

Application News

No. C136A

LC/MS
Liquid Chromatography Mass Spectrometry

LCMS-8060 を用いた残留農薬 646 成分 高速一斉分析

Expanding Capabilities in Multi-Residue Pesticide Analysis Using the LCMS-8060

世界の人口増加にともなう、食の安全に対する関心が高まっています。そのため、農業分野では、より安全に、より安定的により多くの食料を生産することが課題となっています。除草剤、殺虫剤、防カビ剤などの農薬を使用することで、病害虫や雑草の害から作物を守ることができるとともに、作物の収穫量は増加しています。しかしその反面、残留農薬による健康リスクが問題となっています。そのため、食品中の残留農薬を検査するための法的枠組みが必要です。

現在は、米国、ヨーロッパ、日本などの国や地域ごとに、食品中の農薬の最大残留基準値 (MRL) もしくは許容量 (米国の場合) が定められています。例えば EU の MRL の一律基準は 0.01 mg/kg と定められており、増加しつつある農薬検査において、農薬分析のための高感度な分析手法が求められています。

ここでは、農薬 766 成分 MRM 情報リスト (Shimadzu Pesticide MRM Library) をもとに作成した残留農薬 646 成分高速一斉分析メソッド (極性反転スピード: 5 msec, 1,919 MRM トランジション) を用いて LCMS-8060 で行った農薬分析の結果をご紹介します。

David R. Baker Laëtitia Fages Eric Capodanno
Neil Loftus N. Asano Y. Uno T. Tanigawa

はじめに

Introduction

現在、全世界で土壌や作物に使用されている農薬は 1,000 種類以上と言われています。食品の輸出入が盛んになり、規制される農薬の種類や設定される各食品中の基準値 (MRL) の数が増加しています。EU では、欧州議会・理事会規則 (EC) No.396/2005 において、370 食品に対して 500 成分以上の農薬の MRL が定められています。¹⁾ 米国では、環境保護庁 (EPA) が 450 成分以上の農薬とその他含有物質の許容量を設定しています。²⁾ 日本の食品中に残留する農薬等に関するポジティブリストには、さまざまな食品に対して 400 成分以上の農薬の MRL が掲載されています。³⁾

検査すべき食品数が増えかつ分析対象農薬の数が増大している中、食の安全に携わる検査・研究機関はより迅速に確かな情報を提供することが要求されています。

本報告では、スクリーニング分析と定量測定の両方に利用可能な残留農薬 646 成分高速一斉分析メソッドをご紹介します。本メソッドは、全 766 成分の MRM 情報を網羅した Shimadzu Pesticide MRM Library をもとに作成しました。1 成分あたり最大 3 つの MRM トランジションが含まれており、通常の 1 成分あたり 2 つの MRM から成るメソッドよりも、データの信頼性

が高まります。本メソッドは LCMS-8060 の高速極性反転能力 (5 msec) を利用したメソッドで、全 1,919 個の MRM をわずか 10.5 分で検出することができます。

メソッドの評価には QuEChERS 法で前処理したミント・トマト・リンゴのアセトニトリル抽出液に 646 成分の農薬を添加したものを用いました。ミントの抽出液はトマト・リンゴの抽出液よりもマトリックス成分が複雑です。本レポートでは、夾雑成分の多いデータを例として、ミント抽出液のデータを示しています。本メソッドの評価は、実試料の抽出液を用いて行いました。

実験

Experimental

ミント・トマト・リンゴの抽出液は Phytocontrol 社 (フランス) から提供していただきました。試料は、QuEChERS 法で前処理して、アセトニトリルで抽出しました。農薬の標準品は ACSD (フランス) から購入しました。溶媒は、LCMS 用のものを Sigma-Aldrich から購入しました。

内部標準法を用いて、0.002 - 0.1 mg/kg の濃度範囲で 6 点の検量線を作成しました。内部標準物質 2 成分 (Atrazine-d5, Diuron-d6) はオートサンプラーの前処理プログラムで添加しました。

LCMS-8060 のデータ安定性をミント・トマト・リンゴそれぞれの試料を用いて、濃度 0.05 mg/kg におけるピーク面積値再現性から評価しました。

LC/MS/MS メソッドの作成

本実験の LC/MS/MS メソッドである 646 成分一斉分析メソッドは、農薬 766 成分 MRM 情報リスト (Shimadzu Pesticide MRM Library) をもとに作成しました。Shimadzu Pesticide MRM Library は、農薬 766 成分の情報データベースです。リストには、各成分に対して複数の MRM 情報が含まれています。(アプリケーションニュース No. C135)

646 成分一斉分析メソッドには、1 農薬あたり最大 3 つの MRM、合計 1,919 個の MRM (ポジティブイオン: 1,819, ネガティブイオン: 100) が含まれています。また、極性反転スピードは、わずか 5 msec です。本メソッドを使用すれば、農薬 646 成分をわずか 10.5 分で検出することができます。

インターフェイス条件 (例: DL 温度, インターフェイス温度, ヒートブロック温度, ヒーティングガス流量, ドライガス流量, ネブライザガス流量) を最適化するために、インターフェイス設定支援ソフトウェアを使用しました。設定支援ソフトウェアを使うことで、一斉分析に最適なインターフェイス条件を決定することができます。

Table 1 分析条件
Experimental Conditions

LC条件		MS条件	
UHPLC	Nexera LC system	LC/MS/MS	LCMS-8060
分析カラム	Restek Raptor Biphenyl (2.1 mm I.D. x 100 mm L, 2.7 μm)	イオン化モード	加熱ESI
カラム温度	35 °C	極性切替時間	5 msec
流速	0.4 mL/min	ポーズタイム	1 msec
移動相A	2 mmol/L ammonium formate + 0.002 % formic acid - Water	MRMトランジション数	1,919 (1,819 positive; 100 negative)
移動相B	2 mmol/L ammonium formate + 0.002 % formic acid - Methanol	Dwellタイム	4 msec (定量イオン); 1 msec (確認イオン)
グラジエントプログラム (B. Conc)	3 % (0 min) - 10 % (1.00 min) - 55 % (3.00 min) - 100 % (10.50 - 12.00 min) - 3 % (12.01 - 15.00 min)	インターフェイス温度	350 °C
注入量	2 μL sample (plus 40 μL water)	ブロックヒータ温度	300 °C
		DL温度	150 °C
		ヒーティングガス流量	10 L/min
		ドライガス流量	10 L/min
		ネブライザガス流量	3 L/min

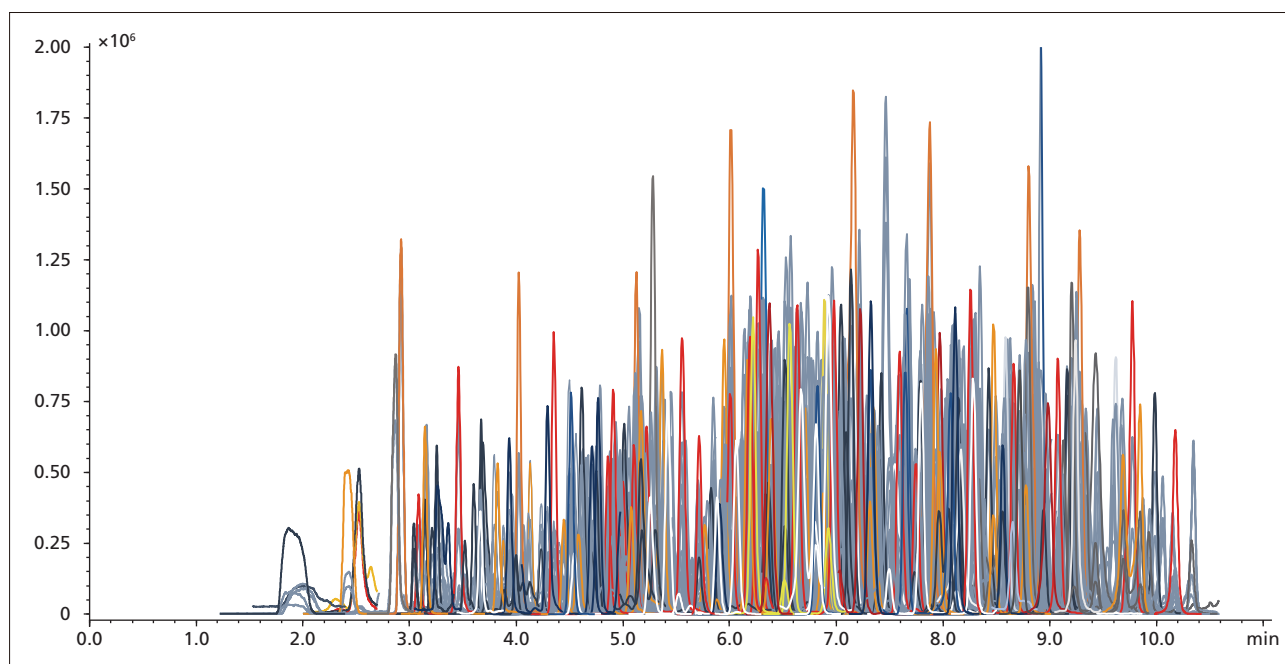


Fig. 1 ミント抽出液に添加した農薬 646 成分の MRM クロマトグラム (添加濃度 : 0.01 mg/kg)
MRM chromatograms of 646 pesticides spiked into a mint extract at 0.01 mg/kg

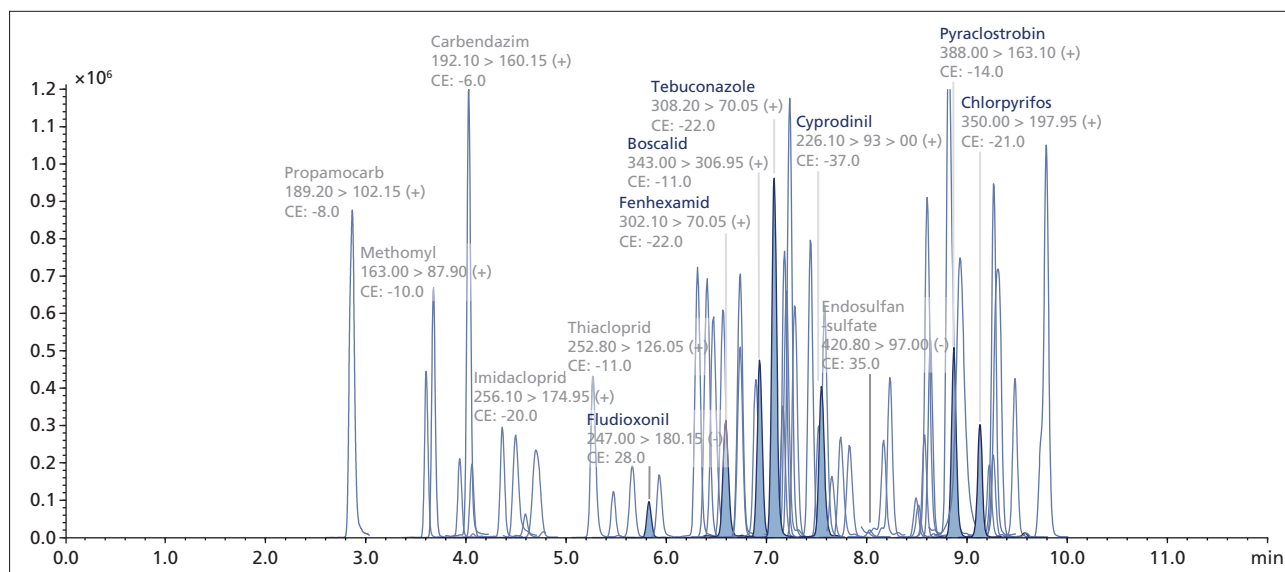


Fig. 2 EUにて検出頻度の高い農産物中の農薬 58 成分の MRM クロマトグラム (添加濃度 : 0.01 mg/kg; 2015 European Food Safety Journal 参照)
Boscalid, Chlorpyrifos, Cyprodinil, Fenhexamid, Fludioxonil, Pyraclostrobin, Tebuconazole は 4 % 以上と高頻度で検出される農薬。(青字)
Fludioxonil と endosulfan はネガティブイオンモードで検出。
MRM chromatograms for pesticides most commonly detected in plant products listed in the 2015 European Food Safety Journal.
Compounds such as boscalid, chlorpyrifos, cyprodinil, fenhexamid, fludioxonil, pyraclostrobin and tebuconazole (highlighted in the MRM chromatogram) are some of the most frequently detected compounds present in more than 4 % of the samples analyzed.
Fludioxonil and endosulfan were both detected in negative ion mode.

結果と考察

Results and Discussion

Shimadzu Pesticide MRM Library (アプリケーションニュース No.C135)

Shimadzu Pesticide MRM Library は、メソッド作成と成分管理を簡単に行うことができます。

リストには、ポジティブイオン、ネガティブイオン合わせて1成分あたり平均8MRM、計6,000個以上のMRMトランジションが含まれています。また、CAS番号、化学式、効果、モノアイソトピック質量、付加イオン質量、MRMトランジションのランク、一般名、InChI、InChIKey、化合物名(日・英・中)、様々なウェブサイトへのリンク情報(alanwood.net, PAN pesticide database, Chemical Book, ChemSpider)などの情報も含まれています。農薬データの共有にも有効です。

容易なメソッドのカスタマイズ

646成分一斉分析メソッドはLabSolutions LCMSにワンクリックでインポートできます。現在のメソッドに対象成分を追加したり、対象成分を絞った分析用に成分を削除したりと、メソッドをカスタマイズすることも可能です。

LCMS-8060は、世界最高速のスキャンスピード(30,000 u/sec)、世界最高レベルの高感度、世界最高速の極性切替スピード5 msecを誇るフラッグシップモデルです。本メソッドをLCMS-8060とともにご使用いただければ、今までの農薬分析にさまざまなメリットを付加することが可能です。

LCMS-8060の優れた性能

LCMS-8060の超高速スキャン(最高スキャンスピード30,000 u/sec)は、対象化合物パネルの拡張と高密度でのデータ取得に新たな可能性を提供します。

高密度データ取得でも正確な定量が可能であることを示す例として、保持時間6.45 - 6.60分に溶出される25成分の農薬を検出したMRMクロマトグラムをFig. 3に示しました。ピーク面積値変動は平均3%RSD以下(変動幅1.1 - 5.9%RSD)と安定しています。(Table 2)

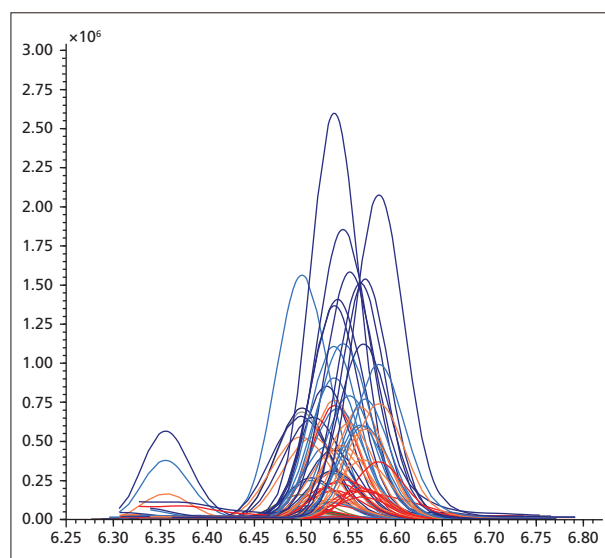


Fig.3 保持時間6.45 - 6.60分間に検出された農薬25成分(Table 2)のMRMクロマトグラム
MRM Chromatograms for 25 components (Table 2) detected with retention times of 6.45 - 6.60 minutes.

Table 2 9秒間(保持時間6.45 - 6.60分間)に検出された農薬25成分(ミント抽出液に0.01 mg/kg添加)とピーク面積値再現性(%RSD; n=6)
Peak area variation (%RSD; n=6) for 25 pesticides eluting over a 9 second time window (6.45 - 6.60 minutes) spiked into a mint matrix extract at the reporting limit of 0.01 mg/kg.

化合物名	CAS番号	分子式	分子量	極性	MRM 定量イオン	保持時間 (分)	平均 ピーク面積値	%RSD (n=6)
Trinexapac-ethyl	95266-40-3	C13H16O5	252.0998	+	252.90 > 69.05	6.45	1,780,015	3.1
Iprovalicarb	140923-17-7	C18H28N2O3	320.2100	+	321.20 > 119.15	6.46	1,442,486	2.8
Dodemorph	1593-77-7	C18H35NO	281.2719	+	282.30 > 116.15	6.47	658,920	4.2
Fluopyram	658066-35-4	C16H11ClF6N2O	396.0464	+	397.00 > 145.00	6.47	2,439,146	1.9
Flutolanil	66332-96-5	C17H16F3NO2	323.1133	+	324.10 > 242.00	6.48	3,372,285	2.7
Trifloxysulfuron	145099-21-4	C14H14F3N5O6S	437.0617	+	438.00 > 182.15	6.48	1,822,340	2.5
Azaconazole	60207-31-0	C12H11Cl2N3O2	299.0228	+	300.00 > 159.00	6.50	1,580,445	2.0
Terbutryn	886-50-0	C10H19N5S	241.1361	+	242.10 > 157.95	6.50	755,446	3.4
Prometryn	7287-19-6	C10H19N5S	241.1361	+	242.10 > 158.00	6.50	1,300,193	2.6
Azimsulfuron	120162-55-2	C13H16N10O5S	424.1026	+	425.10 > 182.10	6.50	2,498,050	1.8
Metominostrobin	133408-50-1	C16H16N2O3	284.1161	+	285.10 > 193.95	6.51	2,929,500	1.7
Thifluzamide	130000-40-7	C13H6Br2F6N2O2S	525.8421	+	528.60 > 148.05	6.51	193,982	5.9
Nicarbazin	330-95-0	C13H10N4O5	302.0651	-	301.10 > 137.15	6.52	973,101	2.6
Bromobutide	74712-19-9	C15H22BrNO	311.0885	+	312.10 > 194.10	6.53	1,829,781	2.1
Saflufenacil	372137-35-4	C17H17ClF4N4O5S	500.0544	+	501.00 > 198.00	6.53	465,224	2.3
Cyproconazole	94361-06-5	C15H18ClN3O	291.1138	+	292.10 > 70.05	6.54	1,174,967	1.7
Clomazone	81777-89-1	C12H14ClNO2	239.0713	+	239.90 > 125.00	6.54	3,409,656	1.7
Fensulfthion	115-90-2	C11H17O4PS2	308.0306	+	309.00 > 281.00	6.54	4,267,514	1.4
Oxasulfuron	144651-06-9	C17H18N4O6S	406.0947	+	407.10 > 150.15	6.54	2,911,533	1.1
Rimsulfuron	122931-48-0	C14H17N5O7S2	431.0569	+	432.00 > 182.00	6.55	4,722,065	1.8
Fenthion-oxon	6552-12-1	C10H15O4PS	262.0429	+	263.10 > 231.00	6.55	3,075,195	1.4
Nitrothal-isopropyl	10552-74-6	C14H16NO6Na	317.0875	+	295.10 > 230.95	6.56	2,199,581	3.0
Chlorantraniliprole	500008-45-7	C18H14BrCl2N5O2	480.9708	+	483.90 > 452.90	6.57	2,407,025	2.7
Fipronil-sulfone	120068-36-2	C12H4Cl2F6N4O2S	451.9336	-	451.00 > 414.90	6.57	2,843,708	2.0
Valifenalate	283159-90-0	C19H27ClN2O5	398.1608	+	399.20 > 155.00	6.59	3,845,335	1.9

646 成分高速一斉分析メソッドの評価

646 成分高速一斉分析メソッドについて、直線性、ピーク面積値再現性、長時間の安定性を評価しました。

直線性

直線性は、0.002 - 0.1 mg/kg (2 - 100 pg/μL) の範囲で 6 点検量線を作成して評価しました。ミント、トマトに添加したいずれの場合においても、直線性は全成分で非常に良好 (R^2 : 0.99 以上) な結果を示しました。検量線の重み付けは 1/C としました。代表例として、ミント抽出液に添加した農薬 6 成分のマトリックス検量線データを Fig. 4 に示します。

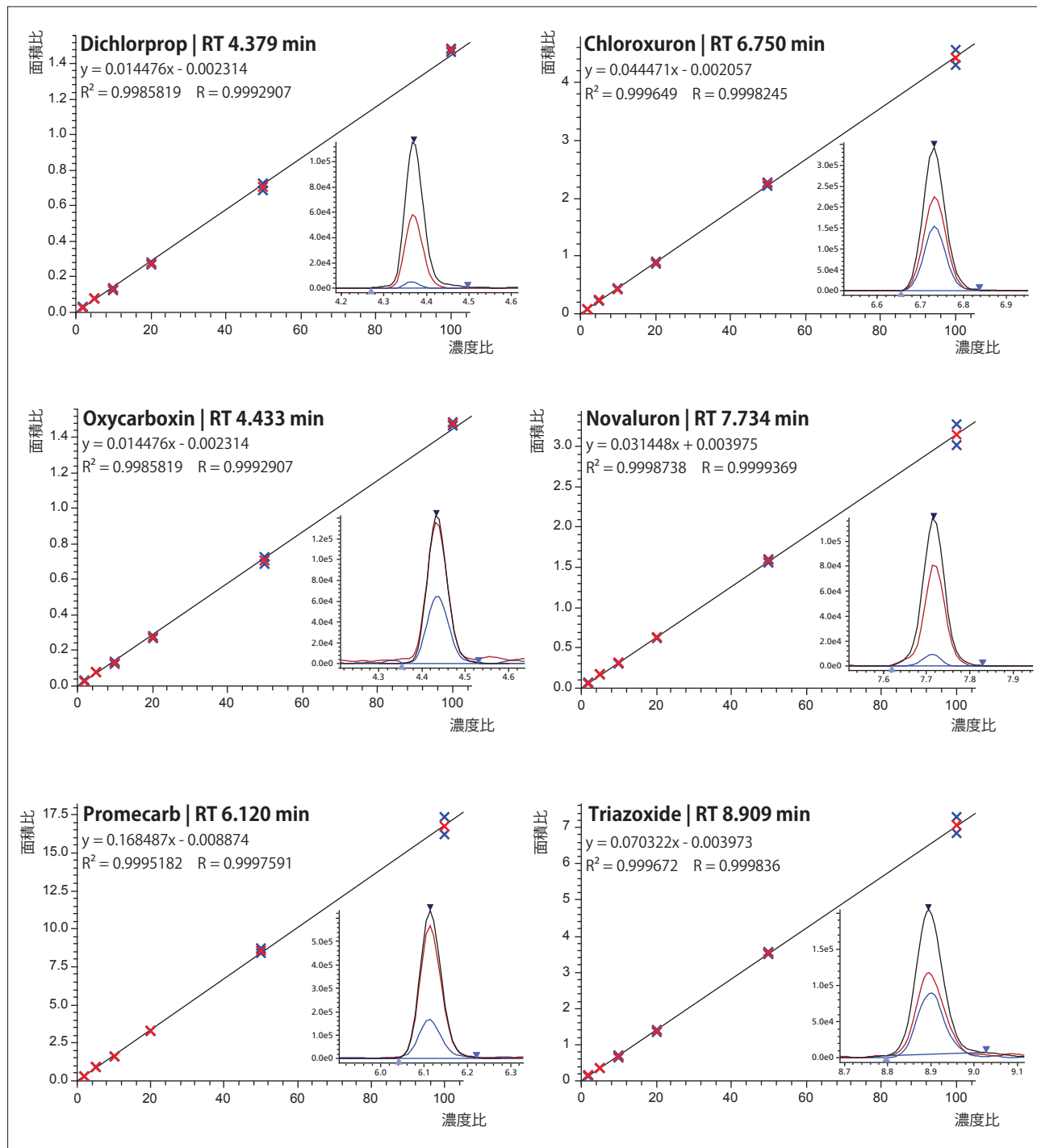


Fig. 4 ミント抽出液に添加した農薬の検量線 (添加濃度: 0.002 - 0.1 mg/kg) と MRM クロマトグラム (黒線: 定量イオン, 赤線・青線: 確認イオン)
Calibration curves for selected pesticides spiked into a mint matrix extract in the range 0.002 - 0.1 mg/kg.
The quantitation MRM chromatogram is shown in black (qualifier ion MRM chromatograms are shown in red and blue).

面積値再現性

ルーチン分析における定量データの安定性を評価するために、農薬 646 成分を添加したミント抽出液（添加濃度 0.05 mg/kg）を繰り返し注入し、24 時間以上の連続分析を行いました。

農薬 8 成分のピーク面積値の変動を Fig. 5 に示します。この農薬 8 成分は保持時間が等間隔に離れています(保持時間が 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 分に近い成分を選択 ; Table 3)。

ポジティブイオンで検出する農薬とネガティブイオンで検出する農薬が含まれているため、極性切替スピード 5 msec でポジティブイオンとネガティブイオンの同時測定を行いました。

100 回の連続分析のピーク面積値再現性 (%RSD) は、農薬 8 成分とも 5.7 % 未満となりました。

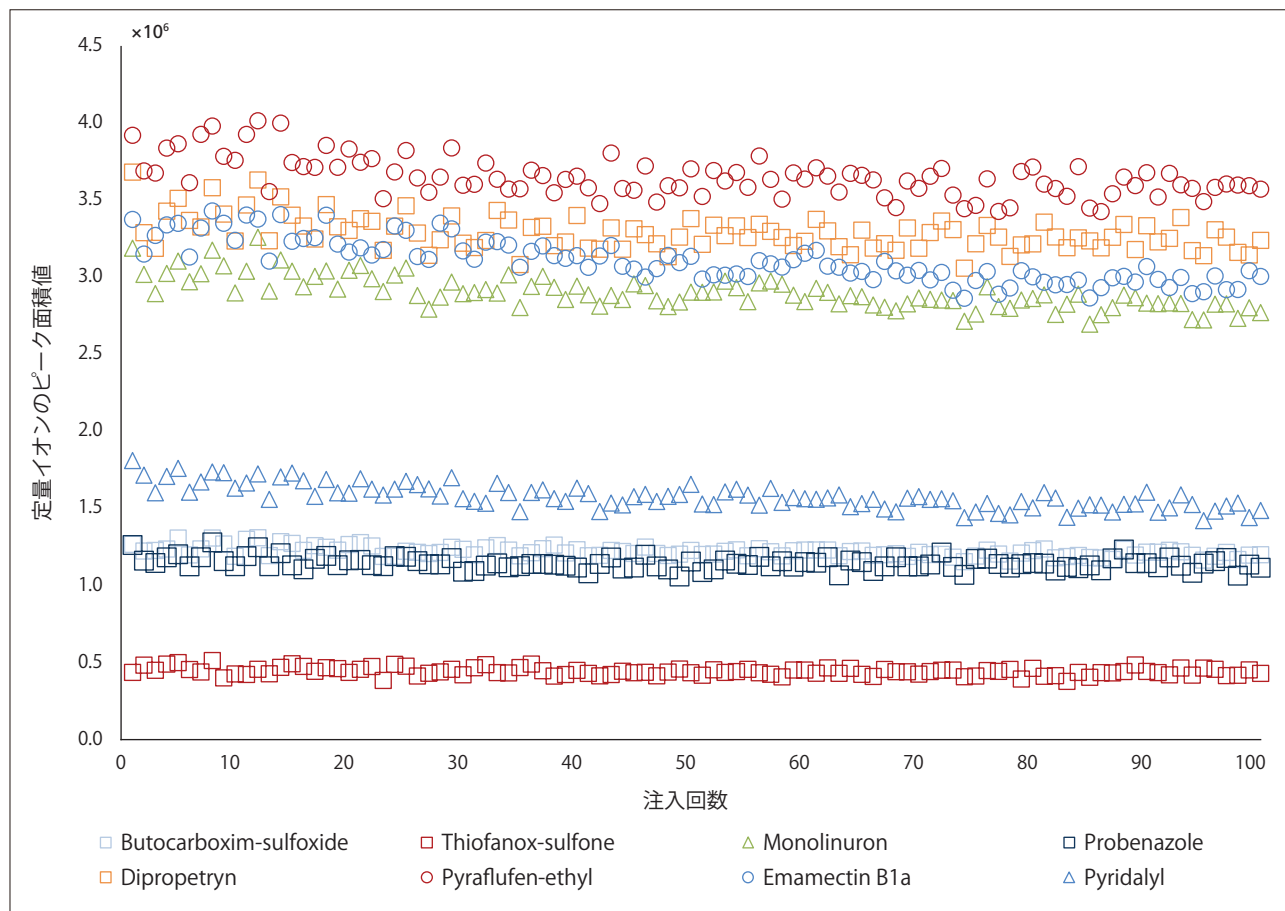


Fig. 5 ミント抽出液中農薬 8 成分のピーク面積値プロット (添加濃度 : 0.05 mg/kg, 100 回連続分析)
Peak area response for several pesticides following 100 repeat injections of a 0.05 mg/kg spiked into a mint matrix extract.

Table 3 農薬 8 成分のピーク面積値再現性 (農薬 0.05 mg/kg を添加したミント抽出液の 100 回注入連続 24 時間分析)
Peak area variance for selected pesticides following the repeated injection of a 0.05 mg/kg spiked into a mint matrix extract. (number of sample replicates was 100; the analysis sequence was 24 hours).

化合物名	CAS番号	分子式	分子量	極性	MRM 定量イオン	保持時間 (分)	平均 ピーク面積値	%RSD (n=100)
Butocarboxim-sulfoxide	34681-24-8	C7H14N2O3S	206.0725	+	207.10 > 75.10	3.042	1,220,391	2.6
Thiofanox-sulfone	39184-59-3	C9H18N2O4S	250.0987	+	268.10 > 57.00	4.001	442,724	5.7
Monolinuron	1746-81-2	C9H11ClN2O2	214.0509	+	215.10 > 99.10	4.985	2,904,116	3.7
Probenazole	27605-76-1	C10H9NO3S	223.0303	+	224.00 > 41.05	5.995	1,145,189	3.5
Dipropetryn	4147-51-7	C11H21N5S	255.1518	+	256.20 > 144.05	6.999	3,289,597	3.4
Pyraflufen-ethyl	129630-19-9	C15H13Cl2F3N2O4	412.0204	+	413.00 > 339.00	8.004	3,653,333	3.5
Emamectin B1a	138511-97-4	C56H81NO15	1007.5606	+	886.40 > 158.20	9.008	3,109,562	4.5
Pyridalyl	179101-81-6	C18H14Cl4F3NO3	488.9680	+	491.90 > 109.05	10.171	1,579,422	5.0

異なるマトリクス中での安定性

食品中の残留農薬定量のためのLC/MS/MS分析の大きな課題の1つは、共存する化合物やマトリクス成分によってイオン化が抑制されたり、あるいはイオン化が促進されたりするマトリクス効果が発生することです。マトリクス効果はピーク面積値に影響を与えます。食品が異なればマトリクス成分が異なるため、ピーク面積再現性(%RSD)の値も異なりますが、同一のマトリクス内であれば面積値の変動は最小限に抑えられるのが理想です。

実例として、農薬646成分を添加した3種の試料(リンゴ・ミント・トマト)を100回ずつ、合計300回連続分析を行いました。(添加濃度:0.05 mg/kg) 農薬3成分の連続分析結果をFig. 6に示します。各成分ともマトリクス効果を受けることなく、異なる試料中でも安定したピーク面積再現性%RSDを示しています。

また、ProbenazoleとDipropetrynの注入1回目と100回目のMRMクロマトグラムを比較しました。(Fig. 7) 異なる試料間ではマトリクス効果によるピーク面積値の変動が見られますが、同一試料内では1回目と100回目のピーク面積変動率は5.7%RSDと低く抑えられました。(Fig. 7)

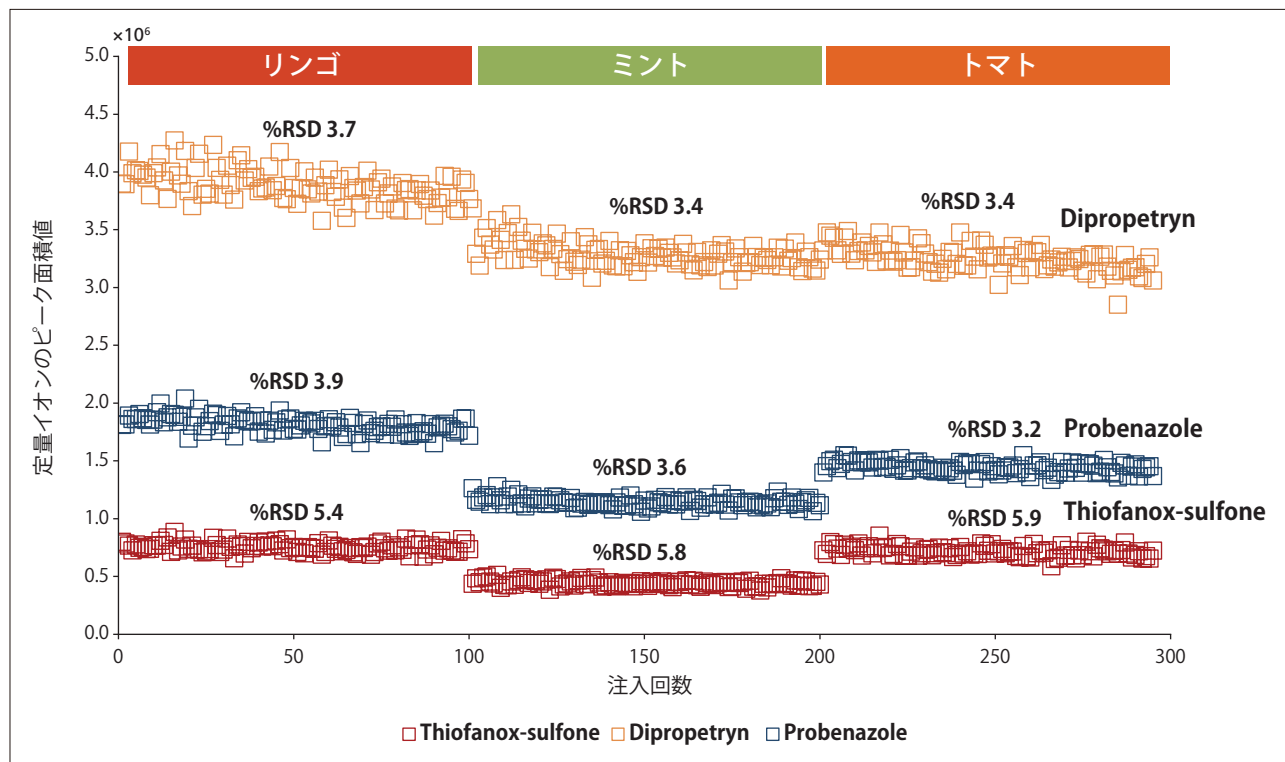


Fig. 6 リンゴ・ミント・トマトの抽出液中の農薬3成分のピーク面積値プロット (添加濃度:0.05 mg/kg, 分析時間:72時間以上)
Peak area response for 3 pesticides spiked into apple, mint and tomato matrix extracts at 0.05 mg/kg over 72 hours.

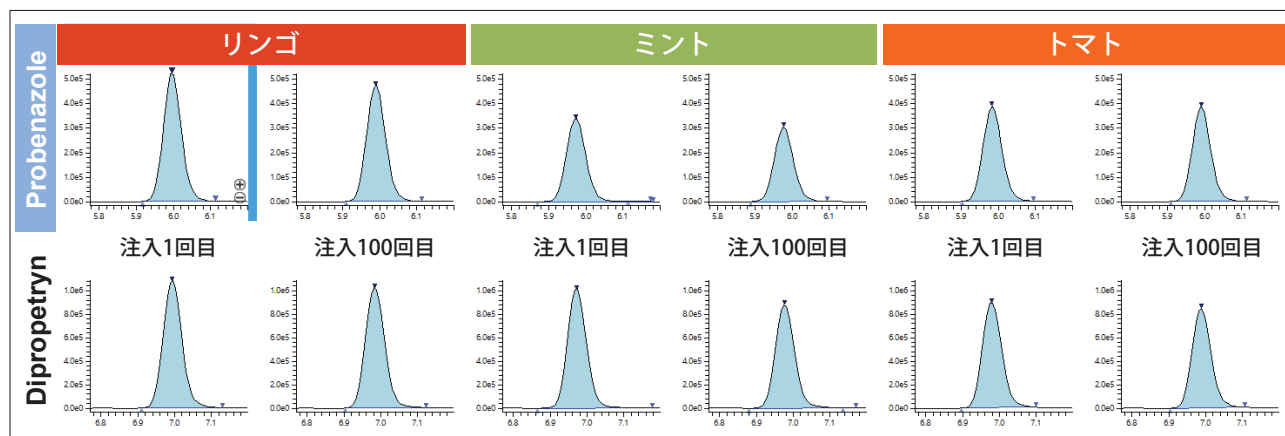


Fig. 7 リンゴ・ミント・トマト抽出液中のProbenazole (保持時間5.995分)とDipropetryn (保持時間6.999分)の注入1回目と100回目のMRMクロマトグラム
MRM chromatograms for probenazole (RT 5.995 minutes) and dipropetryn (RT 6.999 minutes) for injection 1 and injection 100 spiked into apple, mint and tomato matrix extracts.

マトリクス効果の抑制

様々な試料において、より多くの農薬を高感度かつ正確に分析するための測定法開発が行われています。試料中の成分によるマトリクス効果は、イオン化抑制やイオン化促進を引き起こします。特にイオン化抑制は、装置の検出能力、データの正確さや精度に悪影響を及ぼす可能性があります。

複雑なマトリクス試料中の化合物同士の干渉を抑制するために、現在は試料を希釈する方法が広く使われています。前処理のための希釈操作は一般化が容易であり、費用対効果の高い方法です。試料希釈は、結果として試料注入量の減少を意味し、装置の堅牢性向上につながります。別の言い方をすれば、データクオリティ向上とダウンタイム削減の両立が可能となります。

農薬を 0.005 mg/kg 添加したミント抽出液を、水で 1 : 5, 1 : 10, 1 : 20, 1 : 50, 1 : 100 に希釈した試料の MRM クロマトグラムを Fig. 8 に示します。

Table 4 に各希釈系列の回収率を示します。

試料を 10 倍 (1 : 10) 希釈すると、ほとんどの成分でマトリクス効果が抑制され、回収率が 70 - 120 % となりました。%RSD は 20 % 以下、平均値からの変動係数はほぼ 10 % 未満と良好な結果を得ることができました。試料を 20 倍もしくは 50 倍に希釈すると、マトリクス効果は許容可能な程度まで抑制できました。

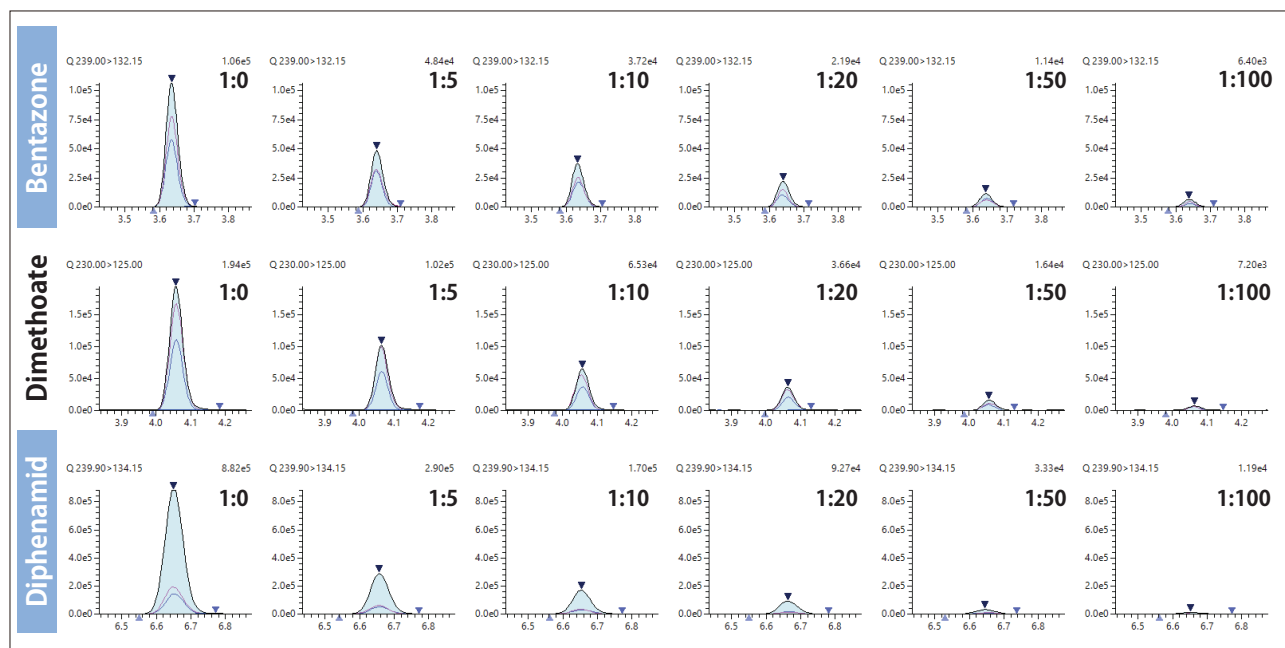


Fig. 8 ミント抽出液に添加した農薬 3 成分の MRM クロマトグラム (添加濃度 : 0.005 mg/kg) 試料は水で 1 : 5, 1 : 10, 1 : 20, 1 : 50, 1 : 100 に希釈。MRM chromatograms for 3 selected compounds spiked into a mint extract at 0.005 mg/kg and diluted 1:5, 1:10, 1:20, 1:50 and 1:100 with water.

Table 4 ミント抽出液を水で希釈した際の希釈系列と回収率 (添加濃度 : 0.005 mg/kg)
Diluting a sample matrix extract spiked with 0.005 mg/kg with water reduced matrix ion suppression.

化合物名	CAS番号	分子式	分子量	希釈系列					
				0	1:5	1:10	1:20	1:50	1:100
Bentazone	25057-89-0	C10H12N2O3S	240.0569	32.1	44.6	65.5	72.7	91.7	98.1
Demeton-S-methyl-sulfone	17040-19-6	C6H15O5PS2	262.0099	51.1	78.5	89.6	91.1	114.2	116.8
Dimethoate	60-51-5	C5H12NO3PS2	228.9996	36.2	65.3	88.5	92.2	92.4	94.2
Isocarbamid	30979-48-7	C8H15N3O2	185.1164	28.8	57.1	81.8	98.7	102.5	96.4
Vamidotion	2275-23-2	C8H18NO4PS2	287.0415	53.6	76.3	98.2	98.5	101.5	114.1
Thiazafurion	25366-23-8	C6H7F3N4OS	240.0293	32.8	62.9	80.5	84.2	87.1	97.4
Demeton-S-methyl	919-86-8	C6H15O3PS2	230.0200	57.8	82.1	93.1	87.6	108.5	102.4
Sebuthylazine	7286-69-3	C9H16ClN5	229.1094	28.7	53.3	69.8	79.8	88.5	95.8
Flutriafol	76674-21-0	C16H13F2N3O	301.1027	27.3	46.1	71.4	76.1	81.8	87.3
Furametpyr	123572-88-3	C17H20ClN3O2	333.1244	48.3	69.8	86.9	86.2	97.6	101.9
Fenobucarb	3766-81-2	C12H17NO2	207.1259	60.9	79.2	100.7	96.1	102.8	103.9
Benodanil	15310-01-7	C13H10INO	322.9807	50.9	69.8	86.3	96.5	102.4	94.8
Terbuthylazine	5915-41-3	C9H16ClN5	229.1094	50.4	66.6	83.2	87.2	89.8	91.0
Dimethachlor	50563-36-5	C13H18ClNO2	255.1026	75.1	86.1	106.0	107.1	106.2	108.0
Dimethenamid	87674-68-8	C12H18ClNO2S	275.0747	72.6	84.9	102.9	100.0	103.6	97.3
Furalaxyl	57646-30-7	C17H19NO4	301.1314	82.2	89.1	106.6	108.6	106.2	102.4
Bixafen	581809-46-3	C18H12Cl2F3N3O	413.0310	66.8	79.3	99.0	95.6	103.7	97.1
Triflururon	64628-44-0	C15H10ClF3N2O3	358.0332	54.2	71.8	95.5	84.9	95.3	101.7
Epoxiconazole	133855-98-8	C17H13ClFN3O	329.0731	61.6	77.2	98.8	95.3	90.0	101.2
Teflubenzuron	83121-18-0	C14H6Cl2F4N2O2	379.9742	41.8	50.9	80.1	86.8	100.0	97.7

■ 結論

Conclusion

本アプリケーションニュースで紹介した残留農薬 646 成分一斉定量分析メソッド（1 成分あたり最大 3 MRM, 計 1,919 MRM）は LCMS-8060 と利用することで、わずか 10.5 分で全成分検出することができ、高速かつ高感度な分析を可能とするメソッドです。また、LCMS-8060 の世界最高速の極性反転スピード 5 msec を活かし、一度の測定でネガティブイオン 34 成分とポジティブイオン 612 成分を検出することが可能です。

LCMS-8060 の高感度性能によって、試料を希釈してマトリクス効果を抑制することが可能となりました。ほとんどの化合物は、20 倍もしくは 50 倍することで 70 - 120 % の回収率を得ることができました。



■ 参考文献

References

1. Commission Regulation (EC). 2005. No 396/2005 of the European Parliament and of the Council, maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin. Official Journal of the European Union, L 70: 1 - 16
2. US Environmental Protection Agency, Electronic code of federal regulation: Title 40: Part 180 - tolerances and exemptions for pesticide chemical residues in food.
http://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx?c=ecfr&tpl=/ecfrbrowse/Title40/40cfr180_main_02.tpl
3. Japanese Ministry of Health, Labour and Welfare, Department of Food Safety. 2006. Director Notice about Analytical Methods for Residual Compositional Substances of Agricultural Chemicals, Feed Additives, and Veterinary Drugs in Food (Syoku-An No. 0124001 January 24, 2005; amendments May 26, 2006).