

## 4.2.2 家畜

### 4.2.2.01 家きん及び反すう動物

試験成績 4.2.2.01 Johnson I. Jutson, 2021

SYN547407 - Validation of the Analytical Method (GRM072.014A) for the Determination of SYN547407 and its Metabolites SYN549431, SYN548569, SYN549436, SYN549544, SYN551583 and SYN551475 in Commodities of Animal Origin by LC-MS/MS  
Report No.: 1781.7340

### 試験ガイドライン

OECD ENV/JM/MONO (2007) 17

EPA OCSPP 860.1340 (1996)

EU SANCO/3029/99 rev 4 (2000)

逸脱：なし

試験施設：Smithers (米国)

GLP：準拠

### 分析法の原理

鶏卵、鶏筋肉、鶏脂肪、鶏肝臓、牛乳、牛クリーム、牛筋肉、牛脂肪、牛肝臓及び牛腎臓試料中のイソシクロセラム及びその代謝物 (SYN549431 [I]、SYN548569 [N]、SYN549436 [H]、SYN549544 [G]、SYN551583 [ZI] 及び SYN551475 [ZH]) の残留濃度を以下の方法で抽出・分析した。

#### <鶏卵、鶏筋肉、牛乳、牛クリーム及び牛筋肉の分析>

鶏卵、鶏筋肉、牛乳、牛クリーム及び牛筋肉試料は、アセトニトリル／超純水 (80/20、v/v) を加えてホモジナイズ後、遠心分離し、抽出液を採取する操作を 2 回行った。得られた抽出液を合わせ、アセトニトリル／超純水 (80/20、v/v) で定容し、その一定量を Oasis PRIME SPE カートリッジを用いてろ過した。ろ液の一定量を超純水で定容し、LC-MS/MS を用いて鶏卵中のイソシクロセラム、代謝物 SYN549431 [I] 及び SYN549544 [G]、鶏筋肉、牛乳、牛クリーム及び牛筋肉中のイソシクロセラム、代謝物 SYN549431 [I] を定量した。

#### <鶏脂肪の分析>

鶏脂肪試料はあらかじめ温浴 (約 60° C) で溶かした後、ヘキサンを加えてホモジナイズ後、遠心分離し、抽出液を採取する操作を 2 回行った。抽出残渣 (PES) は残しておいた。得られた抽出液を合わせ、アセトニトリル／アセトン (80/20、v/v) で 3 回振盪分配し、アセトン／アセトニトリル層 (下層) を合わせ、アセトンで定容し、別容器に移して混合後、翌日まで冷蔵保存した。

PES はナス型フラスコに移し、イソプロパノール／1N 塩酸水溶液 (50/50、v/v) 及び沸騰石を加え、1 時間還流した後、室温まで放冷した。試料 (液体のみ) を別容器に移し、還流に用いたフラスコをアセトニトリルで洗浄した洗浄液を合わせ、緩やかな窒素気流下 (40°C) で濃縮 (アセトニトリル除去) し、超純水を加えてよく混合した後、別容器に移して翌日まで冷蔵保存した。

<イソシクロセラム及び代謝物 SYN551475 [ZH] の分析>

冷蔵保存した分配試料を室温に戻した後、それぞれをよく混合した。分配試料は一定量を緩やかな窒素気流下（室温）で濃縮（注：ヘキサン除去が目的であり、乾固させないこと）後、アセトニトリル／アセトン（80/20、v/v）で定容し、さらに超純水で希釈した後、その一定量を遠心分離し、上清を LC-MS/MS を用いて鶏脂肪中のイソシクロセラム及び代謝物 SYN551475 [ZH] を定量した。

<代謝物 SYN549431 [I] の分析>

室温に戻して混合した分配試料及び加水分解試料を合わせ、その一定量を緩やかな窒素気流下（室温）で濃縮後、アセトニトリル／アセトン（80/20、v/v）で定容し、さらに超純水で希釈した後、その一定量を遠心分離し、上清を LC-MS/MS を用いて鶏脂肪中の代謝物 SYN549431 [I] を定量した。

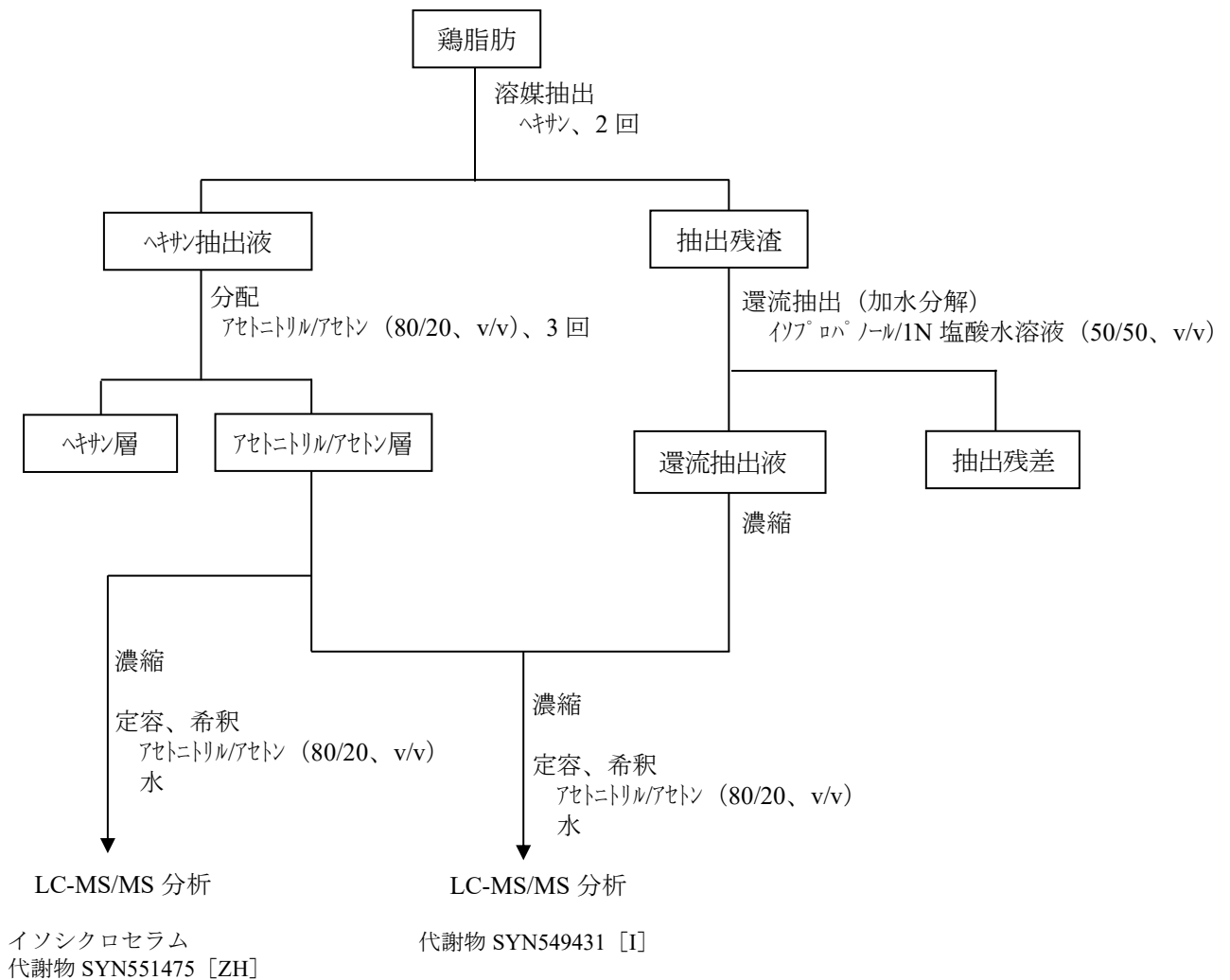


図 4.2.2.1-1 鶏脂肪の抽出・分析フローチャート

申請者注：フローチャートは申請者が作成した。

#### <牛脂肪の分析>

牛脂肪試料はあらかじめ温浴（約 60° C）で溶かした後、ヘキサンを加えてホモジナイズ後、遠心分離し、抽出液を採取する操作を 2 回行った。得られた抽出液を合わせ、アセトニトリル／アセトン（80/20、v/v）で 2 回振盪分配し、水層（下層）を合わせ、アセトンで定容して混合後、一定量を緩やかな窒素気流下（40°C）で濃縮した。超純水で定容してろ過した後、LC-MS/MS を用いて牛脂肪中のイソシクロセラム及び代謝物 SYN549431 [I] を定量した。

#### <鶏肝臓、牛肝臓及び牛腎臓の分析>

鶏肝臓、牛肝臓及び牛腎臓試料は、アセトニトリル／超純水（80/20、v/v）を加えてホモジナイズ後、遠心分離し、抽出液を採取する操作を 2 回行い、得られた抽出液を合わせた。

抽出残渣（PES）はナス型フラスコに移し、イソプロパノール／1 N 塩酸水溶液（50/50、v/v）及び沸騰石を加え、1 時間還流した後、室温まで放冷した。3 N 水酸化ナトリウム水溶液を加えて混合（中和）し、溶液の pH を確認（pH 5-7）後、先の抽出液と合わせ、超純水で定容して混合し、遠心分離後、上清を LC-MS/MS で分析し、鶏肝臓中のイソシクロセラム、代謝物 SYN549431 [I]、SYN548569 [N]、SYN549544 [G] 及び SYN551583 [ZI]、牛肝臓及び牛腎臓中のイソシクロセラム、代謝物 SYN549431 [I]、SYN548569 [N]、SYN549436 [H] 及び SYN549544 [G] を定量した。

対照群の試料を用いて本分析法のバリデーションを 0.0100 及び 0.100 mg/kg で実施した結果を表 4.2.2.1-1～表 4.2.2.1-20 に示す。

表 4.2.2.1-1 鶏卵中のイソシクロセラム、SYN549431 [I] 及び SYN549544 [G] の分析法のバリ  
 デーション結果 Primary Transition

分析対象物質	添加レベル (mg/kg)	分析回数	平均回収率 (%)	SD	RSD (%)
イソシクロセラム m/z=548→418	0.0100	5	85.4	3.22	3.78
	0.100	5	87.3	2.15	2.46
SYN549431 [I] m/z=435→418	0.0100	5	79.6	10.4	13.1
	0.100	5	86.8	4.25	4.90
SYN549544 [G] m/z=520→490	0.0100	5	104	6.23	5.98
	0.100	5	105	5.61	5.36

表 4.2.2.1-2 鶏卵中のイソシクロセラム、SYN549431 [I] 及び SYN549544 [G] の分析法のバリ  
 デーション結果 Confirmatory Transition

分析対象物質	添加レベル (mg/kg)	分析回数	平均回収率 (%)	SD	RSD (%)
イソシクロセラム m/z=548→160	0.0100	5	85.2	3.44	4.04
	0.100	5	87.1	1.15	1.31
SYN549431 [I] m/z=435→160	0.0100	5	87.7	8.52	9.72
	0.100	5	86.9	1.61	1.85
SYN549544 [G] m/z=520→420	0.0100	5	104	6.14	5.90
	0.100	5	109	3.99	3.65

表 4.2.2.1-3 鶏筋肉中のイソシクロセラム及び SYN549431 [I] の分析法のバリ  
 デーション結果 Primary Transition

分析対象物質	添加レベル (mg/kg)	分析回数	平均回収率 (%)	SD	RSD (%)
イソシクロセラム m/z=548→418	0.0100	5	97.1	8.13	8.38
	0.100	5	98.5	1.99	2.02
SYN549431 [I] m/z=435→418	0.0100	5	104	8.78	8.47
	0.100	5	95.0	1.66	1.75

表 4.2.2.1-4 鶏筋肉中のイソシクロセラム及び SYN549431 [I] の分析法のバリ  
 デーション結果 Confirmatory Transition

分析対象物質	添加レベル (mg/kg)	分析回数	平均回収率 (%)	SD	RSD (%)
イソシクロセラム m/z=548→160	0.0100	5	95.0	5.93	6.24
	0.100	5	98.7	3.09	3.13
SYN549431 [I] m/z=435→160	0.0100	5	98.7	7.44	7.54
	0.100	5	93.7	2.63	2.81

表 4.2.2.1-5 鶏脂肪中のイソシクロセラム、SYN549431 [I] 及び SYN551475 [ZH] の分析法のバリデーション結果 Primary Transition

分析対象物質	添加レベル (mg/kg)	分析回数	平均回収率 (%)	SD	RSD (%)
イソシクロセラム m/z=548→418	0.0100	5	102	9.24	9.09
	0.100	5	93.3	7.41	7.94
SYN549431 [I] m/z=435→418	0.0100	5	99.3	2.53	2.55
	0.100	5	96.3	8.20	8.51
SYN551475 [ZH] m/z=546→418	0.0100	5	105	9.74	9.26
	0.100	5	105	10.2	9.67

表 4.2.2.1-6 鶏脂肪中のイソシクロセラム、SYN549431 [I] 及び SYN551475 [ZH] の分析法のバリデーション結果 Confirmatory Transition

分析対象物質	添加レベル (mg/kg)	分析回数	平均回収率 (%)	SD	RSD (%)
イソシクロセラム m/z=548→160	0.0100	5	104	8.10	7.78
	0.100	5	95.5	8.75	9.16
SYN549431 [I] m/z=435→160	0.0100	5	97.3	8.81	9.05
	0.100	5	93.7	7.97	8.50
SYN551475 [ZH] m/z=546→160	0.0100	5	108	6.41	5.95
	0.100	5	103	6.46	6.26

表 4.2.2.1-7 鶏肝臓中のイソシクロセラム、SYN549431 [I]、SYN548569 [N]、SYN549544 [G] 及び SYN551583 [ZI] の分析法のバリデーション結果 Primary Transition

分析対象物質	添加レベル (mg/kg)	分析回数	平均回収率 (%)	SD	RSD (%)
イソシクロセラム m/z=548→418	0.0100	5	90.2	3.17	3.52
	0.100	5	94.0	1.68	1.79
SYN549431 [I] m/z=435→418	0.0100	5	97.7	8.20	8.40
	0.100	5	96.8	3.48	3.60
SYN548569 [N] m/z=261→191	0.0100	5	98.0	4.48	4.58
	0.100	5	99.0	3.08	3.11
SYN549544 [G] m/z=520→490	0.0100	5	109	3.78	3.48
	0.100	5	109	5.21	4.77
SYN551583 [ZI] m/z=520→435	0.0100	5	93.5	6.31	6.74
	0.100	5	96.5	3.33	3.45

表 4.2.2.1-8 鶏肝臓中のイソシクロセラム、SYN549431 [I]、SYN548569 [N]、SYN549544 [G] 及び SYN551583 [ZI] の分析法のバリデーション結果 Confirmatory Transition

分析対象物質	添加レベル (mg/kg)	分析回数	平均回収率 (%)	SD	RSD (%)
イソシクロセラム m/z=548→160	0.0100	5	90.1	3.30	3.67
	0.100	5	94.9	1.78	1.87
SYN549431 [I] m/z=435→160	0.0100	5	93.6	6.19	6.61
	0.100	5	95.2	3.21	3.38
SYN548569 [N] m/z=263→193	0.0100	5	102	7.24	7.12
	0.100	5	102	5.61	5.50
SYN549544 [G] m/z=520→420	0.0100	5	104	5.43	5.25
	0.100	5	108	3.41	3.16
SYN551583 [ZI] m/z=522→437	0.0100	5	93.4	3.22	3.45
	0.100	5	96.7	2.73	2.82

表 4.2.2.1-9 牛乳中のイソシクロセラム及び SYN549431 [I] の分析法のバリデーション結果 Primary Transition

分析対象物質	添加レベル (mg/kg)	分析回数	平均回収率 (%)	SD	RSD (%)
イソシクロセラム m/z=548→418	0.0100	5	92.7	2.07	2.24
	0.100	5	92.7	1.11	1.19
SYN549431 [I] m/z=435→418	0.0100	5	89.7	5.58	6.22
	0.100	5	98.5	0.565	0.574

表 4.2.2.1-10 牛乳中のイソシクロセラム及び SYN549431 [I] の分析法のバリデーション結果 Confirmatory Transition

分析対象物質	添加レベル (mg/kg)	分析回数	平均回収率 (%)	SD	RSD (%)
イソシクロセラム m/z=548→160	0.0100	5	96.6	3.17	3.29
	0.100	5	92.6	1.82	1.97
SYN549431 [I] m/z=435→160	0.0100	5	91.3	8.55	9.37
	0.100	5	98.0	1.63	1.66

表 4.2.2.1-11 牛クリーム中のイソシクロセラム及び SYN549431 [I] の分析法のバリデーション結果 Primary Transition

分析対象物質	添加レベル (mg/kg)	分析回数	平均回収率 (%)	SD	RSD (%)
イソシクロセラム m/z=548→418	0.0100	5	105	2.73	2.61
	0.100	5	102	3.20	3.15
SYN549431 [I] m/z=435→418	0.0100	5	94.3	6.46	6.84
	0.100	5	98.7	4.10	4.16

表 4.2.2.1-12 牛クリーム中のイソシクロセラム及び SYN549431 [I] の分析法のバリデーション結果 Confirmatory Transition

分析対象物質	添加レベル (mg/kg)	分析回数	平均回収率 (%)	SD	RSD (%)
イソシクロセラム m/z=548→160	0.0100	5	102	8.85	8.64
	0.100	5	101	2.33	2.31
SYN549431 [I] m/z=435→160	0.0100	5	99.4	7.65	7.70
	0.100	5	98.9	5.48	5.53

表 4.2.2.1-13 牛筋肉中のイソシクロセラム及び SYN549431 [I] の分析法のバリデーション結果 Primary Transition

分析対象物質	添加レベル (mg/kg)	分析回数	平均回収率 (%)	SD	RSD (%)
イソシクロセラム m/z=548→418	0.0100	5	100	3.97	3.96
	0.100	5	99.9	2.34	2.35
SYN549431 [I] m/z=435→418	0.0100	5	98.0	4.62	4.71
	0.100	5	95.5	1.92	2.01

表 4.2.2.1-14 牛筋肉中のイソシクロセラム及び SYN549431 [I] の分析法のバリデーション結果 Confirmatory Transition

分析対象物質	添加レベル (mg/kg)	分析回数	平均回収率 (%)	SD	RSD (%)
イソシクロセラム m/z=548→160	0.0100	5	103	8.54	8.33
	0.100	5	99.6	3.60	3.62
SYN549431 [I] m/z=435→160	0.0100	5	102	7.04	6.91
	0.100	5	96.9	2.91	3.00

表 4.2.2.1-15 牛脂肪中のイソシクロセラム及び SYN549431 [I] の分析法のバリデーション結果 Primary Transition

分析対象物質	添加レベル (mg/kg)	分析回数	平均回収率 (%)	SD	RSD (%)
イソシクロセラム m/z=548→418	0.0100	5	98.2	3.07	3.12
	0.100	5	74.9	11.0	14.6
SYN549431 [I] m/z=435→418	0.0100	5	98.3	4.66	4.74
	0.100	5	77.8	9.56	12.3

表 4.2.2.1-16 牛脂肪中のイソシクロセラム及び SYN549431 [I] の分析法のバリデーション結果  
Confirmatory Transition

分析対象物質	添加レベル (mg/kg)	分析回数	平均回収率 (%)	SD	RSD (%)
イソシクロセラム	0.0100	5	98.7	4.35	4.40
	0.100	5	74.9	10.9	14.6
SYN549431 [I]	0.0100	5	103	6.96	6.78
	0.100	5	78.0	9.37	12.0

表 4.2.2.1-17 牛肝臓中のイソシクロセラム、SYN549431 [I]、SYN548569 [N]、SYN549436 [H]  
及び SYN549544 [G] の分析法のバリデーション結果 Primary Transition

分析対象物質	添加レベル (mg/kg)	分析回数	平均回収率 (%)	SD	RSD (%)
イソシクロセラム	0.0100	5	84.4	7.36	8.72
	0.100	5	85.7	5.26	6.14
SYN549431 [I]	0.0100	5	85.8	4.15	4.84
	0.100	5	91.4	2.32	2.54
SYN548569 [N]	0.0100	5	87.8	5.92	6.74
	0.100	5	96.3	1.83	1.90
SYN549436 [H]	0.0100	5	91.6	6.65	7.26
	0.100	5	110	6.55	5.93
SYN549544 [G]	0.0100	5	101	5.21	5.17
	0.100	5	106	8.66	8.20

表 4.2.2.1-18 牛肝臓中のイソシクロセラム、SYN549431 [I]、SYN548569 [N]、SYN549436 [H]  
及び SYN549544 [G] の分析法のバリデーション結果 Confirmatory Transition

分析対象物質	添加レベル (mg/kg)	分析回数	平均回収率 (%)	SD	RSD (%)
イソシクロセラム	0.0100	5	84.9	6.61	7.79
	0.100	5	84.4	5.71	6.77
SYN549431 [I]	0.0100	5	84.9	4.39	5.17
	0.100	5	91.2	1.51	1.66
SYN548569 [N]	0.0100	5	92.3	8.24	8.92
	0.100	5	104	2.96	2.85
SYN549436 [H]	0.0100	5	100	6.74	6.74
	0.100	5	116	7.62	6.57
SYN549544 [G]	0.0100	5	105	7.28	6.90
	0.100	5	109	10.5	9.62

表 4.2.2.1-19 牛腎臓中のイソシクロセラム、SYN549431 [I]、SYN548569 [N]、SYN549436 [H] 及び SYN549544 [G] の分析法のバリデーション結果 Primary Transition

分析対象物質	添加レベル (mg/kg)	分析回数	平均回収率 (%)	SD	RSD (%)
イソシクロセラム m/z=548→418	0.0100	5	94.8	2.50	2.64
	0.100	5	98.8	3.42	3.46
SYN549431 [I] m/z=435→418	0.0100	5	103	4.78	4.63
	0.100	5	98.8	2.76	2.79
SYN548569 [N] m/z=261→191	0.0100	5	96.2	4.90	5.09
	0.100	5	99.1	4.01	4.04
SYN549436 [H] m/z=518→459	0.0100	5	98.6	7.94	8.05
	0.100	5	109	4.05	3.71
SYN549544 [G] m/z=520→490	0.0100	5	97.1	6.94	7.14
	0.100	5	109	5.06	4.63

表 4.2.2.1-20 牛腎臓中のイソシクロセラム、SYN549431 [I]、SYN548569 [N]、SYN549436 [H] 及び SYN549544 [G] の分析法のバリデーション結果 Confirmatory Transition

分析対象物質	添加レベル (mg/kg)	分析回数	平均回収率 (%)	SD	RSD (%)
イソシクロセラム m/z=548→160	0.0100	5	96.4	3.19	3.31
	0.100	5	98.2	2.87	2.93
SYN549431 [I] m/z=435→160	0.0100	5	98.8	5.29	5.36
	0.100	5	99.0	1.95	1.97
SYN548569 [N] m/z=263→193	0.0100	5	89.7	3.27	3.65
	0.100	5	97.2	7.71	7.93
SYN549436 [H] m/z=518→448	0.0100	5	110	10.2	9.24
	0.100	5	108	3.72	3.43
SYN549544 [G] m/z=520→420	0.0100	5	97.6	5.59	5.72
	0.100	5	107	6.97	6.53

#### 回収率

試験した家畜試料において、イソシクロセラム及びその代謝物 (SYN549431 [I]、SYN548569 [N]、SYN549436 [H]、SYN549544 [G]、SYN551583 [ZI] 及び SYN551475 [ZH]) の平均回収率は、30 消安第 6278 号の要求 (添加レベル 0.0100 mg/kg : 60-120%、添加レベル 0.100 mg/kg : 70-120%) を満たしていた。

#### 直線性

イソシクロセラム及びその代謝物 (SYN549431 [I]、SYN548569 [N]、SYN549436 [H]、SYN549544 [G]、SYN551583 [ZI] 及び SYN551475 [ZH]) について、鶏卵、鶏筋肉、牛乳、牛クリーム及び牛筋肉では 0.0160-10.0 µg/L の範囲で、鶏脂肪では 0.0400-10.0 µg/L の範囲で、鶏肝臓、牛脂肪、牛肝臓及び牛腎臓では 0.0500-10.0 µg/L の範囲で良好な直線性が認められた (相関係数  $r^2=0.991$  以上)。

表 4.2.2.1-21 相関係数 (鶏)

分析部位	イソシクロ セラム	SYN549431 [I]	SYN548569 [N]	SYN549544 [G]	SYN551583 [ZI]	SYN551475 [ZH]
Primary transition						
卵	1.00	0.999	NA	0.999	NA	NA
筋肉	1.00	1.00	NA	NA	NA	NA
脂肪	0.997	0.998	NA	NA	NA	0.998
肝臓	0.999	0.999	0.998	0.994	0.999	NA
Confirmatory transition						
卵	1.00	1.00	NA	0.997	NA	NA
筋肉	1.00	1.00	NA	NA	NA	NA
脂肪	0.998	0.999	NA	NA	NA	0.997
肝臓	0.998	0.999	0.999	0.997	0.999	NA

NA：該当なし

表 4.2.2.1-22 相関係数 (牛)

分析部位	イソシクロセ ラム	SYN549431 [I]	SYN548569 [N]	SYN549436 [H]	SYN549544 [G]
Primary transition					
乳	0.999	0.998	NA	NA	NA
クリーム	0.999	1.00	NA	NA	NA
筋肉	1.00	1.00	NA	NA	NA
脂肪	1.00	0.999	NA	NA	NA
肝臓	0.998	1.00	0.997	0.999	0.998
腎臓	0.997	1.00	0.996	0.998	0.996
Confirmatory transition					
乳	1.00	0.996	NA	NA	NA
クリーム	1.00	1.00	NA	NA	NA
筋肉	1.00	1.00	NA	NA	NA
脂肪	1.00	0.999	NA	NA	NA
肝臓	0.998	1.00	0.998	0.998	0.995
腎臓	0.998	0.999	0.991	0.999	0.996

NA：該当なし

### 選択性

二種類のイオントランジションでの LC-MS/MS 分析により、高い選択性が得られた。また、対照群及び試薬ブランク試料の分析の結果、定量限界 (0.0100 mg/kg) の 30%を超える分析対象物質は認められず、家畜試料の成分又は使用した試薬、溶媒及びガラス器具に起因する妨害は認められなかった。

## 定量限界

定量限界は、許容できる回収率及び RSD が得られる最低濃度として決定し、イソシクロセラム及びその代謝物 (SYN549431 [I]、SYN548569 [N]、SYN549436 [H]、SYN549544 [G]、SYN551583 [ZI] 及び SYN551475 [ZH]) のいずれも 0.0100 mg/kg であった。

## 分析法の検出限界 (MDL)

分析法の検出限界は、試験溶液で検出できる最低濃度として設定し、鶏卵、鶏筋肉、牛乳、牛クリーム及び牛筋肉試料においては 0.00192 mg/kg であり、鶏脂肪、鶏肝臓、牛脂肪、牛肝臓及び牛腎臓試料においては 0.00200 mg/kg であった。

## 繰り返し精度

試験した家畜試料の回収率に関して算定した相対標準偏差 (RSD) は、30 消安第 6278 号の要求 (添加レベル 0.0100 mg/kg : 30%以下、添加レベル 0.100 mg/kg : 20%以下) を満たしていた。

## マトリックス効果

次を除いて、鶏卵、鶏筋肉、鶏脂肪、鶏肝臓、牛乳、牛クリーム、牛筋肉、牛脂肪、牛肝臓及び牛腎臓試料では、各分析対象物質の分析において primary 及び confirmatory transition とも顕著なマトリックス効果は認められなかった。顕著なマトリックス効果 (±20%以上) が認められた鶏肝臓試料の SYN549431 [I] 及び SYN548569 [N] (primary 及び confirmatory transition)、牛脂肪試料のイソシクロセラム及び SYN549431 [I] (primary 及び confirmatory transition)、牛肝臓試料の SYN549431 [I] 及び SYN549436 [H] (primary 及び confirmatory transition)、牛肝臓試料の SYN548569 [N] (primary transition)、牛腎臓試料の SYN549436 [H] (confirmatory transition) については、マトリックス適合標準溶液を用いて検量線を作成し定量する。

表 4.2.2.1-23 マトリックス効果 (%) (鶏)

分析部位	イソシクロセラム	SYN549431 [I]	SYN548569 [N]	SYN549544 [G]	SYN551583 [ZI]	SYN551475 [ZH]
Primary transition						
卵	-4.04	-6.60	-	2.29	-	-
筋肉	4.03	-6.81	-	-	-	-
脂肪	-2.13	-4.06	-	-	-	2.44
肝臓	0.0723	-37.6	25.8	1.57	-5.83	-
Confirmatory transition						
卵	4.89	-8.90	-	1.12	-	-
筋肉	-2.32	-7.58	-	-	-	-
脂肪	-5.75	-4.70	-	-	-	6.14
肝臓	2.38	-33.5	27.2	-3.24	-14.1	-

マトリックス効果 = (B - A) / B × 100、

A : 溶媒で調製した標準溶液の平均応答、B : マトリックス添加標準溶液の平均応答。

表 4.2.2.1-24 マトリックス効果 (%) (牛)

分析部位	イソシクロセラム	SYN549431 [I]	SYN548569 [N]	SYN549436 [H]	SYN549544 [G]
Primary transition					
乳	0.547	5.04	—	—	—
クリーム	0.234	-4.50	—	—	—
筋肉	1.79	-0.608	—	—	—
脂肪	-32.5	-34.3	—	—	—
肝臓	6.82	-24.6	26.8	-56.8	8.51
腎臓	5.42	-14.4	8.67	-7.42	10.7
Confirmatory transition					
乳	2.95	5.19	—	—	—
クリーム	-3.61	-2.46	—	—	—
筋肉	1.26	0.410	—	—	—
脂肪	-31.1	-35.8	—	—	—
肝臓	4.06	-26.9	17.8	-102	13.0
腎臓	6.84	-16.9	13.3	-26.3	4.82

マトリックス効果 = (B - A) / B × 100、

A : 溶媒で調製した標準溶液の平均応答、B : マトリックス添加標準溶液の平均応答。

#### 抽出物の安定性

イソシクロセラム及び代謝物 (SYN549431 [I]、SYN548569 [N]、SYN549436 [H]、SYN549544 [G]、SYN551583 [ZI] 及び SYN551475 [ZH]) を定量限界相当 (0.0100 mg/kg) で添加した家畜試料の抽出液 (最終希釈液) 及び各濃度の検量線用標準溶液を、約 4°C、暗所で一定期間保存後、再分析した結果、牛腎臓試料中の代謝物 SYN548569 [N] の回収率を除いて、平均回収率は 70-120% であり、抽出液中の分析対象物質は最低 7 日間安定であった。この期間は分析操作における抽出液の保存期間 (2 日間) を超える期間である。牛腎臓試料中の代謝物 SYN548569 [N] の平均回収率が 120% を超えたが、同バッチ試料での他の分析対象物質は許容基準内であることから分析のばらつきと考え、抽出液中で安定であると結論付けた。

表 4.2.2.1-25 鶏試料抽出液中の各分析対象物質の安定性 Primary Transition : 平均回収率 (%)

分析部位	保存期間 (日)	イソシクロセラム	SYN549431 [I]	SYN548569 [N]	SYN549544 [G]	SYN551583 [ZI]	SYN551475 [ZH]
卵	12	93.5	91.7	—	107	—	—
筋肉	7	85.6	90.0	—	—	—	—
脂肪	7	107	99.5	—	—	—	107
肝臓	8	96.2	83.0	96.4	99.2	99.0	—

表 4.2.2.1-26 牛試料抽出液中の各分析対象物質の安定性 Primary Transition : 平均回収率 (%)

分析部位	保存期間 (日)	イソシクロ セラム	SYN549431 [I]	SYN548569 [N]	SYN549544 [G]	SYN549436 [H]
乳	13	73.7	78.2	—	—	—
クリーム	12	95.1	91.2	—	—	—
筋肉	13	96.4	89.7	—	—	—
脂肪	10	106	84.5	—	—	—
肝臓	23	96.5	109	106	105	99.6
腎臓	12	112	109	121	106	105

牛脂肪の SYN549431 [I] 標準溶液、牛肝臓の SYN548569 [N] 標準溶液、牛腎臓のイソシクロセラム及びその代謝物 (SYN549431 [I]、SYN549436 [H]、SYN548569 [N] 及び SYN549544 [G]) 標準溶液の回収率は、許容範囲 (80-120%) から外れたことから、これら試料の再分析を行う場合には、新たに調製した標準溶液を用いて分析を行うことが推奨される。

## 結論

鶏卵、鶏筋肉、鶏脂肪、鶏肝臓、牛乳、牛クリーム、牛筋肉、牛脂肪、牛肝臓及び牛腎臓試料中のイソシクロセラム及びその代謝物 (SYN549431 [I]、SYN548569 [N]、SYN549436 [H]、SYN549544 [G]、SYN551583 [ZI] 及び SYN551475 [ZH]) を定量するための分析法は、試料の抽出、精製 (必要に応じて抽出残渣 (PES) の加水分解及び加水分解物の精製) 後、LC-MS/MS により定量する方法である。イソシクロセラム及び各代謝物の定量限界はいずれも 0.0100 mg/kg であった。