

※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。

食品に残留する農薬等の成分である物質 (メチオカルブ)の試験法開発事業報告書

メチオカルブ試験法（農産物）の検討結果

〔緒言〕

1. 目的及び試験法の検討方針

メチオカルブはバイエルAG社が開発したカーバメート系殺虫剤であり、アリ、ゴキブリ及びシロアリ等に殺虫活性を示す。

メチオカルブの規制対象については食安発1217第5号（平成22年12月17日）で、『メチオカルブとは、メチオカルブ、メチオカルブスルホキシド（代謝物D）をメチオカルブに換算したもの及びメチオカルブスルホン（代謝物H）をメチオカルブに換算したものの和をいうこと。』とされている。食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法におけるメチオカルブの個別試験法は抽出及び精製操作にジクロロメタンを使用しており、測定も現在の農薬等の測定機器としては広く普及していないポストカラム反応蛍光検出・液体クロマトグラフ法である。以上を考慮し、「薬事食品衛生審議会 食品衛生分科会報告書」に記載されている規制対象物質及び残留基準値案を踏まえ、ジクロロメタンを使用せず、かつ液体クロマトグラフィー質量分析計（LC-MS/MS）を測定機器とする試験法の開発を行った。

1) 規制対象物質

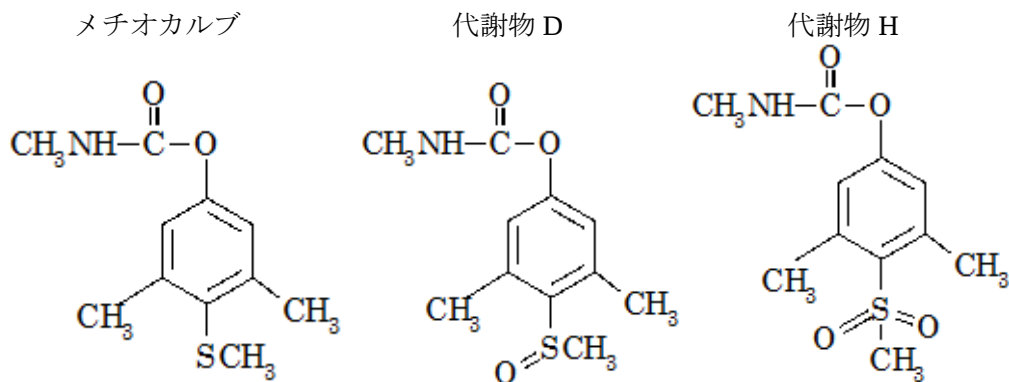
メチオカルブ

メチオカルブスルホキシド（以下、「代謝物D」という。）

メチオカルブスルホン（以下、「代謝物H」という。）

2. 分析対象化合物の構造式、物理化学的性質及び基準値等に関する情報

1) 構造式及び物理化学的性質



メチオカルブ

化学式：C₁₁H₁₅NO₂S、分子量：225.31

化学名（IUPAC）：4-methyltio-3,5-xylyl methylcarbamate

外 観：無色結晶粉末、軽いフェノール臭

融 点：119℃

比 重：1.236（20℃）

蒸気圧：0.015 mPa（20℃）、0.036 mPa（25℃）

溶解性：水 27 mg/L（20℃）

ジクロロメタン >200、2-プロパノール 53、トルエン 33、ヘキサン 1.3（以上 g/L、20℃）

オクタノール/水分配係数：log Pow=3.08（20℃）

安定性：強アルカリ溶液中で不安定

加水分解半減期（22℃）；1年以上（pH4）、35日以内（pH7）、6時間（pH9）

光分解半減期：6～16日

（出典：The Pesticide Manual 17th）

代謝物D

化学式：C₁₁H₁₅NO₃S、分子量：241.31

化学名（IUPAC）：3,5-dimethyl-4-(methylsulfinyl)phenyl N-methylcarbamate

外 観：白色結晶性粉末

溶解性：ジクロロメタンに可溶

（出典：和光純薬株式会社）

代謝物H

化学式：C₁₁H₁₅NO₄S、分子量：257.31

化学名（IUPAC）：3,5-dimethyl-4-(methylsulfonyl)phenyl methylcarbamate

外 観：白色結晶～粉末

溶解性：アセトンに可溶

（出典：和光純薬株式会社）

2) 基準値

玄米、小麦、小豆及び大豆	0.05 ppm
らっかせい	0.05 ppm
ばれいしょ及びかんしょ	0.05 ppm
ほうれんそう、こまつな及びしゅんぎく	0.05 ppm
キャベツ、レタス及びブロッコリー	0.1 ppm
たまねぎ及びねぎ	0.5 ppm
オレンジ及びレモン	0.05 ppm
りんご、日本なし及び西洋なし	0.05 ppm
ぶどう	0.1 ppm
いちご	1 ppm

[実験方法]

1. 試料

1) 購入先

都内のスーパーにて購入した。

2) 試料の採取方法

- ①玄米は425 μm の標準網ふるいを通して均一化した。
- ②大豆は425 μm の標準網ふるいを通して均一化した。
- ③らっかせいは殻を除き、2 mmのふるいを通して均一化した。
- ④ほうれんそうはひげ根及び変質葉を除き、細切均一化した。
- ⑤キャベツは外側変質葉及びしんを除き、細切均一化した。
- ⑥ばれいしょは泥を水で軽く洗い落とし、細切均一化した。
- ⑦オレンジは細切均一化した。
- ⑧りんごは花おち、しん及び果梗の基部を除き、細切均一化した。
- ⑨茶は425 μm の標準網ふるいを通して均一化した。
- ⑩ぶどうは果梗を除き、細切均一化した。

2. 試薬・試液

1) 標準品

メチオカルブ標準品：純度99.5 % (Dr. Ehrenstorfer製)

代謝物D標準品：純度99.5 % (和光純薬工業製)

代謝物H標準品：純度98.5 % (和光純薬工業製)

2) 試薬

アセトニトリル、アセトン、酢酸エチル：残留農薬試験用 (関東化学製)

アセトニトリル：高速液体クロマトグラフ用 (関東化学製)

無水硫酸ナトリウム：PCB分析用 (関東化学製)

塩化ナトリウム、ギ酸：特級 (関東化学製)

ケイソウ土：セライト545 (関東化学製)

グラフアイトカーボンミニカラム：Supelclean Envi-carb (充てん量250 mg、シグマアルドリッチ製)

アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム：Sep-pak plus NH_2 (充てん量360 mg、Waters製)

3) 標準溶液及び試液の調製方法

①標準溶液の調製方法

標準原液：メチオカルブ、代謝物D及び代謝物H標準品、各25 mgを精秤し、アセトンで溶解して各500 mg/L溶液を調製した。

検量線用混合標準溶液：メチオカルブ、代謝物D及び代謝物H各標準原液を適宜混合してアセトニトリル及び0.1 vol%ギ酸 (1 : 1) 混液で希釈し、0.00025~0.0075 mg/Lの濃度の混合溶液を調製した。

添加用混合標準溶液：メチオカルブ、代謝物D及び代謝物H各標準原液を適宜混合してアセトンで希釈して0.1、1、2及び4 mg/Lの濃度の混合溶液を調製した。

②試液の調製方法

0.1 vol%ギ酸：ギ酸1 mLに水を加えて1000 mLとした。

アセトニトリル及び0.1 vol%ギ酸 (1 : 1) 混液：アセトニトリル250 mL及び0.1 vol%ギ酸250 mLを混合した。

3. 装置

ホモジナイザー：ウルトラタラックスT-25ベーシック（イカ・ジャパン製）

振とう器：エルビスEL型（杉山元医理器製）

ロータリーエバポレーター：R-200（柴田科学製）等

LC-MS/MS

	型式	会社
MS 装置	API-3200	AB SCIEX
LC 装置	Prominence	島津製作所
データ処理	Analyst	AB SCIEX

4. 測定条件

LC 条件																								
カラム	Mightysil RP-18 GP (内径 2.0 mm、長さ 150 mm、粒子径 5 μm：関東化学株式会社製)																							
移動相流速 (mL/min)	0.2																							
注入量 (μL)	4																							
カラム温度 (°C)	40																							
移動相	A液：0.1 vol% ギ酸 B液：アセトニトリル																							
グラジエント条件	<table><tr><td>時間 (分)</td><td>A液 (%)</td><td>B液 (%)</td></tr><tr><td>0.0</td><td>90</td><td>10</td></tr><tr><td>10.00</td><td>30</td><td>70</td></tr><tr><td>13.00</td><td>30</td><td>70</td></tr><tr><td>13.01</td><td>10</td><td>90</td></tr><tr><td>18.00</td><td>10</td><td>90</td></tr><tr><td>18.01</td><td>90</td><td>10</td></tr></table>			時間 (分)	A液 (%)	B液 (%)	0.0	90	10	10.00	30	70	13.00	30	70	13.01	10	90	18.00	10	90	18.01	90	10
時間 (分)	A液 (%)	B液 (%)																						
0.0	90	10																						
10.00	30	70																						
13.00	30	70																						
13.01	10	90																						
18.00	10	90																						
18.01	90	10																						
MS 条件																								
測定モード	MS/MS、SRM (選択反応モニタリング)																							
イオン化モード	ESI (+)																							
キャピラリ電圧 (V)	4500																							
脱溶媒温度 (°C)	700																							
脱溶媒ガス	窒素 70 psi																							
コリジョンガス	窒素																							
定量イオン (m/z)	メチオカルブ： +226→169[コーン電圧：21(V)、コリジョンエネルギー：13(eV)] 代謝物 D： +242→185[コーン電圧：21(V)、コリジョンエネルギー：17(eV)] 代謝物 H： +258→201[コーン電圧：26(V)、コリジョンエネルギー：13(eV)]																							
定性イオン (m/z)	メチオカルブ： +226→121[コーン電圧：21(V)、コリジョンエネルギー：23(eV)] 代謝物 D： +242→122[コーン電圧：21(V)、コリジョンエネルギー：39(eV)] 代謝物 H： +258→122[コーン電圧：26(V)、コリジョンエネルギー：23(eV)]																							
保持時間 (min)	メチオカルブ：12.1 代謝物D：6.6 代謝物H：8.1																							

5. 定量

〔実験方法〕 3) ①に従い調製した混合標準溶液4 μ LをLC-MS/MSに注入し、得られたピーク面積から絶対検量線法で検量線を作成した。試験溶液4 μ LをLC-MS/MSに注入し、得られたピーク面積と作成した検量線からメチオカルブ、代謝物D及び代謝物Hの含量を算出した。

6. 添加試料の調製

2. 3) で調製した添加用混合標準溶液を添加した。

玄米、大豆及びびらっかせい（添加濃度：0.05 ppm）：試料10.0 gに添加用混合標準溶液1 mg/Lを0.5 mL添加しよく混合した後、30分間放置した。

キャベツ及びぶどう（添加濃度：0.1 ppm）：試料20.0 gに添加用混合標準溶液4 mg/Lを0.5 mL添加しよく混合した後、30分間放置した。

ほうれんそう、オレンジ、りんご及びばれいしょ（添加濃度：0.05 ppm）：試料20.0 gに添加用混合標準溶液2 mg/Lを0.5 mL添加しよく混合した後、30分間放置した。

茶（添加濃度：0.01 ppm）：試料5.00 gに添加用混合標準溶液0.1 mg/Lを0.5 mL添加しよく混合した後、30分間放置した。

7. 試験溶液の調製

メチオカルブ及び代謝物を試料からアセトンで抽出し、ギ酸酸性下で酢酸エチルに転溶した後、グラファイトカーボンミニカラムの下部にアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムを連結して精製し、LC-MS/MSで定量及び確認した。

1) 抽出

①穀類、豆類及び種実類の場合

試料10.0 gを200 mL遠心管に量り採り、水20 mLを加え、30分間放置した。これにアセトン100 mLを加え、ホモジナイズした後、ケイソウ土を厚さ約1 cmに敷いたろ紙（直径60 mm、No. 4、桐山製作所製）を用いて吸引ろ過し、200 mL容メスフラスコに採取した。ろ紙上の残留物にアセトン50 mLを加えてホモジナイズした後、上記と同様にろ過した。得られたろ液を合わせて、アセトンで正確に200 mLとした。この2 mLを採り、ギ酸0.1 mLを加えた10 w/v%塩化ナトリウム溶液100 mLを用いて300 mL分液漏斗に移し、酢酸エチル100 mL及び50 mLで2回振とう抽出した。抽出液を300 mL三角フラスコに採り、無水硫酸ナトリウムを加えて時々振り混ぜながら15分間放置した。200 mLなす形フラスコにろ過した後、ロータリーエバポレーターを用いて40℃以下で約1 mLに濃縮し、更に窒素を吹き付けて溶媒を除去した。この残留物をアセトニトリル10 mLに溶解した。

②果実及び野菜の場合

試料20.0 gを200 mL遠心管に量り採り、アセトン100 mLを加え、ホモジナイズした後、ケイソウ土を厚さ約1 cmに敷いたろ紙（直径60 mm、No. 4、桐山製作所製）を用いて吸引ろ過し、200 mL容メスフラスコに採取した。ろ紙上の残留物にアセトン50 mLを加えてホモジナイズした後、上記と同様にろ過した。得られたろ液を合わせて、アセトンで正確に200 mLとした。この1 mLを採り、ギ酸0.1 mLを加えた10 w/v%塩化ナトリウム溶液100 mLを用いて300 mL分液漏斗に移し、酢酸エチル100 mL及び50 mLで2回振とう抽出した。抽出液を300 mL三角フラスコに採り、無水硫酸ナトリウムを加えて時々振り混ぜながら15分間放置した。200 mLなす形フラスコにろ過した後、ロータリーエバポレーターを用いて40℃以下で約1 mLに濃縮し、更に窒素を吹き付けて溶媒を除去した。この残留物をアセトニトリル10 mLに溶解した。

③茶の場合

試料5.00 gを200 mL遠心管に量り採り、水20 mLを加え、30分間放置した。これにアセトン100 mLを加え、ホモジナイズした後、ケイソウ土を厚さ約1 cmに敷いたろ紙（直径60 mm、No. 4、桐山製作所製）を用いて吸引ろ過し、200 mL容メスフラスコに採取した。ろ紙上の残留物にアセトン50 mLを加えてホモジナイズした後、上記と同様にろ過した。得られたろ液を合わせて、アセトンで正確に200 mLとした。この4 mLを採り、ギ酸0.1 mLを加えた10 w/v%塩化ナトリウム溶液100 mLを用いて300 mL分液漏斗に移し、酢酸エチル100 mL及び50 mLで2回振とう抽出した。抽出液を300 mL三角フラスコに採り、無水硫酸ナトリウムを加えて時々振り混ぜながら15分間放置した。200 mLなす形フラスコにろ過した後、ロータリーエバポレーターを用いて40℃以下で約1 mLに濃縮し、更に窒素を吹き付けて溶媒を除去した。この残留物をアセトニトリル10 mLに溶解した。

2) 精製

グラファイトカーボンミニカラム (250 mg) 及びアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム (360 mg) にアセトニトリル各10 mLを注入し、流出液は捨てた。グラファイトカーボンミニカラムの下部にアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムを連結し、1) で得られた溶液を注入した後、アセトニトリル10 mLを注入し、溶出液を50 mL遠心管に採り、ロータリーエバポレーターを用いて40℃以下で約1 mLに濃縮し、更に窒素を吹き付けて溶媒を除去した。この残留物をアセトニトリル及び0.1 vol%ギ酸 (1 : 1) 混液に溶解し、正確に2 mLとしたものを試験溶液とした。

[分析法フローチャート]

秤 取

- | 穀類、豆類及び種実類：試料10.0 gに水20 mLを加え30分間放置
- | 果実及び野菜：試料20.0 g
- ↓ 茶：試料5.00 gに水20 mLを加え30分間放置

アセトン抽出

- | アセトン100 mLを加え、ホモジナイズ
- | 吸引ろ過
- | 残留物にアセトン50 mLを加え、ホモジナイズ
- | 吸引ろ過
- | ろ液を合わせて、アセトンで正確に200 mLとする
- | 穀類、豆類及び種実類：抽出液2 mL分取
- | 果実及び野菜：抽出液1 mL分取
- ↓ 茶：抽出液4 mL分取

ギ酸酸性下酢酸エチル転溶

- | 10 w/v%塩化ナトリウム溶液100 mL、ギ酸0.1 mL
- | 酢酸エチル100 mLを加え、5分間振とう
- | 酢酸エチル層を採る
- | 水層に酢酸エチル50 mLを加え、5分間振とう
- ↓ 酢酸エチル層を合わせ脱水する

濃縮（溶媒除去）

- ↓ 残留物をアセトニトリル10 mLに溶解

グラファイトカーボンミニカラム（250 mg）及び

アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム（360 mg）精製

- | 各アセトニトリル10 mLでコンディショニング
- | グラファイトカーボンミニカラムの下部にアミノプロピルシリル化シリカゲルを連結
- | 全量注入
- ↓ アセトニトリル10 mLで溶出

濃縮（溶媒除去）

- ↓ 残留物をアセトニトリル及び0.1 vol%ギ酸（1：1）混液2 mLに溶解

試験溶液

↓

LC-MS/MS定量

4 μ L注入

8. マトリックス添加標準溶液の調製

1) 定量限界相当濃度（定量限界の推定用）

玄米、大豆、らっかせい、ほうれんそう、キャベツ、ばれいしょ、オレンジ、りんご及びぶどうはブランク試験溶液から0.5 mL分取し溶媒を除去した後、0.0005 mg/Lの標準溶液0.5 mLに溶解したものを、マトリックス添加標準溶液とした。

2) 添加回収試験における回収率 100%相当濃度（試料マトリックスの測定への影響用）

茶はブランク試験溶液から0.5 mL分取し溶媒を除去した後、0.0005 mg/Lの標準溶液0.5 mLに溶解したものを、玄米、大豆、らっかせい、ほうれんそう、ばれいしょ、オレンジ及びりんごはブランク試験溶液から0.5 mL分取し溶媒を除去した後、0.0025 mg/Lの標準溶液0.5 mLに溶解したものを、キャベツ及びぶどうはブランク試験溶液から0.5 mL分取し溶媒を除去した後、0.005 mg/Lの標準溶液0.5 mLに溶解したものをマトリックス添加標準溶液とした。

[結果及び考察]

1. 測定条件の検討

1) MS 条件の検討

メチオカルブ、代謝物D及び代謝物HはESI（+）モードでの測定が可能であった。

メチオカルブのESI（+）モード測定時のマススペクトルを図1に示した。その結果から、基準ピークとして226が得られたので、メチオカルブのプロトン付加分子（ m/z 226 $[M+H]^+$ ）をプリカーサーイオンとした。また、 m/z 226をプリカーサーイオンとした場合のプロダクトイオンスペクトルを図2に示した。 m/z 169及び m/z 121で同程度の強度が得られたが、 m/z 121はベースが乱れ、ノイズが大きくなることがあるため、より選択性に優れた m/z 169を定量用イオン、 m/z 121を定性用イオンとした。

代謝物DのESI（+）モード測定時のマススペクトルを図3に示した。その結果から、基準ピークとして242が得られたので、代謝物Dのプロトン付加分子（ m/z 242 $[M+H]^+$ ）をプリカーサーイオンとした。また、 m/z 242をプリカーサーイオンとした場合のプロダクトイオンスペクトルを図4に示した。強度として m/z 185のプロダクトイオンが強く、次いで m/z 122であったため、 m/z 185を定量用イオン、 m/z 122を定性用イオンとした。

代謝物HのESI（+）モード測定時のマススペクトルを図5に示した。その結果から、基準ピークとして258が得られたので、代謝物Hのプロトン付加分子（ m/z 258 $[M+H]^+$ ）をプリカーサーイオンとした。また、 m/z 258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6に示した。強度として m/z 122のプロダクトイオンが強く、次いで m/z 201であったが、 m/z 122はベースが乱れ、ノイズが大きくなることがあるため、より選択性に優れた m/z 201を定量用イオン、 m/z 122を定性用イオンとした。

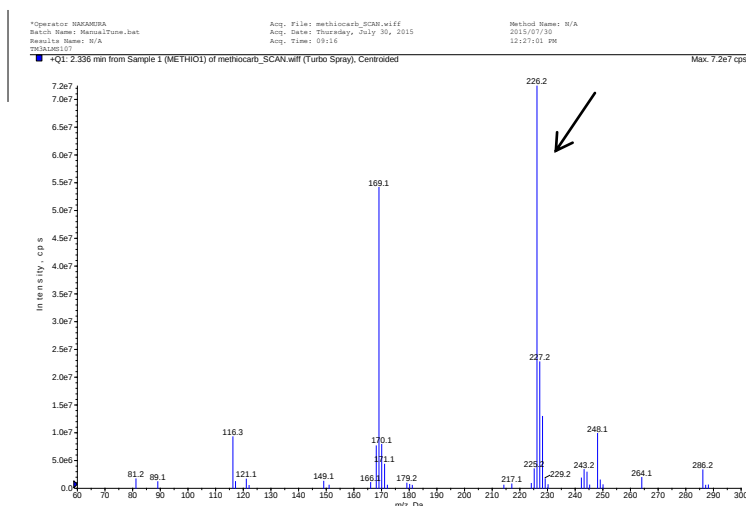


図 1 メチオカルブのマススペクトル

スキャン範囲：60～300 m/z

測定条件：ESI（+）、CV=21（CV：コーン電圧）

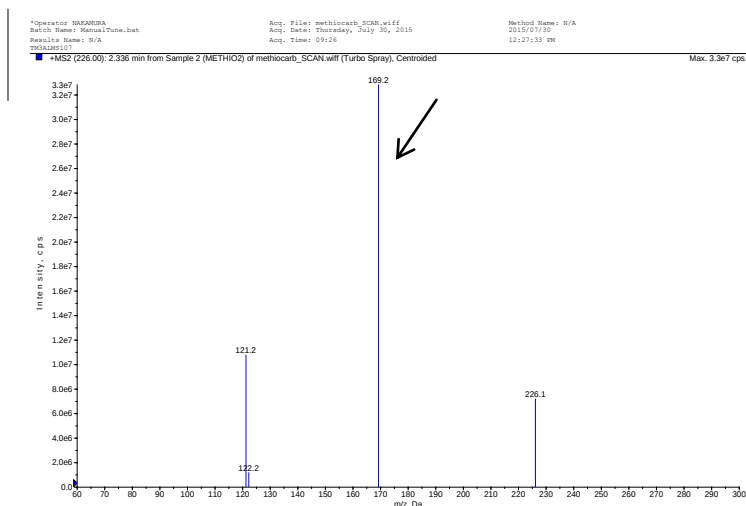


図 2-1 メチオカルブのプリカーサーイオン m/z 226 のプロダクトイオンスペクトル（定量用）

スキャン範囲：60～300 m/z

測定条件：ESI（+）、CV=21、CE=13（CV：コーン電圧、CE：コリジョンエネルギー）

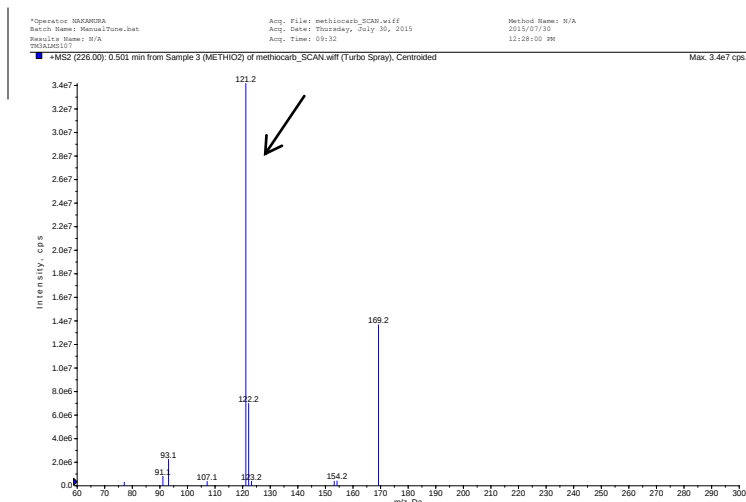


図 2-2 メチオカルブのプリカーサーイオン m/z 226 のプロダクトイオンスペクトル（定性用）

スキャン範囲：60～300 m/z

測定条件：ESI（+）、CV=21、CE=23（CV：コーン電圧、CE：コリジョンエネルギー）

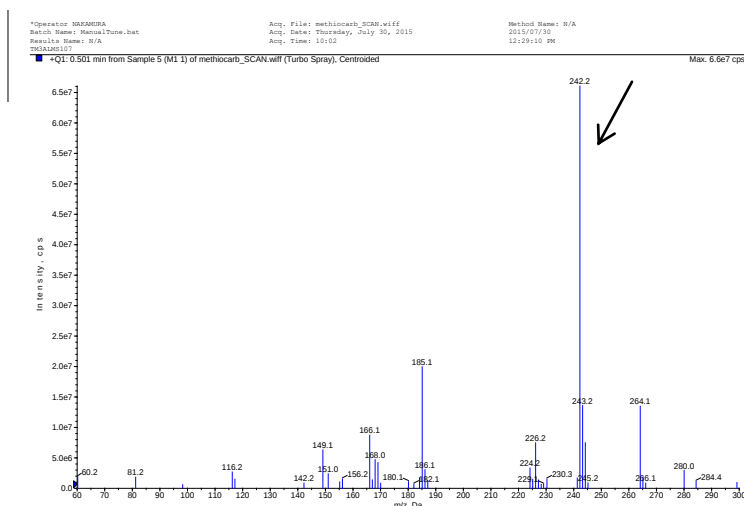


図3 代謝物Dのマススペクトル

スキャン範囲：60～300 m/z

測定条件：ESI (+)、CV=21 (CV：コーン電圧)

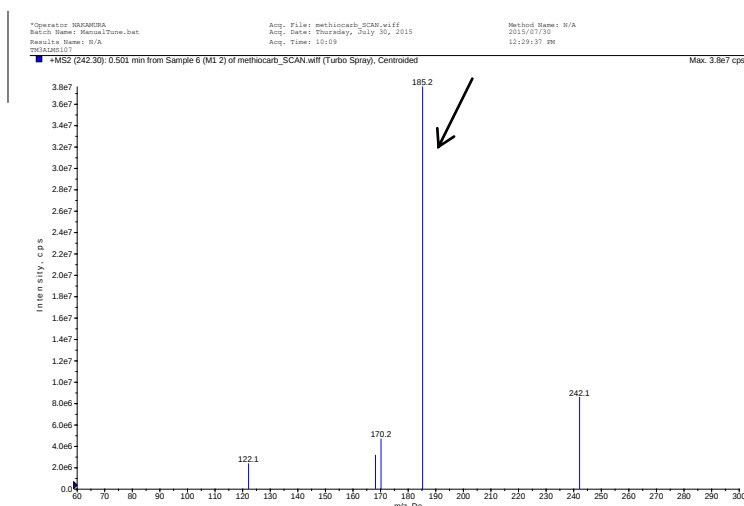


図4-1 代謝物Dのプリカーサイオン m/z 242のプロダクトイオンスペクトル (定量用)

スキャン範囲：60～300 m/z

測定条件：ESI (+)、CV=21、CE=17 (CV：コーン電圧、CE：コリジョンエネルギー)

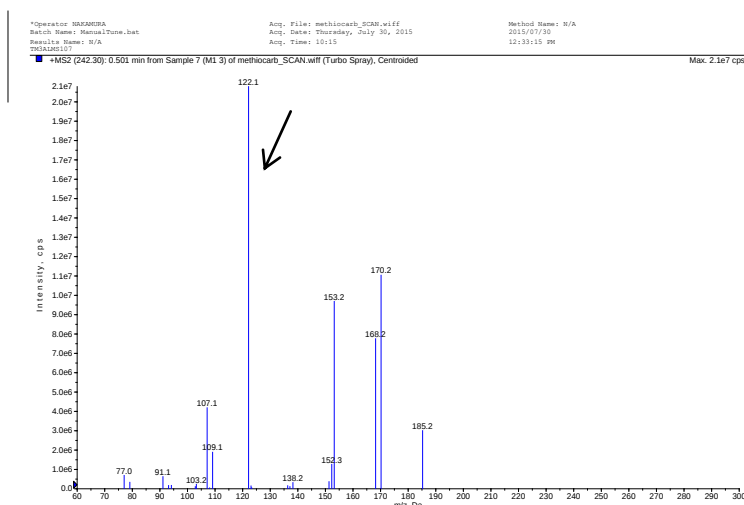


図4-2 代謝物Dのプリカーサイオン m/z 242のプロダクトイオンスペクトル (定性用)

スキャン範囲：60～300 m/z

測定条件：ESI (+)、CV=21、CE=39 (CV：コーン電圧、CE：コリジョンエネルギー)

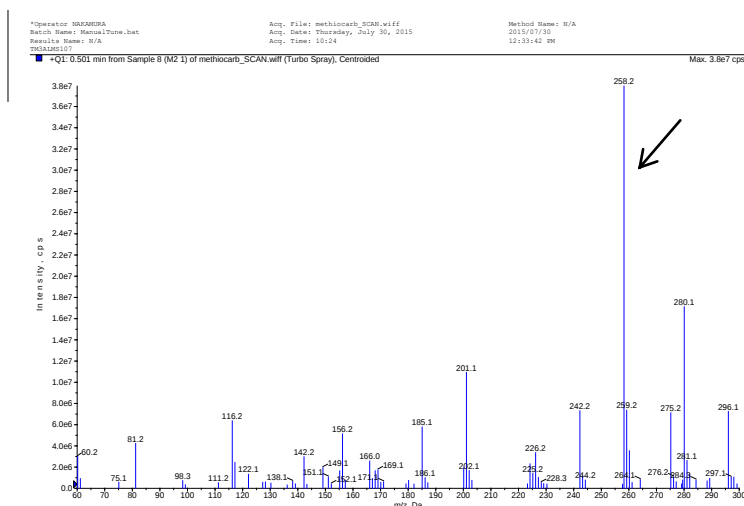


図5 代謝物 H のマスペクトル

スキャン範囲：60～300 m/z

測定条件：ESI (+)、CV=26 (CV：コーン電圧)

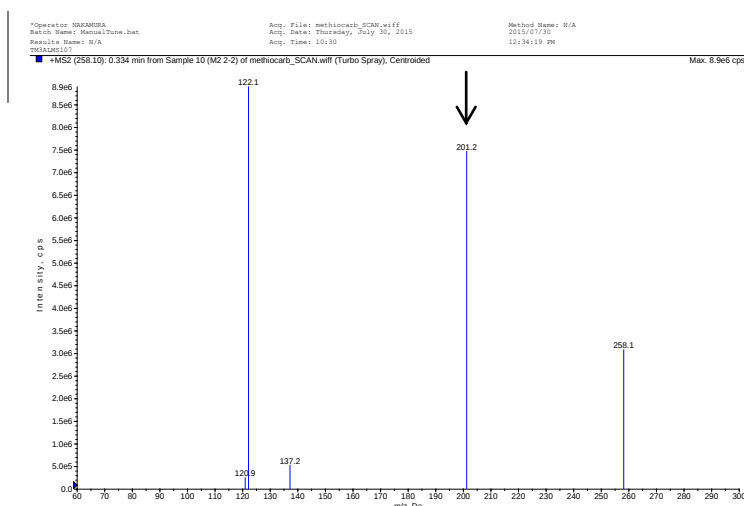


図6-1 代謝物 H のプリカーサイオン m/z 258 のプロダクトイオンスペクトル (定量用)

スキャン範囲：60～300 m/z

測定条件：ESI (+)、CV=26、CE=13 (CV：コーン電圧、CE：コリジョンエネルギー)

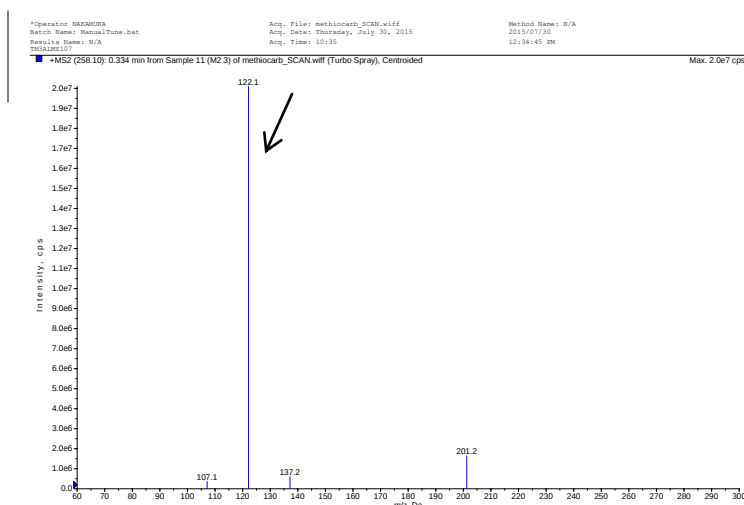


図6-2 代謝物 H のプリカーサイオン m/z 258 のプロダクトイオンスペクトル (定性用)

スキャン範囲：60～300 m/z

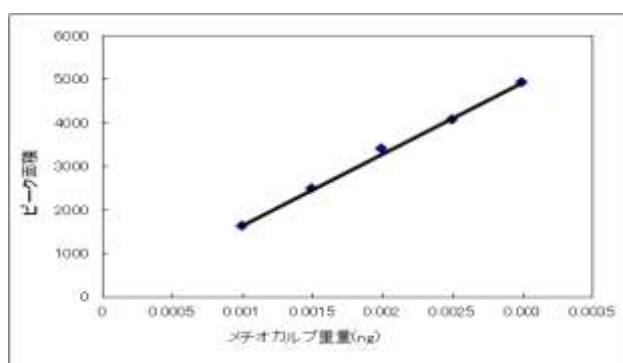
測定条件：ESI (+)、CV=26、CE=23 (CV：コーン電圧、CE：コリジョンエネルギー)

2) LC条件の検討

分離カラムについて、Mightysil RP-18 GP（内径 2.0 mm、長さ 150 mm、粒子径 5 μ m）を、移動相について、アセトニトリル及び 0.1 vol% ギ酸溶液を用いて検討を行ったところ、ピーク形状、分離、再現性及び感度のいずれも良好な結果が得られたので、分離カラムは Mightysil RP-18 GP（内径 2.0 mm、長さ 150 mm、粒子径 5 μ m）を、移動相はアセトニトリル及び 0.1 vol% ギ酸を用い、アセトニトリル及び 0.1 vol% ギ酸（1：9）から（7：3）までの濃度勾配を 10 分間で行い、（7：3）で 3 分間保持した後、（9：1）で 5 分間保持することとした。

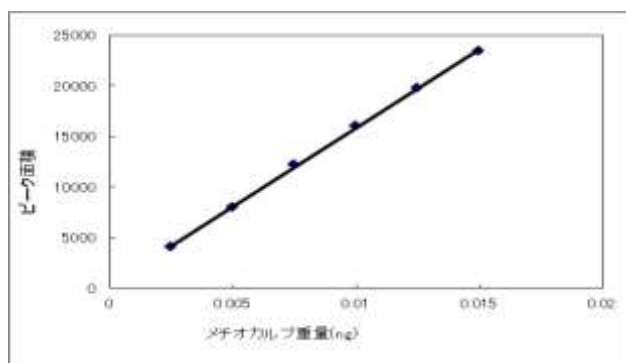
3) 検量線

図7にメチオカルブ、代謝物D及び代謝物Hの検量線の例を示した。0.00025 mg/L（0.001 ng）～0.00075 mg/L（0.003 ng）、0.000625 mg/L（0.0025 ng）～0.00375 mg/L（0.015 ng）及び0.00125 mg/L（0.005 ng）～0.0075 mg/L（0.03 ng）の濃度範囲で作成した検量線の決定係数は、いずれも0.995以上であり良好な直線性を示した。



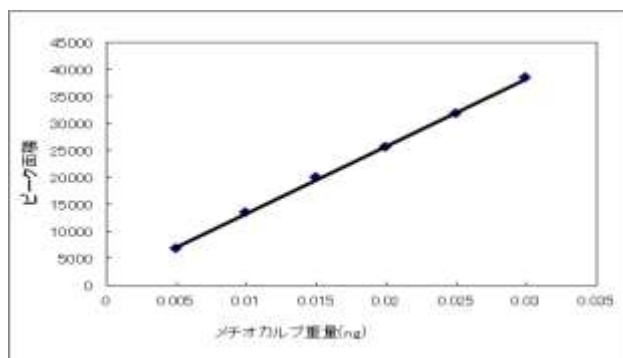
データ処理装置設定条件の一例
 解析ソフトウェア（メーカー）：Analyst
 （AB SCIEX製）
 ピークの定量方法：ピーク面積法
 検量線の種類：最小二乗法
 検量線基準ピークの重量：0.001 ng～0.003 ng
 $y = 1636668x + 10.144$
 $R^2 = 0.9979$

図 7-1 メチオカルブ検量線例 1（ m/z 226→169）



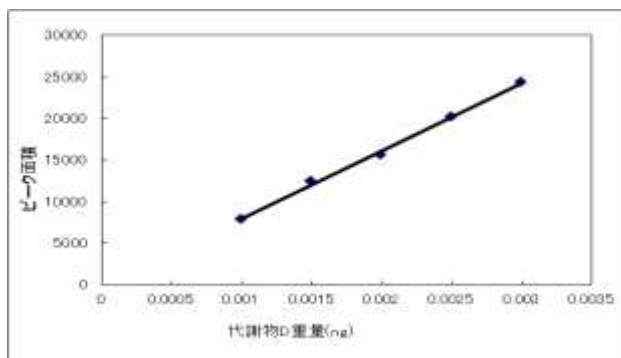
データ処理装置設定条件の一例
 解析ソフトウェア（メーカー）：Analyst
 （AB SCIEX製）
 ピークの定量方法：ピーク面積法
 検量線の種類：最小二乗法
 検量線基準ピークの重量：0.0025 ng～0.015 ng
 $y = 1551646x + 345.17$
 $R^2 = 0.9994$

図 7-2 メチオカルブ検量線例 2（ m/z 226→169）



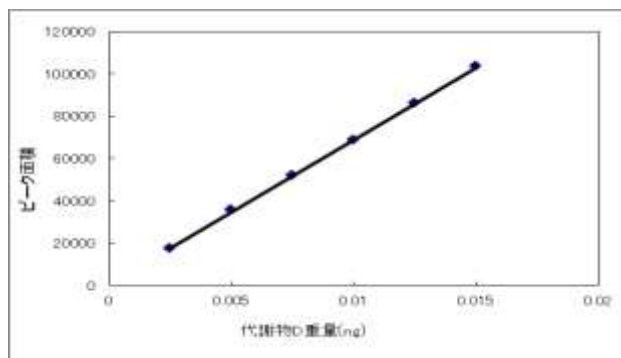
データ処理装置設定条件の一例
 解析ソフトウェア（メーカー）：Analyst
 （AB SCIEX製）
 ピークの定量方法：ピーク面積法
 検量線の種類：最小二乗法
 検量線基準ピークの重量：0.005 ng～0.03 ng
 $y = 1250198x + 841.37$
 $R^2 = 0.9995$

図7-3 メチオカルブ検量線例3（ m/z 226→169）



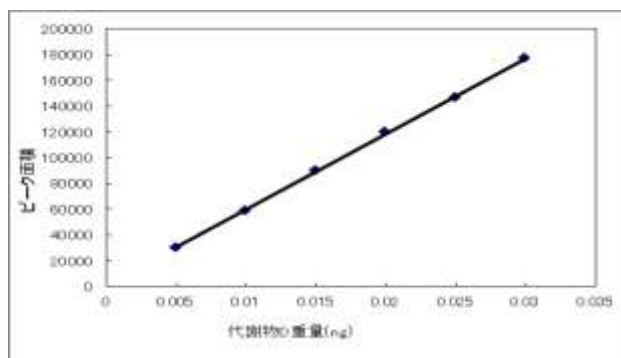
データ処理装置設定条件の一例
 解析ソフトウェア（メーカー）：Analyst
 （AB SCIEX製）
 ピークの定量方法：ピーク面積法
 検量線の種類：最小二乗法
 検量線基準ピークの重量：0.001 ng～0.003 ng
 $y=8136964x-167.78$
 $R^2=0.9971$

図 7-4 代謝物 D 検量線例 1 (m/z 242→185)



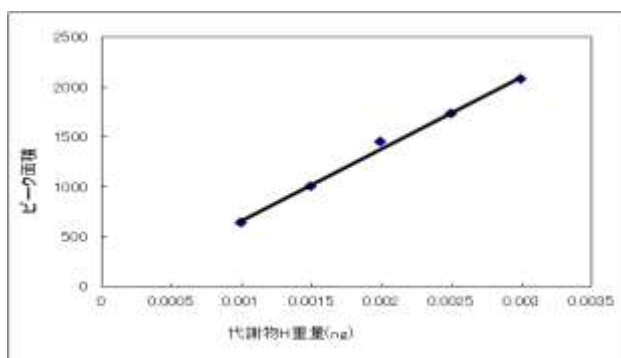
データ処理装置設定条件の一例
 解析ソフトウェア（メーカー）：Analyst
 （AB SCIEX製）
 ピークの定量方法：ピーク面積法
 検量線の種類：最小二乗法
 検量線基準ピークの重量：0.0025 ng～0.015 ng
 $y=6830886x+737.37$
 $R^2=0.9998$

図 7-5 代謝物 D 検量線例 2 (m/z 242→185)



データ処理装置設定条件の一例
 解析ソフトウェア（メーカー）：Analyst
 （AB SCIEX製）
 ピークの定量方法：ピーク面積法
 検量線の種類：最小二乗法
 検量線基準ピークの重量：0.005 ng～0.03 ng
 $y=5885736x+775.59$
 $R^2=0.9996$

図7-6 代謝物D検量線例3 (m/z 242→185)



データ処理装置設定条件の一例
 解析ソフトウェア（メーカー）：Analyst
 （AB SCIEX製）
 ピークの定量方法：ピーク面積法
 検量線の種類：最小二乗法
 検量線基準ピークの重量：0.001 ng～0.003 ng
 $y=721288.8x-60.842$
 $R^2=0.9951$

図 7-7 代謝物 H 検量線例 1 (m/z 258→201)

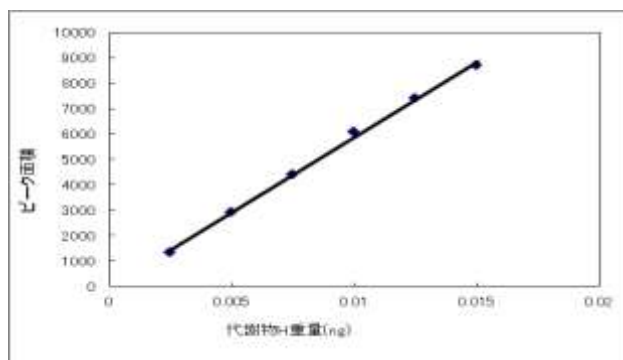


図 7-8 代謝物 H 検量線例 2 (m/z 258→201)

データ処理装置設定条件の一例
 解析ソフトウェア（メーカー）：Analyst
 （AB SCIEX製）
 ピークの定量方法：ピーク面積法
 検量線の種類：最小二乗法
 検量線基準ピークの重量：0.0025 ng～0.015 ng
 $y=591461.4x-36.185$
 $R^2=0.9982$

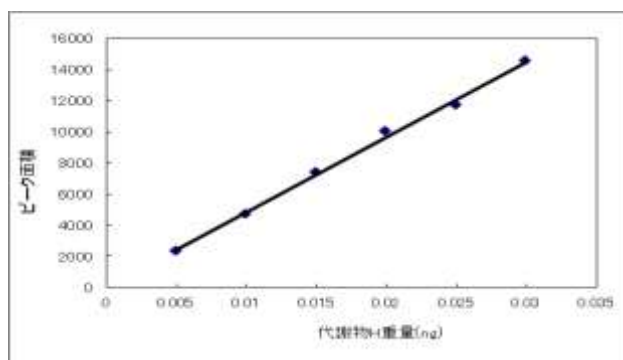


図7-9 代謝物H検量線例3 (m/z 258→201)

データ処理装置設定条件の一例
 解析ソフトウェア（メーカー）：Analyst
 （AB SCIEX製）
 ピークの定量方法：ピーク面積法
 検量線の種類：最小二乗法
 検量線基準ピークの重量：0.005 ng～0.03 ng
 $y=483748.8x-14.274$
 $R^2=0.9970$

4) 定量限界

定量限界の算出結果を以下に示した。

メチオカルブの定量限界

$$0.01 \text{ mg/kg} \left[(2 \text{ mL}/0.1 \text{ g}^{*1}) \times (0.002 \text{ ng}/4 \text{ } \mu\text{L}) \right]$$

代謝物Dのメチオカルブとしての定量限界

$$0.01 \text{ mg/kg} > 0.0093 \text{ mg/kg} \left[(2 \text{ mL}/0.1 \text{ g}^{*1}) \times (0.002 \text{ ng}/4 \text{ } \mu\text{L}) \times 0.9336^{*2} \right]$$

代謝物Hのメチオカルブとしての定量限界

$$0.01 \text{ mg/kg} > 0.0088 \text{ mg/kg} \left[(2 \text{ mL}/0.1 \text{ g}^{*1}) \times (0.002 \text{ ng}/4 \text{ } \mu\text{L}) \times 0.8756^{*3} \right]$$

*¹ 10.0 g×2 mL/200 mL（穀類、豆類及び種実類の場合）

20.0 g×1 mL/200 mL（果実及び野菜の場合）

5.00 g×4 mL/200 mL（茶の場合）

*² メチオカルブの分子量225.31/代謝物Dの分子量241.31

*³ メチオカルブの分子量225.31/代謝物Hの分子量257.31

2. 試験溶液調製法の検討

1) 抽出方法の検討

現通知試験法では試料にアセトンを加えた後、ジクロロメタン及びヘキサン（1：1）混液及び塩化ナトリウムを加え、有機溶媒層に抽出を行っている。当試験法ではジクロロメタンを使用せず、アセトン抽出とした。

2) 転溶溶媒の検討

現通知試験法で有機溶媒層への抽出に使用しているジクロロメタンを使用せず、酢酸エチルへの転溶が可能か検討した。メチオカルブ及び代謝物各0.01 μg を、10 w/v%塩化ナトリウム100 mLに別々に添加し、酢酸エチルで3回振とう抽出を行った結果を表1-1～3に示した。その結果、メチオカルブ添加

時に転溶操作中にメチオカルブが6%程度代謝物Dへ変換していることが判明した。代謝物D及び代謝物Hの分解及び変換はみられなかった。

次に、各成分0.01 µgを、10 w/v%塩化ナトリウム100 mLに別々に添加し、0.1 vol%となるようにギ酸を加えて酸性（pH2）にした後、酢酸エチルで3回振とう抽出を行った結果を表2-1～3に示した。ギ酸酸性下ではメチオカルブ、代謝物D及び代謝物Hはいずれも分解及び変換はみられず、2回の抽出でいずれの成分もほぼ抽出できた。次に、ギ酸濃度を0.01 vol%または1 vol%にして酢酸エチルで3回振とう抽出を行った結果を表3及び4に示した。ギ酸濃度を変えてもメチオカルブ及び代謝物の転溶率に差はみられなかった。酸性下で転溶することによってメチオカルブの代謝物Dへの変換が抑えられたため、他の酸を用いて酸性下で転溶操作を行う検討を行った。メチオカルブ及び代謝物各0.01 µgを、10 w/v%塩化ナトリウム100 mLに添加し、それぞれ塩酸酸性下（pH<1）、リン酸酸性下（pH<1）で酢酸エチルで3回振とう抽出を行った結果を表5及び6に示した。塩酸酸性下及びリン酸酸性下ではいずれもメチオカルブの転溶率が低く、一部が代謝物に変換していることが判明した。以上から、転溶操作は10 w/v%塩化ナトリウム100 mLに0.1 vol%となるようギ酸を加え、酢酸エチルで2回抽出することとした。なお、採用したギ酸濃度は0.01 vol%で問題ないことが確認されたが、十分量として0.1 vol%とした。

表 1-1 酢酸エチルへの転溶率（メチオカルブ添加）（%）

	100 mL (1 回目)	50 mL (2 回目)	50 mL (3 回目)	合計
メチオカルブ添加	102	0	0	102
代謝物 D 換算	6*	0	0	6
代謝物 H 換算	0	0	0	0

* 代謝物D検出量に換算係数0.9337を乗じて算出

添加量：0.01 µg

表 1-2 酢酸エチルへの転溶率（代謝物 D 添加）（%）

	100 mL (1 回目)	50 mL (2 回目)	50 mL (3 回目)	合計
メチオカルブ換算	0	0	0	0
代謝物 D 添加	92	11	2	105
代謝物 H 換算	0	0	0	0

添加量：0.01 µg

表 1-3 酢酸エチルへの転溶率（代謝物 H 添加）（%）

	100 mL (1 回目)	50 mL (2 回目)	50 mL (3 回目)	合計
メチオカルブ換算	0	0	0	0
代謝物 D 換算	0	0	0	0
代謝物 H 添加	103	6	0	109

添加量：0.01 µg

表 2-1 0.1 vol%ギ酸酸性下での酢酸エチルへの転溶率（メチオカルブ添加）（%）

	100 mL (1 回目)	50 mL (2 回目)	50 mL (3 回目)	合計
メチオカルブ添加	97	10	0	107
代謝物 D 換算	0	0	0	0
代謝物 H 換算	0	0	0	0

添加量：0.01 µg

表 2-2 0.1 vol%ギ酸酸性下での酢酸エチルへの転溶率（代謝物 D 添加）（%）

	100 mL (1 回目)	50 mL (2 回目)	50 mL (3 回目)	合計
メチオカルブ換算	0	0	0	0
代謝物 D 添加	84	13	2	99
代謝物 H 換算	0	0	0	0

添加量：0.01 µg

表 2-3 0.1 vol%ギ酸酸性下での酢酸エチルへの転溶率（代謝物 H 添加）（%）

	100 mL (1 回目)	50 mL (2 回目)	50 mL (3 回目)	合計
メチオカルブ換算	0	0	0	0
代謝物 D 換算	0	0	0	0
代謝物 H 添加	92	5	0	97

添加量：0.01 µg

表 3 0.01 vol%相当ギ酸酸性下での酢酸エチルへの転溶率（%）

	100 mL (1 回目)	50 mL (2 回目)	50 mL (3 回目)	合計
メチオカルブ添加	98	8	0	106
代謝物 D 添加	91	12	2	105
代謝物 H 添加	90	10	0	100

添加量：各0.01 µg

表 4 1 vol%相当ギ酸酸性下での酢酸エチルへの転溶率（%）

	100 mL (1 回目)	50 mL (2 回目)	50 mL (3 回目)	合計
メチオカルブ添加	97	7	0	104
代謝物 D 添加	89	12	1	102
代謝物 H 添加	95	9	0	104

添加量：各0.01 µg

表 5-1 塩酸酸性下での酢酸エチルへの転溶率（メチオカルブ添加）（%）

	100 mL (1 回目)	50 mL (2 回目)	50 mL (3 回目)	合計
メチオカルブ添加	78	0	0	78
代謝物 D 換算	12*	0	0	12
代謝物 H 換算	0	0	0	0

* 代謝物D検出量に換算係数0.9337を乗じて算出

添加量：0.01 µg

表 5-2 塩酸酸性下での酢酸エチルへの転溶率（代謝物 D 添加）（%）

	100 mL (1 回目)	50 mL (2 回目)	50 mL (3 回目)	合計
メチオカルブ換算	0	0	0	0
代謝物 D 添加	74	12	1	87
代謝物 H 換算	0	0	0	0

添加量：0.01 µg

表 5-3 塩酸酸性下での酢酸エチルへの転溶率（代謝物 H 添加）（％）

	100 mL (1 回目)	50 mL (2 回目)	50 mL (3 回目)	合計
メチオカルブ換算	0	0	0	0
代謝物 D 換算	0	0	0	0
代謝物 H 添加	80	0	0	80

添加量：0.01 µg

表6-1 リン酸酸性下での酢酸エチルへの転溶率（メチオカルブ添加）（％）

	100 mL (1 回目)	50 mL (2 回目)	50 mL (3 回目)	合計
メチオカルブ添加	0	0	0	0
代謝物 D 換算	60 ^{*1}	3 ^{*1}	0	63
代謝物 H 換算	9 ^{*2}	1 ^{*2}	0	10

*1 代謝物D検出量に換算係数0.9337を乗じて算出

*2 代謝物H検出量に換算係数0.8757を乗じて算出

添加量：0.01 µg

表 6-2 リン酸酸性下での酢酸エチルへの転溶率（代謝物 D 添加）（％）

	100 mL (1 回目)	50 mL (2 回目)	50 mL (3 回目)	合計
メチオカルブ換算	0	0	0	0
代謝物 D 添加	77	13	1	91
代謝物 H 換算	0	0	0	0

添加量：0.01 µg

表 6-3 リン酸酸性下での酢酸エチルへの転溶率（代謝物 H 添加）（％）

	100 mL (1 回目)	50 mL (2 回目)	50 mL (3 回目)	合計
メチオカルブ換算	0	0	0	0
代謝物 D 換算	0	0	0	0
代謝物 H 添加	91	3	0	94

添加量：0.01 µg

3) カラム精製の検討

① グラファイトカーボンミニカラムによる精製

試料の色素除去を目的として、グラファイトカーボンミニカラムでの精製を検討した。カラムをアセトニトリル10 mLで予備洗浄した後メチオカルブ及び代謝物各0.01 µgを添加したアセトニトリル10 mLを負荷し、アセトニトリル10 mLずつで2回溶出したときの溶出状況を表7に示した。メチオカルブ及び代謝物はいずれもグラファイトカーボンミニカラムからアセトニトリル20 mLで溶出できた。

表 7 グラファイトカーボンミニカラムからの溶出率（％）

溶出量	アセトニトリル			合計
	0-10 mL	10-20 mL	20-30 mL	
メチオカルブ添加	64	33	0	97
代謝物 D 添加	79	27	0	106
代謝物 H 添加	63	38	0	101

Supelclean Envi-carb（充てん量250 mg、シグマアルドリッチ製）

添加量：各0.01 µg

②アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムによる精製

試料の脂肪酸、有機酸除去を目的として、アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムでの精製を検討した。カラムをアセトニトリル10 mLで予備洗浄した後メチオカルブ及び代謝物各0.01 µgを添加し、アセトニトリルで負荷、溶出したときの溶出状況を表8に示した。メチオカルブ及び代謝物はいずれもアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムからアセトニトリル20 mLで溶出できた。また、エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムでの精製が可能かも検討した。カラムをアセトニトリル10 mLで予備洗浄した後メチオカルブ及び代謝物各0.01 µgを添加し、アセトニトリルで負荷、溶出したときの溶出状況を表9-1及び2に示した。アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムと比較して代謝物Hの溶出率が落ちることが確認され、メーカーによって溶出率にも差がみられたため、アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムを使用することとした。

表 8 アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムからの溶出率 (%)

溶出量	アセトニトリル			合計
	0-10 mL	10-20 mL	20-30 mL	
メチオカルブ添加	87	13	0	100
代謝物 D 添加	90	14	0	104
代謝物 H 添加	86	10	0	96

Sep-pak plus NH₂ (充てん量360 mg、Waters製)

添加量：各0.01 µg

表 9-1 エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムからの溶出率 (%)

溶出量	アセトニトリル			合計
	0-10 mL	10-20 mL	20-30 mL	
メチオカルブ添加	90	11	0	101
代謝物 D 添加	94	8	0	102
代謝物 H 添加	82	6	0	88

Bond Elut PSA (充てん量500 mg、Agilent Technologies製)

添加量：各 0.01 µg

表 9-2 エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムからの溶出率 (%)

溶出量	アセトニトリル			合計
	0-10 mL	10-20 mL	20-30 mL	
メチオカルブ添加	99	15	0	114
代謝物 D 添加	84	15	0	99
代謝物 H 添加	51	7	0	58

InertSep Slim-J PSA (充てん量500 mg、ジーエルサイエンス製)

添加量：各0.01 µg

③グラファイトカーボン/アミノプロピルシリル化シリカゲル連結ミニカラムによる精製

①及び②より、メチオカルブ及び代謝物がいずれもグラファイトカーボンミニカラム及びアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムからアセトニトリル20 mLで溶出できたことから、ミニカラムを連結しての精製が可能か検討した。各カラムをアセトニトリル10 mLで予備洗浄した後、グラファイトカーボンミニカラムの下部にアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムを連結し、メチオカルブ及び代謝物を0.01 µgを添加し、アセトニトリルで負荷、溶出したときの溶出状況を表10に示した。カラムを連結した条件でメチオカルブ及び代謝物はいずれもアセトニトリル20 mLで溶出できたことから、グラファイトカーボンミニカラムの下部にアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムを連結し、アセトニトリル20 mLで溶出することとした。なお、グラファイトカーボン及びアミノプロピ

ルシリル化シリカゲル連結ミニカラム精製時、途中でカラムを乾燥させると代謝物Hの溶出率が落ちることがあるため、途中カラムを乾燥させないように注意する必要であった。

表 10 グラファイトカーボンミニカラム及びアミノプロピルシリル化シリカゲル連結ミニカラムからの溶出率 (%)

溶出量	アセトニトリル			合計
	0-10 mL	10-20 mL	20-30 mL	
メチオカルブ添加	56	44	0	100
代謝物 D 添加	68	37	0	105
代謝物 H 添加	54	38	0	92

Supelclean Envi-carb (充てん量250 mg、シグマアルドリッチ製)

Sep-pak plus NH₂ (充てん量360 mg、Waters製)

添加量：各0.01 µg

4) 濃縮操作の検討

メチオカルブ、代謝物D及び代謝物Hは過剰な濃縮操作による回収率の低下があるか検討した。

メチオカルブ、代謝物D及び代謝物H各0.01 µgを酢酸エチルに溶解し、40℃以下で減圧濃縮し液がなくなった後、さらに10分間減圧濃縮をし、アセトニトリル及び0.1 vol%ギ酸 (1 : 1) 混液で2 mLに溶解したときの回収率を表11に示した。過酷な濃縮操作によってメチオカルブ及び代謝物の回収率が低下することが確認された。キーパーとして、2 vol%ジエチレングリコール含有アセトン溶液0.5 mLを添加して同様に濃縮操作を行っても回収率の改善はみられなかった。乾固せず40℃以下で約1 mLに濃縮し、更に窒素を吹き付けて溶媒を除去すれば回収率の低下はみられなかったため、濃縮操作は乾固しないよう注意して行うこととした。

表 11 濃縮操作時の乾固の有無による各成分の回収率 (%)

	乾固なし	乾固あり	
		キーパー無	キーパー有
メチオカルブ	96	24	26
代謝物 D	99	27	25
代謝物 H	95	27	24

5) 検量線作成用標準溶液の安定性について

メチオカルブ及び代謝物の標準原液及び検量線作成用標準溶液の安定性について調査した。標準原液及び添加回収試験で使用するアセトン溶液中ではメチオカルブ及び代謝物はいずれも安定であった。次に、検量線作成用標準溶液として各標準溶液0.05 mg/L相当をアセトニトリル及び水 (1 : 1) 混液に溶解し、4及び8日間冷蔵保存したところ、代謝物D及び代謝物Hで分解がみられた。標準溶液の希釈溶媒であるアセトニトリル及び水 (1 : 1) 混液にギ酸を加えて調製したところ、代謝物は冷蔵8日間安定であり、ギ酸濃度の違いによって感度や安定性に差はみられなかった。表12に、アセトニトリル及び0.1 vol%ギ酸 (1 : 1) 混液で調製した直後の0.05 mg/L標準溶液の面積値を100%とした各成分の残存率について示した。

次に、実際に試験で使用する濃度での短期間での安定性について調査した。表13に、各標準溶液0.05 mg/L相当をアセトニトリル及び水 (1 : 1) 混液に溶解し、アセトニトリル及び0.1 vol%ギ酸 (1 : 1) 混液で調製した0.005 mg/L標準溶液の面積値を100%とした各成分の残存率について示した。低濃度域では、17時間後までに代謝物Hが半減したため、ギ酸添加は必要と判断し、検量線作成用標準溶液はアセトン溶液で保存しておいた標準原液からアセトニトリル及び0.1 vol%ギ酸 (1 : 1) 混液で用時調製をして使用することとした。

表 12 0.05 mg/L 標準溶液中での各成分の残存率 (%)

	調製溶媒				
	アセトニトリル 及び水 (1 : 1)		アセトニトリル 及び 0.01 vol% ギ酸 (1 : 1)	アセトニトリル 及び 0.1 vol% ギ酸 (1 : 1)	アセトニトリル 及び 1 vol% ギ酸 (1 : 1)
保存日数	4	8	8	8	8
メチオカルブ	88	93	101	100	101
代謝物 D	84	66	101	99	99
代謝物 H	59	4	100	100	100

表 13 アセトニトリル及び水 (1 : 1) 溶液で調製した 0.005 mg/L 標準溶液中での各成分の残存率 (%)

	保存時間 (h)				
	1	5	9	13	17
メチオカルブ	—	—	—	—	101
代謝物 D	—	—	—	—	96
代謝物 H	103	84	78	57	50

3. 添加回収試験

玄米、大豆、らっかせい、ばれいしょ、ほうれんそう、キャベツ、オレンジ、りんご、茶及びぶどうの10食品を用いて、〔実験方法〕7. 試験溶液の調製に従って添加回収試験を実施した。

添加回収試験における回収率100%相当の溶媒標準溶液、各食品のブランク試料及び添加試料の代表的なクロマトグラムを図8、10及び12に示した。また、各食品のブランク試料のスキャン測定による代表的なトータルイオンクロマトグラムを図14に示した。

1) 選択性

選択性の結果を表14に示した。検討した何れの試料においてもメチオカルブ及び代謝物の定量を妨害するようなピークは認められず、選択性は良好であった。

表14 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 ¹⁾ (ppm)	添加濃度 ²⁾ (ppm)	妨害ピークの許容範囲		ピーク面積(高さ) ³⁾				選択性の 評価 ⁵⁾	備 考	
						評価対象濃度 (ppm)	判定基準	面積又は 高さの別	ブランク試料 (a)	標準溶液 ⁴⁾ (b)	面積(高さ) 比 (a)/(b)			
1	メチオカルブ	玄米	0.01	0.05	0.05	基準値	0.05	< 0.100	面積	0	12746	0.000	○	
		大豆	0.01	0.05	0.05	基準値	0.05	< 0.100	面積	0	14361	0.000	○	
		らっかせい	0.01	0.05	0.05	基準値	0.05	< 0.100	面積	0	12746	0.000	○	
		ほうれんそう	0.01	0.05	0.05	基準値	0.05	< 0.100	面積	0	13195	0.000	○	
		キャベツ	0.01	0.1	0.1	基準値	0.1	< 0.100	面積	0	25626	0.000	○	
		ばれいしょ	0.01	0.05	0.05	基準値	0.05	< 0.100	面積	0	13195	0.000	○	
		オレンジ	0.01	0.05	0.05	基準値	0.05	< 0.100	面積	0	13708	0.000	○	
		りんご	0.01	0.05	0.05	基準値	0.05	< 0.100	面積	0	13708	0.000	○	
		茶	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	3385	0.000	○	
		ぶどう	0.01	0.1	0.1	基準値	0.1	< 0.100	面積	0	24731	0.000	○	
		玄米	0.01	0.05	0.05	基準値	0.05	< 0.100	面積	0	60300	0.000	○	
		大豆	0.01	0.05	0.05	基準値	0.05	< 0.100	面積	0	54860	0.000	○	
2	代謝物D	らっかせい	0.01	0.05	0.05	基準値	0.05	< 0.100	面積	0	60300	0.000	○	
		ほうれんそう	0.01	0.05	0.05	基準値	0.05	< 0.100	面積	0	57125	0.000	○	
		キャベツ	0.01	0.1	0.1	基準値	0.1	< 0.100	面積	0	120235	0.000	○	
		ばれいしょ	0.01	0.05	0.05	基準値	0.05	< 0.100	面積	0	57125	0.000	○	
		オレンジ	0.01	0.05	0.05	基準値	0.05	< 0.100	面積	0	71493	0.000	○	
		りんご	0.01	0.05	0.05	基準値	0.05	< 0.100	面積	0	71493	0.000	○	
		茶	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	15594	0.000	○	
		ぶどう	0.01	0.1	0.1	基準値	0.1	< 0.100	面積	0	126732	0.000	○	
		玄米	0.01	0.05	0.05	基準値	0.05	< 0.100	面積	0	4541	0.000	○	
		大豆	0.01	0.05	0.05	基準値	0.05	< 0.100	面積	0	4697	0.000	○	
		らっかせい	0.01	0.05	0.05	基準値	0.05	< 0.100	面積	0	4541	0.000	○	
		ほうれんそう	0.01	0.05	0.05	基準値	0.05	< 0.100	面積	0	5048	0.000	○	
3	代謝物H	キャベツ	0.01	0.1	0.1	基準値	0.1	< 0.100	面積	0	10019	0.000	○	
		ばれいしょ	0.01	0.05	0.05	基準値	0.05	< 0.100	面積	0	5048	0.000	○	
		オレンジ	0.01	0.05	0.05	基準値	0.05	< 0.100	面積	0	5225	0.000	○	
		りんご	0.01	0.05	0.05	基準値	0.05	< 0.100	面積	0	5225	0.000	○	
		茶	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	1452	0.000	○	
		ぶどう	0.01	0.1	0.1	基準値	0.1	< 0.100	面積	0	9953	0.000	○	
		*1 基準値は、基準値未設定の場合には一律基準(0.01 ppm)を用いる。												
		2 添加濃度と評価対象濃度の異なる場合(定量限界と基準値との関係が、『定量限界<基準値×3』となる場合には、『』が表示される。『*』が表示された分析対象化合物は、添加濃度と評価対象濃度が異なるため、別途、定量限界濃度相当のマトリックス添加標準溶液を調製して評価する。												
		*3 ブランク試料及び標準溶液の順に測定した結果から評価する。(必要に応じて起爆注入を行う。)												
		*4 試料中の濃度が「評価対象濃度(基準値濃度又は定量限界濃度)」相当になるように、ブランク試料の試験溶液で調製した標準溶液(マトリックス添加標準溶液)を用いる。ブランク試料に妨害ピークが観察されなかった場合には、標準溶液のピーク面積(高さ)は求めなくても良い。												
		*5 面積(高さ)比が、妨害ピークの許容範囲の判定基準に適合する場合には「○」、適合しない場合には「×」を記載する。												

*1 基準値は、基準値未設定の場合には一律基準(0.01 ppm)を用いる。

2 添加濃度と評価対象濃度が異なる場合(定量限界と基準値との関係が、「定量限界<基準値<定量限界×3」となる場合)には、『』が表示される。『*』が表示された分析対象化合物は、添加濃度と評価対象濃度が異なるため、別途、定量限界濃度相当のマトリックス添加標準溶液を調製して評価する。

*3 ブランク試料及び標準溶液の順に測定した結果から評価する。(必要に応じて起爆注入を行う。)

*4 試料中の濃度が「評価対象濃度(基準値濃度又は定量限界濃度)」相当になるように、ブランク試料の試験溶液で調製した標準溶液(マトリックス添加標準溶液)を用いる。ブランク試料に妨害ピークが観察されなかった場合には、標準溶液のピーク面積(高さ)は求めなくても良い。

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

2) 真度、精度及び定量限界

真度及び併行精度の検討結果を表15に示した。メチオカルブの真度は88～103%、併行精度は2～8%であり、目標値を十分に満たした。代謝物Dの真度は88～97%、併行精度は1～10%であり、目標値を十分に満たした。代謝物Hの真度は79～94%、併行精度は1～7%であり、目標値を十分に満たした。茶については、S/N比の平均値はメチオカルブ70、代謝物D 229、代謝物H 40でありS/N $\geq$ 10を十分に満たした。

添加濃度が定量限界濃度と異なる試料について、定量限界の推定を行った結果を表16に示した。また、定量限界の推定における代表的なクロマトグラムを図9、11及び13に示した。S/N比の平均値はメチオカルブ35～105、代謝物D 141～350、代謝物H 18～51でありS/N $\geq$ 10を十分に満たした。

表15 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 ¹⁾ (ppm)	添加濃度 (ppm)	定量限界 の評価 ²⁾	検量線		回収率(%)					真度 (%)	併行精度 (RSD%)	S/N比 ³⁾			備 考
							傾き	切片	r ² 値	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5		Max.	Min.	平均値	
1	メチオカルブ	玄米	0.01	0.05	0.05	*	1551646	345	0.9994	99.7	102.0	93.6	94.5	83.8	94.7	—	—	#DIV/0!	
		大豆	0.01	0.05	0.05	*	1407264	137	0.9995	91.0	83.7	87.9	90.6	87.2	88.1	3.4	—	#DIV/0!	
		らっかせい	0.01	0.05	0.05	*	1551646	345	0.9994	95.7	94.6	90.6	94.2	88.8	92.8	3.2	—	#DIV/0!	
		ほうれんそう	0.01	0.05	0.05	*	1301350	66	0.9991	92.1	97.6	90.4	101.0	98.7	96.0	4.7	—	#DIV/0!	
		キャベツ	0.01	0.1	0.1	*	1250198	841	0.9995	92.9	92.8	89.2	94.6	90.4	92.0	2.3	—	#DIV/0!	
		ばれいしょ	0.01	0.05	0.05	*	1301350	66	0.9991	88.7	91.5	93.6	91.6	99.0	92.9	4.1	—	#DIV/0!	
		オレンジ	0.01	0.05	0.05	*	1470720	-565	0.9989	87.0	87.4	90.9	92.9	94.3	90.5	3.6	—	#DIV/0!	
		りんご	0.01	0.05	0.05	*	1470720	-565	0.9989	86.7	91.1	95.6	97.3	94.6	93.1	4.5	—	#DIV/0!	
		茶	0.01	0.01	0.01	*	1636668	10	0.9979	91.2	96.5	113.0	106.0	106.0	102.5	8.4	100.1	39.0	69.5
		ぶどう	0.01	0.1	0.1	*	1204746	266	0.9993	97.8	98.4	100.0	101.0	97.7	99.0	1.5	—	#DIV/0!	
		玄米	0.01	0.05	0.05	*	6830886	737	0.9998	95.4	92.5	86.9	92.8	84.1	90.3	5.2	—	#DIV/0!	
		大豆	0.01	0.05	0.05	*	5957549	234	0.9992	91.2	86.9	87.3	89.1	93.1	89.5	2.9	—	#DIV/0!	
		らっかせい	0.01	0.05	0.05	*	6830886	737	0.9998	93.3	90.6	85.7	83.7	87.6	88.2	4.3	—	#DIV/0!	
2	代謝物D	ほうれんそう	0.01	0.05	0.05	*	5871293	-96	0.9990	96.5	95.7	95.1	93.9	99.2	96.1	2.1	—	#DIV/0!	
		キャベツ	0.01	0.1	0.1	*	5885796	776	0.9996	91.5	89.6	94.3	94.1	92.7	92.4	2.1	—	#DIV/0!	
		ばれいしょ	0.01	0.05	0.05	*	5871293	-96	0.9990	94.9	97.7	96.8	97.7	97.1	96.8	1.2	—	#DIV/0!	
		オレンジ	0.01	0.05	0.05	*	7278075	-716	0.9996	84.1	86.1	88.0	92.5	94.4	89.0	4.9	—	#DIV/0!	
		りんご	0.01	0.05	0.05	*	7278075	-716	0.9996	92.2	88.9	97.1	96.5	96.0	94.1	3.7	—	#DIV/0!	
		茶	0.01	0.01	0.01	*	8136964	-168	0.9971	79.4	91.3	99.8	103.0	101.0	94.9	10.3	246.0	211.8	228.9
		ぶどう	0.01	0.1	0.1	*	6150201	1255	0.9995	96.1	98.3	97.3	97.5	95.9	97.0	1.0	—	#DIV/0!	
		玄米	0.01	0.05	0.05	*	591461	-36	0.9982	74.9	76.6	88.6	80.0	76.6	79.3	6.9	—	#DIV/0!	
		大豆	0.01	0.05	0.05	*	484544	-2	0.9982	86.2	86.3	85.8	84.9	92.3	87.1	3.4	—	#DIV/0!	
		らっかせい	0.01	0.05	0.05	*	591461	-36	0.9982	88.5	86.0	87.0	86.6	85.9	86.8	1.2	—	#DIV/0!	
		ほうれんそう	0.01	0.05	0.05	*	519524	-183	0.9992	95.6	92.4	92.2	94.1	97.1	94.3	2.2	—	#DIV/0!	
		キャベツ	0.01	0.1	0.1	*	483749	-14	0.9970	83.5	88.1	90.0	91.3	90.3	88.6	3.5	—	#DIV/0!	
3	代謝物H	ばれいしょ	0.01	0.05	0.05	*	519524	-183	0.9992	85.6	97.0	87.1	88.5	90.1	89.7	4.9	—	#DIV/0!	
		オレンジ	0.01	0.05	0.05	*	532490	-16	0.9956	82.3	87.4	91.0	89.7	91.6	88.4	4.3	—	#DIV/0!	
		りんご	0.01	0.05	0.05	*	532490	-16	0.9956	88.0	86.4	98.2	97.8	94.4	93.0	5.9	—	#DIV/0!	
		茶	0.01	0.01	0.01	*	721289	-61	0.9951	89.1	87.5	98.0	90.5	103.0	93.6	7.1	52.8	26.2	39.5
		ぶどう	0.01	0.1	0.1	*	488005	63	0.9964	93.6	94.3	93.0	88.8	94.2	92.8	2.5	—	#DIV/0!	

*1 基準値は、基準値未設定の場合には一律基準(0.01 ppm)を用いる。

2 添加濃度が定量限界濃度と異なる場合には、『』が表示される。その場合には、S/N比の算出は不要であるが、別途、定量限界の推定を行う。

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

表16 定量限界の推定

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (mg/kg)	基準値 ¹ (ppm)	添加濃度 (ppm)	定量限界 の評価 ²	標準溶液 濃度 ³ (mg/L)	ピーク面積(高さ) ⁴						S/N比		平均値		備 考					
								面積又は 高さの別	ブランク ⁵	マトリックス添加標準溶液			溶媒標準溶液			n=1	n=2		平均	n=1	n=2	面積(高さ) 比(%) ⁶	S/N比
										n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均								
1	メチオカルブ	玄米	0.01	0.05	0.05	*	0.0005	面積	0	3484	3558	3521.0	3172	3316	3244.0	102.0	66.2	108.5	84.1				
		大豆	0.01	0.05	0.05	*	0.0005	面積	0	3047	2849	2948.0	2947	2864	2905.5	36.5	33.9	101.5	35.2				
		らっかせい	0.01	0.05	0.05	*	0.0005	面積	0	3475	3920	3697.5	3108	3347	3227.5	113.5	97.3	114.6	105.4				
		ほうれんそう	0.01	0.05	0.05	*	0.0005	面積	0	2543	2657	2600.0	2535	2437	2486.0	48.5	50.2	104.6	49.3				
		キャベツ	0.01	0.1	0.1	*	0.0005	面積	0	2934	2969	2951.5	2753	2812	2782.5	68.1	43.5	106.1	55.8				
		ばれいしょ	0.01	0.05	0.05	*	0.0005	面積	0	2889	2828	2858.5	2846	2535	2690.5	70.6	41.8	106.2	56.2				
		オレンジ	0.01	0.05	0.05	*	0.0005	面積	0	2222	2475	2348.5	2577	2069	2323.0	55.6	54.8	101.1	55.2				
		りんご	0.01	0.05	0.05	*	0.0005	面積	0	3007	3171	3089.0	3038	3000	3019.0	61.0	42.3	102.3	51.6				
		茶	0.01	0.01	0.01							0.0			0.0			#DM/0!	#DM/0!				
		ぶどう	0.01	0.1	0.1	*	0.0005	面積	0	2472	2599	2535.5	2707	2415	2561.0	45.1	43.6	99.0	44.4				
2	代謝物D	玄米	0.01	0.05	0.05	*	0.0005	面積	0	15466	15067	15266.5	14256	13698	13977.0	234.8	227.3	109.2	231.0				
		大豆	0.01	0.05	0.05	*	0.0005	面積	0	10754	11141	10947.5	11316	10768	11042.0	115.2	167.3	99.1	141.2				
		らっかせい	0.01	0.05	0.05	*	0.0005	面積	0	13410	14088	13749.0	14069	14324	14196.5	429.8	269.3	96.8	349.5				
		ほうれんそう	0.01	0.05	0.05	*	0.0005	面積	0	11496	11432	11464.0	11631	12625	12128.0	241.8	356.0	94.5	298.9				
		キャベツ	0.01	0.1	0.1	*	0.0005	面積	0	12075	12534	12304.5	11083	12148	11615.5	157.5	186.0	105.9	171.8				
		ばれいしょ	0.01	0.05	0.05	*	0.0005	面積	0	12362	12588	12475.0	11919	12381	12150.0	250.2	248.5	102.7	249.3				
		オレンジ	0.01	0.05	0.05	*	0.0005	面積	0	13650	11661	12655.5	11476	11776	11626.0	217.3	182.3	108.9	199.8				
		りんご	0.01	0.05	0.05	*	0.0005	面積	0	14843	15076	14959.5	14264	14811	14537.5	237.3	226.0	102.9	231.6				
		茶	0.01	0.01	0.01							0.0			0.0			#DM/0!	#DM/0!				
		ぶどう	0.01	0.1	0.1	*	0.0005	面積	0	12830	11841	12335.5	12122	12904	12513.0	258.5	184.8	98.6	221.6				
3	代謝物H	玄米	0.01	0.05	0.05	*	0.0005	面積	0	1148	1167	1157.5	1085	1185	1135.0	40.0	43.5	102.0	41.8				
		大豆	0.01	0.05	0.05	*	0.0005	面積	0	1110	1049	1079.5	1093	903	998.0	20.9	15.8	108.2	18.3				
		らっかせい	0.01	0.05	0.05	*	0.0005	面積	0	1295	996	1145.5	1253	1232	1242.5	51.6	35.3	92.2	43.4				
		ほうれんそう	0.01	0.05	0.05	*	0.0005	面積	0	1067	917	992.0	981	1019	1000.0	25.2	27.0	99.2	26.1				
		キャベツ	0.01	0.1	0.1	*	0.0005	面積	0	1058	1061	1059.5	963	982	972.5	28.7	26.6	108.9	27.6				
		ばれいしょ	0.01	0.05	0.05	*	0.0005	面積	0	1022	1024	1023.0	1022	972	997.0	33.7	37.8	102.6	35.7				
		オレンジ	0.01	0.05	0.05	*	0.0005	面積	0	643	800	721.5	775	805	790.0	34.5	17.3	91.3	25.9				
		りんご	0.01	0.05	0.05	*	0.0005	面積	0	1083	1279	1181.0	1169	1124	1146.5	56.0	45.2	103.0	50.6				
		茶	0.01	0.01	0.01							0.0			0.0			#DM/0!	#DM/0!				
		ぶどう	0.01	0.1	0.1	*	0.0005	面積	0	864	791	827.5	873	1071	972.0	26.0	25.6	85.1	25.8				

*1 基準値は、基準値未設定の場合には一律基準(0.01 ppm)を用いる。

2 定量限界の推定を行う対象(添加濃度と定量限界濃度と異なる場合)には、『』が表示される。

*3 試料中の濃度が定量限界相当濃度になるように、ブランク試料の試験溶液で調製した標準溶液(マトリックス添加標準溶液)及び溶媒で調製した標準溶液(溶媒標準溶液)を作成する。

*4 マトリックス添加標準溶液及び溶媒標準溶液の順に交互に2回以上測定する。(必要に応じて起爆注入を行う。)

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

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

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17に示した。添加回収試験における回収率100%相当濃度になるように調製したマトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積比を求めた。面積比はメチオカルブ0.99~1.07、代謝物D 0.97~1.05、代謝物H 0.97~1.09であり、測定への影響はないものと考えられた。

添加回収試験における真度を表17で求めたピーク面積比で除して補正真度を求め、表18に示した。補正真度はメチオカルブ87~99%、代謝物D 87~97、代謝物H 77~96であり、試料マトリックスの測定への影響と真度との間に矛盾は見られなかった。

表17 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 ¹ (ppm)	添加濃度 (ppm)	標準溶液 濃度 ² (mg/L)	ピーク面積(高さ) ³									備考
							面積又は 高さの別	ブランク ⁴	マトリックス添加標準溶液 ⁵			溶媒標準溶液			ピーク面積 (高さ)比 ⁶	
									n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均		
1	メチオカルブ	玄米	0.01	0.05	0.05	0.0025	面積	0	17285	16791	17038.0	15667	16846	16256.5	1.05	
		大豆	0.01	0.05	0.05	0.0025	面積	0	14267	13910	14088.5	13835	14242	14038.5	1.00	
		らっかせい	0.01	0.05	0.05	0.0025	面積	0	17374	17536	17455.0	15890	16856	16373.0	1.07	
		ほうれんそう	0.01	0.05	0.05	0.0025	面積	0	12933	12600	12766.5	12597	13149	12873.0	0.99	
		キャベツ	0.01	0.1	0.1	0.005	面積	0	25854	27155	26504.5	26398	25291	25844.5	1.03	
		ばれいしょ	0.01	0.05	0.05	0.0025	面積	0	12879	12963	12921.0	12070	12482	12276.0	1.05	
		オレンジ	0.01	0.05	0.05	0.0025	面積	0	14238	14072	14155.0	14119	13972	14045.5	1.01	
		りんご	0.01	0.05	0.05	0.0025	面積	0	14153	14191	14172.0	13485	13594	13539.5	1.05	
		茶	0.01	0.01	0.01	0.0005	面積	0	3156	3522	3339.0	3038	3402	3220.0	1.04	
		ぶどう	0.01	0.1	0.1	0.005	面積	0	24582	25049	24815.5	24707	24808	24757.5	1.00	
2	代謝物D	玄米	0.01	0.05	0.05	0.0025	面積	0	70144	70003	70073.5	72665	70632	71648.5	0.98	
		大豆	0.01	0.05	0.05	0.0025	面積	0	53673	55217	54445.0	56198	55746	55972.0	0.97	
		らっかせい	0.01	0.05	0.05	0.0025	面積	0	72207	70368	71287.5	72731	71831	72281.0	0.99	
		ほうれんそう	0.01	0.05	0.05	0.0025	面積	0	60082	59728	59905.0	61261	59859	60560.0	0.99	
		キャベツ	0.01	0.1	0.1	0.005	面積	0	119317	125150	122233.5	119532	120863	120197.5	1.02	
		ばれいしょ	0.01	0.05	0.05	0.0025	面積	0	60741	58148	59444.5	59854	57819	58336.5	1.01	
		オレンジ	0.01	0.05	0.05	0.0025	面積	0	74217	74191	74204.0	71978	72793	72385.5	1.03	
		りんご	0.01	0.05	0.05	0.0025	面積	0	73071	70670	71870.5	71666	71082	71374.0	1.01	
		茶	0.01	0.01	0.01	0.0005	面積	0	16420	17013	16716.5	15611	16214	15912.5	1.05	
		ぶどう	0.01	0.1	0.1	0.005	面積	0	126771	128352	127561.5	125172	125318	125245.0	1.02	
3	代謝物H	玄米	0.01	0.05	0.05	0.0025	面積	0	6180	6077	6128.5	5956	5878	5917.0	1.04	
		大豆	0.01	0.05	0.05	0.0025	面積	0	4418	4884	4651.0	4340	4491	4415.5	1.05	
		らっかせい	0.01	0.05	0.05	0.0025	面積	0	5668	5980	5824.0	5909	6138	6023.5	0.97	
		ほうれんそう	0.01	0.05	0.05	0.0025	面積	0	4960	4899	4929.5	4601	4592	4596.5	1.07	
		キャベツ	0.01	0.1	0.1	0.005	面積	0	10079	10192	10135.5	9801	8865	9333.0	1.09	
		ばれいしょ	0.01	0.05	0.05	0.0025	面積	0	4860	4786	4823.0	4537	4837	4687.0	1.03	
		オレンジ	0.01	0.05	0.05	0.0025	面積	0	5253	5238	5245.5	5074	5278	5176.0	1.01	
		りんご	0.01	0.05	0.05	0.0025	面積	0	5417	5452	5434.5	5442	5419	5430.5	1.00	
		茶	0.01	0.01	0.01	0.0005	面積	0	1309	1518	1413.5	1476	1425	1450.5	0.97	
		ぶどう	0.01	0.1	0.1	0.005	面積	0	10289	9812	10050.5	9455	9485	9470.0	1.06	

*1 基準値は、基準値未設定の場合には一律基準(0.01 ppm)を用いる。

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

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

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

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

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

*1 基準値は、基準値未設定の場合には一律基準(0.01 ppm)を用いる。

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

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

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

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

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

表 18 補正真度

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	基準値*1 (ppm)	添加濃度 (ppm)	真度 (%)	ピーク面積 比 (%)	補正真度 (%)	備 考
1	メチオカルブ	玄米	0.01	0.05	0.05	94.7	1.05	90.4	
		大豆	0.01	0.05	0.05	88.1	1.00	87.8	
		らっかせい	0.01	0.05	0.05	92.8	1.07	87.0	
		ほうれんそう	0.01	0.05	0.05	96.0	0.99	96.8	
		キャベツ	0.01	0.1	0.1	92.0	1.03	89.7	
		ばれいしょ	0.01	0.05	0.05	92.9	1.05	88.2	
		オレンジ	0.01	0.05	0.05	90.5	1.01	89.8	
		りんご	0.01	0.05	0.05	93.1	1.05	88.9	
		茶	0.01	0.01	0.01	102.5	1.04	98.9	
		ぶどう	0.01	0.1	0.1	99.0	1.00	98.7	
2	代謝物D	玄米	0.01	0.05	0.05	90.3	0.98	92.4	
		大豆	0.01	0.05	0.05	89.5	0.97	92.0	
		らっかせい	0.01	0.05	0.05	88.2	0.99	89.4	
		ほうれんそう	0.01	0.05	0.05	96.1	0.99	97.1	
		キャベツ	0.01	0.1	0.1	92.4	1.02	90.9	
		ばれいしょ	0.01	0.05	0.05	96.8	1.01	95.8	
		オレンジ	0.01	0.05	0.05	89.0	1.03	86.8	
		りんご	0.01	0.05	0.05	94.1	1.01	93.5	
		茶	0.01	0.01	0.01	94.9	1.05	90.3	
		ぶどう	0.01	0.1	0.1	97.0	1.02	95.3	
3	代謝物H	玄米	0.01	0.05	0.05	79.3	1.04	76.6	
		大豆	0.01	0.05	0.05	87.1	1.05	82.7	
		らっかせい	0.01	0.05	0.05	86.8	0.97	89.8	
		ほうれんそう	0.01	0.05	0.05	94.3	1.07	87.9	
		キャベツ	0.01	0.1	0.1	88.6	1.09	81.6	
		ばれいしょ	0.01	0.05	0.05	89.7	1.03	87.1	
		オレンジ	0.01	0.05	0.05	88.4	1.01	87.2	
		りんご	0.01	0.05	0.05	93.0	1.00	92.9	
		茶	0.01	0.01	0.01	93.6	0.97	96.1	
		ぶどう	0.01	0.1	0.1	92.8	1.06	87.4	

*1 基準値は、基準値未設定の場合には一律基準 (0.01 ppm) を用いる。

4. 考察

アセトンで抽出し、ギ酸酸性下で10 w/v%塩化ナトリウム100 mLから酢酸エチル100 mL及び50 mLで十分に抽出することができたため、酢酸エチルへ転溶する方法を採用した。

精製カラムとしてはグラファイトカーボンミニカラムの下部にアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムを連結して使用した。

開発した方法を用いて、玄米等10食品の添加回収試験を行った結果、選択性は良好で何れの試料においても測定を妨害するようなピークは認められず、真度はメチオカルブ88~103%、代謝物D 88~97%、代謝物H 79~94%、併行精度はメチオカルブ2~8%、代謝物D 1~10%、代謝物H 1~7%の良好な結果が得られたことから、本試験法は、穀類、豆類、種実類、果実、野菜及び茶等の農産物に適応可能であると判断された。

[結論]

農産物中のメチオカルブ試験法として、メチオカルブ、代謝物D及び代謝物Hをアセトンで抽出し、ギ酸酸性下で酢酸エチルに転溶し、グラファイトカーボンミニカラムの下部にアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムを連結して精製した後、LC-MS/MSで定量及び確認する方法を開発した。

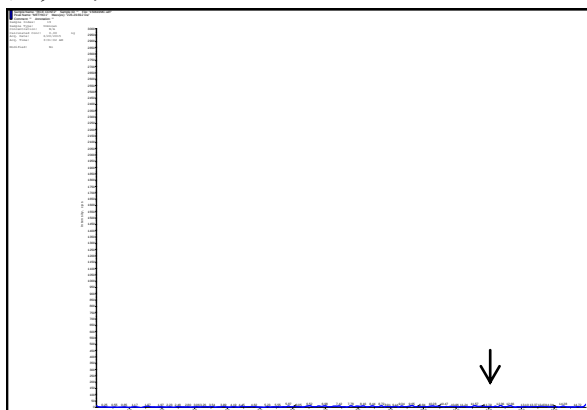
開発した試験法を玄米、大豆、らっかせい、ほうれんそう、キャベツ、ばれいしょ、オレンジ、りんご、茶及びぶどうの10食品に適用した結果、選択性は良好で何れの試料においても妨害ピークは認められず、真度はメチオカルブ88~103%、代謝物D 88~97%、代謝物H 79~94%、併行精度はメチオカルブ2~8%、代謝物D 1~10%、代謝物H 1~7%の良好な結果が得られた。また、定量限界として、0.01 mg/kgを設定可能であることが確認された。

[参考文献]

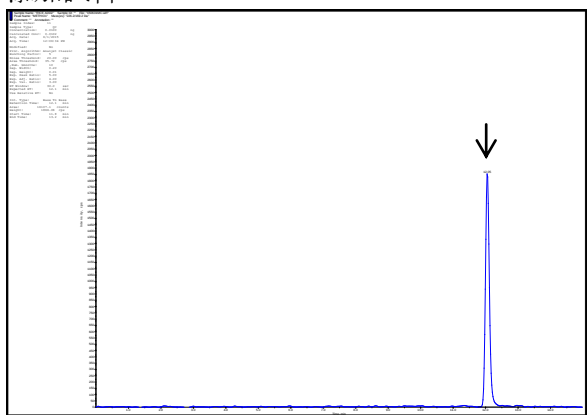
食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法：メチオカルブ試験法（農産物）

メチオカルブの添加回収試験におけるクロマトグラム

ブランク



添加試料



標準溶液

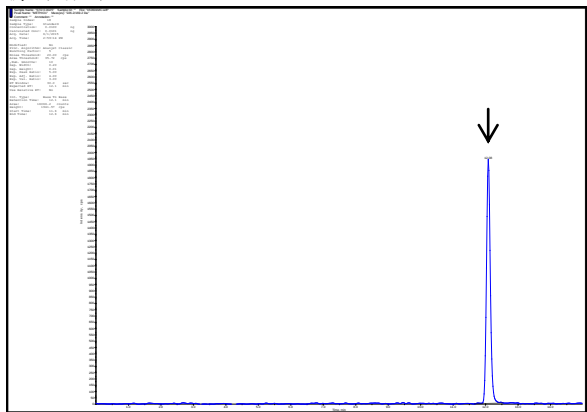
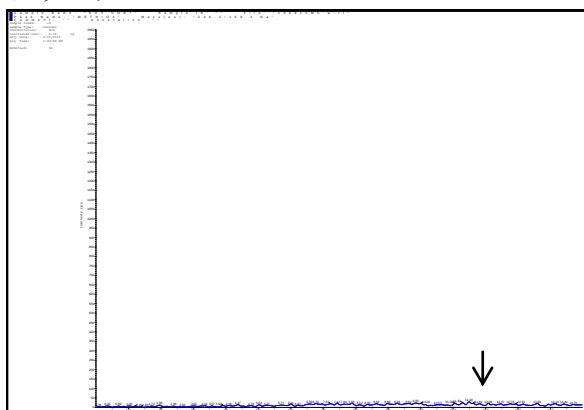
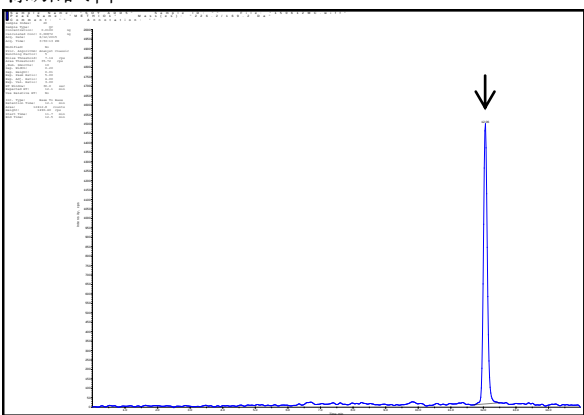


図 8-1 玄米の SRM クロマトグラム
メチオカルブ (m/z +226→169)
添加濃度 : 0.05 ppm

ブランク



添加試料



標準溶液

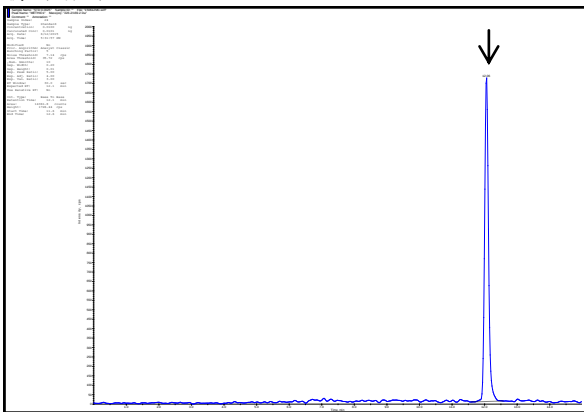
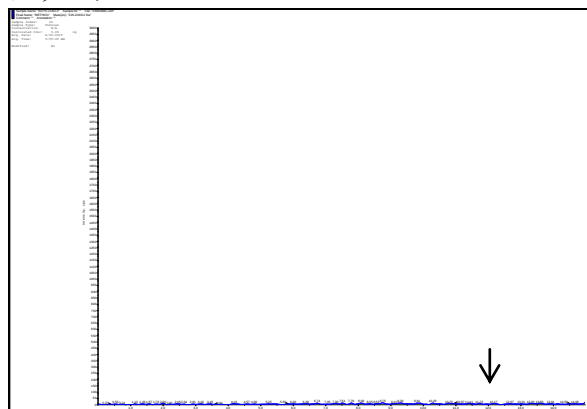
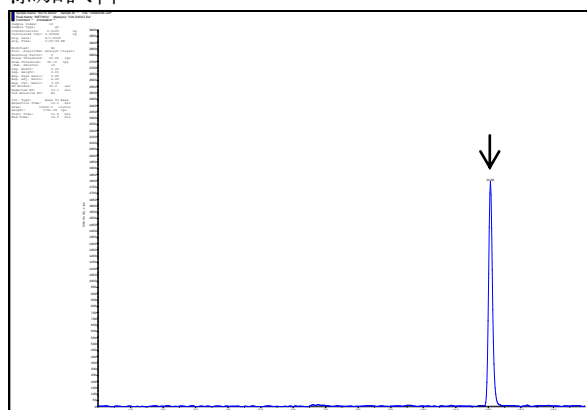


図 8-2 大豆の SRM クロマトグラム
メチオカルブ (m/z +226→169)
添加濃度 : 0.05 ppm

ブランク



添加試料



標準溶液

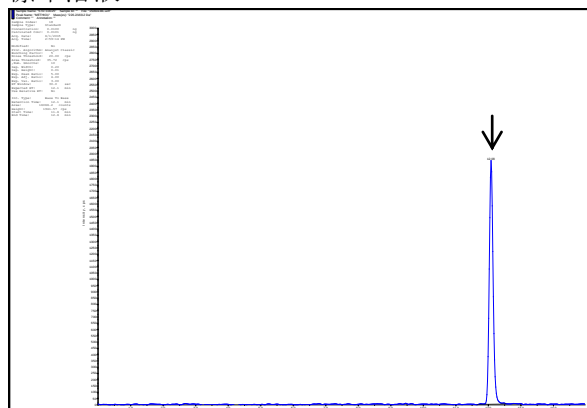
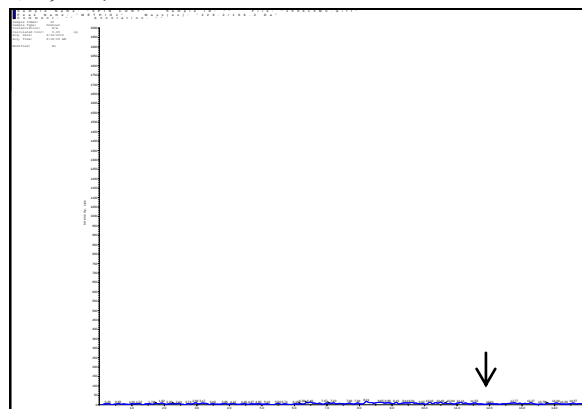
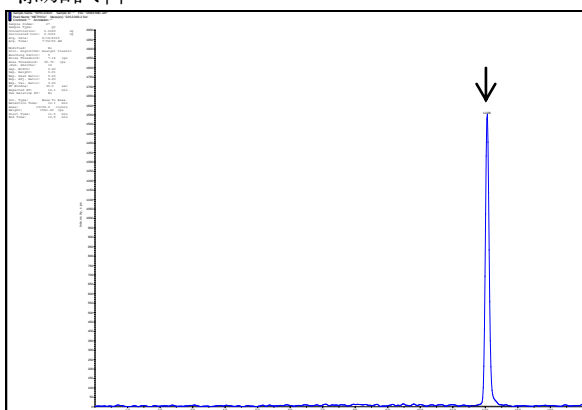


図 8-3 らっかせいの SRM クロマトグラム
メチオカルブ (m/z +226→169)
添加濃度 : 0.05 ppm

ブランク



添加試料



標準溶液

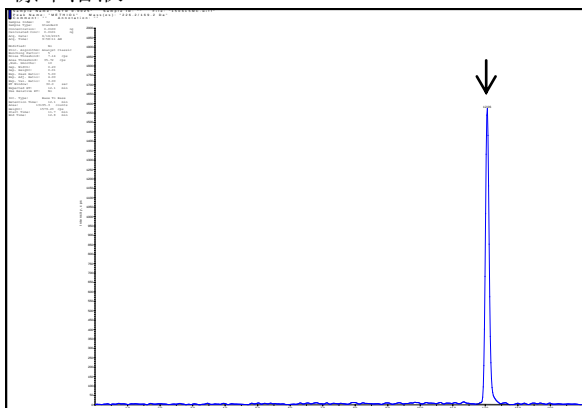
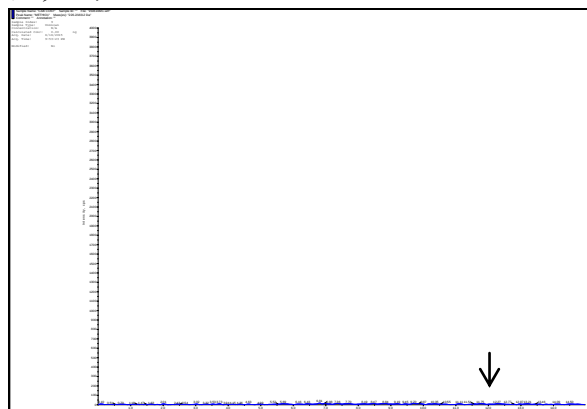
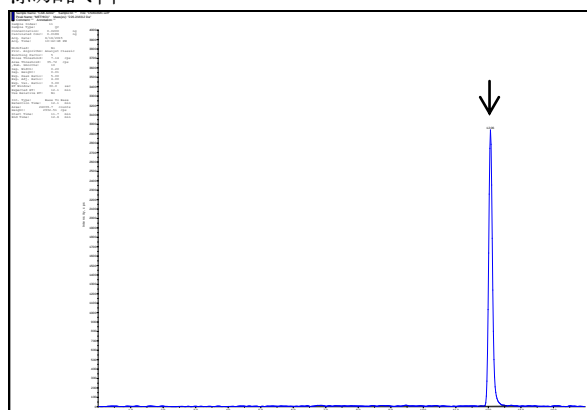


図 8-4 ほうれんそうの SRM クロマトグラム
メチオカルブ (m/z +226→169)
添加濃度 : 0.05 ppm

ブランク



添加試料



標準溶液

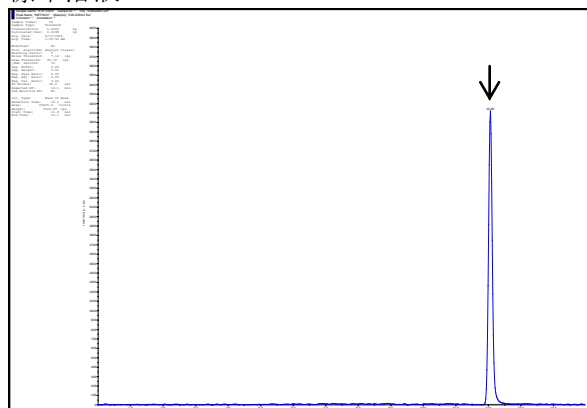
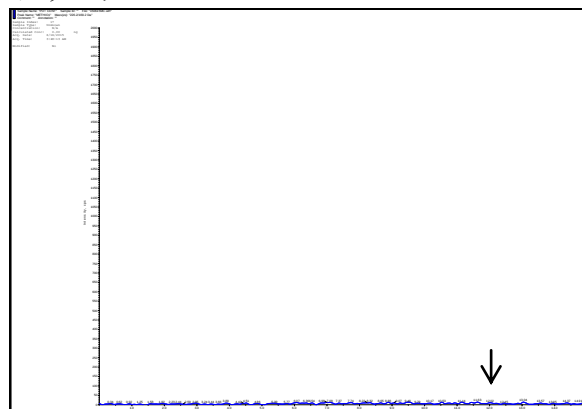
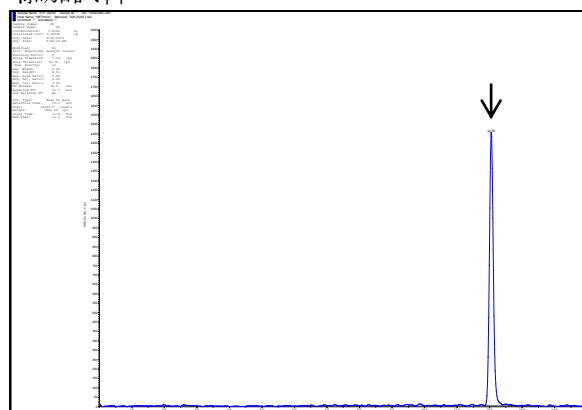


図 8-5 キャベツの SRM クロマトグラム
メチオカルプ (m/z +226→169)
添加濃度 : 0.1 ppm

ブランク



添加試料



標準溶液

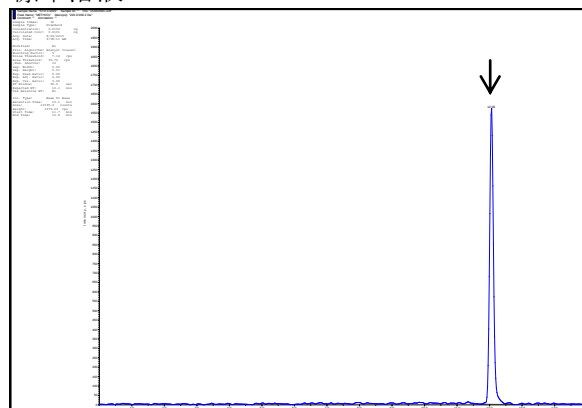
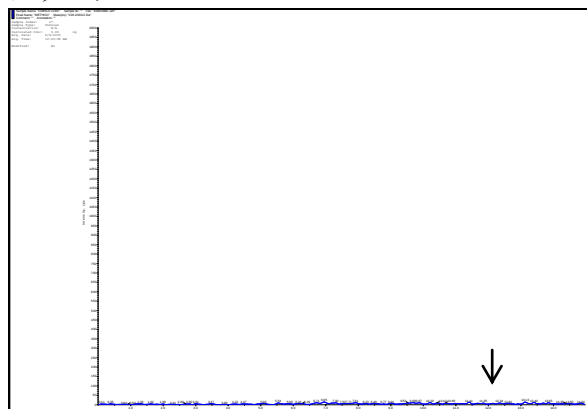
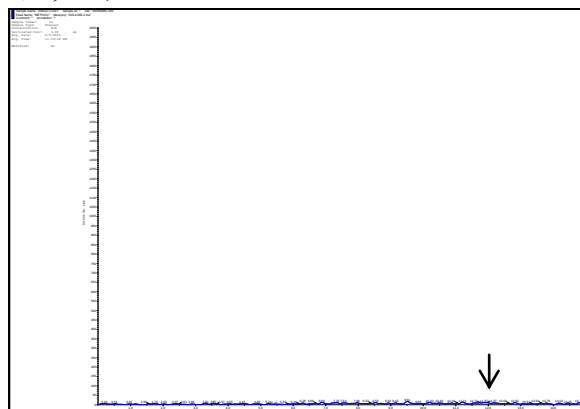


図 8-6 ばれいしょの SRM クロマトグラム
メチオカルプ (m/z +226→169)
添加濃度 : 0.05 ppm

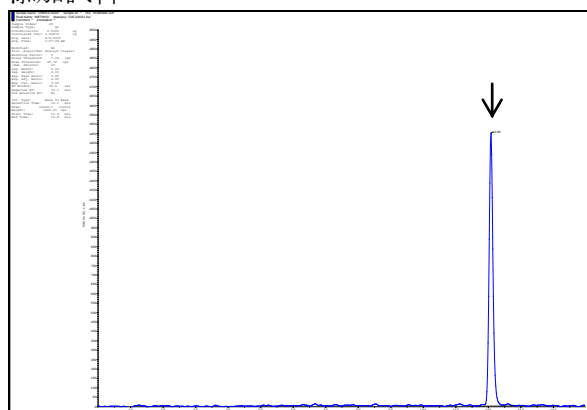
ブランク



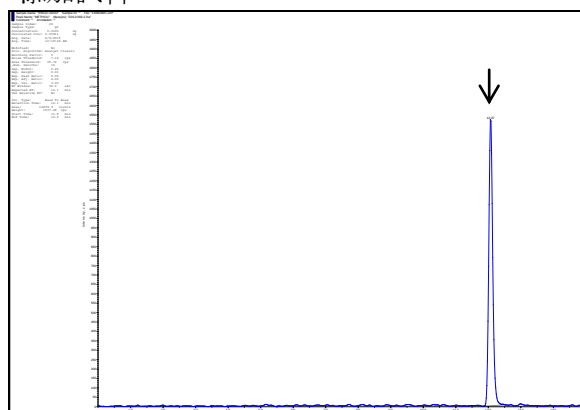
ブランク



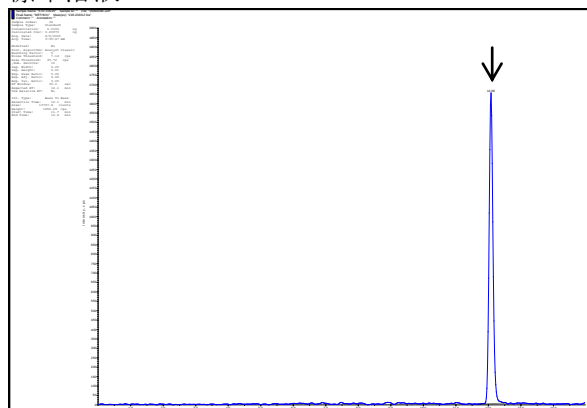
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

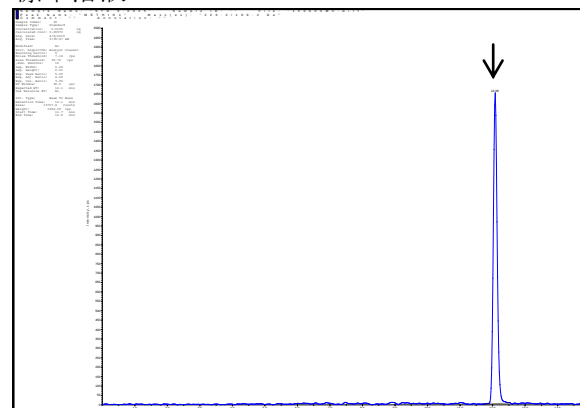
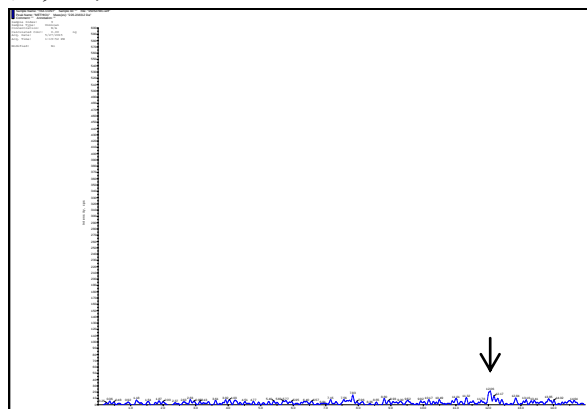


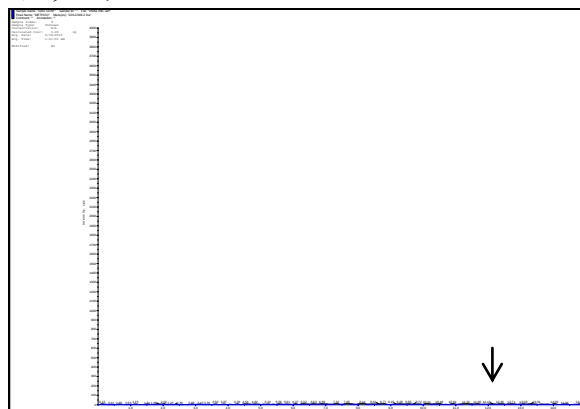
図8-7 オレンジのSRMクロマトグラム
メチオカルプ (m/z +226→169)
添加濃度 : 0.05 ppm

図8-8 りんごのSRMクロマトグラム
メチオカルプ (m/z +226→169)
添加濃度 : 0.05 ppm

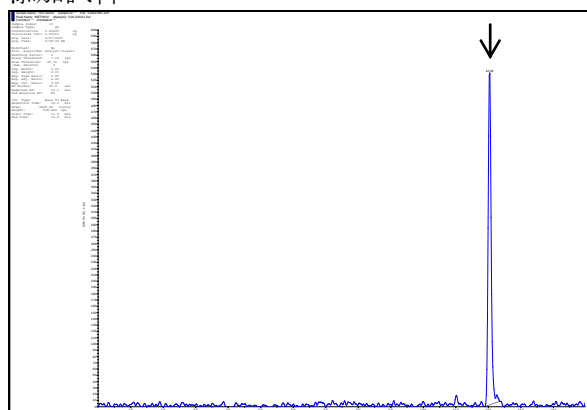
ブランク



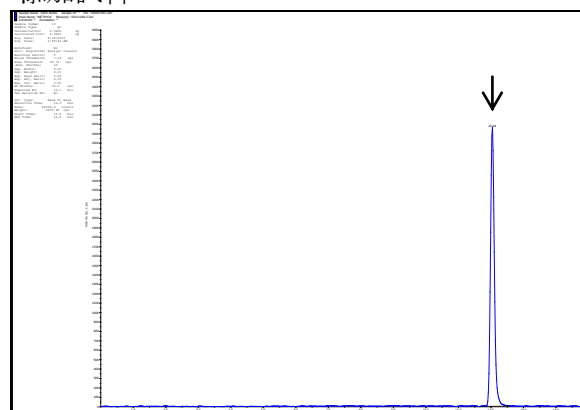
ブランク



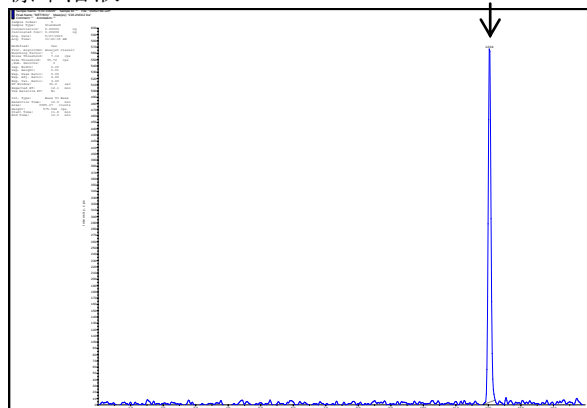
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

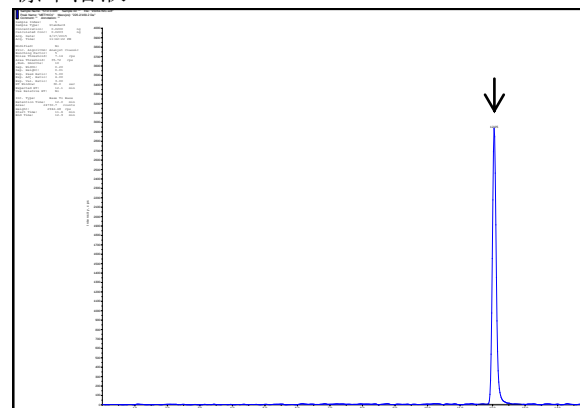
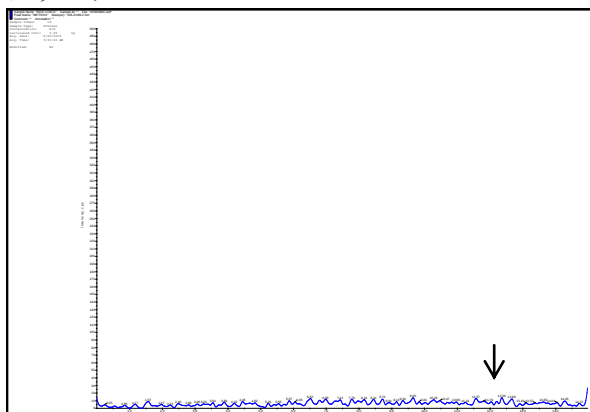


図 8-9 茶の SRM クロマトグラム
メチオカルブ (m/z +226→169)
添加濃度 : 0.01 ppm

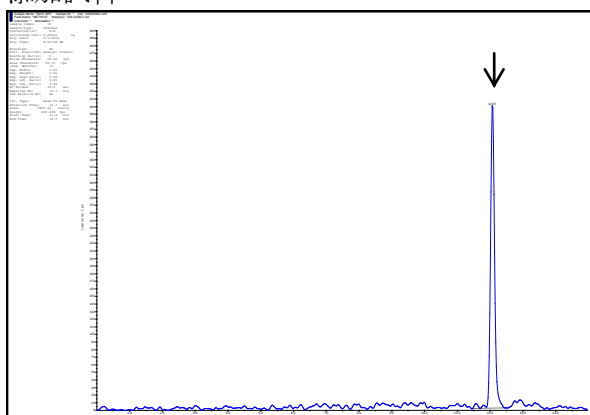
図 8-10 ぶどうの SRM クロマトグラム
メチオカルブ (m/z +226→169)
添加濃度 : 0.1 ppm

メチオカルブの定量限界の推定におけるクロマトグラム

ブランク



添加試料



標準溶液

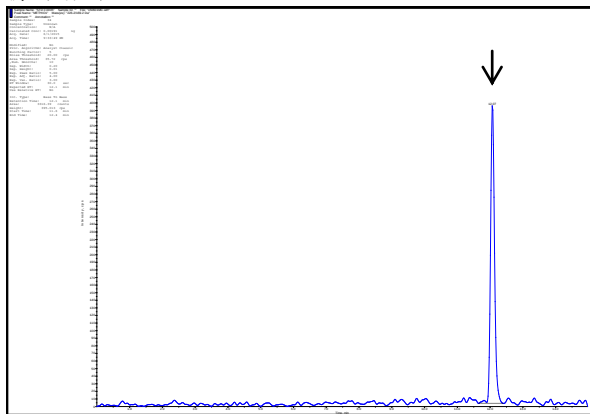
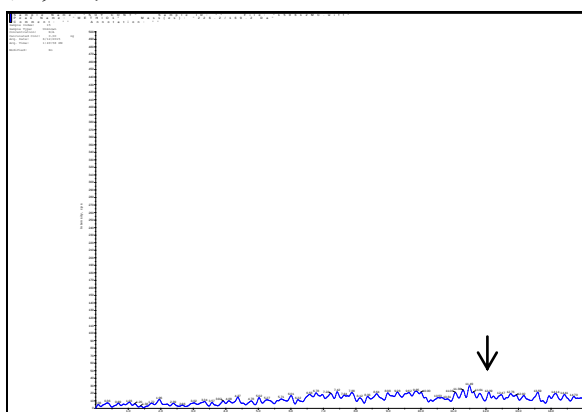
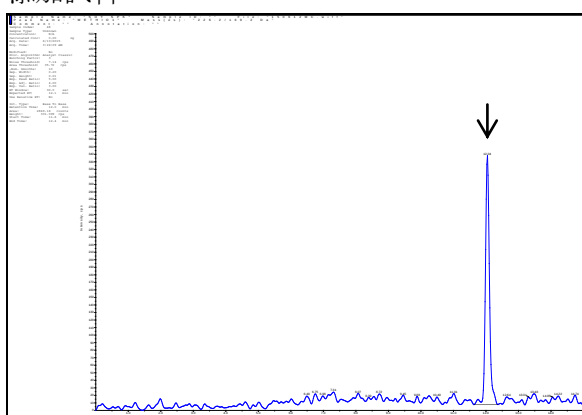


図 9-1 玄米の SRM クロマトグラム
メチオカルブ (m/z +226→169)
試料中 0.01 ppm 相当

ブランク



添加試料



標準溶液

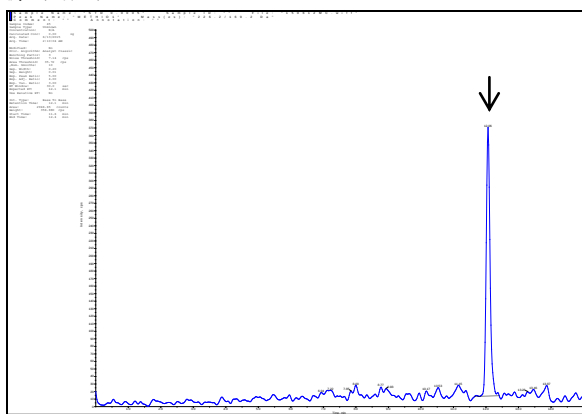
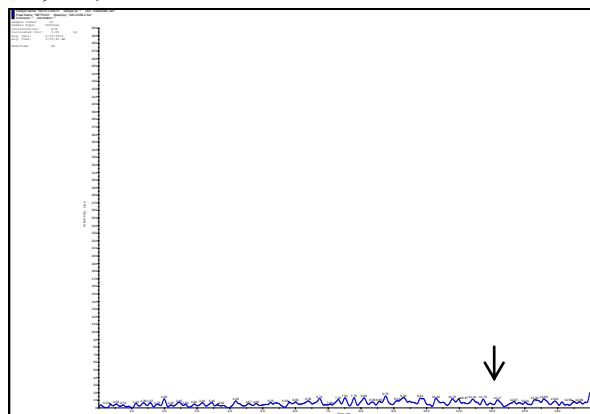
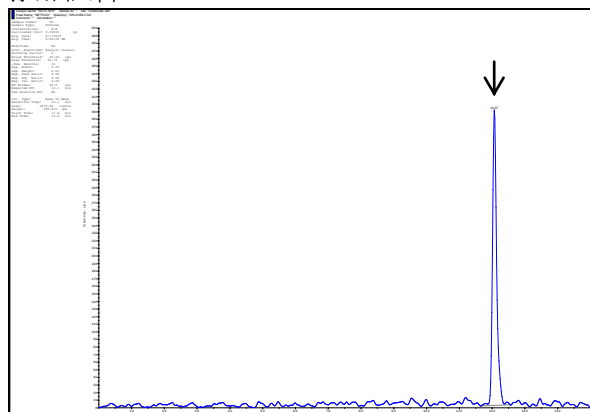


図 9-2 大豆の SRM クロマトグラム
メチオカルブ (m/z +226→169)
試料中 0.01 ppm 相当

ブランク



添加試料



標準溶液

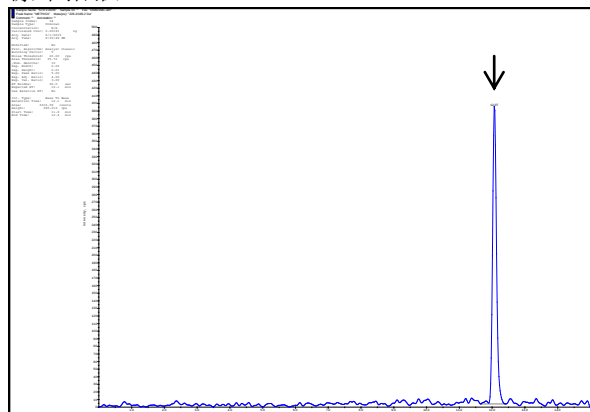
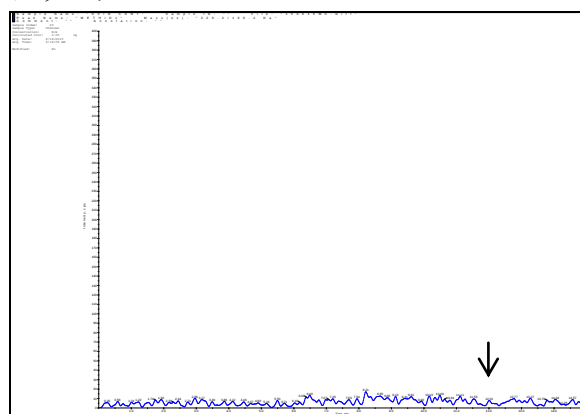
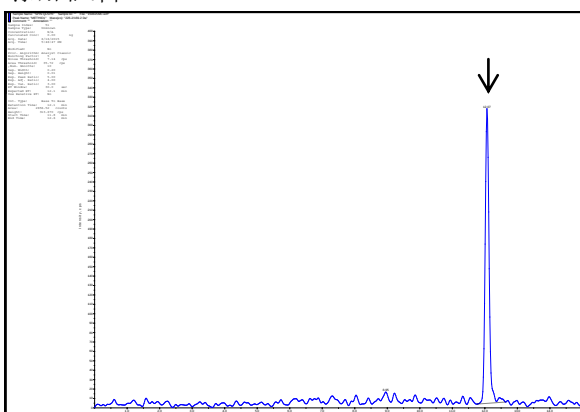


図9-3 らっかせいのSRMクロマトグラム
メチオカルブ (m/z +226→169)
試料中 0.01 ppm 相当

ブランク



添加試料



標準溶液

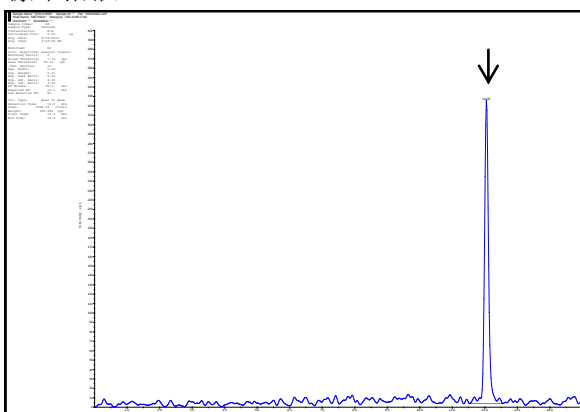
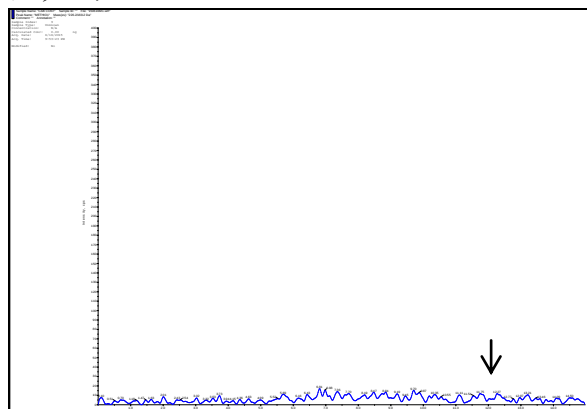
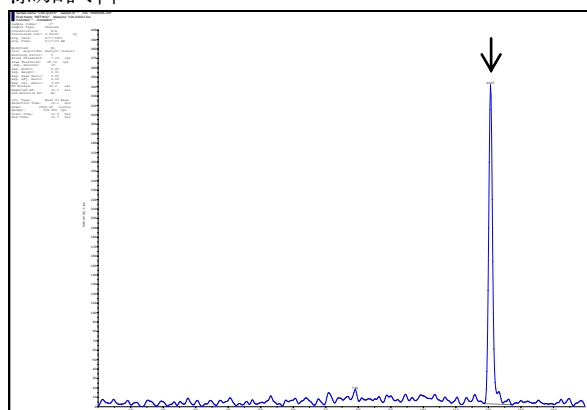


図9-4 ほうれんそうのSRMクロマトグラム
メチオカルブ (m/z +226→169)
試料中 0.01 ppm 相当

ブランク



添加試料



標準溶液

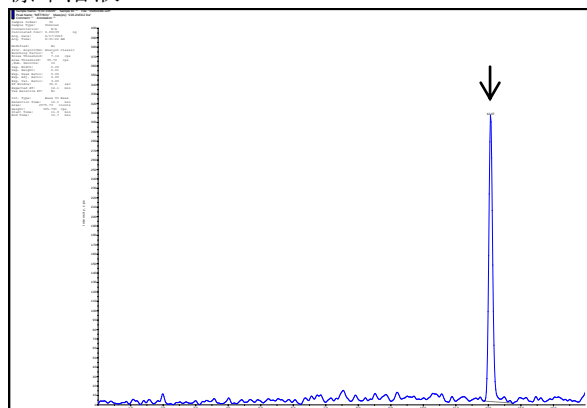
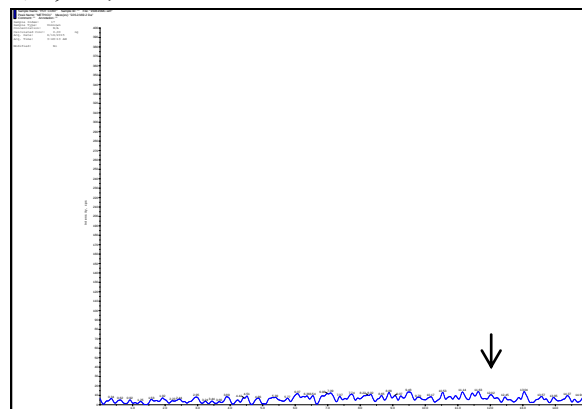
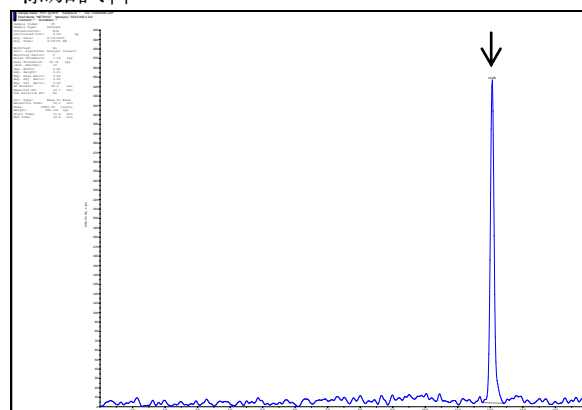


図9-5 キャベツのSRMクロマトグラム
メチオカルプ (m/z +226→169)
試料中 0.01 ppm 相当

ブランク



添加試料



標準溶液

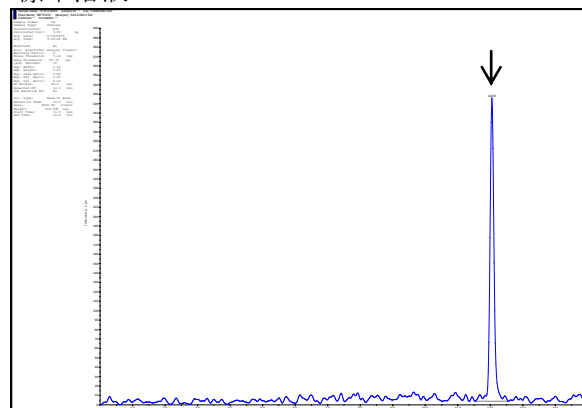
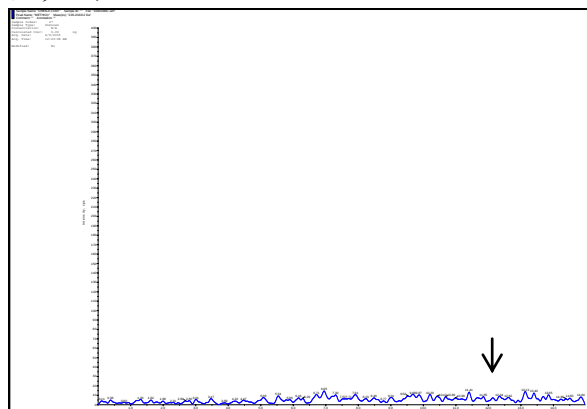
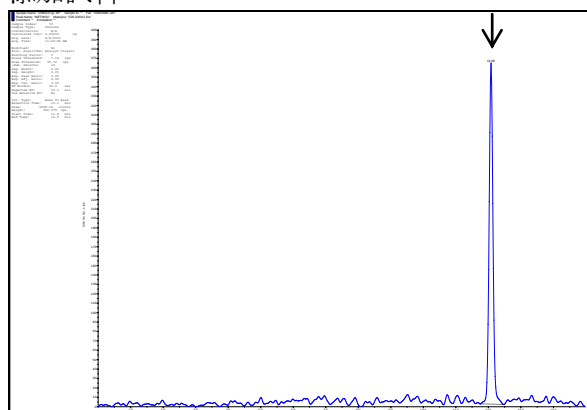


図9-6 ばれいしょのSRMクロマトグラム
メチオカルプ (m/z +226→169)
試料中 0.01 ppm 相当

ブランク



添加試料



標準溶液

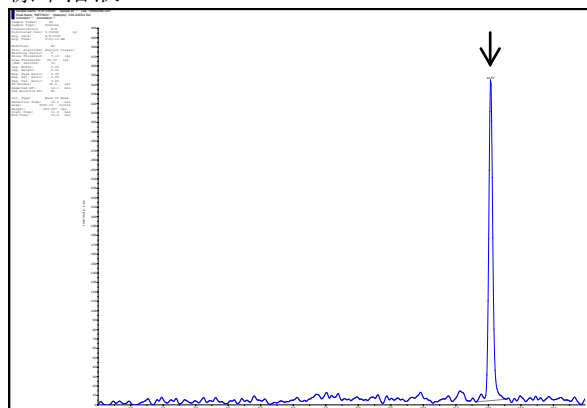
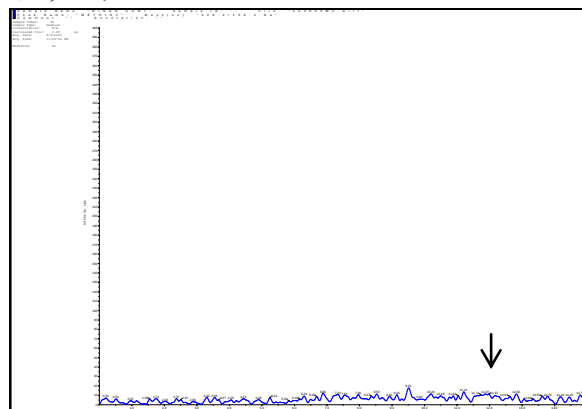
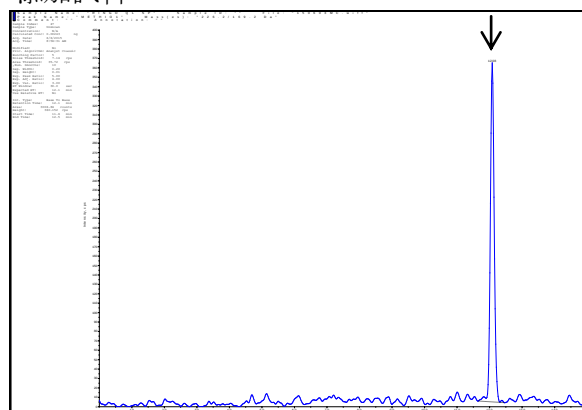


図 9-7 オレンジの SRM クロマトグラム
メチオカルブ (m/z +226→169)
試料中 0.01 ppm 相当

ブランク



添加試料



標準溶液

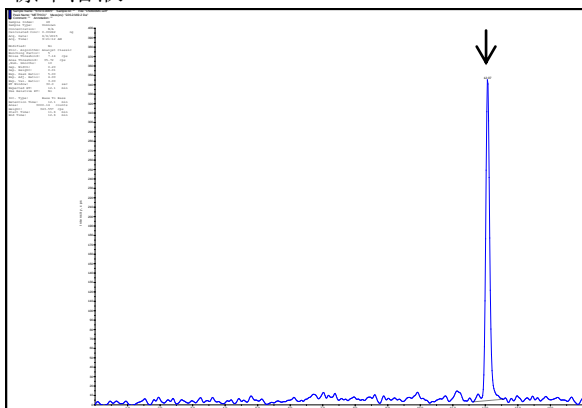
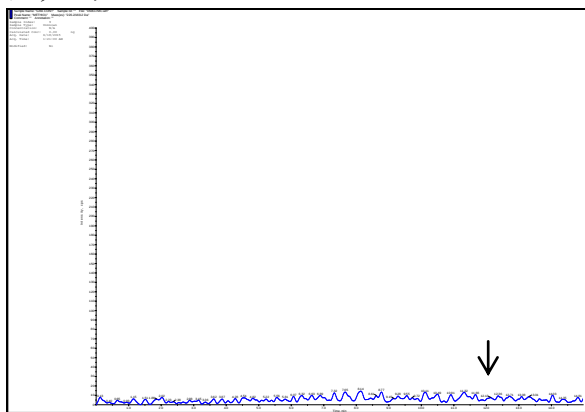
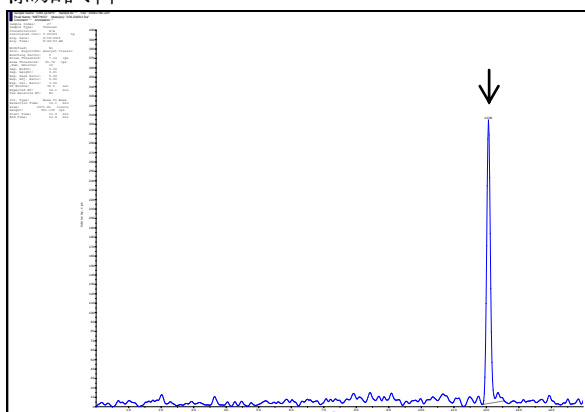


図 9-8 りんごの SRM クロマトグラム
メチオカルブ (m/z +226→169)
試料中 0.01 ppm 相当

ブランク



添加試料



標準溶液

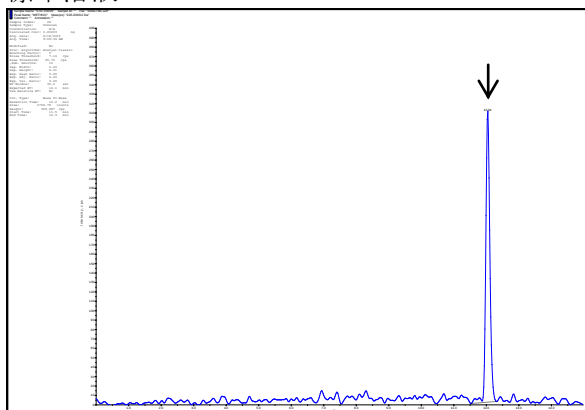
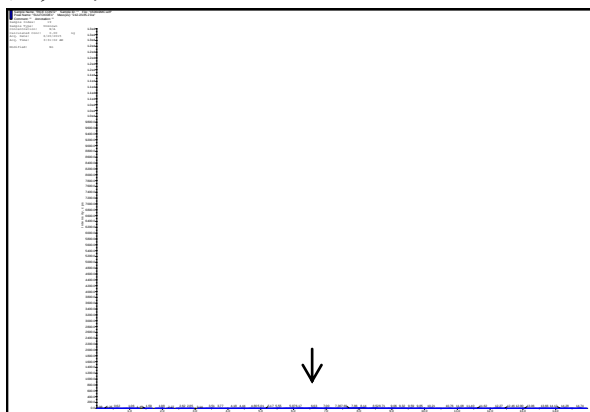
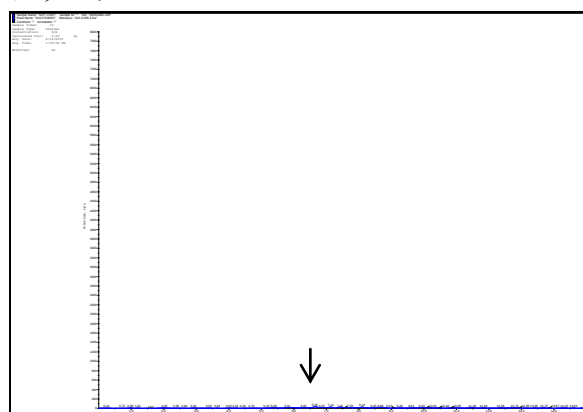


図 9-9 ぶどうの SRM クロマトグラム
メチオカルブ (m/z +226→169)
試料中 0.01 ppm 相当

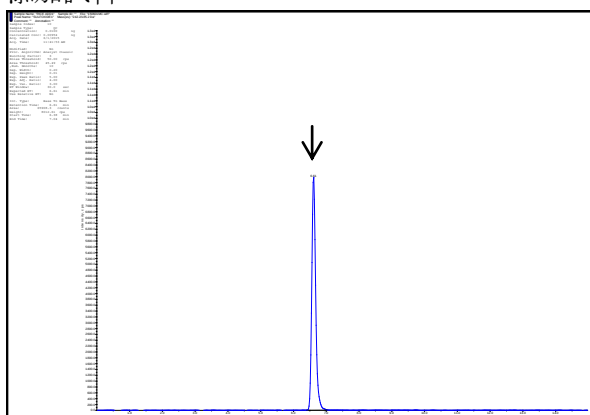
代謝物Dの添加回収試験におけるクロマトグラム
ブランク



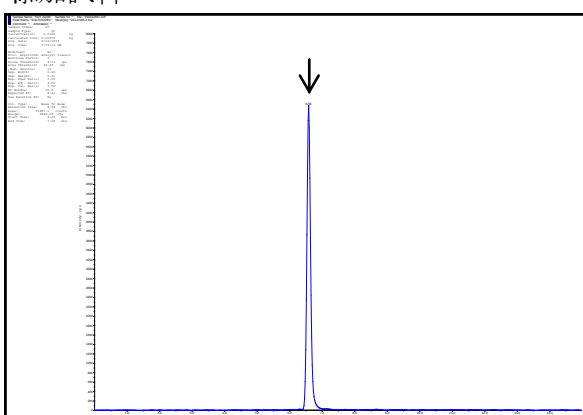
ブランク



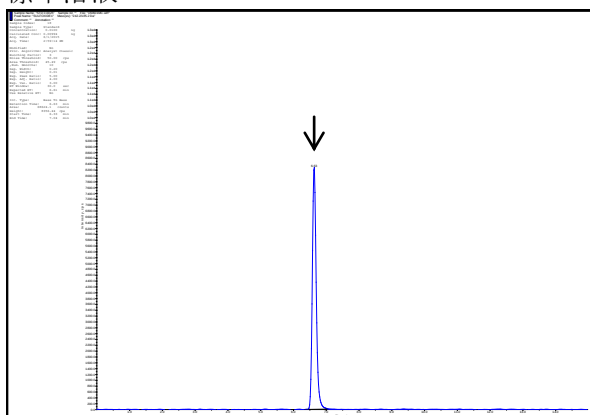
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

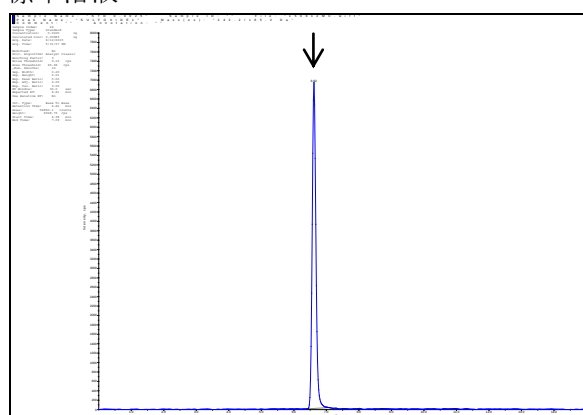
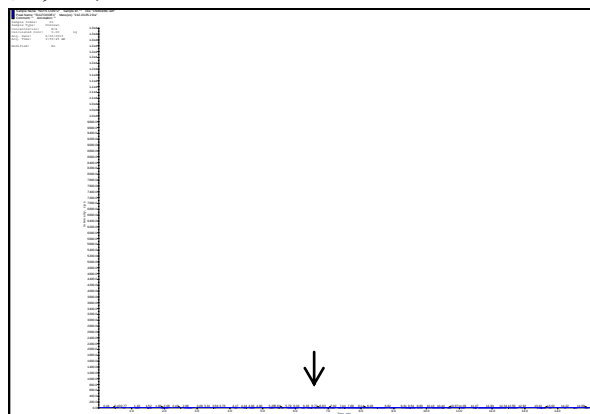


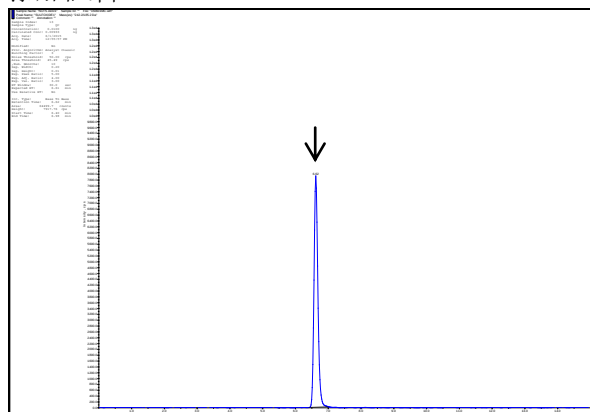
図 10-1 玄米の SRM クロマトグラム
代謝物 D (m/z +242→185)
添加濃度 : 0.05 ppm

図 10-2 大豆の SRM クロマトグラム
代謝物 D (m/z +242→185)
添加濃度 : 0.05 ppm

ブランク



添加試料



標準溶液

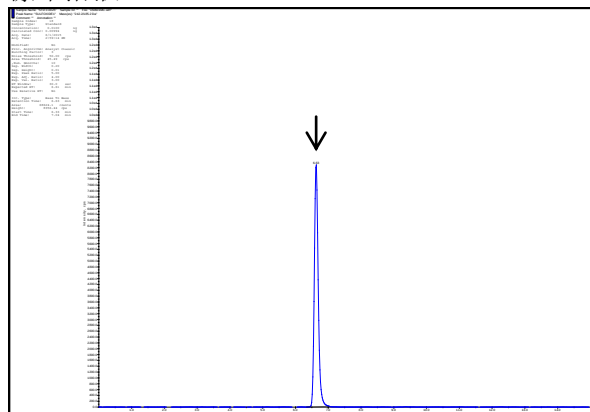
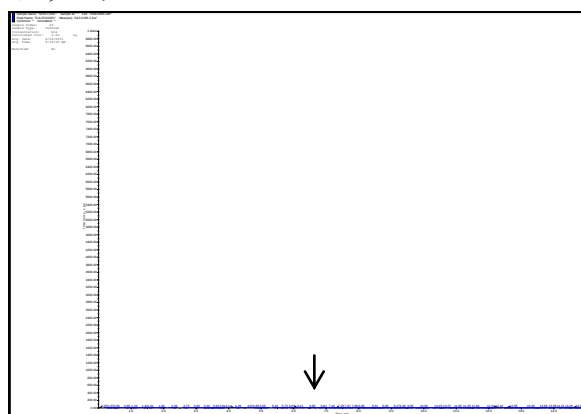
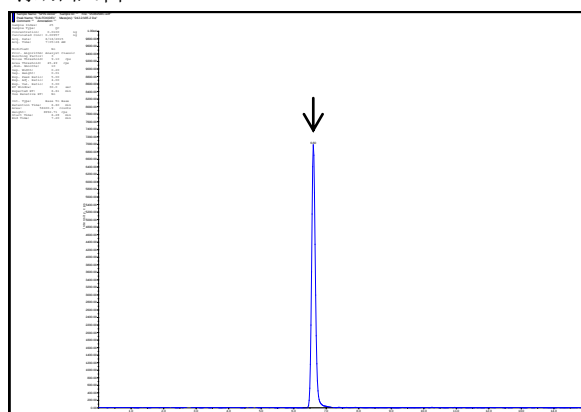


図 10-3 らっかせいの SRM クロマトグラム
代謝物 D (m/z +242→185)
添加濃度 : 0.05 ppm

ブランク



添加試料



標準溶液

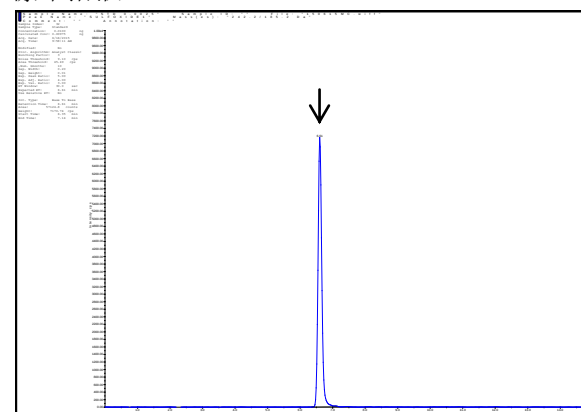
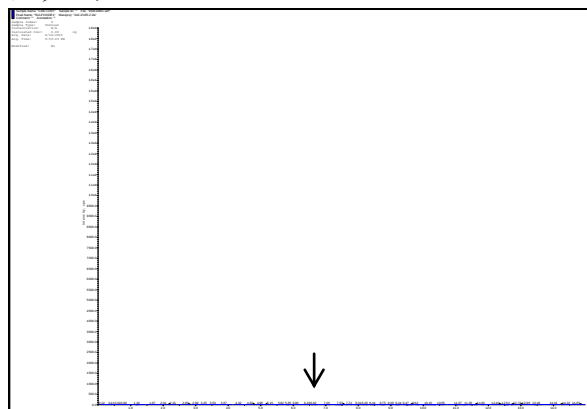
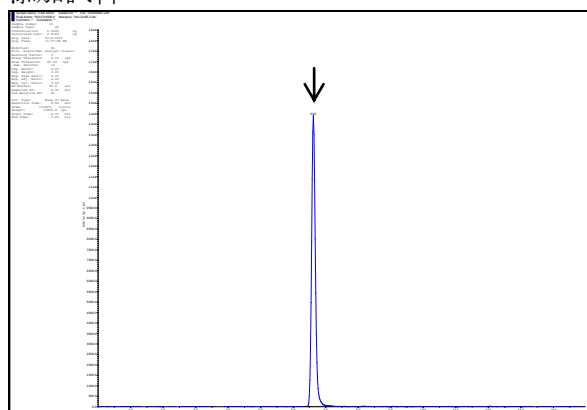


図 10-4 ほうれんそうの SRM クロマトグラム
代謝物 D (m/z +242→185)
添加濃度 : 0.05 ppm

ブランク



添加試料



標準溶液

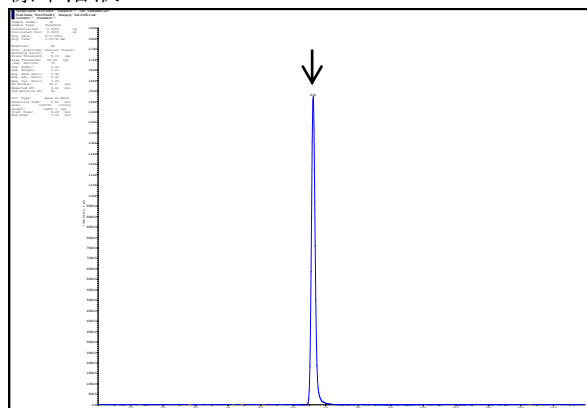
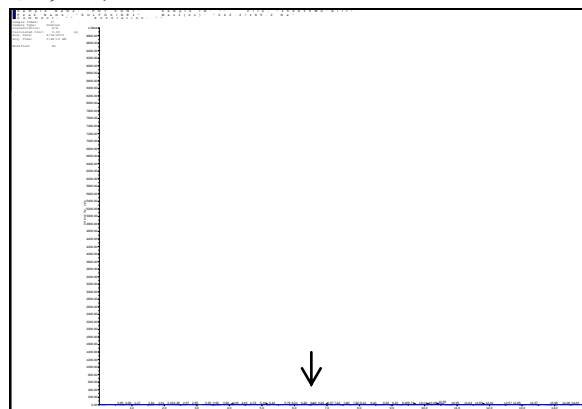
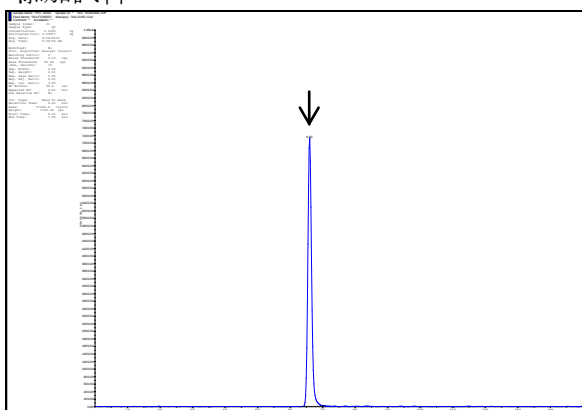


図 10-5 キャベツの SRM クロマトグラム
代謝物 D (m/z +242→185)
添加濃度 : 0.1 ppm

ブランク



添加試料



標準溶液

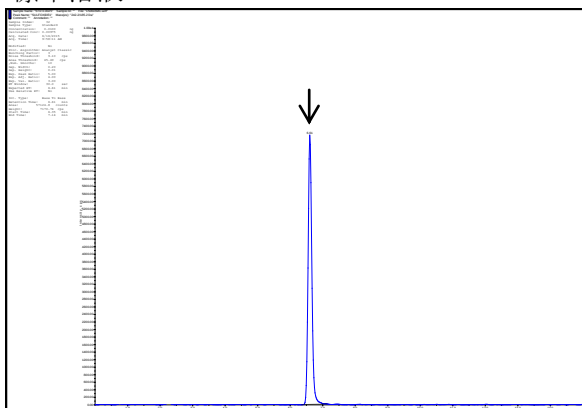
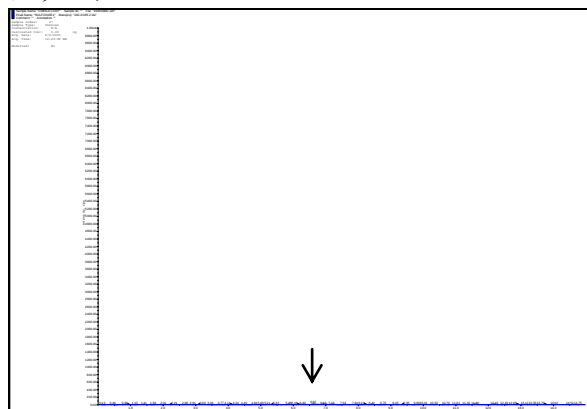
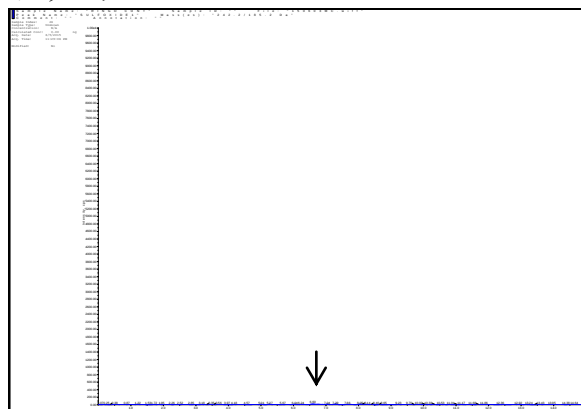


図 10-6 ばれいしょの SRM クロマトグラム
代謝物 D (m/z +242→185)
添加濃度 : 0.05 ppm

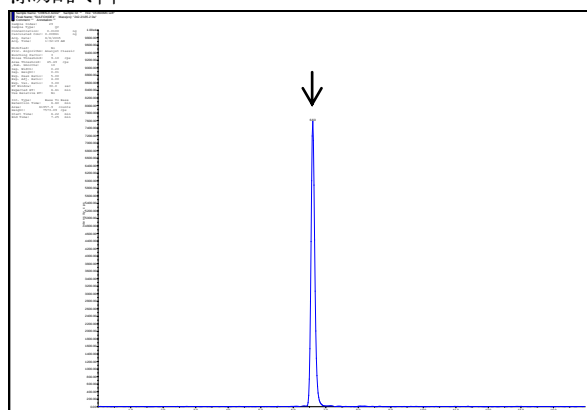
ブランク



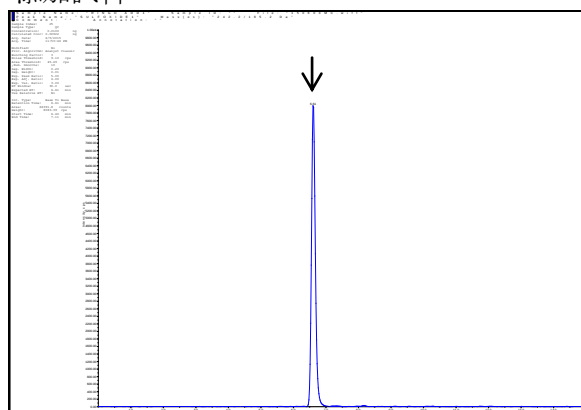
ブランク



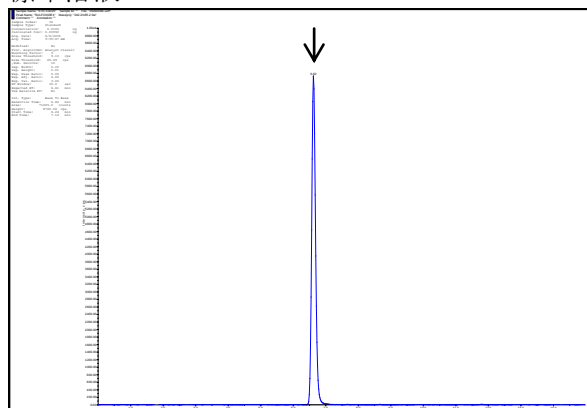
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

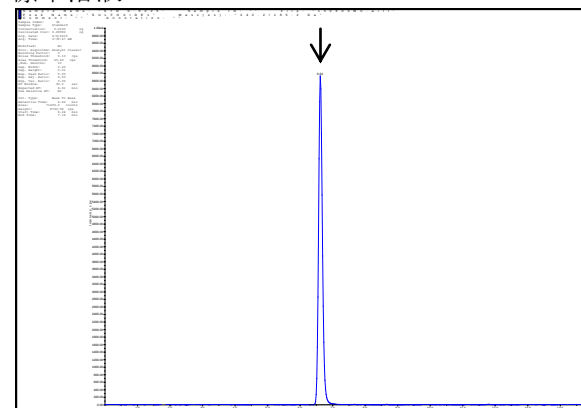
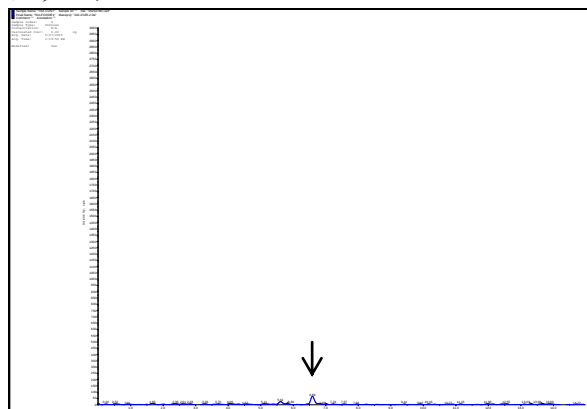


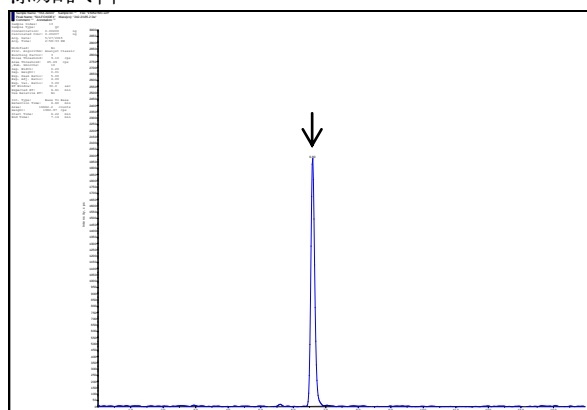
図 10-7 オレンジの SRM クロマトグラム
代謝物 D (m/z +242→185)
添加濃度 : 0.05 ppm

図 10-8 りんごの SRM クロマトグラム
代謝物 D (m/z +242→185)
添加濃度 : 0.05 ppm

ブランク



添加試料



標準溶液

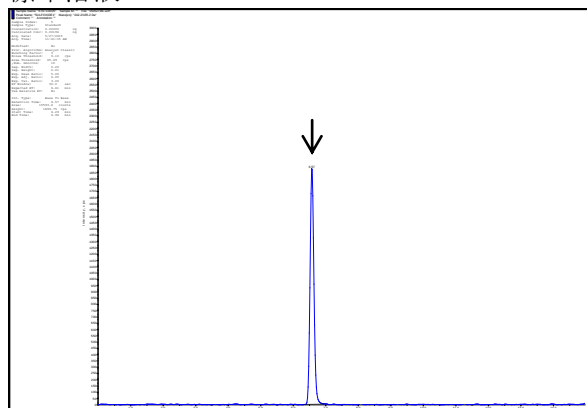
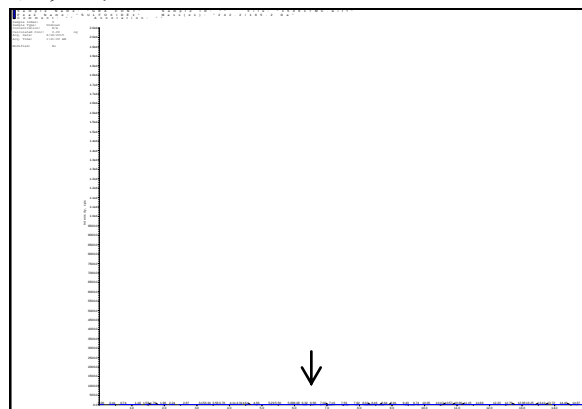
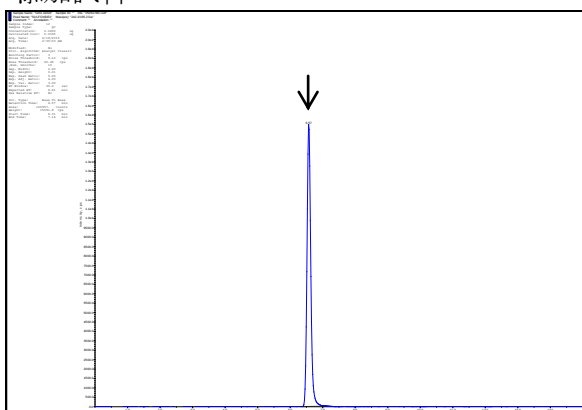


図 10-9 茶の SRM クロマトグラム
代謝物 D (m/z +242→185)
添加濃度 : 0.01 ppm

ブランク



添加試料



標準溶液

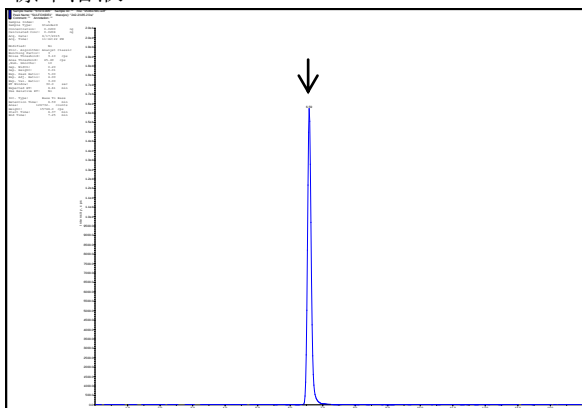
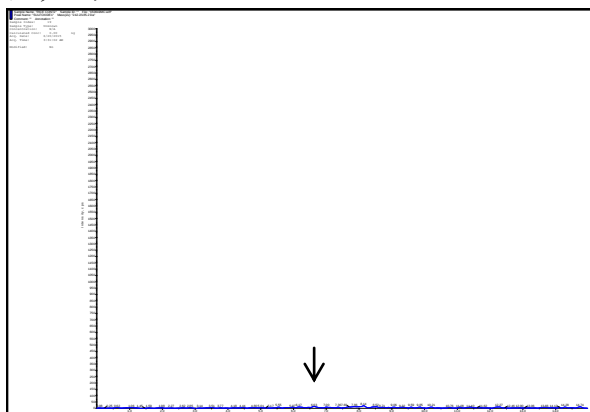
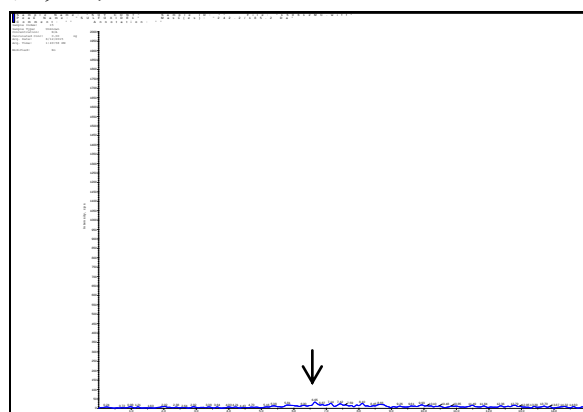


図 10-10 ぶどうの SRM クロマトグラム
代謝物 D (m/z +242→185)
添加濃度 : 0.1 ppm

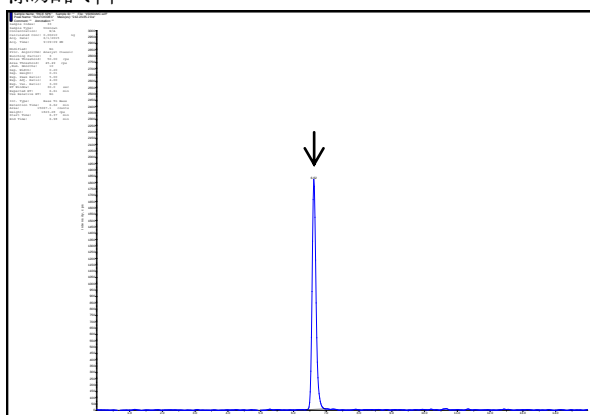
代謝物Dの定量限界の推定におけるクロマトグラム
ブランク



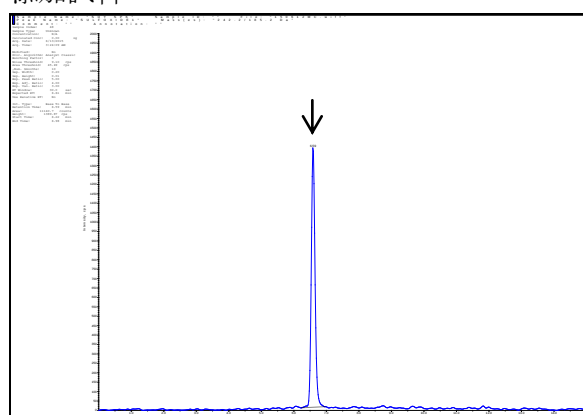
ブランク



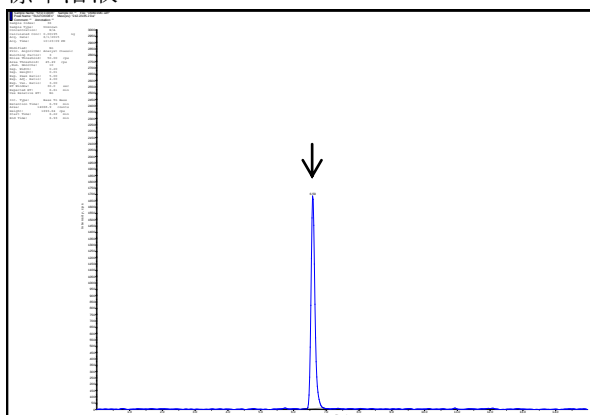
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

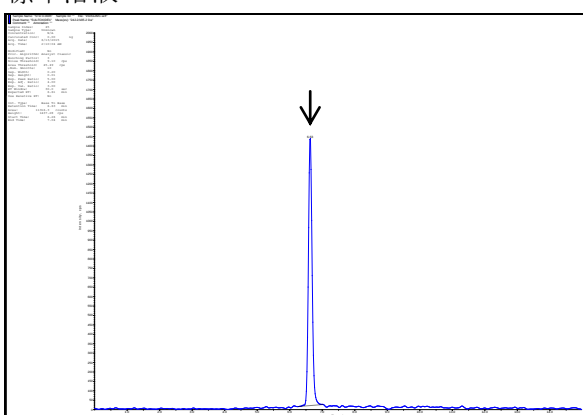
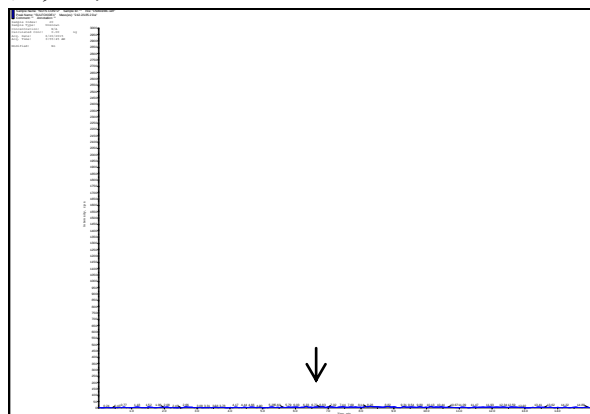


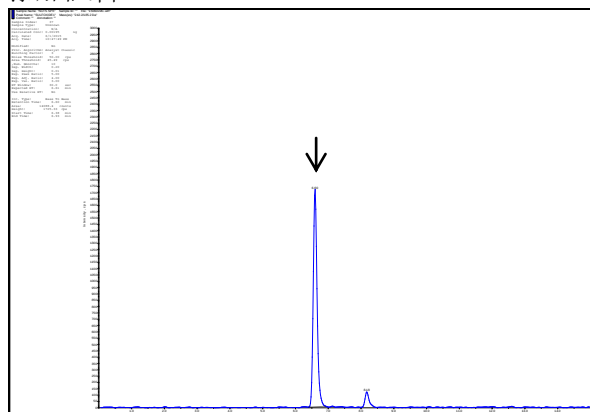
図 11-1 玄米の SRM クロマトグラム
代謝物 D (m/z +242→185)
添加濃度 : 0.01 ppm

図 11-2 大豆の SRM クロマトグラム
代謝物 D (m/z +242→185)
添加濃度 : 0.01 ppm

ブランク



添加試料



標準溶液

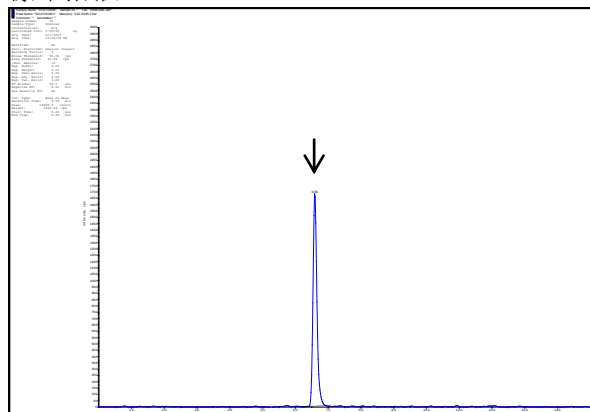
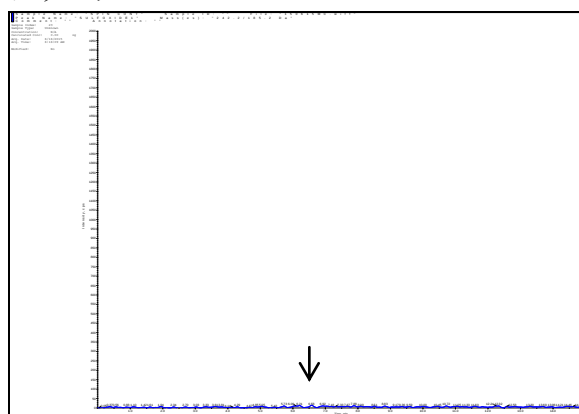
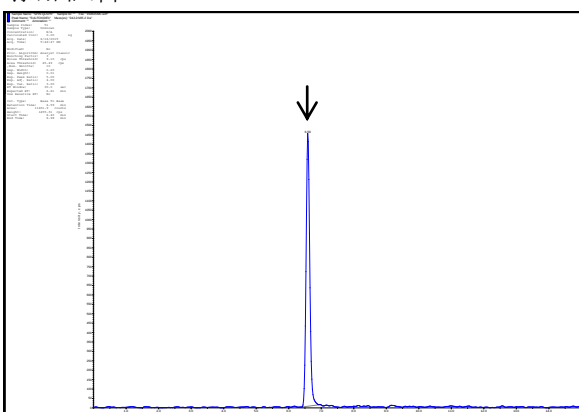


図 11-3 らっかせいの SRM クロマトグラム
代謝物 D (m/z +242→185)
添加濃度 : 0.01 ppm

ブランク



添加試料



標準溶液

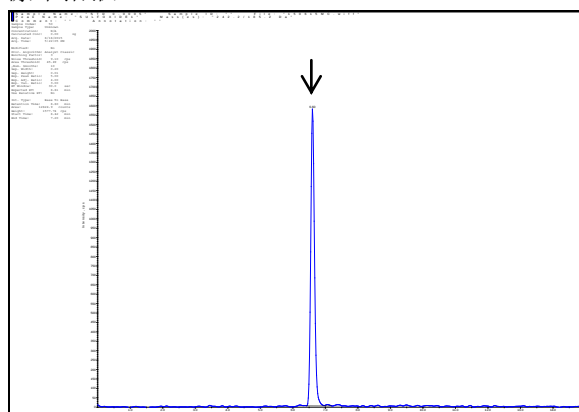
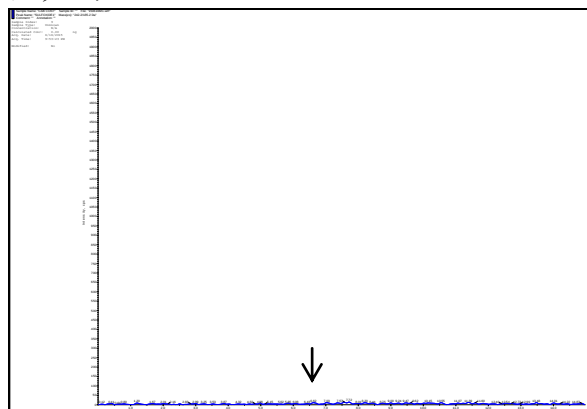
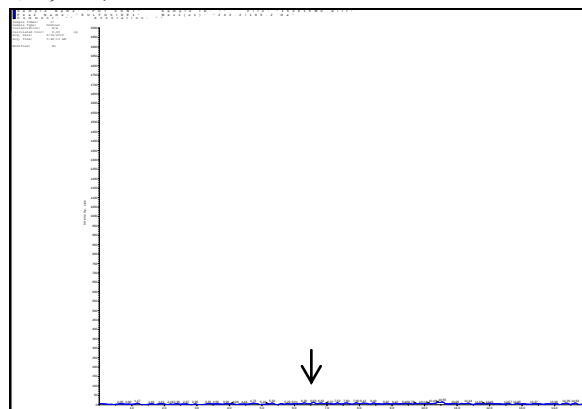


図 11-4 ほうれんそうの SRM クロマトグラム
代謝物 D (m/z +242→185)
添加濃度 : 0.01 ppm

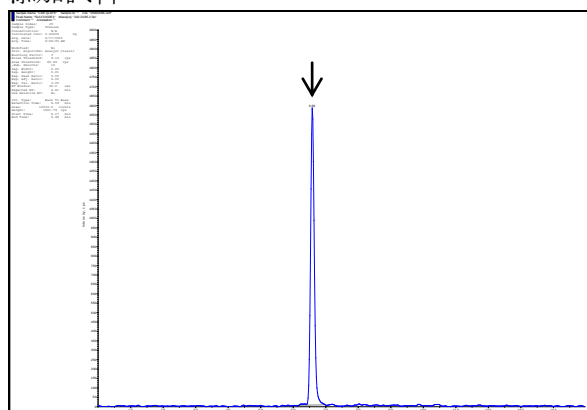
ブランク



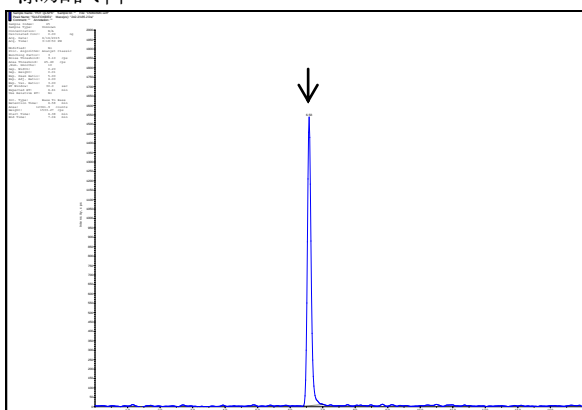
ブランク



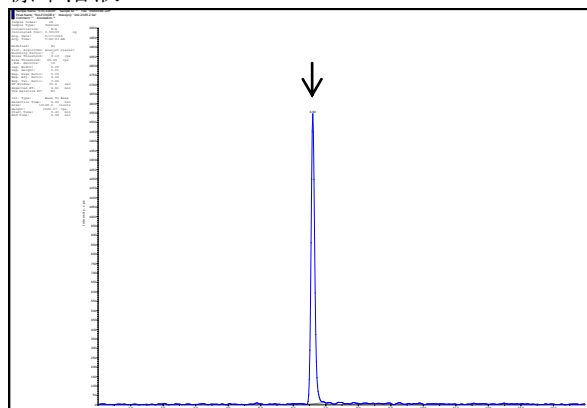
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

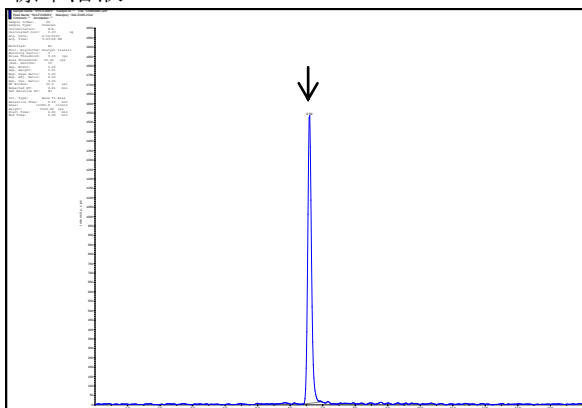
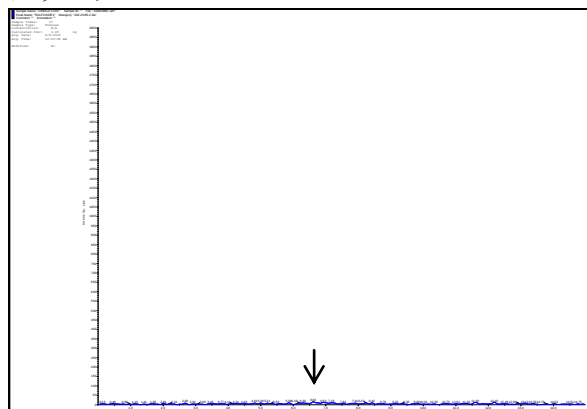


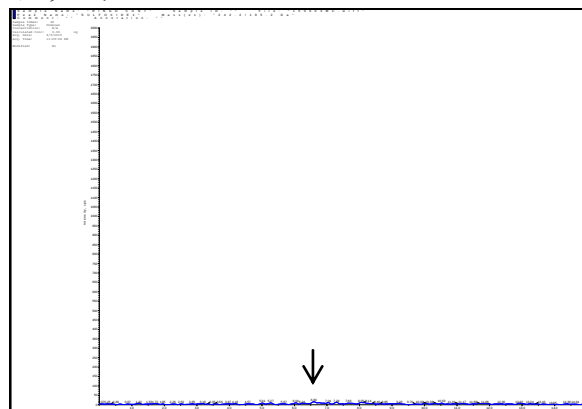
図 11-5 キャベツの SRM クロマトグラム
代謝物 D (m/z +242→185)
添加濃度 : 0.01 ppm

図 11-6 ばれいしょの SRM クロマトグラム
代謝物 D (m/z +242→185)
添加濃度 : 0.01 ppm

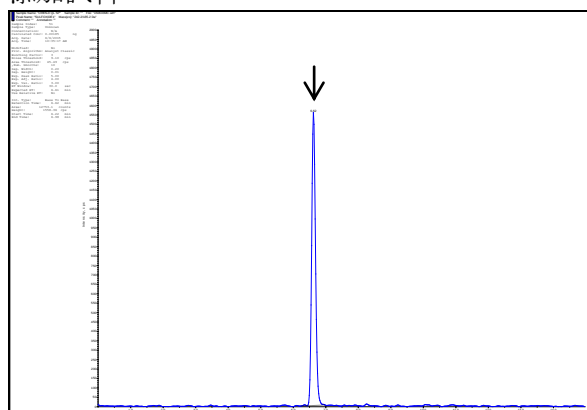
ブランク



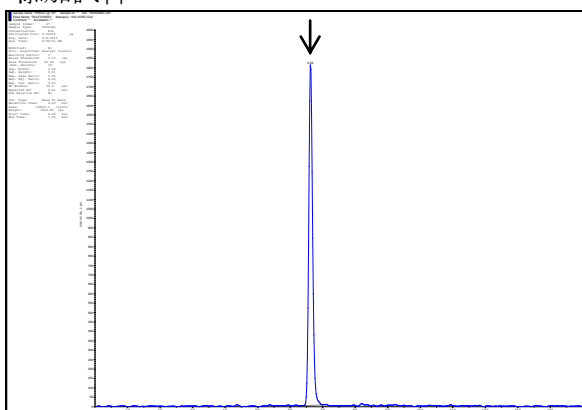
ブランク



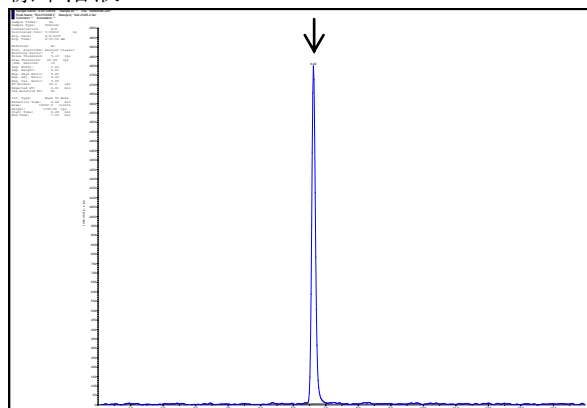
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

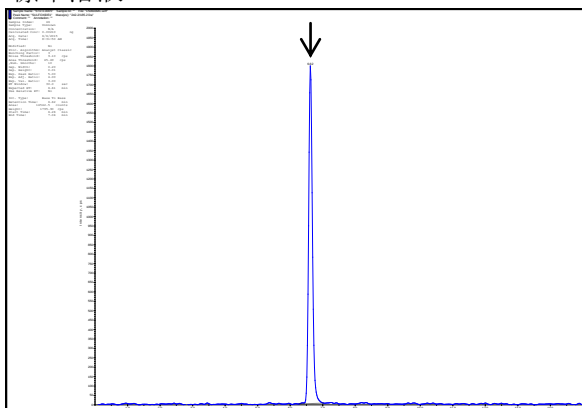
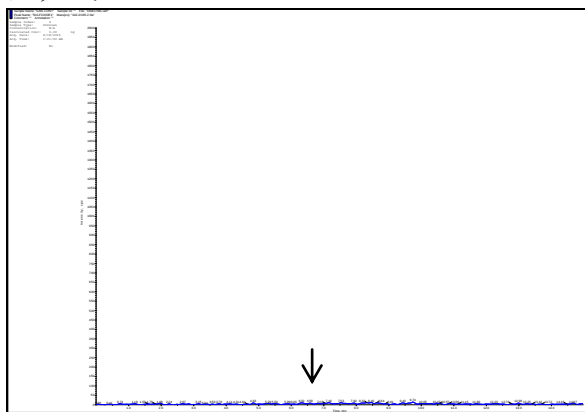


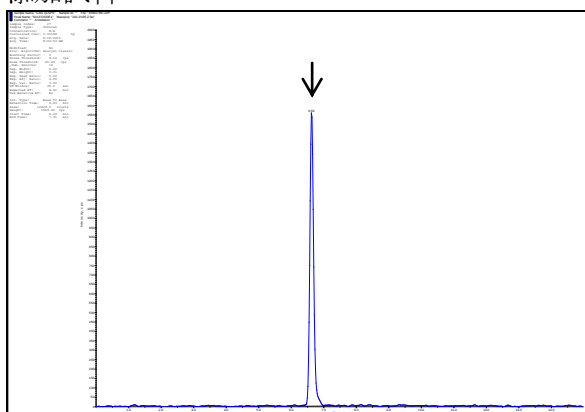
図 11-7 オレンジの SRM クロマトグラム
代謝物 D (m/z +242→185)
添加濃度 : 0.01 ppm

図 11-8 りんごの SRM クロマトグラム
代謝物 D (m/z +242→185)
添加濃度 : 0.01 ppm

ブランク



添加試料



標準溶液

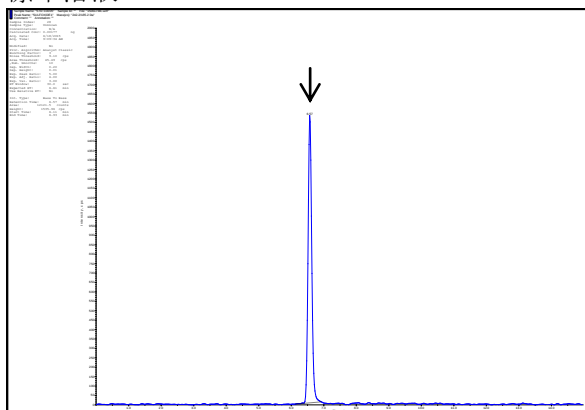
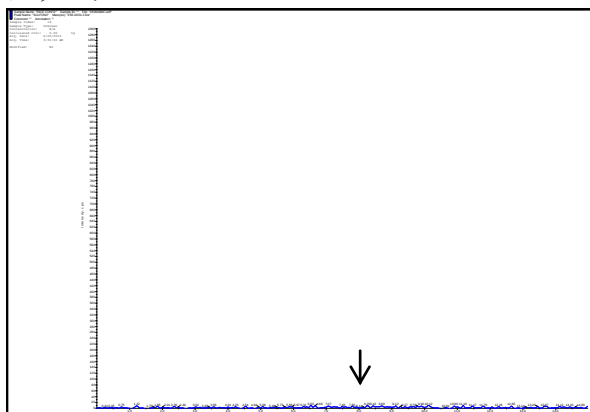
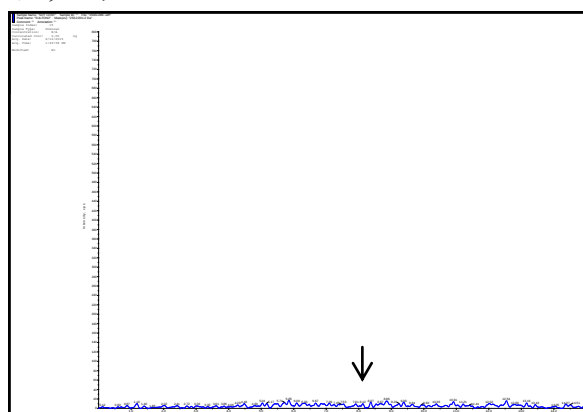


図 11-9 ぶどうの SRM クロマトグラム
代謝物 D (m/z +242→185)
添加濃度 : 0.01 ppm

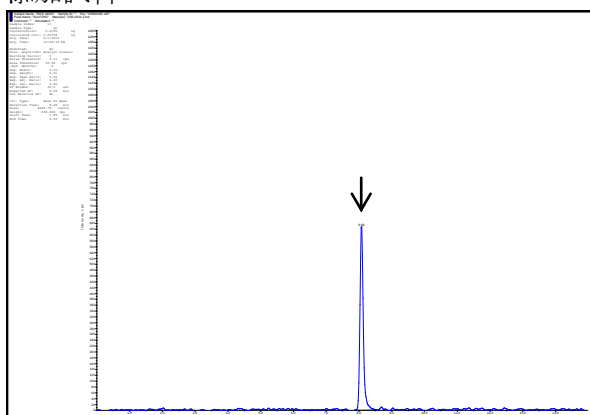
代謝物Hの添加回収試験におけるクロマトグラム
ブランク



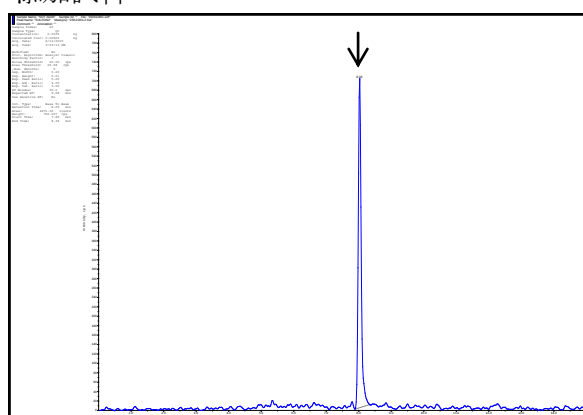
ブランク



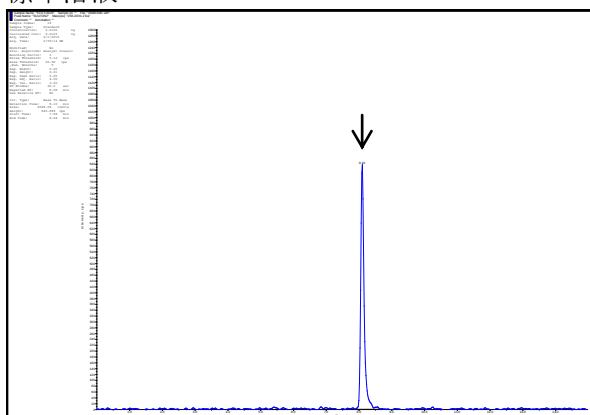
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

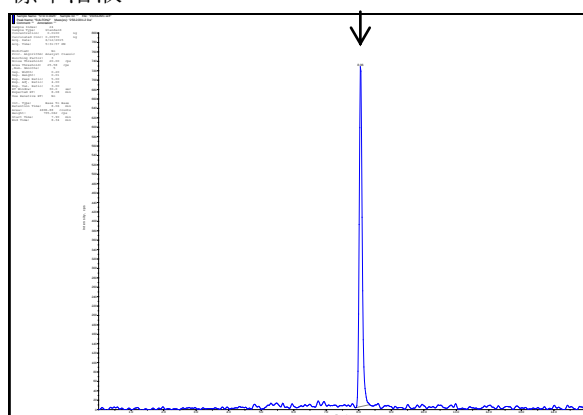
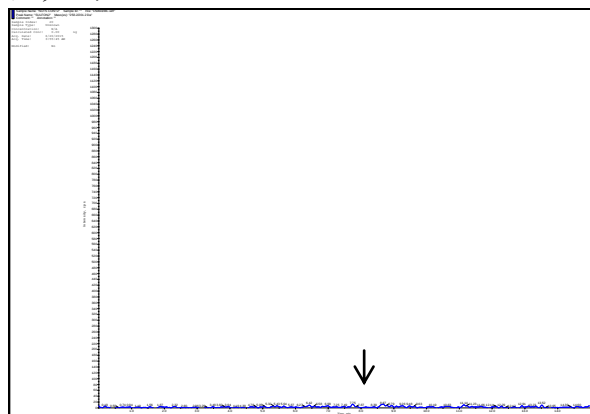


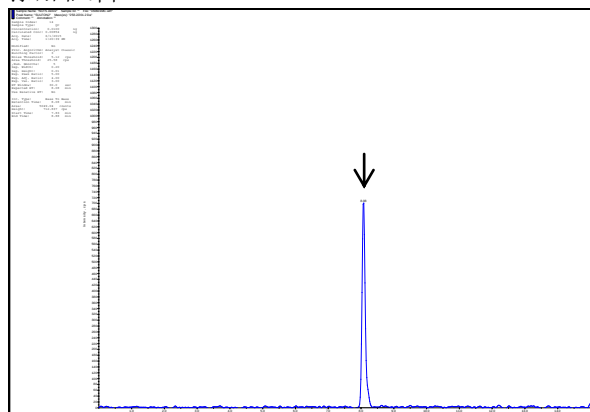
図 12-1 玄米の SRM クロマトグラム
代謝物 H (m/z +258→201)
添加濃度 : 0.05 ppm

図 12-2 大豆の SRM クロマトグラム
代謝物 H (m/z +258→201)
添加濃度 : 0.05 ppm

ブランク



添加試料



標準溶液

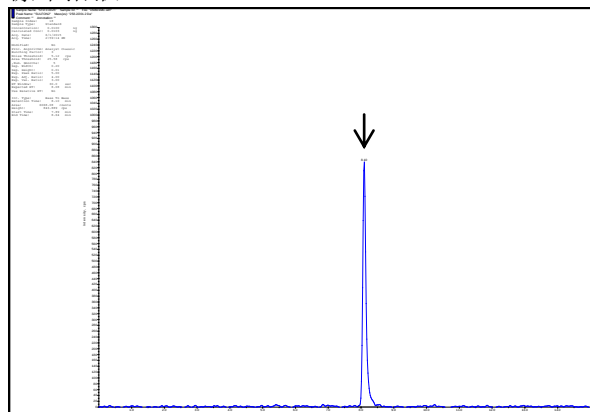
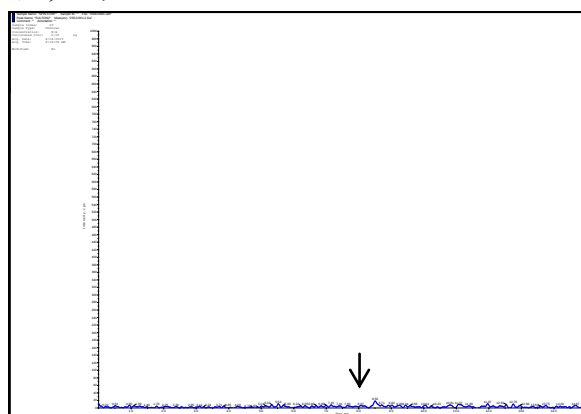
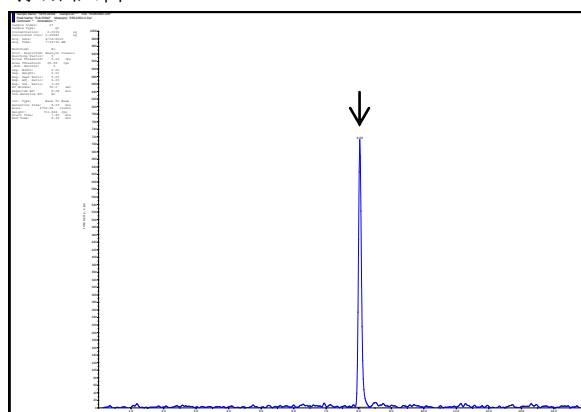


図 12-3 らっかせいの SRM クロマトグラム
代謝物 H (m/z +258→201)
添加濃度 : 0.05 ppm

ブランク



添加試料



標準溶液

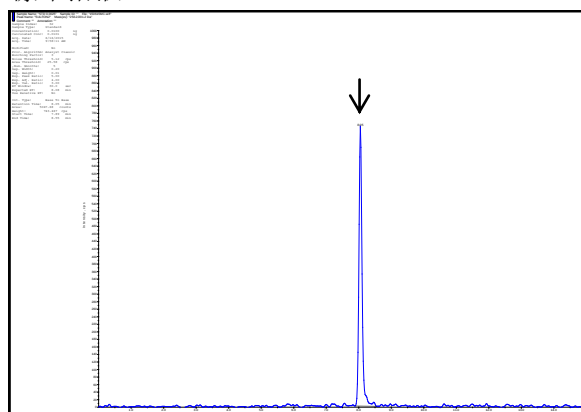
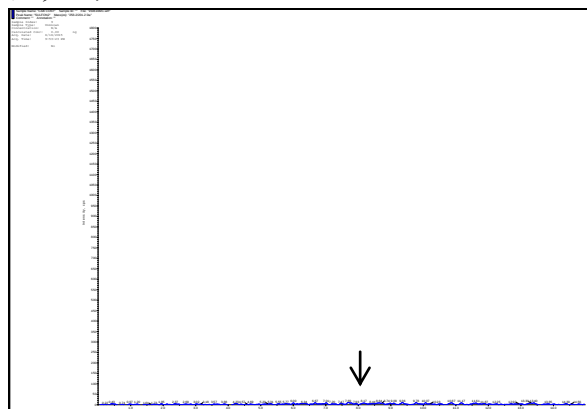
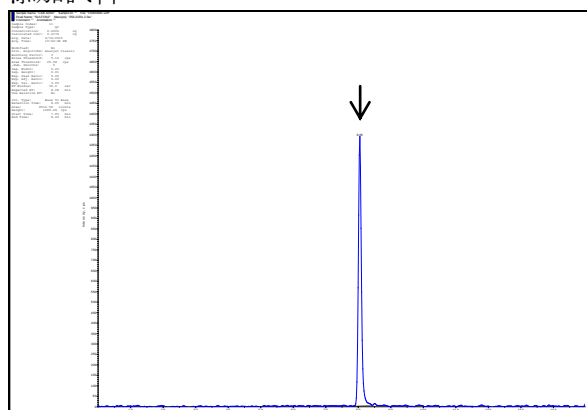


図 12-4 ほうれんそうの SRM クロマトグラム
代謝物 H (m/z +258→201)
添加濃度 : 0.05 ppm

ブランク



添加試料



標準溶液

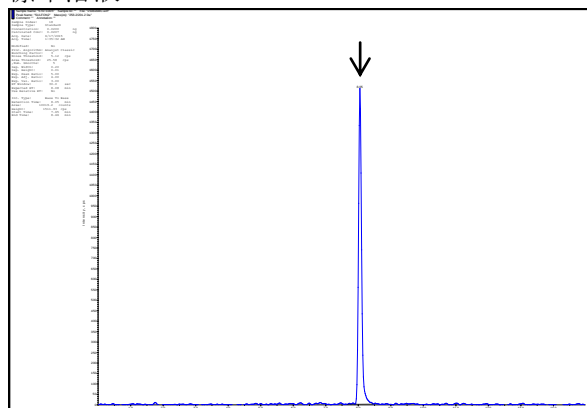
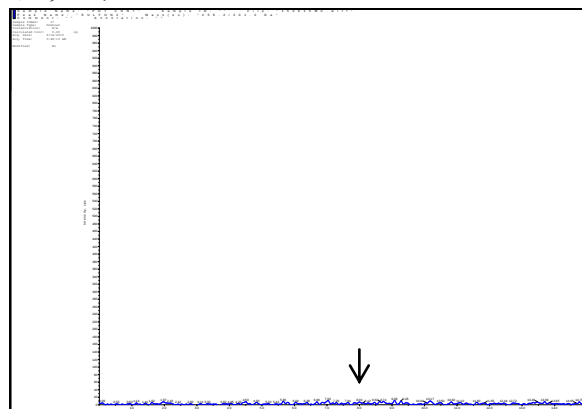
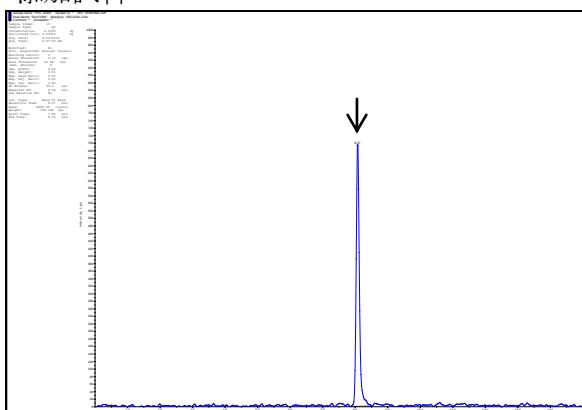


図 12-5 キャベツの SRM クロマトグラム
代謝物 H (m/z +258→201)
添加濃度 : 0.1 ppm

ブランク



添加試料



標準溶液

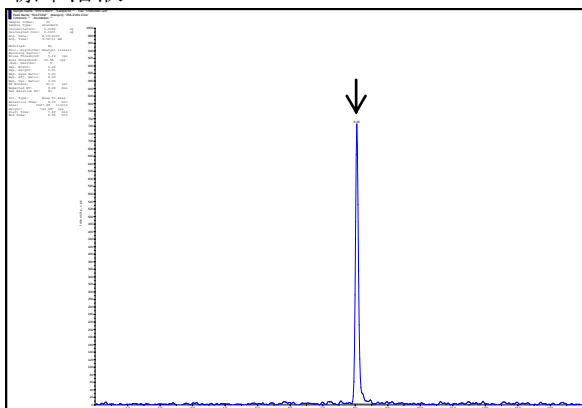
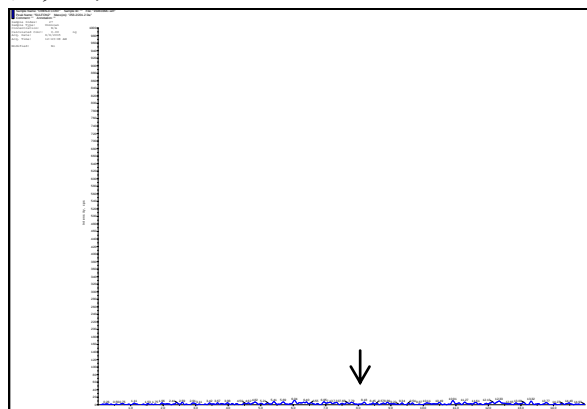
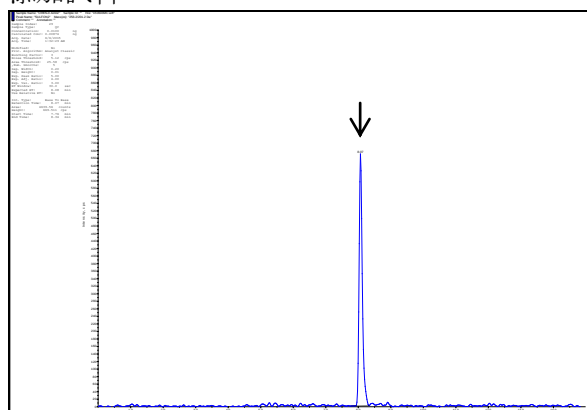


図 12-6 ばれいしょの SRM クロマトグラム
代謝物 H (m/z +258→201)
添加濃度 : 0.05 ppm

ブランク



添加試料



標準溶液

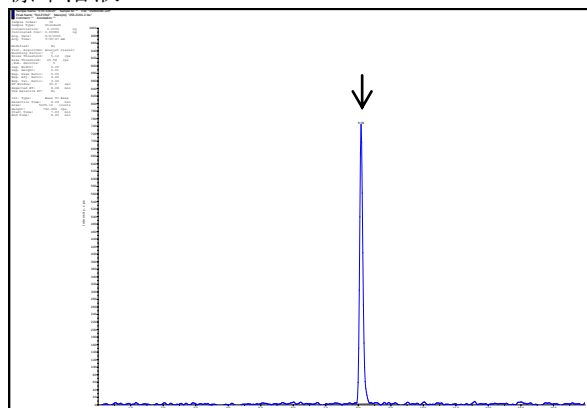
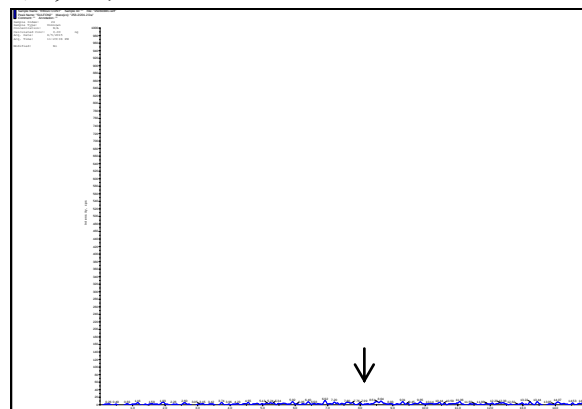
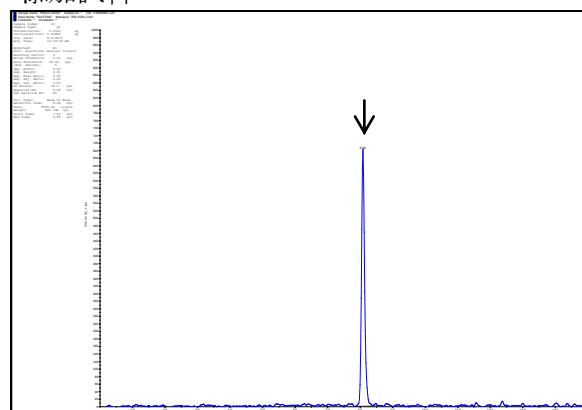


図 12-7 オレンジの SRM クロマトグラム
代謝物 H (m/z +258→201)
添加濃度 : 0.05 ppm

ブランク



添加試料



標準溶液

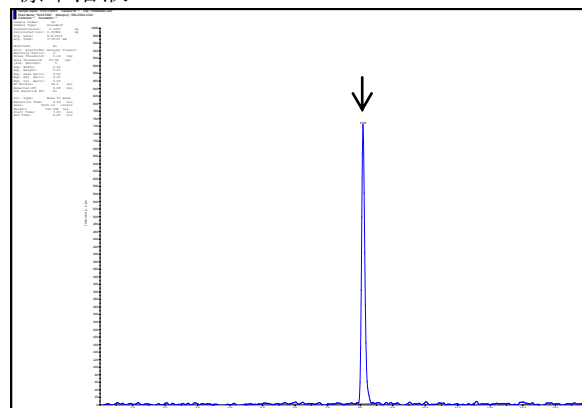
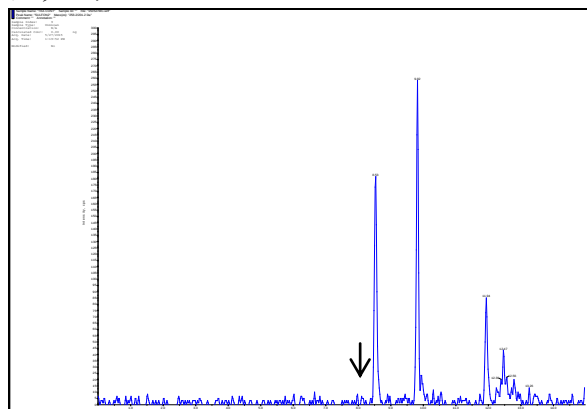
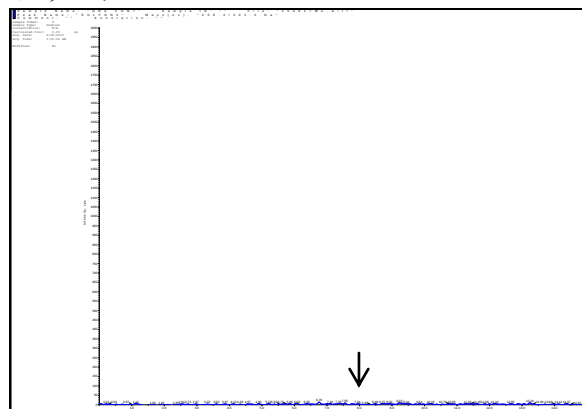


図 12-8 りんごの SRM クロマトグラム
代謝物 H (m/z +258→201)
添加濃度 : 0.05 ppm

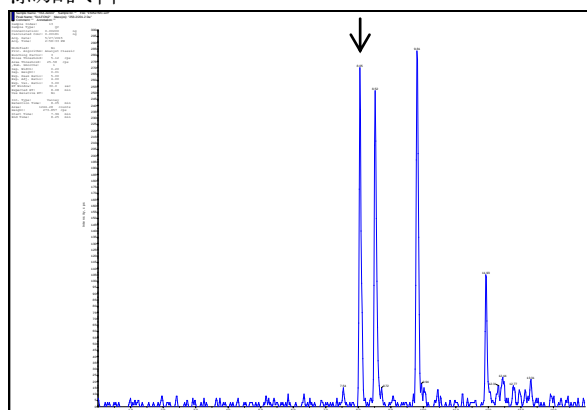
ブランク



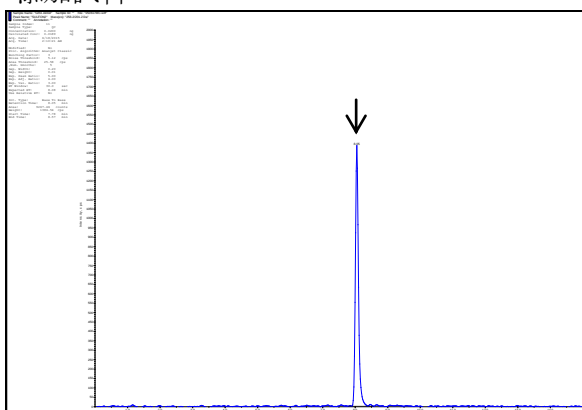
ブランク



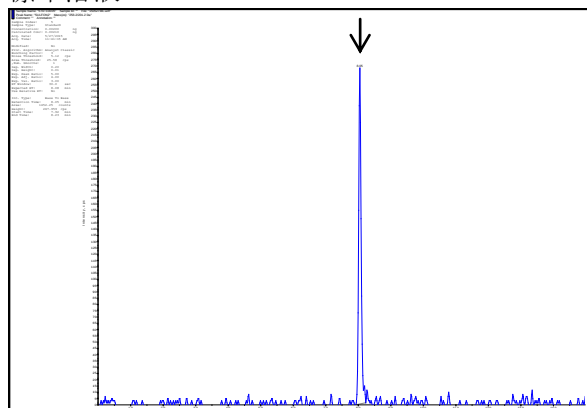
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

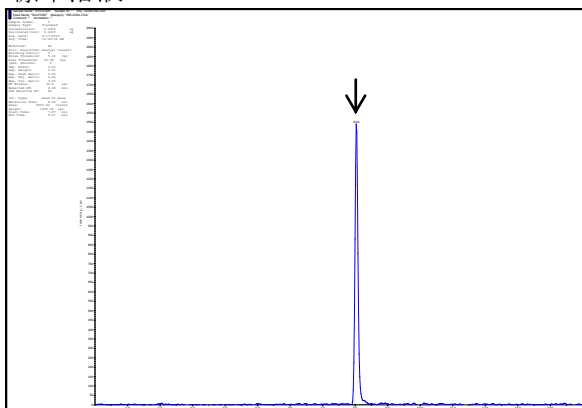
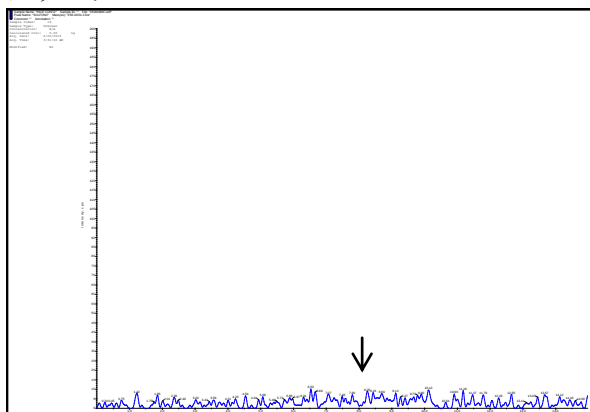


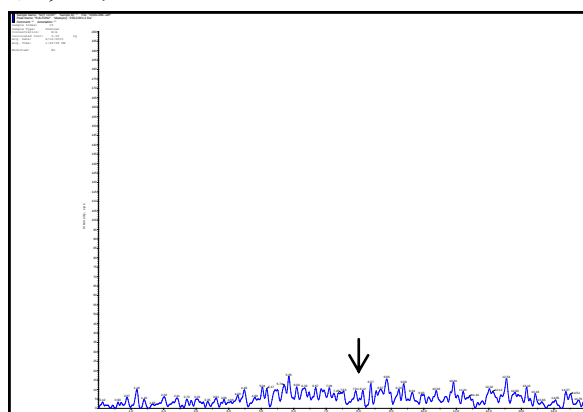
図 12-9 茶の SRM クロマトグラム
代謝物 H (m/z +258→201)
添加濃度 : 0.01 ppm

図 12-10 ぶどうの SRM クロマトグラム
代謝物 H (m/z +258→201)
添加濃度 : 0.1 ppm

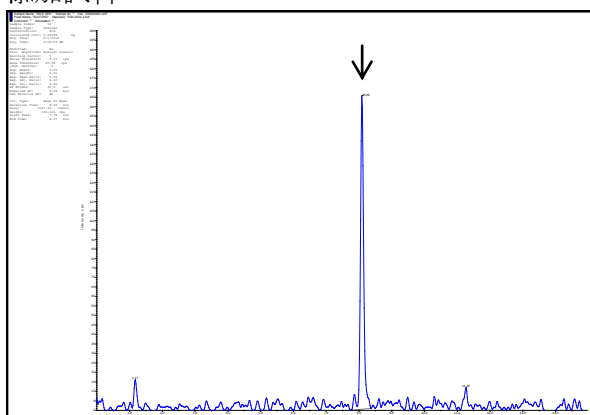
代謝物Hの定量限界の推定におけるクロマトグラム
 ブランク



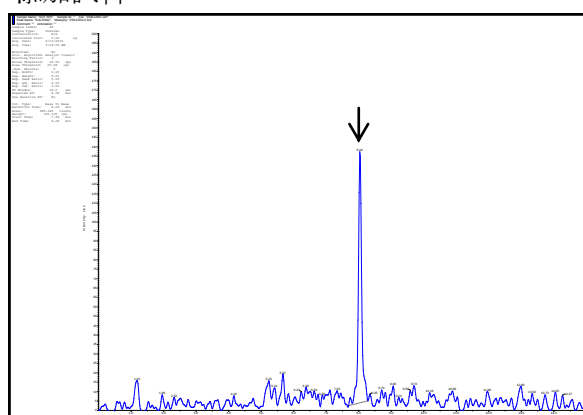
ブランク



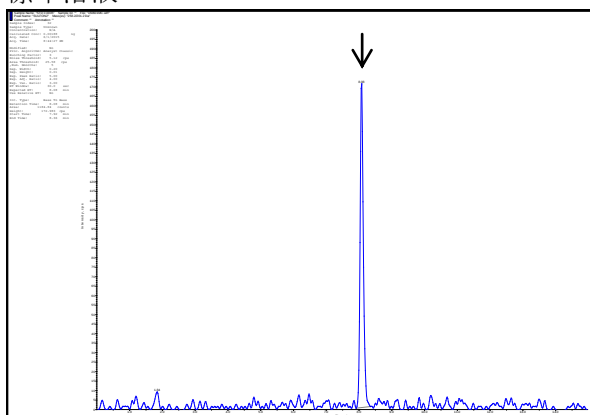
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

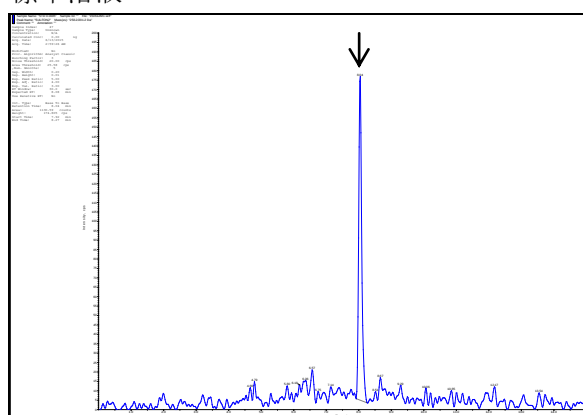
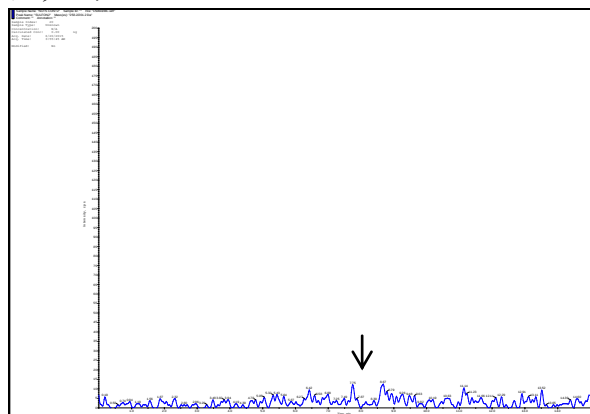


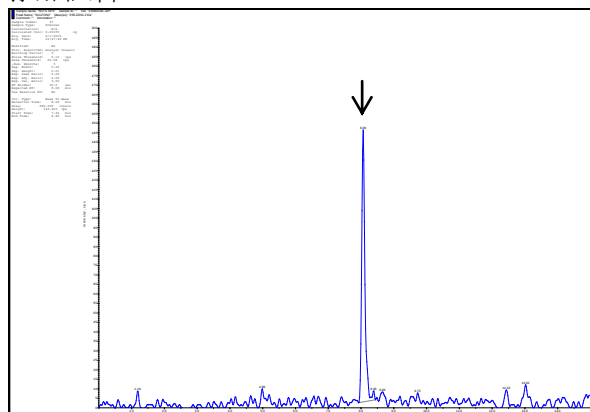
図 13-1 玄米の SRM クロマトグラム
 代謝物 H (m/z +258→201)
 添加濃度 : 0.01 ppm

図 13-2 大豆の SRM クロマトグラム
 代謝物 H (m/z +258→201)
 添加濃度 : 0.01 ppm

ブランク



添加試料



標準溶液

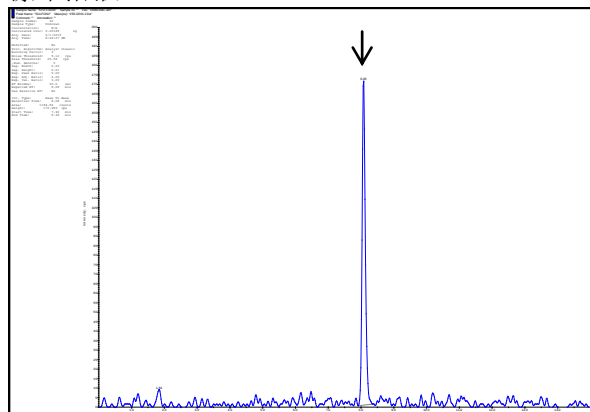
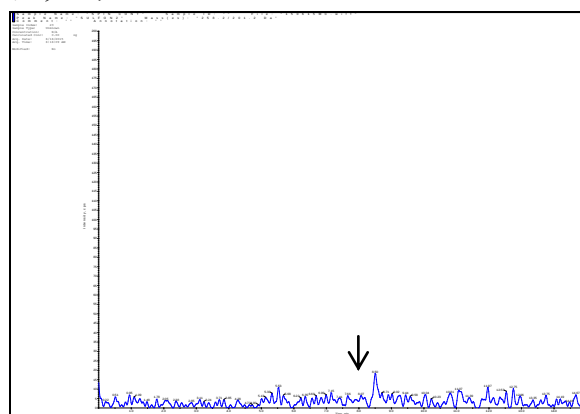
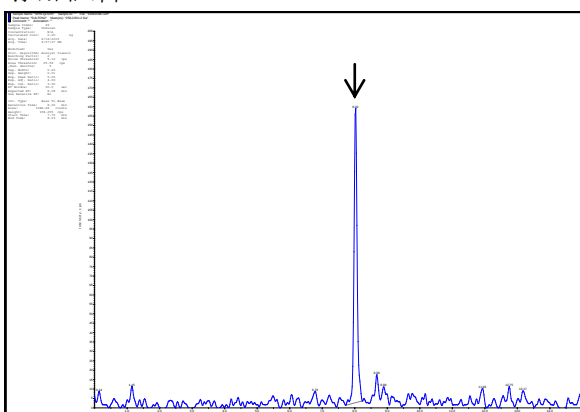


図 13-3 らっかせいの SRM クロマトグラム
代謝物 H (m/z +258→201)
添加濃度 : 0.01 ppm

ブランク



添加試料



標準溶液

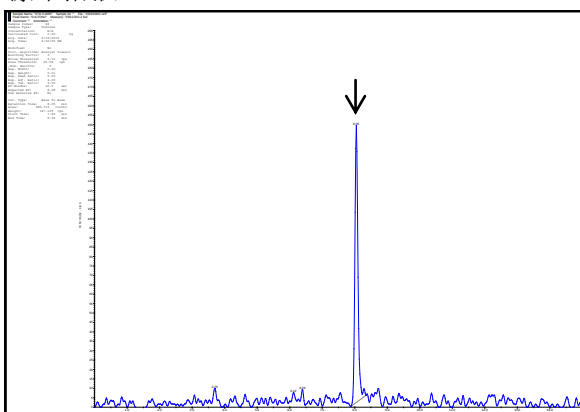
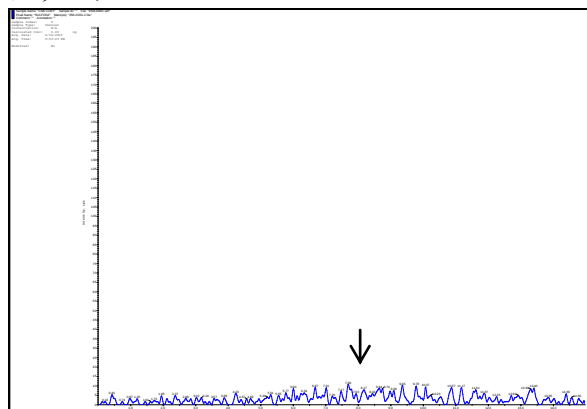
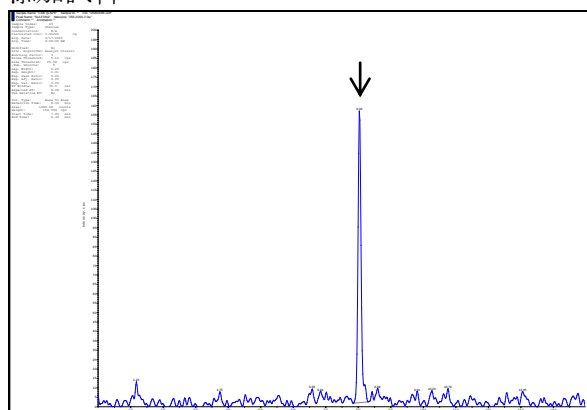


図 13-4 ほうれんそうの SRM クロマトグラム
代謝物 H (m/z +258→201)
添加濃度 : 0.01 ppm

ブランク



添加試料



標準溶液

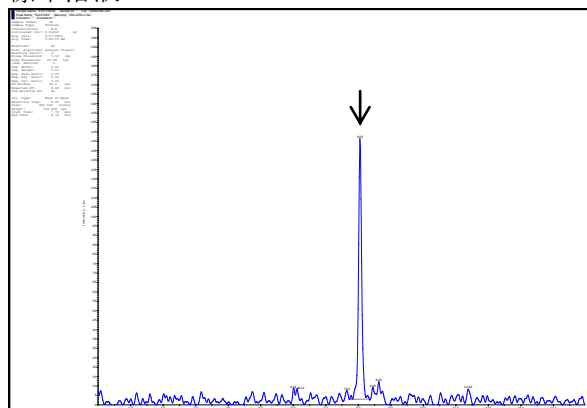
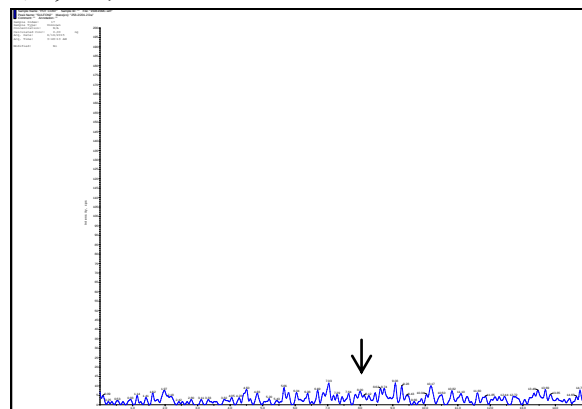
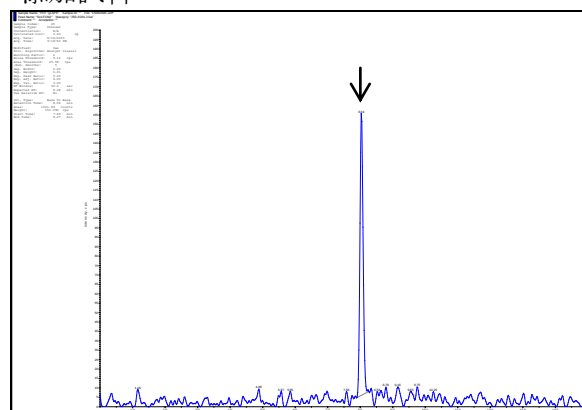


図 13-5 キャベツの SRM クロマトグラム
代謝物 H (m/z +258→201)
添加濃度 : 0.01 ppm

ブランク



添加試料



標準溶液

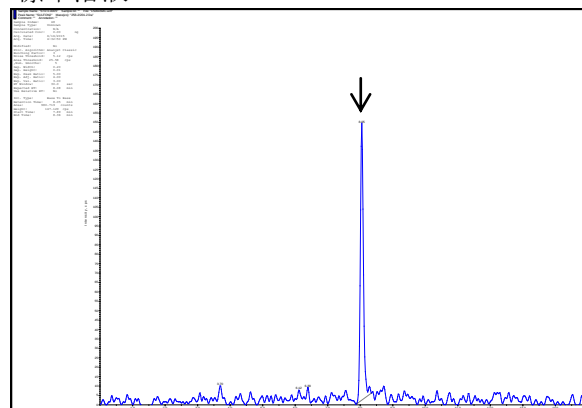
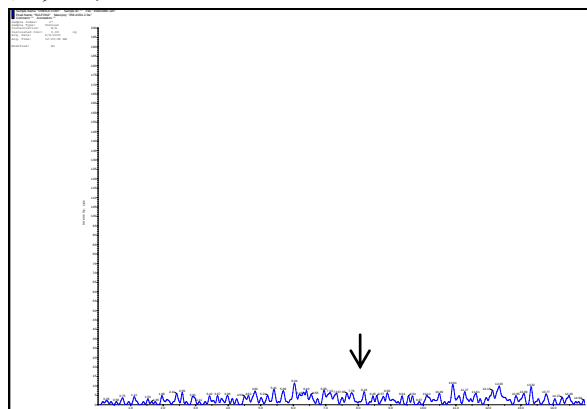
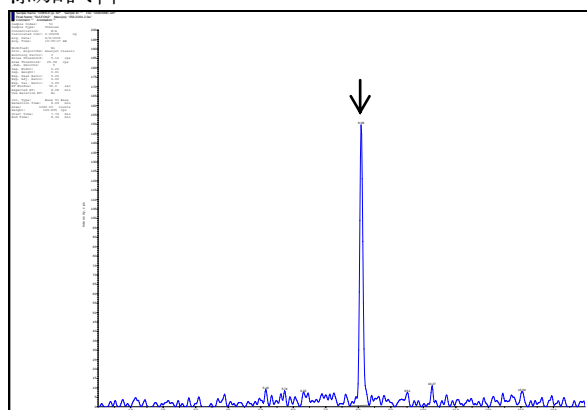


図 13-6 ばれいしょの SRM クロマトグラム
代謝物 H (m/z +258→201)
添加濃度 : 0.01 ppm

ブランク



添加試料



標準溶液

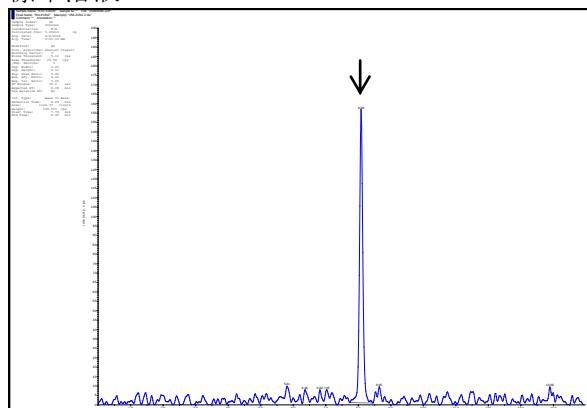
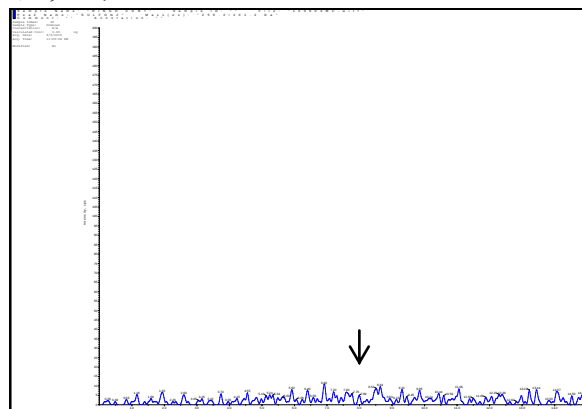
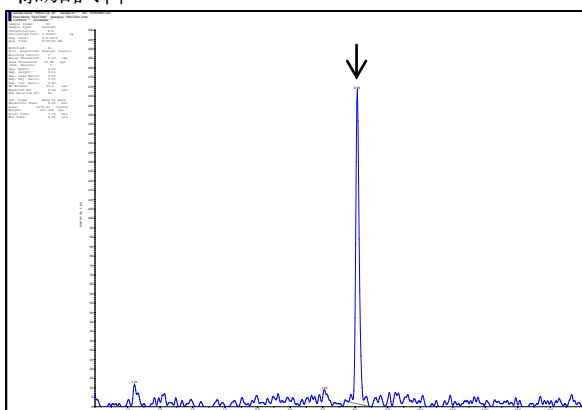


図 13-7 オレンジの SRM クロマトグラム
代謝物 H (m/z +258→201)
添加濃度 : 0.01 ppm

ブランク



添加試料



標準溶液

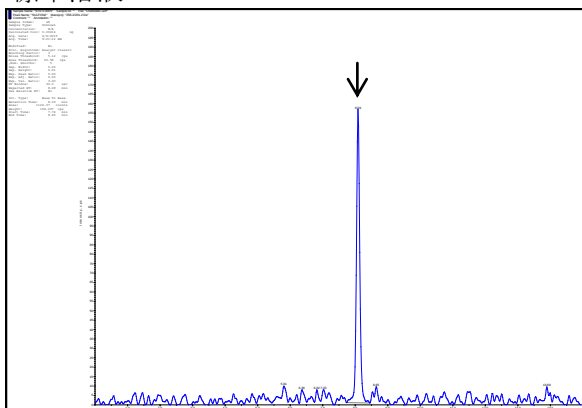
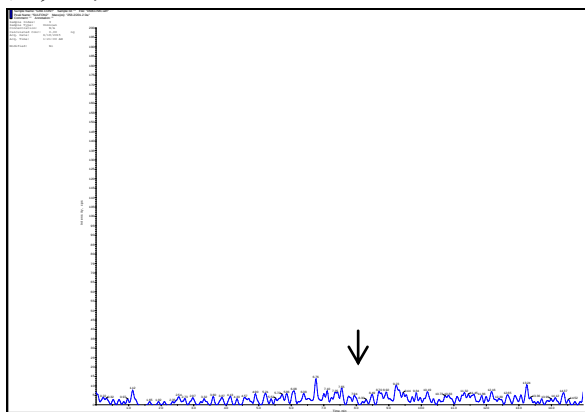
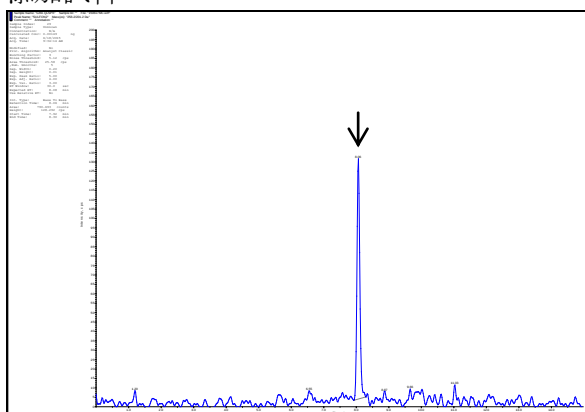


図 13-8 りんごの SRM クロマトグラム
代謝物 H (m/z +258→201)
添加濃度 : 0.01 ppm

ブランク



添加試料



標準溶液

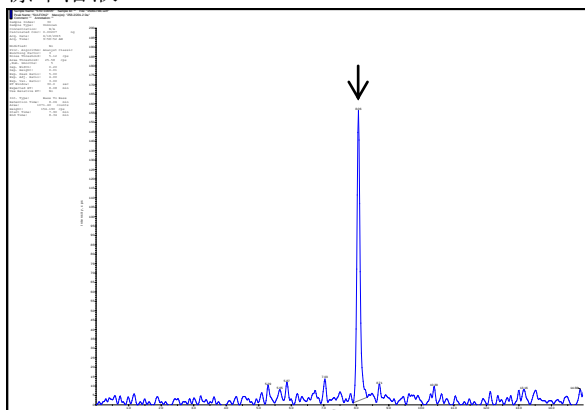
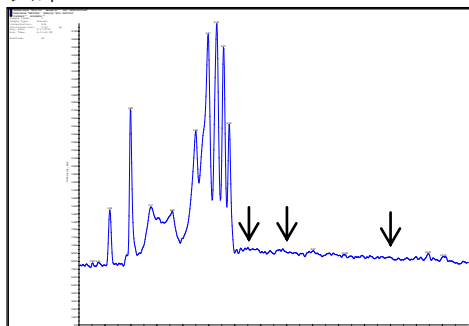
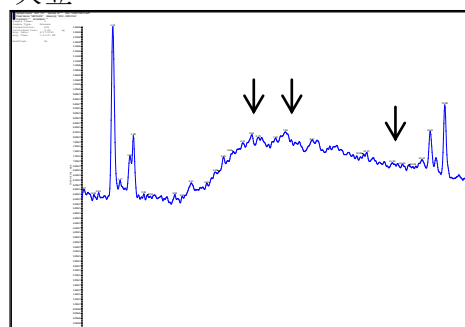


図 13-9 ぶどうの SRM クロマトグラム
代謝物 H (m/z +258→201)
添加濃度 : 0.01 ppm

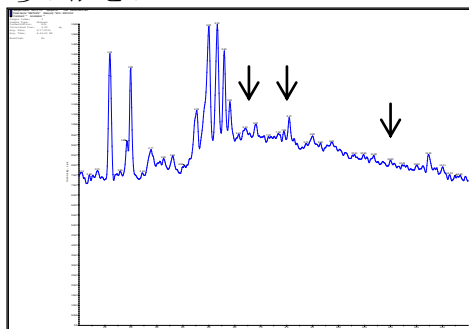
玄米



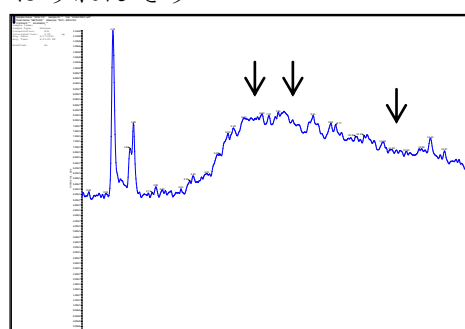
大豆



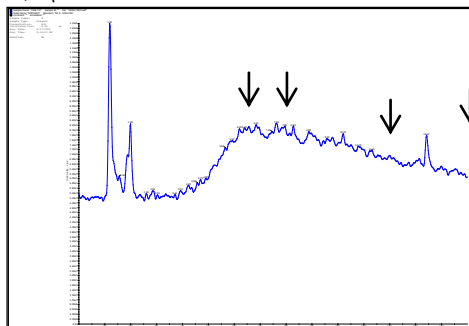
らっかせい



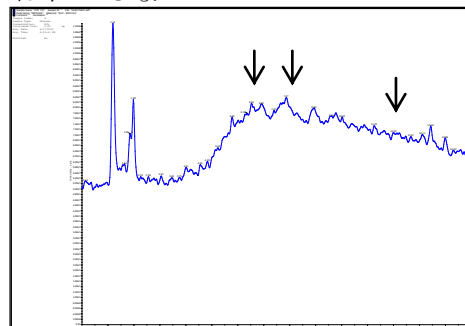
ほうれんそう



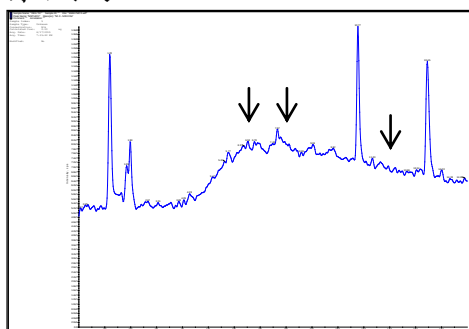
キャベツ



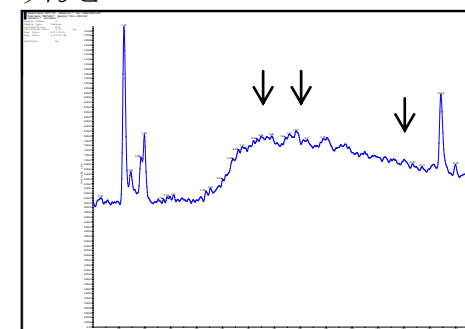
ばれいしょ



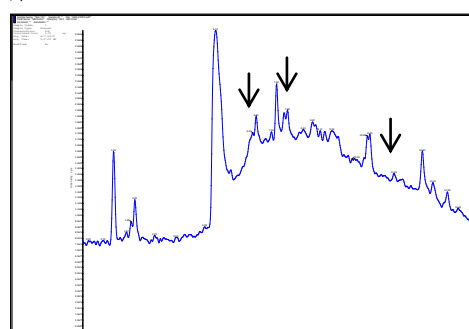
オレンジ



りんご



茶



ぶどう

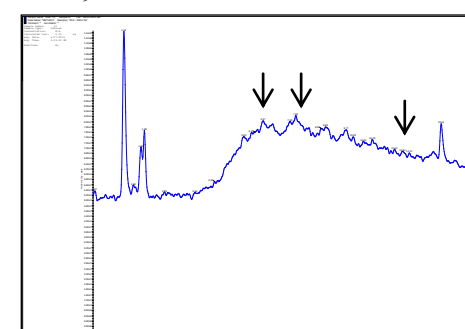


図 14 ブランク試料のトータルイオンクロマトグラム (スキャン範囲 : 50~500 m/z)