

※本報告書は、試験法開発における検討結果を取り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下さい。

食品に残留する農薬等の成分である物質の 試験法開発業務報告書

イソキサフルトール試験法（畜産物）

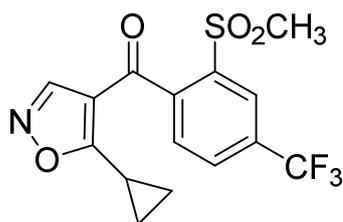
イソキサフルトール試験法（畜産物）の検討結果

【緒言】

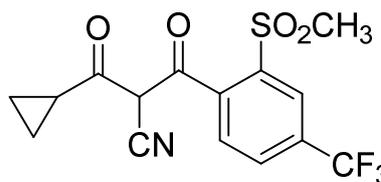
1. 目的及び試験法の検討方針

イソキサフルトールはイソキサゾール構造を持つ除草剤であり、プラストキノン生合成経路を阻害することで除草活性を示す。日本国内での農薬登録はないが、海外では米国、豪州等において、とうもろこし、さとうきび、ひよこ豆等の栽培時に用いられている。コーデックスにおいて、MRL（Maximum Residue Limit：残留基準値）が設定されており、EU、米国、カナダ、日本においても独自のMRLが設定されている。農薬・動物用医薬品部会において残留の規制対象の変更及び残留基準値の改正が行われ（平成28年1月26日付部会報告）、「今回残留基準値を設定するイソキサフルトールとは、イソキサフルトール及び代謝物B【2-シアノ-3-シクロプロピル-4-(2-メチルスルホニル-4-トリフルオロメチルフェニル)プロパン-1,3-ジオン】をイソキサフルトールに換算したものの和をいうこと。」とされた（生食発0607第1号、平成28年6月7日）。しかしながら、畜産物を対象とした代謝物Bを含むイソキサフルトールの残留分析法は報告されていないため、新たに試験法の開発を行った。

2. 分析対象化合物の構造式及び物理化学的性質



イソキサフルトール



代謝物B

イソキサフルトール

分子式：C₁₅H₁₂F₃NO₄S

化学名（IUPAC）：5-Cyclopropyl-4-(2-methylsulfonyl-4-trifluoromethylbenzoyl)-isoxazole

分子量：359.32

外観：白色粉末

沸点：575.1±50.0 °C

融点：140°C

蒸気圧：7.50×10⁻⁹ mmHg (25°C)

酸解離定数（pKa）：-4.29 ± 0.50

1-オクタノール/水分配係数（log Pow）：2.32 (20°C)

水溶解度：6.2 mg/L (20°C、pH 5.5)

溶解性：メタノール1 Lに13.8 gが溶解する。

加水分解による推定半減期（暗所）：11日（pH 5）、20時間（pH 7）、3時間（pH 9）

水中光分解による推定半減期：40時間（pH 5）

【出典】 ChemIDplus (U.S. National Library of Medicine)、SciFinder（化学情報協会）、The Pesticide Manual 16th edition (BCPC)、富士フィルム和光純薬データシート、農薬・動物用医薬品部会報告書。

代謝物B

分子式：C₁₅H₁₂F₃NO₄S

化学名（IUPAC）：3- Cyclopropyl-2-[2-mesy1-4-(trifluoromethyl)benzoyl]-3-oxopropanenitrile

分子量：359.32

外観：白色粉末

沸点：527.8 ± 50.0°C

酸解離定数（pKa）：1.14 ± 0.20

密度：1.460 ± 0.06 g/cm³

溶解性：アセトンに溶け、エタノール及び水にほとんど溶けない

[出典] SciFinder（化学情報協会）、富士フィルム和光純薬データシート。

3. 基準値

イソキサフルトールとは、イソキサフルトール及び代謝物Bをイソキサフルトールに換算したものの和をいう（生安発0607第1号、平成28年6月7日）。

牛の筋肉：0.01 ppm、牛の脂肪：0.01 ppm、牛の肝臓：0.1 ppm、牛乳：0.01 ppm、

鶏卵：0.01 ppm

[実験方法]

1. 試料

1) 購入先

牛の筋肉、牛乳、鶏卵は、神奈川県内のスーパーマーケットで購入したものをを用いた。牛の脂肪、肝臓は、インターネットを介して購入したものをを用いた。

2) 試料の採取方法

- ① 牛の筋肉は、可能な限り脂肪層を除いたもの100 gを量り採り、4 mol/L塩酸及びエタノール（1：1）混液を重量比で1/2量を加えて、フードプロセッサーで均一化した。
- ② 牛の脂肪は、可能な限り筋肉部を除いたもの100 gを量り採り、4 mol/L塩酸及びエタノール（1：1）混液を重量比で1/2量を加えて、フードプロセッサーで均一化した。
- ③ 牛の肝臓100 gを量り採り、4 mol/L塩酸及びエタノール（1：1）混液を重量比で1/2量を加えて、フードプロセッサーで均一化した。
- ④ 牛乳100 gを量り採り、4 mol/L塩酸及びエタノール（1：1）混液を重量比で1/2量を加えて、よく混合した。
- ⑤ 鶏卵は、殻を除去した試料100 gを量り採り、4 mol/L塩酸及びエタノール（1：1）混液を重量比で1/2量を加えて、フードプロセッサーで均一化した。

2. 試薬・試液

1) 標準品

イソキサフルトール標準品：純度98.3%（富士フイルム和光純薬製）

イソキサフルトール代謝物B標準品：純度98.8%（富士フイルム和光純薬製）

2) 試薬等

アセトニトリル、アセトン、酢酸エチル、*n*-ヘキサン：残留農薬試験用（関東化学製）

アセトニトリル、蒸留水：LC-MS用（関東化学製）

エタノール：特級（関東化学製）

塩化ナトリウム、メタノール、無水硫酸ナトリウム：残留農薬試験用（富士フイルム和光純薬製）

0.1 mol/L塩酸、6 mol/L塩酸：定量分析用（富士フイルム和光純薬製）

酢酸：LC/MS用（富士フイルム和光純薬製）

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：Oasis HLB（500 mg/6 mL）（日本ウォーターズ製）

3) 標準溶液、試液の調製方法

① 標準溶液の調製方法

イソキサフルトール標準原液：イソキサフルトール標準品を精秤し、1 vol%酢酸・アセトニトリル溶液に溶解して1 mg/mL溶液を調製した。

イソキサフルトール添加用標準溶液：イソキサフルトール標準原液をアセトンで希釈し、0.2、2 µg/mLの濃度の溶液を調製した。

代謝物B標準原液：代謝物B標準品を精秤し、アセトニトリルに溶解して1 mg/mL溶液を調製した。

代謝物B添加用標準溶液：代謝物B標準原液をアセトンで希釈し、0.2、2 µg/mLの濃度の溶液を調製した。

② 試液の調製方法

酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（3：7）混液：酢酸エチル300 mL及び*n*-ヘキサン700 mLを混合した。

酢酸、水及びメタノール（1：20：30）混液：酢酸10 mL、水200 mL及びメタノール300 mLを混合した。

酢酸、水及びメタノール（1：5：45）混液：酢酸10 mL、水50 mL及びメタノール450 mLを混合した。

3. 装置

ホモジナイザー：PT 10-35 GT（KINEMATICA製）

遠心分離機：8100（久保田商事製）

振とう機：SR-2w（タイテック製）

LC-MS/MS

	型式	会社
LC 装置	Nexera X2	島津製作所
MS 装置	LCMS-8060	島津製作所
データ処理	LabSolutions Ver.5.93	島津製作所

4. 測定条件

LC 条件																											
カラム	InertSustain C18 HP 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																										
流速 (mL/min)	0.3																										
注入量(μL)	5																										
カラム温度 (°C)	40																										
移動相	A 液：0.05 vol%酢酸 B 液：0.05 vol%酢酸・アセトニトリル溶液																										
グラジエント条件	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間 (分)</th> <th>A 液 (%)</th> <th>B 液(%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.0</td> <td>70</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>5.0</td> <td>70</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>20</td> <td>45</td> <td>55</td> </tr> <tr> <td>20.01</td> <td>1</td> <td>99</td> </tr> <tr> <td>25.0</td> <td>1</td> <td>99</td> </tr> <tr> <td>25.01</td> <td>70</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>35.0</td> <td>70</td> <td>30</td> </tr> </tbody> </table>			時間 (分)	A 液 (%)	B 液(%)	0.0	70	30	5.0	70	30	20	45	55	20.01	1	99	25.0	1	99	25.01	70	30	35.0	70	30
時間 (分)	A 液 (%)	B 液(%)																									
0.0	70	30																									
5.0	70	30																									
20	45	55																									
20.01	1	99																									
25.0	1	99																									
25.01	70	30																									
35.0	70	30																									
MS 条件																											
測定モード	SRM (選択反応モニタリング)																										
イオン化モード	ESI (-)																										
インターフェース電圧 (V)	イソキサフルトール、代謝物 B：-3,000																										
ブロックヒーター温度 (°C)	400																										
ネブライザーガス流量 (L/min)	3																										
ドライイングガス流量 (L/min)	10																										
ヒーティングガス流量 (L/min)	10																										
CID ガス (kPa)	270 (アルゴン)																										
DL 温度 (°C)	250																										
定量イオン (<i>m/z</i>)	イソキサフルトール： <i>m/z</i> 358.1→79.1 [コリジョンエネルギー：17 eV] 代謝物 B： <i>m/z</i> 358.1→79.1 [コリジョンエネルギー：19 eV]																										
定性イオン (<i>m/z</i>)	イソキサフルトール： <i>m/z</i> 358.1→278.2 [コリジョンエネルギー：18 eV] 代謝物 B： <i>m/z</i> 358.1→278.1 [コリジョンエネルギー：17 eV]																										
保持時間 (分)	5 (代謝物 B)、19 (イソキサフルトール)																										

5. 定量

イソキサフルトール及び代謝物B標準原液をそれぞれ0.05 vol%酢酸及び0.05 vol%酢酸・アセトニトリル溶液（7：3）混液で希釈して、各食品の添加濃度及び定量限界濃度（0.01 mg/kg）に対して、25、50、75、100、125、150%の回収率に相当する濃度の検量溶液を調製した。各濃度に調製した検量溶液5 µLをLC-MS/MSに注入して、得られたピーク面積値を用いて検量線を作成した。なお、本法に従って試験溶液を調製した場合には、試料中0.01 mg/kgのイソキサフルトール及び代謝物Bに相当する試験溶液の濃度は、0.002 mg/Lである。試験溶液は5 µLをLC-MS/MSに注入して、検量線から絶対検量線法によりイソキサフルトールの含量を求めた。

6. 添加試料の調製

1) 基準値濃度の添加試料の作成

牛の筋肉・乳、鶏卵（添加濃度：0.01 mg/kg）：試料10.0 g相当量に、0.2 µg/mL添加用標準溶液0.5 mLを添加し混合後、30分放置した。

牛の脂肪（添加濃度：0.01 mg/kg）：試料10.0 g相当量を採り、約40℃の湯浴で融解し、0.2 µg/mL添加用標準溶液0.5 mLを添加し混合後、-30℃で30分間放置して凝固させた。

牛の肝臓（添加濃度：0.1 mg/kg）：試料10.0 g相当量に、2 µg/mL添加用標準溶液0.5 mLを添加し混合後、30分放置した。

2) 定量限界濃度（0.01 mg/kg）の添加試料の作成

牛の筋肉・脂肪・肝臓、乳、鶏卵：1)に同じ。

牛の肝臓（添加濃度：0.01 mg/kg）：試料10.0 g相当量に、0.2 µg/mL添加用標準溶液0.5 mLを添加し混合後、30分放置した。

7. 試験溶液の調製

概要

イソキサフルトール及び代謝物Bを4 mol/L塩酸及びエタノール（1：1）混液で磨砕均一化した試料から、*n*-ヘキサン存在下アセトニトリルで抽出し、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（3：7）混液に転溶した後、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で精製し、LC-MS/MSで定量及び確認する方法である。

1) 抽出

試料を正確に量り、重量比で1/2量の4 mol/L塩酸及びエタノール（1：1）混液を加え磨砕均一化した後、試料10.0 gに相当する量を350 mL容ガラス製遠沈管（褐色）に量り採った。これに*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル50 mL、*n*-ヘキサン50 mL及び無水硫酸ナトリウム20 gを加えてホモジナイズした後、毎分3,000回転で5分間遠心分離し、*n*-ヘキサン層を捨て、アセトニトリル層を100 mL容メスフラスコ（褐色）に採った。残留物に*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル50 mL及び*n*-ヘキサン50 mLを加えてホモジナイズした後、上記と同様に遠心分離し、得られたアセトニトリル層を先のアセトニトリル層と合わせ、アセトニトリルを加えて正確に100 mLとした。この溶液から正確に4 mLを50 mL容ポリプロピレン製遠沈管に分取し、0.1 mol/L塩酸16 mL及び塩化ナトリウム2 gを加え、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（3：7）混液20 mLを加えて振とう抽出した後、毎分3,000回転で5分間遠心分離し、有機層を50 mL容ナス型フラスコ（褐色）に採った。水層に酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（3：7）混液20 mLを加えて振とう抽出した後、上記と同様に遠心分

離し、得られた有機層を合わせ、40℃以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物に酢酸、水及びメタノール（1：20：30）混液2 mLを加えて溶解した。

2) 精製

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（500 mg）に、メタノール5 mL、次いで酢酸、水及びメタノール（1：20：30）混液5 mLを注入し、各流出液は捨てた。このカラムに1）で得られた溶液を注入した後、酢酸、水及びメタノール（1：20：30）混液10 mLを注入し、流出液は捨てた。次いで、酢酸、水及びメタノール（1：5：45）混液20 mLを注入し、溶出液を50 mL容ナス型フラスコ（褐色）に採った。溶出液を40℃以下で1 mL程度まで濃縮し、2 mL容メスフラスコ（褐色）に移した。ナス型フラスコを0.05 vol%酢酸及び0.05 vol%酢酸・アセトニトリル溶液（7：3）混液300 µL程度で3回程度容器を洗い、洗浄液を合わせて正確に2 mLとしたものを試験溶液とした。試験溶液を2 mL容褐色バイアルに移したものを測定に用いた。

8. マトリックス添加標準溶液の調製

各検討食品の添加回収試験における回収率100%相当濃度となるように、イソキサフルトール及び代謝物B標準溶液50 µLを2 mL容褐色バイアルに採った。室温で窒素ガスを吹き付け乾固し、ブランク試験溶液0.5 mLを加えて溶解したものをマトリックス添加標準溶液とした。

[分析法フローチャート]

試料採取

- ↓ 試料を正確に量り、重量比で 1/2 量の 4 mol/L 塩酸及びエタノール (1 : 1) 混液を加え磨砕均一化
- ↓ 試料 10.0 g 相当量を 350 mL 容ガラス製遠沈管 (褐色) に量り採った

抽出

- ↓ *n*-ヘキサン 50 mL、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 50 mL、無水硫酸ナトリウム 20 g を加え、ホモジナイズした
- ↓ 遠心分離 (3,000 回転、5 分間) し、*n*-ヘキサン層を捨て、アセトニトリル層を採った
- ↓ 残留物に *n*-ヘキサン 50 mL、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 50 mL を加え、ホモジナイズ
- ↓ 遠心分離 (3,000 回転、5 分間) し、*n*-ヘキサン層を捨て、アセトニトリル層を合わせ、アセトニトリルで 100 mL に定容

転溶

- ↓ 抽出液 4 mL を正確に採り、0.1 mol/L 塩酸 16 mL、塩化ナトリウム 2 g、酢酸エチル及び *n*-ヘキサン (3 : 7) 混液 20 mL を加えて、5 分間振とう
- ↓ 遠心分離 (3,000 回転、5 分間) し、有機層を採った
- ↓ 水層に酢酸エチル及び *n*-ヘキサン (3 : 7) 混液 20 mL を加えて、5 分間振とう
- ↓ 遠心分離 (3,000 回転、5 分間) し、有機層を合わせた
- ↓ 40°C以下で濃縮後に、酢酸、水及びメタノール (1 : 20 : 30) 混液 2 mL に溶解

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 (Oasis HLB、500 mg)

- ↓ 予めメタノール 5 mL、酢酸、水及びメタノール (1 : 20 : 30) 混液 5 mL を通液して平衡化
- ↓ 上記で得られた溶液を全量カラムに注入
- ↓ 酢酸、水及びメタノール (1 : 20 : 30) 混液 10 mL を注入し、流出液を捨てた
- ↓ 酢酸、水及びメタノール (1 : 5 : 45) 混液 20 mL を注入し、溶出液を採取した

溶出液

- ↓ 40°C以下で 1 mL 程度まで濃縮
- ↓ 0.05 vol% 酢酸及び 0.05 vol% 酢酸・アセトニトリル溶液 (7 : 3) 混液で正確に 2 mL とした

試験溶液

↓

LC-MS/MS測定 (0.2 g 試料/mL) 試験溶液 5 µL を注入

[結果及び考察]

1. 測定条件の検討

1) MS条件の検討

① イソキサフルトールのMS条件の検討

イソキサフルトール標準溶液をESIのポジティブ及びネガティブモードでスキャン測定した。ポジティブモードでは、プロトン付加分子 (m/z 360.3 $[M+H]^+$) に由来するイオンが、ネガティブモードにおいては脱プロトン分子 (m/z 358.1 $[M-H]^-$) が、それぞれ検出された (図1)。両測定モードでSRM条件の検討を行ったところ、ネガティブモードにおいて、より高感度に測定することが可能であった。図2及び3には、脱プロトン分子 m/z 358.1をプリカーサーイオンとした場合のプロダクトイオンスペクトルを示した。最も高感度に測定できた m/z 358.1 \rightarrow 79.1 (CE: 17 eV) を定量イオンとし、 m/z 358.1 \rightarrow 278.2 (CE: 18 eV) を定性イオンとした。

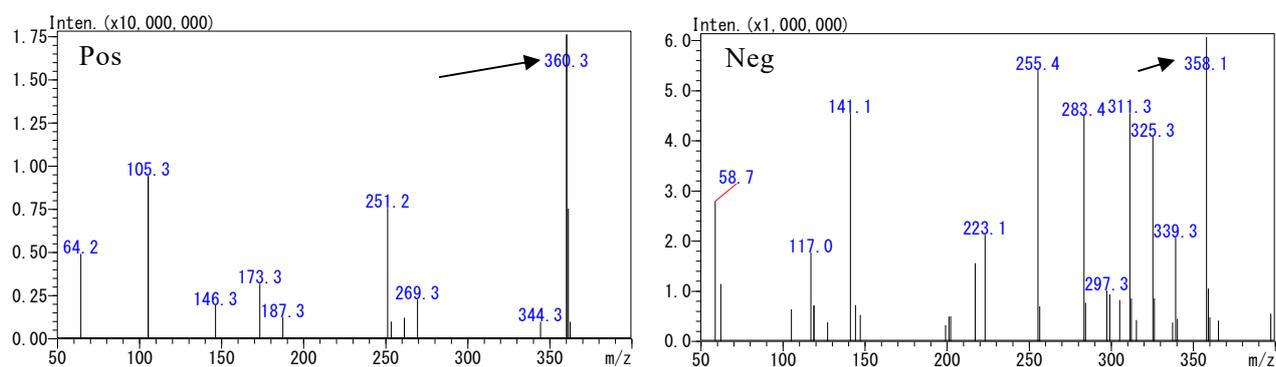


図1 イソキサフルトールのスキャン測定により得られるマススペクトル
スキャン範囲: 50~400 m/z 、左: ESI (+)、右: ESI (-)

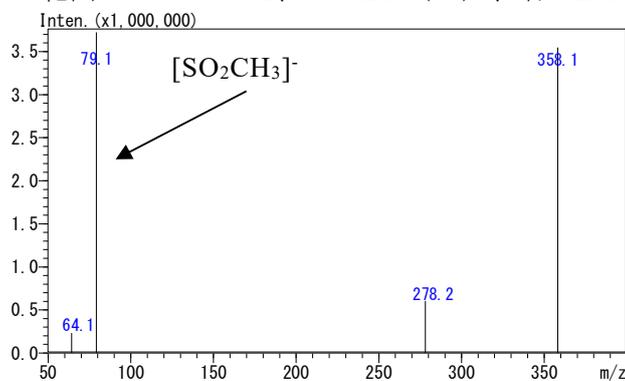


図2 イソキサフルトールのプロダクトイオンスペクトル (定量用)

プリカーサーイオン: m/z 358.1、測定条件: ESI (-)、CE = 17 eV

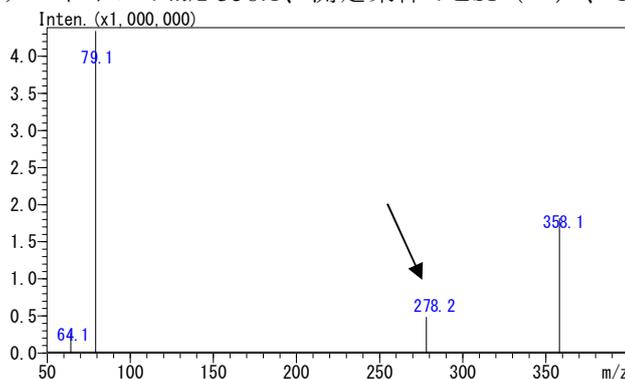


図3 イソキサフルトールのプロダクトイオンスペクトル (定性用)

プリカーサーイオン: m/z 358.1、測定条件: ESI (-)、CE = 18 eV

② 代謝物BのMS条件の検討

代謝物B標準溶液をESIのポジティブ及びネガティブモードでスキャン測定した。ポジティブモードにおいては、プロトン付加分子に由来すると考えられるイオンが検出されなかったが、ネガティブモードでは代謝物Bの脱プロトン分子 (m/z 358.1 $[M-H]^-$) が強く観察された (図4)。図5、6には、本イオンをプリカーサーイオンとした場合のプロダクトイオンスペクトルを示した。最も高感度に測定できた m/z 358.1 \rightarrow 79.1 (CE : 19 eV) を定量イオンとし、 m/z 358.1 \rightarrow 278.1 (CE : 17 eV) を定性イオンとした。

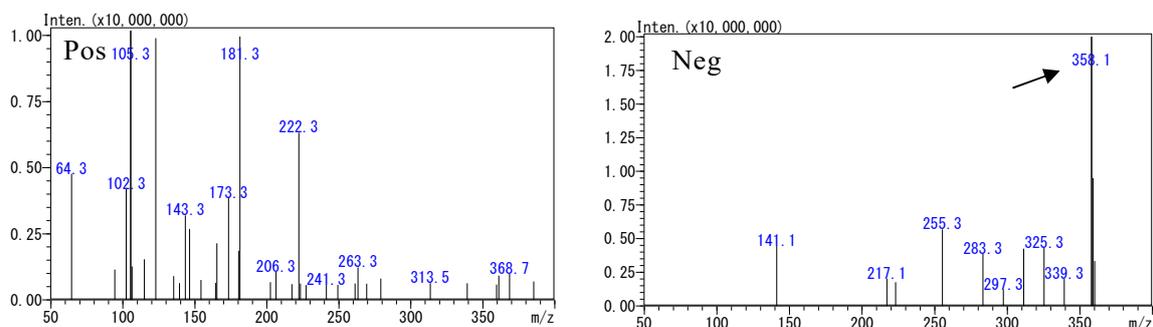


図4 代謝物Bのスキャン測定により得られるマススペクトル
スキャン範囲 : 50~400 m/z 、左 : ESI (+)、右 : ESI (-)

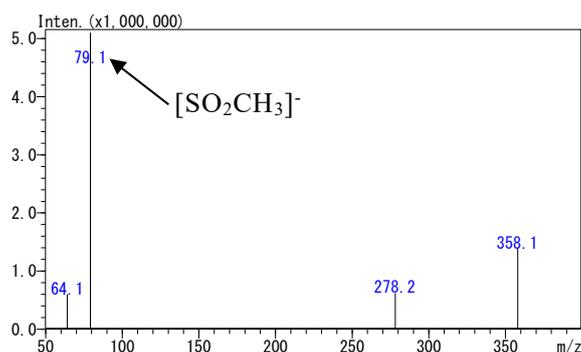


図5 代謝物Bのプロダクトイオンスペクトル (定量用)
プリカーサーイオン : m/z 358.1、測定条件 : ESI (-)、CE = 19 eV

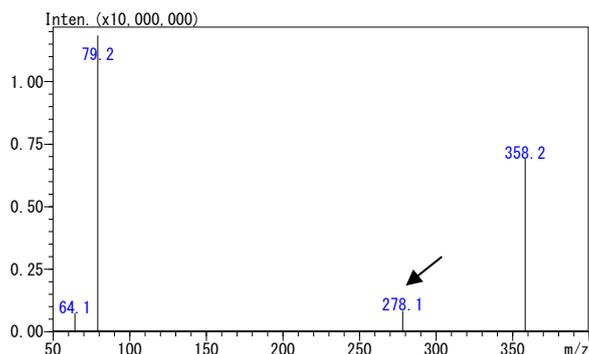


図6 代謝物Bのプロダクトイオンスペクトル (定性用)
プリカーサーイオン : m/z 358.1、測定条件 : ESI (-)、CE = 17 eV

2) LC条件の検討

① 移動相条件の検討

添加剤は一般のLC-MS/MS分析で汎用される酢酸、ギ酸を用い、有機溶媒には、アセトニトリル、メタノールを用いた。イソキサフルトール及び代謝物B標準溶液を表1に示す分析条件で測

定し、ピーク面積値、SN比、ピーク形状を指標として最適な移動相を検討した。表1に示すように、添加剤としてはギ酸を用いると、酢酸を用いた場合に比べてSN比の大幅な低下が認められた。また、有機系の移動相にメタノールを用いると両化合物のピーク形状がブロードとなった。以上のことから、水系の移動相には酢酸を添加剤として用い、有機系の移動相には、酢酸を添加したアセトニトリルを用いることにした。

次に、最適な酢酸の濃度を検討した。0.01 vol%~0.1 vol%の濃度の酢酸溶液を用いて検討した結果、0.01 vol%と0.05 vol%の酢酸の濃度では、ピークのS/Nに大きな差は認められなかった（表2）。分析対象化合物は酸性条件下で比較的に安定であること、及び移動相の緩衝作用を考慮して、移動相には0.05 vol%酢酸及び0.05 vol%酢酸・アセトニトリル混液を用いることにした。

表1 各移動相におけるイソキサフルトール及び代謝物Bのピーク面積値、SN比、ピーク形状

移動相		イソキサフルトール				代謝物 B			
水系溶媒	有機系溶媒	保持時間 (分)	ピーク面積値	SN 比	ピーク形状	保持時間 (分)	ピーク面積値	SN 比	ピーク形状
0.05 vol%酢酸	0.05 vol%酢酸・メタノール溶液	12.5	293,333	2,313	ブロード	3.8	2,510,000	16,567	ブロード
	0.05 vol%酢酸・アセトニトリル溶液	7.2	239,667	2,057	良好	3.3	2,140,000	19,867	良好
0.1 vol%ギ酸	0.1 vol%ギ酸・メタノール溶液	12.4	13,300	170	ブロード	4.0	810,000	6,860	ブロード
	0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液	7.1	13,267	206	良好	2.9	723,333	4,477	テーリング

10 ng/mL イソキサフルトール及び代謝物B標準溶液5 µLを注入

流速：0.3 mL/min、カラム：InertSustain C18 HP (2.1 x 150 mm, 3 µm)、水系移動相：有機系移動相=1:1

表2 酢酸の濃度がピーク面積値等に与える影響

移動相		イソキサフルトール				代謝物 B			
水系溶媒	有機系溶媒	保持時間 (分)	ピーク面積値	SN 比	ピーク形状	保持時間 (分)	ピーク面積値	SN 比	ピーク形状
0.01 vol%酢酸	0.01 vol%酢酸・アセトニトリル溶液	6.6	566,562 ± 4,215	1,124 ± 52	良好	2.8	641,900 ± 5,676	5,914 ± 341	ブロード
0.05 vol%酢酸	0.05 vol%酢酸・アセトニトリル溶液	6.6	511,716 ± 11,718	1,143 ± 153	良好	2.2	513,706 ± 9,121	5,796 ± 117	良好
0.1 vol%酢酸	0.1 vol%酢酸・アセトニトリル溶液	6.6	508,420 ± 6,265	876 ± 153	良好	2.1	446,891 ± 1,236	5,882 ± 642	良好

2 ng/mL イソキサフルトール及び代謝物B標準溶液5 µLを注入、n = 3

流速：0.3 mL/min、カラム：InertSustain C18 HP (2.1 x 150 mm, 3 µm)、水系移動相：有機系移動相=1:1

② 分析カラムの選定

5種の一般的なODSカラムを用いてイソキサフルトール及び代謝物B標準溶液を測定し、ピークのSN比、ピーク形状を指標として分析カラムを選択した。表3に示すように、InertSustain C18 HPカラムを用いたときに、両化合物共に良好なピーク形状が得られ、かつピークのS/Nが最大となった。なお、代謝物BはInertsil ODS-4を用いた場合にはブロードとなり、CAPCELL PAK C18 MG IIIでは溶出しなかった。以上のことから、分析カラムは、InertSustain C18 HPを用いることにした。なお、代謝物Bは非常に高極性であるため、本移動相の条件では十分に分析カラムに保

持されていない。イソキサフルトールとの極性の差、及びマトリックスとの分離を考慮して、最終的な送液条件は、アイソクラティックではなく、グラジエント溶出することとした。

表3 各分析カラムを用いたときの、各化合物のピーク面積値、SN比、ピーク形状

カラム	流速 (mL/ min)	イソキサフルトール			代謝物B			代謝物B のピーク 形状など
		保持時間 (min)	ピーク 面積値	S/N 比 平均	保持時間 (min)	ピーク 面積値	S/N 比	
InertSustain C18 HP 内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm (ジーエルサイエンス製)	0.3	6.6	126,689± 1,218	356±43	2.8	174,352± 2870	4,462±814	良好
InertSustainSwift C18 HP 内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm (ジーエルサイエンス製)	0.3	4.4	127,220± 2,340	309±15	2.3	146,204± 2125	3,572±609	良好
Inertsil ODS-4 HP 内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm (ジーエルサイエンス製)	0.3	6.8	-	-	-	-	-	激しくブ ロード
CAPCELL PAK C18 MG III 内径 2.0 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm (大阪ソーダ製)	0.3	5.8	-	-	-	-	-	溶出しな い
XTERRA MS C18 内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3.5 μm (ウォーターズ製)	0.3	4.6	104,286± 1,491	206±23	8.0	136,269± 393	358±169	ブロード

0.5 ng/mL イソキサフルトール及び代謝物B標準溶液 5 μLを注入、流速：0.3 mL/min、n = 3

移動相：0.05 vol%酢酸及び0.05 vol%酢酸・アセトニトリル（1：1）混液

3) 検量線

図7には、定量限界濃度（0.01 mg/kg）に対する回収率25%～150%（0.0005～0.003 mg/L）（イソキサフルトールとして）に相当する濃度範囲の検量線の例を示した。試験法の希釈倍率は、5倍希釈（0.2 g試料/mL）とした。本濃度範囲で作成した検量線の決定係数 R^2 は0.999以上と良好な直線性が認められた。なお、本濃度範囲では、API 4000（SCIEX製）などの汎用機種においても、十分な感度及び直線性が得られることを確認している。

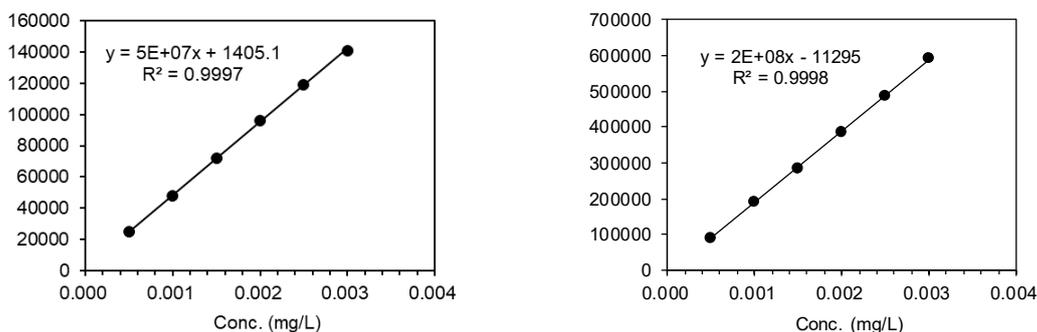


図7 定量下限値（0.01 ppm）を定量する際に作成する検量線の例

（左：イソキサフルトール、右：代謝物B）

2. 試験溶液調製方法の検討

1) 申請企業の残留分析法

申請企業からは、下記に示す代謝物Bを含むイソキサフルトールの残留分析法が報告されている¹⁾。牛の筋肉・脂肪・肝臓・腎臓、牛乳、鶏卵の6食品を用いて開発した分析法のバリデー

ションを実施しており、良好な結果が得られている。なお、牛の筋肉を試料とした場合に、抽出後24時間以内にイソキサフルトールの60%程度が分解することが示されており、その分解防止措置として、0.01 mol/L塩酸を加える処理を実施している。

[フローチャート]

試料

↓ 試料 5 g を量り採る

抽出

↓ 0.01 mol/L 塩酸 2 mL を加えて 30 分間静置する (牛の筋肉のみ)

↓ 水をアセトニトリル及び水の比率が 1 : 1 となるように適量を加える

↓ アセトニトリル 10 mL を加えて、1 分間振とうする

精製

↓ 硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、クエン酸三ナトリウム二水和物、クエン酸水素二ナトリウム 1.5 水和物 (4 : 1 : 1 : 0.5, w/w/w/w) 6.5 g を加えて、2 分間振とうする

↓ 4,000 回転で 5 分間遠心分離し、上澄液 1 mL を採取して、水 1 mL を加える

試験溶液

↓

LC-MS/MS 測定

2) イソキサフルトール及び代謝物Bの安定性の確認

イソキサフルトールは極めて不安定な化合物であり、特にpHの影響を強く受ける。クエン酸緩衝液 (pH 5)、イミダゾール緩衝液 (pH 7)、ホウ酸緩衝液 (pH 9) 中でのイソキサフルトールの推定半減期は、それぞれ、11日、20時間、3時間であり、中性からアルカリ性においては短時間で分解する。分解経路としては、分子内のイソキサゾール環が加水分解により開裂して、代謝物Bが生成するものと考えられている。一方で、イソキサゾール環を持たない代謝物Bは、いずれのpHにおいても高い安定性を示す。また、イソキサフルトールは、pHの影響の他にも、光により速やかに分解され、代謝物Bをはじめとする複数の化合物に分解される。主要な水中光分解経路は、イソキサゾール環の開裂による代謝物Bの生成、代謝物Bの分解による代謝物C (2-メチルスルホニル-4-トリフルオロメチル安息香酸) の生成など、複数の分解経路が示されている。なお、光分解によるイソキサフルトールの推定半減期は、クエン酸緩衝液中 (pH 5) で40時間である²⁾。一般に、畜水産物を対象とした農薬等の残留分析法では、抽出、脱脂、転溶及び固相ミニカラム等による精製操作など複数の前処理操作を行う。この過程において、イソキサフルトール及び代謝物Bは多様な食品マトリックス (pH)、光に曝されるため正確な定量値を求めることが困難となることが予想される。従って、より頑健性の高い残留分析法を構築するためには、光に対する安定性を実際の食品試料を用いて詳細に検証する必要がある。

① 試料マトリックス中での光に対する安定性の検証

はじめに、牛の筋肉のブランク試料からアセトニトリル (*n*-ヘキサン存在下) で抽出した抽出液を、透明または褐色の100 mL容メスフラスコに採り、イソキサフルトールまたは代謝物Bを添加して、0~1.5時間放置した。30分ごとにLC-MS/MS分析を行い、それぞれのピーク面積値を経時的に追跡した。なお、アセトニトリル抽出液のpHは塩酸で1程度とした。図8に示すように、透明のガラス容器を用いた場合に、イソキサフルトール及び代謝物Bは経時的に分解し、イソキ

サフルトールは1時間で約40%ピーク面積値が減少した。一方、褐色のガラス器具を用いた場合は、ピーク面積値の減少は認められなかった。以上のことから、試験法開発の検討においては、操作中の光による分解を最小限にするため、可能な限り褐色のガラス器具を用いることとした。

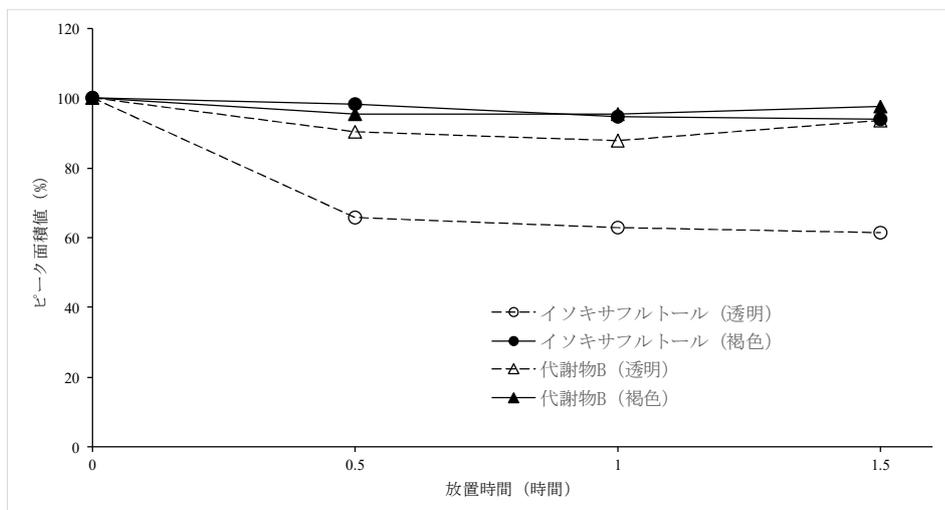


図8 牛の筋肉のマトリックス中でのイソキサフルトール及び代謝物Bの安定性 (pH 1)

n = 3、イソキサフルトール、代謝物Bの添加濃度：0.1 ppm

② 減圧濃縮操作におけるイソキサフルトール及び代謝物Bの損失についての検討

基礎検討において、代謝物Bはエバポレーターによる減圧濃縮操作により損失することを示唆するデータが得られたことから、減圧濃縮操作による安定性を確認した。なお、検討には損失が強く認められた牛の脂肪を用いた。

牛の脂肪のブランク試料を「7. 試験溶液の調製」に従って操作し、Oasis HLBカラムからの溶出液20 mLにイソキサフルトールまたは代謝物B標準溶液 (100 ng/mL) を各40 µL添加して、エバポレーターにより濃縮操作を行った。溶出液を1 mL程度まで濃縮した後、一方は窒素を吹き付けて溶媒を完全に除去して、0.05 vol%酢酸及び0.05 vol%酢酸・アセトニトリル溶液 (7:3) 混液2 mLで溶解した。他方は窒素による吹き付け操作を行わずに、2 mL容のメスフラスコで0.05 vol%酢酸及び0.05 vol%酢酸・アセトニトリル溶液 (7:3) 混液で定容した。その結果、図9に示すように、代謝物Bは窒素ガスを吹き付けて乾燥した場合に、40%程度ピーク面積値が低下することが明らかになった。一方、イソキサフルトールはピーク面積値の減少は認められなかった。以上の結果から、ミニカラムからの溶出液はエバポレーターで1 mL程度まで濃縮した後に、2 mLに定容することにした。

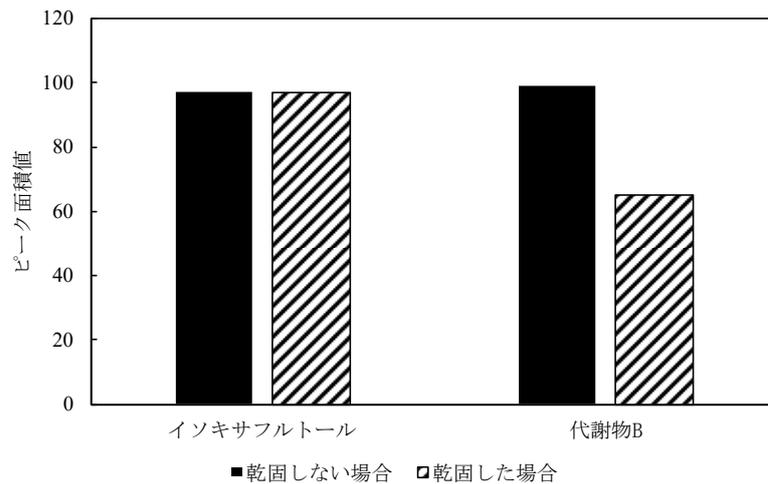


図9 減圧濃縮操作による代謝物Bの損失
イソキサフルトール及び代謝物Bの量：4 ng、n = 3

3) 分解防止方法の検討

① 添加試料中の分析対象化合物の分解に関する検討

食品試料からの抽出方法を検討した際に、添加試料（食品試料にイソキサフルトールまたは代謝物 B 標準溶液を添加して混合し、30 分程度放置した試料）中でイソキサフルトールが分解することを示唆するデータが得られた。このため、実際の検査においても、試料の細切均一化の際に、イソキサフルトールが損失する可能性がある。そこで、より正確な測定結果を得るために、試料の均一化時の分析対象化合物の分解の程度を明らかにするとともに、その分解を防ぐ方法として、申請企業の残留分析法に示されている酸を加える方法を検討した。

添加する酸の種類として、酢酸、ギ酸、塩酸を用いて検討を行ったが、弱酸の酢酸、ギ酸では分解を防止する効果は得られなかった。そこで、牛の筋肉、牛の肝臓を試料に用いて、イソキサフルトール及び代謝物 B のホモジナイズ中の安定性を確認した。検討では、(a) 試料 10 g に 4 mol/L 塩酸及びエタノール (1 : 1) 混液 5 g を加えて良く混合した後にイソキサフルトールまたは代謝物 B 標準溶液を添加して混合し 30 分間放置した後に、アセトニトリル (*n*-ヘキサン存在下) により抽出した場合と、(b) 試料 10 g にイソキサフルトールまたは代謝物 B 標準溶液を添加して混合し 30 分間放置した後に、4 mol/L 塩酸及びエタノール (1 : 1) 混液 5 g を加えて良く混合してからアセトニトリル (*n*-ヘキサン存在下) により抽出した場合について比較した。

(a) 及び (b) で得られた抽出液を希釈して、LC-MS/MS 分析を行い、その結果を表 4 に示した。

塩酸及びエタノール混液を試料に予め加えずに分析対象化合物を添加して抽出操作を行った場合、イソキサフルトールの回収率は牛の筋肉、肝臓ともに 51%であった。これにイソキサフルトールから分解して生成したと考えられる代謝物 B の回収率を合わせると、それぞれ、91%、96%であった。一方、塩酸及びエタノール混液を予め試料に加えてから抽出した場合には、イソキサフルトールの回収率は、それぞれ、96%、99%であり、代謝物 B のピークは検出されなかった。塩酸及びエタノール混液を試料に予め加えない場合でも、イソキサフルトールと代謝物 B の回収率を合わせると、90%程度の回収率が得られたことから、ホモジナイズ中にイソキサフルトールの約半分が代謝物 B に分解され、その内の 10%程度が更に他の代謝物に分解されたものと推察された。このため、試料の細切均一化の際のイソキサフルトールの代謝物 B 及び他の代謝物への分解を防ぐために、分解防止操作を行う必要があると考えられた。

表4 分解防止操作が回収率に与える影響

試料	分解防止操作**	回収率 (%) *			
		イソキサフルトールを添加			代謝物 B を添加
		イソキサフルトール (①)	代謝物 B (②)	合計 (①+②)	代謝物 B
牛の筋肉	なし	51	40	91	98
	あり	96	0	96	98
牛の肝臓	なし	51	45	96	102
	あり	99	0	99	100

*添加試料から得られるピーク面積値/マトリックス添加標準溶液から得られるピーク面積値 x 100

** 試料への4 mol/L塩酸及びエタノール (1:1) の添加が、各標準溶液の添加後の場合を「なし」、添加前の場合を「あり」とした。

イソキサフルトール、代謝物Bの添加濃度：0.1 ppm

②塩酸濃度の検討

分解防止を目的として試料に加える酸は塩酸とした。しかし、塩酸（水溶液）を試料に添加すると、脂溶性の高い牛の脂肪では二層に分離して十分に混和しなかった。しかし、エタノールを塩酸と 1:1 の比率で混合した溶液を用いると牛の脂肪においても分離することなく、十分に混和した。

適切な塩酸の濃度を検討するために、5 食品（牛の筋肉・脂肪・肝臓、牛乳、鶏卵）各 10 g に、2 mol/L 塩酸及びエタノール (1:1) 混液、または 4 mol/L 塩酸及びエタノール (1:1) 混液 5 g を加えてよく混合した後に、イソキサフルトール及び代謝物 B 標準溶液を添加して、アセトニトリル (*n*-ヘキサン存在下) で抽出操作を行った。これまでに行った基礎的な検討において、イソキサフルトールは、中性から弱酸の抽出液中で不安定であることを示唆するデータが得られていたため、抽出溶液中での安定性を経時的に追跡した。図 10 に示すように、4 mol/L 塩酸及びエタノール混液を用いた場合には、イソキサフルトール及び代謝物 B とともに、放置時間に依らず 95%以上の回収率が得られた。一方、イソキサフルトールは 2 mol/L 塩酸及びエタノール混液を用いたときに、牛の肝臓と鶏卵で放置時間に依存してピーク面積値の低下が認められた。また、代謝物 B はすべての食品で、いずれの条件においても分解等は見られず、良好な回収率が得られた。以上のことから、分解防止操作として、試料 10 g に 1/2 量の 4 mol/L 塩酸及びエタノール (1:1) 混液 5 g を加えて、均一化してから抽出操作を行うことにした。

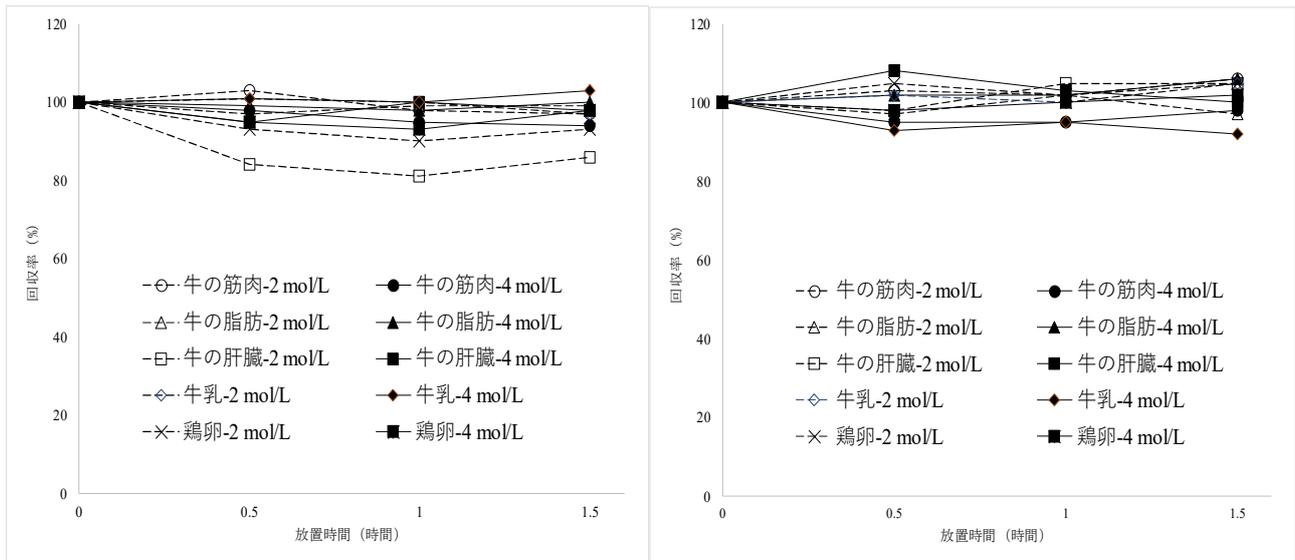


図10 塩酸濃度の検討

(左：イソキサフルトール、右：代謝物B)

イソキサフルトール、代謝物Bの濃度：0.1 ppm

4) 抽出方法の検討

抽出溶媒の候補として、脂肪を分散できるアセトン、メタノール、アセトニトリル (*n*-ヘキサン存在下) を候補とした。分析操作中のイソキサフルトール及び代謝物Bの安定性を考慮すると、できるだけ操作が少なく短時間で分析が完了することが望ましい。アセトン及びメタノールを抽出溶媒に用いた場合には、その後に脂質等の低極性化合物を除去するために脱脂操作が必要になる。一方、アセトニトリル (*n*-ヘキサン存在下) の場合は、抽出操作と脱脂操作を同時に行うことが可能であり、分析操作の短縮が期待できる。更に農薬の申請企業から報告された残留分析法においても、アセトニトリルが抽出溶媒に用いられていることから、アセトニトリル (*n*-ヘキサン存在下) を抽出溶媒の第一の候補とした。5食品 (牛の筋肉・肝臓・脂肪、牛乳、鶏卵) を対象に抽出操作時の回収率を確認したところ、イソキサフルトールは96~102%、代謝物Bは102~106%と良好な結果が得られた。以上のことから、抽出溶媒はアセトニトリル (*n*-ヘキサン存在下) を用いることにした。

5) 転溶方法の検討

① 転溶溶媒の検討

酢酸エチル及び *n*-ヘキサン混液への転溶方法を検討した。「7. 試験溶液の調製」に従って操作した牛の筋肉のアセトニトリル抽出液 4 mL をポリプロピレン製の遠沈管に採り、0.1 mol/L 塩酸 16 mL を加えた後に、酢酸エチル及び *n*-ヘキサン (1:1~1:9) 混液 20 mL で2回抽出した。表5に示すように、代謝物Bは *n*-ヘキサンの比率が高くなると回収率がやや低下したが、イソキサフルトールは *n*-ヘキサンの比率に依らず、良好な回収率が得られた。*n*-ヘキサンの比率が高い方が精製効果を期待できるため、酢酸エチル及び *n*-ヘキサン (3:7) 混液、酢酸エチル及び *n*-ヘキサン (2:3) 混液を転溶溶媒の候補とした。なお、本検討ではポリプロピレン製の遠沈管を用いたが、ガラス製の遠沈管でも問題ない。

表5 各溶媒を用いたときの回収率

抽出溶媒	回収率 (%)	
	イソキサフルトール	代謝物 B
酢酸エチル及び <i>n</i> -ヘキサン (1:1) 混液	102	99
酢酸エチル及び <i>n</i> -ヘキサン (2:3) 混液	101	100
酢酸エチル及び <i>n</i> -ヘキサン (3:7) 混液	97	100
酢酸エチル及び <i>n</i> -ヘキサン (1:4) 混液	96	98
酢酸エチル及び <i>n</i> -ヘキサン (1:9) 混液	99	92

イソキサフルトール、代謝物Bの量：50 ng

② 酢酸エチル及び *n*-ヘキサンによる転溶回数の検討

①の検討結果から、抽出溶媒は、酢酸エチル及び *n*-ヘキサン (3:7) 及び (2:3) 混液を候補とした。「7. 試験溶液の調製」に従って操作した牛の筋肉のアセトニトリル抽出液4 mLをポリプロピレン製の遠沈管に採り、0.1 mol/L塩酸16 mLを加えた後に、酢酸エチル及び *n*-ヘキサン (2:3) 又は酢酸エチル及び *n*-ヘキサン (3:7) 混液20 mLで3回抽出した。それぞれの画分について回収率を求めた。表6に示すように、いずれの溶媒においての2回までの抽出でほぼ100%の回収率が得られた。以上の結果から、精製効果を考慮して、転溶操作に用いる溶媒は酢酸エチル及び *n*-ヘキサン (3:7) 混液を用いて2回抽出することにした。

表6 転溶回数の検討

化合物名	回収率 (%)							
	酢酸エチル及び <i>n</i> -ヘキサン (2:3) 混液				酢酸エチル及び <i>n</i> -ヘキサン (3:7) 混液			
	20 mL (1回目)	20 mL (2回目)	20 mL (3回目)	合計	20 mL (1回目)	20 mL (2回目)	20 mL (3回目)	合計
イソキサフルトール	99	3	0	103	93	8	0	101
代謝物 B	90	6	0	97	96	6	0	101

イソキサフルトール、代謝物Bの添加量：50 ng

③ 転溶操作における塩添加に関する検討

①で決定した転溶方法を種々の食品に適用したところ、牛の脂肪以外ではイソキサフルトール及び代謝物Bはほぼ100%の回収が得られた。しかし、牛の脂肪では、イソキサフルトール及び代謝物の回収率がともに、90%と若干低くなった。このため、転溶操作の際に、塩化ナトリウムを加えることで、回収率が上昇するかを検討した。「7. 試験溶液の調製」に従って操作した牛の脂肪の抽出液4 mLをポリプロピレン製の遠沈管に採り、0.1 mol/L塩酸16 mL及び塩化ナトリウム (0、1、2 g) を加えた後に、酢酸エチル及び *n*-ヘキサン (3:7) 混液20 mLで2回抽出した。表7に示す通り、塩化ナトリウムを1または2 g加えたときに、回収率がほぼ100%となった。以上のことから、転溶操作の際には、塩化ナトリウム2 gを加えることにした。

表7 転溶操作における塩の添加の影響

試料	化合物	塩化ナトリウム (g)	回収率 (%)
牛の脂肪	イソキサフルトール	0	96
		1	100
		2	100
	代謝物 B	0	92
		1	98
		2	98

イソキサフルトール、代謝物Bの量：50 ng

6) ミニカラム精製方法の検討

LC-MS/MS測定では、イソキサフルトール及び代謝物Bの保持時間が大きく異なるが、分析方法の操作性を考慮して、同一画分に溶出することが可能なミニカラム及び溶出条件を検討した。種々の固相カラムを用いた検討の結果、ミニカラムはOasis HLB (500 mg) を用いることにした。牛の脂肪のブランク試料を「7. 試験溶液の調製」に従って操作し、得られた酢酸エチル及び*n*-ヘキサン混液に、100 ng/mLイソキサフルトールまたは代謝物B標準溶液100 µLを添加した後に濃縮した。酢酸、水及びメタノール (1 : 20 : 30) 混液 2 mLに溶解して、カラムに負荷した。酢酸、水及びメタノール (1 : 20 : 30) 混液5 mLで2回洗浄した後、酢酸、水及びメタノール (1 : 5 : 45) 混液5 mLで4回溶出して、それぞれの画分から回収率を求めた。表8に示すように、酢酸、水及びメタノール (1 : 20 : 30) を注入した際には溶出せずに、酢酸、水及びメタノール (1 : 5 : 45) 混液で溶出した。以上のことから、酢酸、水及びメタノール (1 : 20 : 30) 混液2 mLに溶解して、カラムに負荷した後、酢酸、水及びメタノール (1 : 20 : 30) 混液10 mLでカラムを洗浄した後、酢酸、水及びメタノール (1 : 5 : 45) 混液20 mLで溶出することにした。

表8 各画分からの回収率 (%)

試料	化合物	回収率 (%)							合計
		酢酸、水及びメタノール (1 : 20 : 30)			酢酸、水及びメタノール (1 : 5 : 45)				
		2 mL (負荷液)	5 mL	5 mL	5 mL	5 mL	5 mL	5 mL	
牛の脂肪	イソキサフルトール	0	0	0	83	14	2	0	99
	代謝物 B	0	0	0	37	56	3	1	97

イソキサフルトール及び代謝物Bの量：10 ng

3. 添加回収試験

畜産物5食品 (牛の筋肉・脂肪・肝臓、牛乳、鶏卵) を用いて、[実験方法] 7. 試験溶液の調製に示す方法に従い、各食品に設定されている基準値濃度及び定量限界濃度 (0.01 mg/kg) (濃度はいずれもイソキサフルトール換算) でイソキサフルトール及び代謝物Bの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11~22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23に示した。

1) 選択性の評価

選択性の評価結果を表9に示した。すべての食品において、イソキサフルトール及び代謝物Bの定量を妨害するピークは検出されなかった。以上のことから、選択性は問題が無いと判断した。

表9 選択性の評価

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 [検出限界] (mg/kg)	基準値 (ppm)	妨害ピークの許容範囲の評価		ピーク面積(高さ) ¹⁾									選択性 の評価 ³⁾	備考
					評価濃度 (ppm)	評価基準	面積又は 高さの別	ブランク			マトリックス添加標準溶液 ²⁾			面積(高さ) 比(a)/(b)			
								n=1	n=2	平均(a)	n=1	n=2	平均(b)				
1	イソキサフルトール	牛の筋肉	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	82836	85886	84361	0.000	○	
1	イソキサフルトール	牛の脂肪	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	90903	91706	91305	0.000	○	
1	イソキサフルトール	牛の肝臓	0.01	0.1	基準値	0.1	< 0.100	面積	0	0	0	871160	887564	879362	0.000	○	
1	イソキサフルトール	鶏卵	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	92880	91687	92284	0.000	○	
1	イソキサフルトール	牛乳	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	93181	91393	92287	0.000	○	
2	代謝物B	牛の筋肉	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	397685	393816	395751	0.000	○	
2	代謝物B	牛の脂肪	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	391747	392684	392216	0.000	○	
2	代謝物B	牛の肝臓	0.01	0.1	基準値	0.1	< 0.100	面積	0	0	0	4113798	4111960	4112879	0.000	○	
2	代謝物B	鶏卵	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	353702	354973	354338	0.000	○	
2	代謝物B	牛乳	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	376607	383699	380153	0.000	○	

*1 ブランク試料、標準溶液の順に注入して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。)

*2 試料中の濃度が「評価濃度」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。

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

2) 真度、精度

基準値濃度及び定量限界濃度(0.01 mg/kg)における真度、精度の検討結果を表10に示した。基準値濃度及び定量下限濃度での真度及び併行精度は、イソキサフルトールでそれぞれ89~94%及び1.2~3.1%、代謝物Bでそれぞれ80~90%及び2.4~5.7%であった。検討した両添加濃度ともに、ガイドラインの目標値を十分に満たした。また、イソキサフルトールを添加した試料において、イソキサフルトールの分解により生じたと考えられる代謝物Bのピークが検出された。しかし、その回収率はすべての食品で2%未満(外挿したため、参考値)であった。本分析法では、イソキサフルトールから代謝物への分解を抑えるために、光及びpHをコントロールしている。代謝物への分解を完全にコントロールすることは出来ないが、定量下限値(0.01 ppm)を測定する際においても、定量値への影響を最小限に留めることが出来たと考えられる。また、定量限界濃度における添加試料のピークのS/Nの平均値は、イソキサフルトールで1,405~2,498、代謝物Bで2,042~3,856であり、S/N \geq 10以上を十分に満たした。

表10 真度、精度の評価

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 [検出限界] (mg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	定量限界 の評価 ¹⁾	検査値					回収率(%)					真度 (%)	併行精度 (RSD%)	S/N ²⁾			備考
							横き	切片	ρ^2 値	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5	Max.	Min.			平均値			
1	イソキサフルトール	牛の筋肉	0.01	0.01	0.01	S/N	41624914	2524	0.9991	90.5	89.8	89.6	90.2	84.0	88.8	3.1	2204.5	767.7	1486.1			
		牛の脂肪	0.01	0.01	0.01	S/N	45991143	-1631	0.9990	92.9	92.6	89.0	92.3	92.0	91.7	1.7	1416.2	1531.8	1474.0			
		牛の肝臓	0.01	0.1	0.01	S/N	44859686	2372	0.9993	93.5	91.2	90.1	89.8	92.8	91.5	1.8	1730.9	3264.5	2497.7			
		牛の肝臓	0.01	0.1	0.1	-	44969154	30036	0.9997	89.5	88.7	88.0	91.5	88.2	89.2	1.6	14911.3	15000.4	14955.8			
		鶏卵	0.01	0.01	0.01	S/N	46529314	1135	0.9992	91.7	92.9	93.7	94.5	95.7	93.7	1.6	1739.7	1622.1	1680.9			
		牛乳	0.01	0.01	0.01	S/N	46916057	1405	0.9997	90.8	93.1	92.1	93.5	93.2	92.5	1.2	1148.7	1661.7	1405.2			
2	代謝物B	牛の筋肉	0.01	0.01	0.01	S/N	198646914	-3494	0.9996	86.0	89.0	89.0	91.8	90.1	89.2	2.4	3130.2	4581.0	3855.6			
		牛の脂肪	0.01	0.01	0.01	S/N	20285660	-2492	0.9995	83.0	78.8	77.5	77.0	84.0	80.1	4.0	2932.8	2466.2	2699.5			
		牛の肝臓	0.01	0.1	0.01	S/N	205229029	-4077	0.9996	79.3	86.3	89.2	80.7	78.4	82.8	5.7	3053.7	3578.3	3316.0			
		牛の肝臓	0.01	0.1	0.1	-	192493240	5510	0.9998	80.6	89.9	89.6	85.4	93.0	87.7	5.5	17524.0	20255.8	18889.9			
		鶏卵	0.01	0.01	0.01	S/N	171564743	3778	0.9994	82.1	92.5	90.2	89.7	94.8	89.9	5.4	2264.0	2093.6	2178.8			
		牛乳	0.01	0.01	0.01	S/N	198804400	-11295	0.9998	85.5	87.3	88.8	79.6	86.9	85.6	4.1	2092.0	1992.9	2042.5			

*1 S/Nを求める必要がある場合には『S/N』と表示される。

*2 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を求める。

3) 試料マトリックスの測定への影響

試料マトリックスの測定への影響について検討した結果を表11に示した。添加回収試験における回収率100%相当濃度となるように調製したマトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積比を求めた。その結果、ピーク面積比は、イソキサフルトールでは0.96~1.00、代

謝物Bでは0.97~1.04であったことから、本法は試料由来のマトリックスの影響をほとんど受けずに測定することが可能と考えられた。

表11 試料マトリックスの測定への影響

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 [検出限界] (mg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	標準溶液 濃度 ¹⁾ (mg/L)	ピーク面積(高さ) ²⁾						備考			
							面積又は 高さの別	ブランク ³⁾	マトリックス添加標準溶液 ⁴⁾			溶媒標準溶液				
									n=1	n=2	平均	n=1		n=2	平均	ピーク面積 (高さ)比 ⁵⁾
1	イソキサフルトール	牛の筋肉	0.01	0.01	0.01	0.002	面積	0	82836	85886	84361	85259	86139	85699	0.98	
		牛の脂肪	0.01	0.01	0.01	0.002	面積	0	90903	91706	91305	92838	92120	92479	0.99	
		牛の肝臓	0.01	0.1	0.01	0.002	面積	0	90553	89893	90223	90995	93134	92065	0.98	
		牛の肝臓	0.01	0.1	0.1	0.02	面積	0	871160	887564	879362	902256	925518	913887	0.96	
		鶏卵	0.01	0.01	0.01	0.002	面積	0	92880	91687	92284	92352	92699	92526	1.00	
		牛乳	0.01	0.01	0.01	0.002	面積	0	93181	91393	92287	93053	91281	92167	1.00	
2	代謝物B	牛の筋肉	0.01	0.01	0.01	0.002	面積	0	397685	393816	395751	391001	391623	391312	1.01	
		牛の脂肪	0.01	0.01	0.01	0.002	面積	0	391747	392684	392216	393559	391397	392478	1.00	
		牛の肝臓	0.01	0.1	0.01	0.002	面積	0	395497	388450	391974	408773	401301	405037	0.97	
		牛の肝臓	0.01	0.1	0.1	0.02	面積	0	4113798	4111960	4112879	3952237	3973171	3962704	1.04	
		鶏卵	0.01	0.01	0.01	0.002	面積	0	353702	354973	354338	343759	344506	344133	1.03	
		牛乳	0.01	0.01	0.01	0.002	面積	0	376607	383699	380153	386574	395850	391212	0.97	

*1 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。

*2 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。）

*3 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。

*4 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。

*5 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。

[結論]

イソキサフルトール及び代謝物Bを4 mol/L塩酸及びエタノール（1：1）混液で磨砕均一化した試料から、*n*-ヘキサン存在下アセトニトリルで抽出し、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（3：7）混液に転溶した後、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で精製し、LC-MS/MSで定量及び確認する方法を開発した。開発した分析法を基準値濃度及び定量下限濃度（0.01 mg/kg）で、牛の筋肉・肝臓・脂肪、牛乳、鶏卵の5食品に適用した。基準値濃度及び定量下限濃度での真度及び併行精度は、イソキサフルトールでそれぞれ89~94%及び1.2~3.1%、代謝物Bでそれぞれ80~90%及び2.4~5.7%であった。また、各食品におけるマトリックス添加標準溶液に対する溶媒標準溶液のピーク面積比は、イソキサフルトールでは0.96~1.00、代謝物Bでは0.97~1.04であったことから、本法は試料由来のマトリックスの影響をほとんど受けずに測定することが可能と考えられた。以上のことから、開発した分析法は、畜産物中のイソキサフルトール及び代謝物Bを基準値濃度及び定量限界濃度で精度良く定量することが可能であると考えられた。

[参考文献]

1) Validation of the BCS-method-01300/M009 (based on QuEChERS) for the determination of residues of Isoxaflutole and Metabolite PRA 202248 in Animal Tissue. Final Report: S12-00056, eurofins agrosience service, 2013.

2) JMPR評価書

http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPR/Evaluation13/Isoxaflutole.pdf

添加回収試験における代表的なクロマトグラム（添加濃度：基準値濃度）

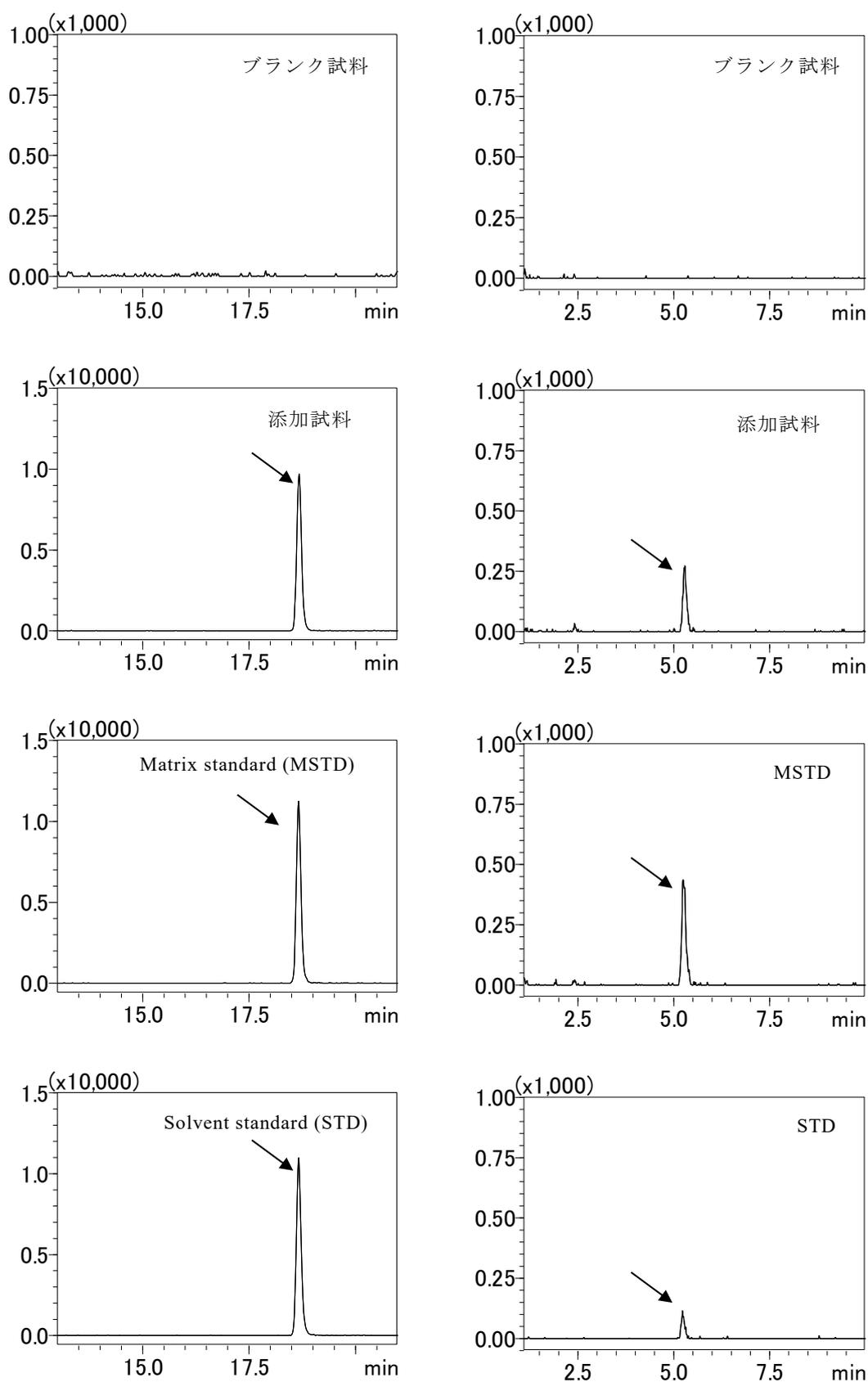


図11 牛の筋肉のSRMクロマトグラム [イソキサフルトール添加]
(左：イソキサフルトール； m/z 358.1→79.1、右：代謝物B； m/z 358.1→79.1)

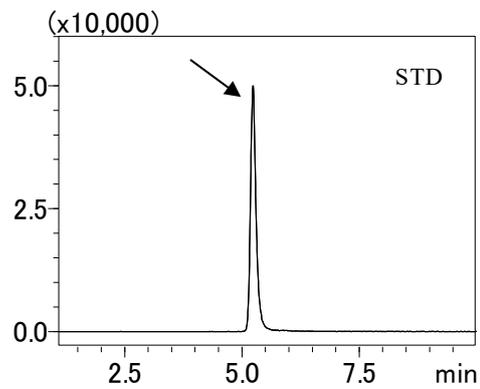
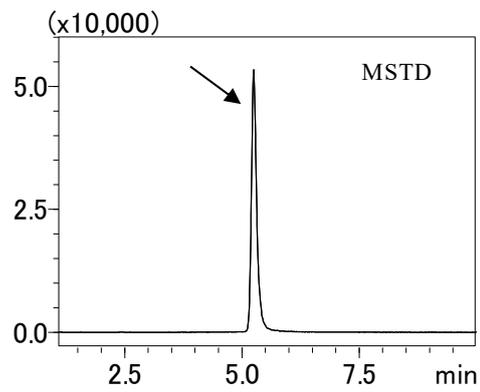
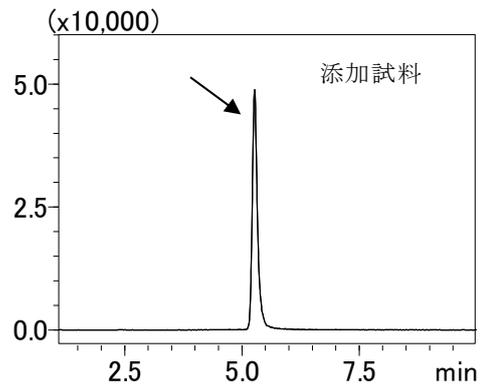
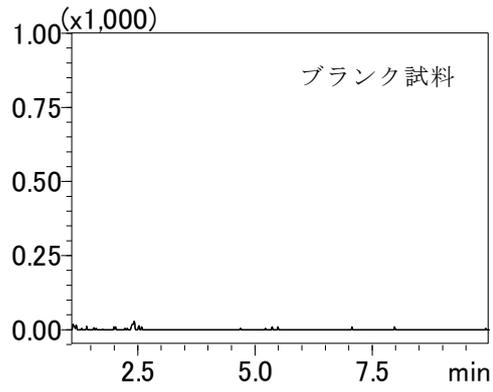


図12 牛の筋肉のSRMクロマトグラム [代謝物B添加]
(代謝物B ; m/z 358.1→79.1)

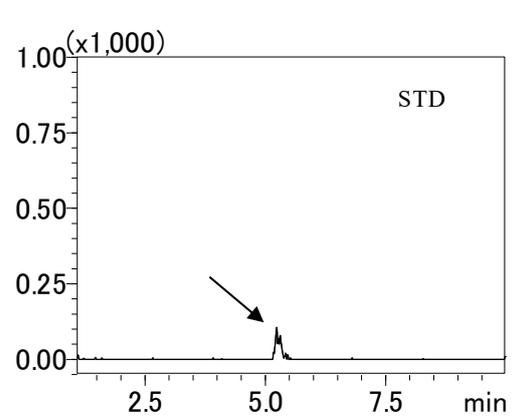
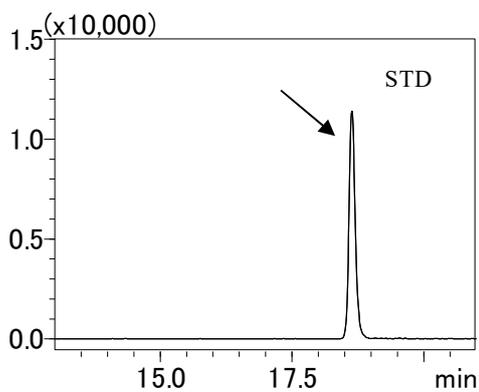
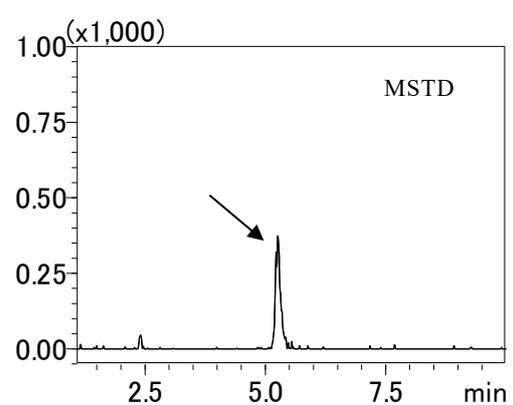
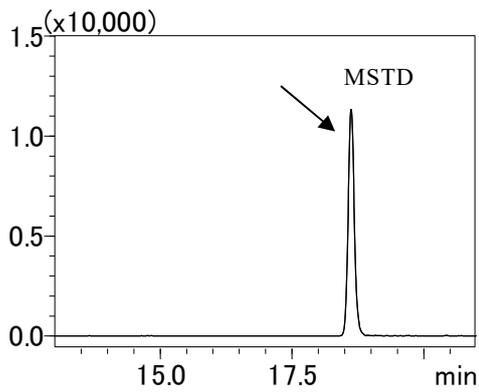
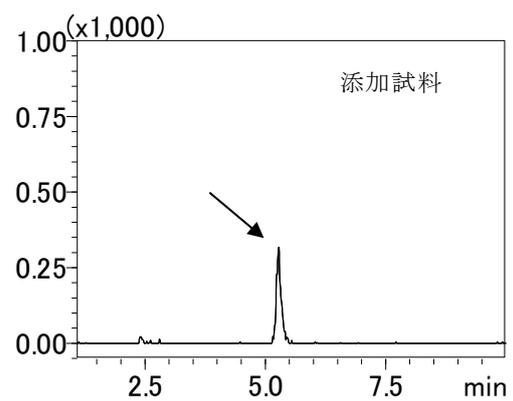
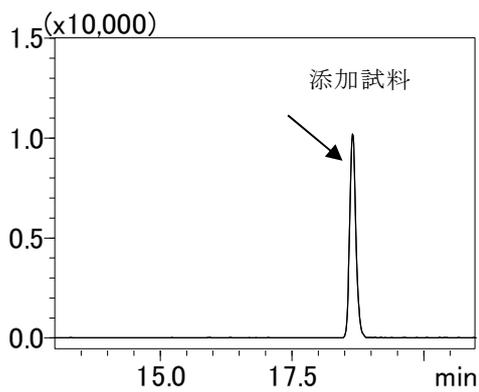
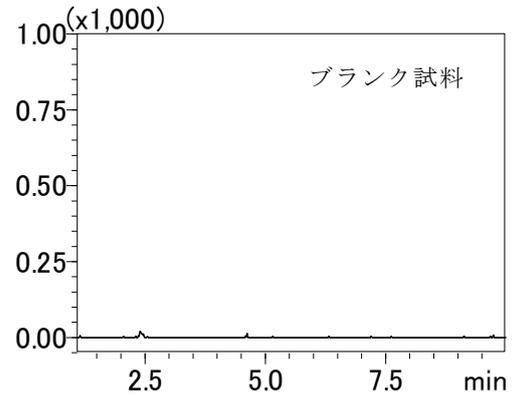
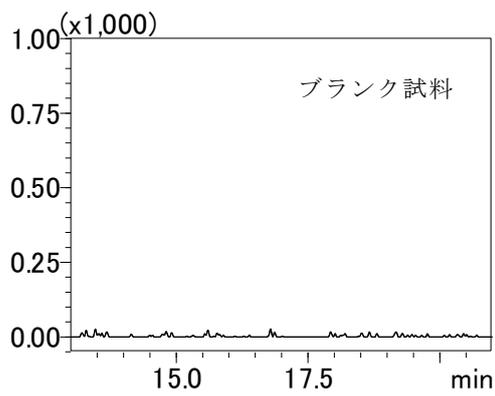


図13 牛の脂肪のSRMクロマトグラム [イソキサフルトール添加]
 (左：イソキサフルトール； m/z 358.1→79.1、右：代謝物B； m/z 358.1→79.1)

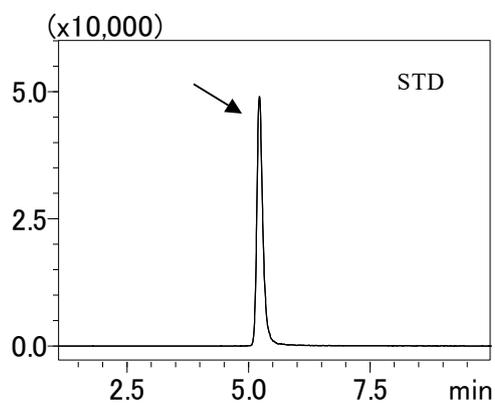
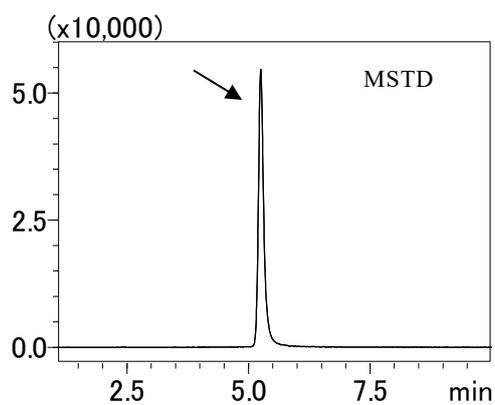
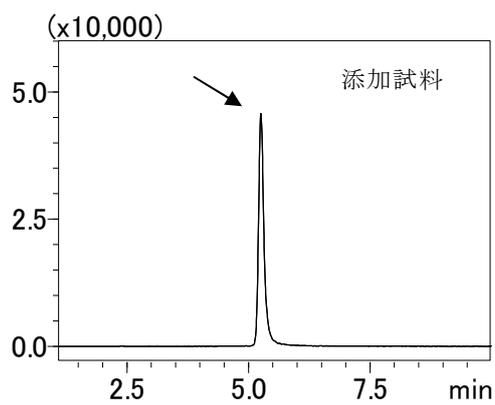
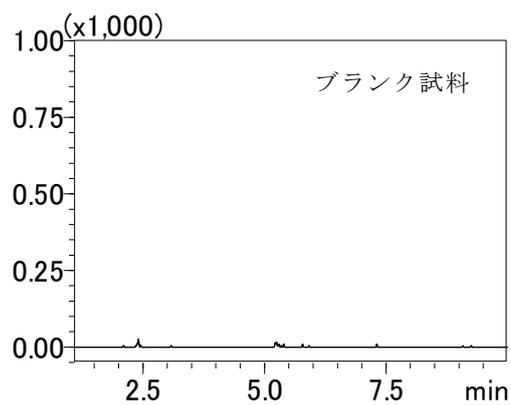


図14 牛の脂肪のSRMクロマトグラム [代謝物B添加]
(代謝物B ; m/z 358.1→79.1)

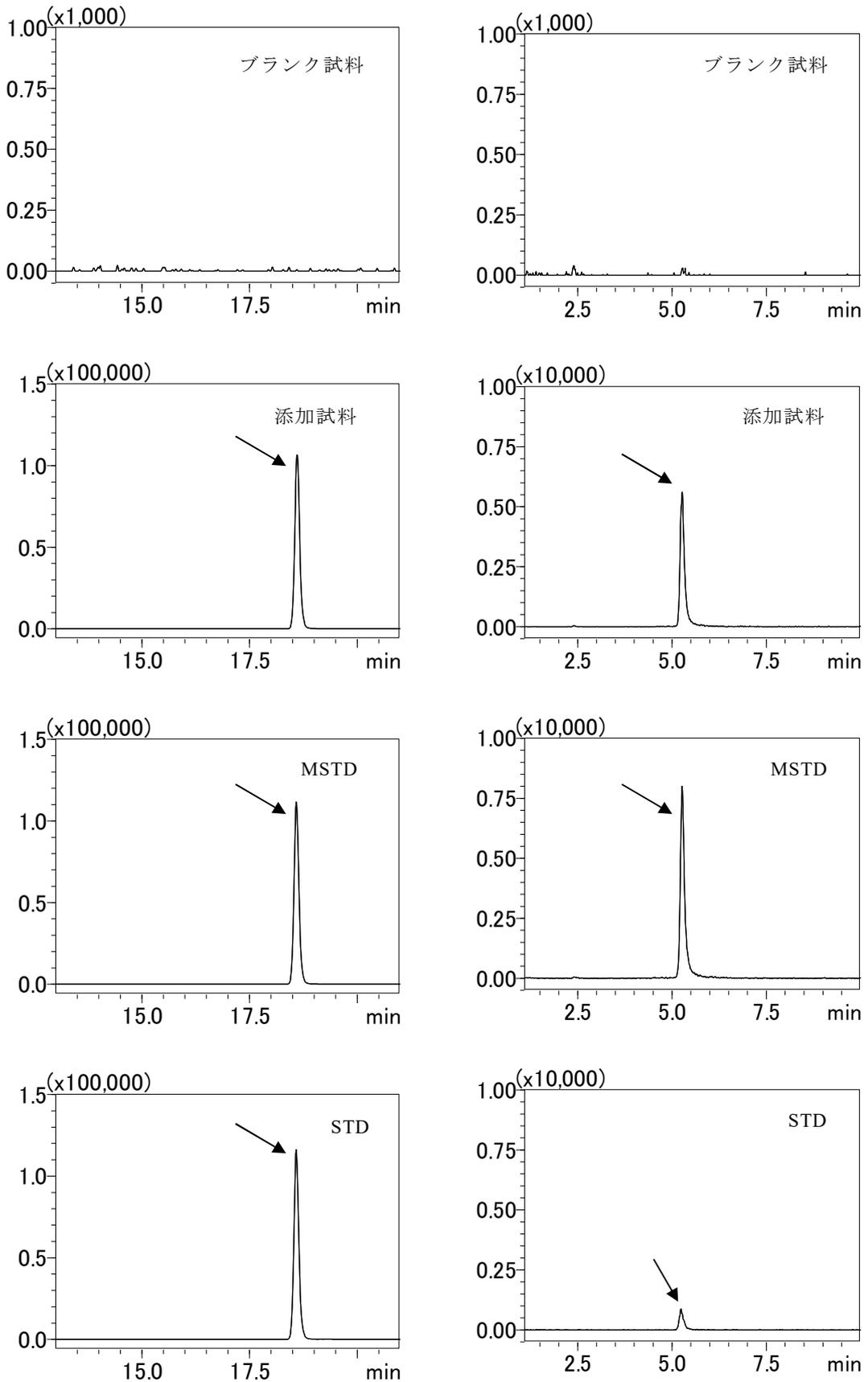


図15 牛の肝臓のSRMクロマトグラム [イソキサフルトール添加]
 (左：イソキサフルトール； m/z 358.1→79.1、右：代謝物B； m/z 358.1→79.1)

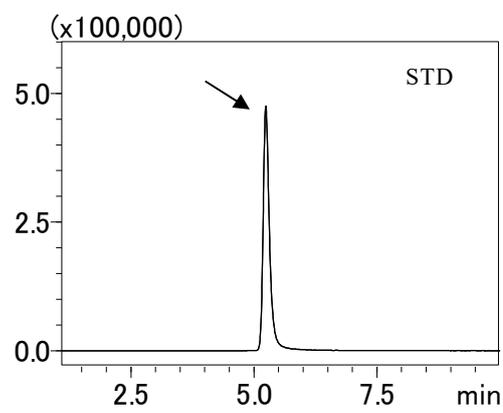
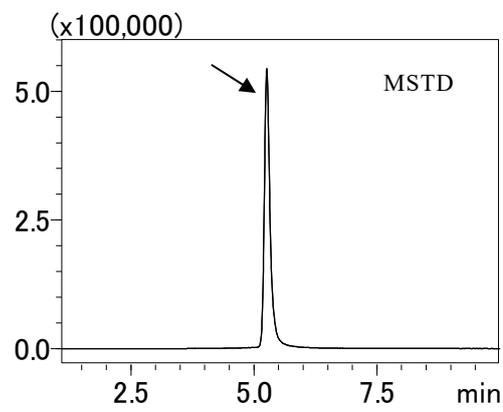
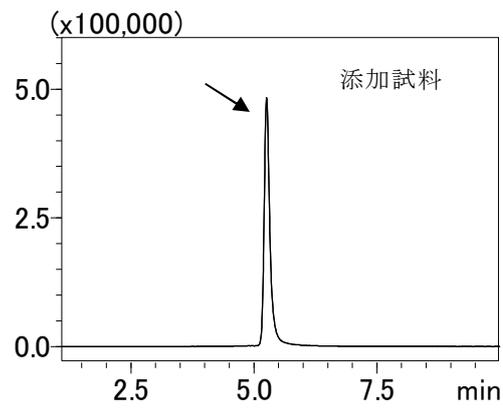
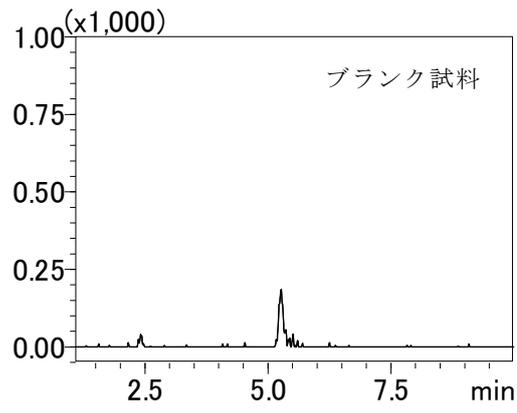


図16 牛の肝臓のSRMクロマトグラム [代謝物B添加]
(代謝物B ; m/z 358.1 \rightarrow 79.1)

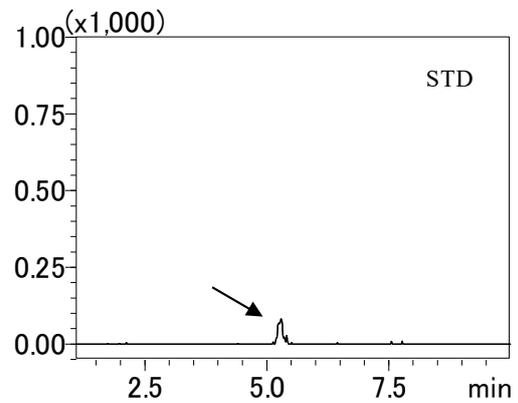
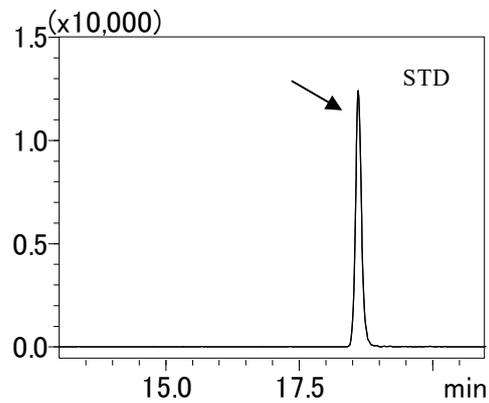
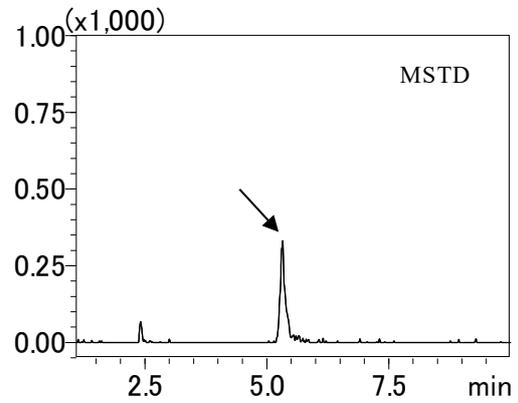
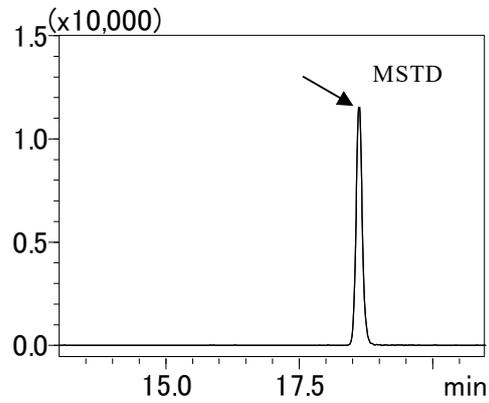
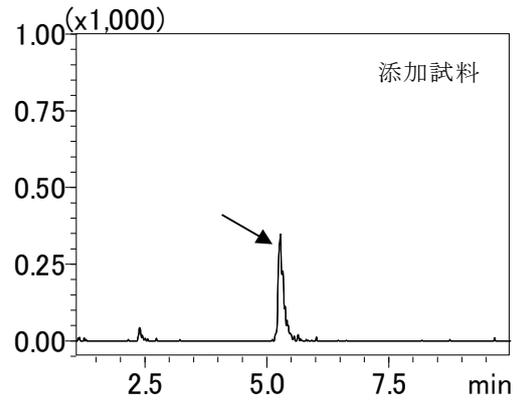
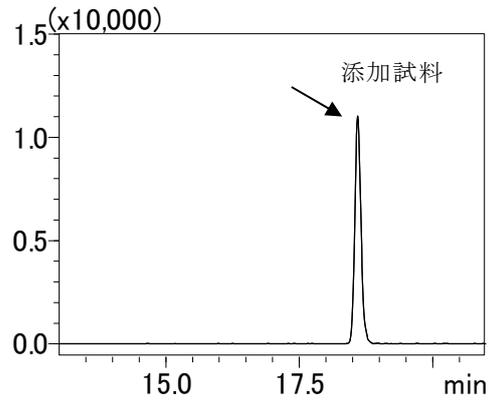
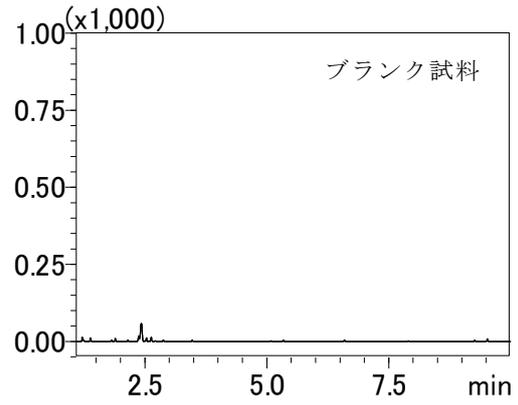
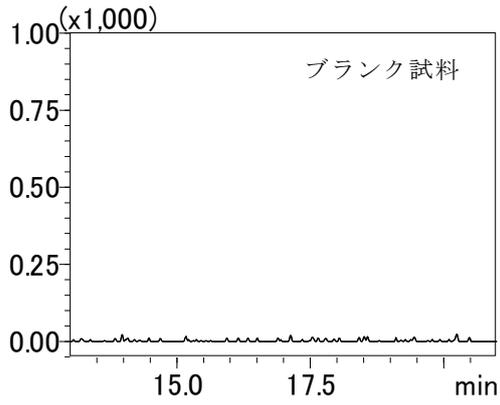


図17 牛乳のSRMクロマトグラム [イソキサフルトール添加]

(左：イソキサフルトール； m/z 358.1→79.1、右：代謝物B； m/z 358.1→79.1)

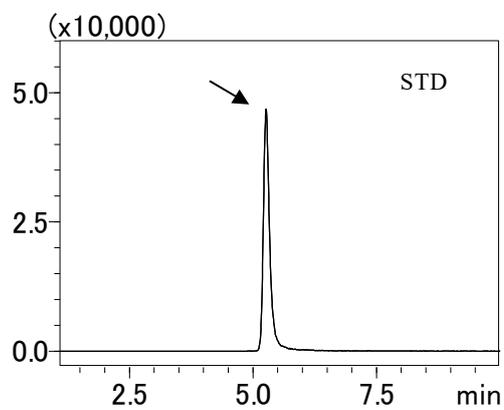
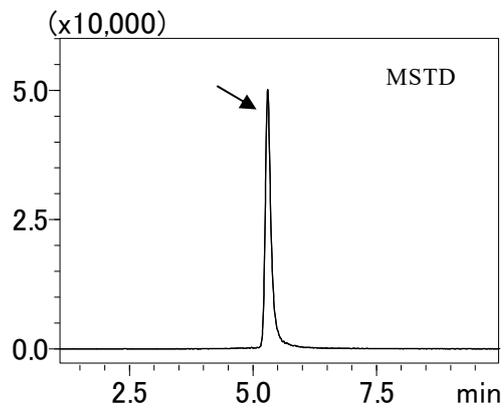
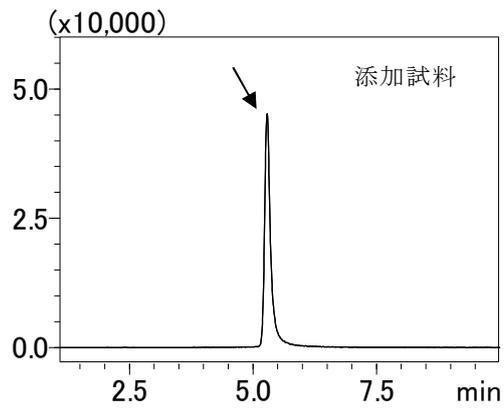
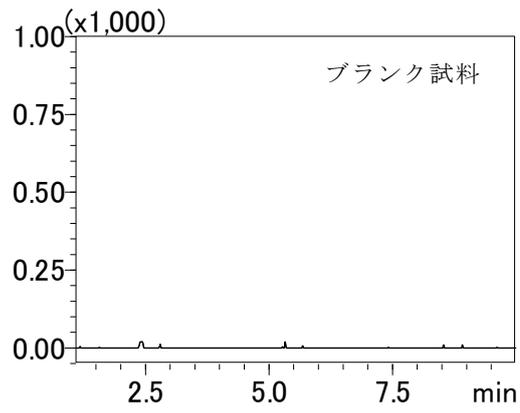


図18 牛乳のSRMクロマトグラム [代謝物B添加]
(代謝物B ; m/z 358.1 \rightarrow 79.1)

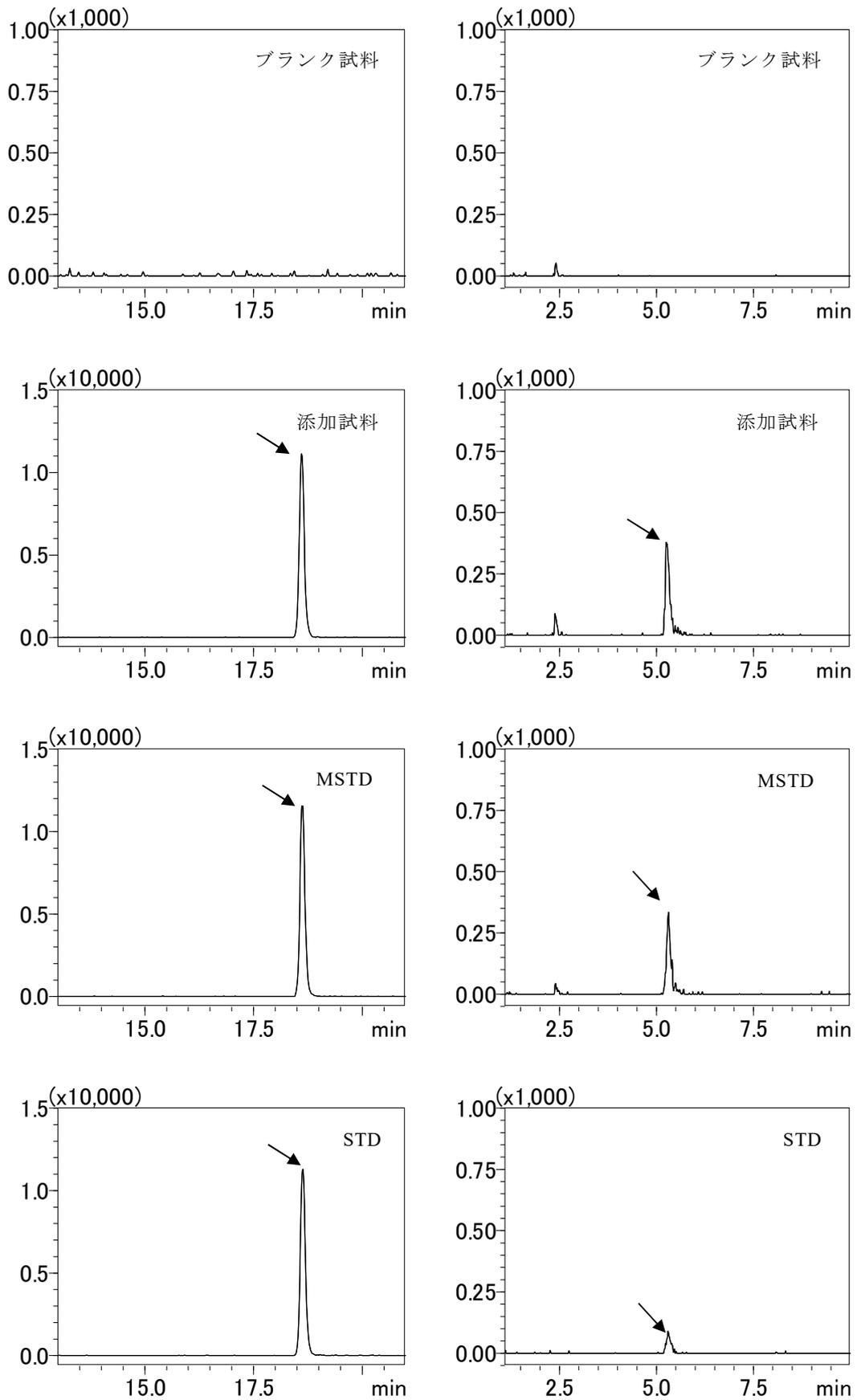


図19 鶏卵のSRMクロマトグラム [イソキサフルトール添加]

(左：イソキサフルトール； m/z 358.1→79.1、右：代謝物B； m/z 358.1→79.1)

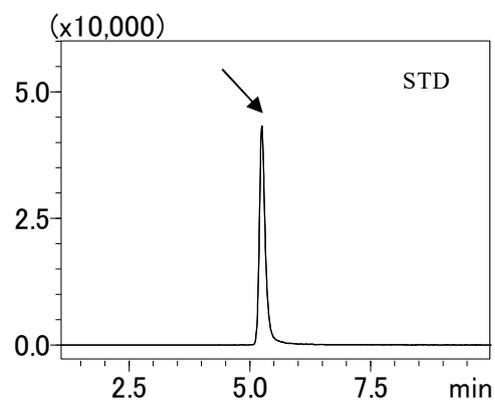
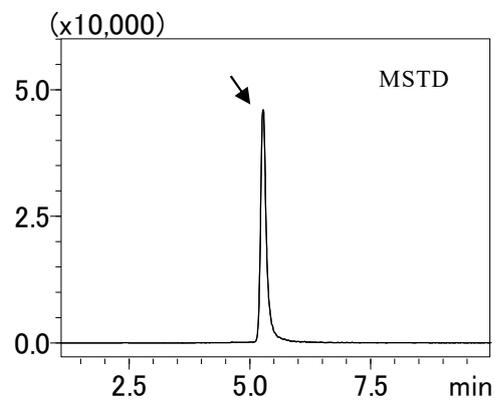
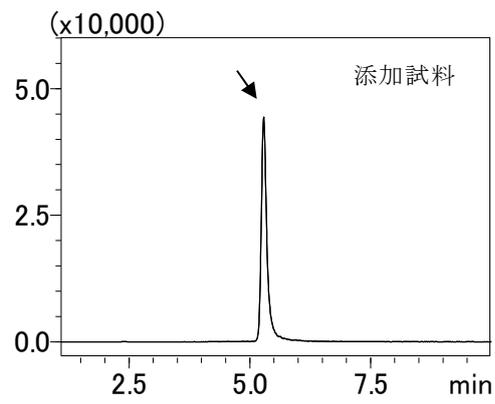
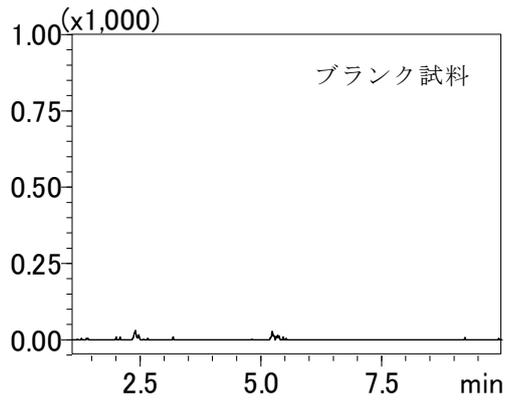


図20 鶏卵のSRMクロマトグラム [代謝物B添加]
(代謝物B ; m/z 358.1 \rightarrow 79.1)

添加回収試験における代表的なクロマトグラム（添加濃度：定量下限濃度）

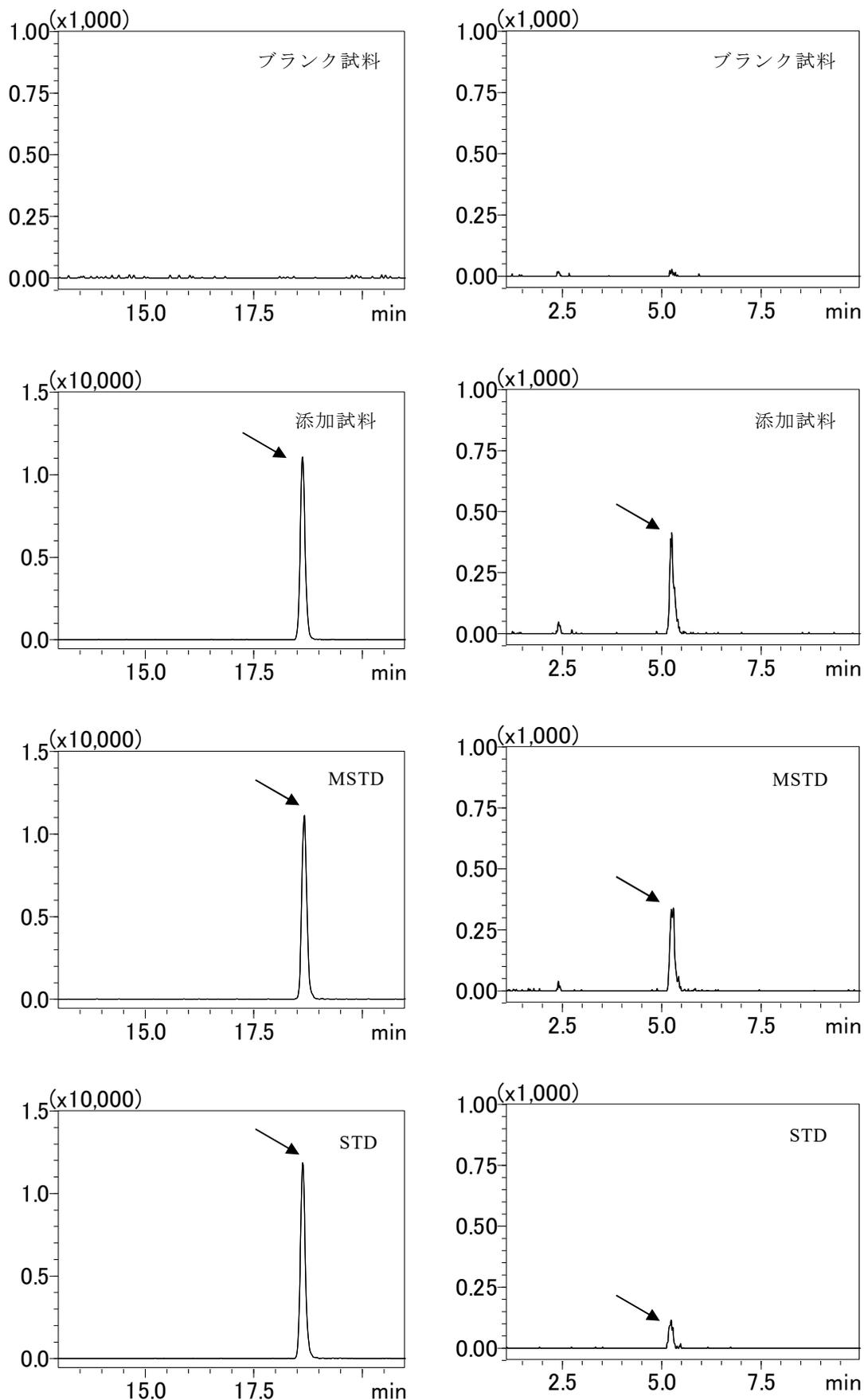


図21 牛の肝臓のSRMクロマトグラム [イソキサフルトール添加]

(左：イソキサフルトール； m/z 358.1→79.1、右：代謝物B； m/z 358.1→79.1)

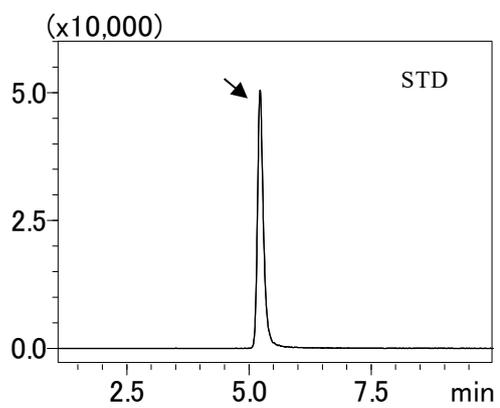
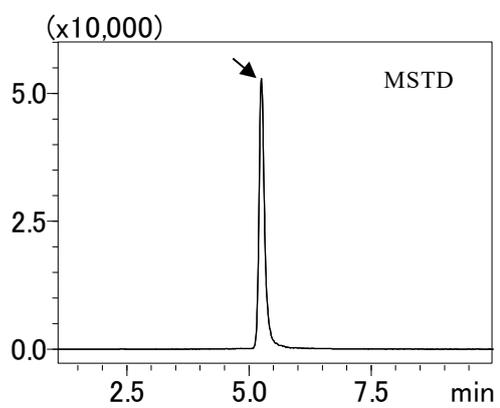
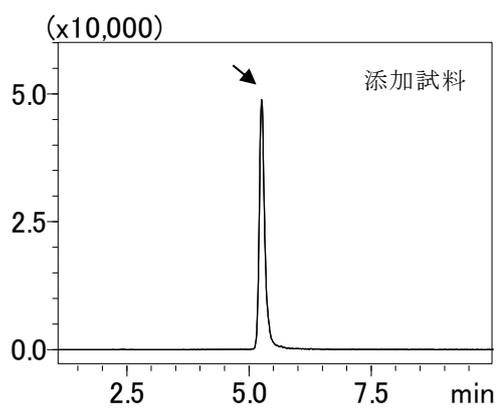
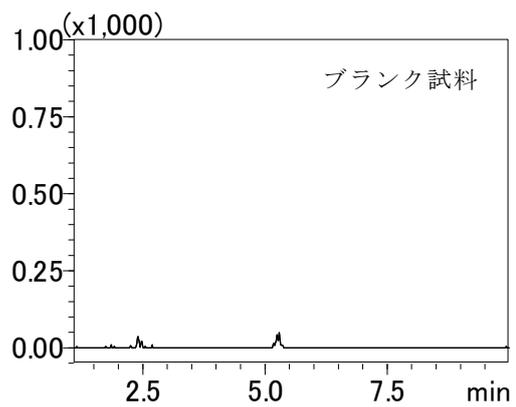


図22 牛の肝臓のSRMクロマトグラム [代謝物B添加]
(代謝物B ; m/z 358.1→79.1)

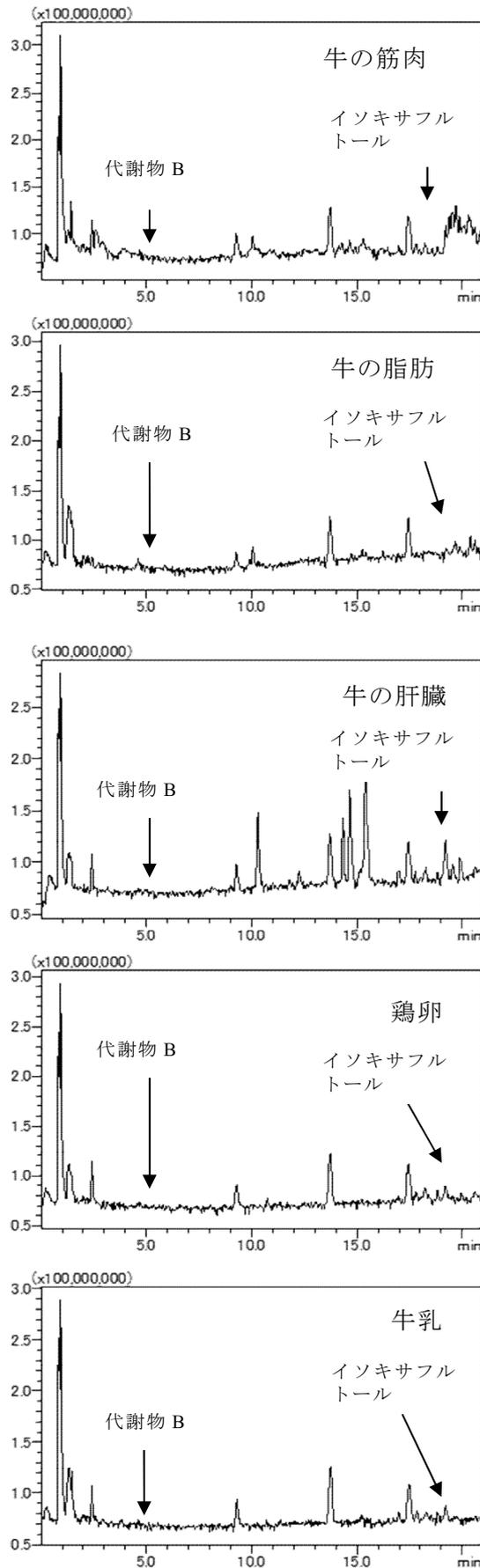


図23 ブランク試料のトータルイオンクロマトグラム
(スキャン範囲：50～500 amu)