

※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

### キンクロラック試験法（畜産物）

## キンクロラック試験法（畜産物）の検討結果

### [緒言]

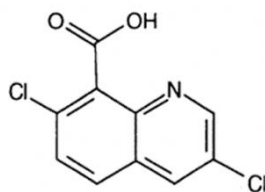
#### 1. 目的

キンクロラックはキノリンカルボン酸系の除草剤であり、シアン化物の蓄積等による細胞壁の生合成阻害等により除草効果を示すと考えられている。米国、カナダ等において登録されているが、日本では農薬登録が失効している<sup>1)</sup>。現在、キンクロラックの畜産物を対象とした試験法は公示されていないことから、今回、試験法開発を行った。

#### 2. 分析対象化合物の構造式及び物理化学的性質

##### (1) 分析対象化合物：キンクロラック（Quinclorac）

構造式：



分子式：C<sub>10</sub>H<sub>5</sub>Cl<sub>2</sub>NO<sub>2</sub>

分子量：242.06

IUPAC名：3,7-Dichloroquinoline-8-carboxylic acid

CAS番号：84087-01-4

外観：白色～わずかに薄い黄褐色、結晶性粉末～粉末

融点：274℃（分解）

溶解性：水；0.065 mg/kg（pH7、20℃）、アセトン；<1 g/100 mL

*n*-オクタノール／水分配係数：log *P*<sub>ow</sub> = - 0.74（pH 7）

酸解離定数：pK<sub>a</sub> 4.34（20℃）

### [出典]

富士フイルム和光純薬（株）キンクロラック安全データシート <https://labchem-wako.fujifilm.com/sds/W01W0117-0045JGHEJP.pdf>

MacBean, C. ed. The pesticide manual, 16th ed. Alton, UK, British Crop Protection Council, 2012, p.999-1000. (ISBN 978-1-901396-86-7)

### 3. 基準値

品目名:キンクロラク

英名:QUINCLORAC

留意点:キンクロラクとは、農産物にあつてはキンクロラク及び代謝物C【メチル3,7-ジクロロ-8-キノリンカルボキシレート】をキンクロラクに換算したものの和とし、畜産物にあつてはキンクロラクとする。

食品分類名	基準値(ppm)
米(玄米)	5
小麦	0.5
大麦	2
その他の穀類	0.8
ブルーベリー	2
クランベリー	2
その他のベリー類果実	2
ごまの種子	2
なたね	2
その他のオイルシード	2
その他のスパイス	2
その他のハーブ	0.5
牛の筋肉	0.05
豚の筋肉	0.05
その他の陸棲哺乳類に属する動物の筋肉	0.05
牛の脂肪	0.7
豚の脂肪	0.7
その他の陸棲哺乳類に属する動物の脂肪	0.7
牛の肝臓	2
豚の肝臓	2
その他の陸棲哺乳類に属する動物の肝臓	2
牛の腎臓	2
豚の腎臓	2
その他の陸棲哺乳類に属する動物の腎臓	2
牛の食用部分	2
豚の食用部分	2
その他の陸棲哺乳類に属する動物の食用部分	2
乳	0.05
鶏の筋肉	0.05
その他の家きんの筋肉	0.05
鶏の脂肪	0.05
その他の家きんの脂肪	0.05
鶏の肝臓	0.05
その他の家きんの肝臓	0.05
鶏の腎臓	0.05
その他の家きんの腎臓	0.05
鶏の食用部分	0.05
その他の家きんの食用部分	0.05
鶏の卵	0.05
その他の家きんの卵	0.05

## [実験方法]

### 1. 試料

牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳及び鶏卵は、市内の小売店で購入した。

#### (1) 牛の筋肉

脂肪層を取り除いた後、松下電器産業（株）〔現 パナソニック（株）〕製フードプロセッサーマK-K77を用いて均一化した。

#### (2) 牛の脂肪

筋肉層を取り除いた後、松下電器産業（株）〔現 パナソニック（株）〕製フードプロセッサーマK-K77を用いて均一化した。

#### (3) 牛の肝臓

松下電器産業（株）〔現 パナソニック（株）〕製フードプロセッサーマK-K77を用いて均一化した。

#### (4) 牛乳

市販品をそのまま使用した。

#### (5) 鶏卵

殻を除き、卵白と卵黄を合わせてよく混合し、均一化した。

### 2. 試薬・試液

キンクロラック標準品：キンクロラック農薬標準品 純度 98.0% [富士フィルム和光純薬（株）製]

アセトン、アセトニトリル、酢酸エチル：残留農薬試験用 [関東化学（株）及び富士フィルム和光純薬（株）製]

メタノール：LC/MS 用 [関東化学（株）及び富士フィルム和光純薬（株）製]

蒸留水：LC/MS 用 [関東化学（株）及び富士フィルム和光純薬（株）製]

アンモニア水（28%）：試薬特級 [富士フィルム和光純薬（株）製]

塩酸：試薬特級 [関東化学（株）製]

塩化ナトリウム：残留農薬試験用 [関東化学（株）製]

ギ酸：試薬特級 [富士フィルム和光純薬（株）製]

酢酸アンモニウム：試薬特級 [富士フィルム和光純薬（株）製]

炭酸水素ナトリウム：試薬特級 [シグマ アルドリッチ製]

無水硫酸ナトリウム：残留農薬試験用 [関東化学（株）製]

ケイソウ土：セライト 545 [関東化学（株）製]

4 級アンモニウム塩修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム（500 mg）：Oasis MAX [500 mg、6 mL、Waters 製]（以下 MAX ミニカラムとする）

ろ紙：桐山ロート濾紙 No.707×60 m/m [日本理化学器械（株）製]、

定量ろ紙 No.5A（直径 110 mm）[東洋濾紙（株）製]

2 w/v%炭酸水素ナトリウム含有 10 w/v%塩化ナトリウム溶液：10 w/v%塩化ナトリウム溶液で炭酸水素ナトリウムを溶かして、炭酸水素ナトリウムが 2 w/v%濃度の溶液を調製した。

標準原液：キンクロラック標準品 10 mg を精密にはかり採り、アセトンに溶解して 1,000

mg/L 溶液を調製した。

添加用標準溶液：標準原液をアセトンで希釈して 0.1 mg/L、0.5 mg/L、7 mg/L 及び 20 mg/L の標準溶液を調製した。

検量線用標準溶液：添加用標準溶液をメタノールで適宜希釈し、0.000125～0.0525 mg/L の標準溶液を調製した。

### 3. 装置

ホモジナイザー：ウルトラタラックス T25 デジタル（シャフトジェネレーターは S25N-18G）（IKA 製）

フードプロセッサー：MK-K77 [松下電器産業（株）（現 パナソニック（株））製]

濃縮装置：エバポレーター；N-1000 [東京理化工械（株）製]、真空ポンプ；FTP-34A [AGC テクノグラス（株）製]、真空コントローラ；NVC-2100 [東京理化工械（株）製]、クーリングシステム；CA-112 [東京理化工械（株）製]

#### LC-MS/MS

装置	型式	会社
MS	LCMS-8050	(株) 島津製作所
LC	Prominence 高圧グラジエントシステム	
ポンプ	LC-20AD	(株) 島津製作所
デガッサー	DGU-20A3R	(株) 島津製作所
インジェクター	SIL-20AC	(株) 島津製作所
システムコントローラ	CBM-20A	(株) 島津製作所
カラムオーブン	CTO-20AC	(株) 島津製作所
データ処理	LabSolution	(株) 島津製作所

#### 4. 測定条件

##### LC-MS/MS

LC 条件																			
カラム	Inertsil ODS-4 [内径 2.1 mm、長さ 150 mm、 粒子径 3 $\mu\text{m}$ : ジーエルサイエンス (株) 製]																		
移動相流速	0.20 mL/min																		
注入量	2 $\mu\text{L}$																		
カラム温度	40°C																		
移動相	A 液 : 5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 B 液 : 5 mmol/L 酢酸アンモニウム・メタノール溶液																		
グラジエント条件	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間 (分)</th> <th>A 液 (%)</th> <th>B 液 (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.0</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>20.0</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>25.0</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>25.1</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>35.0</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> </tbody> </table>	時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)	0.0	90	10	20.0	5	95	25.0	5	95	25.1	90	10	35.0	90	10
時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)																	
0.0	90	10																	
20.0	5	95																	
25.0	5	95																	
25.1	90	10																	
35.0	90	10																	
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 (+)																		
プローブ電圧	4 kV																		
DL 温度	250°C																		
インターフェイス温度	150°C																		
ヒートブロック温度	200°C																		
ネブライザー流量	3.0 L/min																		
ドライイングガス流量	10.0 L/min																		
ヒーティングガス流量	10.0 L/min																		
コリジョンガス	アルゴン																		
定量イオン ( $m/z$ )	+241.8→161.1 (CE 38 V)																		
定性イオン ( $m/z$ )	+241.8→196.0 (CE 29 V)																		
保持時間	10.9 分																		

#### 5. 定量

添加用標準溶液をメタノールで希釈して、以下の濃度の検量線用標準溶液を調製した。

- ・ 定量限界濃度添加 (0.01 mg/kg)

0.000125、0.00025、0.000375、0.0005、0.000625 及び 0.00075 mg/L

- ・ 基準値濃度添加

牛の筋肉、牛乳、鶏卵 (基準値 0.05 mg/kg) : 0.000625、0.00125、0.001875、0.0025、  
0.003125 及び 0.00375 mg/L

牛の肝臓 (基準値 2 mg/kg ; 4 倍希釈して測定) : 0.00625、0.0125、0.01875、0.025、  
0.03125 及び 0.0375 mg/L

牛の脂肪（基準値 0.7 mg/kg）：0.00875、0.0175、0.02625、0.035、0.04375、0.0525 mg/L

この溶液 2  $\mu$ L を LC-MS/MS に注入して、得られたピーク面積を用いてキクロラックの検量線を作成した。試験溶液 2  $\mu$ L を LC-MS/MS に注入し、絶対検量線法によりキクロラックの含量を算出した。

## 6. 添加試料の調製

牛の筋肉（基準値 0.05 mg/kg、定量限界 0.01 mg/kg）：試料 10.0 g に基準値濃度添加の場合は 0.5 mg/L 添加用標準溶液 1 mL を、定量限界濃度添加の場合は 0.1 mg/L 添加用標準溶液 1 mL を添加し、混合した後、30 分間放置した。

牛の脂肪：（基準値 0.7 mg/kg、定量限界 0.01 mg/kg）：試料 10.0 g に基準値濃度添加の場合は 7 mg/L 添加用標準溶液 1 mL を、定量限界濃度添加の場合は 0.1 mg/L 添加用標準溶液 1 mL を添加し、混合した後、30 分間放置した。

牛の肝臓：（基準値 2 mg/kg、定量限界 0.01 mg/kg）：試料 10.0 g に基準値濃度添加の場合は 20 mg/L 添加用標準溶液 1 mL を、定量限界濃度添加の場合は 0.1 mg/L 添加用標準溶液 1 mL を添加し、混合した後、30 分間放置した。

牛乳：（基準値 0.05 mg/kg、定量限界 0.01 mg/kg）：試料 10.0 g に基準値濃度添加の場合は 0.5 mg/L 添加用標準溶液 1 mL を、定量限界濃度添加の場合は 0.1 mg/L 添加用標準溶液 1 mL を添加し、混合した後、30 分間放置した。

鶏卵：（基準値 0.05 mg/kg、定量限界 0.01 mg/kg）：試料 10.0 g に基準値濃度添加の場合は 0.5 mg/L 添加用標準溶液 1 mL を、定量限界濃度添加の場合は 0.1 mg/L 添加用標準溶液 1 mL を添加し、混合した後、30 分間放置した。

## 7. 試験溶液の調製

### 概要

キクロラックを試料からアセトン及び塩酸（99：1）混液で抽出し、2 w/v%炭酸水素ナトリウム含有 10 w/v%塩化ナトリウム溶液を加えて塩基性とし、酢酸エチルで洗浄した。水層に塩酸を加えて酸性とした後、酢酸エチルに転溶し、LC-MS/MS で定量及び確認した。

### （1）抽出及び精製

試料 10.0 g にアセトン及び塩酸（99：1）混液 100 mL を加え、ホモジナイズした後、吸引ろ過した。ろ紙上の残留物を採り、アセトン及び塩酸（99：1）混液 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、アセトンを加えて正確に 200 mL とした。この溶液から正確に 4 mL を分取し、2 w/v%炭酸水素ナトリウム含有 10 w/v%塩化ナトリウム溶液 40 mL を加えた。酢酸エチル 40 mL を加え、振とうし、酢酸エチル層を除去する操作を 2 回繰り返した。水層に塩酸 1 mL を加え、酢酸エチル 40 mL 及び 20 mL で 2 回振とう抽出した。抽出液を合わせ、無水硫酸ナトリウムを加えて脱水し、無水硫酸ナトリウムをろ別した後、ろ液を 40°C 以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物をメタノールで溶かし、4 mL としたものを試験溶液とした。

[分析法フローチャート]

秤取

↓ 試料 10.0 g

抽出

- ↓ アセトン及び塩酸 (99 : 1) 混液 100 mL を加え、ホモジナイズ
- ↓ 吸引ろ過
- ↓ アセトン及び塩酸 (99 : 1) 混液 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 200 mL に定容 (アセトン抽出液)

洗浄

- ↓ 2 w/v%炭酸水素ナトリウム含有 10 w/v%塩化ナトリウム溶液 40 mL にアセトン抽出液 4 mL (試料 0.2 g 相当分) を加える
  - ↓ 酢酸エチル 40 mL を加える
  - ↓ 振とう
  - ↓ 酢酸エチル層を除去する
  - ↓ 塩酸 1 mL を加える
- } 2 回繰り返す

転溶

- ↓ 酢酸エチル 40 mL、20 mL で振とう抽出
- ↓ 無水硫酸ナトリウムで脱水
- ↓ 無水硫酸ナトリウムをろ別

濃縮 (溶媒除去)

- ↓ 残留物をメタノールに溶かし、4 mL とする

試験溶液

↓

LC-MS/MS 測定

牛の肝臓 (基準値濃度添加) は試験溶液をメタノールで 4 倍に希釈して測定

## 8. マトリックス添加標準溶液の調製

各検討対象食品のブランク試験溶液から 0.2 mL を分取し、窒素気流下で溶媒を除去した後、添加回収試験における回収率 100%相当濃度の検量線用標準溶液 0.2 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。なお、牛の肝臓に基準値濃度で標準品を添加して回収試験を行ったときは、ブランク試験溶液 0.05 mL を分取し、以下同様に操作してマトリックス添加標準溶液を調製した。



## [結果及び考察]

### 1. 測定条件の検討

#### (1) MS条件の検討

キンクロラク標準溶液をESI (+) 及びESI (-) でスキャン測定したところ、ESI (+) で十分な感度が得られたことから、ESI (+) モードで測定することにした。キンクロラクのスキャン測定におけるマススペクトルを図1-1に示した。キンクロラク (モノアイソトピック質量: 240.9697) のプロトン付加分子 ( $m/z$  241.9  $[M+H]^+$ ) が強く観察されたため、本イオンを中心とした1 amuの範囲を詳細にスキャン測定した結果、最も強度の高かった  $m/z$  241.8 (図1-2) をプリカーサーイオンに選択した。図2及び図3には、 $m/z$  241.8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。プロダクトイオンには、強度の強い  $m/z$  161.1、 $m/z$  196.0及び  $m/z$  224.0を選択し、この中でもっともS/N比が高かった  $m/z$  241.8→161.1を定量イオン、2番目に高かった  $m/z$  241.8→196.0を定性イオンとした。

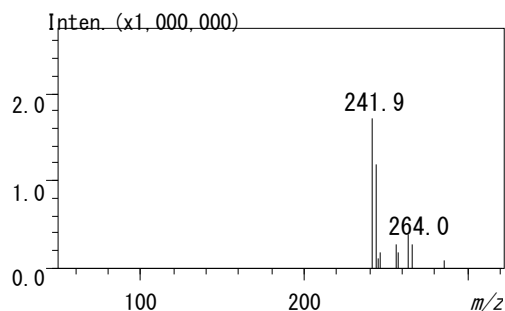


図 1-1 キンクロラクのマススペクトル  
スキャン範囲：50～300 amu  
測定条件：ESI (+)  
キンクロラク：10 mg/L

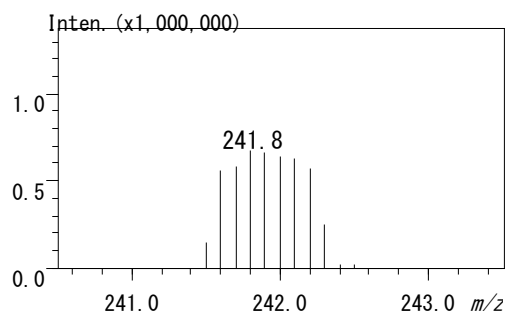


図 1-2 キンクロラクのマススペクトル  
スキャン範囲：241.5～242.5 amu  
測定条件：ESI (+)  
キンクロラク：10 mg/L

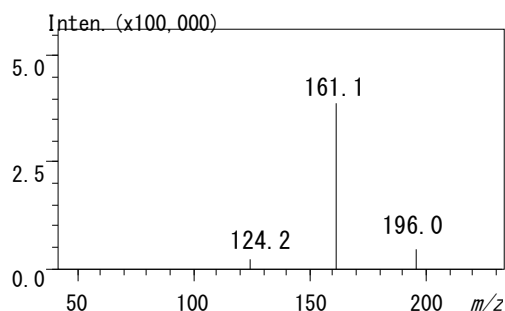


図 2 プロダクトイオンスペクトル (定量)  
プリカーサーイオン： $m/z$  241.8  
測定条件：ESI (+)  
CE = 38 V (CE : collision energy)  
キンクロラク：1 mg/L

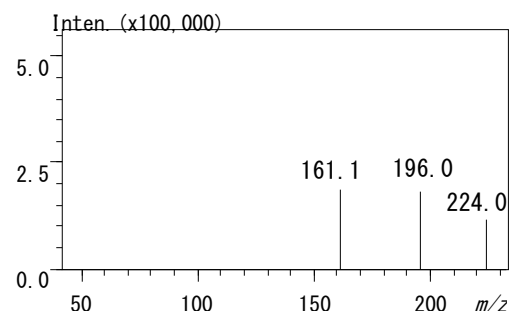


図 3 プロダクトイオンスペクトル (定性)  
プリカーサーイオン： $m/z$  241.8  
測定条件：ESI (+)  
CE = 29 V (CE : collision energy)  
キンクロラク：1 mg/L

## (2) LC 条件の検討

フローインジェクション分析を用いて、移動相を検討した。アセトニトリル及び水 (1:1) 混液、水及びメタノール (1:1) 混液に各種添加剤 [ギ酸 (0.01~0.1 vol%)、酢酸 (0.01~0.1 vol%)、ギ酸アンモニウム (2.5~10 mmol/L) 及び酢酸アンモニウム (2.5~10 mmol/L)] を添加、または無添加の条件でキンクロラックのピーク強度を比較した。その結果、5 mmol/L 酢酸アンモニウム添加の水及びメタノール (1:1) 混液で最大のピーク強度が得られた。次に、A 液を 5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液、B 液を 5 mmol/L 酢酸アンモニウム・メタノール溶液とし、分析カラムにオクタデシルシリル化シリカゲルカラムの Inertsil ODS-4 [ジーエルサイエンス (株) 製、内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3  $\mu$ m] を用いてグラジエント条件を検討した。その結果、5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液及び 5 mmol/L 酢酸アンモニウム・メタノール溶液の混液(9:1)から(1:19)までを 20 分間で行う条件でピーク形状及び再現性ともに良好な結果が得られたことから、本グラジエント条件を採用した。なお、注入量については、5  $\mu$ L とするとピーク形状がブロードとなったことから、2  $\mu$ L とした。

## (3) 検量線

キンクロラックの検量線の例を図 4-1~図 4-4 に示した。0.000125~0.00075 mg/L、0.000625~0.00375 mg/L、0.00625~0.0375 mg/L 及び 0.00875~0.0525 mg/L の濃度範囲で作成した検量線の決定係数  $r^2$  はいずれも 0.999 であり、良好な直線性を示した。

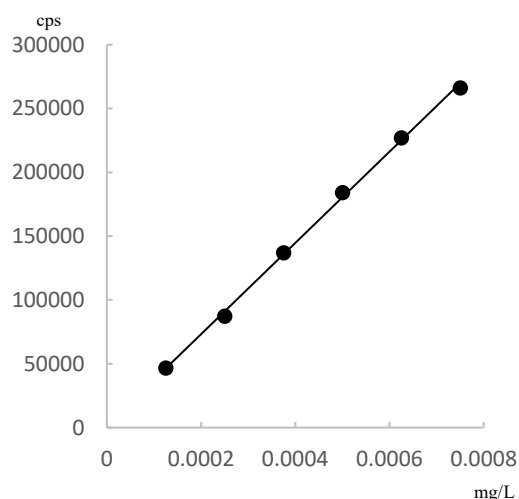


図 4-1 キンクロラックの検量線の例  
濃度範囲 : 0.000125~0.00075 mg/L  
 $y = 357387657x + 1696$   
 $r^2 = 0.999$

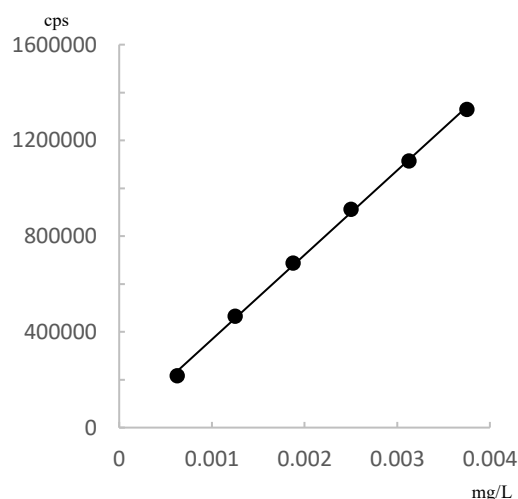


図 4-2 キンクロラックの検量線の例  
濃度範囲 : 0.000625~0.00375 mg/L  
 $y = 353501600x + 14609$   
 $r^2 = 0.999$

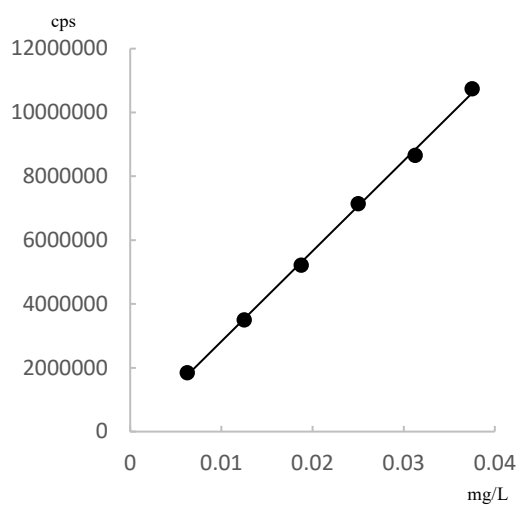


図 4-3 キンクロラックの検量線の例  
 濃度範囲：0.00625～0.0375 mg/L  
 $y = 282878866x - 4424$   
 $r^2 = 0.999$

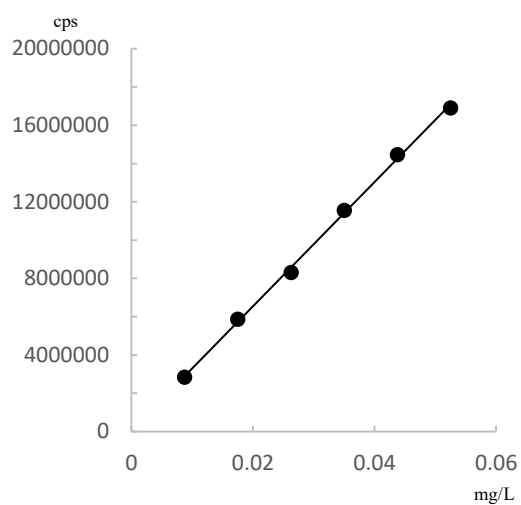


図 4-4 キンクロラックの検量線の例  
 濃度範囲：0.00875～0.0525 mg/L  
 $y = 324448738x + 51132$   
 $r^2 = 0.999$

#### (4) 定量限界

定量限界の算出結果を以下に示した。

キンクロラック：0.01 mg/kg [試験溶液量 4 (mL) /試験溶液中の試料量 0.2 (g) ]

× [キンクロラックの定量限界相当量 0.001 (ng) /注入量 2 (μL) ]

## 2. 試験溶液調製法の検討

### (1) 抽出

申請企業の残留試験法<sup>2)</sup>では、試料 20 g からキンクロラックを塩基性条件 [アセトン 150 mL 及び 0.1 mol/L 水酸化ナトリウム 100 mL] で抽出した後、酸性条件 [アセトン 50 mL 及び 0.1 mol/L 硫酸 50 mL] で抽出している (図 5)。この方法に準じ、キンクロラックを添加した牛の筋肉を用いて回収率を検討した。牛の筋肉 10 g (キンクロラック 100 µg を添加) にアセトン及び 0.1 mol/L 水酸化ナトリウム (3 : 2) 混液 100 mL を加えてホモジナイズし、硫酸 1 mL を添加して酸性にした後、吸引ろ過した。ろ紙上の残留物を採り、アセトン及び 0.1 mol/L 硫酸 (1 : 1) 混液 50 mL を加えてホモジナイズした後、吸引ろ過した。ろ液を合わせてアセトンで 200 mL に定容した抽出液中のキンクロラックを定量したところ、回収率は 86% ( $n=3$ ) であった。この方法における塩基性条件でホモジナイズした場合、ドロドロした粘性の高い溶液となり、塩基性のまま遠心しても固形部分がきれいに沈殿せず、また、吸引ろ過しても、目詰まりしてろ過することが困難であった。一方、酸性では遠心分離及び吸引ろ過することが可能であったことから、酸性条件での抽出のみによる回収率を確認した。キンクロラック 100 µg (100 µg/mL アセトン溶液を 1 mL) を添加した牛の筋肉にアセトン及び塩酸混液 100 mL を加えてホモジナイズした後、吸引ろ過した。ろ紙上の残留物を採り、アセトン及び塩酸混液 50 mL を加えて同様に操作し、ろ液を合わせてアセトンで 200 mL に定容したときの回収率を表 1 に示した。アセトンを抽出溶媒とした場合、回収率は 42% と低かったが、塩酸を加えることで回収率が向上した。アセトンに対する塩酸の割合が大きくなるに従い、回収率は高くなり、99.25 : 0.75 以降ではほぼ定量的に回収されたことから、アセトン及び塩酸 (99 : 1) 混液を選択した。次に、アセトン及び塩酸 (99 : 1) 混液を用いて、牛の肝臓、牛の脂肪、牛乳及び鶏卵で同様に検討したところ、95~97%の回収率が得られた。以上の結果から、抽出溶媒はアセトン及び塩酸 (99 : 1) 混液を採用した。

表 1 牛の筋肉からアセトン及び塩酸混液によるキンクロラックの回収結果

比率	アセトン及び塩酸混液						
	100 : 0	99.9 : 0.1	99.8 : 0.2	99.5 : 0.5	99.25 : 0.75	99 : 1	98 : 2
回収率 (%)	42	65	87	96	99	102	99

$n=2$ 、牛の筋肉 10 g に対し、100 µg (100 µg/mL アセトン溶液を 1 mL) 添加

試料 20 g

- ↓ アセトン 150 mL 及び 0.1 mol/L 水酸化ナトリウム 100 mL を加える
- ↓ ホモジナイズ
- ↓ セライト 20 g を加え、ホモジナイズ
- ↓ 濃硫酸 3 mL を加える
- ↓ 遠心分離 (3,000 rpm、10 分間)
- ↓ ろ過
- ↓ 残留物を採り、アセトン 50 mL 及び 0.1 mol/L 硫酸 50 mL を加える
- ↓ ホモジナイズ
- ↓ 遠心分離 (3,000 rpm、10 分間)
- ↓ ろ過

ろ液を合わせてアセトンで 500 mL にメスアップ

## 図 5 申請企業のキンクロラック抽出方法

### (2) ろ過補助剤 (ケイソウ土) に対する吸着

キンクロラックのろ過補助剤への吸着を検討した。アセトン及び塩酸 (99 : 1) 混液で調製した 0.50 mg/L キンクロラック標準溶液 50 mL を遠沈管に採り、セライト 545 [関東化学 (株) 製] 5 g を加えて 1 分間激しく振とうした後、遠心分離し、上澄液を試験溶液とした。試験溶液中のキンクロラック濃度を測定したところ、0.51 mg/L ( $n=1$ ) であったことから、キンクロラックはろ過補助剤 (ケイソウ土) にほとんど吸着しないと考えられた。

### (3) 液-液分配による精製

牛の筋肉のアセトン及び塩酸 (99 : 1) 混液抽出液から 0.005 mg/L のマトリックス添加標準溶液 (Mt) を調製し、同濃度の溶媒標準溶液 (Std) と LC-MS/MS 測定によるピーク面積を比較したところ、Mt/Std は 0.41 であり、強いイオン化抑制が認められたことから、抽出液の精製方法について検討した。

厚生労働省から通知されているキンクロラック試験法 (農産物) は、規制対象化合物に代謝物が追加されたことから令和 2 年 8 月 6 日生食発 0806 第 1 号により新試験法となり、C18 ミニカラムによる精製法が採用された。一方、平成 17 年 1 月 24 日付け食安発第 0124001 号の旧試験法では、キンクロラックの pKa が 4.3 であることを利用した液-液分配による精製を行っていた。カルボン酸を有する化合物では、溶液の液性を調整した液-液分配による精製が有効な手法の 1 つであることから、本精製法を検討した。

アセトン及び塩酸 (99 : 1) 混液で調製した 200 mg/L 標準溶液 4 mL を 1 w/v% または 2 w/v% 炭酸水素ナトリウム含有 10 w/v% 塩化ナトリウム溶液 (1 w/v% 溶液及び 2 w/v% 溶液とする) 40 mL に加え、混和した後、酢酸エチル 40 mL で 2 回洗浄したところ、洗液からキンクロラックは検出されなかった。各々の水層に塩酸 1 mL を加えて酸性とし、酢酸エチル 40 mL (1 回目)、引き続き酢酸エチル 20 mL (2 回目) で振とう抽出したところ、回収率は 1 w/v% 溶液では 100% (1 回目 98%、2 回目 2%)、2 w/v% 溶液では 102% (1 回目 100%、2 回目 2%) といずれも良好であった。

表2 液-液分配によるキンクロラックの回収結果

水層	酢酸エチル洗浄 (%)	酢酸エチル抽出 (%)	
		1回目	2回目
1 w/v% NaHCO <sub>3</sub> 含有 10% w/v NaCl 溶液	nd	98	2
2 w/v% NaHCO <sub>3</sub> 含有 10% w/v NaCl 溶液	nd	100	2

nd : 不検出

次に、牛の筋肉の無添加試料を用いて試料夾雑物の測定値に対する影響を確認した。図6に従って調製した試験溶液（1 w/v%試験溶液及び2 w/v%試験溶液とする）から0.005 mg/Lマトリックス添加標準溶液（Mt\_1 w/v%及びMt\_2 w/v%とする）を調製し、同濃度の溶媒標準溶液（Std）とLC-MS/MS測定によるピーク面積を比較した。その結果、Mt\_1 w/v% / Stdは0.98、Mt\_2 w/v% / Stdは0.99と両者ともにイオン化抑制はほとんど認められなかった。一方、1 w/v%試験溶液及び2 w/v%試験溶液をSCAN測定（50～550 amu）したところ、2 w/v%試験溶液の方が1 w/v%試験溶液に比べて全体的に強度が低かったことから、2 w/v%炭酸水素ナトリウムの方が精製効果が高いと判断した。以上の結果から、液-液分配による精製法として、2 w/v%炭酸水素ナトリウム含有10 w/v%塩化ナトリウム溶液40 mLに試料のアセトン及び塩酸（99：1）混液抽出液4 mLを加え、酢酸エチル40 mLで2回洗浄した後、塩酸1 mLを加えて酸性とし、酢酸エチル40 mL、次いで20 mLで振とう抽出する方法を採用した。

牛の筋肉 10.0 g

↓

**抽出**

- ↓ アセトン及び塩酸（99：1）混液 100 mLを加え、ホモジナイズ
- ↓ 吸引ろ過
- ↓ アセトン及び塩酸（99：1）混液 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200 mLに定容(アセトン抽出液)

**洗浄**

- ↓ 1 w/v%または2 w/v%炭酸水素ナトリウム含有10 w/v%塩化ナトリウム溶液40 mLにアセトン抽出液4 mL（試料0.2 g相当分）を加える
  - ↓ 酢酸エチル40 mLを加える
  - ↓ 振とう
  - ↓ 酢酸エチル層を除去する
  - ↓ 塩酸1 mLを加える
- } 2回繰り返す

**転溶**

- ↓ 酢酸エチル40 mL、20 mLで振とう抽出
- ↓ 無水硫酸ナトリウムで脱水
- ↓ 無水硫酸ナトリウムをろ別

濃縮（溶媒除去）

↓ 残留物をメタノールに溶かし、4 mL とする

試験溶液（1 w/v%試験溶液及び2 w/v%試験溶液とする）

図6 液-液分配による試料夾雑物の比較のための試験溶液調製法

### 3. 添加回収試験

畜産物5食品（牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳及び鶏卵）を用いて、[実験方法]の7. 試験溶液の調製に従ってキンクロラックの添加回収試験を実施した。添加濃度は、基準値濃度及び定量限界濃度（0.01 mg/kg）の2濃度とした。なお、基準値（2 mg/kg）濃度を添加した牛の肝臓の試験溶液は、高濃度のために検量線の直線性が低下したことから、メタノールで4倍に希釈して測定した。添加回収試験における各ブランク試料、添加試料及び回収率100%相当の溶媒標準溶液のクロマトグラムを図7-1～図7-10に示した。また、各ブランク試料のスキャン測定による代表的なトータルイオンクロマトグラムを図8に示した。

#### (1) 選択性

選択性の評価結果を表3に示した。検討したいずれの試料においても、キンクロラックの定量を妨害するピークは認められず、妥当性ガイドラインの選択性の目標値<sup>4)</sup>を満たした。

表3 選択性の評価

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (mg/kg)	基準値 (ppm)	妨害ピークの許容範囲の評価		ピーク面積 (高さ) <sup>1)</sup>							選択性の評価 <sup>3)</sup>		
					評価濃度 (ppm)	評価基準	面積又は高さの別	ブランク			マトリックス添加標準溶液 <sup>2)</sup>				面積 (高さ) 比 (a)/(b)	
								n=1	n=2	平均 (a)	n=1	n=2	平均 (b)			
1	キンクロラック	牛の筋肉	0.01	0.05	基準値	0.05	< 0.100	面積	0	0	0	863371	867279	865325	0.000	○
		牛の脂肪	0.01	0.7	基準値	0.7	< 0.100	面積	0	0	0	10755452	10556488	10655970	0.000	○
		牛の肝臓 <sup>4)</sup>	0.01	2.	基準値	2.	< 0.100	面積	0	0	0	6378525	6381353	6379939	0.000	○
		牛乳	0.01	0.05	基準値	0.05	< 0.100	面積	0	0	0	851982	861379	856681	0.000	○
		鶏卵	0.01	0.05	基準値	0.05	< 0.100	面積	0	0	0	699174	692953	696064	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)は求めなくてもよい。

\*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。

\*4 試験溶液をメタノールで4倍希釈して測定した。

#### (2) 真度、精度及び定量限界

真度、精度及び定量限界の評価結果を表4に示した。基準値濃度では、真度 88.7～93.5%、併行精度 2.7～4.6%、定量限界濃度では、真度 85.6～92.3%、併行精度 1.7～6.8%と良好な結果が得られ、妥当性評価ガイドラインの真度及び精度の目標値<sup>4)</sup>を満たした。また、定量限界濃度の添加試料から得られたピークの S/N はいずれも 400 以上あり、十分な検出感度が得られた。

表4 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>		
							傾き	切片	r <sup>2</sup> 値	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5			Max.	Mn.	平均値
1	キンクロラック	牛の筋肉	0.01	0.05	0.05	—	8912	12637	0.9985	91.0	92.5	85.2	88.5	86.1	88.7	3.5			—
		(基準値濃度添加)	牛の脂肪	0.01	0.7	0.7	—	113557	51132	0.9987	94.0	100.3	92.6	91.8	88.7	93.5	4.6		—
		牛の肝臓 <sup>3)</sup>	0.01	2.	2.	—	70720	-4424	0.9987	91.1	95.7	90.2	95.6	93.2	93.2	2.7		—	
		牛乳	0.01	0.05	0.05	—	8558	24688	0.9981	89.3	96.4	93.0	92.1	95.0	93.2	2.9		—	
		鶏卵	0.01	0.05	0.05	—	7158	-2253	0.9975	92.1	94.0	95.0	89.7	87.8	91.7	3.3		—	
(定量限界濃度添加)	キンクロラック	牛の筋肉	0.01	0.05	0.01	S/N	1645	8115	0.9961	81.9	93.8	92.7	98.8	94.2	92.3	6.8	1130.7	975.6	1053.2
		牛の脂肪	0.01	0.7	0.01	S/N	1471	423	0.9989	88.0	90.6	91.9	89.4	89.1	89.8	1.7	748.7	746.3	747.5
		牛の肝臓	0.01	2.	0.01	S/N	1774	2390	0.9977	83.5	83.6	86.5	88.1	86.3	85.6	2.3	601.6	590.8	596.2
		牛乳	0.01	0.05	0.01	S/N	1787	1696	0.9987	87.4	90.3	85.6	89.5	86.1	87.8	2.3	426.4	477.3	451.9
		鶏卵	0.01	0.05	0.01	S/N	1838	-3078	0.9903	92.6	91.0	89.0	90.4	92.9	91.2	1.8	600.4	479.3	539.8

\*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(Mn.)のそれぞれのS/Nを求める。

\*3 試験溶液をメタノールで4倍希釈して測定した。



(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評価した結果を表5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ところ、0.93~1.01であり、測定に対する試料マトリックスの顕著な影響は認められなかった。添加回収試験により得られた真度を上記に示すピーク面積比で除して補正した真度を表6に示した。補正後の真度は、基準値濃度では90.7~100.8%、定量限界濃度では87.5~96.4%と良好な結果が得られた。

表5 試料マトリックスの測定への影響

No.	食品名	定量限界 (mg/kg)	標準溶液濃度 <sup>*1</sup> (mg/L)	ピーク面積(高さ) <sup>*2</sup>								ピーク面積(高さ)比 <sup>*5</sup>
				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			
						n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均	
1	牛の筋肉	0.01	0.0025	面積	0	863371	867279	865325	886429	884738	885584	0.98
	牛の脂肪	0.01	0.035	面積	0	10755452	10556488	10655970	11475256	11491337	11483297	0.93
	牛の肝臓 <sup>*6</sup>	0.01	0.025	面積	0	6378525	6381353	6379939	6337366	6265647	6301507	1.01
	牛乳	0.01	0.0025	面積	0	851982	861379	856681	866265	869196	867731	0.99
	鶏卵	0.01	0.0025	面積	0	699174	692953	696064	719011	702811	710911	0.98
	牛の筋肉	0.01	0.0005	面積	0	225791	224090	224941	236722	233043	234883	0.96
	牛の脂肪	0.01	0.0005	面積	0	137133	138078	137606	144914	143054	143984	0.96
	牛の肝臓	0.01	0.0005	面積	0	185301	184169	184735	192183	185470	188827	0.98
	牛乳	0.01	0.0005	面積	0	171910	169870	170890	177701	172173	174937	0.98
	鶏卵	0.01	0.0005	面積	0	180107	171065	175586	182703	182930	182817	0.96

\*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。

\*6 試験溶液をメタノールで4倍希釈して測定した。

表6 補正真度

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)	回収率(%)					真度 (%)	併行精度 (RSD%)
						n=1	n=2	n=3	n=4	n=5		
1	キンクロラク	牛の筋肉	0.01	0.05	0.05	93.2	94.6	87.2	90.6	88.1	90.7	3.5
	(基準値濃度添加)	牛の脂肪	0.01	0.7	0.7	101.3	108.1	99.8	99.0	95.6	100.8	4.6
		牛の肝臓 <sup>*1</sup>	0.01	2.	2.	90.0	94.6	89.1	94.4	92.1	92.0	2.7
		牛乳	0.01	0.05	0.05	90.5	97.7	94.2	93.3	96.2	94.4	2.9
		鶏卵	0.01	0.05	0.05	94.0	96.1	97.1	91.7	89.7	93.7	3.3
	(定量限界濃度添加)	牛の筋肉	0.01	0.05	0.01	85.5	97.9	96.8	103.2	98.3	96.4	6.8
		牛の脂肪	0.01	0.7	0.01	92.1	94.8	96.1	93.5	93.3	94.0	1.7
		牛の肝臓	0.01	2.	0.01	85.3	85.5	88.4	90.0	88.2	87.5	2.3
		牛乳	0.01	0.05	0.01	89.5	92.4	87.6	91.6	88.1	89.8	2.3
		鶏卵	0.01	0.05	0.01	96.4	94.7	92.6	94.1	96.7	94.9	1.8

\*1 試験溶液をメタノールで4倍希釈して測定した。

#### 4. その他の試験法検討に関連する事項

##### (1) MAXミニカラム (500 mg、6 mL) による精製

キンクロラックはカルボン酸を有していることから、逆相-強陰イオン交換ポリマーミニカラムであるOasis MAXミニカラムによる精製について検討した。アセトン及び水各10 mLで順次予備洗浄したMAXミニカラムに、キンクロラック1 µg (10 mg/L標準溶液を0.1 mL)を負荷した。その後、水、アセトン及びアセトニトリル各10 mLを注入し、引き続き1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液、2 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液及び3 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液各10 mLを順次注入したときの溶出状況を表7に示した。キンクロラックは、水、アセトン及びアセトニトリルでは溶出せず、1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液画分に93.6%が溶出したが、2 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液画分に3.0%、3 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液画分に痕跡程度の溶出が認められた。そこで次に、MAXミニカラムにキンクロラック1 µg (10 mg/L標準溶液を0.1 mL)を負荷し、3 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検討した。結果を表8に示した。キンクロラックは6 mLまでの画分に全て溶出した。以上の結果から、牛の筋肉試料のアセトン及び塩酸 (99 : 1) 混液抽出液を用いて、MAXミニカラムによる精製を検討した。抽出液4 mLにアンモニア水50 µLを加えて塩基性とした後、MAXミニカラムに負荷した。水、アセトン、アセトニトリル各10 mLで洗浄した後、3 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液10 mLで溶出し、溶媒を除去してメタノール4 mLに溶かし、試験溶液とした。この試験溶液から調製したマトリックス添加標準溶液と溶媒標準溶液をLC-MS/MSで測定したところ、ピーク面積比が0.88となり、イオン化抑制が認められたことから、本精製法は不採用とした。

表7 MAXミニカラムからの溶出状況

溶出液 (各10 mL)	水	アセトン	アセトニトリル	ギ酸・アセトニトリル溶液			合計
				1 vol%	2 vol%	3 vol%	
回収率 (%)	nd	nd	nd	93.6	3.0	tr	96.6

Oasis MAX (150 mg、6 mL、Waters社製)

負荷量 : 1 µg (10 mg/L標準溶液を0.1 mL)

tr : 0.5未満、nd : 不検出

表8 MAXミニカラムから3 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液による溶出状況

	3 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液				合計 (%)
	0-2 mL	2-4 mL	4-6 mL	6-8 mL	
回収率 (%)	0.7	91.3	7.6	nd	99.6

Oasis MAX (500 mg、6 mL、Waters社製)

負荷量 : 1 µg (10 mg/L標準溶液を0.1 mL)

nd : 不検出

## まとめ

抽出溶媒としてアセトン及び塩酸混液を用いて抽出する方法を比較検討した結果、アセトン及び塩酸（99：1）混液を抽出溶媒に採用した。

アセトン及び塩酸（99：1）混液抽出液の精製について、液-液分配による精製方法を検討した。その結果、2 w/v%炭酸水素ナトリウム含有 10 w/v%塩化ナトリウム溶液 40 mL に試料抽出液 4 mL を加え、酢酸エチル 40 mL で 2 回洗浄した後、塩酸を加えて酸性とし、酢酸エチル 40 mL、次いで 20 mL で抽出する方法により、マトリックスの測定値への顕著な影響は認められず、良好な回収率が得られた。

牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳及び鶏卵にキンクロラックを基準値濃度及び定量限界濃度（0.01 mg/kg）で添加し、開発した方法を用いて回収試験を行なったところ、いずれの試料においても選択性は問題なく、真度は 85.6～93.5%、併行精度は 1.7～6.8% の良好な結果が得られた。また、各試料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 0.93～1.01 であり、LC-MS/MS 測定において顕著なマトリックスの影響は認められなかった。定量限界については、0.01 mg/kg を設定することが可能であった。

## 【結論】

畜産物を対象としたキンクロラック試験法として、「試料を塩酸酸性条件下アセトンで抽出し、塩基性条件下酢酸エチルで洗浄する。酸性条件下酢酸エチルに転溶し、LC-MS/MS で定量及び確認する」方法を開発した。開発した試験法を用いて牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳及び鶏卵の 5 試料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) 食品安全委員会農薬専門調査会“農薬評価書 キンクロラック”平成 26 年 9 月
- 2) BASF 社、社内資料
- 3) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知“食品に残留する農薬，試料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について”平成 17 年 1 月 24 日，食安発第 0124001 号（2005）
- 4) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知“食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインの一部改正について”平成 22 年 12 月 24 日，食安発第 1224 第 1 号（2010）

①添加回収試験における代表的なクロマトグラム

【キンクロラック】

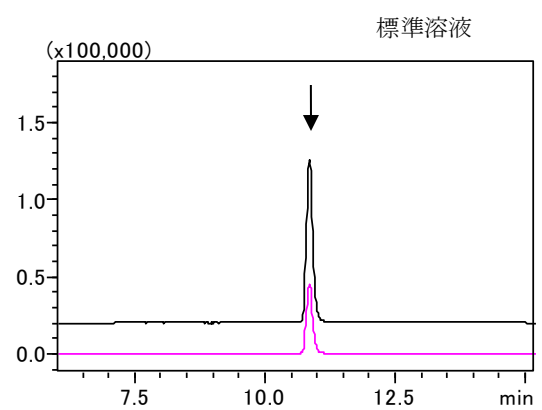
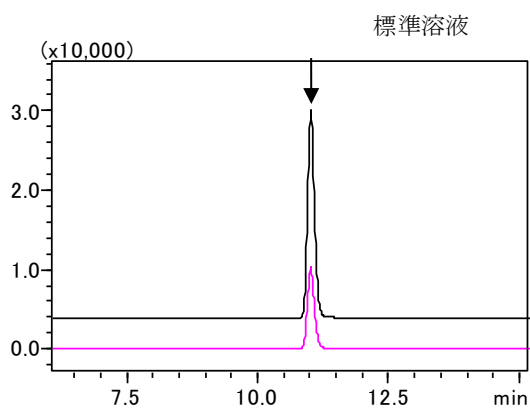
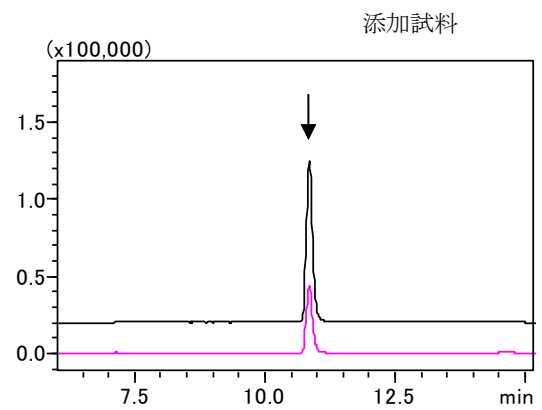
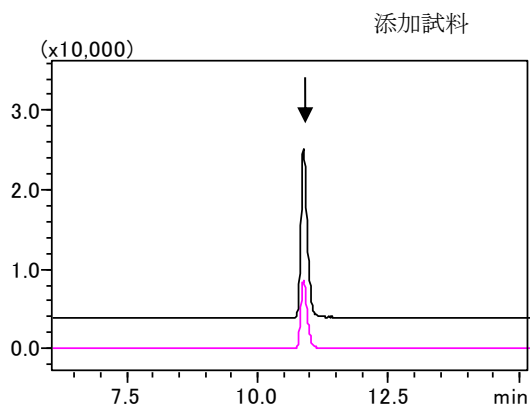
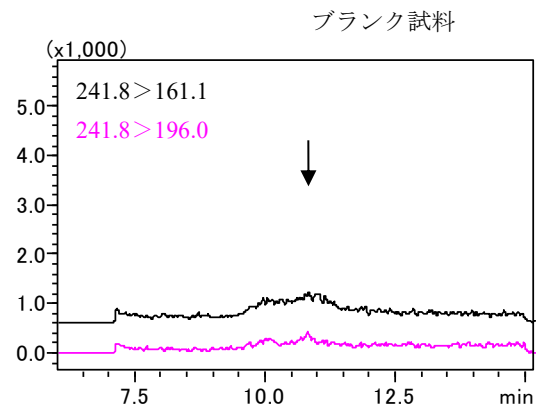
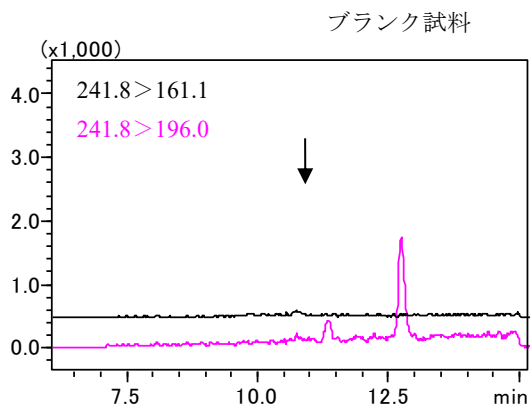


図 7-1 牛の筋肉の SRM クロマトグラム  
(添加濃度 0.01 mg/kg)

図 7-2 牛の筋肉の SRM クロマトグラム  
(添加濃度 0.05 mg/kg)

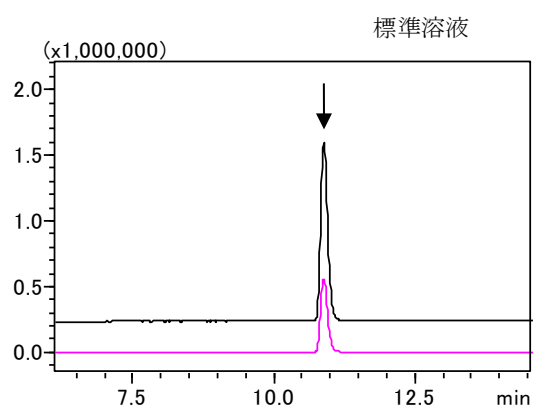
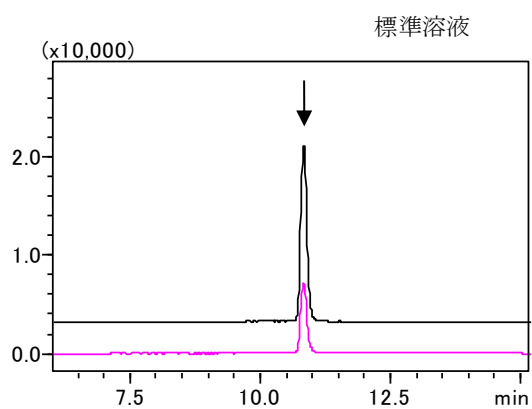
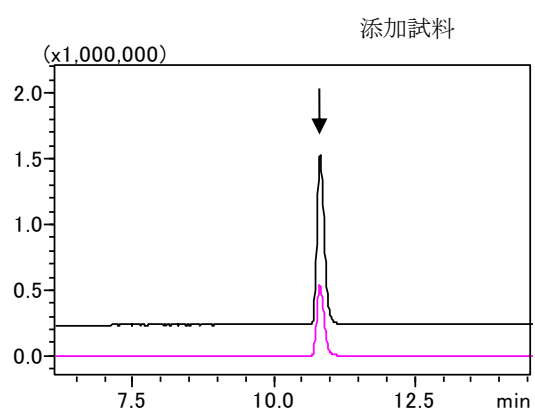
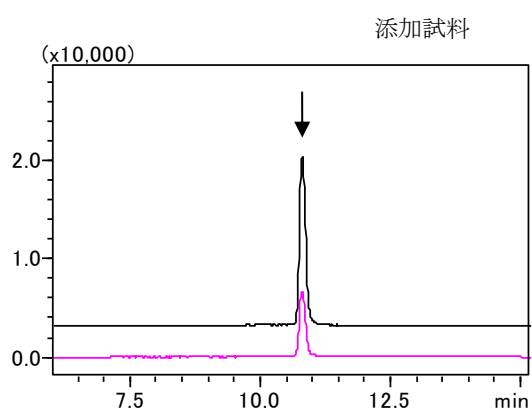
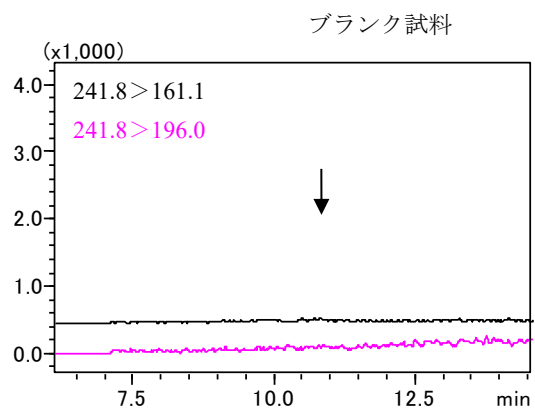
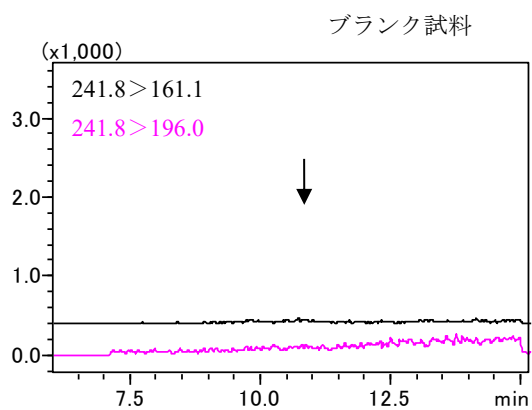


図 7-3 牛の脂肪の SRM クロマトグラム  
(添加濃度 0.01 mg/kg)

図 7-4 牛の脂肪の SRM クロマトグラム  
(添加濃度 0.7 mg/kg)

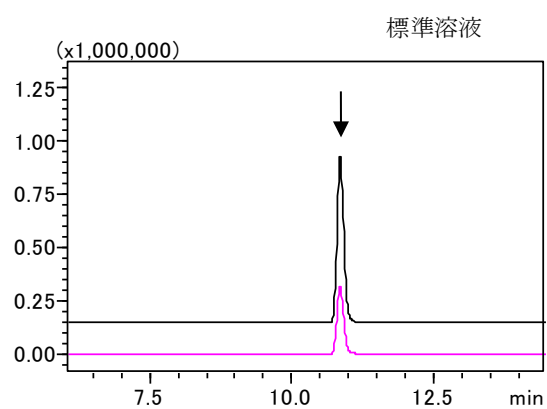
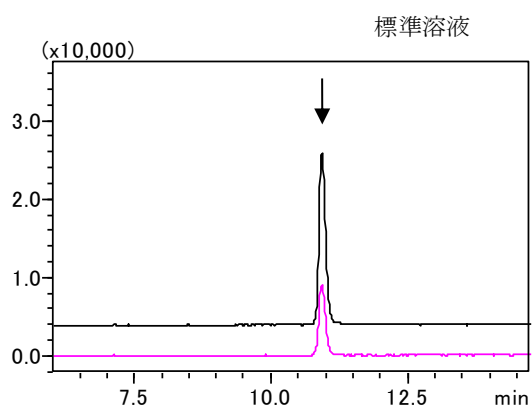
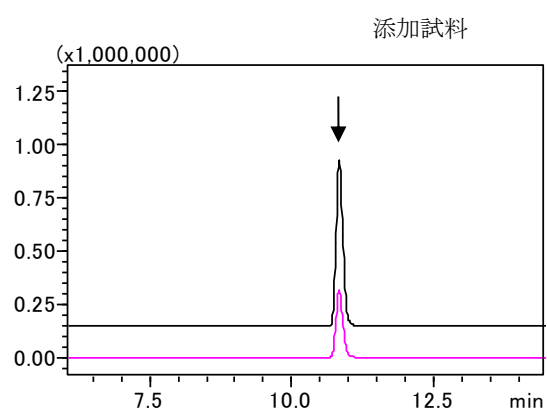
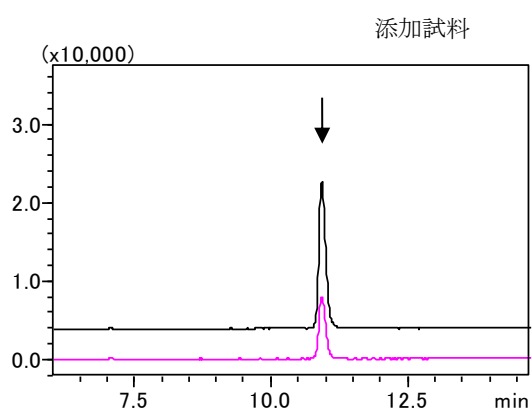
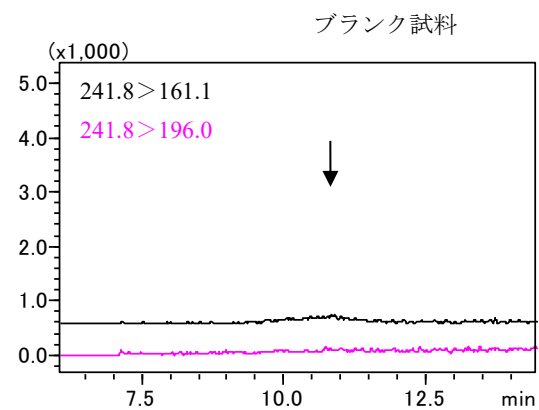
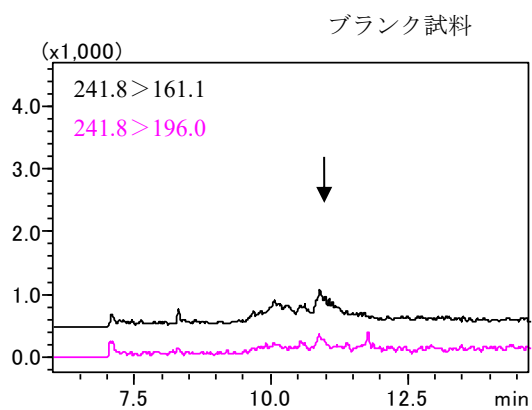


図 7-5 牛の肝臓の SRM クロマトグラム  
(添加濃度 0.01 mg/kg)

図 7-6 牛の肝臓の SRM クロマトグラム  
(添加濃度 2 mg/kg)

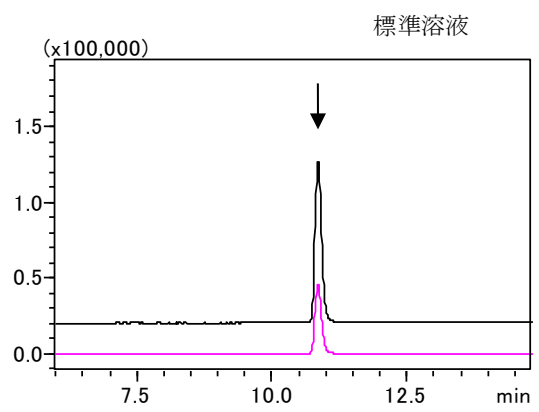
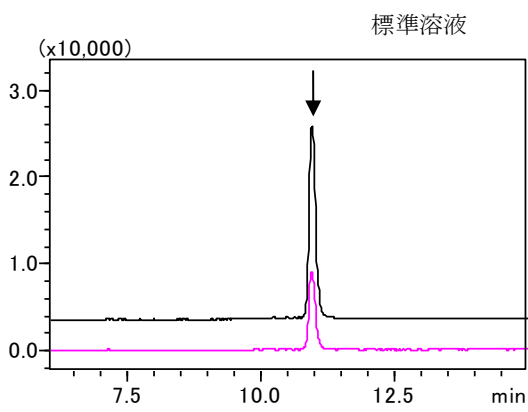
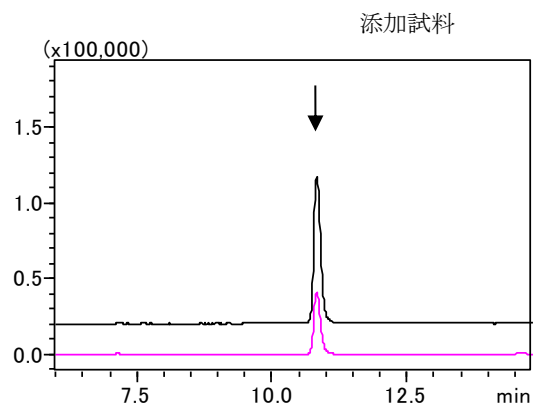
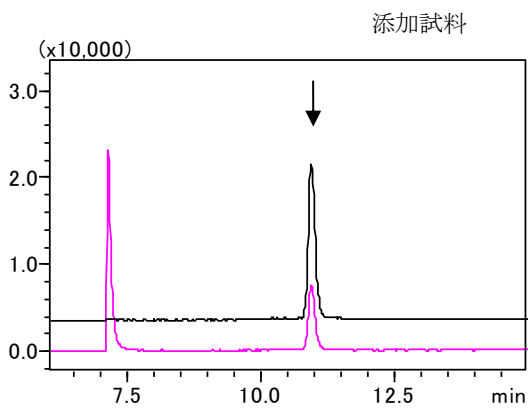
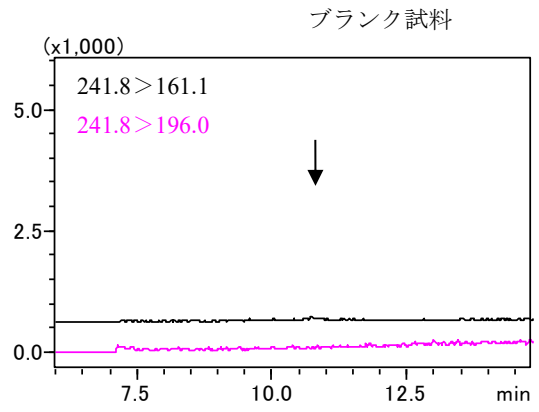
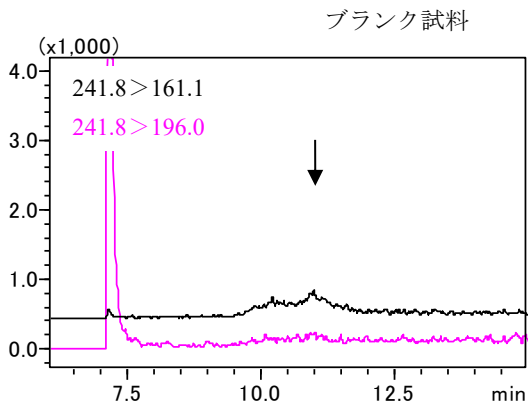


図 7-7 牛乳の SRM クロマトグラム  
(添加濃度 0.01 mg/kg)

図 7-8 牛乳の SRM クロマトグラム  
(添加濃度 0.05 mg/kg)

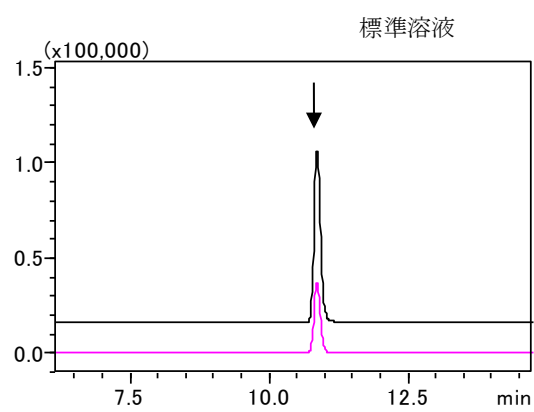
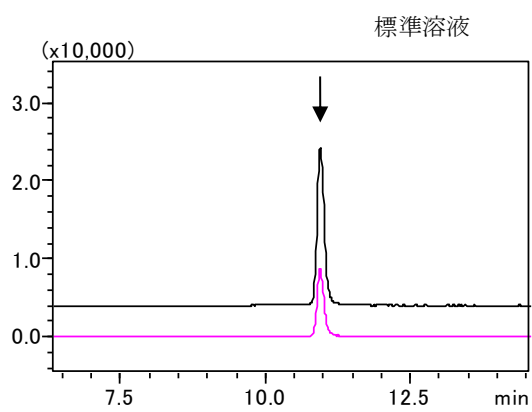
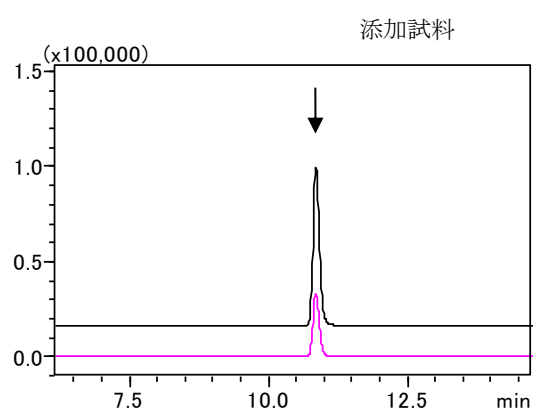
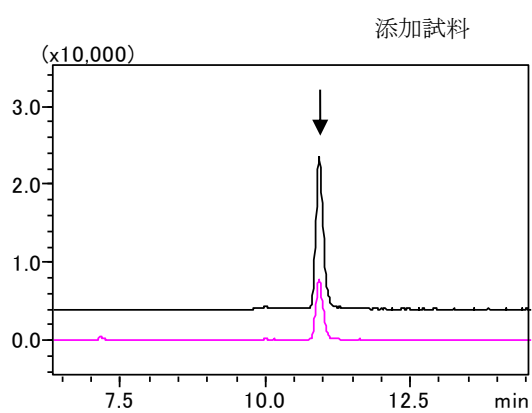
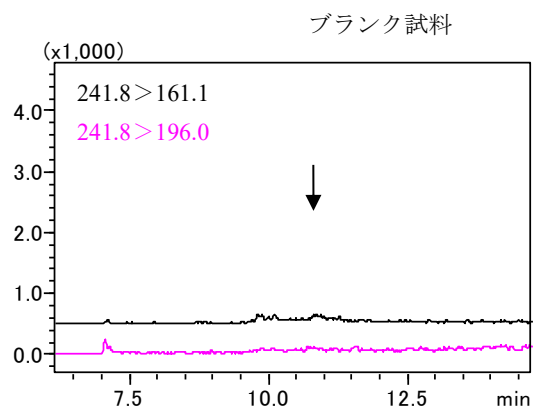
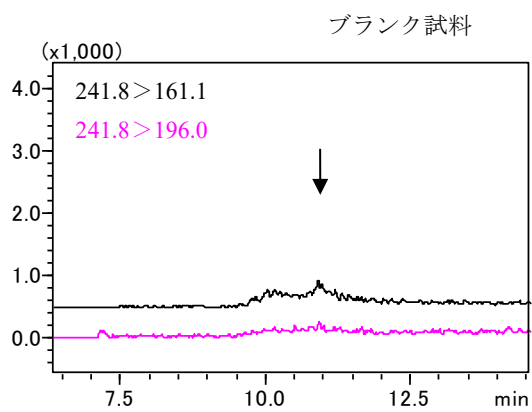


図 7-9 鶏卵の SRM クロマトグラム  
(添加濃度 0.01 mg/kg)

図 7-10 鶏卵の SRM クロマトグラム  
(添加濃度 0.05 mg/kg)



② ブランク試料の代表的なトータルイオンクロマトグラム

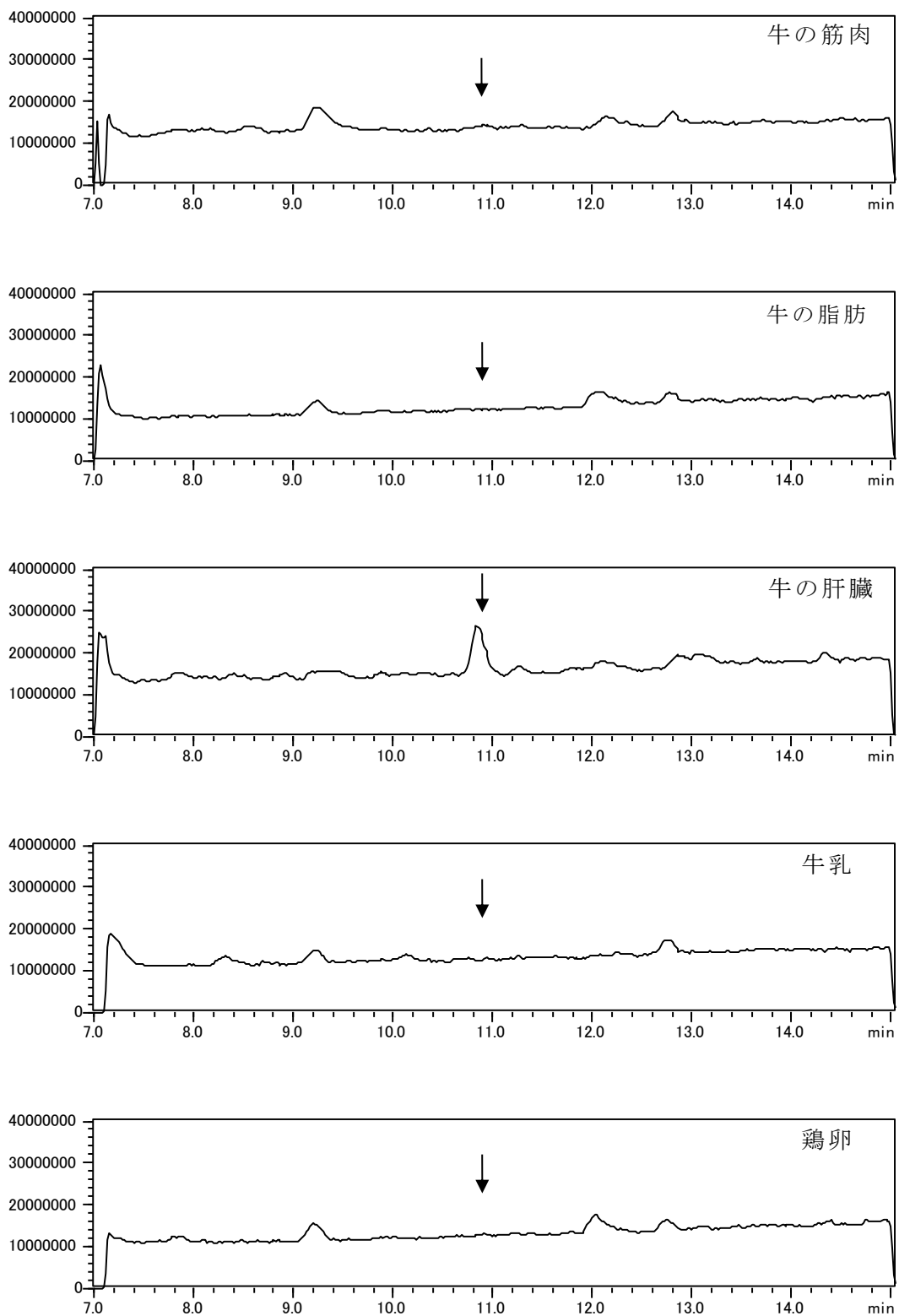


図 8 ブランク試料のトータルイオンクロマトグラム (スキャン範囲 : 50~550 amu)