

※本報告書は、試験法開発における検討結果を取りまとめたものであり、試験法の実施に際して参考として下さい。なお、報告書の内容と通知または告示試験法との間に齟齬がある場合には、通知または告示試験法が優先することをご留意下さい。

食品に残留する農薬等の成分である物質の 試験法開発事業報告書

アシベンゾラルS-メチル試験法 (農産物)

アシベンゾラルS-メチル試験法（農産物）の検討結果

[緒言]

1. 目的及び試験法の検討方針

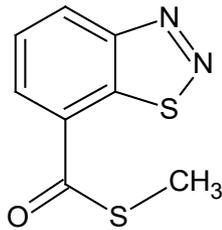
アシベンゾラルS-メチルはCiba-Geigy社(現 Syngenta社)が開発したベンゾチアジアゾール系の殺菌剤である。直接的な殺菌活性は持たず、植物の防御機能を活性化することで、種々の病原菌に対する防除効果を示すと考えられている。

食品中の残留基準値は、アシベンゾラルS-メチル及び代謝物B【ベンゾ[1,2,3]チアジアゾール-7-カルボン酸】と加水分解により代謝物Bに変換される代謝物に対して設定されているが、加水分解により代謝物Bに変換される代謝物は公示試験法の測定対象になっていない。そこで、開発メーカーの分析法を参考に、農産物中のアシベンゾラル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。〕を測定する試験法を開発することを目的とした。

2. 分析対象物質の構造式、物理化学的性質、基準値等に関する情報

1) 構造式及び物理化学的性質

① アシベンゾラルS-メチル



CAS No. *1 : 135158-54-2

化学式*1 : C₈H₆N₂OS₂

分子量*2 : 210.28

化学名(IUPAC) *1 : S-methyl benzo[1,2,3]thiadiazole-7-carbothioate

外観*2 : 白色～わずかにうすい黄色, 結晶性粉末～粉末

融点*1 : 132.9°C

沸点*1 : 267°C / 760 mmHg

蒸気圧*1 : 0.46 mPa (25°C)

溶解性*1 : 水 7.7 mg/L(20~25°C、pH 7.5~7.9)

アセトン 28 g/L、ジクロロメタン 160 g/L、酢酸エチル 25 g/L、*n*-ヘキサン 1.3 g/L、

メタノール 4.2 g/L、*n*-オクタノール 5.4 g/L、トルエン 36 g/L

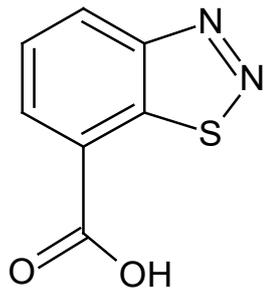
安定性*1 : 加水分解半減期(20°C) 3.8年(pH 5)、23週(pH 7)、19.4時間(pH 9)

オクタノール/水分配係数 (log K_{ow}) *1 : 3.1

(出展*1 : The Pesticide Manual 17th Edition)

(出展*2 : 富士フイルム和光純薬情報)

② 代謝物B



CAS No. *1 : 35272-27-6

化学式*1 : C₇H₄N₂O₂S

分子量*1 : 180.18

化学名(IUPAC) *1 : 1,2,3-Benzothiadiazole-7-carboxylic acid

外観 : *1ほとんど白色～わずかに薄い黄色, 結晶性粉末～粉末

融点 : *1260～264℃

溶解性 : *1アセトンに溶ける。

オクタノール/水分配係数 (log K_{ow}) *2 : 1.11

酸解離定数 (pKa) *2 : 1.35

(出展*1 : 富士フイルム和光純薬情報)

(出展*2 : ChEMBL <https://www.ebi.ac.uk/chembl/compound/inspect/CHEMBL2228257>)

2) 基準値 (生食発0320第1号 (平成31年3月20日)、農産物のみ抜粋)

アシベンゾラルS-メチルとは、アシベンゾラルS-メチル及び代謝物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。)をアシベンゾラルS-メチルに換算したものの和とする。

食品名	基準値 (ppm)
玄米 (米)	0.1
小麦	0.05
かぶ類の葉	1
クレソン	0.3
はくさい	1
キャベツ	1
芽キャベツ	1
ケール	1
こまつな	1
きょうな	1
チンゲンサイ	1
カリフラワー	1
ブロッコリー	1

食品名	基準値 (ppm)
その他のあぶらな科野菜	1
エンダイブ	0.3
しゅんぎく	0.3
レタス (サラダ菜及びちしやを含む)	0.4
その他のきく科野菜	0.3
たまねぎ	0.2
にんにく	0.2
パセリ	0.3
セロリ	0.3
その他のせり科野菜	0.3
トマト	1
ピーマン	1
なす	1
その他のなす科野菜	1
きゅうり (ガーキンを含む)	0.8
かぼちや (スカッシュを含む)	0.8
しろうり	0.8
その他のうり科野菜	0.8
ほうれんそう	1
その他の野菜	0.3
なつみかんの果実全体	0.02
レモン	0.02
オレンジ (ネーブルオレンジを含む)	0.02
グレープフルーツ	0.02
ライム	0.02
その他のかんきつ類果実	0.02
りんご	0.3
ネクタリン	0.2
あんず (アプリコットを含む)	0.2
うめ	0.2
いちご	0.2
ブルーベリー	0.2
クランベリー	0.2
その他のベリー類果実	0.2
バナナ	0.1
その他のハーブ	1

3) 参考とした開発メーカーの方法 (REM 172.11)

秤 取

| 植物試料：試料10 g

加水分解

| 水18 mL及び1 mol/L水酸化ナトリウム溶液2 mLを加える

| 水浴中55°C~60°Cで30分間加温

| 室温になるまで放冷

メタノール抽出

| メタノール80 mL及び塩化カルシウム2 g加える

| 30分間振とう

| ろ紙を用いて吸引ろ過

| 100 mLに定容

| 500 mL分液ロートに抽出液を10 mL分取する

液液抽出①

| 水50 mL、飽和塩化ナトリウム溶液40 mL及び1 mol/L塩酸8 mLを加え、振り混ぜる。

| n-ヘキサン及びMTBE (7 : 3) 混液50 mLを加えて振とうする。

| 水層は捨てる。

液液抽出②

| 1 mol/L水酸化ナトリウム溶液20 mLを加えて振とうする。

| 水層の15 mLを分取する。

液液抽出③

| 85 w/v%リン酸2 mLを加える。

| n-ヘキサン及びMTBE (7 : 3) 混液10 mLで3回抽出する。

| 溶媒除去

| 0.02 mol/Lオルトリン酸3 mLで溶解する。(試料0.25g相当/mL)

HPLC定量

50 µL注入

[実験方法]

1. 試料

1) 購入先

いちごは国産のものをインターネットを通じて入手した。その他の試料は愛知県内の小売店にて購入した。

2) 試料の採取方法

- ① 玄米及び小麦は、検体を425 μm の標準網ふるいを通して均一化した。
- ② ほうれんそう、キャベツ、なす、いちご、バナナ及びオレンジは、検体約1 kgを細切均一化した。

2. 試薬・試液等

1) 標準品

- ① アシベンズラルS-メチル標準品（純度99.5%、富士フィルム和光純薬製）
- ② 代謝物B標準品（純度99.0%、富士フィルム和光純薬製）

2) 試薬

- ① アセトニトリル、アセトン、メタノール、酢酸エチル
(残留農薬試験用300倍 富士フィルム和光純薬製)
- ② 塩化ナトリウム、酢酸、0.1 mol/L水酸化ナトリウム溶液（特級 関東化学製）
- ③ 塩化カルシウム（無水）（特級 富士フィルム和光純薬製）
- ④ ケイソウ土（セライトNo.545 富士フィルム和光純薬製）
- ⑤ 水
- ⑥ ギ酸、1 mol/L塩酸溶液（特級 富士フィルム和光純薬製）
- ⑦ 超純水、メタノール、アセトニトリル（LC/MS用 富士フィルム和光純薬製）（移動相に使用した。）
- ⑧ 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（Oasis HLB (150 mg/6 cc) Waters製）
- ⑨ 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（Sep-Pak Accell Plus QMA(360 mg) Waters製）
- ⑩ トリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム（BondElut SAX (500 mg) Agilent製）
- ⑪ 3級アルキルアミン修飾ジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム（Oasis WAX (150 mg/6 cc) Waters製）
- ⑫ トリメチルアンモニウム塩修飾メタクリレート重合体ミニカラム（InertSep MA-1(250 mg) ジーエルサイエンス製）
- ⑬ オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム（BondElut C18 (500 mg) Agilent製）
- ⑭ オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム（Sep-Pak Plus C18(360 mg) Waters製）
- ⑮ 窒素含有極性基修飾メタクリレート-スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラム（InertSep PLS-3(230 mg) ジーエルサイエンス製）

3) 標準溶液の調製方法

- ① アシベンゾラルS-メチル標準原液・・・アシベンゾラルS-メチル標準品10 mgを精密に量り採り、アセトニトリルを加えて溶解し、10 mLとした(1000 mg/L)。
- ② 代謝物B標準原液・・・代謝物B標準品10 mgを精密に量り採り、メタノールを加えて溶解し、10 mLとした(1000 mg/L)。
- ③ アシベンゾラルS-メチル添加用標準溶液 (1 mg/L)・・・アシベンゾラルS-メチル標準品10 mgを精密に量り採り、アセトンを加えて溶解し、10 mLとしたものを、さらにアセトンで1000倍に希釈したものを添加用標準溶液とした。
- ④ アシベンゾラルS-メチル添加用標準溶液 (10 mg/L)・・・アシベンゾラルS-メチル標準品10 mgを精密に量り採り、アセトンを加えて溶解し、10 mLとしたものを、さらにアセトンで100倍に希釈したものを添加用標準溶液とした。
- ⑤ アシベンゾラルS-メチル添加用標準溶液 (100 mg/L)・・・アシベンゾラルS-メチル標準品10 mgを精密に量り採り、アセトンを加えて溶解し、10 mLとしたものを、さらにアセトンで10倍に添加用標準溶液とした。
- ⑥ 代謝物B添加用標準溶液 (0.857 mg/L、アシベンゾラルS-メチル体1 mg/L相当)・・・代謝物B標準品10 mgを精密に量り採り、アセトンを加えて溶解し、10 mLとしたものを、さらにアセトンで1000倍に希釈したものを添加用標準溶液とした。
- ⑦ 代謝物B添加用標準溶液 (8.57 mg/L、アシベンゾラルS-メチル10 mg/L相当)・・・代謝物B標準品10 mgを精密に量り採り、アセトンを加えて溶解し、10 mLとしたものを、さらにアセトンで100倍に希釈したものを添加用標準溶液とした。
- ⑧ 代謝物B添加用標準溶液 (85.7 mg/L、アシベンゾラルS-メチル100 mg/L相当)・・・代謝物B標準品10 mgを精密に量り採り、アセトンを加えて溶解し、10 mLとしたものを、さらにアセトンで10倍に希釈したものを添加用標準溶液とした。

3. 装置

前処理装置	型式	メーカー
純水製造装置	Elix UV-3	メルクミリポア
フードプロセッサ	DLC-7 SUPER PRO	Cuisinart
ホモジナイザー	T-18	IKA
遠心分離機	7780 II	久保田製作所

測定装置	型式	メーカー
LC	Nexera X2	島津製作所
MS	4000 QTRAP	Sciex

4. 測定条件

LC条件																		
カラム	InertSustain C18 HP サイズ：内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm ジーエルサイエンス																	
移動相流速 (mL/分)	0.20																	
注入量 (μL)	5																	
カラム温度 (°C)	40																	
移動相	A液：0.1 vol%酢酸 B液：メタノール																	
移動相条件																		
グラジエント条件	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間 (分)</th> <th>A液 (%)</th> <th>B液 (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>75</td> <td>25</td> </tr> <tr> <td>23.0</td> <td>75</td> <td>25</td> </tr> <tr> <td>27.0</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>35.0</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> </tbody> </table>			時間 (分)	A液 (%)	B液 (%)	0	75	25	23.0	75	25	27.0	5	95	35.0	5	95
時間 (分)	A液 (%)	B液 (%)																
0	75	25																
23.0	75	25																
27.0	5	95																
35.0	5	95																
MS条件																		
測定モード	選択反応モニタリング (SRM)																	
イオン化モード	代謝物B：ESI (-) アシベンゾラルS-メチル：ESI (+)																	
キャピラリ電圧 (V)	ESI (-)：-3500、ESI (+)：3500																	
ソース温度 (°C)	600																	
コリジョンガス	窒素																	
測定イオン (代謝物B)	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>イオン (<i>m/z</i>)</th> <th>DP*¹ (V)</th> <th>CE*² (eV)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>定量イオン</td> <td>178.9>106.9</td> <td>-45</td> <td>-26</td> </tr> <tr> <td>定性イオン</td> <td>178.9>134.9</td> <td>-45</td> <td>-16</td> </tr> </tbody> </table>				イオン (<i>m/z</i>)	DP* ¹ (V)	CE* ² (eV)	定量イオン	178.9>106.9	-45	-26	定性イオン	178.9>134.9	-45	-16			
	イオン (<i>m/z</i>)	DP* ¹ (V)	CE* ² (eV)															
定量イオン	178.9>106.9	-45	-26															
定性イオン	178.9>134.9	-45	-16															
測定イオン (アシベンゾラルS-メチル)	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>イオン (<i>m/z</i>)</th> <th>DP*¹ (V)</th> <th>CE*² (eV)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>定量イオン</td> <td>210.9>136.1</td> <td>26</td> <td>41</td> </tr> <tr> <td>定性イオン</td> <td>210.9>69.0</td> <td>26</td> <td>79</td> </tr> </tbody> </table>				イオン (<i>m/z</i>)	DP* ¹ (V)	CE* ² (eV)	定量イオン	210.9>136.1	26	41	定性イオン	210.9>69.0	26	79			
	イオン (<i>m/z</i>)	DP* ¹ (V)	CE* ² (eV)															
定量イオン	210.9>136.1	26	41															
定性イオン	210.9>69.0	26	79															
保持時間	代謝物B：19.0分 アシベンゾラルS-メチル：26.7分																	

*¹ Declustering Potentialの略。カーテンプレートにかかる電圧。

*² Collision Energy (コリジョンエネルギー) の略。

5. 定量

代謝物B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、以下の濃度の標準溶液を調製した。なお、基準値はアシベンゾラルS-メチルに対して設定されているため、下記の濃度はすべてアシベンゾラルS-メチル換算濃度であり、実際の代謝物B濃度としては換算係数1.167で除した濃度である。

定量限界濃度 : 0.000125、0.00025、0.000375、0.0005、0.000625及び0.00075 mg/L

基準値濃度 (オレンジ) : 0.00025、0.0005、0.00075、0.001、0.00125及び0.0015 mg/L

基準値濃度 (小麦) : 0.000625、0.00125、0.001825、0.0025、0.003125及び0.00375 mg/L

基準値濃度 (玄米及びバナナ) : 0.00125、0.0025、0.00375、0.005、0.00625及び0.0075 mg/L

基準値濃度 (いちご) : 0.0025、0.005、0.0075、0.01、0.0125及び0.015 mg/L

基準値濃度 (ほうれんそう、なす及びキャベツ) : 0.0125、0.025、0.0375、0.05、0.0625及び0.075 mg/L

これらの標準溶液5 µLをLC-MS/MSに注入し、得られたピーク面積から絶対検量線法で検量線を作成した。検量線の作成例は図5に示した。

6. 添加試料の調製

1) 定量限界濃度 (穀類)

試料10.0 gに1 mg/LアシベンゾラルS-メチル添加用標準溶液100 µLまたは0.857 mg/L代謝物B添加用標準溶液100 µLを添加してよく混合し、30分間放置した。

2) 定量限界濃度 (野菜類及び果実類)

試料20.0 gに1 mg/LアシベンゾラルS-メチル添加用標準溶液200 µLまたは0.857 mg/L代謝物B添加用標準溶液200 µLを添加してよく混合し、30分間放置した。

3) 基準値濃度 (小麦)

試料10.0 gに1 mg/LアシベンゾラルS-メチル添加用標準溶液500 µLまたは0.857 mg/L代謝物B添加用標準溶液500 µLを添加してよく混合し、30分間放置した。

4) 基準値濃度 (玄米)

試料10.0 gに10 mg/LアシベンゾラルS-メチル添加用標準溶液100 µLまたは8.57 mg/L代謝物B添加用標準溶液100 µLを添加してよく混合し、30分間放置した。

5) 基準値濃度 (オレンジ)

試料20.0 gに1 mg/LアシベンゾラルS-メチル添加用標準溶液400 µLまたは0.857 mg/L代謝物B添加用標準溶液400 µLを添加してよく混合し、30分間放置した。

6) 基準値濃度 (バナナ)

試料20.0 gに10 mg/LアシベンゾラルS-メチル添加用標準溶液200 µLまたは8.57 mg/L代謝物B添加用標準溶液200 µLを添加してよく混合し、30分間放置した。

7) 基準値濃度 (いちご)

試料20.0 gに10 mg/LアシベンゾラルS-メチル添加用標準溶液400 µLまたは8.57 mg/L代謝物B添加用標準溶液400 µLを添加してよく混合し、30分間放置した。

8) 基準値濃度 (ほうれんそう、なす及びキャベツ)

試料20.0 gに100 mg/LアシベンゾラルS-メチル添加用標準溶液200 µLまたは85.7 mg/L代謝物B添加用標準溶液200 µLを添加してよく混合し、30分間放置した。

7. 試験溶液の調製

1) 試験法の分析操作

試料を塩基性条件下で加熱して、アシベンズラル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で定量及び確認した。

① 抽出

a 穀類の場合

試料10.0 gを250 mL容テフロン製遠心容器に量り採り、0.1 mol/L水酸化ナトリウム溶液40 mLを加えて密栓し、これを時々振り混ぜながら60°Cの水浴中で30分間加熱した後、放冷した。これにメタノール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、ケイソウ土を1 cmの厚さに敷いたろ紙を用いてすり合わせ減圧濃縮器中に吸引ろ過した。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、上記と同様にろ過した。得られたろ液を合わせ、メタノールで正確に200 mLとした。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を加えてpH 2以下に調整した。

b 果実及び野菜の場合

試料20.0 gを250 mL容テフロン製遠心容器に量り採り、0.1 mol/L水酸化ナトリウム溶液40 mLを加えて密栓し、これを時々振り混ぜながら60°Cの水浴中で30分間加熱した後、放冷した。これにメタノール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、ケイソウ土を1 cmの厚さに敷いたろ紙を用いてすり合わせ減圧濃縮器中に吸引ろ過した。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、上記と同様にろ過した。得られたろ液を合わせ、メタノールで正確に200 mLとした。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を加えてpH 2以下に調整した。

c 酸性の強い食品の場合

試料20.0 gを250 mL容テフロン製遠心容器に量り採り、1 mol/L水酸化ナトリウム溶液を加えてpH 6.5~7.5に調整した。これに、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密栓し、これを時々振り混ぜながら60°Cの水浴中で30分間加熱した後、放冷した。これにメタノール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、ケイソウ土を1 cmの厚さに敷いたろ紙を用いてすり合わせ減圧濃縮器中に吸引ろ過した。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、上記と同様にろ過した。得られたろ液を合わせ、メタノールで正確に200 mLとした。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を加えてpH 2以下に調整した。

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5 mL及び水5 mLを順次注入し、各流出液は捨てた。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、流出液は捨てた。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、さらに0.1 vol%酢酸及びメタノール混液 (4 : 1) 10 mLを注入し、流出液は捨てた。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、流出液は捨てた。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°C以下で濃縮し、溶媒を除去した。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した。

2) フローチャート

秤 取

- | 果実及び野菜 : 試料20.0 g
- | 穀類 : 試料10.0 g

加水分解

- | 穀類、果実及び野菜 : 0.1 mol/L水酸化ナトリウム溶液40 mLを加える
- |

※酸性の強い食品は、1 mol/L水酸化ナトリウム溶液を加えて約pH 6.5~7.5に調整し、0.1 mol/L水酸化ナトリウム溶液40 mLを、pH調整のために加えた1 mol/L水酸化ナトリウム溶液の液量を差し引いて加える

- | 水浴中60°C、30分間加温
- | 室温になるまで放冷

メタノール抽出

- | メタノール100 mL及び塩化カルシウム4 g加える
- | 3分間ホモジナイズ
- | ケイソウ土を1 cmの厚さに敷いたろ紙を用いて吸引ろ過
- | 残留物にメタノール50 mLを加えて3分間ホモジナイズ
- | ケイソウ土を1 cmの厚さに敷いたろ紙を用いて吸引ろ過
- | 得られた溶液を合わせ、メタノールで正確に200 mLに定容
- | 抽出液を正確に5 mL分取し、水15 mLを加える
- | 1 mol/L塩酸0.2 mLを加えてpH2以下に調整

Oasis HLB (150mg)

- | メタノール5 mL及び水5 mLで予備洗浄し、試料溶液負荷
- | 0.1 vol%酢酸及びメタノール (4 : 1) 混液10 mLで洗浄

Sep-Pak Accell Plus QMA (360 mg)

- | メタノール10 mLで予備洗浄
- | 先のOasis HLBの下部に接続
- | メタノール10 mL注入し、流出液は捨てる
- | Oasis HLBを除く
- | 0.5 vol%ギ酸・メタノール溶液5 mL注入し、溶出液を採る

- | 溶媒除去
- | 果実及び野菜: 0.1 vol%酢酸及びメタノール (3:1) 混液で正確に10 mLとする (試料0.05g相当/mL)
- | 穀類: 0.1 vol%酢酸及びメタノール (3:1) 混液で正確に5 mLとする (試料0.05g相当/mL)

LC-MS/MS定量

5 µL注入

8. マトリックス添加標準溶液の調製

ブランク試験溶液から1 mL分取し、溶媒を除去した後、添加回収試験における回収率100%相当濃度の代謝物B標準溶液1 mLを加えて溶解したものをマトリックス添加標準溶液とした。

[検討結果及び考察]

1. 測定条件の検討

1) プリカーサーイオンの検討 (スキャン測定)

メタノール及び水 (1:1) 混液で調製した0.1 mg/L代謝物B標準液をインフュージョンでESI法によるスキャン測定を行った。その結果を図1-1に示した。代謝物BはESI (-) モードで脱プロトン分子[M-H]の m/z 178.9が最も強く検出された。

したがって、代謝物BはESI (-) モードで測定される m/z 178.9をプリカーサーイオンとした。

また、メタノール及び水 (1:1) 混液で調製した0.1 mg/LアシベンゾラルS-メチル標準液をインフュージョンでESI法によるスキャン測定を行った。その結果を図1-2に示した。アシベンゾラルS-メチルはESI (+) モードでプロトン付加分子[M+H]⁺の m/z 210.9が最も高く検出された。

したがって、アシベンゾラルS-メチルはESI (+) モードで測定される m/z 210.9をプリカーサーイオンとした。

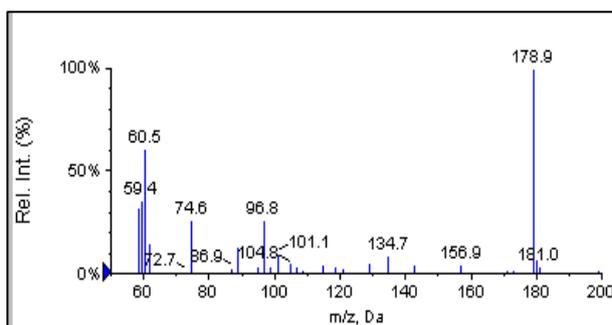


図1-1 代謝物Bのマススペクトル

スキャン範囲: m/z 50~200

測定条件: ESI (-)

Declustering Potential (以下、DP) = -45 V

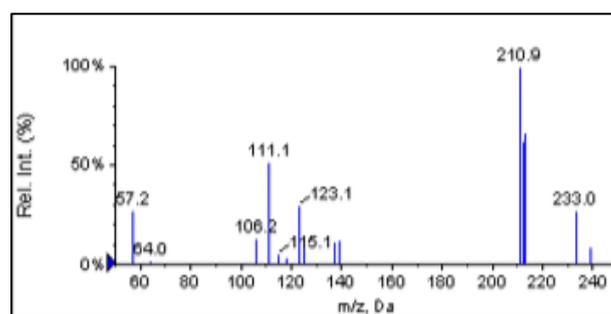


図1-2 アシベンゾラルS-メチルの

マススペクトル

スキャン範囲: m/z 50~250

測定条件: ESI (+)、DP = 26 V

2) プロダクトイオンの検討 (プロダクトイオンスキャン測定)

メタノール及び水 (1 : 1) 混液で調製した0.1 mg/L代謝物B標準液をインフュージョンでESI法によるプロダクトスキャン測定を行った。その結果を図2-1に示した。

代謝物BはESI (-) モードで m/z 178.9→106.9 (Collision Energy (以下、CE) =-26 eV) が最も高く検出された為、これを定量イオンとし、次いで高く検出された m/z 178.9→134.9 (CE=-16 eV) を定性イオンとした。

また、メタノール及び水 (1 : 1) 混液で調製した0.1 mg/LアシベンゾラルS-メチル標準液をインフュージョンでESI法によるプロダクトスキャン測定を行った。その結果を図2-2に示した。

アシベンゾラルS-メチルはESI (+) モードで m/z 210.9→136.1 (CE=41 eV) が最も高く検出された為、これを定量イオンとし、次いで高く検出された m/z 210.9→69.0 (CE=79 eV) を定性イオンとした。

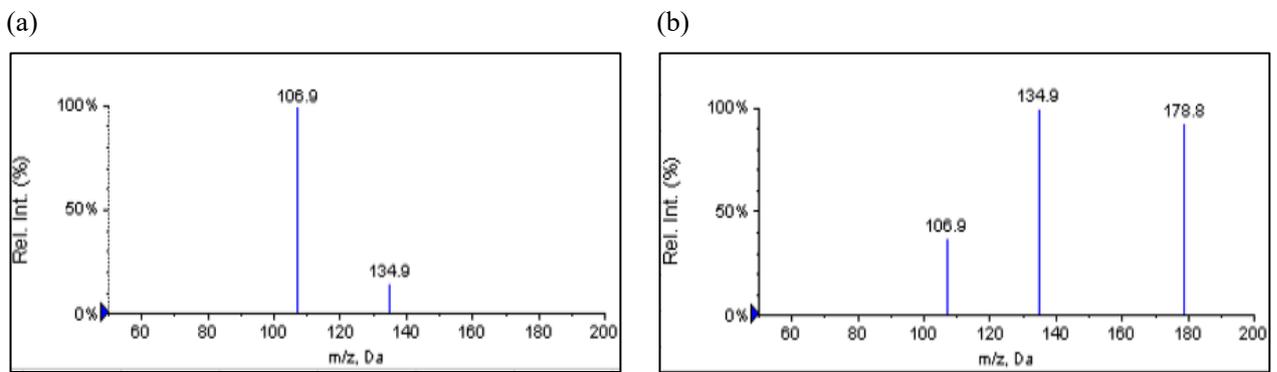


図2-1 代謝物Bのプロダクトイオンスキャンスペクトル

プリカーサーイオン： m/z 178.9、スキャン範囲： m/z 50~200、測定条件：ESI (-)

(a) DP = -45 V、CE = -26 eV、(b) DP = -45 V、CE = -16 eV

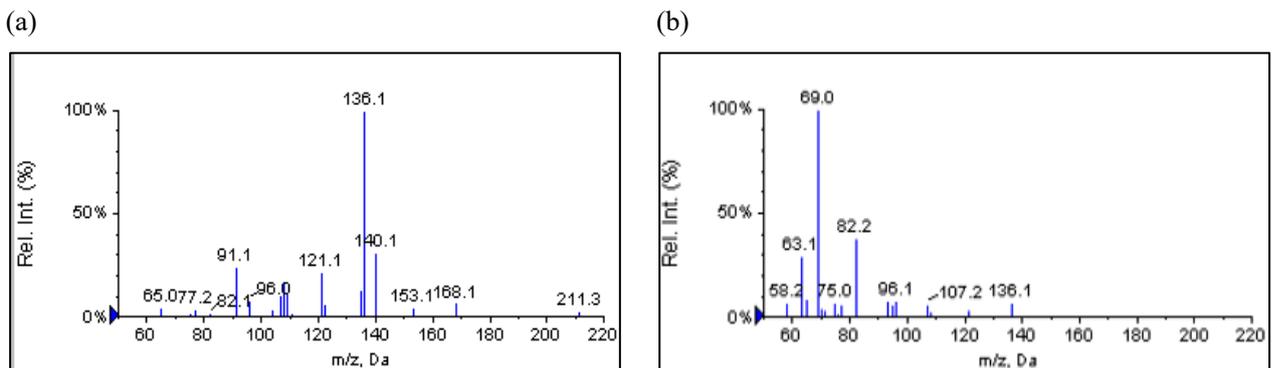


図2-2 アシベンゾラルS-メチルのプロダクトイオンスキャンスペクトル

プリカーサーイオン： m/z 210.9、スキャン範囲： m/z 50~250、測定条件：ESI (+)

(a) DP = 26 V、CE = 41 eV、(b) DP = 26 V、CE = 79 eV

3) MS条件の検討

0.1 mg/L代謝物B標準液をフローインジェクションでMS条件の最適化を行ったところ、キャピラリー電圧：-3500 V、ソース温度：600℃、DP：-45 Vで代謝物Bの定量イオン強度が最も高くなったため、この条件を採用した。

4) 移動相の検討（添加剤）

水系移動相の添加剤として酢酸（0.1 vol%）を使用した条件とギ酸（0.1 vol%）を使用した条件で0.01 mg/L代謝物B標準液を測定し、S/Nを比較した。その結果、ギ酸を用いた場合（S/N=178）より、酢酸を用いた場合（S/N=363）の方がS/Nが高かったため、移動相に用いる添加剤は酢酸を採用した。

5) 移動相に使用する添加剤濃度の検討

移動相に添加する酢酸濃度を0.1 vol%、0.2 vol%、0.5 vol%と変えて0.01 mg/L代謝物B標準液を測定し、S/Nを算出した結果を表1に示した。

最もS/Nが高かった条件は0.1 vol%酢酸の場合であったため、これを採用した。

表1 各酢酸濃度における代謝物BのS/Nの比較

	酢酸濃度		
	0.1 vol%	0.2 vol%	0.5 vol%
S/N	363	263	215

6) 分析カラムの検討

InertSustainC18 HP (ジーエルサイエンス製)、Atlantis T3 (Waters製)、L-column 3 (化学物質評価研究機構製) (いずれも内径2.1 mm、長さ150 mm、粒子径3 μm) をそれぞれ用いて測定したときの結果を図3に示した。最もピーク対称性が良好であったInertSustainC18 HPを本試験法開発では採用した。

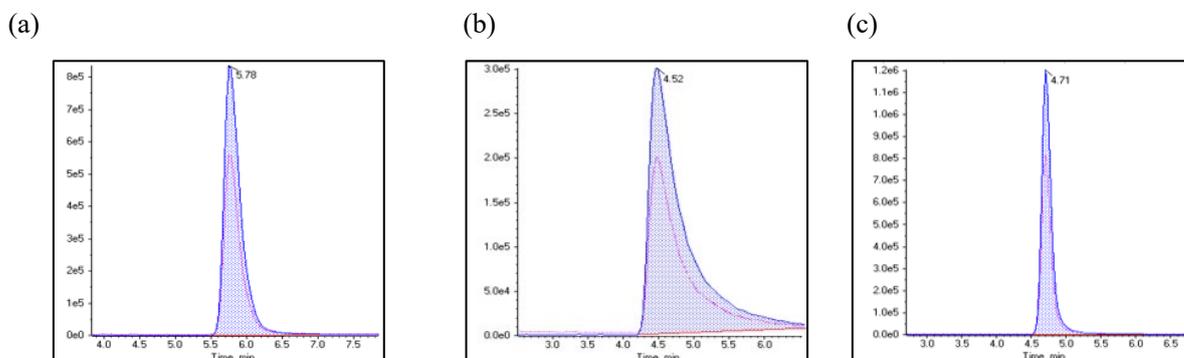


図3 代謝物Bのクロマトグラム (移動相: 0.1 vol%酢酸及びメタノール (1:1) 混液)

(a) Atlantis T3 (内径2.1 mm、長さ150 mm、粒子径3 μm Waters製)

(b) L-column 3 (内径2.1 mm、長さ150 mm、粒子径3 μm 化学物質評価研究機構製)

(c) InertSustainC18 HP (内径2.1 mm、長さ150 mm、粒子径3 μm ジーエルサイエンス製)

7) 移動相の検討 (有機溶媒)

条件によっては、玄米、小麦、ほうれんそう及びキャベツは、定性イオンではあるが代謝物Bとリテンションタイムが被る夾雑ピークが定量下限相当濃度の5~20倍程度の強度で認められた。この妨害ピークと代謝物Bのピークを十分分離できる条件として、0.1 vol%酢酸及びメタノール (3:1) 混液を採用した。なお、アシベンゾラルS-メチルは、さらにメタノール濃度を上げないと溶出しないため、アシベンゾラルS-メチルの測定条件は、4. 測定条件に示す条件を採用した。代謝物B及びアシベンゾラルS-メチルのクロマトグラム例を図4に示した。

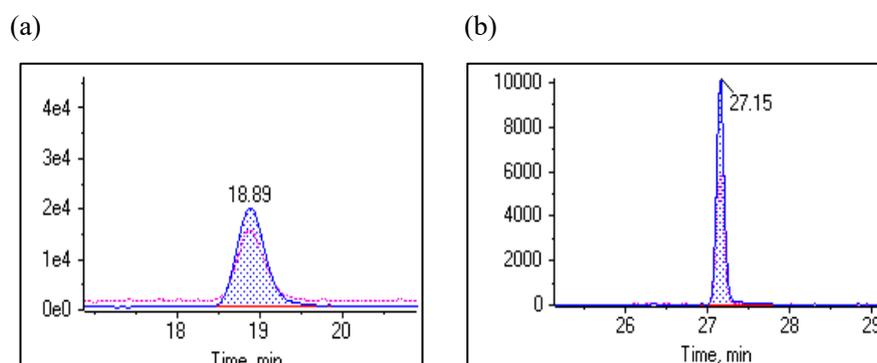


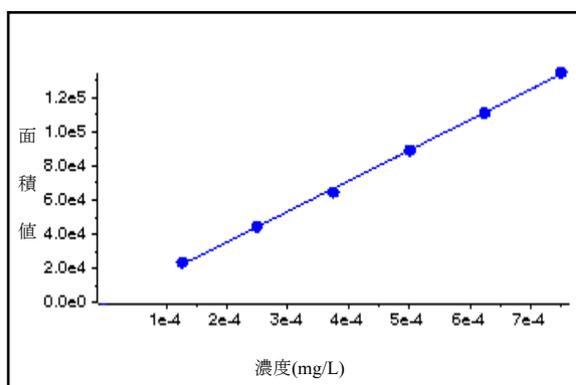
図4 代謝物B及びアシベンゾラルS-メチルのクロマトグラム

(a) 代謝物B (0.005 mg/L、注入量5 μL)

(b) アシベンゾラルS-メチル (0.01 mg/L、注入量5 μL)

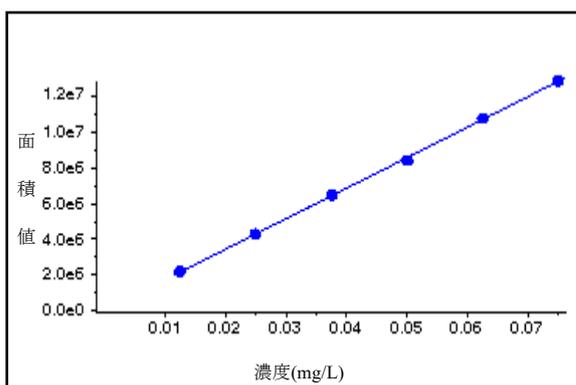
8) 検量線の直線性について

代謝物Bの検量線の例を図5-1、図5-2に、アシベンゾラルS-メチルの検量線の例を図5-3に示した。



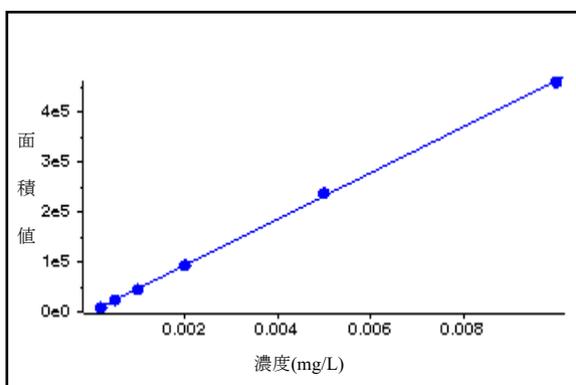
データ処理装置設定条件の一例
 データ処理ソフトウェア：MultiQuant2.1.1 (Sciex製)
 ピークの定量方法：ピーク面積法
 検量線の種類：最小二乗法
 濃度範囲：0.000125～0.00075 mg/L
 (アシベンゾラルS-メチル換算)
 検量線傾き (a)：178403000
 検量線切片 (b)：-127.4
 寄与率 (r^2)：0.9992

図5-1 代謝物Bの検量線の例 (低濃度)



データ処理装置設定条件の一例
 データ処理ソフトウェア：MultiQuant2.1.1 (Sciex製)
 ピークの定量方法：ピーク面積法
 検量線の種類：最小二乗法
 濃度範囲：0.0125～0.075 mg/L
 (アシベンゾラルS-メチル換算)
 検量線傾き (a)：170508000
 検量線切片 (b)：39585.1
 寄与率 (r^2)：0.9997

図5-2 代謝物Bの検量線の例 (高濃度)



データ処理装置設定条件の一例
 データ処理ソフトウェア：MultiQuant2.1.1 (Sciex製)
 ピークの定量方法：ピーク面積法
 検量線の種類：最小二乗法
 濃度範囲：0.0002～0.01 mg/L
 検量線傾き (a)：46224400
 検量線切片 (b)：855.6
 寄与率 (r^2)：0.9996

図5-3 アシベンゾラルS-メチルの検量線の例

9) 定量限界について

定量限界の算出結果について以下に示した。

① 穀類の場合

$$0.01 \text{ mg/kg} \left[\frac{\text{試験溶液量} 5 \text{ (mL)}}{\text{試験溶液中の試料量} 0.25 \text{ (g)}^{*1}} \times \frac{\text{分析対象化合物の定量限界相当量} 0.0025 \text{ (ng)}^{*2}}{\text{注入量} 5 \text{ (}\mu\text{L)}} \right]$$

*1 穀類：10.0 g × 5 mL / 200 mL

*2 アシベンゾラルS-メチル換算

② 野菜類及び果実類の場合

$$0.01 \text{ mg/kg} \left[\frac{\text{試験溶液量} 10 \text{ (mL)}}{\text{試験溶液中の試料量} 0.5 \text{ (g)}^{*3}} \times \frac{\text{分析対象化合物の定量限界相当量} 0.0025 \text{ (ng)}^{*4}}{\text{注入量} 5 \text{ (}\mu\text{L)}} \right]$$

*3 野菜類及び果実類：20.0 g × 5 mL / 200 mL

*4 アシベンゾラルS-メチル換算

2. 試験溶液調製法の検討

本試験法開発における加水分解反応及び試料からの抽出方法は、開発メーカーの分析法を基に検討を行った。

1) 加水分解の検討

開発メーカーの分析法では、試料10 gに水18 mL及び1 mol/L水酸化ナトリウム溶液2 mLを加えて、水浴中55～60℃で30分間加温し、加水分解を行っている。そこで、まずこの加水分解条件の確認を行った。

アシベンゾラルS-メチル40 μg（アセトンで調製した100 mg/L標準溶液400 μL）に0.1 mol/L水酸化ナトリウム溶液40 mLを加えた後、水浴中60℃で加温し、0分後、15分後、30分後、60分後の溶液を移動相で希釈した後、それぞれの溶液中の代謝物B及び未反応のアシベンゾラルS-メチルのピークを測定し、加水分解の状況を調べた。

また、いちご20.0 gにアシベンゾラルS-メチル40 μg（アセトンで調製した100 mg/L標準溶液400 μL）を加えたものも同様に、加水分解反応の回収率を求めた。その結果を表2-1、表2-2に示した。

アシベンゾラルS-メチルのピークは、水浴中60℃、30分間の加温で確認できなくなったため、加水分解反応は、水浴中60℃、30分間とした。

表2-1 加水分解反応における代謝物Bの回収率 (%)

経過時間 (分)	0	15	30	60
試料なし	88	101	<u>98</u>	100
いちご	10	88	<u>112</u>	109

供試量：アシベンゾラルS-メチル 40 μg

表2-2 加水分解反応におけるアシベンゾラルS-メチルの面積値変化

経過時間 (分)	0	15	30	60
試料なし	0	0	0	0
いちご	365220	57502	0	0

供試量：アシベンゾラルS-メチル 40 µg

2) 加水分解の検討（酸性の強い食品の場合）

レモンを始めとする酸性の強い食品の場合、試料20.0 gに対して0.1 mol/L水酸化ナトリウム溶液40 mLを加えてもpHがアルカリ性にならず、加水分解が十分行われな可能性があったため、下記の検討を行った。

オレンジ、レモン、いちごをそれぞれ20.0 g量り採り、アシベンゾラルS-メチル40 µg（アセトンで調製した100 mg/L標準溶液400 µL）を添加し30分間静置した。これに1 mol/L水酸化ナトリウム溶液を加えてpH 6.5~7.5に調整したのち、0.1 mol/L水酸化ナトリウム溶液を、pH調整のために加えた1 mol/L水酸化ナトリウム溶液の液量と合わせて40 mLになるように加えた後、水浴中60°Cで加温した。0分後、15分後、30分後、60分後の溶液を移動相で希釈した後、それぞれの溶液中の未反応のアシベンゾラルS-メチル及び代謝物Bの回収率を求めた。また、試料のpH調整前、加水分解開始時、加水分解中及び加水分解終了時のpHも測定した。その結果を表3に示した。

レモンのような酸性の強い農産物については、1 mol/L水酸化ナトリウム溶液を加えて約pH 7に調整したのち、0.1 mol/L水酸化ナトリウム溶液を加えて水浴中60°C、30分間加温することで、アシベンゾラルS-メチルを代謝物Bに変換することができると考えられる。

表3 加水分解反応における代謝物Bの回収率 (%)

マトリクス (1 mol/L NaOH添加量)	pH 調整前	pH 調整後	加水分解 0分後	加水分解 15分後	加水分解 30分後	加水分解 60分後	
いちご (1.5mL)	pH	3.45	7.49	12.02	11.61	11.57	11.47
	代謝物B(%)	-	-	85	105	97	104
	未反応物(%)	-	-	0	0	0	0
オレンジ (1.5mL)	pH	4.51	6.82	12.17	11.56	11.17	10.87
	代謝物B(%)	-	-	85	94	93	94
	未反応物(%)	-	-	13	0	0	0
レモン (9.0mL)	pH	2.97	6.80	11.37	8.89	8.08	6.94
	代謝物B(%)	-	-	95	97	89	82
	未反応物(%)	-	-	0	0	0	0
レモン (pH調整なし)	pH	2.97	-	5.46	6.37	7.00	7.23
	代謝物B(%)	-	-	0	0	0	0
	未反応物(%)	-	-	99	100	98	99

供試量：アシベンゾラルS-メチル 40 µg

3) 塩化カルシウム添加による塩析効果の検証

開発メーカーの分析法では、メタノールを用いて振とう抽出を行う際、試料10 gに2 gの塩化カルシウムを加えている。そこで、塩化カルシウム添加の効果を検証した。

小麦10.0 g及びほうれんそう20.0 gを量り採り、7. 試験溶液の調製にしたがって加水分解操作を行った後、塩化カルシウム4 gを添加したものと未添加のものと、粗抽出液の性状の比較を行った。

その結果、塩化カルシウムを添加することで、抽出液の透明度の向上、ろ過性の向上が認められたため、本試験法でも塩化カルシウムの添加を行うこととした。

4) 塩化カルシウム添加量の検討

玄米及び小麦について、試料10.0 gを加水分解した後、塩化カルシウムを2 g加えた場合と4 g加えた場合の粗抽出液の性状の比較も行った。その結果、特に違いが認められなかったため、穀類の場合の塩化カルシウムの添加量は、果実及び野菜に合わせて4 gとした。

5) アルカリ添加量の違いによる抽出の状況検討

穀類（玄米及び小麦）10.0 gに添加する0.1 mol/L水酸化ナトリウム溶液の量の違いによる回収率の状況を調べた。

玄米及び小麦10.0 gに代謝物B 10 µg（アセトンで調製した100 mg/L標準溶液100 µL）を加えた後、0.1 mol/L水酸化ナトリウム溶液20 mLまたは40 mLを加えた。これを60°Cの水浴中で30分間加熱した後、放冷した。これに、メタノール100 mLおよび塩化カルシウム4 gを加え、ホモジナイズした後、ケイソウ土を1 cmの厚さに敷いたろ紙を用いてすり合わせ減圧濃縮器中に吸引ろ過した。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、上記と同様にろ過した。得られたろ液を合わせ、メタノールで正確に200 mLとした。この溶液を移動相で希釈した後、それぞれの溶液中の代謝物Bを測定し、回収率を比較した。その結果を表4に示した。

0.1 mol/L水酸化ナトリウム溶液の添加量40 mLの方が、20 mLに比べ、回収率がわずかに良かった。果実及び野菜と操作を合わせるため、穀類に添加する0.1 mol/L水酸化ナトリウム溶液の量は40 mLとした。

表4 水酸化ナトリウム溶液量の比較（回収率（%））

	0.1 mol/L水酸化ナトリウム溶液添加量（mL）	
	20	40
玄米	102	104
小麦	95	99

供試量：代謝物B 10 µg

6) 抽出回数の検討

穀類（玄米及び小麦）10.0 g、果実及び野菜（ほうれんそう、なす、キャベツ、バナナ）20.0 g、酸性の強い食品（いちご及びオレンジ）20.0 gそれぞれに代謝物B10 µg（アセトンで調製した100 mg/L標準溶液100 µL）を添加し、「7. 試験溶液の調製 1）試験法の分析操作」にしたがって加水分解操作を行った後、メタノール100 mL、50 mL、50 mLで3回ホモジナイズ抽出し、それぞれの回収率を求めた結果を表5に示した。

下記の結果より、メタノールによる抽出は100 mL、50 mLの2回とした。

表5 メタノール抽出回収率の状況 (%)

抽出回数	1回目	2回目	3回目	合計
メタノール量 (mL)	100	50	50	
玄米	96	8	2	106
小麦	94	5	2	101
ほうれんそう	96	8	tr	104
なす	80	14	2	96
キャベツ	89	11	2	102
バナナ	88	9	tr	97
いちご	73	26	3	102
オレンジ	74	29	3	106

供試量：代謝物B 10 µg、tr：0.1 µg未満

7) 精製前のpH調整に必要な塩酸量の検討

アルカリ加水分解及びメタノール抽出後の代謝物Bを含む溶液を逆相モードでOasis HLB (150 mg)に保持させるには、水を加えて有機溶媒濃度を下げ、酸でpHを下げないと十分保持できない。本検討では、農産物8種類(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)の抽出液について、逆相モードでOasis HLB (150 mg)に保持させるのに必要な1 mol/L塩酸の量を求めた。

玄米及び小麦は試料10.0 gを、ほうれんそう、キャベツ、なす、いちご、バナナ及びオレンジは試料20.0 gを250 mL容テフロン製遠心容器にそれぞれ量り採り、「7. 試験溶液の調製 1) 試験法の分析操作」にしたがって加水分解操作及び抽出操作を行って得られた溶液を正確に5 mL分取し、代謝物B 0.2 µg (メタノールで調製した1 mg/L標準溶液200 µL)及び水15 mLを加えた。これに、1 mol/L塩酸を0.1 mLずつ加え、pHを測定した。さらにこの溶液を、あらかじめメタノール及び水各5 mLを順次注入してコンディショニングしたOasis HLB(150 mg)に注入し、流出液中の代謝物Bを測定した。

その結果、農産物8種類全てにおいて1 mol/L塩酸0.1 mL以上加えれば、代謝物BはOasis HLB(150 mg)に十分保持できることがわかった。1 mol/L塩酸0.2 mL加えたところで全ての試料においてpH 2以下となり、保持の状況は1 mol/L塩酸0.1 mLを加えた場合と0.2 mLを加えた場合と差がなかったため、本試験法では、精製前のpH調整で加える1 mol/L塩酸の量は0.2 mLとした。

8) 逆相ミニカラムによる精製の検討

試料なしで「7. 試験溶液の調製 1) 試験法の分析操作」にしたがって加水分解操作及び抽出操作を行って得られたブランク溶液5 mLに代謝物B 2 µg (メタノールで調製した10 mg/L標準溶液200 µL)及び水15 mLを加えた後、1 mol/L塩酸0.2 mLを加えた。これを、あらかじめメタノール及び水各5 mLを順次注入してコンディショニングした下記に示す4種のミニカラムにそれぞれ注入

した後、0.1 vol%酢酸及びメタノールの混液（4：1）、（3：2）、（2：3）、（1：4）、（0：10）各10 mLを順次注入し、各溶出液を得た。得られた各溶出液を移動相で希釈し、回収率を求めた。その結果を表6に示した。

今回比較検討したミニカラムの中で最も代謝物Bの保持能力が高かったのは、Oasis HLB(150 mg)であった。さらに、検討したミニカラムの中で通液性もOasis HLB(150 mg)が最も良好であったため、本試験法では、Oasis HLB(150 mg)を使用し、試料液負荷後の洗浄溶媒には、成分の溶出の認められなかった0.1 vol%酢酸及びメタノール（4：1）混液10 mLを使用することとした。

表6 ミニカラムからの溶出状況（回収率（%））

ミニカラム	試料 負荷液	0.1 vol%酢酸及びメタノール混液の比率					合計
		(4：1)	(3：2)	(2：3)	(1：4)	(0：10)	
Oasis HLB(150 mg)	0	0	0	58	41	0	99
InertSep PLS-3(230 mg)	0	0	0	82	15	0	97
Sep-pak Plus C18(360 mg)	11	47	35	0	0	0	93
BondElut C18(500 mg)	15	67	13	10	1	1	107

供試量：代謝物B 2 µg

9) Oasis HLB(150 mg)による精製の検討

Oasis HLB(150 mg)に保持した代謝物Bを溶出するメタノール量を以下のように検討した。

メタノール5 mLに代謝物B 2 µg（メタノールで調製した10 mg/L標準溶液200 µL）及び水15 mLを加えた後、1 mol/L塩酸0.2 mLを加えた。これを、あらかじめメタノール及び水各5 mLを順次注入してコンディショニングしたミニカラムに注入した後、0.1 vol%酢酸及びメタノール（4：1）混液10 mLを注入し、流出液を得た。このミニカラムにメタノール5 mLを注入し、溶出液を得る操作を3回繰り返した。得られた流出液及び溶出液を移動相で希釈し、回収率を求めた。その結果を表7に示した。

Oasis HLB(150 mg)に保持した代謝物Bは、メタノール10 mLですべて溶出していると考えられた。したがって溶出に使用するメタノール量は10 mLとした。

表7 Oasis HLB(150 mg)からの溶出状況

	試料負荷液	流出液	0～5 mL	5～10 mL	10～15 mL	合計
回収率（%）	0	0	98	3	0	101

供試量：代謝物B 2 µg、洗浄溶媒：0.1 vol%酢酸及びメタノール（4：1）混液、溶出溶媒：メタノール

1 0) 陰イオン交換ミニカラムによる精製の検討

Oasis HLBを用いた精製により、試料液中のにごりや色素の一部を除去することができたが、玄米を除くすべての試料で色素の大部分が残った。これらを除去するため、陰イオン交換による精製を以下のように検討し、4種のミニカラムから適したものを選定した。

メタノール10 mLに代謝物B 2 µg（メタノールで調製した10 mg/L標準溶液200 µL）を加えた。この溶液を、あらかじめ2 vol%ギ酸・メタノール溶液10 mL及びメタノール10 mLを順次注入してコンディショニングしたミニカラムに注入した後、メタノール10 mLを注入し、流出液を得た。このミニカラムに2 vol%ギ酸・メタノール溶液5 mLを注入し、溶出液を得る操作を3回繰り返した。得られた流出液及び溶出液を移動相で希釈し、回収率を求めた。その結果を表8に示した。

BondElut SAX(500 mg)は、試料負荷液に成分の流出が認められた。また、Sep-pak Accell Plus QMA(360 mg)はOasis WAX(150 mg)やInertSep MA-1(250 mg)に比べ、少ない溶媒量で目的成分が溶出した。したがって、本試験法ではSep-pak Accell Plus QMA(360 mg)を採用した。Sep-pak Accell Plus QMA(360 mg)による精製によって、8農産物（玄米、小麦、ほうれんそう、なす、キャベツ、バナナ、いちご、オレンジ）の全てで色素の除去効果が認められた。

なお、Sep-pak Accell Plus QMA(360 mg)は、コンディショニングにメタノール10 mLのみを使用した場合でも、代謝物Bの溶出挙動に変化はなく、Sep-pak Accell Plus QMA由来の物質による測定への影響も認められなかったことから、コンディショニングはメタノール10 mLのみとした。

表8 陰イオン交換ミニカラムからの溶出状況（回収率（%））

ミニカラム	試料負荷液	流出液	0～5 mL	5～10 mL	10～15 mL	合計
Sep-pak Accell Plus QMA(360 mg)	0	0	98	0	0	98
Oasis WAX(150 mg)	0	0	87	10	2	99
InertSep MA-1(250 mg)	0	0	92	3	0	95
BondElut SAX(500 mg)	4	6	86	0	0	96

供試量：代謝物B 2 µg、洗浄溶媒：メタノール、溶出溶媒：2 vol%ギ酸・メタノール溶液

1 1) Sep-pak Accell Plus QMA(360 mg)による精製の検討①

Sep-pak Accell Plus QMA(360 mg)に保持した代謝物Bを溶出する最適な溶媒を以下のように検討した。

メタノール10 mLに代謝物B 4 µg（メタノールで調製した10 mg/L標準溶液400 µL）を加えた。この溶液を、あらかじめメタノール10 mLを注入してコンディショニングしたSep-pak Accell Plus QMA(360 mg)に注入した後、メタノール10 mLを注入し、流出液を捨てた。このミニカラムに2 vol%酢酸・メタノール、または2 vol%ギ酸・メタノール2 mLを注入し、溶出液を得る操作を3回繰り返した。得られた溶出液を移動相で希釈し、回収率を求めた。その結果を表9に示した。

酢酸・メタノール溶液よりもギ酸・メタノール溶液の方が溶出力が高かったため、ギ酸・メタノールを採用した。

表9 Sep-pak Accell Plus QMA(360 mg)からの溶出状況 (回収率 (%))

溶出溶媒	0~2 mL	2~4 mL	4~6 mL	合計
2 vol%酢酸・メタノール溶液	79	23	0	102
2 vol%ギ酸・メタノール溶液	93	6	0	99

供試量：代謝物B 4 µg

1 2) Sep-pak Accell Plus QMA(360 mg)による精製の検討②

Sep-pak Accell Plus QMA(360 mg)に保持した代謝物Bの溶出溶媒中のギ酸濃度を以下のように検討した。

メタノール10 mLに代謝物B 4 µg (メタノールで調製した10 mg/L標準溶液400 µL)を加えた。この溶液を、あらかじめメタノール10 mLを注入してコンディショニングしたミニカラムに注入した後、メタノール10 mLを注入し、流出液を捨てた。このミニカラムに表10に示す溶出溶媒2.5 mLを注入し、溶出液を得る操作を3回繰り返した。得られた溶出液を移動相で希釈し、回収率を求めた。その結果を表10に示した。

ギ酸濃度が0.5 vol%以上のギ酸・メタノール溶液を用いた場合、5 mLの注入で十分回収できていると考えられた。したがってSep-pak Accell Plus QMAに保持した代謝物Bは、0.5 vol%ギ酸・メタノール溶液5 mLで溶出することとした。

表10 Sep-pak Accell Plus QMA(360 mg)からの溶出状況 (回収率 (%))

溶出溶媒	0~2.5 mL	2.5~5 mL	5~7.5 mL	合計
0.2 vol%ギ酸・メタノール溶液	31	62	4	97
0.5 vol%ギ酸・メタノール溶液	83	13	0	96
1 vol%ギ酸・メタノール溶液	86	13	0	99
2 vol%ギ酸・メタノール溶液	93	6	0	99

供試量：代謝物B 4 µg

1 3) Oasis HLB(150 mg)及びSep-pak Accell Plus QMA(360 mg)による精製の検討

上記検討により決定した精製方法の回収率を確認した。

メタノール5 mLに代謝物B 0.05 µg (メタノールで調製した1 mg/L標準溶液50 µL)を加えた。これに水15 mLを加えた後、1 mol/L塩酸0.2 mLを加えてpH 2以下に調整した。この溶液を、あらかじめメタノール5 mL及び水5 mLを順次注入し、コンディショニングしたOasis HLB (150 mg)に注入した後、さらに0.1 vol%酢酸及びメタノール混液 (4 : 1) 10 mLを注入し、流出液は捨てた。次いで、このカラムの下部に、あらかじめメタノール10 mLを注入し、コンディショニングしたSep-pak Accell Plus QMA (360 mg)を接続した後、メタノール10 mLを注入し、流出液は捨てた。Oasis HLB (150 mg)を取り外し、Sep-pak Accell Plus QMA (360 mg)に0.5 vol%ギ酸・メタノール溶液5 mLを注入し、溶出液を40°C以下で濃縮し、溶媒を除去した。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、正確に10 mLとしたものを試験溶液とし、回収率を求めた。

また、玄米、ほうれんそうと、1 mol/L水酸化ナトリウム溶液を加えて中和操作を行ったいちご及

びオレンジの加水分解及び抽出後のブランク溶液に代謝物B 0.05 µg（メタノールで調製した1 mg/L標準溶液50 µL）を加えたものも同様に、回収率を求めた。その結果を表11に示した。

いずれの場合も良好な回収率であった。また、試料マトリックスによる溶出挙動の変化も認められなかった。

表11 ミニカラム精製の状況

	回収率 (%)
メタノール	103
玄米	109
ほうれんそう	91
オレンジ	103
いちご	101

供試量：代謝物B 0.05 µg

3. 添加回収試験

農産物8種類（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）を用いて、試料にアシベンゾラルS-メチルまたは代謝物Bを添加して、実験方法の「7. 試験溶液の調製」に従い、定量限界濃度（0.01 mg/kg）及び基準値濃度で5併行の添加回収試験を行った。なお、いちご及びオレンジは、酸性の強い食品であるため、試料に1 mol/L水酸化ナトリウム溶液を加えてpH 6.5～pH 7.5に調整する操作を加えて添加回収試験を行った。添加回収試験における各食品のブランク試料、添加試料、回収率100%相当の溶媒標準溶液の代表的なクロマトグラムを図6～図9に示した。また、各食品のブランク試料の代表的なトータルイオンクロマトグラムを図10に示した。

1) 選択性

選択性の検討結果を表12に示した。いずれの食品においても、定量を妨害するピークは認められず、良好な選択性が得られた。

表12 選択性の評価

表1 選択性の評価

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 [検出限界] (mg/kg)	基準値 (ppm)	妨害ピークの許容範囲の評価		ピーク面積(高さ) ^{*1}						選択性 の評価 ³	備 考			
					評価濃度 (ppm)	評価基準	面積又は 高さの別	ブランク			マトリックス添加標準溶液 ^{*2}				面積(高さ) 比 (a)/(b)		
								n=1	n=2	平均 (a)	n=1	n=2				平均 (b)	
1	代謝物B	玄米	0.01	0.1	基準値 0.1	< 0.100	面積	0	0	0				#DIV/0!	#DIV/0!	○	
		小麦	0.01	0.05	基準値 0.05	< 0.100	面積	0	0	0				#DIV/0!	#DIV/0!	○	
		ほうれんそう	0.01	1.	基準値 1.	< 0.100	面積	0	0	0				#DIV/0!	#DIV/0!	○	
		キャベツ	0.01	1.	基準値 1.	< 0.100	面積	0	0	0				#DIV/0!	#DIV/0!	○	
		なす	0.01	1.	基準値 1.	< 0.100	面積	0	0	0				#DIV/0!	#DIV/0!	○	
		いちご	0.01	0.2	基準値 0.2	< 0.100	面積	0	0	0				#DIV/0!	#DIV/0!	○	
		バナナ	0.01	0.1	基準値 0.1	< 0.100	面積	0	0	0				#DIV/0!	#DIV/0!	○	
		オレンジ	0.01	0.02	定量限界 0.01	< 0.333	面積	0	0	0				#DIV/0!	#DIV/0!	○	

*1 ブランク試料、標準溶液の順に注入して測定した結果から評価する。(必要に応じて起爆注入を行う。)

*2 試料中の濃度が「評価濃度」相当になるように、ブランク試料の試験溶液で調製した標準溶液(マトリックス添加標準溶液)を用いる。
ブランク試料に妨害ピークが観察されなかった場合には、標準溶液のピーク面積(高さ)は求めなくても良い。

*3 面積(高さ)比が、妨害ピークの許容範囲の評価基準に適合する場合には「○」、適合しない場合には「×」を記載する。

2) 真度、精度及び定量限界

真度及び併行精度の検討結果を表13に示した。定量限界濃度のアシベンゾラルS-メチルでは真度84.4～106.1%、併行精度1.5～7.9%、定量限界濃度の代謝物Bでは真度84.5～92.5%、併行精度1.1～7.6%、基準値濃度のアシベンゾラルS-メチルでは真度76.8～90.2%、併行精度1.1～3.4%、基準値濃度の代謝物Bでは真度82.6～96.4%、併行精度0.6～4.8%と良好な結果が得られ、妥当性評価ガイドラインの真度及び精度の目標値を満足した。また、定量限界濃度の添加試料から得られたピークのS/Nは56～112であり、目標値（10以上）を満足した。

表13 真度、併行精度及び定量限界の評価

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 [検出限界] (mg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	定量限界 の評価 ¹⁾	検量線			回収率(%)					真度 (%)	併行精度 (RSD%)	S/N ²⁾			備考
							傾き	切片	r ² 値	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5			Max	Mn.	平均値	
1	アスピロゾラルS-メチル	玄米	0.01	0.1	0.01	S/N	178870857	2030	0.9991	104.6	103.3	103.4	104.1	115.0	106.1	4.7	102	93	98	
		玄米	0.01	0.1	0.1	—	179588000	-7630	0.9993	85.0	83.5	84.1	86.1	87.3	85.2	1.8	-	-	#DIV/0!	
		小麦	0.01	0.05	0.01	S/N	178409600	-129	0.9992	95.1	103.3	94.4	96.6	100.4	98.0	3.9	91	67	79	
		小麦	0.01	0.05	0.05	—	160393829	-3764	0.9999	84.3	84.0	87.7	89.4	87.3	86.5	2.7	-	-	#DIV/0!	
		ほうれんそう	0.01	1.	0.01	S/N	164497600	-229	0.9998	100.9	110.5	109.4	112.5	95.9	105.8	6.7	84	76	80	
		ほうれんそう	0.01	1.	1.	—	170503543	39720	0.9997	76.5	73.6	79.5	75.1	79.3	76.8	3.4	-	-	#DIV/0!	
		キャベツ	0.01	1.	0.01	S/N	164561371	-1785	0.9996	100.4	100.6	102.5	100.2	103.6	101.5	1.5	83	77	80	
		キャベツ	0.01	1.	1.	—	186080229	240640	0.9993	85.6	84.8	83.4	85.9	85.0	84.9	1.1	-	-	#DIV/0!	
		なす	0.01	1.	0.01	S/N	181622400	535	0.9994	95.2	91.3	94.2	90.5	91.6	92.6	2.2	91	90	91	
		なす	0.01	1.	1.	—	172100800	92773	0.9997	82.3	78.9	80.9	80.2	79.3	80.3	1.7	-	-	#DIV/0!	
		いちご	0.01	0.2	0.01	S/N	153989143	-1171	0.9943	97.9	96.0	103.5	89.6	96.1	96.6	5.1	72	50	61	
		いちご	0.01	0.2	0.2	—	156781371	-31179	0.9993	89.7	89.0	88.1	92.9	87.9	89.5	2.3	-	-	#DIV/0!	
		バナナ	0.01	0.1	0.01	S/N	184705371	5	0.9981	83.2	88.7	87.1	85.8	85.8	86.1	2.3	78	65	72	
		バナナ	0.01	0.1	0.1	—	147335543	19385	0.9994	86.2	88.2	88.4	88.1	86.0	87.4	1.3	-	-	#DIV/0!	
		オレンジ	0.01	0.02	0.01	S/N	153989143	-1171	0.9943	88.0	89.8	89.8	78.5	76.0	84.4	7.9	68	44	56	
		オレンジ	0.01	0.02	0.02	—	153984457	233	0.9992	93.8	87.6	93.2	86.6	87.9	90.2	3.4	-	-	#DIV/0!	
2	代謝物B	玄米	0.01	0.1	0.01	S/N	178409600	-129	0.9992	93.9	92.0	92.0	91.5	93.2	92.5	1.1	70	64	67	
		玄米	0.01	0.1	0.1	—	173293257	-22968	0.9994	84.7	87.8	94.1	93.0	89.3	89.8	4.3	-	-	#DIV/0!	
		小麦	0.01	0.05	0.01	S/N	154301943	-6308	0.9891	79.2	88.7	87.0	95.3	95.7	89.2	7.6	82	52	67	
		小麦	0.01	0.05	0.05	—	151296229	-22069	0.9999	85.3	84.9	93.1	93.9	91.7	89.8	4.8	-	-	#DIV/0!	
		ほうれんそう	0.01	1.	0.01	S/N	156196114	-663	0.9990	91.3	89.5	90.5	91.8	88.8	90.3	1.4	84	81	83	
		ほうれんそう	0.01	1.	1.	—	164786971	236553	0.9998	83.4	84.9	84.6	83.5	81.5	83.6	1.6	-	-	#DIV/0!	
		キャベツ	0.01	1.	0.01	S/N	151690514	-1116	0.9994	89.5	90.0	93.3	93.7	94.4	92.2	2.5	79	77	78	
		キャベツ	0.01	1.	1.	—	191816914	147193	0.9998	83.7	82.9	84.1	84.0	83.8	83.7	0.6	-	-	#DIV/0!	
		なす	0.01	1.	0.01	S/N	179763657	172	0.9995	87.2	87.1	89.6	92.3	92.1	89.7	2.8	119	105	112	
		なす	0.01	1.	1.	—	173242514	-3627	0.9996	83.1	82.3	84.7	86.9	83.7	84.1	2.1	-	-	#DIV/0!	
		いちご	0.01	0.2	0.01	S/N	109259657	-269	0.9980	95.2	88.9	83.4	94.0	87.5	89.8	5.4	63	51	57	
		いちご	0.01	0.2	0.2	—	156781371	-31179	0.9993	97.4	94.2	93.4	98.7	98.1	96.4	2.5	-	-	#DIV/0!	
		バナナ	0.01	0.1	0.01	S/N	181622400	535	0.9994	85.7	88.8	91.1	89.2	86.9	88.3	2.4	81	65	73	
		バナナ	0.01	0.1	0.1	—	150312229	14441	0.9987	87.2	88.2	94.9	86.4	85.5	88.4	4.2	-	-	#DIV/0!	
		オレンジ	0.01	0.02	0.01	S/N	109259657	-269	0.9980	87.3	88.3	83.7	84.6	78.4	84.5	4.6	69	43	56	
		オレンジ	0.01	0.02	0.02	—	120390514	-6994	0.9954	80.0	82.5	83.8	82.6	84.4	82.6	2.0	-	-	#DIV/0!	

*1 S/Nを求める必要がある場合には「S/N」と表示される。

*2 得られた回収率の中で最大値を与えるピーク(Max.)及び最小値を与えるピーク(Mn.)のそれぞれのS/Nを求める。

3) 試料マトリックスの測定への影響

試料マトリックスの測定への影響について検討した結果を表14に示した。添加回収試験における回収率100%相当濃度に調製したマトリックス添加標準溶液のピーク面積と、溶媒で回収率100%相当濃度に調製した溶媒添加標準溶液とのピーク面積の比を求めて評価した。面積比は0.97~1.12であり、試料マトリックスの測定への影響は小さいと考えられた。

表14 試料マトリックスの測定への影響

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 [検出限界] (mg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	標準溶液 濃度 ¹⁾ (mg/L)	面積又は 高さの別	ブランク ³⁾	ピーク面積(高さ) ²⁾						備考
									マトリックス添加標準溶液 ⁴⁾			溶媒標準溶液			
								n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均		
1	代謝物B	玄米	0.01	0.1	0.01	0.001	面積	0	89413	92851	91132	92219	87912	90066	1.01
		玄米	0.01	0.1	0.1	0.01	面積	0	895610	911750	903680	889390	872790	881090	1.03
		小麦	0.01	0.05	0.01	0.001	面積	0	87968	84067	86018	89438	85343	87391	0.98
		小麦	0.01	0.05	0.05	0.005	面積	0	397710	391650	394680	397750	388750	388750	1.02
		ほうれんそう	0.01	1.	0.01	0.001	面積	0	92338	88920	90629	82805	79203	81004	1.12
		ほうれんそう	0.01	1.	1.	0.1	面積	0	9230200	9252100	9241150	8417500	8560100	8488800	1.09
		キャベツ	0.01	1.	0.01	0.001	面積	0	84110	86692	85401	80818	77737	79278	1.08
		キャベツ	0.01	1.	1.	0.1	面積	0	9841300	10049000	9945150	9686700	9785500	9736100	1.02
		なす	0.01	1.	0.01	0.001	面積	0	94453	94881	94667	90971	90798	90885	1.04
		なす	0.01	1.	1.	0.1	面積	0	9481300	9533500	9507400	8749200	8671900	8710550	1.09
		いちご	0.01	0.2	0.01	0.001	面積	0	58338	55718	57028	52877	59173	56025	1.02
		いちご	0.01	0.2	0.2	0.02	面積	0	1505900	1484900	1495400	1555900	1540300	1548100	0.97
		バナナ	0.01	0.1	0.01	0.001	面積	0	95035	94339	94687	88677	92747	90712	1.04
		バナナ	0.01	0.1	0.1	0.01	面積	0	805440	791630	798535	763770	787790	775780	1.03
		オレンジ	0.01	0.02	0.01	0.001	面積	0	54583	57348	55966	52756	58717	55737	1.00
		オレンジ	0.01	0.02	0.02	0.002	面積	0	116150	114990	115570	108380	121160	114770	1.01

*1 添加回収試験における回収率100%相当濃度になるように、ブランク試料の試験溶液で調製した標準溶液(マトリックス添加標準溶液)及び溶媒で調製した標準溶液(溶媒標準溶液)を作成する。

*2 マトリックス添加標準溶液及び溶媒標準溶液の順に交互に2回以上測定した結果から評価する。(必要に応じて燃焼注入を行う。)

*3 ブランクにピークが認められた場合には、マトリックス添加標準溶液の値はブランク値を差し引いた値を用いる。

*4 マトリックス添加標準溶液は試験当日のブランク試料の試験溶液を用いて調製する。

*5 マトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積(又は高さ)の比を求める。

[添加回収試験における代表的なクロマトグラム]

低濃度群

アシベンゾラルS-メチル添加 (ESI(-)、青線 (定量イオン) : m/z 178.9>106.9、赤線 (定性イオン) : m/z 178.9>134.9)

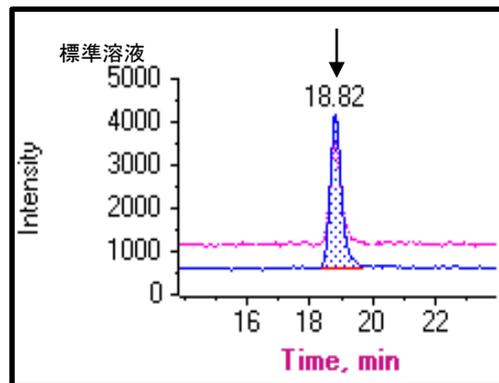
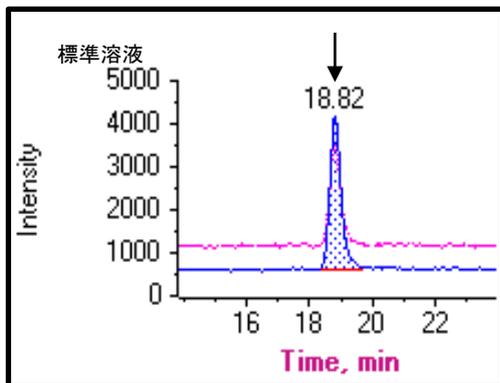
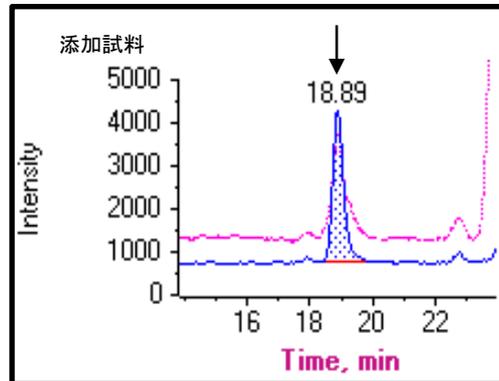
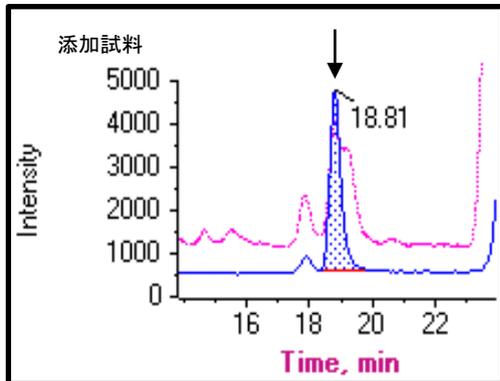
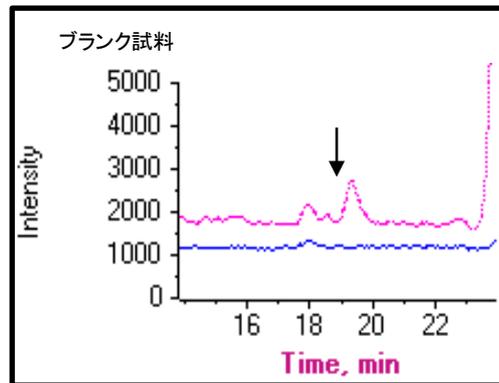
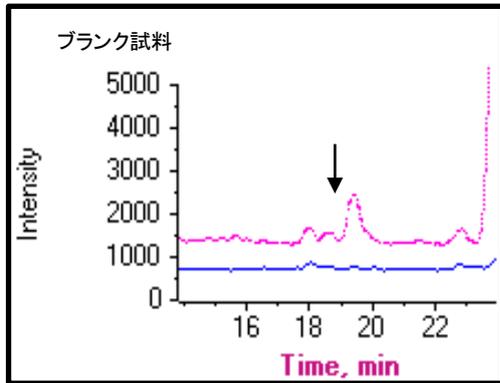


図6-1 玄米のSRMクロマトグラム
(添加濃度 0.01 ppm)

図6-2 小麦のSRMクロマトグラム
(添加濃度 0.01 ppm)

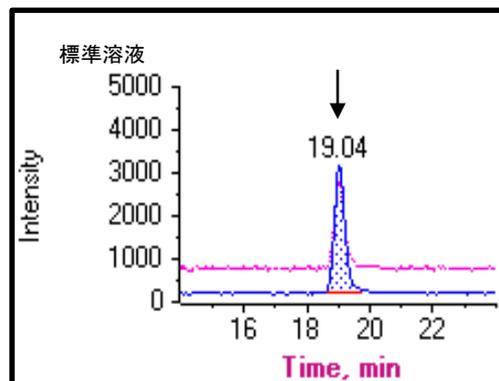
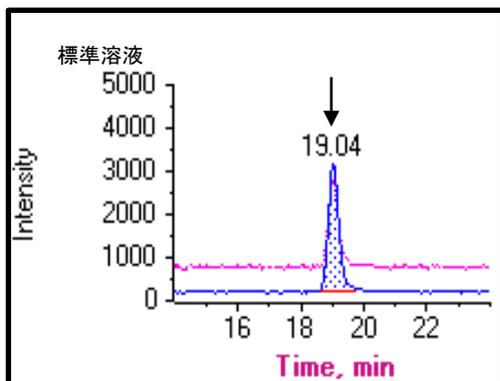
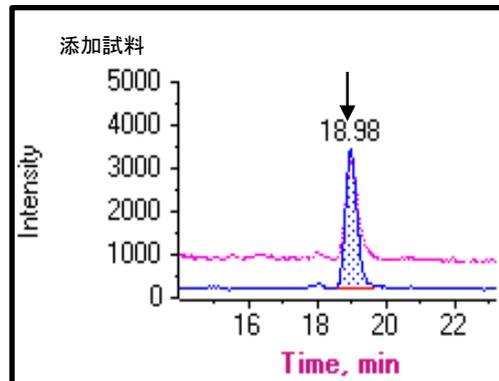
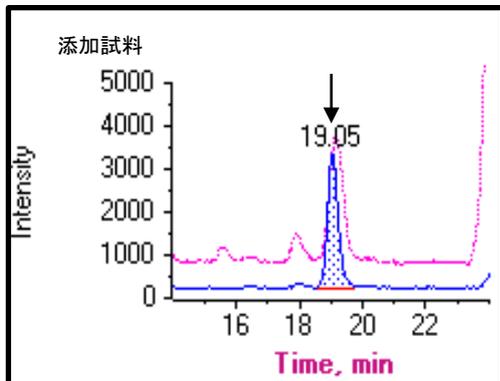
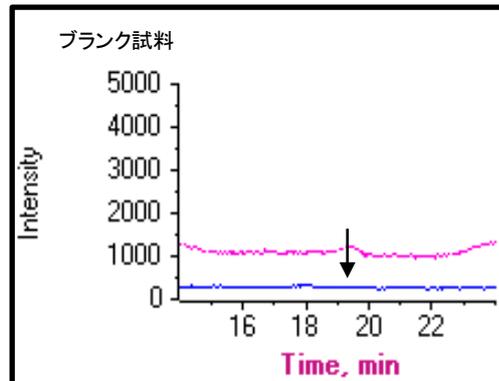
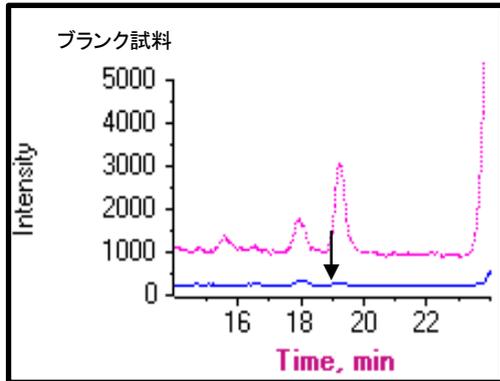


図6-3 ほうれんそうのSRMクロマトグラム
(添加濃度 0.01 ppm)

図6-4 キャベツのSRMクロマトグラム
(添加濃度 0.01 ppm)

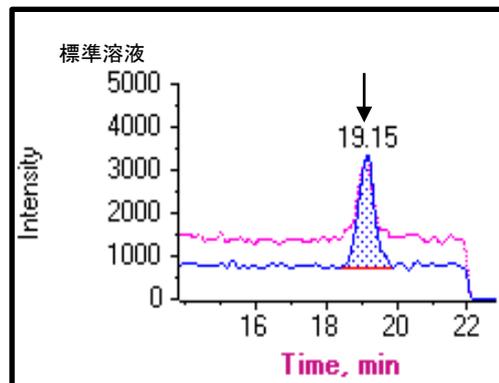
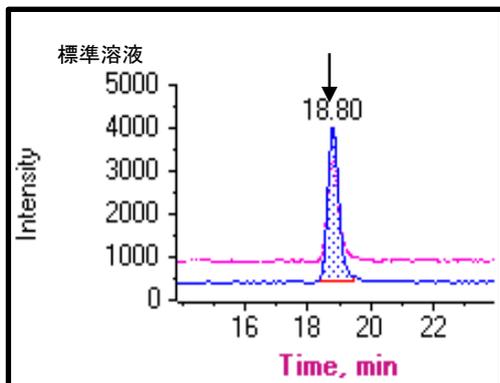
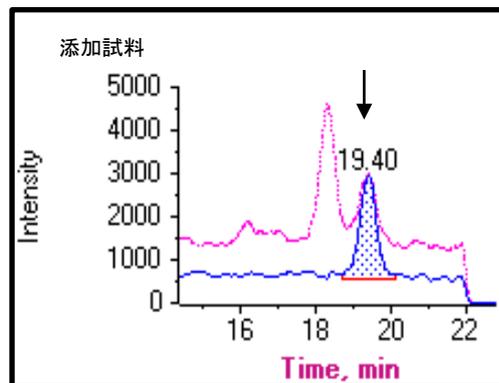
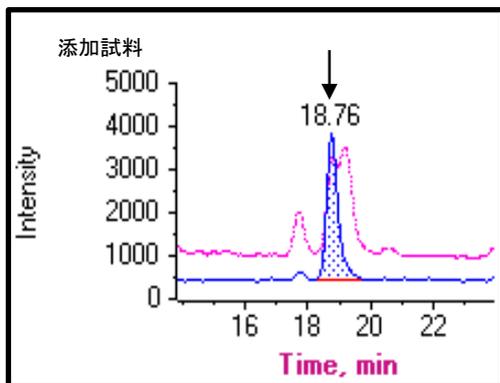
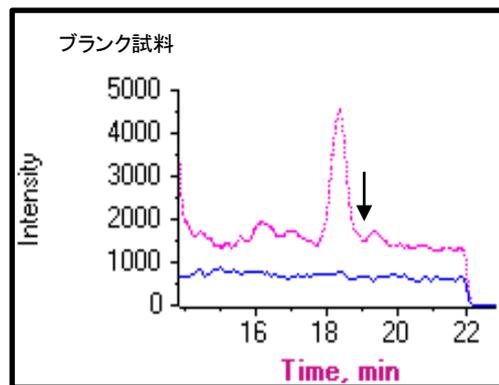
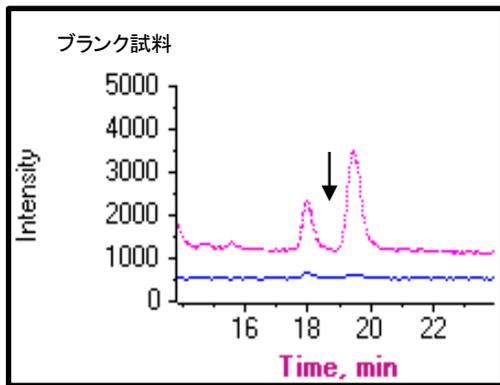


図6-5 ナスのSRMクロマトグラム
(添加濃度 0.01 ppm)

図6-6 いちごのSRMクロマトグラム
(添加濃度 0.01 ppm)

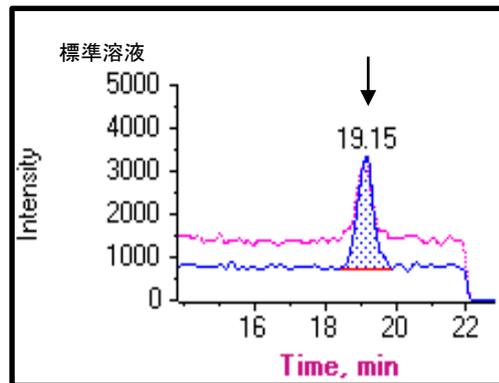
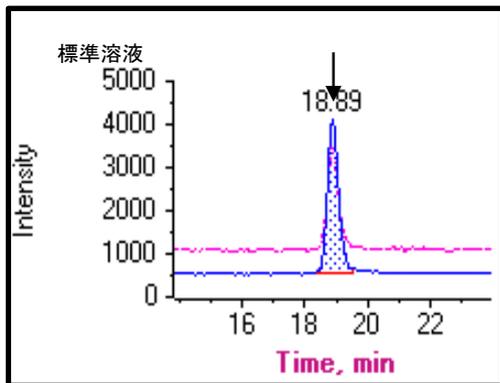
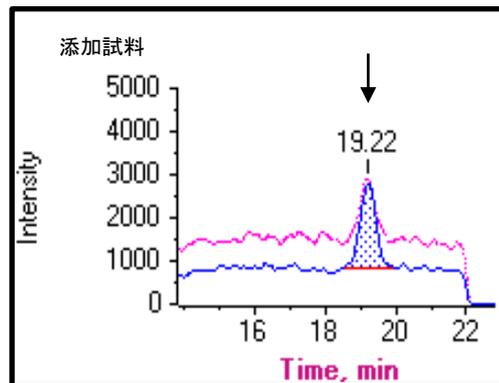
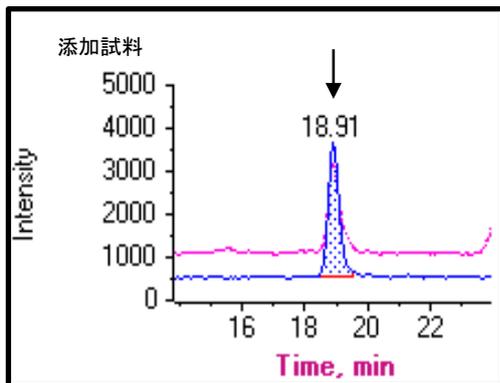
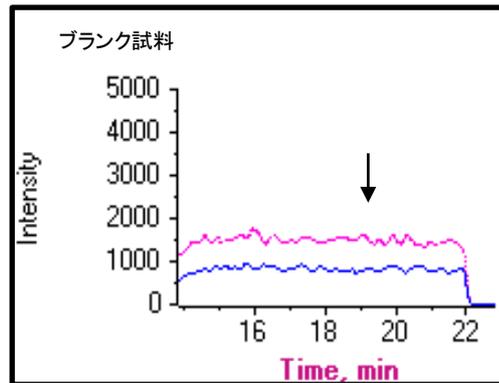
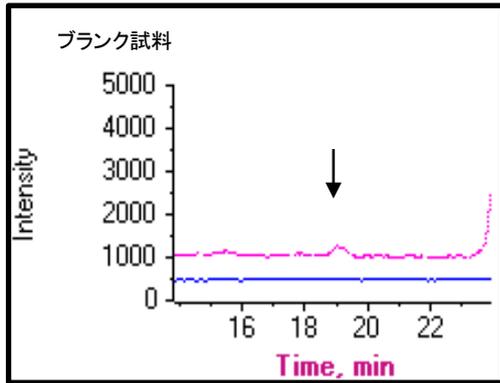


図6-7 バナナのSRMクロマトグラム
(添加濃度 0.01 ppm)

図6-8 オレンジのSRMクロマトグラム
(添加濃度 0.01 ppm)

低濃度群

代謝物B添加 (ESI (-)、青線 (定量イオン) : m/z 178.9>106.9、赤線 (定性イオン) : m/z 178.9>134.9)

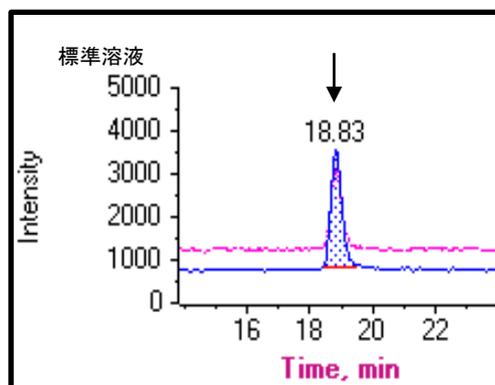
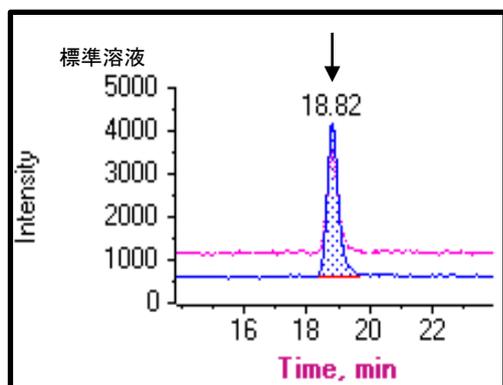
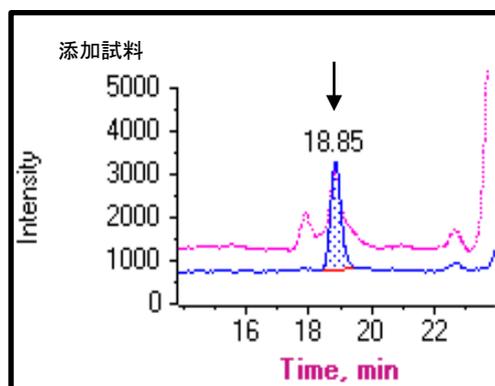
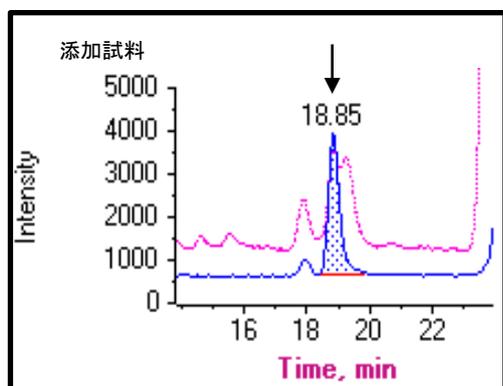
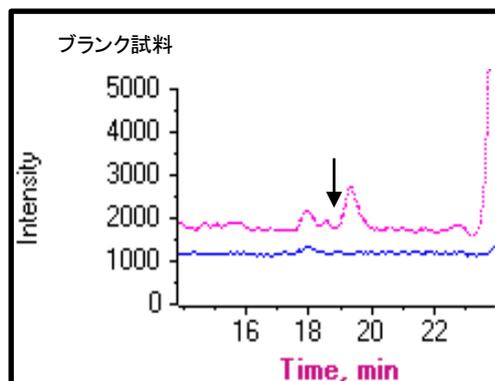
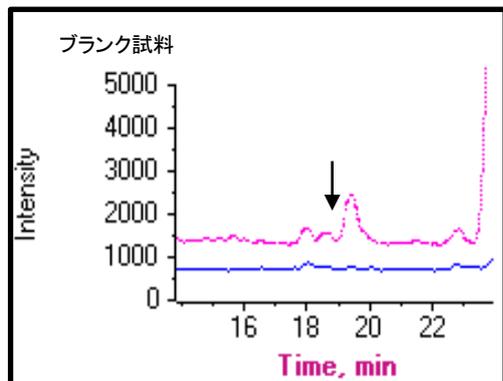


図7-1 玄米のSRMクロマトグラム

(添加濃度 0.00857 ppm)

※アシベンズラルS-メチル 0.01 ppm相当

図7-2 小麦のSRMクロマトグラム

(添加濃度 0.00857 ppm)

※アシベンズラルS-メチル 0.01 ppm相当

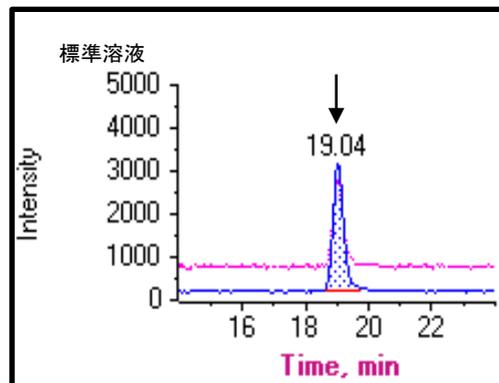
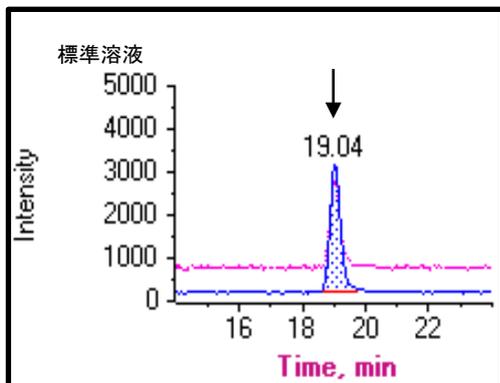
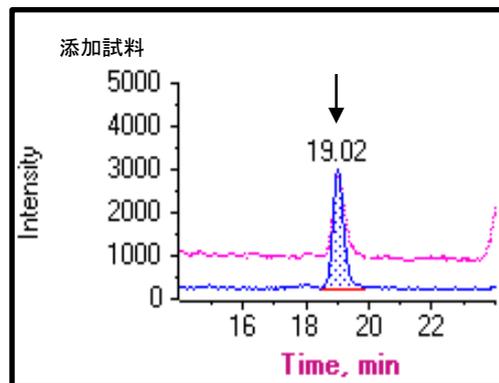
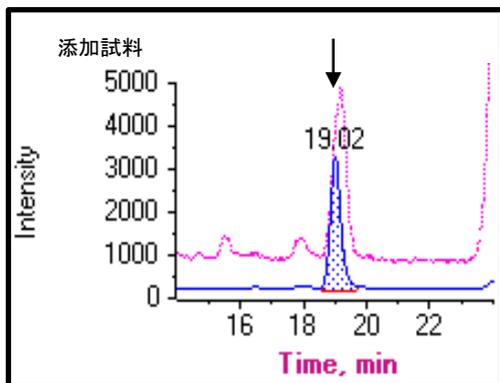
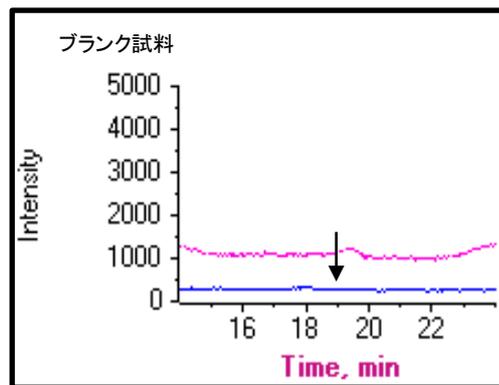
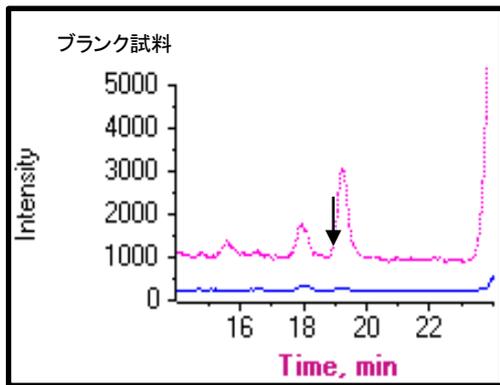


図7-3 ほうれんそうのSRMクロマトグラム
(添加濃度 0.00857 ppm)

※アシベンゾラルS-メチル 0.01 ppm相当

図7-4 キャベツのSRMクロマトグラム
(添加濃度 0.00857 ppm)

※アシベンゾラルS-メチル 0.01 ppm相当

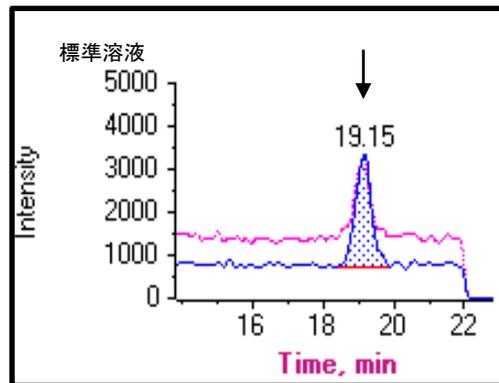
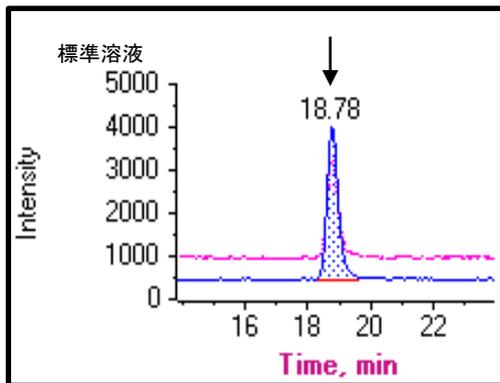
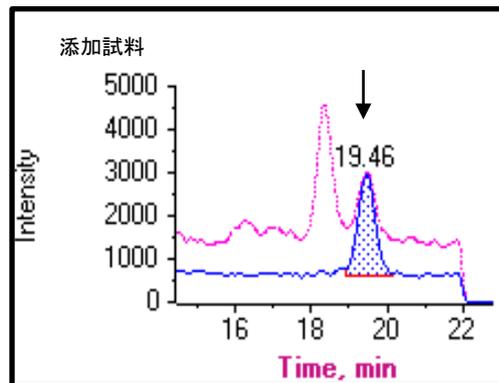
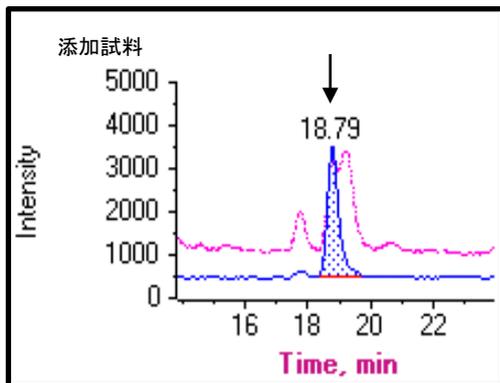
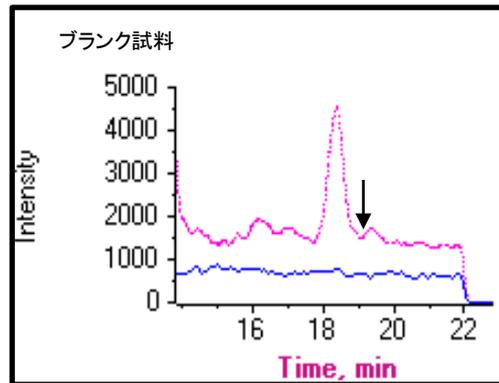
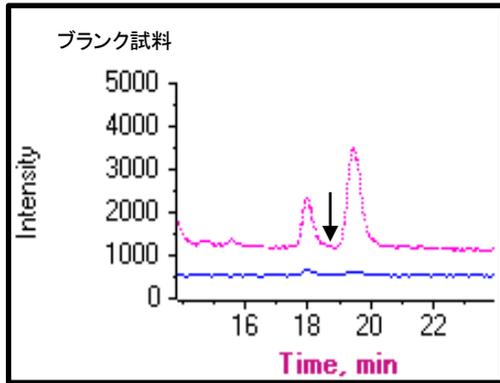


図7-5 なすのSRMクロマトグラム
(添加濃度 0.00857 ppm)

※アシベンズラルS-メチル 0.01 ppm相当

図7-6 いちごのSRMクロマトグラム
(添加濃度 0.00857 ppm)

※アシベンズラルS-メチル 0.01 ppm相当

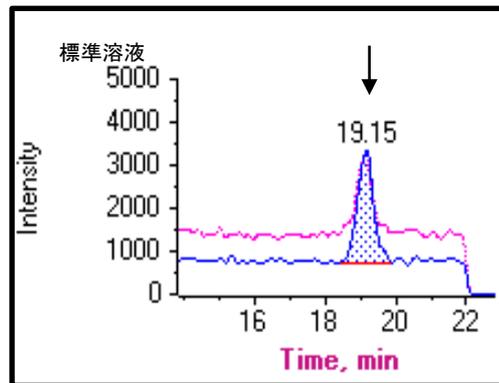
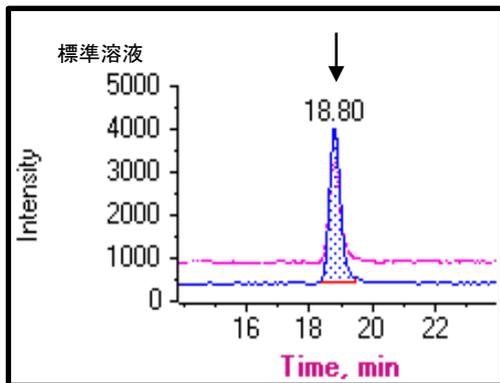
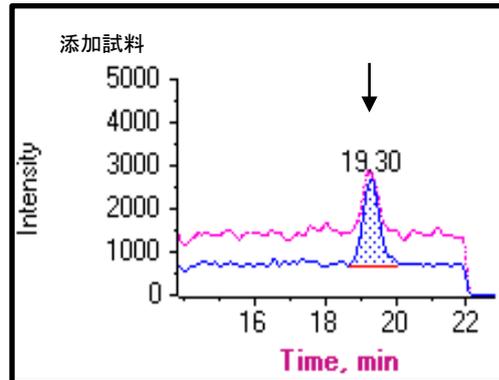
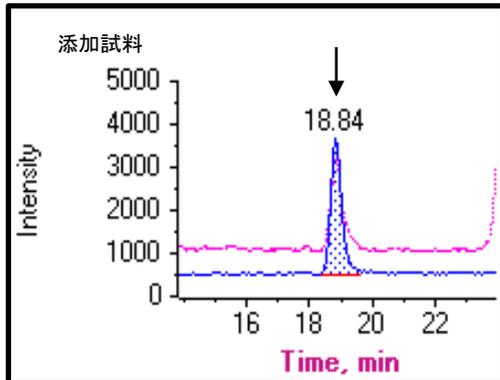
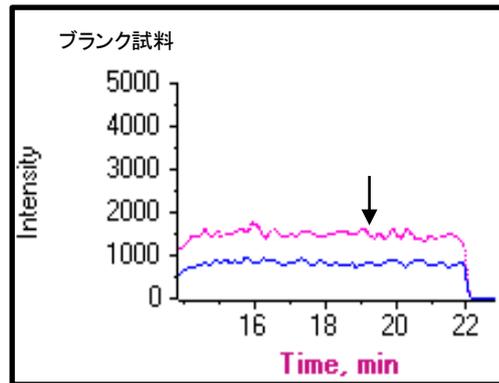
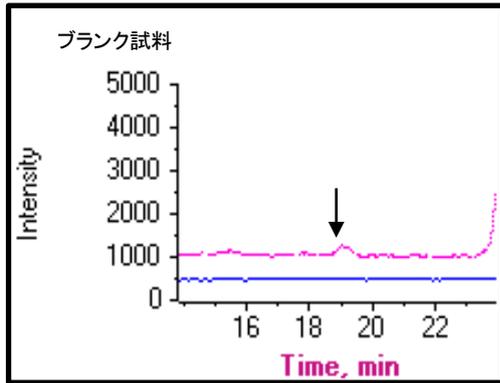


図7-7 バナナのSRMクロマトグラム
(添加濃度 0.00857 ppm)

図7-8 オレンジのSRMクロマトグラム
(添加濃度 0.00857 ppm)

※アシベンズラルS-メチル 0.01 ppm相当

※アシベンズラルS-メチル 0.01 ppm相当

高濃度群

アシベンズラルS-メチル添加 (ESI(-)、青線 (定量イオン) : m/z 178.9>106.9、赤線 (定性イオン) : m/z 178.9>134.9)

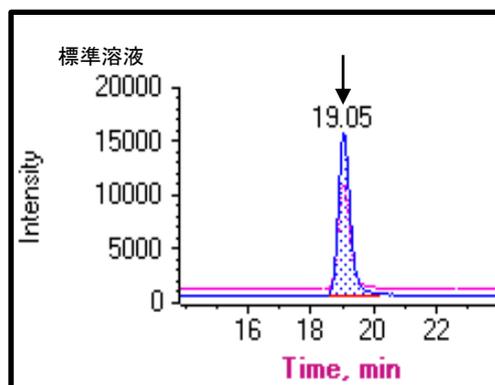
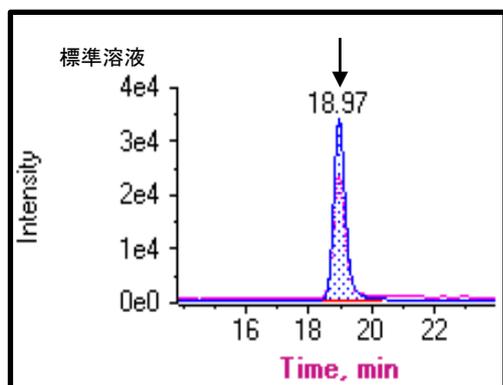
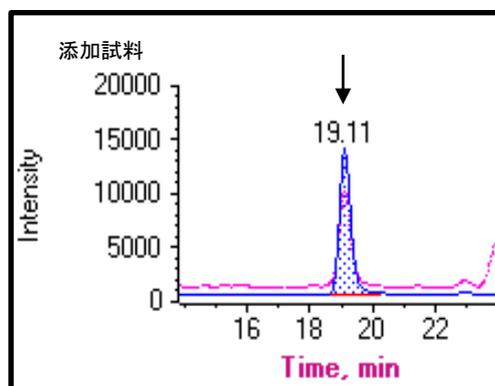
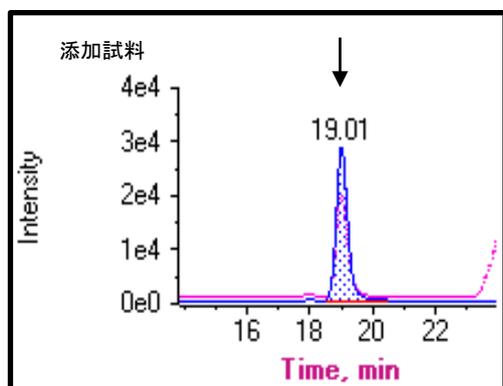
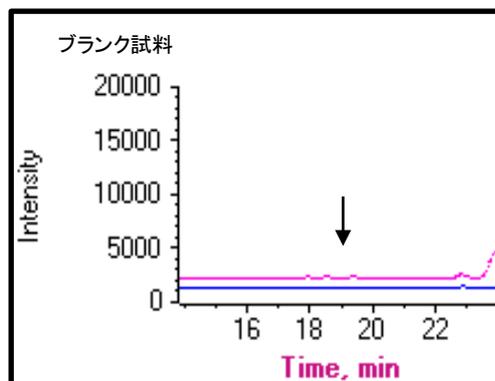
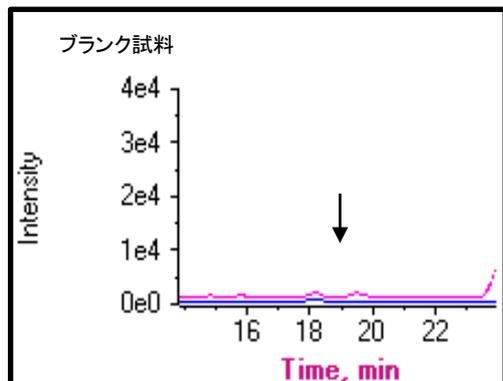


図8-1 玄米のSRMクロマトグラム
(添加濃度 0.1 ppm)

図8-2 小麦のSRMクロマトグラム
(添加濃度 0.05 ppm)

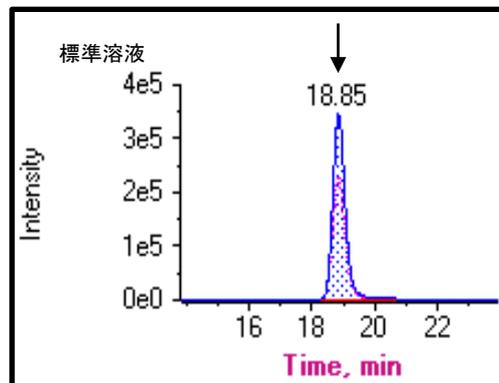
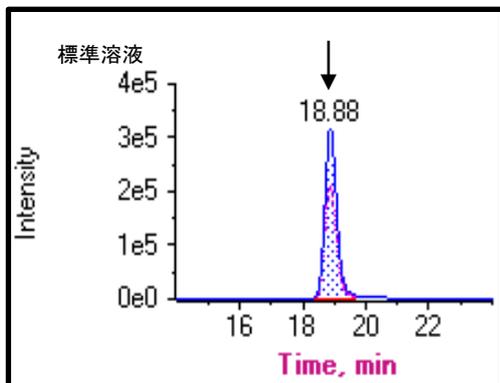
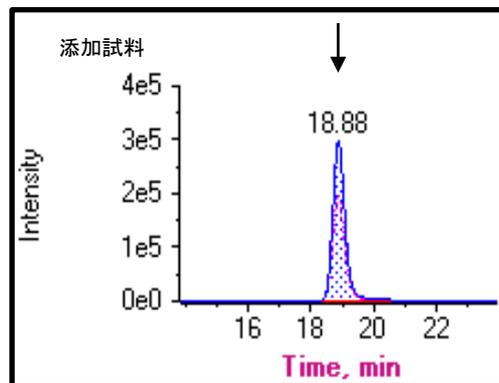
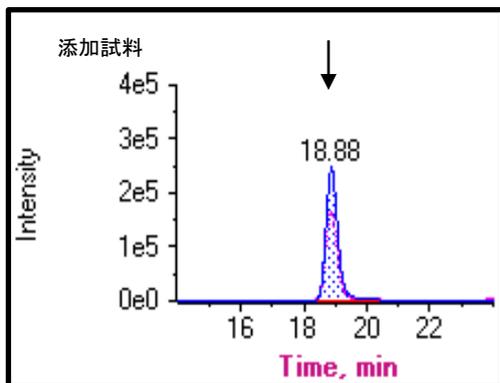
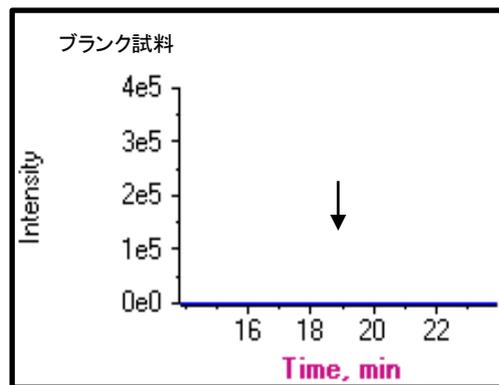
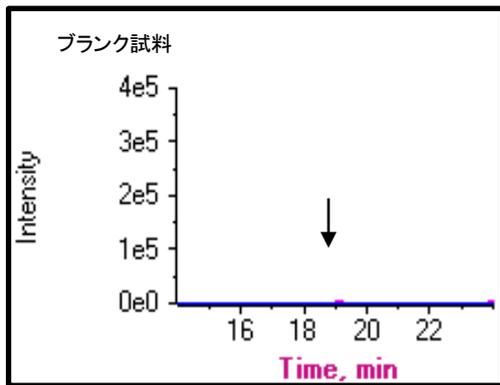


図8-3 ほうれんそうのSRMクロマトグラム
(添加濃度 1 ppm)

図8-4 キャベツのSRMクロマトグラム
(添加濃度 1 ppm)

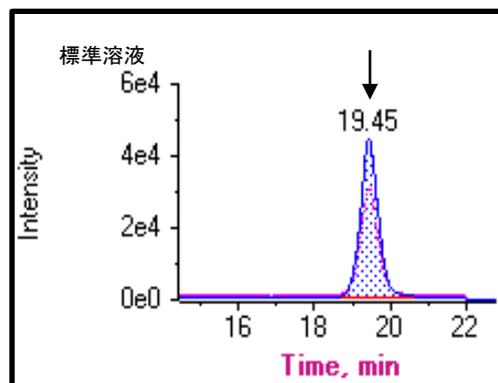
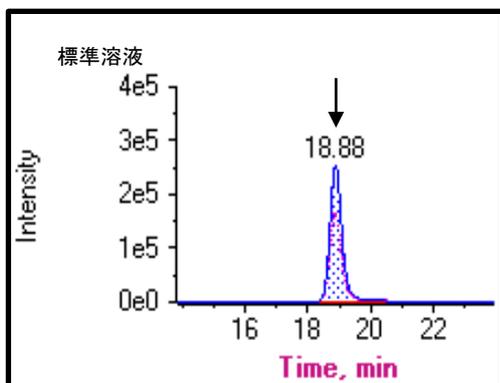
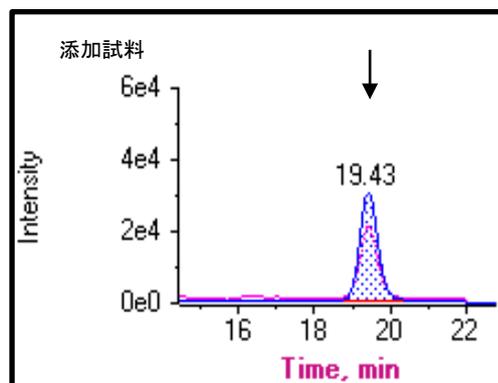
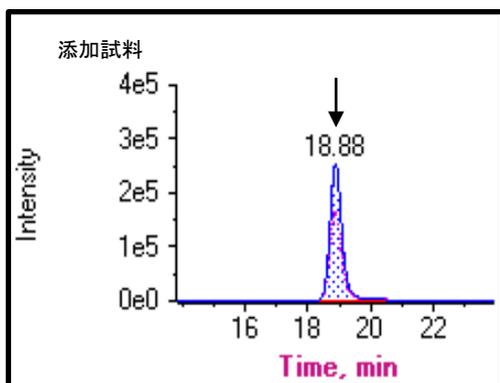
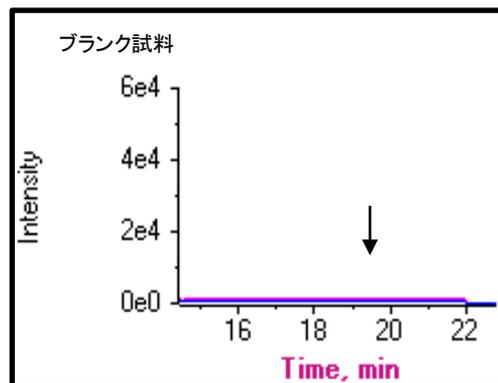
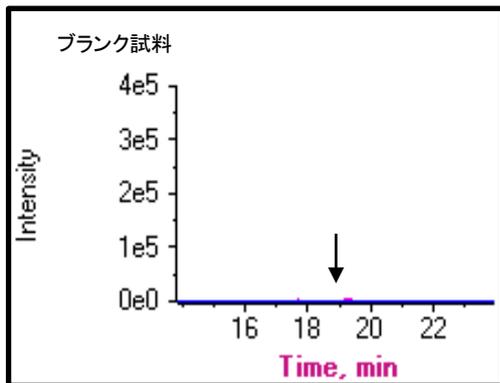


図8-5 なすのSRMクロマトグラム
(添加濃度 1 ppm)

図8-6 いちごのSRMクロマトグラム
(添加濃度 0.2 ppm)

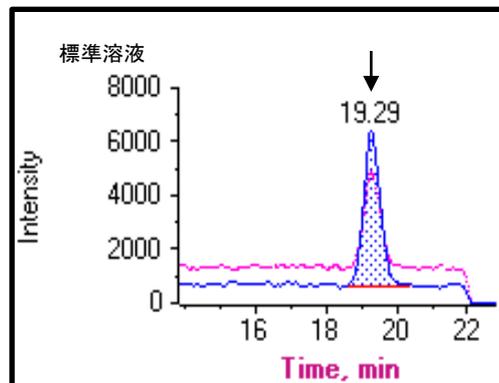
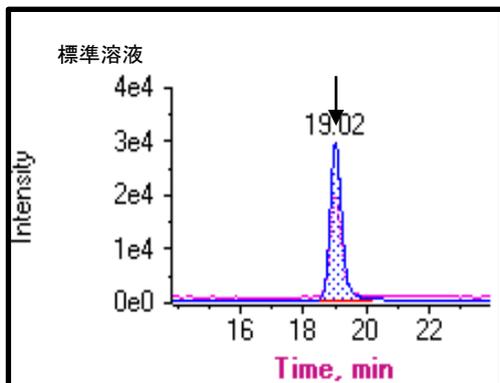
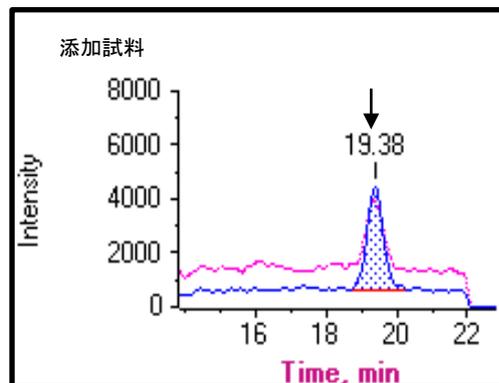
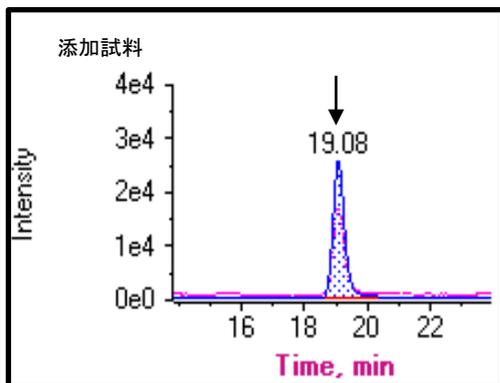
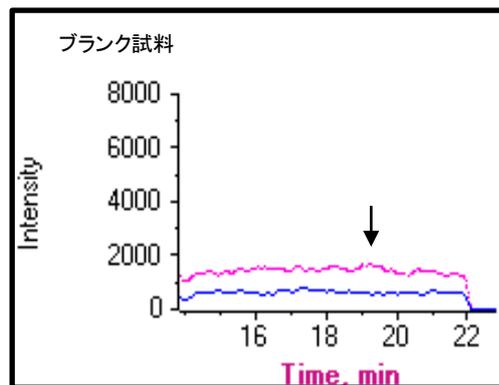
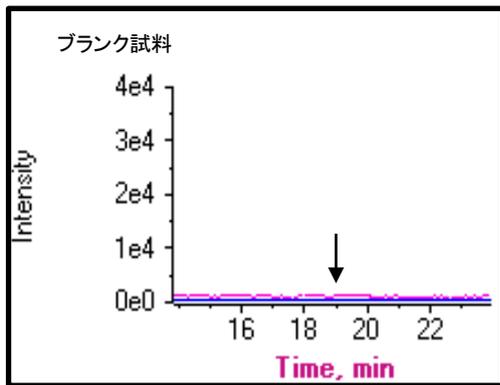


図8-7 バナナのSRMクロマトグラム
(添加濃度 0.1 ppm)

図8-8 オレンジのSRMクロマトグラム
(添加濃度 0.02 ppm)

高濃度群

代謝物B添加 (ESI (-)、青線 (定量イオン) : m/z 178.9>106.9、赤線 (定性イオン) : m/z 178.9>134.9)

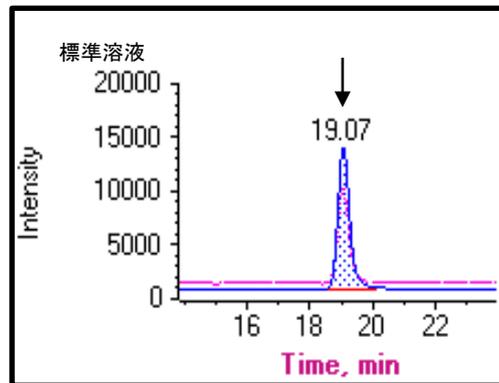
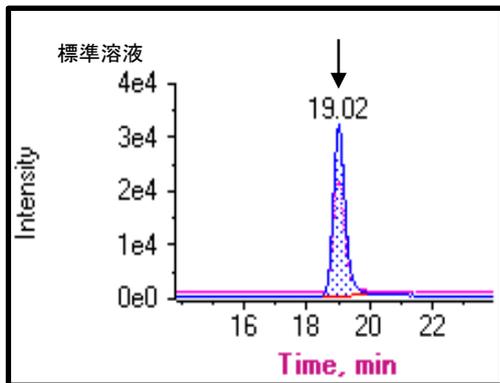
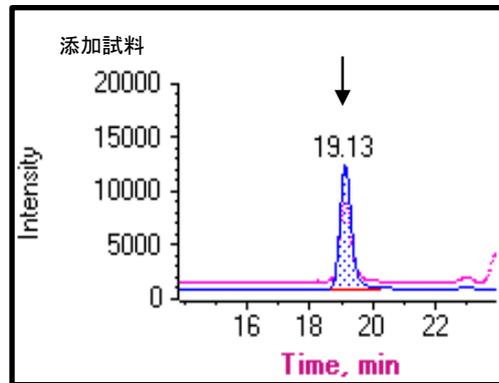
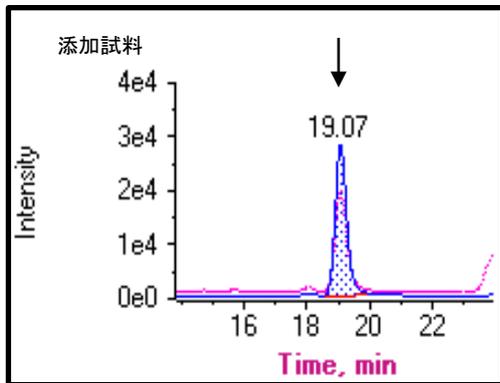
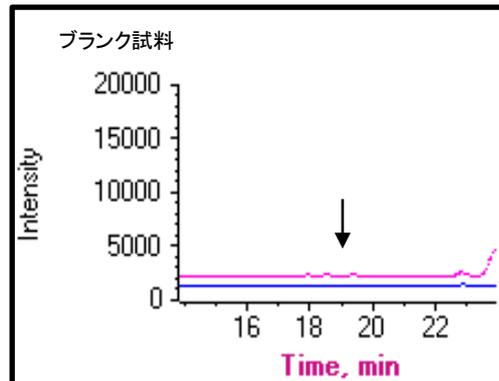
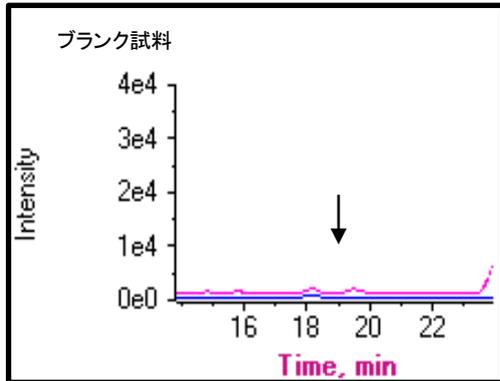


図9-1 玄米のSRMクロマトグラム

(添加濃度 0.0857 ppm)

※アシベンゾラルS-メチル 0.1 ppm相当

図9-2 小麦のSRMクロマトグラム

(添加濃度 0.0429 ppm)

※アシベンゾラルS-メチル 0.05 ppm相当

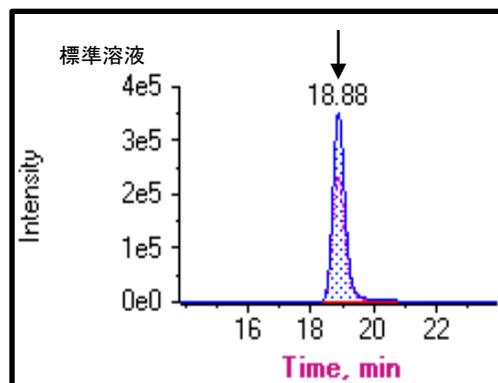
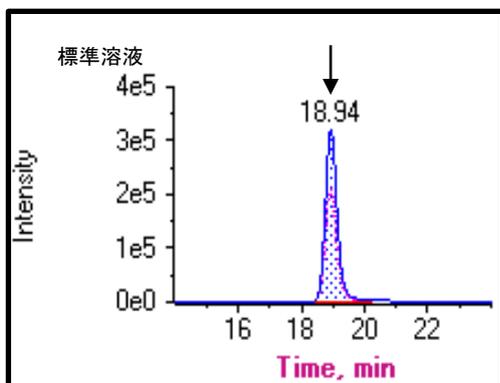
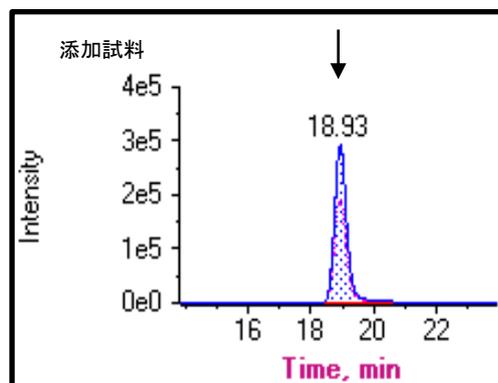
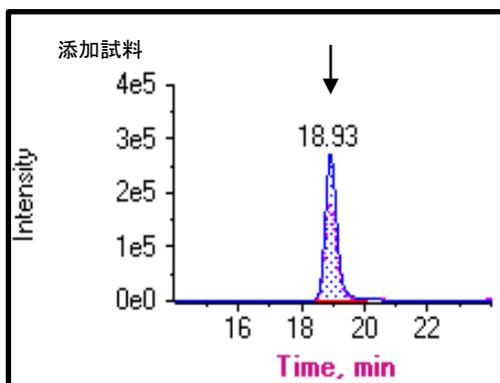
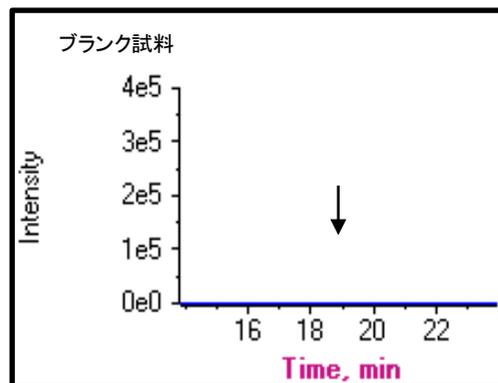
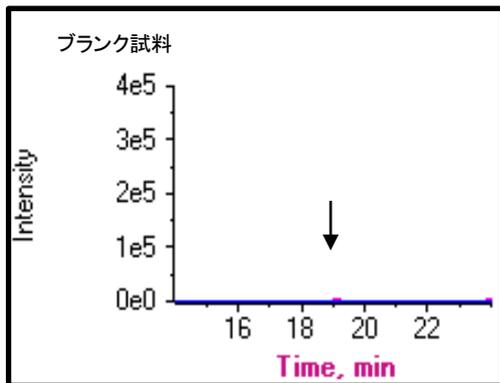


図9-3 ほうれんそうのSRMクロマトグラム
(添加濃度 0.857 ppm)
※アシベンゾラルS-メチル 1 ppm相当

図9-4 キャベツのSRMクロマトグラム
(添加濃度 0.857 ppm)
※アシベンゾラルS-メチル 1 ppm相当

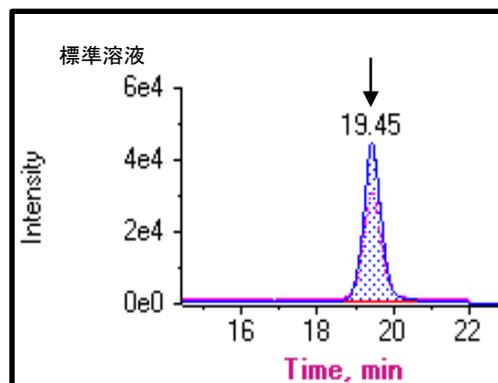
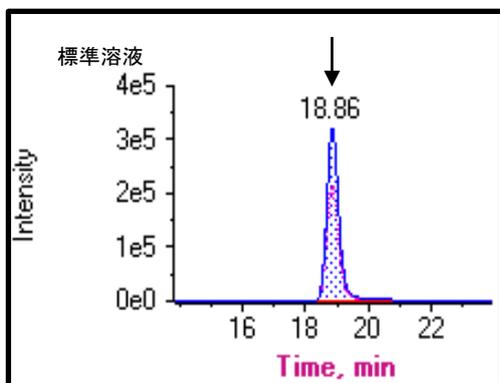
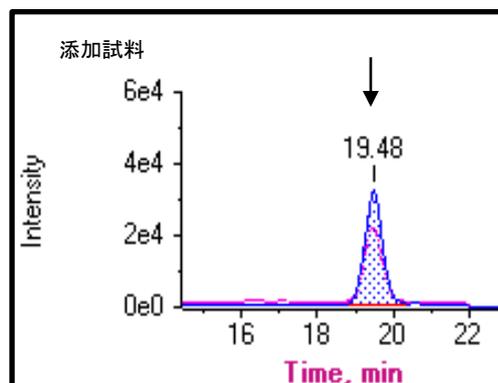
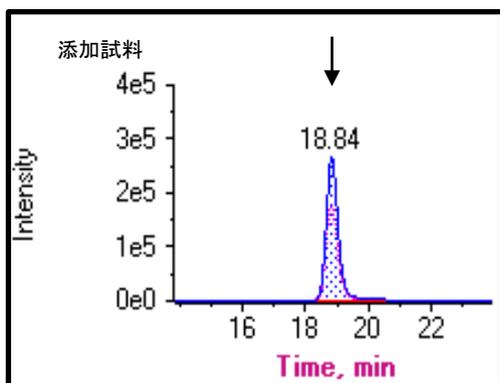
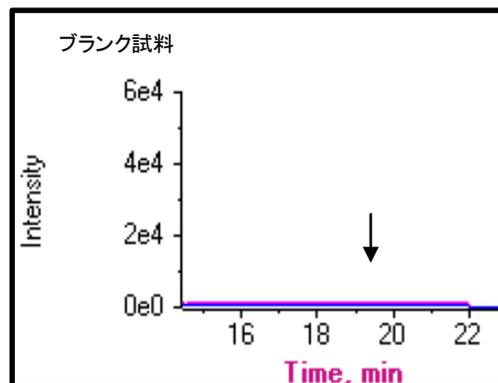
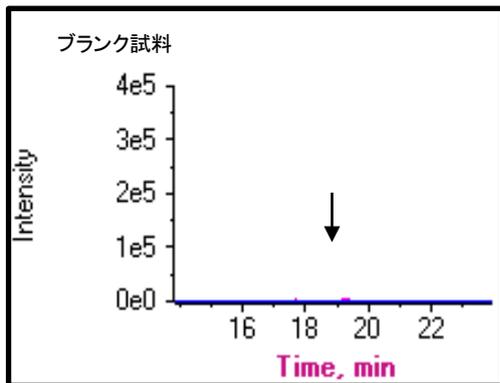


図9-5 なすのSRMクロマトグラム
(添加濃度 0.857 ppm)
※アシベンゾラルS-メチル 1 ppm相当

図9-6 いちごのSRMクロマトグラム
(添加濃度 0.171 ppm)
※アシベンゾラルS-メチル 0.2 ppm相当

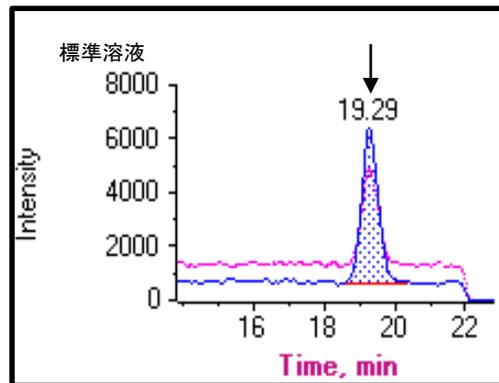
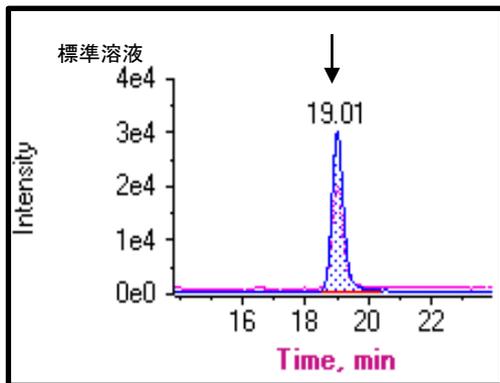
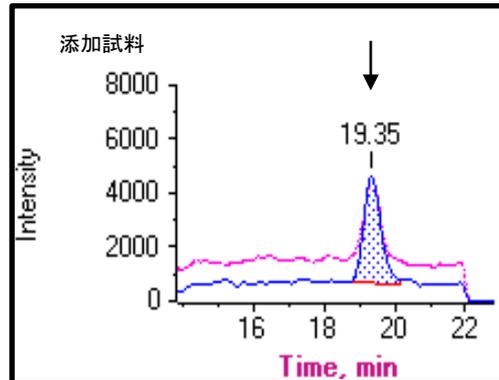
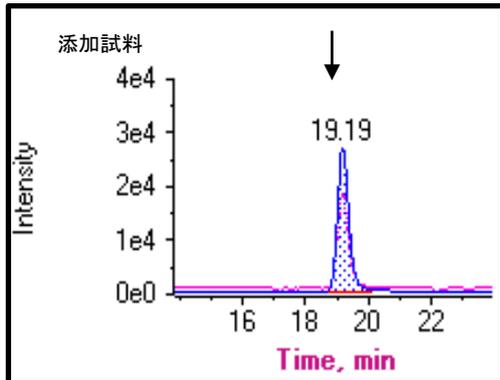
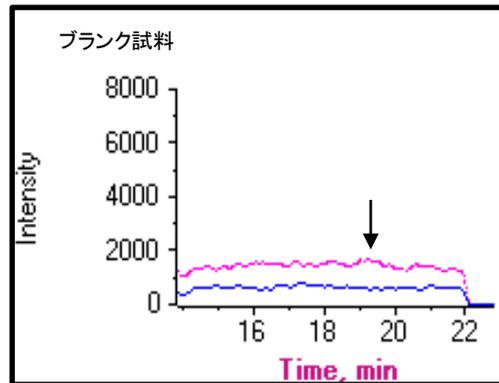
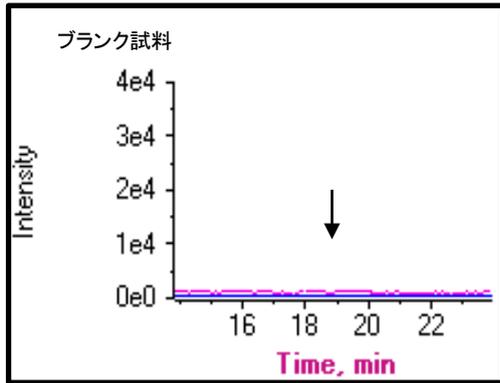


図9-7 バナナのSRMクロマトグラム
(添加濃度 0.0857 ppm)

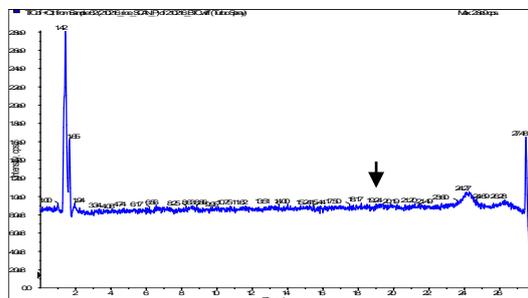
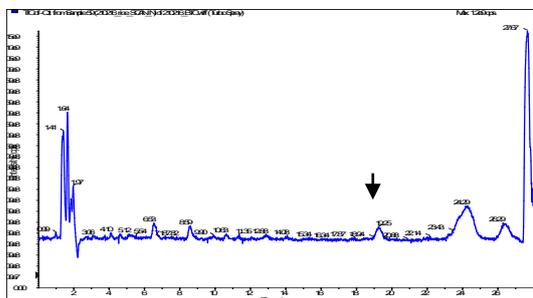
※アシベンズラルS-メチル 0.1 ppm相当

図9-8 オレンジのSRMクロマトグラム
(添加濃度 0.0171 ppm)

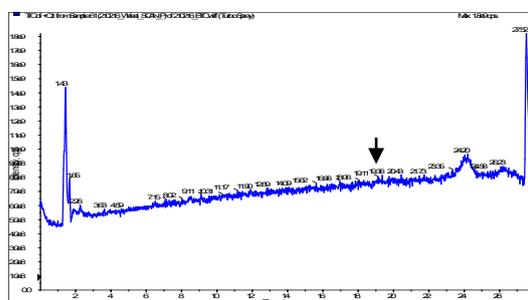
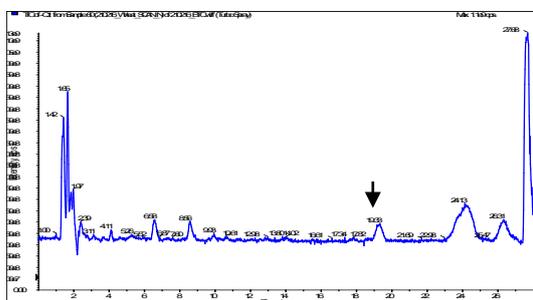
※アシベンズラルS-メチル 0.02 ppm相当

[各食品のブランク試料のトータルイオンクロマトグラム]

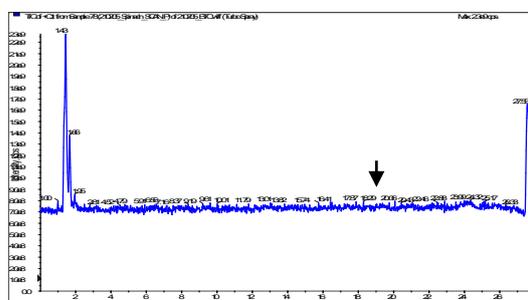
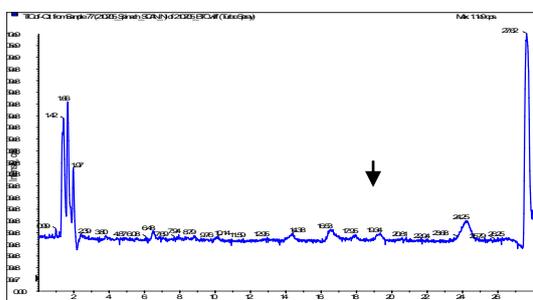
① 玄米



② 小麦



③ ほうれんそう



④ キャベツ

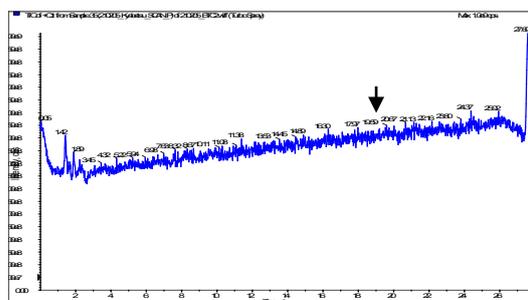
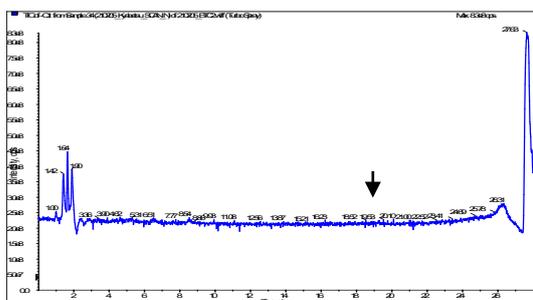
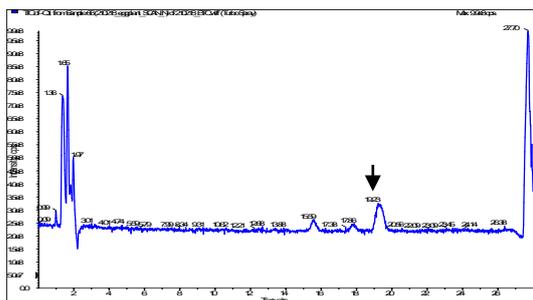


図10-1 各農産物のトータルイオンクロマトグラム

左：スキャン範囲(m/z)：50～1000、ESI (-)、DP：-45

右：スキャン範囲(m/z)：50～1000、ESI (+)、DP：26

⑤ なす



[結論]

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含む代謝物Bを塩基性下で加水分解した。反応後に試料から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た後、LC-MS/MSで定量及び確認する方法を開発した。本法を用いて農産物（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）を対象に定量限界濃度及び基準値濃度で添加回収試験を行った結果、アシベンゾラルS-メチルでは真度76.8～106.1%、併行精度1.1～7.9%、代謝物Bでは真度82.6～96.4%、併行精度0.6～7.6%と良好な結果が得られた。いずれの試料においても妨害ピークは認められず選択性は良好であった。また、溶媒標準溶液に対するマトリックス標準溶液のピーク面積比は0.97～1.12となり、試料由来のマトリックスの影響をほとんど受けずに測定することができた。これらの結果から、本法はアシベンゾラル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含む代謝物Bを精確に分析することが可能な方法と考えられた。また、定量限界として0.01 mg/kgの定量が可能であると確認された。

[参考文献]

なし