

※本報告書は、試験法開発における検討結果を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ください。

平成 23 年度

食品に残留する農薬等の成分である物質  
(アセキノシル)の試験法開発事業報告書

## アセキノシル試験法（畜水産物）の検討結果

### [緒言]

#### 1. 目的及び試験法の検討方針

アセキノシルは、米国デュポン社及びアグロカネシヨウ株式会社によって開発された、ナフトキノン骨格を持つキノリン系殺ダニ剤である。

「薬事食品衛生審議会 食品衛生分科会報告書」に記載されている規制対象物質及び残留基準値案を踏まえ、試験法の開発を行った。

#### 規制対象物質

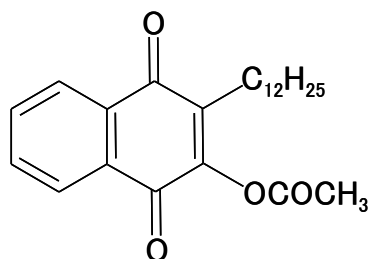
アセキノシル

3-ドデシル-2-ヒドロキシ-1,4-ナフトキノン（以下「アセキノシルヒドロキシ体」という。）

#### 2. 分析対象化合物の構造式、物理化学的性質、基準値等に関する情報

構造式及び物理化学的性質

アセキノシル



化学式：C<sub>24</sub>H<sub>32</sub>O<sub>4</sub>

分子量：384.51

化学名（IUPAC）：3-dodecyl-1,4-dihydro-1,4-dioxo-2-naphthyl acetate

外 観：うすい黄色、結晶性粉末～粉末

溶解性：水 6.7×10<sup>-6</sup> g/L (25℃)

ヘキサン 44、トルエン 450、ジクロロメタン 620、アセトン 220、酢酸エチル 290、  
メタノール 7.8、アセトニトリル28 （全てg/L、20℃）

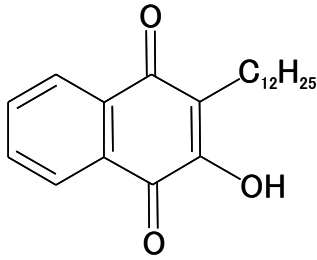
オクタノール/水分配係数：log P<sub>ow</sub> (25℃) ≥ 6.2

安定性：熱安定性；約60℃で融解、その後150℃まで吸熱・発熱変化無し

加水分解性；（半減期）pH1.2 = 19日（37℃）、pH4 = 74日（25℃）、pH7 = 53時間（25℃）  
pH9 = 76分（25℃）

水中光分解性；（半減期、25℃、光強度144.1 W/m<sup>2</sup>、カットオフ波長200～800 nm）  
緩衝液 = 14分、自然水 = 12分

### アセキノシルヒドロキシ体



化学式：C<sub>22</sub>H<sub>30</sub>O<sub>3</sub>

分子量：342.47

化学名：3-dodecyl-2-hydroxy-1,4-naphthoquinone

外 観：黄色の結晶性粉末

溶解性：水 6.65×10<sup>-6</sup> g/L (20℃)

オクタノール/水分配係数：log P<sub>ow</sub> (25℃) = 5.16

安定性：水中光分解性；（半減期、25℃、光強度44.1 W/m<sup>2</sup>、カットオフ波長200～800 nm）

緩衝液 = 14分、自然水 = 12分

出典：「農薬抄録 アセキノシル」

### 3. 基準値

牛の脂肪、牛の肝臓 0.02 ppm

#### [実験方法]

#### 1. 試料

##### 1) 購入先

うなぎは愛知県の業者から、牛の肝臓については都内の業者から、その他の試料については都内のスーパーにて購入した。

##### 2) 試料の採取方法

- ① 牛の筋肉は脂肪層を除き、細切均一化した。
- ② 牛の脂肪は筋肉部を除き、細切均一化した。
- ③ 牛の肝臓は、全体を細切均一化した。
- ④ さけは可食部（皮を含む）を細切均一化した。
- ⑤ うなぎは、活鰻を使用し、頭部を除いた可食部（内臓、骨及び皮を含む）を細切均一化した。
- ⑥ しじみは、貝殻を除き細切均一化した。
- ⑦ 牛乳は全体をよく混合して均一化した。
- ⑧ 鶏卵は、殻を除き卵白と卵黄を合わせてよく混合し均一化した。
- ⑨ はちみつはそば蜜を使用し、加温（40℃以下）してから、よく混合して均一化した。
- ⑩ 鶏の筋肉は脂肪層を除き、細切均一化した。

#### 2. 試薬・試液

##### 1) 標準品

アセキノシル標準品（98.5%、和光純薬工業製）

アセキノシルヒドロキシ体標準品（99%、和光純薬工業製）

## 2) 試薬

アセトニトリル、アセトン、酢酸エチル、*n*-ヘキサン（以上、残留農薬試験用、関東化学製）  
塩化ナトリウム、塩酸、ギ酸、無水硫酸ナトリウム（以上、試薬特級、関東化学製）  
ケイソウ土（セライト545、関東化学製）  
シリカゲルミニカラム（Sep-Pak Vac Silica、充てん量500 mg、Waters製）  
スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラム  
（InertSep PLS-2、充てん量500 mg、ジーエルサイエンス製）

## 3) 標準溶液、試液の調製方法

### ① 標準溶液の調製方法

アセキノシル標準品及びアセキノシルヒドロキシ体標準品を25 mg精密に量り、それぞれアセトンに溶解した後、50 mLに定容し500 mg/Lの各標準原液を調製した。各標準原液をアセトニトリルで混合希釈し、アセキノシルが0.005～0.1 mg/L、アセキノシルヒドロキシ体が0.004～0.08 mg/Lの濃度の混合標準溶液を調製した。また、各標準原液をアセトンで混合希釈し、アセキノシルが0.1 mg/L、アセキノシルヒドロキシ体が0.08 mg/Lの濃度の添加用標準溶液を調製した。

### ② 試液の調製方法

#### 0.4 mol/L塩酸

塩酸10 mL及び水290 mLを混合した。

#### 10 w/v%塩化ナトリウム溶液

塩化ナトリウム100 gに水を加えて溶解し、1000 mLとした。

#### 酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（1：4）混液

酢酸エチル200 mL及び*n*-ヘキサン800 mLを混合した。

#### アセトニトリル及び水（1：1）混液

アセトニトリル500 mL及び水500 mLを混合した。

#### 0.1 vol%ギ酸

ギ酸1 mLに水を加えて混合し、1000 mLとした。

### 3. 装置

	型式	会社
MS 装置	Quattro Premier XE	Waters
LC 装置	Alliance 2795 HT	Waters

### 4. 測定条件

LC 条件															
カラム	Inertsil ODS4 サイズ：内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm 会社：ジーエルサイエンス株式会社														
移動相流速 (mL/min)	0.2														
注入量 (μL)	10														
カラム温度 (°C)	40														
移動相	A液：0.1 vol% ギ酸 B液：アセトニトリル														
グラジエント条件	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間 (分)</th> <th>A液 (%)</th> <th>B液 (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.00</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>10.00</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>20.00</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> </tbody> </table>			時間 (分)	A液 (%)	B液 (%)	0.00	50	50	10.00	5	95	20.00	5	95
時間 (分)	A液 (%)	B液 (%)													
0.00	50	50													
10.00	5	95													
20.00	5	95													
MS 条件															
測定モード	MS/MS、SRM (選択反応モニタリング)														
イオン化モード	APCI (-)														
コロナ電流 (μA)	20														
ソース温度 (°C)	110														
脱溶媒温度 (°C)	500														
コーンガス	窒素、50 L/hr														
脱溶媒ガス	窒素、800 L/hr														
コリジョンガス	アルゴン、0.2 mL/min														
定量イオン (m/z)	アセキノシル： -384→342[コーン電圧：25(V)、コリジョンエネルギー：15(eV)] アセキノシルヒドロキシ体： -341→186[コーン電圧：55(V)、コリジョンエネルギー：30(eV)]														
定性イオン (m/z)	アセキノシル： -384→187[コーン電圧：25(V)、コリジョンエネルギー：40(eV)] アセキノシルヒドロキシ体： -341→200[コーン電圧：55(V)、コリジョンエネルギー：30(eV)] -341→313[コーン電圧：55(V)、コリジョンエネルギー：30(eV)]														
保持時間の目安	アセキノシル 17.5 分 アセキノシルヒドロキシ体 17 分														

## 5. 定量

アセキノシル標準品及びアセキノシルヒドロキシ体標準品をアセトンに溶解し、500 mg/Lの標準原液を調製した。各標準原液をアセトニトリルで混合希釈し、アセキノシルが0.005、0.01、0.02、0.05、0.1 mg/L、アセキノシルヒドロキシ体が0.004、0.008、0.016、0.04、0.08 mg/Lの濃度の混合標準溶液を調製した。混合標準溶液10 µLをLC-MS/MSに注入し、得られたピーク面積から絶対検量線法で検量線を作成した。試験溶液10 µLをLC-MS/MSに注入し、アセキノシル及びアセキノシルヒドロキシ体のそれぞれについて得られたピーク面積と作成した検量線からアセキノシル及びアセキノシルヒドロキシ体の含量を求めた。

## 6. 試験溶液の調製

### 1) 試験法の分析操作

アセキノシル及びアセキノシルヒドロキシ体を試料から0.4 mol/L塩酸及びアセトンで抽出し、*n*-ヘキサン転溶、アセトニトリル/ヘキサン分配、シリカゲルミニカラム及びスチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラムで精製した後、LC-MS/MSで定量及び確認した。

#### ① 抽出

##### a 筋肉、肝臓、腎臓、乳、卵及び魚介類の場合

試料10.0 gを200 mL遠心管に量り採り、0.4 mol/L塩酸5 mL及びアセトン100 mLを加え、ホモジナイズした後、ケイソウ土を厚さ約1 cmに敷いたろ紙を用いて吸引ろ過し、200 mL容メスフラスコに採取した。ろ紙上の残留物にアセトン50 mLを加えてホモジナイズし、上記と同様にろ過した。得られたろ液を合わせて、アセトンを加えて正確に200 mLとした。この20 mLを採り、10 w/v%塩化ナトリウム溶液100 mLを加え、*n*-ヘキサン100 mL及び50 mLで2回振とう抽出した。抽出液に無水硫酸ナトリウムを加えて脱水し、無水硫酸ナトリウムをろ別した後、40°C以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物に*n*-ヘキサン20 mLを加え、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル40 mLずつで3回振とう抽出した。抽出液を合わせ、40°C以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物に*n*-ヘキサン2 mLを加えて溶かした。

##### b はちみつの場合

試料10.0 gを200 mL遠心管に量り採り、水20 mLを加え溶解した。これに0.4 mol/L塩酸5 mL及びアセトン100 mLを加え、ホモジナイズした後、ケイソウ土を厚さ約1 cmに敷いたろ紙を用いて吸引ろ過し、200 mL容メスフラスコに採取した。ろ紙上の残留物にアセトン50 mLを加えてホモジナイズし、上記と同様にろ過した。得られたろ液を合わせて、アセトンを加えて正確に200 mLとした。この20 mLを採り、10 w/v%塩化ナトリウム溶液100 mLを加え、*n*-ヘキサン100 mL及び50 mLで2回振とう抽出した。抽出液に無水硫酸ナトリウムを加えて脱水し、無水硫酸ナトリウムをろ別した後、40°C以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物に*n*-ヘキサン2 mLを加えて溶かした。

##### c 脂肪の場合

試料5.00 gを200 mL遠心管に量り採り、0.4 mol/L塩酸5 mL及びアセトン100 mLを加え、ホモジナイズし、ケイソウ土を厚さ約1 cmに敷いたろ紙を用いて吸引ろ過し、200 mL容メスフラスコに採取した。ろ紙上の残留物にアセトン50 mLを加えてホモジナイズし、上記と同様にろ過した。得られたろ液を合わせて、アセトンを加えて正確に200 mLとした。この40 mLを採り、10 w/v%塩化ナトリウム溶液100 mLを加え、*n*-ヘキサン100 mL及び50 mLで2回振とう抽出した。抽出液に無水硫酸ナトリウムを加えて脱水し、無水硫酸ナトリウムをろ別した後、40°C以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物に*n*-ヘキサン20 mLを加え、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル40 mLずつで3回振とう抽出した。抽出液を合わせ、40°C以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物に*n*-ヘキサン2 mLを加えて溶かした。

## ② 精製

### a シリカゲルカラムクロマトグラフィー

Sep-Pak Silica (500 mg) に *n*-ヘキサン 10 mL を注入し、流出液は捨てた。このカラムに①で得られた溶液を注入した後、さらに *n*-ヘキサン 10 mL で容器を洗い込み注入し、流出液は捨てた。次いで酢酸エチル及び *n*-ヘキサン (1 : 4) 混液 10 mL で容器を洗い込み注入し、溶出液を 40°C 以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物にアセトニトリル及び水 (1 : 1) 2 mL を加えて溶かした。

### b スチレンジビニルベンゼン共重合体カラムクロマトグラフィー

InertSep PLS2 (500 mg) にアセトニトリル 10 mL、アセトニトリル及び水 (1 : 1) 10 mL を順次注入し、流出液は捨てた。このカラムに a で得られた溶液を注入した後、アセトニトリル及び水 (1 : 1) 10 mL で容器を洗い込み注入し、流出液は捨てた。次いでアセトニトリル 20 mL で容器を洗い込み注入し、溶出液を 40°C 以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物をアセトニトリルに溶解し、正確に 1 mL としたものを試験溶液とした。

## 2) フローチャート

### 秤 取

- | 脂肪及びはちみつ以外：試料10.0 g
- | 脂肪：試料5.00 g
- ↓ はちみつ：試料10.0 gに水20 mLを加え溶解

### アセトン抽出

- | 0.4 mol/L塩酸5 mL及びアセトン100 mLを加え、ホモジナイズ
- | 吸引ろ過、ろ紙上の残留物を採る
- | 残留物にアセトン50 mLを加え、ホモジナイズ
- | 吸引ろ過、ろ液を合わせ、アセトンで正確に200 mLとする
- | 脂肪以外：抽出液20 mL分取
- ↓ 脂肪：抽出液40 mL分取

### 転 溶

- | 10 w/v%塩化ナトリウム溶液100 mL及び*n*-ヘキサン100 mLを加え、5分間振とう
- | *n*-ヘキサン層を採る
- | 水層に*n*-ヘキサン50 mLを加え、5分間振とう
- | *n*-ヘキサン層を合わせ、無水硫酸ナトリウムを加え脱水ろ過
- ↓ 減圧濃縮、*n*-ヘキサンを除去

### アセトニトリル/ヘキサン分配 (はちみつ以外で実施)

- | 残留物を*n*-ヘキサン20 mLで分液漏斗に移す
- | *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル40 mLを加え、5分間振とう
- | アセトニトリル層を採る
- | さらに2回繰り返す、アセトニトリル層を合わせ減圧濃縮、窒素乾固
- ↓ *n*-ヘキサン2 mLに溶解

### シリカゲルミニカラム

- | *n*-ヘキサン10 mLで予備洗浄
- | 試料溶液負荷、*n*-ヘキサン10 mLで洗浄
- | 酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (1 : 4) 混液10 mLで溶出
- | 溶出液を減圧濃縮、窒素乾固
- ↓ アセトニトリル及び水 (1 : 1) 混液2 mLに溶解

### スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラム

- | アセトニトリル10 mL、アセトニトリル及び水 (1 : 1) 混液10 mLで予備洗浄
- | 試料溶液負荷、アセトニトリル及び水 (1 : 1) 混液10 mLで洗浄
- | アセトニトリル20 mLで溶出
- | 溶出液を減圧濃縮、窒素乾固
- ↓ アセトニトリルで正確に1 mLとし、試験溶液とする

### LC-MS/MS定量

10 µL注入



## 7. マトリックス添加標準溶液の調製

### 1) 定量限界相当濃度（定量限界の推定及び試料マトリックスの測定への影響用）

試験溶液から0.5 mL分取し溶媒を除去した後、アセキノシル0.01 mg/L及びアセキノシルヒドロキシ体0.008 mg/Lの混合標準溶液0.5 mLに溶解したものを、マトリックス添加標準溶液とした。

### 2) 添加回収試験における回収率100%相当濃度（試料マトリックスの測定への影響用）

牛の脂肪及び牛の肝臓は試験溶液から0.2 mL分取し溶媒を除去した後、アセキノシル0.02 mg/L及びアセキノシルヒドロキシ体0.016 mg/Lの混合標準溶液0.2 mLに溶解したものを、マトリックス添加標準溶液とした。

## [結果及び考察]

### 1. 測定条件の検討

#### 1) MS条件、LC条件等

##### ① イオン化法

アセキノシル及びアセキノシルヒドロキシ体について、ESI及びAPCIそれぞれについてイオン化の確認を行った。検討結果をTable 1-1及び1-2に、マススペクトルを図1-1～1-8に示す。

アセキノシルはESI正負いずれのモードでもその分子構造に由来するイオンが確認出来ず、主にAPCI負イオンモードにてイオンが確認出来た。なお、移動相にメタノール、アセトニトリルどちらを用いた場合でもAPCI負イオンモードにて分子イオンが確認出来た。また、移動相にメタノールを用いた場合に、APCI正イオンモードでは、アセチル基が脱離した質量数に相当するフラグメントイオンが基準ピークとして観察された。

アセキノシルヒドロキシ体はESI負イオンモードにおいてプロトン脱離イオンが、APCI負イオンモード及びメタノール存在下でのAPCI正イオンモードにおいて分子イオンが観察出来たが、ESI正イオンモード及び移動相にアセトニトリルを用いたAPCI正イオンモードではその分子構造に由来するイオンが観察出来なかった。

以上の検討より、アセキノシル及びアセキノシルヒドロキシ体の同時測定が可能なAPCI負イオンモードを選択した。

Table 1-1 ESIモードでのイオン化

移動相	0.1 vol%ギ酸及びメタノール (1:1)		0.1 vol%ギ酸及びアセトニトリル (1:1)	
	ESI負	ESI正	ESI負	ESI正
アセキノシル	×	×	×	×
アセキノシルヒドロキシ体	○	×	○	×

Table 1-2 APCIモードでのイオン化

移動相	0.1 vol%ギ酸及びメタノール (1:1)		0.1 vol%ギ酸及びアセトニトリル (1:1)	
	APCI負	APCI正	APCI負	APCI正
アセキノシル	○	△	○	×
アセキノシルヒドロキシ体	○	○	○	×

○：分子イオンまたはプロトン脱離イオンが基準イオン △：フラグメントイオンが基準イオン ×：分子構造に由来するイオンが観察されず

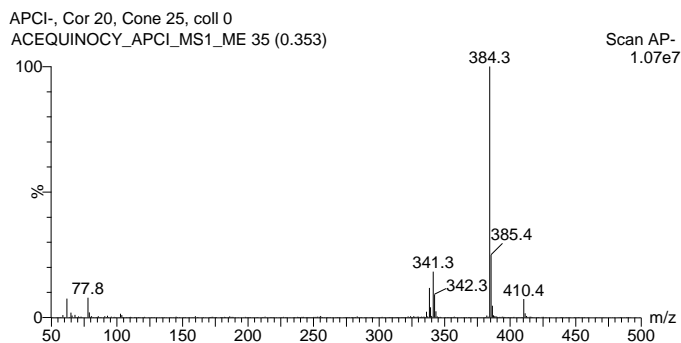


図1-1 アセキノシルのマススペクトル  
 スキャン範囲：50～500  $m/z$   
 測定条件：APCI-、CV=25 V  
 (CV : cone voltage)  
 移動相：0.1 vol%ギ酸及びメタノール (1 : 1)

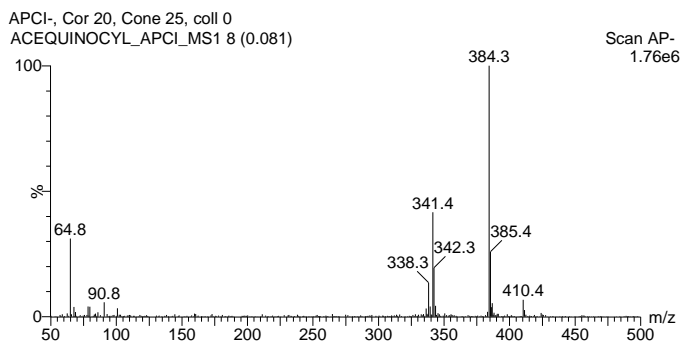


図1-2 アセキノシルのマススペクトル  
 スキャン範囲：50～500  $m/z$   
 測定条件：APCI-、CV=25 V  
 (CV : cone voltage)  
 移動相：0.1 vol%ギ酸及びアセトニトリル (1 : 1)

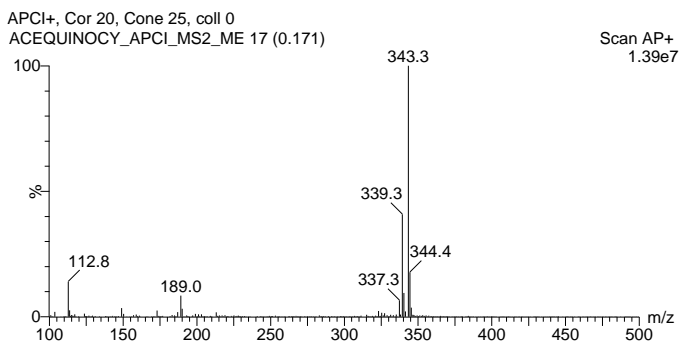


図1-3 アセキノシルのマススペクトル  
 スキャン範囲：50～500  $m/z$   
 測定条件：APCI+、CV=25 V  
 (CV : cone voltage)  
 移動相：0.1 vol%ギ酸及びメタノール (1 : 1)

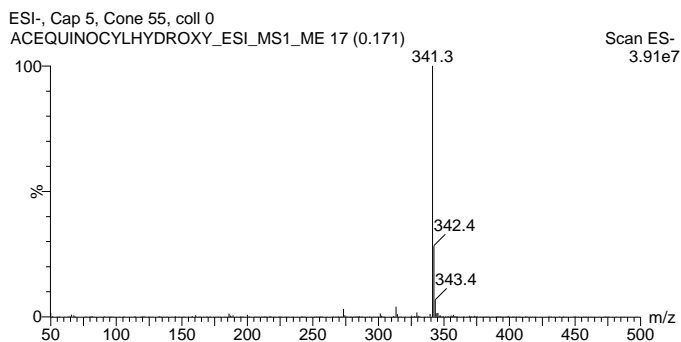


図1-4 アセキノシルヒドロキシ体のマススペクトル  
 スキャン範囲：50～500  $m/z$   
 測定条件：ESI-、CV=55 V  
 (CV : cone voltage)  
 移動相：0.1 vol%ギ酸及びメタノール (1 : 1)

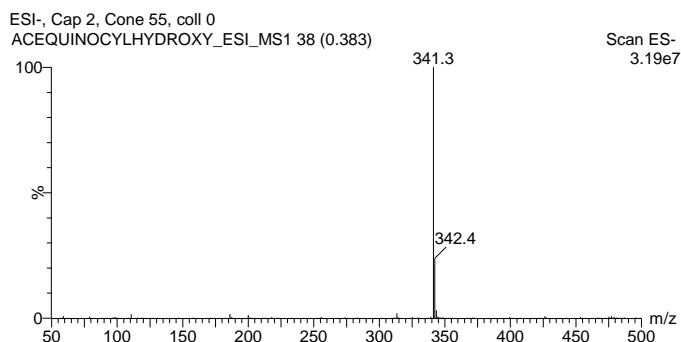


図1-5 アセキノシルヒドロキシ体のマススペクトル  
 スキャン範囲：50～500  $m/z$   
 測定条件：ESI-、CV=55 V  
 (CV : cone voltage)  
 移動相：0.1 vol%ギ酸及びアセトニトリル (1 : 1)

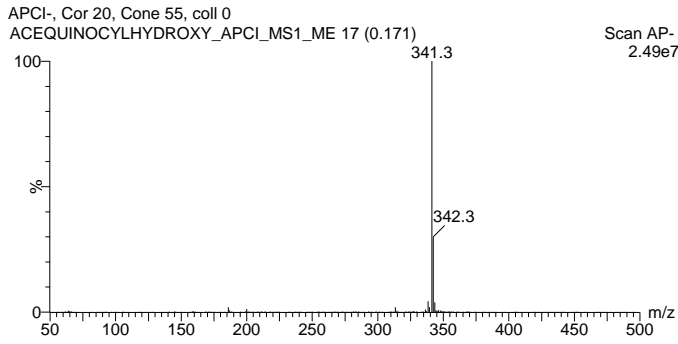


図1-6 アセキノシルト<sup>®</sup>ロキシ体のマススペクトル

スキャン範囲：50～500 *m/z*

測定条件：APCI-、CV=55 V

(CV : cone voltage)

移動相：0.1 vol%ギ酸及びメタノール (1 : 1)

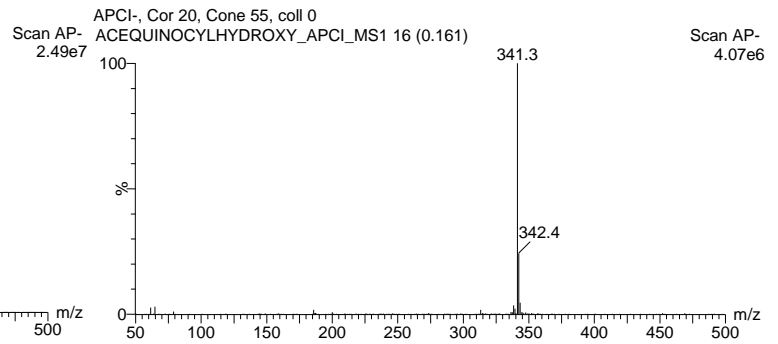


図1-7 アセキノシルト<sup>®</sup>ロキシ体のマススペクトル

スキャン範囲：50～500 *m/z*

測定条件：APCI-、CV=55 V

(CV : cone voltage)

移動相：0.1 vol%ギ酸及びアセトニトリル (1 : 1)

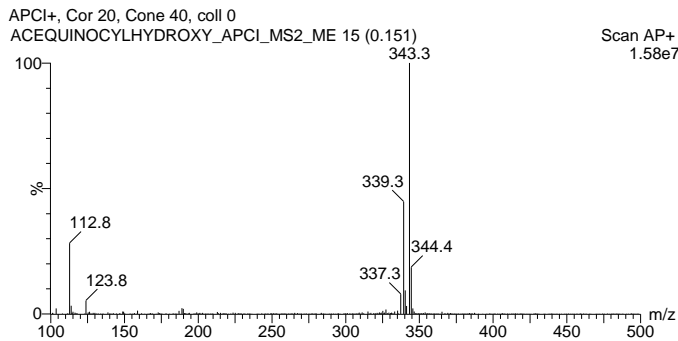


図1-8 アセキノシルト<sup>®</sup>ロキシ体のマススペクトル

スキャン範囲：50～500 *m/z*

測定条件：APCI+、CV=40 V

(CV : cone voltage)

移動相：0.1 vol%ギ酸及びメタノール (1 : 1)

## ② マススペクトル

APCI負イオンモードにおけるアセキノシル及びアセキノシルヒドロキシ体のマススペクトル及びプロダクトイオンスペクトルを図2-1～2-5に示す。

アセキノシルは脱プロトン分子は観察されなかったが、電子捕獲による負イオン $m/z$  384が観察された。 $m/z$  384をプリカーサーイオンとしたプロダクトイオン $m/z$  342はアセチル基の脱離及びプロトンのシフトが生じたイオンと推測された。なお、アセキノシルヒドロキシ体では水酸基からプロトンの脱離した脱プロトン分子の質量数に相当する $m/z$  341が観察された。

なお、本試験法開発において選択したモニターイオンは4．測定条件の主なイオン ( $m/z$ ) に示した。

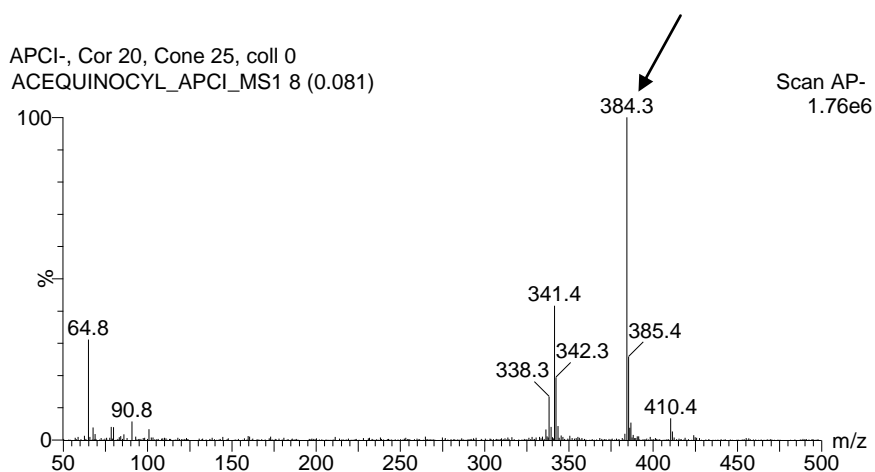


図 2-1 アセキノシルのマススペクトル

スキャン範囲：50～500  $m/z$

測定条件：APCI-、CV=25 V

(CV : cone voltage)

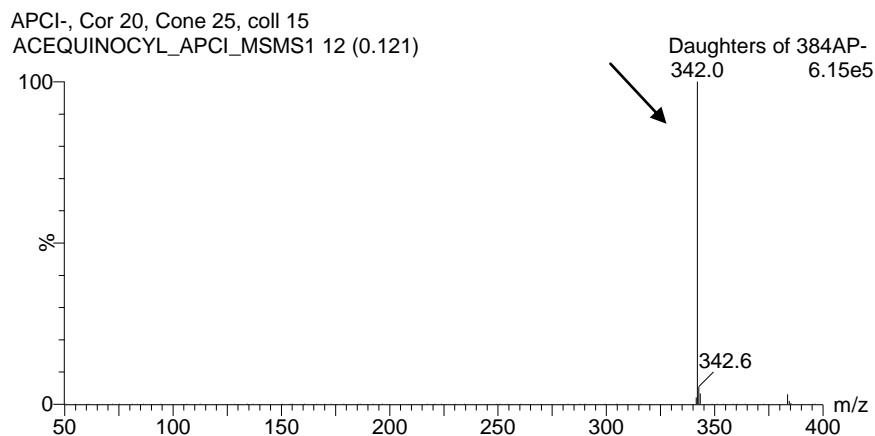


図 2-2 アセキノシルのプロダクトスキャンスペクトル (定量用)

プリカーサーイオン： $m/z$  384

測定条件：APCI-、CV=25 V、CE=15 eV

(CV : cone voltage、CE : collision energy)

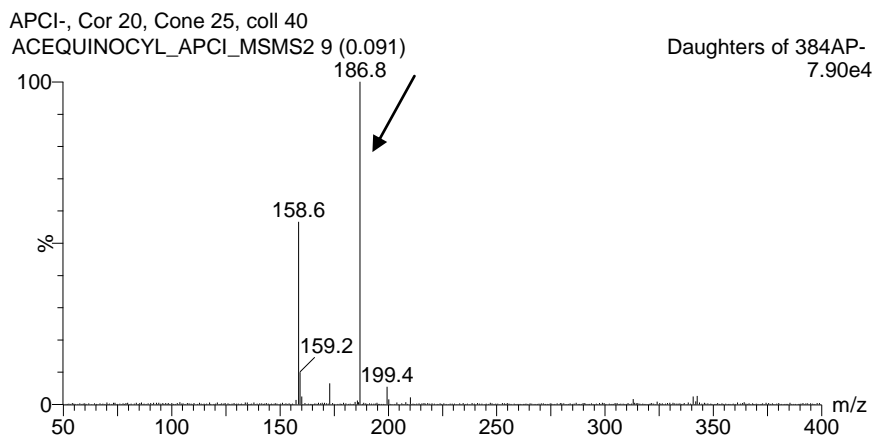


図 2-3 アセキノシルのプロダクトスキャンスペクトル (定性用)  
 プリカーサーイオン :  $m/z$  384  
 測定条件 : APCI-, CV=25 V、CE=40 eV  
 (CV : cone voltage、CE : collision energy)

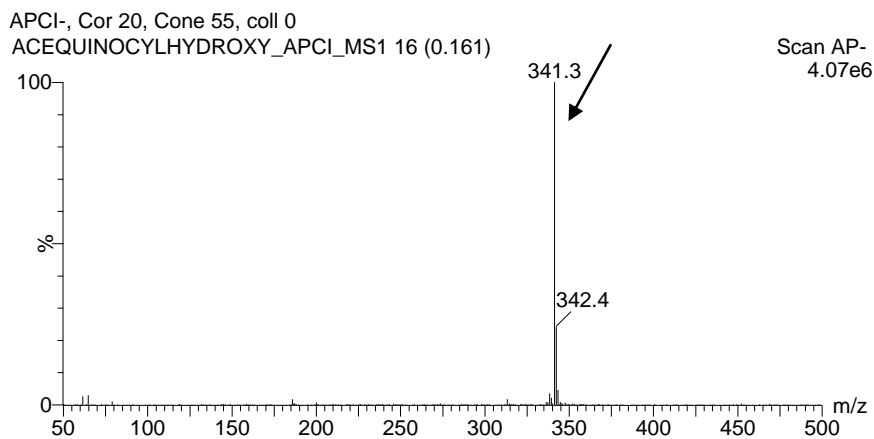


図 2-4 アセキノシルヒドロキシ体のマススペクトル  
 スキャン範囲 : 50~500  $m/z$   
 測定条件 : APCI-, CV=55 V  
 (CV : cone voltage)

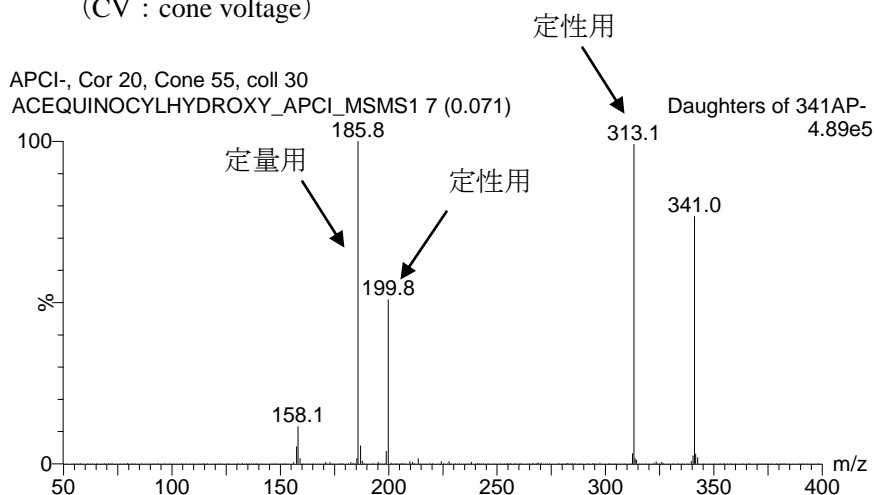


図 2-5 アセキノシルヒドロキシ体のプロダクトスキャンスペクトル (定量及び定性用)  
 プリカーサーイオン :  $m/z$  341  
 測定条件 : APCI-, CV=55 V、CE=30 eV  
 (CV : cone voltage、CE : collision energy)

### ③ 測定カラムの種類及び移動相条件

アセキノシル及びアセキノシルヒドロキシ体は、オクタデシルシリル化シリカゲルカラムで保持可能であったが、アセキノシルヒドロキシ体の分離保持を良好にするためには移動相を酸性にする必要があった。また、メタノールよりもアセトニトリルを移動相に用いた方が、アセキノシルヒドロキシ体のピーク形状が良好であり、アセキノシル及びアセキノシルヒドロキシ体の感度も良好であったため、移動相には0.1 vol%ギ酸及びアセトニトリルを選択した。なお、アセキノシルのイオンがアセキノシルヒドロキシ体の測定イオンに影響するため、測定カラムにて両者を分離する必要があった。4. 測定条件に示した条件で採取したアセキノシルヒドロキシ体のクロマトグラムを図3に示した。

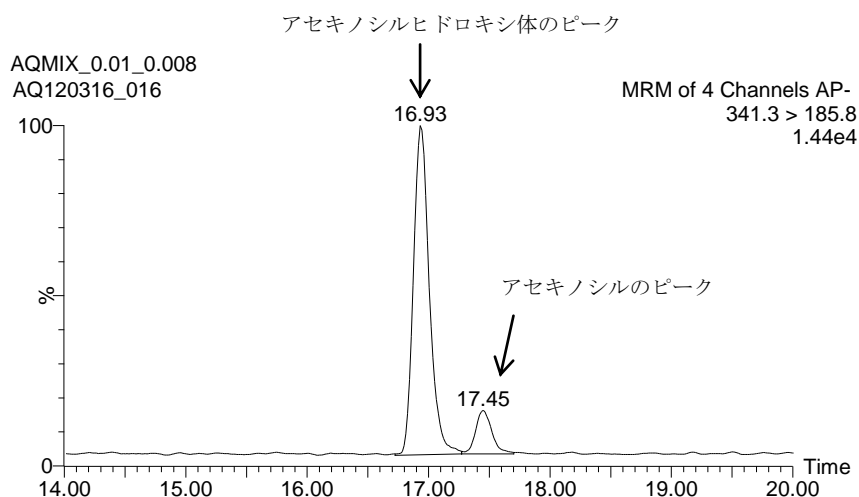


図3 アセキノシルヒドロキシ体のSRMクロマトグラム (一例)

( $m/z$  341→186)

混合標準溶液アセキノシル0.01 mg/L及びアセキノシルヒドロキシ体0.008 mg/L

以上の検討より、アセキノシル及びアセキノシルヒドロキシ体の同時測定が可能なAPCI負イオンモードを選択した。また、移動相には0.1 vol%ギ酸及びアセトニトリルを選択した。モニターイオンは4. 測定条件の主なイオン ( $m/z$ ) に示した。定量限界相当濃度であるアセキノシルの標準溶液 (0.01 mg/L) 及びアセキノシルヒドロキシ体の標準溶液 (0.008 mg/L) 10  $\mu$ L注入時におけるS/N比をTable 2-1及び2-2に示した。定量限界相当濃度のS/N比はいずれも10以上であった。

Table 2-1 アセキノシルのS/N比 (0.01 mg/L)

プリカーサーイオン	プロダクトイオン	イオン化モード	S/N比	ピーク面積
384	342	APCI (-)	242	1589
384	187	APCI (-)	39	309

Table 2-2 アセキノシルヒドロキシ体のS/N比 (0.008 mg/L)

プリカーサーイオン	プロダクトイオン	イオン化モード	S/N比	ピーク面積
341	186	APCI (-)	202	1993
341	200	APCI (-)	117	958
341	313	APCI (-)	42	1374

## 2) 検量線の直線性 (図4-1及び4-2)

4. の測定条件において、アセキノシル濃度0.005 mg/L (0.05 ng) ~0.1 mg/L (1 ng)、アセキノシルヒドロキシ体濃度0.004 mg/L (0.04 ng) ~0.08 mg/L (0.8 ng) の範囲で良好な直線性を示した。

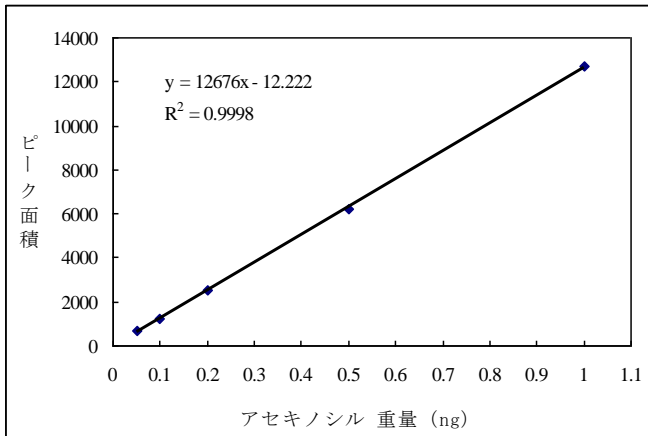


図4-1 アセキノシル検量線 (一例)

データ処理装置設定条件の一例

機種 (メーカー) : TargetLynx (Waters製)

ピークの定量方法 : ピーク面積法

検量線の種類 : 最小二乗法

検量線基準ピークの重量 : 0.05 ng ~ 1 ng

検量線傾き (a) : a = 12676

検量線切片 (b) : b = -12.222

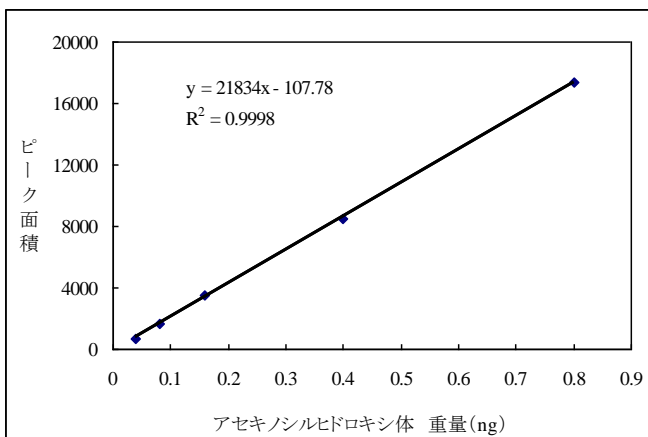


図4-2 アセキノシルヒドロキシ体検量線 (一例)

データ処理装置設定条件の一例

機種 (メーカー) : TargetLynx (Waters製)

ピークの定量方法 : ピーク面積法

検量線の種類 : 最小二乗法

検量線基準ピークの重量 : 0.04 ng ~ 0.8 ng

検量線傾き (a) : a = 21834

検量線切片 (b) : b = -107.78

## 3) 定量限界

① アセキノシルの定量限界 (mg/kg) = 0.01 mg/kg [ (1 mL/1 g<sup>\*1</sup>) × (0.1 ng/10 μL) ]

② アセキノシルヒドロキシ体の定量限界 (mg/kg) = 0.008 mg/kg [ (1 mL/1 g<sup>\*1</sup>) × (0.08 ng/10 μL) ]

アセキノシルとしての定量限界 (mg/kg)

$$0.01 \text{ mg/kg} > 0.008984 \text{ mg/kg} [ (1 \text{ mL/1 g}^{*1}) \times (0.08 \text{ ng/10 } \mu\text{L}) \times 1.123]$$

\*1 5.00 g × 40 mL / 200 mL (脂肪の場合)

10.0 g × 20 mL / 200 mL (脂肪以外の場合)

## 2. 試験溶液調製法の検討

### 1) 抽出方法の検討

通知試験法 (アセキノシル試験法) を参考に0.4 mol/L塩酸及びアセトン抽出溶媒として選択した。高速ホモジナイザーを用いて1分間細砕し、ケイソウ土を1 cmの厚さに敷いたろ紙を用いて吸引ろ過した。

## 2) 転溶の検討

*n*-ヘキサンを用いた転溶率について検討した。アセキノシル及びアセキノシルヒドロキシ体の各1 µgを窒素乾固後、0.4 mol/L塩酸5 mL及びアセトンを加え200 mLに定容した。ここから、①20 mL分取後に減圧濃縮にてアセトンを除去したもの、②20 mL分取しアセトンを除去していないもの、③40 mL分取しアセトンを除去していないものについて、10 w/v%塩化ナトリウム溶液100 mLを加え、*n*-ヘキサン1回目100 mL、2回目50 mLで転溶した結果をTable 3-1及び3-2に示した。①～③全て2回の転溶で十分な回収率が得られたため、分取後にアセトンを除去せず転溶する条件を採用した。

Table 3-1 アセキノシルの転溶率 (%)

アセキノシル	<i>n</i> -ヘキサン		合計
	1回目	2回目	
	100 mL	50 mL	
①20 mL分取後減圧濃縮	106	tr	106
②20 mL分取	93	tr	93
③40 mL分取	99	tr	99

Table 3-2 アセキノシルヒドロキシ体の転溶率 (%)

アセキノシルヒドロキシ体	<i>n</i> -ヘキサン		合計
	1回目	2回目	
	100 mL	50 mL	
①20 mL分取後減圧濃縮	99	tr	99
②20 mL分取	97	tr	97
③40 mL分取	101	tr	101

## 3) 脱脂方法の検討

アセトニトリル/*n*-ヘキサン分配について検討した。アセキノシル及びアセキノシルヒドロキシ体の各1 µgを窒素乾固後、①*n*-ヘキサン30 mLに溶解し、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル30 mLで4回抽出、②*n*-ヘキサン20 mLに溶解し、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル40 mLで4回抽出を行った。結果をTable 4-1及び4-2に示した。良好な回収率の得られた*n*-ヘキサン及び*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル1：2の比率で3回抽出する条件を採用した。

Table 4-1 ①アセトニトリル/*n*-ヘキサン分配 (%)

	<i>n</i> -ヘキサン	<i>n</i> -ヘキサン飽和アセトニトリル				合計
	30 mL	1回目	2回目	3回目	4回目	
		30 mL	30 mL	30 mL	30 mL	
アセキノシル	0	46	24	12	6	88
アセキノシルヒドロキシ体	0	42	25	14	9	90



Table 4-2 ②アセトニトリル/ヘキサン分配 (%)

	<i>n</i> -ヘキサン	<i>n</i> -ヘキサン飽和アセトニトリル				合計
	20 mL	1回目 40 mL	2回目 40 mL	3回目 40 mL	4回目 40 mL	
アセキノシル	0	63	21	7	tr	91
アセキノシルヒドロキシ体	0	59	23	8	tr	90

## 3) 精製方法の検討

## ① シリカゲルミニカラムによる精製

シリカゲルミニカラムを*n*-ヘキサン10 mLで予備洗浄した後、シリカゲルミニカラムに*n*-ヘキサン2 mLで負荷した。*n*-ヘキサン10 mL洗浄後、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (1 : 9) 混液による溶出状況をTable 5-1に、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (1 : 4) 混液による溶出状況をTable 5-2に示した。*n*-ヘキサン10 mLでは溶出せず、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (1 : 4) 混液10 mLにて良好な回収率が得られたため、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (1 : 4) 混液10 mLにて溶出する条件を採用した。

なお、検討した試料において、着色成分の多くが除去可能であった。

Table 5-1 シリカゲルミニカラムからの溶出状況 (%)

	<i>n</i> -ヘキサン	酢酸エチル及び <i>n</i> -ヘキサン (1 : 9)			合計
	2 mL (負荷) + 10 mL	0-5 mL	5-10 mL	10-15 mL	
アセキノシル	0	97	0	0	97
アセキノシルヒドロキシ体	0	69	12	tr	81

Sep-Pak Vac Silica (充てん量 500 mg、Waters製)

供試量 : アセキノシル1 µg、アセキノシルヒドロキシ体1 µg

Table 5-2 シリカゲルミニカラムからの溶出状況 (%)

	<i>n</i> -ヘキサン	酢酸エチル及び <i>n</i> -ヘキサン (1 : 4)			合計
	2 mL (負荷) + 10 mL	0-5 mL	5-10 mL	10-15 mL	
アセキノシル	0	109	0	0	109
アセキノシルヒドロキシ体	0	98	0	0	98

Sep-Pak Vac Silica (充てん量 500 mg、Waters製)

供試量 : アセキノシル1 µg、アセキノシルヒドロキシ体1 µg

## ② スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラムによる精製

スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラムをアセトニトリル10 mL、アセトニトリル及び水 (1 : 1) 10 mLで予備洗浄し、アセトニトリル及び水 (1 : 1) 2 mLで負荷した後、それぞれアセトニトリル及び水の比率を変えた溶出状況をTable 6-1に示した。

Table 6-1 スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラムからの溶出状況 (%)

	アセトニトリル及び水					
	(1 : 1)	(3 : 2)	(7 : 3)	(4 : 1)	(9 : 1)	(100 : 0)
	20 mL	20 mL	20 mL	20 mL	20 mL	20 mL
アセキノシル	0	0	0	tr	38	104
アセキノシルヒドロキシ体	0	0	0	11	89	107

InertSep PLS-2 (充てん量 500 mg、ジーエルサイエンス製)

供試量 : アセキノシル1 µg、アセキノシルヒドロキシ体1 µg

アセトニトリル及び水 (1 : 1) ではアセキノシル及びアセキノシルヒドロキシ体が十分保持されていたため、試料溶液負荷後、アセトニトリル及び水 (1 : 1) にて洗浄し、アセトニトリルにて溶出する条件とした。Table 6-2に溶出状況を示した。アセトニトリル及び水 (1 : 1) 混液10 mLにて洗浄後、アセトニトリル20 mLにて良好な回収率が得られた。

なお、肝臓試料において、シリカゲルミニカラムまでの精製工程で試験溶液の測定をしたところ、試料マトリックスの影響 (イオン化促進) を受けていたが、本工程の追加により試料マトリックスの影響が改善された。シリカゲルミニカラム工程までの結果と本工程までの肝臓試料の結果をTable 6-3に示した。

Table 6-2 スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラムからの溶出状況 (%)

	アセトニトリル 及び水 (1 : 1)		アセトニトリル			合計
	2 mL (負荷) + 10 mL		10 mL	10-20 mL	20-30 mL	
	アセキノシル	0	97	7	0	
アセキノシルヒドロキシ体	0	91	15	0	106	

InertSep PLS-2 (充てん量 500 mg、ジーエルサイエンス製)

供試量 : アセキノシル1 µg、アセキノシルヒドロキシ体1 µg

Table 6-3 肝臓試料におけるミニカラムの精製効果

	Sep-Pak Vac Silica まで		InertSep PLS-2 まで	
	回収率	試料マトリックスの影響	回収率	試料マトリックスの影響
	(%)	ピーク面積比	(%)	ピーク面積比
アセキノシル	126	1.35	81	0.98
アセキノシルヒドロキシ体	138	1.52	89	1.08

ピーク面積比=マトリックス添加標準溶液 (面積) / 溶媒標準溶液 (面積)

## 6) その他の基礎データ

### ① 多孔性ケイソウ土カラムを用いた脱脂方法の検討

多孔性ケイソウ土カラムに*n*-ヘキサン5 mLで負荷し、5分間放置した。*n*-ヘキサンを吸引除去後、アセトニトリルによる溶出状況をTable 7に示した。検討した条件では、アセキノシルヒドロキシ体の溶出が確認出来なかったため、多孔性ケイソウ土カラムを用いた脱脂方法は採用しなかった。

Table 7 多孔性ケイソウ土カラムからの溶出状況 (%)

	アセトニトリル			合計
	0-50 mL	50-100 mL	100-150 mL	
アセキノシル	49	36	0	85
アセキノシルヒドロキシ体	0	0	0	0

InertSep K-solute (20 mL保持用、ジーエルサイエンス製)

供試量：アセキノシル1 µg、アセキノシルヒドロキシ体1 µg

② オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムを用いた精製方法

シリカゲルミニカラム精製後の追加精製候補として、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムの適用可否を検討した。オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムをアセトニトリル10 mL、アセトニトリル及び水 (1 : 1) 混液10 mLで予備洗浄した後、アセトニトリル及び水 (1 : 1) 混液5 mLで負荷した。溶出状況をTable 8に示した。検討した条件ではアセキノシルヒドロキシ体の溶出が確認出来なかったため、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムを用いた精製方法は今回採用しなかった。

Table 8 オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムからの溶出状況 (%)

	アセトニトリル 及び水 (1 : 1)		アセトニトリル		合計
	10 mL	0-10 mL	10-20 mL	20-30 mL	
アセキノシル	0	102	0	0	102
アセキノシルヒドロキシ体	0	0	0	0	0

InertSep C18 (充てん量 500 mg、ジーエルサイエンス製)

供試量：アセキノシル1 µg、アセキノシルヒドロキシ体1 µg

### 3. 添加回収試験

牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、さけ、うなぎ、しじみ、牛乳、鶏卵及びはちみつの9品目に鶏の筋肉を加えた10品目を試料とした。

アセキノシル及びアセキノシルヒドロキシ体を牛の脂肪及び牛の肝臓は各0.02 ppm相当、牛の筋肉、さけ、うなぎ、しじみ、牛乳、鶏卵、はちみつ及び鶏の筋肉は各0.01 ppm相当添加し、[実験方法]6の分析法に従って添加回収試験を行った。

具体的操作としては、アセトンで調製したアセキノシル濃度0.1 mg/L及びアセキノシルヒドロキシ体濃度0.08 mg/Lの混合標準溶液を牛の肝臓10.0 gに2 mL、牛の脂肪5.00 gに1 mL、その他の試料では試料10.0 gに1 mL添加混合を行った。

#### 1) 選択性の評価

表1 選択性の評価

担当機関: 財団法人 日本食品分析センター

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	基準値 <sup>*1</sup> (ppm)	添加濃度 <sup>*2</sup> (ppm)	妨害ピークの許容範囲		ピーク面積(高さ) <sup>*3</sup>			選択性の評価 <sup>*5</sup>	備考			
						評価対象濃度 (ppm)	判定基準	面積又は高さの別	ブランク試料 (a)	標準溶液 <sup>*4</sup> (b)			面積(高さ)比 (a)/(b)		
アセキノシル	牛の筋肉	牛の筋肉	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○		
		牛の脂肪	0.01	0.02	0.02	*	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		牛の肝臓	0.01	0.02	0.02	*	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		さけ	0.01	0.01	0.01		定量限界	0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		うなぎ	0.01	0.01	0.01		定量限界	0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		しじみ	0.01	0.01	0.01		定量限界	0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		牛乳	0.01	0.01	0.01		定量限界	0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		鶏卵	0.01	0.01	0.01		定量限界	0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		はちみつ	0.01	0.01	0.01		定量限界	0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		鶏の筋肉	0.01	0.01	0.01		定量限界	0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	

\*1 基準値は、基準値未設定の場合には一律基準(0.01 ppm)を用いる。

\*2 添加濃度と評価対象濃度が異なる場合(定量限界と基準値との関係が、『定量限界<基準値<定量限界×3』となる場合には、『\*』が表示される。『\*』が表示された分析対象化合物は、添加濃度と評価対象濃度が異なるため、別途、定量限界濃度相当のマトリックス添加標準溶液を調製して評価する。

\*3 ブランク試料及び標準溶液の順に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。)

\*4 試料中の濃度が「評価対象濃度(基準値濃度又は定量限界濃度)」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。

\*5 面積(高さ)比が、妨害ピークの許容範囲の判定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1 選択性の評価

担当機関: 財団法人 日本食品分析センター

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	基準値 <sup>*1</sup> (ppm)	添加濃度 <sup>*2</sup> (ppm)	妨害ピークの許容範囲		ピーク面積(高さ) <sup>*3</sup>			選択性の評価 <sup>*5</sup>	備考			
						評価対象濃度 (ppm)	判定基準	面積又は高さの別	ブランク試料 (a)	標準溶液 <sup>*4</sup> (b)			面積(高さ)比 (a)/(b)		
アセキノシルヒドロキシ体	牛の筋肉	牛の筋肉	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○		
		牛の脂肪	0.01	0.02	0.02	*	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		牛の肝臓	0.01	0.02	0.02	*	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		さけ	0.01	0.01	0.01		定量限界	0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		うなぎ	0.01	0.01	0.01		定量限界	0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		しじみ	0.01	0.01	0.01		定量限界	0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		牛乳	0.01	0.01	0.01		定量限界	0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		鶏卵	0.01	0.01	0.01		定量限界	0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		はちみつ	0.01	0.01	0.01		定量限界	0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		鶏の筋肉	0.01	0.01	0.01		定量限界	0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	

\*1 基準値は、基準値未設定の場合には一律基準(0.01 ppm)を用いる。

\*2 添加濃度と評価対象濃度が異なる場合(定量限界と基準値との関係が、『定量限界<基準値<定量限界×3』となる場合には、『\*』が表示される。『\*』が表示された分析対象化合物は、添加濃度と評価対象濃度が異なるため、別途、定量限界濃度相当のマトリックス添加標準溶液を調製して評価する。

\*3 ブランク試料及び標準溶液の順に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。)

\*4 試料中の濃度が「評価対象濃度(基準値濃度又は定量限界濃度)」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。

\*5 面積(高さ)比が、妨害ピークの許容範囲の判定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。

10食品何れの試料においても妨害ピークは認められず、選択性は良好であった。

## 2) 真度、精度及び定量限界の評価

表2 真度、精度及び定量限界の評価

担当機関: 財団法人 日本食品分析センター

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	基準値 <sup>1</sup> (ppm)	添加濃度 (ppm)	定量限界の評価 <sup>2</sup>	検量線			回収率(%)					真度 (%)	併行精度 (RSD%)	S/N比 <sup>3</sup>			備考
							傾き	切片	r <sup>2</sup> 値	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5			Max.	Min.	平均値	
アセキノシル		牛の筋肉	0.01	0.01	0.01		147636	101	1	86	76	85	86	94	85	8	227	149	188	
		牛の脂肪	0.01	0.02	0.02	*	120970	30	1	104	94	101	106	98	100	5			#DIV/0!	
		牛の肝臓	0.01	0.02	0.02	*	163166	-27	1	83	75	94	73	81	81	10			#DIV/0!	
		さけ	0.01	0.01	0.01		127600	-16	1	83	84	101	97	93	92	9	224	97	161	
		うなぎ	0.01	0.01	0.01		159421	-17	1	101	89	94	100	97	96	5	151	301	226	
		しじみ	0.01	0.01	0.01		142807	8	1	102	91	93	93	106	97	7	226	178	202	
		牛乳	0.01	0.01	0.01		124911	59	1	94	87	100	107	102	98	8	301	178	240	
		鶏卵	0.01	0.01	0.01		164816	-3	1	84	76	83	81	89	83	5	301	179	240	
		はちみつ	0.01	0.01	0.01		154782	16	1	76	95	74	87	77	82	11	453	298	376	
		鶏の筋肉	0.01	0.01	0.01		154130	24	1	93	73	85	87	89	85	9	181	180	181	

\*1 基準値は、基準値未設定の場合には一律基準(0.01 ppm)を用いる。

\*2 添加濃度が定量限界濃度と異なる場合には、『\*』が表示される。その場合には、S/N比の算出は不要であるが、別途、定量限界の推定を行う。

\*3 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比を求める。

表2 真度、精度及び定量限界の評価

担当機関: 財団法人 日本食品分析センター

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	基準値 <sup>1</sup> (ppm)	添加濃度 (ppm)	定量限界の評価 <sup>2</sup>	検量線			回収率(%)					真度 (%)	併行精度 (RSD%)	S/N比 <sup>3</sup>			備考
							傾き	切片	r <sup>2</sup> 値	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5			Max.	Min.	平均値	
アセキノシルヒドロキシ体		牛の筋肉	0.01	0.01	0.01		225579	38	1	91	99	94	88	108	96	8	228	150	189	
		牛の脂肪	0.01	0.02	0.02	*	242060	-161	1	104	86	95	100	98	97	7			#DIV/0!	
		牛の肝臓	0.01	0.02	0.02	*	256601	-125	1	88	83	105	76	93	89	12			#DIV/0!	
		さけ	0.01	0.01	0.01		221607	-108	1	85	92	99	102	102	96	8	225	148	186	
		うなぎ	0.01	0.01	0.01		256196	-27	1	90	87	93	87	85	88	4	226	150	188	
		しじみ	0.01	0.01	0.01		219200	111	1	85	94	90	103	89	92	8	181	112	146	
		牛乳	0.01	0.01	0.01		222266	-27	1	108	106	87	94	111	101	10	304	301	302	
		鶏卵	0.01	0.01	0.01		251211	36	1	81	83	81	74	89	81	6	301	226	263	
		はちみつ	0.01	0.01	0.01		238547	43	1	88	85	78	90	97	88	8	302	299	301	
		鶏の筋肉	0.01	0.01	0.01		228141	68	1	92	75	95	86	101	90	11	150	180	165	

\*1 基準値は、基準値未設定の場合には一律基準(0.01 ppm)を用いる。

\*2 添加濃度が定量限界濃度と異なる場合には、『\*』が表示される。その場合には、S/N比の算出は不要であるが、別途、定量限界の推定を行う。

\*3 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比を求める。

アセキノシルの真度は81~100%、併行精度は5~11%、アセキノシルヒドロキシ体の真度は81~101%、併行精度は4~12%であり、真度の目標値70~120%、併行精度の目標値25% > (牛の筋肉、さけ、うなぎ、しじみ、牛乳、鶏卵、はちみつ及び鶏の筋肉)、15% > (牛の脂肪及び牛の肝臓)を十分に満たした。また、定量限界濃度の添加回収試験を行った、牛の筋肉、さけ、うなぎ、しじみ、牛乳、鶏卵、はちみつ及び鶏の筋肉の添加回収試験におけるS/N比の平均値はアセキノシルで161~376、アセキノシルヒドロキシ体で146~302であり、S/N ≥ 10を十分に満たした。

## 3) 定量限界の推定

表3 定量限界の推定

担当機関: 財団法人 日本食品分析センター

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	基準値 <sup>1</sup> (ppm)	添加濃度 (ppm)	定量限界の評価 <sup>2</sup>	標準溶液濃度 <sup>3</sup> (mg/L)	ピーク面積(高さ) <sup>4</sup>						S/N比		平均値		備考					
								面積又は高さの別	ブランク <sup>5</sup>	マトリックス添加標準溶液			溶媒標準溶液			n=1	n=2		平均	n=1	n=2	面積(高さ)比(%) <sup>6</sup>	S/N比
										n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均								
アセキノシル		牛の筋肉	0.01	0.01	0.01			面積	0										#DIV/0!	#DIV/0!			
		牛の脂肪	0.01	0.02	0.02	*	0.01	面積	0	1193	1289	1241	1200	1333	1267	224	225	98	224				
		牛の肝臓	0.01	0.02	0.02	*	0.01	面積	0	1597	1559	1578	1455	1395	1425	182	182	111	182				
		さけ	0.01	0.01	0.01															#DIV/0!	#DIV/0!		
		うなぎ	0.01	0.01	0.01																#DIV/0!	#DIV/0!	
		しじみ	0.01	0.01	0.01																#DIV/0!	#DIV/0!	
		牛乳	0.01	0.01	0.01																#DIV/0!	#DIV/0!	
		鶏卵	0.01	0.01	0.01																#DIV/0!	#DIV/0!	
		はちみつ	0.01	0.01	0.01																#DIV/0!	#DIV/0!	
		鶏の筋肉	0.01	0.01	0.01																#DIV/0!	#DIV/0!	

\*1 基準値は、基準値未設定の場合には一律基準(0.01 ppm)を用いる。

\*2 定量限界の推定を行う対象(添加濃度と定量限界濃度と異なる場合には、『\*』が表示される。

\*3 試料中の濃度が定量限界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。

\*4 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回以上測定する。(必要に応じて起爆注入を行う。)

\*5 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。

\*6 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3 定量限界の推定

担当機関: 財団法人 日本食品分析センター

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	基準値 <sup>1)</sup> (ppm)	添加濃度 (ppm)	定量限界の評価 <sup>2)</sup>	標準溶液濃度 <sup>3)</sup> (mg/L)	ピーク面積(高さ) <sup>4)</sup>									S/N比		備考		
								面積又は高さの別	ブランク <sup>5)</sup>	マトリックス添加標準溶液 <sup>6)</sup>			溶媒標準溶液			平均値					
										n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均	n=1	n=2	面積(高さ)比 <sup>7)</sup> (%)		S/N比	
アセキノシルヒドロキシ体	牛の筋肉	牛の筋肉	0.01	0.01	0.01	*	0.008	面積	0	1706	1899	1803	1835	1732	1784	182	162	#DIV/0!	#DIV/0!		
		牛の脂肪	0.01	0.02	0.02	*	0.008	面積	0	2199	2151	2175	1929	1948	1938	184	230	112	207		
		牛の肝臓	0.01	0.02	0.02	*	0.008	面積	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		さけ	0.01	0.01	0.01				面積	0	0	0	0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	
		うなぎ	0.01	0.01	0.01				面積	0	0	0	0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	
		しじみ	0.01	0.01	0.01				面積	0	0	0	0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	
		牛乳	0.01	0.01	0.01				面積	0	0	0	0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	
		鶏卵	0.01	0.01	0.01				面積	0	0	0	0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	
		はちみつ	0.01	0.01	0.01				面積	0	0	0	0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	
		鶏の筋肉	0.01	0.01	0.01				面積	0	0	0	0	0	0	0	0	0	#DIV/0!	#DIV/0!	

\*1 基準値は、基準値未設定の場合には一律基準(0.01 ppm)を用いる。

\*2 定量限界の推定を行う対象(添加濃度と定量限界濃度が異なる場合)には、『\*』が表示される。

\*3 試料中の濃度が定量限界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。

\*4 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回以上測定する。(必要に応じて起爆注入を行う。)

\*5 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。

\*6 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。

牛の脂肪及び牛の肝臓のブランク試料の試験溶液で調製した定量限界相当濃度のマトリックス添加標準溶液と溶媒で調製した標準溶液の面積比の平均値はアセキノシルで98及び111%、アセキノシルヒドロキシ体で101及び112%であり、真度の目標値70~120%を十分に満たした。また、マトリックス添加標準溶液のS/N比の平均値はアセキノシルで224及び182、アセキノシルヒドロキシ体で167及び207であり、S/N  $\geq 10$ を十分に満たした。

## 4) 試料マトリックスの影響

表4 試料マトリックスの測定への影響

担当機関: 財団法人 日本食品分析センター

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	基準値 <sup>1)</sup> (ppm)	添加濃度 (ppm)	標準溶液濃度 <sup>2)</sup> (mg/L)	ピーク面積(高さ) <sup>3)</sup>									備考
							面積又は高さの別	ブランク <sup>4)</sup>	マトリックス添加標準溶液 <sup>5)</sup>			溶媒標準溶液			ピーク面積(高さ)比 <sup>6)</sup>	
									n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均		
アセキノシル	牛の筋肉	牛の筋肉	0.01	0.01	0.01	0.01	面積	0	1724	1531	1627	1701	1590	1645	0.99	
		牛の脂肪	0.01	0.02	0.02	0.02	面積	0	2608	2491	2549	2721	2604	2663	0.96	
		牛の肝臓	0.01	0.02	0.02	0.02	面積	0	3182	3060	3121	3287	3230	3258	0.96	
		さけ	0.01	0.01	0.01	0.01	面積	0	1226	1294	1260	1222	1226	1224	1.03	
		うなぎ	0.01	0.01	0.01	0.01	面積	0	1462	1528	1495	1515	1488	1502	1.00	
		しじみ	0.01	0.01	0.01	0.01	面積	0	1343	1499	1421	1390	1423	1406	1.01	
		牛乳	0.01	0.01	0.01	0.01	面積	0	1387	1411	1399	1367	1325	1346	1.04	
		鶏卵	0.01	0.01	0.01	0.01	面積	0	1658	1710	1684	1548	1578	1563	1.08	
		はちみつ	0.01	0.01	0.01	0.01	面積	0	1677	1597	1637	1553	1712	1633	1.00	
		鶏の筋肉	0.01	0.01	0.01	0.01	面積	0	1544	1700	1622	1576	1508	1542	1.05	

\*1 基準値は、基準値未設定の場合には一律基準(0.01 ppm)を用いる。

\*2 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。

\*3 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。)

\*4 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。

\*5 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。

\*6 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4 試料マトリックスの測定への影響

担当機関: 財団法人 日本食品分析センター

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	基準値 <sup>1)</sup> (ppm)	添加濃度 (ppm)	標準溶液濃度 <sup>2)</sup> (mg/L)	ピーク面積(高さ) <sup>3)</sup>									備考
							面積又は高さの別	ブランク <sup>4)</sup>	マトリックス添加標準溶液 <sup>5)</sup>			溶媒標準溶液			ピーク面積(高さ)比 <sup>6)</sup>	
									n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均		
アセキノシルヒドロキシ体	牛の筋肉	牛の筋肉	0.01	0.01	0.01	0.008	面積	0	1803	1989	1896	1880	1910	1885	1.01	
		牛の脂肪	0.01	0.02	0.02	0.016	面積	0	4102	3837	3970	3693	4037	3865	1.03	
		牛の肝臓	0.01	0.02	0.02	0.016	面積	0	4201	4214	4207	3958	3834	3896	1.08	
		さけ	0.01	0.01	0.01	0.008	面積	0	1761	1757	1759	1744	1792	1768	0.99	
		うなぎ	0.01	0.01	0.01	0.008	面積	0	1759	1689	1724	1886	1842	1864	0.93	
		しじみ	0.01	0.01	0.01	0.008	面積	0	1926	1956	1941	1948	1984	1966	0.99	
		牛乳	0.01	0.01	0.01	0.008	面積	0	2156	2089	2123	2193	2043	2118	1.00	
		鶏卵	0.01	0.01	0.01	0.008	面積	0	2045	1963	2004	1986	2010	1998	1.00	
		はちみつ	0.01	0.01	0.01	0.008	面積	0	2012	2140	2076	1947	2195	2071	1.00	
		鶏の筋肉	0.01	0.01	0.01	0.008	面積	0	2010	1996	2003	1903	1770	1837	1.09	

\*1 基準値は、基準値未設定の場合には一律基準(0.01 ppm)を用いる。

\*2 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。

\*3 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。)

\*4 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。

\*5 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。

\*6 マトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積(又は高さ)の比を求める。

添加回収試験における回収率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マトリックス添加標準溶液と溶媒で調製した標準溶液の面積比の平均値はアセキノシルで0.96~1.08、アセキノシルヒドロキシ体で0.93~1.09であった。

#### [結論]

アセキノシル及びアセキノシルヒドロキシ体を試料から0.4 mol/L塩酸及びアセトンで抽出し、*n*-ヘキサン転溶、アセトニトリル/ヘキサン分配で脱脂（はちみつ以外）、シリカゲルミニカラム及びスチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラムで精製した後、LC-MS/MSで定量及び確認する方法を提案する。

この試験法を牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、さけ、うなぎ、しじみ、牛乳、鶏卵、はちみつ及び鶏の筋肉に適用した場合、選択性は良好で何れの試料においても妨害ピークは認められず、真度はアセキノシルで81~100%、アセキノシルヒドロキシ体で81~101%、併行精度はアセキノシルで5~11%、アセキノシルヒドロキシ体で4~12%で、真度及び併行精度は目標値を十分に満たした。また、定量限界濃度の添加回収試験を行った、牛の筋肉、さけ、うなぎ、しじみ、牛乳、鶏卵、はちみつ及び鶏の筋肉の添加回収試験におけるS/N比の平均値はアセキノシルで161~376、アセキノシルヒドロキシ体で146~302であり、基準値濃度の添加回収試験を行った牛の脂肪及び牛の肝臓のブランク試料の試験溶液で調製した定量限界相当濃度のマトリックス添加標準溶液のS/N比の平均値はアセキノシルで224及び182、アセキノシルヒドロキシ体で167及び207であり、何れもS/N $\geq$ 10を十分に満たした。

以上より、定量限界はアセキノシル及びアセキノシルヒドロキシ体それぞれ0.01 mg/kgが可能であることが確認できた。

#### [参考文献]

食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法 アセキノシル試験法  
(厚生労働省)

薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会 農薬・動物用医薬品部会報告書 アセキノシル

農薬評価書 アセキノシル（第2版） 食品安全委員会

評価報告書 アセキノシル カナダ保健省

農薬抄録 アセキノシル アグロ カネショウ株式会社