

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

# 食品に残留する農薬等の成分である物質の 試験法開発事業報告書

シフルメトフェン試験法（畜産物）

## シフルメトフェン試験法（畜産物）の検討結果

### 〔緒言〕

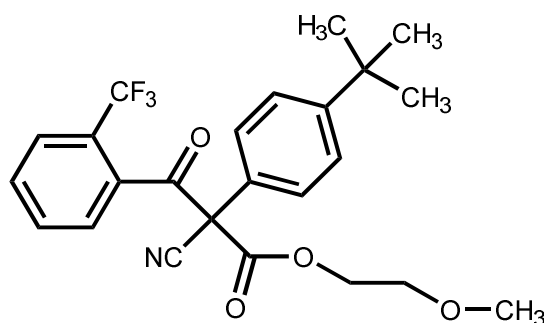
#### 1. 背景・目的

シフルメトフェンはベンゾイルアセトニトリル系の殺ダニ剤であり、ミトコンドリアの電子伝達系複合体Ⅱを阻害することにより作用すると考えられている。シフルメトフェンの残留基準値は、「農産物についてはシフルメトフェンをいい、畜産物についてはシフルメトフェン及び代謝物 B-1【 $\alpha, \alpha, \alpha$ -トリフルオロ-*o*-トルイル酸】をシフルメトフェン含量に換算したものの和」として設定されている。シフルメトフェンに関する個別試験法（シフルメトフェン試験法（農産物）（食安発第 1026004 号、平成 19 年 10 月 26 日））では、農産物（果実及び野菜）に関して、液体クロマトグラフ・質量分析計（LC-MS）を用いた方法があるが、畜産物に適用されていない。本研究では、液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計（LC-MS/MS）を用いた畜産物中のシフルメトフェン試験法を開発することを目的とした。

#### 2. 分析対象化合物の構造式及び物理化学的性質

分析対象化合物： シフルメトフェン（Cyflumetofen）

構造式：



分子式：  $C_{24}H_{24}F_3NO_4$

分子量： 447.45

化学名： 2-Methoxyethyl (*RS*)-2-(4-*tert*-butylphenyl)-2-cyano-3-oxo-3-( $\alpha, \alpha, \alpha$ -trifluoro-*o*-tolyl) propionate

CAS 番号： 400882-07-7

外観： 白色～ほとんど白色、結晶性粉末～粉末

溶解性： エタノール及びアセトンに溶け、水にほとんど溶けない

1-オクタノール/水分配係数（log Pow）： 4.3

沸点： 269°C（22 hPa）

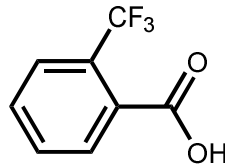
融点： 77.9 – 81.7°C

蒸気圧：  $1.0 \times 10^{-6}$  hPa

出典：富士フィルム和光純薬および林純薬 シフルメトフェン標準品 製品規格書

分析対象化合物：  $\alpha, \alpha, \alpha$ -トリフルオロ-*o*-トルイル酸（以下、代謝物 B-1 という）

構造式：



分子式：  $C_8H_5F_3O_2$

分子量： 190.12

化学名：  $\alpha, \alpha, \alpha$ -Trifluoro-*o*-toluic acid

CAS 番号： 433-97-6

外観： 白色 ~ わずかにうすい黄褐色の結晶性粉末

溶解性： エタノール及びアセトンに溶け、水にほとんど溶けない

1-オクタノール/水分配係数 (log Pow)： 2.95

沸点： 247°C

融点： 107.0 – 111.0°C

蒸気圧：  $1.0 \times 10^{-6}$  hPa

出典：富士フィルム和光純薬、東京化成、Merck および林純薬 シフルメトフェン標準品 製品規格書、EPA DSSTox

### 3. 基準値

畜産物についてはシフルメトフェン及び代謝物 B-1 【 $\alpha, \alpha, \alpha$ -トリフルオロ-*o*-トルイル酸】をシフルメトフェン含量に換算したものの和とする。(生食発 1217 第 1 号 令和 3 年 12 月 17 日より抜粋)

食品名	基準値 (ppm)
牛の筋肉	0.01
豚の筋肉	0.01
その他の陸棲哺乳類に属する動物の筋肉	0.01
牛の脂肪	0.01
豚の脂肪	0.01
その他の陸棲哺乳類に属する動物の脂肪	0.01
牛の肝臓	0.02
豚の肝臓	0.02
その他の陸棲哺乳類に属する動物の肝臓	0.02

牛の腎臓	0.02
豚の腎臓	0.02
その他の陸棲哺乳類に属する動物の腎臓	0.02
牛の食用部分	0.02
豚の食用部分	0.02
その他の陸棲哺乳類に属する動物の食用部分	0.02
乳	0.01
はちみつ	0.05

## [実験方法]

### 1. 試料

試料は滋賀県内の小売店で購入した。試料の調製方法を以下に記載した。

#### (1) 牛の筋肉

可能な限り脂肪層を除き、試料を細切した後、フードプロセッサーを用いて均一化した。

#### (2) 牛の脂肪

可能な限り筋肉層を除き、試料を細切した後、フードプロセッサーを用いて均一化した。

#### (3) 牛の肝臓

試料を細切した後、フードプロセッサーを用いて均一化した。

#### (4) 牛乳

全体を混合し均一化した。

### 2. 試薬・試液

#### (1) 標準品

シフルメトフェン標準品：純度 98.0%（関東化学製）

代謝物 B-1 標準品：純度 99.9%（林純薬製）

#### (2) 試薬等

アセトニトリル、アセトン、*n*-ヘキサン、メタノール：残留農薬試験用（富士フィルム和光純薬製）

蒸留水、アセトニトリル、メタノール、酢酸、ギ酸：LC-MS 用（富士フィルム和光純薬製）

ギ酸アンモニウム、酢酸アンモニウム：特級（富士フィルム和光純薬製）

水（試験溶液調製用）：超高純度蒸留水精製装置で精製したもの

ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム：Oasis HLB（200 mg/6 mL）  
（Waters 製）

#### (3) 試液

##### ① 標準原液

シフルメトフェン標準原液：シフルメトフェン標準品 10 mg を精秤し、アセトニトリルに溶解して 1 mg/mL 溶液を調製した。

代謝物 B-1 標準原液：代謝物 B-1 標準品 10 mg を精秤し、アセトニトリルに溶解して 1 mg/mL（シフルメトフェンとして）溶液を調製した。なお、代謝物 B-1 の濃度からシフルメトフェンの濃度への換算は、換算係数 2.354（シフルメトフェンの分子量を代謝物 B-1 の分子量で除した値）を用いて行った。

## ② 検量線用標準溶液

①で調製した標準原液を混合してメタノール及び水 (3:2) 混液で希釈し、0.0001、0.0002、0.0004、0.0008、0.0016、0.0031、0.0063、0.0125、0.025 mg/L の検量線用標準溶液を調製した。また、マトリックス効果などの確認用として、0.0005、0.005 および 0.01 mg/L も調製した。

## ③ 添加用標準溶液 (定量限界濃度 (0.001 ppm))

### a) 定量限界濃度 (0.001 ppm)

シフルメトフェン標準原液及び代謝物 B-1 標準原液をそれぞれメタノールで希釈して 0.01 µg/mL の濃度の溶液を調製した。

### b) 牛の筋肉、牛の脂肪及び牛乳：基準値濃度 (0.01 ppm)

シフルメトフェン標準原液及び代謝物 B-1 標準原液をそれぞれメタノールで希釈して 0.1 µg/mL の濃度の溶液を調製した。

### c) 牛の肝臓：基準値濃度 (0.02 ppm)

シフルメトフェン標準原液及び代謝物 B-1 標準原液をそれぞれメタノールで希釈して 0.2 µg/mL の濃度の溶液を調製した。

## 3. 装置等

ホモジナイザー： Polytron PT 10-35 GT (Kinematica 社製)

遠心分離機： Himac CF15RN (日立工機社製)

蒸留水精製装置： 超高純度蒸留水精製装置 Flex3 (ELGA 社製)

ロータリーエバポレーター： N-1000/NVC-2100/DPE-1300/CCA-1111/SB-1000 (東京理化学器械製)

## LC-MS/MS

装置	型式	会社
LC	Acquity UPLC H-Class	Waters
MS	Xevo TQD	Waters
データ処理	MassLynx V.4.1	Waters

## 4. 測定条件

### LC-MS/MS

LC 条件	
カラム	TSKgel ODS-100 V (内径 2.0 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 µm：東ソー製)

移動相流速 (mL/min)	0.2		
注入量 (μL)	10		
カラム温度 (°C)	40		
移動相	A 液 : 0.05 vol% 酢酸 B 液 : 0.05 vol% 酢酸・メタノール溶液		
グラジエント条件	時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)
	0.0	40	60
	1.0	40	60
	15.0	5	95
	20.0	5	95
	20.1	40	60
MS 条件			
測定モード	選択反応モニタリング (SRM)		
イオン化モード	シフルメトフェン : ESI (+) 代謝物 B-1 : ESI (-)		
キャピラリー電圧 (kV)	2.0		
ソース温度 (°C)	150		
脱溶媒温度 (°C)	400		
コーンガス	N <sub>2</sub> , 50 L/hr		
脱溶媒ガス	N <sub>2</sub> , 800 L/hr		
コリジョンガス	Ar		
定量イオン (m/z)	シフルメトフェン MS/MS: 448.4→249.1 [コーン電圧 40 (V)、コリジョンエネルギー 10 (eV)] 代謝物 B-1 MS/MS: 189.0→145.1 [コーン電圧 -20 (V)、コリジョンエネルギー -10 (eV)]		
定性イオン (m/z)	シフルメトフェン MS/MS: 448.4→173.1 [コーン電圧 40 (V)、コリジョンエネルギー 30 (eV)]		

	代謝物 B-1 MS/MS: 189.0→69.0 [コーン電圧 -20 (V)、コリジョンエネルギー -35 (eV)]
保持時間 (分)	シフルメトフェン 14.0 代謝物 B-1 4.0

## 5. 定量

シフルメトフェン及び代謝物 B-1 の標準原液を混合してメタノール及び水 (3 : 2) 混液で希釈し、0.0001、0.0002、0.0004、0.0008、0.0016、0.0031、0.0063、0.0125、0.025 mg/L の標準溶液を調製した。検量線は、低濃度範囲 (6 点) 及び高濃度範囲 (6 点) に分けて作成した。これらの溶液 10 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。なお、検量線作成用の標準溶液は、シフルメトフェンとしての濃度で調製した。シフルメトフェンとしての濃度から代謝物 B-1 濃度への換算は、以下の換算係数 (代謝物 B-1 の分子量をシフルメトフェンの分子量で除した値) を用いて行った。

### 換算係数

代謝物 B-1     0.4249

## 6. 添加試料の調製

### (1) 定量限界濃度 (0.001 mg/kg)

試料 (牛の筋肉、肝臓、牛乳) 10.0 g に添加用標準溶液 (2. (3) ③ a) 1.0 mL をそれぞれ添加して混合後、30 分間放置した。また、本試験では、シフルメトフェン及び代謝物 B-1 はそれぞれ別に添加して検討を行った。

牛の脂肪の場合、試料 10.0 g を採り、約 40℃ で加温して融解させたものに添加用標準溶液 (2. (3) ③ a) 1.0 mL をそれぞれ添加して混合後、放置 (室温) して再度凝固させた後、30 分放置した。また、本試験では、シフルメトフェン及び代謝物 B-1 はそれぞれ別に添加して検討を行った。

### (2) 基準値濃度

試料 (牛の筋肉、牛乳) 10.0 g に添加用標準溶液 (2. (3) ③ b) 1.0 mL をそれぞれ添加して混合後、30 分間放置した。また、本試験では、シフルメトフェン及び代謝物 B-1 はそれぞれ別に添加して検討を行った。

牛の脂肪の場合、試料 10.0 g を採り、約 40℃ で加温して融解させたものに添加用標準溶液 (2. (3) ③ b) 1.0 mL をそれぞれ添加して混合後、放置 (室温) して再度凝固させた後、30 分放置した。また、本試験では、シフルメトフェン及び代謝物 B-1 はそれぞれ別に添加して検討を行った。



牛の肝臓の場合、試料 10.0 g に添加用標準溶液 (2. (3) ③ c) 1.0 mL を添加して混合後、30 分間放置した。また、本試験では、シフルメトフェン及び代謝物 B-1 はそれぞれ別に添加して検討を行った。

## 7. 試験溶液の調製

### 概要

シフルメトフェン及び代謝物 B-1 を試料からメタノールで抽出した。この抽出液をジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムで精製した後、LC-MS/MS で定量及び確認した。シフルメトフェン及び代謝物 B-1 のそれぞれについて定量を行い、代謝物 B-1 の含量に換算係数を乗じてシフルメトフェンの含量に変換し、これらの和をシフルメトフェン濃度として基準値に対する分析値とした。

#### (1) 抽出

試料 10.0 g を量り採り、メタノール 50 mL を加えてホモジナイズした後、遠心分離（毎分 3,000 回転、10 分間）し、上澄液を採った。残留物にメタノール 25 mL を加えて同様に操作し、上澄液を合わせてメタノールで、100 mL に定容した。この抽出液から正確に 25 mL（試料 2.5 g 相当）分取し、40°C 以下で濃縮して、約 1 mL になるまで溶媒を除去した。この濃縮液に 0.1 vol% 酢酸を加え、10 mL にした。

#### (2) 精製

ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム（200 mg）にメタノール 5 mL、0.1 vol% 酢酸 5 mL を順次注入し、各流出液は捨てた。(1) で得られた溶液を全量負荷し、水 5 mL でカラムを洗浄した後、メタノール 10 mL で溶出した。この溶出液を、40°C 以下で濃縮して、約 1 mL になるまで溶媒を除去した。この濃縮液にメタノール及び水（3：2）混液を加え、正確に 5 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

シフルメトフェン無添加の試料に対して、7.試験溶液の調製を行い、カラムからの溶出液 10 mL を約 1 mL まで濃縮させた溶液に添加用標準液を加え、メタノール及び水（3：2）混液を加えて 5 mL に定容したものをマトリックス添加標準溶液とした。なお、添加した標準溶液の濃度は、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。また、本試験では、シフルメトフェン及び代謝物 B-1 はそれぞれ別に添加して検討を行った。

[分析法フローチャート]

**秤 取**

↓ 試料 10.0 g

**メタノール抽出**

↓ メタノール 50 mL を加えホモジナイズ

↓ 遠心分離（毎分 3,000 回転、10 分間）し、上澄液を採る

↓ 残留物はメタノール 25 mL を加えホモジナイズ

↓ 遠心分離（毎分 3,000 回転、10 分間）し、上澄液を採る

↓ 上澄液を合わせ、メタノールを加えて 100 mL に定容する

↓ 抽出液 25 mL（試料 2.5 g 相当）をナス型フラスコに採り、溶媒を除去（約 1 mL まで濃縮）

↓ 0.1 vol%酢酸を加えて 10 mL にする

**ジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム[OASIS HLB (200 mg/6 mL)]**

↓ メタノール 5 mL 及び 0.1 vol%酢酸 5 mL でコンディショニング

↓ 抽出溶液を注入

↓ 水 5 mL で洗浄

↓ メタノール 10 mL で溶出（全溶出液を採取）

↓ 溶出溶媒を除去（約 1 mL まで濃縮）

↓ メタノール及び水（3:2）混液を加えて 5 mL に正確に定容する（試料 0.5 g 相当/1 mL）

**試験溶液**

↓

**LC-MS/MS**

## [結果及び考察]

### 1. 測定条件の検討

#### (1) MS 条件の検討

ESI(+)モードで、最適な条件を見つけるために、スキャン測定について検討したところ、シフルメトフェンのマススペクトルを検出することができた(図1(a))。シフルメトフェンでは、 $m/z$  300~500の範囲で、 $m/z$  448.4 ( $[M+H]^+$ )及び $m/z$  465.4 ( $[M+NH_4]^+$ )が検出された。 $[M+NH_4]^+$ では、スペクトル強度は $[M+H]^+$ よりも高いが、移動相にアンモニウム塩を添加する必要があり、代謝物 B-1 をネガティブイオンモードで同時分析する場合、強度の低下が観察された。また、食品の夾雑物からのイオン化抑制を受け、 $m/z$  465.4 ( $[M+NH_4]^+$ )のピークの再現性を得ることができなかつた。一方で、 $[M+H]^+$ を用いた場合、上記のような影響は観察されなかつた。それに加え、本分析条件において、 $[M+H]^+$   $m/z$  448.4 をプレカーサーイオンとして選択しても十分な感度を得られた。さらに、企業法の分析に関する報告も同様に  $m/z$  448.4 をプレカーサーイオンとして選択しているため、本研究でも $[M+H]^+$ を用いることとした<sup>1)</sup>。次に、ESI(-)モードで、最適な条件を見つけるために、スキャン測定について検討したところ、代謝物 B-1 のマススペクトルを検出することができた(図1(b))。代謝物 B-1 では、 $m/z$  50~300の範囲で、 $[M-H]^-$   $m/z$  189.0 が検出された。本プレカーサーイオンも企業法と同様のものを採用していたため、本イオンを選択することとした<sup>1)</sup>。

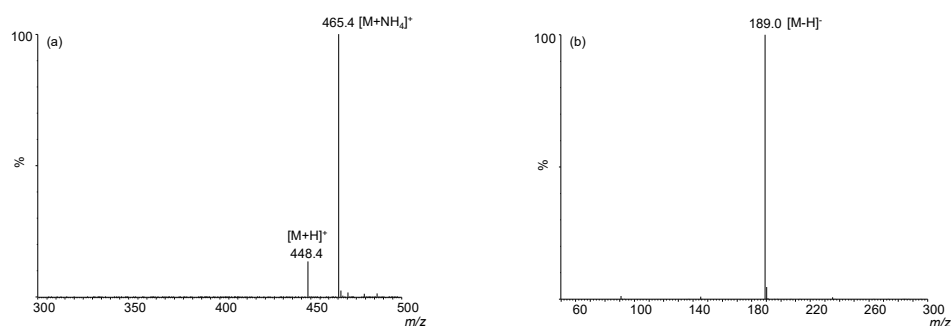


図1 シフルメトフェン (a) 及び代謝物 B-1 (b) のスキャン測定により得られるマススペクトル

(a) シフルメトフェン; スキャン範囲:  $m/z$  300~500、測定条件: ESI(+), コーン電圧 40V

(b) 代謝物 B-1; スキャン範囲:  $m/z$  50~300、測定条件: ESI(-), コーン電圧 -20V

次に、シフルメトフェンのプロダクトイオンスペクトル及びフラグメントパターンを図2に示した。シフルメトフェンにおいて、 $m/z$  249.1 及び  $m/z$  173.0 が観察された。いずれのイオンについて、再現性を考慮した結果、 $m/z$  249.1 が良好であり、ピーク強度も十分得られたので定量用プロダクトイオンとして設定した。一方で、代謝物 B-1 のプロダクトイオンスペクトル及びフラグメントパターンを図3に示した。代謝物 B-1 において、 $m/z$  145.1 及び  $m/z$  69.0 が観察された。いずれのイオンについて、再現性を考慮した結果、 $m/z$  145.1 が良好であり、ピーク強度も十分得られたので定量用プロダクトイオンとして設定した。

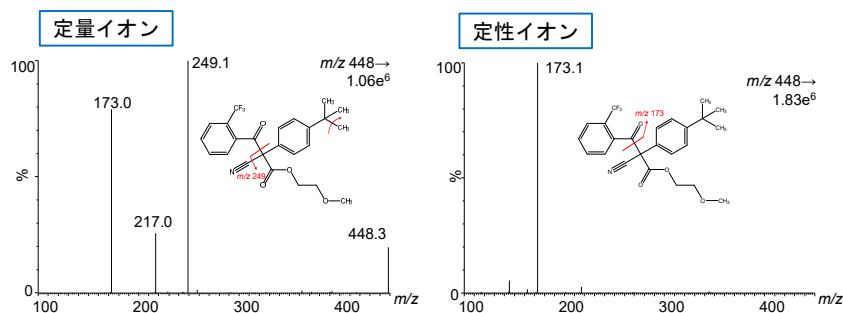


図2 シフルメトフェンのプロダクトイオンスキャン測定により得られるマススペクトル  
 (定量イオン：プリカーサーイオン  $m/z$  448.4、スキャン範囲： $m/z$  100~450、測定条件：  
 ESI(+)、コリジョンエネルギー 10 eV)  
 (定性イオン：プリカーサーイオン  $m/z$  448.4、スキャン範囲： $m/z$  100~450、測定条件：  
 ESI(+)、コリジョンエネルギー 30 eV)

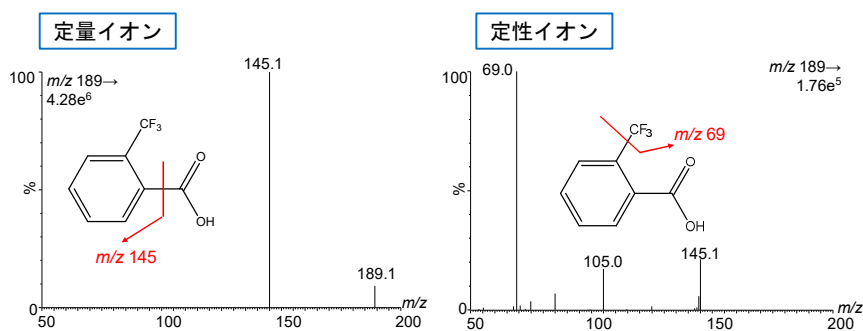


図3 代謝物 B-1 のプロダクトイオンスキャン測定により得られるマススペクトル  
 (定量イオン：プリカーサーイオン  $m/z$  189.0、スキャン範囲： $m/z$  50~200、測定条件：  
 ESI(-)、コリジョンエネルギー -10 eV)  
 (定性イオン：プリカーサーイオン  $m/z$  189.0、スキャン範囲： $m/z$  50~200、測定条件：  
 ESI(-)、コリジョンエネルギー -35 eV)

## (2) LC 条件の検討

### ① カラムの検討

既報<sup>1,2)</sup>では、逆相系カラムを採用していたため、本研究でも、逆相系カラムである TSKgel ODS-100V、TSKgel ODS-100Z、TSKgel ODS-120H (いずれも内径 2.0 mm、長さ 150 mm、粒子径 3  $\mu\text{m}$ ：東ソー製) を用いてシンメトリー係数 ( $S$ ) と  $S/N$  比を比較検討した。移動相にはメタノール及び水を用いた結果、TSKgel ODS-100V (シフルメトフェン： $S=1.1$ ,  $S/N=6816$ ；代謝物 B-1： $S=1.1$ ,  $S/N=443$ )、TSKgel ODS-100Z (シフルメトフェン： $S=1.4$ ,  $S/N=3421$ ；代謝物 B-1： $S=1.9$ ,  $S/N=256$ )、TSKgel ODS-120H (シフルメトフェン： $S=1.2$ ,  $S/N=4139$ ；代謝物 B-1： $S=1.3$ ,  $S/N=356$ ) となり、両化合物とも TSKgel ODS-100V が良好なピーク形状が得られた。よって、TSKgel ODS-100V を用いて検討することとした。また、標

準溶液の濃度は、0.025 mg/L を用いた。

## ② 移動相の検討

移動相にアセトニトリル及び水、またはメタノール及び水（グラジエント条件及び流速は 4. 測定条件に従う）を用いて検討をした結果、S/N 比でシフルメトフェンは 1694 及び 6592、代謝物 B-1 は 285 及び 465 となった。よって、メタノール及び水を用いたとき、S/N が比較して高かったため、本混液を移動相とした。

次に、移動相の添加剤としてギ酸、酢酸、ギ酸アンモニウム、酢酸アンモニウムで比較検討した（表 1）。その結果、ギ酸と酢酸については、移動相中の濃度を高めるとシフルメトフェン及び代謝物 B-1 とともに、S/N は減少した。また、ギ酸アンモニウム及び酢酸アンモニウムでは、シフルメトフェンについては濃度にあまり影響を受けず、良好な S/N を得た。

しかし、代謝物 B-1 はギ酸及び酢酸と比較すると S/N は低下した。本条件を考慮して、0.05 vol% 酢酸を添加することで、シフルメトフェン及び代謝物 B-1 の一斉分析に適用できると判断した。

表 1 移動相（メタノール及び水）に添加する塩の比較検討（S/N 比）

塩	濃度	シフルメトフェン	代謝物 B-1
ギ酸	0.05 vol%	11457	2665
	0.1 vol%	8713	1056
	0.5 vol%	6185	560
酢酸	0.05 vol%	13637	8603
	0.1 vol%	8917	7132
	0.5 vol%	8790	4833
ギ酸アンモニウム	2.5 mmol/L	18511	3117
	5.0 mmol/L	16218	1319
	10 mmol/L	16151	1202
酢酸アンモニウム	2.5 mmol/L	17757	2256
	5.0 mmol/L	16627	3493
	10 mmol/L	15517	1195

「4. 測定条件」において、標準原液の希釈溶媒を移動相の初期条件（メタノール及び水（3：2））混液に合わせることで、良好なピーク形状を得ることができた（図 4）。

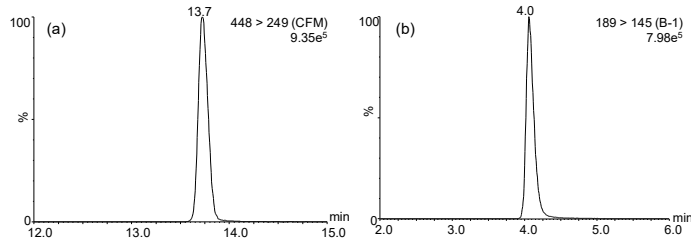


図4 シフルメトフェン (a) 及び代謝物 B-1 (b) の SRM クロマトグラム

(3) 検量線

図5及び6にシフルメトフェン及び代謝物 B-1 の検量線の例を示した。検量線は、低濃度 (0.0001~0.0031 mg/L : 6点) と高濃度 (0.0008~0.025 mg/L : 6点) とした。いずれの濃度範囲で作成した検量線の決定係数は、 $r^2 = 0.999$  以上であり良好な直線性を示した。

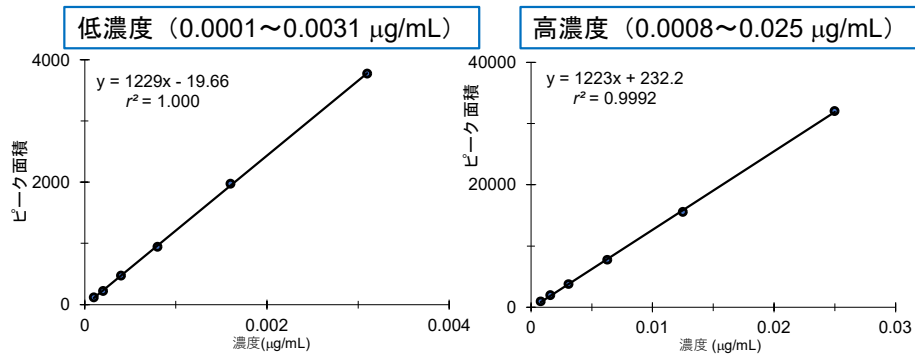


図4 シフルメトフェンの検量線 (定量イオン) の例

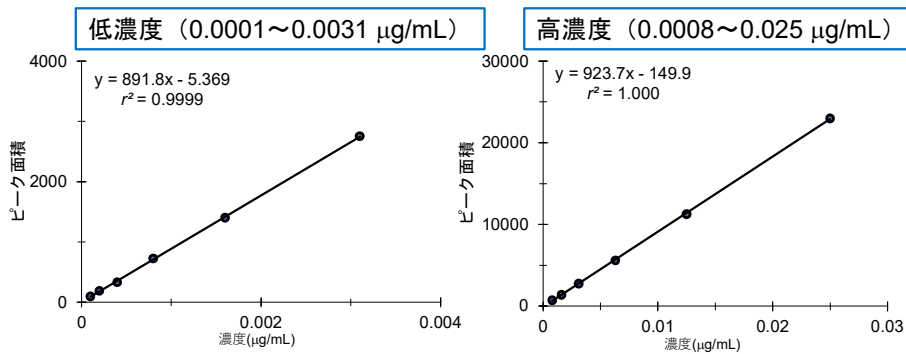


図5 代謝物 B-1 の検量線 (定量イオン) の例

#### (4) 定量限界

シフルメトフェン：0.001 mg/kg = [5 mL/2.5 g × 0.005 ng/10 μL]<sup>1</sup>

代謝物 B-1 (シフルメトフェン換算値)：0.001 mg/kg = [5 mL/2.5 g × 0.005 ng/10 μL]<sup>1</sup>

## 2. 試験溶液調製法の検討

### (1) 抽出方法の検討

抽出溶媒として、メタノール、アセトン、アセトニトリル (*n*-ヘキサン存在下) (1 : 1) を検討した。試料 (牛の筋肉) 10.0 g に添加用標準溶液 (2.(3) ③ b) 1.0 mL を添加し、「7. 試料溶液の調製」の抽出操作を行った。牛の筋肉の抽出溶液 100 mL のうち、10 mL をナス型フラスコに採り、1 mL 程度まで減圧濃縮した。その残留液にメタノール及び水 (3 : 2) 混液を加えて 10 mL に定容し、試験溶液とした。また、抽出液は精製を行っていないため、試料由来のマトリックスの影響を排除する目的のため、マトリックス添加標準溶液との相対回収率を算出した。その結果、メタノールではいずれも良好な回収率 (相対回収率 90% 以上) となった (表 2)。これらの結果より、試料をメタノールで抽出することとし、他の食品にも応用した結果、本対象試料では、85%以上の良好な結果を得た (表 3)。

表 2 各種溶媒によるシフルメトフェン及び代謝物 B-1 の回収率 (牛の筋肉)

抽出溶媒	回収率 (%)	シフルメトフェン	代謝物 B-1
メタノール	絶対回収率 <sup>*1</sup>	18.2	51.2
	マトリックス添加標準溶液 <sup>*1</sup>	19.2	53.8
	相対回収率 <sup>*2</sup>	94.8	95.2
アセトン	絶対回収率	3.8	51.2
	マトリックス添加標準溶液	6.6	63.0
	相対回収率	57.6	81.3
アセトニトリル ( <i>n</i> -ヘキサン存在下) (1 : 1) ※ 3	絶対回収率	47.4	88.2
	マトリックス添加標準溶液	83.2	132.0
	相対回収率	57.0	67.0

n=1

<sup>1</sup> 評価会議での審議の結果、通知試験法においてはマトリックスの影響を考慮し、定量限界を各化合物 0.005 mg/kg とした。

※1 [シフルメトフェン又は代謝物 B-1 の検出濃度/シフルメトフェン又は代謝物 B-1 の添加濃度] × 100

※2 [絶対回収率/マトリックス添加標準溶液] × 100

※3 アセトニトリル層と *n*-ヘキサン層を合わせて回収し、検討操作を行った。

表 3 各試料の相対回収率 (%) ※1 の結果

分析対象	回収率 (%)	牛の筋肉	牛の脂肪	牛の肝臓	牛乳
シフルメトフェン	絶対回収率	20.9	23.1	19.1	25.2
	マトリックス 添加標準溶液	22.0	24.8	21.1	29.6
	相対回収率	95.0	93.1	90.5	85.1
代謝物 B-1	絶対回収率	52.6	55.3	47.2	54.3
	マトリックス 添加標準溶液	55.0	56.0	49.2	56.3
	相対回収率	95.6	98.8	95.9	96.5

n=1

抽出溶媒：メタノール

※1 [絶対回収率/マトリックス添加標準溶液] × 100

## (2) 精製方法の検討

シフルメトフェン試験法（農産物）<sup>3)</sup>では、グラファイトカーボンミニカラム（500 mg）及びトリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム（1,000 mg）を併用している。そこで、本研究では、より汎用的なオクタデシルシリル（ODS）化シリカゲルやポリマー系の充填剤ミニカラムを検討した。はじめに、ODS 化シリカゲルミニカラム（InertSep C18 [500 mg/6 mL]）、ジビニルベンゼン-*N*-メタクリレート・スチレン共重合体ミニカラム（InertSep PLS-2 及び 3 [200 mg/6 mL]）、ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム（Oasis HLB [200 mg/6 mL]）の比較を行った。添加用標準溶液（2. (3) ③ c)）1 mL に 0.1 vol% 酢酸を混合し 10 mL とした溶液を負荷液とした。ミニカラムにメタノール 5 mL 及び 0.1 vol% 酢酸 5 mL でコンディショニングを行い、負荷液を負荷した後、水 5 mL で洗浄し、メタノール 10 mL で溶出した（表 4）。その結果、シフルメトフェン及び代謝物 B は、回収率が良好であったジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム（Oasis HLB [200 mg/6 mL]）を用いて、さらなる詳細な条件検討を行うこととした。また、今回、6 mL 固相抽出カートリッジを用いているため、コンディショニング、洗浄及び溶出には 5 mL を用いて検討した。



表4 固相抽出ミニカラムの比較検討の回収率 (%) の結果

	InertSep C18	InertSep PLS-2	InertSep PLS-3	Oasis HLB
シフルメトフェン	92.6	58.0	63.8	93.4
代謝物 B-1	3.8	99.2	102.8	102.2

n=1

コンディショニング：メタノール 5 mL 及び 0.1 vol% 酢酸 5 mL

負荷溶媒：メタノール及び 0.1 vol% 酢酸 (1:9) 混液

洗浄：水 5mL

溶出：メタノール 5mL

次に、ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム (Oasis HLB [200 mg/6 mL]) を固相抽出ミニカラムとして、負荷溶液の条件を検討した (表 5)。濃度を 0.5 vol% に統一して検討した結果、酢酸とギ酸で良好な結果を得た。本研究では、移動相の溶媒においては酢酸を用いており、使用試薬類を減らすために酢酸を用いることとした。その後、酢酸の濃度検討を行った (表 6)。その結果、負荷溶媒は 0.1 vol% 酢酸が最適と判断した。

表5 負荷溶媒の比較検討の回収率 (%) の結果

	水	酢酸	ギ酸	トリフル ルオロ 酢酸	アンモ ニア	トリエ チルア ミン
シフルメトフェン	81.2	88.4	87.2	79.6	0	0
代謝物 B-1	30.4	103.0	104.2	97.0	0	0

n=1

コンディショニング：メタノール及び、水又は各添加剤の 0.5 vol% 溶液 各 5 mL

負荷溶媒：メタノール及び水 (1:9) 混液又は、メタノール及び各添加剤の 0.5 vol% 溶液 (1:9) 混液

洗浄：水 5mL

溶出：メタノール 5mL

表6 負荷溶媒 (酢酸濃度： vol%) の比較検討の回収率 (%) の結果

	0	0.1	0.5	1.0
シフルメトフェン	87.9	91.3	84.0	71.1
代謝物 B-1	30.0	96.0	96.6	100.2

n=1

コンディショニング：メタノール 5 mL 及び 0~1.0 vol% 酢酸 5 mL

負荷溶媒：メタノール及び 0～1.0 vol%酢酸（1:9）混液

洗浄：水 5 mL

溶出：メタノール 5 mL

最後に、固相抽出ミニカラムからの溶出に関して検討した。溶出溶媒量とそれ以外の過程（負荷及び洗浄）における回収率を表 7 に示す。本結果より、分析対象はメタノール 10 mL で十分溶出されていると判断した。以上より、『7. 試験溶液の調製』にある条件を用いて添加回収実験を行うこととした。

表 7 固相抽出過程の比較検討の回収率（%）の結果

	負荷 0.1 vol%酢 酸 10 mL	洗浄 水 5 mL	溶出 メタノール 0～10 mL	溶出 メタノール 10～20 mL
シフルメトフェン	0	0	90.2	1.5
代謝物 B-1	0	0	92.6	0.8

n=1

コンディショニング：メタノール 5 mL 及び 0.1 vol%酢酸 5 mL

### 3. 添加回収試験

畜産物 4 食品（牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓及び牛乳）を用いて、実験方法の『7. 試験溶液の調製』に従い、シフルメトフェン及び代謝物 B-1（シフルメトフェン換算）の定量限界（0.001 mg/kg）及び基準値濃度（牛の筋肉、牛の脂肪及び牛乳：0.01 mg/kg, 牛の肝臓：0.02 mg/kg）で 5 併行の添加回収試験を行った。なお、シフルメトフェン及び代謝物 B-1 の添加回収試験は別々に実施した。その添加回収試験におけるブランク試料、添加試料及び回収率 100%相当のシフルメトフェン及び代謝物 B-1 溶媒標準溶液の代表的なクロマトグラムを図 6～13 に示した。また、各食品のブランク試料の代表的なトータルイオンカレントクロマトグラムを図 14 及び 15 に示した。

#### (1) 選択性

いずれの食品においても、シフルメトフェン及び代謝物 B-1 の定量を妨害するピークは検出されず、選択性は良好であった（表 8）。

表 8 選択性の評価

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (mg/kg)	基準値 (ppm)	妨害ピークの許容範囲の評価		ピーク面積 (高さ) <sup>1)</sup>			マトリックス添加標準溶液 <sup>2)</sup>			面積 (高さ) 比 (a)/(b)	選択性の評価 <sup>3)</sup>	備考	
					評価濃度 (ppm)	評価基準	面積又は高さの別	ブランク	平均 (a)	平均 (b)	平均 (a)	平均 (b)				
1	シフルメトフェン	牛の筋肉	0.001		定量限界	0.001	< 0.333	面積	0	0	0	234	244	239	0.000	○
2		牛の脂肪	0.001		定量限界	0.001	< 0.333	面積	0	0	0	301	309	305	0.000	○
3		牛の肝臓	0.001		定量限界	0.001	< 0.333	面積	0	0	0	331	346	339	0.000	○
4		牛乳	0.001		定量限界	0.001	< 0.333	面積	0	0	0	208	198	203	0.000	○
5		牛の筋肉	0.001	0.01	基準値	0.01	< 0.100	面積	0	0	0	2859	2944	2901	0.000	○
6		牛の脂肪	0.001	0.01	基準値	0.01	< 0.100	面積	0	0	0	3066	3023	3045	0.000	○
7		牛の肝臓	0.001	0.02	基準値	0.02	< 0.100	面積	0	0	0	6860	6803	6832	0.000	○
8		牛乳	0.001	0.01	基準値	0.01	< 0.100	面積	0	0	0	3089	3089	3079	0.000	○
9	代謝物B-1	牛の筋肉	0.001		定量限界	0.001	< 0.333	面積	0	0	0	491	464	478	0.000	○
10		牛の脂肪	0.001		定量限界	0.001	< 0.333	面積	0	0	0	632	643	637	0.000	○
11		牛の肝臓	0.001		定量限界	0.001	< 0.333	面積	0	0	0	598	591	594	0.000	○
12		牛乳	0.001		定量限界	0.001	< 0.333	面積	0	0	0	592	606	599	0.000	○
13		牛の筋肉	0.001	0.01	基準値	0.01	< 0.100	面積	0	0	0	5583	5506	5544	0.000	○
14		牛の脂肪	0.001	0.01	基準値	0.01	< 0.100	面積	0	0	0	5945	5924	5935	0.000	○
15		牛の肝臓	0.001	0.02	基準値	0.02	< 0.100	面積	0	0	0	18912	18933	18922	0.000	○
16		牛乳	0.001	0.01	基準値	0.01	< 0.100	面積	0	0	0	4902	4924	4913	0.000	○

<sup>1)</sup> 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。(必要に応じて記憶注入を行う。)

<sup>2)</sup> 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整した標準溶液(マトリックス添加標準溶液)を用いる。

<sup>3)</sup> 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) 真度及び併行精度

シフルメトフェン及び代謝物 B-1 の定量限界及び基準値濃度での真度及び併行精度を表 9 に示した。シフルメトフェンでは、定量限界濃度で真度 80.6~83.8%、併行精度 2.6~8.1% 及び基準値濃度で真度 80.4~90.4%、併行精度 1.3~2.9%となった。代謝物 B-1 では、定量限界濃度で真度 82.2~98.0%、併行精度 1.9~6.6%及び基準値濃度で真度 96.4~99.5%、併行精度 0.8~2.9%となった。また、定量限界値におけるシフルメトフェンの S/N の平均値は 56.8~97.3 であり、代謝物 B-1 の S/N の平均値は 168.2~288.2 であり S/N ≥ 10 を満たした。よって、妥当性評価ガイドラインの真度及び併行精度の目標値を満たした。

表 9 真度、精度及び定量限界の評価

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (mg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	定量限界の評価 <sup>1)</sup>	検量線		回収率 (%)					真度 (%)	併行精度 (RSD%)	S/N <sup>2)</sup>	備考		
							傾き	切片	r <sup>2</sup> 値	n=1	n=2	n=3	n=4					n=5	
1	シフルメトフェン	牛の筋肉	0.001	0.01	0.001	S/N	400	16	0.9969	78.3	82.6	83.3	82.6	83.3	82.0	2.6	65.2	48.5	56.8
2		牛の脂肪	0.001	0.01	0.001	S/N	365	12	0.9979	78.8	75.8	81.8	84.8	81.8	80.6	4.2	133.7	61.0	97.3
3		牛の肝臓	0.001	0.02	0.001	S/N	855	6	0.9994	78.1	93.8	87.5	81.3	78.1	83.8	8.1	128.4	40.1	84.3
4		牛乳	0.001	0.01	0.001	S/N	833	15	0.9984	79.2	83.3	91.7	83.3	79.2	83.3	6.1	144.7	45.7	95.2
5		牛の筋肉	0.001	0.01	0.01	—	784	10	0.9992	83.6	87.1	88.9	87.9	89.3	87.4	2.6			
6		牛の脂肪	0.001	0.01	0.01	—	822	84	0.9967	84.0	83.8	85.7	83.7	85.9	84.6	1.3			
7		牛の肝臓	0.001	0.02	0.02	—	327	0	0.9997	86.8	89.8	89.6	91.7	93.9	90.4	2.9			
8		牛乳	0.001	0.01	0.01	—	837	14	0.9991	82.1	80.8	83.1	78.8	77.3	80.4	2.9			
9	代謝物B-1	牛の筋肉	0.001	0.01	0.001	S/N	1456	67	0.9991	82.9	97.2	97.6	90.2	90.2	91.6	6.6	267.2	214.7	240.9
10		牛の脂肪	0.001	0.01	0.001	S/N	1419	2	0.9999	95.7	93.5	91.3	91.3	93.5	93.1	2.0	299.2	213.5	256.3
11		牛の肝臓	0.001	0.02	0.001	S/N	1672	375	0.9972	84.9	81.1	81.1	81.1	83.0	82.2	2.1	202.9	133.6	168.2
12		牛乳	0.001	0.01	0.001	S/N	1691	27	0.9983	100.0	97.2	97.2	95.8	100.0	98.0	1.9	237.4	339.0	288.2
13		牛の筋肉	0.001	0.01	0.01	—	1261	38	0.9982	100.7	99.4	98.6	99.0	100.0	99.5	0.8			
14		牛の脂肪	0.001	0.01	0.01	—	1446	5	0.9995	98.7	99.2	98.3	96.4	97.0	97.9	1.2			
15		牛の肝臓	0.001	0.02	0.02	—	1126	13	0.9994	99.8	98.3	96.4	94.7	92.8	96.4	2.9			
16		牛乳	0.001	0.01	0.01	—	1694	58	0.9998	98.4	98.4	98.8	100.6	98.7	99.0	0.9			

<sup>1)</sup> S/Nを求める必要がある場合には「S/N」と表示される。

<sup>2)</sup> 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

定量限界及び基準値濃度での試料マトリックスの測定への影響を表 10 に示した。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に対するマトリックス添加標準溶液のピーク面積比を求めた結果、基準値濃度ではシフルメトフェン及び代謝物 B-1 において、0.80~0.91 及び 0.97~0.99 となった。次に、定量限界を回収率 100%相当濃度の 1/10 と設定し、そのときのマトリックス添加標準溶液のピーク面積比を求めた結果、シフルメトフェン及び代謝物 B-1 において、0.80~0.89 及び 0.91~0.99 となった。

表 10 試料マトリックスの測定への影響

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (mg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	標準溶液 濃度 <sup>1)</sup> (mg/L)	ピーク面積(高さ) <sup>2)</sup>										備考
							面積又は 高さの別	ブランク <sup>3)</sup>	マトリックス添加標準溶液 <sup>4)</sup>			溶媒標準溶液			ピーク面積 (高さ)比 <sup>5)</sup>		
									n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均			
1	シフルメトフェン	牛の筋肉	0.001	0.01	0.001	0.0005	面積	0	259	254	256	267	310	288	0.89		
2		牛の脂肪	0.001	0.01	0.001	0.0005	面積	0	327	313	320	368	372	370	0.86		
3		牛の肝臓	0.001	0.02	0.001	0.0005	面積	0	329	312	320	384	372	378	0.85		
4		牛乳	0.001	0.01	0.001	0.0005	面積	0	264	244	254	289	342	316	0.80		
5		牛の筋肉	0.001	0.01	0.01	0.005	面積	0	2859	2944	2901	3283	3669	3476	0.83		
6		牛の脂肪	0.001	0.01	0.01	0.005	面積	0	3182	3103	3143	3832	3899	3915	0.80		
7		牛の肝臓	0.001	0.02	0.02	0.01	面積	0	7079	7234	7157	7859	7785	7822	0.91		
8		牛乳	0.001	0.01	0.01	0.005	面積	0	3208	3088	3148	3571	3337	3454	0.91		
9	代謝物B-1	牛の筋肉	0.001	0.01	0.001	0.0005	面積	0	434	423	428	448	463	456	0.94		
10		牛の脂肪	0.001	0.01	0.001	0.0005	面積	0	588	597	593	590	601	596	0.99		
11		牛の肝臓	0.001	0.02	0.001	0.0005	面積	0	620	611	616	675	676	676	0.91		
12		牛乳	0.001	0.01	0.001	0.0005	面積	0	654	636	645	649	655	652	0.99		
13		牛の筋肉	0.001	0.01	0.01	0.005	面積	0	5949	5776	5862	5981	6077	6029	0.97		
14		牛の脂肪	0.001	0.01	0.01	0.005	面積	0	5945	5924	5935	6040	5964	6002	0.99		
15		牛の肝臓	0.001	0.02	0.02	0.01	面積	0	18458	18515	18487	19635	18403	19019	0.97		
16		牛乳	0.001	0.01	0.01	0.005	面積	0	4716	4808	4782	4845	4895	4870	0.98		

\*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。

#### (4) 補正真度

上記の真度及びマトリックス効果の値より補正真度を求め、表 11 に示した。なお、補正真度は、真度をマトリックス効果の値で除して算出した。その結果、表 11 に示したように、補正真度は基準値濃度で 88.4~105.8%、定量限界濃度で 90.3~104.1%と良好であった。

表 11 補正真度

分析対象化合物	食品名	添加濃度 (ppm)	真度 (%)	マトリックス効果	補正真度 <sup>*</sup> (%)
シフルメトフェン	牛の筋肉	0.001	82.0	0.89	92.1
	牛の脂肪	0.001	80.6	0.86	93.7
	牛の肝臓	0.001	83.8	0.85	98.6
	牛乳	0.001	83.3	0.80	104.1
	牛の筋肉	0.01	87.4	0.83	105.3
	牛の脂肪	0.01	84.6	0.80	105.8
	牛の肝臓	0.02	90.4	0.91	99.3
	牛乳	0.01	80.4	0.91	88.4
代謝物 B-1	牛の筋肉	0.001	91.6	0.94	97.4
	牛の脂肪	0.001	93.1	0.99	94.0
	牛の肝臓	0.001	82.2	0.91	90.3
	牛乳	0.001	98.0	0.99	99.0
	牛の筋肉	0.01	99.5	0.97	102.6
	牛の脂肪	0.01	97.9	0.99	98.9
	牛の肝臓	0.02	96.4	0.97	99.4
	牛乳	0.01	99.0	0.98	101.0

\*補正真度=真度 (%) /マトリックス効果

添加回収試験における代表的なクロマトグラム

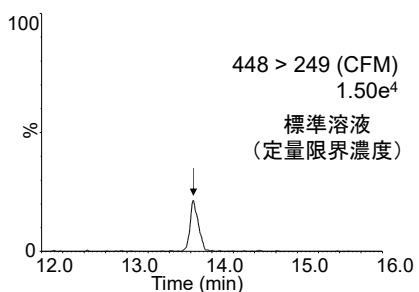
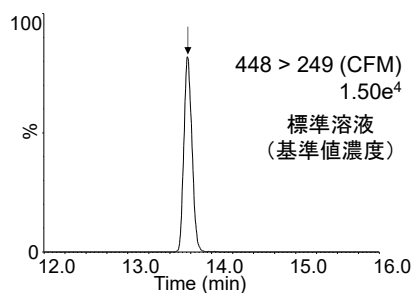
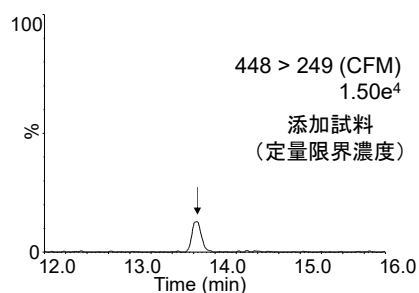
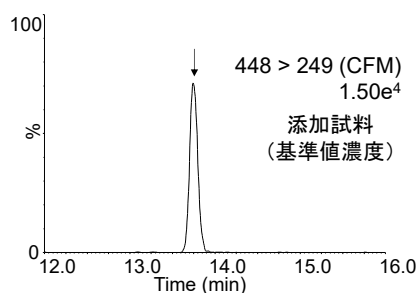
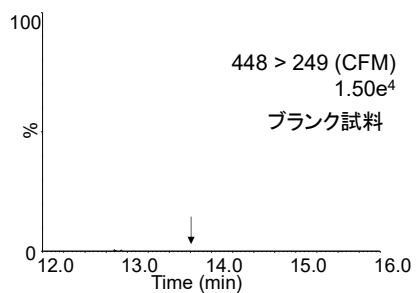


図6 牛の筋肉の SRM クロマトグラム  
シフルメトフェン ( $m/z$  448→249)

基準値濃度 : 0.01 ppm

定量限界濃度 : 0.001 ppm

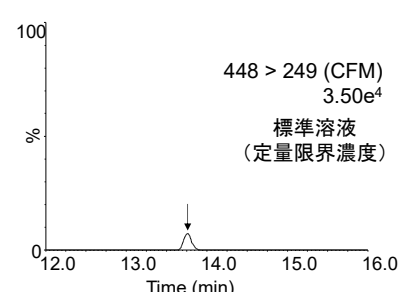
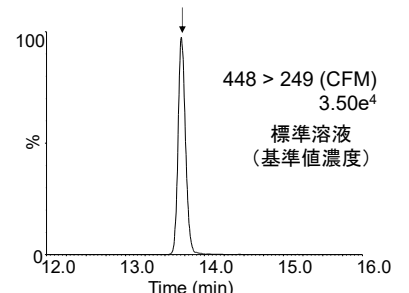
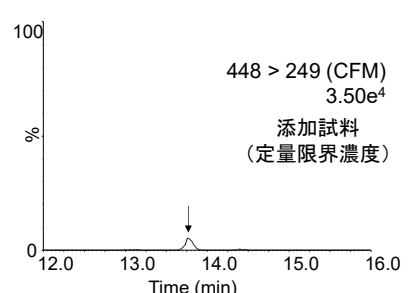
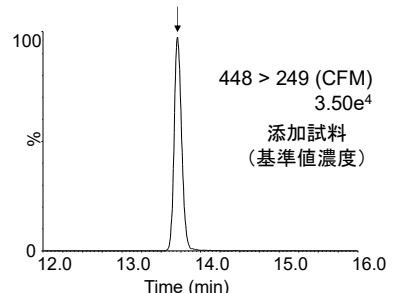
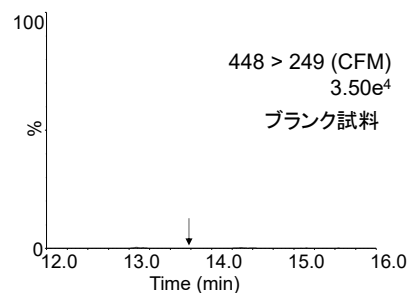


図7 牛の脂肪の SRM クロマトグラム  
シフルメトフェン ( $m/z$  448→249)

基準値濃度 : 0.01 ppm

定量限界濃度 : 0.001 ppm

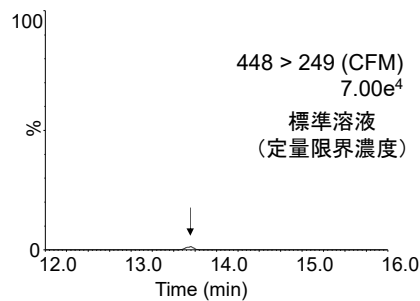
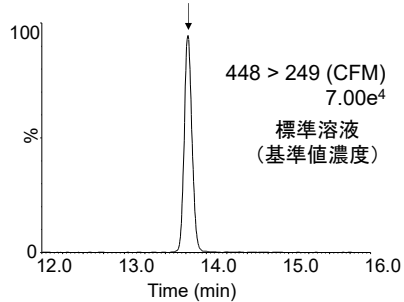
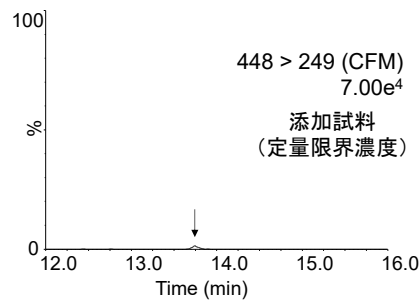
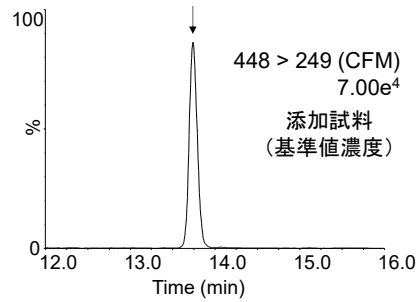
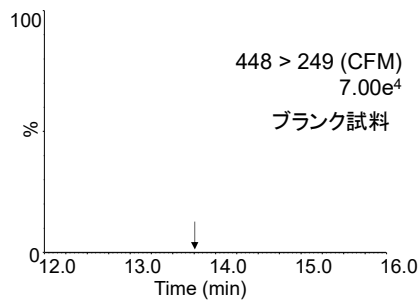


図 8 牛の肝臓の SRM クロマトグラム  
シフルメトフェン ( $m/z$  448→249)  
基準値濃度 : 0.02 ppm  
定量限界濃度 : 0.001 ppm

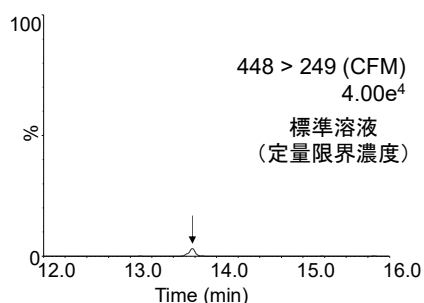
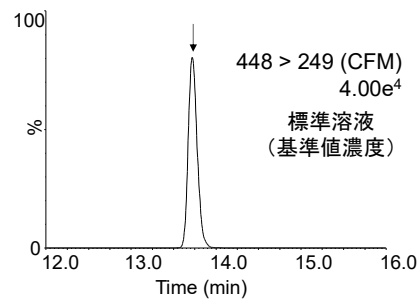
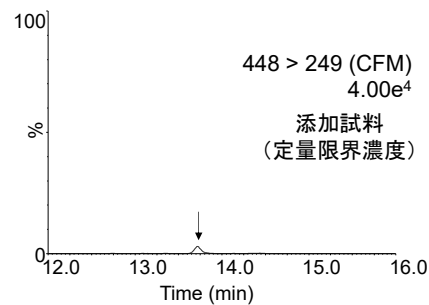
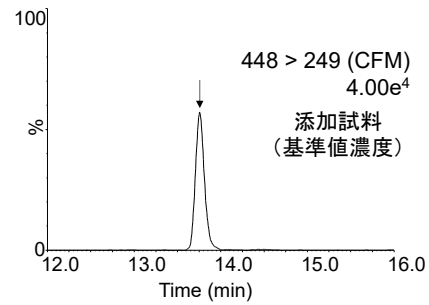
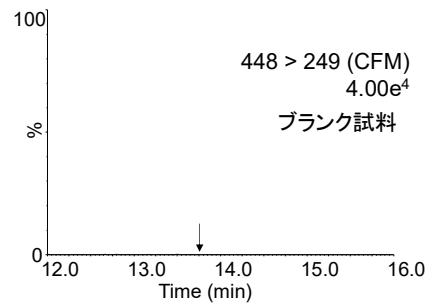


図 9 牛乳の SRM クロマトグラム  
シフルメトフェン ( $m/z$  448→249)  
基準値濃度 : 0.01 ppm  
定量限界濃度 : 0.001 ppm

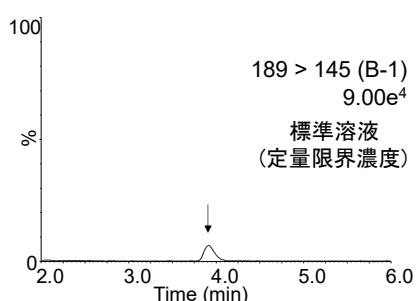
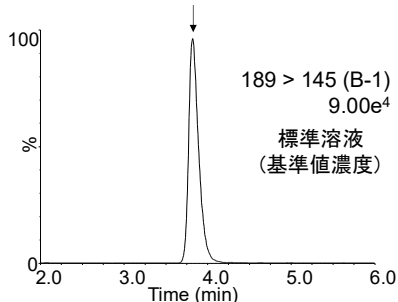
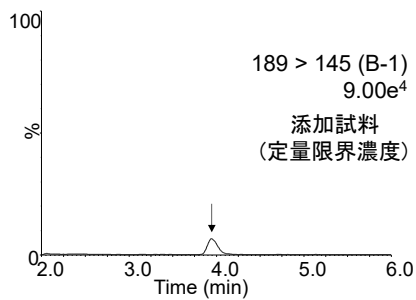
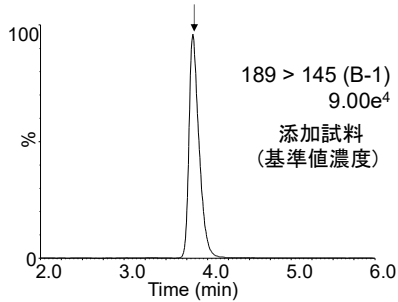
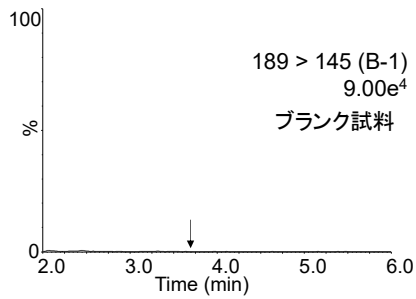


図 10 牛の筋肉 SRM クロマトグラム  
代謝物 B-1 ( $m/z$  189→145)  
基準値濃度：0.01 ppm  
定量限界濃度：0.001 ppm

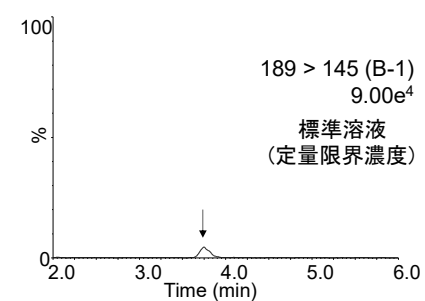
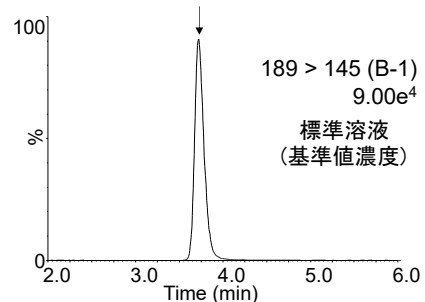
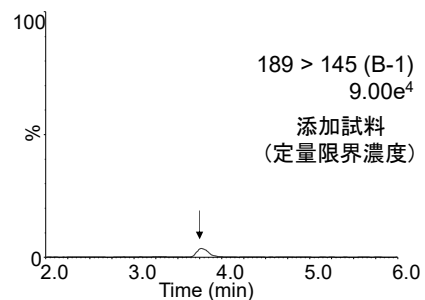
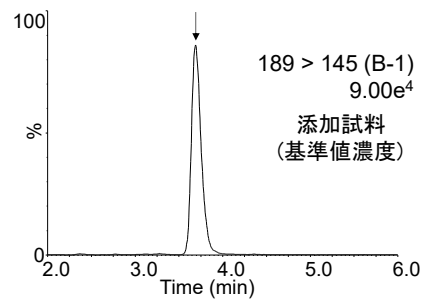
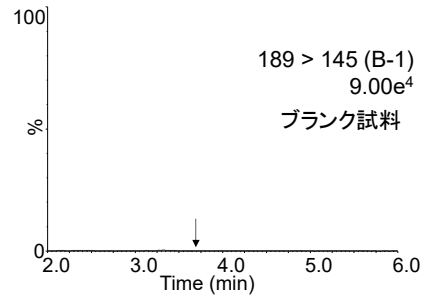


図 11 牛の脂肪の SRM クロマトグラム  
代謝物 B-1 ( $m/z$  189→145)  
基準値濃度：0.01 ppm  
定量限界濃度：0.001 ppm

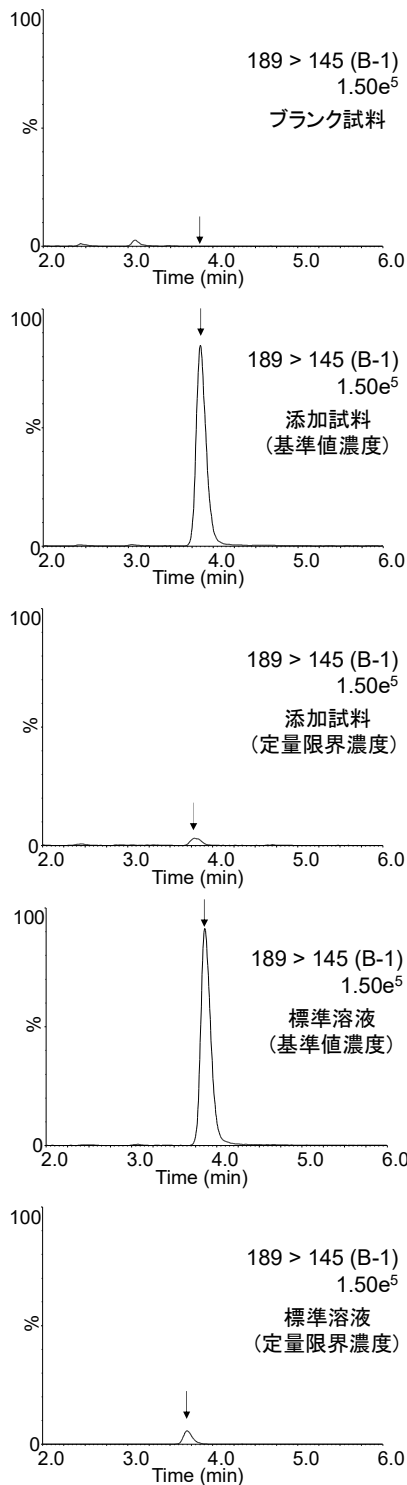


図 12 牛の肝臓の SRM クロマトグラム  
代謝物 B-1 ( $m/z$  189→145)  
基準値濃度 : 0.02 ppm  
定量限界濃度 : 0.001 ppm

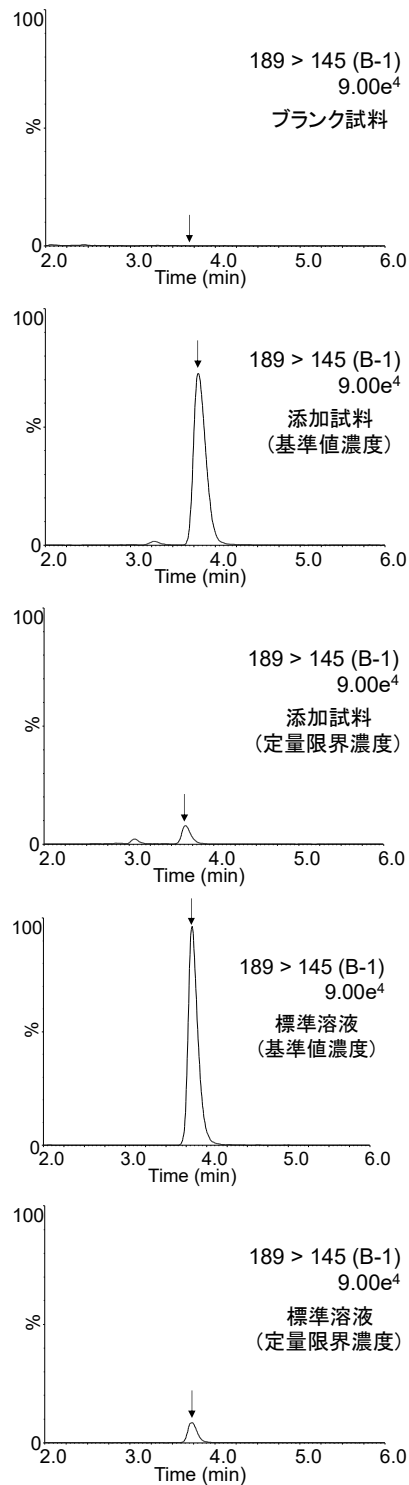


図 13 牛乳の SRM クロマトグラム  
代謝物 B-1 ( $m/z$  189→145)  
基準値濃度 : 0.01 ppm  
定量限界濃度 : 0.001 ppm



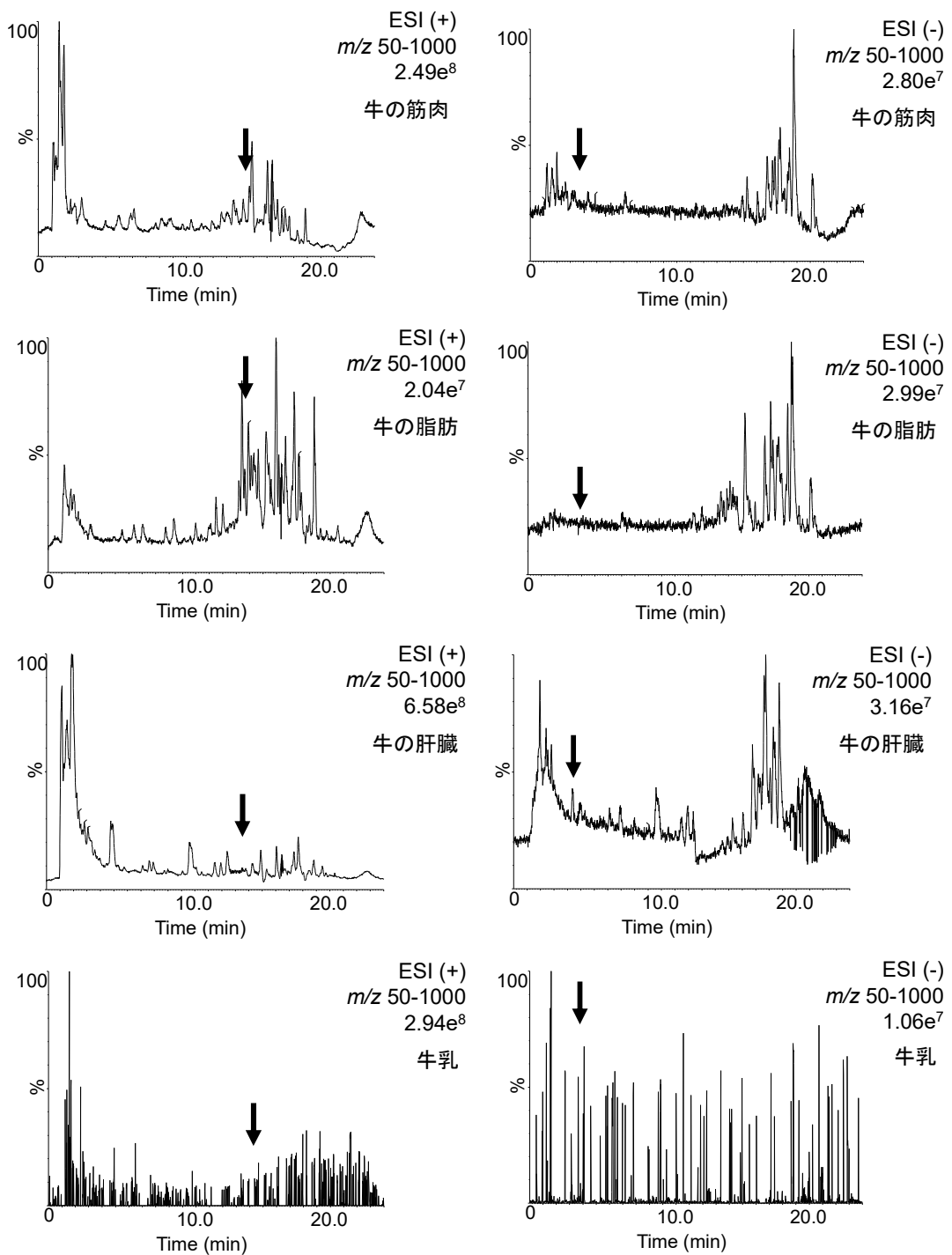


図 14 各食品のブランク試料の代表的な  
トータルイオンカレントクロマトグラム  
測定条件：ESI (+)

Cone voltage：40 V

図 15 各食品のブランク試料の代表的な  
トータルイオンカレントクロマトグラム  
測定条件：ESI (-)

Cone voltage：-20 V

#### 4. 考察

畜産物中のシフルメトフェン及び代謝物 B-1 を試料からメタノールで抽出し、ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムで精製した後、LC-MS/MS で定量及び確認する方法を開発した。シフルメトフェン及び代謝物 B-1 のそれぞれについて定量を行い、代謝物 B-1 の含量に換算係数を乗じてシフルメトフェンの含量に変換し、これらの和をシフルメトフェン濃度として基準値に対する分析値とする。本試験法を牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓及び牛乳の 4 食品で添加回収試験を行ったところ、良好な結果が得られたため、本法は畜産物の残留試験法として適用可能であると考えられた。

#### [参考文献]

- 1) BASF Registration “Magnitude of Cyflumetofen Residues in Tomato, Following Application of Cyflumetofen” October 31, 2011
- 2) Li M, Liu X, Dong F, *et al.* Simultaneous determination of cyflumetofen and its main metabolite residues in samples of plant and animal origin using multi-walled carbon nanotubes in dispersive solid-phase extraction and ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 1300: 95-103. 2013
- 3) シフルメトフェン試験法（農産物） <https://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/syoku-anzen/zanryu3/2-222.html>