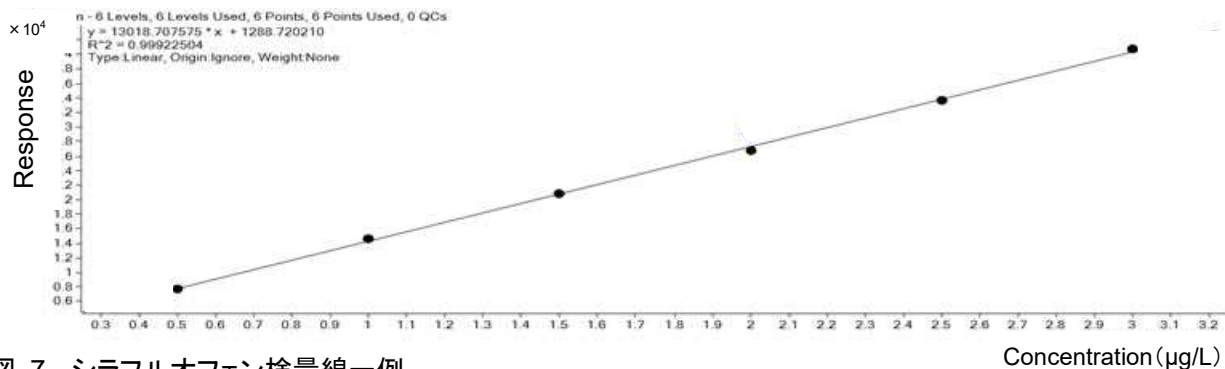


図 7. シラフルオフエン検量線一例

$$y = 13018x + 1289$$

$$R^2 = 0.9992$$

(4) 定量限界

牛の筋肉・脂肪・肝臓・乳、鶏の卵、しじみ、うなぎ： 0.01 mg/kg

一律基準 0.01 ppm(mg/kg)を目標とした。詳細を以下に示す。

試験溶液量： 5 mL

試験溶液中の試料量： 1 g

分析対象化合物の定量限界(0.01 mg/kg)相当量:0.004 ng

注入量： 2 µL

$$\begin{aligned}
 & [\text{試験溶液量(mL)} / \text{試験溶液中の試料量(g)}] \times [\text{分析対象化合物の定量限界相当量(ng)} / \text{注入量(µL)}] \\
 & = 5(\text{mL/g}) \times 2(\text{ng/mL}) \\
 & = 10 \text{ ng/g} \\
 & = 0.01 \text{ mg/kg}
 \end{aligned}$$

前処理にて試料を 5 (mL/g) 倍希釈相当とした場合、試料 0.01 mg/kg に相当する試験溶液濃度は 2 ng/mL(µg/L)である。標準溶液 2 µg/L (2 µL 注入、0.004 ng)のクロマトグラムは、図 5 及び図 6 に示したとおりであり、溶媒ベースの標準溶液では感度は十分であった。

また、後述の添加試料のピーク形状、感度及び再現性も良好であったため、定量限界を 0.01 mg/kg とした。

2. 試験溶液調製法の検討

(1) 抽出方法の検討

シラフルオフエンの物性として、疎水性が極めて高いこと(log Pow = 8.2)に着眼し、検討を行った。試料から対象成分を抽出する方法は、通知試験法「LC/MS による農薬等の一斉試験法 I (畜水産物)」を参考に構築した。当該試験法では、試料(筋肉、脂肪および肝臓等)に水を加えホモジナイズしたのち、アセトン及び n-ヘキサンの混液を加えホモジナイズ抽出し、遠心分離した後、上層の有機層を採り、下層及び残留物を再度、n-ヘキサンの抽出し、有機層を合わせたものを抽出液とする方法である。

この方法を採用することで、疎水性の高いシラフルオフエンを有機層へ容易に回収し、また高極性のマトリックスを下層へ分離、除去できるものと考えた。

なお、採取量及び溶媒量は、半分のスケールにすることを基本とした。すなわち試料 10 g に水 10 mL を加えホモジナイズした後、アセトン及び n-ヘキサン(1:2)混液 50 mL で 1 回目の抽出を行った。抽出操作では、高速ホモジナイザーを使用した。ホモジナイズ後、遠心分離(3,000 回転/分、5 分間)を実施し、上層の有機層を分取した。下層及び残留物については、n-ヘキサン 30 mL を使用し、1 回目の抽出と同様に操作し、上層を先の有機層と合わせ、n-ヘキサンの抽出液とした。

前処理の抽出率の評価として、シラフルオフエン 10 µg を添加した水 10 g を疑似試料とし、上述の操作に従

い 100 mL の抽出液を調製した。この 10 mL を溶媒除去した後、アセトニトリル 1 mL に再溶解したものを LC-MS/MS で測定した。表1に示した結果のとおり、十分な回収率が得られることを確認できた。

表1 抽出方法の評価（溶媒ベース n=3）

	1	2	3	Ave.	RSD(%)
回収率(%)	98	101	96	98	2.6

模擬試料:水 添加量:10 µg (試料濃度として1 mg/kg)

一方、上述の抽出操作を試料に適用したところ、牛乳では有機層がコロイド状に白濁する現象がみられた。なお、水を加えホモジナイズする操作を省略したところ、この現象は生じなかった。また、牛乳及び鶏卵では、もともと試料中の含水量が十分なため、遠心分離後の上層と下層の分離は良好であった。

以上より、牛乳及び鶏卵については、水を添加しないで抽出することとした。

各試料を用い、上述の抽出操作における回収率を検証した。標準溶液を添加し 30 分放置した後、抽出操作を行い、得られた抽出液を分取し、溶媒を除去したのち、残留物をアセトニトリルに溶かした。なお、LC-MS/MS 測定にてマトリックスによる支障を受けないよう、試料には高濃度となるよう標準溶液を添加した。作製した各試料の抽出液を適宜希釈し LC-MS/MS 測定を実施した。表2に示した結果のとおり、試料でも良好な抽出操作が可能であると判断した。

表2 抽出方法の評価（試料で実施 n=1）

	牛の筋肉	牛の脂肪	牛の肝臓	牛乳	鶏卵	しじみ	うなぎ
回収率(%)	95	95	95	98	102	91	91

添加量:200 µg (試料濃度として20 mg/kg)

なお、以降の作業性やマトリックスの絶対量を考慮し、抽出操作にて作成した抽出液 100 mL から正確に 10 mL (試料 1 g 相当) を分取することとした。分取した抽出液の溶媒を除去し、*n*-ヘキサンで 10 mL としたものを以降の脱脂操作に使用した。

(2) 脱脂方法の検討

脱脂方法として、アセトニトリル/ヘキサン分配の適用を試みた。一般的に、*n*-ヘキサン及びアセトニトリル各 30 mL で操作するが、上述の 2.(1) のとおり、抽出液 100 mL から 10 mL 分取とし、試料量を 1 g 相当に減じていることから、脱脂のための *n*-ヘキサンの量は 10 mL とした。

一方で、シラフルオフェンは、疎水性の極めて高い物質のため、アセトニトリルへ分配されにくいことが予想される。そのため、分配状況を確認するにあたり *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル量は 10 mL を基本とし、さらに 15 mL 及び 20 mL での分配も実施し、*n*-ヘキサン量に対する比率を上げて検証を行った。

n-ヘキサン 10 mL に標準を添加し、3 回ずつ分配操作を行い、それぞれ分取及び濃縮を行い 100 mL に定容したものを LC-MS/MS で測定した。

結果を表3に示した。いずれのアセトニトリル量でも 3 回の分配で、定量的に回収できるものの、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 10 mL での分配では、3 回目においても 7.4%~8.6% の回収が認められた。*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 20 mL とした場合、2 回の抽出で定量的に回収できることが判った。

表3 アセトニトリル/ヘキサン分配の抽出率の評価

		<i>n</i> -ヘキサン飽和アセトニトリル量								
		10 mL			15 mL			20 mL		
試行数 (n)		1	2	3	1	2	3	1	2	3
回収率 (%)	1回目	70	72	71	82	82	81	86	87	88
	2回目	24	24	24	22	20	21	16	16	16
	3回目	8.6	7.4	8.5	4.1	3.9	4.8	1.5	1.8	1.9
	合計	103	103	104	108	111	107	104	105	106
	Ave.	103			109			105		
RSD (%)		0.6			1.9			1.0		

添加量: 10 µg

溶媒: *n*-ヘキサン 10 mL に標準溶液を添加し、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリルで抽出を行った。

しかし、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 20 mL での抽出を繰り返すことで、ヘキサン層が分配後に減少することが確認された。さらに、試料を用いて操作を行ったところ、余剰の脂溶性マトリックスの抽出量も増加したことから、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 20 mL で 2 回抽出したのち、3 回目の抽出を 10 mL で行うこととした。

上述の操作を試料に適用し、回収率の検証を行った。その結果、表4に示したとおり、全ての試料で 3 回の抽出操作にて良好な回収率が得られること、かつ *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 20 mL による 2 回の抽出操作によって定量的な回収が得られることも確認できた。

表4 アセトニトリル/ヘキサン分配 (試料抽出液で実施 n=1)

抽出条件	牛の筋肉	牛の脂肪	牛の肝臓	牛乳	鶏卵	しじみ	うなぎ
	回収率 (%)						
2回抽出	97	96	104	103	106	103	103
3回抽出	96	99	104	100	107	101	97

添加量: 10 µg

2 回抽出: *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 20 mL で 2 回抽出

3 回抽出: *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 20 mL で 2 回抽出したのち、さらに *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 10 mL で抽出

(3) 精製方法の検討

脱脂操作により得られた抽出液の溶媒を除去したところ、牛乳では粘性のある透明な残留物、鶏卵では淡黄色の色素、さらに、しじみでは緑色の残留物が確認された。高級脂肪酸、色素といった極性を有する官能基を持つ疎水性化合物の除去を目的とし、エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラム (PSA: 500 mg) を用いた精製の適用を検討した。

シラフルオフェンは、分子構造上、極性は非常に低いため、使用する溶媒の極性を極力下げ、極性を有する官能基を持つ化合物をなるべくカラムに保持させたまま、回収する方法が有用であると考えた。

種々の溶媒を検討した結果、シラフルオフェンは、カラムにほとんど保持はせず、低極性溶媒の *n*-ヘキサンのみで回収できることが判った。

以上より、アセトニトリル/ヘキサン分配後の試料液を溶媒除去した後、*n*-ヘキサン 5 mL に再溶解することとした。なお、ミニカラムは、あらかじめ *n*-ヘキサン 10 mL で洗浄し使用することとした。

保持及び溶出の挙動把握のため、標準溶液を添加した *n*-ヘキサン 5 mL をカラムに注入し溶出液を採取した(画分①)。次いで、*n*-ヘキサン 5 mL をカラムに注入し、溶出液を採取した(画分②)。さらに *n*-ヘキサン 5 mL をカラムに注入し、溶出液を採取した(画分③)。各画分を溶媒除去し、アセトニトリルに溶解し LC-MS/MS

で測定した。

表5に示した結果のとおり、*n*-ヘキサンのみで容易に回収できることが確認できた。画分①及び画分②を採取することで、96%~102%の回収率が得られた。

なお、あらかじめ試料を用い、マトリックスのカラムへの保持及び流出の挙動を確認したところ、画分③にあたる *n*-ヘキサンの注入を行っても、カラム上端に保持されたマトリックスのバンドの大幅な流出は見受けられなかった。

以上の結果より、試料において確実な回収と操作の再現性の観点から、画分①から③、すなわち、試料溶液 5 mL をカラムに注入後、さらに *n*-ヘキサン 10 mL をカラムに注入し、得られた全溶出液を採取することとした。採取した溶出液を濃縮し、溶媒を除去しアセトニトリルで正確に 5 mL としたものを LC-MS/MS の試験溶液とした。

表5 PSAミニカラム精製の検討（溶媒ベース n=3）

試行数(n)		1	2	3	Ave.	RSD (%)
画分① 試料溶液5 mL 注入後の流出液	回収率 (%)	94	95	100	96	3.3
画分② <i>n</i> -ヘキサン5 mL注入		2.2	2.9	1.7	2.3	26.6
画分③ さらに <i>n</i> -ヘキサン 5 mL注入		N.D.	N.D.	N.D.	***	***
合計		96	98	102	99	3.1

添加量: 1 µg (試験溶液として100 µg/L)

N.D.・・・Not Detected (LOD 1 µg/L、回収率<1%)

各試料におけるカラム精製の評価を実施した。すなわち、各試料について、7. 試験溶液の調製に従い脱脂操作を行った溶液の残留物に標準溶液を添加し、溶媒を除去したのち、*n*-ヘキサン 5 mL を加えた溶液をカラムに注入した。さらに、*n*-ヘキサン 10 mL をカラムに注入し、試料液注入からの全溶出液を採取した。溶出液を溶媒除去し、アセトニトリルで正確に 5 mL に定容し、LC-MS/MS 測定を行った。

上述した鶏卵、しじみの色素は、カラム内に残存し除去されていることを目視で確認することができた。高級脂肪酸の除去に関しては、牛乳を用い GC-MS スキャン測定を行った結果、除去されていることを確認することができた。カラム精製前と精製後の溶液の測定クロマトグラムを図 8 に示す。

以上より、PSA ミニカラム精製において、極性の低い *n*-ヘキサンのみを使用することで、極性を有する官能基を持つ疎水性化合物をカラム内に残存させることが可能であり、精製操作として有用であることを確認できた。

なお、精製後の溶出液の溶媒除去後の残留物は、アセトニトリルで容易に溶解した。また、懸濁及び沈殿物のない試験溶液を得ることができた。各試料の回収率の結果を表6に示す。各試料で、良好な回収率が得られた。また、マトリックスによる定量及び定性への支障も認められなかった。以上より、PSA ミニカラムを使用した本操作を精製操作として、適用することとした。

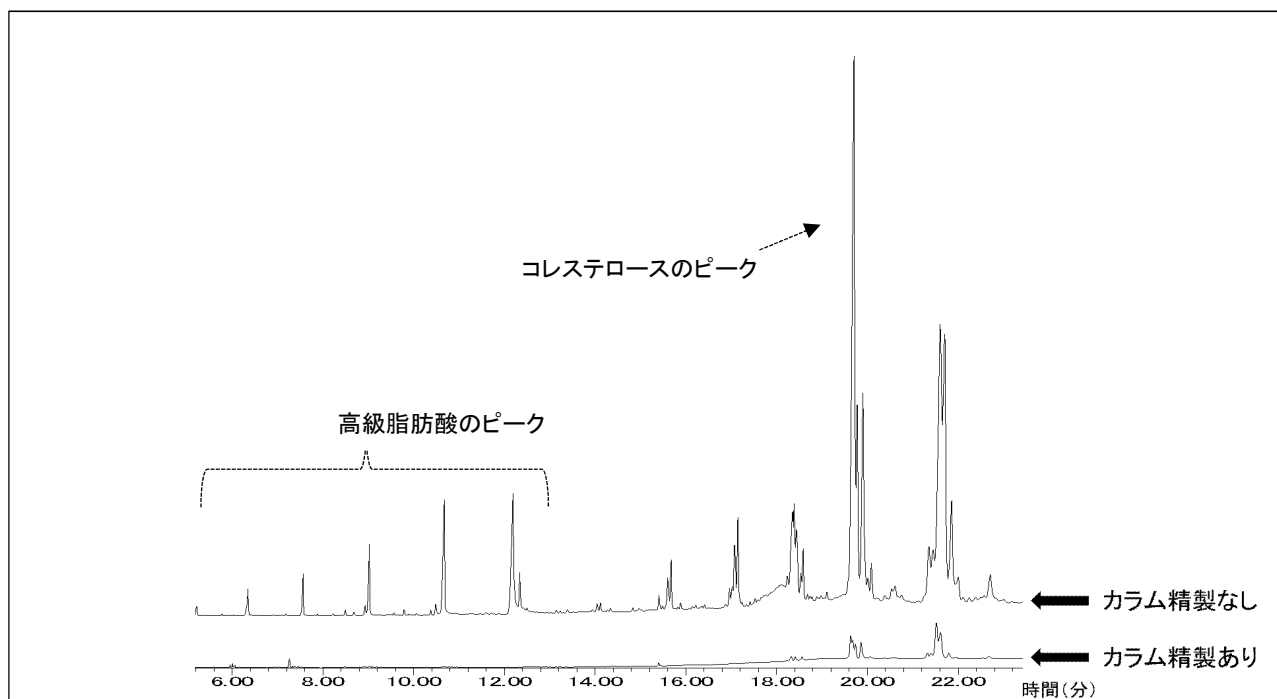


図 8. PSA ミニカラムによる脂肪酸除去の確認(試料:牛乳)

(GC-MS Scan 測定 TIC クロマトグラム)

【GC-MS 測定条件】

カラム:HP5-MS(長さ 30 m、内径 0.25 mm、膜厚 0.25 μm)

カラムオープン:50 °C(1 min)-25 °C/min、175 °C、10 °C/min、300 °C(5 min)

注入口:250 °C キャリアガス:ヘリウム 流量:1.6 mL/min(定流量モード)

注入量:2 μL (スプリットレス) イオン化法: EI 法 スキャン範囲:50-550 Amu

(シラフルオフェン保持時間:15.0 min)

表6 PSAカラム精製の検討(試料で実施 n=1)

	牛の筋肉	牛の脂肪	牛の肝臓	牛乳	鶏卵	しじみ	うなぎ
回収率(%)	107	107	97	101	96	106	102

添加量:0.5 μg

3. 添加回収試験

畜水産物 7 食品(牛の筋肉・脂肪・肝臓・乳、鶏の卵、うなぎ、しじみ)を用いて[実験方法]6. 添加試料の作成及び 7. 試験溶液の調製に従いシラフルオフェンの添加回収試験を実施した。濃度は、定量限界 0.01 mg/kg 及び各食品の基準値濃度で、それぞれ 5 回の併行実施で行った。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～図21に示した。また、各食品等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22に示した。

1) 選択性の評価

マトリックス試料を用いたスパイク試験による選択性の評価を行った。結果を表7に示した。対象食品の全てにおいて選択性の目標値を満たしていた。ブランクのマトリックス試料にて、測定機器におけるキャリーオーバーあるいはメモリーと考えられるピークがわずかに見られたが、いずれも基準値及び定量限界相当のピークの 1/10 以下であり、定量及び定性への支障は認められなかった。以上のことから、選択性に問題はないものと判断した。

表7 選択性の評価

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (mg/kg)	基準値 (ppm)	妨害ピークの許容範囲の評価		ピーク面積 (高さ) ¹⁾							選択性の評価 ³⁾	備考		
					評価濃度 (ppm)	評価基準	面積又は高さの別	ブランク			マトリックス添加標準溶液 ²⁾					面積(高さ)比 (a)/(b)	
								n=1	n=2	平均 (a)	n=1	n=2	平均 (b)				
1	シラフルオフェン	牛の筋肉	0.01		定量限界	0.01	< 0.333	面積	376	272	324	24808	25454	25131	0.013	○	
		牛の脂肪	0.01		定量限界	0.01	< 0.333	面積	182	136	159	24558	24927	24743	0.006	○	
		牛の肝臓	0.01		定量限界	0.01	< 0.333	面積	365	439	402	22542	22622	22582	0.018	○	
		牛乳	0.01		定量限界	0.01	< 0.333	面積	492	190	341	24863	23719	24291	0.014	○	
		鶏卵	0.01		定量限界	0.01	< 0.333	面積	270	192	231	24629	24506	24568	0.009	○	
		しじみ	0.01		定量限界	0.01	< 0.333	面積	402	322	362	23589	23829	23709	0.016	○	
		うなぎ	0.01		定量限界	0.01	< 0.333	面積	508	571	540	25145	24432	24789	0.022	○	
		牛の筋肉	0.01	1	基準値	1	< 0.100	面積	238	266	252	228230	213639	220935	0.001	○	10倍希釈して測定
		牛の脂肪	0.01	10	基準値	10	< 0.100	面積	296	167	232	225632	228435	227034	0.001	○	100倍希釈して測定
		牛の肝臓	0.01	2	基準値	2	< 0.100	面積	170	212	191	227187	220095	223641	0.001	○	20倍希釈して測定
		牛乳	0.01	2	基準値	2	< 0.100	面積	223	232	228	197150	235380	216265	0.001	○	20倍希釈して測定
		鶏卵	0.01	1	基準値	1	< 0.100	面積	203	179	191	249638	248148	248893	0.001	○	10倍希釈して測定
		しじみ	0.01	0.4	基準値	0.4	< 0.100	面積	389	231	310	197043	225644	211344	0.001	○	4倍希釈して測定
		うなぎ	0.01	0.4	基準値	0.4	< 0.100	面積	207	215	211	235363	239890	237627	0.001	○	4倍希釈して測定

*1 ブランク試料、標準溶液の順に注入して測定した結果から評価した。
 *2 試料中の濃度が「評価濃度」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)を用いた。
 *3 面積(高さ)比が、妨害ピークの許容範囲の評価基準に適合する場合には「○」を記載した。

2) 真度、精度及び定量限界

定量限界及び基準値濃度での真度及び併行精度を表8に示した。定量限界濃度では真度 91.9~103.1%、併行精度 2.8~9.6%、基準値濃度では真度 93.0~96.6%、併行精度 1.2~5.7%と良好な結果が得られ、妥当性評価ガイドラインの真度及び精度の目標値を満たした。また、定量限界濃度の添加試料から得られたピークの S/N は最小でも 213 であり、S/N ≥ 10 を満たしていた。

表8 真度、精度及び定量限界

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (mg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	定量限界の評価 ¹⁾	検量線			回収率(%)					真度 (%)	併行精度 (RSD%)	S/N ²⁾			備考	
							傾き	切片	r ² 値	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5			Max.	Min.	平均値		
1	シラフルオフェン	牛の筋肉	0.01	1	0.01	S/N	1382	-158	0.9977	103.9	94.7	97.8	81.0	92.5	94.0	9.0	235.3	243.9	249.6		
		牛の脂肪	0.01	10	0.01	S/N	13725	-414	0.9987	96.0	98.6	91.6	96.2	97.9	96.1	2.8	244.3	221.4	232.9		
		牛の肝臓	0.01	2	0.01	S/N	13798	-297	0.9991	99.2	92.0	98.1	85.9	85.0	92.0	7.2	234.2	213.2	223.7		
		牛乳	0.01	2	0.01	S/N	13638	-211	0.9990	107.0	99.5	98.6	105.5	104.7	103.1	3.7	303.2	287.3	295.2		
		鶏卵	0.01	1	0.01	S/N	14094	-488	0.9984	83.0	99.5	97.5	97.8	81.6	91.9	9.6	265.6	244.9	255.2		
		しじみ	0.01	0.4	0.01	S/N	15090	-597	0.9981	103.0	95.8	97.2	95.3	101.7	98.6	3.6	342.1	310.0	328.1		
		うなぎ	0.01	0.4	0.01	S/N	14851	-318	0.9991	100.9	99.0	103.3	94.3	97.1	98.9	3.5	270.0	243.9	257.0		
		牛の筋肉	0.01	1	1	--	18045	-3019	0.9997	101.9	96.7	92.2	96.0	95.9	96.5	3.6				--	10倍希釈して測定
		牛の脂肪	0.01	10	10	--	18111	-2960	0.9998	98.3	96.6	98.3	99.2	90.4	96.6	3.7				--	100倍希釈して測定
		牛の肝臓	0.01	2	2	--	18878	-2820	0.9998	97.4	96.4	90.6	92.7	92.5	93.9	3.0				--	20倍希釈して測定
		牛乳	0.01	2	2	--	16488	-1911	0.9997	97.4	97.2	95.7	94.8	95.1	96.0	1.2				--	20倍希釈して測定
		鶏卵	0.01	1	1	--	16488	-1911	0.9997	97.8	90.7	96.5	90.5	89.3	93.0	4.2				--	10倍希釈して測定
		しじみ	0.01	0.4	0.4	--	18239	-2005	0.9998	93.6	96.6	93.0	97.0	96.4	96.7	2.5				--	4倍希釈して測定
		うなぎ	0.01	0.4	0.4	--	18166	-1523	0.9998	97.0	98.2	93.1	84.7	95.4	93.7	5.7				--	4倍希釈して測定

*1 定量限界の評価においては、S/Nを求めた。
 *2 得られた回収率の中で最大値を与えるピーク(Max.)及び最小値を与えるピーク(Min.)のそれぞれのS/Nを求めた。

3) 試料マトリックスの測定への影響

試料マトリックスの測定への影響について検討した結果を表9に示した。添加回収試験における回収率 100%相当濃度と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。その結果、ピーク面積比は、0.94~1.06 であり、定量への支障は認められなかった。

表9 試料マトリックスの測定への影響

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (mg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	標準溶液 濃度 ¹⁾ (mg/L)	ピーク面積(高さ) ²⁾						備考			
							面積又は 高さの別	ブランク ³⁾	マトリックス添加標準溶液 ⁴⁾			溶媒標準溶液				
									n=1	n=2	平均	n=1		n=2	平均	
1	シラフルオフェン	牛の筋肉	0.01	1	0.01	0.002	面積	324	25436	26614	25701	24808	25454	25131	1.02	
		牛の脂肪	0.01	10	0.01	0.002	面積	159	24641	24912	24618	24558	24927	24743	0.99	
		牛の肝臓	0.01	2	0.01	0.002	面積	402	22758	23123	22539	22542	22622	22582	1.00	
		牛乳	0.01	2	0.01	0.002	面積	341	25016	21417	22876	24863	23719	24291	0.94	
		鶏卵	0.01	1	0.01	0.002	面積	231	24898	24734	24585	24629	24506	24568	1.00	
		しじみ	0.01	0.4	0.01	0.002	面積	362	26751	24470	25249	23589	23829	23709	1.06	
		うなぎ	0.01	0.4	0.01	0.002	面積	540	26300	22631	23926	25145	24432	24789	0.97	
		牛の筋肉	0.01	1	1	0.02	面積	252	228230	213639	220683	217820	215937	216879	1.02	10倍希釈して測定
		牛の脂肪	0.01	10	10	0.02	面積	232	225632	228435	226802	215786	214873	215330	1.05	100倍希釈して測定
		牛の肝臓	0.01	2	2	0.02	面積	191	227187	220095	223450	215685	217149	216417	1.03	20倍希釈して測定
		牛乳	0.01	2	2	0.02	面積	228	197150	235380	216038	216687	235732	226210	0.96	20倍希釈して測定
		鶏卵	0.01	1	1	0.02	面積	191	249638	248148	248702	242744	235964	239354	1.04	10倍希釈して測定
		しじみ	0.01	0.4	0.4	0.02	面積	310	197043	225644	211034	216107	215711	215909	0.98	4倍希釈して測定
		うなぎ	0.01	0.4	0.4	0.02	面積	211	235363	239890	237416	232359	232247	232303	1.02	4倍希釈して測定

*1 添加回収試験における回収率100%相当濃度になるように、ブランク試料の試験溶液で調製した標準溶液(マトリックス添加標準溶液)及び溶媒で調製した標準溶液(溶媒標準溶液)を作成した。

*2 マトリックス添加標準溶液及び溶媒標準溶液の間に交互に2回以上測定した結果から評価した。

*3 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た。

*4 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した。

*5 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)の比を求めた。

4. その他の試験法検討に関連する事項

LC-MS/MS 条件の設定において、検討当初、アンモニウムイオン付加分子が全く検出しなかった。使用した機器のESIソースは、イオン化部のスプレー拡散の防止のため、別に高温ガスを噴霧しスプレーを収束する機構を有しており、付加分子の熱分解が疑われた。イオン化部の各種温度パラメータを低く設定することで、感度良く検出することができたが、さらに安定的なアンモニウム付加分子の形成を目的とし移動相には、やや高濃度の酢酸アンモニウム(20 mmol/L)を使用した。使用する機器のイオンソースの仕様によっては、酢酸アンモニウム塩の濃度を下げることが可能(例えば5 mmol/L)であると考えられる。

脱脂操作については、操作の簡便な多孔性ケイソウ土カートリッジの適用も試みたが、試料液負荷後、シラフルオフェンの溶出に多量の溶媒が必要であったこと、さらに脂溶性の高いマトリックスも多く溶出されたことから、適用を断念した。

5. 考察

対象成分のシラフルオフェンが分子構造上、極性が極めて低いことに着目し、抽出方法、脱脂方法、及び精製方法を検討した。

開発した方法を用いて、牛の筋肉等、畜水産物 7 食品の添加回収試験を行った結果、真度及び併行精度について、ともに良好な結果が得られた。このことから本法は、検討で適用した畜水産物 7 食品に適用可能であると判断できた。

【結論】

シラフルオフェンを試料からアセトン及び *n*-ヘキサンの混液で抽出した後、再度 *n*-ヘキサンで抽出し、得られた抽出液を分取し、アセトニトリル/ヘキサン分配で脱脂した後、さらにエチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムで精製し、LC-MS/MS で定量及び確認する方法を開発した。

本法を、牛の筋肉・脂肪・肝臓・乳、鶏卵、しじみ及びうなぎの7食品に適用した結果、定量限界で真度 91.9~103.1%、併行精度 2.8~9.6%、S/N \geq 10 の良好な結果が得られた。以上より、定量限界として0.01 mg/kg の設定が可能であった。さらに各食品の基準値で真度 93.0~96.6%、併行精度 1.2~5.7%であり、妥当性評価ガイドラインの真度及び精度の目標値を満たす試験法を構築することができた。

[参考文献]

- 1) 農薬評価書シラフルオフエン(食品安全委員会 2008 年 1 月)
- 2) 食品、添加物等の規格基準改正(厚生労働省医薬食品局食品安全部長平成 25 年 3 月 12 日食安発 0312 第 2 号)
- 3) 水産動植物の被害防止に係る農薬登録保留基準の設定に関する資料(環境省)
- 4) シラフルオフエン農薬抄録(独立行政法人農林水産消費安全技術センター)
- 5) 食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について(平成17年1月24日付け食安発第 0124001 号厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知)別添「LC/MS による農薬等の一斉試験法Ⅰ(畜水産物)」
- 6) 食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について(平成17年1月24日付け食安発第 0124001 号厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知)別添「LC/MS による農薬等の一斉試験法Ⅲ(畜水産物)」
- 7) 水質管理目標設定項目の検査方法(平成 15 年 10 月 10 日付健水発第 1010001 号)(厚生労働省医薬・生活衛生局水道課)
- 8) 食品、添加物等の規格基準(昭和 34 年厚生省告示第370号)に規定する試験法(告示試験法)「クマホス試験法」

[クロマトグラム報告例]
 添加回収試験における代表的なクロマトグラム

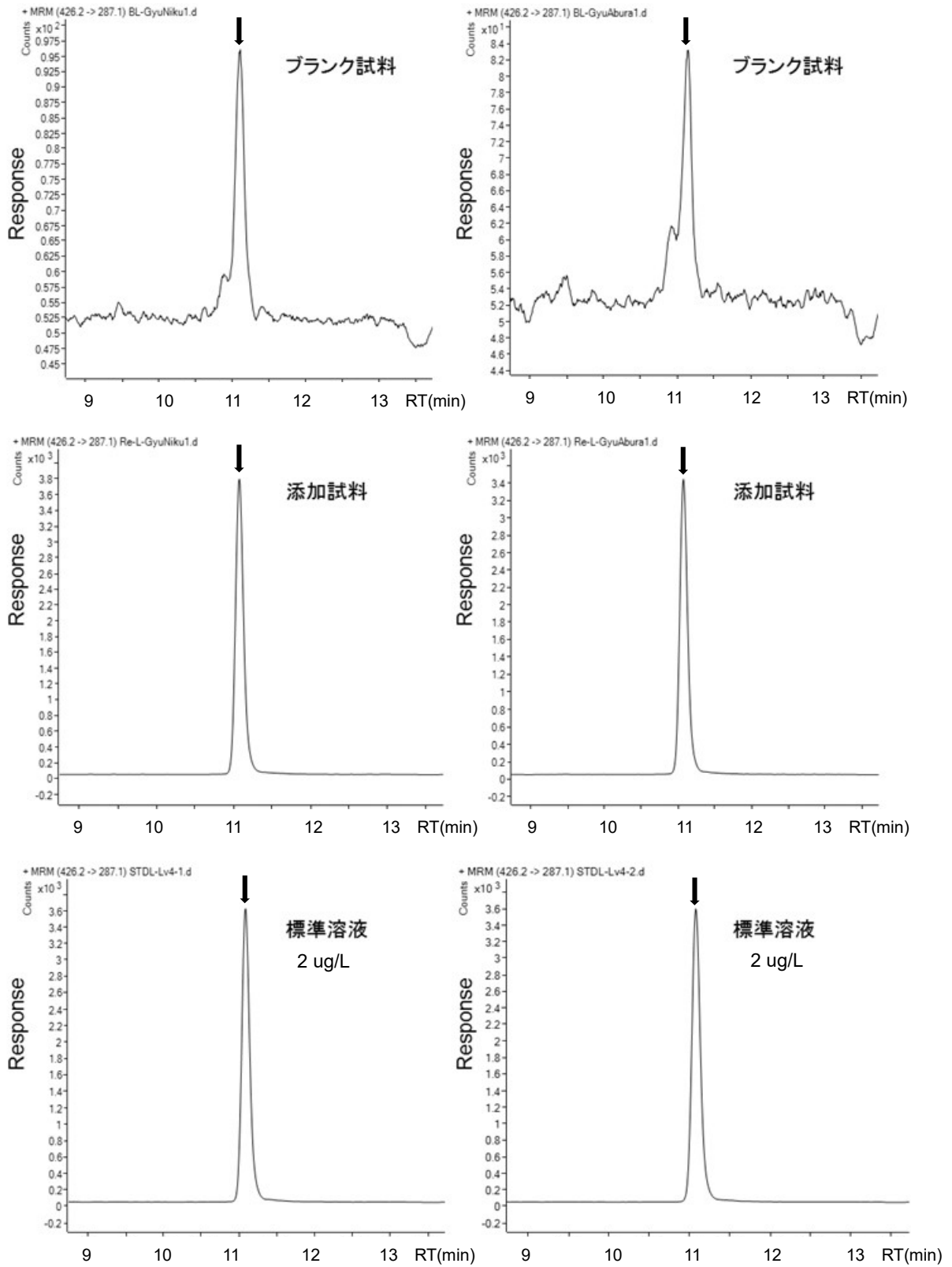


図8 牛の筋肉の SRM クロマトグラム
 (m/z 426.2→287.1)
 添加濃度 : 0.01 ppm

図9 牛の脂肪の SRM クロマトグラム
 (m/z 426.2→287.1)
 添加濃度 : 0.01 ppm

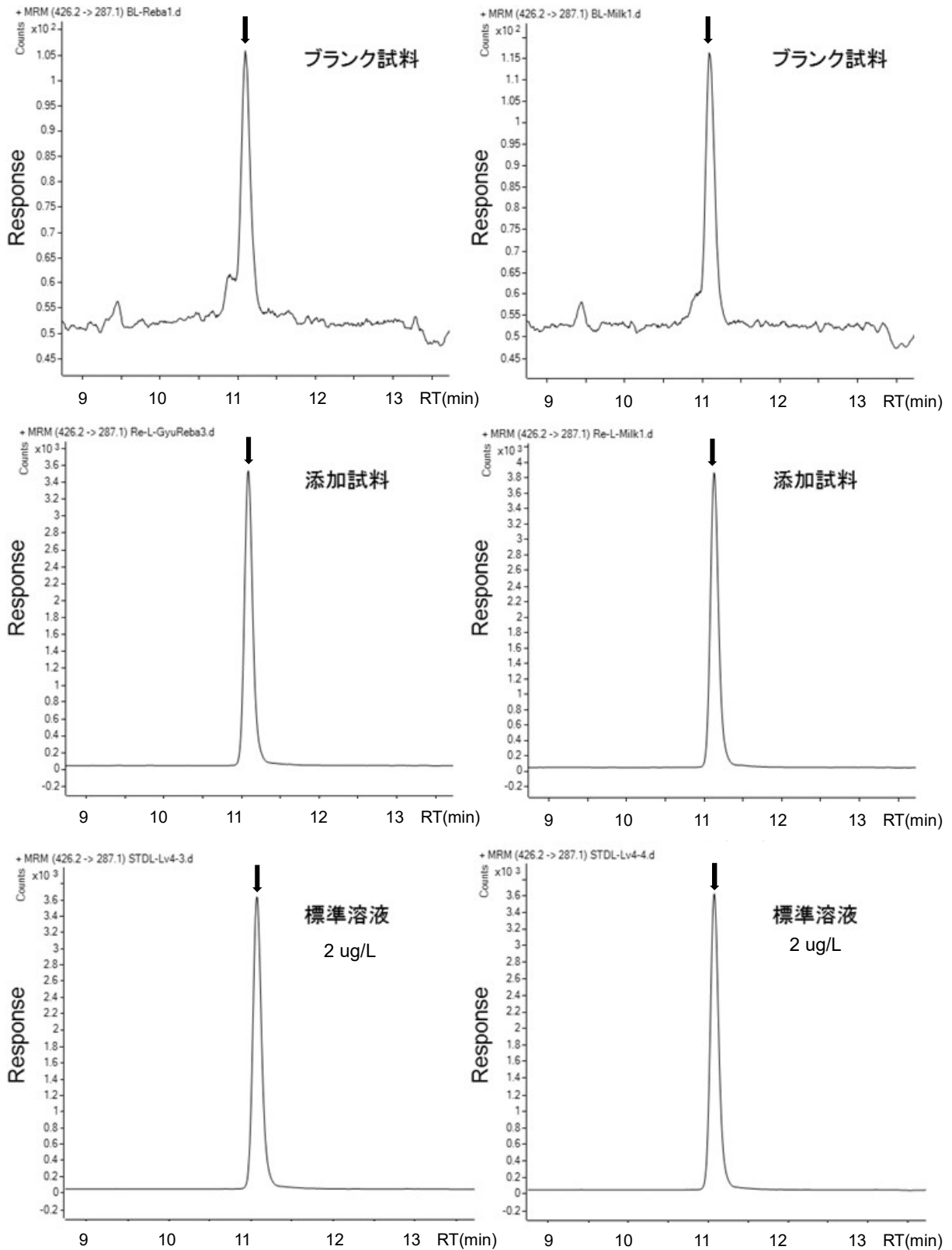


図10 牛の肝臓の SRM クロマトグラム
 (m/z 426.2→287.1)
 添加濃度:0.01 ppm

図11 牛乳の SRM クロマトグラム
 (m/z 426.2→287.1)
 添加濃度:0.01 ppm

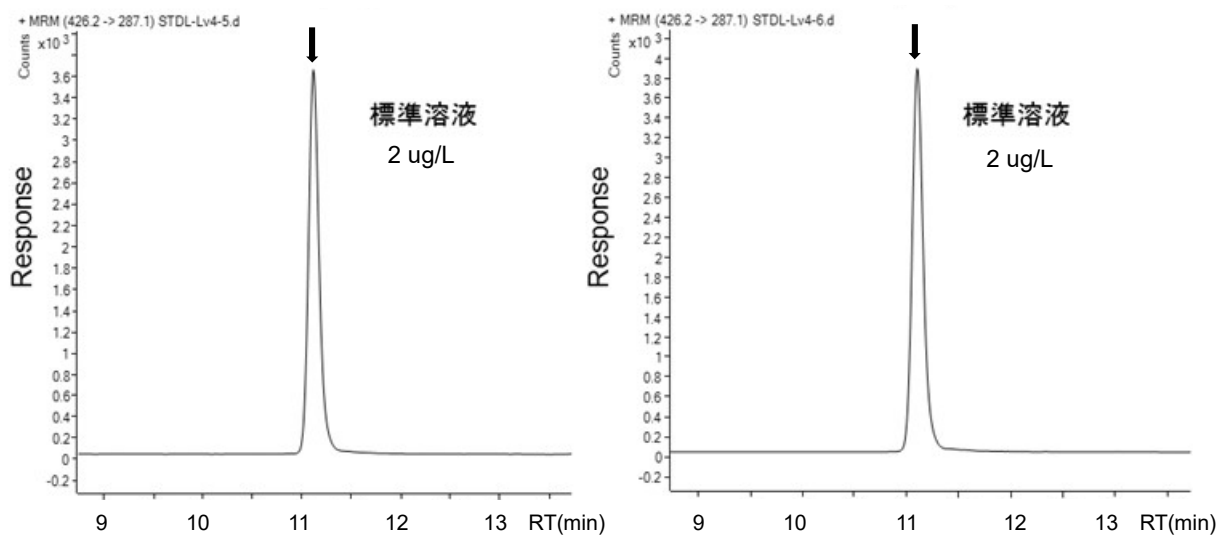
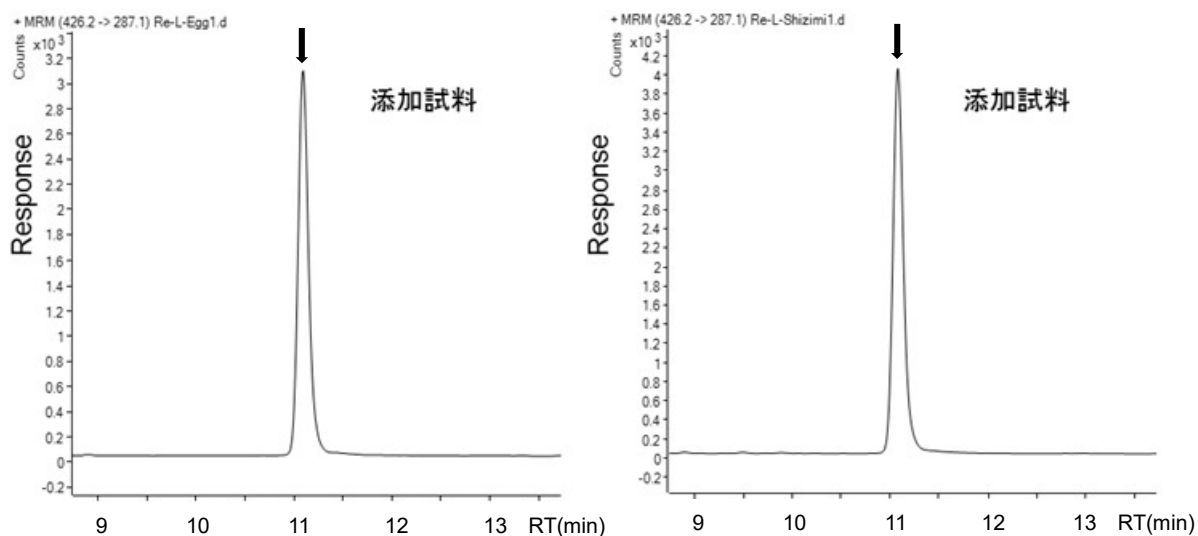
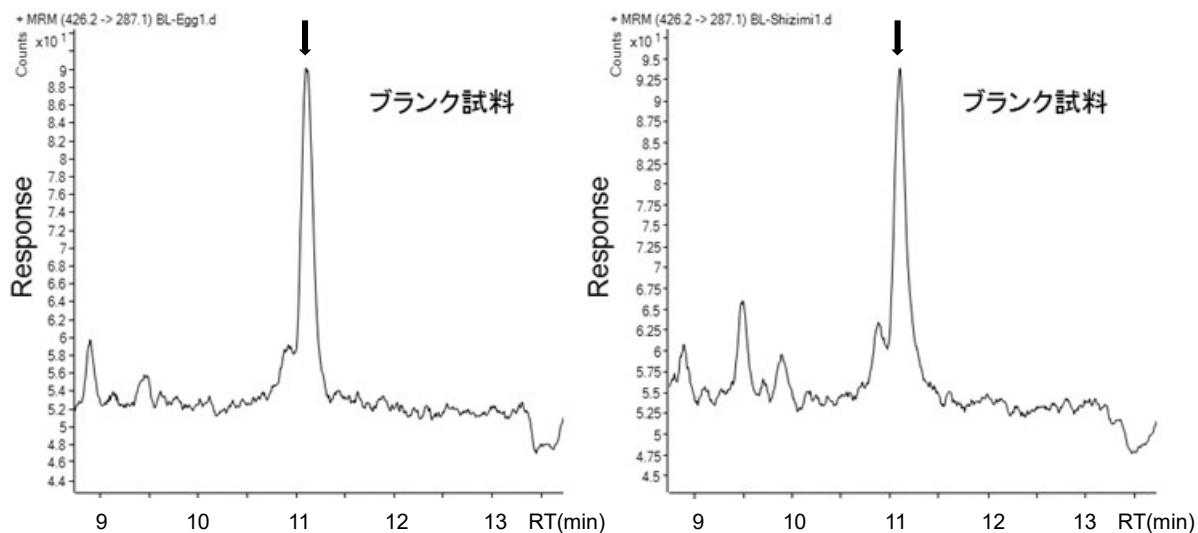


図 12 鶏卵の SRM クロマトグラム
(m/z 426.2→287.1)
添加濃度:0.01 ppm

図 13 しじみの SRM クロマトグラム
(m/z 426.2→287.1)
添加濃度:0.01 ppm

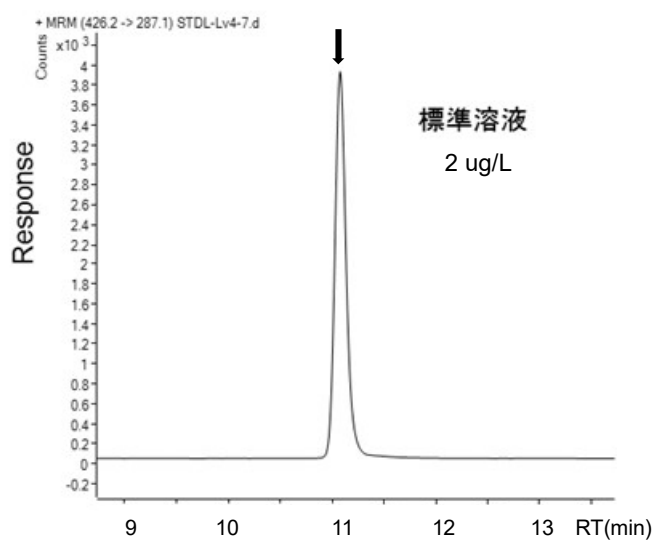
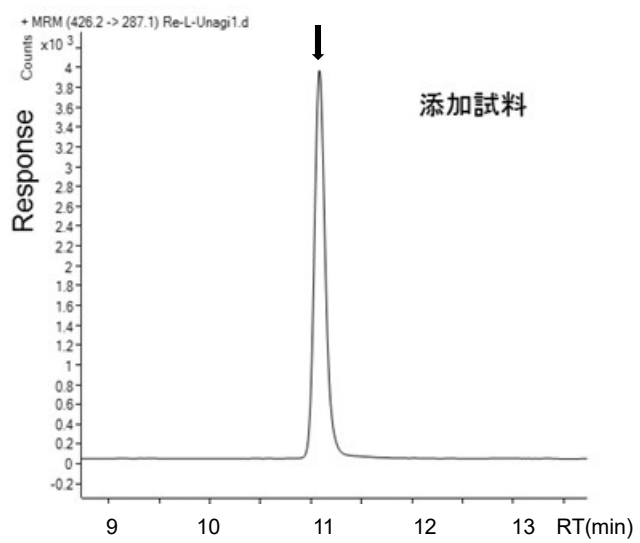
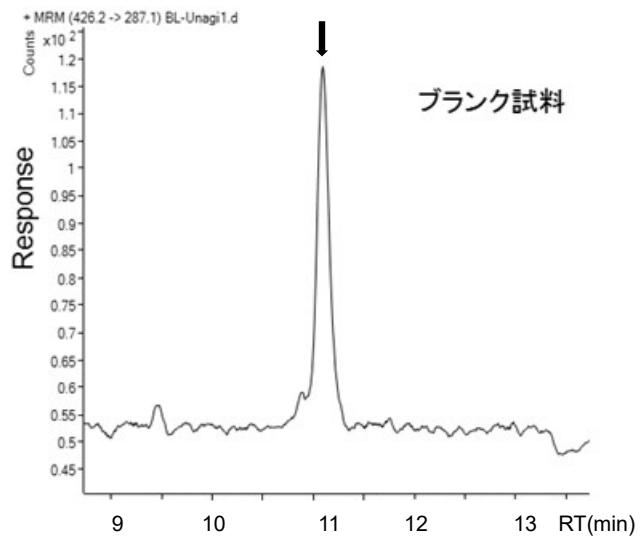


図 14 うなぎの SRM クロマトグラム
 (m/z 426.2→287.1)
 添加濃度:0.01 ppm

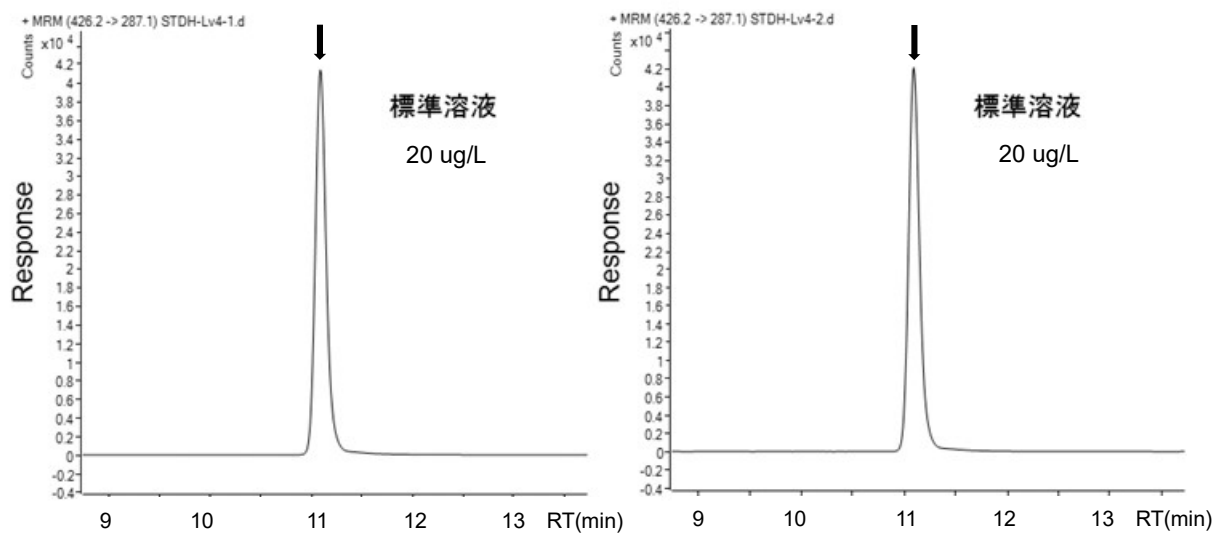
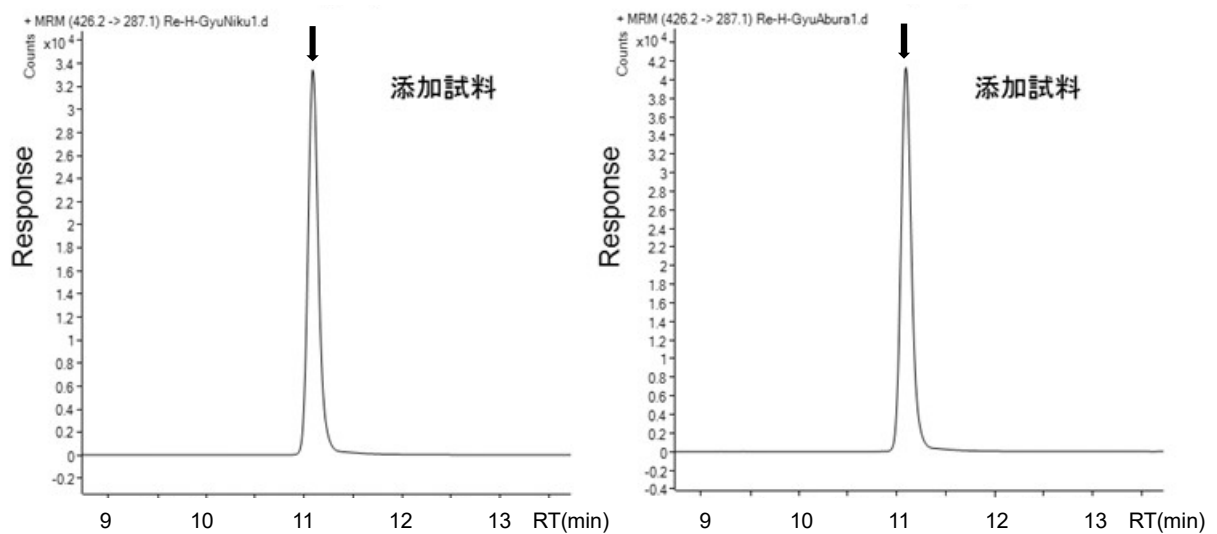
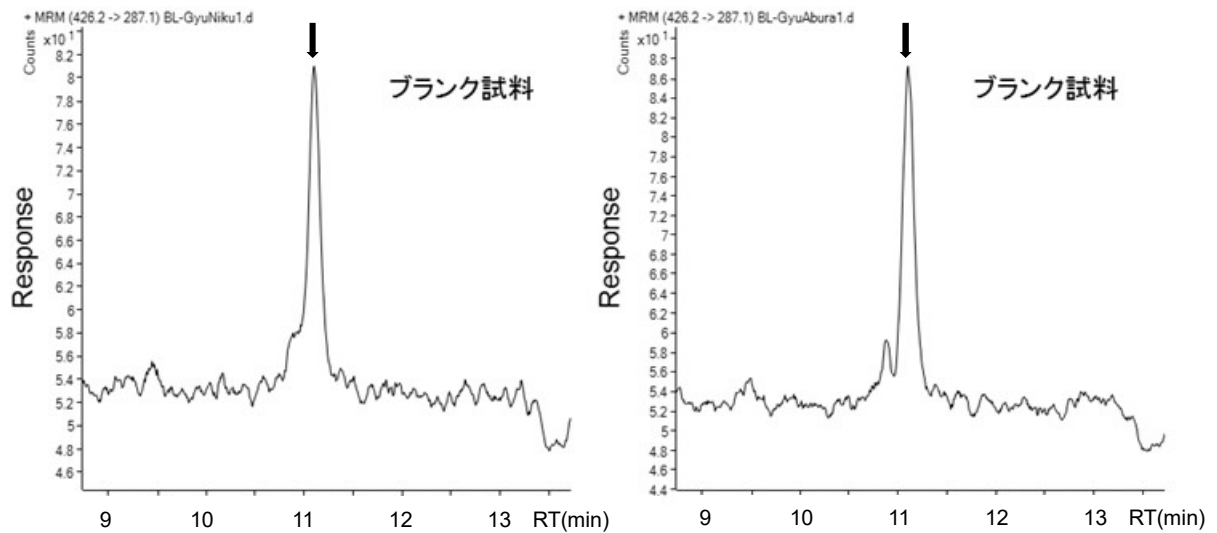


図15 牛の筋肉のSRMクロマトグラム
(m/z 426.2→287.1)
添加濃度: 1 ppm
(試験溶液10倍希釈にて測定)

図16 牛の脂肪のSRMクロマトグラム
(m/z 426.2→287.1)
添加濃度: 10 ppm
(試験溶液100倍希釈にて測定)

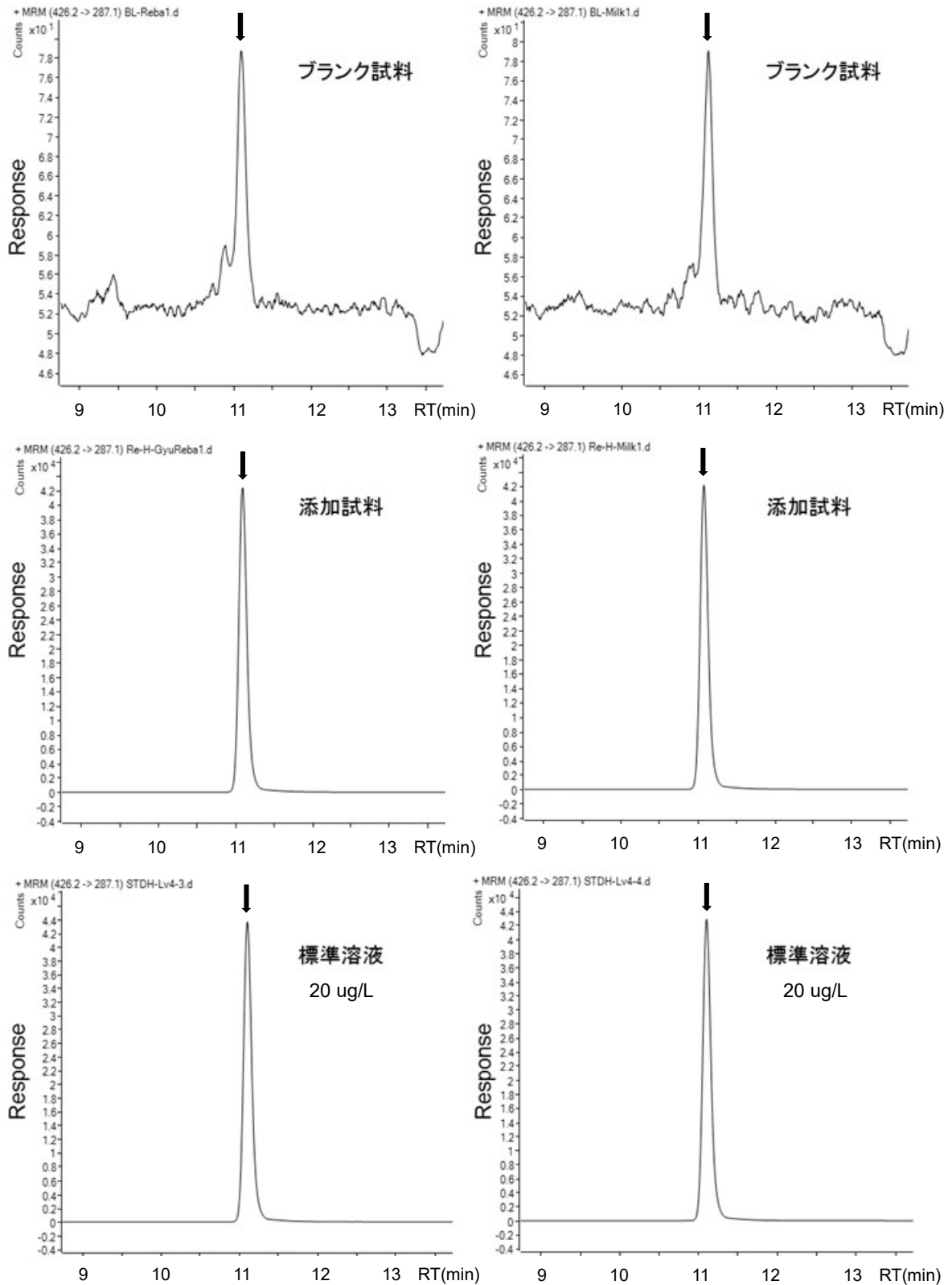


図 17 牛の肝臓の SRM クロマトグラム
 (m/z 426.2→287.1)
 添加濃度 : 2 ppm
 (試験溶液 20 倍希釈にて測定)

図 18 牛乳の SRM クロマトグラム
 (m/z 426.2→287.1)
 添加濃度 : 2 ppm
 (試験溶液 20 倍希釈にて測定)

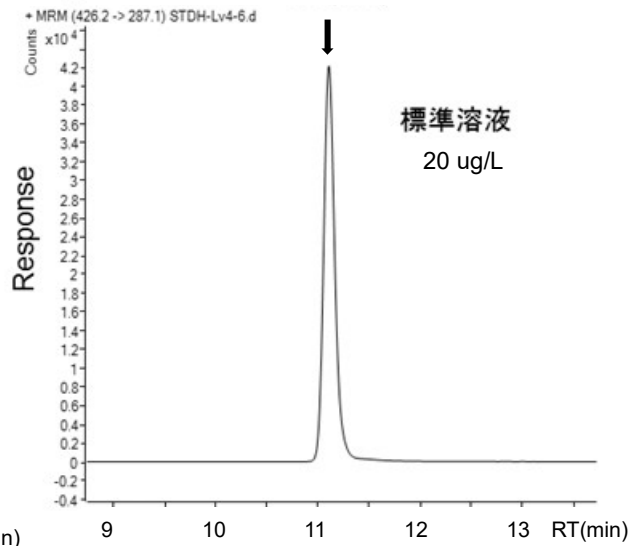
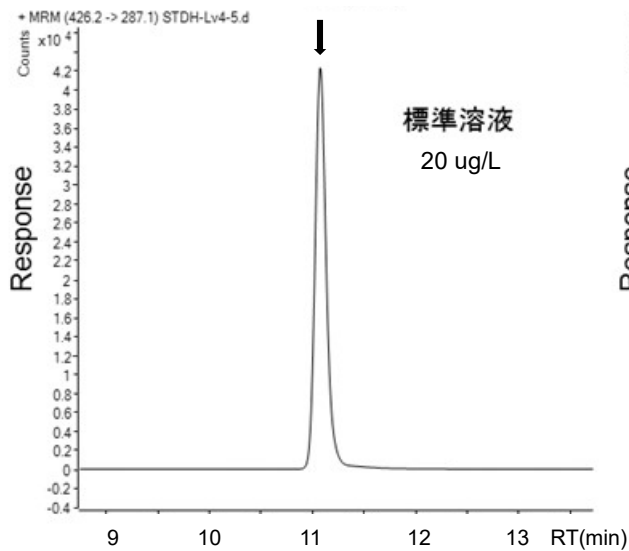
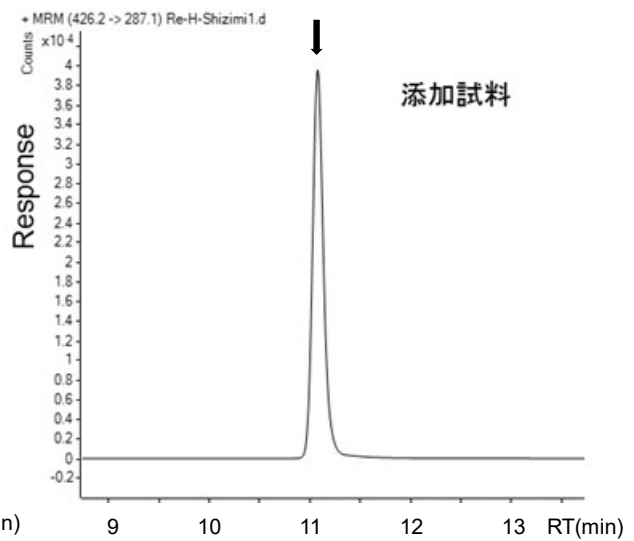
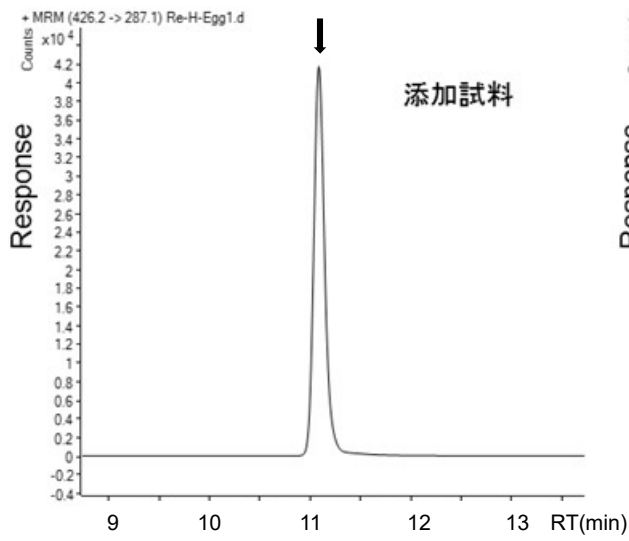
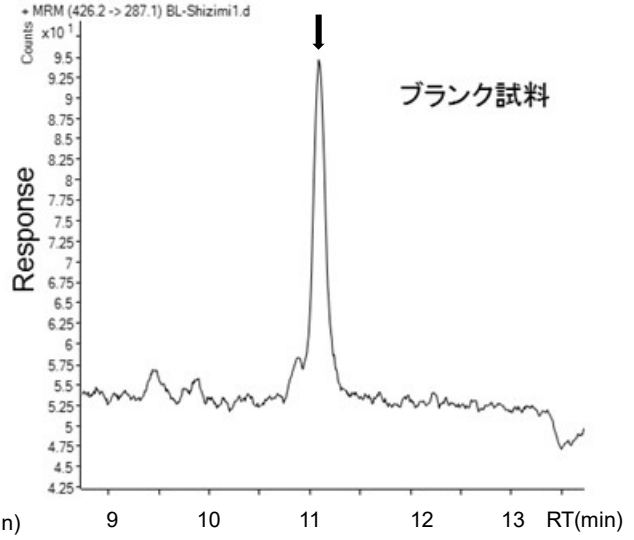
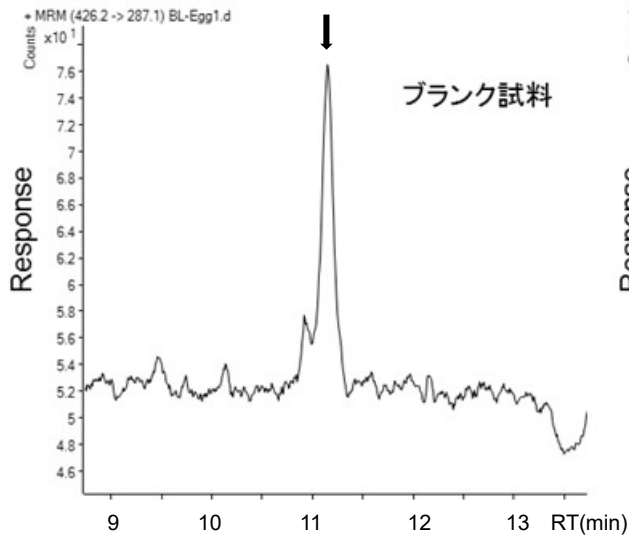


図 19 鶏卵の SRM クロマトグラム
 (m/z 426.2→287.1)
 添加濃度:1 ppm
 (試験溶液10倍希釈にて測定)

図 20 しじみの SRM クロマトグラム
 (m/z 426.2→287.1)
 添加濃度:0.4 ppm
 (試験溶液4倍希釈にて測定)

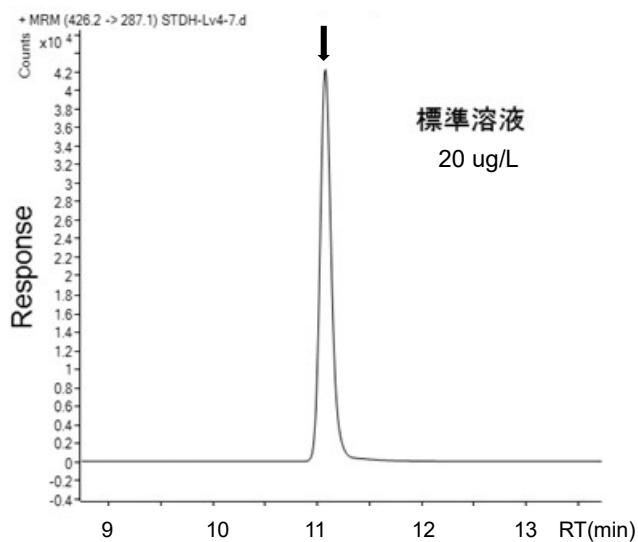
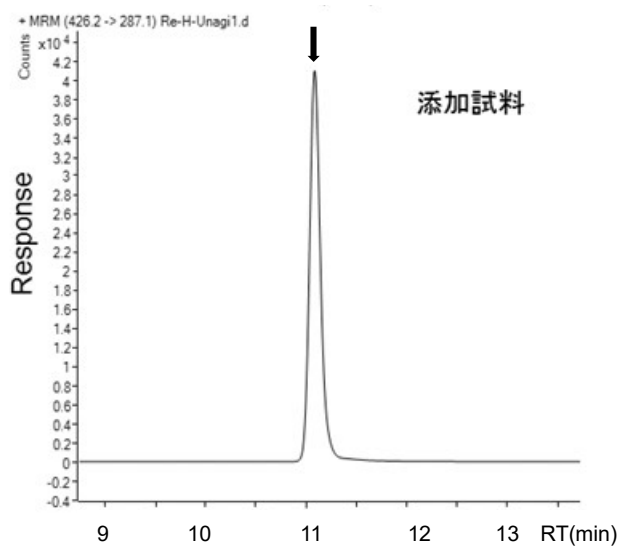
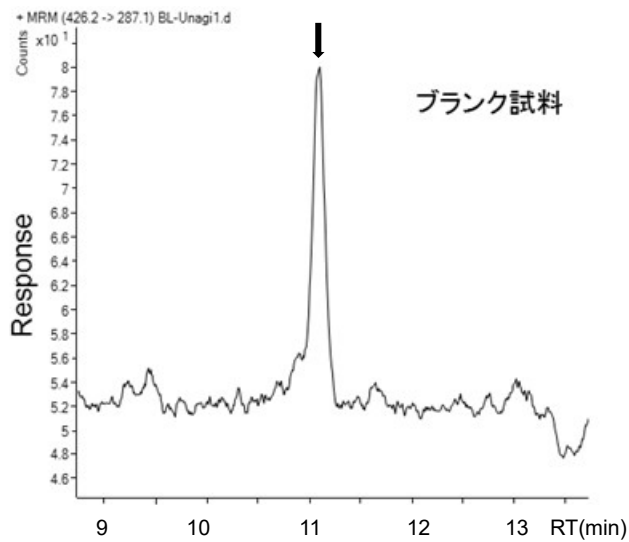


図 21 うなぎの SRM クロマトグラム
 (m/z 426.2→287.1)
 添加濃度:0.4 ppm
 (試験溶液4倍希釈にて測定)

ブランク試料の代表的なトータルイオンクロマトグラム

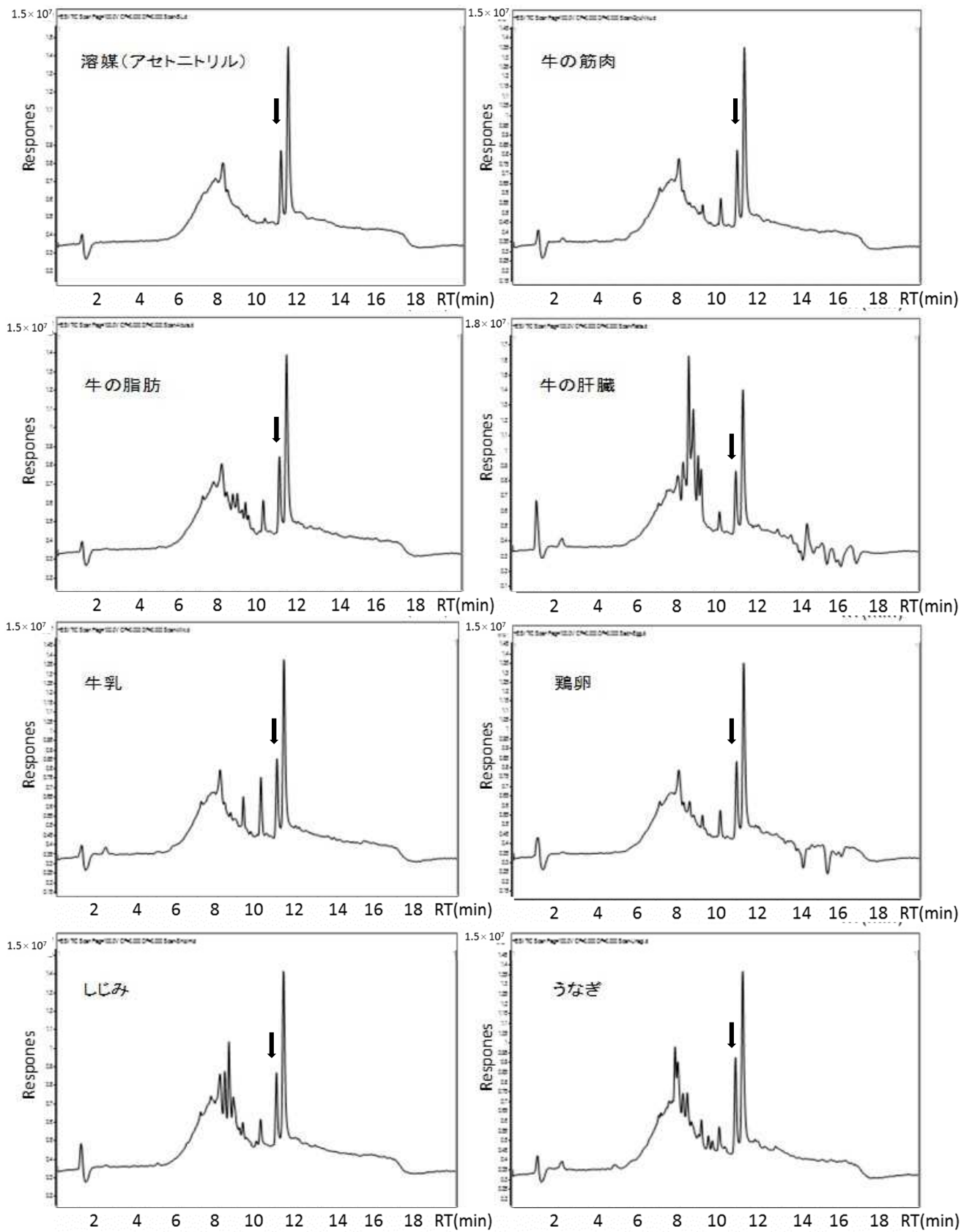


図 22 ブランク試料のトータルイオンクロマトグラム
(スキャン範囲: 50~550 amu)