

ピラスルホトール試験法（農産物）

1. 分析対象化合物

ピラスルホトール

(5-ヒドロキシ-3-メチル-1*H*-ピラゾール-4-イル) [2-(メチルスルホニル)-4-(トリフルオロメチル)フェニル]メタノン (以下、「代謝物M1」という。)

3-メチル-4-{[2-(メチルスルホニル)-4-(トリフルオロメチル)フェニル]カルボニル}-1*H*-ピラゾール-5-イル D-グルコピラノシド (以下「代謝物M2」という。)

2. 適用食品

農産物

3. 装置

液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計 (LC-MS/MS)

4. 試薬、試液

次に示すもの以外は、総則の3に示すものを用いる。

ピラスルホトール標準品 本品はピラスルホトール 98%以上を含む。

代謝物M1標準品 本品は代謝物M1 98%以上を含む。

5. 試験溶液の調製

1) 抽出

① 穀類及び種実類の場合

試料10.0 gに水20 mLを加え、30分間放置する。これにアセトニトリル、水及び塩酸 (10 : 5 : 1) 混液100 mLを加え、ホモジナイズした後、毎分2,500回転で5分間遠心分離し、上澄液を採る。残留物にアセトニトリル、水及び塩酸 (10 : 5 : 1) 混液 50 mLを加えてホモジナイズした後、上記と同様に遠心分離する。上澄液を採り、先の上澄液に合わせた後、アセトニトリル、水及び塩酸 (10 : 5 : 1) 混液を加えて正確に200 mLとする。

この溶液から正確に10 mLを分取し、60°Cの水浴中で30分間加熱した後、10 w/v%塩化ナトリウム溶液100 mL、塩酸5 mL及び*n*-ヘキサン50 mLを加え、振とうし、ヘキサン層を除去する。

水層を酢酸エチル100 mL及び50 mLで2回振とう抽出する。抽出液を合わせ、無水硫酸ナトリウムを加えて脱水し、無水硫酸ナトリウムをろ別した後、40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物にアセトン5 mLを加えて溶かす。

② 豆類の場合

試料10.0 gに水20 mLを加え、30分間放置する。これにアセトニトリル、水及び塩酸 (10 : 5 : 1) 混液100 mLを加え、ホモジナイズした後、毎分2,500回転で5分間遠心分離し、上澄液を採る。残留物にアセトニトリル、水及び塩酸 (10 : 5 : 1) 混液 50 mLを加えてホモジナイズした後、上記と同様に遠心分離する。上澄液を採り、先の上澄液に合わせた

後、アセトニトリル、水及び塩酸（10：5：1）混液を加えて正確に200 mLとする。

この溶液から正確に2 mLを分取し、60°Cの水浴中で30分間加熱した後、10 w/v%塩化ナトリウム溶液100 mL、塩酸5 mL及び*n*-ヘキサン50 mLを加え、振とうし、ヘキサン層を除去する。

水層を酢酸エチル100 mL及び50 mLで2回振とう抽出する。抽出液を合わせ、無水硫酸ナトリウムを加えて脱水し、無水硫酸ナトリウムをろ別した後、40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物にアセトン5 mLを加えて溶かす。

③ 果実及び野菜の場合

試料20.0 gにアセトニトリル、水及び塩酸（10：5：1）混液100 mLを加え、ホモジナイズした後、毎分2,500回転で5分間遠心分離し、上澄液を採る。残留物にアセトニトリル、水及び塩酸（10：5：1）混液 50 mLを加えてホモジナイズした後、上記と同様に遠心分離する。上澄液を採り、先の上澄液に合わせた後、アセトニトリル、水及び塩酸（10：5：1）混液を加えて正確に200 mLとする。

この溶液から正確に5 mLを分取し、60°Cの水浴中で30分間加熱した後、10 w/v%塩化ナトリウム溶液100 mL、塩酸5 mL及び*n*-ヘキサン50 mLを加え、振とうし、ヘキサン層を除去する。

水層を酢酸エチル100 mL及び50 mLで2回振とう抽出する。抽出液を合わせ、無水硫酸ナトリウムを加えて脱水し、無水硫酸ナトリウムをろ別した後、40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物にアセトン5 mLを加えて溶かす。

④ 茶の場合

試料5.00 gに水20 mLを加え、30分間放置する。これにアセトニトリル、水及び塩酸（10：5：1）混液100 mLを加え、ホモジナイズした後、毎分2,500回転で5分間遠心分離を行い、上澄液を採る。残留物にアセトニトリル、水及び塩酸（10：5：1）混液 50 mLを加えてホモジナイズした後、上記と同様に遠心分離する。上澄液を採り、先の上澄液に合わせた後、アセトニトリル、水及び塩酸（10：5：1）混液を加えて正確に200 mLとする。

この溶液から正確に4 mLを分取し、60°Cの水浴中で30分間加熱した後、10 w/v%塩化ナトリウム溶液100 mL、塩酸5 mL及び*n*-ヘキサン50 mLを加え、振とうし、ヘキサン層を除去する。

水層を酢酸エチル100 mL及び50 mLで2回振とう抽出する。抽出液を合わせ、無水硫酸ナトリウムを加えて脱水し、無水硫酸ナトリウムをろ別した後、40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物にアセトン5 mLを加えて溶かす。

2) 精製

グラファイトカーボン/アミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム（500 mg/500 mg）にメタノール及びアセトン各10 mLを順次注入し、各流出液は捨てる。このカラムに1）で得られた溶液を注入した後、アセトン10 mLを注入し、流出液は捨てる。次いでメタノール及び塩酸（99：1）混液 30 mLを注入し、溶出液を40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物をメタノールに溶解し、正確に5 mLとしたものを試験溶液とする。

6. 検量線の作成

ピラスルホトール標準品及び代謝物M1標準品をそれぞれアセトンに溶かして標準原液を調製する。各標準原液を適宜混合してメタノールで希釈した溶液を数点調製し、それぞれLC-MS/MSに注入し、ピーク高法又はピーク面積法で検量線を作成する。なお、本法に従って試験溶液を調製した場合、豆類及び茶以外にあつては試料中0.01 mg/kgに相当する試験溶液中濃度は各化合物0.001 mg/Lである。豆類及び茶にあつては、試料中0.05 g/kgに相当する試験溶液中濃度は各化合物0.001 mg/Lである。

7. 定量

試験溶液をLC-MS/MSに注入し、6の検量線でピラスルホトール及び代謝物M1（代謝物M2を含む）の含量を求める。代謝物M1を含むピラスルホトールの含量を求める場合には、次式により求める。

ピラスルホトール（代謝物M1を含む。）の含量（ppm）=A+B×1.040

A：ピラスルホトールの含量（ppm）

B：代謝物M1の含量（ppm）

8. 確認試験

LC-MS/MSにより確認する。

9. 測定条件

（例）

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲル 内径2.1 mm、長さ150 mm、粒子径5 µm

カラム温度：40℃

移動相：5 mmol/L酢酸アンモニウム溶液及び5 mmol/L酢酸アンモニウム・メタノール溶液の混液（17：3）から（1：1）までの濃度勾配を14分間で行った後、（1：19）までの濃度勾配を0.1分間で行い、（1：19）で5分間保持する。

イオン化モード：ESI（+）

主なイオン（*m/z*）

ピラスルホトール：プリカーサーイオン 363、プロダクトイオン 251、144

代謝物M1：プリカーサーイオン 349、プロダクトイオン 251、144

注入量：5 µL

保持時間の目安

ピラスルホトール：12分

代謝物M1：11分

10. 定量限界

ピラスルホトール：0.01 mg/kg（豆類及び茶以外）、0.05 mg/kg（豆類及び茶）

代謝物M1：0.01 mg/kg（豆類及び茶以外）、0.05 mg/kg（豆類及び茶）

11. 留意事項

1) 試験法の概要

ピラスルホトール、代謝物M1及び代謝物M2を試料からアセトニトリル、水及び塩酸(10:5:1)混液で抽出した後、加熱して代謝物M2を代謝物M1に加水分解する。*n*-ヘキサンで洗浄した後、酢酸エチルに転溶する。グラファイトカーボン/アミノプロピルシリル化シリカゲル積層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である。なお、ピラスルホトール及び代謝物M1(代謝物M2を含む。)のそれぞれについて定量を行い、代謝物M1を含むピラスルホトールの含量を求める場合には、代謝物M1の含量に換算係数を乗じてピラスルホトール含量に変換し、これらの和を分析値とする。

2) 注意点

① ピラスルホトール及び代謝物M1はケイソウ土への吸着があるため、抽出後はケイソウ土を用いた吸引ろ過を避け、また、試料によってはケイソウ土を使用しないと目詰まりすることもあるため、遠心分離後に上澄液上清を分取する方法とした。

② LC-MS/MS測定で、試験法開発時に使用したのイオンを以下に示す。

ピラスルホトール

定量イオン (m/z) : プリカーサーイオン 363、プロダクトイオン 251

定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン 363、プロダクトイオン 144

代謝物M1

定量イオン (m/z) : プリカーサーイオン 349、プロダクトイオン 251

定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン 349、プロダクトイオン 144

③ ESI (-) モードでの測定条件

LC-MS/MS測定で、試験法開発時に検討したESI (-) モードでのイオンを以下に示す。

主なイオン (m/z)

ピラスルホトール : プリカーサーイオン361、プロダクトイオン79

代謝物M1 : プリカーサーイオン347、プロダクトイオン267、64

④ 定量限界について

試験法開発時に玄米、大豆、ばれいしょ、ほうれんそう、キャベツ、りんご、オレンジ、茶(煎茶)、小麦、ライ麦及びごまについて検討した。これらの農産物の中で大豆及び茶(煎茶)では、0.01 mg/kg相当添加時の真度が目標値に達しなかった。0.05 mg/kg相当添加時の真度は目標値に達していたため、豆類及び茶の定量限界は0.05 mg/kgに設定した。

⑤ 試験法開発時に検討した食品 : 玄米、大豆、ばれいしょ、ほうれんそう、キャベツ、りんご、オレンジ、茶、小麦、ライ麦及びごま

12. 参考文献

なし

13. 類型

C