

## ピラジフルミド分析法（畜水産物）

### 1. 分析対象化合物

畜産物：ピラジフルミド、代謝物 BC-01 : *N*-(3',4'-ジフルオロ-5-ヒドロキシビフェニル-2-イル)-3-(トリフルオロメチル)ピラジン-2-カルボキサミド  
及び BC-10 : 3-(トリフルオロメチル)ピラジン-2-カルボキサミド  
水産物：ピラジフルミド

### 2. 装置

液体クロマトグラフ・タンデム質量分析計（LC-MS/MS）

### 3. 試薬、試液

アセトニトリル	:	HPLC 用
アセトニトリル	:	LC-MS 用
水	:	HPLC 用
水	:	LC-MS 用
酢酸エチル	:	HPLC 用
ヘキサン	:	特級
氷酢酸	:	特級
酢酸	:	LC-MS 用
酢酸ナトリウム	:	特級
0.1%ギ酸含有水	:	LC-MS 用
0,1%ギ酸含有アセトニトリル	:	LC-MS 用
$\beta$ -グルクロニダーゼ	:	$\beta$ -Glucuronidase from <i>Helix Pomatia</i> , Type HP-2, >100000 $\mu\text{g/mL}$ （シグマ製）
ピラジフルミド	:	分析用標準品
BC-01	:	分析用標準品
BC-10	:	分析用標準品
C <sub>18</sub> ミニカラム	:	HF Mega Bond-Elut, C <sub>18</sub> , 1 g, 6 mL SPE cartridges（アジレントテクノロジー製）
QuEChERS 抽出塩	:	Agilent QuEChERS dSPE EMR-Lipid clean-up powder mixture（アジレントテクノロジー製）
QuEChERS 抽出塩	:	Agilent QuEChERS Polish NaCl/MgSO <sub>4</sub> powder mixture（アジレントテクノロジー製）

#### 4. 試験溶液の調製

##### 1) 抽出

###### ① 卵黄の場合

均一化した卵黄試料 5 g にアセトニトリル 15 mL 及びヘキサン 15 mL を加え 10 分間振とう抽出、2500 rpm で 3 分間遠心分離し、アセトニトリル層とヘキサン層を分けて採る。ヘキサン層にアセトニトリル 15 mL を加え 10 分間振とう抽出、2500 rpm で 3 分間遠心分離し、アセトニトリル層を採る。抽出残留物に、アセトニトリル 15 mL を加え、振とう抽出し、2500 rpm で 3 分間遠心分離する。さらに抽出残留物にアセトニトリル及び水 (1 : 1) 混液 15 mL を加え振とう抽出し、2500 rpm で 3 分間遠心分離する。得られた抽出液を合一、液々分配しアセトニトリル層を回収し、100 mL に定容する。得られた抽出液は酵素処理に供する。

###### ② 卵白、鶏の肝臓、筋肉及び脂肪の場合

磨砕・均一化した試料 5 g にアセトニトリル 15 mL を加え 10 分間振とう抽出する。3500 rpm (肝臓、筋肉及び脂肪は 4750 rpm) で 3 分間遠心分離し、上清を採る。残留物にアセトニトリル 15 mL 加え、10 分間振とう抽出する。3500 rpm (肝臓、筋肉及び脂肪は 4750 rpm) で 3 分間遠心分離し、上清を採り、得られた抽出液を合一する (あと 1 回繰り返す)。ここにヘキサン 50 mL を添加し 10 分間振とう、アセトニトリル層を採り、アセトニトリルにて 50 mL に定容する。得られた抽出液から 10 mL 採取し、QuEChERS 抽出塩 (dSPE EMR-Lipid clean-up powder mixture) を添加、5 分間振とう、3500 rpm で 5 分間遠心分離し、上清を採取する。ここに QuEChERS 抽出塩 (Polish NaCl/MgSO<sub>4</sub> powder mixture) を添加、5 分間振とうする。3500 rpm (肝臓、筋肉及び脂肪は 4750 rpm) で 5 分間遠心分離し、上清を採取する。

ピラジフルミド及び BC-01 の分析にあつては、ここから 1.25 mL を採取し、アセトニトリル 1.25 mL を加え、水で 5 mL に定容し、この一部を LC-MS/MS に注入する。

BC-10 の分析にあつては、卵白試料はここから 0.2 mL を採取、アセトニトリル 0.05 mL 及び水 0.75 mL と混合、LC-MS/MS を用いて定量する。肝臓、筋肉及び脂肪試料は、抽出液から 2 mL 採取、40° C 以下で濃縮乾固し、アセトニトリル及び水 (2 : 8,) 混液 1 mL を加えて溶解、LC-MS/MS に注入する。

###### ③ 牛の筋肉及び脂肪の場合

筋肉及び脂肪試料 5 g にアセトニトリル 15 mL 加え、30 秒程度均一化、その後 10 分間振とう抽出する。5000 rpm で 3 分間遠心分離し、上清を採る。残留物にアセトニトリル 15 mL 加え、10 分間振とう抽出する。5000 rpm で 3 分間遠心分離し、アセトニトリル層を採り、得られた抽出液を合一する (あと 1 回繰り返す)。ここにヘキサン 50 mL を添加し 10 分間振とう、アセトニトリル層を採り、アセトニトリルにて 50 mL に定容する。

得られた抽出液は酵素処理に供する。

④ 牛の肝臓及び腎臓の場合（ピラジフルミド、BC-01）

肝臓及び腎臓試料 10 g にアセトニトリル 30 mL 加え、30 秒程度均一化する。ここにヘキサン 30 mL 加え、10 分間振とう抽出する。2500 rpm で 3 分間遠心分離し、抽出液を分液漏斗に移す。液液分配し、アセトニトリル層を採る。抽出残留物にアセトニトリル 30 mL を加え 10 分間振とう抽出、2500 rpm で 3 分間遠心分離し、抽出液を採る（2 回繰り返す）。抽出液はアセトニトリルで 100 mL に定容する。得られた抽出液は酵素処理に供する。

⑤ 牛の腎臓の場合（BC-10）

腎臓試料 5 g にアセトニトリル 15 mL 加え、10 分間振とう抽出する。3000 rpm で 3 分間遠心分離し、抽出液を採る。抽出残留物にアセトニトリル 15 mL を加え 10 分間振とう抽出、3000 rpm で 3 分間遠心分離し、抽出液を採る（1 回繰り返す）。抽出液を合一し、ヘキサン 50 mL を加えて 10 分振とうし、アセトニトリル層を採り、アセトニトリルにて 50 mL に定容する。得られた抽出液から 10 mL 採取し、QuEChERS 抽出塩（dSPE EMR-Lipid clean-up powder mixture）を添加、5 分間振とう、3500 rpm で 5 分間遠心分離し、上清を採取する。ここに QuEChERS 抽出塩（Polish NaCl/MgSO<sub>4</sub> powder mixture）を添加、5 分間振とうする。3500 rpm で 5 分間遠心分離し、上清を採取する。ここから 0.2 mL を採取、アセトニトリル 0.05 mL 及び水 0.75 mL と混合、LC-MS/MS を用いて定量する。

⑥ 乳の場合

乳試料 10 g にアセトニトリル 30 mL を入れ 10 分振とう抽出、2500 rpm で 3 分間遠心分離し、アセトニトリル層を採る（あと 1 回繰り返す）。アセトニトリル及び水（1 : 1）混液 30 mL を加え、10 分間振とう抽出、2500 rpm で 3 分間遠心分離し、アセトニトリル層を採る（あと 1 回繰り返す）。抽出液を合一し、アセトニトリルで 200 mL に定容する。得られた抽出液は酵素処理に供する。

⑦ 乳脂肪の場合

乳脂肪試料 10 g にアセトニトリル 30 mL 及びヘキサン 30 mL を加え 10 分振とう抽出、2500 rpm で 3 分間遠心分離し、有機層を分液漏斗に採る。液液分配し、アセトニトリル層とヘキサン層を別の容器に取り分ける。ヘキサン層はヘキサンにて 50 mL に定容する。残留物にアセトニトリル 30 mL を加え、10 分間振とう抽出、2500 rpm で 3 分間遠心分離し、抽出液を同じ容器に合わせて採る（2 回繰り返す）。アセトニトリルで 100 mL に定容する。アセトニトリル抽出液から 5 mL、ヘキサン抽出液から 2.5 mL を取り合一し、40° C 以下で濃縮乾固、酵素処理に供する。

## 2) 誘導体化、加水分解など

### ① 卵黄の場合

抽出液から 10 mL 採取し、有機溶媒を 40°C 以下で留去後、100 mM 酢酸ナトリウム水溶液 (pH5) 1.5 mL を加えて溶解し、酵素 ( $\beta$ -グルクロニダーゼ) 溶液 10  $\mu$ L を加え、脱抱合処理 (37°C、15-20 時間) を行う。反応後、酢酸エチル 4 mL を加え液々分配、2500 rpm で 3 分間遠心分離 (1 回繰り返す) し、有機層を合一、40°C 以下で濃縮乾固し、アセトニトリル 0.5 mL 次いで水 0.5 mL 加え、LC-MS/MS に注入する。

### ②⑤ 鶏の卵白、肝臓、筋肉、脂肪及び牛の腎臓の場合 (BC-10) 実施なし

### ③④⑥ 牛の筋肉、脂肪、肝臓、腎臓及び乳の場合 (ピラジフルミド、BC-01)

抽出液から 5 mL (乳は 10 mL) 採取し、水 1 mL を加え 40°C 以下で 1 mL 以下になるまで濃縮する。100 mM 酢酸ナトリウム水溶液 (pH5) 1.5 mL を加えて溶解し、酵素 ( $\beta$ -グルクロニダーゼ) 溶液 10  $\mu$ L を加え、脱抱合処理 (37°C、15-20 時間) を行う。反応後、酢酸エチル 4 mL を加え液々分配、2500 rpm で 3 分間遠心分離 (2 回繰り返す) し、有機層を合一、40°C 以下で濃縮乾固し、アセトニトリル/水 (2/8, v/v) 混液 3 mL を加え再溶解する。これを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に供する。

### ⑦ 乳脂肪の場合

抽出液から 5 mL、ヘキサン抽出液から 2.5 mL を取り合一し、40°C 以下で濃縮乾固、100 mM 酢酸ナトリウム水溶液 (pH5) 2.5 mL を加えて溶解し、酵素 ( $\beta$ -グルクロニダーゼ) 溶液 10  $\mu$ L を加え、脱抱合処理 (37°C、15-20 時間) を行う。アセトニトリル 3.7 mL を加えて酵素反応を停止し、40°C 以下でアセトニトリルを留去する。ここに飽和食塩水 1 mL、酢酸エチル 4 mL を加え 1 分間液々分配、2500 rpm で 3 分間遠心分離、酢酸エチル層を採取する (2 回繰り返す)。酢酸エチル層を合一し、40°C 以下で濃縮乾固する。ここにアセトニトリル及び水 (2 : 8) 混液 3 mL を加え再溶解する。これを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に供する。

## 3) 精製

### ①②⑤ 卵黄、卵白、鶏の肝臓、筋肉、脂肪及び牛の腎臓 (BC-10) の場合 精製なし

③④⑥⑦ 乳、乳脂肪、牛の筋肉、脂肪、肝臓及び腎臓の場合（ピラジフルミド、BC-01）

酵素処理後の試料を濃縮乾固しアセトニトリル/水（2/8, v/v）混液 3 mL を加え再溶解する。これをあらかじめアセトニトリル 6 mL、アセトニトリル及び水（2：8）混液 6 mL でコンディショニングした C<sub>18</sub> カラムに負荷し、流下液を廃棄する。アセトニトリル及び水（2：8）混液 3 mL でカラムを洗浄、アセトニトリル 3 mL でサンプル容器を洗いこみながらカラムに負荷、ついでアセトニトリル 6 mL にて溶出させ、流下液を採取、40° C 以下で濃縮乾固する。アセトニトリル及び水（1：1）混液 1 mL にて再溶解する。LC-MS/MS で定量する

5. 検量線の作成

ピラジフルミド標準品及び BC-01 標準品をそれぞれアセトニトリルに溶解し、100 µg/mL の標準溶液を調製する。調製した標準液をそれぞれ一定量ずつ混合し、10 µg/mL の混合標準溶液を調製する。さらに希釈溶液で希釈して検量線用の標準液を数点調製し、それぞれ LC-MS/MS に注入し、ピーク面積法で検量線を作成する。

BC-10 標準品をアセトニトリルに溶解し、100 µg/mL の標準溶液を調製する。調製した標準液を希釈溶液で希釈して 0.08 µg/mL の標準溶液を調製し、さらに希釈溶液で希釈して検量線用の標準液を数点調製し、それぞれ LC-MS/MS に注入し、ピーク面積法で検量線を作成する。

なお、希釈溶液はそれぞれの無処理区の試料の抽出液を用い、マトリクスマッチ検量線として調製した。

6. 定量

試験溶液を LC-MS/MS に注入し、5 の検量線を用いて含量を定量する。

7. 測定条件

ピラジフルミド及び BC-01

- カラム : YMC Triart C18、UPLC column、粒子径 2.0 µm（長さ 100 mm × 内径 2 mm）及び YMC Triart C18（5 mm × 2.1 mm）ガードカラム（ワイエムシィ製）
- カラム温度 : 40 °C
- 移動相 : A) 0.1 vol% ギ酸含有水溶液  
B) 0.1 vol% ギ酸含有アセトニトリル溶液

グラジエント :

鶏試料、乳、乳脂肪		
時間(分)	%A	%B
0.0	80	20
0.5	80	20
2.5	0	100
5.0	0	100
5.5	80	20
7	Stop	
牛筋肉、脂肪、肝臓、腎臓		
時間(分)	%A	%B
0.0	80	20
0.5	80	20
2.5	0	100
3.0	0	100
3.5	80	20
5	Stop	

流量 : 0.6 mL/min

注入量 : 5  $\mu$ L

保持時間の目安 : ピラジフルミド ; 2.7 分 (乳 2.5 分)

BC-01 ; 2.3 分 (乳 2.2 分)

モニタリング  
イオン

分析対象	プリカーサーイオン ( <i>m/z</i> )	プロダクトイオン ( <i>m/z</i> )
ピラジフルミド	378.0	147.1
	378.0	229.9
BC-01	394.2	246.2
	394.2	147.2

BC-10

カラム : YMC Triart C18、UPLC column、粒子径 2.0  $\mu$ m (長さ 100 mm × 内径 2 mm) 及び YMC Triart C18 (5 mm × 2.1 mm) ガードカラム (ワイエムシィ製)

カラム温度 : 40 °C

移動相 : C) 0.1 vol% 酢酸含有水溶液

D) 0.1 vol% 酢酸含有アセトニトリル溶液

グラジエント :

時間(分)	%A	%B
0.0	95	5
0.5	95	5
2.5	0	100
5.0	0	100
5.5	95	5
7	Stop	

流量 0.5 mL/min

注入量 :

牛 : 15  $\mu$ L

鶏 : 卵黄 5  $\mu$ L、卵白 20  $\mu$ L、肝臓、筋肉、脂肪 15  $\mu$ L

保持時間の目安 :

BC-10 ; 1.8 分

モニタリング  
イオン

分析対象	フリッカーイオン ( <i>m/z</i> )	プロダクトイオン ( <i>m/z</i> )
BC-10	192.0	69.0
	192.0	147.0

## 8. 定量限界

ピラジフルミド、BC-01、BC-10 : 0.01 mg/kg

## 9. 留意事項

水産物は、畜産物の分析法を参考にして適宜改良して実施すること。

※ 本分析法は、農作物及び畜産物における残留試験等において用いられた残留農薬等分析法であり、新たな試験法の開発等に際して参考として下さい。なお、当該分析法をもとに開発した試験法を食品規格への適合判定のために使用する場合には、「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインの一部改正について(平成 22 年 12 月 24 日薬食発 1224 第 1 号)」に従って使用する試験法の妥当性を評価する必要があります。