

イソプロチオラン分析法（畜水産物）

1. 分析対象化合物

畜産物：イソプロチオラン、モノイソプロピル 1,3-ジチオラン-2-イリデンマロネート（代謝物 M-2）（抱合体含む）

水産物：イソプロチオラン

2. 装置

液体クロマトグラフ・タンデム質量分析計（LC-MS/MS）

3. 試薬、試液

アセトニトリル	:	HPLC 用
メタノール	:	HPLC 用
水	:	HPLC 用
ギ酸	:	LC-MS 用
氷酢酸	:	ACS グレード
アセトニトリル	:	特級
アセトン	:	特級
ヘキサン	:	特級
QuEChERS 抽出塩	:	QuEChERS 抽出塩（緩衝作用なし）（カタログ番号 25847、Restek 製）
QuEChERS 抽出塩	:	QuEChERS 抽出塩（緩衝作用あり）（カタログ番号 25849、Restek 製）
β -グルクロニダーゼ	:	β -glucuronidase solid from Escherichia Coli (Sigma Aldrich P/N: G8295)
イソプロチオラン	:	分析用標準品
M-2	:	分析用標準品
オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム (C ₁₈ ミニカラム)	:	Bond Elute C18 100 mg/1 mL (Agilent technologies 製または同等品)

4. 試験溶液の調製

1) 抽出

① 牛の筋肉、肝臓、腎臓、乳の場合

筋肉、肝臓、腎臓及び乳試料 5 g に、アセトニトリル 10 mL 及び水 5 mL（乳を除く）を加え、ホモジナイザーで 3 分間抽出、3000 rpm で 5 分間遠心分離し、有機層を採る。

イソプロチオランは有機層に QuEChERS 抽出塩（緩衝作用なし、硫酸マグネシウム及び塩化ナトリウム）を添加して 3 分間抽出、3000 rpm で

5 分間遠心分離し、アセトニトリル層を採り水で希釈、LC-MS/MS で定量する。

代謝物 M-2 は有機層に QuEChERS 抽出塩（緩衝作用あり、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及びクエン酸水素二ナトリウム）を添加して 3 分間抽出、3000 rpm で 5 分間遠心分離し、アセトニトリル層を採る。ここに 0.1 mL の水を加え、0.1 mL 程度になるまで減圧濃縮する。これを酵素処理に供する。

② 牛の脂肪の場合

イソプロチオランは、牛の脂肪試料 5 g にヘキサン及びアセトン（4 : 1）混液 40 mL を加え、20 分間振とう抽出、3000 rpm で 5 分間遠心分離し、有機層を分液漏斗に採る。残留物にアセトニトリル 40 mL を加え、ホモジナイザーで 3 分間抽出、3000 rpm で 5 分間遠心分離し、有機層を同じ分液漏斗に合わせて採る。分配しアセトニトリル層をフラスコに採る。分液漏斗にアセトニトリル 40 mL を加え再度分配し、アセトニトリル層を同じフラスコに採る。2-プロパノールを 1 mL 加え、40° C で減圧濃縮する。残留物にアセトニトリル 9 mL を加え、アセトニトリル及び水（1 : 1）混液で希釈し、LC-MS/MS に注入する。

代謝物 M-2 は牛の脂肪試料 5 g にヘキサン及びアセトン（4 : 1）混液 40 mL を加え、20 分間振とう抽出、3000 rpm で 5 分間遠心分離し、有機層を分液漏斗に採る。残留物にアセトニトリル 40 mL を加え、ホモジナイザーで 3 分間抽出、3000 rpm で 5 分間遠心分離し、有機層を同じ分液漏斗に合わせて採る。残留物にアセトニトリル及び 0.1N 塩酸（4 : 1）混液 40 mL を加えホモジナイザーで 3 分間抽出、3000 rpm で 5 分間遠心分離し、有機層を別の容器に採る。QuEChERS 抽出塩（緩衝作用あり、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及びクエン酸水素二ナトリウム）を添加して 2 分間抽出、3000 rpm で 5 分間遠心分離し、アセトニトリル層を採り、分液漏斗に入れる。分配しアセトニトリル層をフラスコに採る。アセトニトリル 40 mL を加え再度分配し、アセトニトリル層を採る。アセトニトリルで 150 mL に定容する。アセトニトリル及び水（1 : 1）混液で希釈し、LC-MS/MS に注入する。

③ 鶏の筋肉及び肝臓の場合

鶏の筋肉及び肝臓試料 5 g に、アセトニトリル 10 mL 及び水 5 mL を加え、ホモジナイザーで 3 分間抽出、3000 rpm で 5 分間遠心分離し、有機層を採る。QuEChERS 抽出塩（緩衝作用あり、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及びクエン酸水素二ナトリウム）を添加して 3 分間抽出、3000 rpm で 5 分間遠心分離し、アセトニトリル層を採り、水で希釈、これを LC-MS/MS に注入する。

④ 鶏の脂肪の場合

鶏の脂肪試料 5 g にヘキサン及びアセトン（4 : 1）混液 40 mL を加え、

20 分間振とう抽出、3000 rpm で 5 分間遠心分離し、有機層を分液漏斗に採る。残留物にアセトニトリル 40 mL を加え、ホモジナイザーで 3 分間抽出、3000 rpm で 5 分間遠心分離し、有機層を同じ分液漏斗に合わせて採る。分配しアセトニトリル層をフラスコに採る。分液漏斗にアセトニトリル 40 mL を加え再度分配し、アセトニトリル層を同じフラスコに採り、アセトニトリルで 100 mL に定容する。抽出液 4 mL を取り、25° C で 1 mL 程度になるまで濃縮する。水で希釈し、LC-MS/MS に注入する。

⑤ 卵の場合

卵試料 5 g にヘキサン及びアセトン (4 : 1) 混液 40 mL を加え、20 分間振とう抽出、3000 rpm で 5 分間遠心分離し、有機層を分液漏斗に採る。残留物にアセトニトリル 40 mL を加え、ホモジナイザーで 3 分間抽出、3000 rpm で 5 分間遠心分離し、有機層を同じ分液漏斗に合わせて採る。残留物にアセトニトリル 40 mL を加え、ホモジナイザーで 3 分間抽出、3000 rpm で 5 分間遠心分離し、有機層を同じ分液漏斗に合わせて採る。残留物にアセトニトリル及び 0.1N 塩酸 (4 : 1) 混液 40 mL を加えホモジナイザーで 3 分間抽出、3000 rpm で 5 分間遠心分離し、有機層を別の容器に採る。QuEChERS 抽出塩 (緩衝作用あり、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及びクエン酸水素二ナトリウム) を添加して 2 分間抽出、3000 rpm で 5 分間遠心分離し、アセトニトリル層を採り、分液漏斗に入れる。分配しアセトニトリル層をフラスコに採る。アセトニトリル 40 mL を加え再度分配し、アセトニトリル層を採る。アセトニトリルで 150 mL に定容する。アセトニトリル及び水 (1 : 1) 混液で希釈し、LC-MS/MS に注入する。

2) 酵素による加水分解

① 牛の筋肉、肝臓、腎臓、乳の場合

代謝物 M-2 は抽出液を QuEChERS 塩で分配、濃縮したものに 0.1 mL の水を加え、0.1 mL 程度になるまで減圧濃縮する。β-グルクロニダーゼ溶液 (1000 units/mL) を 1-2 mL 添加、37° C で終夜加温して加水分解する。10%酢酸水溶液を 1-3 mL 添加し攪拌する。これをオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム精製に供する。

3) 精製

① 牛の筋肉、肝臓、腎臓、乳の場合

代謝物 M-2 は β-グルクロニダーゼで酵素処理したサンプルをあらかじめアセトニトリル 2 mL、1%酢酸水溶液 2 mL でコンディショニングした C18 カラムに負荷し、1%酢酸水溶液 2 mL を用いてカラムを洗浄、アセトニトリル 1 mL にて溶出させ、流下液を採取、水 1 mL を入れて攪拌した後、LC-MS/MS に注入する。

5. 検量線の作成

イソプロチオラン標準品及び M-2 標準品をそれぞれアセトニトリルに溶解

し、1 mg/mL の標準溶液を調製する。調製した標準液をそれぞれ一定量ずつ混合し、500 μ g/mL の混合標準溶液を調製する。それをさらに希釈溶液で希釈して 10 および 1 μ g/mL の混合標準溶液を調製し、さらに希釈溶液で希釈して検量線用の標準液を数点調製し、それぞれ LC-MS/MS に注入し、ピーク面積法で検量線を作成する。

なお、希釈溶液は、マトリックスフリー検量線にはアセトニトリル及び水 (1 : 1) 混液を、マトリックスマッチ検量線 (肝臓、腎臓、脂肪分析用) にはそれぞれの無処理区の試料の抽出液を用いた。

イソプロチオラン：乳、牛の筋肉、鶏の筋肉、卵、鶏の脂肪 (マトリックスフリー) 牛の肝臓、牛の腎臓、牛の脂肪、鶏の筋肉、鶏の肝臓 (マトリックスマッチ)

M-2：酵素処理後の乳、筋肉、肝臓、腎臓 (マトリックスフリー)、脂肪 (マトリックスマッチ)

6. 定量

試験溶液を LC-MS/MS に注入し、5 の検量線を用いて含量を定量する。

7. 測定条件

カラム : Synergi 4 μ Hydro-RP 75 \times 2.0 mm (Phenomenex製) 及び AQ-C18 Security Guard cartridge 4 \times 2 mm (ジューエルサイエンス製).

カラム温度 : 30 $^{\circ}$ C

移動相 : A) 0.1 vol%ギ酸含有水溶液

B) 0.1 vol%ギ酸含有アセトニトリル溶液

グラジエント :

時間 (分)	%A	%B
0.00	80	20
2.50	0	100
3.75	0	100
3.76	80	20
5.00	80	20

流量 : 1 mL/min

注入量 : 20 μ L

保持時間の目安 : イソプロチオラン ; 2.4 分

モニタリング
イオン

分析対象	プリカーサーイオン (m/z)	プロダクトイオン (m/z)
イソプロチオラン	291.0	231.0
	291.0	189.0
M-2	249.0	189.0
	249.0	145.0

8. 定量限界

イソプロチオラン、M-2（抱合体を含む）：0.01 mg/kg

9. 留意事項

水産物は、畜産物の分析法を参考にして適宜改良して実施すること。

※ 本分析法は、農作物及び畜産物における残留試験等において用いられた残留農薬等分析法であり、新たな試験法の開発等に際して参考として下さい。なお、当該分析法をもとに開発した試験法を食品規格への適合判定のために使用する場合には、「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインの一部改正について（平成 22 年 12 月 24 日薬食発 1224 第 1 号）」に従って使用する試験法の妥当性を評価する必要があります。