

※ 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の参考としてください。なお、報告書の内容と通知又は告示試験法との間に齟齬がある場合には、通知又は告示試験法が優先することに御留意ください。

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

セトキシジム試験法 (畜水産物)

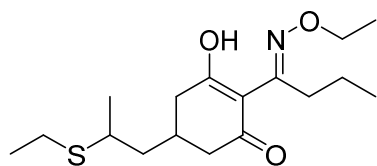
セトキシジム試験法（畜水産物）

[緒言]

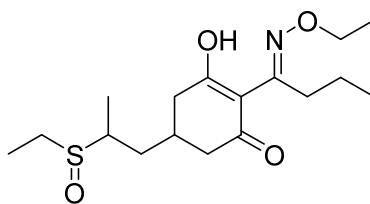
1. 背景及び目的

セトキシジムは、植物体内で脂肪酸生合成に関与するアセチルCoAカルボキシラーゼを阻害することで作用を示すシクロヘキサジオン系の除草剤である。令和5年に残留基準値が改正され、その規制対象は、「畜産物及び魚介類にあたっては、オキサゾール化及びスルホン化反応により代謝物Iに変換される化合物（セトキシジム、代謝物B、代謝物C、代謝物G、代謝物H及び代謝物I）とする。ただし、代謝物Iはセトキシジムの濃度に換算すること。」とされた（健生発1107第1号、令和5年11月7日）。しかし、上記の規格基準の適合判定のための残留分析法は示されていないため、新たに畜水産物を対象とした分析法を開発する。

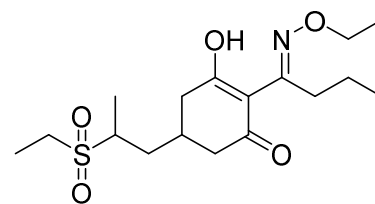
2. 分析対象化合物の構造式及び物理化学的性質



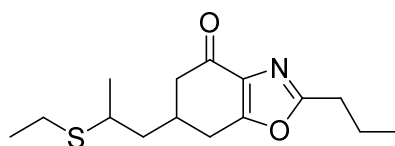
セトキシジム



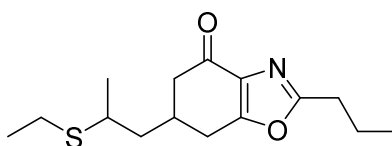
代謝物 B



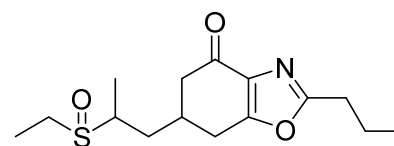
代謝物 C



代謝物 G



代謝物 H



代謝物 I

セトキシジム

分子式：C₁₇H₂₉NO₃S

化学名（IUPAC）：(5*RS*)-2-[(*EZ*)-1-(エトキシイミノ)ブチル]-5-[(2*RS*)-2-(エチルチオ)プロピル]-3-ヒドロキシシクロヘキサ-2-エン-1-オン

分子量：327.48

外観：無色透明、不揮発性液体

蒸気圧：1.6×10⁻⁷ mmHg（25℃）

解離定数（pKa）：4.61～4.62（25℃）

溶解度：水（104.4 mg/L、20℃）、メタノール、酢酸エチル、*n*-ヘキサン（>10,000 g/L、20℃）、ジクロロメタン、アセトン（>1,000 g/L、20℃）

1-オクタノール/水分配係数（log Pow）：3.51（pH 5緩衝液/25℃）、1.65（pH 7緩衝液/25℃）、-0.03（pH 9緩衝液/25℃）

加水分解性：8.7日（pH 5、25±1℃）、115.2日（pH 7、25±1℃）、283.7日（pH 8.6、25±1℃）

[出典] 農薬抄録（一般名：セトキシジム）¹（日本曹達株式会社）、安全データシート（関東化学）

代謝物B

分子式：C₁₇H₂₉NO₄S

化学名：2-[1-(エトキシイミノ)ブチル]-5-[2-(エチルスルフィニル)プロピル]-3-ヒドロキシシクロヘキサ-2-エン-1-オン

分子量：343.48

〔出典〕農薬抄録（一般名：セトキシジム）¹（日本曹達株式会社）

代謝物C

分子式：C₁₇H₂₉NO₅S

化学名：2-[1-(エトキシイミノ)ブチル]-5-[2-(エチルスルフォニル)プロピル]-3-ヒドロキシシクロヘキサ-2-エン-1-オン

分子量：359.48

〔出典〕農薬抄録（一般名：セトキシジム）¹（日本曹達株式会社）

代謝物G

分子式：C₁₅H₂₃NO₂S

化学名：6-[2-(エチルチオ)プロピル]-4-オキソ-2-プロピル-4,5,6,7-テトラヒドロベンゾオキサゾール

分子量：281.41

〔出典〕農薬抄録（一般名：セトキシジム）¹（日本曹達株式会社）

代謝物H

分子式：C₁₅H₂₃NO₃S

化学名：6-[2-(エチルスルフィニル)プロピル]-4-オキソ-2-プロピル-4,5,6,7-テトラヒドロベンゾオキサゾール

分子量：297.41

〔出典〕農薬抄録（一般名：セトキシジム）¹（日本曹達株式会社）

代謝物I

分子式：C₁₅H₂₃NO₄S

化学名（IUPAC）：6-[2-(エチルスルフォニル)プロピル]-4-オキソ-2-プロピル-4,5,6,7-テトラヒドロベンゾオキサゾール

分子量：313.41

外観：白色～淡黄色の固体

溶解性：水に不溶、クロロホルム、ジクロロメタン、アセトン、メタノールに可溶

〔出典〕農薬抄録（一般名：セトキシジム）¹（日本曹達株式会社）、安全データシート（関東化学）

3. 基準値

畜産物及び魚介類にあたっては、オキサゾール化及びスルホン化反応により代謝物Iに変換される化合物（セトキシジム、代謝物B、代謝物C、代謝物G、代謝物H及び代謝物I）とする。ただし、代謝物Iはセトキシジムの濃度に換算すること（厚生発1107第1号、令和5年11月7日）。

牛の筋肉、豚の筋肉、その他の陸棲哺乳類に属する動物の筋肉、牛の脂肪、豚の脂肪、その他の陸棲哺乳類に属する動物の脂肪：0.01 ppm、牛の肝臓、豚の肝臓、その他の陸棲哺乳類に属する動物の肝臓、牛の腎臓、豚の腎臓、その他の陸棲哺乳類に属する動物の腎臓、牛の食用部分、豚の食用部分、その他の陸棲哺乳類に属する動物の食用部分：0.1 ppm、乳：0.03 ppm、鶏の筋肉、その他の家きんの筋肉、鶏の脂肪、その他の家きんの脂肪：0.1 ppm、鶏の肝臓、その他の家きんの肝臓、鶏の腎臓、その他の家きんの腎臓、鶏の食用部分、その他の家きんの食用部分：0.2 ppm、鶏の卵、その他の家きんの卵：0.3 ppm、魚介類：0.2 ppm（畜水産物の基準値のみの抜粋）

[実験方法]

1. 試料

1) 購入先

牛乳及び鶏卵は、神奈川県内のスーパーマーケットで購入したものを用いた。その他の食品は、インターネットを介して購入したものを用いた。

2) 試料の採取方法

- ① 牛の筋肉は、可能な限り脂肪層を除き細切均一化した。
- ② 牛の脂肪は、可能な限り筋肉部を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、全体を混合し均一化した。
- ⑤ 鶏卵は、殻を除去し卵黄と卵白を良く混合し均一化した。
- ⑥ うなぎは、頭部を除き、内臓、骨及び皮を含む可食部を細切均一化した。
- ⑦ しじみは、殻を除去し、得られたむき身を目の細かい金網にのせ、約5分間水切りを行ったものを細切均一化した。

2. 試薬・試液

1) 標準品

セトキシジム標準品：純度97%（関東化学製）

代謝物B標準品：純度93.1%（日本曹達株式会社からの供与）

代謝物C標準品：純度98.9%（日本曹達株式会社からの供与）

代謝物G標準品：純度98.8%（日本曹達株式会社からの供与）

代謝物H標準品：純度95.0%（日本曹達株式会社からの供与）

代謝物I標準品：純度98%（関東化学製）

2) 試薬等

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）

アセトニトリル、ギ酸、酢酸：LC-MS用（富士フイルム和光純薬製）

m-クロロ過安息香酸（水分含有）（含量69～75%）：化学用（富士フイルム和光純薬製）

塩化ナトリウム：残留農薬・PCB試験用（富士フイルム和光純薬製）

過酸化水素（過酸化水素水（30%））、ギ酸アンモニウム、クエン酸、クエン酸三ナトリウム二水和物、酢酸アンモニウム、チオ硫酸ナトリウム五水和物：試薬特級（富士フイルム和光純薬製）

多孔性ケイソウ土カラム：InertSep K-solute Plus（10 mL保持用）（ジーエルサイエンス製）

シリカゲルミニカラム：InertSep SI（500 mg/6 mL）（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

セトキシジム標準原液：セトキシジム標準品10.3 mgを精秤し、アセトニトリルに溶解して10 mLとし、1 mg/mL溶液を調製した。

セトキシジム添加用標準溶液：セトキシジム標準原液をアセトンで希釈し、0.1、0.3、1、2、3 µg/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11.3 mgを精秤し、アセトニトリルに溶解して10 mLとし、1 mg/mL溶液（セトキシジムとして）を調製した。なお、換算係数は、1.049（代謝物Bの分子量をセトキシジムの分子量で除した値：343.48/327.48）とした。

代謝物C標準原液：代謝物C標準品11.1 mgを精秤し、アセトニトリルに溶解して10 mLとし、1 mg/mL溶液（セトキシジムとして）を調製した。なお、換算係数は、1.098（代謝物Cの分子量をセトキシジムの分子量で除した値：359.48/327.48）とした。

代謝物G標準原液：代謝物G標準品8.7 mgを精秤し、アセトニトリルに溶解して10 mLとし、1 mg/mL溶液（セトキシジムとして）を調製した。なお、換算係数は、0.859（代謝物Gの分子量をセトキシジムの分子量で除した値：281.41/327.48）とした。

代謝物G添加用標準溶液：代謝物G標準原液をアセトンで希釈し、0.1、0.3、1、2、3 µg/mLの濃度の溶液を調製した。

代謝物H標準原液：代謝物H標準品9.6 mgを精秤し、アセトニトリルに溶解して10 mLとし、1 mg/mL溶液（セトキシジムとして）を調製した。なお、換算係数は、0.908（代謝物Hの分子量をセトキシジムの分子量で除した値：297.41/327.48）とした。

代謝物I標準原液：代謝物I標準品9.8 mgを精秤し、アセトニトリルに溶解して10 mLとし、1 mg/mL溶液（セトキシジムとして）を調製した。なお、換算係数は、0.957（代謝物Iの分子量をセトキシジムの分子量で除した値：313.41/327.48）とした。

代謝物I添加用標準溶液：代謝物I標準原液をアセトンで希釈し、0.1、0.3、1、2、3 µg/mLの濃度の溶液を調製した。

② 試液の調製方法

0.05 mol/L クエン酸緩衝液（pH 3.0）：第1液：クエン酸9.6 gを量り、水を加えて溶解し1Lとした。第2液：クエン酸三ナトリウム二水和物7.35 gを量り、水を加えて溶解し500 mLとした。第1液に第2液を加えて混和し、pHを3.0に調整した。

20 w/v%塩化ナトリウム含有5 w/v%チオ硫酸ナトリウム試液：塩化ナトリウム200 g及びチオ硫酸ナトリウム五水和物78.6 gを量り、水に溶解して1Lとした。

m-クロロ過安息香酸試液：*m*-クロロ過安息香酸100 mg（純度補正なし）を量り、酢酸エチル20 mLで溶解した。本溶液は用時調製した。

3. 装置

アルミブロック恒温槽：MG-2300（東京理化器械製）

遠心分離機：S700FR（久保田商事製）

振とう機：SR-2w（タイテック製）

LC-MS/MS : ACQUITY I-class及びXevo TQ-S micro (Water製)

データ処理 : MassLynx V4.2 (Waters製)

4. 測定条件

LC 条件																								
カラム	InertSustainSwift C8 HP サイズ:内径 3.0 mm、長さ 150 mm、粒子径 5 μm 会社：ジーエルサイエンス株式会社																							
流速 (mL/min)	0.4																							
注入量(μL)	5																							
カラム温度 (°C)	40																							
移動相	A 液：2.5 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液 B 液：アセトニトリル																							
グラジエント条件	<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>13</td> <td>12</td> </tr> <tr> <td>8.0</td> <td>13</td> <td>12</td> </tr> <tr> <td>8.01</td> <td>1</td> <td>99</td> </tr> <tr> <td>13.0</td> <td>1</td> <td>99</td> </tr> <tr> <td>13.01</td> <td>13</td> <td>12</td> </tr> <tr> <td>20.0</td> <td>13</td> <td>12</td> </tr> </tbody> </table>			時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)	0.0	13	12	8.0	13	12	8.01	1	99	13.0	1	99	13.01	13	12	20.0	13	12
時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)																						
0.0	13	12																						
8.0	13	12																						
8.01	1	99																						
13.0	1	99																						
13.01	13	12																						
20.0	13	12																						
MS 条件																								
測定モード	SRM (選択反応モニタリング)																							
イオン化モード	ESI (+)																							
キャピラリー電圧 (kV)	0.8																							
脱溶媒温度 (°C)	600																							
イオンソース温度 (°C)	150																							
脱溶媒ガス流量 (L/hr)	1,000																							
コリジョンガス	アルゴン																							
コーンガス流量 (L/hr)	50																							
定量イオン (m/z)	セトキシジム：m/z 328.2→178.1 [コーン電圧：30 V、コリジョンエネルギー：18 eV] 代謝物 B：m/z 344.2→220.1 [コーン電圧：28 V、コリジョンエネルギー：16 eV] 代謝物 C：m/z 360.2→314.2 [コーン電圧：42 V、コリジョンエネルギー：12 eV] 代謝物 G：m/z 282.2→176.1 [コーン電圧：40 V、コリジョンエネルギー：16 eV] 代謝物 H：m/z 298.2→220.1 [コーン電圧：30V、コリジョンエネルギー：12 eV] 代謝物 I：m/z 314.2→220.2 [コーン電圧：7 V、コリジョンエネルギー：18 eV]																							
定性イオン (m/z)	セトキシジム：m/z 328.2→282.2 [コーン電圧：30 V、コリジョンエネルギー：10 eV] 代謝物 B：m/z 344.2→178.1 [コーン電圧：28 V、コリジョンエネルギー：18 eV] 代謝物 C：m/z 360.2→178.1 [コーン電圧：42 V、コリジョンエネルギー：24 eV] 代謝物 G：m/z 282.2→220.1 [コーン電圧：40 V、コリジョンエネルギー：16 eV] 代謝物 H：m/z 298.2→178.1 [コーン電圧：30 V、コリジョンエネルギー：26 eV]																							

	代謝物 I : m/z 314.2→178.1 [コーン電圧 : 7 V、コリジョンエネルギー : 30 eV]
保持時間 (分)	2.1、6.6 (セトキシジム)、1.9 (代謝物 B)、2.1 (代謝物 C)、7.1 (代謝物 G)、2.5 (代謝物 H)、3.0 (代謝物 I)

5. 定量

代謝物I標準原液をアセトニトリル及び2.5 mmol/Lギ酸アンモニウム溶液 (12 : 13) 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調製した。なお、代謝物Iの検量溶液は、セトキシジムとしての濃度で調製した。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には、試料中0.01 mg/kgのセトキシジムに相当する試験溶液の濃度は、0.001 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セトキシジムの含量を求めた。

6. 添加試料の調製

添加濃度はセトキシジムとしての濃度で示した。

1) 基準値濃度の添加試料の作製

牛の筋肉 (添加濃度 : 0.01 mg/kg) : 試料10.0 gに、0.1 µg/mL添加用標準溶液1 mLを添加し混合後、30分放置した。

牛の脂肪 (添加濃度 : 0.01 mg/kg) : 試料10.0 gを採り、約40°Cの湯浴で融解し、0.1 µg/mL添加用標準溶液1 mLを添加し混合後、-30°Cで30分間放置して凝固させた。

牛の肝臓 (添加濃度 : 0.1 mg/kg) : 試料10.0 gに、1 µg/mL添加用標準溶液1 mLを添加し混合後、30分放置した。

牛乳 (添加濃度 : 0.03 mg/kg) : 試料10.0 gに、0.3 µg/mL添加用標準溶液1 mLを添加し混合後、30分放置した。

鶏卵 (添加濃度 : 0.3 mg/kg) : 試料10.0 gに、3 µg/mL添加用標準溶液1 mLを添加し混合後、30分放置した。

うなぎ、しじみ (添加濃度 : 0.2 mg/kg) : 試料10.0 gに、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) 定量限界濃度の添加試料の作製

牛の筋肉、脂肪 : 1) と同じ。

牛の肝臓、牛乳、鶏卵、うなぎ、しじみ (添加濃度 : 0.01 mg/kg) : 試料10.0 gに、0.1 µg/mL添加用標準溶液1 mLを添加し混合後、30分放置した。

7. 試験溶液の調製

概要

セトキシジム及びその代謝物 (代謝物B、代謝物C、代謝物G、代謝物H及び代謝物I) を試料からメタノールで抽出した。過酸化水素を加えて50°Cで16時間加温して、オキサゾール化及びスルホキシド化を行う。多孔性ケイソウ土カラムで精製した後、*m*-クロロ過安息香酸を加えてスルホン化を行い、セトキシジム及びその代謝物 (代謝物B、代謝物C、代謝物G、代謝物H及び代謝物I) を代謝物Iに変換した。反応液を予め20 w/v%塩化ナトリウム含有5 w/v%チオ硫酸ナトリ

ウム溶液を注入した多孔性ケイソウ土カラムに注入し、*m*-クロロ過安息香酸を還元するとともに精製した。更に、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である。なお、代謝物Iについて定量を行い、代謝物Iの含量に換算係数を乗じてセトキシジム（代謝物B、代謝物C、代謝物G、代謝物H及び代謝物Iを含む）の含量に換算したものを分析値とした。

1) 抽出

試料10.0 gにメタノール50 mLを加えてホモジナイズした後、毎分3,000回転で5分間遠心分離し、上澄液を採った。残留物にメタノール30 mLを加えてホモジナイズした後、上記と同様に遠心分離し、上澄液を採った。得られた上澄液を合わせ、メタノールを加えて正確に100 mLとした。

2) オキサゾール化及びスルホン化

① オキサゾール化及びスルホキシド化

1) で得られた溶液から正確に2 mLを分取し、0.05 mol/Lクエン酸緩衝液 (pH 3.0) 2 mL、過酸化水素25 μ Lを加えて混合した後、密栓して50°Cで16時間加温した。冷後、全量を多孔性ケイソウ土カラム (10 mL保持用) に注入した。水4 mLで反応溶液が入っていた容器を洗い、この洗液をカラムに注入して10分間放置した。このカラムに*n*-ヘキサン50 mLを注入し、流出液は捨てた。次いで、酢酸エチル80 mLを注入して、溶出液を採り、40°C以下で約30 mLまで濃縮した。

② スルホン化

①で得られた溶液に、*m*-クロロ過安息香酸試液1 mLを加えて混合した後、密栓して30°Cで10分間加温した。この溶液を、予め20 w/v%塩化ナトリウム含有5 w/v%チオ硫酸ナトリウム溶液9 mLを注入して10分間放置した多孔性ケイソウ土カラム (10 mL保持用) に注入して、溶出液を採った。次いで、このカラムに酢酸エチル40 mLを注入して溶出液を採った。得られた溶出液を合わせて、40°C以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物に酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (3 : 2) 混液2 mLを加えて溶かした。

3) 精製

シリカゲルミニカラム (500 mg) に、酢酸エチル5 mL並びに酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (3 : 2) 混液5 mLを順次注入し、各流出液は捨てた。このカラムに2) で得られた溶液を注入した後、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (3 : 2) 混液10 mLを注入し、流出液は捨てた。次いで、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (9 : 1) 混液15 mLを注入し、溶出液を40°C以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物をアセトニトリル及び2.5 mmol/Lギ酸アンモニウム溶液 (12 : 13) 混液に溶かし、正確に2 mLとしたものを試験溶液とした。

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、代謝物I標準溶液100 μ Lを2 mL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1 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

↓ 試料 10.0 g を 250 mL 容ポリプロピレン (PP) 製遠心管に量り採る

抽出

↓ メタノール 50 mL を加え、ホモジナイズする

↓ 遠心分離 (3000 rpm、5 分間) し、上澄液を採る

↓ 残留物にメタノール 30 mL を加えて、ホモジナイズする

↓ 遠心分離 (3000 rpm、5 分間) し、上澄液を合わせてメタノールで 100 mL に定容する

オキサゾール化及びスルホキシド化

↓ 抽出液 2 mL を正確に採り、0.05 mol/L クエン酸緩衝液 (pH 3.0) 2 mL、過酸化水素 25 μ L を加えて、密栓下、50°C で 16 時間加温する

↓ 反応液全量を InertSep K-solute Plus (10 mL 保持用) に負荷した後、水 4 mL で容器を洗い込み洗液をカラムに負荷して 10 分間放置する

↓ *n*-ヘキサン 50 mL をカラムに注入して、流出液を捨てた後、酢酸エチル 80 mL をカラムに注入して、溶出液を採る

↓ 溶出液を 40°C 以下で 30 mL 程度に減圧濃縮する

スルホン化

↓ 酢酸エチル溶液に、*m*-クロロ過安息香酸試液 1 mL を加えて、30°C で 10 分間加温する

↓ 20 w/v% 塩化ナトリウム含有 5 w/v% チオ硫酸ナトリウム 9 mL を負荷して 10 分間放置した InertSep K-solute Plus (10 mL 保持用) に、反応液全量を注入し、溶出液を採る

↓ 酢酸エチル 40 mL をカラムに注入し、溶出液を採る

↓ 溶出液を合わせ、40°C 以下で減圧濃縮し、酢酸エチル及び *n*-ヘキサン (3 : 2) 混液 2 mL に溶解する

InertSep SI (500 mg、6mL) ミニカラム精製

↓ 酢酸エチル 5 mL、酢酸エチル及び *n*-ヘキサン (3 : 2) 混液 5 mL を通液して、流出液を捨てる

↓ 上記の溶液をカラムに注入して、流出液を捨てる

↓ 酢酸エチル及び *n*-ヘキサン (3 : 2) 混液 10 mL を注入し、流出液は捨てる

↓ 酢酸エチル及び *n*-ヘキサン (9 : 1) 混液 15 mL を注入し、溶出液を採る

↓ 溶出液を 40°C 以下で減圧濃縮し、アセトニトリル及び 2.5 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液 (12 : 13) 混液 2 mL に溶解する

LC-MS/MS 分析 (0.1 g 試料/mL) 試験溶液 5 μ 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 セトキシジムのMS条件の検討

セトキシジム標準溶液をESIのポジティブモードでスキャン測定したときのマススペクトル（コーン電位：30 V）を図1に示した。セトキシジムのプロトン付加分子（ m/z 328.2 [M+H]⁺）が強く観察されたため、本イオンをプリカーサーイオンとした。なお、ネガティブモードでは、セトキシジムの脱プロトン化分子は検出できたが、十分な感度が得られなかったため採用しなかった。図2及び3には、本イオンをプリカーサーイオンとしたとき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 328.2→178.1（コーン電位：30 V、CE：18 eV）を定量イオンとし、 m/z 328.2→282.2（コーン電位：30 V、CE：10 eV）を定性イオンとした。

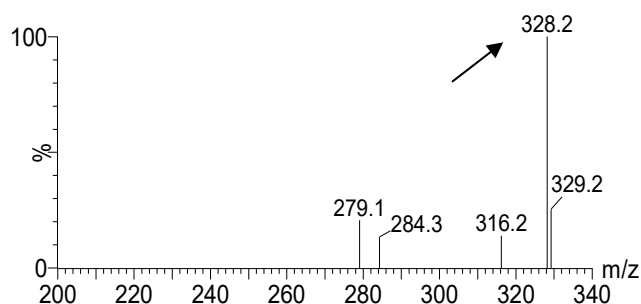


図1 セトキシジムのマススペクトル

スキャン範囲：200～340 m/z 、測定条件：ESI（+）、コーン電位：30 V

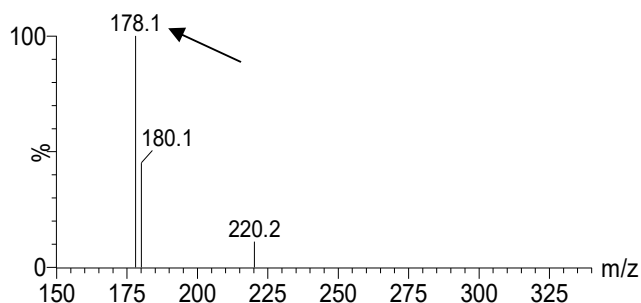


図2 セトキシジムのプロダクトイオンスペクトル（定量用）

プリカーサーイオン： m/z 328.2、測定条件：ESI（+）、コーン電位：30 V、CE = 18 eV

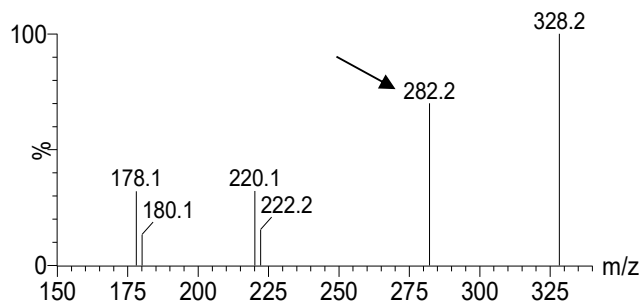


図3 セトキシジムのプロダクトイオンスペクトル（定性用）

プリカーサーイオン： m/z 328.2、測定条件：ESI（+）、コーン電位：30 V、CE = 10 eV

② 代謝物BのMS条件の検討

代謝物B標準溶液をESIのポジティブモードでスキャン測定したときのマススペクトル（コーン電圧：28 V）を図4に示した。代謝物Bのプロトン付加分子（ m/z 344.2 $[M+H]^+$ ）が強く観察されたため、本イオンをプリカーサーイオンとした。図5及び6には、本イオンをプリカーサーイオンとしたとき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 344.2→220.1（コーン電圧：28 V、CE：16 eV）を定量イオンとし、 m/z 344.2→178.1（コーン電圧：28 V、CE：18 eV）を定性イオンとした。

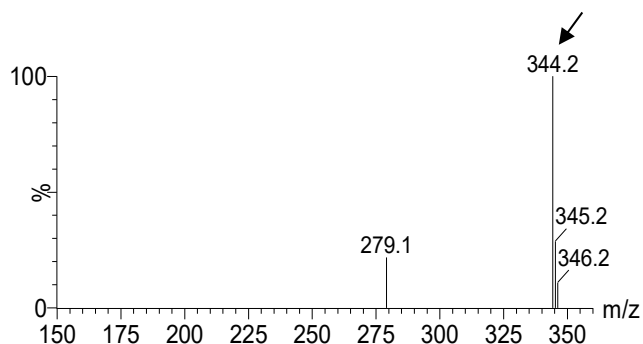


図4 代謝物Bのマススペクトル

スキャン範囲：150～360 m/z 、測定条件：ESI（+）、コーン電圧：28 V

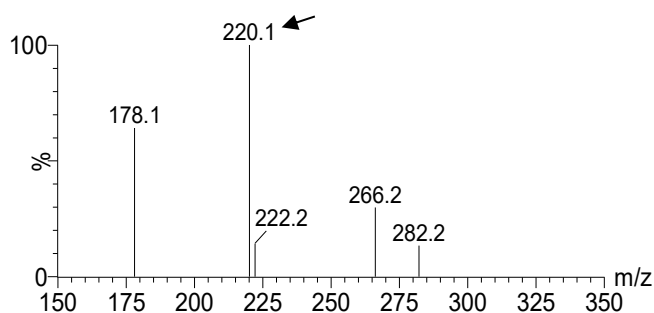


図5 代謝物Bのプロダクトイオンスペクトル（定量用）

プリカーサーイオン： m/z 344.2、測定条件：ESI（+）、コーン電圧：28 V、CE = 16 eV

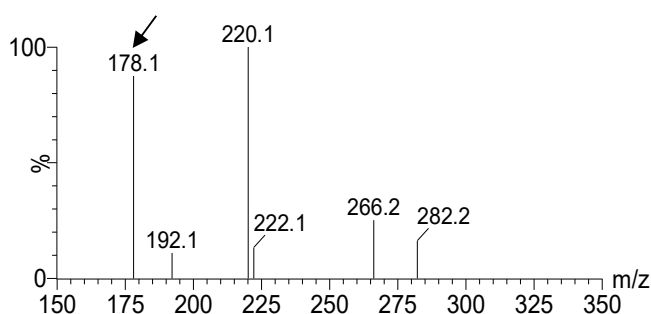


図6 代謝物Bのプロダクトイオンスペクトル（定性用）

プリカーサーイオン： m/z 344.2、測定条件：ESI（+）、コーン電圧：28 V、CE = 18 eV

③ 代謝物CのMS条件の検討

代謝物C標準溶液をESIのポジティブモードでスキャン測定したときのマススペクトル（コーン電位：42 V）を図7に示した。代謝物Cのプロトン付加分子（ m/z 360.2 $[M+H]^+$ ）が強く観察

されたため、本イオンをプリカーサーイオンとした。図8及び9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 360.2→314.2（コーン電位：42 V、CE：12 eV）を定量イオンとし、 m/z 360.2→178.1（コーン電位：42 V、CE：24 eV）を定性イオンとした。

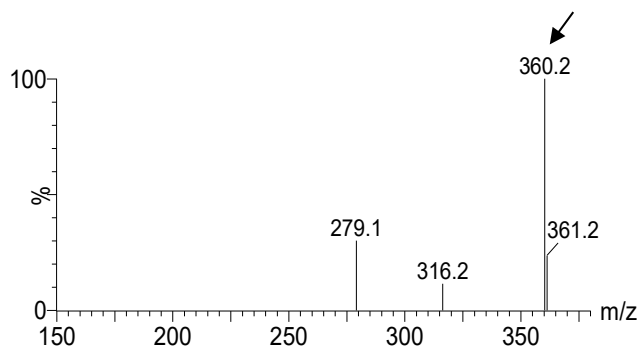


図7 代謝物Cのマススペクトル

スキャン範囲：150～380 m/z 、測定条件：ESI（+）、コーン電位：42 V

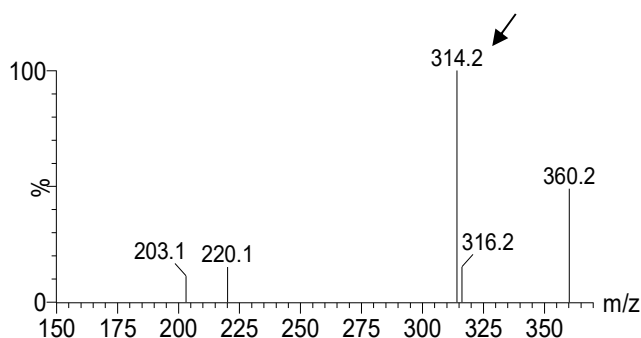


図8 代謝物Cのプロダクトイオンスペクトル（定量用）

プリカーサーイオン： m/z 360.2、測定条件：ESI（+）、コーン電位：42 V、CE = 12 eV

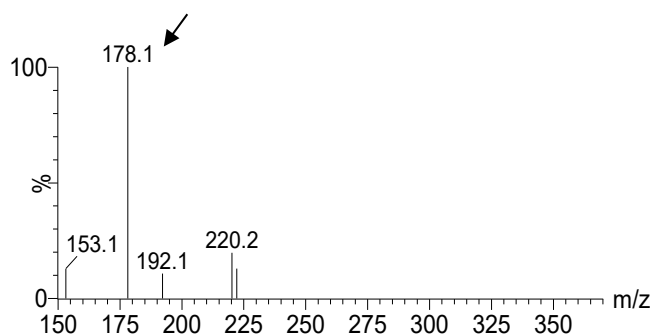


図9 代謝物Cのプロダクトイオンスペクトル（定性用）

プリカーサーイオン： m/z 360.2、測定条件：ESI（+）、コーン電位：42 V、CE = 24 eV

④ 代謝物GのMS条件の検討

代謝物G標準溶液をESIのポジティブモードでスキャン測定したときのマススペクトル（コーン電位：40 V）を図10に示した。代謝物Gのプロトン付加分子（ m/z 282.2 $[M+H]^+$ ）が強く観察されたため、本イオンをプリカーサーイオンとした。図11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 282.2→

176.1 (コーン電位 : 40 V、CE : 16 eV) を定量イオンとし、 m/z 282.2→220.1 (コーン電位 : 40 V、CE : 16 eV) を定性イオンとした。

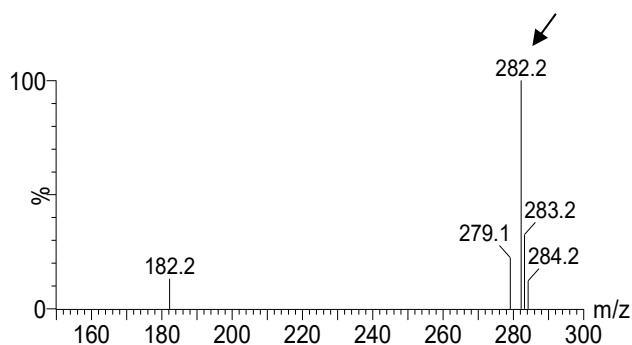


図10 代謝物Gのマススペクトル

スキャン範囲 : 150~300 m/z 、測定条件 : ESI (+)、コーン電位 : 40 V

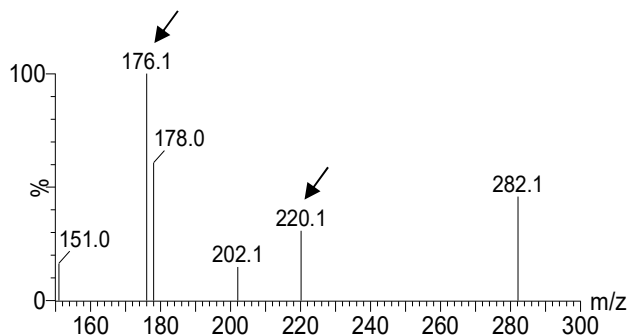


図11 代謝物Gのプロダクトイオンスペクトル (定量及び定性用)

プリカーサーイオン : m/z 282.2、測定条件 : ESI (+)、コーン電位 : 40 V、CE = 16 eV

⑤ 代謝物HのMS条件の検討

代謝物H標準溶液をESIのポジティブモードでスキャン測定したときのマススペクトル (コーン電位 : 30 V) を図12に示した。代謝物Hのプロトン付加分子 (m/z 298.2 $[M+H]^+$) が強く観察されたため、本イオンをプリカーサーイオンとした。図13及び14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 298.2→220.1 (コーン電位 : 30 V、CE : 12 eV) を定量イオンとし、 m/z 298.2→178.1 (コーン電位 : 30 V、CE : 26 eV) を定性イオンとした。

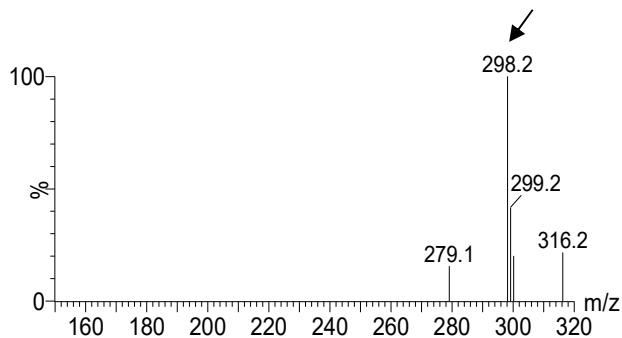


図12 代謝物Hのマススペクトル

スキャン範囲 : 150~320 m/z 、測定条件 : ESI (+)、コーン電位 : 30 V

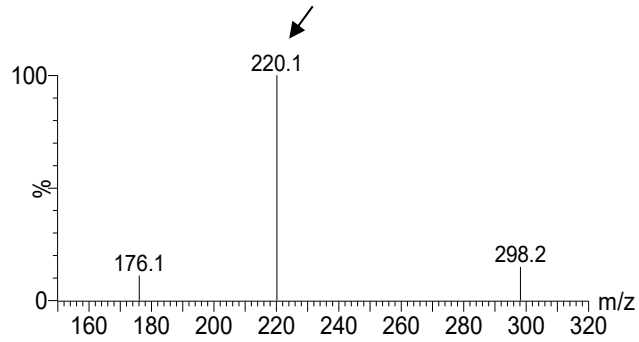


図13 代謝物Hのプロダクトイオンスペクトル (定量用)

プリカーサーイオン : m/z 298.2、測定条件 : ESI (+)、コーン電位 : 30 V、CE = 12 eV

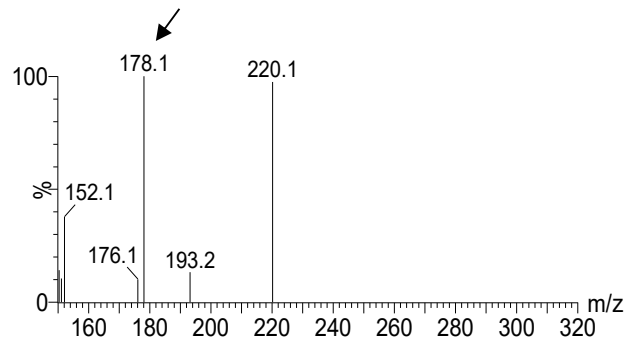


図14 代謝物Hのプロダクトイオンスペクトル (定性用)

プリカーサーイオン : m/z 298.2、測定条件 : ESI (+)、コーン電位 : 30 V、CE = 26 eV

⑥ 代謝物IのMS条件の検討

代謝物I標準溶液をESIのポジティブモードでスキャン測定したときのマススペクトル (コーン電位 : 7 V) を図15に示した。代謝物Iのプロトン付加分子 (m/z 314.2 $[M+H]^+$) が強く観察されたため、本イオンをプリカーサーイオンとした。図16及び17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 314.2 \rightarrow 220.2 (コーン電位 : 7 V、CE : 18 eV) を定量イオンとし、 m/z 314.2 \rightarrow 178.1 (コーン電位 : 7 V、CE : 30 eV) を定性イオンとした。

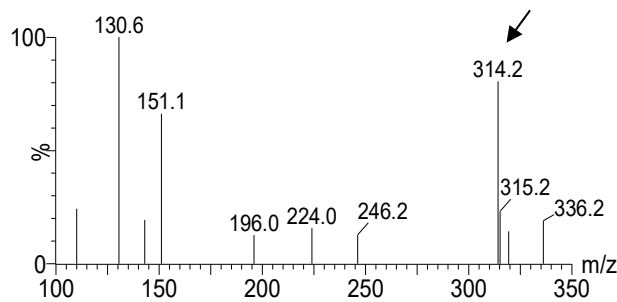


図15 代謝物Iのマススペクトル

スキャン範囲 : 100~350 m/z 、測定条件 : ESI (+)、コーン電位 : 7 V

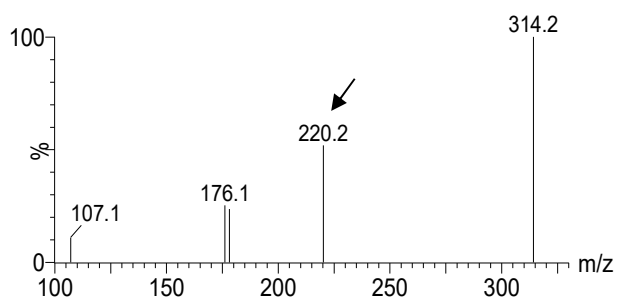


図16 代謝物Iのプロダクトイオンスペクトル (定量用)

プリカーサーイオン : m/z 314.2、測定条件 : ESI (+)、コーン電位 : 7 V、CE = 18 eV

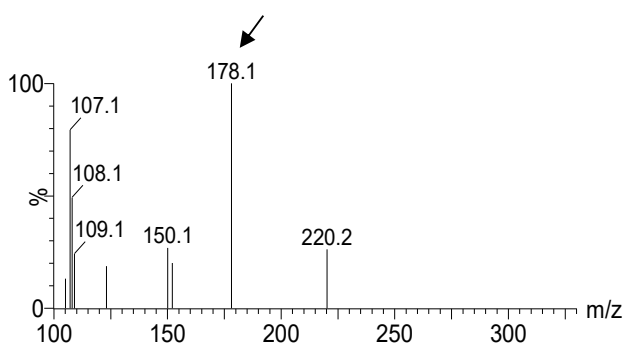


図17 代謝物Iのプロダクトイオンスペクトル (定性用)

プリカーサーイオン : m/z 314.2、測定条件 : ESI (+)、コーン電位 : 7 V、CE = 30 eV

2) LC条件の検討

① 移動相条件の検討

測定対象である代謝物Iをより高感度に測定することが可能な移動相条件を検討した。水系の移動相として、5 mmol/Lギ酸アンモニウム溶液、5 mmol/L酢酸アンモニウム溶液、0.1 vol%ギ酸、0.1 vol%酢酸を候補として、有機系の移動相にはアセトニトリルを用いた。水系溶媒とアセトニトリルの混合比を1 : 1として送液して、各移動相条件で代謝物I標準溶液を繰り返し測定し、代謝物Iのピーク面積値及びS/Nを比較した。分析カラムは、COSMOSIL C₁₈-MS-II (3.0 x 150 mm, 5 μm) を用いたが、いずれの移動相条件においても、代謝物Iのピーク形状は良好であった。表1に示す通り、添加剤としてギ酸アンモニウムを用いたときに代謝物IのピークのS/Nが最大となった。次に、最適なギ酸アンモニウムの濃度を検討するために、2.5~20 mmol/Lギ酸アンモニウム溶液 (2.5、5、10、20 mmol/L) を調製して同様に検討した。その結果、2.5 mmol/Lギ酸アンモニウム溶液を用いたときに、代謝物Iのピーク面積値及びS/Nが最大となった (表2)。以上の結果から、水系の移動相には2.5 mmol/Lギ酸アンモニウム溶液を、有機系の移動相にはアセトニトリルを用いることにした。

表1 各移動相条件における代謝物Iのピーク面積値とS/N

移動相		代謝物 I	
水系	有機系	ピーク面積値	S/N
5 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液	アセトニトリル	637,413 ± 44,610	4,017 ± 432
5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液		658,133 ± 23,226	3,803 ± 148
0.1 vol% 酢酸		326,395 ± 13,651	2,086 ± 322
0.1 vol% ギ酸		331,888 ± 10,641	1,662 ± 230

5 ng/mL 代謝物I標準溶液5 μLを注入、n = 3

流速：0.3 mL/min、移動相：アセトニトリル及び水系移動相（1：1）混液

分析カラム：COSMOSIL C₁₈-MS-II（3.0 x 150 mm, 5 μm）

表2 各ギ酸アンモニウム濃度における代謝物Iのピーク面積値とS/N

移動相		代謝物 I	
水系	有機系	ピーク面積値	S/N
2.5 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液	アセトニトリル	642,777 ± 8,937	3,240 ± 374
5 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液		577,398 ± 20,754	2,800 ± 349
10 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液		580,919 ± 38,697	2,750 ± 254
20 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液		483,882 ± 11,773	2,488 ± 245

5 ng/mL 代謝物I標準溶液5 μLを注入、n = 3

流速：0.3 mL/min、移動相：アセトニトリル及び水系移動相（1：1）混液

分析カラム：COSMOSIL C₁₈-MS-II（3.0 x 150 mm, 5 μm）

② 分析カラムの選定

図18に代謝物I標準品（左）と、オキサゾール化及びスルホン化反応によりセトキシジムから変換された代謝物I（右）のSRMクロマトグラムを示す。標準溶液では、保持時間3.2分に1本の明瞭なピークが観察されるが、セトキシジムから変換された代謝物Iは、保持時間3.1分と3.2分に2つのピークが観察された。このことは、セトキシジムがジアステレオマーの混合物であることが原因と考えられる。このため、分離能を下げて、単一のピークとして分析可能なカラムを検討することとした。はじめに、粒子径が3 μmの汎用されている複数のC18カラムを用いて検討を行ったが、いずれの分析カラムでもピークトップが2つに割れることが確認された。次に、粒子径を5 μmとして、複数のC18及びC8カラムを用いて検討したところ、図19に示すように、InertSustainSwift C8 HP（5 μm, 3.0×150 mm）を用いることで単一のピークとして分析することが可能であった。以上の結果から、分析には本分析カラムを使用することとした。

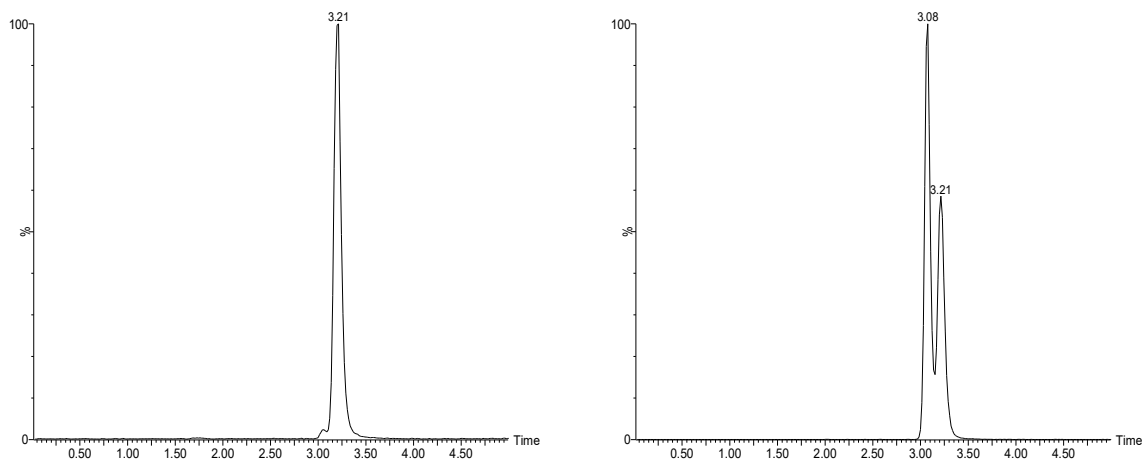


図18 代謝物IのSRMクロマトグラム

左：代謝物I標準品、右：セトキシジムからの変換された代謝物I

流速：0.3 mL/min、分析カラム：COSMOSIL C₁₈-MS-II (3.0×150 mm, 5 μm)
 移動相：アセトニトリル及び2.5 mmol/Lギ酸アンモニウム溶液 (2 : 3) 混液

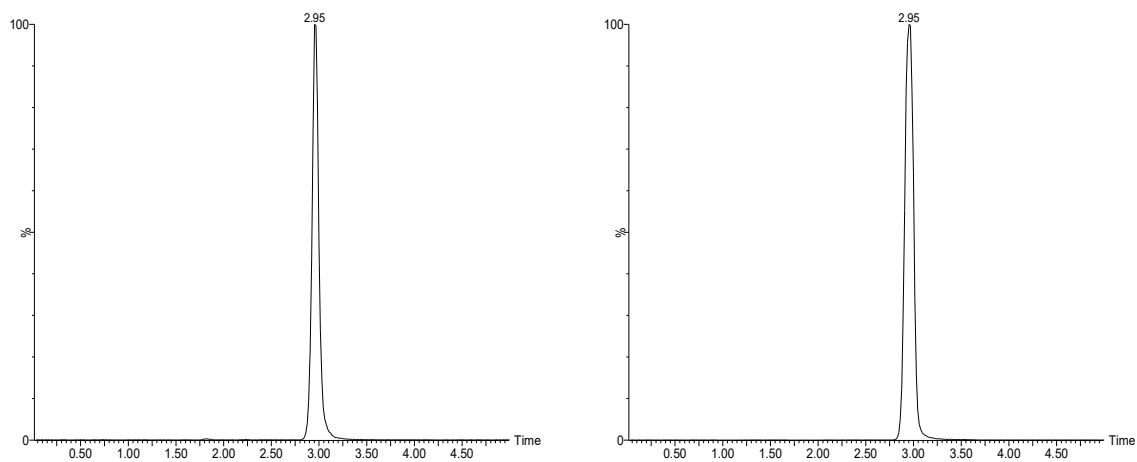


図19 代謝物IのSRMクロマトグラム

左：代謝物I標準品、右：セトキシジムからの変換された代謝物I

流速：0.4 mL/min、分析カラム：IneretSutainSwift C8 HP (3.0×150 mm, 5 μm)
 移動相：アセトニトリル及び2.5 mmol/Lギ酸アンモニウム溶液 (12 : 13) 混液

3) 検量線

代謝物Iについて、鶏卵の基準値濃度 (0.3 mg/kg) 及び定量限界濃度 (0.01 mg/kg) に対する回収率25%、50%、75%、100%、125%、150%に相当する濃度の検量溶液をアセトニトリル及び2.5 mmol/Lギ酸アンモニウム溶液 (12 : 13) 混液で調製し、5 μLをLC-MS/MSに注入して検量線をそれぞれ作成した (図20)。本濃度範囲で作成した両検量線の決定係数 R^2 は0.999以上と良好な直線性が認められ、最下点の検量溶液 (0.00025 mg/L) から得られる代謝物IのピークのS/Nは500以上であり、10以上を十分に満たした。

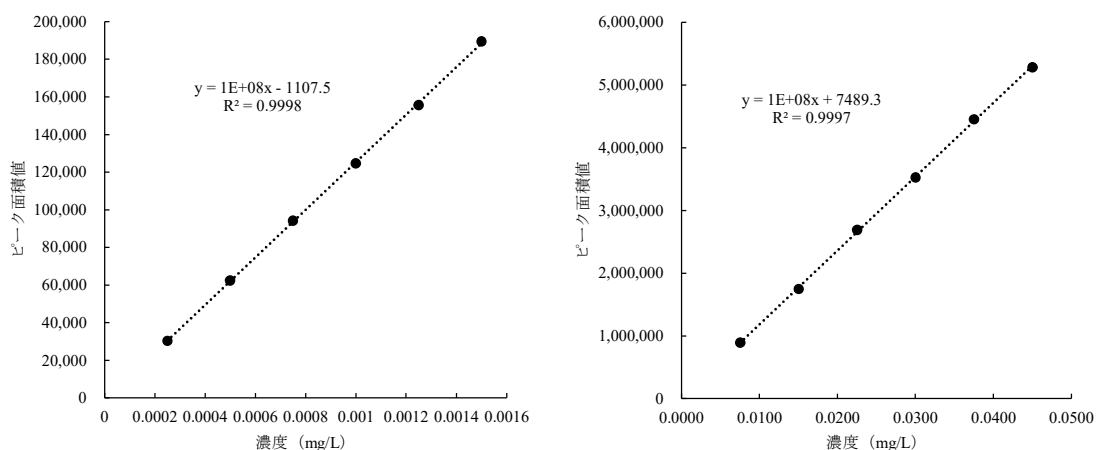


図20 代謝物I (セトキシジムとして) の検量線の例

左：定量下限濃度 (0.01 mg/kg) 用、右：鶏卵の基準値 (0.3 mg/kg) 用の検量線

2. 試験溶液調製方法の検討

1) 申請企業の家畜及び作物残留分析法

開発検討において参考にした残留分析法の概要、フローチャートを以下に示す。

① 畜産物の場合²⁾

試料をメタノールで抽出する。水酸化カルシウムを加えて沈殿処理し、ろ液を酸性にしてジクロロメタンに転溶する。水酸化バリウム溶液を加えてから過酸化水素水を加えて還流する。ついで、無水メタノール・塩酸を加え還流することにより、セトキシジム、代謝物B、代謝物C、代謝物G、代謝物H及び代謝物Iは変換物DME (3-(2-エチルスルフォニルプロピル)ペンタン-1,5,-二酸ジメチル) に、代謝物J、代謝物K及び代謝物Mは変換物OH-DMEに、代謝物T及び代謝物Uは変換物nor-DMEにそれぞれ変換する。炭酸水素ナトリウム溶液を加え、ジクロロメタンに転溶する。シリカゲルカラムを用いて精製し、さらにシリカゲルカラムを装着したHPLCで分画した後、GC-FPD(S)で定量する。

② 大豆の場合³⁾

試料

- ↓ 試料 10 g
- ↓ 水 20 mL を加えて 30 分以上放置

抽出

- ↓ メタノール 40 mL を加えて、20 分振とう抽出した後、遠心分離 (11,000 rpm、5 分間)
- ↓ 残留物にメタノール 40 mL を加えて、同様に操作し、100 mL に定容

オキサゾール化及びスルホキシド化

- ↓ 2 mL を分取し、pH 3 クエン酸緩衝液 2 mL を加える
- ↓ 過酸化水素 20 μ L を加えて、50°C で 16 時間静置

ジクロロメタン転溶

- ↓ 溶媒を室温まで冷却する
- ↓ ジクロロメタン 4 mL、10% 塩化ナトリウム溶液 4 mL を加えて、10 分間振とう
- ↓ 遠心分離後 (3,500 rpm、5 分間) に、上層を採る
- ↓ 上層にジクロロメタン 4 mL を加えて、10 分間振とう

↓ 遠心分離後 (3,500 rpm、5 分間) に、ジクロロメタン層を採り、合わせる

スルホン化

↓ *m*-クロロ過安息香酸 約 5 mg を加えて、30°C で 10 分間振とうする

↓ 10%チオ硫酸ナトリウム溶液 2 mL を加えて、1 分間振とうする

↓ 10%塩化ナトリウム溶液 2 mL を加えて、混合後に遠心分離 (3,500 rpm、5 分間) する

↓ ジクロロメタン層を分取し、水層にジクロロメタン 4 mL を加える

↓ 10分間振とうした後、遠心分離 (3,500 rpm、5分間) し、下層を合わせる

↓ 減圧濃縮し、0.1%ギ酸・メタノール溶液で定容する

LC-MS/MS測定

③ 穀類及び豆類の場合⁴⁾

試料

↓ 試料 10.0 g

↓ 水 20 mL、2 時間放置

抽出

↓ メタノール 100 mL を加えてホモジナイズ

↓ メタノール 20 mL を加えて、30 分間振とうした後、吸引ろ過する

↓ 残留物にメタノール 50 mL を加えて吸引ろ過して、200 mL に定容

オキサゾール化及びスルホキシド化

↓ 2 mL を分取、メタノール 3 mL 及び水 4 mL を加える

↓ 0.1 mol/L 塩酸で pH 3~4 に調整

↓ 過酸化水素 30 μ L を加えて 50°C で 16 時間

多孔性ケイソウ土カラム精製 (InertSep K-solute 10 mL)

↓ 反応液をケイソウ土カラムに負荷、10 分間放置

↓ *n*-ヘキサン 60 mL で洗浄

↓ 酢酸エチル 80 mL で溶出

↓ 約 30 mL まで減圧濃縮

スルホン化

↓ *m*-クロロ過安息香酸約 20 mg を加えて、30°C で 10 分間放置する

多孔性ケイソウ土/GC 連結カラム精製 (InertSep K-solute* 10 mL + InertSep GC**(500 mg))

↓ 反応液を負荷、溶出

↓ 酢酸エチル 20 mL で溶出

↓ 減圧濃縮後に、窒素ガスで溶媒を除去する

シリカゲルミニカラム精製 (Presep-Cシリカゲル (800 mg))

↓ アセトン、*n*-ヘキサン 5 mL をカラムに注入して、流出液は捨てる

↓ 残留物を *n*-ヘキサン及びアセトン (17 : 3) 5 mL に溶解して、カラムに負荷

↓ *n*-ヘキサン及びアセトン (17 : 3) 10 mL で負荷、洗浄

↓ *n*-ヘキサン及びアセトン (7 : 3) 30 mL で溶出して、減圧濃縮

↓ 水及びメタノール (1 : 1) 4 mL に溶解する

LC-MS/MS測定

*10%塩化ナトリウム含有 5%チオ硫酸ナトリウム 9.5 mL を負荷し 10 分間放置したもの

**予め酢酸エチル 5 mL を流下させて洗浄したもの

2) 抽出方法の検討

申請企業の残留分析法^{1,4)}では、メタノールを抽出溶媒に用いているため、牛の筋肉を試料としてメタノールを用いて抽出操作を行い、回収率を確認することとした。牛の筋肉10 gに、0.1 mg/kgとなるようにセトキシジム、代謝物B、C、G、H、Iを添加した試料を作製した。これにメタノール（1回目：50 mL、2回目：30 mL）を加えて、ホモジナイズ後に遠心分離して、上澄液を合わせてメタノールで100 mLとした。抽出液の一部を採取し希釈したのをLC-MS/MSに注入した。なお、回収率は、添加試料から得られた各化合物のピーク面積値に対するマトリックススタンダードから得られたピーク面積値の比に100を乗じて求めた。

表3に示すように、全て化合物で90%以上の良好な回収率が確認できた。次に、牛の脂肪、牛の肝臓、鶏卵10 gに、0.1 mg/kgとなるようにセトキシジム、代謝物G、Iを添加して、上記と同様に検討した。表4に示すように、検討した食品においても90%以上の良好な回収率が確認できた。以上のことから、抽出溶媒は申請企業の残留分析法と同様にメタノールを用いることとした。

表3. 牛の筋肉を用いたときの各分析対象化合物の回収率 (%)

食 品	回収率* (%)					
	セトキシジム**	代謝物 B	代謝物 C	代謝物 G	代謝物 H	代謝物 I
牛の筋肉	90±1.7	98±0.7	94±2.3	92±1.2	92±1.1	95±3.1

*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

**セトキシジムは2本のピークが検出されたため、それらの合算値を用いて算出した。

n=3

表4. 牛の脂肪、肝臓、鶏卵を用いたときのセトキシジム、代謝物 G、I の回収率 (%)

食 品	回収率* (%)		
	セトキシジム**	代謝物 G	代謝物 I
牛の脂肪	91	94	103
牛の肝臓	92	91	98
鶏 卵	96	92	93

*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

**セトキシジムは2本のピークが検出されたため、それらの合算値を用いて算出した。

3) オキサゾール化及びスルホキシド化反応の条件検討

① 過酸化水素の添加量の検討

申請企業の残留分析法では、オキサゾール化及びスルホキシド化反応時のpHを調整する方法として、メタノール抽出液に水及びメタノールを加えた後に塩酸でpH 3~4にする方法、またはメタノール抽出液に等量のクエン酸緩衝液 (pH 3) を加えてpH 3とする方法が示されている。この溶液に、過酸化水素20、または30 µLを加えて、50°Cで16時間加温してオキサゾール化及びスルホキシド化する。本検討では、より簡便なメタノール抽出液に等量のクエン酸緩衝液 (pH 3.0) を加えて、pH調整を行うこととした。はじめに、最適な過酸化水素の添加量を検討した。ネジ口製試験管に1 µg/mLセトキシジム標準溶液100 µLを採り、窒素ガスを吹き付けて溶媒を除去した。この試験管に牛の筋肉のメタノール抽出液2 mL、0.05 mol/Lクエン酸緩衝液 (pH 3.0) 2 mL、過酸化水素25~100 µL (25、50、75、100 µL) を加えて混合して、密栓後に50°Cで16時間加温した。反応後の溶液を室温に戻した後に、反応液を移動相で希釈してLC-MS/MS測定した。

その結果を表5に示す。セトキシジムの変換反応物として、代謝物Hのみが検出されると予想していたが、代謝物Iも検出された。なお、未反応のセトキシジムに由来するピークは検出され

なかったことから、全てのセトキシジムが反応したものと考えられた。代謝物Hの生成量は、過酸化水素の添加量に依存して低下する一方で、代謝物Iの生成量は増加したが、代謝物Hと代謝物Iへの変換効率の合算値はいずれの過酸化水素の添加量でも57%程度と大きな差は認められなかった。十分な変換効率を得られなかった原因を明らかにするために、反応溶液のSCAN測定などを実施したが、明確な回答を得ることが出来なかった。

次に、オキサゾール化及びスルホキシド化反応単独での評価ではなく、スルホン化反応まで実施して、全てを代謝物Iに変換して評価することとした。先の検討と同様に、牛の筋肉のメタノール抽出液を用いてオキサゾール化及びスルホキシド化反応まで実施した。反応後の溶液を「7. 試験溶液の調製」に従い、スルホン化反応まで実施した。得られた酢酸エチル溶液を濃縮後に移動相で希釈して、LC-MS/MS測定した。その結果、代謝物Hは検出されずに、代謝物Iのみが検出された（表6）。過酸化水素の添加量が25 μ Lのときに代謝物Iへの変換効率が最大となり、ほぼ100%が代謝物Iに変換されたことから、添加量は25 μ Lとした。

表5 過酸化水素の添加量におけるセトキシジムの変換効率 (%)

化合物	食品	過酸化水素の量 (μ L)	変換反応物への変換効率* (%)		
			代謝物 H	代謝物 I	合計 (%)
セトキシジム	牛の筋肉	25	51 \pm 0.9	4 \pm 0.2	55 \pm 1.1
		50	48 \pm 0.4	9 \pm 0.1	57 \pm 0.5
		75	43 \pm 0.7	14 \pm 0.1	56 \pm 0.6
		100	39 \pm 0.1	19 \pm 0.1	58 \pm 0.2

オキサゾール化及びスルホキシド化反応（反応温度：50 $^{\circ}$ C、反応時間：16時間）

*反応液から得られた代謝物HまたはIのピーク面積値/マトリックス添加標準溶液から得られたピーク面積値 \times 100

n = 3

表6 過酸化水素の添加量におけるセトキシジムの変換効率 (%)

化合物	食品	過酸化水素の量 (μ L)	代謝物 I への変換効率* (%)
セトキシジム	牛の筋肉	25	99 \pm 1.1
		50	95 \pm 1.2
		75	94 \pm 1.2
		100	90 \pm 0.1

オキサゾール化及びスルホキシド化反応（反応温度：50 $^{\circ}$ C、反応時間：16時間）

スルホン化反応（*m*-CPBA：5 mg、反応温度：30 $^{\circ}$ C、反応時間：10分）

*反応液から得られた代謝物Iのピーク面積値/代謝物I標準溶液から得られたピーク面積値 \times 100

n = 3

② 反応時間の検討

申請企業の残留分析法では、反応条件として、50 $^{\circ}$ Cで16時間と長時間に亘る加温時間が示されている。本条件では、分析操作が2日間に亘るため、分析法の効率化の観点から反応時間について改めて検討した。なお、加温温度はメタノールの沸点を考慮すると50 $^{\circ}$ Cが妥当と考えられるため変更しないこととした。ネジ口製試験管に1 μ g/mLセトキシジム標準溶液100 μ Lを採り、窒素ガスを吹き付けて溶媒を除去した。この試験管に、牛の筋肉のメタノール抽出液2 mL、0.05 mol/Lクエン酸緩衝液（pH 3.0）2 mL、過酸化水素25 μ Lを加えて混合して、密栓後に50 $^{\circ}$ Cで1~16時間（1、3、16時間）加温した。反応後の溶液を「7. 試験溶液の調製」に従い、スルホン化反応まで実施してLC-MS/MS測定した。その結果、表7に示す通り、3時間程度では50%程度の変換効率となったが、16時間加温することで100%が代謝物Iに変換された。以上の結果から、加温時間は、申請企業の残

留分析法と同様に16時間に設定した。

表7 オキサゾール化及びスルホキシド化の反応時間の検討

化合物	食品	反応時間 (時間)	代謝物 I への変換効率* (%)
セトキシジム	牛の筋肉	1	21±0.4
		3	50±0.04
		16	99±1.1

オキサゾール化及びスルホキシド化反応 (過酸化水素の添加量: 25 µL、反応温度: 50°C)

スルホン化反応 (*m*-CPBA量: 5 mg、反応温度: 30°C、反応時間: 10分)

*反応液から得られた代謝物Iのピーク面積値/代謝物I標準溶液から得られたピーク面積値×100

n = 3

③ ケイソウ土カラム精製方法の検討

申請企業の残留分析法では、オキサゾール化及びスルホキシド化反応後の溶液をケイソウ土カラムに負荷した後、*n*-ヘキサン60 mLで洗浄した後に酢酸エチル80 mLで溶出する方法、または液々分配によりジクロロメタンに転溶する方法が示されている。酢酸エチルや*n*-ヘキサンなどの有機溶媒を用いて液々分配する検討を実施したが、有機層からは十分な回収が得られなかったため、不採用とした。このため、ケイソウ土カラムを用いる方法を検討した。本検討では、抽出液の着色が強いしじみのメタノール抽出液を用いた。なお、ケイソウ土カラムはInertSep K-solute plus (10 mL保持用)を用いた。ねじ口試験管に100 ng/mL代謝物I標準溶液100 µLを加えて、窒素ガスを吹き付けて溶媒を除去した。この試験管に、しじみのメタノール抽出液2 mL、0.05 mol/Lクエン酸緩衝液 (pH 3.0) 2 mL、過酸化水素25 µLを加えて混合後に、密栓して50°Cで16時間加温した。反応液全量をケイソウ土カラム負荷して、試験管を水4 mLで洗い込み、洗液をカラムに負荷して10分間放置した。このカラムに、*n*-ヘキサン50 mLをカラムに負荷して、溶出液を採取した。次に、酢酸エチル100 mLをカラムに負荷して10 mLずつ採取して、各画分からの代謝物Iの回収率を求めた。その結果、表8に示すように、*n*-ヘキサンからの溶出画分からは代謝物Iは検出されず、酢酸エチル70 mLまでにはほぼ100%の溶出が確認できた。以上の結果から、反応溶液及び洗液を負荷したケイソウ土カラムに、*n*-ヘキサン50 mLを加えて洗浄した後、酢酸エチル80 mLで溶出することとした。

表8. ケイソウ土カラムから代謝物Iの溶出状況

	回収率 (%)											
	<i>n</i> -ヘキサン	酢酸エチル										
	50 mL	0-10 mL	10-20 mL	20-30 mL	30-40 mL	40-50 mL	50-60 mL	60-70 mL	70-80 mL	80-90 mL	90-100 mL	合計
代謝物 I	n.d.	26	21	17	16	14	7	2	n.d.	n.d.	n.d.	103

マトリックス: しじみ

n.d.: S/N ≤ 3

4) スルホン化反応の検討

① *m*-CPBAの添加量の検討

申請企業の残留分析法では、酢酸エチルまたはジクロロメタン溶液に酸化剤として*m*-CPBA 5 または20 mgを加えて、30°Cで10分間加温してスルホン化する。粉体の*m*-CPBAを秤量して、検体ごとに添加する煩雑な操作であるため、本検討では、*m*-CPBA・酢酸エチル溶液として、得ら

れた酢酸エチル溶液30 mLに1 mLを加えることとした。反応時間10分及び反応温度30°Cは残留分析法に準拠した。

はじめに、*m*-CPBAの添加量を検討した。ねじ口試験管に1 µg/mLセトキシジム標準溶液100 µLを加えて、窒素ガスを吹き付けて溶媒を除去した。この試験管に、牛肉のメタノール抽出液2 mL、0.05 mol/Lクエン酸緩衝液 (pH 3.0) 2 mL、過酸化水素25 µLを加えて混合後に、50°Cで16時間加温した。反応後の溶液をケイソウ土カラムに注入して、酢酸エチルで溶出した。溶出液を濃縮して30 mLとして、5 mgまたは20 mg/mL *m*-CPBA・酢酸エチル溶液1 mLを加えて、30°Cで10分間加温した。反応液をケイソウ土カラムで精製した後に、移動相で希釈してLC-MS/MS測定した。表9に示すように、いずれの*m*-CPBA量においても、ほぼ100%の変換効率が確認できた。*m*-CPBAの添加量を20 mgとすると、この後のシリカゲルミニカラム精製時に白色の粉体 (*m*-CPBAが還元されて生成する*m*-クロロ安息香酸と考えられる) が大量に生成されて、ミニカラムに目詰まりするため操作性が著しく低下する。このため、*m*-CPBAの添加量は5 mgとした。

表9. *m*-CPBAの量の検討

食品	<i>m</i> -CPBA の添加量 (mg)	代謝物 I への変換効率* (%)
牛の筋肉	5	99±1.1
	20	98±2.0

*反応液から得られた代謝物Iのピーク面積値/代謝物I標準溶液から得られたピーク面積値×100

n=3

② スルホン化反応後のケイソウ土カラム精製方法の検討

申請企業の残留分析法では、予め、10%塩化ナトリウム含有5%チオ硫酸ナトリウム溶液9.5 mLを負荷し、10分間放置したケイソウ土カラムの下部にグラファイトカーボンミニカラム (GCミニカラム) を連結したカラムを用いて、夾雑成分の除去を行うとともに、*m*-CPBAを還元する方法が示されている。本検討では、色素などの夾雑成分が問題となる可能性は少ないことから、GCミニカラムは使用せずに、ケイソウ土カラムを単独で用いる方法を検討した。

はじめに、酢酸エチルによる溶出液量を検討した。ねじ口試験管に100 ng/mL代謝物I標準溶液100 µLを加えて、窒素ガスを吹き付けて溶媒を除去した。この試験管に、牛の筋肉、脂肪、しじみのメタノール抽出液2 mLを加えた後、「7. 試験溶液の調製」に従って、スルホン化反応まで実施した。約30 mLに濃縮した酢酸エチル溶液を、予め10 w/v%塩化ナトリウム含有5 w/v%チオ硫酸ナトリウム溶液9 mLを負荷して、10分間放置したケイソウ土カラムに全量を負荷して溶出液を採取した。このカラムに酢酸エチル50 mLを注入して、10 mLずつを採取して各画分からの回収率を求めた。その結果、表10の上段に示すように、全ての食品で酢酸エチル40 mL以降には代謝物Iは検出されずに、その回収率は92~95%とやや低い回収率となった。そこで、より高い回収率を得ることを期待して、塩化ナトリウムの濃度を 20 w/v%として同様に検討した。その結果、表10の下段に示すように、回収率は94~102%とより良好な回収率が得られた。カラムに負荷する酢酸エチルの液量は、30 mLまではわずかに代謝物Iが検出されていることから、余裕を見て40 mLとした。

表10 ケイソウ土カラムからの代謝物Iの溶出状況

食品	塩化ナトリウムの濃度* (w/v%)	代謝物Iの回収率 (%)						
		反応溶液	酢酸エチル					
			30 mL	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL
牛の筋肉	10	71	19	4	trace	n.d.	n.d.	95
牛の脂肪		73	15	4	trace	n.d.	n.d.	93
しじみ		72	17	3	0.9	n.d.	n.d.	92
牛の筋肉	20	81	16	4	0.9	n.d.	n.d.	102
牛の脂肪		75	15	4	0.7	n.d.	n.d.	94
しじみ		81	15	3	0.9	n.d.	n.d.	99

*チオ硫酸ナトリウムの濃度：5 w/v%

5) 代謝物を用いた変換反応の確認

これまでに、セトキシジムを用いて、オキサゾール化及びスルホキシド化、スルホン化反応の変換効率を確認したが、代謝物B、C、G、H、Iについても牛の筋肉の抽出液を用いて同様に確認した。ねじ口試験管に100 ng/mL各代謝物標準溶液100 μ Lを加えて、窒素ガスを吹き付けて溶媒を除去した。この試験管に、牛の筋肉のメタノール抽出液2 mLを加えて、「7. 試験溶液の調製」に従って、スルホン化反応まで実施した。ケイソウ土カラムからの溶出液を濃縮後に移動相で希釈してLC-MS/MSに注入した。その結果、表11に示す通り、全ての化合物で94~103%と良好な代謝物Iへの変換が認められた。

表11 代謝物におけるオキサゾール化及びスルホキシド化、スルホン化の変換効率 (%)

食品	各代謝物から代謝物Iへの変換効率* (%)				
	代謝物 B	代謝物 C	代謝物 G	代謝物 H	代謝物 I
牛の筋肉	102.8 \pm 4.5	94.4 \pm 0.6	100.1 \pm 0.4	98.0 \pm 1.8	94.8 \pm 1.4

*反応液から得られた代謝物Iのピーク面積値/代謝物I標準溶液から得られたピーク面積値 \times 100

n = 3

6) シリカゲルカラム精製方法の検討

スルホン化後のケイソウ土カラムからの溶出液には、*m*-CPBAが還元されて生成した*m*-クロロ安息香酸が大量に存在するため、LC-MS/MSに注入する前に除去する必要がある。*m*-クロロ安息香酸及び食品マトリックスを除去するために、シリカゲルミニカラムを用いる精製方法を検討した。予め、ミニカラムに酢酸エチル5 mL、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (3 : 2) 混液5 mLを順次注入し、流出液は捨てた。このカラムに、1 ng/mL代謝物I標準溶液 (酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (3 : 2) 混液) 2 mLを負荷し、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (3 : 2) 混液10 mL (5 mL \times 2回)、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (9 : 1) 混液20 mL (5 mL \times 4回) で溶出したときの溶出状況を表12に示した。代謝物Iは酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (3 : 2) 混液10 mLでは溶出されず、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (9 : 1) 混液10 mLで溶出された。以上の結果から、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (3 : 2) 混液2 mLで負荷した後、同混液10 mLでカラムを洗浄し、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (9 : 1) 混液15 mLで溶出することにした。なお、シリカゲルミニカラムからの溶出液からは、*m*-クロロ安息香酸は認められなかったことから、本操作で除去することが可能であった。

表12 シリカゲルミニカラムからの溶出状況

	回収率 (%)							
	酢酸エチル及び <i>n</i> -ヘキサン (3:2) 混液			酢酸エチル及び <i>n</i> -ヘキサン (9:1) 混液				
	2 mL (負荷)	5 mL	5 mL	5 mL	5 mL	5 mL	5 mL	合計
代謝物 I	n.d.	n.d.	n.d.	95	3	trace	trace	99

カラム：InertSep SI (500 mg、GLサイエンス製)
 添加量：2 ng, n.d. : S/N ≤ 3, trace : 3 ≤ S/N ≤ 10

3. 添加回収試験

畜水産物7食品（牛の筋肉・脂肪・肝臓、牛乳、鶏卵、うなぎ、しじみ）を用いて、「7. 試験溶液の調製方法」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）（濃度はいずれもセトキシジム換算）の2濃度でセトキシジム、代謝物G及びIの添加回収試験を実施した。親化合物であるセトキシジム、変換反応後の化合物である代謝物I及び、反応中間体の代謝物である代謝物Gを対象化合物とした。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21～56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57に示した。

1) 選択性の評価

選択性の評価結果を表13に示した。全ての食品で代謝物Iの定量を妨害するピークは検出されず、選択性の評価基準を満たしていることから、選択性は問題が無いと判断した。

表13 選択性の評価

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 [検出限界] (mg/kg)	基準値 (ppm)	妨害ピークの許容範囲の評価		ピーク面積(高さ) ¹⁾						選択性の 評価 ³⁾			
					評価濃度 (ppm)	評価基準	面積又は 高さの別	ブランク			マトリックス添加標準溶液 ²⁾			面積(高さ) 比(a)/(b)		
								n=1	n=2	平均(a)	n=1	n=2			平均(b)	
1	セトキシジム	牛の筋肉	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	126115	125057	125586	0.000	○
1	セトキシジム	牛の脂肪	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	131546	132096	131821	0.000	○
1	セトキシジム	牛の肝臓	0.01	0.1	基準値	0.1	< 0.100	面積	0	0	0	1339548	1334623	1337085	0.000	○
1	セトキシジム	牛乳	0.01	0.03	基準値	0.03	< 0.100	面積	0	0	0	378338	380574	379456	0.000	○
1	セトキシジム	鶏卵	0.01	0.3	基準値	0.3	< 0.100	面積	0	0	0	3482619	3525888	3504253	0.000	○
1	セトキシジム	うなぎ	0.01	0.2	基準値	0.2	< 0.100	面積	0	0	0	2365082	2378211	2371646	0.000	○
1	セトキシジム	しじみ	0.01	0.2	基準値	0.2	< 0.100	面積	0	0	0	2384011	2359068	2371539	0.000	○
2	代謝物G	牛の筋肉	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	131657	130991	131324	0.000	○
2	代謝物G	牛の脂肪	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	131546	132096	131821	0.000	○
2	代謝物G	牛の肝臓	0.01	0.1	基準値	0.1	< 0.100	面積	0	0	0	1322570	1323832	1323201	0.000	○
2	代謝物G	牛乳	0.01	0.03	基準値	0.03	< 0.100	面積	0	0	0	374267	375896	375082	0.000	○
2	代謝物G	鶏卵	0.01	0.3	基準値	0.3	< 0.100	面積	0	0	0	3503632	3516806	3510219	0.000	○
2	代謝物G	うなぎ	0.01	0.2	基準値	0.2	< 0.100	面積	0	0	0	2519147	2501188	2510168	0.000	○
2	代謝物G	しじみ	0.01	0.2	基準値	0.2	< 0.100	面積	0	0	0	2344917	2344386	2344652	0.000	○
3	代謝物I	牛の筋肉	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	131657	130991	131324	0.000	○
3	代謝物I	牛の脂肪	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	130534	133587	132061	0.000	○
3	代謝物I	牛の肝臓	0.01	0.1	基準値	0.1	< 0.100	面積	0	0	0	1285128	1297743	1291435	0.000	○
3	代謝物I	牛乳	0.01	0.03	基準値	0.03	< 0.100	面積	0	0	0	396502	394159	395330	0.000	○
3	代謝物I	鶏卵	0.01	0.3	基準値	0.3	< 0.100	面積	0	0	0	3599182	3597508	3598345	0.000	○
3	代謝物I	うなぎ	0.01	0.2	基準値	0.2	< 0.100	面積	0	0	0	2392831	2385330	2389080	0.000	○
3	代謝物I	しじみ	0.01	0.2	基準値	0.2	< 0.100	面積	0	0	0	2395571	2393641	2394606	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14に示した。基準値濃度での真度及び併行精度は、セトキシジムでそれぞれ84～88%及び1.3～3.6%、代謝物Gでそれぞれ88～94%及び1.6～5.4%、代謝物Iでそれぞれ86～92%及び0.9～2.5%であった。定

量限界濃度での真度及び併行精度は、セトキシジムでそれぞれ84~90%及び1.0~2.7%、代謝物Gでそれぞれ89~94%及び1.8~7.4%、代謝物Iでそれぞれ85~92%及び1.3~2.9%であった。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の平均値はセトキシジムで871~1941、代謝物Gで1029~1452、代謝物Iで916~1630であり、S/N \geq 10以上を十分に満たした。

表14 真度、精度の評価

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 [検出限界] (mg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	定量限界 の評価 ¹⁾	検量線			回収率(%)					真度 (%)	併行精度 (RSD%)	S/N ²⁾		
							傾き	切片	r ² 値	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5			Max.	Min.	平均値
1	セトキシジム	牛の筋肉	0.01	0.01	0.01	S/N	126394210	-1107	0.9998	84.5	85.4	87.1	84.5	84.6	85.2	1.3	2180.5	1700.6	1940.6
1	セトキシジム	牛の脂肪	0.01	0.01	0.01	S/N	135421556	-2246	0.9999	81.5	87.0	85.1	82.2	82.9	83.8	2.7	1444.1	1394.9	1419.5
1	セトキシジム	牛の肝臓	0.01	0.1	0.01	S/N	136047599	-3429	0.9998	85.5	83.1	88.3	83.4	84.5	85.0	2.5	1284.1	1008.2	1146.1
1	セトキシジム	牛乳	0.01	0.03	0.01	S/N	132339370	-3094	0.9999	87.3	89.0	91.5	89.4	88.4	89.1	1.7	1334.0	987.4	1160.7
1	セトキシジム	鶏卵	0.01	0.3	0.01	S/N	120135638	-1999	0.9998	86.0	88.1	87.9	86.9	85.0	86.8	1.5	1252.3	1109.5	1180.9
1	セトキシジム	うなぎ	0.01	0.2	0.01	S/N	120771603	-991	0.9999	86.9	85.8	83.7	87.7	84.1	85.7	2.0	1208.1	1113.3	1160.7
1	セトキシジム	しじみ	0.01	0.2	0.01	S/N	124970231	-3098	0.9998	88.7	90.4	90.5	91.1	90.9	90.3	1.0	986.4	755.6	871.0
1	セトキシジム	牛の肝臓	0.01	0.1	0.1	—	136628134	-16667	0.9999	85.4	84.4	86.8	85.5	88.0	86.0	1.6	—	—	#DIV/0!
1	セトキシジム	牛乳	0.01	0.03	0.03	—	131031999	-6100	0.9999	85.5	88.5	88.0	85.9	88.8	87.3	1.8	—	—	#DIV/0!
1	セトキシジム	鶏卵	0.01	0.3	0.3	—	117717180	7489	0.9997	80.8	85.5	82.1	84.2	88.6	84.2	3.6	—	—	#DIV/0!
1	セトキシジム	うなぎ	0.01	0.2	0.2	—	120413730	-2483	0.9998	84.5	85.6	80.5	87.4	85.0	84.6	3.0	—	—	#DIV/0!
1	セトキシジム	しじみ	0.01	0.2	0.2	—	121252957	-18186	0.9999	91.0	85.9	85.6	90.7	88.7	88.4	2.9	—	—	#DIV/0!
2	代謝物G	牛の筋肉	0.01	0.01	0.01	S/N	139481523	-3477	0.9997	90.8	91.8	88.3	92.4	90.2	90.7	1.8	1361.1	1341.2	1351.2
2	代謝物G	牛の脂肪	0.01	0.01	0.01	S/N	135716049	-1285	0.9998	93.7	92.0	93.7	91.3	97.0	93.5	2.4	1456.3	1446.8	1451.6
2	代謝物G	牛の肝臓	0.01	0.1	0.01	S/N	137591659	-2422	1.0000	77.1	90.6	91.4	93.7	90.1	88.6	7.4	1311.6	890.0	1100.8
2	代謝物G	牛乳	0.01	0.03	0.01	S/N	130568819	-3855	0.9999	92.1	95.7	94.6	91.2	93.2	93.3	1.9	1164.6	892.4	1028.5
2	代謝物G	鶏卵	0.01	0.3	0.01	S/N	129096099	-1109	0.9998	93.2	89.8	86.8	95.3	88.2	90.6	3.9	1344.9	1333.2	1339.0
2	代謝物G	うなぎ	0.01	0.2	0.01	S/N	131600313	-2910	0.9998	91.3	96.1	95.3	94.7	90.1	93.5	2.8	1061.3	1188.3	1124.8
2	代謝物G	しじみ	0.01	0.2	0.01	S/N	120730865	-1286	0.9998	86.7	91.2	88.1	91.2	89.4	89.3	2.2	1307.4	888.4	1097.9
2	代謝物G	牛の肝臓	0.01	0.1	0.1	—	136877419	-8664	1.0000	84.9	90.5	87.9	88.9	86.6	87.8	2.4	—	—	#DIV/0!
2	代謝物G	牛乳	0.01	0.03	0.03	—	126774541	-572	0.9998	91.1	82.9	91.2	90.6	95.4	90.2	5.0	—	—	#DIV/0!
2	代謝物G	鶏卵	0.01	0.3	0.3	—	119026267	13114	0.9998	90.6	92.2	92.2	92.4	89.1	91.3	1.6	—	—	#DIV/0!
2	代謝物G	うなぎ	0.01	0.2	0.2	—	124875382	12592	0.9997	94.1	94.4	93.5	94.0	82.9	91.8	5.4	—	—	#DIV/0!
2	代謝物G	しじみ	0.01	0.2	0.2	—	118152584	129	0.9999	84.4	93.3	91.3	93.7	93.7	91.3	4.3	—	—	#DIV/0!
3	代謝物I	牛の筋肉	0.01	0.01	0.01	S/N	138368831	-1388	0.9997	86.4	88.6	87.3	85.7	89.5	87.5	1.8	1670.0	1590.3	1630.2
3	代謝物I	牛の脂肪	0.01	0.01	0.01	S/N	139732308	-3016	0.9998	90.8	91.2	93.3	91.3	90.2	91.3	1.3	1656.2	1391.3	1523.8
3	代謝物I	牛の肝臓	0.01	0.1	0.01	S/N	131599096	-3231	0.9994	85.0	81.5	86.9	85.3	85.1	84.7	2.3	1345.5	973.9	1159.7
3	代謝物I	牛乳	0.01	0.03	0.01	S/N	136277292	-3308	0.9997	90.4	90.1	92.5	93.4	92.8	91.8	1.7	1438.4	1421.3	1429.9
3	代謝物I	鶏卵	0.01	0.3	0.01	S/N	125437039	-2266	0.9999	89.3	88.8	87.3	89.5	87.1	88.4	1.3	1371.4	1350.3	1360.9
3	代謝物I	うなぎ	0.01	0.2	0.01	S/N	125143287	-2423	0.9998	87.4	85.6	84.2	89.6	90.2	87.4	2.9	985.5	846.7	916.1
3	代謝物I	しじみ	0.01	0.2	0.01	S/N	127012089	-3344	0.9998	86.2	84.0	89.1	83.7	86.9	86.0	2.6	1200.0	806.7	1003.4
3	代謝物I	牛の肝臓	0.01	0.1	0.1	—	130614841	-660	0.9999	83.0	84.7	87.0	86.5	87.2	85.7	2.1	—	—	#DIV/0!
3	代謝物I	牛乳	0.01	0.03	0.03	—	135071818	-4548	0.9996	90.7	93.2	91.9	92.0	90.6	91.7	1.2	—	—	#DIV/0!
3	代謝物I	鶏卵	0.01	0.3	0.3	—	119796428	50263	0.9998	88.1	87.5	89.4	88.4	87.5	88.2	0.9	—	—	#DIV/0!
3	代謝物I	うなぎ	0.01	0.2	0.2	—	121359575	1648	0.9998	86.5	83.9	87.2	87.2	87.4	86.4	1.7	—	—	#DIV/0!
3	代謝物I	しじみ	0.01	0.2	0.2	—	119972448	11693	0.9999	86.0	87.3	91.3	87.7	90.5	88.5	2.5	—	—	#DIV/0!

*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15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、基準値濃度で0.97~1.00、定量限界濃度で0.96~1.01であることから、本分析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15 試料マトリックスの測定への影響

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 [検出限界] (mg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	標準溶液 濃度 ¹ (mg/L)	ピーク面積(高さ) ²								
							面積又は 高さの別	ブランク ³	マトリックス添加標準溶液 ⁴			溶媒標準溶液			ピーク面積 (高さ)比 ⁵
									n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均	
1	セトキシジム	牛の筋肉	0.01	0.01	0.01	0.001	面積	0	126115	125057	125586	126511	124662	125586	1.00
1	セトキシジム	牛の脂肪	0.01	0.01	0.01	0.001	面積	0	131546	132096	131821	132540	133752	133146	0.99
1	セトキシジム	牛の肝臓	0.01	0.1	0.01	0.001	面積	0	132843	132807	132825	134030	131519	132775	1.00
1	セトキシジム	牛乳	0.01	0.03	0.01	0.001	面積	0	126729	126271	126500	129368	128793	129081	0.98
1	セトキシジム	鶏卵	0.01	0.3	0.01	0.001	面積	0	114619	113943	114281	116160	118556	117358	0.97
1	セトキシジム	うなぎ	0.01	0.2	0.01	0.001	面積	0	118599	119519	119059	121576	122608	122092	0.98
1	セトキシジム	しじみ	0.01	0.2	0.01	0.001	面積	0	119693	121185	120439	121938	123655	122797	0.98
1	セトキシジム	牛の肝臓	0.01	0.1	0.1	0.01	面積	0	1339548	1334623	1337085	1345769	1356708	1351239	0.99
1	セトキシジム	牛乳	0.01	0.03	0.03	0.003	面積	0	378338	380574	379456	389719	388648	389184	0.98
1	セトキシジム	鶏卵	0.01	0.3	0.3	0.03	面積	0	3482619	3525888	3504253	3566045	3578863	3572454	0.98
1	セトキシジム	うなぎ	0.01	0.2	0.2	0.02	面積	0	2365082	2378211	2371646	2415741	2399807	2407774	0.98
1	セトキシジム	しじみ	0.01	0.2	0.2	0.02	面積	0	2384011	2359068	2371539	2420988	2404558	2412773	0.98
2	代謝物G	牛の筋肉	0.01	0.01	0.01	0.001	面積	0	131657	130991	131324	134709	134947	134828	0.97
2	代謝物G	牛の脂肪	0.01	0.01	0.01	0.001	面積	0	131546	132096	131821	132540	133752	133146	0.99
2	代謝物G	牛の肝臓	0.01	0.1	0.01	0.001	面積	0	133093	131308	132200	137743	135288	136515	0.97
2	代謝物G	牛乳	0.01	0.03	0.01	0.001	面積	0	122105	122109	122107	126884	126594	126739	0.96
2	代謝物G	鶏卵	0.01	0.3	0.01	0.001	面積	0	117758	117359	117558	122512	122324	122418	0.96
2	代謝物G	うなぎ	0.01	0.2	0.01	0.001	面積	0	126263	126874	126569	128487	129030	128758	0.98
2	代謝物G	しじみ	0.01	0.2	0.01	0.001	面積	0	115891	119809	115980	118431	118374	118403	0.98
2	代謝物G	牛の肝臓	0.01	0.1	0.1	0.01	面積	0	1322570	1323832	1323201	1366741	1370163	1363452	0.97
2	代謝物G	牛乳	0.01	0.03	0.03	0.003	面積	0	374267	375896	375082	379104	381069	380087	0.99
2	代謝物G	鶏卵	0.01	0.3	0.3	0.03	面積	0	3503632	3516806	3510219	3639334	3620427	3629880	0.97
2	代謝物G	うなぎ	0.01	0.2	0.2	0.02	面積	0	2519147	2501188	2510168	2530785	2485576	2508181	1.00
2	代謝物G	しじみ	0.01	0.2	0.2	0.02	面積	0	2344917	2344386	2344652	2351769	2390165	2370967	0.99
3	代謝物I	牛の筋肉	0.01	0.01	0.01	0.001	面積	0	131657	130991	131324	134709	134947	134828	0.97
3	代謝物I	牛の脂肪	0.01	0.01	0.01	0.001	面積	0	130534	133587	132061	135879	135258	135568	0.97
3	代謝物I	牛の肝臓	0.01	0.1	0.01	0.001	面積	0	125836	126519	126178	127730	126701	127215	0.99
3	代謝物I	牛乳	0.01	0.03	0.01	0.001	面積	0	128111	127765	127938	132119	132312	132215	0.97
3	代謝物I	鶏卵	0.01	0.3	0.01	0.001	面積	0	119881	122419	121150	122700	125707	124203	0.98
3	代謝物I	うなぎ	0.01	0.2	0.01	0.001	面積	0	121480	122222	121851	120492	121704	121098	1.01
3	代謝物I	しじみ	0.01	0.2	0.01	0.001	面積	0	119334	119699	119517	122606	122558	122582	0.97
3	代謝物I	牛の肝臓	0.01	0.1	0.1	0.01	面積	0	1285128	1297743	1291435	1316031	1308174	1312103	0.98
3	代謝物I	牛乳	0.01	0.03	0.03	0.003	面積	0	396502	394159	395330	400970	404580	402775	0.98
3	代謝物I	鶏卵	0.01	0.3	0.3	0.03	面積	0	3599182	3597508	3598345	3656306	3632850	3644578	0.99
3	代謝物I	うなぎ	0.01	0.2	0.2	0.02	面積	0	2392831	2385330	2389080	2393035	2415635	2404335	0.99
3	代謝物I	しじみ	0.01	0.2	0.2	0.02	面積	0	2395571	2393641	2394606	2423146	2422188	2422667	0.99

- *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]

セトキシジム及びその代謝物を試料からメタノールで抽出する。抽出液の一部を採取して、クエン酸緩衝液（pH 3.0）、過酸化水素を加えて50℃で16時間加温して、オキサゾール化及びスルホキシド化する。反応液を多孔性ケイソウ土カラムで精製した後、*m*-CPBAによりスルホン化して代謝物Iに変換する。この反応後の溶液を、予め塩化ナトリウム及びチオ硫酸ナトリウム溶液を注入した多孔性ケイソウ土カラムに注入し、未反応の*m*-CPBAを還元するとともに精製する。更に、シリカゲルミニカラムで精製し、LC-MS/MSで定量及び確認する方法を検討した。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、牛の筋肉、脂肪、肝臓、牛乳、鶏卵、うなぎ、しじみの7食品に適用した。真度及び併行精度（RSD%）は、基準値濃度での真度及び併行精度は、セトキシジムでそれぞれ84~88%及び1.3~3.6%、代謝物Gでそれぞれ88~94%及び1.6~5.4%、代謝物Iでそれぞれ86~92%及び0.9~2.5%であった。定量限界濃度での真度及び併行精度は、セトキシジムでそれぞれ84~90%及び1.0~2.7%、代謝物Gでそれぞれ89~94%及び1.8~7.4%、代謝物Iでそれぞれ85~92%及び1.3~2.9%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、基準値濃度で0.97~1.00、定量限界濃度で0.96~1.01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、畜水産物中のセトキシジム及びその代謝物（代謝物B、C、G、H、I）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) 農薬抄録（一般名：セトキシジム）。日本曹達株式会社。平成30年5月18日改定。
- 2) 農薬・動物用医薬品部会報告について（セトキシジム）、薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会（令和5年6月7日）
- 3) セトキシジムのだいずへの農薬作物残留性試験（11C-G031）における残留分析試験。試験場所報告書番号 NCAS 11-092。
- 4) 農産物または畜水産物における残留試験で用いた分析法（セトキシジム試験法（農産物））、消費者庁HP。URL：
https://www.caa.go.jp/policies/policy/standards_evaluation/pesticide_residues/examination

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）

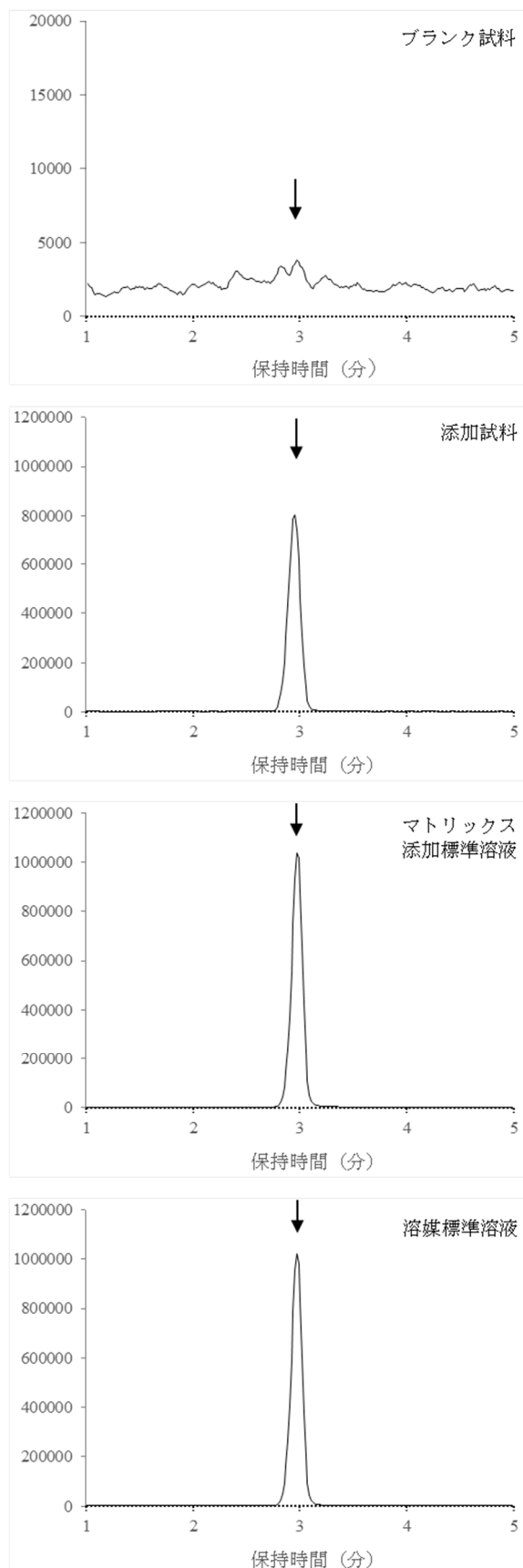


図21 牛の筋肉のSRMクロマトグラム [セトキシジム添加]
(代謝物I: m/z 314.2 \rightarrow 220.2)
添加濃度: 0.01 mg/kg (セトキシジム換算)

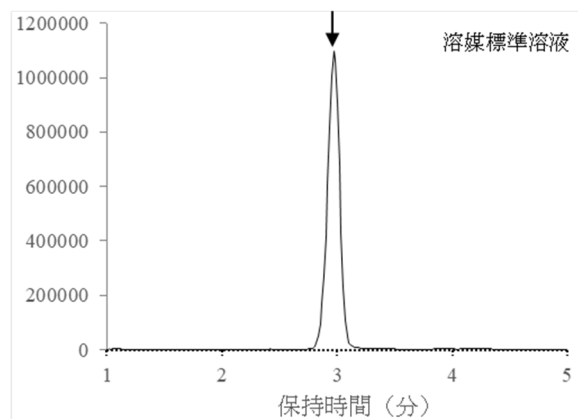
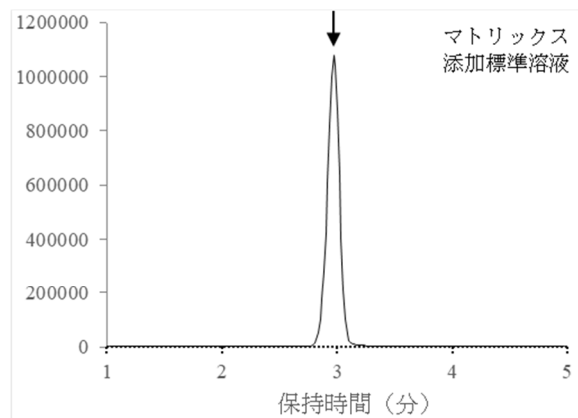
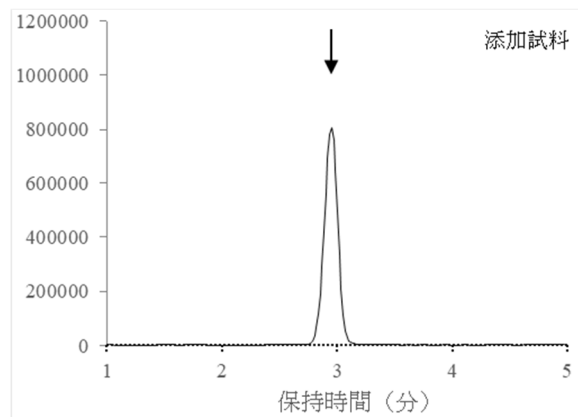
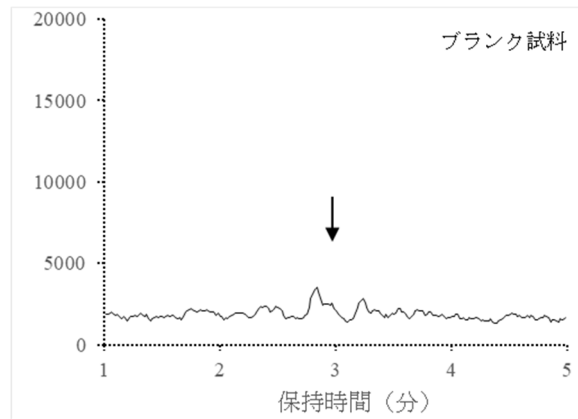


図22 牛の脂肪のSRMクロマトグラム [セトキシジム添加]
 (代謝物I : m/z 314.2 \rightarrow 220.2)
 添加濃度 : 0.01 mg/kg (セトキシジム換算)

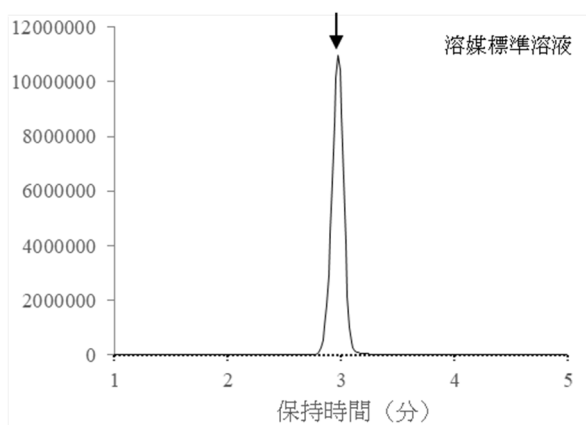
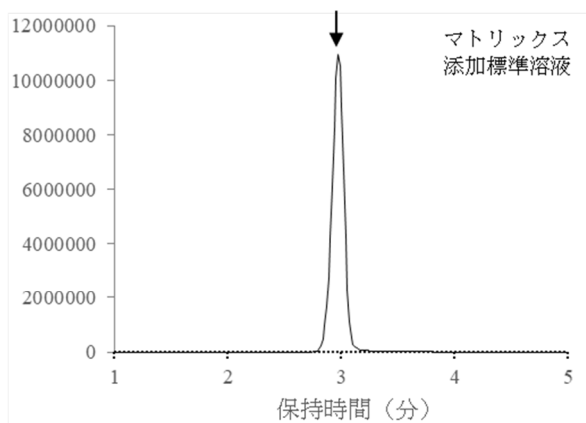
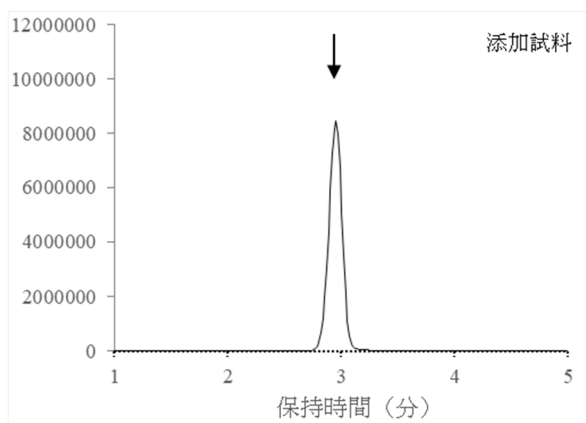
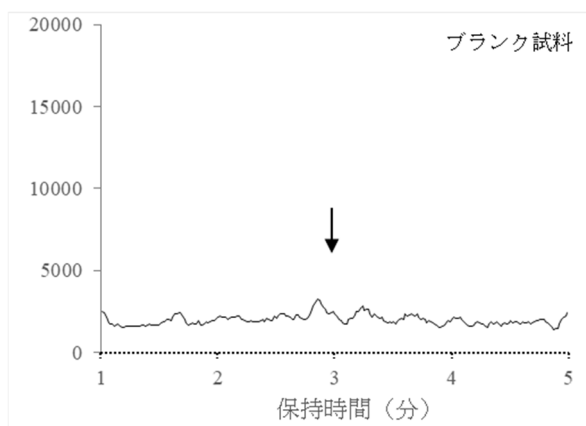


図23 牛の肝臓のSRMクロマトグラム [セトキシジム添加]
 (代謝物I : m/z 314.2 \rightarrow 220.2)
 添加濃度 : 0.1 mg/kg (セトキシジム換算)

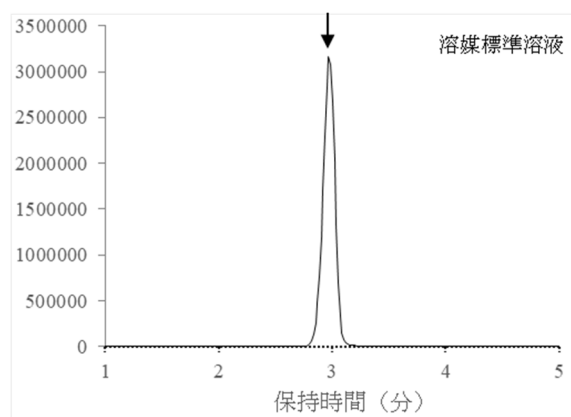
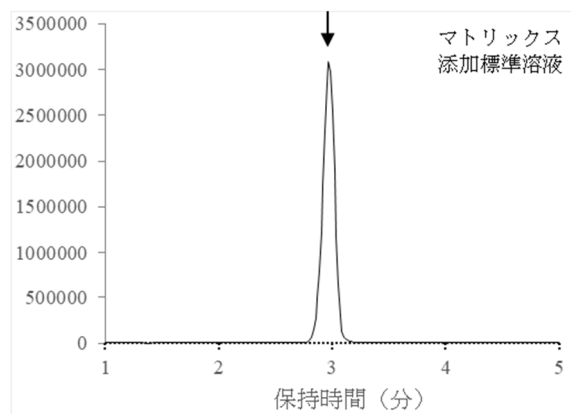
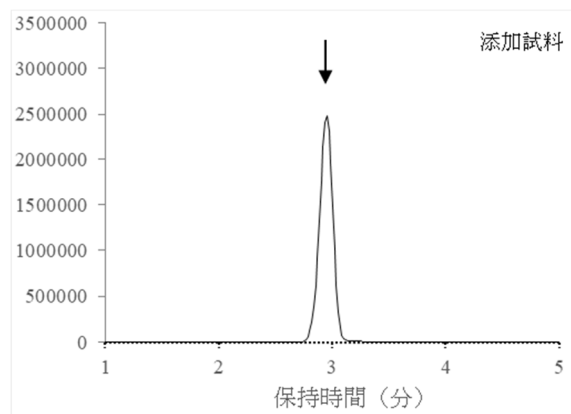
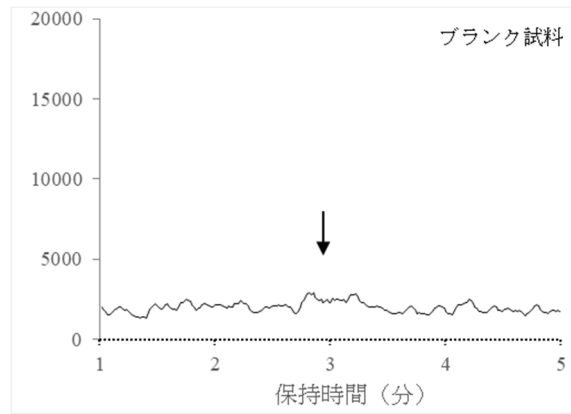


図24 牛乳のSRMクロマトグラム [セトキシジム添加]
 (代謝物I : m/z 314.2 \rightarrow 220.2)
 添加濃度 : 0.03 mg/kg (セトキシジム換算)

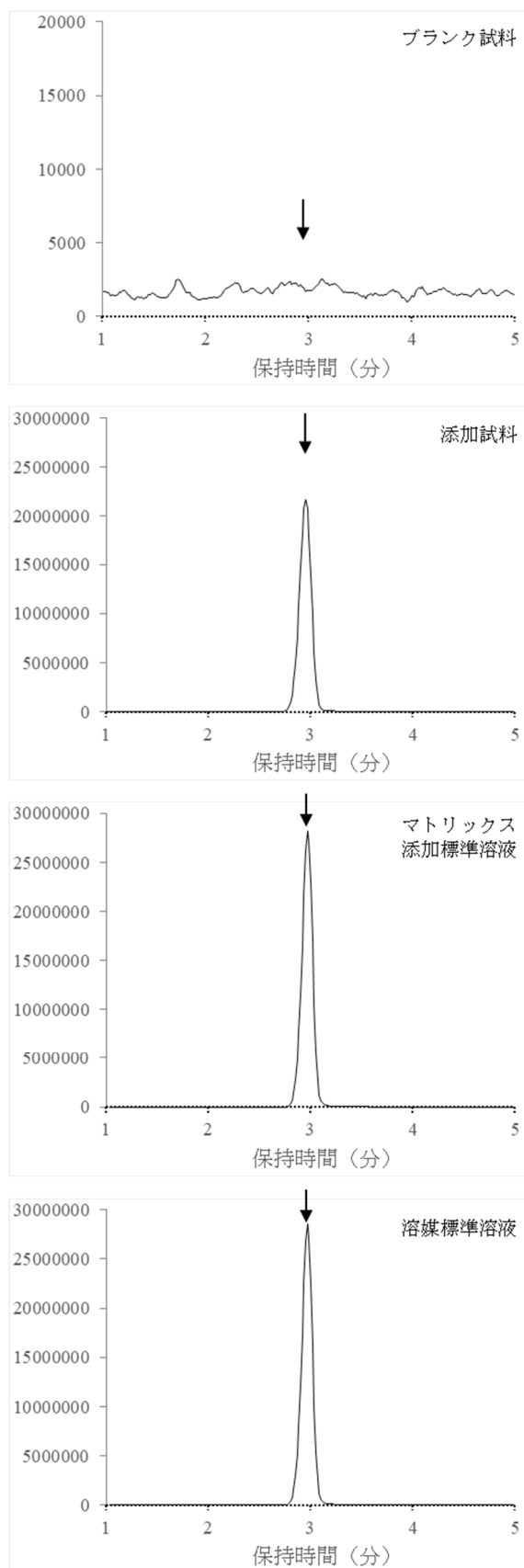


図25 鶏卵のSRMクロマトグラム [セトキシジム添加]
 (代謝物I : m/z 314.2 \rightarrow 220.2)
 添加濃度 : 0.3 mg/kg (セトキシジム換算)

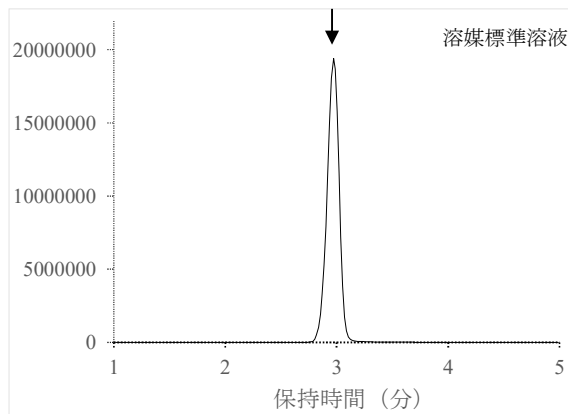
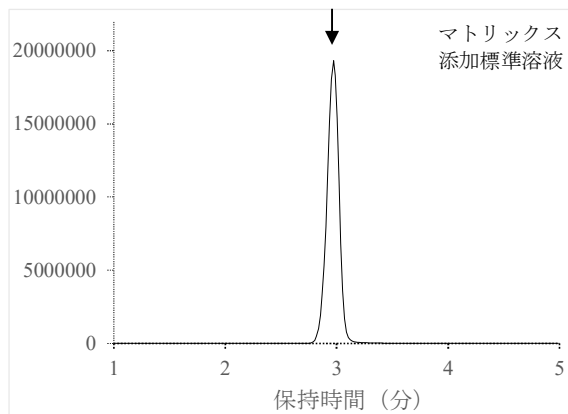
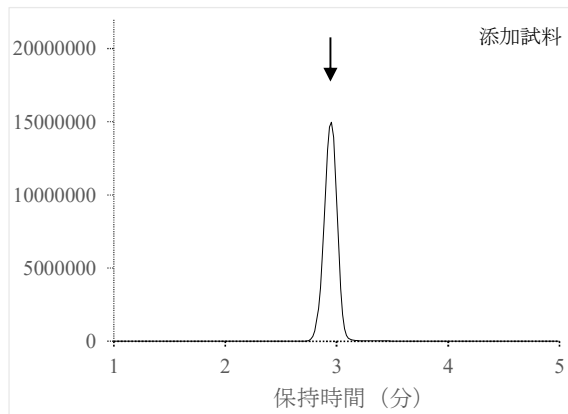
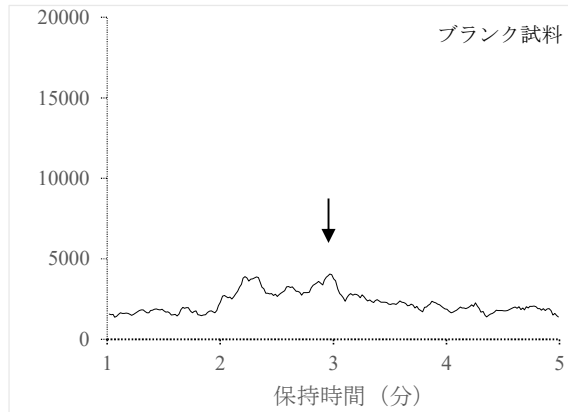


図26 うなぎのSRMクロマトグラム [セトキシジム添加]
 (代謝物I : m/z 314.2 \rightarrow 220.2)
 添加濃度 : 0.2 mg/kg (セトキシジム換算)

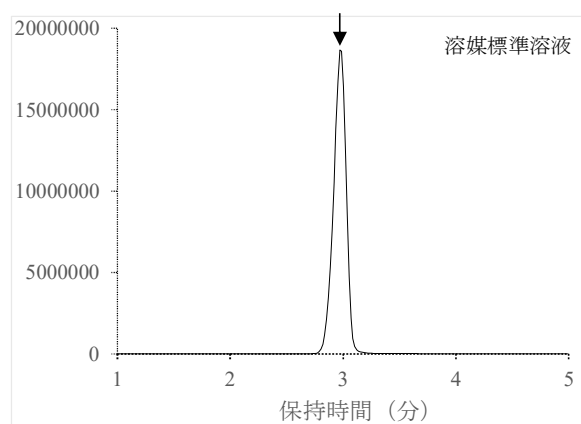
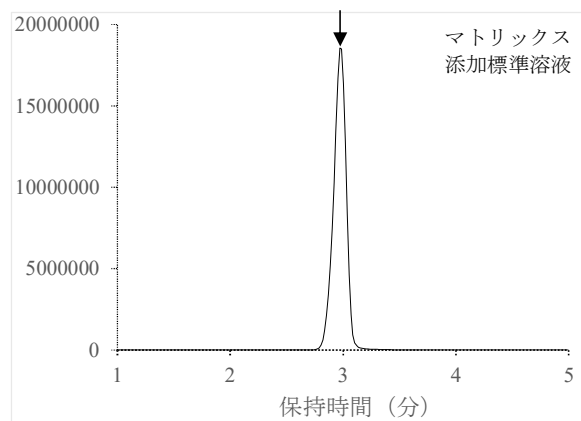
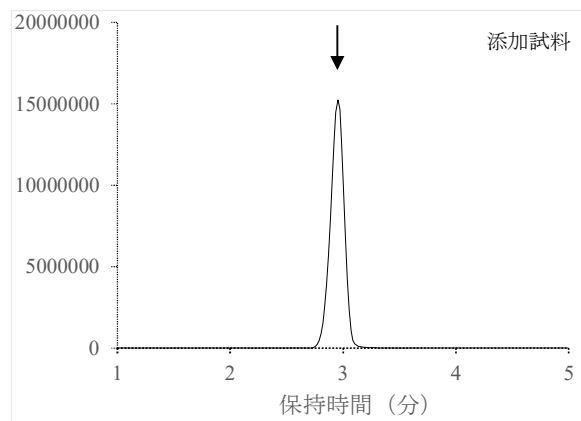
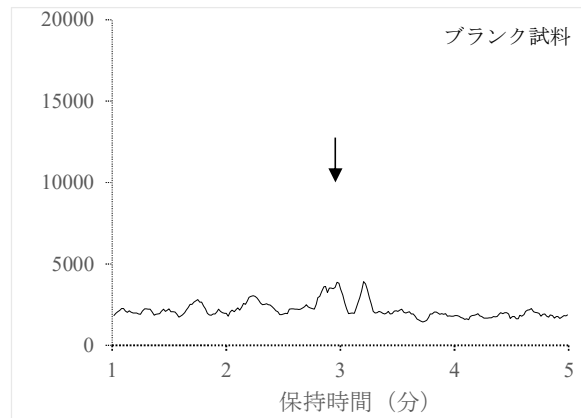


図27 しじみのSRMクロマトグラム [セトキシジム添加]

(代謝物I : m/z 314.2 \rightarrow 220.2)

添加濃度 : 0.2 mg/kg (セトキシジム換算)

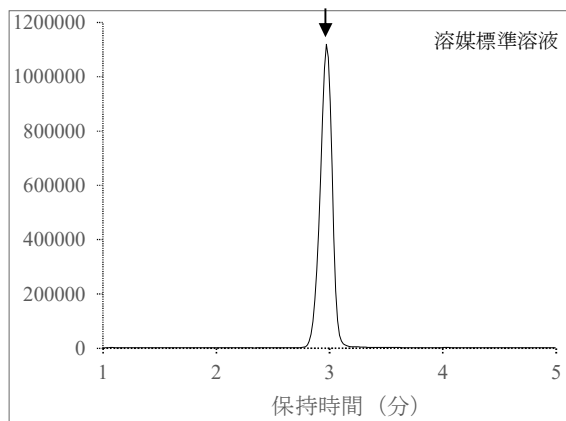
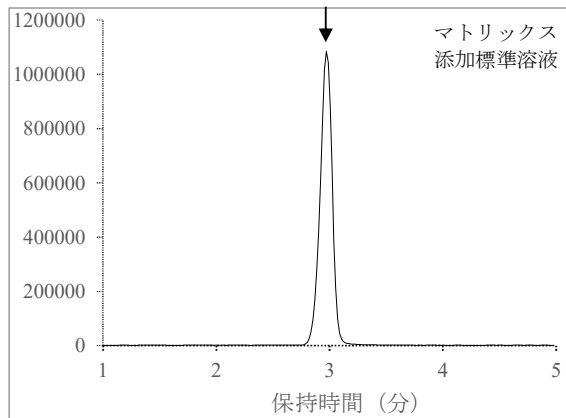
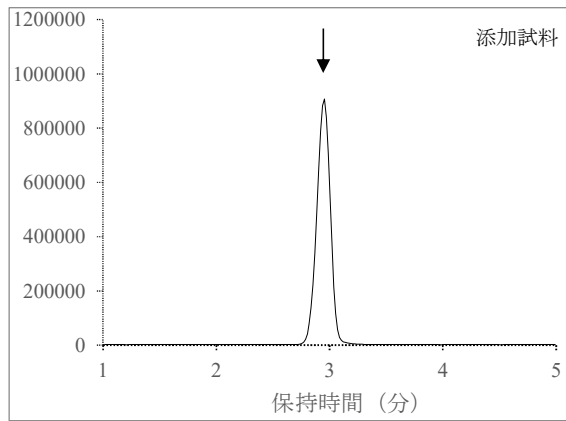
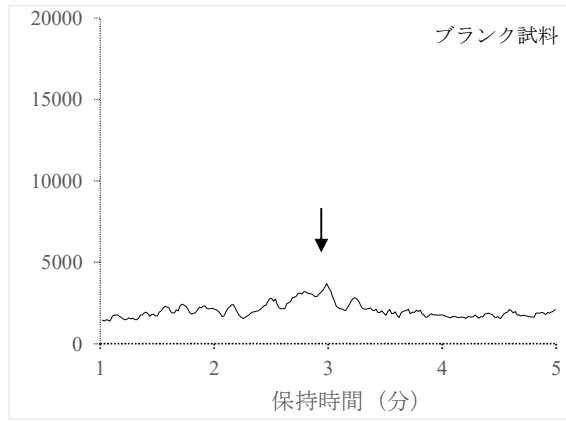


図28 牛の筋肉のSRMクロマトグラム [代謝物G添加]
 (代謝物I : m/z 314.2 \rightarrow 220.2)
 添加濃度 : 0.01 mg/kg (セトキシジム換算)

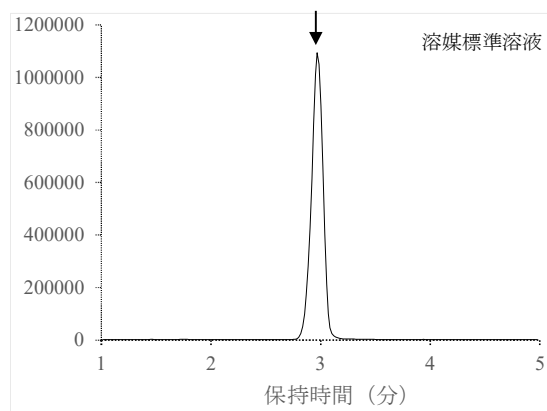
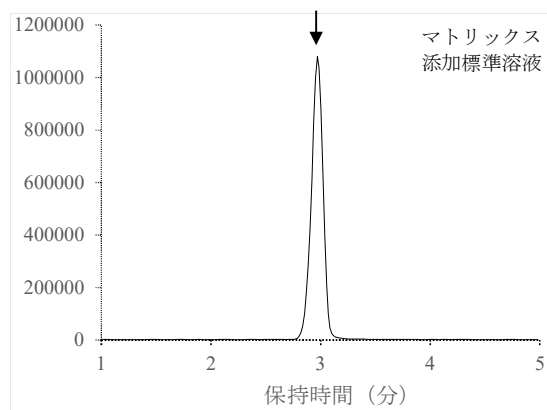
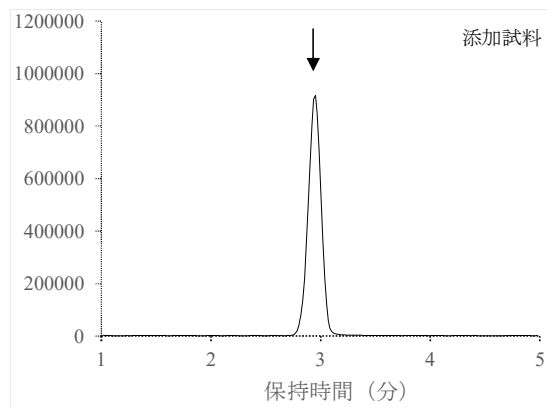
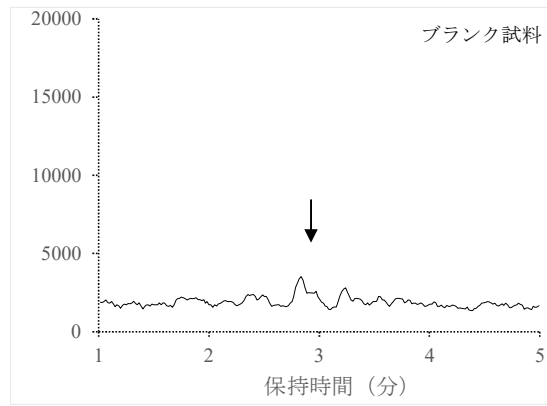


図29 牛の脂肪のSRMクロマトグラム [代謝物G添加]
 (代謝物I : m/z 314.2 \rightarrow 220.2)
 添加濃度 : 0.01 mg/kg (セトキシジム換算)

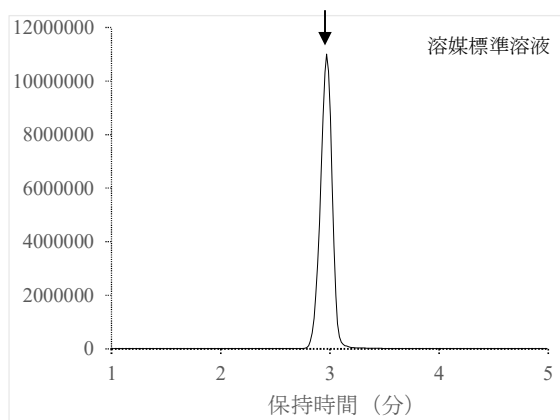
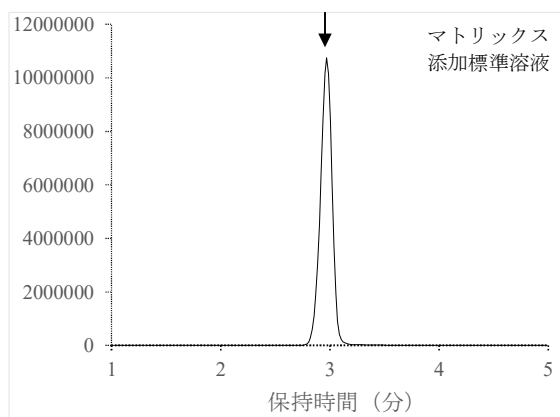
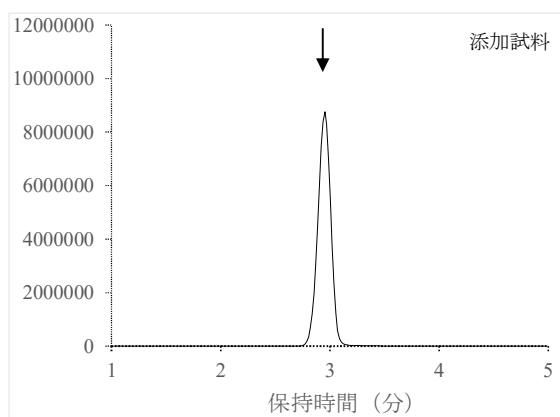
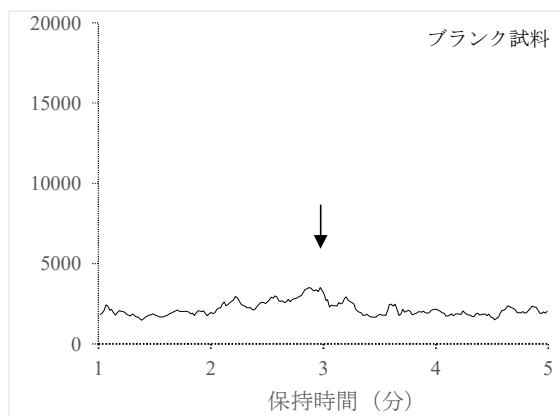


図30 牛の肝臓のSRMクロマトグラム [代謝物G添加]
 (代謝物I : m/z 314.2 \rightarrow 220.2)
 添加濃度 : 0.1 mg/kg (セトキシジム換算)

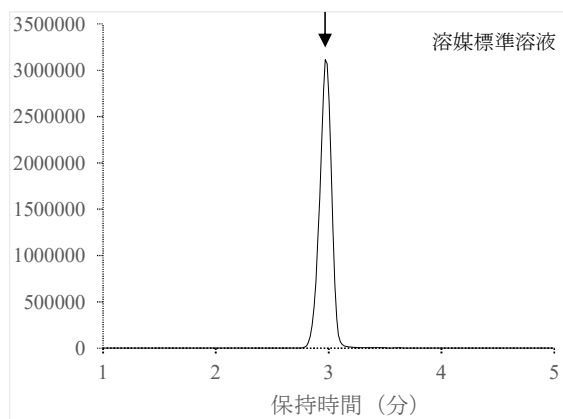
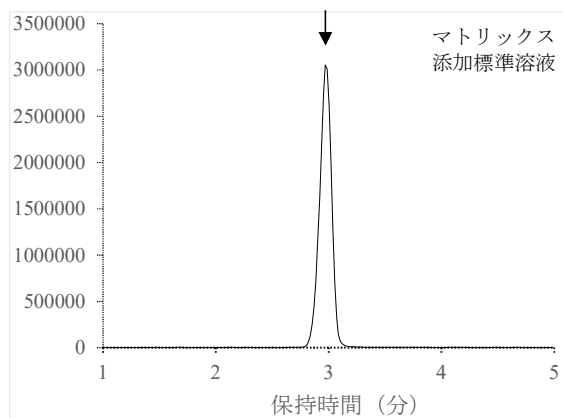
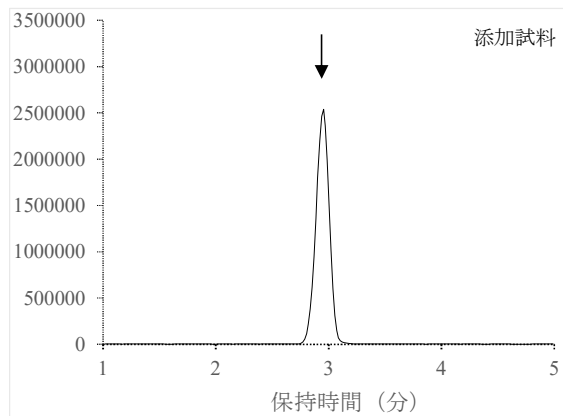
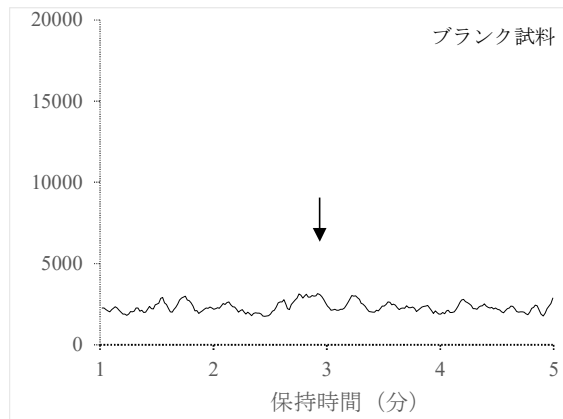


図31 牛乳のSRMクロマトグラム [代謝物G添加]
 (代謝物I : m/z 314.2 \rightarrow 220.2)
 添加濃度 : 0.03 mg/kg (セトキシジム換算)

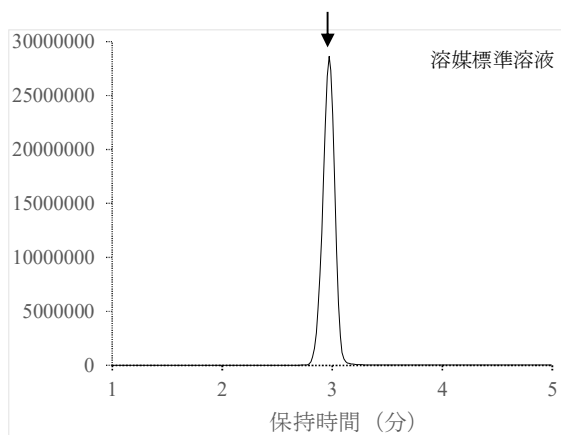
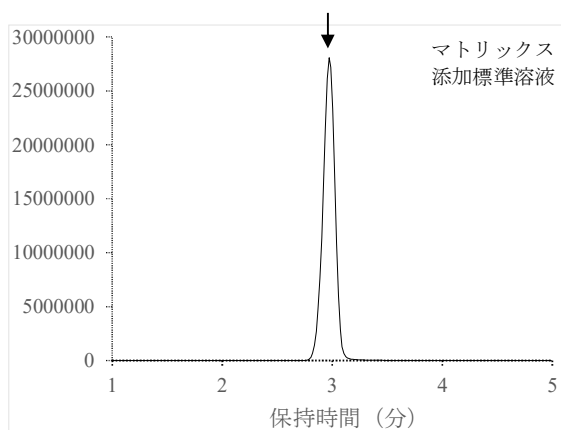
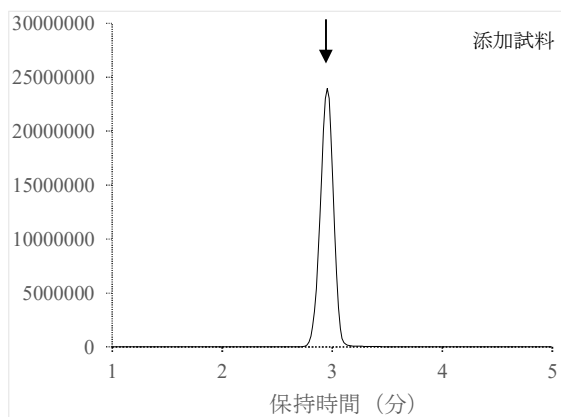
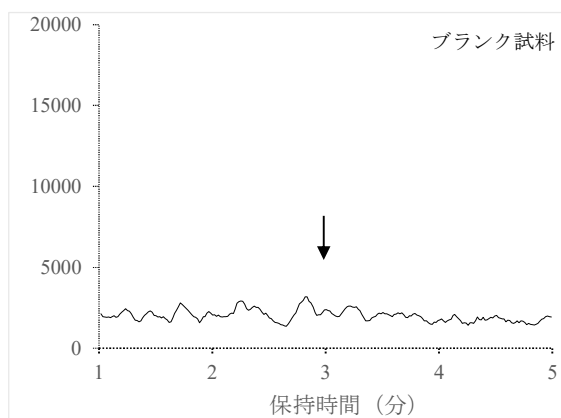


図32 鶏卵のSRMクロマトグラム [代謝物G添加]

(代謝物I : m/z 314.2→220.2)

添加濃度 : 0.3 mg/kg (セトキシジム換算)

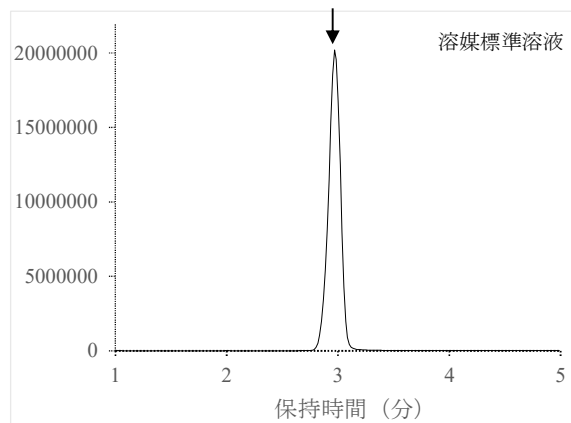
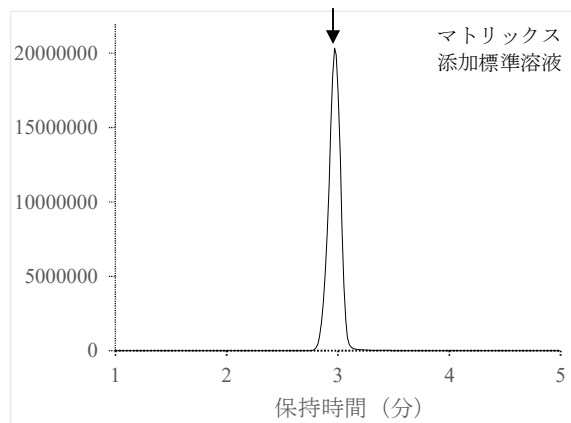
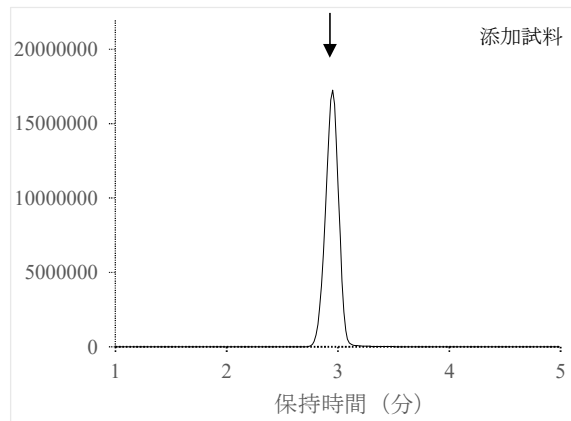
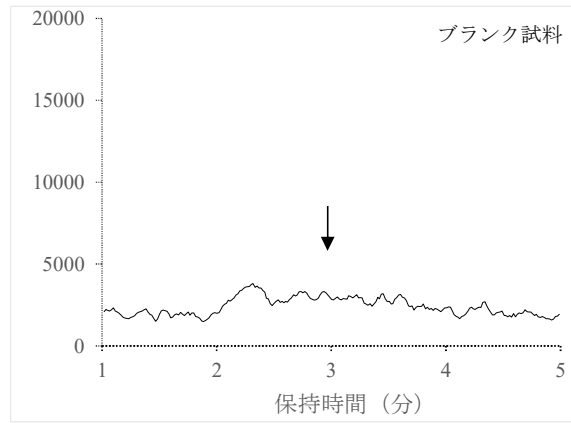


図33 うなぎのSRMクロマトグラム [代謝物G添加]
 (代謝物I : m/z 314.2 \rightarrow 220.2)
 添加濃度 : 0.2 mg/kg (セトキシジム換算)

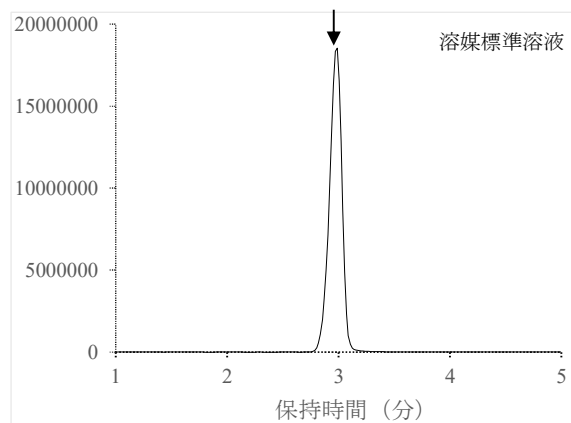
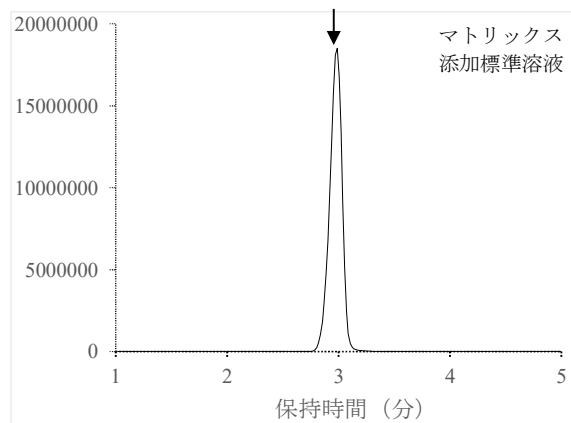
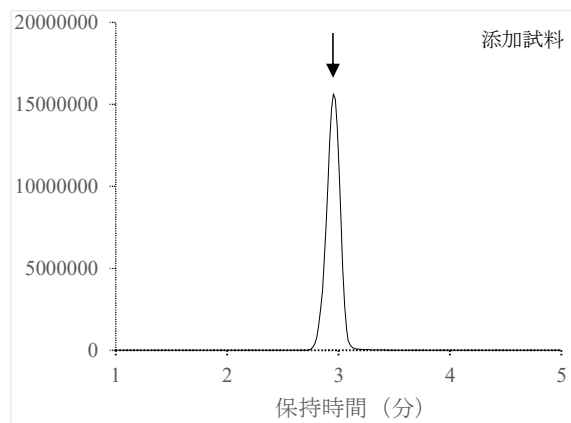
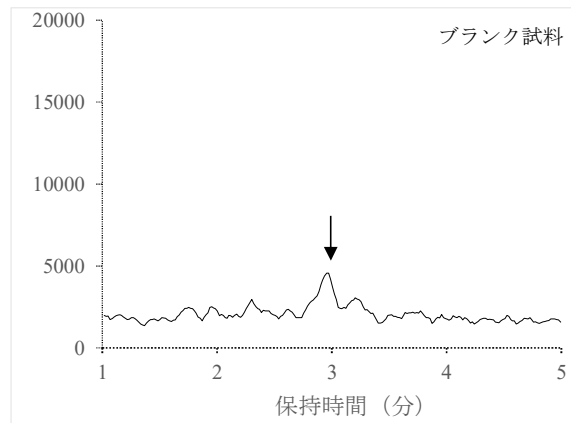


図34 しじみのSRMクロマトグラム [代謝物G添加]
 (代謝物I : m/z 314.2 \rightarrow 220.2)
 添加濃度 : 0.2 mg/kg (セトキシジム換算)

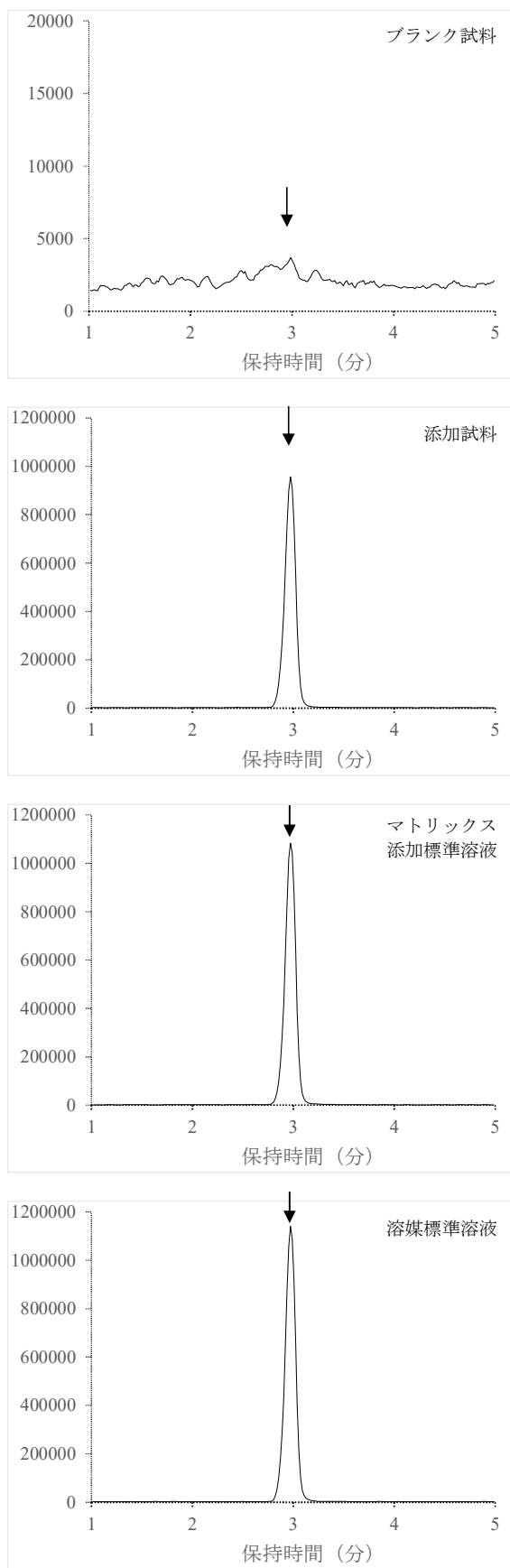


図35 牛の筋肉のSRMクロマトグラム [代謝物I添加]
 (代謝物I : m/z 314.2 \rightarrow 220.2)
 添加濃度 : 0.01 mg/kg (セトキシジム換算)

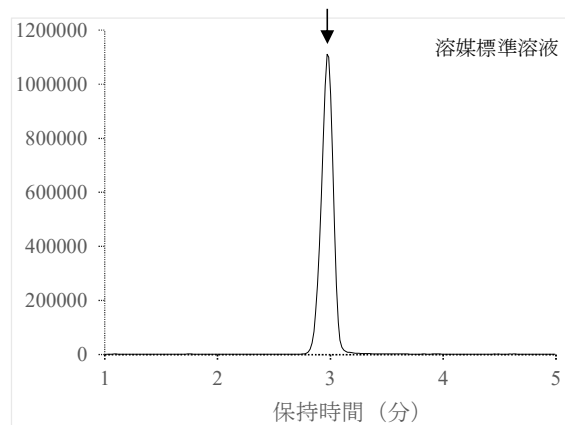
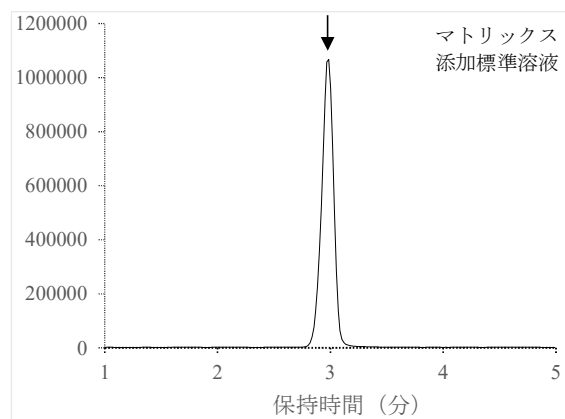
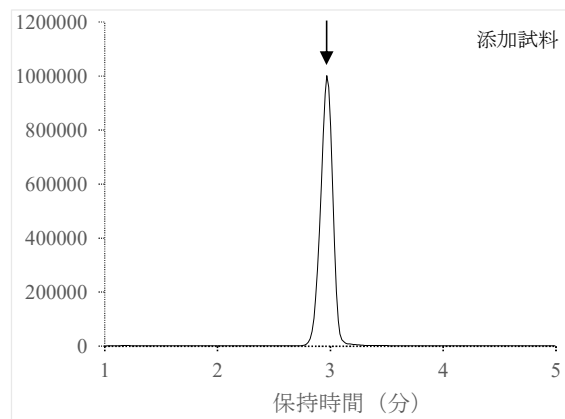
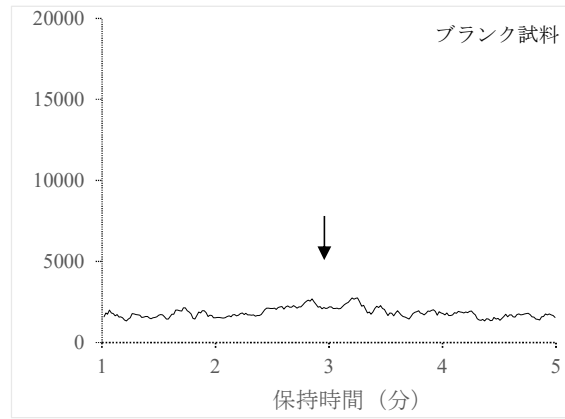


図36 牛の脂肪のSRMクロマトグラム [代謝物I添加]
 (代謝物I : m/z 314.2 \rightarrow 220.2)
 添加濃度 : 0.01 mg/kg (セトキシジム換算)

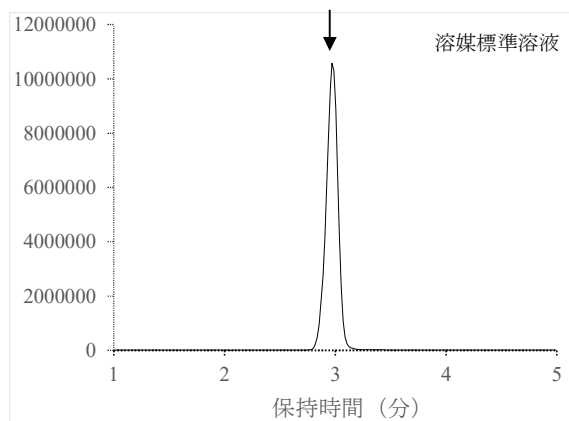
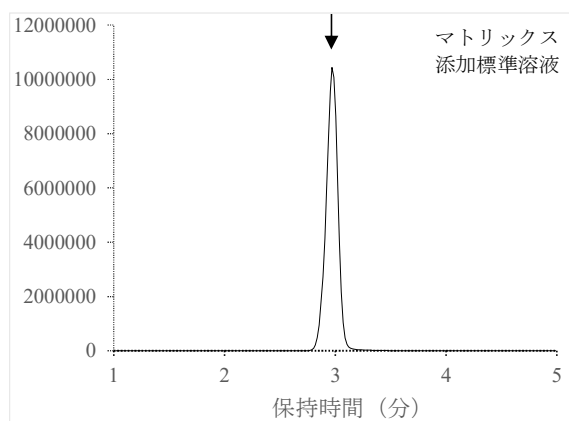
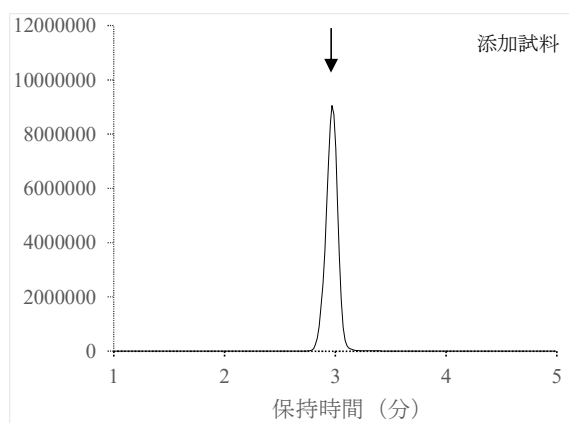
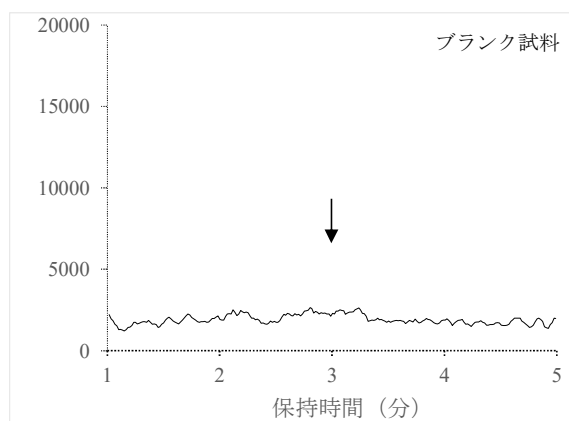


図37 牛の肝臓のSRMクロマトグラム [代謝物I添加]

(代謝物I : m/z 314.2→220.2)

添加濃度 : 0.1 mg/kg (セトキシジム換算)

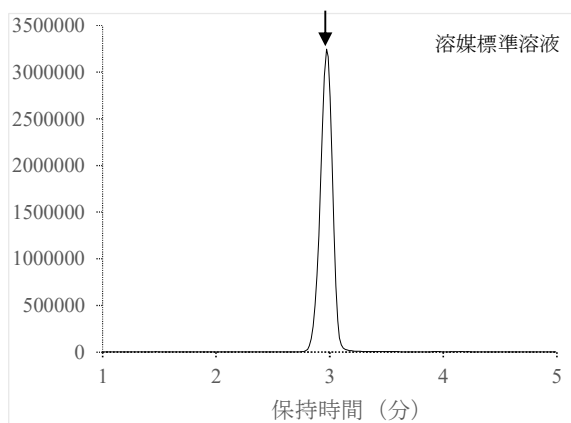
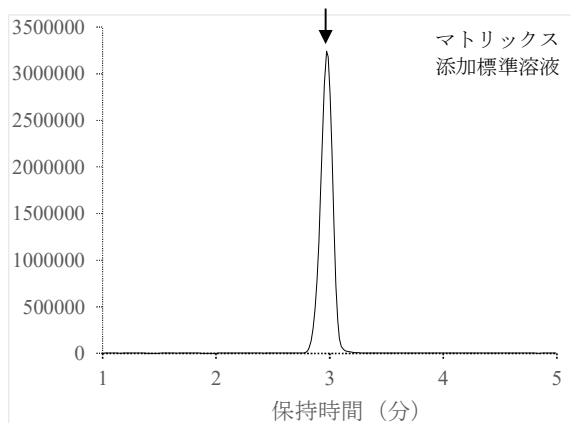
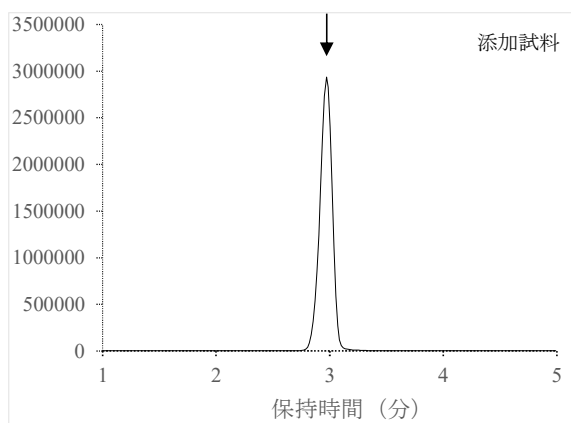
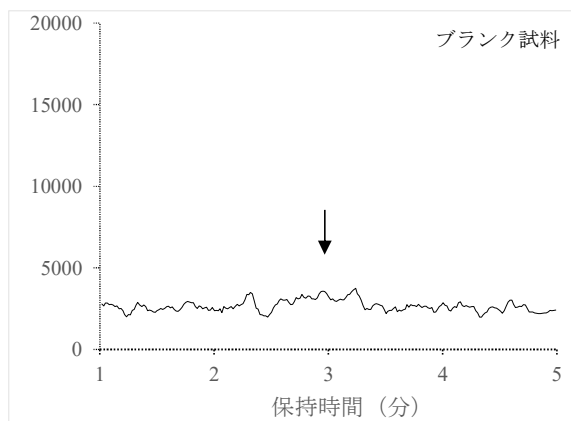


図38 牛乳のSRMクロマトグラム [代謝物I添加]
 (代謝物I : m/z 314.2 \rightarrow 220.2)
 添加濃度 : 0.03 mg/kg (セトキシジム換算)

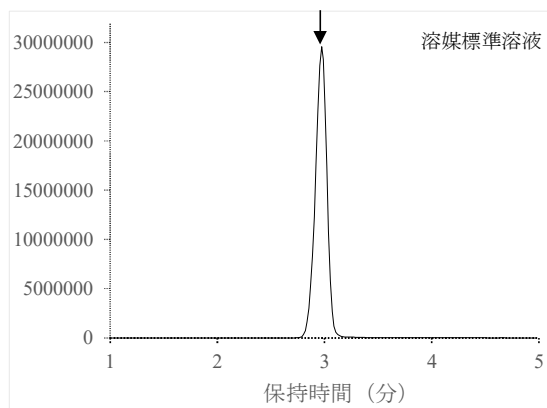
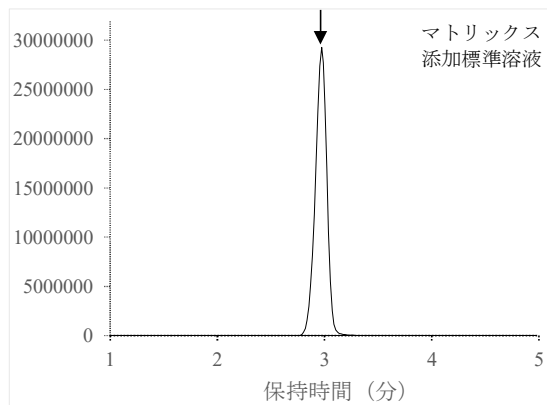
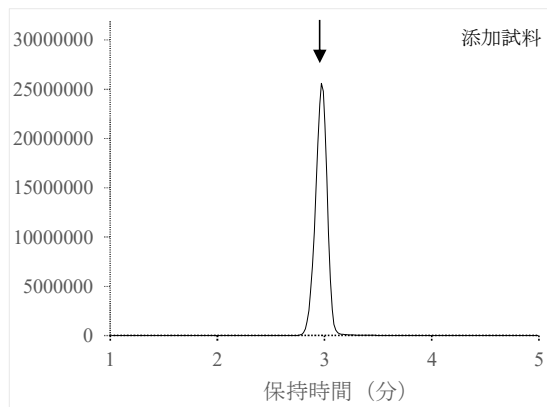
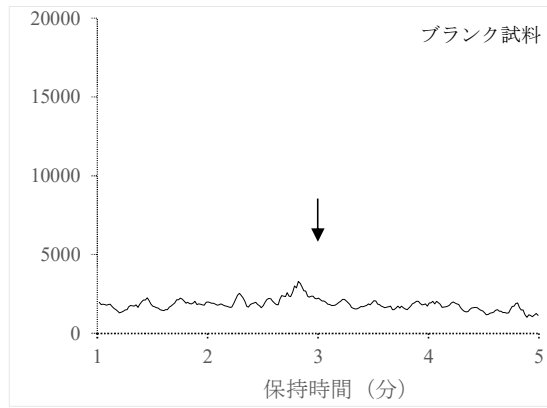


図39 鶏卵のSRMクロマトグラム [代謝物I添加]

(代謝物I : m/z 314.2 \rightarrow 220.2)

添加濃度 : 0.3 mg/kg (セトキシジム換算)

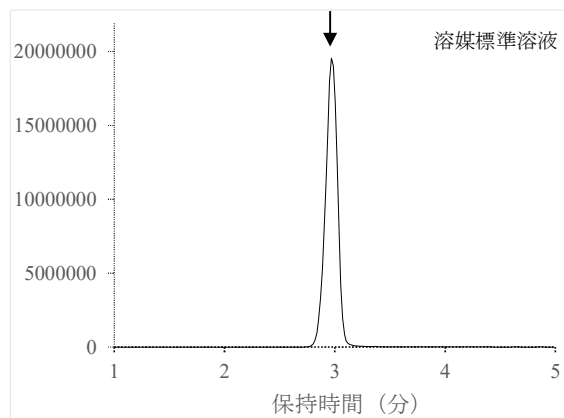
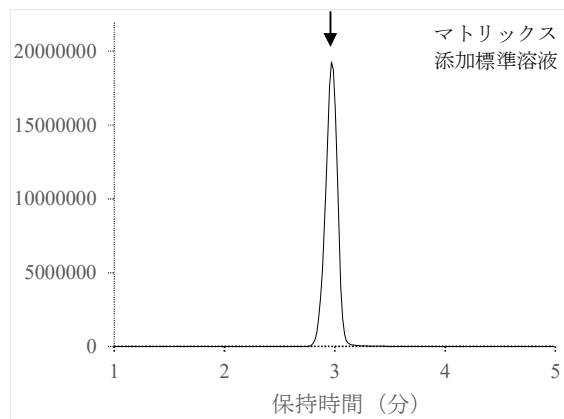
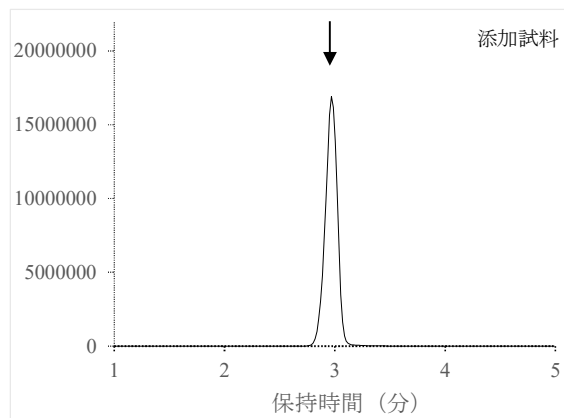
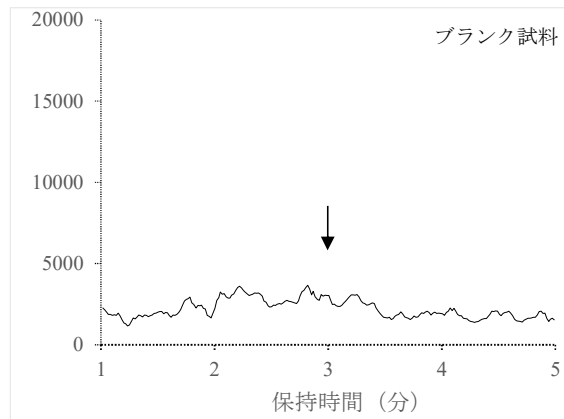


図40 うなぎのSRMクロマトグラム [代謝物I添加]
 (代謝物I : m/z 314.2→220.2)
 添加濃度 : 0.2 mg/kg (セトキシジム換算)

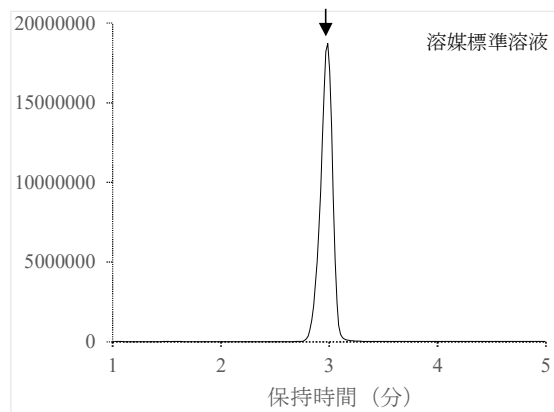
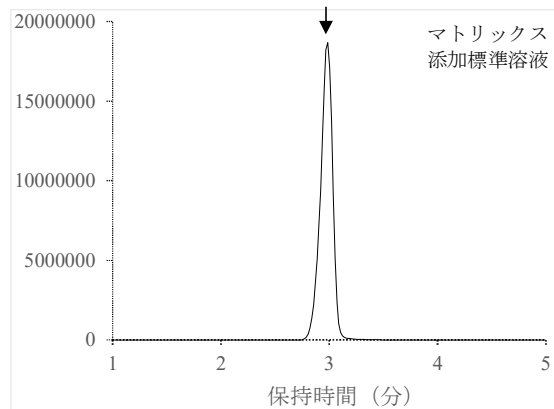
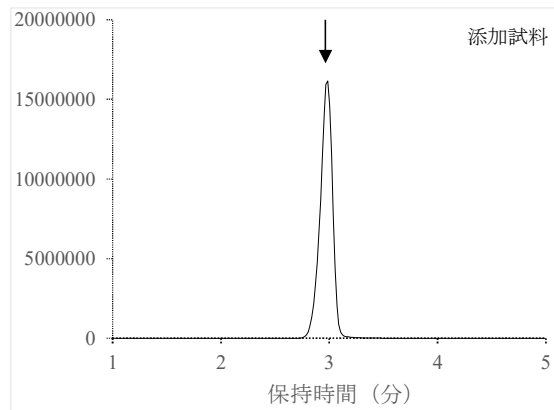
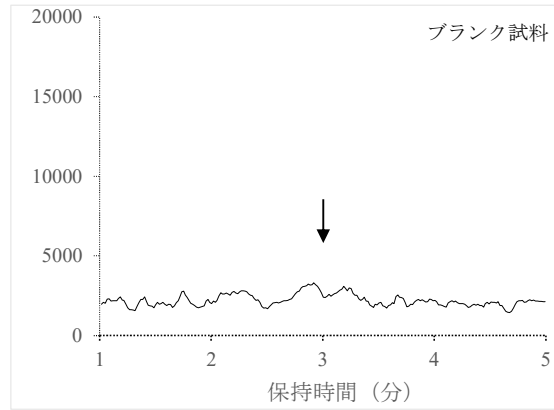


図41 しじみのSRMクロマトグラム [代謝物I添加]
 (代謝物I : m/z 314.2 \rightarrow 220.2)
 添加濃度 : 0.2 mg/kg (セトキシジム換算)

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）

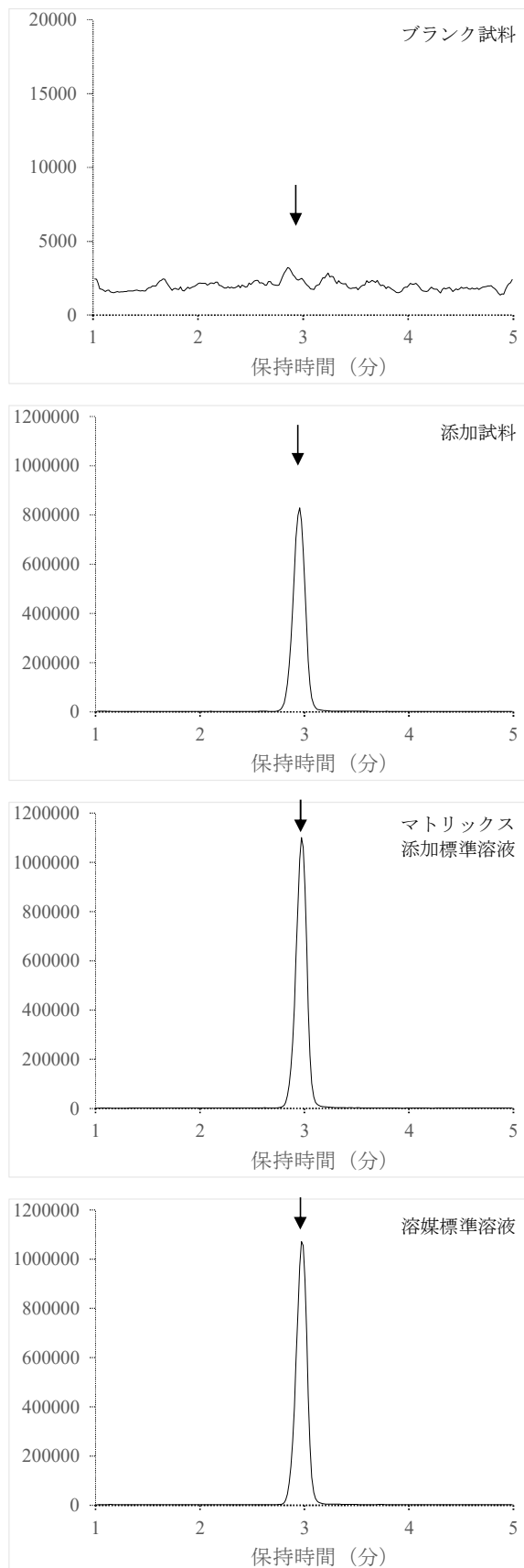


図42 牛の肝臓のSRMクロマトグラム [セトキシジム添加]
(代謝物I : m/z 314.2 \rightarrow 220.2)
添加濃度 : 0.01 mg/kg (セトキシジム換算)

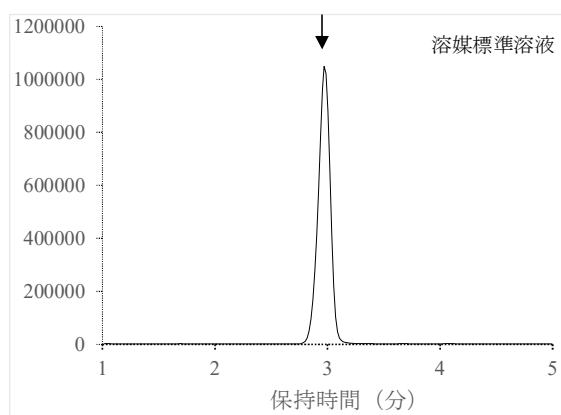
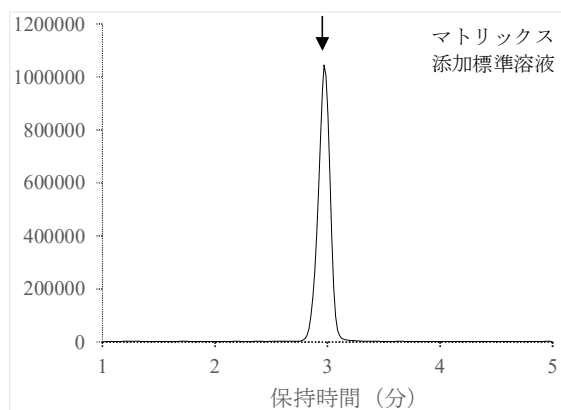
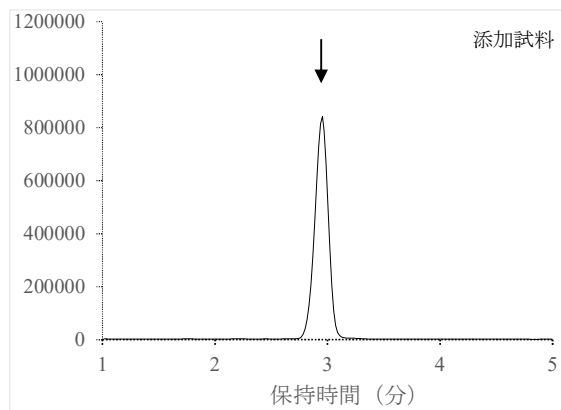
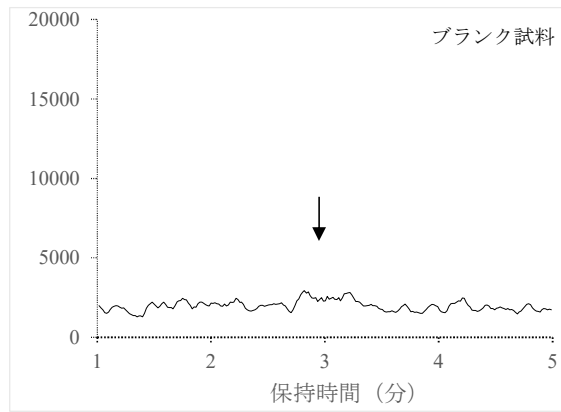


図43 牛乳のSRMクロマトグラム [セトキシジム添加]
 (代謝物I : m/z 314.2 \rightarrow 220.2)
 添加濃度 : 0.01 mg/kg (セトキシジム換算)

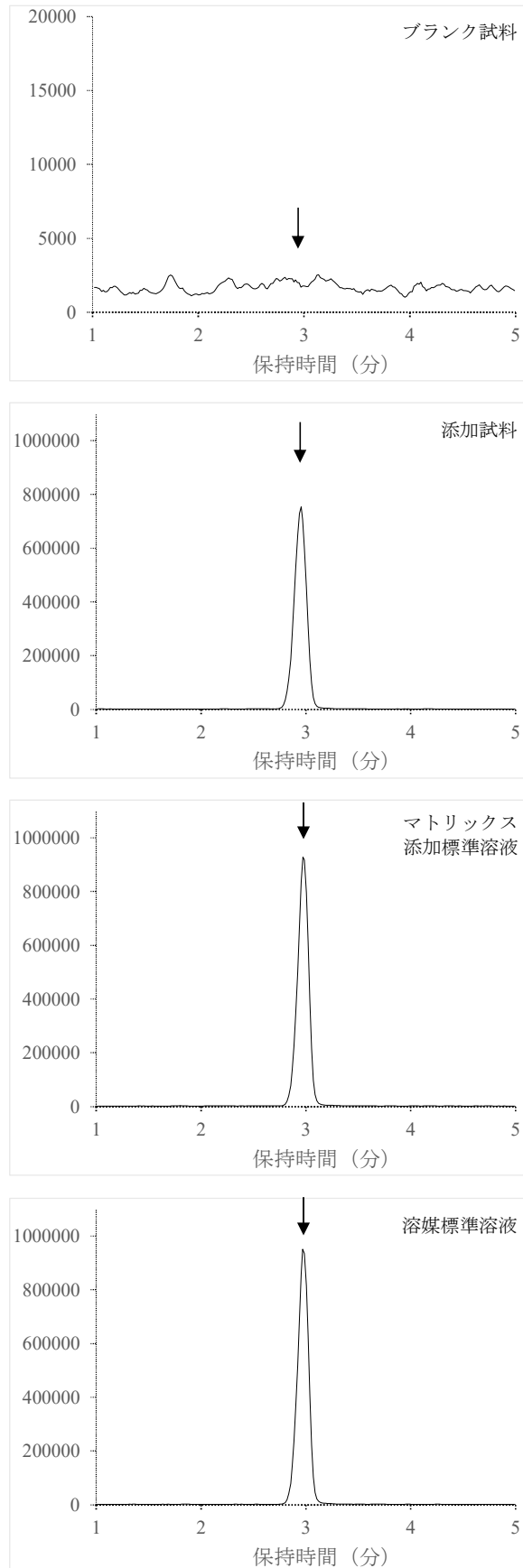


図44 鶏卵のSRMクロマトグラム [セトキシジム添加]
 (代謝物I : m/z 314.2 \rightarrow 220.2)
 添加濃度 : 0.01 mg/kg (セトキシジム換算)

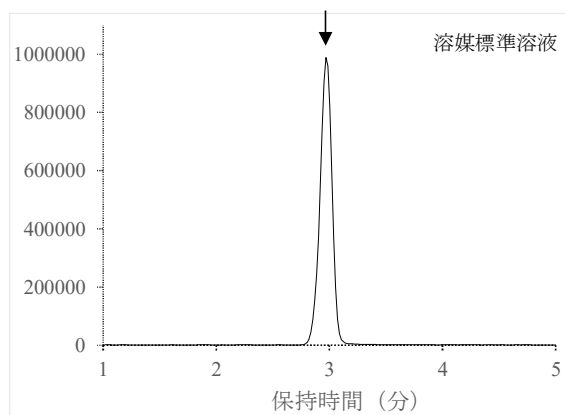
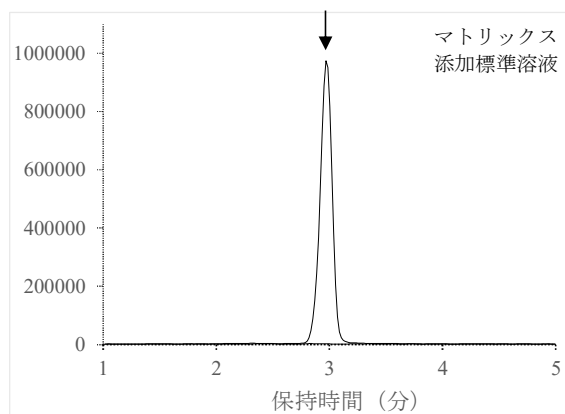
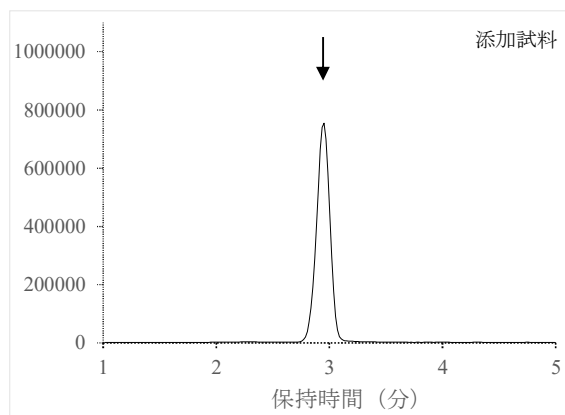
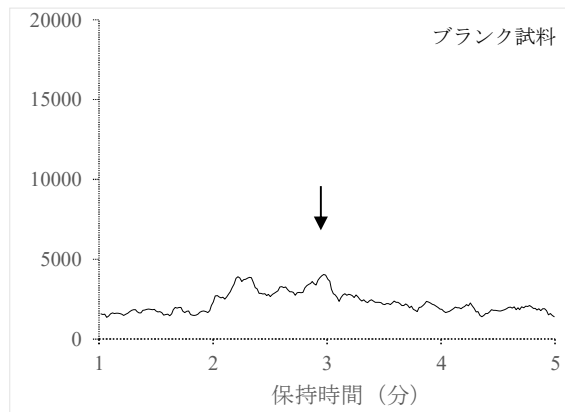


図45 うなぎのSRMクロマトグラム [セトキシジム添加]
 (代謝物I: m/z 314.2 \rightarrow 220.2)
 添加濃度: 0.01 mg/kg (セトキシジム換算)

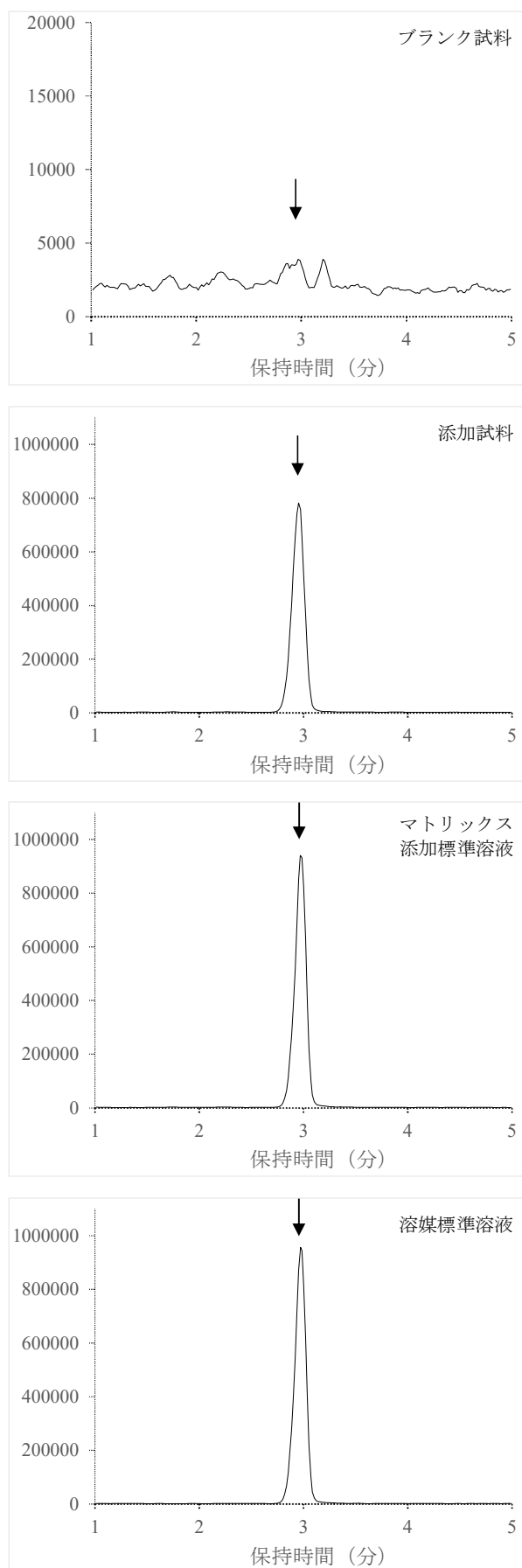


図46 しじみのSRMクロマトグラム [セトキシジム添加]
 (代謝物I : m/z 314.2 \rightarrow 220.2)
 添加濃度 : 0.01 mg/kg (セトキシジム換算)

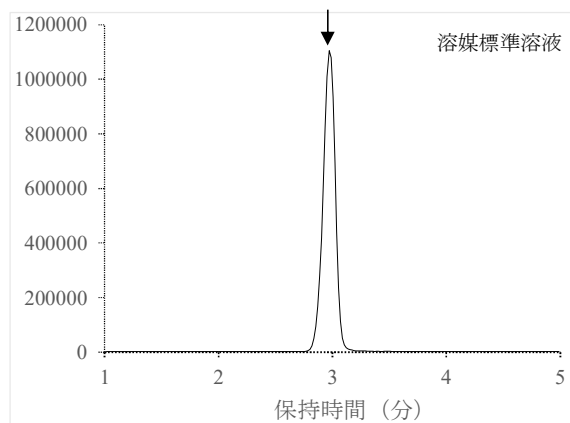
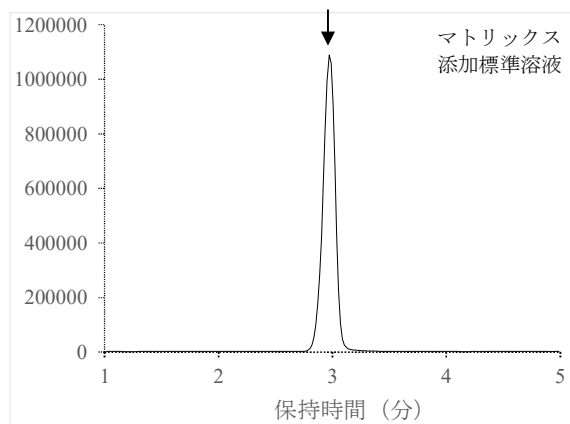
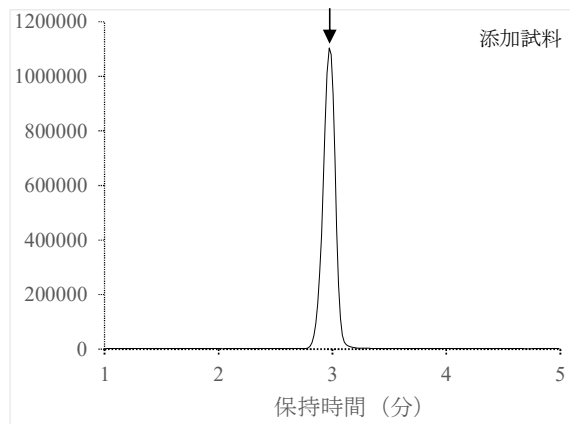
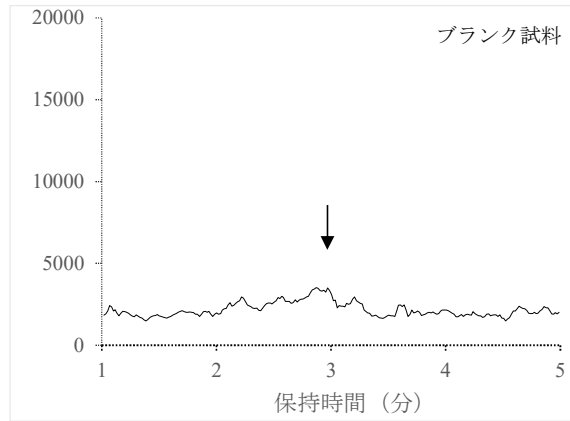


図47 牛の肝臓のSRMクロマトグラム [代謝物G添加]
 (代謝物I : m/z 314.2 \rightarrow 220.2)
 添加濃度 : 0.01 mg/kg (セトキシジム換算)

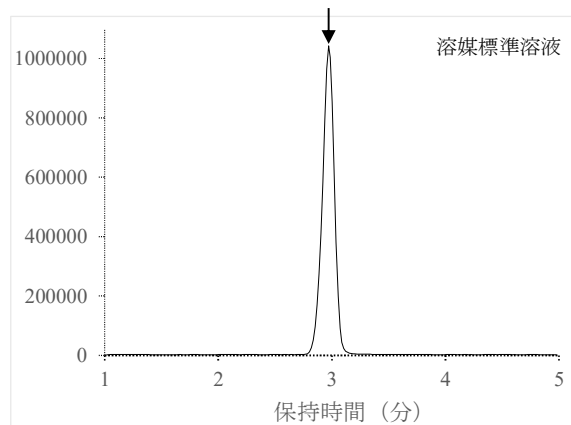
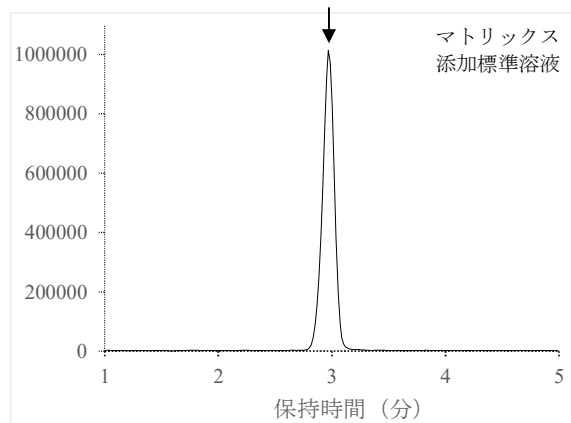
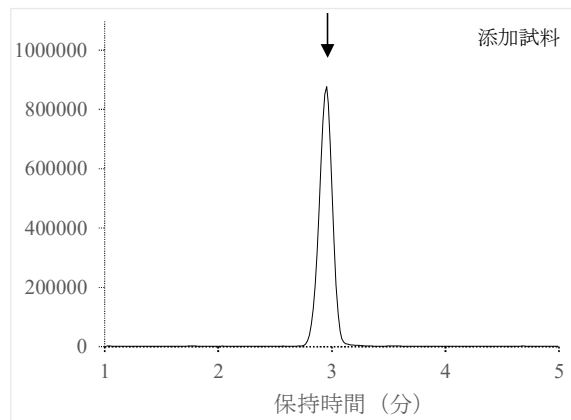
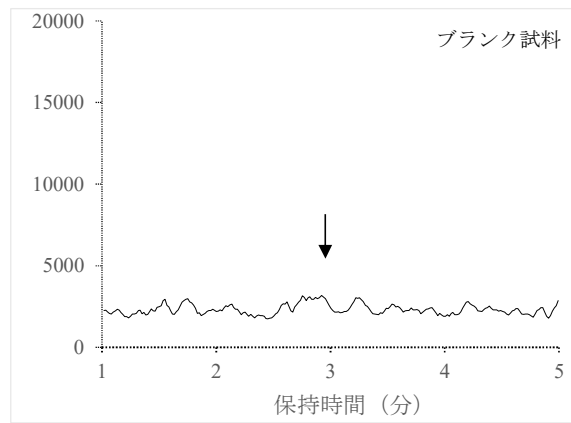


図48 牛乳のSRMクロマトグラム [代謝物G添加]
 (代謝物I : m/z 314.2 \rightarrow 220.2)
 添加濃度 : 0.01 mg/kg (セトキシジム換算)

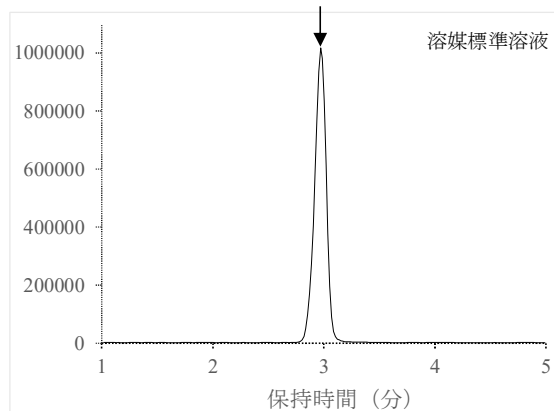
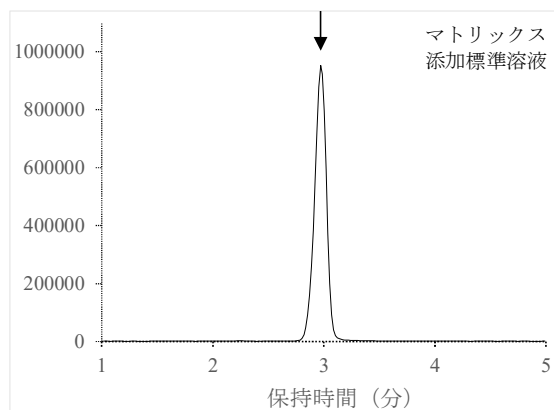
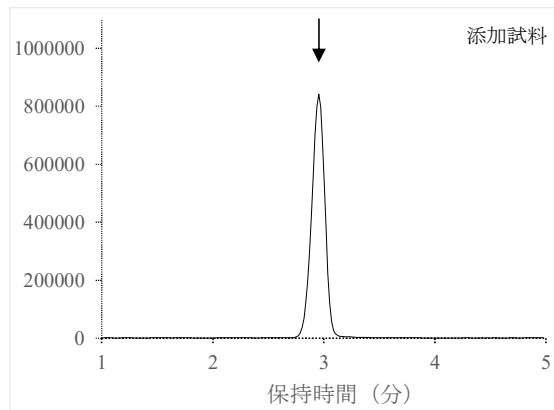
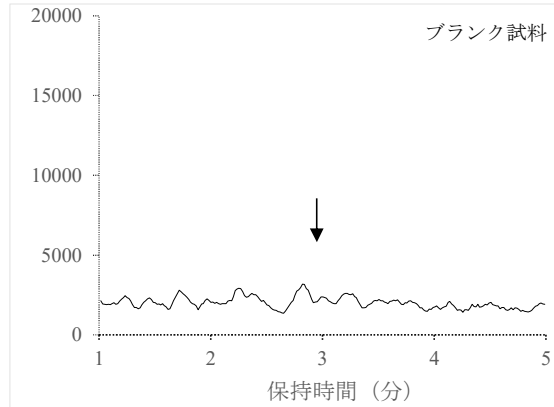


図49 鶏卵のSRMクロマトグラム [代謝物G添加]
 (代謝物I : m/z 314.2→220.2)
 添加濃度 : 0.01 mg/kg (セトキシジム換算)

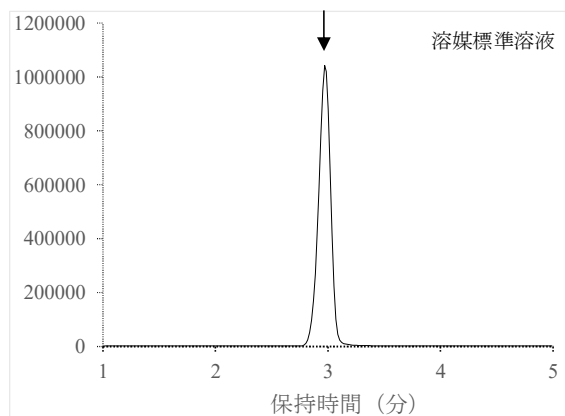
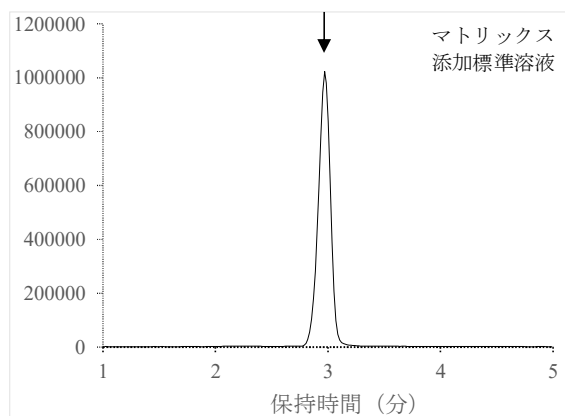
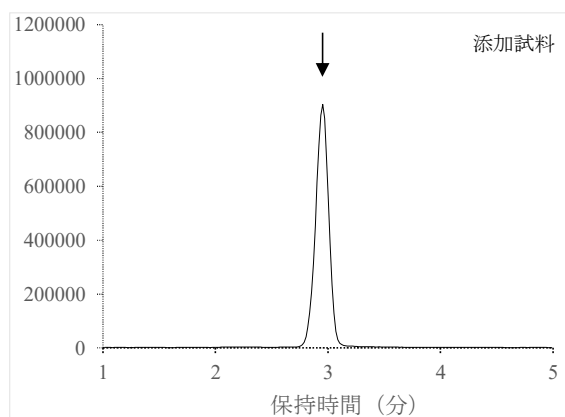
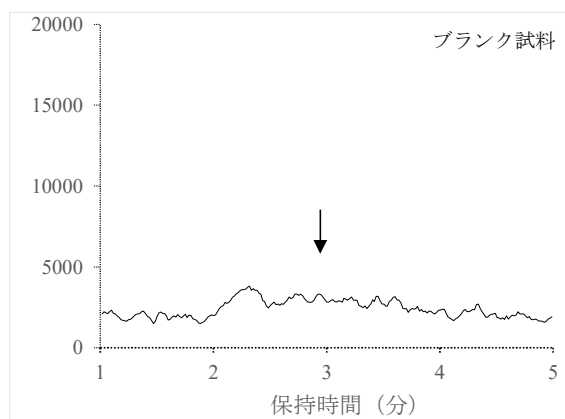


図50 うなぎのSRMクロマトグラム [代謝物G添加]
 (代謝物I : m/z 314.2 \rightarrow 220.2)
 添加濃度 : 0.01 mg/kg (セトキシジム換算)

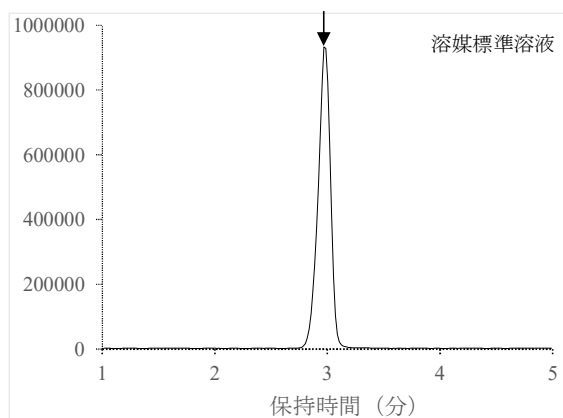
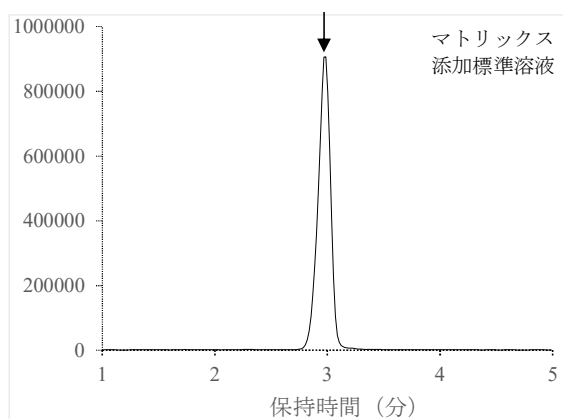
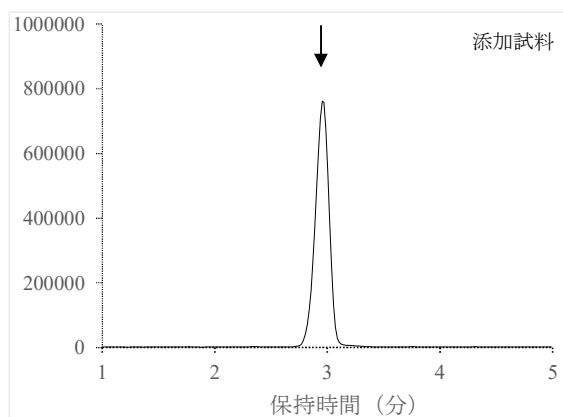
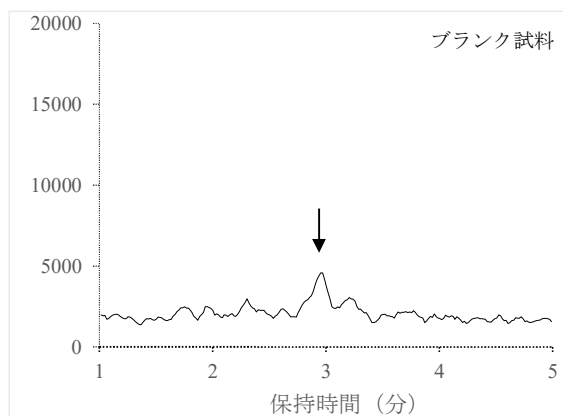


図51 しじみのSRMクロマトグラム [代謝物G添加]
 (代謝物I : m/z 314.2 \rightarrow 220.2)
 添加濃度 : 0.01 mg/kg (セトキシジム換算)

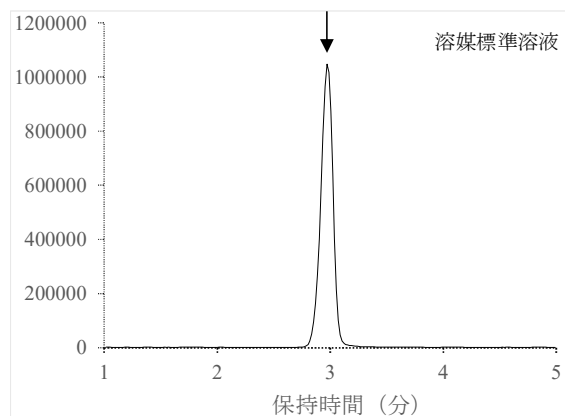
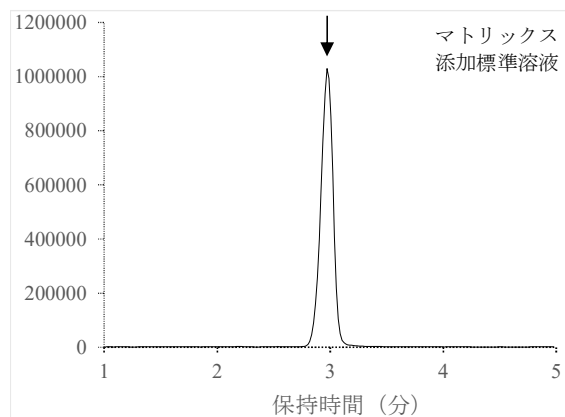
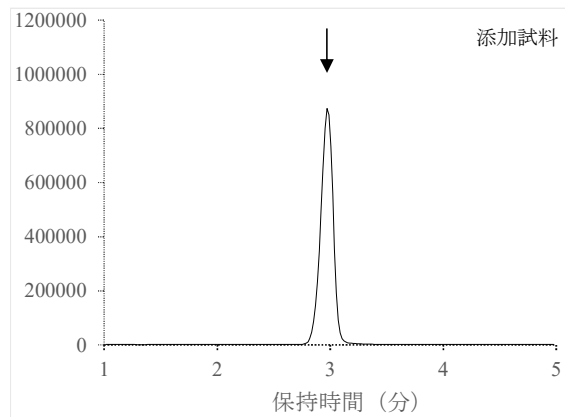
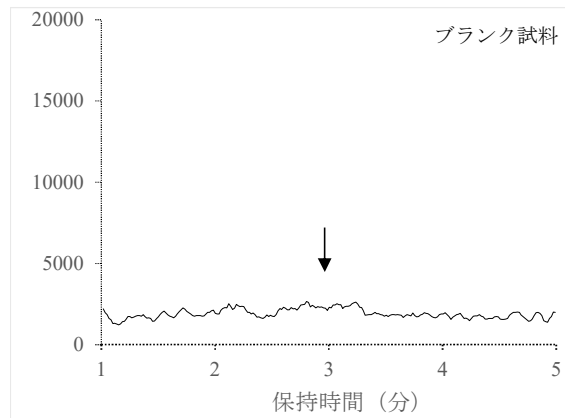


図52 牛の肝臓のSRMクロマトグラム [代謝物I添加]
 (代謝物I : m/z 314.2→220.2)
 添加濃度 : 0.01 mg/kg (セトキシジム換算)

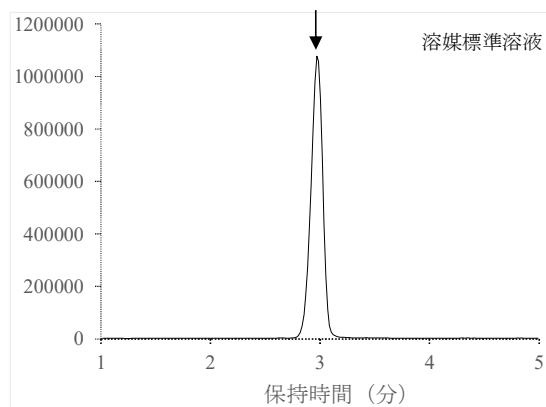
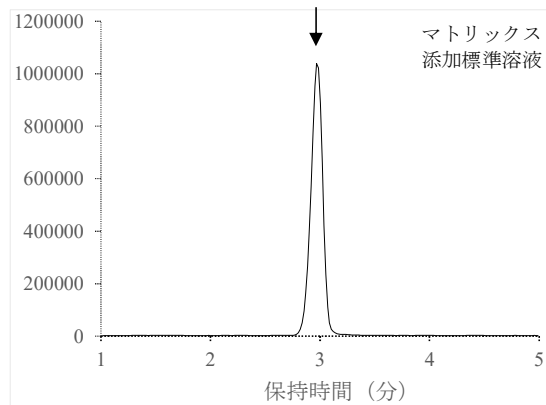
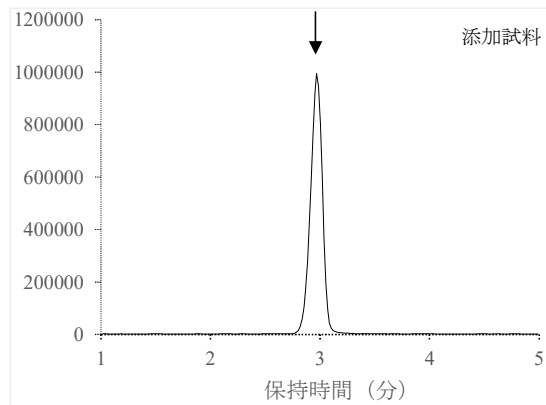
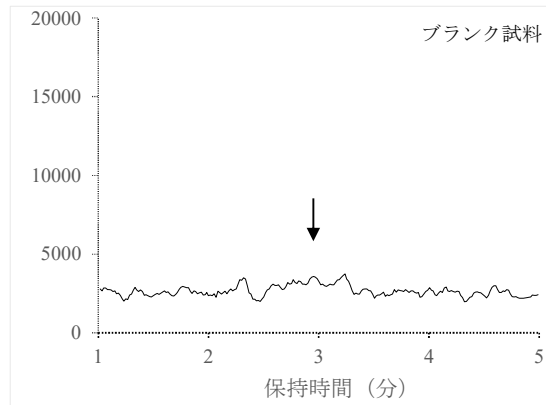


図53 牛乳のSRMクロマトグラム [代謝物I添加]
 (代謝物I : m/z 314.2→220.2)
 添加濃度 : 0.01 mg/kg (セトキシジム換算)

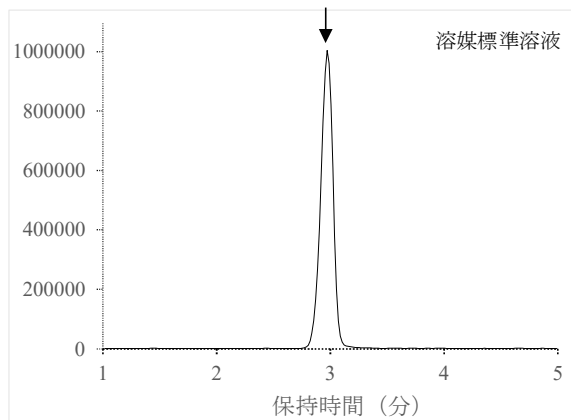
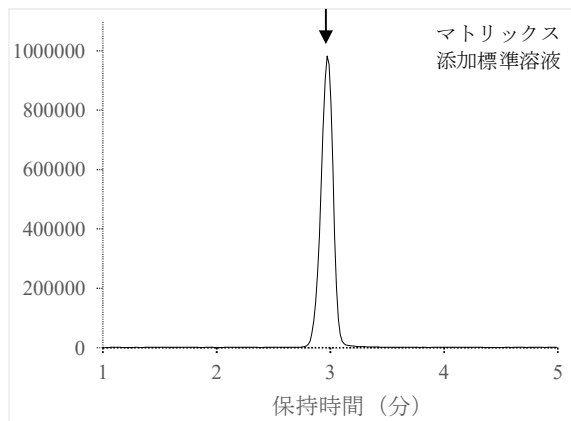
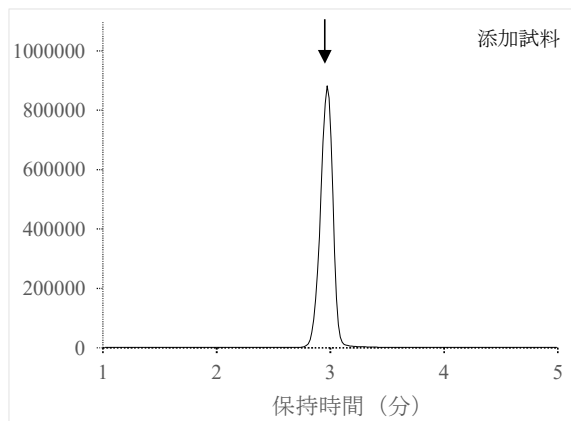
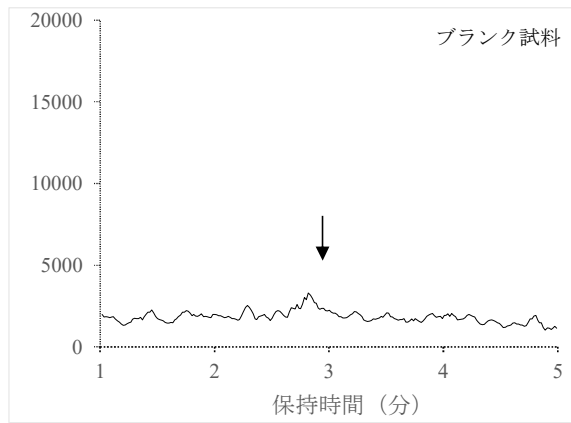


図54 鶏卵のSRMクロマトグラム [代謝物I添加]
 (代謝物I : m/z 314.2 \rightarrow 220.2)
 添加濃度 : 0.01 mg/kg (セトキシジム換算)

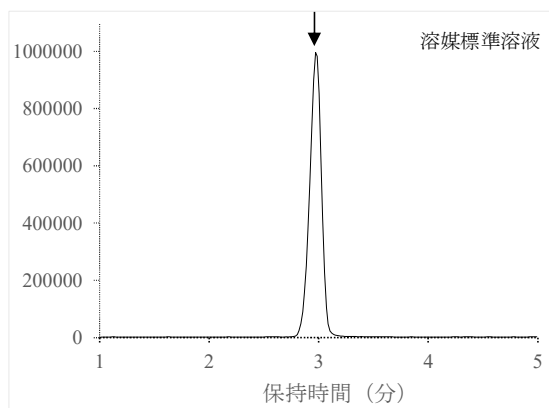
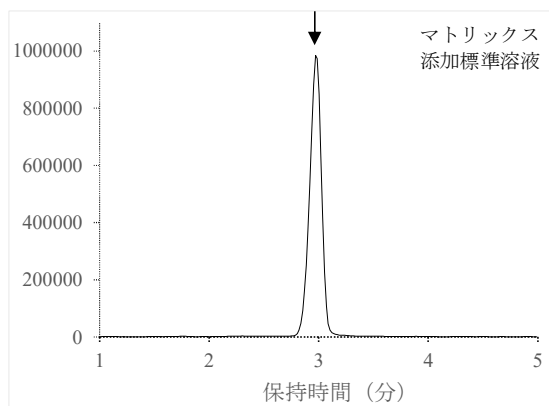
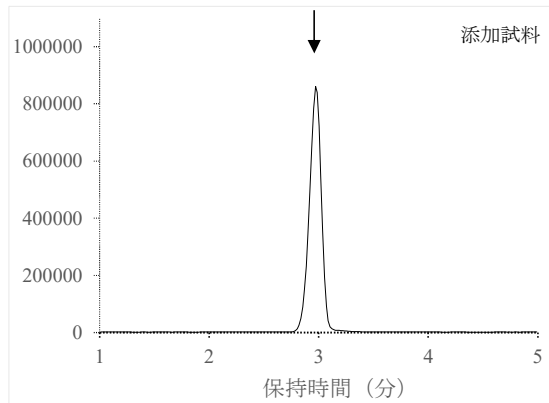
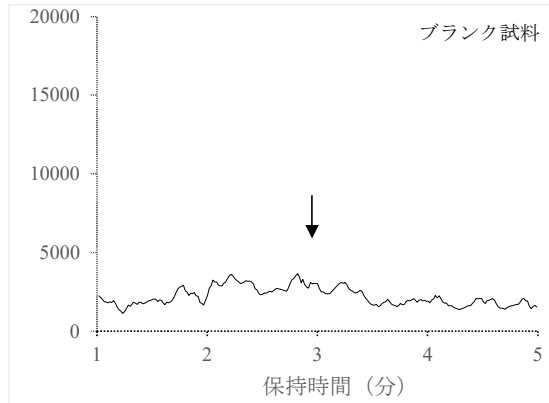


図55 うなぎのSRMクロマトグラム [代謝物I添加]
 (代謝物I : m/z 314.2→220.2)
 添加濃度 : 0.01 mg/kg (セトキシジム換算)

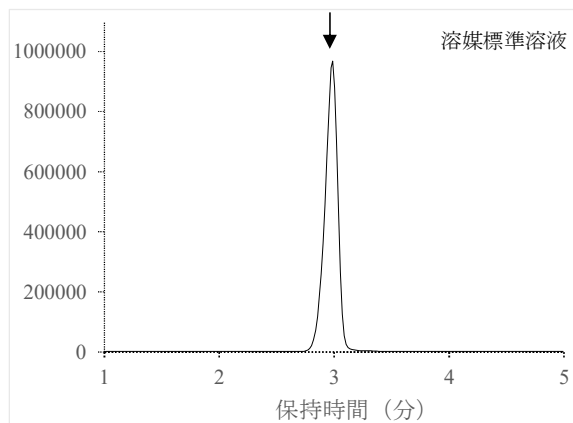
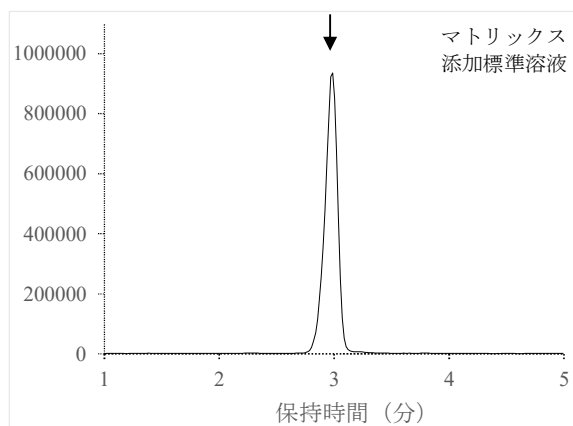
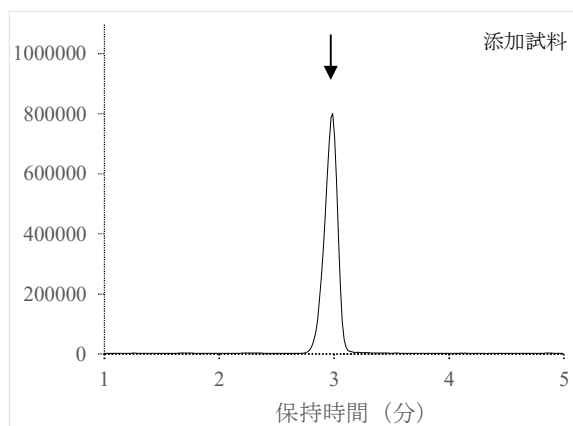
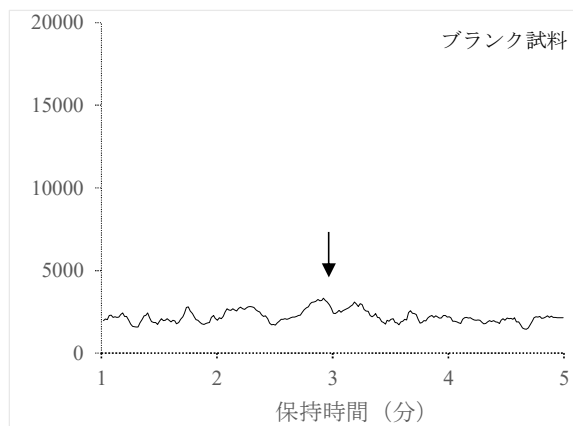


図56 しじみのSRMクロマトグラム [代謝物I添加]

(代謝物I : m/z 314.2 \rightarrow 220.2)

添加濃度 : 0.01 mg/kg (セトキシジム換算)

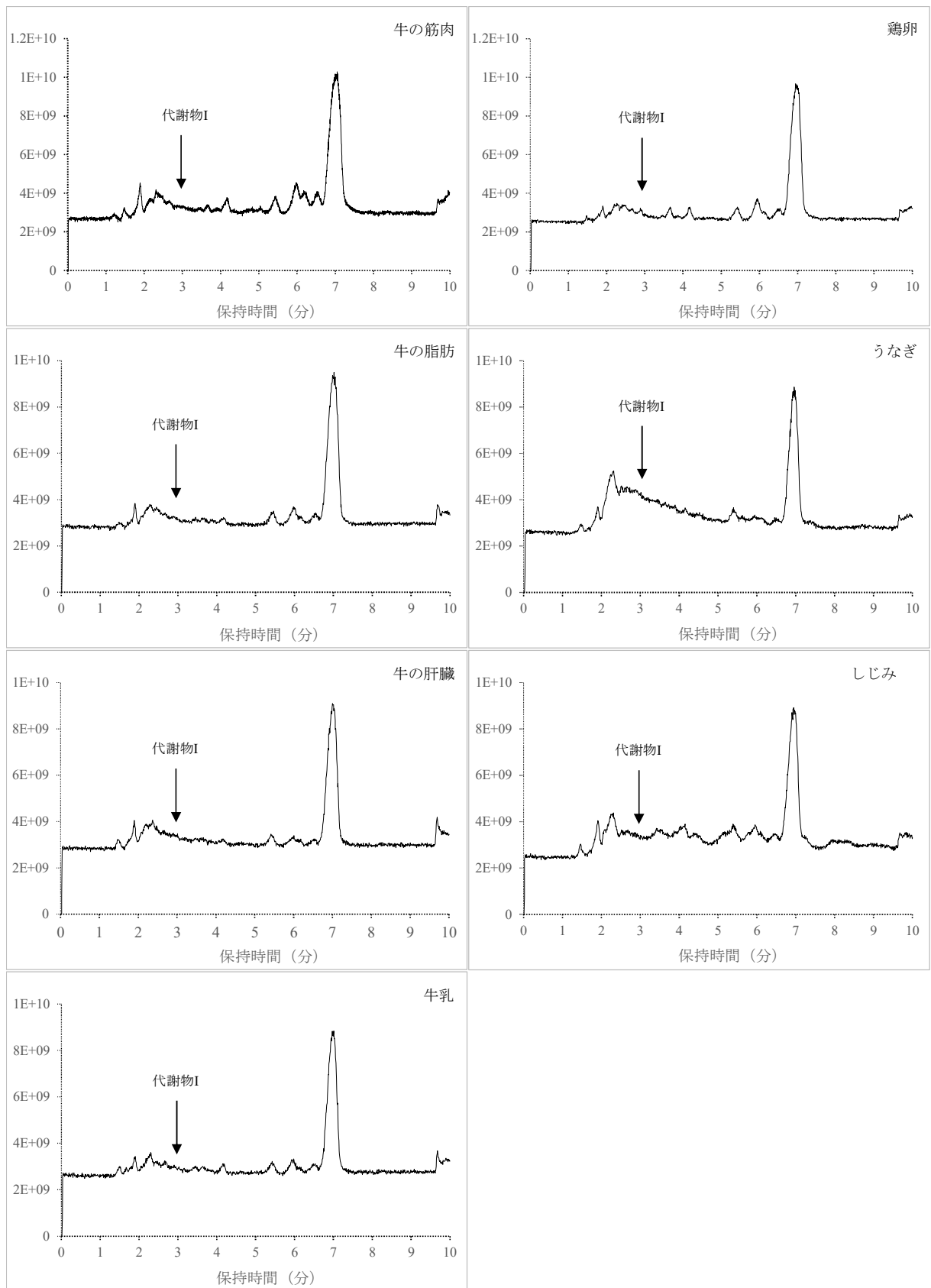


図57 ブランク試料のトータルイオンクロマトグラム
(スキャン範囲：50-500 amu)