

※ 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 23 年度

食品に残留する農薬等の成分である物質
(セフキノム)の試験法開発事業報告書

セフキノム試験法（畜水産物）の検討結果

[緒言]

1. 目的及び試験法の検討方針

セフキノムは、牛の肺炎及び乳房炎、豚の呼吸器感染症等の治療薬として使用されている、セフェム系抗生物質である。

「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。

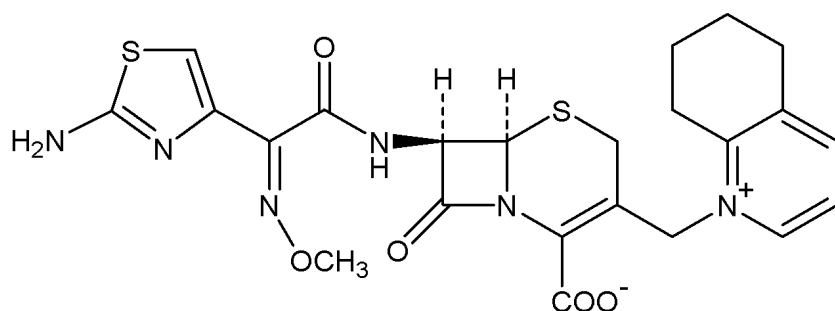
なお、定量限界の目標値は0.01 ppmとした。

1) 規制対象物質

セフキノム

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



化学式：C₂₃H₂₄N₆O₅S₂

分子量：528.6

化学名（IUPAC）：1-[[[(6R,7R)-7-[[[(2Z)-(2-Amino-4-thiazolyl)(methoxyimino)acetyl]amino]-2-carboxy-8-oxo-5-thia-1-azabicyclo[4.2.0]oct-2-en-3-yl]methyl]-5,6,7,8-tetrahydroquinolinium

inner salt

外 観：白色～淡黄白色の結晶性粉末（硫酸セフキノムとして）

溶解性：水に溶けにくく、メタノールには極めて溶けにくい（硫酸セフキノムとして）

酸解離定数（pKa）：2.51と2.91

安定性：尿路中（塩基性下）に長く滞留すると分解される。

出典：「薬事食品衛生審議会 食品衛生分科会報告書」

「動物用医薬品評価書 セフキノム 食品安全委員会動物用医薬品専門調査会」

2) 基準値

牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛の腎臓、牛の食用部分、乳 0.02 ppm

豚の筋肉、豚の脂肪、その他の陸棲哺乳類に属する動物の筋肉及び脂肪 0.05 ppm

豚の肝臓、その他の陸棲哺乳類に属する動物の肝臓 0.1 ppm

豚の腎臓、豚の食用部分、その他の陸棲哺乳類に属する動物の腎臓及び食用部分 0.2 ppm

記載のない食品については、食品、添加物等の規格基準（昭和34年厚生省告示第370号）第1食品の部 A 食品一般の成分規格の項1に示す「食品は、抗生物質又は化学的合成品たる抗菌性物質を含有してはなら

ない。」が適用される。

[実験方法]

1.

1) 試料

うなぎは愛知県の業者から、豚の腎臓及び牛の肝臓については都内の業者から、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 牛の筋肉は脂肪層を除き、細切均一化した。
- ② 牛の脂肪は筋肉部を除き、細切均一化した。
- ③ 牛の肝臓は、全体を細切均一化した。
- ④ さけは可食部（皮を含む）を細切均一化した。
- ⑤ うなぎは、活鰻を使用し、頭部を除いた可食部（内臓、骨及び皮を含む）を細切均一化した。
- ⑥ しじみは、貝殻を除き細切均一化した。
- ⑦ 牛乳は全体をよく混合して均一化した。
- ⑧ 鶏卵は、殻を除き卵白と卵黄を合わせてよく混合し均一化した。
- ⑨ はちみつはそば蜜を使用し、加温（40℃以下）してから、よく混合して均一化した。
- ⑩ 豚の腎臓は、全体を細切均一化した。

2. 試薬・試液

n-ヘキサン、アセトニトリル（以上、残留農薬試験用）

ギ酸、酢酸アンモニウム（以上、試薬特級）

ケイソウ土（セライト545）

スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラム

（InertSep PLS-2、充てん量500 mg、ジーエルサイエンス製）

セフキノム硫酸塩標準品（セフキノム硫酸塩としての純度97.5 %、和光純薬工業製）

3. 装置

	型式	会社
MS 装置	Quattro Premier XE	Waters
LC 装置	Alliance 2795	Waters

4. 測定条件

LC 条件	
カラム	Inertsil ODS4 サイズ：内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm 会社：ジーエルサイエンス株式会社
移動相流速 (mL/min)	0.2
注入量 (μL)	5
カラム温度 (°C)	40
移動相	A液：5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 B液：アセトニトリル

グラジエント条件	時間(分)	A液(%)	B液(%)
	0.00	90	10
	10.00	70	30
	12.00	70	30
	12.01	90	10
	17.00	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)	1000		
ソース温度 (°C)	120		
脱溶媒温度 (°C)	500		
コーンガス	窒素、50 L/hr		
脱溶媒ガス	窒素、800 L/hr		
コリジョンガス	アルゴン、0.2 mL/min		
定量イオン (m/z)	+529→134[コーン電圧：30(V)、コリジョンエネルギー：12(eV)]		
定性イオン (m/z)	+529→396[コーン電圧：30(V)、コリジョンエネルギー：12(eV)]		
保持時間の目安	9分		

5. 定量

セフキノム硫酸塩を0.1 vol%ギ酸に溶解し、セフキノム濃度として500 mg/Lの標準原液を調製した。セフキノム標準原液をアセトニトリル、ギ酸及び水 (200 : 1 : 800) 混液で希釈し、00005、0001、00015、0002、00025、0003及び、0001、0002、0003、0004、0005、0006並びに0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06 mg/Lの濃度の標準溶液を調製した。標準溶液5 µL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5 µL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セフキノムの含量を算出した。

6. 添加試料の調製

さけ、うなぎ、しじみ、鶏卵及びびはちみつ (添加濃度：0.01 ppm相当)：試料10.0 gにアセトニトリル、ギ酸及び水 (200 : 1 : 800) 混液で調製したセフキノム濃度1 mg/Lの標準溶液を0.1 mLを添加しよく混合した後、30分間放置した。

牛の筋肉、牛の肝臓及び牛乳 (添加濃度：0.02 ppm相当)：試料10.0 gにアセトニトリル、ギ酸及び水 (200 : 1 : 800) 混液で調製したセフキノム濃度1 mg/Lの標準溶液を0.2 mL添加しよく混合した後、30分間放置した。

豚の腎臓 (添加濃度：0.2 ppm相当)：試料10.0 gにアセトニトリル、ギ酸及び水 (200 : 1 : 800) 混液で調製したセフキノム濃度10 mg/Lの標準溶液を0.2 mL添加しよく混合した後、30分間放置した。

牛の脂肪 (添加濃度：0.02 ppm相当)：40°Cの水浴で熔融させた試料5.00 gに、アセトニトリル、ギ酸及び水 (200 : 1 : 800) 混液で調製したセフキノム濃度1 mg/Lの標準溶液を0.1 mLにアセトン1 mLを加え混合した状態で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

1) 試験法の分析操作

セフキノムを試料からn-ヘキサン存在下でアセトニトリル、ギ酸及び水 (900 : 1 : 100) 混液で抽出し、スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラムで精製した後、LC-MS/MSで定量及び確認した。

① 抽出

a 筋肉、肝臓、腎臓、乳、卵、魚介類及びはちみつの場合

試料（はちみつ以外）10.0 gを200 mL遠心管に量り採った。はちみつの場合は、試料10.0 gを200 mL遠心管に量り採り、水70 mLを加えて溶かした。これにアセトニトリル、ギ酸及び水（900 : 1 : 100）混液50 mL及び*n*-ヘキサン50 mLを加え、ホモジナイズし、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、300 mL容フラスコに採取した。ろ紙上の残留物にアセトニトリル、ギ酸及び水（900 : 1 : 100）混液30 mL及び*n*-ヘキサン30 mLを加えてホモジナイズし、上記と同様にろ過した。得られたろ液を合わせ300 mL容分液ロートに移し、下層を200 mL容メスフラスコに移した後、アセトニトリル、ギ酸及び水（900 : 1 : 100）混液を加えて200 mLとした。200 mL容フラスコに、この抽出液を正確に40 mL採り、40℃以下ではちみつ以外は4 mL以下、はちみつは18 mL以下まで濃縮し、アセトニトリルを除去した。この残留物に水20 mLを加え超音波処理を行い混合した。

b 脂肪の場合

試料5.00 gを200 mL遠心管に量り採り、アセトニトリル、ギ酸及び水（900 : 1 : 100）混液50 mL及び*n*-ヘキサン50 mLを加え、ホモジナイズし、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、300 mL容フラスコに採取した。ろ紙上の残留物にアセトニトリル、ギ酸及び水（900 : 1 : 100）混液30 mL及び*n*-ヘキサン30 mLを加えてホモジナイズし、上記と同様にろ過した。得られたろ液を合わせ300 mL容分液ロートに移し、水層を200 mL容メスフラスコに移した後、アセトニトリル、ギ酸及び水（900 : 1 : 100）混液を加えて正確に200 mLとした。200 mL容フラスコに、この抽出液を正確に80 mL採り、40℃以下で8 mL以下まで濃縮し、アセトニトリルを除去した。残留物に水20 mLを加え超音波処理を行い混合した。

② 精製

スチレンジビニルベンゼン共重合体カラムクロマトグラフィー

スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラム（500 mg）にアセトニトリル及び水各10 mLを順次注入し、流出液を捨てた。このカラムに①で得られた溶液を注入した後、水10 mLで容器を洗い込み注入し、流出液は捨てた。次いでアセトニトリル及び水（1 : 19）混液10 mLを注入し、流出液は捨てた。さらに、アセトニトリル及び水（1 : 4）混液10 mLを注入し、溶出液を10 mL容メスフラスコに受け、溶出液にギ酸10 µLを加えた後、アセトニトリル及び水（1 : 4）混液で正確に10 mLとしたものを試験溶液とした。

秤 取

| 脂肪以外：試料10.0 g（はちみつ：水70 mL加える）

↓ 脂肪：試料5.00 g

アセトニトリル、ギ酸及び水（900：1：100）混液抽出

| アセトニトリル、ギ酸及び水（900：1：100）混液50 mL及び*n*-ヘキサン50 mLを加え、
| ホモジナイズ

| 吸引ろ過、ろ紙上の残留物を採る

| 残留物にアセトニトリル、ギ酸及び水（900：1：100）混液30 mL及び*n*-ヘキサン30 mLを加え、
| ホモジナイズ

| 吸引ろ過、ろ液を合わせ、下層を分取

| アセトニトリル、ギ酸及び水（900：1：100）混液で正確に200 mLとする

| 脂肪以外：抽出液40 mL分取、減圧濃縮、アセトニトリルを除去、水20 mLを加え混合

↓ 脂肪：抽出液80 mL分取、減圧濃縮、アセトニトリルを除去、水20 mLを加え混合

スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラム

| [InertSep PLS2（500 mg）]

| アセトニトリル及び水各10 mLで予備洗浄

| 試料溶液負荷、水10 mLで洗浄

| アセトニトリル及び水（1：19）混液10 mLで洗浄

| アセトニトリル及び水（1：4）混液10 mLで溶出

| 溶出液にギ酸10 µLを加える

↓ アセトニトリル及び水（1：4）混液で正確に10 mLとし、試験溶液とする

LC-MS/MS定量

5 µL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）

牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳及び豚の腎臓は、ブランク溶液から1 mL分取し溶媒を除去した後、0.002 mg/Lの標準溶液1 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）

牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓及び牛乳はブランク溶液から1 mL分取し溶媒を除去した後、0.004 mg/Lの標準溶液1 mLに溶解したものを、さけ、うなぎ、しじみ、鶏卵及びはちみつはブランク溶液から1 mL分取し溶媒を除去した後、0.002 mg/Lの標準溶液1 mLに溶解したものを、豚の腎臓はブランク溶液から1 mL分取し溶媒を除去した後、0.04 mg/Lの標準溶液1 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) LC条件

a 測定カラムの種類

セフキノムの保持には一般的なオクタデシルシリル化シリカゲルカラムで保持可能であった。AtlantisT3とInertsil ODS-4は保持時間以外のピーク形状、再現性、感度とも同等であった。今回は、Inertsil ODS-4を採用した。検討した測定カラムをTable 1に示した。

Table 1 検討に用いた測定カラムと保持時間

測定カラム	会社	保持時間 (分)
Mightysil RP18 GP 内径 2.0 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm	関東化学	6.8
Atlantis T3 内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm	Waters	8.3
Inertsil ODS4 内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm	ジーエルサイエンス	8.3

4. 測定条件に示した移動相条件でデータを採取した。

b 移動相条件

セフキノムの保持、イオン化効率を確認するため、移動相に加える揮発性塩及び酸の比較検討を酢酸アンモニウム及び、酢酸を用いて行った。4. 測定条件に示すLC条件のうち、移動相Aを5 mmol/L酢酸アンモニウムまたは5 mmol/L酢酸にして、0.02 mg/Lの標準溶液5 μL注入による比較を行った。

酢酸よりも酢酸アンモニウムを用いた移動相の方が、セフキノムの感度が良好であったため、移動相には5 mmol/L酢酸アンモニウムを採用した。検討結果をTable 2に示した。

Table 2 酢酸アンモニウムと酢酸での比較

移動相A	ピーク面積	保持時間 (min)
5 mmol/L酢酸アンモニウム	22870	8.11
5 mmol/L酢酸	3864	8.02

2) MS条件

イオン化法

セフキノムは正イオンモードでイオン化が可能であったが、負イオンモードではイオンが確認出来なかったため、正イオンモードを選択した。モニターイオンは4. 測定条件の主なイオン (m/z) に、スペクトルを図1-1及び1-2に示した。セフキノムの標準溶液 (0.002 mg/L) 5 μL注入時におけるS/N比をTable 3に示した。S/N及び選択性から m/z 529→134を定量イオンに、次いで良好であった m/z 529→396を定性イオンに選択した。

Table 3 セフキノムのS/N比 (0.002 mg/L)

プリカーサーイオン	プロダクトイオン	イオン化モード	S/N比	ピーク面積
529	134	ESI (+)	113	2990
529	396	ESI (+)	54	1274
529	324	ESI (+)	29	334

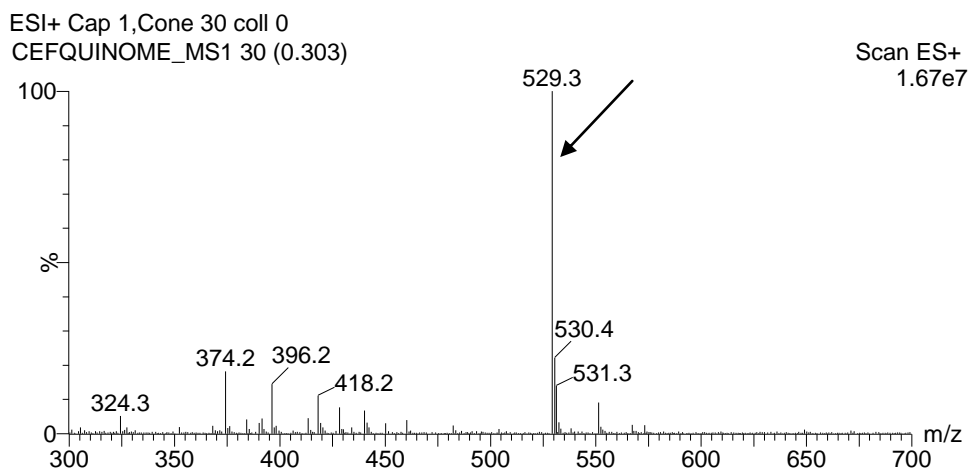


図1-1 セフキノムのマススペクトル

スキャン範囲：300～700 m/z

測定条件：ESI+、CV=30 V

(CV : cone voltage)

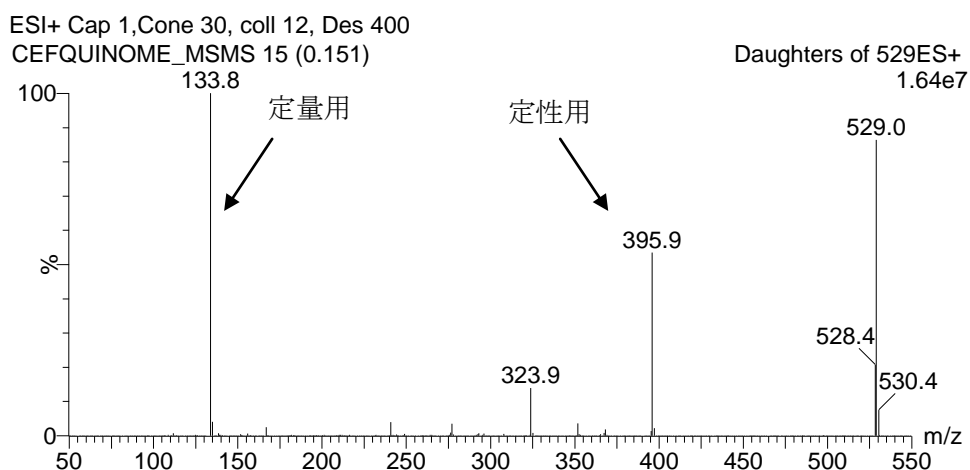


図1-2 セフキノムのプロダクトスキャンスペクトル (定量及び定性用)

プリカーサーイオン： m/z 529

測定条件：ESI+、CV=30 V、CE=12 eV

(CV : cone voltage、CE : collision energy)

3) 検量線の直線性

図2-1、2-2及び2-3にセフキノムの検量線の例を示した。0.0005 mg/L (0.0025 ng) ～0.003 mg/L (0.015 ng)、0.001 mg/L (0.005 ng) ～0.006 mg/L (0.03 ng) 及び0.01 mg/L(0.05 ng) ～0.06 mg/L (0.3 ng) の濃度範囲で良好な直線性を示した。

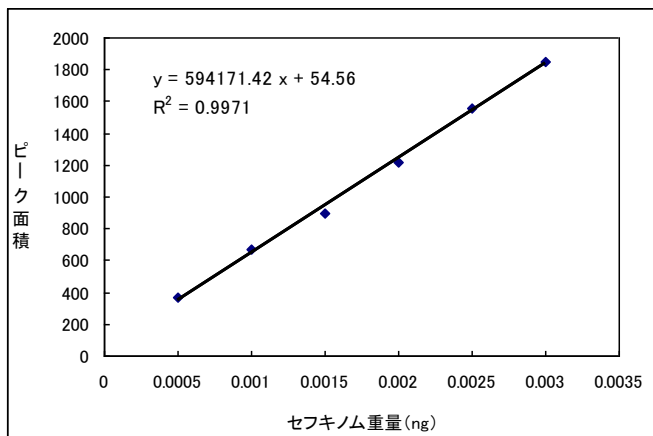


図2-1 セフキノム検量線例

データ処理装置設定条件の一例

機種 (メーカー) : TargetLynx (Waters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

検量線傾き (a) : a = 594171.42

検量線切片 (b) : b = 54.56

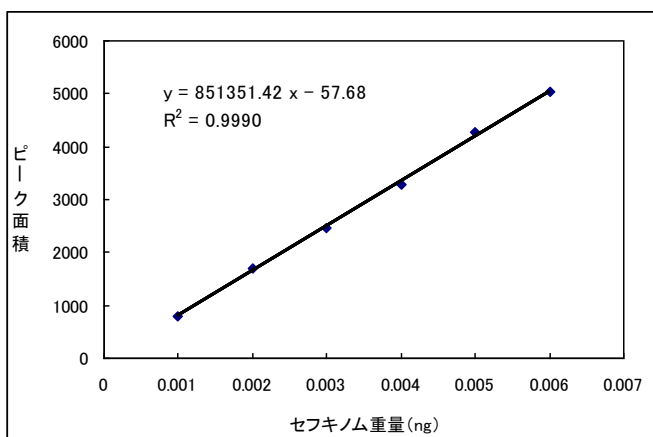


図2-2 セフキノム検量線例

データ処理装置設定条件の一例

機種 (メーカー) : TargetLynx (Waters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

検量線傾き (a) : a = 851351.42

検量線切片 (b) : b = -57.68

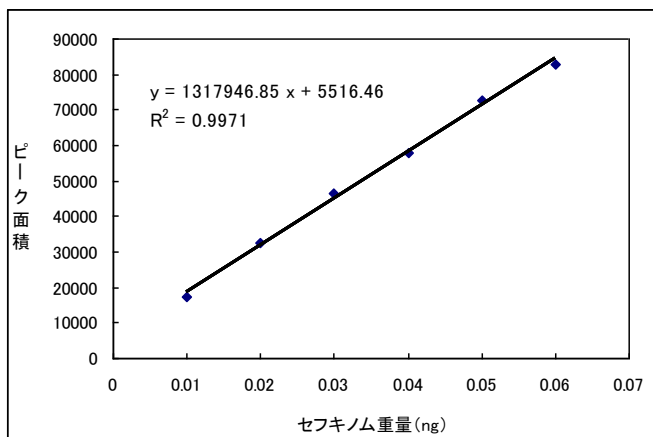


図2-3 セフキノム検量線例

データ処理装置設定条件の一例

機種 (メーカー) : TargetLynx (Waters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 : 0.05 ng~0.3 ng

検量線傾き (a) : a = 1317946.85

検量線切片 (b) : b = 5516.46

4) 定量限界

0.01 mg/kg [(10 mL/2 g*1) × (0.01 ng/5 μL)]

*1 5.00 g × 80 mL/200 mL (脂肪の場合)

10.0 g × 40 mL/200 mL (脂肪以外の場合)

2. 試験溶液調製法の検討

1) 溶解溶媒

セフキノム硫酸塩を溶解させる溶媒について検討を行った。

n-ヘキサン、アセトニトリル、アセトン、メタノール、水、ジメチルホルムアミドについて、セフキノムとして25 mgを各溶媒50 mLを用いて溶解を試みた。*n*-ヘキサン、アセトニトリル、アセトン、メタノールは目視でほぼ不溶と判断した。水では僅かな不溶分の残存が目視で観察された。ジメチルホルムアミドは目視で不溶分は認められなかったが、LC-MS/MSによる分析を予定していたため採用しなかった。

次に、セフキノムとして25 mgを0.1 vol%ギ酸50 mLを用いて溶解を試みたところ、目視による不溶分が認められなくなったため、酸を加えることでセフキノムが溶解し易くなると考えられた。

また、同様にセフキノムとして25 mgをアセトニトリル、ギ酸及び水（200 : 1 : 800）混液50 mLを用いて溶解を試みたところ、目視による不溶分が認められなくなった。ギ酸を加えることで、アセトニトリルを加えた混液でもセフキノムを溶解させることが可能であった。

0.1 vol%ギ酸と、アセトニトリル、ギ酸及び水（200 : 1 : 800）混液が同等にセフキノムを溶解させているか確認するため、0.1 vol%ギ酸で調製したセフキノム原液（500 mg/L）とアセトニトリル、ギ酸及び水（200 : 1 : 800）混液で調製したセフキノム原液（500 mg/L）それぞれから、アセトニトリル、ギ酸及び水（200 : 1 : 800）混液を用いて順次希釈し、セフキノム0.01 mg/L相当の標準溶液を作製した。これをLC-MS/MSにて測定し、ピーク面積の比較を行った。

0.1 vol%ギ酸で調製した原液から希釈した標準溶液（0.01 mg/L）を測定したときのピーク面積を100%とした際の、アセトニトリル、ギ酸及び水（200 : 1 : 800）混液で調製した原液からの標準溶液（0.01 mg/L）の面積は98.9%であった。

以上より、セフキノム原液（500 mg/L）の調製溶媒としては、0.1 vol%ギ酸と、アセトニトリル、ギ酸及び水（200 : 1 : 800）混液は同等であると考えられた。なお、本開発ではセフキノムの原液調製は0.1 vol%ギ酸で実施した。

2) 標準溶液の安定性

セフキノムは尿路中（塩基性下）に長く滞留すると分解される。との情報があったため、塩基性とならないよう、試験溶液は酸性の溶液にすることが望ましいと考えた。なお、酸性下でのセフキノムの安定性情報は不明であったため、安定性を確認するため、以下の検討を行った。

0.1 vol%ギ酸で調製したセフキノム原液（500 mg/L）と、アセトニトリル、ギ酸及び水（200 : 1 : 800）混液で調製したセフキノム原液（500 mg/L）それぞれから、アセトニトリル、ギ酸及び水（200 : 1 : 800）混液にて希釈調製した標準溶液（0.01 mg/L）を冷暗所（褐色ガラス容器）にて保管し安定性の確認を行った。残存率（%）は比較当日にセフキノム標準品の量り採りから新たに調製した標準溶液との比較により算出した。結果をTable 4に示す。

Table 4の結果より、アセトニトリル、ギ酸及び水（200 : 1 : 800）混液中、冷暗所保管で約3週間の安定性が確認出来た。

Table 4 標準溶液の安定性 残存率 (%)

日数 (日)	保存1日後	保存21日後
0.1vol%ギ酸で調製した原液から希釈	103	98
アセトニトリル、ギ酸及び水 (200 : 1 : 800) 混液で調製した原液から希釈	102	103

なお、検討初期においてジメチルホルムアミドで調製したセフキノム原液をメタノールで順次希釈した標準溶液は調製1日後にピーク面積が減少していることが観察された。メタノール中で不安定であることが予想されたため、メタノールで希釈調製した標準溶液を保管し、標準溶液のマスペクトルを確認した。

約1ヶ月冷暗所に保管した標準溶液5 mg/Lを用いたマスペクトルを図3に示す。

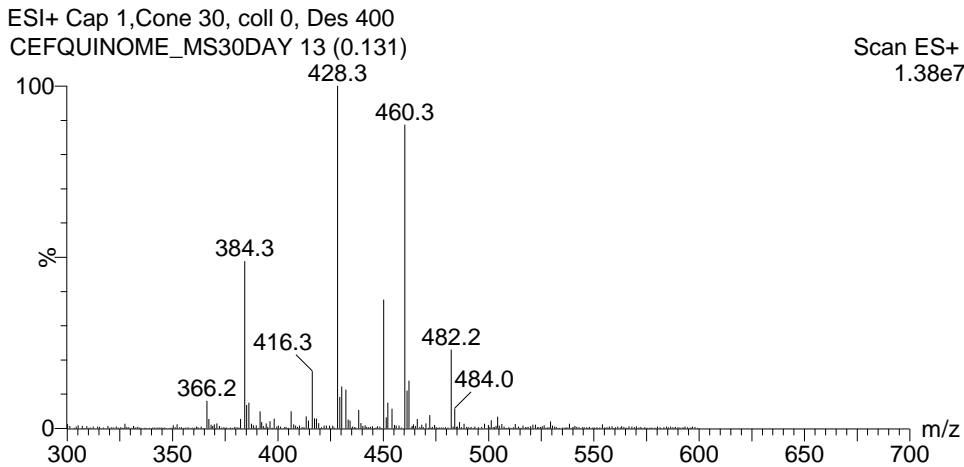


図3 セフキノムのマスペクトル (メタノール溶液)

スキャン範囲 : 300~700 m/z

測定条件 : ESI+, CV=30 V

(CV : cone voltage)

m/z 529が観察されず、メタノール溶液中での分解の可能性が示唆されたため、本試験法ではメタノールを用いないこととした。

3) 抽出方法の検討

a 抽出溶媒の検討

アセトニトリル、ギ酸及び水 (200 : 1 : 800) 混液で調製したセフキノム標準溶液 (100 mg/L) をアセトンで100倍に希釈した添加用標準溶液 (1 mg/L) を調製した。牛の脂肪5 gを40°Cで加温、融解させ、添加用標準溶液 (1 mg/L) 0.1 mL加え、よく混合し再凝固した試料を抽出溶媒の検討用試料とした。

溶解溶媒の検討において、セフキノム原液 (500 mg/L) 調製には不向きであったが、アセトン、アセトニトリル、水、アセトニトリル及び水の混液について抽出溶媒として用いることが可能か検討した。

アセトン以外のアセトニトリル、水は脂肪を溶解させることが出来ないため、抽出時に*n*-ヘキサンを加え脂肪を*n*-ヘキサンに溶解させ均一な状態にすることで抽出効率を担保することとした。

①アセトン

検討用試料5 gにアセトン100 mLを加え1分間ホモジナイズ抽出後、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た。ろ紙上の残留物にアセトン50 mLを加え、ホモジナイズした後、上記と同様に

ろ過し、アセトン層を合わせ、アセトンで正確に200 mLに定容した。この抽出液80 mLを採り、減圧濃縮にてアセトン除去後、水20 mLを加え超音波処理し、*n*-ヘキサン10 mLを加え洗浄を行った。水層を回収した。

②アセトニトリル及び*n*-ヘキサン

検討用試料5 gにアセトニトリル50 mL、*n*-ヘキサン50 mLを加え1分間ホモジナイズ抽出後、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た。ろ紙上の残留物にアセトニトリル30 mL、*n*-ヘキサン30 mLを加え、ホモジナイズした後、上記と同様にろ過し、アセトニトリル層を合わせ、アセトニトリルで正確に200 mLに定容した。この抽出液80 mLを採り、減圧濃縮にてアセトニトリル除去後、水20 mLを加え超音波処理した。

③水及び*n*-ヘキサン

検討用試料5 gに水50 mL、*n*-ヘキサン50 mLを加え1分間ホモジナイズ抽出した。抽出液全体がエマルジョンとなったため、遠心分離後、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た。ろ紙上の残留物に水30 mL、*n*-ヘキサン30 mLを加え、ホモジナイズした後、上記と同様に遠心分離、ろ過し、水層を合わせ、水で正確に100 mLに定容した。この抽出液40 mLを採り、減圧濃縮にて約20 mLまで濃縮後、超音波処理した。

④アセトニトリル及び水（9：1）混液及び*n*-ヘキサン

検討用試料5 gにアセトニトリル及び水（9：1）混液50 mL、*n*-ヘキサン50 mLを加え1分間ホモジナイズ抽出後、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た。ろ紙上の残留物にアセトニトリル及び水（9：1）30 mL、*n*-ヘキサン30 mLを加え、ホモジナイズした後、上記と同様にろ過し、アセトニトリル及び水層を合わせ、アセトニトリル及び水（9：1）混液で正確に200 mLに定容した。この抽出液80 mLを採り、減圧濃縮にて8 mL以下まで濃縮し、水20 mLを加え超音波処理した。

①～④の操作で得られた溶液を7.試験溶液の調製の②精製を行い試験溶液を作製し、測定を行った。Table5に抽出率（%）を示した。

アセトン、アセトニトリルではセフキノムの抽出率は低かったが、水またはアセトニトリル及び水（9：1）混液では80%以上の抽出率が得られた。溶解溶媒の検討でセフキノム原液（500 mg/L）の調製にはギ酸を加えない水は溶解が不十分であったが、検討したセフキノムの試料濃度（0.02 ppm）では水への抽出が可能であった。

しかし、水及び*n*-ヘキサン（1：1）の割合での抽出操作は脂肪以外に牛の肝臓やしじみの試料においてもエマルジョンの生成がひどく、操作性が劣るため本開発では不採用とした。

アセトニトリル及び水（9：1）混液及び*n*-ヘキサン（1：1）の割合での抽出操作はエマルジョンの生成がほとんど無く、操作性は良好であった。

Table 5 抽出溶媒による脂肪からの抽出率 (%)

抽出溶媒	抽出率 (%)
①アセトン	0
②アセトニトリル及び <i>n</i> -ヘキサン	15
③水及び <i>n</i> -ヘキサン	89
④アセトニトリル及び水 (9 : 1) 混液 及び <i>n</i> -ヘキサン	92

b 抽出溶媒の混合割合の検討

牛の脂肪を用いたアセトニトリル及び水 (9 : 1) 混液及び*n*-ヘキサン (1 : 1) の割合での抽出は操作性、抽出率とも良好であったが、脂肪以外の試料では牛乳等の試料由来の水分を含むものがあるため、アセトニトリル及び水 (9 : 1) 混液中の水の割合が試料由来の水分を加味して増加してもセフキノムの抽出率が得られるのか、確認する必要がある。

そこで、アセトニトリル及び水の割合を変化させた抽出率の確認を行った。検討用試料としては、a 抽出溶媒の検討と同様にセフキノムを添加した牛の脂肪を用いた。アセトニトリルと水の比率以外、a 抽出溶媒の検討の④と同様の操作を行った。結果をTable 6-1に示す。アセトニトリル及び水 (4 : 1) 混液やアセトニトリル及び水 (7 : 3) 混液ではセフキノムの抽出率が80%を下回ったことから、水の割合が増えるとセフキノムの抽出率が低下する現象が観察された。

なお、アセトニトリル及び水 (3 : 2) 混液では遠心分離が必要な程度のエマルジョンの生成が認められたため、操作性が悪く検討から除外した。

Table 6-1 アセトニトリル及び水の割合を変化させた場合の牛の脂肪からの抽出率 (%)

アセトニトリル及び水	抽出率 (%)
1 : 0	9
9 : 1	92
4 : 1	64
7 : 3	70

上記の結果から、牛乳のように水分の多い試料の場合、セフキノムの抽出率が低くなることが懸念された。次に、抽出率改善を目的として、抽出溶媒にギ酸を加えた抽出溶媒を検討した。アセトニトリル及び水混液中にギ酸が0.1 vol%となるようにギ酸を加え、a 抽出溶媒の検討の④と同様の操作を行った。結果をTable 6-2に示した。

Table 6-2 アセトニトリル、ギ酸及び水の割合を変化させた場合の牛の脂肪からの抽出率 (%)

アセトニトリル、ギ酸及び水の割合	抽出率 (%)
1000 : 1 : 0	6
900 : 1 : 100	90
800 : 1 : 200	85
700 : 1 : 300	90

ギ酸を加えることにより、水の割合が増えた場合でもセフキノムの抽出率が改善した。本開発では、試料由来の水分も考慮し、*n*-ヘキサン存在下、アセトニトリル、ギ酸及び水 (900 : 1 : 100) 混液にて抽出

する方法を採用した。

また、抽出時に加えた n -ヘキサンにより脱脂及び低極性物質の除去が期待できる。

c はちみつにおける加水の検討

アセトニトリル、ギ酸及び水（900 : 1 : 100）混液を用いた抽出検討において、はちみつのみ回収が得られなかった。はちみつ10 gに対し、アセトニトリル、ギ酸及び水（900 : 1 : 100）混液50 mLではアセトニトリルとはちみつの層が分離し、ろ過の際にはちみつがセライトに吸着し、セフキノムもはちみつとともにセライトに吸着したと考えられた。

はちみつは糖濃度が高いためにアセトニトリルと分離したと考えられたため、はちみつへの加水量を検討した。

加水量の検討にはそば蜜及び百花蜜を用いた。それぞれはちみつ10 gに水を10 mL、20 mL、30 mL、40 mL、50 mL、60 mL、70 mL、80 mLを別々に加え混合した後、アセトニトリル、ギ酸及び水（900 : 1 : 100）混液を用いて200 mLに定容した際、加水70 mL以上でそば蜜、百花蜜ともアセトニトリル層と水層の分離が観察されなかった。はちみつ10 gに対し水70 mLを加えることでアセトニトリルと分離せず、セライトへの取り込みも回避可能であったため、はちみつについては加水混合後に抽出する方法とした。

2) 精製方法の検討

a ミニカラムの事前検討

抽出液が酸性となるため、カラムに負荷する試験溶液がpH1となった場合でもカラムに保持可能かポリマー系ミニカラムを用いて検討した。

スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラムとしてInertSep PLS2、ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムとしてOASIS-HLBを用いた。

ミニカラムをアセトニトリル及び水各10 mLで呼び洗浄した後、0.1 mol/L塩酸20 mLにセフキノム標準溶液 (1 mg/L) 0.1 mLを加え負荷し、水10 mLで洗浄後、アセトニトリル及び水 (1 : 19) 混液10 mL、アセトニトリル及び水 (1 : 9) 混液10 mL、アセトニトリル及び水 (1 : 4) 混液10 mLを順次溶出させたときの溶出状況をTable 7に示した。OASIS-HLBではアセトニトリル及び水 (1 : 19) 混液10 mLで溶出が認められたが、InertSep PLS2では溶出が認められなかった。本開発では、アセトニトリル及び水 (1 : 19) 混液で洗浄可能なInertSep PLS2を選択した。

Table 7 ミニカラムからの溶出状況 (%)

カラム	アセトニトリル及び水			合計
	(1 : 19)	(1 : 9)	(1 : 4)	
	10 mL	10 mL	10 mL	
InertSep PLS2	0	25	72	97
OASIS-HLB	46	52	tr	98

InertSep PLS-2 (充てん量 500 mg、ジーエルサイエンス製)

OASIS-HLB (充てん量 500 mg、Waters製)

供試量 : 0.1 µg

b スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラムによる精製

a ミニカラムの事前検討を踏まえ、メーカーの異なる2種類のミニカラムについて、溶出状況の確認を行った。

アセトニトリル、ギ酸及び水 (900 : 1 : 100) 混液40 mLにセフキノム標準溶液 (1 mg/L) 0.1 mLを加え、40°C以下で4 mL以下まで減圧濃縮し、水20 mLに溶解した試験溶液を作製した。

スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラムをアセトニトリル及び水各10 mLで予備洗浄した後、スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラムに水20 mLで作製した試験溶液を負荷し、水10 mL、アセトニトリル及び水 (1 : 19) 混液10 mL、アセトニトリル及び水 (1 : 4) 混液10 mLを順次溶出させたときの溶出状況をTable 8に示した。InertSep PLS2及び、SepPak PS2とも水20 mL負荷液、水10 mL、アセトニトリル及び水 (1 : 19) 混液10 mLでは溶出せず、アセトニトリル及び水 (1 : 4) 混液0-5 mLで9割以上の溶出、5-10 mLでトレースが確認された。以上より、試料溶液負荷後、水10 mLにて洗浄、アセトニトリル及び水 (1 : 19) 混液10 mL洗浄後、アセトニトリル及び水 (1 : 4) 混液10 mLにて溶出する条件を採用した。検討したInertSep PLS2、SepPak PS2とも同等の結果であった。今回はInertSep PLS2を採用した。

また、測定の際、アセトニトリル、ギ酸及び水 (200 : 1 : 800) 混液で希釈調製している標準溶液の方が、アセトニトリル及び水 (1 : 4) 混液で希釈調製した標準溶液ではよりもピーク形状が良好であったため、試験溶液にもギ酸を加えることとした。

Table 8 スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラムからの溶出状況 (%)

カラム	水		アセトニトリル及び水				合計
	(負荷分)	(洗浄分)	(1 : 19)	(1 : 4)			
	20 mL	10 mL	10 mL	0-5 mL	5-10 mL	10-15 mL	
InertSep PLS2	0	0	0	97	tr	0	97
SepPak PS2	0	0	0	94	tr	0	94

InertSep PLS-2 (充てん量 500 mg、ジーエルサイエンス製)

SepPak PS2 (充てん量 500 mg、Waters製)

供試量 : 0.1 µg

c 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による精製

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をアセトニトリル及び水各10 mLで予備洗浄した後、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に水5 mLで負荷した。溶出状況をTable 9に示した。水5 mL負荷液及び水10 mLで良好な回収率が得られた。

スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラムのみの精製で試料共存下でも良好なクロマトグラムが得られたことから、本開発においてはエチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムを用いなかった。

Table 9 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状況 (%)

(負荷分)	水		合計
	(溶出分)		
	5 mL	0-5 mL	
30	55	11	96

InertSep PSA (充てん量 500 mg、ジーエルサイエンス製)

供試量 : 0.1 µg

3. 添加回収試験

牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、さけ、うなぎ、しじみ、牛乳、鶏卵及びはちみつの9食品に豚の腎臓を加えた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4-1~4-10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6に示した。

1) 選択性の評価

表1 選択性の評価

担当機関: 財団法人 日本食品分析センター

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 ^{*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)				
セフキノム		牛の筋肉	0.01	0.02	0.02	*	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		牛の脂肪	0.01	0.02	0.02	*	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		牛の肝臓	0.01	0.02	0.02	*	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		さけ	0.01	0.01	0.01		定量限界	0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		うなぎ	0.01	0.01	0.01		定量限界	0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		しじみ	0.01	0.01	0.01		定量限界	0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		牛乳	0.01	0.02	0.02	*	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		鶏卵	0.01	0.01	0.01		定量限界	0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		はちみつ	0.01	0.01	0.01		定量限界	0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		豚の腎臓	0.01	0.2	0.2		基準値	0.2	< 0.100	面積	0		#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側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。

10食品何れの試料においても妨害ピークは認められず、選択性は良好であった。

2) 真度、精度及び定量限界の評価

表2 真度、精度及び定量限界の評価

担当機関: 財団法人 日本食品分析センター

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)	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	
セフキノム		牛の筋肉	0.01	0.02	0.02	*	778357	89	1	93	92	85	94	91	91	4			#DIV/0!	
		牛の脂肪	0.01	0.02	0.02	*	934303	-124	1	98	99	99	98	95	98	2			#DIV/0!	
		牛の肝臓	0.01	0.02	0.02	*	1325903	15	1	80	87	77	78	83	81	5			#DIV/0!	
		さけ	0.01	0.01	0.01		945029	4	1	85	80	91	80	87	85	6	243	159	201	
		うなぎ	0.01	0.01	0.01		1005994	54	1	88	97	95	92	93	93	4	242	242	242	
		しじみ	0.01	0.01	0.01		1143240	-67	1	99	95	87	78	78	84	6	242	134	188	
		牛乳	0.01	0.02	0.02	*	851351	-58	1	85	89	85	82	80	84	4			#DIV/0!	
		鶏卵	0.01	0.01	0.01		594171	55	1	96	96	93	93	99	92	6	154	236	195	
		はちみつ	0.01	0.01	0.01		948789	-17	1	91	102	88	87	103	94	8	242	158	200	
		豚の腎臓	0.01	0.2	0.2	*	1317947	5516	1	98	95	95	96	87	94	4			#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。

真度は81~98%、併行精度は2~8%で良好な結果が得られた。また、定量限界濃度の添加回収試験を行った、さけ、うなぎ、しじみ、鶏卵及びはちみつにおけるS/N比の平均値は188~242であった。

3) 定量限界の推定

表3 定量限界の推定

担当機関: 財団法人 日本食品分析センター

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)	定量限界の評価 ²⁾	標準溶液濃度 ³⁾ (mg/L)	面積又は高さの別	ピーク面積(高さ) ⁴⁾						S/N比		平均値		備考						
									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	平均	n=1	n=2	面積(高さ)比(%) ⁵⁾	S/N比
									n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均											
セフキノム		牛の筋肉	0.01	0.02	0.02	*	0.002	面積	0	2319	2040	2180	2114	2190	2162	149	179	101	164						
		牛の脂肪	0.01	0.02	0.02	*	0.002	面積	0	5042	4685	4864	5423	4921	5172	184	184	94	184						
		牛の肝臓	0.01	0.02	0.02	*	0.002	面積	0	7005	6643	6824	7392	7067	7229	332	290	94	311						
		さけ	0.01	0.01	0.01				面積				0			0			#DIV/0!	#DIV/0!					
		うなぎ	0.01	0.01	0.01				面積				0			0			#DIV/0!	#DIV/0!					
		しじみ	0.01	0.01	0.01				面積				0			0			#DIV/0!	#DIV/0!					
		牛乳	0.01	0.02	0.02	*	0.002	面積	0	4622	5079	4850	4726	5214	4870	182	220	98	206						
		鶏卵	0.01	0.01	0.01				面積				0			0			#DIV/0!	#DIV/0!					
		はちみつ	0.01	0.01	0.01				面積				0			0			#DIV/0!	#DIV/0!					
		豚の腎臓	0.01	0.2	0.2	*	0.002	面積	0	5935	5884	5909	5363	5725	5644	309	244	107	276						

*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が異なる場合には、『』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。(必要に応じて乾燥注入を行う)。

*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。

基準値濃度の添加回収試験を行った、牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳及び豚の腎臓のブランク試料の試験溶液で調製した定量限界相当濃度のマトリックス添加標準溶液と溶媒で調製した標準溶液の面積比の平均値は94~107%であった。また、マトリックス添加標準溶液のS/N比の平均値は164~311であった。

定量限界の推定における代表的なクロマトグラムを図5-1~5-5に示した。

4) 試料マトリックスの測定への影響

表4 試料マトリックスの測定への影響

担当機関: 財団法人 日本食品分析センター

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)	標準溶液濃度 ²⁾ (mg/L)	面積又は高さの別	ブランク ⁴⁾	ピーク面積(高さ) ³⁾						備考	
									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		
セフキノム		牛の筋肉	0.01	0.02	0.02	0.004	面積	0	4280	4108	4194	4048	4041	4045	1.04	
		牛の脂肪	0.01	0.02	0.02	0.004	面積	0	10629	9966	10297	10696	10412	10554	0.98	
		牛の肝臓	0.01	0.02	0.02	0.004	面積	0	12334	12348	12341	10892	11297	11095	1.11	
		さけ	0.01	0.01	0.01	0.002	面積	0	5468	5704	5586	5391	5262	5327	1.05	
		うなぎ	0.01	0.01	0.01	0.002	面積	0	5801	6004	5902	5443	5860	5651	1.04	
		しじみ	0.01	0.01	0.01	0.002	面積	0	5181	5321	5251	5599	5450	5524	0.95	
		牛乳	0.01	0.02	0.02	0.004	面積	0	11255	10853	11054	11497	11432	11464	0.96	
		鶏卵	0.01	0.01	0.01	0.002	面積	0	5717	5721	5719	5872	5302	5587	1.02	
		はちみつ	0.01	0.01	0.01	0.002	面積	0	5358	5422	5390	5671	5682	5677	0.95	
		豚の腎臓	0.01	0.2	0.2	0.04	面積	0	123977	119186	121582	121273	119982	120628	1.01	

*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。(必要に応じて乾燥注入を行う)。

*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。

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マトリックス添加標準溶液と溶媒で調製した標準溶液の面積比の平均値は0.95~1.11であった。

[結論]

セフキノムを試料からn-ヘキサン存在下でアセトニトリル、ギ酸及び水(900:1:100)混液で抽出し、スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラムで精製した後、LC-MS/MSで定量及び確認する方法を提案する。

[参考文献]

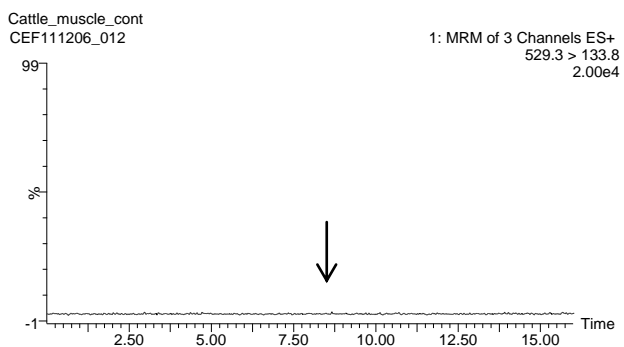
薬事食品衛生審議会 食品衛生分科会報告書 セフキノム

動物用医薬品評価書 セフキノム 食品安全委員会動物用医薬品専門調査会

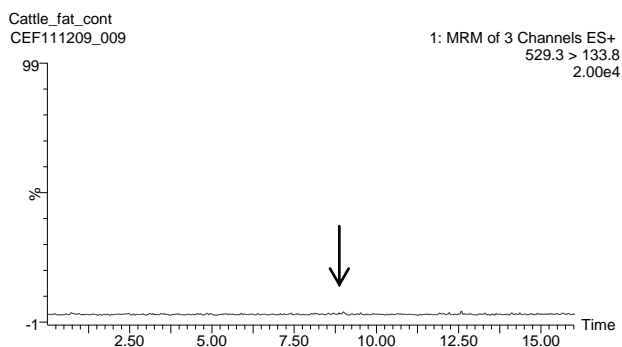
[クロマトグラム]

1) 添加回収試験における代表的なクロマトグラムを図4-1~4-10に示した。

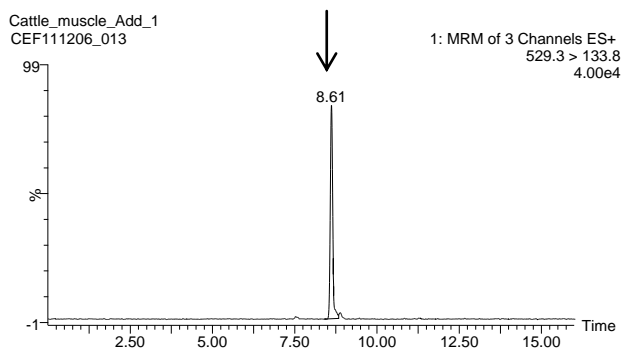
ブランク試料



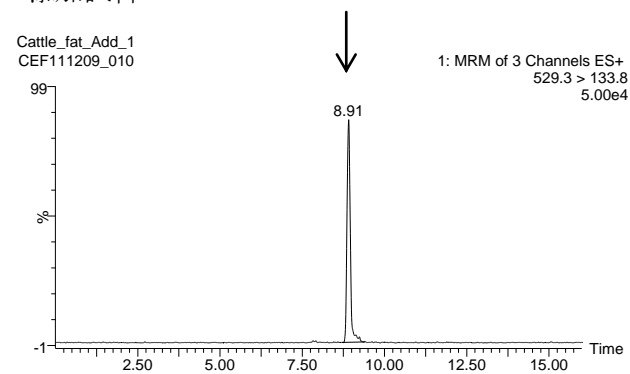
ブランク試料



添加試料



添加試料



標準溶液

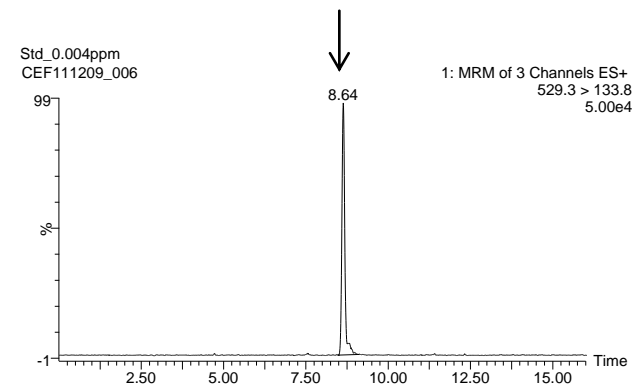
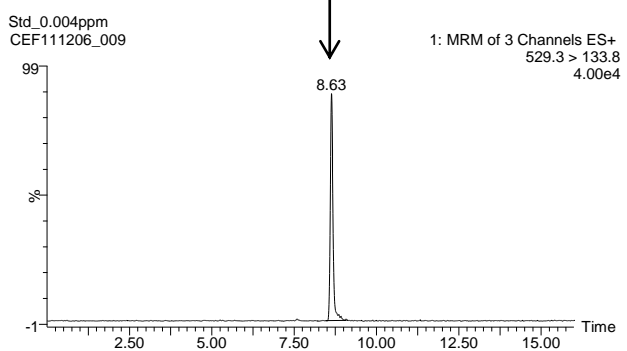
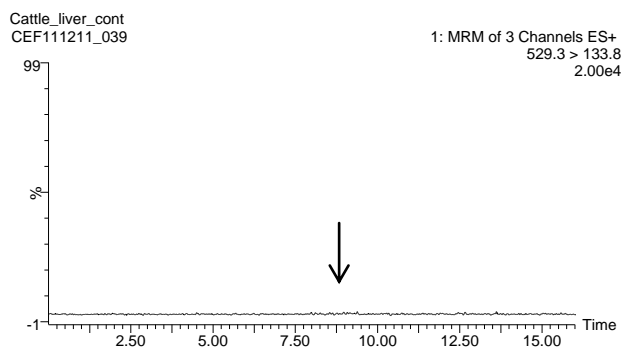


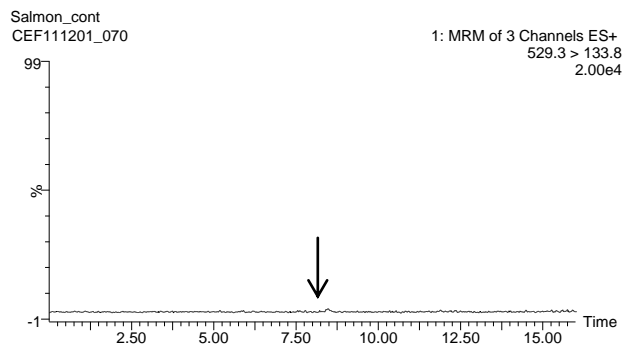
図 4-1 牛の筋肉の SRM クロマトグラム
セフキノム (m/z 529→134)
添加濃度 : 0.02 ppm

図 4-2 牛の脂肪の SRM クロマトグラム
セフキノム (m/z 529→134)
添加濃度 : 0.02 ppm

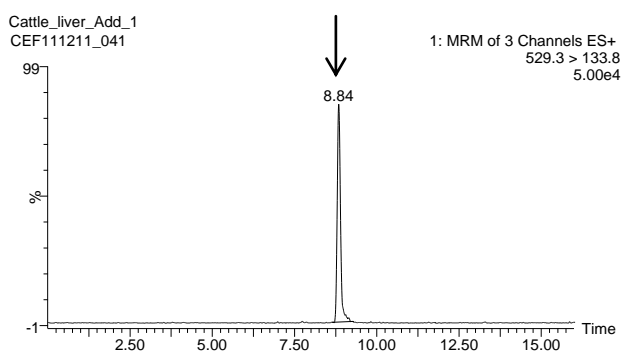
ブランク試料



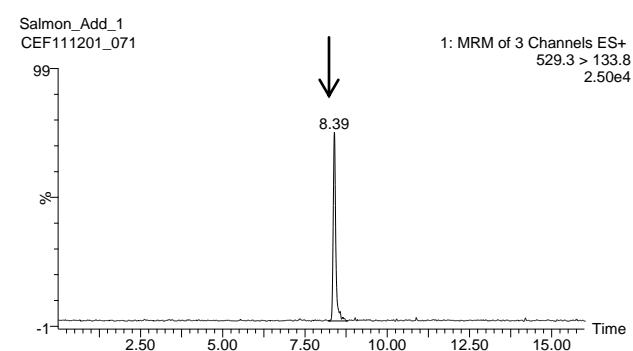
ブランク試料



添加試料



添加試料



標準溶液

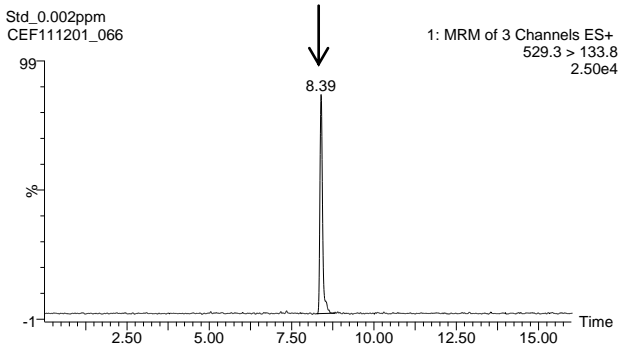
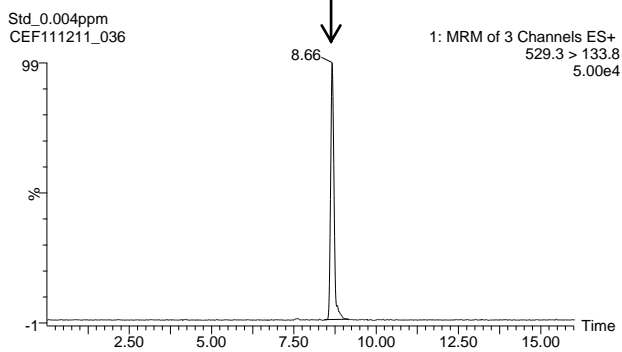
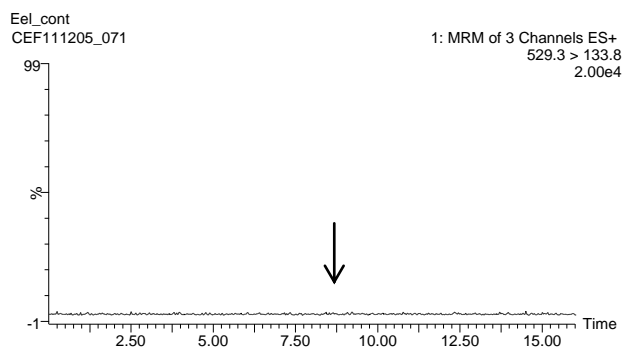


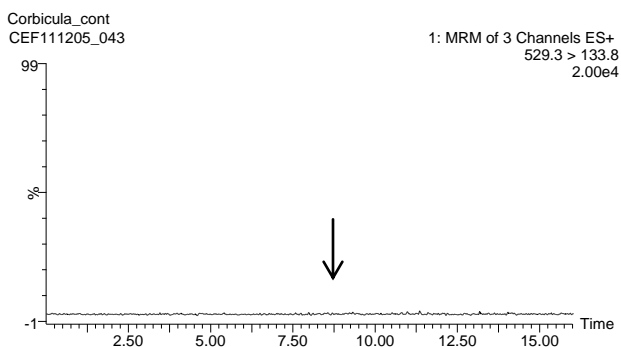
図 4-3 牛の肝臓の SRM クロマトグラム
セフキノム (m/z 529→134)
添加濃度 : 0.02 ppm

図 4-4 さけの SRM クロマトグラム
セフキノム (m/z 529→134)
添加濃度 : 0.01 ppm

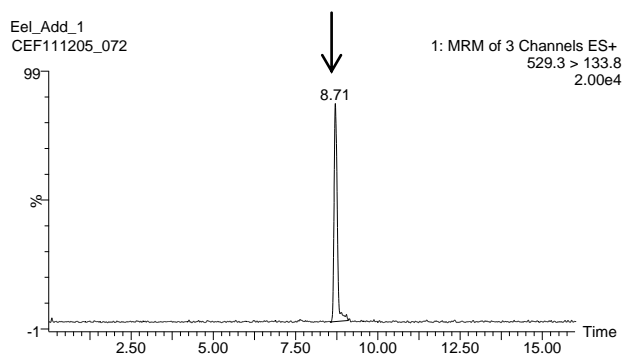
ブランク試料



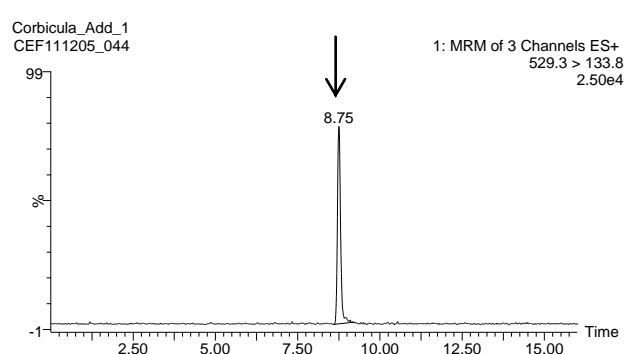
ブランク試料



添加試料



添加試料



標準溶液

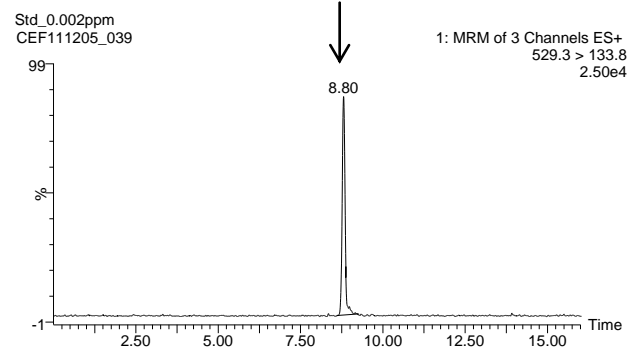
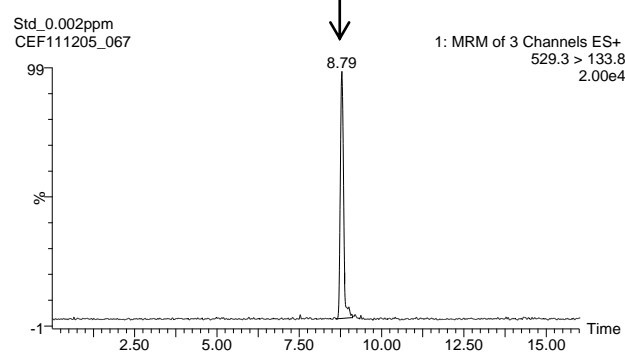
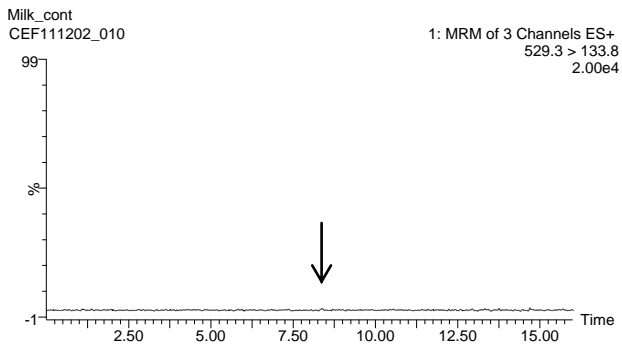


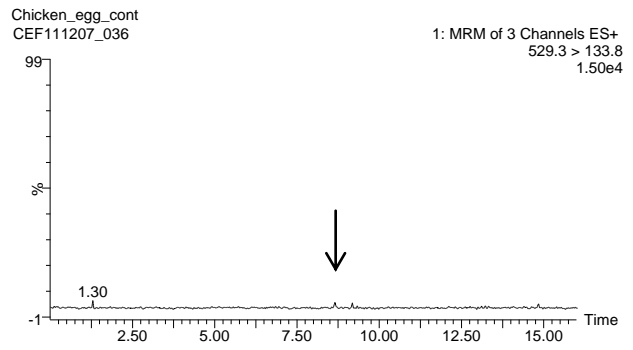
図 4-5 うなぎの SRM クロマトグラム
セフキノム (m/z 529→134)
添加濃度 : 0.01 ppm

図 4-6 しじみの SRM クロマトグラム
セフキノム (m/z 529→134)
添加濃度 : 0.01 ppm

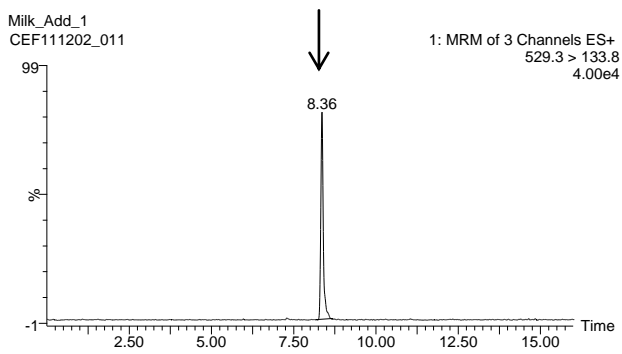
ブランク試料



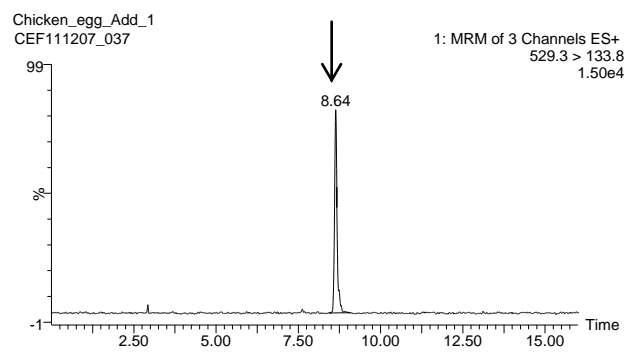
ブランク試料



添加試料



添加試料



標準溶液

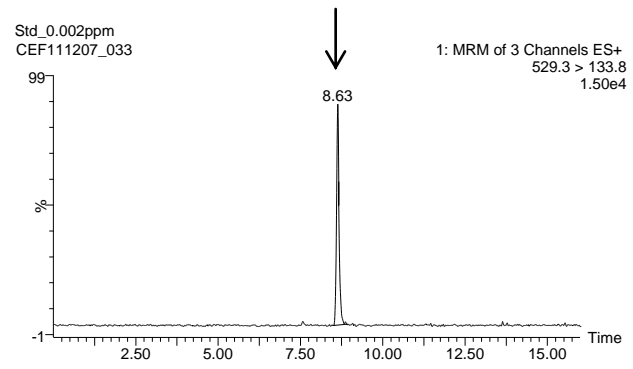
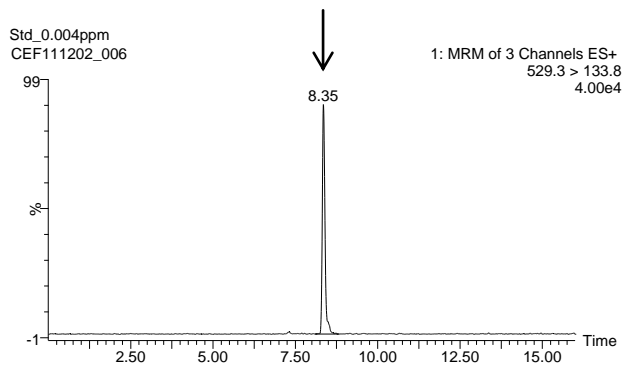
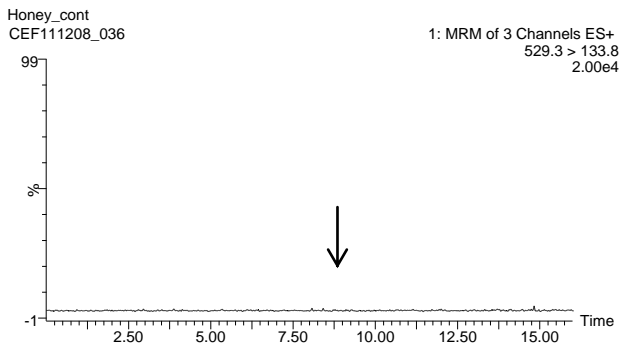


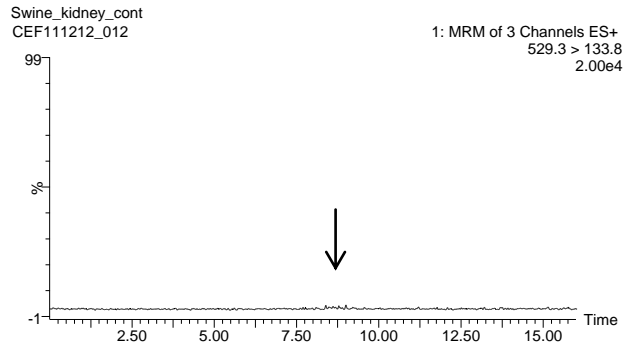
図 4-7 牛乳の SRM クロマトグラム
セフキノム (m/z 529→134)
添加濃度 : 0.02 ppm

図 4-8 鶏卵の SRM クロマトグラム
セフキノム (m/z 529→134)
添加濃度 : 0.01 ppm

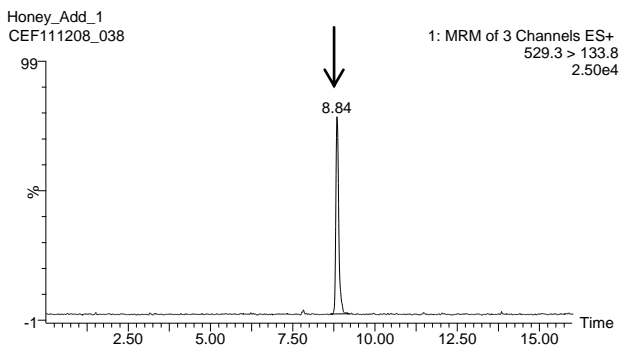
ブランク試料



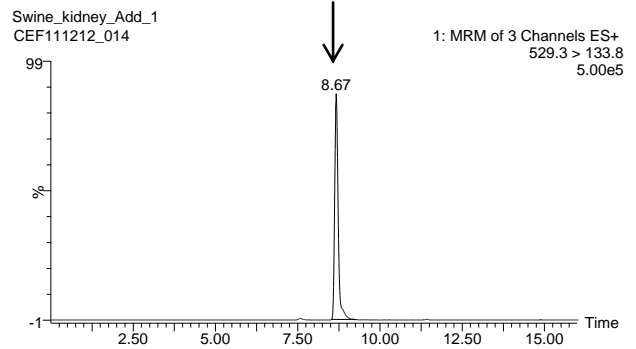
ブランク試料



添加試料



添加試料



標準溶液

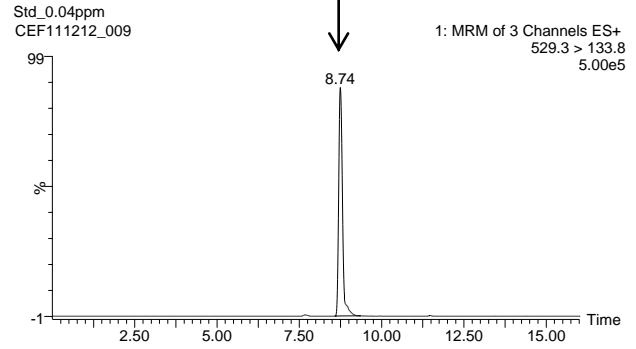
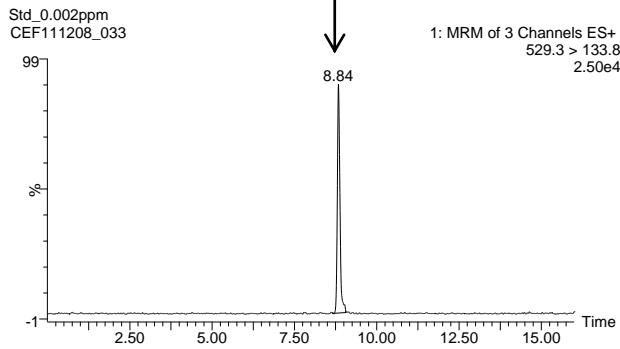
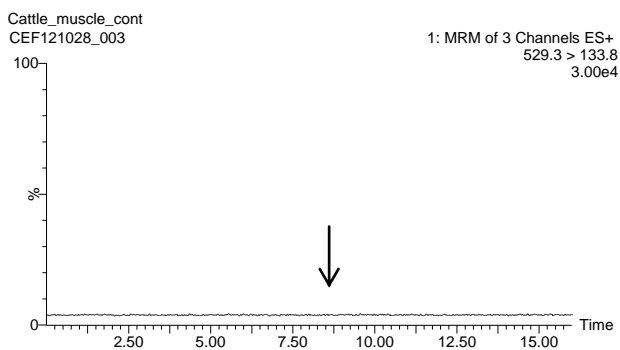


図 4-9 はちみつの SRM クロマトグラム
セフキノム (m/z 529→134)
添加濃度 : 0.01 ppm

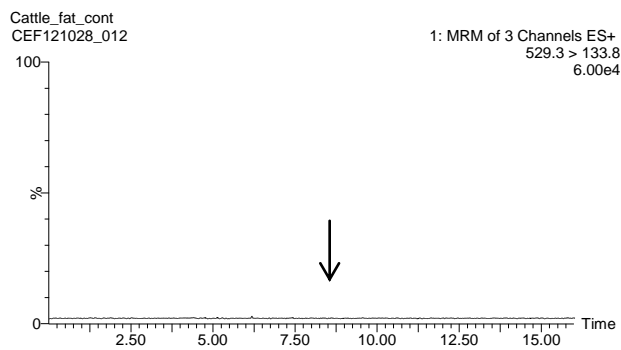
図 4-10 豚の腎臓の SRM クロマトグラム
セフキノム (m/z 529→134)
添加濃度 : 0.2 ppm

2) 定量限界の推定における代表的なクロマトグラムを図5-1~5-5に示した。

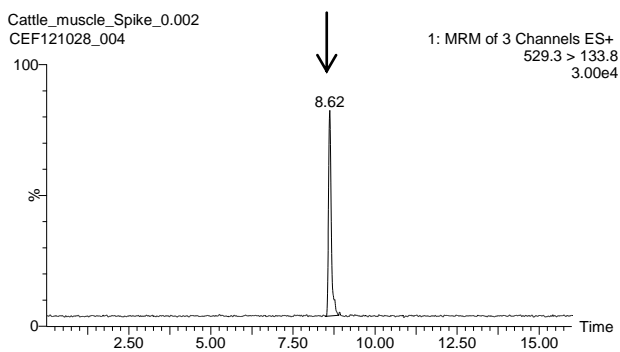
ブランク試料



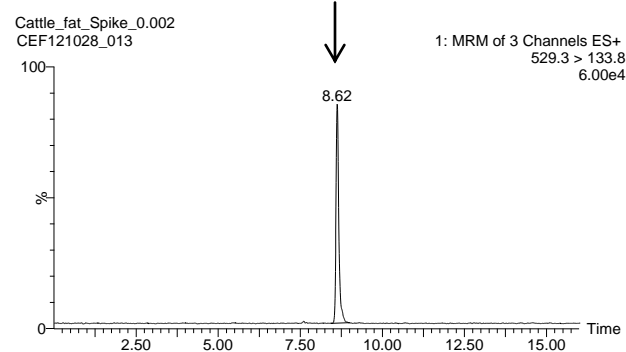
ブランク試料



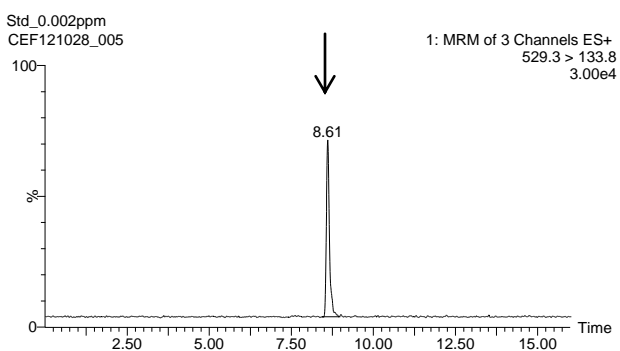
マトリックス添加標準溶液



マトリックス添加標準溶液



溶媒標準溶液



溶媒標準溶液

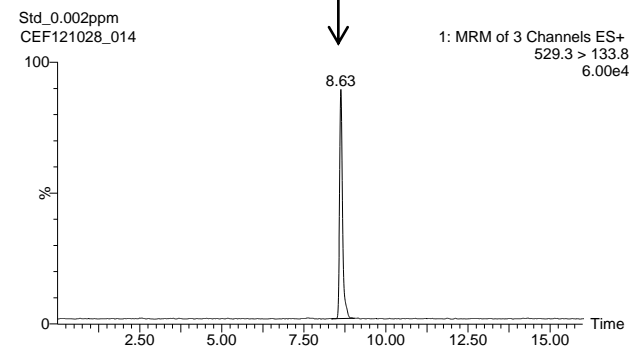
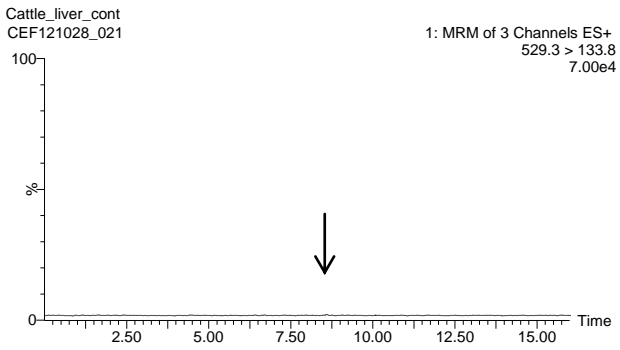


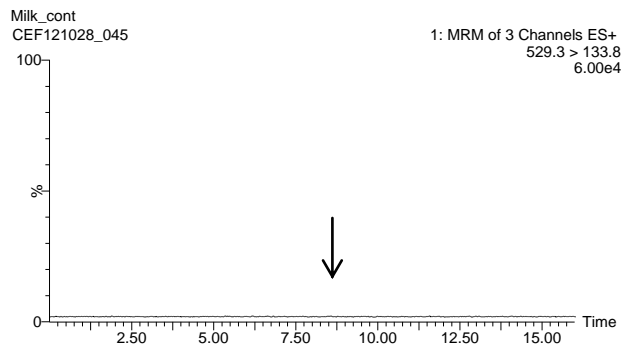
図 5-1 牛の筋肉の SRM クロマトグラム
セフキノム (m/z 529→134)
試料中 : 0.01 ppm 相当

図 5-2 牛の脂肪の SRM クロマトグラム
セフキノム (m/z 529→134)
試料中 : 0.01 ppm

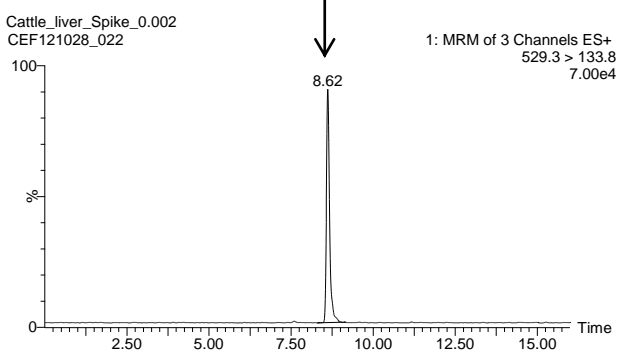
ブランク試料



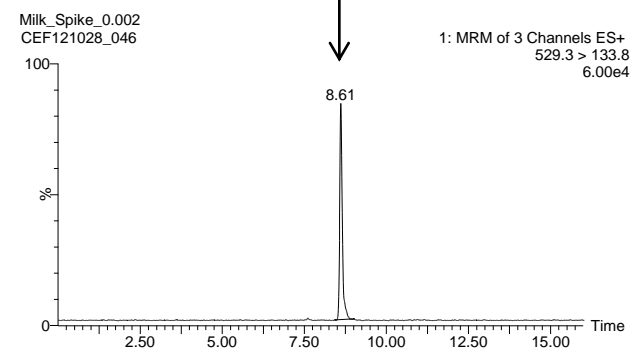
ブランク試料



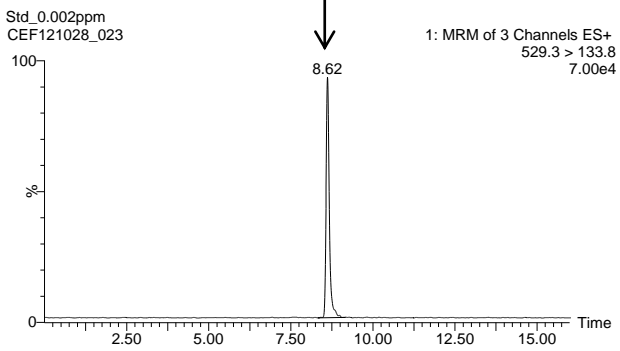
マトリックス添加標準溶液



マトリックス添加標準溶液



溶媒標準溶液



溶媒標準溶液

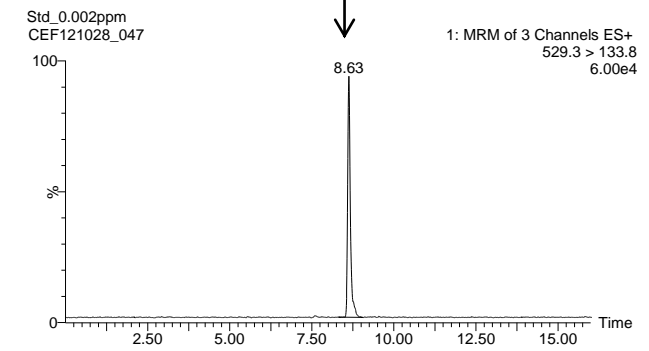
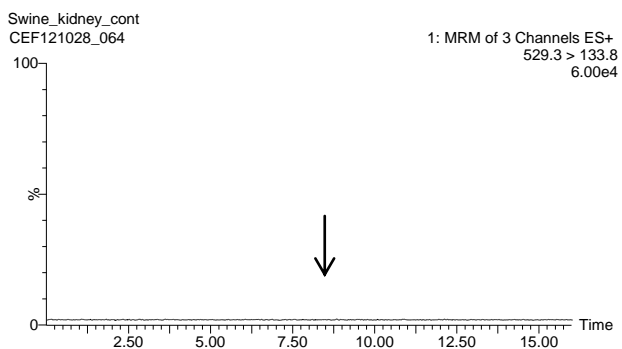


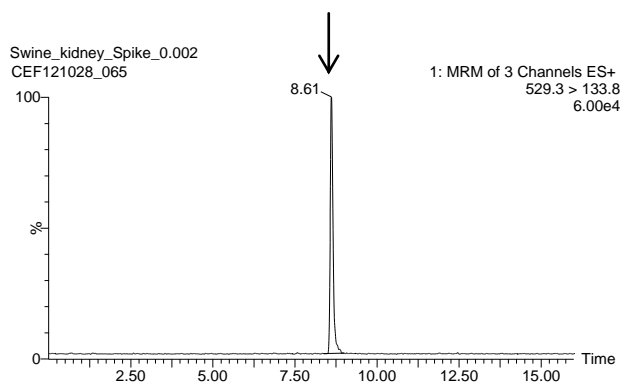
図 5-3 牛の肝臓の SRM クロマトグラム
セフキノム (m/z 529→134)
試料中 : 0.01 ppm 相当

図 5-4 牛乳の SRM クロマトグラム
セフキノム (m/z 529→134)
試料中 : 0.01 ppm

ブランク試料



マトリックス添加標準溶液



溶媒標準溶液

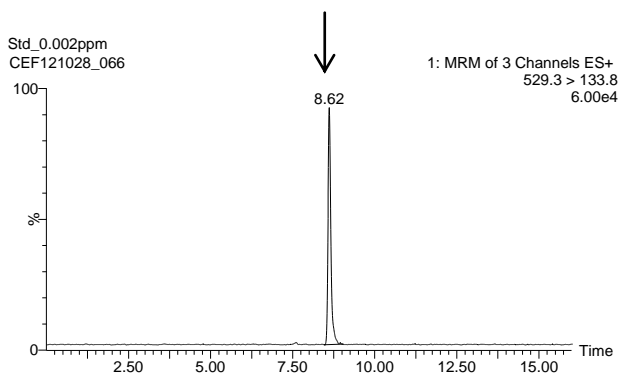


図 5-5 豚の腎臓の SRM クロマトグラム
セフキノム (m/z 529→134)
試料中：0.01 ppm 相当

3) ブランク試料の代表的なトータルイオンクロマトグラムを図6に示した。

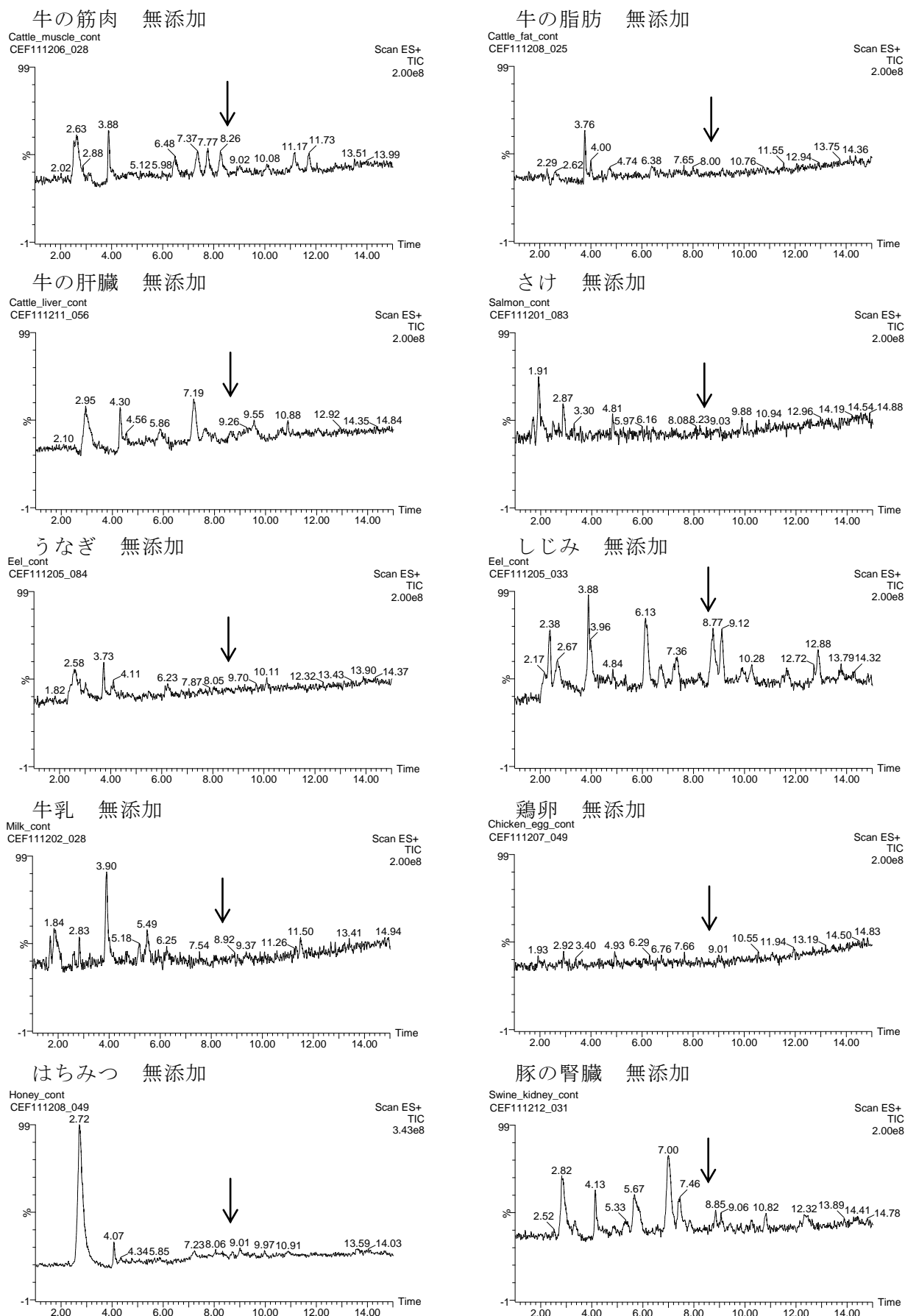


図6 ブランク試料のトータルイオンクロマトグラム (スキャン範囲: 50~1000 m/z)