

アシベンゾラルS-メチル試験法（農産物）

1. 分析対象化合物

アシベンゾラルS-メチル

代謝物B【ベンゾ[1,2,3]チアジアゾール-7-カルボン酸】（加水分解により代謝物Bに変換される代謝物を含む。）

2. 適用食品

穀類、果実及び野菜

3. 装置

液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計（LC-MS/MS）

4. 試薬、試液

次に示すもの以外は、総則の3に示すものを用いる。

塩化カルシウム 塩化カルシウム（特級）

ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム（150 mg） 内径12～13 mmのポリエチレン製のカラム管に、ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体150 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。

アシベンゾラルS-メチル標準品 本品はアシベンゾラルS-メチル95%以上を含む。

代謝物B標準品 本品は代謝物B 95%以上を含む。

5. 試験溶液の調製

1) 抽出

① 穀類の場合

試料10.0 gに0.1 mol/L水酸化ナトリウム溶液40 mLを加え、密栓して60℃の水浴中で時々振り混ぜながら30分間加熱する。放冷後、メタノール100 mL及び塩化カルシウム4 gを加え、ホモジナイズした後、吸引ろ過する。ろ紙上の残留物に、メタノール50 mLを加えてホモジナイズし、上記と同様にろ過する。得られたろ液を合わせ、メタノールを加えて正確に200 mLとする。この溶液から正確に5 mLを分取し、水15 mL及び1 mol/L塩酸0.2 mLを加える。

② 果実及び野菜の場合

試料20.0 gに0.1 mol/L水酸化ナトリウム溶液40 mLを加え、密栓して60℃の水浴中で時々振り混ぜながら30分間加熱する。放冷後、メタノール100 mL及び塩化カルシウム4 gを加え、ホモジナイズした後、吸引ろ過する。ろ紙上の残留物に、メタノール50 mLを加えてホモジナイズし、上記と同様にろ過する。得られたろ液を合わせ、メタノールを加えて正確に200 mLとする。この溶液から正確に5 mLを分取し、水15 mL及び1 mol/L塩酸0.2 mLを加える。

2) 精製

ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム (150 mg) にメタノール及び水各5 mLを順次注入し、各流出液は捨てる。アクリルアミド共重合体結合グリセリルプロピルシリル化シリカゲルミニカラム (360 mg) にメタノール10 mLを注入し、流出液は捨てる。ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムに1) で得られた溶液を注入した後、0.1 vol%酢酸及びメタノール (4 : 1) 混液10 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで、このカラムの下部にアクリルアミド共重合体結合グリセリルプロピルシリル化シリカゲルミニカラムを接続し、メタノール10 mLを注入し、流出液は捨てる。ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムを取り外し、アクリルアミド共重合体結合グリセリルプロピルシリル化シリカゲルミニカラムに0.5 vol%ギ酸・メタノール溶液5 mLを注入し、溶出液を40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物を0.1 vol%酢酸及びメタノール (3 : 1) 混液に溶かして、穀類の場合は正確に5 mL、果実及び野菜の場合は正確に10 mLとしたものを試験溶液とする。

6. 検量線の作成

代謝物B標準品をメタノールに溶かして1,000 mg/Lとし標準原液とする。標準原液を0.1 vol%酢酸及びメタノール (3 : 1) 混液で希釈した溶液を数点調製し、それぞれLC-MS/MS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0.01 mg/kg (アシベンゾラル*S*-メチル換算) に相当する試験溶液中濃度は0.0005 mg/L (アシベンゾラル*S*-メチル換算) である。

7. 定量

試験溶液をLC-MS/MSに注入し、6. の検量線で代謝物Bの含量を求め、次式によりアシベンゾラル*S*-メチル [代謝物B (加水分解により代謝物Bに変換される代謝物を含む。)] の含量を求める。

アシベンゾラル*S*-メチル [代謝物B (加水分解により代謝物Bに変換される代謝物を含む。)] の含量 (ppm) = 代謝物Bの含量 (ppm) × 1.167

8. 確認試験

LC-MS/MSにより確認する。

9. 測定条件

(例)

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℃

移動相 : 0.1 vol%酢酸及びメタノール (3 : 1) 混液

イオン化モード : ESI (－)

主なイオン (*m/z*) : プリカーサーイオン179、プロダクトイオン135、107

注入量 : 5 µL

保持時間の目安 : 19分

10. 定量限界

0.01 mg/kg (アシベンゾラルS-メチル換算)

11. 留意事項

1) 試験法の概要

試料を塩基性条件下で加熱して、アシベンゾラルS-メチル及び加水分解により代謝物Bに変換される代謝物を代謝物Bに加水分解した後、メタノールで抽出し、ジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム及びアクリルアミド共重合体結合グリセリルプロピルシリル化シリカゲルミニカラムで精製し、LC-MS/MSで定量及び確認する方法である。なお、代謝物Bについて定量を行い、代謝物Bの含量に換算係数を乗じてアシベンゾラルS-メチル〔代謝物B（加水分解により代謝物Bに変換される代謝物を含む。）を含む。〕の含量に換算し、これを分析値とする。

2) 注意点

- ① 代謝物BのLC-MS/MS測定で、試験法開発時に使用したイオンを以下に示す。
定量イオン (m/z) : プリカーサーイオン179、プロダクトイオン107
定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン179、プロダクトイオン135
- ② アシベンゾラルS-メチル標準品を用いて添加回収試験を実施し、代謝物Bへの変換が十分に行われていることを確認すること。
- ③ 試料のpHが概ね4以下の場合は、試料20.0 gに1 mol/L水酸化ナトリウム溶液を加えてpH 6.5～7.5に調整し、先に加えた1 mol/L水酸化ナトリウム溶液の量と合わせて40 mLとなるように0.1 mol/L水酸化ナトリウム溶液を加えて加水分解を行うこと。
- ④ 試験溶液の調製における1)の操作では、抽出液を塩基性から酸性に調整するために1 mol/L塩酸0.2 mLを加える。pH試験紙等を用いて溶液のpHが2以下であることを確認し、必要に応じて添加量を調節する。
- ⑤ 試験法開発時に検討した食品：玄米、小麦、ほうれんそう、キャベツ、なす、いちご、バナナ、オレンジ

12. 参考文献

なし

13. 類型

C