

※本報告書は、試験法開発における検討結果をまとめたものであり、試験法の実施に際して参考として下さい。なお、報告書の内容と通知または告示試験法との間に齟齬がある場合には、通知または告示試験法が優先することをご留意ください。

平成 23 年度

食品に残留する農薬等の成分である物質
(ボスカリド)の試験法開発事業報告書

ボスカリド試験法（畜水産物）の検討結果

[緒言]

1. 目的及び試験法の検討方針

ボスカリドはBASF社が開発したアニリド系殺菌剤で、灰色かび病、菌核病に有効であり、既存の灰色かび病、菌核病防除剤と異なる作用性を有する。

「薬事食品衛生審議会 食品衛生分科会報告書」に記載されている規制対象物質及び残留基準値案を踏まえ、試験法の開発を行った。なお、食安発 0519 第 1 号（平成 22 年 5 月 19 日）では、『今回残留基準を設定するボスカリドとは、畜産物にあつては、ボスカリド、代謝物 B [2-クロロ-N-(4'-クロロ-5-ヒドロキシ-ビフェニル-2-イル)ニコチンアミド] 及び代謝物 B のグルクロン酸抱合体をボスカリド含量に換算したものの和をいい、その他の食品にあつては、ボスカリドのみをいう。』とされている。また、農薬・動物用医薬品部会報告書（平成 21 年 9 月 29 日）では、残留の規制対象物質として、『ボスカリド本体とする。ただし、畜産物にあつては、ボスカリド及び代謝物 B（グルクロン酸抱合体を含む）をボスカリドに換算したものの和とする。』とされている。

1) 規制対象物質

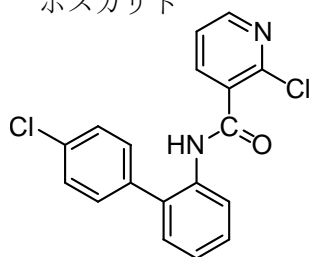
ボスカリド

2-クロロ-N-(4'-クロロ-5-ヒドロキシ-ビフェニル-2-イル)ニコチンアミド（以下、「代謝物 B」という。グルクロン酸抱合体含む。）

2. 分析対象化合物の構造式、物理化学的性質及び基準値等に関する情報

1) 構造式及び物理化学的性質

ボスカリド



ボスカリド

化学式：C₁₈H₁₂Cl₂N₂O

分子量：343.20

化学名（IUPAC）：2-chloro-N-(4'-chlorobiphenyl-2-yl)nicotinamide

外 観：白色結晶

融 点：142.8～143.8℃

蒸気圧：7.2×10⁻⁴ mPa（20℃）

溶解性：水 4.6 mg/L（20℃）

n-ヘプタン<10、メタノール 40～50、アセトン 160～200（以上 g/L、20℃）

オクタノール/水分配係数：log Pow=2.96

安定性：pH 4、5、7及び9の水溶液中で安定。水溶液中で光に対し安定。

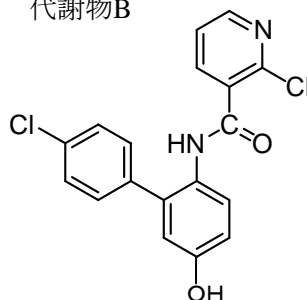
（出典：The e-Pesticide Manual 15th ed.,ver.5.0）

代謝物B

化学式：C₁₈H₁₂Cl₂N₂O₂

分子量：359.20

代謝物B



2) 基準値

牛の筋肉、乳 0.10 ppm

牛の脂肪 0.30 ppm

牛の肝臓 0.35 ppm

鶏の卵 0.02 ppm

鶏の筋肉 0.05 ppm

[実験方法]

1. 試料

1) 購入先

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

2) 試料の採取方法

- ①牛の筋肉は脂肪層を除き、細切均一化した。
- ②牛の脂肪は筋肉部を除き、細切均一化した。
- ③牛の肝臓は、全体を細切均一化した。
- ④さけは可食部（皮を含む）を細切均一化した。
- ⑤うなぎは、活鰻を使用し、頭部を除いた可食部（内臓、骨及び皮を含む）を細切均一化した。
- ⑥しじみは、貝殻を除き細切均一化した。
- ⑦牛乳は全体をよく混合して均一化した。
- ⑧鶏卵は、殻を除き卵白と卵黄を合わせてよく混合し均一化した。
- ⑨はちみつは百花蜜を使用し、加温（40℃以下）してから、よく混合して均一化した。
- ⑩鶏の筋肉は脂肪層を除き、細切均一化した。

2. 試薬・試液

1) 標準品

ボスカリド標準品：純度99.6%（和光純薬工業製）

代謝物B標準品：純度96.7%（BASFジャパン提供品）

2) 試薬

アセトニトリル、アセトン、酢酸エチル、*n*-ヘキサン、メタノール：残留農薬試験用（関東化学製）

アセトニトリル：高速液体クロマトグラフ用（関東化学製）

ギ酸、酢酸、酢酸ナトリウム：試薬特級（関東化学製）

β -グルクロニダーゼ/アシルスルファターゼ溶液（Roche Diagnostics製）

比活性 β -グルクロニダーゼ：5.5 U/mL（フェノールフタレイン- β -グルクロニドを基質として38℃で測定）=4.5 U/mL（4-ニトロフェニル- β -グルクロニドを基質として25℃で測定）=100000 Fishman units/mL（フェノールフタレイン- β -グルクロニドを基質として38℃で測定）1 Fishman unitは38℃で1時間にフェノールフタレイン- β -グルクロニドから1 μ gのフェノールフタレインを遊離させる酵素量

アシルスルファターゼ：2.6 U/mL（フェノールフタレイン-二硫酸を基質として38℃で測定）=14 U/mL（ニトロフェニル硫酸を基質として25℃で測定）=800000 Roy units/mL（2-ヒドロキシ-5-ニトロフェニル硫酸を基質として38℃で測定）1 Roy unitは38℃で、1時間に1 μ gの2-ヒドロキシ-5-ニトロフェノールを遊離させる酵素量

ケイソウ土：セライト545（関東化学製）

シリカゲルミニカラム：Sep-Pak plus Silica（充てん量690 mg、Waters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：ボスカリド標準品25 mgを精秤し、メタノールで溶解して500 mg/L溶液を調製した。

代謝物B25 mgを精秤し、メタノールで溶解して500 mg/L溶液を調製した。

検量線用混合標準溶液：ボスカリド及び代謝物B標準原液をアセトニトリルで混合希釈し、各0.001～0.03 mg/Lの濃度の混合溶液を調製した。

添加用混合標準溶液：ボスカリド及び代謝物B標準原液をアセトンで混合希釈し、各0.2、1、2、3及び7 mg/Lの濃度の混合溶液を調製した。

②試液の調製方法

酢酸緩衝液

酢酸ナトリウム8.2 gに水を加えて溶解し、1000 mLとした後、酢酸を加えてpH5に調整した。

10 w/v%塩化ナトリウム溶液

塩化ナトリウム100 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1000 mL及びn-ヘキサン1000 mLを混合した。

アセトン及びn-ヘキサン（1：19）混液

アセトン10 mL及びn-ヘキサン190 mLを混合した。

アセトン及びn-ヘキサン（3：7）混液

アセトン60 mL及びn-ヘキサン140 mLを混合した。

0.1 vol%ギ酸

ギ酸1 mLに水を加えて混合し、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）

振とう器：エルビスEL型（杉山元医理器製）

ロータリーエバポレーター：R-200（柴田科学製）等

振とう恒温水槽：FS-003（東京硝子器械製）

LC-MS/MS

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

4. 測定条件

LC 条件																								
カラム	TSK-gel ODS-100V サイズ：内径 2.0 mm、長さ 150 mm、粒子径 5 μm 会社：東ソー株式会社																							
移動相流速 (mL/min)	0.2																							
注入量 (μL)	5																							
カラム温度 (°C)	40																							
移動相	A液：0.1 vol%ギ酸 B液：アセトニトリル																							
グラジエント条件	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間(分)</th> <th>A液(%)</th> <th>B液(%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.0</td> <td>80</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>3.0</td> <td>80</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>13.0</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>15.0</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>15.1</td> <td>80</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>23.0</td> <td>80</td> <td>20</td> </tr> </tbody> </table>			時間(分)	A液(%)	B液(%)	0.0	80	20	3.0	80	20	13.0	5	95	15.0	5	95	15.1	80	20	23.0	80	20
時間(分)	A液(%)	B液(%)																						
0.0	80	20																						
3.0	80	20																						
13.0	5	95																						
15.0	5	95																						
15.1	80	20																						
23.0	80	20																						
MS 条件																								
測定モード	MS/MS、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 (V)	4500																							
脱溶媒温度 (°C)	500																							
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)	ボスカリド： +343→140[コーン電圧：66(V)、コリジョンエネルギー：27(eV)] 代謝物 B： +359→140[コーン電圧：66(V)、コリジョンエネルギー：29(eV)]																							
定性イオン (m/z)	ボスカリド： +343→307[コーン電圧：66(V)、コリジョンエネルギー：27(eV)] 代謝物 B： +359→323[コーン電圧：66(V)、コリジョンエネルギー：27(eV)]																							
保持時間の目安	ボスカリド：13分 代謝物B：11分																							

5. 定量

ボスカリド及び代謝物B標準品をそれぞれメタノールに溶解し、500 mg/Lの標準原液を調製した。この溶液を混合し、混合標準溶液をアセトニトリルで希釈し、各0.001、0.002、0.01、0.015、0.02、0.03 mg/Lの濃度の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ボスカリド及び代謝物Bの含量を算出した。

6. 添加試料の調製

牛の筋肉及び牛乳（添加濃度：0.1 ppm相当）：試料10.0 gに添加用標準溶液2 mg/Lを0.5 mL添加し、よく混合した後、30分間放置した。

牛の脂肪（添加濃度：0.3 ppm相当）：試料5.00 gを採り、約80°Cで加温して融解させたものに添加用標準溶液3 mg/Lを0.5 mL添加し、よく混合した後、室温で放置して再度凝固させた後、30分間放置した。

牛の肝臓（添加濃度：0.35 ppm）：試料10.0 gに添加用標準溶液7 mg/Lを0.5 mL添加し、よく混合した後、30分間放置した。

さけ、うなぎ、しじみ及びはちみつ（添加濃度：0.01 ppm）：試料10.0 gに添加用標準溶液0.2 mg/Lを0.5 mL添加しよく混合した後、30分間放置した。

鶏卵（添加濃度：0.02 ppm）：試料10.0 gに添加用標準溶液0.2 mg/Lを1 mL添加しよく混合した後、30分間放置した。

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

7. 試験溶液の調製

ボスカリド及び代謝物Bを試料からメタノールで抽出し、代謝物Bのグルクロン酸抱合体を酵素分解した。酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（1：1）混液で転溶した後、はちみつ以外はアセトニトリル/ヘキサン分配で脱脂し、シリカゲルミニカラムで精製した後、LC-MS/MSで定量及び確認した。

1) 抽出

①はちみつ以外の場合

試料10.0 g（脂肪は5.00 g）を200 mL遠心管に量り採り、メタノール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。ろ紙上の残留物にメタノール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、メタノールで正確に200 mLとした。抽出液8 mL（脂肪は16 mL）を100 mL遠心管に採り、ロータリーエバポレーターを用いて40°C以下で約0.2 mLまで濃縮した。得られた残留物に酢酸緩衝液10 mL及びβ-グルクロニダーゼ/アシルスルファターゼ溶液0.1 mLを加え、37°Cで軽く振とうしながら1時間放置した。10w/v%塩化ナトリウム溶液100 mLを用いて300 mL分液漏斗に移し、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（1：1）混液100 mL及び50 mLで2回振とう抽出した。抽出液を300 mL三角フラスコに採り、無水硫酸ナトリウムを加えて時々振り混ぜながら15分間放置した。抽出液を200 mLなす形フラスコにろ過した後、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5 mLを加えて溶かし、*n*-ヘキサン25 mLを用いて100 mL分液漏斗に移し、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル30 mLで2回振とう抽出した。抽出液を200 mLなす形フラスコに合わせ、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。この残留物にアセトン及び*n*-ヘキサン（1：19）混液5 mLを加えて溶かした。

②はちみつの場合

試料10.0 gを200 mL遠心管に量り採り、メタノール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。ろ紙上の残留物にメタノール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、メタノールで正確に200 mLとした。抽出液8 mLを100 mL遠心管に採り、ロータリーエバポレーターを用いて40°C以下で約0.2 mLまで濃縮した。得られた残留物に酢酸緩衝液10 mL及びβ-グルクロニダーゼ/アシルスルファターゼ溶液0.1 mLを加え、37°Cで軽く振とうしながら1時間放置した。10 w/v%塩化ナトリウム溶液100 mLを用いて300 mL分液漏斗に移し、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（1：1）混液100 mL及び50 mLで2回振とう抽出した。抽出液を300 mL三角フラスコに採り、無水硫酸ナトリウムを加えて時々振り混ぜながら15分間放置した。200 mLなす形フラスコにろ過した後、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。この残留物にアセトン及び*n*-ヘキサン（1：19）混液5 mLを加えて溶かした。

2) 精製

シリカゲルミニカラム [Sep-Pak plus Silica (690 mg)] に*n*-ヘキサン5 mLを注入し、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、さらにアセトン及び*n*-ヘキサン (1 : 19) 5 mLで容器を洗い込み注入し、流出液は捨てた。アセトン及び*n*-ヘキサン (3 : 7) 混液15 mLを注入し、溶出液を50 mL遠心管に採り、溶出液をロータリーエバポレーターを用いて40°C以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物をアセトニトリルに溶解し、正確に2 mLとしたものを試験溶液とした。

[分析法フローチャート]

秤 取

- | 脂肪以外：試料10.0 g
- ↓ 脂肪：試料5.00 g

メタノール抽出

- | メタノール100 mLを加え、ホモジナイズ
- | 吸引ろ過
- | 残留物にメタノール50 mLを加え、ホモジナイズ
- | 吸引ろ過
- | ろ液を合わせ、メタノールで正確に200 mLとする
- | 脂肪以外：抽出液8 mL分取
- ↓ 脂肪：抽出液16 mL分取

濃 縮

- ↓ 約0.2 mLまで濃縮

酵素反応

- | 酢酸緩衝液10 mL
- | β-グルクロニダーゼ/アシルスルファターゼ溶液0.1 mL
- ↓ 37°Cで1時間、緩やかに振とうしながら加温

酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (1 : 1) 混液転溶

- | 10 w/v%塩化ナトリウム溶液100 mL
- | 酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (1 : 1) 混液100 mLを加え、5分間振とう
- | 酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (1 : 1) 混液層を採る
- | 水層に酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (1 : 1) 混液50 mLを加え、5分間振とう
- ↓ 酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (1 : 1) 混液層を合わせ脱水

濃縮 (溶媒除去)

- | はちみつ以外：残留物を*n*-ヘキサン5 mLに溶解
- ↓ はちみつ：残留物をアセトン及び*n*-ヘキサン (1 : 19) 混液5 mLに溶解

アセトニトリル/ヘキサン分配 (はちみつは省略)

- | *n*-ヘキサン25 mL
- | 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
- | 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合せる

濃縮 (溶媒除去) (はちみつは省略)

- ↓ 残留物をアセトン及び*n*-ヘキサン (1 : 19) 混液5 mLに溶解

シリカゲルミニカラム

- | *n*-ヘキサン5 mL予備洗浄
- | 全量注入

- | アセトン及び*n*-ヘキサン (1 : 19) 混液5 mLで洗浄
- | アセトン及び*n*-ヘキサン (3 : 7) 混液 15 mLで溶出
- | 溶出液採取

濃縮 (溶媒除去)

↓ 残留物をアセトニトリル2 mLに溶解

試験溶液

↓

LC-MS/MS

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)

牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳及び鶏卵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、0.002 mg/Lの標準溶液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)

牛の筋肉及び牛乳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、0.02 mg/Lの標準溶液0.5 mLに溶解したものを、牛脂肪はブランク試験溶液から1 mL分取し溶媒を除去した後、0.02 mg/Lの標準溶液3 mLに溶解したものを、牛肝臓はブランク試験溶液から1 mL分取し溶媒を除去した後、0.02 mg/Lの標準溶液3.5 mLに溶解したものを、鶏卵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、0.004 mg/Lの標準溶液0.5 mLに溶解したものを、さけ、うなぎ、しじみ、はちみつ及び鶏の筋肉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、0.002 mg/Lの標準溶液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。

[結果及び考察]

1. 測定条件の検討

1) MS条件の検討

ボスカリド及び代謝物BはESI (+) モード、ESI (-) モードのいずれでも測定が可能であったが、より感度の良いESI (+) モードを用いることとした。

ボスカリドの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343が得られたので、ボスカリドのプロトン付加分子 (m/z 343 [M+H]⁺) をプリカーサーイオンとした。 m/z 343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。強度としては m/z 343をプリカーサーイオンとした場合のプロダクトイオンである m/z 307が一番強く、次いで m/z 140が続いたが、 m/z 307は魚介類サンプルにおいて近接した妨害ピークが見られたため、より選択性の高い m/z 140を定量用イオンに、また m/z 307を定性用イオンとした。

代謝物B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359が得られたので、代謝物Bのプロトン付加分子 (m/z 359 [M+H]⁺) をプリカーサーイオンとした。 m/z 359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。強度としては m/z 359をプリカーサーイオンとした場合のプロダクトイオンである、 m/z 323が一番強く、次いで m/z 140が続いたが、 m/z 323はボスカリドと同様に、魚介類サンプルにおいて近接した妨害ピークが見られたため、より選択性の高い m/z 140を定量用イオンに、また m/z 323を定性用イオンとした。

なお、ESI (-) モードでは、ボスカリド ; プリカーサーイオン341、プロダクトイオン 228、112、代謝物B ; プリカーサーイオン 357、プロダクトイオン 244、182で測定可能であった。

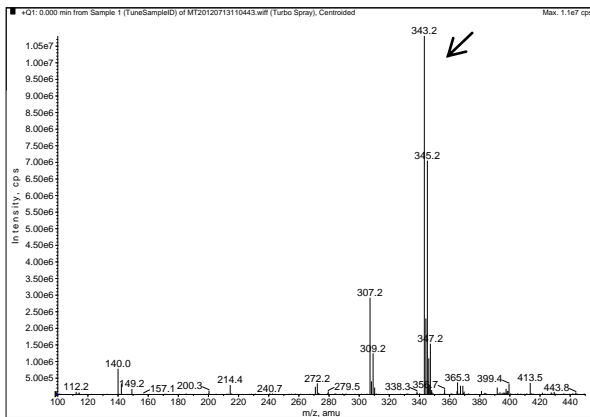


図1 ボスカリドのマススペクトル
 スキャン範囲：50~450 m/z
 測定条件：ESI (+)、CV=66
 (CV：コーン電圧)

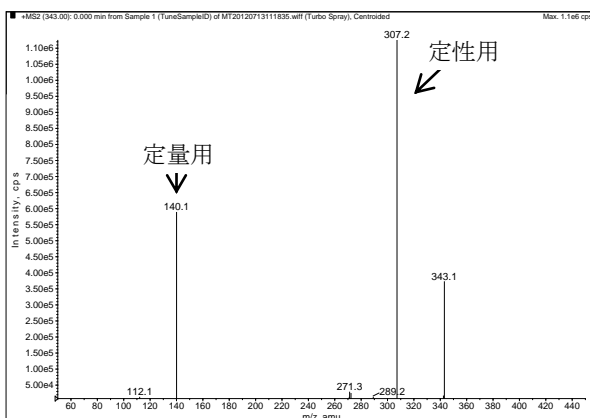


図2 ボスカリドのプロダクトイオンスペクトル (定量及び定性用)
 プリカーサ-イオン： m/z 343
 スキャン範囲：50~450 m/z
 測定条件：ESI (+)、CV=66、CE=27
 (CV：コーン電圧、CE：コリジョンエネルギー)

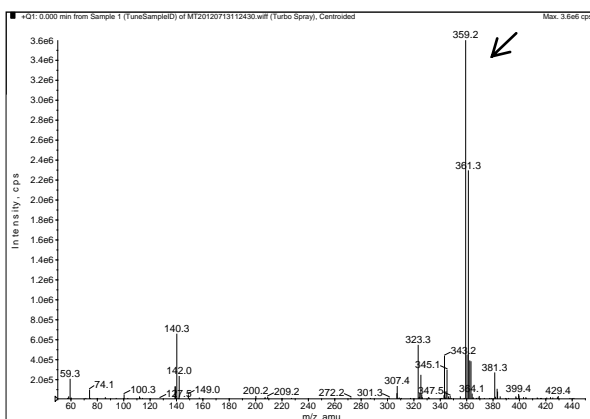


図3 代謝物 B のマススペクトル
 スキャン範囲：50~450 m/z
 測定条件：ESI (+)、CV=66
 (CV：コーン電圧)

プロダクトイオンスペクトル（プロダクトイオンスキャン測定）の例

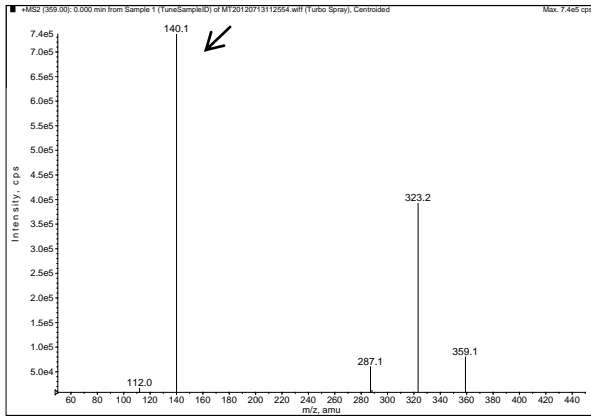


図 4-1 代謝物 B のプロダクトイオンスペクトル (定量用)

プリカーサーイオン： m/z 359

スキャン範囲：50~450 m/z

測定条件：ESI (+)、CV=66、CE=29

(CV：コーン電圧、CE：コリジョンエネルギー)

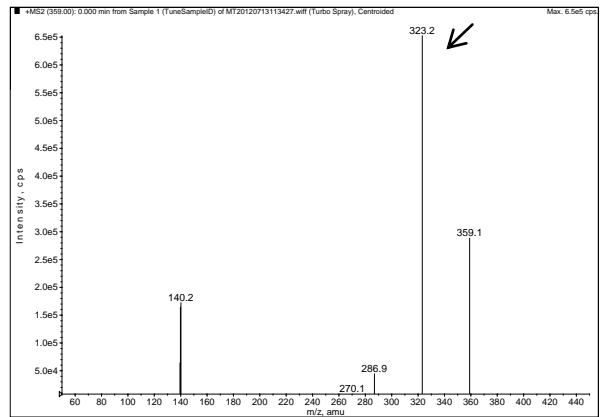


図 4-2 代謝物 B のプロダクトイオンスペクトル (定性用)

プリカーサーイオン： m/z 359

スキャン範囲：50~450 m/z

測定条件：ESI (+)、CV=66、CE=27

(CV：コーン電圧、CE：コリジョンエネルギー)

2) LC 条件の検討

分離カラムについて、TSK-gel ODS-100V (内径 2.0 mm、長さ 150 mm、粒子径 5 μ m) を、移動相について、0.1 vol%ギ酸及びアセトニトリ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、カラムはTSK-gel ODS-100Vを、移動相には0.1 vol%ギ酸およびアセトニトリルを用いることとした。

3) 検量線

図5にボスカリド及び代謝物Bの検量線の例を示した。各0.001 mg/L (0.005 ng) ~0.03 mg/L (0.15 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。

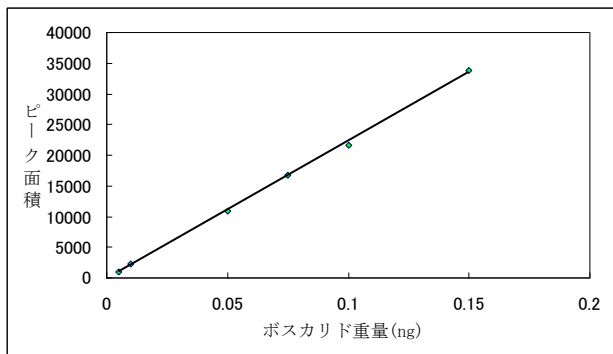


図 5-1 ボスカリド検量線例 (m/z +343 \rightarrow 140)

データ処理装置設定条件の一例

機種 (メーカー) : Analyst

(AB SCIEX製)

ピークの定量方法：ピーク面積法

検量線の種類：最小二乗法

検量線基準ピークの重量：0.005 ng~0.15 ng

傾き (a) : $a=224845.779$

切片 (b) : $b=-211.475$

R^2 : 0.999

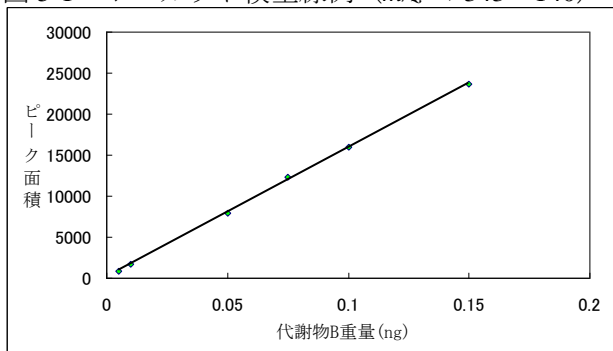


図5-2 代謝物Bの検量線例 (m/z +359 \rightarrow 140)

データ処理装置設定条件の一例

機種 (メーカー) : Analyst

(AB SCIEX製)

ピークの定量方法：ピーク面積法

検量線の種類：最小二乗法

検量線基準ピークの重量：0.005 ng~0.15 ng

傾き (a) : $a=157598.766$

切片 (b) : $b=176.730$

R^2 : 0.999

4) 定量限界

定量限界の算出結果を以下に示した。

$$0.01 \text{ mg/kg} [(2 \text{ mL}/0.4 \text{ g}^{*1}) \times (0.01 \text{ ng}/5 \text{ }\mu\text{L})]$$

代謝物Bのボスカリドとしての定量限界

$$0.01 \text{ mg/kg} > 0.00955 \text{ mg/kg} [(2 \text{ mL}/0.4 \text{ g}^{*1}) \times (0.01 \text{ ng}/5 \text{ }\mu\text{L}) \times 0.955^{*2}]$$

*¹ 5.00 g × 16 mL/200 mL (脂肪の場合)

10.0 g × 8 mL/200 mL (脂肪以外の場合)

*² ボスカリドの分子量343.2/代謝物Bの分子量359.2

2. 試験溶液調製法の検討

1) 抽出方法の検討

開発メーカー提供資料と、ボスカリド及び代謝物Bの溶解性を考慮し、メタノールを用いて抽出した。

2) 酵素分解の検討

開発メーカー提供資料を参考に、β-グルクロニダーゼ/アリルスルファターゼ溶液を用いて代謝物Bのグルクロン酸抱合体を酵素分解する方法を用いた。

3) 転溶溶媒の検討

ボスカリド及び代謝物B各1 μgを、10w/v%塩化ナトリウム100 mLに添加し、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (1 : 1) 混液100 mL、50 mL及び50 mLで3回振とう抽出を行った結果を表1に示した。ボスカリドは酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (1 : 1) 混液100 mL1回転溶で99%、代謝物Bは100 mL及び50 mLの2回目までの抽出で100%の回収率が得られたことから、転溶操作は10 w/v%塩化ナトリウム100 mLから酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (1 : 1) 混液100 mL及び50 mLで2回抽出することとした。

表1 酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (1 : 1) 混液への転溶 (%)

	100 mL	50 mL	50 mL	合計
	(1回目)	(2回目)	(3回目)	
ボスカリド	99	0	0	99
代謝物 B	77	23	0	100

4) 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。ボスカリド及び代謝物B各1 μgをとり、*n*-ヘキサン30 mLに溶解し、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル30 mLで3回抽出を行ったときの結果を表2に示した。ボスカリド及び代謝物Bは2回目までの抽出で大部分が抽出されたため、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル30 mLで2回抽出することとした。

表2 アセトニトリル/ヘキサン分配 (%)

	<i>n</i> -ヘキサン*	<i>n</i> -ヘキサン飽和アセトニトリル			合計
	30 mL	30 mL	30 mL	30 mL	
		(1回目)	(2回目)	(3回目)	
ボスカリド	0	95	2	0	97
代謝物 B	0	88	tr	0	88

※*n*-ヘキサン飽和アセトニトリルで3回分配した後の*n*-ヘキサン層の測定結果

5) カラム精製の検討

シリカゲルミニカラムでの精製について検討した。カラムを*n*-ヘキサン5 mLで予備洗浄した後、ボスカリド及び代謝物B各1 µgをアセトン及び*n*-ヘキサン (1 : 19) 混液で負荷し、アセトン及び*n*-ヘキサン (3 : 7) 混液で溶出したときの溶出状況を表3に示した。ボスカリド及び代謝物Bはアセトン及び*n*-ヘキサン (1 : 19) 混液10 mLでは溶出せず、アセトン及び*n*-ヘキサン (3 : 7) 混液混液15 mLで溶出されたことから、アセトン及び*n*-ヘキサン (1 : 19) 混液10 mLで負荷及び洗浄し、アセトン及び*n*-ヘキサン (3 : 7) 混液混液15 mLで溶出することとした。

表3 シリカゲルミニカラムからの溶出状況 (%)

	アセトン及び <i>n</i> -ヘキサン (1 : 19)	アセトン及び <i>n</i> -ヘキサン (3 : 7)		合計
	5 mL (負荷) + 5 mL	0-15 mL	15-20 mL	
ボスカリド	0	93	0	93
代謝物 B	0	96	tr	96

Sep-Pak plus silica (充てん量 690 mg、Waters製)

添加量 : 1 µg

3. 添加回収試験

牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、さけ、うなぎ、しじみ、牛乳、鶏卵、はちみつ及び鶏の筋肉の10食品を用いて、[実験方法] 7. 試験溶液の調製に従って添加回収試験を実施した。

添加回収試験における回収率100%相当の溶媒標準溶液、各食品のブランク試料及び添加試料の代表的なクロマトグラムを図6~9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10に示した。

1) 選択性

選択性の結果を表4に示した。検討した何れの試料においてもボスカリド及び代謝物B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4 選択性の評価

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	基準値 ^{*1} (ppm)	添加濃度 ^{*2} (ppm)	妨害ピークの許容範囲			ピーク面積(高さ) ^{*3}				選択性の評価 ^{*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	ボスカリド	牛の筋肉	0.01	0.1	0.1	基準値	0.1	< 0.100	面積	147	20610	0.007	○	
		牛の脂肪	0.01	0.3	0.3	基準値	0.3	< 0.100	面積	0		#DIV/0!	○	
		牛の肝臓	0.01	0.35	0.35	基準値	0.35	< 0.100	面積	69	75600	0.001	○	
		さけ	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		うなぎ	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		しじみ	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		牛乳	0.01	0.1	0.1	基準値	0.1	< 0.100	面積	0		#DIV/0!	○	
		鶏卵	0.01	0.02	0.02	* 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	134	2546	0.055	○	
		鶏の筋肉	0.01	0.05	0.05	基準値	0.05	< 0.100	面積	0		#DIV/0!	○	
		2	代謝物B	牛の筋肉	0.01	0.1	0.1	基準値	0.1	< 0.100	面積	47	14880	0.003
		牛の脂肪	0.01	0.3	0.3	基準値	0.3	< 0.100	面積	0		#DIV/0!	○	
		牛の肝臓	0.01	0.35	0.35	基準値	0.35	< 0.100	面積	0		#DIV/0!	○	
		さけ	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		うなぎ	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		しじみ	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		牛乳	0.01	0.1	0.1	基準値	0.1	< 0.100	面積	0		#DIV/0!	○	
		鶏卵	0.01	0.02	0.02	* 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!	○	
		鶏の筋肉	0.01	0.05	0.05	基準値	0.05	< 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

真度及び併行精度の検討結果を表5に示した。ボスカリドの真度は84~97%、併行精度は2~13%であり、目標値を十分に満たした。代謝物Bの真度は73~102%、併行精度は2~9%であり、目標値を十分に満たした。さけ、うなぎ、しじみ及びはちみつについては、S/N比の平均値はボスカリド83~102、代謝物B70~110でありS/N \geq 10を十分に満たした。

添加濃度が定量限界濃度と異なる試料について、定量限界の推定を行った結果を表6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6及び7に示した。S/N比の平均値はボスカリド69~133、代謝物B50~92でありS/N \geq 10を十分に満たした。

表5 真度、精度及び定量限界の評価

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	基準値 ¹⁾ (ppm)	添加濃度 (ppm)	定量限界の評価 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	ボスカリド	牛の筋肉	0.01	0.1	0.1	*	216000	99.3	0.999	90	90	92	92	87	90	2				#DIV/0!	
		牛の脂肪	0.01	0.3	0.3	*	216000	99.3	0.999	98	88	96	94	81	91	8				#DIV/0!	
		牛の肝臓	0.01	0.35	0.35	*	216000	99.3	0.999	88	83	84	83	84	84	2				#DIV/0!	
		さけ	0.01	0.01	0.01		231000	71.3	0.999	92	90	99	88	80	90	8	83	82	83		
		うなぎ	0.01	0.01	0.01		231000	71.3	0.999	103	75	78	83	92	86	13	108	75	92		
		しじみ	0.01	0.01	0.01		231000	71.3	0.999	101	85	89	98	81	91	9	120	83	102		
		牛乳	0.01	0.1	0.1	*	234000	41.3	0.996	89	100	95	94	82	92	7				#DIV/0!	
		鶏卵	0.01	0.02	0.02	*	234000	41.3	0.996	81	87	91	81	98	88	8				#DIV/0!	
		はちみつ	0.01	0.01	0.01		223000	289	0.999	95	93	71	88	87	87	11	94	92	93		
		鶏の筋肉	0.01	0.05	0.05	*	223000	289	0.999	100	95	102	89	97	97	5				#DIV/0!	
2	代謝物B	牛の筋肉	0.01	0.1	0.1	*	153000	220	0.996	89	86	85	81	85	85	3				#DIV/0!	
		牛の脂肪	0.01	0.3	0.3	*	153000	220	0.996	90	80	89	91	84	87	5				#DIV/0!	
		牛の肝臓	0.01	0.35	0.35	*	153000	220	0.996	86	88	86	83	86	86	2				#DIV/0!	
		さけ	0.01	0.01	0.01		158000	177	0.999	80	70	87	74	72	77	9	95	82	89		
		うなぎ	0.01	0.01	0.01		158000	177	0.999	86	70	74	83	84	79	9	82	57	70		
		しじみ	0.01	0.01	0.01		158000	177	0.999	70	67	77	80	72	73	7	92	48	70		
		牛乳	0.01	0.1	0.1	*	228000	339	0.996	88	100	89	98	95	94	6				#DIV/0!	
		鶏卵	0.01	0.02	0.02	*	158000	127	0.999	90	96	93	82	91	90	6				#DIV/0!	
		はちみつ	0.01	0.01	0.01		153000	-40.1	0.998	89	103	98	109	113	102	9	121	98	110		
		鶏の筋肉	0.01	0.05	0.05	*	153000	-40.1	0.996	93	91	97	92	97	94	3				#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6 定量限界の推定

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	基準値 ¹⁾ (ppm)	添加濃度 (ppm)	定量限界の評価 ²⁾	標準溶液濃度 ³⁾ (mg/L)	面積又は高さの別	ブランク ⁵⁾	ピーク面積(高さ) ⁴⁾						S/N比		平均値		備考						
										マトリックス添加標準溶液			溶媒標準溶液			n=1	n=2	平均	n=1		n=2	平均	n=1	n=2	面積(高さ)比(%) ⁶⁾	S/N比
										n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均											
1	ボスカリド	牛の筋肉	0.01	0.1	0.1	*	0.002	面積	0	4054	3743	3899	3739	3795	3767	138	128	103	133							
		牛の脂肪	0.01	0.3	0.3	*	0.002	面積	0	1878	2175	2027	1971	2326	2149	72	66	94	69							
		牛の肝臓	0.01	0.35	0.35	*	0.002	面積	0	1940	1258	1599	1554	1694	1624	81	84	98	83							
		さけ	0.01	0.01	0.01															#DIV/0!	#DIV/0!					
		うなぎ	0.01	0.01	0.01															#DIV/0!	#DIV/0!					
		しじみ	0.01	0.01	0.01															#DIV/0!	#DIV/0!					
		牛乳	0.01	0.1	0.1	*	0.002	面積	0	1886	1645	1786	1783	1984	1884	91	97	94	94							
		鶏卵	0.01	0.02	0.02	*	0.002	面積	0	2013	2029	2021	1657	2380	2019	98	130	100	114							
		はちみつ	0.01	0.01	0.01															#DIV/0!	#DIV/0!					
		鶏の筋肉	0.01	0.05	0.05	*	0.002	面積	0	2193	2222	2208	2457	2401	2429	142	100	91	121							
2	代謝物B	牛の筋肉	0.01	0.1	0.1	*	0.002	面積	0	2558	2621	2590	2629	2417	2523	75	109	103	92							
		牛の脂肪	0.01	0.3	0.3	*	0.002	面積	0	1373	1488	1431	1394	1548	1471	49	51	97	50							
		牛の肝臓	0.01	0.35	0.35	*	0.002	面積	0	1267	1256	1262	1231	1428	1330	53	49	95	51							
		さけ	0.01	0.01	0.01															#DIV/0!	#DIV/0!					
		うなぎ	0.01	0.01	0.01															#DIV/0!	#DIV/0!					
		しじみ	0.01	0.01	0.01															#DIV/0!	#DIV/0!					
		牛乳	0.01	0.1	0.1	*	0.002	面積	0	1318	1184	1251	1447	995	1221	49	57	102	53							
		鶏卵	0.01	0.02	0.02	*	0.002	面積	0	1478	1329	1404	1211	1456	1334	66	64	105	85							
		はちみつ	0.01	0.01	0.01															#DIV/0!	#DIV/0!					
		鶏の筋肉	0.01	0.05	0.05	*	0.002	面積	0	1496	1594	1545	1570	1339	1455	74	55	106	65							

*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。(必要に応じて標準注入を行う。)
 *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7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。面積比はボスカリド0.92~1.04、代謝物B0.92~1.04であり、測定への影響はないものと考えられた。

添加回収試験における真度を表7で求めたピーク面積比で除して補正真度を求め、表8に示した。補正真度はボスカリド84~99%、代謝物B78~105%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7 試料マトリックスの測定への影響

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	基準値 ^{*1} (ppm)	添加濃度 (ppm)	標準溶液濃度 ^{*2} (mg/L)	ピーク面積(高さ) ^{*3}									備考
							面積又は高さの別	ブランク ^{*4}	マトリックス添加標準溶液 ^{*5}			溶媒標準溶液			ピーク面積(高さ)比 ^{*6}	
							n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均				
1	ボスカリド	牛の筋肉	0.01	0.1	0.1	0.02	面積	0	20610	21280	20945	22120	23470	22795	0.92	
		牛の脂肪	0.01	0.3	0.3	0.02	面積	0	22340	23060	22700	24540	22420	23480	0.97	
		牛の肝臓	0.01	0.35	0.35	0.02	面積	0	21600	20860	21230	22280	23750	23015	0.92	
		さけ	0.01	0.01	0.01	0.002	面積	0	2050	2136	2093	2104	2257	2181	0.96	
		うなぎ	0.01	0.01	0.01	0.002	面積	0	2129	2229	2179	2288	2114	2201	0.99	
		しじみ	0.01	0.01	0.01	0.002	面積	0	2437	2211	2324	2609	2247	2428	0.96	
		牛乳	0.01	0.1	0.1	0.02	面積	0	21070	20350	20710	22890	20510	21700	0.95	
		鶏卵	0.01	0.02	0.02	0.004	面積	0	4569	4439	4504	4423	4571	4497	1.00	
		はちみつ	0.01	0.01	0.01	0.002	面積	0	2546	2207	2377	2214	2346	2280	1.04	
		鶏の筋肉	0.01	0.05	0.05	0.01	面積	0	11190	11110	11150	11930	10830	11380	0.98	
2	代謝物B	牛の筋肉	0.01	0.1	0.1	0.02	面積	0	14880	14290	14585	14020	14110	14065	1.04	
		牛の脂肪	0.01	0.3	0.3	0.02	面積	0	13450	15600	14525	15320	14650	14985	0.97	
		牛の肝臓	0.01	0.35	0.35	0.02	面積	0	14500	14370	14435	14740	14120	14430	1.00	
		さけ	0.01	0.01	0.01	0.002	面積	0	1585	1539	1562	1604	1538	1571	0.99	
		うなぎ	0.01	0.01	0.01	0.002	面積	0	1239	1292	1266	1396	1335	1366	0.93	
		しじみ	0.01	0.01	0.01	0.002	面積	0	1216	1469	1343	1545	1370	1458	0.92	
		牛乳	0.01	0.1	0.1	0.02	面積	0	14120	13940	14030	14160	13640	13900	1.01	
		鶏卵	0.01	0.02	0.02	0.004	面積	0	2810	2555	2683	2782	3081	2932	0.92	
		はちみつ	0.01	0.01	0.01	0.002	面積	0	1490	1314	1402	1532	1347	1440	0.97	
		鶏の筋肉	0.01	0.05	0.05	0.01	面積	0	6604	6475	6540	6530	6944	6737	0.97	

*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。(必要に応じて乾燥注入を行う。)

*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8 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	ボスカリド	牛の筋肉	0.01	0.1	0.1	90	0.92	98	
		牛の脂肪	0.01	0.3	0.3	91	0.97	94	
		牛の肝臓	0.01	0.35	0.35	84	0.92	91	
		さけ	0.01	0.01	0.01	90	0.96	94	
		うなぎ	0.01	0.01	0.01	86	0.99	87	
		しじみ	0.01	0.01	0.01	91	0.96	95	
		牛乳	0.01	0.1	0.1	92	0.95	97	
		鶏卵	0.01	0.02	0.02	88	1.00	88	
		はちみつ	0.01	0.01	0.01	87	1.04	84	
		鶏の筋肉	0.01	0.05	0.05	97	0.98	99	
2	代謝物B	牛の筋肉	0.01	0.1	0.1	85	1.04	82	
		牛の脂肪	0.01	0.3	0.3	87	0.97	90	
		牛の肝臓	0.01	0.35	0.35	86	1.00	86	
		さけ	0.01	0.01	0.01	77	0.99	78	
		うなぎ	0.01	0.01	0.01	79	0.93	85	
		しじみ	0.01	0.01	0.01	73	0.92	79	
		牛乳	0.01	0.1	0.1	94	1.01	93	
		鶏卵	0.01	0.02	0.02	90	0.92	98	
		はちみつ	0.01	0.01	0.01	102	0.97	105	
		鶏の筋肉	0.01	0.05	0.05	94	0.97	97	

4. 考察

代謝物Bの標準品は市販されていないため、BASFジャパン提供品を用いて検討を行った。

BASFジャパン提供資料を参考に、メタノールで抽出し、代謝物Bのグルクロン酸抱合体をβ-グルクロニダーゼ/アリルスルファターゼ溶液で酵素分解した。

転溶操作は10w/v%塩化ナトリウム100 mLから酢酸エチル及びn-ヘキサン (1 : 1) 混液100 mL及び50 mLで2回でボスカリド及び代謝物Bを十分に抽出することができた。

脱脂方法は、n-ヘキサン30 mLからn-ヘキサン飽和アセトニトリル30 mL2回でボスカリド及び代

謝物Bの大部分が抽出されたため、アセトニトリル/ヘキサン分配を採用した。はちみつは脱脂操作を省略することが可能であった。

精製カラムとしてはシリカゲルミニカラムを用いた。

開発した方法を用いて、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測定を妨害するようなピークは認められず、真度はボスカリド84～97%、代謝物B73～102%、併行精度はボスカリド2～13%、代謝物B2～9%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、鶏の卵、はちみつ等の畜水産物に適用可能であると判断された。

[結論]

畜水産物中のボスカリド試験法として、ボスカリド及び代謝物Bを試料からメタノールで抽出し、代謝物Bのグルクロン酸抱合体を酵素分解する。酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（1：1）混液で転溶した後、はちみつ以外はアセトニトリル/ヘキサン分配で脱脂し、シリカゲルミニカラムで精製した後、LC-MS/MSで定量及び確認する方法を開発した。

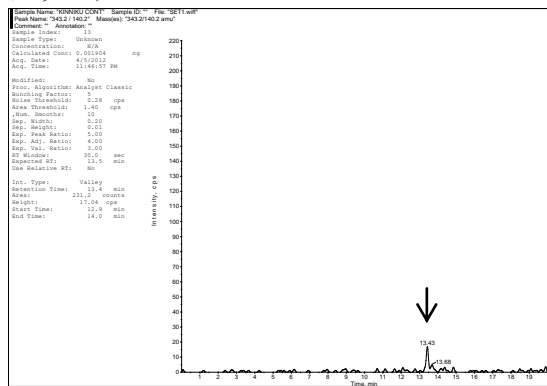
開発した試験法を牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、さけ、うなぎ、しじみ、牛乳、鶏卵、はちみつ及び鶏の筋肉の10食品に適用した結果、選択性は良好で何れの試料においても妨害ピークは認められず、真度はボスカリド84～97%、代謝物B73～102%、併行精度はボスカリド2～13%、代謝物B2～9%の良好な結果が得られた。また、定量限界として、0.01 mg/kgを設定可能であることが確認された。

[参考文献]

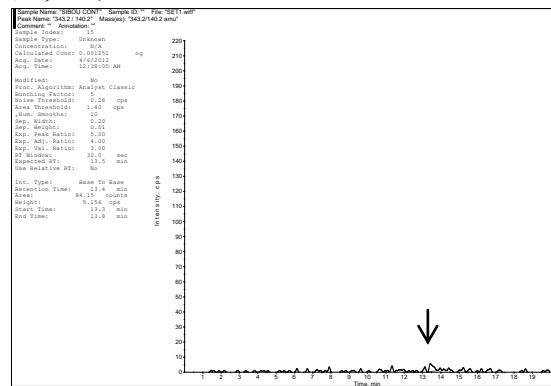
食品に残留する農薬，飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法 ボスカリドの個別試験法(厚生労働省)

開発メーカー提供資料

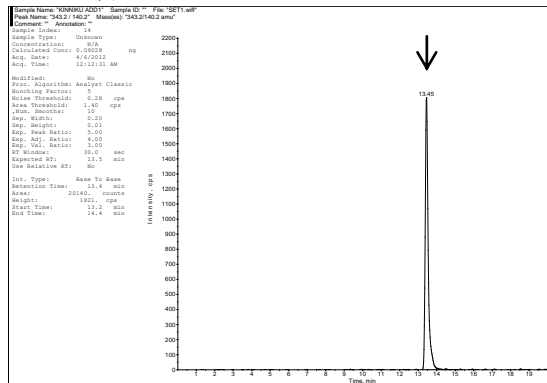
ボスカリドの添加回収試験におけるクロマトグラム ブランク



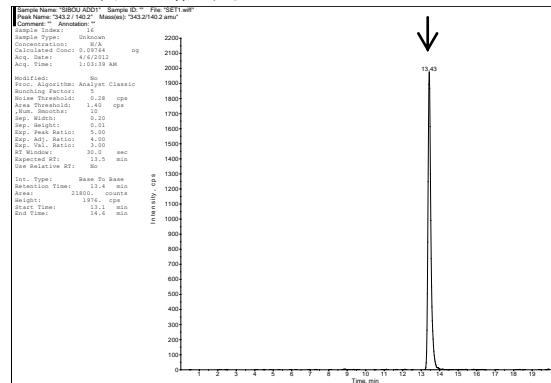
ブランク



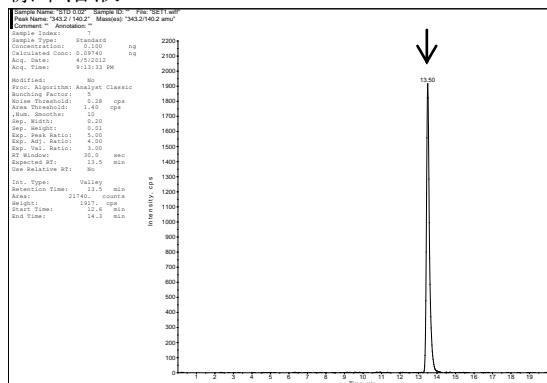
添加試料



添加試料 3倍希釈



標準溶液



標準溶液

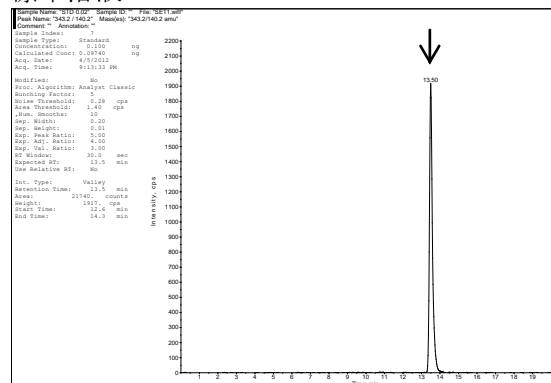
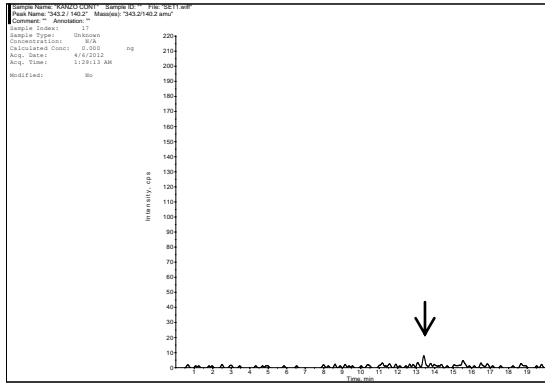


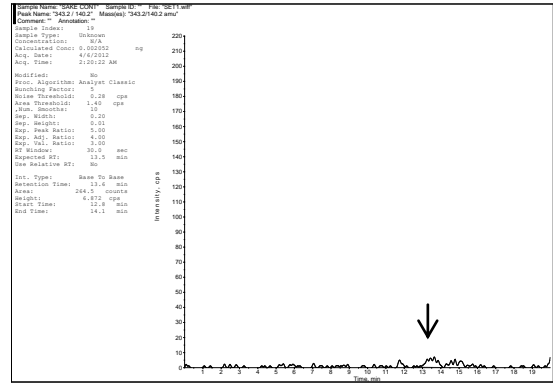
図 6-1 牛の筋肉の SRM クロマトグラム
ボスカリド ($m/z +343 \rightarrow 140$)
添加濃度 : 0.1 ppm

図 6-2 牛の脂肪の SRM クロマトグラム
ボスカリド ($m/z +343 \rightarrow 140$)
添加濃度 : 0.3 ppm

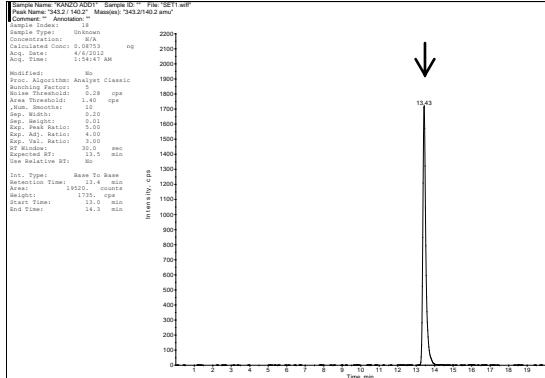
ブランク



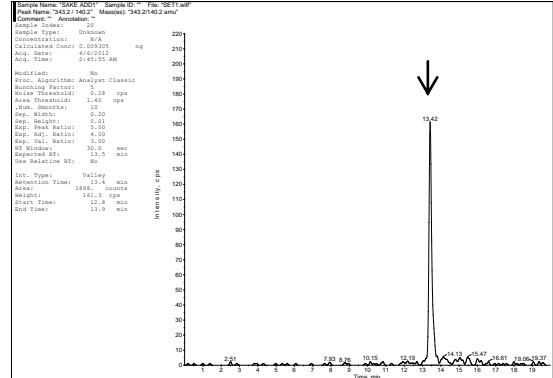
ブランク



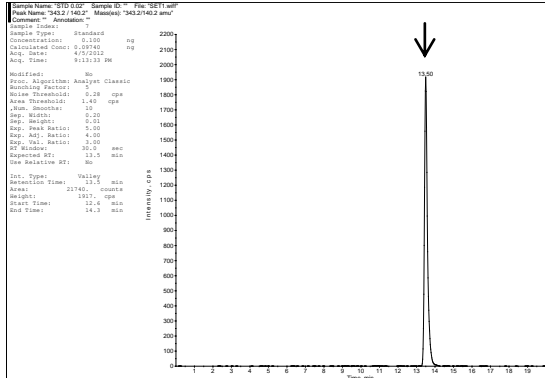
添加試料 3.5 倍希釈



添加試料



標準溶液



標準溶液

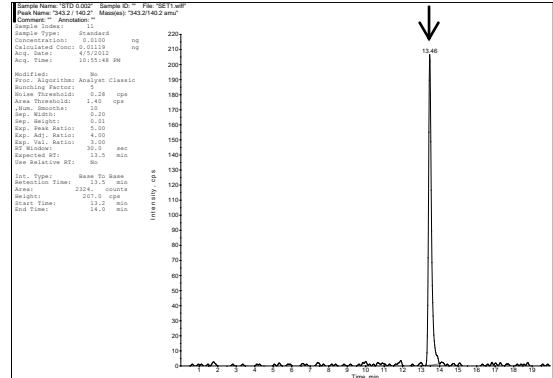
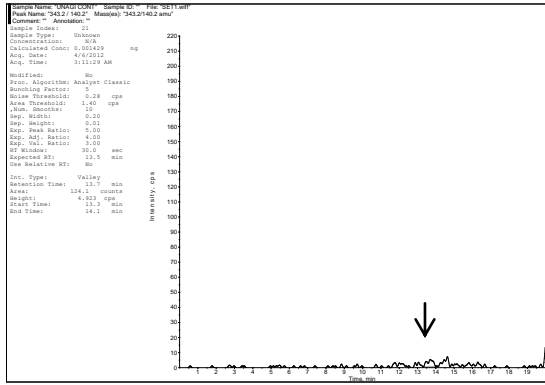


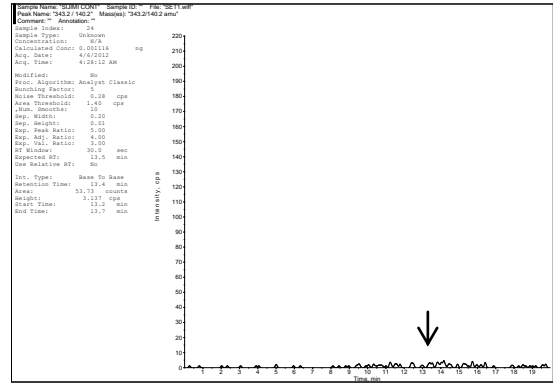
図 6-3 牛の肝臓の SRM クロマトグラム
 ボスカリド ($m/z +343 \rightarrow 140$)
 添加濃度 : 0.35 ppm

図 6-4 さけの SRM クロマトグラム
 ボスカリド ($m/z +343 \rightarrow 140$)
 添加濃度 : 0.01 ppm

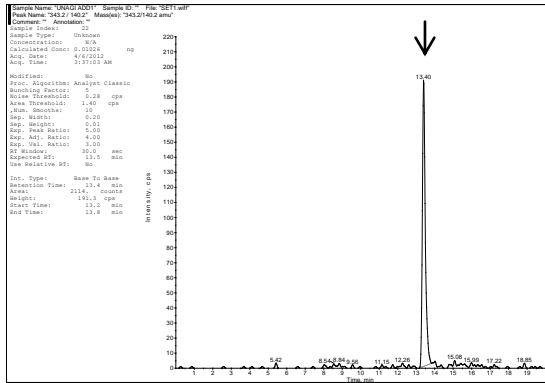
ブランク



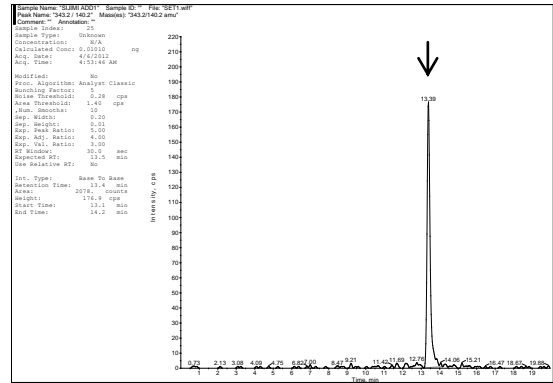
ブランク



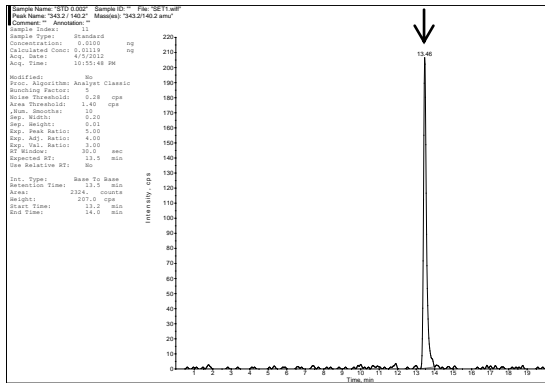
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

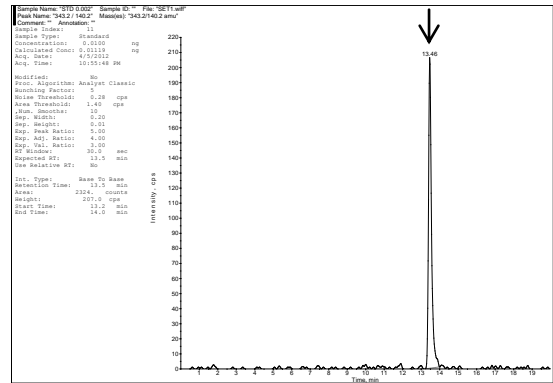
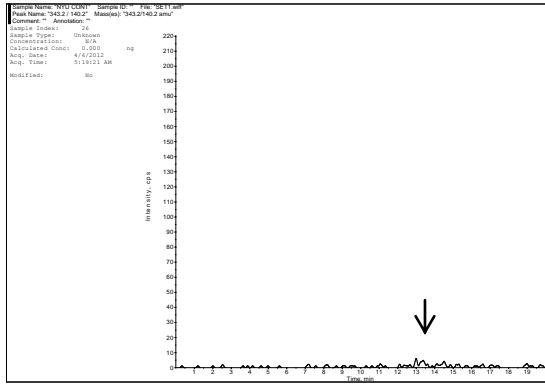


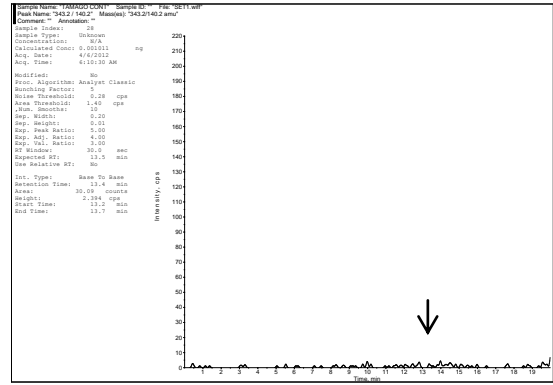
図 6-5 うなぎの SRM クロマトグラム
ボスカリド ($m/z +343 \rightarrow 140$)
添加濃度 : 0.01 ppm

図 6-6 しじみの SRM クロマトグラム
ボスカリド ($m/z +343 \rightarrow 140$)
添加濃度 : 0.01 ppm

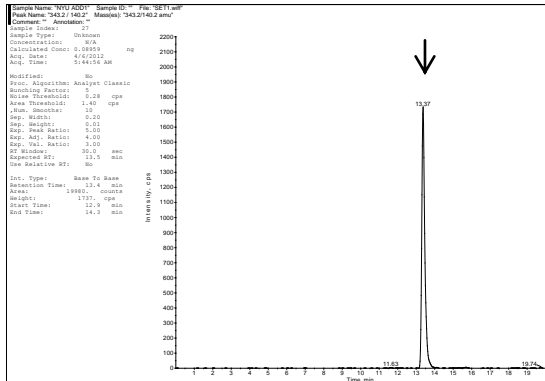
ブランク



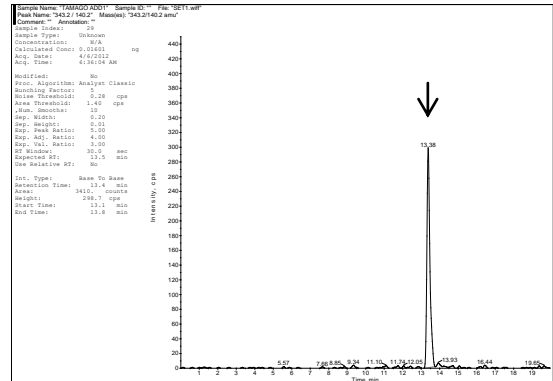
ブランク



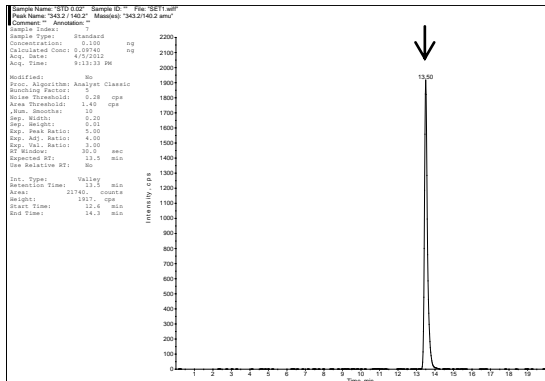
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

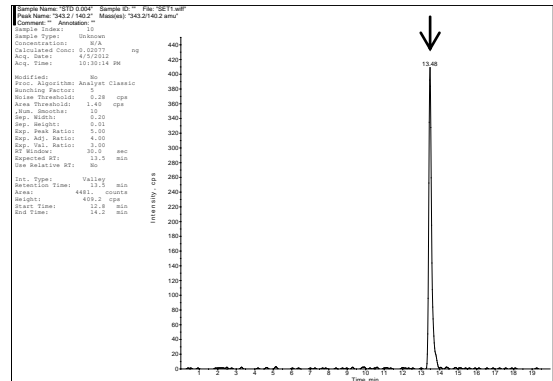
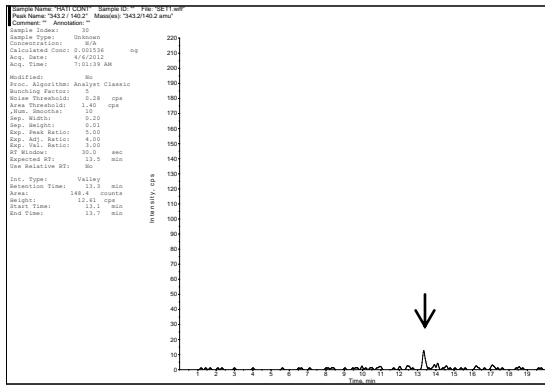


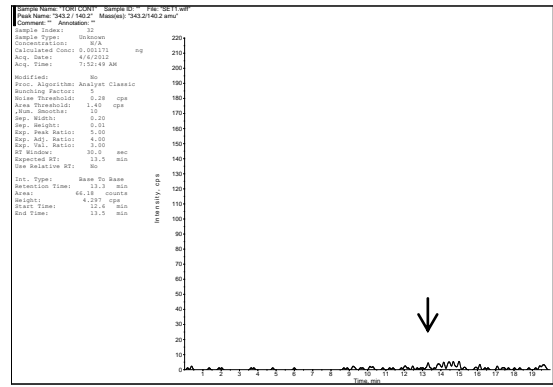
図 6-7 牛乳の SRM クロマトグラム
 ボスカリド ($m/z +343 \rightarrow 140$)
 添加濃度 : 0.1 ppm

図 6-8 鶏卵の SRM クロマトグラム
 ボスカリド ($m/z +343 \rightarrow 140$)
 添加濃度 : 0.02 ppm

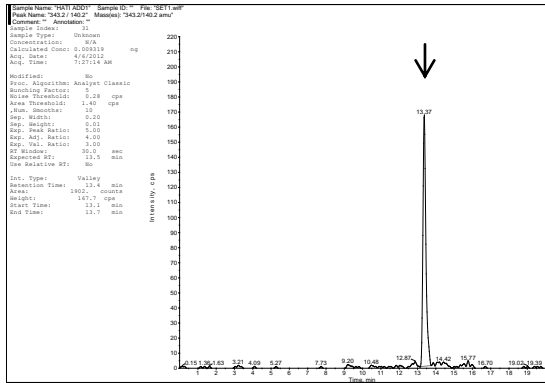
ブランク



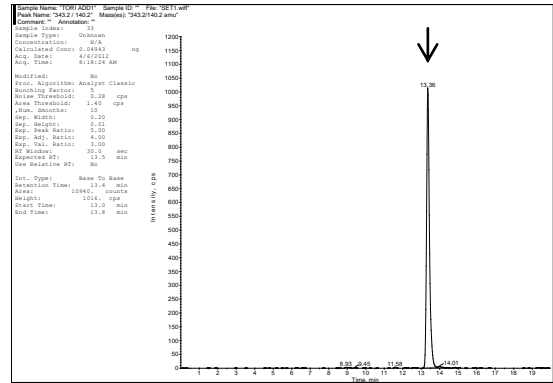
ブランク



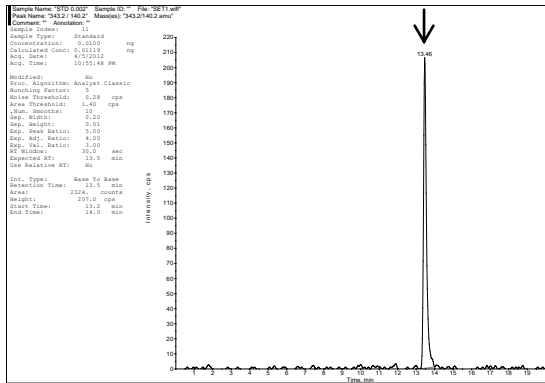
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

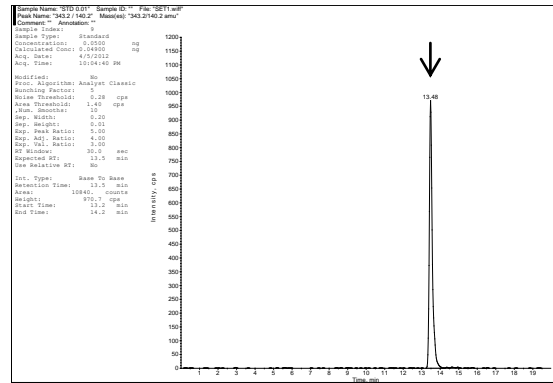


図 6-9 はちみつの SRM クロマトグラム
 ボスカリド ($m/z +343 \rightarrow 140$)
 添加濃度 : 0.01 ppm

図 6-10 鶏の筋肉の SRM クロマトグラム
 ボスカリド ($m/z +343 \rightarrow 140$)
 添加濃度 : 0.05 ppm

ボスカリドの定量限界の推定におけるクロマトグラム

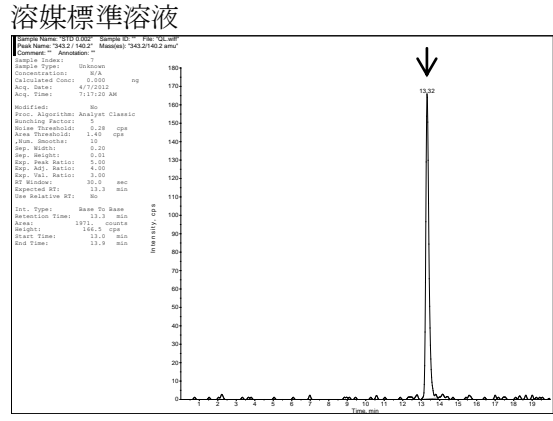
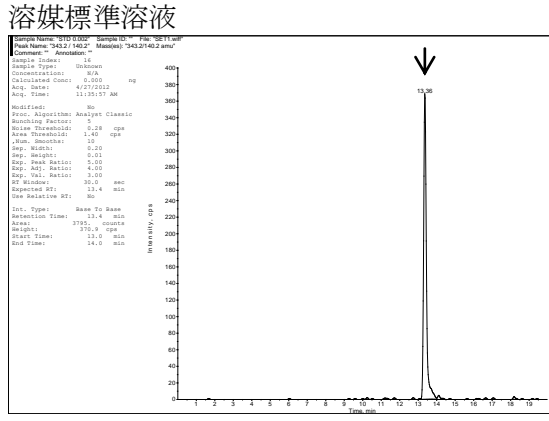
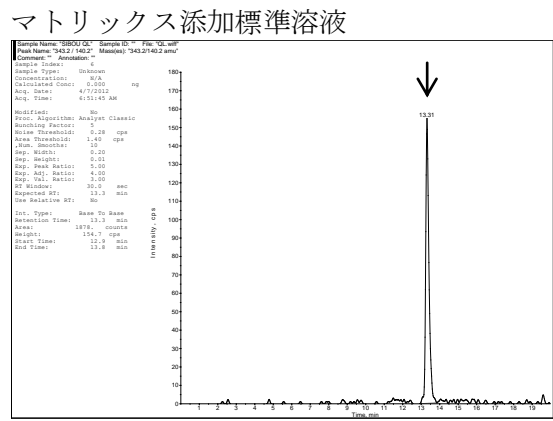
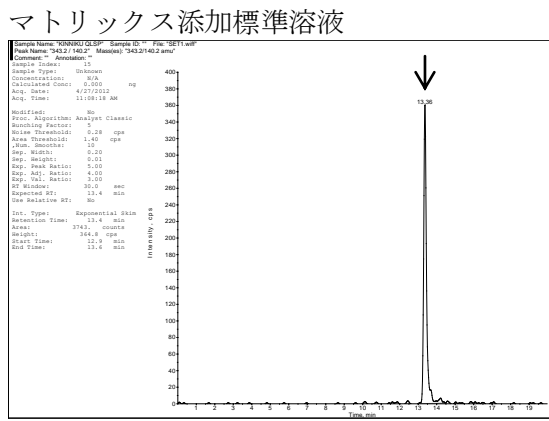
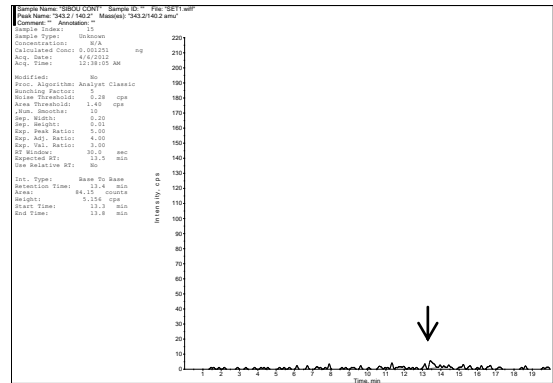
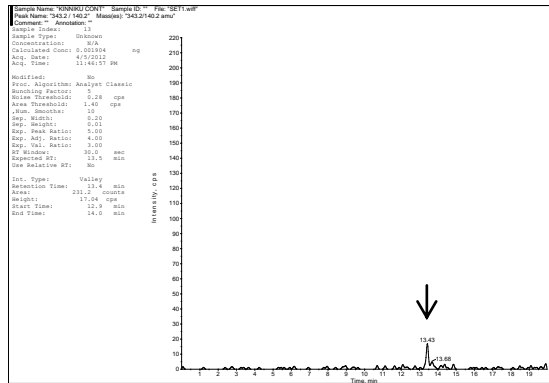
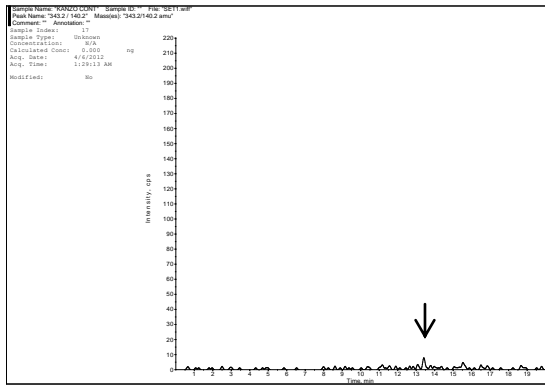


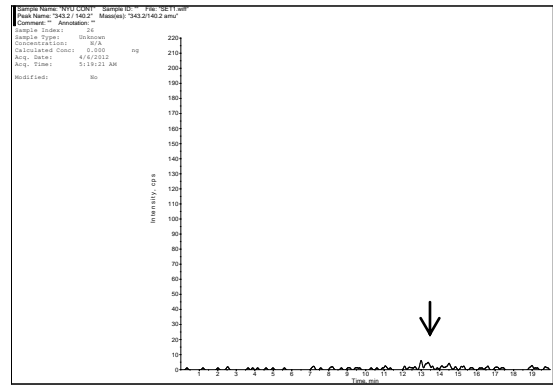
図 7-1 牛の筋肉の SRM クロマトグラム
ボスカリド ($m/z +343 \rightarrow 140$)
試料中 0.01 ppm 相当

図 7-2 牛の脂肪の SRM クロマトグラム
ボスカリド ($m/z +343 \rightarrow 140$)
試料中 0.01 ppm 相当

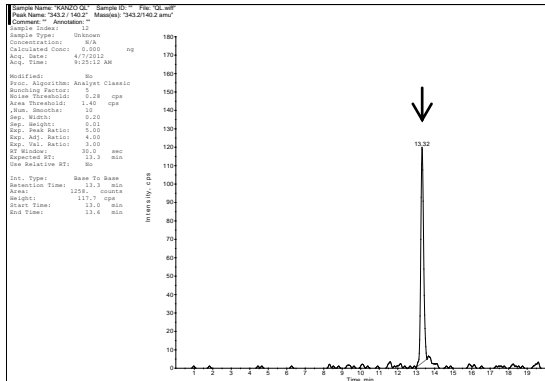
ブランク



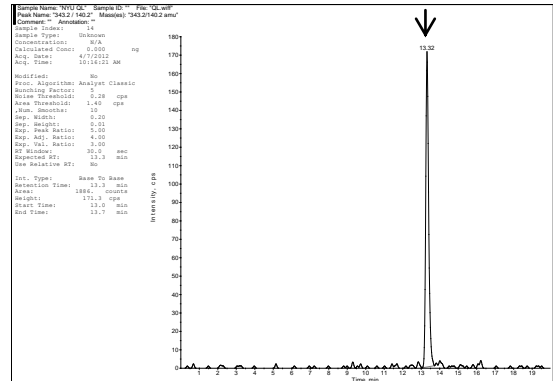
ブランク



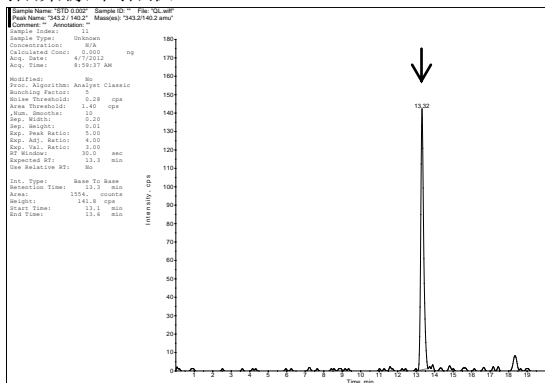
マトリックス添加標準溶液



マトリックス添加標準溶液



溶媒標準溶液



溶媒標準溶液

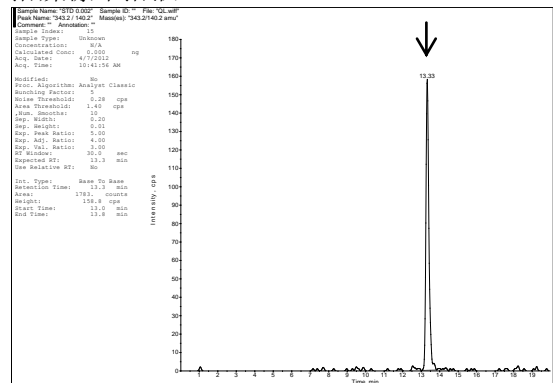
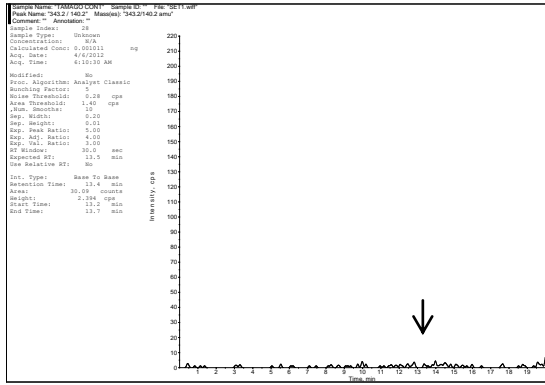


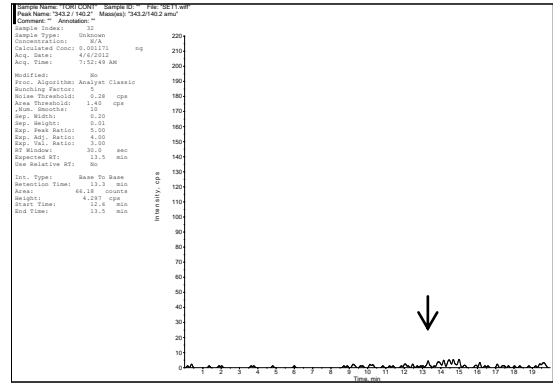
図 7-3 牛の肝臓の SRM クロマトグラム
 ボスカリド ($m/z +343 \rightarrow 140$)
 試料中 0.01 ppm 相当

図 7-4 牛乳の SRM クロマトグラム
 ボスカリド ($m/z +343 \rightarrow 140$)
 試料中 0.01 ppm 相当

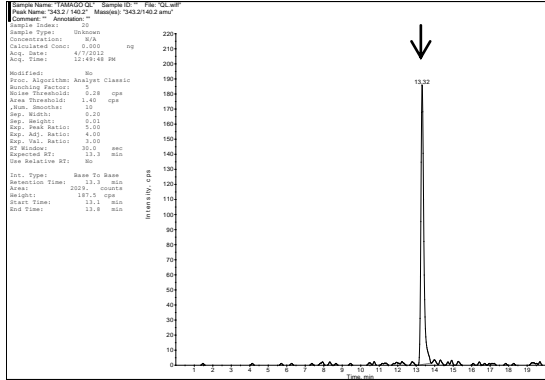
ブランク



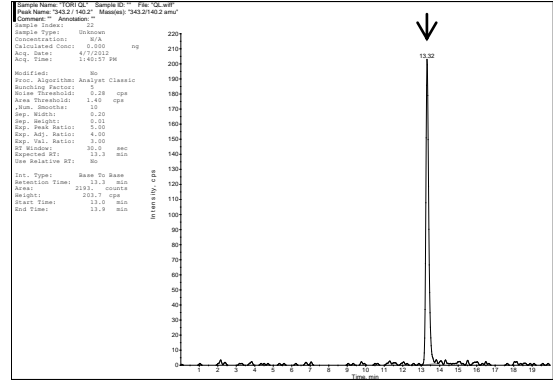
ブランク



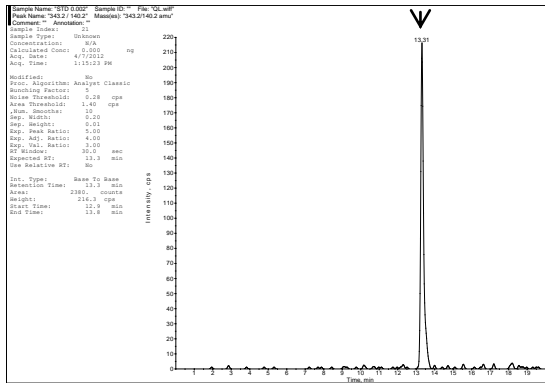
マトリックス添加標準溶液



マトリックス添加標準溶液



溶媒標準溶液



溶媒標準溶液

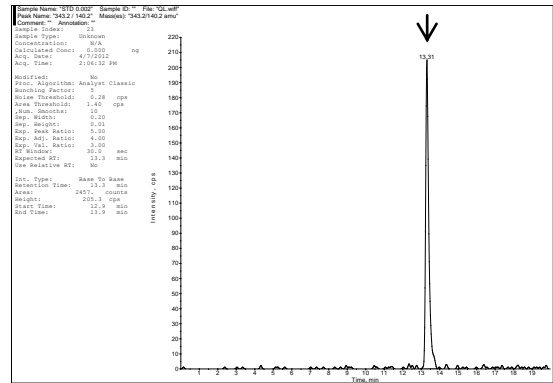
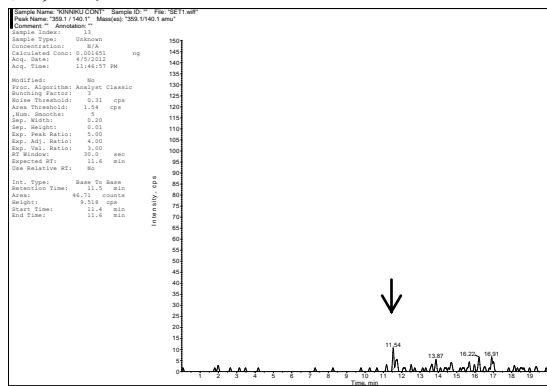


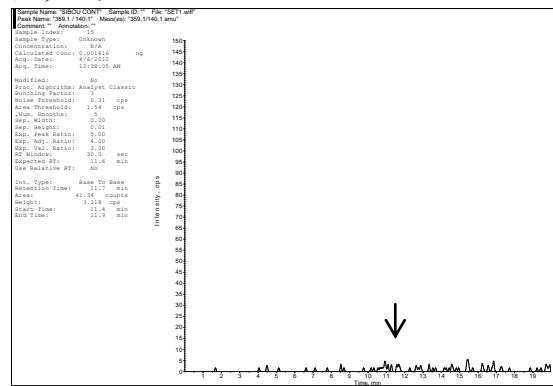
図 7-5 鶏卵の SRM クロマトグラム
 ボスカリド ($m/z +343 \rightarrow 140$)
 試料中 0.01 ppm 相当

図 7-6 鶏の筋肉の SRM クロマトグラム
 ボスカリド ($m/z +343 \rightarrow 140$)
 試料中 0.01 ppm 相当

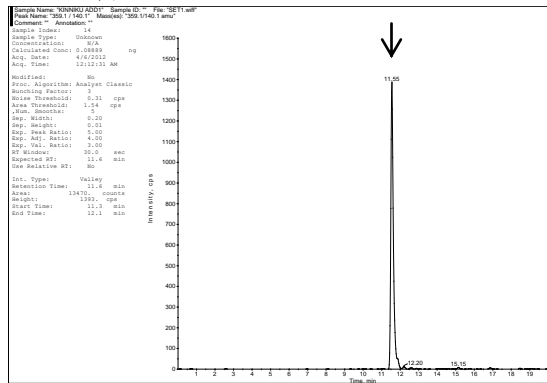
代謝物Bの添加回収試験におけるクロマトグラム
ブランク



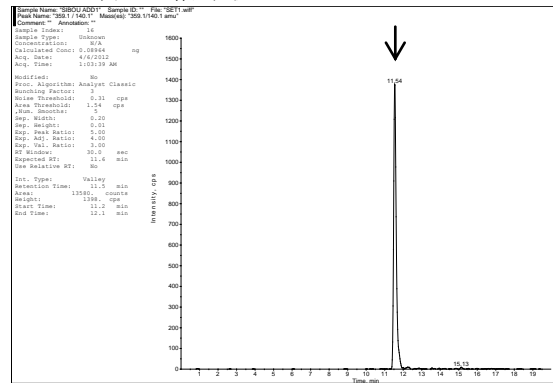
ブランク



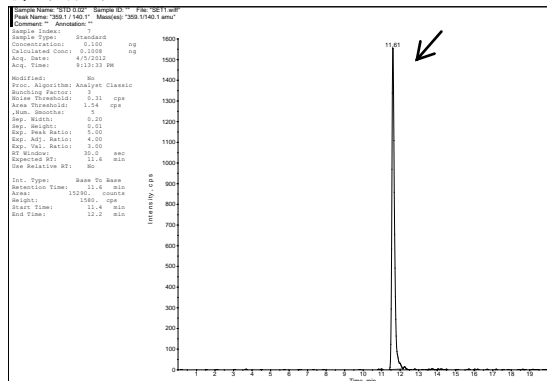
添加試料



添加試料 3倍希釈



標準溶液



標準溶液

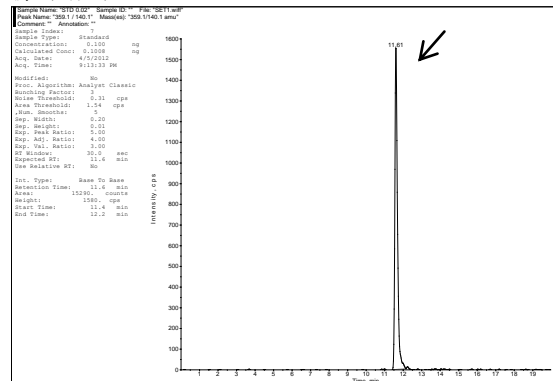
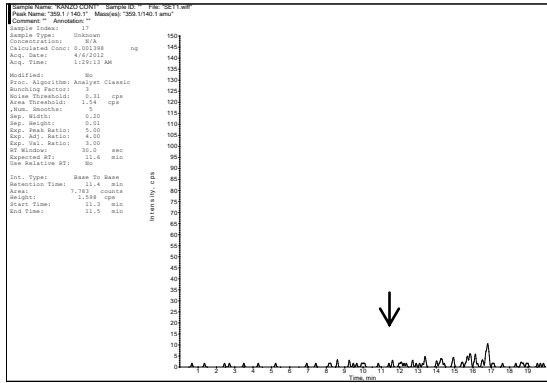


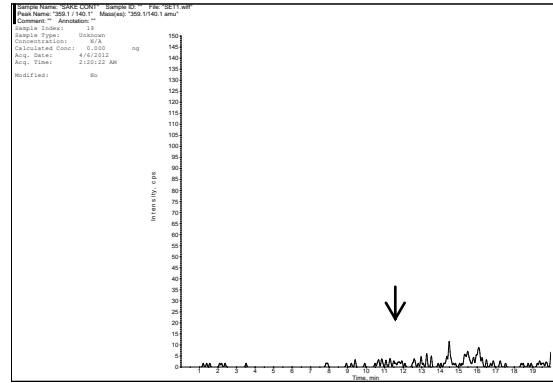
図 8-1 牛の筋肉の SRM クロマトグラム
代謝物 B ($m/z + 359 \rightarrow 140$)
添加濃度 : 0.1 ppm

図 8-2 牛の脂肪の SRM クロマトグラム
代謝物 B ($m/z + 359 \rightarrow 140$)
添加濃度 : 0.3 ppm

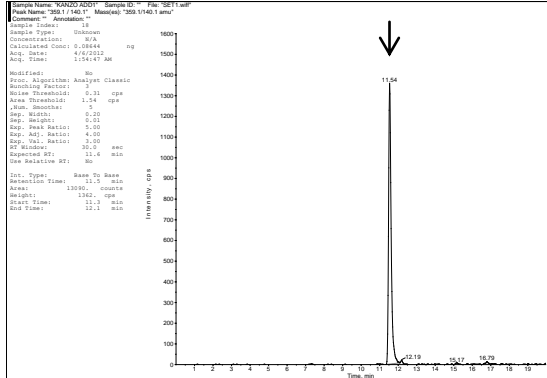
ブランク



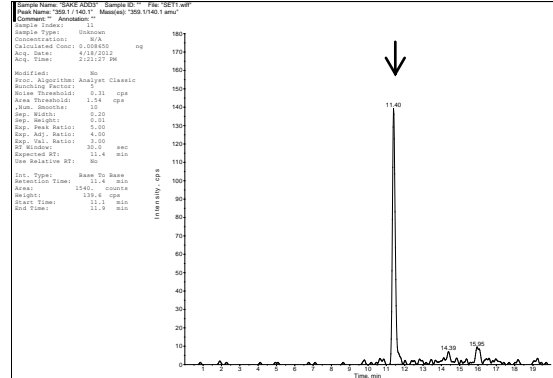
ブランク



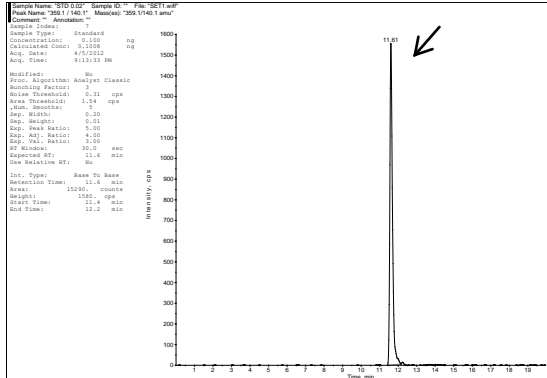
添加試料 3.5 倍希釈



添加試料



標準溶液



標準溶液

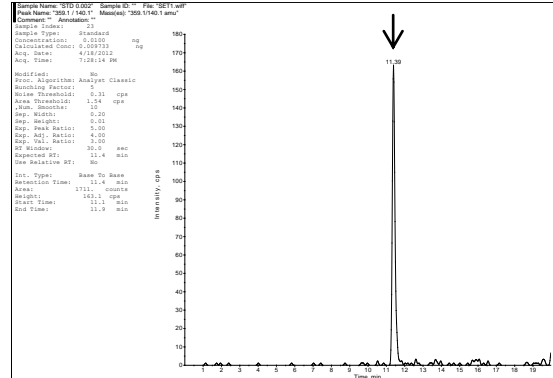
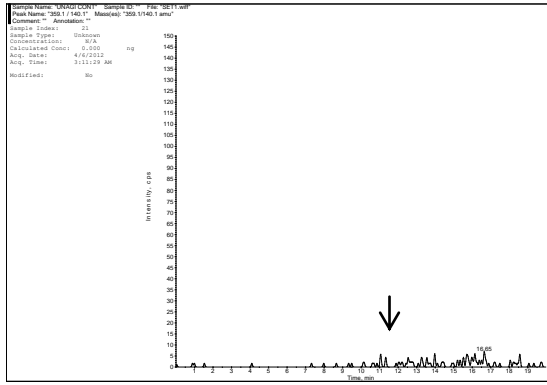


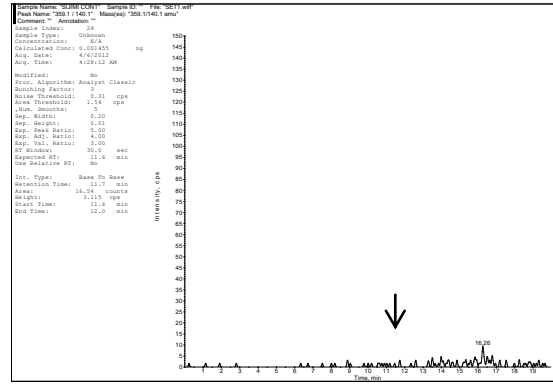
図 8-3 牛の肝臓の SRM クロマトグラム
代謝物 B ($m/z +359 \rightarrow 140$)
添加濃度 : 0.35 ppm

図 8-4 さけの SRM クロマトグラム
代謝物 B ($m/z +359 \rightarrow 140$)
添加濃度 : 0.01 ppm

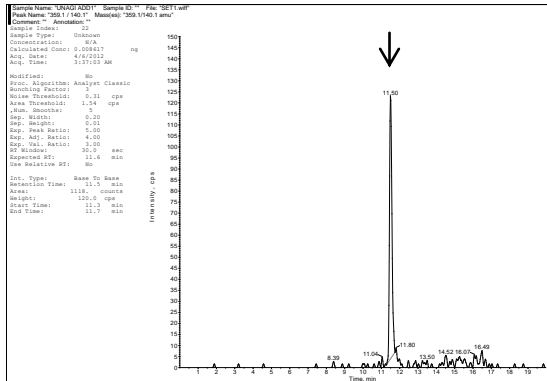
ブランク



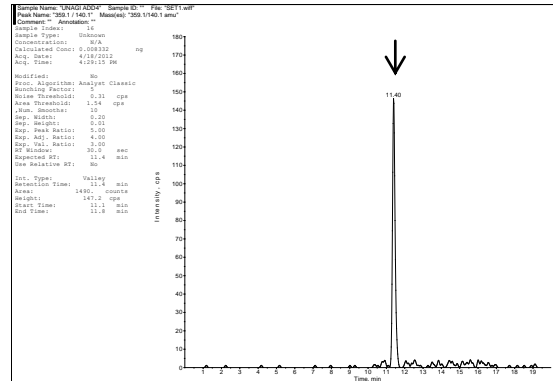
ブランク



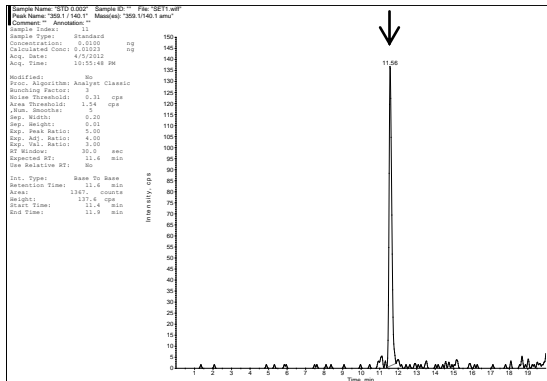
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

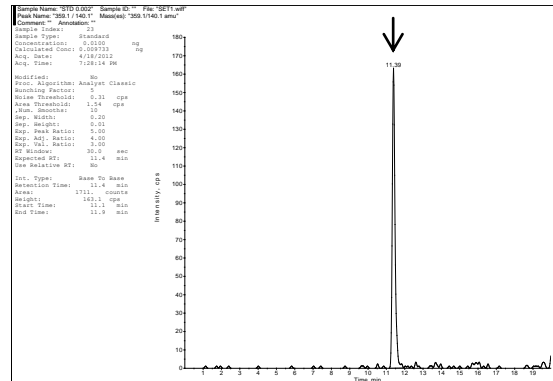
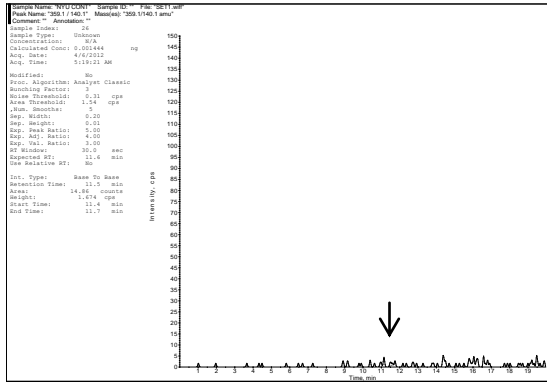


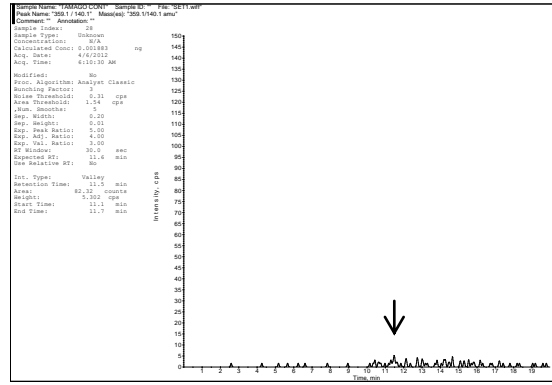
図 8-5 うなぎの SRM クロマトグラム
 代謝物 B ($m/z +359 \rightarrow 140$)
 添加濃度 : 0.01 ppm

図 8-6 しじみの SRM クロマトグラム
 代謝物 B ($m/z +359 \rightarrow 140$)
 添加濃度 : 0.01 ppm

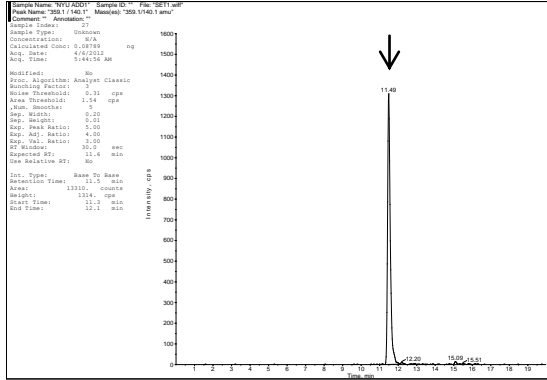
ブランク



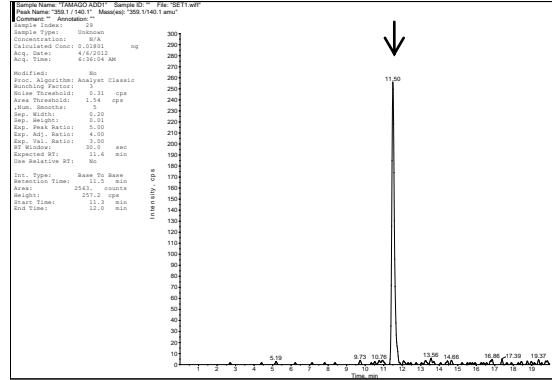
ブランク



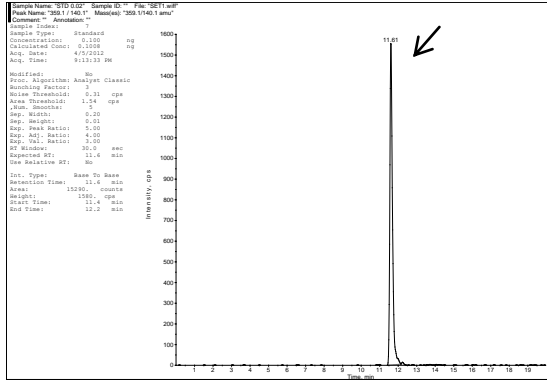
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

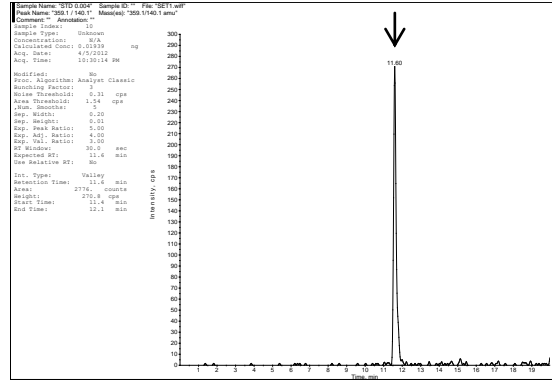
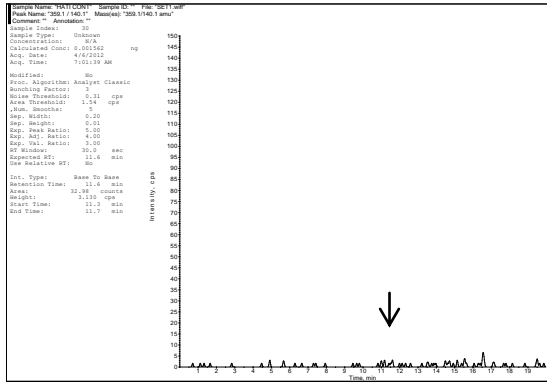


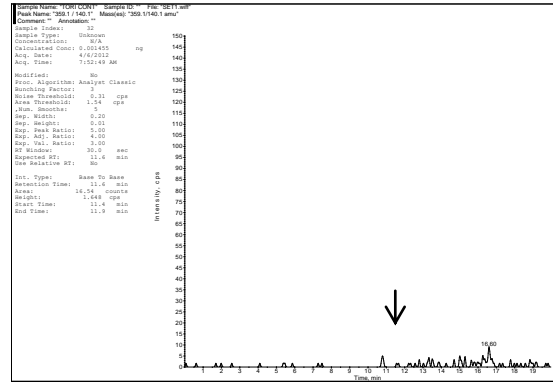
図 8-7 牛乳の SRM クロマトグラム
 代謝物 B ($m/z +359 \rightarrow 140$)
 添加濃度 : 0.1 ppm

図 8-8 鶏卵の SRM クロマトグラム
 代謝物 B ($m/z +359 \rightarrow 140$)
 添加濃度 : 0.02 ppm

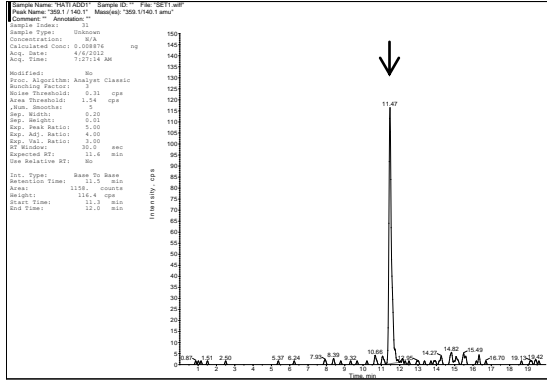
ブランク



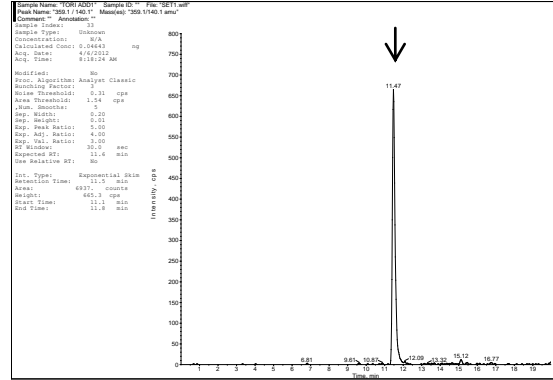
ブランク



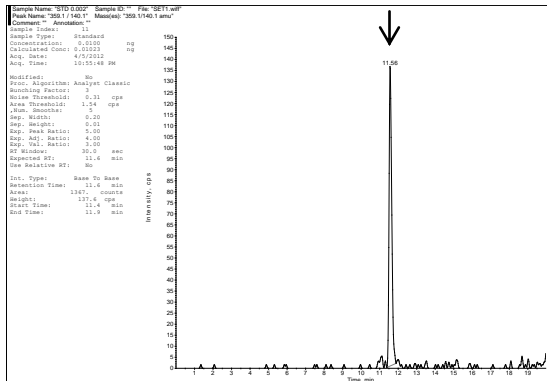
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

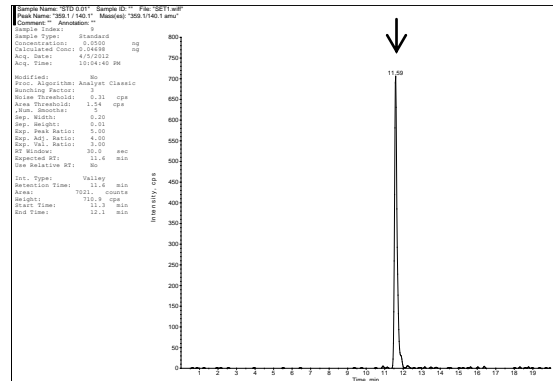
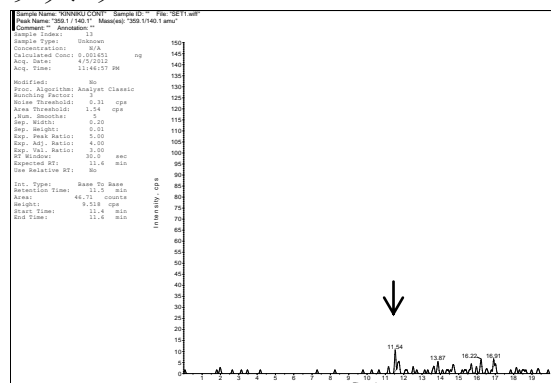


図 8-9 はちみつの SRM クロマトグラム
 代謝物 B ($m/z +359 \rightarrow 140$)
 添加濃度 : 0.01 ppm

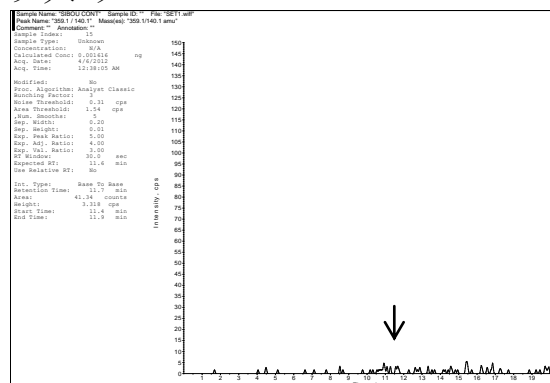
図 8-10 鶏の筋肉の SRM クロマトグラム
 代謝物 B ($m/z +359 \rightarrow 140$)
 添加濃度 : 0.05 ppm

代謝物Bの定量限界の推定におけるクロマトグラム

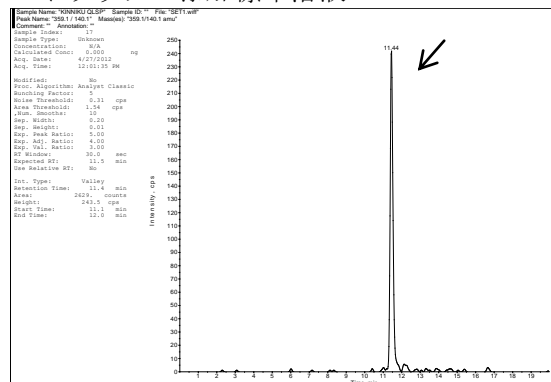
ブランク



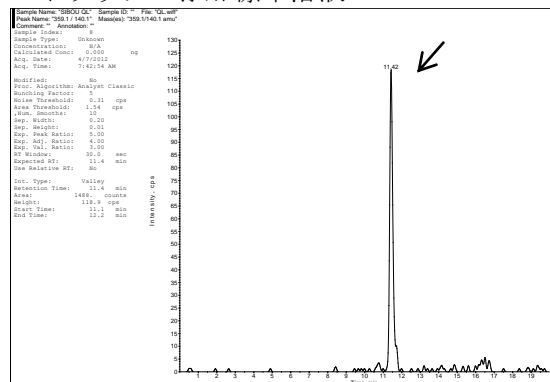
ブランク



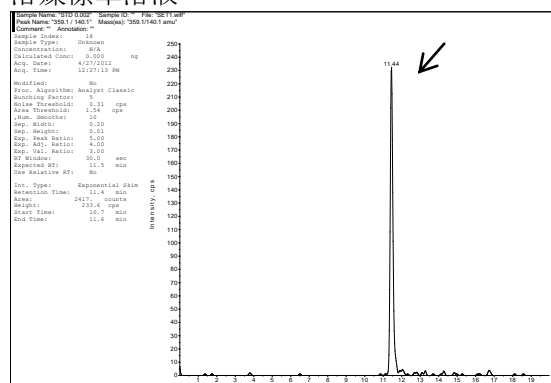
マトリックス添加標準溶液



マトリックス添加標準溶液



溶媒標準溶液



溶媒標準溶液

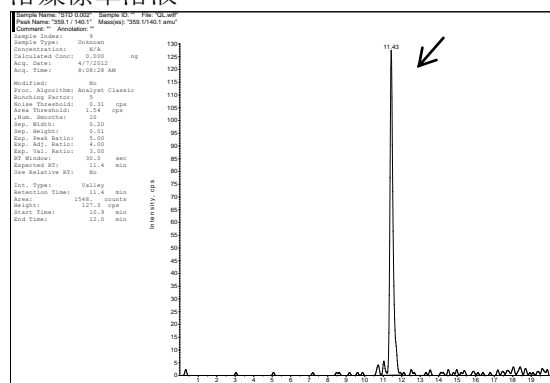
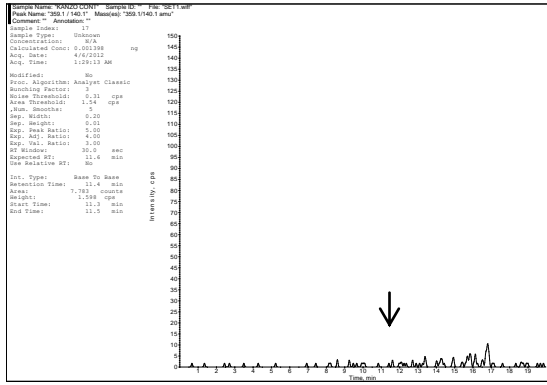


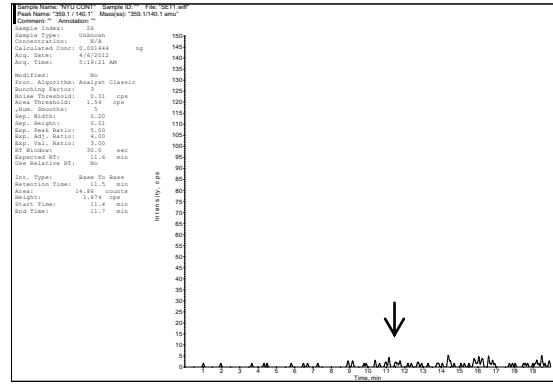
図 9-1 牛の筋肉の SRM クロマトグラム
 代謝物 B ($m/z + 359 \rightarrow 140$)
 試料中 0.01 ppm 相当

図 9-2 牛の脂肪の SRM クロマトグラム
 代謝物 B ($m/z + 359 \rightarrow 140$)
 試料中 0.01 ppm 相当

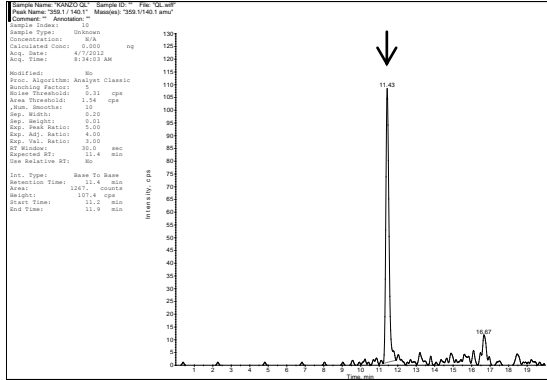
ブランク



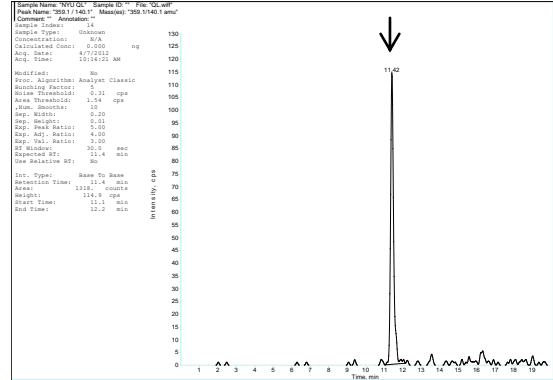
ブランク



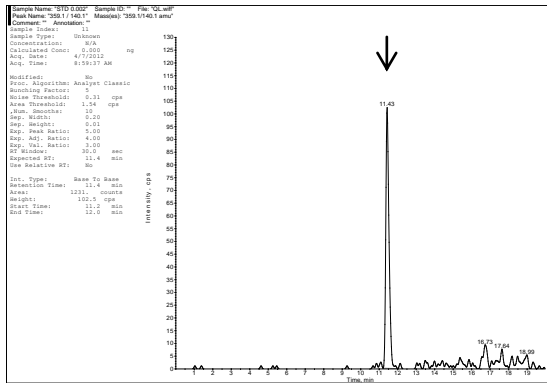
マトリックス添加標準溶液



マトリックス添加標準溶液



溶媒標準溶液



溶媒標準溶液

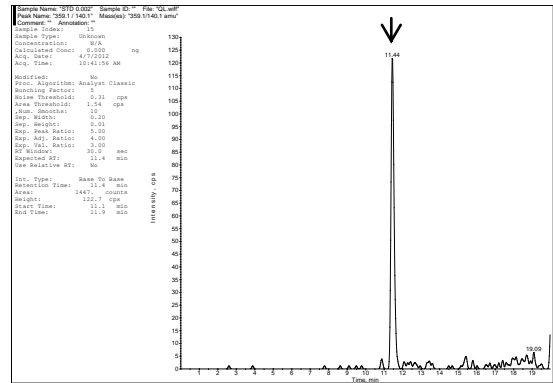
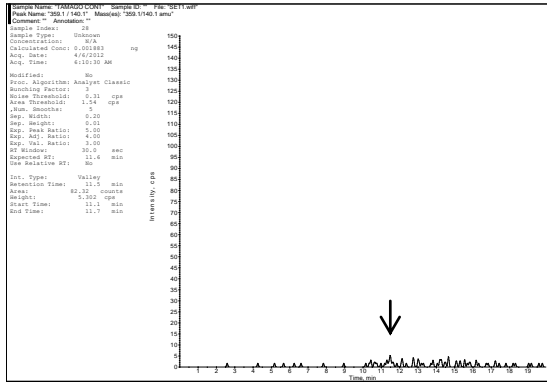


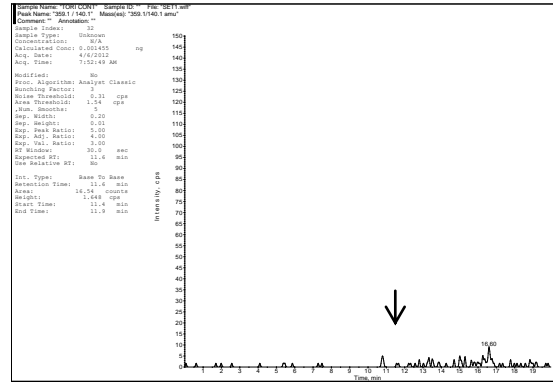
図 9-3 牛の肝臓の SRM クロマトグラム
 代謝物 B ($m/z +359 \rightarrow 140$)
 試料中 0.01 ppm 相当

図 9-4 牛乳の SRM クロマトグラム
 代謝物 B ($m/z +359 \rightarrow 140$)
 試料中 0.01 ppm 相当

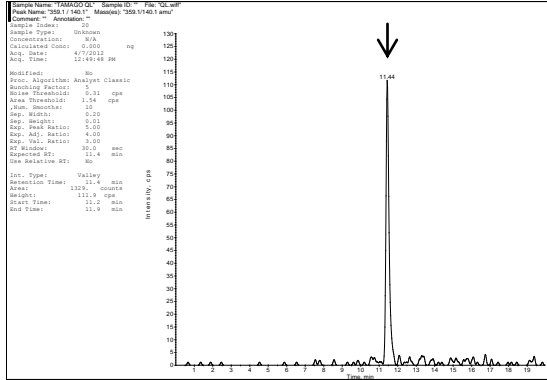
ブランク



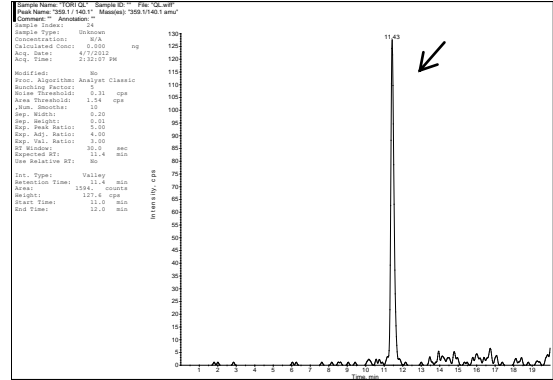
ブランク



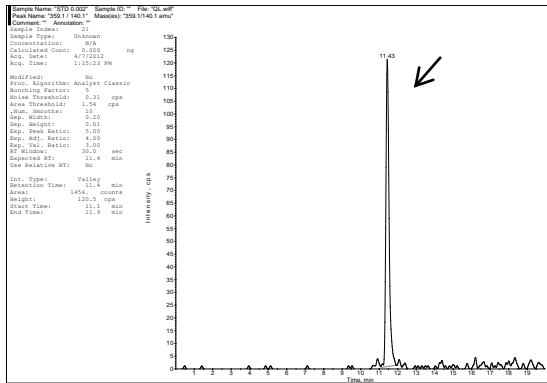
マトリックス添加標準溶液



マトリックス添加標準溶液



溶媒標準溶液



溶媒標準溶液

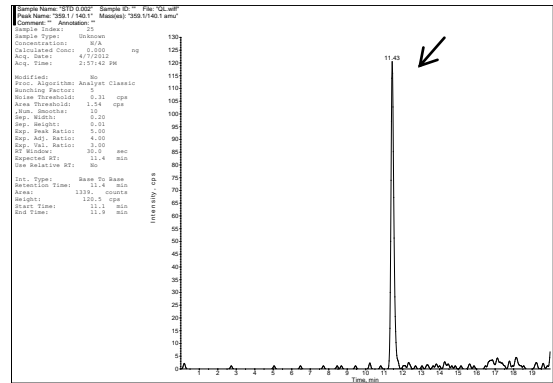
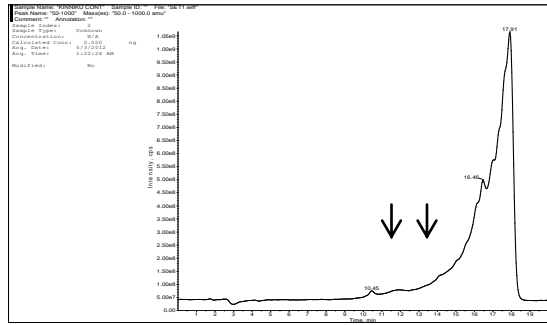


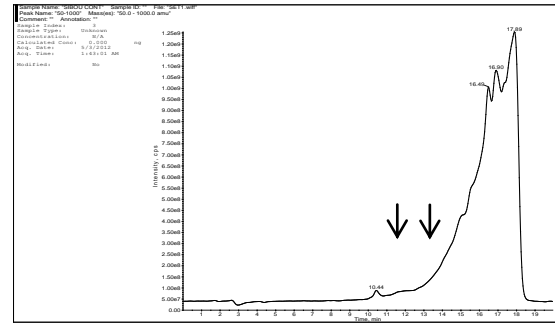
図 9-5 鶏卵の SRM クロマトグラム
 代謝物 B ($m/z +359 \rightarrow 140$)
 試料中 0.01 ppm 相当

図 9-6 鶏の筋肉の SRM クロマトグラム
 代謝物 B ($m/z +359 \rightarrow 140$)
 試料中 0.01 ppm 相当

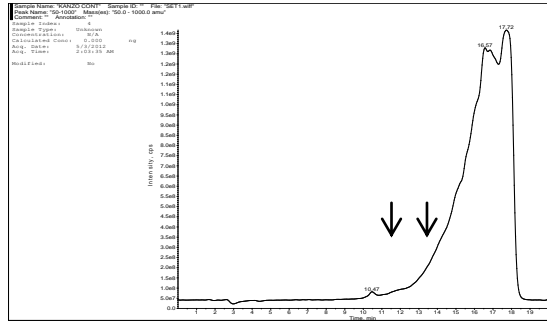
牛の筋肉



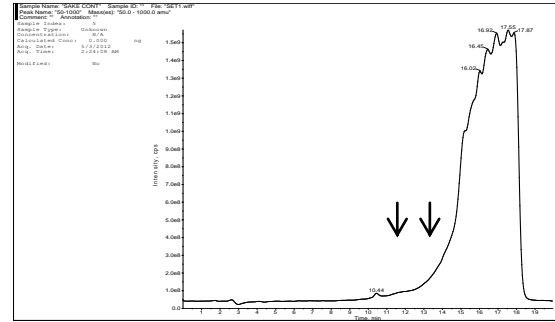
牛の脂肪



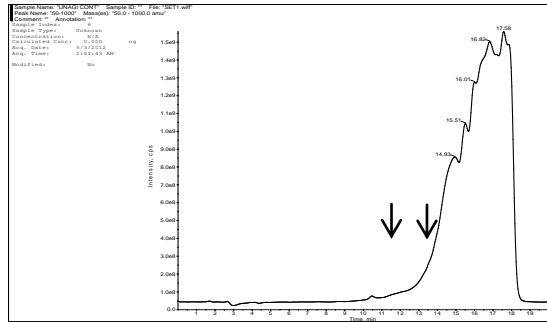
牛の肝臓



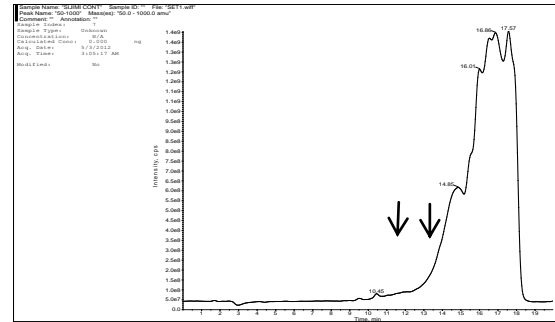
さけ



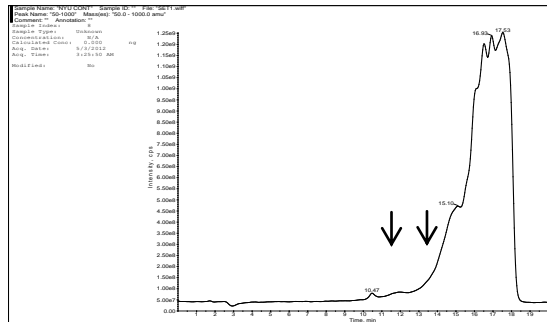
うなぎ



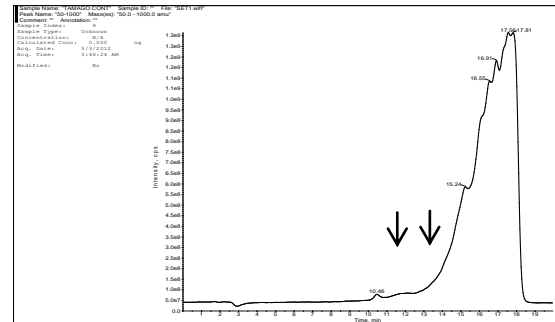
しじみ



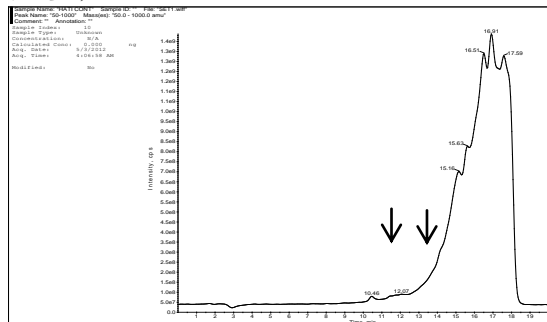
牛乳



鶏卵



はちみつ



鶏の筋肉

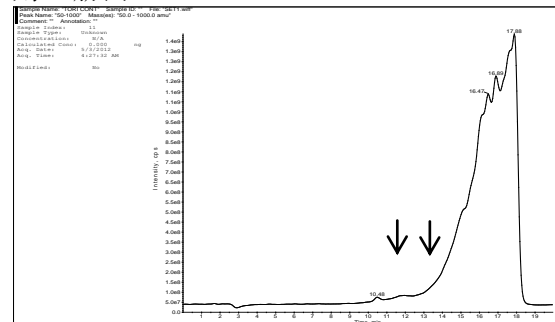


図 10 ブランク試料のトータルイオンクロマトグラム (スキャン範囲 : 50~1000 m/z)