

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

## 食品に残留する農薬等の成分である物質の 試験法開発事業報告書

### アシュラム試験法（畜産物）

## アシュラム試験法（畜産物）の検討結果

### 〔緒言〕

#### 1. 目的

アシュラムはメイ・アンド・ベーカー社により開発されたスルファニルアミド系/カーバメート系の除草剤である。雑草の茎葉部及び根部から吸収され、細胞分裂が盛んな部位で7,8-ジヒドロプテロイン酸シンターゼを阻害し、葉酸の生合成を低下させることにより除草効果を示すと考えられている。

国内では1972年に初回農薬登録された。海外ではオーストラリア、マダガスカル等で登録されている。

農薬評価書ではアシュラムの一日摂取許容量を0.36 mg/kg 体重/日、急性参照用量を3 mg/kg 体重と設定している。

ポジティブリスト制度が導入されたことに伴い、基準値が牛の筋肉、牛の脂肪及び乳等に0.05～0.2 ppm 設定された。

アシュラムの試験法としてLC/MSによる農薬等の一斉試験法Ⅱ（畜水産物）は適用できず、また、LC/MSによる農薬等の一斉試験法Ⅲ（畜水産物）の適用検討では、牛の肝臓で低回収率（46%）であった。そこで、定量限界が一律基準0.01 ppmを満たすアシュラム個別試験法の検討を行った。

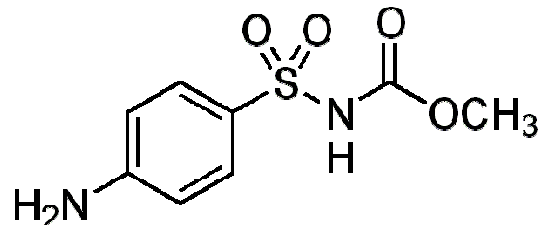
#### 2. 分析対象化合物の構造式及び物理化学的性質

##### 分析対象化合物

和名：アシュラム

英名：Asulam

##### 構造式



分子式：C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S

分子量：230.24

CAS NO.：3337-71-1

##### 化学名

CAS名：methyl[(4-aminophenyl)sulfonyl]carbamate

IUPAC名：methyl sulphanilylcarbamate

外観：白色、微細な固体結晶

融点：228.3-231.5℃

沸点：測定不能（229-230℃で分解）

蒸気圧：4.2×10<sup>-7</sup> Pa（45℃）

水溶解度：5.5 g/L（20℃、pH4.0）、1,048 g/L（20℃、pH9.0）、962 g/L（20℃、蒸留水）

##### 有機溶媒溶解度

アセトン 1.1 g/L（25℃）、アセトニトリル 2.3 g/L（25℃）、*n*-オクタノール 3.0×10<sup>-2</sup> g/L（25℃）、キシレン 9.8×10<sup>-2</sup> g/L（25℃）、酢酸エチル 0.50 g/L（25℃）、1,2-ジクロロエタン 3.3×10<sup>-2</sup> g/L（25℃）、*n*-ヘプタン 7×10<sup>-5</sup> g/L（25℃）、メタノール 117 g/L（25℃）

### 1-オクタノール/水分配係数 (log Pow)

log Pow = 0.11 (25°C、pH4)、0.15 (25°C、pH7)、0.77 (25°C、pH9)

[出典]

- ① 農薬評価書 アシュラム、2014年10月食品安全委員会農薬専門調査会.
- ② 独立行政法人農林水産消費安全技術センター (FAMIC), 農薬抄録 アシュラム (除草剤), <http://www.acis.famic.go.jp/syouroku/fluopicolide/index.htm>, 2015年11月12日掲載.

### 3. 基準値

食品名	基準値(ppm)
牛の筋肉	0.05
牛の脂肪	0.05
牛の肝臓	0.05
牛の腎臓	0.2
牛の食用部分	0.2
乳	0.05

## [実験方法]

### 1. 試料

検討には、牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓及び牛乳を試料として用いた。いずれも東京都内で流通していたものを購入した。

試料及び産地を以下に記載した。

試料名	産地
牛の筋肉	国産
牛の脂肪	国産
牛の肝臓	国産
牛乳	国産

各試料の採取方法を以下に記載した。

#### (1) 牛の筋肉

可能な限り脂肪層を除き、試料を細切した後、フードプロセッサーを用いて均一化した。

#### (2) 牛の脂肪

可能な限り筋肉層を除き、試料を細切した後、フードプロセッサーを用いて均一化した。

#### (3) 牛の肝臓

試料を細切した後、フードプロセッサーを用いて均一化した。

#### (4) 牛乳

振とう混和して均一化した。

### 2. 試薬・試液

アシュラム標準品：純度 99.5% (ジーエルサイエンス製)

アセトン：残留農薬試験用 (富士フィルム和光純薬製)

アセトニトリル：残留農薬試験用 (富士フィルム和光純薬製) 及び LC-MS 用 (富士フィルム和光純薬製)

塩酸：容量分析用 (富士フィルム和光純薬製)

ギ酸：LC-MS 用 (富士フィルム和光純薬製)

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 (500 mg) : InertSep PSA (ジーエルサイエンス製)

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム : (1 g) : InertSep C<sub>18</sub> (ジーエルサイエンス製)

標準原液：標準品 20 mg を精秤し、アセトニトリルで溶解して 1,000 mg/L 溶液を調製した。

検量線用標準溶液：標準原液を 0.1 vol% ギ酸・アセトニトリル溶液で適宜希釈し、0.000125～0.00375 mg/L の各溶液を調製した。

添加用標準溶液①：標準原液をアセトンで希釈して 1 mg/L 溶液を調製した。

添加用標準溶液②：標準原液をアセトンで希釈して 5 mg/L 溶液を調製した。

ポリプロピレン製遠心管：100 mL (AGC テクノグラス製)、15 mL (コーニング製)

### 3. 装置

ホモジナイザー：ヒスコトロン NS-52 (マイクロテック・ニチオン製)

フードプロセッサー：MK-K81 (パナソニック製)

濃縮装置：TurboVap® LV (バイオタージ製)

振とう機：SR-2WD (タイテック製)

遠心分離器：AX-321 (トミー精工製)

アスピレーター：MDA-015 (アルバック機工製)

吸引マニホールド：GL-SPE吸引マニホールド (ジーエルサイエンス製)

## LC-MS/MS

装置	型式	会社
MS	Quattro Premier XE	Waters
LC	ACQUITY UPLC	Waters
データ処理	MassLynx V.4.1 SCN805	Waters

## 4. 測定条件

## LC-MS

LC 条件				
カラム	CAPCELL PAK C18 MGII (内径 2.1 mm、長さ 100 mm、粒子径 5 $\mu$ m : 大阪ソーダ製)			
移動相流速 (mL/min)	0.20			
注入量 ( $\mu$ L)	5			
カラム温度 ( $^{\circ}$ C)	40			
移動相	A 液 : 0.1 vol% ギ酸溶液 B 液 : 0.1 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	98	2	
	4	70	30	
	8	2	98	
	11	2	98	
	15	98	2	
MS 条件				
測定モード	SRM			
イオン化モード	ESI (+)			
キャピラリ電圧 (kV)	3.00			
ソース温度 ( $^{\circ}$ C)	110			
脱溶媒温度 ( $^{\circ}$ C)	350			
コーンガス	窒素、50 L/hr			
脱溶媒ガス	窒素、850 L/hr			
コリジョンガス	アルゴン			
定量イオン ( $m/z$ )	アシュラム : MS/MS: +230.9 $\rightarrow$ 155.9 [コーン電圧 16 (V)、コリジョンエネルギー12 (eV)]			
定性イオン ( $m/z$ )	アシュラム : MS/MS: +230.9 $\rightarrow$ 92.0 [コーン電圧 16 (V)、コリジョンエネルギー22 (eV)]			
保持時間 (min)	アシュラム : 4.7			

## 5. 定量

アシュラム標準品 20 mg を精秤し、アセトニトリルに溶解して 1,000 mg/L 溶液を調製した。この溶液を 0.1 vol% ギ酸・アセトニトリル溶液で希釈して、0.000125、0.00025、0.000375、0.0005、0.000625、0.00075、0.00125、0.001875、0.0025、0.00315 及び 0.00375 mg/L の標準溶液を調製した。この溶液 5  $\mu$ L を LC-MS/MS に注入して、得られたピーク面積を用いた絶対検量線法で定量した。

## 6. 添加試料の調製

- (1) 牛の筋肉 (添加濃度 : 0.05 mg/kg)

試料 10.0 g に添加用標準溶液②0.1 mL (アセトン溶液) を添加しよく混合した後、30 分間放置した。  
牛の筋肉 (添加濃度 : 0.01 mg/kg)

試料 10.0 g に添加用標準溶液①0.1 mL (アセトン溶液) を添加しよく混合した後、30 分間放置した。

(2) 牛の脂肪 (添加濃度 : 0.05 mg/kg)

試料 10.0 g を採り、約 40℃ で加温して融解させたものに添加用標準溶液②0.1 mL (アセトン溶液) を添加してよく混合した後、放置 (室温) して再度凝固させた後、30 分間放置した。

牛の脂肪 (添加濃度 : 0.01 mg/kg)

試料 10.0 g を採り、約 40℃ で加温して融解させたものに添加用標準溶液①0.1 mL (アセトン溶液) を添加してよく混合した後、放置 (室温) して再度凝固させた後、30 分間放置した。

(3) 牛の肝臓 (添加濃度 : 0.05 mg/kg)

試料 10.0 g に添加用標準溶液②0.1 mL (アセトン溶液) を添加しよく混合した後、30 分間放置した。

牛の肝臓 (添加濃度 : 0.01 mg/kg)

試料 10.0 g に添加用標準溶液①0.1 mL (アセトン溶液) を添加しよく混合した後、30 分間放置した。

(4) 牛乳 (添加濃度 : 0.05 mg/kg)

試料 10.0 g に添加用標準溶液②0.1 mL (アセトン溶液) を添加しよく混合した後、30 分間放置した。

牛乳 (添加濃度 : 0.01 mg/kg)

試料 10.0 g に添加用標準溶液①0.1 mL (アセトン溶液) を添加しよく混合した後、30 分間放置した。

## 7. 試験溶液の調製

### 概要

アシュラムを試料からアセトンで抽出し、アセトニトリル/ヘキサン分配で脱脂後、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の下部にオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムを連結したカラムで精製し、LC-MS/MSで定量及び確認した。

#### (1) 抽出

試料10.0 gを100 mLポリプロピレン製遠心管に採り、水10 mLを加え、ホモジナイズした後、アセトン50 mLを加え、さらにホモジナイズした。毎分3,000回転で5分間遠心分離し、上澄液を100 mL容メスフラスコに採取した。残留物にアセトン25 mLを加え、ホモジナイズした後、毎分3,000回転で5分間遠心分離した。得られた上澄液を合わせ、アセトンを加えて正確に100 mLとした。

抽出液5 mLを15 mLポリプロピレン製遠心管に採り、40 °C以下で窒素吹き付け濃縮装置で溶媒を除去した。残留物に*n*-ヘキサン5 mLおよび*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル5 mLを加え、超音波処理により溶解し、5分間振とうした。静置した後、アセトニトリル層を分取した。*n*-ヘキサン層に*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル5 mLを加え、上記と同様の操作を繰り返す、アセトニトリル層を合わせ、40 °C以下で窒素吹き付け濃縮装置で1 mL程度まで濃縮した。

#### (2) 精製

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/3 mL)] に、0.1 mol/L 塩酸 10 mL を注入し、流出液は捨てた。0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液 20 mL を注入し、流出液は捨てた。オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム [InertSep C<sub>18</sub> (1 g/6 mL)] に、0.1 mol/L 塩酸 10 mL を注入し、流出液は捨てた。0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液 20 mL を注入し、流出液は捨てた。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の下にオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムを接続し、このカラムに (1) で得られた溶液を注入した後、残留物に 0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液及び水 (1 : 4) 混液 2 mL を加えて超音波処理により溶解し、カラムに注入した。容器を 0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液 2 mL で洗い、カラムに注入し、さらに 0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液 5 mL を注入し、全溶出液を採り、0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液を用いて正確に

10 mL としたものを試験溶液とした。

[分析法フローチャート]

秤 取

↓ 試料 10.0 g

アセトン抽出

- ↓ 水 10 mL を加えホモジナイズ
- ↓ アセトン 50 mL を加えホモジナイズ
- ↓ 遠心分離
- ↓ 残留物にアセトン 25 mL を加えホモジナイズ
- ↓ 遠心分離
- ↓ 上澄液を合わせる
- ↓ アセトン 100 mL 定容

濃縮 (溶媒除去)

↓ 抽出液 5 mL を分取し、濃縮

アセトニトリル/ヘキサン分配 (脱脂)

- ↓ *n*-ヘキサン 5 mL 及び *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 5 mL を加え振とう
- ↓ アセトニトリル層を分取
- ↓ *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 5 mL を加え振とう
- ↓ アセトニトリル層を分取し、先のアセトニトリル抽出液と合わせ、濃縮

濃縮 (1 mL 程度まで)

↓

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/3 mL) ]

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム [InertSep C<sub>18</sub> (1 g/6 mL) ]

- ↓ 0.1 mol/L 塩酸 10 mL 及び 0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液 20 mL でコンディショニング
- ↓ 約 1 mL まで濃縮した溶液を注入
- ↓ 残留物を 0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液及び水 (1 : 4) 混液 2 mL に溶解し、注入
- ↓ 容器を 0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液 2 mL で洗いこむ
- ↓ 0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液 5 mL で溶出 (全溶出液を採取)
- ↓ 0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液で正確に 10 mL に定容

試験溶液

↓

LC-MS/MS

## 8. マトリックス添加標準溶液の調製

ブランク試験溶液 0.5 mL を採り、窒素気流下で溶媒を除去した後、各検討対象食品の添加回収試験における回収率 100%相当濃度の溶媒標準溶液 0.5 mL を加えて溶解したものをマトリックス添加標準溶液とした。

## [結果及び考察]

### 1. 測定条件の検討

#### (1) MS条件の検討

スキャン測定においては、アシュラムの ESI (+) モード測定時のマススペクトルを図 1 に、ESI (-) モード測定時のマススペクトルを図 2 に示した。ESI (+) モードではアシュラムのプロトン付加分子 ( $m/z$  230.9  $[M+H]^+$ )、ESI (-) モードでは脱プロトン化分子 ( $m/z$  228.7  $[M-H]^-$ ) のモル質量 230.24 に関するスペクトルが得られたが、ESI (-) モードでの感度は ESI (+) モードの 1/100 以下の感度であったことから、測定には ESI (+) モードを用いることにした。

アシュラムのプロトン付加分子 ( $m/z$  230.9  $[M+H]^+$ ) をプリカーサーイオンとした場合のプロダクトイオンスペクトルを図3及び図4に示した。 $m/z$  230.9をプリカーサーイオンとした場合のプロダクトイオンのうち、イオン強度の最も強い $m/z$  155.9を定量用イオンに、次にイオン強度の強い $m/z$  92.0を定性用イオンとした。

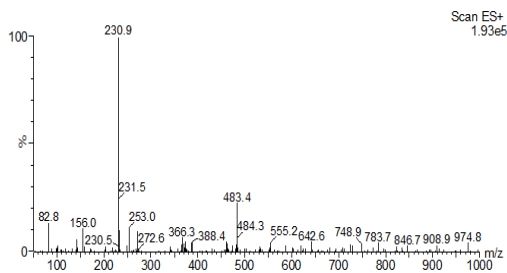


図 1 アシュラムのマススペクトル  
スキャン範囲： 50~1,000  $m/z$   
測定条件： ESI (+)  
CV=16 V (CV : corn voltage)  
アシュラム： 10 mg/L

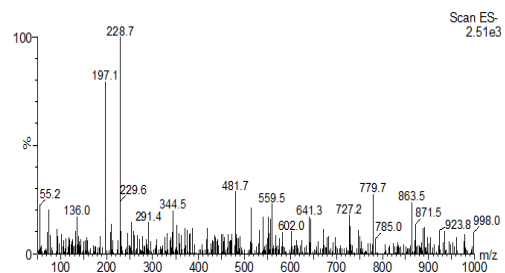


図 2 アシュラムのマススペクトル  
スキャン範囲： 50~1,000  $m/z$   
測定条件： ESI (-)  
CV=40 V (CV : corn voltage)  
アシュラム： 10 mg/L

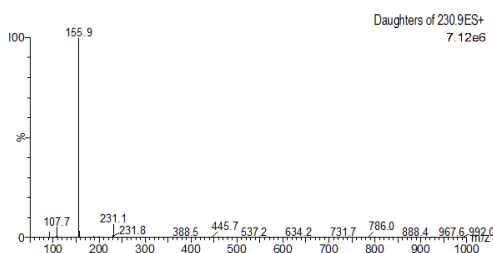


図 3 アシュラムのプロダクトイオン  
スペクトル  
プリカーサーイオン：  $m/z$  230.9  
測定条件： ESI (+)  
CV=16 V, CE=12 eV (定量用)  
(CV : corn voltage, CE : collision energy)  
アシュラム： 0.1 mg/L

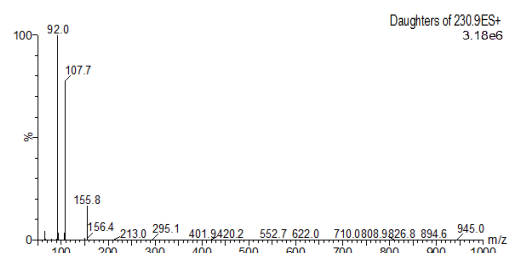


図 4 アシュラムのプロダクトイオン  
スペクトル  
プリカーサーイオン：  $m/z$  230.9  
測定条件： ESI (+)  
CV=16 V, CE=22 eV (定性用)  
(CV : corn voltage, CE : collision energy)  
アシュラム： 0.1 mg/L

#### (2) LC条件の検討

分析カラムは、汎用されているオクタデシルシリル化シリカゲル (ODS) 充填カラムである、CAPCELL PAK C18 MGII (内径 2.1 mm、長さ 100 mm、粒子径 5 $\mu$ m: 大阪ソーダ製)、L-column2 ODS (内径 2.1 mm、



長さ 100 mm、粒子径 5 $\mu$ m : 化学物質評価研究機構製) 及び Mighysil RP-18 (内径 2.1 mm、長さ 100 mm、粒子径 5 $\mu$ m : 関東化学製) を比較検討した結果、CAPCELL PAK C18 MGII を使用することで、アシュラムのピーク形状、分離及び再現性について良好な結果が得られた。

移動相条件については、ギ酸及び酢酸アンモニウム溶液について検討したところ、0.1 vol%ギ酸溶液が最もピーク強度が高く、また、メタノール混液よりもアセトニトリル混液のほうが良好なピーク形状であったため、0.1 vol%ギ酸溶液及びアセトニトリルとの混液について検討した。

アイソクラティックの条件を検討したが、アセトニトリル及びギ酸溶液 (5 : 95) 混液ではアシュラムのピーク強度が低く、(3 : 7) 混液では保持時間が 2 分と早かった。ピーク形状及び強度を確保するためグラジエント測定条件を検討した。

0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル及び 0.1 vol%ギ酸溶液 (2 : 98) から、4 分までに (30 : 70)、8 分までに (98 : 2) のグラジエント条件で分析カラムからの試料成分流出のため、(98 : 2) で 3 分間保持した場合、アシュラムの保持時間は 4.7 分であった。

### (3) 検量線

図 5-1 に 0.000125~0.00075 及びに図 5-2 に 0.000625~0.00375 mg/L の濃度範囲で作成したアシュラム検量線を示した。検量線の決定係数は、0.999 以上であり良好な直線性を示した。

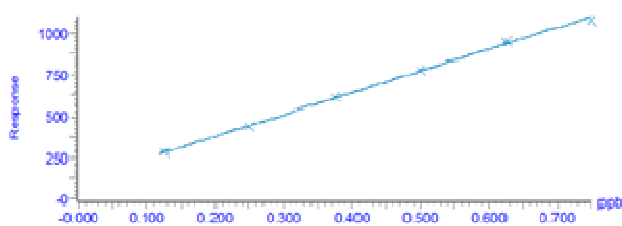


図5-1 アシュラム検量線の例

$$y = 1309.5x + 117.832$$

$$r^2 = 0.999551$$

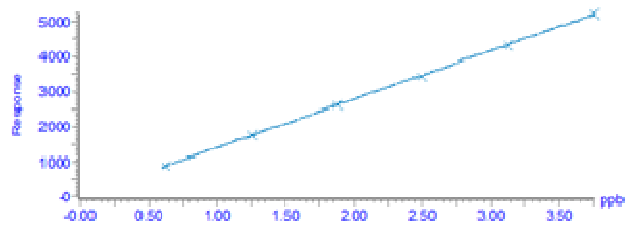


図5-2 アシュラム検量線の例

$$y = 1380.8x + 26.0897$$

$$r^2 = 0.999969$$

### (4) 定量限界

定量限界の算出結果を以下に示した。

$$\text{アシュラム} : \left[ \frac{10(\text{mL})}{0.5(\text{g})} \times \frac{0.0025(\text{ng})}{5(\mu\text{L})} \right] = 0.01 \text{ mg/kg}$$

## 2. 試験溶液調製法の検討

### (1) 抽出溶媒の検討

抽出溶媒としてアセトニトリル、アセトン、アセトン及び *n*-ヘキサン (1 : 1) 混液、酢酸エチル及びメタノールについて検討した。水 10mL に 5 mg/L アセトン溶液 0.1 mL を添加し、各溶媒 50 mL、25 mL で 1 分間ホモジナイズ後、毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離した。得られた上層を 100 mL に定容後、5 mL を分取し、0.1 vol%ギ酸・アセトニトリルに置換後、LC-MS/MS で測定した。表 1 に添加したアシュラムの回収結果を示した。

アセトニトリル、アセトン及びメタノールで 99%の回収率が得られたが、脂肪を十分に分散可能なアセトン及びメタノールを用いて検討を行うこととした。

次に、牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓及び牛乳を試料として、アセトン及びメタノールを用いて抽出した溶液をアセトニトリル/ヘキサン分配後、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、LC-MS/MS で測定した。その結果、メタノール抽出液よりもアセトン抽出液のほうが試料由来の夾雑成分の影響が少なかった (図 6)。また、メタノールよりも濃縮時間が短時間であることから、アセトンを

抽出溶媒に用いることとした。

表 1 各溶媒からのアシュラムの回収結果

化合物	回収率(%)		
	50 mL (1回目)	25 mL (2回目)	合計
アセトニトリル	97	2	99
アセトン	98	1	99
アセトン・ <i>n</i> -ヘキサン(1:1)	3	2	5
酢酸エチル	38	30	68
メタノール	97	2	99

添加量 : 0.5  $\mu$ g ( $n=1$ )

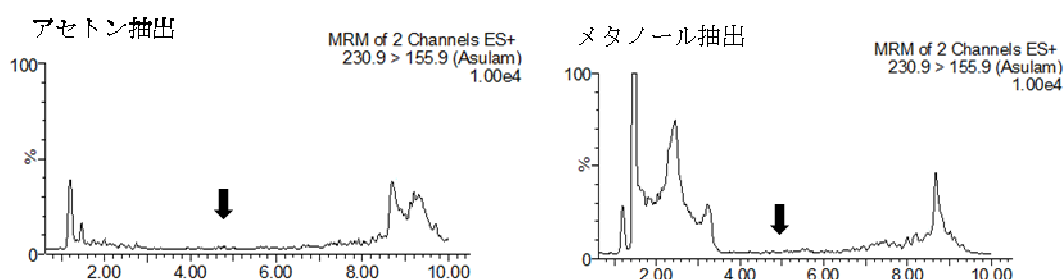


図 6 牛の肝臓無添加溶液における夾雑成分の比較

### (2) 抽出時分解の有無の確認

牛の肝臓に標準品を添加後、放置中に分解が起きるか確認した。

牛の肝臓に 5 mg/L アセトン溶液 0.1mL を添加し、各時間放置後、水 10 mL を加え、アセトン抽出後、アセトニトリル/ヘキサン分配で脱脂し、スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラムで精製を行った後、試験溶液とした。表 2 に添加したアシュラムの回収率の結果を示した。

いずれも 90%程度の回収率となり、特に分解はみられなかった。

表 2 抽出時放置時間による分解の確認

放置時間 (分)	回収率(%)
0	94
10	92
20	92
30	93

添加量 : 0.5  $\mu$ g ( $n=1$ )

### (3) 脱脂操作の検討

#### ① アセトニトリル/ヘキサン分配

アシュラムの 0.05 mg/L アセトニトリル溶液 0.5 mL を *n*-ヘキサン 30 mL に加え、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL で分液ロートを用いて 3 回抽出を行った場合と、15 mL ポリプロピレン製遠心管にアシュラムの 0.05 mg/L アセトニトリル溶液 0.5 mL を加え、*n*-ヘキサン 5 mL を加え、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 5 mL で 3 回抽出を行った場合の結果を表 3 に示した。いずれも 2 回の抽出で 100% の回収が得られたが、簡易・迅速化のため、溶媒量が少ないポリプロピレン製遠心管でアセトニトリル/ヘキサン分配を行うこととした。

牛の脂肪をアセトンで抽出し、100 mL に定容後、その 5 mL を分取し、溶媒を除去後、同様に操作

し、溶媒を除去したところ、顕著な脂肪の残留は見られず、脱脂効果が十分であることを確認した。

表3 アセトニトリル/ヘキサン分配の検討

器具	転溶回数			合計(%)
	1回	2回	3回	
分液ロート (100 mL)	96	4	0	100
ポリプロピレン製遠心管 (15 mL)	98	2	0	100

回収率 (%), 添加量 : 0.025 µg (n=1)

#### (4) 精製法検討

- ① オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムによる精製 [InertSep C18 (500 mg/6 mL 及び 1 g/6 mL)]

脂質除去のためにオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムについて検討した。

カラムをアセトニトリル 20 mL で予備洗浄した後、アシュラム 0.05 mg/L アセトニトリル溶液 0.5 mL を負荷し、アセトニトリルで溶出したときの溶出状況を表 4 に示した。充てん量 500 mg 及び 1 g ともアシュラムは 5 mL で 100%回収された。

表 4 オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムのアセトニトリルによる溶出状況

ミニカラム	充てん量	アセトニトリル量(mL)						合計 (%)
		1-5	5-10	10-15	15-20	20-25	25-30	
InertSep C <sub>18</sub>	500 mg	100	0	0	0	0	0	100
	1 g	100	0	0	0	0	0	100

回収率 (%), 添加量 : 0.025 µg (n=1)

- ② グラファイトカーボンミニカラムによる精製 [InertSep GC (250 mg/3 mL 及び 500 mg/6 mL)]

色素除去のためにグラファイトカーボンミニカラムについて検討した。

カラムをアセトニトリル 20 mL で予備洗浄した後、アシュラム 0.05 mg/L アセトニトリル溶液 0.5 mL を負荷し、アセトニトリルで溶出したときの溶出状況を表 5 に示した。充てん量 250 mg では 5 mL で、500 mg では 10 mL で 100%回収された。

表 5 グラファイトカーボンミニカラムのアセトニトリルによる溶出状況

ミニカラム	充てん量	アセトニトリル量(mL)						合計 (%)
		1-5	5-10	10-15	15-20	20-25	25-30	
InertSep GC	250 mg	100	0	0	0	0	0	100
	500 mg	98	2	0	0	0	0	100

回収率 (%), 添加量 : 0.025 µg (n=1)

- ③ 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/3 mL)]

色素及び脂肪酸の除去のためにエチレンジアミン-N-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムについて検討した。

カラムをアセトニトリル 20 mL で予備洗浄した後、アシュラム 0.05 mg/L アセトニトリル溶液 0.5 mL を負荷し、アセトニトリルで溶出した場合、アシュラムはミニカラムに吸着した。

アシュラムは酸性条件でミニカラムからの回収が向上するとの報告があることから<sup>2)</sup>、カラムを 0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液 20 mL で予備洗浄した後、アシュラム 0.05 mg/L アセトニトリル溶液 0.5 mL を負荷し、0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液で溶出したときの溶出状況を表 6 に示した。

アシュラムは 100%回収されたが、溶出液量は 30 mL 必要であった。

表6 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の  
0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液による溶出状況

ミニカラム	溶出液量(mL)							合計(%)
	0-5	5-10	10-15	15-20	20-25	25-30	30-35	
InertSep PSA (500 mg/3 mL)	0	0	0	0	28	72	0	100

回収率 (%), 添加量 : 0.025 µg (n=1)

次に、固相を酸性にすることによる溶出液量の減量化を検討した。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に各濃度の塩酸溶液 10 mL 及び 0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液 20 mL で予備洗浄した後、アシュラム 0.05 mg/L アセトニトリル溶液 0.5 mL を負荷し、0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液で溶出したときの溶出状況を表 7 に示した。

塩酸濃度 0.1 及び 0.2 mol/L で洗浄した場合、0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液 10 mL までで 100% 溶出した。そこで、0.1 mol/L 塩酸 10 mL でカラムを洗浄することとした。

表7 塩酸洗浄を行った場合のエチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化  
シリカゲルミニカラムからの溶出状況

塩酸濃度(mol/L)	0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液溶出液量(mL)						合計(%)
	0-5	5-10	10-15	15-20	20-25	25-30	
0.01	0	0	25	54	21	0	100
0.05	10	50	30	10	0	0	100
0.1	99	1	0	0	0	0	100
0.2	99	1	0	0	0	0	100
0.5	0	64	35	1	0	0	100
1	0	46	45	8	0	0	100

回収率 (%), 添加量 : 0.025 µg (n=1)

#### ④ 試料マトリックスの影響の比較

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム、グラファイトカーボンミニカラム及びエチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムを用いて、牛の肝臓におけるマトリックスの影響を確認するため、添加標準溶液の溶媒標準溶液に対する面積比を求め、表 8 に示した。

いずれのミニカラムも 0.01 mg/L 濃度 (溶液中濃度 : 0.0005 mg/L) ではイオン化抑制が見られ、1 種類のミニカラムによる精製では不十分であった。0.05 mg/L 濃度溶液中濃度 : 0.0025 mg/L) で面積比が 1.00 であり、色素及び脂肪酸の除去が可能なエチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムとその他のカラムを組合せて検討することとした。

表 8 牛の肝臓における試料マトリックスの影響

濃度 (mg/L)	ピーク面積比*1				
	C <sub>18</sub> 500mg	C <sub>18</sub> 1 g	GC 250 mg	GC 500 mg	PSA 500 mg
0.0005	0.84	0.90	0.84	0.87	0.86
0.0025	1.11	0.94	0.99	1.01	1.00

\*1 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の比

#### ⑤ 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との組合せの検討

次に牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓及び牛乳を試料として、抽出した溶液をエチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムと各ミニカラムを組み合わせて精製し、濃縮後、残留物を測定し、結果を表9に示した。

その結果、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及びオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム (1 g) の組合せとエチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラム及びグラファイトカーボンミニカラム (500 mg) との組合せで残留物が少なく、夾雑成分の影響が少ないと考えられたため、この組合せについて検討することとした。

表9 試料溶液精製後の残留物量(mg)

試料	PSA+ C <sub>18</sub> 500mg	PSA+ C <sub>18</sub> 1 g	PSA+ GC 250 mg	PSA+ GC 500 mg
牛の筋肉	1.9	0.8	0.9	0.7
牛の脂肪	1.8	1.0	1.1	1.0
牛の肝臓	6.3	1.6	3.6	1.6
牛乳	5.0	1.9	4.1	1.7

n=1

各カラムを 0.1 mol/L 塩酸 10 mL 及び 0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液 20 mL で予備洗浄した後、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の下にオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム (1 g) 又はグラファイトカーボンミニカラム (500 mg) を連結し、アシュラム 0.05 mg/L アセトニトリル溶液 0.5 mL を負荷し、0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液で溶出したときの溶出状況を表10に示した。

アシュラムは、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムとの組合せでは 6 mL で、グラファイトカーボンミニカラムとの組合せでは 9 mL で溶出された。

表10 0.1 mol/L 塩酸洗浄を行った場合の0.1 vol%ギ酸・アセトニトリルによるミニカラムからの溶出状況

ミニカラム	溶出液量(mL)										合計 (%)
	0-1	1-2	2-3	3-4	4-5	5-6	6-7	7-8	8-9	9-10	
InertSep PSA + C <sub>18</sub>	0	0	62	33	4	1	0	0	0	0	100
InertSep PSA + GC	0	0	0	10	8	48	22	9	3	0	100

回収率 (%), 添加量 : 0.025 µg (n=1)

次に夾雑成分の多い牛の肝臓の無添加溶液をそれぞれの組合せで精製を行ったところ、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及びオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムの組合せの方が、夾雑成分のピークが少なかったため、精製効果が高いと判断し、この組合せを用いることとした (図7)。

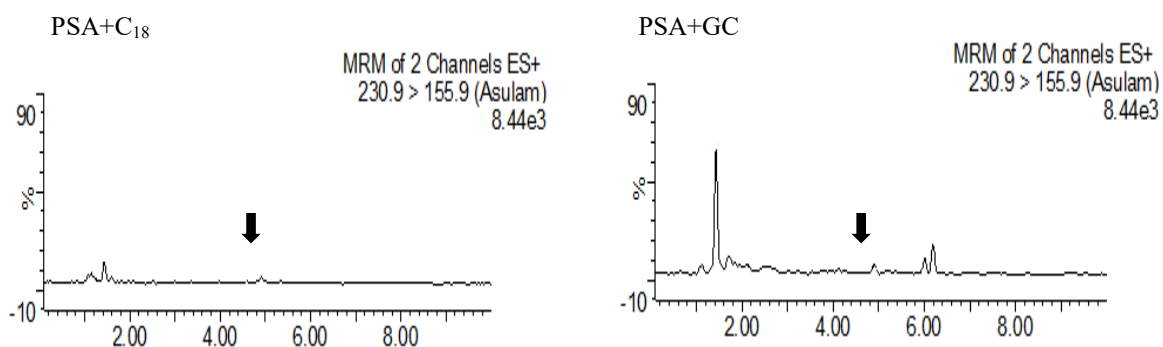


図7 牛の肝臓無添加溶液における精製効果

### (5) 牛乳からの回収の検討

牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓及び牛乳を試料とし、水及びアセトンを用いて抽出した溶液をアセトニトリル/ヘキサン分配後、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及びオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムで精製し、LC-MS/MS で測定したところ、牛乳での回収が 90%未満であった。

次に酸性で回収率向上が見られるか、0.1 vol%ギ酸及びアセトンを用いて抽出した溶液をアセトニトリル/ヘキサン分配後、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及びオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムで精製し LC-MS/MS で測定した。その結果、牛乳では回収率が 90%未満であり（表 11）、抽出以降の操作が回収率に影響していると考えられた。

表 11 添加回収結果

試料	回収率(%)	
	水	0.1 vol%ギ酸
牛の筋肉	95	96
牛の脂肪	100	100
牛の肝臓	92	92
牛乳	89	86

添加量：0.5 µg (n=1)

#### ① 濃縮時の損失確認

牛乳無添加抽出液のアセトニトリル/ヘキサン分配後の溶液にアシュラム 0.05 mg/L（アセトニトリル溶液）0.5 mL を負荷し、1 mL 程度まで濃縮又は乾固した後、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及びオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムで精製し、LC-MS/MS で測定した結果を表 12 に示した。乾固した場合に回収率が 90%未満となった。

表 12 濃縮状況による回収率

濃縮状況	回収率(%)	
	1	2
1 mL まで濃縮	92	91
乾固	87	87

添加量：0.025 µg (n=2)

次に、乾固した場合にアシュラムの損失が起きるか確認した。

アシュラム 0.05 mg/L（アセトニトリル溶液）0.5 mL を 10 mL の試験管に加え、40°C以下で窒素を吹き付けて乾固し、乾固後も各時間窒素を吹き付けた。0.1 vol%ギ酸・アセトニトリルで 5 mL に定容後、LC-MS/MS で測定した結果を表 13 に示した。その結果、乾固による損失は見られなかった。

表 13 乾固時間の違いによる回収率

乾固後の経過時間 (分)	回収率(%)	
	1	2
0	100	100
5	100	100
10	100	100
20	100	100
30	100	100

添加量：0.025 µg (n=2)

## ② 濃縮後溶解溶媒の検討

濃縮時に食品成分と共に乾固した場合、特に牛乳はアセトニトリル濃縮後の残留物量が多く、牛乳の成分にアシュラムが取り込まれ、0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液に十分に溶解していない可能性が考えられた。そこで、アセトニトリル濃縮後の残留物を溶解する溶媒について検討を行った。

牛乳の無添加抽出溶液をアセトニトリル／ヘキサン分配し、乾固したものに水、0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液及び水混液、0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液を加え、超音波処理で溶解した。

その結果、水、0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液及び水（1：9）混液及び（1：4）混液で残留物を十分に溶解することができた（図8）。

次に、牛の筋肉、牛の脂肪及び牛の肝臓の無添加抽出溶液をアセトニトリル／ヘキサン分配し、乾固したものに水、0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液及び水（1：9）混液及び（1：4）混液を加え、残留物を溶解することができるか確認したところ、0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液及び水（1：4）混液でいずれの試料の残留物も十分に溶解することが可能であった。そこで、アセトニトリル濃縮時には食品成分に取り込まれないよう乾固せず、1 mL 程度まで濃縮し、その溶液をミニカラムに注入後、容器内の残留物に0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液及び水（1：4）混液 2 mL を加えて、十分に溶解し、ミニカラムに注入することとした。また、アセトン抽出溶液濃縮後、アセトニトリル／ヘキサン分配時にも食品成分の器壁への吸着が見られたことから、アセトンを除去後、*n*-ヘキサン及び *n*-ヘキサン飽和アセトニトリルを加えた後、超音波処理でよく溶解してから分配操作を行うこととした。

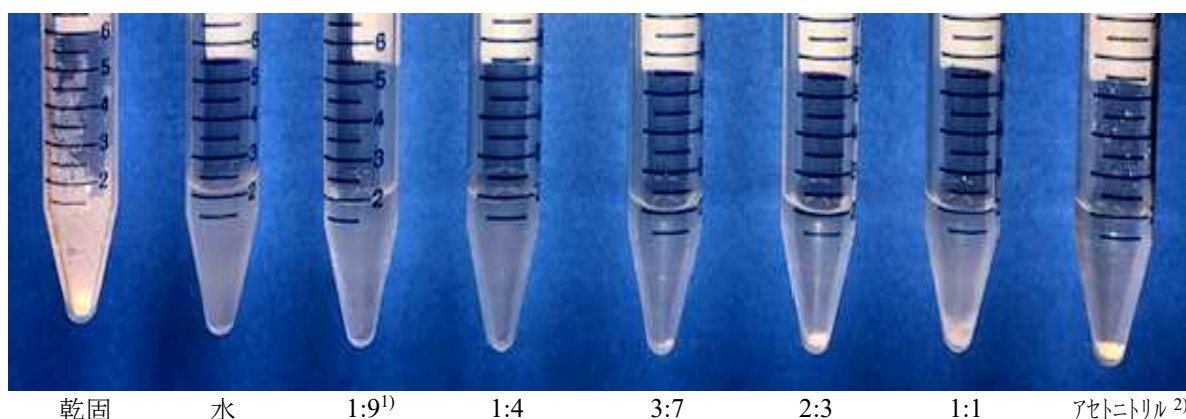


図8 牛乳残留物の溶媒への溶解状況

1) 0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液：水混液 2) 0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液

## 3. 添加回収試験

牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓及び牛乳の4食品を試料に用いて、実験方法の7. 試験溶液の調製に従って添加回収試験を実施した。

添加回収試験における回収率 100%相当の溶媒標準溶液、各食品のブランク試料及び添加試料のクロマトグラムを図9～16に示した。また、各食品のブランク試料のスキャン測定によるトータルイオンクロマトグラムを図17に示した。

### (1) 選択性

選択性の検討結果を表14に示した。検討したいずれの試料においても、アシュラムの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。

表14 選択性の評価

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 [検出限界] (mg/kg)	基準値 (ppm)	妨害ピークの許容範囲の評価		ピーク面積(高さ) <sup>1)</sup>						選択性の 評価 <sup>3)</sup>		
					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 <sup>2)</sup>			面積(高さ) 比(a)/(b)	
								n=1	n=2	平均(a)	n=1	n=2			平均(b)
1	アシュラム	牛筋肉	0.01	0.05	基準値 0.05	< 0.100	面積	0	0	0	1228	1239	1234	0.000	○
		牛脂肪	0.01	0.05	基準値 0.05	< 0.100	面積	0	2	1	1431	1410	1421	0.001	○
		牛肝臓	0.01	0.05	基準値 0.05	< 0.100	面積	5	0	3	1288	1312	1300	0.002	○
		牛乳	0.01	0.05	基準値 0.05	< 0.100	面積	0	0	0	1241	1280	1260	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、精度及び定量限界

基準値及び定量限界濃度である0.01 mg/kgでの添加回収を行った。真度及び併行精度の検討結果を表15に示した。0.01 mg/kgでは真度93~96%、併行精度は6~12%、0.05 mg/kgでは真度97~99%、併行精度は3~4% (目標値: 真度70~120%、併行精度15 > (0.01 mg/kg) 及び25 > (0.05 mg/kg)) といずれも目標値に適合する結果であった。

0.01 mg/kg添加試料溶液でのS/N比の平均値は13~15であり、全ての食品でS/N ≥ 10を満たした。

表15 真度、精度及び定量限界の評価

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 [検出限界] (mg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	定量限界 の評価 <sup>1)</sup>	検量線		回収率(%)					真度 (%)	併行精度 (RSD%)	S/N <sup>2)</sup>			備考	
							傾き	切片	r <sup>2</sup>	n=1	n=2	n=3	n=4			n=5	Max	Min		平均値
1	アシュラム	牛筋肉	0.01	0.05	0.05	—	817	-64	0.9994	100.0	94.8	95.5	92.6	102.0	97.0	4.0	—	—	—	
		牛筋肉	0.01	0.05	0.01	S/N	756	18	0.9996	88.4	97.5	102.0	94.3	81.1	92.7	8.8	13.7	12.5	13.1	
		牛脂肪	0.01	0.05	0.05	—	824	-60	0.9990	102.0	99.5	96.4	101.0	94.7	98.7	3.1	—	—	—	
		牛脂肪	0.01	0.05	0.01	S/N	867	9	0.9984	96.0	98.9	112.0	94.0	80.9	96.4	11.6	15.9	14.5	15.2	
		牛肝臓	0.01	0.05	0.05	—	820	4	0.9990	100.6	98.5	92.8	101.0	94.6	97.5	3.7	—	—	—	
		牛肝臓	0.01	0.05	0.01	S/N	818	-4	0.9997	90.7	94.3	105.0	89.7	90.8	94.1	6.7	13.9	15.8	14.8	
		牛乳	0.01	0.05	0.05	—	813	-41	0.9998	101.0	95.1	94.8	96.5	102.0	97.9	3.5	—	—	—	
		牛乳	0.01	0.05	0.01	S/N	10156	-92	0.9988	96.4	90.5	104.0	90.5	99.7	96.2	6.1	17.4	13.4	15.4	

\*1 S/Nを求める必要がある場合には「S/N」と表示される。

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

(3) 試料マトリックスの測定への影響

試料マトリックスの測定への影響について検討した結果を表16に示した。添加回収試験における回収率100%相当濃度になるように調製した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比を求めた。面積比は0.94~1.04であり、いずれの試料においても、顕著なマトリックスの測定への影響は認められなかった。

添加回収試験における真度を表16で求めたピーク面積比で除して補正真度を求め、表17に示した。補正真度は89~102%であり、目標値(真度70~120%)に適合する結果であった。

表16 試料マトリックスの測定への影響

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 [検出限界] (mg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	標準溶液 濃度 <sup>1)</sup> (mg/L)	ピーク面積(高さ) <sup>2)</sup>									備考
							面積又は 高さの別	ブランク <sup>3)</sup>	マトリックス添加標準溶液 <sup>4)</sup>			溶媒標準溶液			ピーク面積 (高さ)比 <sup>5)</sup>	
									n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均		
1	アシュラム	牛筋肉	0.01	0.05	0.05	0.0025	面積	0	1299	1239	1269	1303	1256	1280	0.99	
		牛筋肉	0.01	0.05	0.01	0.0005	面積	0	286	275	281	281	257	269	1.04	
		牛脂肪	0.01	0.05	0.05	0.0025	面積	0	1431	1410	1421	1472	1345	1409	1.01	
		牛脂肪	0.01	0.05	0.01	0.0005	面積	0	275	236	256	266	275	271	0.94	
		牛肝臓	0.01	0.05	0.05	0.0025	面積	0	1288	1311	1300	1286	1303	1295	1.00	
		牛肝臓	0.01	0.05	0.01	0.0005	面積	0	261	260	261	277	249	263	0.99	
		牛乳	0.01	0.05	0.05	0.0025	面積	0	1271	1280	1276	1269	1293	1281	1.00	
		牛乳	0.01	0.05	0.01	0.0005	面積	0	243	250	247	243	253	248	0.99	

\*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 17 補正真度

化合物名	食品名	添加濃度 (mg/kg)	真度 (%)	ピーク面積比	補正真度 (%)
アシュラム	牛の筋肉	0.05	97	0.99	98
		0.01	93	1.04	89
	牛の脂肪	0.05	99	1.01	98
		0.01	96	0.94	102
	牛の肝臓	0.05	98	1.00	98
		0.01	94	0.99	95
	牛乳	0.05	98	1.00	98
		0.01	96	0.99	97

## 4. その他の試験法検討に関連する事項

採用しなかった検討事項について以下に示す。

(1) 酸溶液等及び塩化ナトリウムの添加による回収率向上の検討

## ① 酸溶液等の添加の検討

環境水での分析では、酸性での操作やエチレンジアミン四酢酸溶液を加える報告がある<sup>2-4,6-8</sup>。酸溶液及びエチレンジアミン四酢酸溶液添加により回収率の向上がみられるか確認した。

牛の肝臓に、5 mg/L アセトン溶液 0.1mL を添加し、各溶液 10 mL を加え、30 分放置し、アセトン抽出後、アセトニトリル/ヘキサン分配で脱脂し、スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラムで精製を行った後、LC-MS/MS で測定した。各溶液を加えた場合の回収結果を表 18 に示した。その結果、特に回収率の向上はみられなかった。

表 18 酸溶液及びエチレンジアミン四酢酸溶液添加によるアシュラムの回収結果

溶液	回収率(%)
0.1 mol/L 塩酸	93
0.1 vol%ギ酸	94
0.1 vol%リン酸	93
1 vol%エチレンジアミン四酢酸溶液	93

添加量：0.5 µg (n=1)

## ② 塩化ナトリウム添加の検討

塩析効果による回収率の向上を検討した。

牛の肝臓に、5 mg/L アセトン溶液 0.1mL を添加後 30 分放置し、塩化ナトリウムを 0.1~3 g 加え、アセトン抽出後、アセトニトリル/ヘキサン分配で脱脂し、スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラムで精製を行った後、LC-MS/MS で測定した。各溶液を加えた場合の回収結果を表 19 に示した。その結果、特に回収率の向上はみられなかった。

表 19 塩化ナトリウム添加によるアシュラムの回収結果

塩化ナトリウム量 (g)	回収率(%)
0.1	90
0.2	91
0.5	91
1	92
2	91
3	90

添加量 : 0.5 µg (n=1)

(2) 脱脂方法の検討

① ケイソウ土カラム [InertSep K-solute (5 mL 保持用)]

操作の簡便性向上及びエマルジョンによる回収率低下を考慮し、ケイソウ土カラムクロマトグラフィーによる脱脂を検討した。

5 mL 保持用カラムに、0.05 mg/L (アセトニトリル溶液) 1 mL 及びアセトン 4 mL を負荷し、室温条件下-0.02 Mpa で 5 分間吸引乾燥後、各溶出液 30 mL 1 分画及び 10 mL 9 分画で溶出し、濃縮後、0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液を加え 10 mL に定容後 LC-MS/MS で測定したときの結果を表 20 に示した。いずれの溶媒でも十分な回収率が得られなかった。

表 20 多孔性ケイソウ土カラムからの溶出状況

溶出液量 (mL)	回収率(%)	
	アセトニトリル	0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル
0- 30	7	27
30- 40	5	20
40- 50	7	11
50- 60	6	6
60- 70	6	4
70- 80	5	3
80- 90	4	2
90-100	5	2
100-110	5	0
110-120	5	0
合計	55	75

添加量 : 0.05 µg (n=1)

(3) 精製法の検討

ミニカラム精製ではジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム、スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラム、イオン交換系のミニカラム及びシリカゲルミニカラム等を用いた報告があるため<sup>2-8)</sup>、それらについて検討を加えた。

① ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム [Oasis HLB (200 mg/6 mL)]

カラムをアセトニトリル20 mLで予備洗浄した後、アシュラム0.05 mg/Lアセトニトリル溶液0.5 mLを負荷し、アセトニトリルで溶出したときの溶出状況を表21に示した。アシュラムは10 mLで100%溶出された。

表 21 ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムからの溶出状況

ミニカラム	溶出液量(mL)						回収率(%)
	0-5	5-10	10-15	15-20	20-25	25-30	合計
Oasis HLB (200 mg/6 mL)	97	3	0	0	0	0	100

添加量 : 0.025 µg (n=1)

② アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム [InertSep NH<sub>2</sub> (500 mg/3 mL)]

カラムをアセトニトリル20 mLで予備洗浄した後、アシュラム0.05 mg/Lアセトニトリル溶液0.5 mLを負荷し、アセトニトリルで溶出した場合は、カラムからアシュラムは溶出されなかった。

次にカラムを0.1 mol/L塩酸10 mL及び0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液20 mLで予備洗浄した後、アシュラム0.05 mg/Lアセトニトリル溶液0.5 mLを負荷し、0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液で溶出したときの溶出状況を表22に示した。アシュラムは10 mLで100%溶出された。

表22 アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムからの溶出状況

ミニカラム	溶出液量(mL)						回収率(%)
	0-5	5-10	10-15	15-20	20-25	25-30	合計
InertSep NH <sub>2</sub> (500 mg/3 mL)	99	1	0	0	0	0	100

添加量 : 0.025 µg (n=1)

③ スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラム [InertSep PLS-2 (265 mg/6 mL)]

カラムをアセトニトリル20 mLで予備洗浄した後、アシュラム0.05 mg/Lアセトニトリル溶液0.5 mLを負荷し、アセトニトリルで溶出したときの溶出状況を表23に示した。アシュラムは10 mLで100%溶出された。

表23 スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラムのアセトニトリルによる溶出状況

ミニカラム	溶出液量(mL)						合計
	0-5	5-10	10-15	15-20	20-25	25-30	
InertSep PLS-2 (265 mg/6 mL)	98	2	0	0	0	0	100

回収率 (%), 添加量 : 0.025 µg (n=1)

④ トリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム [InertSep SAX (500 mg/3 mL)]

カラムをアセトニトリル20 mLで予備洗浄した後、アシュラム0.05 mg/Lアセトニトリル溶液0.5 mLを負荷し、アセトニトリルで溶出した場合は、カラムからアシュラムは溶出されなかった。

次にカラムを0.1 mol/L塩酸10 mL及び0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液20 mLで予備洗浄した後、アシュラム0.05 mg/Lアセトニトリル溶液0.5 mLを負荷し、0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液で溶出したときの溶出状況を表24に示した。アシュラムは10 mLで100%溶出された。

表24 トリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムからの溶出状況

ミニカラム	溶出液量(mL)						回収率(%)
	0-5	5-10	10-15	15-20	20-25	25-30	合計
InertSep SAX (500 mg/3 mL)	99	1	0	0	0	0	100

添加量 : 0.025 µg (n=1)

⑤ シリカゲルミニカラム [InertSep SI (500 mg/6 mL)]

カラムをアセトニトリル20 mLで予備洗浄した後、アシュラム0.05 mg/Lアセトニトリル溶液0.5 mLを負荷し、アセトニトリルで溶出したときの溶出状況を表25に示した。アシュラムは10 mLで100%溶出された。

表25 シリカゲルミニカラムからの溶出状況

ミニカラム	溶出液量(mL)						回収率(%)
	0-5	5-10	10-15	15-20	20-25	25-30	合計
InertSep SI (500 mg/6 mL)	99	1	0	0	0	0	100

添加量 : 0.025 µg (n=1)

⑥ 各ミニカラムの試料マトリックスの影響確認

牛の肝臓におけるマトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対する面積比を求め、表 26 に示した。面積比は 0.79~1.05 であり、いずれのミニカラムにおいてもマトリックスの測定への影響は認められた。

表 26 牛の肝臓における試料マトリックスの影響

濃度 (mg/L)	ピーク面積比*1				
	HLB 200 mg	NH <sub>2</sub> 500 mg	PLS-2 265 mg	SAX 500 mg	SI 500 mg
0.01	1.14	0.88	0.79	0.87	0.86
0.05	0.96	0.93	0.90	1.05	0.98

\*1 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の比

次に、牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓及び牛乳を試料として、アセトン抽出した溶液をアセトニトリル/ヘキサン分配後、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と各ミニカラムを組合せて 0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液 10 mL で精製し、濃縮後、残留物量を測定した結果を表 27 に示した。

残留物量は、表 9 に示したオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムとの組合せのほうが多く、これらの組合せでは夾雑成分の除去が不十分と考えられたため、採用しなかった。

表 27 試料溶液精製後の残留物量(mg)

試料	PSA+ HLB 200 mg	PSA+ NH <sub>2</sub> 500 mg	PSA+ PLS-2 265 mg	PSA+ SAX 500 mg	PSA+ SI 500 mg
牛の筋肉	1.7	2.0	1.8	0.6	0.9
牛の脂肪	1.9	1.3	0.6	1.3	1.3
牛の肝臓	6.7	6.9	6.6	5.9	5.8
牛乳	5.5	8.0	6.1	3.0	7.0

n=1

5. 考察

アシュラムを脂肪とともに抽出するため、アセトンを抽出溶媒に用いた。

牛乳での検討結果より、アシュラムは食品成分とともに器壁に吸着しやすいため、アセトニトリル/ヘキサン分配後の抽出液の濃縮時には乾固せず、また、残留物を超音波処理でよく溶解する必要がある。

カラムによる精製では、固相内を酸性にすることによる回収率の向上及び溶出液量の少量化のため、ミニカラムを0.1 mol/L塩酸で洗浄処理を行った。また、一種類のカラムのみでは精製が不十分であった

ことから、試料溶液中の色素及び脂肪酸等を除去するため、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及びオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムを接続して用いた。

検討した試験法を用いて、牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓及び牛乳の4食品を試料として、添加回収試験を実施した。その結果、選択性は良好でいずれの試料においても測定を妨害するようなピークは認められなかった。0.01 mg/kgでは真度93～96%、併行精度は6～12%、0.05 mg/kgでは真度97～99%、併行精度は3～4%の良好な結果が得られたことから、本試験法は、畜産物に適用可能であると判断された。

#### 【結論】

畜産物中のアシュラム試験法を検討した。アシュラムを試料からアセトンで抽出し、アセトニトリル／ヘキサン分配で脱脂した。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の下部にオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムを連結したカラムで精製した後、LC-MS/MSで定量及び確認した。

牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓及び牛乳の4食品に適用した結果、0.01 mg/kgでは真度93～96%、併行精度は6～12%、0.05 mg/kgでは真度97～99%、併行精度は3～4%の良好な結果が得られた。また、定量限界として、0.01 mg/kgを設定可能であることが確認された。

#### 【参考文献】

- 1) 農薬評価書 アシュラム，2014年10月食品安全委員会農薬専門調査会.
- 2) 浦山豊弘ら，環境中超微量有害化学物質の分析，検索技術の開発に関する研究—LC/MSによる農薬の多成分同時分析のための基礎的検討—，岡山県環境保健センター年報，30，57-62，(2006).
- 3) 水質管理目標設定項目の検査方法，平成15年10月10日付健水発第1010001号(最終改正平成30年3月28日)，厚生労働省医薬・生活衛生局水道課.
- 4) 藤本千鶴，固相抽出—高速液体クロマトグラフィーを用いた環境水中の農薬の同時定量，環境化学，6，67-73，(1996).
- 5) 月岡忠ら，高速液体クロマトグラフィーによる環境水中のアシュラムの簡易定量方法，19，652-655 (1990).
- 6) 中川順一ら，水中農薬の自動固相抽出—HPLC法による分析，東京衛研年報，51，263-266，(2000).
- 7) 早川修二ら，GC-MS，LC-MSを用いた河川水中農薬の同時分析法の検討，三重保環研年報，7，54-61，(2005).
- 8) 中川和子ら，高速液体クロマトグラフタンデム型質量分析計を使用したゴルフ場排水中農薬の一斉分析法の検討～その1，京都市衛生環境研究所年報，104-109，(2015).

① 添加回収試験における代表的なクロマトグラム

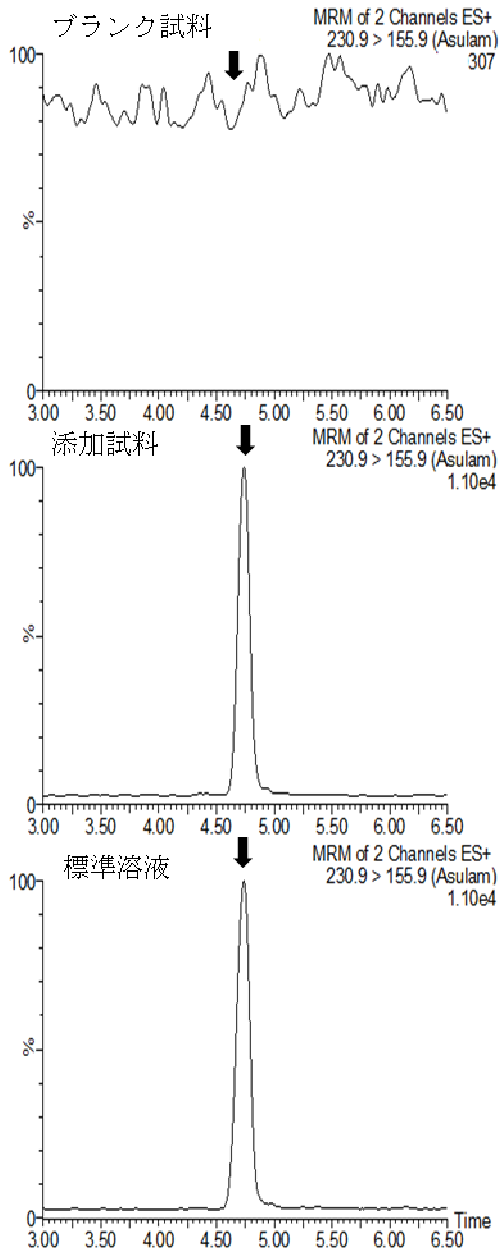


図 9 牛の筋肉の SRM クロマトグラム  
 (アシュラム :  $m/z$  +230.9→155.9)  
 添加濃度 : 0.05 mg/kg

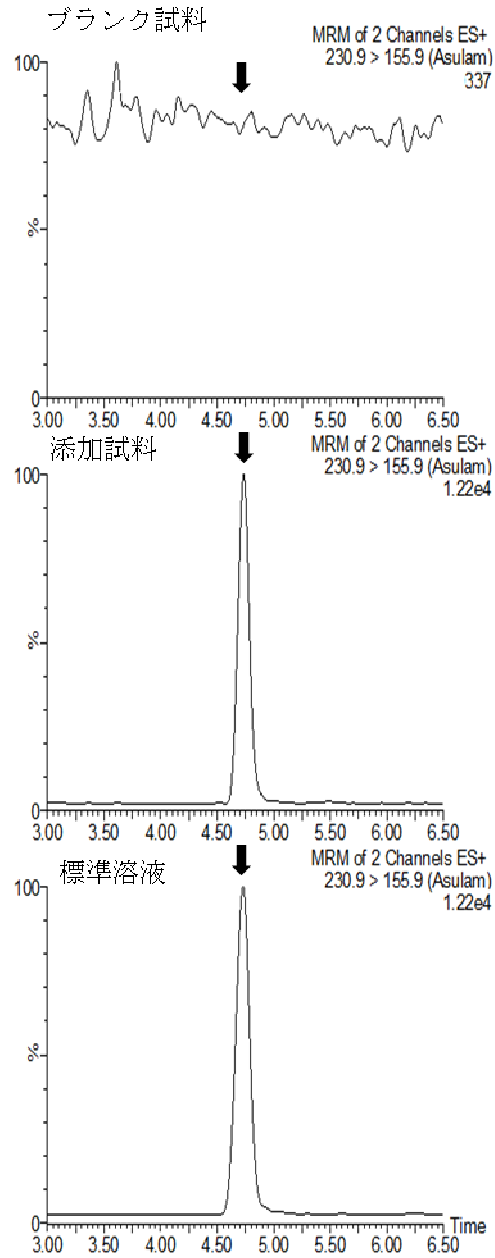


図 10 牛の脂肪の SRM クロマトグラム  
 (アシュラム :  $m/z$  +230.9→155.9)  
 添加濃度 : 0.05 mg/kg

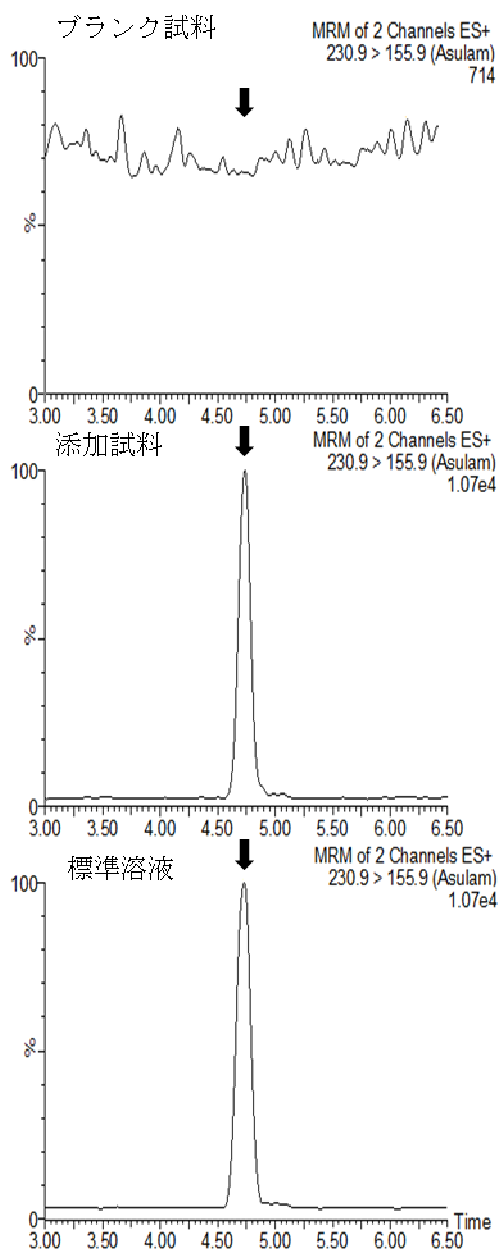


図 11 牛の肝臓の SRM クロマトグラム  
 (アシュラム :  $m/z$  +230.9→155.9)  
 添加濃度 : 0.05 mg/kg

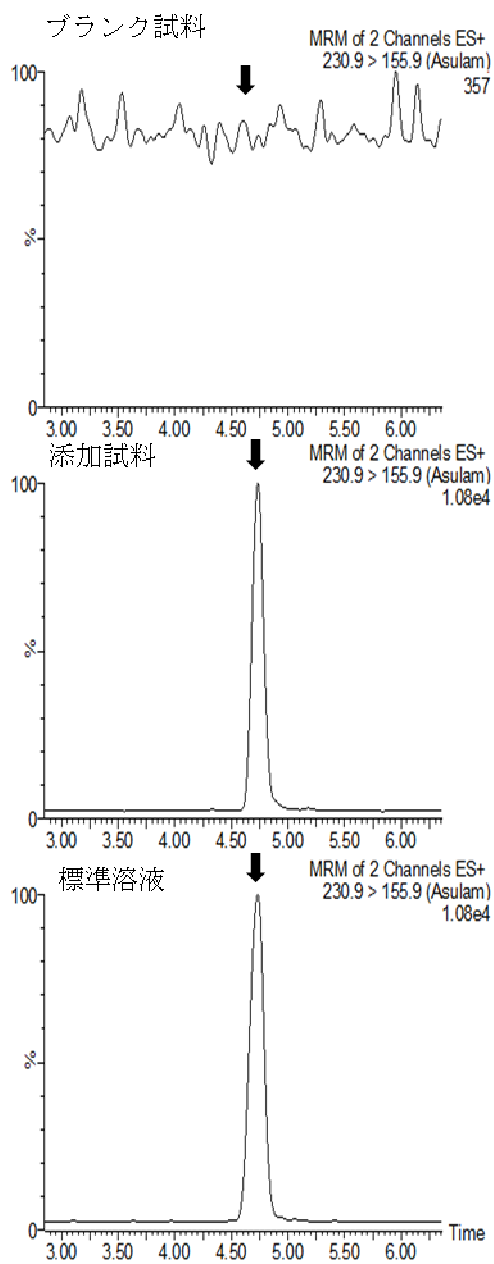


図 12 牛乳の SRM クロマトグラム  
 (アシュラム :  $m/z$  +230.9→155.9)  
 添加濃度 : 0.05 mg/kg

② 定量限界における代表的なクロマトグラム (定量限界濃度)

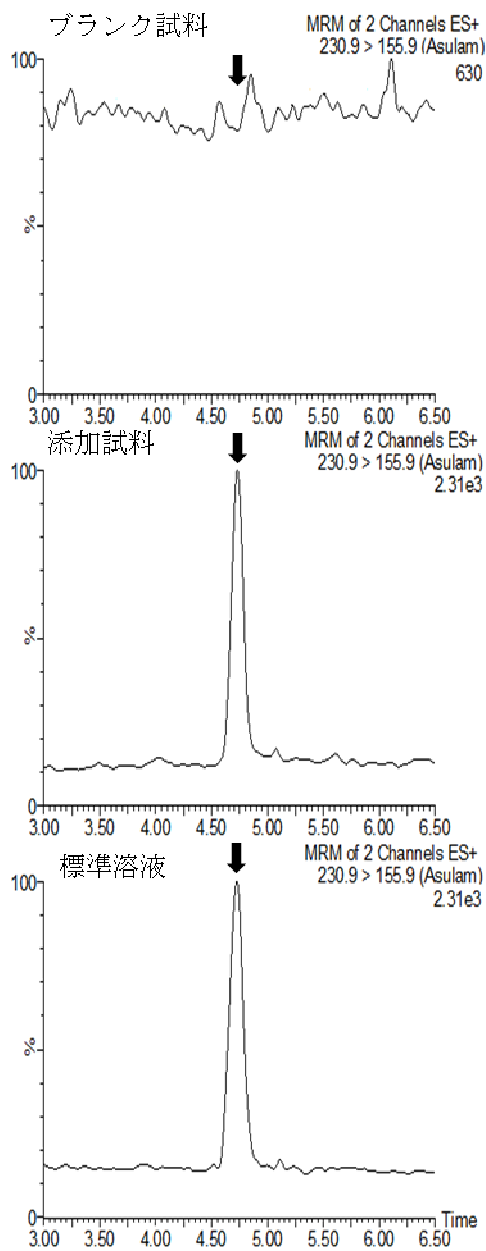


図 13 牛の筋肉の SRM クロマトグラム  
(アシュラム :  $m/z$  +230.9→155.9)  
添加濃度 : 0.01 mg/kg

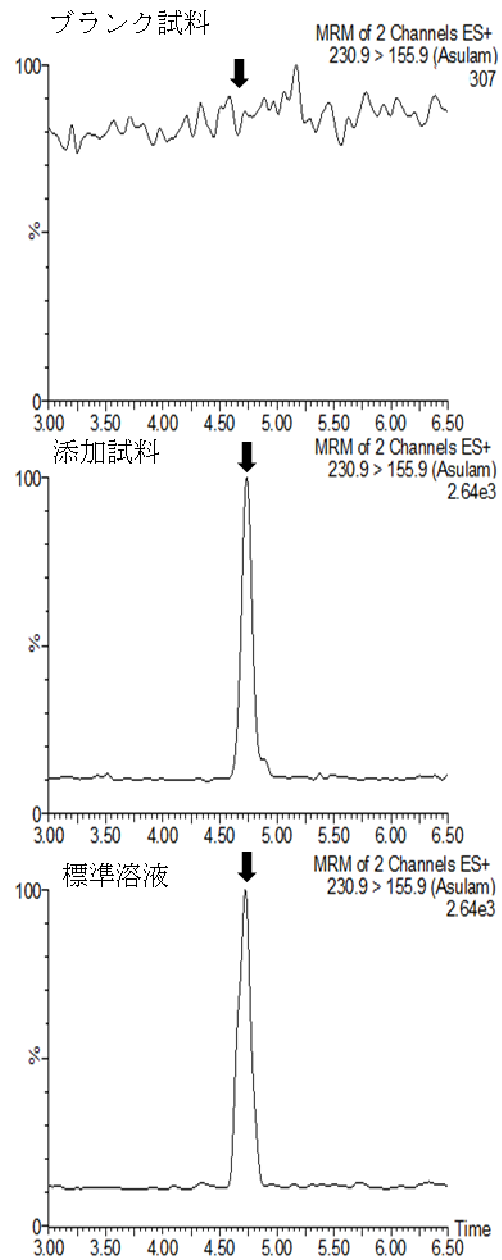


図 14 牛の脂肪の SRM クロマトグラム  
(アシュラム :  $m/z$  +230.9→155.9)  
添加濃度 : 0.01 mg/kg



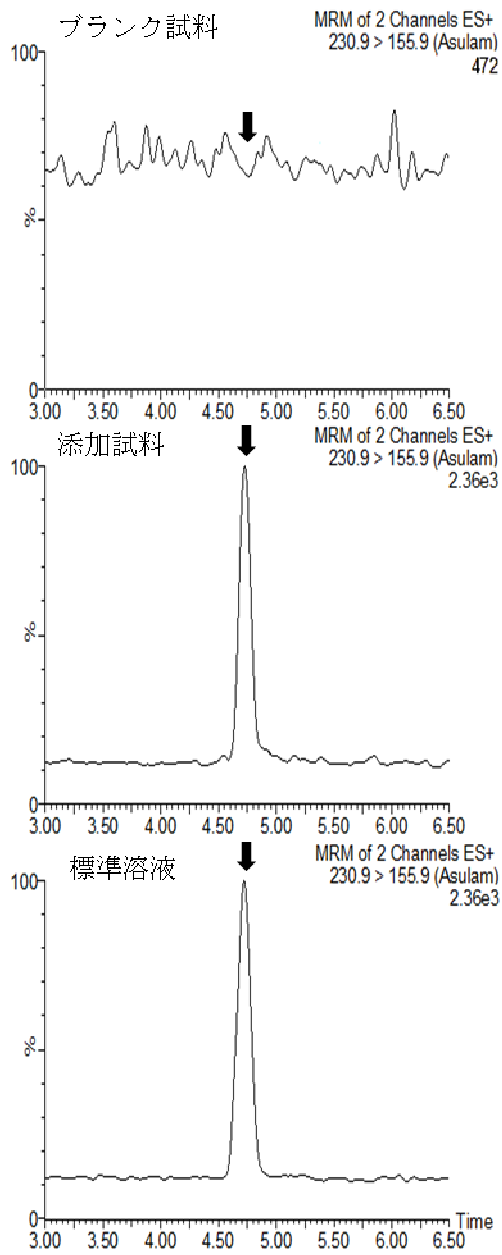


図 15 牛の肝臓の SRM クロマトグラム  
 (アシュラム :  $m/z$  +230.9→155.9)  
 添加濃度 : 0.01 mg/kg

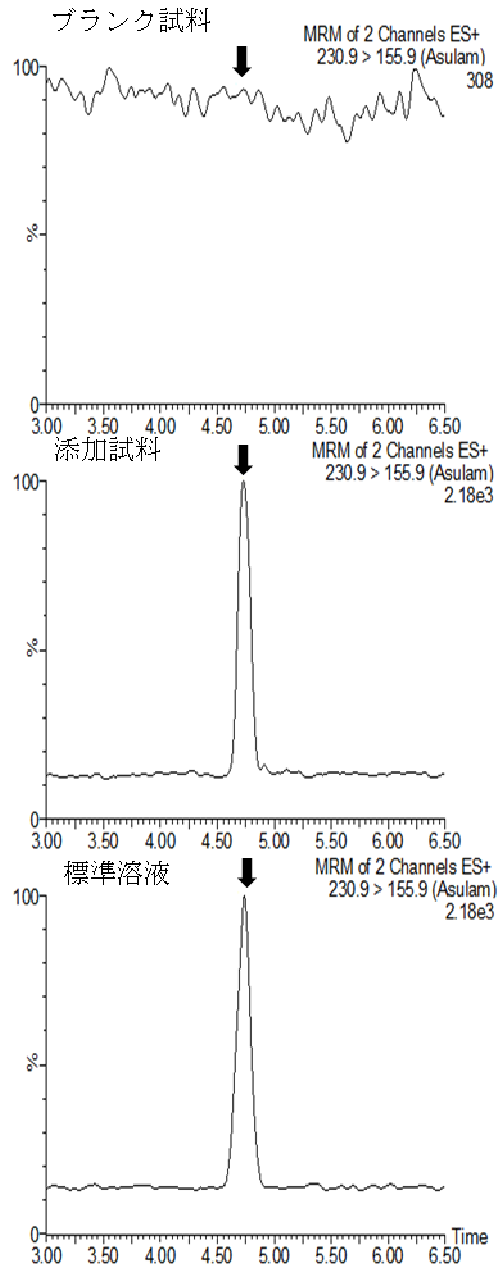


図 16 牛乳の SRM クロマトグラム  
 (アシュラム :  $m/z$  +230.9→155.9)  
 添加濃度 : 0.01 mg/kg

③ ブランク試料の代表的なトータルイオンクロマトグラム

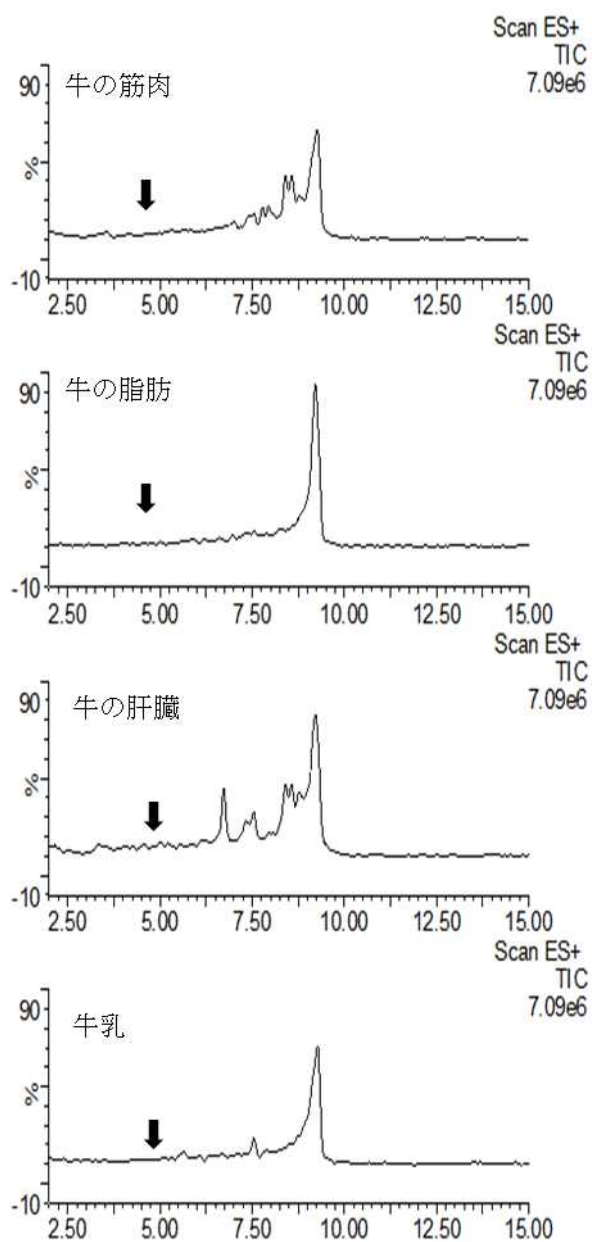


図 17 ブランク試料のトータルイオンクロマトグラム  
測定条件： CV=16 V (CV : corn voltage)  
(スキャン範囲： 50~1,000 m/z)