

※ 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

## フルジオキシニル試験法 (畜産物)

## フルジオキシニル試験法（畜産物）の検討結果

### 〔緒言〕

#### 1. 目的

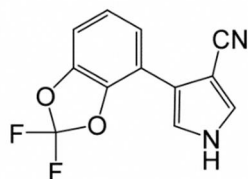
フルジオキシニルはフェニルピロール系の非浸透移行性殺菌剤である。糸状菌の原形質膜に作用することにより物質の透過性に影響を及ぼし、アミノ酸やグルコースの細胞内取り込みを阻害して、殺菌効果を示すと考えられている<sup>1)</sup>。

令和5年4月26日付けで、食品、添加物等の規格基準（昭和34年厚生省告示第370号）の一部が改正され、食品中のフルジオキシニルの残留基準値が設定されたが、その定義については「畜産物にあってはフルジオキシニル及び酸化反応により代謝物K【2,2-ジフルオロ-1,3-ベンゾジオキソール-4-カルボン酸】に変換される代謝物をフルジオキシニルに換算したものの和とすること」とされた。そこで今回の検討においては、畜産物を対象として酸化操作を含む試験法を開発した。

#### 2. 分析対象化合物の構造式及び物理化学的性質

##### （1）分析対象化合物：フルジオキシニル

構造式：



分子式：C<sub>12</sub>H<sub>6</sub>F<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

分子量：248.19

IUPAC名：4-(2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-4-yl)-1H-pyrrole-3-carbonitrile

CAS番号：131341-86-1

外観：ごくうすい黄みの白色固体（粉末）

融点：200℃

密度：1.54 g/cm<sup>3</sup> (23℃)

蒸気圧：3.9×10<sup>-7</sup> Pa (25℃)

水溶解度：1.8 mg/L (25℃)

オクタノール/水分配係数：log Pow=4.12 (25℃)

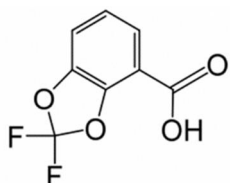
解離定数：pKa<sub>1</sub><0（塩基性）、pKa<sub>2</sub>≒14.1（酸性、計算値）

〔出典〕 農薬・添加物評価書フルジオキシニル（第7版）

(<https://www.mhlw.go.jp/content/11120000/000990297.pdf>)

(2) 分析対象化合物：代謝物 K

構造式：



分子式：C<sub>8</sub>H<sub>4</sub>F<sub>2</sub>O<sub>4</sub>

分子量：202.11

IUPAC名：2,2-difluoro-benzo[1,3]dioxole-4-carboxylic acid

CAS番号：126120-85-2

外観：白～パールクリーム色の結晶または粉末、結晶性粉末

融点：198.0～208.0℃

[出典] Thermo Fisher Scientific ホームページ

(<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/B23955.06?SID=srch-srp-B23955.06>)

### 3. 基準値

フルジオキソニルとは、農産物及び魚介類にあつてはフルジオキソニルのみとし、畜産物にあつてはフルジオキソニル及び酸化反応により代謝物K【2,2-ジフルオロ-1,3-ベンゾジオキソール-4-カルボン酸】に変換される代謝物をフルジオキソニルに換算したものの和とする。

食品分類名	基準値 (ppm)
牛の筋肉	0.02
豚の筋肉	0.02
その他の陸棲哺乳類に属する動物の筋肉	0.02
牛の脂肪	0.02
豚の脂肪	0.02
その他の陸棲哺乳類に属する動物の脂肪	0.02
牛の肝臓	0.1
豚の肝臓	0.1
その他の陸棲哺乳類に属する動物の肝臓	0.1
牛の腎臓	0.1
豚の腎臓	0.1
その他の陸棲哺乳類に属する動物の腎臓	0.1
牛の食用部分	0.1
豚の食用部分	0.1
その他の陸棲哺乳類に属する動物の食用部分	0.1

乳	0.04
鶏の筋肉	0.01
その他の家きんの筋肉	0.01
鶏の脂肪	0.01
その他の家きんの脂肪	0.01
鶏の肝臓	0.1
その他の家きんの肝臓	0.1
鶏の腎臓	0.1
その他の家きんの腎臓	0.1
鶏の食用部分	0.1
その他の家きんの食用部分	0.1
鶏の卵	0.02
その他の家きんの卵	0.02
魚介類	0.04

参考

「その他の陸棲哺乳類に属する動物」とは、陸棲哺乳類に属する動物のうち、牛及び豚以外のものをいう。

「食用部分」とは、食用に供される部分のうち、筋肉、脂肪、肝臓及び腎臓以外の部分をいう。

[出典] 厚生労働省大臣官房生活衛生・食品安全審議官通知“食品、添加物等の規格基準の一部を改正する件について” 令和5年4月26日、生食発0426第1号（畜水産物のみ抜粋）

**[実験方法]**

1. 試料

牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳及び鶏卵は、札幌市内の小売店で購入した。

(1) 牛の筋肉

可能な限り脂肪層を取り除き、フードプロセッサーで細切均一化した。

(2) 牛の脂肪

可能な限り筋肉層を取り除き、フードプロセッサーで細切均一化した。

(3) 牛の肝臓

全体をフードプロセッサーで細切均一化した。

(4) 牛乳

全体をよく混合して均一化した。

(5) 鶏卵

殻を除き、卵白と卵黄を合わせてよく混合し、均一化した。

## 2. 試薬・試液

フルジオキシニル標準品：純度 99.9% [富士フィルム和光純薬（株）製]

代謝物 K 標準品：純度 97.9% [Dr. Ehrenstorfer 製]

アセトニトリル（試験溶液調製用）、アセトン、塩化ナトリウム、蒸留水（試験溶液調製用）、トルエン、メタノール：残留農薬試験用 [関東化学（株）製]

アセトニトリル（LC-MS/MS 移動相調製用）、蒸留水（LC-MS/MS 移動相調製用）：LC/MS 用 [関東化学（株）製]

アンモニア水（28%）、塩酸、過マンガン酸カリウム、ギ酸：特級 [関東化学（株）製]

ギ酸アンモニウム：和光特級 [富士フィルム和光純薬（株）製]

ケイソウ土：セライト 545 [関東化学（株）製]

酢酸、酢酸アンモニウム：特級 [富士フィルム和光純薬（株）製]

水酸化ナトリウム：特級 [富士フィルム和光純薬（株）製]

ピロ亜硫酸ナトリウム：和光特級（規格含量 95.0%以上） [富士フィルム和光純薬（株）製]

ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム（500 mg）：Oasis HLB [500 mg、6 mL、Waters 社製]（以下 HLB ミニカラムとする）

3 級アミン修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム（500 mg）：Oasis WAX [500 mg、6 mL、Waters 社製]（以下 WAX ミニカラムとする）

標準原液：フルジオキシニル標準品 25 mg を精密に量り採り、アセトン 50 mL に溶解して 500 mg/L 溶液を調製した。代謝物 K 標準品 10 mg を精密に量り採り、アセトン 20 mL に溶解して 500 mg/L 溶液を調製した。

添加用標準溶液：フルジオキシニル標準原液を適宜アセトンで希釈し、0.2 mg/L、0.4 mg/L、0.8 mg/L 及び 2 mg/L の標準溶液をそれぞれ調製した。

検量線用標準溶液：代謝物 K 標準原液を 0.2 vol% 酢酸及び 0.2 vol% 酢酸・アセトニトリル溶液（1：1）混液で適宜希釈し、0.00025～0.015 mg/L（フルジオキシニルとして）の標準溶液を調製した。なお、換算係数は 0.8143（代謝物 K の分子量をフルジオキシニルの分子量で除した値：202.11/248.19）とした。

## 3. 装置

フードプロセッサー：MK-K80P [パナソニック（株）製]

ホモジナイザー：ウルトラタラックス T25 デジタル（シャフトジェネレーターは S25N-18G） [IKA 社製]

ウォーターバス（加熱還流用）：BS401 [ヤマト科学（株）製]

ウォーターバス（酸化用）：SB-1300 [東京理化工業（株）製]

### LC-MS/MS

装置	型式	会社
MS	LCMS-8050	(株) 島津製作所
LC	Prominence 高圧グラジエントシステム	

ポンプ	LC-20AD	(株) 島津製作所
デガッサー	DGU-20A3R	(株) 島津製作所
インジェクター	SIL-20AC	(株) 島津製作所
システムコントローラ	CBM-20A	(株) 島津製作所
カラムオーブン	CTO-20AC	(株) 島津製作所
データ処理	LabSolution	(株) 島津製作所

#### 4. LC-MS/MS 測定条件

LC 条件			
カラム	Inertsil ODS-4 [内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 $\mu\text{m}$ : ジーエルサイエンス (株) 製]		
移動相流速	0.20 mL/min		
注入量	5 $\mu\text{L}$		
カラム温度	40°C		
移動相	A 液 : 0.2 vol% 酢酸 B 液 : 0.2 vol% 酢酸・アセトニトリル溶液		
グラジエント条件	時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)
	0.0	98	2
	1.0	98	2
	7.0	60	40
	15.0	60	40
	15.01	5	95
	25.0	5	95
	25.01	98	2
	35.0	98	2
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 (-)		
インターフェース電圧	-1 kV		
脱溶媒管 (DL) 温度	250°C		
インターフェース温度	300°C		
ヒートブロック温度	400°C		
ネブライザー流量	3.0 L/min		
ドライイングガス流量	10.0 L/min		
ヒーティングガス流量	10.0 L/min		
コリジョンガス	アルゴン		
定量イオン ( $m/z$ )	フルジオキシソニル : 246.9→180.0 (CE 30 eV) 代謝物 K : 200.9→91.1 (CE 23 eV)		
定性イオン ( $m/z$ )	フルジオキシソニル : 246.9→126.1 (CE 31 eV) 代謝物 K : 200.9→65.1 (CE 37 eV)		
保持時間 (min)	代謝物 K : 14.1		

#### 5. 定量

代謝物 K 標準原液を 0.2 vol% 酢酸及び 0.2 vol% 酢酸・アセトニトリル溶液 (1 : 1) 混液

で適宜希釈し、以下の濃度の検量線用標準溶液（フルジオキシニルとして）を調製した。

- ・ 定量限界濃度（0.01 mg/kg）を添加した場合の検量点濃度  
0.00025、0.0005、0.00075、0.001、0.00125 及び 0.0015 mg/L
- ・ 基準値濃度を添加した場合  
牛の筋肉、牛の脂肪及び鶏卵（基準値 0.02 mg/kg）  
0.0005、0.001、0.0015、0.002、0.0025 及び 0.003 mg/L  
牛乳（基準値 0.04 mg/kg）  
0.001、0.002、0.003、0.004、0.005 及び 0.006 mg/L  
牛の肝臓（基準値 0.1 mg/kg）  
0.0025、0.005、0.0075、0.01、0.0125 及び 0.015 mg/L

この溶液 5 µL を LC-MS/MS に注入して、得られたピーク面積を用いて検量線を作成した。試験溶液 5 µL を LC-MS/MS に注入し、絶対検量線法によりフルジオキシニルの含量を算出した。

## 6. 添加試料の調製

牛の筋肉（定量限界濃度 0.01 mg/kg、基準値 0.02 mg/kg）：試料 10.0 g に 0.2 mg/L 添加用標準溶液 0.5 mL（0.01 mg/kg 相当）または 0.4 mg/L 添加用標準溶液 0.5 mL（0.02 mg/kg 相当）を添加し、混合した後、30 分間放置した。

牛の脂肪（定量限界濃度 0.01 mg/kg、基準値 0.02 mg/kg）：試料 10.0 g を採り、約 40°C の湯浴で融解し、0.2 mg/L 添加用標準溶液 0.5 mL（0.01 mg/kg 相当）または 0.4 mg/L 添加用標準溶液 0.5 mL（0.02 mg/kg 相当）を添加し、混合した後、冷凍庫で 10 分間放置し、脂肪を凝固させた後、室温で 30 分間放置した。

牛の肝臓（定量限界濃度 0.01 mg/kg、基準値 0.1 mg/kg）：試料 10.0 g に 0.2 mg/L 添加用標準溶液 0.5 mL（0.01 mg/kg 相当）または 2 mg/L 添加用標準溶液 0.5 mL（0.1 mg/kg 相当）を添加し、混合した後、30 分間放置した。

牛乳（定量限界濃度 0.01 mg/kg、基準値 0.04 mg/kg）：試料 10.0 g に 0.2 mg/L 添加用標準溶液 0.5 mL（0.01 mg/kg 相当）または 0.8 mg/L 添加用標準溶液 0.5 mL（0.04 mg/kg 相当）を添加し、混合した後、30 分間放置した。

鶏卵（定量限界濃度 0.01 mg/kg、基準値 0.02 mg/kg）：試料 10.0 g に 0.2 mg/L 添加用標準溶液 0.5 mL（0.01 mg/kg 相当）または 0.4 mg/L 添加用標準溶液 0.5 mL（0.02 mg/kg 相当）を添加し、混合した後、30 分間放置した。

## 7. 試験溶液の調製

### 概要

フルジオキシニル及び酸化反応により代謝物Kに変換される代謝物を試料からアセトニトリル及びアンモニア水混液で加熱還流して抽出し、酸性下でトルエンに転溶する。抽出液を過マンガン酸カリウム・水酸化ナトリウム溶液に置換して加熱し、フルジオキシニル及びその代謝物を代謝物Kに酸化する。酸化生成物をHLBミニカラム及びWAX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 牛の筋肉、牛の肝臓、牛乳及び鶏卵の場合

試料10 gにアセトニトリル160 mLを加え、1分間ホモジナイズした。アセトニトリル10 mLでホモジナイザーを洗浄し、洗液を合わせた後、アンモニア水40 mLを加え、還流冷却器を付けて1時間加熱還流した。室温まで放冷後、ケイソウ土10 gを加えて吸引ろ過した。ろ紙上の残留物を水25 mL、次いで、アセトニトリル25 mLで洗浄し、得られたろ液を合わせ、塩酸2 mLを加えた (pH3以下を確認)。これにトルエン25 mL、飽和塩化ナトリウム溶液25 mLを加えて5分間振とうした後、有機層 (上層) を採り、アセトニトリル及びトルエン (17 : 3) 混液を加えて正確に250 mLとした。

### ② 脂肪の場合

試料10 gにアセトニトリル170 mL、アンモニア水40 mLを加え、還流冷却器を付けて、1時間加熱還流した。室温まで放冷後、ケイソウ土10 gを加えて吸引ろ過し、ろ紙上の残留物を水25 mL、次いで、アセトニトリル25 mLで洗浄し、得られたろ液を合わせ、塩酸2 mLを加えた (pH3以下を確認)。これにトルエン25 mL、飽和塩化ナトリウム溶液25 mLを加えて5分間振とうした後、有機層 (上層) を採り、アセトニトリル及びトルエン (17 : 3) 混液を加えて正確に250 mLとした。

## (2) 酸化

(1) で得られた溶液から正確に25 mLを分取した後、40°C以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物に過マンガン酸カリウム1 g、1 mol/L水酸化ナトリウム溶液30 mLを加え、60°Cで15分間加熱した。反応後の容器を15分間氷冷した後、氷冷下でピロ亜硫酸ナトリウム6 gを加え、適宜振り混ぜながら氷冷下で放置した。反応液が乳白色となった後、不溶物をろ別し、ろ液に水を加えて正確に50 mLとした。この溶液から正確に10 mLを分取し、塩酸800 µLを加えて混合した。

## (3) 精製

HLBミニカラム (500 mg, 6 mL) にアセトニトリル5 mL及び水5 mLを順次注入し、各流出液は捨てた。WAXミニカラム (500 mg, 6 mL) にメタノール5 mL及び水5 mLを順次注入し、各流出液は捨てた。HLBミニカラムに (2) で得られた溶液を注入した後、水12 mL (1 mL×2回で容器を洗浄して注入した後、10 mLを直接注入) を注入し、各流出液は捨てた。このカラムの下部にWAXミニカラムを接続した後、アセトニトリル及び水 (1 : 1) 混液20 mLを注入し、流出液は捨てた。HLBミニカラムを取り外した後、WAXミニカラムに酢酸及びメタノール (1 : 199) 混液10 mLを注入し、流出液は捨てた。次いで、ギ酸及びメタノール (1 : 99) 混液12 mLを注入し、溶出液を採った後、溶出液を40°C以下で約1 mLまで濃縮し、2 mL容メスフラスコに移した。容器を0.2 vol%酢酸及び0.2 vol%酢酸・アセトニトリル溶液 (1 : 1) 混液300 µL程度で3回程度洗い、洗液を合わせて正確に2 mLとしたものを試験溶液とした。

## 8. 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から0.2 mLを分取し、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%相当濃度の検量線用標準溶液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。

[分析法フローチャート]

**秤取**

↓ 試料 10.0 g

**抽出**

↓ 牛の筋肉、牛の肝臓、牛乳及び鶏卵の場合

↓ アセトニトリル 160 mL を加えてホモジナイズ (1 分間)

↓ アセトニトリル 10 mL でホモジナイザーを洗浄し、洗液を合わせる

↓ アンモニア水 40 mL を加える

↓ 1 時間加熱還流した後、室温まで放冷

↓ 牛の脂肪の場合

↓ アセトニトリル 170 mL、アンモニア水 40 mL を加える

↓ 1 時間加熱還流した後、室温まで放冷

↓ ケイソウ土 10 g を加えて、吸引ろ過

↓ ろ紙上の残留物を水 25 mL、次いで、アセトニトリル 25 mL で洗浄し、吸引ろ過

**アセトニトリル及びトルエン混液転溶**

↓ 塩酸 2 mL を加える (pH3 以下を確認)

↓ トルエン 25 mL、飽和塩化ナトリウム溶液 25 mL を加えて振とう (5 分間)

↓ 有機層 (上層) を採る

↓ アセトニトリル及びトルエン (17 : 3) 混液で 250 mL に定容

↓ 25 mL を分取し、減圧濃縮 (40°C 以下) 後、窒素気流下で溶媒除去

**酸化**

↓ 過マンガン酸カリウム 1 g、1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 30 mL を加える

↓ 加熱 (60°C、15 分間)

↓ 冷却 (氷冷下、15 分間)

↓ 氷冷下でピロ亜硫酸ナトリウム 6 g を加え、反応液が乳白色に変化するまで適宜振り混ぜながら氷冷下で放置

↓ 不溶物をろ別し、ろ液を水で 50 mL に定容

↓ 10 mL を分取し、塩酸 800 µL を加えて混合する (①)

**HLB ミニカラム (500 mg, 6 mL) 及び WAX ミニカラム (500 mg, 6 mL) 精製**

↓ HLB ミニカラムにアセトニトリル 5 mL、水 5 mL を順次注入して、流出液を捨てる

↓ HLB ミニカラムに①を注入し、流出液を捨てる

↓ 水 1 mL×2 回で容器を洗浄し、洗液を注入した後、水 10 mL を注入し、流出液を捨てる

↓ WAX ミニカラムにメタノール 5 mL、水 5 mL を順次注入して、流出液を捨てる

↓ HLB ミニカラムの下に WAX ミニカラムを連結した後、アセトニトリル及び水 (1 : 1) 混液 20 mL を注入し、流出液を捨てて、HLB ミニカラムを取り外す

↓ WAX ミニカラムに酢酸及びメタノール (1 : 199) 混液 10 mL を注入し、流出液を捨てる

- ↓ WAX ミニカラムにギ酸及びメタノール (1 : 99) 混液 12 mL 注入し、溶出液を採り、約 1 mL まで減圧濃縮する
- ↓ 0.2 vol% 酢酸及び 0.2 vol% 酢酸・アセトニトリル溶液 (1 : 1) 混液で 2 mL に定容する

LC-MS/MS 測定

## [結果及び考察]

### 1. 測定条件の検討

#### (1) MS条件の検討

フルジオキソニル及び代謝物Kは、スキャン測定において十分な感度が得られたESI(-)モードで測定することとした。フルジオキソニルのスキャン測定におけるマススペクトルを図1-1に示した。モノアイソトピック質量248.03のフルジオキソニルの脱プロトン化分子( $m/z$  247.0[M-H]<sup>-</sup>)が強く観察されたため、本イオンを中心とした1 amuの範囲を詳細にスキャン測定した結果、最も強度の高かった $m/z$  246.9 (図1-2) をプリカーサーイオンに選択した。図1-3及び図1-4にフルジオキソニルの脱プロトン化分子( $m/z$  246.9[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示した。プロダクトイオンには $m/z$  180.0及び126.1を選択し、これらのイオンのうち、より強度の高かった $m/z$  246.9→180.0を定量イオン、 $m/z$  246.9→126.1を定性イオンとした。

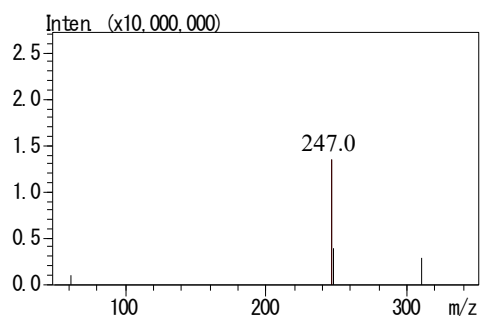


図1-1 フルジオキソニルのマススペクトル  
スキャン範囲：50～350 amu  
測定条件：ESI(-)  
フルジオキソニル：1 mg/L

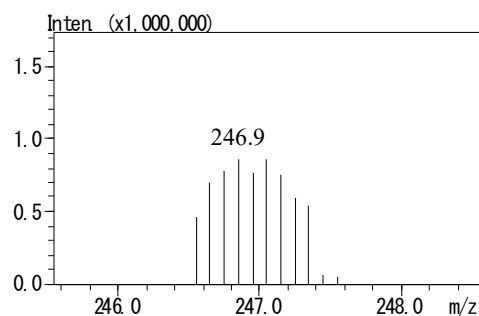


図1-2 フルジオキソニルのマススペクトル  
スキャン範囲：246～248 amu  
測定条件：ESI(-)  
フルジオキソニル：1 mg/L

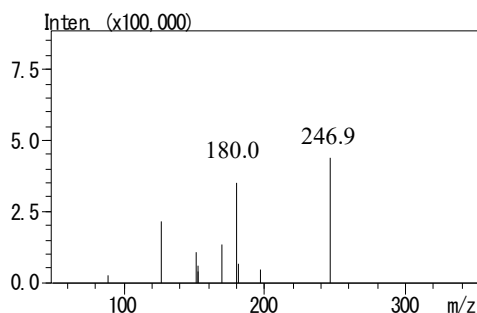


図1-3 プロダクトイオンスペクトル(定量)  
プリカーサーイオン： $m/z$  246.9  
測定条件：ESI(-)  
CE=30 V (CE : collision energy)  
フルジオキソニル：0.1 mg/L

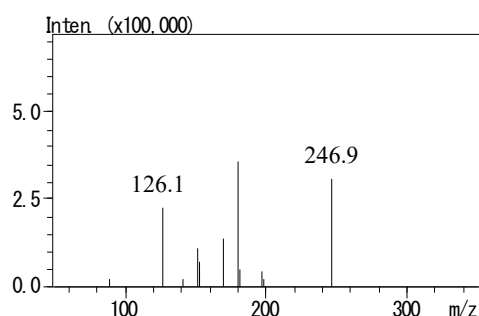


図1-4 プロダクトイオンスペクトル(定性)  
プリカーサーイオン： $m/z$  246.9  
測定条件：ESI(-)  
CE=31V (CE : collision energy)  
フルジオキソニル：0.1 mg/L

代謝物Kのスクリーン測定におけるマススペクトルを図2-1に示した。モノアイソトピック質量202.01の代謝物Kの脱プロトン化分子 ( $m/z$  200.9[M-H]<sup>-</sup>) が強く観察されたため、本イオンを中心とした1 amuの範囲を詳細にスクリーン測定した結果、最も強度の高かった $m/z$  200.9 (図2-2) をプリカーサーイオンに選択した。図2-3及び図2-4に代謝物Kの脱プロトン化分子 ( $m/z$  200.9 [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示した。プロダクトイオンには $m/z$  91.1及び65.1を選択し、これらのイオンのうち、より強度の高かった $m/z$  200.9→91.1を定量イオン、 $m/z$  200.9→65.1を定性イオンとした。

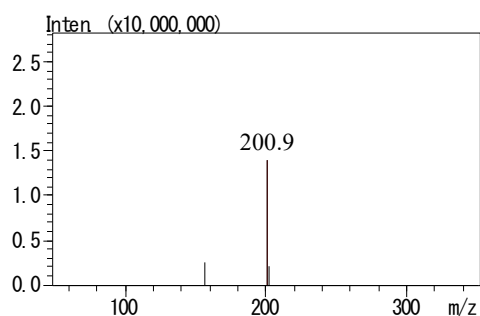


図2-1 代謝物Kのマススペクトル  
 スキャン範囲：50～350 amu  
 測定条件：ESI(-)  
 代謝物K：1 mg/L

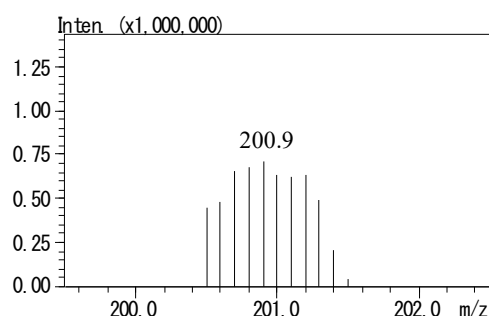


図2-2 代謝物Kのマススペクトル  
 スキャン範囲：200～202 amu  
 測定条件：ESI(-)  
 代謝物K：1 mg/L

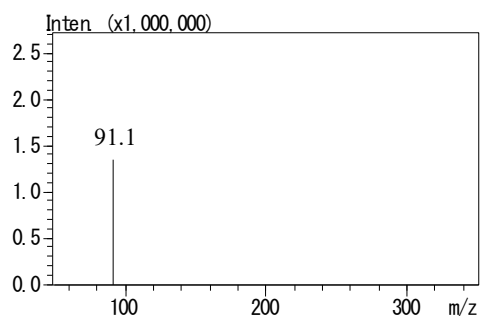


図2-3 プロダクトイオンスペクトル(定量)  
 プリカーサーイオン： $m/z$  200.9  
 測定条件：ESI(-)  
 CE=23 V (CE：collision energy)  
 代謝物K：0.1 mg/L

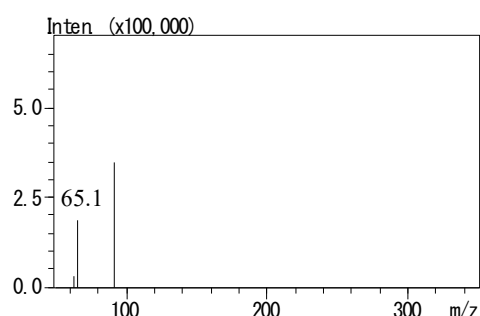


図2-4 プロダクトイオンスペクトル(定性)  
 プリカーサーイオン： $m/z$  200.9  
 測定条件：ESI(-)  
 CE=37V (CE：collision energy)  
 代謝物K：0.1 mg/L

## (2) LC 条件の検討

フローインジェクション分析を用いて移動相の溶媒及び添加剤の種類について検討した。アセトニトリル及び水 (1:1) 混液または水及びメタノール (1:1) 混液を用いて代

代謝物 K のピーク強度を比較したところ、アセトニトリル及び水（1 : 1）混液では水及びメタノール（1 : 1）混液に比べて約 2 倍の強度のピークが得られた。そこで、アセトニトリル及び水（1 : 1）混液に、ギ酸（0.05～0.2 vol%）、ギ酸アンモニウム（2～20 mmol/L）、酢酸（0.05～0.2 vol%）または酢酸アンモニウム（2～20 mmol/L）を添加して代謝物 K のピーク強度を比較した。その結果、図 3 に示したとおり酢酸>ギ酸>酢酸アンモニウム>ギ酸アンモニウムの順に高いピーク強度が得られたことから、移動相の溶媒はアセトニトリル及び水を、添加剤は酢酸を用いることとした。

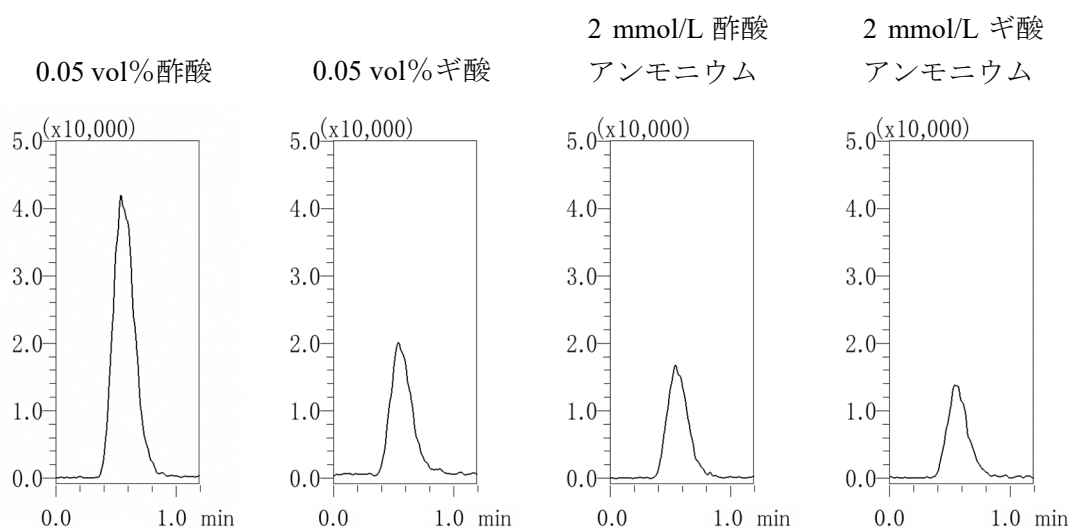


図 3 各種添加剤を含む移動相（溶媒：アセトニトリル及び水（1 : 1）混液）における代謝物 K（200.9→91.1）のクロマトグラム

酢酸の添加濃度については、0.05 または 0.2 vol% 酢酸及び 0.05 または 0.2 vol% 酢酸・アセトニトリル溶液を用いて各種グラジエント分析で測定して比較したところ、0.2 vol% 酢酸及び 0.2 vol% 酢酸・アセトニトリル溶液でより高い検出感度が得られたことから、酢酸の添加濃度は 0.2 vol% とした。

グラジエント条件については、試料マトリックスの測定への影響を比較して検討した。分析カラムに Inertsil ODS-4 [ジーエルサイエンス（株）製、内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm]、A 液に 0.2 vol% 酢酸、B 液に 0.2 vol% 酢酸・アセトニトリル溶液を用いて、A 液及び B 液（49 : 1）混液で 1 分間保持した後、（49 : 1）から（1 : 19）までの濃度勾配を 15 分間で行うグラジエント条件（1）で、牛の肝臓のブランク試験溶液から調製した代謝物 K のマトリックス添加標準溶液及び溶媒標準溶液（ともにフルジオキシニルとして 0.01 mg/L）を測定したとき、マトリックス添加標準溶液に対する溶媒標準溶液のピーク面積比は 0.77 と約 20% のイオン化抑制が認められた。そこで、グラジエント条件について種々検討を行い、A 液及び B 液（49 : 1）混液で 1 分間保持した後、（49 : 1）から（3 : 2）までの濃度勾配を 6 分間で行い、（3 : 2）で 8 分間保持するグラジエント条件（2）に変更した。本条件を用いて同様に測定した結果、ピーク面積比は 0.93 とイオン化抑制を低減す

ることができたことから、グラジエント条件（2）を用いることとした。

分析カラムについては、汎用されている ODS 化シリカゲルカラムである Atlantis T3 [Waters 社製、内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3  $\mu\text{m}$ ]、Inertsil ODS-4、Inertsustain AQ-C18 [ジーエルサイエンス（株）製、内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3  $\mu\text{m}$ ]、L-cloumn3 C18 メタルフリーカラム [(一財) 化学物質評価研究機構製、内径 2.0 mm、長さ 150 mm、粒子径 3  $\mu\text{m}$ ]、Mightysil RP-18 PA、Mightysil RP-18 GPAqua [ともに関東化学（株）製、内径 2.0 mm、長さ 150 mm、粒子径 3  $\mu\text{m}$ ] について、ピーク形状及び検出感度を比較した。その結果、いずれの分析カラムでもピーク形状は良好であったが、Inertsil ODS-4 を用いた場合に最も高い検出感度が得られたことから、分析カラムは Inertsil ODS-4 を選択した。

以上の検討結果から、HPLC 条件は、分析カラムに Inertsil ODS-4、A 液に 0.2 vol% 酢酸 B 液に 0.2 vol% 酢酸・アセトニトリル溶液を用いて、A 液及び B 液（49：1）混液で 1 分間保持した後、（49：1）から（3：2）までの濃度勾配を 6 分間で行い、（3：2）で 8 分間保持する条件で行うこととした。

### （3）検量線

代謝物 K の検量線の例を図 4-1 及び 4-2 に示した。各濃度範囲（0.25～1.5  $\mu\text{g/L}$  及び 2.5～15  $\mu\text{g/L}$ ）で作成した検量線の決定係数  $R^2$  は 0.9998 であり、良好な直線性を示した。

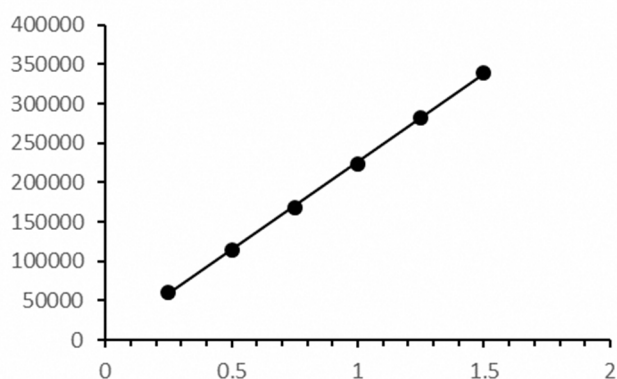


図 4-1 代謝物 K の検量線（フルジオキシニルとして）の例

濃度範囲：0.25～1.5  $\mu\text{g/L}$

$$y=223024114x+2596$$

$$R^2=0.9998$$

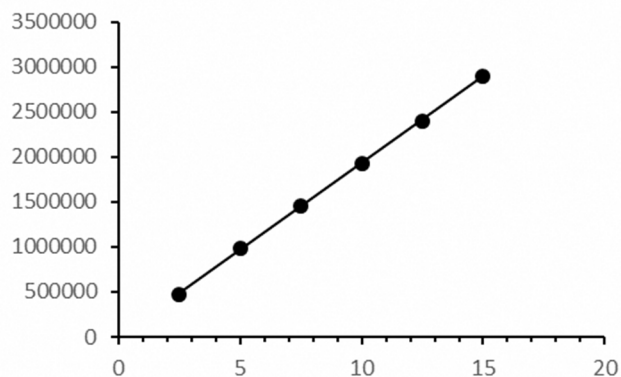


図 4-2 代謝物 K の検量線（フルジオキシソニルとして）の例

濃度範囲：2.5～15 μg/L

$$y=1926890971x+2856$$

$$R^2=0.9998$$

#### (4) 定量限界

定量限界の算出結果を以下に示した。

$$0.01 \text{ mg/kg} \quad \left[ \frac{\text{試験溶液量 } 2 \text{ (mL)} / \text{試験溶液中の試料量 } 0.2 \text{ (g)}}{\left[ \frac{\text{フルジオキシソニルの定量限界相当量 } 0.005 \text{ (ng)} / \text{注入量 } 5 \text{ (}\mu\text{L)}}{\right]} \right]$$

## 2. 試験溶液調製法の検討

### (1) 抽出

#### ①申請企業の残留分析法の検証

申請企業の資料（非公開）に記載されている残留分析法を図 5 に示した。本法では試料からフルジオキシソニル及びその代謝物をアセトニトリル及びアンモニア水混液を用いた加熱還流により抽出した後、酸性下でアセトニトリル及びトルエン混液への転溶を行っている。そこで本法の適用性について検証を行うこととした。

はじめに、アセトニトリル及びトルエン混液への転溶操作によりフルジオキシソニルがどの程度回収されるかを確認するため、以下の実験を行った。ナス型フラスコに試料の代わりに水 10 g を採り、アセトニトリル 170 mL（このうち 10 mL はホモジナイザー洗浄分を想定）、アンモニア水 40 mL を加えて 1 時間加熱還流した。この溶液にフルジオキシソニル 500 μg（500 mg/L アセトニトリル標準溶液を 1 mL）、ろ紙上の残留物洗浄分であるアセトニトリル 24 mL 及び水 25 mL を加えた。ここに塩酸 2 mL を加えて pH3 以下であることを確認した後、トルエン 25 mL 及び飽和塩化ナトリウム溶液 25 mL を加えて振とうし、有機層（上層）を採取して回収率を求めた。その結果、フルジオキシソニルの回収率は 99%、水層では 0% であり、本操作によりフルジオキシソニルはアセトニトリル及びトルエン混液へ良好に回収されることが確認できた。

次に、申請企業の残留分析法の加熱還流抽出からアセトニトリル及びトルエン混液転溶までの操作について、牛の筋肉、牛の肝臓及び牛の脂肪を試料としてフルジオキシソニルの

添加回収試験を行った。牛の筋肉及び牛の肝臓は、試料 10 g にフルジオキシニル 500 µg (500 mg/L アセトン標準溶液を 1 mL) を添加して 30 分間放置した後、アセトニトリル 160 mL を加え、それ以降は図 5 のフローチャートに従って抽出操作、アセトニトリル及びトルエン混液転溶操作を行い、アセトニトリル及びトルエン (85 : 15) 混液で 250 mL に定容して試験溶液とした。牛の脂肪については、試料 10 g を約 40℃の湯浴で融解したものにフルジオキシニル 500 µg (500 mg/L アセトン標準溶液を 1 mL) を添加して混合し、冷凍庫で 10 分間放置して凝固させ、室温で 30 分間放置した後、アセトニトリル 170 mL 及びアンモニア水 40 mL を加えて、加熱還流以降の操作を同様に行って試験溶液を調製した。なお、還流前にホモジナイズにより均一化した牛の筋肉及び牛の肝臓については、還流後もその状態が保たれており、大きな塊としての固形残さは認められず、牛の脂肪については還流後融解していることが目視確認された。調製した試験溶液 20 µL を分取して窒素気流下溶媒を除去し、メタノール 200 µL に溶解 (10 倍希釈) した後、LC-MS/MS で測定し、マトリックス添加標準溶液を用いて各試料からの回収率を求めた。その結果、試料からの回収率は 95~100%といずれも良好であった (表 1)。以上の検討結果から、抽出操作、引き続きアセトニトリル及びトルエン混液への転溶操作については、申請企業の残留分析法の方法に準じることとした。なお、申請企業の残留分析法において、加熱還流抽出時に加えるアセトニトリル量は、筋肉や肝臓では、160 mL にホモジナイザー洗浄分 5~10 mL が加算された 165~170 mL、脂肪では 160 mL となっているが、本試験法開発では、加熱還流抽出条件を同一にするためにホモジナイザー洗浄に使用する量を 10 mL、脂肪に加える量を 170 mL とすることとした。また、申請企業の残留分析法では卵や乳ではホモジナイズを行わないが、本検討においてアセトニトリルを加えた時点で試料の一部が容器に固着したことから、牛の筋肉や牛の肝臓と同様にホモジナイザーで磨砕均一化することとした。

#### 秤取

↓ フラスコに試料 10.0 g を採る

#### 抽出

↓ 筋肉、肝臓及び腎臓の場合

↓ アセトニトリル 160 mL を加えてホモジナイズ

↓ アセトニトリル 5~10 mL でホモジナイザーを洗浄し、洗液を合わせる

↓ アンモニア水 40 mL を加える

↓ 1 時間加熱還流した後、室温まで放冷

↓ 脂肪、乳及び卵の場合

↓ アセトニトリル 160 mL、アンモニア水 40 mL を加える

↓ 1 時間加熱還流した後、室温まで放冷

↓ セライト 10 g を加えて、吸引ろ過

↓ 残留物を水 25 mL、次いで、アセトニトリル 25 mL で洗浄し、吸引ろ過

#### アセトニトリル及びトルエン混液転溶

↓ 塩酸 2 mL を加える (pH3 以下を確認)

↓ トルエン 25 mL、飽和塩化ナトリウム溶液 25 mL を加えて 1 分間振とう

↓ 水層 (下層) を捨てる

- ↓ 卵以外の試料
- ↓ 有機層（上層）を採り、減圧濃縮（40℃以下）により溶媒除去
- ↓ 卵の場合
- ↓ 有機層（上層）を採り、アセトニトリル及びトルエン（17：3）混液で 250 mL に定容した後、25 mL を分取し、減圧濃縮（40℃以下）により溶媒除去

#### 酸化

- ↓ 過マンガン酸カリウム 1 g、1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 30 mL を加える
- ↓ 加熱（60℃、15 分間）した後、冷凍庫（-20℃±5℃）内で 15 分間冷却
- ↓ 氷冷下で、ピロ亜硫酸ナトリウム 3×2 g を加える
- ↓ 適宜振り混ぜながら、反応液が乳白色になるまで氷冷下で放置
- ↓ セライト 5 g を加えて、不溶物をろ別（水 25 mL×3 回で洗浄）

#### ジクロロメタン転溶

- ↓ 塩酸 10 mL を加えて pH 1 程度に調整（淡黄色に変化）
- ↓ ジクロロメタン及び酢酸エチル（4：1）混液 25 mL を加え、振とう後、ジクロロメタン層（下層）を採る（2 回繰り返す）
- ↓ 無水硫酸ナトリウムで脱水
- ↓ 減圧濃縮（40℃）した後、窒素気流下で溶媒除去
- ↓ 残留物をアセトニトリル及び水（1：1）混液 5 mL に溶解

#### LC-MS/MS 測定

図 5 申請企業の残留分析法フローチャート

表 1 申請企業の残留分析法（抽出から転溶操作まで）における添加回収率

	回収率 (%)		
	牛の筋肉	牛の肝臓	牛の脂肪
フルジオキシニル	95	100	98

フルジオキシニル添加量：500 µg

#### (2) 酸化

申請企業の残留分析法（図 5）では、抽出したフルジオキシニル及びその代謝物を過マンガン酸カリウム及び水酸化ナトリウム溶液を用いて酸化し、代謝物 K に変換した後、ピロ亜硫酸ナトリウムを加えて余剰の過マンガン酸カリウムを不活性化している。そこで本法の適用性について検証を行うこととした。

はじめに、酸化操作における代謝物 K の安定性を確認するために以下の実験を行った。ナス型フラスコに代謝物 K 標準溶液（500 mg/L アセトン標準溶液）を 0.5 mL 採り（添加量：250 µg）、窒素気流下溶媒を除去した後、過マンガン酸カリウム 1 g、1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 30 mL を加えた。ガラス栓をし、栓が浮かないようにパラフィルムを栓及びナス型フラスコの境界線に巻き付けた後、60℃の水浴中で適宜振り混ぜながら 30 分間加熱した。氷冷下で 15 分間放置した後、ピロ亜硫酸ナトリウム 6 g を加え、適宜振り混ぜな

から反応液が乳白色になるまで氷冷下で放置した。不溶物をろ別した後、ろ液に水を加えて 50 mL に定容し、回収率を求めた。その結果、代謝物 K の回収率は 98% と良好であったことから、酸化操作における代謝物 K の安定性に問題は無いと考えた。

次に、申請企業の酸化操作におけるフルジオキシソニルから代謝物 K への変換状況を確認するために、以下の実験を行った。なお、本実験では加熱時間及び温度の影響についても検討した。ナス型フラスコにフルジオキシソニル標準溶液 (50 mg/L アセトン標準溶液) を 0.1 mL 採り (添加量: 5 µg)、窒素気流下溶媒を除去した後、過マンガン酸カリウム 1 g、1 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液 30 mL を加えた。ガラス栓をし、パラフィルムを栓及びナス型フラスコの境界線に巻き付けた後、60°C の水浴中で適宜振り混ぜながら 5、10、15 または 20 分間加熱した。氷冷下で 15 分間放置した後、ピロ亜硫酸ナトリウム 6 g を加え、適宜振り混ぜながら反応液が乳白色になるまで氷冷下で放置した。不溶物をろ別した後、ろ液に水を加えて 50 mL に定容し、フルジオキシソニル及び代謝物 K の回収率を求めた。なお、代謝物 K の回収率は、代謝物 K 含量をフルジオキシソニル含量に換算し、フルジオキシソニルの添加量に対する比として求めた。また、上記操作において、加熱時間を 15 分間、水浴温度を 40、60 または 80°C として同様に実験し、回収率を求めた。その結果、表 2-1 及び表 2-2 に示したとおり、申請企業の残留分析法に示されている加熱温度 60°C、加熱時間 15 分間の条件でフルジオキシソニルから代謝物 K への酸化が良好に行われていることが確認できた。

表 2-1 酸化反応における加熱時間の影響 (加熱温度 60 °C)

	回収率 (%)			
	5 分間	10 分間	15 分間	20 分間
代謝物 K	95	98	98	98
フルジオキシソニル	0	0	0	0

フルジオキシソニル添加量: 5 µg

表 2-2 酸化反応における加熱温度の影響 (加熱時間 15 分間)

	回収率 (%)		
	40 °C	60 °C	80 °C
代謝物 K	96	99	95
フルジオキシソニル	0	0	0

フルジオキシソニル添加量: 5 µg

試料存在下での酸化操作におけるフルジオキシソニルから代謝物 K への変換状況を確認した。鶏卵のブランク試料から加熱還流抽出及びアセトニトリル及びトルエン混液転溶により得られた抽出液 250 mL から 25 mL を分取し、フルジオキシソニル 1 µg (10 mg/L アセトン標準溶液を 0.1 mL) を加えた。40°C 以下で減圧濃縮した後、窒素気流下で溶媒を完全に除去し、「実験方法 7. 試験溶液調製法 (2) 酸化」に従って操作し、水で 50 mL に定容したろ液中の代謝物 K の回収率をマトリックス添加標準溶液により求めた。その結果、代謝物 K の回収率は 94% であり、フルジオキシソニルも残存していないことを確認した。

以上の検討結果から、フルジオキシソニル及びその代謝物の代謝物 K への酸化についても、

申請企業の残留分析法の方法に準じることとした。なお、申請企業の残留分析法（図 5）では、卵以外の試料ではアセトニトリル及びトルエン混液転溶後の有機層（上層）全量を酸化反応に供しているが、卵試料の場合は、酸化効率を高めるために有機層をアセトニトリル及びトルエン（17：3）混液で 250 mL に定容した後に 25 mL 分取して、酸化を行っている。本操作は卵以外の試料に対しても適用可能と記載されていることから、本試験法開発では、全ての試料で卵と同様の方法を採用することとした。また、申請企業の残留分析法では、酸化操作の留意点として、溶媒除去が不十分な残留物に過マンガン酸カリウム及び水酸化ナトリウム溶液を加えると、反応液が赤紫色ではなく、茶色や緑色となり、代謝物 K への変換が十分に行われないう可能性があることと記載されている。これと同様の事例について本試験法開発においても認められたことから、酸化試薬添加前の溶媒除去は十分に行う必要がある。

### （3）精製

#### ①ミニカラム精製について

申請企業の残留分析法（図5）では、ピロ亜硫酸ナトリウムを加えて過マンガン酸カリウムを不活性化した後、不溶物をろ別し、得られたろ液に塩酸を加え、ジクロロメタン及び酢酸エチル（4：1）混液で代謝物Kを抽出することで精製操作としている。ジクロロメタンは、「特に発がん性のおそれがある物質」として特定化学物質障害予防規則の特別有機溶剤に指定されていることから、本試験法開発では、ジクロロメタンを使用しない精製方法としてミニカラムを用いた精製を検討した。ミニカラムは、代謝物Kがカルボキシル基を有する酸性化合物であることから、陰イオン交換体ミニカラムであるWAXミニカラム [Oasis WAX (500 mg, 6 mL)] を用いることとし、また、イオン交換による精製効果を高めるために、脱塩を目的としてHLBミニカラム [Oasis HLB (500 mg, 6 mL)] をWAXミニカラムの前に使用することとした。

#### a) HLBミニカラムからの溶出状況について

HLB ミニカラムへの負荷及び洗浄について検討した。酸化反応後のろ液の pH は約 8 であることから、そのまま HLB に注入しても酸性化合物の代謝物 K は HLB に十分に保持されないと考え、塩酸を加えて酸性として負荷することとし、以下の実験を行った。ナス型フラスコに過マンガン酸カリウム 1 g、1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 30 mL を加えた後、「実験方法 7. 試験溶液の調製（2）酸化」に従って操作した。水で 50 mL に定容したろ液（以下、溶液 A とする）から 10 mL を分取し、代謝物 K を 50 µg（500 mg/L アセトン標準溶液 0.1 mL）及び塩酸 400 µL を加えて混合した（pH は約 6）。アセトニトリル 5 mL、水 5 mL で順次コンディショニングした HLB ミニカラムにこの溶液を負荷した後、水 10 mL を注入し、各溶出液を採り、代謝物 K の回収率を求めた。その結果、溶液負荷時には代謝物 K の流出はなかったが、水 10 mL 注入時の画分に約 1%の溶出が認められた。そこで、塩酸の添加量を 800 µL に変更し（混合時の pH は約 1）、上記と同様の検討を行った。その結果、負荷液を注入した後、水 20 mL を注入しても代謝物 K の溶出は認められなかった。本検討結果から、溶液 A 10 mL に塩酸 800 µL を加えて混合し、HLB ミニカラムに負荷した後、水 1 mL×2 回で容器を洗浄して洗液を負荷し、水 10 mL を注入して洗浄することとした。

次に、HLB ミニカラムからの代謝物 K の溶出を検討した。溶液 A を 10 mL 分取し、代謝物 K を 50  $\mu\text{g}$  (500 mg/L アセトン標準溶液 0.1 mL) 及び塩酸 800  $\mu\text{L}$  を加えて混合し、全量を HLB ミニカラムに注入した。水 12 mL を注入し、流出液を捨てた後、アセトニトリル及び水 (1 : 1) 混液を注入して溶出液を採り、回収率を求めた。その結果を表 3-1 に示した。代謝物 K は 15 mL までにはほぼ全て溶出したことから、本試験法ではミニカラムのロット間差等を考慮してアセトニトリル及び水 (1 : 1) 混液 20 mL で溶出させることとした。

表3-1 HLBミニカラムからの溶出状況

化合物名	回収率 (%)						
	負荷液 約11 mL	水 12 mL	アセトニトリル及び水 (1 : 1) 混液				計
			0-5 mL	5-10 mL	10-15 mL	15-20 mL	
代謝物K	0	0	43	55	1	0	99

Oasis HLB (500 mg、6 mL、Waters 社製)

代謝物 K 負荷量 : 50  $\mu\text{g}$

b) WAX ミニカラムからの溶出状況について

WAX ミニカラムに対する代謝物 K の保持について確認した。WAX ミニカラムをアセトニトリル 5 mL、水 5 mL で順次コンディショニングした後、アセトニトリル及び水 (1 : 1) 混液で調製した代謝物 K の 10 mg/L 標準溶液 1 mL を負荷した (負荷量 : 10  $\mu\text{g}$ )。このミニカラムに水、アセトニトリル及び水 (1 : 1)、(3 : 2)、(7 : 3)、(4 : 1)、(9 : 1) 混液、アセトニトリル各 10 mL を順次注入して溶出液を採り、溶出状況を確認したところ、いずれの画分からも代謝物 K は認められず、代謝物 K は溶出液がアセトニトリル及び水混液の場合、WAX ミニカラムに十分に保持されることがわかった。

次に、WAX ミニカラムにおける洗浄方法について検討した。メタノール 5 mL、水 5 mL で順次コンディショニングした WAX ミニカラムにアセトニトリル及び水 (1 : 1) 混液で調製した代謝物 K の 10 mg/L 標準溶液 1 mL を注入し (負荷量 : 10  $\mu\text{g}$ )、酢酸及びメタノール (1 : 999)、(1 : 199)、(1 : 99) 及び (1 : 19) 混液各 10 mL を順次注入して溶出液を採り、回収率を求めた。その結果を表 3-2 に示した。代謝物 K は、酢酸及びメタノール (1 : 999) ~ (1 : 99) 混液で溶出しなかったが、本試験法ではミニカラムのロット間差を考慮して酢酸及びメタノール (1 : 199) 混液 10 mL で洗浄することとした。

表3-2 WAXミニカラムからの酢酸及びメタノール混液による溶出状況

化合物名	回収率 (%)			
	酢酸及びメタノール混液各10 mL			
	1 : 999	1 : 199	1 : 99	1 : 19
代謝物K	0	0	0	97

Oasis WAX (500 mg、6 mL、Waters社製)

代謝物K負荷量 : 10  $\mu\text{g}$

WAX ミニカラムからの代謝物 K の溶出方法について検討した。溶出に用いる溶媒は、

酢酸及びメタノール混液とギ酸及びメタノールの混液について検討したが、酢酸よりも低濃度で溶出可能であったギ酸を用いることとし、ギ酸濃度を検討した。メタノール 5 mL、水 5 mL で順次コンディショニングした WAX ミニカラムにアセトニトリル及び水 (1 : 1) 混液で調製した代謝物 K の 10 mg/L 標準溶液 1 mL を注入し (負荷量 : 10 µg)、ギ酸及びメタノール (1 : 999)、(1 : 199)、(1 : 99) 混液各 10 mL を順次注入して溶出液を採り、回収率を求めた。その結果、表 3-3 に示したとおり、ギ酸及びメタノール (1 : 99) 混液で代謝物 K はほぼ全て溶出した。

次に、ギ酸及びメタノール (1 : 99) 混液による代謝物 K の溶出状況を詳細に検討した。メタノール 5 mL、水 5 mL で順次コンディショニングした WAX ミニカラムにアセトニトリル及び水 (1 : 1) 混液で調製した代謝物 K の 10 mg/L 標準溶液 1 mL を注入し (負荷量 : 10 µg)、ギ酸及びメタノール (1 : 99) 混液を注入して溶出液を 2 mL ずつ分取し、回収率を求めた。その結果を表 3-4 に示した。代謝物 K はギ酸及びメタノール (1 : 99) 混液 10 mL でほぼ全て溶出したが、本試験法では、ミニカラムのロット間差等を考量して溶出溶媒量を 12 mL とした。

表3-3 WAXミニカラムからのギ酸及びメタノール混液による溶出状況

化合物名	回収率 (%)		
	ギ酸及びメタノール混液各10 mL		
	1 : 999	1 : 199	1 : 99
代謝物K	0	92	99

Oasis WAX (500 mg、6 mL、Waters社製)

代謝物K負荷量 : 10 µg

表3-4 WAXミニカラムからのギ酸及びメタノール (1 : 99) 混液による溶出状況

化合物名	回収率 (%)						
	ギ酸及びメタノール (1 : 99) 混液						
	0-2 mL	2-4 mL	4-6 mL	6-8 mL	8-10 mL	10-12 mL	計
代謝物K	0	23	68	6	1	0	98

Oasia WAX (500 mg、6 mL、Waters社製)

代謝物K負荷量 : 10 µg

c) HLB ミニカラムと WAX ミニカラムを併用した精製での溶出状況について

HLB ミニカラムと WAX ミニカラムを併用した精製での代謝物 K の保持及び溶出状況について確認するため、以下の実験を行った。溶液 A を 10 mL 分取し、代謝物 K を 50 µg (500 mg/L アセトン標準溶液 0.1 mL)、塩酸 800 µL を加えて混合した。この溶液をアセトニトリル 5 mL、水 5 mL で順次コンディショニングした HLB ミニカラムに注入した後、水 12 mL (このうち水 1 mL×2 回で容器を洗浄し、洗液を注入した) を注入し、流出液を捨てた。HLB ミニカラムの下部にメタノール 5 mL、水 5 mL で順次コンディショニングした WAX ミニカラムを連結し、アセトニトリル及び水 (1 : 1) 混液を 20 mL 注入し、流出液を採り (画分 1)、HLB ミニカラムを外して、WAX ミニカラムに酢酸及びメタノール (1 : 199) 混液 10 mL を注入し、流出液を採った (画分 2)。引き続き、ギ酸及びメタノール (1 :

99) 混液 12 mL を注入し、溶出液を採った (画分 3)。その結果、画分 1 及び 2 では代謝物 K の溶出は認められず、画分 3 における代謝物 K の回収率は 104% と、両ミニカラムを併用した精製における代謝物 K の保持、溶出状況について問題は認められなかった。

以上の検討結果から、HLB ミニカラムと WAX ミニカラムを併用した精製方法として、「酸化反応後に水で 50 mL に定容したろ液 10 mL に塩酸 800  $\mu$ L を加えて混合した後、HLB ミニカラムに注入し、水 12 mL で洗浄する。HLB ミニカラムの下部に予めメタノール 5 mL、水 5 mL で順次コンディショニングした WAX ミニカラムを連結し、アセトニトリル及び水 (1 : 1) 混液 20 mL を注入した後、HLB ミニカラムを取り外し、WAX ミニカラムを酢酸及びメタノール (1 : 199) 混液 10 mL で洗浄した後、ギ酸及びメタノール (1 : 99) 混液 12 mL で溶出させる」方法を採用した。

#### ②ギ酸及びメタノール混液での濃縮・乾固について

本試験法開発の検討を行っていた中で、代謝物 K を溶解させたギ酸及びメタノール混液を減圧濃縮した後、窒素気流下で溶媒を完全に除去し、残留物をメタノールに溶解したときに代謝物 K の損失が認められた。そこで、濃縮・乾固による代謝物 K の挙動を確認するために以下の実験を行った。ナス型フラスコにメタノールまたはギ酸及びメタノール (1 : 99) 混液 15 mL を採り、代謝物 K を 10  $\mu$ g (500 mg/L アセトン標準溶液 0.02 mL) 添加した。それぞれ約 1 mL まで減圧濃縮した後、メタノールでナス型フラスコの内壁を洗浄しながら 10 mL に定容した。または、約 1 mL まで減圧濃縮した後、窒素気流下で溶媒を完全に除去し、メタノールで内壁を洗浄しながら 10 mL に定容し、代謝物 K の回収率を求めた。その結果を表 3-5 に示した。ギ酸及びメタノール (1 : 99) 混液を約 1 mL まで濃縮した後、窒素気流下で乾固した場合、代謝物 K が大きく損失した。本検討結果から、ミニカラム精製におけるギ酸及びメタノール (1 : 99) 混液による溶出液は約 1 mL まで濃縮した後、乾固せずに 0.2 vol% 酢酸及び 0.2 vol% 酢酸・アセトニトリル溶液 (1 : 1) 混液で 2 mL に定容することとした。

表 3-5 各溶媒を用いた濃縮・乾固における代謝物 K の損失

溶媒	濃縮	窒素乾固	回収率 (%)
メタノール	約 1 mL まで	無	100
	約 1 mL まで	有	99
ギ酸及びメタノール (1 : 99) 混液	約 1 mL まで	無	99
	約 1 mL まで	有	62

代謝物 K 添加量 : 10  $\mu$ g

本試験法では【実験方法】2. 試薬・試液に示したとおり、検量線用標準溶液は 0.2 vol% 酢酸及び 0.2 vol% 酢酸・アセトニトリル溶液 (1 : 1) 混液で調製している。一方で、上述のとおり試験溶液はミニカラムから溶出したギ酸及びメタノール (1 : 99) 混液 12 mL を 40°C 以下で約 1 mL まで濃縮し、0.2 vol% 酢酸及び 0.2 vol% 酢酸・アセトニトリル溶液 (1 : 1) 混液で 2 mL に定容した溶液であり、検量線用標準溶液と試験溶液の各溶媒組成が異なる。そこで、溶媒組成の違いが LC-MS/MS 測定における代謝物 K の保持時間及びピーク面

積に影響を及ぼさないことを確認するため、以下の検討を行った。バイアル内で代謝物 K 標準溶液（アセトン溶液）を乾固し、残留物に 0.2 vol% 酢酸及び 0.2 vol% 酢酸・アセトニトリル溶液（1：1）混液を加えて溶解し、代謝物 K 標準溶液（0.02 mg/L）（以下、溶媒①std とする）を調製した。同様に、残留物に「ナス型フラスコにギ酸及びメタノール（1：99）混液 12 mL を採り、約 1 mL に濃縮した後、2 mL 容メスフラスコに移し、容器を 0.2 vol% 酢酸及び 0.2 vol% 酢酸・アセトニトリル溶液（1：1）混液で洗い、洗液を合わせて正確に 2 mL とした溶液」を加えて溶解し、代謝物 K 標準溶液（0.02 mg/L）（以下、溶媒②std とする）を調製した。溶媒①std 及び溶媒②std を交互に 3 回ずつ LC-MS/MS に注入し、それぞれの保持時間とピーク面積の平均値から保持時間比及びピーク面積比を求めた。その結果、溶媒①std に対する溶媒②std の保持時間比は 0.999、ピーク面積比は 0.99 とほとんど差が認められなかったことから、溶媒組成の違いは保持時間及びピーク面積に影響を及ぼさないと考えた。

#### 4. 添加回収試験

「実験方法の 7. 試験溶液の調製」に従ってフルジオキシニルの添加回収試験を実施した。検討対象食品は牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳及び鶏卵の計 5 試料、添加濃度は定量限界濃度（0.01 mg/kg）及び基準値濃度の 2 濃度とした。添加回収試験における各ブランク試料、添加試料及び回収率 100% 相当の溶媒標準溶液のクロマトグラムを図 6-1～図 6-10 に示した。また、各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 7-1～図 7-5 に示した。

##### （1）選択性

選択性の評価結果を表 4-1 に示した。検討したいずれの試料においても代謝物 K と同じ保持時間にピークが認められたが、評価基準（妥当性評価ガイドライン<sup>2)</sup> を参照）を満たしていたことから、選択性に問題無いと判断した。

これらの妨害ピークは、LC-MS/MS で代謝物 K の標準溶液を測定した直後に試験溶液の調製に用いた 0.2 vol% 酢酸及び 0.2 vol% 酢酸・アセトニトリル（1：1）混液を測定しても検出されなかったことから、測定機器における代謝物 K のキャリーオーバーに由来するピークでは無いと考えた。一方、試料を用いないで試薬・試液のみで調製した試験溶液において同程度の強度のピークが検出されたことから、試薬、器具由来の可能性があった。そのため、試薬・試液を交換し、器具については洗剤を用いた超音波洗浄に加えて、アセトン及びメタノールによる洗浄を行った上で使用した。しかし、ピーク強度の減少は認められたが、完全に除去することはできなかった。

表4-1 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		面積又は高さの別	ピーク面積(高さ) <sup>1)</sup>					面積(高さ)比 (a)/(b)	選択性の評価 <sup>3)</sup>	備考		
					評価濃度 (ppm)	評価基準		ブランク			マトリックス添加標準溶液 <sup>2)</sup>						
								n=1	n=2	平均 (a)	n=1	n=2				平均 (b)	
1	フルジオキシニル	牛の筋肉	0.01	0.02	定量限界	0.01	< 0.333	面積	7955	7062	7509	216177	221013	218595	0.036	○	
		牛の脂肪	0.01	0.02	定量限界	0.01	< 0.333	面積	4034	3739	3887	209069	208054	208562	0.019	○	
		牛の肝臓	0.01	0.1	基準値	0.1	< 0.100	面積	1620	3727	2674	1852848	1828892	1840870	0.001	○	
		牛乳	0.01	0.04	基準値	0.04	< 0.100	面積	3132	3136	3134	730235	737797	734016	0.004	○	
		鶏卵	0.01	0.02	定量限界	0.01	< 0.333	面積	5253	6915	6084	243900	245141	244321	0.026	○	

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

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

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

## (2) 真度、精度及び定量限界

真度、精度及び定量限界の評価結果を表 4-2 に示した。定量限界濃度を添加した場合のフルジオキシニルの真度及び併行精度は、それぞれ 93.5~97.6%及び併行精度 0.6~7.9%、基準値濃度で真度 83.5~93.0%及び併行精度 1.0~4.3%が得られた。これらの真度及び精度は妥当性評価ガイドライン<sup>2)</sup>の目標値を満たしており、良好な結果であった。また、定量限界濃度の添加試料から得られたピークの S/N は、872~1089 であり、いずれも S/N ≥ 10 が得られた。

表 4-2 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	Min			平均値			
1	フルジオキシニル	牛の筋肉	0.01	0.02	0.01	S/N	223024114	2596	0.9998	91.3	88.8	96.9	102.2	91.1	94.1	5.8	958.0	901.5	929.8			
		牛の脂肪	0.01	0.02	0.02	—	205966857	4595	0.9995	86.2	92.7	89.3	87.0	89.6	89.0	2.9	—	—	—			
		牛の肝臓	0.01	0.02	0.01	S/N	215645486	4700	0.9991	95.8	98.2	90.5	92.0	91.2	93.5	3.6	888.3	855.9	872.1			
		牛の脂肪	0.01	0.02	0.02	—	212608914	-1620	0.9992	91.6	85.8	94.5	92.2	90.3	90.9	3.6	—	—	—			
		牛の肝臓	0.01	0.1	0.01	S/N	254737943	3167	0.9996	99.1	94.6	88.6	106.6	89.8	95.7	7.7	1157.7	864.2	911.0			
牛の脂肪	0.01	0.1	0.1	—	192680971	2856	0.9998	79.8	79.8	85.4	87.8	84.5	83.5	4.3	—	—	—					
牛乳	0.01	0.04	0.01	S/N	213538171	3884	0.9994	93.6	94.1	94.9	94.8	93.9	94.3	0.6	935.0	1004.8	969.9					
牛乳	0.01	0.04	0.04	—	190818343	9118	0.9995	93.5	92.8	94.1	91.8	92.7	93.0	1.0	—	—	—					
鶏卵	0.01	0.02	0.01	S/N	252824914	2268	0.9986	111.1	94.9	96.2	92.3	93.3	97.6	7.9	1127.9	1050.1	1089.0					
鶏卵	0.01	0.02	0.02	—	222274800	-12859	0.9974	90.1	86.8	89.9	86.8	89.8	88.7	2.0	—	—	—					

\*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評価した結果を表 4-3 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。その結果、ピーク面積比は、定量限界濃度では 0.93~0.96、基準値濃度では 0.95~0.99 であり、試料由来のマトリックスによる測定値への顕著な影響は認められなかった。添加回収試験により得られた真度を上記に示すピーク面積比で除して補正した真度を表 4-4 に示した。補正後の真度は、定量限界濃度では 99~101%、基準値濃度では 87~95%と良好な結果が得られた。

表 4-3 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	フルジオキシニル	牛の筋肉	0.01	0.02	0.01	0.001	面積	7509	216177	221013	211087	230523	222845	226684	0.93	
		牛の筋肉	0.01	0.02	0.02	0.002	面積	2284	405666	404782	402941	408975	405497	407236	0.99	
		牛の脂肪	0.01	0.02	0.01	0.001	面積	3887	209069	208054	204675	218304	213551	215928	0.95	
		牛の脂肪	0.01	0.02	0.02	0.002	面積	3325	413744	406459	406777	420554	412508	416531	0.98	
		牛の肝臓	0.01	0.1	0.01	0.001	面積	10937	254995	252513	242817	249571	255664	252618	0.96	
		牛の肝臓	0.01	0.1	0.1	0.01	面積	2674	1852848	1828892	1838197	1929103	1919903	1924503	0.96	
		牛乳	0.01	0.04	0.01	0.001	面積	7590	205772	204556	197575	206194	210112	208153	0.95	
		牛乳	0.01	0.04	0.04	0.004	面積	3134	730235	737797	730882	746863	747128	746996	0.98	
		鶏卵	0.01	0.02	0.01	0.001	面積	6084	243500	245141	238237	245782	249216	247499	0.96	
		鶏卵	0.01	0.02	0.02	0.002	面積	10966	426652	419626	412174	430468	441170	435819	0.95	

\*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 4-4 補正真度

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 [検出限界] (mg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	真度(%)	ピーク面積比	補正真度(%) <sup>*1)</sup>	備考
1	フルジオキシニル	牛の筋肉	0.01	0.02	0.01	94	0.93	101	
		牛の筋肉	0.01	0.02	0.02	89	0.99	90	
		牛の脂肪	0.01	0.02	0.01	94	0.95	99	
		牛の脂肪	0.01	0.02	0.02	91	0.98	93	
		牛の肝臓	0.01	0.1	0.01	96	0.96	100	
		牛の肝臓	0.01	0.1	0.1	83	0.96	87	
		牛乳	0.01	0.04	0.01	94	0.95	99	
		牛乳	0.01	0.04	0.04	93	0.98	95	
		鶏卵	0.01	0.02	0.01	98	0.96	101	
		鶏卵	0.01	0.02	0.02	89	0.95	94	

\*1 真度をピーク面積比で除した値

## 5. その他の試験法検討に関連する事項

### ①抽出操作における代謝物 K の回収について

代謝物 K について、加熱還流抽出からアセトニトリル及びトルエン混液転溶までの操作における各種試料からの回収率を確認した。なお、試料は牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳及び鶏卵を用い、代謝物 K の添加濃度は基準値濃度(フルジオキシニルとして)とした。牛の筋肉及び鶏卵では試料 10 g に代謝物 K を 0.2 µg (0.4 mg/L アセトン標準溶液を 0.5 mL)、牛乳では試料 10 g に代謝物 K を 0.4 µg (0.8 mg/L アセトン標準溶液を 0.5 mL)、牛の肝臓では試料 10 g に代謝物 K を 1 µg (2 mg/L アセトン標準溶液を 0.5 mL) 添加して 30 分間放置した。牛の脂肪では、試料 10 g を約 40°C の湯浴で融解したものに代謝物 K を 0.2 µg (0.4 mg/L アセトン標準溶液を 0.5 mL) 添加して混合し、冷凍庫で 10 分間放置して凝固させた後、室温で 30 分間放置した。各試料について「実験方法 7. 試験溶液の調製 (1) 抽出」に従って操作し、250 mL に定容した。本溶液 200 µL を分取し、窒素乾固した後、0.2 vol% 酢酸及び 0.2 vol% 酢酸・アセトニトリル溶液 (1:1) 混液 200 µL に溶解して LC-MS/MS で測定し、マトリックス添加標準溶液を用いて回収率を求めた。その結果、表 5 に示したとおり、代謝物 K については、加熱還流抽出からアセトニトリル及びトルエン混液転溶の操作により 87~109% 回収されることが確認された。

表 5 代謝物 K の回収率

代謝物 K	回収率 (%)				
	牛の筋肉	牛の脂肪	牛の肝臓	牛乳	鶏卵
代謝物 K	92	100	109	87	109

代謝物 K 添加量 (フルジオキシソニルとして)

牛の筋肉、牛の脂肪、鶏卵：0.2 µg、牛の肝臓：1 µg、牛乳：0.4 µg

## ②WAX ミニカラムのみを用いた精製について

精製について、HLB ミニカラムを使用せずに WAX ミニカラムのみを用いた以下の方法を検討した。すなわち、「実験方法 7. 試験溶液の調製の (1) 抽出及び (2) 酸化」に従って操作し、水で 50 mL に定容したろ液から 10 mL を分取し、WAX ミニカラムに注入した後、酢酸及びメタノール (1 : 199) 混液 10 mL を注入し、流出液を捨てる。引き続き、ギ酸及びメタノール (1 : 99) 混液 12 mL を注入し、溶出液を採り、約 1 mL まで濃縮し、0.2 vol% 酢酸及び 0.2 vol% 酢酸・アセトニトリル (1 : 1) 混液で正確に 2 mL としたものを試験溶液とする方法である。本法に従って、牛の脂肪を用いて代謝物 K の回収試験 (添加濃度 : 0.01 mg/kg) を行ったところ、溶媒標準溶液を用いた回収率は 85%、マトリックス添加標準溶液に対する溶媒標準溶液のピーク面積比は 0.87 と 10% を超えるイオン化抑制が認められ、WAX ミニカラムのみでは精製が不十分であったことから、本法は不採用とした。

## まとめ

試料からのフルジオキシソニルの抽出、アセトニトリル及びトルエン混液転溶及び酸化については、申請企業の残留分析法について適用性を検証し、良好な結果が得られたことから、本法に準じることとした。精製については、HLB ミニカラム及び WAX ミニカラムを併用した方法を検討したところ、試料由来マトリックスによる測定値への顕著な影響は認められず、回収率は良好であった。

フルジオキシソニルを牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳及び鶏卵に基準値濃度及び定量限界濃度 (0.01 mg/kg) で添加し、開発した方法を用いて回収試験を行ったところ、いずれの試料においても選択性は問題なく、真度は 83.5~97.6%、併行精度は 0.6~7.9% の良好な結果が得られた。また、各試料におけるマトリックス添加標準溶液に対する溶媒標準溶液のピーク面積比は 0.93~0.99 であり、LC-MS/MS 測定において顕著なマトリックスの影響は認められなかった。定量限界については 0.01 mg/kg を設定することが可能であった。

## 【結論】

畜産物を対象としたフルジオキシソニル試験法として、「フルジオキシソニル及びその代謝物を試料からアセトニトリル及びアンモニア水混液で加熱還流抽出し、酸性下でアセトニトリル及びトルエン混液に転溶する。過マンガン酸カリウム・水酸化ナトリウム溶液として加熱し、フルジオキシソニル及びその代謝物を代謝物 K に酸化する。代謝物 K をジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム及び 3 級アミン修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン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」を開発した。開発した試験法を用いて牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳及び鶏卵の5試料で添加回収試験を行ったところ、良好な結果が得られたため、本法は畜産物の残留試験法として適用可能であると考えられた。

**[参考文献]**

- 1) 薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会報告“薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会 農薬・動物用医薬品部会報告について” 令和4年11月7日  
<https://www.mhlw.go.jp/content/11120000/001009879.pdf>
- 2) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知“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の一部改正について” 平成22年12月24日，食安発1224第1号（2010）

①添加回収試験における代表的なクロマトグラム

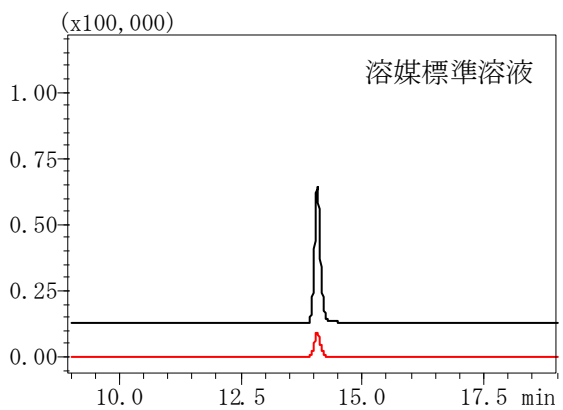
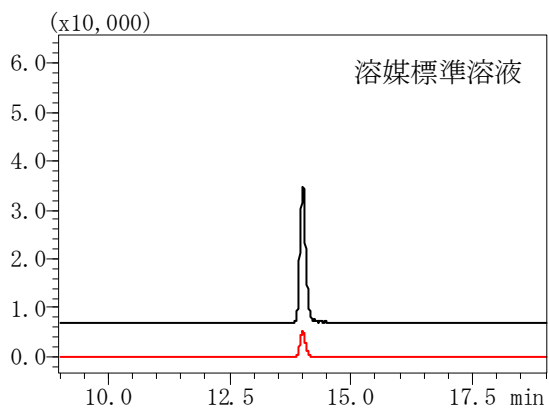
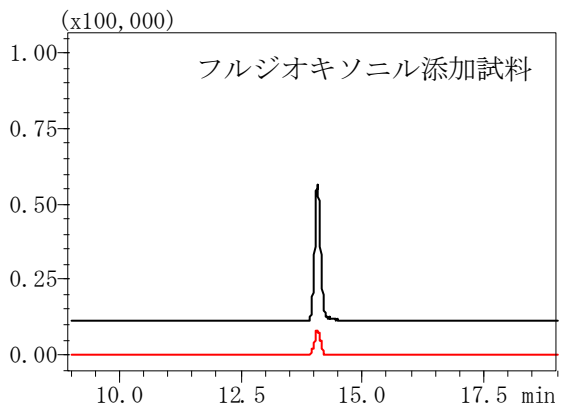
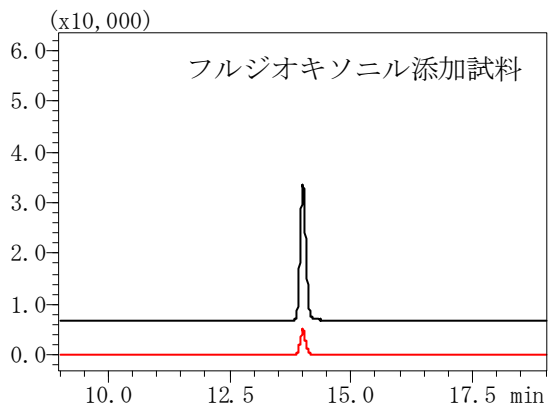
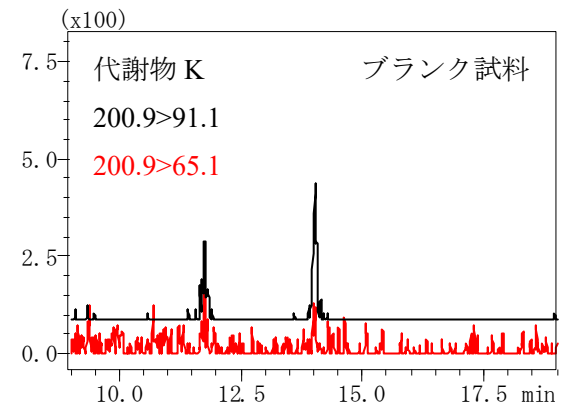
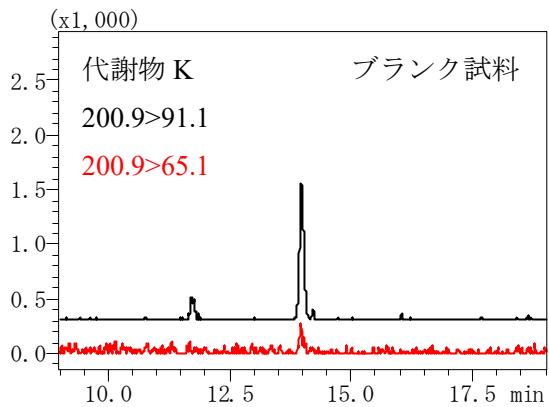


図 6-1 牛の筋肉の SRM クロマトグラム  
添加濃度 : 0.01 mg/kg

図 6-2 牛の筋肉の SRM クロマトグラム  
添加濃度 : 0.02 mg/kg

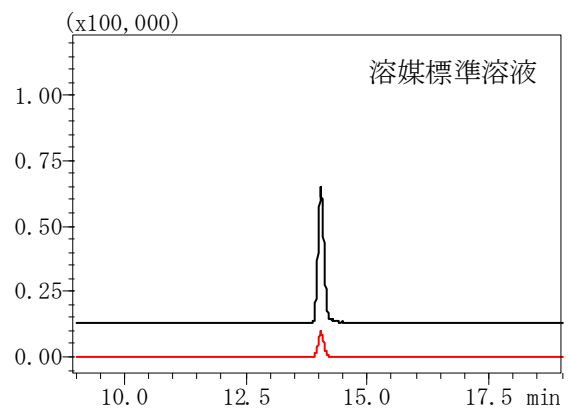
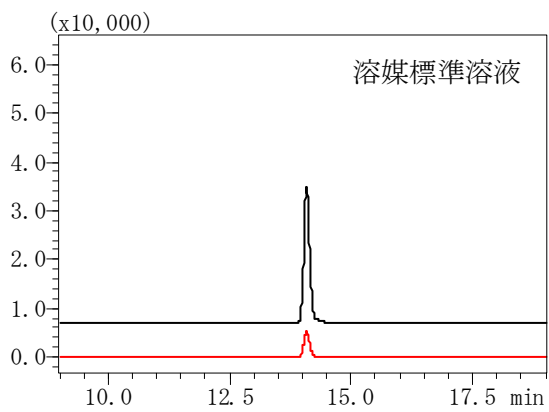
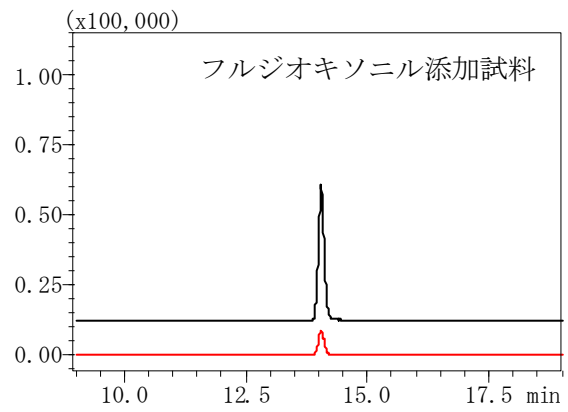
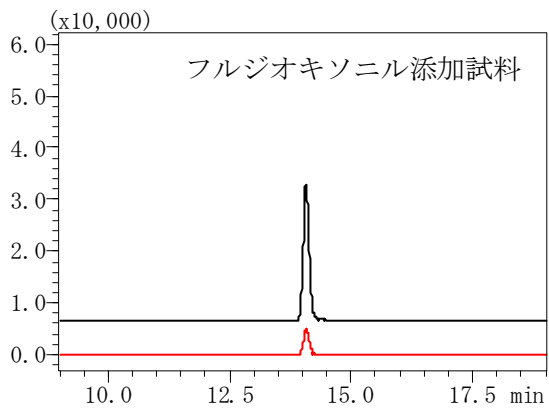
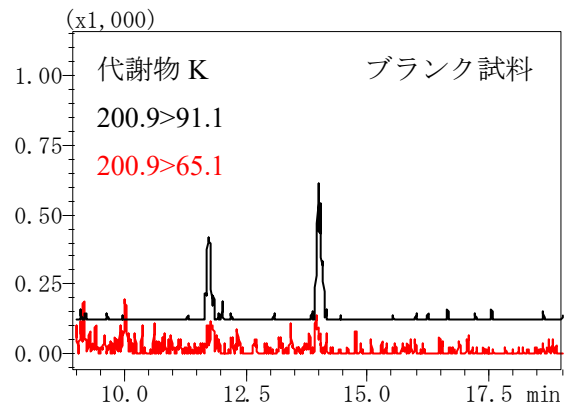
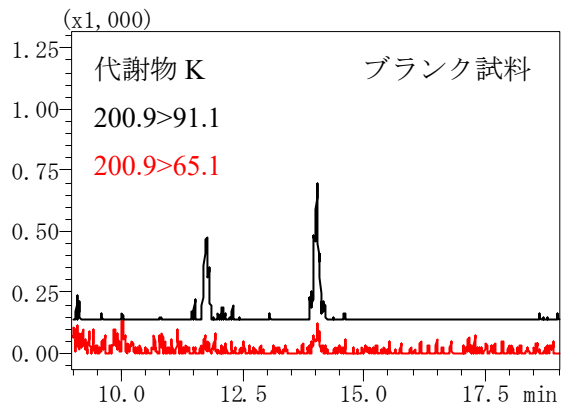


図 6-3 牛の脂肪の SRM クロマトグラム  
添加濃度 : 0.01 mg/kg

図 6-4 牛の脂肪の SRM クロマトグラム  
添加濃度 : 0.02 mg/kg

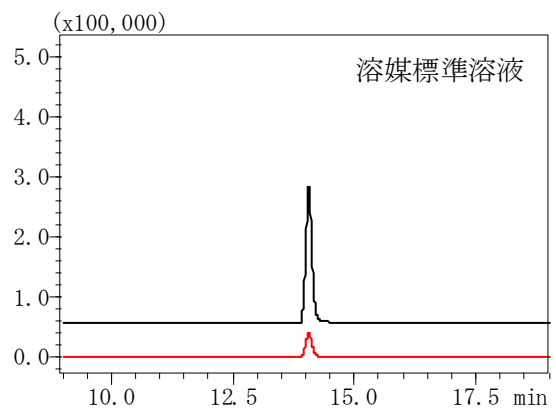
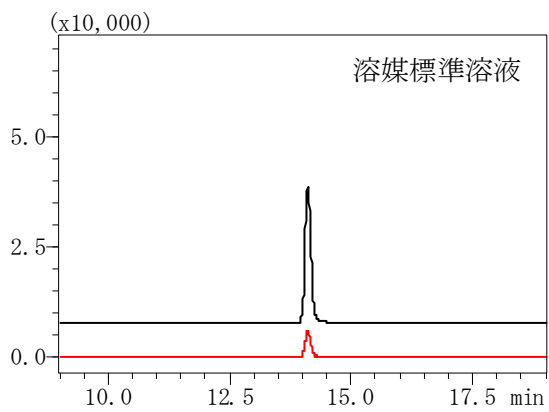
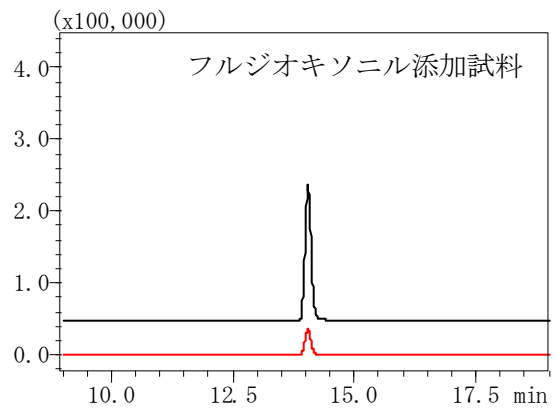
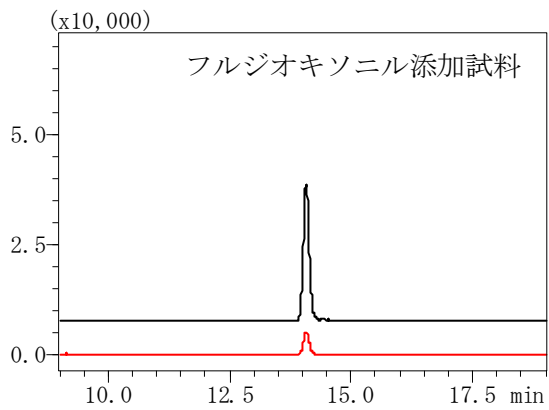
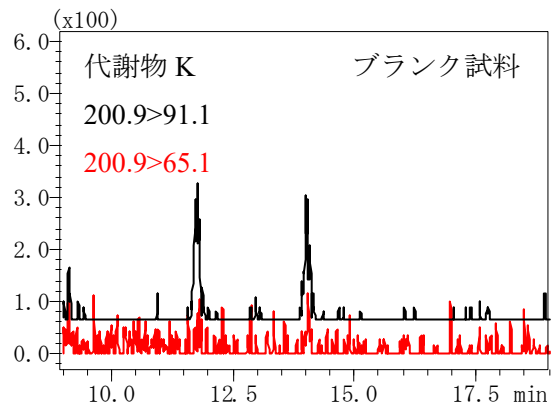
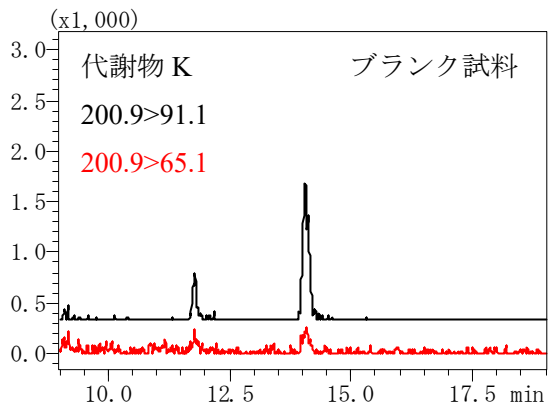


図 6-5 牛の肝臓の SRM クロマトグラム  
添加濃度 : 0.01 mg/kg

図 6-6 牛の肝臓の SRM クロマトグラム  
添加濃度 : 0.1 mg/kg

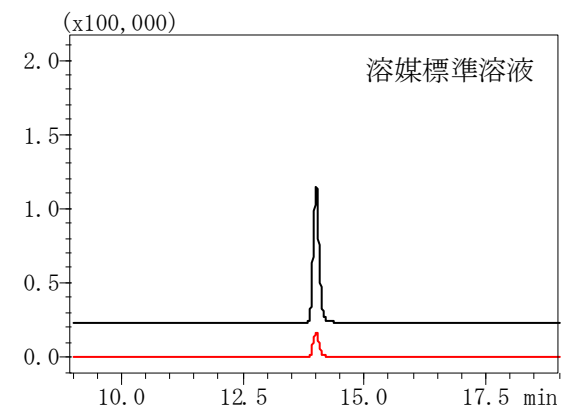
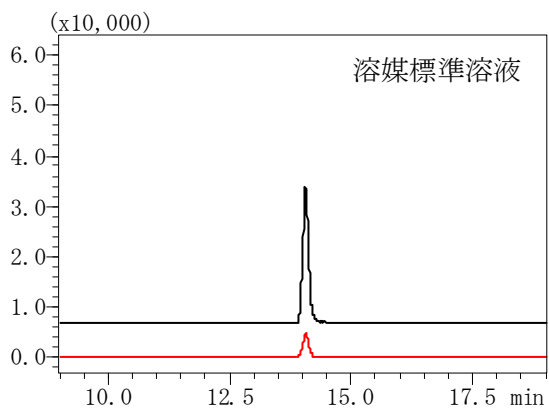
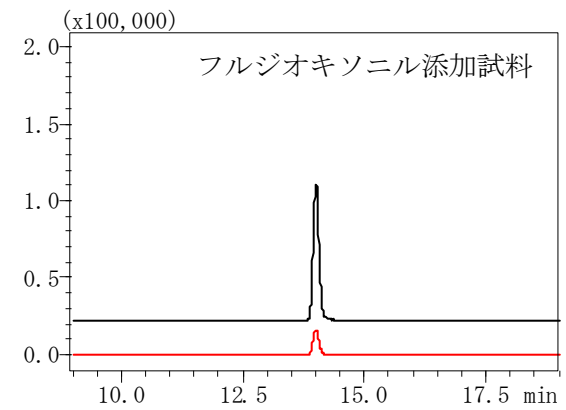
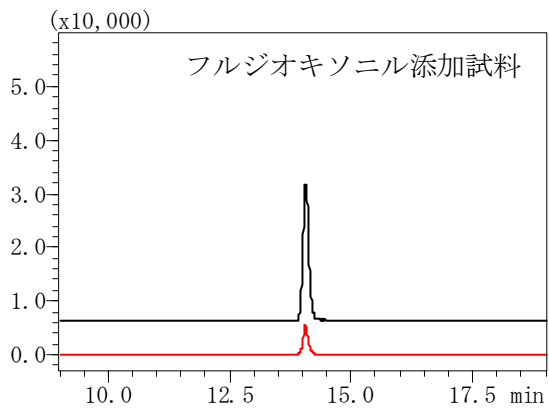
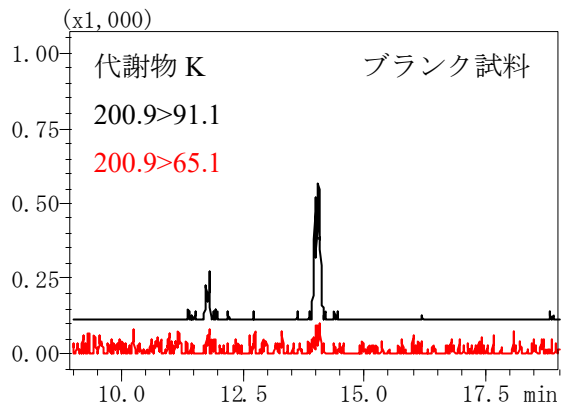
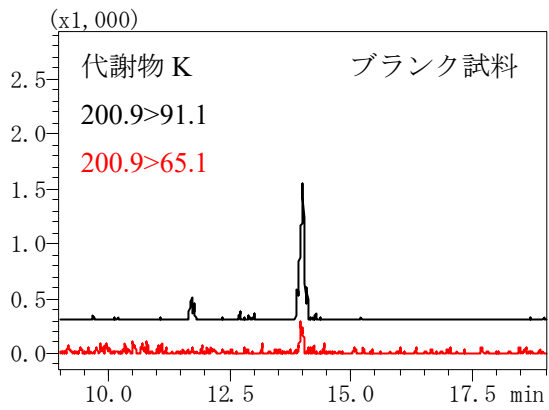


図 6-7 牛乳の SRM クロマトグラム  
 添加濃度 : 0.01 mg/kg

図 6-8 牛乳の SRM クロマトグラム  
 添加濃度 : 0.04 mg/kg

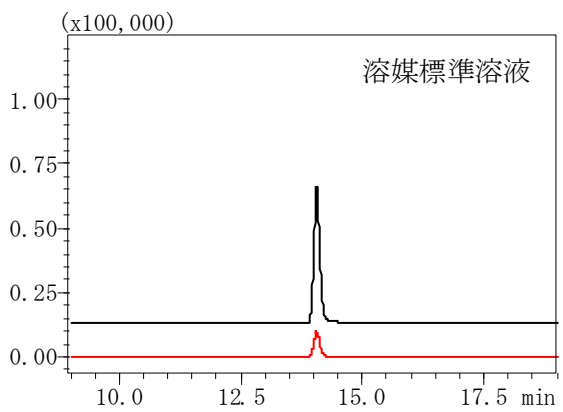
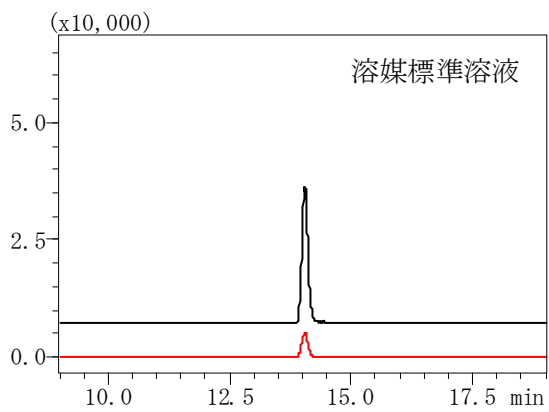
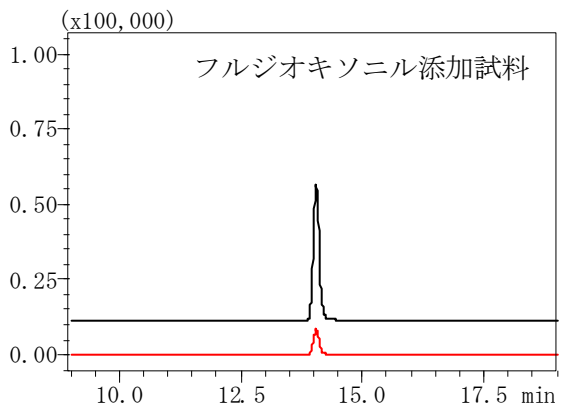
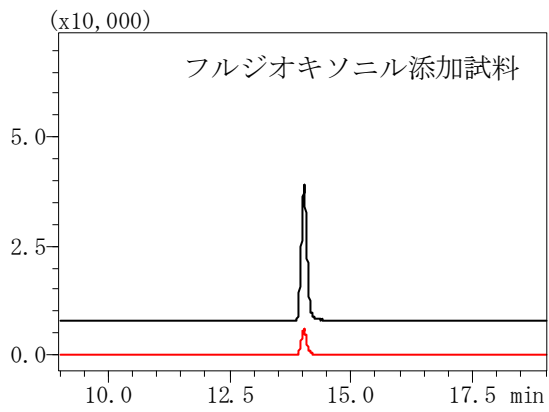
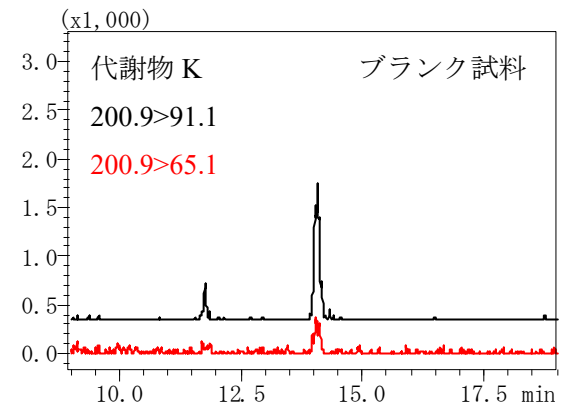
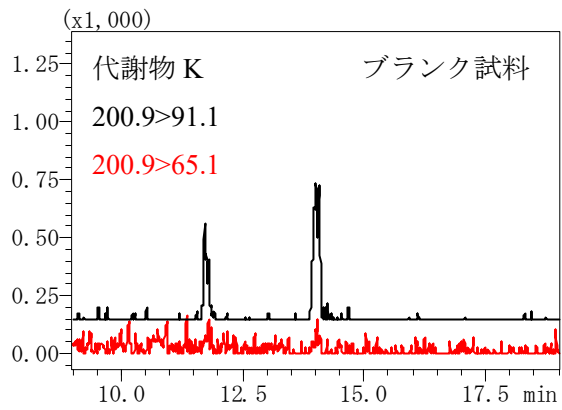


図 6-9 鶏卵の SRM クロマトグラム  
 添加濃度 : 0.01 mg/kg

図 6-10 鶏卵の SRM クロマトグラム  
 添加濃度 : 0.02 mg/kg

②各ブランク試料の代表的なトータルイオンクロマトグラム

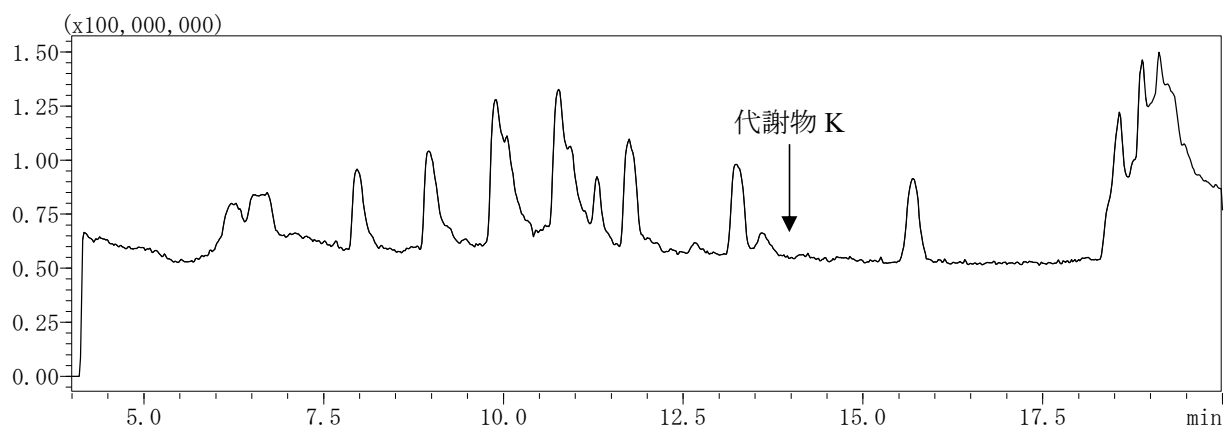


図 7-1 牛の筋肉のトータルイオンクロマトグラム (50~550 amu)

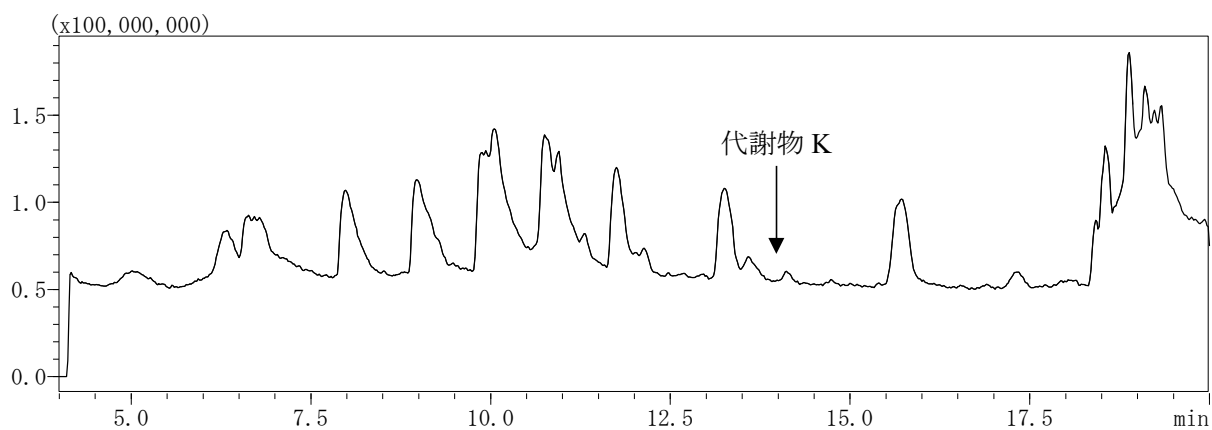


図 7-2 牛の脂肪のトータルイオンクロマトグラム (50~550 amu)

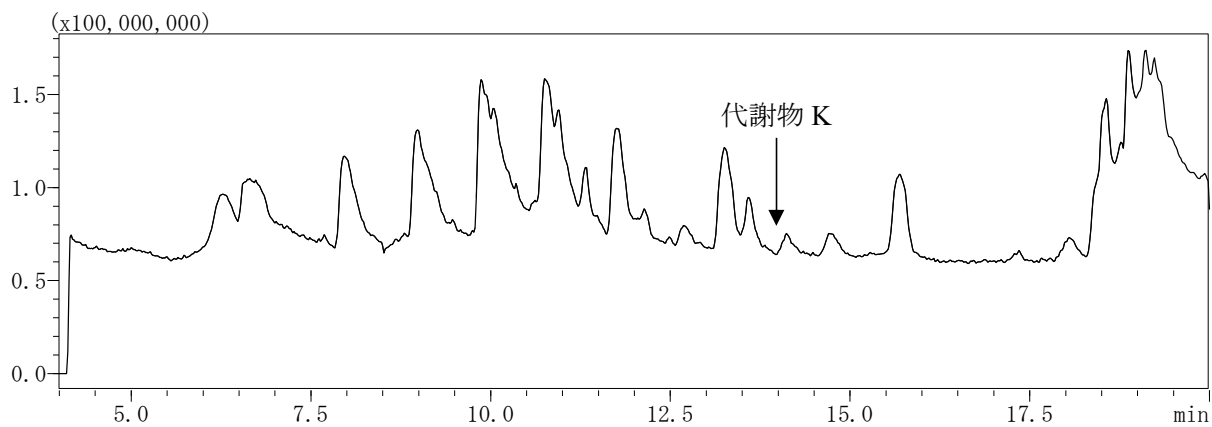


図 7-3 牛の肝臓のトータルイオンクロマトグラム (50~550 amu)

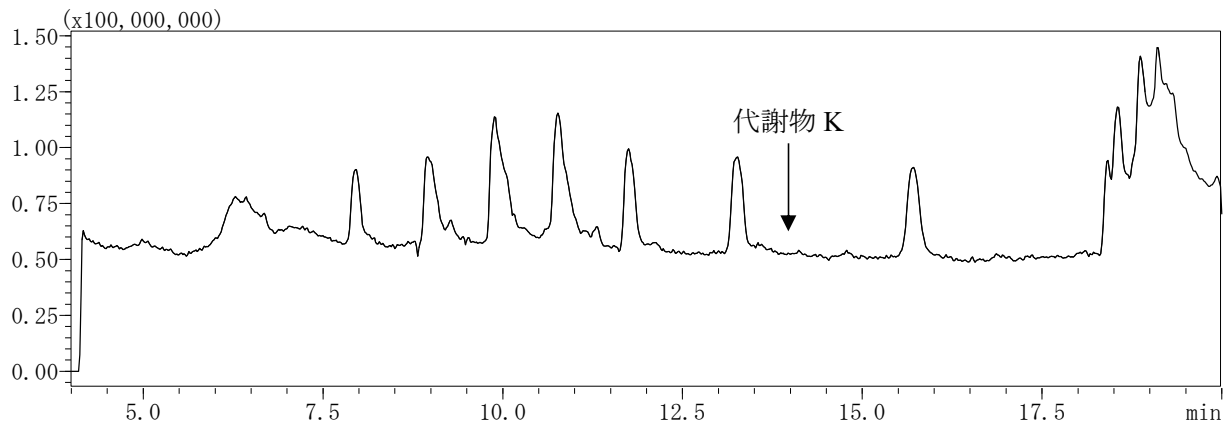


図 7-4 牛乳のトータルイオンクロマトグラム (50~550 amu)

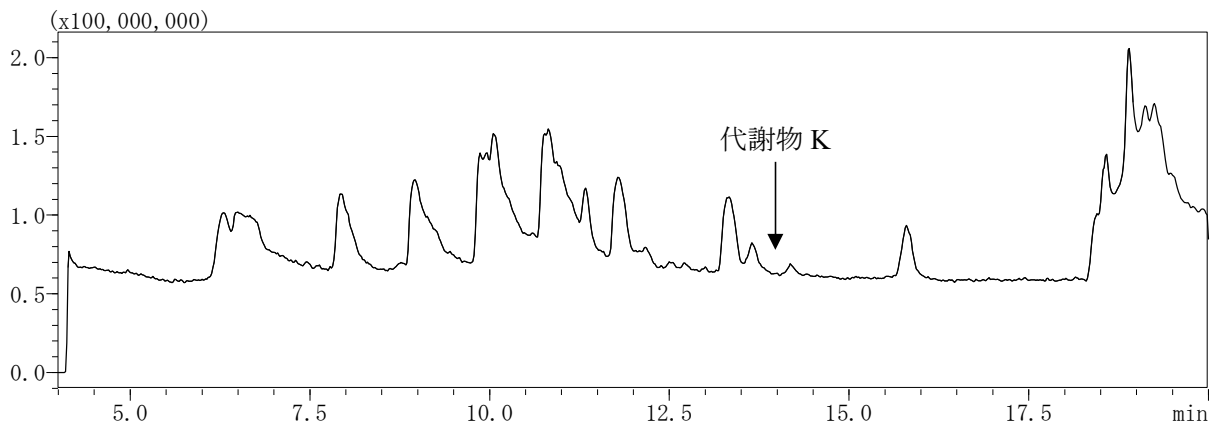


図 7-5 鶏卵のトータルイオンクロマトグラム (50~550 amu)