

※ 本報告書は、試験法開発における検討結果を取りまとめたものであり、試験法の実施に際しての参考としてください。なお、報告書の内容と通知又は告示試験法との間に齟齬がある場合には、通知又は告示試験法が優先することに御留意ください。

# 食品に残留する農薬等の成分である物質の 試験法開発事業報告書

## ジカンバ試験法 (畜産物)

## ジカンバ試験法（畜産物）の検討結果

[緒言]

### 1. 目的

ジカンバは、芳香族カルボン酸系の除草剤である。オーキシンの植物ホルモン作用により細胞分裂を阻害し、生育を抑制することにより除草効果を示すものと考えられている。

今般、関連企業から「国外で使用される農薬等に係る残留基準の設定及び改正に関する指針について」に基づく残留基準の設定要請がなされたことに伴い、食品安全委員会において食品健康影響評価がなされたことを踏まえ、農薬・動物用医薬品部会において基準値が見直された。

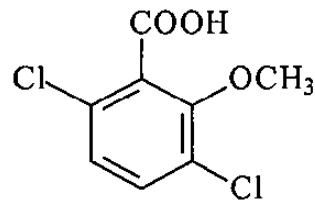
本検討においては、薬事食品衛生審議会食品衛生分科会報告書に記載されている内容を踏まえ、畜産物中のジカンバ試験法の開発を行った。

### 2. 分析対象化合物の構造式及び物理化学的性質

分析対象化合物：ジカンバ

IUPAC 名：4-Chloro-*o*-tolylloxyacetic acid

構造式：



分子式：C<sub>8</sub>H<sub>6</sub>Cl<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

分子量：221.03

溶解度：水 6.6 g/L (25°C, pH 1.8) , >250 g/L (25°C, pH 4.1)

ヘキサン 2.8 g/L

アセトン >500 g/L

メタノール >500 g/L

酢酸エチル >500 g/L

オクタノール 490 g/L

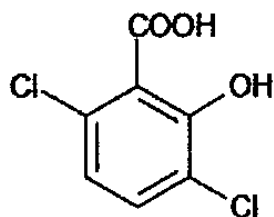
トルエン 180 g/L

ジクロロメタン 340 g/L

分配係数：logP<sub>ow</sub>= -1.8 (25°C, pH 6.8)

酸解離定数：pK<sub>a</sub>=1.87 (25°C)

代謝物 B



分子式：C<sub>7</sub>H<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

分子量：207.01

出典：Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues (JMPR) 評価書

The Pesticide Manual 12th edition, British Crop Protection Council

食品安全委員会 農薬評価書「ジカンバ」

### 3. 基準値（畜産物のみの抜粋）

食品名	基準値 (ppm)
牛の筋肉	0.03
豚の筋肉	0.03
その他の陸棲哺乳類に属する動物の筋肉	0.03
牛の脂肪	0.07
豚の脂肪	0.07
その他の陸棲哺乳類に属する動物の脂肪	0.07
牛の肝臓	0.7
豚の肝臓	0.7
その他の陸棲哺乳類に属する動物の肝臓	0.7
牛の腎臓	0.7
豚の腎臓	0.7
その他の陸棲哺乳類に属する動物の腎臓	0.7
牛の食用部分	0.7
豚の食用部分	0.7
その他の陸棲哺乳類に属する動物の食用部分	0.7
乳	0.2
鶏の筋肉	0.02
その他の家きんの筋肉	0.02
鶏の脂肪	0.04
その他の家きんの脂肪	0.04
鶏の肝臓	0.07

その他の家きんの肝臓	0.07
鶏の腎臓	0.07
その他の家きんの腎臓	0.07
鶏の食用部分	0.07
その他の家きんの食用部分	0.07
鶏の卵	0.01
その他の家きんの卵	0.01

規制対象：畜産物にあつてはジカンバ、代謝物 B 及び代謝物 B の抱合体とする。

出典：平成 26 年 8 月 8 日 食安発 0808 第 1 号 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知

## [実験方法]

### 1. 試料

東京都内の小売店で購入した。試料の調製方法を以下に示した。

#### 1) 牛の筋肉

可能な限り脂肪層を除き、細切した後、フードプロセッサーを用いて均一化した。

#### 2) 牛の脂肪

可能な限り筋肉層を除き、細切した後、フードプロセッサーを用いて均一化した。

#### 3) 牛の肝臓

細切した後、フードプロセッサーを用いて均一化した。

#### 4) 牛乳

よく攪拌して均一化した。

#### 5) 鶏卵

殻を除去し、フードプロセッサーを用いて均一化した。

### 2. 試薬・試液

ジカンバ標準品：純度 100.0% (富士フィルム和光純薬)

代謝物 B 標準品：純度 99.7% (富士フィルム和光純薬)

25%アンモニア水：特級 (富士フィルム和光純薬)

エタノール：残留農薬試験用 (関東化学)

塩酸：特級 (富士フィルム和光純薬)

ギ酸：LC/MS 用 (富士フィルム和光純薬)

酢酸：LC/MS 用 (富士フィルム和光純薬)

酢酸エチル：残留農薬試験用 (関東化学)

*n*-ヘキサン：残留農薬試験用 (富士フィルム和光純薬)

水：超純水装置 Milli-Q Integral 5 (メルク) で精製したもの

メタノール：残留農薬試験用 (関東化学)、LC/MS 用 (富士フィルム和光純薬)

2 mol/L 塩酸：塩酸 100 mL に水を加えて 600 mL とした。

エタノール/2 mol/L 塩酸 (1 : 1)：エタノール 500 mL 及び 2 mol/L 塩酸 500 mL を混合した。

酢酸エチル/*n*-ヘキサン (1 : 4) : 酢酸エチル 200 mL 及び *n*-ヘキサン 800 mL を混合した。

ギ酸/水/メタノール (1 : 600 : 400) : ギ酸 1 mL、水 600 mL 及びメタノール 400 mL を混合した。

25%アンモニア水/水/メタノール (2 : 5 : 95) : 25%アンモニア水 20 mL、水 50 mL 及びメタノール 950 mL を混合した。

水/メタノール (19 : 1) : 水 950 mL 及びメタノール 50 mL を混合した。

スチレンジビニルベンゼン-N 含有ビニル共重合体ミニカラム : InertSep HLB (500 mg/6 mL) (ジーエルサイエンス)

#### 標準原液

ジカンバ標準品 10.0 mg を精秤し、アセトンに溶解して正確に 50 mL とし、ジカンバ 200 mg/L 溶液を調製した。

代謝物 B 標準品 4.7 mg を精秤し、アセトンに溶解して正確に 50 mL とし、代謝物 B 100 mg/L (ジカンバ換算値) 溶液を調製した。なお、以降の代謝物 B の濃度はジカンバ換算濃度である。

検量線作成用標準溶液 : ジカンバ標準原液及び代謝物 B 標準原液を混合し、水/メタノール (19 : 1) で適宜希釈して、0.00125~0.0075 mg/L (ジカンバの定量限界値相当濃度)、0.0025~0.015 mg/L (ジカンバの鶏卵基準値相当濃度)、0.0125~0.075 mg/L (ジカンバの鶏卵以外基準値相当濃度)、0.000125~0.00075 mg/L (代謝物 B の定量限界値相当濃度) 及び 0.00075~0.0045 mg/L (代謝物 B の基準値相当濃度) の溶液を調製した。

#### 添加用標準溶液

##### ① 定量限界値相当濃度 (添加濃度 0.005 ppm)

ジカンバ標準原液及び代謝物 B 標準原液を混合し、アセトンを用いて希釈して、0.05 mg/L の溶液を調製した。

##### ② 基準値相当濃度

###### a. 牛の筋肉 (添加濃度 0.03 ppm)

ジカンバ標準原液及び代謝物 B 標準原液を混合し、アセトンを用いて希釈して、0.3 mg/L の溶液を調製した。

###### b. 牛の脂肪 (添加濃度 0.07 ppm)

ジカンバ標準原液及び代謝物 B 標準原液を混合し、アセトンを用いて希釈して、0.7 mg/L の溶液を調製した。

###### c. 牛の肝臓 (添加濃度 0.7 ppm)

ジカンバ標準原液及び代謝物 B 標準原液を混合し、アセトンを用いて希釈して、7 mg/L の溶液を調製した。

###### d. 牛乳 (添加濃度 0.2 ppm)

ジカンバ標準原液及び代謝物 B 標準原液を混合し、アセトンを用いて希釈して、2 mg/L の溶液を調製した。

###### e. 牛の筋肉 (添加濃度 0.01 ppm)

ジカンバ標準原液及び代謝物 B 標準原液を混合し、アセトンを用いて希釈して、0.1 mg/L の溶液を調製した。

### 3. 装置

フードプロセッサ：MK-K58（パナソニック）

濃縮装置：有機溶媒回収装置 V-703（BUCHI 社製）

遠心分離器：ユニバーサル冷却遠心機 5930（久保田商事）

#### LC-MS/MS

装置	型式	会社
MS	8060	島津製作所
LC	Prominence	島津製作所
データ処理	LC solution	島津製作所

### 4. 測定条件

#### LC-MS/MS

LC 条件																									
カラム	Inertsil Ph（内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 5 μm : GL サイエンス）																								
移動相流速（mL/min）	0.20																								
注入量（μL）	10																								
カラム温度（°C）	40																								
移動相	A 液：0.1 vol% 酢酸・5 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>0.0</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>2.0</td> <td>70</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>15.0</td> <td>70</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>15.5</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>25.0</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>25.5</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>35</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> </tbody> </table>	時間（分）	A 液（%）	B 液（%）	0.0	95	5	2.0	70	30	15.0	70	30	15.5	10	90	25.0	10	90	25.5	95	5	35	95	5
時間（分）	A 液（%）	B 液（%）																							
0.0	95	5																							
2.0	70	30																							
15.0	70	30																							
15.5	10	90																							
25.0	10	90																							
25.5	95	5																							
35	95	5																							
MS 条件																									
測定モード	SRM（選択反応モニタリング）																								
イオン化モード	ESI（-）																								
ネブライザーガス流量	3 L/min（窒素）																								
ドライイングガス流量	10 L/min（窒素）																								
ヒーティングガス流量	10 L/min（窒素）																								

インターフェース電圧	-3.0 KV
インターフェース温度	200°C
脱溶媒温度	355°C
コリジョンガス	アルゴン
DL 電圧	0 V
DL 温度	150°C
ブロックヒーター温度	400°C
定量イオン ( $m/z$ )	ジカンバ : 218.8→174.9 [CE : 10 (eV)] 代謝物 B : 204.7→160.9 [CE : 13 (eV)]
定性イオン ( $m/z$ )	ジカンバ : 221.1→177.0 [CE : 7 (eV)] 代謝物 B : 207.0→163.0 [CE : 12 (eV)]
保持時間	ジカンバ : 7.7 分 代謝物 B : 11.2 分

CE : Collision Energy

## 5. 定量

ジカンバ標準原液及び代謝物 B 標準原液を混合して水/メタノール (19 : 1) で希釈し、ジカンバは 0.00125~0.0075 mg/L (定量限界値相当濃度の添加回収試験用)、0.0025~0.015 mg/L (鶏卵の基準値相当濃度の添加回収試験用) 及び 0.0125~0.075 mg/L (鶏卵以外の基準値相当濃度の添加回収試験用)、代謝物 B は 0.000125~0.00075 mg/L (定量限界値相当濃度の添加回収試験用)、0.00075~0.0045 mg/L (基準値相当濃度の添加回収試験用) の濃度の溶液を調製した。この溶液 5  $\mu$ L を LC-MS/MS に注入して、得られたピーク面積を用いて絶対検量線法により検量線を作成した。同様に試験溶液 10  $\mu$ L を LC-MS/MS に注入し、得られたピーク面積を用いて、作成した検量線から試料中のジカンバ及び代謝物 B の含量を算出した。

## 6. 試験溶液の調製

### 1) 添加試料の調製

試料 10.0 g に添加用標準溶液 (アセトン溶液) 1 mL を添加しよく混合した後、30 分間放置した。牛の脂肪の場合は、試料 10.0 g を 40°C で加温して融解し、添加用標準溶液 1 mL を添加しよく混合した後、再凝固してから 30 分間放置した。各試料において使用した添加用標準溶液の濃度を表 1 に示す。

表 1 各試料における添加用標準溶液の濃度

試料	添加濃度 (ppm)	添加用標準溶液濃度 (mg/L)
牛の筋肉	0.005	0.05
	0.03	0.3
牛の脂肪	0.005	0.05
	0.07	0.7
牛の肝臓	0.005	0.05
	0.7	7
牛乳	0.005	0.05
	0.2	2
鶏卵	0.005	0.05
	0.01	0.1

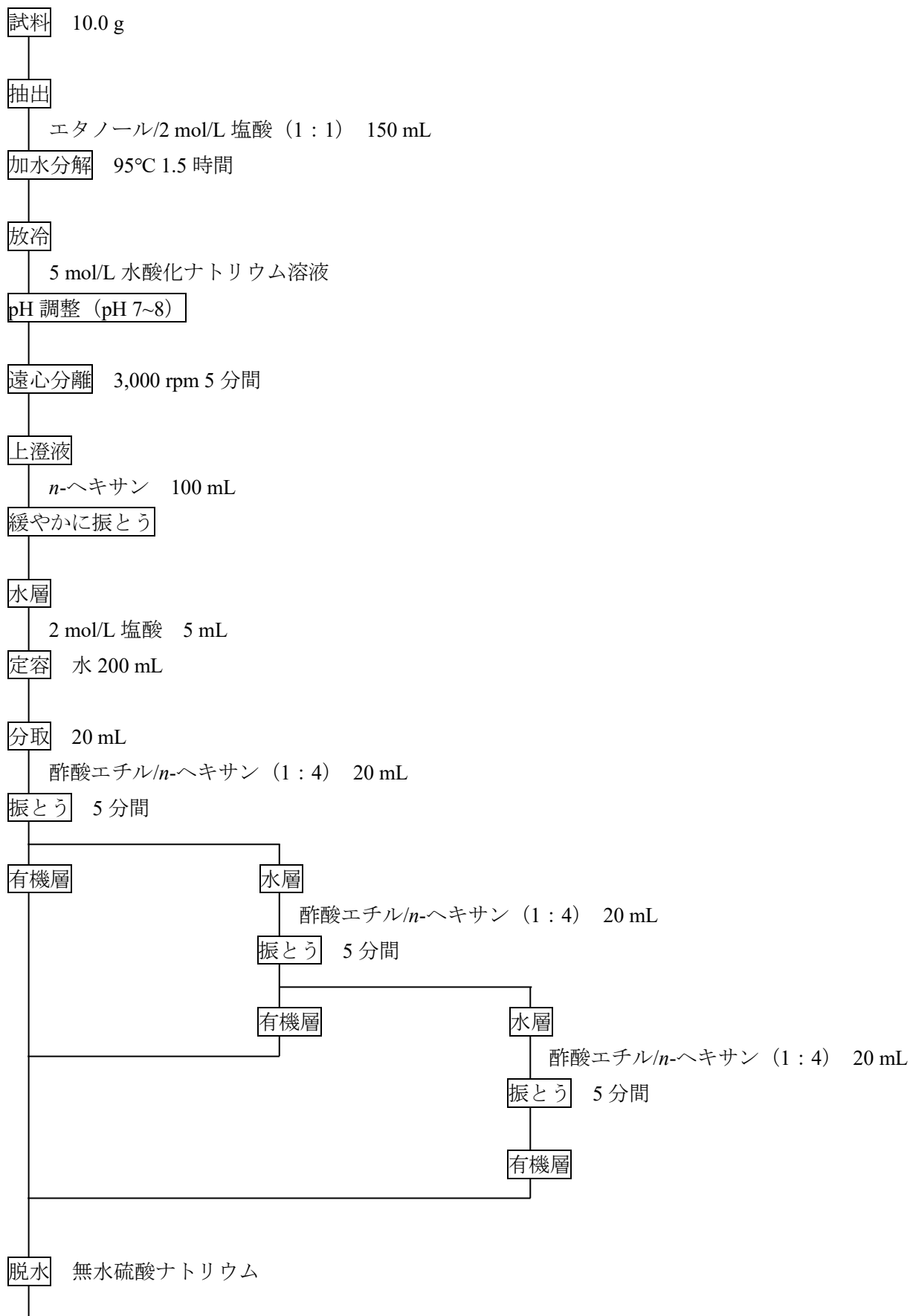
## 2) 抽出及び加水分解

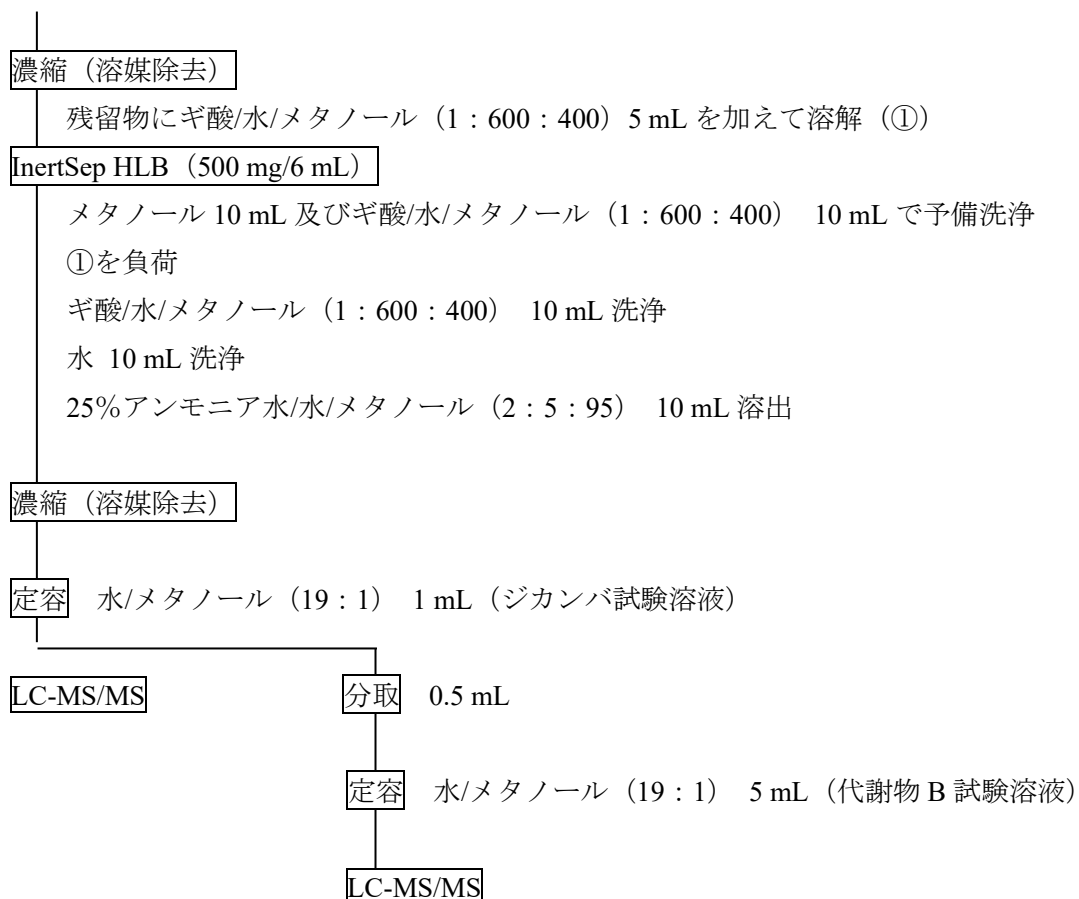
試料 10.0 g にエタノール/2 mol/L 塩酸 (1 : 1) 150 mL を加え混合し、還流冷却器を付けて、95°C で 1.5 時間加熱した。放冷後、5 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を加え、pH を 7~8 に調整した後、毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離した。上澄液を採り、*n*-ヘキサン 100 mL を加えて手で緩やかに振とうした後、水層を採り、2 mol/L 塩酸 5 mL 及び水を加えて正確に 200 mL とした。この溶液から正確に 20 mL を分取し、酢酸エチル/*n*-ヘキサン (1 : 4) 20 mL で 3 回振とう抽出した。抽出液を合わせ、無水硫酸ナトリウムを加えて脱水し、無水硫酸ナトリウムをろ別した後、ろ液を 40°C 以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物にギ酸/水/メタノール (1 : 600 : 400) 5 mL を加えて溶かした。

## 3) 精製

InertSep HLB (500 mg/6 mL) にメタノール 10 mL、ギ酸/水/メタノール (1 : 600 : 400) 10 mL を順次注入し、流出液は捨てた。このカラムに 2) で得られた溶液を注入した後、ギ酸/水/メタノール (1 : 600 : 400) 10 mL、水 10 mL を順次注入し、各流出液は捨てた。次いで、アンモニア水/水/メタノール (2 : 5 : 95) 10 mL を注入し、溶出液を 40°C 以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物を水/メタノール (19 : 1) に溶かし、正確に 1 mL としたものをジカンバ試験溶液とした。ジカンバ試験溶液から正確に 0.5 mL を分取し、水/メタノール (19 : 1) を加えて正確に 5 mL としたものを代謝物 B 試験溶液とした。なお、牛の脂肪の基準値相当については代謝物 B の試験溶液を 2 倍、牛の肝臓の基準値相当についてはジカンバの試験溶液を 10 倍、代謝物 B の試験溶液を 20 倍、牛乳についてはジカンバの試験溶液を 5 倍、代謝物 B の試験溶液を 2 倍に希釈して測定した。

[分析法フローチャート]





#### 7. マトリックス添加標準溶液の調製

各検討対象食品のブランク試験溶液 0.2 mL を採り、窒素気流下で溶媒を除去した後、添加回収試験における回収率 100%相当濃度の溶媒標準溶液 0.2 mL を加えて溶解したものをマトリックス添加標準溶液とした。

[結果及び考察]

1. 測定条件の検討

1) MS 条件の検討

イオン化モードを選択するためにジカンバ標準溶液及び代謝物 B 標準溶液のインフュージョン測定を行ったところ、ESI (+) モードではジカンバ及び代謝物 B 由来の分子は観測されず、ESI (-) モードにおいてジカンバの脱プロトン化分子である  $m/z$  218.8[M-H]<sup>-</sup> 及びその同位体である  $m/z$  221.1[M-H]<sup>-</sup> が検出された。また代謝物 B の脱プロトン化分子である  $m/z$  204.7[M-H]<sup>-</sup> 及びその同位体である  $m/z$  207.0[M-H]<sup>-</sup> が検出された。このときのマススペクトルを図 1 及び 2 に示す。

ジカンバの脱プロトン化分子である  $m/z$  218.8 [M-H]<sup>-</sup> 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 3 及び図 7 に示した。 $m/z$  174.9 が高い強度で検出され、次いで  $m/z$  145.0 が検出されたが  $m/z$  145.0 については強度が低かった。同位体である  $m/z$  221.1[M-H]<sup>-</sup> 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確認したところ、図 4 に示したとおり、 $m/z$  177.0 が高い強度で検出された。この結果より、ジカンバについては、 $m/z$  218.8→174.9 を定量用  $m/z$  221.1→177.0 を定性用の測定イオンとした。

代謝物 B の脱プロトン化分子である  $m/z$  204.7[M-H]<sup>-</sup> 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 5 に示した。 $m/z$  160.9 が非常に高い強度で検出され、次いで  $m/z$  125.0 が検出された。また、同位体である  $m/z$  207.0[M-H]<sup>-</sup> 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確認したところ、図 6 に示したとおり、 $m/z$  163.0 が非常に高い強度で検出された。 $m/z$  204.7→125.0 と  $m/z$  207.0→163.0 を比較したところ、 $m/z$  207.0→163.0 の方がより高い強度で検出されたことから、代謝物 B については、 $m/z$  204.7→160.9 を定量用  $m/z$  207.0→163.0 を定性用の測定イオンとした。

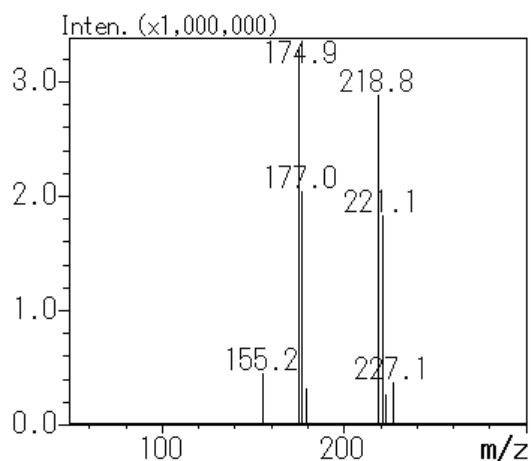


図 1 ジカンバ標準溶液のマススペクトル  
スキャン範囲：50~300 amu  
測定条件：ESI-

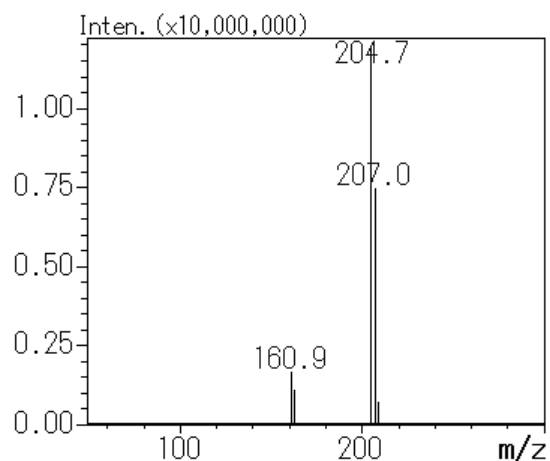


図 2 代謝物 B 標準溶液のマススペクトル  
スキャン範囲：50~300 amu  
測定条件：ESI-

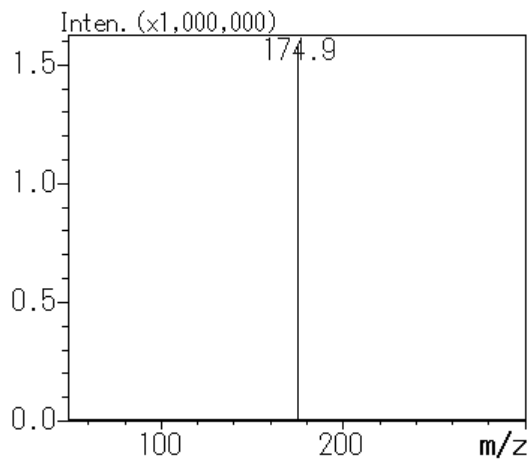


図3 ジカンバのプロダクトイオンスペクトル  
(定量用)

プリカーサーイオン： $m/z$  218.8

測定条件：ESI<sup>-</sup>, CE = 10 eV

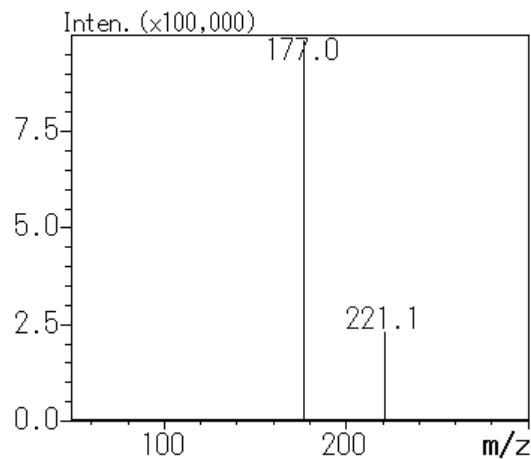


図4 ジカンバのプロダクトイオンスペクトル  
(定性用)

プリカーサーイオン： $m/z$  221.1

測定条件：ESI<sup>-</sup>, CE = 7 eV

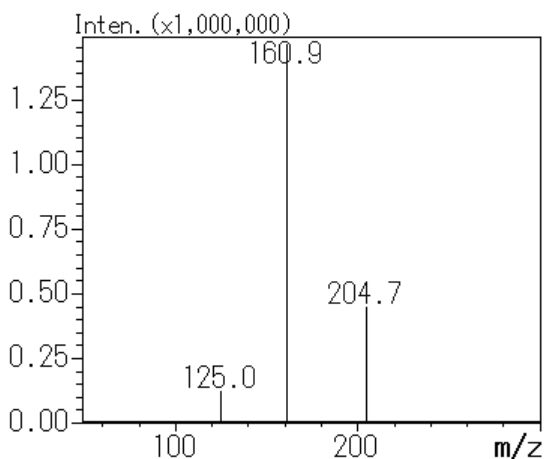


図5 代謝物Bのプロダクトイオンスペクトル  
(定量用)

プリカーサーイオン： $m/z$  204.7

測定条件：ESI<sup>-</sup>, CE = 13 eV

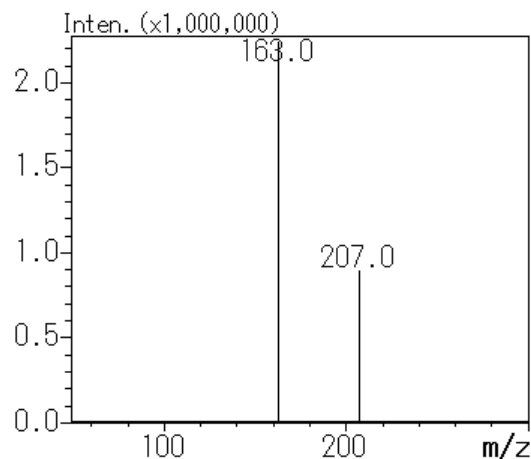


図6 代謝物Bのプロダクトイオンスペクトル  
(定性用)

プリカーサーイオン： $m/z$  207.0

測定条件：ESI<sup>-</sup>, CE = 12 eV

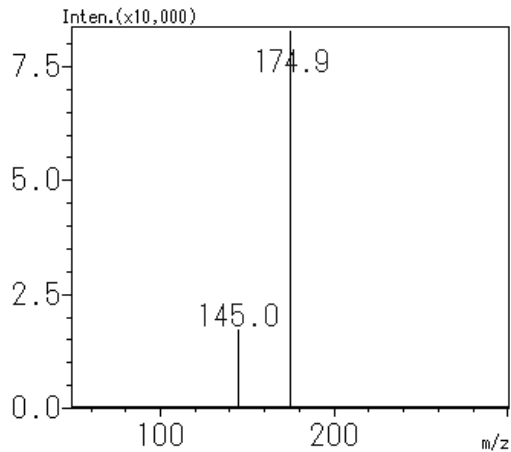


図7 ジカンバのプロダクトイオンスペクトル  
(検討用)

プリカーサーイオン :  $m/z$  218.8

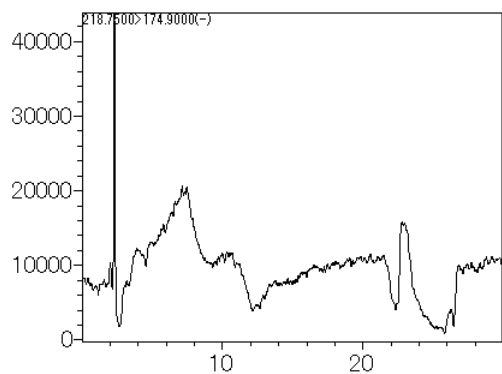
測定条件 : ESI-, CE = 20 eV

## 2) LC 条件の検討

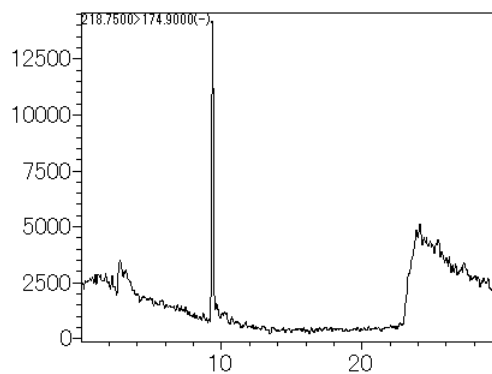
分析カラムについて検討を行った。結果は図 8 及び 9 に示したとおり、逆相系カラムである Inertsil ODS-3 を用いた場合には、ジカンバのクロマトグラムにおいてベースが安定せず、ピーク形状が悪かった。Inertsil Ph (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 5  $\mu\text{m}$  : GL サイエンス製) を用いて測定を行ったところ、保持、ピーク形状ともに良好な結果が得られたことから、分析カラムには Inertsil Ph を用いることとした。

次に、移動相条件の検討を行った。結果は図 8~11 に示したとおり、添加剤について酢酸、ギ酸、酢酸アンモニウム、ギ酸アンモニウムを用い、有機溶媒についてはアセトニトリル及びメタノールを用いて検討を行ったところ、5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液-メタノールにおいて良好な感度が得られたが、ベースがやや不安定であった。そこで酢酸の添加を検討したところ 0.1 vol% 酢酸・5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液-メタノールにおいてジカンバ及び代謝物 B ともに良好な感度及びピーク形状が得られたことから、0.1 vol% 酢酸・5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液-メタノールを移動相として用いることとした。

Inertsil ODS-3

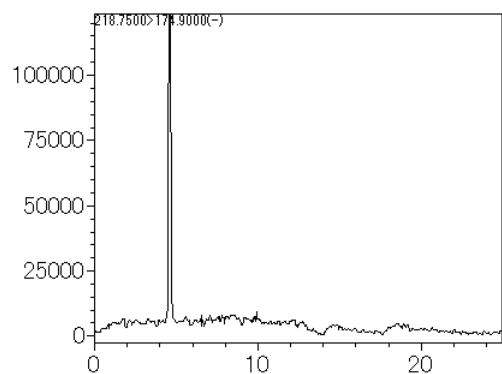


0.1 vol%ギ酸-アセトニトリル



5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液  
-5 mmol/L 酢酸アンモニウム・メタノール

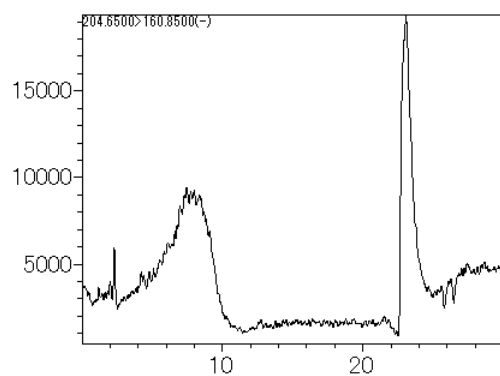
Inertsil Ph



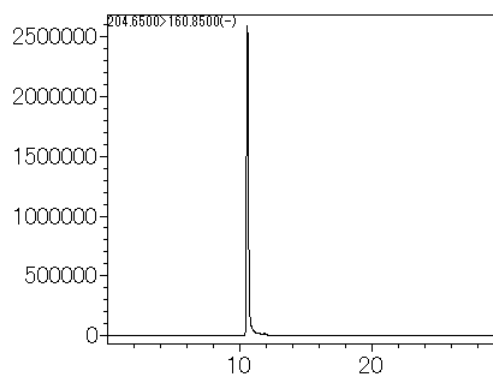
5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液-5 mmol/L 酢酸アンモニウム・メタノール

図8 ジカンバのクロマトグラム (標準溶液 0.2 mg/L)  
移動相以外の条件は同一

Inertsil ODS-3

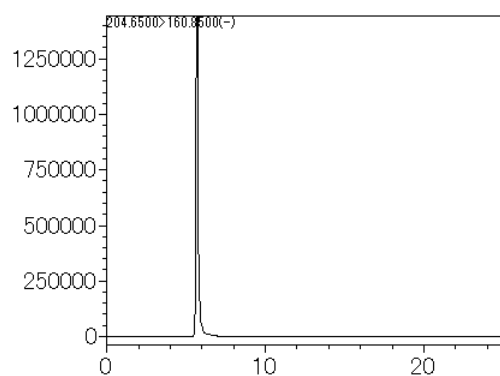


0.1 vol%ギ酸-アセトニトリル



5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液  
-5 mmol/L 酢酸アンモニウム・メタノール

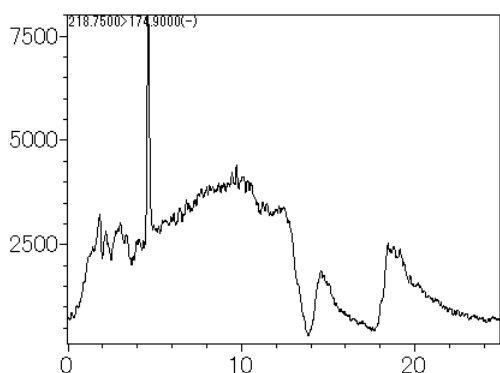
Inertsil Ph



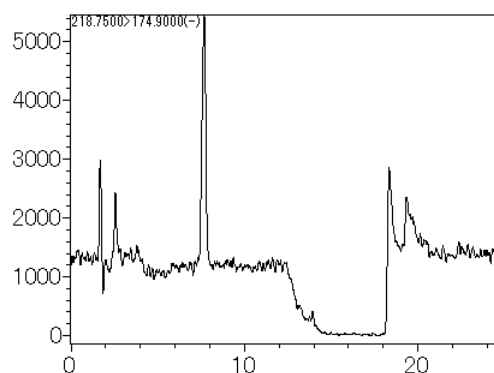
5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液-5 mmol/L 酢酸アンモニウム・メタノール

図9 代謝物Bのクロマトグラム (標準溶液 0.2 mg/L)  
移動相以外の条件は同一

Inertsil Ph



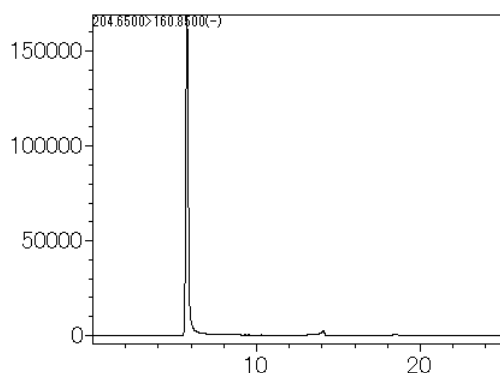
5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液  
-5 mmol/L 酢酸アンモニウム・メタノール



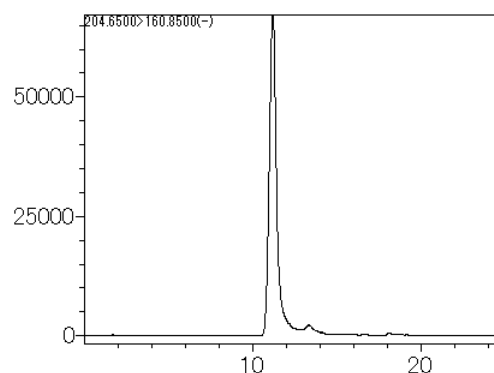
0.1 vol% 酢酸・5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液  
-5 mmol/L 酢酸アンモニウム・メタノール

図 10 ジカンバのクロマトグラム (標準溶液 0.01 mg/L)  
移動相以外の条件は同一

Inertsil Ph



5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液  
-5 mmol/L 酢酸アンモニウム・メタノール



0.1 vol% 酢酸・5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液  
-5 mmol/L 酢酸アンモニウム・メタノール

図 11 代謝物 B のクロマトグラム (標準溶液 0.01 mg/L)  
移動相以外の条件は同一

### 3) 検量線

図 12~16 に検量線の例を示した。ジカンバは 0.00125~0.0075 mg/L (定量限界値相当濃度の添加回収試験用)、0.0025~0.015 mg/L (鶏卵の基準値相当濃度の添加回収試験用) 及び 0.0125~0.075 mg/L (鶏卵以外の基準値相当濃度の添加回収試験用)、代謝物 B は 0.000125~0.00075 mg/L (定量限界値相当濃度の添加回収試験用)、0.00075~0.0045 mg/L (基準値相当濃度の添加回収試験用) の濃度範囲で作成した。いずれも決定係数 0.999 以上であり良好な直線性を示した。

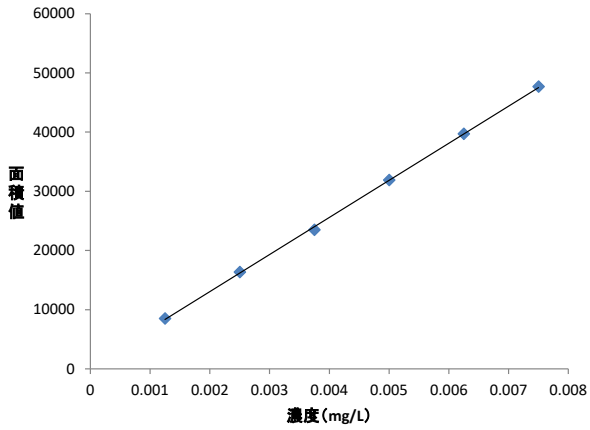


図 12 ジカンバ検量線の例 (定量限界値測定用)  
濃度範囲 : 0.00125~0.0075 mg/L  
 $y = 156713143x + 513$   $r^2 = 0.9997$

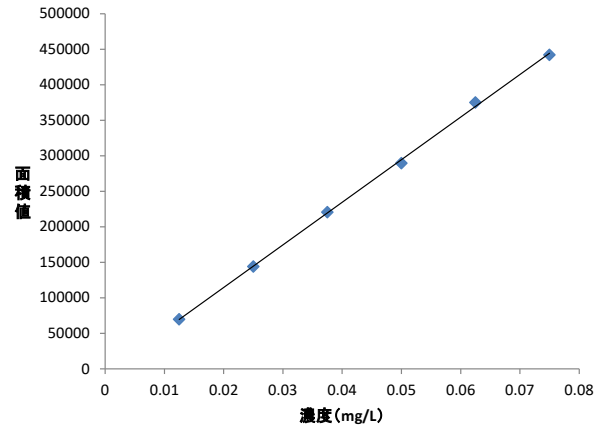


図 14 ジカンバ検量線の例 (鶏卵以外の基準値測定用)  
濃度範囲 : 0.0125~0.075 mg/L  
 $y = 1498949714x - 5448$   $r^2 = 0.9994$

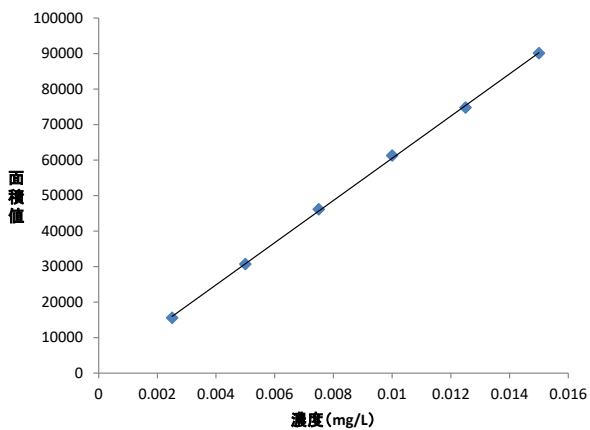


図 13 ジカンバ検量線の例 (鶏卵の基準値測定用)  
濃度範囲 : 0.0025~0.015 mg/L  
 $y = 5939349x + 1120$   $r^2 = 0.9997$

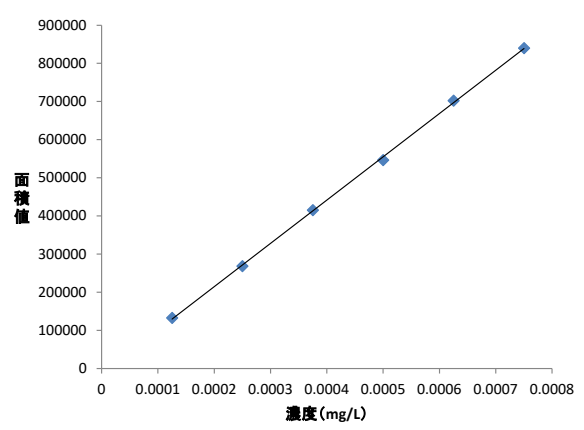


図 15 代謝物 B 検量線の例 (定量限界値測定用)  
濃度範囲 : 0.000125~0.00075 mg/L  
 $y = 161640000x + 600$   $r^2 = 1.0000$

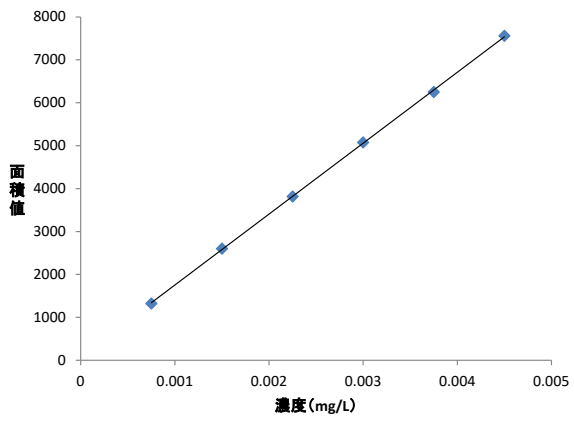


図 16 代謝物 B 検量線の例 (基準値測定用)

濃度範囲 : 0.00075~0.0045 mg/L

$$y = 186637829x + 17158 \quad r^2 = 0.9999$$

## 2. 試験溶液調製法の検討

### 1) 抽出溶媒の検討

牛の筋肉、脂肪、肝臓、牛乳を用いて、家畜残留試験 (AM-0938-0994-0) ※1 の方法に従って加水分解を行った。試料 10.0 g にジカンバ及び代謝物 B を 200 µg 添加し、30 分間放置した後、1 mol/L 塩酸 150 mL を加えて、水浴上で 95°C、1.5 時間加熱した。放冷後、毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離を行った後、上澄液を採り、水を加えて正確に 200 mL とした。この溶液を希釈し、LC-MS/MS で測定した。結果は表 1 に示したとおり、ジカンバ及び代謝物 B とともに牛の筋肉、脂肪及び肝臓では十分な回収が得られなかった。加水分解中の様子として、試料の分散が不十分であり、特に脂肪においては脂が分離して液面に浮いている状態であった。このことから、試料と溶媒との混和が不十分であるため、抽出効率が低いことが回収率低下の要因となっている可能性が考えられた。そこで、試料と溶媒の混和性を高めるため、エタノールの添加を試みた。エタノール/2 mol/L 塩酸 (1 : 1) を用いることで、試料が溶媒中に十分分散しており、表 1 に示したとおり、ジカンバ及び代謝物 B とともに良好な回収が得られた。

#### ※1 家畜残留試験の分析法 (概要)

試料に 1 mol/L 塩酸を加え 95°C で 1 時間加熱する。pH 調整、ジエチルエーテルへの転溶、ブチル化を行った後、シリカゲルカラムで精製し、GC-ECD で測定する。

表 1 加水分解の検討 [回収率 (%) ※2]

分析対象 化合物	試料	1 mol/L 塩酸 (作物残留試験の方法)	エタノール/2 mol/L 塩酸 (1 : 1)
ジカンバ	牛の筋肉	78.6	97.9
	牛の脂肪	66.2	98.5
	牛の肝臓	68.4	98.2
	牛乳	97.3	96.1
代謝物 B	牛の筋肉	74.7	98.6
	牛の脂肪	54.2	95.3
	牛の肝臓	71.9	95.0
	牛乳	95.9	96.5

添加量 : 100 µg

※2 回収率はマトリックス添加標準溶液による補正值

### 2) 脱脂方法の検討

牛の筋肉や脂肪などの加水分解後には、分離した脂が液面に浮いている状態であった。そこで、*n*-ヘキサンを用いた脱脂を行うこととした。

エタノール/2 mol/L 塩酸 (1 : 1) 150 mL に 5 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を加え、溶液を酸性 (無添加)、中性、アルカリ性とした後、*n*-ヘキサンを 100 mL 加えて 5 分間振とうを行い、水層におけるジカンバ及び代謝物 B の回収率を確認した。結果は表 2 に示したとおり、酸性ではジカンバの回収率の低下がみられたが、中性、アルカリ性では良好な回収が得られた。また、中性、アルカリ性においては、

振とう後の *n*-ヘキサン層にエマルジョンが形成されたことから、振とうは緩やかに行うことが望ましいと考えられた。

以上の結果より、脱脂方法として、加水分解溶液に 5 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を加えて pH を 7~8 に調整した後、*n*-ヘキサン 100 mL を加えて緩やかに振とうを行い、水層を採ることとした。

表 2 脱脂方法の検討結果 [回収率 (%)]

分析対象化合物	酸性	中性	アルカリ性
ジカンバ	84.7	98.3	99.3
代謝物 B	96.6	102.6	99.3

添加量：10 µg

### 3) 酢酸エチル/*n*-ヘキサン混液による転溶の検討

実試料を用いて酢酸エチル/*n*-ヘキサン混液による転溶の検討を行った。

牛の肝臓 10.0 g にエタノール/2 mol/L 塩酸 (1 : 1) 150 mL を加えて、95°C で 1.5 時間加熱した。放冷後、5 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を加えて pH を 7~8 に調整した後、毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離した。上澄液を採り、*n*-ヘキサン 100 mL を加えて緩やかに振とうした後、水層を採り、水を加えて正確に 200 mL とした。この溶液 20 mL にジカンバ及び代謝物 B を 1 µg 添加し、酢酸エチル/*n*-ヘキサン (1 : 9) または酢酸エチル/*n*-ヘキサン (1 : 4) を 20 mL ずつ加えて 4 回振とう抽出を行った。結果は表 3 に示したとおり、酢酸エチル/*n*-ヘキサン (1 : 9) では 4 回の振とうを要したが、酢酸エチル/*n*-ヘキサン (1 : 4) では 3 回でほぼ全量回収できたことから、酢酸エチル/*n*-ヘキサン (1 : 4) で 3 回振とう抽出することとした。なお、溶媒除去の際に水が混入すると濃縮 (溶媒除去) に時間がかかることから、酢酸エチル/*n*-ヘキサン混液による転溶を行った後、無水硫酸ナトリウムを用いて脱水を行うこととした。

表 3 酢酸エチル/*n*-ヘキサンによる転溶の検討結果 [回収率 (%)]

分析対象化合物	振とう回数	酢酸エチル/ <i>n</i> -ヘキサン	
		1 : 4	1 : 9
ジカンバ	1 回目	67.5	61.5
	2 回目	24.7	23.0
	3 回目	4.8	7.0
	4 回目	0	4.3
	計	97.0	95.8
代謝物 B	1 回目	75.2	67.6
	2 回目	20.6	26.8
	3 回目	3.7	6.0
	4 回目	0	0
	計	99.5	100.4

添加量：1 µg

#### 4) カラム精製の検討

スチレンジビニルベンゼン-N 含有ビニル共重合体ミニカラムによる精製 [InertSep HLB (500 mg/6 mL)]

InertSep HLB (500 mg/6 mL) における溶出状況の確認を行った。カラムをメタノール 10 mL 及び表 3 に示した各溶出溶媒 10 mL で予備洗浄した後、ジカンバ及び代謝物 B の 1 mg/L 溶液 (各負荷溶媒で調製した溶液) を 1 mL 負荷し、溶出溶媒を 5 mL ずつ負荷して各分画を分取した。結果は表 4 及び 5 に示した通り、ジカンバ及び代謝物 B は水及びギ酸/水/メタノール (1 : 600 : 400) では溶出せず、25%アンモニア水/水/メタノール (1 : 5 : 95) 20 mL または 25%アンモニア水/水/メタノール (2 : 5 : 95) 20 mL で溶出した。

表 4 InertSep HLB (500 mg/6 mL) からのジカンバの溶出状況 [回収率 (%) ]

溶出溶媒量	水	水/メタノール (3 : 2)	メタノール	ギ酸/水/メタノール		25%アンモニア水/水/メタノール	
				1 : 600 : 400	1 : 500 : 500	1 : 5 : 95	2 : 5 : 95
0-5 mL	0	97.1	95.5	0	0	96.1	96.5
5-10 mL	0	0	0	0	0	0	0
10-15 mL	0	0	0	0	0	0	0
15-20 mL	0	0	0	0	0	0	0
20-25 mL	0	0	0	0	0	0	0
25-30 mL	0	0	0	0	0	0	0
計	0	97.1	95.5	0	0	96.1	96.5

添加量 : 1 µg

表 5 InertSepHLB (500 mg/6 mL) からの代謝物 B の溶出状況 [溶出率 (%) ]

溶出溶媒量	水	水/メタノール (3 : 2)	メタノール	ギ酸/水/メタノール		25%アンモニア水/水/メタノール	
				1 : 600 : 400	1 : 500 : 500	1 : 5 : 95	2 : 5 : 95
0-5 mL	0	0	59.8	0	0.2	88.8	82.6
5-10 mL	0	21.3	45.6	0	0.1	3.0	9.0
10-15 mL	0	51.6	1.6	0	0.1	1.0	1.0
15-20 mL	0	15.5	0.8	0	0.1	0.4	0.5
20-25 mL	0	6.9	0.4	0	0.1	0	0
25-30 mL	0	1.2	0.4	0	0.1	0	0
計	0	96.5	108.6	0	0.7	93.2	93.1

添加量 : 1 µg

次にマトリックス (牛の肝臓) 存在下における溶出状況の確認をした。牛の肝臓加水分解液\*20 mL を採り、酢酸エチル/*n*-ヘキサン (1 : 4) 20 mL ずつで 3 回振とう抽出した。抽出液を合わせ、無水硫酸ナトリウムを加えて脱水し、無水硫酸ナトリウムをろ別した後、40°C以下で濃縮し溶媒を除去した。この

残留物にジカンバ及び代謝物 B の 1 mg/L 溶液 [ギ酸/水/メタノール (1 : 600 : 400) 溶液] 1 mL 及びギ酸/水/メタノール (1 : 600 : 400) 4 mL を加えて溶かし、メタノール 10 mL 及びギ酸/水/メタノール (1 : 60 : 40) 10 mL で予備洗浄した HLB ミニカラムに負荷した。ギ酸/水/メタノール (1 : 600 : 400) を 10 mL、水 10 mL を負荷した後、25%アンモニア水/水/メタノール (1 : 5 : 95) または 25%アンモニア水/水/メタノール (2 : 5 : 95) を 10 mL ずつ計 50 mL 負荷して各画分を分取した。結果は表 6 に示したとおり、ジカンバ及び代謝物 B はギ酸/水/メタノール (1 : 60 : 40) 及び水では溶出せず 25%アンモニア水/水/メタノール (1 : 5 : 95) 10 mL または 25%アンモニア水/水/メタノール (2 : 5 : 95) 10 mL で溶出した。代謝物 B については約 80%程度の回収しか得られなかったが、25%アンモニア水/水/メタノール (2 : 5 : 95) で溶出することとした。

※牛の肝臓加水分解液の調製法

牛の肝臓 10.0 g にエタノール/2 mol/L 塩酸 (1 : 1) 150 mL を加えて、95°C で 1.5 時間加熱した。放冷後、5 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を加え、pH を 7~8 に調整した後、毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離した。上澄液を採り、*n*-ヘキサン 100 mL を加えて手で緩やかに振とうした後、水層を採り、2 mol/L 塩酸 5 mL 及び水を加えて正確に 200 mL とした。

表 6 InertSep HLB (500 mg/6 mL) からのジカンバ及び代謝物 B の溶出状況

溶出溶媒 : [溶出率 (%), 試料 : 牛の肝臓]

溶出溶媒	溶出溶媒量	ジカンバ		代謝物 B	
ギ酸/水/メタノール (1 : 60 : 40)	負荷 (5 mL)	0	0	0	0
	0-10 mL	0	0	0	0
水	0-10 mL	0	0	0	0
25%アンモニア水/水/メタノール (1 : 5 : 95)	0-10 mL	95.2	—	76.4	—
	10-20 mL	0	—	0.2	—
	20-30 mL	0	—	0	—
	30-40 mL	0	—	0	—
	40-50 mL	0	—	0	—
25%アンモニア水/水/メタノール (2 : 5 : 95)	0-10 mL	—	95.7	—	80.0
	10-20 mL	—	0	—	0.3
	20-30 mL	—	0	—	0
	30-40 mL	—	0	—	0
	40-50 mL	—	0	—	0
計	計	95.2	95.7	76.6	80.3

添加量 : 1 µg

3. 添加回収試験

牛の筋肉、脂肪、肝臓、牛乳、鶏卵を試料に用いて、実験方法の「6. 試験溶液の調製」に従って添加回収試験を実施した。なお、代謝物 B はマトリックス影響が大きくあらわれたため、ジカンバの試験溶

液を更に 10 倍希釈して測定することとした。また、ジカンバはマトリックスの影響がほとんど見られなかったこと及び代謝物 B と比較して感度が低く、希釈して同時測定をすることはできなかった。

添加回収試験における回収率 100%相当の溶媒標準溶液、各食品のブランク試料及び添加試料の代表的な SRM クロマトグラムを図 17~26 に示した。また、各食品のブランク試料のフルスキャン測定によるトータルイオンクロマトグラムを図 27 及び 28 に示した。なお、牛の脂肪の基準値相当濃度の添加回収試験については代謝物 B の試験溶液を 2 倍に希釈し、牛の肝臓の基準値相当濃度の添加回収試験についてはジカンバの試験溶液を 10 倍、代謝物 B の試験溶液を 20 倍に希釈し、牛乳の基準値相当濃度の添加回収試験についてはジカンバの試験溶液を 5 倍、代謝物 B の試験溶液を 2 倍に希釈して測定した。

## 1) 選択性

選択性の検討結果を表 7 に示した。検討を行ったいずれの試料においても、ジカンバ及び代謝物 B の定量を妨害するピークは認められなかった。

表 7 選択性の評価

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (mg/kg)	基準値 (ppm)	妨害ピークの許容範囲の評価		ピーク面積 (高さ) <sup>1)</sup>						選択性の評価 <sup>3)</sup>	備考			
					評価濃度 (ppm)	評価基準	面積又は高さの別	ブランク			マトリックス添加標準溶液 <sup>2)</sup>				面積(高さ)比 (a)/(b)		
								n=1	n=2	平均 (a)	n=1	n=2				平均 (b)	
1	ジカンバ	牛の筋肉 (LOQ)	0.005	0.03	基準値	0.03	< 0.100	面積	0	0	0	25872	27621	26747	0.000	○	
2		牛の脂肪 (LOQ)	0.005	0.07	基準値	0.07	< 0.100	面積	0	0	0	31299	28684	29992	0.000	○	
3		牛の肝臓 (LOQ)	0.005	0.7	基準値	0.7	< 0.100	面積	0	0	0	31769	32444	32107	0.000	○	
4		牛乳 (LOQ)	0.005	0.2	基準値	0.2	< 0.100	面積	0	0	0	28214	28414	28314	0.000	○	
5		鶏卵 (LOQ)	0.005	0.01	定量限界	0.005	< 0.333	面積	0	0	0	42514	44300	43407	0.000	○	
6		牛の筋肉 (MRL)	0.005	0.03	基準値	0.03	< 0.100	面積	0	0	0	166441	165399	165920	0.000	○	
7		牛の脂肪 (MRL)	0.005	0.07	基準値	0.07	< 0.100	面積	0	0	0	421448	434952	428200	0.000	○	
8		牛の肝臓 (MRL)	0.005	0.7	基準値	0.7	< 0.100	面積	0	0	0	386108	385919	386014	0.000	○	
9		牛乳 (MRL)	0.005	0.2	基準値	0.2	< 0.100	面積	0	0	0	207230	204337	205784	0.000	○	
10		鶏卵 (MRL)	0.005	0.01	定量限界	0.005	< 0.333	面積	0	0	0	45369	46496	45933	0.000	○	
11	代謝物 B	牛の筋肉 (LOQ)	0.005	0.03	基準値	0.03	< 0.100	面積	0	0	0	97214	100085	98650	0.000	○	
12		牛の脂肪 (LOQ)	0.005	0.07	基準値	0.07	< 0.100	面積	0	0	0	49565	48378	48972	0.000	○	
13		牛の肝臓 (LOQ)	0.005	0.7	基準値	0.7	< 0.100	面積	0	0	0	49078	52413	50746	0.000	○	
14		牛乳 (LOQ)	0.005	0.2	基準値	0.2	< 0.100	面積	0	0	0	145650	147184	146417	0.000	○	
15		鶏卵 (LOQ)	0.005	0.01	定量限界	0.005	< 0.333	面積	0	0	0	147940	148794	148367	0.000	○	
16		牛の筋肉 (MRL)	0.005	0.03	基準値	0.03	< 0.100	面積	0	0	0	550059	542892	546476	0.000	○	
17		牛の脂肪 (MRL)	0.005	0.07	基準値	0.07	< 0.100	面積	0	0	0	575635	566643	571139	0.000	○	
18		牛の肝臓 (MRL)	0.005	0.7	基準値	0.7	< 0.100	面積	0	0	0	632361	627175	629768	0.000	○	
19		牛乳 (MRL)	0.005	0.2	基準値	0.2	< 0.100	面積	0	0	0	362962	363162	363062	0.000	○	
20		鶏卵 (MRL)	0.005	0.01	定量限界	0.005	< 0.333	面積	0	0	0	188461	190063	189262	0.000	○	

<sup>1)</sup> ブランク試料、標準溶液の順に注入して測定した結果から評価する。(必要に応じて起爆注入を行う。)

<sup>2)</sup> 試料中の濃度が「評価濃度」相当になるように、ブランク試料の試験溶液で調製した標準溶液(マトリックス添加標準溶液)を用いる。ブランク試料に妨害ピークが観察されなかった場合には、標準溶液のピーク面積(高さ)は求めなくてもよい。

<sup>3)</sup> 面積(高さ)比が、妨害ピークの許容範囲の評価基準に適合する場合には「○」、適合しない場合には「×」を記載する。

## 2) 真度、精度

真度及び併行精度の検討結果を表 8 に示した。

定量限界相当濃度の添加回収試験では、ジカンバにおいて真度 88.0~99.4%、併行精度 1.8~5.1%、代謝物 B において真度 72.5~99.7%、併行精度 1.4~6.9%であり、真度 70~120%、併行精度 (RSD) <25%という目標値を満足した。また、S/N はジカンバにおいて 35.7~87.6、代謝物 B において 109.2~369.5 であり、いずれの食品においても S/N ≥ 10 を満足した。

基準値相当濃度の添加回収試験では、ジカンバにおいて真度 92.7~100.5%、併行精度 0.5~11.0%、代謝物 B において真度 76.7~96.1%、併行精度 1.7~3.5%であり、真度 70~120%、併行精度 (RSD) <25% (鶏卵)、併行精度 (RSD) <15% (牛の筋肉、牛の脂肪) 及び併行精度 (RSD) <10% (牛の肝臓、牛乳) という目標値を満足した。

表 8 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 (ppm)	添加濃度 (ppm)	定量限界の評価 <sup>1)</sup>	検量線				回収率 (%)					真度 (%)	併行精度 (RSD%)	S/N <sup>2)</sup>			備考
							傾き	切片	r <sup>2</sup> 値	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5	Max			Mn.	平均値		
1	ジカンバ	牛の筋肉(LOQ)	0.005	0.03	0.005	S/N	1267131.43	513	0.9997	102.0	96.3	99.0	102.7	96.8	99.4	2.9	46.2	26.8	36.5		
2		牛の脂肪(LOQ)	0.005	0.07	0.005	S/N	167704671	-1267	0.9997	89.5	96.1	95.3	95.7	103.3	96.0	5.1	78.1	39.3	58.7		
3		牛の肝臓(LOQ)	0.005	0.7	0.005	S/N	145096571	1258	0.9994	96.7	98.1	98.8	102.6	96.2	99.3	1.9	70.2	33.6	51.9		
4		牛乳(LOQ)	0.005	0.2	0.005	S/N	163369857	1322	0.9993	93.5	93.0	101.2	99.2	91.2	95.6	4.5	38.1	33.2	35.7		
5		鶏卵(LOQ)	0.005	0.01	0.005	S/N	163357714	466	0.9993	85.6	88.2	89.8	87.9	88.7	88.0	1.8	100.2	75.0	87.6		
6		牛の筋肉(MRL)	0.005	0.03	0.03	—	1498949714	-54.0	0.9994	102.6	80.7	104.3	103.3	108.8	99.9	11.0					
7		牛の脂肪(MRL)	0.005	0.07	0.07	—	1288278285	16578	0.9982	101.5	101.1	99.3	96.9	101.9	100.5	1.3					
8		牛の肝臓(MRL)	0.005	0.7	0.7	—	51465071	11453	0.9992	101.2	99.4	99.9	100.0	100.3	100.2	0.7					
9		牛乳(MRL)	0.005	0.2	0.2	—	254446823	10135	0.9994	89.4	91.4	97.5	92.4	92.6	92.7	3.2					
10		鶏卵(MRL)	0.005	0.01	0.01	—	5939349	1120	0.9997	99.8	99.2	100.0	99.3	98.8	99.4	0.5					
11	代謝物B	牛の筋肉(LOQ)	0.005	0.03	0.005	S/N	51420000	1771	0.9998	71.0	73.0	73.0	73.6	72.0	72.5	1.4	265.8	136.4	201.1		
12		牛の脂肪(LOQ)	0.005	0.07	0.005	S/N	236207429	5933	0.9996	71.2	71.1	78.3	77.5	83.5	76.3	6.9	144.8	87.4	116.1		
13		牛の肝臓(LOQ)	0.005	0.7	0.005	S/N	238005571	395	0.9993	74.0	71.0	79.5	72.7	74.9	74.4	4.3	128.9	89.5	109.2		
14		牛乳(LOQ)	0.005	0.2	0.005	S/N	166914288	1124	0.9989	81.8	86.2	84.7	82.5	84.2	83.9	2.1	379.5	359.5	369.5		
15		鶏卵(LOQ)	0.005	0.01	0.005	S/N	16164000	600	1.0000	101.5	99.4	98.9	101.2	97.5	99.7	1.7	181.3	180.2	180.7		
16		牛の筋肉(MRL)	0.005	0.03	0.03	—	2505528285	16723	0.9997	84.0	85.2	82.6	81.0	78.6	82.3	3.1					
17		牛の脂肪(MRL)	0.005	0.07	0.07	—	238449714	12722	0.9995	96.6	94.8	96.9	94.7	95.3	96.1	1.7					
18		牛の肝臓(MRL)	0.005	0.7	0.7	—	185537829	17158	0.9999	91.9	89.8	88.8	92.3	92.3	91.0	1.8					
19		牛乳(MRL)	0.005	0.2	0.2	—	172893143	464	0.9996	89.2	91.6	96.0	88.8	88.5	90.8	3.5					
20		鶏卵(MRL)	0.005	0.01	0.01	—	171381600	4943	0.9987	73.5	76.3	75.4	78.0	80.4	76.7	3.4					

\*1 S/Nを求める必要がある場合には「S/N」と表示される。

\*2 得られた回収率の中で最大値を与えるピーク(Max.)及び最小値を与えるピーク(Min.)のそれぞれのS/Nを求める。

### 3) 試料マトリックスの測定への影響

試料マトリックスの測定への影響について検討した結果を表 9 に示した。添加回収試験における回収率 100%相当濃度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。定量限界相当濃度及び基準値相当濃度におけるジカンバの面積比は 0.94~1.03、代謝物 B の面積比は 0.94~1.09 であり、いずれも試料マトリックスの測定への影響はほとんどみられなかった。

添加回収試験における真度を表 9 で求めたピーク面積比で除して補正真度を求め、表 10 及び 11 に示した。ジカンバの補正真度は 85.4~102.6%、代謝物 B の補正真度は 73.2~99.1 であり、試料マトリックスの影響を考慮した場合でも良好な結果が得られた。

表 9 試料マトリックスの測定への影響

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (mg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	標準溶液濃度 <sup>1)</sup> (mg/L)	ピーク面積(高さ) <sup>2)</sup>							備考	
							面積又は高さの別	ブランク <sup>3)</sup>	マトリックス添加標準溶液 <sup>4)</sup>			溶媒標準溶液			ピーク面積(高さ)比 <sup>5)</sup>
							n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均			
1	ジカンバ	牛の筋肉(LOQ)	0.005	0.03	0.005	0.005	面積	0	25872	27621	26747	26519	27061	26790	1.00
2		牛の脂肪(LOQ)	0.005	0.07	0.005	0.005	面積	0	31299	28684	29992	31376	30408	30892	0.97
3		牛の肝臓(LOQ)	0.005	0.7	0.005	0.005	面積	0	31769	32444	32107	32087	32444	32266	1.00
4		牛乳(LOQ)	0.005	0.2	0.005	0.005	面積	0	28214	28414	28314	30087	30050	30069	0.94
5		鶏卵(LOQ)	0.005	0.01	0.005	0.005	面積	0	32703	34076	33390	32348	32654	32501	1.03
6		牛の筋肉(MRL)	0.005	0.03	0.03	0.03	面積	0	166441	165399	165920	167588	162569	165079	1.01
7		牛の脂肪(MRL)	0.005	0.07	0.07	0.07	面積	0	421448	434952	428200	432719	437321	435020	0.98
8		牛の肝臓(MRL)	0.005	0.7	0.7	0.07	面積	0	386108	385919	386014	387335	383890	385613	1.00
9		牛乳(MRL)	0.005	0.2	0.2	0.04	面積	0	207230	204337	205784	207193	207694	207444	0.99
10		鶏卵(MRL)	0.005	0.01	0.01	0.01	面積	0	45369	46496	45933	46025	47643	46834	0.98
11	代謝物B	牛の筋肉(LOQ)	0.005	0.03	0.005	0.0005	面積	0	97214	100085	98650	98184	100827	99506	0.99
12		牛の脂肪(LOQ)	0.005	0.07	0.005	0.0005	面積	0	49565	48378	48972	49502	49717	49610	0.99
13		牛の肝臓(LOQ)	0.005	0.7	0.005	0.0005	面積	0	49078	52413	50746	53348	54462	53905	0.94
14		牛乳(LOQ)	0.005	0.2	0.005	0.0005	面積	0	145650	147184	146417	138035	131844	134940	1.09
15		鶏卵(LOQ)	0.005	0.01	0.005	0.0005	面積	0	147940	148794	148367	146478	139514	142996	1.04
16		牛の筋肉(MRL)	0.005	0.03	0.03	0.0003	面積	0	550059	542892	546476	557931	547979	552955	0.99
17		牛の脂肪(MRL)	0.005	0.07	0.07	0.00035	面積	0	575635	566643	571139	590690	588017	589354	0.97
18		牛の肝臓(MRL)	0.005	0.7	0.7	0.00035	面積	0	632361	627175	629788	624372	633977	629175	1.00
19		牛乳(MRL)	0.005	0.2	0.2	0.0002	面積	0	362962	363162	363062	359920	359437	359679	1.01
20		鶏卵(MRL)	0.005	0.01	0.01	0.0001	面積	0	188461	190063	189262	188900	190267	189584	1.00

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

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

\*3 ブランクにピークが認められた場合には、マトリックス添加標準溶液の値はブランク値を差し引いた値を用いる。

\*4 マトリックス添加標準溶液は試験当日のブランク試料の試験溶液を用いて調製する。

\*5 マトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積(又は高さ)の比を求める。

表 10 補正真度（ジカンバ）

食品名	添加濃度 (ppm)	真度 (%)	補正真度 (%)	ピーク面積比 <sup>※4</sup>
牛の筋肉 (LOQ)	0.005	99.4	99.4	1.00
牛の脂肪 (LOQ)	0.005	96.0	99.0	0.97
牛の肝臓 (LOQ)	0.005	99.3	99.3	1.00
牛乳 (LOQ)	0.005	95.6	101.7	0.94
鶏卵 (LOQ)	0.005	88.0	85.4	1.03
牛の筋肉 (MRL)	0.03	99.9	98.9	1.01
牛の脂肪 (MRL)	0.07	100.5	102.6	0.98
牛の肝臓 (MRL)	0.7	100.2	100.2	1.00
牛乳 (MRL)	0.2	92.7	93.6	0.99
鶏卵 (MRL)	0.01	99.4	101.4	0.98

※4 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の比

表 11 補正真度（代謝物 B）

食品名	添加濃度 (ppm)	真度 (%)	補正真度 (%)	ピーク面積比 <sup>※5</sup>
牛の筋肉 (LOQ)	0.005	72.5	73.2	0.99
牛の脂肪 (LOQ)	0.005	76.3	77.1	0.99
牛の肝臓 (LOQ)	0.005	74.4	79.1	0.94
牛乳 (LOQ)	0.005	83.9	77.0	1.09
鶏卵 (LOQ)	0.005	99.7	95.9	1.04
牛の筋肉 (MRL)	0.03	82.3	83.1	0.99
牛の脂肪 (MRL)	0.07	96.1	99.1	0.97
牛の肝臓 (MRL)	0.7	91.0	91.0	1.00
牛乳 (MRL)	0.2	90.8	89.9	1.01
鶏卵 (MRL)	0.01	76.7	76.7	1.00

※5 マトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積の比

#### 4. 考察

開発した試験法を用いて、牛の筋肉、脂肪、肝臓、牛乳、鶏卵の添加回収試験を行った結果、いずれの食品においてもジカンバ及び代謝物 B の定量を妨害するピークやマトリックスの影響はみられず、真度及び併行精度はいずれの化合物においても、基準値相当では真度 70~120%、併行精度 (RSD) <25% (鶏卵)、併行精度 (RSD) <15% (牛の筋肉、牛の脂肪) 及び併行精度 (RSD) <10% (牛の肝臓、牛乳) という目標値を満たしていたことから、本試験法は、畜産物に適用可能であると判断された。

#### [結論]

畜産物中のジカンバ試験法として、ジカンバ及び代謝物 B を試料からジカンバ及び代謝物 B (抱合体

を含む。)を、試料にエタノール及び2 mol/L 塩酸(1:1)混液を加えて加水分解して抽出した後、*n*-ヘキサンで洗浄する。酢酸エチル及び*n*-ヘキサン(1:4)混液に転溶し、スチレンジビニルベンゼン-N 含有ビニル共重合体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である。なお、ジカンバ及び代謝物B(抱合体を含む。)のそれぞれについて定量を行い、代謝物B(抱合体を含む。)を含むジカンバの含量を求める場合には、代謝物B(抱合体を含む。)の含量に換算係数を乗じてジカンバの含量に換算し、これらの和を分析値とする。方法を開発した。

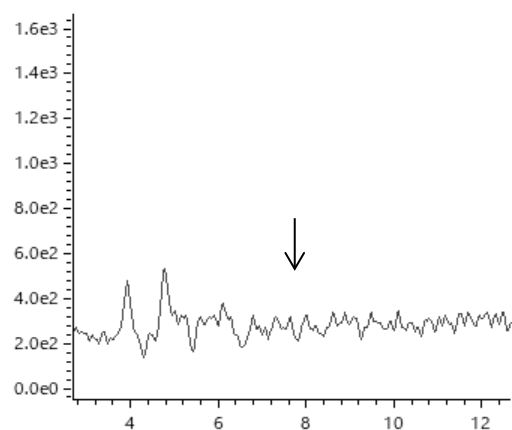
牛の筋肉、脂肪、肝臓、牛乳、鶏卵に適用した結果、いずれの化合物においても選択性には問題なく、定量限界値相当においてS/N $\geq$ 10を満足した。また、真度、併行精度の目標値についても満足する結果が得られた。

#### [参考文献]

JMPR : "Dicamba(240)", Pesticides residues in food 2010 Evaluation, P1004 (2010)

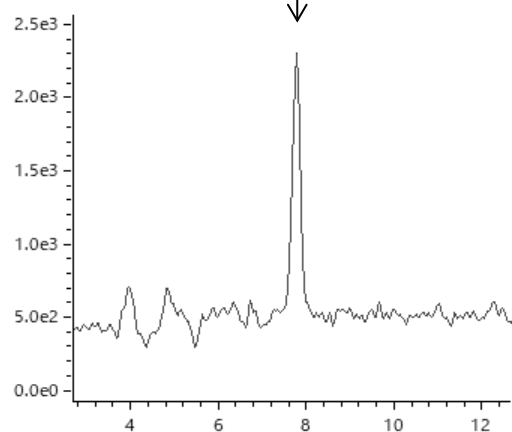
ブランク試料

Q 218.75>174.90 (-) 5.33e2



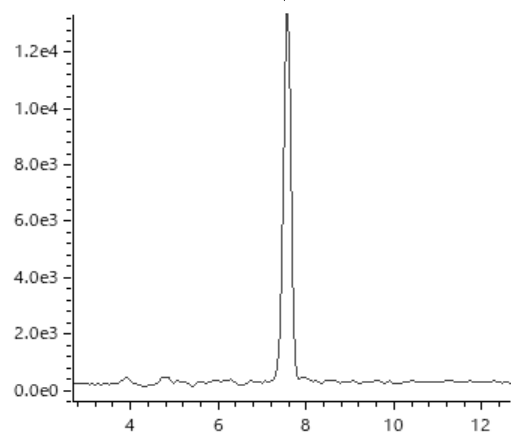
添加試料 (試料中 0.005 ppm 相当)

Q 218.75>174.90 (-) 5.38e3



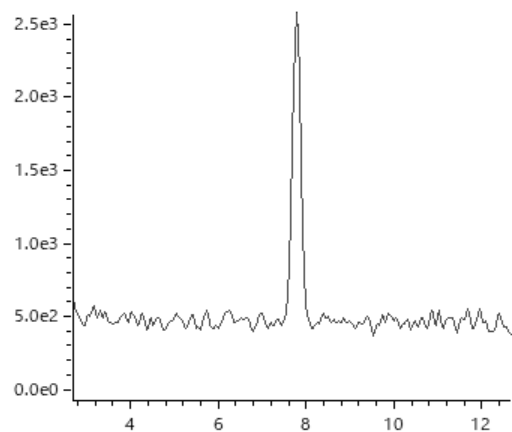
添加試料 (試料中 0.03 ppm 相当)

Q 218.75>174.90 (-) 1.38e4



標準溶液 (0.005 mg/L)

Q 218.75>174.90 (-) 2.57e3



標準溶液 (0.03 mg/L)

Q 218.75>174.90 (-) 1.34e4

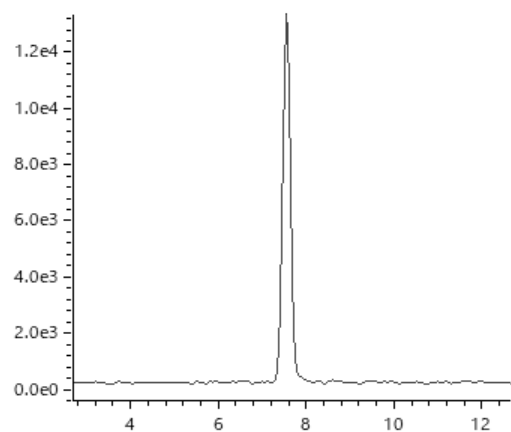
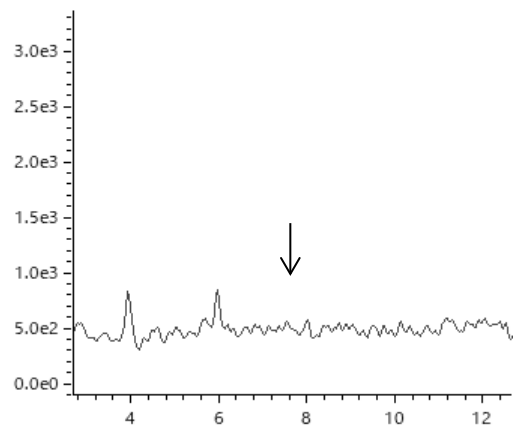


図 17 ジカンバの SRM クロマトグラム ( $m/z$ -218.8→174.9)  
試料：牛の筋肉

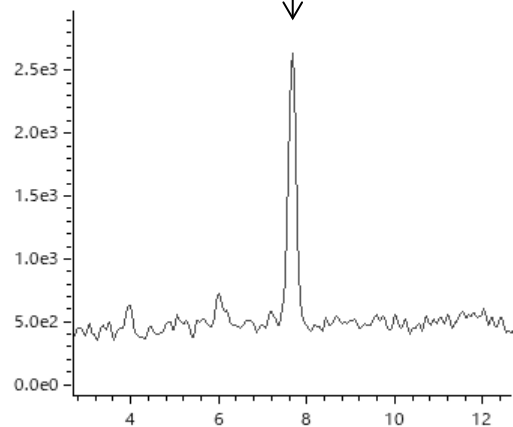
ブランク試料

Q 218.75>174.90 (-) 8.43e2



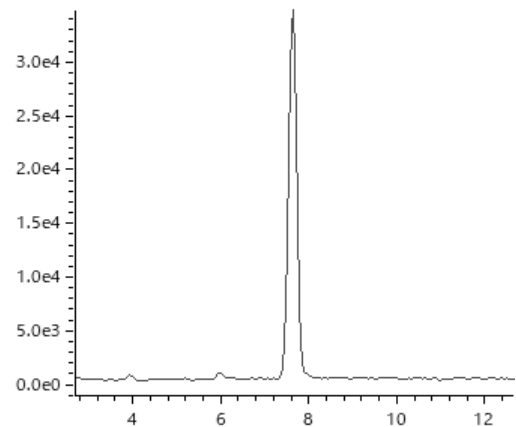
添加試料 (試料中 0.005ppm 相当)

Q 218.75>174.90 (-) 2.65e3



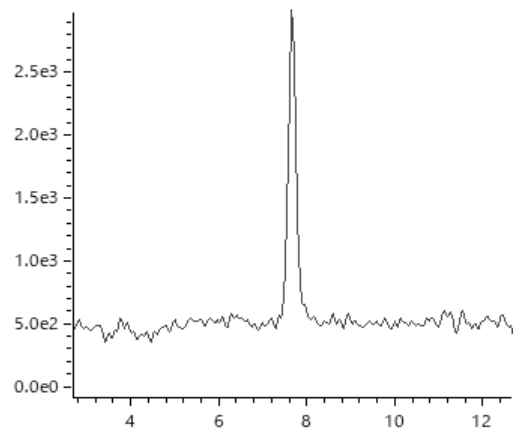
添加試料 (試料中 0.07 ppm 相当)

Q 218.75>174.90 (-) 3.49e4



標準溶液 (0.005 mg/L)

Q 218.75>174.90 (-) 2.98e3



標準溶液 (0.07 mg/L)

Q 218.75>174.90 (-) 2.94e4

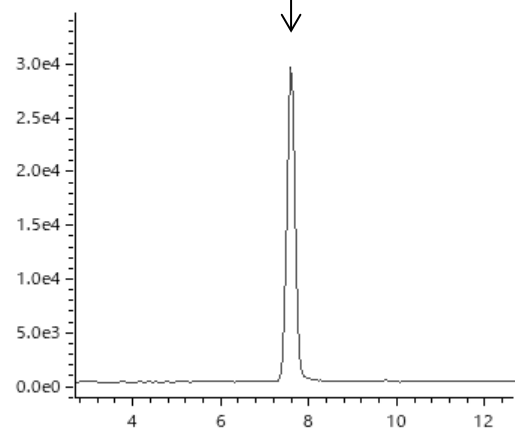
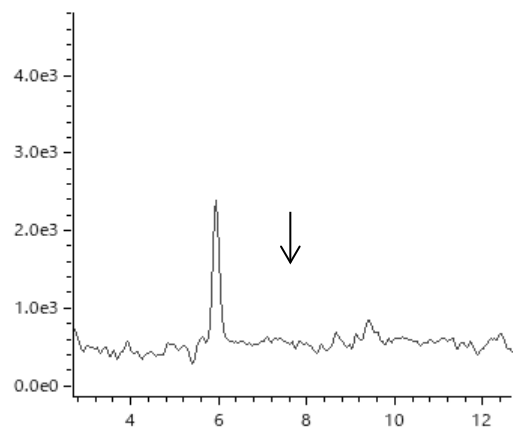


図 18 ジカンバの SRM クロマトグラム ( $m/z$ -218.8→174.9)  
試料：牛の脂肪

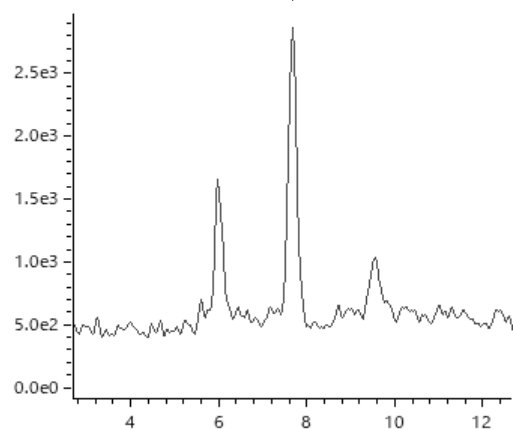
ブランク試料

Q 218.75>174.90 (-) 2.41e3



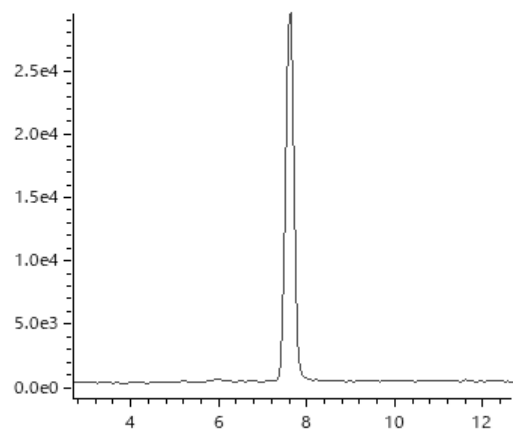
添加試料 (試料中 0.005 ppm 相当)

Q 218.75>174.90 (-) 2.85e3



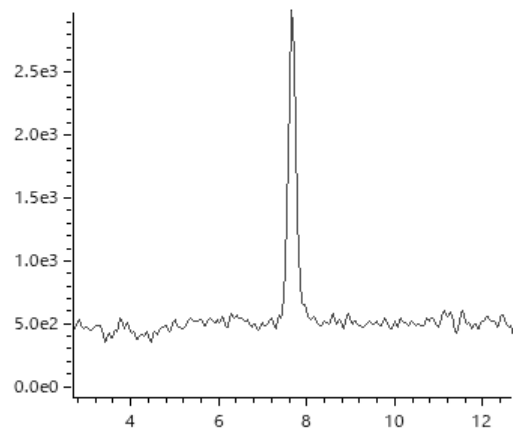
添加試料 (試料中 0.7 ppm 相当、10 倍希釈)

Q 218.75>174.90 (-) 3.03e4



標準溶液 (0.005 mg/L)

Q 218.75>174.90 (-) 2.98e3



標準溶液 (0.07 mg/L)

Q 218.75>174.90 (-) 2.96e4

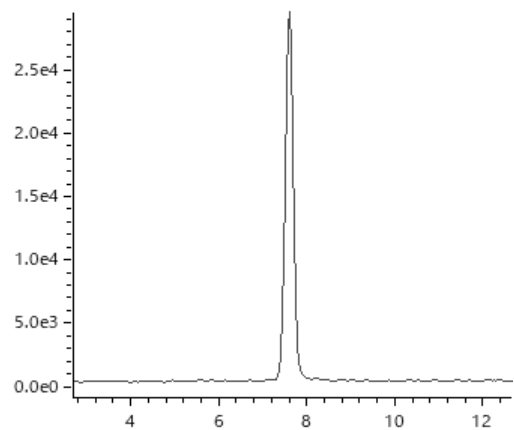
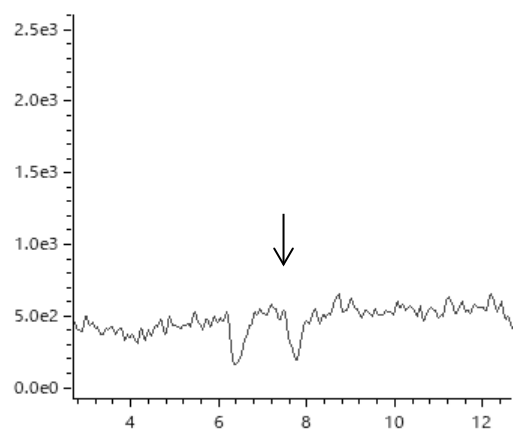


図 19 ジカンバの SRM クロマトグラム ( $m/z$  -218.8→174.9)  
試料：牛の肝臓

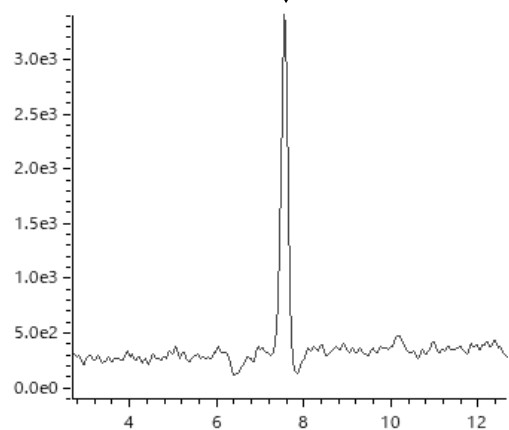
ブランク試料

Q 218.75>174.90 (-) 6.53e2



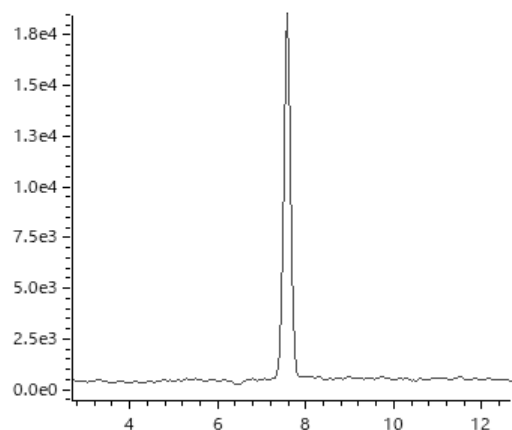
添加試料 (試料中 0.005 ppm 相当)

Q 218.75>174.90 (-) 3.41e3



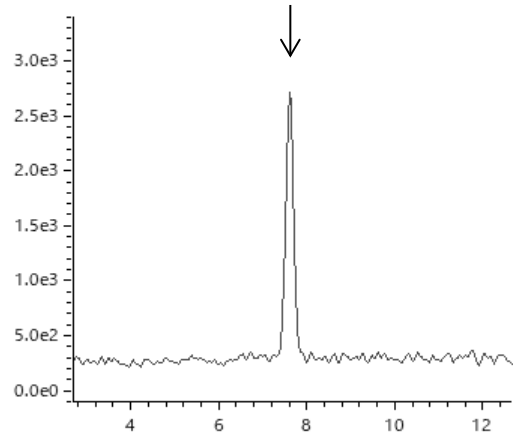
添加試料 (試料中 0.2 ppm 相当、5 倍希釈)

Q 218.75>174.90 (-) 1.85e4



標準溶液 (0.005 mg/L)

Q 218.75>174.90 (-) 2.73e3



標準溶液 (0.04 mg/L)

Q 218.75>174.90 (-) 1.60e4

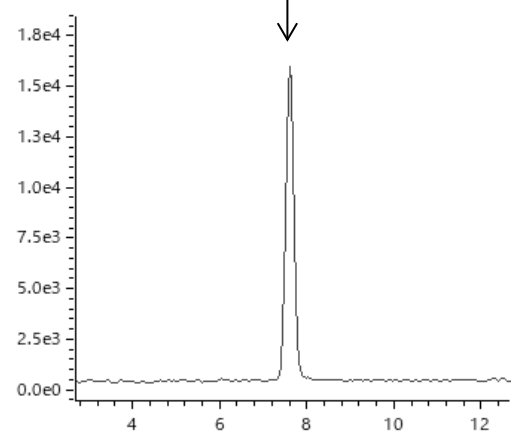
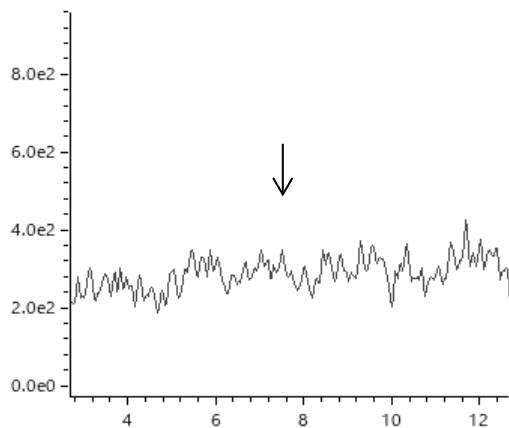


図 20 ジカンバの SRM クロマトグラム ( $m/z$  -218.8→174.9)  
試料：牛乳

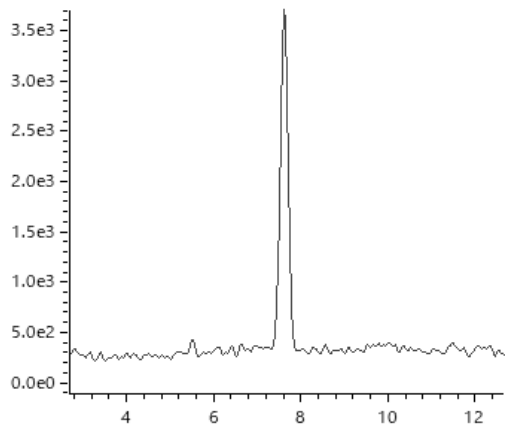
ブランク試料

Q 218.75>174.90 (-) 4.27e2



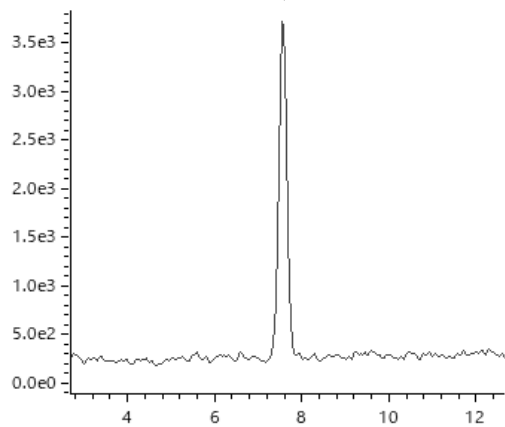
添加試料 (試料中 0.005 ppm 相当)

Q 218.75>174.90 (-) 3.71e3



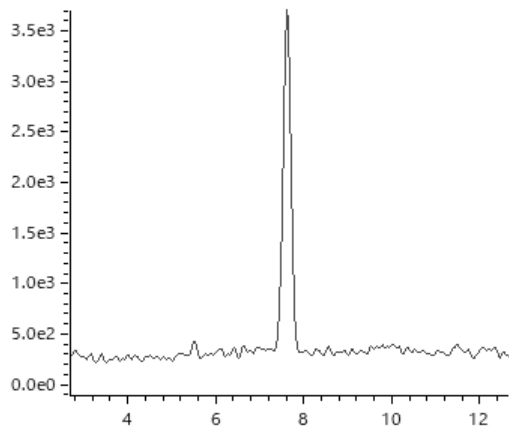
添加試料 (試料中 0.01 ppm 相当)

Q 218.75>174.90 (-) 3.73e3



標準溶液 (0.005 mg/L)

Q 218.75>174.90 (-) 3.71e3



標準溶液 (0.01 mg/L)

Q 218.75>174.90 (-) 3.84e3

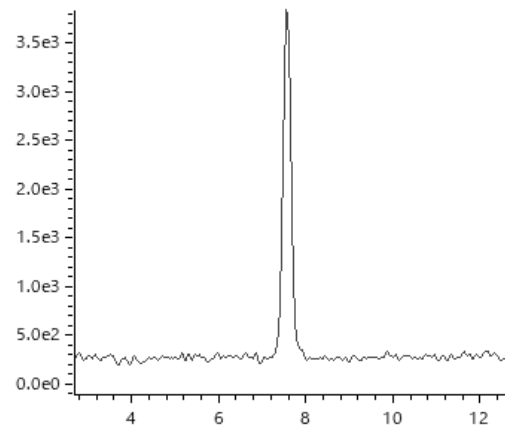
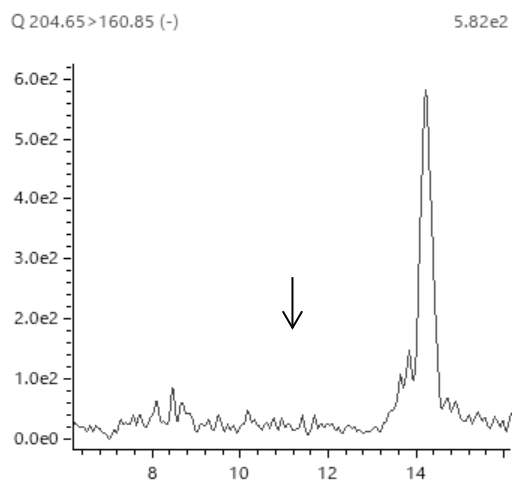
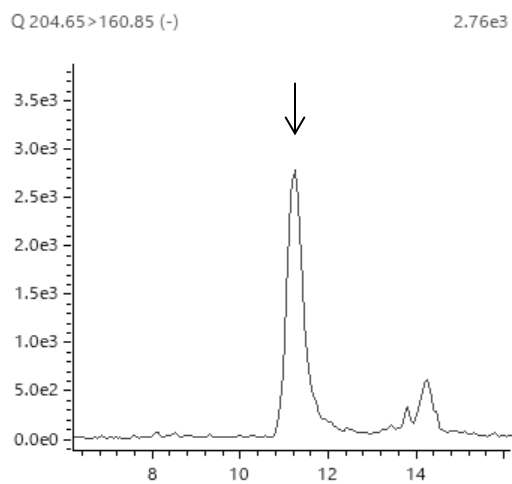


図 21 ジカンバの SRM クロマトグラム ( $m/z$  -218.8→174.9)  
試料：鶏卵

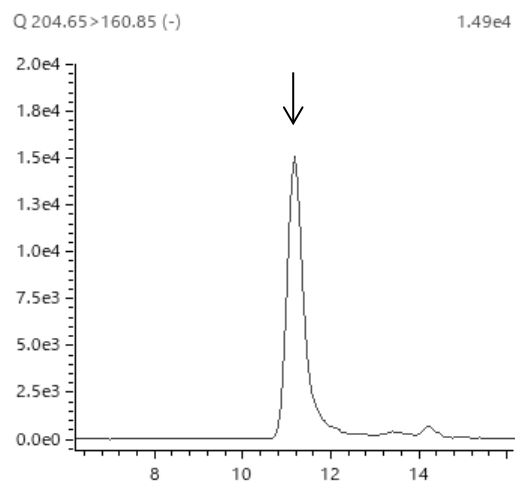
ブランク試料



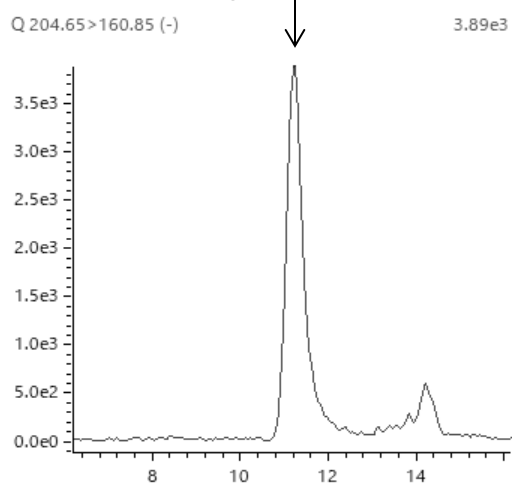
添加試料 (試料中 0.005 ppm 相当)



添加試料 (試料中 0.03 ppm 相当)



標準溶液 (0.0005 mg/L)



標準溶液 (0.003 mg/L)

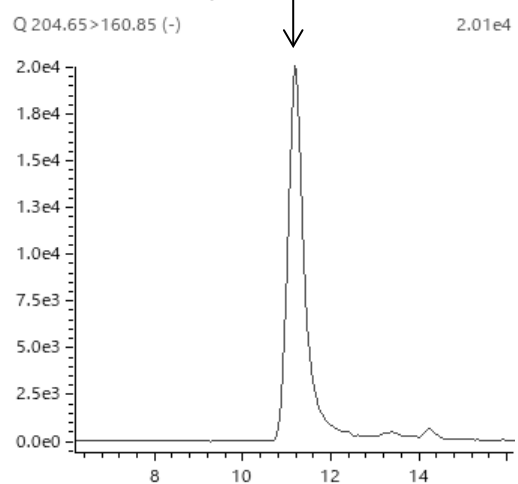
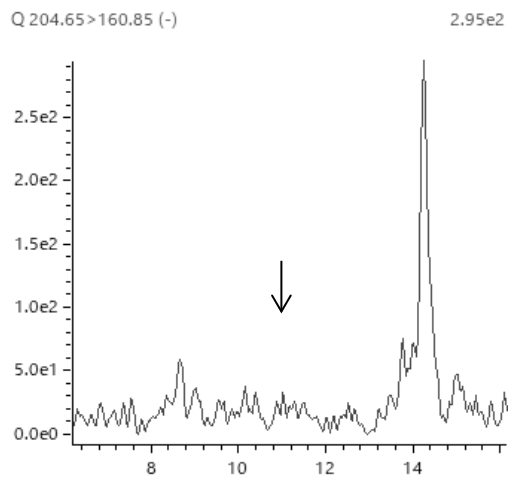
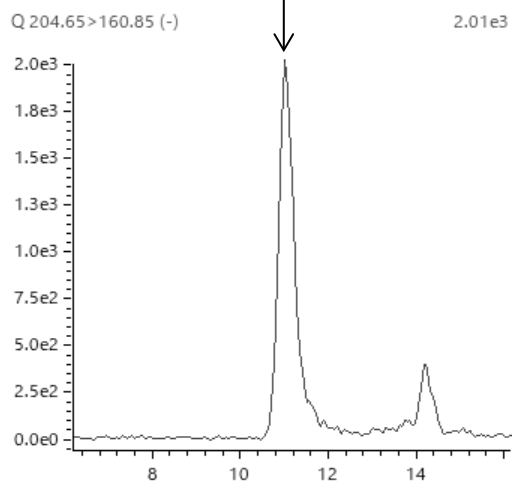


図 22 代謝物 B の SRM クロマトグラム ( $m/z$  -204.7→160.9)  
試料：牛の筋肉

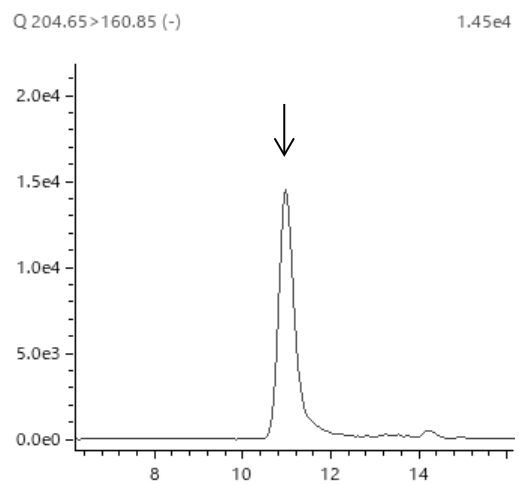
ブランク試料



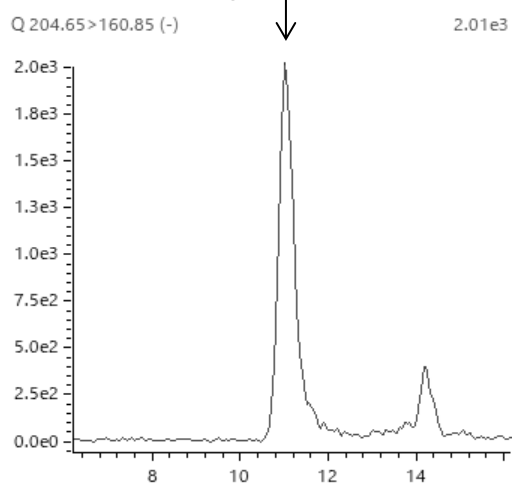
添加試料 (試料中 0.005 ppm 相当)



添加試料 (試料中 0.07 ppm 相当、2 倍希釈)



標準溶液 (0.0005 mg/L)



標準溶液 (0.0035 mg/L)

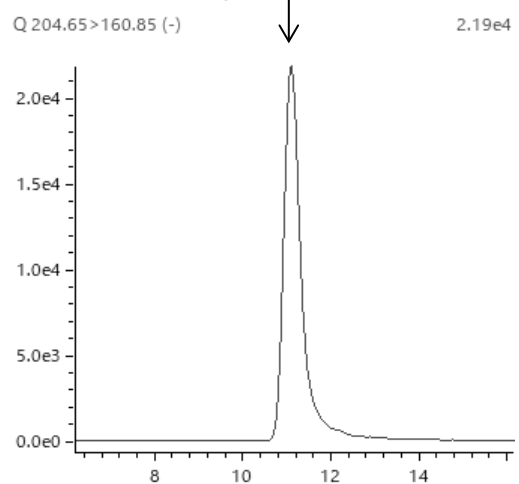
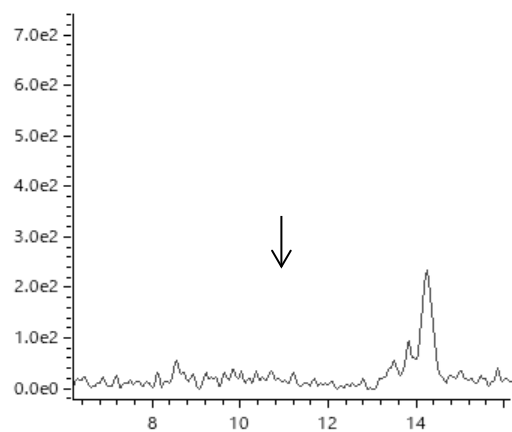


図 23 代謝物 B の SRM クロマトグラム ( $m/z$  -204.7→160.9)  
試料：牛の脂肪

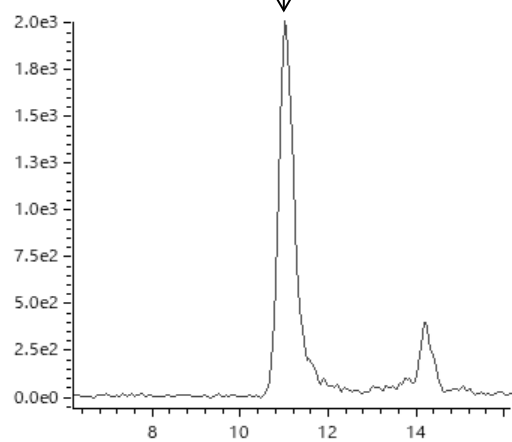
ブランク試料

Q 204.65>160.85 (-) 2.33e2



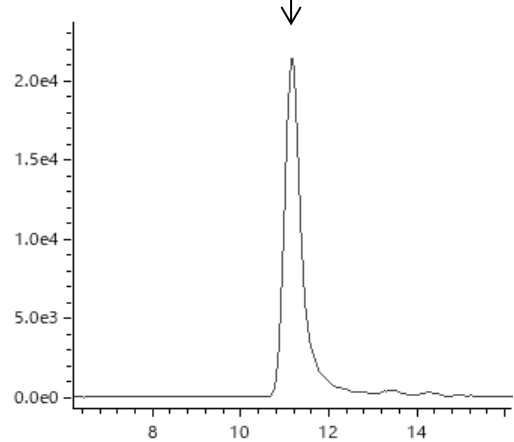
添加試料 (試料中 0.005 ppm 相当)

Q 204.65>160.85 (-) 2.01e3



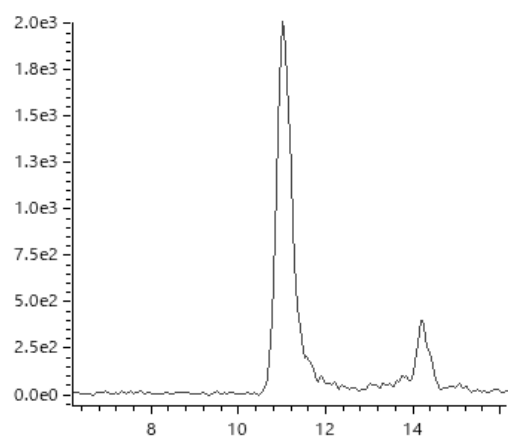
添加試料 (試料中 0.7 ppm 相当、20 倍希釈)

Q 204.65>160.85 (-) 2.15e4



標準溶液 (0.0005 mg/L)

Q 204.65>160.85 (-) 2.01e3



標準溶液 (0.0035 mg/L)

Q 204.65>160.85 (-) 2.38e4

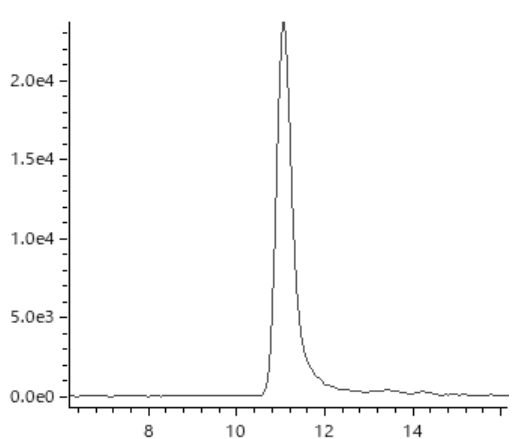
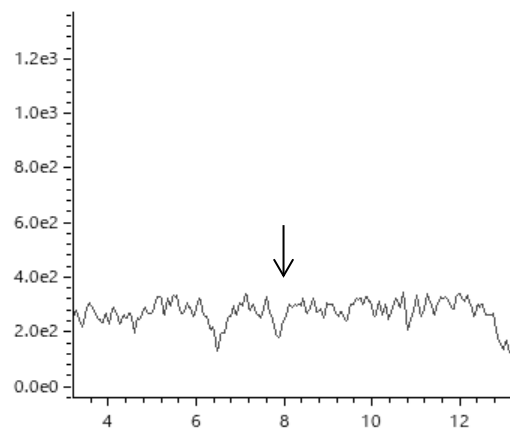


図 24 代謝物 B の SRM クロマトグラム ( $m/z$  -204.7→160.9)  
試料：牛の肝臓

ブランク試料

Q 218.75>174.90 (-)

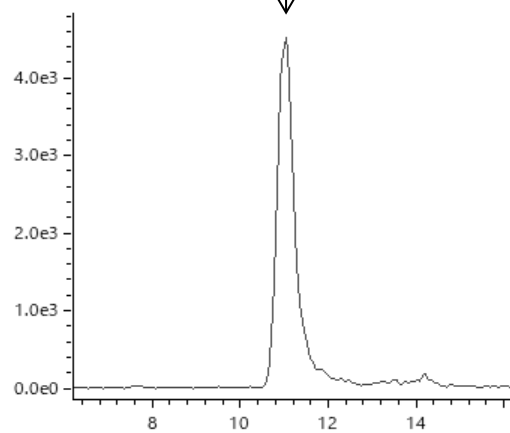
3.44e2



添加試料 (試料中 0.005 ppm 相当)

Q 204.65>160.85 (-)

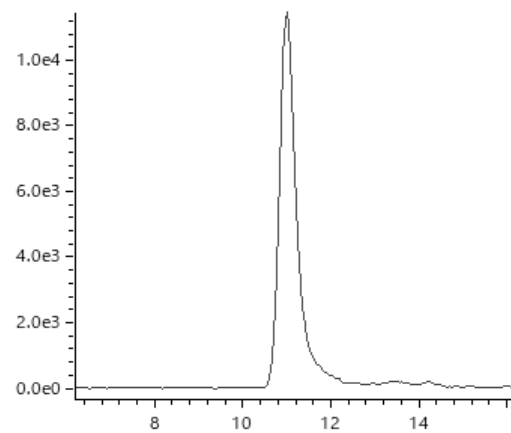
4.53e3



添加試料 (試料中 0.2 ppm 相当、10 倍希釈)

Q 204.65>160.85 (-)

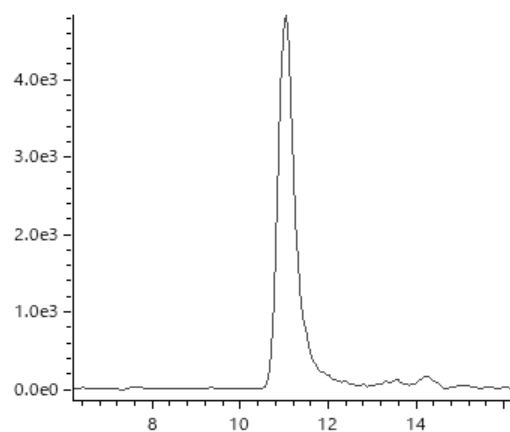
1.15e4



標準溶液 (0.0005 mg/L)

Q 204.65>160.85 (-)

4.85e3



標準溶液 (0.002 mg/L)

Q 204.65>160.85 (-)

1.27e4

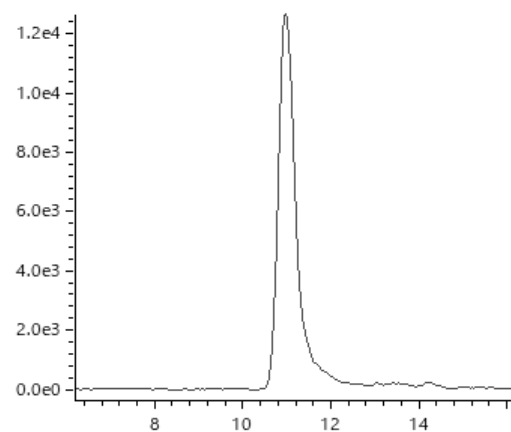
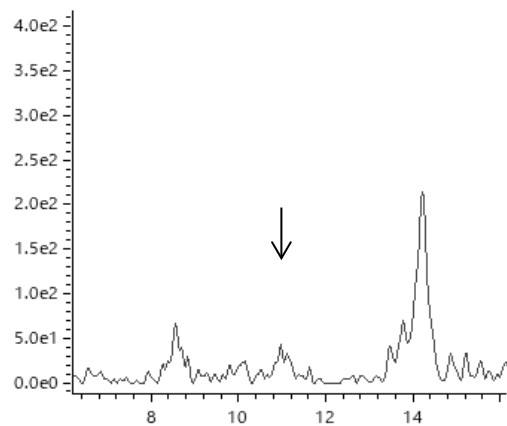


図 25 代謝物 B の SRM クロマトグラム ( $m/z$  -204.7→160.9)

試料：牛乳

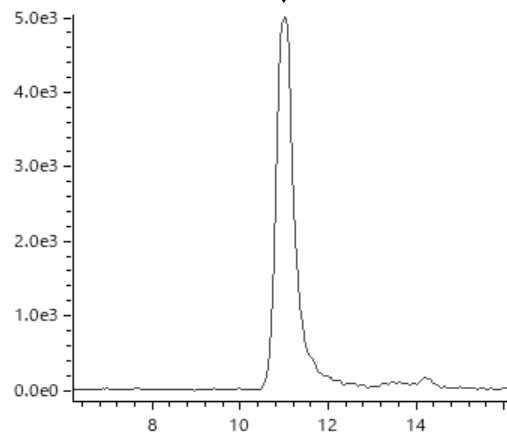
ブランク試料

Q 204.65>160.85 (-) 2.14e2



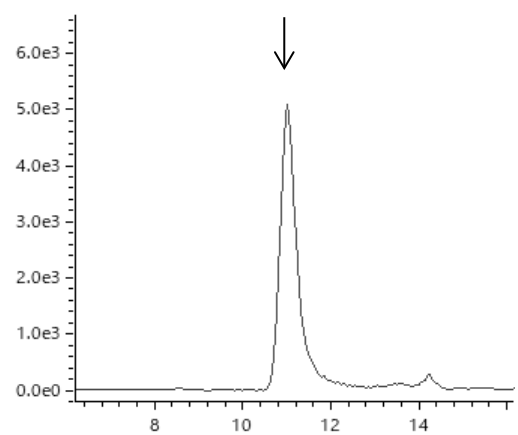
添加試料 (試料中 0.005 ppm 相当)

Q 204.65>160.85 (-) 5.01e3



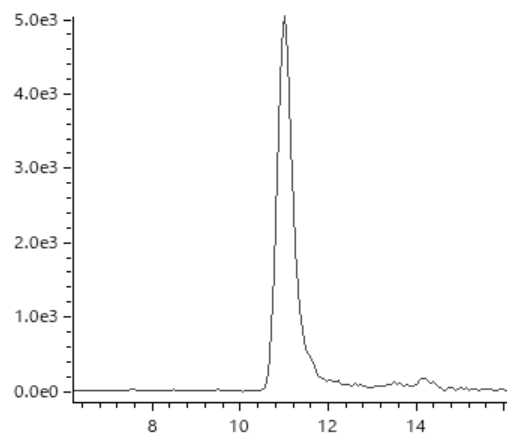
添加試料 (試料中 0.01 ppm 相当)

Q 204.65>160.85 (-) 5.09e3



標準溶液 (0.0005 mg/L)

Q 204.65>160.85 (-) 5.05e3



標準溶液 (0.001 mg/L)

Q 204.65>160.85 (-) 6.70e3

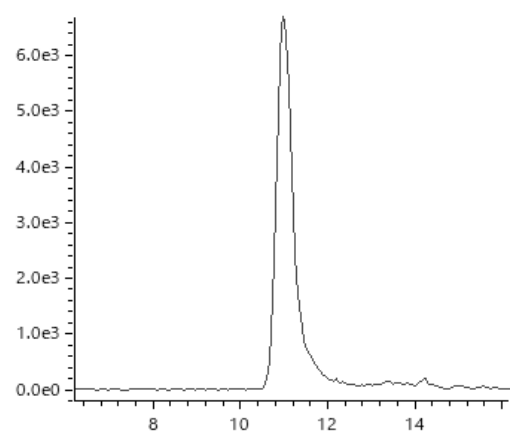
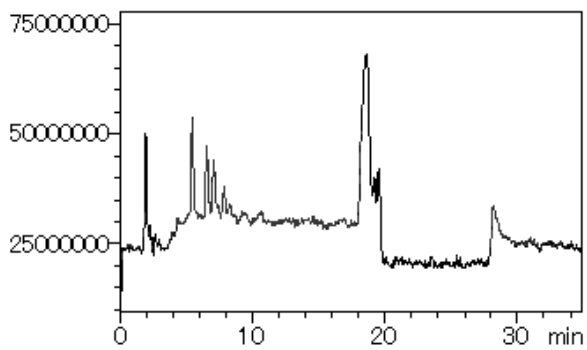


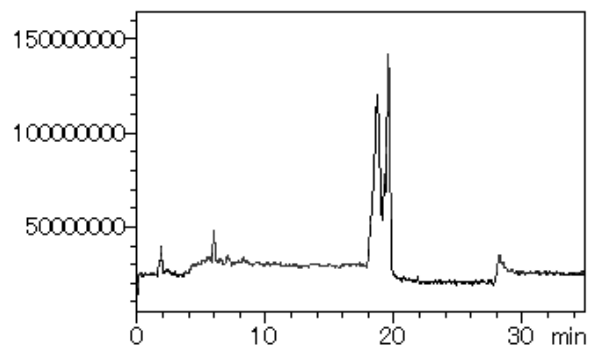
図 26 代謝物 B の SRM クロマトグラム ( $m/z$  -204.7→160.9)

試料：鶏卵

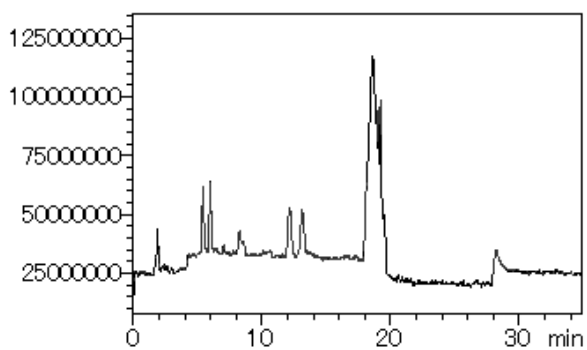
牛の筋肉



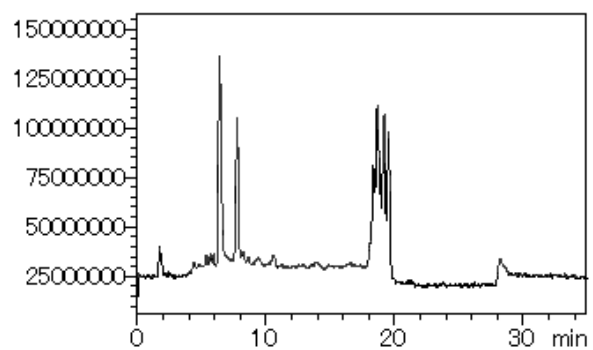
牛の脂肪



牛の肝臓



牛乳



鶏卵

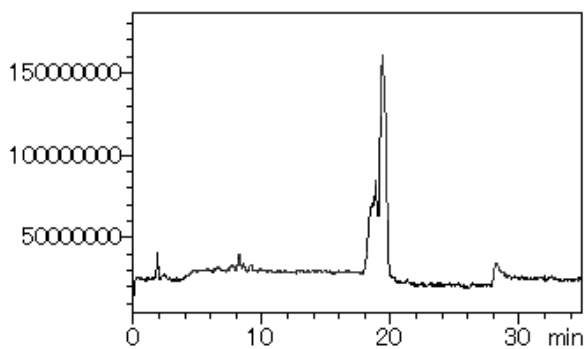
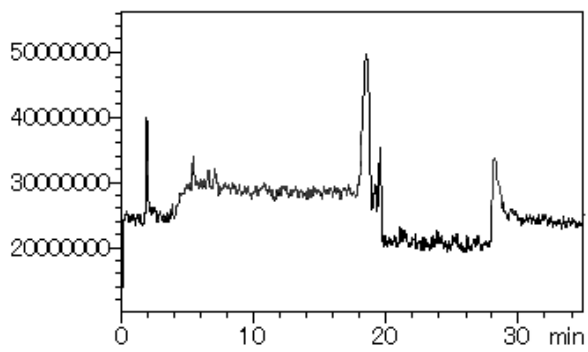
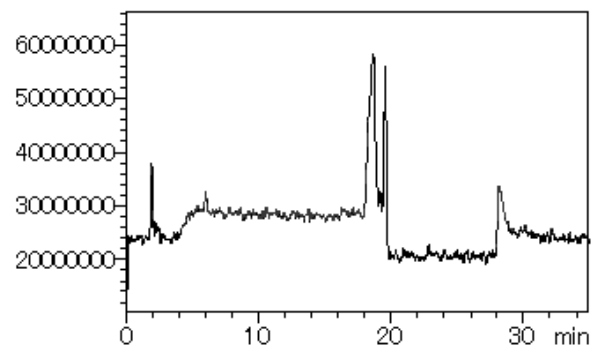


図 27 ジカンバのブランク試料のフルスキャン測定におけるトータルイオンクロマトグラム  
(ネガティブイオンモード、スキャン範囲：50~550 amu)

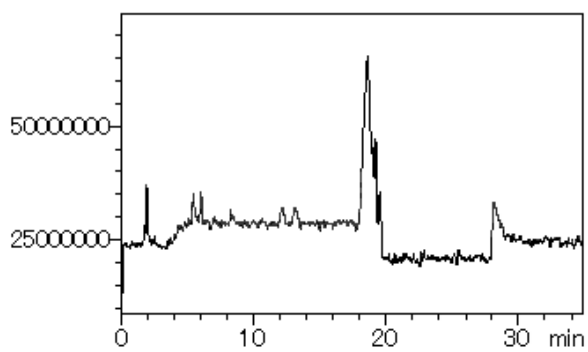
牛の筋肉



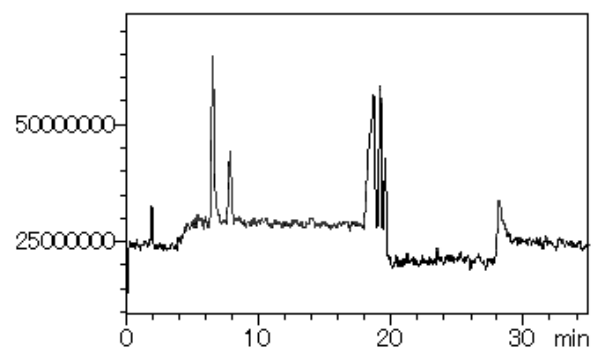
牛の脂肪



牛の肝臓



牛乳



鶏卵

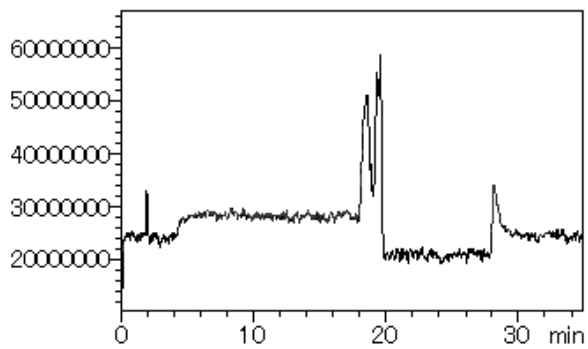


図 28 代謝物 B のブランク試料のフルスキャン測定におけるトータルイオンクロマトグラム (ネガティブイオンモード、スキャン範囲：50~550 amu)