

※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

### イソキサフルトール試験法（農産物）

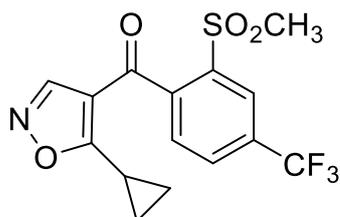
## イソキサフルトール試験法（農産物）の検討結果

### [緒言]

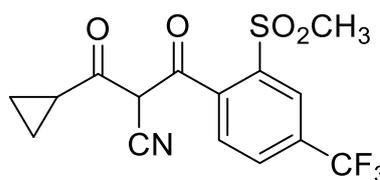
#### 1. 目的及び試験法の検討方針

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

#### 2. 分析対象化合物の構造式及び物理化学的性質



イソキサフルトール



代謝物B

イソキサフルトール

分子式：C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>F<sub>3</sub>NO<sub>4</sub>S

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

分子量：359.32

外観：白色粉末

沸点：575.1±50.0 °C

融点：140°C

蒸気圧：7.50×10<sup>-9</sup> mmHg (25°C)

酸解離定数 (pKa)：-4.29 ± 0.50

1-オクタノール/水分配係数 (log Pow)：2.32 (20°C)

水溶解度：6.2 mg/L (20°C、pH 5.5)

溶解性：メタノール1 Lに13.8 gが溶解する。

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

水中光分解による推定半減期：40時間 (pH 5)

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

## 代謝物B

分子式：C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>F<sub>3</sub>NO<sub>4</sub>S

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

分子量：359.32

外観：白色粉末

沸点：527.8 ± 50.0°C

酸解離定数（pKa）：1.14 ± 0.20

密度：1.460 ± 0.06 g/cm<sup>3</sup>

溶解性：アセトンに溶け、エタノール及び水にほとんど溶けない

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

### 3. 基準値

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

大豆：0.05 ppm、その他の豆類：0.03 ppm、とうもろこし：0.02 ppm、さとうきび：0.01 ppm

## [実験方法]

### 1. 試料

#### 1) 購入先

検討に用いた試料は、インターネットを介して購入したものをを用いた。

#### 2) 試料の採取方法

- ① 大豆、ひよこ豆、とうもろこし（乾燥子実）は、検体を425  $\mu\text{m}$ の標準網ふるいを通るように粉砕し、均一化した。なお、ひよこ豆は、「その他の豆類」の基準値設定の根拠であるため検討に用いた。
- ② とうもろこし（未成熟）は、外皮、ひげ及びしんを除去した種子150 gを量り採り、2 mol/L塩酸を重量比で1/2量を加えて、フードプロセッサーで均一化した。
- ③ さとうきびは、外皮を除去し、細切均一化した試料150 gを量り採り、2 mol/L塩酸を重量比で1/2量を加えて、フードプロセッサーで均一化した。

### 2. 試薬・試液

#### 1) 標準品

イソキサフルトール標準品：純度98.4%（富士フィルム和光純薬製）

イソキサフルトール代謝物B標準品：純度99.5%（富士フィルム和光純薬製）

#### 2) 試薬等

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

蒸留水：LC-MS用（関東化学製）

塩化ナトリウム：残留農薬試験用（富士フィルム和光純薬製）

0.1 mol/L塩酸、2 mol/L塩酸：定量分析用（富士フィルム和光純薬製）

アセトニトリル、酢酸：LC/MS用（富士フィルム和光純薬製）

ケイソウ土：セライトNo.545（富士フィルム和光純薬製）

ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム：Oasis HLB（500 mg/6 mL）  
（ウォーターズ製）

#### 3) 標準溶液、試液の調製方法

##### ① 標準溶液の調製方法

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

イソキサフルトール添加用標準溶液：イソキサフルトール標準原液をアセトンで希釈し、0.2、0.4、0.6、1  $\mu\text{g/mL}$ の濃度の溶液を調製した。

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

代謝物B添加用標準溶液：代謝物B標準原液をアセトンで希釈し、0.2、0.4、0.6、1  $\mu\text{g/mL}$ の濃度の溶液を調製した。

##### ② 試液の調製方法

酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（3：7）混液：酢酸エチル300 mL及び*n*-ヘキサン700 mLを混合した。  
酢酸、水及びメタノール（1：20：30）混液：酢酸10 mL、水200 mL及びメタノール300 mLを混合した。

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

### 3. 装置

ホモジナイザー：PT 10-35 GT（KINEMATICA製）

遠心分離機：S700FR（久保田商事製）

振とう機：SR-2DW（タイテック製）

#### LC-MS/MS

|       | 型式                     | 会社    |
|-------|------------------------|-------|
| LC 装置 | Nexera X2              | 島津製作所 |
| MS 装置 | LCMS-8060NX            | 島津製作所 |
| データ処理 | LabSolutions Ver.5.109 | 島津製作所 |

#### 4. 測定条件

| LC 条件              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |         |  |        |         |         |     |    |    |     |    |    |    |    |    |       |   |    |      |   |    |       |    |    |      |    |    |
|--------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|--|--------|---------|---------|-----|----|----|-----|----|----|----|----|----|-------|---|----|------|---|----|-------|----|----|------|----|----|
| カラム                | InertSustain C18 HP<br>サイズ:内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm<br>会社: ジーエルサイエンス株式会社                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |         |  |        |         |         |     |    |    |     |    |    |    |    |    |       |   |    |      |   |    |       |    |    |      |    |    |
| 流速 (mL/min)        | 0.3                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |         |  |        |         |         |     |    |    |     |    |    |    |    |    |       |   |    |      |   |    |       |    |    |      |    |    |
| 注入量(μL)            | 5                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |         |  |        |         |         |     |    |    |     |    |    |    |    |    |       |   |    |      |   |    |       |    |    |      |    |    |
| カラム温度 (°C)         | 40                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |         |  |        |         |         |     |    |    |     |    |    |    |    |    |       |   |    |      |   |    |       |    |    |      |    |    |
| 移動相                | A 液: 0.05 vol%酢酸<br>B 液: 0.05 vol%酢酸・アセトニトリル溶液                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |         |  |        |         |         |     |    |    |     |    |    |    |    |    |       |   |    |      |   |    |       |    |    |      |    |    |
| グラジエント条件           | <table border="1"> <thead> <tr> <th>時間 (分)</th> <th>A 液 (%)</th> <th>B 液 (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.0</td> <td>70</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>5.0</td> <td>70</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>20</td> <td>45</td> <td>55</td> </tr> <tr> <td>20.01</td> <td>1</td> <td>99</td> </tr> <tr> <td>25.0</td> <td>1</td> <td>99</td> </tr> <tr> <td>25.01</td> <td>70</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>35.0</td> <td>70</td> <td>30</td> </tr> </tbody> </table> |         |  | 時間 (分) | A 液 (%) | B 液 (%) | 0.0 | 70 | 30 | 5.0 | 70 | 30 | 20 | 45 | 55 | 20.01 | 1 | 99 | 25.0 | 1 | 99 | 25.01 | 70 | 30 | 35.0 | 70 | 30 |
| 時間 (分)             | A 液 (%)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | B 液 (%) |  |        |         |         |     |    |    |     |    |    |    |    |    |       |   |    |      |   |    |       |    |    |      |    |    |
| 0.0                | 70                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 30      |  |        |         |         |     |    |    |     |    |    |    |    |    |       |   |    |      |   |    |       |    |    |      |    |    |
| 5.0                | 70                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 30      |  |        |         |         |     |    |    |     |    |    |    |    |    |       |   |    |      |   |    |       |    |    |      |    |    |
| 20                 | 45                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 55      |  |        |         |         |     |    |    |     |    |    |    |    |    |       |   |    |      |   |    |       |    |    |      |    |    |
| 20.01              | 1                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 99      |  |        |         |         |     |    |    |     |    |    |    |    |    |       |   |    |      |   |    |       |    |    |      |    |    |
| 25.0               | 1                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 99      |  |        |         |         |     |    |    |     |    |    |    |    |    |       |   |    |      |   |    |       |    |    |      |    |    |
| 25.01              | 70                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 30      |  |        |         |         |     |    |    |     |    |    |    |    |    |       |   |    |      |   |    |       |    |    |      |    |    |
| 35.0               | 70                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 30      |  |        |         |         |     |    |    |     |    |    |    |    |    |       |   |    |      |   |    |       |    |    |      |    |    |
| MS 条件              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |         |  |        |         |         |     |    |    |     |    |    |    |    |    |       |   |    |      |   |    |       |    |    |      |    |    |
| 測定モード              | SRM (選択反応モニタリング)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |         |  |        |         |         |     |    |    |     |    |    |    |    |    |       |   |    |      |   |    |       |    |    |      |    |    |
| イオン化モード            | ESI (-)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |         |  |        |         |         |     |    |    |     |    |    |    |    |    |       |   |    |      |   |    |       |    |    |      |    |    |
| インターフェース電圧 (V)     | イソキサフルトール、代謝物 B: -3,000                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |         |  |        |         |         |     |    |    |     |    |    |    |    |    |       |   |    |      |   |    |       |    |    |      |    |    |
| ブロックヒーター温度 (°C)    | 400                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |         |  |        |         |         |     |    |    |     |    |    |    |    |    |       |   |    |      |   |    |       |    |    |      |    |    |
| ネブライザーガス流量 (L/min) | 3                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |         |  |        |         |         |     |    |    |     |    |    |    |    |    |       |   |    |      |   |    |       |    |    |      |    |    |
| ドライイングガス流量 (L/min) | 10                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |         |  |        |         |         |     |    |    |     |    |    |    |    |    |       |   |    |      |   |    |       |    |    |      |    |    |
| ヒーティングガス流量 (L/min) | 10                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |         |  |        |         |         |     |    |    |     |    |    |    |    |    |       |   |    |      |   |    |       |    |    |      |    |    |
| CID ガス (kPa)       | 270 (アルゴン)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |         |  |        |         |         |     |    |    |     |    |    |    |    |    |       |   |    |      |   |    |       |    |    |      |    |    |
| DL 温度 (°C)         | 250                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |         |  |        |         |         |     |    |    |     |    |    |    |    |    |       |   |    |      |   |    |       |    |    |      |    |    |
| 定量イオン (m/z)        | イソキサフルトール: m/z 358.1→79.1<br>[コリジョンエネルギー: 17 eV]<br>代謝物 B: m/z 358.1→79.1<br>[コリジョンエネルギー: 19 eV]                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |         |  |        |         |         |     |    |    |     |    |    |    |    |    |       |   |    |      |   |    |       |    |    |      |    |    |
| 定性イオン (m/z)        | イソキサフルトール: m/z 358.1→278.2<br>[コリジョンエネルギー: 18 eV]<br>代謝物 B: m/z 358.1→278.1<br>[コリジョンエネルギー: 17 eV]                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |         |  |        |         |         |     |    |    |     |    |    |    |    |    |       |   |    |      |   |    |       |    |    |      |    |    |
| 保持時間 (分)           | 5.5 (代謝物 B)、18.6 (イソキサフルトール)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |         |  |        |         |         |     |    |    |     |    |    |    |    |    |       |   |    |      |   |    |       |    |    |      |    |    |

#### 5. 定量

イソキサフルトール及び代謝物B標準原液を0.05 vol%酢酸及び0.05 vol%酢酸・アセトニトリル溶液 (7:3) 混液で希釈して、各食品の添加濃度及び定量限界濃度 (0.01 mg/kg) に対して、25、50、75、100、125、150%の回収率に相当する濃度の検量溶液を各々調製した。各濃度に調製し

た検量溶液5 µLをLC-MS/MSに注入して、得られたピーク面積値を用いて検量線を作成した。なお、本法に従って試験溶液を調製した場合、試料中0.01 mg/kgのイソキサフルトール及び代謝物Bに相当する試験溶液の濃度は、穀類、豆類では0.001 mg/Lであり、とうもろこし（未成熟）、さとうきびでは0.002 mg/Lである。試験溶液は5 µLをLC-MS/MSに注入して、検量線から絶対検量線法によりイソキサフルトール及び代謝物Bの含量を求めた。

## 6. 添加試料の調製

### 1) 基準値濃度の添加試料の作製

大豆（添加濃度：0.05 mg/kg）：試料10.0 gに2 mol/L塩酸20 gを加えよく混合した後、30分間放置し、1 µg/mL添加用標準溶液0.5 mLを添加し混合後、さらに30分間放置した。

ひよこ豆（添加濃度：0.03 mg/kg）：試料10.0 gに2 mol/L塩酸20 gを加えよく混合した後、30分間放置し、0.6 µg/mL添加用標準溶液0.5 mLを添加し混合後、さらに30分間放置した。

とうもろこし（乾燥子実）（添加濃度：0.02 mg/kg）：試料10.0 gに2 mol/L塩酸20 gを加えよく混合した後、30分間放置し、0.4 µg/mL添加用標準溶液0.5 mLを添加し混合後、さらに30分間放置した。

とうもろこし（未成熟）（添加濃度：0.02 mg/kg）：試料20.0 g相当量に、0.4 µg/mL添加用標準溶液1 mLを添加し混合後、30分間放置した。

さとうきび（添加濃度：0.01 mg/kg）：試料20.0 g相当量に、0.2 µg/mL添加用標準溶液1 mLを添加し混合後、30分間放置した。

### 2) 定量限界濃度（0.01 mg/kg）の添加試料の作製

大豆（添加濃度：0.01 mg/kg）：試料10.0 gに2 mol/L塩酸20 gを加えよく混合した後、30分間放置し、0.2 µg/mL添加用標準溶液0.5 mLを添加し混合後、さらに30分間放置した。

ひよこ豆（添加濃度：0.01 mg/kg）：試料10.0 gに2 mol/L塩酸20 gを加えよく混合した後、30分間放置し、0.2 µg/mL添加用標準溶液0.5 mLを添加し混合後、さらに30分間放置した。

とうもろこし（乾燥子実）（添加濃度：0.01 mg/kg）：試料10.0 gに2 mol/L塩酸20 gを加えよく混合した後、30分間放置し、0.2 µg/mL添加用標準溶液0.5 mLを添加し混合後、さらに30分間放置した。

とうもろこし（未成熟）（添加濃度：0.01 mg/kg）：試料20.0 g相当量に、0.2 µg/mL添加用標準溶液1 mLを添加し混合後、30分間放置した。

さとうきび：1) に同じ。

## 7. 試験溶液の調製

### 概要

イソキサフルトール及び代謝物Bを2 mol/L塩酸で均一化した試料から、アセトニトリルで抽出し、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（3：7）混液に転溶した後、ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムで精製し、LC-MS/MSで定量及び確認する方法である。

### 1) 抽出

#### ①穀類及び豆類の場合

試料10.0 gを350 mL容ガラス製遠心管（褐色）に量り採り、2 mol/L塩酸20 gを加え、30分間放置した。これにアセトニトリル50 mLを加えてホモジナイズした後、ケイソウ土を約1 cmの厚さ

に敷いたろ紙を用いて吸引ろ過した。ろ紙上の残留物にアセトニトリル30 mLを加えてホモジナイズした後、上記と同様に吸引ろ過した。得られたろ液を合わせ、アセトニトリルを加えて正確に100 mLとした。この溶液から正確に4 mLを50 mL容ポリプロピレン製遠心管に分取し、0.1 mol/L塩酸16 mL及び塩化ナトリウム2 gを加え、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（3：7）混液20 mLを加えて振とう抽出した後、毎分3,000回転で5分間遠心分離し、有機層を100 mL容ナス型フラスコ（褐色）に採った。水層に酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（3：7）混液20 mLを加えて振とう抽出した後、上記と同様に遠心分離し、得られた有機層を合わせ、40℃以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物に酢酸、水及びメタノール（1：20：30）混液2 mLを加えて溶解した。

## ② とうもろこし（未成熟）及びさとうきびの場合

試料を正確に量り、重量比で1/2量の2 mol/L塩酸を加え磨砕均一化した後、試料20.0 gに相当する量を350 mL容ガラス製遠心管（褐色）に量り採った。これにアセトニトリル50 mLを加えてホモジナイズした後、ケイソウ土を約1 cmの厚さに敷いたろ紙を用いて吸引ろ過した。ろ紙上の残留物にアセトニトリル30 mLを加えてホモジナイズした後、上記と同様に吸引ろ過した。得られたろ液を合わせ、アセトニトリルを加えて正確に100 mLとした。この溶液から正確に4 mLを50 mL容ポリプロピレン製遠心管に分取し、0.1 mol/L塩酸16 mL及び塩化ナトリウム2 gを加え、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（3：7）混液20 mLを加えて振とう抽出した後、毎分3,000回転で5分間遠心分離し、有機層を100 mL容ナス型フラスコ（褐色）に採った。水層に酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（3：7）混液20 mLを加えて振とう抽出した後、上記と同様に遠心分離し、得られた有機層を合わせ、40℃以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物に酢酸、水及びメタノール（1：20：30）混液2 mLを加えて溶解した。

## 2) 精製

ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム（500 mg）に、メタノール5 mL、次いで酢酸、水及びメタノール（1：20：30）混液5 mLを注入し、各流出液は捨てた。このカラムに1) で得られた溶液を注入した後、酢酸、水及びメタノール（1：20：30）混液10 mLを注入し、流出液は捨てた。次いで、酢酸、水及びメタノール（1：5：45）混液20 mLを注入し、溶出液を50 mL容ナス型フラスコ（褐色）に採った。溶出液を40℃以下で1 mL程度まで濃縮し、4 mL容メスフラスコ（褐色）に移した。ナス型フラスコを0.05 vol%酢酸及び0.05 vol%酢酸・アセトニトリル溶液（7：3）混液300 µL程度で3回程度容器を洗い、洗浄液を合わせて正確に4 mLとしたものを試験溶液とした。試験溶液を2 mL容褐色バイアルに移したものを測定に用いた。

## 8. マトリックス添加標準溶液の調製

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

[分析法フローチャート]

**試料採取**

- ↓ 穀類、豆類：試料 10.0 g に、2 mol/L 塩酸 20 g を加えて混合して、30 分間放置
- ↓ とうもろこし（未成熟）、さとうきび：試料を正確に量り、重量比で 1/2 量の 2 mol/L 塩酸を加え磨砕均一化し、試料 20.0 g 相当量を量り採る

**抽出**

- ↓ アセトニトリル 50 mL を加え、ホモジナイズした後、吸引ろ過
- ↓ ろ紙上の残留物を取り、アセトニトリル 30 mL を加え、ホモジナイズ後に吸引ろ過
- ↓ 抽出液をアセトニトリルで 100 mL に定容

**転溶**

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

**ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム（Oasis HLB、500 mg）精製**

- ↓ 予めメタノール 5 mL、酢酸、水及びメタノール（1：20：30）混液 5 mL を通液して平衡化
- ↓ 上記で得られた溶液を全量カラムに注入
- ↓ 酢酸、水及びメタノール（1：20：30）混液 10 mL を注入し、流出液を捨てる
- ↓ 酢酸、水及びメタノール（1：5：45）混液 20 mL を注入し、溶出液を採取
- ↓ 40°C 以下で 1 mL 程度まで濃縮
- ↓ 0.05 vol% 酢酸及び 0.05 vol% 酢酸・アセトニトリル溶液（7：3）混液で正確に 4 mL とする

**LC-MS/MS測定**（穀類、豆類：0.1 g 試料/mL、とうもろこし（未成熟）、さとうきび：0.2 g 試料/mL）試験溶液 5  $\mu$ L を注入

## [結果及び考察]

### 1. 測定条件の検討

#### 1) MS条件の検討

##### ① イソキサフルトールのMS条件の検討

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

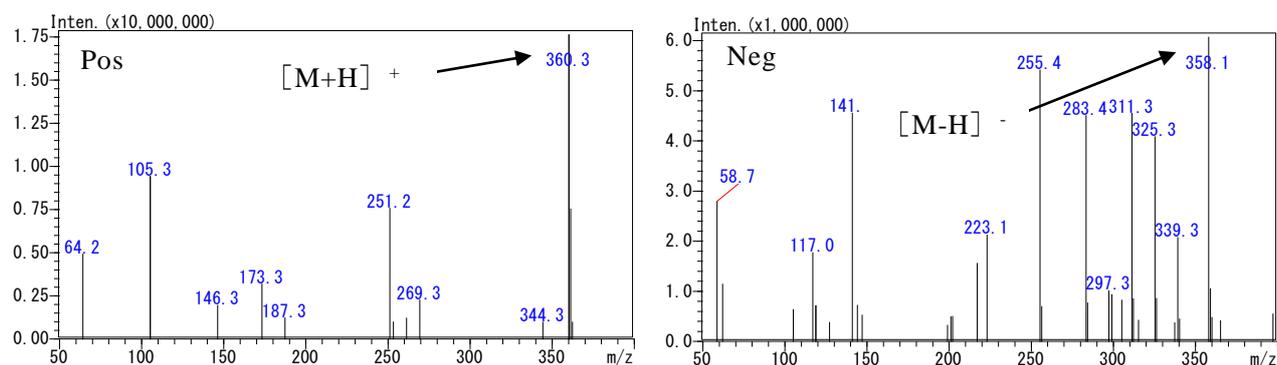


図1 イソキサフルトールのスキャン測定により得られるマススペクトル  
スキャン範囲: 50~400  $m/z$ 、左: ESI (+)、右: ESI (-)

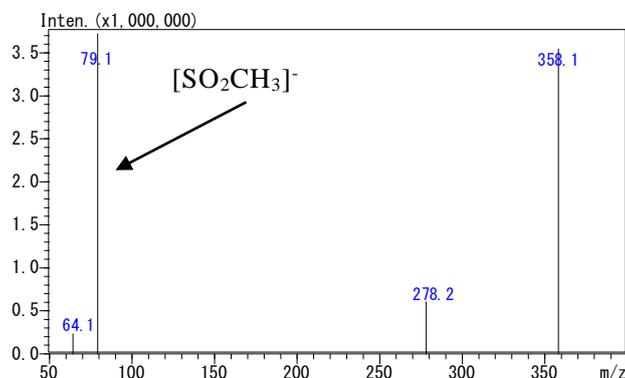


図2 イソキサフルトールのプロダクトイオンスペクトル (定量用)

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

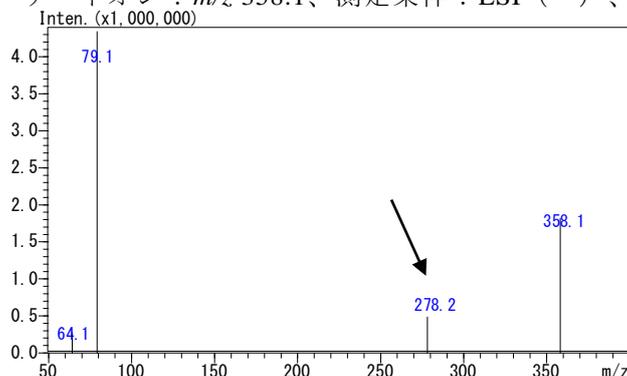


図3 イソキサフルトールのプロダクトイオンスペクトル (定性用)

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

## ② 代謝物BのMS条件の検討

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

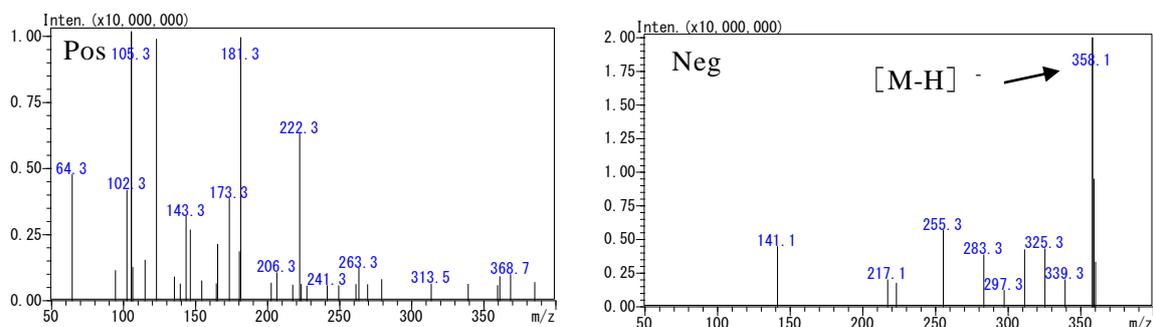


図4 代謝物Bのスキャン測定により得られるマススペクトル  
スキャン範囲 : 50~400  $m/z$ 、左 : ESI (+)、右 : ESI (-)

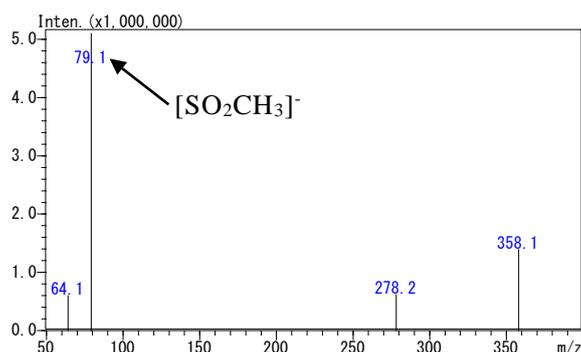


図5 代謝物Bのプロダクトイオンスペクトル (定量用)  
プリカーサーイオン :  $m/z$  358.1、測定条件 : ESI (-)、CE = 19 eV

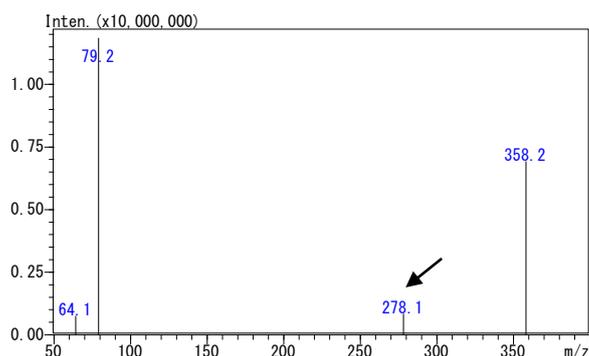


図6 代謝物Bのプロダクトイオンスペクトル (定性用)  
プリカーサーイオン :  $m/z$  358.1、測定条件 : ESI (-)、CE = 17 eV

## 2) LC条件の検討

### ① 移動相条件の検討

添加剤は酢酸、またはギ酸を用いて、有機溶媒には、アセトニトリル、メタノールを用いた。イソキサフルトール及び代謝物B標準溶液を表1に示す分析条件で測定し、ピーク面積値、S/N、

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

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

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

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

10 ng/mL イソキサフルトール及び代謝物B標準溶液5 µLを注入

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

表2 酢酸の濃度がピーク面積値等を与える影響

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

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

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

## ② 分析カラムの選定

一般的なODSカラムを用いてイソキサフルトール及び代謝物B標準溶液を測定し、ピークのS/N及びピーク形状を指標としてカラムを選択した。表3に示すように、InertSustain C18 HPカラムを用いたときに、両化合物共に良好なピーク形状が得られ、かつピークのS/Nが最大となった。また、イソキサフルトールは全てのカラムで良好なピーク形状が得られたが、代謝物BはInertsil ODS-4 HPを用いた場合にはブロードとなり、CAPCELL PAK C18 MG IIIでは溶出しなかったため、不採用とした。以上のことから、分析カラムには、InertSustain C18 HPを用いることにした。

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

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

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

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

### 3) 検量線

図7には、定量限界濃度（0.01 mg/kg）に対する回収率25%～150%（0.00025～0.0015 mg/L）（イソキサフルトールとして）に相当する濃度範囲の検量線の例を示した。試験法では、回収率100%に相当する濃度は、穀類、豆類では、0.001 mg/L（0.1 g試料/mL）である。本濃度範囲で作成した検量線の決定係数 $R^2$ は0.999以上と良好な直線性が認められた。また、最下点の検量溶液（0.00025 mg/L）から得られるピークのS/Nは、イソキサフルトールで2,099、代謝物Bで4,811以上と十分な感度が得られた。

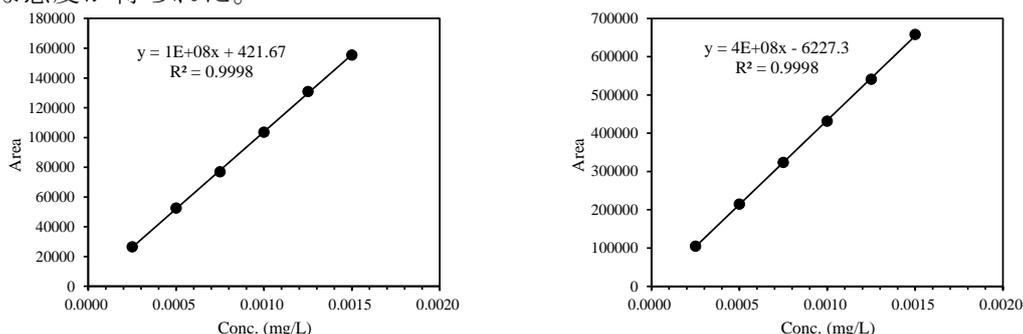


図7 定量限界濃度（0.01 mg/kg）を定量する際に作成する検量線の例（穀類、豆類の場合）

（左：イソキサフルトール、右：代謝物B）

## 2. 試験溶液調製方法の検討

### 1) 申請企業の残留分析法

申請企業から以下の残留分析法が報告されている<sup>1)</sup>。きゅうり、アブラナを用いて添加回収試験を実施しており、良好な結果が得られている。なお、定量値はマトリックスを含む溶液で調製した検量線を用いて算出している。

[フローチャート]

**試料**

↓ 試料 5 g を 50 mL 遠心管に量り採る

**抽出**

↓ きゅうりに 5.2 mL、アブラナには 9.4 mL の水を加える

↓ アセトニトリル 10 mL を加えて、1 分間振とうする

**精製**

↓ 硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、クエン酸三ナトリウム二水和物、クエン酸水素二ナトリウム 6 水和物 (4 : 1 : 1 : 0.5, w/w/w/w) 6.5 g を加えて、2 分間振とうする

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

**試験溶液**

↓

**LC-MS/MS 測定**

## 2) イソキサフルトールの安定性

イソキサフルトールは不安定な化合物で、特に pH の影響を強く受ける。クエン酸緩衝液 (pH 5)、イミダゾール緩衝液 (pH 7)、ホウ酸緩衝液 (pH 9) 中での推定半減期は、それぞれ、11 日、20 時間、3 時間であり、中性からアルカリ性においては短時間で分解する。分解経路としては、分子内のイソキサゾール環が加水分解により開裂して、代謝物 B が生成するものと考えられている。一方で、イソキサゾール環を持たない代謝物 B は、いずれの pH においても高い安定性を示す。また、イソキサフルトールは、pH の影響の他にも、光により速やかに分解され、代謝物 B をはじめとする複数の化合物に分解される。主要な水中光分解経路は、イソキサゾール環の開裂による代謝物 B の生成、代謝物 B の分解による代謝物 C (2-メチルスルホニル-4-トリフルオロメチル安息香酸) の生成など、複数の分解経路が示されている<sup>2)</sup>。従って、本試験法開発では、既に通知されているイソキサフルトール試験法 (畜産物)<sup>3)</sup> (以下、通知試験法という。) と同様に、褐色のガラス器具を使用するなど、可能な限り遮光下で操作することとした。

## 3) 分解防止方法の検討

通知試験法では、試料の細切均一化の際に起こるイソキサフルトールから代謝物 B などの代謝物への分解を防ぐために、試料に塩酸とエタノールの混液を加えて酸性としてから細切均一化することとしている。そこで、農産物の場合にも、同様に代謝物 B などの代謝物への分解が起こるかを検討した。更に、分解が生じた場合には、通知試験法と同様に試料を酸性にしてから細切均一化することで、その分解を抑えることが可能であるかを検討した。なお、通知試験法では、牛の脂肪との混和性を考慮して、塩酸をエタノールとの混液として用いているが、農産物の場合には、試料と塩酸は十分に混和するため、エタノール混液としないこととした。

5 食品 (大豆、ひよこ豆、とうもろこし (乾燥子実、未成熟)、さとうきび) を用いて、塩酸による分解防止措置の効果を検証した。検討では、分解防止措置を実施しない試験区、すなわち試料に水 20 または 10 g を加えて良く混合した後にイソキサフルトールまたは代謝物 B 標準溶液を添加して混合し 30 分間放置した後に、アセトニトリルにより抽出した場合と、分解防止措置を実施する試験区、すなわち試料に 2 mol/L 塩酸 20 または 10 g を加えて良く混合した後にイソキサフルトールまたは代謝物 B 標準溶液を添加して混合し 30 分間放置した後に、アセトニトリルにより抽出した場合とを比較した。

表 4 に示すように、イソキサフルトール、代謝物 B とともに、分解防止措置の実施の有無にかかわらず、全ての試料で 90%以上の良好な回収率が得られた。しかし、分解防止措置を実施しない場合（塩酸の添加量が 0 g の試験区）には、イソキサフルトールから分解された代謝物 B の回収率が高くなっている。なお、牛の筋肉や肝臓では、同様の検討でイソキサフルトールの約 50%程度が代謝物 B に変換されるため<sup>3)</sup>、分解に対する影響が、畜産物と農産物で大きく異なっているものと考えられる。従って、農産物では、試料細切時のイソキサフルトールの分解の程度は畜産物に比べると小さく、本検討で実施した試料では、分解防止の有無が測定値に与える影響は極めて小さいものと考えられる。しかしながら、より多様な農産物に適用が可能となるように、またイソキサフルトールは不安定で液性の影響を強く受けることから、抽出時の溶媒の pH をコントロールするためにも、分解防止措置を実施することとした。

表4 分解防止操作が回収率に与える影響

| 試料               | 試料量 (g) | 分解防止措置<br>2 mol/L 塩酸添加量 (g) | 回収率 (%) *     |           |          |           |
|------------------|---------|-----------------------------|---------------|-----------|----------|-----------|
|                  |         |                             | イソキサフルトールを添加  |           |          | 代謝物 B を添加 |
|                  |         |                             | イソキサフルトール (①) | 代謝物 B (②) | 合計 (①+②) | 代謝物 B     |
| 大豆               | 10      | 0                           | 90            | 1.3       | 91       | 97        |
|                  |         | 20                          | 94            | 0.3       | 94       | 97        |
| ひよこ豆             | 10      | 0                           | 93            | 1.4       | 94       | 99        |
|                  |         | 20                          | 95            | 0.1       | 95       | 99        |
| とうもろこし<br>(乾燥子実) | 10      | 0                           | 94            | 0.6       | 95       | 102       |
|                  |         | 20                          | 95            | 0.1       | 95       | 105       |
| とうもろこし<br>(未成熟)  | 20      | 0                           | 102           | 0.9       | 103      | 97        |
|                  |         | 10                          | 99            | 0.2       | 100      | 113       |
| さとうきび            | 20      | 0                           | 95            | 0.1       | 95       | 98        |
|                  |         | 10                          | 102           | 0.1       | 102      | 107       |

\* 添加試料から得られるピーク面積値/マトリックス添加標準溶液から得られるピーク面積値 × 100、n=3  
イソキサフルトール及び代謝物Bの添加濃度：0.1 mg/kg

#### 4) 転溶方法の検討

5 食品について、通知試験法と同様の方法で転溶操作を行い、それぞれの回収率を求めた。「7. 試験溶液の調製」に従って操作した 5 食品のアセトニトリル抽出液 4 mL をポリプロピレン製の遠心管に採り、イソキサフルトールまたは代謝物 B を試料中の濃度で 0.05 mg/kg となるように添加した。0.1 mol/L 塩酸 16 mL、塩化ナトリウム 2 g を加えた後に、酢酸エチル及び n-ヘキサン (3 : 7) 混液 20 mL で 2 回抽出した。その結果、表 5 に示すように、2 回の抽出操作でほぼ 100%の回収率が得られた。以上の結果から、転溶操作は、通知試験法と同様に、アセトニトリル抽出液 4 mL に、0.1 mol/L 塩酸 16 mL 及び塩化ナトリウム 2 g を加えた後に、酢酸エチル及び n-ヘキサン (3 : 7) 混液 20 mL で 2 回抽出することとした。

表5 転溶方法の検討

| 試料            | 添加濃度<br>(mg/kg) | 回収率 (%)   |       |
|---------------|-----------------|-----------|-------|
|               |                 | イソキサフルトール | 代謝物 B |
| 大豆            | 0.05            | 99        | 101   |
| ひよこ豆          |                 | 98        | 98    |
| とうもろこし (乾燥子実) |                 | 100       | 99    |
| とうもろこし (未成熟)  |                 | 100       | 99    |
| さとうきび         |                 | 99        | 98    |

\* 添加試料から得られるピーク面積値/マトリックス添加標準溶液から得られるピーク面積値 × 100、n = 3

### 5) ミニカラム精製方法の検討

5食品について、通知試験法と同様のミニカラム精製操作を行い、それぞれの回収率を求めた。「7. 試験溶液の調製」に従って転溶操作まで実施した。酢酸エチル及びヘキサン混液層を40℃以下で濃縮後に、イソキサフルトールまたは代謝物Bを試料中の濃度で0.01 mg/kgとなるように添加した。酢酸、水及びメタノール (1 : 20 : 30) 混液2 mLを加えて、通知試験法に従いOasis HLBミニカラム (500 mg) で精製した。表6に食品毎の回収率とマトリックス効果の値を示した。すべての試料において、十分な回収率が得られ、マトリックス効果も1.0程度であった。以上のことから、カラム精製操作は、通知試験法と同様に、酢酸エチル及びヘキサン混液層を濃縮後に、酢酸、水及びメタノール (1 : 20 : 30) 混液2 mLに溶解して、カラムに負荷し、酢酸、水及びメタノール (1 : 20 : 30) 混液10 mLでカラムを洗浄した後、酢酸、水及びメタノール (1 : 5 : 45) 混液20 mLで溶出することにした。

表6 ミニカラム精製による回収率 (%) 及びマトリックス効果

| 試料               | 添加濃度<br>(mg/kg) | イソキサフルトール |          | 代謝物 B     |          |
|------------------|-----------------|-----------|----------|-----------|----------|
|                  |                 | 回収率 (%) * | マトリックス効果 | 回収率 (%) * | マトリックス効果 |
| 大豆               | 0.01            | 88        | 0.94     | 95        | 1.02     |
| ひよこ豆             |                 | 94        | 0.95     | 96        | 1.01     |
| とうもろこし<br>(乾燥子実) |                 | 96        | 1.02     | 92        | 1.00     |
| とうもろこし<br>(未成熟)  |                 | 92        | 0.99     | 88        | 0.99     |
| さとうきび            |                 | 94        | 0.99     | 92        | 1.03     |

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

### 3. 添加回収試験

農産物5食品 (大豆、ひよこ豆、とうもろこし (乾燥子実、未成熟)、さとうきび) を用いて、[実験方法] 7. 試験溶液の調製に示す方法に従い、各食品に設定されている基準値濃度及び定量限界濃度 (0.01 mg/kg) (濃度はいずれもイソキサフルトール換算) でイソキサフルトール及び代謝物Bの添加回収試験を実施した。添加回収試験における回収率100%相当の溶媒標準溶液、

各食品のブランク試料及び添加試料の代表的なクロマトグラムを図8～25に示した。また、各食品のブランク試料のスキア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26に示した。

### 1) 選択性の評価

選択性の評価結果を表7に示した。すべての食品において、イソキサフルトール及び代謝物Bの定量を妨害するピークは検出されなかった。以上のことから、選択性は問題が無いと判断した。

表7 選択性の評価

| No. | 分析対象化合物   | 食品名          | 定量限界<br>[検出限界]<br>(mg/kg) | 基準値<br>(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<br>評価 <sup>3)</sup> |                    |   |
|-----|-----------|--------------|---------------------------|--------------|---------------|------|--------------|-------------------------|-----|-------|----------------------------|---------|---------|--------------------------|--------------------|---|
|     |           |              |                           |              | 評価濃度<br>(ppm) | 評価基準 | 面積又は<br>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)<br>比(a)/(b) |   |
|     |           |              |                           |              |               |      |              | n=1                     | n=2 | 平均(a) | n=1                        | n=2     | 平均(b)   |                          |                    |   |
| 1   | イソキサフルトール | 大豆           | 0.01                      | 0.05         | 基準値           | 0.05 | < 0.100      | 面積                      | 0   | 0     | 0                          | 531246  | 535824  | 533535                   | 0.000              | ○ |
| 1   | イソキサフルトール | ひよこ豆         | 0.01                      | 0.03         | 基準値           | 0.03 | < 0.100      | 面積                      | 0   | 0     | 0                          | 334473  | 336171  | 335322                   | 0.000              | ○ |
| 1   | イソキサフルトール | とうもろこし(乾燥子実) | 0.01                      | 0.02         | 定量限界          | 0.01 | < 0.333      | 面積                      | 0   | 0     | 0                          | 115685  | 114442  | 115064                   | 0.000              | ○ |
| 1   | イソキサフルトール | とうもろこし(未成熟)  | 0.01                      | 0.02         | 定量限界          | 0.01 | < 0.333      | 面積                      | 0   | 0     | 0                          | 231714  | 227994  | 229854                   | 0.000              | ○ |
| 1   | イソキサフルトール | さとうきび        | 0.01                      | 0.01         | 定量限界          | 0.01 | < 0.333      | 面積                      | 0   | 0     | 0                          | 196424  | 197457  | 196941                   | 0.000              | ○ |
| 2   | 代謝物B      | 大豆           | 0.01                      | 0.05         | 基準値           | 0.05 | < 0.100      | 面積                      | 0   | 0     | 0                          | 2031039 | 2043625 | 2037332                  | 0.000              | ○ |
| 2   | 代謝物B      | ひよこ豆         | 0.01                      | 0.03         | 基準値           | 0.03 | < 0.100      | 面積                      | 0   | 0     | 0                          | 1290186 | 1290547 | 1290367                  | 0.000              | ○ |
| 2   | 代謝物B      | とうもろこし(乾燥子実) | 0.01                      | 0.02         | 定量限界          | 0.01 | < 0.333      | 面積                      | 0   | 0     | 0                          | 419773  | 416145  | 417959                   | 0.000              | ○ |
| 2   | 代謝物B      | とうもろこし(未成熟)  | 0.01                      | 0.02         | 定量限界          | 0.01 | < 0.333      | 面積                      | 0   | 0     | 0                          | 853941  | 852069  | 853005                   | 0.000              | ○ |
| 2   | 代謝物B      | さとうきび        | 0.01                      | 0.01         | 定量限界          | 0.01 | < 0.333      | 面積                      | 0   | 0     | 0                          | 816121  | 823427  | 819774                   | 0.000              | ○ |

\*1 ブランク試料、標準溶液の順に注入して測定した結果から評価する。(必要に応じて起爆注入を行う。)

\*2 試料中の濃度が「評価濃度」相当になるように、ブランク試料の試験溶液で調製した標準溶液(マトリックス添加標準溶液)を用いる。ブランク試料に妨害ピークが観察されなかった場合には、標準溶液のピーク面積(高さ)は求めなくても良い。

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

### 2) 真度、精度

基準値濃度及び定量限界濃度(0.01 mg/kg)における真度、精度の検討結果を表8に示した。定量限界濃度での真度及び併行精度は、イソキサフルトールでそれぞれ92~95%及び0.5~1.4%、代謝物Bでそれぞれ86~97%及び0.5~1.7%であった。基準値濃度での真度及び併行精度は、イソキサフルトールでそれぞれ92~95%及び0.3~2.1%、代謝物Bでそれぞれ93~98%及び1.3~1.9%であった。なお、イソキサフルトールを添加した試料からは、イソキサフルトールの分解により生じたと考えられる代謝物Bのピークが検出されたが(図8、10、12、14、16、18、20、22、24)、その定量値は1%未満(外挿のため参考値)であったため、イソキサフルトールの分析値に合算しなかった。検討した両添加濃度ともに、妥当性評価ガイドラインの目標値を十分に満たした。また、定量限界濃度における添加試料のピークのS/Nの平均値は、イソキサフルトールで3,467~16,286、代謝物Bで1,414~4,951であり、S/N≥10以上を十分に満たした。

表8 真度、精度の評価

| No.          | 分析対象化合物   | 食品名          | 定量限界<br>[検出限界]<br>(mg/kg) | 基準値<br>(ppm) | 添加濃度<br>(ppm) | 定量限界<br>の評価 <sup>1)</sup> | 検量線       |       |                  | 回収率(%) |        |      |      |      | 真度<br>(%) | 併行精度<br>(RSD%) | S/N <sup>2)</sup> |       |       |
|--------------|-----------|--------------|---------------------------|--------------|---------------|---------------------------|-----------|-------|------------------|--------|--------|------|------|------|-----------|----------------|-------------------|-------|-------|
|              |           |              |                           |              |               |                           | 傾き        | 切片    | r <sup>2</sup> 値 | n=1    | n=2    | n=3  | n=4  | n=5  |           |                | Max.              | Min.  | 平均値   |
|              |           |              |                           |              |               |                           |           |       |                  |        |        |      |      |      |           |                |                   |       |       |
| 1            | イソキサフルトール | 大豆           | 0.01                      | 0.05         | 0.01          | S/N                       | 103492571 | 422   | 0.9998           | 90.1   | 92.7   | 91.8 | 93.0 | 92.3 | 92.0      | 1.2            | 5240              | 5067  | 5154  |
|              |           | ひよこ豆         | 0.01                      | 0.03         | 0.01          | S/N                       | 107297829 | -840  | 0.9995           | 92.5   | 93.0   | 93.8 | 93.9 | 93.4 | 0.7       | 4008           | 2927              | 3467  |       |
|              |           | とうもろこし(乾燥子実) | 0.01                      | 0.02         | 0.01          | S/N                       | 116103886 | -881  | 0.9999           | 94.5   | 94.9   | 94.1 | 95.4 | 96.3 | 95.1      | 0.9            | 7171              | 7085  | 7128  |
|              |           | とうもろこし(未成熟)  | 0.01                      | 0.02         | 0.01          | S/N                       | 117351600 | -30   | 1.0000           | 91.0   | 91.4   | 91.6 | 92.4 | 91.5 | 91.6      | 0.5            | 12077             | 11834 | 11955 |
|              |           | さとうきび        | 0.01                      | 0.01         | 0.01          | S/N                       | 99559600  | 595   | 1.0000           | 92.3   | 91.0   | 93.2 | 91.0 | 94.1 | 92.3      | 1.4            | 20630             | 11941 | 16286 |
|              |           | 大豆           | 0.01                      | 0.05         | 0.05          | —                         | 112164800 | -7093 | 0.9999           | 89.6   | 90.0   | 93.5 | 93.7 | 91.8 | 91.7      | 2.1            | 13881             | 11298 | 12590 |
|              |           | ひよこ豆         | 0.01                      | 0.03         | 0.03          | —                         | 109801524 | 10161 | 0.9999           | 95.7   | 95.2   | 93.9 | 94.1 | 92.9 | 94.4      | 1.2            | 13481             | 7820  | 10650 |
|              |           | とうもろこし(乾燥子実) | 0.01                      | 0.02         | 0.02          | —                         | 115232857 | -3396 | 0.9999           | 94.1   | 95.6   | 96.8 | 94.6 | 94.1 | 95.0      | 1.2            | 14376             | 8605  | 11490 |
|              |           | とうもろこし(未成熟)  | 0.01                      | 0.02         | 0.02          | —                         | 118246514 | 518   | 0.9999           | 94.4   | 94.4   | 93.9 | 94.3 | 94.6 | 94.3      | 0.3            | 29421             | 24226 | 26823 |
|              |           | 2            | 代謝物B                      | 大豆           | 0.01          | 0.05                      | 0.01      | S/N   | 440356571        | -6227  | 0.9998 | 94.7 | 96.0 | 97.3 | 98.0      | 97.3           | 96.7              | 1.4   | 5402  |
| ひよこ豆         | 0.01      |              |                           | 0.03         | 0.01          | S/N                       | 423510514 | -5918 | 1.0000           | 95.9   | 96.4   | 97.2 | 97.4 | 98.8 | 97.1      | 1.2            | 4147              | 3528  | 3838  |
| とうもろこし(乾燥子実) | 0.01      |              |                           | 0.02         | 0.01          | S/N                       | 419890743 | -5554 | 0.9999           | 92.4   | 94.3   | 96.4 | 94.3 | 95.8 | 94.6      | 1.6            | 1571              | 1402  | 1487  |
| とうもろこし(未成熟)  | 0.01      |              |                           | 0.02         | 0.01          | S/N                       | 423523943 | -2556 | 0.9999           | 91.0   | 94.7   | 92.9 | 92.9 | 94.9 | 93.3      | 1.7            | 2346              | 1185  | 1766  |
| さとうきび        | 0.01      |              |                           | 0.01         | 0.01          | S/N                       | 408522229 | 4160  | 1.0000           | 85.3   | 85.3   | 85.0 | 85.7 | 86.2 | 85.5      | 0.5            | 1729              | 1099  | 1414  |
| 大豆           | 0.01      |              |                           | 0.05         | 0.05          | —                         | 401161257 | 7739  | 1.0000           | 95.4   | 97.6   | 99.3 | 99.8 | 99.5 | 99.3      | 1.9            | 15851             | 9399  | 12625 |
| ひよこ豆         | 0.01      |              |                           | 0.03         | 0.03          | —                         | 424938590 | -1256 | 0.9999           | 93.4   | 94.5   | 94.9 | 96.0 | 96.5 | 95.1      | 1.3            | 11090             | 6729  | 8910  |
| とうもろこし(乾燥子実) | 0.01      |              |                           | 0.02         | 0.02          | —                         | 408796057 | -9723 | 1.0000           | 91.6   | 92.4   | 94.7 | 93.1 | 92.7 | 1.4       | 2076           | 1540              | 1808  |       |
| とうもろこし(未成熟)  | 0.01      |              |                           | 0.02         | 0.02          | —                         | 395863371 | 2137  | 0.9999           | 94.2   | 95.1   | 94.1 | 97.0 | 96.7 | 95.4      | 1.4            | 1587              | 1058  | 1323  |

\*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9に示した。添加回収試験における回収率100%相当濃度となるように調製したマトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積比を求めた。その結果、ピーク面積比は、イソキサフルトールでは0.97~1.00、代謝物Bでは1.00~1.03であったことから、本法は試料由来のマトリックスの影響をほとんど受けずに測定することが可能と考えられた。

表9 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>[検出限界]<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) | 面積又は<br>高さの別 | ブランク <sup>3)</sup> | ピーク面積(高さ) <sup>2)</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            | イソキサフルトール | 大豆           | 0.01                      | 0.05         | 0.01          | 0.001                              | 面積           | 0                  | 101994                     | 101921  | 101958  | 103511  | 102821  | 103166  | 0.99                         |
|              |           | ひよこ豆         | 0.01                      | 0.03         | 0.01          | 0.001                              | 面積           | 0                  | 107462                     | 106510  | 106986  | 106765  | 107613  | 107189  | 1.00                         |
|              |           | とうもろこし(乾燥子実) | 0.01                      | 0.02         | 0.01          | 0.001                              | 面積           | 0                  | 115685                     | 114442  | 115064  | 115524  | 114897  | 115211  | 1.00                         |
|              |           | とうもろこし(未成熟)  | 0.01                      | 0.02         | 0.01          | 0.002                              | 面積           | 0                  | 231714                     | 227994  | 229854  | 233862  | 232642  | 233252  | 0.99                         |
|              |           | さとうきび        | 0.01                      | 0.01         | 0.01          | 0.002                              | 面積           | 0                  | 196424                     | 197457  | 196941  | 199913  | 199784  | 199849  | 0.99                         |
|              |           | 大豆           | 0.01                      | 0.05         | 0.05          | 0.005                              | 面積           | 0                  | 531246                     | 535824  | 533535  | 550515  | 553371  | 551943  | 0.97                         |
|              |           | ひよこ豆         | 0.01                      | 0.03         | 0.03          | 0.003                              | 面積           | 0                  | 334473                     | 336171  | 335322  | 338395  | 336453  | 337424  | 0.99                         |
|              |           | とうもろこし(乾燥子実) | 0.01                      | 0.02         | 0.02          | 0.002                              | 面積           | 0                  | 224990                     | 227708  | 226349  | 226950  | 224778  | 225864  | 1.00                         |
|              |           | とうもろこし(未成熟)  | 0.01                      | 0.02         | 0.02          | 0.004                              | 面積           | 0                  | 467328                     | 467848  | 467588  | 470948  | 470674  | 470811  | 0.99                         |
|              |           | 2            | 代謝物B                      | 大豆           | 0.01          | 0.05                               | 0.01         | 0.001              | 面積                         | 0       | 445653  | 443984  | 444819  | 431506  | 436572                       |
| ひよこ豆         | 0.01      |              |                           | 0.03         | 0.01          | 0.001                              | 面積           | 0                  | 427843                     | 428404  | 428124  | 416692  | 416983  | 416838  | 1.03                         |
| とうもろこし(乾燥子実) | 0.01      |              |                           | 0.02         | 0.01          | 0.001                              | 面積           | 0                  | 419773                     | 416145  | 417959  | 416091  | 414316  | 415204  | 1.01                         |
| とうもろこし(未成熟)  | 0.01      |              |                           | 0.02         | 0.01          | 0.002                              | 面積           | 0                  | 853941                     | 852069  | 853005  | 843030  | 840165  | 841598  | 1.01                         |
| さとうきび        | 0.01      |              |                           | 0.01         | 0.01          | 0.002                              | 面積           | 0                  | 816121                     | 823427  | 819774  | 824215  | 821335  | 822775  | 1.00                         |
| 大豆           | 0.01      |              |                           | 0.05         | 0.05          | 0.005                              | 面積           | 0                  | 2031039                    | 2043625 | 2037332 | 2018483 | 2018834 | 2018659 | 1.01                         |
| ひよこ豆         | 0.01      |              |                           | 0.03         | 0.03          | 0.003                              | 面積           | 0                  | 1290186                    | 1290547 | 1290367 | 1273847 | 1276717 | 1275282 | 1.01                         |
| とうもろこし(乾燥子実) | 0.01      |              |                           | 0.02         | 0.02          | 0.002                              | 面積           | 0                  | 799525                     | 805132  | 802329  | 808448  | 804002  | 806225  | 1.00                         |
| とうもろこし(未成熟)  | 0.01      |              |                           | 0.02         | 0.02          | 0.004                              | 面積           | 0                  | 1596518                    | 1604729 | 1600624 | 1587219 | 1574262 | 1580741 | 1.01                         |

\*1 添加回収試験における回収率100%相当濃度になるように、ブランク試料の試験溶液で調製した標準溶液(マトリックス添加標準溶液)及び溶媒で調製した標準溶液(溶媒標準溶液)を作成する。

\*2 マトリックス添加標準溶液及び溶媒標準溶液の順に交互に2回以上測定した結果から評価する。(必要に応じて起爆注入を行う。)

\*3 ブランクにピークが認められた場合には、マトリックス添加標準溶液の値はブランク値を差し引いた値を用いる。

\*4 マトリックス添加標準溶液は試験当日のブランク試料の試験溶液を用いて調製する。

\*5 マトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積(又は高さ)の比を求める。

### [結論]

イソキサフルトール及び代謝物Bを2 mol/L塩酸で均一化した試料から、アセトニトリルで抽出し、酢酸エチル及びn-ヘキサン(3:7)混液に転溶した後、ジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムで精製し、LC-MS/MSで定量及び確認する方法を開発した。開発した分析法を基準値濃度及び定量限界濃度(0.01 mg/kg)で、大豆、ひよこ豆、とうもろこし(乾燥子実、未成熟)、さとうきびの5食品に適用した。基準値濃度及び定量限界濃度での真度及び併行精度は、イソキサフルトールでそれぞれ92~95%及び0.3~2.1%、代謝物Bでそれぞれ86~98%及び0.5~1.9%であった。また、各食品におけるマトリックス添加標準溶液に対する溶媒標準溶液のピーク面積比は、イソキサフルトールでは0.97~1.00、代謝物Bでは1.00~1.03であったことから、本法は試料由来のマトリックスの影響をほとんど受けずに測定することが可能と考えられた。以上のことから、開発した分析法は、農産物中のイソキサフルトール及び代謝物Bを基準値濃度及び定量限界濃度で精度良く定量することが可能であると考えられた。

### [参考文献]

1) Independent laboratory validation of the BCS-method-01300/M008 (based on QuEChERS) for the determination of residues of Isoxaflutole and its Metabolite RPA 202248 in crops. Study code:S12-02569, eurofins agrosience service, 2013.

2) JMPR評価書

[http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests\\_Pesticides/JMPR/Evaluation13/Isoxaflutole.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPR/Evaluation13/Isoxaflutole.pdf)

3) イソキサフルトール試験法（畜産物）（生食発0906第1号、令和3年9月6日）

添加回収試験における代表的なクロマトグラム（添加濃度：基準値濃度）

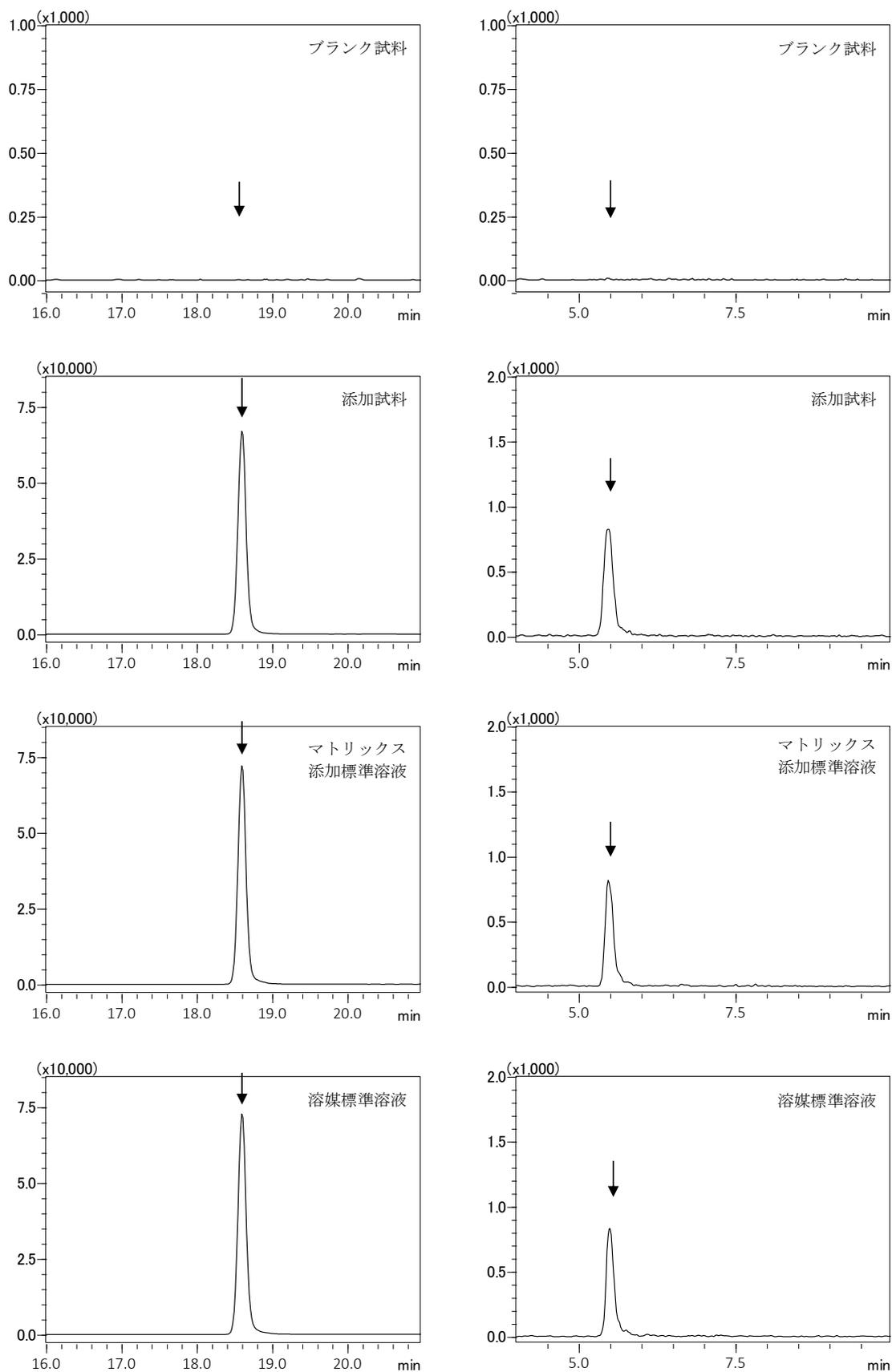


図8 大豆のSRMクロマトグラム [イソキサフトール添加]

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

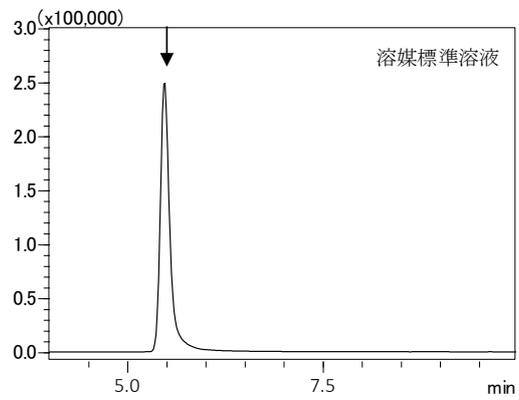
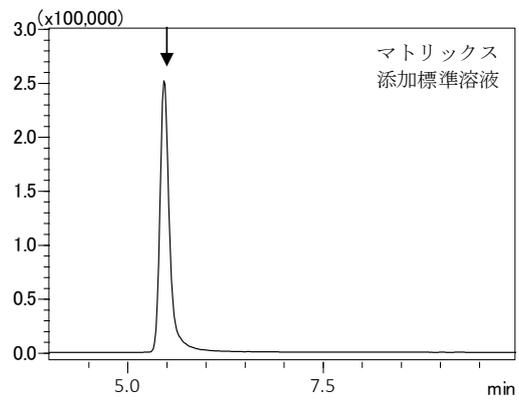
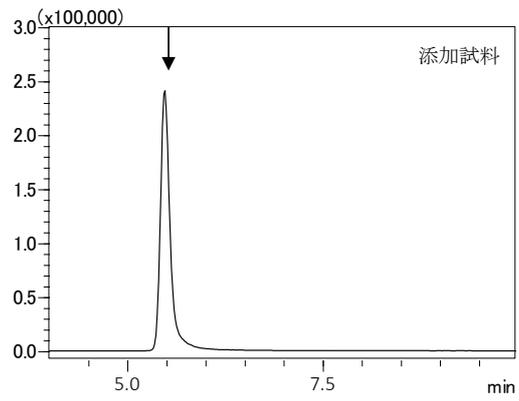
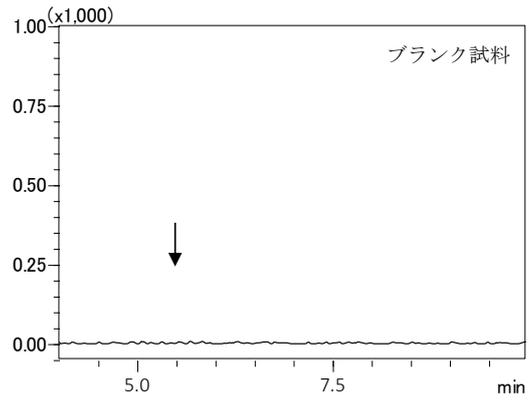


図9 大豆のSRMクロマトグラム [代謝物B添加]  
(代謝物B ;  $m/z$  358.1 $\rightarrow$ 79.1)

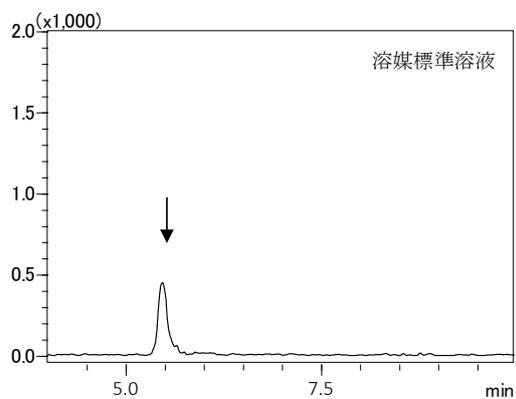
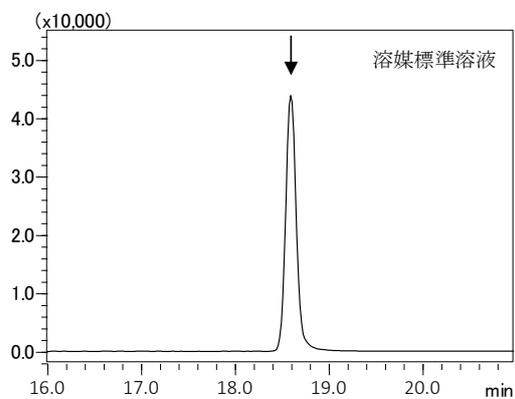
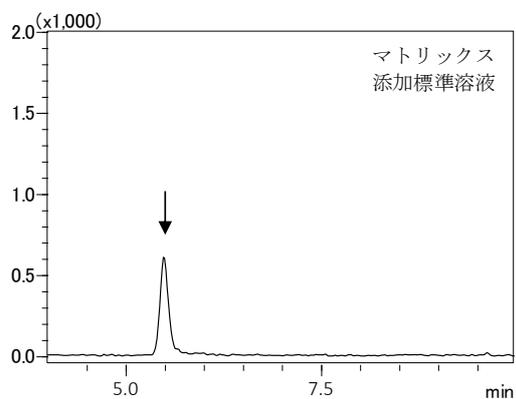
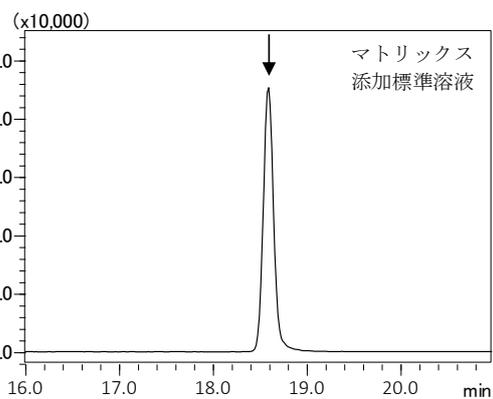
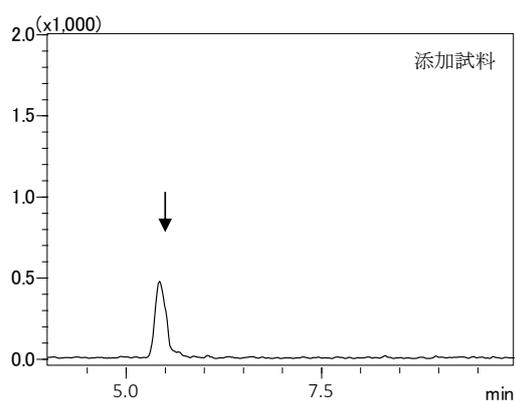
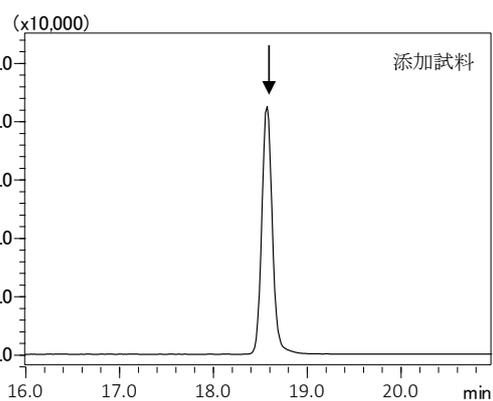
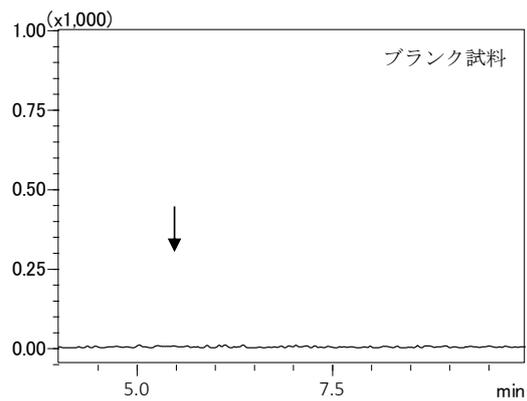
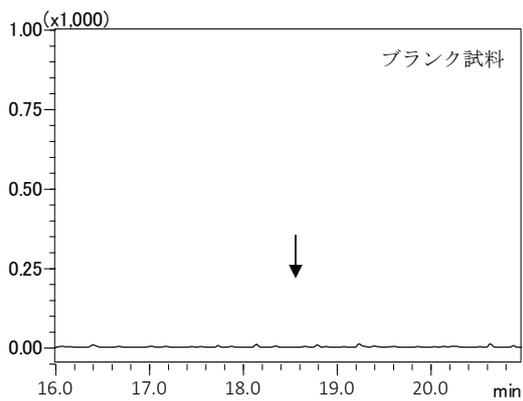


図10 ひよこ豆のSRMクロマトグラム [イソキサフトール添加]  
 (左：イソキサフトール； $m/z$  358.1→79.1、右：代謝物B； $m/z$  358.1→79.1)

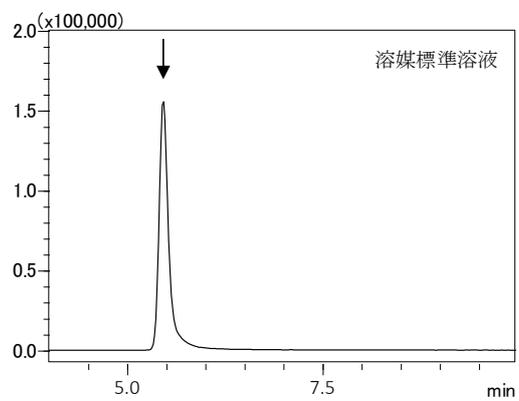
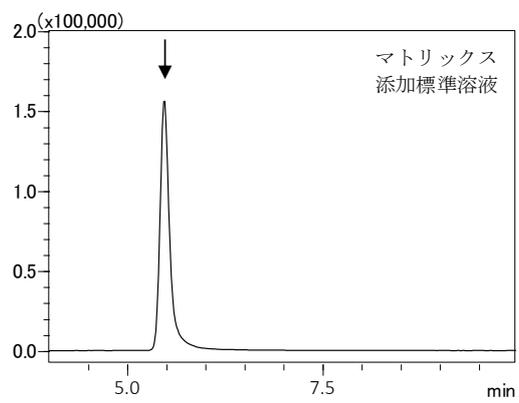
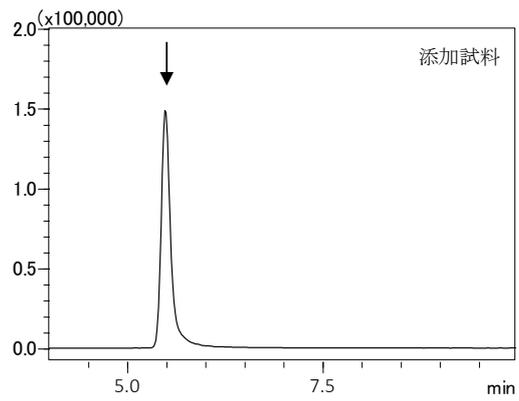
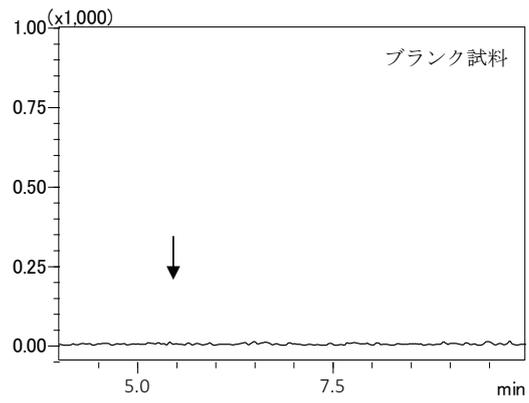


図11 ひよこ豆のSRMクロマトグラム [代謝物B添加]  
(代謝物B ;  $m/z$  358.1→79.1)

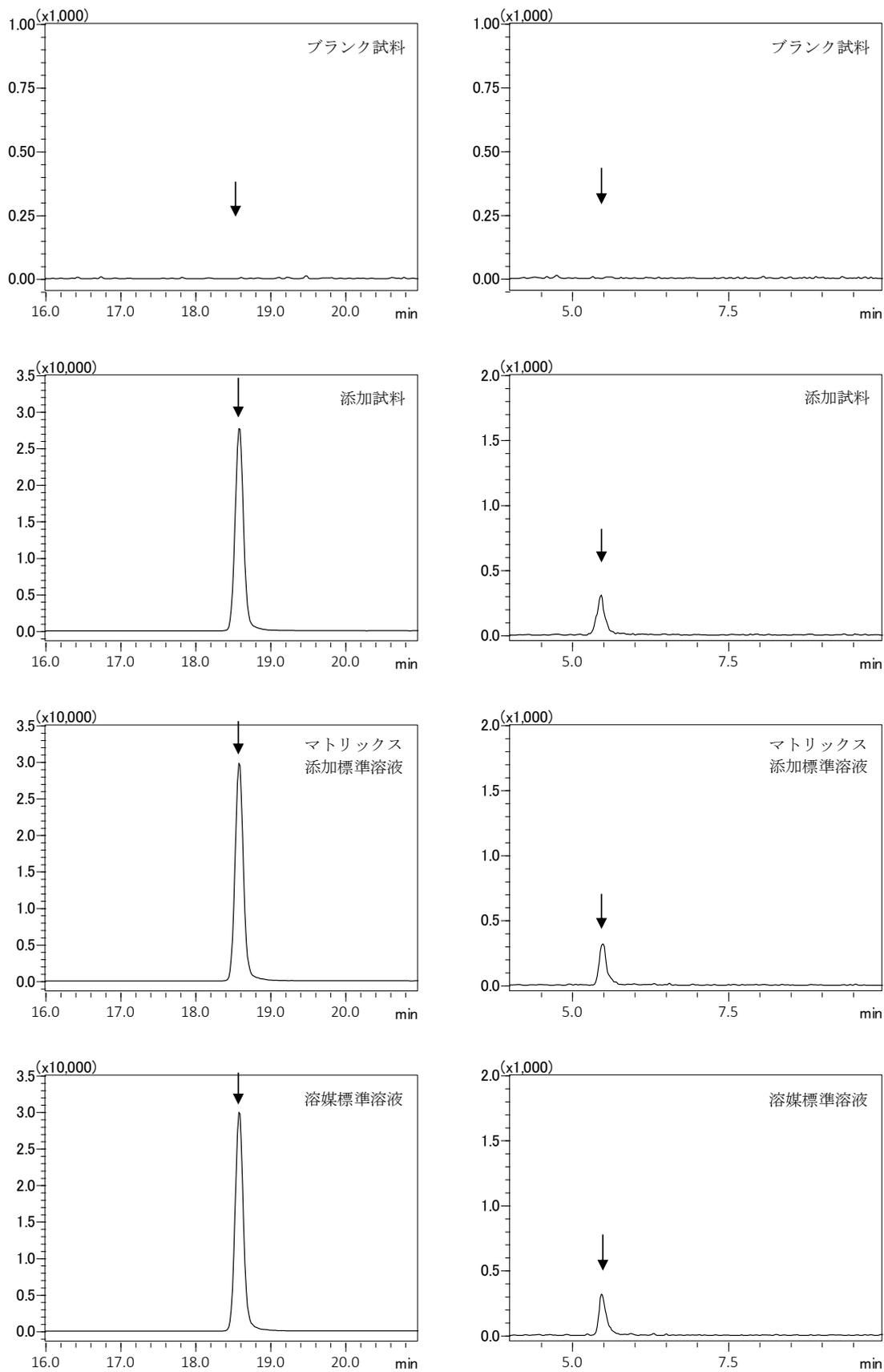


図12 とうもろこし（乾燥子実）のSRMクロマトグラム [イソキサフルトール添加]  
 (左：イソキサフルトール； $m/z$  358.1→79.1、右：代謝物B； $m/z$  358.1→79.1)

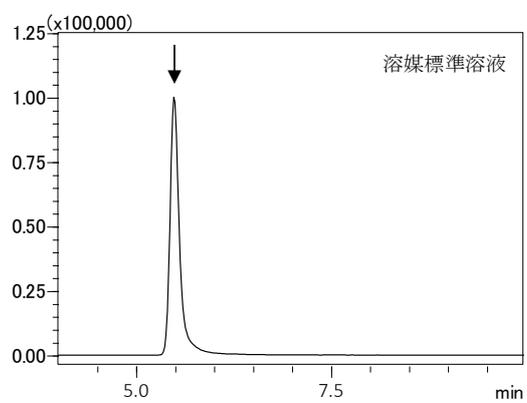
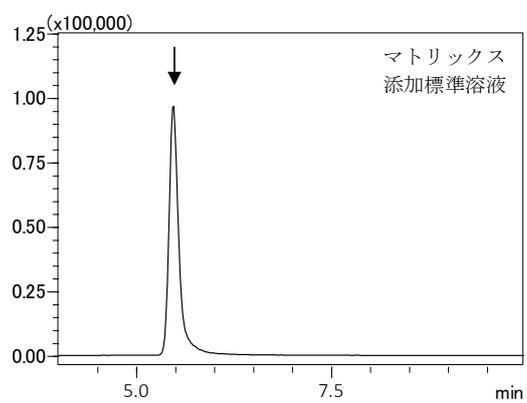
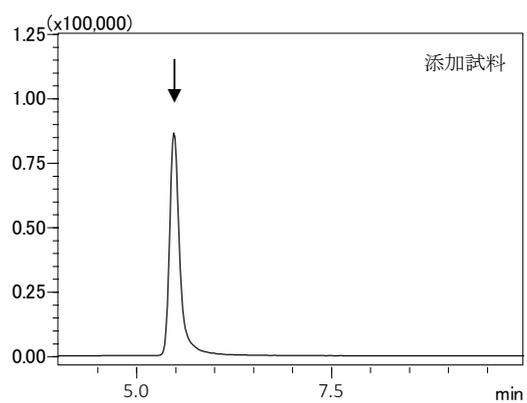
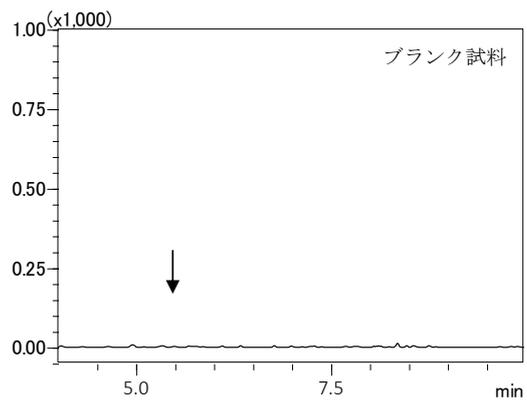


図13 とうもろこし（乾燥子実）のSRMクロマトグラム [代謝物B添加]  
(代謝物B ;  $m/z$  358.1→79.1)

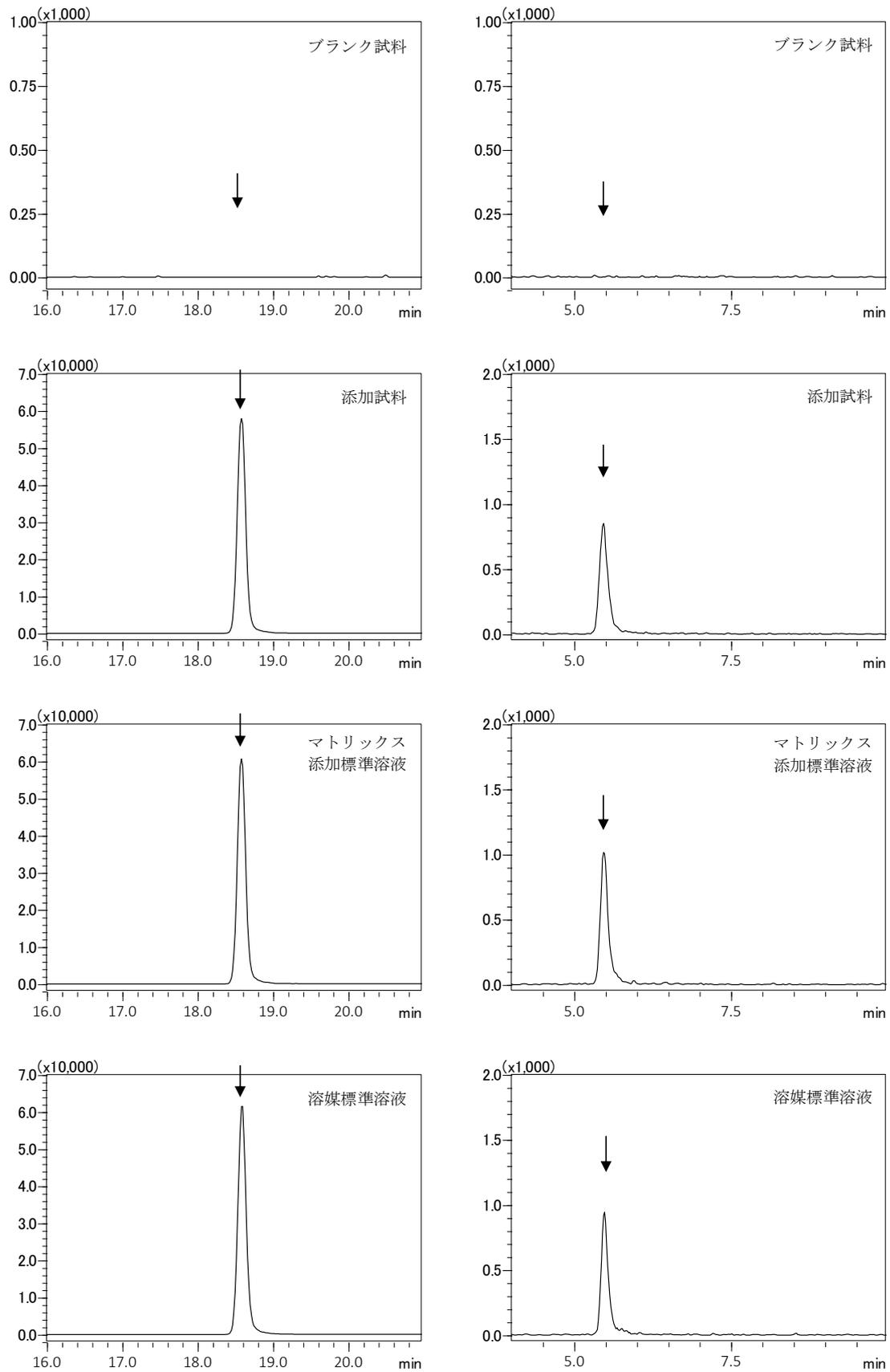


図14 とうもろこし (未成熟) のSRMクロマトグラム [イソキサフルトール添加]  
 (左: イソキサフルトール;  $m/z$  358.1 $\rightarrow$ 79.1、右: 代謝物B;  $m/z$  358.1 $\rightarrow$ 79.1)

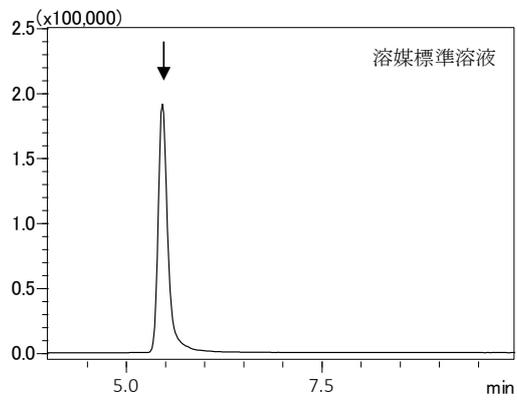
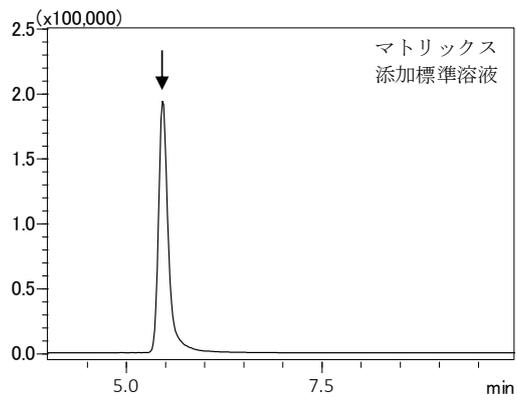
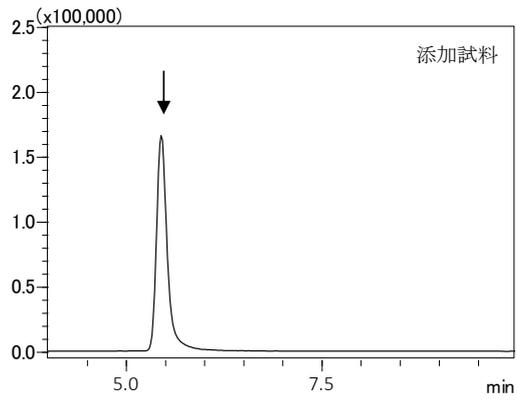
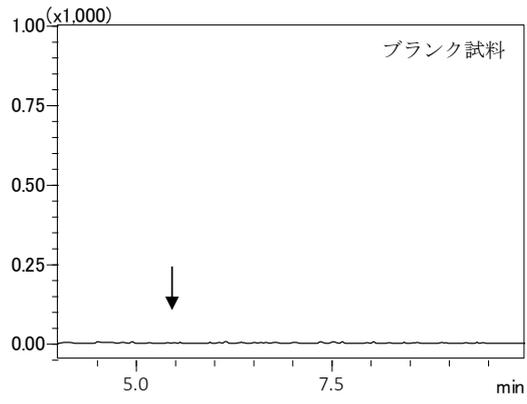


図15 とうもろこし（未成熟）のSRMクロマトグラム [代謝物B添加]  
(代謝物B ;  $m/z$  358.1→79.1)

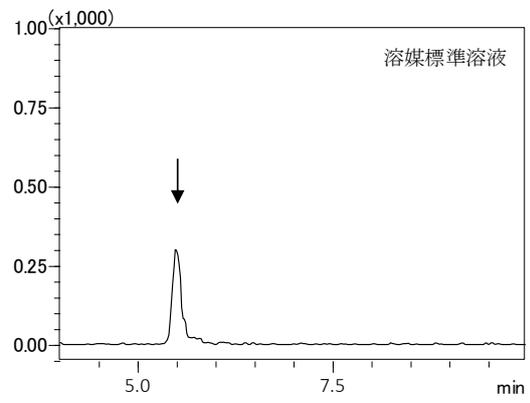
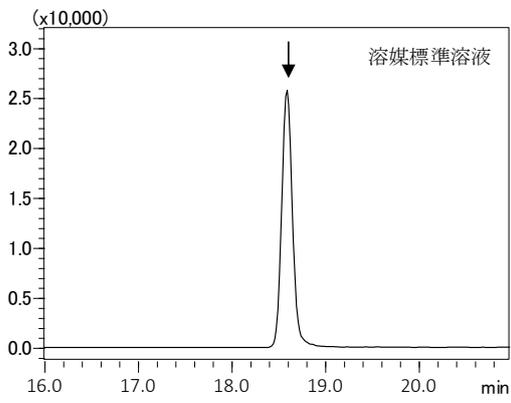
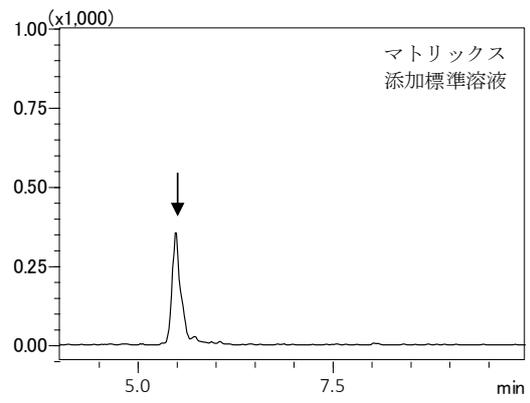
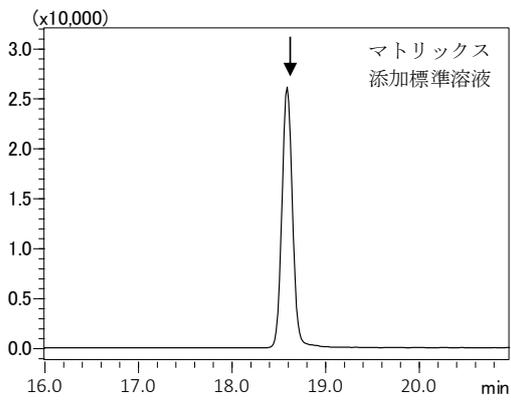
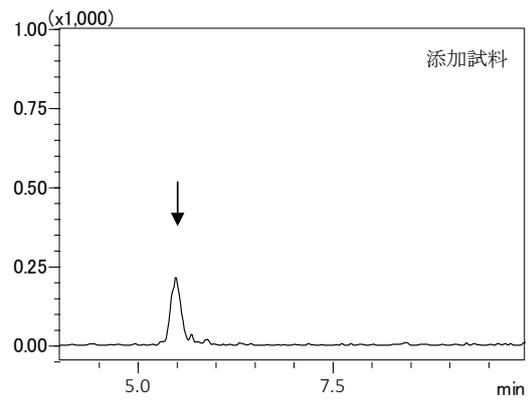
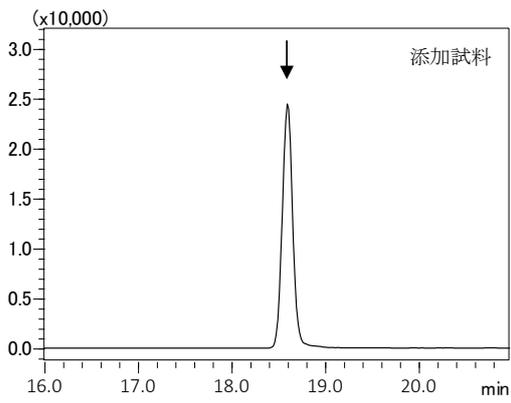
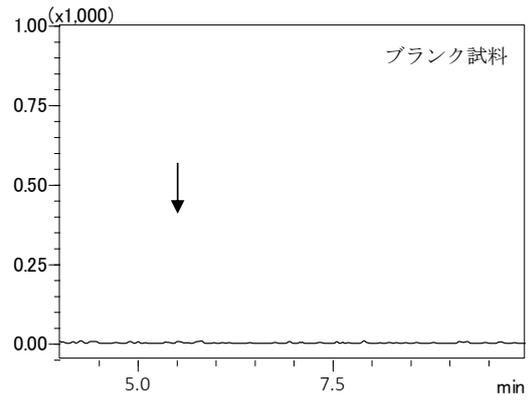
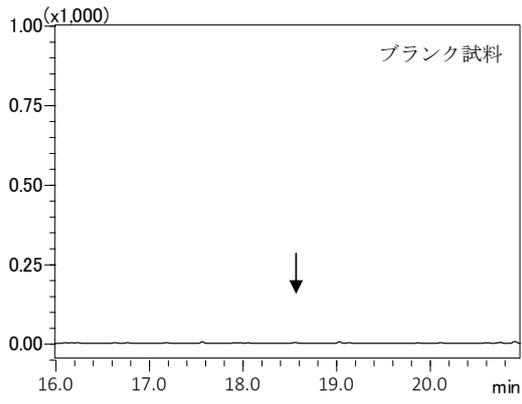


図16 さとうきびのSRMクロマトグラム [イソキサフルトール添加]  
 (左: イソキサフルトール;  $m/z$  358.1 $\rightarrow$ 79.1、右: 代謝物B;  $m/z$  358.1 $\rightarrow$ 79.1)

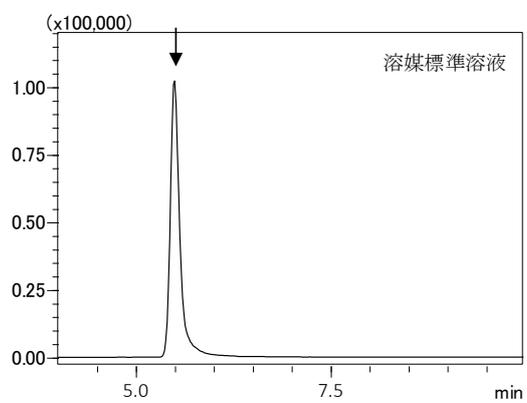
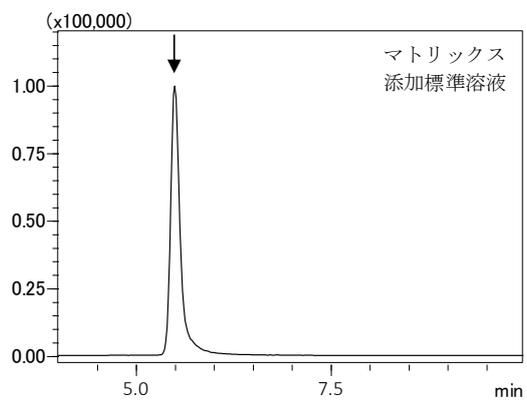
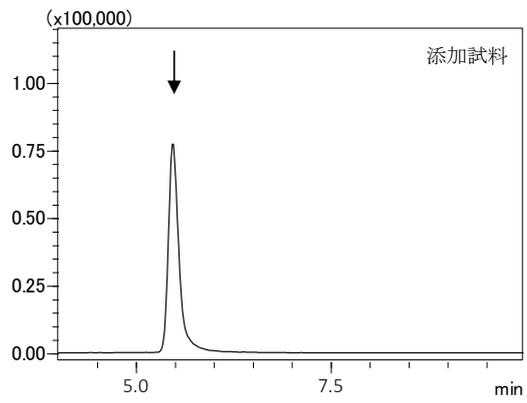
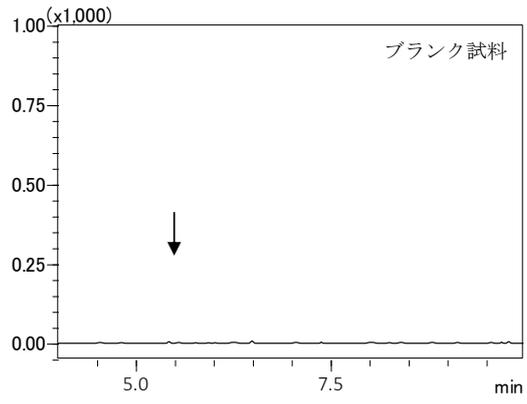


図17 さとうきびのSRMクロマトグラム [代謝物B添加]  
(代謝物B ;  $m/z$  358.1→79.1)

添加回収試験における代表的なクロマトグラム（添加濃度：定量限界濃度）

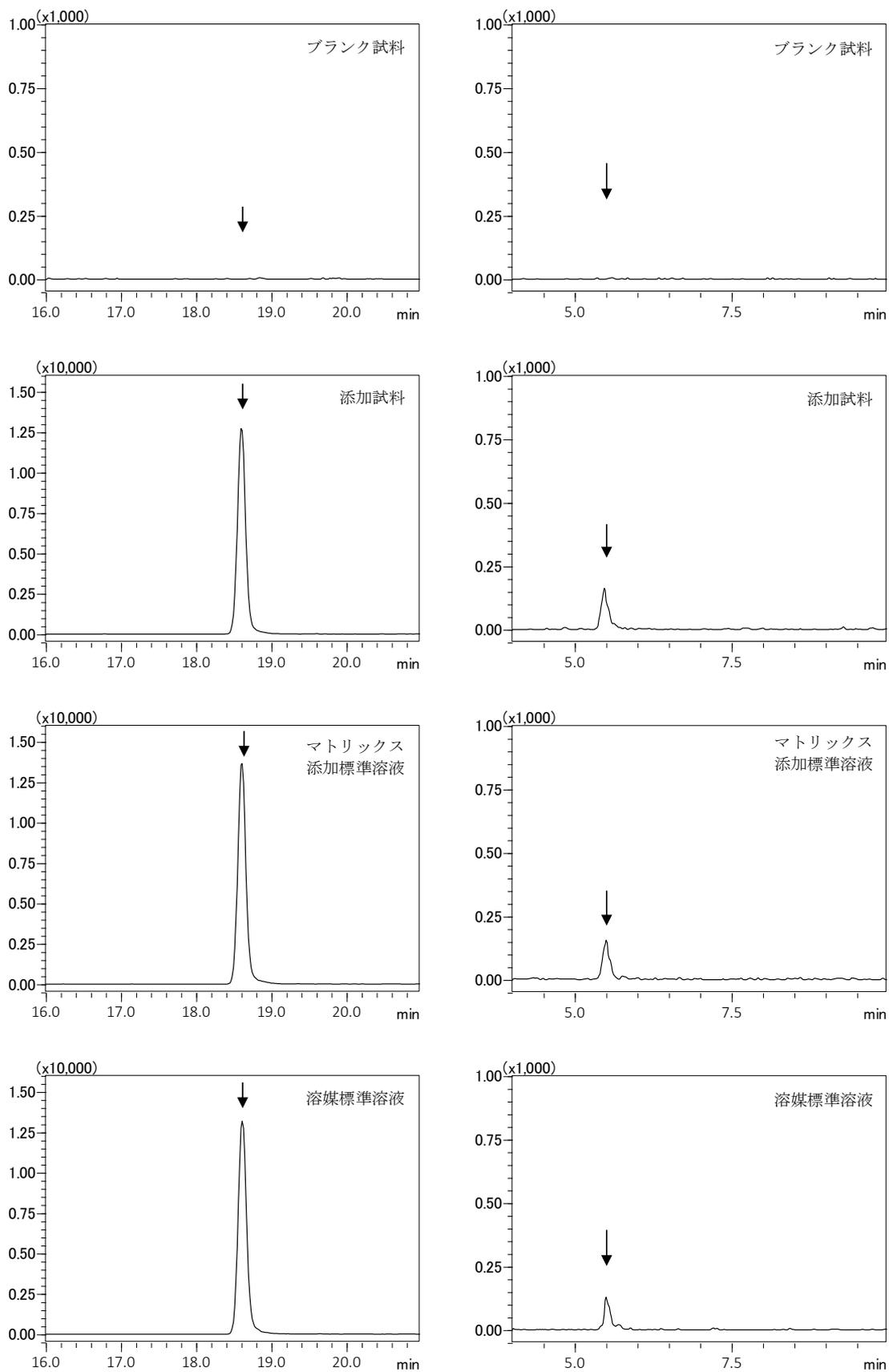


図18 大豆のSRMクロマトグラム [イソキサフルトール添加]

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

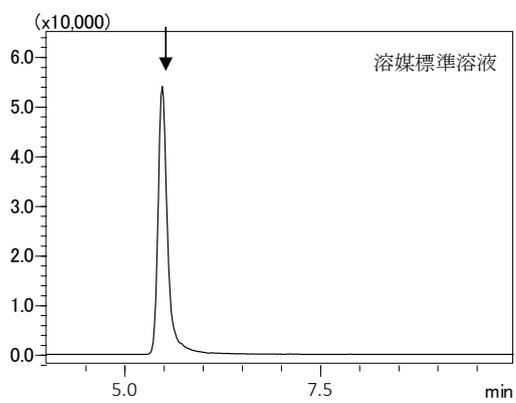
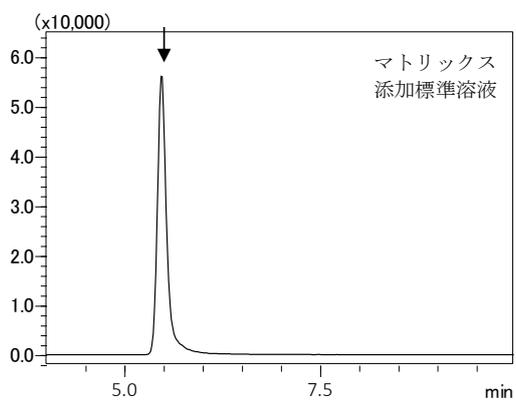
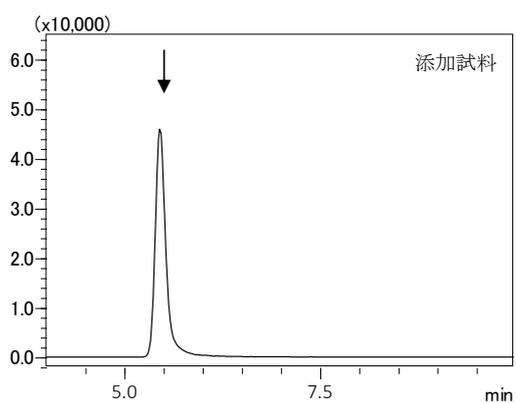
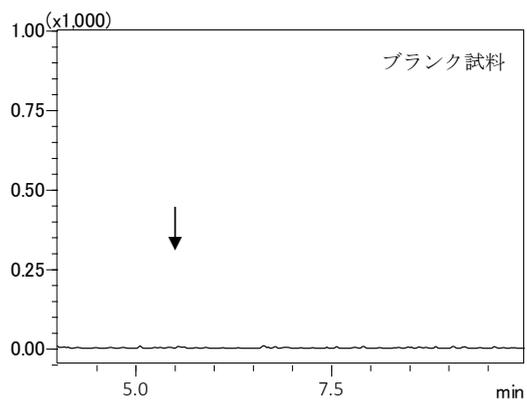


図19 大豆のSRMクロマトグラム [代謝物B添加]  
(代謝物B ;  $m/z$  358.1→79.1)

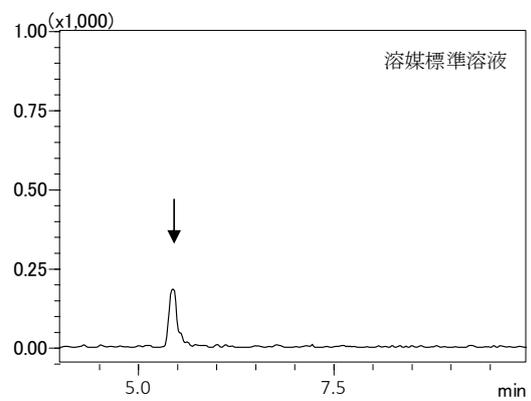
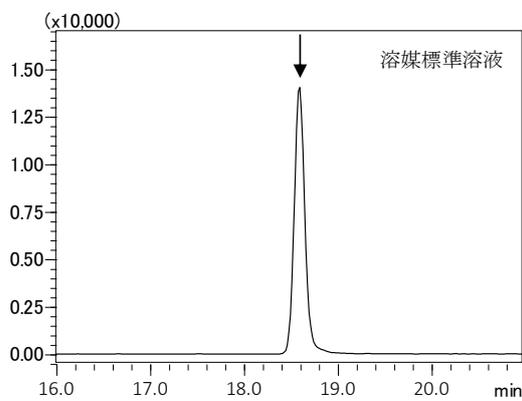
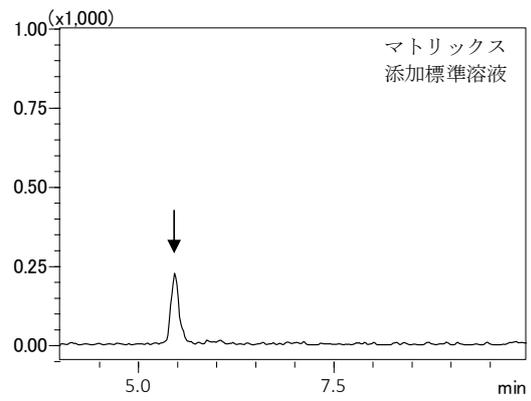
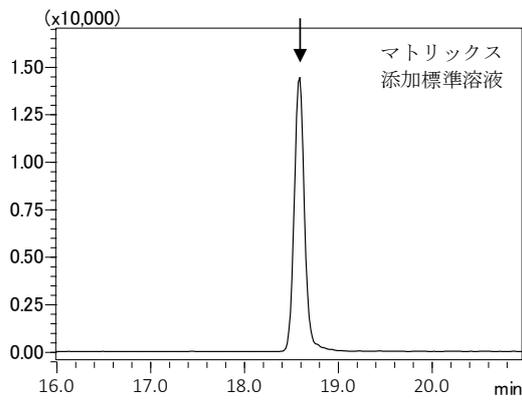
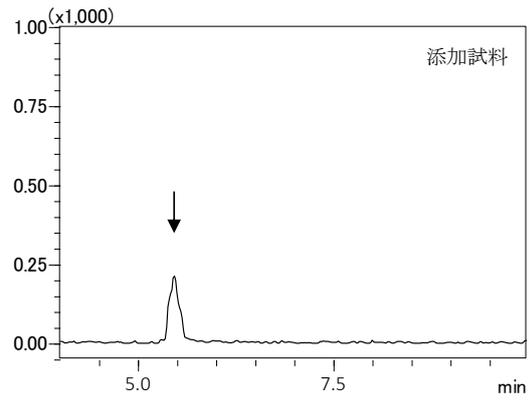
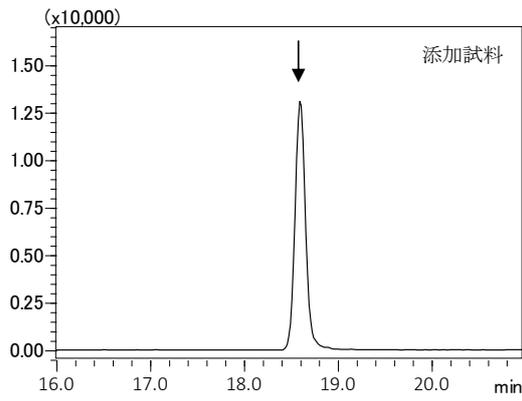
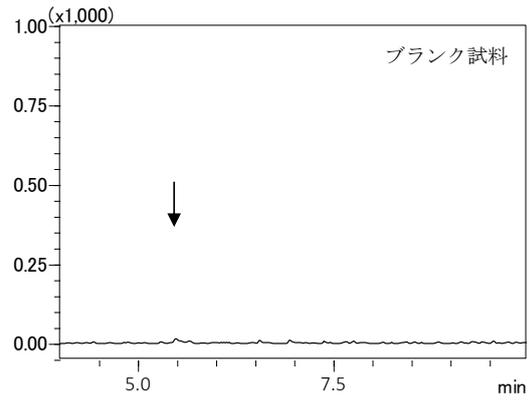
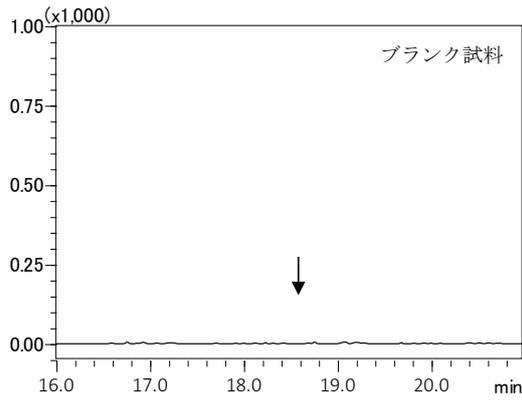


図20 ひよこ豆のSRMクロマトグラム [イソキサフトール添加]  
 (左：イソキサフトール； $m/z$  358.1→79.1、右：代謝物B； $m/z$  358.1→79.1)

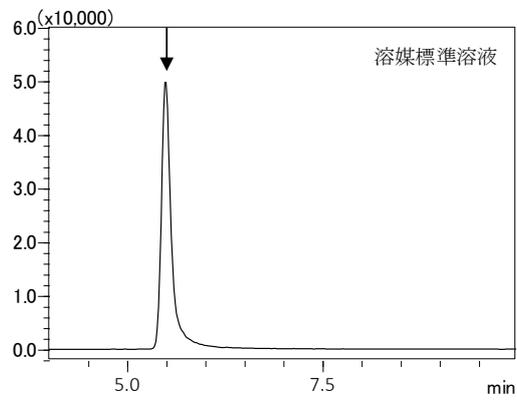
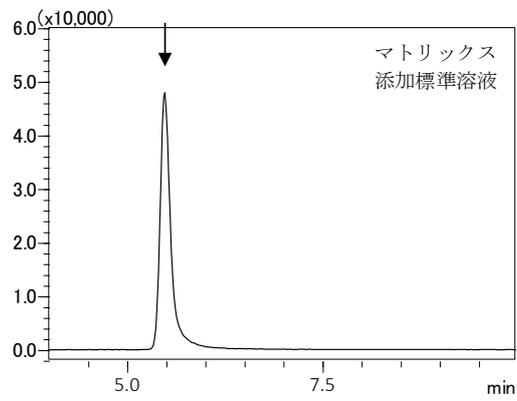
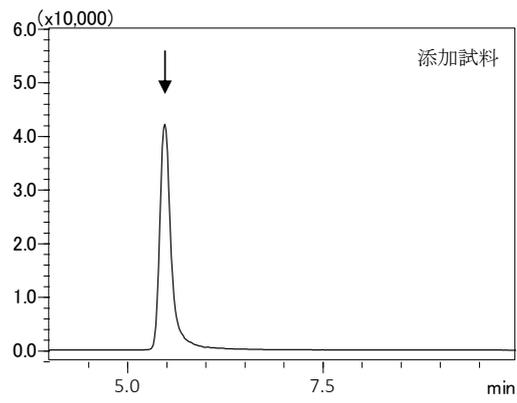
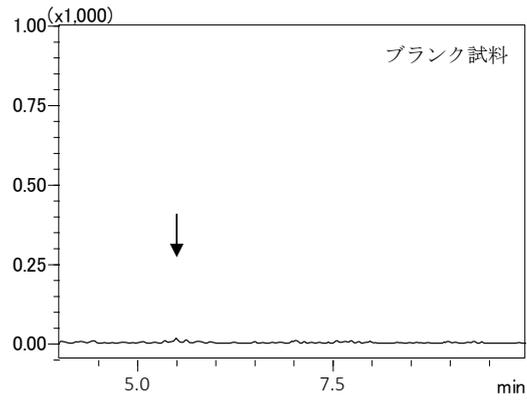


図21 ひよこ豆のSRMクロマトグラム [代謝物B添加]  
(代謝物B ;  $m/z$  358.1 $\rightarrow$ 79.1)

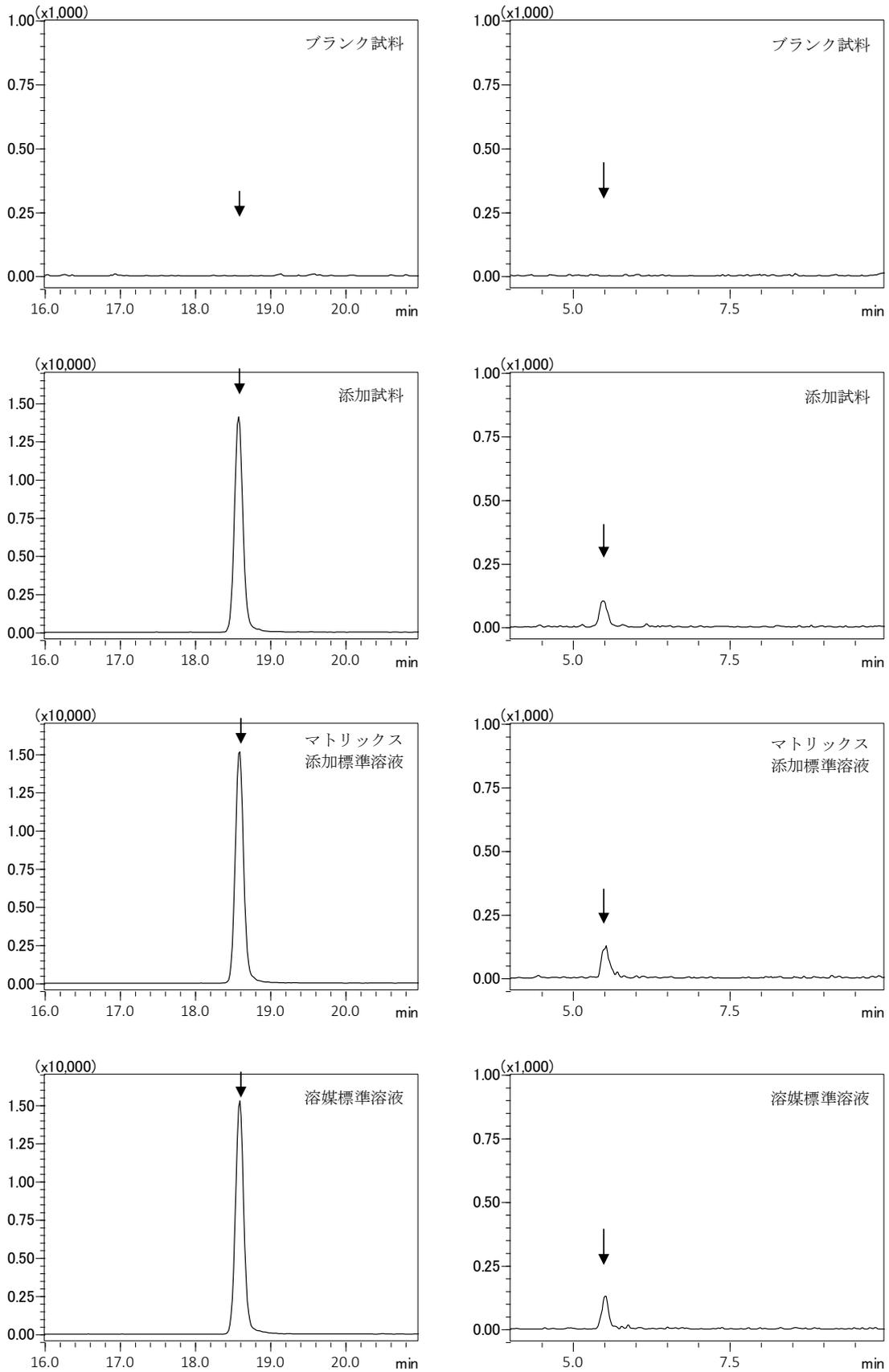


図22 とうもろこし（乾燥子実）のSRMクロマトグラム [イソキサフルトール添加]  
 (左：イソキサフルトール； $m/z$  358.1 $\rightarrow$ 79.1、右：代謝物B； $m/z$  358.1 $\rightarrow$ 79.1)

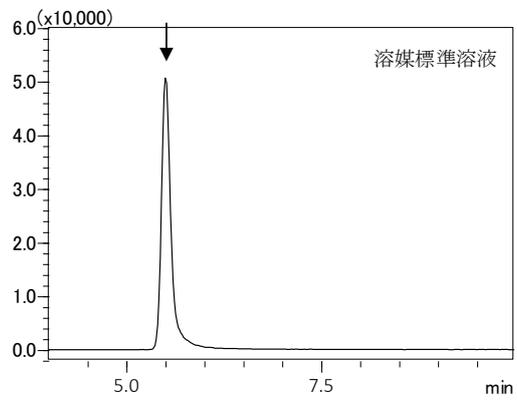
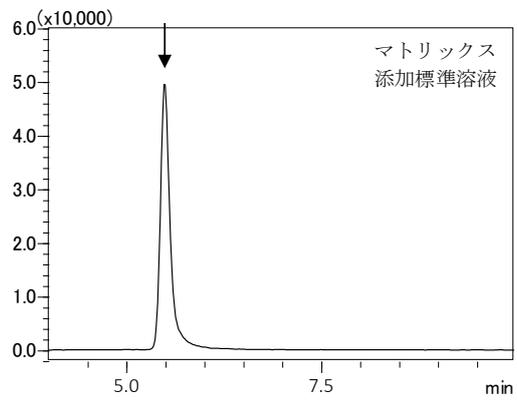
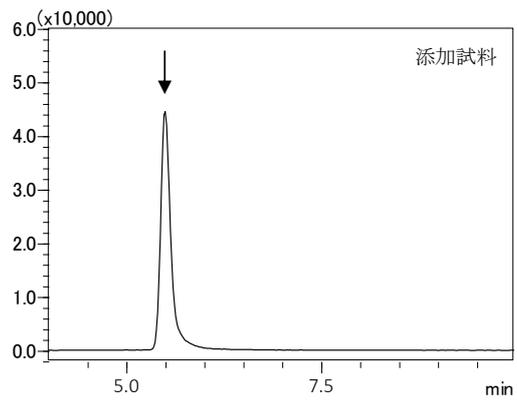
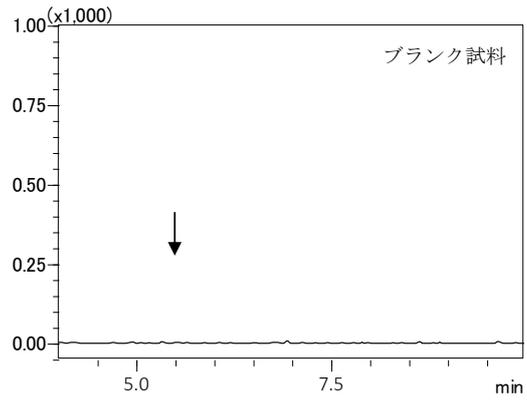


図23 とうもろこし（乾燥子実）のSRMクロマトグラム [代謝物B添加]  
(代謝物B ;  $m/z$  358.1→79.1)

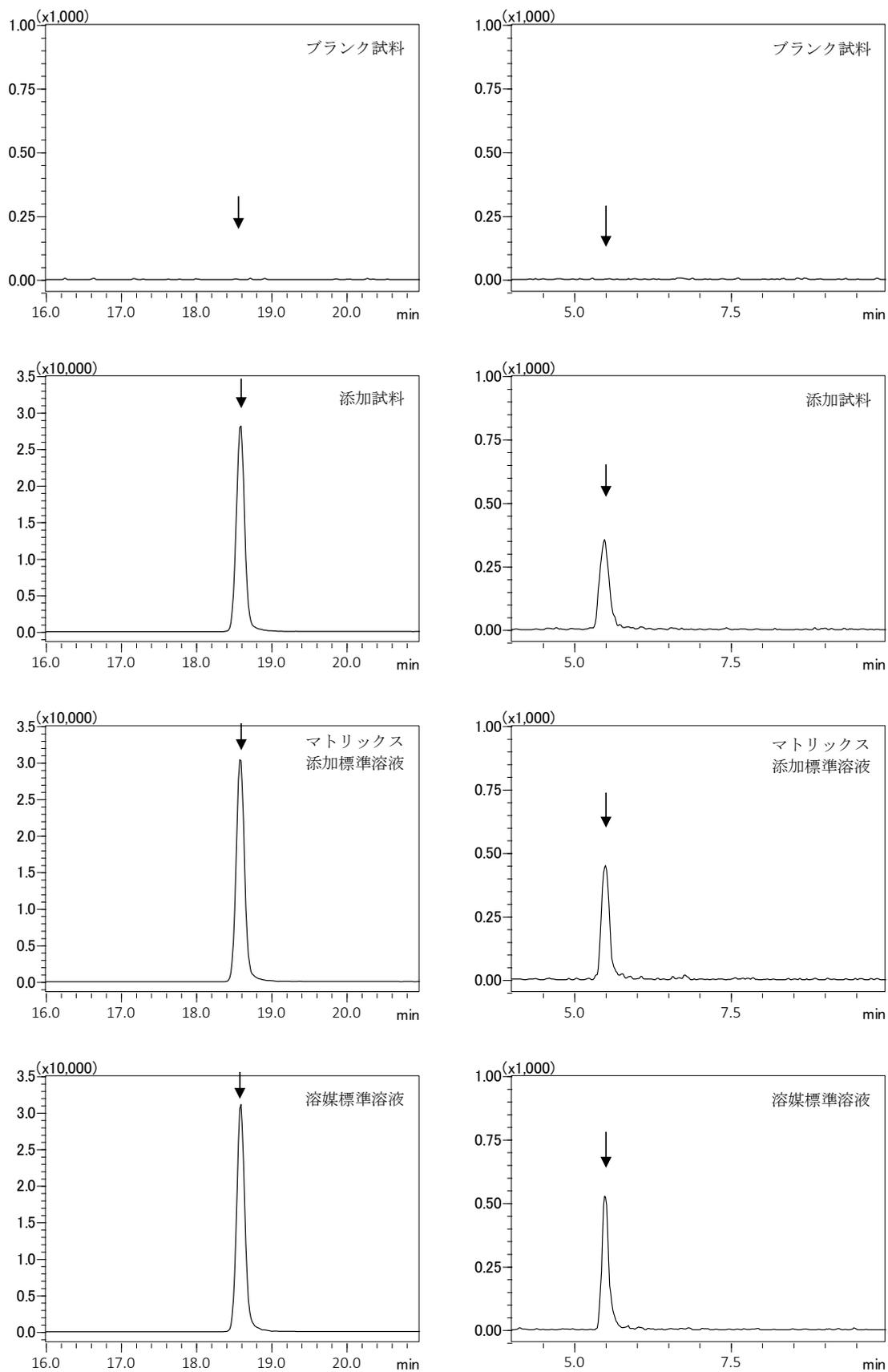


図24 とうもろこし (未成熟) のSRMクロマトグラム [イソキサフルトール添加]  
 (左: イソキサフルトール;  $m/z$  358.1→79.1、右: 代謝物B;  $m/z$  358.1→79.1)

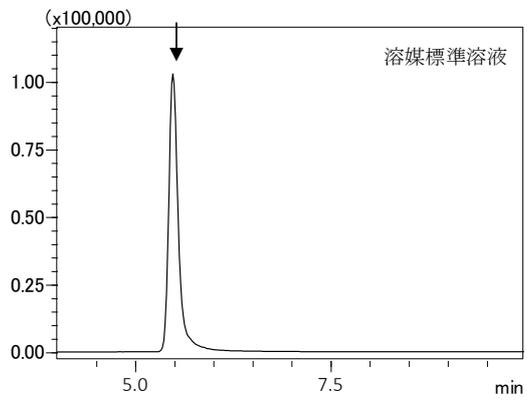
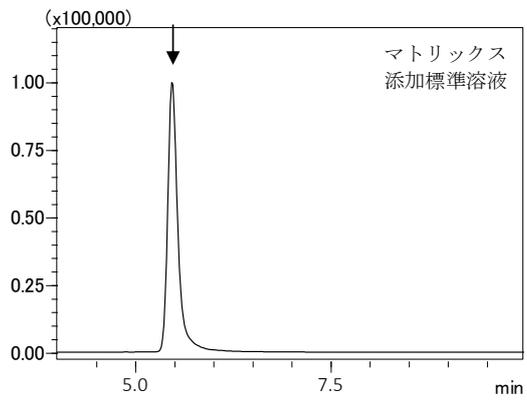
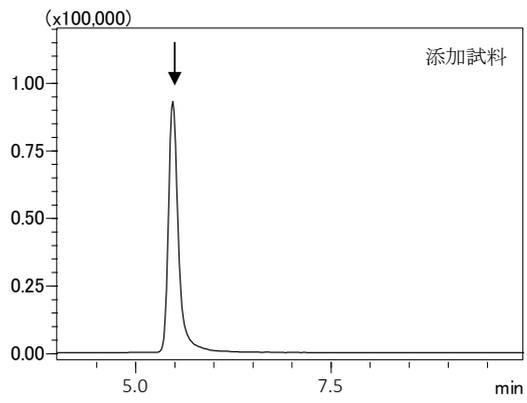
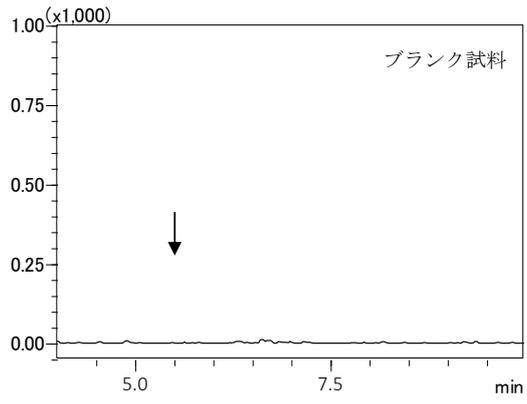


図25 とうもろこし (未成熟) のSRMクロマトグラム [代謝物B添加]  
(代謝物B ;  $m/z$  358.1→79.1)

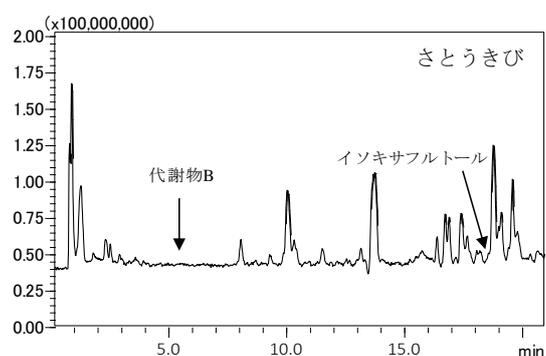
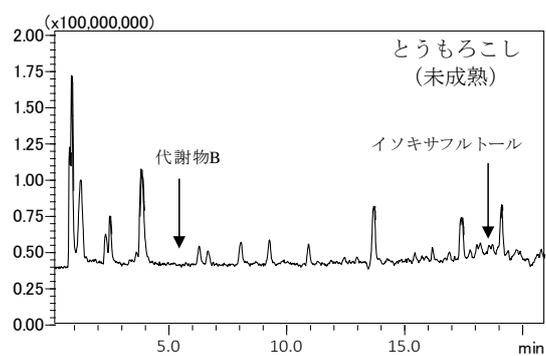
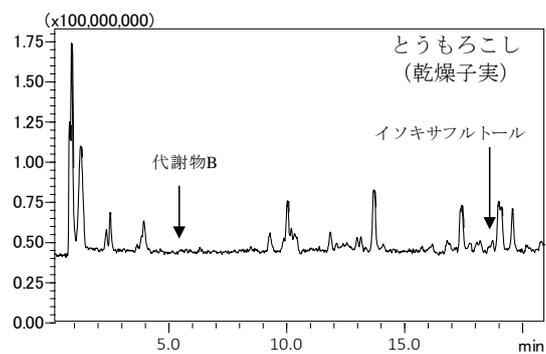
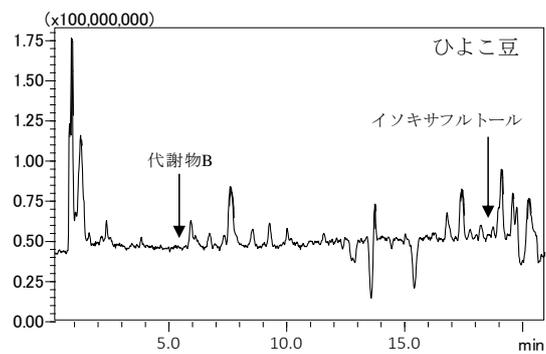
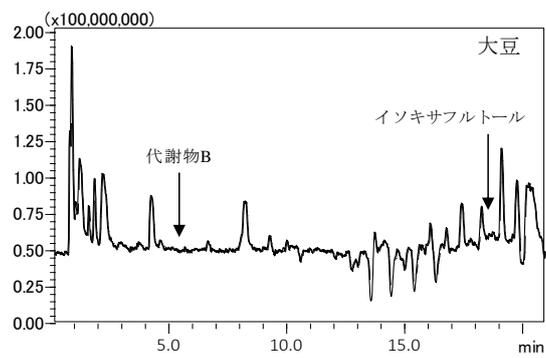


図26 ブランク試料のトータルイオンクロマトグラム  
(スキャン範囲：50～500 amu)