

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

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

エチプロール試験法

エチプロール試験法(畜水産物)の検討結果

[緒言]

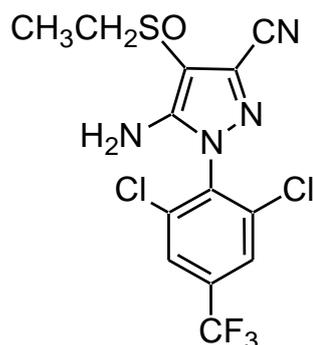
1. 目的

エチプロール(ethiprole)は、 γ -アミノ酪酸(GABA)による神経伝達を阻害することにより殺虫活性を有するフェニルピラゾール系殺虫剤である。現在、農産物及び水産物に対する個別試験法が通知されているが、畜産物を対象とした試験法は通知されていない。今回畜産物の試験法を整備するために、畜産物のエチプロール試験法(水産物)への追加について検討した。

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:エチプロール(ethiprole)

構造式



分子式: $C_{13}H_9Cl_2F_3N_4OS$

分子量: 397.2

化学名: IUPAC 名: 5-Amino-1-(2,6-dichloro- α, α, α -trifluoro-*p*-tolyl)

-4-ethylsulfanylpyrazole-3-carbonitrile、CAS 番号: 181587-01-9

外観: 白色粉末・無臭

融点: 分解のため測定不能

蒸気圧: 9.1×10^{-8} Pa (25°C)

溶解性(20°C): 水 0.92 mg/100 mL、*n*-ヘプタン 0.4 mg/100 mL、トルエン 0.1 g/100 mL、アセトン 9.07 g/100 mL、アセトニトリル 2.45 g/100 mL、メタノール 4.72 g/100 mL

オクタノール/水分配係数: $\log Pow = 2.9$ (20°C)

安定性: 熱安定性; 安定、水中安定性; 酸、アルカリ性で安定、光安定性; やや不安定

[出典] 社団法人 日本植物防疫協会編集 農薬ハンドブック 2005年版(改定新版)

3. 基準値

食品名	基準値(ppm)
米(玄米)	0.2
大豆	0.2
えだまめ	0.5
みかん	0.1
なつみかんの果実全体	0.7
レモン	0.7
オレンジ(ネーブルオレンジを含む)	0.7
グレープフルーツ	0.7
ライム	0.7
その他のかんきつ類果実	0.7
りんご	1
かき	0.2
茶	10
その他のスパイス	3
魚介類	0.09

【実験方法】

1. 試料

牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳、鶏卵及びはちみつは札幌市内の小売店で購入した。

(1) 牛の筋肉

試料から可能な限り脂肪を取り除いた後、松下電器産業(株)[現 パナソニック(株)]製スピードカッターMK-K77を用いて細切均一化した。

(2) 牛の脂肪

試料から可能な限り筋肉部分を取り除き、包丁で細切した後、松下電器産業(株)[現 パナソニック(株)]製スピードカッターMK-K77を用いて細切均一化した。

(3) 牛の肝臓

試料を松下電器産業(株)[現 パナソニック(株)]製スピードカッターMK-K77を用いて細切均一化した。

(4) 牛乳

容器より取り出し、そのまま用いた。

(5) 鶏卵

殻を除去し、卵黄と卵白をよく混合した。

(6) はちみつ

容器中の試料をスパーテルでよく混合した。

2. 試薬・試液

エチプロール標準品：純度 98.0% [和光純薬工業(株)製]

アセトニトリル、アセトン、酢酸エチル、蒸留水、*n*-ヘキサン：残留農薬試験用 [関東化学(株)及び和光純薬工業(株)製]

LC/MS 測定用アセトニトリル、メタノール：LC/MS 用 [関東化学(株)及び和光純薬工業(株)製]

LC/MS 測定用蒸留水又は超純水：LC/MS 用 [関東化学(株)及び和光純薬工業(株)製]

ケイソウ土：セライト No.545 [和光純薬工業(株)製]をあらかじめ蒸留水及びアセトンで洗浄後使用した。

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム：InertSep Slim-J C18 [500 mg: GL サイエンス(株)製]を、あらかじめアセトニトリル、次いで水各 5 mL でコンディショニングした後、用いた。

塩化ナトリウム：特級 [関東化学(株)製]

酢酸アンモニウム：特級 [和光純薬工業(株)製]

無水硫酸ナトリウム：残留農薬試験用 [関東化学(株)及び和光純薬工業(株)製]

桐山ロートろ紙：No.707×60 mm [日本理化学器械(株)製]。

ろ紙：150 mm、No.5A [アドバンテック(株)製]

標準原液：エチプロール標準品 10.0 mg を精秤し、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 溶液を調製した。

検量線用標準溶液：標準原液をアセトニトリル及び水(1:1)混液で適宜希釈し、回収率 25、50、75、100、125 及び 150%相当濃度の標準溶液を調製した(いずれの試料も基準値 0.01 ppm であるので、0.00025～0.0015 mg/L)。

3. 装置

高速ホモジナイザー：ウルトラタラックス T25 デジタルにシャフトジェネレーターS25N-18G を装着 (IKA 社製)。

スピードカッター：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 [東京理化学器械(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 [東京理化学器械(株)製]、クーリングシステム；CA-112 [東京理化学器械(株)製]。

LC-MS/MS

装置	型式	会社
MS	LCMS-8040	(株)島津製作所
LC	Prominence 高圧グラジエントシステム	(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及びLC-MS/MS

LC 条件	
カラム	L-column2 ODS [内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm：(一財)化学物質評価研究機構製]
移動相流速(mL/min)	0.20
注入量(μL)	5
カラム温度(°C)	40

移動相	条件 1 A 液: 2 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 B 液: アセトニトリル 条件 2 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	条件 1 <table border="1"> <thead> <tr> <th>時間(分)</th> <th>A 液(%)</th> <th>B 液(%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>00.00</td> <td>70</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>22.00</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>25.00</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>25.01</td> <td>70</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>40.00</td> <td>70</td> <td>30</td> </tr> </tbody> </table> 条件 2 <table border="1"> <thead> <tr> <th>時間(分)</th> <th>A 液(%)</th> <th>B 液(%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>00.00</td> <td>70</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>15.00</td> <td>1</td> <td>99</td> </tr> <tr> <td>20.00</td> <td>1</td> <td>99</td> </tr> <tr> <td>20.01</td> <td>70</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>35.00</td> <td>70</td> <td>30</td> </tr> </tbody> </table>	時間(分)	A 液(%)	B 液(%)	00.00	70	30	22.00	10	90	25.00	10	90	25.01	70	30	40.00	70	30	時間(分)	A 液(%)	B 液(%)	00.00	70	30	15.00	1	99	20.00	1	99	20.01	70	30	35.00	70	30
時間(分)	A 液(%)	B 液(%)																																			
00.00	70	30																																			
22.00	10	90																																			
25.00	10	90																																			
25.01	70	30																																			
40.00	70	30																																			
時間(分)	A 液(%)	B 液(%)																																			
00.00	70	30																																			
15.00	1	99																																			
20.00	1	99																																			
20.01	70	30																																			
35.00	70	30																																			
MS 条件																																					
測定モード	MS: SIM(選択イオンモニタリング) 及び MS/MS: SRM(選択反応モニタリング)																																				
イオン化モード	ESI(+) 及び ESI(-)																																				
インターフェイス電圧(V)	チューニングファイルの値																																				
DL 温度	250°C																																				
ネブライザー流量	3.0 L/min																																				
ヒートブロック温度	400°C																																				
ドライイングガス流量	15.0 L/min																																				
コリジョンガス	窒素																																				
定量イオン(m/z)	条件 1 MS: -395.0 MS/MS: -395.0→330.0[15(V)] 条件 2 MS: +397.0 MS/MS: +396.9→350.9[22(V)]																																				
定性イオン(m/z)	条件 1 MS: -397.0 MS/MS: -395.0→262.0[30(V)], -395.0→250.1[25(V)] 条件 2 MS: +399.0 MS/MS: +396.9→255.0[35(V)]																																				
保持時間(分)	条件 1 13 分 試験法(案)は試験法(水産物)に合わせて 14 分と記載 条件 2 14 分																																				

5. 定量

エチプロール標準品 10 mg を精秤し、アセトンに溶解して 1,000 mg/L 溶液を調製した。この溶液をアセトニトリル及び水(1:1)混液で希釈して、0.00025、0.00050、0.00075、0.001、0.00125 及び 0.0015 mg/L の標準溶液を調製した。この溶液 5 µL を LC-MS または LC-MS/MS に注入して、得られたピーク面積を用いて検量線を作成した。試験溶液 5 µL を LC-MS または LC-MS/MS に注入し、検量線から絶対検量線法によりエチプロールの含量を算出した。

6. 添加試料の調製

牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳、鶏卵及びはちみつ(各添加濃度:0.01 mg/kg):試料 10.0 g に添加用標準溶液(0.1 mg/L)を 1 mL 添加しよく混合した後、30 分放置した。

7. 試験溶液の調製

概要

エチプロールを試料からアセトンで抽出し、酢酸エチル及び *n*-ヘキサン(1:1)混液に転溶した。アセトニトリル/*n*-ヘキサン分配により脱脂した後、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムで精製し、LC-MS 及び LC-MS/MS で定量及び確認した。

(1)抽出

①牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳及び鶏卵の場合

各試料 10.0 g をガラス製遠沈管に採った。これにアセトン 100 mL を加え、高速ホモジナイザーを用いてホモジナイズした後、けいそう土を約 1 cm の厚さに敷いたろ紙[直径 60 mm、No.707:日本理化学器械(株)製]を用いて吸引ろ過した。ろ紙上の残留物にアセトン 50 mL を加えてホモジナイズし、上記と同様にろ過した。ろ液を合わせ、アセトンで 200 mL とした。この溶液から 40 mL を分取し、エバポレーターを用いて 40°C 以下で約 2 mL に濃縮した。これに 10 w/v%塩化ナトリウム溶液 100 mL を加え、酢酸エチル及び *n*-ヘキサン(1:1)混液 100 mL を加えて振とうし、酢酸エチル及び *n*-ヘキサン層を分取した。水層に酢酸エチル及び *n*-ヘキサン(1:1)混液 50 mL を加え、同様に操作した。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、ろ液をエバポレーターを用いて 40°C 以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物に *n*-ヘキサン 30 mL を加え、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL で 2 回振とう抽出した。抽出液を合わせ、エバポレーターを用いて 40°C 以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物にアセトニトリルを加え正確に 6 mL とした後、その 3 mL を採り、これに水 7 mL を加え、よく混合した。

②はちみつの場合

はちみつ試料 10.0 g をガラス製遠沈管に採り、水 10 mL を加えよく混合した。これにアセトン 100 mL を加え、高速ホモジナイザーを用いてホモジナイズした後、けいそう土を約 1 cm の厚さに敷いたろ紙[直径 60 mm、No.707:日本理化学器械(株)製]を用いて吸引ろ過した。ろ紙上の残留物にアセトン 50 mL を加えてホモジナイズし、上記と同様にろ過した。ろ液を合わせ、アセトンで 200 mL とした。この溶液から 40 mL を分取し、エバポレーターを用いて 40°C 以下で約 2 mL に濃縮した。これに 10 w/v%塩化ナトリウム溶液 100 mL を加え、酢酸エチル及び *n*-ヘキサン(1:1)混液 100 mL を加えて振とうし、酢酸エチル及び *n*-ヘキサン層を分取した。水層に酢酸エチル及び *n*-ヘキサン(1:1)混液 50 mL を加え、同様に操作した。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、ろ液をエバポレーターを用いて 40°C 以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物にアセトニトリルを加え正確に 6 mL とした後、その 3 mL を採り、これに水 7 mL を加え、よく混合した。

(2)精製

オクタデシルシリル化シリカゲルカラムクロマトグラフィー

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム InertSep Slim-J C18[500 mg:GL サイエンス(株)製]にアセトニトリル 5 mL、次いで水 5 mL を注入し、流出液は捨てた。このカラムに(1)で得られた溶液を注入し、流出液は捨てた。次いでアセトニトリル及び水(1:1)混液 10 mL を注入し、溶出液を採った。溶出液にアセトニトリル及び水(1:1)混液を加えて正確に 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]

牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳及び鶏卵の場合

秤取

↓ 牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳及び鶏卵: 試料 10.0 g

アセトン抽出

- ↓ アセトン 100 mL を加えホモジナイズ
- ↓ 吸引ろ過
- ↓ 残留物はアセトン 50 mL を加えホモジナイズ
- ↓ 吸引ろ過
- ↓ ろ液を合わせ、アセトンで 200 mL に定容
- ↓ 抽出液 40 mL を採る

濃縮

- ↓ 約 2 mL まで濃縮
- ↓ 10 w/v% 塩化ナトリウム溶液 100 mL を加える

転溶

↓ 酢酸エチル及び *n*-ヘキサン(1:1) 混液 100 mL、50 mL で振とう抽出

脱水

- ↓ 無水硫酸ナトリウムを適量加える
- ↓ 無水硫酸ナトリウムをろ別する

濃縮(溶媒除去)

↓ 残留物を *n*-ヘキサン 30 mL に溶かす

分配

↓ *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL で 2 回振とう抽出

濃縮(溶媒除去)

- ↓ 残留物をアセトニトリル 6 mL に溶解し、3 mL を採る
- ↓ 水 7 mL を加え、よく混合(抽出溶液)

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム [GL サイエンス(株) 製 InertSep Slim-J C18(500 mg)]

- ↓ アセトニトリル 5 mL 及び水 5 mL でコンディショニング
- ↓ 抽出溶液を注入(流出液は捨てる)
- ↓ アセトニトリル及び水(1:1) 混液 10 mL で溶出
- ↓ アセトニトリル及び水(1:1) 混液で正確に 10 mL にメスアップ

試験溶液

↓

LC-MS 及び LC-MS/MS

はちみつの場合

秤取

↓ はちみつ: 試料 10.0 g に水 10 mL を加えよく混合

アセトン抽出

- ↓ アセトン 100 mL を加えホモジナイズ
- ↓ 吸引ろ過
- ↓ 残留物はアセトン 50 mL を加えホモジナイズ
- ↓ 吸引ろ過
- ↓ ろ液を合わせ、アセトンで 200 mL に定容

↓ 抽出液 40 mL を採る

濃縮

↓ 約 2 mL まで濃縮

↓ 10 w/v%塩化ナトリウム溶液 100 mL を加える

転溶

↓ 酢酸エチル及び *n*-ヘキサン(1:1)混液 100 mL、50 mL で振とう抽出

脱水

↓ 無水硫酸ナトリウムを適量加える

↓ 無水硫酸ナトリウムをろ別する

濃縮(溶媒除去)

↓ 残留物をアセトニトリル 6 mL に溶解し、3 mL を採る

↓ 水 7 mL を加え、よく混合(抽出溶液)

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム[GLサイエンス(株)製 InertSep Slim-J C18(500 mg)]

↓ アセトニトリル 5 mL 及び水 5 mL でコンディショニング

↓ 抽出溶液を注入(流出液は捨てる)

↓ アセトニトリル及び水(1:1)混液 10 mL で溶出

↓ アセトニトリル及び水(1:1)混液で正確に 10 mL にメスアップ

試験溶液

↓

LC-MS 及び LC-MS/MS

8. マトリックス添加標準溶液の調製

各ブランク試験溶液 200 μ L を採り、窒素気流下溶媒を除去した後、各検討対象食品の添加回収試験における回収率 100%相当濃度(0.001 mg/L)の検量線用標準溶液 200 μ L を加えて溶解したものを、「試料マトリックスの測定への影響」評価用マトリックス添加標準溶液とした。

[結果及び考察]

(1)MS 条件の検討

通知エチプロール試験法(水産物)に示されている測定イオンは、定量イオン: m/z -395、定性イオン: m/z +397 であり、その他の確認イオンとして m/z -397、 m/z +399、 m/z -395 \rightarrow 330 及び m/z -395 \rightarrow 262 が記載されている。そこで、ESI negative 及び positive 両モードでエチプロール標準品をスキャン測定し、これらイオンが検出されることを確認した。ESI negative モード測定時のマススペクトルを図 1 に、ESI positive モード測定時のマススペクトルを図 2 に示した。ESI negative モード測定ではエチプロールの脱プロトン化分子(m/z -395.0[M-H]⁻)が、ESI positive モード測定ではエチプロールプロトン付加分子(m/z +397.0[M+H]⁺)の信号が最も大きく観察され、その同位体イオンである m/z -397.0 及び m/z +399.0 が 2 番目の強度で観察されたことから、これらのイオンを SIM モードの測定イオンとした。

次に MS/MS の測定イオンについて ESI negative 及び ESI positive 両モードでの検討を行った。各モードのスキャン測定において信号が最も大きく観察された m/z -395.0 または m/z +397.0 をプリカーサーイオンとして設定し、フローインジェクション分析により MS パラメータを最適化した。その結果、ESI negative モードではプリカーサーイオンとして m/z -395.0 が選択され、その後のプロダクトイオンスキャンでは、 m/z -395.0 \rightarrow 330.0 の信号の強度が最も高く、次に m/z -395.0 \rightarrow 250.1 の信号、3 番目に m/z -395.0 \rightarrow 262.0 の信号の強度が高かった。通知エチプロール試験法(水産物)において LC-MS/MS 測定で選択されているイオンは、 m/z -395.0 \rightarrow 330.0 及び m/z -395.0 \rightarrow 262.0 であったが、今回は両イオンに加えに加え、 m/z -395.0 \rightarrow 250.1 も測定イオンに選択した。また、ESI positive モードでは、プリカーサーイオンとして m/z +396.9 が選択され、その後のプロダクトイオンスキャンでは、 m/z +396.9 \rightarrow 350.9 の信号の強度が最も高く、次いで m/z +396.9 \rightarrow 255.0 の信号の強度が高かったため、これらイオンを測定イオンに選択した。 m/z -395.0 及び m/z +396.9 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各々図 3 及び図 4 に示した。

マススペクトル(スキャン)

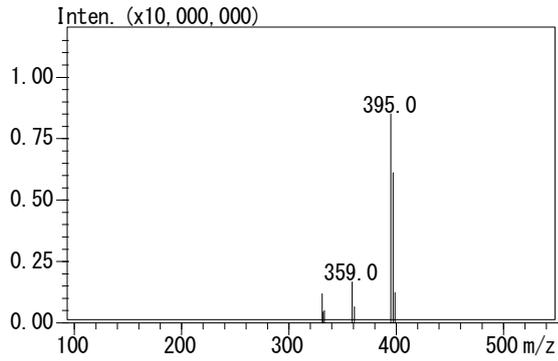


図 1 エチプロールのマススペクトル
スキャン範囲: 100~550 amu
測定条件: ESI(-)
インターフェイス電圧: チューニングの値
エチプロール標準溶液濃度: 1 mg/L

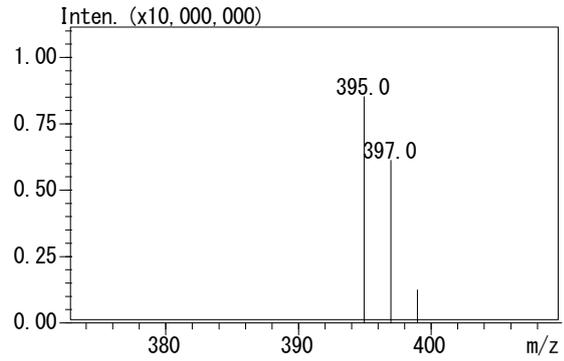


図 1_2 エチプロールのマススペクトル
(図 1 の拡大図)

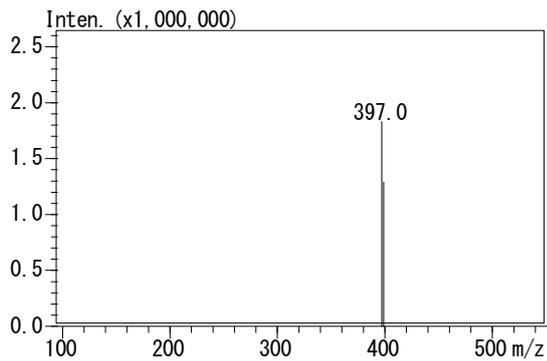


図 2 エチプロールのマススペクトル
スキャン範囲: 100~550 amu
測定条件: ESI(+)
インターフェイス電圧: チューニングの値
エチプロール標準溶液濃度: 1 mg/L

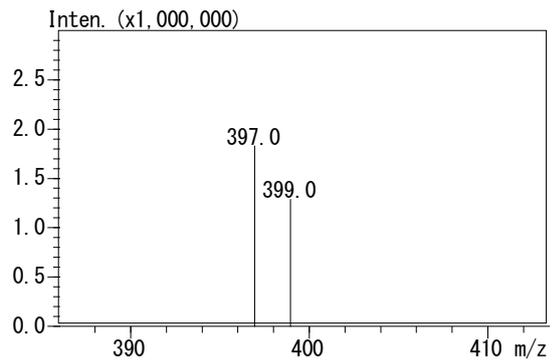


図 2_2 エチプロールのマススペクトル
(図 2 の拡大図)

プロダクトイオンスペクトル(プロダクトイオンキャン)

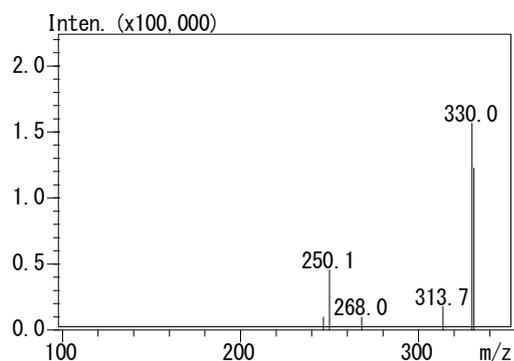


図 3_1 エチプロールのプロダクトイオンスペクトル
 プリカーサーイオン: m/z -395.0
 測定条件: ESI(-)
 インターフェイス電圧: チューニングファイルの値
 CE=15 V (collision energy)
 エチプロール: 1 mg/L

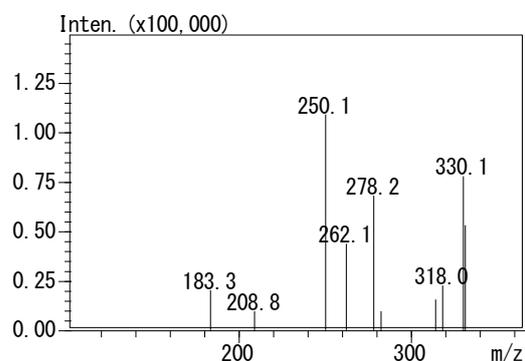


図 3_2 エチプロールのプロダクトイオンスペクトル
 プリカーサーイオン: m/z -395.0
 測定条件: ESI(-)
 インターフェイス電圧: チューニングファイルの値
 CE=25 V (collision energy)
 エチプロール: 1 mg/L

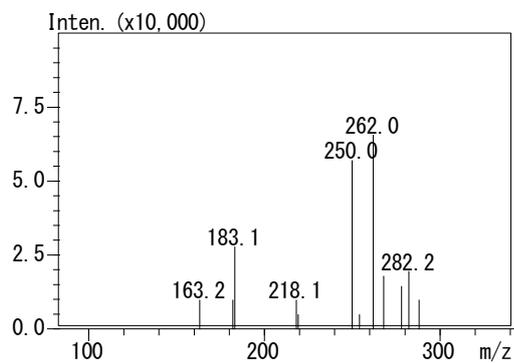


図 3_3 エチプロールのプロダクトイオンスペクトル
 プリカーサーイオン: m/z -395.0
 測定条件: ESI(-)
 インターフェイス電圧: チューニングファイルの値
 CE=30 V (collision energy)
 エチプロール: 1 mg/L

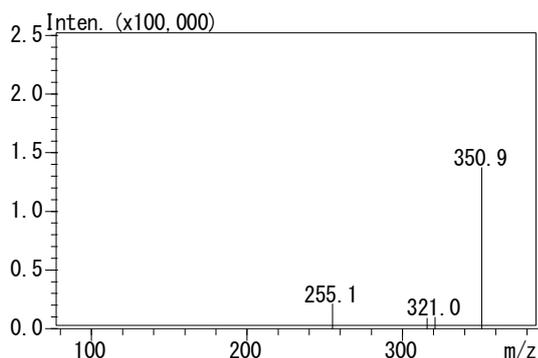


図 4_1 エチプロールのプロダクトイオンスペクトル
 プリカーサーイオン: m/z +396.9
 測定条件: ESI(+)
 インターフェイス電圧: チューニングファイルの値
 CE=22 V (collision energy)
 エチプロール: 1 mg/L

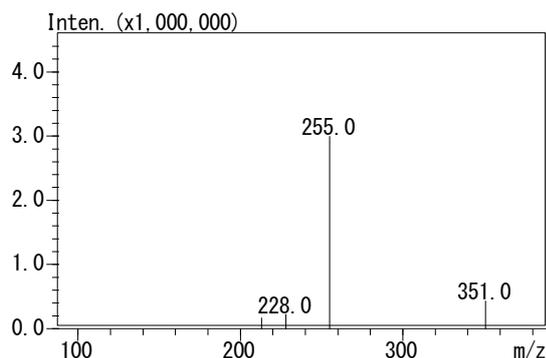


図 4_2 エチプロールのプロダクトイオンスペクトル
 プリカーサーイオン: m/z +396.9
 測定条件: ESI(+)
 インターフェイス電圧: チューニングファイルの値
 CE=35 V (collision energy)
 エチプロール: 1 mg/L

(2) LC 条件及び測定イオンの検討

分析カラムは、通知エチプロール試験法(水産物)で使用されている C18 カラム[内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm (通知試験法は 5 μm)]を用いた。

LC の検討条件等については表 1 に示した。

まず、通知エチプロール試験法(水産物)に記載されている溶媒 (A 液: 2 mmol/L 酢酸アンモニウム、B 液: アセトニトリル) 及びグラジエント条件(表 1 条件 1)を用いて検討を行った。測定イオンは、通知エチプロール試験法に示されている m/z -395.0、 m/z -397.0、 m/z +397.0 及び m/z +399.0 を用いた。定量限界相当濃度 0.001 mg/L のエチプロール標準溶液を測定したところ、 m/z -395.0 のピークは S/N=15、 m/z -397.0 のピークは S/N=10 の感度で確認できたが、 m/z +397.0 及び m/z +399.0 のピークは、インターフェイス電圧を種々変化させ条件を検討したが、感度不足により観察されなかった。そこで上記移動相条件における LC-MS 測定では、 m/z -395.0 を定量イオン及び m/z -397.0 を定性イオンに設定し、各種検討を行った。LC-MS/MS 測定においても、ESI negative モードでは感度良く測定可能であったが、ESI positive モードではピークが確認できなかった。そこで移動相条件 1 における LC-MS/MS 測定では、通知エチプロール試験法で確認イオンとして記載されている m/z -395.0 \rightarrow 330.0 及び m/z -395.0 \rightarrow 262.0 を各々定量イオン及び定性イオンに設定し、各種検討を行った。

ESI positive モードでの検出感度が低かったため、移動相条件を検討した。水及びメタノール(1:1)混液に添加剤としてギ酸(0.05~0.2 vol%)、酢酸(0.05~0.2 vol%)、ギ酸アンモニウム(1~10 mmol/L)及び酢酸アンモニウム(1~10 mmol/L)を添加し、エチプロールピーク(m/z +396.9 \rightarrow 350.9)の検出感度を確認したところ、5 mmol/L 酢酸アンモニウムを添加したときが最も高感度であった。そこで、移動相を条件 2 の 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・メタノール溶液とし、エチプロールの検出について検討した。条件 1 と同様に測定イオンは、通知エチプロール試験法に示されている m/z -395.0、 m/z -397.0、 m/z +397.0 及び m/z +399.0 を用いた。定量限界相当濃度 0.001 mg/L のエチプロール標準溶液を測定したところ、ESI negative モードで強度の高かった m/z -395.0 のピークは S/N=20、ESI positive モードで強度の高かった m/z +397.0 のピークは S/N=80 で観察され(図 5)、ESI positive モード測定の方が約 4 倍高感度であった。次に、LC-MS/MS 測定について m/z -395.0 \rightarrow 330.0、 m/z -395.0 \rightarrow 262.0、 m/z -395.0 \rightarrow 250.1、 m/z +396.9 \rightarrow 350.9 及び m/z +396.9 \rightarrow 255.0 のイオンを用いて検討した。その結果、各モードで

より強度の高かった m/z $-395.0 \rightarrow 330.0$ 及び m/z $+396.9 \rightarrow 350.9$ のピークは、各々 $S/N=131$ 及び $S/N=327$ で観察され(図 6)、ESI positive モードの方が約 2.5 倍高感度であった。以上の検討結果より、移動相条件 2 において、LC-MS 測定では m/z $+397.0$ を定量イオン、 m/z $+399.0$ を定性イオン、LC-MS/MS 測定では m/z $+396.9 \rightarrow 350.9$ を定量イオン、 m/z $+396.9 \rightarrow 255.0$ を定性イオンに設定し、各種検討を行った。条件 1 及び条件 2 ともにピーク形状は良好であり、マトリックスの妨害ピークもなかった。

表 1

	移動相	グラジエント	機器	測定イオン (m/z)																		
条件 1 (通知エチプロール試験法に記載された移動相及びグラジエント条件)	A 液: 2 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 B 液: アセトニトリル	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間 (分)</th> <th>A 液 (%)</th> <th>B 液 (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>00.00</td> <td>70</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>22.00</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>25.00</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>25.01</td> <td>70</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>40.00</td> <td>70</td> <td>30</td> </tr> </tbody> </table>	時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)	00.00	70	30	22.00	10	90	25.00	10	90	25.01	70	30	40.00	70	30	LC-MS	定量 -395.0 定性 -397.0 [ESI(+)]ではピークが確認できない]
			時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)																	
			00.00	70	30																	
			22.00	10	90																	
			25.00	10	90																	
			25.01	70	30																	
40.00	70	30																				
LC-MS/MS	定量 $-395.0 \rightarrow 330.0$ 定性 $-395.0 \rightarrow 262.0$ $-395.0 \rightarrow 250.1$ [ESI(+)]ではピークが確認できない]																					
条件 2	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	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間 (分)</th> <th>A 液 (%)</th> <th>B 液 (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>00.00</td> <td>70</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>15.00</td> <td>1</td> <td>99</td> </tr> <tr> <td>20.00</td> <td>1</td> <td>99</td> </tr> <tr> <td>20.01</td> <td>70</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>35.00</td> <td>70</td> <td>30</td> </tr> </tbody> </table>	時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)	00.00	70	30	15.00	1	99	20.00	1	99	20.01	70	30	35.00	70	30	LC-MS	定量 $+397.0$ 定性 $+399.0$ [ESI(+)]は ESI(-)より約 4 倍高感度]
			時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)																	
			00.00	70	30																	
			15.00	1	99																	
			20.00	1	99																	
20.01	70	30																				
35.00	70	30																				
LC-MS/MS	定量 $+396.9 \rightarrow 350.9$ 定性 $+396.9 \rightarrow 255.0$ [ESI(+)]は ESI(-)より約 2.5 倍高感度]																					

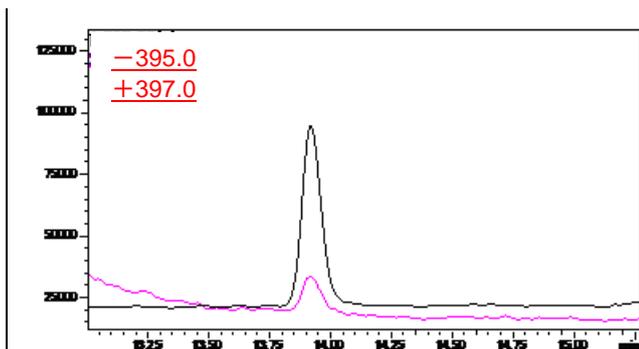


図 5 エチプロールのマスクロマトグラム
(0.001 mg/L)
LC 条件:2
機器:LC-MS
測定イオン: m/z -395.0、 m/z +397.0
(ESI negative 及び positive 同時測定)

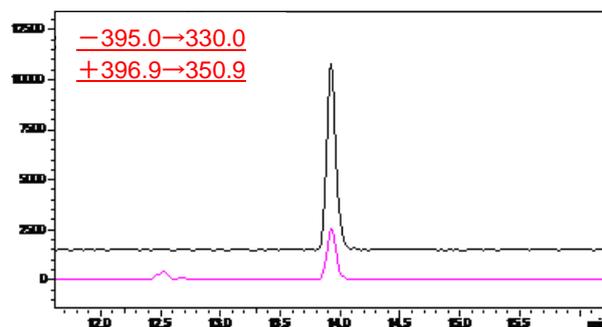


図 6 エチプロールのマスクロマトグラム
(0.001 mg/L)
LC 条件:2
機器:LC-MS/MS
測定イオン: m/z -395.0→330.0、
 m/z +396.9→350.9
(ESI negative 及び positive 同時測定)

(3) 検量線

表 1 条件 1 を用いて LC-MS 及び LC-MS/MS で測定したエチプロール検量線の例を図 7_1 及び図 7_2 に、条件 2 を用いて LC-MS 及び LC-MS/MS で測定したエチプロール検量線の例を図 8_1 及び図 8_2 に示した。0.001~0.1 mg/L の濃度範囲で作成した検量線は、いずれも $r^2 \geq 0.998$ であり、良好な直線性を示した。

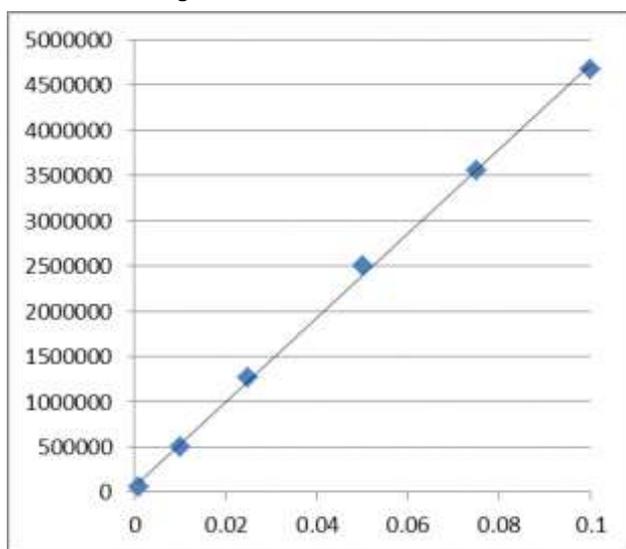


図 7_1 エチプロール検量線
(LC-MS: ESI negative)
測定イオン: m/z -395.0
 $y=46583035x+62434$
 $r^2=0.999$

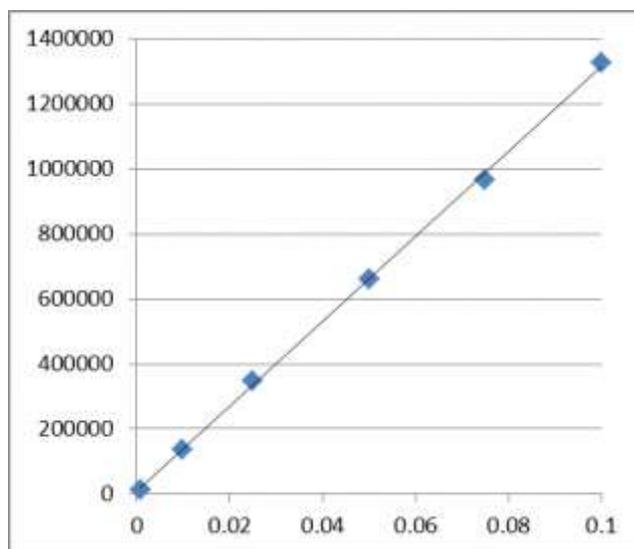


図 7_2 エチプロール検量線
(LC-MS/MS: ESI negative)
測定イオン: m/z -395.0→330.0
 $y=13087626x+5488$
 $r^2=0.999$

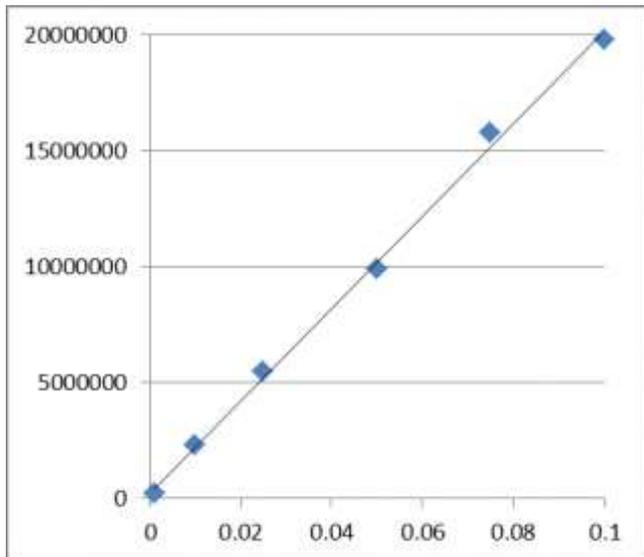


図 8_1 エチプロール検量線
(LC-MS: ESI positive)
測定イオン: m/z +397.0
 $y=198852413x+259618$
 $r^2=0.998$

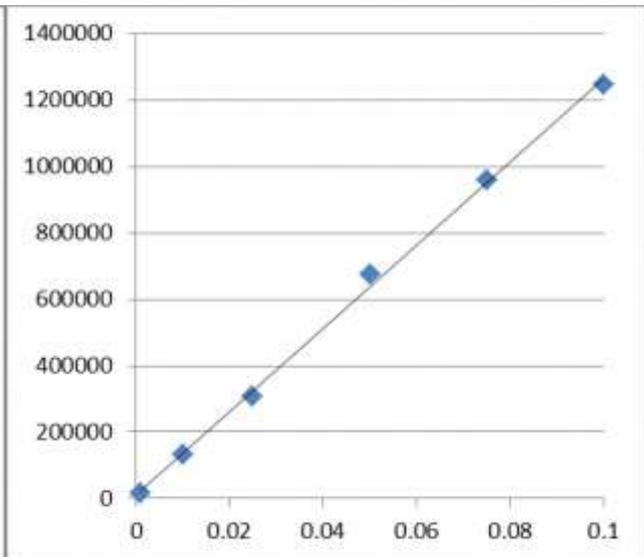


図 8_2 エチプロール検量線
(LC-MS/MS: ESI positive)
測定イオン: m/z +396.9→350.9
 $y=12557165x+9457$
 $r^2=0.998$

(4) 定量限界の算出

定量限界の算出結果を以下に示した。

0.01 mg/kg 【[試験溶液量 10 mL / 試験溶液中の試料量 1 g]

× [エチプロールの定量限界相当量 0.005 ng] / [注入量 5 μ L】

2. 試験溶液調製法の検討

(1) 抽出方法の検討

通知エチプロール試験法(水産物)に従い、抽出溶媒はアセトンで検討した。牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳、鶏卵及びはちみつの全ての試料について、回収率は良好であり、また、抽出操作についても問題となる点は認められなかったことから、アセトン抽出溶媒とした。

(2) 転溶溶媒の検討

通知試験法(水産物)の方法に従い、エチプロール 1 µg を 10 w/v%塩化ナトリウム溶液 100 mL に添加し、酢酸エチル及び *n*-ヘキサン(1:1)混液 100 mL 及び 50 mL で 2 回振とう抽出を行った。その結果を表 2 に示した。1 回目の転溶でほぼ全量回収されたことから、転溶操作は、酢酸エチル及び *n*-ヘキサン(1:1)混液 100 mL 及び 50 mL の 2 回振とう抽出で行うこととした。

表 2 酢酸エチル及び *n*-ヘキサン(1:1)混液への転溶の検討($n=3$ の平均値)

溶媒: 酢酸エチル- <i>n</i> -ヘキサン(1:1)	100 mL (1 回目)	50 mL (2 回目)	合計
回収率(%)	98.4%	0.1%	98.5%

(3) 脱脂方法の検討

通知試験法(水産物)に従い、*n*-ヘキサン及び *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル分配による脱脂を検討した。エチプロール 0.1 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 2 回抽出を行ったときの結果を表 3 に示した。エチプロールは 1 回目の抽出でほぼ全量回収できたことから、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL で 2 回抽出することとした。なお、はちみつ試料は脂質をほとんど含有しないことから、アセトニトリル/*n*-ヘキサン分配による脱脂操作を省略した。

表 3 アセトニトリル/*n*-ヘキサン分配の検討($n=3$ の平均)

	<i>n</i> -ヘキサン飽和アセトニトリル		合計
	30 mL (1 回目)	30 mL (2 回目)	
回収率(%)	96.3%	0.6%	96.9%

(4) カラム精製の検討

① 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

通知試験法(水産物)に従い、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。通知試験法(水産物)では、ミニカラムにアセトニトリル及び水(3:7)混液 10 mL で負荷し、アセトニトリル及び水(1:1)混液 10 mL で溶出することとなっている。

カラムをアセトニトリル 5 mL、次いで水 5 mL で予備洗浄した後、水 0.1 mL に溶解したエチプロール 0.1 µg を負荷し、アセトニトリル及び水(1:9)、(2:8)、(3:7)、(4:6)及び(5:5)混液各 10 mL で順次溶出したときの溶出状況を表 4 に示した。エチプロールは、アセトニトリル及び水(1:9)~(3:7)混液各 10 mL では溶出されず、アセトニトリル及び水(4:6)混液 10 mL で 93.5%、アセトニトリル及び水(5:5)混液 10 mL で 8.1%、アセトニトリル及び水(6:4)混液 10 mL で 1.9%溶出した。

表 4 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 0.1 mL (負荷)	アセトニトリル及び水混液						合計
		1:9	2:8	3:7	4:6	5:5	6:4	
		10 mL	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL	
回収率(%)	0.0	0.0	0.0	0.0	93.5	8.1	1.9	103.5

負荷量: 0.1 µg(水 0.1 mL に溶解)

次にアセトニトリル及び水(1:1)混液の溶出状況を確認した。カラムをアセトニトリル及び水(3:7)混液 10 mL で予備洗浄した後、アセトニトリル及び水(3:7)混液 10 mL に溶解したエチプロール 0.03 µg を負荷し、アセトニトリル及び水(1:1)混液で溶出したときの溶出状況を表5に示した。エチプロールはアセトニトリル及び水(1:1)混液 0~3 mL で 87.7%、3~6 mL で 14.2%、6~9 mL で 1.8%溶出した。

表5 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

	アセトニトリル及び水 (3:7)混液	アセトニトリル及び水(1:1)混液				合計
		0~3 mL	3~6 mL	6~9 mL	9~12 mL	
回収率(%)	0.0	87.7	14.2	1.8	0.0	103.7

負荷量:0.03 µg[アセトニトリル及び水(3:7)混液 10 mL に溶解]

以上の検討結果より、通知試験法(水産物)に記載されたとおりアセトニトリル及び水(3:7)混液 10 mL で負荷し、アセトニトリル及び水(1:1)混液 10 mL で溶出することとした。

3. 添加回収試験

牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳、鶏卵及びはちみつの6食品を試料に用いて、実験方法の7. 試験溶液の調製に従って添加回収試験を実施した。

表1の条件1及び条件2を用いて測定した添加回収試験における回収率100%相当の溶媒標準溶液、各食品のブランク試料及び添加試料の標準的なクロマトグラムを各々図9~14及び図15~20に示した。また、表1の条件1及び条件2を用いて各食品のブランク試料をスキャン測定したトータルイオンクロマトグラムを各々図21~26及び図27~32に示した。

(1) 選択性

選択性の検討結果を表6に示した。表1の条件1を用いたLC-MS及びLC-MS/MS測定(ESI negativeモード測定)、及び表1の条件2を用いたLC-MS及びLC-MS/MS測定(ESI positiveモード測定)において、検討した全ての試料でエチプロールの定量を妨害するピークは認められず良好な選択性を示した。

表6 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 ¹ (ppm)	添加濃度 ² (ppm)	妨害ピークの許容範囲			ピーク面積(高さ) ³				選択性の評価 ⁵	備考
						評価対象濃度 (ppm)	判定基準	面積又は高さの別	ブランク試料 (a)	標準溶液 ⁴ (b)	面積(高さ)比 (a)/(b)	#DVI/OI		
					0.	基準値	0.	< 0.100					○	
	エチプロール	牛の筋肉	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	56689	0.000	○	LC-MS
		牛の脂肪	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	57747	0.000	○	測定モード: SIM(nega)
		牛の肝臓	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	54347	0.000	○	移動相
		牛乳	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	57881	0.000	○	A: 2 mmol/L 酢酸アンモニウム
		卵	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	55868	0.000	○	B: アセトニトリル
		はちみつ	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	57013	0.000	○	定量イオン: m/z -395.0
	エチプロール	牛の筋肉	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	12996	0.000	○	LC-MS/MS
		牛の脂肪	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	12661	0.000	○	測定モード: MRM(nega)
		牛の肝臓	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	12318	0.000	○	移動相
		牛乳	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	11508	0.000	○	A: 2 mmol/L 酢酸アンモニウム
		卵	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	11980	0.000	○	B: アセトニトリル
		はちみつ	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	12897	0.000	○	定量イオン: m/z -395.0~330.0
	エチプロール	牛の筋肉	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	366469	0.000	○	LC-MS
		牛の脂肪	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	272436	0.000	○	測定モード: SIM(posi)
		牛の肝臓	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	224187	0.000	○	移動相
		牛乳	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	364007	0.000	○	A: 5 mmol/L 酢酸アンモニウム
		卵	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	364918	0.000	○	B: 5 mmol/L 酢酸アンモニウムメタノール溶液
		はちみつ	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	215334	0.000	○	定量イオン: m/z +397.0
	エチプロール	牛の筋肉	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	44710	0.000	○	LC-MS/MS
		牛の脂肪	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	35662	0.000	○	測定モード: MRM(posi)
		牛の肝臓	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	27334	0.000	○	移動相
		牛乳	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	47644	0.000	○	A: 5 mmol/L 酢酸アンモニウム
		卵	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	47908	0.000	○	B: 5 mmol/L 酢酸アンモニウムメタノール溶液
		はちみつ	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	26376	0.000	○	定量イオン: m/z +396.9~350.9

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

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

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

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

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

(2) 真度、精度及び定量限界

真度及び併行精度の検討結果を表7に示した。表1条件1のLC-MS(ESI negativeモード)測定では、真度は88.6~96.9%、併行精度は4.0~6.5%、LC-MS/MS(ESI negativeモード)測定では、真度は80.0~104.4%、併行精度は3.2~8.2%であった。また、条件2のLC-MS(ESI positiveモード)測定では、真度は87.9~94.3%、併行精度は1.3~6.5%、LC-MS/MS(ESI positiveモード)測定では、真度は89.6~95.5%、併行精度は1.8~7.6%とすべての検討において良好な結果が得られた。また、すべての試料で定量限界と添加濃度が同じであったため、添加回収試験におけるエチプロールのピークのS/N比を求めたところ、その平均値は、条件1のLC-MS(ESI negativeモード)測定では12.7~24.5、LC-MS/MS(ESI negativeモード)測定では67.3~129.4、条件2のLC-MS(ESI positiveモード)測定では27.1~106.0、LC-MS/MS(ESI positiveモード)測定では202.9~392.3であり、すべての検討において定量に十分な検出感度を得られていた。

表7 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 ¹⁾ (ppm)	添加濃度 (ppm)	定量限界の評価 ²⁾	検量線		回収率 (%)					真度 (%)	併行精度 (RSD%)	S/N比 ³⁾			備考
							傾き	切片	r ² 値	n=1	n=2	n=3	n=4			n=5	Max.	Mn.	
エチプロール	牛の筋肉	0.01	0.01	0.01	550	5362	0.9963	96.5	93.0	91.7	86.0	89.4	91.3	4.3	18.6	18.5	18.6	LC-MS	
		0.01	0.01	0.01	619	-2698	0.9988	92.7	99.0	94.6	102.5	95.6	96.9	4.0	13.7	11.6	12.7	測定モード: SIM(nega)	
		0.01	0.01	0.01	536	2326	0.9968	101.9	90.5	96.1	89.3	86.8	92.9	6.5	15.3	18.6	17.0	移動相	
		0.01	0.01	0.01	653	133	0.9967	90.6	84.0	94.2	88.6	85.3	88.6	4.6	18.7	13.1	15.9	A: 2 mmol/L 酢酸アンモニウム	
		0.01	0.01	0.01	562	1352	0.9970	97.4	92.7	93.7	87.4	96.9	93.6	4.3	18.0	15.8	16.9	B: アセトニトリル	
		0.01	0.01	0.01	666	-5640	0.9988	86.3	94.5	97.6	96.6	94.7	93.9	4.8	26.4	22.5	24.5	定量イオン: m/z -395.0	
エチプロール	牛の脂肪	0.01	0.01	0.01	118	1515	0.9970	88.5	92.0	81.6	84.3	90.8	87.4	5.0	68.2	66.4	67.3	LC-MS/MS	
		0.01	0.01	0.01	134	-97	0.9974	92.1	96.4	90.2	90.7	99.4	93.8	4.2	114.2	93.7	104.0	測定モード: MRM(nega)	
		0.01	0.01	0.01	121	798	0.9963	106.0	101.6	109.4	109.8	95.2	104.4	5.9	75.4	179.8	127.6	移動相	
		0.01	0.01	0.01	157	202	0.9961	82.9	82.1	76.1	77.7	81.2	80.0	3.7	120.5	87.0	103.8	A: 2 mmol/L 酢酸アンモニウム	
		0.01	0.01	0.01	114	386	0.9954	97.6	94.9	106.1	85.0	91.3	95.0	8.2	89.2	75.5	82.4	B: アセトニトリル	
		0.01	0.01	0.01	131	197	0.9971	95.9	96.2	102.8	102.0	99.7	99.3	3.2	117.7	141.1	129.4	定量イオン: m/z -395.0-339.0	
エチプロール	牛の肝臓	0.01	0.01	0.01	3585	21506	0.9988	86.1	89.3	89.3	90.3	90.3	89.1	2.0	26.2	27.9	27.1	LC-MS	
		0.01	0.01	0.01	3072	-4857	0.9996	91.9	94.0	97.8	94.4	93.2	94.3	2.4	51.6	50.3	51.0	測定モード: SIM(posi)	
		0.01	0.01	0.01	2389	-6036	0.9999	87.4	90.0	87.3	88.4	87.6	88.2	1.3	57.4	40.4	48.9	移動相	
		0.01	0.01	0.01	3624	2463	0.9998	89.8	90.3	92.2	89.5	89.4	90.2	1.3	118.0	94.0	106.0	A: 5 mmol/L 酢酸アンモニウム	
		0.01	0.01	0.01	4116	-26151	0.9992	80.3	88.1	88.5	92.3	90.4	87.9	5.2	71.6	37.8	54.7	B: 5 mmol/L 酢酸アンモニウム/メタノール/水	
		0.01	0.01	0.01	2555	-7772	0.9987	80.2	86.9	91.2	92.4	94.9	89.1	6.5	35.9	29.6	32.8	定量イオン: m/z +397.0	
エチプロール	牛の肝臓	0.01	0.01	0.01	473	-70	0.9972	93.0	90.7	90.4	92.4	88.9	91.1	1.8	382.2	402.3	392.3	LC-MS/MS	
		0.01	0.01	0.01	410	-1867	0.9986	86.7	101.8	99.3	94.6	95.1	95.5	6.1	375.5	309.5	342.5	測定モード: MRM(posi)	
		0.01	0.01	0.01	293	-148	0.9977	91.5	96.5	90.1	88.5	95.0	92.3	3.6	235.4	236.7	236.1	移動相	
		0.01	0.01	0.01	427	1427	0.9964	95.3	87.3	89.4	88.9	89.2	90.0	3.4	409.0	214.3	311.7	A: 5 mmol/L 酢酸アンモニウム	
		0.01	0.01	0.01	533	-872	0.9990	88.8	91.8	91.4	87.3	88.9	89.6	2.1	216.4	239.5	228.0	B: 5 mmol/L 酢酸アンモニウム/メタノール/水	
		0.01	0.01	0.01	327	-1435	0.9959	82.6	90.9	92.6	95.7	101.9	92.7	7.6	196.6	209.1	202.9	定量イオン: m/z +395.0-339.0	

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

2 添加濃度が定量限界濃度と異なる場合には、『』が表示される。その場合には、S/N比の算出は不要であるが、別途、定量限界の推定を行う。

*3 得られた回収率の中で最大値を与えるピーク(Max.)及び最小値を与えるピーク(Mn.)のそれぞれのS/N比を求める。

(3) 試料マトリックスの測定への影響

試料マトリックスの測定への影響について検討した結果を表8に示した。添加回収試験における回収率100%相当濃度になるように調製したマトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積比を求めた。面積比は、表1条件1のLC-MS(ESI negativeモード)測定では0.99~1.04、LC-MS/MS(ESI negativeモード)測定では0.95~0.99、条件2のLC-MS(ESI positiveモード)測定では0.92~1.07、LC-MS/MS(ESI positiveモード)測定では0.96~1.08であり、試料マトリックスの測定への影響は少なかった。

添加回収試験における真度を表8で求めたピーク面積比で除して補正真度を求め、表9に示した。補正真度は表1条件1のLC-MS(ESI negativeモード)測定では87.7~96.2%、LC-MS/MS(ESI negativeモード)測定では81.9~105.9%、条件2のLC-MS(ESI positiveモード)測定では84.6~96.4%、LC-MS/MS(ESI positiveモード)測定では83.7~98.7%であり、補正真度も良好であった。

表 8 試料マトリックスの測定への影響

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (mg/kg)	基準値 ^{*1} (ppm)	添加濃度 (ppm)	標準溶液濃度 ^{*2} (mg/L)	ピーク面積(高さ) ^{*3}									備考
							面積又は高さの別	ブランク ^{*4}	マトリックス添加標準溶液 ^{*5}			溶媒標準溶液			ピーク面積(高さ)比 ^{*6}	
									n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均		
エチプロール	牛の筋肉	0.01	0.01	0.01	0.001	面積	0	56689	58379	57534.0	56083	55498	55790.5	1.03	LC-MS	
		牛の脂肪	0.01	0.01	0.01	0.001	面積	0	57747	57574	57660.5	57992	56451	57221.5	1.01	測定モード:SIM(nega)
		牛の肝臓	0.01	0.01	0.01	0.001	面積	0	54347	57717	56032.0	53452	54238	53845.0	1.04	移動相
		牛乳	0.01	0.01	0.01	0.001	面積	0	57881	57759	57820.0	58380	56169	57274.5	1.01	A:2 mmol/L酢酸アンモニウム
		卵	0.01	0.01	0.01	0.001	面積	0	55868	56622	56245.0	56102	57397	56749.5	0.99	B:アセトニトリル
		はちみつ	0.01	0.01	0.01	0.001	面積	0	57013	58950	57981.5	55509	57364	56436.5	1.03	定量イオン:m/z -395.0
エチプロール	牛の筋肉	0.01	0.01	0.01	0.001	面積	0	12996	11138	12067.0	13310	11930	12620.0	0.96	LC-MS/MS	
		牛の脂肪	0.01	0.01	0.01	0.001	面積	0	12661	12475	12568.0	13173	12887	13030.0	0.96	測定モード:MRM(nega)
		牛の肝臓	0.01	0.01	0.01	0.001	面積	0	12318	12762	12540.0	12051	13394	12722.5	0.99	移動相
		牛乳	0.01	0.01	0.01	0.001	面積	0	11508	11090	11299.0	11734	11403	11568.5	0.98	A:2 mmol/L酢酸アンモニウム
		卵	0.01	0.01	0.01	0.001	面積	0	11980	12616	12298.0	12611	12230	12420.5	0.99	B:アセトニトリル
		はちみつ	0.01	0.01	0.01	0.001	面積	0	12897	12705	12801.0	13669	13387	13528.0	0.95	定量イオン:m/z -395.0-330.0
エチプロール	牛の筋肉	0.01	0.01	0.01	0.001	面積	0	366469	382203	374336.0	374366	377815	376090.5	1.00	LC-MS	
		牛の脂肪	0.01	0.01	0.01	0.001	面積	0	272436	270990	271713.0	278846	277021	277933.5	0.98	測定モード:SIM(posi)
		牛の肝臓	0.01	0.01	0.01	0.001	面積	0	224187	222711	223449.0	216772	223148	219960.0	1.02	移動相
		牛乳	0.01	0.01	0.01	0.001	面積	0	364007	373237	368622.0	342900	348304	345602.0	1.07	A:5 mmol/L酢酸アンモニウム
		卵	0.01	0.01	0.01	0.001	面積	0	364918	366547	365732.5	400510	393589	397049.5	0.92	B:5 mmol/L酢酸アンモニウム・メタノール溶液
		はちみつ	0.01	0.01	0.01	0.001	面積	0	215334	215939	215636.5	224508	220717	222612.5	0.97	定量イオン:m/z +397.0
エチプロール	牛の筋肉	0.01	0.01	0.01	0.001	面積	0	44710	44148	44429.0	44844	47577	46210.5	0.96	LC-MS/MS	
		牛の脂肪	0.01	0.01	0.01	0.001	面積	0	35662	36683	36172.5	38007	36782	37394.5	0.97	測定モード:MRM(posi)
		牛の肝臓	0.01	0.01	0.01	0.001	面積	0	27334	26384	26859.0	27329	27666	27497.5	0.98	移動相
		牛乳	0.01	0.01	0.01	0.001	面積	0	47644	47757	47700.5	44573	44142	44357.5	1.08	A:5 mmol/L酢酸アンモニウム
		卵	0.01	0.01	0.01	0.001	面積	0	47908	48515	48211.5	49877	49795	49836.0	0.97	B:5 mmol/L酢酸アンモニウム・メタノール溶液
		はちみつ	0.01	0.01	0.01	0.001	面積	0	26376	26674	26525.0	27353	27623	27488.0	0.96	定量イオン:m/z +396.9-350.9

*1 基準値は、基準値未設定の場合には一律基準(0.01 ppm)を用いる。
 *2 添加回収試験における回収率100%相当濃度になるように、ブランク試料の試験溶液で調製した標準溶液(マトリックス添加標準溶液)及び溶媒で調製した標準溶液(溶媒標準溶液)を作成する。
 *3 マトリックス添加標準溶液及び溶媒標準溶液の順に交互に2回以上測定した結果から評価する。(必要に応じて起爆注入を行う。)
 *4 ブランクにピークが認められた場合には、マトリックス添加標準溶液の値はブランク値を差し引いた値を用いる。
 *5 マトリックス添加標準溶液は試験当日のブランク試料の試験溶液を用いて調製する。
 *6 マトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積(又は高さ)の比を求める。

表 9 補正真度

食品名	真度 (%)	ピーク面積比	補正真度 (%)	測定条件
牛の筋肉	91.3	1.03	88.5	LC-MS 測定モード:SIM(nega) 移動相 A:2 mmol/L酢酸アンモニウム溶液 B:アセトニトリル 測定イオン:m/z -395.0
牛の脂肪	96.9	1.01	96.2	
牛の肝臓	92.9	1.04	89.3	
牛乳	88.6	1.01	87.7	
卵	93.6	0.99	94.4	
はちみつ	93.9	1.03	91.4	
牛の筋肉	87.4	0.96	91.4	LC-MS/MS 測定モード:MRM(nega) 移動相 A:2 mmol/L酢酸アンモニウム溶液 B:アセトニトリル 測定イオン:m/z -395.0-330.0
牛の脂肪	93.8	0.96	97.2	
牛の肝臓	104.4	0.99	105.9	
牛乳	80.0	0.98	81.9	
卵	95.0	0.99	95.9	
はちみつ	99.3	0.95	105.0	
牛の筋肉	89.1	1.00	89.5	LC-MS 測定モード:SIM(posi) 移動相 A:5 mmol/L酢酸アンモニウム溶液 B:5 mmol/L酢酸アンモニウム・メタノール溶液 測定イオン:m/z +397.0
牛の脂肪	94.3	0.98	96.4	
牛の肝臓	88.2	1.02	86.8	
牛乳	90.2	1.07	84.6	
卵	87.9	0.92	95.4	
はちみつ	89.1	0.97	92.0	
牛の筋肉	91.1	0.96	94.7	LC-MS/MS 測定モード:MRM(posi) 移動相 A:5 mmol/L酢酸アンモニウム溶液 B:5 mmol/L酢酸アンモニウム・メタノール溶液 測定イオン:m/z +396.9-350.9
牛の脂肪	95.5	0.97	98.7	
牛の肝臓	92.3	0.98	94.5	
牛乳	90.0	1.08	83.7	
卵	89.6	0.97	92.6	
はちみつ	92.7	0.96	96.1	

4. 考察

通知エチプロール試験法(水産物)において、LC-MS 測定 of 移動相条件は A 液; 2 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液、B 液; アセトニトリル(表 1 条件 1)、測定イオンは m/z -395(定量)及び+397(定性)と記載され、留意事項において、「主なイオンの他に確認できるイオンとして、ESI(-)では m/z 397 が、ESI(+)においては m/z 399 がある。」と記載されている。そこで、まず上記条件で定量限界相当濃度(0.001 mg/L)のエチプロール標準溶液を測定したところ、 m/z -395 のピークは S/N=15 で、 m/z -397 のピークは S/N=10 で観察されたが、 m/z +397 及び m/z +399 のピークは、インターフェイス電圧を種々変化させ条件を検討したが、感度不足によりピークが観察されなかった。

移動相を A 液; 5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液、B 液; 5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液・メタノール溶液(表 1 条件 2)に変更すると、エチプロールは ESI negative 及び positive の両モードで測定可能であったが、LC-MS 及び LC-MS/MS 両測定において、ESI positive モードの方が ESI negative モード測定よりも高感度であった。また、条件 2 で各試料の試験溶液を測定したところ、回収率も良好であり、妨害ピークも認められなかった。以上の結果より、通知エチプロール試験法(水産物) 11. 留意事項 2) 注意点に表 1 条件 2 の移動相条件及び測定イオン等を追記することとした。

11. 留意事項

2) 注意点

③ 使用する機種によって ESI positive モードでの感度が低い場合がある。その場合、以下の条件を用いるとエチプロールを感度良く測定できることがある。

測定条件

移動相: 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・メタノール溶液混液(7:3)から(1:99)までの濃度勾配を 15 分間で行い、(1:99)で 5 分間保持する。

イオン化モード: ESI(+)

主なイオン(m/z)

1) LC-MS の場合: 399、397

2) LC-MS/MS の場合: プリカーサーイオン 397、プロダクトイオン 351、255

注入量: 5 μ L

保持時間の目安: 14 分

また、はちみつ試料は脂質をほとんど含有しないことから、アセトニトリル/ヘキサン分配による脱脂操作を省略した。この操作を省略しても、選択性、回収率等に問題はなかったことから、5. 試験溶液の調製 1) 抽出を ①はちみつ以外の場合 ②はちみつの場合に分けて記載した。

【結論】

畜産物のエチプロール試験法として、通知エチプロール試験法(水産物)の適用を検討した。その結果、通知エチプロール試験法(水産物)の方法に従い、エチプロールを試料からアセトンで抽出し、酢酸エチル及び n -ヘキサン(1:1)混液で転溶後、アセトニトリル/ヘキサン分配で脱脂(はちみつ試料では省略)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 又は LC-MS/MS で定量及び確認することで畜産物中のエチプロールを測定することが可能であった。通知エチプロール試験法(水産物)を牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳、鶏卵及びはちみつの 6 食品に適用したところ、移動相に A 液; 2 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液、B 液; アセトニトリルを用いた場合、LC-MS の ESI negative 測定により真度 88.6~96.9%、併行精度 4.0~6.5%、LC-MS/MS の ESI negative 測定により真度 80.0~104.4%、併行精度 3.2~8.2% の良好な結果が得られた。また、移動相に A 液; 5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液、B 液; 5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液・メタノール溶液を用いた場合、LC-MS の ESI positive 測定により真度 87.9~94.3%、併行精度 1.3~6.5%、LC-MS/MS の ESI positive 測定により真度 89.6~95.5%、併行精度 1.8~7.6% の良好な結果が得られた。また、定量限界として、いずれの測定においても 0.01 mg/kg を設定可能であることが確認された。

[参考文献]

厚生労働省食品安全部長通知 食安発第 0124004 号「食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について」エチプロール試験法(農産物)、エチプロール試験法(水産物)(平成 17 年 1 月 24 日)

① 添加回収試験における代表的なクロマトグラム (ESI negative)

A 液: 2 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液
B 液: アセトニトリル

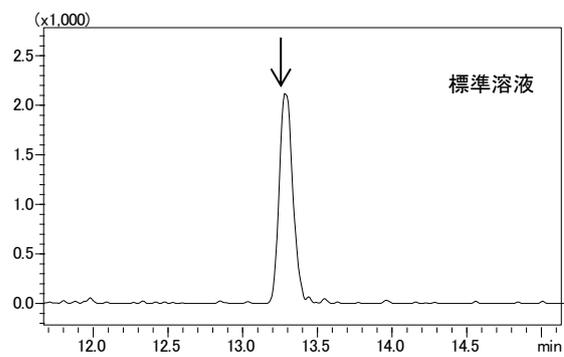
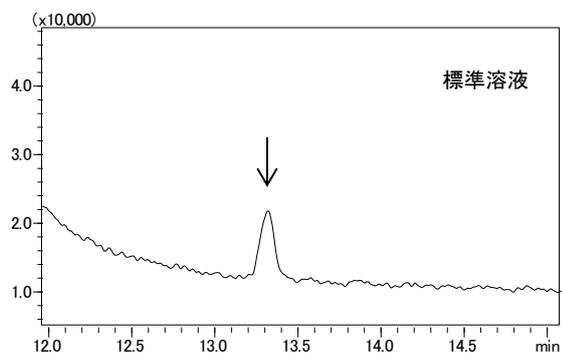
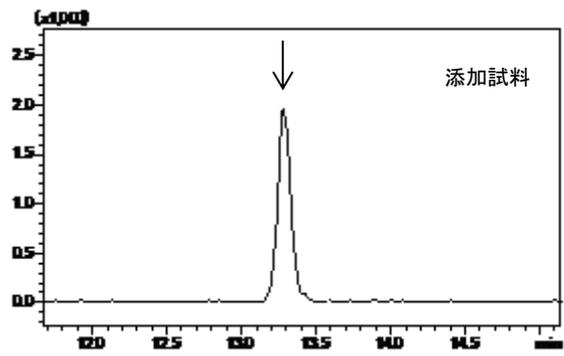
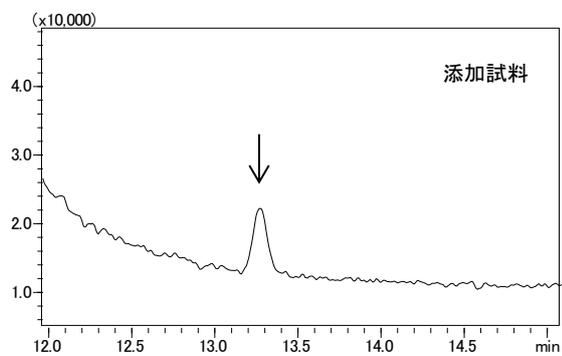
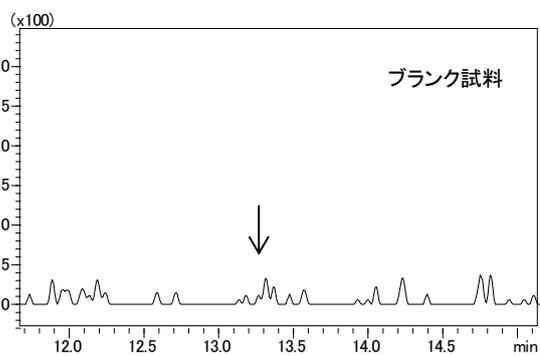
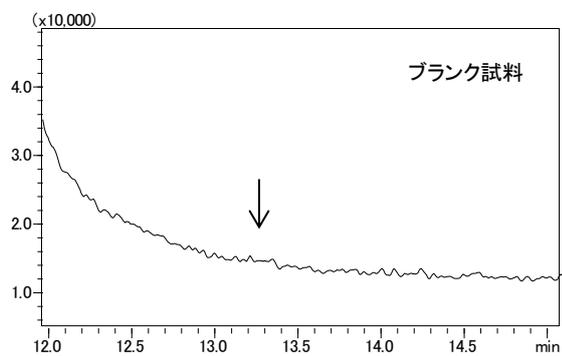


図 9_1 牛の筋肉の SIM クロマトグラム
(m/z -395.0)
添加濃度: 0.01 ppm

図 9_2 牛の筋肉の SRM クロマトグラム
(m/z -395.0→330.0)
添加濃度: 0.01 ppm

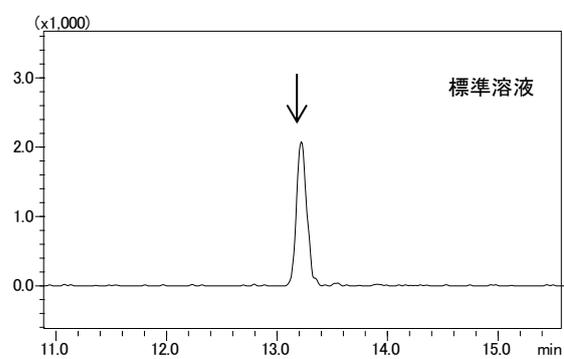
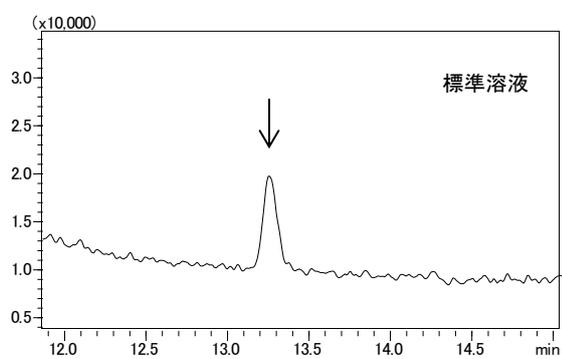
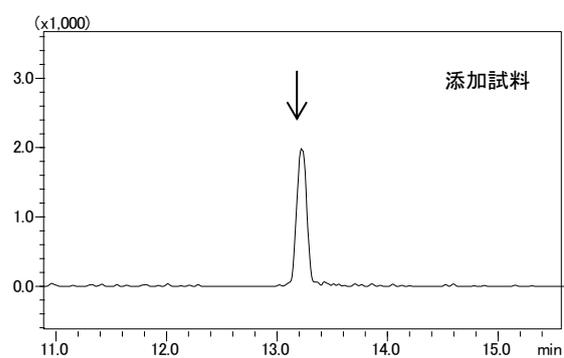
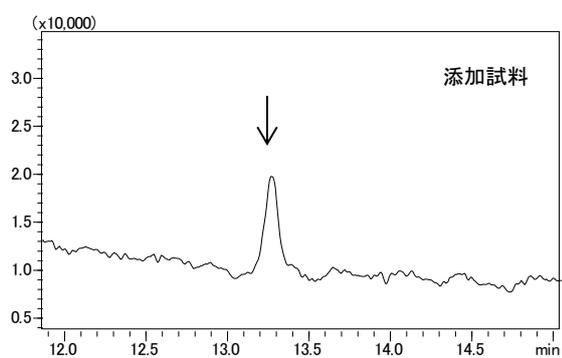
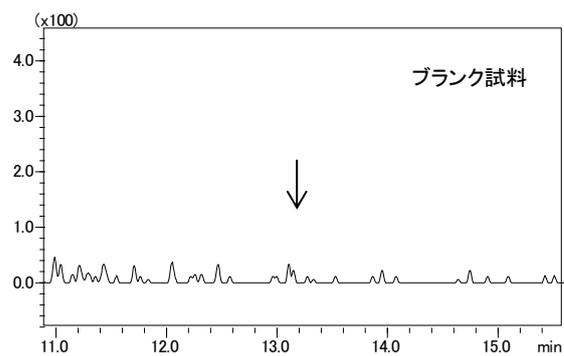
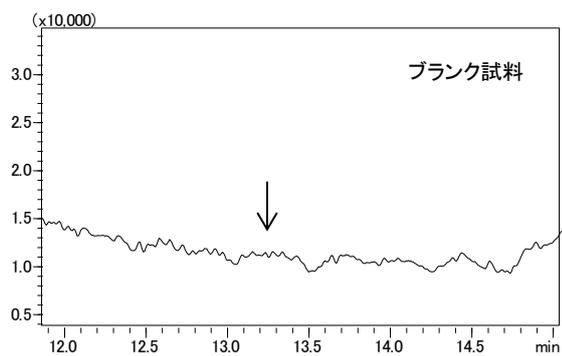


図 10_1 牛の脂肪の SIM クロマトグラム
(m/z - 395.0)
添加濃度: 0.01 ppm

図 10_2 牛の脂肪の SRM クロマトグラム
(m/z - 395.0→330.0)
添加濃度: 0.01 ppm

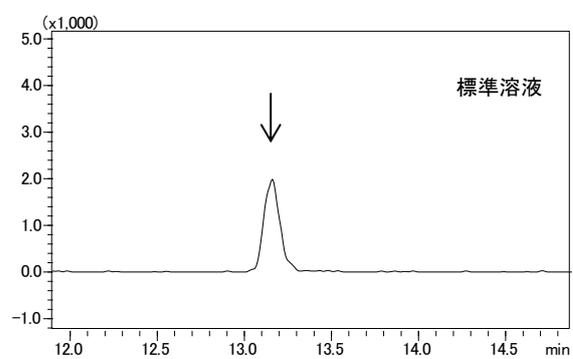
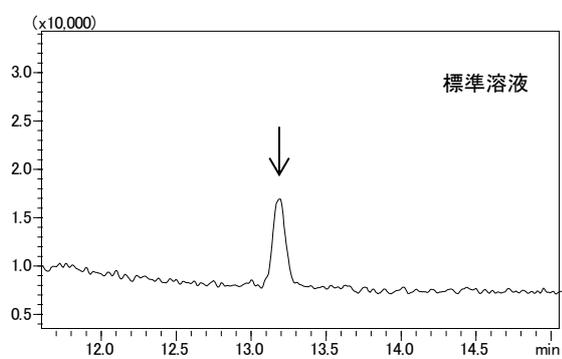
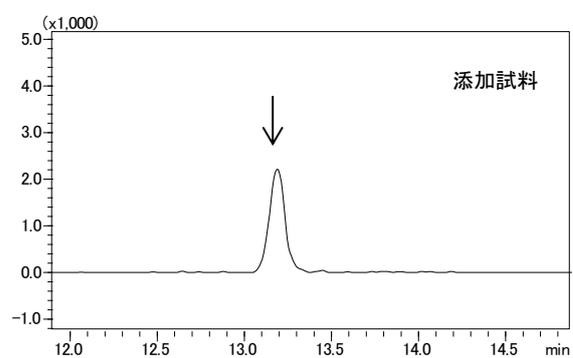
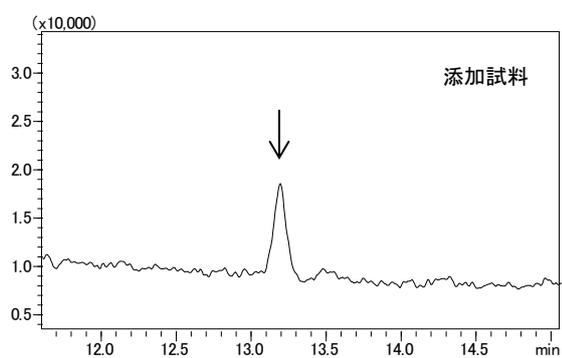
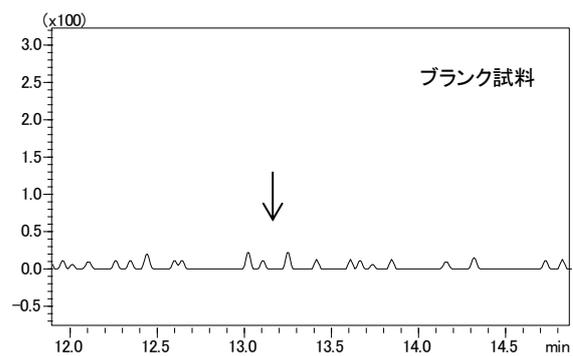
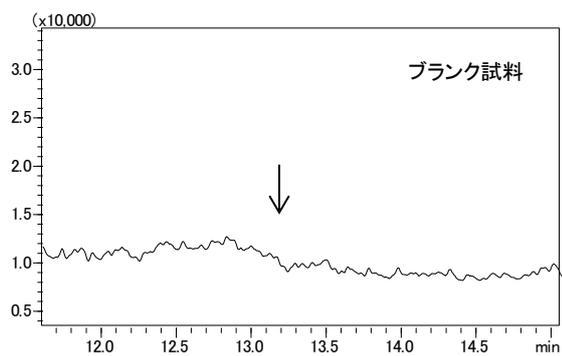


図 11_1 牛の肝臓の SIM クロマトグラム
(m/z - 395.0)
添加濃度: 0.01 ppm

図 11_2 牛の肝臓の SRM クロマトグラム
(m/z - 395.0→330.0)
添加濃度: 0.01 ppm

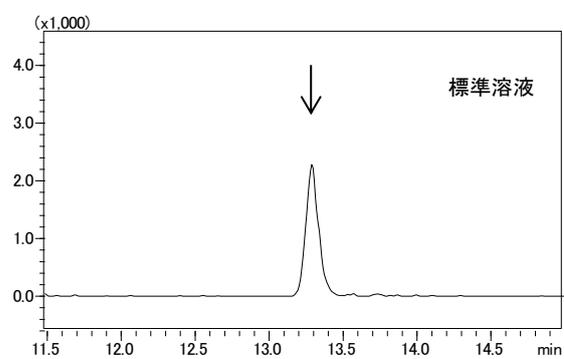
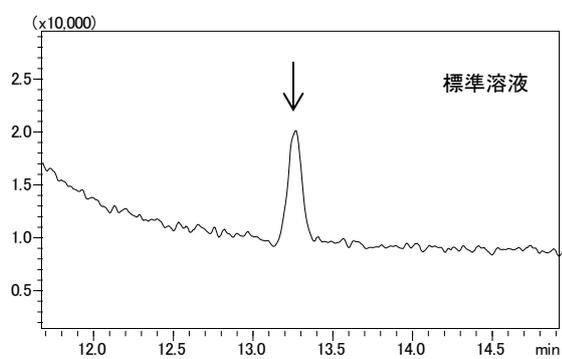
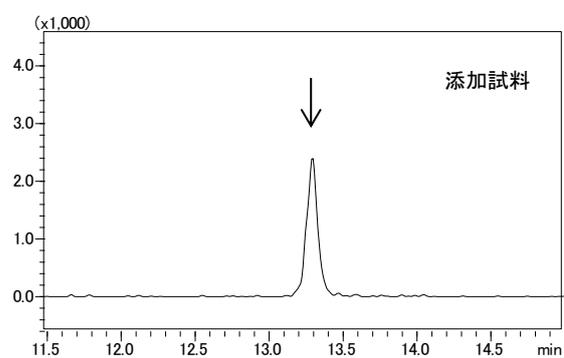
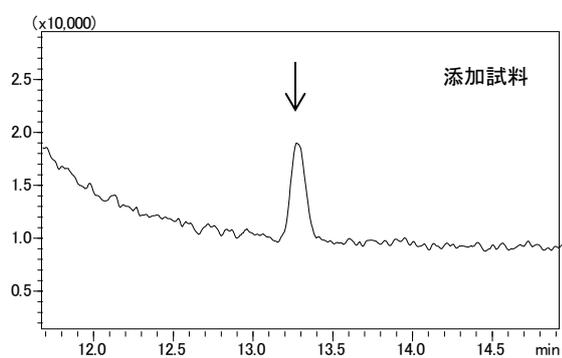
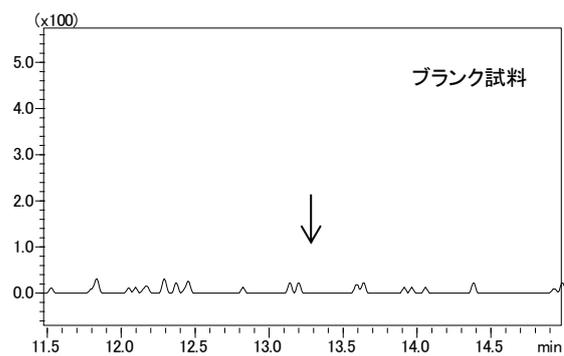
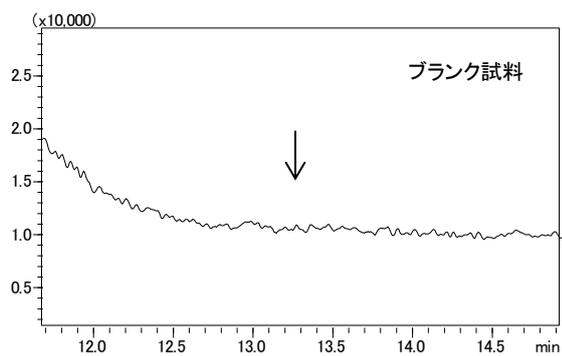


図 12_1 牛乳の SIM クロマトグラム
(m/z -395.0)
添加濃度:0.01 ppm

図 12_2 牛乳の SRM クロマトグラム
(m/z -395.0→330.0)
添加濃度:0.01 ppm

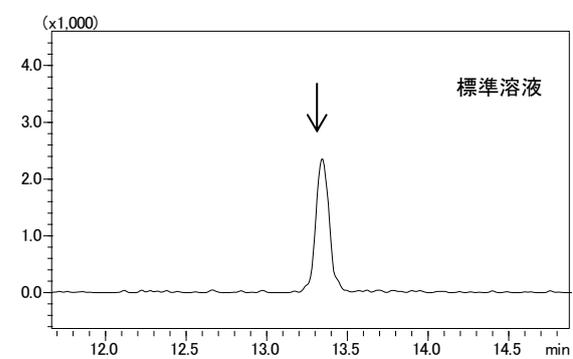
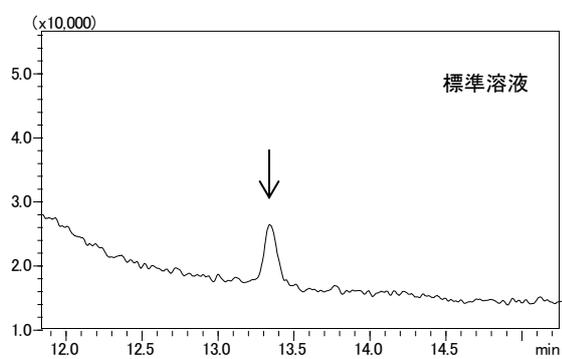
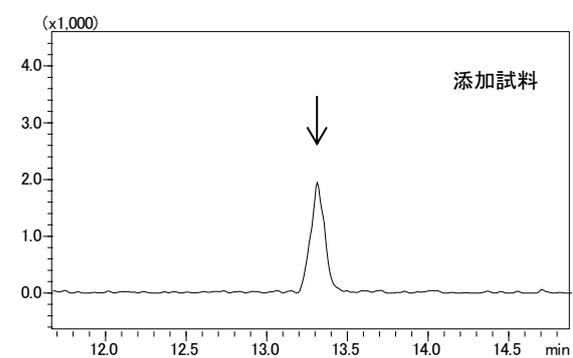
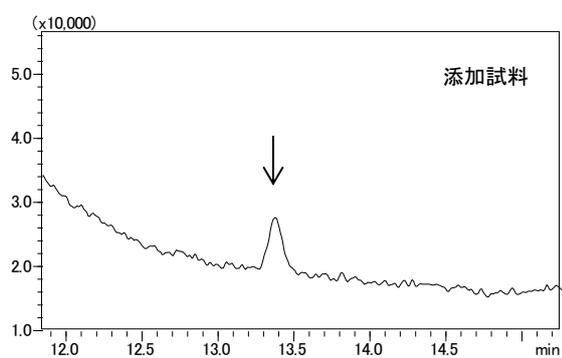
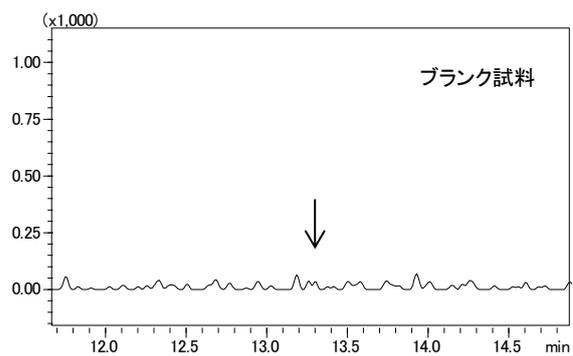
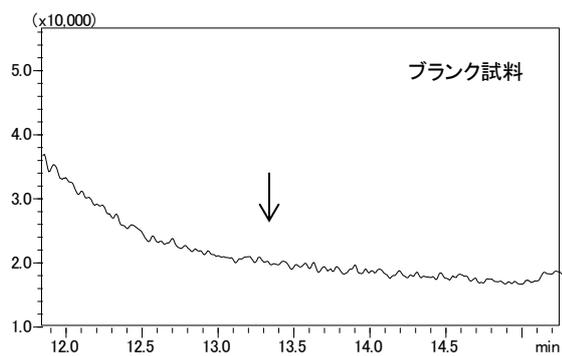


図 13_1 鶏卵の SIM クロマトグラム
(m/z -395.0)
添加濃度:0.01 ppm

図 13_2 鶏卵の SRM クロマトグラム
(m/z -395.0→330.0)
添加濃度:0.01 ppm

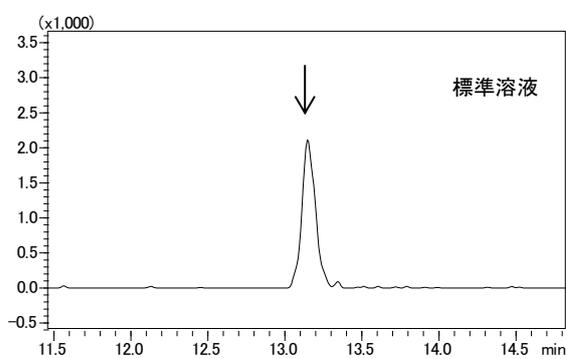
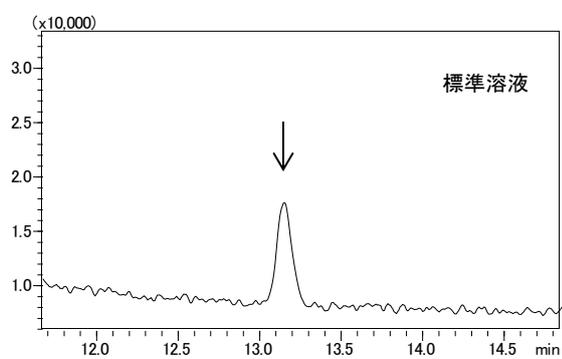
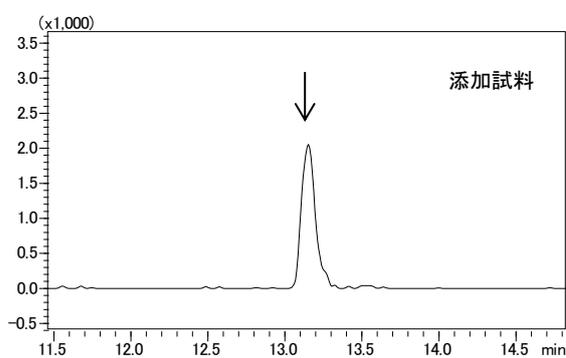
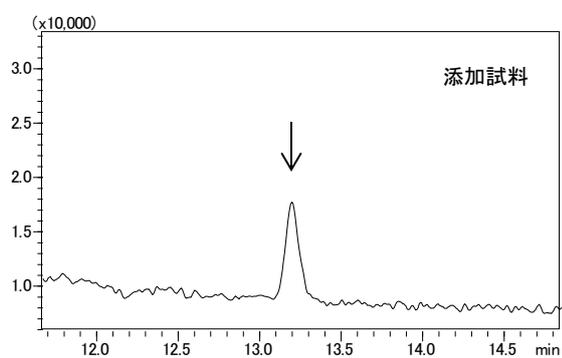
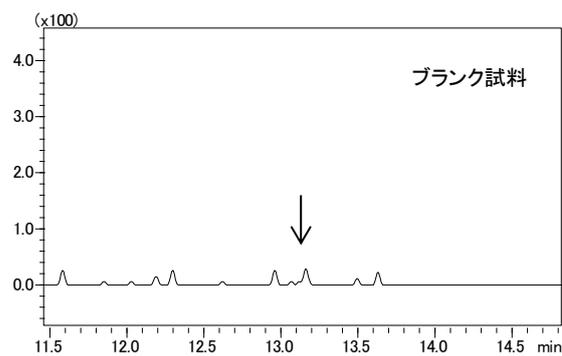
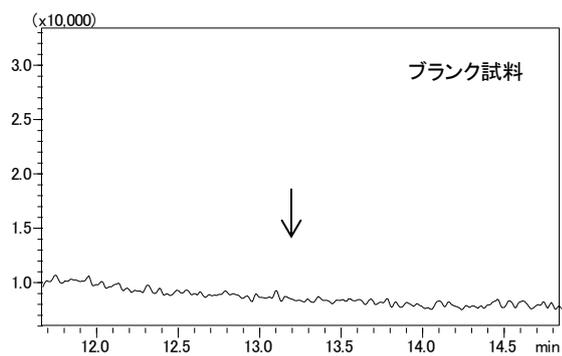


図 14_1 はちみつの SIM クロマトグラム
(m/z - 395.0)
添加濃度: 0.01 ppm

図 14_2 はちみつの SRM クロマトグラム
(m/z - 395.0→330.0)
添加濃度: 0.01 ppm

② 添加回収試験における代表的なクロマトグラム (ESI positive)

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

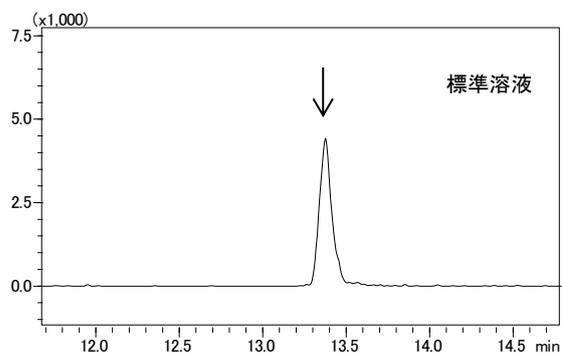
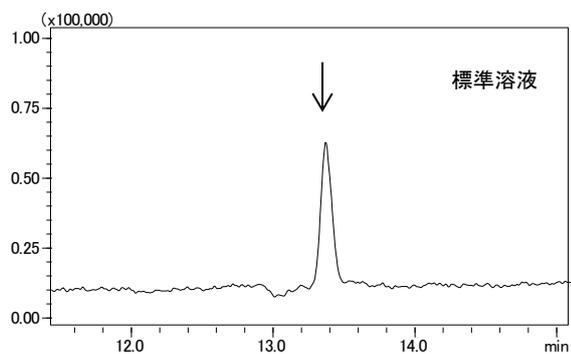
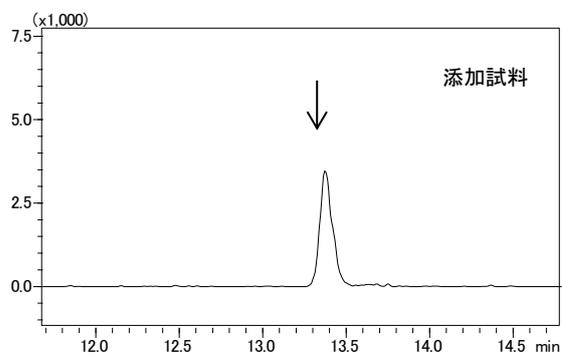
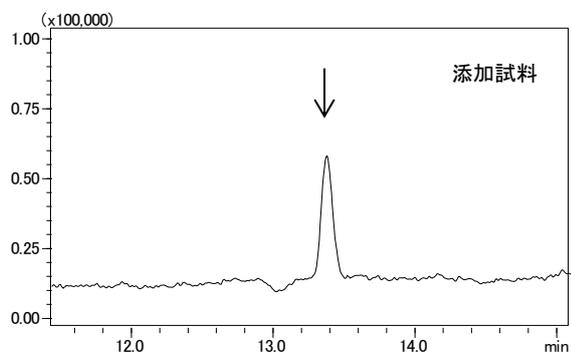
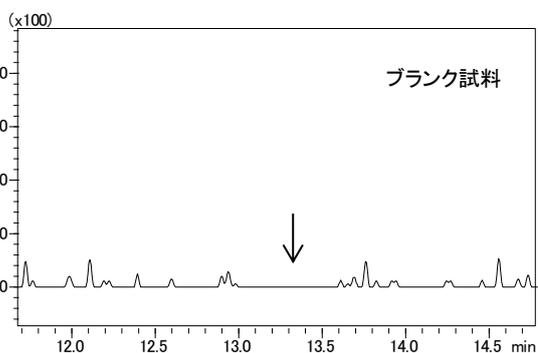
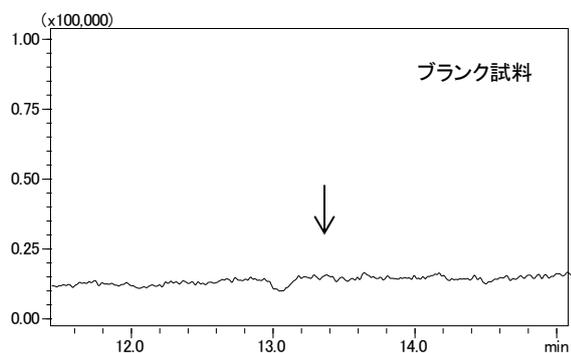


図 15_1 牛の筋肉の SIM クロマトグラム
($m/z +397.0$)
添加濃度: 0.01 ppm

図 15_2 牛の筋肉の SRM クロマトグラム
($m/z +396.9 \rightarrow 350.9$)
添加濃度: 0.01 ppm

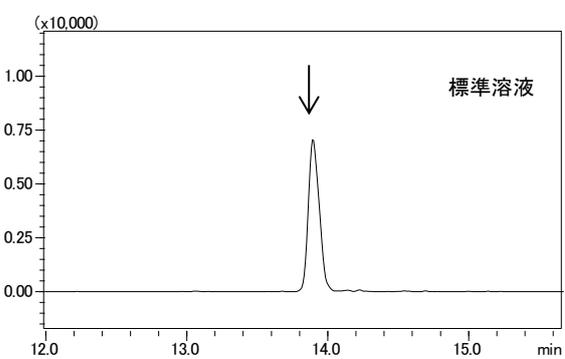
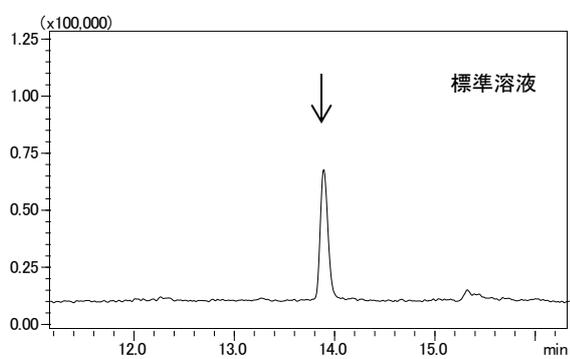
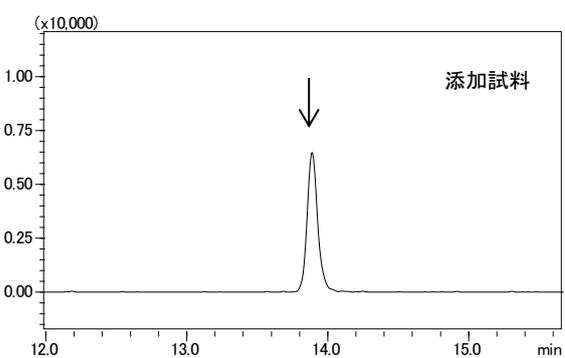
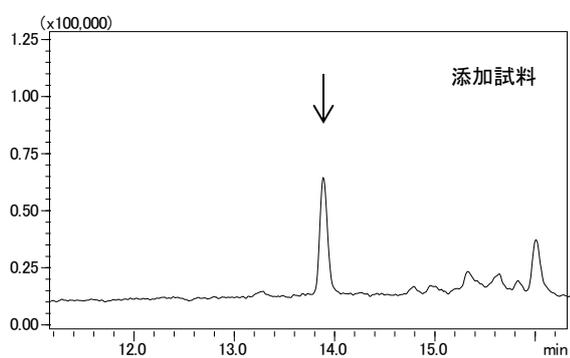
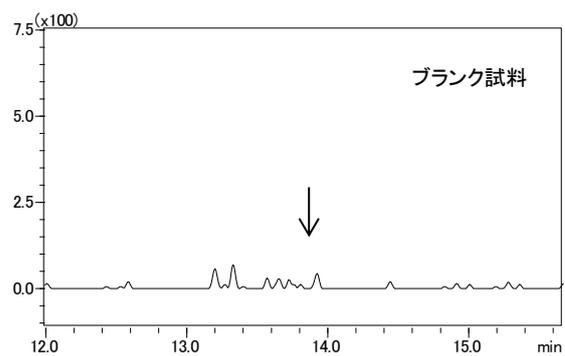
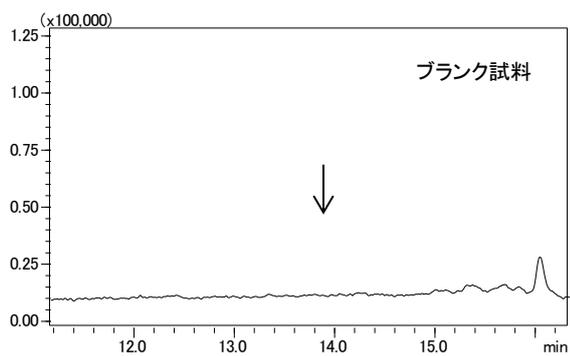


図 16_1 牛の脂肪の SIM クロマトグラム
($m/z +397.0$)
添加濃度:0.01 ppm

図 16_2 牛の脂肪の SRM クロマトグラム
($m/z +396.9 \rightarrow 350.9$)
添加濃度:0.01 ppm

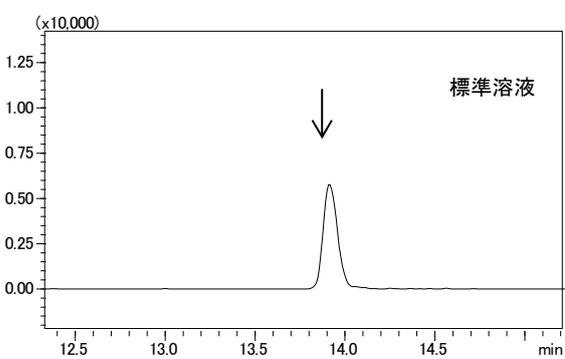
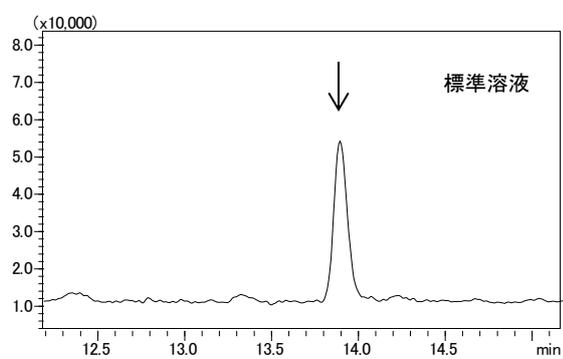
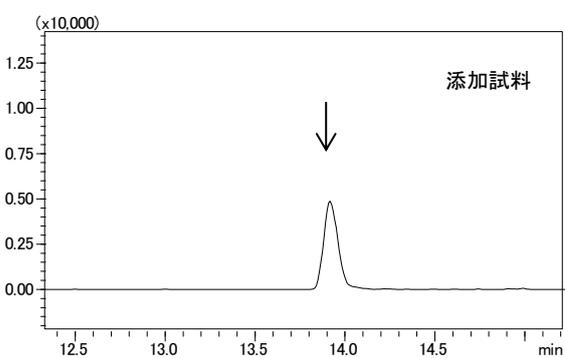
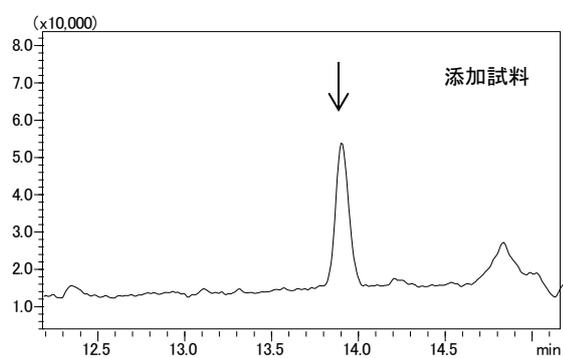
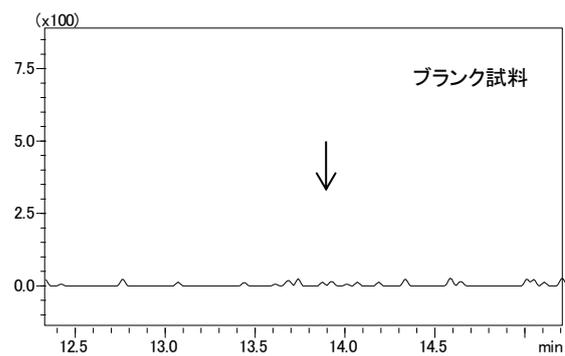
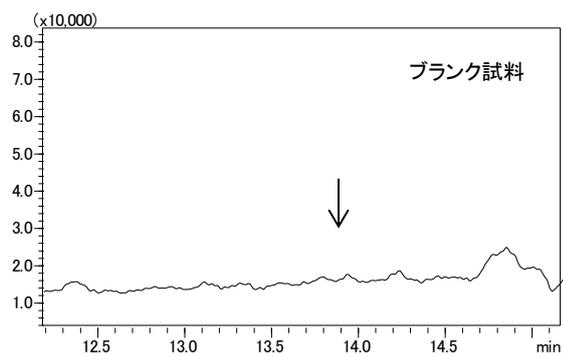


図 17_1 牛の肝臓の SIM クロマトグラム
($m/z +397.0$)
添加濃度:0.01 ppm

図 17_2 牛の肝臓の SRM クロマトグラム
($m/z +396.9 \rightarrow 350.9$)
添加濃度:0.01 ppm

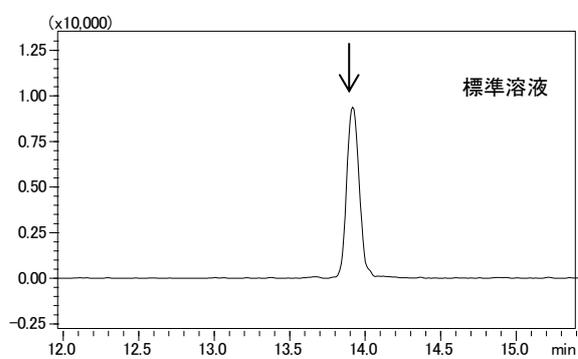
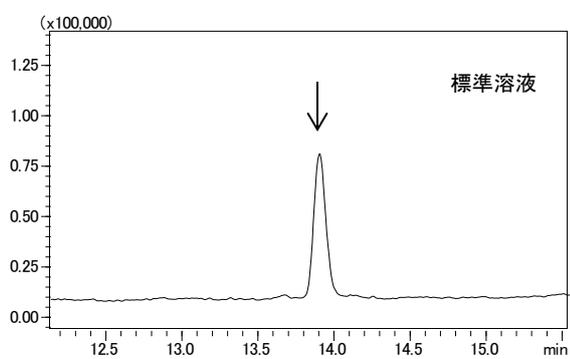
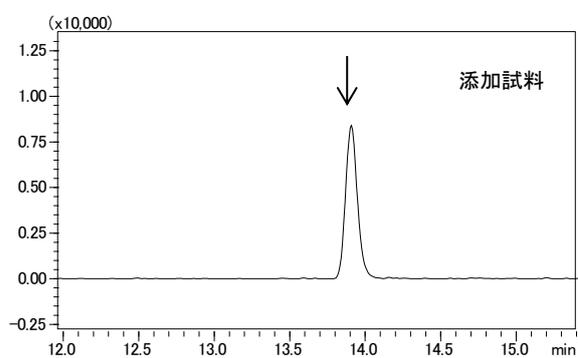
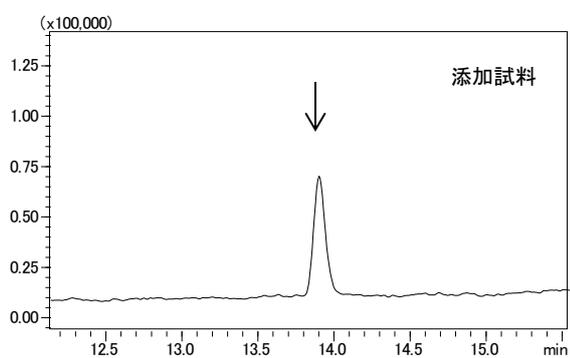
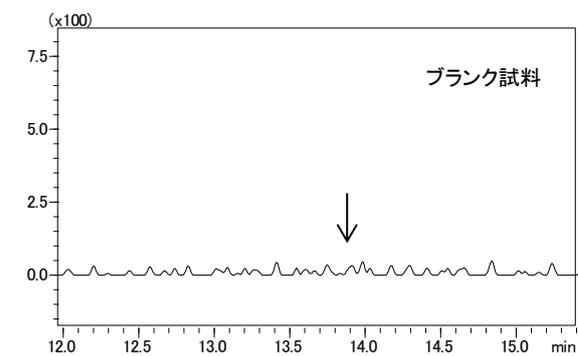
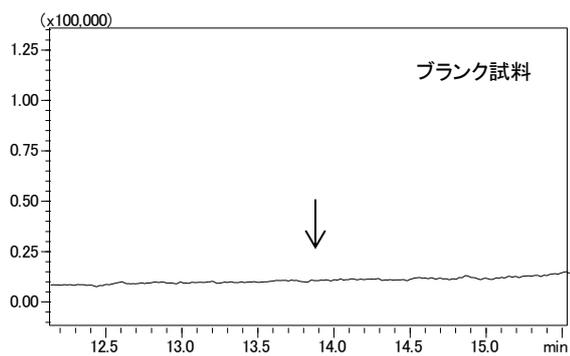


図 18_1 牛乳の SIM クロマトグラム
($m/z +397.0$)
添加濃度:0.01 ppm

図 18_2 牛乳の SRM クロマトグラム
($m/z +396.9 \rightarrow 350.9$)
添加濃度:0.01 ppm

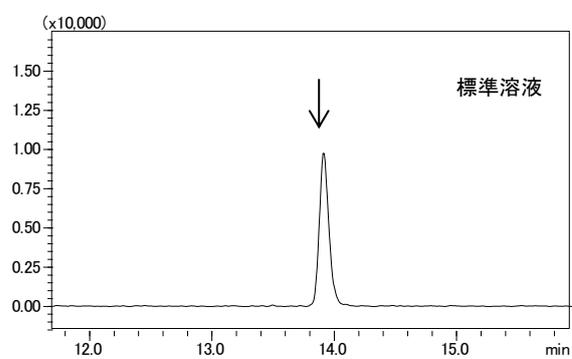
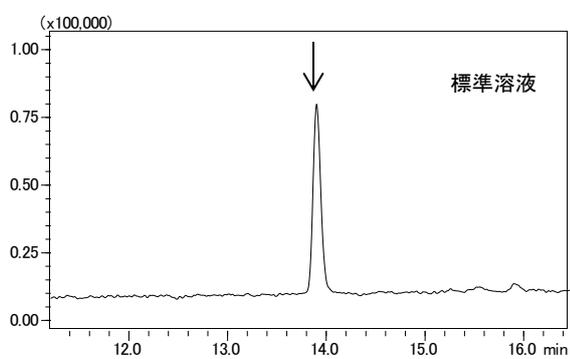
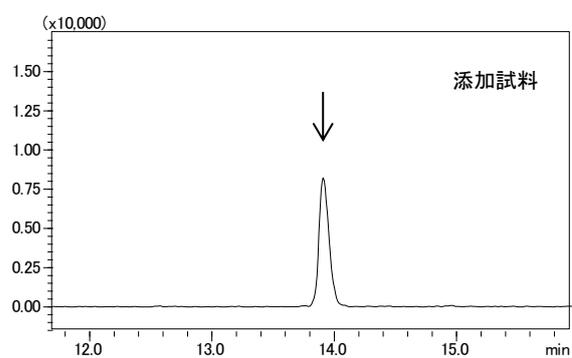
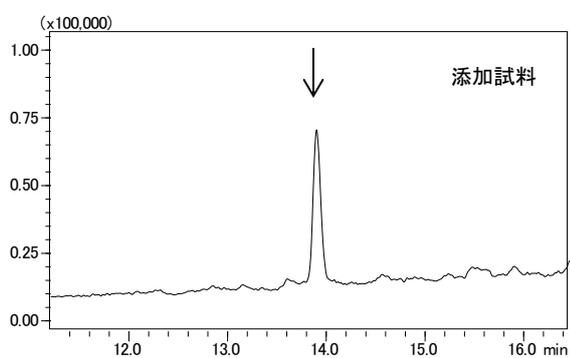
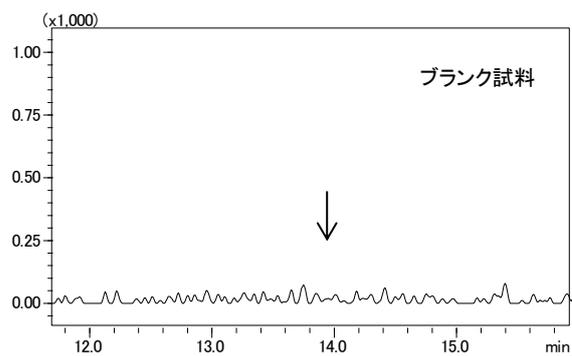
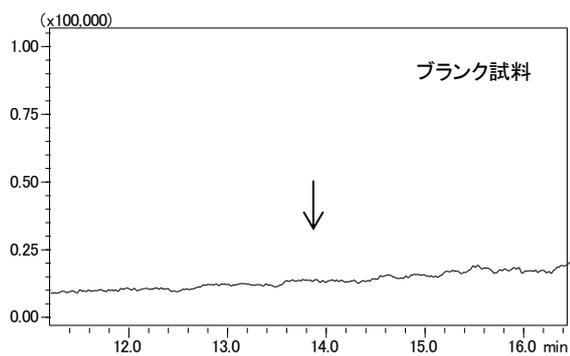


図 19_1 鶏卵の SIM クロマトグラム
($m/z +397.0$)
添加濃度:0.01 ppm

図 19_2 鶏卵の SRM クロマトグラム
($m/z +396.9 \rightarrow 350.9$)
添加濃度:0.01 ppm

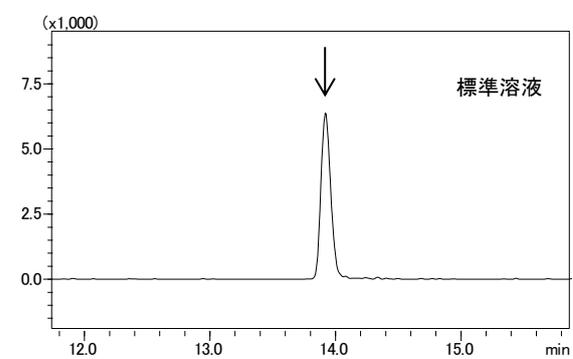
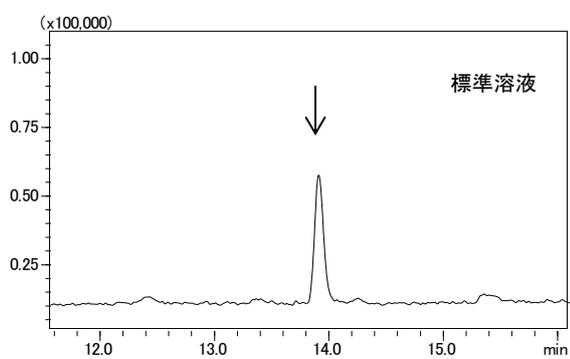
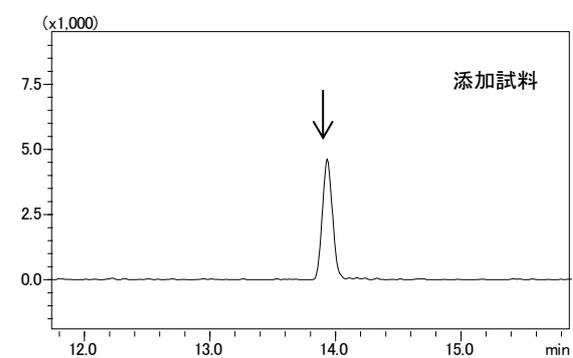
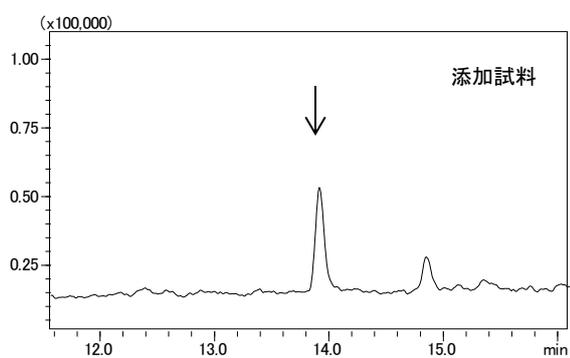
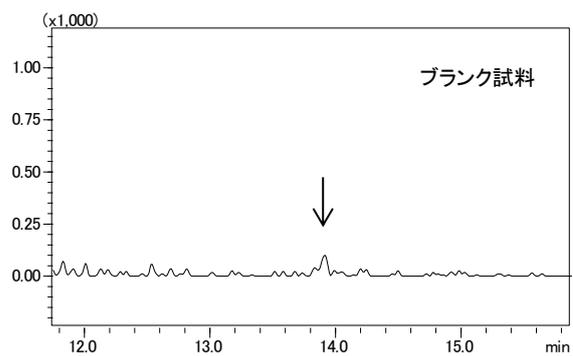
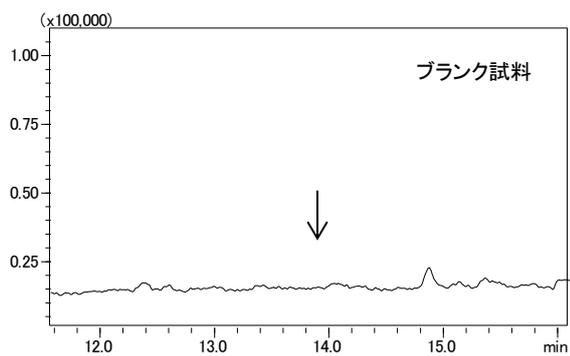


図 20_1 はちみつの SIM クロマトグラム
($m/z + 397.0$)
添加濃度: 0.01 ppm

図 20_2 はちみつの SRM クロマトグラム
($m/z + 396.9 \rightarrow 350.9$)
添加濃度: 0.01 ppm

②-1 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(TIC)

A 液: 2 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液
B 液: アセトニトリル

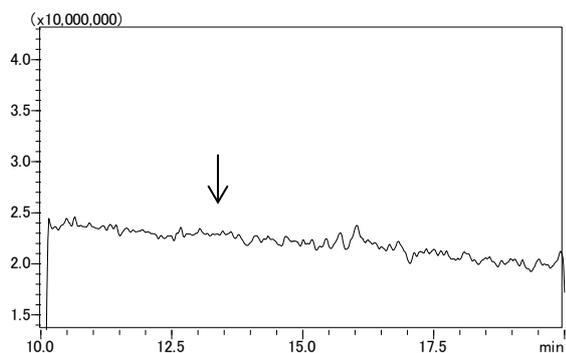


図 21 牛の筋肉試料の TIC
(ESI negative、スキャン範囲: 50~550 amu)

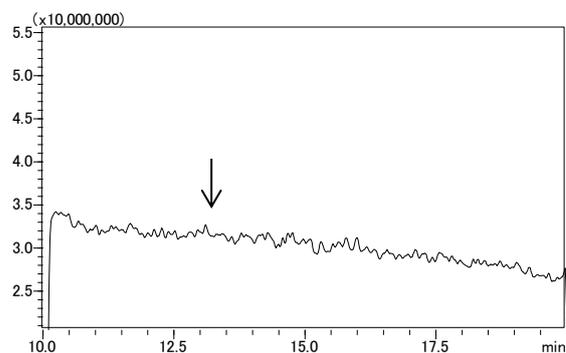


図 24 牛乳試料の TIC
(ESI negative、スキャン範囲: 50~550 amu)

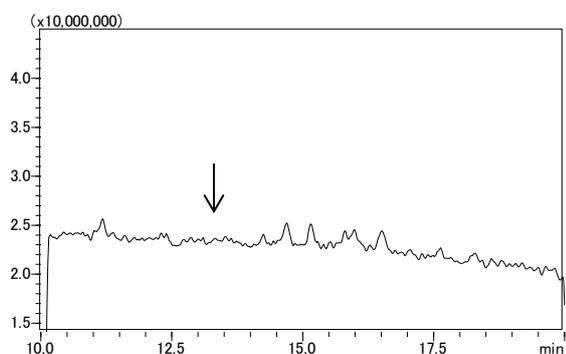


図 22 牛の脂肪試料の TIC
(ESI negative、スキャン範囲: 50~550 amu)

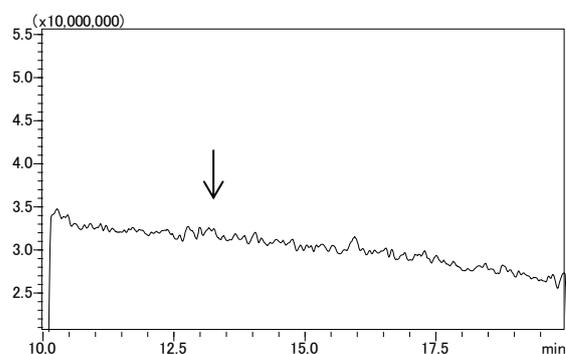


図 25 鶏卵試料の TIC
(ESI negative、スキャン範囲: 50~550 amu)

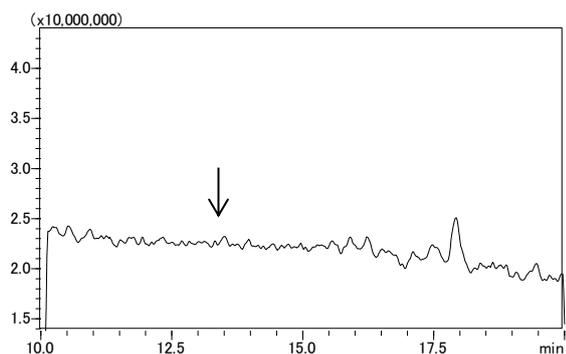


図 23 牛の肝臓試料の TIC
(ESI negative、スキャン範囲: 50~550 amu)

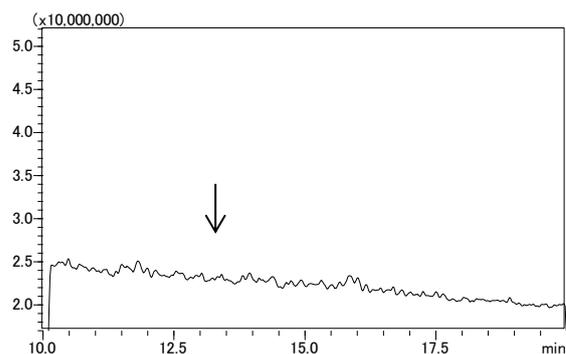


図 26 はちみつ試料の TIC
(ESI negative、スキャン範囲: 50~550 amu)

②-2 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(TIC)

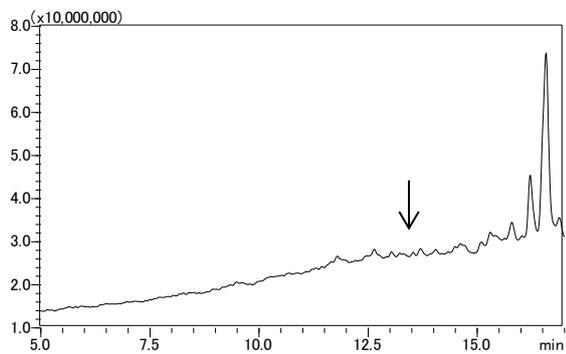


図 27 牛の筋肉試料の TIC
(ESI positive、スキャン範囲:50~550 amu)

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

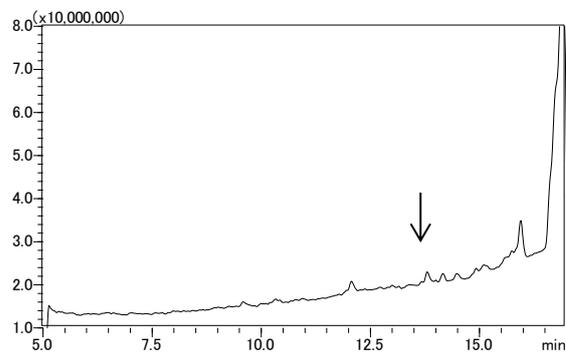


図 30 牛乳試料の TIC
(ESI positive、スキャン範囲:50~550 amu)

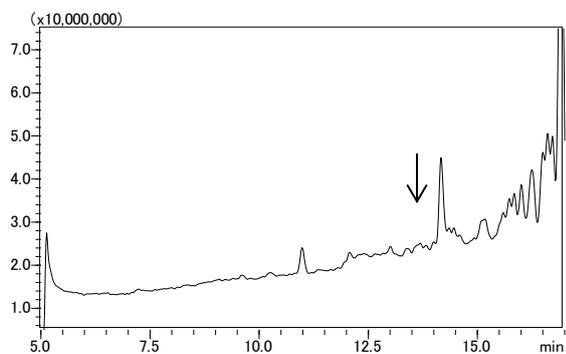


図 28 牛の脂肪試料の TIC
(ESI positive、スキャン範囲:50~550 amu)

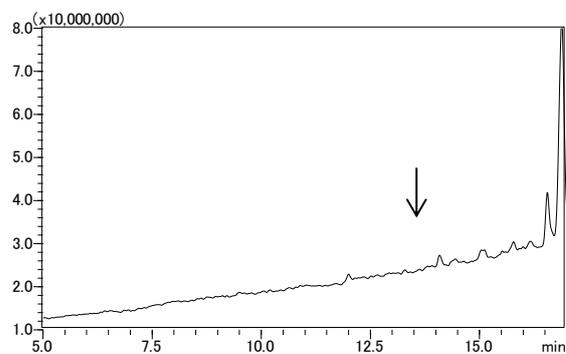


図 31 鶏卵試料の TIC
(ESI positive、スキャン範囲:50~550 amu)

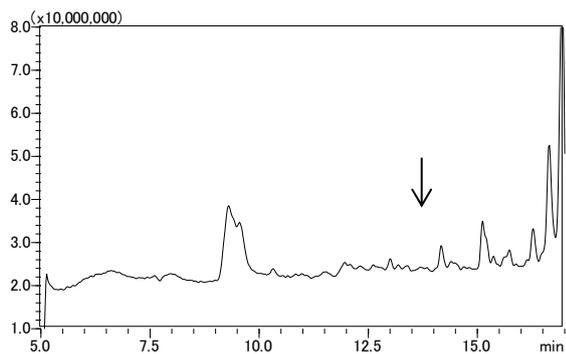


図 29 牛の肝臓試料の TIC
(ESI positive、スキャン範囲:50~550 amu)

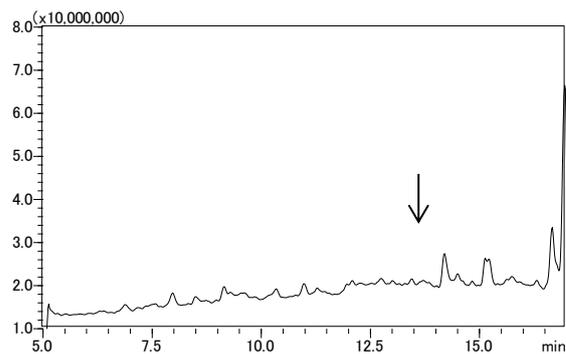


図 32 はちみつ試料の TIC
(ESI positive、スキャン範囲:50~550 amu)