

ピンドン試験法（農産物）

1. 分析対象化合物

ピンドン

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。

ピンドン標準品 本品はピンドン98%以上を含む。

5. 試験溶液の調製

1) 抽出

① 穀類、豆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。これにアセトン100 mLを加え、ホモジナイズした後、吸引ろ過する。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、上記と同様にろ過する。得られたろ液を合わせ、アセトンで正確に200 mLとする。この溶液から正確に40 mLを分取し、40°C以下で約6 mLに濃縮する。これに10%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*n*-ヘキサン30 mLを加え、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル30 mLずつで3回振とう抽出する。抽出液を合わせ、40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物にギ酸、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（1：20：180）混液2 mLを加えて溶かす。

② 果実、野菜及び茶の場合

果実及び野菜の場合は、試料20.0 gを量り採る。茶の場合は、試料5.00 gを量り採り、水20 mLを加え、30分間放置する。これにアセトン100 mLを加え、ホモジナイズした後、吸引ろ過する。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、上記と同様にろ過する。得られたろ液を合わせ、アセトンで正確に200 mLとする。この溶液から正確に20 mL（茶の場合は正確に80 mL）を分取し、40°C以下で約3 mL（茶の場合は約12 mL）に濃縮する。これに10%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。この残留物にギ酸、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（1：20：180）混液2 mLを加えて溶かす。

2) 精製

① 穀類、豆類、種実類及び茶の場合

a グラファイトカーボンカラムクロマトグラフィー及びシリカゲルカラムクロマトグラフィー

グラファイトカーボンミニカラム（500 mg）の下部にシリカゲルミニカラム（1,000 mg）を接続し、ギ酸、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（1：20：180）混液10 mLを注入し、流出液は捨てる。このカラムに1)で得られた溶液を注入した後、さらにギ酸、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（1：20：180）混液18 mLを注入し、全溶出液を採り、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及び*n*-ヘキサン（1：1）混液2 mLを加えて溶かす。

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

エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラム（500 mg）にアセトン及び*n*-ヘキサン（1：1）混液10 mLを注入し、流出液は捨てる。このカラムにaで得られた溶液を注入した後、さらにアセトン及び*n*-ヘキサン（1：1）混液8 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで、アセトン、ギ酸及び*n*-ヘキサン（25：1：25）混液20 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かし、正確に1 mLとしたものを試験溶液とする。

② 果実及び野菜の場合

グラファイトカーボンミニカラム（500 mg）の下部にシリカゲルミニカラム（1,000 mg）を接続し、ギ酸、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（1：20：180）混液10 mLを注入し、流出液は捨てる。このカラムに1)で得られた溶液を注入した後、さらにギ酸、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（1：20：180）混液18 mLを注入し、全溶出液を採り、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かしし、正確に1 mLとしたものを試験溶液とする。

6. 検量線の作成

ピンドン標準品のメタノール溶液を数点調製し、それぞれを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、試料中0.001 mg/kgに相当する試験溶液中濃度は0.002 mg/Lである。

7. 定量

試験溶液をLC-MS/MSに注入し、6の検量線でピンドンの含量を求める。

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3 µm

カラム温度：40℃

移動相：10 mmol/L酢酸アンモニウム溶液及び10 mmol/L酢酸アンモニウム・メタノール溶液混液（4：1）から（1：19）までの濃度勾配を15分間で行い、（1：19）で10分間保持する。

イオン化モード：ESI（－）

主なイオン（ m/z ）：プリカーサーイオン229、プロダクトイオン172、116

注入量：5 µL

保持時間の目安：14分

10. 定量限界

0.001 mg/kg

11. 留意事項

1) 試験法の概要

ピンドンを試料からアセトンで抽出し、*n*-ヘキサンに転溶した後、穀類、豆類及び種実類についてはアセトニトリル/ヘキサン分配で脱脂する。グラファイトカーボンミニカラムとシリカゲルミニカラムを連結したカラムで精製した後、果実及び野菜についてはそのまま、穀類、豆類、種実類及び茶についてはエチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムで精製し、LC-MS/MSで定量及び確認する方法である。

2) 注意点

① ピンドンのLC-MS/MS測定で、試験法開発時に使用したイオンを以下に示す。

定量イオン（ m/z ）：プリカーサーイオン229、プロダクトイオン116

定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン229、プロダクトイオン172

- ② グラファイトカーボンミニカラムとシリカゲルミニカラムの連結カラムにおいて、色素の少ない食品では、グラファイトカーボンミニカラムによる精製を省略し、シリカゲルミニカラムのみを使用しても良い。
- ③ ピンดอนは、測定に用いるオクタデシルシリル化シリカゲルカラムによってはテーリングする場合があるため、金属不純物や残存シラノール基の少ない測定用カラムを用いると良い。
- ④ 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、トマト、きゅうり、りんご、オレンジ及び茶

12. 参考文献

なし

13. 類型

C