

※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

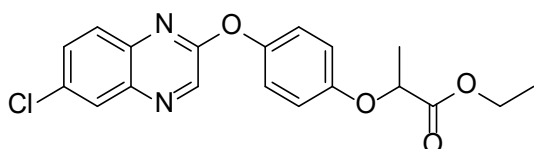
キザロホップエチル及び キザロホップPテフリル試験法 (農産物)

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）の検討結果

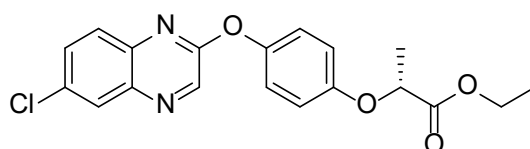
〔緒言〕

1. 背景・目的

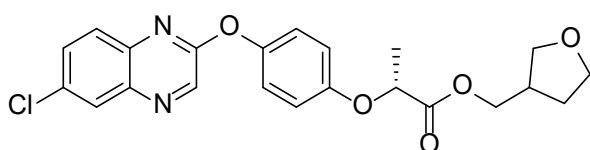
キザロホップエチル及びキザロホップ P テフリル（図 1）はフェノキシプロピオン酸系の茎葉処理型選択性除草剤であり、茎葉処理によって葉面より速やかに吸収された後、特に脂質合成阻害により分裂組織の壊死や生長抑制などを引き起こすことで、枯死させるものと考えられている。残留基準値は、農産物及び畜産物にあつては「キザロホップエチルを代謝物 B 【2-[4-(6-クロロキノキサリン-2-イルオキシ)フェノキシ]プロピオン酸】に換算したもの、キザロホップ P テフリルを代謝物 B に換算したもの、代謝物 B 及び加水分解により代謝物 B に変換される代謝物を代謝物 B に換算したものの和」として設定されており、代謝物 B（キザロホップ）の抱合体も規制対象に含まれるが、現行の通知試験法は抱合体を分析対象としていない。本研究では、抱合体等の代謝物を含めたキザロホップエチル及びキザロホップ P テフリル試験法を開発することを目的とした。



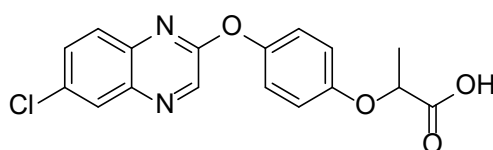
キザロホップエチル



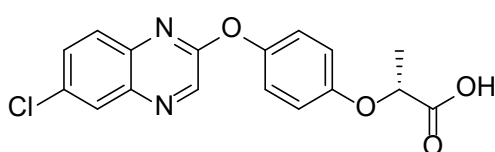
キザロホップ P エチル



キザロホップ P テフリル



代謝物 B（キザロホップ）



キザロホップ P

図 1 キザロホップエチル、キザロホップ P エチル、キザロホップ P テフリル、代謝物 B（キザロホップ）及びキザロホップ P の構造

2. 基準値

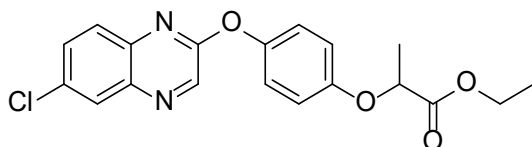
キザロホップエチル及びキザロホップ P テフリルとは、農産物及び畜産物にあつては、キザロホップエチルを代謝物 B に換算したもの、キザロホップ P テフリルを代謝物 B に換算したもの、代謝物 B 及び加水分解により代謝物 B に変換される代謝物を代謝物 B に換算したものの和とし、魚介類にあつては、キザロホップエチルを代謝物 B に換算したもの、代謝物 B 及び加水分解により代謝物 B に変換される代謝物を代謝物 B に換算したものの和をいうこと。ただし、キザロホップエチルにはキザロホップ P エチルが含まれ、代謝物 B にはキザロホップ P が含まれるものとする。ただし、プロパキザホップが検出された場合など、代謝物 B の残留がプロパキザホップの使用によることが明らかな場合には、プロパキザホップに定められた規格基準を適用することとし、キザロホップエチル及びキザロホップ P テフリルに係る規格基準によらないこと。〔食安発 0918 第 1 号（H27.9.18）〕

食品名	基準値 (ppm)
大豆	0.5
キャベツ	0.3
ばれいしょ	0.1
ほうれんそう	0.01
りんご	0.01
いちご	0.02

3. 分析対象化合物の構造式及び物理化学的性質

分析対象化合物： キザロホップエチル（Quizalofop-ethyl）

構造式：



化学名： Ethyl (*RS*)-2-{4-[(6-chloroquinoxalin-2-yl)oxy]phenoxy}propanoate

CAS 番号： 76578-14-8

分子式： C₁₉H₁₇ClN₂O₄

分子量： 372.81

外観： 白色粉末

溶解性： 水 0.3 mg/L (20℃) ^{a)}

融点： 91.7～92.1℃^{a)}

沸点： 220 °C (0.2 mmHg) ^{a)}

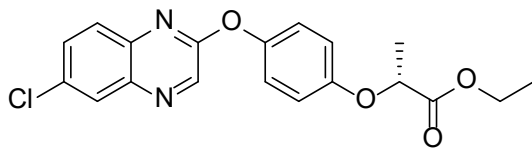
蒸気圧： 8.65×10⁻⁴ mPa (20 °C) ^{a)}

1-オクタノール/水分配係数 (log P_{ow}) : 4.28 (23℃) ^{a)}

^{a)} The Pesticide Manual sixteenth Edition, BCPC

分析対象化合物： キザロホップ P エチル (Quizalofop-P-ethyl)

構造式：



化学名： Ethyl (R)-2-{4-[(6-chloroquinoxalin-2-yl)oxy]phenoxy}propanoate

CAS 番号： 100646-51-3

分子式： $C_{19}H_{17}ClN_2O_4$

分子量： 372.81

溶解性： 水 0.61 mg/L (20°C) ^{a)}

融点： 76.1～77.1°C^{a)}

沸点： 220 °C (26.6 Pa) ^{a)}

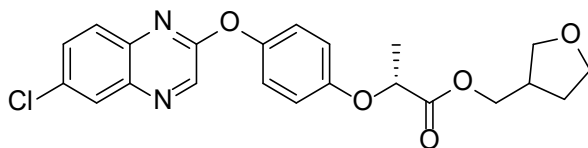
蒸気圧： 1.1×10^{-4} mPa (20 °C) ^{a)}

1-オクタノール/水分配係数 (log P_{ow}) : 4.61 (23°C) ^{a)}

^{a)} The Pesticide Manual sixteenth Edition, BCPC

分析対象化合物： キザロホップ P テフリル (Quizalofop-P-tefuryl)

構造式：



化学名： (Tetrahydrofuran-3-yl)methyl (2R)-2-{4-[(6-chloroquinoxalin-2-yl)oxy]phenoxy}propanoate

CAS 番号： 119738-06-6

分子式： $C_{22}H_{21}ClN_2O_5$

分子量： 428.87

外観： 白色粉末

溶解性： 水 3.1 mg/L (pH 4.4 及び pH 7.0、25°C) ^{a)}

融点： 58.3°C^{a)}

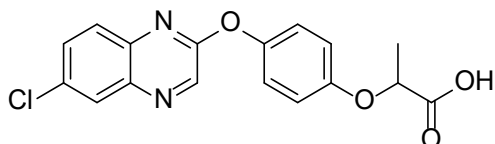
蒸気圧： 7.9×10^{-3} mPa (25 °C) ^{a)}

1-オクタノール/水分配係数 (log P_{ow}) : 4.32 (25°C) ^{a)}

^{a)} The Pesticide Manual sixteenth Edition, BCPC

分析対象化合物： キザロホップ (代謝物 B、Quizalofop)

構造式：



化学名： (RS)-2-{4-[(6-Chloroquinoxalin-2-yl)oxy]phenoxy}propanoic acid

CAS 番号： 76578-12-6

分子式： C₁₇H₁₃ClN₂O₄

分子量： 344.75

外観： 白色粉末

沸点（計算値）： 533.3±50.0°C (760 Torr) ^{a)}

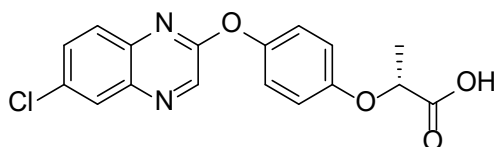
蒸気圧（計算値）： 3.34×10⁻¹² Torr (25 °C) ^{a)}

1-オクタノール/水分配係数 (log P_{ow}、計算値)： 2.640±0.866 (25°C) ^{a)}

^{a)} SciFinder (Calculated using Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software V11.02)

分析対象化合物： キザロホップ P (Quizalofop-P)

構造式：



化学名： (R)-2-{4-[(6-Chloroquinoxalin-2-yl)oxy]phenoxy}propanoic acid

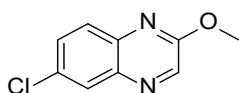
CAS 番号： 94051-08-8

分子式： C₁₇H₁₃ClN₂O₄

分子量： 344.75

分析対象化合物： 6-クロロ-2-メトキシキノキサリン (MeCHQ)

構造式：



化学名： 6-Chloro-2-methoxyquinoxaline

CAS 番号： 104152-39-8

分子式： C₉H₇ClN₂O

分子量： 194.62

外観： 白色粉末

融点： 87.5～89°C ^{a)}

沸点： 294.1±35.0 °C (760 Torr) ^{b)}

蒸気圧： 2.91×10⁻³ Torr (25 °C) ^{b)}

1-オクタノール/水分配係数 (log P_{ow}、計算値)： 2.517±0.842 (25°C) ^{b)}

^{a)} SciFinder (Makino, Kenzi; Heterocycles 1985, V23(10), P2603-11)

^{b)} SciFinder (Calculated using Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software V11.02)

4. 申請企業の残留分析法¹⁾

(1) 試験溶液の調製方法

秤 取

↓ 試料 5.0 g

MeCHQ への変換

↓ 1 mol/L 水酸化カリウム・メタノール溶液 200 mL 及び沸騰石を加える

↓ 1.5 時間還流

↓ 濾過。容器及び残渣をメタノール 25 mL で 2 回洗浄し、濾過

転溶

↓ ろ液に水 400 mL 及び飽和塩化ナトリウム溶液 200 mL を加える

↓ 濃塩酸 20 mL を加える

↓ *n*-ヘキサン 100 mL で 2 回転溶

↓ 硫酸ナトリウムを加えて脱水

↓ 2%ジエチレングリコール・アセトン溶液 2 mL を加える

↓ 乾固近くまでエバポレーター (35°C) で濃縮

↓ GPC の移動相に溶解し、10 mL に定容

GPC

↓ 5 mL を注入

↓ 140~265 mL のフラクションを分取

↓ 2%ジエチレングリコール・アセトン溶液 2 mL を加える

↓ エバポレーター (35°C) で濃縮

↓ 窒素気流下で乾固

↓ *n*-ヘキサン 2 mL に溶解

HPLC (順相) 測定

(2) ゲル浸透クロマトグラフィー (GPC)

装 置	GPC Autoprep Model 1002A	ABC Laboratories
カラム	Enviro Beads, 33 cm×2.5 cm, SX-3 Biobeads (60 g), 200-400 mesh	
移動相	シクロヘキサン/酢酸エチル (85 : 15)	
流速	5 mL/min	

(3) 測定条件

装 置	型 式	会 社
LC	コントローラ SCL-6B、オートサンプラー SIL-6B、ポンプ LC-6A	島津製作所
蛍光検出器	RF-551	島津製作所

LC 条件	
カラム	Maxsil 5 Silica (内径 4.6 mm、長さ 250 mm : Phenomenex 製)
ガードカラム	Adsorbosil Silica 5u guard column (Alltech 製)
移動相流速	1.0 mL/min
移動相	ジクロロメタン及び <i>n</i> -ヘキサン (80 : 20) 混液
波長	励起波長 338 nm、蛍光波長 374 nm
カラム温度	30℃
保持時間	14 分

[実験方法]

1. 試料

試料は東京都内の小売店で購入した。試料の調製方法を以下に記載した。

大豆： 425 μm の標準網ふるいに通るように遠心粉碎機で粉碎した。

キャベツ： 外側変質葉及びしんを除去したものを磨砕装置を用いて細切均一化した。

ばれいしょ： 泥を水で軽く洗い落とししたものを磨砕装置を用いて細切均一化した。

ほうれんそう： 赤色根部を含み、ひげ根及び変質葉を除去したものを磨砕装置を用いて細切均一化した。

りんご： 果梗を除去したものを磨砕装置を用いて細切均一化した。

いちご： へたを除去したものを磨砕装置を用いて細切均一化した。

2. 試薬・試液

(1) 標準品

6-クロロ-2-メトキシキノキサリン (MeCHQ) 標準品： 純度 100% (日産化学より供与)

キザロホップエチル標準品：純度 100% (富士フイルム和光純薬製)

キザロホップ P テフリル標準品：純度 100% (富士フイルム和光純薬製)

キザロホップ (代謝物 B) 標準品：純度 100% (富士フイルム和光純薬製)

(2) 試薬等

アセトン、酢酸エチル、*n*-ヘキサン： 残留農薬試験用 (関東化学製)

蒸留水、アセトニトリル、メタノール： LC-MS 用 (関東化学製)

ギ酸、酢酸アンモニウム： 特級 (富士フイルム和光純薬製)

酢酸： 精密分析用 (富士フイルム和光純薬製)

水酸化カリウム： 特級 (>85.0%) (富士フイルム和光純薬製)

ジエチレングリコール： ダイオキシシン類分析用 (富士フイルム和光純薬製)

硫酸ナトリウム (無水)： 残留農薬試験用 (富士フイルム和光純薬製)

1 mol/L 塩酸： 容量分析用 (富士フイルム和光純薬製)

シリカゲルミニカラム： InertSep SI (1 g/6 mL、ジーエルサイエンス製)

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： InertSep PSA (500 mg/6 mL、ジーエルサイエンス製)

ケイソウ土： セライト No.545 (富士フイルム和光純薬製)

ろ紙： 定量濾紙、No.5A (アドバンテック製)

GC-MS/MS 用分析カラム： DB-5ms UI (内径 0.25 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25 μm : Agilent Technologies 製) に不活性シリカキャピラリーチューブ (内径 0.25 mm : ジーエルサイエンス製) 約 2 m を注入口側に接続

LC-MS/MS 用分析カラム： InertSustain C18 (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm : ジーエルサイエンス製)、Inertsil ODS-4 (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm : ジーエルサイエンス製)、InertSustainSwift C18 (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm : ジーエルサイエンス製)、L-column3 ODS (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)、Atlantis dC18 (内径 3 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm : Waters 製)

(3) 試液

① 標準原液

キザロホップエチル及びキザロホップ P テフリル標準原液： 各標準品 10 mg を精秤し、それぞれアセトニトリルに溶解して 1 mg/mL の濃度の溶液を調製した。

キザロホップ標準原液： 標準品 10 mg を精秤し、0.2 vol%酢酸・アセトニトリル溶液に溶解して 1 mg/mL の濃度の溶液を調製した。

MeCHQ 標準原液： 標準品 10 mg を精秤し、アセトンに溶解して 1 mg/mL の濃度の溶液を調製した。

② 添加用標準溶液

1) 定量限界濃度 (0.01 ppm)

キザロホップエチル及びキザロホップ P テフリル： 各標準原液をアセトニトリルで希釈し、キザロホップとして 0.2 µg/mL (キザロホップエチル 0.216 µg/mL ; キザロホップ P テフリル 0.249 µg/mL) の濃度の溶液を調製した。

キザロホップ： 標準原液を 0.2 vol%酢酸・アセトニトリル溶液で希釈し、0.2 µg/mL の濃度の溶液を調製した。

2) 基準値濃度 (大豆及びキャベツ : 0.3 ppm)

キザロホップエチル及びキザロホップ P テフリル： 各標準原液をアセトニトリルで希釈し、キザロホップとして 6 µg/mL (キザロホップエチル 6.49 µg/mL ; キザロホップ P テフリル 7.46 µg/mL) の濃度の溶液を調製した。

キザロホップ： 標準原液を 0.2 vol%酢酸・アセトニトリル溶液で希釈し、6 µg/mL の濃度の溶液を調製した。

3) 基準値濃度 (ばれいしょ : 0.1 ppm)

キザロホップエチル及びキザロホップ P テフリル： 各標準原液をアセトニトリルで希釈し、キザロホップとして 2 µg/mL (キザロホップエチル 2.16 µg/mL ; キザロホップ P テフリル 2.49 µg/mL) の濃度の溶液を調製した。

キザロホップ： 標準原液を 0.2 vol%酢酸・アセトニトリル溶液で希釈し、2 µg/mL の濃度の溶液を調製した。

4) 基準値濃度 (ほうれんそう、りんご及びいちご : 0.05 ppm)

キザロホップエチル及びキザロホップ P テフリル： 各標準原液をアセトニトリルで希釈し、キザロホップとして 1 µg/mL (キザロホップエチル 1.08 µg/mL ; キザロホップ P テフリル 1.24 µg/mL) の濃度の溶液を調製した。

キザロホップ： 標準原液を 0.2 vol%酢酸・アセトニトリル溶液で希釈し、1 µg/mL の濃度の溶液を調製した。

なお、キザロホップの濃度から各化合物への換算は、以下の換算係数（各化合物の分子量をキザロホップの分子量で除した値）を用いて行った。

	換算係数
キザロホップエチル	1.081
キザロホップ P テフリル	1.244

③ 水酸化カリウム・メタノール溶液

水酸化カリウム 56 g をメタノール 1 L に溶解した。

3. 装置等

磨砕装置： Grindomix GM200（Verder Scientific 製）

遠心粉碎機： ZM200（Verder Scientific 製）

マントルヒーター： マントルヒータースターラーMS-ES2（野中理化工器製作所）

冷却水循環装置： クールエース NCA-11（東京理化工器製）

振とう機： SR-2 DW（タイテック製）

遠心分離機： フロア型冷却遠心機 S700FR（久保田商事製）

蒸留水精製装置： 超高純度蒸留水精製装置 NZJ-2DSYW（藤原製作所製）

ロータリーエバポレーター： N-1300VF-WS/NVP-2000V/DPE-2150/CA-1113（東京理化工器製）

LC-MS/MS

装 置	型 式	会 社
LC	Acquity UPLC I-Class	Waters
MS	Triple Quad 5500	Sciex
データ処理	Analyst 1.6.2	Sciex

GC-MS/MS

装 置	型 式	会 社
GC	Trace 1310	ThermoFisher Scientific
MS	TSQ 8000	ThermoFisher Scientific
オートサンプラー	TriPlus RSH	ThermoFisher Scientific
データ処理	Xcalibur 2.2	ThermoFisher Scientific

4. 測定条件

(1) LC-MS/MS 測定条件

LC 条件			
カラム	InertSustain C18（内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm：ジエールサイエンス製）		
移動相流速	0.2 mL/min		
注入量	3 μL		
カラム温度	40℃		
移動相	A 液：0.01 vol%ギ酸 B 液：0.01 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液		
グラジエント条件	時間（分）	A 液（%）	B 液（%）
	0.0	70	30
	10.0	5	95
	15.0	5	95
	15.1	70	30

保持時間					
					時間（分）
			MeCHQ		9.0
			キザロホップエチル		10.5
			キザロホップ P テフリル		10.2
		キザロホップ		7.8	
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	ESI（＋）				
イオンスプレー電圧	5500 V				
ヒーター温度	700℃				
エントランス電位	10 V				
カーテングス	N ₂ , 10 psi				
ネブライザーガス	ドライエアー, 80 psi				
ターボガス	ドライエアー, 80 psi				
コリジョンガス	N ₂ , 7（任意単位）				
測定イオン					
		イオン（ <i>m/z</i> ）	デクラスタ リング電位 （V）	コリジョン エネルギー （eV）	コリジョンセル イグジット電位 （V）
MeCHQ	定量	195.0→126.0	76	35	12
	定性	195.0→167.0	76	25	14
キザロホップ エチル	定量	373.1→299.0	146	27	24
	定性	373.1→91.1	146	37	8
キザロホップ P テフリル	定量	429.1→299.0	81	27	24
	定性	429.1→85.1	81	23	12
キザロホップ	定量	345.1→299.0	101	27	24
	定性	345.1→244.0	101	41	20

(2) GC-MS/MS 測定条件

GC 条件	
カラム	DB-5ms UI (内径 0.25 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25 μm : Agilent Technologies 製) に不活性シリカキャピラリーチューブ (内径 0.25 mm : ジーエルサイエンス製) を約 2 m 接続
カラム温度	50°C (1 min) →25°C/min→175°C→10°C/min→225°C→25°C/min →300°C (10 min)
注入口温度	280°C
ライナー	Topaz (シングルテーパ、ウール入り : Restek 製)
トランスファーライン温度	290°C
イオン源温度	290°C

イオン化モード	EI
イオン化電圧	70 eV
キャリアーガス	ヘリウム
キャリアーガス流量	1 mL/min（定流量）
注入方式	スプリットレス（高圧注入、200 kPa、1 min）
注入量	2 μL
コリジョンガス	アルゴン
測定モード	SRM
保持時間	8.3 min

測定イオン			
		イオン (<i>m/z</i>)	コリジョン エネルギー (eV)
MeCHQ	定量イオン	194.1→165.1	8
	定性イオン	196.1→167.1	8
	定性イオン	165.0→111.0	24
	定性イオン	165.0→138.0	12

5. 定量

MeCHQ 標準原液を酢酸エチル及び *n*-ヘキサン (1 : 19) 混液で希釈し、以下の濃度の検量線作成用標準溶液を調製した。なお、いずれもキザロホップとしての濃度で調製した。換算係数は 0.5645 (MeCHQ の分子量をキザロホップの分子量で除した値) を用いた。

定量限界濃度 (0.01 ppm) での添加回収試験 : 0.0005、0.001、0.0015、0.002、0.0025 及び 0.003 µg/mL
基準値濃度での添加回収試験

大豆及びキャベツ (基準値 0.3 ppm) : 0.015、0.03、0.045、0.06、0.075 及び 0.09 µg/mL

ばれいしょ (基準値 0.1 ppm) : 0.005、0.01、0.015、0.02、0.025 及び 0.03 µg/mL

ほうれんそう、りんご及びいちご (基準値 0.05 ppm) : 0.0025、0.005、0.0075、0.01、0.0125 及び 0.015 µg/mL

これらの溶液 2 µL を GC-MS/MS に注入し、得られたピーク面積を用いて検量線を作成した。試験溶液 2 µL を GC-MS/MS に注入し、検量線から絶対検量線法によりキザロホップの含量を算出した。

6. 添加試料の調製

(1) 定量限界濃度

大豆の場合 (添加濃度 0.01 mg/kg) は、試料 10.0 g に 0.2 µg/mL (キザロホップとして) 添加用標準溶液 0.5 mL を添加して混合後、30 分間放置した。

キャベツ、ばれいしょ、ほうれんそう、りんご及びいちごの場合 (添加濃度 0.01 mg/kg) は、試料 20.0 g に 0.2 µg/mL (キザロホップとして) 添加用標準溶液 1 mL を添加して混合後、30 分間放置した。

(2) 基準値濃度

大豆の場合 (添加濃度 0.3 mg/kg) は、試料 10.0 g に 6 µg/mL (キザロホップとして) 添加用標準溶液 0.5 mL を添加して混合後、30 分間放置した。

キャベツの場合（添加濃度 0.3 mg/kg）は、試料 20.0 g に 6 µg/mL（キザロホップとして）添加用標準溶液 1 mL を添加して混合後、30 分間放置した。

ばれいしょの場合（添加濃度 0.1 mg/kg）は、試料 20.0 g に 2 µg/mL（キザロホップとして）添加用標準溶液 1 mL を添加して混合後、30 分間放置した。

ほうれんそう、りんご及びいちごの場合（添加濃度 0.05 mg/kg）は、試料 20.0 g に 1 µg/mL（キザロホップとして）添加用標準溶液 1 mL を添加して混合後、30 分間放置した。

7. 試験溶液の調製方法

〔概要〕

試料に水酸化カリウム・メタノール溶液を加えて加熱還流し、キザロホップエチル、キザロホップ P テフルル及びそれらの代謝物を MeCHQ に変換後、*n*-ヘキサンで転溶し、PSA 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 で定量及び確認した。

(1) MeCHQ への変換

豆類の場合は試料 10.0 g（果実及び野菜の場合は 20.0 g）を丸底フラスコ（500 mL 容）に量り採り、水酸化カリウム・メタノール溶液 200 mL 及び沸騰石を加えた。これにジムロート冷却器を接続し、マントルヒータースターラーを用いて攪拌しながら 90 分間加熱還流した。丸底フラスコを氷冷し、1～30℃に冷却後、ジムロート冷却器を外し、メタノール約 5 mL で冷却器を洗い、洗液を反応液に合わせた。これを、ケイソウ土を約 1 cm の厚さに敷いたろ紙を用いて吸引ろ過した。丸底フラスコ及びろ紙上の残留物をメタノール約 5 mL で 2 回洗い、洗液を吸引ろ過した。ろ液を合わせ、メタノールを加えて正確に 250 mL とした。

(2) 転溶

豆類の場合は（1）で得られた溶液から正確に 20 mL を PP 製遠心管（100 mL 容）に分取し、1 mol/L 塩酸 30 mL 及び *n*-ヘキサン 40 mL を加えた。果実及び野菜の場合は（1）で得られた溶液から正確に 10 mL を PP 製遠心管（50 mL 容）に分取し、1 mol/L 塩酸 15 mL 及び *n*-ヘキサン 20 mL を加えた。それぞれ 5 分間振とう後、毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離した。*n*-ヘキサン層を採り、水層に豆類の場合は *n*-ヘキサン 40 mL（果実及び野菜の場合は 20 mL）を加えて 5 分間振とう後、毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離した。それぞれ得られた *n*-ヘキサン層を合わせ、無水硫酸ナトリウムを加えて脱水した。これを綿栓ろ過して無水硫酸ナトリウムを除去した後、ロータリーエバポレーターを用いて 40℃ 以下で約 2 mL まで減圧濃縮した。

(3) PSA ミニカラム精製

PSA ミニカラム [InertSep PSA (500 mg)] に *n*-ヘキサン 10 mL を注入し、流出液は捨てた。このミニカラムに（2）で得られた溶液を注入した後、*n*-ヘキサン 10 mL を注入した。全溶出液をロータリーエバポレーターにて 40℃ 以下で約 2 mL まで減圧濃縮した。

(4) シリカゲルミニカラム精製

シリカゲルミニカラム [InertSep SI (1 g)] に *n*-ヘキサン 10 mL を注入し、流出液は捨てた。このミニカラムに（3）で得られた溶液を注入した後、*n*-ヘキサン 5 mL を注入し、流出液は捨てた。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、溶出液をロータリーエバポレーターにて 40℃ 以下で約 2 mL まで減圧濃縮した。この溶液を酢酸エチル及び *n*-ヘキサン（1 : 19）混液で正確に 4 mL としたものを試験溶液とした。

秤取

↓ 果実及び野菜 20.0 g、豆類 10.0 g

MeCHQ への変換

↓ 水酸化カリウム・メタノール溶液 200 mL 及び沸騰石を加え、90 分間加熱還流

↓ 氷冷後、吸引ろ過

↓ メタノールで 250 mL に定容 (①)

転溶

↓ ①を豆類の場合は正確に 20 mL (果実及び野菜の場合は 10 mL) 採取

↓ 豆類の場合は 1 mol/L 塩酸 30 mL 及び *n*-ヘキサン 40 mL を加え、5 分間振とう

(果実及び野菜の場合は 1 mol/L 塩酸 15 mL 及び *n*-ヘキサン 20 mL を加え、5 分間振とう)

↓ 遠心分離 (毎分 3000 回転、5 分間) 後、有機層を採取

↓ 豆類の場合は水層に *n*-ヘキサン 40 mL を加え、5 分間振とう

(果実及び野菜の場合は水層に *n*-ヘキサン 20 mL を加え、5 分間振とう)

↓ 遠心分離 (毎分 3000 回転、5 分間) 後、有機層を採取し、合わせる

↓ 無水硫酸ナトリウムを加え、脱水

↓ 綿栓ろ過

↓ 約 2 mL まで濃縮 (②)

PSA ミニカラム (500 mg)

↓ *n*-ヘキサン 10 mL でコンディショニング

↓ ②を負荷

↓ *n*-ヘキサン 10 mL で溶出

↓ 約 2 mL まで濃縮 (③)

シリカゲルミニカラム (1 g)

↓ *n*-ヘキサン 10 mL でコンディショニング

↓ ③を負荷

↓ *n*-ヘキサン 5 mL で洗淨

↓ 酢酸エチル及び *n*-ヘキサン (1 : 19) 混液 10 mL で溶出

↓ 約 2 mL まで濃縮

↓ 酢酸エチル及び *n*-ヘキサン (1 : 19) 混液で 4 mL に定容

GC-MS/MS 測定

スキーム 1. 試験溶液調製方法の概要

[結果及び考察]

申請企業の分析法¹⁾は、試料に水酸化カリウム・メタノール溶液を加えて加熱還流し、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をMeCHQに変換して分析する方法を採用している。本検討では、申請企業の分析法¹⁾を参考に、標準品が入手できたキザロホップエチル、キザロホップPテフリル及びキザロホップ（代謝物B）を用いて、MeCHQに変換して分析する方法を検討した。

1. 測定条件の検討

(1) MeCHQ

①LC-MS/MS 測定条件

1) MS条件

ESI (+) 及びESI (-) モードでスキャン測定を行った。その結果、ESI (-) モードでは脱プロトン分子等のMeCHQ由来のイオンは検出されなかった。一方、ESI (+) モードではプロトン付加分子 (m/z 195.0、 $[M+H]^+$) 及びその同位体イオン (m/z 197.0) が観測された (図2)。 m/z 195.0をプリカーサーイオンとしてプロダクトイオンスキャンを行ったところ、プロダクトイオンとして m/z 126.0、152.0、167.0等が観測された (図3-1)。一方、 m/z 197.0をプリカーサーイオンとしてプロダクトイオンスキャンを行ったところ、プロダクトイオンとして m/z 128.0、169.0等が観測された (図3-2)。後述するLC条件で測定を行い、 S/N が高かった m/z 195.0→126.0を定量イオン、 m/z 195.0→167.0を定性イオンとすることとした。

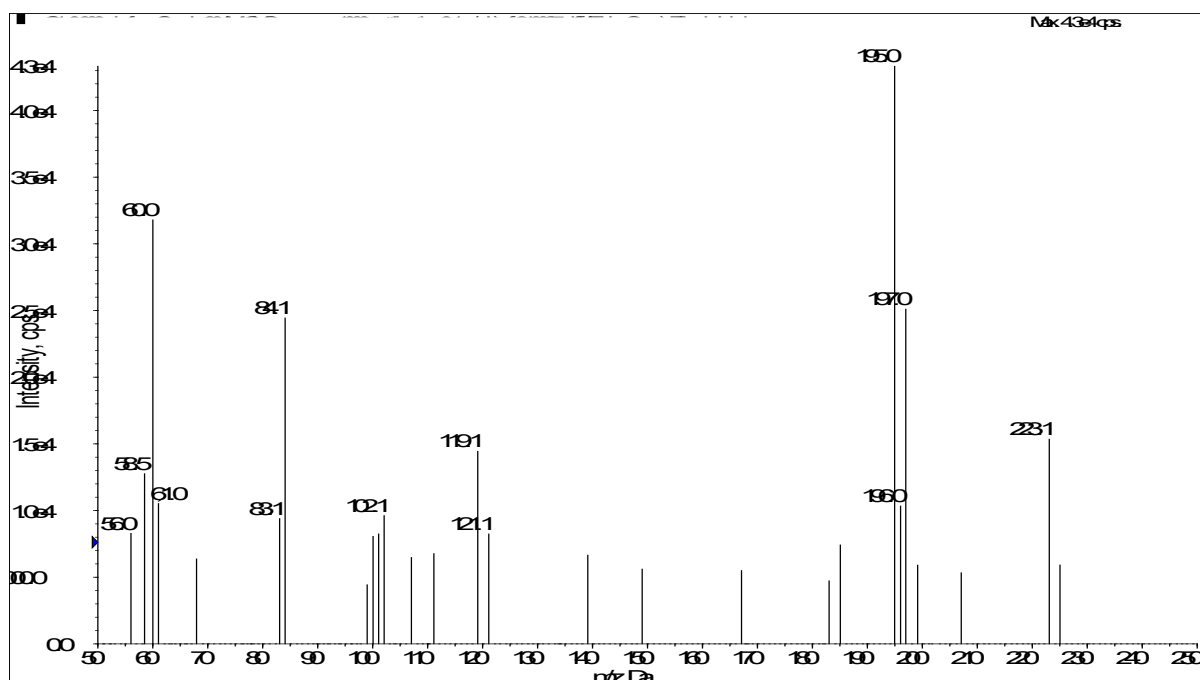
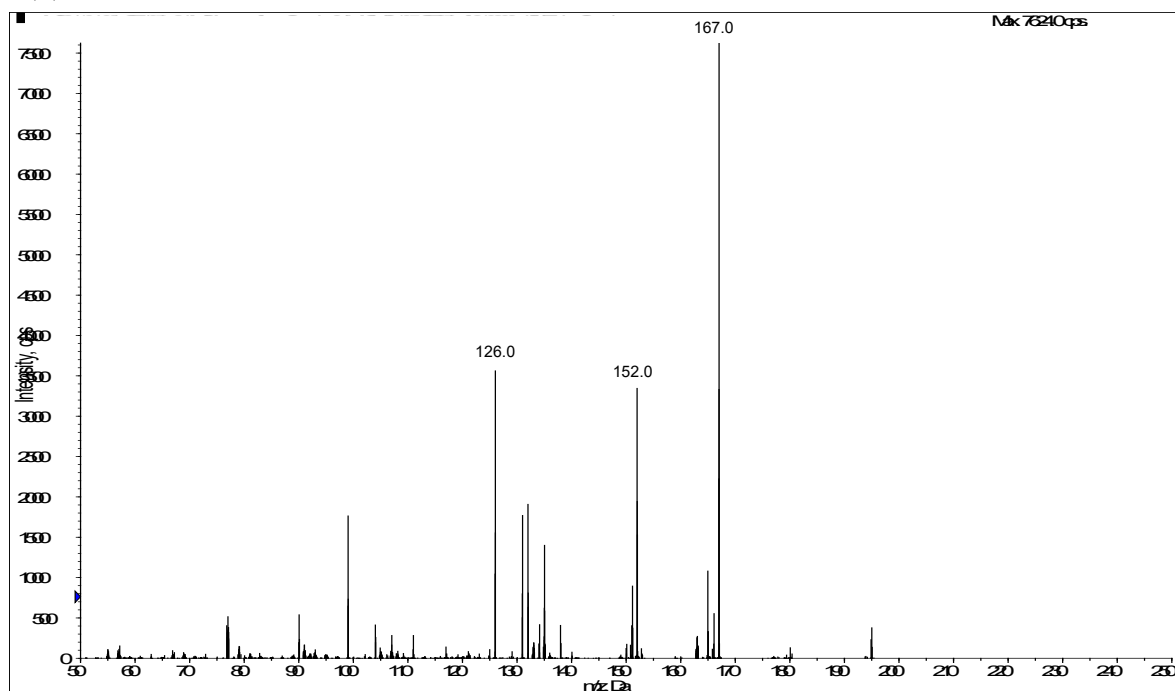


図2 MeCHQのマスペクトル

スキャン範囲： m/z 50～250、測定条件：ESI (+)、デクラスタリング電位 76 V

(a)



(b)

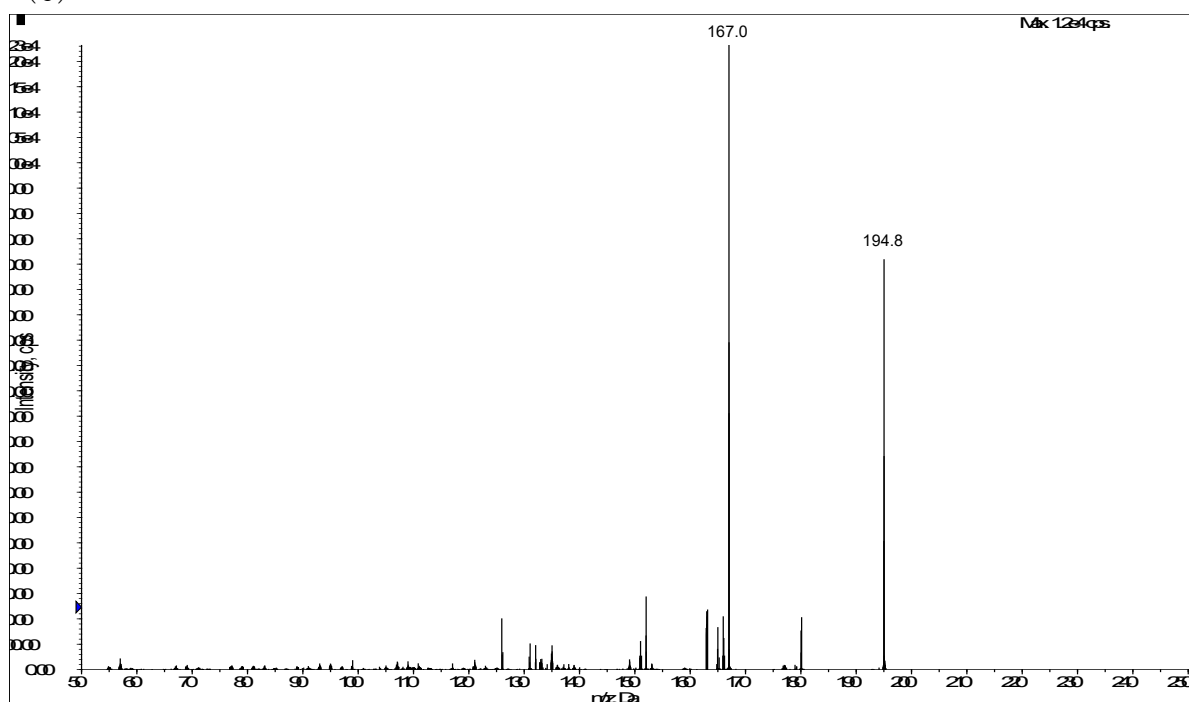


図3-1 MeCHQのプロダクトイオンスペクトル

プリカーサーイオン： m/z 195.0、スキャン範囲： m/z 50～250、測定条件：ESI（+）、デクラスタリング電位76 V
コリジョンエネルギー (a) 35 eV、 (b) 25 eV

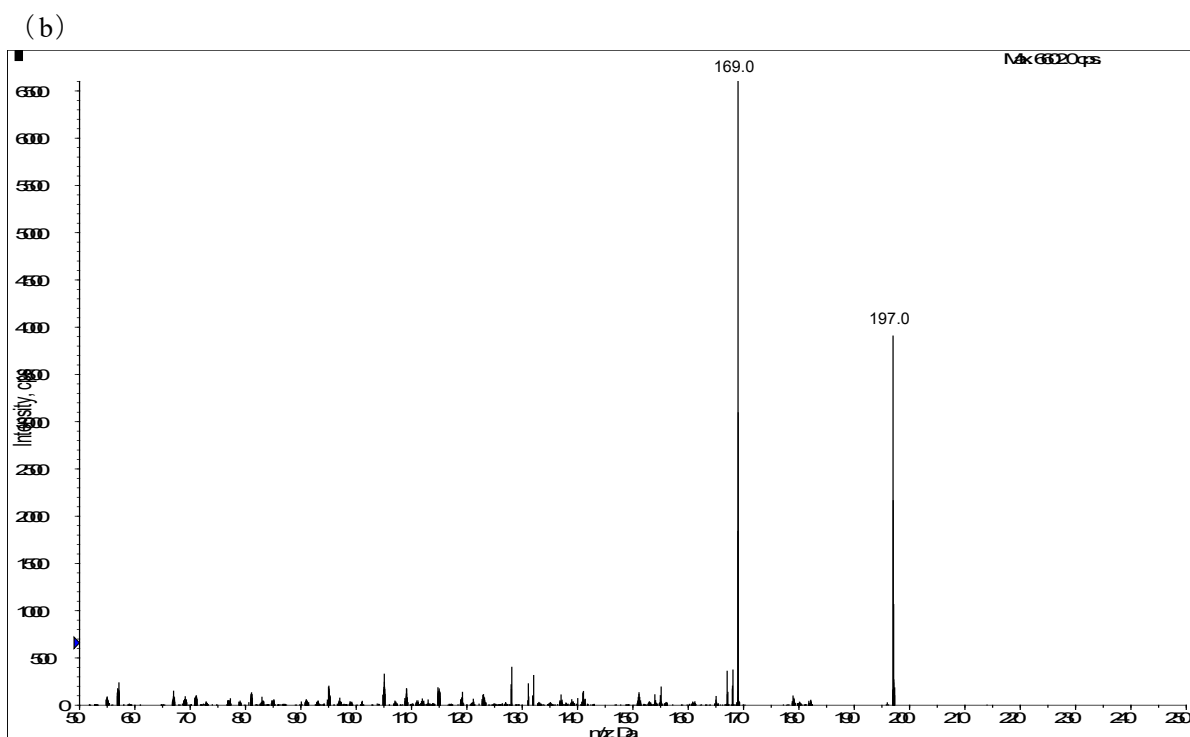
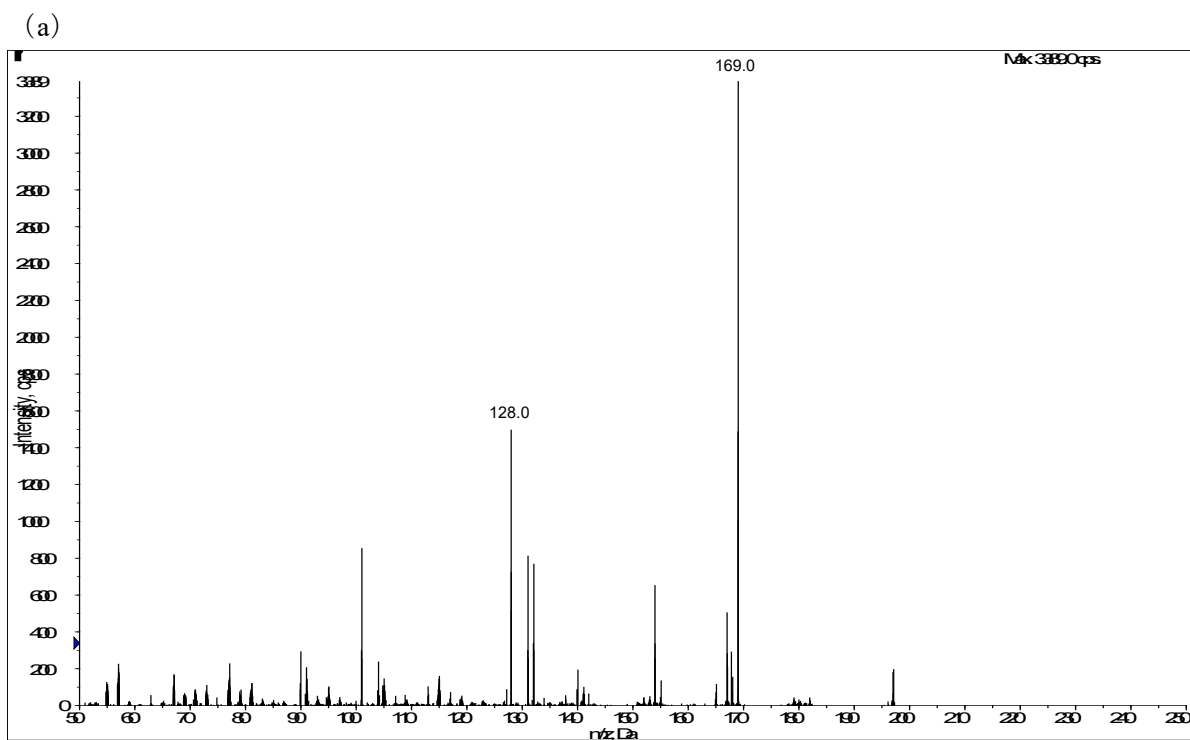


図3-2 MeCHQのプロダクトイオンスペクトル

プリカーサーイオン： m/z 197.0、スキャン範囲： m/z 50～250、測定条件：ESI（+）、デクラスタリング電位76 V、
 コリジョンエネルギー (a) 35 eV、 (b) 25 eV

2) LC条件

ODS カラム (InertSustain C18、ジーエルサイエンス製) を用いて MeCHQ の移動相条件を検討した。移動相の有機溶媒としてメタノール及びアセトニトリル、添加剤として酢酸、ギ酸及び酢酸アンモニウムを検討したところ、アセトニトリル及びギ酸を用いた場合に高い S/N が得られ、ピーク形状も良好であった。そこで、ギ酸の濃度 (0.01、0.05、0.1 vol%) を検討した結果、0.01 vol% ギ酸で最も高いピーク強度が得られた。これらの結果から、移動相には 0.01 vol% ギ酸及び 0.01 vol% ギ酸・アセトニトリル溶液を用いることとした。

次に、5 種類の ODS カラム [InertSustain C18、Inertsil ODS-4 (ジーエルサイエンス製)、InertSustainSwift C18 (ジーエルサイエンス製)、L-column3 ODS (化学物質評価研究機構製) 及び Atlantis dC18 (Waters 製) : 内径 2.1 mm (Atlantis dC18 は 3 mm)、長さ 150 mm、粒子径 3 μm] を用いてピーク形状やピーク強度を比較した。その結果、ピーク形状に大きな違いは見られなかったが、InertSustain C18 を用いた場合に高い S/N が得られ、ピーク形状も良好であった。このため、分析カラムとして InertSustain C18 を用いて測定を行うこととした。

最適化した条件での MeCHQ 標準溶液 (0.01 $\mu\text{g/mL}$) の SRM クロマトグラムを図 4 に示した。定量イオンでは十分な感度が得られたが、定性イオンではバックグラウンドが高く、 S/N がやや低かった。

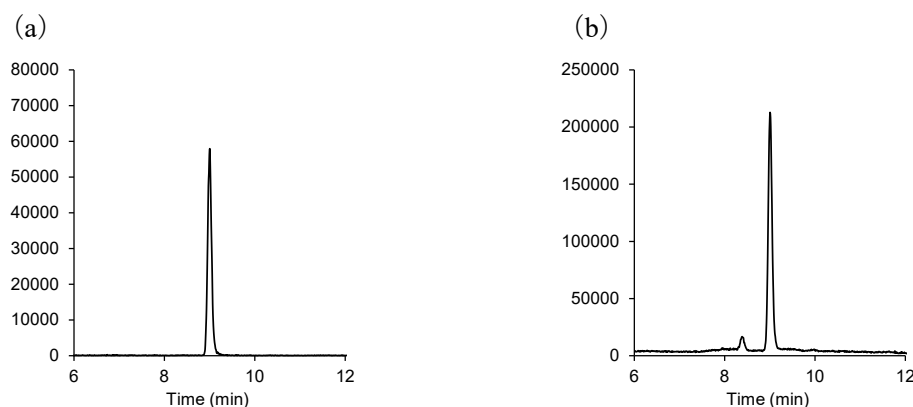


図 4 MeCHQ 標準溶液 (キザロホップとして 0.01 $\mu\text{g/mL}$) の SRM クロマトグラム (LC-MS/MS で測定)

(a) m/z 195.0 $\rightarrow$ 126.0 (定量イオン)、(b) m/z 195.0 $\rightarrow$ 167.0 (定性イオン)

②GC-MS/MS 測定条件

MeCHQ は GC での測定も可能であるため、GC-MS/MS を用いた測定を検討した。分析カラムとして微極性カラム (5% ジフェニル (相当) -95% ジメチルポリシルフェニレンシロキサン) である DB-5ms UI (内径 0.25 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25 μm : Agilent Technologies 製) に不活性シリカキャピラリーチューブ (内径 0.25 mm : ジーエルサイエンス製) を約 2 m 接続したものをを用いて測定条件の検討を行った。

スキャン測定を行ったところ、分子イオン (M^{+} 、 m/z 194.1) 及びその同位体イオン (m/z 196.1) の他、フラグメントイオン (m/z 165.0 等) が観測された (図 5)。分子イオン m/z 194.1 をプリカーサーイオンとしてプロダクトイオンスキャンを行ったところ、プロダクトイオンとして m/z 165.1 等が観測された (図 6-1)。 m/z 196.1 をプリカーサーイオンとした場合はプロダクトイオンとして m/z 167.1 等が観測された (図 6-2)。フラグメントイオン m/z 165.0 をプリカーサーイオンとした場合はプロダクトイオンとして m/z 111.0 及び 138.0 等が観測された (図 6-3)。SRM 測定を行った結果、 m/z 194.1 $\rightarrow$ 165.1、196.1 $\rightarrow$ 167.1、 m/z 165.0 $\rightarrow$ 111.0 及び m/z 165.0 $\rightarrow$ 138.0 で高い S/N が得られた。本検討では、分子イオンとその同位体イオンをプリカーサーイオンとした m/z 194.1 $\rightarrow$ 165.1 及び 196.1 $\rightarrow$ 167.1 をそれぞれ定量イオン及び定性イオンとすることとした。

最適化した条件での MeCHQ 標準溶液（キザロホップとして 0.002 $\mu\text{g/mL}$ ）の SRM クロマトグラムを図 7 に示した。定量イオン及び定性イオンともに十分な感度が得られた。『2. 試験溶液の調製方法の検討 (3) ミニカラム精製』で後述するように、ミニカラムからの溶出液を LC-MS/MS で測定したところ、MeCHQ とほぼ同じ保持時間に充填剤由来と考えられる妨害ピークが認められた。一方、GC-MS/MS では定量を妨害するピークは認められなかった。このため、MeCHQ は GC-MS/MS で測定することとした。検量線を 0.0005～0.003 $\mu\text{g/mL}$ 及び 0.015～0.09 $\mu\text{g/mL}$ の範囲で作成したところ、いずれも良好な直線性が得られた（図 8）。

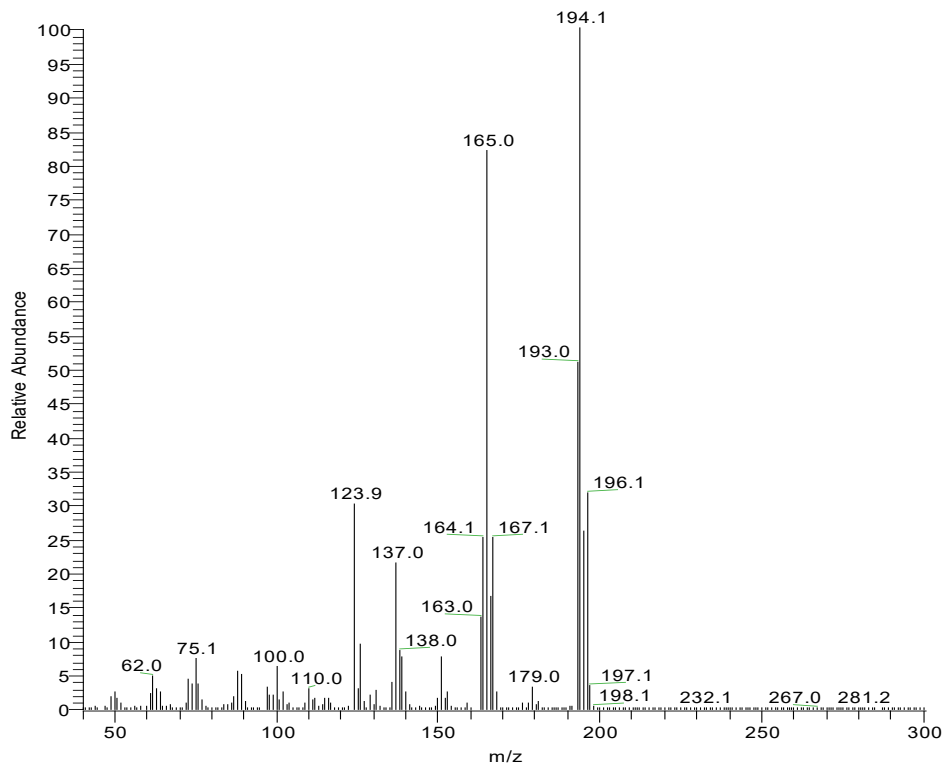


図5 MeCHQのマススペクトル

スキャン範囲：m/z 40～300

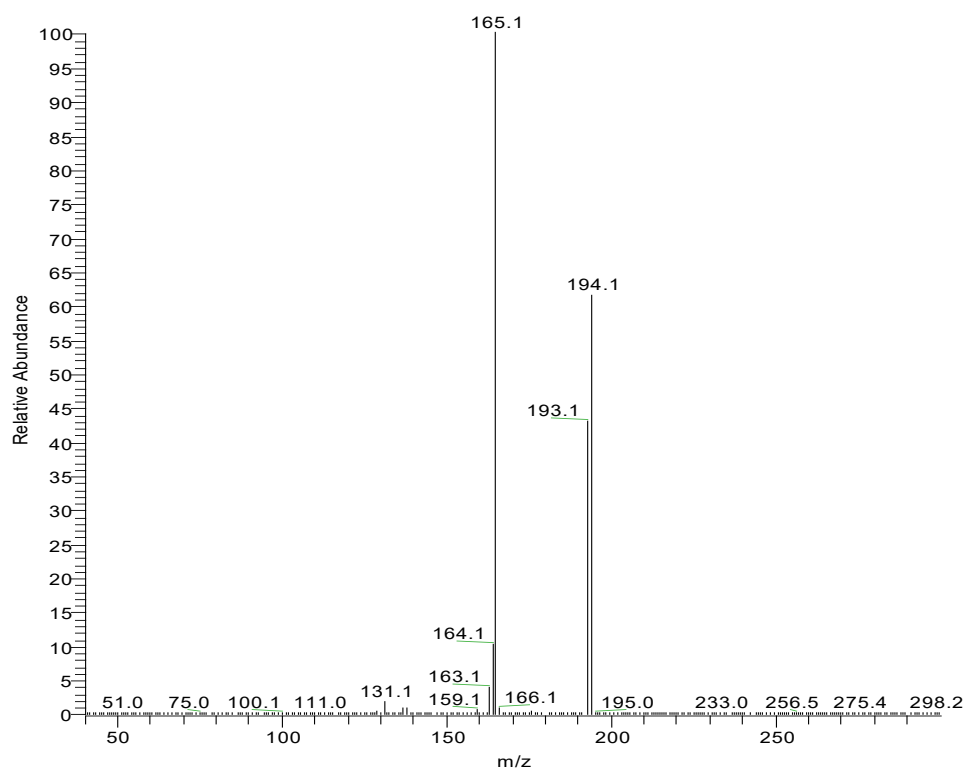


図6-1 MeCHQのプロダクトイオンスペクトル

プリカーサーイオン： m/z 194.1、スキャン範囲： m/z 40～300、コリジョンエネルギー：8 eV

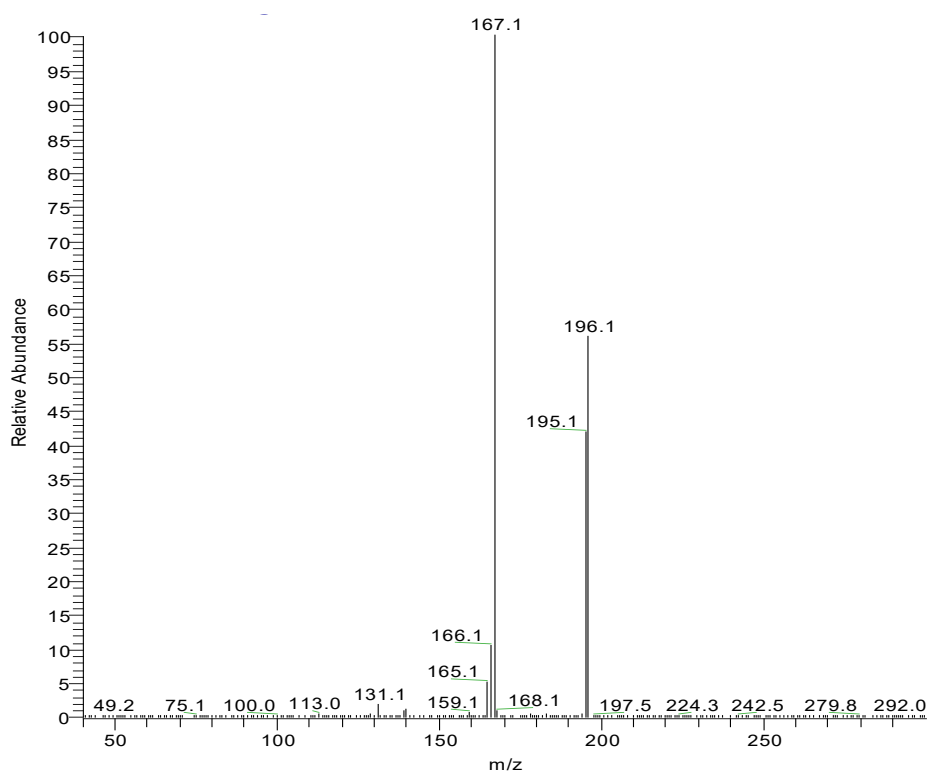


図6-2 MeCHQのプロダクトイオンスペクトル

プリカーサーイオン： m/z 196.1、スキャン範囲： m/z 40～300、コリジョンエネルギー：8 eV

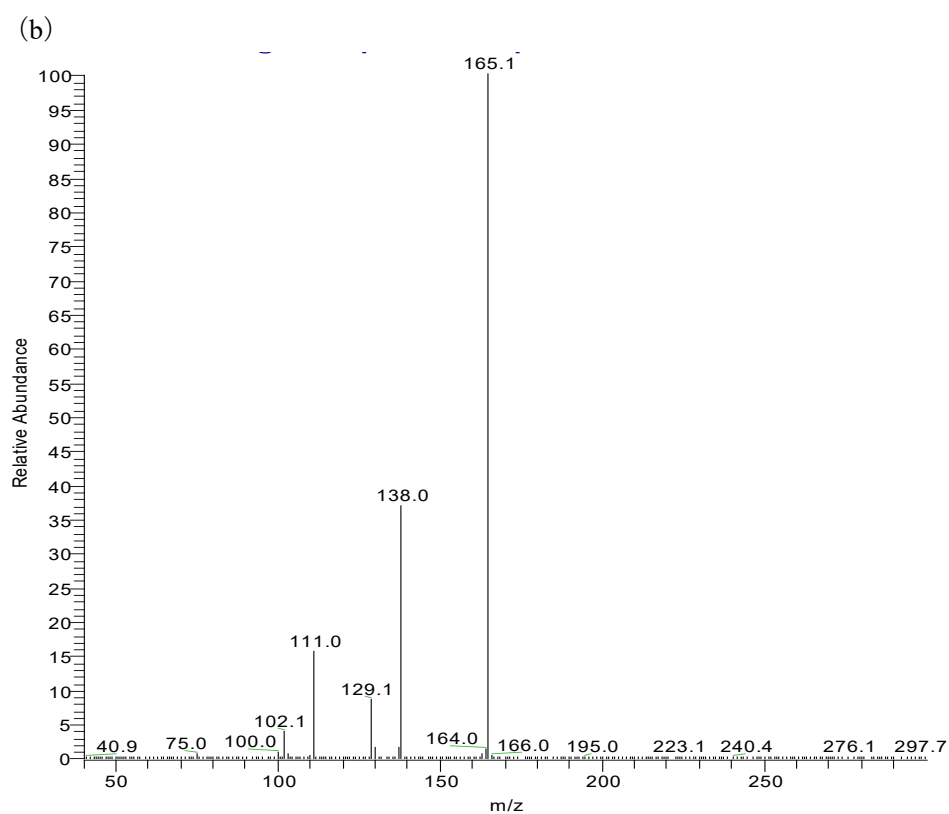
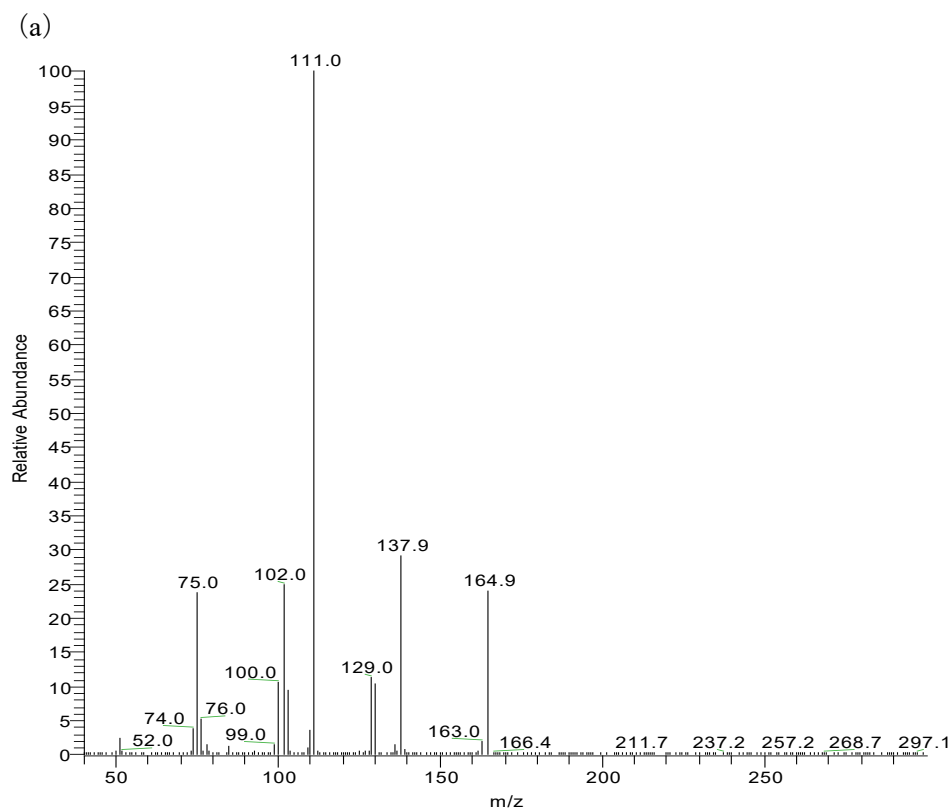


図6-3 MeCHQのプロダクトイオンスペクトル

プリカーサーイオン： m/z 165.0、スキャン範囲： m/z 40～300、コリジョンエネルギー：(a) 24 eV、(b) 12 eV

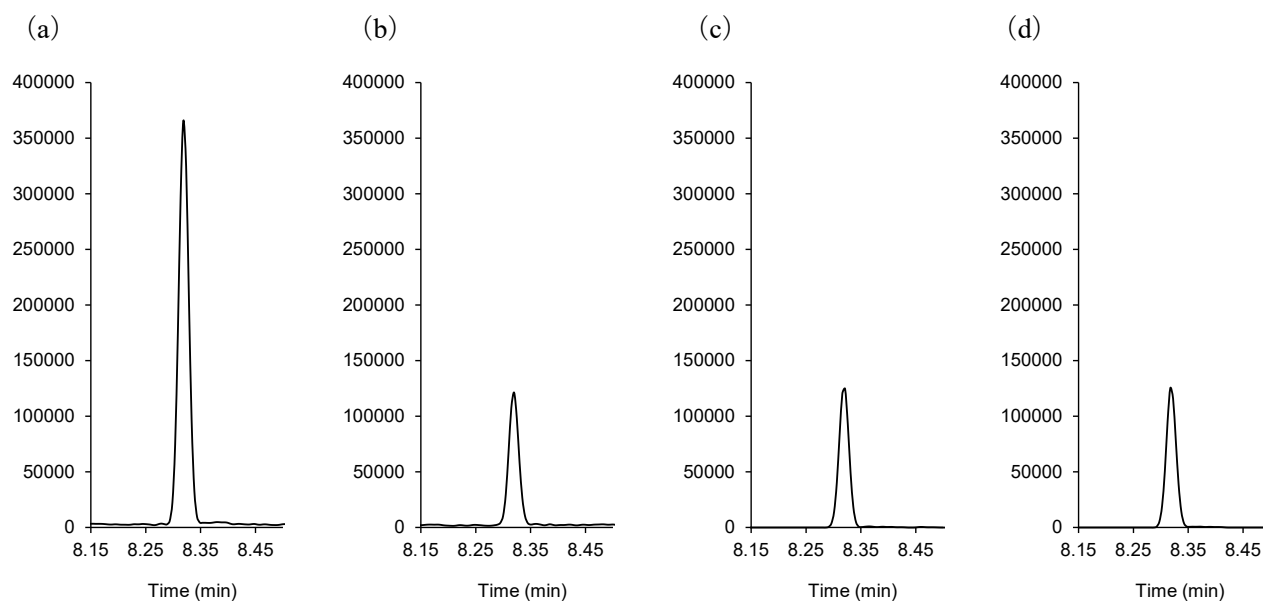


図7 MeCHQ 標準溶液（キザロホップとして 0.002 $\mu\text{g/mL}$ ）のクロマトグラム（GC-MS/MS で測定）
 (a) m/z 194.1 $\rightarrow$ 165.1（定量イオン）、(b) m/z 196.1 $\rightarrow$ 167.1（定性イオン）、(c) m/z 165.0 $\rightarrow$ 111.0（定性イオン）、(d) m/z 165.0 $\rightarrow$ 138.0（定性イオン）

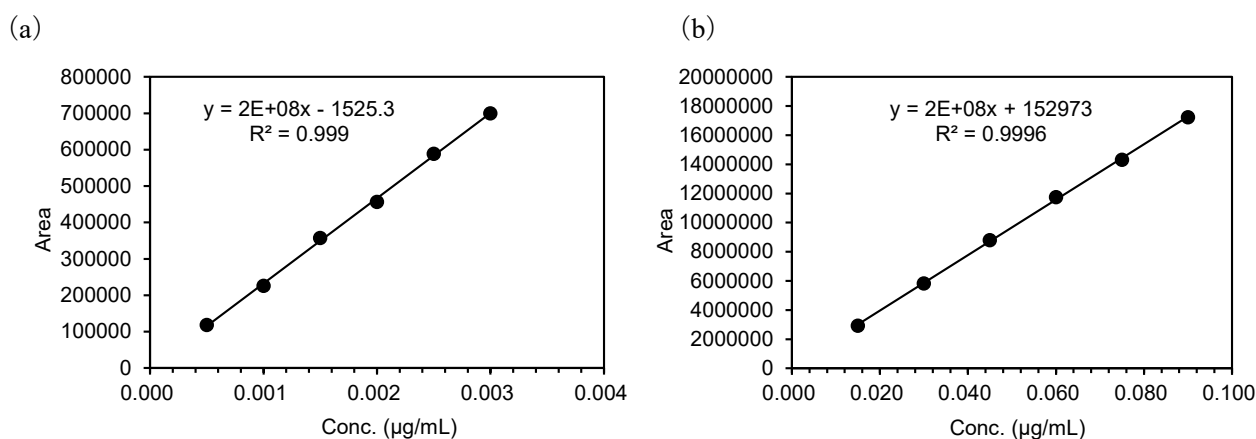


図8 MeCHQ の検量線の例（ m/z 194.1 $\rightarrow$ 165.1）

- (a) キザロホップとして 0.0005~0.003 $\mu\text{g/mL}$
 (b) キザロホップとして 0.015~0.09 $\mu\text{g/mL}$

(2) キザロホップエチル、キザロホップ P テフリル及びキザロホップ

本試験法ではキザロホップエチル、キザロホップPテフリル及びその代謝物をMeCHQへ変換して測定を行うため、キザロホップエチル、キザロホップPテフリル及びキザロホップを測定する必要はないが、変換反応の進行状況を確認するため、測定条件を検討した。なお、いずれの化合物もLC-MS/MSで測定可能であるが、GC-MS/MSではキザロホップを測定することができないため、LC-MS/MSでの測定条件を検討した。

①MS条件

1) キザロホップエチル

ESI (+) 及びESI (-) モードでスキャン測定を行った結果、ESI (-) モードでは脱プロトン分子等のキザロホップエチル由来のイオンは検出されなかった。一方、ESI (+) モードではプロトン付加分子 (m/z 373.1、 $[M+H]^+$) 及びその同位体イオン (m/z 375.1) 等が観測された (図9)。 m/z 373.1をプリカーサーイオンとしてプロダクトイオンスキャンを行ったところ、プロダクトイオンとして m/z 299.0及び91.1等が観測された (図10)。後述するLC条件で測定を行い、 S/N が高かった m/z 373.1 $\rightarrow$ 299.0を定量イオン、 m/z 373.1 $\rightarrow$ 91.1を定性イオンとすることとした。

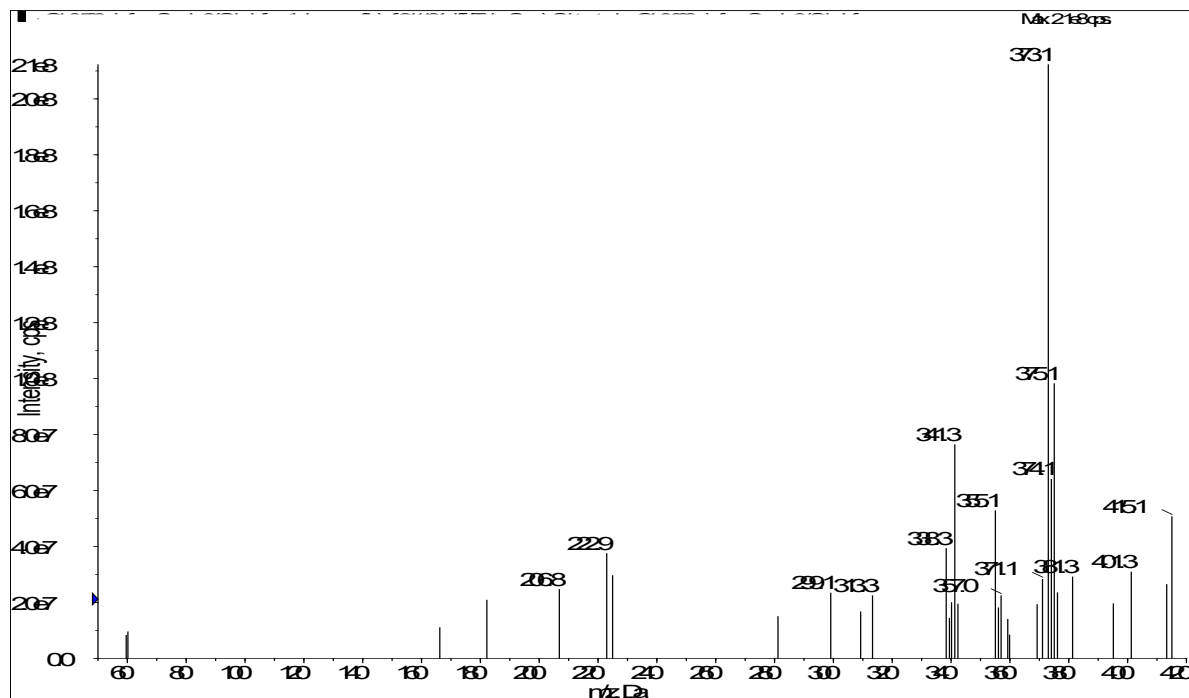
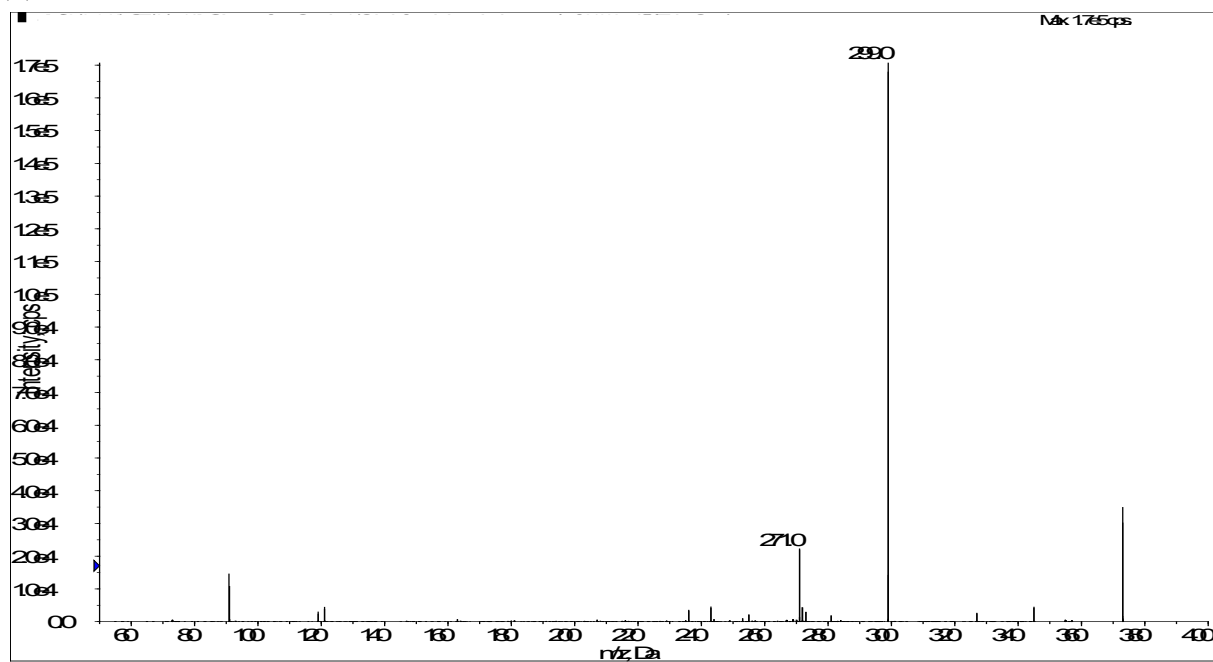


図9 キザロホップエチルのマススペクトル

スキャン範囲: m/z 50~420、測定条件: ESI (+)、デクラスタリング電位 146 V

(a)



(b)

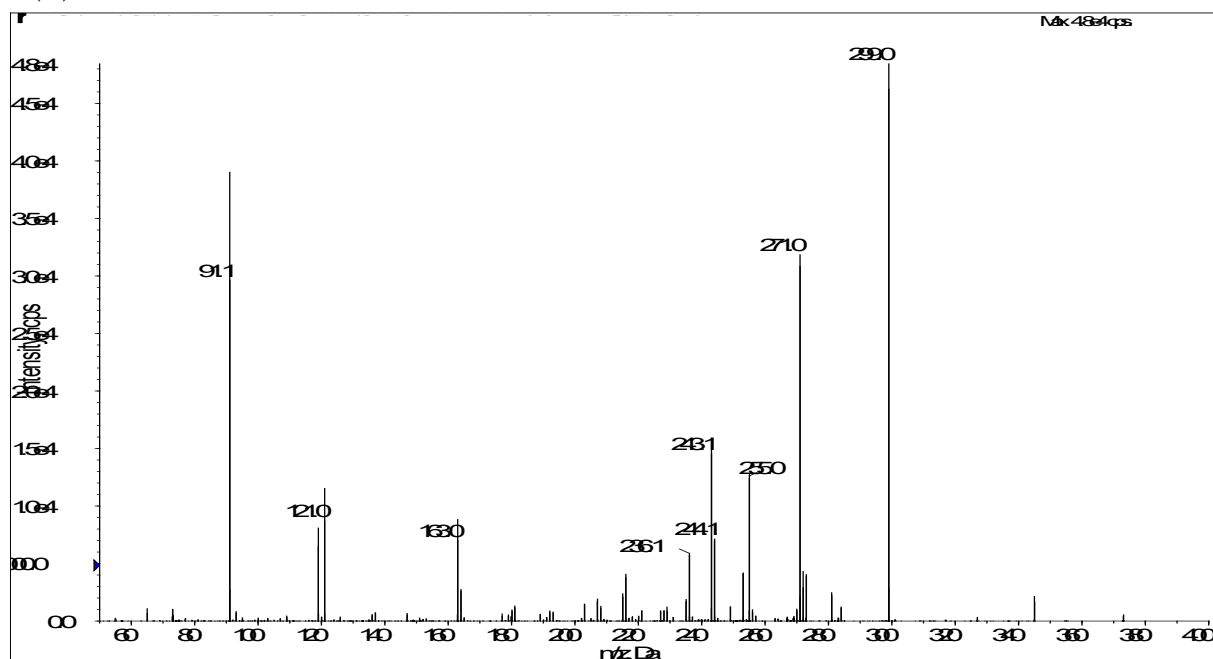


図10 キザロホップエチルのプロダクトイオンスペクトル

プリカーサーイオン： m/z 373.1、スキャン範囲： m/z 50～400、測定条件：ESI（+）、デクラスタリング電位146 V
コリジョンエネルギー（a）27 eV、（b）37 eV

2) キザロホップPテフリル

ESI (+) 及びESI (-) モードでスキャン測定を行った結果、ESI (-) モードでは脱プロトン分子等のキザロホップPテフリル由来のイオンは検出されなかった。一方、ESI (+) モードではプロトン付加分子 (m/z 429.1、 $[M+H]^+$) 及びその同位体イオン (m/z 431.0) が観測された (図11)。 m/z 429.1をプリカーサーイオンとしてプロダクトイオンスキャンを行ったところ、プロダクトイオンとして m/z 299.0及び85.1等が観測された (図12)。後述するLC条件で測定を行い、 S/N が高かった m/z 429.1 $\rightarrow$ 299.0を定量イオン、 m/z 429.1 $\rightarrow$ 85.1を定性イオンとすることとした。

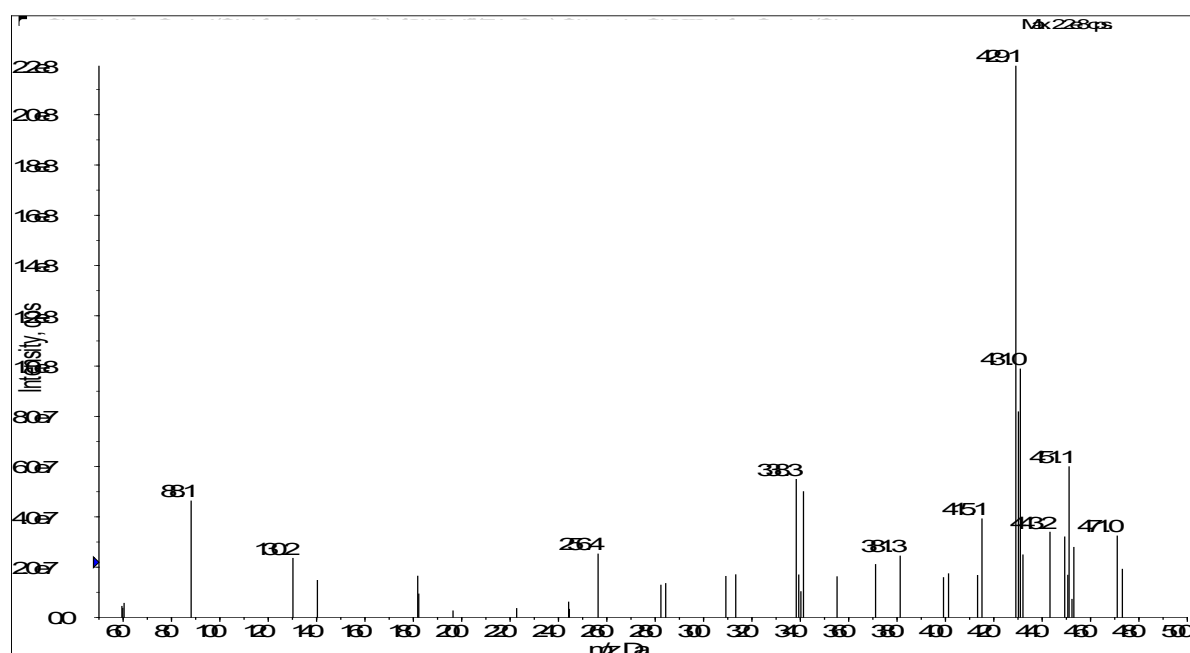
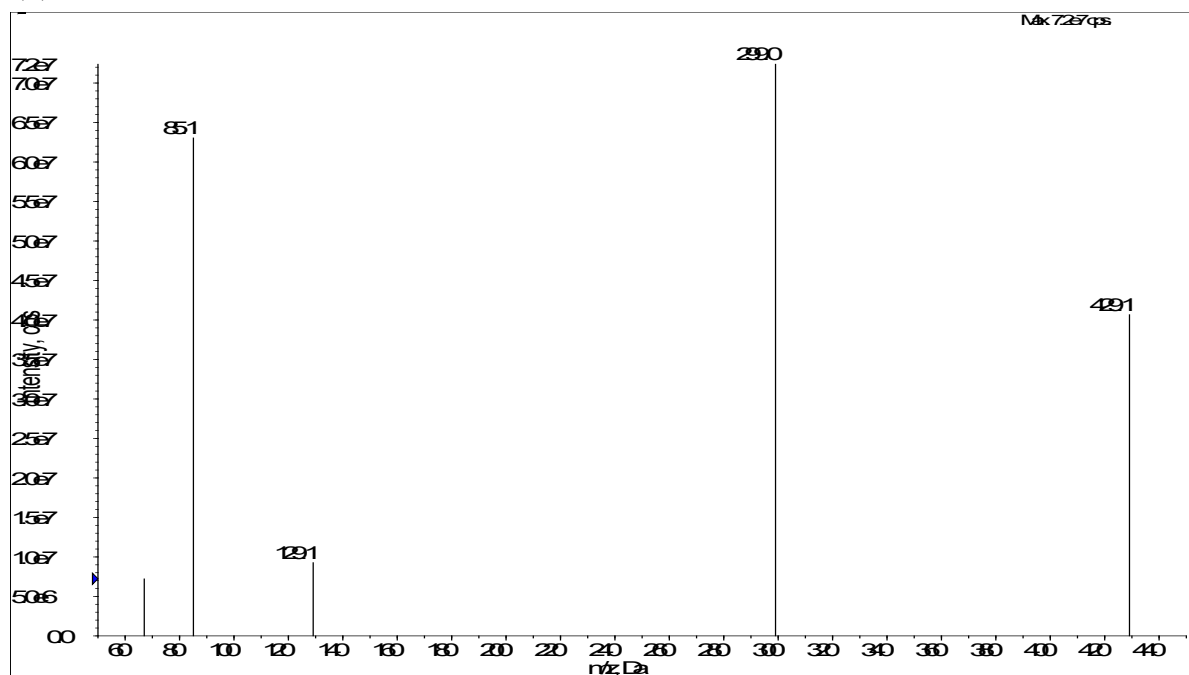


図11 キザロホップPテフリルのマスペクトル

スキャン範囲： m/z 50～500、測定条件：ESI (+)、デクラスタリング電位 81 V

(a)



(b)

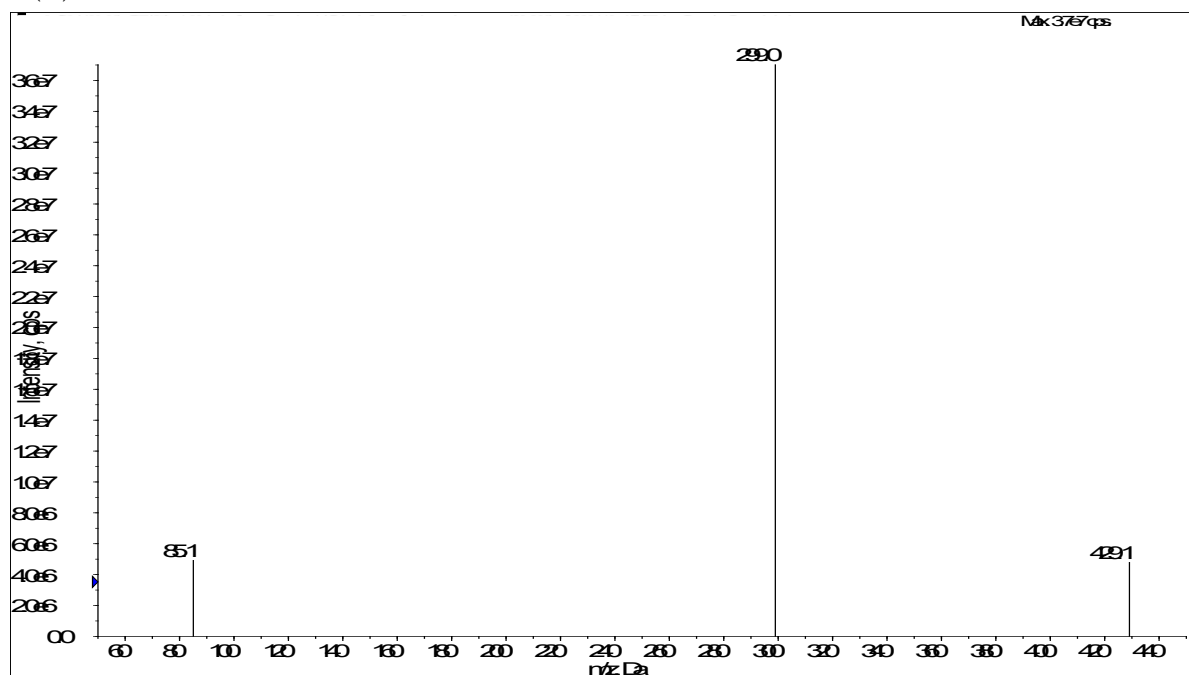


図12 キザロホップPテフリルのプロダクトイオンスペクトル

プリカーサーイオン： m/z 429.1、スキャン範囲： m/z 50～450、測定条件：ESI（+）、デクラスタリング電位81 V
コリジョンエネルギー (a) 23 eV、(b) 27 eV

3) キザロホップ

ESI（+）及びESI（-）モードでスキャン測定を行った結果、ESI（-）モードでは脱プロトン分子（ m/z 343.1、 $[M-H]^-$ ）及びその同位体イオン（ m/z 345.2）が観測された（図13）。 m/z 343.1をプリカーサーイオンとしてプロダクトイオンスキャンを行ったところ、プロダクトイオンとして m/z 271.0及び235.1等が観測された（図14）。一方、ESI（+）モードではプロトン付加分子（ m/z 345.1、 $[M+H]^+$ ）及びその同位体イオン（ m/z 347.1）が観測された（図15）。 m/z 345.1をプリカーサーイオンとしてプロダクト

イオンスキャンを行ったところ、プロダクトイオンとして m/z 299.0及び244.0等が観測された（図16）。後述するLC条件で測定を行ったところ、ESI（+）、ESI（-）のいずれのモードでも高感度に測定できた。本検討ではESI（+）モードで m/z 345.1→299.0を定量イオン、 m/z 345.1→244.0を定性イオンとすることとした。

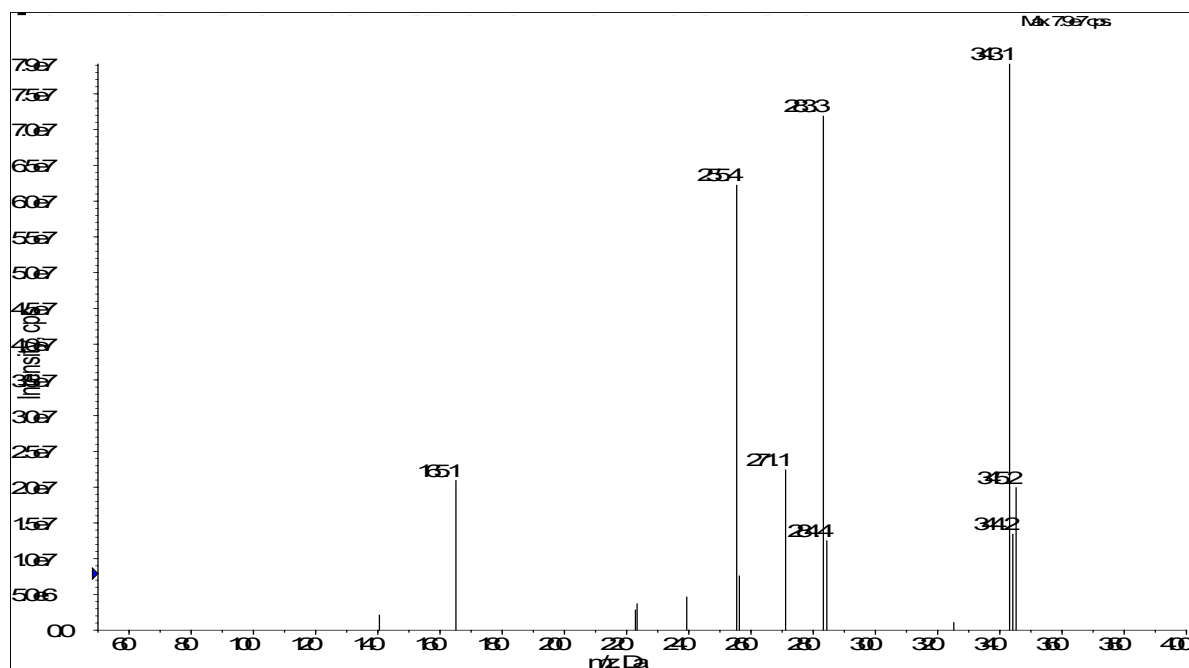


図13 キザロホップのマススペクトル

スキャン範囲： m/z 50～400、測定条件：ESI（-）、デクラスタリング電位 -55 V

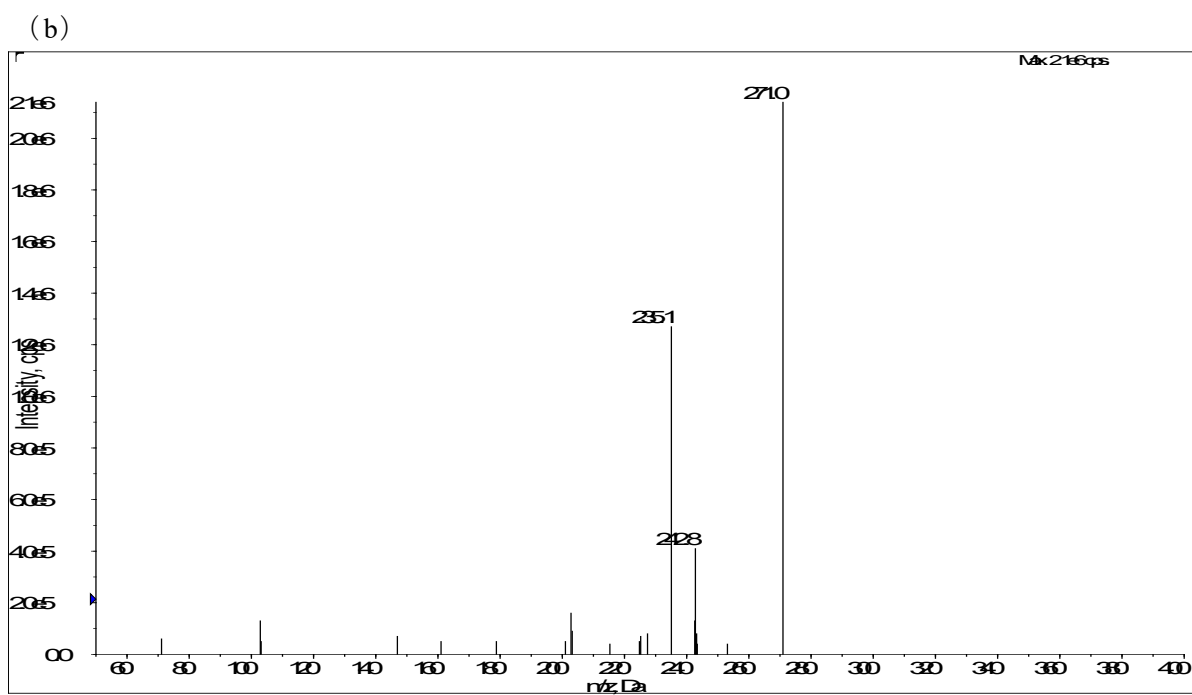
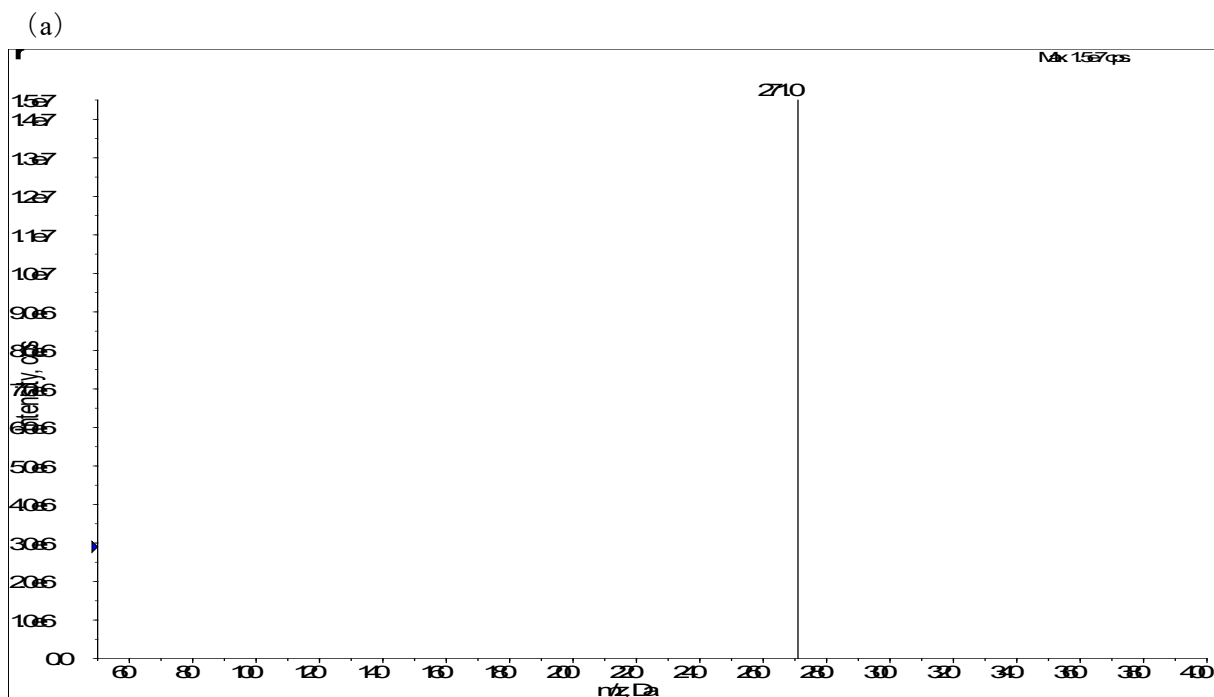


図14 キザロホップのプロダクトイオンスペクトル

プリカーサーイオン： m/z 343.1、スキャン範囲： m/z 50～400、測定条件：ESI（－）、デクラスタリング電位-55 V
 コリジョンエネルギー（a）-20 eV、（b）-35 eV

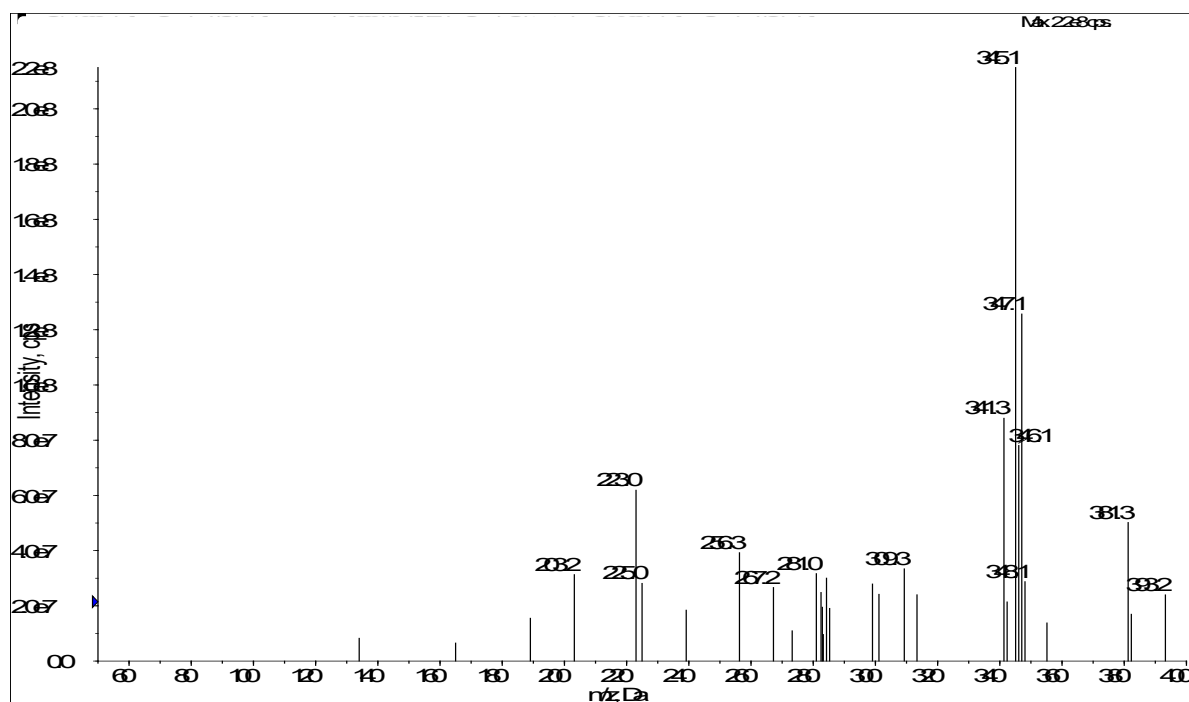


図15 キザロホップのマスペクトル

スキャン範囲： m/z 50～400、測定条件：ESI（+）、デクラスタリング電位 101 V

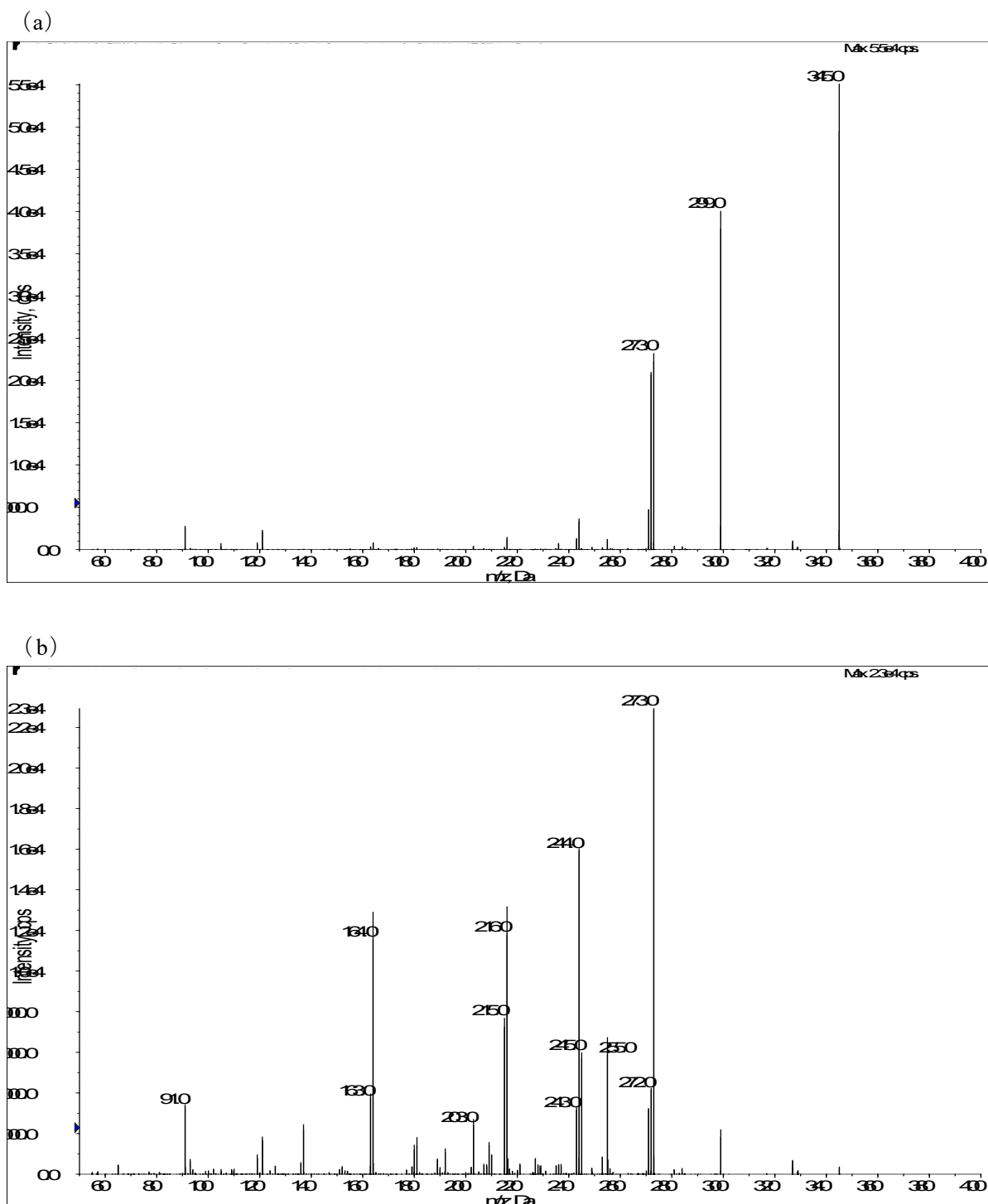


図16 キザロホップのプロダクトイオンスペクトル

プリカーサーイオン： m/z 345.1、スキャン範囲： m/z 50～400、測定条件：ESI（+）、デクラスタリング電位101 V
 コリジョンエネルギー (a) 27 eV、(b) 41 eV

②LC条件

『(1) MeCHQ』で最適化したLC条件で、キザロホップエチル、キザロホップPテフリル及びキザロホップの標準溶液を測定した。その結果、いずれの化合物も良好なピーク形状及び感度が得られた（図17）。このため、キザロホップエチル、キザロホップPテフリル及びキザロホップはMeCHQと同条件で測定を行うこととした。

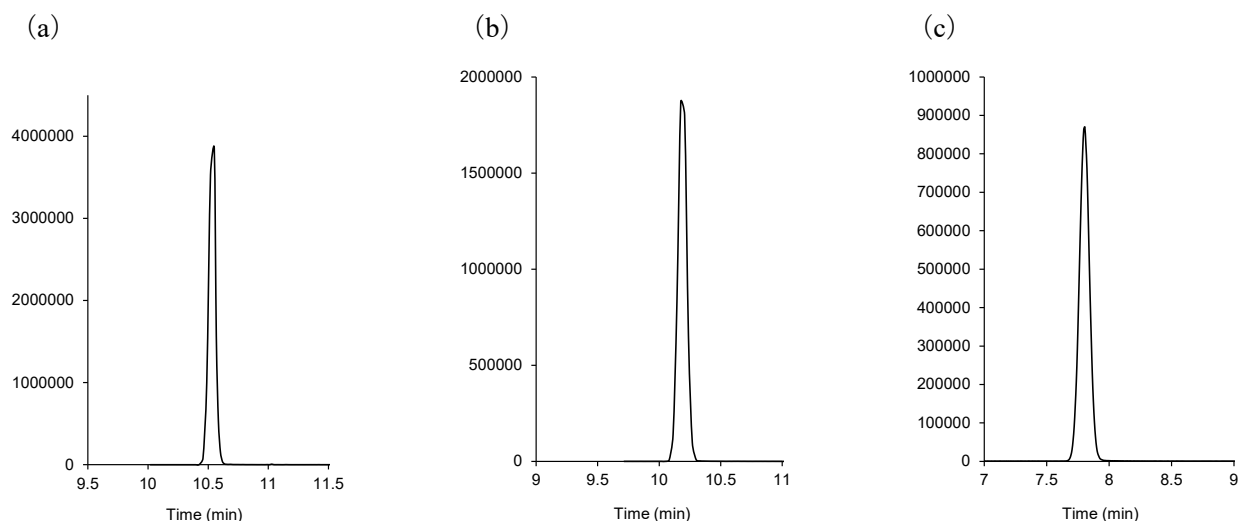


図 17 キザロホップエチル、キザロホップ P テフリル及びキザロホップ標準溶液（キザロホップとして 0.01 $\mu\text{g/mL}$ ）のクロマトグラム

(a) キザロホップエチル、(b) キザロホップ P テフリル、(c) キザロホップ

2. 試験溶液の調製方法の検討

(1) 濃縮操作の検討

MeCHQ の蒸気圧を調査したところ、実測値は文献等に示されていなかったが、計算値は 2.91×10^{-3} Torr* (≈ 390 mPa) であり、高い値であった。このため、通常の濃縮操作により揮散するか検討を行った。MeCHQ (1 $\mu\text{g/mL}$) 0.1 mL を酢酸エチル及び *n*-ヘキサン (1 : 1) 混液 20 mL に加え、ロータリーエバポレーター (40°C、約 200 hPa) で 1 mL 程度まで濃縮した後、窒素気流により乾固した。その結果、MeCHQ の回収率は 50% となり、濃縮操作中に揮散したものと考えられた (表 1)。そこで、揮散の抑制を目的に、キーパーとしてジエチレングリコール・アセトン溶液を添加して濃縮操作を行った。酢酸エチル及び *n*-ヘキサン (1 : 1) 混液 20 mL に MeCHQ (1 $\mu\text{g/mL}$) 0.1 mL を添加した後、ジエチレングリコール・アセトン溶液 (0.5、1 及び 2 vol%) 0.5 mL を加えて同様に濃縮乾固したところ、93% 以上の良好な回収率が得られた (表 1)。これらの結果から、濃縮乾固する場合はキーパーとしてジエチレングリコール・アセトン溶液を加えるのがよいと考えられた。

*SciFinder (Calculated using Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software V11.02)

表 1 濃縮乾固における MeCHQ の回収率 (%)

溶媒	ジエチレングリコール 添加濃度及び添加量	回収率 (%)
酢酸エチル及び <i>n</i> -ヘキサン (1 : 1) 混液	—	50
	0.5 vol%, 0.5 mL	93
	1 vol%, 0.5 mL	94
	2 vol%, 0.5 mL	107

添加量 : MeCHQ 0.1 μg

濃縮乾固における MeCHQ の揮散の抑制には、キーパーとしてジエチレングリコールを添加するのが有効であった。しかしながら、ジエチレングリコールは *n*-ヘキサンへの溶解性が低いことや、GC-MS/MS や LC-MS/MS が汚染するという問題があった。そこで、窒素気流による乾固はせず、ロータリーエバポ

レーター（40℃、約 200 hPa）で 1 mL 程度まで濃縮した後、次の操作を行う方法を検討した。MeCHQ（1 µg/mL）0.1 mL を *n*-ヘキサンまたは酢酸エチル及び *n*-ヘキサン（1 : 19）混液 20 mL に加え、ロータリーエバポレーター（40℃、約 200 hPa）で約 1 mL まで濃縮した後、得られた溶液を 10 mL に定容し、GC-MS/MS で測定した。その結果、98%以上の回収率が得られた（表 2）。これらの結果から、濃縮操作において乾固が必要でない場合はロータリーエバポレーター等で 1～2 mL 程度まで濃縮し、得られた濃縮液を用いて次の操作を行うこととした。

表 2 濃縮操作（乾固せず約 1 mL まで濃縮した場合）における MeCHQ の回収率（%）

溶媒	回収率 (%)
<i>n</i> -ヘキサン	98
酢酸エチル及び <i>n</i> -ヘキサン（1 : 19）混液	100

添加量：MeCHQ 0.1 µg

(2) 転溶

①MeCHQ

加熱還流後の反応液を有機溶媒で転溶することによって、MeCHQ を抽出することができるか検討を行った。塩基性条件（pH 約 14：表 3）及び酸性条件（pH 約 0.6：表 4）で検討した結果、塩基性条件では *n*-ヘキサンで 1 回、酸性条件では 2 回転溶することによって良好な回収率が得られた。ほうれんそう、りんご及び大豆を用いてマトリックス共存下での操作性*を確認した結果、塩基性条件では有機層がゼリー状になり、有機層の採取が困難であった。転溶の際、食塩を加えたところ、ほうれんそうやりんごでは改善されたが、大豆では水層と有機層の間に中間層が生成し、有機層を採取するのが困難であった。一方、酸性条件では食塩を加えなくても、エマルジョンが生成したり、水層と有機層の間に中間層が生成することはなかった。これらの結果から、反応液を酸性にした後、*n*-ヘキサンを用いて 2 回転溶を行うこととした。なお、酸性条件での転溶後の水層の pH は大豆 0.6、キャベツ 0.6、ばれいしょ 0.7、ほうれんそう 0.6、りんご 0.6 及びいちご 0.6 であった。

* 「7. 試験溶液の調製方法、(1) MeCHQ への変換」に記載の方法で調製した。

表 3 *n*-ヘキサン転溶（塩基性条件）における回収率（%）

	1 回目	2 回目	3 回目	合計
MeCHQ	96	0	0	96

操作方法：水酸化カリウム・メタノール溶液 16 mL 及びメタノール 4 mL を混合した（加熱還流後の反応液 200 mL をメタノールで 250 mL に定容した溶液に相当）。この溶液に MeCHQ 標準溶液（1 µg/mL）を添加（0.1 mL）し、水 30 mL を加えた後、*n*-ヘキサン 40 mL で 3 回転溶

表 4 *n*-ヘキサン転溶（酸性条件）における回収率（%）

	1 回目	2 回目	3 回目	合計
MeCHQ	93	3	0	96

操作方法：水酸化カリウム・メタノール溶液 16 mL 及びメタノール 4 mL を混合した（加熱還流後の反応液 200 mL をメタノールで 250 mL に定容した溶液に相当）。この溶液に MeCHQ 標準溶液（1 µg/mL）を添加（0.1 mL）し、1 mol/L 塩酸 30 mL を加えた後、*n*-ヘキサン 40 mL で 3 回転溶

②キザロホップエチル、キザロホップ P テフリル及びキザロホップ

キザロホップエチル、キザロホップ P テフリル及びキザロホップについて、表 4 と同条件（酸性条件）で *n*-ヘキサン転溶を行った。結果を表 5 に示した。キザロホップエチル、キザロホップ P テフリルともにキザロホップが検出され、酸性条件で一部加水分解されることがわかった。いずれの化合物も回収率 22～25%（キザロホップエチルはキザロホップエチルとキザロホップの合計、キザロホップ P テフリルはキザロホップ P テフリルとキザロホップの合計）となり、本条件では十分な回収率が得られないことがわかった。これらの結果から、変換反応の進行状況を確認するためのキザロホップエチル、キザロホップ P テフリル及びキザロホップの測定は行わないこととした。

表 5 *n*-ヘキサン転溶（酸性条件）における回収率（%）

検討化合物	検出化合物	1 回目	2 回目	合計 (1 回目+2 回目)
キザロホップエチル	キザロホップエチル	3	0	3
	キザロホップ	12	9	21
	合計 (キザロホップエチル+キザロホップ)	15	9	24
キザロホップ P テフリル	キザロホップ P テフリル	1	0	1
	キザロホップ	12	9	21
	合計 (キザロホップ P テフリル+キザロホップ)	13	9	22
キザロホップ	キザロホップ	14	11	25

操作方法：水酸化カリウム・メタノール溶液 16 mL 及びメタノール 4 mL を混合した（加熱還流後の反応液 200 mL をメタノールで 250 mL に定容した溶液に相当）。この溶液に各化合物の標準溶液（1 μ g/mL）を添加（0.1 mL）し、1 mol/L 塩酸 30 mL を加えた後、*n*-ヘキサン 40 mL で 3 回転溶

(3) ミニカラム精製

PSA ミニカラム [InertSep PSA (500 mg/6 mL)] 及びシリカゲルミニカラム [InertSep SI (1 g/6 mL)] を用いた精製を検討した。PSA ミニカラムを用いた場合、MeCHQ は *n*-ヘキサン 8 mL（うち 2 mL で負荷）で溶出することにより、良好な回収率が得られた（表 6）。一方、シリカゲルミニカラムを用いた場合は *n*-ヘキサン 5.5 mL で負荷・洗浄（うち 0.5 mL で負荷）後、酢酸エチル及び *n*-ヘキサン（1 : 19）混液 8 mL で溶出することにより良好な回収率が得られた（表 7）。精製効果を確認するため、大豆及びほうれんそうを実験方法の『7. 試験溶液の調製』に従って転溶まで行い、PSA ミニカラムまたはシリカゲルミニカラムで精製した。その結果、PSA ミニカラムまたはシリカゲルミニカラムのいずれか一方のみでは色素や脂質の除去が不十分であった。このため、PSA ミニカラムで精製した後、シリカゲルミニカラムで精製を行うこととした。この精製により、GC-MS/MS 測定においては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。なお、シリカゲルミニカラムからの回収率は負荷液を 5 mL とした場合も良好であったことから（表 8）、負荷液の溶媒量は 0.5 mL から 5 mL の範囲で変動しても回収率に影響はないものと考えられた。MeCHQ は乾固すると揮散してしまうため（表 1）、PSA ミニカラムからの溶出液を約 2 mL まで濃縮し、得られた濃縮液をシリカゲルミニカラムへ負荷することとした。

表6 PSAミニカラムからの回収率 (%) [InertSep PSA (500 mg/6 mL)]

<i>n</i> -ヘキサン					合計
0-2 mL (負荷液)	2-4 mL	4-6 mL	6-8 mL	8-10 mL	
9	81	4	1	0	95

添加量: MeCHQ 0.1 µg

コンディショニング: *n*-ヘキサン 10 mL操作方法: *n*-ヘキサン 2 mL で負荷後、*n*-ヘキサン 8 mL (合計 10 mL) で溶出した。

表7 シリカゲルミニカラムからの回収率 (%) [InertSep SI (1 g/6 mL) 、負荷液量0.5 mL]

<i>n</i> -ヘキサン	酢酸エチル及び <i>n</i> -ヘキサン (1 : 19) 混液					合計
0.5 mL (負荷) + 5 mL (洗浄)	0-2 mL	2-4 mL	4-6 mL	6-8 mL	8-10 mL	
0	0	20	83	1	0	104

添加量: MeCHQ 0.1 µg

コンディショニング: *n*-ヘキサン 10 mL操作方法: *n*-ヘキサン 0.5 mL で負荷後、*n*-ヘキサン 5 mL (合計 5.5 mL) で洗浄し、酢酸エチル及び *n*-ヘキサン (1 : 19) 混液 10 mL で溶出した。

表8 シリカゲルミニカラムからの回収率 (%) [InertSep SI (1 g/6 mL) 、負荷液量5 mL]

<i>n</i> -ヘキサン	酢酸エチル及び <i>n</i> -ヘキサン (1 : 19) 混液					合計
5 mL (負荷) + 5 mL (洗浄)	0-2 mL	2-4 mL	4-6 mL	6-8 mL	8-10 mL	
0	0	14	82	1	0	97

添加量: MeCHQ 0.1 µg

コンディショニング: *n*-ヘキサン 10 mL操作方法: *n*-ヘキサン 5 mL で負荷後、*n*-ヘキサン 5 mL (合計 10 mL) で洗浄し、酢酸エチル及び *n*-ヘキサン (1 : 19) 混液 10 mL で溶出した。

PSA ミニカラム及びシリカゲルミニカラムからの溶出液を LC-MS/MS で測定したところ、定量イオン (m/z 195.0→126.0) では定量を妨害するピークは認められなかったものの、いずれの溶出液も定性イオン (m/z 195.0→167.0) で MeCHQ とほぼ同じ保持時間にミニカラムの充填剤またはカートリッジ由来と考えられる妨害ピークが認められた (図 18)。 m/z 197.0→169.0 においても妨害ピークが認められた。LC-MS/MS 測定条件の検討では、定性イオンとして m/z 195.0→167.0 及び m/z 197.0→169.0 以外にもいくつかイオンが観察されたが、いずれも十分な感度が得られず、適切な定性イオンを設定できなかった。これに対し、GC-MS/MS 測定においては定量イオン、定性イオンともに妨害ピークは認められず、高感度な測定が可能であった。加えて、LC-MS/MS で測定を行う場合はミニカラムからの溶出液にジエチレングリコール等のキーパーを添加後、濃縮して溶媒置換する必要があるのに対し、GC-MS/MS で測定を行う場合は溶出液を定容後、そのまま測定することが可能であり、簡便である。このため、MeCHQ の測定は GC-MS/MS で行うこととした。

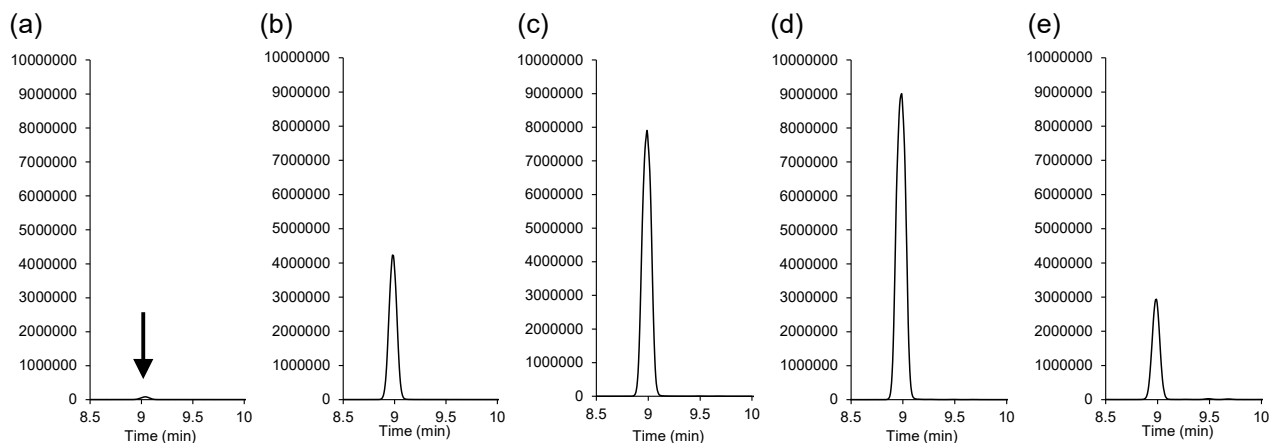


図18 MeCHQ標準溶液及び各ミニカラムからの溶出液のクロマトグラム（LC-MS/MSで測定、 m/z 195.0→167.0）

- (a) MeCHQ標準溶液（キザロホップとして0.01 $\mu\text{g/mL}$ ）
- (b) Inertsep PSA（500 mg）からの溶出液
- (c) Bond Elut PSA（500 mg）からの溶出液
- (d) Inertsep SI（1000 mg）からの溶出液
- (e) Bond Elut SI（500 mg）からの溶出液

操作方法

(b) 及び (c)：ヘキサン10 mLでコンディショニングした後、ヘキサン10 mLで溶出し、得られた溶出液を濃縮乾固後、アセトニトリル1 mLに溶解した。

(d) 及び (e)：ヘキサン17 mLでコンディショニング（コンディショニング10 mL、負荷・洗浄7 mLを想定）した後、酢酸エチル及び n -ヘキサン（1：19）混液10 mLで溶出し、得られた溶出液を濃縮乾固後、アセトニトリル1 mLに溶解した。

(4) MeCHQ への変換

申請企業の分析法¹⁾を参考に、MeCHQ への変換について検討した。

1) マトリックス非共存下での変換

① MeCHQ の安定性

水酸化カリウム・メタノール溶液中での MeCHQ の安定性について検討した。丸底フラスコ（500 mL 容）に MeCHQ 0.05 μg （キザロホップとして）、水酸化カリウム・メタノール溶液 200 mL 及び攪拌子を入れた後、ジムロート冷却管（水温 約 8℃）を接続し、マントルヒーター（スターラー付き）で攪拌しながら、加熱還流（0、0.5、1、2 及び 3 時間）した。その結果、3 時間後においても 91%以上の回収率が得られたことから、反応 3 時間までは安定であり、加熱還流中の損失はほとんどないものと考えられた（図 19）。

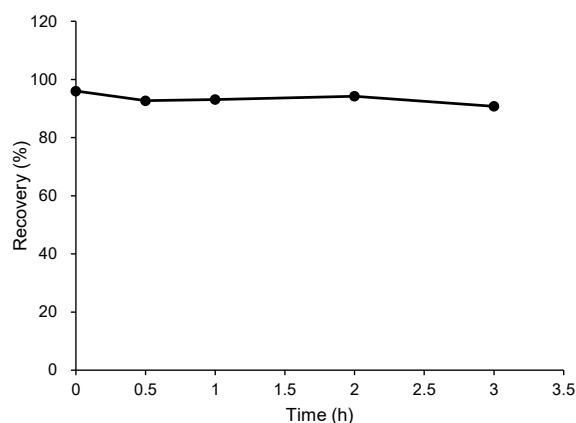


図19 水酸化カリウム・メタノール溶液中での加熱還流におけるMeCHQの安定性
添加量：MeCHQ（キザロホップとして）0.05 μg

② MeCHQ への変換

マトリックス非共存下でキザロホップエチル、キザロホップ P テフリル及びキザロホップから MeCHQ への変換について検討した。各化合物（キザロホップとして）0.05 μg に水酸化カリウム・メタノール溶液 200 mL を加え、上記と同様に加熱還流（0、0.5、1、2 及び 3 時間）した。その結果、いずれの化合物も 0.5 時間以内に 90% 以上 MeCHQ へ変換したが、3 時間加熱還流を行うと若干回収率が低下した（図 20）。

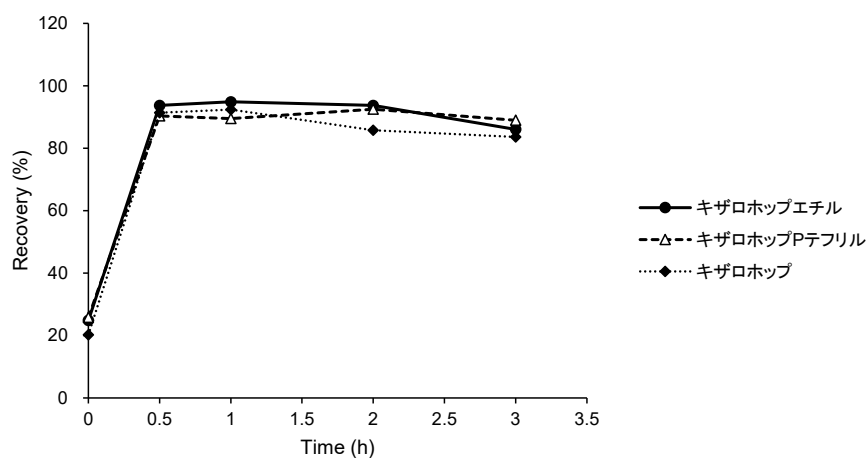


図 20 マトリックス非共存下でのキザロホップエチル、キザロホップ P テフリル及びキザロホップから MeCHQ への変換反応における回収率
添加量：各化合物（キザロホップとして）0.05 μg

2) マトリックス共存下での変換

マトリックス共存下でキザロホップエチル、キザロホップ P テフリル及びキザロホップから MeCHQ への変換について検討を行った。試料には水分の多いいちごと水分の少ない大豆を用いた。試料に各化合物を添加し、加熱還流時間を 0.5、1 及び 2 時間として〔実験方法〕の『7. 試験溶液の調製方法』に従って試験溶液を調製した。結果を図 21-1 及び図 21-2 に示した。いちごではいずれの化合物も反応 1 時間で 87% 以上の回収率が得られたが、反応 2 時間では 78~87% となり、回収率の低下が見られた

(図 21-1)。一方、大豆ではいずれの化合物も反応 1 時間で 93%以上の回収率が得られ、反応 2 時間においても大幅な回収率の低下は見られなかった(図 21-2)。

水分の多いいちごで反応時間を長くすると回収率が低下する原因として、試料中の水の影響が考えられた。そこで、水共存下での加熱還流における MeCHQ の安定性について確認した。MeCHQ (キザロホップとして) 0.05 μg に水酸化カリウム・メタノール溶液 200 mL 及び水 20 mL を加え、加熱還流 (0、1、2 及び 3 時間) した。その結果、MeCHQ は加熱還流時間が長いほど、回収率が低下し、3 時間後では 76%となった(図 22)。水の非共存下では大幅な回収率の低下は見られなかったことから(図 19)、MeCHQ は水共存下塩基性条件で加熱すると分解するものと考えられた。

本検討では規制対象となっているキザロホップの抱合体の標準品を入手することができなかったため、キザロホップの抱合体から MeCHQ への変換における回収率を確認していない。このため、水分の多い食品では MeCHQ への変換反応における回収率がやや低くなるものの、申請企業の分析法¹⁾と同様に 1.5 時間加熱還流を行うこととした。

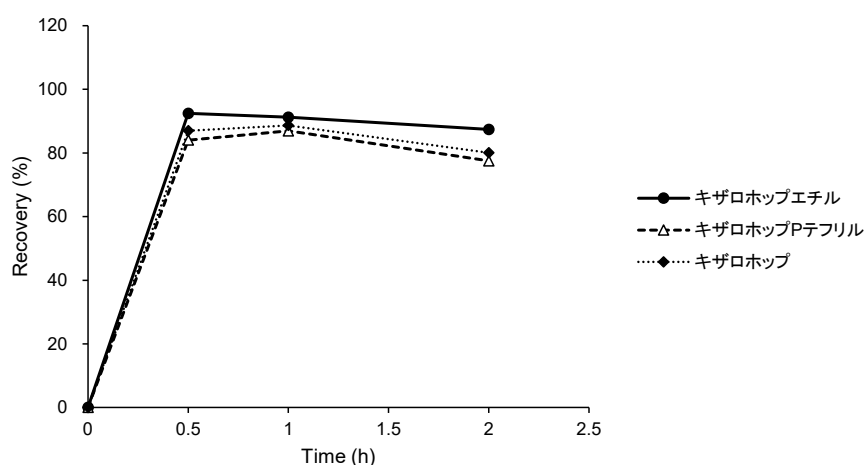


図 21-1 マトリックス (いちご) 共存下でのキザロホップエチル、キザロホップ P テフリル及びキザロホップから MeCHQ への変換反応における回収率

添加量: 各化合物 (キザロホップとして) 0.05 μg

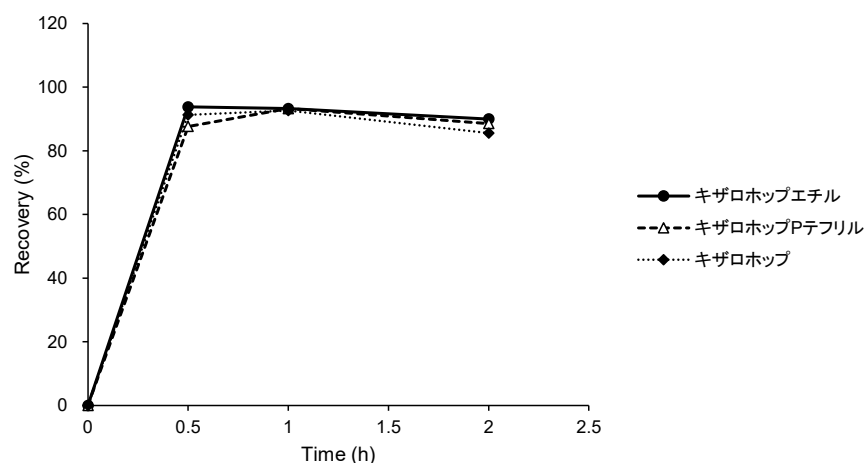


図 21-2 マトリックス (大豆) 共存下でのキザロホップエチル、キザロホップ P テフリル及びキザロホップから MeCHQ への変換反応における回収率

添加量: 各化合物 (キザロホップとして) 0.05 μg

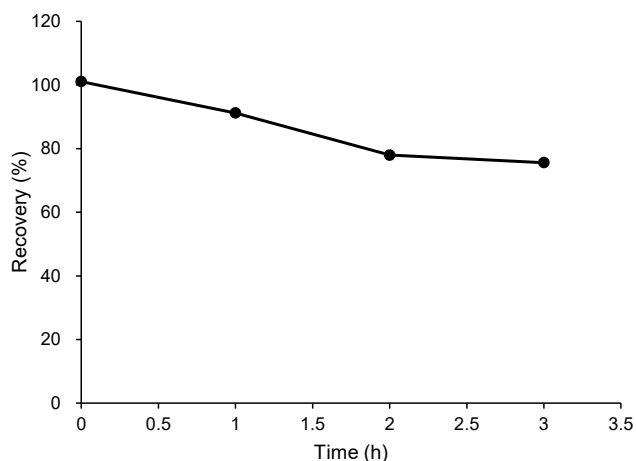


図22 水共存下での加熱還流におけるMeCHQの安定性

水酸化カリウム・メタノール溶液 200 mL 及び水 20 mL の混合溶液中で加熱還流を行った。

添加量：MeCHQ（キザロホップとして）0.05 µg

4. 添加回収試験

大豆、キャベツ、ばれいしょ、ほうれんそう、りんご及びいちごを用いて、実験方法の『7. 試験溶液の調製』に従い、キザロホップエチル、キザロホップ P テフルル及びキザロホップについて基準値濃度及び定量限界濃度（0.01 ppm）で 5 併行の添加回収試験を行った。添加回収試験におけるブランク試料、添加試料及び回収率 100% 相当の溶媒標準溶液の代表的なクロマトグラムを図 23～26 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カレントクロマトグラムを図 27 に示した。

(1) 選択性

いずれの食品においても定量を妨害するピークは検出されず、選択性は良好であった（表 9）。

本検討では、定量イオンとして分子イオン (m/z 194.1) をプリカーサーイオンとした m/z 194.1→165.1 を用いたが、フラグメントイオン (m/z 165.0) をプリカーサーイオンとした m/z 165.0→111.0 の方が高い S/N が得られた（表 12 および 14 参照）。そこで、参考として m/z 165.0→111.0 を定量イオンとして用いた結果を表 10 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検出されず、選択性は良好であった。

表9 選択性の評価

分析対象化合物	食品名	定量限界 (mg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 (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}		
					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)			
キザロホップエテル	大豆	0.01	0.3	0.3	基準値	0.3	< 0.100	面積	0	0	0	10558771	10483553	10521162	0.000	○
		0.01	0.3	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	386537	384340	385439	0.000	○
	キャベツ	0.01	0.3	0.3	基準値	0.3	< 0.100	面積	0	0	0	12465670	13074546	12770108	0.000	○
		0.01	0.3	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	494506	478870	486688	0.000	○
	ばれいしょ	0.01	0.1	0.1	基準値	0.1	< 0.100	面積	0	0	0	4808374	4882843	4845609	0.000	○
		0.01	0.1	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	415637	417832	416735	0.000	○
	ほうれんそう	0.01	0.05	0.05	基準値	0.05	< 0.100	面積	0	0	0	2221658	2210824	2216241	0.000	○
		0.01	0.05	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	447669	453634	450651	0.000	○
	りんご	0.01	0.05	0.05	基準値	0.05	< 0.100	面積	0	0	0	2464751	2538675	2501713	0.000	○
		0.01	0.05	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	475956	469153	472554	0.000	○
	いちご	0.01	0.05	0.05	基準値	0.05	< 0.100	面積	0	0	0	2189396	2207568	2198482	0.000	○
		0.01	0.05	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	502927	494132	498530	0.000	○
キザロホップデフリル	大豆	0.01	0.3	0.3	基準値	0.3	< 0.100	面積	0	0	0	11322583	11566650	11444617	0.000	○
		0.01	0.3	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	343427	346839	345133	0.000	○
	キャベツ	0.01	0.3	0.3	基準値	0.3	< 0.100	面積	0	0	0	14033275	15081894	14557585	0.000	○
		0.01	0.3	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	459269	491248	475259	0.000	○
	ばれいしょ	0.01	0.1	0.1	基準値	0.1	< 0.100	面積	0	0	0	4366618	4257592	4312105	0.000	○
		0.01	0.1	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	406284	407395	406840	0.000	○
	ほうれんそう	0.01	0.05	0.05	基準値	0.05	< 0.100	面積	0	0	0	2334427	2308186	2321306	0.000	○
		0.01	0.05	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	456858	465447	461153	0.000	○
	りんご	0.01	0.05	0.05	基準値	0.05	< 0.100	面積	0	0	0	2524979	2395725	2460352	0.000	○
		0.01	0.05	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	453607	411156	432381	0.000	○
	いちご	0.01	0.05	0.05	基準値	0.05	< 0.100	面積	0	0	0	2213933	2356585	2285259	0.000	○
		0.01	0.05	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	454735	477794	466265	0.000	○
キザロホップ	大豆	0.01	0.3	0.3	基準値	0.3	< 0.100	面積	0	0	0	11773051	11831823	11802437	0.000	○
		0.01	0.3	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	378878	371561	375219	0.000	○
	キャベツ	0.01	0.3	0.3	基準値	0.3	< 0.100	面積	0	0	0	13277335	13323775	13697079	0.000	○
		0.01	0.3	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	474425	496075	485250	0.000	○
	ばれいしょ	0.01	0.1	0.1	基準値	0.1	< 0.100	面積	0	0	0	4285955	4369214	4327584	0.000	○
		0.01	0.1	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	408986	413033	411010	0.000	○
	ほうれんそう	0.01	0.05	0.05	基準値	0.05	< 0.100	面積	0	0	0	2236624	2173342	2204983	0.000	○
		0.01	0.05	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	490136	468585	479360	0.000	○
	りんご	0.01	0.05	0.05	基準値	0.05	< 0.100	面積	0	0	0	2402022	2488321	2445172	0.000	○
		0.01	0.05	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	549456	551652	550554	0.000	○
	いちご	0.01	0.05	0.05	基準値	0.05	< 0.100	面積	0	0	0	2110635	2216968	2163801	0.000	○
		0.01	0.05	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	485525	507593	496559	0.000	○

*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。

表10 (参考) 選択性の評価 (定量イオン m/z 165.0→111.0)

分析対象化合物	食品名	定量限界 (mg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	妨害ピークの許容範囲の評価			ピーク面積(高さ) ¹⁾							
					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)		
キザロホップエチル	大豆	0.01	0.3	0.3	基準値	0.3	< 0.100	面積	0	0	0	3633565	3565181	3599373	0.000
		0.01	0.3	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	147873	145452	146663	0.000
	キャベツ	0.01	0.3	0.3	基準値	0.3	< 0.100	面積	0	0	0	3978762	4190799	4084781	0.000
		0.01	0.3	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	157039	145558	151299	0.000
	ばれいしょ	0.01	0.1	0.1	基準値	0.1	< 0.100	面積	0	0	0	1626647	1662743	1644695	0.000
		0.01	0.1	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	111216	110800	111008	0.000
	ほうれんそう	0.01	0.05	0.05	基準値	0.05	< 0.100	面積	0	0	0	778691	797198	787945	0.000
		0.01	0.05	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	145025	147724	146374	0.000
	りんご	0.01	0.05	0.05	基準値	0.05	< 0.100	面積	0	0	0	865719	879303	872511	0.000
		0.01	0.05	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	151909	144684	148297	0.000
	いちご	0.01	0.05	0.05	基準値	0.05	< 0.100	面積	0	0	0	655385	681281	668333	0.000
		0.01	0.05	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	167303	168797	168050	0.000
キザロホップPテフリル	大豆	0.01	0.3	0.3	基準値	0.3	< 0.100	面積	0	0	0	3796902	3866571	3831736	0.000
		0.01	0.3	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	115002	113209	114106	0.000
	キャベツ	0.01	0.3	0.3	基準値	0.3	< 0.100	面積	0	0	0	4913324	5188901	5051113	0.000
		0.01	0.3	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	141183	145682	143432	0.000
	ばれいしょ	0.01	0.1	0.1	基準値	0.1	< 0.100	面積	0	0	0	1449128	1393620	1421374	0.000
		0.01	0.1	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	109054	108327	108690	0.000
	ほうれんそう	0.01	0.05	0.05	基準値	0.05	< 0.100	面積	0	0	0	771873	777677	774775	0.000
		0.01	0.05	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	146926	145668	146297	0.000
	りんご	0.01	0.05	0.05	基準値	0.05	< 0.100	面積	0	0	0	808253	776951	792602	0.000
		0.01	0.05	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	159562	142809	151185	0.000
	いちご	0.01	0.05	0.05	基準値	0.05	< 0.100	面積	0	0	0	719030	789402	754216	0.000
		0.01	0.05	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	159674	169093	164384	0.000
キザロホップ	大豆	0.01	0.3	0.3	基準値	0.3	< 0.100	面積	0	0	0	4410503	4439761	4425132	0.000
		0.01	0.3	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	134518	141523	138021	0.000
	キャベツ	0.01	0.3	0.3	基準値	0.3	< 0.100	面積	0	0	0	4231075	4317975	4274525	0.000
		0.01	0.3	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	167697	169225	168461	0.000
	ばれいしょ	0.01	0.1	0.1	基準値	0.1	< 0.100	面積	0	0	0	1569989	1574248	1572119	0.000
		0.01	0.1	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	114684	109906	112295	0.000
	ほうれんそう	0.01	0.05	0.05	基準値	0.05	< 0.100	面積	0	0	0	802349	759395	780872	0.000
		0.01	0.05	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	161128	150635	155881	0.000
	りんご	0.01	0.05	0.05	基準値	0.05	< 0.100	面積	0	0	0	823980	858032	841006	0.000
		0.01	0.05	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	181293	188449	184871	0.000
	いちご	0.01	0.05	0.05	基準値	0.05	< 0.100	面積	0	0	0	679832	715326	697579	0.000
		0.01	0.05	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	158160	174080	166120	0.000

*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) 真度及び併行精度

基準値濃度及び定量限界濃度での添加回収試験における真度及び併行精度を表11に示した。基準値濃度では、キザロホップエチルは真度80～92%、併行精度2～6%、キザロホップPテフリルは真度80～88%、併行精度2～6%、キザロホップは真度80～87%、併行精度2～6%となり、良好な結果が得られた。また、定量限界濃度では、キザロホップエチルは真度80～91%、併行精度2～5%、キザロホップPテフリルは真度80～92%、併行精度2～7%、キザロホップは真度80～93%、併行精度1～6%となり、良好な結果が得られた。定量限界濃度(0.01 ppm)の添加試料から得られたMeCHQのピークのS/N(平均値)は129～497となり、S/N≥10が得られた(表12)。

参考として m/z 165.0→111.0を定量イオンとして用いた場合の真度及び併行精度を表13に示した。 m/z 165.0→111.0を定量イオンとして用いた場合も、基準値濃度では、キザロホップエチルは真度80～93%、併行精度2～6%、キザロホップPテフリルは真度80～90%、併行精度2～6%、キザロホップは真度80～87%、併行精度1～6%となり、良好な結果が得られた。また、定量限界濃度では、キザロホップエチルは真度80～91%、併行精度2～4%、キザロホップPテフリルは真度80～96%、併行精度2～9%、キザロホップは真度80～91%、併行精度2～4%となり、良好な結果が得られた。定量限界濃度(0.01 ppm)の添加試料から得られたピークのS/N(平均値)は330～5501となり、S/N≥10が得られた(表14)。

表11 真度及び併行精度

分析対象化合物	食品名	定量限界 (mg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	検量線			回収率(%)					真度 (%)	併行精度 (RSD%)
					傾き	切片	r ² 値	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5		
キザロホップエチル	大豆	0.01	0.3	0.3	171506718	275401	0.9982	96	95	93	89	88	92	4
		0.01	0.3	0.01	209761576	-10385	0.9986	95	84	95	91	90	91	5
	キャベツ	0.01	0.3	0.3	195825614	151941	0.9977	84	82	85	82	84	83	2
		0.01	0.3	0.01	225908399	-8478	0.9989	81	82	81	85	83	83	2
	ばれいしょ	0.01	0.1	0.1	231717924	-21824	0.9996	81	84	88	82	83	83	3
		0.01	0.1	0.01	191748378	-4502	0.9963	80	78	79	81	80	80	2
	ほうれんそう	0.01	0.05	0.05	217272362	-43987	0.9996	80	81	80	79	86	81	4
		0.01	0.05	0.01	201934703	4927	0.9986	88	83	84	78	77	82	5
	りんご	0.01	0.05	0.05	242757629	16710	0.9998	81	82	82	83	78	81	3
		0.01	0.05	0.01	218232510	-3005	0.9994	85	81	83	81	83	83	2
キザロホップペフリル	大豆	0.01	0.3	0.3	175626227	25276	0.9968	96	86	90	81	87	88	6
		0.01	0.3	0.01	157989853	9959	0.9980	95	92	91	91	90	92	2
	キャベツ	0.01	0.3	0.3	21905061	133945	0.9977	76	81	76	81	83	80	4
		0.01	0.3	0.01	210928584	5956	0.9993	82	86	79	82	78	82	4
	ばれいしょ	0.01	0.1	0.1	196747604	43185	0.9974	82	82	84	80	81	82	2
		0.01	0.1	0.01	194983348	-970	0.9968	83	87	77	82	77	81	5
	ほうれんそう	0.01	0.05	0.05	205119746	23119	0.9979	85	82	81	78	78	81	3
		0.01	0.05	0.01	198202941	5197	0.9967	81	84	82	83	85	83	2
	りんご	0.01	0.05	0.05	219066693	83153	0.9983	77	79	82	84	81	81	3
		0.01	0.05	0.01	196013765	1613	0.9970	79	77	86	83	92	83	7
キザロホップ	大豆	0.01	0.3	0.3	213020969	-7152	0.9974	80	82	80	76	80	80	3
		0.01	0.3	0.01	207288359	9845	0.9976	79	79	79	83	82	80	2
	キャベツ	0.01	0.3	0.3	190260031	152973	0.9996	89	88	84	91	86	87	3
		0.01	0.3	0.01	167771873	12813	0.9972	95	95	93	93	91	93	2
	ばれいしょ	0.01	0.3	0.3	196795422	-69832	0.9990	83	79	87	83	81	82	3
		0.01	0.3	0.01	220794513	15416	0.9987	82	84	77	81	76	80	4
	ほうれんそう	0.01	0.1	0.1	237065954	-301218	0.9972	78	73	84	83	83	80	6
		0.01	0.1	0.01	194537723	763	0.9985	81	85	73	82	84	81	6
	りんご	0.01	0.05	0.05	205216277	21530	0.9978	82	79	80	79	79	80	2
		0.01	0.05	0.01	228552539	-19461	0.9966	78	78	82	82	83	81	3
キザロホップ	大豆	0.01	0.3	0.3	222100823	34137	0.9994	77	79	82	84	81	81	3
		0.01	0.3	0.01	247792359	-1235	1.0000	79	75	81	83	84	80	5
	キャベツ	0.01	0.3	0.3	204382392	-34913	0.9990	82	78	80	83	76	80	3
		0.01	0.3	0.01	233945428	-1525	0.9990	81	80	81	79	80	80	1

表12 定量限界濃度の添加試料から得られたピークのS/N

分析対象化合物	食品名	定量限界 (mg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	S/N*		
					Max.	Min.	平均値
キザロホップエチル	大豆	0.01	0.3	0.01	188	126	157
	キャベツ	0.01	0.3	0.01	263	398	331
	ばれいしょ	0.01	0.1	0.01	334	387	361
	ほうれんそう	0.01	0.05	0.01	443	398	420
	りんご	0.01	0.05	0.01	197	228	212
	いちご	0.01	0.05	0.01	489	505	497
キザロホップペフリル	大豆	0.01	0.3	0.01	191	165	178
	キャベツ	0.01	0.3	0.01	431	362	397
	ばれいしょ	0.01	0.1	0.01	298	416	357
	ほうれんそう	0.01	0.05	0.01	320	293	306
	りんご	0.01	0.05	0.01	255	203	229
	いちご	0.01	0.05	0.01	400	481	441
キザロホップ	大豆	0.01	0.3	0.01	131	143	137
	キャベツ	0.01	0.3	0.01	284	318	301
	ばれいしょ	0.01	0.1	0.01	410	281	345
	ほうれんそう	0.01	0.05	0.01	352	441	397
	りんご	0.01	0.05	0.01	114	144	129
	いちご	0.01	0.05	0.01	408	453	431

*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 (Min.) のそれぞれのS/N

表13 (参考) 真度及び併行精度 (定量イオン m/z 165.0→111.0)

分析対象化合物	食品名	定量限界 (mg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	検量線			回収率(%)					真度 (%)	併行精度 (RSD%)
					傾き	切片	r^2 値	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5		
キザロホップエチル	大豆	0.01	0.3	0.3	58784733	173015	0.9989	98	95	93	90	88	93	5
		0.01	0.3	0.01	72396894	-1783	0.9985	91	88	92	93	91	91	2
	キャベツ	0.01	0.3	0.3	69123273	-173734	0.9972	83	79	83	81	83	82	2
		0.01	0.3	0.01	68345577	237	0.9983	83	85	83	82	86	84	2
	ばれいしょ	0.01	0.1	0.1	78571084	-42104	0.9992	81	83	89	83	84	84	4
		0.01	0.1	0.01	52527125	-806	0.9971	78	79	79	82	81	80	2
	ほうれんそう	0.01	0.05	0.05	74972387	-7445	0.9999	79	81	77	78	85	80	4
		0.01	0.05	0.01	64870927	2938	0.9965	85	82	78	79	83	82	4
	りんご	0.01	0.05	0.05	86128272	-9170	0.9983	80	81	80	84	78	81	3
		0.01	0.05	0.01	69742753	-925	0.9981	85	82	82	81	85	83	2
キザロホップPテフリル	大豆	0.01	0.3	0.3	60223242	63770	0.9978	97	88	93	82	89	90	6
		0.01	0.3	0.01	51576471	-27	0.9974	99	98	98	93	93	96	3
	キャベツ	0.01	0.3	0.3	76700818	-17982	0.9997	81	79	75	80	83	80	4
		0.01	0.3	0.01	64148689	3067	0.9982	84	82	81	79	81	81	2
	ばれいしょ	0.01	0.1	0.1	65503569	-11170	0.9992	85	83	84	80	82	83	2
		0.01	0.1	0.01	51813733	768	0.9970	88	87	77	84	80	83	6
	ほうれんそう	0.01	0.05	0.05	68834439	8854	0.9962	85	83	80	77	76	80	5
		0.01	0.05	0.01	66793862	-1701	0.9967	81	82	84	79	84	82	2
	りんご	0.01	0.05	0.05	65708336	51979	0.9960	78	78	84	87	83	82	5
		0.01	0.05	0.01	68686064	-242	0.9987	77	74	85	80	94	82	9
キザロホップ	大豆	0.01	0.3	0.3	71174118	54524	0.9995	88	88	84	89	85	87	2
		0.01	0.3	0.01	65175895	1048	0.9970	92	90	94	91	86	91	3
	キャベツ	0.01	0.3	0.3	61312448	35366	0.9983	86	80	87	84	80	83	4
		0.01	0.3	0.01	74490626	5081	0.9977	81	85	78	82	80	81	3
	ばれいしょ	0.01	0.1	0.1	76697280	-61427	0.9967	82	72	84	83	83	81	6
		0.01	0.1	0.01	50003472	4737	0.9983	82	85	79	82	81	82	2
	ほうれんそう	0.01	0.05	0.05	64070186	45610	0.9989	87	81	82	83	85	84	3
		0.01	0.05	0.01	73510623	-1163	0.9979	78	80	78	81	85	80	4
	りんご	0.01	0.05	0.05	77897633	-15981	0.9976	81	78	79	80	79	80	1
		0.01	0.05	0.01	81587844	1953	0.9994	80	77	83	84	84	82	4
キザロホップ	大豆	0.01	0.3	0.3	66228082	1088	0.9972	81	78	78	84	76	80	4
		0.01	0.3	0.01	75073095	387	0.9982	82	78	81	78	84	81	3
	キャベツ	0.01	0.3	0.3	61312448	35366	0.9983	86	80	87	84	80	83	4
		0.01	0.3	0.01	74490626	5081	0.9977	81	85	78	82	80	81	3
	ばれいしょ	0.01	0.1	0.1	76697280	-61427	0.9967	82	72	84	83	83	81	6
		0.01	0.1	0.01	50003472	4737	0.9983	82	85	79	82	81	82	2
	ほうれんそう	0.01	0.05	0.05	64070186	45610	0.9989	87	81	82	83	85	84	3
		0.01	0.05	0.01	73510623	-1163	0.9979	78	80	78	81	85	80	4
	りんご	0.01	0.05	0.05	77897633	-15981	0.9976	81	78	79	80	79	80	1
		0.01	0.05	0.01	81587844	1953	0.9994	80	77	83	84	84	82	4
	いちご	0.01	0.05	0.05	66228082	1088	0.9972	81	78	78	84	76	80	4
		0.01	0.05	0.01	75073095	387	0.9982	82	78	81	78	84	81	3

表14 (参考) 定量限界濃度の添加試料から得られたピークのS/N (定量イオン m/z 165.0→111.0)

分析対象化合物	食品名	定量限界 (mg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	S/N*		
					Max.	Min.	平均値
キザロホップエチル	大豆	0.01	0.3	0.01	354	307	330
	キャベツ	0.01	0.3	0.01	1491	1931	1711
	ばれいしょ	0.01	0.1	0.01	704	696	700
	ほうれんそう	0.01	0.05	0.01	6401	3017	4709
	りんご	0.01	0.05	0.01	1171	2097	1634
	いちご	0.01	0.05	0.01	1722	3508	2615
キザロホップPテフリル	大豆	0.01	0.3	0.01	349	337	343
	キャベツ	0.01	0.3	0.01	755	1560	1157
	ばれいしょ	0.01	0.1	0.01	1941	1201	1571
	ほうれんそう	0.01	0.05	0.01	1815	5607	3711
	りんご	0.01	0.05	0.01	5767	5235	5501
	いちご	0.01	0.05	0.01	1365	1047	1206
キザロホップ	大豆	0.01	0.3	0.01	469	291	380
	キャベツ	0.01	0.3	0.01	1179	680	930
	ばれいしょ	0.01	0.1	0.01	1575	5639	3607
	ほうれんそう	0.01	0.05	0.01	2175	3481	2828
	りんご	0.01	0.05	0.01	1957	2003	1980
	いちご	0.01	0.05	0.01	1548	1240	1394

*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 (Min.) のそれぞれのS/N

(3) 試料マトリックスの測定への影響

基準値濃度及び定量限界濃度での試料マトリックスの測定への影響を表 15 に示した。添加回収試験における回収率 100%相当の溶媒標準溶液に対するマトリックス添加標準溶液のピーク面積比を求めた結果、基準値濃度では 0.99～1.12、定量限界濃度では 1.02～1.10 となり、本試験法は大きな影響を受けずに測定することが可能であると考えられた。

参考として m/z 165.0→111.0 を定量イオンとして用いた場合の結果を表 16 に示した。添加回収試験における回収率 100%相当の溶媒標準溶液に対するマトリックス添加標準溶液のピーク面積比を求めた結果、基準値濃度では 0.97～1.12、定量限界濃度では 0.99～1.11 となり、本試験法は大きな影響を受けずに測定することが可能であると考えられた。

表15 試料マトリックスの測定への影響

分析対象化合物	食品名	定量限界 (mg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	標準溶液 濃度 ¹ (mg/L)	ピーク面積 (高さ) ²								
						面積又は 高さの別	ブランク ³	マトリックス添加標準溶液 ⁴			溶媒標準溶液			ピーク面積 (高さ)比 ⁵
								n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均	
キザロホップエチル	大豆	0.01	0.3	0.3	0.06	面積	0	10558771	10483553	10521162	10685554	10358750	10522152	1.00
		0.01	0.3	0.01	0.002	面積	0	386537	384340	385439	388348	347198	367773	1.05
	キャベツ	0.01	0.3	0.3	0.06	面積	0	12465670	13074546	12770108	11516104	12029989	11773047	1.08
		0.01	0.3	0.01	0.002	面積	0	494506	478870	486688	451056	445267	448162	1.09
	ばれいしよ	0.01	0.1	0.1	0.02	面積	0	4808374	4882843	4845609	4363014	4488637	4425826	1.09
		0.01	0.1	0.01	0.002	面積	0	415637	417832	416735	380252	399747	390000	1.07
	ほうれんそう	0.01	0.05	0.05	0.01	面積	0	2221658	2210824	2216241	2235041	2097637	2166339	1.02
		0.01	0.05	0.01	0.002	面積	0	447669	453634	450651	420665	431274	425970	1.06
	りんご	0.01	0.05	0.05	0.01	面積	0	2464751	2538675	2501713	2454132	2379809	2416971	1.04
		0.01	0.05	0.01	0.002	面積	0	475956	469153	472554	425684	435350	430517	1.10
	いちご	0.01	0.05	0.05	0.01	面積	0	2189396	2207568	2198482	2117251	2255115	2186183	1.01
		0.01	0.05	0.01	0.002	面積	0	502927	494132	498530	475835	464673	470254	1.06
キザロホップデフリル	大豆	0.01	0.3	0.3	0.06	面積	0	11322583	11566650	11444617	11422936	11225255	11324096	1.01
		0.01	0.3	0.01	0.002	面積	0	343427	346839	345133	331420	322784	327102	1.06
	キャベツ	0.01	0.3	0.3	0.06	面積	0	14033275	15081894	14557585	13768893	14055282	13912087	1.05
		0.01	0.3	0.01	0.002	面積	0	459269	491248	475259	449833	465719	457776	1.04
	ばれいしよ	0.01	0.1	0.1	0.02	面積	0	4366618	4257592	4312105	4196333	4165283	4180808	1.03
		0.01	0.1	0.01	0.002	面積	0	406284	407395	406840	409007	389258	399133	1.02
	ほうれんそう	0.01	0.05	0.05	0.01	面積	0	2334427	2308186	2321306	2215794	2356946	2286370	1.02
		0.01	0.05	0.01	0.002	面積	0	456858	465447	461153	445855	439137	442496	1.04
	りんご	0.01	0.05	0.05	0.01	面積	0	2524979	2395725	2460352	2405327	2406226	2405776	1.02
		0.01	0.05	0.01	0.002	面積	0	453607	411156	432381	413105	398508	405806	1.07
	いちご	0.01	0.05	0.05	0.01	面積	0	2213933	2356585	2285259	2252821	2367281	2310051	0.99
		0.01	0.05	0.01	0.002	面積	0	454735	477794	466265	442297	443290	442793	1.05
キザロホップ	大豆	0.01	0.3	0.3	0.06	面積	0	11773051	11831823	11802437	11267487	11582386	11424936	1.03
		0.01	0.3	0.01	0.002	面積	0	378878	371561	375219	350125	341246	345685	1.09
	キャベツ	0.01	0.3	0.3	0.06	面積	0	13277335	13323775	13300555	11989155	11709085	11849120	1.12
		0.01	0.3	0.01	0.002	面積	0	474425	496075	485250	474632	459029	466831	1.04
	ばれいしよ	0.01	0.1	0.1	0.02	面積	0	4285955	4369214	4327584	4108176	4046777	4077476	1.06
		0.01	0.1	0.01	0.002	面積	0	408986	413033	411010	396409	398671	397540	1.03
	ほうれんそう	0.01	0.05	0.05	0.01	面積	0	2236624	2173342	2204983	2166448	2193496	2179972	1.01
		0.01	0.05	0.01	0.002	面積	0	490136	468585	479360	434998	438743	436871	1.10
	りんご	0.01	0.05	0.05	0.01	面積	0	2402022	2488321	2445172	2340009	2401797	2370903	1.03
		0.01	0.05	0.01	0.002	面積	0	549456	551652	550554	511658	527853	519755	1.06
	いちご	0.01	0.05	0.05	0.01	面積	0	2110635	2216968	2163801	2080407	1951611	2016009	1.07
		0.01	0.05	0.01	0.002	面積	0	485525	507593	496559	481587	456088	468837	1.06

*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。(必要に応じて起爆注入を行う。)

*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。

表16（参考）試料マトリックスの測定への影響（定量イオン m/z 165.0→111.0）

分析対象化合物	食品名	定量限界 (mg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	標準溶液 濃度 ¹ (mg/L)	ピーク面積 (高さ) ²								
						面積又は 高さの別	ブランク ³	マトリックス添加標準溶液 ⁴			溶媒標準溶液			ピーク面積 (高さ)比 ⁵
								n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均	
キザロホップエチル	大豆	0.01	0.3	0.3	0.06	面積	0	3633565	3565181	3599373	3626312	3562727	3594520	1.00
		0.01	0.3	0.01	0.002	面積	0	147873	145452	146663	147099	127725	137412	1.07
	キャベツ	0.01	0.3	0.3	0.06	面積	0	3978762	4190799	4084781	3675769	3836547	3756158	1.09
		0.01	0.3	0.01	0.002	面積	0	157039	145558	151299	146210	126985	136597	1.11
	ばれいしょ	0.01	0.1	0.1	0.02	面積	0	1626647	1662743	1644695	1481698	1498075	1489886	1.10
		0.01	0.1	0.01	0.002	面積	0	111216	110800	111008	104713	115452	110083	1.01
	ほうれんそう	0.01	0.05	0.05	0.01	面積	0	778691	797198	787945	796720	741214	768967	1.02
		0.01	0.05	0.01	0.002	面積	0	145025	147724	146374	131451	135003	133227	1.10
	りんご	0.01	0.05	0.05	0.01	面積	0	865719	879303	872511	855330	838827	847079	1.03
		0.01	0.05	0.01	0.002	面積	0	151909	144684	148297	135393	139975	137684	1.08
	いちご	0.01	0.05	0.05	0.01	面積	0	655385	681281	668333	643160	688081	665621	1.00
		0.01	0.05	0.01	0.002	面積	0	167303	168797	168050	164237	162433	163335	1.03
キザロホップデフリル	大豆	0.01	0.3	0.3	0.06	面積	0	3796902	3866571	3831736	3833333	3875201	3854267	0.99
		0.01	0.3	0.01	0.002	面積	0	115002	113209	114106	104433	106826	105630	1.08
	キャベツ	0.01	0.3	0.3	0.06	面積	0	4913324	5188901	5051113	4806442	4961913	4884177	1.03
		0.01	0.3	0.01	0.002	面積	0	141183	145682	143432	145089	139625	142357	1.01
	ばれいしょ	0.01	0.1	0.1	0.02	面積	0	1449128	1393620	1421374	1369161	1356026	1362594	1.04
		0.01	0.1	0.01	0.002	面積	0	109054	108327	108690	112558	106919	109738	0.99
	ほうれんそう	0.01	0.05	0.05	0.01	面積	0	771873	777677	774775	742058	743826	742942	1.04
		0.01	0.05	0.01	0.002	面積	0	146926	145668	146297	139373	135604	137489	1.06
	りんご	0.01	0.05	0.05	0.01	面積	0	808253	776951	792602	764216	777480	770848	1.03
		0.01	0.05	0.01	0.002	面積	0	159562	142809	151185	143794	137348	140571	1.08
	いちご	0.01	0.05	0.05	0.01	面積	0	719030	789402	754216	748684	804150	776417	0.97
		0.01	0.05	0.01	0.002	面積	0	159674	169093	164384	155219	156226	155722	1.06
キザロホップ	大豆	0.01	0.3	0.3	0.06	面積	0	4410503	4439761	4425132	4201589	4333717	4267653	1.04
		0.01	0.3	0.01	0.002	面積	0	134518	141523	138021	134156	124020	129088	1.07
	キャベツ	0.01	0.3	0.3	0.06	面積	0	4231075	4317975	4274525	3850528	3789632	3820080	1.12
		0.01	0.3	0.01	0.002	面積	0	167697	169225	168461	164964	162101	163532	1.03
	ばれいしょ	0.01	0.1	0.1	0.02	面積	0	1569989	1574248	1572119	1496735	1434477	1465606	1.07
		0.01	0.1	0.01	0.002	面積	0	114684	109906	112295	108525	110748	109636	1.02
	ほうれんそう	0.01	0.05	0.05	0.01	面積	0	802349	759395	780872	743757	774913	759335	1.03
		0.01	0.05	0.01	0.002	面積	0	161128	150635	155881	137798	143676	140737	1.11
	りんご	0.01	0.05	0.05	0.01	面積	0	823980	858032	841006	809884	799790	804837	1.04
		0.01	0.05	0.01	0.002	面積	0	181293	188449	184871	171213	175936	173574	1.07
	いちご	0.01	0.05	0.05	0.01	面積	0	679832	715326	697579	686025	645254	665639	1.05
		0.01	0.05	0.01	0.002	面積	0	158160	174080	166120	154486	152099	153293	1.08

*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。（必要に応じて起爆注入を行う。）

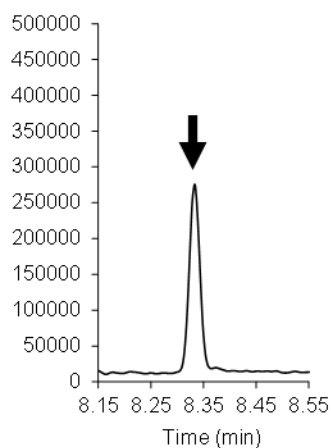
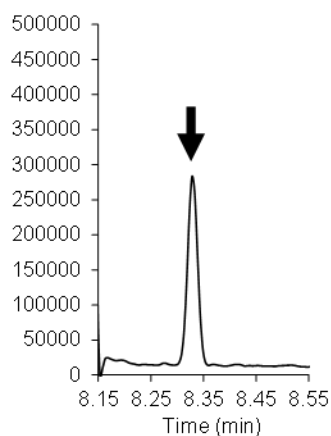
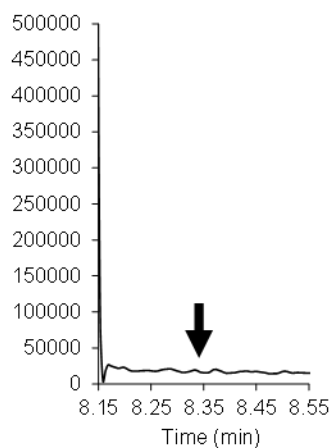
*3 ブランクにピークが認められた場合には、マトリックス添加標準溶液の値はブランク値を差し引いた値を用いる。

*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。

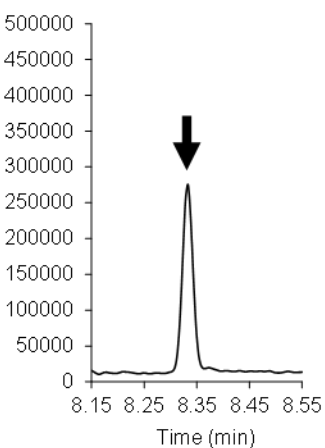
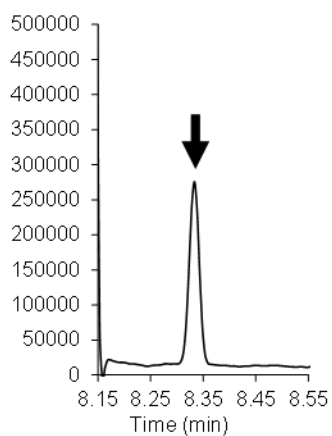
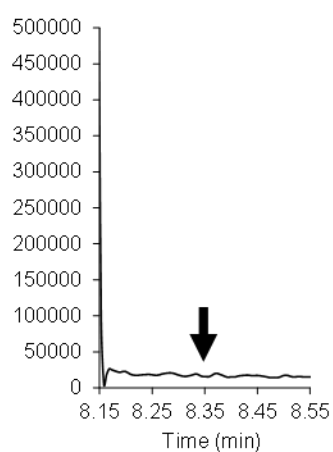
*5 マトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積（又は高さ）の比を求める。

①大豆

(a) キザロホップエチル



(b) キザロホップ P テフリル



(c) キザロホップ

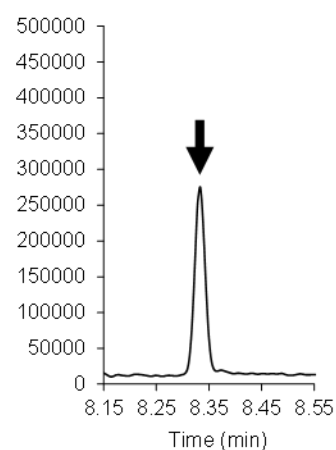
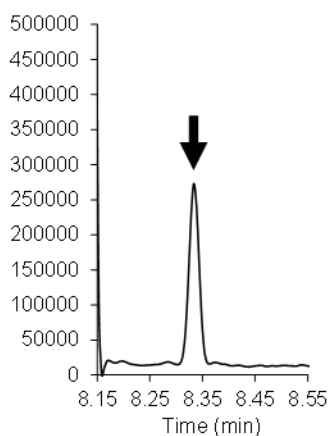
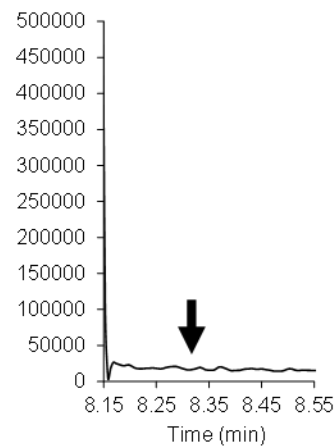
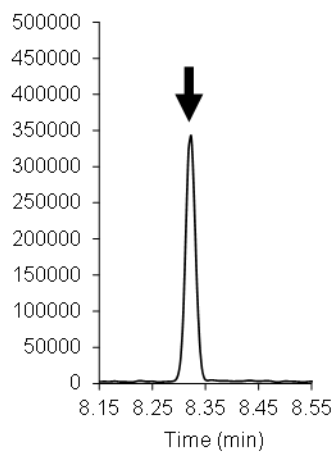
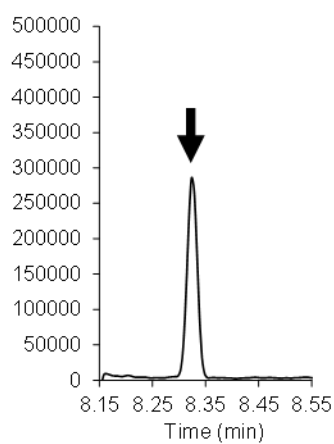
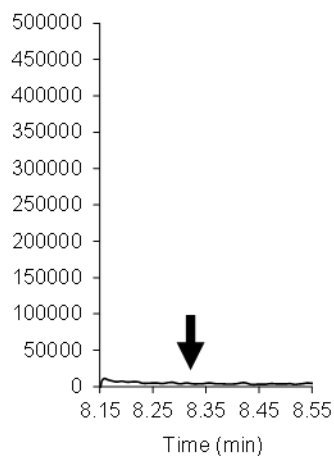


図 23 定量限界濃度での添加回収試験における代表的なクロマトグラム (m/z 194.1→165.1)

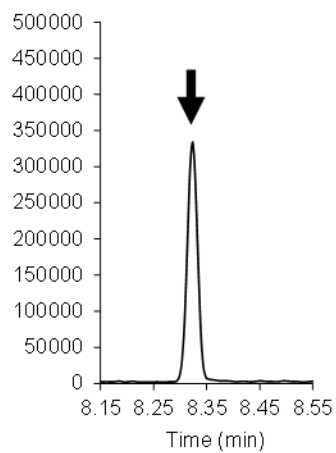
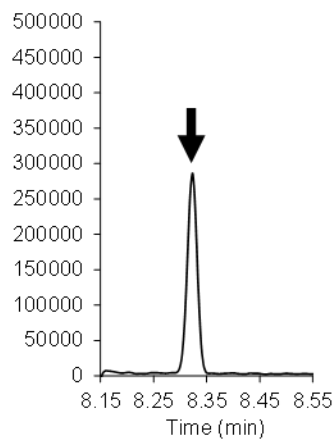
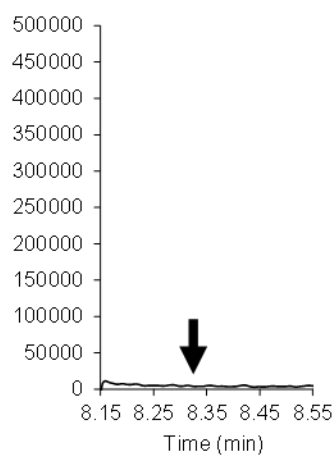
上：ブランク試料、中：添加試料、下：回収率 100%相当の MeCHQ 溶媒標準溶液

②キャベツ

(a) キザロホップエチル



(b) キザロホップ P テフリル



(c) キザロホップ

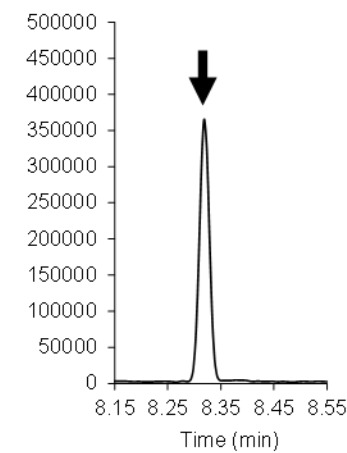
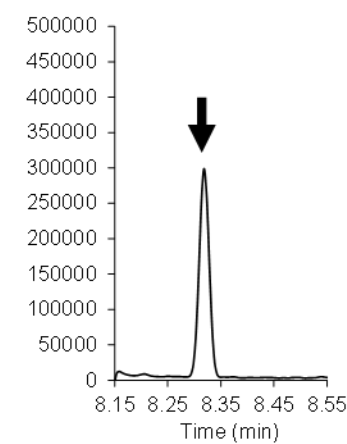
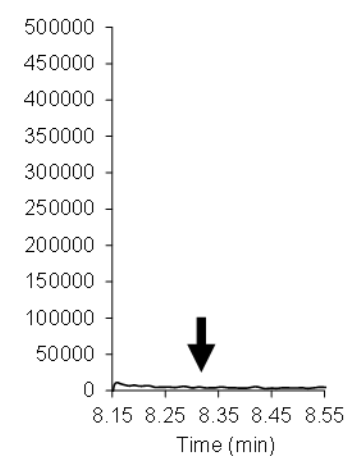
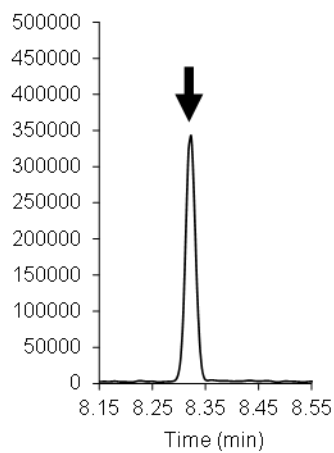
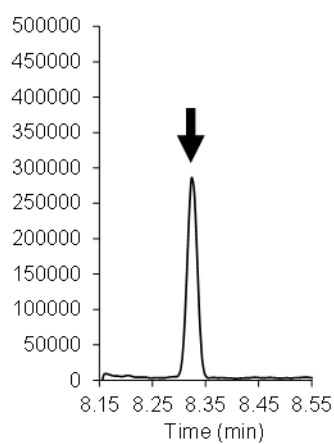
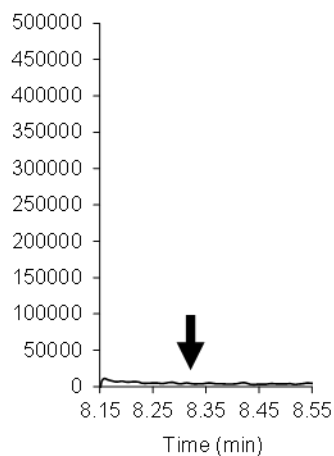


図 23 (つづき)

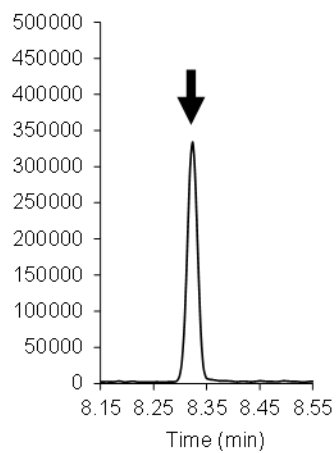
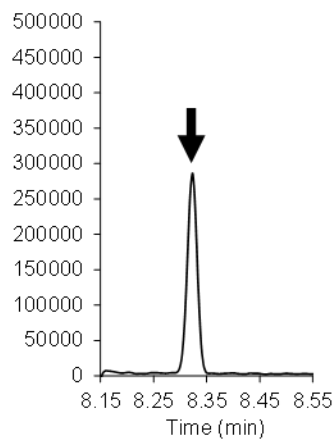
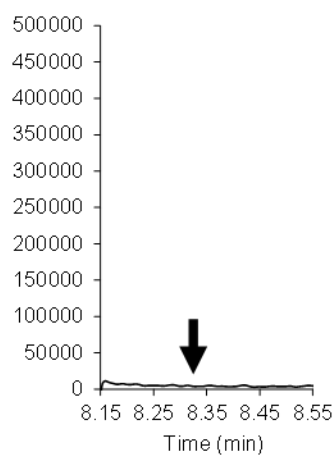
上：ブランク試料、中：添加試料、下：回収率 100%相当の MeCHQ 溶媒標準溶液

③ばれいしょ

(a) キザロホップエチル



(b) キザロホップ P テフリル



(c) キザロホップ

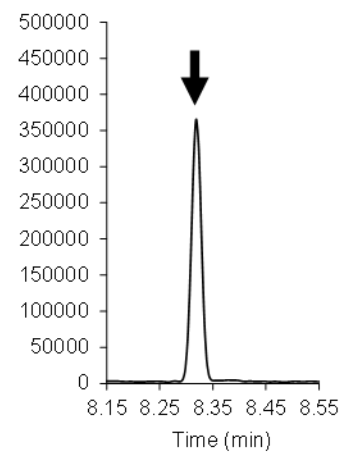
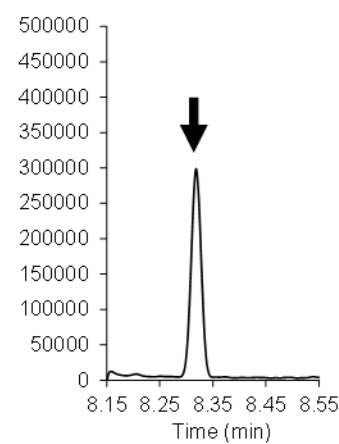
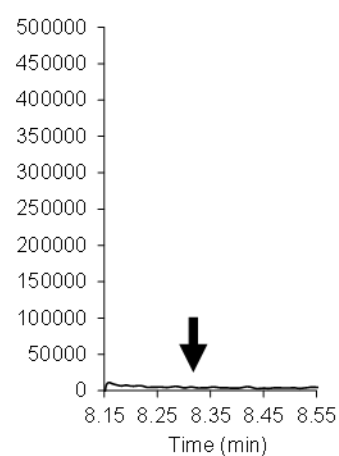
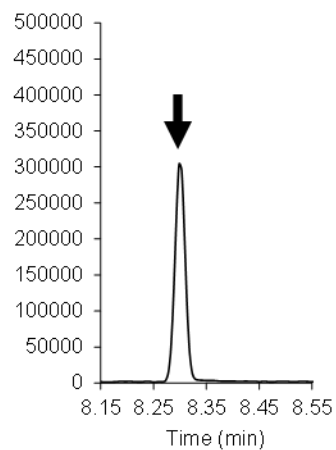
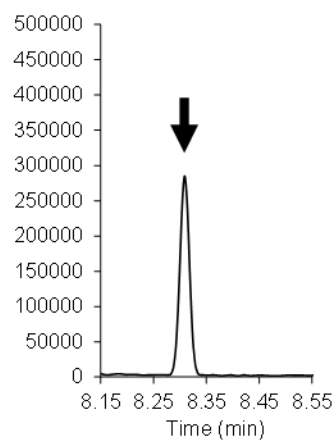
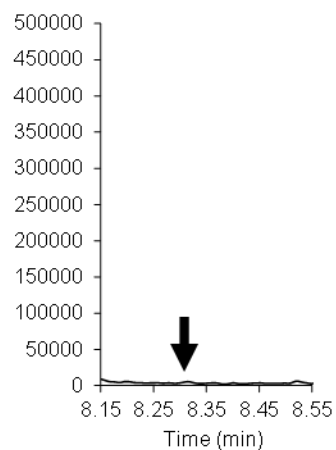


図 23 (つづき)

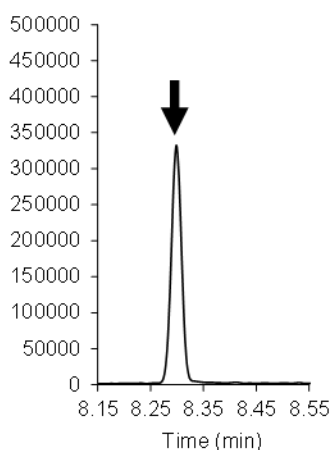
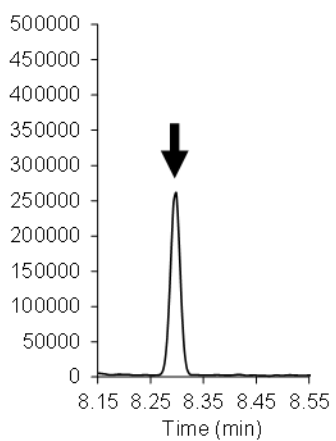
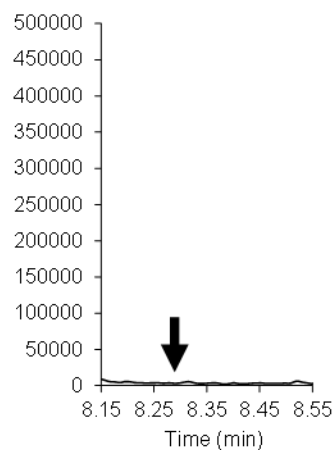
上：ブランク試料、中：添加試料、下：回収率 100%相当の MeCHQ 溶媒標準溶液

④ほうれんそう

(a) キザロホップエチル



(b) キザロホップ P テフリル



(c) キザロホップ

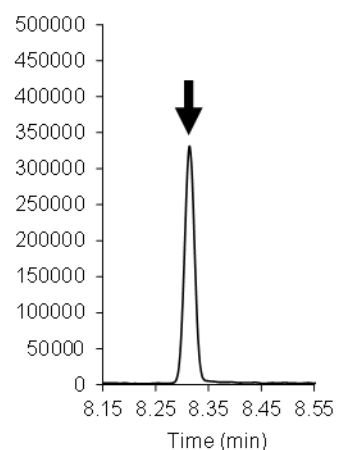
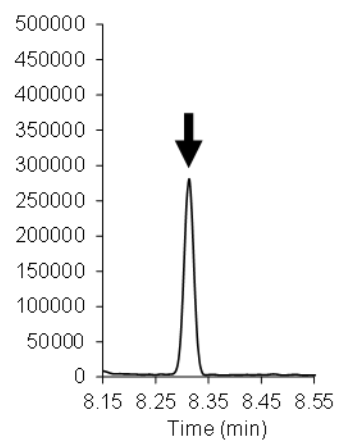
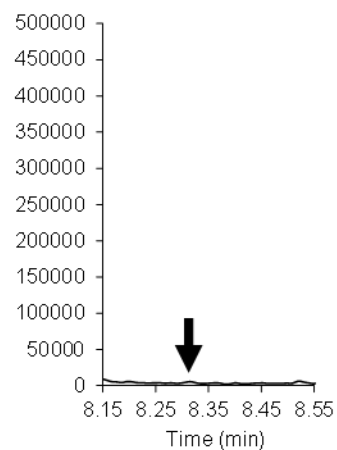
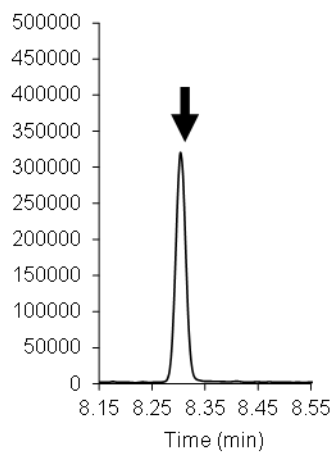
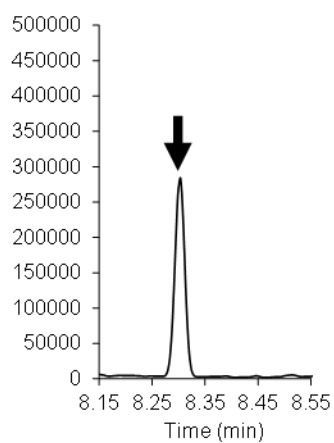
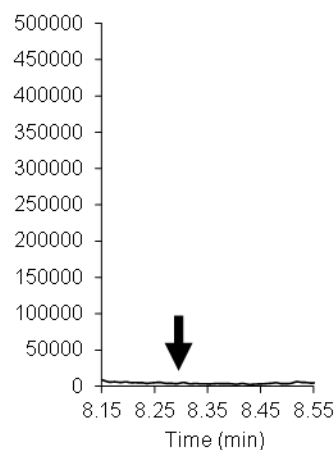


図 23 (つづき)

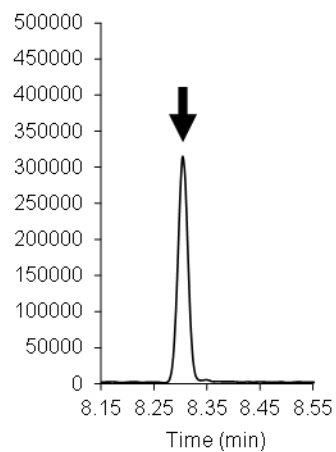
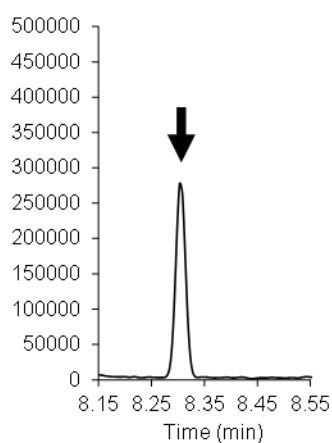
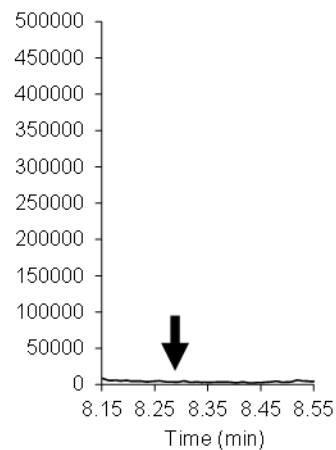
上：ブランク試料、中：添加試料、下：回収率 100%相当の MeCHQ 溶媒標準溶液

⑤りんご

(a) キザロホップエチル



(b) キザロホップP テフリル



(c) キザロホップ

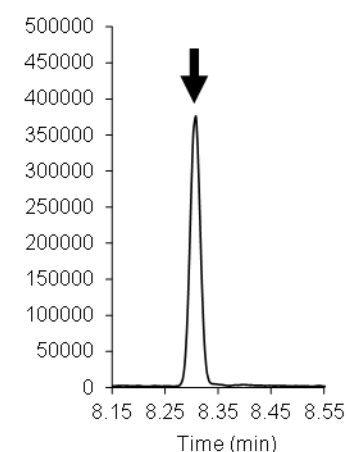
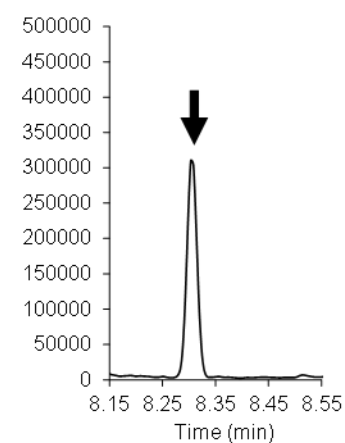
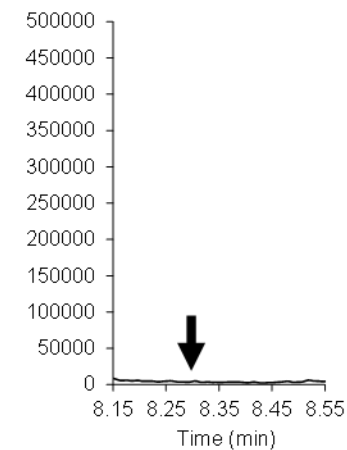
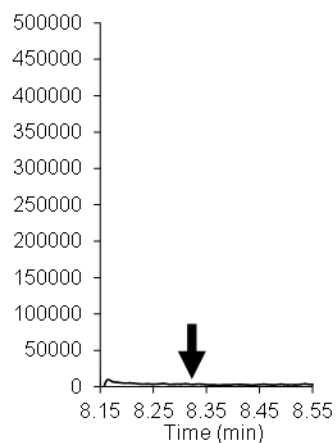


図 23 (つづき)

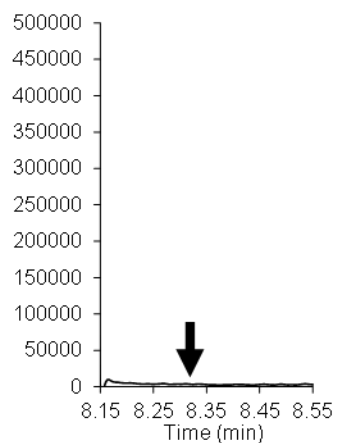
上：ブランク試料、中：添加試料、下：回収率 100%相当の MeCHQ 溶媒標準溶液

⑥いちご

(a) キザロホップエチル



(b) キザロホップ P テフリル



(c) キザロホップ

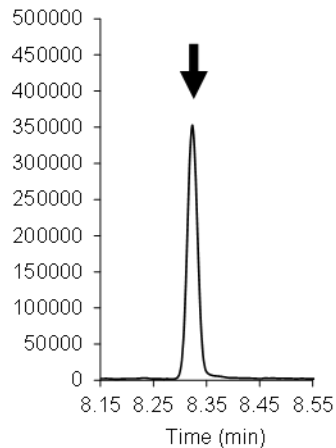
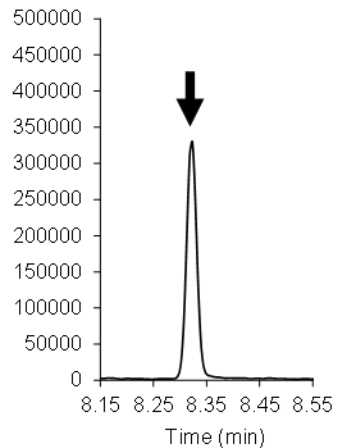
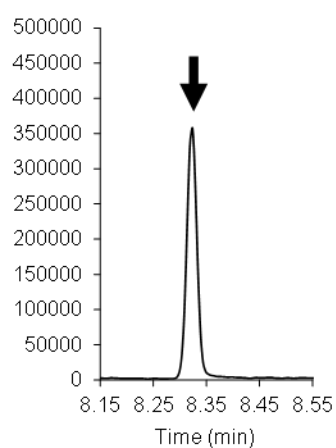
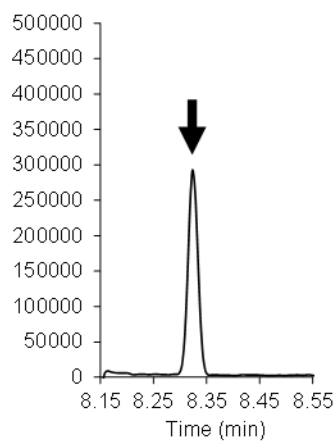
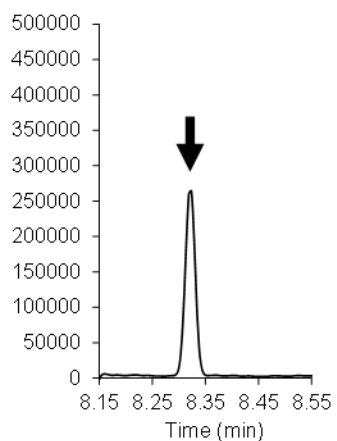
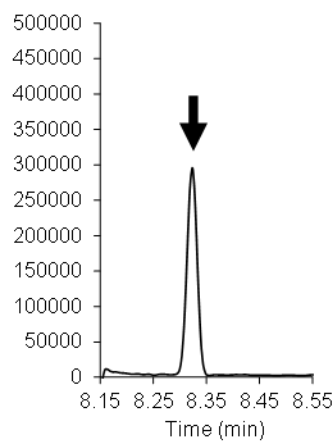
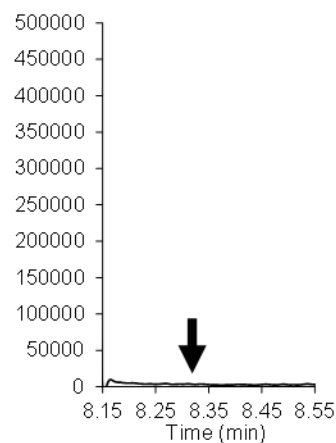
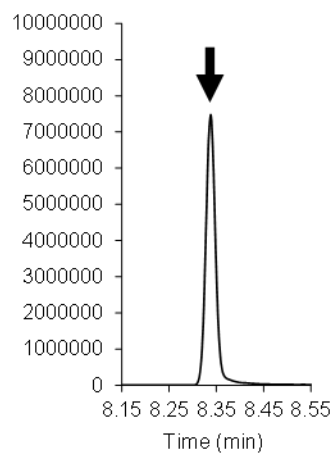
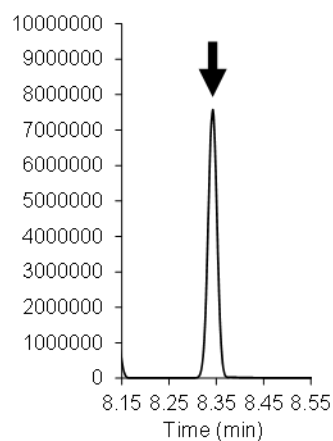
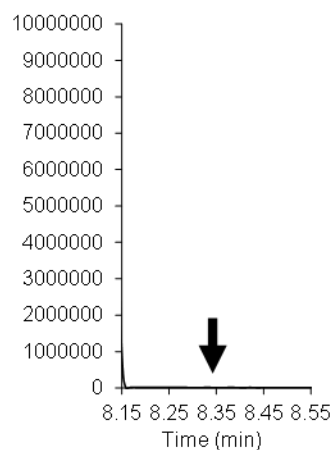


図 23 (つづき)

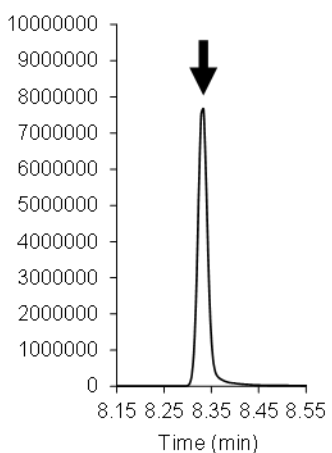
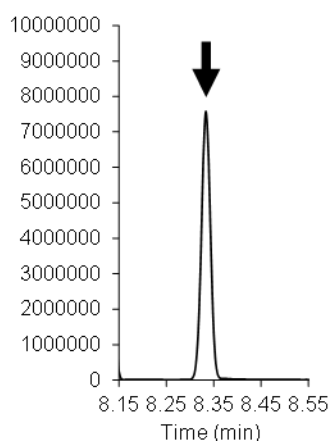
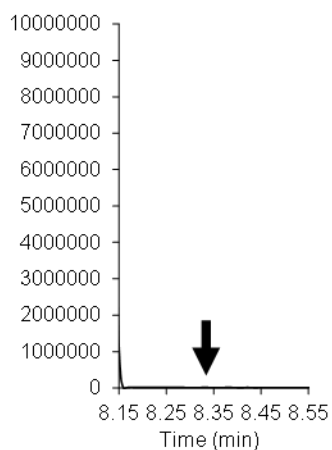
上 : ブランク試料、中 : 添加試料、下 : 回収率 100% 相当の MeCHQ 溶媒標準溶液

①大豆（基準値 0.3 ppm）

(a) キザロホップエチル



(b) キザロホップ P テフリル



(c) キザロホップ

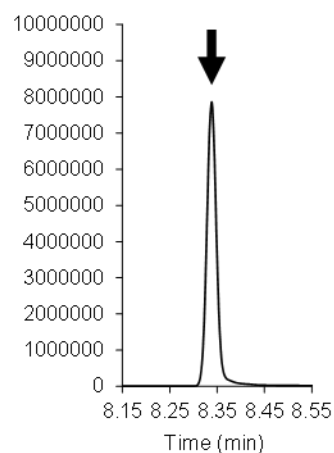
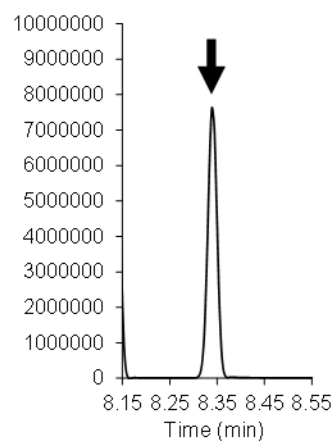
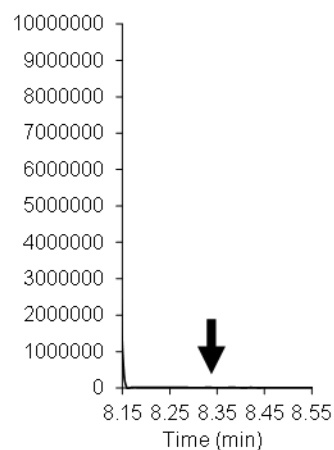
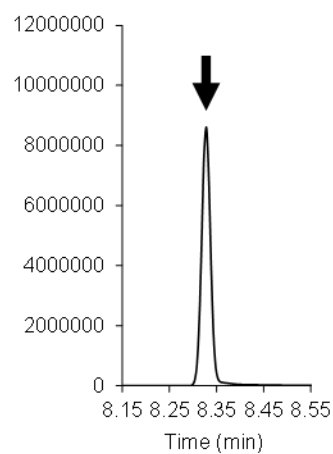
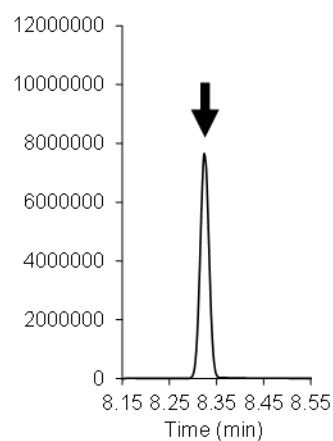
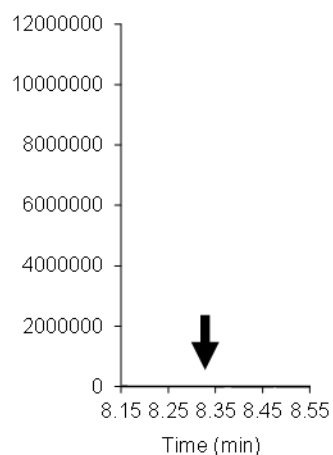


図 24 基準値濃度での添加回収試験における代表的なクロマトグラム (m/z 194.1→165.1)

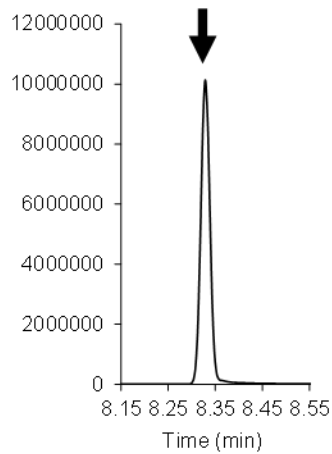
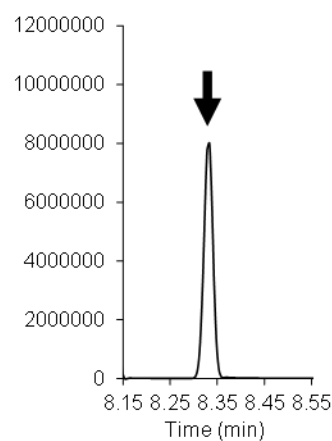
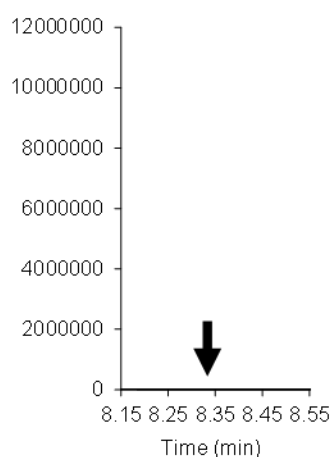
上：ブランク試料、中：添加試料、下：回収率 100%相当の MeCHQ 溶媒標準溶液

②キャベツ（基準値 0.3 ppm）

(a) キザロホップエチル



(b) キザロホップ P テフリル



(c) キザロホップ

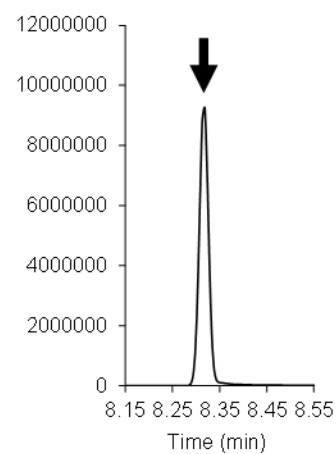
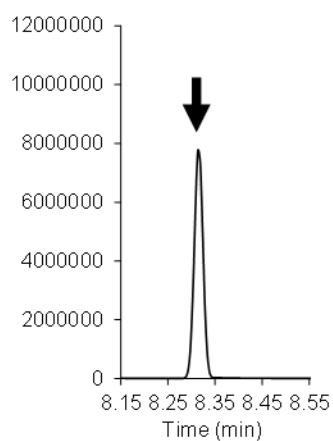
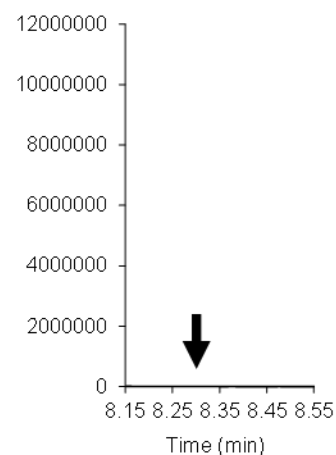
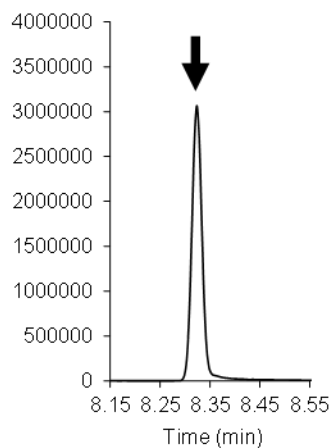
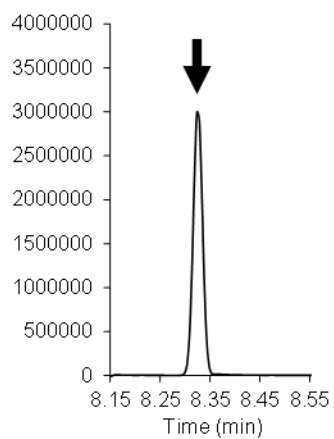
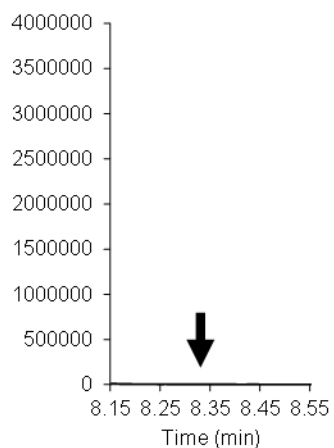


図 24 （つづき）

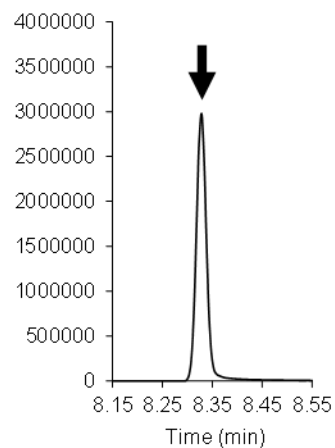
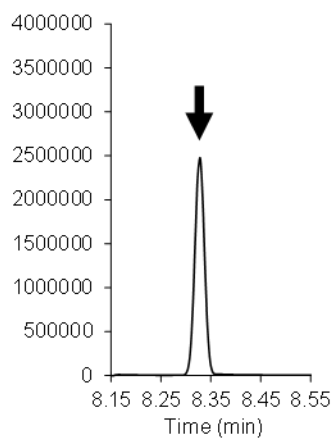
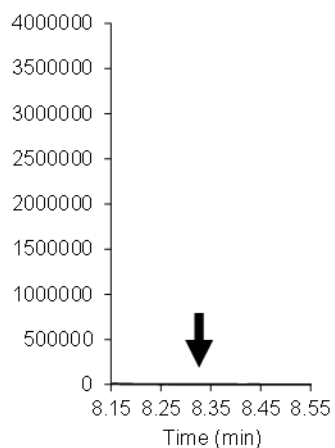
上：ブランク試料、中：添加試料、下：回収率 100%相当の MeCHQ 溶媒標準溶液

③ばれいしょ（基準値 0.1 ppm）

(a) キザロホップエチル



(b) キザロホップ P テフリル



(c) キザロホップ

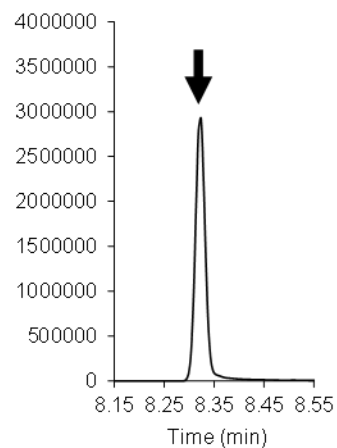
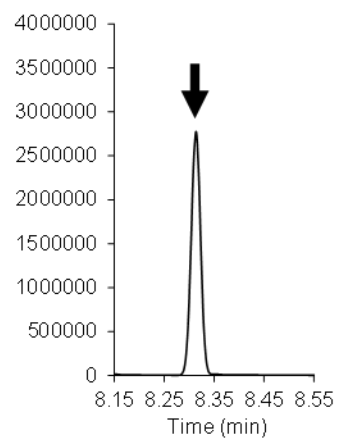
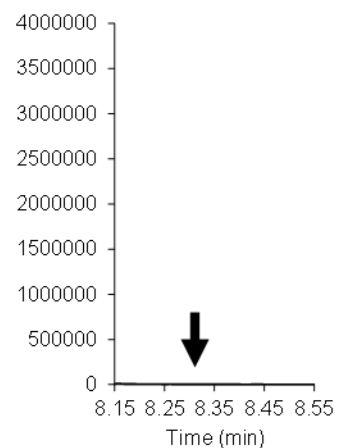
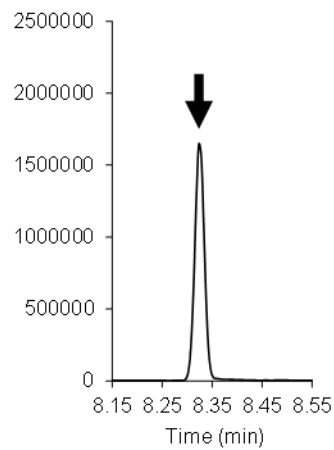
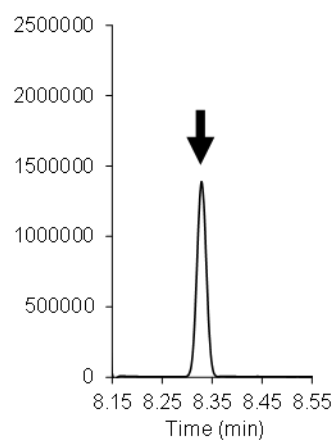
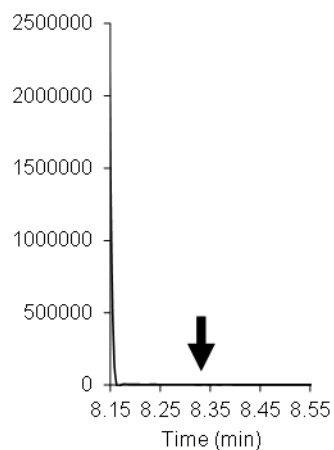


図 24 （つづき）

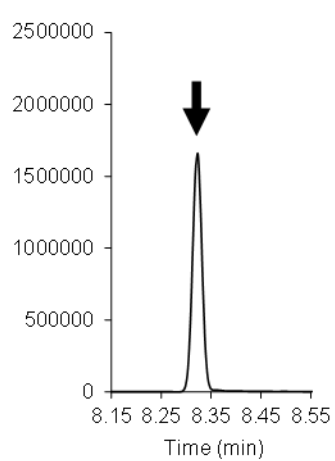
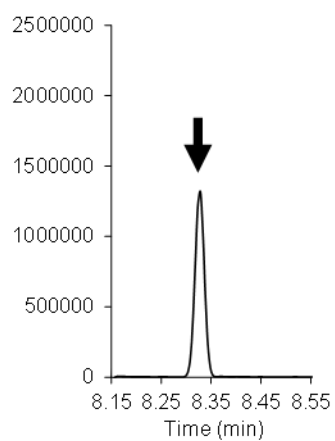
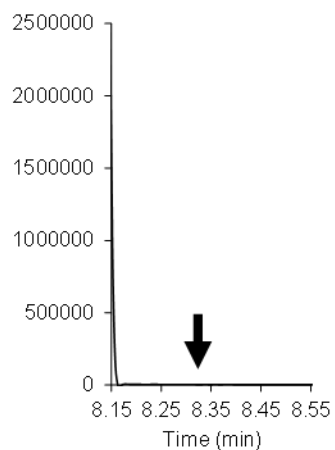
上：ブランク試料、中：添加試料、下：回収率 100%相当の MeCHQ 溶媒標準溶液

④ほうれんそう（基準値 0.05 ppm）

(a) キザロホップエチル



(b) キザロホップ P テフリル



(c) キザロホップ

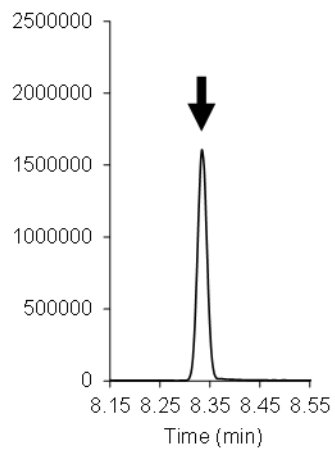
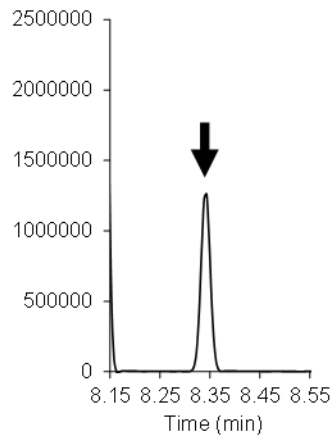
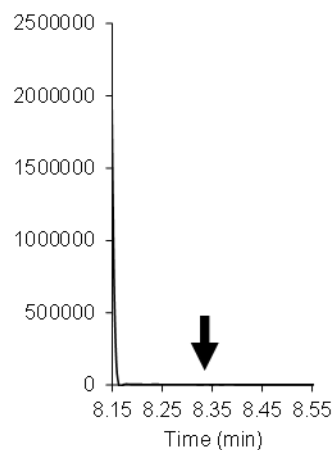
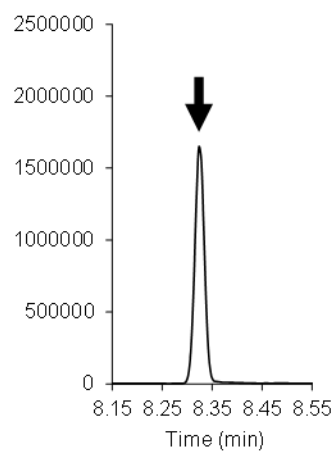
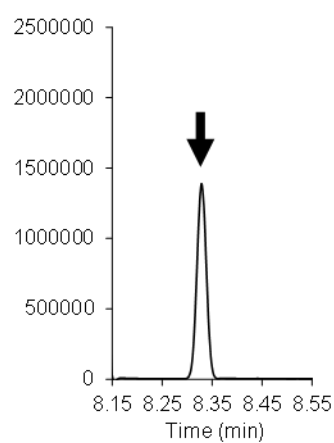
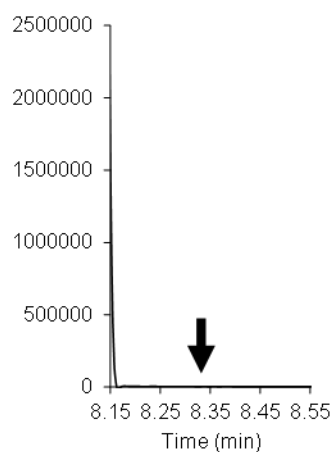


図 24 （つづき）

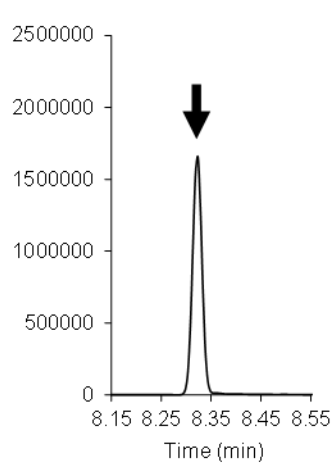
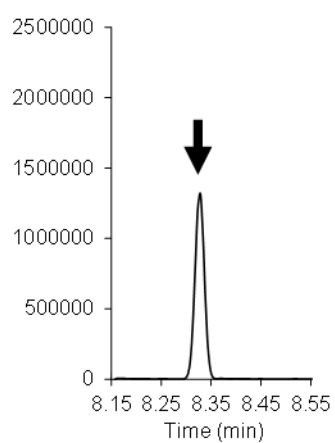
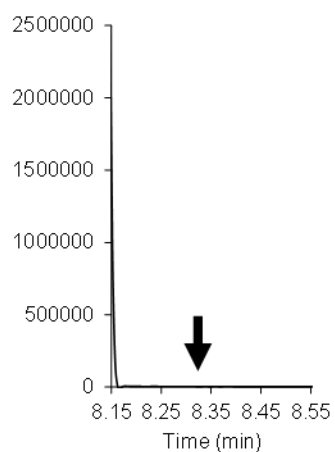
上：ブランク試料、中：添加試料、下：回収率 100%相当の MeCHQ 溶媒標準溶液

⑤りんご（基準値 0.05 ppm）

(a) キザロホップエチル



(b) キザロホップ P テフリル



(c) キザロホップ

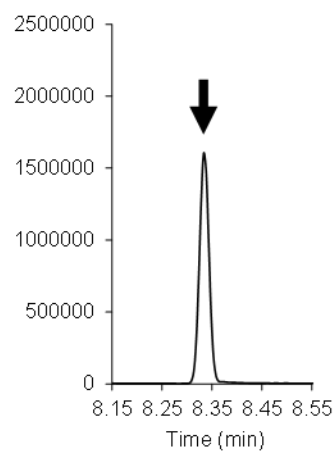
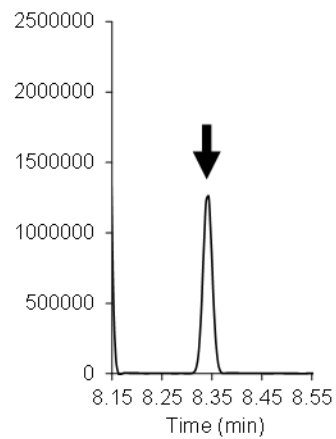
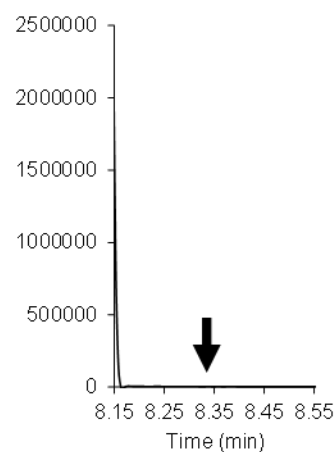
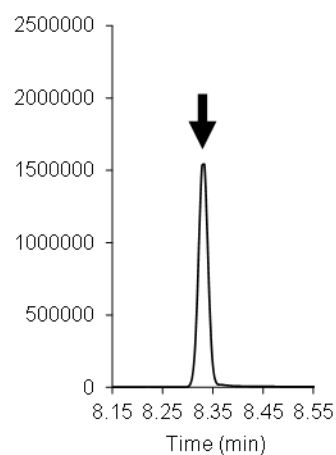
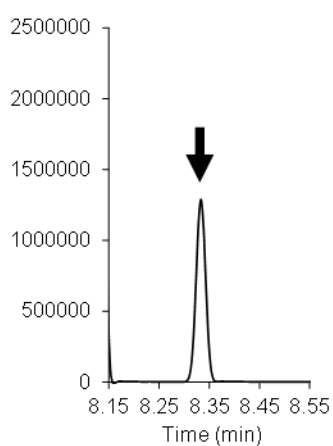
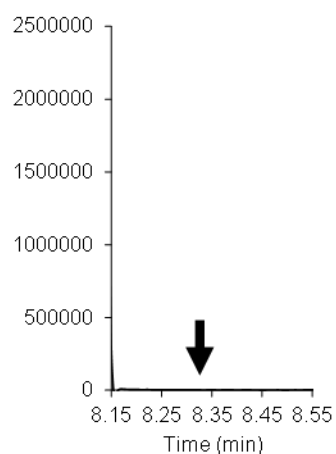


図 24 （つづき）

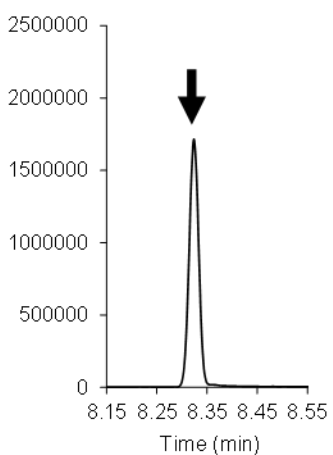
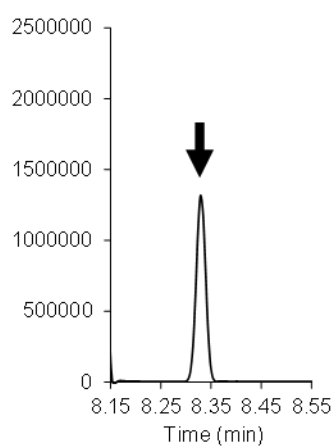
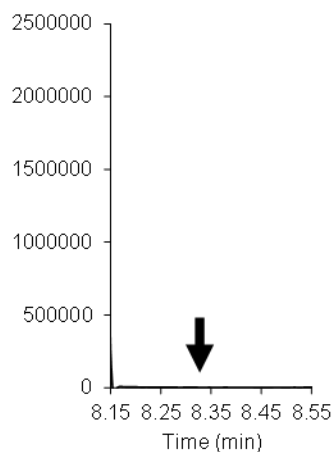
上：ブランク試料、中：添加試料、下：回収率 100%相当の MeCHQ 溶媒標準溶液

⑥いちご（基準値 0.05 ppm）

(a) キザロホップエチル



(b) キザロホップP テフリル



(c) キザロホップ

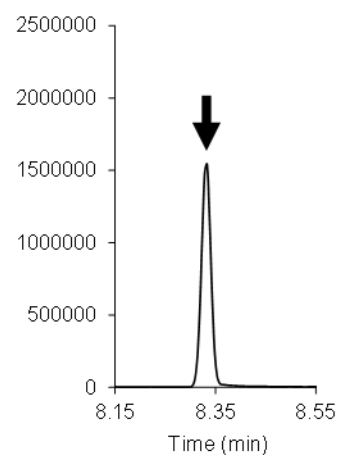
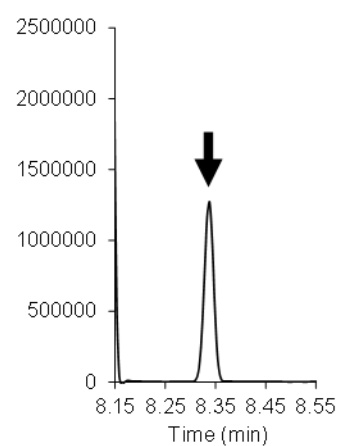
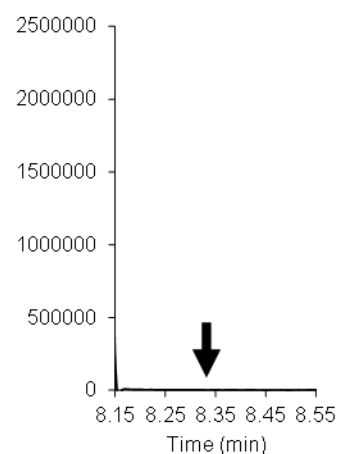
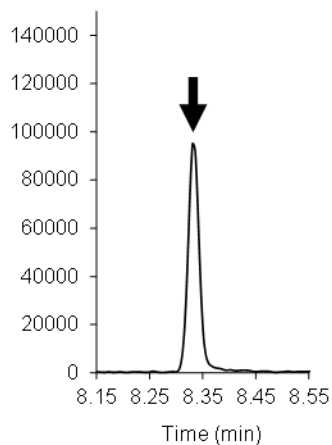
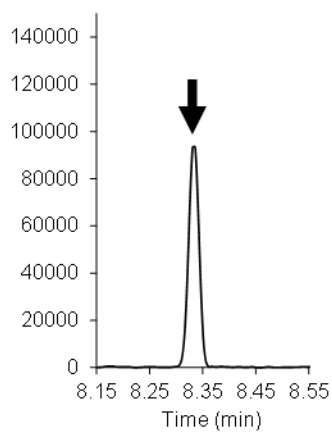
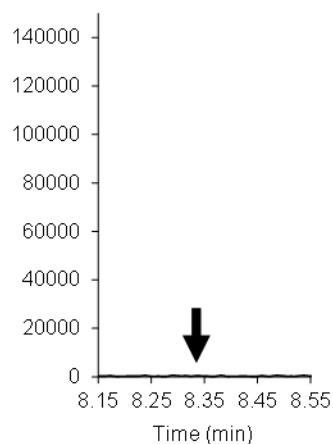


図 24 （つづき）

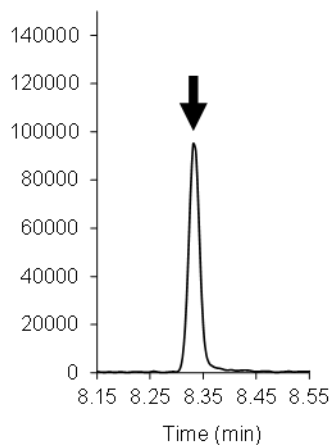
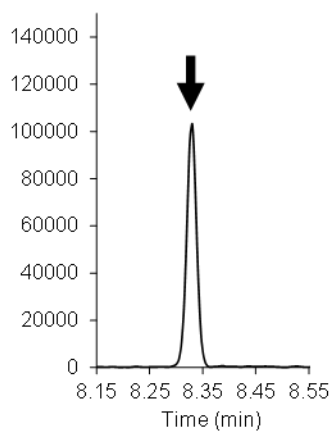
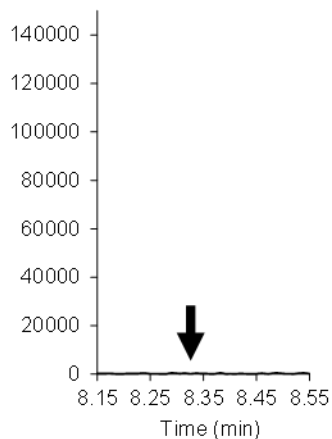
上：ブランク試料、中：添加試料、下：回収率 100%相当の MeCHQ 溶媒標準溶液

①大豆

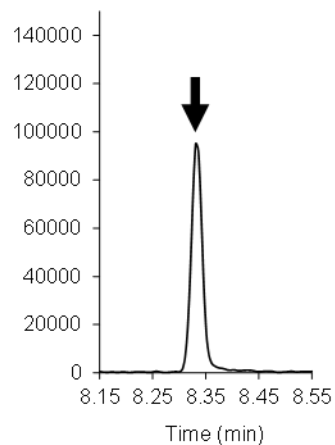
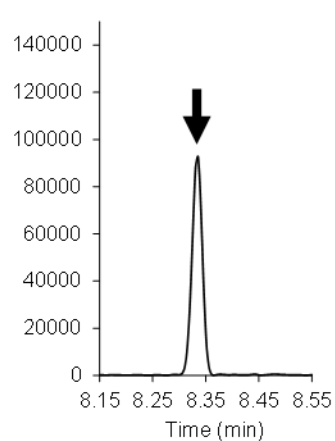
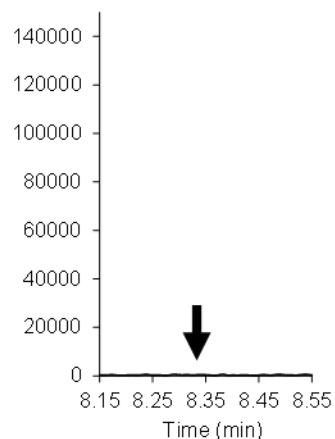
(a) キザロホップエチル



(b) キザロホップ P テフリル



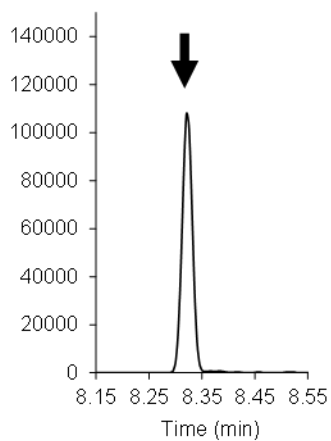
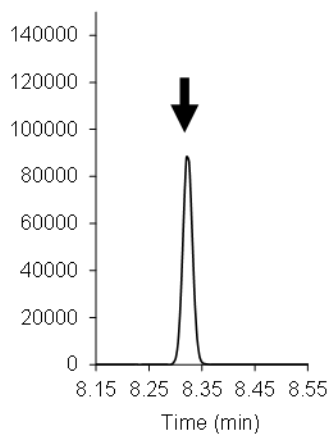
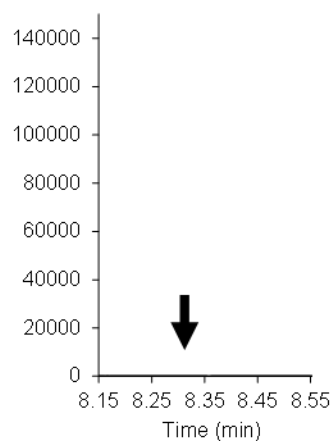
(c) キザロホップ



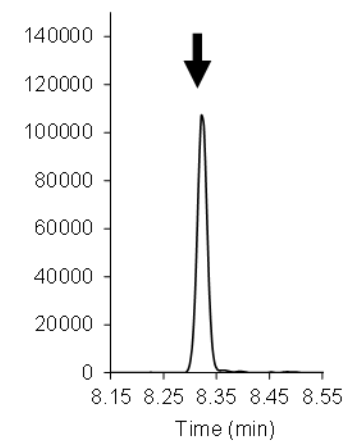
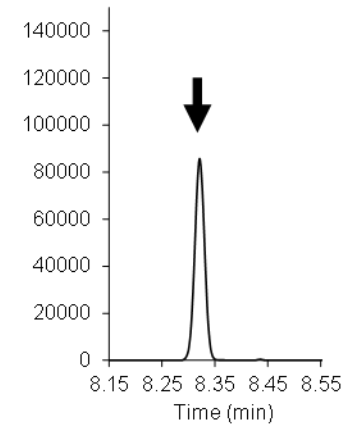
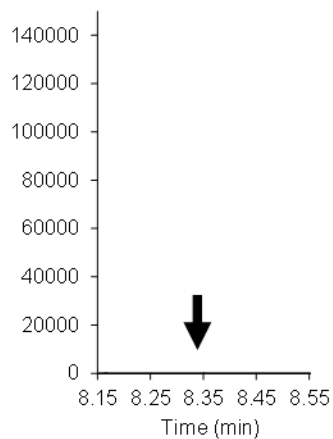
(参考) 図 25 定量限界濃度での添加回収試験における代表的なクロマトグラム (m/z 165.0→111.0)
上：ブランク試料、中：添加試料、下：回収率 100%相当の MeCHQ 溶媒標準溶液

②キャベツ

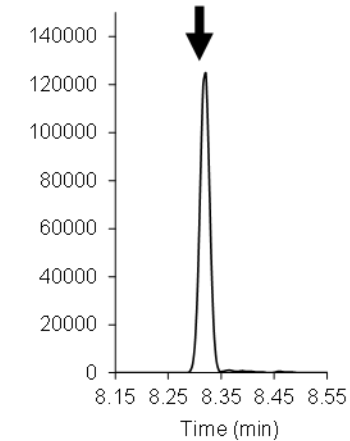
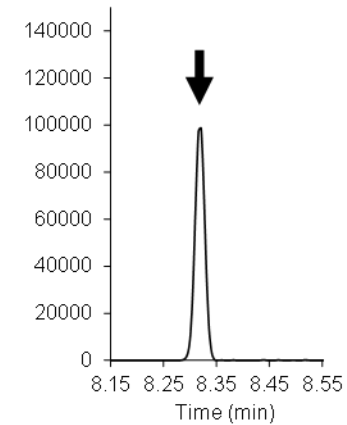
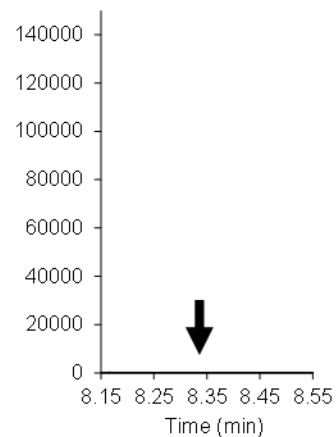
(a) キザロホップエチル



(b) キザロホップ P テフリル



(c) キザロホップ

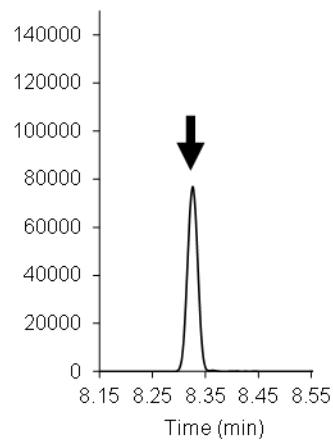
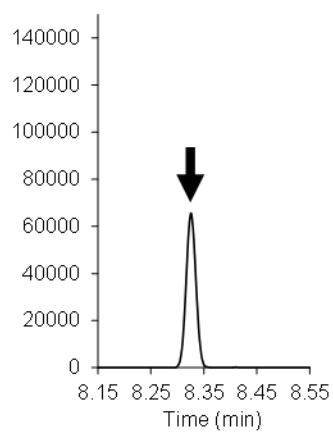
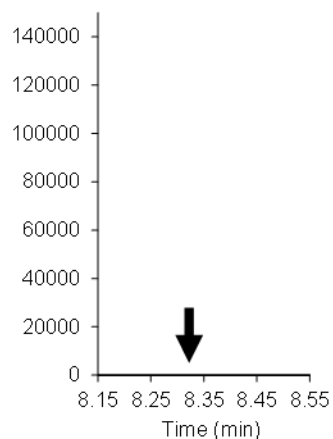


(参考) 図 25 (つづき)

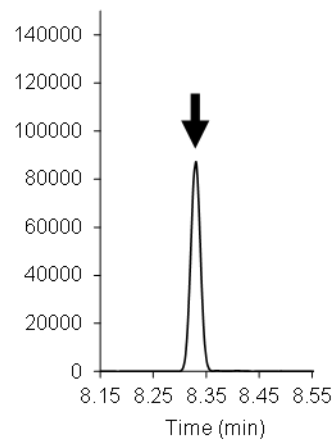
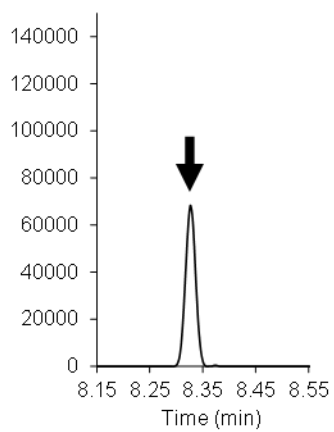
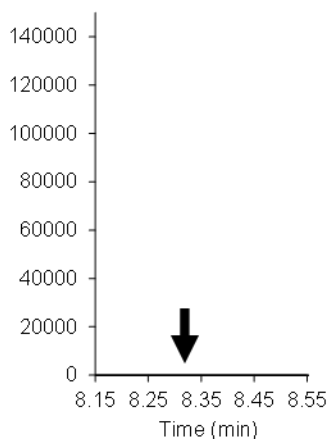
上：ブランク試料、中：添加試料、下：回収率 100%相当の MeCHQ 溶媒標準溶液

③ばれいしょ

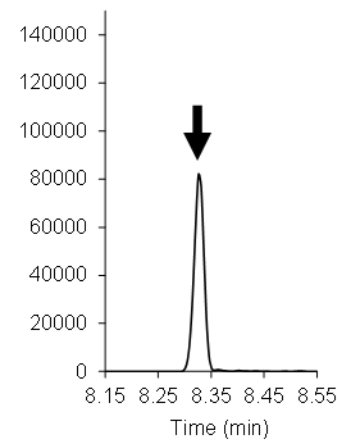
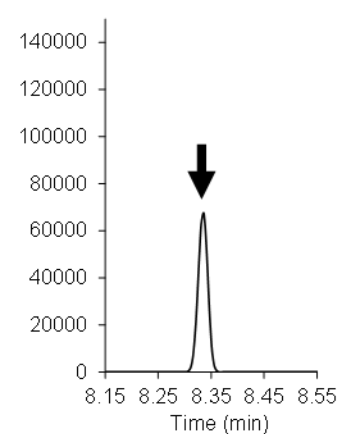
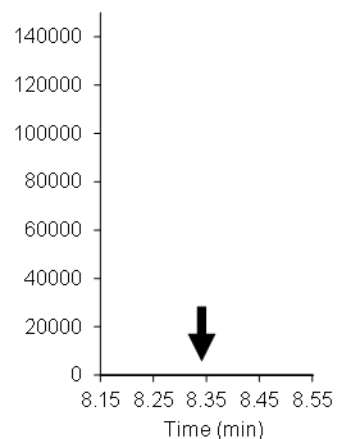
(a) キザロホップエチル



(b) キザロホップ P テフリル



(c) キザロホップ

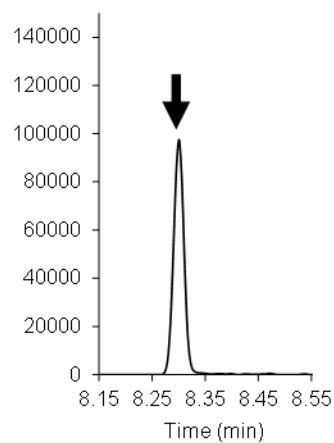
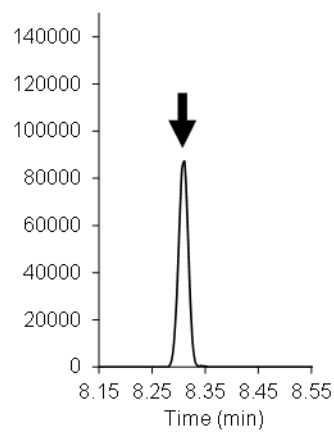
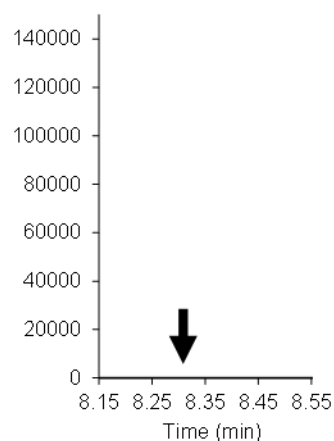


(参考) 図 25 (つづき)

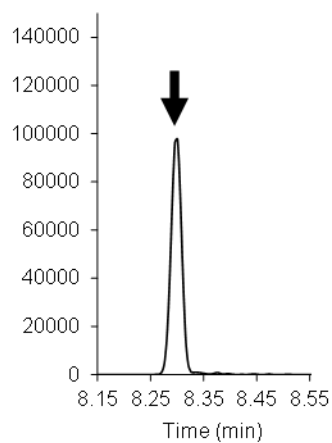
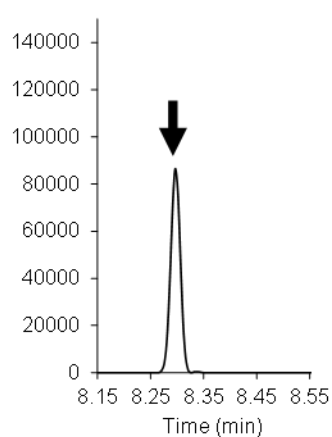
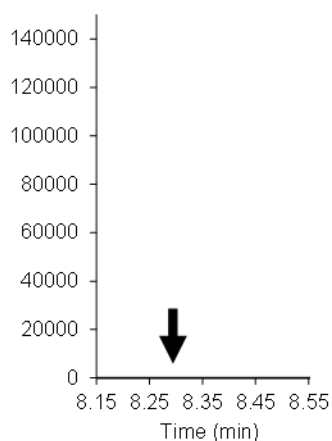
上：ブランク試料、中：添加試料、下：回収率 100%相当の MeCHQ 溶媒標準溶液

④ほうれんそう

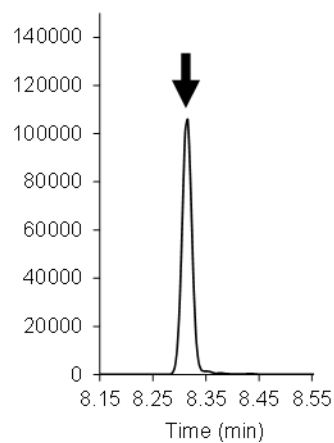
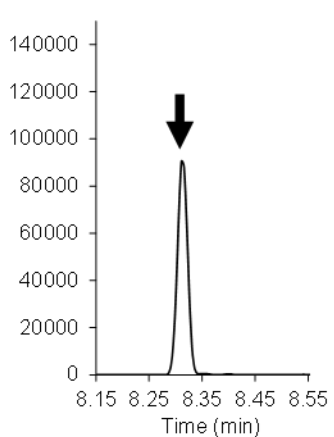
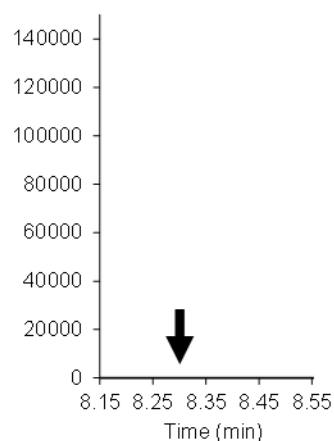
(a) キザロホップエチル



(b) キザロホップ P テフリル



(c) キザロホップ

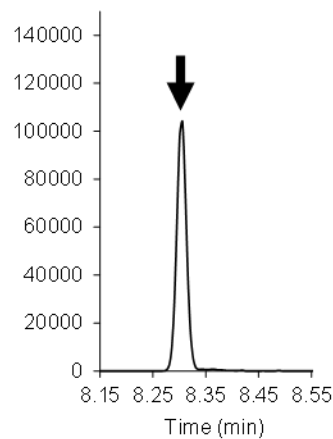
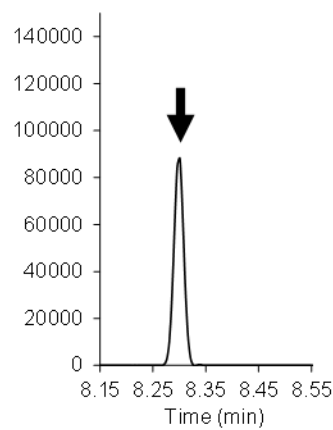
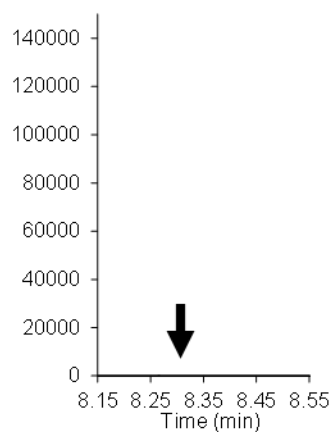


(参考) 図 25 (つづき)

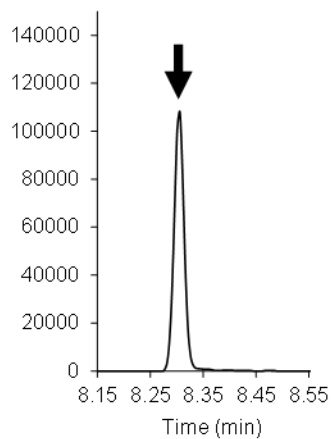
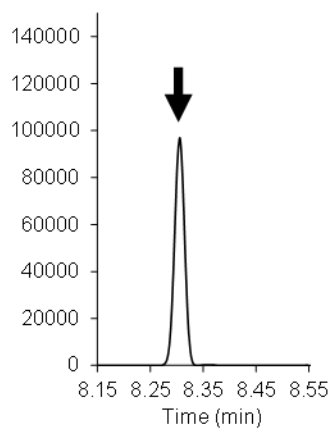
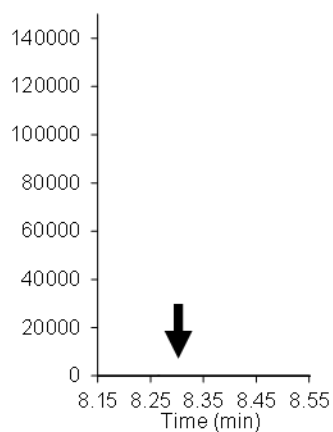
上：ブランク試料、中：添加試料、下：回収率 100%相当の MeCHQ 溶媒標準溶液

⑤りんご

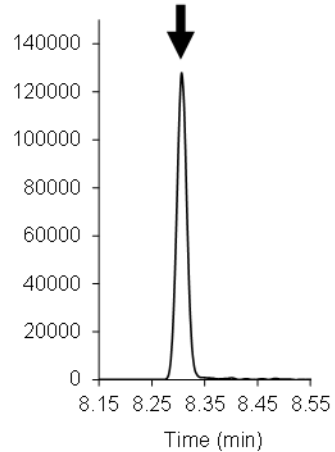
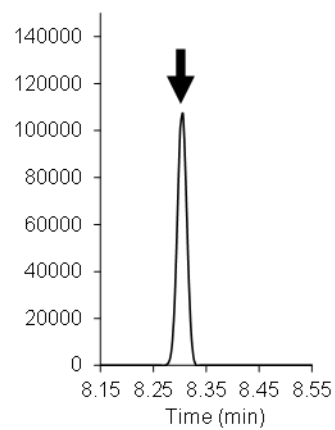
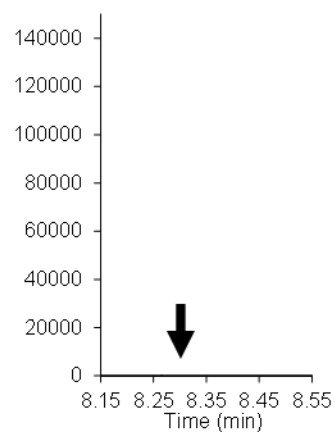
(a) キザロホップエチル



(b) キザロホップ P テフリル



(c) キザロホップ

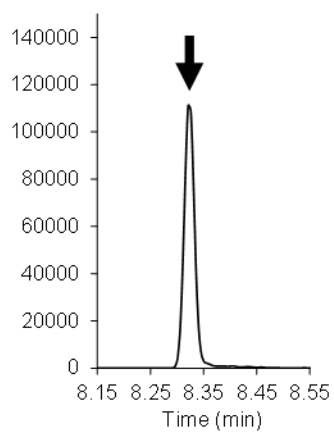
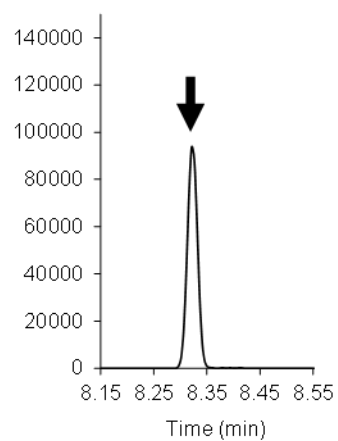
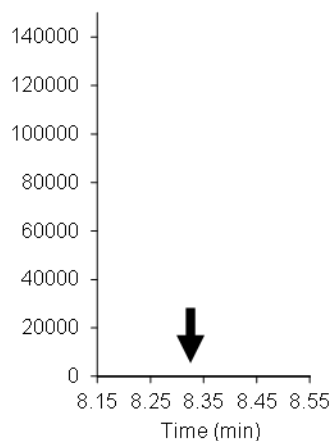


(参考) 図 25 (つづき)

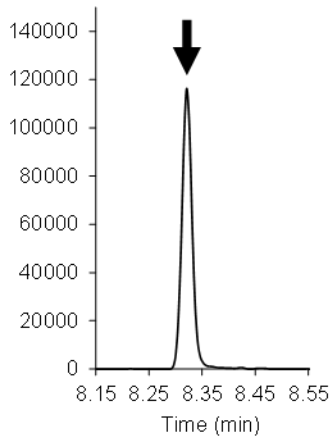
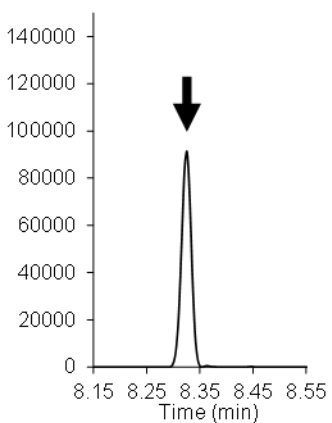
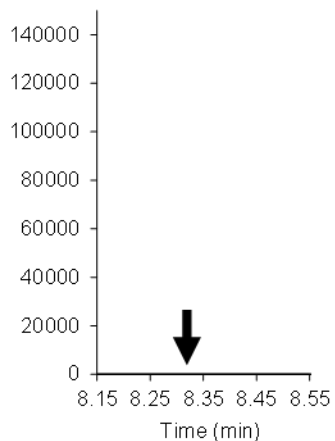
上：ブランク試料、中：添加試料、下：回収率 100%相当の MeCHQ 溶媒標準溶液

⑥いちご

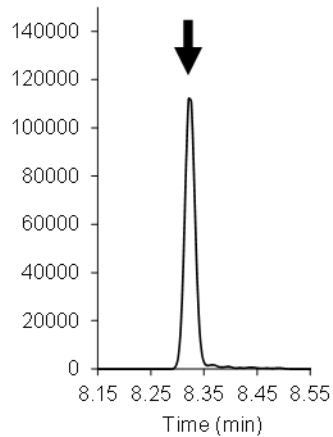
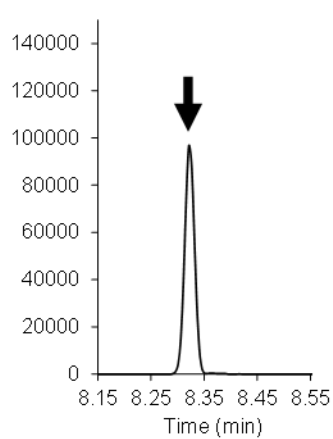
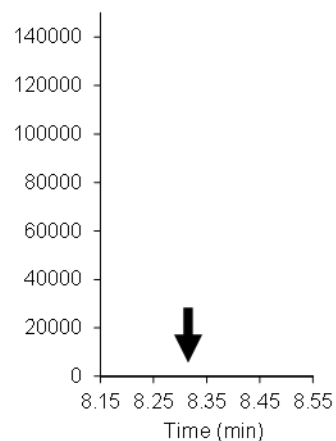
(a) キザロホップエチル



(b) キザロホップ P テフリル



(c) キザロホップ

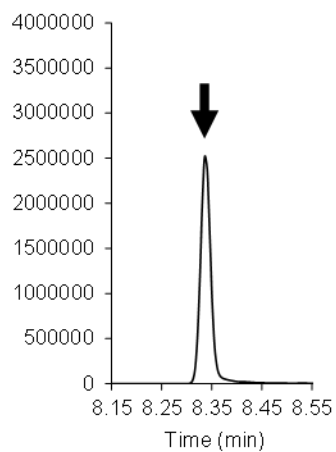
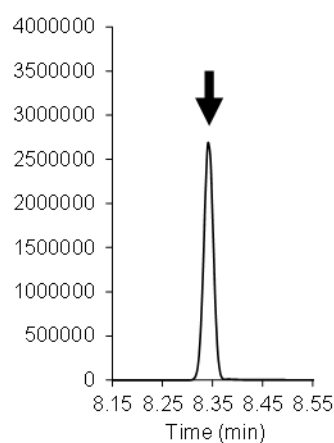
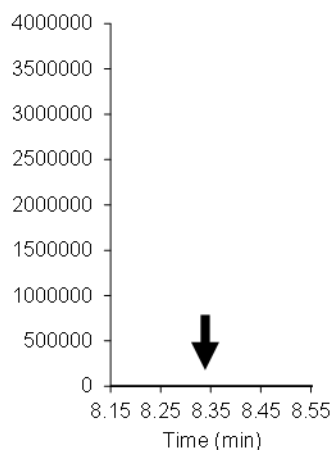


(参考) 図 25 (つづき)

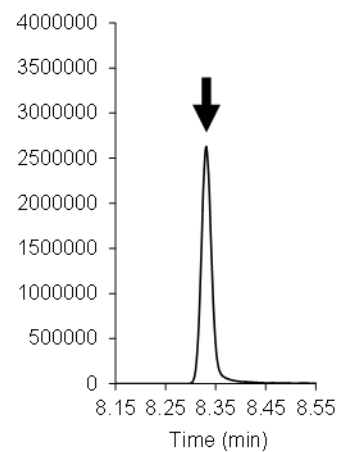
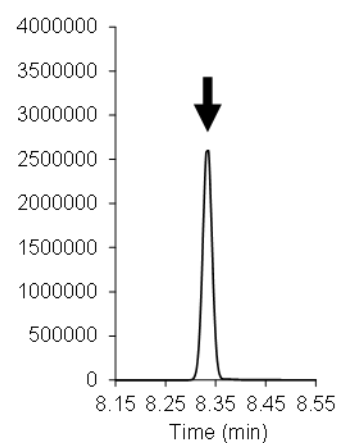
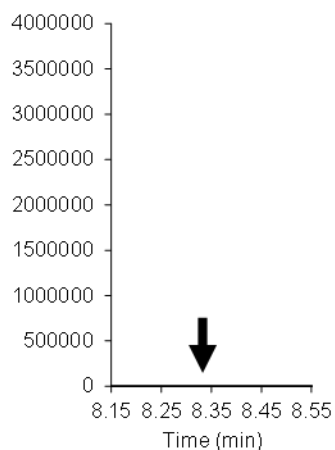
上：ブランク試料、中：添加試料、下：回収率 100%相当の MeCHQ 溶媒標準溶液

①大豆（基準値 0.3 ppm）

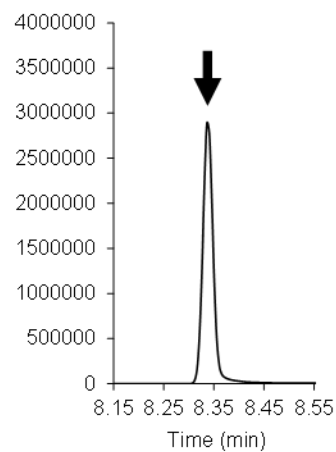
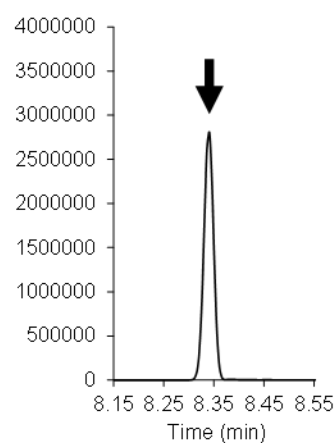
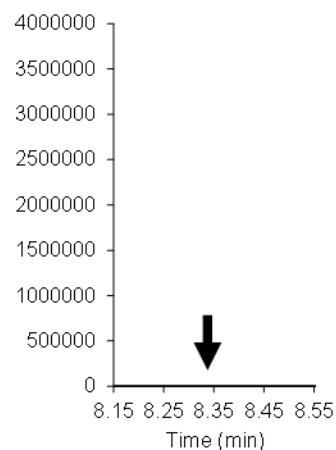
(a) キザロホップエチル



(b) キザロホップ P テフリル



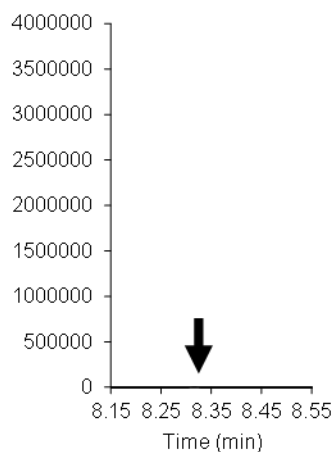
(c) キザロホップ



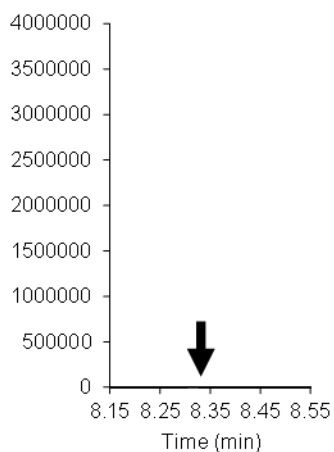
（参考）図 26 基準値濃度での添加回収試験における代表的なクロマトグラム（ m/z 165.0→111.0）
上：ブランク試料、中：添加試料、下：回収率 100%相当の MeCHQ 溶媒標準溶液

②キャベツ（基準値 0.3 ppm）

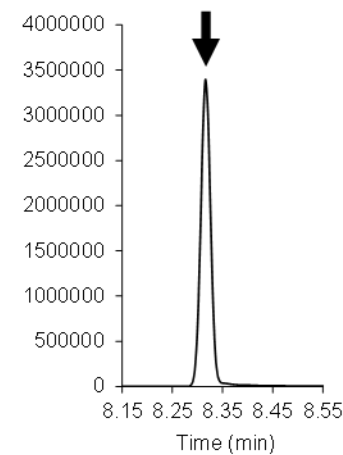
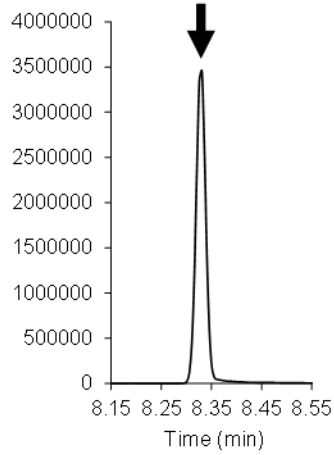
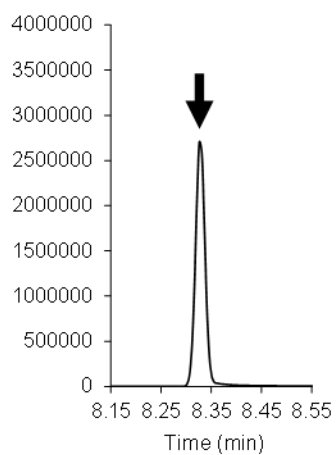
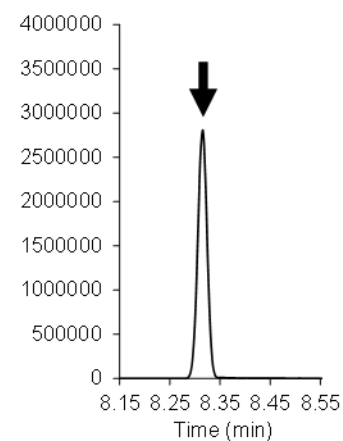
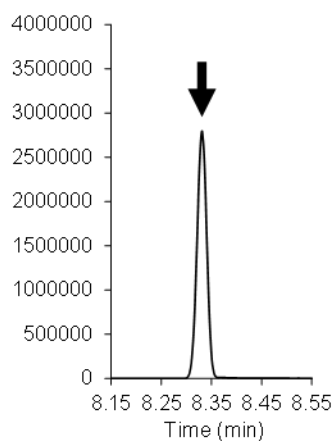
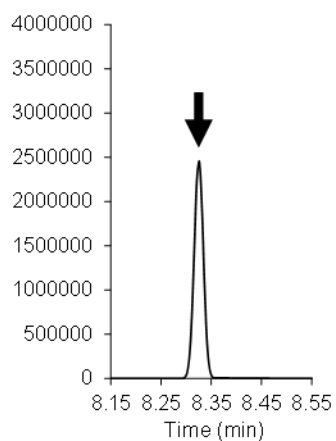
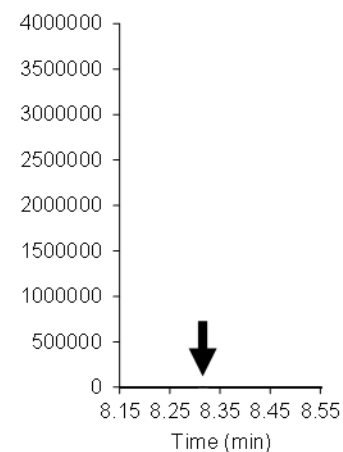
(a) キザロホップエチル



(b) キザロホップ P テフリル



(c) キザロホップ

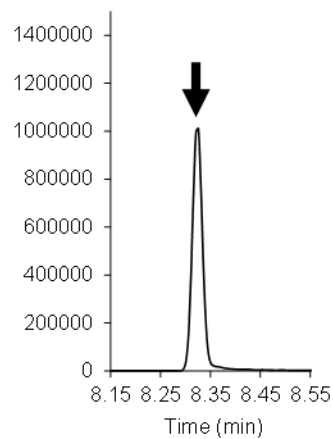
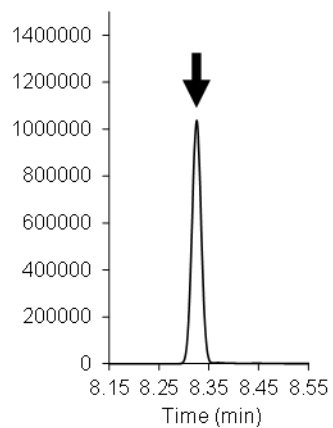
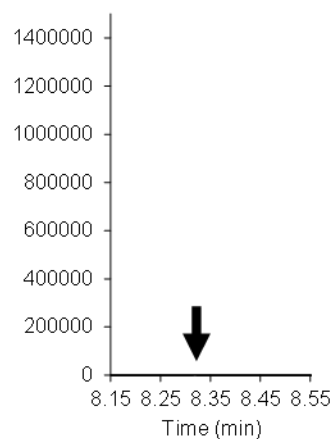


（参考）図 26 （つづき）

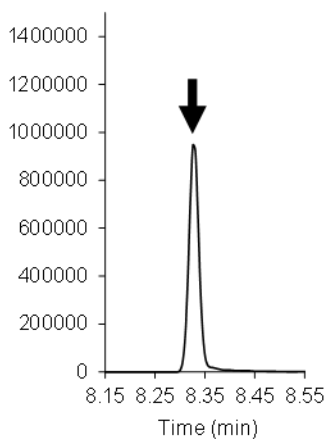
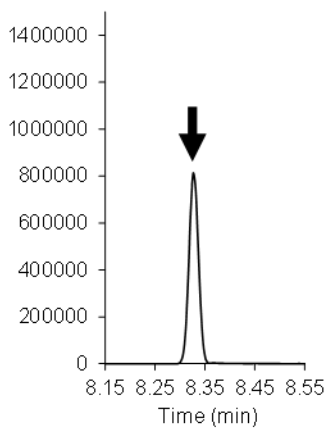
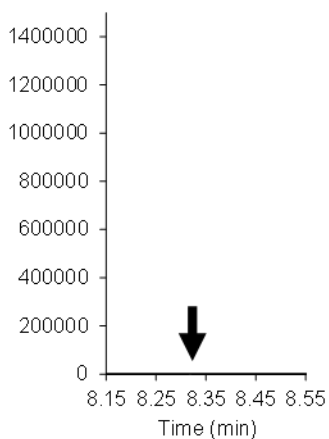
上：ブランク試料、中：添加試料、下：回収率 100%相当の MeCHQ 溶媒標準溶液

③ばれいしょ（基準値 0.1 ppm）

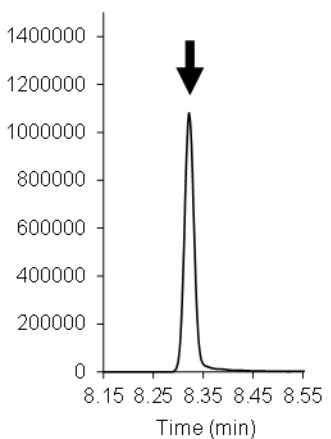
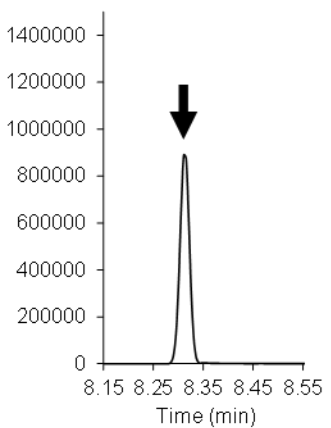
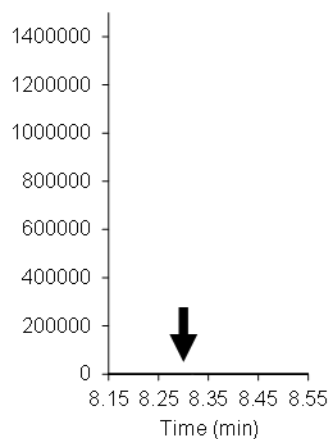
(a) キザロホップエチル



(b) キザロホップ P テフリル



(c) キザロホップ

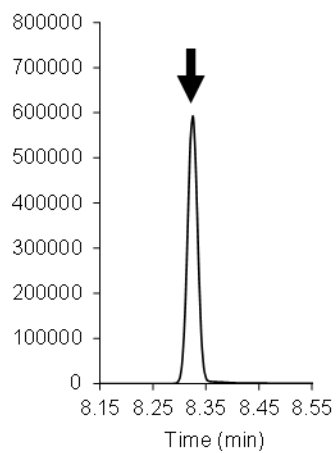
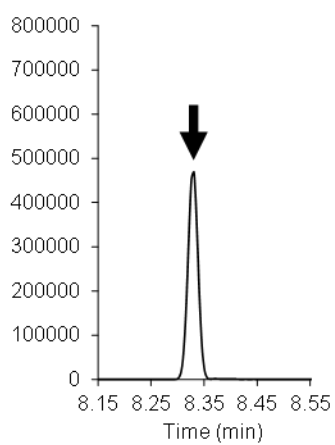
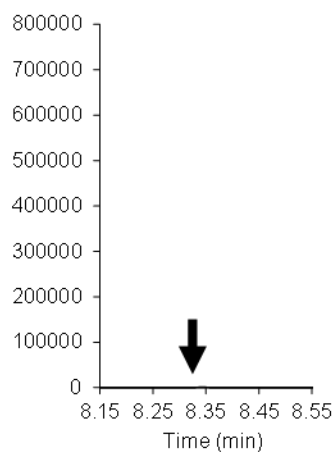


(参考) 図 26 (つづき)

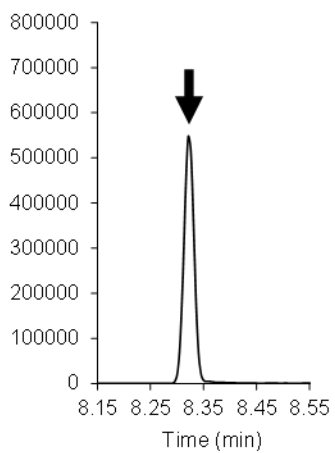
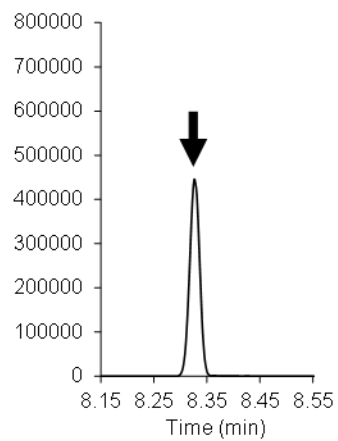
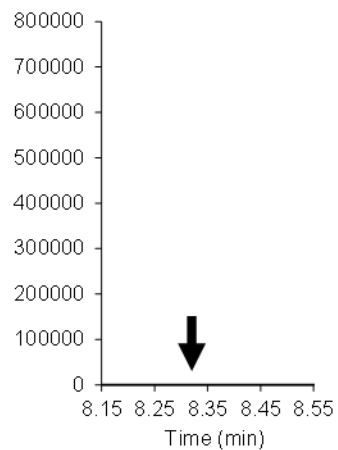
上：ブランク試料、中：添加試料、下：回収率 100%相当の MeCHQ 溶媒標準溶液

④ほうれんそう（基準値 0.05 ppm）

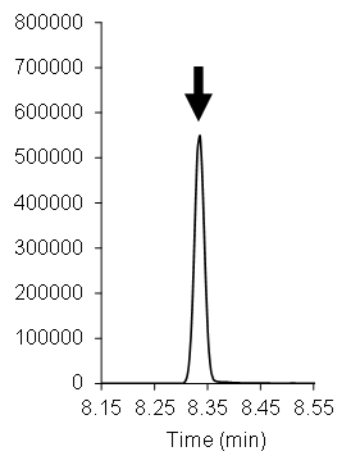
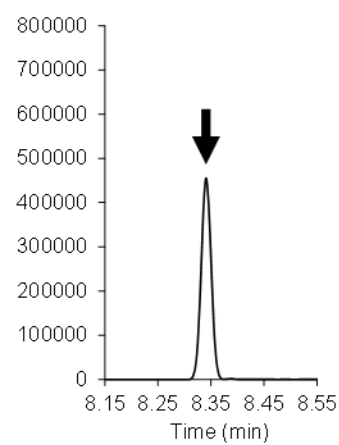
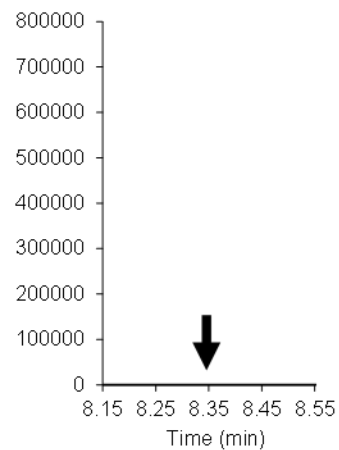
(a) キザロホップエチル



(b) キザロホップ P テフリル



(c) キザロホップ

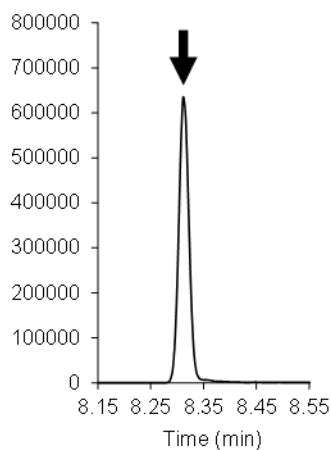
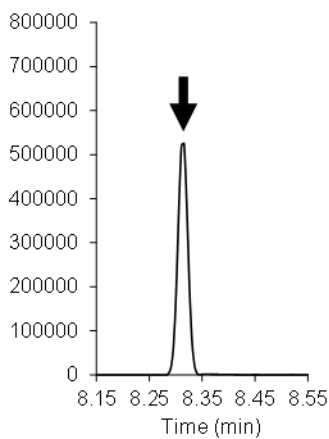
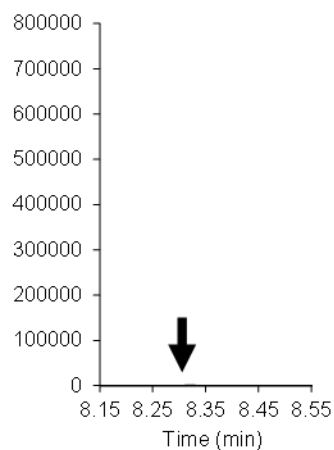


（参考）図 26 （つづき）

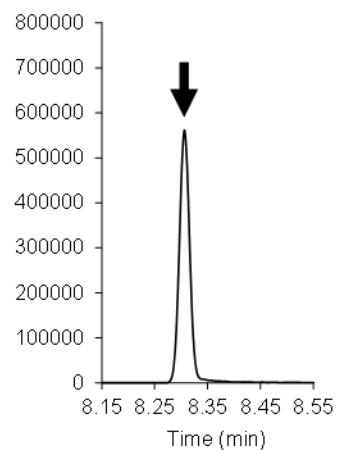
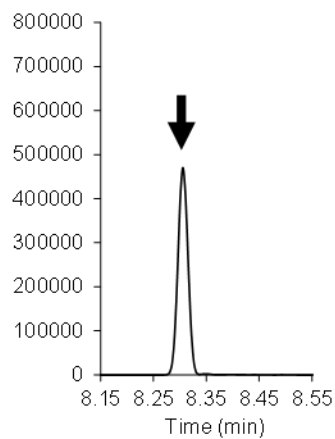
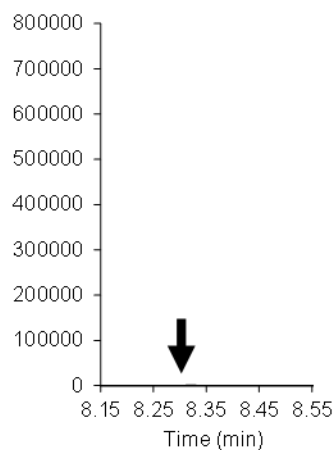
上：ブランク試料、中：添加試料、下：回収率 100%相当の MeCHQ 溶媒標準溶液

⑤りんご（基準値 0.05 ppm）

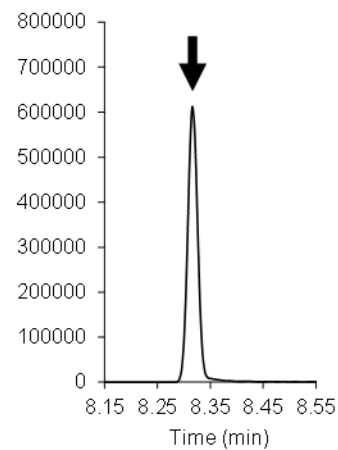
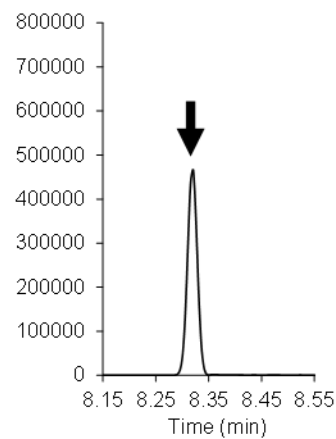
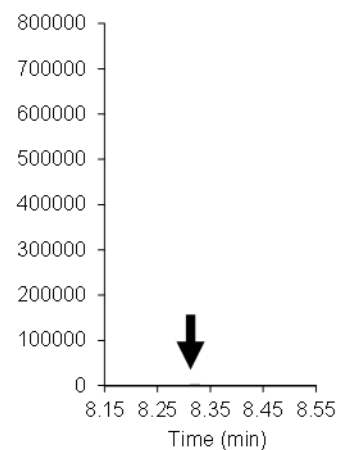
(a) キザロホップエチル



(b) キザロホップP テフリル



(c) キザロホップ

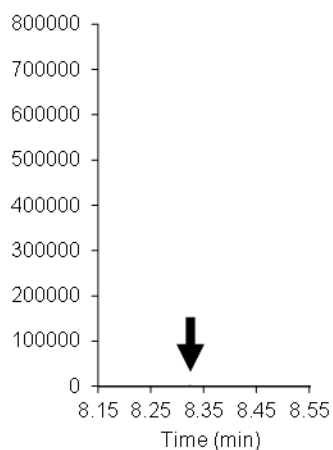


（参考）図 26 （つづき）

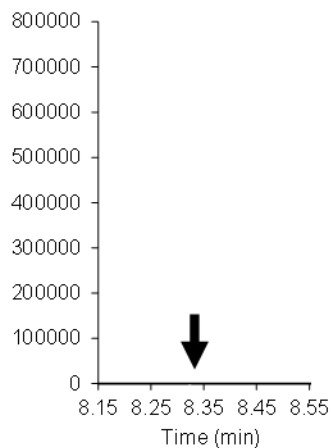
上：ブランク試料、中：添加試料、下：回収率 100%相当の MeCHQ 溶媒標準溶液

⑥いちご（基準値 0.05 ppm）

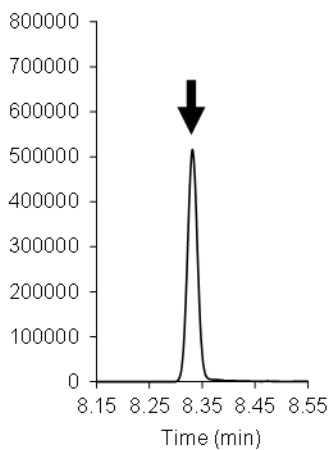
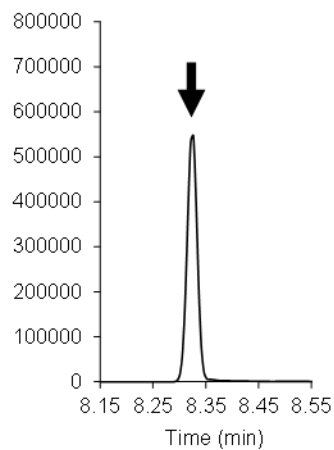
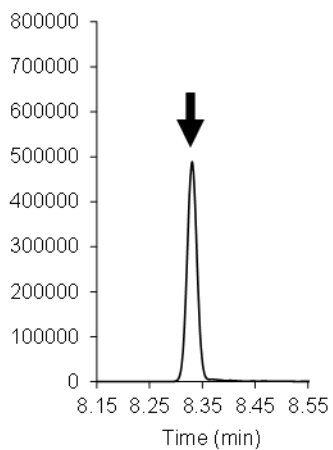
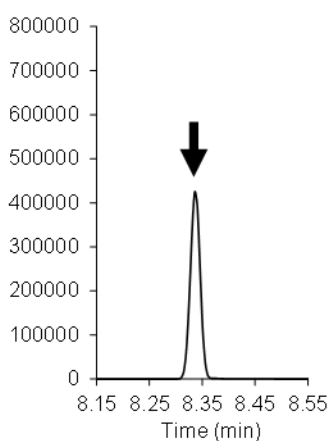
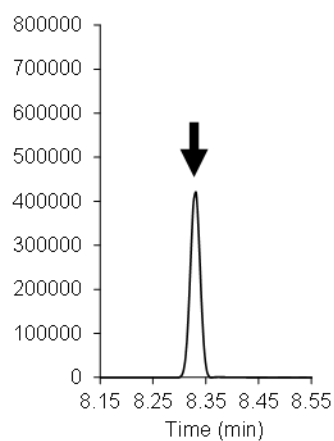
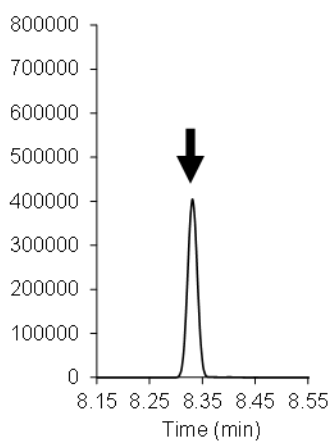
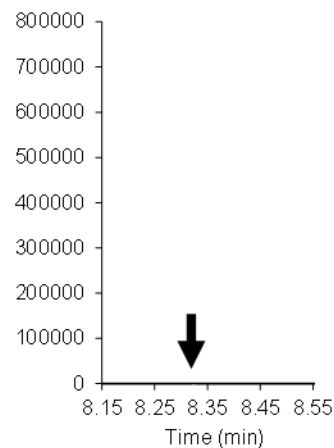
(a) キザロホップエチル



(b) キザロホップ P テフリル



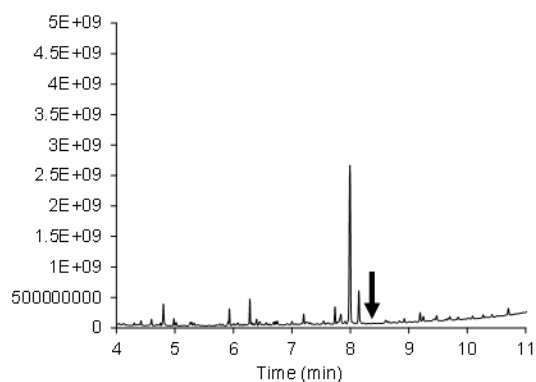
(c) キザロホップ



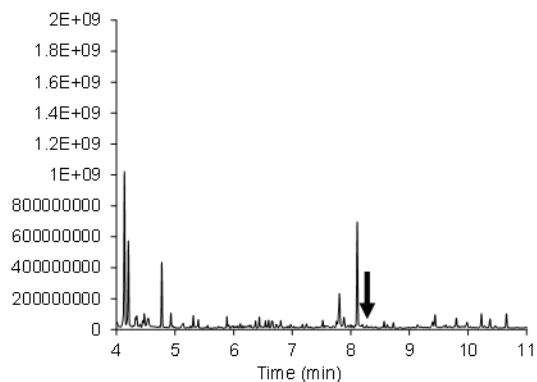
（参考）図 26 （つづき）

上：ブランク試料、中：添加試料、下：回収率 100%相当の MeCHQ 溶媒標準溶液

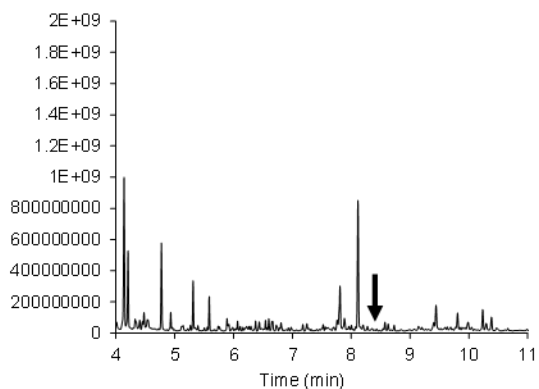
①大豆



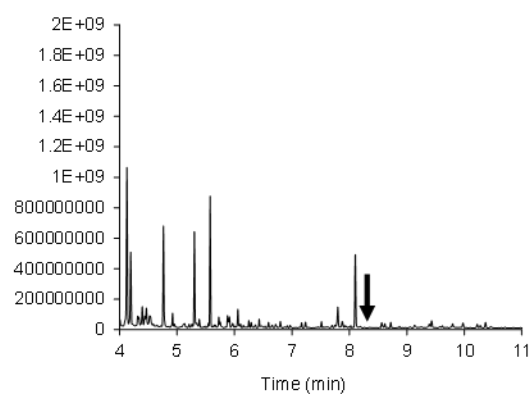
④ほうれんそう



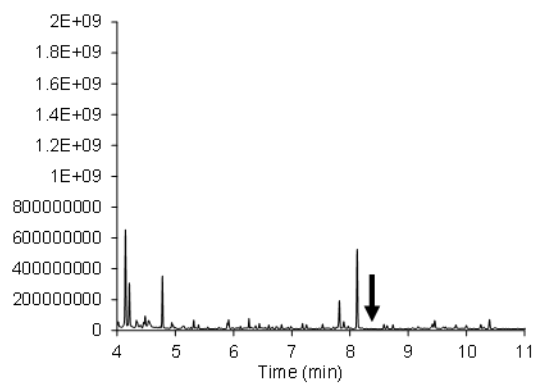
②キャベツ



⑤りんご



③ばれいしょ



⑥いちご

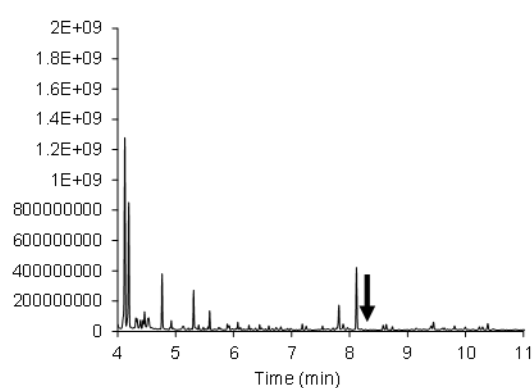


図 27 添加回収試験におけるブランク試料の代表的なトータルイオンカレントクロマトグラム
スキャン範囲： m/z 50～500

〔結論〕

農産物中のキザロホップエチル及びキザロホップ P テフリル試験法を開発した。本試験法は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を塩基性条件下で加熱還流して MeCHQ に変換後、*n*-ヘキサンに転溶し、PSA 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。大豆、キャベツ、ばれいしょ、ほうれんそう、りんご及びいちごを用いてキザロホップエチル、キザロホップ P テフリル及びキザロホップについて定量限界及び基準値濃度で添加回収試験を行った結果、キザロホップエチルは真度 80～92%、併行精度 2～6%、キザロホップ P テフリルは真度 80～92%、併行精度 2～7%、キザロホップは真度 80～93%、併行精度 1～6% の良好な結果が得られた。いずれの試料についても定量を妨害するピークは認められず、選択性は良好であった。試料マトリックスによる測定への影響を評価するため、溶媒標準溶液に対するマトリックス添加標準溶液のピーク面積比を求めたところ、0.99～1.12 となり、本試験法は大きな影響を受けずに測定することが可能であることが示された。これらの結果から、本試験法はキザロホップエチル、キザロホップ P テフリル及びその代謝物を精確に分析可能な方法と考えられた。

〔参考文献〕

- 1) 企業提供資料