

ブロチゾラム試験法（案）

ブロチゾラムについては、ポジティブリスト制度導入時に設定された暫定基準の見直し、及びブロチゾラムを有効成分とする製剤（メデランチル）が承認を受けた後、所定の期間（6年）が経過したことによる再審査のため、食品安全委員会において食品健康影響評価が行われ、一日摂取許容量として0.013 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日が設定された。

この評価結果を踏まえ、平成21年7月に、薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会において、適用のある牛の残留試験結果をもとに牛の筋肉等の食用部位の基準値の見直しを行うと共に、牛の食用部位以外の畜水産物に設定された基準値を削除し、「食品に含有されるものであってはならない」（以下「不検出基準」という。）と改定することとされた。

従来、不検出基準を含む農薬等については、試験法の検出限界により規制が行われることから、規格基準の改正と同時に試験法を告示し、併せてその検出限界が別途通知されているところである。

そのため、ブロチゾラムの試験法について開発が進められてきたところ、今般、その開発が終了したため、同試験法について審議するものである。

1. 概要

(1) 分析対象の化合物

ブロチゾラム

(2) 分析対象食品

畜水産物

(3) 試験法の概要

ブロチゾラムを試料からアセトン及び*n*-ヘキサンの混液（1：1）で抽出（乳、卵及びはちみつの場合はアセトニトリルで抽出）し、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム及びトリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲル/エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラムで精製し（筋肉、脂肪、肝臓、腎臓及び魚介類の場合は精製前に酢酸エチルへの転溶及びアセトニトリル/ヘキサン分配での脱脂を追加する）、LC-MS/MSで定量及び確認する方法である。

(4) 検出限界 0.0005 mg/kg

2. 真度及び精度等の評価

10種類の畜水産物を対象として、3機関において、真度及び併行精度等の確認を行った結果、別紙1のとおり、いずれの食品においても目標値^{*}の範囲内であった。

※「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について」

（平成19年11月15日付け食安発1115001号、最終改正平成22年12月24日付け食安発1224第1号）による

3. 答申案

別紙2のとおり。

(参考) これまでの経緯

- 平成18年10月16日 厚生労働大臣から食品安全委員会委員長あてに残留基準設定に係る食品健康影響評価について要請
- 平成20年 3月13日 食品安全委員会から委員長から厚生労働大臣あてに食品健康影響評価について通知
- 平成21年 4月14日 薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会農薬・動物用医薬品部会
- 平成21年 5月20日 薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会農薬・動物用医薬品部会
- 平成21年 7月 3日 薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会
- 平成22年度 試験法開発
- 平成24年 6月～平成27年 7月
残留農薬等公示分析法検討会で随時検討
- 平成27年 8月31日 厚生労働大臣から食品安全委員会委員長あてに告示試験法改定に係る食品健康影響評価について要請
- 平成27年 9月 8日 食品安全委員会委員長から厚生労働大臣あてに回答の通知
- 平成27年 9月 7日 薬事・食品衛生審議会へ諮問
- 平成27年 9月10日 薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会農薬・動物用医薬品部会

● 薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会農薬・動物用医薬品部会

[委員]

- 石井 里枝 埼玉県衛生研究所水・食品担当部長
- 大野 泰雄 公益財団法人木原記念横浜生命科学振興財団理事長
- 尾崎 博 東京大学大学院農学生命科学研究科獣医薬理学教室教授
- 斉藤 貢一 星薬科大学薬品分析化学教室教授
- 佐々木 一昭 東京農工大学大学院農学研究院動物生命科学部門准教授
- 佐藤 清 一般財団法人残留農薬研究所技術顧問
- 佐野 元彦 東京海洋大学海洋生物資源学部門教授
- 永山 敏廣 明治薬科大学薬学部薬学教育研究センター薬学教育部門教授
- 根本 了 国立医薬品食品衛生研究所食品部第一室長
- 二村 睦子 日本生活協同組合連合会組織推進本部組合員活動部部長
- 宮井 俊一 一般社団法人日本植物防疫協会技術顧問
- 由田 克士 大阪市立大学大学院生活科学研究科公衆栄養学教授
- 吉成 浩一 静岡県立大学薬学部衛生分子毒性学分野教授
- 鰐淵 英機 大阪市立大学大学院医学研究科分子病理学教授

(○：部会長)

複数機関における検証試験結果まとめ

食品	基準値 (ppb)	添加 濃度 (ppb)	目標値			機関 1			機関 2			機関 3		
			真度 (%)	併行 精度 (RSD%)	室内 精度 (RSD%)	真度 (%)	併行 精度 (RSD%)	室内 精度 (RSD%)	真度 (%)	併行 精度 (RSD%)	室内 精度 (RSD%)	真度 (%)	併行 精度 (RSD%)	室内 精度 (RSD%)
牛の筋肉	1	1	70~120	30>	35>	89	4	4	94	4	8	83	3	7
牛の脂肪	2	2	70~120	25>	30>	97	4	5	96	4	9	86	3	7
牛の肝臓	3	3	70~120	25>	30>	92	3	3	99	3	5	83	7	12
鶏卵	不検出	0.5	70~120	30>	35>	98	2	2	90	10	11	85	5	6
牛乳	1	1	70~120	30>	35>	105	4	8	89	3	4	86	4	7
はちみつ	不検出	0.5	70~120	30>	35>	99	1	4	79	3	6	87	8	14
うなぎ	不検出	0.5	70~120	30>	35>	91	3	5	98	2	9	81	5	7
さけ	不検出	0.5	70~120	30>	35>	93	4	5	108	5	6	86	7	7
しじみ	不検出	0.5	70~120	30>	35>	93	3	5	97	5	6	85	8	8
豚の筋肉	不検出	0.5	70~120	30>	35>	99	2	6	91	3	9	87	4	6

答申（案）

(○) プロチゾラム試験法

1. 装置

液体クロマトグラフ・タンデム質量分析計を用いる。

2. 試薬, 試液

次に示すもの以外は, 第2 添加物の部C 試薬・試液等の項に示すものを用いる。

アセトニトリル 当該農薬等の成分である物質の分析の妨害物質を含まないものを用いる。

アセトン 当該農薬等の成分である物質の分析の妨害物質を含まないものを用いる。

塩化ナトリウム 当該農薬等の成分である物質の分析の妨害物質を含まないものを用いる。

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム (1,000 mg) 内径12~13 mmのポリエチレン製の
カラム管に, オクタデシルシリル化シリカゲル1,000 mgを充てんしたもの又はこれと同等の分離特性を有するものを用いる。

トリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲル/エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム (500 mg/500 mg) 内径12~13 mmのポリエチレン製のカラム管に,
上層にトリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲルを, 下層にエチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルを各500 mg充てんしたもの又はこれと同等の分離特性を有するものを用いる。

n-ヘキサン 当該農薬等の成分である物質の分析の妨害物質を含まないものを用いる。

水 蒸留水, 精製水, 純水等の化学分析に適したものを用いる。当該農薬等の成分である物質の分析の妨害物質を含む場合には, *n*-ヘキサン等の溶媒で洗浄したものを用いる。

無水硫酸ナトリウム 当該農薬等の成分である物質の分析の妨害物質を含まないものを用いる。

3. 標準品

プロチゾラム標準品 本品はプロチゾラム98%以上を含む。

4. 試験溶液の調製

a 抽出法

① 筋肉, 脂肪, 肝臓, 腎臓及び魚介類の場合

脂肪の場合は, 検体を細切均一化した後, その5.00 gを量り採る。

脂肪以外の場合は, 検体を細切均一化した後, その10.0 gを量り採る。

これにアセトン及び*n*-ヘキサン(1:1)混液50 mLを加えて細砕した後, 吸引ろ過する。ろ紙上の残留物を採り, アセトン及び*n*-ヘキサン(1:1)混液25 mLを加えて細砕した後, 上記と同様に操作する。得られたろ液を合わせ, 40℃以下で約15 mLまで濃縮する。これに飽和塩化ナトリウム溶液100 mLを加え, 酢酸エチル100 mL及び50 mLで2回振とう抽出する。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40℃以下で濃縮し, 溶媒を除去する。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 ずつで 2 回振とう抽出する。抽出液を合わせ、40°C 以下で約 5 mL まで濃縮する。

② 乳、卵及びはちみつの場合

乳及び卵の場合は、検体を均一化した後、その 5.00 g を量り採る。

はちみつの場合は、検体を均一化した後、その 5.00 g を量り採り、水 5 mL を加えて溶かす。

これにアセトニトリル 30 mL を加えて細砕した後、毎分 2,500 回転で 5 分間遠心分離し、アセトニトリル層を採る。残留物（はちみつの場合は残留物及び水層）にアセトニトリル 20 mL を加えて細砕した後、上記と同様に遠心分離する。得られたアセトニトリル層を合わせ、これに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 40°C 以下で約 5 mL まで濃縮する。

b 精製法

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム (1,000 mg) の下部にトリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲル/エチレンジアミン-*N*-*N*-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム (500 mg/500 mg) を連結し、アセトニトリル 10 mL を注入し、流出液は捨てる。この連結カラムに a 抽出法で得られた溶液を注入し、さらにアセトニトリル 10 mL を注入して全溶出液を採り、40°C 以下で濃縮し、溶媒を除去する。残留物をアセトニトリル及び水 (1:1) 混液に溶かし、正確に 5 mL (脂肪、乳、卵及びはちみつの場合は 2.5 mL) としたものを試験溶液とする。

5. 操作法

a 検量線の作成

プロチゾラム標準品のアセトニトリル及び水 (1:1) 混液の溶液を数点調製し、それぞれ液体クロマトグラフ・タンデム質量分析計に注入し、ピーク高法又はピーク面積法で検量線を作成する。なお、本法に従って試験溶液を調製した場合、試料中 0.0005 mg/kg に相当する試験溶液中濃度は 0.001 mg/L である。

b 定量試験

試験溶液を液体クロマトグラフ・タンデム質量分析計に注入し、a 検量線の作成で作成した検量線によりプロチゾラムの定量を行う。

c 確認試験

液体クロマトグラフ・タンデム質量分析計により確認する。

d 測定条件

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲル 内径 2.1 mm, 長さ 150 mm, 粒子径 3 μm

カラム温度：40°C

移動相：アセトニトリル及び 0.1 vol% ギ酸の混液 (3:7) から (7:3) までの濃度勾配を 15 分間で行う。

イオン化モード：エレクトロスプレーイオン化法 ポジティブイオンモード

主なイオン (m/z) : プリカーサーイオン 395, プロダクトイオン 316, 314

注入量 : 5 μ L

保持時間の目安 : 13 分