

※ 本報告書は、試験法開発における検討結果をまとめたものであり、試験法の実施に際して参考として下さい。なお、報告書の内容と通知または告示試験法との間に齟齬がある場合には、通知または告示試験法が優先することをご留意ください。

平成 23 年度

食品に残留する農薬等の成分である物質  
(トリフロキシストロビン)の試験法開発事業報告書

## トリフロキシストロビン試験法（畜水産物）の検討結果

### 〔緒言〕

#### 1. 目的及び試験法の検討方針

トリフロキシストロビンは2000年にスイスのノバルティスからバイエルクロップサイエンスにより買収、その後開発されたストロビルリン系殺菌剤である。病原菌の孢子発芽阻止、孢子発芽以降の宿主への侵入阻止や吸器の形成阻止、子座の形成阻止効果が確認されている。

「薬事食品衛生審議会 食品衛生分科会報告書」に記載されている規制対象物質及び残留基準値案を踏まえ、試験法の開発を行った。なお、食安発 0810 第 1 号（平成 22 年 8 月 10 日）では、「今回基準値を設定するトリフロキシストロビンとは、畜産物にあつては、トリフロキシストロビン及び代謝物（(E,E)-メトキシイミノ- {2-[1-(3-トリフロロメチル-フェニル)-エチリデンアミノオキシメチル]-フェニル}-酢酸）をトリフロキシストロビンに換算したものの和をいい、その他の食品にあつては、トリフロキシストロビンのみをいうこと。」とされている。また、農薬・動物用医薬品部会報告書（平成 23 年 11 月 10 日）では、残留の規制対象として、「農産物及び魚介類にあつては、トリフロキシストロビンのみとし、畜産物にあつては、トリフロキシストロビン及び代謝物 B とする。」とされている。

#### 1) 規制対象物質

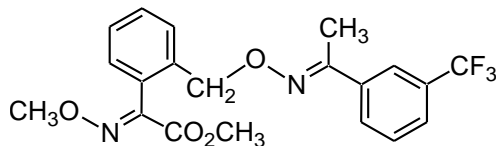
トリフロキシストロビン

(E,E)-メトキシイミノ- {2-[1-(3-トリフロロメチル-フェニル)-エチリデンアミノオキシメチル]-フェニル}-酢酸（以下、「代謝物 B」という。）

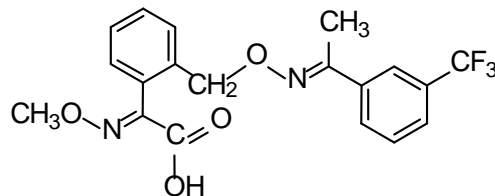
#### 2. 分析対象化合物の構造式、物理化学的性質及び基準値等に関する情報

##### 1) 構造式及び物理化学的性質

トリフロキシストロビン



代謝物B



トリフロキシストロビン

化学式：C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>

分子量：408.37

化学名（IUPAC）：methyl(E)-methoxyimino-

{(E)-α-[1-(α,α,α-trifluoro-m-tolyl)ethylideneaminoxy]-o-tolyl}acetate

外 観：白色固体

融 点：72.9℃

蒸気圧：3.4×10<sup>-3</sup> mPa (25℃)

溶解性：610 µg/L (25℃)

アセトン、ジクロロメタン、酢酸エチル>500、ヘキサン 11、メタノール 76、  
オクタノール 18、トルエン 500 (以上 g/L、25℃)

オクタノール/水分配係数：log Pow=4.5 (25℃)

安定性：水中半減期 (20℃)；27.1時間 (pH 9)、11.4週間 (pH 7)、pH 5で安定

光分解半減期 (25℃)；1.7日 (pH 7)、1.1日 (pH 5)

(出典：The e-Pesticide Manual 15th ed.,ver.5.2)

## 代謝物B

化学式：C<sub>19</sub>H<sub>17</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>

分子量：394.34

化学名 (IUPAC) : methoxyimino-{2-[1-(3-trifluoromethyl-phenyl)-ethylideneaminooxymethyl]-phenyl}-acetic acid

外 観：淡茶色粉末

融 点：117.7℃

蒸気圧：1.0×10<sup>-5</sup> Pa (20℃)

溶解性：水 0.21 (pH 5.0)、緩衝液 11.69 (pH 6.2) (以上 g/L、20℃)

アセトン 44、アセトニトリル 22、メタノール 35、ジクロロメタン 12、  
n-オクタノール 3 (以上 % (w/v)、20℃)

オクタノール/水分配係数：log Pow=0.59 (pH 7.0)

酸解離定数 (pKa) : 3.28

(出典：バイエルクロップサイエンス資料)

## 2) 基準値

牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、豚の筋肉 0.05 ppm

牛乳 0.02 ppm

鶏卵 0.04 ppm

### [実験方法]

#### 1. 試料

##### 1) 購入先

うなぎは愛知県の業者から、しじみは熊本県の業者から、その他の試料については都内のスーパーにて購入した。

##### 2) 試料の採取方法

- ①牛の筋肉は脂肪層を除き、細切均一化した。
- ②牛の脂肪は筋肉部を除き、細切均一化した。
- ③牛の肝臓は、全体を細切均一化した。
- ④さけは可食部（皮を含む）を細切均一化した。
- ⑤うなぎは、活鰻を使用し、頭部を除いた可食部（内臓、骨及び皮を含む）を細切均一化した。
- ⑥しじみは、貝殻を除き細切均一化した。
- ⑦牛乳は全体をよく混合して均一化した。
- ⑧鶏卵は、殻を除き卵白と卵黄を合わせてよく混合し均一化した。
- ⑨はちみつは百花蜜を使用し、加温（40℃以下）してから、よく混合して均一化した。
- ⑩豚の筋肉は脂肪層を除き、細切均一化した。

## 2. 試薬・試液

### 1) 標準品

トリフロキシストロビン標準品（純度99.9%、和光純薬工業製）

代謝物B標準品（純度98.7%、企業提供品）

## 2) 試薬

アセトニトリル、アセトン、メタノール：残留農薬試験用（関東化学製）

アセトニトリル：高速液体クロマトグラフ用（関東化学製）

塩酸：試薬特級（小宗化学薬品製）

ギ酸：試薬特級（関東化学製）

ケイソウ土：セライト545（関東化学製）

スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラム：Inertsep PLS-2（500 mg、ジーエルサイエンス製）

グラファイトカーボンミニカラム：Supelclean ENVI-Carb（500 mg、シグマアルドリッチジャパン製）

## 3) 標準溶液、試液の調製方法

### ①標準溶液の調製方法

標準原液：トリフロキシストロビン標準品25 mgを精秤し、アセトンで溶解して500 mg/L溶液を調製した。代謝物B 25 mgを精秤し、1 vol%ギ酸・アセトン溶液で溶解して500 mg/L溶液を調製した。

検量線用混合標準溶液：トリフロキシストロビン及び代謝物B標準原液を{アセトニトリル、ギ酸及び水（50：1：50）混液}で混合希釈し、トリフロキシストロビン0.00025～0.00375 mg/L及び代謝物B 0.0005～0.003375 mg/Lの濃度の混合溶液を調製した。

添加用混合標準溶液：トリフロキシストロビン及び代謝物B標準原液を1 vol%ギ酸・アセトン溶液で混合希釈し、トリフロキシストロビン0.1、0.4及び0.5 mg/L、代謝物B 0.09、0.36及び0.45 mg/Lの濃度の混合溶液を調製した。

### ②試液の調製方法

#### 1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液

ギ酸5 mLにアセトニトリルを加えて混合し、500 mLとした。

#### 1 vol%ギ酸・アセトン溶液

ギ酸5 mLにアセトンを加えて混合し、500 mLとした。

#### 4 mol/L塩酸

水300 mLに塩酸150 mLを加えて混合した。

#### アセトニトリル、ギ酸及び水（50：1：50）混液

アセトニトリル500 mL、ギ酸10 mL及び水500 mLを混合した。

#### ギ酸、水及びメタノール（1：30：70）混液

ギ酸10 mL、水300 mL及びメタノール700 mLを混合した。

#### 0.1 vol%ギ酸

ギ酸1 mLに水を加えて混合し、1000 mLとした。

## 3. 装置

ホモジナイザー：ウルトラタラックスT-25ベーシック（イカ・ジャパン製）

ロータリーエバポレーター：R-200（柴田科学製）等

### LC-MS/MS

	型式	会社
MS 装置	API3200	AB SCIEX
LC 装置	LC-20AD	島津製作所
データ処理	Analyst	AB SCIEX

#### 4. 測定条件

LC 条件																					
カラム	Develosil C30-UG-5 サイズ：内径 2.0 mm、長さ 150 mm、粒子径 5 μm 会社：野村化学株式会社																				
移動相流速 (mL/min)	0.2																				
注入量 (μL)	4																				
カラム温度 (°C)	40																				
移動相	A液：0.1 vol%ギ酸 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>0.00</td> <td>60</td> <td>40</td> </tr> <tr> <td>14.00</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>21.00</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>21.01</td> <td>60</td> <td>40</td> </tr> <tr> <td>28.00</td> <td>60</td> <td>40</td> </tr> </tbody> </table>			時間(分)	A液(%)	B液(%)	0.00	60	40	14.00	5	95	21.00	5	95	21.01	60	40	28.00	60	40
時間(分)	A液(%)	B液(%)																			
0.00	60	40																			
14.00	5	95																			
21.00	5	95																			
21.01	60	40																			
28.00	60	40																			
MS 条件																					
測定モード	MS/MS、SRM (選択反応モニタリング)																				
イオン化モード	ESI (+)																				
キャピラリ電圧 (V)	5500																				
脱溶媒温度 (°C)	700																				
脱溶媒ガス	窒素 80 psi																				
コリジョンガス	窒素																				
定量イオン (m/z)	トリフロキシストロビン： +409→186[コーン電圧：26(V)、コリジョンエネルギー：25(eV)] 代謝物 B： +395→186[コーン電圧：21(V)、コリジョンエネルギー：23(eV)]																				
定性イオン (m/z)	トリフロキシストロビン： +409→145[コーン電圧：26(V)、コリジョンエネルギー：63(eV)] 代謝物 B： +395→145[コーン電圧：21(V)、コリジョンエネルギー：63(eV)]																				
保持時間	トリフロキシストロビン：13.0分 代謝物B：10.5分																				

#### 5. 定量

トリフロキシストロビン標準品をアセトンに溶解、代謝物B標準品は1 vol%ギ酸・アセトン溶液に溶解し、それぞれ500 mg/Lの標準原液を調製した。この原液を {アセトニトリル、ギ酸及び水 (50 : 1 : 50) } 混液で混合希釈し、0.00025、0.0005、0.001、0.002、0.00375 mg/L (代謝物Bは0.000225、0.00045、0.0009、0.0018、0.003375 mg/L) の濃度の標準溶液を調製した。標準溶液4 μLをLC-MS/MSに注入し、得られたピーク面積を用いて検量線を作成した。試験溶液4 μLをLC-MS/MSに注入し、検量線から絶対検量線法によりトリフロキシストロビン及び代謝物Bの含量を算出した。

## 6. 添加試料の調製

牛の筋肉、牛の肝臓及び豚の筋肉 {添加濃度：0.05 (代謝物B 0.045) ppm} : 試料10.0 gに添加用標準溶液0.5 (代謝物B 0.45) mg/Lを1 mL添加しよく混合した後、30分間放置した。

牛の脂肪 {添加濃度：0.05 (代謝物B 0.045) ppm} : 試料5.0 gに添加用標準溶液0.5 (代謝物B 0.45) mg/Lを0.5 mL添加しよく混合した後、30分間放置した。

牛乳 {添加濃度：0.02 (代謝物B 0.018) ppm} : 試料10.0 gに添加用標準溶液0.4 (代謝物B 0.36) mg/Lを0.5 mL添加しよく混合した後、30分間放置した。

鶏卵 {添加濃度：0.04 (代謝物B 0.036) ppm} : 試料10.0 gに添加用標準溶液0.4 (代謝物B 0.36) mg/Lを1 mL添加しよく混合した後、30分間放置した。

さけ、うなぎ、しじみ及びはちみつ {添加濃度：0.01 (代謝物B 0.009) ppm} : 試料10.0 gに添加用標準溶液0.1 (代謝物B 0.09) mg/Lを1 mL添加しよく混合した後、30分間放置した。

## 7. 試験溶液の調製

トリフロキシストロビン及び代謝物Bを試料から酸性下でアセトン抽出し、スチレンジビニルベンゼン共重合体及びグラファイトカーボン連結ミニカラムで精製した後、LC-MS/MSで定量及び確認した。

### 1) 抽出

#### ①はちみつ以外の場合

試料10.0 g (脂肪は5.00 g) を200 mL遠心管に量り採り、4 mol/L塩酸5 mL及びアセトン100 mLを加え、ホモジナイズした後、ケイソウ土を厚さ約1 cmに敷いたろ紙 (直径60 mm、No. 4、桐山製作所製) を用いて吸引ろ過し、200 mL容メスフラスコに採取した。ろ紙上の残留物にアセトン50 mLを加えてホモジナイズした後、上記と同様にろ過した。得られたろ液を合わせて、アセトンで正確に200 mLとした。この2 mL (脂肪は4 mL) を採り、水10 mLを加えた。

#### ②はちみつの場合

試料10.0 gを200 mL遠心管に量り採り、水20 mLを加え溶解した。これに4 mol/L塩酸5 mL及びアセトン100 mLを加え、ホモジナイズした後、ケイソウ土を厚さ約1 cmに敷いたろ紙 (直径60 mm、No. 4、桐山製作所製) を用いて吸引ろ過し、200 mL容メスフラスコに採取した。ろ紙上の残留物に水10 mL及びアセトン50 mLを加えてホモジナイズし、上記と同様にろ過した。得られたろ液を合わせて、アセトンで正確に200 mLとした。この2 mLを採り、水10 mLを加えた。

### 2) 精製

スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラム [Inertsep PLS-2 (500 mg)] の下部にグラファイトカーボンミニカラム [Supelclean ENVI-Carb (500 mg)] を連結し、アセトニトリル及び水各10 mLを順次注入し、流出液を捨てた。連結ミニカラムに1) で得られた溶液を注入した後、さらにギ酸、水及びメタノール (1 : 30 : 70) 混液5 mLで4回容器を洗い込み注入し、流出液を捨てた。次いで、1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液20 mLを注入し、溶出液を50 mL遠心管に採り、ロータリーエバポレーターを用いて40℃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、ギ酸及び水 (50 : 1 : 50) 混液に溶解し、正確に2 mLとしたものを試験溶液とした。

[分析法フローチャート]

秤 取

| 脂肪以外：試料10.0 g (はちみつ：水20 mLを加え溶解)

↓ 脂肪：試料5.00 g

**酸性下アセトン抽出**

| 4 mol/L塩酸5 mL及びアセトン100 mLを加え、ホモジナイズ

| 吸引ろ過

| 残留物にアセトン50 mL（はちみつ：水10 mL及びアセトン50 mL）を加え、ホモジナイズ

| 吸引ろ過

| ろ液を合わせ、アセトンで正確に200 mLとする

| 脂肪以外：抽出液2 mL分取し、水10 mLを加える

↓ 脂肪：抽出液4 mL分取し、水10 mLを加える

**スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラム及びグラファイトカーボンミニカラム**

| アセトニトリル及び水各10 mLで予備洗浄

| 抽出溶液を注入

| ギ酸、水及びメタノール（1：30：70）混液20 mLで洗浄

↓ 1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液20 mLで溶出

**濃縮（溶媒除去）**

↓ 残留物をアセトニトリル、ギ酸及び水（50：1：50）混液2 mLに溶解

**試験溶液**

↓

**LC-MS/MS**

4 µL注入

## 8. マトリックス添加標準溶液の調製

### 1) 定量限界相当濃度（定量限界の推定用）

牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳、鶏卵及び豚の筋肉はブランク試料の試験溶液から0.5 mLを採り、窒素気流下で溶媒を除去した後、0.0005（代謝物Bは0.00045）mg/Lの標準溶液0.5 mLに溶解したものを、マトリックス添加標準溶液とした。

### 2) 添加回収試験における回収率 100%相当濃度（試料マトリックスの測定への影響評価用）

試料10品目のブランク試料の試験溶液0.5 mLを採り窒素気流下で溶媒を除去した後、各々の添加回収試験における回収率100 %相当濃度の溶媒標準溶液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。以下に詳細を示した。

試験溶液	溶解した溶媒標準溶液濃度 (mg/L)
牛の筋肉、牛の肝臓、牛の脂肪及び豚の筋肉	0.0025（代謝物Bは0.00225）
さけ、うなぎ、しじみ及びはちみつ	0.0005（代謝物Bは0.00045）
牛乳	0.001（代謝物Bは0.0009）
鶏卵	0.002（代謝物Bは0.0018）

## [結果及び考察]

### 1. 測定条件の検討

#### 1) MS条件の検討

トリフロキシストロビン及び代謝物Bのイオン化について、ESI (+) モードとESI (-) モードを比較したところ、ESI (+) モードの方が感度良く測定できたため、こちらを用いることとした。

トリフロキシストロビンのESI (+) モード測定時のマススペクトルを図1に示した。その結果から、ベースピークとして409が得られたので、トリフロキシストロビンのプロトン付加分子 ( $m/z$  409 [M+H]<sup>+</sup>) をプリカーサーイオンとした。また、 $m/z$  409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図2に示した。強度として $m/z$  186のプロダクトイオンが強く、次いで $m/z$  145であったため、 $m/z$  186を定量用イオン、 $m/z$  145を定性用イオンとした。

代謝物BのESI (+) モード測定時のマススペクトルを図3に示した。その結果から、ベースピークとして395が得られたので、代謝物Bのプロトン付加分子 ( $m/z$  395 [M+H]<sup>+</sup>) をプリカーサーイオンとした。また、 $m/z$  395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図4に示した。強度として $m/z$  186のプロダクトイオンが強く、次いで $m/z$  145であったため、 $m/z$  186を定量用イオン、 $m/z$  145を定性用イオンとした。

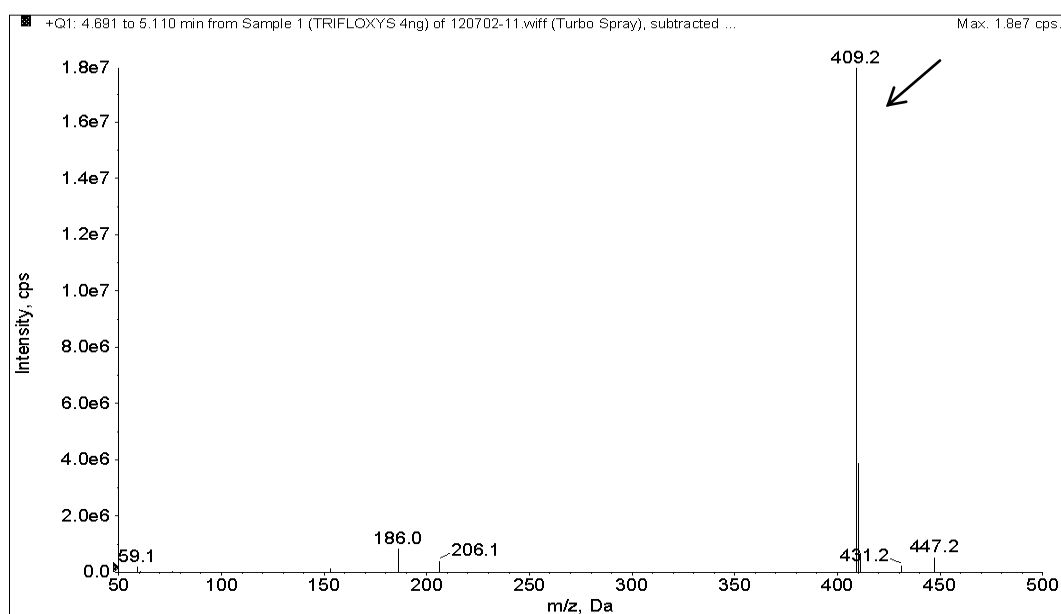


図1 トリフロキシストロビンのマススペクトル

スキャン範囲：50~500  $m/z$

測定条件：ESI (+)、CV=26

(CV：コーン電圧)



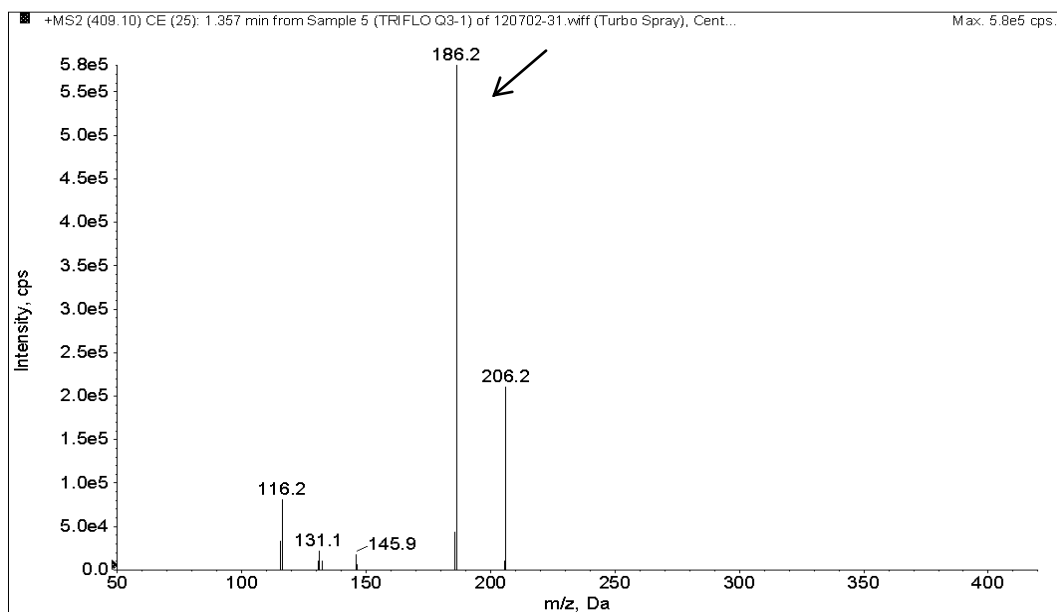


図 2-1 トリフロキシストロビンのプロダクトイオンスペクトル (定量用)

スキャン範囲 : 50~420  $m/z$

測定条件 : ESI (+)、CV=26、CE=25

(CV : コーン電圧、CE : コリジョンエネルギー)

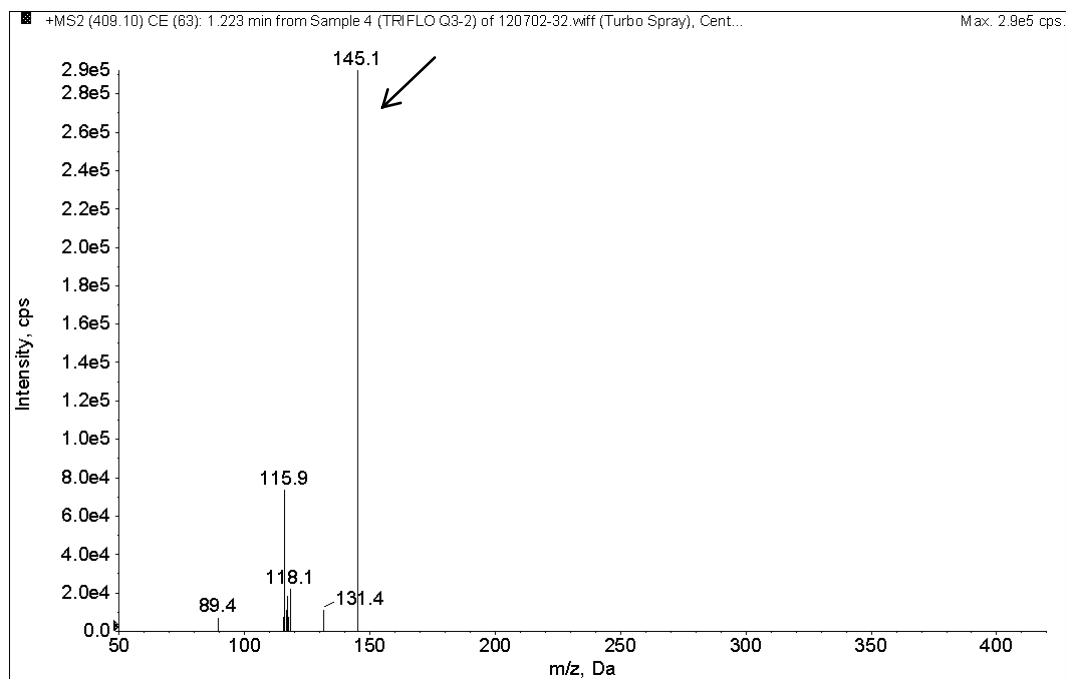


図 2-2 トリフロキシストロビンのプロダクトイオンスペクトル (定性用)

スキャン範囲 : 50~420  $m/z$

測定条件 : ESI (+)、CV=26、CE=63

(CV : コーン電圧、CE : コリジョンエネルギー)

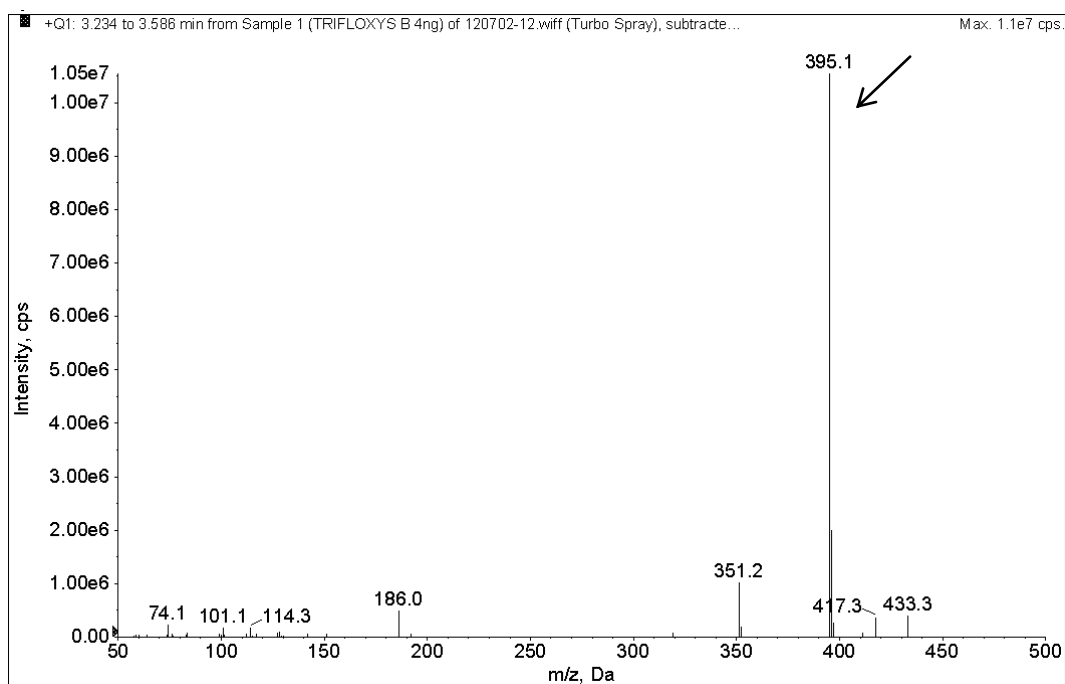


図3 代謝物Bのマススペクトル  
 スキャン範囲：50～500  $m/z$   
 測定条件：ESI (+)、CV=21  
 (CV：コーン電圧)

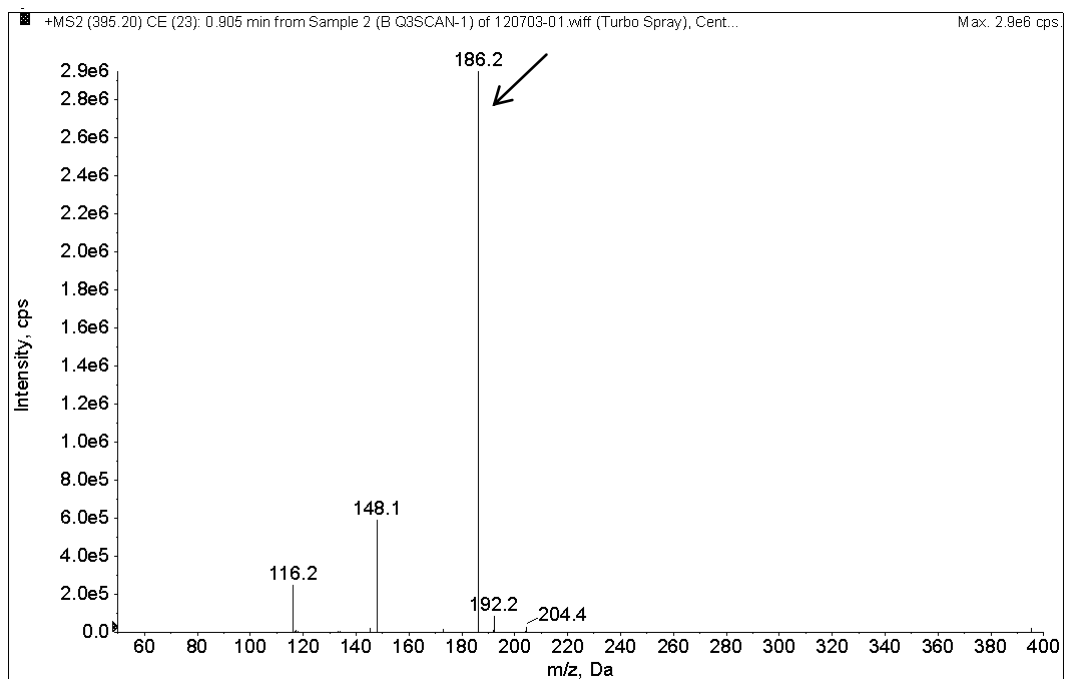


図4-1 代謝物Bのプロダクトイオンスペクトル (定量用)  
 スキャン範囲：50～400  $m/z$   
 測定条件：ESI (+)、CV=21、CE=23  
 (CV：コーン電圧、CE：コリジョンエネルギー)

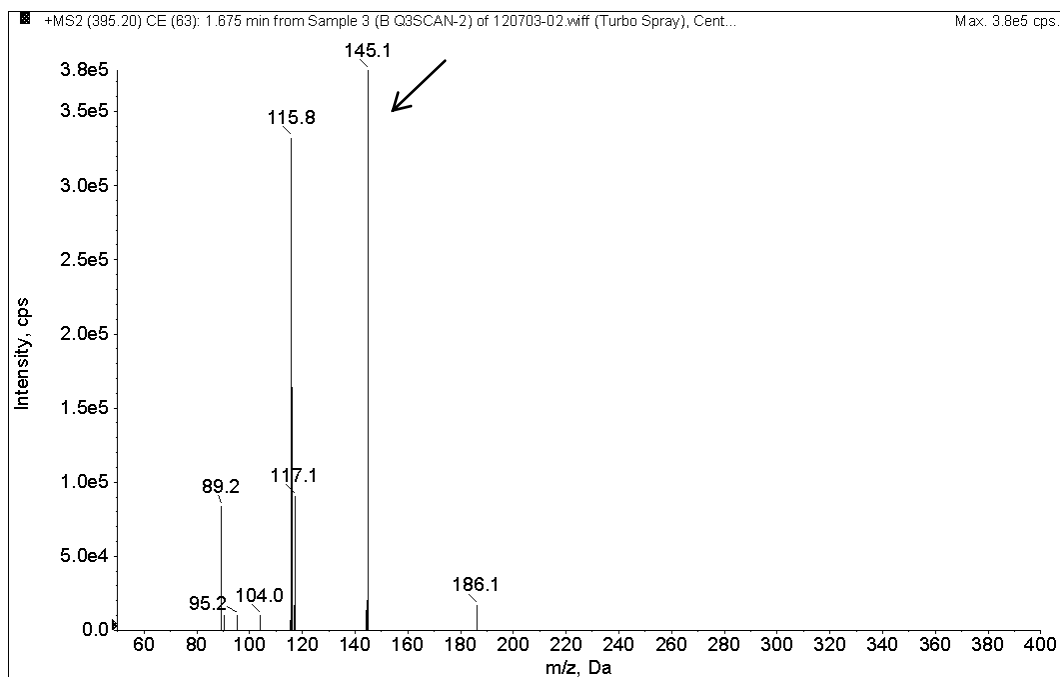


図 4-2 代謝物 B のプロダクトイオンスペクトル (定性用)

スキャン範囲：50～400  $m/z$

測定条件：ESI (+)、CV=21、CE=63

(CV：コーン電圧、CE：コリジョンエネルギー)

## 2) LC 条件の検討

マススペクトルをスキャン測定した際に溶媒をアセトニトリルとメタノールで比較したところ、代謝物Bの感度において、アセトニトリルの方が良好であった。また、移動相を0.1 vol%ギ酸と5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液で比較したところ、後者の方が感度は良好であったが代謝物Bのカルボキシル基の解離が起こることによって極性が高くなり、カラムへの保持が弱くなった。このため、試験溶液の溶解溶媒及び移動相は代謝物Bの感度と解離を考慮し、アセトニトリル及び0.1 vol%ギ酸を使用することとした。この条件においてトリフロキシストロピンは十分な感度を示した。

分離カラムについて、TSK-gel ODS-100 (内径 2.0 mm、長さ 150 mm、粒子径 5  $\mu\text{m}$ ) を用いて検討を行ったが、試料によってはイオンサプレッションが認められた。またグラジエント条件の変更を検討したが改善されなかった。Develosil C30-UG-5 (内径 2.0 mm、長さ 150 mm、粒子径 5  $\mu\text{m}$ ) を用いたところ、イオンサプレッションの影響はなく、ピーク形状、再現性及び感度のいずれも良好な結果が得られたので、カラムはDevelosil C30-UG-5 (内径 2.0 mm、長さ 150 mm、粒子径 5  $\mu\text{m}$ ) を用いることとした。

## 3) 検量線

図5にトリフロキシストロピン及び代謝物Bの検量線の例を示した。0.00025 mg/L (0.001 ng) ～0.00375 mg/L (0.015 ng) (代謝物Bは0.000225 mg/L (0.0009 ng) ～0.003375 mg/L (0.0135 ng) の濃度範囲で作成した検量線の相関係数はどちらも0.999以上であり良好な直線性を示した。

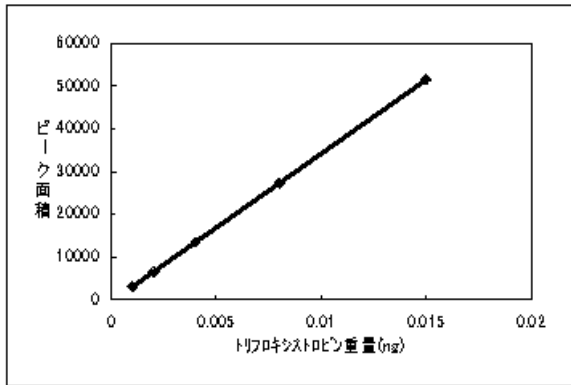


図5-1 トリフロキシストロビンの検量線 (一例)

データ処理装置設定条件の一例  
機種 (メーカー) : Analyst  
(AB SCIEX製)  
ピークの定量方法: ピーク面積法  
検量線の種類: 最小二乗法  
検量線基準ピークの重量: 0.001 ng~0.015 ng  
傾き (a) : a=3463507.692  
切片 (b) : b=-433.6461537  
 $R^2$  : 0.9999

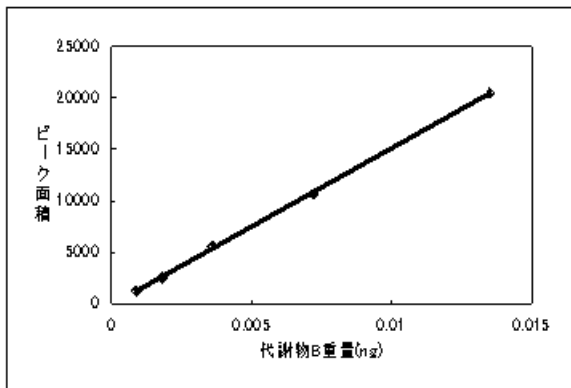


図5-2 代謝物Bの検量線 (一例)

データ処理装置設定条件の一例  
機種 (メーカー) : Analyst  
(AB SCIEX製)  
ピークの定量方法: ピーク面積法  
検量線の種類: 最小二乗法  
検量線基準ピークの重量: 0.0009 ng~0.0135 ng  
傾き (a) : a= 1523008.547  
切片 (b) : b= -98.64615385  
 $R^2$  : 0.9996

#### 4) 定量限界

定量限界の算出結果を以下に示した。

$$0.01 \text{ mg/kg} [(2 \text{ mL}/0.1 \text{ g}^{*1}) \times (0.002 \text{ ng}/4 \text{ }\mu\text{L})]$$

代謝物Bのトリフロキシストロビンとしての定量限界

$$0.01 \text{ mg/kg} > 0.00932 \text{ mg/kg} [(2 \text{ mL}/0.1 \text{ g}^{*1}) \times (0.0018 \text{ ng}/4 \text{ }\mu\text{L}) \times 1.036^{*2}]$$

\*1 5.00 g × 4 mL/200 mL (脂肪の場合)

10.0 g × 2 mL/200 mL (脂肪以外の場合)

\*2 トリフロキシストロビンの分子量408.37/代謝物Bの分子量394.35

## 2. 試験溶液調製法の検討

### 1) 代謝物Bの溶解溶媒の検討

バイエルクロップサイエンス提供品を用いて検討を行った。代謝物Bの1 mg/L標準溶液を1 mLずつ試験管に分取し、窒素気流下で溶媒を除去したものを2本作成した。一方をアセトニトリル、もう一方を1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液に溶解して0.2 mg/L溶液を作成し、再溶解における酸の有無の影響の比較を試みた。この溶液をアセトニトリル、ギ酸及び水 (50 : 1 : 50) 混液でそれぞれ0.002 mg/Lに希釈して測定したところ、アセトニトリルで0.2 mg/L溶液を作成した方が、1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液で作成した場合より、30%程度ピーク面積が小さかった。

そのため、代謝物Bの標準原液、溶液の調製には1 vol%のギ酸を含有させた溶媒を用いることとした。また、分析操作中の溶媒に関しても同様の扱いとした。

## 2) 抽出方法の検討

バイエルクロップサイエンス提供資料では、アセトニトリル及び水 (4:1) 混液で抽出しているが、脂肪との混和性を考慮し、アセトンを用いることとした。また、代謝物Bは酸性化合物であるため、アセトンのみでは抽出されにくいと考えられ、酸を加えてアセトンで抽出することとした。代謝物Bと同様に酸性化合物である2,4-D等の農産物における個別試験法等を参考に4 mol/L塩酸を5 mL添加する方法を採用することとした。牛の脂肪5 gに4 mol/L塩酸5 mL及びアセトン100 mLを加えてホモジナイズ抽出した際、脂肪のほとんどは溶解し、一部は微粒子となって分散した。ホモジナイザーシヤフトへの脂肪の付着もみられなかった。

## 3) 精製方法の検討

### ① スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラムの溶出状況

スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラムの精製について検討した。カラムをアセトニトリル及び水各10 mLで予備洗浄した後、トリフロキシストロビン及び代謝物B 0.5 (代謝物Bは0.45) µgを抽出溶媒\*4 mLに溶解させ、水10 mLを加え軽く振り混ぜて負荷した。次いでギ酸、水及びメタノール (1:30:70) 混液で洗浄、1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液で溶出したときの溶出状況を表2に示した。トリフロキシストロビン及び代謝物Bはギ酸、水及びメタノール (1:30:70) 混液20 mLでは溶出せず、1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液20 mLで溶出したことから、ギ酸、水及びメタノール (1:30:70) 混液20 mLで洗浄し、1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液20 mLで溶出することとした。

実際に肝臓、しじみ及び鶏卵試料を使用して検討したところ、トリフロキシストロビン及び代謝物Bはスチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラム精製のみではイオンサプレッションを十分に除くことができなかつたため、追加精製を検討することとした。

表2 スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラムからの溶出状況 (%)

	[負荷] 抽出溶媒4 mL +水10 mL	ギ酸、水及びメタノール (1:30:70)		1 vol%ギ酸・ アセトニトリル		合計	
		0-20 mL		0-20 mL	20-25 mL		25-30 mL
トリフロキシストロビン	0	0	99	0	0	99	
代謝物B	0	0	101	0	0	101	

Inertsep PLS-2 (500 mg、GLサイエンス製)

供試量：トリフロキシストロビン 0.5 µg及び代謝物B 0.45 µg

\*抽出溶媒は4 mol/L塩酸5 mL及びアセトン195 mLを混和させたもの。

### ② グラファイトカーボンミニカラムの溶出状況

グラファイトカーボンミニカラムの精製について、上記のスチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラムと同じ条件で検討した。

カラムをアセトニトリル及び水各10 mLで予備洗浄した後、トリフロキシストロビン及び代謝物B 0.5 (代謝物Bは0.45) µgを抽出溶媒\*4 mLに溶解させ、水10 mLを加え軽く振り混ぜて負荷した。次いでギ酸、水及びメタノール (1:30:70) 混液で洗浄、1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液で溶出したときの溶出状況を表3に示した。トリフロキシストロビン及び代謝物Bはギ酸、水及びメタノール (1:30:70) 混液20 mLでは溶出せず、1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液20 mLで溶出されたことから、ギ酸、水及びメタノール (1:30:70) 混液 20 mLで洗浄し、1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液20 mLで溶出することとした。

上記のスチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラムと同様の溶出を示したため連結して使用する

ることとした。

表3 グラファイトカーボンミニカラムからの溶出状況 (%)

	[負荷] 抽出溶媒4 mL +水10 mL	ギ酸、水及びメタノール (1 : 30 : 70)		1 vol%ギ酸・ アセトニトリル		合計
		0-20 mL	0-20 mL	20-25 mL	25-30 mL	
		トリフロキシストロビン	0	0	104	
代謝物B	0	0	104	0	0	104

tr は1%以下を表す

Supelclean ENVI-Carb (500 mg、シグマアルドリッチジャパン製)

供試量：トリフロキシストロビン0.5 µg及び代謝物B 0.45 µg

\*抽出溶媒は4 mol/L塩酸5 mL及びアセトン195 mLを混和させたもの。

### ③スチレンジビニルベンゼン共重合体及びグラファイトカーボン連結ミニカラムの溶出状況

スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラム及びグラファイトカーボンミニカラムを連結させて検討した。

スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラムの下部にグラファイトカーボンミニカラムを連結させ、アセトニトリル及び水各10 mLで予備洗浄する。トリフロキシストロビン及び代謝物B 0.5 (代謝物Bは0.45) µgを抽出溶媒\*4 mLに溶解させ、水10 mLを加え軽く振り混ぜて負荷した。次いでギ酸、水及びメタノール (1 : 30 : 70) 混液で洗浄、1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液で溶出したときの溶出状況を表4に示した。トリフロキシストロビン及び代謝物Bはギ酸、水及びメタノール (1 : 30 : 70) 混液20 mLでは溶出せず、1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液20 mLで溶出されたことから、ギ酸、水及びメタノール (1 : 30 : 70) 混液20 mLで洗浄し、1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液20 mLで溶出することとした。

表4 スチレンジビニルベンゼン共重合体及び  
グラファイトカーボン連結ミニカラムからの溶出状況 (%)

	[負荷] 抽出溶媒4 mL +水10 mL	ギ酸、水及びメタノール (1 : 30 : 70)		1 vol%ギ酸・ アセトニトリル		合計
		0-20 mL	0-20 mL	20-25 mL	25-30 mL	
		トリフロキシストロビン	0	0	103	
代謝物B	0	0	104	0	0	104

tr は1%以下を表す

Inertsep PLS-2 (500 mg、GLサイエンス製)

Supelclean ENVI-Carb (500 mg、シグマアルドリッチジャパン製)

供試量：トリフロキシストロビン 0.5 µg及び代謝物B 0.45 µg

\*抽出溶媒は4 mol/L塩酸5 mL及びアセトン195 mLを混和させたもの。

### 3. 添加回収試験

牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、さけ、うなぎ、しじみ、牛乳、鶏卵、はちみつ及び豚の筋肉の10食品を用いて、〔実験方法〕7. 試験溶液の調製に従って添加回収試験を実施した。

添加回収試験における回収率100%相当の溶媒標準溶液、各食品のブランク試料及び添加試料の代表的なクロマトグラムを図6～9に示した。また、各食品のブランク試料のスクラ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10に示した。

#### 1) 選択性

選択性の結果を表5に示した。検討した何れの試料においてもトリフロキシストロビン及び代謝物Bの定量を妨害ピークは認められず、選択性は良好であった。

表5 選択性の評価

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	基準値 <sup>1)</sup> (ppm)	添加濃度 <sup>2)</sup> (ppm)	妨害ピークの許容範囲		ピーク面積(高さ) <sup>3)</sup>				選択性の評価 <sup>5)</sup>	備考
						評価対象濃度 (ppm)	判定基準	面積又は高さの別	ブランク試料 (a)	標準溶液 <sup>4)</sup> (b)	面積(高さ)比 (a)/(b)		
1	トリフロキシストロビン	牛の筋肉	0.01	0.05	0.05	基準値 0.05	< 0.100	否	0	31493	0.000	○	
		牛の脂肪	0.01	0.05	0.05	基準値 0.05	< 0.100	否	0	34009	0.000	○	
		牛の肝臓	0.01	0.05	0.05	基準値 0.05	< 0.100	否	0	31048	0.000	○	
		さけ	0.01	0.01	0.01	定量限界 0.01	< 0.333	否	0	6721	0.000	○	
		うなぎ	0.01	0.01	0.01	定量限界 0.01	< 0.333	否	0	6200	0.000	○	
		しじみ	0.01	0.01	0.01	定量限界 0.01	< 0.333	否	0	6546	0.000	○	
		牛乳	0.01	0.02	0.02	* 定量限界 0.01	< 0.333	否	0	5923	0.000	○	
		鶏卵	0.01	0.04	0.04	基準値 0.04	< 0.100	否	0	23893	0.000	○	
		はちみつ	0.01	0.01	0.01	定量限界 0.01	< 0.333	否	0	6408	0.000	○	
		豚の筋肉	0.01	0.05	0.05	基準値 0.05	< 0.100	否	0	34874	0.000	○	
2	代謝物B(親換算)	牛の筋肉	0.01	0.05	0.05	基準値 0.05	< 0.100	否	0	14996	0.000	○	
		牛の脂肪	0.01	0.05	0.05	基準値 0.05	< 0.100	否	0	15819	0.000	○	
		牛の肝臓	0.01	0.05	0.05	基準値 0.05	< 0.100	否	0	14624	0.000	○	
		さけ	0.01	0.01	0.01	定量限界 0.01	< 0.333	否	0	2128	0.000	○	
		うなぎ	0.01	0.01	0.01	定量限界 0.01	< 0.333	否	0	2702	0.000	○	
		しじみ	0.01	0.01	0.01	定量限界 0.01	< 0.333	否	0	2608	0.000	○	
		牛乳	0.01	0.02	0.02	* 定量限界 0.01	< 0.333	否	0	3011	0.000	○	
		鶏卵	0.01	0.04	0.04	基準値 0.04	< 0.100	否	0	11113	0.000	○	
		はちみつ	0.01	0.01	0.01	定量限界 0.01	< 0.333	否	0	2646	0.000	○	
		豚の筋肉	0.01	0.05	0.05	基準値 0.05	< 0.100	否	0	15271	0.000	○	

\*1 基準値は、基準値未設定の場合には一律基準(0.01 ppm)を用いる。

\*2 添加濃度と評価対象濃度が異なる場合(定量限界と基準値との関係が、『定量限界<基準値<定量限界×3』となる場合)には、『\*』が表示される。『\*』が表示された分析対象化合物は、添加濃度と評価対象濃度が異なるため、別途、定量限界濃度相当のマトリックス添加標準溶液を調製して評価する。

\*3 ブランク試料及び標準溶液の順に測定した結果から評価する。(必要に応じて記憶注入を行う。)

\*4 試料中の濃度が「評価対象濃度(基準値濃度又は定量限界濃度)」相当になるように、ブランク試料の試験溶液で調製した標準溶液(マトリックス添加標準溶液)を用いる。ブランク試料に妨害ピークが観察されなかった場合には、標準溶液のピーク面積(高さ)は求めなくても良い。

\*5 面積(高さ)比が、妨害ピークの許容範囲の判定基準に適合する場合には「○」、適合しない場合には「×」を記載する。

## 2) 真度、精度及び定量限界

真度及び併行精度の検討結果を表6に示した。トリフロキシストロビンの真度は90~100%、併行精度は1~4%であり、目標値を十分に満たした。代謝物Bの真度は89~101%、併行精度は1~6%であり、目標値を十分に満たした。さけ、うなぎ、しじみ及びはちみつについては、S/N比の平均値はトリフロキシストロビン158~263、代謝物B 57~79でありS/N $\geq$ 10を十分に満たした。

添加濃度が定量限界濃度と異なる試料について、定量限界の推定を行った結果を表7に示した。また、定量限界の推定における代表的なクロマトグラムを図7及び9に示した。S/N比の平均値はトリフロキシストロビン122~197、代謝物B 75~105でありS/N $\geq$ 10を十分に満たした。

表6 真度、精度及び定量限界の評価

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm) <sup>1)</sup>	基準値 <sup>2)</sup> (ppm)	添加濃度の評価 <sup>3)</sup>	定量限界の評価 <sup>4)</sup>	検量線					回収率(%)					真度 (%)	併行精度 (RSD%)	S/N比 <sup>5)</sup>			備考
							検量	切片	r <sup>2</sup>	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5	Max	Min			平均値			
1	トリフロキシストロビン	牛の筋肉	0.01	0.05	0.05	*	2285400	234	1.000	91	92	91	94	90	92	1	/	/	#DIV/0!			
		牛の脂肪	0.01	0.05	0.05	*	2379540	-543	0.993	92	95	98	93	94	94	2	/	/	#DIV/0!			
		牛の肝臓	0.01	0.05	0.05	*	2285400	234	1.000	89	90	92	92	88	90	2	/	/	#DIV/0!			
		さけ	0.01	0.01	0.01		2289400	266	0.997	92	98	99	96	102	98	4	253	263	263			
		うなぎ	0.01	0.01	0.01		2583900	268	0.995	95	97	100	99	92	97	3	197	197	197			
		しじみ	0.01	0.01	0.01		2393900	268	0.993	94	97	101	97	93	96	3	158	158	158			
		牛乳	0.01	0.02	0.02	*	2394900	344	0.998	97	98	102	103	89	100	3	/	/	#DIV/0!			
		鶏卵	0.01	0.04	0.04	*	2385200	457	1.000	93	93	97	95	94	94	2	/	/	#DIV/0!			
		はちみつ	0.01	0.01	0.01		3081200	213	0.999	100	95	92	92	96	95	4	197	131	164			
		豚の筋肉	0.01	0.05	0.05	*	3379640	-543	0.999	98	101	104	97	100	100	3	/	/	#DIV/0!			
		牛の脂肪	0.01	0.05	0.05	*	1751911	471	0.992	91	88	92	88	89	89	3	/	/	#DIV/0!			
		2	代謝物B(競換算)	牛の筋肉	0.01	0.05	0.05	*	1698117	929	0.998	99	92	97	98	97	97	3	/	/	#DIV/0!	
牛の脂肪	0.01			0.05	0.05	*	1751911	471	0.992	93	95	94	95	94	94	1	/	/	#DIV/0!			
さけ	0.01			0.01	0.01		1172222	89	0.992	101	100	105	99	94	100	4	71	85	88			
うなぎ	0.01			0.01	0.01		1272000	17	0.999	96	102	92	93	97	95	4	65	48	57			
しじみ	0.01			0.01	0.01		1772000	17	0.998	107	98	104	93	99	100	5	79	56	67			
牛乳	0.01			0.02	0.02	*	1805555	-133	0.990	103	97	101	97	92	98	4	/	/	#DIV/0!			
鶏卵	0.01			0.04	0.04	*	1715388	-907	0.997	88	94	89	95	89	91	4	/	/	#DIV/0!			
はちみつ	0.01			0.01	0.01		1199964	378	0.994	89	96	93	104	101	97	5	79	79	79			
豚の筋肉	0.01			0.05	0.05	*	1598117	929	0.998	98	104	105	101	96	101	4	/	/	#DIV/0!			

\*1 基準値は、基準値未設定の場合には一律基準(0.01 ppm)を用いる。  
 \*2 添加濃度が定量限界濃度と異なる場合には、[\*]が表示される。その場合には、S/N比の算出は不要であるが、別途、定量限界の推定を行う。  
 \*3 得られた回収率の中で最大値を与えるピーク(Max.)及び最小値を与えるピーク(Min.)のそれぞれのS/N比を求める。

表7 定量限界の推定

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	基準値 <sup>1)</sup> (ppm)	添加濃度の評価 <sup>2)</sup>	定量限界の推定 <sup>3)</sup>	標準溶液濃度 <sup>4)</sup> (mg/L)	ピーク面積(濃度) <sup>5)</sup>										S/N比	平均値		備考
								マトリックス添加標準溶液		母液標準溶液		S/N比		面積(濃度)比(%)							
								母液	マトリックス	母液	マトリックス	n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均	Max	Min		
1	トリフロキシストロビン	牛の筋肉	0.01	0.05	0.05	*	0.0005	0	6837	6676	6757	6918	7159	7038	112	253	95	188			
		牛の脂肪	0.01	0.05	0.05	*	0.0005	0	7501	7030	7266	6891	6900	6848	158	131	106	144			
		牛の肝臓	0.01	0.05	0.05	*	0.0005	0	6360	6585	6473	7155	7396	7278	131	158	89	144			
		さけ	0.01	0.01	0.01		0.0005	0	6721	6687	6704	6717	6966	6867	/	/	95	#DIV/0!			
		うなぎ	0.01	0.01	0.01		0.0005	0	6200	5870	6086	5977	6239	6706	/	/	100	#DIV/0!			
		しじみ	0.01	0.01	0.01		0.0005	0	6548	6076	6311	6217	5740	5979	/	/	108	#DIV/0!			
		牛乳	0.01	0.02	0.02	*	0.0005	0	5623	6824	6274	6139	5652	5951	131	131	105	131			
		鶏卵	0.01	0.04	0.04	*	0.0005	0	5895	6068	5978	6030	5517	5775	112	131	103	122			
		はちみつ	0.01	0.01	0.01		0.0005	0	6403	5698	6147	6200	5993	6097	/	/	101	#DIV/0!			
		豚の筋肉	0.01	0.05	0.05	*	0.0005	0	6740	6861	6852	7404	6860	7142	197	197	96	197			
		牛の脂肪	0.01	0.05	0.05	*	0.00045	0	3268	3274	3316	3393	3004	3199	80	112	104	105			
		牛の脂肪	0.01	0.05	0.05	*	0.00045	0	2966	3467	3212	3363	3136	3256	87	98	99	95			
牛の肝臓	0.01	0.05	0.05	*	0.00045	0	3654	3320	3437	3362	3053	3206	87	98	107	93					
さけ	0.01	0.01	0.01		0.00045	0	2128	2347	2298	2094	2260	2177	/	/	103	#DIV/0!					
うなぎ	0.01	0.01	0.01		0.00045	0	2702	2574	2638	2526	2524	2626	/	/	104	#DIV/0!					
しじみ	0.01	0.01	0.01		0.00045	0	2908	2845	2727	2654	2434	2549	/	/	107	#DIV/0!					
牛乳	0.01	0.02	0.02	*	0.00045	0	3011	3077	3044	2840	2952	2896	71	79	105	75					
鶏卵	0.01	0.04	0.04	*	0.00045	0	2903	3077	3005	2989	3108	3004	71	79	100	75					
はちみつ	0.01	0.01	0.01		0.00045	0	2646	2568	2622	2434	2472	2453	/	/	107	#DIV/0!					
豚の筋肉	0.01	0.05	0.05	*	0.00045	0	3227	3338	3283	3175	3297	3236	80	79	101	89					

\*1 基準値は、基準値未設定の場合には一律基準(0.01 ppm)を用いる。  
 \*2 定量限界の推定を行う対象(添加濃度と定量限界濃度と異なる場合には、[\*]が表示される。  
 \*3 試料中の濃度が定量限界濃度(母液)になるように、ブランク試料の試験溶液で調整した標準溶液(マトリックス添加標準溶液)及び母液で調整した標準溶液(母液標準溶液)を作成する。  
 \*4 マトリックス添加標準溶液及び母液標準溶液の間に交互に2回以上測定する。(必要に応じて経線注入を行う。)  
 \*5 ブランクにピークが認められた場合には、マトリックス添加標準溶液の後はブランク値を差し引いた値を用いる。  
 \*6 マトリックス添加標準溶液の母液標準溶液に対するピーク面積比(又は濃度)の比(%)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8に示した。添加回収試験における回収率100%相当濃度になるように調製したマトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積比を求めた。面積比はトリフロキシストロビン0.94~1.06、代謝物B 0.98~1.08であり、測定への影響はほぼないものと考えられた。

添加回収試験における真度を表8で求めたピーク面積比で除して補正真度を求め、表9に示した。補正真度はトリフロキシストロビン91~100%、代謝物B 89~97%であり、試料マトリックスの測定への



影響と真度との間に問題は見られなかった。

表8 試料マトリックスの測定への影響

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	基準値 <sup>*1</sup> (ppm)	添加濃度 (ppm)	標準溶液濃度 <sup>*2</sup> (mg/L)	ピーク面積(高さ) <sup>*3</sup>							備考		
							面積又は高さの別	ブランク <sup>*4</sup>	マトリックス添加標準溶液 <sup>*5</sup>			溶媒標準溶液			ピーク面積(高さ)比 <sup>*6</sup>	
							n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均				
1	トリプロキシステロン	牛の筋肉	0.01	0.05	0.05	0.0025	面積	0	31493	31027	31260	31958	33054	32506	0.96	
		牛の脂肪	0.01	0.05	0.05	0.0025	面積	0	34009	34472	34241	34366	37158	35772	0.98	
		牛の肝臓	0.01	0.05	0.05	0.0025	面積	0	31048	29831	30440	32241	32784	32513	0.94	
		さけ	0.01	0.01	0.01	0.0005	面積	0	6721	6667	6704	6717	6996	6857	0.98	
		うなぎ	0.01	0.01	0.01	0.0005	面積	0	6200	5970	6085	5977	6239	6108	1.00	
		しじみ	0.01	0.01	0.01	0.0005	面積	0	6548	6078	6311	6217	5740	5979	1.06	
		牛乳	0.01	0.02	0.02	0.001	面積	0	11796	11895	11831	11245	11224	11235	1.05	
		鶏卵	0.01	0.04	0.04	0.002	面積	0	23893	23953	23923	23257	23639	23448	1.02	
		はちみつ	0.01	0.01	0.01	0.0005	面積	0	6408	5898	6147	6200	5993	6097	1.01	
		豚の筋肉	0.01	0.05	0.05	0.0025	面積	0	34874	35101	34988	35067	34661	34664	1.00	
2	代謝物B(親換算)	牛の筋肉	0.01	0.05	0.05	0.00225	面積	0	14996	14808	14802	14959	15155	15057	0.98	
		牛の脂肪	0.01	0.05	0.05	0.00225	面積	0	15819	15959	15899	15218	15280	15249	1.04	
		牛の肝臓	0.01	0.05	0.05	0.00225	面積	0	14624	15859	15242	14552	14309	14431	1.06	
		さけ	0.01	0.01	0.01	0.00045	面積	0	2128	2347	2238	2094	2260	2177	1.03	
		うなぎ	0.01	0.01	0.01	0.00045	面積	0	2702	2574	2638	2526	2524	2525	1.04	
		しじみ	0.01	0.01	0.01	0.00045	面積	0	2608	2845	2727	2664	2434	2546	1.07	
		牛乳	0.01	0.02	0.02	0.0009	面積	0	5612	5349	5481	5401	5510	5456	1.00	
		鶏卵	0.01	0.04	0.04	0.0018	面積	0	11113	10750	10932	10583	11113	10848	1.01	
		はちみつ	0.01	0.01	0.01	0.00045	面積	0	2648	2598	2622	2434	2472	2453	1.07	
		豚の筋肉	0.01	0.05	0.05	0.00225	面積	0	15271	16270	15771	14782	14478	14830	1.06	

\*1 基準値は、基準値未設定の場合には一律基準(0.01 ppm)を用いる。

\*2 追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。

\*3 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。(必要に応じて記録注入を行う。)

\*4 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。

\*5 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。

\*6 マトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積(又は高さ)の比を求める。

表9 補正真度

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	基準値 <sup>*1</sup> (ppm)	添加濃度 (ppm)	真度 (%)	ピーク面積比 (%)	補正真度 (%)	備考
1	トリプロキシステロン	牛の筋肉	0.01	0.05	0.05	92	0.96	95	
		牛の脂肪	0.01	0.05	0.05	94	0.96	98	
		牛の肝臓	0.01	0.05	0.05	90	0.94	96	
		さけ	0.01	0.01	0.01	98	0.98	100	
		うなぎ	0.01	0.01	0.01	97	1.00	97	
		しじみ	0.01	0.01	0.01	96	1.06	91	
		牛乳	0.01	0.02	0.02	100	1.05	95	
		鶏卵	0.01	0.04	0.04	94	1.02	92	
		はちみつ	0.01	0.01	0.01	95	1.01	94	
		豚の筋肉	0.01	0.05	0.05	100	1.00	100	
2	代謝物B(親換算)	牛の筋肉	0.01	0.05	0.05	89	0.98	91	
		牛の脂肪	0.01	0.05	0.05	97	1.04	93	
		牛の肝臓	0.01	0.05	0.05	94	1.06	89	
		さけ	0.01	0.01	0.01	100	1.03	97	
		うなぎ	0.01	0.01	0.01	96	1.04	92	
		しじみ	0.01	0.01	0.01	100	1.07	94	
		牛乳	0.01	0.02	0.02	98	1.00	97	
		鶏卵	0.01	0.04	0.04	91	1.01	90	
		はちみつ	0.01	0.01	0.01	97	1.07	90	
		豚の筋肉	0.01	0.05	0.05	101	1.08	94	

#### 4. その他の試験法検討に関する事項

ミニカラム精製についてオクタデシルシリル化シリカゲル及びグラファイトカーボンミニカラムを検討したが、牛の肝臓及び鶏卵試料のイオンサプレッションを除くことが困難だったため採用しなかった。

#### 5. 考察

代謝物Bの標準品は市販されていなかったため、バイエルクロップサイエンス提供品を用いて検討を行った。代謝物Bはガラス器具への吸着の可能性が考えられたため、標準原液、溶液の調製及び分析操作中の溶媒にはギ酸を含有させた溶媒を用いた。

抽出は畜水産物との混和性と代謝物Bの性質を考慮して、2,4-D等の農産物における個別試験法等を参考に、塩酸酸性下でアセトン抽出を行った。

精製カラムについて、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム及びグラファイトカーボンミニカラムを検討したところ、試料によってはイオンサプレッションを除くことが困難だったため、スチレンジビニルベンゼン共重合体及びグラファイトカーボン連結ミニカラムを検討したところ、良好な結果が得られた。

分離カラムについて、TSK-gel ODS-100を使用し、グラジエント条件も合わせて検討を行ったが、試料によってはイオンサプレッションを除くことが困難だったため、Develosil C30-UG-5を用いたところ、良好な結果が得られた。

開発した方法を用いて、牛の筋肉等10食品の添加回収試験を行った結果、選択性は良好で何れの試料においても妨害ピークは認められず、真度はトリフロキシストロビン90～100%、代謝物B 89～101%、併行精度はトリフロキシストロビン1～4%、代謝物B 1～6%の良好な結果が得られたことから、本試験法は、陸棲哺乳類に属する動物の筋肉、脂肪及び肝臓並びに、魚介類、鶏卵、はちみつ等の畜水産物に適応可能であると判断された。

#### [結論]

畜水産物中のトリフロキシストロビン試験法として、トリフロキシストロビン及び代謝物Bを試料から塩酸酸性下でアセトン抽出し、スチレンジビニルベンゼン共重合体及びグラファイトカーボン連結ミニカラムで精製した後、LC-MS/MSで定量及び確認する方法を開発した。

開発した試験法を牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、さけ、うなぎ、しじみ、牛乳、鶏卵、はちみつ及び豚の筋肉の10食品に適用した結果、選択性は良好で何れの試料においても妨害ピークは認められず、真度はトリフロキシストロビン90～100%、代謝物B 89～101%、併行精度はトリフロキシストロビン1～4%、代謝物B 1～6%の良好な結果が得られた。また、定量限界として、0.01 mg/kgを設定可能であることが確認された。

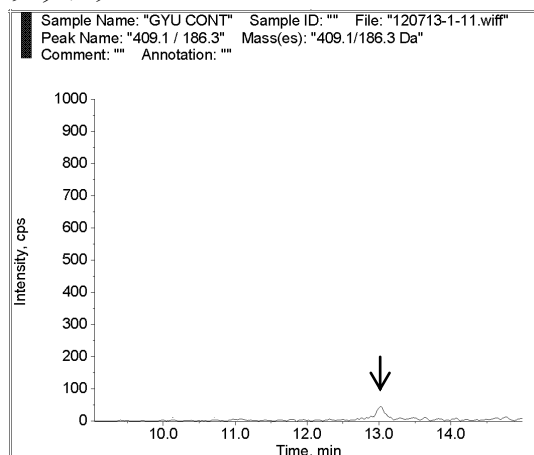
#### [参考文献]

食品に残留する農薬，飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法 2,4-D、2,4-DB及びクロプロップ試験法(農産物)(厚生労働省)

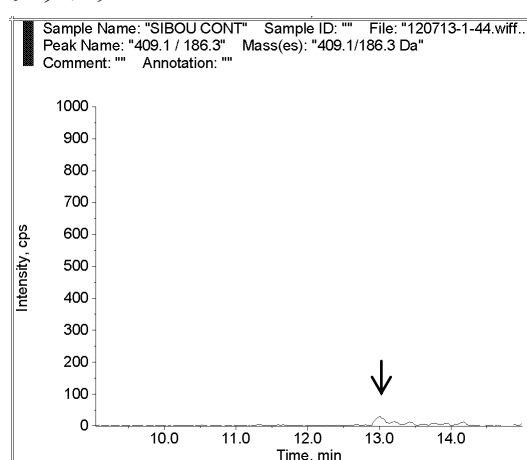
バイエルクロップサイエンス提供資料

トリフロキシストロビンの添加回収試験におけるクロマトグラム

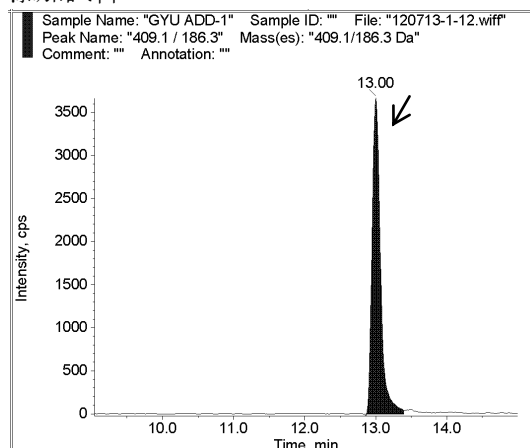
ブランク



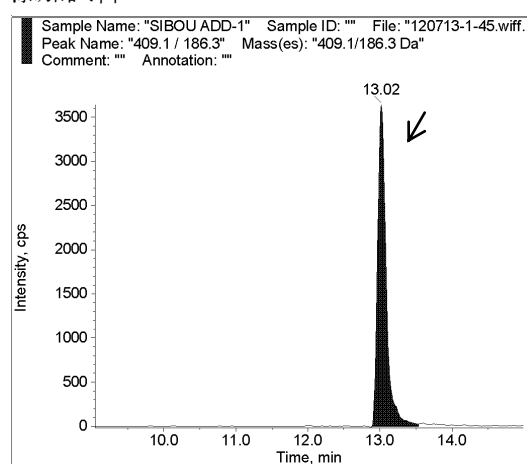
ブランク



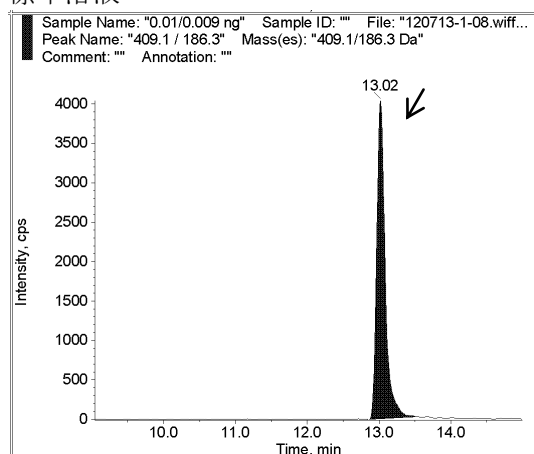
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

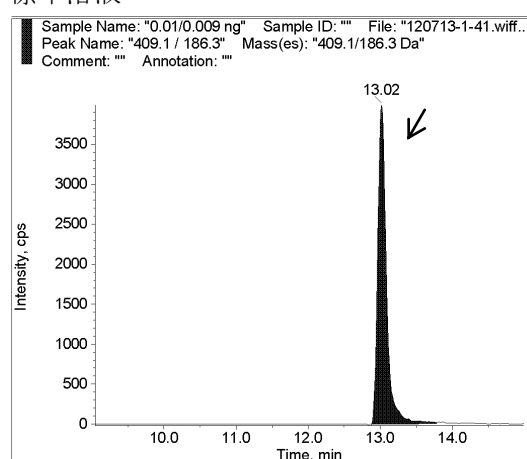
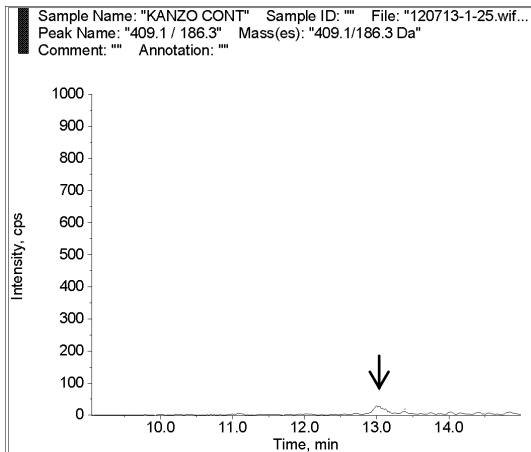


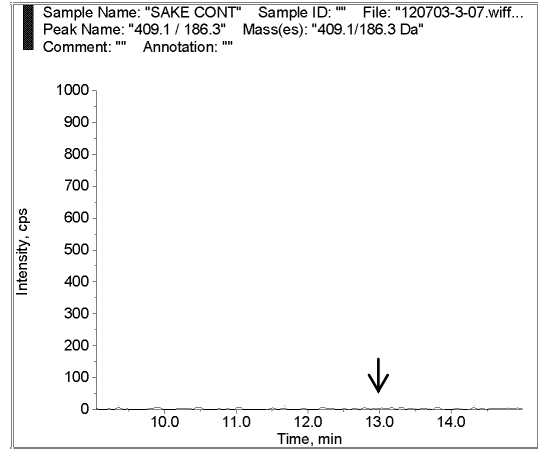
図 6-1 牛の筋肉の SRM クロマトグラム  
 トリフロキシストロビン ( $m/z$  +409→186)  
 添加濃度 : 0.05 ppm

図 6-2 牛の脂肪の SRM クロマトグラム  
 トリフロキシストロビン ( $m/z$  +409→186)  
 添加濃度 : 0.05 ppm

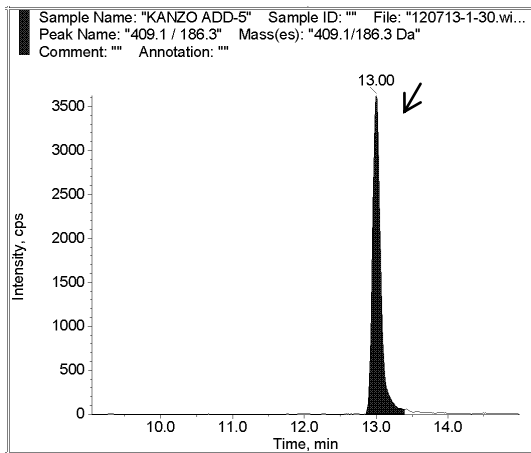
ブランク



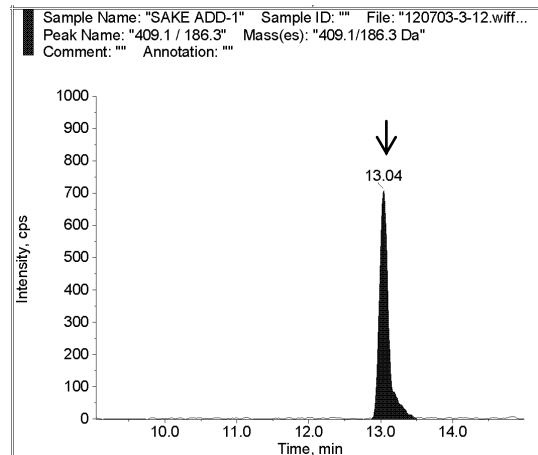
ブランク



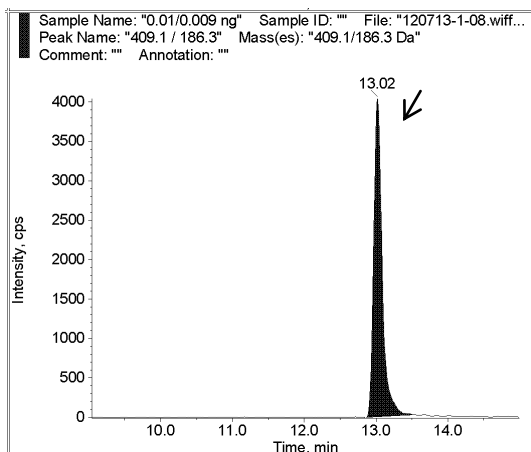
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

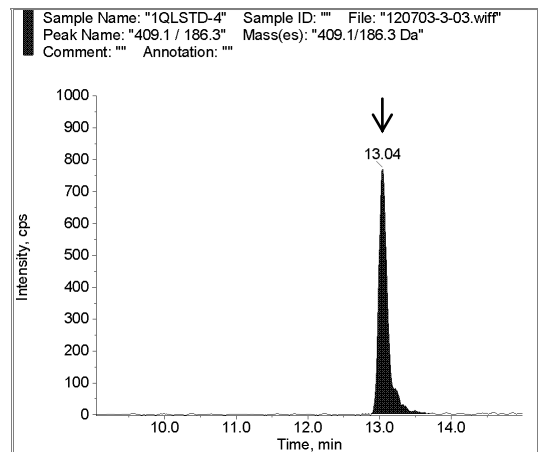
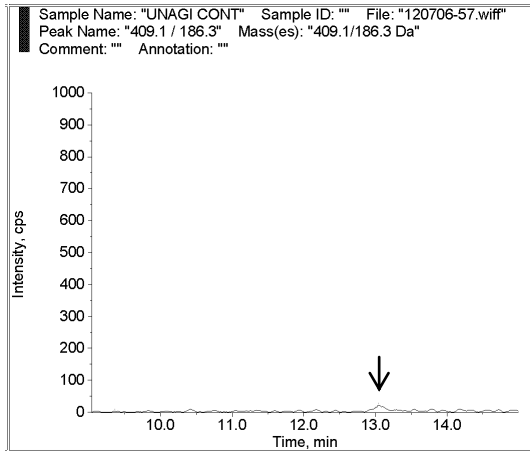


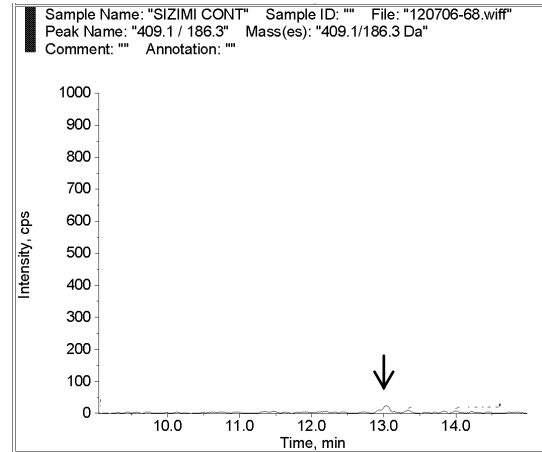
図 6-3 牛の肝臓の SRM クロマトグラム  
 トリフロキシストロビン ( $m/z$  +409→186)  
 添加濃度 : 0.05 ppm

図 6-4 さけの SRM クロマトグラム  
 トリフロキシストロビン ( $m/z$  +409→186)  
 添加濃度 : 0.01 ppm

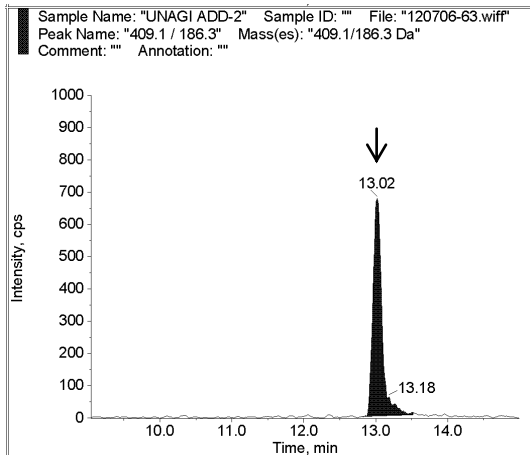
ブランク



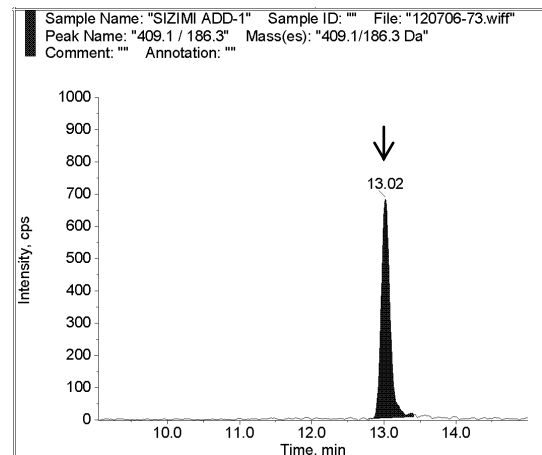
ブランク



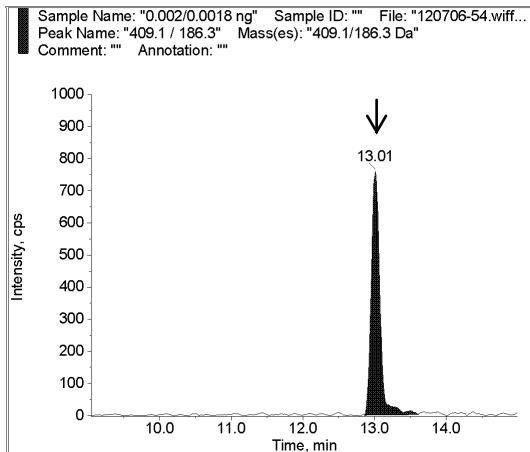
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

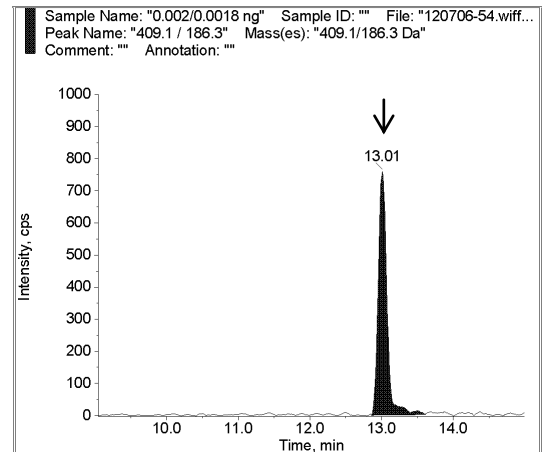
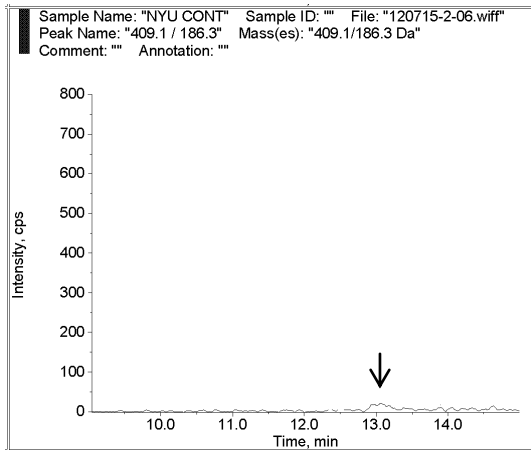


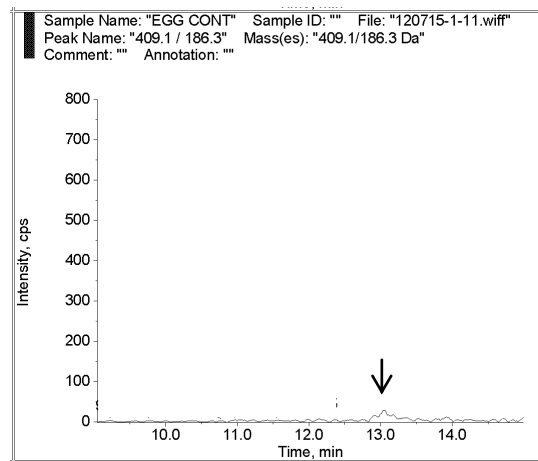
図 6-5 うなぎの SRM クロマトグラム  
トリフロキシストロピン ( $m/z$  +409→186)  
添加濃度 : 0.01 ppm

図 6-6 しじみの SRM クロマトグラム  
トリフロキシストロピン ( $m/z$  +409→186)  
添加濃度 : 0.01 ppm

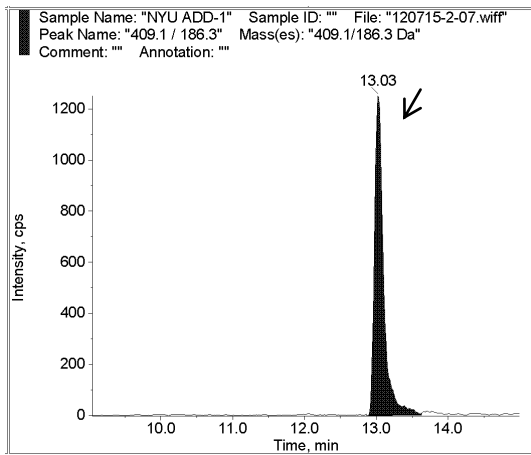
ブランク



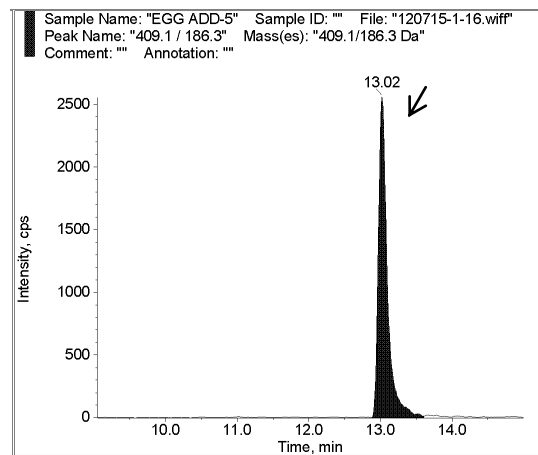
ブランク



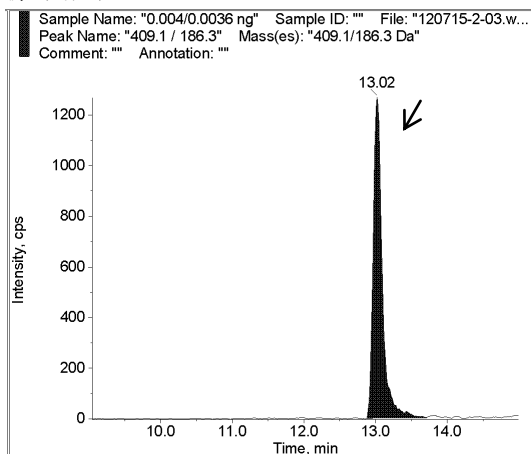
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

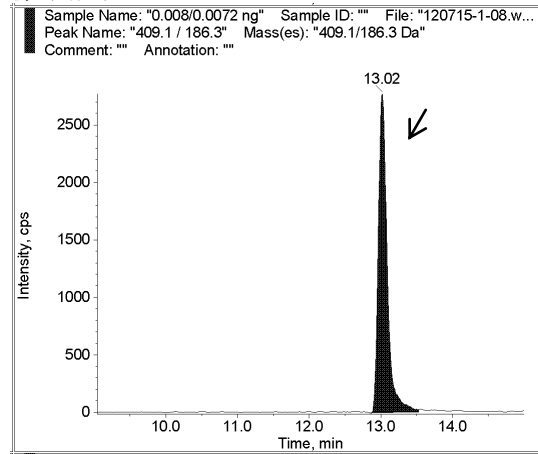
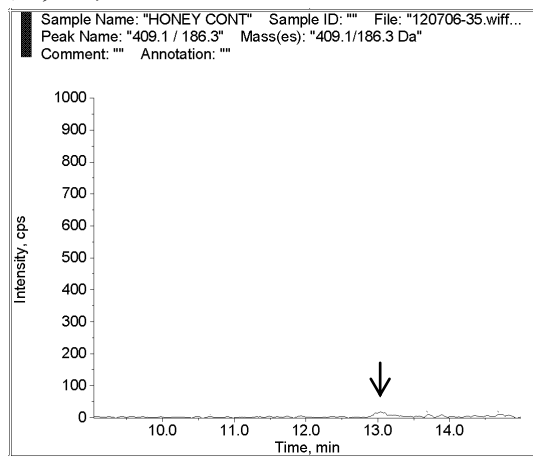


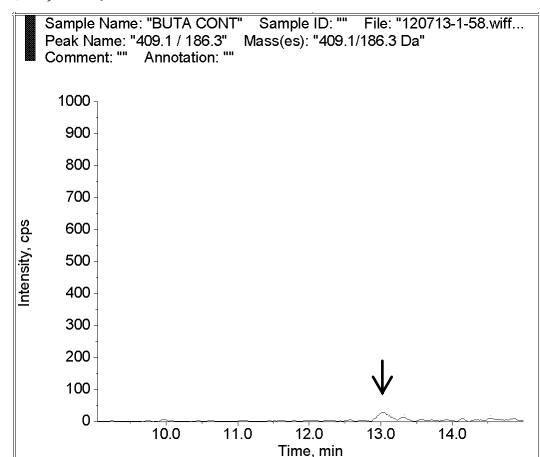
図 6-7 牛乳の SRM クロマトグラム  
 トリフロキシストロビン ( $m/z$  +409→186)  
 添加濃度 : 0.02 ppm

図 6-8 鶏卵の SRM クロマトグラム  
 トリフロキシストロビン ( $m/z$  +343→140)  
 添加濃度 : 0.04 ppm

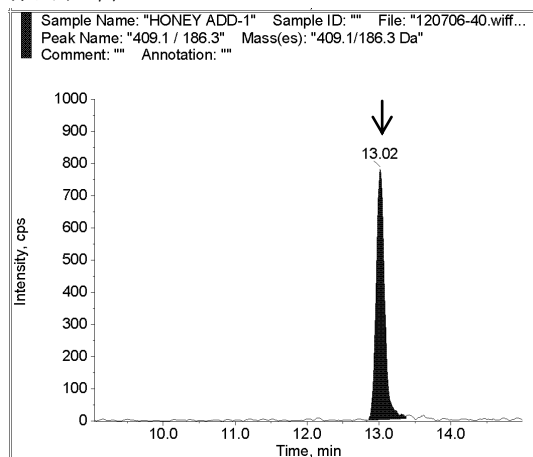
ブランク



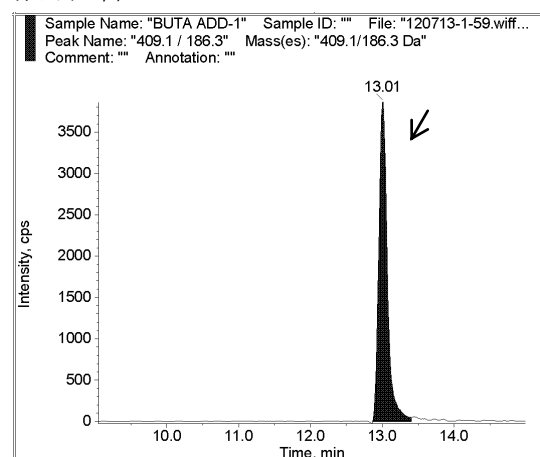
ブランク



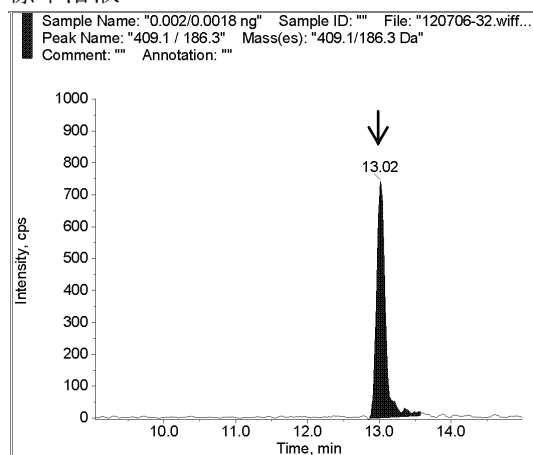
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

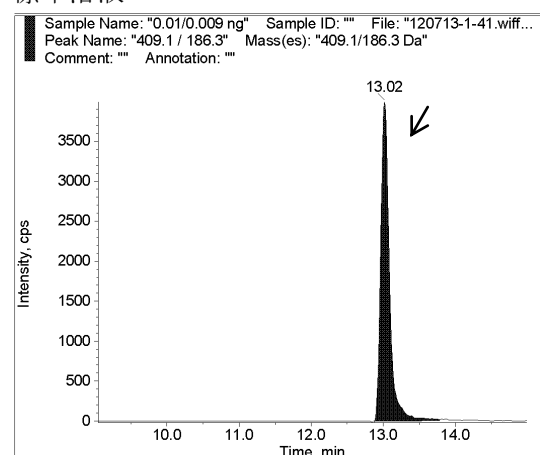
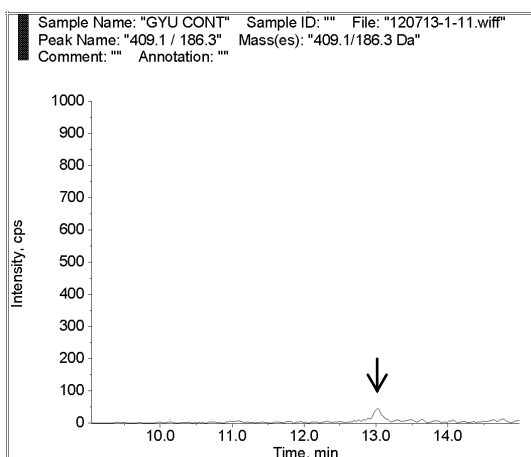


図 6-9 はちみつの SRM クロマトグラム  
トリフロキシストロビン ( $m/z$  +409→186)  
添加濃度 : 0.01 ppm

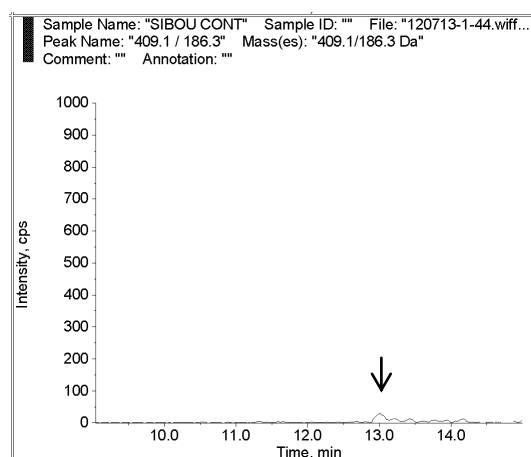
図 6-10 豚の筋肉の SRM クロマトグラム  
トリフロキシストロビン ( $m/z$  +409→186)  
添加濃度 : 0.05 ppm

トリフロキシストロビンの定量限界の推定におけるクロマトグラム

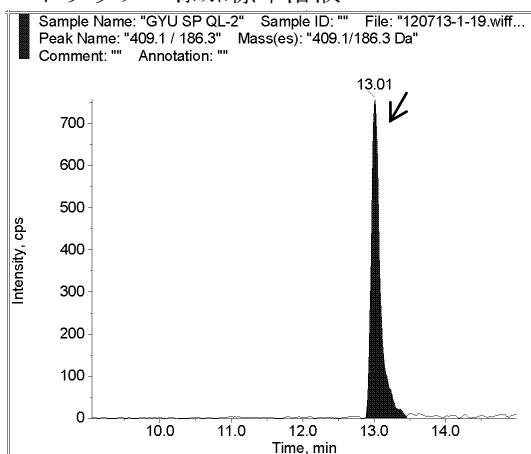
ブランク



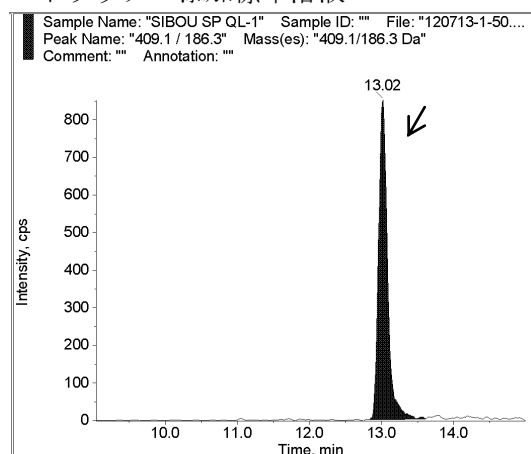
ブランク



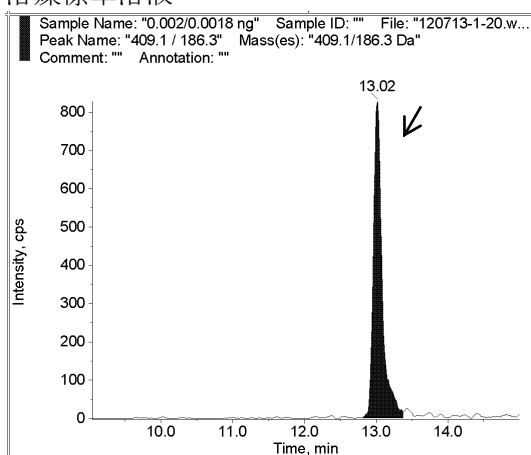
マトリックス添加標準溶液



マトリックス添加標準溶液



溶媒標準溶液



溶媒標準溶液

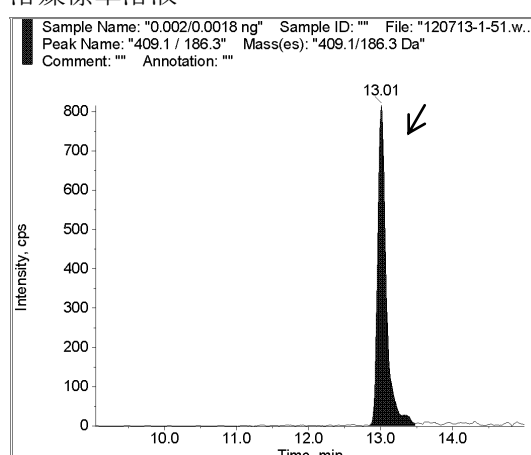
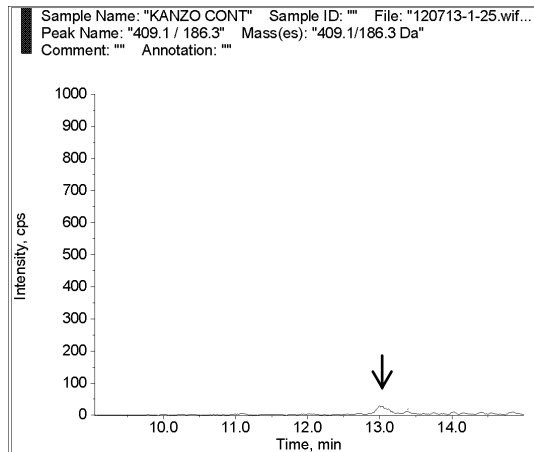


図 7-1 牛の筋肉の SRM クロマトグラム  
 トリフロキシストロビン ( $m/z$  +409→186)  
 試料中 0.01 ppm 相当

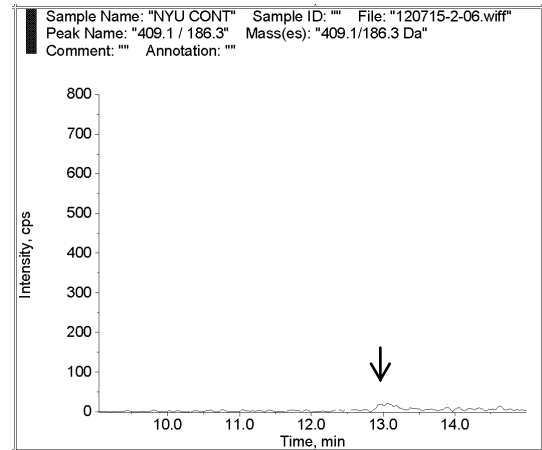
図 7-2 牛の脂肪の SRM クロマトグラム  
 トリフロキシストロビン ( $m/z$  +409→186)  
 試料中 0.01 ppm 相当



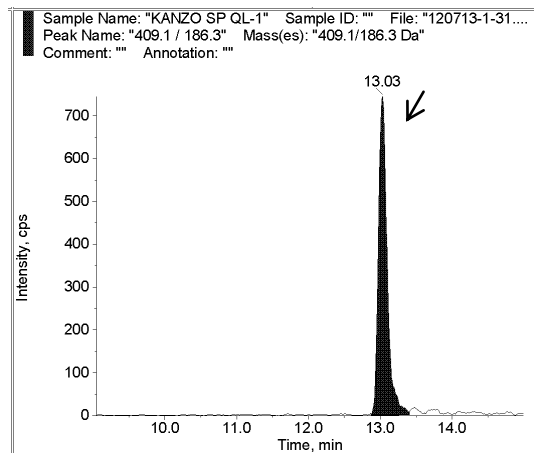
ブランク



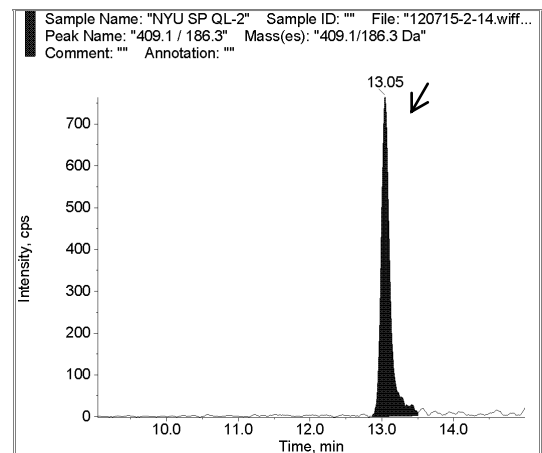
ブランク



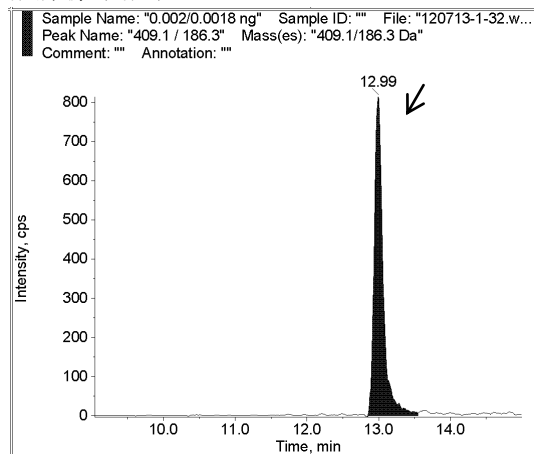
マトリックス添加標準溶液



マトリックス添加標準溶液



溶媒標準溶液



溶媒標準溶液

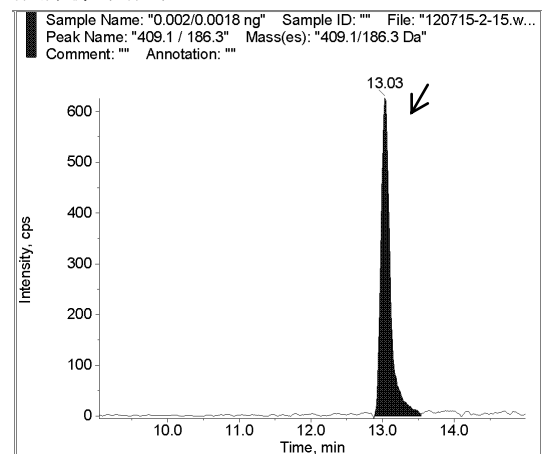
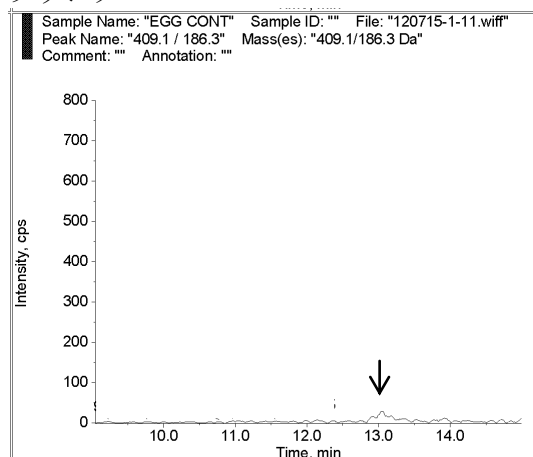


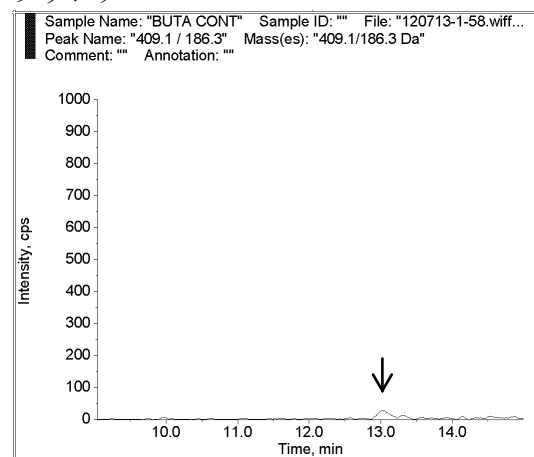
図 7-3 牛の肝臓の SRM クロマトグラム  
トリフロキシストロビン ( $m/z$  +409→186)  
試料中 0.01 ppm 相当

図 7-4 牛乳の SRM クロマトグラム  
トリフロキシストロビン ( $m/z$  +409→186)  
試料中 0.01 ppm 相当

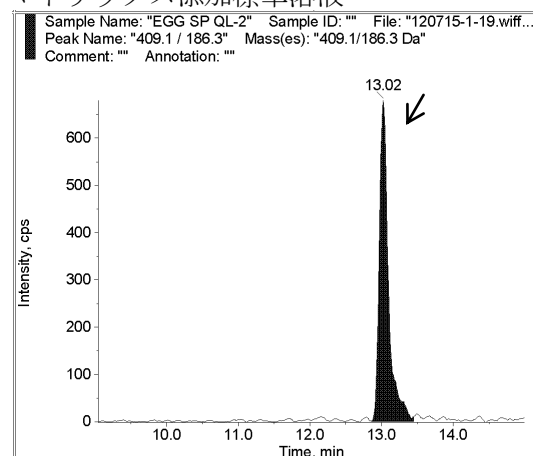
ブランク



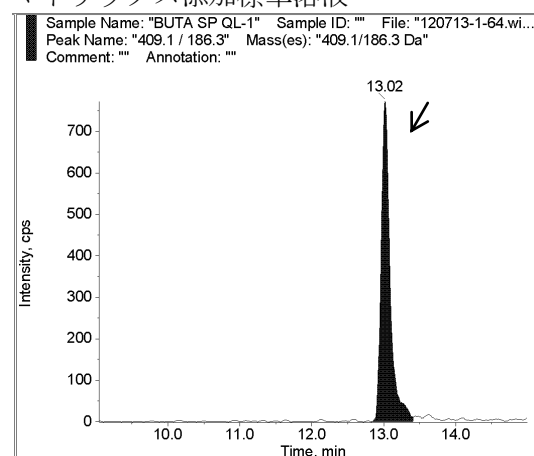
ブランク



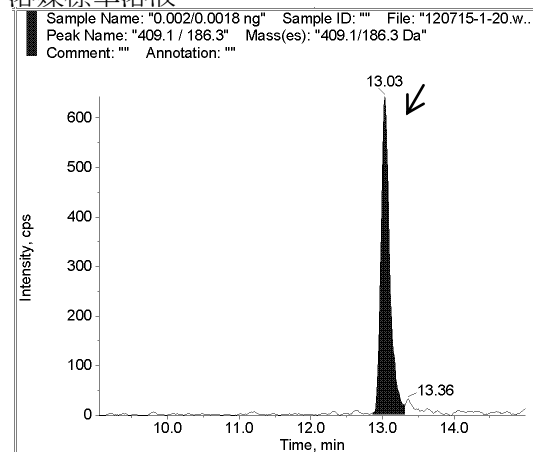
マトリックス添加標準溶液



マトリックス添加標準溶液



溶媒標準溶液



溶媒標準溶液

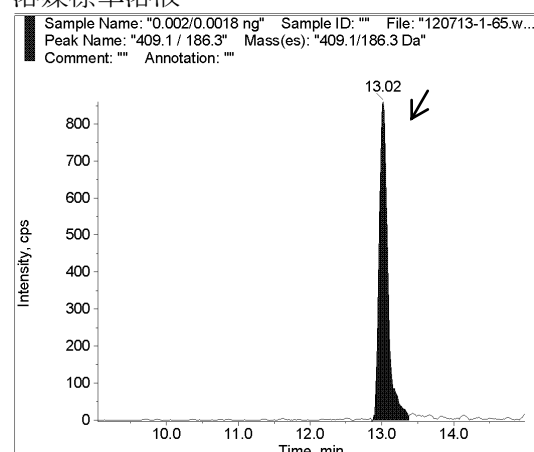
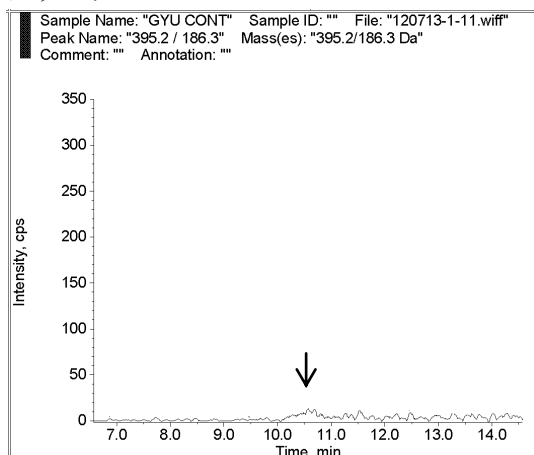


図 7-5 鶏卵の SRM クロマトグラム  
 トリフロキシストロビン ( $m/z$  +409→186)  
 試料中 0.01 ppm 相当

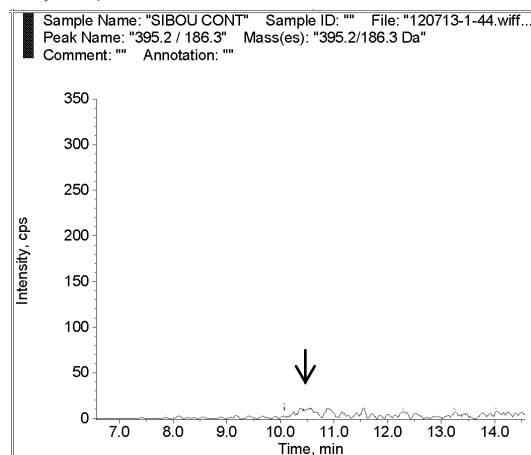
図 7-6 豚の筋肉の SRM クロマトグラム  
 トリフロキシストロビン ( $m/z$  +409→186)  
 試料中 0.01 ppm 相当

代謝物Bの添加回収試験におけるクロマトグラム

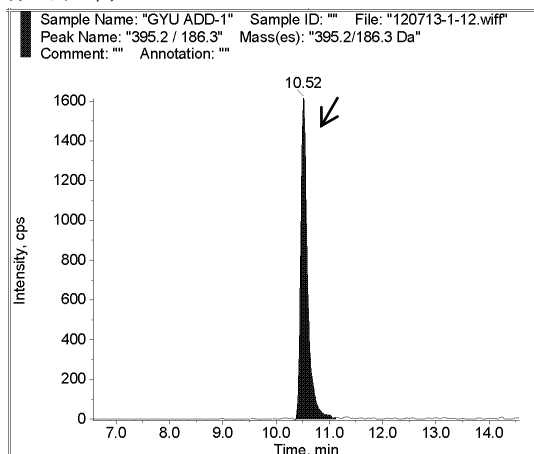
ブランク



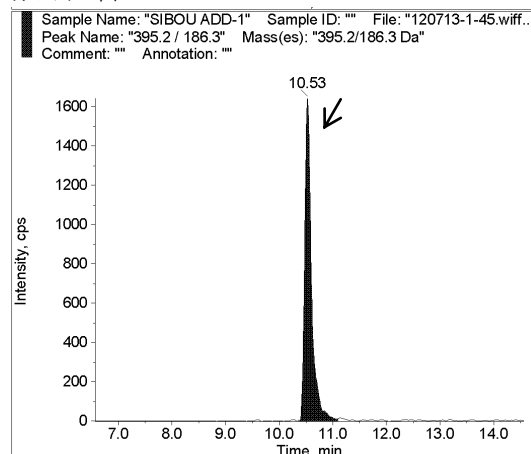
ブランク



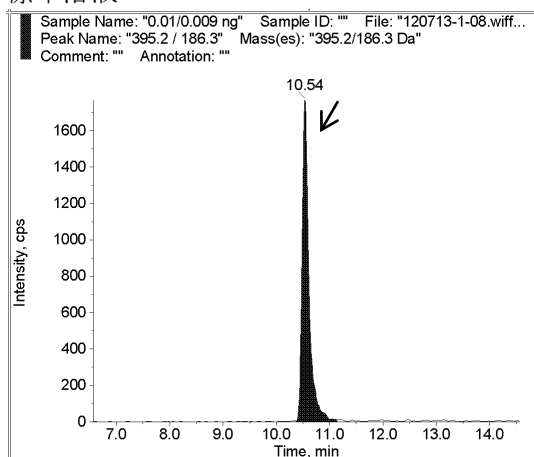
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

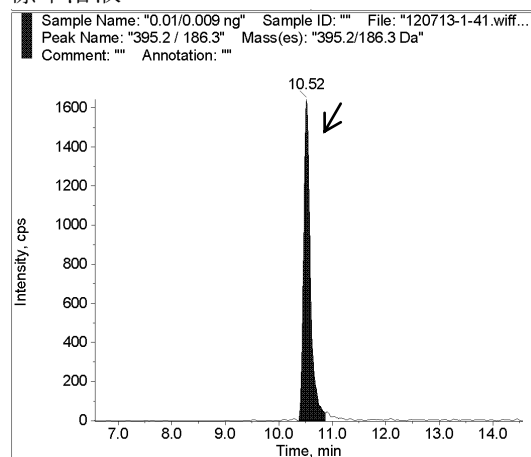
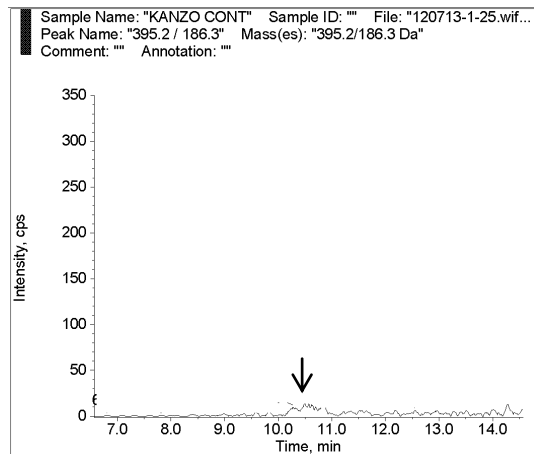


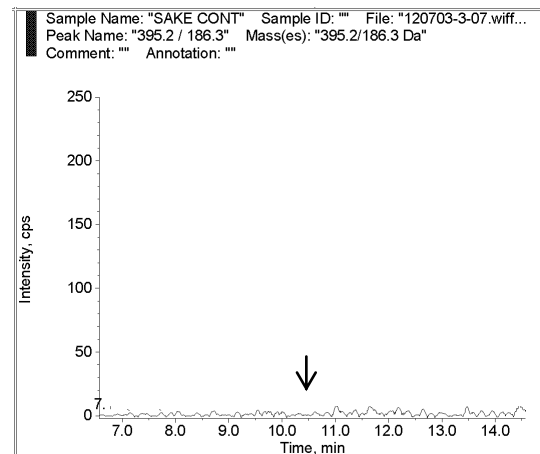
図 8-1 牛の筋肉の SRM クロマトグラム  
 代謝物 B ( $m/z +395 \rightarrow 186$ )  
 添加濃度 : 0.045 ppm

図 8-2 牛の脂肪の SRM クロマトグラム  
 代謝物 B ( $m/z +395 \rightarrow 186$ )  
 添加濃度 : 0.045 ppm

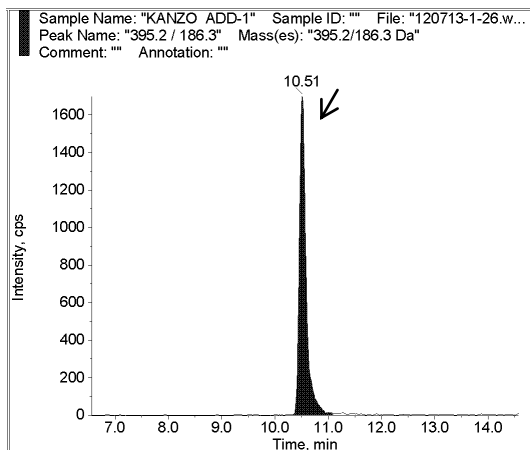
ブランク



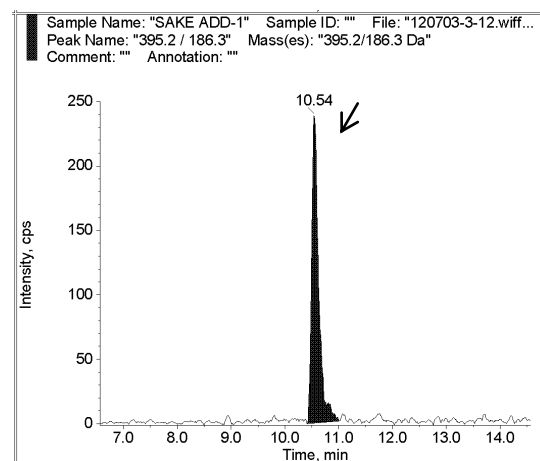
ブランク



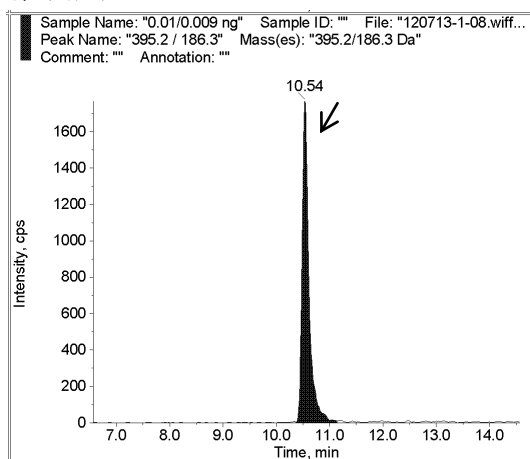
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

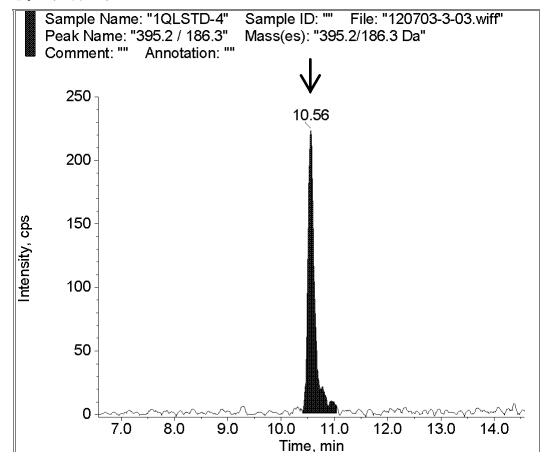
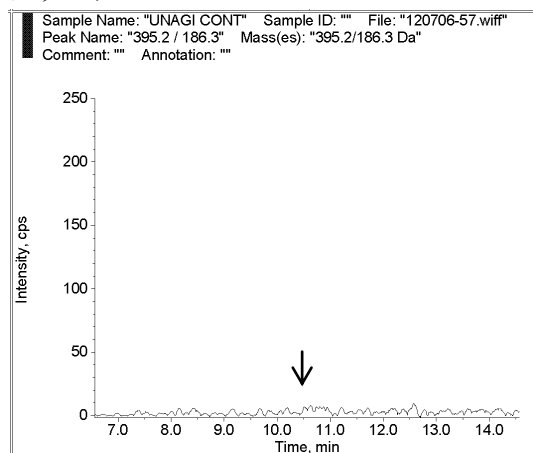


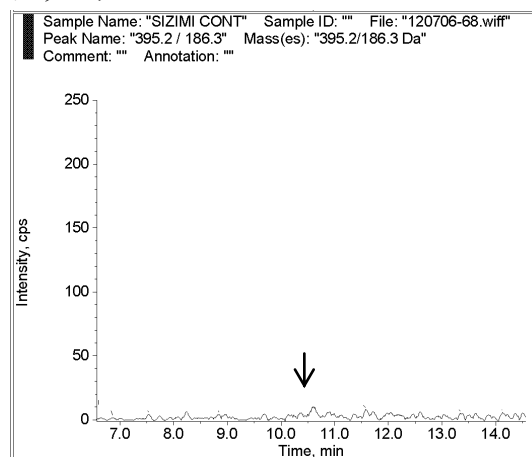
図 8-3 牛の肝臓の SRM クロマトグラム  
 代謝物 B ( $m/z + 395 \rightarrow 186$ )  
 添加濃度 : 0.045 ppm

図 8-4 さけの SRM クロマトグラム  
 代謝物 B ( $m/z + 395 \rightarrow 186$ )  
 添加濃度 : 0.009 ppm

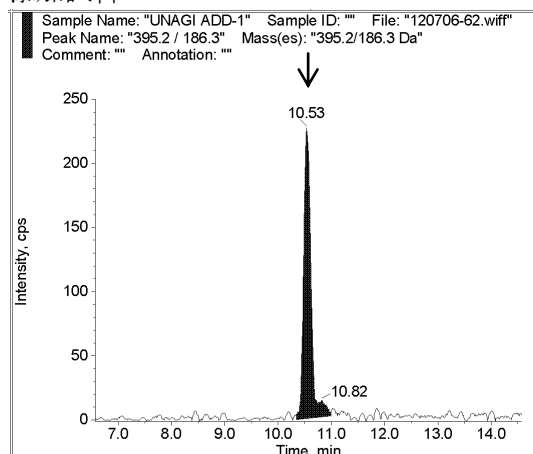
ブランク



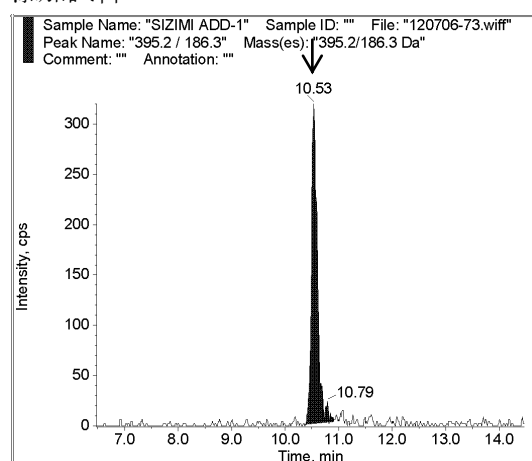
ブランク



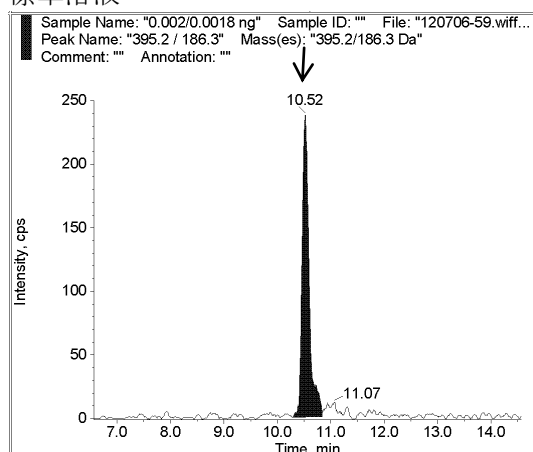
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

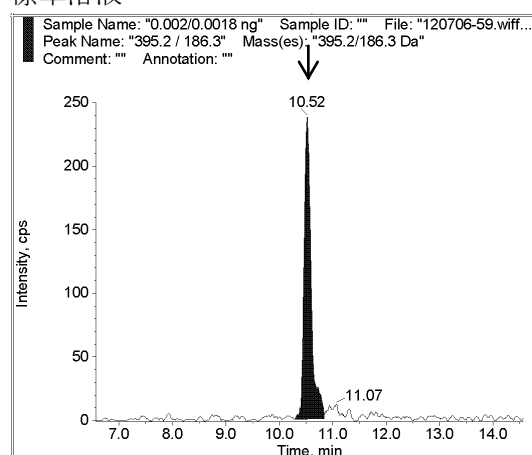
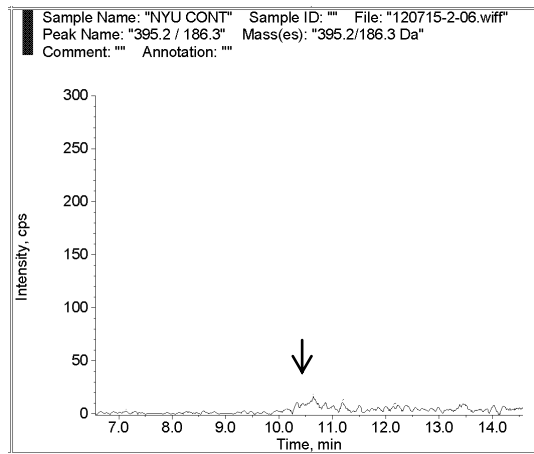


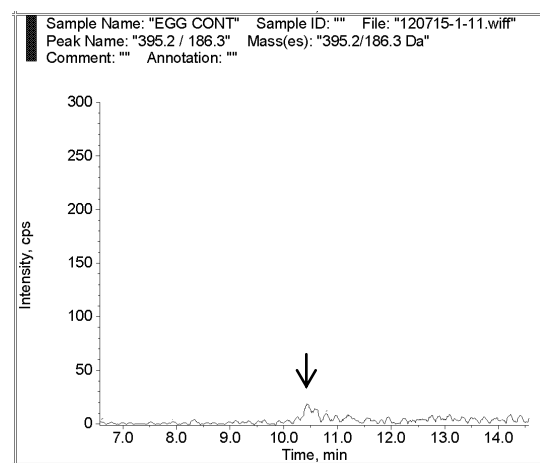
図 8-5 うなぎの SRM クロマトグラム  
代謝物 B ( $m/z +395 \rightarrow 186$ )  
添加濃度 : 0.009 ppm

図 8-6 しじみの SRM クロマトグラム  
代謝物 B ( $m/z +395 \rightarrow 186$ )  
添加濃度 : 0.009 ppm

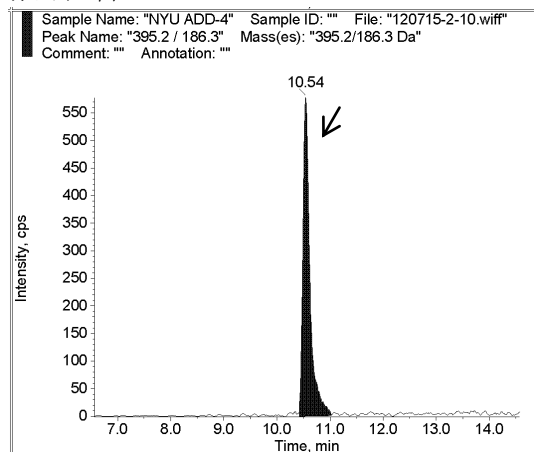
ブランク



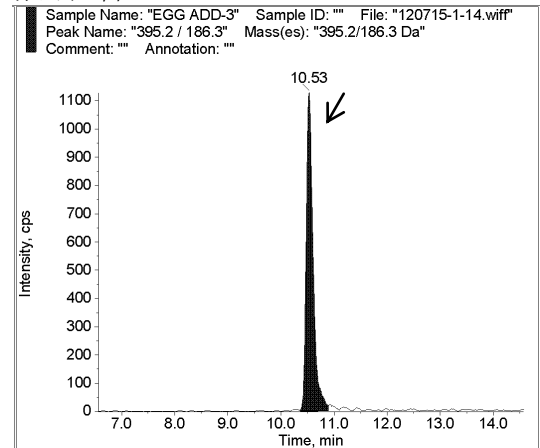
ブランク



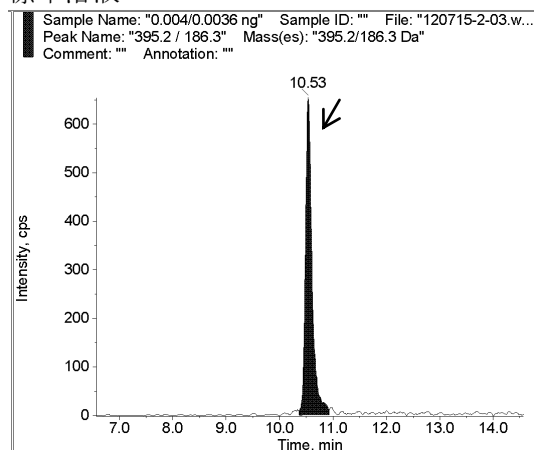
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

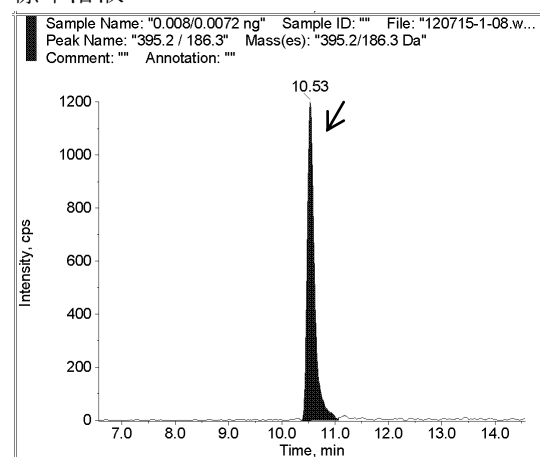
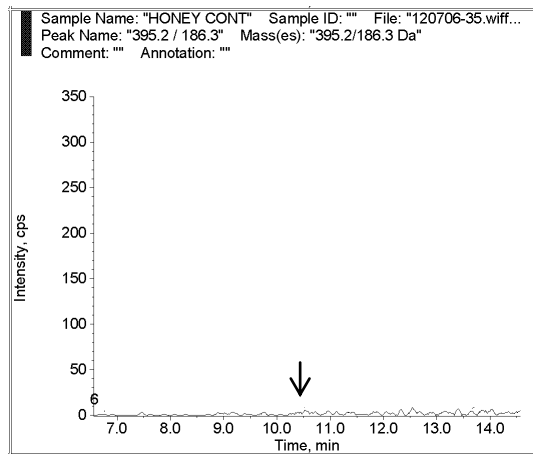


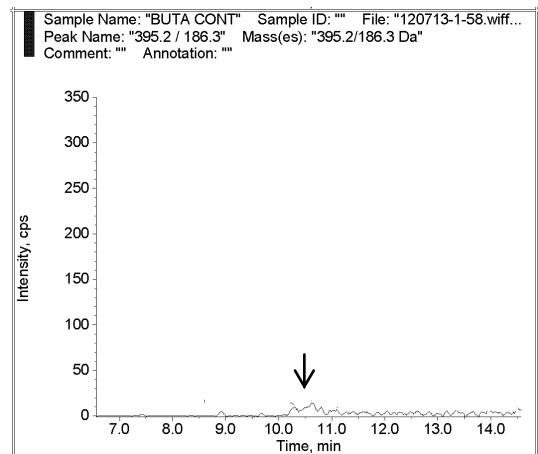
図 8-7 牛乳の SRM クロマトグラム  
 代謝物 B ( $m/z +395 \rightarrow 186$ )  
 添加濃度 : 0.018 ppm

図 8-8 鶏卵の SRM クロマトグラム  
 代謝物 B ( $m/z +395 \rightarrow 186$ )  
 添加濃度 : 0.036ppm

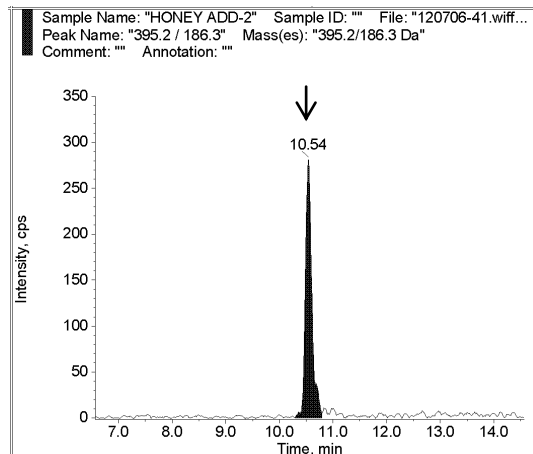
ブランク



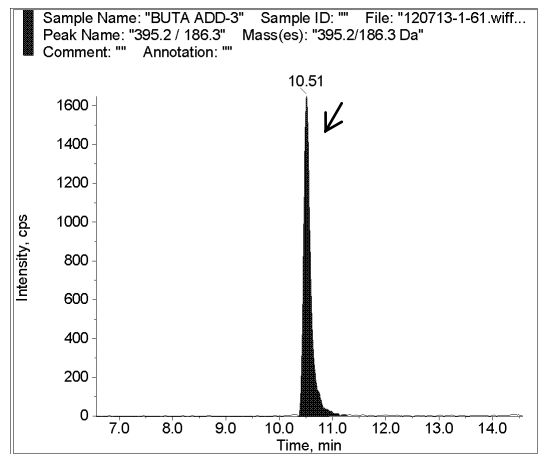
ブランク



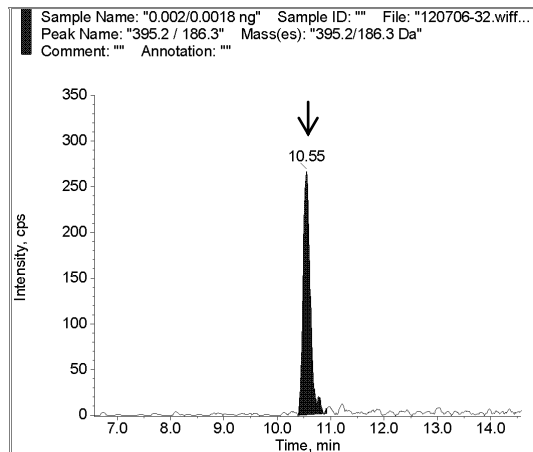
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

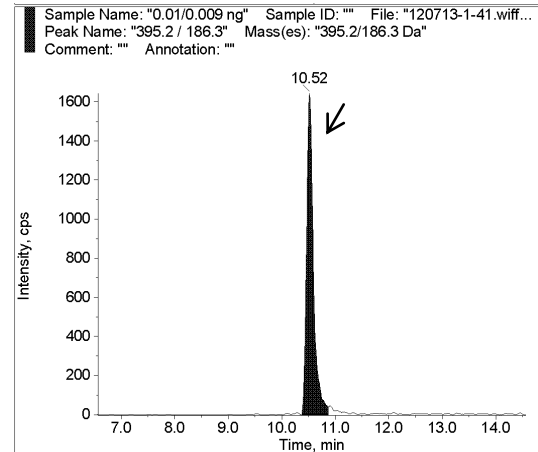
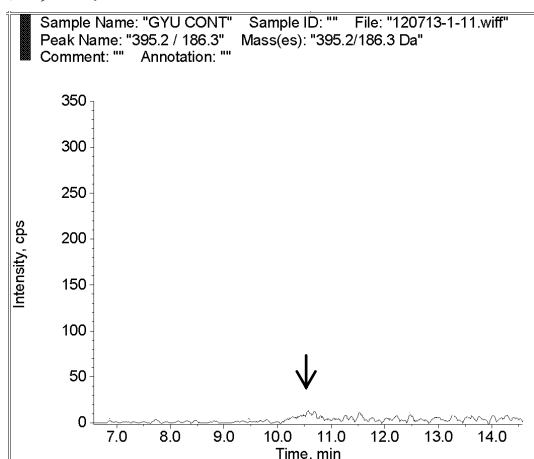


図 8-9 はちみつの SRM クロマトグラム  
代謝物 B ( $m/z$  +395→186)  
添加濃度 : 0.009 ppm

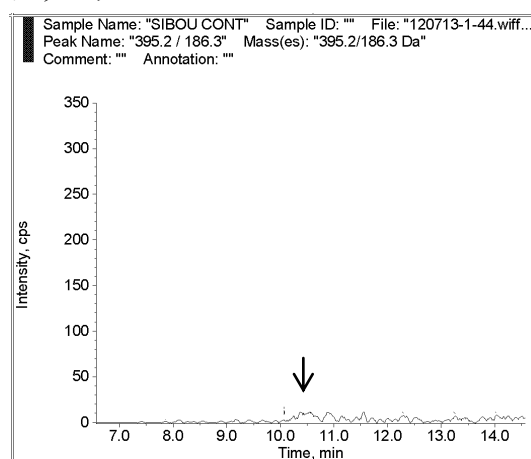
図 8-10 豚の筋肉の SRM クロマトグラム  
代謝物 B ( $m/z$  +195→186)  
添加濃度 : 0.045 ppm

代謝物Bの定量限界の推定におけるクロマトグラム

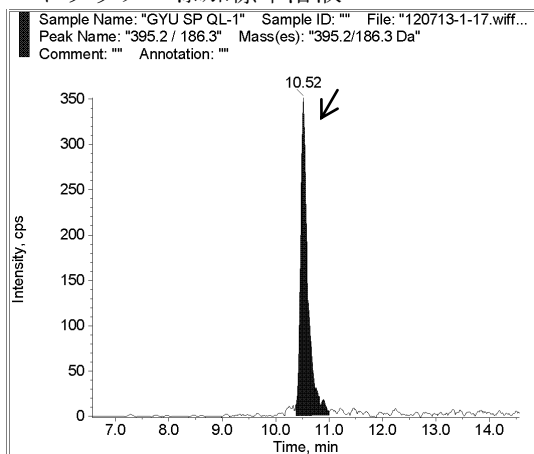
ブランク



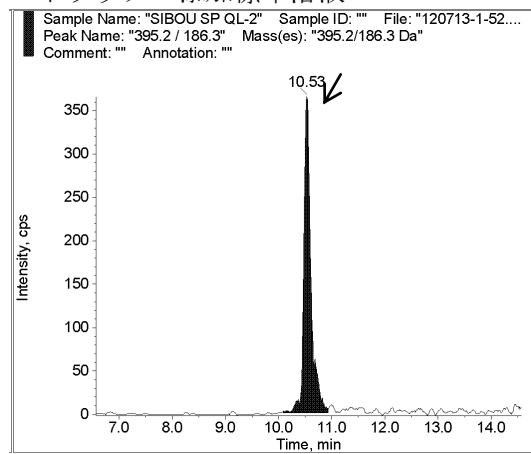
ブランク



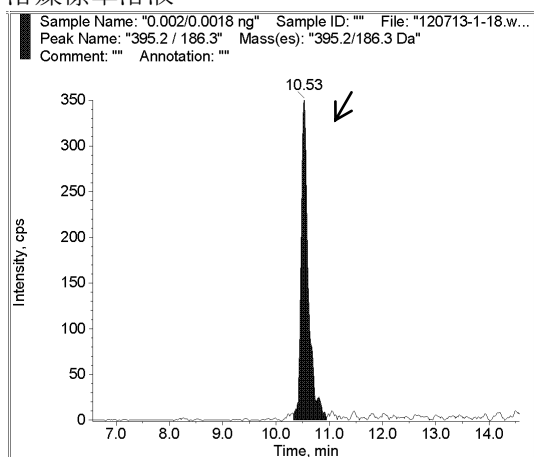
マトリックス添加標準溶液



マトリックス添加標準溶液



溶媒標準溶液



溶媒標準溶液

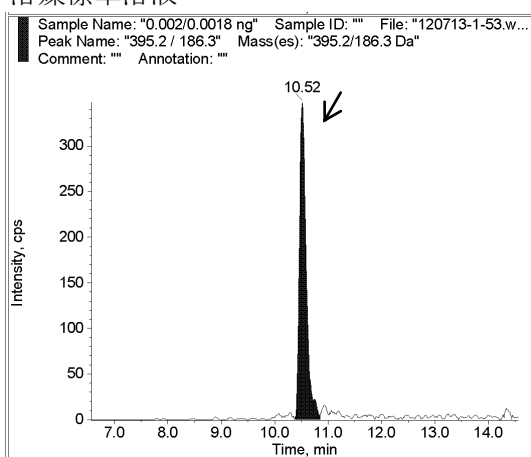
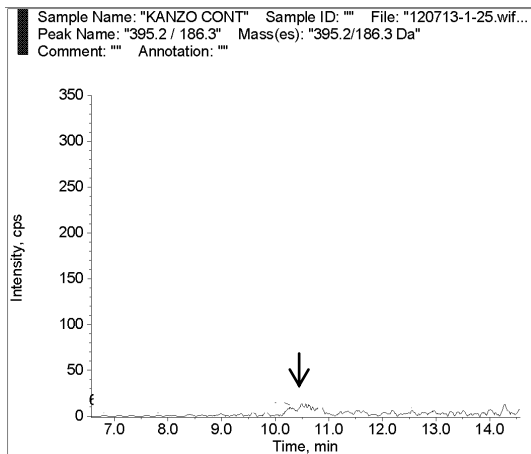


図 9-1 牛の筋肉の SRM クロマトグラム  
 代謝物 B ( $m/z + 395 \rightarrow 186$ )  
 試料中 0.009 ppm 相当

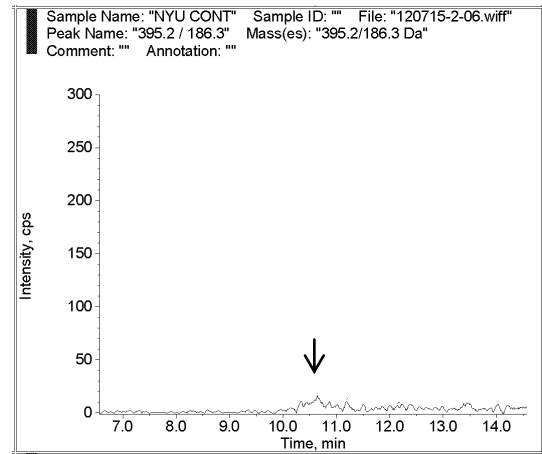
図 9-2 牛の脂肪の SRM クロマトグラム  
 代謝物 B ( $m/z + 395 \rightarrow 186$ )  
 試料中 0.009 ppm 相当



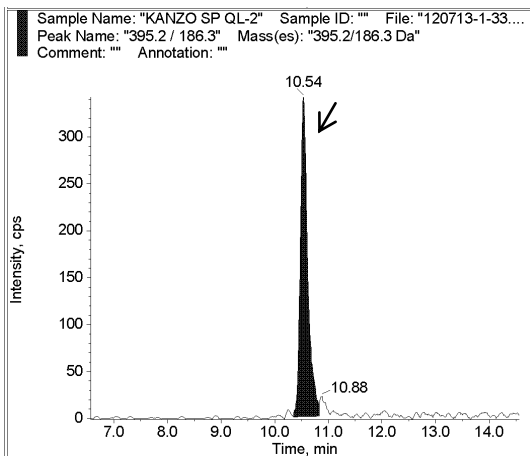
ブランク



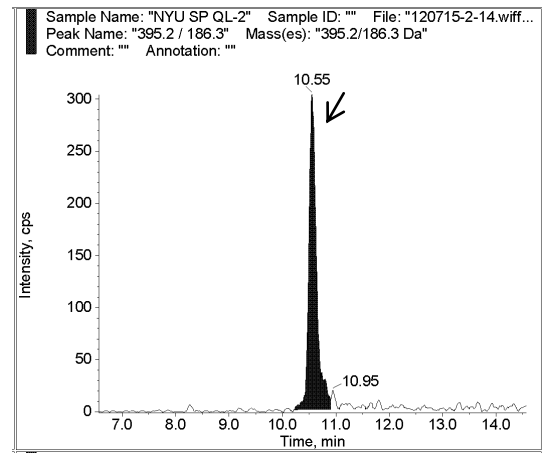
ブランク



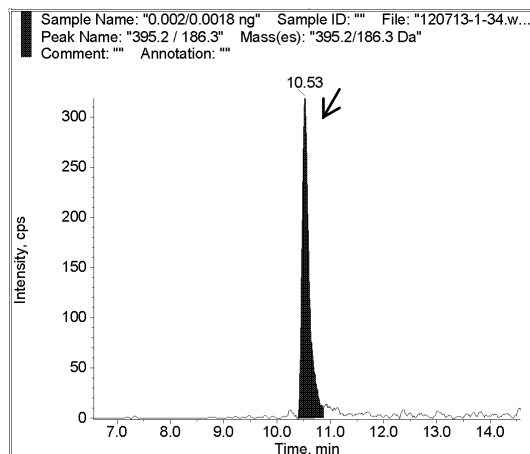
マトリックス添加標準溶液



マトリックス添加標準溶液



溶媒標準溶液



溶媒標準溶液

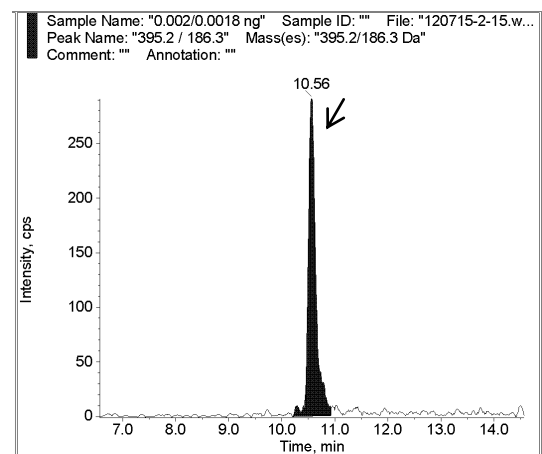
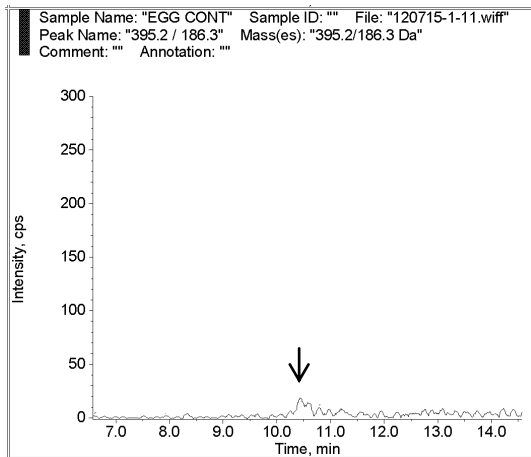


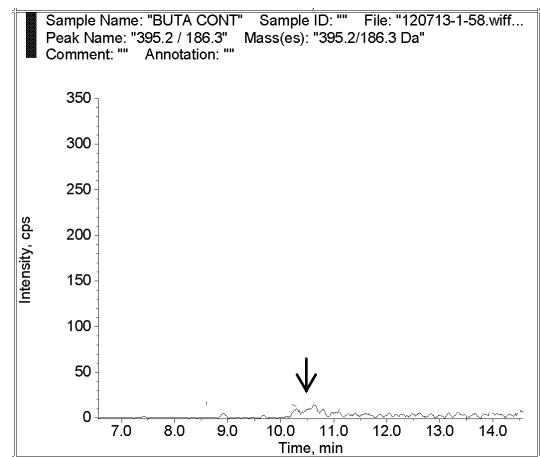
図 9-3 牛の肝臓の SRM クロマトグラム  
代謝物 B ( $m/z + 395 \rightarrow 186$ )  
試料中 0.009 ppm 相当

図 9-4 牛乳の SRM クロマトグラム  
代謝物 B ( $m/z + 395 \rightarrow 186$ )  
試料中 0.009 ppm 相当

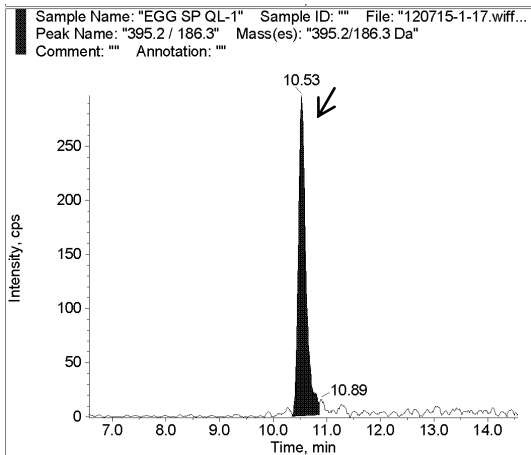
ブランク



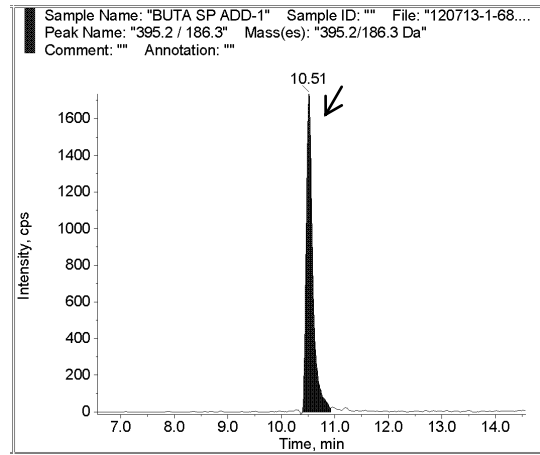
ブランク



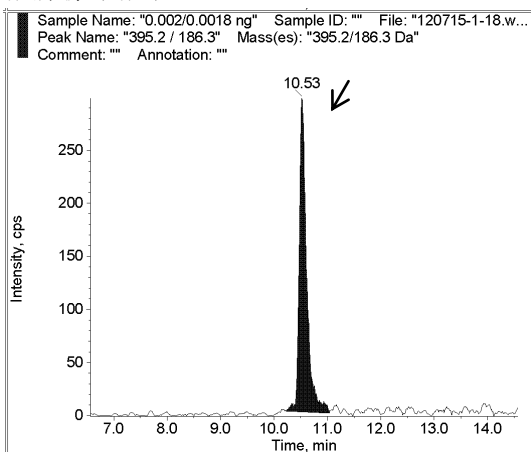
マトリックス添加標準溶液



マトリックス添加標準溶液



溶媒標準溶液



溶媒標準溶液

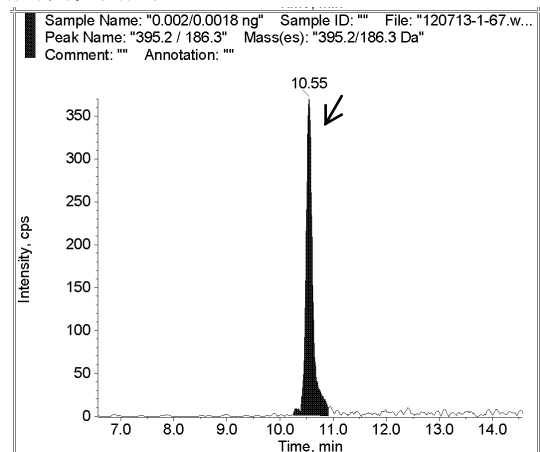
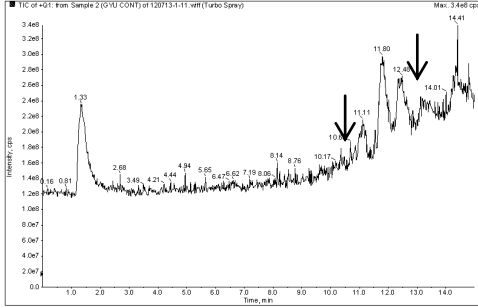


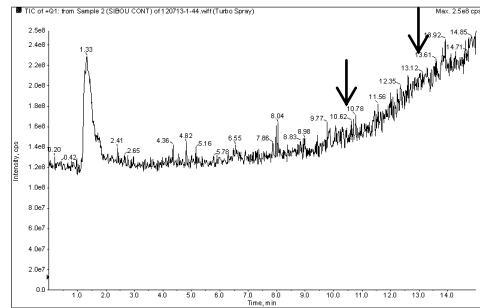
図 9-5 鶏卵の SRM クロマトグラム  
 代謝物 B ( $m/z + 395 \rightarrow 186$ )  
 試料中 0.009 ppm 相当

図 9-6 豚の筋肉の SRM クロマトグラム  
 代謝物 B ( $m/z + 395 \rightarrow 186$ )  
 試料中 0.009 ppm 相当

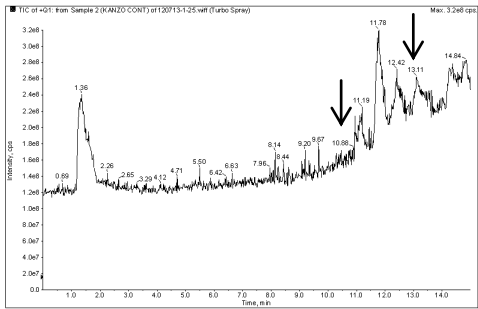
### 牛の筋肉



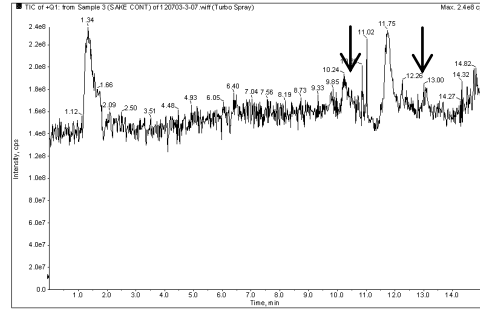
### 牛の脂肪



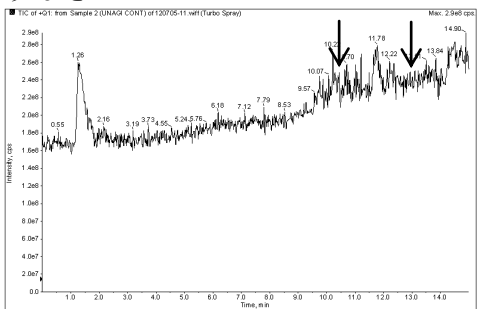
### 牛の肝臓



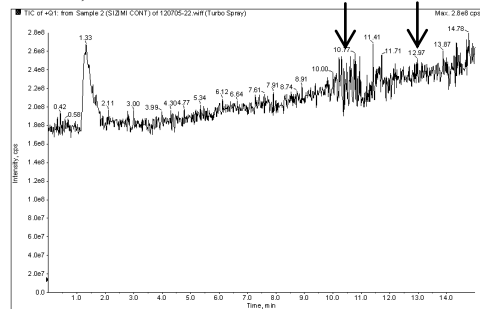
### さけ



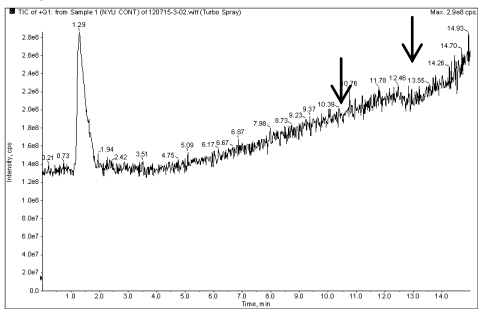
### うなぎ



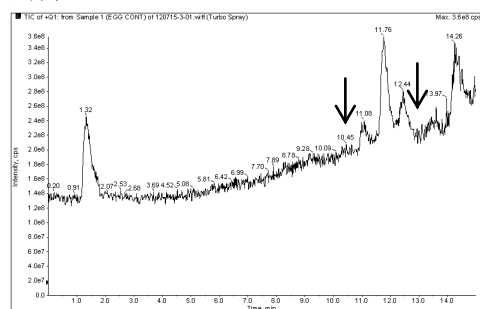
### しじみ



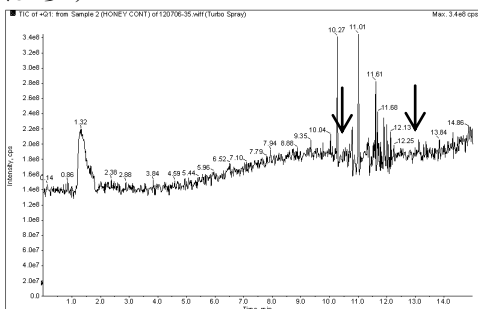
### 牛乳



### 鶏卵



### はちみつ



### 豚の筋肉

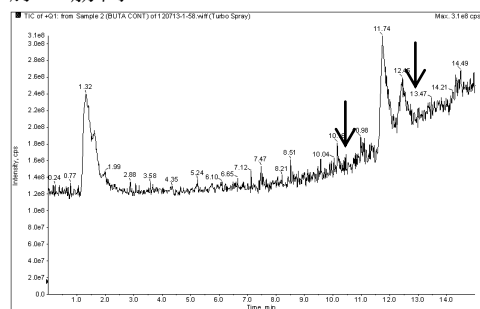


図 10 ブランク試料のトータルイオンクロマトグラム (スキャン範囲: 50~1000 m/z)