

※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。

フェンチオン試験法の検討結果

[緒言]

1. 目的及び試験法の検討方針

フェンチオンは有機リン系殺虫剤であり、アセチルコリンエステラーゼを失活させることでシナプスのアセチルコリン濃度を上昇させ、神経の異常興奮を起こさせる。

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おけるフェンチオンの個別試験法は代謝物を含まない試験法である。「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、ジクロロメタンを使用せず、かつ代謝物を含む試験法の開発を行った。

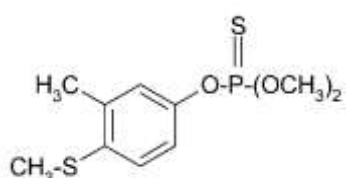
1) 規制対象物質

- ・フェンチオン
- ・フェンチオンスルホキシド (以下、「代謝物B」と略す。)
- ・フェンチオンスルホン (以下、「代謝物C」と略す。)
- ・フェンチオンオキシソ (以下、「代謝物D」と略す。)
- ・フェンチオンオキシソスルホキシド (以下、「代謝物E」と略す。)
- ・フェンチオンオキシソスルホン (以下、「代謝物F」と略す。)

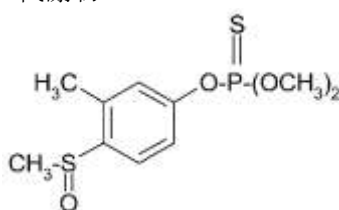
2. 分析対象化合物の構造式、物理化学的性質、基準値等に関する情報

1) 構造式

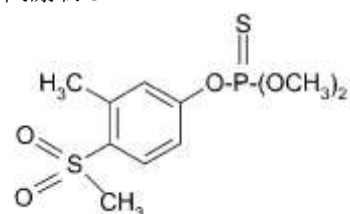
フェンチオン



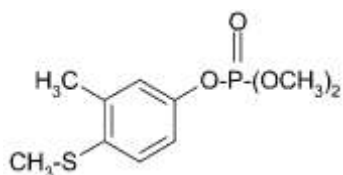
代謝物B



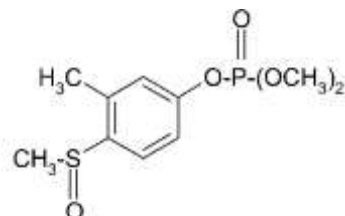
代謝物C



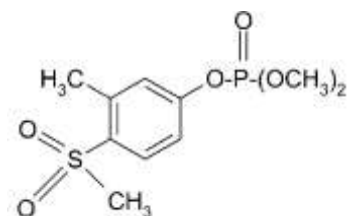
代謝物D



代謝物E



代謝物F



2) 物理化学的性質

フェンチオン

化学式： $C_{10}H_{15}O_3PS_2$

分子量：278.33

化学名 (IUPAC)：O,O-dimethyl O-4-methylthio-m-tolyl phosphorothioate

外 観：無色油状液体

蒸気圧：0.74 mPa (20°C)、1.4 mPa (25°C)

溶解性：水 4.2 mg/L (20°C)、

ジクロロメタン、トルエン、イソプロパノール >250、*n*-ヘキサン 100 (以上 g/L、20°C)

オクタノール/水分配係数：log Pow=4.84

安定性：加水分解半減期；223日 (pH 4)、200日 (pH 7)、151日 (pH 9) (以上 22°C)

熱安定性；210 °Cまで安定

光分解性；なし

(出典：The e-Pesticide Manual 16th ed.,ver.5.0)

代謝物B

化学式： $C_{10}H_{15}O_4PS_2$

分子量：294.33

外 観：白色結晶性粉末

溶解性：アセトンに可溶。

代謝物C

化学式： $C_{10}H_{15}O_5PS_2$

分子量：310.33

外 観：白色結晶性粉末

溶解性：水 2.6 g/L (30°C)、アセトンに可溶、非極性溶媒に難溶。

シクロヘキサノン 790、キシレン 100 (以上 g/kg、30 °C)、

メタノール 880 g/kg (室温)

代謝物D

化学式： $C_{10}H_{15}O_4PS$

分子量：262.26

外 観：無色～黄色液体

溶解性：アセトンに可溶。

代謝物E

化学式： $C_{10}H_{15}O_5PS$

分子量：278.26

外 観：白色結晶性粉末

溶解性：水、エタノール及びアセトンに可溶。

代謝物F

化学式：C₁₀H₁₅O₆PS

分子量：294.26

外 観：白色結晶性粉末

溶解性：水、エタノール及びアセトンに可溶。

(出典：和光純薬株式会社提供資料)

3) 基準値

フェンチオン、フェンチオンスルホキシド及びフェンチオンスルホンの和をフェンチオンに換算したもの及びフェンチオンオキソン、フェンチオンオキシンスルホキシド及びフェンチオンオキシンスルホンの和をフェンチオンに換算したものの和として

①農産物

玄米及びさとうきび	0.3 ppm
大豆、ばれいしょ及びアボカド	0.05 ppm
小豆類及びかんしょ	0.1 ppm
やまいも（長いものをいう）	0.2 ppm
ネクタリン、かき及びその他の果実	1 ppm
なつみかんの果実全体、レモン、オレンジ（ネーブルオレンジを含む）、グレープフルーツ、ライム、その他のかんきつ類果実及びおうとう（チェリーを含む）	2 ppm
すもも（プルーンを含む）	3 ppm
キウイー及びマンゴー	5 ppm

②畜水産物

魚介類	0.08 ppm
-----	----------

③加工食品

食用オリーブ油（バージンオイルに限る。）	1 ppm
----------------------	-------

[実験方法]

1. 試料

1) 購入先

うなぎは愛知県の養鰻業者から、しじみは都内の卸売市場から、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砕し均一化した。
- ②大豆は425 μm の標準網ふるいを通るように粉砕し均一化した。
- ③らっかせいは殻を除き、2 mmのふるいを通るように粉砕し均一化した。
- 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、細切均一化した。
- ⑦オレンジは細切均一化した。
- ⑧りんごは花おち、しん及び果梗の基部を除き、細切均一化した。
- ⑨茶は425 μm の標準網ふるいを通るように粉砕し均一化した。
- ⑩ぶどうは果梗を除き、細切均一化した。

(畜水産物)

- ①牛の筋肉は可能な限り脂肪層を除き、細切均一化した。
- ②牛の脂肪は可能な限り筋肉部を除き、細切均一化した。
- ③牛の肝臓は全体を細切均一化した。
- ④鶏の筋肉は可能な限り脂肪層を除き、細切均一化した。
- ⑤鶏卵は殻を除き、卵白と卵黄を合わせてよく混合し均一化した。
- ⑥牛乳は全体をよく混合して均一化した。
- ⑦はちみつはそば蜜を使用し、加温(40°C以下)してから、よく混合して均一化した。
- ⑧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)を細切均一化した。
- ⑨さけは可食部(皮を含む)を細切均一化した。
- ⑩しじみは貝殻を除き、約5分間水切りを行った後、細切均一化した。

2. 試薬・試液

1) 標準品

フェンチオン標準品：純度98.4% (AccuStandard製)

代謝物B標準品：純度99.5% (和光純薬工業製)

代謝物C標準品：純度99.5% (和光純薬工業製)

代謝物D標準品：純度99.5% (和光純薬工業製)

代謝物E標準品：純度98.8% (和光純薬工業製)

代謝物F標準品：純度99.7% (和光純薬工業製)

2) 試薬

- アセトニトリル、アセトン、酢酸エチル、*n*-ヘキサン：残留農薬試験用（関東化学製）
メタノール：高速液体クロマトグラフ用（関東化学製）
酢酸アンモニウム：特級（関東化学製）
過マンガン酸カリウム：試薬特級（小宗化学製）
ケイソウ土：セライト545（関東化学製）
グラファイトカーボン/アミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム：InertSep GC/NH₂（充てん量500 mg/500 mg、ジーエルサイエンス製）
多孔性ケイソウ土カラム：InertSep K-solute 5 mL用（ジーエルサイエンス製）

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：フェンチオン、代謝物B、代謝物C、代謝物D、代謝物E及び代謝物F標準品、各25 mgを精秤し、それぞれアセトンに溶かして各500 mg/L溶液を調製した。

検量線用混合標準溶液：代謝物C及び代謝物F標準原液を水及びメタノール（1：1）混液で混合希釈し、0.00025～0.0225 mg/Lの濃度の混合溶液を調製した。

添加用混合標準溶液：フェンチオン及び代謝物D標準原液をアセトンで混合希釈して0.1、1、2及び20 mg/Lの濃度の混合溶液を調製した。代謝物B及び代謝物E標準原液をアセトンで混合希釈して0.1、1、2及び20 mg/Lの濃度の混合溶液を調製した。代謝物C及び代謝物F標準原液をアセトンで混合希釈して0.1、1、2及び20 mg/Lの濃度の混合溶液を調製した。

②試液の調製方法

n-ヘキサン飽和アセトニトリル

n-ヘキサン200 mL及びアセトニトリル1000 mLを混合し、5分間振とうした後アセトニトリル層を採った。

5 w/v%過マンガン酸カリウム溶液

過マンガン酸カリウム50 gに水を加えて溶解し、1000 mLとした。

酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（1：1）混液

酢酸エチル500 mL及び*n*-ヘキサン500 mLを混合した。

水及びメタノール（1：1）混液

水200 mL及びメタノール200 mLを混合した。

1 mol/L酢酸アンモニウム溶液

酢酸アンモニウム15.43 gを水に溶解し200 mLとした。

2 mmol/L酢酸アンモニウム溶液

1 mol/L酢酸アンモニウム溶液2 mLに水を加えて1000 mLとした。

3. 装置

ホモジナイザー：ウルトラタラックスT-25ベーシック（イカ・ジャパン製）

ロータリーエバポレーター：R-200（柴田科学製）等

LC-MS/MS

	型式	会社
MS 装置	API-3200	AB SCIEX
LC 装置	Prominence	島津製作所
データ処理	Analyst	AB SCIEX

4. 測定条件

LC 条件																					
カラム	XBridge C18 サイズ：内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 5 μm 会社：Waters																				
移動相流速 (mL/min)	0.2																				
注入量 (μL)	5																				
カラム温度 (°C)	40																				
移動相	A液：2 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 B液：メタノール																				
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>0.00</td> <td>70</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>10.00</td> <td>30</td> <td>70</td> </tr> <tr> <td>15.00</td> <td>30</td> <td>70</td> </tr> <tr> <td>15.01</td> <td>70</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>20.00</td> <td>70</td> <td>30</td> </tr> </tbody> </table>			時間 (分)	A液 (%)	B液 (%)	0.00	70	30	10.00	30	70	15.00	30	70	15.01	70	30	20.00	70	30
時間 (分)	A液 (%)	B液 (%)																			
0.00	70	30																			
10.00	30	70																			
15.00	30	70																			
15.01	70	30																			
20.00	70	30																			
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)	5500																				
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)	代謝物 C： +311→125[コーン電圧：51(V)、コリジョンエネルギー：25(eV)] 代謝物 F： +295→217[コーン電圧：56(V)、コリジョンエネルギー：27(eV)]																				
定性イオン (m/z)	代謝物 C： +311→109[コーン電圧：51(V)、コリジョンエネルギー：33(eV)] 代謝物 F： +295→104[コーン電圧：56(V)、コリジョンエネルギー：33(eV)]																				
保持時間	代謝物 C：10.8分 代謝物 F：6.4分																				

5. 定量

代謝物C標準品及び代謝物F標準品をそれぞれアセトンに溶かし、各500 mg/Lの標準原液を調製した。この溶液を水及びメタノール (1 : 1) 混液で希釈し、0.00025、0.000375、0.0005、0.000625、0.00075、0.001、0.00125、0.001875、0.002、0.0025、0.003、0.003125、0.00375、0.004、0.005、0.006、0.0075、0.01125、0.015、0.01875及び0.0225 mg/Lの濃度の混合標準溶液を調製した。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代謝物C及び代謝物Fの含量を算出した。なお、オレンジは試験溶液を40倍希釈した後に注入した。

6. 添加試料の調製

3) で調製した、フェンチオン及び代謝物D混合標準溶液、代謝物B及び代謝物E混合標準溶液並びに代謝物C及び代謝物F混合標準溶液をそれぞれ別々に添加した。

1) 農産物

玄米（添加濃度：0.3 ppm）：試料10.0 gに添加用混合標準溶液20 mg/Lを0.15 mL添加しよく混合した後、30分間放置した。

大豆（添加濃度：0.05 ppm）：試料10.0 gに添加用混合標準溶液1 mg/Lを0.5 mL添加しよく混合した後、30分間放置した。

らっかせい（添加濃度：0.01 ppm）：試料10.0 gに添加用混合標準溶液0.1 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、キャベツ、りんご及びぶどう（添加濃度：0.01 ppm）：試料20.0 gに添加用混合標準溶液1 mg/Lを0.2 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：0.05 ppm）：試料20.0 gに添加用混合標準溶液2 mg/Lを0.5 mL添加しよく混合した後、30分間放置した。

オレンジ（添加濃度：2 ppm）：試料20.0 gに添加用混合標準溶液20 mg/Lを2 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 ppm）：試料5.00 gに添加用混合標準溶液0.1 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、牛の脂肪、牛の肝臓、鶏の筋肉、鶏卵、牛乳及びはちみつ（添加濃度：0.01 ppm）：試料10.0 gに添加用混合標準溶液0.1 mg/Lを1 mL添加しよく混合した後、30分間放置した。

うなぎ、さけ及びしじみ（添加濃度：0.08 ppm）：試料10.0 gに添加用混合標準溶液2 mg/Lを0.4 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

フェンチオン及び代謝物を試料からアセトンで抽出し、アセトニトリル/ヘキサン分配で脱脂した後、グラファイトカーボン/アミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラムで精製する。過マンガン酸カリウムで酸化して代謝物C又は代謝物Fに変換した後、多孔性ケイソウ土カラムで精製し、LC-MS/MSで定量及び確認した。

1) 抽出（農産物）

① 穀類、豆類、種実類及び茶の場合

試料10.0 g（茶は5.00 g）を200 mL遠心管に量り採り、2 vol%ギ酸20 mLを加え、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。この溶液から正確に2 mLを100 mL分液漏斗に分取し、*n*-ヘキサン30 mLを加え、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル30 mLずつで2回振とう抽出した。

② 果実及び野菜の場合

試料20.0 gを200 mL遠心管に量り採り、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。この溶液から正確に2 mLを100 mL分液漏斗に分取し、*n*-ヘキサン30 mLを加え、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル30 mLずつで2回振とう抽出した。

2) 抽出 (畜水産物)

①はちみつ以外の場合

試料10.0 gを200 mL遠心管に量り採り、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。この溶液から正確に2 mLを100 mL分液漏斗に分取し、*n*-ヘキサン30 mLを加え、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル30 mLずつで2回振とう抽出した。

②はちみつの場合

試料10.0 gを200 mL遠心管に量り採り、水20 mLを加え、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。ろ紙上の残留物に水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。この溶液から正確に2 mLを100 mL分液漏斗に分取し、*n*-ヘキサン30 mLを加え、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル30 mLずつで2回振とう抽出した。

3) 精製

グラファイトカーボン/アミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム (500 mg/500 mg) に*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル10 mLを注入し、流出液は捨てた。このカラムに1) 又は2) で得られたアセトニトリル層60 mL (約30 mL×2回) を注入し、溶出液を200 mL遠心管に採り、40°C以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物にアセトン2 mLを加えて溶解した。

4) 酸化反応

3) で得られた液に5 w/v%過マンガン酸カリウム溶液1 mLを加え、軽く振り混ぜ室温で10分間放置した後、40°C以下で約1 mLまで濃縮し、水3 mLを加えた。

5) 精製

多孔性ケイソウ土カラム (5 mL保持用) に4) で得られた液を注入し、室温で5分間放置した後、酢酸エチル及びヘキサン (1 : 1) 混液40 mLを注入し、溶出液を100 mL遠心管に採り、40°C以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物を水及びメタノール (1 : 1) 混液2 mL (果実及び野菜は4 mL、茶は1 mL) に溶解し、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20.0 g
- ↓ 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
- ↓ 抽出液2 mL分取

アセトニトリル/ヘキサン分配

- | *n*-ヘキサン30 mL
- | *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル30 mLを加え、5分間振とう
- | アセトニトリル層を採る
- | *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル30 mLを加え、5分間振とう
- ↓ アセトニトリル層を採る

グラファイトカーボン/アミノプロピルシリル化シリカゲル積層カラム (500 mg/500 mg) 精製

- | *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル10 mL予備洗浄
- ↓ 全量注入、溶出

濃縮 (溶媒除去)

- ↓ 残留物をアセトン2 mLに溶解

酸化反応

- | 5 w/v%過マンガン酸カリウム溶液1 mL
- ↓ 室温で10分間放置

濃縮

- ↓ 約1 mLまで濃縮後水3 mLを加える

多孔性ケイソウ土カラム (5 mL用) 精製

- | 全量注入
- | 5分間放置
- ↓ 酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (1 : 1) 混液40 mLで溶出

濃縮 (溶媒除去)

- | 穀類、豆類及び種実類：残留物を水及びメタノール (1 : 1) 混液2 mLに溶解
- | 果実及び野菜：残留物を水及びメタノール (1 : 1) 混液4 mLに溶解
- ↓ 茶：残留物を水及びメタノール (1 : 1) 混液1 mLに溶解

試験溶液

↓

LC-MS/MS定量

5 µL注入

畜水産物

秤 取

| はちみつ以外：試料10.0 g

↓ はちみつ：試料10.0 gに水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

| はちみつ以外：残留物にアセトン50 mLを加え、ホモジナイズ

| はちみつ：残留物に水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

↓ 抽出液2 mL分取

アセトニトリル/ヘキサン分配

| *n*-ヘキサン30 mL

| *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル30 mLを加え、5分間振とう

| アセトニトリル層を採る

| *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル30 mLを加え、5分間振とう

↓ アセトニトリル層を採る

グラファイトカーボン/アミノプロピルシリル化シリカゲル積層カラム (500 mg/500 mg) 精製

| *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル10 mL予備洗浄

↓ 全量注入、溶出

濃縮 (溶媒除去)

↓ 残留物をアセトン2 mLに溶解

酸化反応

| 5 w/v%過マンガン酸カリウム溶液1 mL

↓ 室温で10分間放置

濃縮

↓ 約1 mLまで濃縮後水3 mLを加える

多孔性ケイソウ土カラム (5 mL用) 精製

| 全量注入

| 5分間放置

↓ 酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (1 : 1) 混液40 mLで溶出

濃縮 (溶媒除去)

↓ 残留物を水及びメタノール (1 : 1) 混液2 mLに溶解

試験溶液

↓

LC-MS/MS定量

5 μ L注入

8. マトリックス添加標準溶液の調製

1) 定量限界相当濃度（定量限界の推定用）

ブランク試験溶液から0.5 mL分取し溶媒を除去した後、代謝物C及び代謝物F 0.0005 mg/Lの混合標準溶液0.5 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）

らっかせい、ほうれんそう、キャベツ、りんご、茶、ぶどう、牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、鶏の筋肉、鶏卵、牛乳及びはちみつは、ブランク試験溶液から0.5 mL分取し溶媒を除去した後、代謝物C及び代謝物F 0.0005 mg/Lの混合標準溶液0.5 mLに溶解したものを、マトリックス添加標準溶液とした。大豆及びばれいしょはブランク試験溶液から0.5 mL分取し溶媒を除去した後、代謝物C及び代謝物F 0.0025 mg/Lの混合標準溶液0.5 mLに溶解したものを、マトリックス添加標準溶液とした。うなぎ、さけ及びじみはブランク試験溶液から0.5 mL分取し溶媒を除去した後、代謝物C及び代謝物F 0.004 mg/Lの混合標準溶液0.5 mLに溶解したものを、マトリックス添加標準溶液とした。玄米はブランク試験溶液から0.5 mL分取し溶媒を除去した後、代謝物C及び代謝物F 0.015 mg/Lの混合標準溶液0.5 mLに溶解したものを、マトリックス添加標準溶液とした。オレンジは40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、代謝物C及び代謝物F 0.0025 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

代謝物C及び代謝物FはESI（+）モードでの測定が可能であった。

代謝物C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311が得られたので、代謝物Cのプロトン付加分子 (m/z 311 $[M+H]^+$) をプリカーサーイオンとした。また、 m/z 311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 125のプロダクトイオンが強く、次いで m/z 109であったため、 m/z 125を定量用イオン、 m/z 109を定性用イオンとした。

代謝物F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295が得られたので、代謝物Fのプロトン付加分子 (m/z 295 $[M+H]^+$) をプリカーサーイオンとした。また、 m/z 295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 217のプロダクトイオンが強く、次いで m/z 104であったため、 m/z 217を定量用イオン、 m/z 104を定性用イオンとした。

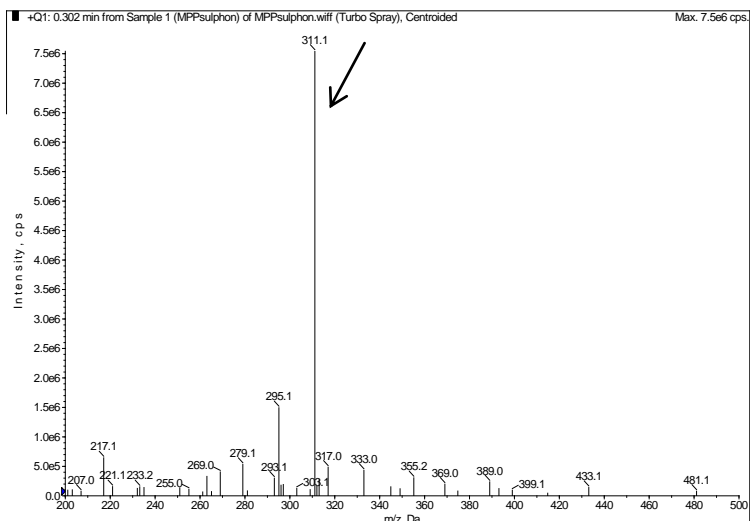


図1 代謝物Cのマススペクトル
 スキャン範囲：200～500 m/z
 測定条件：ESI (+)、CV=51 (CV：コーン電圧)

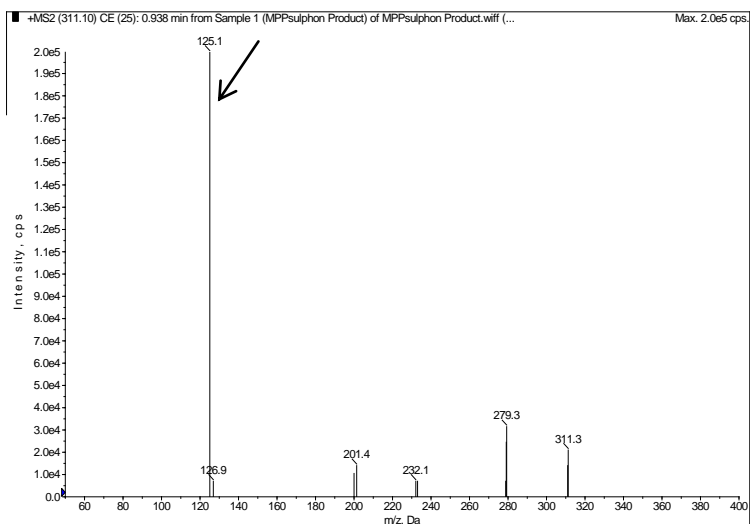


図2-1 代謝物Cのプリカーサーイオン m/z 311のプロダクトイオンスペクトル (定量用)
 スキャン範囲：50～400 m/z
 測定条件：ESI (+)、CV=51、CE=25 (CV：コーン電圧、CE：コリジョンエネルギー)

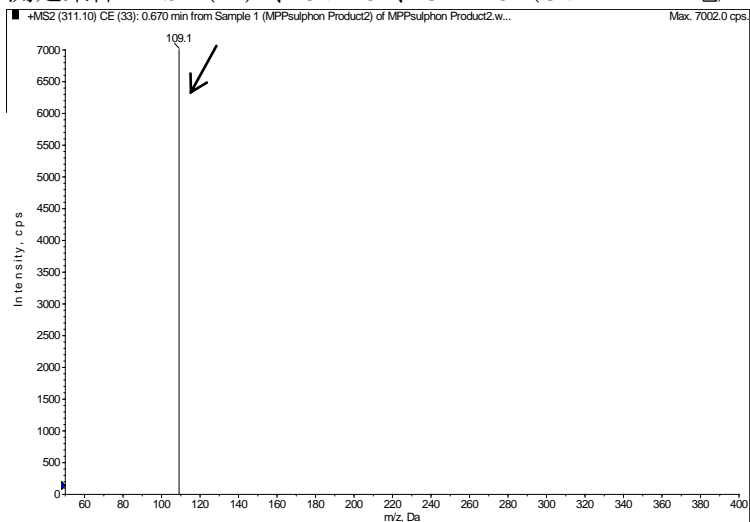


図2-2 代謝物Cのプリカーサーイオン m/z 311のプロダクトイオンスペクトル (定性用)
 スキャン範囲：50～400 m/z
 測定条件：ESI (+)、CV=51、CE=33 (CV：コーン電圧、CE：コリジョンエネルギー)

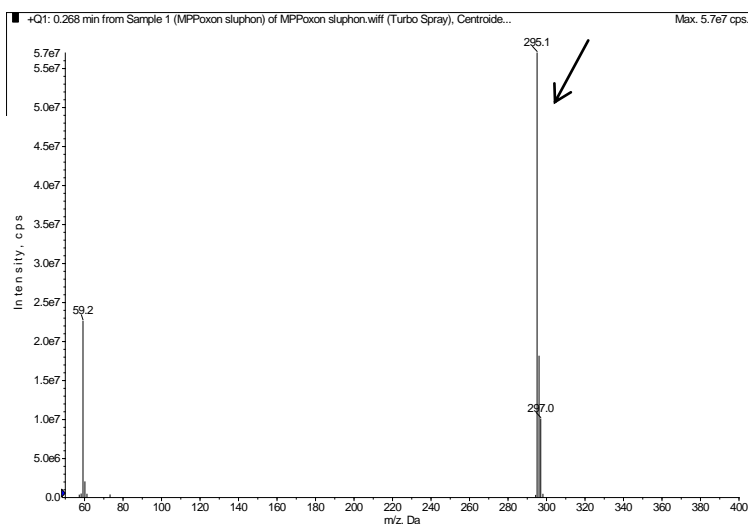


図3 代謝物Fのマススペクトル

スキャン範囲：50~400 m/z

測定条件：ESI (+)、CV=56 (CV：コーン電圧)

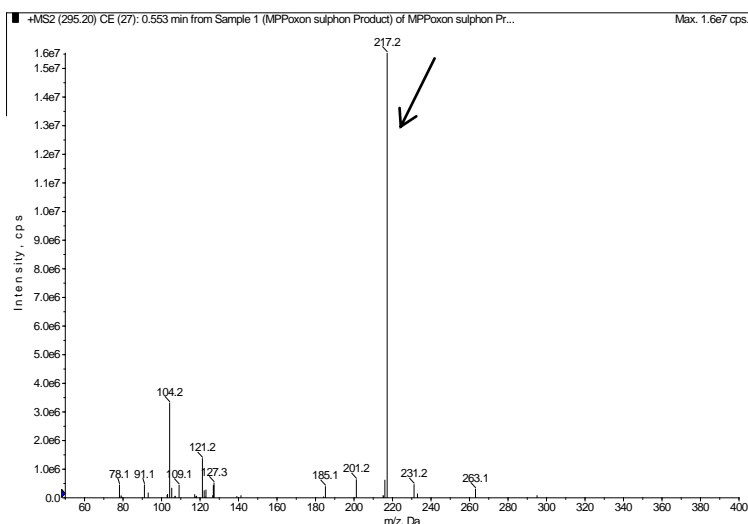


図4-1 代謝物Fのプリカーサーイオン m/z 295 のプロダクトイオンスペクトル (定量用)

スキャン範囲：50~400 m/z

測定条件：ESI (+)、CV=56、CE=27 (CV：コーン電圧、CE：コリジョンエネルギー)

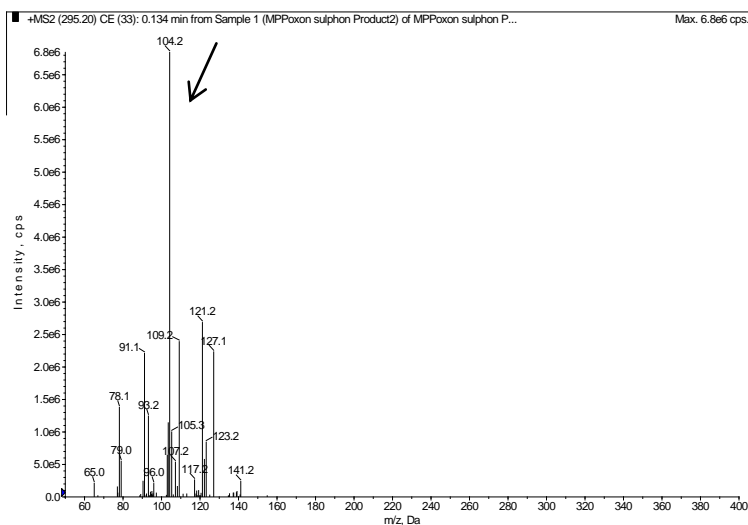


図4-2 代謝物Fのプリカーサーイオン m/z 295 のプロダクトイオンスペクトル (定性用)

スキャン範囲：50~400 m/z

測定条件：ESI (+)、CV=56、CE=33 (CV：コーン電圧、CE：コリジョンエネルギー)

2) LC条件の検討

分離カラムとして XBridge C18 (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 5 μm) を、移動相について、2 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液及びメタノールを用いて検討を行ったところ、ピーク形状、分離、再現性及び感度のいずれも良好な結果が得られたので、分離カラムは XBridge C18 (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 5 μm) を、移動相は 2 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液及びメタノールを用い、2 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液及びメタノール (7 : 3) から (3 : 7) までの濃度勾配を 10 分間で行い、(3 : 7) で 5 分間保持することとした。

3) 検量線

図5に代謝物C及び代謝物Fの検量線の例を示した。0.00025 mg/L (0.00125 ng) ~0.00075 mg/L (0.00375 ng)、0.000625 mg/L (0.003125 ng) ~0.00375 mg/L (0.01875 ng)、0.001 mg/L (0.005 ng) ~0.006 mg/L (0.03 ng) 及び0.00375 mg/L (0.01875 ng) ~0.0225 mg/L (0.1125 ng) の濃度範囲で作成した検量線の決定係数は、いずれも0.999以上であり良好な直線性を示した。

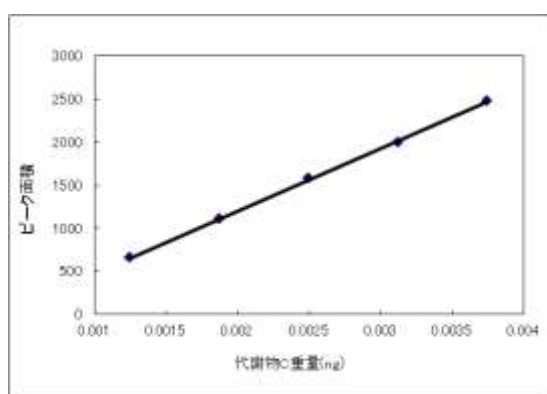


図 5-1 代謝物 C 検量線例 1 (m/z 311→125)

データ処理装置設定条件の一例
データ処理ソフトウェア (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 : 0.00125 ng~0.00375 ng
傾き (a) : a=722000
切片 (b) : b=-242
 R^2 : 0.9996

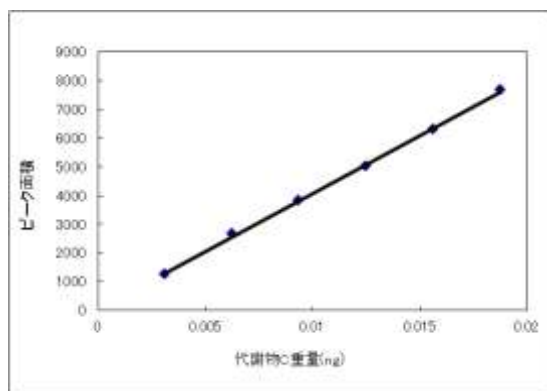


図 5-2 代謝物 C 検量線例 2 (m/z 311→125)

データ処理装置設定条件の一例
データ処理ソフトウェア (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 : 0.003125 ng~0.01875 ng
傾き (a) : a=402000
切片 (b) : b=63.3
 R^2 : 0.9990

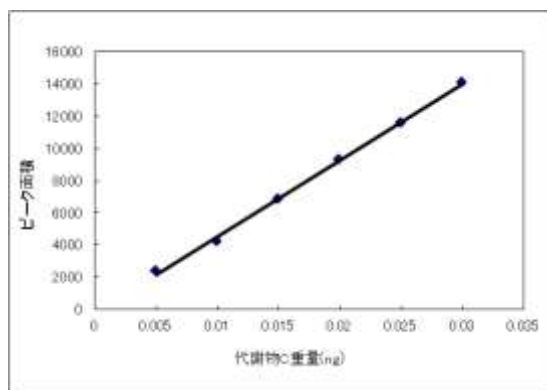


図 5-3 代謝物 C 検量線例 3 (m/z 311→125)

データ処理装置設定条件の一例
データ処理ソフトウェア (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 : 0.005 ng~0.03 ng
傾き (a) : a=474000
切片 (b) : b=-219
 R^2 : 0.9986

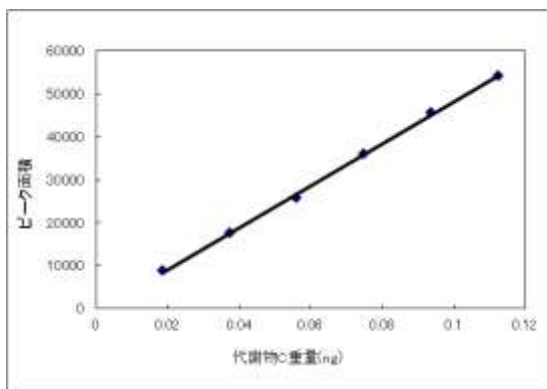


図5-4 代謝物C検量線例4 (m/z 311→125)

データ処理装置設定条件の一例
 データ処理ソフトウェア (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: 0.01875 ng~0.1125 ng
 傾き (a) : a=488000
 切片 (b) : b=-728
 R^2 : 0.9990

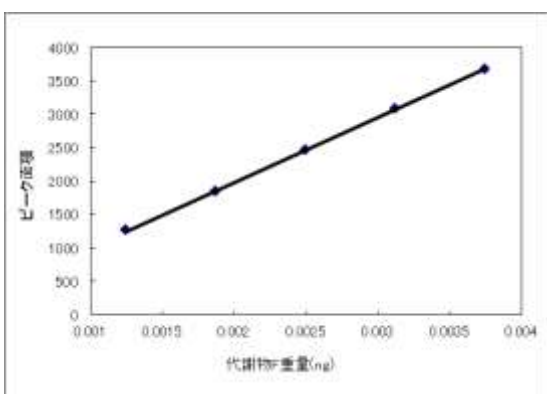


図5-5 代謝物Fの検量線例1 (m/z 295→217)

データ処理装置設定条件の一例
 データ処理ソフトウェア (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: 0.00125 ng~0.00375 ng
 傾き (a) : a=971000
 切片 (b) : b=41
 R^2 : 0.9998

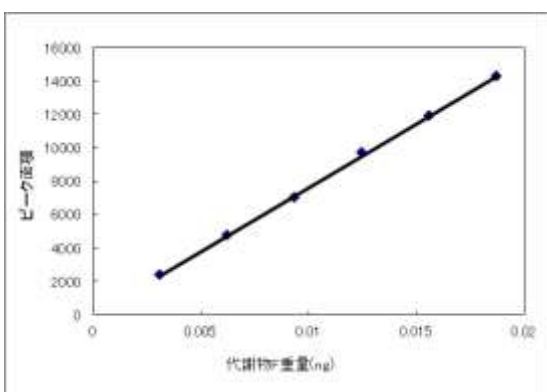


図5-6 代謝物Fの検量線例2 (m/z 295→217)

データ処理装置設定条件の一例
 データ処理ソフトウェア (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: 0.003125 ng~0.01875 ng
 傾き (a) : a=764000
 切片 (b) : b=-13
 R^2 : 0.9996

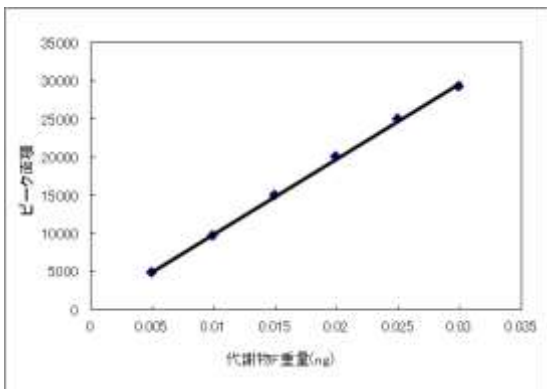


図5-7 代謝物Fの検量線例3 (m/z 295→217)

データ処理装置設定条件の一例
 データ処理ソフトウェア (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: 0.005 ng~0.03 ng
 傾き (a) : a=988000
 切片 (b) : b=30.7
 R^2 : 0.9990

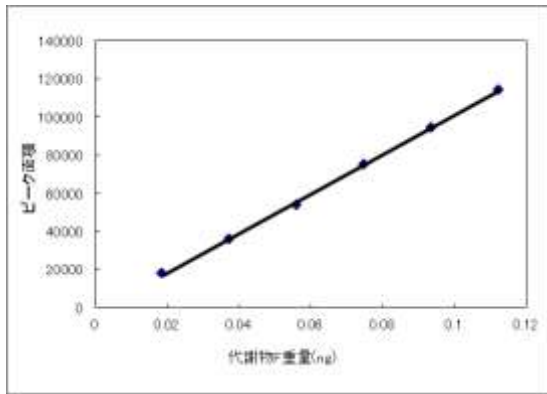


図5-8 代謝物Fの検量線例4 (m/z 295→217)

データ処理装置設定条件の一例
 データ処理ソフトウェア (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 : 0.01875 ng~0.1125 ng
 傾き (a) : $a=1030000$
 切片 (b) : $b=-2480$
 $R^2 : 0.9990$

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、豆類及び種実類の場合)

代謝物Cのフェンチオンとしての定量限界

$$0.01 \text{ mg/kg} > 0.0090 \text{ mg/kg} [(2 \text{ mL}/0.1 \text{ g}^{*1}) \times (0.0025 \text{ ng}/5 \text{ } \mu\text{L}) \times 0.8969^{*2}]$$

代謝物Fのフェンチオンとしての定量限界

$$0.01 \text{ mg/kg} > 0.0095 \text{ mg/kg} [(2 \text{ mL}/0.1 \text{ g}^{*1}) \times (0.0025 \text{ ng}/5 \text{ } \mu\text{L}) \times 0.9459^{*3}]$$

*¹ 10.0 g × 2 mL/200 mL

*² フェンチオンの分子量278.33/代謝物Cの分子量310.33

*³ フェンチオンの分子量278.33/代謝物Fの分子量294.26

②農産物 (果実及び野菜の場合)

代謝物Cのフェンチオンとしての定量限界

$$0.01 \text{ mg/kg} > 0.0090 \text{ mg/kg} [(4 \text{ mL}/0.2 \text{ g}^{*4}) \times (0.0025 \text{ ng}/5 \text{ } \mu\text{L}) \times 0.8969^{*2}]$$

代謝物Fのフェンチオンとしての定量限界

$$0.01 \text{ mg/kg} > 0.0095 \text{ mg/kg} [(4 \text{ mL}/0.2 \text{ g}^{*4}) \times (0.0025 \text{ ng}/5 \text{ } \mu\text{L}) \times 0.9459^{*3}]$$

*⁴ 20.0 g × 2 mL/200 mL

③農産物 (茶の場合)

代謝物Cのフェンチオンとしての定量限界

$$0.01 \text{ mg/kg} > 0.0090 \text{ mg/kg} [(1 \text{ mL}/0.05 \text{ g}^{*5}) \times (0.0025 \text{ ng}/5 \text{ } \mu\text{L}) \times 0.8969^{*2}]$$

代謝物Fのフェンチオンとしての定量限界

$$0.01 \text{ mg/kg} > 0.0095 \text{ mg/kg} [(1 \text{ mL}/0.05 \text{ g}^{*5}) \times (0.0025 \text{ ng}/5 \text{ } \mu\text{L}) \times 0.9459^{*3}]$$

*⁵ 5.00 g × 2 mL/200 mL

④畜水産物

代謝物Cのフェンチオンとしての定量限界

$$0.01 \text{ mg/kg} > 0.0090 \text{ mg/kg} [(2 \text{ mL}/0.1 \text{ g}^{*1}) \times (0.0025 \text{ ng}/5 \text{ } \mu\text{L}) \times 0.8969^{*2}]$$

代謝物Fのフェンチオンとしての定量限界

$$0.01 \text{ mg/kg} > 0.0095 \text{ mg/kg} [(2 \text{ mL}/0.1 \text{ g}^{*1}) \times (0.0025 \text{ ng}/5 \text{ } \mu\text{L}) \times 0.9459^{*3}]$$

2. 試験溶液調製法の検討

1) 抽出溶媒の検討

現行の通知試験法ではアセトンを用いてフェンチオンの抽出を行っている。本検討でも脂肪組織との混和性を考慮し、アセトンを用いてフェンチオン及び代謝物の抽出を行った。

2) 大豆の抽出条件の検討

大豆において添加回収試験を行った際、水20 mLを加えて膨潤させた後アセトンを用いて抽出を行ったところ、代謝物Fを添加したときのみ添加回収率が70%を下回る現象がみられた。低回収となる原因及び改善法について以下について検討を行った。なお、大豆以外の穀類、豆類、種実類及び茶に関しては水20 mLを加えて膨潤させた後アセトンを用いて抽出を行う方法で、いずれの成分も良好な回収率が得られた。

①酸添加による検討

酸添加によって回収率が向上するか検討を行った。大豆試料10 gに代謝物F 0.5 µg (1 mg/Lを0.5 mL)を添加し30分間放置した後、0.5 mol/L塩酸、2 vol%ギ酸、5 w/v%アスコルビン酸溶液、5 w/v%クエン酸溶液各20 mLを加えて30分膨潤させ、アセトンを用いて抽出を行った結果を表1に示した。水の代わりに酸を加えて膨潤を行ったところ、いずれも添加回収率の向上がみられた。また、膨潤前に代謝物Fを添加し、30分放置している間には回収率の低下は起こっていないと推測された。

表1 水又は各酸を添加して膨潤した後添加回収試験を行った結果 (%)

試料:大豆	水	0.5 mol/L 塩酸	2 vol% ギ酸	5 w/v% アスコルビン酸溶液	5 w/v% クエン酸溶液
添加量	20 mL	20 mL	20 mL	20 mL	20 mL
pH	6	1	2	3	2
代謝物F	59	103	94	89	98

添加量：0.5 µg、試料10 g相当共存下

抽出以降の操作は「分析法フローチャート」に従って試験溶液を調製

塩酸を含有する溶液を過マンガン酸カリウム溶液で酸化させると有毒な塩素ガスを発生するため、調製の容易なギ酸溶液を用いて、酸濃度の検討を行った。大豆試料10 gに代謝物F 0.5 µg (1 mg/Lを0.5 mL)を添加し30分間放置した後、各濃度のギ酸20 mLを加え30分膨潤させ、アセトンを用いて抽出を行った結果を表2に示した。ギ酸濃度1 vol%以上で良好な結果が得られたが、本試験ではさらに十分量として2 vol%ギ酸20 mLを添加することとした。

表2 各濃度のギ酸 20 mL を添加した後添加回収試験を行った結果 (%)

試料：大豆	ギ酸濃度 (vol%)							
	0	0.01	0.1	0.5	1	2	5	10
代謝物 F	59	60	61	81	91	94	88	89

添加量：0.5 µg、試料10 g相当共存下

抽出以降の操作は「分析法フローチャート」に従って試験溶液を調製

試行2の平均値を入力

②膨潤時のギ酸添加の必要性について

①より、ギ酸を添加することで回収率の向上がみられたため、次にギ酸添加が膨潤時に必要か、抽出時にギ酸を加えれば良いかについて検討した。

大豆試料10 gに代謝物F 0.5 µg (1 mg/Lを0.5 mL) を添加し30分間放置した後、以下のa) b) の条件で抽出を行った結果を表3に示した。

a) 2 vol%ギ酸20 mLを加え30分膨潤させ、アセトンを用いて抽出 (膨潤時にギ酸添加)

b) 水20 mLを加え30分膨潤させた後、ギ酸0.4 mL及びアセトンを用いて抽出 (抽出時にギ酸添加)

抽出時にギ酸を添加した場合、代謝物Fの回収率の向上はみられなかったため、水20 mLを加え30分放置中に代謝物Fの回収率の低下が起こっていると推測された。

表3 膨潤時又は抽出時にギ酸を加えて添加回収試験を行った結果 (%)

試料：大豆	a) 膨潤時にギ酸添加	b) 抽出時にギ酸添加
代謝物 F	98	62

添加量：各0.5 µg、試料10 g相当共存下

抽出以降の操作は [分析法フローチャート] に従って試験溶液を調製
それぞれ試行2の平均値

なお、野菜、果実及び畜水産物ではギ酸添加を行わずアセトン抽出を行ってもいずれの成分も良好な回収率が得られたため、穀類、豆類、種実類及び茶 (玄米、大豆、らっかせい及び茶) 試料に関してのみ試料を量り採った後2 vol%ギ酸20 mLを加えて30分間放置し、アセトンを用いて抽出を行うこととした。

3) アセトニトリル/ヘキサン分配の検討

脂溶性の妨害物質の除去を目的として、アセトニトリル/ヘキサン分配を検討した。実際の操作を想定して、フェンチオン及び代謝物各1 mg/Lを0.1 mL採り、溶媒を除去した後、アセトン2 mLを加えて溶解し、*n*-ヘキサン30 mLを加えた。*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル30 mLずつで3回振とう抽出を行った結果を表4に示した。フェンチオン及び代謝物はいずれも2回の抽出で抽出できたことから、分配操作は*n*-ヘキサン30 mLに*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル30 mLずつで2回抽出することとした。

表4 アセトニトリル/ヘキサン分配の検討 (%)

	<i>n</i> -ヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL 及びアセトン 2 mL			合計
	(1回目)	(2回目)	(3回目)	
	フェンチオン	106	8	
代謝物 B	104	1	0	105
代謝物 C	97	2	0	99
代謝物 D	102	2	0	104
代謝物 E	104	1	0	105
代謝物 F	97	1	0	98

添加量：各 0.1 µg

4) 酸化条件の検討

フェンチオン及び代謝物の6成分同時定量を試みたところ、フェンチオン及び代謝物Dを添加した際に、濃縮操作中などに各5~30%程度が代謝物B及び代謝物Eに変換していることが確認された。本検討ではフェンチオン及び代謝物をスルホン体に酸化し、フェンチオン及び代謝物Bを代謝物Cに、代謝物D及び代謝物Eを代謝物Fとして測定する方法を検討した。バイエルクロップサイエン

ス社提供資料では、試験溶液をアセトンに溶解し過マンガン酸カリウム溶液を用いて酸化を行っている。本検討でもこの方法に準拠し、加える過マンガン酸カリウム溶液量及び反応時間の検討を行った。

なお、酸化を防ぐ方法としてアスコルビン酸を加えての検討など実施したが、完全に酸化を抑えられず、また、逆の現象として、スルホン体がスルホキシド体に変換する現象も確認されたため、方法としては、酸化法を採用とした。

①過マンガン酸カリウム溶液の添加量の検討

加える過マンガン酸カリウム溶液量について検討を行った。フェンチオン及び代謝物各 0.1 mg/L を 0.5 mL 採り、溶媒を除去した後、アセトン 2 mL に溶解し、5 w/v% 過マンガン酸カリウム溶液各 0.2 mL、0.5 mL、1 mL 及び 1.5 mL を加え、室温で 30 分間反応させた結果を表 5 に示した。過マンガン酸カリウム 0.2 mL 以上で全ての成分において酸化反応は十分行われていたが、本試験ではさらに十分量として 1 mL を加えることとした。

表 5 各量の過マンガン酸カリウム溶液を加えた際の酸化反応率 (%)

	5 w/v% 過マンガン酸カリウム溶液の量 (mL)			
	0.2	0.5	1	1.5
フェンチオン	100	97	100	93
代謝物B	94	94	94	91
代謝物C	103	100	97	90
代謝物D	93	92	91	90
代謝物E	99	98	99	96
代謝物F	94	92	94	91

供試量：各0.05 µg

各30分間反応

酸化反応後、[分析法フローチャート]に従って試験溶液を調製

②酸化反応時間の検討

酸化反応時間について検討を行った。フェンチオン及び代謝物各 0.1 mg/L を 0.5 mL 採り、溶媒を除去した後、アセトン 2 mL に溶解し、5 w/v% 過マンガン酸カリウム溶液 1 mL を加え、室温で 5 分、10 分、15 分間及び 30 分間反応させた結果を表 6 に示した。5 分間以上の放置時間で良好な反応率が得られたが、本試験ではさらに十分量として、反応時間を 10 分間とした。

表6 過マンガン酸カリウム溶液を加え各時間放置した際の酸化反応率 (%)

	酸化反応時間 (分)			
	5	10	15	30
フェンチオン	92	82	90	89
代謝物B	87	97	87	98
代謝物C	96	88	98	90
代謝物D	87	112	86	93
代謝物E	95	85	95	89
代謝物F	88	95	89	93

供試量：各0.05 µg

酸化反応後、[分析法フローチャート]に従って試験溶液を調製

5) 酸化前の精製方法の検討

アセトン抽出を行い、アセトニトリル/ヘキサン分配を行った後の試験溶液を4)の酸化反応に供したところ、茶で黒色の残渣が生じ、クロマトグラム上で妨害ピークが多くみられたため、酸化前の精製操作を検討した。

①グラファイトカーボン/アミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラムによる精製

グラファイトカーボン/アミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラムによる精製を検討した。なお、精製操作は3)で検討したアセトニトリル/ヘキサン分配の後に行うことを想定し、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリルでの溶出を試みた。カラムを*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル10 mLで予備洗浄した後、フェンチオン及び代謝物各2 mg/Lを0.1 mL採り、溶媒を除去した後、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル20 mLに溶解後、負荷、溶出したときの溶出状況を表7に示した。フェンチオン及び代謝物はいずれも*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル60 mLで溶出することが可能であった。以上の結果から、溶出条件は、分配操作で得られた*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル層30 mLずつ、計60 mLをカラムに順次負荷、溶出することとした。

表7 グラファイトカーボン/アミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラムからの溶出状況 (%)

	<i>n</i> -ヘキサン飽和アセトニトリル			合計
	0-20 mL	20-40 mL	40-60 mL	
フェンチオン	41	47	3	91
代謝物 B	51	45	0	96
代謝物 C	60	45	0	105
代謝物 D	62	31	0	93
代謝物 E	68	32	0	100
代謝物 F	71	30	0	101

Inertsep GC/NH₂、充てん量 500 mg/500 mg、ジーエルサイエンス製

供試量：各0.2 µg

②多孔性ケイソウ土カラムによる精製

多孔性ケイソウ土カラムによる精製を検討した。フェンチオン及び代謝物各0.04 µgを水4 mLでカラムに負荷し、5分間放置した後酢酸エチルで溶出したときの溶出状況を表8に示した。フェンチオン及び代謝物はいずれも酢酸エチル40 mLで溶出することが可能であった。しかし、グラファイトカーボン/アミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラムによる精製でより高い精製効果が得られたため不採用とした。

表8 多孔性ケイソウ土カラムからの溶出状況① (%)

	酢酸エチル		合計
	0-30 mL	30-40 mL	
フェンチオン	97	4	101
代謝物 B	104	3	107
代謝物 C	104	0	104
代謝物 D	105	8	113
代謝物 E	105	3	108
代謝物 F	110	1	111

InertSep K-solute 5 mL 用、ジーエルサイエンス製

供試量：各0.04 µg

6) 酸化後の精製方法の検討

酸化反応後の試験溶液は高濃度の過マンガン酸カリウム溶液を含んでいるため、主に過マンガン酸カリウム溶液を除去することを目的として酸化後の精製方法の検討を行った。以下に検討内容を示した。なお、ジクロロメタンを用いた液液分配操作等も可能ではあるが、ジクロロメタンをなるべく使用せず、操作性も簡便さを考慮し、多孔性ケイソウ土カラムなどの担体での精製方法を検討した。

①多孔性ケイソウ土カラムによる精製

多孔性ケイソウ土カラムによる精製を検討した。実際の酸化後の状況を想定し、まず代謝物C及び代謝物F各0.1 mg/Lを0.2 mL採り、溶媒を除去した後、アセトン2 mLに溶解し、そこへ5 w/v%過マンガン酸カリウム溶液1 mL加えてカラムに負荷した場合、アセトンの影響で紫色を呈する液が溶出し、過マンガン酸カリウムの除去が不十分であったため、アセトン除去した状況で負荷することとした。5 w/v%過マンガン酸カリウム溶液1 mLに水3 mLを加えカラムに負荷し5分間放置した後、酢酸エチル又は酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (1 : 1) 混液で溶出を試みた。酢酸エチルで溶出を行った結果、溶出液が薄く紫色となり、過マンガン酸カリウムの除去が不十分であると考えられたためLC-MS/MSへの注入を行わず不採用とした。酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (1 : 1) 混液で溶出した場合は溶出液は透明であった。酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (1 : 1) 混液で溶出した結果を表9に示した。代謝物C及び代謝物Fいずれも酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (1 : 1) 混液40 mLで溶出できたため、酸化反応液からアセトン除去した後、水3 mLを加えカラムに負荷し5分間放置した後、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (1 : 1) 混液40 mLで溶出することとした。また、さらに*n*-ヘキサンの比率を上げて酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (1 : 4) 混液で溶出を試みた結果を表10に示した。代謝物Fの溶出が不十分であったため不採用とした。

表9 多孔性ケイソウ土カラムからの溶出状況② (%)

	酢酸エチル及び <i>n</i> -ヘキサン (1 : 1) 混液		合計
	0-30 mL	30-40 mL	
代謝物 C	91	2	93
代謝物 F	87	3	90

InertSep K-solute 5 mL用、ジーエルサイエンス製

供試量 : 各 0.02 µg

表10 多孔性ケイソウ土カラムからの溶出状況③ (%)

	酢酸エチル及び <i>n</i> -ヘキサン (1 : 4) 混液		合計
	0-30 mL	30-40 mL	
代謝物 C	101	0	101
代謝物 F	72	0	72

InertSep K-solute 5 mL用、ジーエルサイエンス製

供試量 : 各 0.02 µg

②オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムによる精製

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムによる精製を検討した。メタノール及び水各5 mLで予備洗浄した後、代謝物C及び代謝物F各0.1 mg/Lを0.5 mL採り、溶媒を除去した後、アセトン2 mLに溶解し、水10 mLを加えた混液を負荷し、水及びメタノール (4 : 1) 混液10 mL、水及びメタノール (2 : 3) 混液で順次負荷、溶出した溶出状況を表11に示した。代謝物C及び代謝物Fは負荷液、水及びメタノール (4 : 1) 混液10 mLでは溶出せず、水及びメタノール (2 : 3) 混液10 mLで溶出することが可能であ

った。しかし、過マンガン酸カリウム溶液共存下で溶出を行った際、溶出液に過マンガン酸カリウム由来の紫色が残り、多孔性ケイソウ土カラムによる精製の方が高い精製効果があると判断し不採用とした。

表11 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 (%)

	水10 mL		水及びメタノール混液			合計
	0-10 mL	10-20 mL	(4 : 1)		10-20 mL	
			0-10 mL	0-10 mL		
代謝物C	0	0	0	97	0	97
代謝物F	0	0	0	98	0	98

InertSep C18-C、充てん量1,000 mg、ジーエルサイエンス製

供試量：各0.05 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、茶及びぶどうの10食品を用いて、畜水産物は牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、鶏の筋肉、鶏卵、牛乳、はちみつ、うなぎ、さけ及びしじみの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農産物は図6及び8に、畜水産物は図10及び12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14に示した。

1) 選択性

農産物の選択性の結果を表12-1に、畜水産物の選択性の結果を表12-2に示した。検討した何れの試料においても代謝物C及び代謝物F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12-1 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 (mg/kg)	基準値 ^{*1} (ppm)	添加濃度 ^{*2} (ppm)	妨害ピークの許容範囲		ピーク面積(高さ) ^{*3}			選択性の評価 ^{*5}	備考	
						評価対象濃度 (ppm)	判定基準	面積又は高さの別	ブランク試料 (a)	標準溶液 ^{*4} (b)			面積(高さ)比 (a)/(b)
1	代謝物C	玄米	0.01	0.3	0.3	基準値	0.3	< 0.100	面積	0	#DIV/0!	○	
		大豆	0.01	0.05	0.05	基準値	0.05	< 0.100	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	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	#DIV/0!	○	
		キャベツ	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	#DIV/0!	○	
		ばれいしょ	0.01	0.05	0.05	基準値	0.05	< 0.100	面積	0	#DIV/0!	○	
		オレンジ	0.01	2.	2.	基準値	2.	< 0.100	面積	0	#DIV/0!	○	
		りんご	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	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!	○	
		ぶどう	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	#DIV/0!	○	
2	代謝物F	玄米	0.01	0.3	0.3	基準値	0.3	< 0.100	面積	0	#DIV/0!	○	
		大豆	0.01	0.05	0.05	基準値	0.05	< 0.100	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	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	#DIV/0!	○	
		キャベツ	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	#DIV/0!	○	
		ばれいしょ	0.01	0.05	0.05	基準値	0.05	< 0.100	面積	0	#DIV/0!	○	
		オレンジ	0.01	2.	2.	基準値	2.	< 0.100	面積	0	#DIV/0!	○	
		りんご	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	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!	○	
		ぶどう	0.01	0.01	0.01	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。

表12-2 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 (mg/kg)	基準値 ¹⁾ (ppm)	添加濃度 ²⁾ (ppm)	妨害ピークの許容範囲		ピーク面積(高さ) ³⁾			選択性 の評価 ⁵⁾	備考	
						評価対象濃度 (ppm)	判定基準	面積又は 高さの別	ブランク試料 (a)	標準溶液 ⁴⁾ (b)			面積(高さ) 比 (a)/(b)
1	代謝物C	牛の筋肉	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	#DIV/0!	○	
		牛の脂肪	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	#DIV/0!	○	
		牛の肝臓	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	#DIV/0!	○	
		鶏の筋肉	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!	○	
		牛乳	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!	○	
		うなぎ	0.01	0.08	0.08	基準値	0.08	< 0.100	面積	0	#DIV/0!	○	
		さけ	0.01	0.08	0.08	基準値	0.08	< 0.100	面積	0	#DIV/0!	○	
		しじみ	0.01	0.08	0.08	基準値	0.08	< 0.100	面積	0	#DIV/0!	○	
2	代謝物F	牛の筋肉	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	#DIV/0!	○	
		牛の脂肪	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	#DIV/0!	○	
		牛の肝臓	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	#DIV/0!	○	
		鶏の筋肉	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!	○	
		牛乳	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!	○	
		うなぎ	0.01	0.08	0.08	基準値	0.08	< 0.100	面積	0	#DIV/0!	○	
		さけ	0.01	0.08	0.08	基準値	0.08	< 0.100	面積	0	#DIV/0!	○	
		しじみ	0.01	0.08	0.08	基準値	0.08	< 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。

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13-1に示した。フェンチオンの真度は81.3~95.9%、併行精度は1.8~14.4%であり、目標値を十分に満たした。代謝物Bの真度は84.1~102.7%、併行精度は3.1~12.8%であり、目標値を十分に満たした。代謝物Cの真度は81.6~91.9%、併行精度は4.1~12.8%であり、目標値を十分に満たした。代謝物Dの真度は83.6~102.1%、併行精度は2.1~8.0%であり、目標値を十分に満たした。代謝物Eの真度は89.8~100.8%、併行精度は3.7~10.0%であり、目標値を十分に満たした。代謝物Fの真度は82.9~94.8%、併行精度は2.9~8.2%であり、目標値を十分に満たした。らっかせい、ほうれんそう、キャベツ、りんご、茶及びぶどうについては、S/N比の平均値は代謝物C 37.3~73.1、代謝物F 72.9~112.3でありS/N≥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13-2に示した。フェンチオンの真度は86.7~103.5%、併行精度は2.8~13.4%であり、目標値を十分に満たした。代謝物Bの真度は86.6~107.4%、併行精度は2.4~11.3%であり、目標値を十分に満たした。代謝物Cの真度は85.2~109.7%、併行精度は2.1~12.6%であり、目標値を十分に満たした。代謝物Dの真度は89.5~111.3%、併行精度は1.8~9.0%であり、目標値を十分に満たした。代謝物Eの真度は89.6~105.9%、併行精度は1.7~11.6%であり、目標値を十分に満たした。代謝物Fの真度は84.8~106.2%、併行精度は3.8~7.9%であり、目標値を十分に満たした。牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、鶏の筋肉、鶏卵、牛乳及びはちみつについては、S/N比の平均値は代謝物C 43.7~92.1、代謝物F 66.7~110.3でありS/N≥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14-1及び表14-2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7、9、11及び13に示した。農産物のS/N比の平均値は代謝物C 47.7~60.7、代謝物F 39.1~82.1でありS/N≥10を十分に満たした。畜水産物のS/N比の平均値は代謝物C 55.5~70.3、代謝物F 38.1~93.4でありS/N≥10を十分に満たした。

表13-2 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 (mg/kg)	基準値 ¹ (ppm)	添加濃度 (ppm)	定量限界 の評価 ²	検量線					回収率 (%)					真度 (%)	併行精度 (RSD%)	S/N比 ³		備考
							傾き	切片	r ² 値	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5	Max.	Min.			平均値		
1	フェンチオン	牛の筋肉	0.01	0.01	0.01		810000	-196	0.9950	87.9	90.7	91.4	100.1	89.6	91.9	5.2	-	-	#DIV/0!		
		牛の脂肪	0.01	0.01	0.01		547000	2	0.9980	87.5	96.6	76.2	97.7	76.5	86.9	12.0	-	-	#DIV/0!		
		牛の肝臓	0.01	0.01	0.01		406000	188	0.9966	93.6	103.4	82.8	101.0	98.3	95.8	8.5	-	-	#DIV/0!		
		鶏の筋肉	0.01	0.01	0.01		713000	-108	0.9952	84.5	90.9	91.1	90.8	90.3	89.5	3.2	-	-	#DIV/0!		
		鶏卵	0.01	0.01	0.01		406000	188	0.9966	99.6	98.7	101.6	95.9	94.9	98.1	2.8	-	-	#DIV/0!		
		牛乳	0.01	0.01	0.01		406000	188	0.9966	85.6	87.0	96.5	102.5	74.7	89.3	12.0	-	-	#DIV/0!		
		はちみつ	0.01	0.01	0.01		439000	-25	0.9982	74.7	98.7	74.5	96.5	88.9	86.7	13.4	-	-	#DIV/0!		
		うなぎ	0.01	0.08	0.08	*	437000	-238	0.9940	99.8	88.2	103.5	90.0	100.3	96.4	7.1	-	-	#DIV/0!		
		さけ	0.01	0.08	0.08	*	390000	-178	0.9934	100.9	109.7	102.9	100.7	103.4	103.5	3.5	-	-	#DIV/0!		
		しじみ	0.01	0.08	0.08	*	474000	-219	0.9986	92.9	95.3	100.6	101.5	103.3	98.7	4.5	-	-	#DIV/0!		
2	代謝物B	牛の筋肉	0.01	0.01	0.01		810000	-196	0.9950	98.0	93.8	100.1	98.8	94.4	97.0	2.9	-	-	#DIV/0!		
		牛の脂肪	0.01	0.01	0.01		547000	2	0.9980	82.0	91.4	82.6	90.6	86.3	86.6	5.0	-	-	#DIV/0!		
		牛の肝臓	0.01	0.01	0.01		406000	188	0.9966	97.4	85.7	105.0	110.5	89.3	97.6	10.6	-	-	#DIV/0!		
		鶏の筋肉	0.01	0.01	0.01		713000	-108	0.9952	91.4	94.5	95.3	82.9	79.9	88.8	7.9	-	-	#DIV/0!		
		鶏卵	0.01	0.01	0.01		406000	188	0.9966	104.2	90.6	89.6	97.1	99.3	96.2	6.4	-	-	#DIV/0!		
		牛乳	0.01	0.01	0.01		406000	188	0.9966	118.8	91.6	91.4	103.9	98.0	100.7	11.3	-	-	#DIV/0!		
		はちみつ	0.01	0.01	0.01		439000	-25	0.9982	100.7	104.7	107.3	101.8	113.3	105.6	4.8	-	-	#DIV/0!		
		うなぎ	0.01	0.08	0.08	*	437000	-238	0.9940	98.1	92.3	97.5	95.7	97.2	96.2	2.4	-	-	#DIV/0!		
		さけ	0.01	0.08	0.08	*	390000	-178	0.9934	111.2	111.1	113.2	104.4	96.9	107.4	6.3	-	-	#DIV/0!		
		しじみ	0.01	0.08	0.08	*	474000	-219	0.9986	110.7	104.2	105.8	99.8	109.6	106.0	4.1	-	-	#DIV/0!		
3	代謝物C	牛の筋肉	0.01	0.01	0.01		810000	-196	0.9950	93.6	96.2	90.8	94.6	98.6	94.8	3.1	84.8	55.3	70.1		
		牛の脂肪	0.01	0.01	0.01		547000	2	0.9980	103	80.6	76.0	87.2	79.4	85.2	12.6	68.3	34.8	51.6		
		牛の肝臓	0.01	0.01	0.01		406000	188	0.9966	99.9	102.4	97.9	100.1	97.1	99.5	2.1	77.2	66.4	71.8		
		鶏の筋肉	0.01	0.01	0.01		713000	-108	0.9952	79.8	76.4	85.9	96.3	94.9	86.7	10.2	103.3	80.8	92.1		
		鶏卵	0.01	0.01	0.01		406000	188	0.9966	112.1	109.4	98.0	116.2	103.7	107.9	6.6	67.6	60.8	64.2		
		牛乳	0.01	0.01	0.01		406000	188	0.9966	101.0	102.5	105.6	98.4	92.6	100.0	4.9	63.3	46.5	54.9		
		はちみつ	0.01	0.01	0.01		439000	-25	0.9982	117.6	106.9	104.3	105.7	114.0	109.7	5.3	48.8	41.5	43.7		
		うなぎ	0.01	0.08	0.08	*	437000	-238	0.9940	92.9	93.6	99.1	92.9	101.9	96.1	4.3	-	-	#DIV/0!		
		さけ	0.01	0.08	0.08	*	390000	-178	0.9934	94.6	99.1	94.8	99.1	110.6	99.6	6.5	-	-	#DIV/0!		
		しじみ	0.01	0.08	0.08	*	474000	-219	0.9986	96.5	92.3	102.7	95.8	96.2	96.7	3.9	-	-	#DIV/0!		
4	代謝物D	牛の筋肉	0.01	0.01	0.01		1560000	15	0.9990	100.8	105.7	100.8	108.5	106.2	104.4	3.3	-	-	#DIV/0!		
		牛の脂肪	0.01	0.01	0.01		980000	203	0.9934	84.1	97.5	83.2	99.2	83.7	89.5	9.0	-	-	#DIV/0!		
		牛の肝臓	0.01	0.01	0.01		973000	246	0.9956	100.8	93.9	83.1	94.6	98.1	94.1	7.2	-	-	#DIV/0!		
		鶏の筋肉	0.01	0.01	0.01		1400000	-127	0.9984	95.0	101.2	98.7	98.1	98.5	98.3	2.2	-	-	#DIV/0!		
		鶏卵	0.01	0.01	0.01		973000	246	0.9956	99.2	95.0	96.8	99.0	97.7	97.5	1.8	-	-	#DIV/0!		
		牛乳	0.01	0.01	0.01		973000	246	0.9956	86.5	93.0	95.1	100.8	103.8	95.8	7.1	-	-	#DIV/0!		
		はちみつ	0.01	0.01	0.01		1010000	-159	0.9966	89.9	98.5	88.0	95.2	102.0	94.7	6.2	-	-	#DIV/0!		
		うなぎ	0.01	0.08	0.08	*	806000	194	0.9984	104.1	97.5	107.9	95.8	109.6	103.0	6.0	-	-	#DIV/0!		
		さけ	0.01	0.08	0.08	*	741000	217	0.9952	111.4	118.1	115.2	105.5	106.3	111.3	4.9	-	-	#DIV/0!		
		しじみ	0.01	0.08	0.08	*	988000	31	0.9990	101.4	94.0	102.9	102.1	103.7	100.8	3.9	-	-	#DIV/0!		
5	代謝物E	牛の筋肉	0.01	0.01	0.01		1560000	15	0.9990	100.7	100.5	97.0	96.5	100.4	99.0	2.1	-	-	#DIV/0!		
		牛の脂肪	0.01	0.01	0.01		980000	203	0.9934	77.4	99.0	92.8	93.8	84.8	89.6	9.5	-	-	#DIV/0!		
		牛の肝臓	0.01	0.01	0.01		973000	246	0.9956	82.8	88.1	101.6	98.6	76.9	89.6	11.6	-	-	#DIV/0!		
		鶏の筋肉	0.01	0.01	0.01		1400000	-127	0.9984	96.2	96.4	92.5	93.9	98.7	95.5	2.5	-	-	#DIV/0!		
		鶏卵	0.01	0.01	0.01		973000	246	0.9956	98.4	101.8	107.6	93.0	92.5	98.7	6.4	-	-	#DIV/0!		
		牛乳	0.01	0.01	0.01		973000	246	0.9956	91.7	87.7	85.5	91.7	97.1	90.7	4.9	-	-	#DIV/0!		
		はちみつ	0.01	0.01	0.01		1010000	-159	0.9966	108.8	90.7	111.3	100.7	108.2	103.9	8.1	-	-	#DIV/0!		
		うなぎ	0.01	0.08	0.08	*	806000	194	0.9984	103.4	101.8	91.3	90.2	102.0	97.7	6.6	-	-	#DIV/0!		
		さけ	0.01	0.08	0.08	*	741000	217	0.9952	108.8	106.0	112.0	106.9	95.8	105.9	5.8	-	-	#DIV/0!		
		しじみ	0.01	0.08	0.08	*	988000	31	0.9990	99.5	101.5	103.2	99.1	99.9	100.6	1.7	-	-	#DIV/0!		
6	代謝物F	牛の筋肉	0.01	0.01	0.01		1560000	15	0.9990	88.2	97.2	96.0	95.0	107.2	96.7	7.1	87.4	69.4	78.4		
		牛の脂肪	0.01	0.01	0.01		980000	203	0.9934	97.4	86.3	82.4	93.4	93.0	90.5	6.7	86.5	67.0	76.8		
		牛の肝臓	0.01	0.01	0.01		973000	246	0.9956	105.2	103.8	102.8	106.1	113.0	106.2	3.8	99.5	86.3	92.9		
		鶏の筋肉	0.01	0.01	0.01		1400000	-127	0.9984	92.2	74.7	84.6	87.7	84.6	84.8	7.6	118.3	102.3	110.3		
		鶏卵	0.01	0.01	0.01		973000	246	0.9956	92.9	93.5	96.4	106.5	101.4	98.1	5.9	84.3	83.9	84.1		
		牛乳	0.01	0.01	0.01		973000	246	0.9956	93.8	88.8	82.9	87.3	101.6	90.9	7.9	77.7	55.7	66.7		
		はちみつ	0.01	0.01	0.01		1010000	-159	0.9966	95.2	102.3	102.1	100.8	110.9	102.3	5.5	116.1	97.9	107.0		
		うなぎ	0.01	0.08	0.08	*	806000	194	0.9984	91.0	92.0	98.1	88.2	98.9	93.6	5.0	-	-	#DIV/0!		
		さけ	0.01	0.08	0.08	*	741000	217	0.9952	95.4	96.4	93.6	96.7	103.2	97.1	3.8	-	-	#DIV/0!		
		しじみ	0.01	0.08	0.08	*	988000	31	0.9990	84.6	85.2	90.4	79.7	85.5	85.1	4.5	-	-	#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 添加濃度が定量限界濃度と異なる場合には、「」が表示される。その場合には、S/N比の算出は不要であるが、別途、定量限界の推定を行う。

*3 得られた回収率の中で最大値を与えるピーク(Max.)及び最小値を与えるピーク(Min.)のそれぞれのS/N比を求める。

表14-1 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 (mg/kg)	基準値 ¹⁾ (ppm)	添加濃度 (ppm)	定量限界の評価 ²⁾	標準溶液濃度 ³⁾ (mg/L)	ピーク面積(高さ) ⁴⁾						S/N比		平均値		備考						
								面積又は高さの別	ブランク ⁵⁾	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	面積(高さ)比(%) ⁶⁾	S/N比
										n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均									
1	代謝物C	玄米	0.01	0.3	0.3	*	0.0005	面積	0	1020	1033	1026.5	1039	1121	1080.0	50.0	45.4	95.0	47.7					
		大豆	0.01	0.05	0.05	*	0.0005	面積	0	872	947	909.5	906	883	894.5	67.3	54.1	101.7	60.7					
		らっかせい	0.01	0.01	0.01				面積				0.0			0.0			#DIV/0!	#DIV/0!				
		ほうれんそう	0.01	0.01	0.01				面積				0.0			0.0			#DIV/0!	#DIV/0!				
		キャベツ	0.01	0.01	0.01				面積				0.0			0.0			#DIV/0!	#DIV/0!				
		ばれいしょ	0.01	0.05	0.05	*	0.0005	面積	0	1252	1068	1160.0	1046	1162	1104.0	63.3	57.3	105.1	60.3					
		オレンジ	0.01	2	2	*	0.0005	面積	0	1094	1133	1113.5	1013	1124	1068.5	61.2	50.4	104.2	55.8					
		りんご	0.01	0.01	0.01				面積				0.0			0.0			#DIV/0!	#DIV/0!				
		茶	0.01	0.01	0.01				面積				0.0			0.0			#DIV/0!	#DIV/0!				
		ぶどう	0.01	0.01	0.01				面積				0.0			0.0			#DIV/0!	#DIV/0!				
2	代謝物F	玄米	0.01	0.3	0.3	*	0.0005	面積	0	2289	2259	2274.0	2246	2386	2316.0	86.4	53.0	98.2	69.7					
		大豆	0.01	0.05	0.05	*	0.0005	面積	0	1930	1945	1937.5	1930	1791	1860.5	65.4	60.3	104.1	62.9					
		らっかせい	0.01	0.01	0.01				面積				0.0			0.0			#DIV/0!	#DIV/0!				
		ほうれんそう	0.01	0.01	0.01				面積				0.0			0.0			#DIV/0!	#DIV/0!				
		キャベツ	0.01	0.01	0.01				面積				0.0			0.0			#DIV/0!	#DIV/0!				
		ばれいしょ	0.01	0.05	0.05	*	0.0005	面積	0	2003	2024	2013.5	2091	2041	2066.0	39.3	38.9	97.5	39.1					
		オレンジ	0.01	2	2	*	0.0005	面積	0	2283	2055	2169.0	2317	2351	2334.0	89.0	75.1	92.9	82.1					
		りんご	0.01	0.01	0.01				面積				0.0			0.0			#DIV/0!	#DIV/0!				
		茶	0.01	0.01	0.01				面積				0.0			0.0			#DIV/0!	#DIV/0!				
		ぶどう	0.01	0.01	0.01				面積				0.0			0.0			#DIV/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 定量限界の推定を行う対象(添加濃度と定量限界濃度が異なる場合)には、『』が表示される。
 *3 試料中の濃度が定量限界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。
 *4 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回以上測定する。(必要に応じて起爆注入を行う。)
 *5 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。
 *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14-2 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 (mg/kg)	基準値 ¹⁾ (ppm)	添加濃度 (ppm)	定量限界の評価 ²⁾	標準溶液濃度 ³⁾ (mg/L)	ピーク面積(高さ) ⁴⁾						S/N比		平均値		備考						
								面積又は高さの別	ブランク ⁵⁾	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	面積(高さ)比(%) ⁶⁾	S/N比
										n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均									
1	代謝物C	牛の筋肉	0.01	0.01	0.01			面積				0.0			0.0			#DIV/0!	#DIV/0!					
		牛の脂肪	0.01	0.01	0.01				面積				0.0			0.0			#DIV/0!	#DIV/0!				
		牛の肝臓	0.01	0.01	0.01				面積				0.0			0.0			#DIV/0!	#DIV/0!				
		鶏の筋肉	0.01	0.01	0.01				面積				0.0			0.0			#DIV/0!	#DIV/0!				
		鶏卵	0.01	0.01	0.01				面積				0.0			0.0			#DIV/0!	#DIV/0!				
		牛乳	0.01	0.01	0.01				面積				0.0			0.0			#DIV/0!	#DIV/0!				
		はちみつ	0.01	0.01	0.01				面積				0.0			0.0			#DIV/0!	#DIV/0!				
		うなぎ	0.01	0.08	0.08	*	0.0005	面積	0	1136	1230	1183.0	1152	1226	1189.0	78.7	61.8	99.5	70.3					
		さけ	0.01	0.08	0.08	*	0.0005	面積	0	1152	947	1049.5	1153	1203	1178.0	61.3	49.6	89.1	55.5					
		しじみ	0.01	0.08	0.08	*	0.0005	面積	0	1261	1377	1319.0	1290	1170	1230.0	62.3	56.6	107.2	59.5					
2	代謝物F	牛の筋肉	0.01	0.01	0.01				面積				0.0			0.0			#DIV/0!	#DIV/0!				
		牛の脂肪	0.01	0.01	0.01				面積				0.0			0.0			#DIV/0!	#DIV/0!				
		牛の肝臓	0.01	0.01	0.01				面積				0.0			0.0			#DIV/0!	#DIV/0!				
		鶏の筋肉	0.01	0.01	0.01				面積				0.0			0.0			#DIV/0!	#DIV/0!				
		鶏卵	0.01	0.01	0.01				面積				0.0			0.0			#DIV/0!	#DIV/0!				
		牛乳	0.01	0.01	0.01				面積				0.0			0.0			#DIV/0!	#DIV/0!				
		はちみつ	0.01	0.01	0.01				面積				0.0			0.0			#DIV/0!	#DIV/0!				
		うなぎ	0.01	0.08	0.08	*	0.0005	面積	0	2046	1999	2022.5	2135	2014	2074.5	40.1	39.7	97.5	39.9					
		さけ	0.01	0.08	0.08	*	0.0005	面積	0	1930	2021	1975.5	1997	2108	2052.5	44.3	31.9	96.2	38.1					
		しじみ	0.01	0.08	0.08	*	0.0005	面積	0	2514	2740	2627.0	2358	2520	2439.0	102.6	84.1	107.7	93.4					

*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が異なる場合)には、『』が表示される。
 *3 試料中の濃度が定量限界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。
 *4 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回以上測定する。(必要に応じて起爆注入を行う。)
 *5 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。
 *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15-1及び15-2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。農産物の面積比は代謝物C 0.99~1.06、代謝物F 0.99~1.04であり、測定への影響は少ないものと考えられた。畜水産物の面積比は代謝物C 0.98~1.08、代謝物F 0.96~1.08であり、測定への影響は少ないものと考えられた。

添加回収試験における真度を表15-1及び表15-2で求めたピーク面積比で除して補正真度を求め、表16-1、16-2に示した。農産物の補正真度はフェンチオン77.7~95.1%、代謝物B 80.0~97.6%、代謝物C 77.8~90.8%、代謝物D 81.4~99.8%、代謝物E 87.5~99.3%、代謝物F 83.1~94.0%であり、畜水産物の補正真度はフェンチオン83.1~101.9%、代謝物B 82.7~107.8%、代謝物C 81.5~112.0%、代謝物D 88.1~113.9%、代謝物E 86.4~108.3%、代謝物F 81.0~105.8%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15-1 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 (mg/kg)	基準値 ¹ (ppm)	添加濃度 (ppm)	標準溶液 濃度 ² (mg/L)	ピーク面積(高さ) ³							備考		
							面積又は 高さの別	ブランク ⁴	マトリックス添加標準溶液 ⁵			溶媒標準溶液			ピーク面積 (高さ)比 ⁶	
									n=1	n=2	平均	n=1	n=2			平均
1	代謝物C	玄米	0.01	0.3	0.3	0.015	面積	0	32474	31479	31976.5	31099	32040	31569.5	1.01	
		大豆	0.01	0.05	0.05	0.0025	面積	0	4485	4542	4513.5	4411	4082	4246.5	1.06	
		らっかせい	0.01	0.01	0.01	0.0005	面積	0	1648	1538	1593.0	1519	1473	1496.0	1.06	
		ほうれんそう	0.01	0.01	0.01	0.0005	面積	0	1480	1327	1403.5	1282	1385	1333.5	1.05	
		キャベツ	0.01	0.01	0.01	0.0005	面積	0	1655	1592	1623.5	1580	1578	1579.0	1.03	
		ばれいしょ	0.01	0.05	0.05	0.0025	面積	0	5329	5060	5194.5	5247	5062	5154.5	1.01	
		オレンジ	0.01	2.	2.	0.0025	面積	0	5332	5801	5666.5	5449	5552	5500.5	1.01	
		りんご	0.01	0.01	0.01	0.0005	面積	0	1232	1270	1251.0	1248	1290	1269.0	0.99	
		茶	0.01	0.01	0.01	0.0005	面積	0	1025	1093	1059.0	1065	1035	1050.0	1.01	
		ぶどう	0.01	0.01	0.01	0.0005	面積	0	1697	1883	1790.0	1797	1745	1771.0	1.01	
2	代謝物F	玄米	0.01	0.3	0.3	0.015	面積	0	62732	65524	64128.0	63861	65493	64677.0	0.99	
		大豆	0.01	0.05	0.05	0.0025	面積	0	8612	9018	8815.0	8845	8740	8792.5	1.00	
		らっかせい	0.01	0.01	0.01	0.0005	面積	0	3552	3387	3469.5	3474	3333	3403.5	1.02	
		ほうれんそう	0.01	0.01	0.01	0.0005	面積	0	2657	2782	2719.5	2833	2624	2728.5	1.00	
		キャベツ	0.01	0.01	0.01	0.0005	面積	0	3712	3582	3647.0	3513	3621	3567.0	1.02	
		ばれいしょ	0.01	0.05	0.05	0.0025	面積	0	9156	9353	9254.5	9083	9276	9179.5	1.01	
		オレンジ	0.01	2.	2.	0.0025	面積	0	11037	11004	11020.5	10788	10410	10599.0	1.04	
		りんご	0.01	0.01	0.01	0.0005	面積	0	2429	2518	2473.5	2418	2497	2457.5	1.01	
		茶	0.01	0.01	0.01	0.0005	面積	0	2270	2131	2200.5	2110	2300	2205.0	1.00	
		ぶどう	0.01	0.01	0.01	0.0005	面積	0	3846	3825	3835.5	3613	3857	3735.0	1.03	

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

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

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

*4 ブランクにピークが認められた場合には、マトリックス添加標準溶液の値はブランク値を差し引いた値を用いる。

*5 マトリックス添加標準溶液は試験当日のブランク試料の試験溶液を用いて調製する。

*6 マトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積(又は高さ)の比を求める。

表15-2 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 (mg/kg)	基準値 ¹ (ppm)	添加濃度 (ppm)	標準溶液 濃度 ² (mg/L)	ピーク面積(高さ) ³							備考		
							面積又は 高さの別	ブランク ⁴	マトリックス添加標準溶液 ⁵			溶媒標準溶液			ピーク面積 (高さ)比 ⁶	
									n=1	n=2	平均	n=1	n=2			平均
1	代謝物C	牛の筋肉	0.01	0.01	0.01	0.0005	面積	0	1690	1587	1638.5	1612	1434	1523.0	1.08	
		牛の脂肪	0.01	0.01	0.01	0.0005	面積	0	1265	1198	1231.5	1295	1059	1177.0	1.05	
		牛の肝臓	0.01	0.01	0.01	0.0005	面積	0	1296	1213	1254.5	1209	1145	1177.0	1.07	
		鶏の筋肉	0.01	0.01	0.01	0.0005	面積	0	1672	1773	1722.5	1578	1666	1622.0	1.06	
		鶏卵	0.01	0.01	0.01	0.0005	面積	0	1168	1237	1202.5	1144	1159	1151.5	1.04	
		牛乳	0.01	0.01	0.01	0.0005	面積	0	1031	1058	1044.5	1031	1048	1039.5	1.00	
		はちみつ	0.01	0.01	0.01	0.0005	面積	0	1050	1217	1133.5	1158	1157	1157.5	0.98	
		うなぎ	0.01	0.08	0.08	0.004	面積	0	8564	8479	8521.5	7898	7838	7868.0	1.08	
		さけ	0.01	0.08	0.08	0.004	面積	0	8139	8404	8271.5	8218	8074	8146.0	1.02	
		しじみ	0.01	0.08	0.08	0.004	面積	0	9439	9804	9621.5	9219	9439	9329.0	1.03	
2	代謝物F	牛の筋肉	0.01	0.01	0.01	0.0005	面積	0	4036	4114	4075.0	4022	4019	4020.5	1.01	
		牛の脂肪	0.01	0.01	0.01	0.0005	面積	0	2617	2676	2646.5	2616	2869	2742.5	0.96	
		牛の肝臓	0.01	0.01	0.01	0.0005	面積	0	2748	2655	2701.5	2661	2724	2692.5	1.00	
		鶏の筋肉	0.01	0.01	0.01	0.0005	面積	0	3282	3433	3357.5	3333	3543	3438.0	0.98	
		鶏卵	0.01	0.01	0.01	0.0005	面積	0	2763	2728	2745.5	2721	2526	2623.5	1.05	
		牛乳	0.01	0.01	0.01	0.0005	面積	0	2362	2434	2398.0	2305	2259	2282.0	1.05	
		はちみつ	0.01	0.01	0.01	0.0005	面積	0	2509	2558	2533.5	2300	2412	2356.0	1.08	
		うなぎ	0.01	0.08	0.08	0.004	面積	0	15820	16056	15938.0	15397	15683	15540.0	1.03	
		さけ	0.01	0.08	0.08	0.004	面積	0	15927	15355	15641.0	16205	15796	16000.5	0.98	
		しじみ	0.01	0.08	0.08	0.004	面積	0	20468	19651	20059.5	19379	18811	19095.0	1.05	

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

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

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

*4 ブランクにピークが認められた場合には、マトリックス添加標準溶液の値はブランク値を差し引いた値を用いる。

*5 マトリックス添加標準溶液は試験当日のブランク試料の試験溶液を用いて調製する。

*6 マトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積(又は高さ)の比を求める。

表 16-1 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	フェンチオン	玄米	0.01	0.3	0.3	88.6	1.01	87.5	
		大豆	0.01	0.05	0.05	82.6	1.06	77.7	
		らっかせい	0.01	0.01	0.01	94.8	1.06	89.0	
		ほうれんそう	0.01	0.01	0.01	86.1	1.05	81.8	
		キャベツ	0.01	0.01	0.01	87.8	1.03	85.4	
		ばれいしょ	0.01	0.05	0.05	89.5	1.01	88.8	
		オレンジ	0.01	2.	2.	93.6	1.01	92.5	
		りんご	0.01	0.01	0.01	88.2	0.99	89.4	
		茶	0.01	0.01	0.01	95.9	1.01	95.1	
		ぶどう	0.01	0.01	0.01	81.3	1.01	80.4	
2	代謝物B	玄米	0.01	0.3	0.3	92.1	1.01	90.9	
		大豆	0.01	0.05	0.05	85.1	1.06	80.0	
		らっかせい	0.01	0.01	0.01	90.1	1.06	84.6	
		ほうれんそう	0.01	0.01	0.01	102.7	1.05	97.6	
		キャベツ	0.01	0.01	0.01	92.6	1.03	90.1	
		ばれいしょ	0.01	0.05	0.05	91.9	1.01	91.2	
		オレンジ	0.01	2.	2.	94.8	1.01	93.7	
		りんご	0.01	0.01	0.01	84.5	0.99	85.7	
		茶	0.01	0.01	0.01	94.1	1.01	93.3	
		ぶどう	0.01	0.01	0.01	84.1	1.01	83.2	
3	代謝物C	玄米	0.01	0.3	0.3	86.6	1.01	85.5	
		大豆	0.01	0.05	0.05	82.7	1.06	77.8	
		らっかせい	0.01	0.01	0.01	87.8	1.06	82.4	
		ほうれんそう	0.01	0.01	0.01	86.2	1.05	81.9	
		キャベツ	0.01	0.01	0.01	87.4	1.03	85.0	
		ばれいしょ	0.01	0.05	0.05	87.1	1.01	86.4	
		オレンジ	0.01	2.	2.	91.9	1.01	90.8	
		りんご	0.01	0.01	0.01	81.6	0.99	82.8	
		茶	0.01	0.01	0.01	91.3	1.01	90.5	
		ぶどう	0.01	0.01	0.01	91.1	1.01	90.1	
4	代謝物D	玄米	0.01	0.3	0.3	93.1	0.99	93.9	
		大豆	0.01	0.05	0.05	93.8	1.00	93.6	
		らっかせい	0.01	0.01	0.01	94.3	1.02	92.5	
		ほうれんそう	0.01	0.01	0.01	91.0	1.00	91.3	
		キャベツ	0.01	0.01	0.01	95.1	1.02	93.0	
		ばれいしょ	0.01	0.05	0.05	97.4	1.01	96.6	
		オレンジ	0.01	2.	2.	102.1	1.04	98.2	
		りんご	0.01	0.01	0.01	100.5	1.01	99.8	
		茶	0.01	0.01	0.01	94.7	1.00	94.9	
		ぶどう	0.01	0.01	0.01	83.6	1.03	81.4	
5	代謝物E	玄米	0.01	0.3	0.3	89.8	0.99	90.5	
		大豆	0.01	0.05	0.05	91.7	1.00	91.5	
		らっかせい	0.01	0.01	0.01	98.0	1.02	96.1	
		ほうれんそう	0.01	0.01	0.01	90.2	1.00	90.5	
		キャベツ	0.01	0.01	0.01	98.2	1.02	96.0	
		ばれいしょ	0.01	0.05	0.05	100.1	1.01	99.3	
		オレンジ	0.01	2.	2.	100.8	1.04	96.9	
		りんご	0.01	0.01	0.01	91.0	1.01	90.4	
		茶	0.01	0.01	0.01	91.3	1.00	91.5	
		ぶどう	0.01	0.01	0.01	89.9	1.03	87.5	
6	代謝物F	玄米	0.01	0.3	0.3	86.0	0.99	86.7	
		大豆	0.01	0.05	0.05	93.9	1.00	93.7	
		らっかせい	0.01	0.01	0.01	94.3	1.02	92.5	
		ほうれんそう	0.01	0.01	0.01	91.5	1.00	91.8	
		キャベツ	0.01	0.01	0.01	92.2	1.02	90.2	
		ばれいしょ	0.01	0.05	0.05	94.8	1.01	94.0	
		オレンジ	0.01	2.	2.	92.5	1.04	89.0	
		りんご	0.01	0.01	0.01	90.3	1.01	89.7	
		茶	0.01	0.01	0.01	82.9	1.00	83.1	
		ぶどう	0.01	0.01	0.01	90.6	1.03	88.2	

*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。

表 16-2 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 ^{*1} (ppm)	添加濃度 (ppm)	真度 (%)	ピーク面積 比 (%)	補正真度 (%)	備 考
1	フェンチオン	牛の筋肉	0.01	0.01	0.01	91.9	1.08	85.5	
		牛の脂肪	0.01	0.01	0.01	86.9	1.05	83.1	
		牛の肝臓	0.01	0.01	0.01	95.8	1.07	89.9	
		鶏の筋肉	0.01	0.01	0.01	89.5	1.06	84.3	
		鶏卵	0.01	0.01	0.01	98.1	1.04	94.0	
		牛乳	0.01	0.01	0.01	89.3	1.00	88.8	
		はちみつ	0.01	0.01	0.01	86.7	0.98	88.5	
		うなぎ	0.01	0.08	0.08	96.4	1.08	89.0	
		さけ	0.01	0.08	0.08	103.5	1.02	101.9	
		しじみ	0.01	0.08	0.08	98.7	1.03	95.7	
2	代謝物B	牛の筋肉	0.01	0.01	0.01	97.0	1.08	90.2	
		牛の脂肪	0.01	0.01	0.01	86.6	1.05	82.7	
		牛の肝臓	0.01	0.01	0.01	97.6	1.07	91.6	
		鶏の筋肉	0.01	0.01	0.01	88.8	1.06	83.6	
		鶏卵	0.01	0.01	0.01	96.2	1.04	92.1	
		牛乳	0.01	0.01	0.01	100.7	1.00	100.3	
		はちみつ	0.01	0.01	0.01	105.6	0.98	107.8	
		うなぎ	0.01	0.08	0.08	96.2	1.08	88.8	
		さけ	0.01	0.08	0.08	107.4	1.02	105.7	
		しじみ	0.01	0.08	0.08	106.0	1.03	102.8	
3	代謝物C	牛の筋肉	0.01	0.01	0.01	94.8	1.08	88.1	
		牛の脂肪	0.01	0.01	0.01	85.2	1.05	81.5	
		牛の肝臓	0.01	0.01	0.01	99.5	1.07	93.3	
		鶏の筋肉	0.01	0.01	0.01	86.7	1.06	81.6	
		鶏卵	0.01	0.01	0.01	107.9	1.04	103.3	
		牛乳	0.01	0.01	0.01	100.0	1.00	99.5	
		はちみつ	0.01	0.01	0.01	109.7	0.98	112.0	
		うなぎ	0.01	0.08	0.08	96.1	1.08	88.7	
		さけ	0.01	0.08	0.08	99.6	1.02	98.1	
		しじみ	0.01	0.08	0.08	96.7	1.03	93.8	
4	代謝物D	牛の筋肉	0.01	0.01	0.01	104.4	1.01	103.0	
		牛の脂肪	0.01	0.01	0.01	89.5	0.96	92.8	
		牛の肝臓	0.01	0.01	0.01	94.1	1.00	93.8	
		鶏の筋肉	0.01	0.01	0.01	98.3	0.98	100.7	
		鶏卵	0.01	0.01	0.01	97.5	1.05	93.2	
		牛乳	0.01	0.01	0.01	95.8	1.05	91.2	
		はちみつ	0.01	0.01	0.01	94.7	1.08	88.1	
		うなぎ	0.01	0.08	0.08	103.0	1.03	100.4	
		さけ	0.01	0.08	0.08	111.3	0.98	113.9	
		しじみ	0.01	0.08	0.08	100.8	1.05	96.0	
5	代謝物E	牛の筋肉	0.01	0.01	0.01	99.0	1.01	97.7	
		牛の脂肪	0.01	0.01	0.01	89.6	0.96	92.8	
		牛の肝臓	0.01	0.01	0.01	89.6	1.00	89.3	
		鶏の筋肉	0.01	0.01	0.01	95.5	0.98	97.8	
		鶏卵	0.01	0.01	0.01	98.7	1.05	94.3	
		牛乳	0.01	0.01	0.01	90.7	1.05	86.4	
		はちみつ	0.01	0.01	0.01	103.9	1.08	96.7	
		うなぎ	0.01	0.08	0.08	97.7	1.03	95.3	
		さけ	0.01	0.08	0.08	105.9	0.98	108.3	
		しじみ	0.01	0.08	0.08	100.6	1.05	95.8	
6	代謝物F	牛の筋肉	0.01	0.01	0.01	96.7	1.01	95.4	
		牛の脂肪	0.01	0.01	0.01	90.5	0.96	93.8	
		牛の肝臓	0.01	0.01	0.01	106.2	1.00	105.8	
		鶏の筋肉	0.01	0.01	0.01	84.8	0.98	86.8	
		鶏卵	0.01	0.01	0.01	98.1	1.05	93.8	
		牛乳	0.01	0.01	0.01	90.9	1.05	86.5	
		はちみつ	0.01	0.01	0.01	102.3	1.08	95.1	
		うなぎ	0.01	0.08	0.08	93.6	1.03	91.3	
		さけ	0.01	0.08	0.08	97.1	0.98	99.3	
		しじみ	0.01	0.08	0.08	85.1	1.05	81.0	

*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。

4. 考察

フェンチオン、代謝物B、代謝物C、代謝物D、代謝物E及び代謝物Fを測定対象とする分析法の検討を行った。分析操作中にフェンチオン及び代謝物Dがそれぞれ代謝物B及び代謝物Eに変換することが確認され、6成分の同時分析法の確立が困難であったため、酸化反応を行い、フェンチオン及び代謝物Bを代謝物Cに、代謝物D及び代謝物Eを代謝物Fに収束させて測定する試験法とした。溶解度を考慮し抽出溶媒にはアセトンを用いた。脂溶性の妨害物質の除去を目的として、アセトニトリル/ヘキサン分配を検討したところ、良好な結果が得られた。精製について、グラファイトカーボン/アミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラムによる精製を行ったところ良好な結果が得られた。酸化反応にはバイエルクロップサイエンス社提供資料の方法に準拠し過マンガン酸カリウム溶液を用いたところ、酸化反応は良好でありフェンチオン及び代謝物Bを代謝物Cに、代謝物D及び代謝物Eを代謝物Fに収束させることができた。酸化後に過マンガン酸カリウム溶液を除去することを目的として多孔性ケイソウ土カラムによる精製を実施したところ良好な結果が得られた。

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、真度はフェンチオン81.3~95.9%、代謝物B 84.1~102.7%、代謝物C 81.6~91.9%、代謝物D 83.6~102.1%、代謝物E 89.8~100.8%、代謝物F 82.9~94.8%、併行精度はフェンチオン1.8~14.4%、代謝物B 3.1~12.8%、代謝物C 4.1~12.8%、代謝物D 2.1~8.0%、代謝物E 3.7~10.0%、代謝物F 2.9~8.2%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判断された。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、真度はフェンチオン86.7~103.5%、代謝物B 86.6~107.4%、代謝物C 85.2~109.7%、代謝物D 89.5~111.3%、代謝物E 89.6~105.9%、代謝物F 84.8~106.2%、併行精度はフェンチオン2.8~13.4%、代謝物B 2.4~11.3%、代謝物C 2.1~12.6%、代謝物D 1.8~9.0%、代謝物E 1.7~11.6%、代謝物F 3.8~7.9%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判断された。

[結論]

農産物及び畜水産物中のフェンチオン試験法として、フェンチオン、代謝物B、代謝物C、代謝物D、代謝物E及び代謝物Fを試料からアセトン抽出し、アセトニトリル/ヘキサン分配を行った後グラファイトカーボン/アミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラムで精製し、過マンガン酸カリウム溶液を用いて酸化してフェンチオン及び代謝物Bを代謝物Cに、代謝物D及び代謝物Eを代謝物Fに収束させた。酸化後多孔性ケイソウ土カラムで精製し、LC-MS/MSで定量及び確認する方法を開発した。

得られた結果における選択性、真度及び精度は良好であり、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]

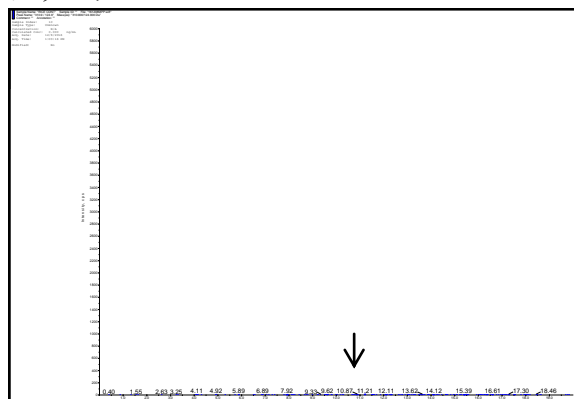
食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法 フェンチオンの個別試験法(厚生労働省)

E. S. Rzepka, ENFORCEMENT METHOD 00085/M001 FOR THE DETERMINATION OF RESIDUES OF FENTHION AND ITS METABOLITES IN MATERIALS OF PLANT ORIGIN-VALIDATION OF DFG METHOD S 16, Bayer CropScience

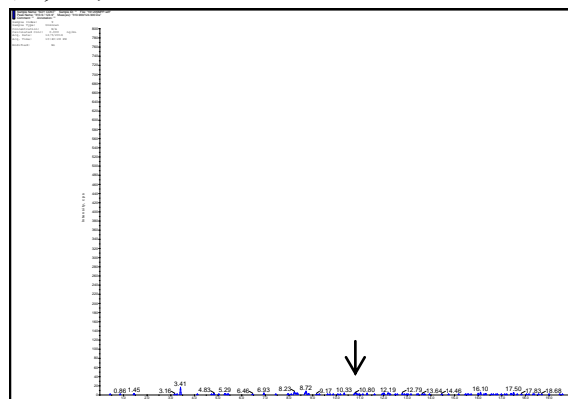
S. Rzepka, ENFORCEMENT METHOD 00085/M002 FOR THE DETERMINATION OF RESIDUES OF FENTHION AND ITS METABOLITES IN MATERIALS OF ANIMAL ORIGIN-VALIDATION OF DFG METHOD S 16, Bayer CropScience

代謝物Cの添加回収試験におけるクロマトグラム（農産物）

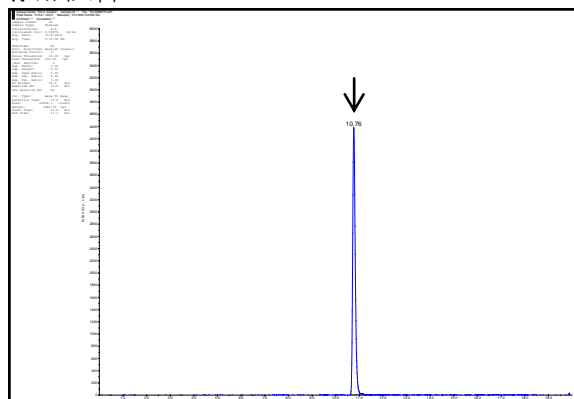
ブランク



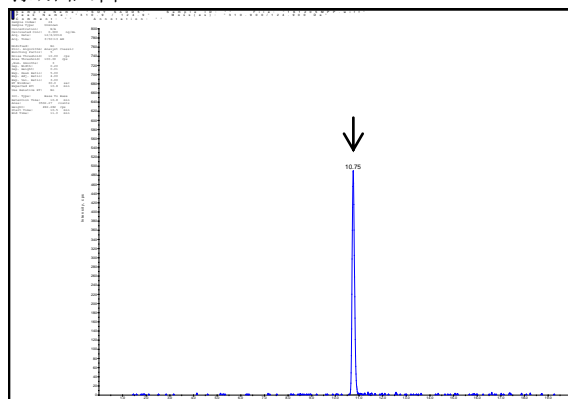
ブランク



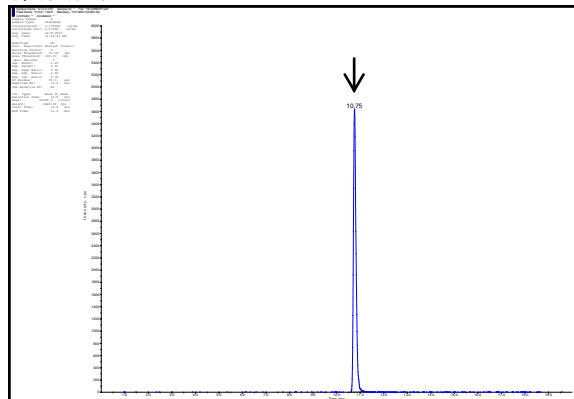
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

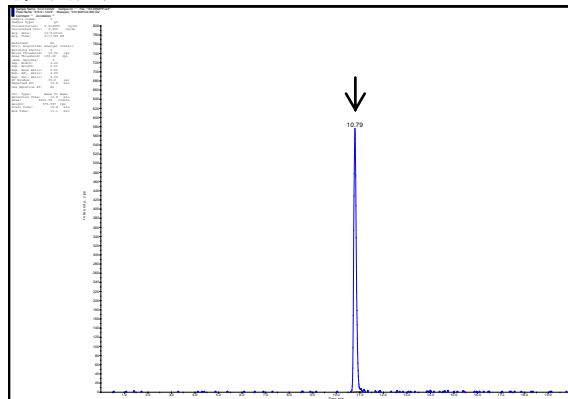
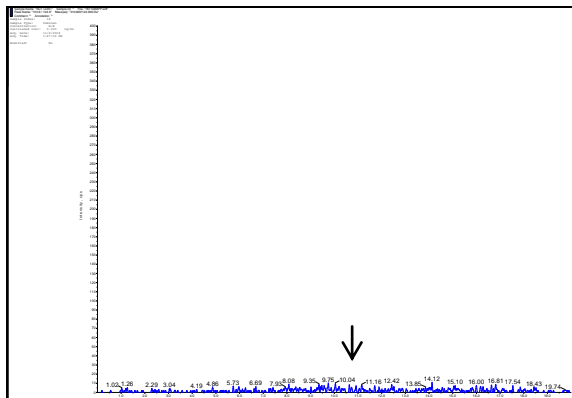


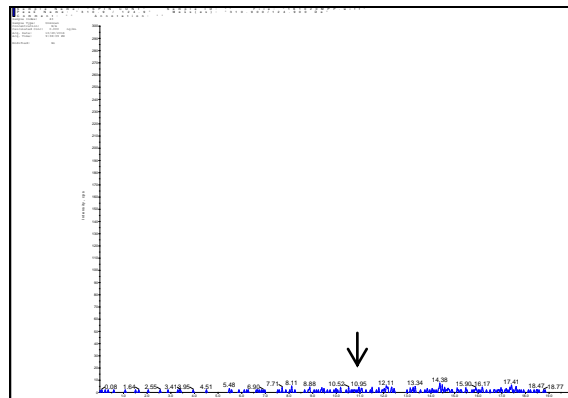
図 6-1 玄米の SRM クロマトグラム
代謝物 C (m/z +311→125)
添加濃度 : 0.3 ppm

図 6-2 大豆の SRM クロマトグラム
代謝物 C (m/z +311→125)
添加濃度 : 0.05 ppm

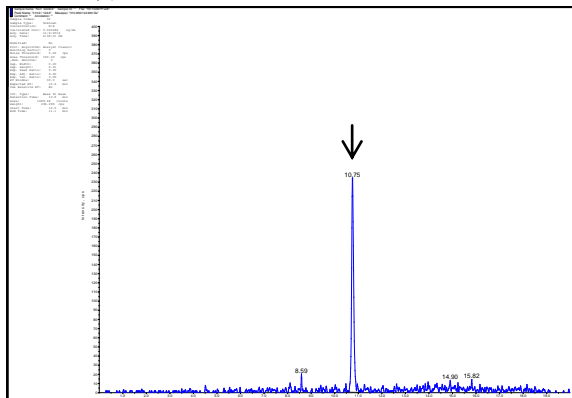
ブランク



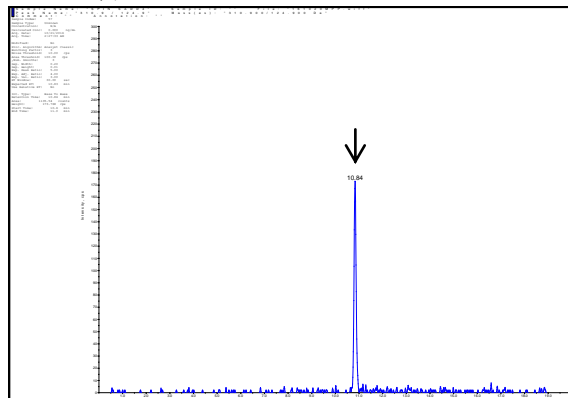
ブランク



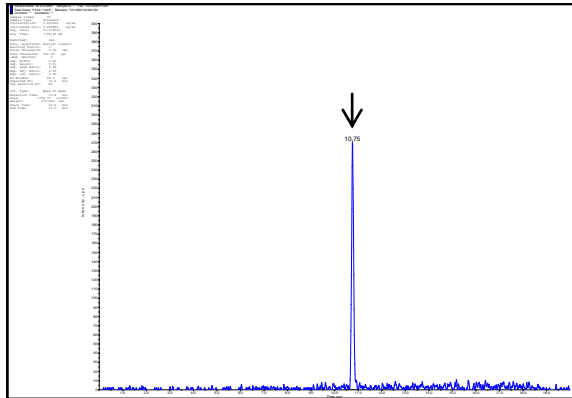
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

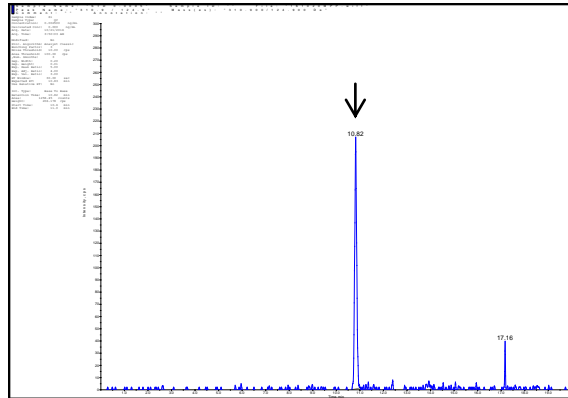
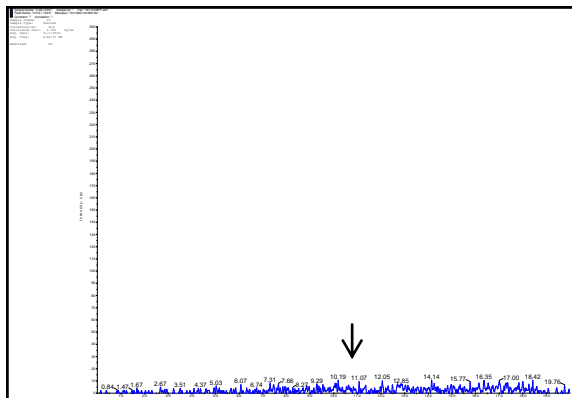


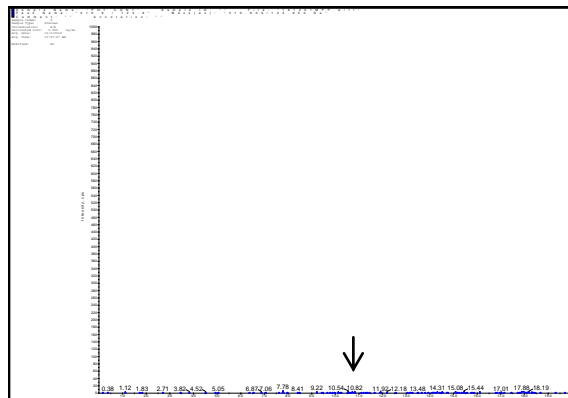
図 6-3 らっかせいの SRM クロマトグラム
代謝物 C (m/z +311 \rightarrow 125)
添加濃度 : 0.01 ppm

図 6-4 ほうれんそうの SRM クロマトグラム
代謝物 C (m/z +311 \rightarrow 125)
添加濃度 : 0.01 ppm

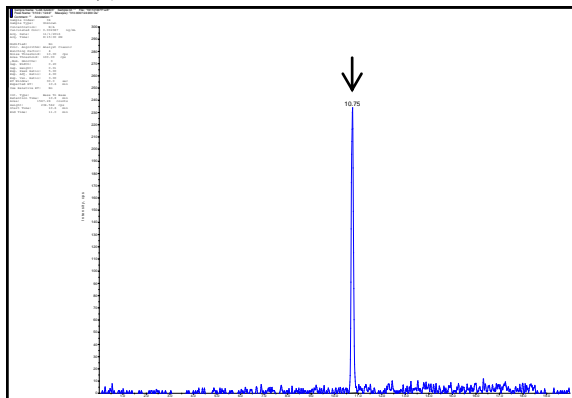
ブランク



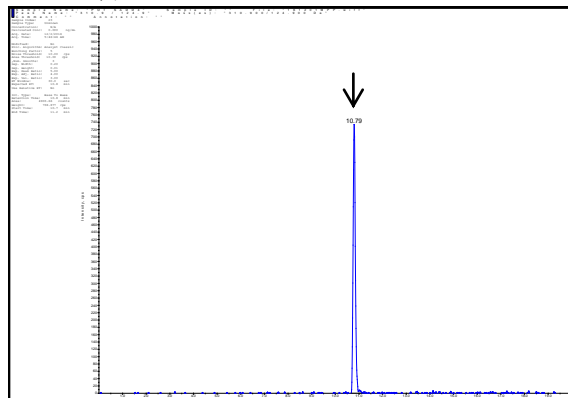
ブランク



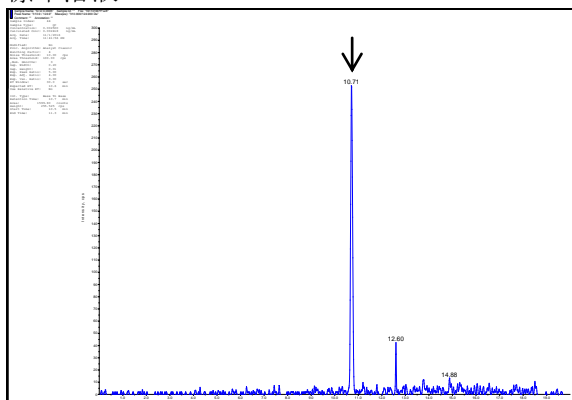
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

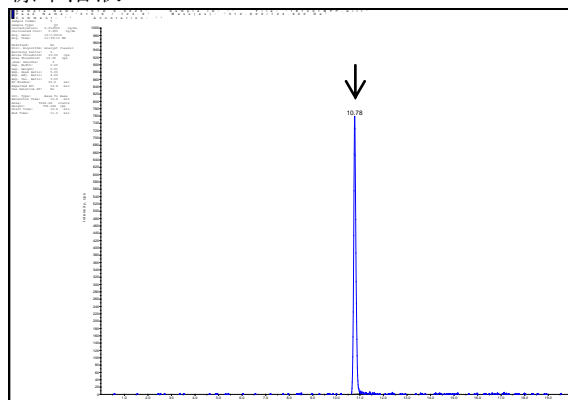
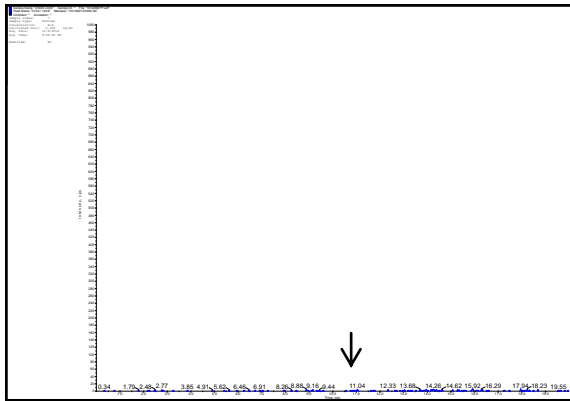


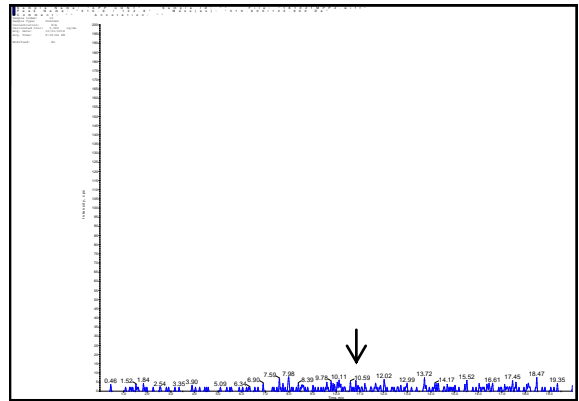
図 6-5 キャベツの SRM クロマトグラム
代謝物 C (m/z +311 \rightarrow 125)
添加濃度 : 0.01 ppm

図 6-6 ばれいしょの SRM クロマトグラム
代謝物 C (m/z +311 \rightarrow 125)
添加濃度 : 0.05 ppm

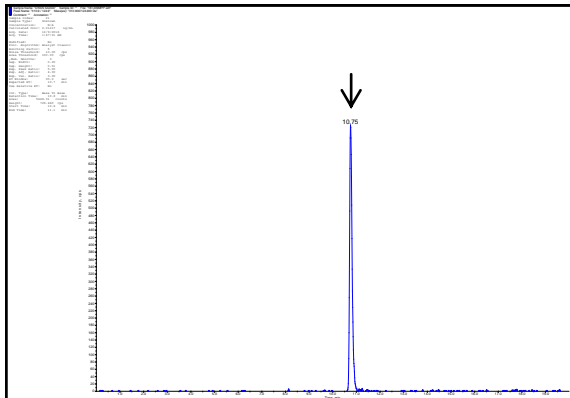
ブランク



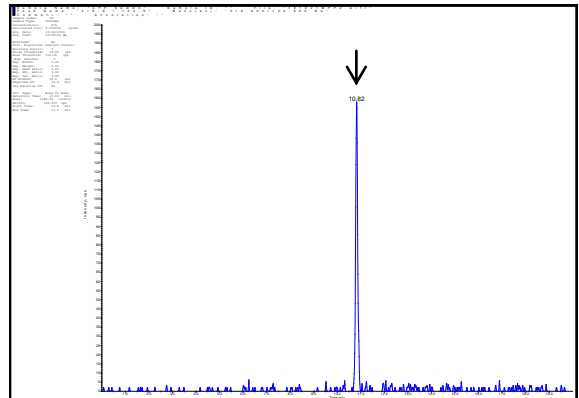
ブランク



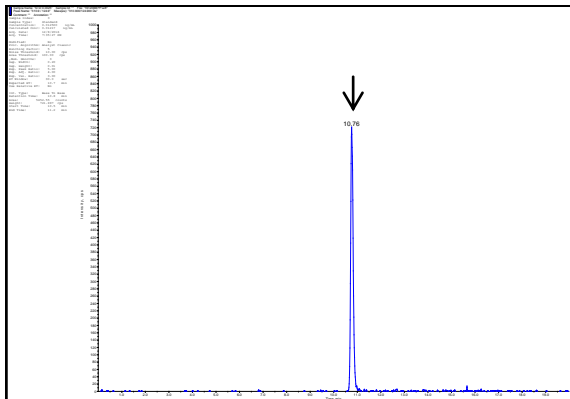
添加試料 40倍希釈



添加試料



標準溶液



標準溶液

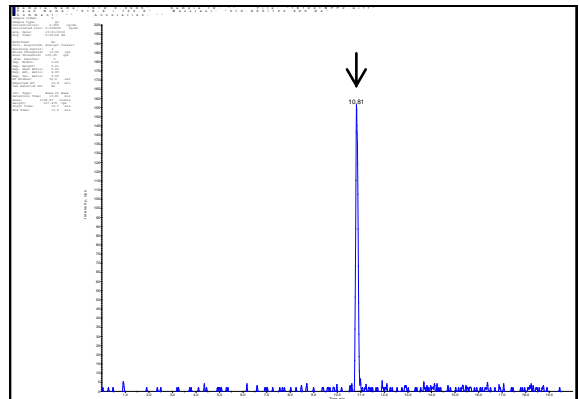
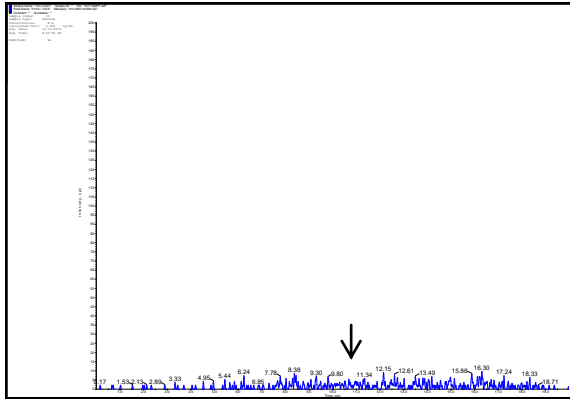


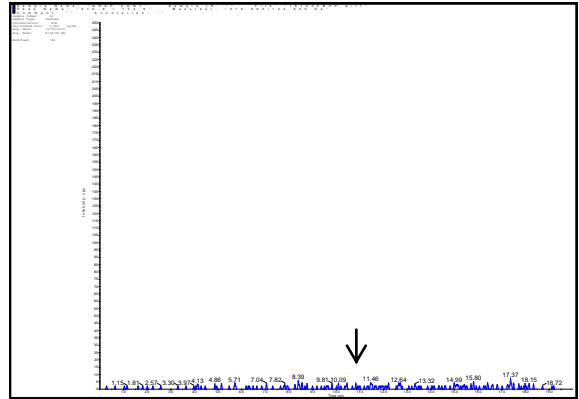
図 6-7 オレンジの SRM クロマトグラム
代謝物 C (m/z +311 \rightarrow 125)
添加濃度 : 2 ppm

図 6-8 りんごの SRM クロマトグラム
代謝物 C (m/z +311 \rightarrow 125)
添加濃度 : 0.01 ppm

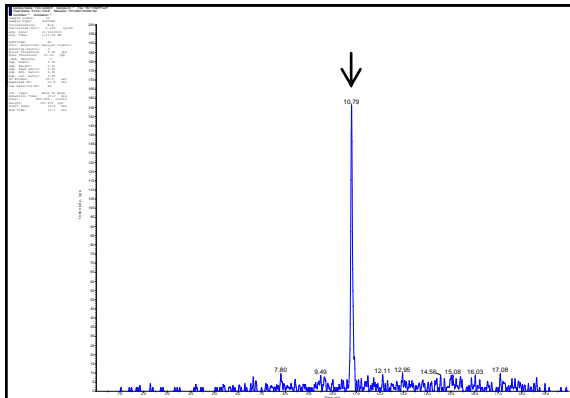
ブランク



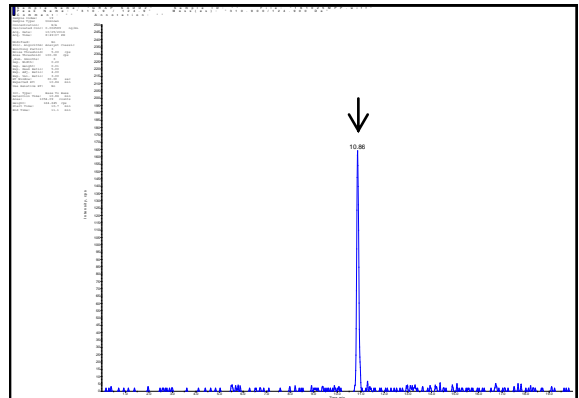
ブランク



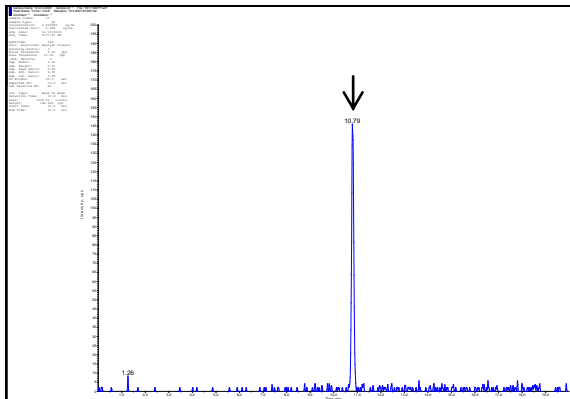
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

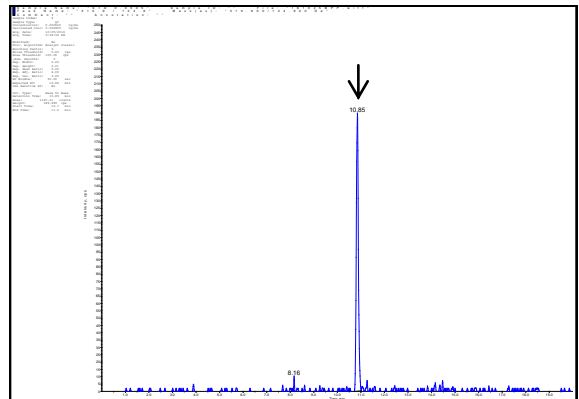
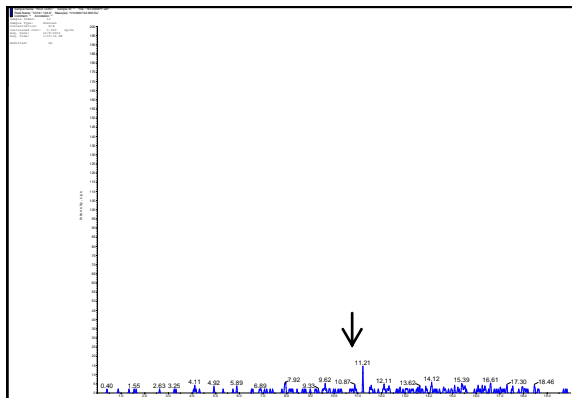


図 6-9 茶の SRM クロマトグラム
代謝物 C (m/z +311 \rightarrow 125)
添加濃度 : 0.01 ppm

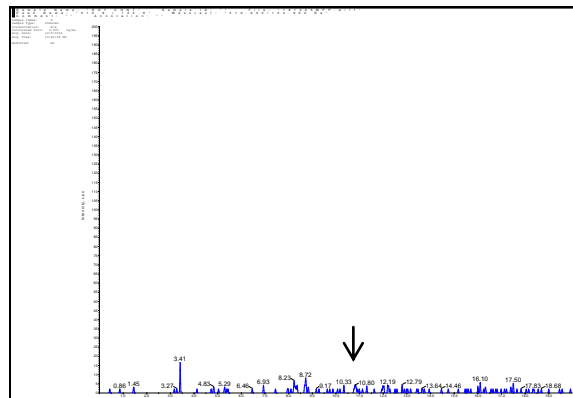
図 6-10 ぶどうの SRM クロマトグラム
代謝物 C (m/z +311 \rightarrow 125)
添加濃度 : 0.01 ppm

代謝物 C の定量限界の推定におけるクロマトグラム (農産物)

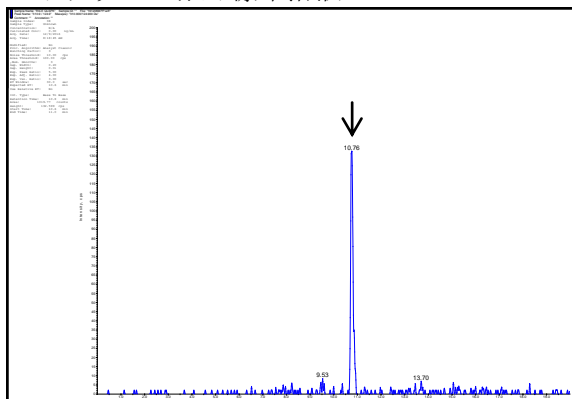
ブランク



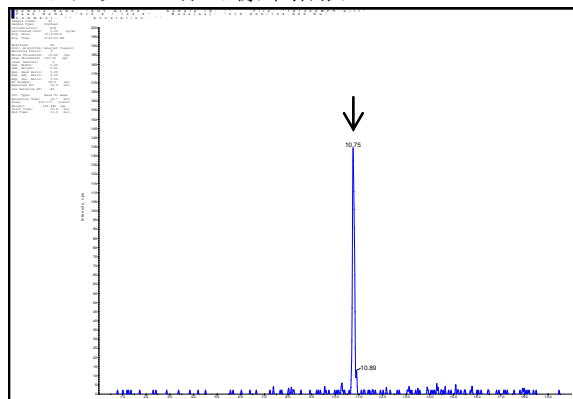
ブランク



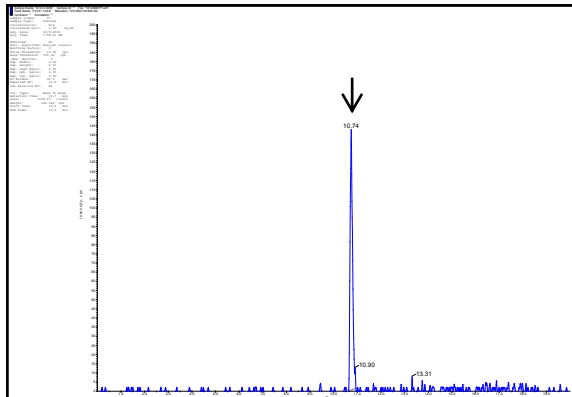
マトリックス添加標準溶液



マトリックス添加標準溶液



溶媒標準溶液



溶媒標準溶液

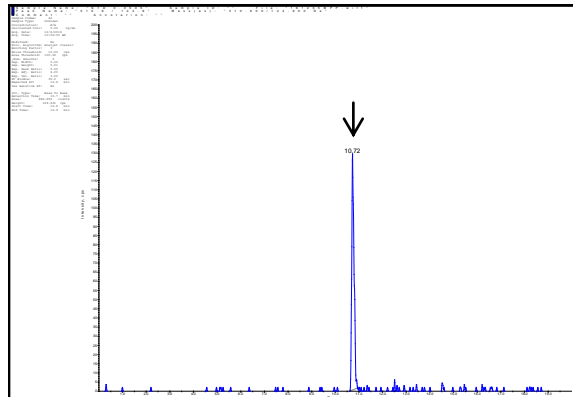
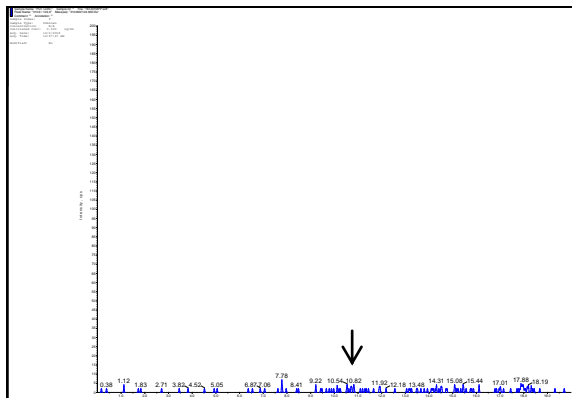


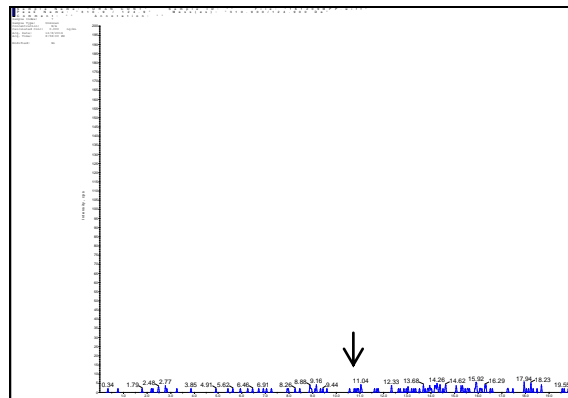
図 7-1 玄米の SRM クロマトグラム
代謝物 C (m/z +311 \rightarrow 125)
試料中 0.01 ppm 相当

図 7-2 大豆の SRM クロマトグラム
代謝物 C (m/z +311 \rightarrow 125)
試料中 0.01 ppm 相当

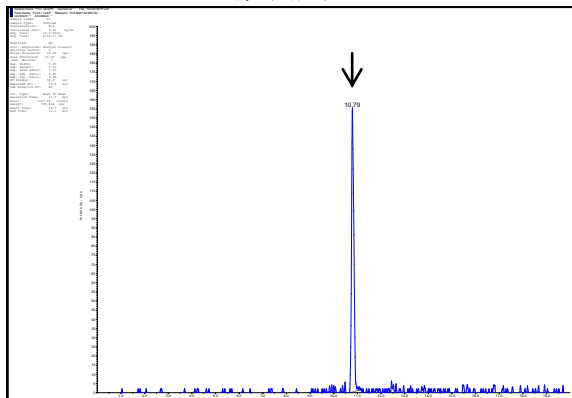
ブランク



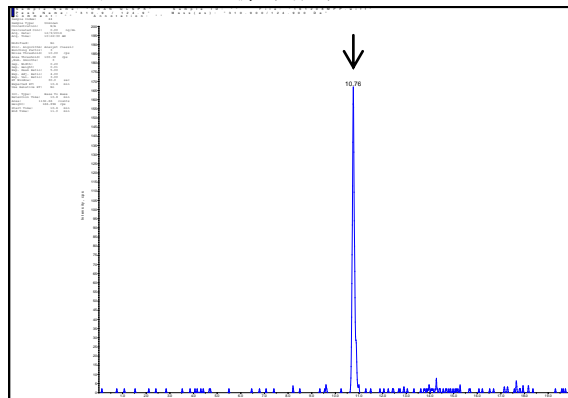
ブランク



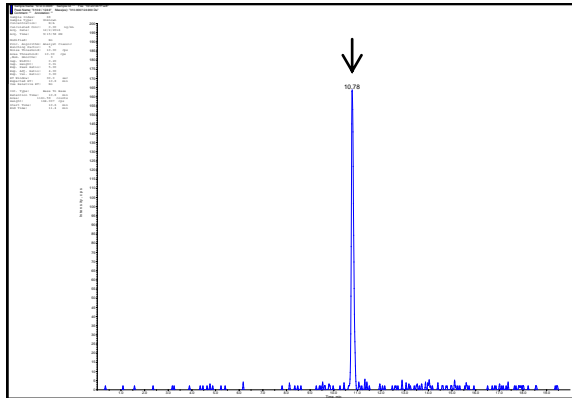
マトリックス添加標準溶液



マトリックス添加標準溶液



溶媒標準溶液



溶媒標準溶液

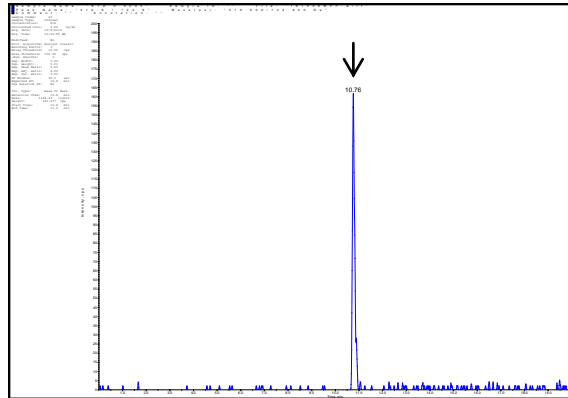
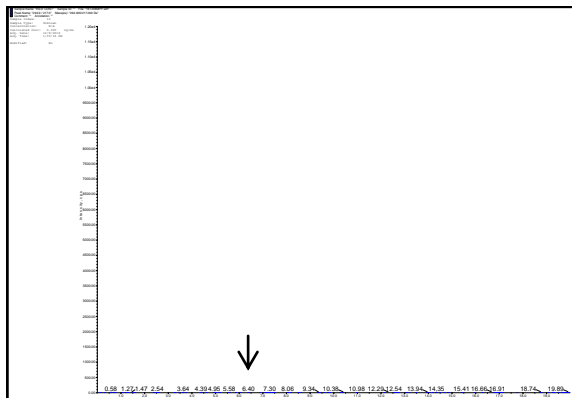


図 7-3 ばれいしょの SRM クロマトグラム
代謝物 C (m/z +311→125)
試料中 0.01 ppm 相当

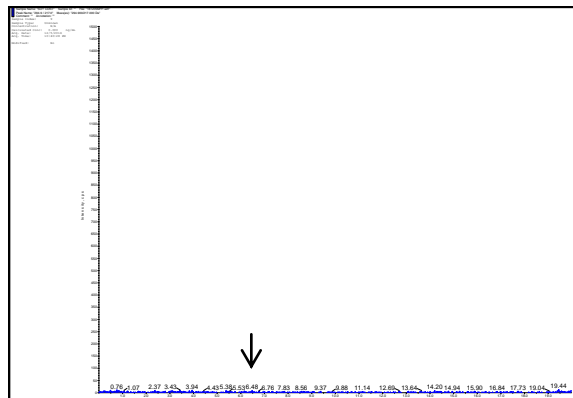
図 7-4 オレンジの SRM クロマトグラム
代謝物 C (m/z +311→125)
試料中 0.01 ppm 相当

代謝物 F の添加回収試験におけるクロマトグラム（農産物）

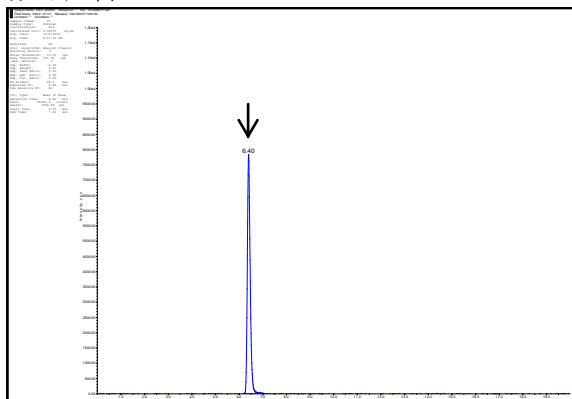
ブランク



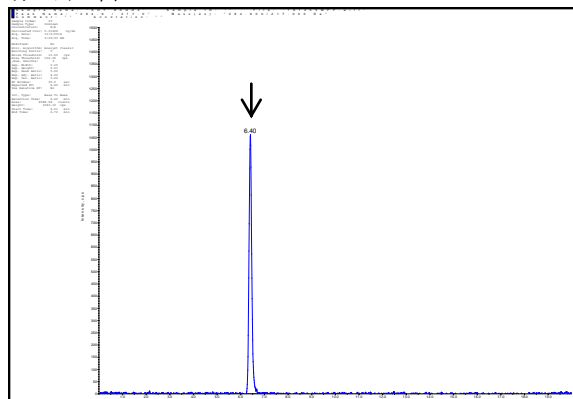
ブランク



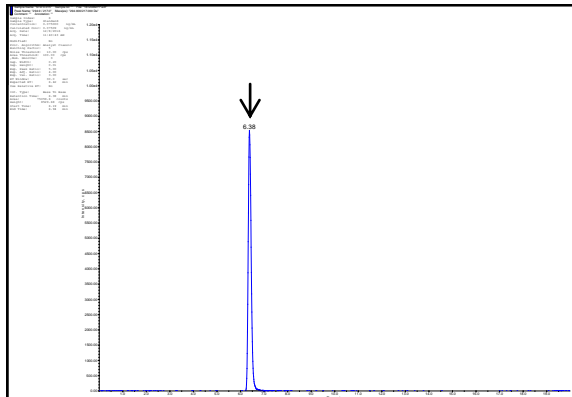
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

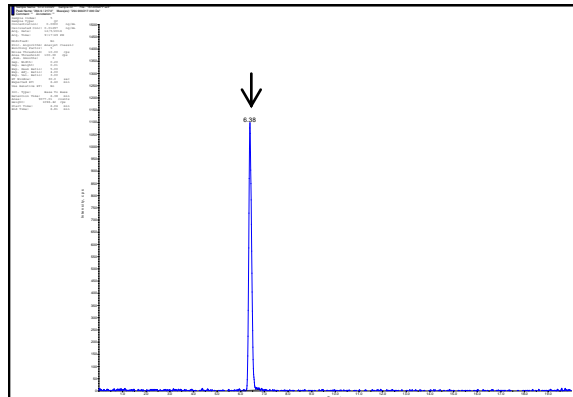
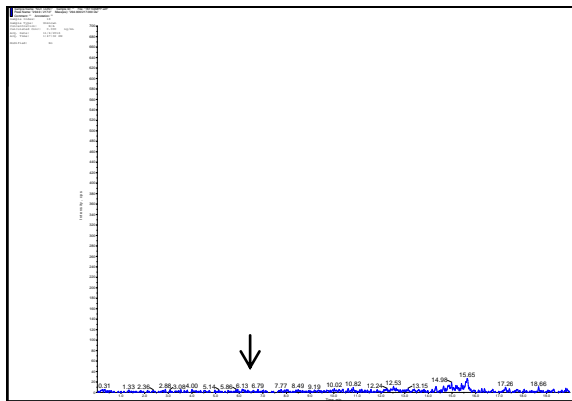


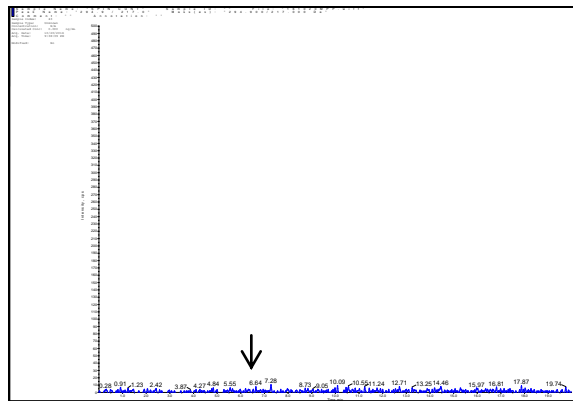
図 8-1 玄米の SRM クロマトグラム
代謝物 F (m/z +295→217)
添加濃度 : 0.3 ppm

図 8-2 大豆の SRM クロマトグラム
代謝物 F (m/z +295→217)
添加濃度 : 0.05 ppm

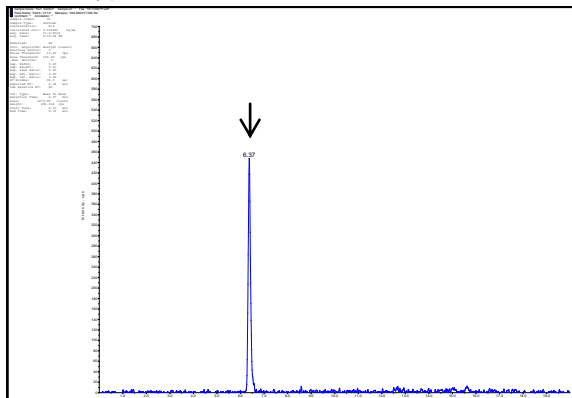
ブランク



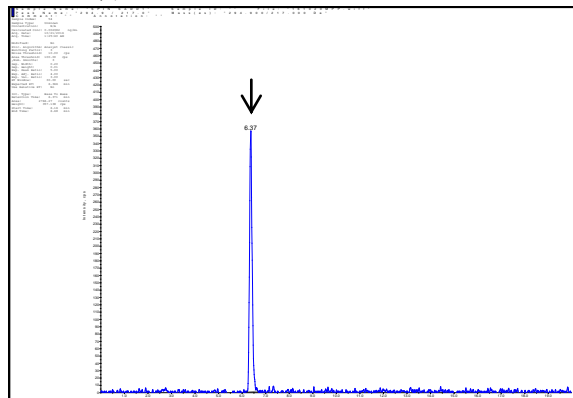
ブランク



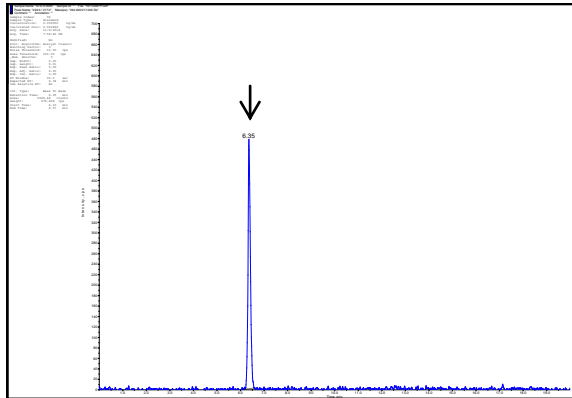
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

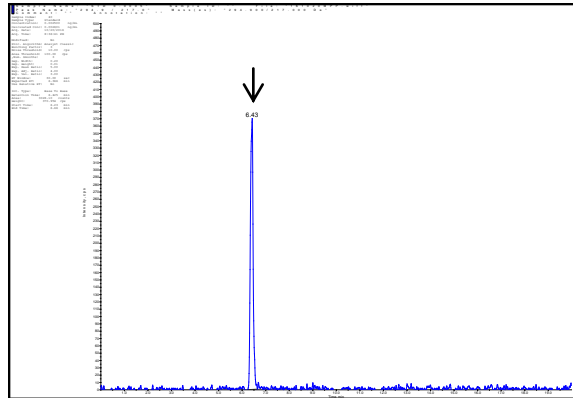
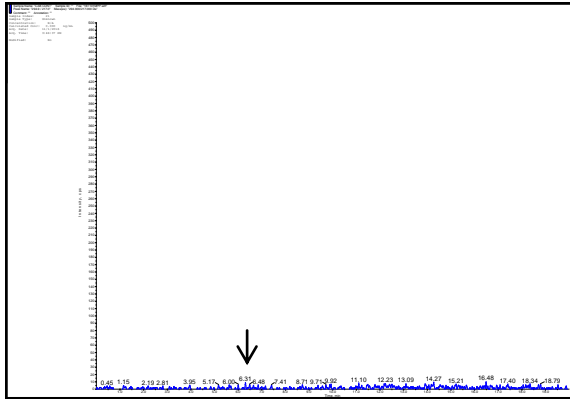


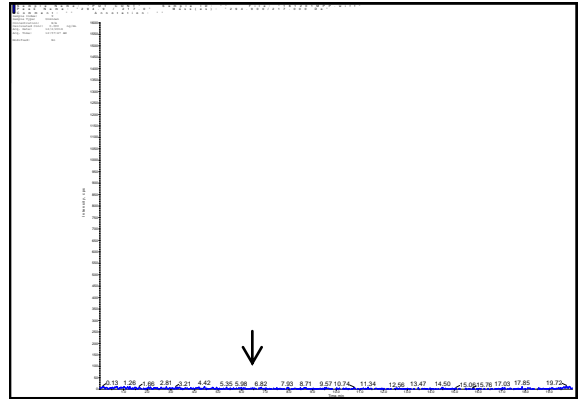
図 8-3 らっかせいの SRM クロマトグラム
代謝物 F (m/z +295→217)
添加濃度 : 0.01 ppm

図 8-4 ほうれんそうの SRM クロマトグラム
代謝物 F (m/z +295→217)
添加濃度 : 0.01 ppm

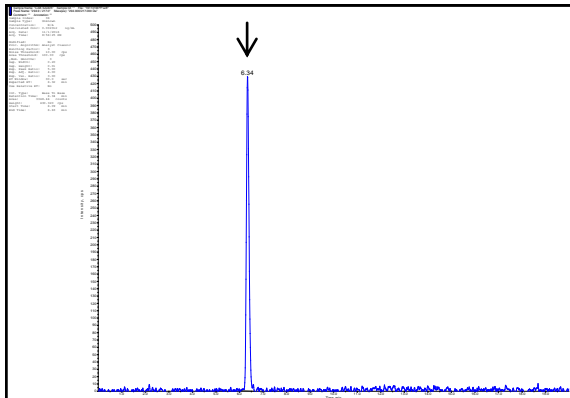
ブランク



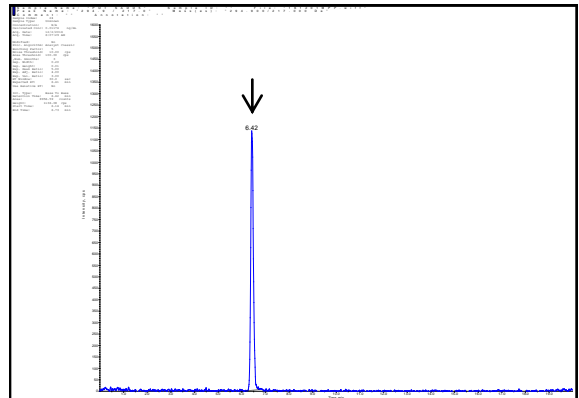
ブランク



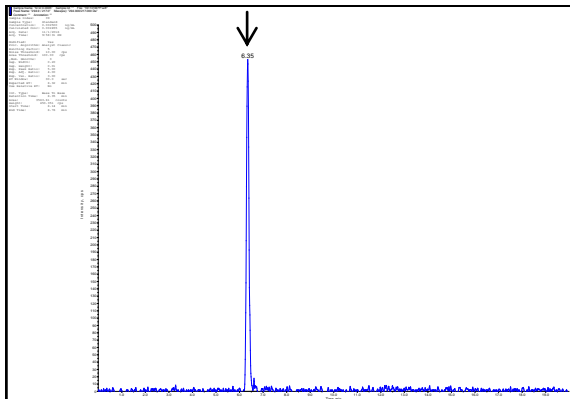
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

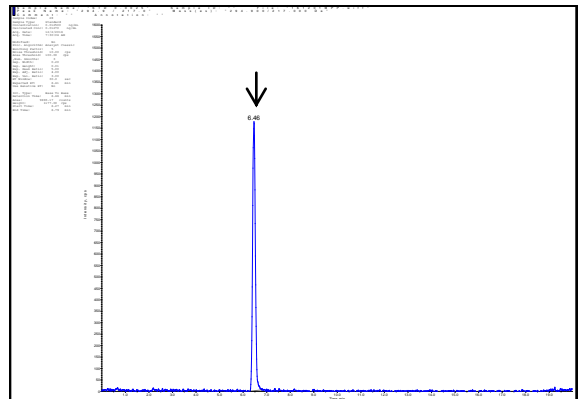
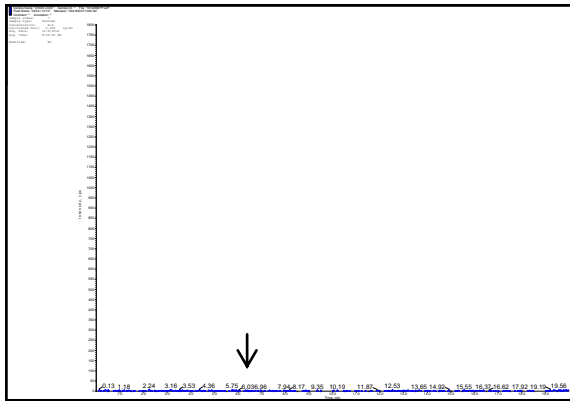


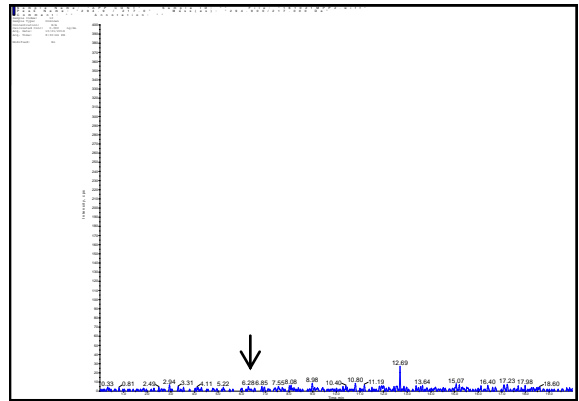
図 8-5 キャベツの SRM クロマトグラム
代謝物 F (m/z +295→217)
添加濃度 : 001 ppm

図 8-6 ばれいしょの SRM クロマトグラム
代謝物 F (m/z +295→217)
添加濃度 : 0.05 ppm

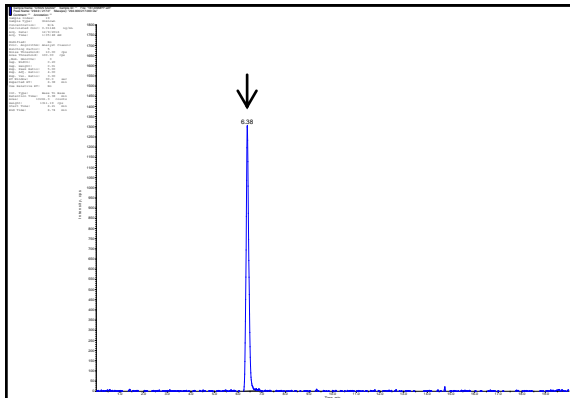
ブランク



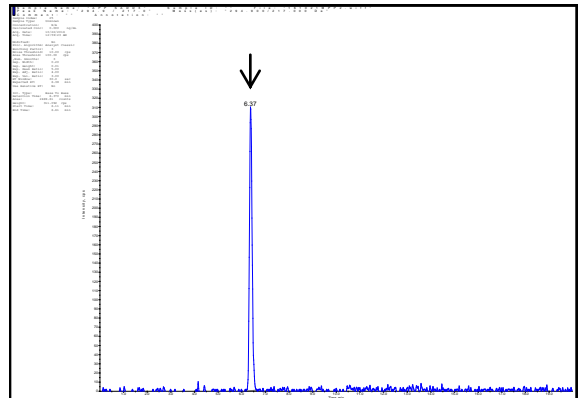
ブランク



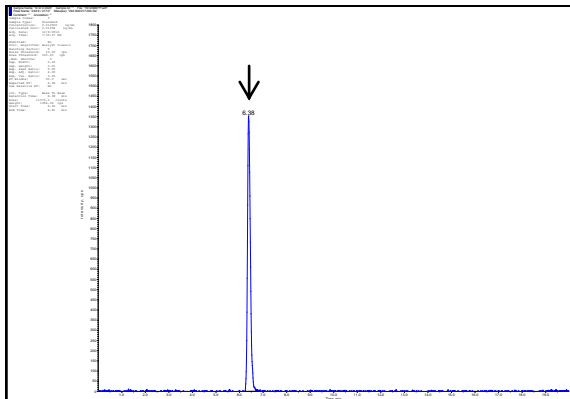
添加試料 40倍希釈



添加試料



標準溶液



標準溶液

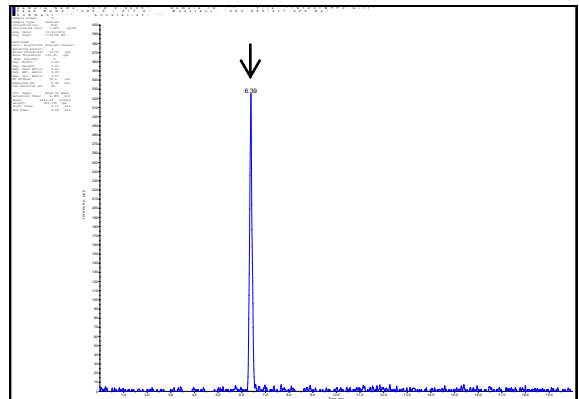
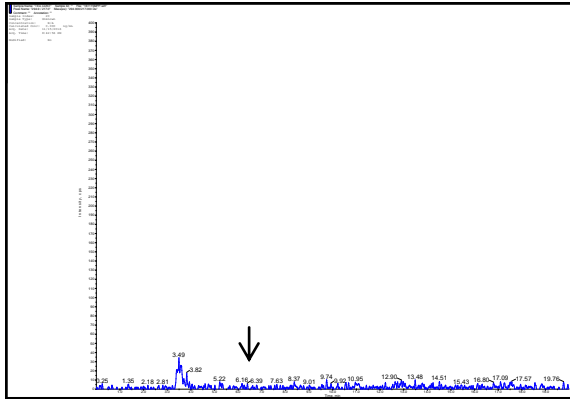


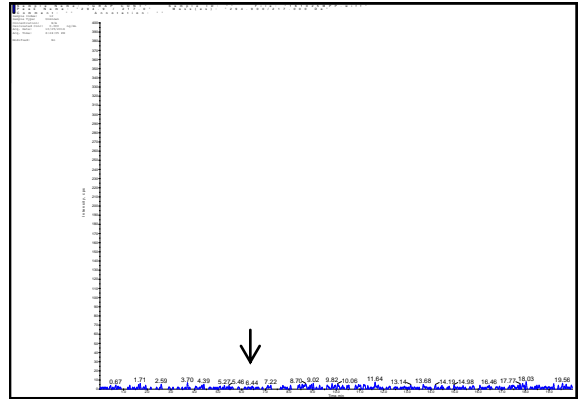
図 8-7 オレンジの SRM クロマトグラム
代謝物 F (m/z +295→217)
添加濃度 : 2 ppm

図 8-8 りんごの SRM クロマトグラム
代謝物 F (m/z +295→217)
添加濃度 : 0.01 ppm

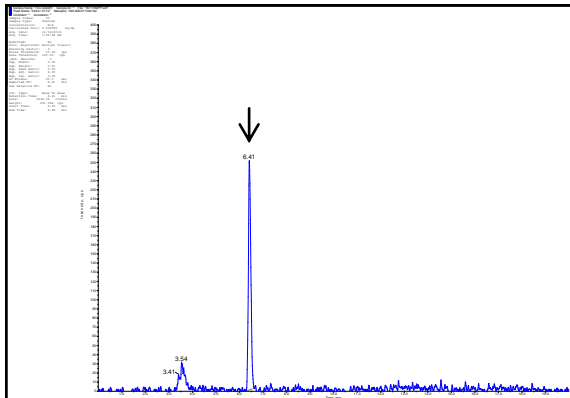
ブランク



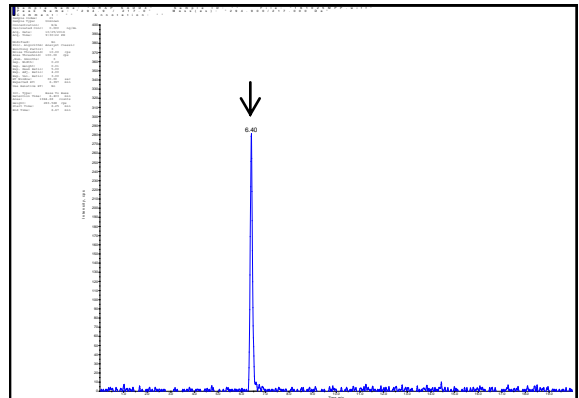
ブランク



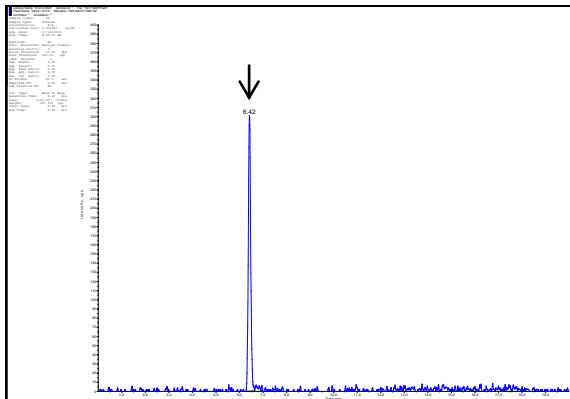
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

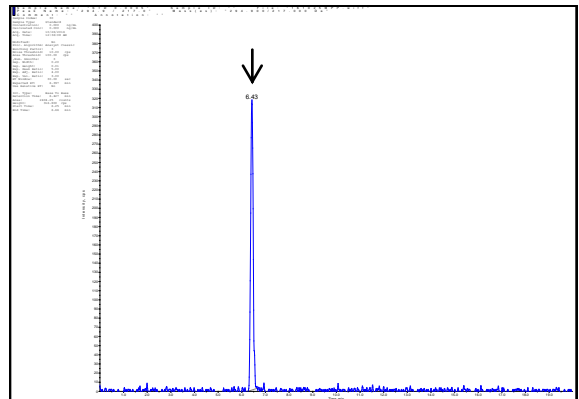
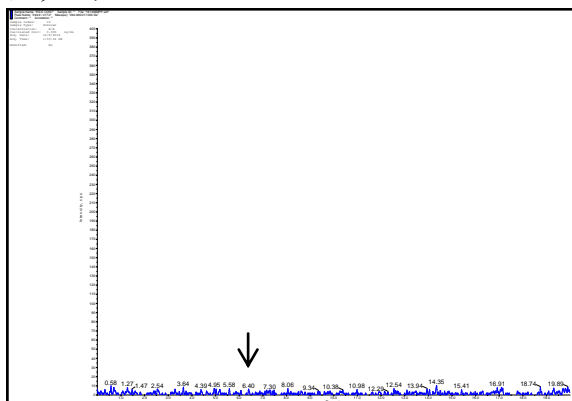


図 8-9 茶の SRM クロマトグラム
代謝物 F (m/z +295→217)
添加濃度 : 0.01 ppm

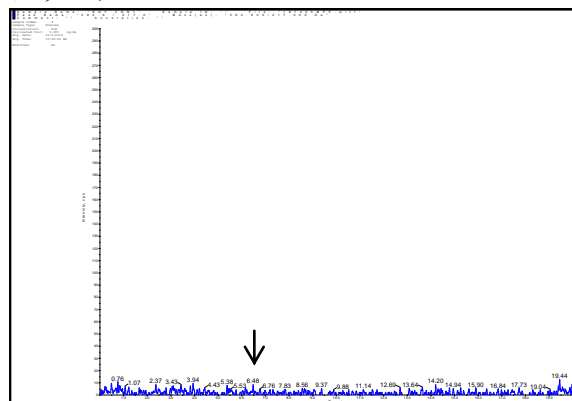
図 8-10 ぶどうの SRM クロマトグラム
代謝物 F (m/z +295→217)
添加濃度 : 0.01 ppm

代謝物Fの定量限界の推定におけるクロマトグラム（農産物）

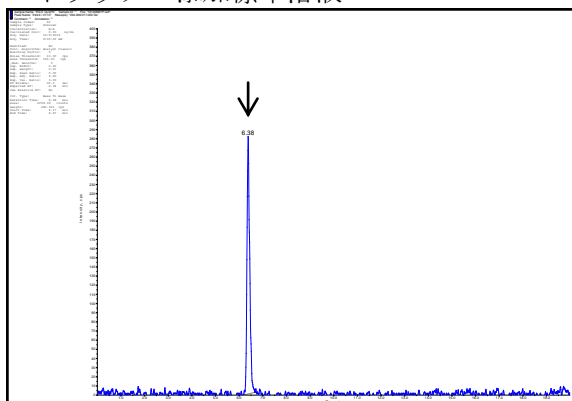
ブランク



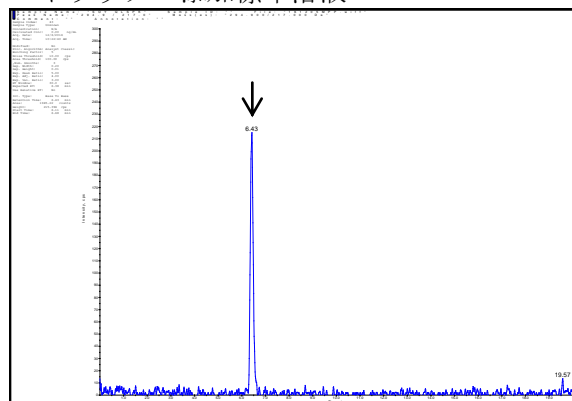
ブランク



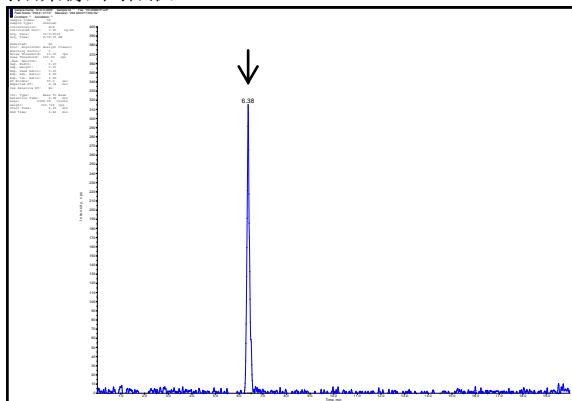
マトリックス添加標準溶液



マトリックス添加標準溶液



溶媒標準溶液



溶媒標準溶液

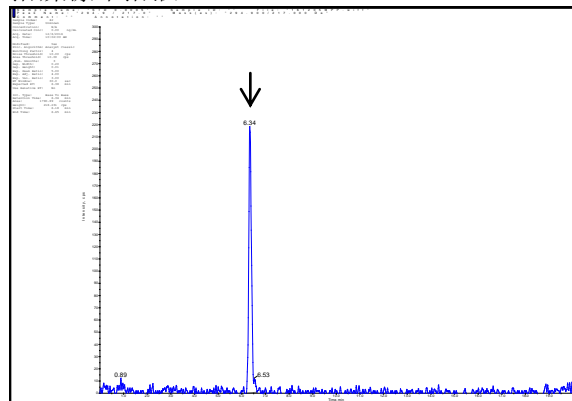
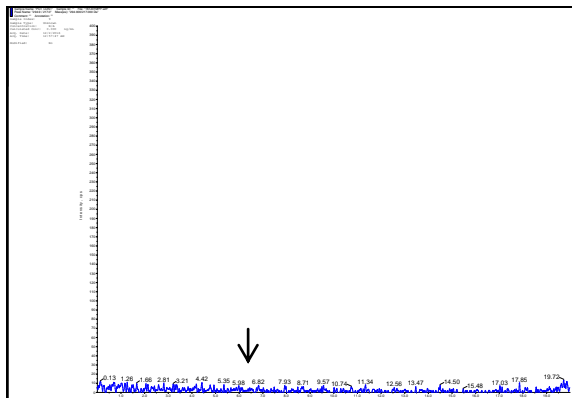


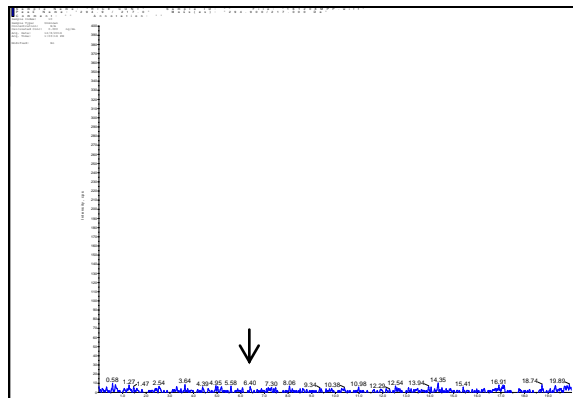
図 9-1 玄米の SRM クロマトグラム
代謝物 F (m/z +295→217)
試料中 0.01 ppm 相当

図 9-2 大豆の SRM クロマトグラム
代謝物 F (m/z +295→217)
試料中 0.01 ppm 相当

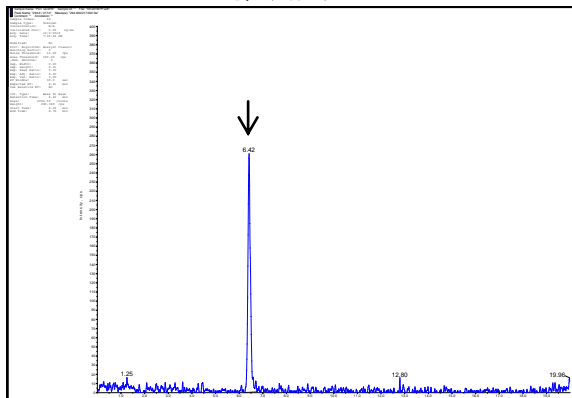
ブランク



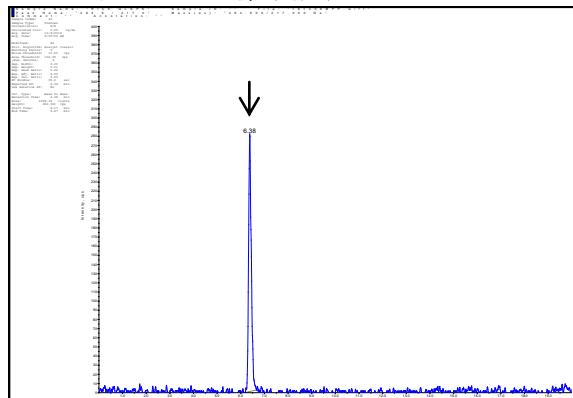
ブランク



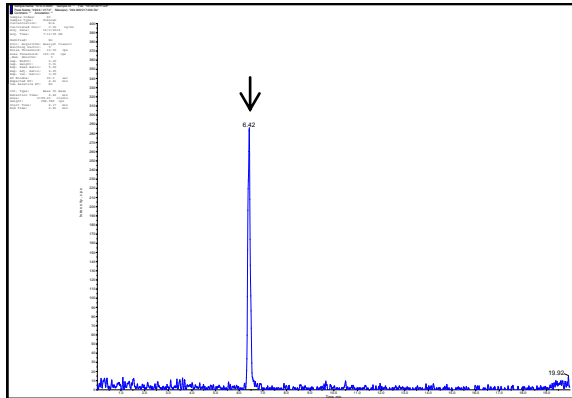
マトリックス添加標準溶液



マトリックス添加標準溶液



溶媒標準溶液



溶媒標準溶液

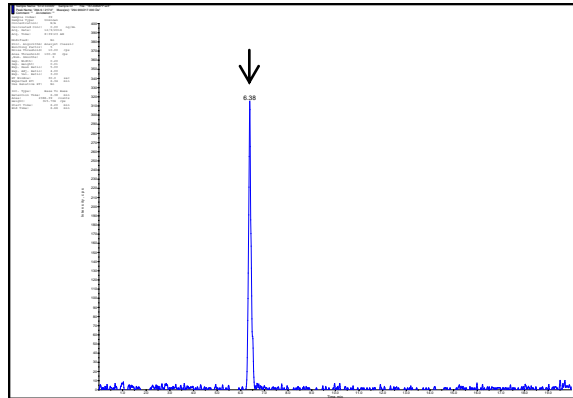
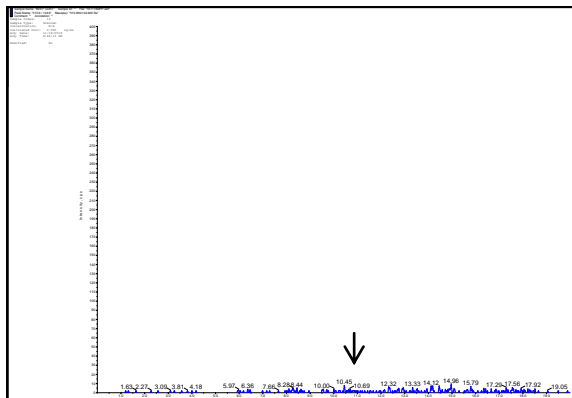


図 9-3 ばれいしょの SRM クロマトグラム
代謝物 F (m/z +295→217)
試料中 0.01 ppm 相当

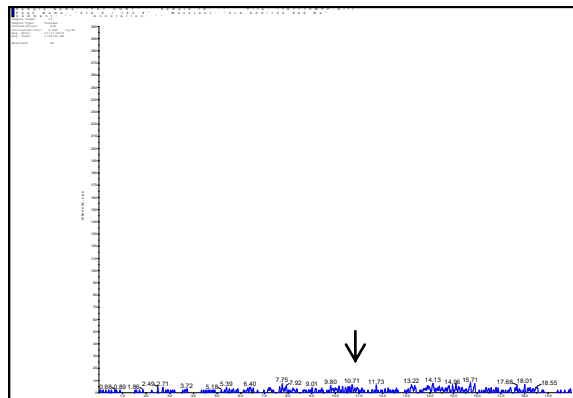
図 9-4 オレンジの SRM クロマトグラム
代謝物 F (m/z +295→217)
試料中 0.01 ppm 相当

代謝物 C の添加回収試験におけるクロマトグラム (畜水産物)

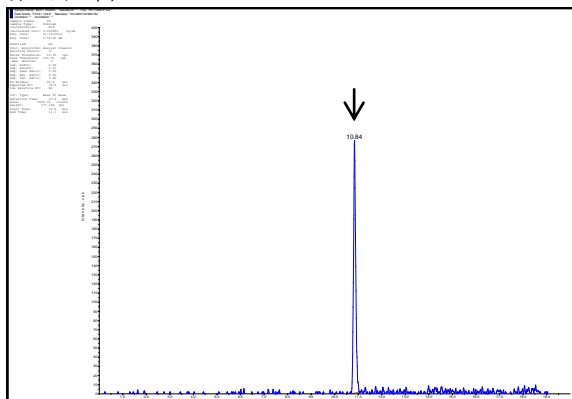
ブランク



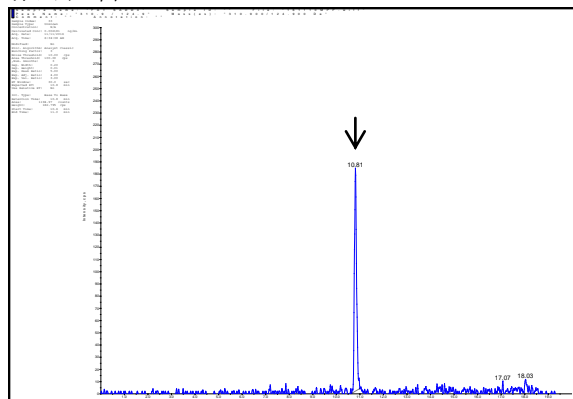
ブランク



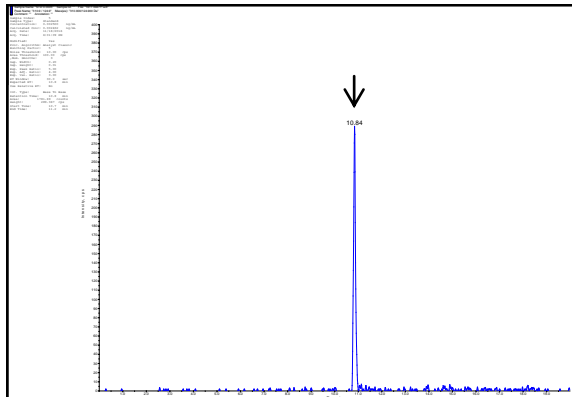
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

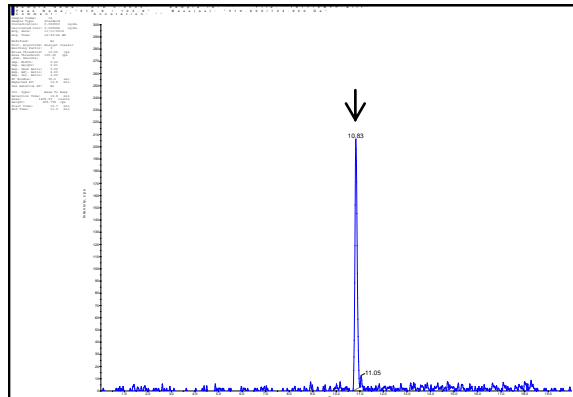
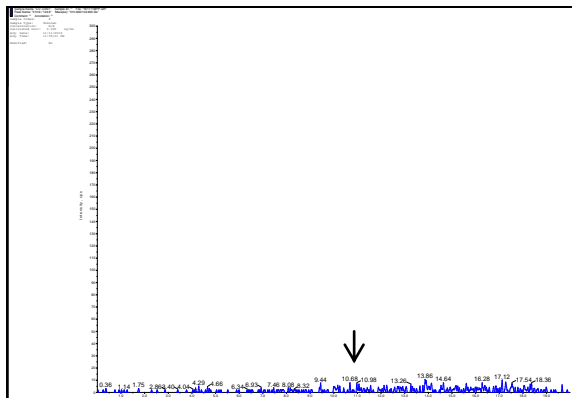


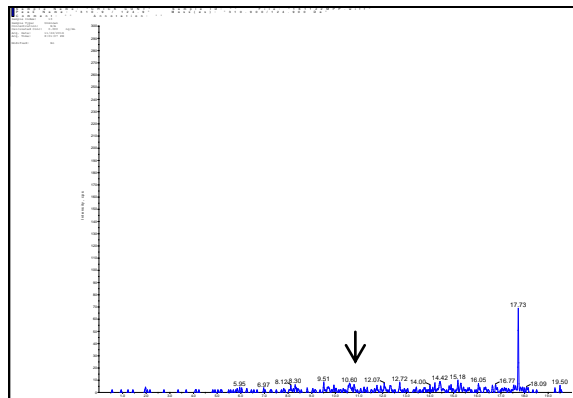
図 10-1 牛の筋肉の SRM クロマトグラム
代謝物 C (m/z +311→125)
添加濃度 : 0.01 ppm

図 10-2 牛の脂肪の SRM クロマトグラム
代謝物 C (m/z +311→125)
添加濃度 : 0.01ppm

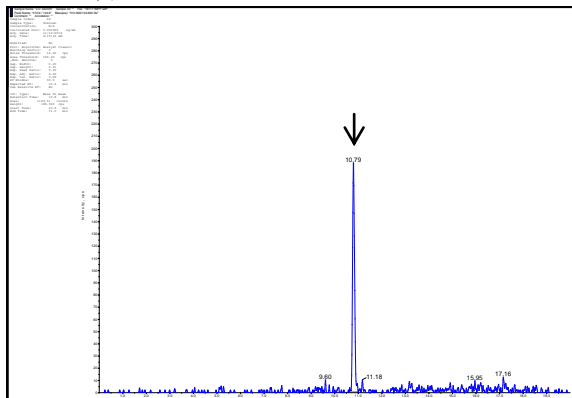
ブランク



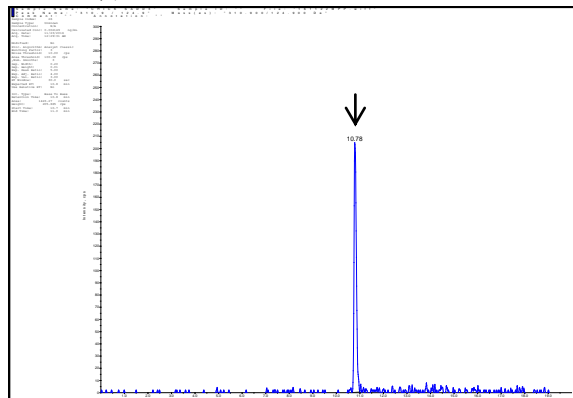
ブランク



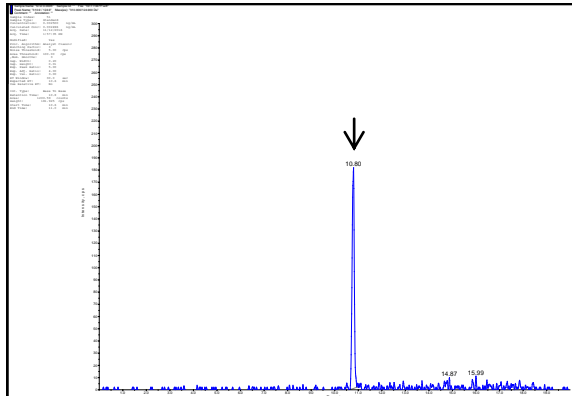
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

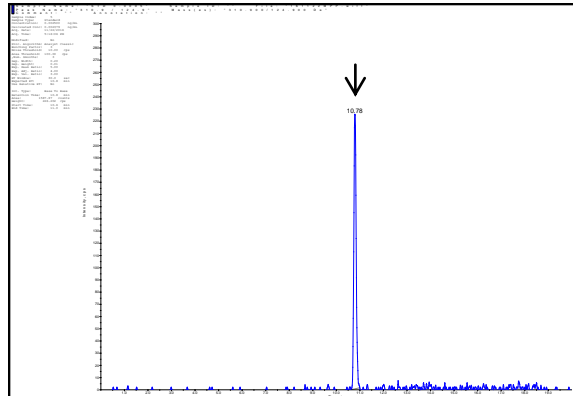
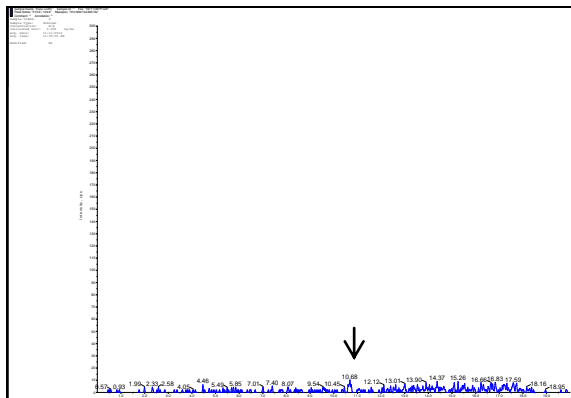


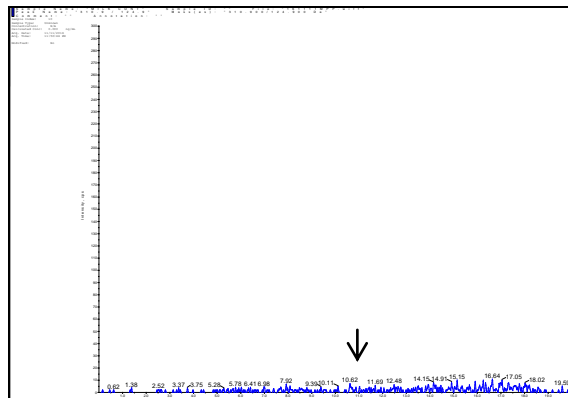
図 10-3 牛の肝臓の SRM クロマトグラム
代謝物 C (m/z +311 \rightarrow 125)
添加濃度 : 0.01 ppm

図 10-4 鶏の筋肉の SRM クロマトグラム
代謝物 C (m/z +311 \rightarrow 125)
添加濃度 : 0.01 ppm

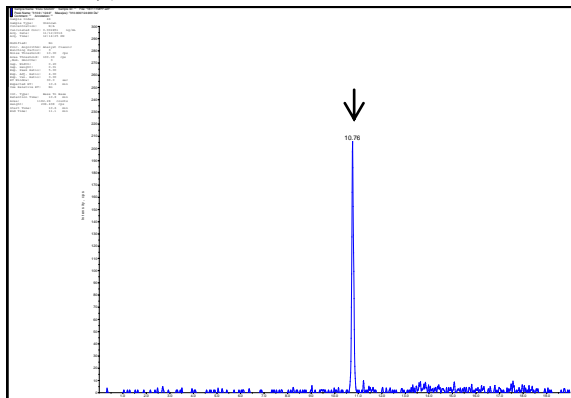
ブランク



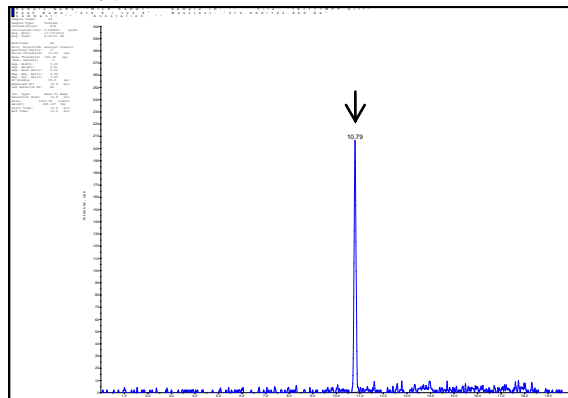
ブランク



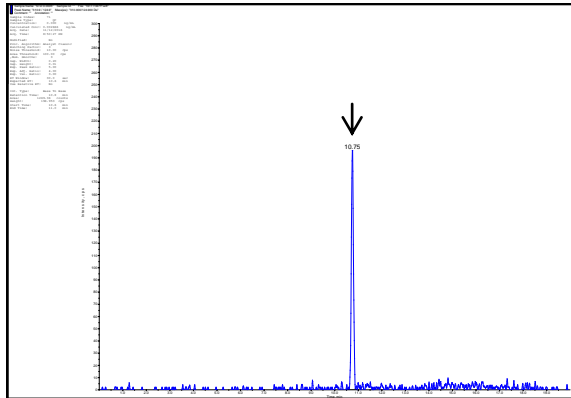
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

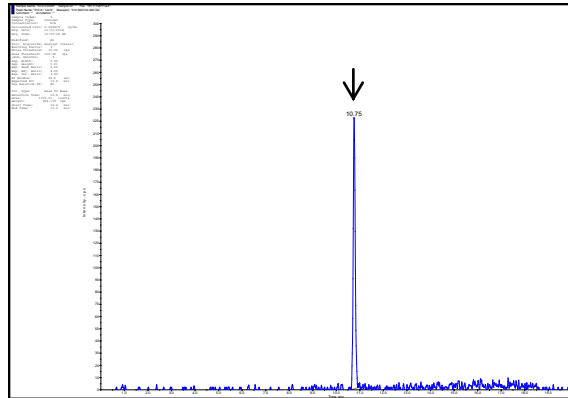
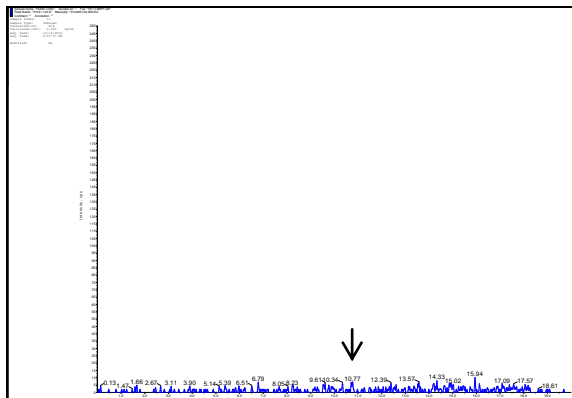


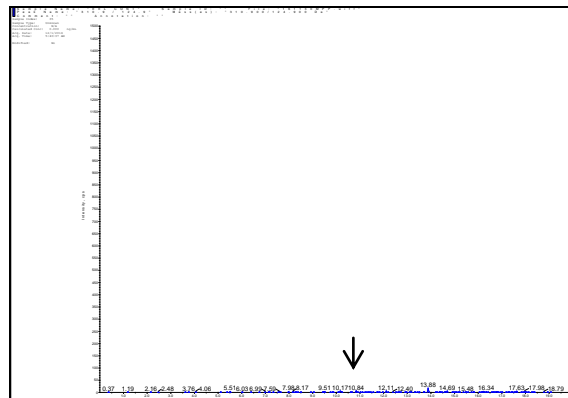
図 10-5 鶏卵の SRM クロマトグラム
代謝物 C (m/z +311 \rightarrow 125)
添加濃度 : 0.01 ppm

図 10-6 牛乳の SRM クロマトグラム
代謝物 C (m/z +311 \rightarrow 125)
添加濃度 : 0.01 ppm

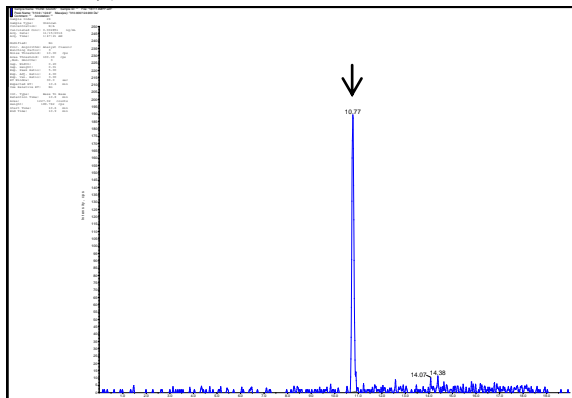
ブランク



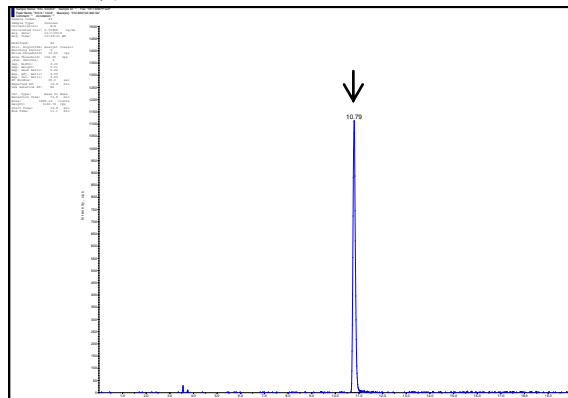
ブランク



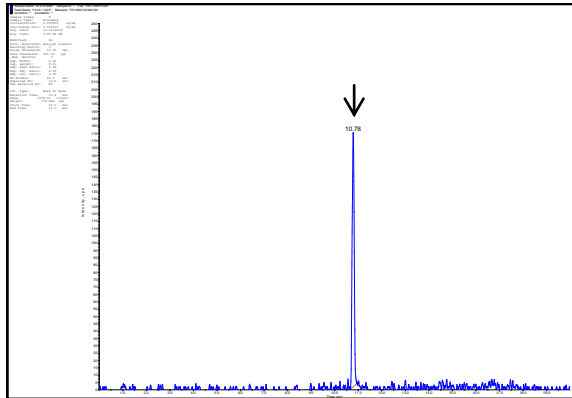
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

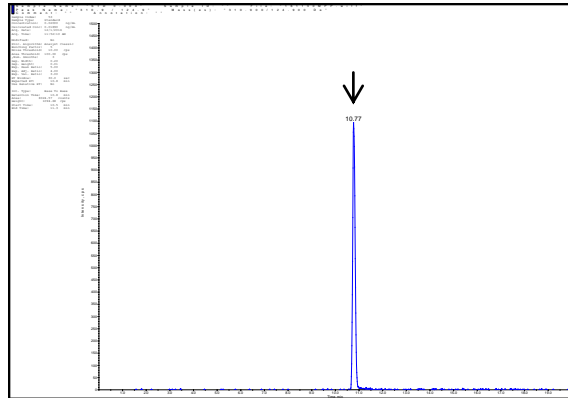
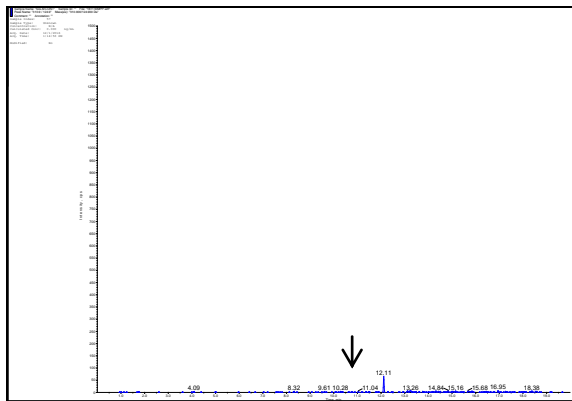


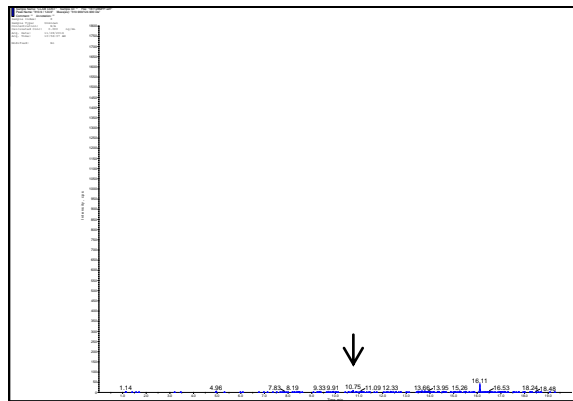
図 10-7 はちみつの SRM クロマトグラム
代謝物 C (m/z +311→125)
添加濃度 : 0.01 ppm

図 10-8 うなぎの SRM クロマトグラム
代謝物 C (m/z +311→125)
添加濃度 : 0.08 ppm

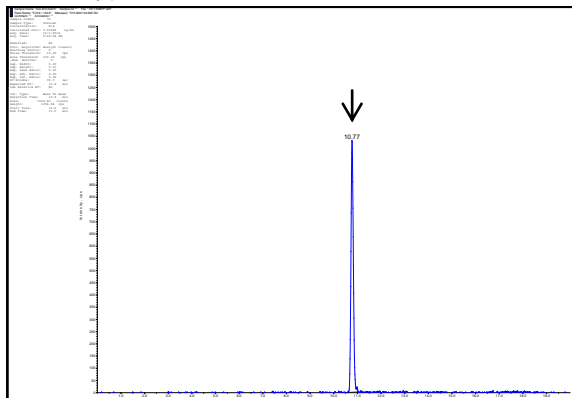
ブランク



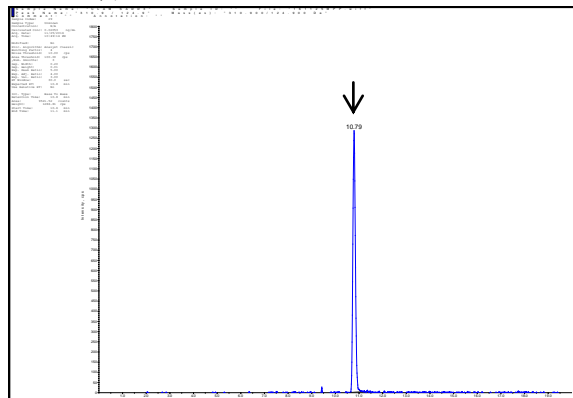
ブランク



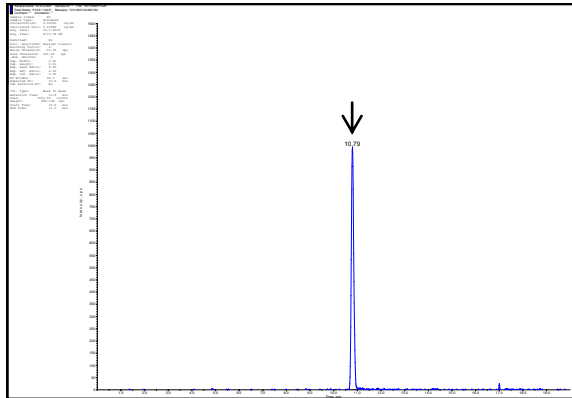
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

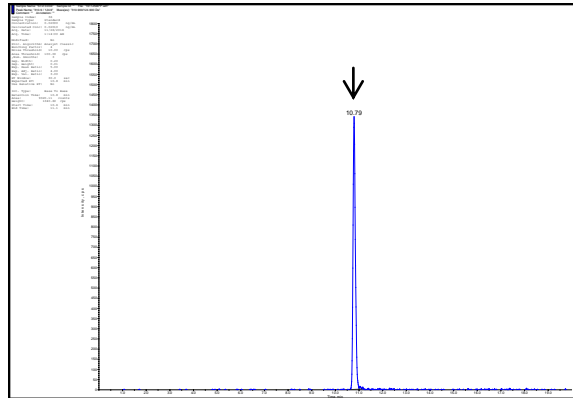
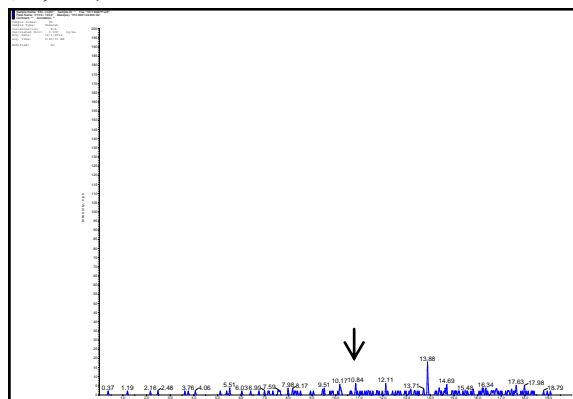


図 10-9 さけの SRM クロマトグラム
代謝物 C (m/z +311→125)
添加濃度 : 0.08 ppm

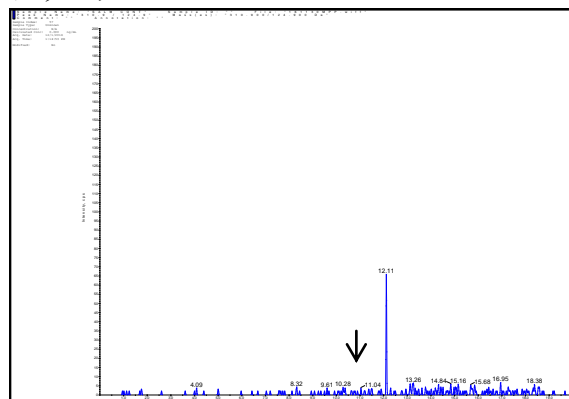
図 10-10 しじみの SRM クロマトグラム
代謝物 C (m/z +311→125)
添加濃度 : 0.08 ppm

代謝物Cの定量限界の推定におけるクロマトグラム (畜水産物)

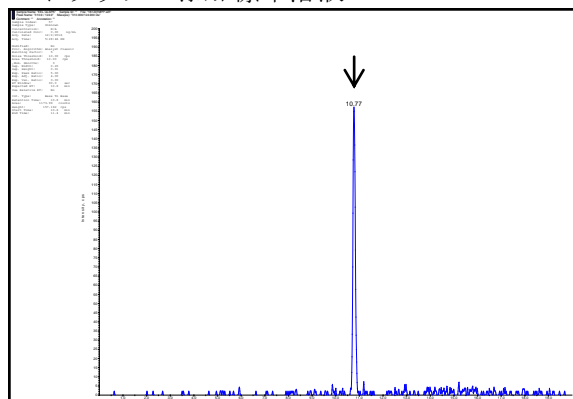
ブランク



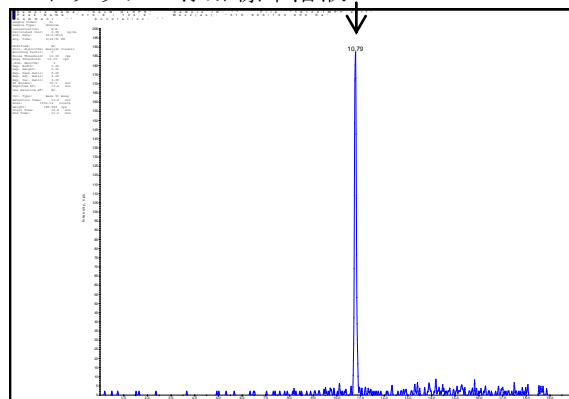
ブランク



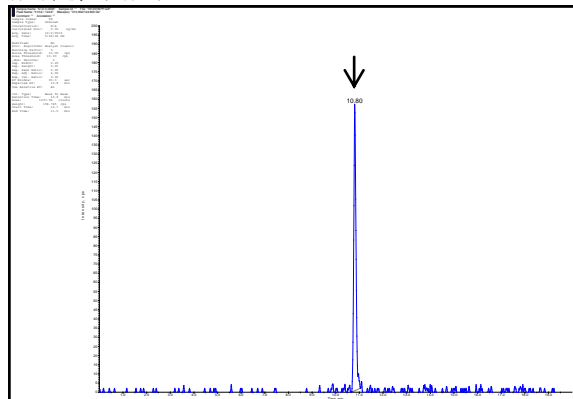
マトリックス添加標準溶液



マトリックス添加標準溶液



溶媒標準溶液



溶媒標準溶液

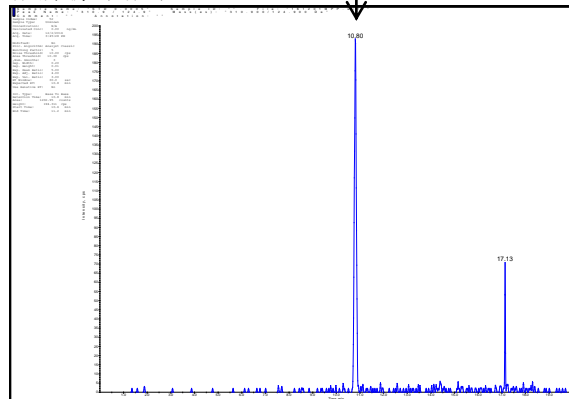
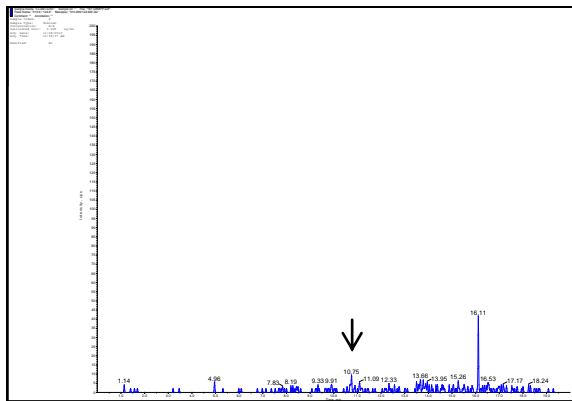


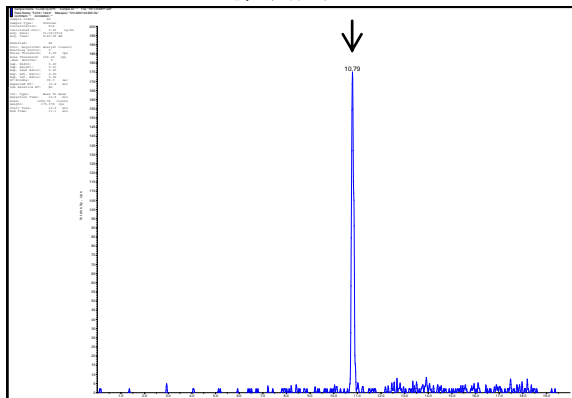
図 11-1 うなぎの SRM クロマトグラム
代謝物 C (m/z +311→125)
試料中 0.01 ppm 相当

図 11-2 さけの SRM クロマトグラム
代謝物 C (m/z +311→125)
試料中 0.01 ppm 相当

ブランク



マトリックス添加標準溶液



溶媒標準溶液

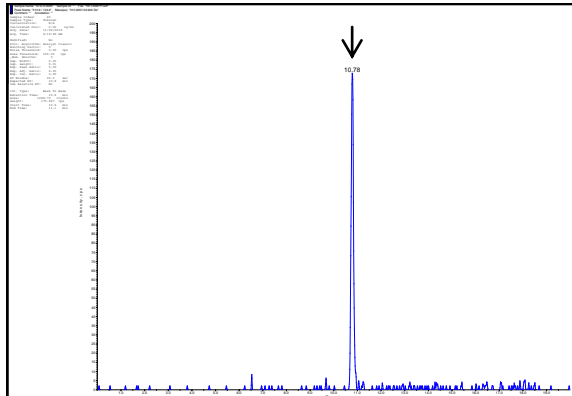
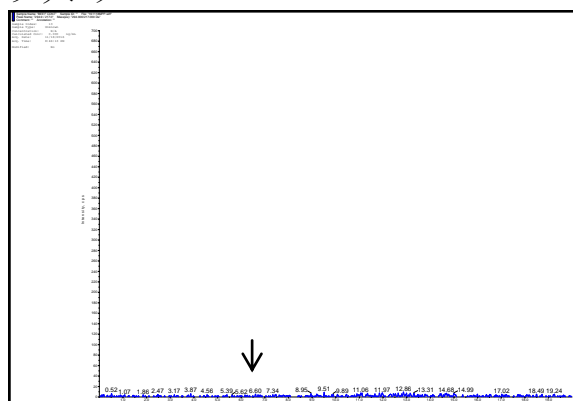


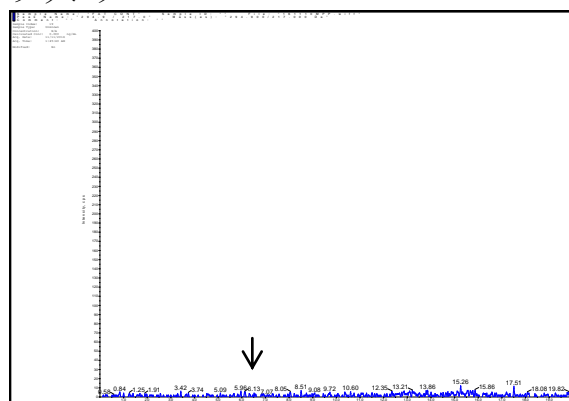
図 11-3 しじみの SRM クロマトグラム
代謝物 C (m/z +311→125)
試料中 0.01 ppm 相当

代謝物Fの添加回収試験におけるクロマトグラム（畜水産物）

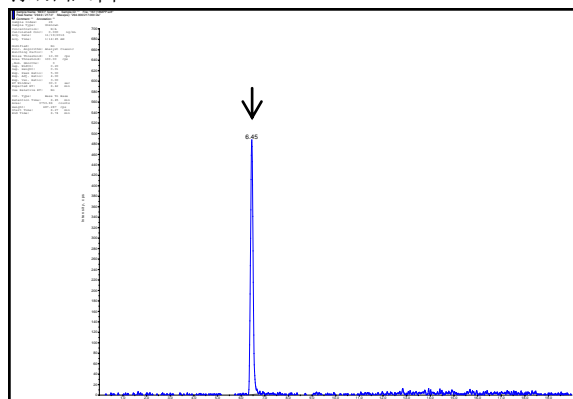
ブランク



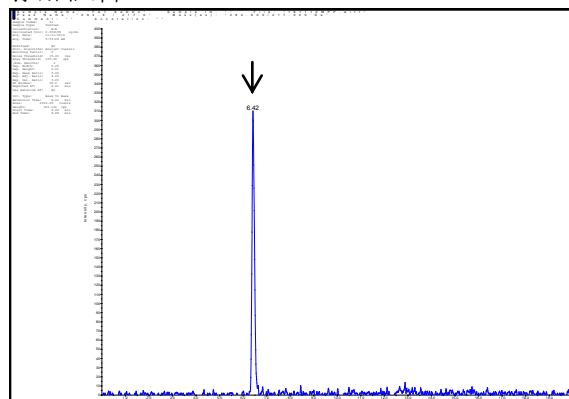
ブランク



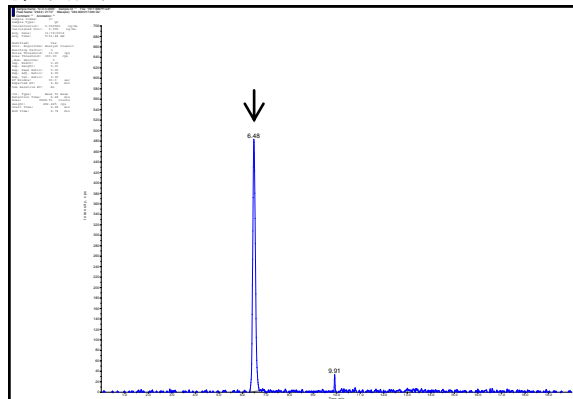
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

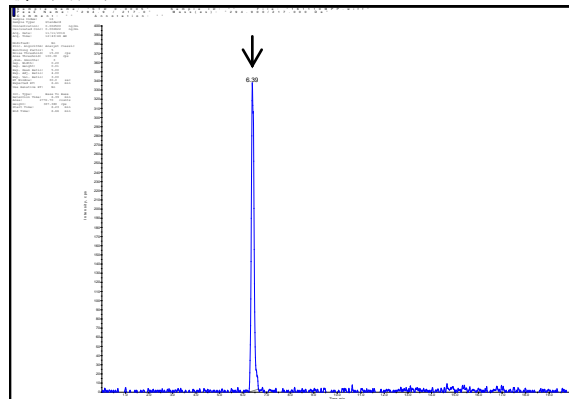
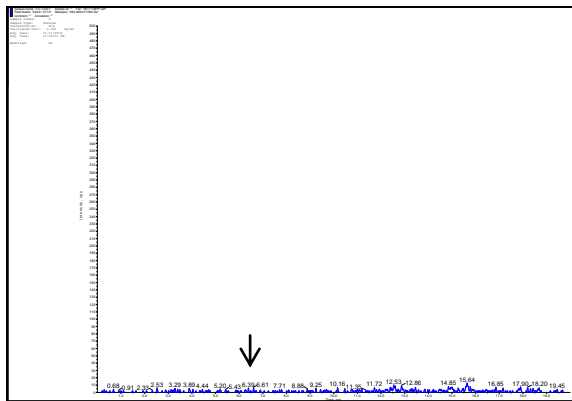


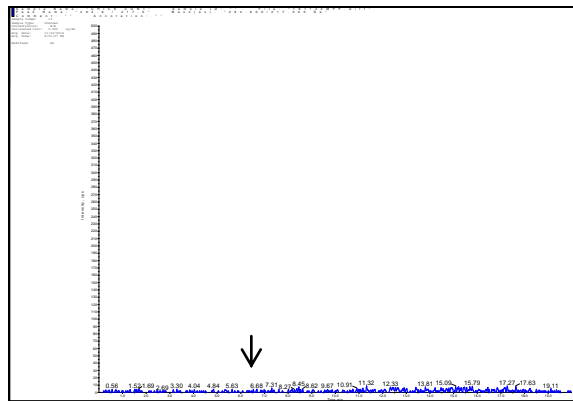
図 12-1 牛の筋肉の SRM クロマトグラム
代謝物 F (m/z +295→217)
添加濃度：0.01 ppm

図 12-2 牛の脂肪の SRM クロマトグラム
代謝物 F (m/z +295→217)
添加濃度：0.01ppm

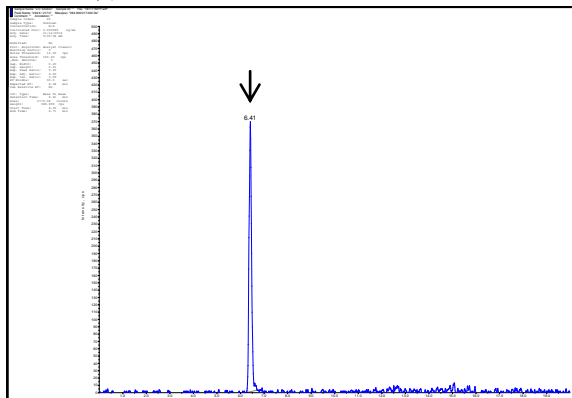
ブランク



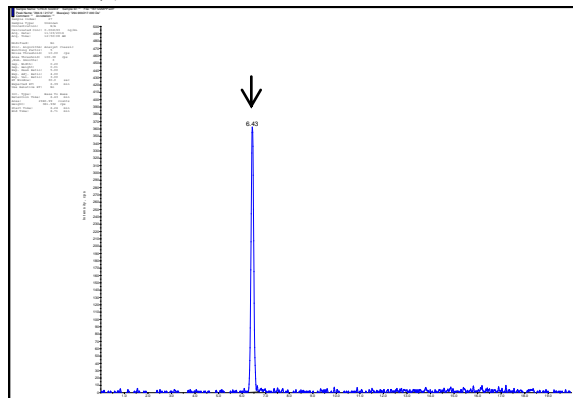
ブランク



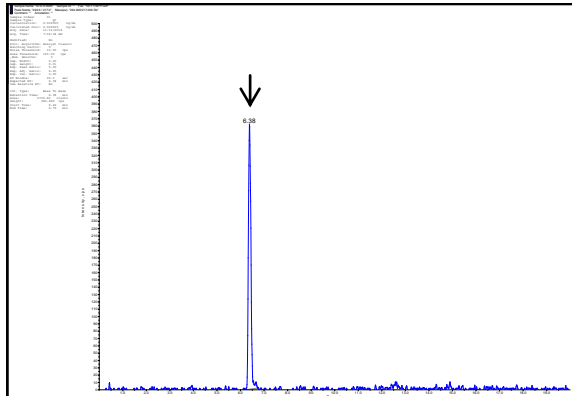
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

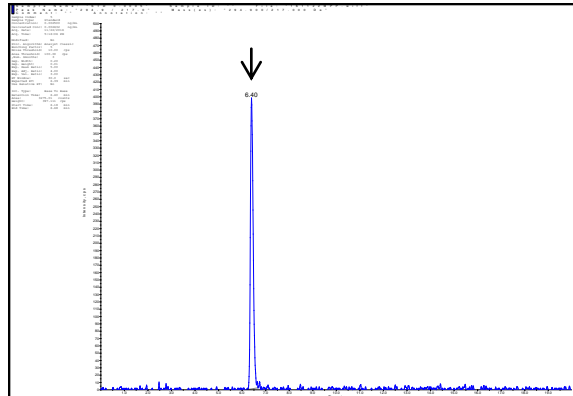
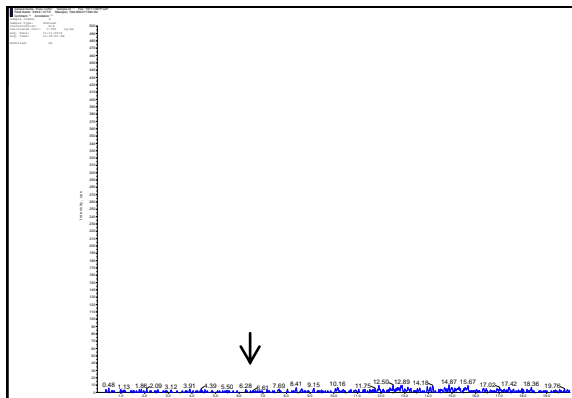


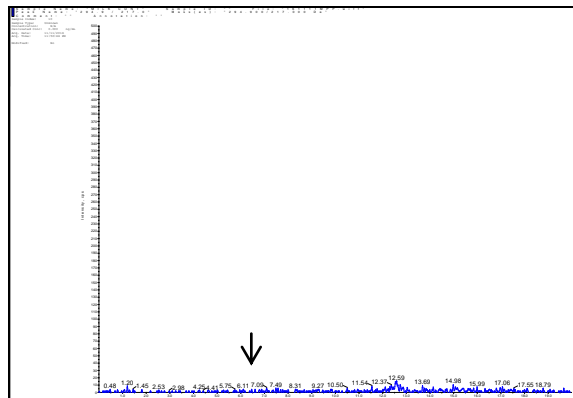
図 12-3 牛の肝臓の SRM クロマトグラム
代謝物 F (m/z +295→217)
添加濃度 : 0.01 ppm

図 12-4 鶏の筋肉の SRM クロマトグラム
代謝物 F (m/z +295→217)
添加濃度 : 0.01 ppm

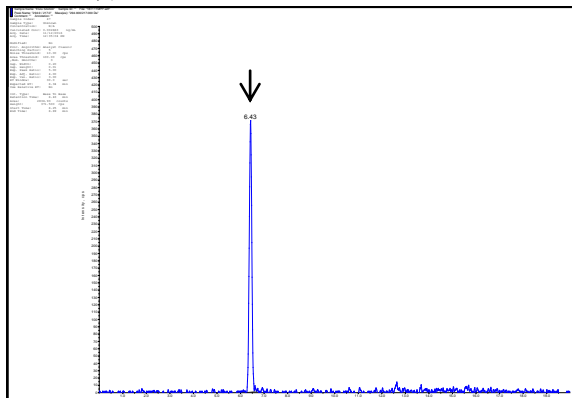
ブランク



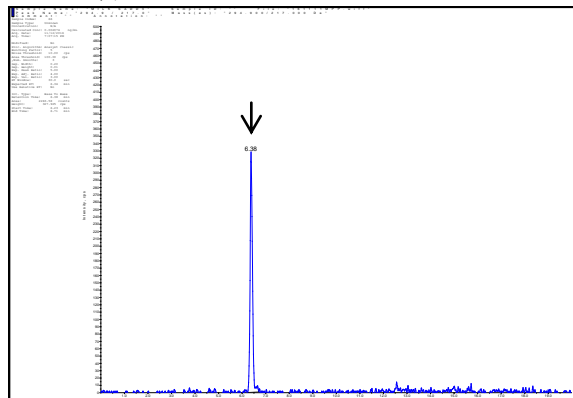
ブランク



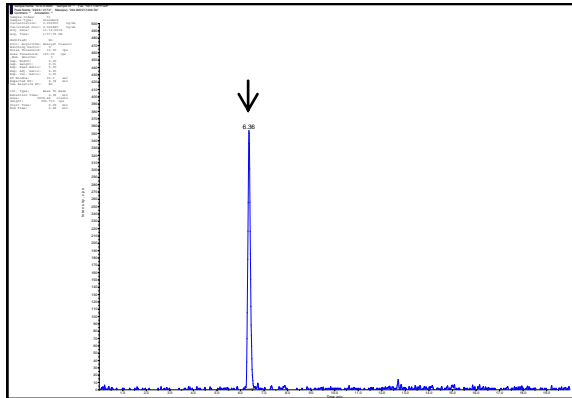
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

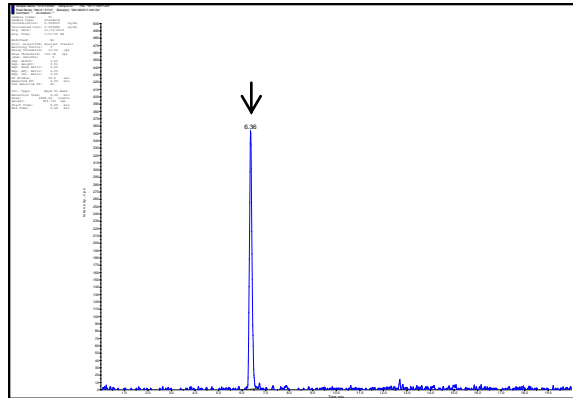
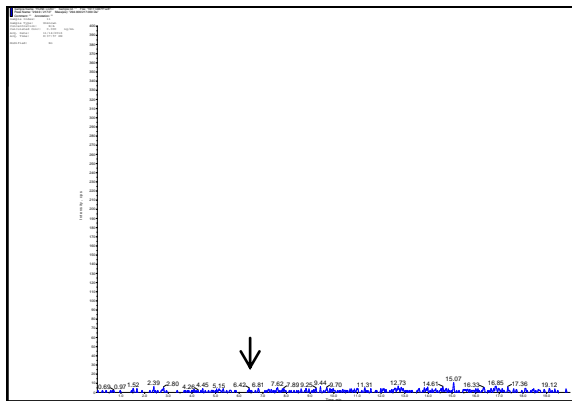


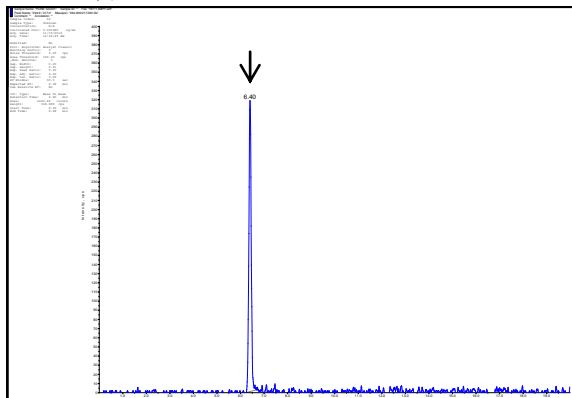
図 12-5 鶏卵の SRM クロマトグラム
代謝物 F (m/z +295→217)
添加濃度 : 0.01 ppm

図 12-6 牛乳の SRM クロマトグラム
代謝物 F (m/z +295→217)
添加濃度 : 0.01 ppm

ブランク



添加試料



標準溶液

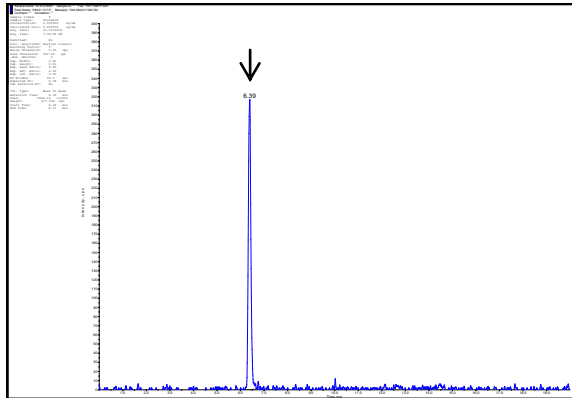
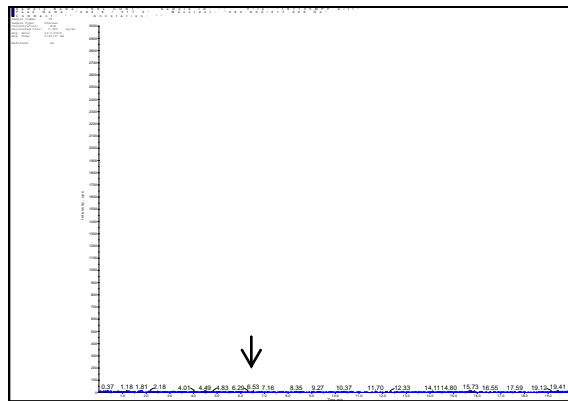
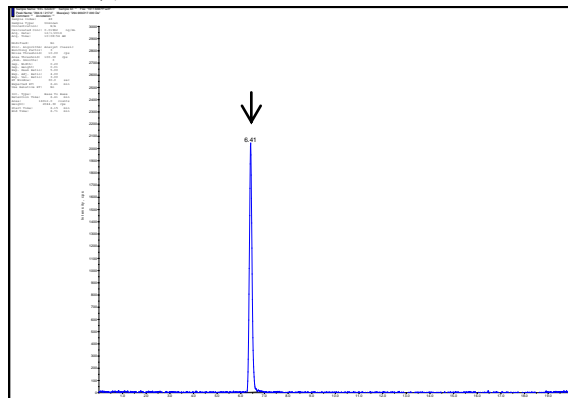


図 12-7 はちみつの SRM クロマトグラム
代謝物 F (m/z +295→217)
添加濃度 : 0.01 ppm

ブランク



添加試料



標準溶液

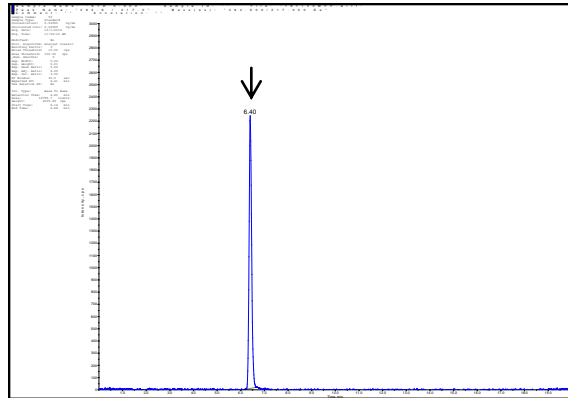
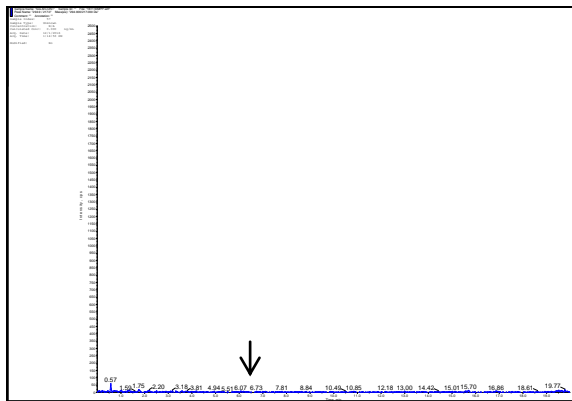
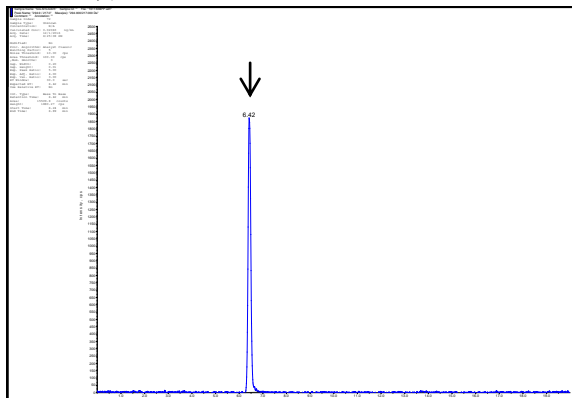


図 12-8 うなぎの SRM クロマトグラム
代謝物 F (m/z +295→217)
添加濃度 : 0.08 ppm

ブランク



添加試料



標準溶液

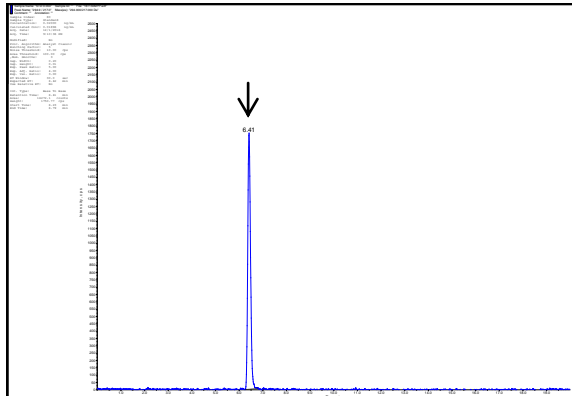
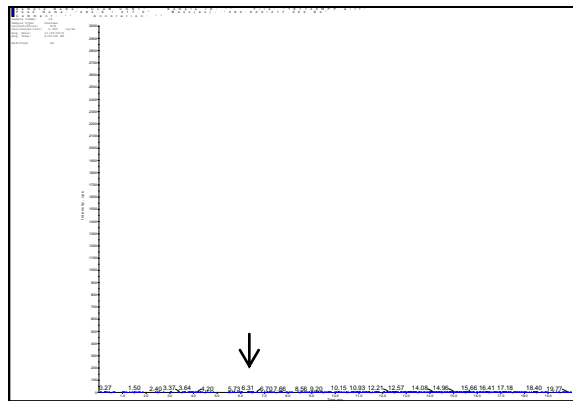
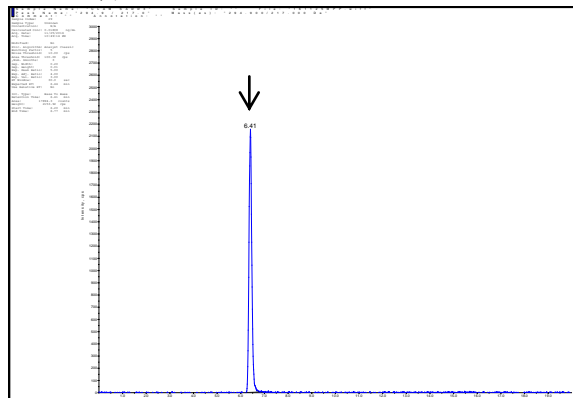


図 12-9 さけの SRM クロマトグラム
代謝物 F (m/z +295→217)
添加濃度 : 0.08 ppm

ブランク



添加試料



標準溶液

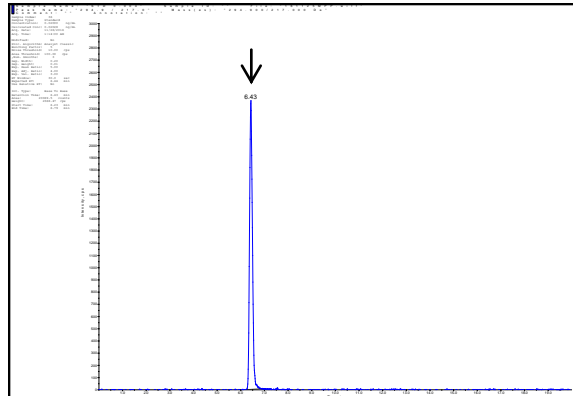
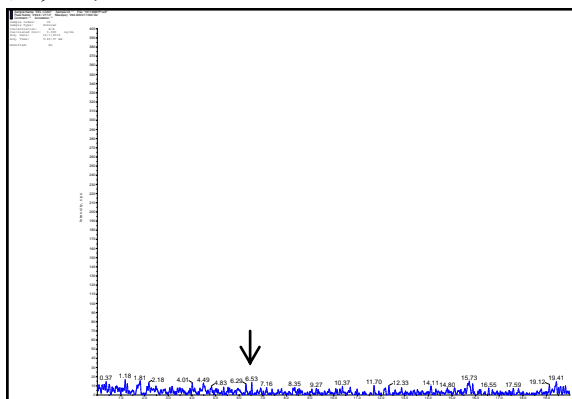


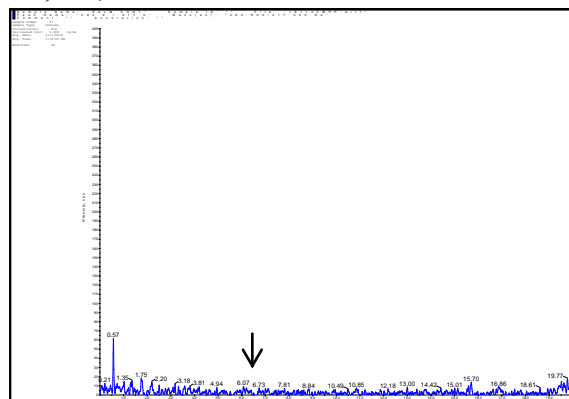
図 12-10 しじみの SRM クロマトグラム
代謝物 F (m/z +295→217)
添加濃度 : 0.08 ppm

代謝物Fの定量限界の推定におけるクロマトグラム（畜水産物）

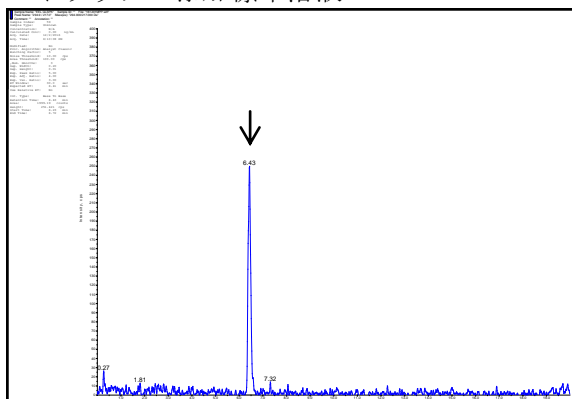
ブランク



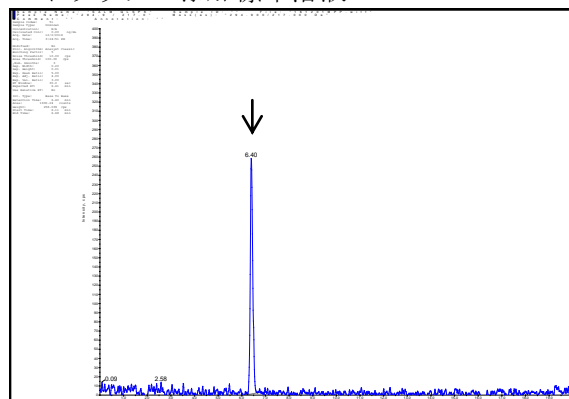
ブランク



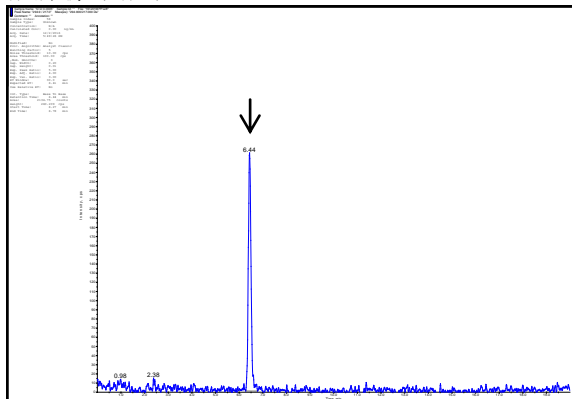
マトリックス添加標準溶液



マトリックス添加標準溶液



溶媒標準溶液



溶媒標準溶液

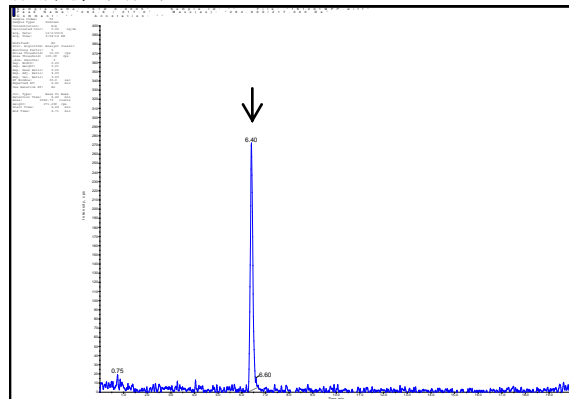
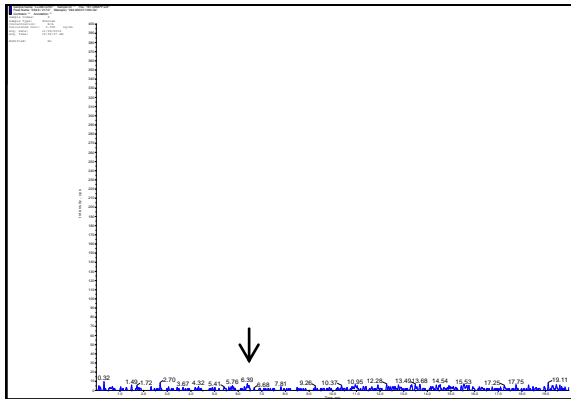


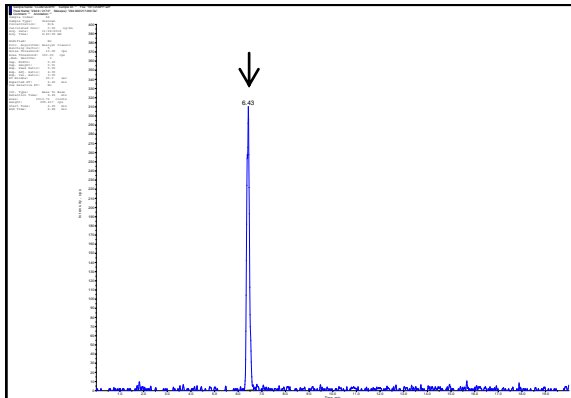
図 13-1 うなぎの SRM クロマトグラム
代謝物 F ($m/z +295 \rightarrow 217$)
試料中 0.01 ppm 相当

図 13-2 さけの SRM クロマトグラム
代謝物 F ($m/z +295 \rightarrow 217$)
試料中 0.01 ppm 相当

ブランク



マトリックス添加標準溶液



溶媒標準溶液

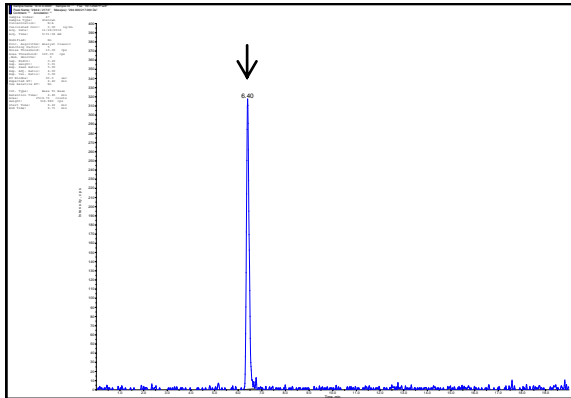
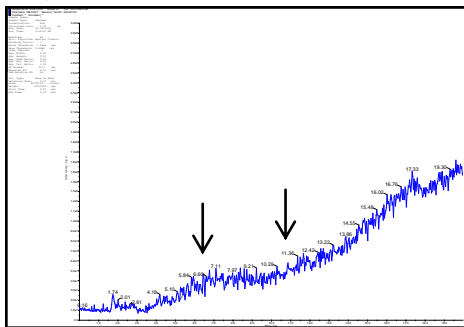
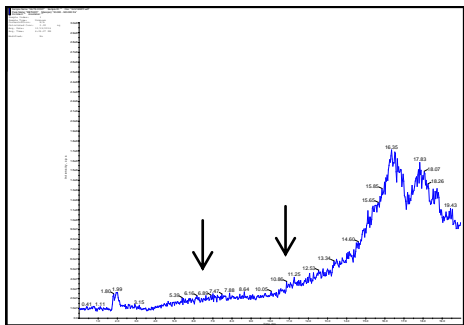


図 13-3 しじみの SRM クロマトグラム
代謝物 F (m/z +295→217)
試料中 0.01 ppm 相当

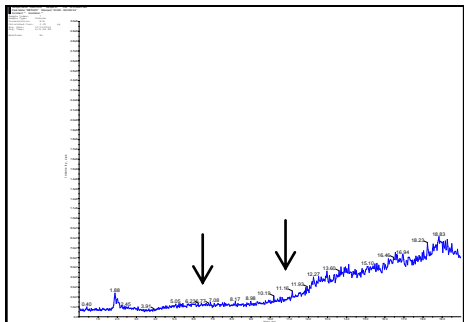
玄米



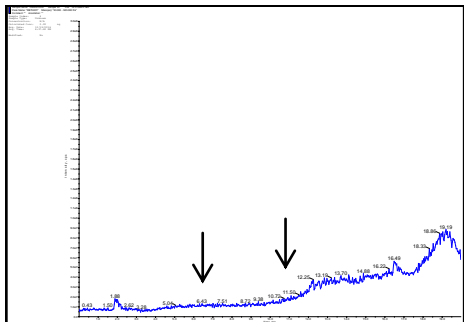
らっかせい



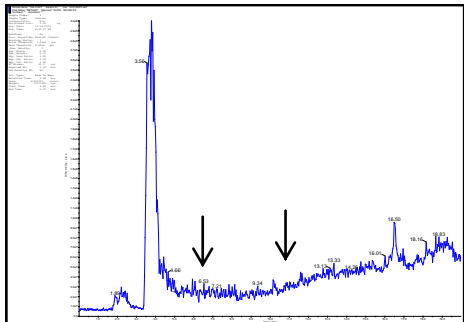
キャベツ



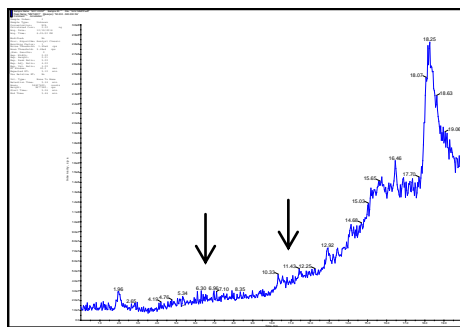
オレンジ



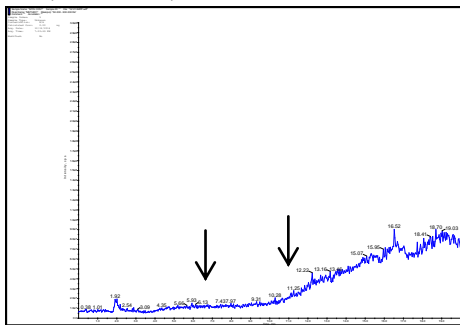
茶



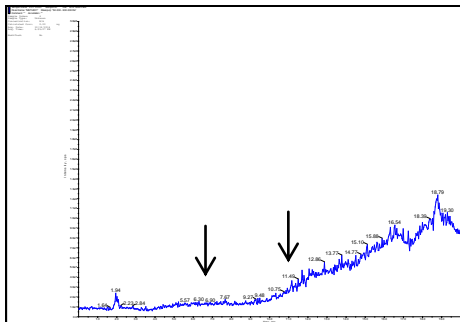
大豆



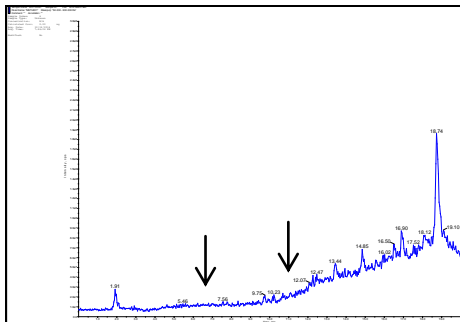
ほうれんそう



ばれいしょ



りんご



ぶどう

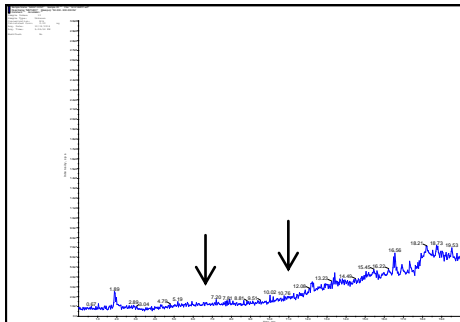
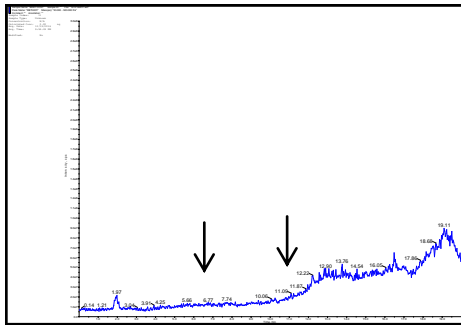
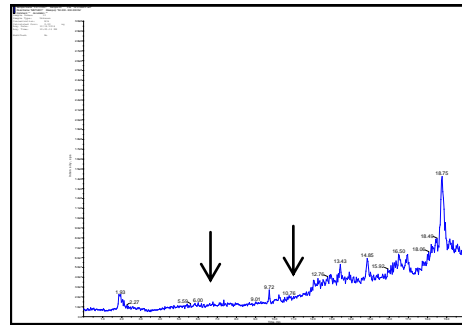


図 14-1 ブランク試料のトータルイオンクロマトグラム (スキャン範囲: 50~500 m/z)

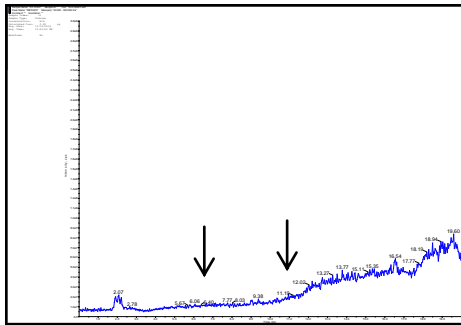
牛の筋肉



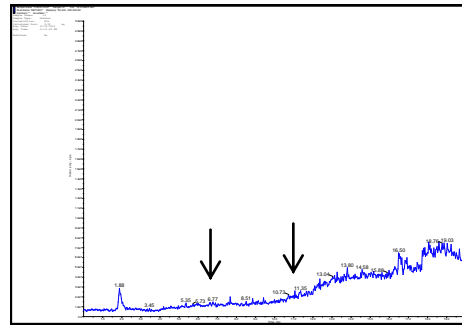
牛の脂肪



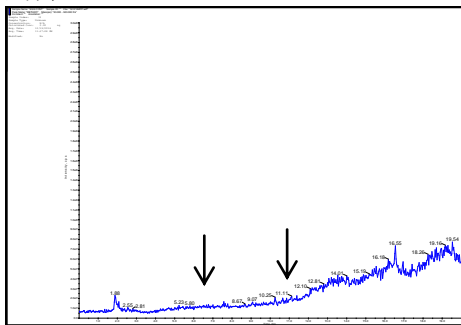
牛の肝臓



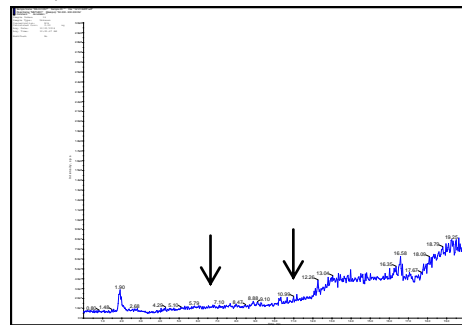
鶏の筋肉



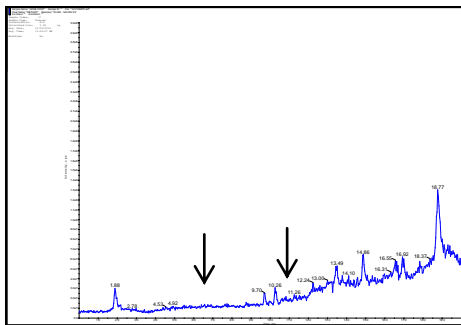
鶏卵



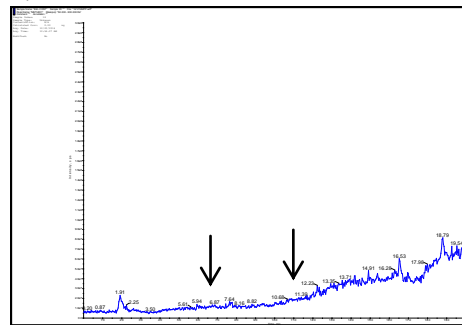
牛乳



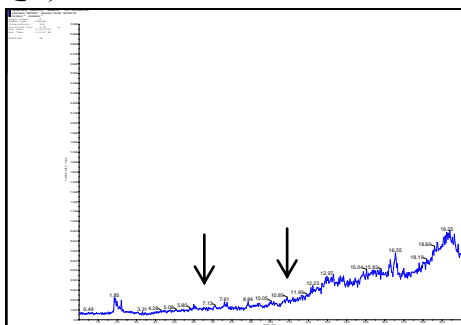
はちみつ



うなぎ



さけ



しじみ

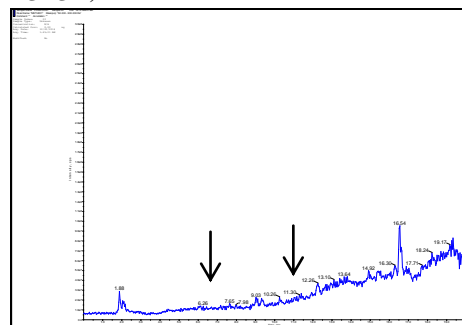


図 14-2 ブランク試料のトータルイオンクロマトグラム (スキャン範囲: 50~500 m/z)