

※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 試験法開発事業報告書

シクラニリド試験法（畜産物）

シクラニリド試験法（畜産物）の検討結果

〔緒言〕

1. 目的

シクラニリドは、オーキシンの輸送阻害作用を持つ植物成長調整剤（枯凋剤）である。植物成長調整剤であるエテホンと同時に使用され、エテホンと協調的に作用することによってオーキシンの輸送阻害作用を増強し、わたの開じょ促進に効果を示すと考えられる。

日本では農薬として登録されていない。ポジティブリスト制度導入に伴う暫定基準値が設定されている。

食品安全委員会ではシクラニリドの一日摂取許容量を 0.0063 mg/kg 体重/日と設定している。

薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会（平成 23 年 11 月 10 日）において、植物代謝及び家畜代謝試験において代謝物の生成が僅かであったことから、「残留の規制対象はシクラニリド本体のみとする」とされた。畜産物を対象としたシクラニリドの試験法は報告されていない。そこで、定量限界が一律基準 0.01 ppm を満たすシクラニリド個別試験法の検討を行った。

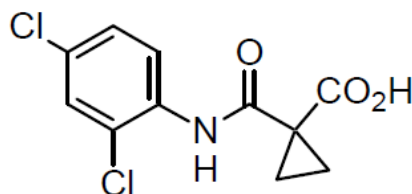
2. 分析対象化合物の構造式及び物理化学的性質

分析対象化合物

和名：シクラニリド

英名：Cyclanilide

構造式



分子式：C₁₁H₉Cl₂NO₃

分子量：274.10

Cas NO.：113136-77-9

化学名（IUPAC）：1-(2,4-dichloroanilino)carboxylic acid

外観：白色、結晶性粉末～粉末

密度：1.47 g/cm³ (20-25℃)

融点：195.5℃

解離定数（pKa）：3.5 (20-25℃)

ヘンリー定数：<7.41×10⁻⁵ Pa・m³/mol

蒸気圧：0.084 (50℃)

水溶解度 (20-25℃)：37.0 mg/L (pH5.2)、48.0 mg/L (pH7.0)、48.0 mg/L (pH9)

有機溶媒溶解度 (20-25℃)

アセトニトリル 5.0 g/L、アセトン 52.9 g/L、イソプロパノール 68.2 g/L、*n*-オクタノール 67.2 g/L、酢酸エチル 31.8 g/L、ジクロロメタン 1.7 g/L、*n*-ヘキサシ<0.001 g/L、メタノール 59.1 g/L

1-オクタノール/水分配係数（Log₁₀ Pow）：3.25 (20-25℃)

光分解に対して比較的安定。25℃、pH5～9 で加水分解しない

[出典]

- ① The Pesticide Manual 18th ed., British Crop Production Council
- ② 富士フイルム和光純薬 シクラニリド データシート

3. 基準値

食品分類名	基準値(ppm)
牛の筋肉	0.05
豚の筋肉	0.05
その他の陸棲哺乳類に属する動物の筋肉	0.05
牛の脂肪	0.1
豚の脂肪	0.1
その他の陸棲哺乳類に属する動物の脂肪	0.1
牛の肝臓	2
豚の肝臓	2
その他の陸棲哺乳類に属する動物の肝臓	2
牛の腎臓	2
豚の腎臓	2
その他の陸棲哺乳類に属する動物の腎臓	2
牛の食用部分	2
豚の食用部分	2
その他の陸棲哺乳類に属する動物の食用部分	2
乳	0.05

施行通知 食安発 0820 第 1 号(平成 24 年 8 月 20 日)

〔実験方法〕

1. 試料

検討には、牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓及び牛乳を試料として用いた。いずれも東京都内で流通していたものを購入した。

試料及び産地を以下に記載した。

試料名	産地
牛の筋肉	国産
牛の脂肪	国産
牛の肝臓	国産
牛乳	国産

各試料の採取方法を以下に記載した。

(1) 牛の筋肉

可能な限り脂肪層を除き、試料を細切した後、フードプロセッサーを用いて均一化した。

(2) 牛の脂肪

可能な限り筋肉層を除き、試料を細切した後、フードプロセッサーを用いて均一化した。

(3) 牛の肝臓

試料を細切した後、フードプロセッサーを用いて均一化した。

(4) 牛乳

振とう混和して均一化した。

2. 試薬・試液

シクラニリド標準品：純度 98%（富士フイルム和光純薬製）

アセトン：残留農薬試験用（富士フイルム和光純薬製）

アセトニトリル：残留農薬試験用（富士フイルム和光純薬製）及び LC-MS 用（富士フイルム和光純薬製）

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（500 mg 及び 1 g）：InertSep PSA（ジーエルサイエンス製）

塩酸：1 mol/L 塩酸 特級（富士フイルム和光純薬製）

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム（500 mg）：InertSep C₁₈（ジーエルサイエンス製）

ギ酸：LC-MS 用（富士フイルム和光純薬製）

グラファイトカーボンミニカラム（500 mg）：InertSep GC（ジーエルサイエンス製）

合成ケイ酸マグネシウムミニカラム（500 mg）：InertSep FL（ジーエルサイエンス製）

酢酸アンモニウム：高速液体クロマトグラフ用（富士フイルム和光純薬製）

酢酸エチル：残留農薬試験用（関東化学製）

シリカゲルミニカラム（500 mg）：InertSep SI（ジーエルサイエンス製）

n-ヘキサン：残留農薬試験用（富士フイルム和光純薬製）

メタノール：残留農薬試験用（富士フイルム和光純薬製）及び LC-MS 用（関東化学製）

精製水：Milli-Q®超純水装置（日本ミリポア製）

ケイソウ土カラム（5 mL 保持用）：InertSep K-solute（ジーエルサイエンス製）

シクラニリド標準原液：シクラニリド標準品 10 mg を精秤し、アセトンで溶解して 1,000 mg/L 溶液を調製した。

検量線用標準溶液：シクラニリド標準原液をメタノールで適宜希釈し、0.0000625～0.075 mg/L の各溶液を調製した。

添加用標準溶液①：シクラニリド標準原液をアセトンで希釈して 1 mg/L 溶液を調製した。

添加用標準溶液②：シクラニリド標準原液をアセトンで希釈して 5 mg/L 溶液を調製した。

添加用標準溶液③：シクラニリド標準原液をアセトンで希釈して 10 mg/L 溶液を調製した。
 添加用標準溶液④：シクラニリド標準原液をアセトンで希釈して 200 mg/L 溶液を調製した。
 ポリプロピレン製遠心管：100 mL（AGC テクノグラス製）、15 mL（コーニング製）

3. 装置

アスピレーター：MDA-015（アルバック機工製）
 遠心分離器：AX-321（トミー精工製）
 吸引マニホールド：GL-SPE吸引マニホールド（ジーエルサイエンス製）
 振とう機：SR-2WD（タイテック製）
 窒素吹き付け濃縮装置：TurboVap® LV（バイオタージ製）
 フードプロセッサ：MK-K81（パナソニック製）
 ホモジナイザー：ヒスコトロソ NS-52（マイクロテック・ニチオン製）

LC-MS/MS

装 置	型 式	会 社
MS	Xevo TQD	Waters
LC	ACQUITY H-CLASS	Waters
データ処理	MassLynx V.4.1 SCN962	Waters

4. 測定条件

LC-MS

LC 条件				
カラム	L-column2 ODS Metal-free（内径 2.0 mm, 長さ 100 mm, 粒子径 3 μm ：化学物質研究機構製）			
移動相流速（mL/min）	0.20			
注入量（ μL ）	5			
カラム温度（ $^{\circ}\text{C}$ ）	40			
移動相	A 液：0.1 vol%ギ酸・1 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 B 液：メタノール			
グラジエント条件	時間（分）	A 液（%）	B 液（%）	
	0	50	50	
	3	10	90	
	5	2	98	
	8	2	98	
	8.1	50	50	
	13.5	50	50	
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（－）			
キャピラリ電圧（kV）	1.0			
ソース温度（ $^{\circ}\text{C}$ ）	120			
脱溶媒温度（ $^{\circ}\text{C}$ ）	400			
コーンガス	窒素、50 L/hr			
脱溶媒ガス	窒素、650 L/hr			
コリジョンガス	アルゴン			
定量イオン（ m/z ）	シクラニリド：MS/MS: 272.0→159.9 [コーン電圧 25（V）、コリジョンエネルギー 24（eV）]			

定性イオン (m/z)	シクラニリド：MS/MS: 272.0→228.0 [コロン電圧 25 (V)、コリジョンエネルギー12 (eV)]
保持時間 (min)	シクラニリド：5.9

5. 定量

標準原液をメタノールで希釈して、

定量限界濃度：0.0000625、0.000125、0.0001875、0.00025、0.0003125 及び 0.000375 mg/L

基準値濃度（牛の筋肉・牛乳）：0.0003125、0.000625、0.0009375、0.00125、0.0015625 及び 0.001875 mg/L

基準値濃度（牛の脂肪）：0.000625、0.00125、0.001875、0.0025、0.003125 及び 0.00375 mg/L

基準値濃度（牛の肝臓）：0.0125、0.025、0.0375、0.05、0.0625 及び 0.075 mg/L の標準溶液を調製した。

この溶液 5 μ L を LC-MS/MS に注入して、得られたピーク面積を用いた絶対検量線法で定量した。

6. 添加試料の調製

(1) 牛の筋肉（添加濃度：0.05 mg/kg）

試料 10.0 g に添加用標準溶液②0.1 mL（アセトン溶液）を添加し、よく混合した後、30 分間放置した。

牛の筋肉（添加濃度：0.01 mg/kg）

試料 10.0 g に添加用標準溶液①0.1 mL（アセトン溶液）を添加し、よく混合した後、30 分間放置した。

(2) 牛の脂肪（添加濃度：0.1 mg/kg）

試料 10.0 g を採り、約 40℃で加温して融解させたものに添加用標準溶液③0.1 mL（アセトン溶液）を添加し、よく混合した後、放置（室温）して再度凝固させた後、30 分間放置した。

牛の脂肪（添加濃度：0.01 mg/kg）

試料 10.0 g を採り、約 40℃で加温して融解させたものに添加用標準溶液①0.1 mL（アセトン溶液）を添加し、よく混合した後、放置（室温）して再度凝固させた後、30 分間放置した。

(3) 牛の肝臓（添加濃度：2 mg/kg）

試料 10.0 g に添加用標準溶液④0.1 mL（アセトン溶液）を添加し、よく混合した後、30 分間放置した。

牛の肝臓（添加濃度：0.01 mg/kg）

試料 10.0 g に添加用標準溶液①0.1 mL（アセトン溶液）を添加し、よく混合した後、30 分間放置した。

(4) 牛乳（添加濃度：0.05 mg/kg）

試料 10.0 g に添加用標準溶液②0.1 mL（アセトン溶液）を添加し、よく混合した後、30 分間放置した。

牛乳（添加濃度：0.01 mg/kg）

試料 10.0 g に添加用標準溶液①0.1 mL（アセトン溶液）を添加し、よく混合した後、30 分間放置した。

7. 試験溶液の調製

概要

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後、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム及びエチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムで精製し、LC-MS/MS で定量及び確認した。

(1) 抽出

試料10.0 gを100 mLポリプロピレン製遠心管に採り、水10 mLを加え、ホモジナイズした後、アセトン50 mLを加え、さらにホモジナイズした。毎分3,000回転で5分間遠心分離し、上澄液を採取した。残留物にアセトン25 mLを加え、ホモジナイズした後、毎分3,000回転で5分間遠心分離した。得られた上澄液を合わせ、アセトンを加えて正確に100 mLとした。

抽出液5 mLを15 mLポリプロピレン製遠心管に採り、40 °C以下で窒素吹き付け濃縮装置を用いて溶媒を除去した。残留物に*n*-ヘキサン5 mL及び*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル5 mLを加え、超音波処理により溶解し、5分間振とうした。静置した後、アセトニトリル層を分取した。*n*-ヘキサン層に*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル5 mLを加え、上記と同様の操作を繰り返し、アセトニトリル層を合わせ、40 °C以下で窒素吹き付け濃縮装置を用いて濃縮乾固した。残留物に水及びメタノール（9：1）混液1 mLを加え、超音波溶解した。

(2) 精製

① オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム精製

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム[InertSep C₁₈（500 mg）]に0.1 mol/L 塩酸 10 mL、メタノール 5 mL 及び水 10 mL を順次注入し、各流出液は捨てた。オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムに（1）で得られた溶液を注入した後、メタノール・水（1：9）混液 10 mL 及びメタノール・水（1：1）混液 10 mL を順次注入し、流出液は捨てた。次いで、0.5 vol%ギ酸・メタノール溶液 10 mL を注入し、全溶出液を採り、40 °C以下で窒素吹き付け濃縮装置を用いて濃縮した。残留物をメタノール 1 mL に溶解した。

② 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[InertSep PSA（1 g/6 mL）]に0.1 mol/L 塩酸 10 mL 及びメタノール 10 mL を順次注入し、各流出液は捨てた。①で得られた溶液を注入した後、0.5 vol%ギ酸・メタノール溶液 15 mL を注入し、負荷液を含む全溶出液を採り、0.5 vol%ギ酸・メタノール溶液で正確に 20 mL にしたものを試験溶液とした。

[分析法フローチャート]

秤 取

↓ 試料 10.0 g

アセトン抽出

↓ 水 10 mL を加えホモジナイズ
↓ アセトン 50 mL を加えホモジナイズ
↓ 遠心分離（毎分 3,000 回転、5 分間）
↓ 残留物にアセトン 25 mL を加えホモジナイズ
↓ 遠心分離（毎分 3,000 回転、5 分間）
↓ 上澄液を合わせる
↓ アセトン 100 mL 定容
↓ 抽出液 5 mL を分取し、濃縮

濃縮（溶媒除去）

↓

アセトニトリル／ヘキサン分配（脱脂）

↓ *n*-ヘキサン 5 mL 及び *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 5 mL を加え振とう
↓ アセトニトリル層を分取
↓ *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 5 mL を加え振とう
↓ アセトニトリル層を分取し、先のアセトニトリルと合わせ、濃縮

濃縮（乾固）

↓ 残留物にメタノール・水（1：9）混液 1 mL を加え、超音波溶解

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム[InertSep C₁₈（500 mg/6 mL）]

↓ 0.1 mol/L 塩酸 10 mL、メタノール 5 mL 及び水 10 mL でコンディショニング

- ↓ メタノール・水（１：９）混液 １ mL に溶解した溶液を注入
- ↓ メタノール・水（１：９）混液 １０ mL 洗浄
- ↓ メタノール・水（１：１）混液 １０ mL 洗浄
- ↓ ０.５ vol%ギ酸・メタノール溶液 １０ mL 溶出

濃縮

- ↓ 残留物をメタノール １ mL に溶解（溶液①）

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[InertSep PSA（１ g/6 mL）]

- ↓ ０.１ mol/L 塩酸 １０ mL、メタノール １０ mL でコンディショニング
- ↓ 溶液①をカラムに注入
- ↓ ０.５ vol%ギ酸・メタノール溶液 １５ mL で溶出（全溶出液を採取）
- ↓ ０.５ vol%ギ酸・メタノール溶液で正確に ２０ mL に定容

試験溶液

↓

LC-MS/MS

8. マトリックス添加標準溶液の調製

ブランク試験溶液 0.5 mL を採り、窒素気流下で溶媒を除去した後、各検討対象食品の添加回収試験における回収率 100%相当濃度の溶媒標準溶液 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。

[結果及び考察]

1. 測定条件の検討

(1) MS条件の検討

スキャン測定におけるシクラニリドの ESI (+) モード測定時のマススペクトルを図 1 に、ESI (-) モード測定時のマススペクトルを図 2 に示した。ESI (+) モードではシクラニリドのプロトン付加分子 (m/z 274.0 $[M+H]^+$) を、ESI (-) モードでは既報¹⁻³⁾における検出イオンと一致した脱プロトン化分子 (m/z 272.0 $[M-H]^-$) のモノアイソトピック質量 272.99 に関するスペクトルが観察された。ESI (-) モードでのイオン強度は ESI (+) モードの 1/10 程度であったが、豚の肝臓で採用した精製条件においてもマトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対する面積比が 0.51 及び 0.61 (0.01 mg/kg 及び 2 mg/kg 添加相当濃度) と夾雑成分の影響を受けた。ESI (-) モードでは面積比が 0.94 及び 0.97 と夾雑成分の影響が ESI (+) モードより少ないことから、ESI (-) モードを用いることとした。

シクラニリドの脱プロトン化分子のうち最も強度の高い m/z 272.0 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図 3 及び図 4 に示した。 m/z 272.0 をプリカーサーイオンとした場合のプロダクトイオンとして、 m/z 159.9 及び 228.0 が観測された。SRM 測定を行った結果、高い SN 比が得られた m/z 159.9 を定量用イオンに、 m/z 228.0 を定性用イオンとすることとした。

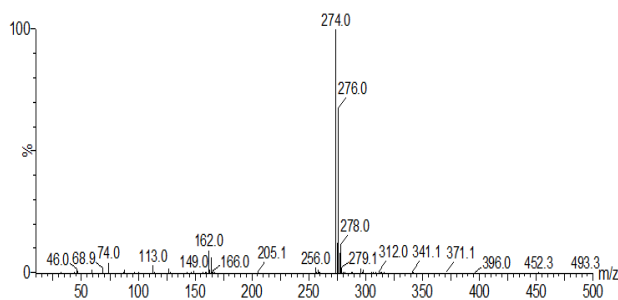


図 1 シクラニリドのマススペクトル
スキャン範囲： m/z 30～500
測定条件：ESI (+)
CV=24 V (CV：cone voltage)
シクラニリド：10 mg/L

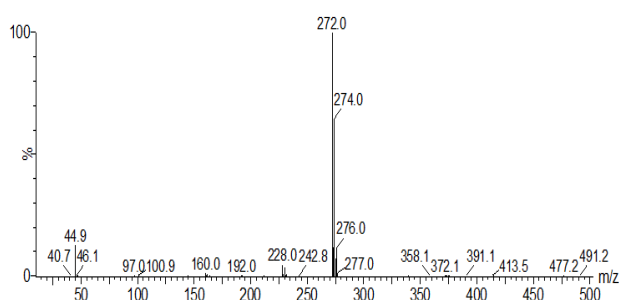


図 2 シクラニリドのマススペクトル
スキャン範囲： m/z 30～500
測定条件：ESI (-)
CV=25 V (CV：cone voltage)
シクラニリド：10 mg/L

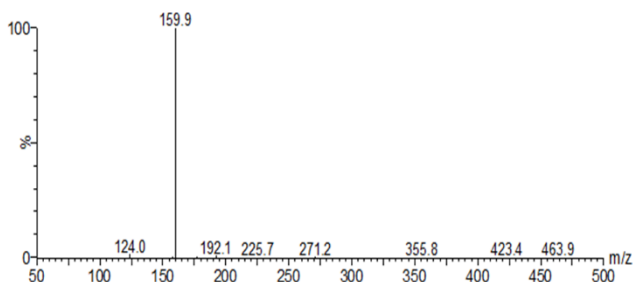


図 3 シクラニリドのプロダクトイオン
スペクトル
プリカーサーイオン： m/z 272.0
測定条件：ESI (-)
CV=25 V, CE=24 eV (定量用)
(CV：cone voltage, CE：collision energy)
シクラニリド：0.1 mg/L

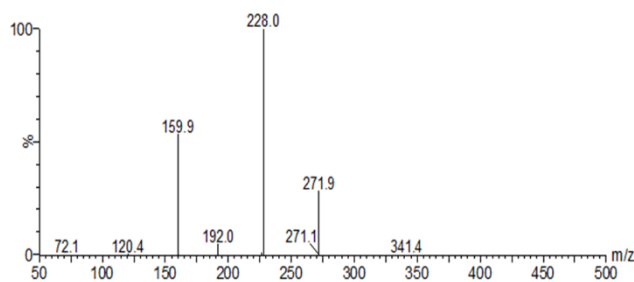


図 4 シクラニリドのプロダクトイオン
スペクトル
プリカーサーイオン： m/z 272.0
測定条件：ESI (-)
CV=25 V, CE=12 eV (定性用)
(CV：cone voltage, CE：collision energy)
シクラニリド：0.1 mg/L

分析カラムは、汎用されているオクタデシルシリル（ODS）化シリカゲル充填カラム CAPCELL PAK C18 MGII（内径 2.1 mm、長さ100 mm、粒子径5 μm ：大阪ソーダ製）、Inertsil ODS-3（内径 2.1 mm、長さ100 mm、粒子径3 μm ：ジーエルサイエンス製）、Inertsil ODS-4（内径 2.1 mm、長さ100 mm、粒子径3 μm ：ジーエルサイエンス製）、L-column2 ODS（内径 2.0 mm、長さ100 mm、粒子径3 μm ：化学物質評価研究機構製）、L-column2 ODS Metal-free（内径 2.0 mm、長さ100 mm、粒子径3 μm ：化学物質評価研究機構製）、Mightysil RP-18（内径 2.1 mm、長さ100 mm、粒子径3 μm ：関東化学製）及びXselect HSS T3（内径 2.1 mm、長さ100 mm、粒子径2.5 μm ：ウォーターズ製）を比較検討した結果、L-column2 ODS Metal-freeを使用することで、シクラニリドの保持、ピーク強度及び再現性について良好な結果が得られた（図5）。

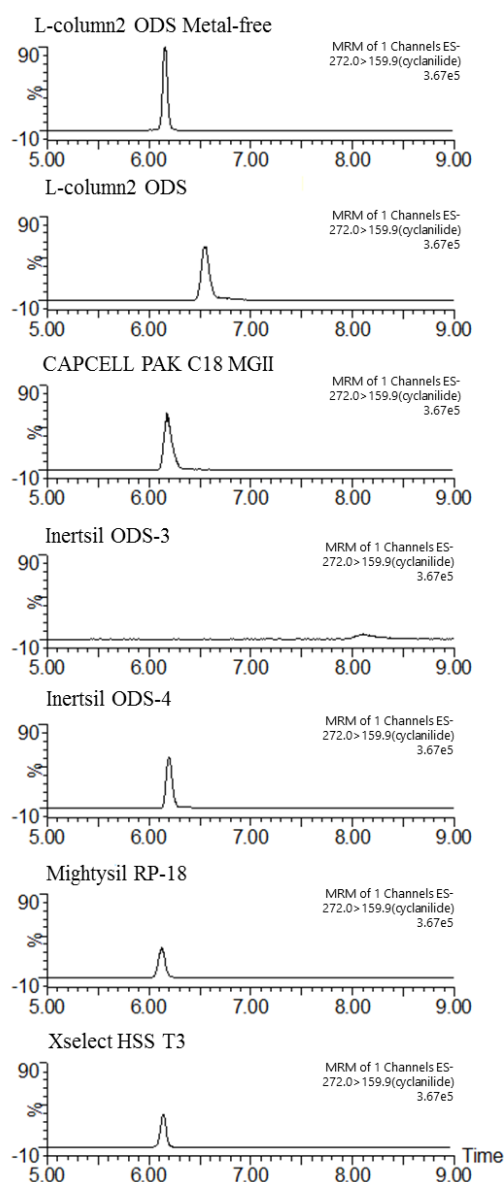


図5 シクラニリドの各カラムにおけるピーク形状
シクラニリド：0.01 mg/L
移動相：0.1 vol%ギ酸・1 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液

移動相条件については、ギ酸及び酢酸アンモニウム溶液について検討したところ、ギ酸及び酢酸アンモニウム溶液との混液でシクラニリドのピーク強度が最も高く、また、アセトニトリル混液よりもメタノール混液のほうがピーク強度及び形状が良好であったため、ギ酸・酢酸アンモニウム溶液及びメタノールとの混液について検討した。ギ酸については0.05～0.5 vol%濃度を、酢酸アンモニウムについては1～5 mmol/L について比較したところ、0.1 vol%ギ酸・1 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液で保持、ピーク強度及びピーク形状が良好となったことから、移動相は0.1 vol%ギ酸・1 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液及びメタノールを用いることとした（表1、図6及び7）。

表1 ギ酸及び酢酸アンモニウム添加濃度によるシクラニリドピーク面積値

溶液	濃度	ピーク面積値
ギ酸濃度 (vol%)	0.05	883,230
	0.1	1,241,409
	0.2	901,020
	0.3	885,794
	0.4	815,165
	0.5	793,640
酢酸アンモニウム濃度 (mmol/L)	1	1,014,945
	2	999,674
	3	971,823
	4	854,481
	5	786,739

シクラニリド : 0.01 mg/L

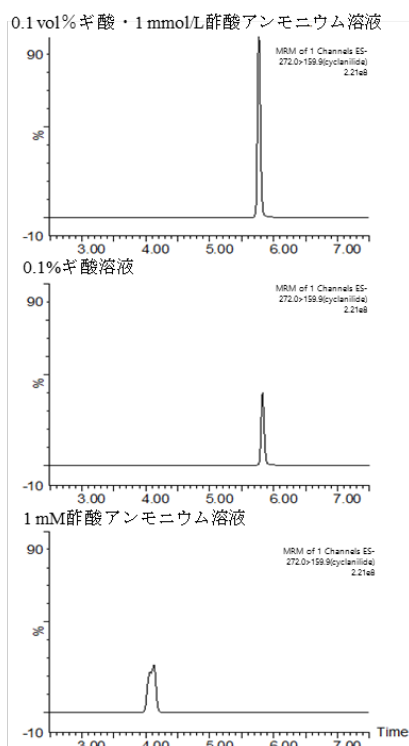


図6 シクラニリドの各移動相におけるピーク形状
シクラニリド : 0.01 mg/L

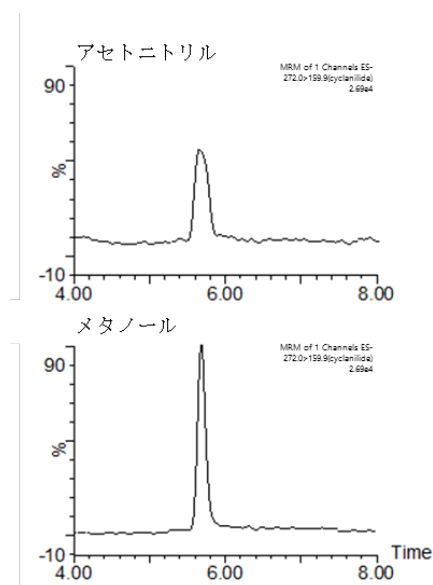


図7 シクラニリドのアセトニトリル及びメタノール移動相におけるピーク形状
シクラニリド : 0.0025 mg/L

シクラニリドのピーク強度を確保するためには 0.1 vol% ギ酸・1 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液及びメタノール（1：9）混液程度が必要であったが、イソクラティック測定では保持時間が 2 分と早く、ピーク形状が不十分であった。ピーク形状及び強度を確保するためグラジエント測定の条件を検討した。

0.1 vol% ギ酸・1 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液及びメタノール（1：1）から 3 分までに（1：9）、5 分までに（1：49）のグラジエント条件とし、分析カラムからの試料成分流出のため、（1：49）で 3 分間保持した場合、シクラニリドの保持時間は 5.9 分であった。

(3) 検量線

図 8-1 に 0.0000625～0.000375 mg/L 及び図 8-2 に 0.0125～0.075 mg/L の濃度範囲で作成した検量線を示した。検量線の決定係数は、0.999 以上であり良好な直線性を示した。

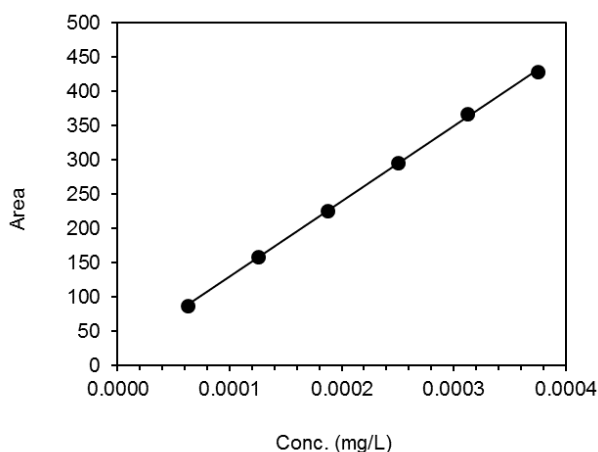


図 8-1 シクラニリド検量線の例
 $y = 1098194x + 19.987$
 $r^2 = 0.999566$

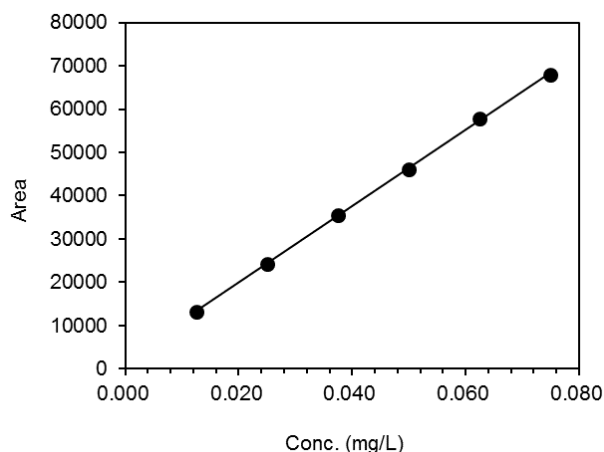


図 8-2 シクラニリド検量線の例
 $y = 880131x + 23333.3$
 $r^2 = 0.999737$

(4) 定量限界

定量限界の算出結果を以下に示した。

$$\text{シクラニリド} : \left[\frac{20(\text{mL})}{0.5(\text{g})} \right] \times \left[\frac{0.00125(\text{ng})}{5(\mu\text{L})} \right] = 0.01 \text{ mg/kg}$$

2. 試験溶液調製法の検討

(1) 抽出溶媒の検討

抽出溶媒としてアセトニトリル、アセトン、アセトン及び *n*-ヘキサン（1：1）混液、酢酸エチル及びメタノールについて検討した。水 10 mL にシクラニリド 5 mg/L（アセトン溶液）0.1 mL を添加し、各溶媒 50 mL、25 mL で 1 分間ホモジナイズ後、毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離した。得られた上澄液または上層を 100 mL に定容後、5 mL 分取し、メタノールに置換後、LC-MS/MS で測定した。表 2 に添加したシクラニリドの回収結果を示した。

アセトニトリル、アセトン及びメタノールで 100% の回収率が得られたが、脂肪を十分に分散可能なアセトン及びメタノールを用いて検討を行うこととした。

表 2 各溶媒からのシクラニリドの回収結果

化合物	回収率(%)		
	50 mL (1回目)	25 mL (2回目)	合計
アセトニトリル	96	4	100
アセトン	96	4	100
アセトン・ <i>n</i> -ヘキサン(1:1)	6	7	13
酢酸エチル	71	5	76
メタノール	95	5	100

添加量 : 0.5 µg (*n*=1)

次に、牛の肝臓を試料として、アセトン及びメタノールを用いて抽出した溶液をアセトニトリル／ヘキサン分配後、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム及びエチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムで精製し、LC-MS/MS で測定した。その結果、メタノール抽出液よりもアセトン抽出液のほうが試料由来の夾雑成分の影響が少なかった (図 9)。また、メタノールよりも濃縮時間が短時間であることから、アセトンを抽出溶媒に用いることとした。

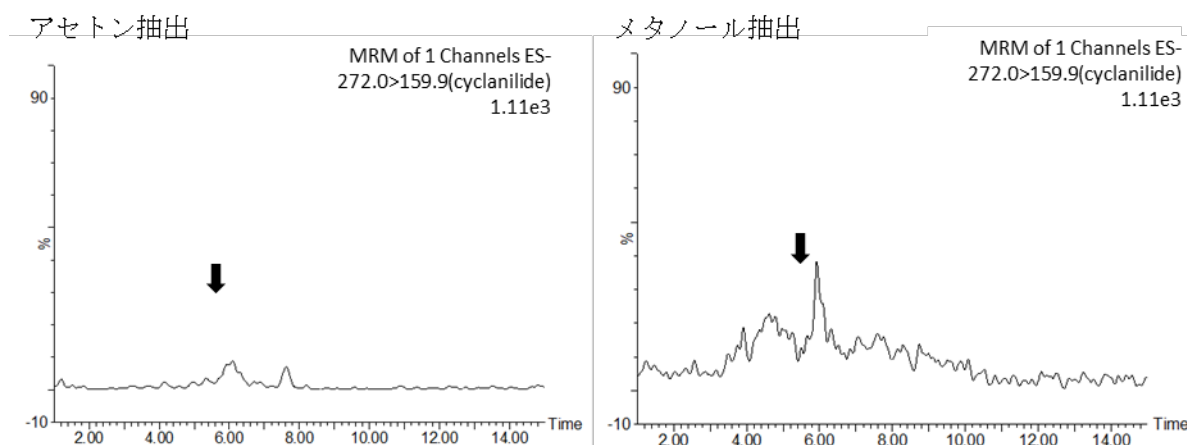


図 9 牛の肝臓無添加溶液における夾雑成分の比較

(2) 抽出時分解の有無の確認

牛の肝臓に標準品を添加後、放置中に分解が起きるか確認した。

牛の肝臓に 5 mg/L (アセトン溶液) 0.1 mL を添加し、各時間放置後、水 10 mL を加え、アセトン抽出後、アセトニトリル／ヘキサン分配で脱脂し、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム及びエチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムで精製を行った後、試験溶液とした。絶対検量線法により算出したシクラニリドの回収結果を表 3 に示した。

いずれも 90%程度の回収率となり、特に分解はみられなかった。

表 3 抽出時放置時間による分解の確認

放置時間 (分)	回収率(%)
0	91
10	90
20	90
30	91

添加量 : 0.5 µg (*n*=1)

(3) 脱脂操作の検討

① アセトニトリル／ヘキサン分配

シクラニリドの 0.05 mg/L (アセトニトリル溶液) 0.5 mL を *n*-ヘキサン 30 mL に加え、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL で分液ロートを用いて 3 回抽出を行った場合と、15 mL ポリプロピレン製遠心管にシクラニリドの 0.05 mg/L (アセトニトリル溶液) 0.5 mL を加え、溶媒を除去後、*n*-ヘキサン 5 mL を加え、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 5 mL で 3 回抽出を行った場合の結果を表 4 に示した。

いずれも 2 回の抽出で 100% の回収が得られたが、簡易・迅速化のため、溶媒量が少ないポリプロピレン製遠心管でアセトニトリル／ヘキサン分配を行うこととした。

牛の脂肪をアセトンで抽出し、100 mL に定容後、その 5 mL を分取し、溶媒を除去後、*n*-ヘキサン 5 mL を加え、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 5 mL で 3 回抽出し、溶媒を除去したところ、顕著な脂肪の残留は見られず、脱脂効果が十分であることを確認した。

表4 アセトニトリル／ヘキサン分配の検討

器具	転溶回数			回収率(%)
	1回	2回	3回	
分液ロート (100 mL)	96	4	0	100
ポリプロピレン製遠心管 (15 mL)	97	3	0	100

添加量 : 0.025 µg (*n*=1)

(4) 精製法の検討

① オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム[InertSep C₁₈ (500 mg/6 mL)]

精製に汎用され、既報^{2,3)}で用いられている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た。

カラムをメタノール 10 mL で予備洗浄した後、シクラニリド 0.05 mg/L (アセトニトリル溶液) 0.5 mL を負荷し、メタノールで溶出したが、シクラニリドは溶出されなかった。

カラムを 0.1 vol% ギ酸・メタノール溶液 10 mL で予備洗浄した後、シクラニリド 0.05 mg/L (メタノール) 0.5 mL を負荷し、0.1 vol% ギ酸・メタノール溶液で溶出したときの溶出状況を表 5 に示した。シクラニリドは 20 mL で 100% 回収された。

表 5 オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムミニカラムからの溶出状況

溶出液	溶出液量(mL)							回収率(%)
	0-5	5-10	10-15	15-20	20-25	25-30	30-35	
0.1 vol% ギ酸・メタノール溶液	0	42	28	30	0	0	0	100

添加量 : 0.025 µg (*n*=1)

ミニカラムに含まれる金属の影響を減少させ、固相を酸性にすることで溶出液量の少量化を検討した。カラムを 0.1 mol/L 塩酸 10 mL 及び 0.1 vol% ギ酸・メタノール溶液 10 mL で予備洗浄した後、シクラニリド 0.05 mg/L (メタノール溶液) 0.5 mL を負荷し、0.1 ~ 1 vol% ギ酸・メタノール溶液で溶出したときの溶出状況を表 6 に示した。シクラニリドはギ酸が 0.5 vol% 以上の濃度の場合に 10 mL で 100% 回収されたため、0.1 vol% ギ酸・メタノール溶液 10 mL で溶出することとした。

マトリックスの影響を確認するため、アセトン抽出、アセトニトリル／ヘキサン分配、及びオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム精製を行った牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓及び牛乳の試料溶

液を用いて 0.01 mg/kg 添加相当濃度（溶液中濃度 0.00025 mg/L）でのマトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対する面積比を求めた。

その結果、牛の筋肉 1.25、牛の脂肪 2.80、牛の肝臓 0.54 及び牛乳 0.90 と牛乳以外は精製が不十分であった。

表 6 塩酸洗浄後の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

溶出液	溶出液量(mL)							回収率 (%)
	0-5	5-10	10-15	15-20	20-25	25-30	30-35	
0.1 vol%ギ酸・メタノール溶液	95	4	1	0	0	0	0	100
0.2 vol%ギ酸・メタノール溶液	95	4	1	0	0	0	0	100
0.5 vol%ギ酸・メタノール溶液	98	2	0	0	0	0	0	100
1 vol%ギ酸・メタノール溶液	98	2	0	0	0	0	0	100

添加量：0.025 µg (n=1)

次に洗浄操作が可能か、メタノール及び水との混液でのカラムへの保持を検討した。

カラムを 0.1 mol/L 塩酸 10 mL、メタノール 5 mL 及び水 10 mL で予備洗浄した後、シクラニリド 0.05 mg/L（メタノール・水（1：9）混液）0.5 mL を負荷し、メタノール・水（1：9）、（1：4）、（3：7）、（2：3）及び（1：1）混液各 5 mL で順次溶出したところ、シクラニリドは溶出されなかった。そこで、メタノール・水混液で負荷し、カラムに保持させ、メタノール・水混液で洗浄後、0.5 vol%ギ酸・メタノール溶液で溶出することを検討した。

カラムへの保持の確認のため、牛の肝臓における 0.01 mg/kg 添加相当濃度（溶液中濃度 0.0005 mg/L）でのマトリックス添加標準溶液をカラムに負荷し、メタノール・水（1：1）混液で溶出したところ、10 mL で 50%のシクラニリドの溶出が見られ、保持が不十分であった。

次にマトリックス添加標準溶液をカラムに負荷し、メタノール・水（1：9）混液 10 mL、次いでメタノール・水（1：1）混液 10 mL で溶出した場合は溶出されず、カラムに保持された。順次メタノール濃度をあげることでマトリックスの影響を受けずにカラムに保持されたことから、負荷はメタノール・水（1：9）混液に溶解して行い、メタノール・水（1：9）混液 10 mL、次いでメタノール・水（1：1）混液 10 mL で洗浄し、0.5 vol%ギ酸・メタノール溶液 10 mL で溶出することとした。

マトリックスの影響を確認するため、最もマトリックスの影響が大きい牛の肝臓における 0.01 mg/kg 添加相当濃度（溶液中濃度 0.00025 mg/L）でのマトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対する面積比を求めた。その結果、0.67 と精製が不十分であった。

② 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 [InertSep PSA (500 mg/6 mL)]

脂肪酸除去のためエチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムについて検討した。

カラムをメタノール 10 mL で予備洗浄した後、シクラニリド 0.05 mg/L（メタノール溶液）0.5 mL を負荷し、メタノール 50 mL で溶出したが、シクラニリドは溶出されなかった。

次に、0.1 vol%ギ酸・メタノール溶液を用いて溶出を行った。カラムを 0.1 vol%ギ酸・メタノール溶液 10 mL で予備洗浄した後、シクラニリド 0.05 mg/L（メタノール溶液）0.5 mL を負荷し、0.1 vol%ギ酸・メタノール溶液 50 mL で溶出した結果、シクラニリドは溶出されなかった。

カラムを 0.1 mol/L 塩酸 10 mL で洗浄し、次いでカラムを 0.1 vol%ギ酸・メタノール溶液 10 mL で予備洗浄した後、シクラニリド 0.05 mg/L（メタノール溶液）0.5 mL を負荷し、0.1 vol%ギ酸・メタノール溶液で溶出したときの溶出状況を表 7 に示した。シクラニリドは 10 mL で 100%回収された。

充てん剤を塩酸で洗浄することにより、充てん剤に含有されている金属が除去され、金属による吸着の影響がなくなったこと及び充てん剤が酸性になったため、シクラニリドの溶出率が高まり、0.1 vol%ギ酸・メタノール溶液 10 mL で溶出されたと考えられる。

表7 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

ミニカラム	0.1 vol%ギ酸・メタノール溶液量(mL)							回収率 (%)
	0-5	5-10	10-15	15-20	20-25	25-30	30-35	
InertSep PSA (500 mg/6 mL)	40	60	0	0	0	0	0	100

添加量：0.025 µg (n=1)

次に、マトリックスの影響を確認するため、アセトン抽出、アセトニトリル/ヘキサン分配及びC18ミニカラム精製を行った牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓及び牛乳の試料溶液を用いて0.01 mg/kg 添加相当濃度（溶液中濃度 0.0005 mg/L）でのマトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対する面積比を求めた(n=2)。

その結果、牛の筋肉 0.86、牛の脂肪 0.58、牛の肝臓 0.50 及び牛乳 0.85 と牛の脂肪及び牛の肝臓でイオン化抑制が認められた。

③ 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 [InertSep PSA (1 g/6 mL)]

充てん量を 500 mg から 1 g に増量して精製効果を検討した。

カラムを 0.1 mol/L 塩酸 10 mL で予備洗浄し、0.1 vol%ギ酸・メタノール溶液 10 mL で予備洗浄した後、シクラニリド 0.05 mg/L（メタノール溶液）0.5 mL を負荷し、0.1 ~1 vol%ギ酸・メタノール溶液で溶出したときの溶出状況を表 8 に示した。

シクラニリドはギ酸が 0.5 vol%以上の濃度の場合に 15 mL で 100%回収されたため、0.5 vol%ギ酸・メタノール溶液 15 mL で溶出することとした。

表8 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 (1 g) からの溶出状況

溶出液	溶出液量(mL)							回収率 (%)
	0-5	5-10	10-15	15-20	20-25	25-30	30-35	
0.1 vol%ギ酸・メタノール溶液	90	7	2	1	0	0	0	100
0.2 vol%ギ酸・メタノール溶液	95	3	1	1	0	0	0	100
0.5 vol%ギ酸・メタノール溶液	97	2	1	0	0	0	0	100
1 vol%ギ酸・メタノール溶液	98	1	1	0	0	0	0	100

添加量：0.025 µg (n=1)

次に、マトリックスの影響を確認するため、牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓及び牛乳における 0.01 mg/kg 添加相当濃度（溶液中濃度 0.0005 mg/L）でのマトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対する面積比を求めた(n=2)。

その結果、牛の筋肉 0.84、牛の脂肪 0.83、牛の肝臓 0.62 及び牛乳 0.94 と牛の肝臓でイオン化抑制が認められた。

④ オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム精製後のエチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラム精製の検討

操作の簡易化のため、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムをメタノール・水混液で洗浄後、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 (1 g) と連結して 0.5 vol%ギ酸・メタノール溶液で溶出したが、牛の肝臓におけるマトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対する面積比は 0.70 と改善しなかった。

次に、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムで精製し、濃縮したものをエチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラム (1 g) で精製することを検討した。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 (1 g) 内での試料溶液のバンド幅を狭くすることで溶出される

夾雑成分量が減少するか確認した。

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムを 0.1 mol/L 塩酸 10 mL、メタノール 5 mL 及び水 10 mL で予備洗浄した後、牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓及び牛乳の無添加試料溶液（アセトン抽出、アセトニトリル/ヘキサン分配濃縮後、メタノール・水（1：9）混液 1ml に溶解）を負荷し、メタノール・水（1：9）混液 10 mL 及びメタノール・水（1：1）混液 10 mL で洗浄し、0.5 vol% 酢酸・メタノール溶液 10 mL で溶出後、濃縮した。残さをメタノール 1 mL に溶解し、0.1 mol/L 塩酸 10 mL、メタノール 10 mL で予備洗浄したエチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラム（1 g）に負荷後、0.5 vol% 酢酸・メタノール溶液 15 mL で溶出し、0.5 vol% 酢酸・メタノール溶液で 20 mL に定容した。

牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓及び牛乳における 0.01 mg/kg 添加相当濃度（溶液中濃度 0.00025 mg/L）でのマトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対する面積比を求めた（*n*=2）。

その結果、牛の筋肉 1.02、牛の脂肪 0.94、牛の肝臓 0.94 及び牛乳 1.00 とマトリックスの影響を十分に軽減可能であることを確認した。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への負荷量を 1 mL と少量にし、ミニカラム内で負荷液のバンド幅を狭めると色素や夾雑成分がミニカラムに保持され、精製効果が高まる結果が得られた。

3. 添加回収試験

牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓及び牛乳の4食品を試料に用いて、実験方法の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クロマトグラムを図 10～17 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トータルイオンクロマトグラムを図 18 に示した。

(1) 選択性

選択性の検討結果を表9に示した。検討したいずれの試料においても、シクラニドの定量を妨害するピークは認められず、選択性は良好であった。

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}		
					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	シクラニド	牛の筋肉	0.01	0.05	基準値	0.05	< 0.100	面積	0	0	0	1021	1039	1030	0.000	○
		牛の脂肪	0.01	0.1	基準値	0.1	< 0.100	面積	0	0	0	1951	1995	1973	0.000	○
		牛の肝臓	0.01	2.	基準値	2.	< 0.100	面積	0	0	0	32125	32856	32491	0.000	○
		牛乳	0.01	0.05	基準値	0.05	< 0.100	面積	0	0	0	1059	1087	1073	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、精度及び定量限界

基準値及び定量限界濃度である0.01 mg/kgでの添加回収を行った。

真度及び併行精度の検討結果を表10に示した。2 mg/kgでは真度86%、併行精度2%（目標値：真度70~120%及び併行精度10>）、0.1及び0.05 mg/kgでは真度96~107%、併行精度は2~4%（目標値：真度70~120%及び併行精度15>）、0.01 mg/kgでは真度83~111%、併行精度は3~7%（目標値：真度70~120%、併行精度25>）といずれも目標値に適合する結果であった。

0.01 mg/kg添加試料溶液でのSN比の平均値は22~24であり、全ての食品でS/N≥10を満たした。

表10 真度、精度及び定量限界の評価

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	検量線			回収率 (%)					真度 (%)	併行精度 (RSD%)	S/N ²		
							傾き	切片	r ² 値	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5			Max.	Min.	平均値
1	シクラニリド	牛の筋肉	0.01	0.05	0.05	—	10842	310	0.9994	95	94	97	95	97	96	2	—	—	—
		牛の筋肉	0.01	0.05	0.01	S/N	10984	200	0.9996	96	89	83	94	96	92	6	24	21	22
		牛の脂肪	0.01	0.1	0.1	—	10789	-43	0.9997	110	107	107	104	109	107	2	—	—	—
		牛の脂肪	0.01	0.1	0.01	S/N	10748	138	0.9992	104	101	119	114	117	111	7	26	23	24
		牛の肝臓	0.01	2.	2.	—	8801	23333	0.9997	83	86	85	87	86	86	2	—	—	—
		牛の肝臓	0.01	2.	0.01	S/N	10146	279	0.9991	80	83	88	87	79	83	5	23	20	22
		牛乳	0.01	0.05	0.05	—	10452	604	0.9993	104	101	104	100	95	101	4	—	—	—
		牛乳	0.01	0.05	0.01	S/N	11263	41	0.9990	94	93	92	87	91	91	3	26	20	23

*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%相当濃度に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。面積比は 0.94~1.02 であり、いずれの試料においても、顕著なマトリックスの測定への影響は認められなかった。

添加回収試験における真度を表 11 で求めたピーク面積比で除して補正真度を求め、表 12 に示した。補正真度は 88~118%であり、目標値（真度 70~120%）に適合する結果であった。

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								
							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			ピーク面積 (高さ)比 ⁵
									n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均	
1	シクラニリド	牛の筋肉	0.01	0.05	0.05	0.00125	面積	0	1021	1039	1030	1011	1037	1024	1.01
		牛の筋肉	0.01	0.05	0.01	0.00025	面積	0	158	162	160	152	162	157	1.02
		牛の脂肪	0.01	0.1	0.1	0.0025	面積	0	1951	1995	1973	1954	2060	2007	0.98
		牛の脂肪	0.01	0.1	0.01	0.00025	面積	0	208	210	209	219	225	222	0.94
		牛の肝臓	0.01	2.	2.	0.05	面積	0	32125	32856	32491	33732	33457	33595	0.97
		牛の肝臓	0.01	2.	0.01	0.00025	面積	0	204	200	202	212	217	215	0.94
		牛乳	0.01	0.05	0.05	0.00125	面積	0	1059	1087	1073	1058	1057	1058	1.01
		牛乳	0.01	0.05	0.01	0.00025	面積	0	191	188	190	198	182	190	1.00

*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。

表 12 補正真度

化合物名	食品名	添加濃度 (mg/kg)	真度 (%)	ピーク面積比	補正真度 (%)
シクラニリド	牛の筋肉	0.05	96	1.01	95
		0.01	92	1.02	90
	牛の脂肪	0.1	107	0.98	109
		0.01	111	0.94	118
	牛の肝臓	2	86	0.97	89
		0.01	83	0.94	88
	牛乳	0.05	101	1.01	100
		0.01	91	1.00	91

4. その他の試験法検討に関連する事項

採用しなかった検討事項について以下に示す。

(1) 脱脂方法の検討

① ケイソウ土カラム [InertSep K-solute (5 mL 保持用)]

操作の簡便性向上及びエマルジョンによる回収率低下を考慮し、ケイソウ土カラムクロマトグラフィーによる脱脂を検討した。

5 mL 保持用カラムに、0.05 mg/L (アセトン溶液) 1 mL 及びアセトン 4 mL を負荷し、室温条件下-0.02 MPa で 5 分間吸引乾燥後、アセトニトリル 15 mL 1 分画及び 10 mL 9 分画で溶出し、濃縮後、アセトニトリルを加え 10 mL に定容後 LC-MS/MS で測定したときの結果を表 13 に示した。シクラニリドの回収率は 55%と全量溶出しなかった。

表 13 多孔性ケイソウ土カラムからの溶出状況

溶出液量 (mL)	回収率 (%)
1 - 15	40
15- 25	14
25-35	1
35- 45	1
45- 55	0
55- 65	0
65- 75	0
75- 85	0
85- 95	0
95-105	0
合計	56

添加量 : 0.05 µg (n=1)

(2) 精製法の検討

汎用される合成ケイ酸マグネシウムミニカラム、シリカゲルミニカラム及び色素除去のためにグラファイトカーボンミニカラムについて検討を加えた。

① 合成ケイ酸マグネシウムミニカラム : ([InertSep FL 500 mg/6 mL])

カラムを0.1 mol/L塩酸10 mL及び0.1 vol%ギ酸・メタノール溶液10 mLで予備洗浄した後、シクラニリド0.05 mg/L (メタノール溶液) 0.5 mLを負荷し、0.1 vol%ギ酸・メタノール溶液で溶出したときの溶出状況を表14に示した。シクラニリドは10 mLで100%溶出された。

マトリックスの影響を確認するため、牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳における 0.01 mg/kg 添加相当濃度 (溶液中濃度 0.0005 mg/L) でのマトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対する面積比を求めた (n=2)。

その結果、牛の筋肉 0.67、牛の脂肪 0.89、牛の肝臓 0.51 及び牛乳 0.91 と牛の筋肉及び牛の肝臓でイオン化抑制がみられ、マトリックスの測定への影響が認められた。

表 14 合成ケイ酸マグネシウムミニカラムからの溶出状況

ミニカラム	0.1 vol%ギ酸・メタノール溶液量(mL)						回収率 (%)
	0-5	5-10	10-15	15-20	20-25	25-30	
InertSep FL (500 mg/6 mL)	95	5	0	0	0	0	100

添加量 : 0.025 µg (n=1)

② シリカゲルミニカラム [InertSep SI (500 mg/6 mL)]

カラムを0.1 mol/L塩酸10 mL及び0.1 vol%ギ酸・メタノール溶液10 mLで予備洗浄した後、シクラニリド0.05 mg/L (メタノール溶液) 0.5 mLを負荷し、0.1 vol%ギ酸・メタノール溶液で溶出したときの溶出状況を表15に示した。シクラニリドは5 mLで100%溶出された。

マトリックスの影響を確認するため、牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳における 0.01 mg/kg 添加相当濃度 (溶液中濃度 0.0005 mg/L) でのマトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対する面積比を求めた ($n=2$)。

その結果、牛の筋肉 0.83、牛の脂肪 2.49、牛の肝臓 0.59 及び牛乳 1.16 と牛の脂肪でイオン化促進が、牛の肝臓でイオン化抑制がみられ、マトリックスの測定への影響が認められた。

表 15 シリカゲルミニカラムの溶出状況

ミニカラム	0.1 vol%ギ酸・メタノール溶出液量(mL)							回収率 (%)
	0-5	5-10	10-15	15-20	20-25	25-30	30-35	
InertSep C ₁₈ (500 mg/6 mL)	100	0	0	0	0	0	0	100

添加量：0.025 µg ($n=1$)

③ グラファイトカーボンミニカラム [InertSep GC (500 mg/6 mL)]

カラムを0.1 mol/L塩酸10 mL及び0.1 vol%ギ酸・メタノール溶液10 mLで予備洗浄した後、シクラニリド0.05 mg/L (アセトニトリル溶液) 0.5 mLを負荷し、0.1 vol%ギ酸・メタノール溶液で溶出した。シクラニリドは溶出されなかった。

④ ミニカラムの組合せによる精製検討

いずれのミニカラムにおいてもマトリックスの影響を除去できなかったことから、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムと組合せて検討を行った。

マトリックスの影響を確認するため、牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓及び牛乳における 0.01 mg/kg 添加相当濃度 (溶液中濃度 0.0005 mg/L) でのマトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対する面積比を求め、表 16 に示した。

その結果、牛の脂肪でイオン化促進が、牛の肝臓でイオン化抑制がみられ、マトリックスの測定への影響が認められた。

表 16 試料マトリックスの影響

試料	ピーク面積比 ¹⁾	
	C ₁₈ 500 mg + FL 500 mg	C ₁₈ 500 mg + SI 500 mg
牛の筋肉	0.70	0.84
牛の脂肪	1.25	1.34
牛の肝臓	0.66	0.69
牛乳	1.07	1.06

1)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の比 ($n=2$)

5. 考察

シクラニリ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した。オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム及びエチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムで精製した後、LC-MS/MSで定量及び確認した。カラムによる精製では、充てん剤が一種類のカラムのみで

は精製が不十分であったことから、試料溶液中の色素及び脂肪酸等を除去するため、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムで精製・濃縮後、さらに、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で精製した。

検討した試験法を用いて、牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓及び牛乳の4食品を試料として、添加回収試験を実施した。その結果、選択性は良好でいずれの試料においても測定を妨害するようなピークは認められなかった。添加回収結果は、0.01 mg/kgで真度83～111%、併行精度は3～7%、0.1及び0.05 mg/kgでは真度96～107%、併行精度は2～4%、2 mg/kgでは真度86%、併行精度2%の結果が得られた。

〔結論〕

畜産物中のシクラニド試験法を検討した。シクラ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した。オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム及びエチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムで精製した後、LC-MS/MS で定量及び確認した。

牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓及び牛乳の4食品に適用した結果、0.01 mg/kg では真度 83～111%、併行精度は 3～7%、0.1 及び 0.05 mg/kg では真度 96～107%、併行精度は 2～4%、2 mg/kg では真度 86%、併行精度 2%の良好な結果が得られた。また、定量限界として、0.01 mg/kg を設定可能であることが確認された。

〔参考文献〕

- 1) 小西友彦, 中村正規, LC-MS/MS による農産物中の残留農薬の一斉分析(2008), 福岡市保健環境研究所報, 34, 105-109(2008).
- 2) 小山知生, 益永利久, 林 裕美, 竹内悠里, 有田俊幸, 都内農産物の安全性確保に向けた残留農薬分析技術の確立 [平成 21～23 年度], <https://www.tokyo-aff.or.jp/uploaded/attachment/6230.pdf>
- 3) 平井知里, 中村雅子, 山岸 浩, 山崎慶子, 石畝 史, LC/MS/MS による農産物中残留農薬一斉試験法の妥当性評価, 福井県衛生環境研究センター年報, 12, 108-117(2013).

① 添加回収試験における代表的なクロマトグラム

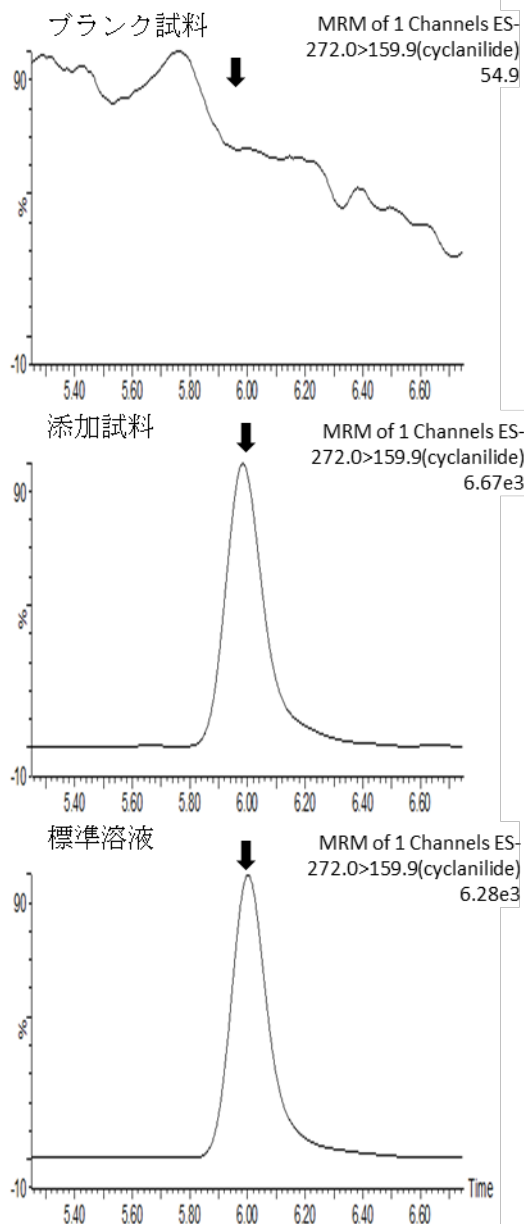


図 10 牛の筋肉の SRM クロマトグラム
(シクラニリド : m/z -272.0→159.9)
シクラニリド添加濃度 : 0.05 mg/kg

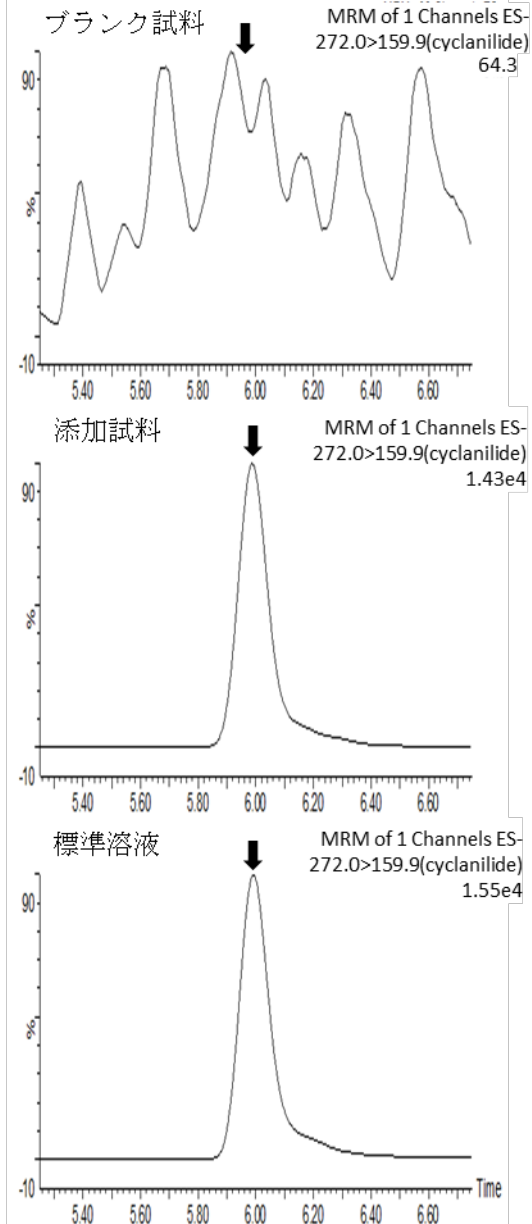


図 11 牛の脂肪の SRM クロマトグラム
(シクラニリド : m/z -272.0→159.9)
シクラニリド添加濃度 : 0.1 mg/kg

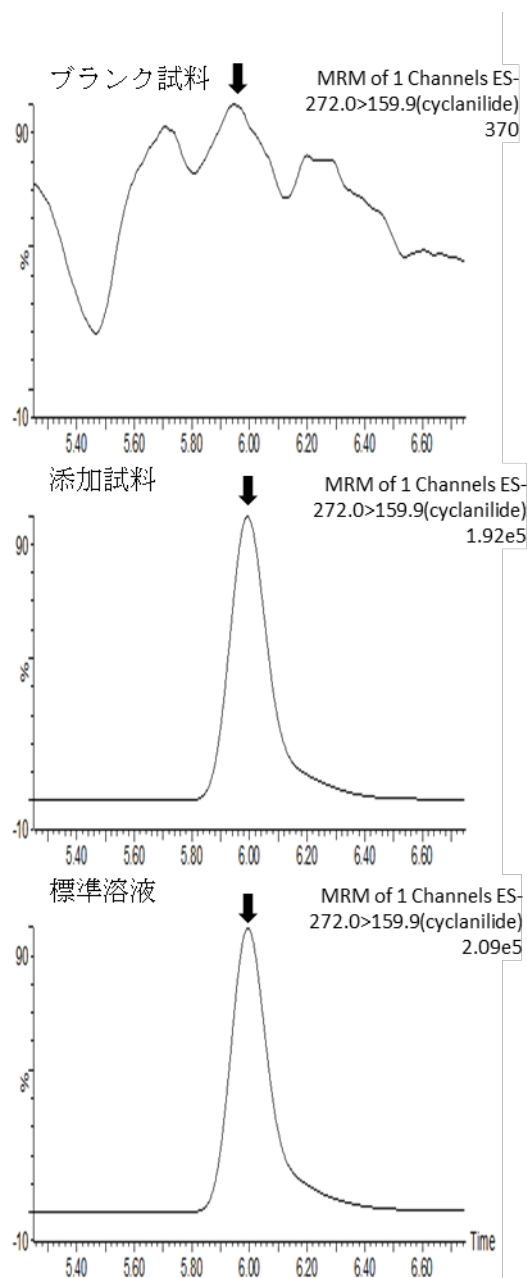


図 12 牛の肝臓の SRM クロマトグラム
(シクラニリド : m/z -272.0→159.9)
シクラニリド添加濃度 : 2 mg/kg

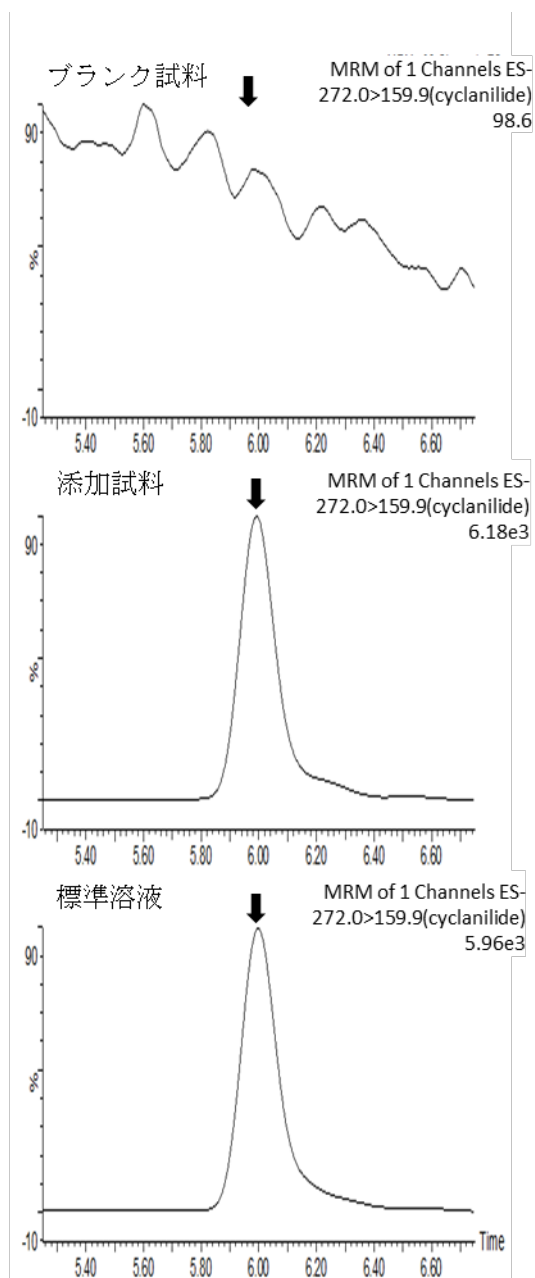


図 13 牛乳の SRM クロマトグラム
(シクラニリド : m/z -272.0→159.9)
シクラニリド添加濃度 : 0.05 mg/kg

② 定量限界における代表的なクロマトグラム（定量限界濃度）

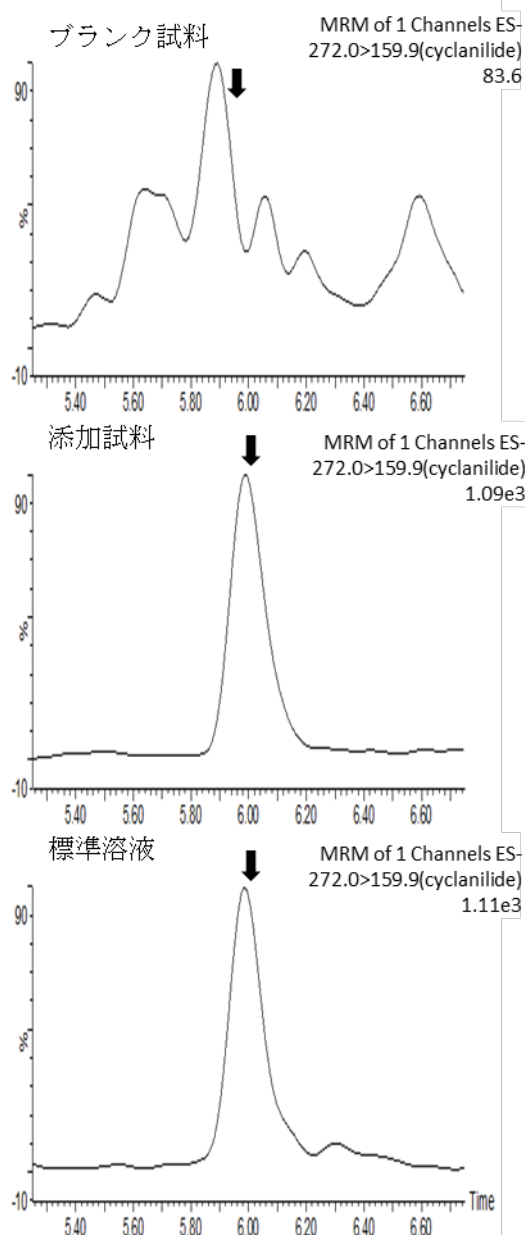


図 14 牛の筋肉の SRM クロマトグラム
(シクラニリド : m/z -272.0→159.9)
シクラニリド添加濃度 : 0.01 mg/kg

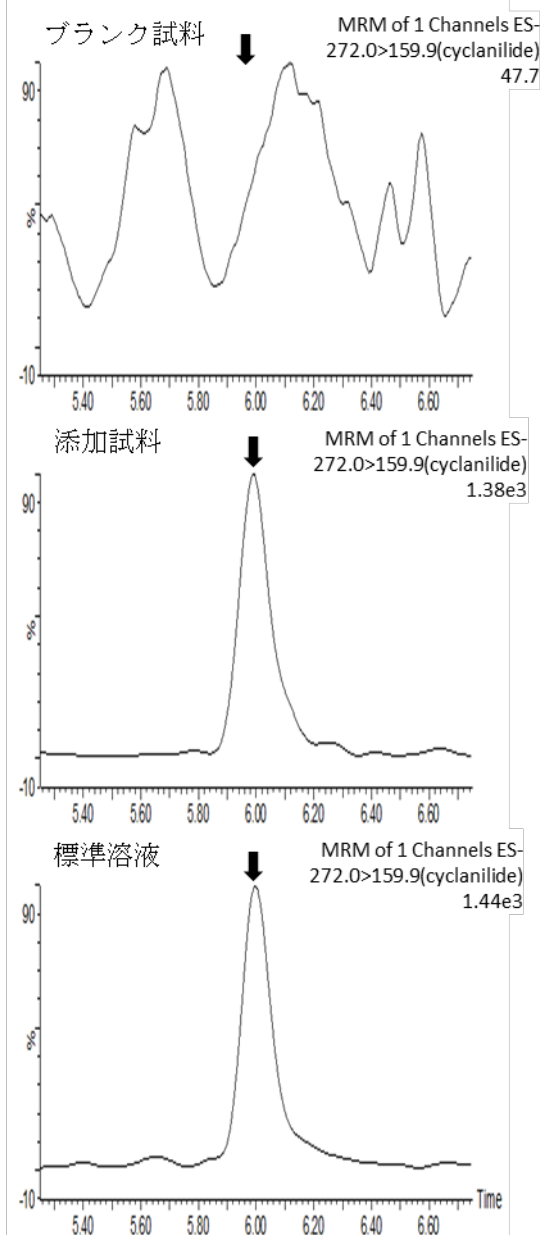


図 15 牛の脂肪の SRM クロマトグラム
(シクラニリド : m/z -272.0→159.9)
シクラニリド添加濃度 : 0.01 mg/kg

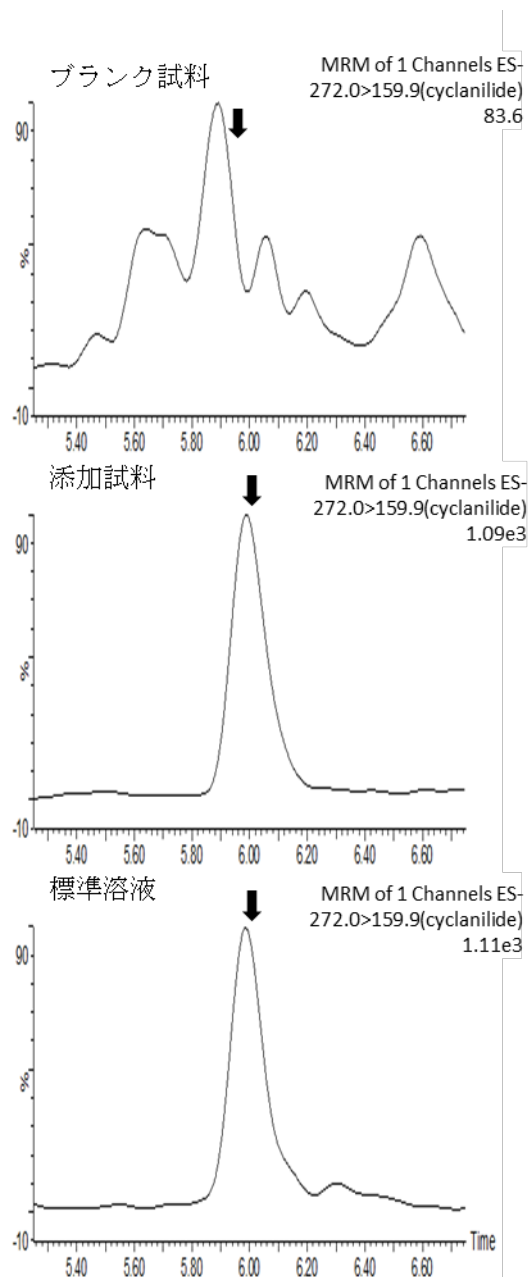


図 16 牛の肝臓の SRM クロマトグラム
(シクラニリド : m/z -272.0→159.9)
シクラニリド添加濃度 : 0.01 mg/kg

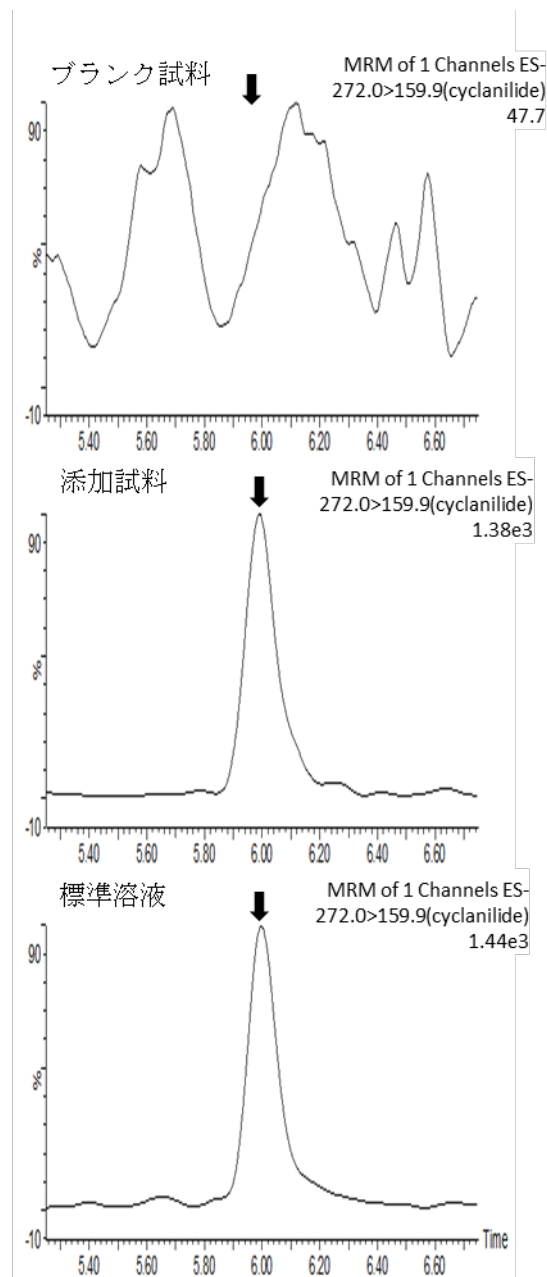


図 17 牛乳の SRM クロマトグラム
(シクラニリド : m/z -272.0→159.9)
シクラニリド添加濃度 : 0.01 mg/kg

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

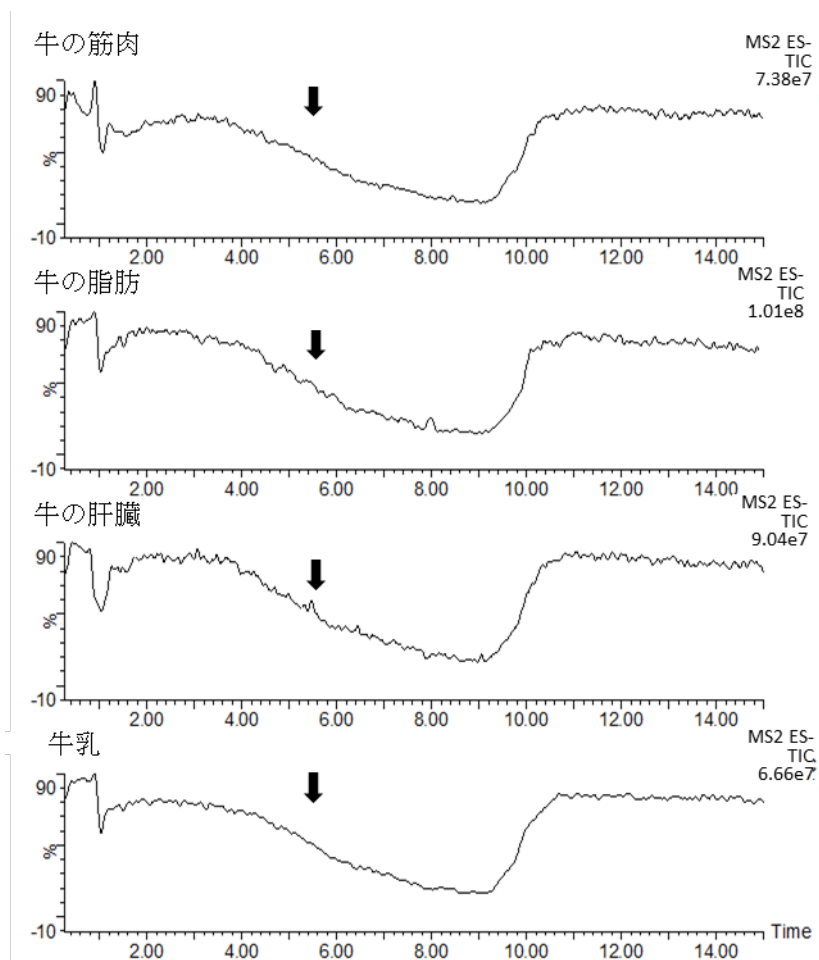


図 18 ブランク試料のトータルイオンクロマトグラム
 測定条件： CV=25V (CV : cone voltage)
 (スキャン範囲： 50~1,000 m/z)