

キザロホップエチル及びキザロホップPテフリル試験法（農産物）

1. 分析対象化合物

キザロホップエチル（キザロホップPエチルを含む。）

キザロホップPテフリル

代謝物B【2-[4-(6-クロロキノキサリン-2-イルオキシ)フェノキシ]プロピオン酸】（キザロホップPを含む。）

加水分解により代謝物Bに変換される代謝物

2. 適用食品

豆類、種実類、果実及び野菜

3. 装置

ガスクロマトグラフ・タンデム型質量分析計（GC-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。

水酸化カリウム・メタノール試液 水酸化カリウム（特級）56 gをメタノール1 Lに溶解する。

キザロホップエチル標準品 本品はキザロホップエチル95%以上を含む。

キザロホップPテフリル標準品 本品はキザロホップPテフリル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。

6-クロロ-2-メトキシキノキサリン標準品 本品は6-クロロ-2-メトキシキノキサリン95%以上を含む。

5. 試験溶液の調製

1) 6-クロロ-2-メトキシキノキサリンへの変換

豆類及び種実類の場合は、試料10.0 gを量り採る。果実及び野菜の場合は、試料20.0 gを量り採る。これに水酸化カリウム・メタノール試液200 mL及び沸騰石を加え、還流冷却器を取り付けて、90分間加熱還流した後、氷冷する。反応液を吸引ろ過し、得られたろ液にメタノールを加えて正確に250 mLとする。

2) 転溶

① 豆類及び種実類の場合

1) で得られた溶液から正確に20 mLを分取し、1 mol/L塩酸30 mLを加え、*n*-ヘキサン40 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°C以下で約2 mLに濃縮する。

② 果実及び野菜の場合

1) で得られた溶液から正確に10 mLを分取し、1 mol/L塩酸15 mLを加え、*n*-ヘキサン20 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°C以下で約2 mLに濃縮する。

3) 精製

① エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルカラムクロマトグラフィー

エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラム (500 mg) に*n*-ヘキサン10 mLを注入し、流出液は捨てる。このカラムに2) で得られた溶液を注入した後、*n*-ヘキサン10 mLを注入し、溶出液を40°C以下で約2 mLに濃縮する。

② シリカゲルカラムクロマトグラフィー

シリカゲルミニカラム (1,000 mg) に*n*-ヘキサン10 mLを注入し、流出液は捨てる。このカラムに①で得られた溶液を注入した後、*n*-ヘキサン5 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (1 : 19) 混液10 mLを注入し、溶出液を40°C以下で約2 mLに濃縮する。この溶液に酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (1 : 19) 混液を加えて、正確に4 mLとしたものを試験溶液とする。

6. 検量線の作成

6-クロロ-2-メトキシキノキサリン標準品の酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (1 : 19) 混液の溶液を数点調製し、それぞれGC-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 (代謝物B換算) に相当する試験溶液中濃度は0.002 mg/L (代謝物B換算) である。

7. 定量

試験溶液をGC-MS/MSに注入し、6. の検量線で6-クロロ-2-メトキシキノキサリンの含量を求め、次式により代謝物Bの含量を求める。

$$\text{代謝物Bの含量 (ppm)} = \text{6-クロロ-2-メトキシキノキサリンの含量 (ppm)} \times 1.771$$

8. 確認試験

GC-MS/MSにより確認する。

9. 測定条件

(例)

カラム : 5%フェニル-メチルシリコン 内径0.25 mm、長さ30 m、膜厚0.25 μm

カラム温度 : 50°C (1分) - 25°C/分 - 175°C - 10°C/分 - 225°C - 25°C/分 - 300°C (10分)

注入口温度 : 280°C

キャリアーガス : ヘリウム

イオン化モード (イオン化エネルギー) : EI (70 eV)

主なイオン (*m/z*) :

プリカーサーイオン194、プロダクトイオン165

プリカーサーイオン196、プロダクトイオン167

注入量：2 μL

保持時間の目安：8分

10. 定量限界

キザロホップエチル：0.01 mg/kg（代謝物B換算）

キザロホップPテフリル：0.01 mg/kg（代謝物B換算）

代謝物B：0.01 mg/kg

加水分解により代謝物Bに変換される代謝物：0.01 mg/kg（代謝物B換算）

11. 留意事項

1) 試験法の概要

試料に水酸化カリウム・メタノール試液を加えて加熱し、キザロホップエチル、キザロホップPテフリル及びそれらの代謝物（代謝物B及び加水分解により代謝物Bに変換される代謝物を含む。）を6-クロロ-2-メトキシキノキサリンに変換した後、*n*-ヘキサンに転溶し、エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラム及びシリカゲルミニカラムで精製した後、GC-MS/MSで定量及び確認する方法である。なお、6-クロロ-2-メトキシキノキサリンの含量に換算係数を乗じて代謝物Bの含量に換算し、これを分析値とする。代謝物Bの含量には、キザロホップエチル（キザロホップPエチルを含む。）、キザロホップPテフリル、代謝物B（キザロホップPを含む。）及び加水分解により代謝物Bに変換される代謝物が含まれる。

2) 注意点

- ① キザロホップエチル標準品、キザロホップPテフリル標準品及び代謝物B標準品を用いて添加回収試験を実施し、6-クロロ-2-メトキシキノキサリンへの変換が十分に行われていることを確認すること。
- ② 6-クロロ-2-メトキシキノキサリンは揮散しやすいため、加熱還流後は反応容器を氷冷し、1～30℃に冷却した後、還流冷却器を取り外すこと。
- ③ 転溶の際、エマルジョンが生成した場合は毎分3,000回転で5分間遠心分離するとよい。
- ④ 6-クロロ-2-メトキシキノキサリンは揮散しやすいため、濃縮操作の際は2 mL程度まで濃縮し、乾固しないこと。
- ⑤ 6-クロロ-2-メトキシキノキサリンのGC-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194、プロダクトイオン165
 - 定性イオン (*m/z*) : プリカーサーイオン196、プロダクトイオン167
- ⑥ 6-クロロ-2-メトキシキノキサリンのGC-MS/MS測定で、感度が不足する場合は以下のイオンを使用するとよい。
 - 定量イオン (*m/z*) : プリカーサーイオン165、プロダクトイオン111
 - 定性イオン (*m/z*) : プリカーサーイオン165、プロダクトイオン138
- ⑦ 試験法開発時に検討した食品：大豆、ほうれんそう、キャベツ、ばれいしょ、りんご、

いちご

12. 参考文献

なし

13. 類型

C