

テプラロキシジム試験法（畜産物（乳牛））

1. 分析対象化合物

- ・テプラロキシジム及び酸化反応後メチルエステル化反応により 3-ペルヒドロピラン-4-イルペンタン-1,5-二酸ジメチル（DMP）に変換される代謝物
- ・(EZ)-(RS)-2-{1-[(2E)-3-クロロアリルオキシイミノ]プロピル}-3,5-ジヒドロキシ-5-ペルヒドロピラン-4-イルシクロヘキス-2-エン-1-オン（5-OH-DP）及び酸化反応後メチルエステル化反応により 3-ヒドロキシ-3-ペルヒドロピラン-4-イルペンタン-1,5-二酸ジメチル（OH-DMP）に変換される代謝物
- ・(EZ)-(RS)-2-{1-[(2E)-3-クロロアリルオキシイミノ]プロピル}-3-ヒドロキシ-5-(2-オキソペルヒドロピラン-4-イル)シクロヘキス-2-エン-1-オン（DL）及び酸化反応後メチルエステル化反応によりジメチル-(3,4,5,6-テトラヒドロ-2H-オキソピラノ-4-イル)グルタラート（DML）に変換される代謝物

2. 装置

ガスクロマトグラフ質量分析計（GC-MS）

3. 試薬、試液

水酸化カルシウム	: Aldrich Chemical Co Ltd
水酸化カリウム	: Fisher Scientific、分析用試薬
炭酸水素ナトリウム	: BDH
硫酸ナトリウム（無水）	: Fisher Scientific、分析用試薬
過酸化水素	: Fisher Scientific、分析用試薬
セライト 545	: BDH
メタ重亜硫酸カリウム	: Fisher Scientific、分析用試薬
水酸化ナトリウム	: BDH
カタラーゼ懸濁液	: Boehringer Mannheim
ブラックリボン濾紙（110 mm）	: Scheicher & Schuell
Sep-Pak C ₁₈	: Waters WAT51910
Sep-Pak シリカゲルカラム	: Waters WAT51900
アセトン	: Rathburn Chemicals Ltd、ガラス蒸留グレード
アセトニトリル	: Fisher Far UV
ヘキサン	: Rathburn Chemicals、ガラス蒸留グレード
メタノール	: Fisher、高純度試薬
ジクロロメタン	: Rathburn Chemicals Ltd、HPLC ガラス蒸留グレード
水	: Elgastat UHP-4
塩酸	: Fisher Scientific、分析用試薬
硫酸	: Fisher Scientific、分析用試薬
イソプロパノール	: Fisher Scientific、分析用試薬

4. 試験溶液の調製

1) 抽出

乳 (25 g) はアセトニトリル／ヘキサン (3 : 1) 混液 400 mL を加え、ろ過する。アセトニトリル層を収集し、ヘキサン 100 mL を加え、1 分間振とうする。アセトニトリル層を収集し、有機層を蒸発させ、水／イソプロパノール (1 : 1) 混液 200 mL を加える。

組織 (25 g) はメタノール 200 mL を加え、ろ過し、残留物をメタノール 25 mL で洗浄する。水／メタノール (1 : 1) 混液 200 mL を加え、ろ過し、残留物をメタノール 25 mL で洗浄する。得られたろ液と最初のろ液と合わせ、メタノールを加えて 500 mL とする。100 mL 分画を取り、有機層を蒸発させる。水を加えて 100 g とし、イソプロパノール 100 mL を加える。

2) 誘導體化、加水分解など

1) に水酸化カルシウム約 2 g 及びセライト約 10 g を加え、15 分間振とうし、ろ過する。残留物をイソプロパノール／水 (1 : 1) 混液 50 mL で洗浄する。ろ液に水酸化カリウム 2 g を加え、加熱還流下で 33% 過酸化水素水 5 mL を加える。5 M 塩酸 10 mL を加えて酸性にし、イソプロパノールを蒸発させ、液相重量を 60-70 g とし、水を加えて 80 g とする。

3) 精製

ジクロロメタンに転用した後、乳汁及び肝臓はシリカゲルカラム及びフェニルカラムで、その他の組織は、シリカゲルカラム及び C₁₈ カラムで、精製し、GC-MS で定量する。

5. 検量線の作成

カリブレーション及び抽出溶液中の DMP、OH-DP 及び DL の保持時間におけるピーク面積について測定及び記録を行い、それぞれの分析物質について検量線を作成した。ピーク面積及び濃度データがフィットした Second order function を用いた。

6. 定量

4. で調整した試料を GC-MS で定量する。

7. 測定条件

カラム	: J & W, DB-XLB, 30 m×0.25 mm id、フィルム厚 さ 0.25 μm
キャリアガス	: ヘリウム
気圧	: 15 psi
スプリット	: なし
注入温度	: 250°C
注入量	: 2 μL
温度	: 60°C2 分間、15°C/分で 60-250°C、1 分間保持 30°C/分で 250-280°C、2 分間保持 場合によっては、温度を変更する必要あり。
モニタリングイオン	: 代謝物 DMP=m/z 182, 160、RT=13.1 分 代謝物 OH-DMP=m/z 175, 143、RT=14.6 分 代謝物 DML=m/z 160, 99、RT=20.3 分

8. 定量限界

乳 0.01 ppm、組織 0.05 ppm

9. 留意事項

なし

※ 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。

テプラロキシジム試験法（畜産物（鶏））

1. 分析対象化合物

・テプラロキシジム及び酸化反応により 3-ペルヒドロピラン-4-イルペンタン-1,5-二酸 (GP)、3-ヒドロキシ-3-ペルヒドロピラン-4-イルペンタン-1,5-二酸 (OH-GP) 又は(EZ)-(RS)-2-{1-[(2E)-3-クロロアシルオキシイミノ]プロピル}-3-ヒドロキシ-5-(2-オキソペルヒドロ-ピラン-4-イル)シクロヘキサ-2-エン-1-オン (DL) に変換される代謝物

2. 装置

ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC-MS)

3. 試薬、試液

代謝物 DMP、代謝物 OH-DMP : 分析用標準品
及び代謝物 DML
水酸化カルシウム、水酸化カリウム、炭酸水素ナトリウム、無水硫酸ナトリウム、過酸化水素、セライト 545、ピロ亜硫酸カリウム、水酸化ナトリウム
カタラーゼ懸濁液 : Boehringer Mannheim, 106836
C₁₈ カラム : Sep-Pak C₁₈、Waters WAT 51910
シリカゲルカラム : Sep-Pak シリカゲルカラム、Waters WAT 51900
アセトン、アセトニトリル、ヘキサン、ジクロロメタン : HPLC 用
メタノール : 特級
水 : UHP-4 (Elgastat 製) で蒸留したもの
塩酸、硫酸、イソプロパノール : 精密分析用

4. 試験溶液の調製

1) 抽出

① 卵

均質化した試料 5 g にメタノール 50 mL を加え、3 分間磨砕抽出した後 3500 rpm で 3 分間遠心分離し、上澄液を採取する。残渣にメタノール 50 mL を加え 3 分間磨砕抽出後、遠心分離し、上澄液を採取する。残渣に蒸留水 50 mL を加え、3 分間浸漬、遠心分離し、上澄液を採取する。得られた 3 つの上澄液を合わせ、蒸留水 50 mL を加える。

② 筋肉、肝臓、脂肪

均質化した試料 5 g にメタノール 50 mL を加え、5 分間磨砕抽出した後 3500 rpm で 3 分間遠心分離し、上澄液を採取する。残渣にメタノール

50 mL を加え 5 分間磨砕抽出後、遠心分離し、上澄液を採取する。残渣に蒸留水 50 mL を加え、5 分間磨砕抽出、遠心分離し、上澄液を採取する。得られた上澄液を合わせ、蒸留水 50 mL を加える。

2) 水酸化カルシウム沈殿

1) の抽出液に水酸化カルシウム 5 g 及びセライト 10 g を加え 10 分間攪拌する。10 分間静置後、内径 95 mm のブフナー漏斗を用いて吸引ろ過する。容器及び漏斗は 50%メタノール水溶液 25 mL で洗浄する。ろ液及び洗浄液を合わせ、約 40~50 °C の水浴中、減圧条件下で約 50 mL に濃縮した後、蒸留水 20 mL とイソプロパノール 130 mL を加える。

3) 酸化

2) で得られた溶液に水酸化カリウム 2 g を加え、pH 試験紙で pH が約 13 であることを確認後、加熱還流する。30%過酸化水素 5 mL を突沸が起これないようにゆっくり加え 10 分間還流する。過酸化水素の添加と 10 分間の還流をさらに 3 回繰返した後、さらに 30 分間還流する。

試料溶液を冷却後、減圧下で約 100 mL に濃縮する。濃塩酸を加え冷却しつつ攪拌して pH を 7±1 に調整する。(酸化剤が分解され) 酸素が生成されなくなるまでカタラーゼ懸濁液を滴下する。その後ピロ亜硫酸カリウムで pH を 5.0~5.5 に調整する。ヨウ化カリウム紙ですべての酸化剤が分解されているか確認し、酸化剤が残っている場合は、再度中和、カタラーゼの添加、pH 調整を行う。

試料溶液を 500 mL の丸底フラスコに移し、元容器を蒸留水 20 mL で 2 回洗浄する。試験溶液及び洗浄液を合わせ、約 60°C の水浴でロータリーエバポレーターを用いて減圧濃縮乾固する。

4) エステル化

3) の濃縮乾固した試料にメタノール 100 mL を加え超音波浴により溶解する。フラスコを還流冷却器に接続し、コンデンサーの上部から硫酸 10 mL を徐々に加え、コンデンサーをメタノール 10 mL で洗浄する。60 分間還流後、メタノール 50 mL をコンデンサーの下部から加える。反応溶液を冷却する。

5) 精製

ジクロロメタンによる分配

4) の反応液に蒸留水 200 mL を加え分液漏斗に移し、ジクロロメタン (DCM) 100 mL で 2 回分配する。

各画分を 2 分間攪拌する。DCM 層を採り飽和重炭酸ナトリウム溶液 50 mL を加え、2 分間攪拌する。無水硫酸ナトリウムを用いてろ過する。飽和重炭酸ナトリウム溶液を DCM 50 mL で再抽出、ろ過する。2 回のろ過で得られた DCM を合せ、約 40°C、減圧下で約 20 mL に濃縮した後さらに濃縮乾固する。

シリカゲルカラムによる精製

シリカゲルカラムをヘキサン 20 mL で洗浄する（流速 3 mL/分、溶出液は捨てる）。濃縮乾固した試料に DCM 5 mL、ヘキサン 5 mL の順に加え超音波浴により溶解し、シリカゲルカラムに負荷する（流速 2 mL/分、溶出液は捨てる）。容器を DCM 10 mL で洗浄し、洗浄液をシリカゲルカラムに負荷する（溶出液は捨てる）。さらに容器を 0.5%メタノール/DCM 溶液 12 mL 及び 1.0%メタノール/DCM 溶液 12 mL でそれぞれ洗浄し、各洗浄液を順にシリカゲルカラムに負荷し、溶出液を採取する。採取した溶出液を合わせ、約 40°C で濃縮乾固する。

C₁₈ 固相抽出カラムによる精製

C₁₈ カラムをアセトニトリル 10 mL 及び蒸留水 10 mL でそれぞれ洗浄する（流速 4 mL/分、溶出液は捨てる）。濃縮乾固した試料にアセトニトリル 0.5 mL 及び蒸留水 9.5 mL の順に加え、超音波浴により溶解し、C₁₈ カラムに負荷する（流速約 2 mL/分、溶出液は捨てる）。容器を 90%アセトニトリル水溶液 12 mL で洗浄し、洗浄液を C₁₈ カラムに負荷、溶出液を採取する。容器の洗浄、C₁₈ カラムに負荷、溶出液の採取を再度繰り返す。さらに容器を 80%アセトニトリル水溶液 12 mL で洗浄し、洗浄液を C₁₈ カラムに負荷、溶出液を採取する。採取した溶出液を合わせ 60°C、減圧下で濃縮乾固する。適量のアセトンを加え超音波浴により溶解し試験溶液とする。

5. 検量線の作成

代謝物 DMP、代謝物 OH-DMP 及び代謝物 DML 標準品をアセトンに溶解し、500 µg/mL の溶液を調製する。各溶液から 10 mL 採取、混合し、アセトン 50 mL を加え標準液とする。調製した標準液をアセトンで希釈して検量線の標準液を数点調製、それぞれ GC-MS に注入しピーク面積法で検量線を作成する。

6. 定量

試験溶液を GC-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

カラム	: DB-XLB、0.25 µm (内径 0.25 mm、長さ 3000mm、アジレント製)
カラム温度	: 初期温度 60°C (2 分間保持) 60°C→250°C (15°C/分) 250°C (1 分間保持) 250°C→280°C (30°C/分) 280°C (2 分間保持)
注入口温度	: 250 °C
注入方法	: スプリットレス
注入量	: 2 µL

保持時間の目安	:	代謝物 DMP : 13.06 分 代謝物 OH-DMP : 13.73 分 代謝物 DML : 15.90 分
モニタリングイオン	:	代謝物 DMP : m/z 182、168 代謝物 OH-DMP : m/z 175、143 代謝物 DML : m/z 160、99

8. 定量限界
0.05 ppm

9. 留意事項

- マトリックスに干渉がみられる場合温度プログラムを変更する。
- メチル化において、飽和重炭酸ナトリウム添加後、CO₂ が発生するため排気が必要。

※ 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。