

※ 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
(ラフオキサニド)の試験法開発事業報告書

ラフォキサニド試験法（畜水産物）の検討結果

[緒言]

1. 目的及び試験法の検討方針

ラフォキサニドはハロゲン化サリチルアニリドで種々の線虫類、吸虫類に有効な駆虫薬であり、吸虫類に投与したとき[NAD⁺]/[NADH]比及び[オキサロ酢酸]/[リンゴ酸塩]比を上昇させる。酸化リン酸化の脱共役により、ATP濃度の減少、グリコーゲン量の減少及びコハク酸エステルの蓄積を引き起こす。我が国においてはラフォキサニドを主剤とする動物用医薬品は承認されていない。

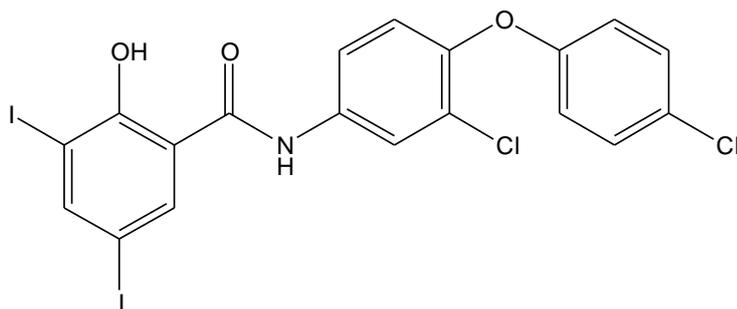
「薬事・食品衛生審議会 食品衛生分科会農薬・動物用医薬品部会報告書」に記載されている規制対象物質及び残留基準値案を踏まえ、試験法の開発を行った。一斉分析法や既存の他の個別試験法の適用確認は実施せず、新規に個別試験法を検討した。

1) 規制対象物質

ラフォキサニド

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：C₁₉H₁₁Cl₂I₂NO₃

分子量：626.0

化学名：N-[3-Chloro-4-(4-chlorophenoxy)phenyl]-2-hydroxy-3,5-diiodobenzamide

外 観：灰色～黄色の粉末（常温）

溶解性：メタノールにわずかに溶け、水には溶けない

（出典：薬事・食品衛生審議会 食品衛生分科会農薬・動物用医薬品部会報告書）

2) 基準値

牛の筋肉	0.03 ppm ^{*1} → 一律基準 ^{*2}
その他の陸棲哺乳類に属する動物の筋肉	0.1 ppm ^{*1} → 一律基準 ^{*2}
牛の脂肪	0.03 ppm ^{*1} → 一律基準 ^{*2}
その他の陸棲哺乳類に属する動物の脂肪	0.3 ppm ^{*1} → 一律基準 ^{*2}
牛の肝臓	0.01 ppm ^{*1} → 一律基準 ^{*2}
その他の陸棲哺乳類に属する動物の肝臓	0.2 ppm ^{*1} → 一律基準 ^{*2}
牛の腎臓	0.04 ppm ^{*1} → 一律基準 ^{*2}
その他の陸棲哺乳類に属する動物の腎臓	0.2 ppm ^{*1} → 一律基準 ^{*2}
牛の食用部分	0.01 ppm ^{*1} → 一律基準 ^{*2}
その他の陸棲哺乳類に属する動物の食用部分	0.2 ppm ^{*1} → 一律基準 ^{*2}

*1 平成17年厚生労働省告示第499号（平成17年11月29日）

*2 施行通知 食安発1109第1号（平成22年11月9日）で基準値は削除された。

[実験方法]

1. 試料

1) 購入先

うなぎは愛知県の業者から、しじみは熊本県の業者から、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よく混合して均一化した。

⑨はちみつは百花蜜を使用し、よく混合して均一化した。

⑩牛の腎臓は細切均一化した。

2. 試薬・試液

1) 標準品

ラフォキサニド標準品（純度97.9%、和光純薬工業製）

2) 試薬

アセトン、アセトニトリル、*n*-ヘキサン（以上、残留農薬試験用）

アセトン（特級）

ケイソウ土（セライト545）

ギ酸（分析用、純度98%以上）

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム（Bond Elut C18、充てん量1,000 mg、アジレントテクノロジー製）

3) 標準溶液の調製方法

標準原液：ラフォキサニド標準品25 mgを精秤し、アセトンで溶解して500 mg/L溶液を調製した。

検量線用標準溶液：標準原液をアセトンで希釈し、40 mg/L溶液を調製した後、アセトニトリルで適宜希釈し、0.000125～0.00125 mg/Lの濃度の溶液を調製した。

添加用標準溶液：標準原液をアセトンで希釈して0.1 mg/L溶液を調製した。

3. 装置

	型式	会社
MS 装置	Quattro Premier XE	Waters
LC 装置	alliance2695	Waters

4. 測定条件

LC 条件	
カラム	L-Column2 ODS サイズ：内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 5 μm 会社：化学物質評価研究機構
移動相流速 (mL/min)	0.2
注入量 (μL)	4
カラム温度 (°C)	40
移動相	アセトニトリル及び0.1vol%ギ酸 (17 : 3) 混液
MS 条件	
測定モード	MS/MS、SRM (選択反応モニタリング検出)
イオン化モード	ESI (-)
キャピラリ電圧 (V)	2000
ソース温度 (°C)	120
脱溶媒温度 (°C)	400
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
定量イオン (m/z)	-624→127[コーン電圧：60(V)、コリジョンエネルギー：45(eV)]
定性イオン (m/z)	-624→345[コーン電圧：60(V)、コリジョンエネルギー：35(eV)]
保持時間の目安	10 分

5. 定量

ラフオキサニド標準品25 mgを精秤し、アセトンに溶解して500 mg/Lの標準原液を調製した。この溶液をアセトンで希釈して40 mg/L溶液を調製した後、アセトニトリルで希釈し、0.000125、0.00025、0.0005、0.00075、0.001、0.00125 mg/Lの濃度の標準溶液を調製した。標準溶液4 μLをLC-MS/MSに注入し、得られたピーク面積から最小二乗法で検量線を作成した。試験溶液4 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ラフオキサニドの含量を算出した。

1) 検量線の直線性 (図3)

4. の測定条件において、濃度0.000125 mg/L (0.0005 ng) ~0.00125 mg/L (0.005 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4)

定量限界相当の検出量：0.001 ng (0.00025 mg/L×4 μL) のピークのS/N比は10以上であった。

6. 試験溶液の調製

1) 試験法の分析操作

ラフオキサニドを試料からアセトンで抽出した。アセトニトリル/ヘキサン分配で脱脂（脂肪の場合のみ）、オクタデシルシリル化シリカゲル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10.0 gを200 mL遠心管に量り採り、アセトン100 mL（はちみつの場合は水20 mLで溶解後アセトン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（はちみつの場合は水10 mLで溶解後アセトン50 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、アセトンを加えて正確に200 mLとした。この2 mLを100 mL遠心管に採った。

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、上記と同様にろ過した。得られたろ液を合わせ、アセトンを加えて正確に200 mLとした。この4 mLを100 mL遠心管に採り、40°C以下で濃縮し、アセトンを除去した。この残留物に*n*-ヘキサン30 mLを加え100 mL分液漏斗に移した。*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル30 mLずつで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2 mLを加えて溶かした。

② 精製

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム (1,000 mg) にアセトニトリル及び水各5 mLを順次注入し、流出液は捨てた。このカラムに①で得られた液に水2 mLを加えたものを注入した後、アセトニトリル及び水 (7 : 3) 混液10 mLで容器を洗い、洗液をカラムに注入し、流出液は捨てた。次いでアセトニトリル10 mLを注入し、溶出液を50 mL遠心管に採り、40°C以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物をアセトニトリルに溶解し、正確に4 mLとしたものを試験溶液とした。

a 筋肉、肝臓、腎臓、乳、卵、魚介類及びはちみつの場合

秤 取

↓ 試料10.0 g

アセトン抽出

- | アセトン100 mL (はちみつ : 水20 mLで溶解後アセトン100 mL) を加え、ホモジナイズ
- | 吸引ろ過、ろ紙上の残留物を採る
- | 残留物にアセトン50 mL (はちみつ : 水10 mLで溶解後アセトン50 mL) を加え、ホモジナイズ
- | 吸引ろ過、ろ液を合わせ、アセトンで正確に200 mLとする
- ↓ 抽出液2 mL分取

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム

- | アセトニトリル及び水各5 mLで予備洗浄
- | 水2 mLを加えて負荷
- | アセトニトリル及び水 (7 : 3) 混液10 mLで洗浄
- | アセトニトリル10 mLで溶出
- | 溶出液を減圧濃縮し窒素乾固する (40°C以下)
- ↓ アセトニトリルで正確に4 mLとし、試験溶液とする

LC-MS/MS定量

4 µL注入

b 脂肪の場合

秤 取

↓ 試料5.00 g

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、ろ紙上の残留物を採る
- | 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、アセトンで正確に200 mLとする
- ↓ 抽出液4 mL分取、減圧濃縮、アセトンを除去

アセトニトリル/ヘキサン分配

- | 残留物を*n*-ヘキサン30 mLで分液漏斗に移す
- | *n*-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
- | さらに繰り返し、アセトニトリル層を合わせ減圧濃縮、窒素乾固
- ↓ アセトン2 mLに溶解

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム

- | アセトニトリル及び水各5 mLで予備洗浄
- | 水2 mLを加えて負荷
- | アセトニトリル及び水（7：3）混液10 mLで洗浄
- | アセトニトリル10 mLで溶出
- | 溶出液を減圧濃縮し窒素乾固する（40℃以下）
- ↓ アセトニトリルで正確に4 mLとし、試験溶液とする

LC-MS/MS定量

4 μL注入

2) 定量限界

0.01 mg/kg [(4 mL/0.1 g^{*1}) × (0.001 ng/4 μL)]

*¹ 5.00 g × 4 mL/200 mL (脂肪の場合)

10.0 g × 2 mL/200 mL (脂肪以外の場合)

7. マトリックス添加標準溶液の調製（添加回収試験における回収率 100%相当濃度）

ブランク試料の試験溶液から1 mL採り溶媒を除去した後、0.00025 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

分離カラムについて、L-Column2 ODS（内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 5 μm）を、移動相について、ギ酸及びアセトニトリルの混液を用いて検討を行った。0.01vol%ギ酸溶液及びアセトニトリルを用いたところラフォキサニドの保持が強かったため、移動相には0.1vol%ギ酸溶液及びアセトニトリルを用いることとした。

2) MS/MS条件

MS/MS条件について検討した。ラフォキサニドは負イオンモードで測定が可能であった。モニターイオンは4. の測定条件に示した。スペクトルを図1及び図2に示した。ラフォキサニドの標準溶液（0.00025 mg/L）におけるS/N比をTable1に示した。

Table1 ラフォキサニドのS/N比（0.00025 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	Area (counts)
624	127	ESI (-)	135	2210
624	345	ESI (-)	90	1180

2. 試験溶液調製法の検討

1) 抽出方法の検討

ラフォキサニドの溶解性や脂肪等との混和性を考慮し、アセトンを抽出溶媒として選択した。高速ホモジナイザーを用いて1分間細砕し、ケイソウ土を1 cmの厚さに敷いたろ紙を用いて吸引ろ過した。

2) 精製方法の検討

① 減圧濃縮時の損失

ラフォキサニドの減圧濃縮時の損失について調査した。ラフォキサニド1 µgを各溶媒50 mLに溶解した後、40 °C以下で各溶媒に適した減圧度で減圧濃縮した。乾固後、5分間減圧を継続した後、窒素ガスを穏やかに送って乾固した。減圧濃縮時の損失は認められなかった。結果をTable2に示した。

溶媒	残存率 (%)
アセトニトリル	105
アセトン	99

② アセトニトリル/ヘキサン分配

ラフォキサニド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Table3に示した。アセトニトリル/ヘキサン分配で2回の抽出で十分な回収率が得られた。

	<i>n</i> -ヘキサン飽和アセトニトリル			合計
	30 mL (1回目)	30 mL (2回目)	30 mL (3回目)	
ラフォキサニド	101	tr	0	101

③ オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムによる精製

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムについて3種類のカラムの溶出状況を調べた。アセトニトリル及び水各5 mLで予備洗浄した後、アセトニトリル及び水 (1 : 1) 混液4 mLで負荷した。溶出状況をTable4に示した。

最も溶出バンドが狭かったBond Elut C18を用いて、再度溶出状況を調べた。アセトニトリル及び水各5 mLで予備洗浄した後、アセトン及び水 (1 : 1) 混液10 mLで負荷した。溶出状況をTable5に示した。アセトニトリル10 mLで大部分が溶出された。

カラム	アセトニトリル-水					アセトニトリル 10 mL	合計
	(1 : 1) 10 mL	(6 : 4) 10 mL	(7 : 3) 10 mL	(8 : 2) 10 mL	(9 : 1) 10 mL		
InertSep C18	0	3	79	8	3	—	93
InertSep Slim-J C18-B	61	21	5	2	1	—	90
Bond Elut C18	0	0	0	13	80	tr	93

InertSep C18 (充てん量 1,000 mg、ジーエルサイエンス製)

InertSep Slim-J C18-B (充てん量 500 mg、ジーエルサイエンス製)

Bond Elut C18 (充てん量 1,000 mg、アジレントテクノロジー製)

添加量：1 µg、－：測定せず

Table5 オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムからの溶出状況 (%)

	アセトン-水	アセトニトリル-水	アセトニトリル		合計
	(1:1)	(7:3)	0-10 mL	10-20 mL	
	4 mL (負荷)	10 mL			
ラフォキサニド	0	0	98	tr	98

Bond Elut C18 (充てん量 1,000 mg、アジレントテクノロジー製)

添加量：1 µg

脱脂操作の検討では、アセトニトリル/ヘキサン分配で良好な回収率が得られたことより、脱脂の必要な脂肪については、アセトニトリル/ヘキサン分配を行うこととした。

カラムによる精製の検討では、3種類のオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムについて検討し、最も溶出バンドが狭かったBond Elut C18を用いることとした。オクタデシルシリル化シリカゲル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。

なお、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム精製において、試料溶液を濃縮した後にアセトニトリル及び水 (7:3) 混液で負荷する方法を検討したが、残留物を負荷溶媒に溶解する工程で夾雑物が妨害となりラフォキサニドが十分溶解しなかったために、若干の回収率の低下やばらつきの要因となった。濃縮操作を行わず、アセトン抽出液、又はアセトン溶解液に水2 mLを加えて懸濁液をカラムに負荷することにより、回収率が安定したため、この方法を採用した。

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品目に牛の腎臓を加えた10品目を試料とした。

ラフォキサニドを0.01 ppm相当添加し、[実験方法]6の分析法に従って添加回収試験を行った。

1) 選択性の評価

表1 選択性の評価

担当機関:(財)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)			
	ラフォキサニド	牛の筋肉	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		牛の脂肪	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		牛の肝臓	0.01	0.01	0.01	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	0.01	0.01	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!	○	
		牛の腎臓	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	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。

10品目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)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値	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5			Max.	Min.	平均値	
ラフォキサニド		牛の筋肉	0.01	0.01	0.01		2134030	-995909	0.998118	91	91	89	89	90	90	1	209	188	199	
		牛の脂肪	0.01	0.01	0.01		2134030	-995909	0.998118	86	86	87	86	82	85	2	157	171	164	
		牛の肝臓	0.01	0.01	0.01		2279290	-291169	0.99966	92	96	91	89	91	92	3	171	134	153	
		さけ	0.01	0.01	0.01		2183850	58.166	0.999275	96	95	98	96	99	97	2	209	163	186	
		うなぎ	0.01	0.01	0.01		2279290	-291169	0.99966	97	97	99	107	96	99	5	209	125	167	
		しじみ	0.01	0.01	0.01		2278440	39.5267	0.997573	85	91	85	89	88	88	3	188	134	161	
		牛乳	0.01	0.01	0.01		2238070	-67.7043	0.998452	102	101	97	98	98	99	2	171	125	148	
		鶏卵	0.01	0.01	0.01		2268750	-63.1482	0.998026	104	98	104	101	101	102	2	188	179	184	
		はちみつ	0.01	0.01	0.01		2268750	-63.1482	0.998026	97	100	95	97	98	97	2	150	188	169	
		牛の腎臓	0.01	0.01	0.01		2134030	-995909	0.998118	91	93	88	88	88	90	3	252	209	231	

*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、別添、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85~102%、併行精度は1~5%で良好な結果が得られた。又、定量限界濃度の添加回収試験を行った。全試料におけるS/N比の平均値は148~231であった。

3) 試料マトリックスの影響

表4 試料マトリックスの測定への影響

担当機関: (財)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)	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					
ラフォキサニド		牛の筋肉	0.01	0.01	0.01	0.00025	面積	0	2277	2228	2253	2196	2138	2167	1.04		
		牛の脂肪	0.01	0.01	0.01	0.00025	面積	0	2180	2295	2238	2147	2194	2171	1.03		
		牛の肝臓	0.01	0.01	0.01	0.00025	面積	0	2394	2318	2356	2319	2204	2262	1.04		
		さけ	0.01	0.01	0.01	0.00025	面積	0	2373	2326	2350	2356	2277	2317	1.01		
		うなぎ	0.01	0.01	0.01	0.00025	面積	0	2411	2372	2392	2307	2261	2284	1.05		
		しじみ	0.01	0.01	0.01	0.00025	面積	0	2444	2410	2427	2259	2333	2296	1.06		
		牛乳	0.01	0.01	0.01	0.00025	面積	0	2251	2274	2263	2174	2235	2205	1.03		
		鶏卵	0.01	0.01	0.01	0.00025	面積	0	2289	2318	2304	2203	2277	2240	1.03		
		はちみつ	0.01	0.01	0.01	0.00025	面積	0	2219	2284	2252	2349	2310	2330	0.97		
		牛の腎臓	0.01	0.01	0.01	0.00025	面積	0	2361	2224	2293	2200	2258	2229	1.03		

*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0.97~1.06であった。

[結論]

ラフォキサニドを試料からアセトンで抽出し、アセトニトリル/ヘキサン分配で脱脂(脂肪の場合のみ)、オクタデシルシリル化シリカゲル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。

この試験法を牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、さけ、うなぎ、しじみ、牛乳、鶏卵、はちみつ及び牛の腎臓に適用した場合、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85~102%、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]

なし

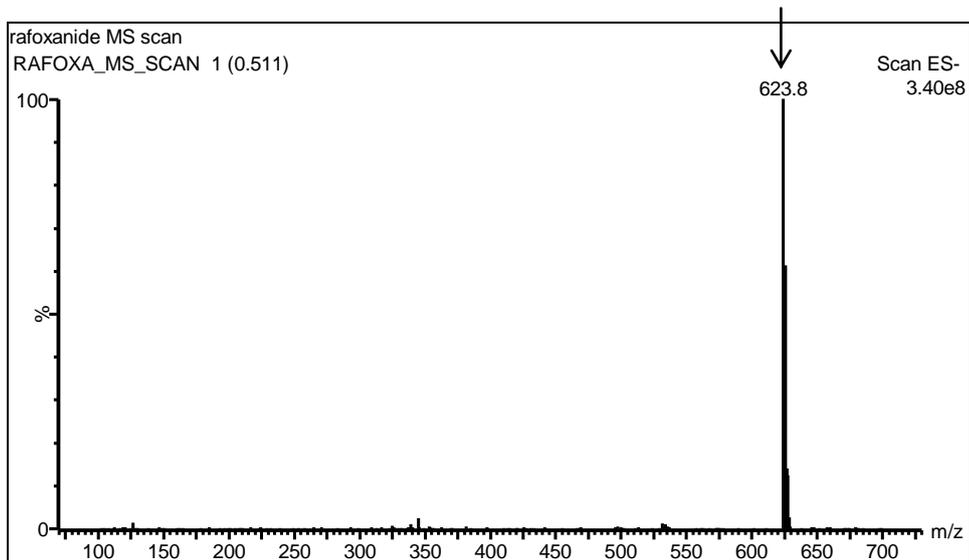


図1 ラフォキサニドのマススペクトル

スキャン範囲：100～700 m/z

測定条件：ESI-、CV=60 (CV：cone voltage)

移動相：アセトニトリル及び0.1vol%ギ酸 (17：3) 混液

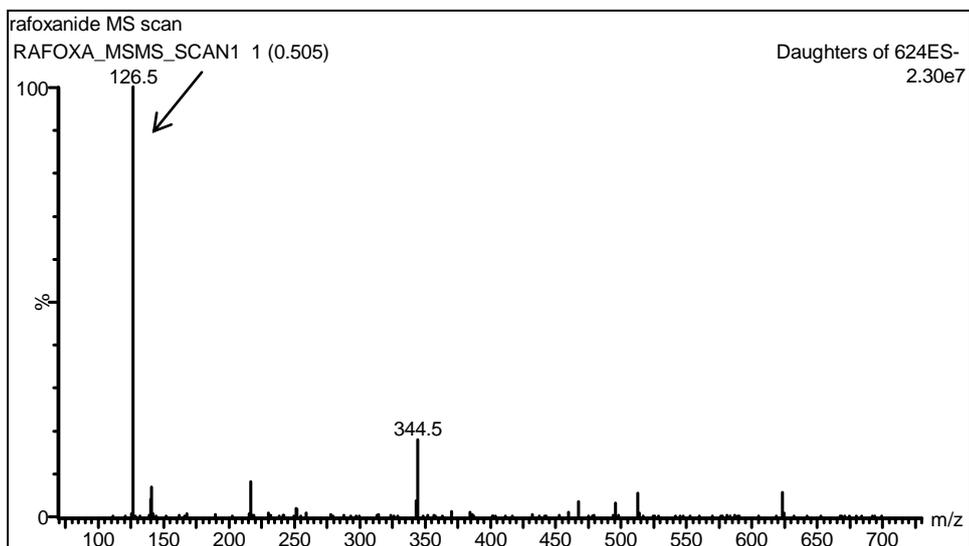


図2 ラフォキサニドのプリカーサーイオン m/z 624 のプロダクトイオンスペクトル

スキャン範囲：100～700 m/z

測定条件：ESI-、CV=60、CE=45 (CV：cone voltage、CE：collision energy)

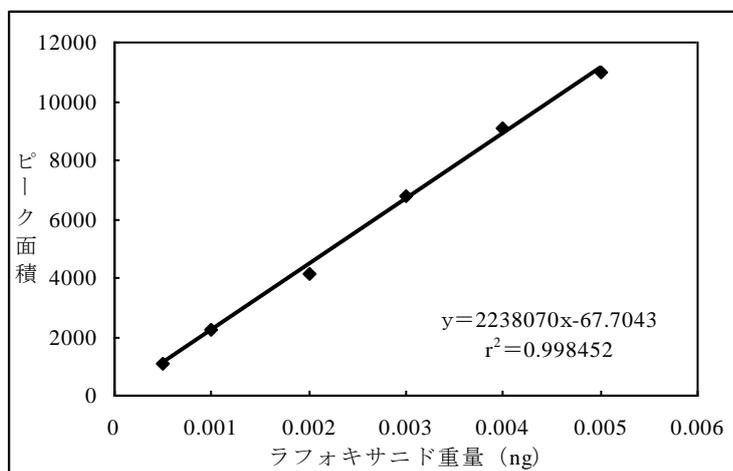


図3 ラフォキサニド検量線 (一例)

データ処理装置設定条件の一例

機種 (メーカー)：MassLynx (Waters製)

ピークの定量方法：ピーク面積法

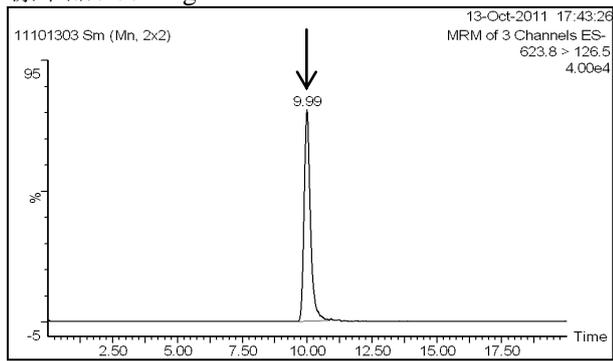
検量線の種類：最小二乗法

検量線基準ピークの重量：0.0005 ng～0.005 ng

検量線傾き (a)：a=2238070

検量線切片 (b)：b=-67.7043

標準品0.004 ng



標準品0.001 ng (定量限界相当)

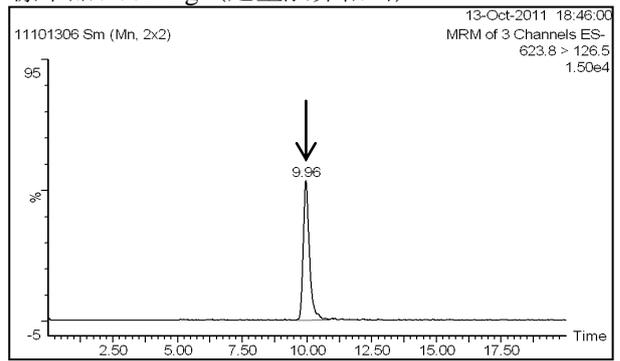
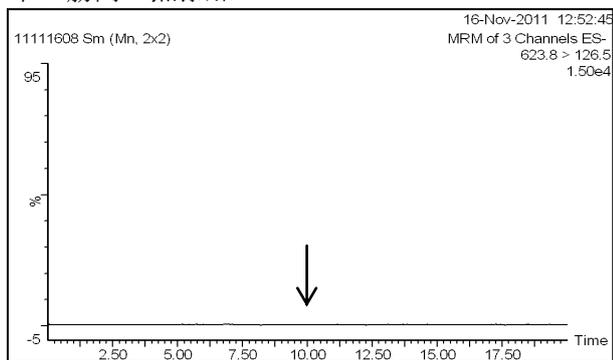
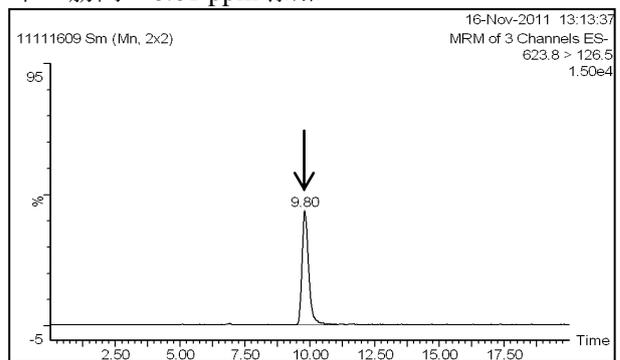


図4 標準溶液のクロマトグラム (一例)

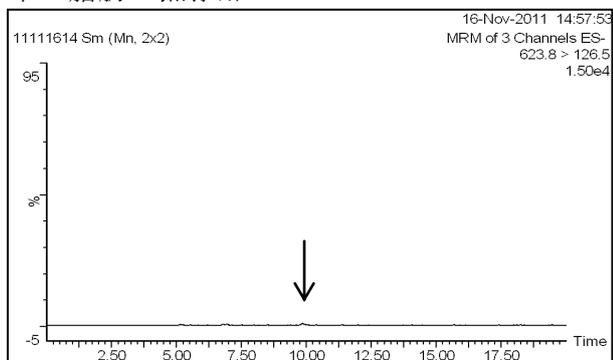
牛の筋肉 無添加



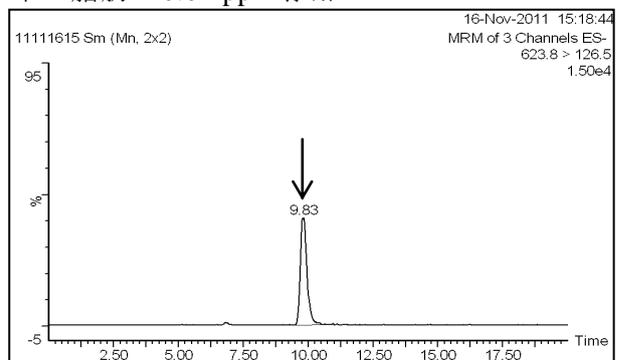
牛の筋肉 0.01 ppm 添加



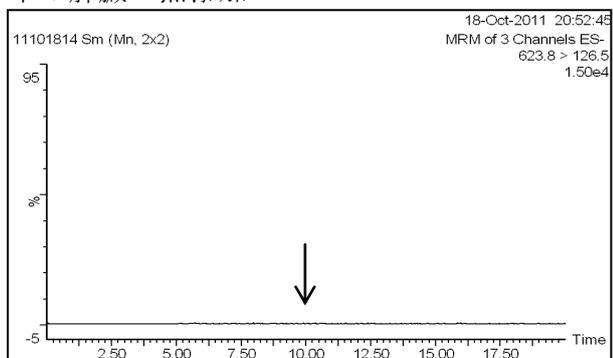
牛の脂肪 無添加



牛の脂肪 0.01 ppm 添加



牛の肝臓 無添加



牛の肝臓 0.01 ppm 添加

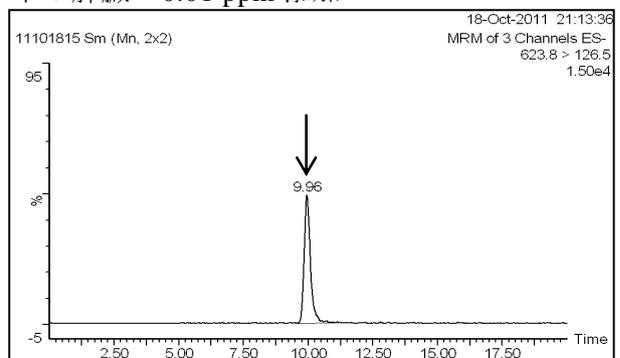
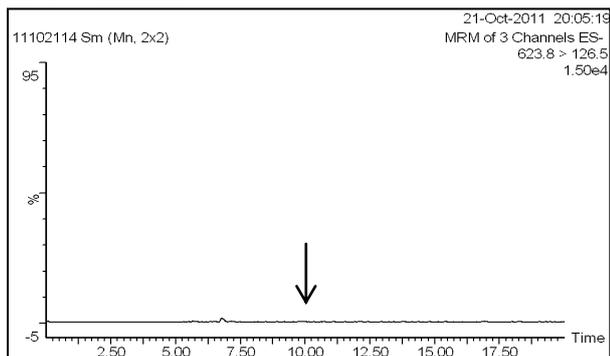
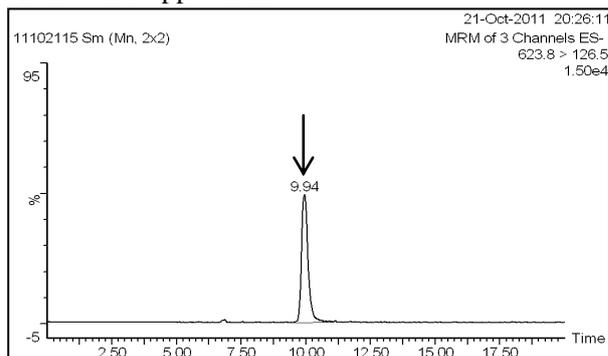


図5-1 試料のクロマトグラム

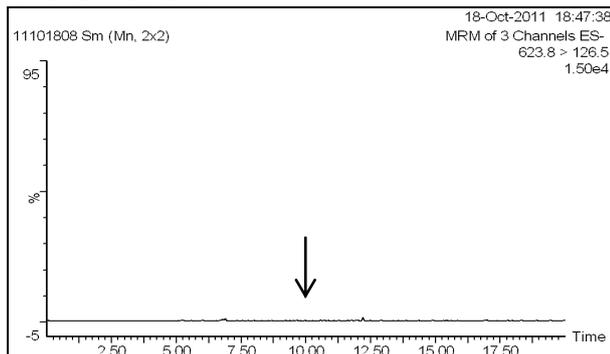
さけ 無添加



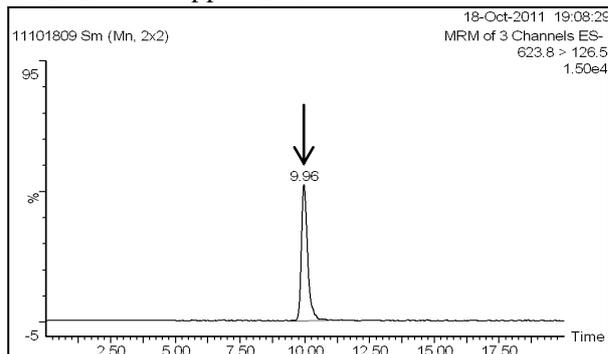
さけ 0.01 ppm 添加



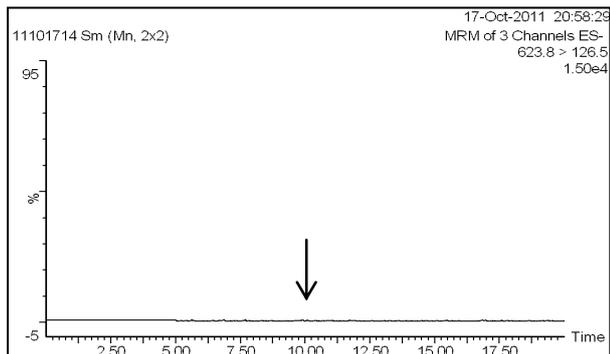
うなぎ 無添加



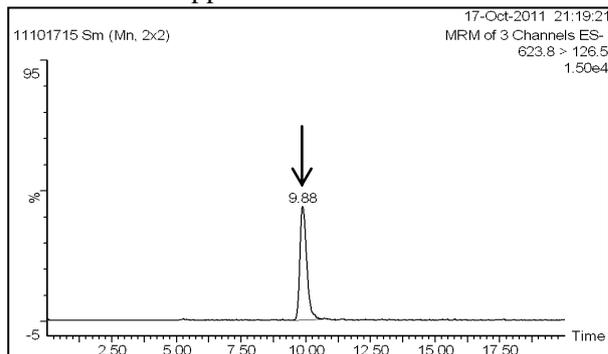
うなぎ 0.01 ppm 添加



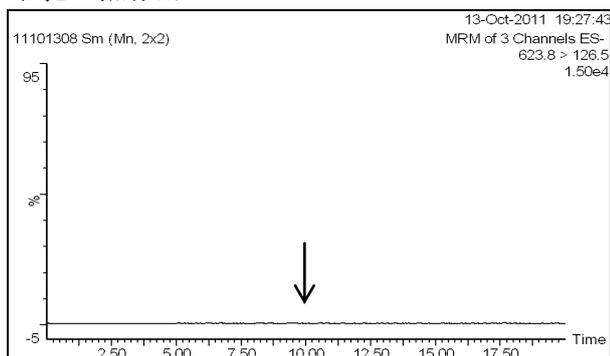
しじみ 無添加



しじみ 0.01 ppm 添加



牛乳 無添加



牛乳 0.01 ppm 添加

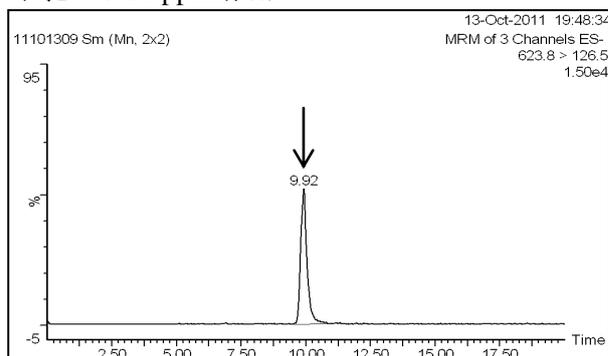
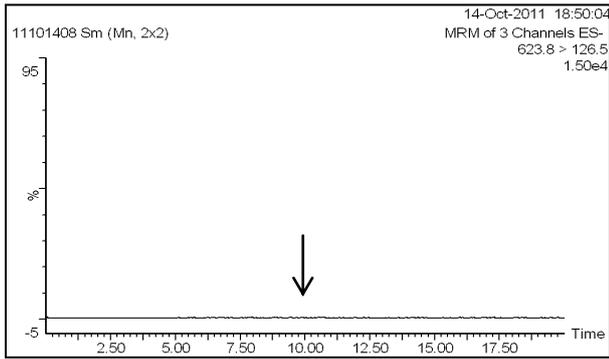
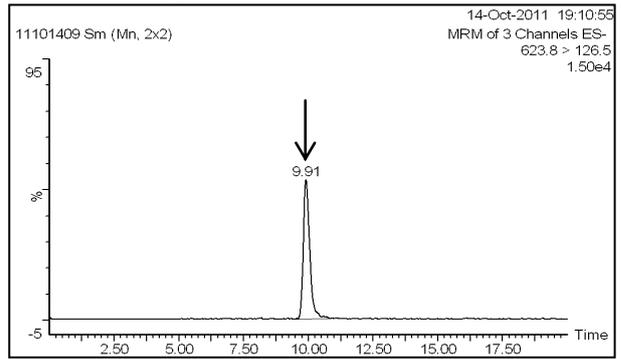


図5-2 試料のクロマトグラム

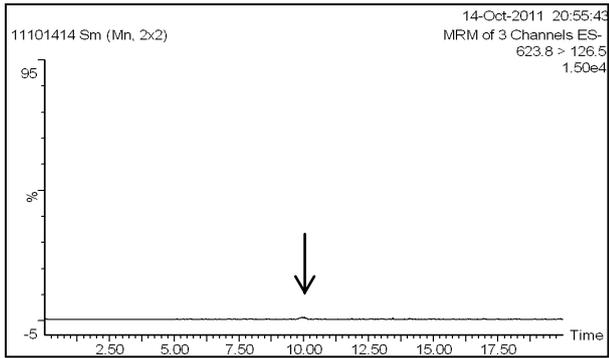
鶏卵 無添加



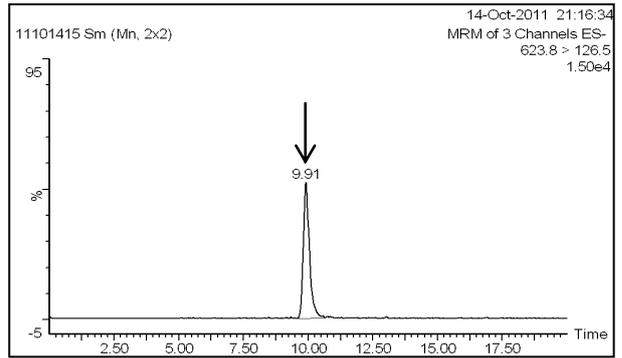
鶏卵 0.01 ppm 添加



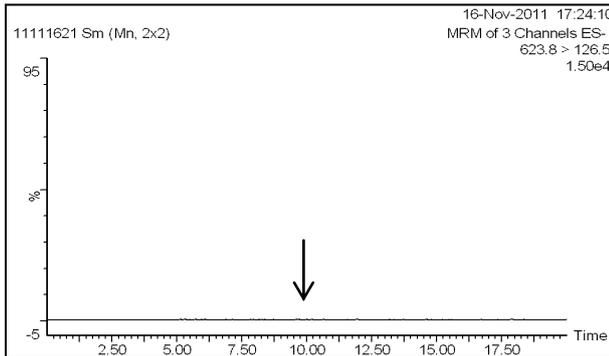
はちみつ 無添加



はちみつ 0.01 ppm 添加



牛の腎臓 無添加



牛の腎臓 0.01 ppm 添加

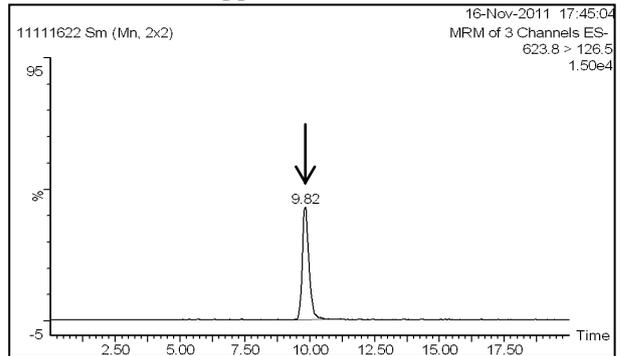
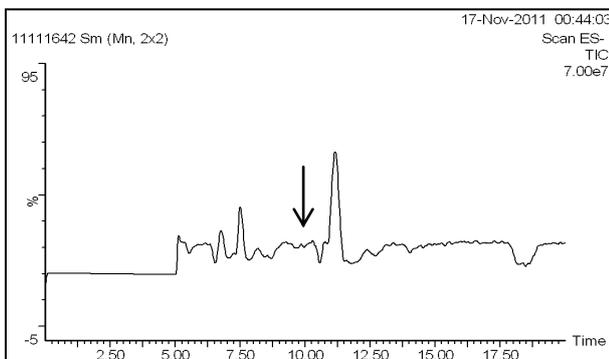


図5-3 試料のクロマトグラム

牛の筋肉 無添加



牛の脂肪 無添加

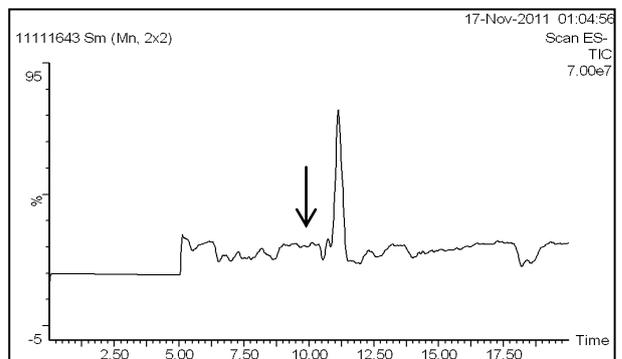
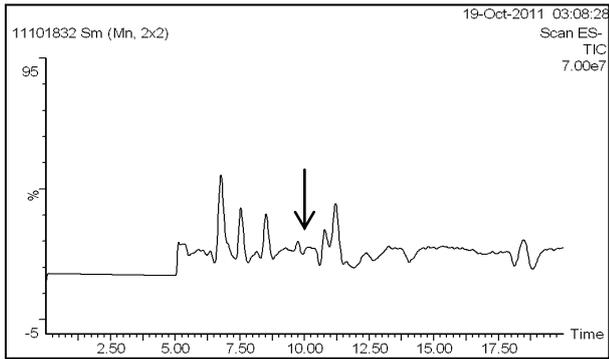
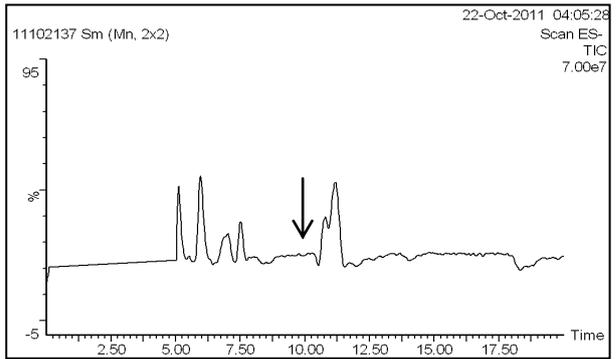


図6-1 ブランク試料のトータルイオンクロマトグラム (スキャン範囲: 50~1000 amu)

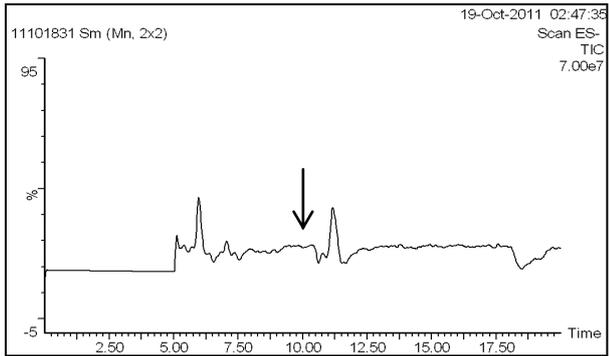
牛の肝臓 無添加



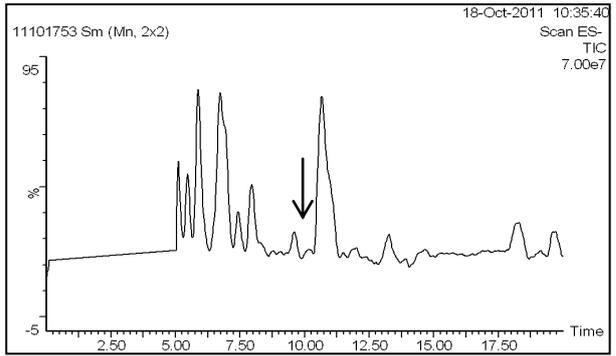
さけ 無添加



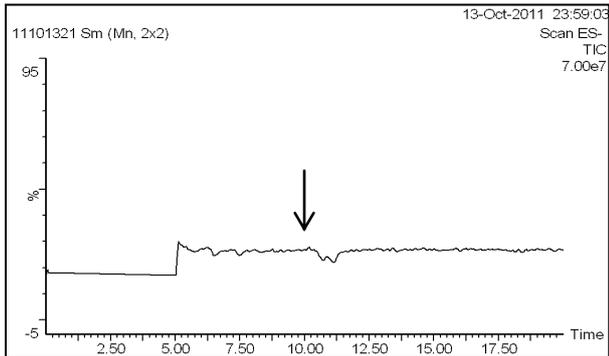
うなぎ 無添加



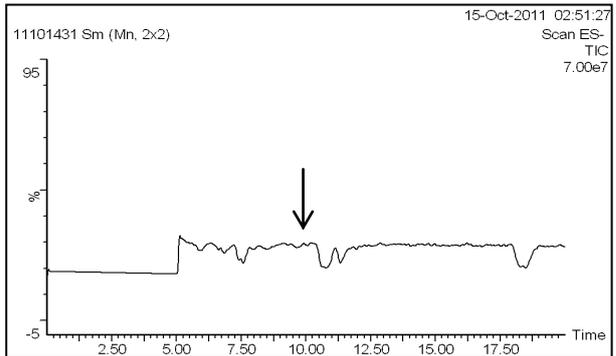
しじみ 無添加



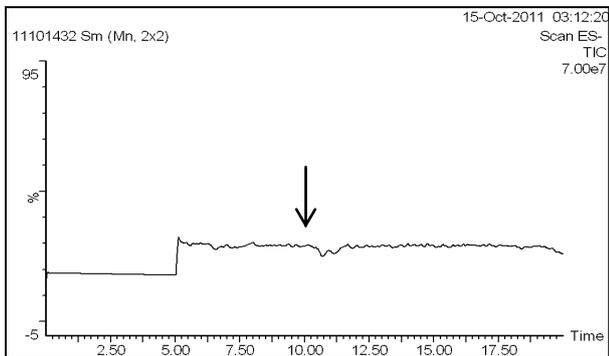
牛乳 無添加



鶏卵 無添加



はちみつ 無添加



牛の腎臓 無添加

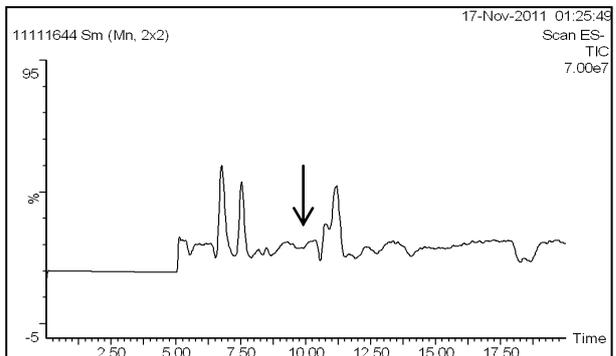


図6-2 ブランク試料のトータルイオンクロマトグラム (スキャン範囲 : 50~1000 amu)