

※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ください。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。

プロチオコナゾール試験法（畜産物）の検討結果

〔緒言〕

1. 目的及び試験法の検討方針

プロチオコナゾールはバイエルクロップサイエンス社により開発されたトリアゾリンチオン構造を有するトリアゾール系殺菌剤であり、脂質合成経路中の2,4-メチレンジヒドロラノステロールのC14位の脱メチル化阻害により抗菌作用を示すと考えられている。

プロチオコナゾールは、国内では農薬登録されておらず（EU、豪州、米国及びカナダで登録されている）、厚生労働省通知試験法も示されていない。

「薬事食品衛生審議会食品衛生分科会報告書 農薬・動物用医薬品部会報告について」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1003第1号（平成26年10月3日）では『プロチオコナゾールとは、農産物にあつてはプロチオコナゾール及び代謝物M17をプロチオコナゾールに換算したものの和をいい、畜産物にあつては代謝物M17及びその抱合体をプロチオコナゾールに換算したものの和をいうこと。』とされている。以上を考慮し、「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、代謝物M17及びその抱合体の試験法の開発を行った。

1) 規制対象物質

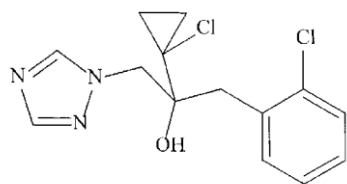
代謝物M17

代謝物M17の抱合体

2. 分析対象化合物の構造式、物理化学的性質、基準値等に関する情報

1) 構造式及び物理化学的性質

名称：代謝物M17（別名：プロチオコナゾールデスチオ体）



化学式：C₁₄H₁₅Cl₂N₃O

分子量：312.19

化学名（IUPAC）：2-(1-chlorocyclopropyl)-1-(2-chlorophenyl)-3-(1*H*-1,2,4-triazol-1-yl)-2-propanol

（出典：バイエルクロップサイエンス社提供資料）

2) 基準値

牛、豚の筋肉：0.01 ppm

牛、豚の脂肪：0.05 ppm

牛、豚の肝臓、腎臓及び食用部分：0.6 ppm

乳：0.004 ppm

〔実験方法〕

1. 試料

1) 購入先

都内のスーパーにて購入した。

2) 試料の採取方法

- ① 牛の筋肉は可能な限り脂肪層を除き、細切均一化した。
- ② 牛の脂肪は可能な限り筋肉部を除き、細切均一化した。
- ③ 牛の肝臓は、全体を細切均一化した。
- ④ 牛乳は全体をよく混合して均一化した。

2. 試薬・試液

1) 標準品

代謝物M17標準品：純度98%（シグマアルドリッチジャパン製）

2) 試薬

アセトン、アセトニトリル及び*n*-ヘキサン：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）

酢酸アンモニウム：特級（関東化学製）

塩酸：特級（小宗化学薬品製）

消泡剤：シリコーン樹脂製剤 消泡剤KM-72（信越化学工業製）

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム：InertSep Slim-J C18-B

（充てん量500 mg、ジーエルサイエンス製）

3) 標準溶液、試液の調製方法

① 標準溶液の調製方法

標準原液：代謝物M17標準品10 mgを精秤し、アセトニトリルに溶かして50 mLに定容し、200 mg/L溶液を調製した。

検量線用標準溶液：代謝物M17標準原液をアセトニトリル及び水（4：1）混液で希釈し、0.000075～0.00045 mg/Lの濃度の標準溶液（牛乳に使用）、0.0002～0.0012 mg/Lの濃度の標準溶液（牛の筋肉、牛の脂肪及び牛の肝臓に使用）及び0.001～0.006 µg/Lの濃度の標準溶液（牛の脂肪及び牛の肝臓に使用）を調製した。

添加用標準溶液：代謝物M17標準原液をアセトンで希釈し、0.04、0.1、1及び6 mg/Lの濃度の標準溶液を調製した。なお、各濃度は代謝物M17としての濃度である。

② 試液の調製方法

アセトニトリル及び水（4：1）混液

アセトニトリル800 mL及び水200 mLを混合した。

5 mol/L塩酸

塩酸400 mLに水560 mLを加え混合した。

アセトニトリル及び水（1：4）混液

アセトニトリル200 mL及び水800 mLを混合した。

1 mol/L酢酸アンモニウム溶液

酢酸アンモニウム15.9 gを水に溶解し200 mLとした。

5 mmol/L酢酸アンモニウム溶液

1 mol/L酢酸アンモニウム溶液5 mLに水を加えて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（BÜCHI製）等

LC-MS/MS

| | 型式 | 会社 |
|-------|------------------|-------|
| MS 装置 | Triple Quad 4500 | SCIEX |
| LC 装置 | Nexera X2 | 島津製作所 |
| 解析ソフト | Analyst | SCIEX |

4. 測定条件

| LC 条件 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----------------|--|--------|--|----------|--------|--------|-----|----|----|------|----|----|------|----|----|------|----|----|------|----|----|
| カラム | InertSustain C18 サイズ：内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm 会社：ジーエルサイエンス株式会社 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 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：5 mmol/L酢酸アンモニウム溶液 B液：アセトニトリル | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| グラジエント条件 | <table border="1"> <thead> <tr> <th>時間 (min)</th> <th>A液 (%)</th> <th>B液 (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.0</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>10.0</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>15.0</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>15.1</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>20.0</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> </tbody> </table> | | | 時間 (min) | A液 (%) | B液 (%) | 0.0 | 50 | 50 | 10.0 | 10 | 90 | 15.0 | 10 | 90 | 15.1 | 50 | 50 | 20.0 | 50 | 50 |
| 時間 (min) | A液 (%) | B液 (%) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 0.0 | 50 | 50 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 10.0 | 10 | 90 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 15.0 | 10 | 90 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 15.1 | 50 | 50 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 20.0 | 50 | 50 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 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) | 300 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 脱溶媒ガス | 窒素 30 psi | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| コリジョンガス | 窒素 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 定量イオン (m/z) | +312.1→70.1 [コーン電圧：81 (V)、コリジョンエネルギー：57 (eV)] | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 定性イオン (m/z) | +312.1→125.1 [コーン電圧：81 (V)、コリジョンエネルギー：49 (eV)] | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 保持時間 (min) | 6.1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

5. 定量

[実験方法] 2. 3) ①に従い調製した標準溶液4 μLをLC-MS/MSに注入し、得られたピーク面積から絶対検量線法で検量線を作成した。試験溶液4 μLをLC-MS/MSに注入し、得られたピーク面積と作成した検量線から代謝物M17の量を算出した。

6. 添加試料の調製

2. 3) ①に従い調製した添加用標準溶液を使用した。

牛の筋肉及び牛の肝臓（添加濃度：代謝物M17として0.01 ppm相当、プロチオコナゾールとして0.011 ppm相当）：1. 2) の試料10.0 gを量り採り、添加用標準溶液0.1 mg/Lを1 mL添加しよく混合した後、30分間放置した。

牛の肝臓（添加濃度：代謝物M17として0.6 ppm相当、プロチオコナゾールとして0.66 ppm相当）：1. 2) の試料10.0 gを量り採り、添加用標準溶液6 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：代謝物M17として0.01 ppm相当、プロチオコナゾールとして0.011 ppm相当）：1. 2) の試料5.00 gを量り採り、40℃の水浴中で溶解させた。そこに添加用標準溶液0.1 mg/Lを0.5 mL添加しよく混合し再凝固後、30分間放置した。

牛の脂肪（添加濃度：代謝物M17として0.05 ppm相当、プロチオコナゾールとして0.055 ppm相当）：1. 2) の試料5.00 gを量り採り、40℃の水浴中で溶解させた。そこに添加用標準溶液1 mg/Lを0.25 mL添加しよく混合し再凝固後、30分間放置した。

牛乳（添加濃度：代謝物M17として0.004 ppm相当、プロチオコナゾールとして0.0044 ppm相当）：1. 2) の試料10.0 gを量り採り、添加用標準溶液0.04 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

代謝物M17及びその抱合体を試料から*n*-ヘキサン存在下アセトニトリル及び水（4：1）混液で抽出し、代謝物M17の抱合体を塩酸で加水分解して代謝物M17とし、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムで精製した後、LC-MS/MSで定量及び確認した。

1) 抽出

1. 2) の試料10.0 g（脂肪の場合は5.00 g）を遠心管に量り採り、アセトニトリル及び水（4：1）混液40 mL並びに*n*-ヘキサン20 mLを加え、ホモジナイズした後、毎分3000回転で10分間遠心分離し、液層を分液漏斗に採った。残留物にアセトニトリル及び水（4：1）混液40 mL並びに*n*-ヘキサン20 mLを加え、ホモジナイズし、上記と同様に遠心分離し、得られた液層を先の分液漏斗に合わせ、アセトニトリル及び水混液層を500 mL容なす形フラスコに移した後、消泡剤3滴を加え、40℃以下で濃縮し、溶媒を除去した。

2) 加水分解

1) で得られた残留物に水10 mL及び5 mol/L塩酸20 mLを加え、還流装置に接続し、2時間加熱還流を行い、代謝物M17の抱合体を加水分解した。放冷後、反応液に水を加えて正確に100 mLとした。

3) 精製

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム [InertSep Slim-J C18-B (500 mg)] に、アセトニトリル及び水各5 mLを順次注入し、各流出液は捨てた。2) で得られた定容液から正確に10 mL（脂肪の場合は20 mL）を分取し、このカラムに注入し流出液を捨てた後、アセトニトリル及び水（1：4）混液10 mLを注入し、流出液は捨てた。次いでアセトニトリル及び水（4：1）混液10 mLを注入し、溶出液を10 mL容メスフラスコに受け、アセトニトリル及び水（4：1）混液で正確に10 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（脂肪の場合は5.00 g）を量り採る

アセトニトリル及び水（4：1）混液抽出

- | アセトニトリル及び水（4：1）混液40 mL並びに*n*-ヘキサン20 mLを加え、
- | ホモジナイズ、遠心分離（3000回転/分、10分）、液層を採る
- | 残留物にアセトニトリル及び水（4：1）混液40 mL並びに*n*-ヘキサン20 mLを加え、
- | ホモジナイズ、遠心分離（3000回転/分、10分）、液層を合わせる
- ↓ アセトニトリル層を分取し、消泡用シリコン3滴加え、減圧濃縮、溶媒除去

加水分解

- | 水10 mL、5 mol/L塩酸20 mLを加え、
- | 2時間加熱還流
- ↓ 放冷後、水で正確に100 mLとする

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム

- | アセトニトリル及び水各5 mLでコンディショニング
- | 加水分解後の溶液10 mL（脂肪の場合は20 mL）分取、注入
- | アセトニトリル及び水（1：4）混液10 mLで洗浄
- | アセトニトリル及び水（4：1）混液10 mLで溶出
- ↓ アセトニトリル及び水（4：1）混液で10 mLに定容

試験溶液

↓

LC-MS/MS定量

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、牛の脂肪及び牛の肝臓はブランク試験溶液から0.5 mL分取し溶媒を除去した後、代謝物M17として0.0008 mg/L（プロチオコナゾールとして0.00088 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。

牛乳はブランク試験溶液から0.5 mL分取し溶媒を除去した後、代謝物M17として0.000375 mg/L（プロチオコナゾールとして0.0004125 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用）

牛の脂肪はブランク試験溶液から0.5 mL分取し溶媒を除去した後、代謝物M17として0.005 mg/Lの標準溶液（プロチオコナゾールとして0.0055 mg/L）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。

牛の肝臓はブランク試験溶液から1 mL分取しアセトニトリル及び水（4：1）混液20 mLに定容したものをから0.5 mL分取し溶媒を除去した後、代謝物M17として0.003 mg/L（プロチオコナゾールとして0.0033 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。

[結果及び考察]

1. 測定条件の検討

1) MS条件の検討

代謝物M17はESI（+）モードでの測定が可能であった。

代謝物M17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、基準ピークとして312が得られたので、代謝物M17のプロトン付加分子（ m/z 312 [M+H]⁺）をプリカーサーイオン

とした。 m/z 312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。強度としては m/z 70が強く、次いで m/z 125であったため、 m/z 70を定量用イオン、 m/z 125を定性用イオンとした。

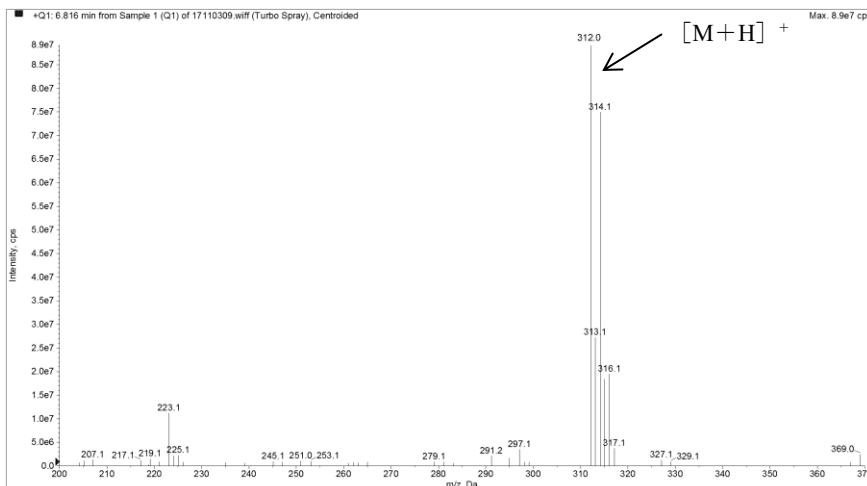


図1 代謝物 M17 のマススペクトル
 スキャン範囲： m/z 200～370
 測定条件：ESI（+）、コーン電圧=81 V

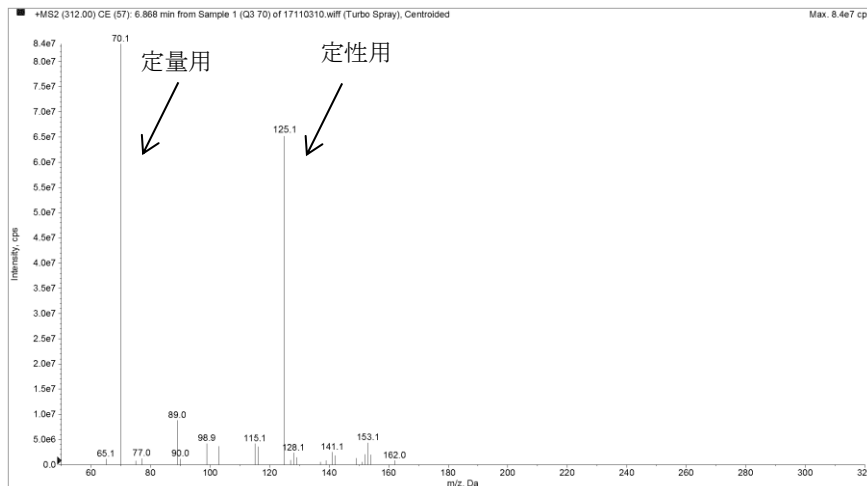


図2 代謝物 M17 のプリカーサーイオン m/z 312 のプロダクトイオンスペクトル（定量及び定性）
 スキャン範囲： m/z 50～320
 測定条件：ESI（+）、コーン電圧=81 V、コリジョンエネルギー=57 eV

2) LC条件の検討

分離カラムについて、InertSustain C18（内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm ）を、移動相について、A液として酢酸、ギ酸又は酢酸アンモニウムを、B液としてメタノール又はアセトニトリルを用いて検討を行った。5 mmol/L酢酸アンモニウム溶液及びアセトニトリルでピーク形状、分離、再現性及び感度のいずれも良好な結果が得られたため、カラムはInertSustain C18を、移動相には5 mmol/L酢酸アンモニウム溶液及びアセトニトリルを用い、5 mmol/L酢酸アンモニウム溶液及びアセトニトリル（1：1）から（1：9）までの濃度勾配を10分間で行い、（1：9）で5分間保持することとした。

3) 検量線

図3に代謝物M17の検量線の例を示した。0.000075 mg/L (0.0003 ng) ～0.00045 mg/L (0.0018 ng)、0.0002 mg/L (0.0008 ng) ～0.0012 mg/L (0.0048 ng)、0.001 mg/L (0.004 ng) ～0.006 mg/L (0.024 ng) の濃度範囲で作成した検量線の相関係数は、いずれも0.995以上であり良好な直線性を示した。

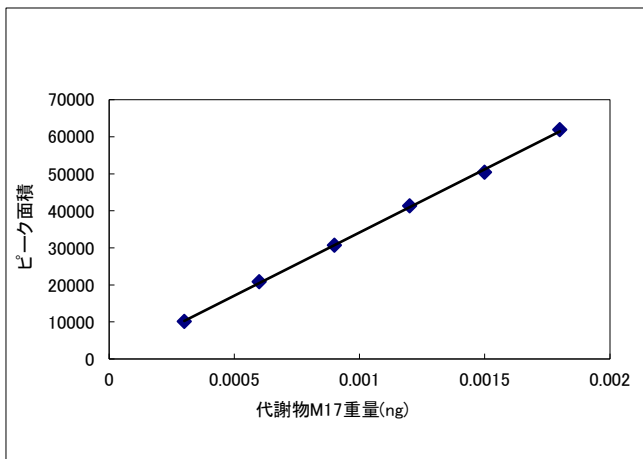


図 3-1 代謝物 M17 検量線例 ($m/z +312 \rightarrow 70$)

データ処理装置設定条件の一例
 データ処理ソフト (メーカー) : Analyst (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 : 0.0003 ng~0.0018 ng
 傾き (a) : a=34118
 切片 (b) : b=34
 R : 0.999

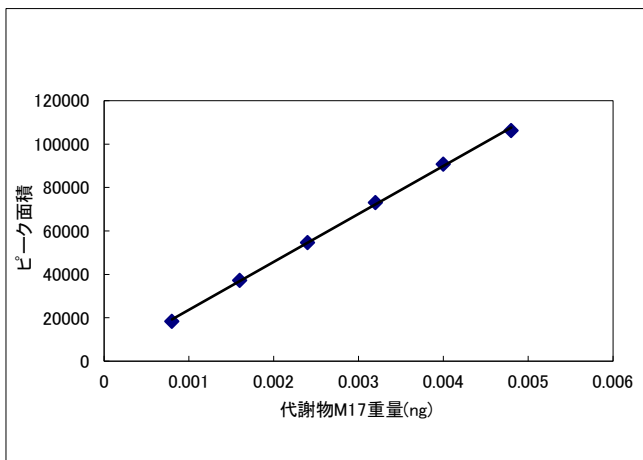


図 3-2 代謝物 M17 検量線例 ($m/z +312 \rightarrow 70$)

データ処理装置設定条件の一例
 データ処理ソフト (メーカー) : Analyst (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 : 0.0008 ng~0.0048 ng
 傾き (a) : a=22093
 切片 (b) : b=1573
 R : 0.999

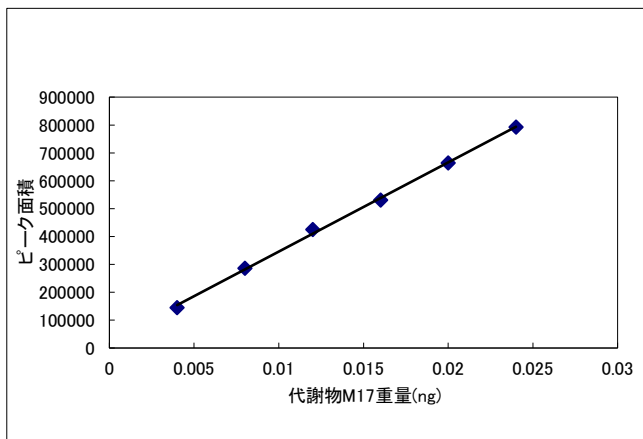


図 3-3 代謝物 17 の検量線例 ($m/z +312 \rightarrow 70$)

データ処理装置設定条件の一例
 データ処理ソフト (メーカー) : Analyst (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 : 0.004 ng~0.024 ng
 傾き (a) : a=31988
 切片 (b) : b=26012
 R : 0.999

4) 定量限界

定量限界の算出結果を以下に示した。

① 牛の筋肉、牛の脂肪及び牛の肝臓

$$0.01 \text{ mg/kg} > 0.008 \text{ mg/kg} \left[(10 \text{ mL/1 g}^{*1}) \times (0.0032 \text{ ng/4 } \mu\text{L}) \times 1.103^{*2} \right]$$

*1 10.0 g × 10 mL/100 mL (牛の筋肉及び牛の肝臓の場合)

5.00 g × 20 mL/100 mL (牛の脂肪の場合)

*2 プロチオコナゾールの分子量344.26/代謝物M17の分子量312.19

② 牛乳

$$0.004 \text{ mg/kg} > 0.003 \text{ mg/kg} [(10 \text{ mL/1 g}^{*3}) \times (0.0012 \text{ ng/4 } \mu\text{L}) \times 1.103^{*2}]$$

$$^{*3} 10.0 \text{ g} \times 10 \text{ mL/100 mL}$$

2. 試験溶液調製法の検討

1) 抽出方法の検討

本検討時では代謝物M17の抱合体の入手が不可能であり、代謝物M17の抱合体の抽出効率についての検証が不可能であったため、代謝物M17及びその抱合体を同時抽出する方法について文献調査を行い、その抽出溶媒を表1に示した。

表1 各文献で使用している抽出溶媒

| | 対象食品 | 抽出溶媒 | 対象成分 |
|---|--------------------|--|--------------------|
| | 牛乳 | 抽出せず | |
| バイエルクロップ サイエンス社 提供資料 | 牛の筋肉、牛の肝臓、 牛の腎臓 | アセトニトリル及び水 (4 : 1) | 代謝物 M17 及びその抱合体 |
| | 牛の脂肪 | アセトニトリル及び水 (4 : 1) + <i>n</i> -ヘキサン | |
| | 畜水産物 | アセトニトリル及び水 (4 : 1) | |
| 薬事・食品 衛生審議会資料 | 豚の肝臓、豚の腎臓、 豚の筋肉 | アセトニトリル及び水 (17 : 3) | 代謝物 M17 及びその抱合体 |
| Hui Liu, et al. <i>J.Agric.Food.Chem.</i> , 65, 2481-2487 (2017) | 卵、牛乳 | アセトニトリル | 代謝物 M17 |

① 抽出溶媒の組成の検討

バイエルクロップサイエンス社提供資料では牛の筋肉、牛の肝臓及び牛の腎臓はアセトニトリル及び水 (4 : 1) 混液で、牛の脂肪はアセトニトリル及び水 (4 : 1) の混液並びに *n*-ヘキサンで抽出を行っている。本試験法開発では牛の脂肪の抽出方法に合わせて、抽出溶媒はアセトニトリル及び水 (4 : 1) の混液並びに *n*-ヘキサンを採用することとした。なお、抽出溶媒をアセトニトリル及び水 (4 : 1) とすることで、次工程となる加水分解前の減圧濃縮では突沸を回避するため、消泡用シリコンを加えることとした。

② 抽出時の *n*-ヘキサン洗浄の検討

バイエルクロップサイエンス社提供資料では牛の脂肪はアセトニトリル及び水 (4 : 1) の混液並びに *n*-ヘキサンで抽出を行っている。抽出溶媒と *n*-ヘキサンの比率が回収率に影響するか検討を行った。以下に検討内容のフローを示した。

[フローチャート]

秤 取

- | 牛の脂肪 : 試料5.00 g
- | 約40℃に加温して溶融後、代謝物M17 0.5 µg添加
- ↓ 冷却して再凝固

アセトニトリル及び水 (4 : 1) 混液抽出並びに *n*-ヘキサン洗浄

- | a) アセトニトリル及び水 (4 : 1) 混液40 mL + *n*-ヘキサン40 mL

- | b) アセトニトリル及び水 (4 : 1) 混液40 mL+n-ヘキサン20 mL
- | ホモジナイズ抽出、遠心分離 (3000回転/分、10分)、液層を採る
- | 残留物に同様の溶媒を加え、
- | ホモジナイズ、遠心分離 (3000回転/分、10分)、液層を合わせる
- ↓ アセトニトリル層を分取し、消泡用シリコン3滴加え、減圧濃縮

加水分解

- | 水10 mL、5 mol/L塩酸20 mL、2時間加熱還流
- ↓ 放冷後、水で正確に100 mLとする

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム精製

- | アセトニトリル及び水各5 mLでコンディショニング
- | 20 mL分取、注入
- | 水及びアセトニトリル (4 : 1) 混液10 mLで洗浄
- | アセトニトリル及び水 (4 : 1) 混液10 mLで溶出
- ↓ アセトニトリル及び水 (4 : 1) 混液で10 mLに定容、10倍希釈

LC-MS/MS定量

フローチャートに従って添加回収試験を行った結果を表 2 に示した。20 mL のほうが回収率が高く、代謝物 M17 の *n*-ヘキサンへの移行の可能性も考えられたため、*n*-ヘキサン量は抽出溶媒の 1/2 量である 20 mL とした。

表 2 上記フローチャートに従って添加回収試験を行った結果 (%)

| <i>n</i> -ヘキサンの量 | |
|------------------|-------|
| 20 mL | 40 mL |
| 95 | 90 |

①及び②の検討結果から、抽出方法としてはアセトニトリル及び水 (4 : 1) 混液 40 mL+n-ヘキサン 20 mL を加えて抽出を行った後、液層を採り、残留物にアセトニトリル及び水 (4 : 1) 混液 40 mL+n-ヘキサン 20 mL を加えて再抽出する方法を採用することとした。

2) 代謝物 M17 の抱合体の加水分解法について

バイエルクロップサイエンス社提供資料では水 10 mL 及び 5 mol/L 塩酸 20 mL を加えて 2 時間加熱還流し加水分解を行っている。本試験でも同様の方法を採用した。

3) 精製法について

① *n*-ヘキサンによる転溶について

n-ヘキサン転溶による精製を検討した。代謝物M17 0.2 µgを10 w/v%塩化ナトリウム溶液100 mLに添加し、*n*-ヘキサンで3回振とう抽出を行った。また、5 mol/L塩酸2 mLを加えた塩酸酸性下でも検討を行った。結果を表3に示した。代謝物M17は*n*-ヘキサン2回の抽出でほぼ100%抽出することができた。なお、塩酸の有無による差は見られなかった。

表3 *n*-ヘキサンへの転溶率 (%)

| | 100 mL | 50 mL | 50 mL | 合計 |
|------|--------|-------|-------|-----|
| | (1回目) | (2回目) | (3回目) | |
| 塩酸なし | 89 | 15 | 0 | 104 |
| 塩酸あり | 90 | 13 | 1 | 104 |

添加量 : 0.2 µg

② 酢酸エチルによる転溶について

酢酸エチル転溶による精製を検討した。代謝物M17 0.2 µgを10 w/v%塩化ナトリウム溶液100 mLに添加し、酢酸エチルで3回振とう抽出を行った。また、5 mol/L塩酸2 mLを加えた塩酸酸性下でも検討を行った。結果を表4に示した。代謝物M17は酢酸エチル2回の抽出でほぼ100%抽出することができた。なお、塩酸の有無による差は見られなかった。

表4 酢酸エチルへの転溶率 (%)

| | 100 mL | 50 mL | 50 mL | 合計 |
|------|--------|-------|-------|-----|
| | (1回目) | (2回目) | (3回目) | |
| 塩酸なし | 97 | 6 | 1 | 104 |
| 塩酸あり | 95 | 8 | 0 | 103 |

添加量 : 0.2 µg

③ 脱脂操作について

脱脂の方法としてアセトニトリル/ヘキサン分配による精製を検討した。代謝物M17 0.2 µgを*n*-ヘキサン30 mLに添加し、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル30 mLで3回振とう抽出を行った結果を表5に示した。代謝物M17は2回の抽出でほぼ100%抽出することができた。

表5 アセトニトリル/ヘキサン分配の検討 (%)

| <i>n</i> -ヘキサン飽和アセトニトリル | | | |
|-------------------------|-------|-------|-----|
| 30 mL | 30 mL | 30 mL | 合計 |
| (1回目) | (2回目) | (3回目) | |
| 92 | 10 | 1 | 103 |

添加量 : 0.2 µg

④ 多孔性ケイソウ土カラムによる精製

多孔性ケイソウ土カラムによる精製を検討した。

多孔性ケイソウ土カラムに代謝物M17 0.2 µgを水8 mL及び5 mol/L塩酸2 mLで負荷し、10分間放置した後、*n*-ヘキサンで溶出した。溶出状況を表6に示した。代謝物M17は*n*-ヘキサン100 mLで溶出された。

表6 多孔性ケイソウ土カラムからの溶出状況 (%)

| <i>n</i> -ヘキサン | | | 合計 |
|----------------|-----------|------------|-----|
| 0-50 mL | 50-100 mL | 100-150 mL | |
| 79 | 22 | 1 | 102 |

InertSep K-solute 10 mL、ジーエルサイエンス製
添加量：0.2 µg

⑤ オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムによる精製

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムによる精製を検討した。

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムをアセトニトリル及び水各5 mLで予備洗浄した後、代謝物M17 0.2 µgを水8 mL及び5 mol/L塩酸2 mLに溶解し、負荷した。溶出状況を表7に示した。代謝物M17はアセトニトリル及び水 (1 : 4) 混液では溶出せず、水及びアセトニトリル (1 : 4) 混液10 mLで溶出した。

表7 オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムからの溶出状況 (%)

| 水 8 mL + 5 mol/L塩酸2 mL | アセトニトリル及び水 (1 : 4) 混液 | | 水及びアセトニトリル (1 : 4) 混液 | | 合計 |
|------------------------------|--------------------------|---------|--------------------------|--|-----|
| | 10 mL | 0-10 mL | 10-15 mL | | |
| 0 | 0 | 107 | 1 | | 108 |

InertSep Slim-J C18-B、充てん量500 mg、ジーエルサイエンス製
添加量：0.2 µg

①～⑤の各種検討結果よりいくつかの精製が可能であったが、代謝物 M17 は比較的高感度で測定が可能であったことから、抽出、加水分解後にオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムによる精製のみで試験法を確立した。

3. 添加回収試験

牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓及び牛乳の4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 (代謝物M17の濃度として) 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4に示した。また、各食品のブランク試料のスクリー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5に示した。

1) 選択性

選択性の結果を表8に示した。検討した何れの試料においても代謝物M17の定量を妨害するようなピークは認められず、選択性は良好であった。

表8 選択性の評価

| No. | 分析対象化合物 | 食品名 | 定量限界 [検出限界] (mg/kg) | 基準値 (ppm) | 妨害ピークの許容範囲の評価 | | | ピーク面積(高さ) ¹⁾ | | | | | | 選択性の 評価 ³⁾ | 備考 | | |
|-----|---------|------|---------------------------|--------------|---------------|-------|--------------|-------------------------|-----|-------|----------------------------|-----|-------|--------------------------|---------|--------------------|--|
| | | | | | 評価濃度 (ppm) | 評価基準 | 面積又は 高さの別 | ブランク | | | マトリックス添加標準溶液 ²⁾ | | | | | 面積(高さ) 比(a)/(b) | |
| | | | | | | | | n=1 | n=2 | 平均(a) | n=1 | n=2 | 平均(b) | | | | |
| 1 | 代謝物M17 | 牛の筋肉 | 0.01 | 0.01 | 定量限界 | 0.01 | < 0.333 | 面積 | 0 | 0 | 0 | | | #DIV/0! | #DIV/0! | ○ | |
| | | | 0.01 | 0.05 | 基準値 | 0.05 | < 0.100 | 面積 | 0 | 0 | 0 | | | #DIV/0! | #DIV/0! | ○ | |
| | | 牛の脂肪 | 0.01 | 0.6 | 基準値 | 0.6 | < 0.100 | 面積 | 0 | 0 | 0 | | | #DIV/0! | #DIV/0! | ○ | |
| | | | 0.01 | 0.004 | 定量限界 | 0.004 | < 0.333 | 面積 | 0 | 0 | 0 | | | #DIV/0! | #DIV/0! | ○ | |
| | | 牛の肝臓 | 0.01 | 0.05 | 基準値 | 0.05 | < 0.100 | 面積 | 0 | 0 | 0 | | | #DIV/0! | #DIV/0! | ○ | |
| | | | 0.01 | 0.6 | 基準値 | 0.6 | < 0.100 | 面積 | 0 | 0 | 0 | | | #DIV/0! | #DIV/0! | ○ | |
| | | 牛の肝臓 | 0.01 | 0.6 | 基準値 | 0.6 | < 0.100 | 面積 | 0 | 0 | 0 | | | #DIV/0! | #DIV/0! | ○ | |
| | | | 0.01 | 0.004 | 定量限界 | 0.004 | < 0.333 | 面積 | 0 | 0 | 0 | | | #DIV/0! | #DIV/0! | ○ | |
| | | 乳 | 0.004 | 0.004 | 基準値 | 0.004 | < 0.100 | 面積 | 0 | 0 | 0 | | | #DIV/0! | #DIV/0! | ○ | |
| | | | 0.004 | 0.004 | 基準値 | 0.004 | < 0.100 | 面積 | 0 | 0 | 0 | | | #DIV/0! | #DIV/0! | ○ | |

*1 ブランク試料、標準溶液の順に注入して測定した結果から評価する。(必要に応じて起爆注入を行う。)
 *2 試料中の濃度が「評価濃度」相当になるように、ブランク試料の試験溶液で調製した標準溶液(マトリックス添加標準溶液)を用いる。
 ブランク試料に妨害ピークが観察されなかった場合には、標準溶液のピーク面積(高さ)は求めなくても良い。
 *3 面積(高さ)比が、妨害ピークの許容範囲の評価基準に適合する場合には「○」、適合しない場合には「×」を記載する。

2) 真度、精度及び定量限界

真度及び併行精度の検討結果を表9に示した。真度は91.8~102.6%、併行精度は0.6~3.7%であり、目標値を十分に満たした。S/N比の平均値は325.3~604.9でありS/N≧10を十分に満たした。

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 [検出限界] (mg/kg) | 基準値 (ppm) | 添加濃度 (ppm) | 定量限界 の評価 ¹⁾ | 検量線 | | | | | 回収率(%) | | | | | 真度 (%) | 併行精度 (RSD%) | S/N ²⁾ | | | 備考 |
|-----|---------|------|---------------------------|--------------|---------------|---------------------------|-------|-------|------------------|-------|-------|--------|---------|---------|---------|---------|-----------|----------------|-------------------|-----|-----|----|
| | | | | | | | 傾き | 切片 | r ² 値 | n=1 | n=2 | n=3 | n=4 | n=5 | Max. | Mn. | | | 平均値 | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | n=1 | n=2 | |
| 1 | 代謝物M17 | 牛の筋肉 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | S/N | 36387 | -645 | 0.9990 | 93.6 | 92.1 | 94.0 | 91.1 | 93.6 | 92.9 | 1.3 | 548.2 | 547.0 | 547.6 | | | |
| | | | 0.01 | 0.05 | 0.01 | S/N | 22093 | 1573 | 0.9992 | 94.4 | 98.9 | 95.8 | 97.2 | 97.3 | 96.7 | 1.8 | 365.4 | 285.1 | 325.3 | | | |
| | | 牛の脂肪 | 0.01 | 0.05 | 0.05 | - | 31988 | 26012 | 0.9986 | 102.1 | 103.9 | 96.3 | 104.9 | 106.0 | 102.6 | 3.7 | - | - | #DIV/0! | | | |
| | | | 0.01 | 0.6 | 0.01 | S/N | 33864 | 1148 | 0.9994 | 90.6 | 93.4 | 92.9 | 91.4 | 91.8 | 1.4 | 605.9 | 603.8 | 604.9 | | | | |
| | | 牛の肝臓 | 0.01 | 0.6 | 0.6 | - | 35696 | 7837 | 0.9999 | 98.5 | 97.0 | 97.7 | 98.5 | 98.0 | 97.9 | 0.6 | - | - | #DIV/0! | | | |
| | | | 0.01 | 0.004 | 0.004 | S/N | 34118 | 34 | 0.9994 | 97.8 | 98.3 | 99.6 | 99.3 | 96.8 | 98.4 | 1.2 | 451.8 | 270.9 | 361.4 | | | |
| | | 乳 | | | | S/N | | | | | | | | | #DIV/0! | #DIV/0! | | | #DIV/0! | | | |
| | | | | | | S/N | | | | | | | | | #DIV/0! | #DIV/0! | | | #DIV/0! | | | |
| | | | | | | S/N | | | | | | | | | #DIV/0! | #DIV/0! | | | #DIV/0! | | | |
| | | | | | | S/N | | | | | | | | | #DIV/0! | #DIV/0! | | | #DIV/0! | | | |
| | | | | S/N | | | | | | | | | #DIV/0! | #DIV/0! | | | #DIV/0! | | | | | |

*1 S/Nを求める必要がある場合には「S/N」と表示される。
 *2 得られた回収率の中で最大値を与えるピーク(Max.)及び最小値を与えるピーク(Mn.)のそれぞれのS/Nを求める。

3) 試料マトリックスの測定への影響

試料マトリックスの測定への影響について検討した結果を表10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0.92~1.03であり、測定への影響はないものと考えられた。添加回収試験における真度を表10で求めたピーク面積比で除して補正真度を求め、表11に示した。補正真度は93.7~107.0%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矛盾は見られなかった。

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 [検出限界] (mg/kg) | 基準値 (ppm) | 添加濃度 (ppm) | 標準溶液 濃度 ¹⁾ (mg/L) | ピーク面積(高さ) ²⁾ | | | | | | | | | 備考 |
|-----|---------|------|---------------------------|--------------|---------------|------------------------------------|-------------------------|--------------------|----------------------------|--------|--------|--------|---------|--------|------------------------------|---------|
| | | | | | | | 面積又は 高さの別 | ブランク ³⁾ | マトリックス添加標準溶液 ⁴⁾ | | | 溶媒標準溶液 | | | ピーク面積 (高さ)比 ⁵⁾ | |
| | | | | | | | | | n=1 | n=2 | 平均 | n=1 | n=2 | 平均 | | |
| 1 | 代謝物M17 | 牛の筋肉 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.001 | 面積 | 0 | 138505 | 137612 | 138059 | 141944 | 142855 | 142400 | 0.97 | |
| | | | 0.01 | 0.05 | 0.01 | 0.001 | 面積 | 0 | 138997 | 140374 | 139686 | 138913 | 138074 | 138494 | 1.01 | |
| | | 牛の脂肪 | 0.01 | 0.05 | 0.05 | 0.005 | 面積 | 0 | 739051 | 733630 | 736341 | 725637 | 721251 | 723444 | 1.02 | |
| | | | 0.01 | 0.6 | 0.01 | 0.001 | 面積 | 0 | 136919 | 135935 | 136427 | 138954 | 138378 | 138666 | 0.98 | |
| | | 牛の肝臓 | 0.01 | 0.6 | 0.6 | 0.003 | 面積 | 0 | 476167 | 468340 | 472254 | 462075 | 457117 | 459596 | 1.03 | |
| | | | 0.004 | 0.004 | 0.004 | 0.000375 | 面積 | 0 | 48459 | 47951 | 48205 | 53175 | 51136 | 52156 | 0.92 | #DIV/0! |
| | | | | | | | | | | | | | | 0 | #DIV/0! | |
| | | | | | | | | | | | | | | 0 | #DIV/0! | |
| | | | | | | | | | | | | | | 0 | #DIV/0! | |
| | | | | | | | | | | | | | | 0 | #DIV/0! | |
| | | | | | | | | | | | | 0 | #DIV/0! | | | |

*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。

表 11 補正真度

| No. | 分析対象化合物 | 食品名 | 定量限界 (ppm) | 基準値*1 (ppm) | 添加濃度 (ppm) | 真度 (%) | ピーク面積比 (%) | 補正真度 (%) | 備考 |
|-----|---------|------|------------|-------------|------------|--------|------------|----------|----|
| 1 | 代謝物M17 | 牛の筋肉 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 92.9 | 0.97 | 95.8 | |
| | | 牛の脂肪 | 0.01 | 0.05 | 0.01 | 96.7 | 1.01 | 95.7 | |
| | | 牛の脂肪 | 0.01 | 0.05 | 0.05 | 102.6 | 1.02 | 100.6 | |
| | | 牛の肝臓 | 0.01 | 0.6 | 0.01 | 91.8 | 0.98 | 93.7 | |
| | | 牛の肝臓 | 0.01 | 0.6 | 0.6 | 97.9 | 1.03 | 95.0 | |
| | | 乳 | 0.004 | 0.004 | 0.004 | 98.4 | 0.92 | 107.0 | |
| | | | | | | | #DIV/0! | | |
| | | | | | | | #DIV/0! | | |
| | | | | | | | #DIV/0! | | |
| | | | | | | | #DIV/0! | | |
| | | | | | | | #DIV/0! | | |
| | | | | | | | #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。

4. 考察

代謝物M17の抱合体の標準品が入手できなかったため、抽出法はメーカー提供資料を参考にアセトニトリル及び水の混液並びに*n*-ヘキサンを用いたところ、良好な回収率が得られた。代謝物M17の抱合体の加水分解法はメーカー提供資料の方法に倣い、塩酸を加えて2時間加熱還流することとした。加水分解後の溶液はオクタデシルシリル化シリカゲルによる精製を検討したところ、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4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91.8~102.6%、併行精度は0.6~3.7%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、肝臓及び牛乳に適応可能であると判断された。

[結論]

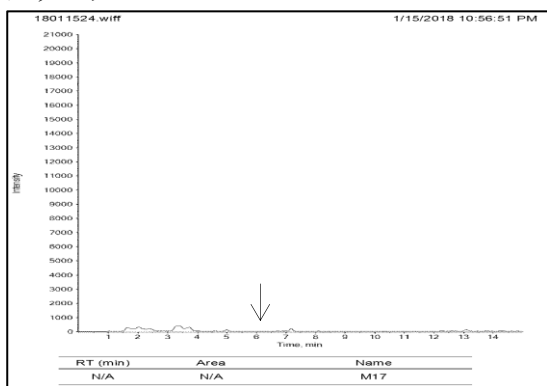
畜水産物中のプロチオコナゾールの試験法として、代謝物M17及びその抱合体を試料から*n*-ヘキサン存在下アセトニトリル及び水(4:1)混液で抽出し、代謝物M17の抱合体を塩酸で加水分解して代謝物M17とし、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムで精製した後、LC-MS/MSで定量及び確認する方法を開発した。

開発した試験法を牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓及び牛乳の4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91.8~102.6%、併行精度は0.6~3.7%の良好な結果が得られた。また、定量限界として、牛の筋肉、牛の脂肪及び牛の肝臓は0.01 mg/kg、牛乳は0.004 mg/kgを設定可能であることが確認できた。

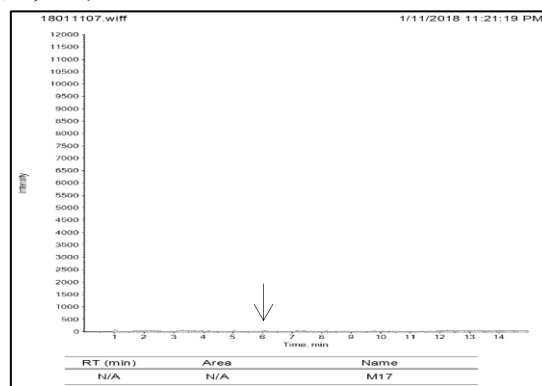
[参考文献]

- ・ JAU6476 Independent Method Validation (Battelle Study Number A4-14-01-01)
- ・ [Phenyl-UL-¹⁴C]JAU6476-desthio Absorption, Distribution, Excretion, and Metabolism in the Lactating Goat
(以上 バイエルクロップサイエンス社提供資料)
- ・ 薬事・食品衛生審議会資料

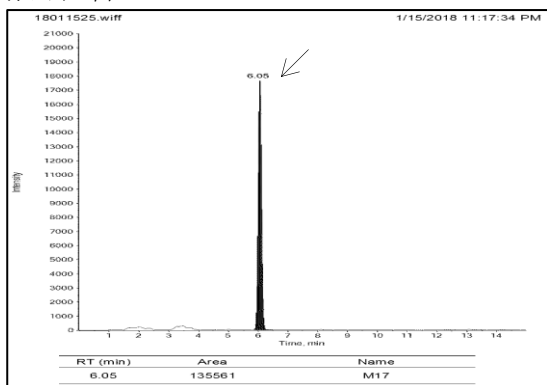
代謝物M17の添加回収試験におけるクロマトグラム
ブランク



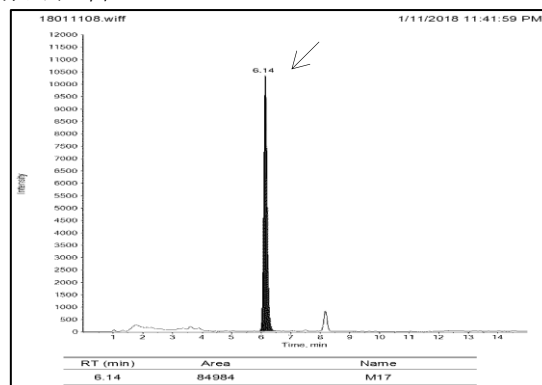
ブランク



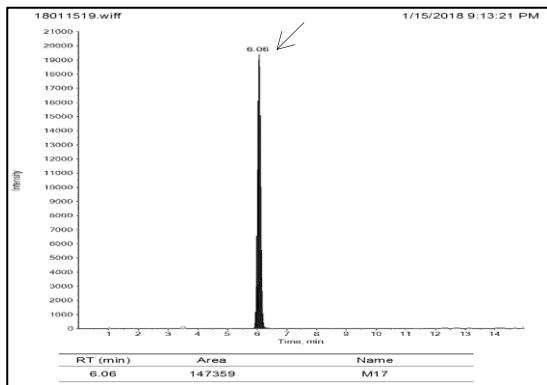
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

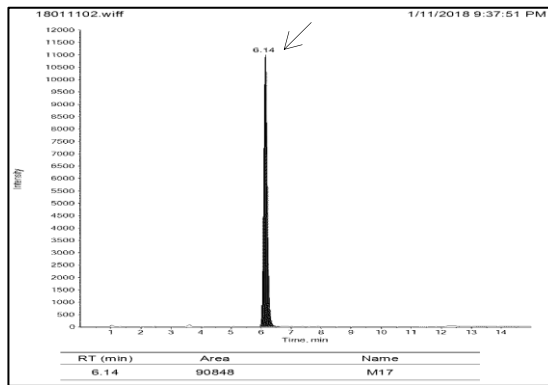
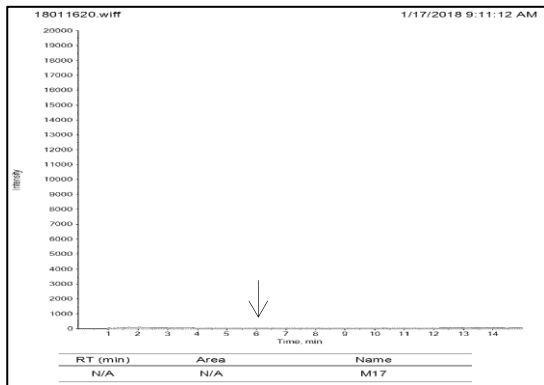


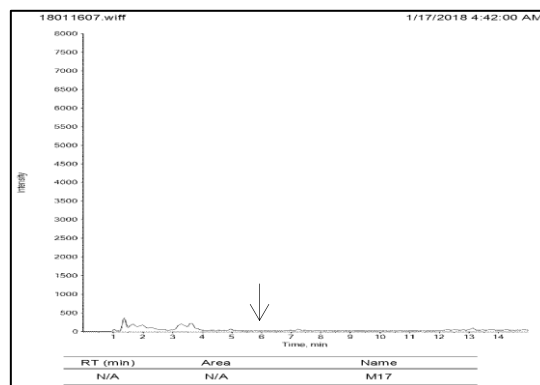
図 4-1 牛の筋肉の MRM クロマトグラム
代謝物 M17 (m/z +312→70)
添加濃度 : 0.01 ppm

図 4-2 牛の脂肪の MRM クロマトグラム
代謝物 M17 (m/z +312→70)
添加濃度 : 0.01 ppm

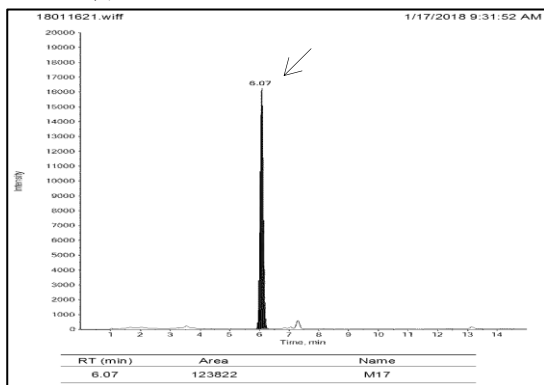
ブランク



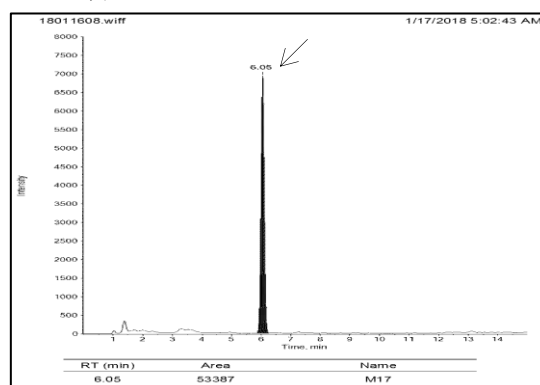
ブランク



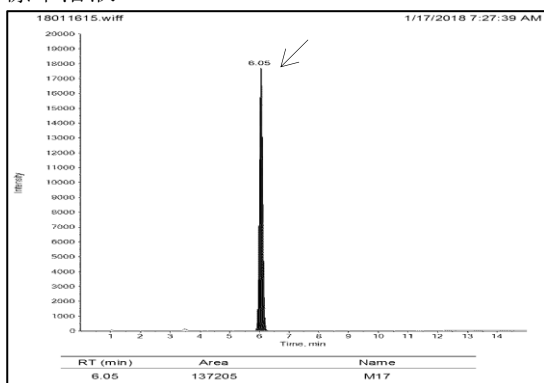
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

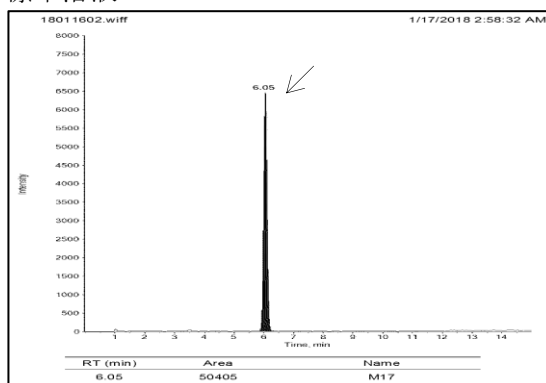


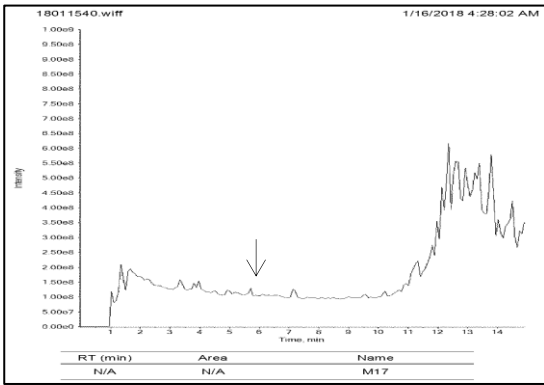
図 4-3 牛の肝臓の MRM クロマトグラム
代謝物 M17 ($m/z +312 \rightarrow 70$)

添加濃度 : 0.01 ppm

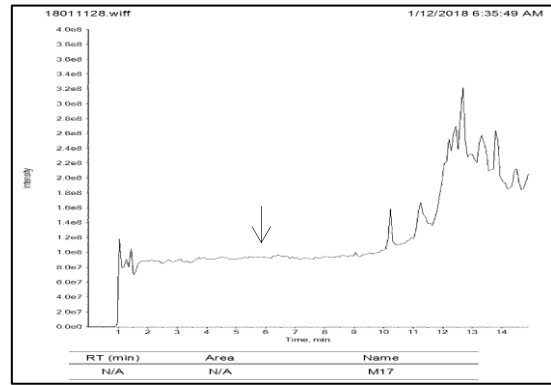
図 4-4 牛乳の MRM クロマトグラム
代謝物 M17 ($m/z +312 \rightarrow 70$)

添加濃度 : 0.004 ppm

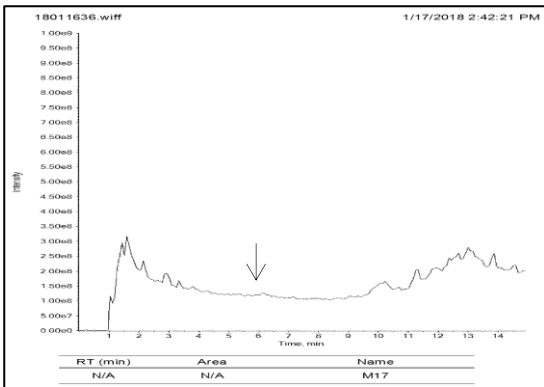
牛の筋肉



牛の脂肪



牛の肝臓



牛乳

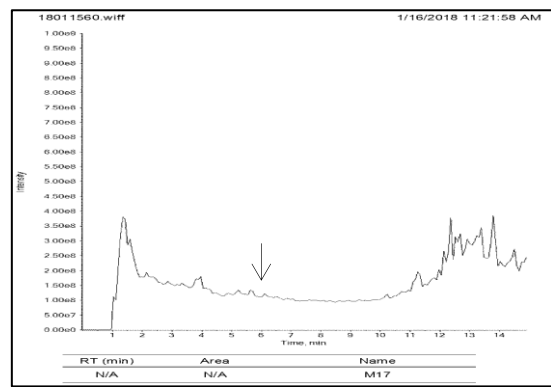


図5 ブランク試料のトータルイオンクロマトグラム (スキャン範囲: 50~1000 m/z)