

※ 本報告書は、試験法開発における検討結果をまとめたものであり、試験法の実施に際して参考として下さい。なお、報告書の内容と通知または告示試験法との間に齟齬がある場合には、通知または告示試験法が優先することをご留意ください。

平成 22 年度

食品に残留する農薬等の成分である物質
(レピメクチン)の試験法開発事業報告書

レピメクチン試験法の検討結果

[緒言]

1. 目的及び試験法の検討方針

レピメクチンは三共株式会社（現三井化学アグロ株式会社）により開発された殺虫剤であり、ミルベマイシン誘導体に関する研究の中で開発された。「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、試験法の開発を行った。

レピメクチンの類縁物質であるミルベメクチン試験法(旧環境省法)を参考に試験法を検討し、ミルベメクチンについても同時分析が可能か検証した。

1) 規制対象物質

・レピメクチンA3

(*(10E,14E,16E)*-(*1R,4S,5'S,6R,6'R,8R,12R,13S,20R,21R,24S*)-21,24-ジヒドロキシ-5',6',11,13,22-ペンタメチル-2-オキソ-3,7,19-トリオキサテトラシクロ[15.6.1.1^{4,8}.0^{20,24}]*]ペンタコサ-10,14,16,22-テトラエン-6-スピロ-2'-テトラヒドロピラン-12-イル (Z)*-2-メトキシイミノ-2-フェニルアセタート)

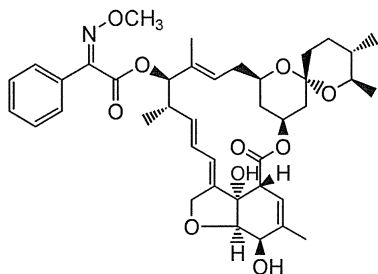
・レピメクチンA4

(*(10E,14E,16E)*-(*1R,4S,5'S,6R,6'R,8R,12R,13S,20R,21R,24S*)-6'-エチル-21,24-ジヒドロキシ-5',11,13,22-テトラメチル-2-オキソ-3,7,19-トリオキサテトラシクロ[15.6.1.1^{4,8}.0^{20,24}]*]ペンタコサ-10,14,16,22-テトラエン-6-スピロ-2'-テトラヒドロピラン-12-イル (Z)*-2-メトキシイミノ-2-フェニルアセタート)

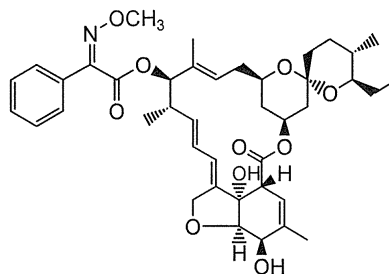
2. 分析対象化合物の構造式、物理化学的性質、基準値等に関する情報

1) 構造式及び物理化学的性質

レピメクチンA3



レピメクチンA4



レピメクチン A3

化学式：C₄₀H₅₁NO₁₀

分子量：705.83

化学名 (IUPAC)：(*10E,14E,16E*)-(*1R,4S,5'S,6R,6'R,8R,12R,13S,20R,21R,24S*)-21,24-dihydroxy-5',6',11,13,22-pentamethyl-2-oxo-3,7,19-trioxatetra-cyclo[15.6.1.1^{4,8}.0^{20,24}]*]pentacos-10,14,16,22-tetraene-6-spiro-2'-tetrahydropyran-12-yl (Z)*-2-methoxyimino-2-phenylacetate

外 観：類白色不定形結晶

融 点：153.8～155.5℃

蒸気圧：<2.97×10⁻⁶ Pa (80℃)

溶解性：水 103.47 μg/L

トルエン、ジクロロメタン、アセトン、メタノール、酢酸エチル>250 g/L

n-ヘキサン 4.43 g/L (以上 20℃)

オクタノール/水分配係数：log P_{ow} (25℃) =6.5

安定性：加水分解半減期：71.6日 (pH 4.0) 71.6日 (pH 7.0) 56.8日 (pH 9.0) (25℃)

(出典：レピメクチン農薬抄録)

レピメクチンA4

化学式：C₄₁H₅₃NO₁₀

分子量：719.86

化学名 (IUPAC)：(10*E*,14*E*,16*E*)-(1*R*,4*S*,5'*S*,6*R*,6'*R*,8*R*,12*R*,13*S*,20*R*,21*R*,24*S*)-6'-ethyl-21,24-dihydroxy-5',11,13,22-tetramethyl-2-oxo-3,7,19-trioxatetra-cyclo[15.6.1.1^{4,8}.0^{20,24}]pentacosa-10,14,16,22-tetraene-6-spiro-2'-tetrahydropyran-12-yl (Z)-2-methoxyimino-2-phenylacetate

外 観：類白色不定形結晶

融 点：152.3～154.0℃

蒸気圧：<4.78×10⁻⁶ Pa (80℃)

溶解性：水 46.79 μg/L

トルエン、ジクロロメタン、アセトン、メタノール>250 g/L、酢酸エチル 226.90 g/L、*n*-ヘキサン 0.89 g/L (以上 20℃)

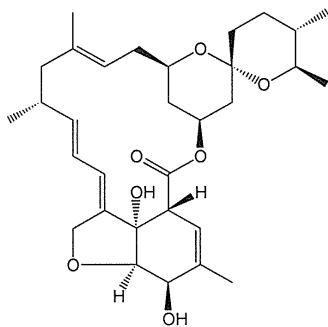
オクタノール/水分配係数：log P_{ow} (25℃) =7.0

安定性：加水分解半減期：75.2日 (pH 4.0) 86.0日 (pH 7.0) 97.1日 (pH 9.0) (25℃)

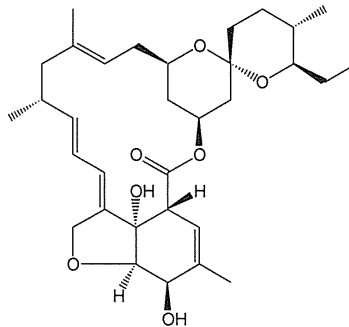
(出典：レピメクチン農薬抄録)

【参考】

ミルベメクチンA3



ミルベメクチンA4



ミルベメクチンA3

化学式：C₃₁H₄₄O₇

分子量：528.68

化学名 (IUPAC)：(10*E*,14*E*,16*E*,22*Z*)-(1*R*,4*S*,5'*S*,6*R*,6'*R*,8*R*,13*R*,20*R*,21*R*,24*S*)-21,24-dihydroxy-5',6',11,13,22-pentamethyl-3,7,19-trioxatetracyclo[15.6.1.1^{4,8}.0^{20,24}]pentacosa-10,14,16,22-tetraene-6-spiro-2'-tetrahydropyran-2-one

外 観：白色結晶

融 点：212～215℃

蒸気圧：9.73×10⁻¹² Pa (20℃)

溶解性：水 0.88 ppm (20℃)

メタノール 64.8、エタノール 41.9、アセトン 66.1、*n*-ヘキサン 1.4、ベンゼン 143.1、酢酸エチル 69.5 (以上 g/L 20℃)

オクタノール/水分配係数：log P_{ow}=5.3

(出典：The e-Pesticide Manual 15th ed.,ver.5.0)

ミルベメクチンA4

化学式：C₃₂H₄₆O₇

分子量：542.71

化学名 (IUPAC) : (10*E*,14*E*,16*E*,22*Z*)-(1*R*,4*S*,5'*S*,6*R*,6'*R*,8*R*,13*R*,20*R*,21*R*,24*S*)-6'-ethyl-21,24-dihydroxy-5',11,13,22-tetramethyl-3,7,19-trioxatetracyclo[15.6.1.1^{4,8}.0^{20,24}]pentacosa-10,14,16,22-tetraene-6-spiro-2'-tetrahydropyran-2-one

外 観：白色結晶

融 点：212～215℃

蒸気圧：4.27×10⁻¹⁰ Pa (20℃)

溶解性：水 7.2 ppm (20℃)

メタノール 458.8、エタノール 234.0、アセトン 365.3、*n*-ヘキサン 6.5、ベンゼン 524.2、酢酸エチル 320.4 (以上 g/L 20℃)

オクタノール/水分配係数：log P_{ow}=5.9

安定性：加水分解半減期：11.6日 (pH 5) 260日 (pH 7) 226日 (pH 9)

(出典：The e-Pesticide Manual 15th ed.,ver.5.0)

2) 基準値

食品名	基準値 (ppm)
だいこん類 (ラディッシュを含む) の根	0.01
だいこん類 (ラディッシュを含む) の葉	0.3
はくさい	0.05
キャベツ	0.05
ブロッコリー	0.05
レタス (サラダ菜及びちしやを含む。)	0.1
ねぎ (リーキを含む。)	0.01
トマト	0.3
なす	0.2
みかん	0.01
なつみかんの果実全体	0.1
レモン	0.1
オレンジ (ネーブルオレンジを含む。)	0.1
グレープフルーツ	0.1
ライム	0.1
その他のかんきつ類果実	0.1
りんご	0.2
日本なし	0.2
西洋なし	0.2
いちご	0.5
ぶどう	0.3
茶	0.3
その他のスパイス	0.3

施行通知 食安発0519第1号 (平成22年5月19日)

[実験方法]

1. 試料

1) 購入先

コーヒー生豆は愛知県の業者にて、その他の試料については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るように粉砕し均一化した。
- ②大豆は425 μm の標準網ふるいを通るように粉砕し均一化した。
- ③ばれいしょは泥を水で軽く洗い落とし細切りして均一化した。
- ④ほうれんそうはひげ根及び変質葉を除き細切りして均一化した。
- ⑤キャベツは外側変質葉及びしんを除き細切りして均一化した。
- ⑥りんごは花おち、しん及び果梗の基部を除き細切りして均一化した。
- ⑦オレンジは細切りして均一化した。
- ⑧茶は425 μm の標準網ふるいを通るように粉砕し均一化した。
- ⑨コーヒー生豆は425 μm の標準網ふるいを通るように粉砕し均一化した。
- ⑩ねぎは外皮及びひげ根を除去し、細切りして均一化した。

2. 試薬・試液

1) 試薬及び標準品

アセトニトリル、アセトン、酢酸エチル、*n*-ヘキサン、無水硫酸ナトリウム（残留農薬試験用）

アセトニトリル、メタノール（高速液体クロマトグラフィー用）

塩化ナトリウム、トリエチルアミン、トルエン、無水トリフルオロ酢酸（試薬特級）

ケイソウ土（セライト545）

グラファイトカーボンミニカラム

（Supelclean ENVI-Carb、充てん量500 mg、SUPELCO製）

シリカゲルミニカラム

（Sep-Pak plus silica、充てん量690 mg、Waters製）

レピメクチン標準品（純度レピメクチンA3、10.9%、レピメクチンA4、89.1%、林純薬工業製）

レピメクチン純度、100%として検討した。

ミルベメクチンA3標準品（純度98.9%、林純薬工業製）

ミルベメクチンA4標準品（純度99.9%、林純薬工業製）

2) 標準溶液の調製方法

①標準溶液の調製方法

標準原液：レピメクチン標準品10 mgを精秤し、アセトニトリルで溶解して200 mg/L溶液を調製した。

ミルベメクチンA3標準品10 mgを精秤し、アセトニトリルで溶解して200 mg/L溶液を調製した。ミルベメクチンA4標準品10 mgを精秤し、アセトニトリルで溶解して200 mg/L溶液を調製した。

検量線用混合標準溶液：レピメクチン、ミルベメクチンA3及びミルベメクチンA4標準原液をアセトニトリルで混合希釈し、2 mg/L^{*}の濃度の混合溶液を調製した。混合溶液1 mL（2 μg ）の溶媒を除去し、トルエン1 mLを加えて溶かした。トリエチルアミン0.05 mL及び無水トリフルオロ酢酸0.1 mLを加え、密栓し、40°Cで30分間緩やかに振とう後、トリエチルアミン0.05 mLを加え、窒素ガスを噴き付け溶媒を除去した後、メタノールに溶解、希釈し、0.001、0.002、0.005、0.01、0.02及び0.05 mg/L溶液を調製した。

添加用標準溶液：レピメクチン標準原液をアセトンで希釈して0.2、2及び3 mg/L溶液を調製した。ミルベメクチンA3標準原液をアセトンで希釈して0.2、1、4及び7 mg/L溶液を調製した。ミルベメクチンA4標準原液をアセトンで希釈して0.2、1、4及び7 mg/L溶液を調製した。

※) 混合溶液2 mg/L : レピメクチン2 mg/L、ミルベメクチンA3 2 mg/L、ミルベメクチンA4 2 mg/Lが含まれる。

3. 装置

	型式	会社
LC 装置	LC-20AD	島津製作所

4. 測定条件

1) 定量条件

LC 条件	
カラム	TSK-gel ODS-80Ts サイズ：内径 4.6 mm、長さ 150 mm、粒子径 5 μm 会社：東ソー株式会社
検出器	蛍光光度型検出器 (FL)
移動相流速 (mL/min)	1.0
注入量 (μL)	20
カラム温度 (°C)	40
移動相	アセトニトリル及び水の混液 (9 : 1)
励起波長 (nm)	368
蛍光波長 (nm)	460
保持時間の目安	レピメクチンA3 : 13分 レピメクチンA4 : 15分 ミルベメクチンA3 : 14分 ミルベメクチンA4 : 18分

レピメクチンの励起スペクトル及び蛍光スペクトルを図1に示した。

2) 確認条件

LC 条件	
カラム	Inertsil Ph サイズ：内径 4.6 mm、長さ 250 mm、粒子径 5 μm 会社：ジーエルサイエンス株式会社
検出器	蛍光光度型検出器 (FL)
移動相流速 (mL/min)	1.0
注入量 (μL)	20
カラム温度 (°C)	40
移動相	アセトニトリル及び水の混液 (3 : 1)
励起波長 (nm)	368
蛍光波長 (nm)	460
保持時間の目安	レピメクチンA3 : 16分 レピメクチンA4 : 18分 ミルベメクチンA3 : 13分 ミルベメクチンA4 : 15分

5. 定量

レピメクチン標準溶液2 mg/Lから1 mL (2 μg相当) 採り蛍光誘導体化した後メタノールで希釈し、0.001、0.002、0.005、0.01、0.02及び0.05 mg/Lの濃度の標準溶液を調製した。標準溶液20 μLをHPLC-FLに注入し、得られたレピメクチンA3及びレピメクチンA4のピーク高さの含量から検量線を作成した。試験溶液20

μLをHPLC-FLに注入し、得られたレピメクチンA3及びレピメクチンA4のピーク高の含量と作成した検量線からレピメクチンの含量を算出した。

ミルベメクチンも同時に定量するため、レピメクチン標準溶液、ミルベメクチンA3標準溶液及びミルベメクチンA4標準溶液を混合して用いた。

1) 検量線の直線性 (図2)

4. の測定条件において、濃度0.001 mg/L (0.02 ng) ~0.05 mg/L (1 ng) の範囲で良好な直線性を示した。

2) 標準溶液の検出感度 (図3)

定量限界相当の検出量：0.04 ng* (0.002 mg/L×20 μL) のレピメクチンA3及びレピメクチンA4のピークのS/N比はいずれも10以上であった。

※レピメクチンA3約0.004 ng相当

3) 安定性の確認

蛍光誘導体化した標準溶液の安定性を確認した。レピメクチン2 μgを蛍光誘導体化し、0.02 mg/Lの標準溶液を調製した。標準溶液を冷蔵で保存し、安定性評価時に調製したものとピーク高を比較した。結果をTable1に示した。レピメクチンは蛍光誘導体化後は不安定であることが確認できたため、蛍光誘導体化後の操作は速やかに行い、測定まで即日で行った。

なお、ミルベメクチンも蛍光誘導体化後は不安定だが、レピメクチンに比べ安定であった。

Table1 蛍光誘導体化後標準溶液の安定性 (%)

	保存日数			
	0日	1日	4日	6日
レピメクチン	100	85	67	67

6. 試験溶液の調製

1) 試験法の分析操作

レピメクチン (レピメクチンA3及びレピメクチンA4) を試料からアセトンで抽出し、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (1 : 4) 混液で転溶した後、穀類、豆類及び種実類はアセトニトリル/ヘキサン分配で脱脂した。グラファイトカーボン/シリカゲル連結ミニカラムで精製した後、蛍光誘導体化しHPLC-FLで定量及び確認した。

① 抽出

a 穀類、豆類及び種実類の場合

試料10.0 gを200 mL遠心管に採り、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。

抽出液20 mLを200 mLなす形フラスコに採り、40°C以下で濃縮し、アセトンを除去した。10%塩化ナトリウム溶液100 mLを用いて300 mL分液漏斗に移し、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (1 : 4) 混液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、40°C以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物に*n*-ヘキサン5 mLを加えて溶かし、*n*-ヘキサン25 mLを用いて100 mL分液漏斗に移し、*n*-ヘキサン

飽和アセトニトリル30 mLで2回振とう抽出した。抽出液を200 mLなす形フラスコに合わせ、40°C以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物にアセトン及び*n*-ヘキサン（1：19）混液5 mLを加えて溶かした。

b 果実及び野菜の場合

試料20.0 gを200 mL遠心管に採り、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。

抽出液10 mLを200 mLなす形フラスコに採り、40°C以下で濃縮し、アセトンを除去した。10%塩化ナトリウム溶液100 mLを用いて300 mL分液漏斗に移し、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（1：4）混液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、40°C以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物にアセトン及び*n*-ヘキサン（1：19）混液5 mLを加えて溶かした。

c 茶の場合

試料5.00 gを200 mL遠心管に採り、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。

抽出液40 mLを200 mLなす形フラスコに採り、40°C以下で濃縮し、アセトンを除去した。10%塩化ナトリウム溶液100 mLを用いて300 mL分液漏斗に移し、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（1：4）混液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、40°C以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物にアセトン及び*n*-ヘキサン（1：19）混液5 mLを加えて溶かした。

② 精製

グラファイトカーボンミニカラム（500 mg）の下にシリカゲルミニカラム（690 mg）を連結し、アセトン及び*n*-ヘキサン各10 mLを順次注入し、流出液は捨てた。このカラムに①で得られた溶液を注入した後、さらにアセトン及び*n*-ヘキサン（1：19）混液15 mLを注入し、流出液は捨てた。次いでアセトン及び*n*-ヘキサン（3：7）混液30 mLを注入し、溶出液を50 mL遠心管に採り、40°C以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物にトルエン1 mLを加えて溶かした。

③ 蛍光誘導体化

②で得られた溶液にトリエチルアミン0.05 mL及び無水トリフルオロ酢酸0.1 mLを加え、密栓し、40°Cで30分間緩やかに振とう後、トリエチルアミン0.05 mLを加え、窒素ガスを噴き付け溶媒を除去した。この残留物をメタノールに溶解し、正確に5 mLとしたものを試験溶液とした。

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
- | ろ紙上の残留物にアセトン50 mLを加え、ホモジナイズ
- | 吸引ろ過
- ↓ ろ液を合わせて、アセトンを加えて、正確に200 mLとする

酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（1：4）混液転溶

- | 穀類、豆類及び種実類：抽出液20 mL分取、濃縮
- | 果実及び野菜：抽出液10 mL分取、濃縮
- | 茶：抽出液40 mL分取、濃縮
- | 10%塩化ナトリウム溶液100 mL
- | 酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（1：4）混液50 mLを加え、5分間振とう
- | 酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（1：4）混液層を採る
- | 水層に酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（1：4）混液50 mLを加え、5分間振とう
- | 酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（1：4）混液層を合わせ脱水し、減圧濃縮、窒素乾固
- | *n*-ヘキサン5 mLに溶解（穀類、豆類及び種実類）
- ↓ アセトン及び*n*-ヘキサン（1：19）混液5 mLに溶解（果実、野菜及び茶）

アセトニトリル/ヘキサン分配（穀類、豆類及び種実類のみ実施）

- | *n*-ヘキサン25 mL
- | ヘキサン飽和アセトニトリル30 mLを加え、5分間振とう
- | アセトニトリル層を採る
- | ヘキサン飽和アセトニトリル30 mLを加え、5分間振とう
- | アセトニトリル層を合わせ、減圧濃縮、窒素乾固
- ↓ アセトン及び*n*-ヘキサン（1：19）混液5 mLに溶解

グラファイトカーボン/シリカゲル連結ミニカラム

- | アセトン及びヘキサン各10 mL予備洗浄
- | 全量負荷
- | アセトン及び*n*-ヘキサン（1：19）混液15 mLで洗浄
- | アセトン及び*n*-ヘキサン（3：7）混液30 mLで溶出
- | 溶出液を減圧濃縮、窒素乾固
- ↓ トルエン1 mLに溶解

蛍光誘導体化

- | トリエチルアミン0.05 mL及び無水トリフルオロ酢酸0.1 mLを加える
- | 40°Cで30分間、緩やかに振とうしながら加温
- | トリエチルアミン0.05 mLを加え、窒素ガスを吹き付け乾固
- ↓ メタノールで正確に5 mLとし、試験溶液とする

HPLC-FL定量

20 µL注入

2) 定量限界

0.01 mg/kg [(5 mL/1 g^{*1}) × (0.04 ng/20 µL)]

- *¹ 5.00 g × 40 mL/200 mL (茶の場合)
- 10.0 g × 20 mL/200 mL (穀類、豆類及び種実類の場合)
- 20.0 g × 10 mL/200 mL (果実及び野菜類の場合)

7. マトリックス添加標準溶液の調製

玄米、大豆、ばれいしょ、ほうれんそう、コーヒー豆及びねぎは0.002 mg/Lの標準溶液から1 mL分取し溶媒を除去した後、試験溶液1 mLに溶解したものを、キャベツは0.01 mg/Lの標準溶液から1 mL分取し溶媒を除去した後、試験溶液1 mLに溶解したものを、オレンジは0.02 mg/Lの標準溶液から1 mL分取し溶媒を除去した後、試験溶液1 mLに溶解したものを、りんごは0.02 mg/Lの標準溶液から2 mL分取し溶媒を除去した後、試験溶液1 mLに溶解したものを、茶は0.02 mg/Lの標準溶液から3 mL分取し溶媒を除去した後、試験溶液1 mLに溶解した後5倍希釈したものをマトリックス添加標準溶液とした。

マトリックス添加標準溶液は、レピメクチン及びミルベメクチンの混合標準溶液を用いて調製し、濃度は、レピメクチン添加濃度と同等とした。

[結果及び考察]

1. 測定条件の検討

1) 分析カラムの検討

市販されているTSK-gel ODS-80Ts、Inertsil ODS-3及びMightysil RP-18GPの3種類のODSカラムについてレピメクチンA3、レピメクチンA4、ミルベメクチンA3及びミルベメクチンA4の分離状況について検討した。全て内径4.6 mm、長さ150 mm、粒子径5 µmのものをを用い、移動相はアセトニトリル及び水 (9 : 1) 混液とした。全てのカラムでレピメクチンA3、レピメクチンA4、ミルベメクチンA3及びミルベメクチンA4が分離することが確認できた。本試験ではピーク形状及び分離度が一番良好であったTSK-gel ODS-80Tsを用いることとした。

2) MS 条件の検討

LC-MS及びLC-MS/MSでの確認が可能かどうか検討した。蛍光誘導体化した標準溶液及び蛍光誘導体化前の標準溶液を用いて、LC-MS (ESI)、LC-MS (APCI) 及びLC-MS/MSでの感度を確認したところ、感度が悪くHPLC-FLと同程度の感度レベルでの測定は不可能であった。

3) 確認カラムの検討

LC-MS及びLC-MS/MSでの確認が不可能であったためHPLC-FLでの確認カラムについて検討した。カラムにInertsil Ph (内径4.6 mm、長さ250 mm、粒子径5 µm) を、移動相にアセトニトリル及び水 (3 : 1) を用いたところ、ピーク形状及び分離度ともに良好なクロマトグラムが得られた。

2. 試験溶液調製法の検討

1) 精製方法の検討

① 転溶

レピメクチン、ミルベメクチンA3及びミルベメクチンA4各1 µgに、10%塩化ナトリウム100 mLを加え、転溶溶媒として、*n*-ヘキサン、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (1 : 4) 混液、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (1 : 1) 混液を用いて転溶率を調べた。結果をTable2~4に示した。

標準溶液のみでは、*n*-ヘキサンには転溶されなかったが、試料共存下では70 %程度転溶された。酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (1 : 4) 混液及び酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (1 : 1) 混液では良好な転溶率が得られたが、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (1 : 1) 混液で試験したところ、コーヒー豆において、レピメクチンA4付近に測定を妨害するピークが認められた。この妨害ピークは確認カラムでは、分離することができた。酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (1 : 4) 混液を用いたところ、全ての試料で測定カラム及び確認カラムのいずれを用いた測定でも、測定を妨害するようなピークは認められなかったため、転溶溶媒は酢酸エチ

ル及び*n*-ヘキサン (1 : 4) 混液を用いることとした。

Table2 *n*-ヘキサンへの転溶 (%)

	50 mL	50 mL	50 mL	合計
	(1回目)	(2回目)	(3回目)	
レピメクチン	0	0	0	0
ミルベメクチン A3	0	0	0	0
ミルベメクチン A4	0	0	0	0

Table3 酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (1 : 4) 混液への転溶 (%)

	50 mL	50 mL	50 mL	合計
	(1回目)	(2回目)	(3回目)	
レピメクチン	86	8	0	94
ミルベメクチン A3	90	8	0	98
ミルベメクチン A4	89	8	0	97

Table4 酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (1 : 1) 混液への転溶 (%)

	50 mL	50 mL	50 mL	合計
	(1回目)	(2回目)	(3回目)	
レピメクチン	76	23	0	99
ミルベメクチン A3	76	23	0	99
ミルベメクチン A4	77	23	0	100

②アセトニトリル/ヘキサン分配

レピメクチン、ミルベメクチンA3及びミルベメクチンA4各1 µgを窒素乾固後、*n*-ヘキサン30 mLに溶解し、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル30 mLで3回抽出を行った。結果をTable5に示した。*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル30 mL2回で良好な回収率が得られた。

Table5 アセトニトリル/ヘキサン分配 (%)

	<i>n</i> -ヘキサン	<i>n</i> -ヘキサン飽和アセトニトリル			合計
	30 mL	30 mL	30 mL	30 mL	
		(1回目)	(2回目)	(3回目)	
レピメクチン	0	85	2	tr	87
ミルベメクチン A3	0	80	9	tr	89
ミルベメクチン A4	0	78	11	tr	89

③蛍光誘導体化前カラム精製

a グラファイトカーボンミニカラム

グラファイトカーボンミニカラムをアセトン及び*n*-ヘキサン各10 mLで予備洗浄した後、アセトン及び*n*-ヘキサン (1 : 19) 混液5 mLで負荷した。溶出状況をTable6に示した。レピメクチンはアセトン及び*n*-ヘキサン (1 : 19) 混液30 mLで、ミルベメクチンA3及びミルベメクチンA4は20 mLで良好な回収率が得られた。

また、グラファイトカーボンミニカラムをアセトン及び*n*-ヘキサン各10 mLで予備洗浄した後、アセトン及び*n*-ヘキサン (3 : 7) 混液5 mLで負荷した。溶出状況をTable7に示した。レピメクチン、ミルベメクチンA3及びミルベメクチンA4はアセトン及び*n*-ヘキサン (3 : 7) 混液20 mLで良好な回収率が得られた。

Table6 グラファイトカーボンミニカラムからの溶出状況 (%)

	アセトン及び <i>n</i> -ヘキサン (1 : 19)			合計
	0-10 mL	10-20 mL	20-30 mL	

レピメクチン	0	60	30	90
ミルベメクチン A3	71	25	0	96
ミルベメクチン A4	69	24	0	93

Supelclean ENVI-Carb (充てん量 500 mg、SUPELCO製)

添加量 : 1 μ g

Table7 グラファイトカーボンミニカラムからの溶出状況 (%)

	アセトン及び <i>n</i> -ヘキサン (3 : 7)			合計
	0-10 mL	10-20 mL	20-30 mL	
レピメクチン	86	14	0	100
ミルベメクチン A3	91	9	0	100
ミルベメクチン A4	92	9	0	101

Supelclean ENVI-Carb (充てん量 500 mg、SUPELCO製)

添加量 : 1 µg

b シリカゲルミニカラム

シリカゲルミニカラムをアセトン及び*n*-ヘキサン各10 mLで予備洗浄した後、アセトン及び*n*-ヘキサン (1 : 19) 混液5 mLで負荷した。溶出状況をTable8に示した。レピメクチン、ミルベメクチンA3及びミルベメクチンA4はアセトン及び*n*-ヘキサン (1 : 19) 混液では溶出せず、アセトン及び*n*-ヘキサン (3 : 7) 混液20 mLで良好な回収率が得られた。しかし、試料共存下では溶出が後ろにずれる傾向があり、アセトン及び*n*-ヘキサン (3 : 7) 混液30 mLで溶出する必要があった。

Table8 シリカゲルミニカラムからの溶出状況 (%)

	アセトン及び <i>n</i> -ヘキサン (1 : 19)	アセトン及び <i>n</i> -ヘキサン (3 : 7)		合計
	5 mL (負荷) + 15 mL	0-10 mL	10-20 mL	
	レピメクチン	0	88	
ミルベメクチン A3	0	95	tr	95
ミルベメクチン A4	0	96	tr	96

Sep-Pak plus silica (充てん量 690 mg、Waters製)

添加量 : 1 µg

精製効果、操作性及びミルベメクチンと同時分析することを考慮し、連結しても溶出状況に変わりはないことからグラファイトカーボンミニカラムの下にシリカゲルミニカラムを連結して用いることとし、アセトン及び*n*-ヘキサン (1 : 19) 20 mLで負荷、洗浄後、アセトン及び*n*-ヘキサン (3 : 7) 30 mLで溶出させる方法を用いることとした。

④ 蛍光誘導体化後カラム精製

蛍光誘導体化後に、試薬由来と思われる残留物が生じた。これを除去する目的でシリカゲルミニカラムの検討を行った。シリカゲルミニカラムを*n*-ヘキサン10 mLで予備洗浄した後、*n*-ヘキサン5 mLで負荷した。溶出状況をTable9に示した。レピメクチン、ミルベメクチンA3及びミルベメクチンA4は*n*-ヘキサンでは溶出せず、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (1 : 4) 混液10 mLで8割程度の回収率が得られた。しかし、試料共存下では溶出がずれ、十分な回収率を得るために溶出量を増やしたり、溶出溶媒の極性を上げると、残留物の除去が出来ない結果となった。本試験では最終定容量を5 mLに設定することで残留物の影響を抑えることが出来たため、蛍光誘導体化後のカラム精製は行わなかった。

Table9 シリカゲルミニカラムからの溶出状況 (%)

	<i>n</i> -ヘキサン	酢酸エチル及び <i>n</i> -ヘキサン (1 : 4)	酢酸エチル及び <i>n</i> -ヘキサン (2 : 3)	合計
	5 mL (負荷) + 5 mL	0-10 mL	0-10 mL	
レピメクチン	0	80	0	80
ミルベメクチン A3	0	80	0	80
ミルベメクチン A4	0	81	0	81

Sep-Pak plus silica (充てん量 690 mg、Waters製)

添加量 : 1 µg

2) 蛍光誘導体化の検討

旧環境省告示ミルベメクチン試験法を参考に検討を行った。

参考とした蛍光誘導体化法を以下に示した。

残留物に0.5 mol/L トリエチルアミン・ベンゼン溶液1 mL及び無水トリフルオロ酢酸0.1 mLを加え、栓をして40°Cで30分間加熱する。冷後、この溶液にトリエチルアミン0.05 mLを加え、すり合わせ減圧濃縮器を用いて40°C以下で0.1 mLに濃縮する。

① 溶媒の検討

旧環境省告示ミルベメクチン試験法ではベンゼン、トリエチルアミン及び無水トリフルオロ酢酸を用いて蛍光誘導体化を行っている。ベンゼンの代わりに、アセトニトリル、*n*-ヘキサン及びトルエンを用いて反応を行い、ベンゼンを用いたときと比較した。レピメクチン、ミルベメクチンA3及びミルベメクチンA4各2 µgにベンゼン、アセトニトリル、*n*-ヘキサン及びトルエンをそれぞれ1 mL、トリエチルアミン0.05 mL及び無水トリフルオロ酢酸0.1 mLを加え、40°Cで30分間緩やかに振とうした。ベンゼンを用いたときを100 %としたときの反応率比をTable10に示した。アセトニトリルは、反応が不十分であった。*n*-ヘキサンはベンゼンを用いたときよりも、若干反応率が良いようであったが、反応中に大量の白煙が生じたため、操作性が良く反応率もベンゼンと同等であったトルエンを用いることとした。

Table10 反応溶媒の違いによる反応率比 (%)

反応溶媒	レピメクチン	ミルベメクチンA3	ミルベメクチンA4
アセトニトリル	84	59	59
<i>n</i> -ヘキサン	127	111	110
トルエン	98	96	96

添加量 : 2 µg

② 反応時間

レピメクチン、ミルベメクチンA3及びミルベメクチンA4各2 µgにトルエン1 mL、トリエチルアミン0.05 mL及び無水トリフルオロ酢酸0.1 mLを加え、40°Cで各時間緩やかに振とうした。試行数は3回とし、各時間の平均値を求め、反応時間30分間を100%としたときの反応率比をTable11に示した。レピメクチン、ミルベメクチンA3及びミルベメクチンA4の反応率比に反応時間による違いは見られなかったが、15分間では、反応終了後にふたを開けると白煙が多く生じたため、操作性を考慮し反応時間は30分間とした。

Table11 反応時間の違いによる反応率比 (%)

反応時間	レピメクチン	ミルベメクチンA3	ミルベメクチンA4
15分	97	91	92
30分	100	100	100
60分	99	103	103
120分	100	97	99

添加量：2 µg

③ トリエチルアミン量

レピメクチン、ミルベメクチンA3及びミルベメクチンA4各2 µgにトルエン1 mL、各量のトリエチルアミン及び無水トリフルオロ酢酸0.1 mLを加え、40°Cで30分間緩やかに振とうした。試行数は3回とし、各量の平均値を求め、0.05 mLを100%としたときの反応率比をTable12に示した。レピメクチン、ミルベメクチンA3及びミルベメクチンA4の反応率比にトリエチルアミン量による違いは見られなかった。旧環境省告示ミルベメクチン試験法に倣い、トリエチルアミン量は0.05 mLとした。

Table12 トリエチルアミン量の違いによる反応率比 (%)

トリエチルアミン量 (mL)	レピメクチン	ミルベメクチンA3	ミルベメクチンA4
0.01	96	97	95
0.05	100	100	100
0.1	105	101	101

添加量：2 µg

④ 無水トリフルオロ酢酸量

レピメクチン、ミルベメクチンA3及びミルベメクチンA4各2 µgにトルエン1 mL、トリエチルアミン0.05 mL及び各量の無水トリフルオロ酢酸を加え、40°Cで30分間緩やかに振とうした。試行数は3回とし、各量の平均値を求め、0.1 mLを100%としたときの反応率比をTable13に示した。レピメクチン、ミルベメクチンA3及びミルベメクチンA4の反応率比に無水トリフルオロ酢酸量による違いは見られなかった。旧環境省告示ミルベメクチン試験法に倣い、無水トリフルオロ酢酸量は0.1 mLとした。

Table13 無水トリフルオロ酢酸量の違いによる反応率比 (%)

無水トリフルオロ酢酸量 (mL)	レピメクチン	ミルベメクチンA3	ミルベメクチンA4
0.05	97	96	96
0.1	100	100	100
0.2	97	97	97

添加量：2 µg

⑤ 各濃度における回収率

レピメクチン、ミルベメクチンA3及びミルベメクチンA4各濃度にトルエン1 mL、トリエチルアミン0.05 mL及び無水トリフルオロ酢酸0.1 mLを加え、40°Cで30分間緩やかに振とうした。2 µgを100%としたときの反応率比をTable14に示した。レピメクチン、ミルベメクチンA3及びミルベメクチンA4の反応率比に反応量による大きな違いは見られなかった。

Table14 反応量の違いによる反応率比 (%)

反応量 (μg)	レピメクチン	ミルベメクチンA3	ミルベメクチンA4
5	95	94	94
2	100	100	100
1	97	94	93
0.5	92	87	87
0.1	99	88	90
0.05	109	105	108

3. 添加回収試験

玄米、大豆、ばれいしょ、ほうれんそう、キャベツ、りんご、オレンジ及び茶の8品目にコーヒー豆及びねぎを加えた10品目を試料とした。[実験方法] 6の分析法に従って添加回収試験を行った結果をTable15~17に示した。

レピメクチンの真度は81~92%、併行精度は3.5~11.6%、ミルベメクチンA3の真度は79~93%、併行精度は3.8~12.7%、ミルベメクチンA4の真度は78~94%、併行精度は3.8~11.9%であり、良好な回収率が得られた。

また、確認カラムを用いて測定した結果をTable18, 19に示した。

Table15 レピメクチン添加回収試験結果

試料	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)					真度 (%)	併行精度 (RSD%)
		1	2	3	4	5		
玄米	0.01	88	83	98	88	85	88	6.5
大豆	0.01	90	75	93	93	85	87	8.5
ばれいしょ	0.01	90	83	83	80	93	86	6.3
ほうれんそう	0.01	98	83	73	83	83	84	10.7
キャベツ	0.05	84	81	78	78	84	81	3.9
りんご	0.2	83	88	72	83	92	83	8.6
オレンジ	0.1	87	97	82	82	88	87	7.2
茶	0.3	88	96	91	93	90	92	3.5
コーヒー豆	0.01	85	100	78	80	98	88	11.6
ねぎ	0.01	95	88	85	90	88	89	4.3

Table16 ミルベメクチンA3添加回収試験結果

試料	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)					真度 (%)	併行精度 (RSD%)
		1	2	3	4	5		
玄米	0.01	88	78	90	83	100	88	9.7
大豆	0.1	93	80	77	76	74	80	9.3
ばれいしょ	0.01	105	85	85	85	93	91	9.6
ほうれんそう	0.01	95	80	85	85	83	86	6.7
キャベツ	0.01	103	80	78	80	80	84	12.4
りんご	0.2	86	97	85	95	99	92	7.0
オレンジ	0.2	81	89	84	78	82	83	5.2
茶	0.7	100	92	95	87	90	93	5.5
コーヒー豆	0.01	75	80	70	73	95	79	12.7
ねぎ	0.01	80	80	75	83	83	80	3.8

Table17 ミルベメクチンA4添加回収試験結果

試料	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)					真度 (%)	併行精度 (RSD%)
		1	2	3	4	5		
玄米	0.01	88	78	93	85	93	87	7.2
大豆	0.1	93	79	76	75	73	79	10.2
ばれいしょ	0.01	105	85	88	85	93	91	9.2
ほうれんそう	0.01	93	75	78	80	80	81	8.3
キャベツ	0.01	103	83	80	88	90	89	9.9
りんご	0.2	86	98	86	96	100	93	7.2
オレンジ	0.2	82	91	85	79	83	84	5.4
茶	0.7	100	93	97	88	91	94	4.8
コーヒー豆	0.01	73	80	70	73	93	78	11.9
ねぎ	0.01	80	80	75	83	83	80	3.8

Table18 確認条件でのレピメクチン添加回収試験結果 (1例)

試料	添加濃度 (ppm)	レピメクチン
玄米	0.01	84
大豆	0.01	73
ばれいしょ	0.01	93
ほうれんそう	0.01	93
キャベツ	0.05	84
りんご	0.2	88
オレンジ	0.1	92
茶	0.3	73
コーヒー豆	0.01	88
ねぎ	0.01	88

Table19 確認条件でのミルベメクチン添加回収試験結果 (1例)

試料	添加濃度 (ppm)	ミルベメクチン A3	ミルベメクチン A4
玄米	0.01	85	84
大豆	0.1	77	75
ばれいしょ	0.01	108	105
ほうれんそう	0.01	90	88
キャベツ	0.01	100	100
りんご	0.2	98	99
オレンジ	0.2	86	86
茶	0.7	91	88
コーヒー豆	0.01	78	73
ねぎ	0.01	73	73

4. 試料マトリックスの測定への影響

試料由来の夾雑物質による測定への影響を把握するために、[実験方法] 7に従ってマトリックス添加標準溶液を調製し、溶媒標準溶液に対するマトリックス添加標準溶液のピーク高の比を求めた結果をTable20に示した。10品目について、マトリックスによる顕著な影響は認められなかった。

Table20 試料マトリックスの測定への影響

試料	添加濃度 (ppm)	レピメクチン	ミルベメクチン A3	ミルベメクチン A4
玄米	0.01	102	103	105
大豆	0.01	103	104	100
ばれいしょ	0.01	99	101	100
ほうれんそう	0.01	106	109	106
キャベツ	0.05	98	101	100
りんご	0.2	101	100	100
オレンジ	0.1	104	102	104
茶	0.3	100	100	100
コーヒー豆	0.01	103	97	98
ねぎ	0.01	103	103	103

数値 (%) : (マトリックス標準溶液のピーク高/標準溶液のピーク高) × 100

5. 選択性の評価

農産物10品目の何れの試料においても妨害ピークは認められなかった。クロマトグラムを図4に示した。

[結論]

レピメクチン (レピメクチンA3及びレピメクチンA4) を試料からアセトンで抽出し、酢酸エチル及び *n*-ヘキサン (1 : 4) 混液で転溶した後、穀類、豆類及び種実類はアセトニトリル/ヘキサン分配で脱脂する。グラフアイトカーボン/シリカゲル連結ミニカラムで精製した後、蛍光誘導体化しHPLC-FLで定量及び確認する方法を提案する。

この試験法を玄米、大豆、ばれいしょ、ほうれんそう、キャベツ、りんご、オレンジ、茶、コーヒー豆及びねぎに適用した場合、レピメクチンの真度は81~92%、併行精度は3.5~11.6%であり、定量限界は0.01 mg/kgが可能であることが確認できた。

なお、ミルベメクチンA3及びミルベメクチンA4についても適用可能か確認を行い、玄米、大豆、ばれいしょ、ほうれんそう、キャベツ、りんご、オレンジ、茶、コーヒー豆及びねぎに適用した場合、ミルベメクチンA3の真度は79~93%、併行精度は3.8~12.7%、ミルベメクチンA4の真度は78~94%、併行精度は3.8~11.9%であり、いずれも定量限界は0.01 mg/kgが可能であることが確認できた。

[参考文献]

旧環境省告示ミルベメクチン試験法

レピメクチン農薬抄録

ミルベメクチン農薬抄録

The e-Pesticide Manual 15th ed.,ver.5.0

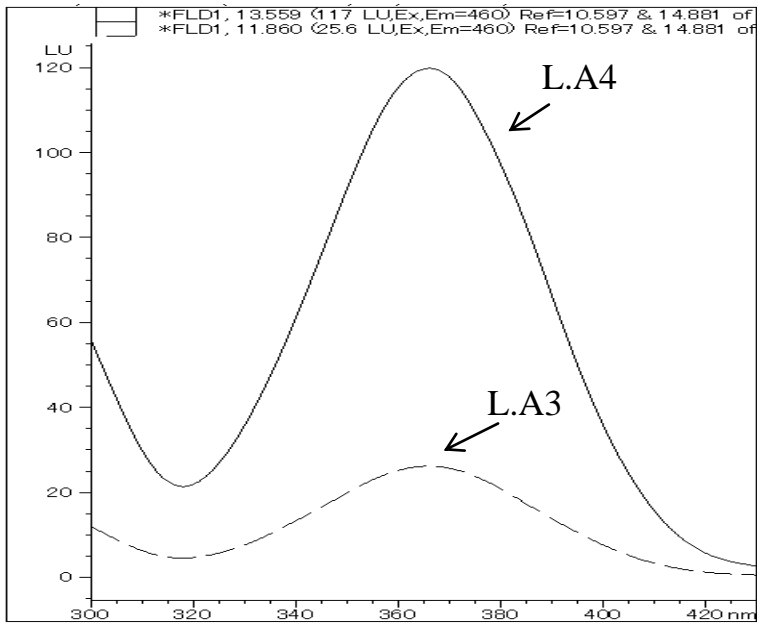


図 1-1-1 レピメクチン励起スペクトル(蛍光波長 460 nm)

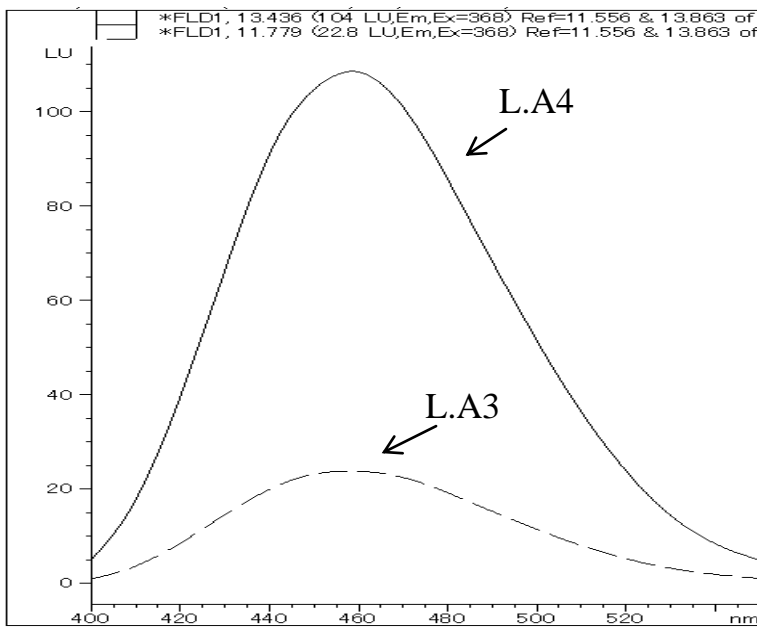
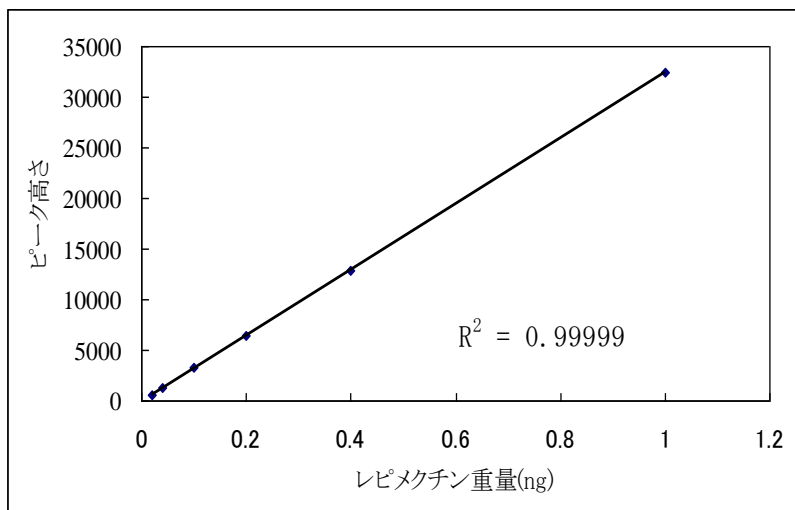
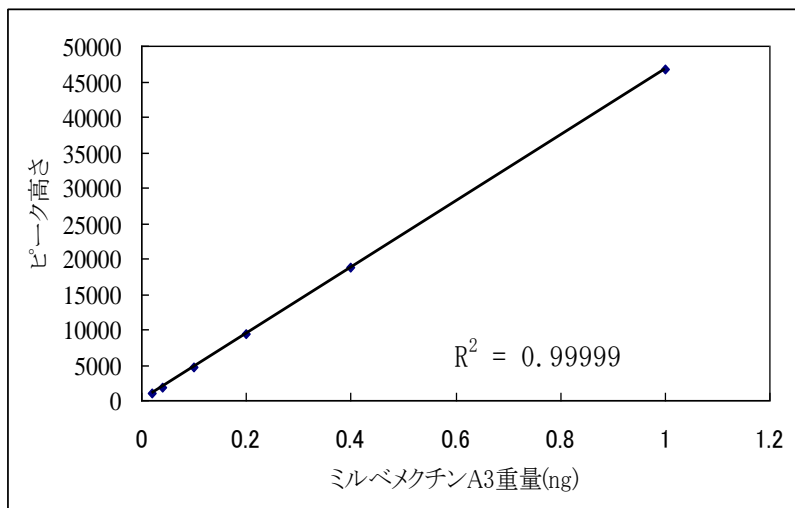


図 1-2-1 レピメクチン蛍光スペクトル(励起波長 368 nm)



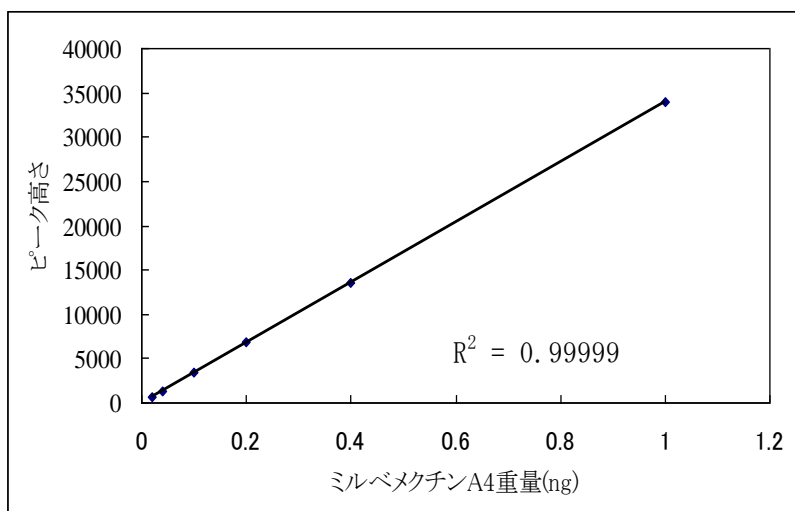
データ処理装置設定条件の一例
 機種 (メーカー) : LCsolution
 (島津製作所製)
 ピークの定量方法 : ピーク高法
 検量線の種類 : 最小二乗法
 検量線基準ピークの重量 : 0.02 ng~1 ng
 検量線傾き (a) : a=32432.48371
 検量線切片 (b) : b=-27.02855

図 2-1-1 レピメクチン検量線 (一例) (測定分析カラム TSK-gel ODS-80Ts)



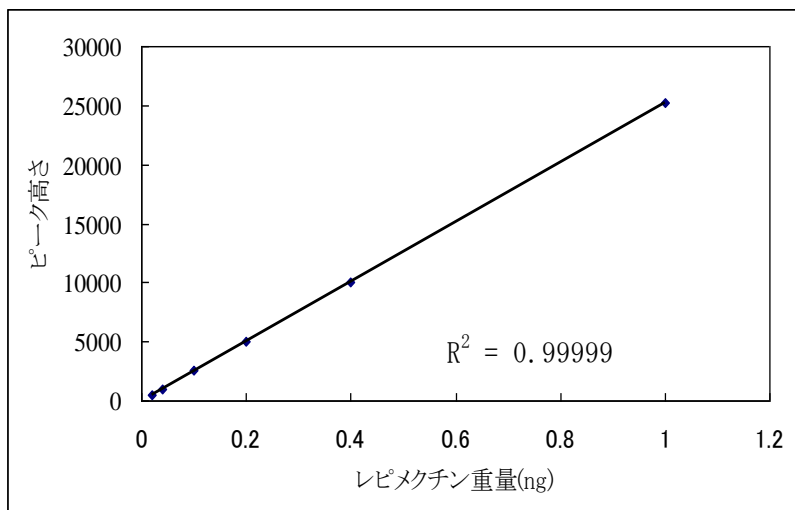
データ処理装置設定条件の一例
 機種 (メーカー) : LCsolution
 (島津製作所製)
 ピークの定量方法 : ピーク高法
 検量線の種類 : 最小二乗法
 検量線基準ピークの重量 : 0.02 ng~1 ng
 検量線傾き (a) : a=46704.76236
 検量線切片 (b) : b=-6.56362

図2-1-2 ミルベメクチンA3検量線 (一例) (測定分析カラム TSK-gel ODS-80Ts)



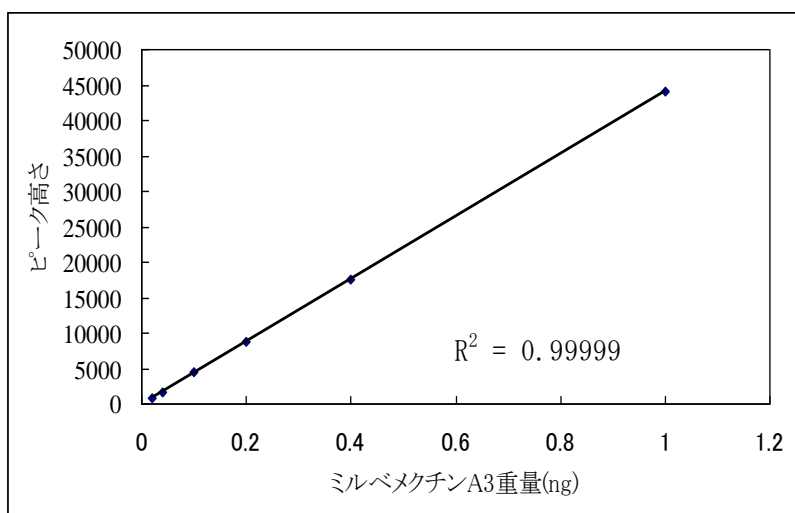
データ処理装置設定条件の一例
 機種 (メーカー) : LCsolution
 (島津製作所製)
 ピークの定量方法 : ピーク高法
 検量線の種類 : 最小二乗法
 検量線基準ピークの重量 : 0.02 ng~1 ng
 検量線傾き (a) : a=34036.81487
 検量線切片 (b) : b=-6.46569

図2-1-3 ミルベメクチンA4検量線 (一例) (測定分析カラム TSK-gel ODS-80Ts)



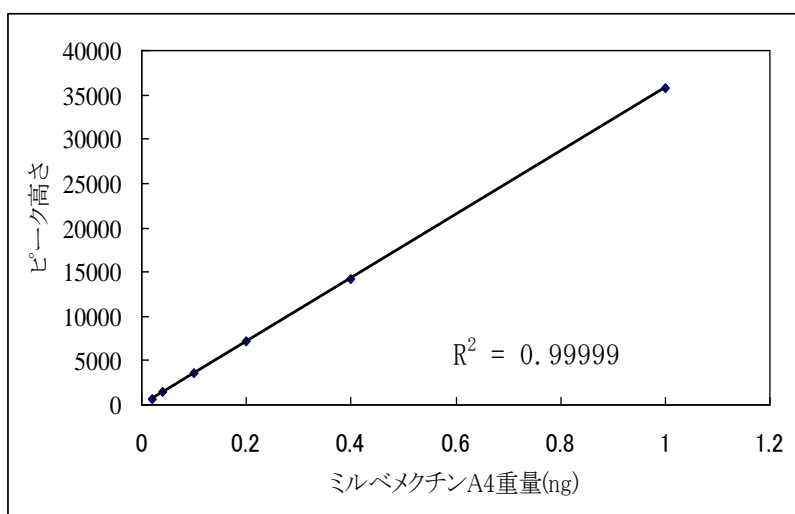
データ処理装置設定条件の一例
 機種（メーカー）：LCsolution
 （島津製作所製）
 ピークの定量方法：ピーク高法
 検量線の種類：最小二乗法
 検量線基準ピークの重量：0.02 ng～1 ng
 検量線傾き (a) : a=25254.37907
 検量線切片 (b) : b=-26.11786

図2-2-1 レピメクチン検量線（一例）（測定分析カラムInertsil Ph）



データ処理装置設定条件の一例
 機種（メーカー）：LCsolution
 （島津製作所製）
 ピークの定量方法：ピーク高法
 検量線の種類：最小二乗法
 検量線基準ピークの重量：0.02 ng～1 ng
 検量線傾き (a) : a=44064.50747
 検量線切片 (b) : b=-33.92219

図2-2-2 ミルベメクチンA3検量線（一例）（測定分析カラムInertsil Ph）



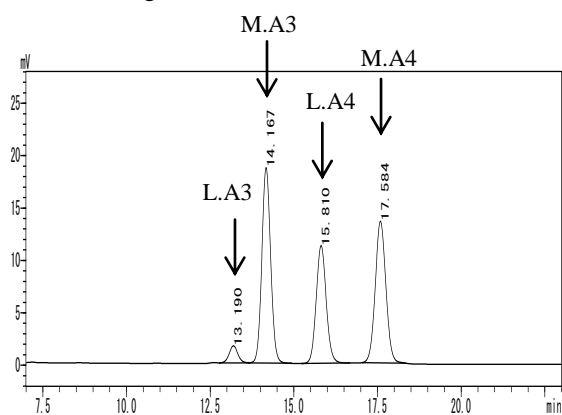
データ処理装置設定条件の一例
 機種（メーカー）：LCsolution
 （島津製作所製）
 ピークの定量方法：ピーク高法
 検量線の種類：最小二乗法
 検量線基準ピークの重量：0.02 ng～1 ng
 検量線傾き (a) : a=35710.29130
 検量線切片 (b) : b=-23.01878

図2-2-3 ミルベメクチンA4検量線（一例）（測定分析カラムInertsil Ph）

[クロマトグラム上の表記について]

クロマトグラム上ではレピメクチン A3 は L.A3、レピメクチン A4 は L.A4、ミルベメクチン A3 は M.A3 及びミルベメクチン A4 は M.A4 と表記した。

標準品0.4 ng



標準品0.04 ng(定量限界相当)

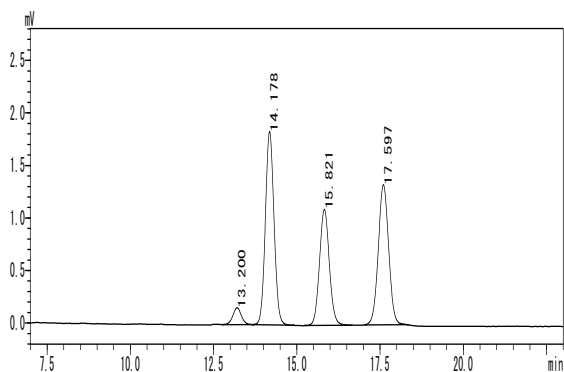
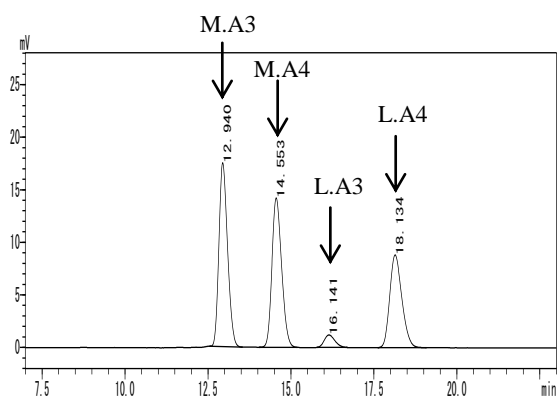


図 3-1 標準溶液のクロマトグラム (一例) (測定分析カラム TSK-gel ODS-80Ts)

標準品0.4 ng



標準品0.04 ng(定量限界相当)

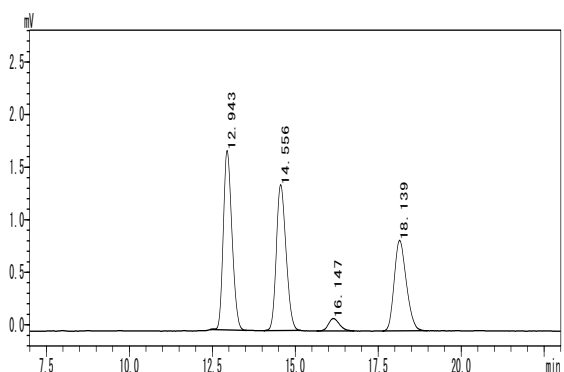
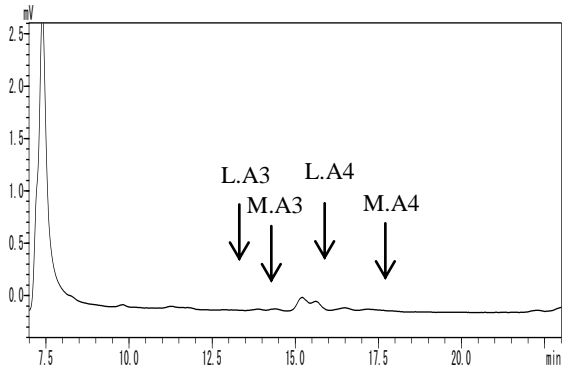
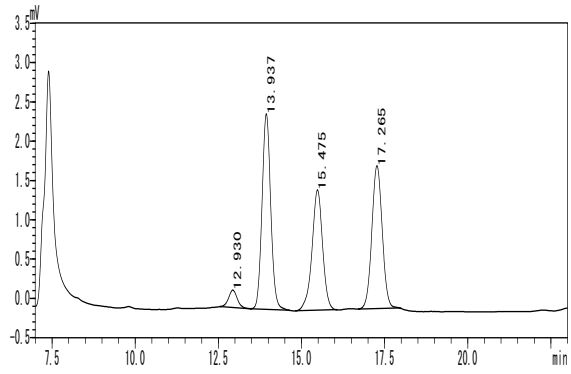


図 3-2 標準溶液のクロマトグラム (一例) (測定分析カラム Inertsil Ph)

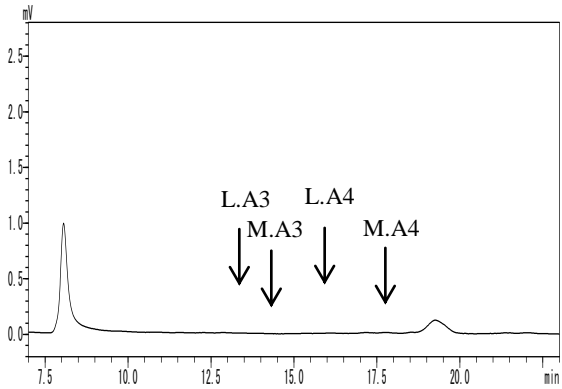
玄米 無添加



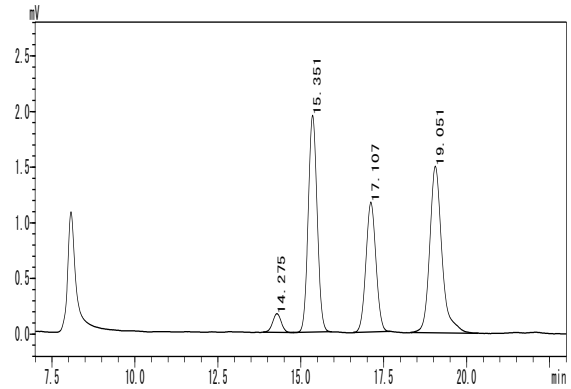
玄米 0.01 ppm 添加



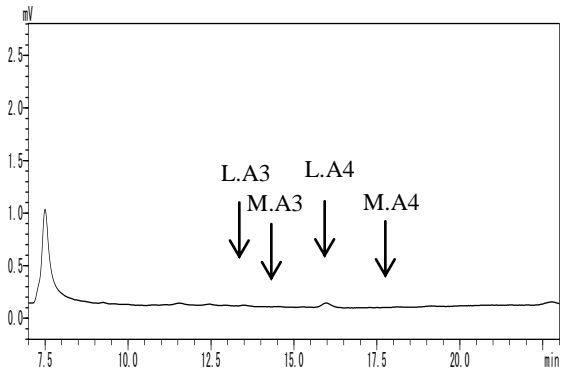
大豆 無添加



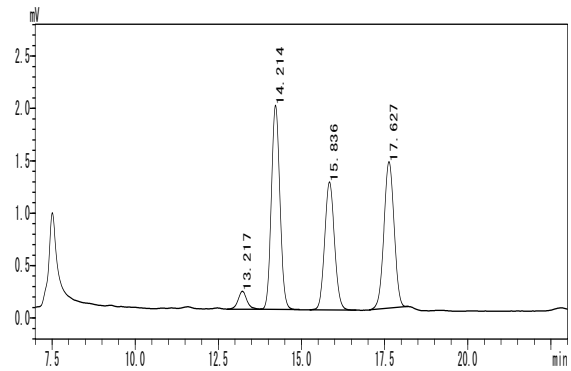
大豆 0.01 ppm 添加



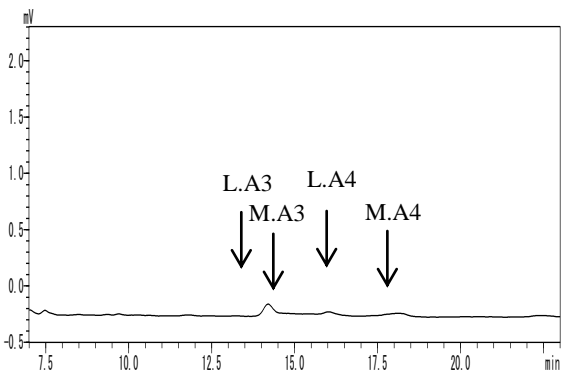
ばれいしょ 無添加



ばれいしょ 0.01 ppm 添加



ほうれんそう 無添加



ほうれんそう 0.01 ppm 添加

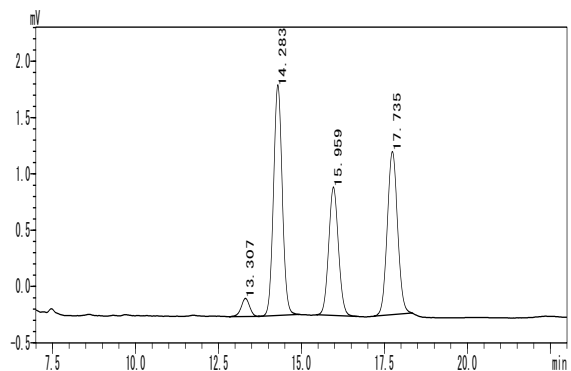
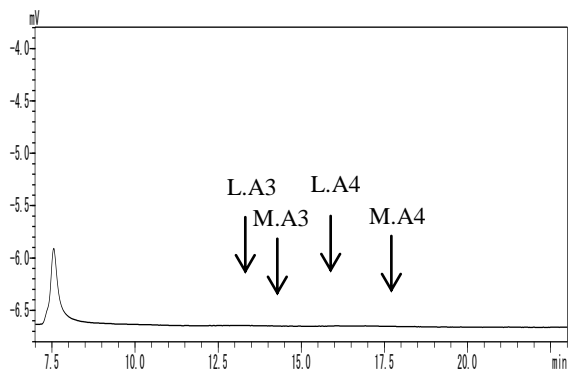
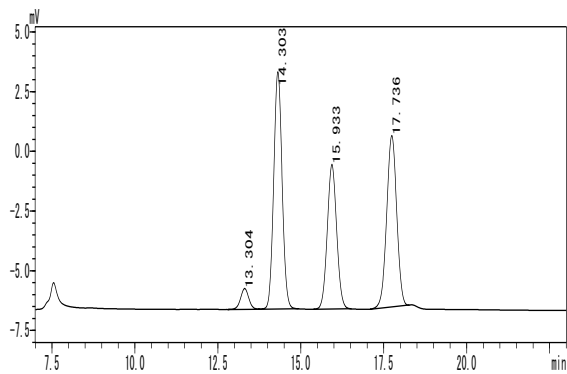


図 4-1-1 試料のクロマトグラム (測定分析カラム TSK-gel ODS-80Ts)

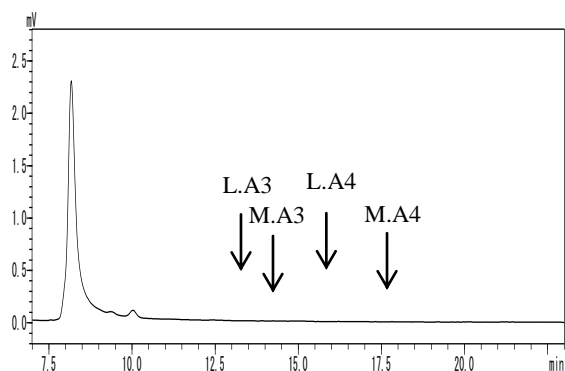
キャベツ 無添加



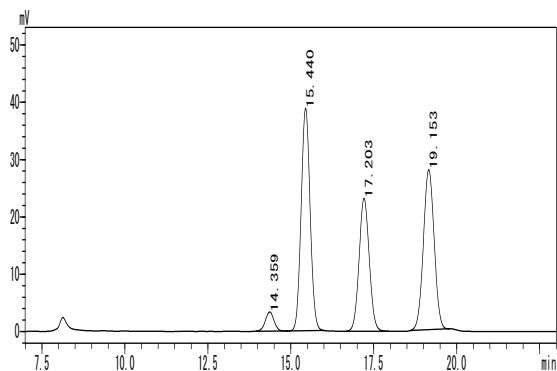
キャベツ 0.05 ppm 添加



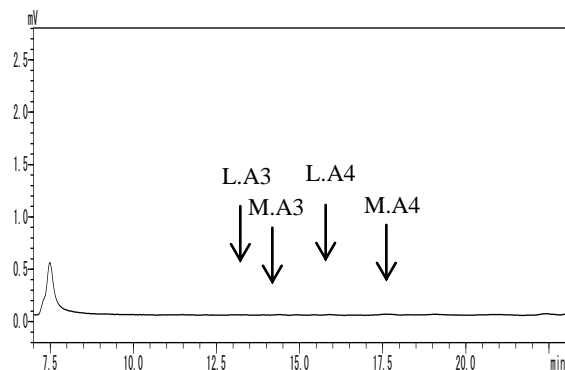
りんご 無添加



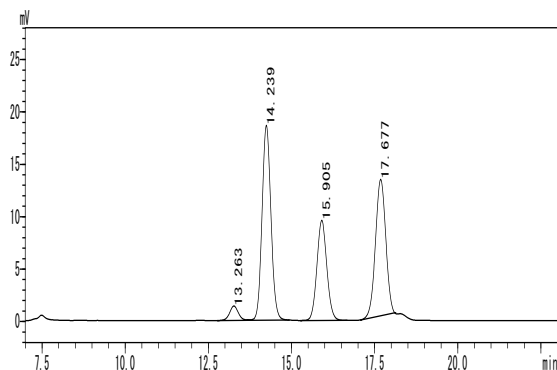
りんご 0.2 ppm 添加



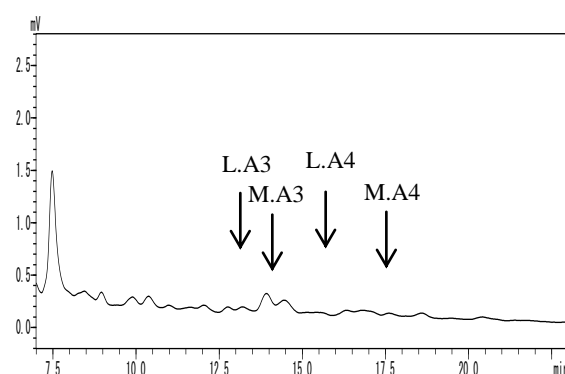
オレンジ 無添加



オレンジ 0.1 ppm 添加



茶 無添加



茶 0.3 ppm 添加 5倍希釈

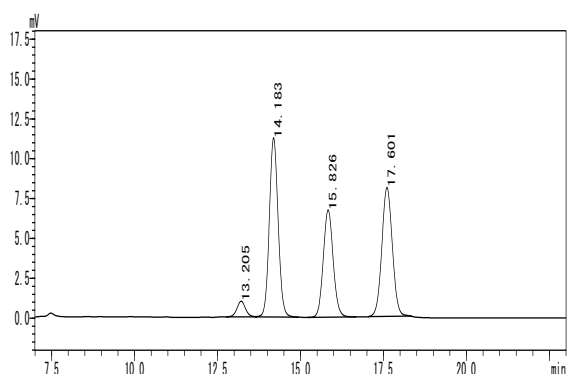
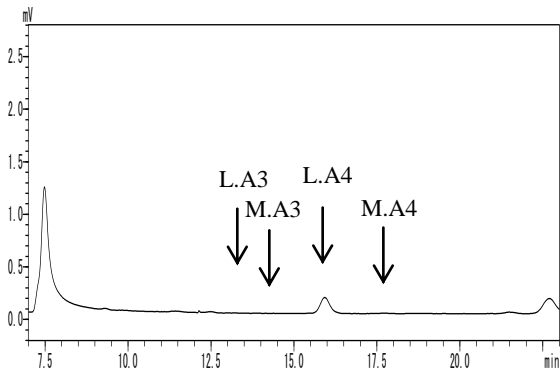
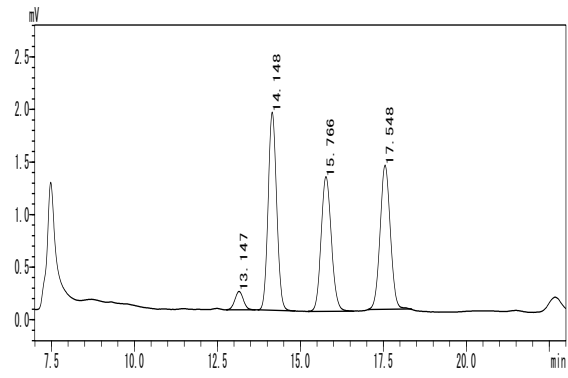


図 4-1-2 試料のクロマトグラム (測定分析カラム TSK-gel ODS-80Ts)

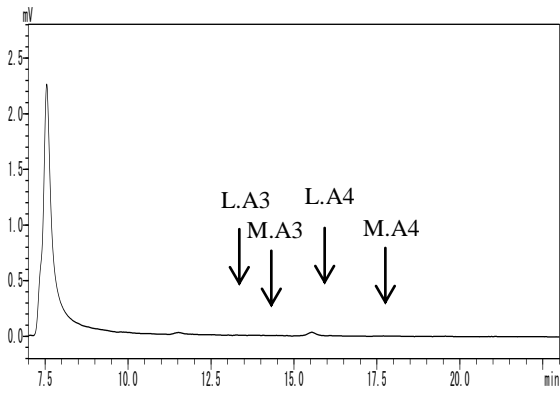
コーヒー豆 無添加



コーヒー豆 0.01 ppm添加



ねぎ 無添加



ねぎ 0.01 ppm添加

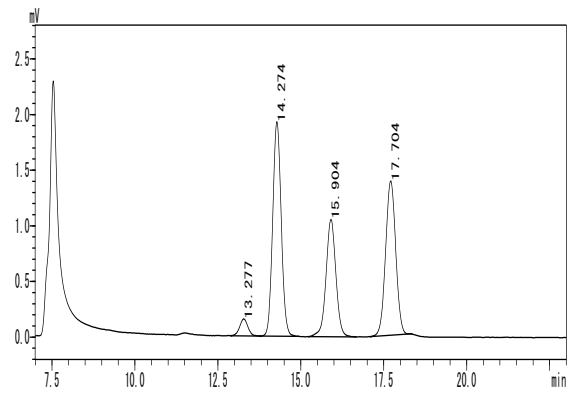
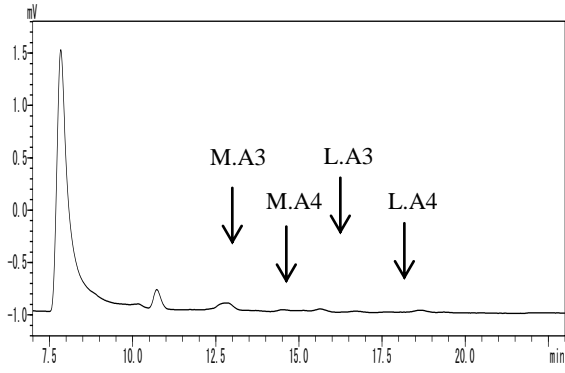
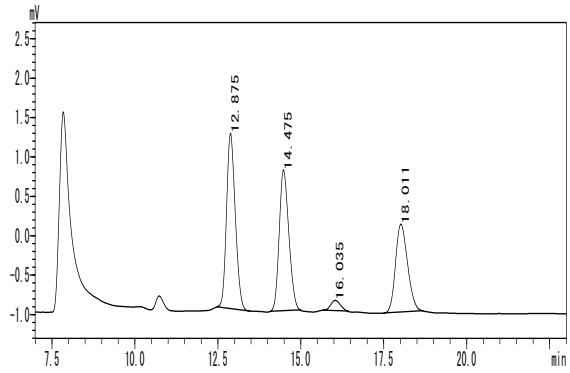


図 4-1-3 試料のクロマトグラム (測定分析カラム TSK-gel ODS-80Ts)

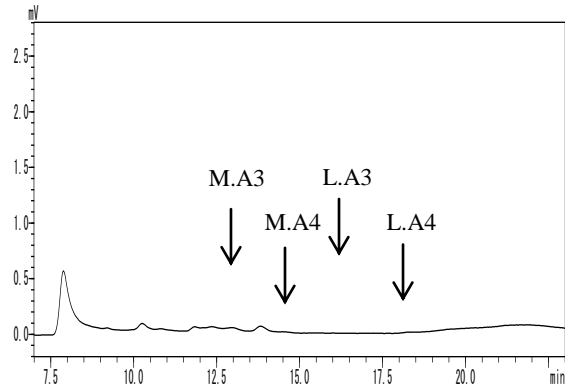
玄米 無添加



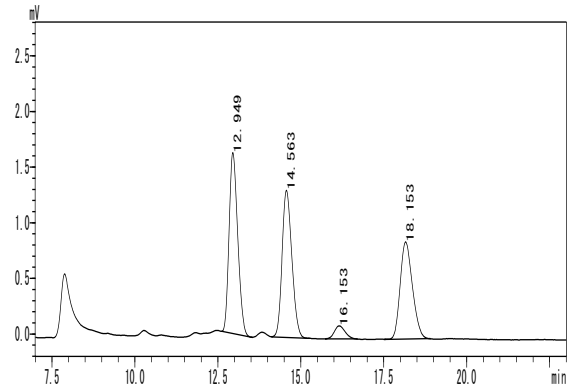
玄米 0.01 ppm 添加



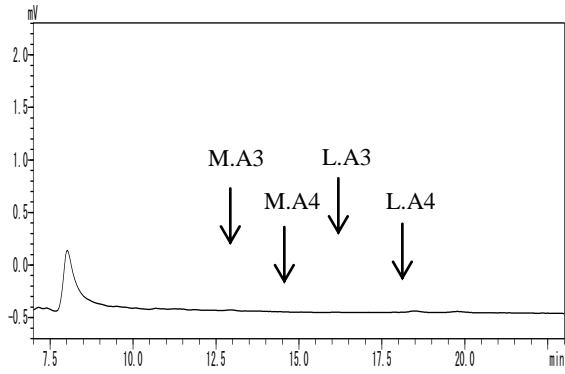
大豆 無添加



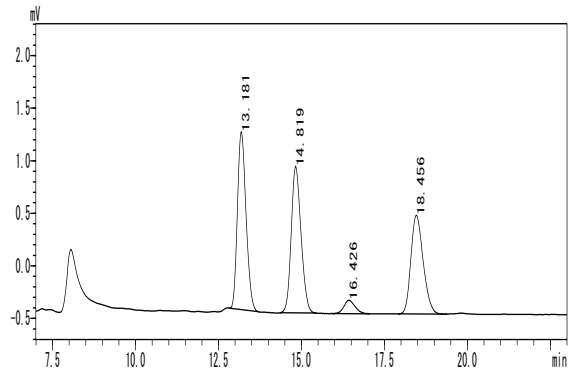
大豆 0.01 ppm 添加



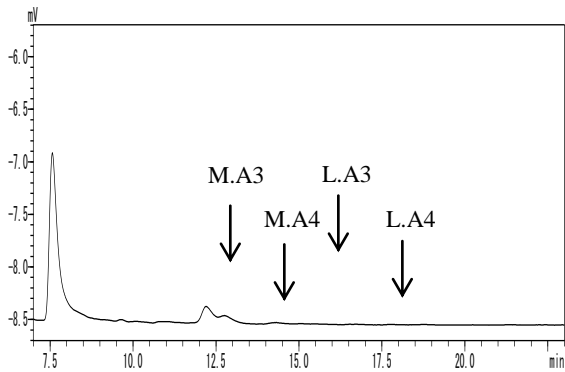
ばれいしょ 無添加



ばれいしょ 0.01 ppm 添加



ほうれんそう 無添加



ほうれんそう 0.01 ppm 添加

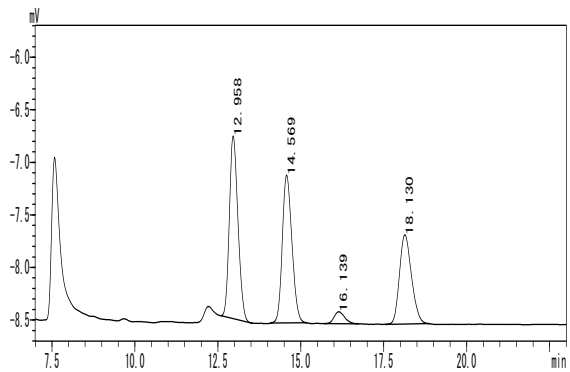
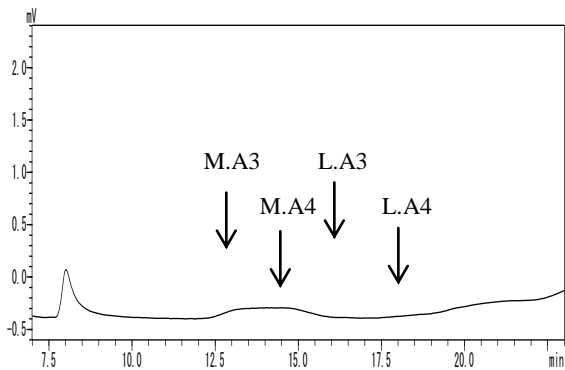
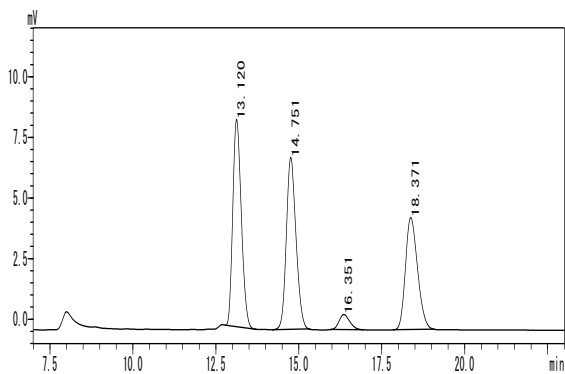


図 4-2-1 試料のクロマトグラム (測定分析カラム Inertsil Ph)

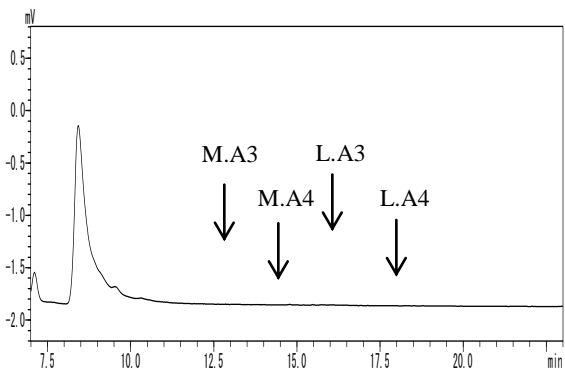
キャベツ 無添加



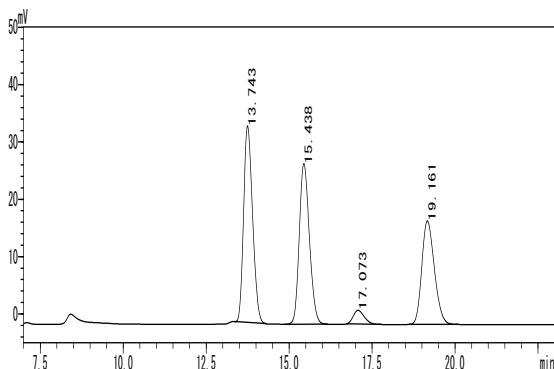
キャベツ 0.05 ppm 添加



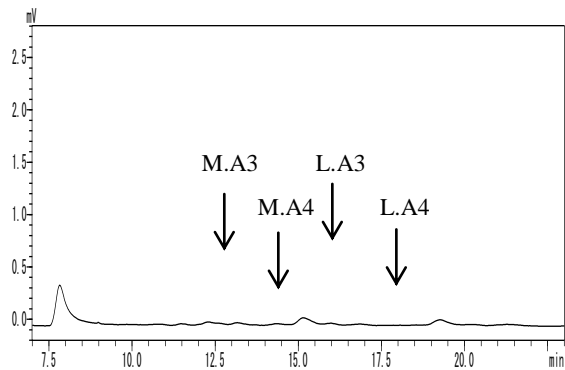
りんご 無添加



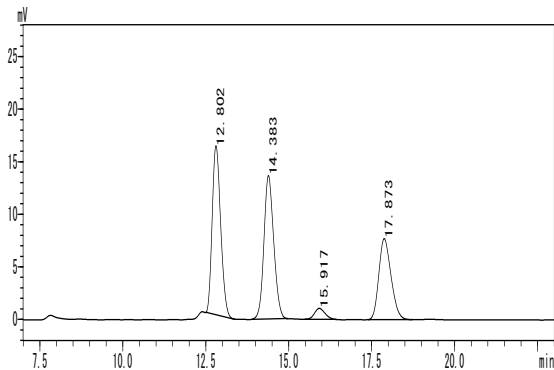
りんご 0.2 ppm 添加



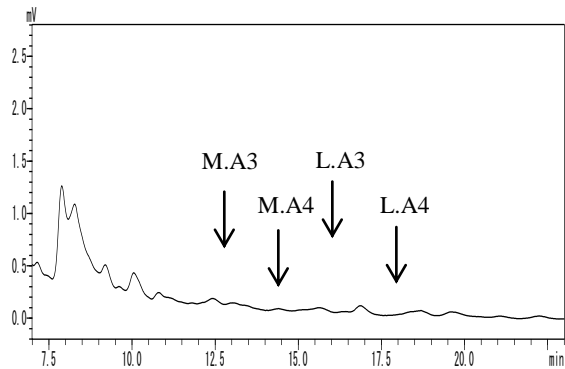
オレンジ 無添加



オレンジ 0.1 ppm 添加



茶 無添加



茶 0.3 ppm 添加 5倍希釈

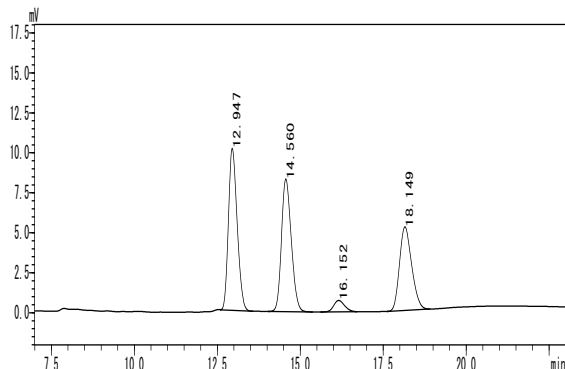
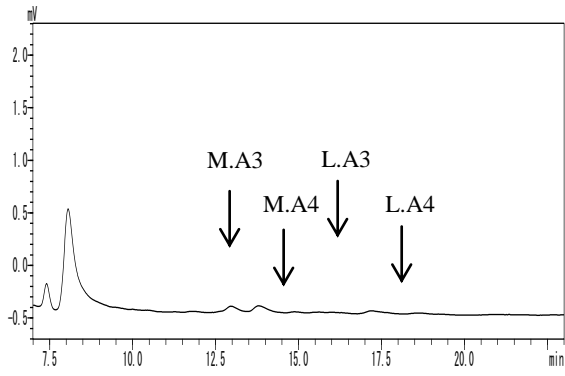
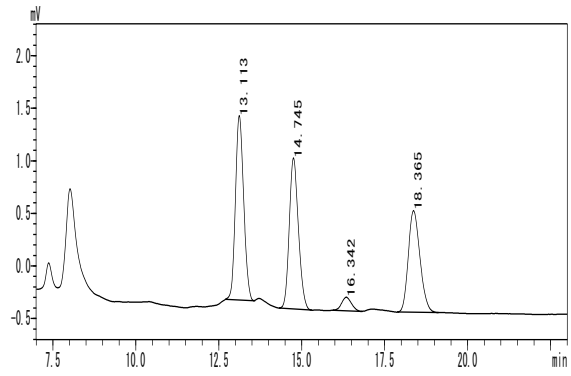


図 4-2-2 試料のクロマトグラム (測定分析カラム Inertsil Ph)

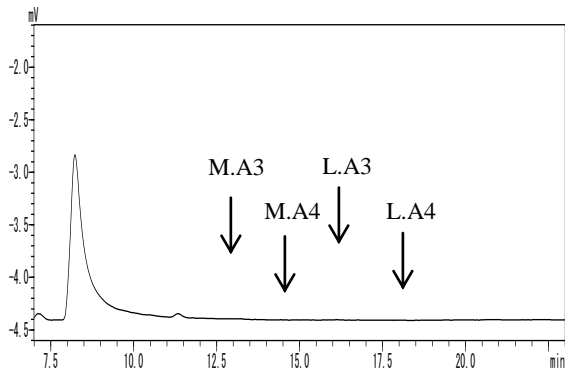
コーヒー豆 無添加



コーヒー豆 0.01 ppm添加



ねぎ 無添加



ねぎ 0.01 ppm添加

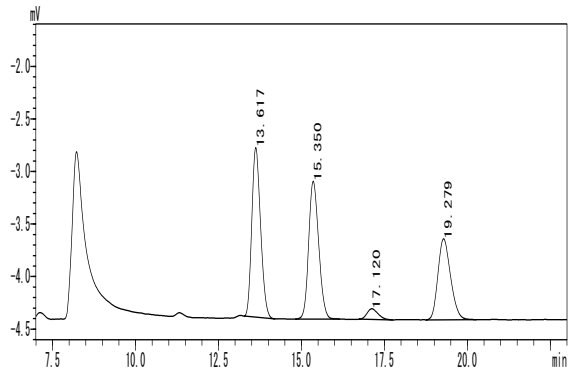


図 4-2-3 試料のクロマトグラム (測定分析カラム Inertsil Ph)