

※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

エマメクチン安息香酸塩試験法（畜水産物）

エマメクチン安息香酸塩試験法（畜水産物）の検討結果

【緒言】

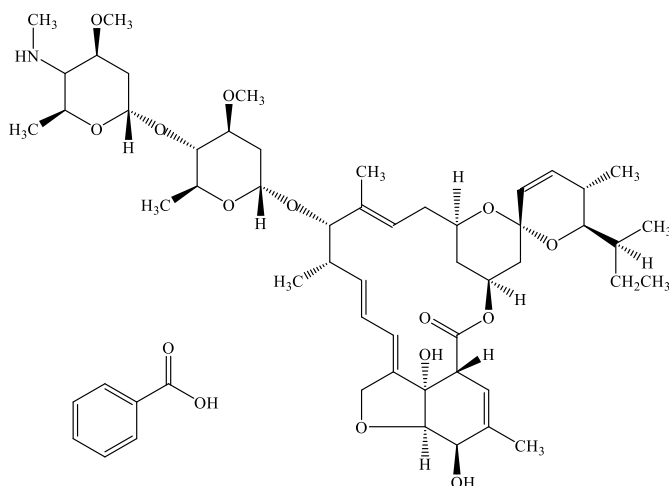
1. 目的及び試験法の検討方針等

エマメクチン安息香酸塩は、エマメクチン B_{1a} 安息香酸塩とエマメクチン B_{1b} 安息香酸塩の混合物であり、16員環マクロサイクリックラクトン構造を有するマクロライド系の殺虫剤である。その作用機序は節足動物の神経筋接合部の抑制性神経伝達物質受容体に作用して塩化物イオンの膜透過性を増大させ、神経興奮が抑制されて、麻痺や致死に至ると考えられている。わが国では1997年12月に登録され、1999年11月に残留基準値が設定され、適用農作物には雑穀、果樹、野菜、いも、樹木、花き等がある。畜水産物中の残留基準値はエマメクチン B_{1a} 及び8,9-Z-エマメクチン B_{1a} に対して設定されている。厚生労働省通知試験法として「エマメクチン安息香酸塩試験法（農産物）」が報告されているが、畜水産物を対象とした残留分析法はない。そこで、本検討では、LC-MS/MSを用いた畜水産物を対象としたエマメクチン安息香酸塩の個別試験法の開発を行うことを目的とした。

2. 分析対象化合物の構造式及び物理化学的性質

1) 分析対象化合物：エマメクチン B_{1a} 安息香酸塩

構造式：



分子式：C₄₉H₇₅NO₁₃ · C₇H₆O₂

CAS：155569-91-8

分子量：1008.26

化学名：(10E, 14E, 16E, 22Z)-(1R, 4R, 5'S, 6S, 6'R, 8R, 12S, 13S, 20R, 21R, 24S)-6'-[(S)-sec-butyl]-21, 24-dihydroxy-5', 11, 13, 22-tetramethyl-2-oxo-3, 7, 19-trioxatetracyclo [15, 6, 1, 1^{4,8}, 0^{20,24}] pentacosa-10, 14, 16, 22-tetraene-6-spiro-2'-(5', 6'-dihydro-2' H-pyran)-12-yl 2, 6-dideoxy-3-O-methyl-4-O-(2, 4, 6-trideoxy-3-O-methyl-4-methylamino-α-L-lyxo-hexopyranosyl)-α-L-arabino-hexopyranoside benzoate (IUPAC 名)

外観：類白色・結晶粉末・無臭

融点：141~146 °C

沸点：測定不能（300°Cで分解のため）

蒸気圧：3.99×10⁻⁶ Pa（21 °C）

溶解度：水：0.31 g/L、アセトン：140 g/L、ジクロロメタン：> 500 g/L、酢酸エチル：81 g/L、
n-ヘキサン：77 mg/L、メタノール：270 g/L、オクタノール：48 g/L、トルエン：26 g/L、

オクタノール/水分配係数：log Pow 5.7 (エマメクチン B_{1a} 安息香酸塩)

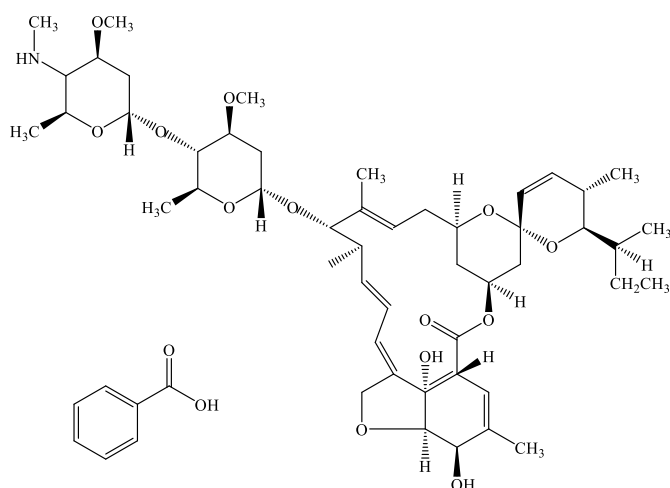
解離定数 (pKa)： 4.2 (安息香酸) (23.3~23.7 °C)

7.6 (エピ-メチルアミノ) (23.3~23.7 °C)

[出典：農薬抄録 一般名：エマメクチン安息香酸塩]

1) 分析対象化合物：8,9-Z-エマメクチン B_{1a} 安息香酸塩

構造式：



分子式：C₄₉H₇₅NO₁₃ · C₇H₆O₂

分子量：1008.26

3. 基準値

海外では、米国（あぶらな科葉菜類、仁果類等）、カナダ（魚介類）、EU（りんご、トマト、レタス等）、オーストラリア（キャベツ、レタス、畜産物等）及びニュージーランド（アボカド等）で基準値が設定されている。JMPRにおける毒性評価は、ADI = 0.0005 mg/kg 体重/day とされているが、国際基準は設定されていない。

エマメクチン安息香酸塩の基準値一覧

食品名	基準値 (ppm)
大麦	0.1
ライ麦	0.1
とうもろこし	0.1
そば	0.1
その他の穀類	0.1
ばれいしよ	0.1
さといも類（やつがしらを含む）	0.1
かんしよ	0.1
やまいも（長いもをいう）	0.1
こんにやくいも	0.1
その他のいも類	0.1

だいこん類（ラディッシュを含む）の根	0.1
だいこん類（ラディッシュを含む）の葉	0.1
かぶ類の根	0.1
かぶ類の葉	0.5
西洋わさび	0.1
クレソン	0.5
はくさい	0.1
キャベツ	0.1
芽キャベツ	0.1
ケール	0.5
こまつな	0.5
きょうな	0.5
チンゲンサイ	0.5
カリフラワー	0.5
ブロッコリー	0.1
その他のあぶらな科野菜	0.5
ごぼう	0.1
サルシフィー	0.1
アーティチョーク	0.5
チコリ	0.5
エンダイブ	0.5
しゅんぎく	0.5
レタス（サラダ菜及びちしやを含む）	0.5
その他のきく科野菜	0.5
ねぎ（リーキを含む）	0.5
にら	0.5
アスパラガス	0.5
わけぎ	0.5
その他のゆり科野菜	0.5
にんじん	0.1
パースニップ	0.1
パセリ	0.5
セロリ	0.5
みつば	0.5
その他のせり科野菜	0.5
トマト	0.1
ピーマン	0.2
なす	0.1
その他のなす科野菜	0.2
きゅうり（ガーキンを含む）	0.1
かぼちや（スカッシュを含む）	0.1
しろうり	0.1
すいか	0.1
メロン類果実	0.1

まくわうり	0.1
その他のうり科野菜	0.1
はうれんそう	0.5
たけのこ	0.1
オクラ	0.2
しょうが	0.1
未成熟えんどう	0.1
未成熟いんげん	0.1
えだまめ	0.1
その他の野菜	0.5
みかん	0.1
びわ	0.1
もも	0.1
あんず (アプリコットを含む)	0.1
すもも (プルーンを含む)	0.1
うめ	0.1
おうとう (チェリーを含む)	0.1
いちご	0.1
ラズベリー	0.1
ブラックベリー	0.1
ブルーベリー	0.1
クランベリー	0.1
ハックルベリー	0.1
その他のベリー類果実	0.1
ぶどう	0.1
キウイ	0.1
なつめやし	0.1
その他の果実	0.1
綿実	0.02
その他のオイルシード	0.05
茶	0.5
その他のスパイス	0.5
その他のハーブ	0.5
牛の筋肉	0.002
豚の筋肉	0.002
その他の陸棲哺乳類に属する動物の筋肉	0.002
牛の脂肪	0.002
豚の脂肪	0.002
その他の陸棲哺乳類に属する動物の脂肪	0.002
牛の肝臓	0.01
豚の肝臓	0.01
その他の陸棲哺乳類に属する動物の肝臓	0.01
牛の腎臓	0.01
豚の腎臓	0.01

その他の陸棲哺乳類に属する動物の腎臓	0.01
牛の食用部分	0.01
豚の食用部分	0.01
その他の陸棲哺乳類に属する動物の食用部分	0.01
乳	0.0005
鶏の筋肉	0.0005
その他の家きんの筋肉	0.0005
鶏の脂肪	0.0005
その他の家きんの脂肪	0.0005
鶏の肝臓	0.0005
その他の家きんの肝臓	0.0005
鶏の腎臓	0.0005
その他の家きんの腎臓	0.0005
鶏の食用部分	0.0005
その他の家きんの食用部分	0.0005
鶏の卵	0.0005
その他の家きんの卵	0.0005
魚介類（さけ目魚類に限る。）	0.1
魚介類（うなぎ目魚類に限る。）	0.0005
魚介類（すずき目魚類に限る。）	0.0005
魚介類（その他の魚類に限る。）	0.0005
魚介類（貝類に限る。）	0.0005
魚介類（甲殻類に限る。）	0.0005
その他の魚介類	0.0005
はちみつ	0.0005

【実験方法】

1. 試料

試料は埼玉県内で市販されていた 1) 牛の筋肉、2) 牛の脂肪、3) 牛の肝臓、4) 牛乳、5) 鶏卵、6) うなぎ、7) しじみ及び 8) はちみつを用いた。

各食品の試料採取の方法を以下に示した。

- 1) 牛の筋肉：可能な限り脂肪層を除き、細切均一化した。
- 2) 牛の脂肪：可能な限り筋肉層を除き、細切均一化した。
- 3) 牛の肝臓：全体を細切均一化した。
- 4) 牛乳：よく混合して均一化した。
- 5) 鶏卵：殻を除去し、卵白と卵黄をよく混合して均一化した。
- 6) うなぎ：頭を除いた可食部（内臓、皮及び骨を含む）を細切均一化した。
- 7) しじみ：殻を除去し、目の細かい金網にのせ、5 分間水切りを行ったものを細切均一化した。
- 8) はちみつ：そば蜜を使用し、加温（40℃以下）した後に、よく混合して均一化した。

2. 試薬、試液

エマメクチン B_{1a} 安息香酸塩標準品：純度 92.0 %（林純薬工業製）

8,9-Z-エマメクチン B_{1a} 安息香酸塩標準品：純度 88.2 %（林純薬工業製）

アセトニトリル：LC-MS 用（関東化学製）

蒸留水：LC-MS 用（関東化学製）

アセトン：残留農薬試験用（関東化学製）

酢酸エチル：残留農薬試験用（富士フイルム和光純薬製）

n-ヘキサン：残留農薬試験・PCB 試験用（関東化学製）

ギ酸：LC-MS 用（富士フイルム和光純薬製）

アンモニア水：特級（富士フイルム和光純薬製）

1 mol/L 塩酸：容量分析用（富士フイルム和光純薬製）

1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液：容量分析用（富士フイルム和光純薬製）

ケイソウ土：ハイフロスーパーセル（富士フイルム和光純薬製）

塩化ナトリウム：特級（関東化学製）

20 w/v% 塩化ナトリウム溶液：塩化ナトリウム 200 g に水を加えて溶解し、1000 mL とした。

1 vol% ギ酸含有アセトニトリル及び水（1：1）混液：ギ酸 1 mL にアセトニトリル及び水（1：1）混液を加えて 100 mL とした。

スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラム：InertSep PLS-2（500 mg /6 mL、GL サイエンス製）

標準原液：エマメクチン B_{1a} 安息香酸塩標準品及び 8,9-Z-エマメクチン B_{1a} 安息香酸塩標準品を純度補正した後、各 10 mg（エマメクチン B_{1a} 及び 8,9-Z-エマメクチン B_{1a} として）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 1 vol% ギ酸含有アセトニトリル及び水（1：1）混液で適宜希釈し、0.0000125~0.0015 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 0.005 mg/L、0.02 mg/L 及び 0.1 mg/L 溶液を調製した。

3. 装置

粉碎機：FP-25（Cuisinart 製）

ホモジナイザー：ヒスコトロン（マイクロテック・ニチオン製）

遠心分離器：テーブルトップ遠心機 4000（KUBOTA 製）

LC-MS/MS

装置	型式	会社
MS	Xevo TQS	Waters
LC	ACQUITY UPLC	Waters
データ処理	MassLynx Ver.4.1	Waters

4. 測定条件

LC-MS/MS

LC 条件				
カラム	XBridge C18 (内径 2.1 mm、長さ 100 mm、 粒子径 3.5 μm : Waters 社製)			
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 : 蒸留水 B 液 : アセトニトリル C 液 : 0.2 vol% ギ酸			
グラジエント条件	時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)	C 液 (%)
	0.0	40	50	10
	0.5	40	50	10
	10.0	0	90	10
	15.0	0	90	10
	15.1	40	50	10
	21.0	40	50	10
MS 条件				
測定モード	選択反応モニタリング (SRM)			
イオン化モード	ESI (+)			
キャピラリ電圧 (kV)	2.0			
ソース温度 (°C)	150			
脱溶媒温度 (°C)	500			
コーンガス	窒素、150 L/hr			
脱溶媒ガス	窒素、1000 L/hr			
コリジョンガス	アルゴン			
定量イオン (m/z)	MS/MS: m/z +887→158 [コーン電圧 : 60 (V)、コリジ ョンエネルギー : 35 (eV)]			
定性イオン (m/z)	MS/MS: m/z +887→82 [コーン電圧 : 60 (V)、コリジ ョンエネルギー : 75 (eV)]			
保持時間 (min)	エマメクチン B _{1a} 5.4 8,9-Z-エマメクチン B _{1a} 6.1			

5. 定量

エマメクチン B_{1a}安息香酸塩標準原液及び 8,9-Z-エマメクチン B_{1a}安息香酸塩標準原液を 1 vol%ギ酸含有アセトニトリル及び水 (1 : 1) 混液 で希釈し、0.0000125~0.0015 mg/L 濃度範囲の数点の標準溶液を調製した。この溶液 5 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 5 µL を LC-MS/MS に注入し、検量線から絶対検量線法によりエマメクチン B_{1a}及び 8,9-Z-エマメクチン B_{1a}の含量を算出した。

6. 添加試料の調製

- 1) 牛の筋肉 (添加濃度 : 0.002 ppm または 0.0005 ppm (エマメクチン安息香酸塩換算)) : 試料 10.0 g に添加用標準溶液 (0.02 mg/L または 0.005 mg/L) 1 mL を添加しよく混合した後、30 分間放置した。
- 2) 牛の脂肪 (添加濃度 : 0.002 ppm または 0.0005 ppm (エマメクチン安息香酸塩換算)) : 試料 10.0 g に添加用標準溶液 (0.02 mg/L または 0.005 mg/L) 0.5 mL を添加しよく混合した後、30 分間放置した。
- 3) 牛の肝臓 (添加濃度 : 0.01 ppm または 0.0005 ppm (エマメクチン安息香酸塩換算)) : 試料 10.0 g に添加用標準溶液 (0.1 mg/L または 0.005 mg/L) 1 mL を添加しよく混合した後、30 分間放置した。
- 4) 牛乳 (添加濃度 : 0.0005 ppm (エマメクチン安息香酸塩換算)) : 試料 10.0 g に添加用標準溶液 (0.005 mg/L) 1 mL を添加しよく混合した後、30 分間放置した。
- 5) 鶏卵 (添加濃度 : 0.0005 ppm (エマメクチン安息香酸塩換算)) : 試料 10.0 g に添加用標準溶液 (0.005 mg/L) 1 mL を添加しよく混合した後、30 分間放置した。
- 6) はちみつ (添加濃度 : 0.0005 ppm (エマメクチン安息香酸塩換算)) : 試料 10.0 g に添加用標準溶液 (0.005 mg/L) 1 mL を添加しよく混合した後、30 分間放置した。
- 7) うなぎ (添加濃度 : 0.0005 ppm (エマメクチン安息香酸塩換算)) : 試料 10.0 g に添加用標準溶液 (0.005 mg/L) 1 mL を添加しよく混合した後、30 分間放置した。
- 8) しじみ (添加濃度 : 0.0005 ppm (エマメクチン安息香酸塩換算)) : 試料 10.0 g に添加用標準溶液 (0.005 mg/L) 1 mL を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

1) 抽出

① 筋肉、脂肪、肝臓、乳、卵及び魚介類の場合

試料 10.0 g にアセトン 50 mL を加え、ホモジナイズした後、ケイソウ土 (ハイフロスーパーセル) を約 1 cm の厚さに敷いたろ紙 (直径 60 mm、No. 5B、桐山製作所製) を用いて吸引ろ過した。ろ紙上の残留物にアセトン 25 mL を加えホモジナイズした後、上記と同様にろ過した。得られたろ液を合わせ、アセトンを加えて正確に 100 mL とした。この溶液から正確に 10 mL を 50 mL 容ポリプロピレン製遠心管に分取し、窒素を吹き付けて 40°C 以下で約 1 mL まで濃縮した。これに 20 w/v% 塩化ナトリウム溶液 10 mL 及びアンモニア水 1 mL を加え、酢酸エチル 10 mL ずつで 2 回振とう抽出した。抽出液を合わせ、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。この残留物に *n*-ヘキサン 10 mL を加え、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 10 mL ずつで 3 回振とう抽出した。抽出液を合わせ、ロータリーエバポレーターを用いて 40°C 以下で濃縮し、更に窒素を吹き付けて溶媒を除去した。この残留物にアセトニトリル及び水 (1 : 1) 混液 10 mL 及びアンモニア水 0.5 mL を加えて溶かした。

② はちみつの場合

試料 10.0 g に水 5 mL を加えて溶かした後、アセトン 50 mL を加え、ホモジナイズした後、ケイソウ土 (ハイフロスーパーセル) を約 1 cm の厚さに敷いたろ紙 (直径 60 mm、No. 5B、桐山製作所製) を用いて吸引ろ過した。ろ紙上の残留物に水 5 mL を加えて溶かした後、アセトン 25 mL を加えホモジナイズした後、上記と同様にろ過した。得られたろ液を合わせ、アセトンを加えて

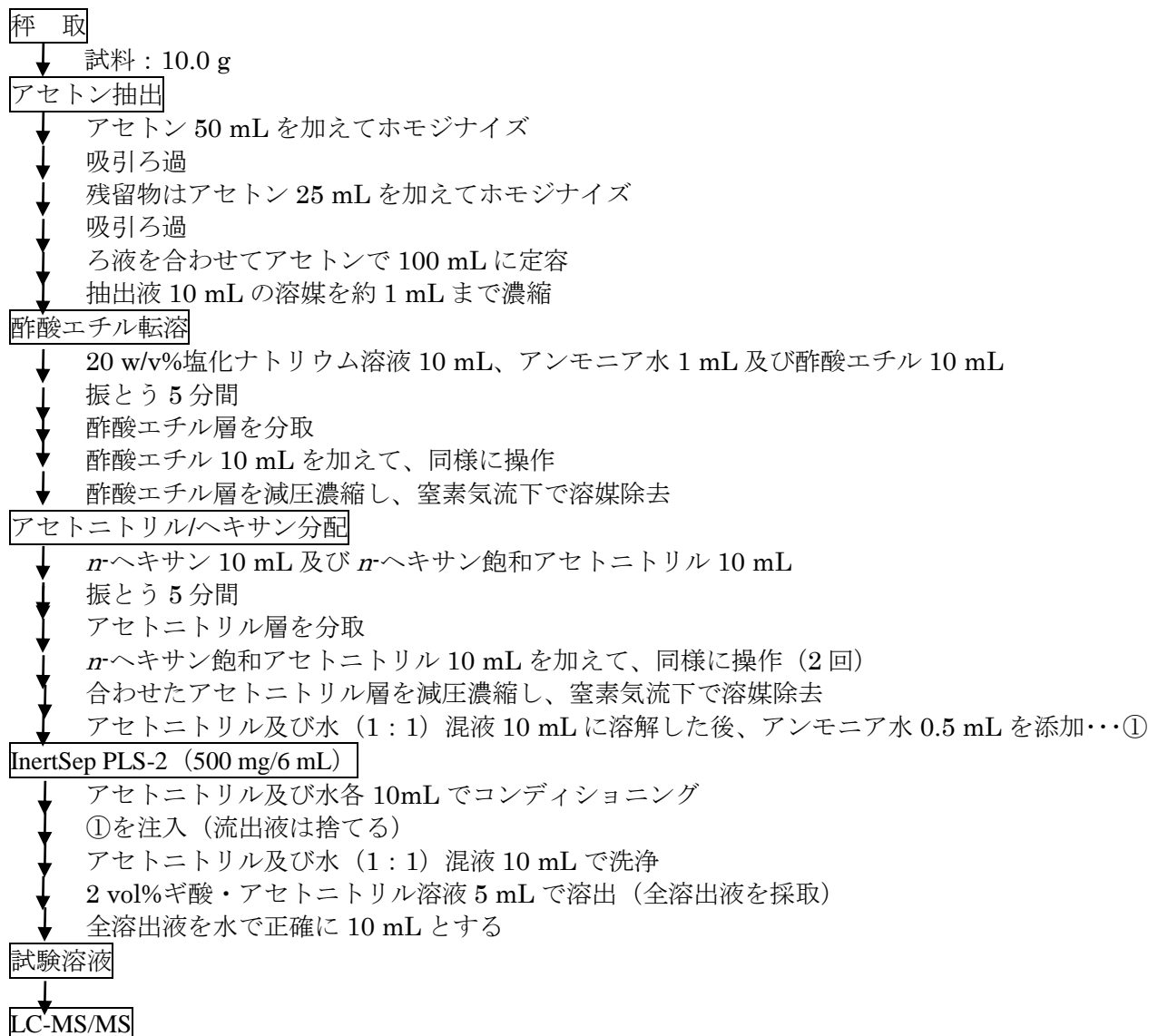
正確に 100 mL とした。この溶液から正確に 10 mL を 50 mL 容ポリプロピレン製遠心管に分取し、窒素を吹き付けて 40°C 以下で約 1 mL まで濃縮した。これに 20 w/v% 塩化ナトリウム溶液 10 mL 及びアンモニア水 1 mL を加え、酢酸エチル 10 mL ずつで 2 回振とう抽出した。抽出液を合わせ、ロータリーエバポレーターを用いて 40°C 以下で濃縮し、更に窒素を吹き付けて溶媒を除去した。この残留物にアセトニトリル及び水 (1 : 1) 混液 10 mL 及びアンモニア水 0.5 mL を加えて溶かした。

2) 精製

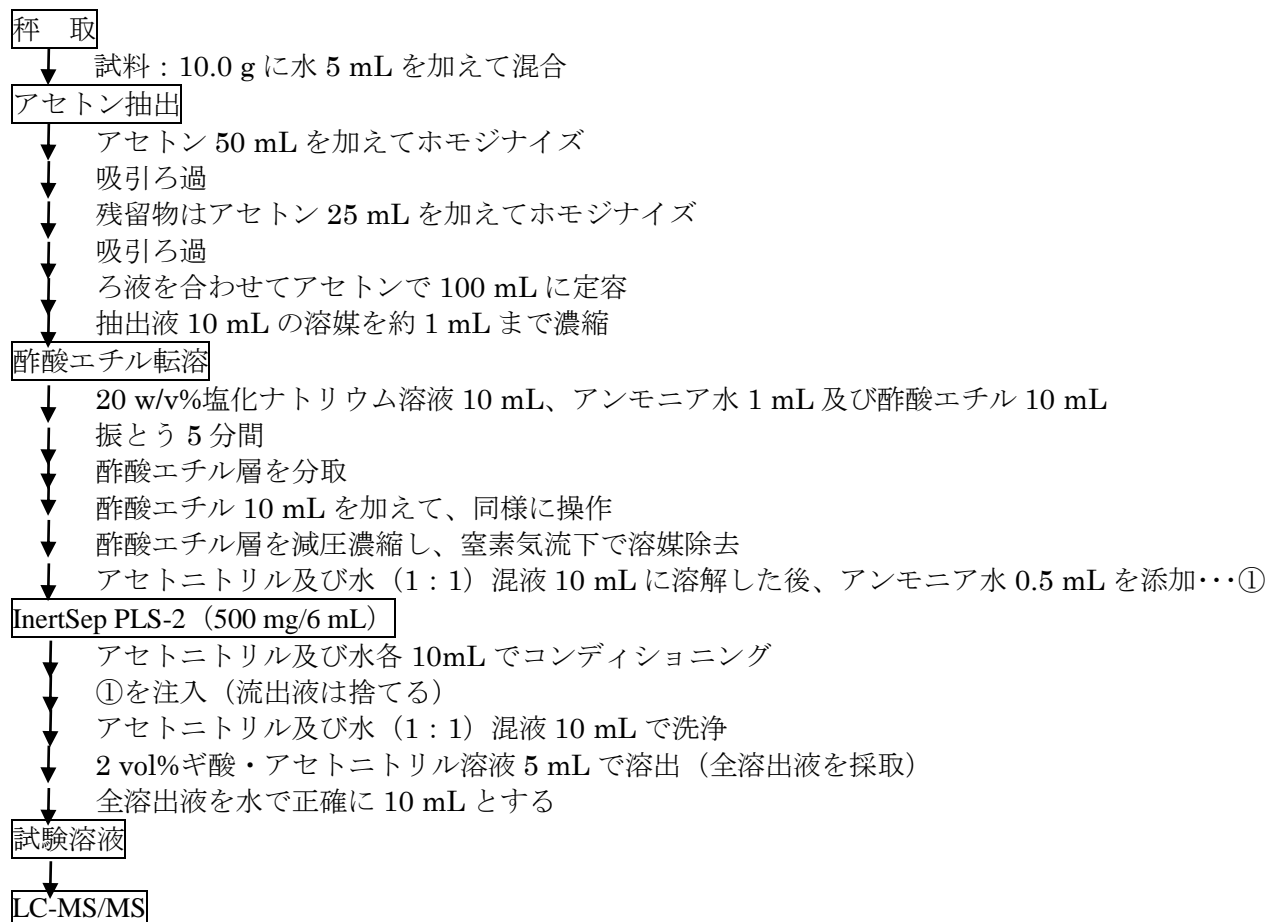
スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラム (500 mg) にアセトニトリル及び水各 10 mL を順次注入し、各流出液は捨てた。このカラムに 1) で得られた溶液を注入した後、アセトニトリル及び水 (1 : 1) 混液 10 mL を注入し、流出液は捨てた。次いで、2 vol% ギ酸・アセトニトリル溶液 5 mL を注入し、溶出液を水で正確に 10 mL としたものを試験溶液とした。

《分析法フローチャート》

① 筋肉、脂肪、肝臓、乳、卵及び魚介類の場合



②はちみつの場合



8. マトリックス添加標準溶液の調製

エマメクチン B_{1a} 及び 8,9-Z-エマメクチン B_{1a} が含有されていないことを確認した試料を 7. 試験溶液の調製に従い、調製した。スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラムでの 2 vol%ギ酸・アセトニトリル溶出液 5 mL のうち 1 mL を量り採り、40 °C 以下で濃縮し、溶媒を除去した後、各検討対象食品の添加回収試験における回収率 100% 相当濃度の溶媒標準溶液 (1 vol%ギ酸含有アセトニトリル及び水 (1 : 1) 混液) 2 mL を加えて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) LC 及び MS 条件の検討

① LC 条件

シリカベースの逆相系カラムについて、ピーク形状やMS検出の感度が良好なカラムを検討した。L-column ODS ((一財)化学物質評価研究機構製)、Cadenza CD-C18 (Imtakt製)、Atlantis T3 及び XBridge C18 (Waters製)、Inertsil ODS-3 及び InertSustain C18 (GLサイエンス製)の内径2~2.1 mm、長さ100 mm、粒子径3~3.5 μm のカラムについて検討したところ、XBridge C18を使用することで、エマメクチン B_{1a} 及び 8,9-Z-エマメクチン B_{1a} のピーク形状、分離及び再現性について良好な結果が得られたため、本カラムを用いて検討した。

移動相への添加剤について、ギ酸、酢酸及び酢酸アンモニウムを比較したところ、ギ酸の添加においてピーク形状が良好であったため、ギ酸を採用し、かつ、その至適濃度は0.02 vol%であった。有機溶媒についてメタノールとアセトニトリルを比較したところ、感度では顕著な差は認められなかったが、アセトニトリルの方がよりカラム圧が低かったことからアセトニトリルを採用した。

② MS 条件

スキャン測定においては、ESIの(-)モードではエマメクチン B_{1a} 及び 8,9-Z-エマメクチン B_{1a} は検出されなかった。このため、測定モードは十分な感度の得られたESIの(+)モードとした。ESIの(+)モード測定におけるエマメクチン B_{1a} 及び 8,9-Z-エマメクチン B_{1a} のマススペクトルを図1に示した。ESIの(+)モードではエマメクチン B_{1a} 及び 8,9-Z-エマメクチン B_{1a} とともに、プロトン付加分子 (m/z 887 [M+H]⁺) のスペクトルが得られた。

Selected Reaction Monitoring (SRM) モード測定条件について検討した。エマメクチン B_{1a} 及び 8,9-Z-エマメクチン B_{1a} とともに、 m/z 887 をプリカーサーイオンとした場合のプロダクトイオンのうち、イオン強度の最も強い m/z 158 を定量用イオンに、次にイオン強度の強い m/z 82 を定性イオンに採用した (図2~5)。

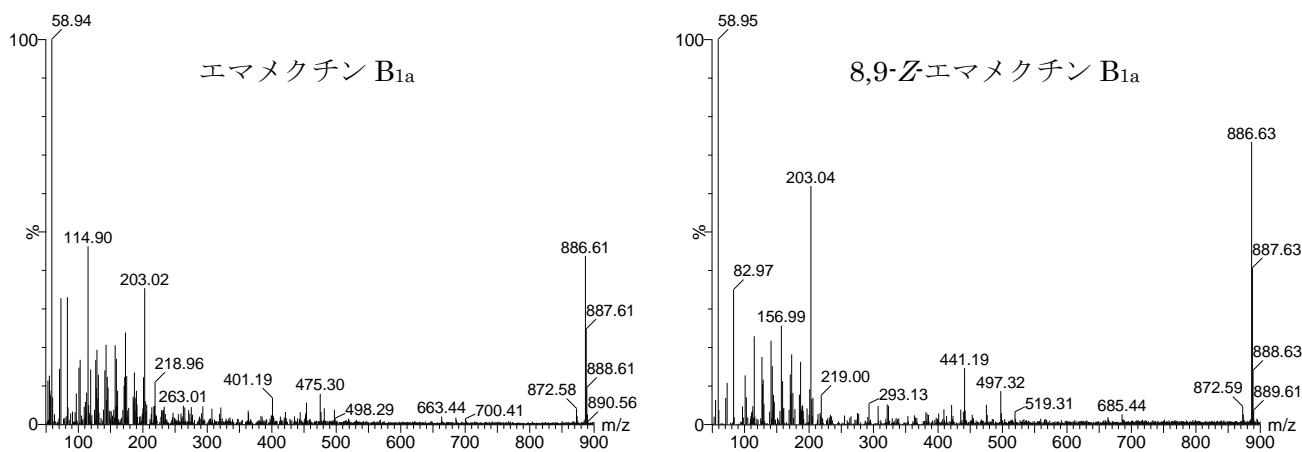


図1 エマメクチン B_{1a} 及び 8,9-Z-エマメクチン B_{1a} のマススペクトル
スキャン範囲：50~900 amu
測定条件：ESI(+), CV=60 V
(CV: corn voltage)

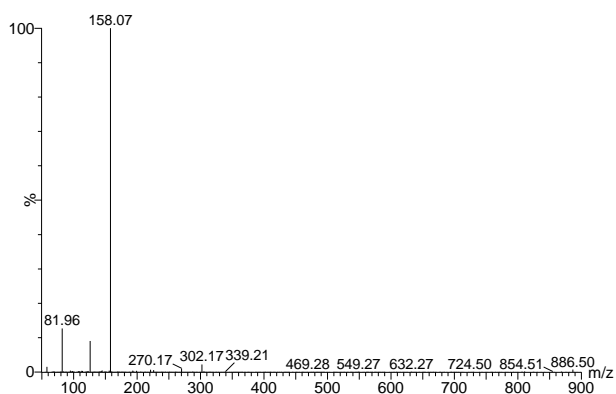


図 2 エマメクチン B_{1a} のプロダクトイオン
スペクトル (定量用)
プリカーサーイオン : m/z 886.6
測定条件 : ESI(+), CV=60 V, CE=35 eV
(CV: corn voltage, CE: collision energy)

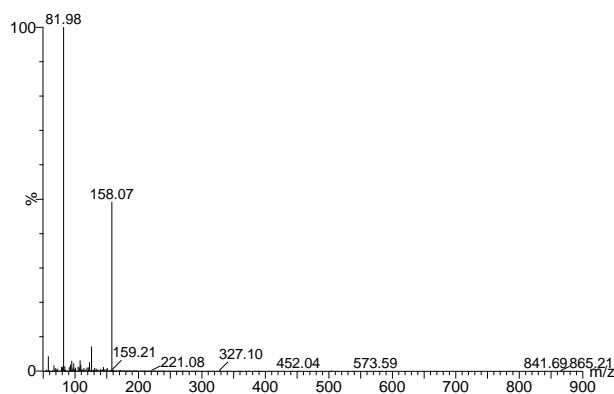


図 3 エマメクチン B_{1a} のプロダクトイオン
スペクトル (定性用)
プリカーサーイオン : m/z 886.6
測定条件 : ESI(+), CV=60 V, CE=75 eV
(CV: corn voltage, CE: collision energy)

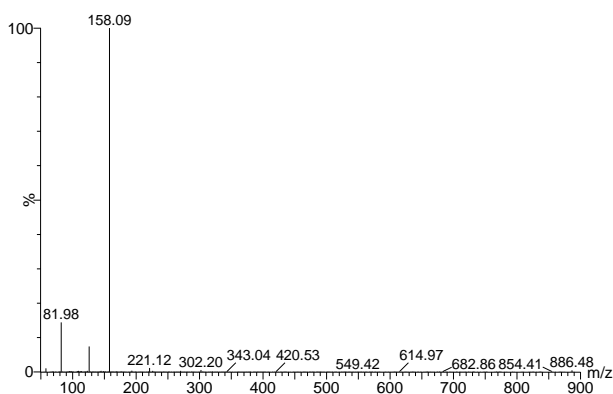


図 4 8,9-Z-Emamectin B_{1a} のプロダクトイオン
スペクトル (定量用)
プリカーサーイオン : m/z 886.6
測定条件 : ESI(+), CV=60 V, CE=35 eV
(CV: corn voltage, CE: collision energy)

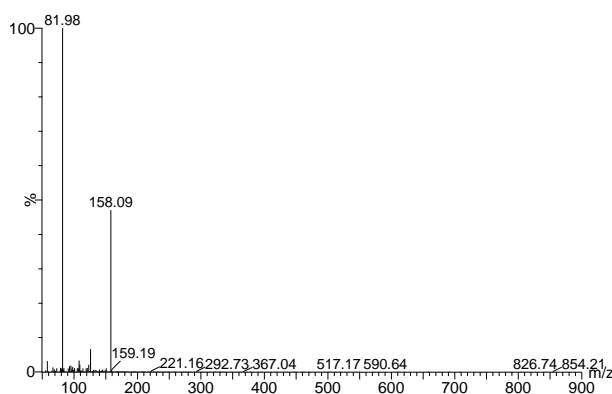


図 5 8,9-Z-Emamectin B_{1a} のプロダクトイオン
スペクトル (定性用)
プリカーサーイオン : m/z 886.6
測定条件 : ESI(+), CV=60 V, CE=75 eV
(CV: corn voltage, CE: collision energy)

2) 検量線

各定量用イオンのピーク面積値を用いて、絶対検量線を作成した。図 6~8 にエマメクチン B_{1a} (定量イオン測定) の検量線の例を示した。0.0000125~0.000075 mg/L、0.00005~0.0003 mg/L 及び 0.00025~0.0015 mg/L の各濃度範囲で、それぞれ作成した検量線の相関係数は、0.9991~0.9999 の良好な直線性を示した。図 9~11 に 8,9-Z-Emamectin B_{1a} (定量イオン測定) の検量線の例を示した。0.0000125~0.000075 mg/L、0.00005~0.0003 mg/L 及び 0.00025~0.0015 mg/L の各濃度範囲で、それぞれ作成した検量線の相関係数は、0.9991~0.9999 の良好な直線性を示した。

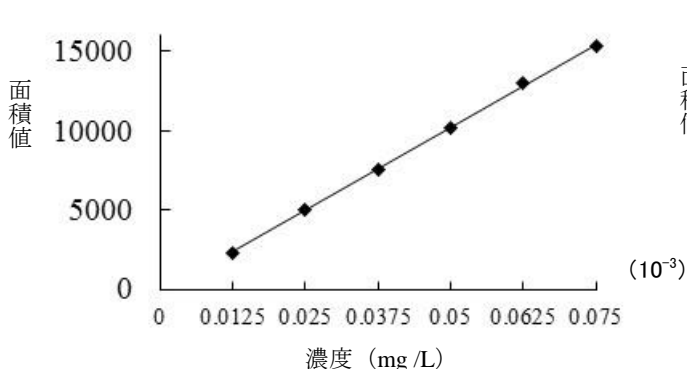


図6 エマメクチン B_{1a} の検量線例

濃度範囲：0.0000125~0.000075 mg/L
 $y=210050x-278$ $r=0.9998$

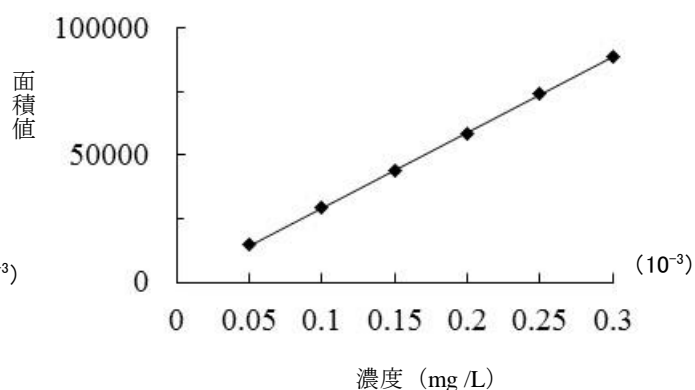


図7 エマメクチン B_{1a} の検量線例

濃度範囲：0.00005~0.0003 mg/L
 $y=296655x-245$ $r=0.9999$

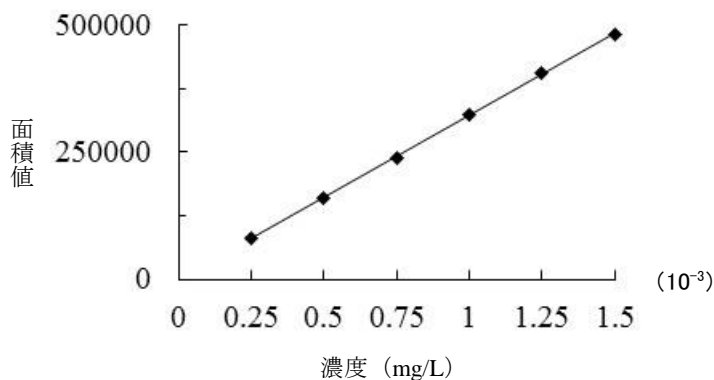


図8 エマメクチン B_{1a} の検量線例

濃度範囲：0.00025~0.0015 mg/L
 $y=322944x+24$ $r=0.9999$

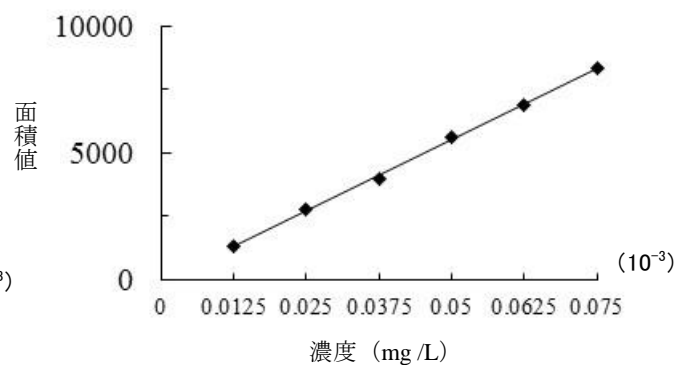


図9 8,9-Z-エマメクチン B_{1a} の検量線例

濃度範囲：0.0000125~0.000075 mg/L
 $y=112112x-78$ $r=0.9996$

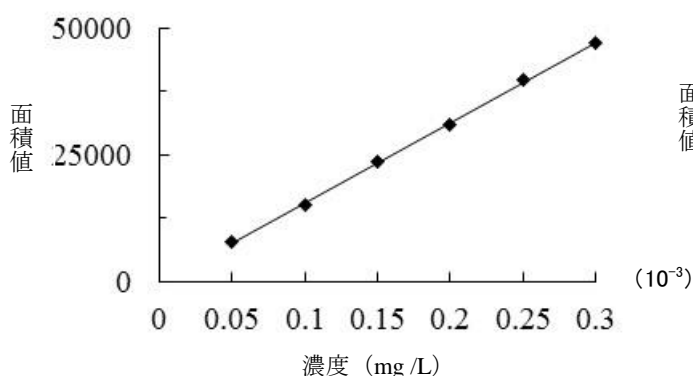


図10 8,9-Z-エマメクチン B_{1a} の検量線例

濃度範囲：0.00005~0.0003 mg/L
 $y=157775x-152$ $r=0.9997$

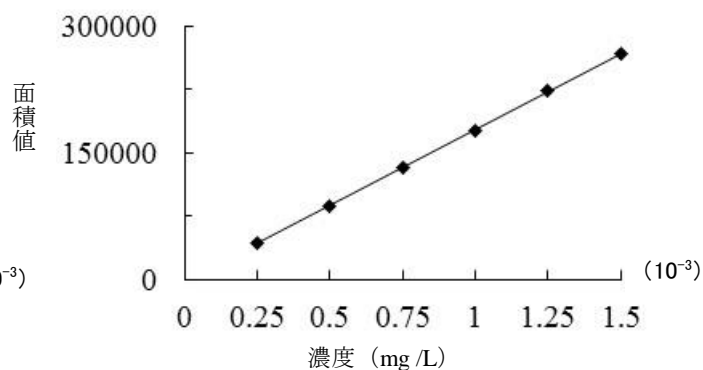


図11 8,9-Z-エマメクチン B_{1a} の検量線例

濃度範囲：0.00025~0.0015 mg/L
 $y=178844x-817$ $r=0.9999$

2. 試験溶液調製法の検討

1) 抽出溶媒の検討

抽出溶媒は、脂質と分析対象としているエマメクチン B_{1a} 及び 8,9-Z-エマメクチン B_{1a} を同時に抽出できる溶媒として、エマメクチン安息香酸塩試験法（農産物）で採用されているアセトンを用いた。エマメクチン B_{1a} 及び 8,9-Z-エマメクチン B_{1a} の化学構造の特徴として、エピ-メチルアミノ基（pKa=7.6）を有しており弱塩基性である。そこで、抽出溶媒の pH 変動により回収率に影響を及ぼしているか否かについて検討した。牛の筋肉試料を用いてアセトン抽出時に 1 mol/L 塩酸または 1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を添加し、各抽出条件でのエマメクチン B_{1a} 及び 8,9-Z-エマメクチン B_{1a} の回収率を比較した（表 1）。その結果、酸または塩基の添加による回収率の変動は認められず、抽出時に酸または塩基を添加しない場合の回収率が最も良好であったことから、抽出溶媒にはアセトンを採用した。また、各アセトン抽出液の pH を比較したところ、酸・塩基添加なし（pH 7.3）、1 mol/L 塩酸 0.5~2 mL 添加（pH 5.6~pH 6.8）1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 0.5 mL 添加（pH 7.7）であった。なお、抽出操作については、残留農薬等試験法検討実施要領に従って、50 mL 及び 25 mL で 2 回抽出する方法とした。

表 1 アセトン抽出時の酸・塩基添加によるエマメクチン B_{1a} 及び 8,9-Z-エマメクチン B_{1a} の回収率 (%)

牛の筋肉	添加なし	1 mol/L 塩酸			1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液
		0.5 mL	1 mL	2 mL	0.5 mL
エマメクチン B _{1a}	95	90	90	89	84
8,9-Z-エマメクチン B _{1a}	93	91	88	86	84

(0.1 mg/kg 相当添加、n = 2)

【実験方法】 7. 試験溶液の調製に従って調製した（ただし、酢酸エチル転溶時にはアンモニア水 1 mL を添加しなかった）。

牛の筋肉試料 10.0 g に添加用標準溶液を添加した。

アセトン抽出 1 回目の操作時に 1 mol/L 塩酸または 1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を添加した。

2) 有機溶媒への転溶

転溶溶媒として *n*-ヘキサンまたは酢酸エチルを用いてエマメクチン B_{1a} 及び 8,9-Z-エマメクチン B_{1a} の回収率について検討した（表 2）。なお、エマメクチン B_{1a} 及び 8,9-Z-エマメクチン B_{1a} はガラスに吸着する恐れがあるので、50 mL 容ポリプロピレン製遠心管を用いた。牛の筋肉試料を用いて *n*-ヘキサンまたは酢酸エチルを転溶溶媒として検討した結果、酢酸エチルを転溶溶媒として用いた場合、エマメクチン B_{1a} 及び 8,9-Z-エマメクチン B_{1a} とともに概ね 100% 回収されていたが、*n*-ヘキサンを転溶溶媒として用いた場合、約 70% 程度の回収率であった。この点に関しては、酢酸エチル（81 g/L）及び *n*-ヘキサン（77 mg/L）に対する溶解性が関係していると考えられる。以上の結果より、転溶溶媒は酢酸エチルを採用した。また、LC-MS/MS 測定では感度が高く、抽出液のすべてを用いる必要がないため、アセトン抽出液の一部（10 mL）を用いることとした。

表2 有機溶媒転溶におけるエマメクチン B_{1a}及び8,9-Z-エマメクチン B_{1a}の回収率 (%)

牛の筋肉	<i>n</i> -ヘキサン	酢酸エチル
エマメクチンB _{1a}	68	100
8,9-Z-エマメクチンB _{1a}	67	100

(0.1 mg/kg 相当添加、*n* = 2)

【実験方法】7. 試験溶液の調製に従って調製した（ただし、酢酸エチル転溶時にはアンモニア水 1 mL を添加しなかった）。

牛の筋肉ブランク試料のアセトン抽出液の溶媒を約 1 mL まで濃縮した後、添加用標準溶液を添加した。転溶溶媒は *n*-ヘキサン及び酢酸エチルを用いた。

酢酸エチル転溶時の転溶回数におけるエマメクチン B_{1a}及び8,9-Z-エマメクチン B_{1a}の回収率について牛の筋肉試料を用いて検討した（表3）。その結果、エマメクチン B_{1a}及び8,9-Z-エマメクチン B_{1a}ともに、酢酸エチル転溶操作を2回実施することで有機層に100%回収され、転溶操作3回目からは回収されなかった。以上の結果より、酢酸エチルの転溶回数は2回とした。

表3 酢酸エチル転溶時の転溶回数におけるエマメクチン B_{1a}及び8,9-Z-エマメクチン B_{1a}の回収率 (%)

牛の筋肉	酢酸エチル転溶			
	1回目	2回目	3回目	計
エマメクチンB _{1a}	99	2	0	101
8,9-Z-エマメクチンB _{1a}	99	3	0	102

(0.1 mg/kg 相当添加、*n* = 2)

【実験方法】7. 試験溶液の調製に従って調製した（ただし、酢酸エチル転溶時にはアンモニア水 1 mL を添加しなかった）。

牛の筋肉ブランク試料のアセトン抽出液の溶媒を約 1 mL まで濃縮した後、添加用標準溶液を添加した。酢酸エチル転溶回数（1~3回）における回収率を比較した。

次に、酢酸エチル転溶時の塩化ナトリウム濃度におけるエマメクチン B_{1a}及び8,9-Z-エマメクチン B_{1a}の回収率について牛の筋肉試料を用いて検討した（表4）。その結果、塩化ナトリウム溶液濃度によるエマメクチン B_{1a}及び8,9-Z-エマメクチン B_{1a}の回収率の差異は認められず、何れの試験溶液も無色透明であった。塩化ナトリウムを添加しない場合でも良好な回収率であったが、多くの畜水産物食品マトリックスに対応可能であることを考慮して、塩化ナトリウム溶液の濃度は、20 w/v%を採用した。

表4 塩化ナトリウム濃度 (w/v%) におけるエマメクチン B_{1a} 及び 8,9-Z-エマメクチン B_{1a} の回収率 (%)

牛の筋肉	塩化ナトリウム溶液濃度 (w/v%)			
	0%	10%	20%	30%
エマメクチンB _{1a}	97	98	99	99
8,9-Z-エマメクチンB _{1a}	97	101	101	99

(0.1 mg/kg 相当添加、n = 2)

【実験方法】 7. 試験溶液の調製に従って調製した (ただし、酢酸エチル転溶時にはアンモニア水 1 mL を添加しなかった)。

牛の筋肉ブランク試料のアセトン抽出液の溶媒を約 1 mL まで濃縮した後、添加用標準溶液を添加した。0~30 w/v%塩化ナトリウム溶液 10 mL を用いた。

3) 脱脂方法の検討

脱脂方法としてアセトニトリル/ヘキサン分配について検討した。牛の筋肉試料及び牛の脂肪試料を用いてアセトニトリル/ヘキサン分配の分配操作を検討した (表 5 及び表 6)。その結果、牛の筋肉試料同様に、牛の脂肪試料でも、エマメクチン B_{1a} 及び 8,9-Z-エマメクチン B_{1a} ともに、アセトニトリル/ヘキサン分配を 2 回操作することで 100%回収され、アセトニトリル/ヘキサン分配操作 3 回目からは回収されなかったため、アセトニトリル/ヘキサン分配を 2 回操作することとした。なお、はちみつ試料では脂質をほとんど含有しないことから、アセトニトリル/ヘキサン分配を省略し、酢酸エチル転溶した有機層を 40℃以下で濃縮し、溶媒を除去した後、残留物に水及びアセトニトリル各 10 mL を加えて溶解し、ミニカラムに負荷し精製操作を行ったが、妨害となるピークはなく、良好な回収率が得られた。

表5 アセトニトリル/ヘキサン分配によるエマメクチン B_{1a} 及び 8,9-Z-エマメクチン B_{1a} の回収率 (%)

牛の筋肉	アセトニトリル/ヘキサン分配			
	1回目	2回目	3回目	計
エマメクチンB _{1a}	102	1	0	103
8,9-Z-エマメクチンB _{1a}	101	2	0	103

(0.1 mg/kg 相当添加、n = 2)

【実験方法】 7. 試験溶液の調製に従って調製した (ただし、酢酸エチル転溶時にはアンモニア水 1 mL を添加しなかった)。

酢酸エチル転溶した後、酢酸エチル層を除去し、添加用標準溶液を添加した。アセトニトリル/ヘキサン分配回数 (1~3 回目) における回収率を比較した。

表6 アセトニトリル/ヘキサン分配によるエマメクチン B_{1a}及び8,9-Z-エマメクチン B_{1a}の回収率 (%)

牛の脂肪	アセトニトリル/ヘキサン分配			
	1回目	2回目	3回目	計
エマメクチンB _{1a}	95	5	0	100
8,9-Z-エマメクチンB _{1a}	92	9	0	101

(0.1 mg/kg 相当添加、n = 2)

【実験方法】7. 試験溶液の調製に従って調製した(ただし、酢酸エチル転溶時にはアンモニア水 1 mL を添加しなかった)。

酢酸エチル転溶した後、酢酸エチル層を除去し、添加用標準溶液を添加した。

アセトニトリル/ヘキサン分配回数(1~3回目)における回収率を比較した。

4) ミニカラム精製

エマメクチン安息香酸塩試験法(農産物)ではシラン処理を行うことで分解・吸着を抑制していることから、シリカゲル中の金属不純物や混入金属による吸着による影響が考えられた。そこで、ミニカラムによる精製はスチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラムを用いて精製効果の確認を行った。牛の筋肉試料を用いて、InertSep PLS-2 500 mg/6 mL(ジーエルサイエンス製)からのエマメクチン B_{1a}及び8,9-Z-エマメクチン B_{1a}の溶出パターンを表7及び表8に示す。なお、本検討では負荷液にアンモニア水 0.5 mL を添加して PLS-2 ミニカラムからの溶出を確認した。エマメクチン B_{1a}はアセトニトリル及び水(5:5)混液では全く溶出されず、8,9-Z-エマメクチン B_{1a}はアセトニトリル及び水(8:2)混液までは全く溶出されなかった。エマメクチン B_{1a}及び8,9-Z-エマメクチン B_{1a}ともに、PLS-2 ミニカラムへの保持が強く、カラムから100%回収するためにはアセトニトリル 20~30 mL 必要であったが、2 vol%ギ酸・アセトニトリル 5 mL で溶出することにより、カラムから100%回収することが可能であった。

表7 InertSep PLS-2 (500 mg/6 mL)からのエマメクチン B_{1a}の溶出率 (%)

溶出液(mL)	アセトニトリル及び水混液の比率					
	5:5	6:4	7:3	8:2	9:1	10:0
0-10	0	0	0	0	2	50
10-20	0	0	0	2	14	49
20-30	0	1	2	7	23	0
30-40	0	24	8	13	23	0
40-45 *	105	79	95	81	40	0
合計	105	104	105	103	102	99

* 2 vol%ギ酸・アセトニトリル5 mLで溶出させた。

表 8 InertSep PLS-2 (500 mg/6 mL)からの 8,9-Z-エマメクチン B_{1a} の溶出率 (%)

溶出液 (mL)	アセトニトリル及び水混液の比率					
	5:5	6:4	7:3	8:2	9:1	10:0
0-10	0	0	0	0	0	24
10-20	0	0	0	0	0	71
20-30	0	0	0	0	5	3
30-40	0	0	0	0	8	0
40-45 *	103	102	102	104	88	0
合計	103	102	102	104	101	106

* 2 vol%ギ酸・アセトニトリル 5 mL で溶出させた。

表 7 及び表 8 で検討した各比率のアセトニトリル及び水混液に 2 vol%ギ酸を含有することにより、エマメクチン B_{1a} 及び 8,9-Z-エマメクチン B_{1a} のカラムからの回収が可能であるか検討した。牛の筋肉試料を用いて、InertSep PLS-2 500 mg/6 mL (ジーエルサイエンス製) からのエマメクチン B_{1a} 及び 8,9-Z-エマメクチン B_{1a} の溶出パターンを表 9 及び表 10 に示す。その結果、エマメクチン B_{1a} 及び 8,9-Z-エマメクチン B_{1a} とともに、2 vol%ギ酸を含有したアセトニトリル及び水 (7:3) 混液以上のアセトニトリル混合比率では 5 mL で溶出させることにより、100%回収された。以上の結果より、PLS-2 ミニカラムによる精製は、アセトニトリル及び水 (1:1) 混液 10 mL 及びアンモニア水 0.5 mL で負荷し、アセトニトリル及び水 (1:1) 混液 10 mL で洗浄し、2 vol%ギ酸・アセトニトリル 5 mL で溶出することとした。

表 9 InertSep PLS-2 (500 mg/6 mL)からのエマメクチン B_{1a} の溶出率 (%)

溶出液 (mL)	2 vol%ギ酸を含有したアセトニトリル及び水混液の比率					
	5:5	6:4	7:3	8:2	9:1	10:0
0-5	3	94	104	102	102	102
5-10	80	10	0	0	0	0
10-20	20	0	0	0	0	0
20-30	0	0	0	0	0	0
合計	103	104	104	102	102	102

表 10 InertSep PLS-2 (500 mg/6 mL)からの 8,9-Z-エマメクチン B_{1a} の溶出率 (%)

溶出液 (mL)	2 vol%ギ酸を含有したアセトニトリル及び水混液の比率					
	5:5	6:4	7:3	8:2	9:1	10:0
0-5	0	28	102	102	101	101
5-10	13	73	0	0	0	0
10-20	88	0	0	0	0	0
20-30	0	0	0	0	0	0
合計	101	101	102	102	101	101

負荷液にアンモニア水を添加せずに PLS-2 ミニカラムに負荷させるとエマメクチン B_{1a} 及び 8,9-Z-エマメクチン B_{1a} の十分な回収が得られなかった。そこで、牛の筋肉試料を用いて、負荷液、洗浄液及び溶出液の各溶液中のエマメクチン B_{1a} 及び 8,9-Z-エマメクチン B_{1a} の回収率を比較した (表 11)。負荷液にアンモニア水 0.5 mL を添加しない場合、エマメクチン B_{1a} 及び 8,9-Z-エマメクチン B_{1a} ともに、負荷液及び洗浄液から回収されていることが確認された。

表 11 負荷液、洗浄液及び溶出液中でのエマメクチン B_{1a} 及び 8,9-Z-エマメクチン B_{1a} の回収率 (%)

牛の筋肉	エマメクチン B _{1a}	8,9-Z エマメクチン B _{1a}
負荷液 (10 mL)	4	1
洗浄液 (10 mL)	18	3
溶出液 (5 mL)	79	97
合計	101	101

(0.1 mg/kg 相当添加、n = 2)

【実験方法】 7. 試験溶液の調製に従って調製した (ただし、酢酸エチル転溶時にはアンモニア水 1 mL を添加しなかった)。

InertSep PLS-2 負荷液に添加用標準溶液を添加した。
負荷液にアンモニア水 0.5 mL は添加しなかった。

エマメクチン B_{1a} 及び 8,9-Z-エマメクチン B_{1a} の化学構造の特徴として、エピ-メチルアミノ基を有している。その解離定数は pKa=7.6 であり、弱塩基性である。そこで、負荷液の pH により PLS-2 ミニカラムへの保持に影響を及ぼす可能性があると考え、負荷液に塩基を添加させることにより PLS-2 ミニカラムへの保持に変化が生じるか否か検討した (表 12)。その結果、負荷液にアンモニア水を添加した場合、エマメクチン B_{1a} 及び 8,9-Z-エマメクチン B_{1a} は PLS-2 ミニカラム溶出液から 100% 回収されていた。すなわち、エマメクチン B_{1a} 及び 8,9-Z-エマメクチン B_{1a} ともに、負荷液及び洗浄液の流出液中には溶出されていなかった。また、アンモニア水の添加量に関しては、検討したアンモニア水添加量による違いは認められなかった。一方、負荷液に 1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 0.5 mL を添加した場合、エマメクチン B_{1a} 及び 8,9-Z-エマメクチン B_{1a} の PLS-2 ミニカラムからの回収率は、それぞれ 86% 及び 81% であった。以上の結果より、負荷液にアンモニア水 0.5 mL を添加することとした。

表 12 PLS-2 ミニカラム負荷液への塩基添加によるエマメクチン B_{1a} 及び 8,9-Z-エマメクチン B_{1a} の回収率 (%)

牛の筋肉	塩基 添加なし	アンモニア水					1 mol/L NaOH
		0.1 mL	0.2 mL	0.5 mL	1 mL	2 mL	0.5 mL
エマメクチンB _{1a}	81	100	100	100	103	103	86
8,9-Z-エマメクチンB _{1a}	97	100	100	100	101	101	81

(0.1 mg/kg 相当添加、n = 2)

【実験方法】 7. 試験溶液の調製に従って調製した (ただし、酢酸エチル転溶時にはアンモニア水 1 mL を添加しなかった)。

InertSep PLS-2 負荷液に添加用標準溶液を添加した。

負荷液にアンモニア水 0~2 mL または 1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 0.5 mL 添加した。

エマメクチン B_{1a} 及び 8,9-Z-エマメクチン B_{1a} とともに、負荷液にアンモニア水を添加することにより PLS-2 ミニカラムへの保持が強くなったことから、酸の添加により PLS-2 ミニカラムへの保持が低下する可能性も考えられた。そこで、牛の筋肉試料を用いて、溶出液にギ酸を添加させることにより PLS-2 ミニカラムからのアセトニトリル溶出量の低減について検討した (表 13)。その結果、アセトニトリルにギ酸を添加した場合、エマメクチン B_{1a} 及び 8,9-Z-エマメクチン B_{1a} の PLS-2 ミニカラムへの保持が弱まり、ギ酸・アセトニトリル溶出量 5 mL で 100% 溶出されていた。また、ギ酸を添加する濃度に関しては、検討した 0.1~5 vol% ギ酸・アセトニトリルの範囲でほとんど溶出に違いはなく、アセトニトリル溶出液にギ酸を添加することにより、溶出量の削減が図れた。以上の結果より、溶出液には 2 vol% ギ酸・アセトニトリルを採用した。

表 13 ギ酸・アセトニトリル溶出によるエマメクチン B_{1a} 及び 8,9-Z-エマメクチン B_{1a} の回収率 (%)

牛の筋肉	ギ酸・アセトニトリル(5 mL)					
	0 vol%	0.1 vol%	0.5 vol%	1 vol%	2 vol%	5 vol%
エマメクチンB _{1a}	0	104	104	103	102	102
8,9-Z-エマメクチンB _{1a}	0	103	102	103	101	100

(0.1 mg/kg 相当添加、n = 2)

【実験方法】 7. 試験溶液の調製に従って調製した (ただし、酢酸エチル転溶時にはアンモニア水 1 mL を添加しなかった)。

InertSep PLS-2 負荷液に添加用標準溶液を添加した。

0~5 vol% ギ酸・アセトニトリル 5 mL で溶出させた。

牛の筋肉試料を用いて 2 vol% ギ酸・アセトニトリルの溶出量によるエマメクチン B_{1a} 及び 8,9-Z-エマメクチン B_{1a} の回収率を検討した (表 14)。その結果、2 vol% ギ酸・アセトニトリル溶出量 3 mL でエマメクチン B_{1a} 及び 8,9-Z-エマメクチン B_{1a} の回収率は、ともに概ね 100% であった。以上の結果より、2 vol% ギ酸・アセトニトリルでの溶出量は 5 mL とした。

表 14 2 vol%ギ酸・アセトニトリルの溶出量によるエマメクチン B_{1a}及び 8,9-Z-エマメクチン B_{1a}の回収率 (%)

牛の筋肉	2 vol%ギ酸・アセトニトリル溶出量(5 mL)					計
	0-1 mL	1-2 mL	2-3 mL	3-4 mL	4-5 mL	
エマメクチンB _{1a}	0	61	41	0	0	102
8,9-Z-エマメクチンB _{1a}	0	47	54	0	0	101

(0.1 mg/kg 相当添加、n = 2)

【実験方法】 7. 試験溶液の調製に従って調製した (ただし、酢酸エチル転溶時にはアンモニア水 1 mL を添加しなかった)。

InertSep PLS-2 負荷液に添加用標準溶液を添加した。

2 vol%ギ酸・アセトニトリル各 1 mL ずつで溶出させ、その回収率を比較した。

5) 定量限界値における添加回収試験

検討した畜水産物 8 食品のエマメクチン安息香酸塩の残留基準値は、牛の筋肉、牛の脂肪及び牛の肝臓以外で 0.0005 mg/kg と極めて低いことから、本測定法における定量限界値を 0.0005 mg/kg として評価した。そこで、牛の筋肉試料及び牛の脂肪試料 (0.1 mg/kg 相当添加) を用いて検討した本分析法が定量限界値 (0.0005 mg/kg) においても適用可能であるか、牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳、鶏卵、はちみつ、うなぎ及びしじみ試料を用いて回収率の確認を行った (表 15)。その結果、牛乳試料においてエマメクチン B_{1a}及び 8,9-Z-エマメクチン B_{1a}の回収率が約 50%であった。一方、牛乳以外の試料では、牛の脂肪及び鶏卵試料で若干回収率が低かったが、概ね良好な回収率が得られた。さらに、マトリックスの違いにより 2 vol%ギ酸・アセトニトリル 5 mL の溶出では十分に回収されない可能性も考えられたため、2 vol%ギ酸・アセトニトリル 5 mL で溶出させた後、再度、2 vol%ギ酸・アセトニトリル 5 mL で追加溶出させることによりエマメクチン B_{1a}及び 8,9-Z-エマメクチン B_{1a}が PLS-2 ミニカラムから溶出されるか否かについて確認した。その結果、検討を行った畜水産物 8 食品について、何れの試料においても最初の 2 vol%ギ酸・アセトニトリル 5 mL の溶出でエマメクチン B_{1a}及び 8,9-Z-エマメクチン B_{1a}は回収され、追加の 2 vol%ギ酸・アセトニトリル 5 mL 中にはエマメクチン B_{1a}及び 8,9-Z-エマメクチン B_{1a}は回収されていなかった。

表 15 定量限界値濃度 (0.0005 mg/kg) でのエマメクチン B_{1a}及び 8,9-Z-エマメクチン B_{1a}の回収率 (%)

	回収率 (%)	
	エマメクチンB _{1a}	8,9-Z-エマメクチンB _{1a}
牛の筋肉	95	94
牛の脂肪	78	80
牛の肝臓	96	96
牛乳	54	53
鶏卵	82	85
そば蜜	93	89
うなぎ	93	91
しじみ	92	92

0.0005 mg/kg 相当添加、n = 2

【実験方法】 7. 試験溶液の調製に従って調製した (ただし、酢酸エチル転溶時にはアンモニア水 1 mL を添加しなかった)。

6) 牛乳試料での追加検討

牛乳試料においてエマメクチン B_{1a} 及び 8,9-Z-エマメクチン B_{1a} の回収率が約 50%であった原因を検討するため、各精製工程で添加用標準溶液を添加することにより、各精製工程での回収率を比較した (表 16)。その結果、アセトニトリル/ヘキサン分配及び PLS-2 ミニカラム精製では 100%回収されていることから、牛乳試料における低回収率の原因は、酢酸エチル転溶工程に問題があることが明らかとなった。

表 16 各精製工程におけるエマメクチン B_{1a} 及び 8,9-Z-エマメクチン B_{1a} の回収率 (%)

牛乳	各精製工程における回収率 (%)		
	酢酸エチル転溶	アセトニトリル/ヘキサン分配	PLS-2ミニカラム精製
エマメクチンB _{1a}	50	105	104
8,9-Z-エマメクチンB _{1a}	56	103	103

(0.1 mg/kg 相当添加、n = 2)

【実験方法】 7. 試験溶液の調製に従って調製した (ただし、酢酸エチル転溶時にはアンモニア水 1 mL を添加しなかった)。

酢酸エチル転溶時、アセトニトリル/ヘキサン分配時または PLS-2 ミニカラム精製時に添加用標準溶液を添加した。

エマメクチン B_{1a} 及び 8,9-Z-エマメクチン B_{1a} は、エピ-メチルアミノ基 (pK_a=7.6) を有しており、弱塩基性であるため、酢酸エチル転溶時に非解離型にして有機層に移行しやすくなるか否か検討した。牛乳試料を用いて酢酸エチル転溶時のアンモニア水添加によるエマメクチン B_{1a} 及び 8,9-Z-エマメクチン B_{1a} の回収率を比較した (表 17)。その結果、酢酸エチル転溶時にアンモニア水を添加することにより、エマメクチン B_{1a} 及び 8,9-Z-エマメクチン B_{1a} の回収率は、概ね 100%に改善されたが、アンモニア水添加量による回収率の差異は認められなかった。さらに、アンモニア水を添加した場合の水層の pH を比較した結果、アンモニア水の添加量にかかわらず、水層の pH が大きく塩基性側に変動していた (表 18)。酢酸エチル転溶時にアンモニア水を添加し、その液性を塩基性側にするることにより、エマメクチン B_{1a} 及び 8,9-Z-エマメクチン B_{1a} は非解離型となり、有機層へ移行しやすくなり回収率が改善されたと推察される。以上の結果より、酢酸エチル転溶時にアンモニア水を添加し、その添加量は 1 mL を採用した。

表 17 酢酸エチル転溶時のアンモニア水添加によるエマメクチン B_{1a} 及び 8,9-Z-エマメクチン B_{1a} の

回 牛乳 収率 (%)	酢酸エチル転溶時のアンモニア水添加量			
	0 mL	0.5 mL	1 mL	2 mL
エマメクチンB _{1a}	36	105	105	106
8,9-Z-エマメクチンB _{1a}	38	99	101	100

(0.1 mg/kg 相当添加、n = 2)

【実験方法】 7. 試験溶液の調製に従って調製した。

牛乳ブランク試料のアセトン抽出液の溶媒を約 1 mL まで濃縮した後、添加用標準溶液を添加した。酢酸エチル転溶時、アンモニア水 0~2 mL を添加した。

表 18 酢酸エチル転溶時のアンモニア水添加による水層の pH

牛乳	酢酸エチル転溶時のアンモニア水添加量			
	0 mL	0.5 mL	1 mL	2 mL
水層のpH	pH 5.6	pH 10.3	pH 10.6	pH 10.8

牛乳試料において、エマメクチン B_{1a} 及び 8,9-Z-エマメクチン B_{1a} の回収率の改善が認められた酢酸エチル転溶時にアンモニア水 1 mL を添加する操作について、牛乳以外の 7 食品に適用可能であるか、その回収率及び酢酸エチル転溶時の水層の pH を検討した (表 19)。その結果、検討した何れの食品においても良好な回収率が得られた。表 15 と比較すると、酢酸エチル転溶時にアンモニア水 1 mL を添加することにより、牛の脂肪試料、牛乳試料及び鶏卵試料において回収率の著しい改善が認められた。さらに、検討を行った何れの食品においても酢酸エチル転溶時の水層の pH は、大きく塩基性側に変動していた。以上の結果から、酢酸エチル転溶時にアンモニア水 1 mL を添加する操作を採用した。

表 19 定量限界値濃度 (0.0005 mg/kg) でのエマメクチン B_{1a} 及び 8,9-Z-エマメクチン B_{1a} の回収率 (%)

	回収率 (%)		酢酸エチル転溶時の 水層のpH
	エマメクチンB _{1a}	8,9-Z-エマメクチンB _{1a}	
牛の筋肉	100	100	10.5
牛の脂肪	98	98	10.6
牛の肝臓	92	95	10.5
牛乳	94	96	10.7
鶏卵	97	96	10.6
そば蜜	95	96	10.6
うなぎ	95	96	10.6
しじみ	98	98	10.6

0.0005 mg/kg 相当添加、n = 2

3. 添加回収試験

牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳、鶏卵、はちみつ、うなぎ及びしじみの 8 食品を試料に用いて、実験方法の 7. 試験溶液の調製に従って添加回収試験 (エマメクチン安息香酸塩換算として基準値濃度または定量限界値濃度の 2 濃度) を実施した。添加回収試験における回収率 100% 相当の溶媒標準溶液、各食品のブランク試料及び添加試料の代表的なクロマトグラムを図 12~22 に示した。また、各食品のスキヤ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 23-1 及び図 23-2 に示した。特に、測定を妨害するような顕著なピークは認められなかった。

1) 選択性

選択性の検討結果を表 20 に示した。検討した何れの試料においても、ブランク試料にエマメクチン B_{1a} 及び 8,9-Z-エマメクチン B_{1a} の定量を妨害するピークは認められなかった。

表 20 選択性の評価

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 [検出限界] (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)
エマメクチンB _{1a}	牛の筋肉	0.0005	0.002	基準値	0.002	< 0.100	面積	0	0	0			#DIV/0!	#DIV/0!	○	
		0.0005	0.002	基準値	0.002	< 0.100	面積	0	0	0			#DIV/0!	#DIV/0!	○	
	牛の脂肪	0.0005	0.002	基準値	0.002	< 0.100	面積	0	0	0			#DIV/0!	#DIV/0!	○	
		0.0005	0.01	基準値	0.01	< 0.100	面積	0	0	0			#DIV/0!	#DIV/0!	○	
	牛の肝臓	0.0005	0.0005	定量限界	0.0005	< 0.333	面積	0	0	0			#DIV/0!	#DIV/0!	○	
		0.0005	0.0005	定量限界	0.0005	< 0.333	面積	0	0	0			#DIV/0!	#DIV/0!	○	
	牛乳	0.0005	0.0005	定量限界	0.0005	< 0.333	面積	0	0	0			#DIV/0!	#DIV/0!	○	
		0.0005	0.0005	定量限界	0.0005	< 0.333	面積	0	0	0			#DIV/0!	#DIV/0!	○	
	鶏卵	0.0005	0.0005	定量限界	0.0005	< 0.333	面積	0	0	0			#DIV/0!	#DIV/0!	○	
		0.0005	0.0005	定量限界	0.0005	< 0.333	面積	0	0	0			#DIV/0!	#DIV/0!	○	
はちみつ	0.0005	0.0005	定量限界	0.0005	< 0.333	面積	0	0	0			#DIV/0!	#DIV/0!	○		
	0.0005	0.0005	定量限界	0.0005	< 0.333	面積	0	0	0			#DIV/0!	#DIV/0!	○		
8,9-Z-エマメクチンB _{1a}	牛の筋肉	0.0005	0.002	基準値	0.002	< 0.100	面積	0	0	0			#DIV/0!	#DIV/0!	○	
		0.0005	0.002	基準値	0.002	< 0.100	面積	0	0	0			#DIV/0!	#DIV/0!	○	
	牛の脂肪	0.0005	0.01	基準値	0.01	< 0.100	面積	0	0	0			#DIV/0!	#DIV/0!	○	
		0.0005	0.0005	定量限界	0.0005	< 0.333	面積	0	0	0			#DIV/0!	#DIV/0!	○	
	牛の肝臓	0.0005	0.0005	定量限界	0.0005	< 0.333	面積	0	0	0			#DIV/0!	#DIV/0!	○	
		0.0005	0.0005	定量限界	0.0005	< 0.333	面積	0	0	0			#DIV/0!	#DIV/0!	○	
	牛乳	0.0005	0.0005	定量限界	0.0005	< 0.333	面積	0	0	0			#DIV/0!	#DIV/0!	○	
		0.0005	0.0005	定量限界	0.0005	< 0.333	面積	0	0	0			#DIV/0!	#DIV/0!	○	
	鶏卵	0.0005	0.0005	定量限界	0.0005	< 0.333	面積	0	0	0			#DIV/0!	#DIV/0!	○	
		0.0005	0.0005	定量限界	0.0005	< 0.333	面積	0	0	0			#DIV/0!	#DIV/0!	○	
はちみつ	0.0005	0.0005	定量限界	0.0005	< 0.333	面積	0	0	0			#DIV/0!	#DIV/0!	○		
	0.0005	0.0005	定量限界	0.0005	< 0.333	面積	0	0	0			#DIV/0!	#DIV/0!	○		
うなぎ	0.0005	0.0005	定量限界	0.0005	< 0.333	面積	0	0	0			#DIV/0!	#DIV/0!	○		
	0.0005	0.0005	定量限界	0.0005	< 0.333	面積	0	0	0			#DIV/0!	#DIV/0!	○		
しじみ	0.0005	0.0005	定量限界	0.0005	< 0.333	面積	0	0	0			#DIV/0!	#DIV/0!	○		
	0.0005	0.0005	定量限界	0.0005	< 0.333	面積	0	0	0			#DIV/0!	#DIV/0!	○		

*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する。(必要に応じて起爆注入を行う。)
 *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。
 *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「○」、適合しない場合には「×」を記載する。

2) 真度及び精度

真度及び併行精度の検討結果を表 21 に示した。残留基準値濃度での 5 併行の添加回収試験における真度は、エマメクチン B_{1a} が 95.0~99.1%、8,9-Z-エマメクチン B_{1a} が 95.4~98.9%であった。また、併行精度の相対標準偏差はエマメクチン B_{1a} が 2.4~4.2%、8,9-Z-エマメクチン B_{1a} が 2.0~3.8%であった。回収率及び併行精度は厚生労働省から通知されている「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインについて」(平成 19 年 11 月 15 日、平成 22 年 12 月 24 日改正)で示されている目標値を満足するものであった。

牛の筋肉、牛の脂肪及び牛の肝臓以外の試料での残留基準値が 0.0005 mg/kg と極めて低いことから、本測定法における定量限界値を 0.0005 mg/kg とし評価した。そこで、牛の筋肉、牛の脂肪及び牛の肝臓の 3 試料について、定量限界値濃度を添加し、5 併行の添加回収試験を行った。真度は、エマメクチン B_{1a} が 93.8~99.7%、8,9-Z-エマメクチン B_{1a} が 96.3~98.9%であった。また、併行精度の相対標準偏差はエマメクチン B_{1a} が 2.4~4.1%、8,9-Z-エマメクチン B_{1a} が 2.5~2.6 %であった。これら試料を含めて検討した 8 種類の畜水産物で、定量限界値濃度の添加回収試験において良好な結果が認められた。さらに、定量限界値濃度での添加回収試験のクロマトグラムより算出した S/N 比の平均値は 112.8~474.5 であり、検討した何れの試料においても S/N ≥ 10 を満たしていた(表 22)。

表 21 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 [検出限界] (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
エマメクチンB _{1a}	牛の筋肉	0.0005	0.002	0.002	—	296655	-245	0.9999	101.9	99.9	94.8	96.9	98.2	98.3	2.8			#DIV/0!		
		0.0005	0.002	0.0005	S/N	210050	-278	0.9996	100.6	101.6	97.1	102.1	97.1	99.7	2.4	315.8	209.9	262.8		
	牛の脂肪	0.0005	0.002	0.002	—	310003	-37	0.9996	100.8	99.7	93.2	91.3	96.1	96.2	4.2			#DIV/0!		
		0.0005	0.002	0.0005	S/N	236708	-1	0.9995	102.7	94.9	97.8	96.0	99.2	98.1	3.1	315.8	209.9	262.8		
	牛の肝臓	0.0005	0.01	0.01	—	322944	24	0.9998	98.3	100.2	92.1	93.0	91.3	95.0	4.2			#DIV/0!		
		0.0005	0.01	0.0005	S/N	261290	-503	0.9992	100.3	92.1	93.5	93.0	90.3	93.8	4.1	315.8	209.9	262.8		
	牛乳	0.0005	0.0005	0.0005	S/N	237569	-113	0.9988	99.9	95.3	97.1	93.0	95.6	96.2	2.6	315.8	209.9	262.8		
		0.0005	0.0005	0.0005	S/N	234059	60	0.9996	102.1	99.2	99.5	99.4	95.5	99.1	2.4	315.8	209.9	262.8		
	鶏卵	0.0005	0.0005	0.0005	S/N	280104	-90	0.9997	98.4	94.9	92.4	97.0	92.7	95.1	2.8	633.3	315.8	474.5		
		0.0005	0.0005	0.0005	S/N	241754	-195	0.9986	102.2	95.6	96.3	96.1	94.8	97.0	3.1	209.9	209.9	209.9		
はちみつ	0.0005	0.0005	0.0005	S/N	260864	20	0.9994	102.2	95.8	97.7	98.0	98.7	98.5	2.4	209.9	209.9	209.9			
	0.0005	0.002	0.002	—	157775	-152	0.9994	101.5	100.8	95.8	97.2	98.5	98.8	2.4			#DIV/0!			
8,9-Z-エマメクチンB _{1a}	牛の筋肉	0.0005	0.002	0.0005	S/N	112112	-78	0.9991	100.0	95.9	99.2	102.3	97.3	98.9	2.5	160.8	111.6	136.2		
		0.0005	0.002	0.002	—	166859	183	0.9998	99.8	100.4	93.7	95.7	99.4	97.8	3.0			#DIV/0!		
	牛の脂肪	0.0005	0.002	0.0005	S/N	131816	16	0.9990	102.2	96.4	98.5	96.0	100.1	98.6	2.6	175.8	114.9	145.3		
		0.0005	0.01	0.01	—	178844	-817	0.9999	99.9	100.5	93.3	95.8	92.6	96.4	3.8			#DIV/0!		
	牛の肝臓	0.0005	0.01	0.0005	S/N	147287	-298	0.9998	100.4	94.5	96.9	94.7	94.9	96.3	2.6	174.5	117.4	146.0		
		0.0005	0.0005	0.0005	S/N	129749	-16	0.9989	98.2	93.4	100.2	94.5	98.4	96.9	3.0	169.5	113.3	141.4		
	牛乳	0.0005	0.0005	0.0005	S/N	133888	-171	0.9989	102.6	100.4	100.5	95.4	95.7	98.9	3.2	178.3	113.3	145.8		
		0.0005	0.0005	0.0005	S/N	152272	-167	0.9988	95.3	97.5	92.4	98.8	93.1	95.4	2.9	338.3	158.3	248.3		
	鶏卵	0.0005	0.0005	0.0005	S/N	145347	-408	0.9993	100.6	96.3	98.8	97.0	95.9	97.7	2.0	117.4	114.9	116.2		
		0.0005	0.0005	0.0005	S/N	141726	103	0.9990	102.0	96.7	98.7	101.8	94.3	98.7	3.4	114.1	111.6	112.8		

*1 S/Nを求める必要がある場合には「S/N」と表示される。
 *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を求める。

表 22 定量限界濃度での S/N 比

No.	分析対象化合物	食品名	定量 イオン ($\mu\text{g/L}$)	定量限界 (mg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	Max.						Min.						S/N		備 考		
							ピークの 最大値 (Dmax)	ノイズ			ピーク トップ (D)	ピーク 高さ (S)	ノイズ 幅 (N)	ピークの 最大値 (Dmax)	ノイズ			ピーク トップ (D)	ピーク 高さ (S)	ノイズ 幅 (N)		Max.	Min.
								最大値 (E1)	最小値 (E2)	中央値 (C) *					最大値 (E1)	最小値 (E2)	中央値 (C) *						
エマメクチン B _{1a}	牛の筋肉	158	0.0005	0.002	0.0005	254	2	0	1	253.6	252.6	0.8	254	3	0	2	253.4	251.9	1.2	315.8	209.9		
		158	0.0005	0.002	0.0005	254	2	0	1	253.6	252.6	0.8	254	3	0	2	253.4	251.9	1.2	315.8	209.9		
		158	0.0005	0.01	0.0005	254	2	0	1	253.6	252.6	0.8	254	3	0	2	253.4	251.9	1.2	315.8	209.9		
		158	0.0005	0.0005	0.0005	254	2	0	1	253.6	252.6	0.8	254	3	0	2	253.4	251.9	1.2	315.8	209.9		
		158	0.0005	0.0005	0.0005	254	2	0	1	253.6	252.6	0.8	254	3	0	2	253.4	251.9	1.2	315.8	209.9		
		158	0.0005	0.0005	0.0005	254	2	0	1	253.6	252.6	0.8	254	3	0	2	253.4	251.9	1.2	315.8	209.9		
		158	0.0005	0.0005	0.0005	254	2	0	1	253.6	252.6	0.8	254	3	0	2	253.4	251.9	1.2	315.8	209.9		
		158	0.0005	0.0005	0.0005	254	2	0	1	253.6	252.6	0.8	254	3	0	2	253.4	251.9	1.2	315.8	209.9		
		158	0.0005	0.0005	0.0005	254	2	0	1	253.6	252.6	0.8	254	3	0	2	253.4	251.9	1.2	315.8	209.9		
		158	0.0005	0.0005	0.0005	254	2	0	1	253.6	252.6	0.8	254	3	0	2	253.4	251.9	1.2	315.8	209.9		
8,9-Z-エマメクチン B _{1a}	牛の筋肉	158	0.0005	0.002	0.0005	130	2	0	1	129.6	128.6	0.8	136	3	0	2	135.4	133.9	1.2	160.8	111.6		
		158	0.0005	0.002	0.0005	142	2	0	1	141.6	140.6	0.8	140	3	0	2	139.4	137.9	1.2	175.8	114.9		
		158	0.0005	0.01	0.0005	141	2	0	1	140.6	139.6	0.8	143	3	0	2	142.4	140.9	1.2	174.5	117.4		
		158	0.0005	0.0005	0.0005	137	2	0	1	136.6	135.6	0.8	138	3	0	2	137.4	135.9	1.2	169.5	113.3		
		158	0.0005	0.0005	0.0005	144	2	0	1	143.6	142.6	0.8	138	3	0	2	137.4	135.9	1.2	178.3	113.3		
		158	0.0005	0.0005	0.0005	136	1	0	1	135.8	135.3	0.4	128	2	0	1	127.6	126.6	0.8	338.3	158.3		
		158	0.0005	0.0005	0.0005	143	3	0	2	142.4	140.9	1.2	140	3	0	2	139.4	137.9	1.2	117.4	114.9		
		158	0.0005	0.0005	0.0005	139	3	0	2	138.4	136.9	1.2	136	3	0	2	135.4	133.9	1.2	114.1	111.6		

3) 試料マトリックスの測定値への影響

添加回収試験（基準値濃度または定量限界値濃度の 2 濃度）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と溶媒標準溶液を交互に 2 回測定し、そのピーク面積比から試料マトリックスの測定への影響を評価した。ピーク面積比は 0.97~1.02 の範囲であり、検討した何れの試料においても、顕著なイオン化抑制及び増強効果は低く、許容できる範囲であると考えられた(表 23)。

表 23 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 [検出限界] (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			ピーク面積 (高さ) 比 ^{*5}	
									n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均		
エマメクチン B _{1a}	牛の筋肉	0.0005	0.002	0.0005	0.0005	0.0002	面積	0	60763	60884	60824	60996	60654	60825	1.00	
		0.0005	0.002	0.0005	0.0005	0.0005	面積	0	15508	15067	15288	15224	15255	15240	1.00	
		0.0005	0.002	0.002	0.0002	0.0002	面積	0	58394	58292	58343	59016	58938	58977	0.99	
		0.0005	0.002	0.0005	0.0005	0.0005	面積	0	14317	14280	14299	14391	14433	14412	0.99	
		0.0005	0.01	0.01	0.001	0.001	面積	0	306068	303627	304848	309602	305974	307788	0.99	
		0.0005	0.01	0.0005	0.0005	0.0005	面積	0	14588	14709	14649	14740	14794	14767	0.99	
		0.0005	0.0005	0.0005	0.0005	0.0005	面積	0	13969	14226	14098	14293	14032	14163	1.00	
		0.0005	0.0005	0.0005	0.0005	0.0005	面積	0	13916	14078	13997	13873	13921	13897	1.01	
		0.0005	0.0005	0.0005	0.0005	0.0005	面積	0	14172	14601	14387	13991	14171	14081	1.02	
		0.0005	0.0005	0.0005	0.0005	0.0005	面積	0	14324	14323	14324	14488	14097	14293	1.00	
8,9-Z-エマメクチン B _{1a}	牛の筋肉	0.0005	0.002	0.002	0.0002	0.0002	面積	0	36911	35973	36442	36697	36317	36507	1.00	
		0.0005	0.002	0.0005	0.0005	0.0005	面積	0	8645	8644	8645	8657	8593	8625	1.00	
		0.0005	0.002	0.002	0.0002	0.0002	面積	0	33849	32913	33381	32838	32886	32862	1.02	
		0.0005	0.002	0.0005	0.0005	0.0005	面積	0	8336	8390	8363	8401	8519	8460	0.99	
		0.0005	0.01	0.01	0.001	0.001	面積	0	169959	169119	169539	179752	170428	175090	0.97	
		0.0005	0.01	0.0005	0.0005	0.0005	面積	0	8615	8459	8537	8559	8707	8633	0.99	
		0.0005	0.0005	0.0005	0.0005	0.0005	面積	0	8160	8127	8144	8438	8384	8411	0.97	
		0.0005	0.0005	0.0005	0.0005	0.0005	面積	0	8211	8215	8213	8105	8104	8105	1.01	
		0.0005	0.0005	0.0005	0.0005	0.0005	面積	0	8007	8090	8049	8114	8099	8107	0.99	
		0.0005	0.0005	0.0005	0.0005	0.0005	面積	0	8039	7943	7991	8056	8286	8161	0.98	
0.0005	0.0005	0.0005	0.0005	0.0005	面積	0	8224	8070	8147	8222	8441	8332	0.98			

*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）を作成する。

*2 マトリックス添加標準溶液及び溶媒標準溶液の順に交互に2回以上測定した結果から評価する。（必要に応じて繰返し注入を行う。）

*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る。

*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する。

*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）の比を求める。

4. まとめ

検討した何れの試料においても、ブランク試料のクロマトグラムに定量を妨害するピークは認められなかった。エマメクチン B_{1a} の真度 93.8~99.7%、併行精度 2.4~4.2%及び 8,9-Z-エマメクチン B_{1a} の真度 95.4~98.9%、併行精度 2.0~3.8%は目標値に適合する結果であった。マトリックス添加標準溶液及び溶媒標準溶液のピーク面積比は 0.97~1.02 であり、本法では明らかなマトリックス効果は認められなかった。定量限界濃度（0.0005 mg/kg）での添加回収試験の S/N 比は、検討した何れの試料においても S/N ≥ 10 を満たした。

【結論】

畜水産物中エマメクチン安息香酸塩試験法として、エマメクチン B_{1a} 及び 8,9-Z-エマメクチン B_{1a} を試料からアセトンで抽出し、20 w/v% 塩化ナトリウム溶液、アンモニア水及び酢酸エチルを加え、有機溶媒転溶した後、アセトニトリル/ヘキサン分配により脱脂し、スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラムで精製し、LC-MS/MS で定量及び確認する方法を開発した。開発した試験法を牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳、鶏卵、はちみつ、うなぎ及びしじみの畜水産物 8 食品に適用した結果、良好な結果が認められたため、本法は畜水産物の残留分析法として適用可能であることが確認された。

【クロマトグラム報告】

① 添加回収試験（基準値添加）における代表的なクロマトグラム

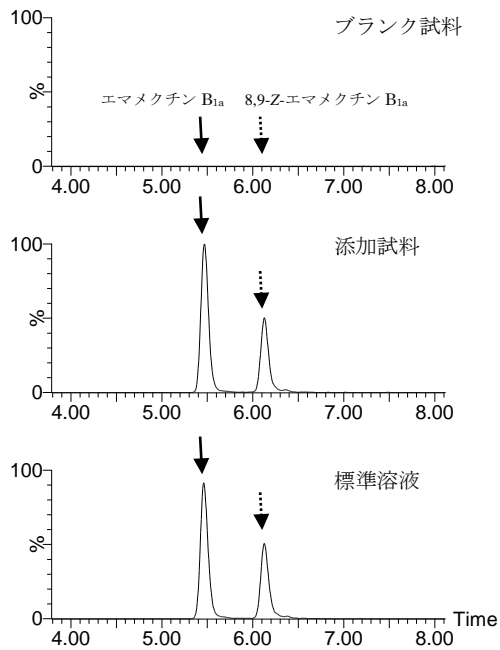


図 12 牛の筋肉の SRM クロマトグラム
(m/z 887→158)
添加濃度：0.002 ppm

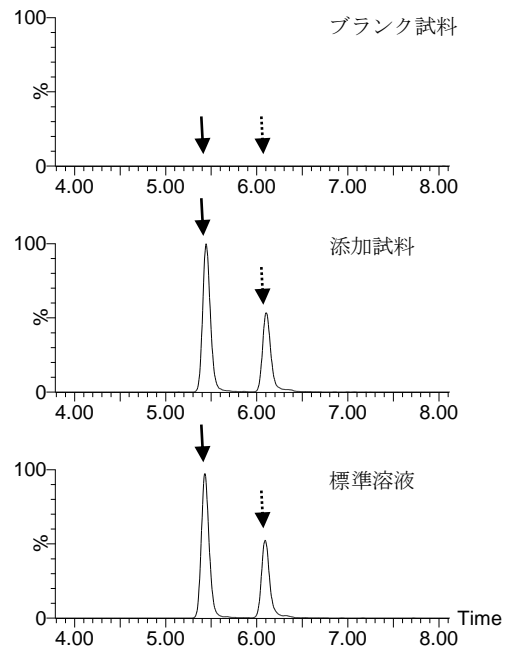


図 13 牛の脂肪の SRM クロマトグラム
(m/z 887→158)
添加濃度：0.002 ppm

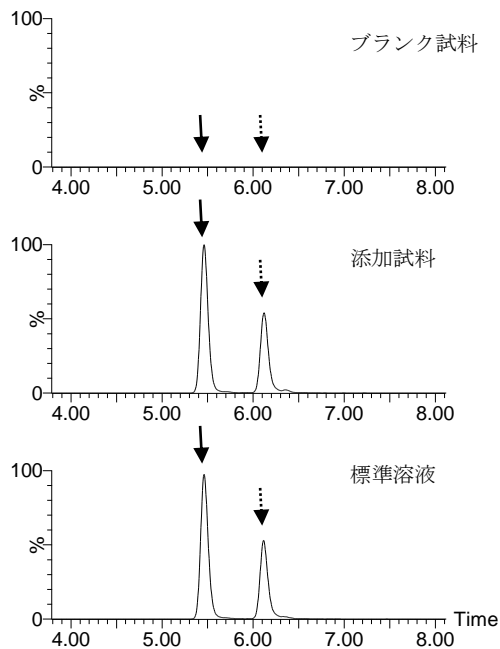


図 14 牛の肝臓の SRM クロマトグラム
(m/z 887→158)
添加濃度：0.01 ppm

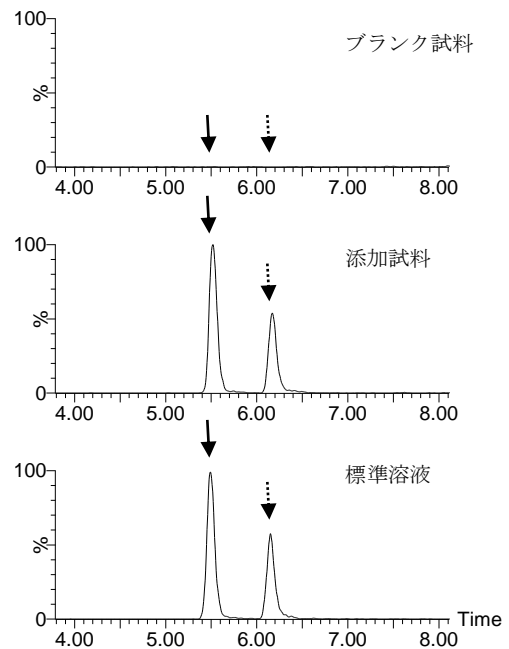


図 15 牛乳の SRM クロマトグラム
(m/z 887→158)
添加濃度：0.0005 ppm

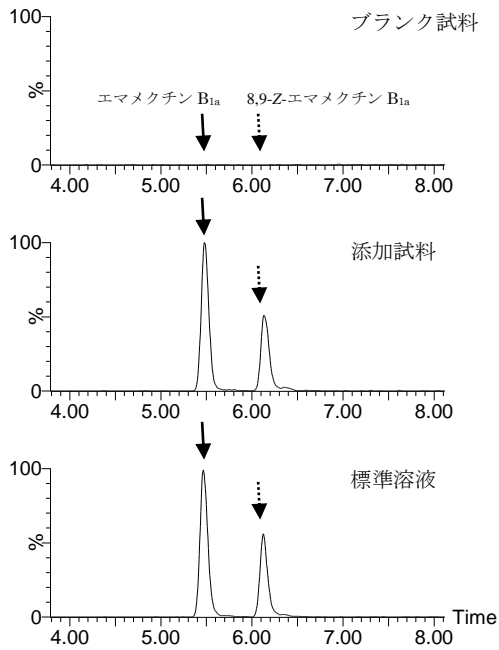


図 16 鶏卵の SRM クロマトグラム
(m/z 887→158)
添加濃度 : 0.0005 ppm

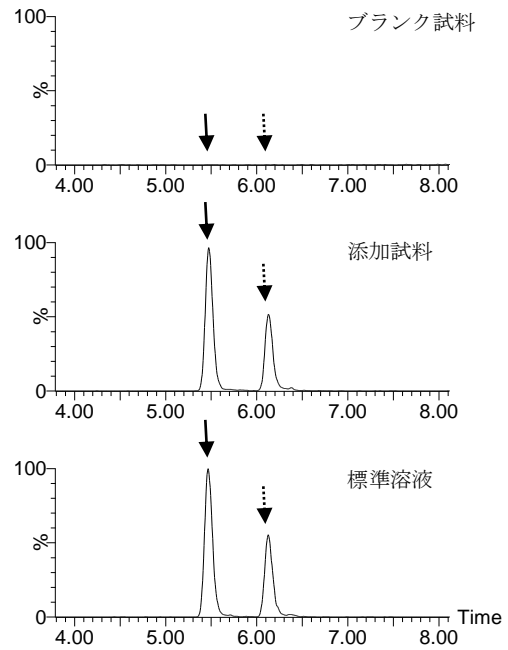


図 17 はちみつの SRM クロマトグラム
(m/z 887→158)
添加濃度 : 0.0005 ppm

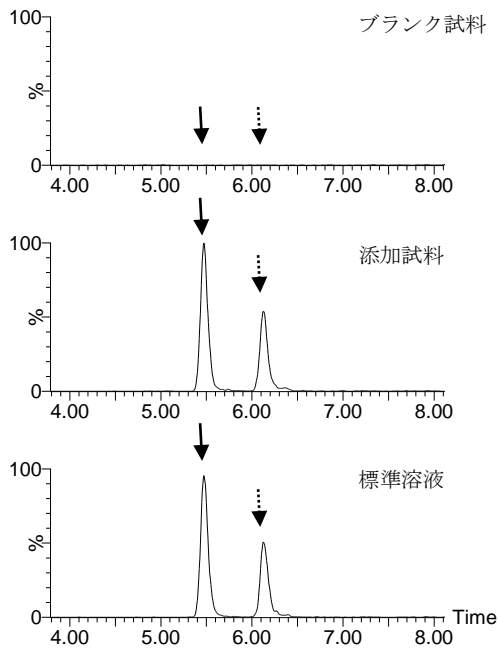


図 18 うなぎの SRM クロマトグラム
(m/z 887→158)
添加濃度 : 0.0005 ppm

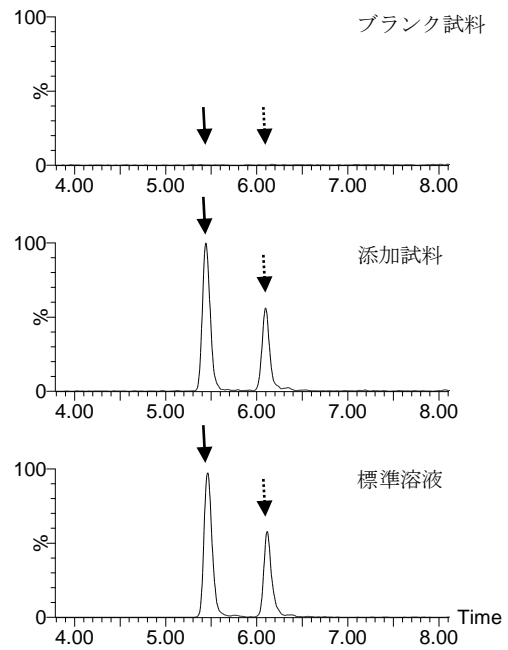


図 19 しじみの SRM クロマトグラム
(m/z 887→158)
添加濃度 : 0.0005 ppm

② 添加回収試験（定量限界値添加）における代表的なクロマトグラム

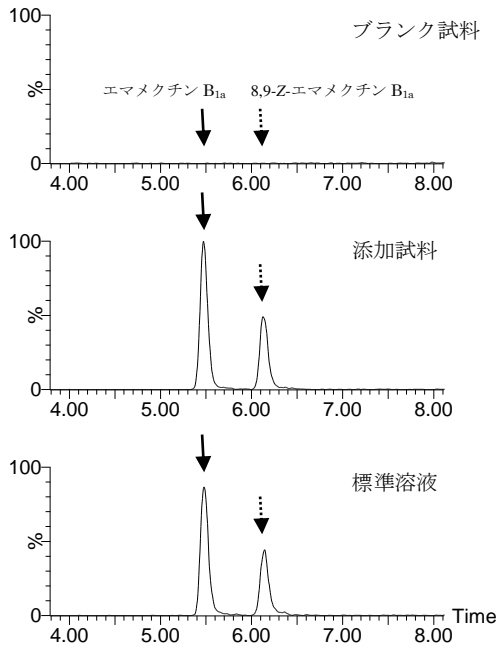


図 20 牛の筋肉の SRM クロマトグラム
(m/z 887→158)
添加濃度：0.0005 ppm

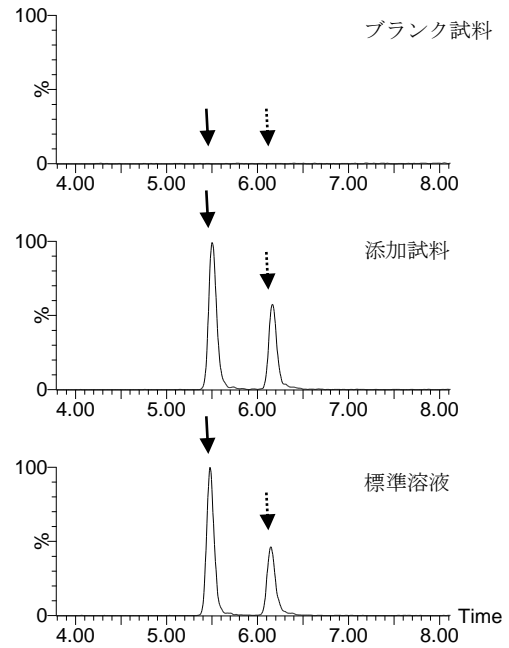


図 21 牛の脂肪の SRM クロマトグラム
(m/z 887→158)
添加濃度：0.0005 ppm

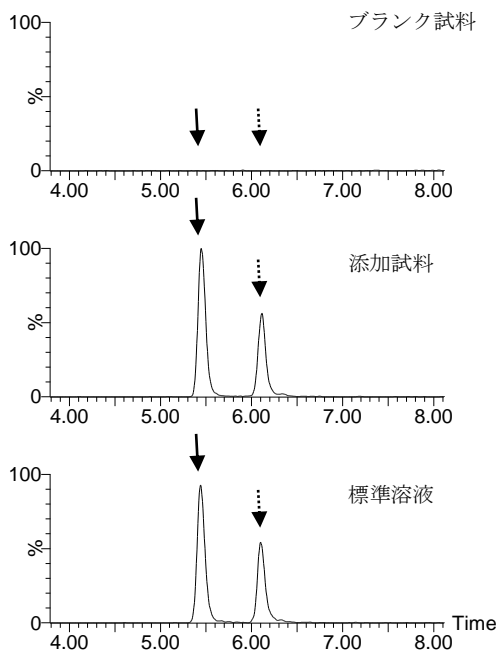


図 22 牛の肝臓の SRM クロマトグラム
(m/z 887→158)
添加濃度：0.0005 ppm

③ 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

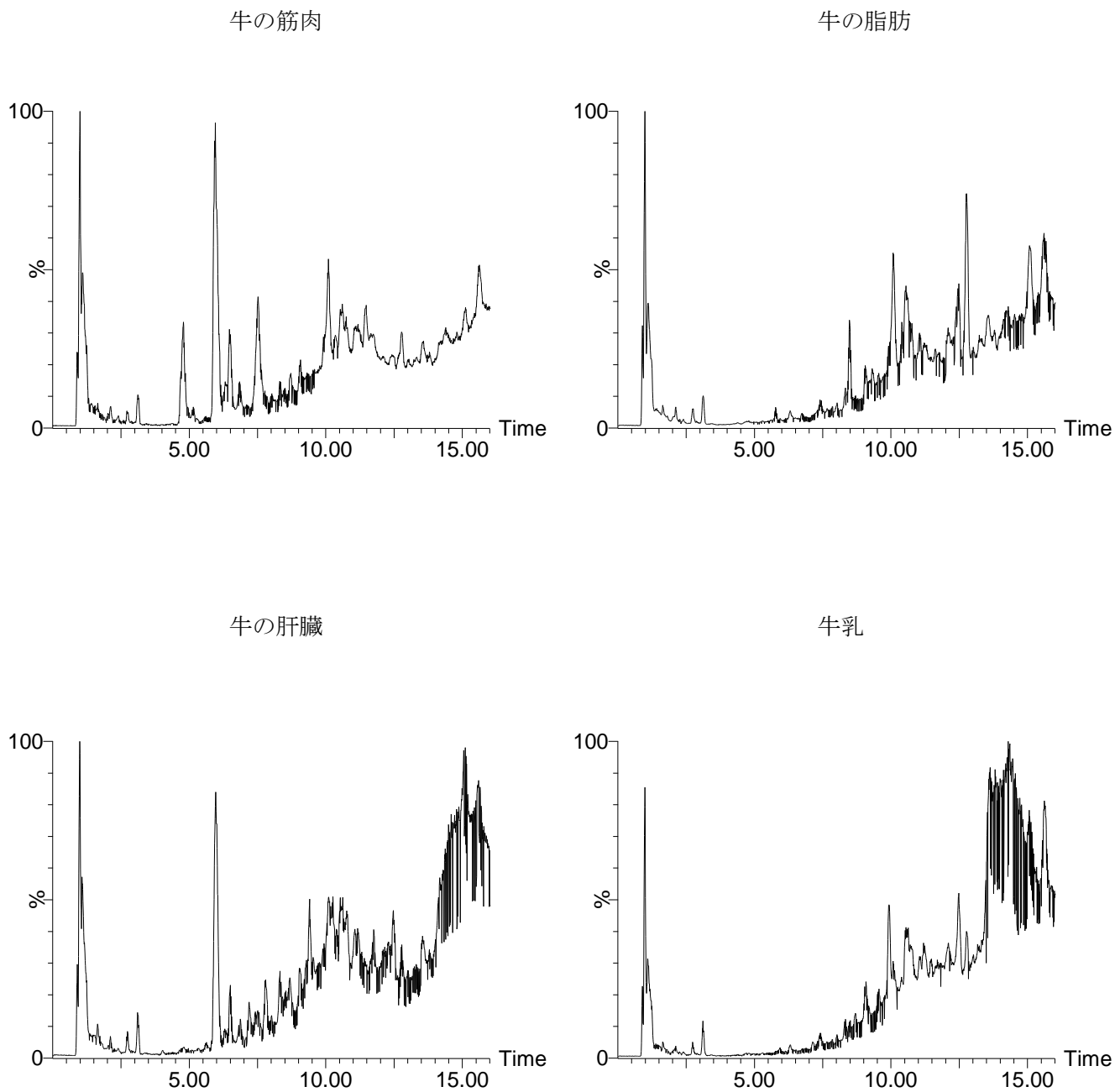
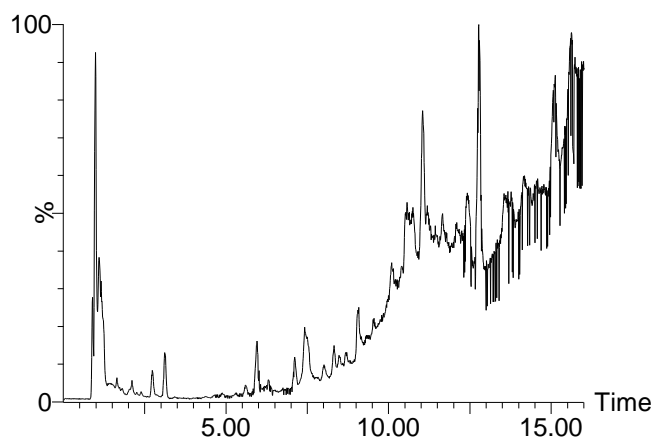
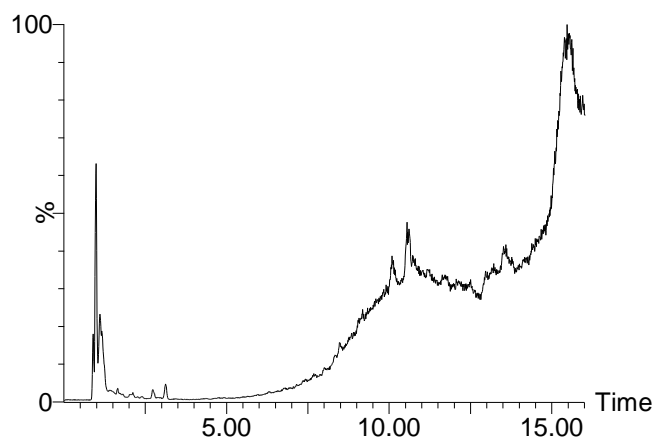


図 23-1 ブランク試料のトータルイオンクロマトグラム
スキャン範囲：50~1000 amu
測定条件：ESI(+), CV=60 V (CV: corn voltage)

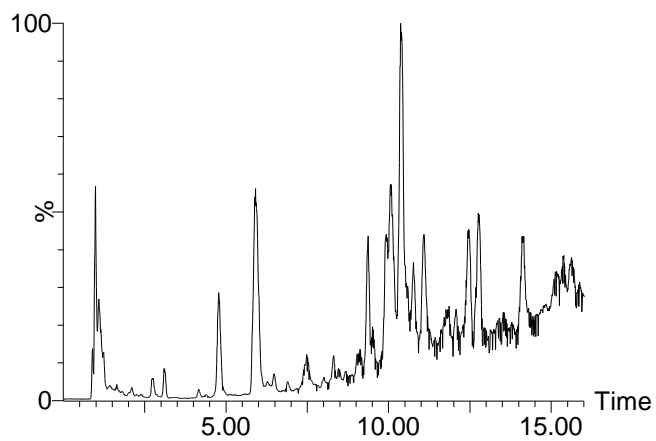
鶏卵



はちみつ



うなぎ



しじみ

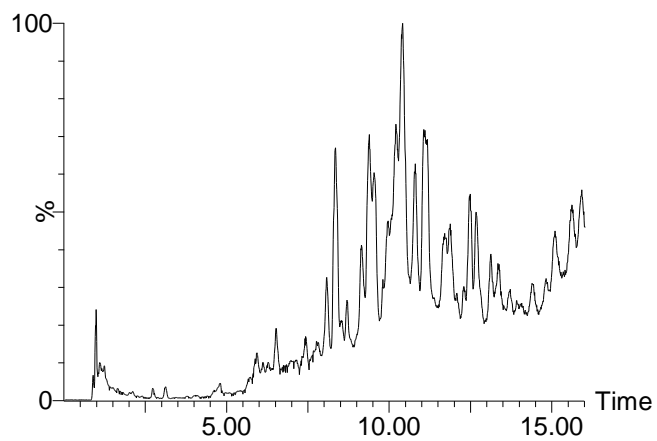


図 23-2 ブランク試料のトータルイオンクロマトグラム
スキャン範囲：50~1000 amu
測定条件：ESI(+)、CV=60 V (CV: corn voltage)