

※ 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20年度 残留農薬等試験法の検討及び 作成に関する報告書

クマホス試験法（畜水産物）

[緒言]

クマホス(図-1)はBayer社が開発した有機リン系の動物用駆虫薬である。log Powが4.13と比較的極性が低いことから、アセトン-ヘキサンを用いて畜水産物から脂肪とともに抽出し、脱脂・精製したのち、GC-FPDで定量し、GC-MSで確認する分析法を検討した。なお、クマホスには「不検出」基準が設定されており、告示試験法となることから、汎用性の高い方法を採用した。

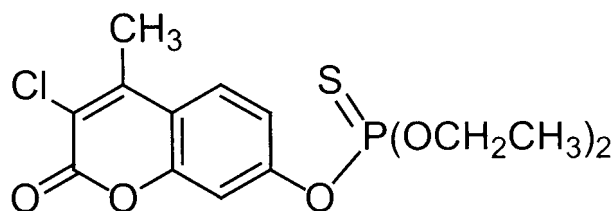


図-1 クマホスの構造式

クマホスの性状等

分子量：362.8

分子式：C₁₄H₁₆ClO₅PS

外観：無色結晶

融点：95℃

蒸気圧：0.013 mPa (20℃)

log Pow：4.13

溶解性：水 1.5 mg/L (20℃)、有機溶媒 微溶

安定性：希アルカリ性でピロン環(複素環式ケトン)が開き、酸性化で再び閉じる

(出典 The Pesticide Manual 14th ed., British Crop Production Council)

[実験方法]

1. 試料

1) 市販の牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛の腎臓、鶏の筋肉、さけ、えび、あさり、牛乳、鶏卵及びはちみつ(百花蜜)を用いた。

2) 試料の採取方法

- ① 牛の筋肉及び鶏の筋肉は、可能な限り脂肪層を除き細切均一化した。
- ② 牛の脂肪は、可能な限り筋肉部を除き細切均一化した。
- ③ 牛の肝臓及び腎臓は、全体を細切均一化した。
- ④ さけは、可食部(皮を含む)を細切均一化した。
- ⑤ えびは、外側の殻を除去し細切均一化した。

- ⑥ あさりは、殻を除去し細切均一化した。
- ⑦ 牛乳は、全体をよく混合し均一化した。
- ⑧ 鶏卵は、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 はちみつは、よく混合し均一化した。

2. 試薬、試液

試薬は、原則として和光純薬工業(株)の残留農薬試験用を用いた。

クマホス標準品(純度 >98%)は、林純薬工業(株)の残留農薬試験用を用い、トルエンに溶解して1 mg/ mL標準原液とし、アセトン-ヘキサン(1:9)で適宜希釈して検量線作成用の標準溶液とした。また、標準原液をアセトンで希釈し、添加回収試験用の標準溶液とした。

多孔性ケイソウ土カラム(20 mL保持用)は、ジーエルサイエンス(株)のInertSep K-solute (20mL)を用いた。

トリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲル/エチレンジアミン-N-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム(500 mg/500 mg)は、ジーエルサイエンス(株)のInertSep SAX/PSA(500 mg/500 mg/6 mL)を用いた。

3. 装置および測定条件

1)GC-FPD

(株)島津製作所製GC-2010を用い、以下の測定条件に設定した。

カラム: J&W社製DB-200(内径0.32 mm、長さ30 m、膜厚0.5 μm)

カラム温度: 60°C(1 min)→25°C/min→210°C→10°C/min→280°C(10 min)

注入口温度: 250°C

検出器温度: 280°C

キャリアーガス: ヘリウム

キャリアーガス線速度: 40 cm/sec(定流量)

水素ガス流量: 80 mL/min

エアール量: 120 mL/min

光学フィルター: リン用干渉フィルター(波長526 nm)

注入方式: スプリットレス(1 min、200 kPa)

注入量: 2 μL

2)GC-MS

(株)島津製作所製GCMS-QP2010を用い、以下の測定条件に設定した。

カラム: J&W社製DB-5ms(内径0.25 mm、長さ30 m、膜厚0.25 μm)

カラム温度: 60°C(1 min)→25°C/min→210°C→10°C/min→300°C(8 min)

注入口温度: 250°C

インターフェイス温度: 300°C

イオン源温度： 200℃
イオン化モード： EI
イオン化電圧： 70 eV
キャリアーガス： ヘリウム
キャリアーガス線速度： 40 cm/sec (定流量)
注入方式： スプリットレス (1 min、 250 kPa)
注入量： 2 μ L
測定モード： SIM
SIM測定イオン(m/z)： 362.0, 364.0, 226.0

4. 試験溶液調製法

1) 抽出

① 筋肉、脂肪、肝臓、腎臓及び魚介類の場合

筋肉、肝臓、腎臓及び魚介類は、試料を必要によりミンサーですじ切りし、フードカッターで細切均一化した20 gを250 mL容遠沈管に量り採った。脂肪は、試料をフードカッターで細切均一化した5 gを250 mL容遠沈管に量り採った。これに0.1mol/L塩酸20 mLを加えて30秒間ホモジナイズしたのち、アセトン-ヘキサン(1:2)100 mLを加えて2分間ホモジナイズ抽出した。毎分3,000回転で5分間遠心分離したのち、有機層を300 mL容三角フラスコ中に採った。残留物は、ヘキサン50 mLを加えて2分間ホモジナイズ抽出したのち、同様に遠心分離し、有機層を上記の三角フラスコ中に合わせた。これに適量の無水硫酸ナトリウムを加え、時々振り混ぜながら15分間放置したのち、300 mL容ナスフラスコ中にろ過した。無水硫酸ナトリウムをヘキサン20 mLで2回洗浄し、ろ液を合わせた。ろ液を40℃以下で約1 mLまで減圧濃縮し、わずかな窒素気流により溶媒を留去した。この残留物をヘキサンに溶かし、正確に20 mLとしたものを試験原液とした。

② 乳、卵及びはちみつの場合

必要によりフードカッターでかくはん均一化した10.0 gを250 mL容遠沈管に量り採った。これに0.1mol/L塩酸10 mLを加えて30秒間ホモジナイズしたのち、アセトン-ヘキサン(1:2)100 mLを加えて2分間ホモジナイズ抽出した。毎分3,000回転で5分間遠心分離したのち、有機層を300 mL容三角フラスコ中に採った。残留物は、ヘキサン50 mLを加えて2分間ホモジナイズ抽出したのち、同様に遠心分離し、有機層を上記の三角フラスコ中に合わせた。これに適量の無水硫酸ナトリウムを加え、時々振り混ぜながら15分間放置したのち、300 mL容ナスフラスコ中にろ過した。無水硫酸ナトリウムをヘキサン20 mLで2回洗浄し、ろ液を合わせた。ろ液を40℃以下で約1 mLまで減圧濃縮し、わずかな窒素気流により溶媒を留去した。乳及び卵の場合は、この残留物をヘキサンに溶かし、正確に10 mLとしたものを試験原液とした。はちみつの場合は、残留物をアセトン-ヘキサン(1:9)に溶かし、正確に5 mLとしたものを試験原液とした。

2) 精製

①筋肉、脂肪、肝臓、腎臓、魚介類、乳及び卵の場合

試験原液10 mLを多孔性ケイソウ土カラム(20 mL保持用)に負荷し、10分間放置したのち、10分間吸引して大部分の溶媒を留去した。このケイソウ土カラムにヘキサン飽和アセトニトリル90 mLを注入し、溶出液を200 mL容ナスフラスコ中に採り、40℃以下で約1 mLまで減圧濃縮し、わずかな窒素気流により溶媒を留去した。この残留物をアセトン-ヘキサン(1:9)に溶かし、正確に5 mLとした。

この溶液2 mLをあらかじめアセトン-ヘキサン(1:9)10 mLで洗浄しておいたSAX/PSAミニカラム(500 mg/500 mg)に負荷して溶出液を採り、さらにアセトン-ヘキサン(1:9)10 mLで溶出した。溶出液を合わせて40℃以下で約1 mLまで減圧濃縮し、わずかな窒素気流により溶媒を留去した。この残留物をアセトン-ヘキサン(1:9)に溶かし、正確に4 mL(脂肪の場合は1 mL)としたものを試験溶液(1 g試料/mL)とした。

②はちみつの場合

試験原液2 mLをあらかじめアセトン-ヘキサン(1:9)10 mLで洗浄しておいたSAX/PSAミニカラム(500 mg/500 mg)に負荷して溶出液を採り、さらにアセトン-ヘキサン(1:9)10 mLで溶出した。溶出液を合わせて40℃以下で約1 mLまで減圧濃縮し、わずかな窒素気流により溶媒を留去した。この残留物をアセトン-ヘキサン(1:9)に溶かし、正確に4 mLとしたものを試験溶液(1 g試料/mL)とした。

試料採取

筋肉, 肝臓, 腎臓, 魚介類 20 g
脂肪 5 g
乳, 卵, はちみつ 10 g

アセトン-ヘキサン(1:2)抽出

筋肉, 肝臓, 腎臓, 魚介類, 脂肪は 0.1mol/L 塩酸 20 mL 加え, 30 秒間ホモジナイズ
乳, 卵, はちみつは 0.1mol/L 塩酸 10 mL 加え, 30 秒間ホモジナイズ
アセトン-ヘキサン(1:2)100 mL で 2 分間ホモジナイズ抽出
毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離し, 有機層を採る
残留物をヘキサン 50 mL で 2 分間ホモジナイズ抽出
毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離し, 有機層を採る
有機層を合わせ, 無水硫酸ナトリウム適量を加えて脱水
無水硫酸ナトリウムをろ別
40℃以下で減圧濃縮

多孔性ケイソウ土カラム(20 mL 保持用)脱脂

【はちみつは、本操作を省略】

残留物をヘキサンに溶解

(筋肉, 肝臓, 腎臓, 魚介類, 脂肪は 20 mL, 乳, 卵は 10 mL に定容)

10 mL を負荷

10 分間放置

吸引して大部分のヘキサンを除去

ヘキサン飽和アセトニトリル 90 mL で溶出

溶出液を 40°C以下で減圧濃縮(約 1 mL まで)

緩やかに窒素を吹き付けて乾固

SAX/PSA (500/500 mg)ミニカラム精製

カラムを予めアセトン-ヘキサン(1:9) 10 mL で洗淨

残留物をアセトン-ヘキサン(1:9)に溶解して 5 mL に定容し, 2 mL 負荷

アセトン-ヘキサン(1:9) 10 mL で溶出

負荷液および溶出液を合わせ, 40°C以下で減圧濃縮(約 1 mL まで)

緩やかに窒素を吹き付けて乾固

アセトン-ヘキサン(1:9)に溶解

(筋肉, 肝臓, 腎臓, 魚介類, 乳, 卵, はちみつは 4 mL, 脂肪は 1 mL に定容)

GC-FPD (P モード)

GC-MS

5. 定量

クマホス標準品の0.01、0.02、0.05、0.10、0.20及び0.50 mg/Lアセトン-ヘキサン(1:9)溶液を用時調製し、それぞれ2 µLをGC-FPDに注入して、ピーク面積法で検量線を作成した。

試験溶液(1 g試料/mL)2 µLをGC-FPDに注入し、絶対検量線法を用いてクマホスの含量を求めた。

6. 確認

クマホス標準品の0.01、0.02、0.05、0.10、0.20及び0.50 mg/Lアセトン-ヘキサン(1:9)溶液を用時調製し、それぞれ2 µLをGC-MSに注入して、SIMクロマトグラム(m/z 362.0)によりピーク面積法で検量線を作成した。

試験溶液(1 g試料/mL)2 µLをGC-MSに注入し、SIMクロマトグラム(m/z: 362.0, 364.0, 226.0)によりピークの有無及びイオン強度比により確認した。さらに、SIMクロマトグラム(m/z 362.0)により絶対検量線法を用いてクマホスの含量を求めた。

[結果及び考察]

1. GC-MSによる農薬等の一斉試験法(畜水産物)の適用性について

平成17年度に、当所において実施したGC-MSによる農薬等の一斉試験法(畜水産物)(以下、一斉試験法)の検討では、クマホスについてはほぼ満足すべき結果を得ている。しかし、今回の検討により、鮮度が低いなど畜水産物によっては抽出時の液性がアルカリ性となることでピロン環が開き、水溶性が高まることからクマホスの一部が残留物に残ることが判明した。

また、クマホス試験法(畜水産物)は告示法となることから、GPCを用いるなど汎用性や選択性などの点でやや問題のある一斉試験法に準じた分析法を採用することは不相当と考えられた。

2. 新たな分析法の組み立てについて

前述したように、畜水産物によってはマトリックスの影響によってクマホスの抽出率が低下することから、塩酸酸性下でのアセトン-ヘキサン抽出法を採用することにした。

また、農産物の試験法では、原則としてアセトニトリル/ヘキサン分配による脱脂法が採用されている。しかし、畜水産物によっては多量に抽出される脂質成分を十分に除去できない上に、肉質によっては強固なエマルジョンが生成し、遠心分離を行っても十分に分離できないものも見受けられた。このため多孔性ケイソウ土カラムを用いて脱脂・精製する方法を検討することにした。

定量には、GC-MSに比べてマトリックスの影響を受けにくく、有機リン化合物に高い選択性を有しているGC-FPD(Pモード)を用いて検討を進めた。なお、GC-NPD(及びGC-FTD)は感度及び選択性の点で劣っており、「不検出」基準が設定されているクマホスの試験法に用いることは不相当と判断した。

検討の結果、実験方法に示したようにクマホスを試料から0.1 mol/L塩酸及びアセトン-ヘキサン(1:2)で抽出→多孔性ケイソウ土カラムにより脱脂→SAX/PSAミニカラムにより精製→GC-FPD(Pモード)により定量→GC/MSにより確認する方法を採用した。

3. 試験溶液調製法の検討

1) 抽出溶媒

一斉試験法に従って牛の筋肉からアセトン/ヘキサン法により抽出したところ、十分な回収率が得られた(表-1)。遠心により分離した水層を捨て、有機層のみを分取するアセトン/ヘキサン法は、脂肪組織への蓄積性を考慮してlog Powがおおよそ2~3以上の成分を抽出対象としており、クマホス(log Pow = 4.13)の抽出には適当な方法と考えられた。

表-1 アセトン/ヘキサン法の抽出率(%)

項目	1回目:水20 mL, アセトン-ヘキサン(1:2)100 mL 2回目:ヘキサン50 mL
牛の筋肉(生鮮品)	98

牛の肝臓(冷凍保存品)	58
牛の腎臓(冷凍保存品)	25
あさり(冷凍保存品)	67

牛の筋肉20 gに標準品0.1 ppm添加

しかし、冷凍保存していた牛の肝臓及び腎臓、あさりなどを用いて検討したところ、抽出率が25～67%と低いものがあった(表-1)。その原因として、①試料の鮮度が低く、生成したトリメチルアミンなど塩基性窒素成分の影響によって、液性がアルカリ性となることでPyrone環が開き、クマホスの水溶性が高まる。②アルカリ条件下で分解する。③試料に含まれるマトリックスの影響によって分解が促進されることが考えられた。

そこで、(A)抽出時に加える水20 mLのpHを1～12にしてアセトン/ヘキサン法により抽出したところ、アルカリ性では抽出率が低く、中性～酸性条件下で抽出する必要があることが判明した(表-2)。

表-2 pHの違いによるアセトン/ヘキサン法の抽出率A(%)

項目	1回目:水20 mL, アセトン-ヘキサン(1:2)100 mL 2回目:ヘキサン50 mL
pH 1	99
pH 4	99
pH 7	96
pH 9	88
pH 12	48

牛の肝臓20 gにクマホス標準品0.1 ppm添加

さらに、(B)残留物に塩酸を加えてpH 1としたのち、アセトン/ヘキサン法により同様に抽出したところ、添加したクマホスの多くが回収された(表-3)。これは、酸性条件下でピロン環が再び閉じ、クマホスの脂溶性が高まったことにより回収されたものと考えられた。また、抽出率Aと回収率Bの合計はpH 9で92%、pH 12で82%とやや低かったことから、アルカリ条件下での分解なども示唆された。

表-3 残留物(pH 1)からの回収率B(%) ()内はAとBの合計

項目	1回目:水20 mL, アセトン-ヘキサン(1:2)100 mL 2回目:ヘキサン50 mL
pH 1	0 (99)
pH 4	0 (99)
pH 7	1 (97)
pH 9	4 (92)
pH 12	33 (82)

なお、一斉試験法では、液体試料に対してアセトニトリル抽出法が採用されている。しかし、これら試料に対しても、抽出効率、選択性及び操作性を考慮するとアセトン/ヘキサン抽出法の方が優れていると考えられた。そこで、液体試料からアセトン/ヘキサン法により抽出したところ、試料20 gでは水分などが多くなることでエマルジョンを生じやすく、遠心しても十分に分離できないものがあった。特に、牛乳及び卵で有機層全体が固まるものがあった。このため、液体試料では試料量を10 gとしたところ、問題なくホモジナイズ抽出できた。

以上の結果から、畜水産物5~20 gに0.1 mol/L塩酸10~20 mLを加えてホモジナイズしたのち、アセトン-ヘキサン(1:2)100 mL、次いでヘキサン50 mLで抽出する方法を採用した。

2) 多孔性ケイソウ土カラムによる脱脂

上述したように多孔性ケイソウ土カラム(20 mL保持用)を用いて脱脂する方法を検討した。クマホス標準品及び牛の脂肪をヘキサンに溶かして10 mLとしたものをケイソウ土カラムに負荷して10分間放置し、さらに10分間吸引して大部分のヘキサンを除去したのち、このカラムにヘキサン飽和アセトニトリルを注入して溶出率を調査した。その結果を表-4に示したように、クマホスは70 mLまでの画分に溶出し、脂質成分の9割以上を除去できることが判明した。

表-4 多孔性ケイソウ土カラムからの溶出率(%)

画分	クマホス		牛の脂肪	
	各画分	積算	各画分	積算
0 - 10 mL	40.5	40.5	1.0	1.0
10 - 20 mL	31.5	72.0	1.2	2.2
20 - 30 mL	15.1	87.1	1.2	3.4
30 - 40 mL	5.8	92.9	1.0	4.4
40 - 50 mL	2.1	95.0	1.0	5.4
50 - 60 mL	1.0	96.0	0.8	6.2
60 - 70 mL	0.3	96.3	0.7	6.9
70 - 80 mL	0.0	—	0.7	7.6
80 - 90 mL	0.0	—	0.7	8.3
90 - 100 mL	0.0	—	0.7	9.0
100 - 110 mL	0.0	—	0.6	9.6
110 - 120 mL	0.0	—	0.6	10.2
120 - 130 mL	0.0	—	0.6	10.8
130 - 140 mL	0.0	—	0.6	11.4

クマホス標準品2 μg、及び牛の脂肪2 g負荷

さらに、Merck社製のEXTrelut NT20及びVarian社製のChem Elut (20mL)を加えて、再度、

ヘキサン飽和アセトニトリル90 mL (溶出量として約70 mL)を注入し、クマホスの溶出率を調査した。その結果、各社のカラムで溶出率の差はほとんどなかった(表-5)。

表-5 各社の多孔性ケイソウ土カラムからの溶出率(%)

項目	ヘキサン飽和アセトニトリル90 mL
InertSep K-solute (20mL)	96.2
EXtrelut NT20	97.2
Chem Elut (20mL)	97.3

クマホス標準品0.4 μ g負荷

3) SAX/PSAミニカラムによる精製

上述のケイソウ土カラムから溶出した脂質成分について、ODSミニカラム(1,000 mg)を用いて除去する方法を検討した。しかし、クマホスを溶出可能とする条件下では1~2割程度しか除去できず、多くは比較的極性の高い脂肪酸などと考えられた。

多孔性ケイソウ土カラムによる脱脂後の試料溶液をGC-FPD及びGC-MSで測定したところ、試料によっては保持時間のずれを生じるとともに、MSではクロマトグラム上のクマホスピーク近傍に妨害ピークが観察された。また、脂肪酸及びカロテン類などは、GC注入部でのマトリックス効果による感度上昇の原因となり、その後、GC注入部を汚して感度低下の原因となることが判明した。そこで、一斉試験法に準じて脂肪酸などを除去できるPSA(500 mg)ミニカラム、さらに強陰イオン交換タイプのSAXをPSA上部に積層したSAX/PSA(500 mg/500 mg)二層式ミニカラムを用いて検討を進めた。その結果、SAX/PSAは、PSA に比べてアスタキサンチンなどのカロテン類を強く保持するとともに脂肪酸類の除去効果が高かったことから、SAX/PSAミニカラムによる精製を追加することにした。なお、夾雑物の除去効果を考慮し、溶出溶媒として一斉試験法などに採用されているアセトン-ヘキサン(1:1)に代えて、アセトン-ヘキサン(1:9)を選択した。

SAX/PSAミニカラムにアセトン-ヘキサン(1:9)2 mLで負荷し、アセトン-ヘキサン(1:9)で溶出したところ、クマホスは10 mLまでの画分にほとんど溶出した(表-6)。

表-6 SAX/PSA(500 mg/500 mg)ミニカラムからの溶出率(%)

画分	アセトン-ヘキサン(1:9)	
	各画分	積算
0 - 2 mL	0.0	0.0
2 - 4 mL	11.7	11.7
4 - 6 mL	65.1	76.8
6 - 8 mL	14.7	91.5
8 - 10 mL	5.8	97.3

10 - 12 mL	0.2	97.5
12 - 14 mL	0.0	0.0
14 - 16 mL	0.0	0.0

クマホス標準品1 μ g負荷

4. 測定条件の検討

1) GC-FPD

クマホスは比較的高沸点物質であり、カラムから15～20分程度で溶出させるためにはカラム温度を280℃程度まで昇温させる必要があった。また、内径0.32 mmのカラムの方が、内径0.25 mmのカラムに比べてマトリックス効果による感度上昇が少なく、定量用に適していると考えられた。そこで、280℃程度までの使用に耐える一般的なカラムとして、J&W社製のDB-1、DB-5、DB-1701及びDB-200(内径0.32 mm、長さ30 m、膜厚0.5 μ m)を用いて比較検討した。その結果、いずれのカラムでもピーク形状は良好で、問題なく使用可能と考えられた。これらのカラムの中で、塩素などのハロゲンやカルボニル基を有する化合物に特異的とされるDB-200が、クマホスの保持が強く、妨害ピークとの分離が最も良かった(図-2)。

注入口の温度は、250～280℃でピーク強度に差は見られなかったので250℃に設定した。また、マトリックス効果による感度上昇を抑えるためには、200 kPa程度の高圧注入が有効であった。

その他の条件は、定法に従い実験方法に示した条件により最適化した。

2) GC-MS

カラムは、GC-MSによる残留農薬等の分析において汎用されているDB-5ms(内径0.25 mm、長さ30 m、膜厚0.25 μ m)を採用した。本カラムは、フェニル基を有する化合物に特異的とされ、DB-200と分離パターンが大きく異なっていたことから、確認用に適していると考えられた(図-3)。なお、SIM測定の方が、スキャン測定に比べてS/N比が20倍程度高かったことから、不検出基準(0.01 ppm)レベルでの定量結果等の確認には適していると考えられた(図-4)。測定イオンは、強度が高く、かつ脂肪酸類などの妨害ピークに対して特異的であったm/z 362、364及び226を選択した(図-5)。また、マトリックス効果による感度上昇を抑えるためには、250 kPa程度の高圧注入が有効であった。

その他のGC-MS条件は、定法に従い実験方法に示した条件により最適化した。

3) 検量線

GC-FPDにより、0.01～0.5 mg/L(0.02～1.0 ng)の範囲で良好な直線性が認められた(図-6)。なお、GC-MSでは、濃度が高くなるに従って感度が上昇したために、0.01～0.5 mg/L(0.02～1.0 ng)の範囲で二次的な曲線となった(図-7)。内径0.32 mmのカラムを装着し、さらに高圧注入モード(200 kPa、1 min)を採用したGC-FPDでは、注入された溶液が瞬時にカラムに導入されることで、低濃度でも対象成分のGC注入部での吸着・分解が抑制され、良好

な直線性が得られたものと考えられた。この結果から、定量にはGC-FPDを、確認(定量結果の確認を含む)にはGC-MSを用いることとした。

4) 検出限界(定量限界)

GC-FPDにより、0.01 mg/kgであった。また、GC-MS(m/z 362)により、0.005 mg/kgであった。

5. 添加回収試験

本分析法により、牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、さけ、えび、牛乳、鶏卵、牛の腎臓、鶏の筋肉、あさり及びはちみつの11食品を用いて、実験方法 4. 試験溶液調製法に従って0.01 ppm及び0.10 ppmでの添加回収試験を行い、その結果を表-7～表-17に示した(図-8)。

表-7 牛の筋肉の添加回収試験結果(%)

項目	添加濃度	
	0.01 ppm	0.10 ppm
ブランク	0.0	0.0
クマホス添加(1回目)	82.7	93.7
クマホス添加(2回目)	84.4	92.5
クマホス添加(3回目)	91.1	90.6
クマホス添加(4回目)	80.3	88.1
クマホス添加(5回目)	77.4	87.2
平均	83.2	90.4
標準偏差	5.2	2.8
変動係数	6.2	3.1

表-8 牛の脂肪の添加回収試験結果(%)

項目	添加濃度	
	0.01 ppm	0.10 ppm
ブランク	0.0	0.0
クマホス添加(1回目)	77.0	93.5
クマホス添加(2回目)	84.4	93.4
クマホス添加(3回目)	90.3	97.9
クマホス添加(4回目)	88.6	81.2
クマホス添加(5回目)	67.8	96.7
平均	81.6	92.5

標準偏差	9.3	6.6
変動係数	11.4	7.2

表－9 牛の肝臓の添加回収試験結果 (%)

項目	添加濃度	
	0.01 ppm	0.10 ppm
ブランク	0.0	0.0
クマホス添加(1回目)	92.5	88.4
クマホス添加(2回目)	84.2	88.2
クマホス添加(3回目)	80.0	85.3
クマホス添加(4回目)	86.7	81.0
クマホス添加(5回目)	74.0	88.6
平均	83.5	86.3
標準偏差	7.0	3.3
変動係数	8.3	3.8

表－10 さけの添加回収試験結果 (%)

項目	添加濃度	
	0.01 ppm	0.10 ppm
ブランク	0.0	0.0
クマホス添加(1回目)	75.6	95.5
クマホス添加(2回目)	73.0	90.8
クマホス添加(3回目)	81.4	87.8
クマホス添加(4回目)	82.9	82.4
クマホス添加(5回目)	74.7	90.0
平均	77.5	89.3
標準偏差	4.4	4.8
変動係数	5.6	5.3

表－11 えびの添加回収試験結果 (%)

項目	添加濃度	
	0.01 ppm	0.10 ppm
ブランク	0.0	0.0
クマホス添加(1回目)	94.1	80.6
クマホス添加(2回目)	83.5	93.0
クマホス添加(3回目)	80.1	86.9
クマホス添加(4回目)	84.3	80.6
クマホス添加(5回目)	77.0	83.6
平均	83.8	84.9

標準偏差	6.4	5.2
変動係数	7.7	6.1

表－12 牛乳の添加回収試験結果(%)

項目	添加濃度	
	0.01 ppm	0.10 ppm
ブランク	0.0	0.0
クマホス添加(1回目)	75.6	79.0
クマホス添加(2回目)	80.1	82.5
クマホス添加(3回目)	73.0	86.7
クマホス添加(4回目)	84.1	77.9
クマホス添加(5回目)	78.0	76.3
平均	78.2	80.5
標準偏差	4.3	4.2
変動係数	5.4	5.2

表－13 鶏卵の添加回収試験結果(%)

項目	添加濃度	
	0.01 ppm	0.10 ppm
ブランク	0.0	0.0
クマホス添加(1回目)	75.6	99.6
クマホス添加(2回目)	82.9	103.1
クマホス添加(3回目)	85.4	98.1
クマホス添加(4回目)	86.2	97.6
クマホス添加(5回目)	74.0	91.4
平均	80.8	97.9
標準偏差	5.7	4.3
変動係数	7.0	4.4

表－14 牛の腎臓の添加回収試験結果(%)

項目	添加濃度	
	0.01 ppm	0.10 ppm
ブランク	0.0	0.0
クマホス添加(1回目)	74.0	86.7
クマホス添加(2回目)	84.7	86.3
クマホス添加(3回目)	85.6	83.6
クマホス添加(4回目)	89.8	81.0
クマホス添加(5回目)	88.4	86.4
平均	84.5	84.8

標準偏差	6.2	2.5
変動係数	7.4	2.9

表－15 鶏の筋肉の添加回収試験結果(%)

項目	添加濃度	
	0.01 ppm	0.10 ppm
ブランク	0.0	0.0
クマホス添加(1回目)	94.2	96.4
クマホス添加(2回目)	73.0	97.2
クマホス添加(3回目)	81.8	94.1
クマホス添加(4回目)	83.3	99.9
クマホス添加(5回目)	91.8	98.5
平均	84.8	97.2
標準偏差	8.5	2.2
変動係数	10.0	2.2

表－16 あさりの添加回収試験結果(%)

項目	添加濃度	
	0.01 ppm	0.10 ppm
ブランク	0.0	0.0
クマホス添加(1回目)	74.0	94.0
クマホス添加(2回目)	84.7	94.1
クマホス添加(3回目)	85.6	93.2
クマホス添加(4回目)	89.8	90.7
クマホス添加(5回目)	88.4	99.9
平均	84.5	94.4
標準偏差	6.2	3.4
変動係数	7.4	3.6

表－17 はちみつの添加回収試験結果(%)

項目	添加濃度	
	0.01 ppm	0.10 ppm
ブランク	0.0	0.0
クマホス添加(1回目)	92.4	100.1
クマホス添加(2回目)	73.0	93.8
クマホス添加(3回目)	81.1	88.4
クマホス添加(4回目)	84.0	92.8
クマホス添加(5回目)	85.4	92.9
平均	83.2	93.6

標準偏差	7.0	4.2
変動係数	8.5	4.5

0.1 ppm添加では、すべて良好な回収率および変動係数が求められた。また、0.01 ppm添加では、さけ及び牛乳で回収率がそれぞれ77.5%、78.2%とやや低く、また、牛の脂肪及び鶏の筋肉で変動係数がそれぞれ11.4%、10.0%とややバラツキが認められたが、おおむね良好な回収率および変動係数が求められた。

なお、新品のGC用カラムは、活性を有し、マトリックス効果等を生じやすいものが認められたことから、試験溶液を10回程度注入してピーク強度が安定してから用いた。また、牛の筋肉等品目ごとに毎回インサートを交換するとともにカラムを15 cm程度カットしたのち、ブランク試験溶液を3回注入、次いで標準溶液を1回注入後、以下の順で測定した。

ブランク試験溶液→標準溶液(0.01 μ g/mL)→マトリックス標準溶液(0.01 μ g/mL)→標準溶液(0.02 μ g/mL)→試験溶液(1回目)→標準溶液(0.05 μ g/mL)→試験溶液(2回目)→標準溶液(0.10 μ g/mL)→試験溶液(3回目)→標準溶液(0.20 μ g/mL)→試験溶液(4回目)→標準溶液(0.50 μ g/mL)→試験溶液(5回目)

6. 試料マトリックスの測定値に与える影響

ブランク試料溶液(1 g/mL)0.5 mLをバイアルに採り、窒素を吹き付けて乾固させたのち、残留物に0.01 μ g/mLの標準溶液0.5 mLを加えて溶解したマトリックス標準溶液と溶媒標準溶液でピーク面積値を比較したところ、表-18に示したように牛の腎臓において若干のピーク強度の増加が認められた以外には、両者に大きな差は認められなかった。

表-18 溶媒標準品とマトリックス標準品の比較

項目	マトリックス標準品/溶媒標準品(%)
牛の筋肉	104.1
牛の脂肪	101.2
牛の肝臓	101.8
さけ	94.8
えび	100.6
牛乳	95.9
鶏卵	98.1
牛の腎臓	111.0
鶏の筋肉	99.1
あさり	104.2
はちみつ	103.2

[結論]

クマホスの試験法(畜水産物)として、塩酸酸性下でアセトン/ヘキサンにより抽出、多孔性ケイソウ土カラムにより脱脂、SAX/PSAミニカラムにより精製ののち、GC-FPD(Pモード)により定量し、GC/MSにより確認する方法を提案した。牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、さけ、えび、牛乳、鶏卵、牛の腎臓、鶏の筋肉、あさり及びはちみつの11品目に適用した場合の添加回収率および変動係数はおおむね良好であり、クマホスの0.01 ppmでの定量分析が可能と判断された。

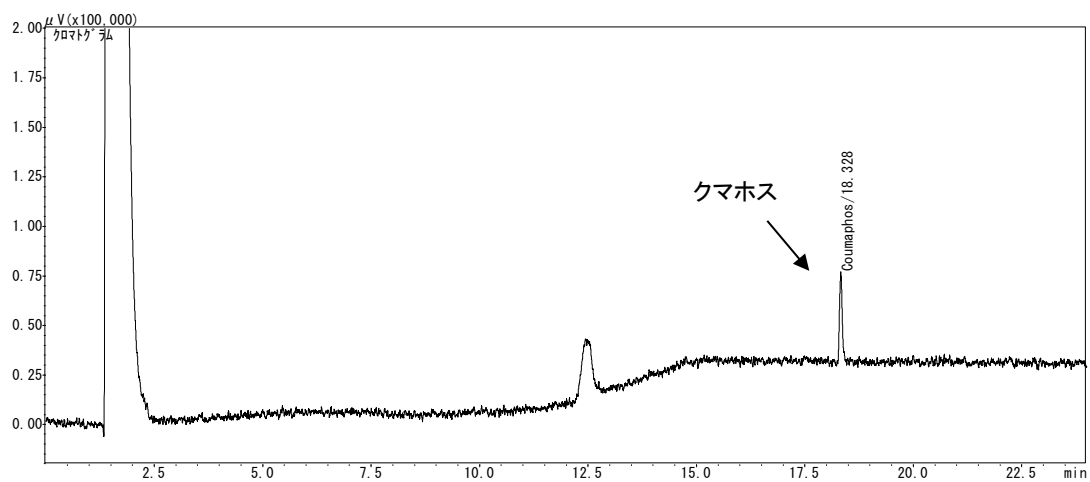
[参考文献]

なし

図-2 標準品の GC-FPD クロマトグラム

DB-200 カラム(0.32 mm.i.d.×30 m, 0.5 μm)

0.01 μg/mL アセトン-ヘキサン(1:9)溶液を 2 μL 注入



DB-5 カラム(0.32 mm.i.d.×30 m, 0.5 μm)

0.01 μg/mL アセトン-ヘキサン(1:9)溶液を 2 μL 注入

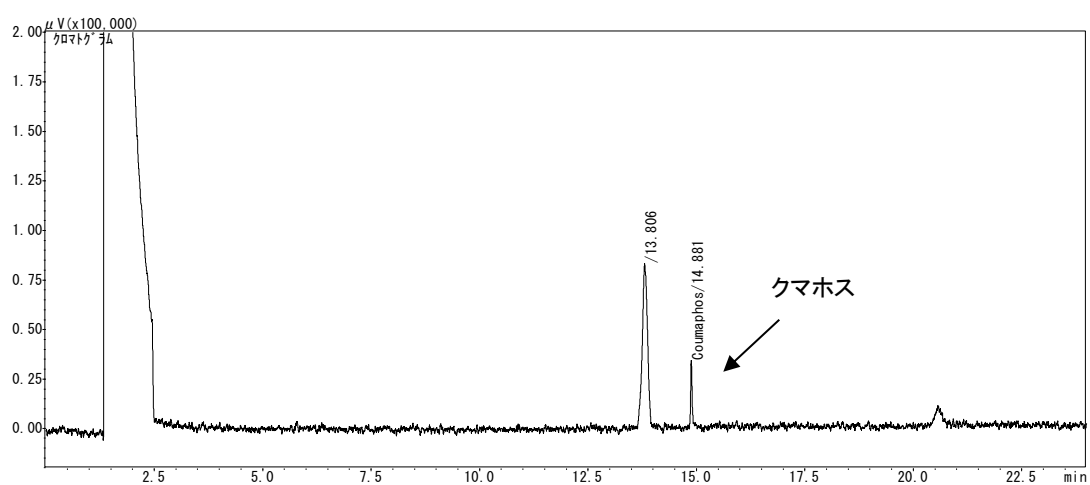


図-3 標準品の GC-MS (Scan 50→400 m/z) クロマトグラム及びマススペクトル
DB-5ms カラム(0.25 mm i.d.×30 m, 0.25 μm)
1 μg/mL アセトン-ヘキサン(1:9)溶液を 2 μL 注入

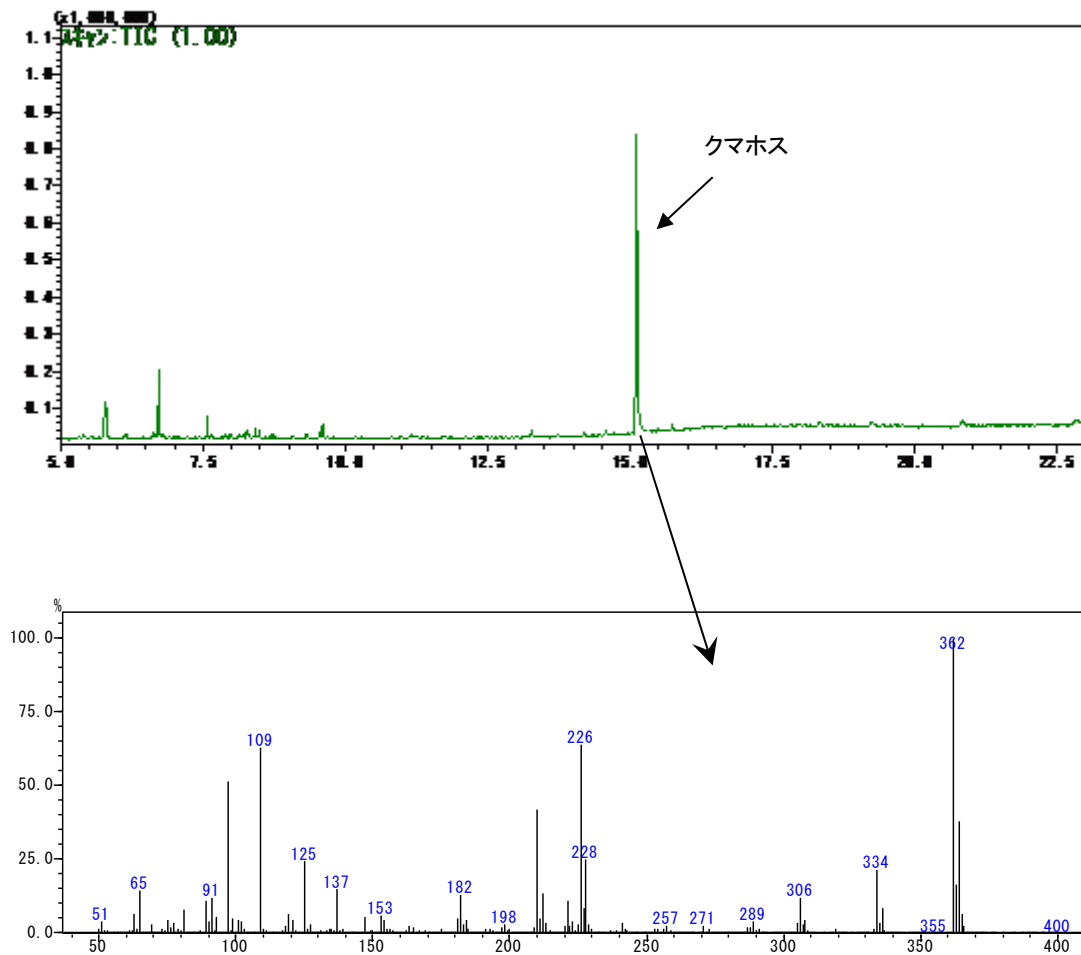


図-4 標準品の GC-MS SIM 測定及びスキャン測定により得られたクロマトグラム
DB-5ms カラム(0.25 mm i.d.×30 m, 0.25 μm)
0.01 μg/mL アセトン-ヘキサン(1:9) 溶液を 2 μL 注入

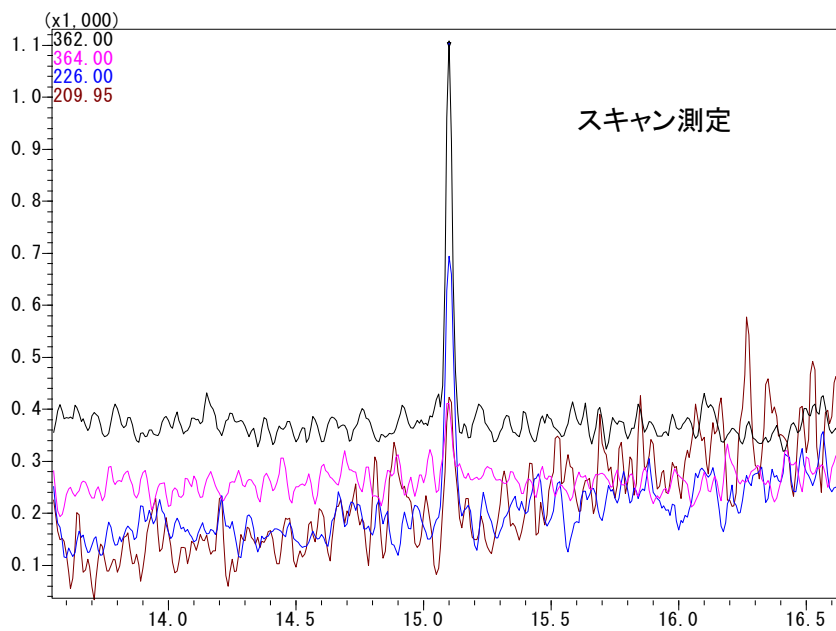
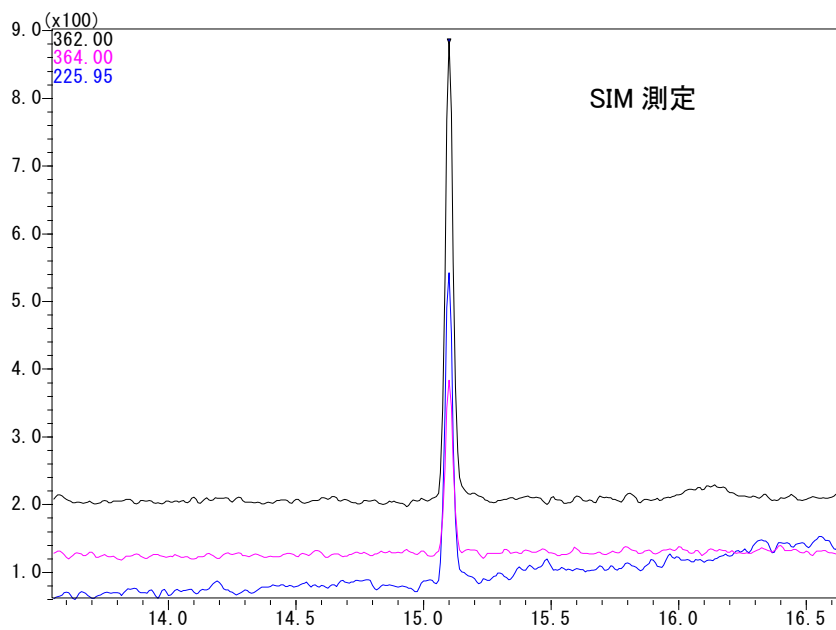
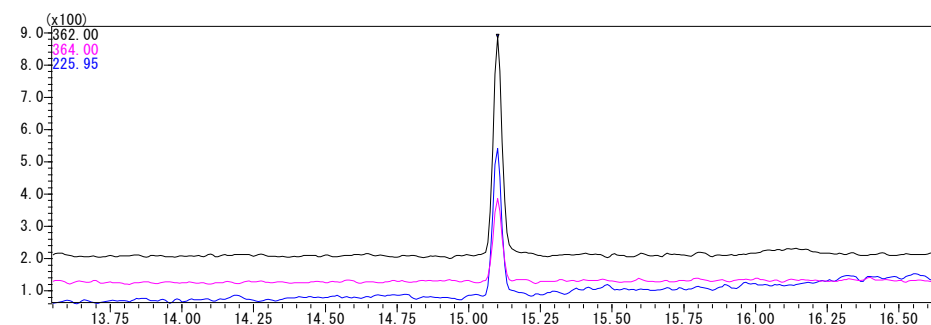


図-5 標準品及び試料の GC-MS (SIM) クロマトグラム

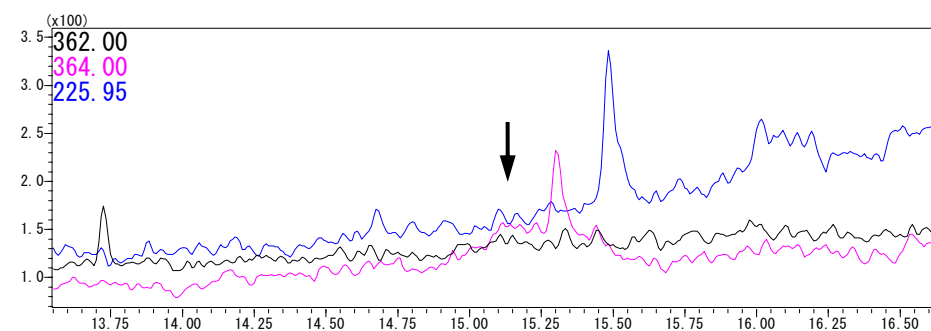
DB-5ms カラム(0.25 mm i.d.×30 m, 0.25 μm)

いずれも 1 g 試料/mL アセトン-ヘキサン(1:9) 溶液を 2 μL 注入

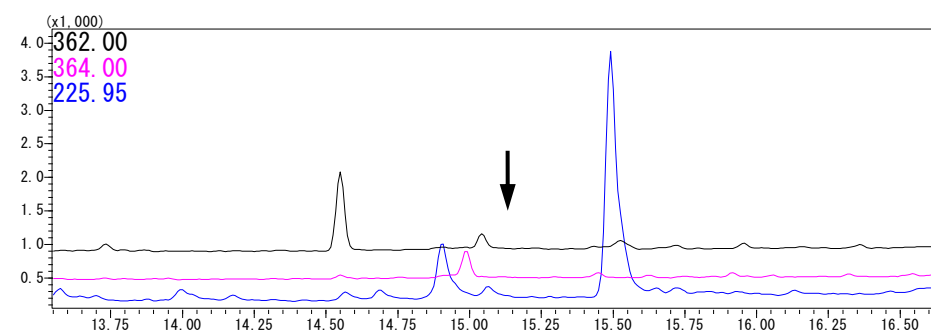
標準品 0.01 μg/mL アセトン-ヘキサン(1:9) 溶液を 2 μL 注入



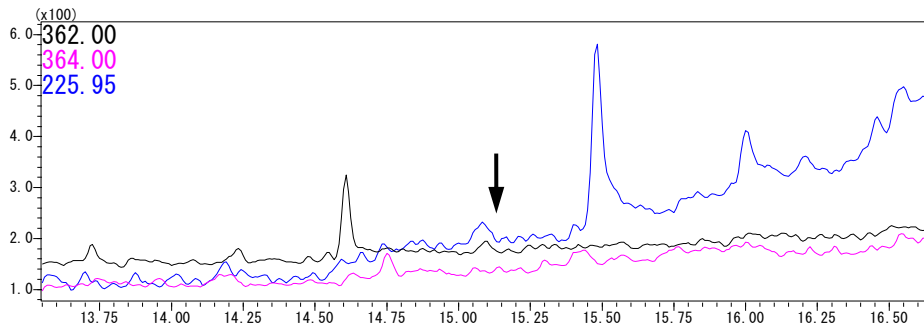
牛の筋肉 ブランク



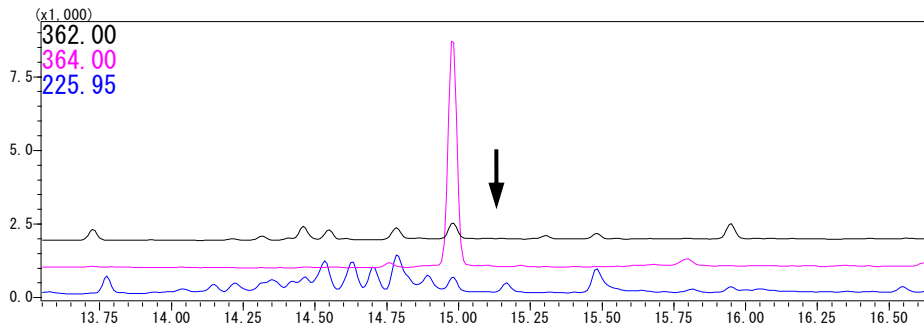
牛の脂肪 ブランク



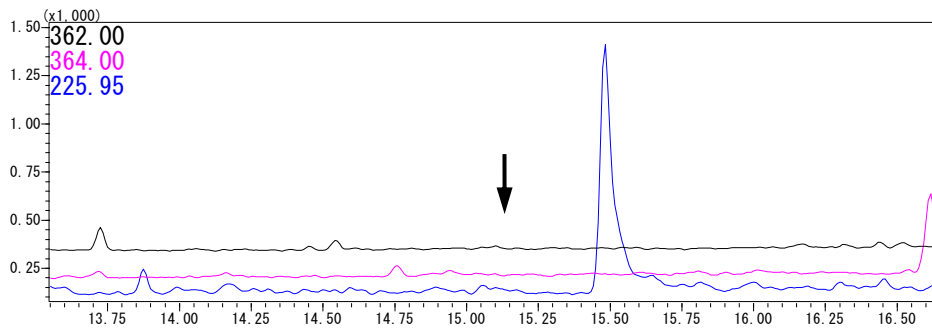
牛の肝臓 ブランク



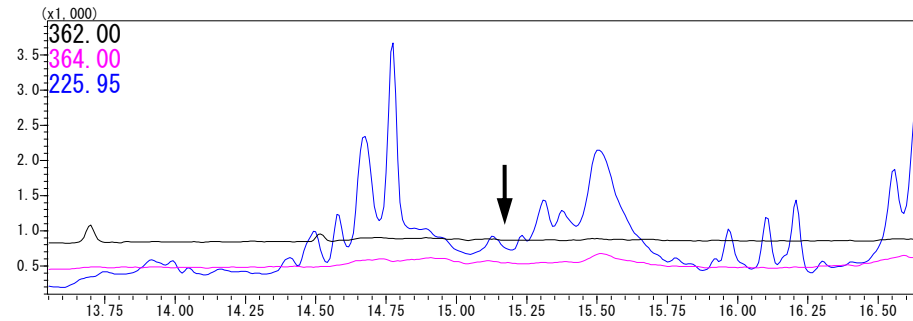
さけ ブランク



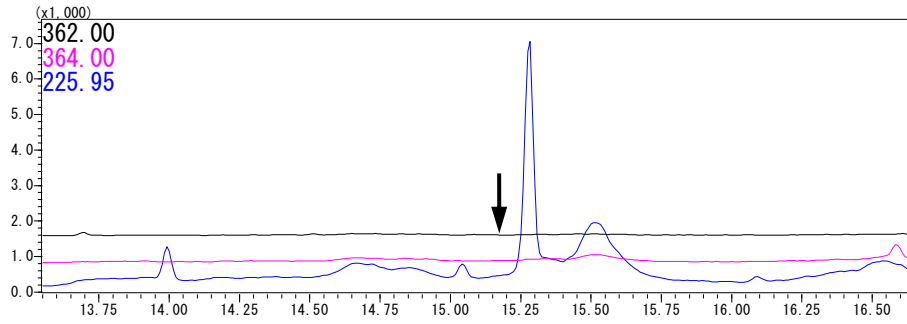
えび ブランク



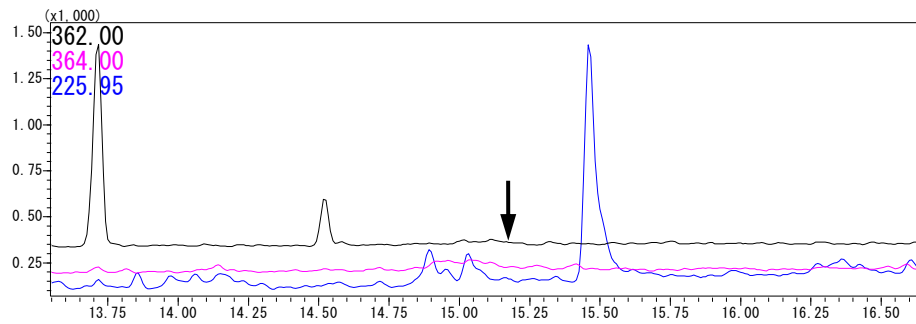
牛乳 ブランク



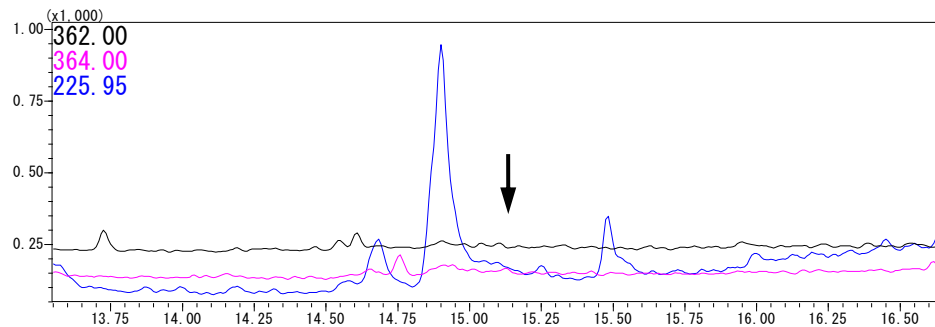
鶏卵 ブランク



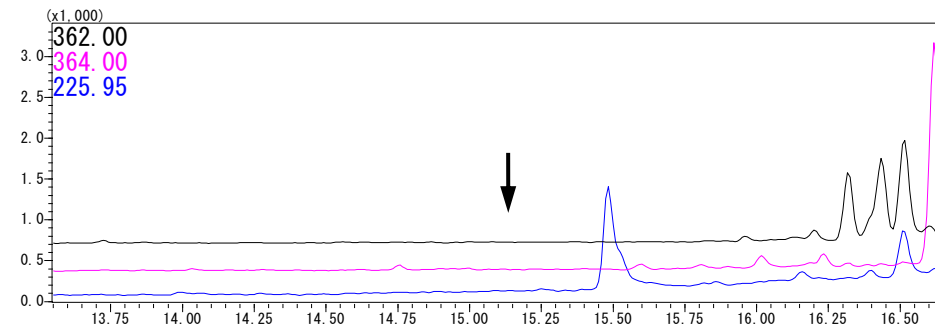
牛の腎臓 ブランク



鶏の筋肉 ブランク



あさり ブランク



はちみつ ブランク

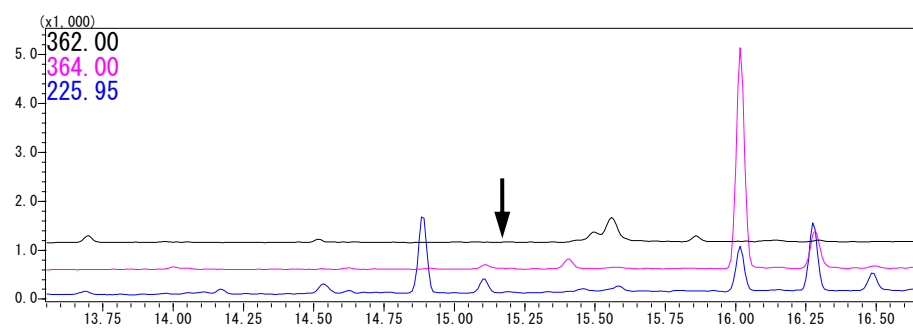
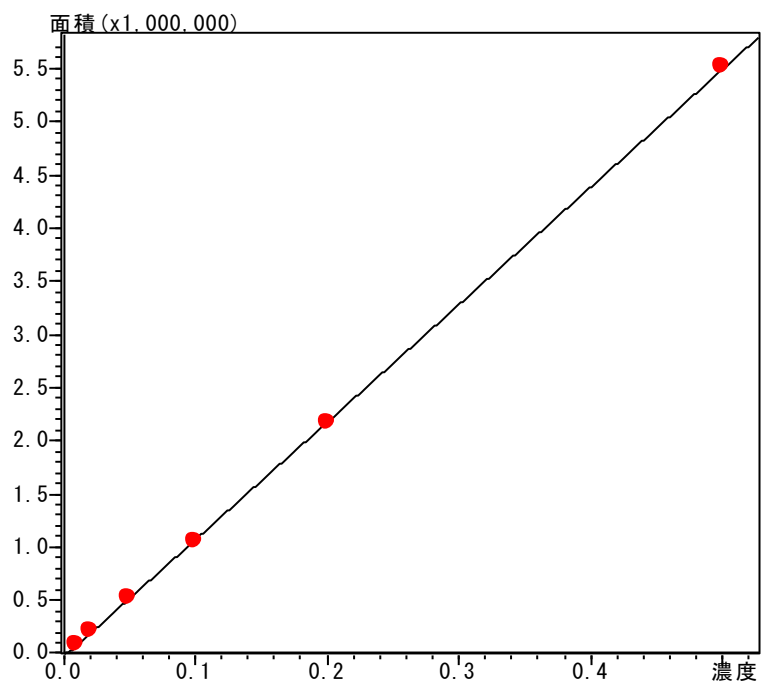


図-6 GC-FPD により得られた検量線

DB-200 カラム(0.32 mm i.d.×30 m, 0.5 μm)

0.01~0.5 μg/mL アセトン-ヘキサン(1:9)溶液を 2 μL 注入



$$Y = aX + b$$

$$a = 1.106224e+007$$

$$b = -31200.9$$

$$R^2 = 0.9999267$$

$$R = 0.9999633$$

外部標準法

検量線:直線

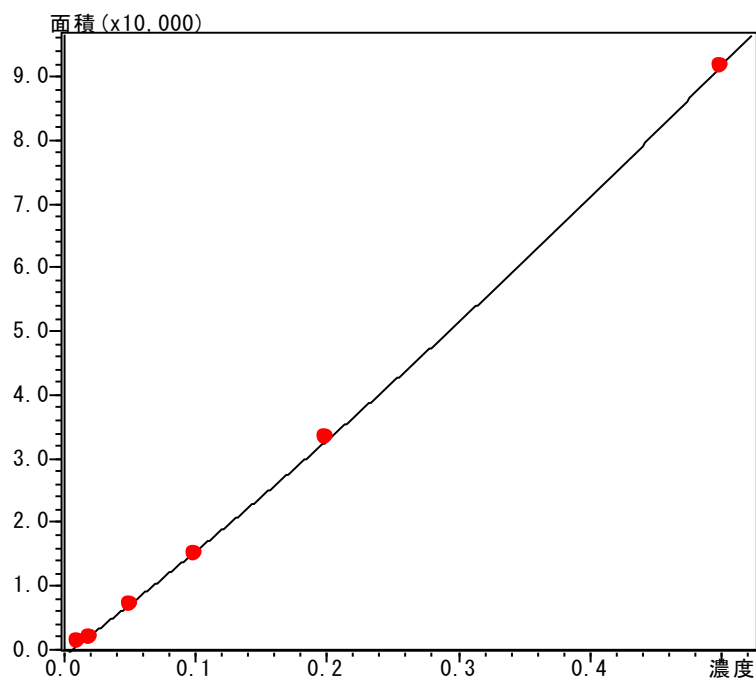
原点通過:通さない

重み付け:なし

図-7 GC-MS により得られた検量線

DB-5ms カラム(0.25 mm i.d.×30 m, 0.25 μm)

0.01~0.5 μg/mL アセトン-ヘキサン(1:9)溶液を 2 μL 注入



$$Y = aX^2 + bX + c$$

$$a = 54178.51$$

$$b = 157990.3$$

$$c = -896.9282$$

$$R^2 = 0.9998817$$

$$R = 0.9992943$$

絶対検量線法

検量線:二次式

原点:通さない

重み付け法:なし

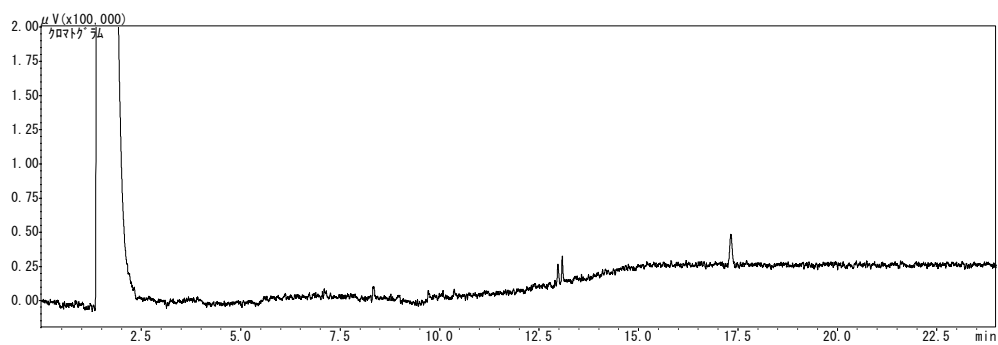
図-8 試料の GC-FPD クロマトグラム

DB-200 カラム(0.32 mm i.d.×30 m, 0.5 μm)

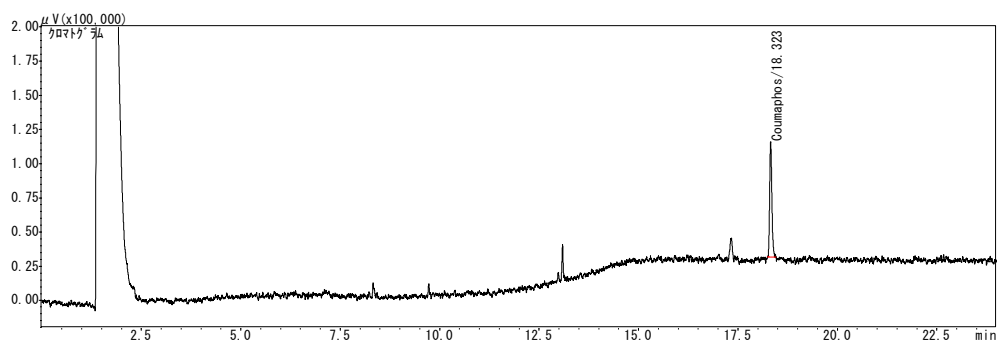
ブランク試料及び 0.01 ppm 添加試料

いずれも 1 g 試料/mL アセトン-ヘキサン(1:9) 溶液を 2 μL 注入

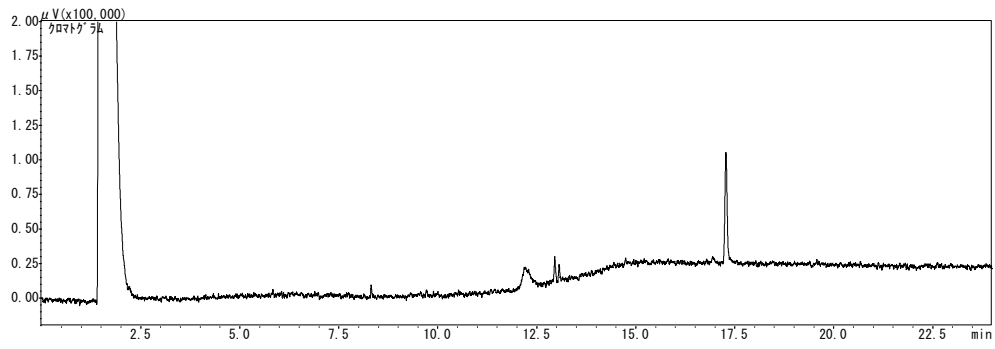
牛の筋肉 ブランク



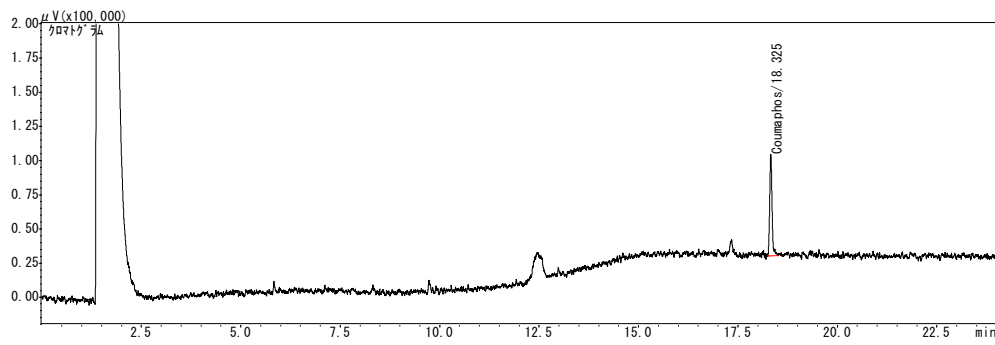
牛の筋肉 0.01 ppm 添加



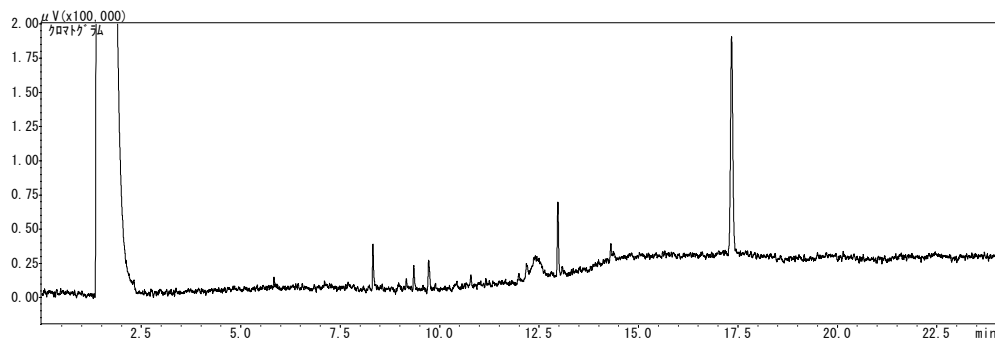
牛の脂肪 ブランク



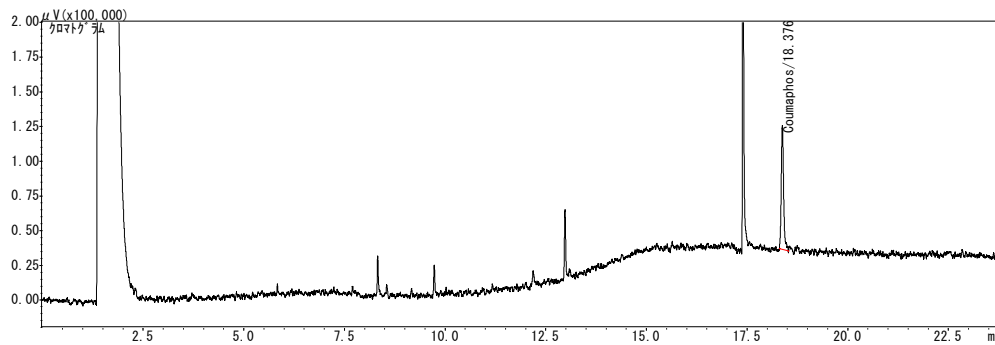
牛の脂肪 0.01 ppm 添加



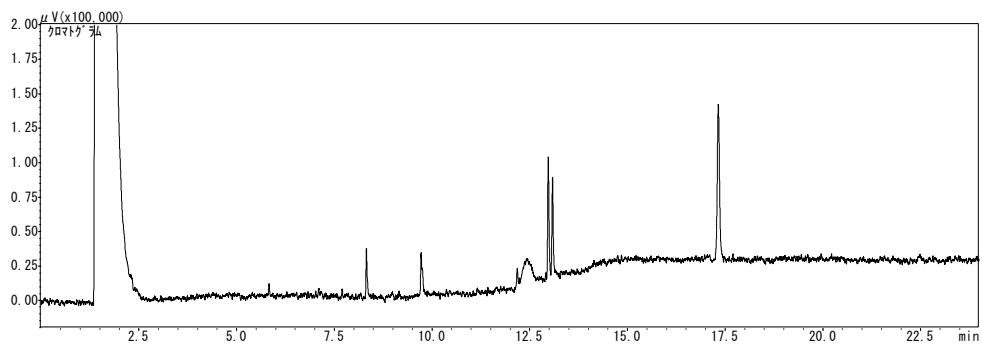
牛の肝臓 ブランク



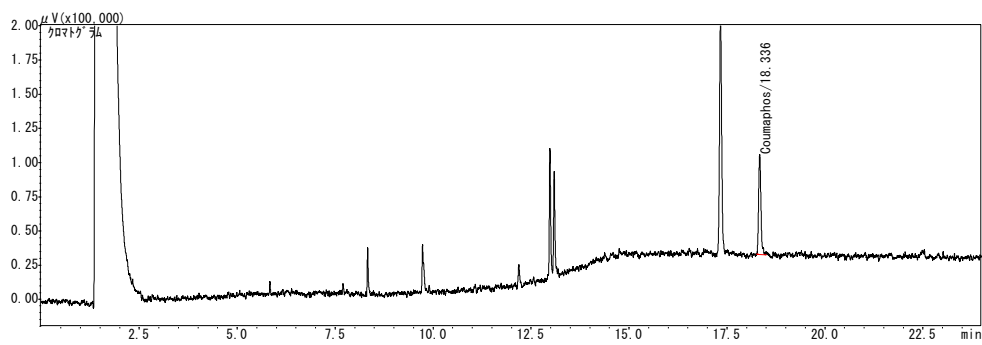
牛の肝臓 0.01 ppm 添加



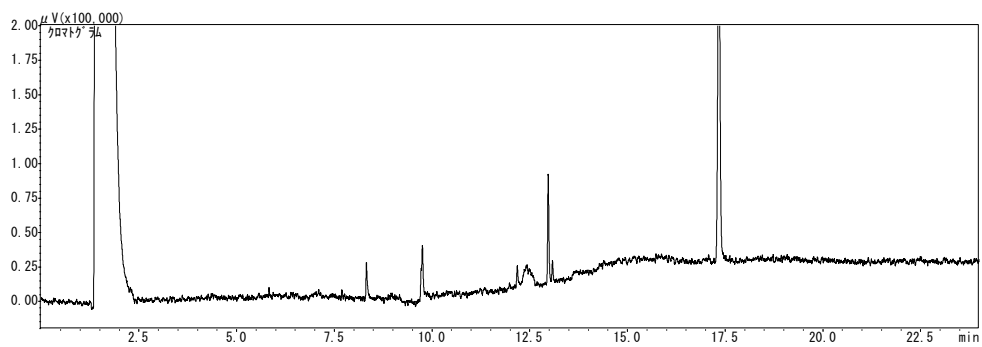
さけ ブランク



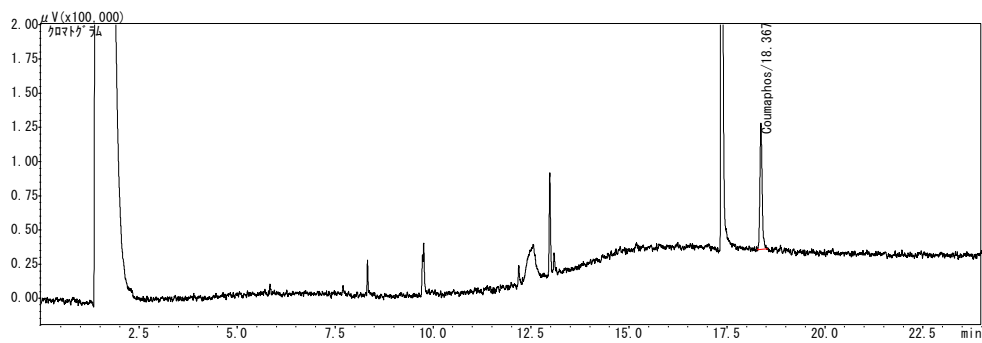
さけ 0.01 ppm 添加



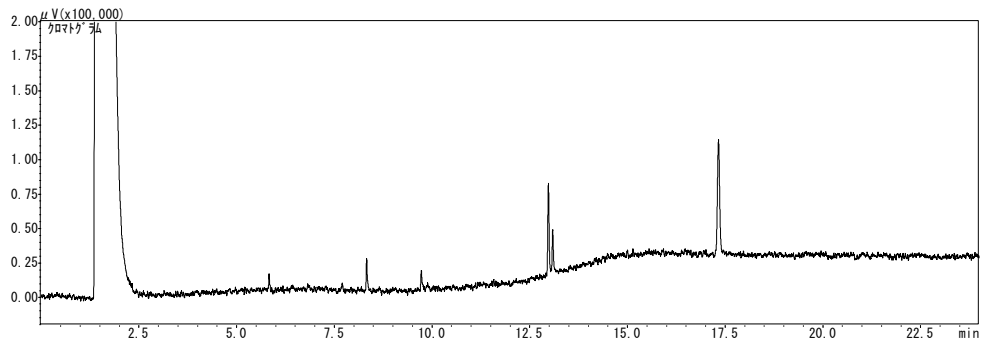
えび ブランク



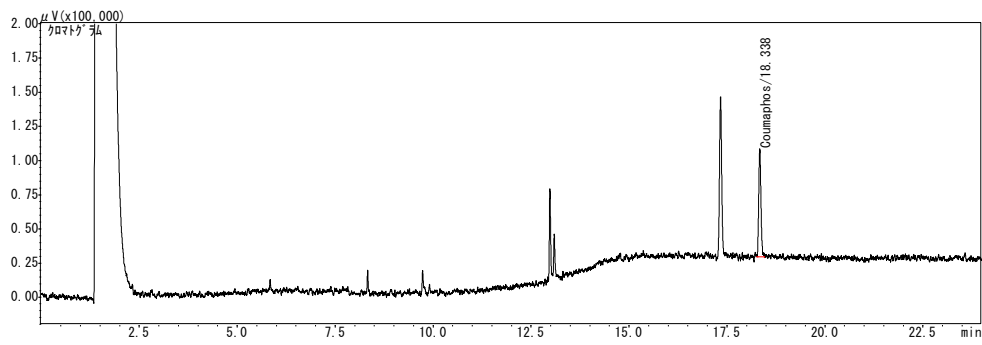
えび 0.01 ppm 添加



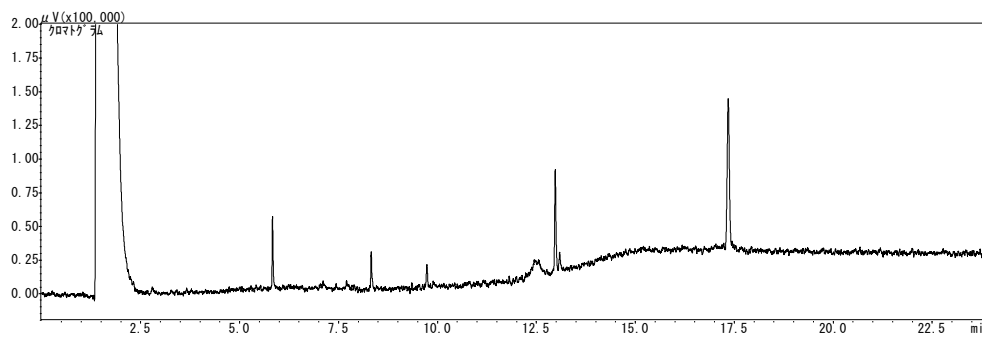
牛乳 ブランク



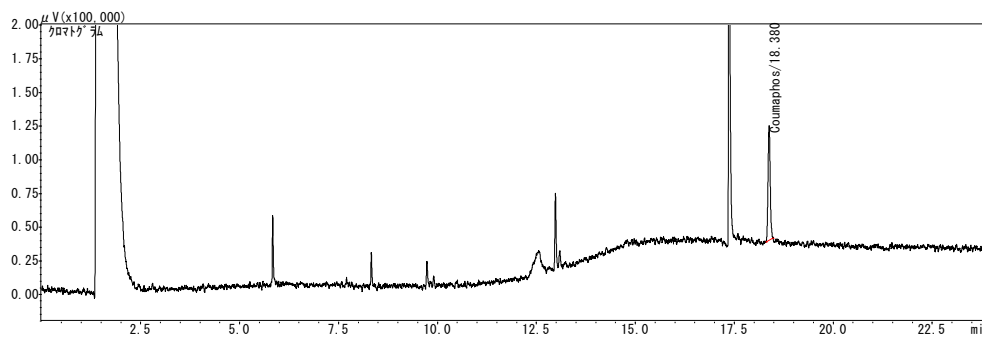
牛乳 0.01 ppm 添加



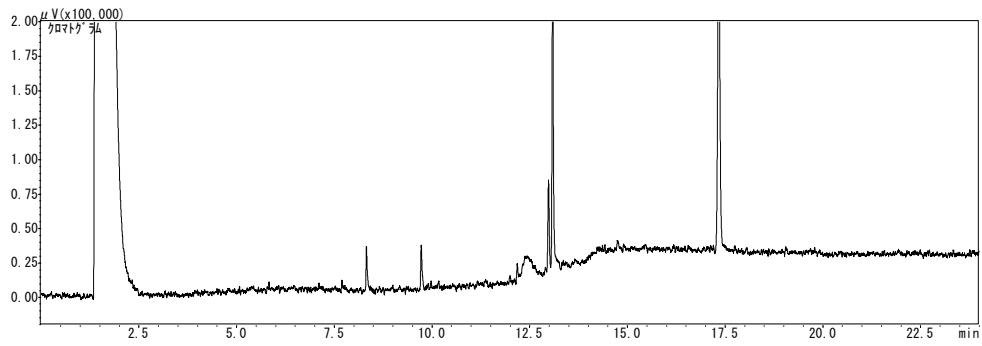
鶏卵 ブランク



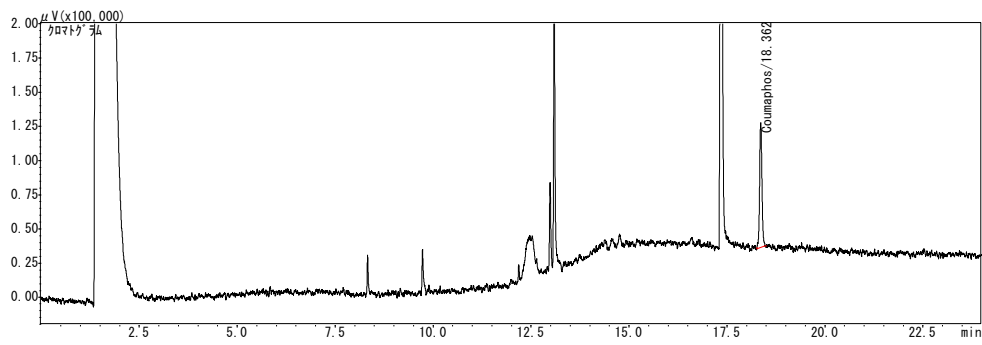
鶏卵 0.01 ppm 添加



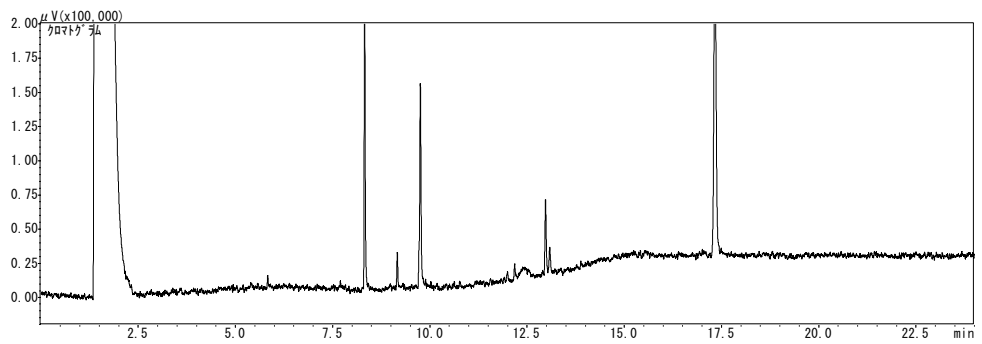
牛の腎臓 ブランク



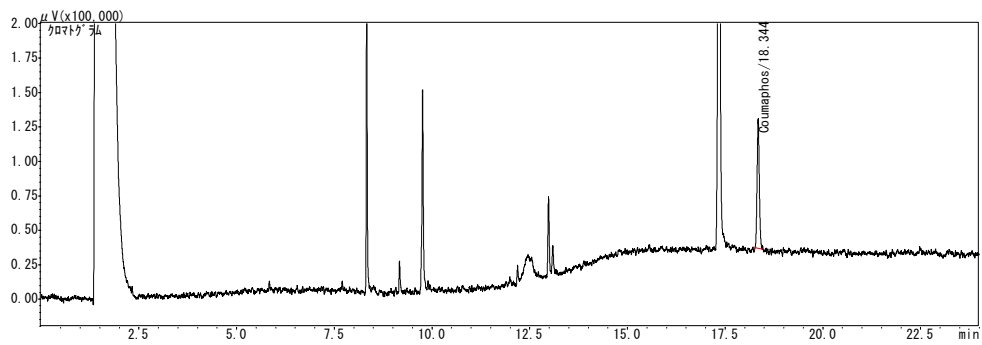
牛の腎臓 0.01 ppm 添加



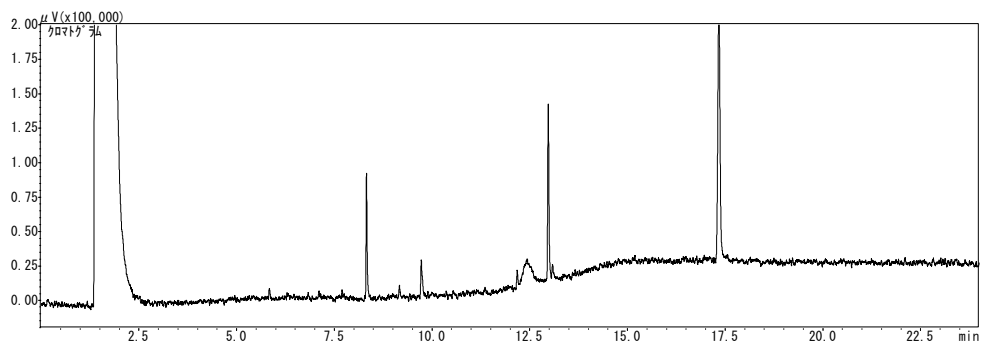
鶏の筋肉 ブランク



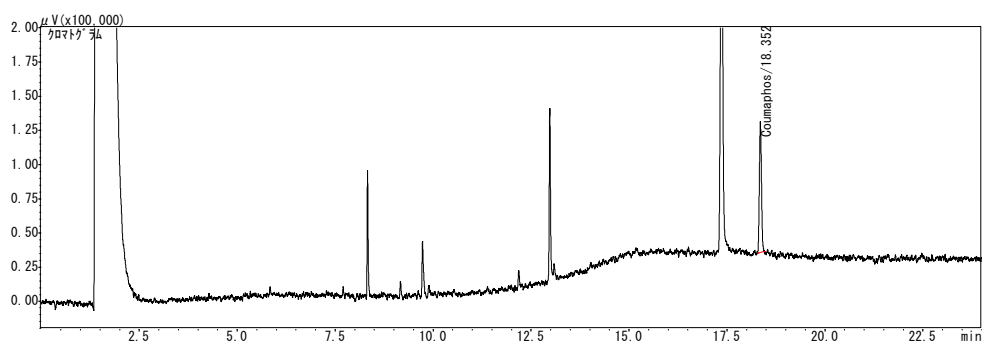
鶏の筋肉 0.01 ppm 添加



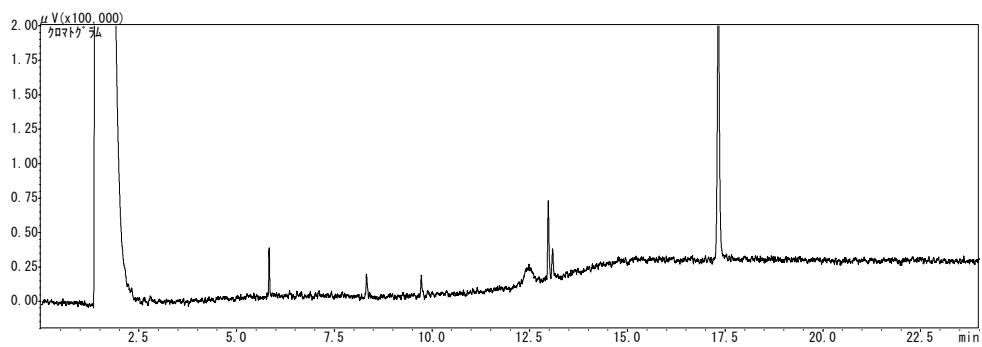
あさり ブランク



あさり 0.01 ppm 添加



はちみつ ブランク



はちみつ 0.01 ppm 添加

