

※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の
試験法開発事業報告書

クロルスロン試験法（畜水産物）

クロルスロン試験法（畜水産物）の検討結果

【緒言】

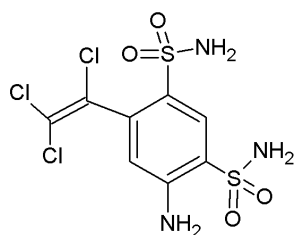
1. 目的及び試験法の検討方針等

クロルスロン（以下「CLN」という。）は、農薬、動物用医薬品及び飼料添加物のポジティブリスト制度の導入に伴い、新たに食品衛生法に基づく残留基準が設定された動物用医薬品である。分析法の整備状況としては、すでに LC/MS 一斉分析法適用の検討が終了しており、「HPLC による動物用医薬品等の一斉試験法 I（畜水産物）」が CLN の分析法として通知されている¹⁾。しかし、薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会による審議の結果、食品に含有されるものであってはならない動物用医薬品、すなわち告示試験法により不検出として管理するという結論が導かれている。そこで本検討では、畜水産物を対象とした定量限界が 0.001 mg/kg を満たす CLN 個別試験法の開発を行うことを目的とした。

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：クロルスロン

構造式：



分子式：C₈H₈Cl₃N₃O₄S₂

CAS：60200-06-8

分子量：380.66

化学名：4-Amino-6-(trichloroethenyl)benzene-1,3-disulfonamide (IUPAC)

：4-Amino-6-(trichloroethenyl)-1,3-benzenedisulfonamide (CAS)

外観：白色、結晶性粉末～粉末

融点：206°C

溶解性：水：ほとんど溶けない。エタノール、アセトン溶ける。

（出典：製品安全データシート（和光純薬工業））

オクタノール/水分配係数 (log P)：1.09 (pH 7、20°C)

（出典：Veterinary Substances DataBase、University of Hertfordshire、

<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/vsdb/Reports/1755.htm>）

解離定数 (pKa)：0.4±0.2 (アミノ基)、10 (スルホンアミド基)

（出典：Environmental Impact Analysis Report (1985)、

<http://www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/DevelopmentApprovalProcess/EnvironmentalAssessments/UCM072185.pdf>）

3. 基準値

(ppm)

食品名	基準値 (案)	基準値 現行	米国	豪州	EU
牛の筋肉	ND ^{*6}	0.08	0.1	0.1	0.035
豚の筋肉	ND ^{*6}	0.02			
その他の陸棲哺乳類 ^{*1} に属する動物の筋肉	ND ^{*6}	0.02			
牛の脂肪	ND ^{*6}	0.08			
豚の脂肪	ND ^{*6}	0.02			
その他の陸棲哺乳類 ^{*1} に属する動物の脂肪	ND ^{*6}	0.02			
牛の肝臓	ND ^{*6}	0.1		0.1	0.1
豚の肝臓	ND ^{*6}	0.02			
その他の陸棲哺乳類 ^{*1} に属する動物の肝臓	ND ^{*6}	0.02			
牛の腎臓	ND ^{*6}	0.4	1	0.1	0.2
豚の腎臓	ND ^{*6}	0.02			
その他の陸棲哺乳類 ^{*1} に属する動物の腎臓	ND ^{*6}	0.02			
牛の食用部分 ^{*2}	ND ^{*6}	0.1		0.1	
豚の食用部分 ^{*2}	ND ^{*6}	0.02			
その他の陸棲哺乳類 ^{*1} に属する動物の食用部分	ND ^{*6}	0.02			
乳	ND ^{*6}	2		1.5	
鶏の筋肉	ND ^{*6}	0.02			
その他の家きん ^{*3} の筋肉	ND ^{*6}	0.02			
鶏の脂肪	ND ^{*6}	0.02			
その他の家きん ^{*3} の脂肪	ND ^{*6}	0.02			
鶏の肝臓	ND ^{*6}	0.02			
その他の家きん ^{*3} の肝臓	ND ^{*6}	0.02			
鶏の腎臓	ND ^{*6}	0.02			
その他の家きん ^{*3} の腎臓	ND ^{*6}	0.02			
鶏の食用部分 ^{*2}	ND ^{*6}	0.02			
その他の家きん ^{*3} の食用部分	ND ^{*6}	0.02			
鶏の卵	ND ^{*6}	0.02			
その他の家きん ^{*3} の卵	ND ^{*6}	0.02			
魚介類 (さけ目魚類に限る。)	ND ^{*6}	0.02			
魚介類 (うなぎ目魚類に限る。)	ND ^{*6}	0.02			
魚介類 (すずき目魚類に限る。)	ND ^{*6}	0.02			
魚介類 (その他の魚類 ^{*4} に限る。)	ND ^{*6}	0.02			

3. 基準値 (つづき)

(ppm)

食品名	基準値 (案)	基準値 現行	米国	豪州	EU
魚介類 (貝類に限る。)	ND* ⁶	0.02			
魚介類 (甲殻類に限る。)	ND* ⁶	0.02			
その他の魚介類* ⁵	ND* ⁶	0.02			
はちみつ	ND* ⁶	0.02			

*1: その他の陸棲哺乳類に属する動物とは、陸棲哺乳類のうち、牛及び豚以外のものをいう。

*2: 食用部分とは、食用に供される部分のうち、筋肉、脂肪、肝臓及び腎臓以外の部分をいう。

*3: その他の家きんとは、家きんのうち、鶏以外のものをいう。

*4: その他の魚類とは、魚類のうち、さけ目類、うなぎ目類及びすずき目類以外のものをいう。

*5: その他の魚介類とは、魚介類のうち、魚類、貝類及び甲殻類以外のものをいう。

*6: 食品に含有されるものであってはならない。

[実験方法]

1. 試料

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 (百花蜜) 及び豚の筋肉は、横浜市内の小売店で購入した。

2. 試薬・試液

CLN 標準品: 純度 99.8% (和光純薬工業社製)

アセトニトリル、蒸留水: LC-MS 用 (関東化学社製)

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

塩化ナトリウム、無水硫酸ナトリウム: 残留農薬試験・PCB 試験用 (関東化学社製)

酢酸アンモニウム: 特級 (関東化学社製)

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: Inert Sep PSA (1,000 mg/6 mL、ジーエルサイエンス社製)

10 w/v% 塩化ナトリウム溶液: 塩化ナトリウム 100 g を蒸留水に溶解し、1,000 mL とした。

40 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液: 酢酸アンモニウム 3.08 g を蒸留水に溶解し 1,000 mL とした。

標準原液: CLN 標準品 20.0 mg を精秤し、アセトニトリルに溶解して 100 mL とした。

検量線用標準溶液: 標準原液をアセトニトリル及び水 (1:1) 混液で希釈し、0.00005 ~ 0.0003 mg/L の濃度の溶液を調製した。

添加用標準液: 標準原液をアセトンで希釈し、10 ng/mL 溶液を調製した。

3. 装置

ホモジナイザー：BM-2（日本精機製作所社製）

濃縮装置：N-1100V（東京理化学器械社製）

遠心分離機：H-36（コクサン社製）

LC-MS/MS

装置	型式	会社
MS/MS	Triple Quad 5500	AB SCIEX
HPLC	Nexela X2	島津製作所
データ処理	MultiQuant 3.0	AB SCIEX

4. 測定条件

LC-MS/MS

LC 条件				
カラム	L-column ODS (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3.0 μm : 化学物質評価研究機構製)			
移動相流速 (mL/min)	0.4			
注入量 (μL)	5			
カラム温度 (°C)	40			
移動相	A 液 : 40 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 B 液 : アセトニトリル			
グラジエント条件	時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)	
	0.0	90	10	
	1.0	90	10	
	10.0	20	80	
	12.0	20	80	
	12.1	1	99	
	15.0	1	99	
	15.1	90	10	
	18.0	90	10	
MS 条件				
測定モード	選択反応モニタリング (SRM)			
イオン化モード	ESI (-)			
キャピラリ電圧 (V)	4500			
脱溶媒温度 (°C)	650			
脱溶媒ガス	窒素、70 psi			
コリジョンガス	窒素			
定量イオン (m/z)	MS/MS : 380→344 [コーン電圧 : 115 (V)、コリジョンエネルギー : 16 (eV)]			
定性イオン (m/z)	MS/MS : 378→342 [コーン電圧 : 115 (V)、コリジョンエネルギー : 18 (eV)]			
保持時間の目安 (min)	6			

5. 定量

CLN 標準品 20.0 mg を精秤し、アセトニトリルに溶解して 200 mg/L 溶液を調製した。この溶液をアセトニトリル及び水 (1 : 1) 混液で希釈して 0.05、0.1、0.15、0.2、0.25 及び 0.3 ng/mL の標準溶液を調製した。この溶液 5 µL を LC-MS/MS に注入し、得られたピーク面積を用いて検量線を作成した。試験溶液 5 µL を LC-MS/MS に注入し、検量線から絶対検量線法により CLN 含量を算出した。

6. 添加試料の調製

(1) 試料採取

牛の筋肉及び豚の筋肉の場合は、可能な限り脂肪層を除き、細切均一化した。牛の脂肪の場合は、可能な限り筋肉層を除き、細切均一化した。さけの場合は、可食部 (皮を含む。) を細切均一化した。うなぎの場合は、頭を除いた可食部 (内臓、骨、皮を含む。) を細切均一化した。しじみの場合は、殻を除去し、細切均一化した。鶏卵の場合は、殻を除去し、卵白と卵黄をよく混合し均一化した。牛の肝臓は、全体を細切均一化した。牛乳は、よく混合して均一化した。はちみつは、加温 (40°C以下) した後に、よく混合して均一化した。

(2) 添加試料の調製

筋肉、肝臓、乳、卵、魚介類及びはちみつ (添加濃度 : 0.001 mg/kg) : 試料 10.0 g に添加用標準溶液 (10 ng/mL、アセトン溶液) 1 mL を添加しよく混合した後、30 分間放置した。

脂肪 (添加濃度 : 0.001 mg/kg) : 試料 10.0 g を採り、約 40°C で加温して融解させたものに添加用標準溶液 (10 ng/mL、アセトン溶液) 1 mL を添加してよく混合し、放置 (室温) して再度凝固させた後、30 分間放置した。

7. 試験溶液の調製

(1) 抽出

試料 10.0 g を遠心管に量り採った。はちみつの場合は、水 20 mL を加えて溶解した。これにアセトン 100 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、ろ紙 (直径 150 mm、No.5A、ADVANTEC 社製) を用いて上澄液をろ過した。遠心管内の残留物にアセトン 50 mL を加えてホモジナイズし、上記と同様に遠心分離し、ろ紙を用いて上澄液をろ過した。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 20 mL を採り、これに 10 w/v% 塩化ナトリウム溶液 100 mL 及び酢酸エチル 100 mL を加えて 5 分間振とうし、酢酸エチル層を採った。水層に酢酸エチル 50 mL を加え、上記と同様に振とうした。得られた酢酸エチル層を合わせ、無水硫酸ナトリウムを加えて脱水した後、無水硫酸ナトリウムをろ別し、酢酸エチル 20 mL で 2 回洗浄した。得られた抽出液を 40°C 以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物に *n*-ヘキサン 30 mL を加え、*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。アセトニトリル層を合わせ、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及び *n*-ヘキサン (1 : 1) 混液 2 mL を加えて溶かした。

(2) 精製

エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルカラムクロマトグラフィー (Inert Sep PSA 1,000 mg/6 mL、ジーエルサイエンス社製) に、アセトン及び *n*-ヘキサン各 5 mL を順次注入し、流出液は捨てた。このカラムに (1) で得られた溶液を注入した後、アセトン及び *n*-ヘキサン (1 : 1) 混液 10 mL を注入し、流出液は捨てた。これにアセトン 15 mL を注入し、溶出液を 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及び水 (1 : 1) 混液に溶解し、正確に 5 mL としたものを試験溶液とした。

《分析法フローチャート》

(抽出)

秤 取 試料 10.0 g
↓ 水 20 mL (はちみつの場合)

アセトン抽出
| アセトン 100 mL、50 mL
| ホモジナイズ
| 遠心分離 (3,000 回転/分、5 分間)
| 上澄液をろ過
↓ アセトンで 200 mL に定容

転 溶
| 20 mL 分取
| 10 w/v%塩化ナトリウム溶液 100 mL
| 酢酸エチル 100 mL、50 mL
↓ 振とう

脱 水
| 無水硫酸ナトリウム
| 溶媒除去
↓ *n*-ヘキサン 30 mL

アセトニトリル/ヘキサン分配
| *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL×2 回
| 振とう
| アセトニトリル層の溶媒除去
↓ アセトン及び *n*-ヘキサン (1 : 1) 混液 2 mL

抽出溶液

(精製及び定量)

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 [Inert Sep PSA (1,000 mg/6 mL)]

| アセトン 5 mL 及び *n*-ヘキサン 5 mL でコンディショニング

| 抽出溶液

| アセトン及び *n*-ヘキサン (1 : 1) 混液 10 mL で洗浄

| アセトン 15 mL で溶出

| 溶媒除去

↓ アセトニトリル及び水 (1 : 1) 混液 5 mL

試験溶液

↓

LC-MS/MS

8. マトリックス添加標準溶液の調製

7. 試験溶液の調製に従い、ブランク試料から調製した抽出溶液をカラムクロマトグラフィーで精製した。カラムクロマトグラフィーからの溶出液の溶媒を除去して得られた残留物に、1 ng/mL の CLN 標準溶液 (アセトニトリル及び水 (1 : 1) 混液) を 5 mL 加え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. 既存試験法の適用確認

既に公示されている試験法である「HPLC による動物用医薬品等の一斉試験法 I (畜水産物)」の分析対象化合物には CLN が掲載されている。そこで、この方法を牛の肝臓、鶏卵及び牛乳に適用し、添加回収試験を行った。その結果 (表 1)、目標とする真度 70~120% 及び併行精度 <30% を達成できず、また試料マトリックスによるイオン化抑制の効果が大きいことから、新規に試験法を開発することとした。なお、イオン化抑制の効果については、マトリックス添加標準溶液のピーク面積を溶媒標準溶液のピーク面積で除した値を指標として評価した。

表 1 添加回収試験 (n=5) の結果 (0.001 mg/kg 相当添加、絶対検量線法)

食品名	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	マトリックス添加標準溶液 / 溶媒標準溶液
牛の肝臓	33.4	31.6	0.29
鶏卵	47.9	27.6	0.87
牛乳	34.2	15.9	0.45

2. 測定条件の検討

CLN の測定は、HPLC-UV を用いて測定する方法^{2)~4)}、誘導體化して GC-ECD 又は GC-MS 用いて測定する方法^{5)~7)}、LC-MS (MS) を用いて測定する方法¹⁾ 等が報告されている。本事業では定量限界が 0.001 mg/kg を満たす試験方法を開発するため、簡便、高感度かつ高選択的に測定することができる LC-MS/MS を用いて以下の検討を行った。

(1) 質量分析計 (MS) 条件の検討

① イオン化法及びプリカーサーイオンの検討

インフュージョン分析によりイオン化法及びプリカーサーイオンの検討を行った。インフュージョン分析は、流速 20 µL/min で送液した CLN 標準溶液 (アセトニトリル及び水 (1:1) 混液、0.1 µg/mL) をイオン源に導入する方法とした。

イオン化法には ESI を選択し、ポジティブイオンモード及びネガティブイオンモードで CLN がイオン化するかどうか検討した。その結果、どちらのイオン化モードでも CLN はイオン化することが確認された。本法ではベースラインが低い傾向を示したネガティブイオンモードを採用した。

CLN の定量に適したプリカーサーイオンを検討した。その結果、脱プロトン分子 (m/z 380、378) 及び CLN の二量体の脱プロトン分子 (m/z 759、761、763) が観測された (図 1)。

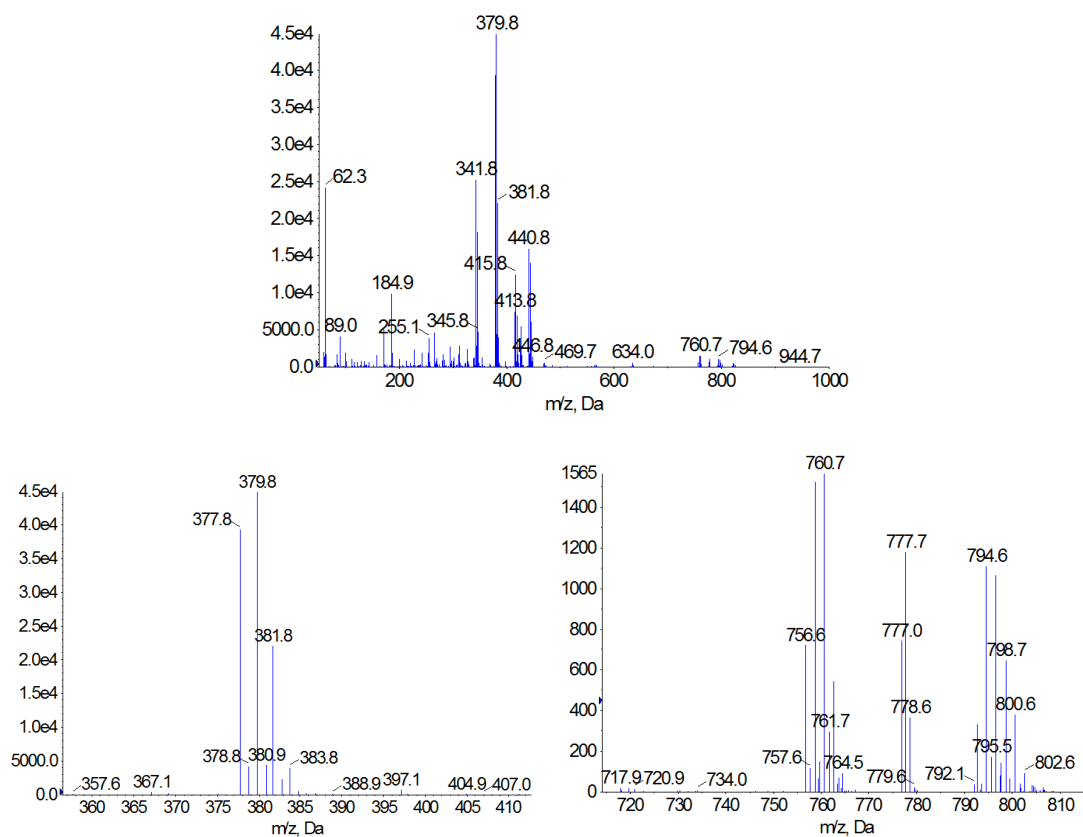


図 1 CLN のマススペクトル

測定条件：ESI (－)、CV=115 V

CV：コーン電圧、CLN 標準溶液：0.1 $\mu\text{g/mL}$

上図：スキャン範囲： m/z 50～1,000

下図左：スキャン範囲： m/z 360～410 (上図拡大)

下図右：スキャン範囲： m/z 720～810 (上図拡大)

② プロダクトイオンの検討

①と同様の方法でインフュージョン分析を行い、 m/z 380 及びその同位体ピークである m/z 378 のプロダクトイオンスキャン測定を実施した。定量イオンにはプリカーサーイオン m/z 380 のプロダクトイオンスペクトルでベースピークとなる m/z 344 を採用した (図 2)。確認イオンにはプリカーサーイオン m/z 378 のプロダクトイオンスペクトルでベースピークとなる m/z 342 を採用した (図 3)。

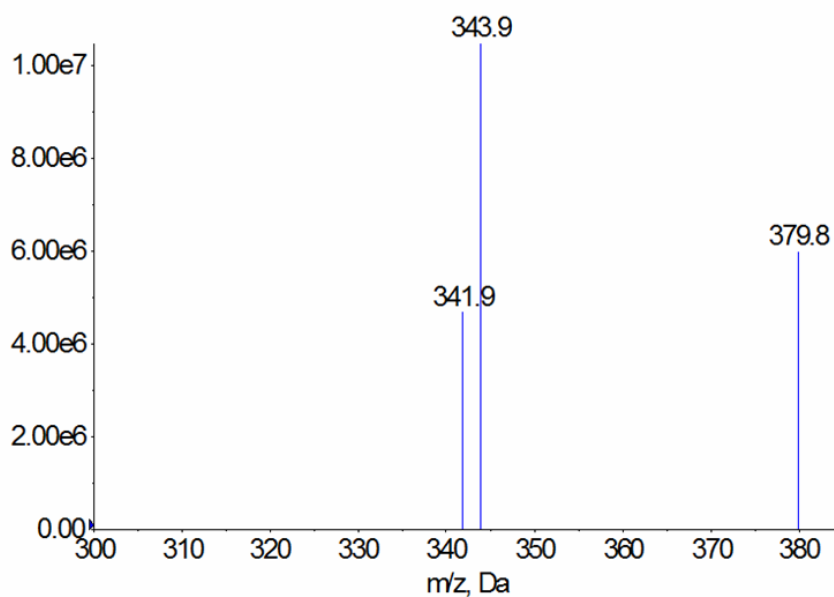


図 2 CLN のプロダクトイオンスペクトル (定量用)

プリカーサーイオン : m/z 380

測定条件 : ESI (-), CV=115 V, CE=16 eV

(CE : コリジョンエネルギー)

CLN 標準溶液 : 0.1 $\mu\text{g/mL}$

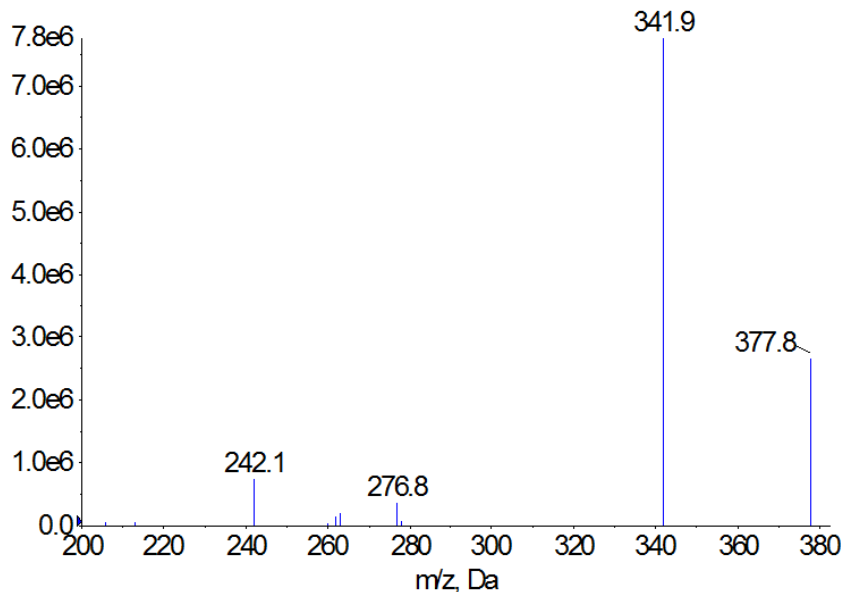


図3 CLNのプロダクトイオンスペクトル（定性用）

プリカーサーイオン： m/z 378

測定条件：ESI（－）, CV=115 V, CE=18 eV

CLN標準溶液：0.1 $\mu\text{g/mL}$

③ 移動相の検討

移動相の有機溶媒にはアセトニトリル及びメタノールを、添加剤にはギ酸、酢酸、ギ酸アンモニウム及び酢酸アンモニウムを選択し、CLNを安定して測定することができる有機溶媒/添加剤の組み合わせ及びこの添加剤の濃度を検討した。有機溶媒及び水溶液による2液グラジエント溶離の条件を設定することを前提に、水溶液中の添加剤濃度を変化させてCLN標準溶液の測定を行った。水溶液については、添加剤をそれぞれ蒸留水に溶解し、ギ酸及び酢酸では0 vol%～0.8 vol%、ギ酸アンモニウム及び酢酸アンモニウムでは0 mmol/L～80 mmol/Lの濃度範囲で数点ずつ調製した。有機溶媒の種類並びに水溶液の種類及び濃度の組み合わせを変えた移動相条件によりCLN標準溶液（アセトニトリル及び水（1：1）混液、100 ng/mL）を測定し、それぞれの組み合わせにおける検出感度を比較した。

その結果、有機溶媒の種類による検出感度の差はほとんどみられなかったが、いずれの添加剤においても、添加剤の濃度が高いほどCLNの検出感度が減少する傾向が見られ、ギ酸及び酢酸の場合には0.2 vol%を超えた辺りから、ギ酸アンモニウム及び酢酸アンモニウムの場合には20 mmol/Lを超えた辺りから検出感度の変動が緩やかになった。以上の検討から、有機溶媒にはグラジエント分析時のシステム圧力をより低く抑えることができるアセトニトリルを採用した。また、CLNは移動相に添加剤を用いないときが

検出感度の面で優れていることが分かったが、添加剤を全く加えない場合にはピーク形状がブロードし、保持時間が変動する傾向がみられたため、本法では検出感度を犠牲にしながらも測定の安定性を優先し、移動相に添加剤を用いることとした。

水溶液に加える添加剤の種類及び濃度の選定に際しては、それぞれの添加剤における検出感度の変動が緩やかな濃度範囲にある3濃度（ギ酸及び酢酸の場合には0.2 vol%、0.4 vol%及び0.6 vol%、ギ酸アンモニウム及び酢酸アンモニウムの場合には20 mmol/L、40 mmol/L及び60 mmol/L）の水溶液を調製し、これら水溶液とアセトニトリルのグラジエント分析によりCLNのSN比を比較した。本検討においては、CLNの溶媒標準溶液（アセトニトリル及び水（1:1）混液、100 ng/mL）とマトリックス添加標準溶液（アセトニトリル及び水（1:1）混液、100 ng/mL）の双方を測定し、マトリックスの有無によるSN比への影響も同時に評価した。ここで使用したマトリックスは、牛の肝臓、はちみつ、鶏卵、しじみ及びさけを各2 gずつ混合したものを試料として用いた。マトリックス添加標準溶液は、7. 試験溶液の調製に従いアセトニトリル/ヘキサン分配を行い溶媒を除去した後、CLN溶媒標準溶液（アセトニトリル及び水（1:1）混液、100 ng/mL）に溶解し、正確に5 mLとした。

その結果、図4に示すように添加剤の種類としては酢酸アンモニウムがその他の添加剤よりもSN比が高く、また酢酸アンモニウム水溶液の3濃度の中では40 mmol/LのSN比が最も高かった。また、ここで使用した添加剤の種類及び濃度によらず、マトリックスの有無による顕著なSN比への影響はみられなかった。

以上の結果から、アセトニトリル及び40 mmol/L酢酸アンモニウム溶液の組み合わせの移動相を用いることとした。

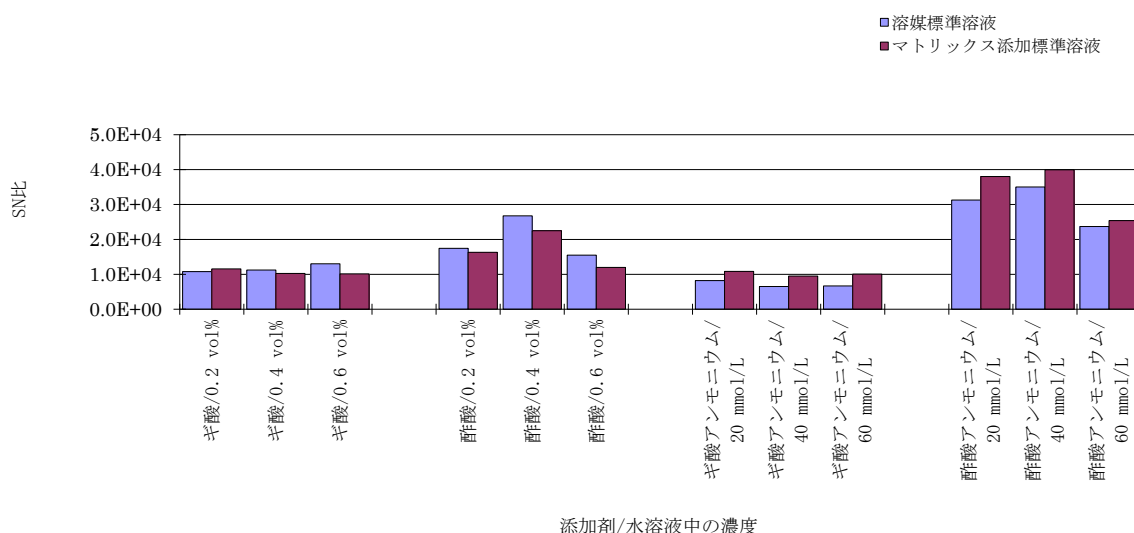


図4 アセトニトリルを用いた移動相における各添加剤の種類及び濃度の違いによるCLNのSN比の比較

(2) 液体クロマトグラフ (LC) 条件

4種類の ODS カラム (ジーエルサイエンス社製 Inertsil ODS-3、東ソー社製 TSK-gel ODS-100V、SHISEIDO 社製 CAPCELL PAK C18 MGⅢ、化学物質評価研究機構製 L-column) を用いて、CLN の測定に最適な分析カラムを検討した。その結果、SN 比が最も大きかった L-column を選択した。

(3) 検量線

LC-MS/MS による CLN 標準溶液の検量線 (例) を図 5 に示した。濃度 0.0002~0.02 mg/L の範囲で良好な直線性が得られた。なお、定量限界は $S/N \geq 10$ が得られた 0.001 ng (試験法の定量限界の目標値 0.001 mg/kg) とした。定量限界 (0.001 ng) の標準溶液の SRM クロマトグラムを図 6 に示す。

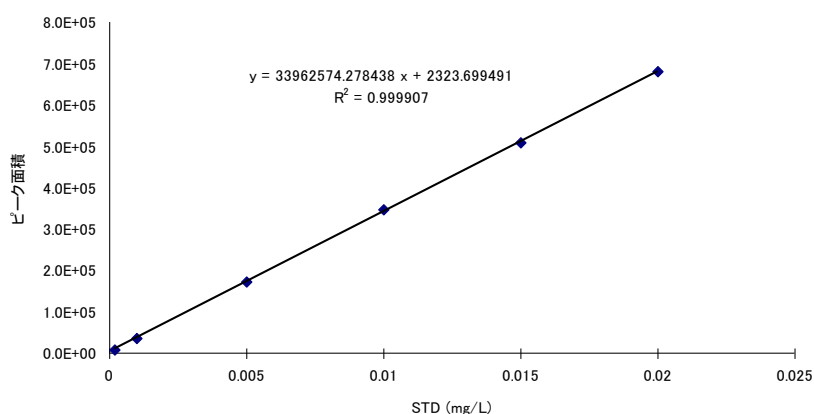


図 5 CLN の検量線 (例)

ピーク面積を用いて最小二乗法で作成、イオン： m/z 380→344

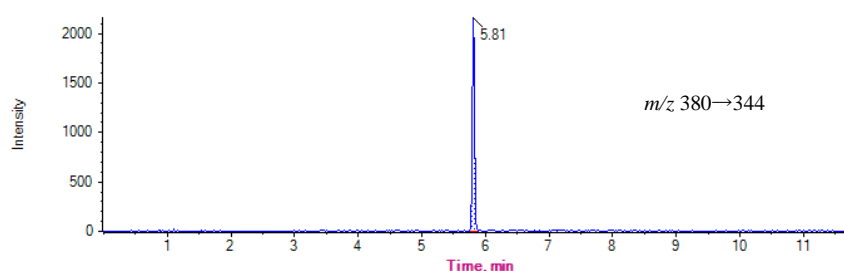


図 6 定量限界 (0.001 ng) の標準溶液の SRM クロマトグラム

3. 試験溶液調製法の検討

(1) 抽出溶媒の検討

試料から CLN を抽出する方法としては、牛乳を対象とした酢酸酸性下で酢酸エチルにより抽出する方法⁵⁾、牛腎臓を対象とした塩酸酸性下で酢酸エチルにより抽出する方法⁶⁾、牛腎臓を対象としたアンモニア水及び塩酸ヒドロキシルアミンの共存下で酢酸エチルによ

り抽出する方法²⁾が報告されている。それぞれ添加する試薬は異なるが、抽出溶媒としては同じ酢酸エチルが採用されている。そこで、抽出溶媒の検討では、文献等で採用例が多い酢酸エチルのほかに、筋肉等の水分の多い細胞の中に浸透しやすく、試料成分を微粒子として溶液内に分散させることができるアセトンを用いて、融解脂肪の添加回収試験を行った。その結果(表2)、どちらの抽出溶媒においてもCLNを十分に回収することができた。そのため、筋肉等の水分の多い細胞の中に浸透しやすいアセトンを採用した。なお、抽出操作については、残留農薬等試験法検討実施要領にのっとり、100 mL及び50 mLで2回抽出する方法とした。また、アセトン抽出後に遠心分離を行ったが、牛の脂肪や牛乳などでは上澄みに浮遊物が見られたため、遠心分離後にろ過を行いこれを除くこととした。

表2 抽出溶媒の検討 (n=3)

抽出溶媒	回収率 (%)	RSD%
アセトン	102.4	1.3
酢酸エチル	105.6	0.4

※ 本検討は以下の手順で行った。

1) 40℃で融解させた脂肪 10.0 g に、CLN 標準溶液 (2 µg/mL、アセトン溶液) を 1 mL 添加し、攪拌して 30 分放置して凝固させた。その後、アセトン又は酢酸エチル 100 mL、50 mL で 2 回抽出し、200 mL に定容した。

2) 各抽出液 1 mL を分取した。溶媒除去してアセトニル及び水 (1:1) 混液 1 mL で溶解して LC-MS/MS で定量した。

(2) 転溶の検討

転溶については、10 w/v%塩化ナトリウム溶液 100 mL から酢酸エチル 100 mL 及び 50 mL で 2 回抽出する方法を検討した。CLN は解離性官能基を有することから、水層の pH 変化に応じて CLN の回収率が変化する可能性がある。そこで、水層の pH を変化させて 2 回抽出における各回の CLN の回収率を確認した。その結果、表 3 に示したとおり、いずれの pH であっても殆ど回収率は変化しなかった。よって、特に pH の調整はせずに 10 w/v%塩化ナトリウム溶液及び酢酸エチルによる転溶を採用することとした。

表3 転溶における pH を変化させたときの CLN 回収率 (%)

pH	1 回目	2 回目	合計
1	100	1	101
3	100	1	101
5	99	1	100
7	102	1	103
9	100	1	101
11	98	1	99
13	98	2	100

※ 本検討は以下の手順で行った。

1) 10 w/v%塩化ナトリウム溶液の pH は、塩酸又は水酸化ナトリウムを用いて pH 1、3、5、7、9、11 及び 13 に調整

した。

2) 10 w/v%塩化ナトリウム水溶液 100 mL に CLN 標準溶液 (2 µg/mL、アセトン溶液) を 1 mL 添加した後、酢酸エチル 100 mL、50 mL で 2 回抽出した。

3) 酢酸エチルを除去後、アセトニリル及び水 (1 : 1) 混液で 50ml に定容し、LC-MS/MS で測定した。

転溶を行う際には、事前に抽出液を濃縮し、塩が析出しないようにアセトン含量を少なくしておかなければならない。しかし、分析に供する試料量を 10.0 g として、各検討対象試料をアセトンで抽出し、その抽出液を濃縮すると、牛の肝臓、鶏卵及びしじみなどでは突沸することがあった。そこで抽出液を 200 mL に定容しておき、そこから必要量を分取し、転溶に供する方法を検討した。すべての試料において、分取量が 20 mL の場合に塩の析出やエマルジョンは見られなかった。また、転溶にアセトンが 20 mL 共存しても十分な回収が得られるか検討した結果 (表 4)、ほぼ 100% の CLN が回収された。

表 4 酢酸エチル転溶における CLN の回収率 (%)

1 回目	2 回目	合計
99	< 1	99

※ 本検討は以下の手順で行った。

1) 10 w/v%塩化ナトリウム水溶液 100 mL に CLN 標準溶液 (2 µg/mL、アセトン溶液) を 1 mL 添加した後、アセトン 19mL を添加し、そこから酢酸エチル 100 mL、50 mL で 2 回抽出した。

2) 酢酸エチルを除去後、アセトニリル及び水 (1 : 1) 混液で 50ml に定容し、LC-MS/MS で測定した。

以上の結果から、アセトン抽出液の分取量を 20 mL とし、10 w/v%塩化ナトリウム溶液 100 mL から酢酸エチル 100 mL 及び 50 mL で 2 回抽出する方法を採用した。

(3) 脱脂方法の検討

脱脂方法としてアセトニリル/ヘキサン分配について検討した。

CLN 標準溶液 (0.1 µg) を添加した *n*-ヘキサン 30 mL から *n*-ヘキサン飽和アセトニリル 30 mL で 3 回抽出したときの、各抽出における回収率を表 5 に示す。

表 5 アセトニリル/ヘキサン分配における CLN 回収率 (n=3) (%)

1 回目	2 回目	3 回目	合計
105	<1	<1	105

※ 各アセトニリル層を溶媒除去し、アセトニリル及び水 (1 : 1) 混液 1 mL で溶解して LC-MS/MS で定量した。

この結果から、1 回のアセトニリル/ヘキサン分配によりほぼ 100% の CLN の回収が確認できた。しかし、マトリックスが共存した場合に、1 回の分配では十分な回収率が得られない可能性があることを考慮し、*n*-ヘキサン 30 mL に対して *n*-ヘキサン飽和アセトニリル 30 mL で 2 回抽出することとした。

(4) カラム精製

脂肪酸等の夾雑物を除去するため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 (PSA ミニカラム) を用いて精製効果の確認を行った。

PSA ミニカラム (ジーエルサイエンス社製 Inert Sep PSA 1,000 mg/6 mL) からの CLN の溶出パターンを表 6 に示す。CLN はアセトン及び *n*-ヘキサン (1 : 1) 混液では全く溶出されないが、アセトン 15 mL で溶出させることにより、ほぼ 100% の CLN が回収された。

表 6 Inert Sep PSA (1,000 mg/6 mL) からの CLN 溶出率 (%)

溶出液 (mL)	アセトン及び <i>n</i> -ヘキサン混液の比率					
	10 : 0	9 : 1	8 : 2	7 : 3	6 : 4	5 : 5 (1 : 1)
0-5	11	1	< 1	< 1	< 1	< 1
5-10	81	55	11	< 1	< 1	< 1
10-15	8	37	38	5	< 1	< 1
15-20	< 1	6	30	21	2	< 1
20-25	< 1	1	12	30	13	< 1
25-30	< 1	< 1	4	23	19	< 1
合計	100	100	95	79	34	< 1

※ アセトン 5 mL、*n*-ヘキサン 5 mL でコンディショニングを実施した。
アセトン及び *n*-ヘキサン (1 : 1) 混液で調製した CLN 標準溶液 (0.1 µg/mL) を 2 mL 負荷した。
各溶出液を溶媒除去しアセトニトリル及び水 (1 : 1) 混液 2 mL に溶解して LC-MS/MS で定量した。

以上の結果より、PSA ミニカラム (1,000 mg/6 mL) の精製方法はアセトン及び *n*-ヘキサン (1 : 1) 混液 2 mL で負荷、アセトン及び *n*-ヘキサン (1 : 1) 混液 10 mL で洗浄、アセトン 15 mL で溶出させることとした。

同じ官能基を持つ固相であっても、メーカーが異なると溶出位置がずれる可能性があることから、他メーカーの同等品について溶出位置の確認を行った (表 7)。いずれのメーカーの PSA ミニカラムにおいても本精製方法の適用は可能であった。

表 7 各メーカーの PSA ミニカラム (1,000 mg) からの CLN 溶出率 (%)

溶出液 (mL)		ジーエルサイエンス	Supelco	Waters	Agilent
		Inert Sep PSA	Supelclean PSA	SepPak PSA	Bond Elut Jr PSA
アセトン及び <i>n</i> -ヘキサン (1 : 1) 混液	0-5	< 1	< 1	< 1	< 1
	5-10	< 1	< 1	< 1	< 1
アセトン	0-5	18	12	11	14
	5-10	73	59	71	67
	10-15	8	29	18	19
合計	99	100	100	100	

※ アセトン 5 mL、*n*-ヘキサン 5 mL でコンディショニング
アセトン及び *n*-ヘキサン (1 : 1) 混液で調製した CLN 標準溶液 (0.1 µg/mL) を 2 mL 負荷
各溶出液を溶媒除去しアセトニトリル及び水 (1 : 1) 混液 2 mL に溶解して LC-MS/MS 測定

マトリックスが複雑な牛の肝臓を用いて、PSA ミニカラム (1,000 mg/6 mL) の精製効果を確認した。7. 試験溶液の調製に従い調製した抽出液は黄色がかったが、その後に PSA ミニカラムによる精製を実施することにより無色透明の試験溶液が得られた。試験溶液を測定して得られた TIC クロマトグラムを図7に示す。TIC クロマトグラムの CLN の保持時間付近に夾雑ピークが検出されなかった。また、溶媒標準溶液とマトリックス添加標準溶液のピーク面積比は 0.90 でありマトリックスによる顕著な影響は見られなかった。

以上の結果より、PSA ミニカラムによる精製方法を採用した。

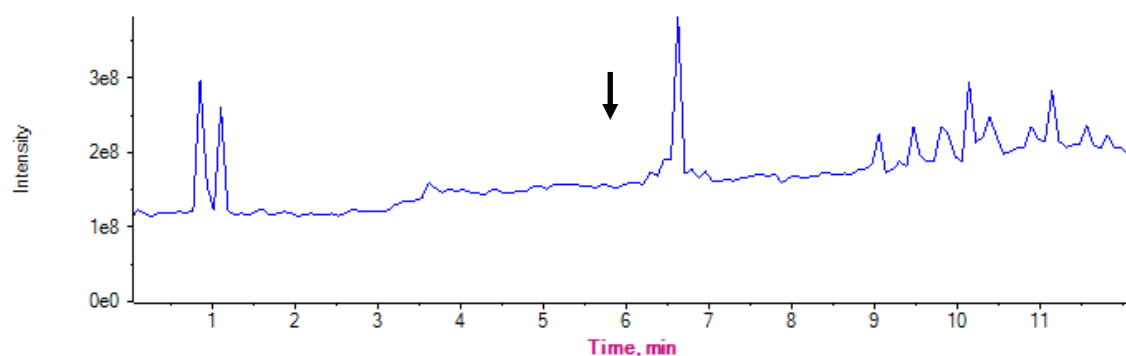


図7 PSA ミニカラム (1,000 mg) 精製を実施した試験溶液の TIC クロマトグラム
スキャン範囲： m/z 50~1,000
試料：牛の肝臓

4. 添加回収試験

(1) 選択性

各食品のブランク試料及びマトリックス添加標準溶液を測定し、選択性を評価した結果を表8に示す。さらに、ブランク試料の定量イオン (m/z 380→344) における代表的なクロマトグラムを図8～17に、 m/z 50～1,000におけるTICクロマトグラムを図18～27に示す。全ての食品においてブランク試料に測定を妨害するピークは認められなかった。

表8 選択性の評価

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)			
1	クロルスロン	牛の筋肉	0.001	不検出	0.001	*	定量限界	0.0002	< 0.333	面積	0	-	-	○	
2	クロルスロン	牛の脂肪	0.001	不検出	0.001	*	定量限界	0.0002	< 0.333	面積	0	-	-	○	
3	クロルスロン	牛の肝臓	0.001	不検出	0.001	*	定量限界	0.0002	< 0.333	面積	0	-	-	○	
4	クロルスロン	さけ	0.001	不検出	0.001	*	定量限界	0.0002	< 0.333	面積	0	-	-	○	
5	クロルスロン	うなぎ	0.001	不検出	0.001	*	定量限界	0.0002	< 0.333	面積	0	-	-	○	
6	クロルスロン	しじみ	0.001	不検出	0.001	*	定量限界	0.0002	< 0.333	面積	0	-	-	○	
7	クロルスロン	牛乳	0.001	不検出	0.001	*	定量限界	0.0002	< 0.333	面積	0	-	-	○	
8	クロルスロン	鶏卵	0.001	不検出	0.001	*	定量限界	0.0002	< 0.333	面積	0	-	-	○	
9	クロルスロン	はちみつ	0.001	不検出	0.001	*	定量限界	0.0002	< 0.333	面積	0	-	-	○	
10	クロルスロン	豚の筋肉	0.001	不検出	0.001	*	定量限界	0.0002	< 0.333	面積	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。

(2) 真度及び精度

各食品について試行 5 回の添加回収試験を行い、真度及び併行精度の評価を行った結果を表 9 に示す。また、添加回収試料及び標準溶液の定量イオン (m/z 380→344) における代表的なクロマトグラムを図 8~17 に示す。真度は 80.6~110.3%、併行精度は 1.7~8.8%で、いずれの食品においても「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 (平成 22 年 12 月 24 日付け食安発 1124 第 1 号)」に示された目標値 (真度 70~120%、併行精度 30%>) を満たす結果であった。さらに、添加回収試験のクロマトグラムより計算した SN 比の平均値は 93.0~343.3 であり、全ての食品で $S/N \geq 10$ を満たした。

表 9 真度及び精度の評価

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 ² 値	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5			Max.	Min.	平均値	
1	クロルスロン	牛の筋肉	0.001	不検出	0.001		18755	-29	0.9960	116.9	115.2	111.7	104.0	103.6	110.3	5.0	384.5	297.6	341.1	
2	クロルスロン	牛の脂肪	0.001	不検出	0.001		22544	94	0.9972	100.7	101.7	102.0	92.8	94.1	98.3	4.1	227.5	249.8	238.7	
3	クロルスロン	牛の肝臓	0.001	不検出	0.001		17678	-18	0.9990	94.2	90.9	85.8	91.3	89.3	90.3	3.1	282.8	281.5	282.2	
4	クロルスロン	さけ	0.001	不検出	0.001		23027	-42	0.9986	85.3	83.9	88.3	83.8	89.5	86.2	2.7	92.5	93.5	93.0	
5	クロルスロン	うなぎ	0.001	不検出	0.001		20222	33	0.9996	95.6	91.7	89.5	86.7	93.7	91.5	3.4	142.5	115.1	128.8	
6	クロルスロン	しじみ	0.001	不検出	0.001		16935	130	0.9982	90.9	89.3	85.9	95.5	95.1	91.3	3.9	222.8	191.1	207.0	
7	クロルスロン	牛乳	0.001	不検出	0.001		17243	41	0.9988	86.7	78.4	95.7	94.0	91.7	89.3	7.0	278.5	264.8	271.7	
8	クロルスロン	鶏卵	0.001	不検出	0.001		23782	-7	0.9987	87.6	81.4	87.6	89.7	87.0	86.7	3.2	103.6	100.0	101.8	
9	クロルスロン	はちみつ	0.001	不検出	0.001		19001	98	0.9965	77.9	81.6	80.9	81.2	81.6	80.6	1.7	238.1	229.0	233.6	
10	クロルスロン	豚の筋肉	0.001	不検出	0.001		18575	-46	0.9986	83.7	84.5	106.0	89.6	91.6	91.1	8.8	425.8	260.8	343.3	

*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、別途、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。

(3) 試料マトリックスの測定への影響

添加回収試験における回収率 100%相当濃度のマトリックス添加標準溶液と溶媒標準溶液を交互に 2 回測定し、そのピーク面積比から試料マトリックスの測定への影響を評価した結果を表 10 に示す。ピーク面積比は 0.905~1.067 で、いずれの食品においても顕著なマトリックスの影響は認められなかった。

表 10 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 (ppm)	基準値 ^{*1} (ppm)	添加濃度 (ppm)	定量限界の評価 ^{*2}	標準溶液濃度 ^{*3} (mg/L)	ピーク面積(高さ) ^{*4}						S/N比		平均値		備考		
								面積又は高さの別	ブランク ^{*5}	マトリックス添加標準溶液			溶媒標準溶液			n=1	n=2		面積(高さ)比(%) ^{*6}	S/N比
										n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均					
1	クロルスロン	牛の筋肉	0.001	不検出	0.001	0.001	0.0002	面積	0	3995	3982	3988.5	3814	3661	3737.5	339.7	367.8	106.7	353.8	
2	クロルスロン	牛の脂肪	0.001	不検出	0.001	0.001	0.0002	面積	0	4271	4174	4222.5	4528	4244	4386.0	157.0	175.2	96.3	166.1	
3	クロルスロン	牛の肝臓	0.001	不検出	0.001	0.001	0.0002	面積	0	3216	3214	3215.0	3558	3549	3553.5	258.3	295.5	90.5	276.9	
4	クロルスロン	さけ	0.001	不検出	0.001	0.001	0.0002	面積	0	4225	4118	4171.5	4442	4415	4428.5	130.2	111.3	94.2	120.8	
5	クロルスロン	うなぎ	0.001	不検出	0.001	0.001	0.0002	面積	0	3824	3782	3803.0	4088	4008	4048.0	127.7	142.3	93.9	135.0	
6	クロルスロン	しじみ	0.001	不検出	0.001	0.001	0.0002	面積	0	3374	3088	3231.0	3562	3429	3495.5	283.3	325.0	92.4	304.2	
7	クロルスロン	牛乳	0.001	不検出	0.001	0.001	0.0002	面積	0	3539	3359	3449.0	3690	3562	3626.0	309.2	295.3	95.1	302.3	
8	クロルスロン	鶏卵	0.001	不検出	0.001	0.001	0.0002	面積	0	4381	4310	4345.5	4714	4632	4673.0	110.0	114.9	93.0	112.5	
9	クロルスロン	はちみつ	0.001	不検出	0.001	0.001	0.0002	面積	0	3862	3748	3805.0	4094	3999	4046.5	338.0	276.6	94.0	307.3	
10	クロルスロン	豚の筋肉	0.001	不検出	0.001	0.001	0.0002	面積	0	3654	3623	3638.5	3733	3661	3697.0	379.6	288.3	98.4	334.0	

*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 定量限界の推定を行う対象(添加濃度と定量限界濃度とが異なる場合)には、『』が表示される。

*3 試料中の濃度が定量限界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。

*4 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回以上測定する。(必要に応じて起爆注入を行う。)

*5 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。

*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。

5. その他の試験法検討に関連する事項

基礎検討における標準標準溶液の測定時に二量体が観察された。そのため、実試料の分析においても二量体が観察されるか確認するため、10 食品の添加回収試験の際に二量体の m/z もモニターした。その結果、いずれの食品においても二量体が観察されることは無かった。

6. まとめ

全ての食品において、ブランク試料のクロマトグラムに定量を妨害するピークはみられなかった。真度 80.6~110.3%、併行精度 1.7~8.8%は目標値（真度 70~120%及び併行精度 30%>）に適合する結果であった。マトリックス添加標準溶液及び溶媒標準溶液のピーク面積比は 0.905~1.067 であり、本法では明らかなマトリックス効果は認められなかった。添加回収試験における SN 比は全ての食品で $S/N \geq 10$ を満たした。

[結論]

LC-MS/MS を用いて、定量限界 0.001 mg/kg を満たす畜水産物中の CLN 分析法を検討した。牛の各組織、卵、乳、はちみつ、魚介類及び豚の筋肉を用いた添加回収試験において良好な結果が得られたため、本法は畜水産物の残留分析法として適用可能であることが確認された。

[参考文献]

- 1) 食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について、平成 17 年 1 月 24 日食安発第 0124001 号 (2005) .
- 2) Markus J Sherma J. Method I. Liquid Chromatographic/Ultraviolet Determination of Clorsulon Residues in Kidney Tissues of Cattle, *J. AOAC. Int*, 75 (5), 937–941 (1992).
- 3) Frank J Schencka, Steven A Barkerb, Austin R Longc. Matrix Solid Phase Dispersion (MSPD) Isolation and Liquid Chromatographic Determination of Clorsulon in Milk, *Journal of Liquid Chromatography*, 14(15), 2827-2834 (1991).
- 4) Frank J Schencka, Roberta Wagnera, William Bargoa. Determination of Clorsulon Residues in Milk Using a Solid-Phase Extraction Cleanup and Liquid Chromatographic Determination, *Journal of Liquid Chromatography*, 16(2), 513-520 (1993).
- 5) William J A Vanden Heuvel III, Virginia F Gruber, Robert W Walker, Frank J Wolf. Gas-Liquid Chromatographic Determination of 4-amino-6-(trichloroethyl)-1,3-benzenedisulfonamide, a New Anthelmintic, in Biological Fluids, *J. Agric. Food Chem*, 25(2), 389–392 (1977) .
- 6) Wehner TA, Wood JS Jr, Walker R, Downing GV, Vandenheuvel WJ. Confirmation of clorsulon residues in cattle kidney by capillary gas chromatography-negative-ion chemical-ionization mass spectrometry, *J Chromatogr*, 399, 251-258 (1987).
- 7) Markus J Sherma J. Method II. Gas Chromatographic/Mass Spectrometric Confirmatory Method for Identification of Clorsulon Residues in Kidney Tissues of Cattle, *J. AOAC.Int*, 75 (5), 942–946 (1992).

[クロマトグラム報告]

①添加回収試験における代表的なクロマトグラム

(添加濃度は全て 0.001 mg/kg、 m/z 380→344)

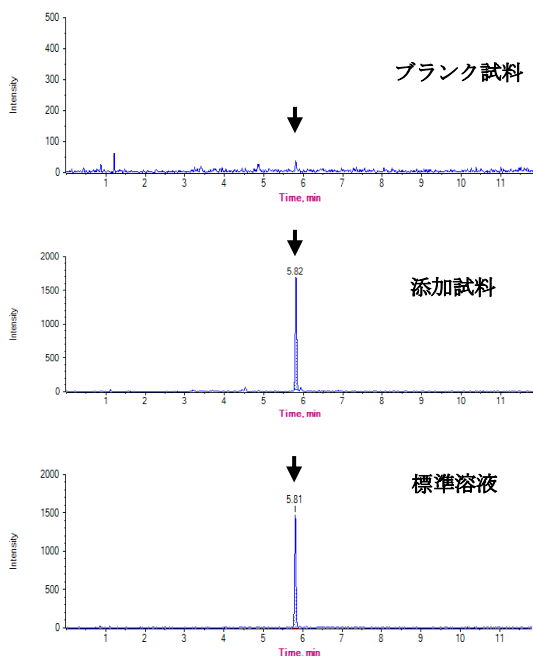


図 8 牛の筋肉の SRM クロマトグラム

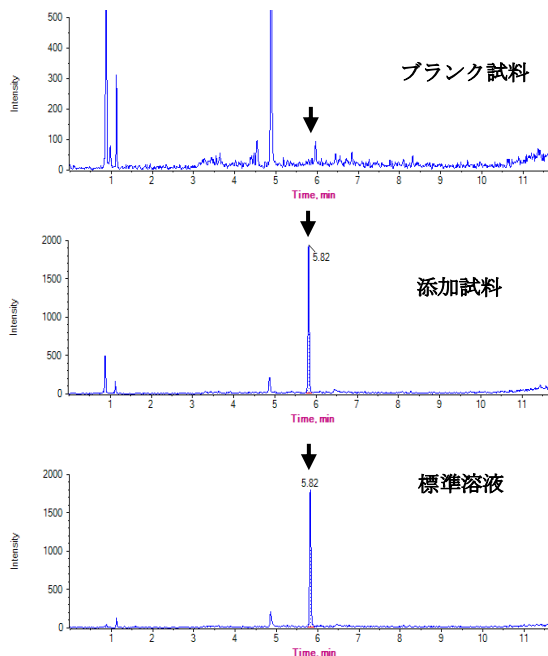


図 9 牛の脂肪の SRM クロマトグラム

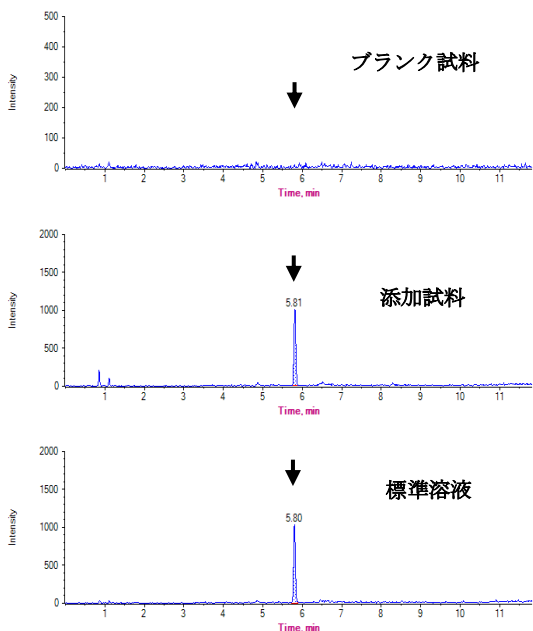


図 10 牛の肝臓の SRM クロマトグラム

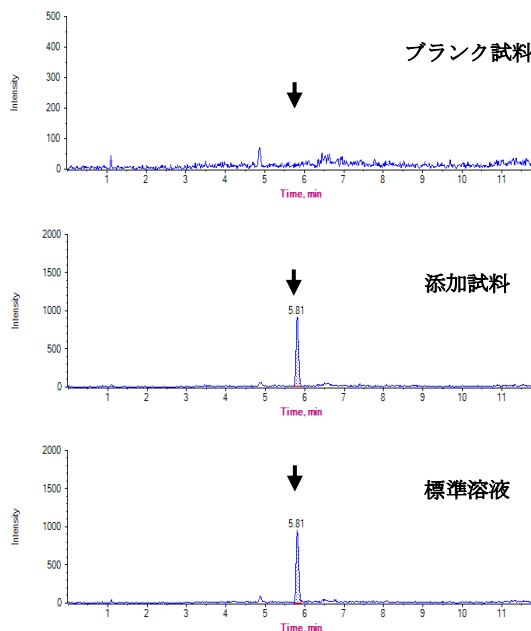


図 11 さけの SRM クロマトグラム

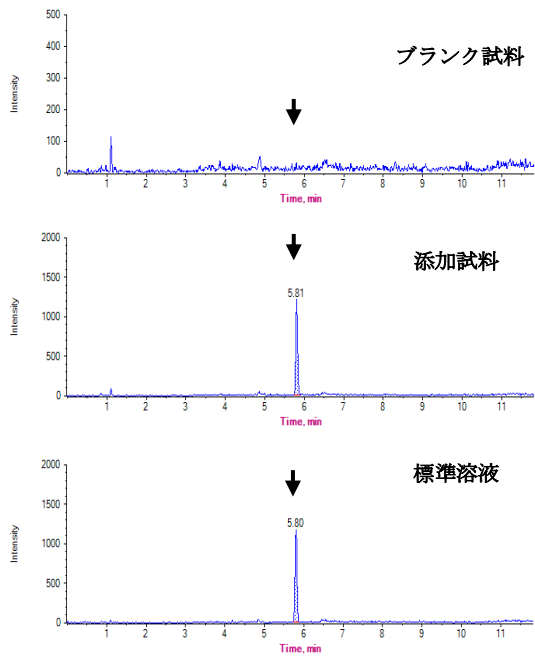


図 12 うなぎの SRM クロマトグラム

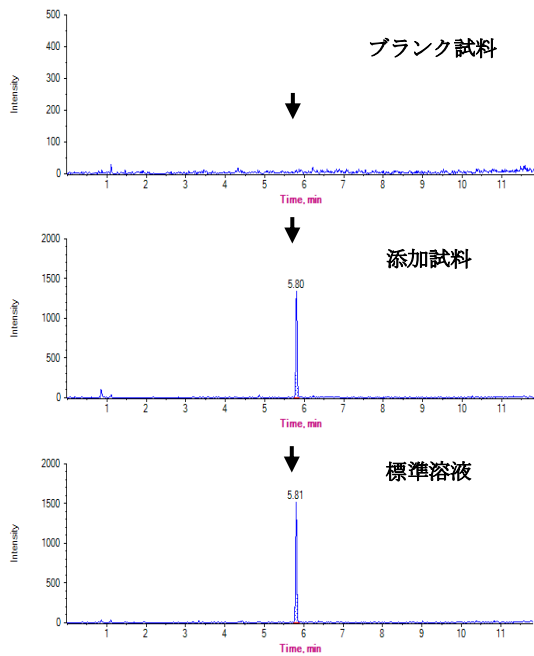


図 13 しじみの SRM クロマトグラム

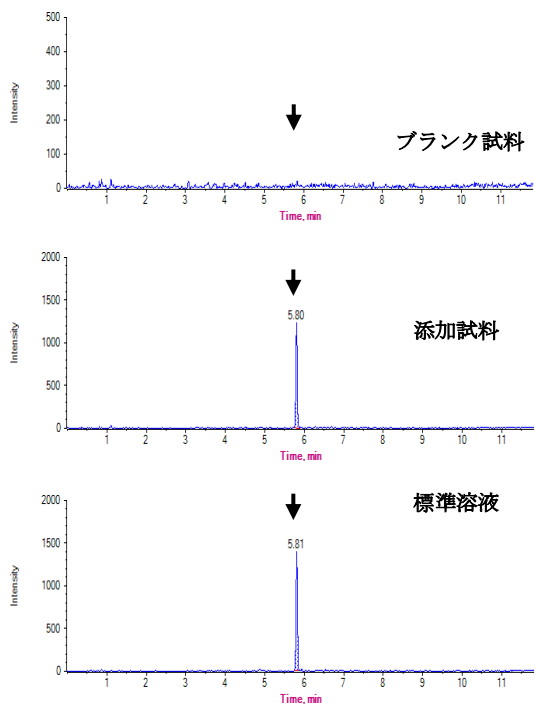


図 14 牛乳の SRM クロマトグラム

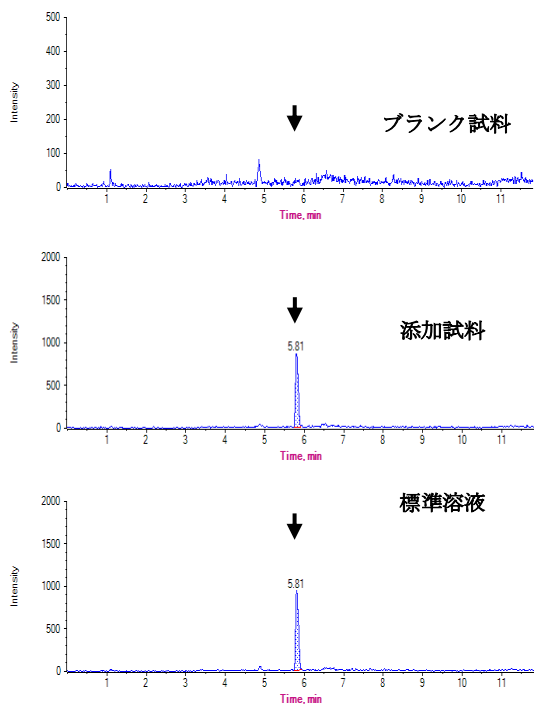


図 15 鶏卵の SRM クロマトグラム

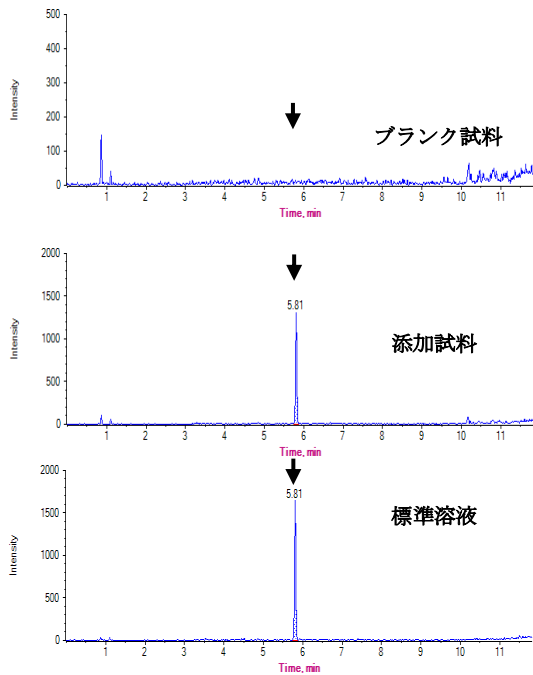


図 16 はちみつの SRM クロマトグラム

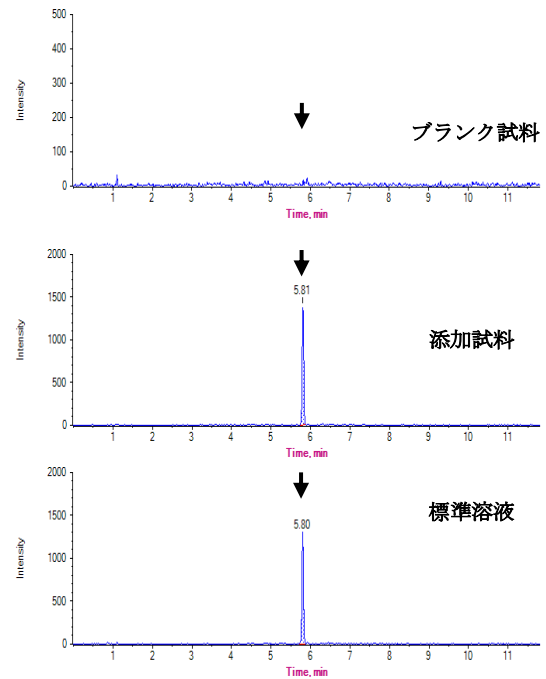


図 17 豚の筋肉の SRM クロマトグラム

②ブランク試料の代表的な TIC クロマトグラム
(ESI (-)、 m/z : 50~1,000)

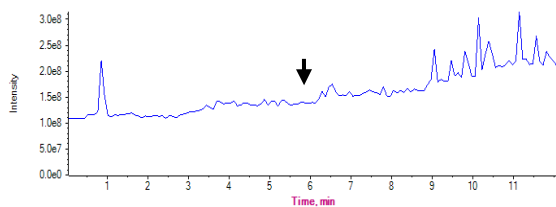


図 18 牛の筋肉のクロマトグラム

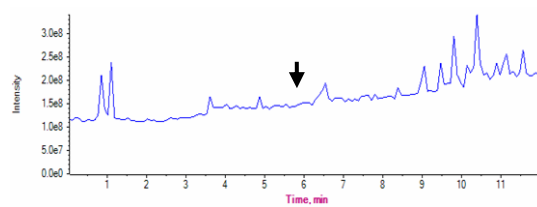


図 19 牛の脂肪のクロマトグラム

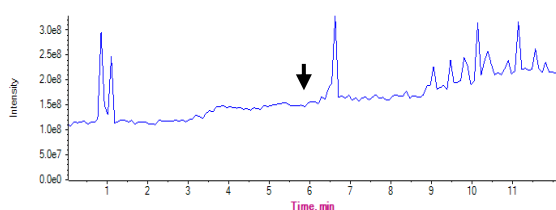


図 20 牛の肝臓のクロマトグラム

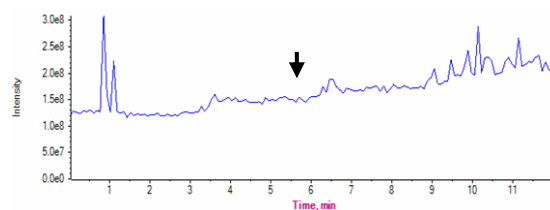


図 21 さけのクロマトグラム

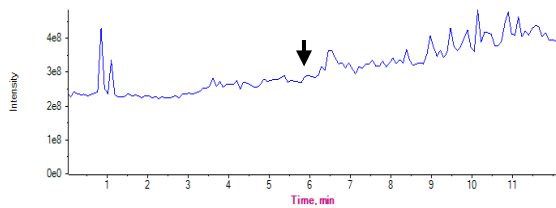


図 22 うなぎのクロマトグラム

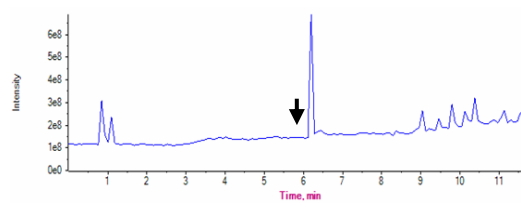


図 23 しじみのクロマトグラム

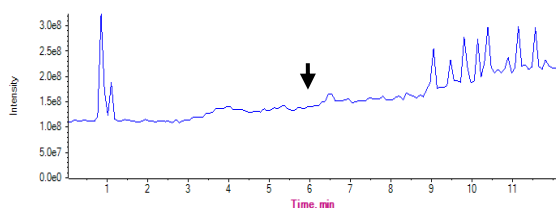


図 24 牛乳のクロマトグラム

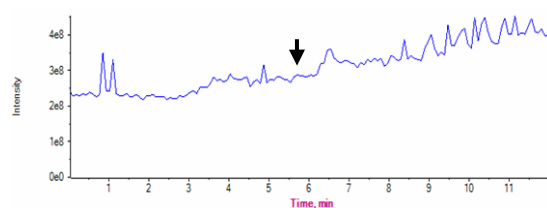


図 25 鶏卵のクロマトグラム

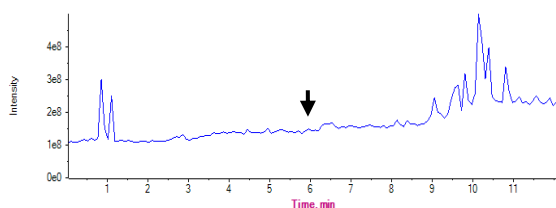


図 26 はちみつのクロマトグラム

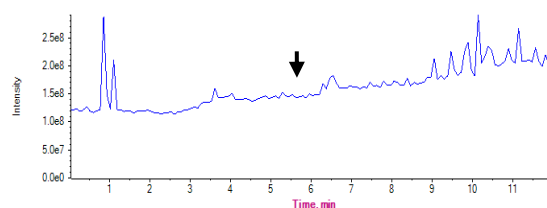


図 27 豚の筋肉のクロマトグラム