

※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22年度

食品に残留する農薬等の成分である物質の
試験法開発事業・検討結果報告

(農薬：ハロスルフロンメチル)

ハロスルフロンメチル試験法（畜水産物）の検討結果

[緒言]

ハロスルフロンメチルはピラゾール環を分子構造中に有するスルホニルウレア系除草剤である。とうもろこし、稲、大麦、サトウキビ、芝等のイネ科植物に高い選択性を示す。とうもろこし栽培地域で問題となる広葉雑草及びカヤツリグサ科雑草に対して、極めて低薬量で高い除草効果を発揮することなどが確認されている。わが国では1995年から農薬登録されており、海外では米国、オーストラリア及びニュージーランドで農薬登録されている。

ハロスルフロンメチルの物理化学的性状¹⁾は、白色の粉末、無臭で、融点 175~178°C、蒸気圧 1.33×10^{-5} Pa 未満 (25±1°C)、解離定数 (pKa) 3.4 (22.4°C)、オクタノール/水分配係数 (log Pow) -0.0186 (pH 7, 22.8°C) である。水及び n-ヘキサンにはほとんど溶けず、トルエン、メタノール及びアセトニトリルには溶けにくい。アセトン及び酢酸エチルにはやや溶けにくく、ジクロロメタンにはやや溶けやすい。

ハロスルフロンメチルの構造を **Fig.1** に示す。

ハロスルフロンメチルの分析法としてこれまでに、農産物中の「アジムスルフロン、ハロスルフロンメチル及びフラザスルフロン試験法」の個別分析法が厚生労働省から通知されているが、畜水産物を対象としたものは通知されていない。そのほか、畜水産物を対象とした分析法の報告もない。

これまでに本検討会においても「LC/MS による農薬等の一斉試験法（畜水産物）」の適用が可能であるかの検討がなされているが、概ね 50%程度の回収率と報告されている。そこで、本検討では個別分析法及び一斉試験法を参考に LC-MS 及び LC-MS/MS を用いた分析法を検討した。

[実験方法]

1. 試料

試料は埼玉県内で市販されていた 1)牛筋肉、2)牛脂、3)牛肝臓、4)牛乳、5)さけ、6)うなぎ、7)しじみ、8)鶏卵、9)はちみつ（そば蜜）及びと畜場で入手した 10)牛腎臓を用いた。

各食品の試料採取の方法を以下に示した。

- 1) 牛筋肉：可能な限り脂肪層を除き、細切均一化した。
- 2) 牛脂：可能な限り筋肉層を除き、細切均一化した。
- 3) 牛肝臓：全体を細切均一化した。
- 4) 牛乳：全体をよく混合して均一化した。
- 5) さけ：可食部（皮を含む）を細切均一化した。

- 6) うなぎ：活鰻を使用し，頭を除いた可食部（内臓、骨及び皮を含む）を細切均一化した。
- 7) しじみ：殻を除去し，細切均一化した。
- 8) 鶏卵：殻を除去し，卵白と卵黄を合わせてよく混合し均一化した。
- 9) はちみつ：そば密を使用し，よく混合して均一化した。
- 10) 牛腎臓：細切均一化した。

2. 試薬

標準品：ハロスルフロンメチルは和光純薬工業社製，純度 99%のものを使用した。

標準原液：標準品 50 mg を精秤し，メタノールに溶解して 50 mL としたものを標準原液とした。

アセトニトリル，メタノール及び蒸留水は高速液体クロマトグラフィー用を，*n*-ヘキサン及びアセトンは残留農薬試験用を，その他の試薬はすべて特級品を用いた。精製用固相抽出カートリッジには InertSep SAX (500 mg) (GL Sciences 社製) を用いた。あらかじめメタノール-アセトン (1:1) 及びアセトン-*n*-ヘキサン (3:1) 各 10 mL で順次，コンディショニングして使用した。

3. 装置

高速液体クロマトグラフは Waters 社製 Acquity，質量分析装置は Waters 社製 Xevo TQ，フォトダイオードアレイ検出器は Waters 社製 2996 を用いた。

4. 測定条件

分析カラムに L-column ODS (2.1×100 mm，粒子径 3 μm) ((財) 化学物質評価研究機構製) を用いた。検出には MS 検出器及びフォトダイオードアレイ検出器 (測定波長は 200~400 nm) を用いて検討した。MS 検出は MRM (Multiple Reaction Monitoring) モード及び SIM (Selected Ion Monitoring) モードで測定した。

LC-MS(MS)の測定条件を Table 1 及び Table 2 示す。

5. 定量

ハロスルフロンメチル標準原液をメタノールで希釈し，0.0002~0.040 μg/mL の標準溶液を調製した。MRM 測定にあつては 0.0002~0.040 μg/mL の濃度範囲で 2 μL を LC-MS/MS に注入した。SIM 測定にあつては 0.001~0.040 μg/mL の濃度範囲で 10 μL を LC-MS に注入した。それぞれ得られたクロマトグラムからハロスルフロンメチルのピーク面積を求め，絶対検量線法で検量線を作成した。

6. 試験溶液の調製

1) 抽出

200 mL 容のポリプロピレン製フタ付き容器に、脂肪以外の試料は 10.0 g を、脂肪試料は 5.00 g を量り採り、アセトン-ヘキサン (1:2) 混液 50 mL, 0.1 mol/L 塩酸 6 mL 及び塩化ナトリウム 8 g を加え、ホモジナイズし、200 rpm/分で 3 分間振とうした。毎分 3,500 回転で 5 分間遠心分離し、上層のアセトン-ヘキサン層を採取した。下層のアセトン-水層及び残渣にヘキサン 50 mL を加え、200 rpm/分で 3 分間振とうした後、毎分 3,500 回転で 5 分間遠心分離した。上層を先のアセトン-ヘキサン層に合わせ、アセトン-ヘキサン (1:2) 混液で 100 mL に定容した。脂肪以外の試料についてはその液の 10 mL (1 g 分) を、脂肪試料は 20 mL (1 g 分) を採取し、40°C 以下で減圧濃縮し、溶媒を除去した。残留物に *n*-ヘキサン 20 mL を加え、50 mL 容のポリプロピレンチューブに移した。*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 20 mL を加え、3 分間、振とう抽出した。3,500 回転で 5 分間遠心分離し、アセトニトリル層を採取した後、40°C 以下で減圧濃縮し、溶媒を除去した。残留物にアセトン-ヘキサン (3:1) 混液 5 mL を加えて超音波溶解した。

2) 精製

あらかじめコンディショニングした InertSep SAX (500 mg) に 1) で得られた溶液を注入した後、アセトン-ヘキサン (3:1) 混液 10 mL で洗浄し、アセトン-メタノール (1:1) 混液 10 mL で溶出した。溶出液を 40°C 以下で減圧濃縮し、溶媒を除去した。残留物をメタノールに溶解し、正確に 5 mL としたものを試験溶液とした。

試験溶液調製法の概略を Fig.2 に示す。

7. マトリックスの測定値への影響及び S/N 比の検討

1) マトリックス溶液 (ブランク 2 倍溶液) の調製

ハロスルフロメチルが含有されていないことを確認した試料を 6 に示した「試験溶液の調製法」に従って試験溶液を作製した。最後に溶解するメタノール量を半量の 2.5 mL とし、ブランク 2 倍溶液を作製した。

2) マトリックスの測定値への影響の検討

添加回収試験での最終試験溶液濃度の 2 倍濃度に相当する標準液 2.5 mL を調製したブランク 2 倍溶液に添加し、マトリックス添加標準溶液を作製した (添加回収試験での 100% 回収率に相当する濃度)。溶媒標準溶液とのピーク面積値と比較し、試料マトリックスの測定値への影響を検討した。

3) S/N 比の検討

MRM 測定では定量下限値濃度の 1/10 濃度 (試料中 0.001 mg/kg)、SIM 測定では 1/2 濃度 (試料中 0.005 mg/kg) に相当する濃度の 2 倍濃度の標準溶液 2.5 mL を調製したブランク 2 倍溶液 2.5 mL に添加した。試料マトリックス存在下における S/N 比を検討した。

[結果及び考察]

1. 測定条件の検討

1) LC, UV, MS(MS)条件の検討

1-1) LC 条件の検討

これまでに報告されているハロスルフロメチル分析法の LC 条件²⁻⁵⁾ はいずれもシリカベースの逆相系のカラム (C18 及び C8) を用いている。これらの報告で良好な結果が得られているので、本検討でもシリカベースの逆相系カラムについて、ピーク形状や MS 検出で感度が良好なカラムを検討した。L-column ODS 及び L-column ODS 2 ((財) 化学物質評価研究機構製), Cadenza (Imtakt 社製), Atlantis T3, Symmetry 及び Xbridge (Waters 社製), Mightysil-RP18 (関東化学 (株) 製) の内径 2~2.1 mm, 長さ 100 mm のカラムについて検討したところ, すべてのカラムで概ね良好な結果が得られたが, 中でも最も MS の感度が高かった L-column ODS を本検討では用いることとした。移動相については, 添加剤を含まない水-有機溶媒系ではハロスルフロメチルは分析カラムに吸着し, 溶出しなかった。そこで, カラムからの溶出及びイオン化の促進のために添加剤を移動相へ加え, 検討した。

ギ酸と酢酸について検討したところ, 両者ともに, ハロスルフロメチルを分析カラムから溶出できた。酢酸の方が MS 検出で良好な感度が得られ, かつ, その至適濃度は 0.01 vol%であった。次に, アンモニウム塩について検討した。10 mM 濃度の酢酸アンモニウムを添加したところ, ポジティブモード測定では感度に影響はなかったが, ネガティブモード測定では感度が 1/2~1/4 へと低下した。メタノールとアセトニトリルを比較したところ, アセトニトリルの方がシャープなピーク形状が得られたが, ネガティブモード測定で, メタノールの方が感度面でアセトニトリルよりも約 2 倍程度優れていた。さらに, グラジェント溶出を採用することにより, ピークがシャープになり, S/N 比が向上した。そこで, 移動相には 0.0 1vol%酢酸含有水-メタノール系のグラジェント溶出にて行うこととした。SIM 測定において, 同様の条件で測定したところ, *m/z* 433 及び 435 のモニターイオンでベースラインが上昇する傾向が認められた。さらに, SIM 測定で必要な感度を得るために, 注入量は MRM 測定の 5 倍量 (10 µL) を注入する必要がある。本検討では最終試験溶液の組成をメタノール 100%としている。グラジェント溶出で水の割合が高い移動相に, メタノール 100%の試験溶液を多量に注入したところ, 分析カラムの入り口側先端での拡散作用により, ピーク幅の広がりが認められた。また, 保持時間の変動, 分析カラム内での不溶性物質の析出等の可能性が考えられたことから, SIM 測定においては 0.01 vol%酢酸含有水-メタノール系 (2:8) のアイソクラティック溶出で行うこととした。以上の検討結果から, 表 1 及び 2 の LC 測定条件とした。

本条件により標準溶液 0.02 µg/mL を 5 回測定した場合の保持時間の再現性を検証し

たところ、グラジエント溶出及びアイソクラティック溶出ともに平均保持時間に対する相対標準偏差は2%以内であった。

1-2) 検出条件の検討

1-2-1) UV 条件

フォトダイオードアレイ検出器により得られたハロスルフロメチルのUVスペクトルを図3に示す。表1に示したLC条件で標準溶液0.1 µg/mLを測定したところ、保持時間5.4分にハロスルフロメチルを検出した。しかし、UV検出では一律基準値(0.01 µg/g)を検出するのに十分な感度は得られないことから、以降の検討はMS検出器により行うこととした (Fig.3)。

1-2-2) MS 条件

ハロスルフロメチルはポジティブモード及びネガティブモード両方のモードで測定が可能であった。それぞれのモードにおけるコーン電圧40Vで測定したマススペクトルを Fig.4 及び Fig.5 に示す。

ポジティブモードではプロトン付加分子の[M+H]⁺の m/z 435 及び塩素原子同位体由来のイオン m/z 437 が感度良く検出された。そのほか m/z 182, 316 及び 403 がフラグメントイオンとして検出された。ネガティブモードでは脱プロトン化分子の[M-H]⁻である m/z 433 及び塩素原子同位体由来のイオン m/z 435 が感度良く検出された。そのほか m/z 252 及び 254 が主なフラグメントイオンとして検出された。ポジティブモードとネガティブモードでの感度を比較するとポジティブモードの方が良好であったが、S/N比はネガティブモードの方が良好だったことから、本検討ではネガティブモードを採用した。それぞれのフラグメントイオンに最適なコーン電圧を表1のとおり設定した。定量用イオンとして最もイオン強度の高い m/z 252 を採用した。そのほか確認用イオンとして m/z 433, 435 及び 254 をモニターした。しかし、はちみつ試料の分析においては m/z 435 で夾雑ピークが出現し、確認が困難であったことから m/z 435 は確認イオンとして採用しなかった (後述)。

1-2-3) MS/MS 条件

MRM (Multiple Reaction Monitoring) モード測定条件について脱プロトン化分子[M-H]⁻をプリカーサーイオンとして、衝突誘起解離によって得られる m/z 433→252 を定量イオンに、塩素原子由来の同位体イオン m/z 435→254 を定性イオンに採用した。それぞれのモニターイオンに最適な条件を表2のとおり設定した。Fig.6に m/z 433 及び 435 のプロダクトイオンスキャンの結果を示す。

2) 検量線

各定量用イオンのピーク面積値を用いて、絶対検量線を作成した。0.0002 (MRM 測

定), 0.001 (SIM 測定) ~0.04 µg/mL の範囲で 6 点の濃度で検量線を作成した. 異なる 10 日間で作成した検量線は良好な直線性が得られた (SIM 測定: $r^2=0.996\sim0.999$, MRM 測定: $r^2=0.990\sim0.999$). 代表的な検量線を Fig.7 に示す.

3) 定量限界

本法による定量下限値は 0.01 mg/kg であった.

2. 前処理法の検討

2-1 抽出溶媒の検討

初めに抽出溶媒について検討した. 脂質と分析対象としているハロスルフロメチルを同時に抽出できる溶媒と考えられるアセトン, 酢酸エチル及びアセトン-ヘキサン (1:2) 混液について検討した. アセトンについて検討したところ, 添加回収試験では良好な回収率が得られたが, 畜水産物のような脂質を多く含む試料においては, 脂質が抽出溶媒中に均一に溶解しない現象が観察された. 抽出液を採取するために吸引ろ過により, ろ液と残渣とに分ける際, ろ液が減圧下, 低温になると, 牛脂や乳試料において溶解しきれない脂質が浮遊物となって抽出ろ液中に析出した. また, それは一度, 超音波処理によって溶解した後も時間経過とともに再析出する傾向にあった.

次に, 平成 20 年 3 月 7 日厚生労働省医薬食品局食品安全部審査課から通知された事務連絡「食品中に残留する有機リン系農薬に係る試験法について」で採用されている無水硫酸ナトリウム存在下酢酸エチルで抽出する方法を検討した. 牛脂等に含まれる脂質は均一に溶解したが, 乳を対象試料に検討したところ, MS 測定において約 20%程度のイオン化抑制が観察された.

次に, 「LC/MS による農薬等の一斉分析法 (畜水産物)」で採用されているアセトン-ヘキサン (1:2) 混液について検討した. 一斉試験法では試料 20 g に対し, 抽出溶媒のアセトン-ヘキサン (1:2) 混液 100 mL, 水 20 mL を同時に添加し, 抽出している. 本検討では試料量を半量の 10 g としたことから抽出溶媒も半量の 50 mL, 水 10 mL とした. ホモジナイズ抽出, 遠心分離により上層の抽出液を得た. この条件で回収率を検討したところ約 30%程度の回収率であった. 一斉試験法では *n*-ヘキサンを用いて再度, 抽出していることから, 1 回目の抽出で得られた下層及び残渣に 50 mL の *n*-ヘキサンを添加し, 再抽出したところ, さらに 20%程度回収され, 合わせて約 50%程度と低い回収率であった.

ハロスルフロメチルは下層のアセトン-水層に分配しているか, あるいは試料に吸着していることが考えられたことから, 塩析効果によるヘキサン-アセトン層への抽出効率の改善を試みた. すなわち, 抽出時に添加する水の量を 6 mL とし, 最も水分含有量の多い試料である牛乳においても飽和になるように, 塩化ナトリウム 8 g を添加した. 牛乳を対象試料として検討したところ, 1 回目の抽出で約 90%, 2 回目の抽出で 8%の

ハロスルフロンメチルが回収された。また、遠心分離操作の際のエマルジョンや上層と下層の分離状態も塩を加えることにより、改善された。そこで、抽出時には水 6 mL 及び塩化ナトリウムを 8 g 添加することとした。

しかし、この抽出条件によっても鶏卵を対象試料とした際には、40%程度の回収率であった。そこで、抽出時に水に換えて、0.1 mol/L 塩酸を添加することによって酸性化合物であるハロスルフロンメチルの有機層への効率的な抽出を図った。その結果、回収率は約 85%へと改善された。

2-2 脱脂方法の検討

次に脱脂方法についてアセトニトリル/ヘキサン分配の溶媒量及び回数を検討した。実施要領では *n*-ヘキサン 30 mL に対して *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL で 3 回抽出することになっている。先の抽出液を一定量に定容し、その一部（試料 1 g 分）についてのみ精製操作を行うこととしたことから、使用する溶媒量の低減を図った。すなわちそれぞれ 20 mL を用いて脱脂操作を行った。1 回の分配操作でハロスルフロンメチルはアセトニトリル層にほぼ 100%回収されたことから、分配操作は脱脂効率を考慮し、1 回とした。なお、はちみつ試料ではその他の試料と同様にアセトニトリル/ヘキサン分配を取り入れた前処理法で添加回収試験を行ったが、脂質をほとんど含有しないことから省略することも可能であった。

2-3 固相抽出カートリッジによる精製方法の検討

固相抽出カートリッジによる精製方法について検討した。畜水産食品での分析妨害物質として脂質に次いで問題となる脂肪酸を除去することを目的として、陰イオン交換作用を持つ PSA (500 mg) (Supelco 社製), Supelclean LC-NH₂ (500 mg) (Supelco 社製), Bond Elut SAX (500 mg) (Varian 社製), と極性物質の保持力が高い Si (500 mg) (Waters 社製), また、ポリマーベースの逆相系カートリッジの BondElut Plexa (200 mg) (Varian 社製) 及び OASIS HLB (200 mg) (Waters 社製) についてそれぞれ適切な洗浄及び溶出溶媒を検討し、精製効果を検証した。Bond Elut Plexa 及び OASIS HLB の逆相系カートリッジでは SCAN 測定で得られたクロマトグラムには顕著な脂肪酸由来のピークは観察されなかったが、いずれのカートリッジにおいても約 10%程度のイオン化抑制作用が認められ、精製が不十分であると考えられた。また、それ以外のカートリッジではいずれも有効な精製効果が得られたが、中でも SAX を用いた時が最も良好な回収率を示し、かつイオン化抑制・増強作用が少なかったことから、本検討ではこれを採用した。

SAX の洗浄及び溶出溶媒は以下のとおり決定した。すなわち、試料（牛の脂肪）抽出液のアセトニトリル/ヘキサン分配操作後の残さにハロスルフロンメチル 100 μ g/mL 濃度の標準溶液（アセトン・ヘキサンの混液（1:1）液）を 0.1 mL 添加し（試料中濃度

として 10 μ g/mL 相当), アセトン-ヘキサンの混液 (1:1) 液 2 mL に溶解し, Bond Elut SAX (500 mg) に負荷後した. その, 順次, アセトン-ヘキサンの (1:1) 混液, (3:1) 混液, アセトン, メタノール-アセトンの (1:9) 混液, (1:1) 混液, (3:1) 混液及びメタノールをそれぞれ 10 mL, SAX に注入し, カートリッジからの溶出状況を検討した. 各画分からの溶出状況を表 3 に示す. アセトン溶液でハロスルフロメチルが一部, 溶出し始め, ほとんどがメタノール-アセトン混液 (1:9) で溶出した. しかし, 試料 (牛乳等) によっては, メタノール-アセトン混液 (1:9) の溶出では不十分であり, メタノール-アセトン混液 (1:1) での溶出が必要であった. そこで, 負荷液及び洗浄液にアセトン-*n*-ヘキサンの混液 (3:1) 10 mL を用い, 溶出液はメタノール-アセトン混液 (1:1) 10 mL とした.

精製固相カートリッジのメーカー及び製造ロットによる溶出状況等の違いについて, 牛乳を対象試料に添加回収率及びピーク形状等を比較検討した. 汎用されている Bond Elut SAX (500 mg) (Varian 社製) と InertSep SAX (500 mg) (GL Science 社製) について検討したところ, 0.01 ppm の添加濃度で回収率およびピーク形状についてはほぼ同様な結果が得られた. $n=3$ で行った平均回収率は Bond Elut SAX (500 mg) で 91%, InertSep SAX (500 mg) で 93%であった. また, それぞれ 2 つの製品のロット間 (2 つのロットについて検討) のバラツキも少なかった. 本検討では操作性を鑑み, 自然落下により溶出が可能な InertSep SAX (500 mg) を用いて回収率を求めた(表 3).

3. 選択性

SIM 測定において, はちみつ試料で確認イオンの m/z 435 にハロスルフロメチルの保持時間付近に妨害ピークが出現した. そこで, SIM 測定におけるモニターイオンとして m/z 252 を定量イオンに m/z 254 及び 433 を確認イオンに設定した. これら 3 モニターイオンにおけるクロマトグラム上にはいずれの試料においても, 妨害となるピークは観察されなかった.

MRM 測定においては, いずれの試料においても定量イオン及び確認イオンともに妨害となるピークは認められなかった (報告例 表 1-SIM, 1-MRM)。

4. 真度及び精度

わが国の食品衛生法では現在のところ, ハロスルフロメチルの残留基準値は牛及び豚の肝臓に 0.1 ppm, 牛及び豚の腎臓に 0.1 ppm, 牛及び豚の食用部分に 0.1 ppm と設定されている. その他の食品には一律基準値が適用される. そこで, 添加回収試験は残留基準値の設定されている試料には基準値濃度を, 残留基準値の設定されていない試料には一律基準値濃度を添加し, 真度を検討した. 添加濃度の 10 倍高い標準溶液濃度 (アセトン溶液) を作成し, 脂肪以外の試料は 1 mL を, 脂肪試料は 0.5 mL を添加した (報告例 表 2-SIM, 2-MRM)。

これら畜水産食品に対する真度は SIM 測定では 76~100 %，MRM 測定では 86~106 %であった。また，併行精度は、SIM 測定では 1~10 %，MRM 測定では 2~18 %であった。真度及び併行精度は厚生労働省から通知されている「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインについて」（平成 19 年 11 月 15 日，平成 22 年 12 月 24 日改正）で示されている目標値を満足するものであった。

代表的な各ブランク試料，添加回収試験，添加回収試験で 100%回収率に相当する溶媒標準溶液の SIM クロマトグラムを Fig.8 に，MRM クロマトグラム Fig.9 に，SIM 測定での LC 条件における SCAN 測定によるクロマトグラムを Fig.10 に，及び MRM 測定での LC 条件における SCAN 測定によるクロマトグラムを Fig.11 に示す。

5. S/N 比の検討

各試料のブランク試験溶液に定量下限値濃度（0.01 mg/kg）の SIM 測定にあつては 1/2（0.005 mg/kg 試料中相当）濃度，MRM 測定にあつては 1/10（0.001 mg/kg 試料中相当）濃度になるように標準溶液を添加し，S/N 比を検討した。SIM 測定における各試料のクロマトグラムを Fig.12 に，MRM 測定におけるクロマトグラムを Fig.13 に示す。SIM 測定においては牛腎臓で平均 S/N 比が 8.5 となったほかはいずれも 10 以上であった。MRM 測定においてはいずれの試料においても S/N 比は 10 以上であった。

6. 試料マトリックスの測定値への影響

添加回収濃度（基準値相当）レベルで溶媒標準溶液に対するマトリックス添加標準溶液のピーク面積の比を比較し，試料マトリックスの測定値への影響について検討した。SIM 測定においては 94~101%，MRM 測定においては 95~110%の範囲であり，イオン化抑制及び増強効果は低く，許容できる範囲であると考えられた（報告例表 4-SIM, 4-MRM）

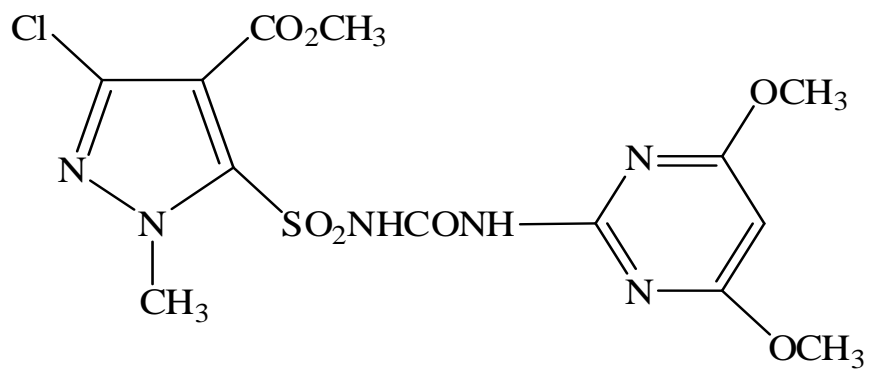
7. その他の試験法検討に関連する事項

標準品の安定性については，メタノールで作製した標準原液は 4℃下で 3 ヶ月は安定であった。

参考文献

- 1) ハロスルフロメチル農薬抄録—独立行政法人農林水産消費安全技術センター（FAMIC） URL: <http://acis.famic.go.jp/halosulfuron-methyl/index.htm>.
- 2) Ishimitsu S., Kaihara A., Yoshii K., Tsumura Y., Nakamura Y., Tonogai Y.,

- Simultaneous determination of Azimsulfuron, Flazasulfuron and Halosulfuron-methyl in Grains, Seed, Vegetables and Fruits by HPLC. *J. Health Sci.*, 48, 335-340 (2002).
- 3) Kerstin G., Lutz A., Fast multiresidue screening of 300 pesticides in water for human consumption by LC-MS/MS. *Anal. Bioanal.Chem.*, 391, 183-197 (2008).
 - 4) Ayano E., Kanazawa H., Ando M., Nishimura T., Determination and quantitation of sulfonylurea and urea herbicides in water samples using liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometric detection. *Analytica. Chimica. Acta*, 507, 211-218 (2004).
 - 5) Wei Z., Scott R. Y., Sharon K. P., Transformation Kinetics and Mechanism of the Sulfonylurea Herbicides Pyrazosulfuron Ethyl and Halosulfuron Methyl in Aqueous Solution. *J. Agric. Food Chem.*, 56, 7367-7372 (2008).



Formula: C₁₃H₁₅ClN₆O₇S
Monoisotopic MW: 434.0411

Fig. 1. Structure of halosulfuron-methyl

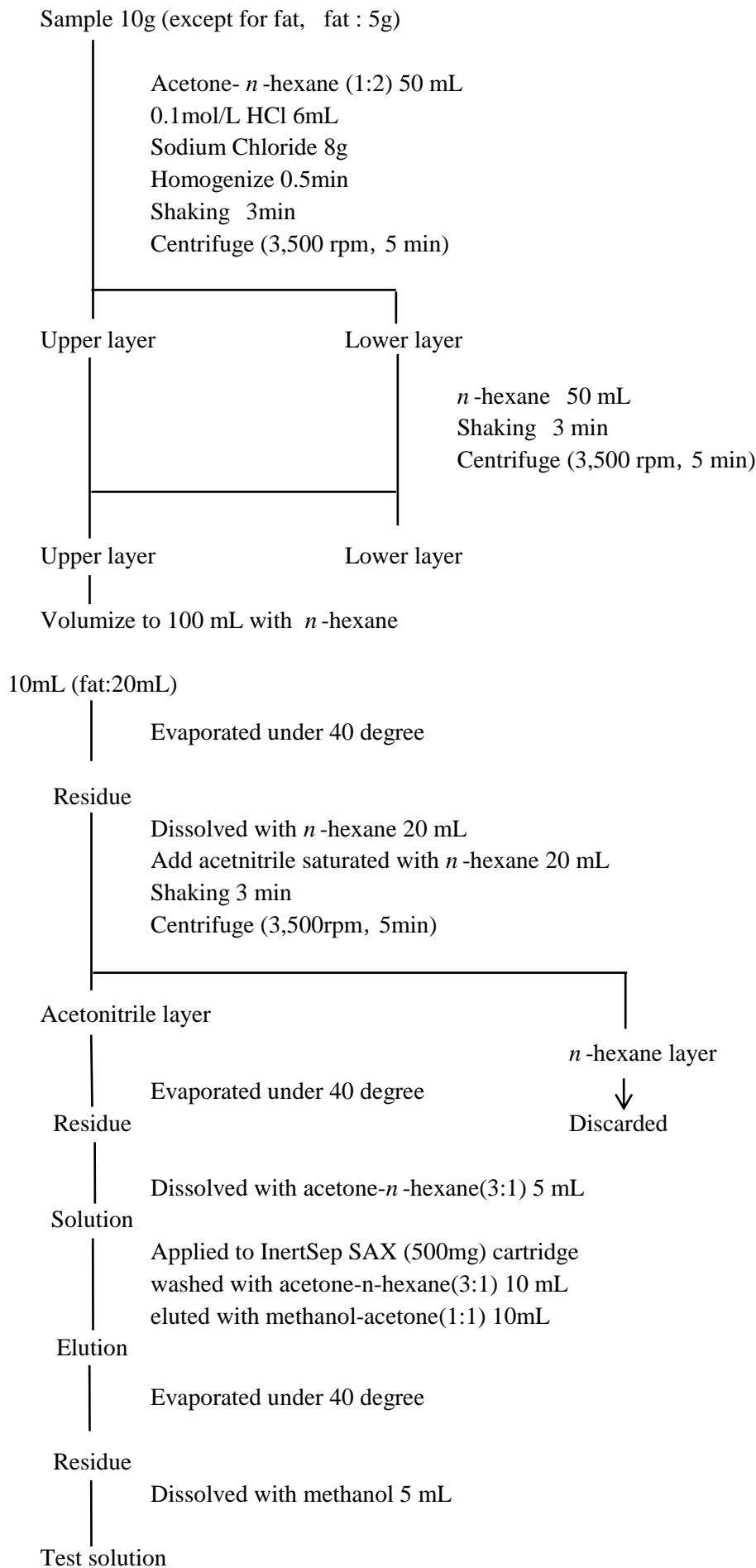


Fig. 2. Scheme of sample preparation method

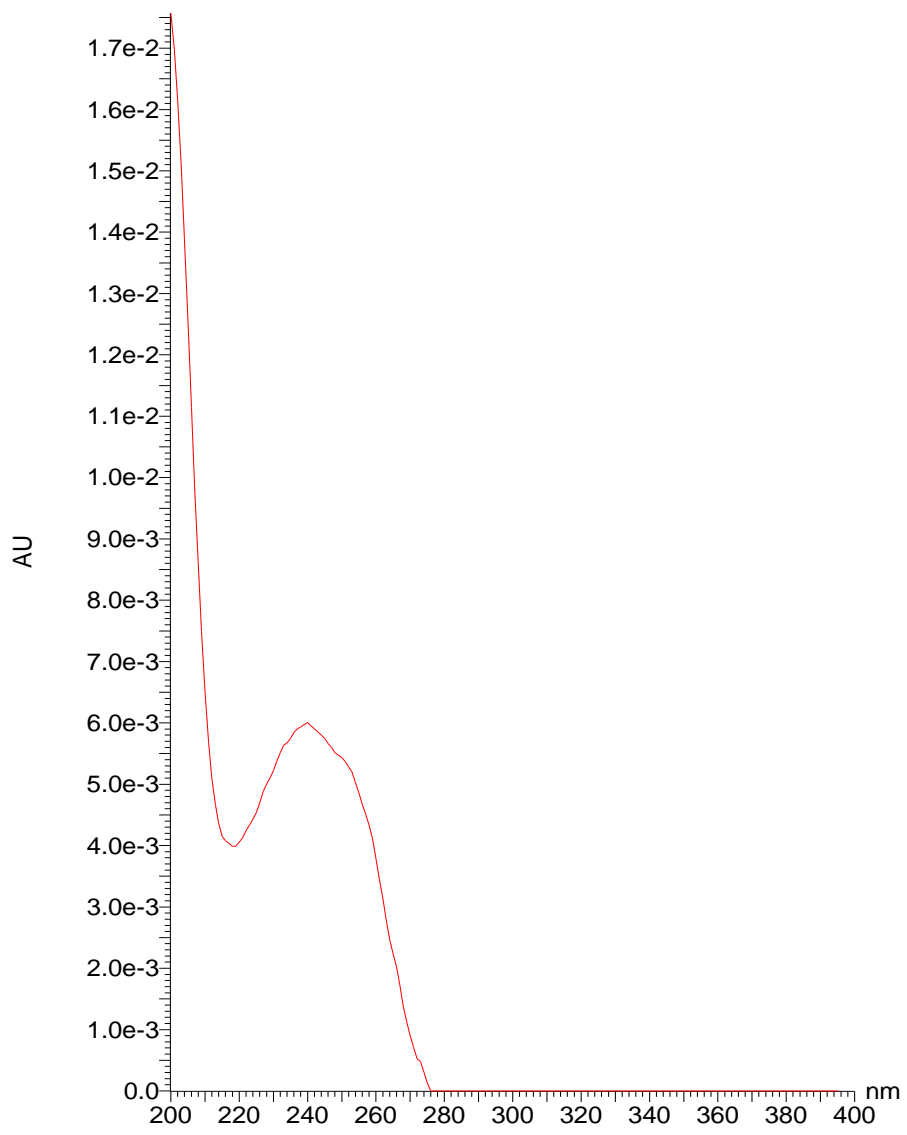


Fig. 3. UV spectrum of halosulfuron-methyl

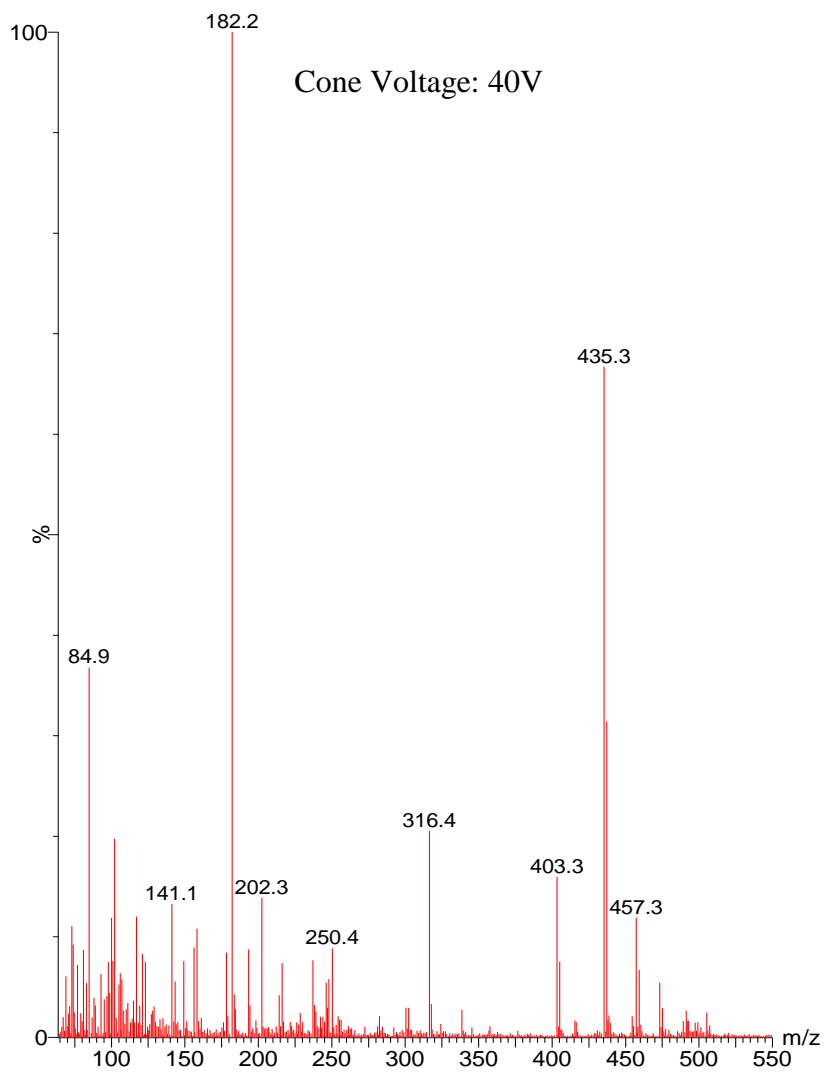


Fig. 4 MS spectrum of halosulfuron-methyl in positive mode

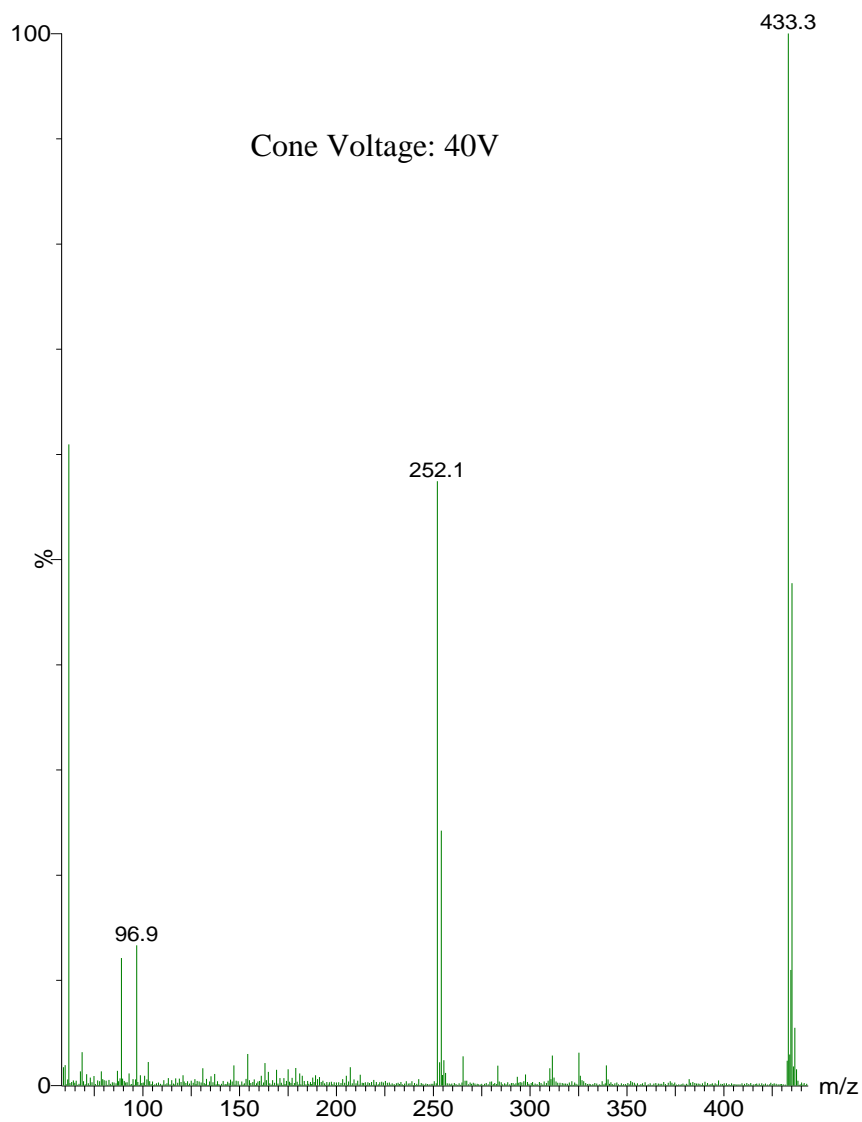


Fig. 5 MS spectrum of halosulfuron-methyl in negative mode

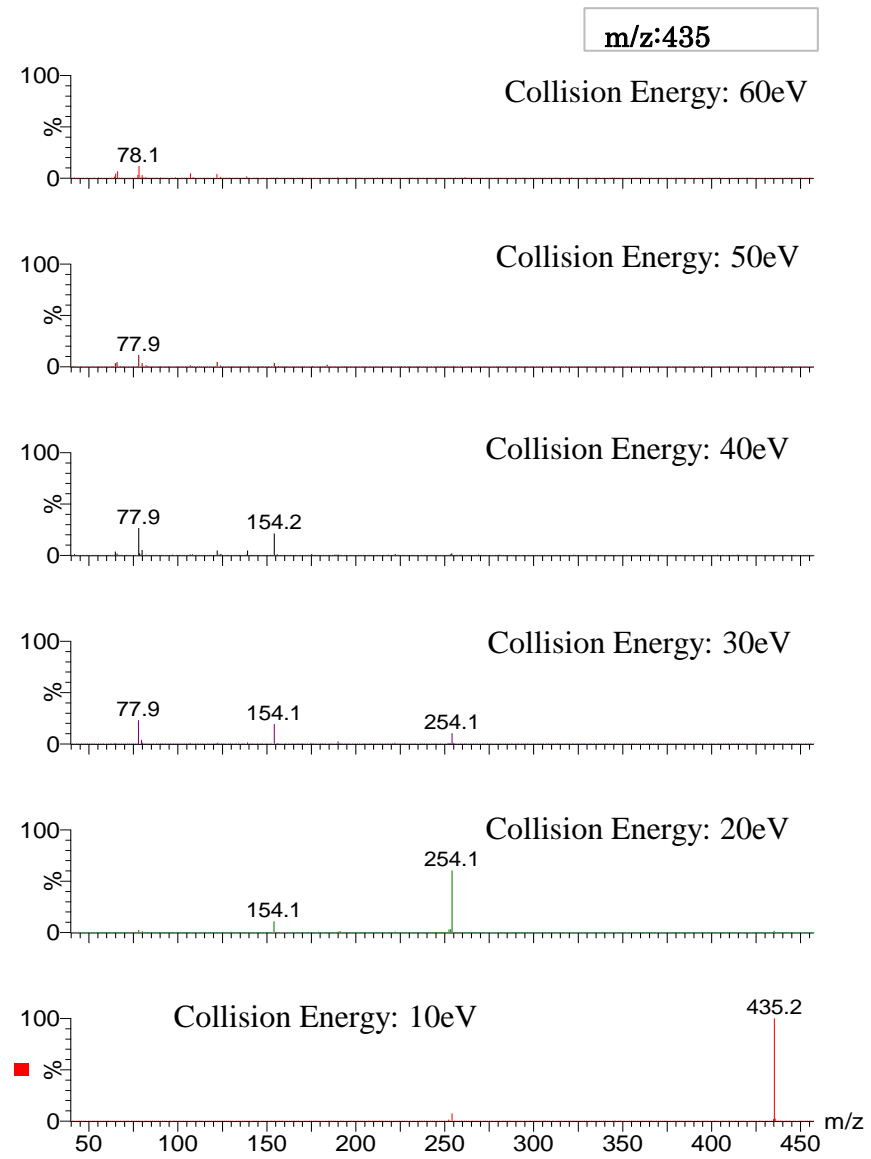
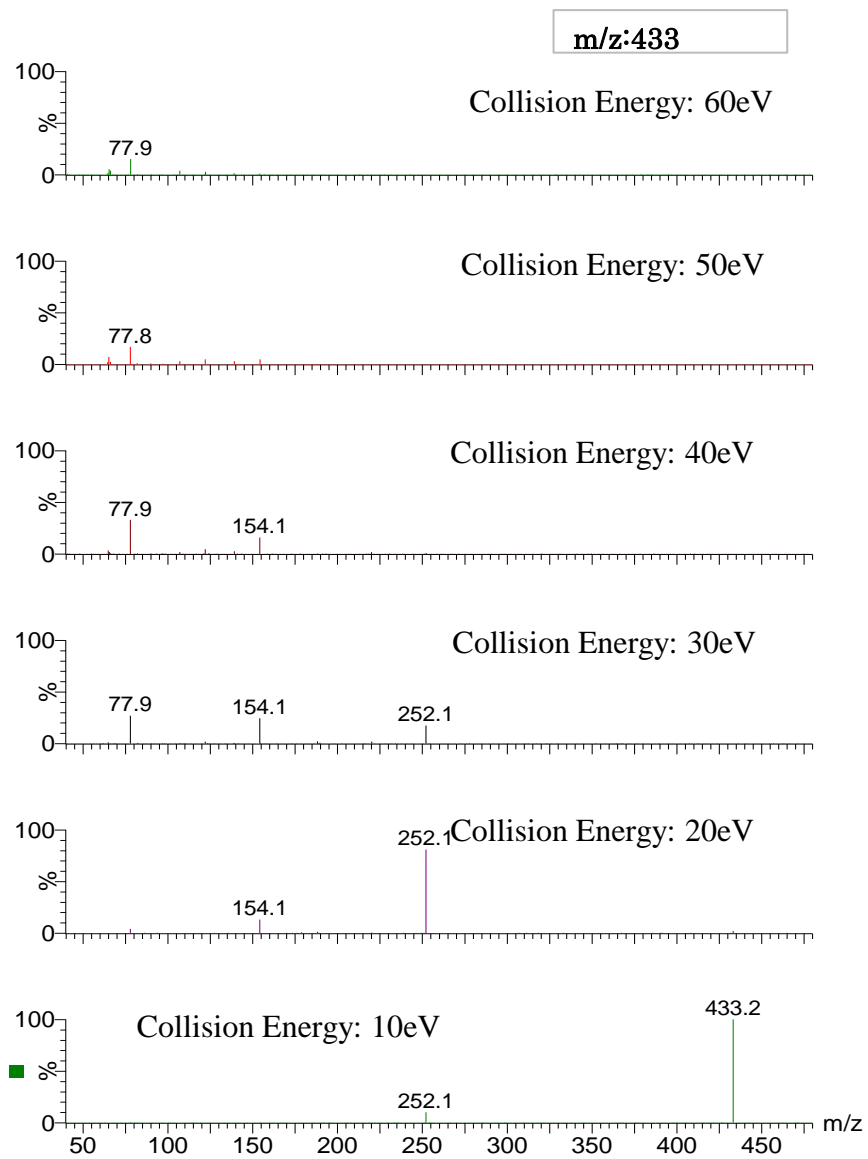


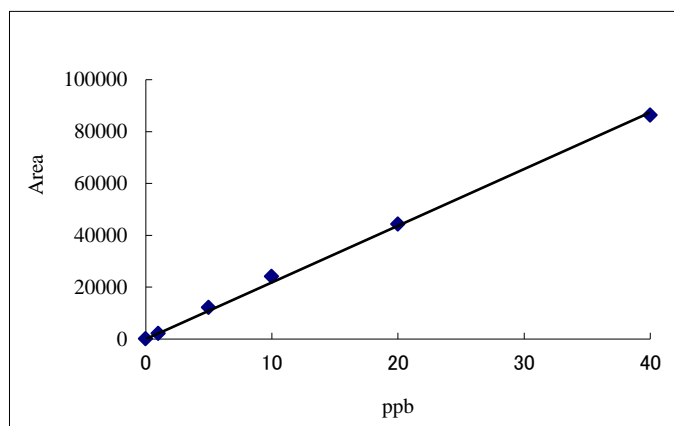
Fig. 6 MS spectrums obtained by product ion scan of m/z 433 or 435

SIM Mode

Concentration (ppb)	1	5	10	20	40
Area	2105	12097	24164	44333	86392

Slope 2138.8
Intercept 1307.8

Correlation Coefficient (r): 0.9995



MRM Mode

Concentration (ppb)	0.2	2	10	20	40
Area	609	6072	17164	40555	81755

Slope 2029.9
Intercept -81.4

Correlation Coefficient (r): 0.9984

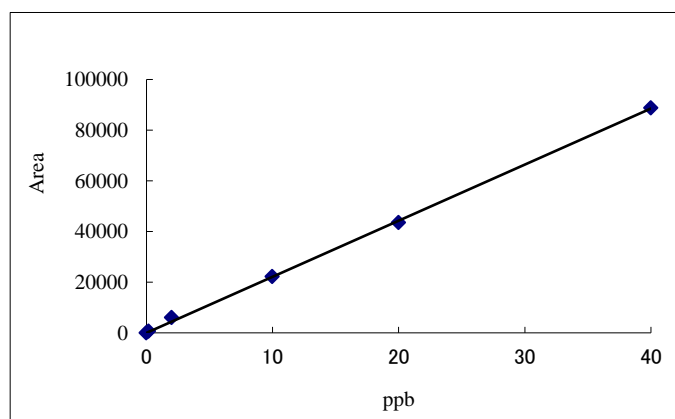


Fig. 7 Typical calibration curves of halosulfuron-methyl

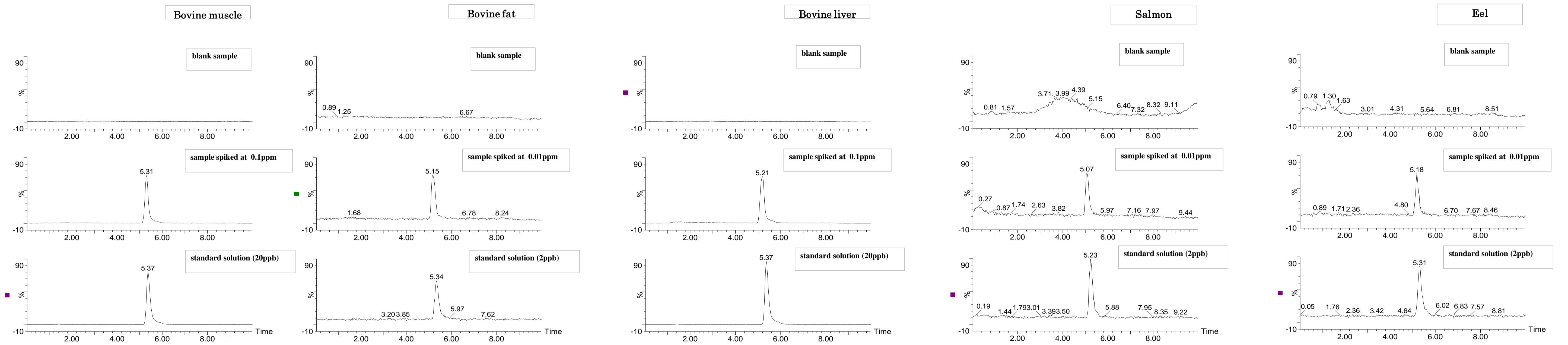


Fig. 8-1. Typical SIM chromatograms (m/z 252) of blank sample, sample spiked with halosulfuron-methyl and standard
Scales were equal in each chromatogram in the sample

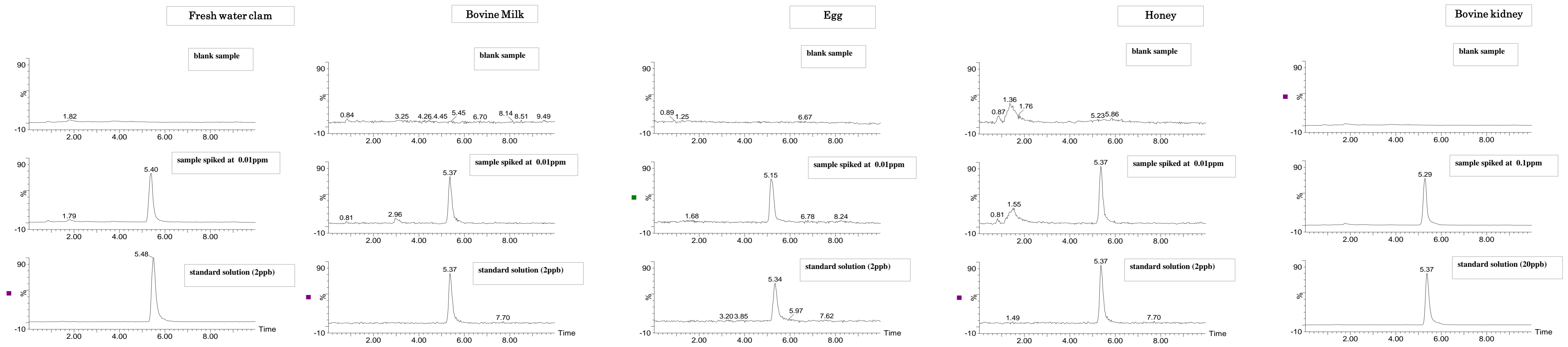


Fig. 8-2. Typical SIM chromatograms (m/z 252) of blank sample, sample spiked with halosulfuron-methyl and standard
Scales were equal in each chromatogram in the sample

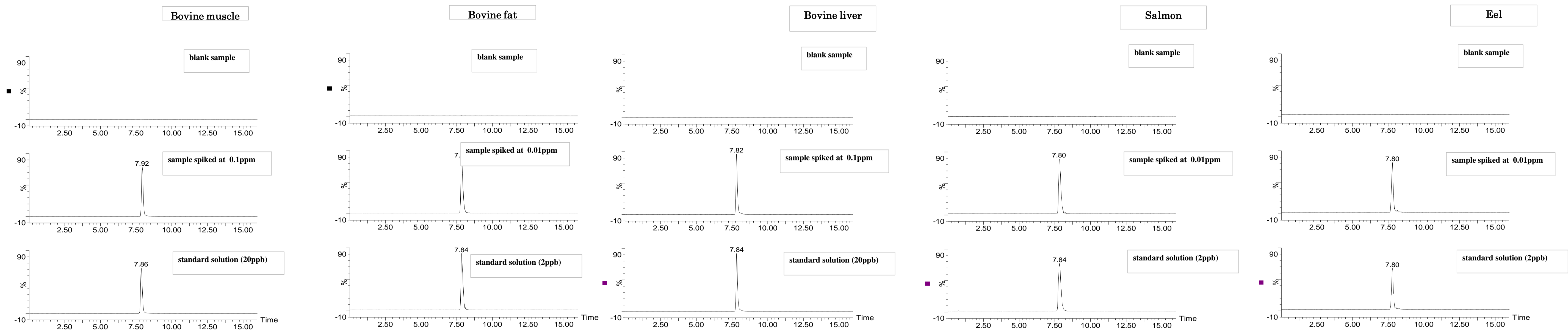
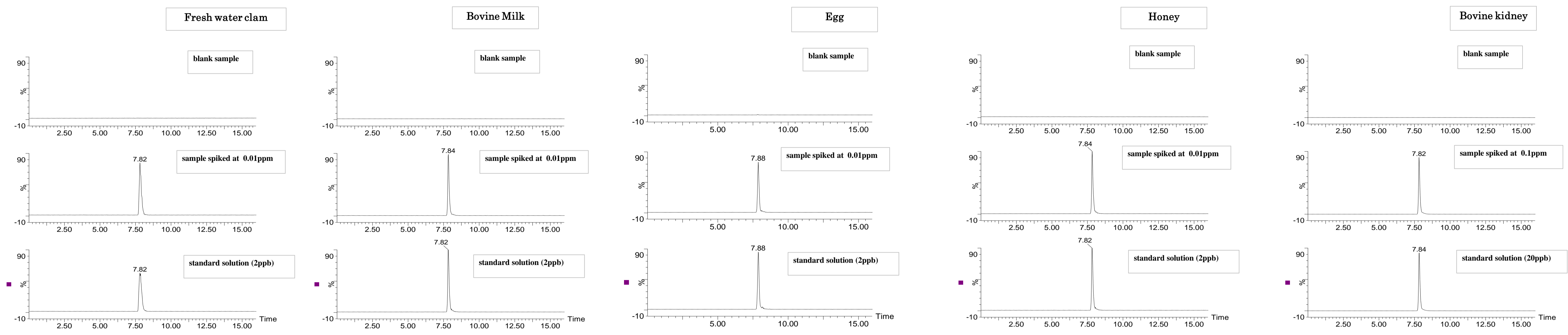


Fig. 9-1. Typical MRM chromatograms (m/z 433 \rightarrow 252) of blank sample, sample spiked with halosulfuron-methyl and standard
Scales were equal in each chromatogram in the sample



**Fig. 9-2. Typical MRM chromatograms (m/z 433 \rightarrow 252) of blank sample, sample spiked with halosulfuron-methyl and standard
Scales were equal in each chromatogram in the sample**

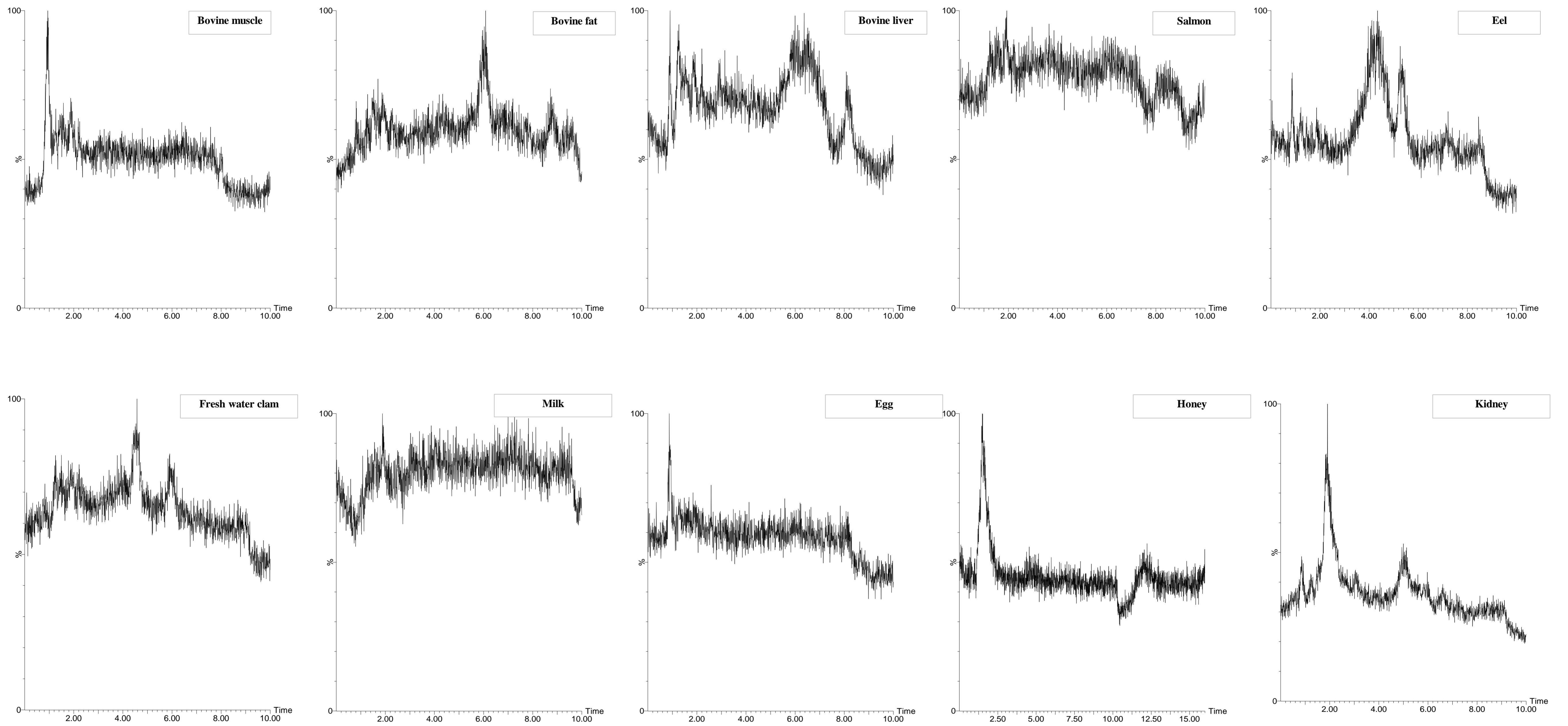


Fig.10. Typical total ion chromatograms (scan: m/z 100-550) of blank sample on LC condition in Table 1

Scales were taken from the intensities of largest peak in each chromatogram

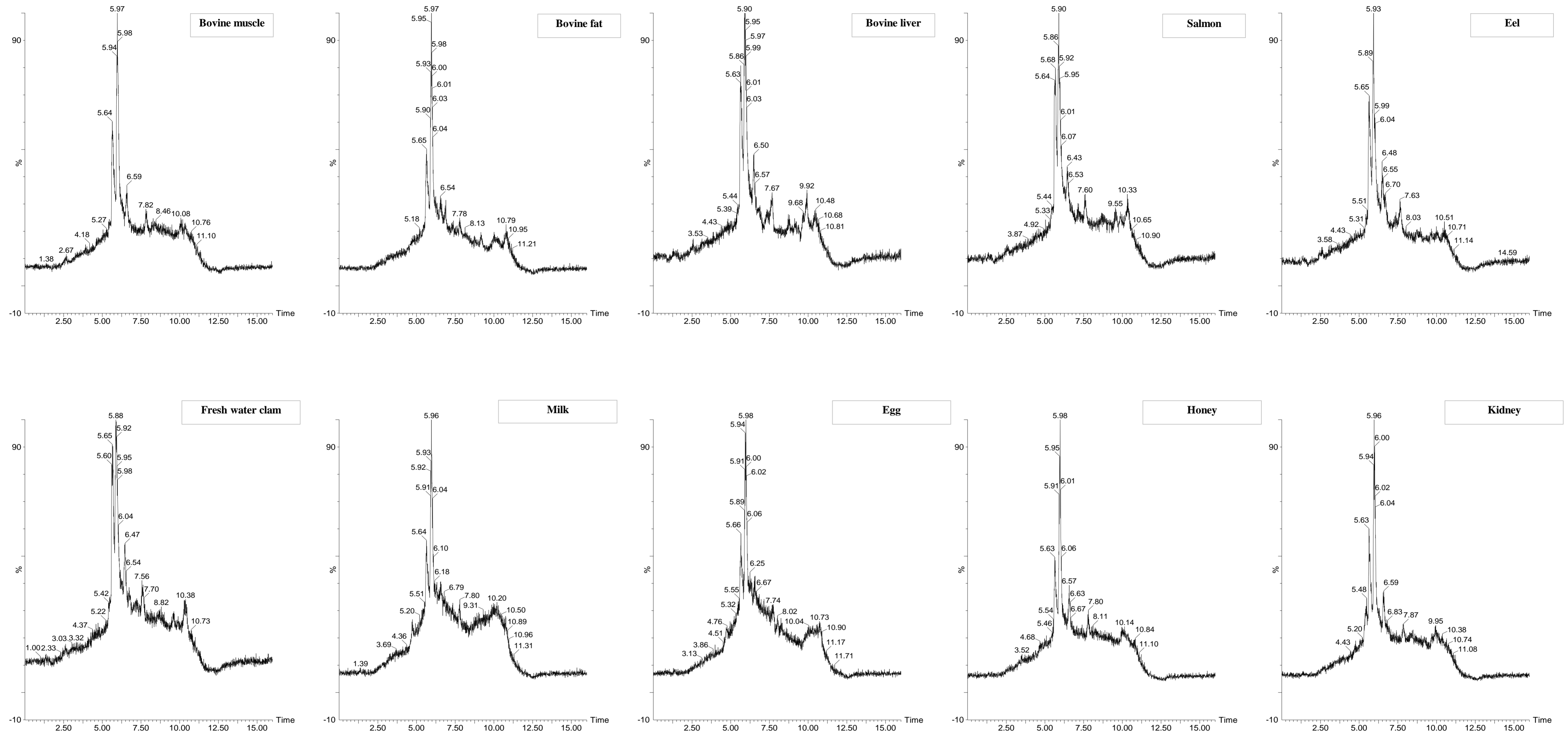


Fig.11. Typical total ion chromatograms (scan: m/z 100-550) of blank sample on LC condition in Table 2

Scales were taken from the intensities of largest peak in each chromatogram

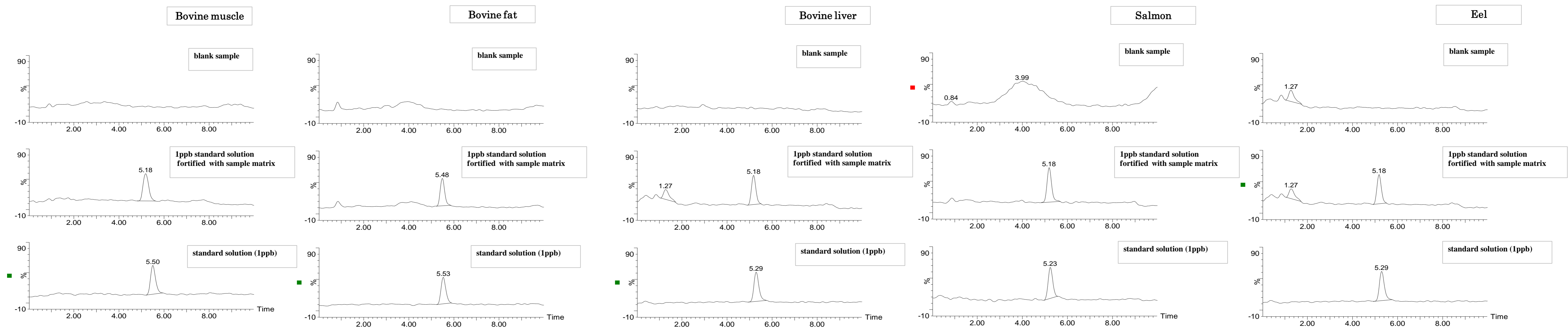


Fig. 12-1. Typical SIM chromatograms (m/z 252) of blank sample, standard solution fortified with sample matrix and standard

Scales were equal in each chromatogram in the sample

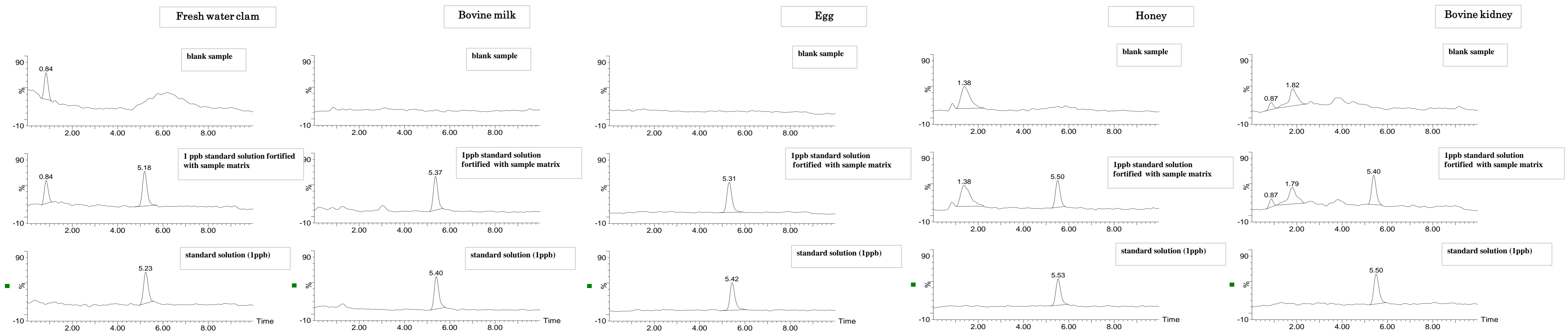


Fig. 12-2. Typical SIM chromatograms (m/z 252) of blank sample, standard solution fortified with sample matrix and standard
Scales were equal in each chromatogram in the sample

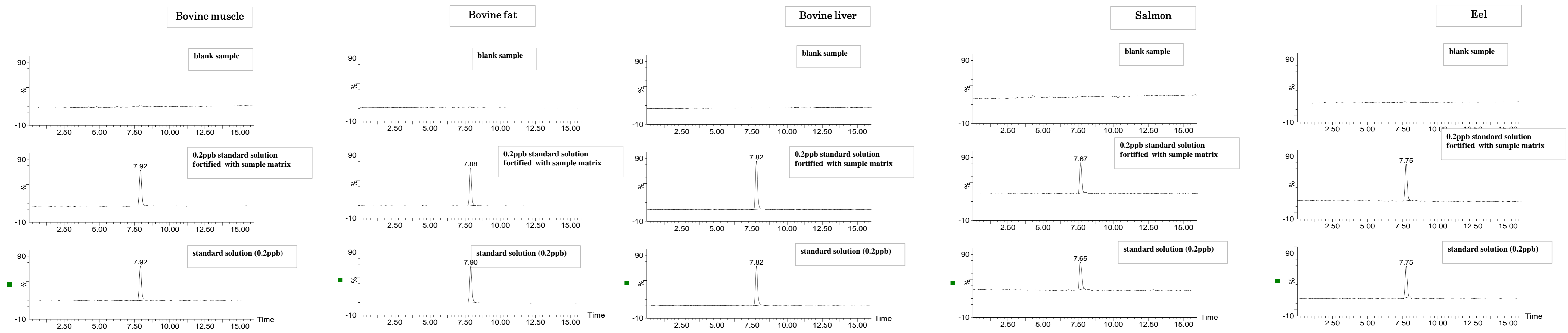


Fig. 13-1. Typical MRM chromatograms (m/z 433 \rightarrow 252) of blank sample, standard solution fortified with sample matrix and standard
Scales were equal in each chromatogram in the sample

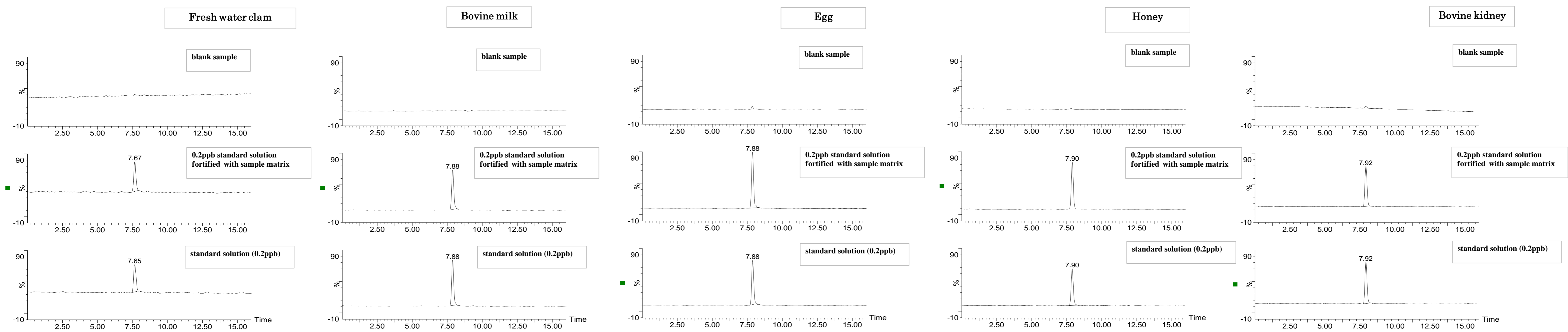


Fig. 13-2. Typical MRM chromatograms (m/z 433 \rightarrow 252) of blank sample, standard solution fortified with sample matrix and standard
Scales were equal in each chromatogram in the sample

Table 1. LC-MS operating conditions

parameter	Settings	
LC parameters		
Mobile phase	A = 0.01% acetic acid B = 0.01% acetic acid in methanol	
Isocratic elution	A:B=20:80	
Flow rate	0.2 ml/min	
Column temperature	40 °C	
Injection volume	10 µl	
Run time	10 min	
AP interface parameters ^a		
Ionization mode	Electrospray ionization (negative mode)	
Capillary voltage	3.00kV	
Source temperature	150°C	
Desolvation temperature	450°C	
Cone gas flow	50 L/hr	
Desolvation gas flow	1000 L/hr	
SIM parameter		
Monitored ions	Dwell	Cone
Precursor m/z	Time	Voltage
>product m/z	(s)	(V)
252 ^b	0.4	50
254 ^c	0.4	50
433 ^c	0.4	34

^aAP= Atmospheric pressure

^b used for quantitation

^c used for confirmation.

Table 2. LC-MS/MS operating conditions

parameter	Settings			
LC parameters				
Mobile phase	A = 0.01% acetic acid B = 0.01% acetic acid in methanol			
Linear gradient elution				
	time (min)	A (%)	B (%)	
	0	85	15	
	0.5	85	15	
	4	10	90	
	9	10	90	
	10	85	15	
Flow rate	0.2 ml/min			
Column temperature	40 °C			
Injection volume	2 µl			
Run time	16 min			
AP interface parameters ^a				
Ionization mode	Electrospray ionization (negative mode)			
Capillary voltage	3.00kV			
Source temperature	150°C			
Desolvation temperature	450°C			
Cone gas flow	50 L/hr			
Desolvation gas flow	1000 L/hr			
MRM parameter				
	Monitored Reactions	Dwell	Cone	Collision
	Precursor m/z	Time	Voltage	Energy
	>product m/z	(s)	(V)	(eV)
	433 > 252 ^b	0.4	34	20
	435 > 254 ^c	0.4	34	15

^aAP= Atmospheric pressure^b used for quantitation^c used for confirmation.

Table 3. Recovery of halosulfuron-methyl in fractionation

fractionation	volume	recovery(%)
acetone:hexane(1:1)	10mL	0
acetone:hexane(3:1)	10mL	0
acetone	10mL	2
methanol:acetone(1:9)	10mL	90
methanol:acetone(1:1)	10mL	8
methanol:acetone(3:1)	10mL	0
methanol	10mL	0

表1-SIM 選択性の評価

・妨害ピークの許容範囲を評価するための対象となる標準溶液の濃度(評価対象濃度)が、添加回収試験における添加濃度と同じ場合には、「試料マトリックスの測定への影響の検討」で使用するマトリックス添加標準溶液を標準溶液に用いることができる。ただし、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、添加濃度と評価対象濃度がそれぞれ基準値濃度及び定量限界濃度となり異なるため、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。

表1 選択性の評価

担当機関:

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	ハロスルフロメチル	牛の筋肉	0.01	0.1	0.1	基準値	0.1	< 0.100	面積	0	43365	0.000	○	
2	ハロスルフロメチル	牛の脂肪	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	4609	0.000	○	
3	ハロスルフロメチル	牛の肝臓	0.01	0.1	0.1	基準値	0.1	< 0.100	面積	0	45474	0.000	○	
4	ハロスルフロメチル	さけ	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	5671	0.000	○	
5	ハロスルフロメチル	うなぎ	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	5096	0.000	○	
6	ハロスルフロメチル	しじみ	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	5671	0.000	○	
7	ハロスルフロメチル	牛乳	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	7467	0.000	○	
8	ハロスルフロメチル	鶏卵	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	7467	0.000	○	
9	ハロスルフロメチル	はちみつ	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	4609	0.000	○	
10	ハロスルフロメチル	牛の腎臓	0.01	0.1	0.1	基準値	0.1	< 0.100	面積	0	43365	0.000	○	
					###	#VALUE!	#VALUE!	< #####				#DIV/0!	○	
					0.	基準値	0.	< 0.100				#DIV/0!	○	
					0.	基準値	0.	< 0.100				#DIV/0!	○	
					0.	基準値	0.	< 0.100				#DIV/0!	○	
					0.	基準値	0.	< 0.100				#DIV/0!	○	
					0.	基準値	0.	< 0.100				#DIV/0!	○	
					0.	基準値	0.	< 0.100				#DIV/0!	○	
					0.	基準値	0.	< 0.100				#DIV/0!	○	
					0.	基準値	0.	< 0.100				#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2-SIM 真度、精度及び定量限界の評価

・基準値が定量限界と一致している場合あるいは農薬等の残留基準告示において「不検出」とされる場合など、添加試料への農薬等の添加濃度に「定量限界濃度」を用いる場合には、回収率を求めるほか、定量限界濃度を添加した添加試料から得られるピークのS/N比を求める。

表2 真度、精度及び定量限界の評価

担当機関:

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	ハロスルフロメチル	牛の筋肉	0.01	0.1	0.1	*	2178	1089	0.996	77.5	78.1	84.6	85.4	87.4	83	5			#DIV/0!	
2	ハロスルフロメチル	牛の脂肪	0.01	0.01	0.01		2293	12	0.998	98.3	100.6	99.6	101.2	101.2	100	1			#DIV/0!	
3	ハロスルフロメチル	牛の肝臓	0.01	0.1	0.1	*	2239	543	0.998	78.0	71.9	85.8	81.5	83.1	80	7			#DIV/0!	
4	ハロスルフロメチル	さけ	0.01	0.01	0.01		2653	13	0.998	80.8	83.2	72.3	77.3	71.0	77	7			#DIV/0!	
5	ハロスルフロメチル	うなぎ	0.01	0.01	0.01		2395	-1	0.998	73.2	74.2	73.3	82.7	76.7	76	5			#DIV/0!	
6	ハロスルフロメチル	しじみ	0.01	0.01	0.01		2653	13	0.998	94.5	97.5	81.5	94.5	87.0	91	7			#DIV/0!	
7	ハロスルフロメチル	牛乳	0.01	0.01	0.01		2429	-2	0.999	92.4	90.5	91.5	95.5	89.2	92	3			#DIV/0!	
8	ハロスルフロメチル	鶏卵	0.01	0.01	0.01		2429	-2	0.999	87.3	85.2	79.3	71.0	72.7	79	9			#DIV/0!	
9	ハロスルフロメチル	はちみつ	0.01	0.01	0.01		2293	12	0.998	103.8	103.3	97.7	99.2	94.5	100	4			#DIV/0!	
10	ハロスルフロメチル	牛の腎臓	0.01	0.1	0.1	*	2384	689	0.997	74.6	73.5	91.0	88.6	89.6	83	10			#DIV/0!	
					0.										#DIV/0!	#DIV/0!			#DIV/0!	
					0.										#DIV/0!	#DIV/0!			#DIV/0!	
					0.										#DIV/0!	#DIV/0!			#DIV/0!	
					0.										#DIV/0!	#DIV/0!			#DIV/0!	
					0.										#DIV/0!	#DIV/0!			#DIV/0!	
					0.										#DIV/0!	#DIV/0!			#DIV/0!	
					0.										#DIV/0!	#DIV/0!			#DIV/0!	
					0.										#DIV/0!	#DIV/0!			#DIV/0!	
					0.										#DIV/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 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3-SIM 定量限界の推定

・実施要領の表3において添加濃度に「基準値濃度」又は「一律基準値濃度」を用いる場合（即ち、添加濃度が定量限界濃度と異なる場合）には、定量限界の評価は不要であるが、次の方法により定量限界の推定を行う。
 (方法)

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）を作成し、それぞれ2回以上測定したときの、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（%）及びS/N比を求める。得られた面積（又は高さ）の比（%）は、表3の真度の目標値を満足し、かつS/N比 ≥ 10 であることが望ましい。**なお、定量限界濃度での添加回収試験を2回以上実施して評価しても良い。**

表3 定量限界の推定

担当機関:

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)	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	面積(高さ)比(%) ⁶	S/N比		
										n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均						
1	ハロスルフロメチル	牛の筋肉	0.01	0.1	0.1	*	0.001	面積	0	2438	2658	2548	2676	2507	2592	10	10	98	10		
2	ハロスルフロメチル	牛の脂肪	0.01	0.01	0.01		0.001	面積	0	2336	2272	2304	2291	2256	2274	10	10	101	10		
3	ハロスルフロメチル	牛の肝臓	0.01	0.1	0.1	*	0.001	面積	0	2530	2192	2361	2352	2286	2319	10	13	102	12		
4	ハロスルフロメチル	さけ	0.01	0.01	0.01		0.001	面積	0	2758	2807	2783	2612	2941	2777	17	17	100	17		
5	ハロスルフロメチル	うなぎ	0.01	0.01	0.01		0.001	面積	0	2250	2248	2249	2352	2286	2319	19	14	97	17		
6	ハロスルフロメチル	しじみ	0.01	0.01	0.01		0.001	面積	0	2828	2937	2883	2612	2941	2777	16	18	104	17		
7	ハロスルフロメチル	牛乳	0.01	0.01	0.01		0.001	面積	0	2951	2922	2937	2782	3043	2913	31	29	101	30		
8	ハロスルフロメチル	鶏卵	0.01	0.01	0.01		0.001	面積	0	2499	2466	2483	2326	2623	2475	33	23	100	28		
9	ハロスルフロメチル	はちみつ	0.01	0.01	0.01		0.001	面積	0	2261	2240	2251	2291	2256	2274	18	16	99	17		
10	ハロスルフロメチル	牛の腎臓	0.01	0.1	0.1	*	0.001	面積	0	2269	2579	2424	2676	2507	2592	9	8	94	9		
					0.							0			0			#DIV/0!	#DIV/0!		
					0.							0			0			#DIV/0!	#DIV/0!		
					0.							0			0			#DIV/0!	#DIV/0!		
					0.							0			0			#DIV/0!	#DIV/0!		
					0.							0			0			#DIV/0!	#DIV/0!		
					0.							0			0			#DIV/0!	#DIV/0!		
					0.							0			0			#DIV/0!	#DIV/0!		
					0.							0			0			#DIV/0!	#DIV/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とが異なる場合)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4-SIM 試料マトリックスの測定への影響

・添加回収試験における回収率100%相当濃度になるようにブランク試料の試験溶液で調製した標準溶液(マトリックス添加標準溶液)及び溶媒で調製した標準溶液(溶媒標準溶液)を作成し、それぞれ2回以上測定したときの、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)の比を求めて、試料マトリックスの測定への影響を確認する。添加回収試験を複数の濃度で実施した場合には、それぞれの濃度について確認する。

表4 試料マトリックスの測定への影響

担当機関:

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	ハロスルフロメチル	牛の筋肉	0.01	0.1	0.1	0.02	面積	0	43740	44071	43906	43365	45230	44298	0.99	
2	ハロスルフロメチル	牛の脂肪	0.01	0.01	0.01	0.002	面積	0	4631	4599	4615	4609	4670	4640	0.99	
3	ハロスルフロメチル	牛の肝臓	0.01	0.1	0.1	0.02	面積	0	46039	45587	45813	45474	46096	45785	1.00	
4	ハロスルフロメチル	さけ	0.01	0.01	0.01	0.002	面積	0	5384	5577	5481	5671	5188	5430	1.01	
5	ハロスルフロメチル	うなぎ	0.01	0.01	0.01	0.002	面積	0	4883	4765	4824	5096	4895	4996	0.97	
6	ハロスルフロメチル	しじみ	0.01	0.01	0.01	0.002	面積	0	5488	5402	5445	5671	5188	5430	1.00	
7	ハロスルフロメチル	牛乳	0.01	0.01	0.01	0.002	面積	0	5062	4829	4946	5234	5337	5286	0.94	
8	ハロスルフロメチル	鶏卵	0.01	0.01	0.01	0.002	面積	0	5151	5196	5174	5234	5337	5286	0.98	
9	ハロスルフロメチル	はちみつ	0.01	0.01	0.01	0.002	面積	0	4630	4657	4644	4609	4670	4640	1.00	
10	ハロスルフロメチル	牛の腎臓	0.01	0.1	0.1	0.02	面積	0	44026	44080	44053	43365	45230	44298	0.99	
					0.						0			0	#DIV/0!	
					0.						0			0	#DIV/0!	
					0.						0			0	#DIV/0!	
					0.						0			0	#DIV/0!	
					0.						0			0	#DIV/0!	
					0.						0			0	#DIV/0!	
					0.						0			0	#DIV/0!	
					0.						0			0	#DIV/0!	
					0.						0			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1-MRM 選択性の評価

・妨害ピークの許容範囲を評価するための対象となる標準溶液の濃度(評価対象濃度)が、添加回収試験における添加濃度と同じ場合には、「試料マトリックスの測定への影響の検討」で使用するマトリックス添加標準溶液を標準溶液に用いることができる。ただし、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、添加濃度と評価対象濃度がそれぞれ基準値濃度及び定量限界濃度となり異なるため、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。

表1 選択性の評価

担当機関:

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	ハロスルフロメチル	牛の筋肉	0.01	0.1	0.1	基準値	0.1	< 0.100	面積	0	27033	0.000	○	
2	ハロスルフロメチル	牛の脂肪	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	5909	0.000	○	
3	ハロスルフロメチル	牛の肝臓	0.01	0.1	0.1	基準値	0.1	< 0.100	面積	0	12642	0.000	○	
4	ハロスルフロメチル	さけ	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	1840	0.000	○	
5	ハロスルフロメチル	うなぎ	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	2024	0.000	○	
6	ハロスルフロメチル	しじみ	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	1840	0.000	○	
7	ハロスルフロメチル	牛乳	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	2719	0.000	○	
8	ハロスルフロメチル	鶏卵	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	2719	0.000	○	
9	ハロスルフロメチル	はちみつ	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	5909	0.000	○	
10	ハロスルフロメチル	牛の腎臓	0.01	0.1	0.1	基準値	0.1	< 0.100	面積	0	27033	0.000	○	
					###	#VALUE!	#VALUE!	< #####				#DIV/0!	○	
					0.	基準値	0.	< 0.100				#DIV/0!	○	
					0.	基準値	0.	< 0.100				#DIV/0!	○	
					0.	基準値	0.	< 0.100				#DIV/0!	○	
					0.	基準値	0.	< 0.100				#DIV/0!	○	
					0.	基準値	0.	< 0.100				#DIV/0!	○	
					0.	基準値	0.	< 0.100				#DIV/0!	○	
					0.	基準値	0.	< 0.100				#DIV/0!	○	
					0.	基準値	0.	< 0.100				#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2-MRM 真度、精度及び定量限界の評価

・基準値が定量限界と一致している場合あるいは農薬等の残留基準告示において「不検出」とされる場合など、添加試料への農薬等の添加濃度に「定量限界濃度」を用いる場合には、回収率を求めるほか、定量限界濃度を添加した添加試料から得られるピークのS/N比を求める。

表2 真度、精度及び定量限界の評価

担当機関:

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	ハロスルフロメチル	牛の筋肉	0.01	0.1	0.1	*	2239	658	0.998	96.2	93.2	90.8	81.7	84.2	89	7			#DIV/0!	
2	ハロスルフロメチル	牛の脂肪	0.01	0.01	0.01		2200	23	0.999	106.7	110.7	111.0	100.5	99.5	106	5			#DIV/0!	
3	ハロスルフロメチル	牛の肝臓	0.01	0.1	0.1	*	2239	658	0.998	91.9	79.9	105.0	103.2	107.5	98	12			#DIV/0!	
4	ハロスルフロメチル	さけ	0.01	0.01	0.01		1550	-90	0.992	92.0	81.0	92.5	79.8	92.0	87	7			#DIV/0!	
5	ハロスルフロメチル	うなぎ	0.01	0.01	0.01		2200	23	0.999	97.4	111.4	74.5	81.5	80.5	89	17			#DIV/0!	
6	ハロスルフロメチル	しじみ	0.01	0.01	0.01		1550	-90	0.992	87.7	98.5	100.0	117.2	102.0	101	10			#DIV/0!	
7	ハロスルフロメチル	牛乳	0.01	0.01	0.01		2452	-12	0.998	93.0	89.0	90.5	99.0	92.0	93	4			#DIV/0!	
8	ハロスルフロメチル	鶏卵	0.01	0.01	0.01		1536	-78	0.998	111.3	88.9	78.0	76.4	75.5	86	18			#DIV/0!	
9	ハロスルフロメチル	はちみつ	0.01	0.01	0.01		2352	24	0.999	88.8	96.8	98.4	89.1	88.2	92	5			#DIV/0!	
10	ハロスルフロメチル	牛の腎臓	0.01	0.1	0.1	*	2239	658	0.998	90.0	93.8	94.9	95.3	92.7	93	2			#DIV/0!	
					0.										#DIV/0!	#DIV/0!			#DIV/0!	
					0.										#DIV/0!	#DIV/0!			#DIV/0!	
					0.										#DIV/0!	#DIV/0!			#DIV/0!	
					0.										#DIV/0!	#DIV/0!			#DIV/0!	
					0.										#DIV/0!	#DIV/0!			#DIV/0!	
					0.										#DIV/0!	#DIV/0!			#DIV/0!	
					0.										#DIV/0!	#DIV/0!			#DIV/0!	
					0.										#DIV/0!	#DIV/0!			#DIV/0!	
					0.										#DIV/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 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3-MRM 定量限界の推定

・実施要領の表3において添加濃度に「基準値濃度」又は「一律基準値濃度」を用いる場合(即ち、添加濃度が定量限界濃度と異なる場合)には、定量限界の評価は不要であるが、次の方法により定量限界の推定を行う。
(方法)

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)を作成し、それぞれ2回以上測定したときの、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(%)及びS/N比を求める。得られた面積(又は高さ)の比(%)は、表3の真度の目標値を満足し、かつS/N比 ≥ 10 であることが望ましい。**なお、定量限界濃度での添加回収試験を2回以上実施して評価しても良い。**

表3 定量限界の推定

担当機関:

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)	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	面積(高さ)比(%) ^{*6}	S/N比		
										n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均						
1	ハロスルフロメチル	牛の筋肉	0.01	0.1	0.1	*	0.0002	面積	0	315	319	317	337	300	319	46	67	100	57		
2	ハロスルフロメチル	牛の脂肪	0.01	0.01	0.01		0.0002	面積	0	505	425	465	433	609	521	102	102	89	102		
3	ハロスルフロメチル	牛の肝臓	0.01	0.1	0.1	*	0.0002	面積	0	485	435	460	453	452	453	102	153	102	128		
4	ハロスルフロメチル	さけ	0.01	0.01	0.01		0.0002	面積	0	138	151	145	138	138	138	33	26	105	30		
5	ハロスルフロメチル	うなぎ	0.01	0.01	0.01		0.0002	面積	0	188	237	213	241	199	220	37	50	97	44		
6	ハロスルフロメチル	しじみ	0.01	0.01	0.01		0.0002	面積	0	142	138	140	138	138	138	33	26	101	30		
7	ハロスルフロメチル	牛乳	0.01	0.01	0.01		0.0002	面積	0	493	579	536	527	522	525	76	94	102	85		
8	ハロスルフロメチル	鶏卵	0.01	0.01	0.01		0.0002	面積	0	554	591	573	527	522	525	102	122	109	112		
9	ハロスルフロメチル	はちみつ	0.01	0.01	0.01		0.0002	面積	0	501	531	516	433	609	521	102	94	99	98		
10	ハロスルフロメチル	牛の腎臓	0.01	0.1	0.1	*	0.0002	面積	0	345	352	349	337	300	319	67	76	109	72		
					0.							0			0			#DIV/0!	#DIV/0!		
					0.							0			0			#DIV/0!	#DIV/0!		
					0.							0			0			#DIV/0!	#DIV/0!		
					0.							0			0			#DIV/0!	#DIV/0!		
					0.							0			0			#DIV/0!	#DIV/0!		
					0.							0			0			#DIV/0!	#DIV/0!		
					0.							0			0			#DIV/0!	#DIV/0!		
					0.							0			0			#DIV/0!	#DIV/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とが異なる場合)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4-MRM 試料マトリックスの測定への影響

・添加回収試験における回収率100%相当濃度になるようにブランク試料の試験溶液で調製した標準溶液(マトリックス添加標準溶液)及び溶媒で調製した標準溶液(溶媒標準溶液)を作成し、それぞれ2回以上測定したときの、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)の比を求めて、試料マトリックスの測定への影響を確認する。添加回収試験を複数の濃度で実施した場合には、それぞれの濃度について確認する。

表4 試料マトリックスの測定への影響

担当機関:

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	ハロスルフロメチル	牛の筋肉	0.01	0.1	0.1	0.02	面積	0	27615	27008	27312	22684	27033	24859	1.10	
2	ハロスルフロメチル	牛の脂肪	0.01	0.01	0.01	0.002	面積	0	5747	5977	5862	6072	5909	5991	0.98	
3	ハロスルフロメチル	牛の肝臓	0.01	0.1	0.1	0.02	面積	0	40942	46258	43600	46059	39437	42748	1.02	
4	ハロスルフロメチル	さけ	0.01	0.01	0.01	0.002	面積	0	1291	1863	1577	1464	1840	1652	0.95	
5	ハロスルフロメチル	うなぎ	0.01	0.01	0.01	0.002	面積	0	1931	1511	1721	1279	2024	1652	1.04	
6	ハロスルフロメチル	しじみ	0.01	0.01	0.01	0.002	面積	0	1645	1992	1819	1464	1840	1652	1.10	
7	ハロスルフロメチル	牛乳	0.01	0.01	0.01	0.02	面積	0	2570	2548	2559	2719	2093	2406	1.06	
8	ハロスルフロメチル	鶏卵	0.01	0.01	0.01	0.002	面積	0	4298	4703	4501	4165	4201	4183	1.08	
9	ハロスルフロメチル	はちみつ	0.01	0.01	0.01	0.002	面積	0	5999	5936	5968	6072	5909	5991	1.00	
10	ハロスルフロメチル	牛の腎臓	0.01	0.1	0.1	0.02	面積	0	26726	25685	26206	22684	27033	24859	1.05	
					0.						0			0	#DIV/0!	
					0.						0			0	#DIV/0!	
					0.						0			0	#DIV/0!	
					0.						0			0	#DIV/0!	
					0.						0			0	#DIV/0!	
					0.						0			0	#DIV/0!	
					0.						0			0	#DIV/0!	
					0.						0			0	#DIV/0!	
					0.						0			0	#DIV/0!	
					0.						0			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。

S/N比(SIM)

・添加濃度が定量限界濃度の場合には、添加試料から得られるピークのS/N比を求める。添加濃度が定量限界濃度と異なる場合には、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)から得られるピークのS/N比を求める。

注) 表の網かけ部分には計算式が入力してありますので、削除や上書きをしないで下さい。

分析対象化合物を入力して下さい。

検討に用いた食品を入力して下さい。

定量限界を入力して下さい。

各食品の基準値を入力して下さい。

定量限界と基準値を入力すると添加濃度が計算されます。

担当機関:

No.	分析対象化合物	食品名	定量イオン(m/z)	定量限界(ppm)	基準値 ^{*1} (ppm)	添加濃度(ppm)	S/N比を求める対象 ^{*2}	マトリックス添加標準溶液濃度 ^{*3} (mg/L)	Max., n=1						Min., n=2						S/N比		備考		
									ピークの最大値(Dmax)	ノイズ			ピークトップ(D)	ピーク高さ(S)	ノイズ幅(N)	ピークの最大値(Dmax)	ノイズ			ピークトップ(D)	ピーク高さ(S)	ノイズ幅(N)		Max. n=1	Min. n=2
										最大値(E1)	最小値(E2)	中央値(C) ^{*4}					最大値(E1)	最小値(E2)	中央値(C) ^{*4}						
1	ハロスルフロメチル	牛の筋肉	252	0.01	0.1	0.1	標準	0.001	248	53	0	27	237	211	21	248	72	23	48	238	191	20	10	10	
2	ハロスルフロメチル	牛の脂肪	252	0.01	0.01	0.01	添加試料	0.001	248	54	0	27	237	210	22	248	55	0	28	237	210	22	10	10	
3	ハロスルフロメチル	牛の肝臓	252	0.01	0.1	0.1	標準	0.001	248	59	10	35	238	204	20	248	50	10	30	240	210	16	10	13	
4	ハロスルフロメチル	さけ	252	0.01	0.01	0.01	添加試料	0.001	248	33	0	17	241	225	13	248	40	7	24	241	218	13	17	17	
5	ハロスルフロメチル	うなぎ	252	0.01	0.01	0.01	添加試料	0.001	248	39	11	25	242	217	11	248	53	17	35	241	206	14	19	14	
6	ハロスルフロメチル	しじみ	252	0.01	0.01	0.01	添加試料	0.001	248	39	5	22	241	219	14	248	37	6	22	242	220	12	16	18	
7	ハロスルフロメチル	牛乳	252	0.01	0.01	0.01	添加試料	0.001	248	19	0	10	244	235	8	248	20	0	10	244	234	8	31	29	
8	ハロスルフロメチル	鶏卵	252	0.01	0.01	0.01	添加試料	0.001	248	18	0	9	244	235	7	248	25	0	13	243	231	10	33	23	
9	ハロスルフロメチル	はちみつ	252	0.01	0.01	0.01	添加試料	0.001	248	31	0	16	242	226	12	248	35	0	18	241	224	14	18	16	
10	ハロスルフロメチル	牛の腎臓	252	0.01	0.10	0.1	標準	0.001	248	68	11	29	237	208	23	248	74	10	43	235	193	26	9	8	
						0.							0	0	0					0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	
						0.							0	0	0					0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	
						0.	添加試料						0	0	0					0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	
						0.	添加試料						0	0	0					0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	
						0.	添加試料						0	0	0					0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	
						0.	添加試料						0	0	0					0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	
						0.	添加試料						0	0	0					0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	
						0.	添加試料						0	0	0					0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	
						0.	添加試料						0	0	0					0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	
						0.	添加試料						0	0	0					0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	
						0.	添加試料						0	0	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。

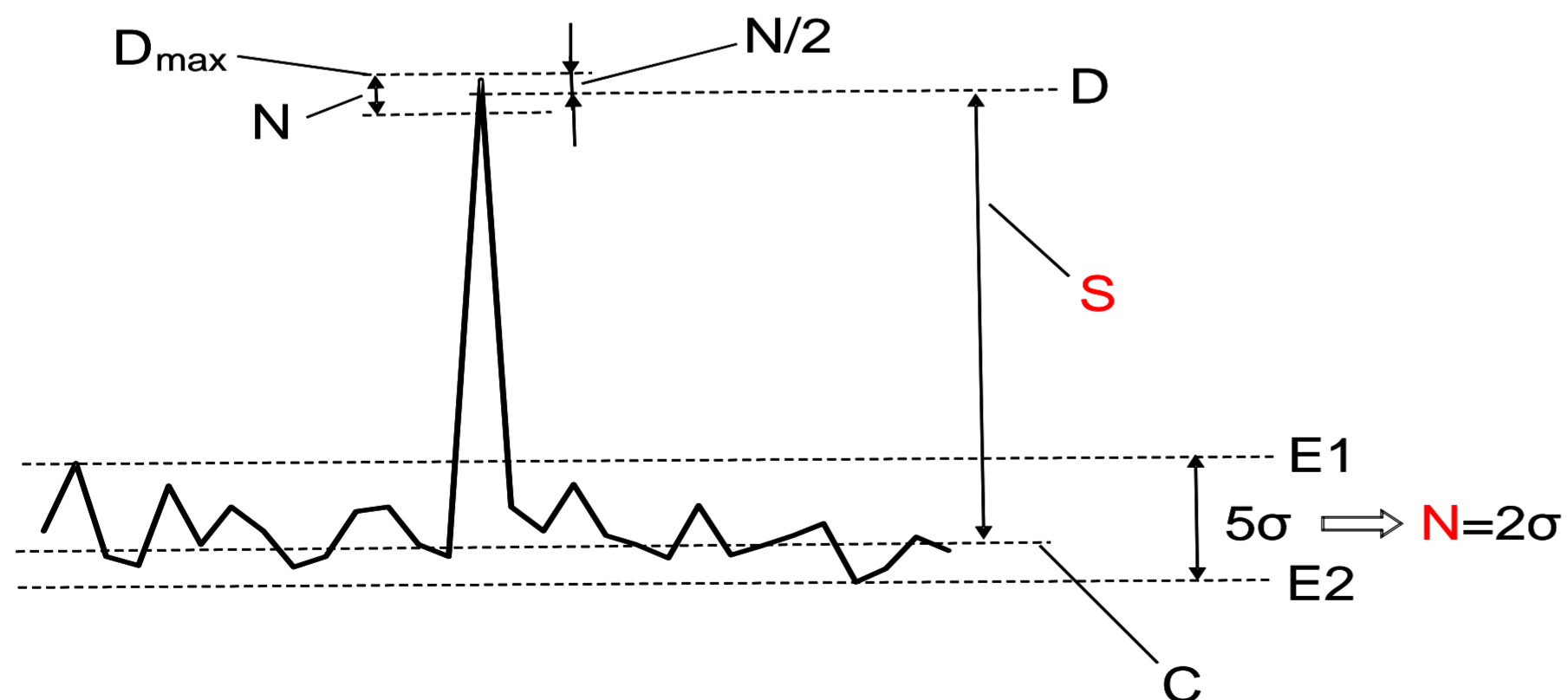
*2 添加試料から得られるピークのS/N比を求める場合には『添加』が、マトリックス添加標準溶液から得られるピークのS/N比を求める場合には『標準』が表示される。

*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)を作成する。

*4 ベースラインにはノイズの中央値(C)を用いることが望ましいが、それが困難な場合にはノイズの最大値(E1)と最小値(E2)の平均値[(E1+E2)/2]を用いても良い。

[S/N比の求め方]

経験的にノイズの最大値(E1)と最小値(E2)との幅はおよそ標準偏差の5倍となるため、その幅の2/5をノイズ幅(N)とする。一方、ノイズの中央値(C)をベースラインとし、ピークの最大値(Smax)からN/2を差し引いた値をピークトップ(D)とし、CとDの幅をピーク高さ(s)とする(下図参照)。



S/N比計算用(MRM)

・添加濃度が定量限界濃度の場合には、添加試料から得られるピークのS/N比を求める。添加濃度が定量限界濃度と異なる場合には、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)から得られるピークのS/N比を求める。

注) 表の網かけ部分には計算式が入力してありますので、削除や上書きをしないで下さい。

分析対象化合物を入力して下さい。
 検討に用いた食品を入力して下さい。
 定量限界を入力して下さい。
 各食品の基準値を入力して下さい。
 定量限界と基準値を入力すると添加濃度が計算されます。

担当機関:

No.	分析対象化合物	食品名	定量イオン(m/z)	定量限界(ppm)	基準値 ^{*1} (ppm)	添加濃度(ppm)	S/N比を求める対象 ^{*2}	マトリックス添加標準溶液濃度 ^{*3} (mg/L)	Max., n=1						Min., n=2						S/N比		備考		
									ピークの最大値(Dmax)	ノイズ			ピークトップ(D)	ピーク高さ(S)	ノイズ幅(N)	ピークの最大値(Dmax)	ノイズ			ピークトップ(D)	ピーク高さ(S)	ノイズ幅(N)		Max. n=1	Min. n=2
										最大値(E1)	最小値(E2)	中央値(C) ^{*4}					最大値(E1)	最小値(E2)	中央値(C) ^{*4}						
1	ハロスルフロメチル	牛の筋肉	433>252	0.01	0.1	0.1	標準	0.0002	248	13	0	7	245	239	5	248	9	0	5	246	242	4	46	67	
2	ハロスルフロメチル	牛の脂肪	433>252	0.01	0.01	0.01	添加試料	0.0002	248	6	0	3	247	244	2	248	6	0	3	247	244	2	102	102	
3	ハロスルフロメチル	牛の肝臓	433>252	0.01	0.1	0.1	標準	0.0002	248	6	0	3	247	244	2	248	4	0	2	247	245	2	102	153	
4	ハロスルフロメチル	さけ	433>252	0.01	0.01	0.01	添加試料	0.0002	248	18	0	9	244	235	7	248	22	0	11	244	233	9	33	26	
5	ハロスルフロメチル	うなぎ	433>252	0.01	0.01	0.01	添加試料	0.0002	248	16	0	8	245	237	6	248	12	0	6	246	240	5	37	50	
6	ハロスルフロメチル	しじみ	433>252	0.01	0.01	0.01	添加試料	0.0002	248	18	0	9	244	235	7	248	22	0	11	244	233	9	33	26	
7	ハロスルフロメチル	牛乳	433>252	0.01	0.01	0.01	添加試料	0.0002	248	8	0	4	246	242	3	248	6.5	0	3	247	243	3	76	94	
8	ハロスルフロメチル	鶏卵	433>252	0.01	0.01	0.01	添加試料	0.0002	248	6	0	3	247	244	2	248	5	0	3	247	245	2	102	122	
9	ハロスルフロメチル	はちみつ	433>252	0.01	0.01	0.01	添加試料	0.0002	248	6	0	3	247	244	2	248	6.5	0	3	247	243	3	102	94	
10	ハロスルフロメチル	牛の腎臓	433>252	0.01	0.10	0.1	標準	0.0002	248	9	0	5	246	242	4	248	8	0	4	246	242	3	67	76	
						0.	添加試料					0	0	0						0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	
						0.	添加試料					0	0	0						0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	
						0.	添加試料					0	0	0						0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	
						0.	添加試料					0	0	0						0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	
						0.	添加試料					0	0	0						0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	
						0.	添加試料					0	0	0						0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	
						0.	添加試料					0	0	0						0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	
						0.	添加試料					0	0	0						0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	
						0.	添加試料					0	0	0						0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	
						0.	添加試料					0	0	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 添加試料から得られるピークのS/N比を求める場合には『添加』が、マトリックス添加標準溶液から得られるピークのS/N比を求める場合には『標準』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)を作成する。
 *4 ベースラインにはノイズの中央値(C)を用いることが望ましいが、それが困難な場合にはノイズの最大値(E1)と最小値(E2)の平均値[(E1+E2)/2]を用いても良い。

[S/N比の求め方]
 経験的にノイズの最大値(E1)と最小値(E2)との幅はおよそ標準偏差の5倍となるため、その幅の2/5をノイズ幅(N)とする。一方、ノイズの中央値(C)をベースラインとし、ピークの最大値(Smax)からN/2を差し引いた値をピークトップ(D)とし、CとDの幅をピーク高さ(s)とする(下図参照)。

