

※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

クレソキシムメチル試験法（畜水産物）

## クレソキシムメチル（畜水産物）の検討結果

### 1. 目的及び試験法の検討方針

クレソキシムメチルはストロビルリン系の殺菌剤である。ミトコンドリア内のチトクローム電子伝達系阻害による呼吸阻害で、結果として孢子発芽及び菌糸伸長を阻害し、殺菌効果を示すものと考えられている。農産物及び魚介類においてはクレソキシムメチルが、畜産物においてはクレソキシムメチル及び2-[2-(4-ヒドロキシ-2-メチルフェノキシメチル)フェニル]-2-メトキシイミノ酢酸が規制の対象になっているが、現行の通知試験法はクレソキシムメチルのみを測定対象とし、2-[2-(4-ヒドロキシ-2-メチルフェノキシメチル)フェニル]-2-メトキシイミノ酢酸を含む試験法は示されていない。以上を考慮し、「薬事食品衛生審議会 食品衛生分科会報告書」に記載されている規制対象物質及び残留基準値案を踏まえ、定量限界0.01 mg/kgが設定可能な試験法の検討を行った。

#### 1) 規制対象物質

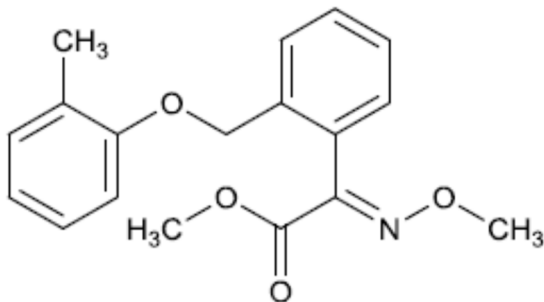
クレソキシムメチル

2-[2-(4-ヒドロキシ-2-メチルフェノキシメチル)フェニル]-2-メトキシイミノ酢酸（以下「代謝物M9」という。）

### 2. 分析対象化合物の構造式、物理化学的性質及び基準値等に関する情報

#### 1) 構造式及び物理化学的性質

クレソキシムメチル



化学式：C<sub>18</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>4</sub>

分子量：313.36

化学名（IUPAC）：methyl(*E*)-methoxyimino-[ $\alpha$ -(*o*-tolylloxy)-*o*-tolyl]acetate

外 観：白色粉末

融 点：101.6～102.5℃

沸 点：なし（310℃で分解）

蒸気圧：2.3×10<sup>-6</sup> Pa（20℃）

溶解性：水 2.0±0.08 mg/L（20℃）、91 mg/L（遊離酸、20℃）

*n*-ヘプタン 1.7、トルエン 111、ジクロロメタン 939、メタノール 14.9

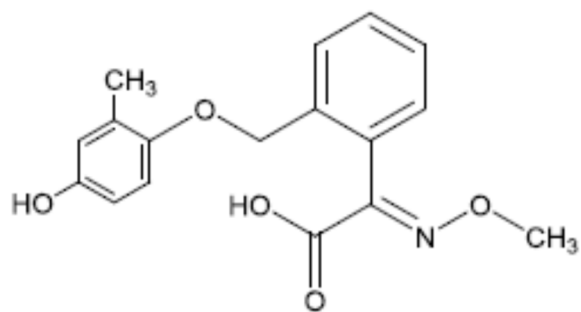
アセトン 217、酢酸エチル 123（以上 g/kg、20℃）

オクタノール/水分配係数：Log P<sub>ow</sub>=3.40（25℃）

安定性：アルカリ下で不安定

（出典：www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/.../Pests.../ Kre-meth.PDF）

## 代謝物 M9



化学式：C<sub>17</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>5</sub>

分子量：315.32

化学名：2-[2-(4-hydroxy-2-methylphenoxy)methyl]phenyl]-2-methoxyimino acetic acid

外観：薄褐色粉末

安定性：光により変質の恐れあり

溶解性：エタノール及びアセトンに可溶

(出典：富士フイルム和光純薬)

### 2) 基準値

牛の筋肉、牛の脂肪及び牛の肝臓：0.05 ppm

乳：0.01 ppm

魚介類：0.03 ppm

#### [実験方法]

##### 1. 試料

###### 1) 購入先

牛の筋肉、牛の脂肪及び牛の肝臓は鹿児島県、うなぎは和歌山県、しじみは都内の業者から、牛乳については都内のスーパーにて購入した。

###### 2) 試料の採取方法

- ①牛の筋肉は脂肪層を可能な限り除き、細切均一化した。
- ②牛の脂肪は筋肉部を可能な限り除き、細切均一化した。
- ③牛の肝臓は全体を細切均一化した。
- ④牛乳は全体をよく混合して均一化した。
- ⑤しじみは貝殻を除き約5分間水切りを行った後細切均一化した。
- ⑥うなぎは活鰻を使用し、頭部を除いた可食部（内臓、骨及び皮を含む）を細切均一化した。

##### 2. 試薬・試液

###### 1) 標準品

クレソキシムメチル標準品：純度100.0%（富士フイルム和光純薬製）

代謝物M9標準品：純度98.1%（富士フイルム和光純薬製）

###### 2) 試薬

アセトン、アセトニトリル、*n*-ヘキサン、メタノール：残留農薬試験用（関東化学製）

アセトニトリル、メタノール：高速液体クロマトグラフ用（関東化学製）

アンモニア水、ギ酸、酢酸アンモニウム：試薬特級（関東化学製）

ケイソウ土：セライト545（関東化学製）

グラファイトカーボンミニカラム：InertSep GC-e（充てん量 250 mg、ジーエルサイエンス製）  
 オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム：InertSep C18（充てん量 1,000 mg、ジーエルサイエンス製）

### 3) 標準溶液、試液の調製方法

#### ①標準溶液の調製方法

標準原液：クレソキシムメチル標準品及び代謝物M9標準品各10 mgを精秤し、それぞれメタノールに溶解して20 mLに定容し、500 mg/Lの標準原液を作成した。なお、代謝物M9はクレソキシムメチルとしての濃度に換算して標準原液を調製した。

検量線用標準溶液：クレソキシムメチル標準原液及び代謝物M9標準原液を0.1 vol%ギ酸・メタノール溶液で希釈し、0.00005～0.00075 mg/Lの濃度の混合標準溶液を調製した。

添加用標準溶液：クレソキシムメチル標準原液及び代謝物M9標準原液をメタノールで希釈し、0.2、0.6及び1 mg/Lの濃度の混合標準溶液を調製した。

#### ②試液の調製方法

##### 0.5 vol%ギ酸・アセトン溶液

ギ酸5 mLにアセトンを加えて1000 mLとした。

##### 0.1 vol%ギ酸

ギ酸1 mLに水を加えて1000 mLとした。

##### 0.1 vol%ギ酸及びメタノール（3：2）混液

0.1 vol%ギ酸150 mL及びメタノール100 mLを混合した。

##### 0.1 vol%ギ酸・メタノール溶液

ギ酸1 mLにメタノールを加えて1000 mLとした。

##### 0.01 vol%ギ酸

0.1 vol%ギ酸100 mLに水を加えて1000 mLとした。

### 3. 装置

ホモジナイザー：ウルトラタラックスT-25ベーシック（イカ・ジャパン製）

ロータリーエバポレーター：R-200（柴田科学製）等

#### LC-MS/MS

|       | 型式         | 会社    |
|-------|------------|-------|
| MS 装置 | QTRAP 5500 | SCIEX |
| LC 装置 | ExionLC AD | SCIEX |
| 解析ソフト | MultiQuant | SCIEX |

### 4. 測定条件

| LC 条件          |  |
|----------------|--|
| カラム            | InertSustain C18<br>サイズ：内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 5 μm<br>会社：ジーエルサイエンス |
| 移動相流速 (mL/min) | 0.2  |
| 注入量 (μL)       | 5  |
| カラム温度 (°C)     | 40   |
| 移動相            | A液：0.01 vol%ギ酸<br>B液：アセトニトリル   |

|             |   |           |           |
|-------------|---|-----------|-----------|
| グラジエント条件    | 時間<br>(分)   | A液<br>(%) | B液<br>(%) |
|             | 0.00  | 60        | 40        |
|             | 10.00   | 30        | 70        |
|             | 13.00   | 30        | 70        |
|             | 13.01   | 0         | 100       |
|             | 17.00   | 0         | 100       |
| MS 条件       |   |           |           |
| 測定モード       | MS/MS、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 (V) | 5500  |           |           |
| 脱溶媒温度 (°C)  | 350   |           |           |
| 脱溶媒ガス       | 窒素 50 psi   |           |           |
| コリジョンガス     | 窒素  |           |           |
| 定量イオン (m/z) | クレソキシムメチル : +314.0 → 115.9<br>[コーン電圧 : 56 (V)、コリジョンエネルギー : 19 (eV)]<br>代謝物 M9 : +316.0 → 269.0<br>[コーン電圧 : 56 (V)、コリジョンエネルギー : 9 (eV)]  |           |           |
| 定性イオン (m/z) | クレソキシムメチル : +314.0 → 130.9<br>[コーン電圧 : 56 (V)、コリジョンエネルギー : 33 (eV)]<br>代謝物 M9 : +316.0 → 116.0<br>[コーン電圧 : 56 (V)、コリジョンエネルギー : 31 (eV)] |           |           |
| 保持時間 (min)  | クレソキシムメチル : 11.5<br>代謝物M9 : 4.6   |           |           |

## 5. 定量

[実験方法] 2. 3) ①に従い調製した混合標準溶液5 µLをLC-MS/MSに注入し、得られたピーク面積から絶対検量線法で検量線を作成した。試験溶液5 µLをLC-MS/MSに注入し、得られたピーク面積と作成した検量線からクレソキシムメチル及び代謝物M9の量を算出した。

## 6. 添加試料の調製

2. 3) で調製した添加用標準溶液を使用した。

牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳、うなぎ及びしじみ（添加濃度：0.01 ppm相当）：1. 2) の試料10.0 gに添加用混合標準溶液0.2 mg/Lを0.5 mL添加しよく混合した後、30分間放置した。

うなぎ及びしじみ（添加濃度：0.03 ppm相当）：1. 2) の試料10.0 gに添加用混合標準溶液0.6 mg/Lを0.5mL添加しよく混合した後、30分間放置した。

牛の筋肉、牛の脂肪及び牛の肝臓（添加濃度：0.05 ppm相当）：1. 2) の試料10.0 gに添加用混合標準溶液1 mg/Lを0.5 mL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

クレソキシムメチル及び代謝物M9を試料からギ酸酸性下アセトンで抽出し、グラファイトカーボンミニカラム及びオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムで精製した後、LC-MS/MSで定量及び確認した。

### 1) 抽出

試料10.0 gを200 mL遠心管に量り採り、0.5 vol%ギ酸・アセトン溶液100 mLを加え、ホモジナイズした後、ケイソウ土を厚さ約1 cmに敷いたろ紙（直径60 mm、No. 4、桐山製作所製）を用いて吸引ろ過した。

ろ紙上の残留物に0.5 vol%ギ酸・アセトン溶液50 mLを加えてホモジナイズした後、上記と同様にろ過した。得られたろ液を合わせて、0.5 vol%ギ酸・アセトン溶液で正確に200 mLとした。この溶液から正確に2 mLを分取した。

## 2) 精製

### ① グラファイトカーボンカラムクロマトグラフィー

グラファイトカーボンミニカラム [InertSep GC-e (250 mg)] に0.5 vol%ギ酸・アセトン溶液5 mLを注入し、流出液は捨てた。このカラムに1) で得られた液を注入した後0.5 vol%ギ酸・アセトン溶液10 mLを注入し、全溶出液を採った。この溶出液に0.1 vol%ギ酸10 mLを加え、40°C以下で10 mL以下まで濃縮した。

### ② オクタデシルシリル化シリカゲルカラムクロマトグラフィー

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム [InertSep C18 (1,000 mg)] に、メタノール及び0.1 vol%ギ酸各5 mLを順次注入し、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、0.1 vol%ギ酸及びメタノール (3 : 2) 混液10 mLを注入し、流出液は捨てた。次いで0.1 vol%ギ酸・メタノール溶液10 mLを注入し、溶出液を10 mL容メスフラスコに受け、0.1 vol%ギ酸・メタノール溶液で正確に10 mLと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

0.5 vol%ギ酸・アセトン溶液抽出

| 0.5 vol%ギ酸・アセトン溶液100 mLを加え、ホモジナイズ後、吸引ろ過  
| 残留物にアセトン50 mLを加え、ホモジナイズ、吸引ろ過  
| ろ液を合わせ、0.5 vol%ギ酸・アセトン溶液で正確に200 mLとする  
↓ 抽出液2 mL分取

グラファイトカーボンミニカラム精製

| 0.5 vol%ギ酸・アセトン溶液5 mLで予備洗浄  
| 全量注入  
| 0.5 vol%ギ酸・アセトン溶液10 mLで溶出  
↓ 0.1 vol%ギ酸10 mLを加える

濃縮 (溶媒除去)

↓ 約10 mL以下まで減圧濃縮

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム精製

| メタノール及び0.1 vol%ギ酸各5 mLで予備洗浄  
| 全量注入  
| 0.1 vol%ギ酸及びメタノール (3 : 2) 混液10 mLで洗浄  
| 0.1 vol%ギ酸・メタノール溶液10 mLで溶出  
↓ 0.1 vol%ギ酸・メタノール溶液で正確に10 mLとし、試験溶液とする

試験溶液

↓

LC-MS/MS定量

5 µL注入

## 8. マトリックス添加標準溶液の調製

定量限界添加の牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳、うなぎ及びしじみはブランク試験溶液から0.5 mL分取し溶媒を除去した後、0.0001 mg/Lの混合標準溶液0.5 mLに溶解したものを、マトリックス添加標準溶液とした。

基準値添加のうなぎ及びしじみは、ブランク試験溶液から0.5 mL分取し溶媒を除去した後、0.0003 mg/Lの標準溶液0.5 mLに溶解したものを、マトリックス添加標準溶液とした。

基準値添加の牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓及び牛乳は、ブランク試験溶液から0.5 mL分取し溶媒を除去した後、0.0005 mg/Lの標準溶液0.5 mLに溶解したものを、マトリックス添加標準溶液とした。

### [結果及び考察]

#### 1. 測定条件の検討

##### 1) MS条件の検討

##### 1) 測定条件の検討

クレソキシムメチル及び代謝物M9はESI (+) モードでの測定が可能であった。クレソキシムメチルのESI (+) モード測定時のマススペクトルを図1に示した。クレソキシムメチルのモノアイソトピック質量は313.13であるが、プロトン付加分子 ( $m/z$  314.0  $[M+H]^+$ ) 及びナトリウムイオン付加分子である ( $m/z$  336.0  $[M+Na]^+$ ) が得られた。 $m/z$  314.0及び336.0をプリカーサーイオンとした場合のプロダクトスペクトルを図2に示した。ピーク強度として $m/z$  314.0をプリカーサーイオンとした場合のプロダクトイオンである $m/z$  116.0、次いで $m/z$  131.1が強かったため、プリカーサーイオンとしてプロトン付加分子 $m/z$  314.0を用い、プロダクトイオン $m/z$  116.0を定量用イオン、 $m/z$  131.1を定性用イオンとした。なおナトリウムイオン付加分子 $m/z$  336.0をプリカーサーイオンとした場合、十分なピーク強度のプロダクトイオンが得られなかったため不採用とした。

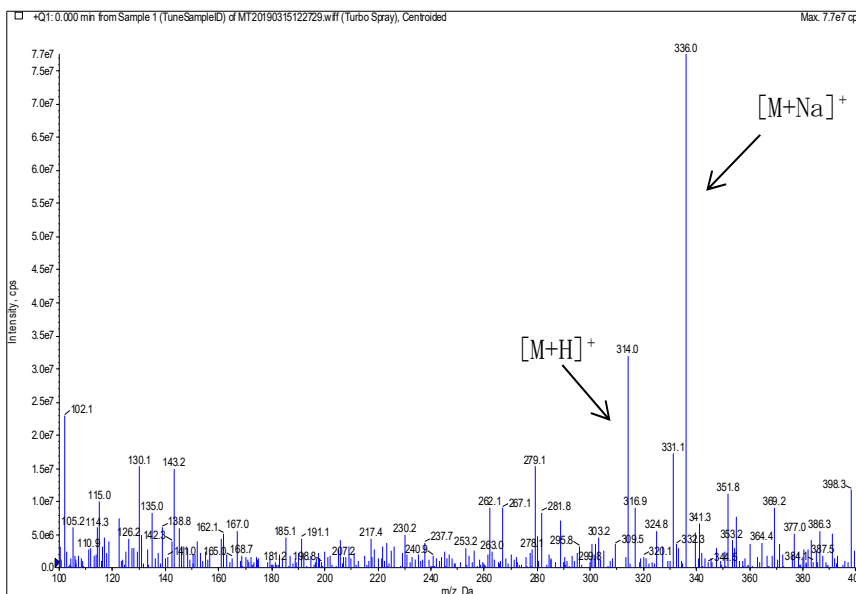


図1 クレソキシムメチルのマススペクトル

スキャン範囲：100~400  $m/z$

測定条件：ESI (+)、CV=56 (CV：コーン電圧)

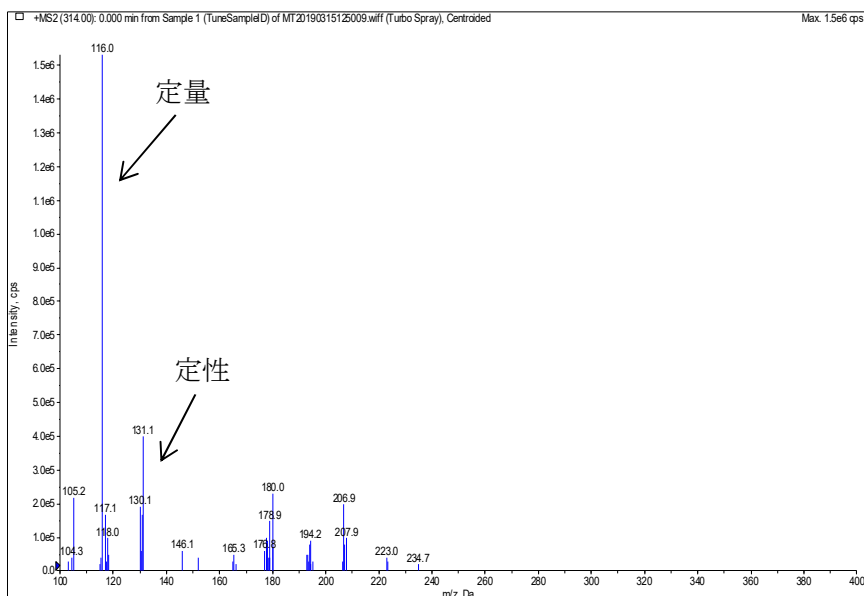


図 2-1 クレゾキシムメチルのプリカーサーイオン  $m/z$  314.0 のプロダクトイオンスペクトル  
スキャン範囲：100~400  $m/z$

測定条件：ESI (+)、CV=56、CE=19 (CV：コーン電圧、CE：コリジョンエネルギー)

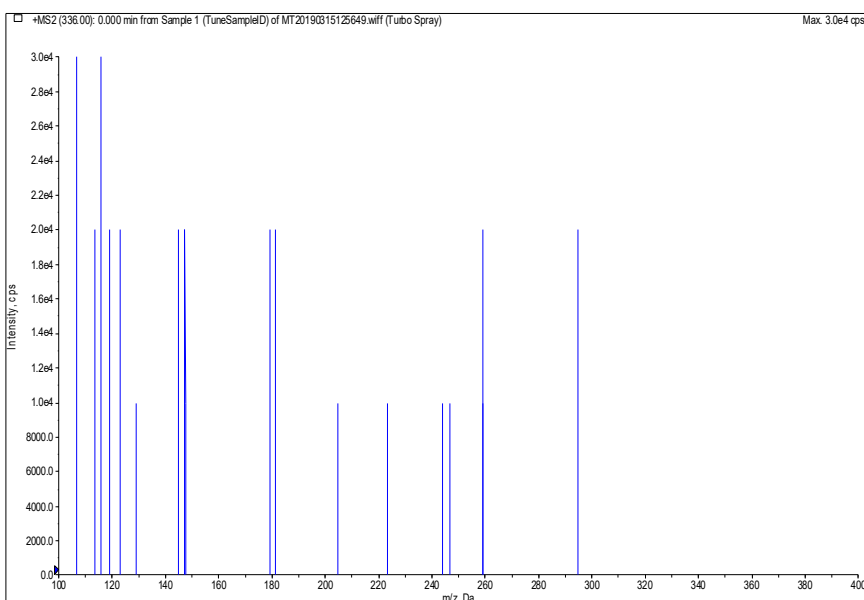


図 2-2 クレゾキシムメチルのプリカーサーイオン  $m/z$  336.0 のプロダクトイオンスペクトル  
スキャン範囲：100~400  $m/z$

測定条件：ESI (+)、CV=56、CE=19 (CV：コーン電圧、CE：コリジョンエネルギー)

続いて代謝物M9のESI (+) モード測定時のマススペクトルを図3に示した。代謝物M9のモノアイソトピック質量は315.11であるが、プロトン付加分子 ( $m/z$  315.9 [M+H]<sup>+</sup>) 及びナトリウムイオン付加分子である ( $m/z$  337.6 [M+Na]<sup>+</sup>) が得られた。 $m/z$  315.9及び337.6をプリカーサーイオンとした場合のプロダクトスペクトルを図4に示した。ピーク強度として $m/z$  315.9をプリカーサーイオンとした場合のプロダクトイオンである $m/z$  269.0、次いで $m/z$  115.8が強かったため、プリカーサーイオンとしてプロトン付加分子 $m/z$  315.9を用い、プロダクトイオン $m/z$  269.0を定量用イオン、 $m/z$  115.8を定性用イオンとした。なおナトリウムイオン付加分子 $m/z$  337.6をプリカーサーイオンとした場合、十分なピーク強度のプロダクトイオンが得られなかったため不採用とした。



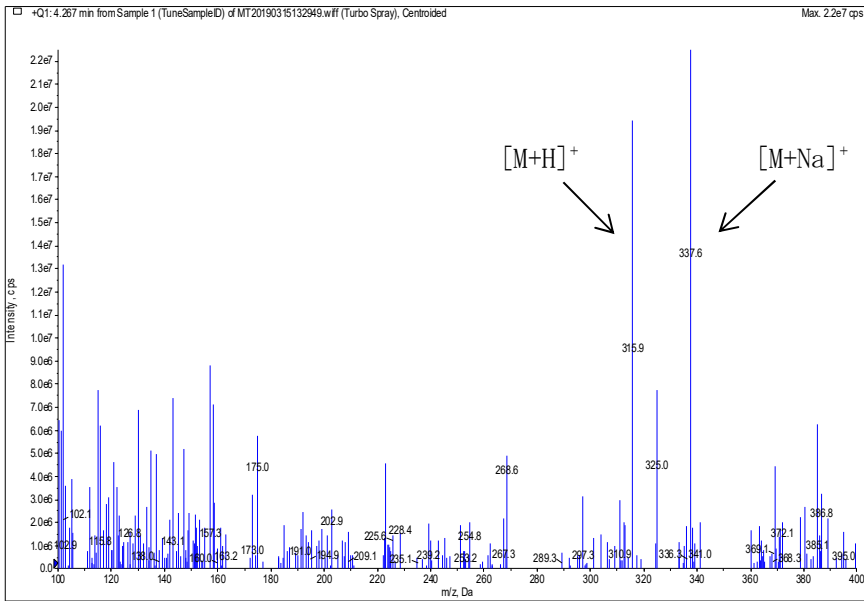


図3 代謝物 M9 のマススペクトル  
 スキャン範囲：100~400  $m/z$   
 測定条件：ESI (+)、CV=56 (CV：コーン電圧)

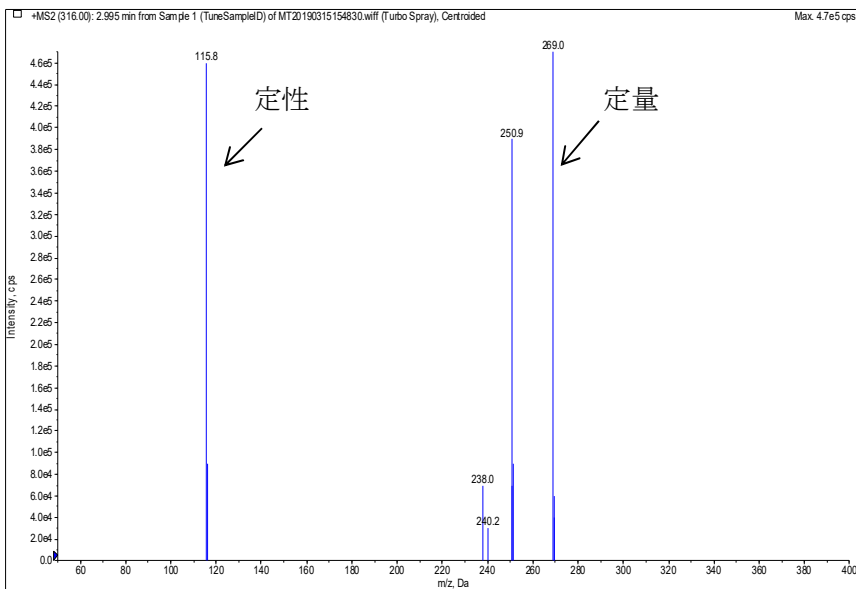


図4-1 代謝物 M9 のプリカーサーイオン  $m/z$  315.9 のプロダクトイオンスペクトル  
 スキャン範囲：100~400  $m/z$   
 測定条件：ESI (+)、CV=56、CE=9 (CV：コーン電圧、CE：コリジョンエネルギー)

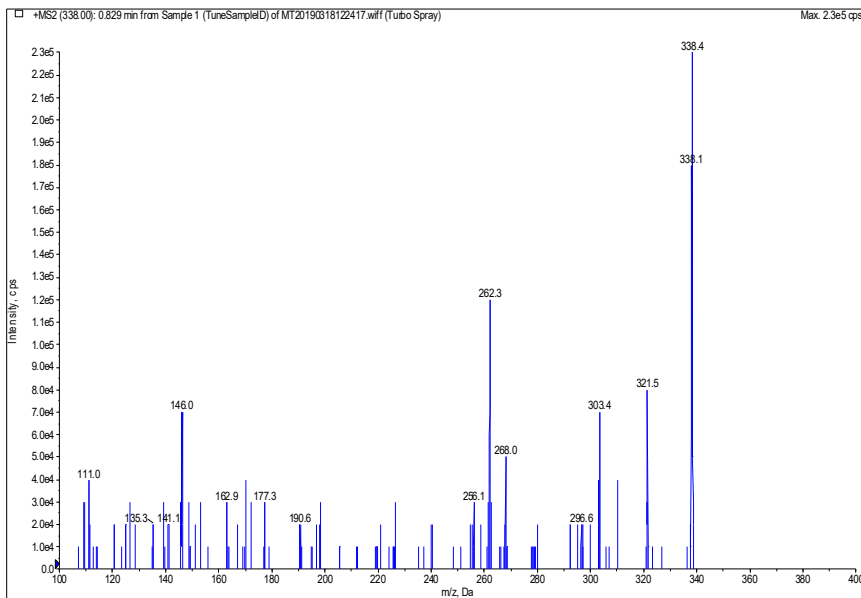


図 4-2 代謝物 M9 のプリカーサーイオン  $m/z$  337.6 のプロダクトイオンスペクトル  
スキャン範囲：100～400  $m/z$

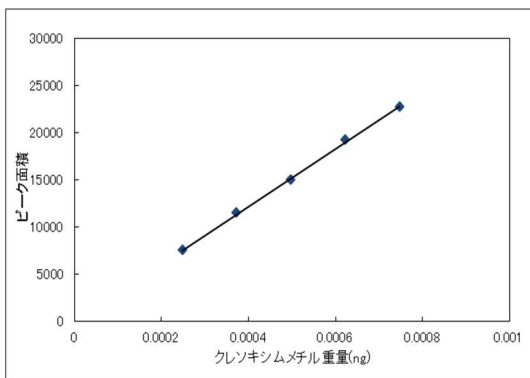
測定条件：ESI (+)、CV=56、CE=15 (CV：コーン電圧、CE：コリジョンエネルギー)

## 2) LC条件の検討

分離カラムには、InertSustain C18 (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 5  $\mu\text{m}$ ) を、移動相には、A液としてギ酸又は酢酸アンモニウムを、B液としてアセトニトリル又はメタノールを用いて検討を行った。再現性及び分離は全て良好であったが、ピーク強度はギ酸及びアセトニトリルの組み合わせが最も高感度であった。ギ酸濃度について0.01 vol%と0.1 vol%を比較したところ、0.01 vol%でより良好な感度が得られた。以上の結果よりカラムはInertSustain C18を、移動相には0.01 vol%ギ酸及びアセトニトリルを用い、0.01 vol%ギ酸及びアセトニトリル (3 : 2) から (3 : 7) までの濃度勾配を10分間で行い、(3 : 7) で3分間保持した後、(0 : 100) で4分間保持することとした。

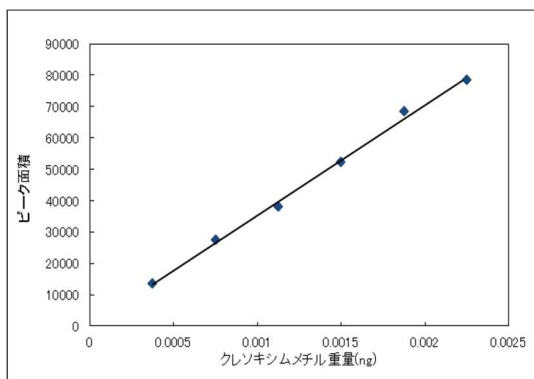
## 3) 検量線

図5にクレソキシムメチル及び代謝物M9の検量線の例を示した。0.00005 mg/L (0.00025 ng) ～0.00015 mg/L (0.00075 ng)、0.000075 mg/L (0.000375 ng) ～0.00045 mg/L (0.00225 ng)、0.000125 mg/L (0.000625 ng) ～0.00075 mg/L (0.0375 ng) の濃度範囲で作成した検量線の相関係数は、いずれも0.998以上であり良好な直線性を示した。



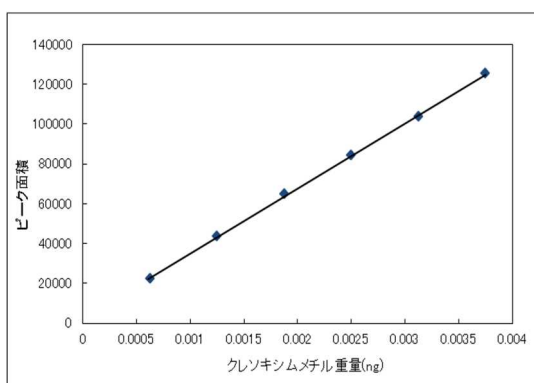
データ処理装置設定条件の一例  
データ処理ソフト (メーカー) : MultiQuant (SCIEX製)  
ピークの定量方法 : ピーク面積法  
検量線の種類 : 最小二乗法  
検量線基準ピークの重量 : 0.00025 ng～0.00075 ng  
傾き (a) :  $a=30552900$   
切片 (b) :  $b=-70$   
R : 0.9996

図 5-1 クレソキシムメチル検量線例 ( $m/z$  314→116)



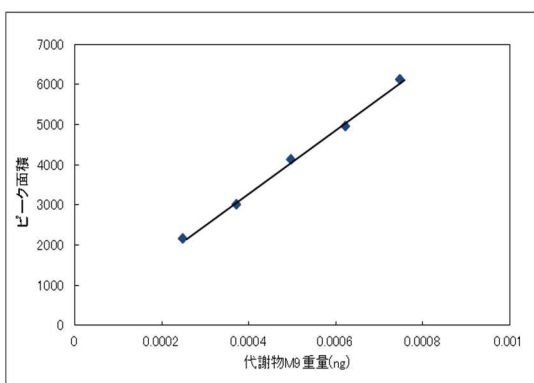
データ処理装置設定条件の一例  
 データ処理ソフト (メーカー) : MultiQuant (SCIEX製)  
 検量線の種類: 最小二乗法  
 検量線基準ピークの重量: 0.000375 ng~0.00225 ng  
 ピークの定量方法: ピーク面積法  
 傾き (a) : a=35182300  
 切片 (b) : b=199  
 R : 0.9982

図 5-2 クレスキシムメチル検量線例 ( $m/z$  314→116)



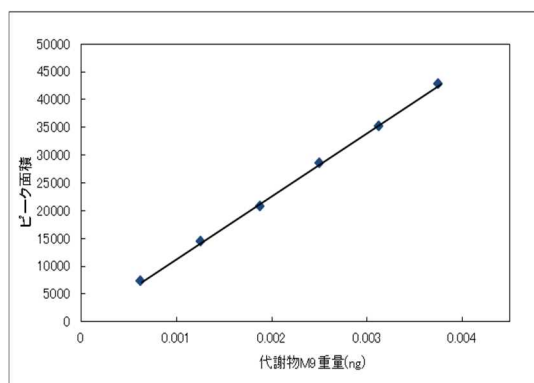
データ処理装置設定条件の一例  
 データ処理ソフト (メーカー) : MultiQuant (SCIEX製)  
 ピークの定量方法: ピーク面積法  
 検量線の種類: 最小二乗法  
 検量線基準ピークの重量: 0.000625 ng~0.0375 ng  
 傾き (a) : a=32646800  
 切片 (b) : b=2194  
 R : 0.9998

図 5-3 クレスキシムメチル検量線例 ( $m/z$  314→116)



データ処理装置設定条件の一例  
 データ処理ソフト (メーカー) : MultiQuant (SCIEX製)  
 ピークの定量方法: ピーク面積法  
 検量線の種類: 最小二乗法  
 検量線基準ピークの重量: 0.00025 ng~0.00075 ng  
 傾き (a) : a=7882310  
 切片 (b) : b=128  
 R : 0.9987

図 5-4 代謝物 M9 検量線例 ( $m/z$  316→269)



データ処理装置設定条件の一例  
 データ処理ソフト (メーカー) : MultiQuant (SCIEX製)  
 ピークの定量方法: ピーク面積法  
 検量線の種類: 最小二乗法  
 検量線基準ピークの重量: 0.000625 ng~0.00375 ng  
 傾き (a) : a=11329200  
 切片 (b) : b=98  
 R : 0.9996

図 5-5 代謝物 M9 検量線例 ( $m/z$  316→269)

#### 4) 定量限界

定量限界の算出結果を以下に示した。

$$0.01 \text{ mg/kg} \left[ (10 \text{ mL}/0.1 \text{ g}^{*1}) \times (0.0005 \text{ ng}/5 \text{ }\mu\text{L}) \right]$$

$$*1 \quad 10.0 \text{ g} \times 2 \text{ mL}/200 \text{ mL}$$

#### 2. 試験溶液調製法の検討

##### 1) 抽出方法の検討

クレソキシムメチルは現通知試験法ではアセトンで、代謝物M9はメーカー提供資料ではメタノールで抽出を行っている。そのためアセトン、メタノール、またその他の溶媒としてアセトニトリルで抽出方法の検討を行った。

まず、抽出操作前に各溶媒への再溶解率の評価を行った。クレソキシムメチル及び代謝物M9各0.01  $\mu\text{g}$ を含む標準溶液を窒素吹付乾固した後、各溶媒1 mLに再溶解した結果を表1に示した。アセトニトリル及びアセトンでは代謝物M9が十分に再溶解できなかつたため抽出溶媒としても不適と判断した。

表1 各溶媒での再溶解率 (%)

|           | アセトニトリル | アセトン | メタノール |
|-----------|---------|------|-------|
| クレソキシムメチル | 100     | 103  | 102   |
| 代謝物M9     | 12      | 0    | 100   |

添加量：各0.01  $\mu\text{g}$

次に、牛の脂肪10 gを加温して融解させ、クレソキシムメチル及び代謝物各0.5  $\mu\text{g}$ を添加後放冷し、再度凝固させた試料からメタノールで抽出を行った結果を表2に示した。代謝物M9の抽出率にばらつきが見られ、安定した回収率が得られないため、メタノールも抽出溶媒として不適と判断した。

表2 メタノールによる牛の脂肪からの抽出率 (%)

|           | 試行1 | 試行2 | 平均  |
|-----------|-----|-----|-----|
| クレソキシムメチル | 99  | 105 | 102 |
| 代謝物M9     | 62  | 85  | 73  |

添加量：各0.5  $\mu\text{g}$

メタノールも抽出溶媒として不適であったため、酸性下及び塩基性下でのアセトン抽出を検討した。抽出操作前に、クレソキシムメチルの酸及びアルカリによる安定性を確認する目的で、1 vol%塩酸及びメタノール (1 : 1) 混液、1 vol%ギ酸及びメタノール (1 : 1) 混液、0.4 vol%アンモニア及びメタノール (1 : 1) 混液でそれぞれ0.01 mg/Lの標準溶液を作成し、15 時間後の残存率を表3に示した。クレソキシムメチルはアルカリで分解することが示唆されたため、塩基性条件となる抽出溶媒は不適と判断した。

表3 酸及びアルカリ下でのクレソキシムメチル残存率 (%)

|           | 1 vol%塩酸及び<br>メタノール (1 : 1) 混<br>液 | 1 vol%ギ酸及び<br>メタノール (1 : 1) 混<br>液 | 0.4 vol%アンモニア及び<br>メタノール (1 : 1) 混液 |
|-----------|------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| クレソキシムメチル | 101                                | 101                                | 56                                  |

残存率は、水及びメタノール (1 : 1) 混液で作成した同濃度の標準溶液の面積を100%として算出

次に牛の脂肪10 gにクレソキシムメチル及び代謝物M9各0.5  $\mu\text{g}$ を添加後、1 vol%ギ酸・アセトン溶液及

び1 vol%塩酸・アセトン溶液で抽出を行った結果を表4に示した。また、対照としてアセトンのみでの抽出率も同時に示した。酸性条件下での抽出率はどちらも良好であったため、より夾雑が少ないと考えられるギ酸・アセトン溶液を抽出に用いることとした。

表4 各溶液による牛の脂肪からの抽出率 (%)

|           | アセトン | 1 vol%ギ酸・アセトン<br>溶液 | 1 vol%塩酸・アセトン<br>溶液 |
|-----------|------|---------------------|---------------------|
| クレソキシムメチル | 91   | 102                 | 102                 |
| 代謝物M9     | 0    | 96                  | 115                 |

添加量：各0.5 μg

表4より代謝物M9の抽出率は酸濃度に依存することが予想されるため、抽出に用いるギ酸濃度の検討を行った。牛の脂肪10.0gにクレソキシムメチル及び代謝物各0.5 μgを添加した後、0.01、0.1、0.3、0.5及び1 vol%ギ酸・アセトン溶液で抽出を行った結果を図6に示した。ギ酸濃度0.3 vol%で90%以上の回収率が得られたため、十分量と考えられる0.5 vol%ギ酸・アセトン抽出溶媒として採用した。

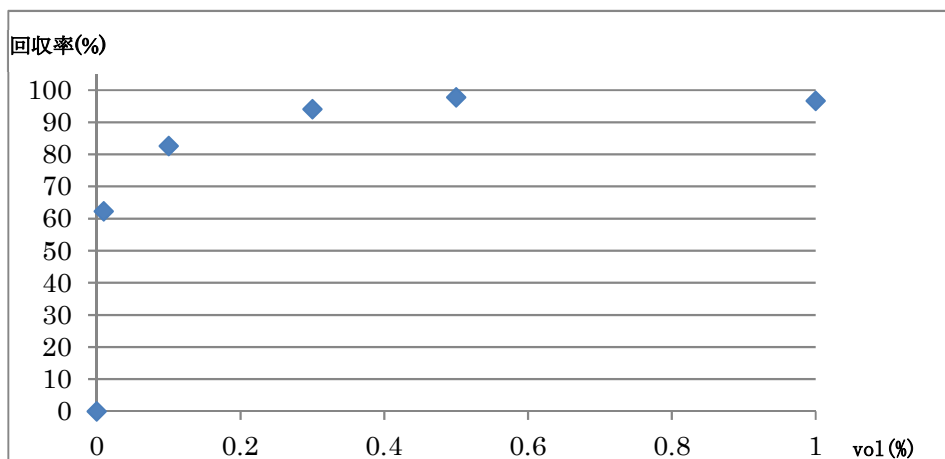


図6 抽出に用いるギ酸濃度の検討結果

## 2) 脱脂方法の検討

脂溶性の妨害物質の除去を目的として、アセトニトリル/ヘキサン分配を検討した。*n*-ヘキサン30 mLにクレソキシムメチル及び代謝物M9各0.02 μgを添加し、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル30 mLずつで3回振とう抽出を行った結果を表5に示した。代謝物M9は、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリルで抽出できなかったため不採用とした。

表5 アセトニトリル/ヘキサン分配の検討 (%)

|           | <i>n</i> -ヘキサン飽和アセトニトリル |                |                | 合計  |
|-----------|-------------------------|----------------|----------------|-----|
|           | 30 mL<br>(1回目)          | 30 mL<br>(2回目) | 30 mL<br>(3回目) |     |
| クレソキシムメチル | 103                     | 3              | 0              | 106 |
| 代謝物 M9    | 0                       | 0              | 0              | 0   |

添加量：各0.02 μg

次に酸性下でのアセトニトリル/ヘキサン分配を検討した。*n*-ヘキサン30 mLにクレソキシムメチル及

び代謝物M9各0.02 µgを添加し、1 vol%ギ酸含有*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル30 mLずつで3回振とう抽出を行った結果を表6に示した。代謝物M9は、酸性下では20%程度*n*-ヘキサン飽和アセトニトリルに溶解したものの抽出不十分なことから、アセトニトリル/ヘキサン分配は脱脂方法として不採用とした。

表6 アセトニトリル/ヘキサン分配の検討 (%)

|           | 1 vol%ギ酸含有 <i>n</i> -ヘキサン飽和アセトニトリル |       |       | 合計 |
|-----------|------------------------------------|-------|-------|----|
|           | 30 mL                              | 30 mL | 30 mL |    |
|           | (1回目)                              | (2回目) | (3回目) |    |
| クレソキシムメチル | 95                                 | 3     | 0     | 98 |
| 代謝物 M9    | 21                                 | 0     | 0     | 21 |

添加量：各0.02 µg

### 3) 精製方法の検討

#### ①オクタデシルシリル化シリカゲルクロマトグラフィー

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムによる精製を検討した。InertSep C18 (1,000 mg) をアセトニトリル及び水各5 mLで予備洗浄した後、クレソキシムメチル及び代謝物M9各0.1 µgを水10 mLで負荷しアセトニトリル及び水の混液各10 mLをオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムに順次負荷、溶出したときの溶出状況を表7に示した。また、0.1 vol%ギ酸を用いた酸性下での溶出状況を表8に示した。代謝物M9は酸性下で溶出が異なった。酸なしの状態では吸着が強く、サンプル共存下での後ろずれを考慮し、酸性下での溶出を採用することとした。

表7 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① (%)

|           | アセトニトリル及び水混液 |       |       |       | アセトニトリル | 合計  |
|-----------|--------------|-------|-------|-------|---------|-----|
|           | 1 : 4        | 2 : 3 | 3 : 2 | 4 : 1 |         |     |
| 溶出量 (mL)  | 10           | 10    | 10    | 10    | 10      |     |
| クレソキシムメチル | 0            | 0     | 85    | 10    | 1       | 96  |
| 代謝物M9     | 0            | 0     | 104   | 9     | 0       | 113 |

InertSep C18、充てん量1,000 mg、ジーエルサイエンス製

添加量：各0.1 µg

表8 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② (%)

|           | アセトニトリル及び0.1 vol%ギ酸混液 |       |       |       | アセトニトリル | 合計  |
|-----------|-----------------------|-------|-------|-------|---------|-----|
|           | 1 : 4                 | 2 : 3 | 3 : 2 | 4 : 1 |         |     |
| 溶出量 (mL)  | 10                    | 10    | 10    | 10    | 10      |     |
| クレソキシムメチル | 0                     | 0     | 88    | 8     | 1       | 97  |
| 代謝物M9     | 0                     | 106   | 10    | 0     | 0       | 116 |

InertSep C18、充てん量1,000 mg、ジーエルサイエンス製

添加量：各0.1 µg

表8の結果をもとにアセトニトリル及び0.1 vol%ギ酸 (1 : 4) 混液で洗浄を行った後、アセトニトリル及び0.1 vol%ギ酸 (4 : 1) 混液で溶出したときの溶出率を表9に示した。試薬回収では良好であったが牛の脂肪試料共存下で代謝物M9の回収が不十分であった。この結果はギ酸濃度を0.5 vol%に上げて70%程度の溶出率であった。

表9 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③ (%)

|           |         | アセトニトリル及び<br>0.1 vol%ギ酸 (1:4) 混液 |         | アセトニトリル及び<br>0.1 vol%ギ酸 (4:1) 混液 |     | 合計 |
|-----------|---------|----------------------------------|---------|----------------------------------|-----|----|
|           |         | 液                                |         |                                  |     |    |
|           |         | 10 mL                            | 0-10 mL | 10-20 mL                         |     |    |
| クレソキシムメチル | 標準溶液    | 0                                | 92      | -                                | 92  |    |
|           | 牛の脂肪共存下 | 0                                | 91      | 6                                | 97  |    |
| 代謝物M9     | 標準溶液    | 0                                | 103     | -                                | 103 |    |
|           | 牛の脂肪共存下 | 0                                | 53      | 7                                | 60  |    |

InertSep C18、充てん量1,000 mg、ジーエルサイエンス製

添加量：各0.1 µg

牛の脂肪試料0.1 g相当共存下

続いてメタノールを用いた溶出を試みた。InertSep C18 (1,000 mg) をメタノール及び水各 5 mL で予備洗浄した後、クレソキシムメチル及び代謝物 M9 各 0.1 µg を水 10 mL に負荷しメタノール及び 0.1 vol%ギ酸の混液各 10 mL をオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムに順次負荷、溶出したときの溶出状況を表 10 に示した。

表10 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② (%)

|           | 0.1 vol%ギ酸及びメタノール混液 |     |     |     | 0.1 vol%ギ酸・<br>メタノール | 合計 |
|-----------|---------------------|-----|-----|-----|----------------------|----|
|           | 1:4                 | 2:3 | 3:2 | 4:1 | 10                   |    |
| 溶出量 (mL)  | 10                  | 10  | 10  | 10  | 10                   |    |
| クレソキシムメチル | 0                   | 0   | 54  | 42  | 0                    | 96 |
| 代謝物M9     | 0                   | 0   | 0   | 87  | Tr                   | 87 |

InertSep C18、充てん量1,000 mg、ジーエルサイエンス製

添加量：各0.1 µg

表10の結果をもとに、牛の脂肪及び筋肉を対象にメタノール及び0.1 vol%ギ酸 (2:3) 混液で洗浄を行った後、0.1 vol%ギ酸・メタノール溶液で溶出した結果を表11に示した。牛の脂肪での回収率は向上したが、牛の筋肉共存下での回収率は不十分であった。

表 11 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④ (%)

|           |         | メタノール及び<br>0.1 vol%ギ酸 (2:3) 混液 |         | 0.1 vol%ギ酸・メタノール溶液 |     | 合計 |
|-----------|---------|--------------------------------|---------|--------------------|-----|----|
|           |         | 液                              |         |                    |     |    |
|           |         | 10 mL                          | 0-10 mL | 10-20 mL           |     |    |
| クレソキシムメチル | 標準溶液    | 0                              | 97      | Tr                 | 97  |    |
|           | 牛の脂肪共存下 | 0                              | 94      | 1                  | 95  |    |
|           | 牛の筋肉共存下 | 0                              | 93      | 0                  | 93  |    |
| 代謝物M9     | 標準溶液    | 0                              | 104     | 0                  | 104 |    |
|           | 牛の脂肪共存下 | 0                              | 95      | 1                  | 96  |    |
|           | 牛の筋肉共存下 | 0                              | 35      | 0                  | 35  |    |

InertSep C18、充てん量1,000 mg、ジーエルサイエンス製

添加量：各0.1 µg

牛の脂肪及び牛の筋肉試料0.1 g相当共存下

②グラファイトカーボンミニカラムによる精製の検討

牛の筋肉共存下での回収率が不十分であったため、追加精製を検討した。追加の精製工程は、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム精製の前に実施し、抽出液そのままの負荷、溶出を想定し、グラファイトカーボンミニカラムを選択した。InertSep GC-e 250 mg を 0.5 vol%ギ酸・アセトン溶液 5 mL で洗浄した後、クレソキシムメチル及び代謝物 M9 各 0.1 µg を添加し、0.5 vol%ギ酸・アセトン溶液で溶出した時の回収率を表 12 に示した。標準溶液、試料共存下共に良好な回収率が得られた。

表 12 グラファイトカーボンミニカラムからの溶出状況 (%)

|           |         | 0.5 vol%ギ酸・アセトン溶液 |          | 合計  |
|-----------|---------|-------------------|----------|-----|
|           |         | 0-10 mL           | 10-20 mL |     |
| クレソキシムメチル | 標準溶液    | 101               | 0        | 101 |
|           | 牛の脂肪共存下 | 100               | 0        | 100 |
|           | 牛の筋肉共存下 | 97                | Tr       | 97  |
| 代謝物M9     | 標準溶液    | 104               | 0        | 104 |
|           | 牛の脂肪共存下 | 101               | 0        | 101 |
|           | 牛の筋肉共存下 | 100               | Tr       | 100 |

InertSep GC-e、充てん量250 mg、ジーエルサイエンス製

添加量：各0.1 µg

牛の脂肪及び牛の筋肉試料0.1 g相当共存下

次に牛の筋肉共存下の InertSep GC-e 溶出液に 0.1 vol%ギ酸 10 mL を加え 10 mL 以下まで減圧濃縮し、クレソキシムメチル及び代謝物 M9 各 0.1 µg を添加した。この液を InertSep C18 (1,000 mg) に負荷し 0.1 vol%ギ酸及びメタノール (3:2) 混液で洗浄を行った後 0.1 vol%ギ酸・メタノール溶液で溶出したときの回収率を表 13 に示した。牛の筋肉での低回収は改善され、良好な回収率を得ることができた。

表 13 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⑤ (%)

|           |         | 0.1 vol%ギ酸及び<br>メタノール (3:2) 混液 |         | 0.1 vol%ギ酸・メタノール溶液 |          | 合計  |
|-----------|---------|--------------------------------|---------|--------------------|----------|-----|
|           |         | 0-10 mL                        | 0-10 mL | 10-20 mL           | 10-20 mL |     |
| クレソキシムメチル | 牛の筋肉共存下 | 0                              | 96      | Tr                 |          | 96  |
| 代謝物M9     | 牛の筋肉共存下 | 0                              | 99      | 2                  |          | 101 |

試行数2の平均値を入力

InertSep GC-e、充てん量250 mg、ジーエルサイエンス製

InertSep C18、充てん量1,000 mg、ジーエルサイエンス製

添加量：各0.1 µg

牛の筋肉試料0.1 g相当共存下

表 13 の結果より、代謝物 M9 はオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム精製の際、若干ではあるが 10-20 mL 画分に溶出がずれてしまう。これは、代謝物 M9 の脂肪成分への吸着の影響が考えられるため、脂肪試料を用いてオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムの画分ごとの回収率を再度確認した。牛の脂肪抽出液に、クレソキシムメチル及び代謝物 M9 各 0.1 µg を添加し、グラファイトカーボンミニカラム精製を行った溶出液に 0.1 vol%ギ酸 10 mL を加え 10 mL 以下まで減圧濃縮する。この液



を InertSep C18 (1,000 mg) に負荷し、メタノール及び 0.1 vol% ギ酸 (2 : 3) 混液で洗浄を行った後 0.1 vol% ギ酸含有メタノールで 0-4 mL 画分、4-6 mL 画分、以降各 2 mL ずつ 20 mL まで画分を取った結果を表 14 に示した。代謝物 M9 は 5 mL までに大半が溶出し、その後、12 mL までで溶出がしきっている結果が得られ、溶出液量は 10 mL で問題ないと判断した。

表 14 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⑤ (%)

|        | メタノール及び<br>0.1 vol% ギ酸<br>(2 : 3) 混液 |     | 0.1 vol% ギ酸・メタノール溶液 |     |      |       |       |       |       |       | 合計  |
|--------|--------------------------------------|-----|---------------------|-----|------|-------|-------|-------|-------|-------|-----|
|        | 0-10 mL                              | 0-4 | 4-6                 | 6-8 | 8-10 | 10-12 | 12-14 | 14-16 | 16-18 | 18-20 |     |
|        | クレソキシムメチル                            | 0   | 89                  | 6   | 0    | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     |     |
| 代謝物 M9 | 0                                    | 86  | 7                   | 5   | 2    | 1     | 0     | 0     | 0     | 0     | 101 |

InertSep Gc-e、充てん量250 mg、ジーエルサイエンス製

InertSep C18、充てん量1,000 mg、ジーエルサイエンス製

添加量：各0.1 µg

牛の脂肪試料0.1 g相当共存下

### ③その他の精製カラム検討

その他のカラムとしてアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム、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を5 vol% ギ酸・アセトン溶液10 mLで予備洗浄した後、クレソキシムメチル及び代謝物M9各0.1 µgを添加し0.5 vol% ギ酸・アセトン溶液4 mLで負荷し、5 vol% ギ酸・アセトン溶液で溶出したときの溶出状況を表15に示した。いずれも5 vol% ギ酸・アセトン溶液10 mLで溶出でき、精製カラムとしての採用も可能と思われたが、脱脂も兼ねた精製カラムとして採用したオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムとグラファイトカーボンミニカラムによる精製で測定が可能であったため、アミノプロピ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精製は省略した。

表 15-1 アミノ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 (%)

|           | 5 vol% ギ酸・アセトン溶液 |          | 合計  |
|-----------|------------------|----------|-----|
|           | 0-10 mL          | 10-20 mL |     |
| クレソキシムメチル | 104              | 0        | 104 |
| 代謝物M9     | 102              | 0        | 102 |

InertSep NH2 (充てん量1,000 mg)、ジーエルサイエンス製

添加量：各0.2 µg

表15-2 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からの溶出状況 (%)

|           | 5 vol% ギ酸・アセトン溶液 |          | 合計  |
|-----------|------------------|----------|-----|
|           | 0-10 mL          | 10-20 mL |     |
| クレソキシムメチル | 103              | 0        | 103 |
| 代謝物M9     | 99               | 0        | 99  |

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

添加量：0.2 µg

### 3. 添加回収試験

牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳、うなぎ及びしじみの6食品を用いて、[実験方法] 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代表的なクロマトグラムを図7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8に示した。

#### 1) 選択性

選択性の結果を表16に示した。検討した何れの試料においてもクレソキシムメチル及び代謝物M9の定量を妨害するようなピークは認められず、選択性は良好であった。

表16 選択性の評価

| No. | 分析対象化合物   | 食品名  | 定量限界 (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) <sup>1)</sup> |      |     |        |                            |     | 選択性の評価 <sup>3)</sup> | 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 <sup>2)</sup> |     |                      |         | 面積(高さ)比 (a)/(b) |        |  |
|     |           |      |              |           |               |      |                         | n=1  | n=2 | 平均 (a) | n=1                        | n=2 |                      |         |                 | 平均 (b) |  |
| 1   | クレソキシムメチル | 牛の筋肉 | 0.01         | 0.05      | 基準値           | 0.05 | < 0.100                 | 面積   | 0   | 0      | 0                          |     |                      | #DIV/0! | #DM/0!          | ○      |  |
|     |           | 牛の脂肪 | 0.01         | 0.05      | 基準値           | 0.05 | < 0.100                 | 面積   | 0   | 0      | 0                          |     |                      | #DIV/0! | #DM/0!          | ○      |  |
|     |           | 牛の肝臓 | 0.01         | 0.05      | 基準値           | 0.05 | < 0.100                 | 面積   | 0   | 0      | 0                          |     |                      | #DIV/0! | #DM/0!          | ○      |  |
|     |           | 乳    | 0.01         | 0.01      | 定量限界          | 0.01 | < 0.333                 | 面積   | 0   | 0      | 0                          |     |                      | #DIV/0! | #DM/0!          | ○      |  |
|     |           | うなぎ  | 0.01         | 0.03      | 基準値           | 0.03 | < 0.100                 | 面積   | 0   | 0      | 0                          |     |                      | #DIV/0! | #DM/0!          | ○      |  |
|     |           | しじみ  | 0.01         | 0.03      | 基準値           | 0.03 | < 0.100                 | 面積   | 0   | 0      | 0                          |     |                      | #DIV/0! | #DM/0!          | ○      |  |
| 2   | 代謝物M9     | 牛の筋肉 | 0.01         | 0.05      | 基準値           | 0.05 | < 0.100                 | 面積   | 0   | 0      | 0                          |     |                      | #DIV/0! | #DM/0!          | ○      |  |
|     |           | 牛の脂肪 | 0.01         | 0.05      | 基準値           | 0.05 | < 0.100                 | 面積   | 0   | 0      | 0                          |     |                      | #DIV/0! | #DM/0!          | ○      |  |
|     |           | 牛の肝臓 | 0.01         | 0.05      | 基準値           | 0.05 | < 0.100                 | 面積   | 0   | 0      | 0                          |     |                      | #DIV/0! | #DM/0!          | ○      |  |
|     |           | 牛乳   | 0.01         | 0.05      | 基準値           | 0.05 | < 0.100                 | 面積   | 0   | 0      | 0                          |     |                      | #DIV/0! | #DM/0!          | ○      |  |
|     |           | うなぎ  | 0.01         | 0.03      | 基準値           | 0.03 | < 0.100                 | 面積   | 0   | 0      | 0                          |     |                      | #DIV/0! | #DM/0!          | ○      |  |
|     |           | しじみ  | 0.01         | 0.03      | 基準値           | 0.03 | < 0.100                 | 面積   | 0   | 0      | 0                          |     |                      | #DIV/0! | #DM/0!          | ○      |  |

\*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

真度及び併行精度の検討結果を表17に示した。クレソキシムメチルの真度は84.8~100.2%、併行精度は1.6~6.1%であり、目標値を十分に満たした。クレソキシムメチルのS/N比の平均値は65.8~115.3でありS/N $\geq$ 10を十分に満たした。代謝物M9の真度は79.6~94.7%、併行精度は1.9~7.9%であり、目標値を十分に満たした。代謝物M9のS/N比の平均値は59.5~88.6でありS/N $\geq$ 10を十分に満たした。

表17 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 (mg/kg) | 基準値 (ppm) | 添加濃度 (ppm) | 定量限界の評価 <sup>1)</sup> | 検査線      |      |                  | 回収率(%) |        |       |       |      | 真度 (%) | 併行精度 (RSD%) | S/N <sup>2)</sup> |       |         | 備考   |
|------|-----------|------|--------------|-----------|------------|-----------------------|----------|------|------------------|--------|--------|-------|-------|------|--------|-------------|-------------------|-------|---------|------|
|      |           |      |              |           |            |                       | 傾き       | 切片   | r <sup>2</sup> 値 | n=1    | n=2    | n=3   | n=4   | n=5  |        |             | Max.              | Mn.   | 平均値     |      |
|      |           |      |              |           |            |                       |          |      |                  |        |        |       |       |      |        |             |                   |       |         |      |
| 1    | クレソキシムメチル | 牛の筋肉 | 0.01         | 0.05      | 0.01       | S/N                   | 19357000 | 109  | 0.9956           | 91.4   | 88.7   | 93.8  | 86.2  | 91.0 | 90.2   | 3.2         | 119.0             | 111.5 | 115.3   |      |
|      |           | 牛の筋肉 | 0.01         | 0.05      | 0.05       | —                     | 32646800 | 2194 | 0.9997           | 90.3   | 91.6   | 92.9  | 92.4  | 89.3 | 91.3   | 1.6         | -                 | -     | #VALUE! |      |
|      |           | 牛の脂肪 | 0.01         | 0.05      | 0.01       | S/N                   | 31276000 | -77  | 0.9967           | 91.8   | 97.9   | 91.0  | 85.7  | 96.7 | 92.6   | 5.3         | 67.6              | 64.0  | 65.8    |      |
|      |           | 牛の脂肪 | 0.01         | 0.05      | 0.05       | —                     | 33882100 | 1440 | 0.9990           | 85.4   | 89.0   | 85.0  | 92.4  | 85.8 | 87.5   | 3.6         | -                 | -     | #VALUE! |      |
|      |           | 牛の肝臓 | 0.01         | 0.05      | 0.01       | S/N                   | 30552900 | -70  | 0.9993           | 98.8   | 100.8  | 94.6  | 102.3 | 93.3 | 97.9   | 4.0         | 80.1              | 73.3  | 76.7    |      |
|      |           | 牛の肝臓 | 0.01         | 0.05      | 0.05       | —                     | 31571500 | 2725 | 0.9993           | 90.3   | 88.9   | 87.5  | 90.3  | 91.7 | 89.7   | 1.8         | -                 | -     | #VALUE! |      |
|      |           | 乳    | 0.01         | 0.01      | 0.01       | S/N                   | 30552900 | -70  | 0.9993           | 103.9  | 104.8  | 105.2 | 94.1  | 92.8 | 100.2  | 6.1         | 76.4              | 74.6  | 75.5    |      |
|      |           | うなぎ  | 0.01         | 0.03      | 0.01       | S/N                   | 30571800 | -35  | 0.9989           | 83.4   | 87.8   | 86.9  | 85.5  | 80.6 | 84.8   | 3.4         | 94.9              | 65.1  | 80.0    |      |
|      |           | うなぎ  | 0.01         | 0.03      | 0.03       | —                     | 35182300 | 199  | 0.9964           | 92.4   | 88.9   | 86.6  | 82.5  | 82.8 | 86.6   | 4.8         | -                 | -     | #VALUE! |      |
|      |           | しじみ  | 0.01         | 0.03      | 0.01       | S/N                   | 30571800 | -35  | 0.9989           | 87.3   | 94.5   | 89.9  | 94.3  | 88.7 | 90.9   | 3.6         | 88.3              | 72.6  | 80.5    |      |
|      |           | しじみ  | 0.01         | 0.03      | 0.03       | —                     | 32182300 | 199  | 0.9964           | 85.9   | 83.7   | 84.8  | 89.8  | 91.2 | 87.1   | 3.7         | -                 | -     | #VALUE! |      |
|      |           | 2    | 代謝物M9        | 牛の筋肉      | 0.01       | 0.05                  | 0.01     | S/N  | 7882310          | 128    | 0.9975 | 92.9  | 101.9 | 82.5 | 88.7   | 88.4        | 90.9              | 7.9   | 88.3    | 68.3 |
| 牛の筋肉 | 0.01      |      |              | 0.05      | 0.05       | —                     | 11329200 | -98  | 0.9993           | 82.8   | 80.2   | 78.9  | 79.5  | 79.4 | 80.2   | 1.9         | -                 | -     | #VALUE! |      |
| 牛の脂肪 | 0.01      |      |              | 0.05      | 0.01       | S/N                   | 10579600 | 137  | 0.9952           | 82.7   | 89.3   | 80.6  | 82.4  | 83.4 | 83.7   | 4.0         | 115.4             | 61.8  | 88.6    |      |
| 牛の脂肪 | 0.01      |      |              | 0.05      | 0.05       | —                     | 11679300 | 144  | 0.9992           | 78.3   | 77.6   | 80.6  | 78.9  | 82.8 | 79.6   | 2.6         | -                 | -     | #VALUE! |      |
| 牛の肝臓 | 0.01      |      |              | 0.05      | 0.01       | S/N                   | 11721900 | 46   | 0.9955           | 90.9   | 92.5   | 93.8  | 87.2  | 95.7 | 92.0   | 3.5         | 62.0              | 57.0  | 59.5    |      |
| 牛の肝臓 | 0.01      |      |              | 0.05      | 0.05       | —                     | 11931700 | -166 | 0.9985           | 90.1   | 90.3   | 85.7  | 90.8  | 93.8 | 90.1   | 3.2         | -                 | -     | #VALUE! |      |
| 牛乳   | 0.01      |      |              | 0.01      | 0.01       | S/N                   | 11721900 | 46   | 0.9955           | 87.9   | 102.1  | 98.9  | 97.7  | 86.8 | 94.7   | 7.3         | 65.8              | 57.0  | 61.4    |      |

\*1 S/Nを求める必要がある場合には「S/N」と表示される。

#### 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18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。クレソキシムメチルの面積比は0.92~1.07であり、測定への影響は少ないものと考えられた。代謝物M9の面積比は0.93~1.04であり、測定への影響は少ないものと考えられた。

添加回収試験における真度を表17で求めたピーク面積比で除して補正真度を求め、表19に示した。補

正真度はクレソキシムメチルが85.1~96.7%、代謝物M9が76.6~101.8%であり、試料マトリックスの測定への影響と真度との間に矛盾は見られなかった。

表 18 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<br>(mg/kg) | 基準値<br>(ppm) | 添加濃度<br>(ppm) | 標準溶液<br>濃度 <sup>*1</sup><br>(mg/L) | ピーク面積(高さ) <sup>*2</sup> |                    |                            |       |       |        |       |       | 備考   |                              |
|-----|-----------|------|-----------------|--------------|---------------|------------------------------------|-------------------------|--------------------|----------------------------|-------|-------|--------|-------|-------|------|------------------------------|
|     |           |      |                 |              |               |                                    | 面積又は<br>高さの別            | ブランク <sup>*3</sup> | マトリックス添加標準溶液 <sup>*4</sup> |       |       | 溶媒標準溶液 |       |       |      | ピーク面積<br>(高さ)比 <sup>*5</sup> |
|     |           |      |                 |              |               |                                    |                         |                    | n=1                        | n=2   | 平均    | n=1    | n=2   | 平均    |      |                              |
| 1   | クレソキシムメチル | 牛の筋肉 | 0.01            | 0.05         | 0.01          | 0.0001                             | 面積                      | 0                  | 17969                      | 17979 | 17974 | 17180  | 16725 | 16953 | 1.06 |                              |
|     |           | 牛の筋肉 | 0.01            | 0.05         | 0.05          | 0.0005                             | 面積                      | 0                  | 80560                      | 82975 | 81768 | 75983  | 77016 | 76500 | 1.07 |                              |
|     |           | 牛の脂肪 | 0.01            | 0.05         | 0.01          | 0.0001                             | 面積                      | 0                  | 17697                      | 17044 | 17371 | 16626  | 17070 | 16848 | 1.03 |                              |
|     |           | 牛の脂肪 | 0.01            | 0.05         | 0.05          | 0.0005                             | 面積                      | 0                  | 79009                      | 74794 | 76902 | 75543  | 75056 | 75300 | 1.02 |                              |
|     |           | 牛の肝臓 | 0.01            | 0.05         | 0.01          | 0.0001                             | 面積                      | 0                  | 18036                      | 17612 | 17824 | 16456  | 17265 | 16861 | 1.06 |                              |
|     |           | 牛の肝臓 | 0.01            | 0.05         | 0.05          | 0.0005                             | 面積                      | 0                  | 78487                      | 78059 | 78273 | 73793  | 76357 | 75075 | 1.04 |                              |
|     |           | 乳    | 0.01            | 0.01         | 0.01          | 0.0001                             | 面積                      | 0                  | 18031                      | 18090 | 18061 | 16973  | 17917 | 17445 | 1.04 |                              |
|     |           | うなぎ  | 0.01            | 0.03         | 0.01          | 0.0001                             | 面積                      | 0                  | 16259                      | 16339 | 16299 | 16696  | 17227 | 16962 | 0.96 |                              |
|     |           | うなぎ  | 0.01            | 0.03         | 0.03          | 0.0003                             | 面積                      | 0                  | 43670                      | 43599 | 43635 | 47112  | 47311 | 47212 | 0.92 |                              |
|     |           | しじみ  | 0.01            | 0.03         | 0.01          | 0.0001                             | 面積                      | 0                  | 16768                      | 17251 | 17010 | 17185  | 17328 | 17257 | 0.99 |                              |
|     |           | しじみ  | 0.01            | 0.03         | 0.03          | 0.0003                             | 面積                      | 0                  | 45637                      | 48600 | 47119 | 46818  | 48064 | 47441 | 0.99 |                              |
| 2   | 代謝物M9     | 牛の筋肉 | 0.01            | 0.05         | 0.01          | 0.0001                             | 面積                      | 0                  | 6480                       | 7222  | 6851  | 6643   | 6506  | 6575  | 1.04 |                              |
|     |           | 牛の筋肉 | 0.01            | 0.05         | 0.05          | 0.0005                             | 面積                      | 0                  | 30770                      | 30715 | 30743 | 30046  | 29357 | 29702 | 1.04 |                              |
|     |           | 牛の脂肪 | 0.01            | 0.05         | 0.01          | 0.0001                             | 面積                      | 0                  | 6140                       | 6659  | 6400  | 6043   | 6233  | 6138  | 1.04 |                              |
|     |           | 牛の脂肪 | 0.01            | 0.05         | 0.05          | 0.0005                             | 面積                      | 0                  | 30725                      | 32075 | 31400 | 30088  | 30322 | 30205 | 1.04 |                              |
|     |           | 牛の肝臓 | 0.01            | 0.05         | 0.01          | 0.0001                             | 面積                      | 0                  | 5955                       | 5862  | 5909  | 6088   | 6076  | 6082  | 0.97 |                              |
|     |           | 牛の肝臓 | 0.01            | 0.05         | 0.05          | 0.0005                             | 面積                      | 0                  | 30728                      | 31676 | 31202 | 30028  | 29829 | 29929 | 1.04 |                              |
|     |           | 乳    | 0.01            | 0.01         | 0.01          | 0.0001                             | 面積                      | 0                  | 5396                       | 5942  | 5669  | 6295   | 5892  | 6094  | 0.93 |                              |

\*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 19 補正真度

| No. | 分析対象化合物   | 食品名  | 定量限界<br>(ppm) | 基準値 <sup>*1</sup><br>(ppm) | 添加濃度<br>(ppm) | 真度<br>(%) | ピーク面積<br>比<br>(%) | 補正真度<br>(%) | 備考 |
|-----|-----------|------|---------------|----------------------------|---------------|-----------|-------------------|-------------|----|
| 1   | クレソキシムメチル | 牛の筋肉 | 0.01          | 0.05                       | 0.01          | 90.2      | 1.06              | 85.1        |    |
|     |           | 牛の筋肉 | 0.01          | 0.05                       | 0.05          | 91.3      | 1.07              | 85.4        |    |
|     |           | 牛の脂肪 | 0.01          | 0.05                       | 0.01          | 92.6      | 1.03              | 89.8        |    |
|     |           | 牛の脂肪 | 0.01          | 0.05                       | 0.05          | 87.5      | 1.02              | 85.8        |    |
|     |           | 牛の肝臓 | 0.01          | 0.05                       | 0.01          | 97.9      | 1.06              | 92.7        |    |
|     |           | 牛の肝臓 | 0.01          | 0.05                       | 0.05          | 89.7      | 1.04              | 86.1        |    |
|     |           | 乳    | 0.01          | 0.01                       | 0.01          | 100.2     | 1.04              | 96.7        |    |
|     |           | うなぎ  | 0.01          | 0.03                       | 0.01          | 84.8      | 0.96              | 88.3        |    |
|     |           | うなぎ  | 0.01          | 0.03                       | 0.03          | 86.6      | 0.92              | 93.7        |    |
|     |           | しじみ  | 0.01          | 0.03                       | 0.01          | 90.9      | 0.99              | 92.2        |    |
|     |           | しじみ  | 0.01          | 0.03                       | 0.03          | 87.1      | 0.99              | 87.7        |    |
| 2   | 代謝物M9     | 牛の筋肉 | 0.01          | 0.05                       | 0.01          | 90.9      | 1.04              | 87.2        |    |
|     |           | 牛の筋肉 | 0.01          | 0.05                       | 0.05          | 80.2      | 1.04              | 77.4        |    |
|     |           | 牛の脂肪 | 0.01          | 0.05                       | 0.01          | 83.7      | 1.04              | 80.2        |    |
|     |           | 牛の脂肪 | 0.01          | 0.05                       | 0.05          | 79.6      | 1.04              | 76.6        |    |
|     |           | 牛の肝臓 | 0.01          | 0.05                       | 0.01          | 92.0      | 0.97              | 94.7        |    |
|     |           | 牛の肝臓 | 0.01          | 0.05                       | 0.05          | 90.1      | 1.04              | 86.4        |    |
|     |           | 乳    | 0.01          | 0.01                       | 0.01          | 94.7      | 0.93              | 101.8       |    |

\*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。

#### 4. 考察

抽出はクレソキシムメチル及び代謝物M9の溶解性及び脂肪組織との混和性を考慮しギ酸・アセトン溶液を、精製カラムについては、グラファイトカーボンミニカラム及びオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムを検討したところ、良好な結果が得られた。

開発した方法を用いて、クレソキシムメチルについては牛の筋肉等6食品、代謝物M9については牛の筋肉等4食品の添加回収試験を行った結果、選択性は良好で何れの試料においても妨害ピークは認められなかった。クレソキシムメチルの真度は84.8~100.2%、併行精度は1.6~6.1%、代謝物M9の真度は79.6~9

4.7、併行精度は1.9～7.9%の良好な結果が得られたことから本試験法は、陸棲哺乳類に属する動物の筋肉、脂肪、肝臓及び乳並びに魚介類等の畜水産物に適応可能であると判断された。

[結論]

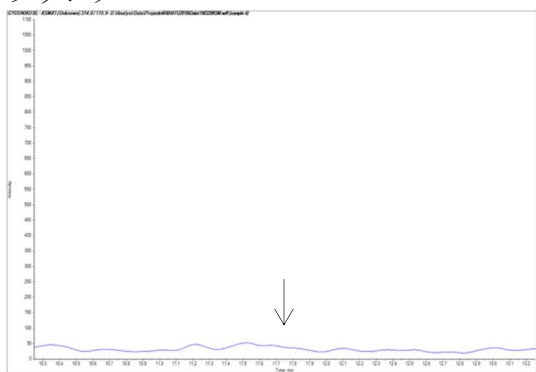
畜水産物中のクレソキシムメチル及び代謝物M9の試験法として、試料からギ酸酸性下、アセトンで抽出し、グラファイトカーボンミニカラム及びオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムで精製した後、LC-MS/MSで定量及び確認する方法を開発した。

開発した試験法を牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳、うなぎ及びしじみに適用した結果、選択性は良好で何れの試料においても妨害ピークは認められず、クレソキシムメチルの真度は84.8～100.2%、併行精度は1.6～6.1%、代謝物M9の真度は79.6～94.7%、併行精度は1.9～7.9%、定量限界は0.01 mg/kgが可能であることが確認できた。

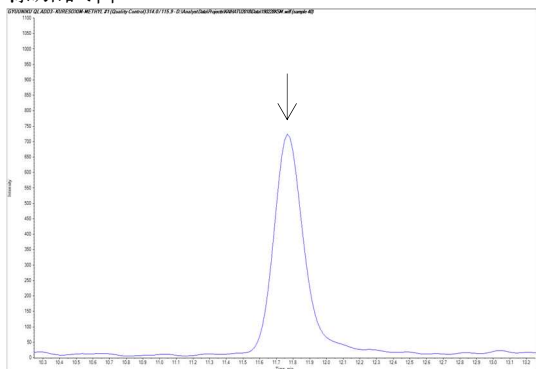
[参考文献]

なし

クレソキシムメチル及び代謝物M9の添加回収試験におけるクロマトグラム  
 ブランク



添加試料



標準溶液

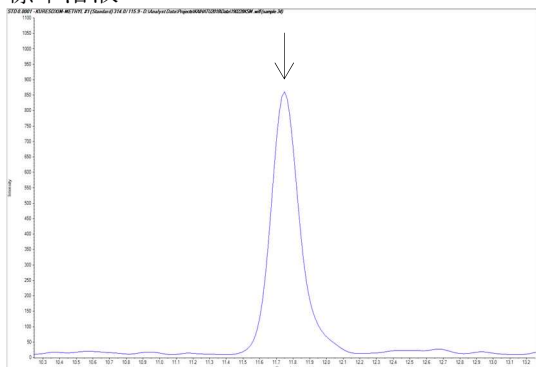
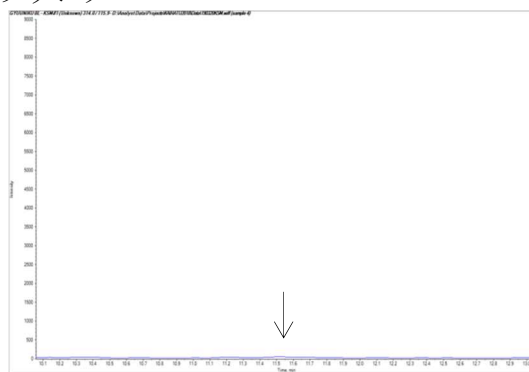
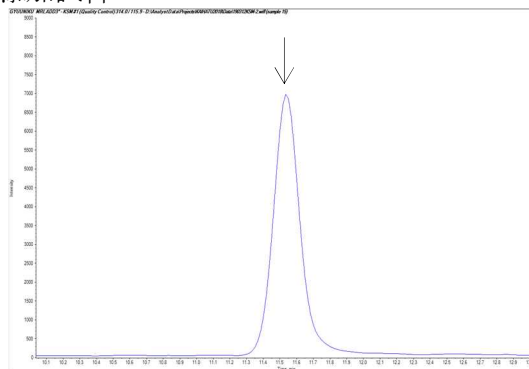


図 7-1 牛の筋肉の SRM クロマトグラム  
 クレソキシムメチル  
 ( $m/z +314 \rightarrow 116$ )  
 添加濃度 : 0.01 ppm

ブランク



添加試料



標準溶液

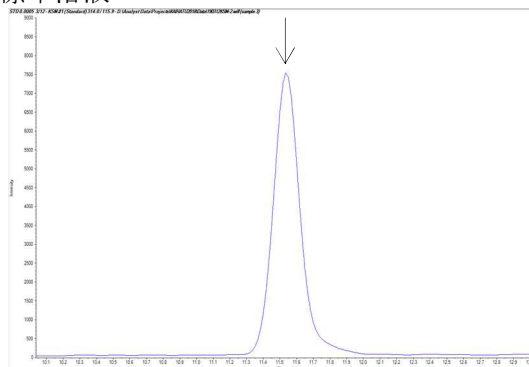
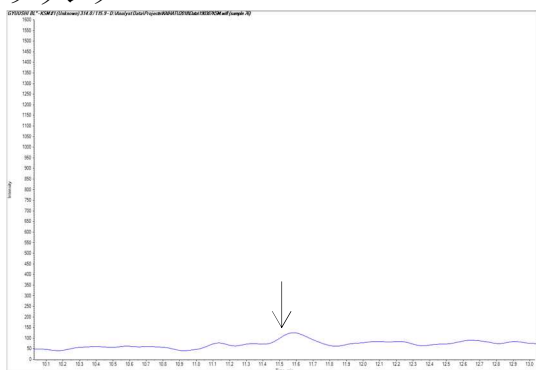
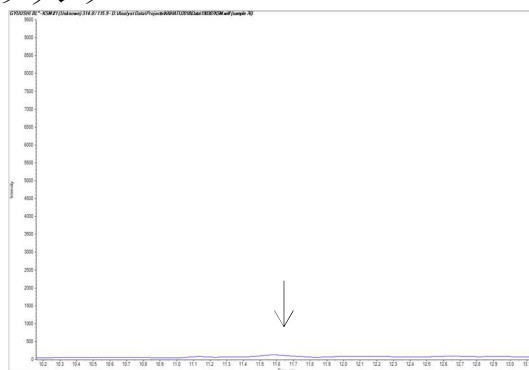


図 7-2 牛の筋肉の SRM クロマトグラム  
 クレソキシムメチル  
 ( $m/z +314 \rightarrow 116$ )  
 添加濃度 : 0.05 ppm

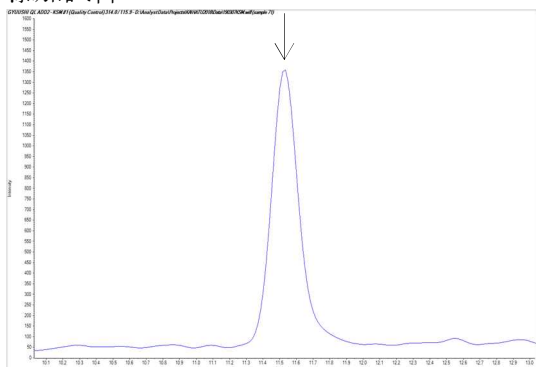
ブランク



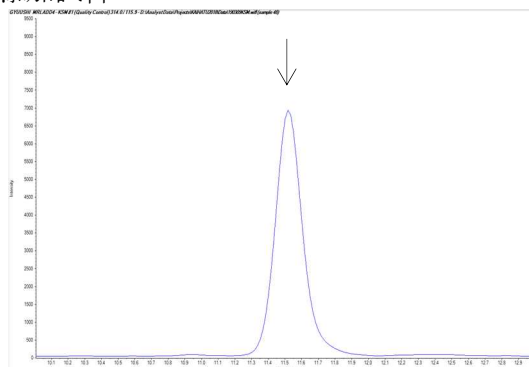
ブランク



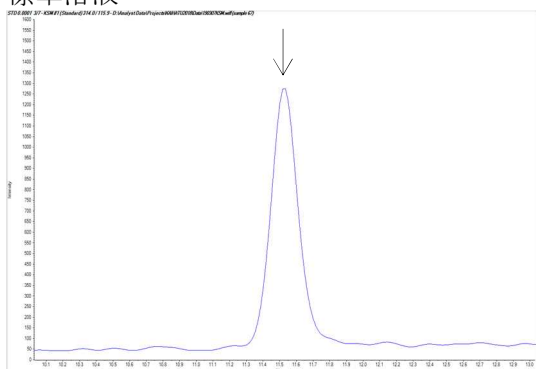
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

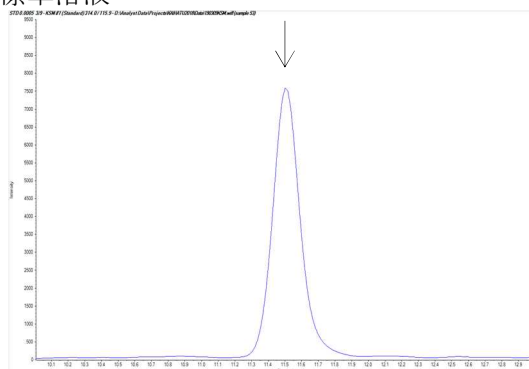
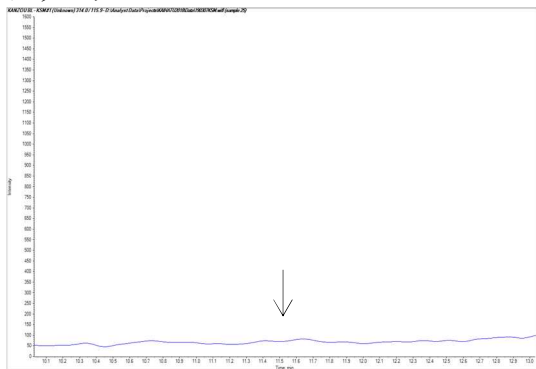


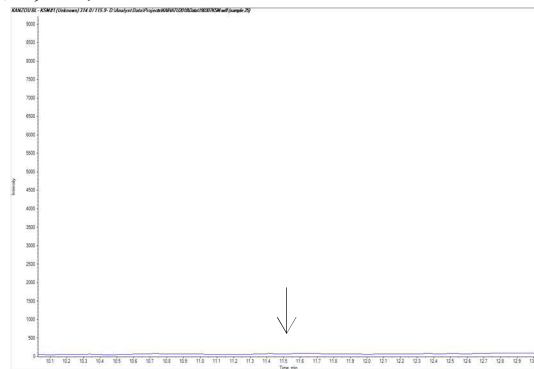
図 7-3 牛の脂肪の SRM クロマトグラム  
クレソキシムメチル  
( $m/z$  +314→116)  
添加濃度 : 0.01 ppm

図 7-4 牛の脂肪の SRM クロマトグラム  
クレソキシムメチル  
( $m/z$  +314→116)  
添加濃度 : 0.05 ppm

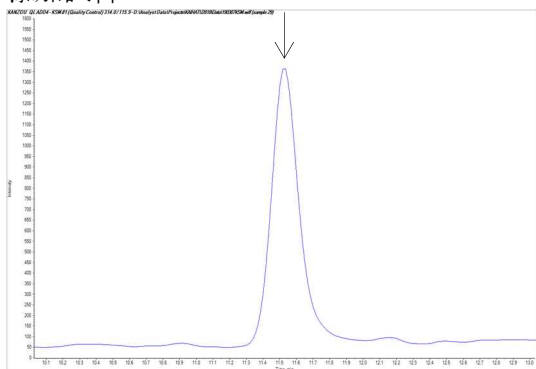
ブランク



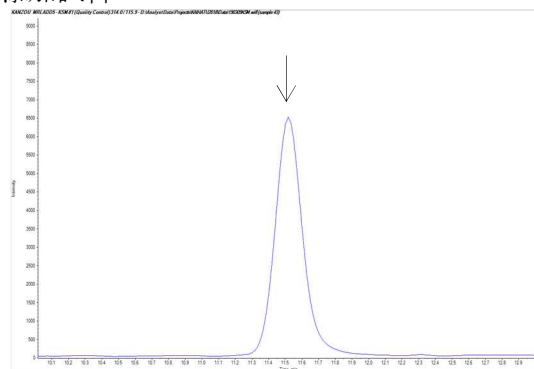
ブランク



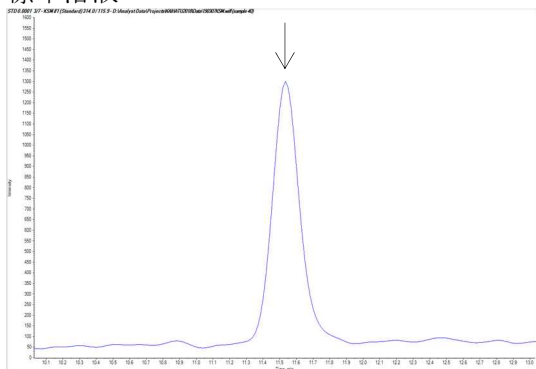
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

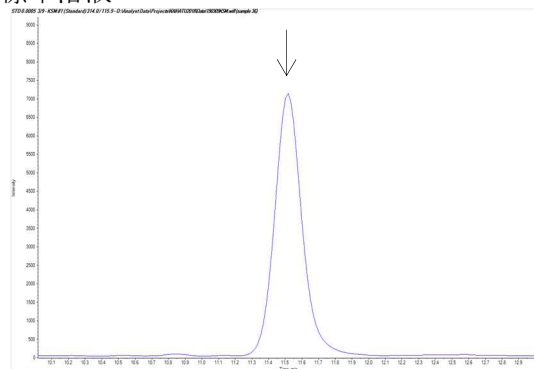
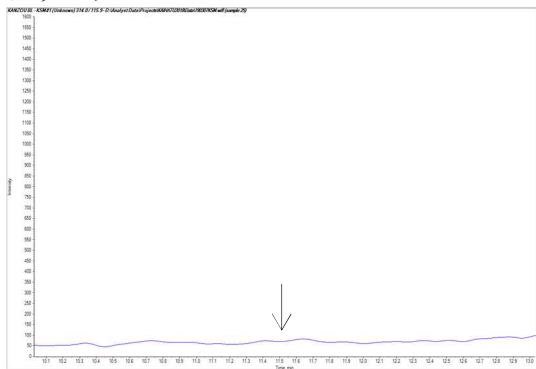


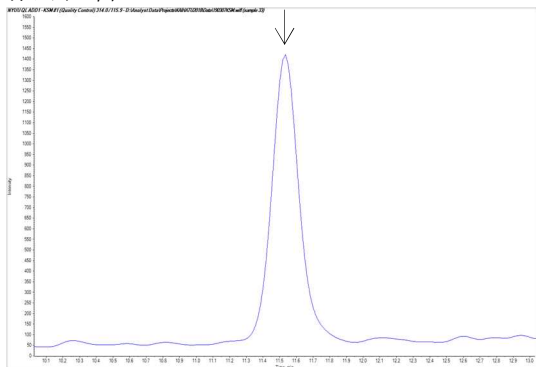
図 7-5 牛の肝臓の SRM クロマトグラム  
クレソキシムメチル  
( $m/z$  +314→116)  
添加濃度 : 0.01 ppm

図 7-6 牛の肝臓の SRM クロマトグラム  
クレソキシムメチル  
( $m/z$  +314→116)  
添加濃度 : 0.05 ppm

ブランク



添加試料



標準溶液

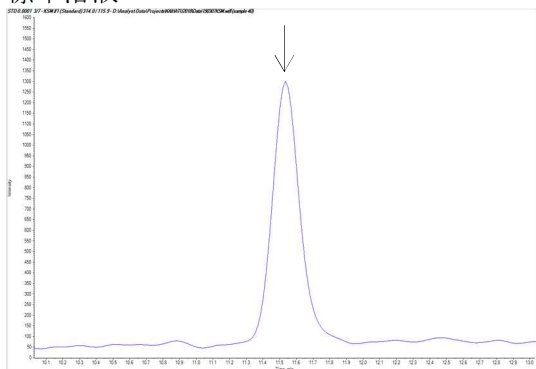
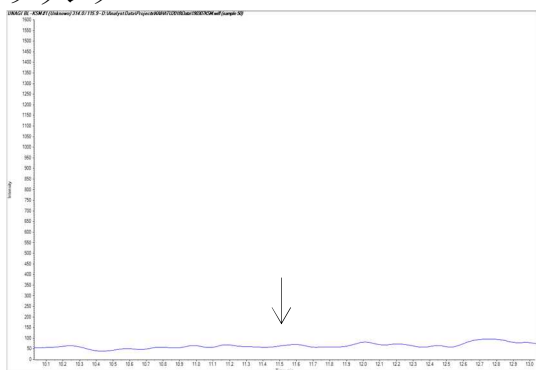


図 7-7 牛乳の SRM クロマトグラム  
クレソキシムメチル  
( $m/z$  +314→116)

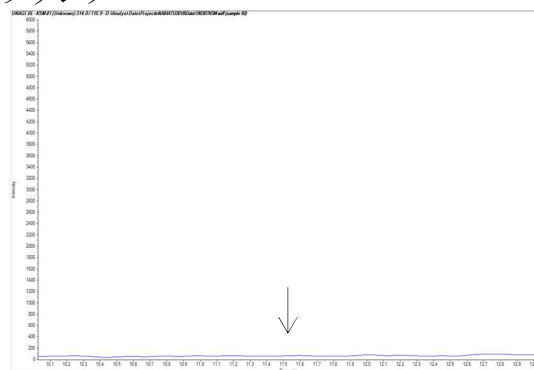
添加濃度 : 0.01 ppm



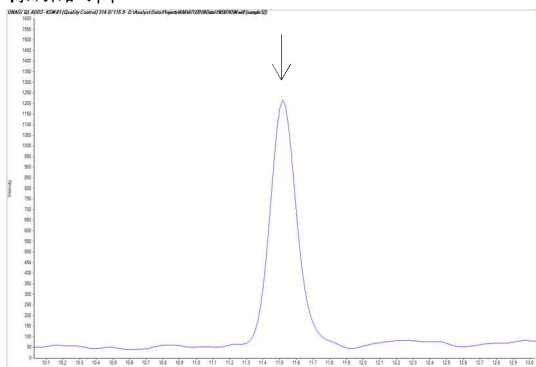
ブランク



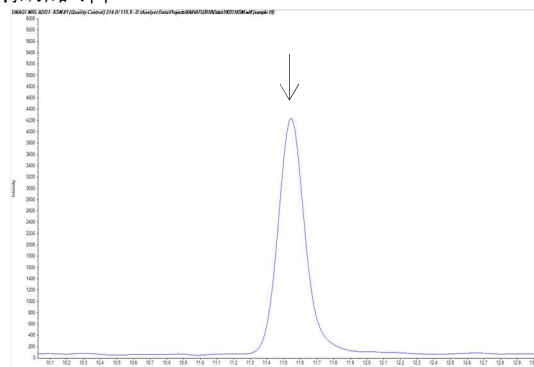
ブランク



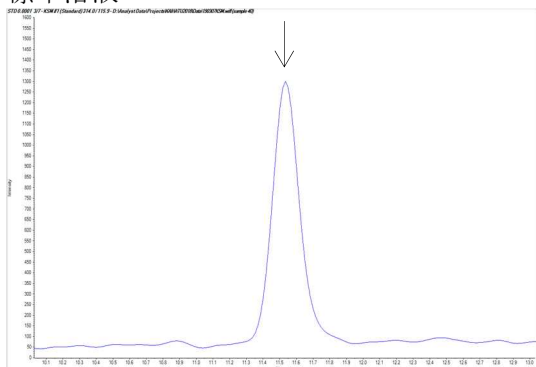
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

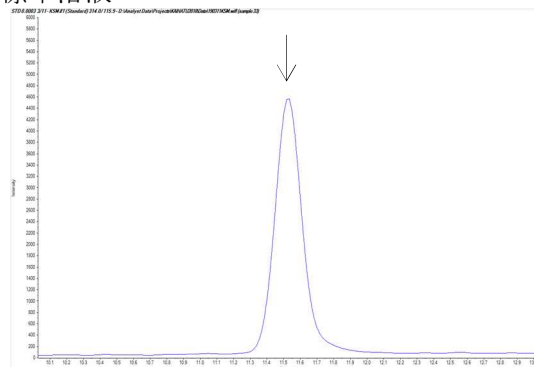
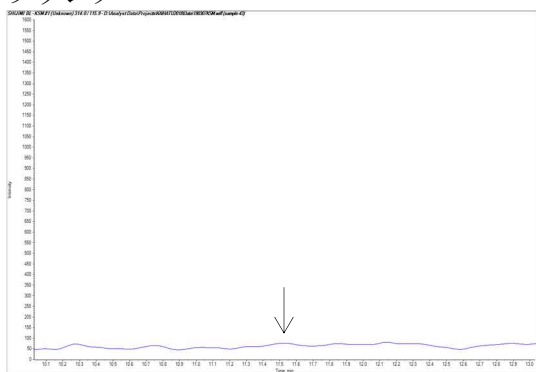


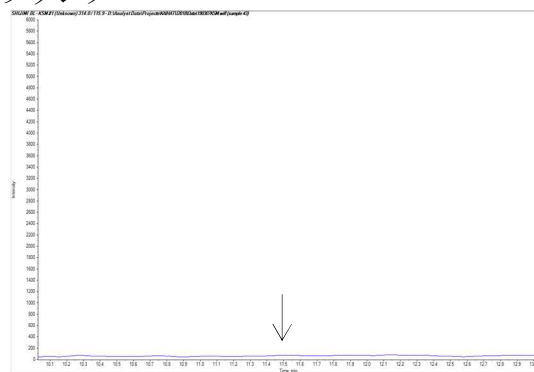
図 7-8 うなぎの SRM クロマトグラム  
クレソキシムメチル  
( $m/z$  +314→116)  
添加濃度 : 0.01 ppm

図 7-9 うなぎの SRM クロマトグラム  
クレソキシムメチル  
( $m/z$  +314→116)  
添加濃度 : 0.03 ppm

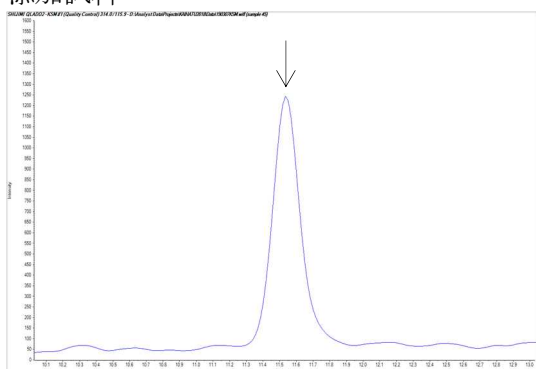
ブランク



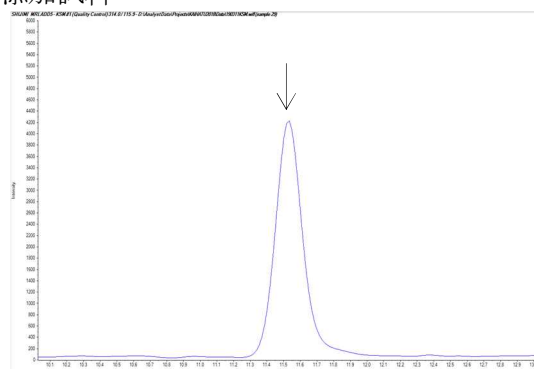
ブランク



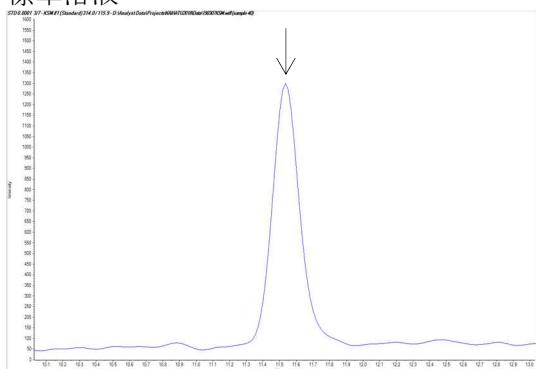
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

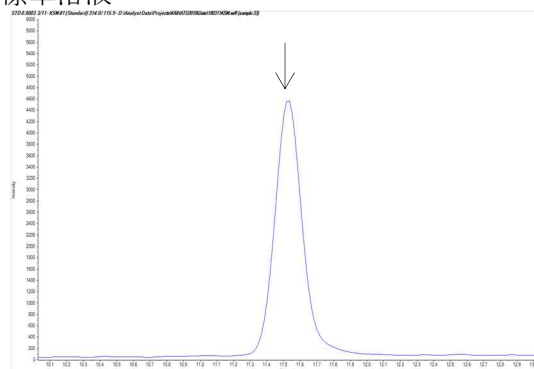
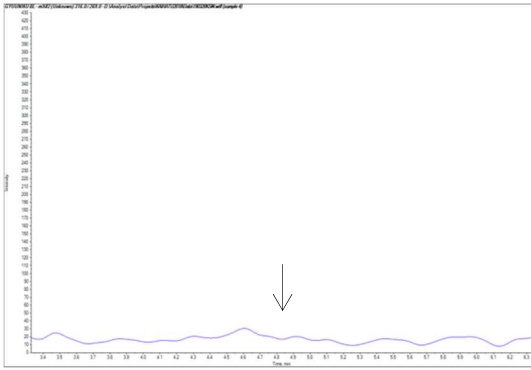


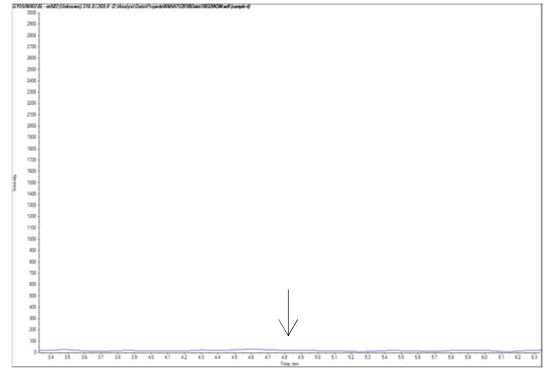
図 7-10 しじみの SRM クロマトグラム  
クレソキシムメチル  
( $m/z$  +314→116)  
添加濃度 : 0.01 ppm

図 7-11 しじみ SRM クロマトグラム  
クレソキシムメチル  
( $m/z$  +314→116)  
添加濃度 : 0.03 ppm

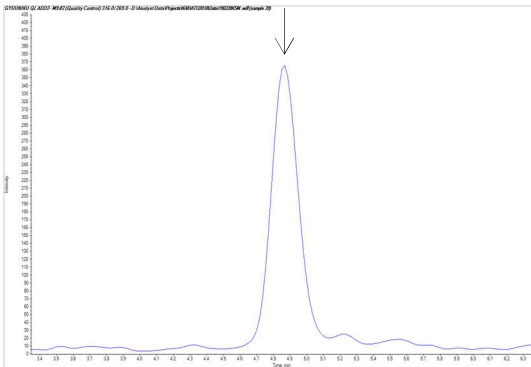
ブランク



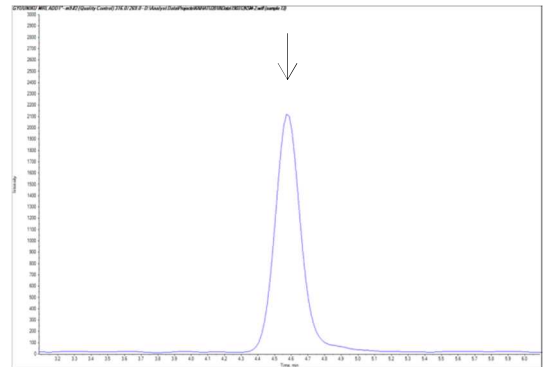
ブランク



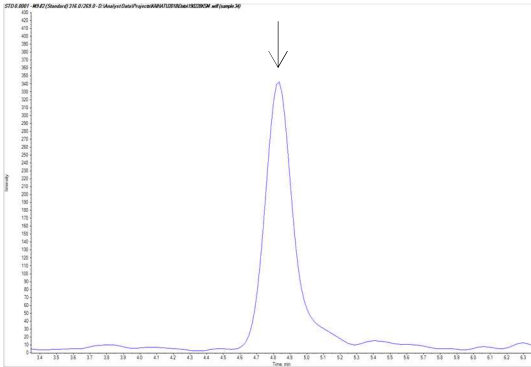
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

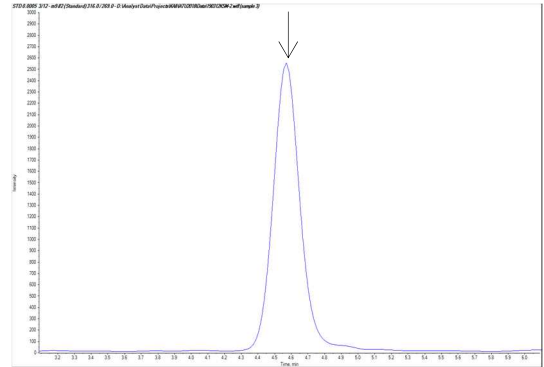


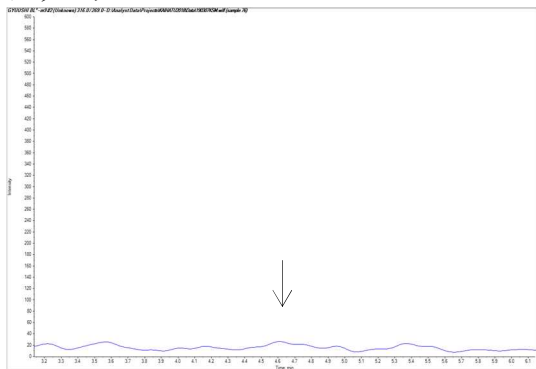
図 7-12 牛の筋肉の SRM クロマトグラム  
代謝物 M9

( $m/z$  +316→269)  
添加濃度 : 0.01 ppm

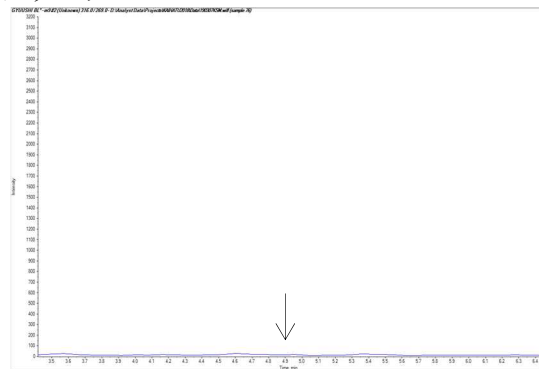
図 7-13 牛の筋肉の SRM クロマトグラム  
代謝物 M9

( $m/z$  +316→269)  
添加濃度 : 0.05 ppm

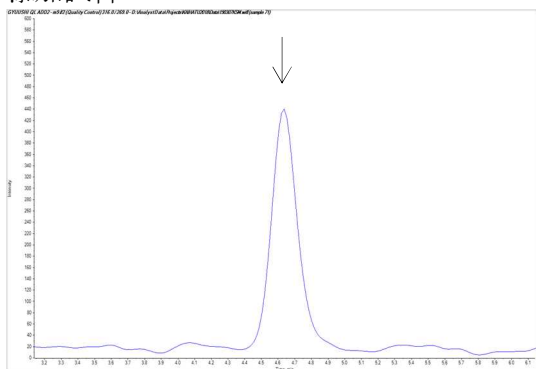
ブランク



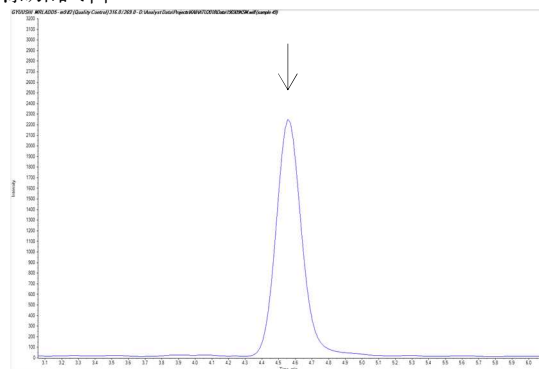
ブランク



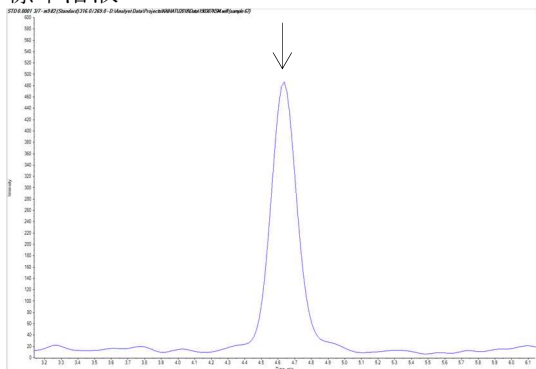
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

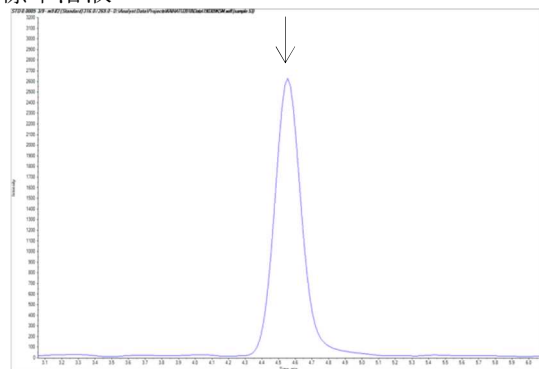


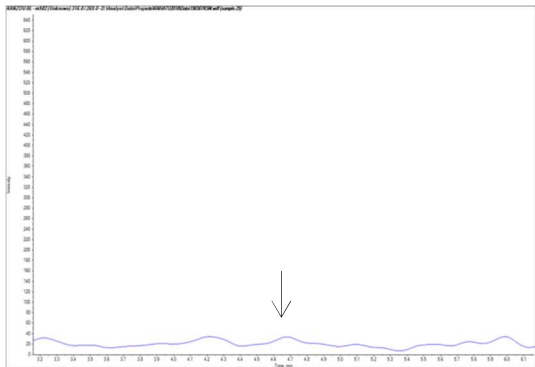
図 7-14 牛の脂肪の SRM クロマトグラム  
代謝物 M9

( $m/z$  +316→269)  
添加濃度 : 0.01 ppm

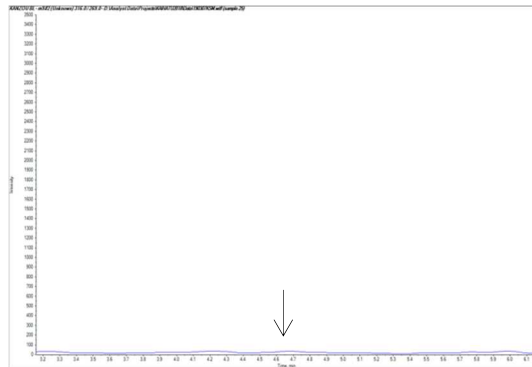
図 7-15 牛の脂肪の SRM クロマトグラム  
代謝物 M9

( $m/z$  +316→269)  
添加濃度 : 0.05 ppm

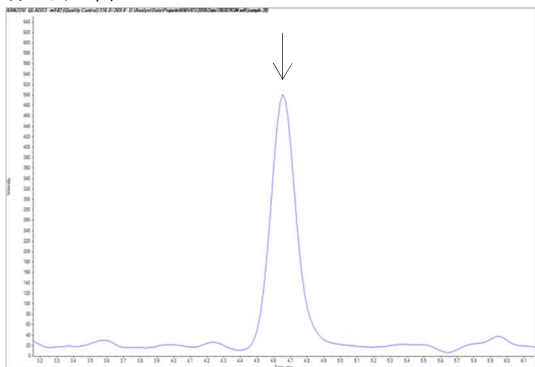
ブランク



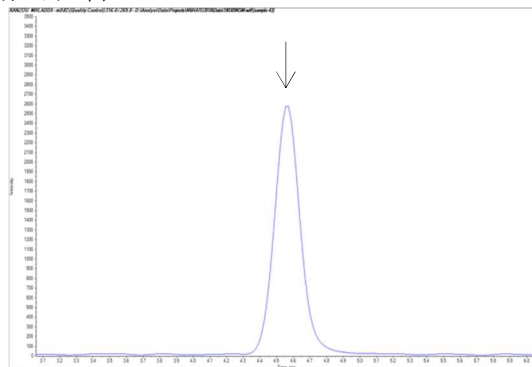
ブランク



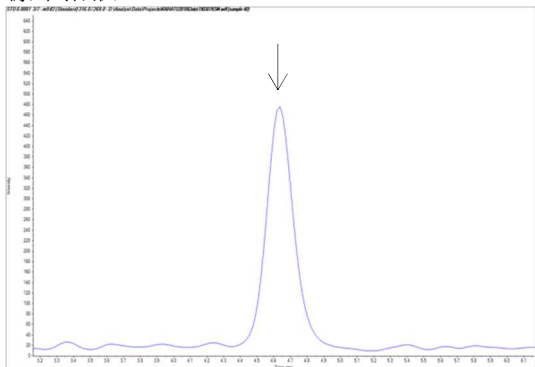
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

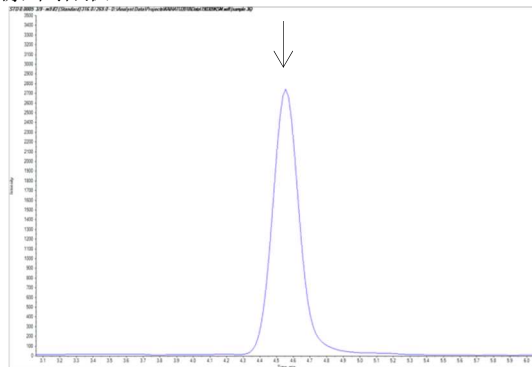


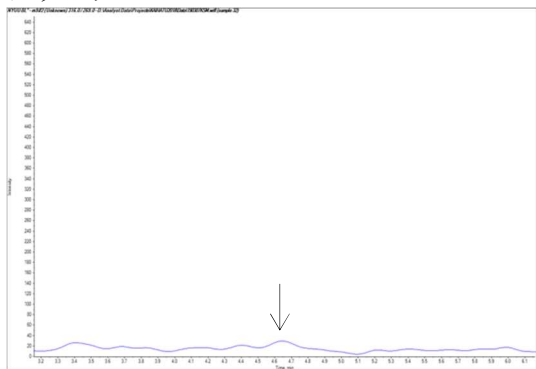
図 7-16 牛の肝臓の SRM クロマトグラム  
代謝物 M9

( $m/z$  +316→269)  
添加濃度 : 0.01 ppm

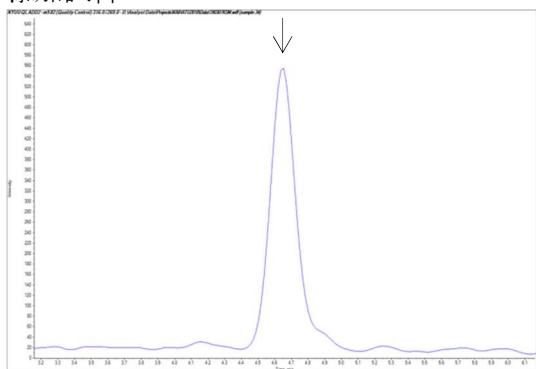
図 7-17 牛の肝臓の SRM クロマトグラム  
代謝物 M9

( $m/z$  +316→269)  
添加濃度 : 0.05 ppm

ブランク



添加試料



標準溶液

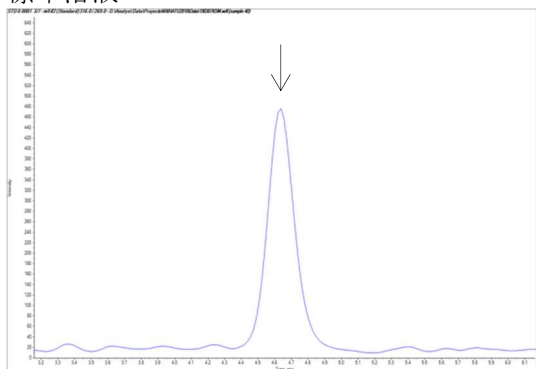


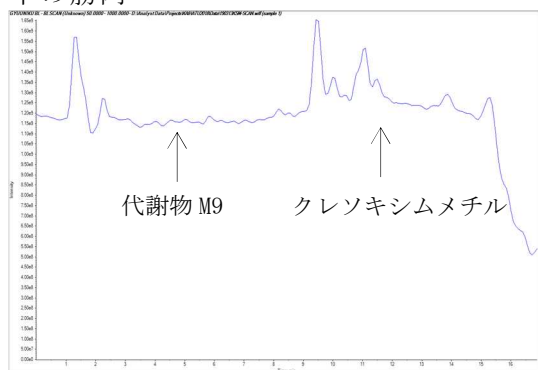
図 7-18 牛乳の SRM クロマトグラム

代謝物 M9

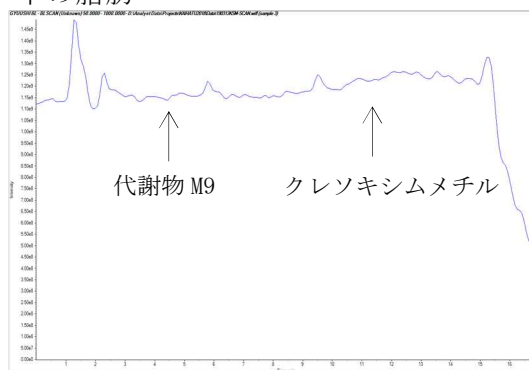
( $m/z$  +316→269)

添加濃度 : 0.01 ppm

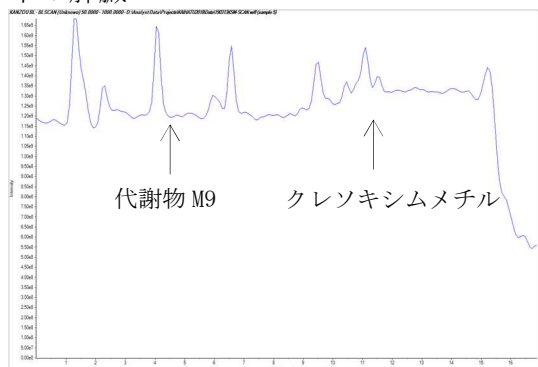
牛の筋肉



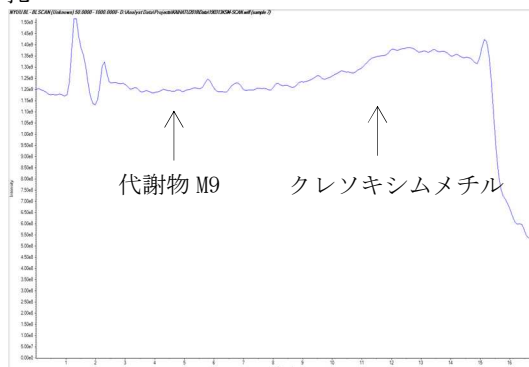
牛の脂肪



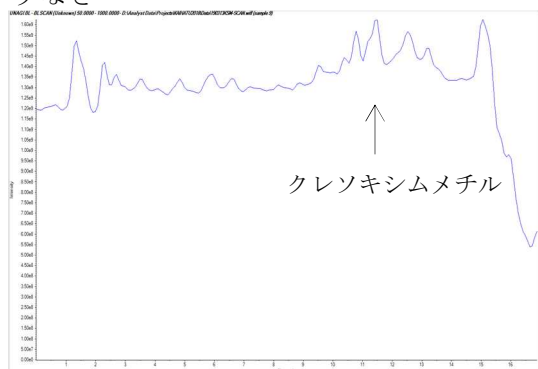
牛の肝臓



乳



うなぎ



しじみ

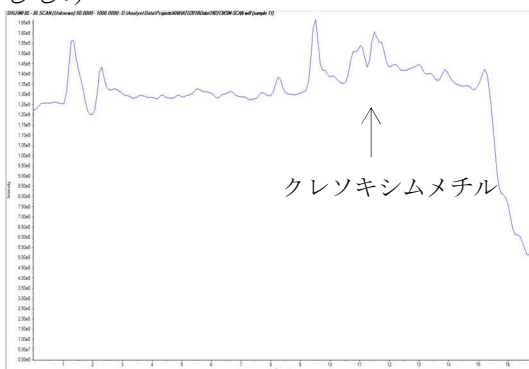


図 8 ブランク試料のトータルイオンクロマトグラム  
(スキャン範囲：50～1000  $m/z$ )