

※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。

## アザペロン試験法の検討結果

### [緒言]

#### 1. 目的及び試験法の検討方針

アザペロンは、ブチロフェノン系の鎮静薬である。海外では、動物用医薬品として、抗攻撃性、抗ストレス、鎮静及び麻酔といった広範囲の用途で豚に使用されているが、国内では使用されていない。ヒト用医薬品としては使用されていない。「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。

#### 1) 規制対象物質

アザペロン及びアザペロール

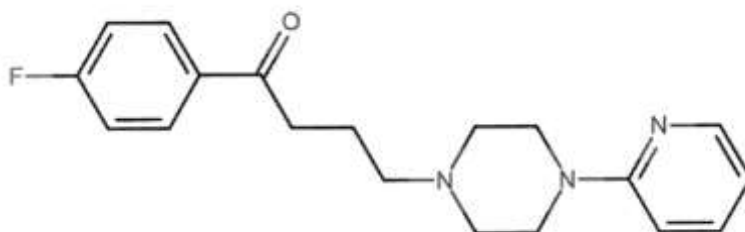
(基準値はアザペロン及びアザペロールの和)

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

##### 1) 構造式及び物理化学的性質

アザペロン

構造式：



化学式：C<sub>19</sub>H<sub>22</sub>FN<sub>3</sub>O

分子量：327.40

化学名 (IUPAC)：1-(4-fluorophenyl)-4-[4-(pyridin-2-yl)piperazin-1-yl]butan-1-one

外 観：白色～黄白色の結晶状粉末

融 点：92℃

溶解性：水：50 mg/L (25 °C)

DMSO 65 mg/mL、エタノール 34 mg/mL <sup>\*1</sup>

オクタノール/水分配係数：log P = 3.3

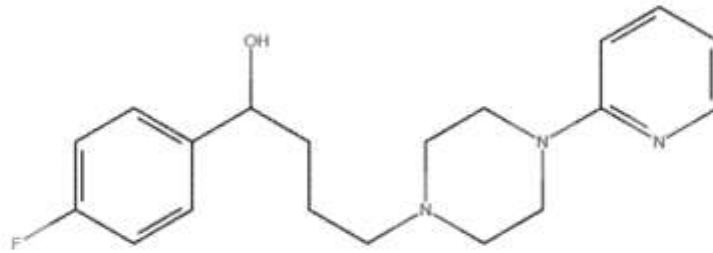
酸解離定数：pKa = 7.5、pKa(2) = 4.3

(出典：VSDB)

\*1: A Selleckchem

アザペロール

構造式：



化学式：C<sub>19</sub>H<sub>24</sub>FN<sub>3</sub>O

分子量：329.41

化学名（IUPAC）：1-(4-fluorophenyl)-4-(4-pyridin-2-ylpiperazin-1-yl)-butan-1-ol

外 観：類白色～淡黄色の固体 \*2

融 点：105~107 °C \*2

蒸気圧：4.05 × 10<sup>-10</sup> mm Hg (25°C)

溶解性：水：207.5 mg/L (25 °C)

オクタノール/水分配係数：log Kow =3.05

(出典：EPISuite Record last updated:Friday 13 November 2015)

\*2：Toronto Research Chemicals Inc.

## 2) 基準値

豚の筋肉 0.06 ppm

豚の脂肪 0.06 ppm

豚の肝臓 0.1 ppm

豚の腎臓 0.1 ppm

豚の食用部分 0.1 ppm

### [実験方法]

#### 1. 試料

##### 1) 購入先

うなぎは愛知県の業者から、しじみは都内の市場から、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豚の筋肉は可能な限り脂肪層を除き、細切均一化した。

②豚の脂肪は可能な限り筋肉部を除き、細切均一化した。

③豚の肝臓は、全体を細切均一化した。

④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。

⑤牛乳は全体をよく混合して均一化した。

⑥はちみつは百花蜜を使用し、加温（40°C以下）してから、よく混合して均一化した。

⑦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。

⑧しじみは、貝殻を除き、約5分間水切りを行った後細切均一化した。

## 2. 試薬・試液

### 1) 標準品

アザペロン標準品：純度99.4%（和光純薬工業製）

アザペロール標準品：純度98%（Toronto Research製）

### 2) 試薬

アセトニトリル、アセトン及び*n*-ヘキサン：残留農薬試験用（関東化学製）

アセトニトリル：高速液体クロマトグラフ用（関東化学製）

ギ酸：特級（関東化学製）

アンモニア水（28%）：試薬特級（小宗化学薬品製）

ケイソウ土：セライト545（関東化学製）

ギ酸アンモニウム：和光特級（和光純薬工業製）

シクロヘキシルシリル化シリカゲルミニカラム：

Bond Elut CH（充てん量1,000 mg、Agilent Technologies製）

### 3) 標準溶液、試液の調製方法

#### ①標準溶液の調製方法

標準原液：アザペロン標準品25 mgを精秤し、アセトンに溶かして500 mg/L溶液を調製した。アザペロールは5 mgを精秤し、アセトンに溶かして200 mg/L溶液を調製した。

検量線用混合標準溶液：アザペロン標準原液及びアザペロール標準原液を混合し、アセトニトリル、アンモニア水及び水（70：1：30）混液で希釈してアザペロン及びアザペロール0.000125～0.00375 mg/Lの濃度の混合標準溶液を調製した。

添加用標準溶液：アザペロン標準原液及びアザペロール標準原液を混合し、アセトンで希釈して0.2、1.2及び2 mg/Lの濃度の混合標準溶液を調製した。

#### ②試液の調製方法

50 mmol/Lギ酸アンモニウム緩衝液（pH 4.5）

ギ酸アンモニウム3.15 gを量り、水990 mLを加えて溶かし、ギ酸でpH 4.5に調整した後、水を加えて1,000 mLとした。

*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル

*n*-ヘキサン200 mL及びアセトニトリル1,000 mLを混合し、5分間振とうした後アセトニトリル層を採った。

アセトニトリル、アンモニア水及び水（70：1：30）混液

アセトニトリル700 mL、アンモニア水10 mL及び水300 mLを混合した。

## 3. 装置

ホモジナイザー：ウルトラタラックスT-25ベーシック（イカ・ジャパン製）

ロータリーエバポレーター：R-200（柴田科学製）等

### LC-MS/MS

	型式	会社
MS 装置	API-2000	AB SCIEX
LC 装置	Agilent1100	Agilent Technologies
データ処理	Analyst	AB SCIEX

#### 4. 測定条件

LC 条件																					
カラム	Inertsil ODS-3 内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 4 μm : ジーエルサイエンス製																				
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 : 50 mmol/L ギ酸アンモニウム緩衝液 (pH 4.5) 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>0.0</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>10</td> <td>60</td> <td>40</td> </tr> <tr> <td>16</td> <td>60</td> <td>40</td> </tr> <tr> <td>16.1</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>21</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> </tbody> </table>			時間 (分)	A液 (%)	B液 (%)	0.0	90	10	10	60	40	16	60	40	16.1	5	95	21	5	95
時間 (分)	A液 (%)	B液 (%)																			
0.0	90	10																			
10	60	40																			
16	60	40																			
16.1	5	95																			
21	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	ESI (+)																				
キャピラリ電圧 (V)	4000																				
脱溶媒温度 (°C)	500																				
脱溶媒ガス	窒素 10 psi																				
コリジョンガス	窒素																				
定量イオン (m/z)	アザペロン +328→165[コーン電圧 : 16 (V)、コリジョンエネルギー : 29 (eV) ] アザペロール +330→121[コーン電圧 : 36 (V)、コリジョンエネルギー : 37 (eV) ]																				
定性イオン (m/z)	アザペロン +328→123[コーン電圧 : 16 (V)、コリジョンエネルギー : 43 (eV) ] アザペロール +330→149[コーン電圧 : 36 (V)、コリジョンエネルギー : 39 (eV) ]																				
保持時間 (min)	アザペロン : 14.3、アザペロール : 13.1																				

#### 5. 定量

アザペロン標準品をアセトンに溶かして500 mg/Lの標準原液を調製した。アザペロール標準品をアセトンに溶かして200 mg/Lの標準原液を調製した。この溶液をアセトニトリル、アンモニア水及び水 (70 : 1 : 30) 混液で希釈し、0.000125、0.0001875、0.00025、0.0003125、0.000375、0.000625、0.00075、0.001125、0.00125、0.0015、0.001875、0.00225、0.0025、0.003125及び0.00375 mg/Lの濃度の標準溶液を調製した。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、得られたピーク面積と作成した検量線からアザペロン及びアザペロールの量を算出した。

#### 6. 添加試料の調製

2. 3) で調製した添加用混合標準溶液を使用した。

豚の筋肉及び豚の脂肪 (添加濃度 : 0.06 ppm相当) : 試料10.0 gに添加用混合標準溶液1.2 mg/Lを0.5 mL添加しよく混合した後、30分間放置した。

豚の肝臓 (添加濃度 : 0.1 ppm) : 試料10.0 gに添加用混合標準溶液2 mg/Lを0.5 mL添加しよく混合した後、30分間放置した。

鶏卵、牛乳、はちみつ、うなぎ及びしじみ (添加濃度 : 0.01 ppm) : 試料10.0 gに添加用混合標準溶液

0.2 mg/Lを0.5 mL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

アザペロン及びアザペロールを試料からアセトン抽出し、アセトニトリル/ヘキサン分配で脱脂した（はちみつの場合は省略）。シクロヘキシルシリル化シリカゲルミニカラムで精製し、LC-MS/MSで定量及び確認した。

### 1) 抽出

#### ①はちみつ以外の場合

試料10.0 gを200 mL遠心管に量り採り、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（直径60 mm、No. 4、桐山製作所製）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た後、上記と同様にろ過した。得られたろ液を合わせて、アセトンで正確に200 mLとした。この溶液から正確に5 mLを分取し100 mL遠心管に採り、ロータリーエバポレーターを用いて40℃以下で約1 mLまで濃縮した後、*n*-ヘキサン30 mLを用いて100 mL分液漏斗に移し、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル30 mLで2回振とう抽出した。抽出液を合わせ、水10 mLを加えてロータリーエバポレーターを用いて40℃以下で約10 mLまで濃縮した。

#### ②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（直径60 mm、No. 4、桐山製作所製）を用いて吸引ろ過し、200 mL容メスフラスコに採取した。ろ紙上の残留物に水10 mL及びアセトン50 mLを加えてホモジナイズした後、上記と同様にろ過した。得られたろ液を合わせて、アセトンで正確に200 mLとした。この溶液から正確に5 mLを分取し100 mL遠心管に採り、ロータリーエバポレーターを用いて40℃以下で約1 mLまで濃縮した後水10 mLを加えた。

### 2) 精製

シクロヘキシルシリル化シリカゲルミニカラム [Bond Elut CH (1,000 mg) ] にアセトニトリル及び水各5 mLを順次注入し、流出液は捨てた。シクロヘキシルシリル化シリカゲルミニカラムに1) で得られた濃縮液を注入した後アセトニトリル10 mLを注入し、流出液は捨てた。次いで、アセトニトリル、アンモニア水及び水（70 : 1 : 30）混液10 mLを注入し、溶出液を10 mL容メスフラスコに採り、アセトニトリル、アンモニア水及び水（70 : 1 : 30）混液で正確に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]

①はちみつ以外

秤 取

↓ 試料10.0 g

アセトン抽出

- | アセトン100 mLを加え、ホモジナイズ
  - | 吸引ろ過
  - | 残留物にアセトン50 mLを加え、ホモジナイズ
  - | 吸引ろ過
  - | ろ液を合わせて、アセトンで正確に200 mLとする
- ↓ 抽出液5 mL分取

濃 縮

↓ 約1 mLまで減圧濃縮

アセトニトリル/ヘキサン分配

- | *n*-ヘキサン30 mL
  - | *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル30 mLを加え、5分間振とう
  - | アセトニトリル層を採る
  - | *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル30 mLを加え、5分間振とう
  - | アセトニトリル層を採り合わせる
- ↓ 水10 mLを加える

濃 縮

↓ 約10 mLまで減圧濃縮

シクロヘキシルシリル化シリカゲルミニカラム (1,000 mg) 精製

- | アセトニトリル及び水各5 mLでコンディショニング
  - | 全量注入
  - | アセトニトリル10 mLで洗浄
  - | アセトニトリル、アンモニア水及び水 (70 : 1 : 30) 混液10 mLで溶出
  - | アセトニトリル、アンモニア水及び水 (70 : 1 : 30) 混液で正確に10 mLとし、
- ↓ 試験溶液とする

LC-MS/MS定量

10 µL注入

## ②はちみつ

### 秤 取

↓ 試料10.0 gに水20 mLを加え溶解

### アセトン抽出

- | アセトン100 mLを加え、ホモジナイズ
  - | 吸引ろ過
  - | 残留物に水10 mL及びアセトン50 mLを加え、ホモジナイズ
  - | 吸引ろ過
  - | ろ液を合わせて、アセトンで正確に200 mLとする
- ↓ 抽出液5 mL分取

### 濃 縮

↓ 約1 mLまで減圧濃縮した後水10 mLを加える

### シクロヘキシルシリル化シリカゲルミニカラム (1,000 mg) 精製

- | アセトニトリル及び水各5 mLでコンディショニング
  - | 全量注入
  - | アセトニトリル10 mLで洗浄
  - | アセトニトリル、アンモニア水及び水 (70 : 1 : 30) 混液10 mLで溶出
  - | アセトニトリル、アンモニア水及び水 (70 : 1 : 30) 混液で正確に10 mLとし、
- ↓ 試験溶液とする

### LC-MS/MS定量

10 µL注入

## 8. マトリックス添加標準溶液の調製

### 1) 定量限界相当濃度 (定量限界の推定用)

豚の筋肉、豚の脂肪及び豚の肝臓はブランク試験溶液から0.5 mL分取し溶媒を除去した後、0.00025 mg/Lの検量線用混合標準溶液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確認用)

豚の筋肉及び豚の脂肪はブランク試験溶液から0.5 mL分取し溶媒を除去した後、0.0015 mg/Lの検量線用混合標準溶液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。豚の肝臓は、ブランク試験溶液から0.5 mL分取し溶媒を除去した後、0.0025 mg/Lの検量線用混合標準溶液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。鶏卵、牛乳、はちみつ、うなぎ及びしじみは、ブランク試験溶液から0.5 mL分取し溶媒を除去した後、0.00025 mg/Lの検量線用混合標準溶液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。

## [結果及び考察]

### 1. 測定条件の検討

#### 1) MS 条件の検討

アザペロン及びアザペロールはESI (+) モードでの測定が可能であった。アザペロンのESI (+) モード測定時のマススペクトルを図1に示した。その結果から、基準ピークとして328が得られたので、アザペロンのプロトン付加分子 ( $m/z$  328  $[M+H]^+$ ) をプリカーサーイオンとした。また、 $m/z$  328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2に示した。強度として $m/z$  165が強く、次いで $m/z$  123であったため、 $m/z$  165を定量用イオン、 $m/z$  123を定性用イオンとした。

アザペロールのESI (+) モード測定時のマススペクトルを図3に示した。その結果から、基準ピークとして330が得られたので、アザペロールのプロトン付加分子 ( $m/z$  330  $[M+H]^+$ ) をプリカーサーイオンとした。また、 $m/z$  330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4に示した。強度として $m/z$  121が強く、次いで $m/z$  149であったため、 $m/z$  121を定量用イオン、 $m/z$  149を定性用イオンとした。

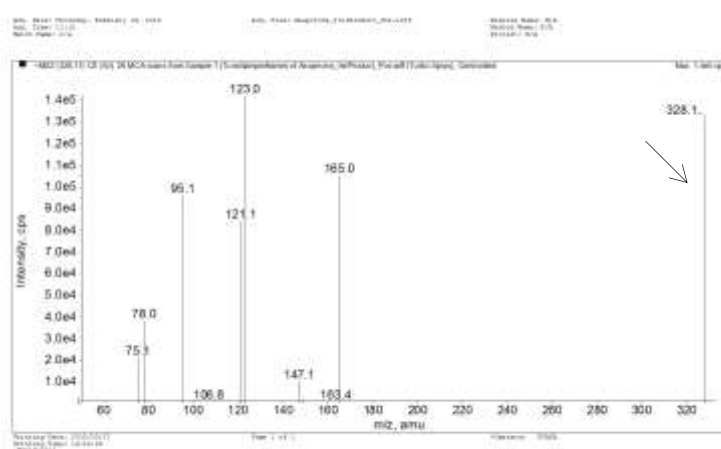


図1 アザペロンのマススペクトル  
スキャン範囲：50~330  $m/z$   
測定条件：ESI+、CV=16 (CV=コーン電圧)

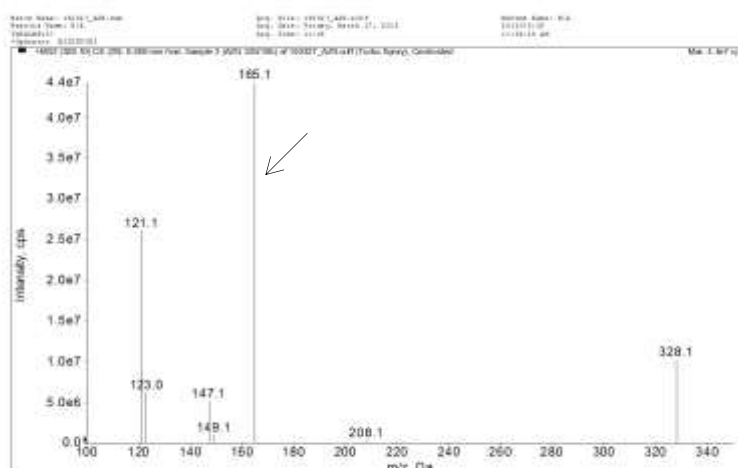


図2-1 アザペロンのプリカーサーイオン $m/z$  328のプロダクトイオンスペクトル (定量用)  
スキャン範囲：100~350  $m/z$   
測定条件：ESI+、CV=16、CE=29 (CV=コーン電圧、CE=コリジョンエネルギー)



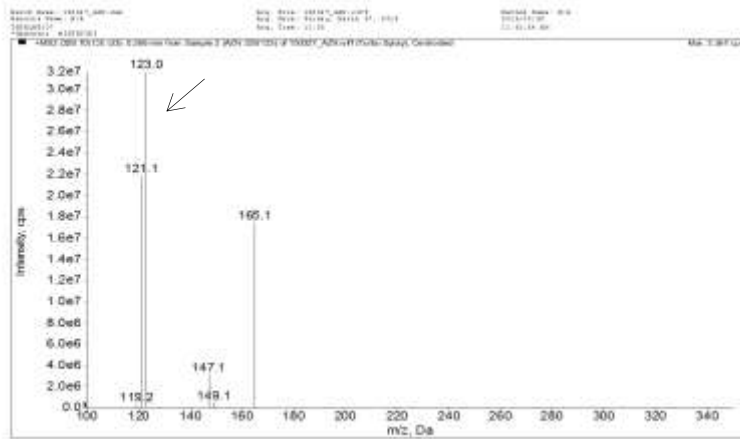


図2-2 アザペロンのプリカーサーイオン $m/z$  328のプロダクトイオンスペクトル (定性用)  
 スキャン範囲 : 100~350  $m/z$   
 測定条件 : ESI+, CV=16、CE=43 (CV=コーン電圧、CE=コリジョンエネルギー)

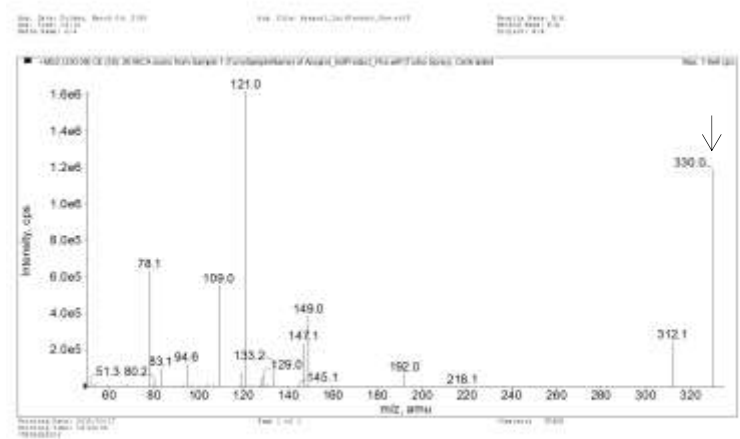


図3 アザペロールのマススペクトル  
 スキャン範囲 : 50~330  $m/z$   
 測定条件 : ESI+, CV=36 (CV=コーン電圧)

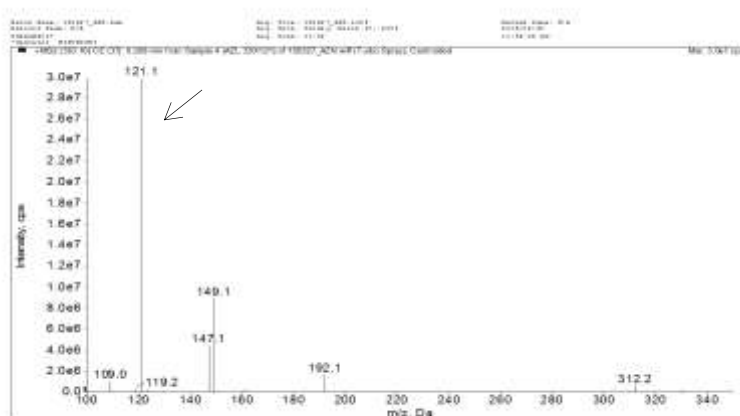


図4-1 アザペロールのプリカーサーイオン $m/z$  330のプロダクトイオンスペクトル (定量用)  
 スキャン範囲 : 100~350  $m/z$   
 測定条件 : ESI+, CV=36、CE=37 (CV=コーン電圧、CE=コリジョンエネルギー)



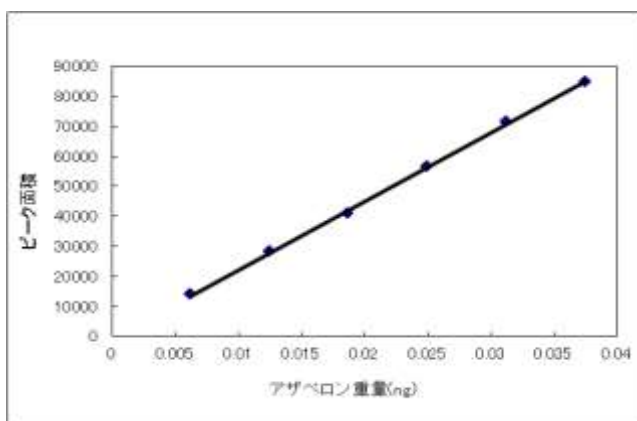
図4-2 アザペロールのプリカーサーイオン $m/z$  330のプロダクトイオンスペクトル（定性用）  
 スキャン範囲：100～350  $m/z$   
 測定条件：ESI+、CV=36、CE=39（CV=コーン電圧、CE=コリジョンエネルギー）

## 2) LC条件の検討

分離カラムとしてInertsil ODS-3（内径2.1 mm、長さ150 mm、粒子径4  $\mu\text{m}$ ）を用い、移動相条件について、アセトニトリル及び0.1 vol%ギ酸並びに2 mmol/L酢酸アンモニウムを用いて検討を行ったところ、良好なピーク形状を得ることが出来なかった。アセトニトリル及び50 mmol/Lギ酸アンモニウム緩衝液（pH 4.5）を用いて検討を行ったところ、ピーク形状、分離、再現性及び感度のいずれも良好な結果が得られたので、カラムはInertsil ODS-3（内径2.1 mm、長さ150 mm、粒子径4  $\mu\text{m}$ ）を、移動相には、アセトニトリル及び50 mmol/Lギ酸アンモニウム緩衝液（pH 4.5）を用い、アセトニトリル及び50 mmol/Lギ酸アンモニウム緩衝液（pH 4.5）（1：9）から（2：3）までの濃度勾配を10分間で行い、（2：3）で6分間保持した後、（19：1）で5分間保持することとした。

## 3) 検量線

図5にアザペロン及びアザペロールの検量線の例を示した。0.000625 mg/L (0.00625 ng) ～0.00375 mg/L (0.0375 ng)、0.000375 mg/L (0.00375 ng) ～0.00225 mg/L (0.0225 ng) 及び0.000125 mg/L (0.00125 ng) ～0.000375 mg/L (0.00375 ng) の濃度範囲で作成した検量線の決定係数は0.996以上であり良好な直線性を示した。



データ処理装置設定条件の一例  
 データ処理ソフトウェア（メーカー）：Analyst  
 （AB SCIEX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：0.00625 ng～0.0375 ng  
 $y = 2282258x - 525.1$   
 $R^2 = 0.9995$

図 5-1 アザペロン検量線例（ $m/z$  328→165）

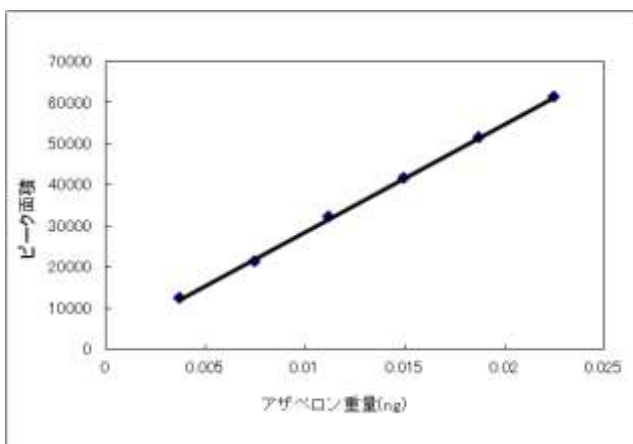


図 5-2 アザペロン検量線例 ( $m/z$  328→165)

データ処理装置設定条件の一例  
 データ処理ソフトウェア (メーカー) : Analyst  
 (AB SCIEX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 : 0.00375 ng~0.0225 ng  
 $y=2623954x+2223.3$   
 $R^2=0.9996$

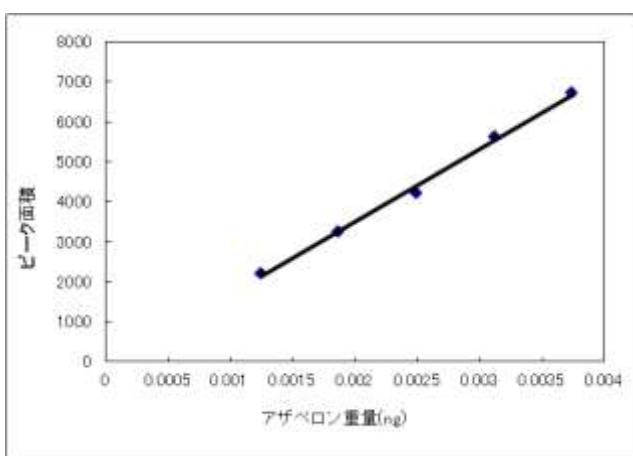


図 5-3 アザペロン検量線例 ( $m/z$  328→165)

データ処理装置設定条件の一例  
 データ処理ソフトウェア (メーカー) : Analyst  
 (AB SCIEX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 : 0.00125 ng~0.00375 ng  
 $y=1822080x-153.7$   
 $R^2=0.9961$

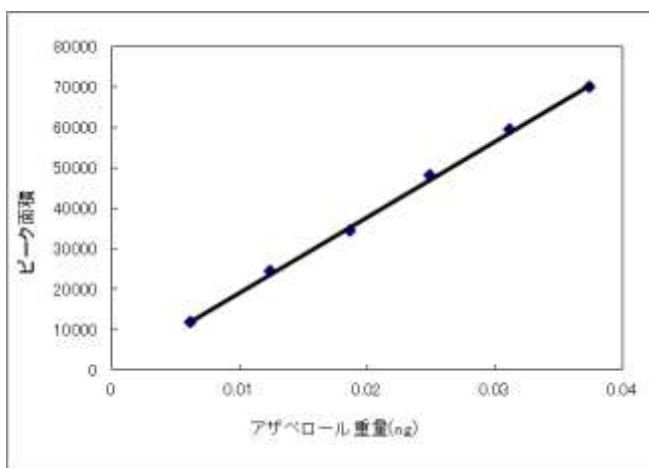


図 5-4 アザペロール検量線例 ( $m/z$  330→121)

データ処理装置設定条件の一例  
 データ処理ソフトウェア (メーカー) : Analyst  
 (AB SCIEX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 : 0.00625 ng~0.0375 ng  
 $y=1872901x+341.8$   
 $R^2=0.9988$

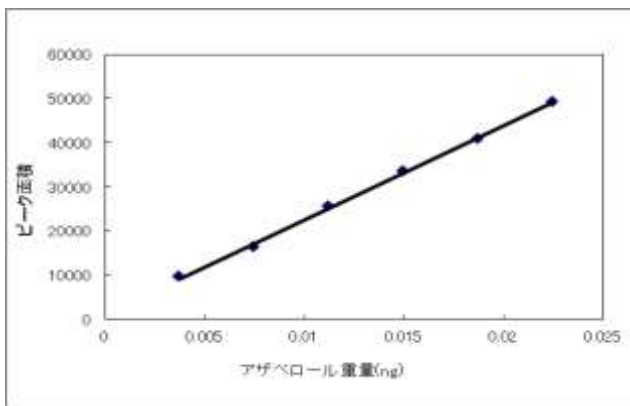


図 5-5 アザペロール検量線例 ( $m/z$  330→121)

データ処理装置設定条件の一例  
 データ処理ソフトウェア（メーカー）：Analyst  
 （AB SCIEX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：0.00375 ng～0.0225 ng  
 $y=2128133x+1277.5$   
 $R^2=0.9988$

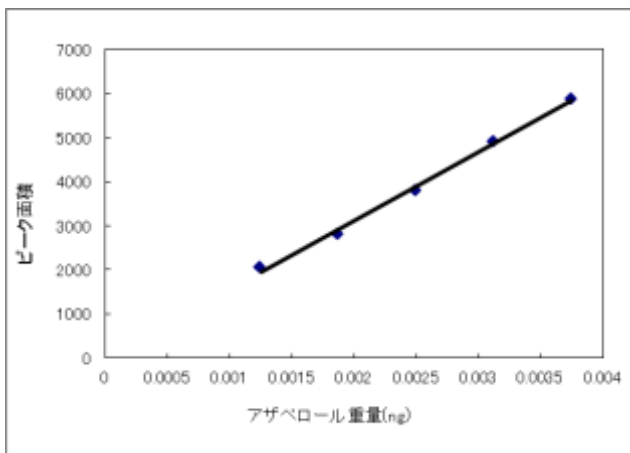


図 5-6 アザペロール検量線例 ( $m/z$  330→121)

データ処理装置設定条件の一例  
 データ処理ソフトウェア（メーカー）：Analyst  
 （AB SCIEX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：0.00125 ng～0.00375 ng  
 $y=1555952x-2.6$   
 $R^2=0.9961$

#### 4) 定量限界

定量限界の算出結果を以下に示した。

$$0.01 \text{ mg/kg} [(10 \text{ mL}/0.25 \text{ g}^*) \times (0.0025 \text{ ng}/10 \text{ }\mu\text{L})]$$

$$* 10.0 \text{ g} \times 5 \text{ mL}/200 \text{ mL}$$

## 2. 試験溶液調製法の検討

### 1) 抽出方法の検討

抽出溶媒として *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル及び *n*-ヘキサンの混液並びにアセトンを用いて抽出効率の比較を行った。豚肝臓試料からの抽出率の調査を行った結果を表1に示した。アセトニトリルよりアセトンを抽出溶媒とした方が回収率が良好であったため、抽出溶媒としてアセトンを選択した。

表 1 豚の肝臓試料からの抽出率 (%)

	アセトン100+50 mL	<i>n</i> -ヘキサン50 mL及び	
		<i>n</i> -ヘキサン飽和アセトニトリル100+50 mL	
アザペロン	91	80	
アザペロール	95	87	

添加量：各1  $\mu\text{g}$

豚の肝臓試料10 g共存下

マトリックス標準溶液中のアザペロン及びアザペロールの面積値を100%として算出

## 2) 濃縮操作の検討

アザペロン及びアザペロールについて濃縮乾固操作による回収率の低下があるか検討した。アザペロン及びアザペロール標準溶液0.01 µgを40℃以下で減圧濃縮し乾固後1分放置したものをアセトニトリル2 mLに再溶解した結果の回収率を表2に示した。標準溶液のみでは濃縮乾固操作による回収率の低下は認められなかったが、豚の肝臓試料共存下では乾固後再溶解すると低回収となることもあり、安定した回収率を得ることができなかった。試料共存下で濃縮操作を行った際のみ回収率の低下が起こることから、減圧濃縮による損失でなく、乾固した後試料への吸着等の影響で再溶解がうまく行えていないと推測された。以上より、試験操作で濃縮操作を行う際には試験溶液を乾固させない方法を採用することとした。

表2 濃縮操作時の乾固の有無による各成分の回収率 (%)

	標準溶液	豚の肝臓試料共存下	
		試行 1	試行 2
アザペロン	92	81	36
		59 (平均値)	
アザペロール	97	92	58
		75 (平均値)	

供試量：各0.01 µg

## 3) 脱脂操作の検討

脱脂方法としてアセトニトリル/ヘキサン分配について検討した。アザペロン及びアザペロール各0.04 µgを添加し、*n*-ヘキサン30 mLに*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル30 mLで3回振とう抽出を行った結果を表3に示した。アザペロン及びアザペロールはいずれも2回の抽出で抽出できたことから、分配操作は*n*-ヘキサン30 mLに*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル30 mLで2回抽出することとした。なお、濃縮乾固操作時の損失を防ぐため、アセトニトリルの濃縮操作前には水10 mLを加えてから濃縮することとした。

表3 アセトニトリル/ヘキサン分配の検討 (%)

	<i>n</i> -ヘキサン飽和アセトニトリル			合計
	30 mL	30 mL	30 mL	
	(1回目)	(2回目)	(3回目)	
アザペロン	91	5	0	96
アザペロール	90	4	0	94

添加量：各 0.04 µg

## 4) 精製方法の検討

精製方法として、シクロヘキシルシリル化シリカゲルミニカラム、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム及びベンゼンスルホニルプロピルシリル化シリカゲルミニカラムによる精製を検討し、濃縮操作を必要とせず高い精製効果の得られたシクロヘキシルシリル化シリカゲルミニカラムによる精製を採用することとした。以下に検討事項について示した。

### ①シクロヘキシルシリル化シリカゲルミニカラム精製について

シクロヘキシルシリル化シリカゲルミニカラムを用いた精製を検討した。シクロヘキシルシリル化シリカゲルはエチルシリル化シリカゲル (C2) と同等の無極性相互作用を持つほか、シクロヘキシル基との相互作用によって、特定の化合物について独特の選択性を示す。アセトニトリル及び水各5 mLで予備洗浄した後、アザペロン及びアザペロール各0.05 µgをアセトン及び水 (3 : 7) 混液20 mLで負荷し、アセトニトリル20 mLで洗浄した後、アセトニトリル及びアンモニア水 (9 : 1) 混液で溶出したときの溶出状況を表4に示した。アザペロン及びアザペロールはアセトン及び水 (3 : 7) 混液20 mL並びにアセトニ

トリル20 mLでは溶出されず、アセトニトリル及びアンモニア水（9：1）混液10 mLで溶出された。

表4 シクロヘキシルシリル化シリカゲルミニカラムからの溶出状況①（%）

	アセトン及び 水（3：7）		アセトニトリル アセトニトリル及びアンモニア水 （9：1）		合計
	20 mL	20 mL	0-10 mL	10-20 mL	
	アザペロン	0	0	106	
アザペロール	0	0	106	0	106

Bond Elut CH、充てん量1,000 mg、Agilent technologies製  
添加量：各0.05 µg

更に精製効果を上げるため、シクロヘキシルシリル化シリカゲルミニカラムからの溶出溶媒のアセトニトリルの比率について検討した。アセトニトリル及び0.6%アンモニア水（アンモニア水を水で50倍に希釈したもの）各5 mLで予備洗浄した後、アザペロン及びアザペロール各0.05 µgをアセトニトリル及び0.6%アンモニア水混液で溶出したときの溶出状況を表5に示した。アザペロン及びアザペロールはアセトニトリル及び0.6%アンモニア水（3：2）混液（アセトニトリル60 vol%）10 mLで溶出されたが、試料共存下での溶出挙動にずれが起こる可能性を考慮して、アセトニトリル70 vol%で溶出することとした。

表5 シクロヘキシルシリル化シリカゲルミニカラムからの溶出状況②（%）

	アセトニトリル及び0.6%アンモニア水					合計
	(1：9)	(1：5)	(2：3)	(3：2)	(4：1)	
	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL	
アザペロン	0	0	22	77	0	99
アザペロール	0	0	67	34	0	101

Bond Elut CH、充てん量1,000 mg、Agilent technologies製  
添加量：各0.05 µg

次に、シクロヘキシルシリル化シリカゲルミニカラムから溶出に必要なアンモニア水濃度について検討を行った。アザペロン及びアザペロール各0.015 µgを添加し、溶出液の調製法をアセトニトリル、アンモニア水及び水（v/v/v）として、アンモニア水濃度について約0.1 vol%、0.5 vol%、1 vol%及び2 vol%でそれぞれ溶出を行った結果を表6に示した。アンモニア水濃度が0.1 vol%ではミニカラムの10-20 mL画分に溶出が認められ、溶出不十分であったが、アンモニア水濃度0.5 vol%以上であれば溶出ずれなく良好な溶出が確認された。以上より、シクロヘキシルシリル化シリカゲルミニカラムからはアセトニトリル、アンモニア水及び水（70：1：30）混液10 mLで溶出することとした。

表6 シクロヘキシルシリル化シリカゲルミニカラムからの溶出状況③（%）

溶出量（mL）	アセトニトリル、アンモニア水及び水（v/v/v）							
	(70：0.1：30)		(70：0.5：30)		(70：1：30)		(70：2：30)	
	0-10	10-20	0-10	10-20	0-10	10-20	0-10	10-20
アザペロン	42	54	100	0	107	0	101	3
アザペロール	47	49	95	0	109	0	97	0

Bond Elut CH 充てん量 1,000 mg、Agilent technologies 製  
添加量：各 0.015 µg

以上の検討結果を踏まえ、アセトニトリル及び水各5 mLで予備洗浄した後、アザペロン及びアザペロール各0.05 µgを水10 mLで負荷し、アセトニトリル10 mLで洗浄した後、アセトニトリル、アンモニア水及び水（70 : 1 : 30）混液で溶出したときの溶出状況を表7に示した。アザペロン及びアザペロールは水10 mL及びアセトニトリル10 mLでは溶出されず、アセトニトリル、アンモニア水及び水（70 : 1 : 30）混液10 mLで溶出されたため、本分析ではシクロヘキシルシリル化シリカゲルミニカラムから水10 mLで負荷し、アセトニトリル10 mLで洗浄を行った後アセトニトリル、アンモニア水及び水（70 : 1 : 30）混液10 mLで溶出することとした。

表7 シクロヘキシルシリル化シリカゲルミニカラムからの溶出状況④ (%)

	水 10 mL	アセトニトリル 10 mL	アセトニトリル、アンモニア水及び水 (70 : 1 : 30)		合計
			0-10 mL	10-20 mL	
アザペロン	0	0	95	0	95
アザペロール	0	0	94	0	94

Bond Elut CH、充てん量1,000 mg、Agilent technologies製  
添加量：各0.05 µg

②オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム精製について

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を検討した。アセトニトリル及び水各5 mLで予備洗浄した後、アザペロン及びアザペロール各0.05 µgを水10 mLで負荷した後、アセトニトリル及び水の混液各10 mLでオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムに順次負荷、溶出したときの溶出状況を表8に示した。アザペロン及びアザペロールはアセトニトリル及び水混液では溶出不十分であった。

そこで、アザペロン及びアザペロールの塩基性官能基の解離を抑えることを目的として、アセトニトリル及び0.6%アンモニア水各5 mLで予備洗浄した後、アザペロン及びアザペロール各0.05 µgをアセトニトリル及び0.6 vol%アンモニア水の混液各10 mLで順次負荷、溶出したときの溶出状況を表9に示した。アンモニア水を用いて塩基性下で溶出を行ったところ良好な回収率が得られた。次に、アセトニトリル及び0.6 vol%アンモニア水各5 mLで予備洗浄した後、アザペロン及びアザペロール各0.05 µgをアセトン及び0.6 vol%アンモニア水（1 : 4）混液25 mLで負荷し、アセトニトリル及びアンモニア水（7 : 3）10 mLで溶出したときの溶出状況を表10に示した。アザペロン及びアザペロールはアセトン及び0.6 vol%アンモニア水（1 : 4）混液25 mLでは溶出されず、アセトニトリル及びアンモニア水（7 : 3）10 mLで溶出された。しかし、うなぎ試料共存下で同様の溶出を行った際、10~20%程度のイオン化抑制がみられたため、より高い精製効果の得られたシクロヘキシルシリル化シリカゲルミニカラムを用いることとし、更なる検討は実施しなかった。

表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① (%)

	水 10 mL	アセトニトリル及び水				アセトニトリル 10 mL	合計
		(1 : 4) 10 mL	(2 : 3) 10 mL	(3 : 2) 10 mL	(4 : 1) 10 mL		
アザペロン	0	0	43	38	1	0	82
アザペロール	0	0	82	4	1	0	87

InertSep C18、充てん量1,000 mg、ジーエルサイエンス製  
添加量：各0.1 µg

表9 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② (%)

	アセトン及び 0.6 vol%アンモニア水 (1 : 4)		アセトニトリル及び0.6 vol%アンモニア水			合計
	25 mL	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL	
	アザペロン	0	0	96	0	
アザペロール	0	89	10	0	0	99

InertSep C18、充てん量1,000 mg、ジーエルサイエンス製  
 添加量：各0.05 µg

表10 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③ (%)

		アセトン及び 0.6 vol%アンモニア水 (1 : 4)		アセトニトリル及び 0.6 vol%アンモニア水 (7 : 3)		合計
		25 mL	0-10 mL	10-20 mL		
		アザペロン	標準溶液	0	96	
	うなぎ共存下	0	83 (0.85)	0	83	
アザペロール	標準溶液	0	98	0	98	
	うなぎ共存下	0	84 (0.87)	0	84	

InertSep C18、充てん量1,000 mg、ジーエルサイエンス製

添加量：各0.05 µg

うなぎ試料0.25 g相当共存下

( ) 内はマトリックス標準溶液の面積比

③ベンゼンスルホニルプロピルシリル化シリカゲルミニカラム精製について

イオン交換カラムであるベンゼンスルホニルプロピルシリル化シリカゲルミニカラムでの検討を行った。メタノール及び2 vol%ギ酸各10 mLで予備洗浄した後、アザペロン及びアザペロール各0.1 µgをアセトン及び2 vol%ギ酸 (2 : 5) 混液 14 mLに溶解、負荷し、各溶媒で溶出したときの溶出状況を表11に示した。アザペロン及びアザペロールは負荷液、水及びメタノールでは溶出せず、アンモニア水及びメタノール (1 : 99) 混液10 mLで溶出された。しかし、2) より、アザペロン及びアザペロールは濃縮、再溶解の操作において回収率の低下の懸念があり、濃縮操作を行わない試験法が適当と思われるため、濃縮操作が必要となる本カラム精製は不採用とし、更なる検討は実施しなかった。

表11 ベンゼンスルホニル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 (%)

	アセトン及び 2 vol%ギ酸 (2 : 5)		水	メタノール	アンモニア水及びメタノール (1 : 99)		合計
	14 mL	5 mL	10 mL	0-10 mL	10-20 mL		
	アザペロン	0	0	0	95	4	
アザペロール	0	0	0	98	3	101	

Bond Elut SCX、充てん量500 mg、Agilent Technologies製

添加量：各0.1 µg

3. 添加回収試験



豚の筋肉、豚の脂肪、豚の肝臓、鶏卵、牛乳、はちみつ、うなぎ及びしじみの8食品を用いて、[実験方法] 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代表的なクロマトグラムを図6及び8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代表的なトータルイオンクロマトグラムを図10に示した。

### 1) 選択性

選択性の結果を表12に示した。検討した何れの試料においてもアザペロン及びアザペロールの定量を妨害するようなピークは認められず、選択性は良好であった。

表12 選択性の評価

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (mg/kg)	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 (b)	面積(高さ)比 (a)/(b)			
1	アザペロン	豚の筋肉	0.01	0.06	0.06	基準値	0.06	< 0.100	面積	0		#DIV/0!	○	
		豚の脂肪	0.01	0.06	0.06	基準値	0.06	< 0.100	面積	0		#DIV/0!	○	
		豚の肝臓	0.01	0.1	0.1	基準値	0.1	< 0.100	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!	○	
		牛乳	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!	○	
		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!	○	
2	アザペロール	豚の筋肉	0.01	0.06	0.06	基準値	0.06	< 0.100	面積	0		#DIV/0!	○	
		豚の脂肪	0.01	0.06	0.06	基準値	0.06	< 0.100	面積	0		#DIV/0!	○	
		豚の肝臓	0.01	0.1	0.1	基準値	0.1	< 0.100	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!	○	
		牛乳	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!	○	
		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!	○	

\*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。

### 2) 真度、精度及び定量限界

真度及び併行精度の検討結果を表13に示した。アザペロンの真度は96~111%、併行精度は4~14%であり、目標値を十分に満たした。アザペロールの真度は91~109%、併行精度は4~16%であり、目標値を十分に満たした。鶏卵、牛乳、はちみつ、うなぎ及びしじみについては、アザペロンのS/N比の平均値は62~65、アザペロールのS/N比の平均値は70~107でありS/N≥10を十分に満たした。

添加濃度が定量限界濃度と異なる試料について、定量限界の推定を行った結果を表14に示した。また、定量限界の推定における代表的なクロマトグラムを図7及び9に示した。アザペロンS/N比の平均値は72~228、アザペロールS/N比の平均値は75~291でありS/N≥10を十分に満たした。

表13 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 (mg/kg)	基準値 <sup>1</sup> (ppm)	添加濃度 (ppm)	定量限界の評価 <sup>2</sup>	検査線					回収率(%)					真度 (%)	併行精度 (RSD%)	S/N比 <sup>3</sup>			備考
							横き	切片	r <sup>2</sup> 値	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5	Max.	Mn.			平均値			
1	アザペロン	豚の筋肉	0.01	0.06	0.06	*	2623954	2223	0.9996	105	112	116	116	103	110.4	5.5	—	—	#DIV/0!			
		豚の脂肪	0.01	0.06	0.06	*	2623954	2223	0.9996	93.0	83.6	106	117	116	103.1	14.1	—	—	#DIV/0!			
		豚の肝臓	0.01	0.1	0.1	*	2262258	-625	0.9995	93.3	86.1	101	102	96.0	95.7	6.7	—	—	#DIV/0!			
		鶏卵	0.01	0.01	0.01		1610784	111	0.9995	104	104	102	108	96.2	102.8	4.2	86.0	42.3	64.2			
		牛乳	0.01	0.01	0.01		1600752	233	0.9976	115	107	101	102	102	105.4	5.6	66.6	56.6	61.6			
		はちみつ	0.01	0.01	0.01		1822080	-154	0.9961	103	105	104	107	97.4	103.3	3.5	68.5	55.6	62.1			
		うなぎ	0.01	0.01	0.01		1610784	111	0.9995	99.7	115	119	109	113	111.1	6.6	69.1	56.0	62.6			
		しじみ	0.01	0.01	0.01		1822080	-154	0.9961	106	106	97.5	101	115	105.1	6.3	70.4	59.1	64.8			
2	アザペロール	豚の筋肉	0.01	0.06	0.06	*	2128133	1277	0.9988	100	101	108	106	96.2	102.2	4.6	—	—	#DIV/0!			
		豚の脂肪	0.01	0.06	0.06	*	2128133	1277	0.9988	83.1	76.9	102	111	108	96.2	15.9	—	—	#DIV/0!			
		豚の肝臓	0.01	0.1	0.1	*	1872901	342	0.9988	91.2	83.4	91.9	96.7	90.9	90.8	5.3	—	—	#DIV/0!			
		鶏卵	0.01	0.01	0.01		1163472	475	0.9970	96.0	107	102	115	105	105.0	6.6	112.3	79.8	96.1			
		牛乳	0.01	0.01	0.01		1442176	-255	0.9920	118	112	97.5	107	97.9	106.5	8.4	76.8	63.5	70.2			
		はちみつ	0.01	0.01	0.01		1555952	-3	0.9961	103	86.7	89.2	97.1	95.1	94.2	6.9	77.7	67.7	72.7			
		うなぎ	0.01	0.01	0.01		1163472	475	0.9970	113	111	95.0	115	110	108.8	7.3	116.0	98.5	107.3			
		しじみ	0.01	0.01	0.01		1555952	-3	0.9961	95.2	103	93.1	92.5	95.5	95.9	4.4	76.8	72.7	74.8			

\*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(Mn.)のそれぞれのS/N比を求める。

表14 定量限界の推定

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (mg/kg)	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		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											
1	アザペロン	豚の筋肉	0.01	0.06	0.06	*	0.00025	面積	0	7393	6696	7044.5	6842	7414	7128.0	296.4	159.8	98.8	228.1							
		豚の脂肪	0.01	0.06	0.06	*	0.00025	面積	0	8990	8749	8869.5	8182	8104	8143.0	218.5	209.8	108.9	214.2							
		豚の肝臓	0.01	0.1	0.1	*	0.00025	面積	0	5261	5541	5401.0	4947	5257	5102.0	72.3	71.6	105.9	72.0							
		鶏卵	0.01	0.01	0.01								0.0			0.0			#DIV/0!	#DIV/0!						
		牛乳	0.01	0.01	0.01								0.0			0.0			#DIV/0!	#DIV/0!						
		はちみつ	0.01	0.01	0.01								0.0			0.0			#DIV/0!	#DIV/0!						
		うなぎ	0.01	0.01	0.01								0.0			0.0			#DIV/0!	#DIV/0!						
		しじみ	0.01	0.01	0.01								0.0			0.0			#DIV/0!	#DIV/0!						
2	アザペロール	豚の筋肉	0.01	0.06	0.06	*	0.00025	面積	0	5485	5138	5311.5	5294	5608	5451.0	303.5	278.5	97.4	291.0							
		豚の脂肪	0.01	0.06	0.06	*	0.00025	面積	0	6232	6299	6265.5	6001	5801	5901.0	172.3	166.0	106.2	169.2							
		豚の肝臓	0.01	0.1	0.1	*	0.00025	面積	0	4338	4818	4578.0	3970	4059	4014.5	61.6	88.5	114.0	75.1							
		鶏卵	0.01	0.01	0.01								0.0			0.0			#DIV/0!	#DIV/0!						
		牛乳	0.01	0.01	0.01								0.0			0.0			#DIV/0!	#DIV/0!						
		はちみつ	0.01	0.01	0.01								0.0			0.0			#DIV/0!	#DIV/0!						
		うなぎ	0.01	0.01	0.01								0.0			0.0			#DIV/0!	#DIV/0!						
		しじみ	0.01	0.01	0.01								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。

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15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。アザペロンの面積比は0.92~1.03、アザペロールの面積比は0.95~1.07であり、測定への影響はないものと考えられた。

添加回収試験における真度を表15で求めたピーク面積比で除して補正真度を求め、表16に示した。補正真度はアザペロン93~114%、アザペロール90~109%であり、試料マトリックスの測定への影響と真度との間に矛盾は見られなかった。

表15 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 (mg/kg)	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		
1	アザペロン	豚の筋肉	0.01	0.06	0.06	0.0015	面積	0	44152	45421	44786.5	46473	46338	46405.5	0.97	
		豚の脂肪	0.01	0.06	0.06	0.0015	面積	0	46197	43905	45051.0	45037	46520	45778.5	0.98	
		豚の肝臓	0.01	0.1	0.1	0.0025	面積	0	58524	57064	57794.0	55446	56368	55907.0	1.03	
		鶏卵	0.01	0.01	0.01	0.00025	面積	0	4865	4577	4721.0	5290	5015	5152.5	0.92	
		牛乳	0.01	0.01	0.01	0.00025	面積	0	4369	4699	4534.0	4125	4886	4505.5	1.01	
		はちみつ	0.01	0.01	0.01	0.00025	面積	0	5587	5153	5370.0	5474	5346	5409.8	0.99	
		うなぎ	0.01	0.01	0.01	0.00025	面積	0	4773	4680	4726.5	4579	4566	4572.5	1.03	
		しじみ	0.01	0.01	0.01	0.00025	面積	0	4563	5031	4797.0	4639	4705	4672.0	1.03	
2	アザペロール	豚の筋肉	0.01	0.06	0.06	0.0015	面積	0	35084	36914	35999.0	35560	35591	35575.5	1.01	
		豚の脂肪	0.01	0.06	0.06	0.0015	面積	0	36281	34529	35405.0	35825	35491	35658.0	0.99	
		豚の肝臓	0.01	0.1	0.1	0.0025	面積	0	45697	45349	45523.0	46084	45207	45645.5	1.00	
		鶏卵	0.01	0.01	0.01	0.00025	面積	0	4198	3671	3934.5	4175	4107	4141.0	0.95	
		牛乳	0.01	0.01	0.01	0.00025	面積	0	4013	4369	4191.0	4017	3872	3944.5	1.06	
		はちみつ	0.01	0.01	0.01	0.00025	面積	0	4611	4079	4345.0	4438	4068	4253.2	1.02	
		うなぎ	0.01	0.01	0.01	0.00025	面積	0	3705	3562	3633.5	3517	3734	3625.5	1.00	
		しじみ	0.01	0.01	0.01	0.00025	面積	0	4041	3904	3972.5	3738	3699	3718.5	1.07	

\*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 16 補正真度

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)	真度 (%)	ピーク面積 比 (%)	補正真度 (%)	備考
1	アザペロン	豚の筋肉	0.01	0.06	0.06	110.4	0.97	113.8	
		豚の脂肪	0.01	0.06	0.06	103.1	0.98	105.2	
		豚の肝臓	0.01	0.1	0.1	95.7	1.03	92.9	
		鶏卵	0.01	0.01	0.01	98.9	0.92	107.5	
		牛乳	0.01	0.01	0.01	105.4	1.01	104.4	
		はちみつ	0.01	0.01	0.01	103.3	0.99	104.3	
		うなぎ	0.01	0.01	0.01	111.1	1.03	107.9	
		しじみ	0.01	0.01	0.01	105.1	1.03	102.0	
2	アザペロール	豚の筋肉	0.01	0.06	0.06	102.2	1.01	101.2	
		豚の脂肪	0.01	0.06	0.06	96.2	0.99	97.2	
		豚の肝臓	0.01	0.1	0.1	90.8	1.00	90.8	
		鶏卵	0.01	0.01	0.01	98.7	0.95	103.9	
		牛乳	0.01	0.01	0.01	106.5	1.06	100.5	
		はちみつ	0.01	0.01	0.01	94.2	1.02	92.4	
		うなぎ	0.01	0.01	0.01	108.8	1.00	108.8	
		しじみ	0.01	0.01	0.01	95.9	1.07	89.6	

\*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。

#### 4. 考察

抽出はアザペロン及びアザペロールの溶解性及び畜水産物との混和性を考慮して、アセトン抽出を行った。脱脂操作として、アセトニトリル/ヘキサン分配を検討したところ、良好な結果が得られた。精製カラムについて、シクロヘキシルシリル化シリカゲルミニカラムを検討したところ、良好な結果が得られた。

開発した方法を用いて、豚の筋肉等8食品の添加回収試験を行った結果、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、アザペロンの真度は96~111%、併行精度は4~14%、アザペロールの真度は91~109%、併行精度は4~16%の良好な結果が得られたことから、本試験法は、陸棲哺乳類に属する動物の筋肉、脂肪及び肝臓並びに魚介類、鶏卵、はちみつ等の畜水産物に適応可能であると判断された。

#### [結論]

畜水産物中のアザペロン及びアザペロールの試験法として、アザペロン及びアザペロール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(はちみつの場合は省略)。シクロヘキシルシリル化シリカゲル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開発した。

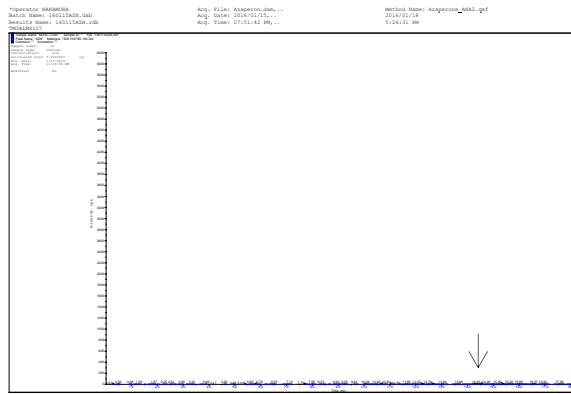
開発した試験法を豚の筋肉、豚の脂肪、豚の肝臓、鶏卵、牛乳、はちみつ、うなぎ及びしじみに適用した結果、選択性は良好で何れの試料においても妨害ピークは認められず、アザペロンの真度は96~111%、アザペロールの真度は91~109%、定量限界は0.01 mg/kgが可能であることが確認できた。

#### [参考文献]

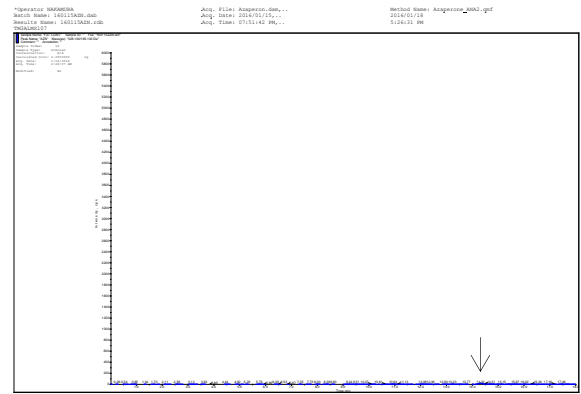
なし

アザペロンの添加回収試験におけるクロマトグラム

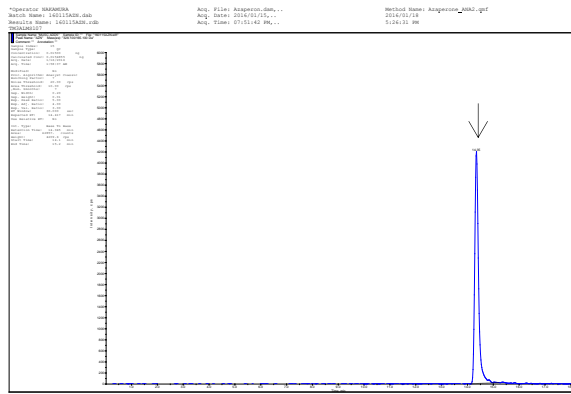
ブランク試料



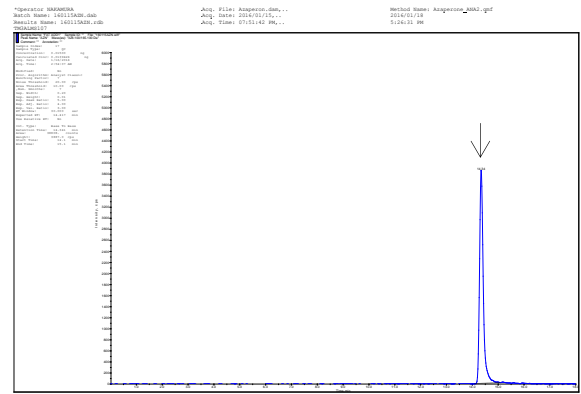
ブランク試料



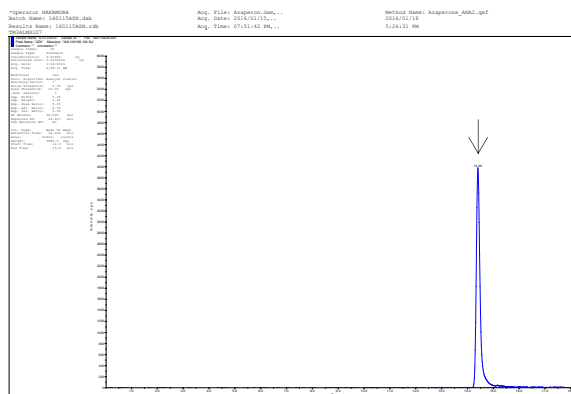
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

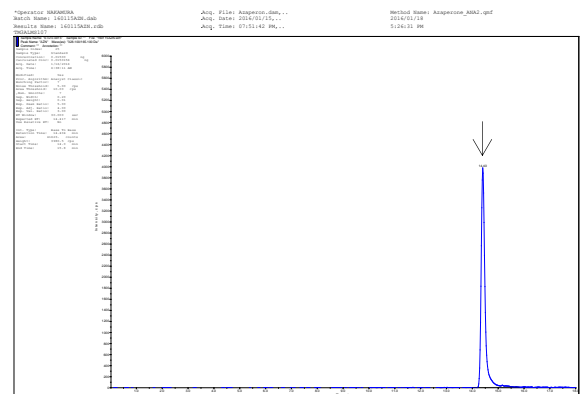
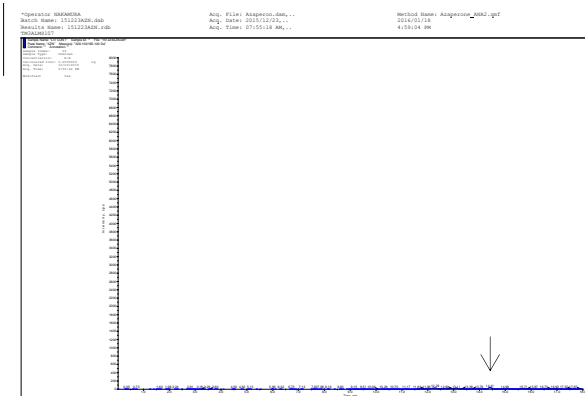


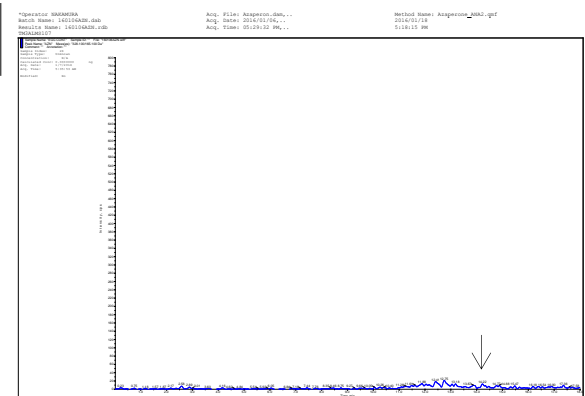
図 6-1 豚の筋肉の SRM クロマトグラム  
アザペロン ( $m/z +328 \rightarrow 165$ )  
添加濃度 : 0.06 ppm

図 6-2 豚の脂肪の SRM クロマトグラム  
アザペロン ( $m/z +328 \rightarrow 165$ )  
添加濃度 : 0.06 ppm

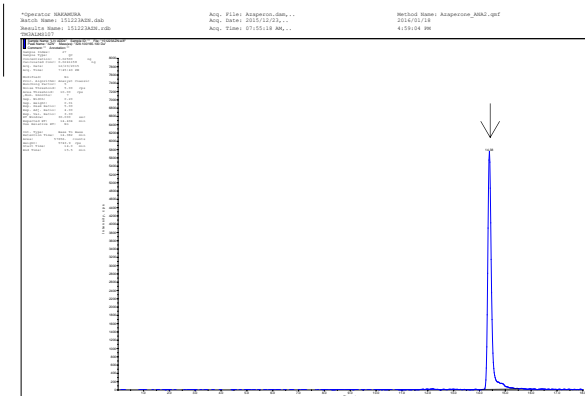
ブランク試料



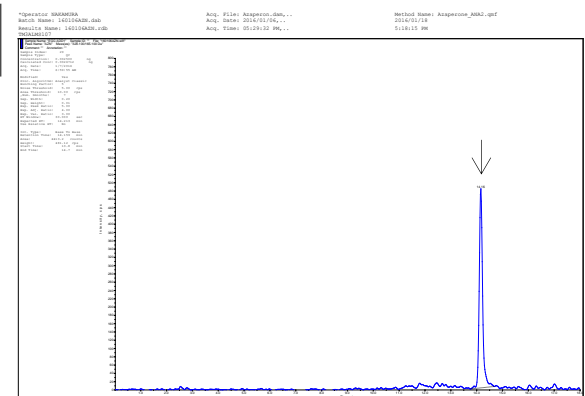
ブランク試料



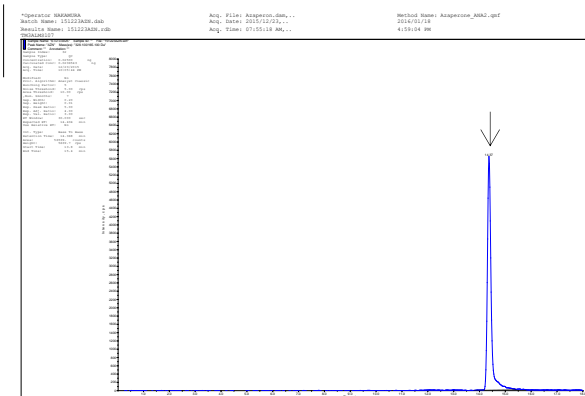
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

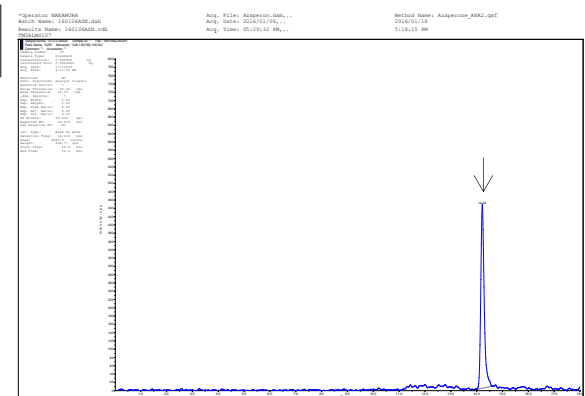
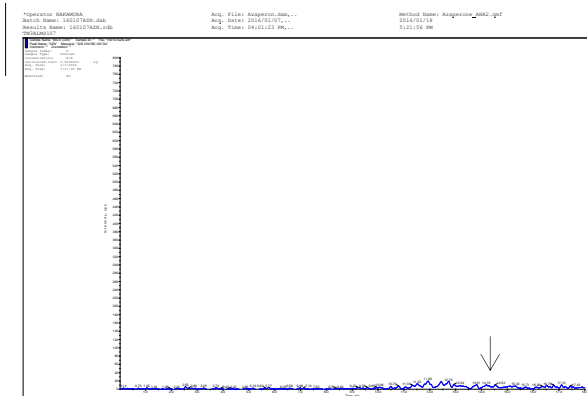


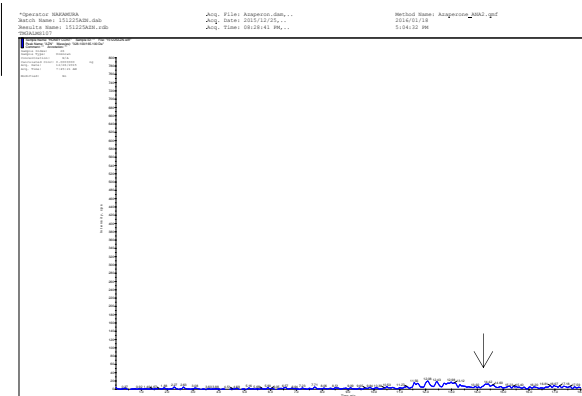
図 6-3 豚の肝臓の SRM クロマトグラム  
アザペロン ( $m/z +328 \rightarrow 165$ )  
添加濃度 : 0.1 ppm

図 6-4 鶏卵の SRM クロマトグラム  
アザペロン ( $m/z +328 \rightarrow 165$ )  
添加濃度 : 0.01 ppm

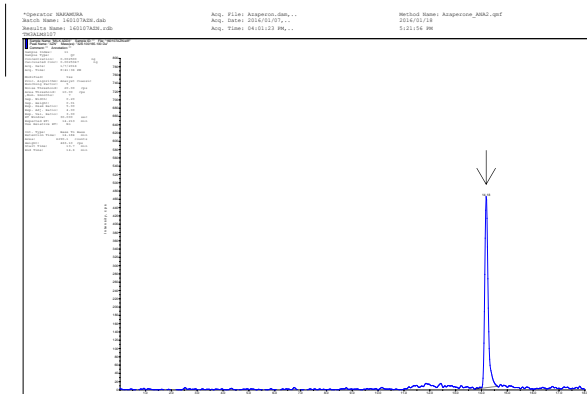
ブランク試料



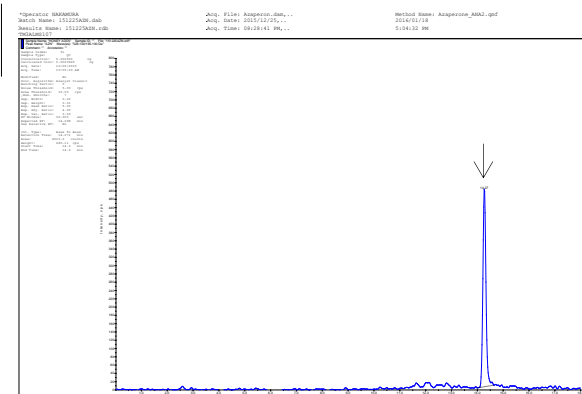
ブランク試料



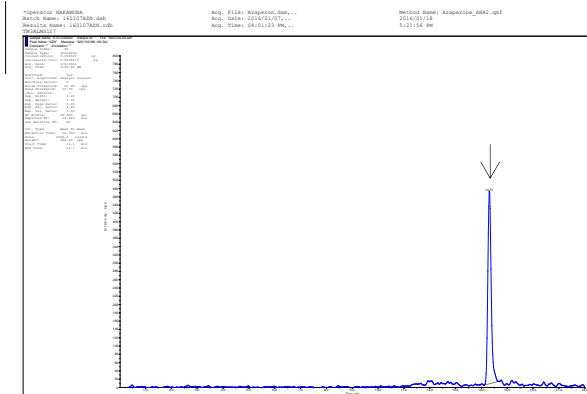
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

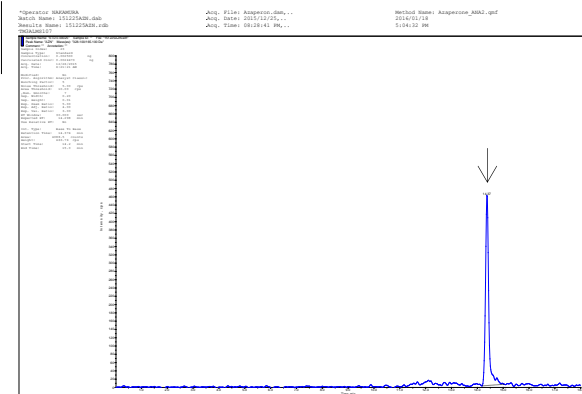
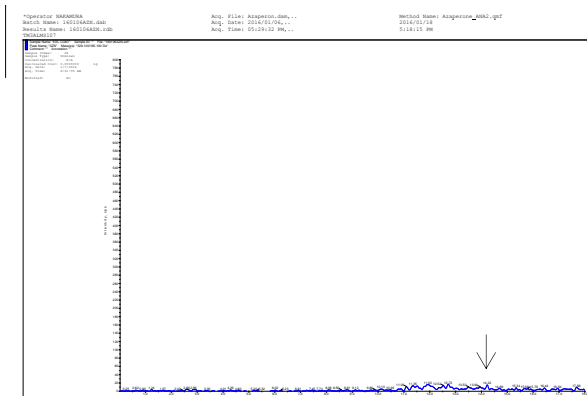


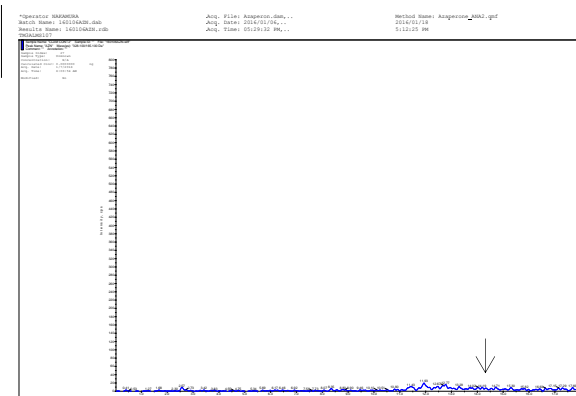
図 6-5 牛乳の SRM クロマトグラム  
 アザペロン ( $m/z +328 \rightarrow 165$ )  
 添加濃度 : 0.01 ppm

図 6-6 はちみつの SRM クロマトグラム  
 アザペロン ( $m/z +328 \rightarrow 165$ )  
 添加濃度 : 0.01 ppm

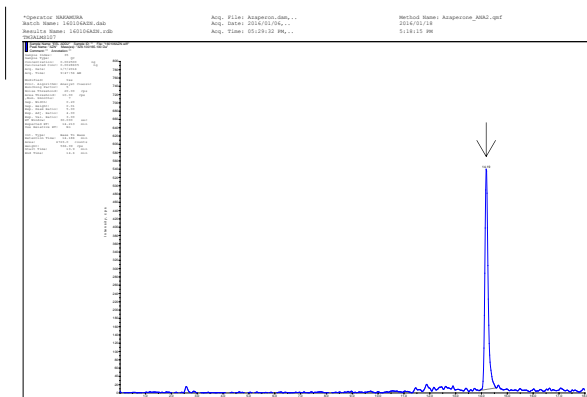
ブランク試料



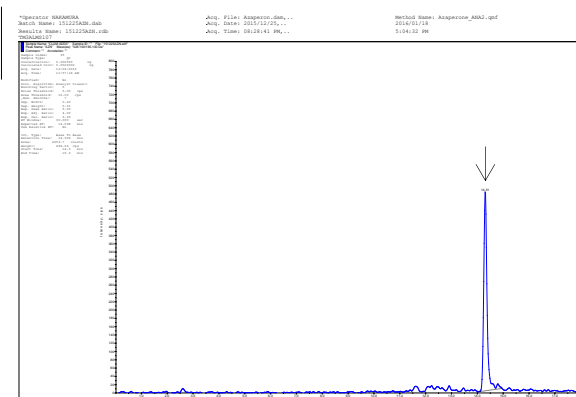
ブランク試料



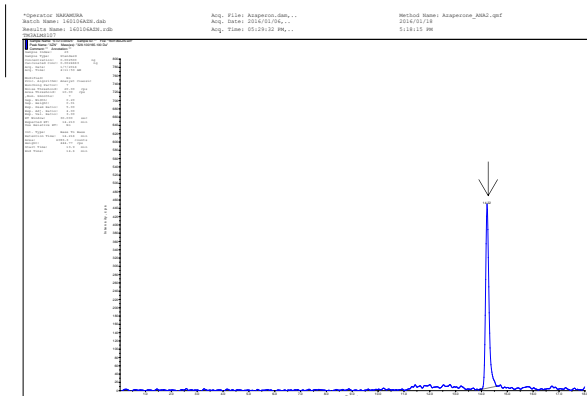
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

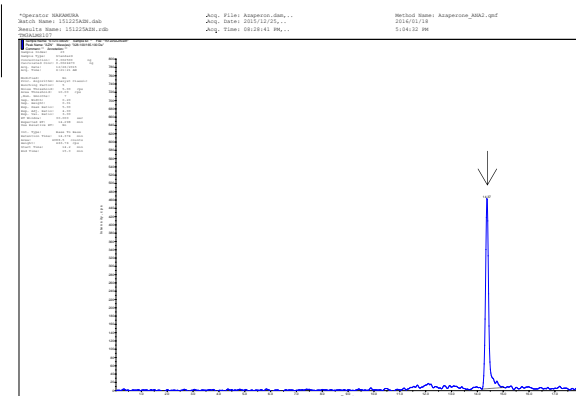
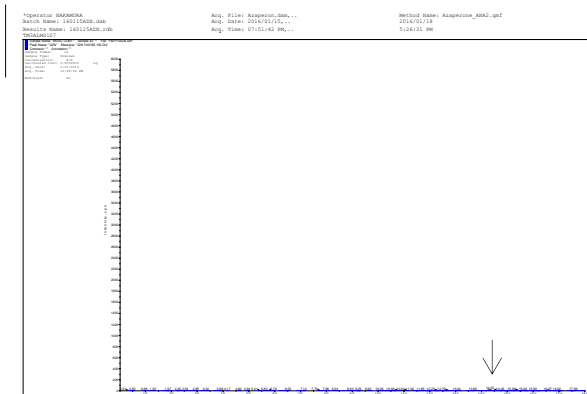


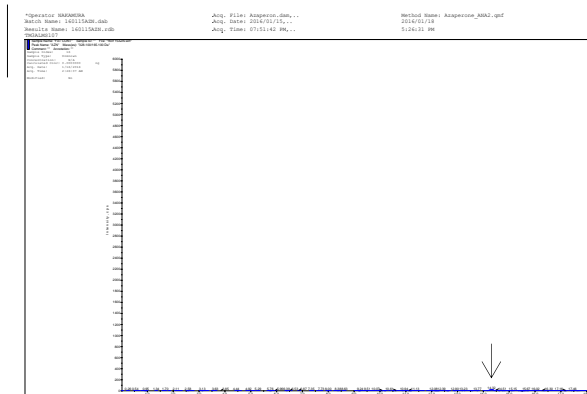
図 6-7 うなぎの SRM クロマトグラム  
アザペロン ( $m/z +328 \rightarrow 165$ )  
添加濃度 : 0.01 ppm

図 6-8 しじみの SRM クロマトグラム  
アザペロン ( $m/z +328 \rightarrow 165$ )  
添加濃度 : 0.01 ppm

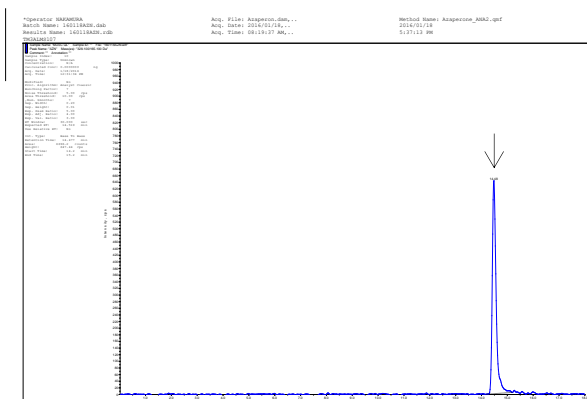
アザペロンの定量限界の推定におけるクロマトグラム  
 ブランク試料



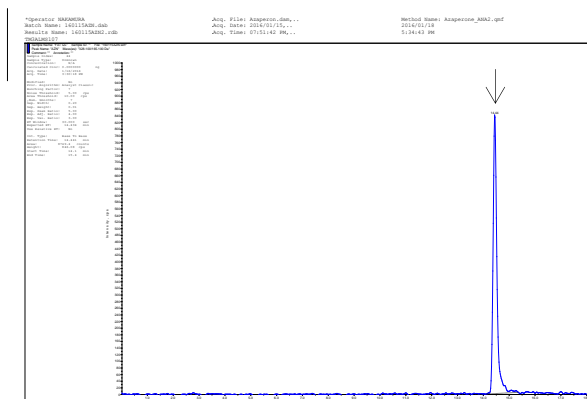
アザペロンの定量限界の推定におけるクロマトグラム  
 ブランク試料



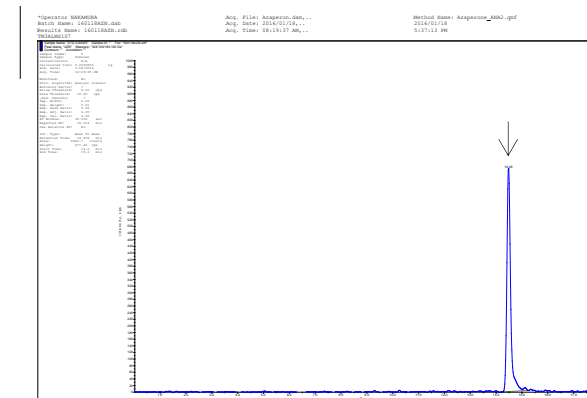
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

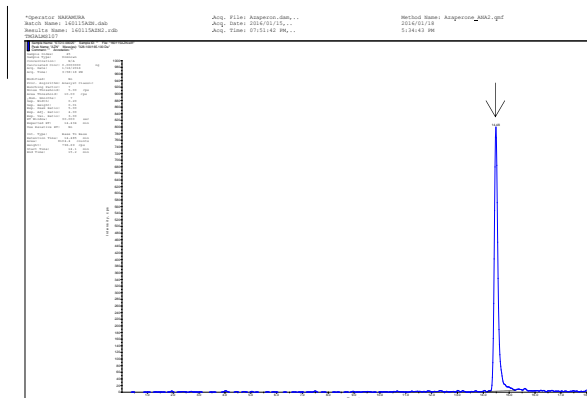
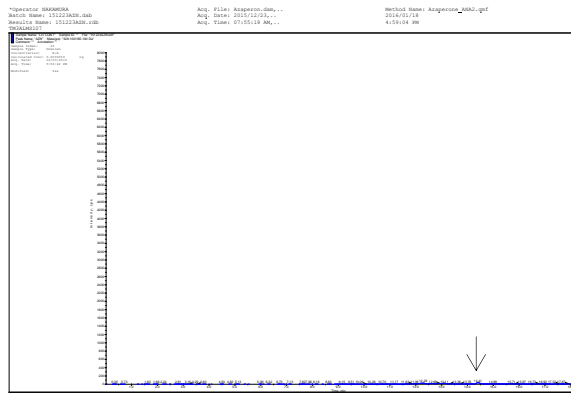


図 7-1 豚の筋肉の SRM クロマトグラム  
 アザペロン ( $m/z +328 \rightarrow 165$ )  
 試料中 0.01 ppm 相当

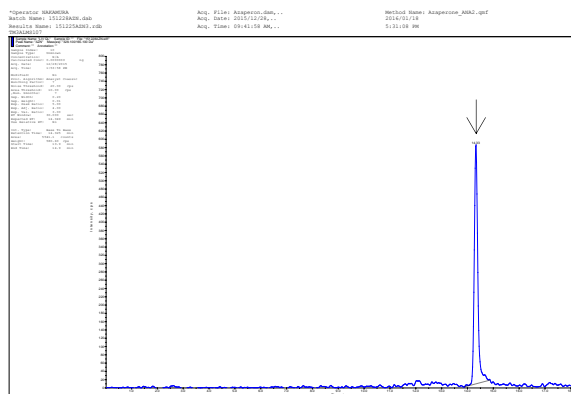
図 7-2 豚の脂肪の SRM クロマトグラム  
 アザペロン ( $m/z +328 \rightarrow 165$ )  
 試料中 0.01 ppm 相当



### ブランク試料



### 添加試料



### 標準溶液

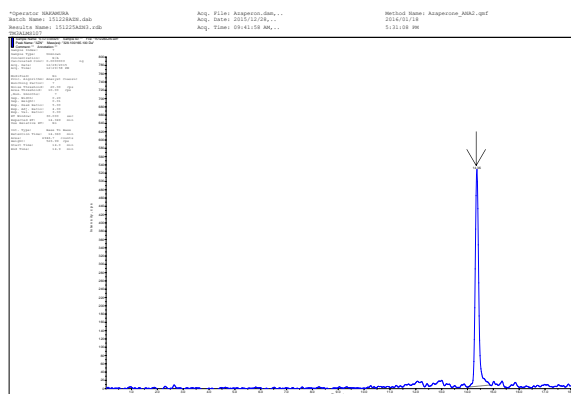
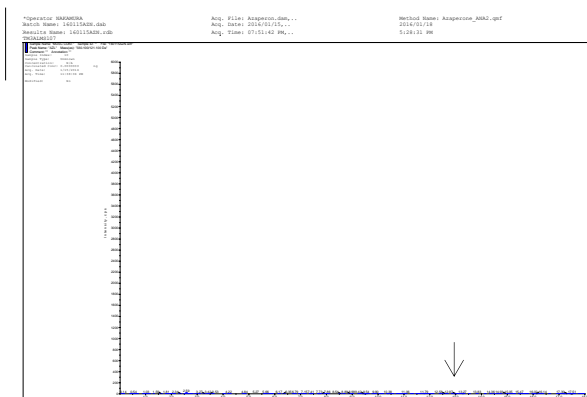
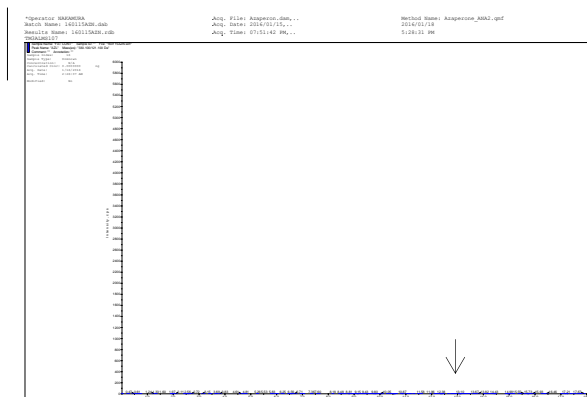


図 7-3 豚の肝臓の SRM クロマトグラム  
アザペロン ( $m/z$  +328→165)  
試料中 0.01 ppm 相当

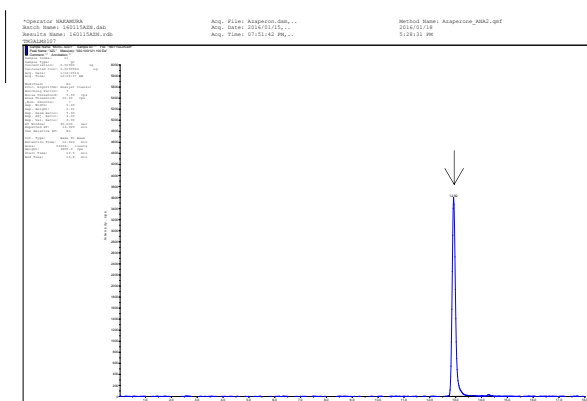
アザペロールの添加回収試験におけるクロマトグラム  
 ブランク試料



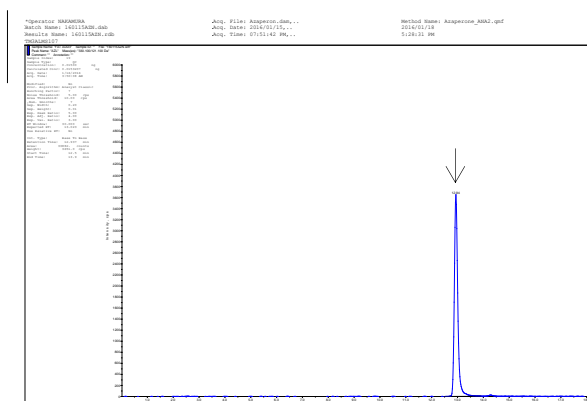
ブランク試料



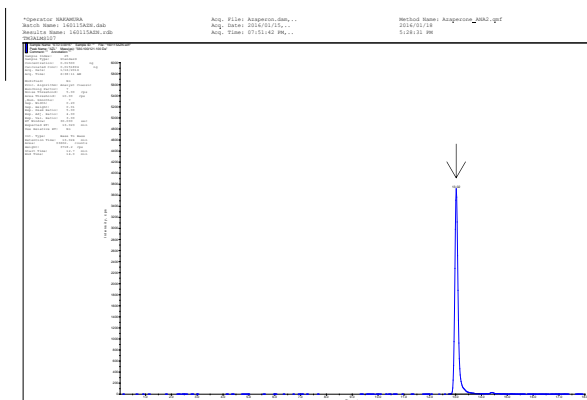
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

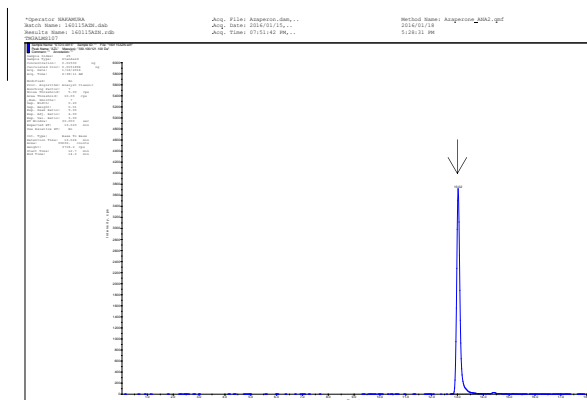
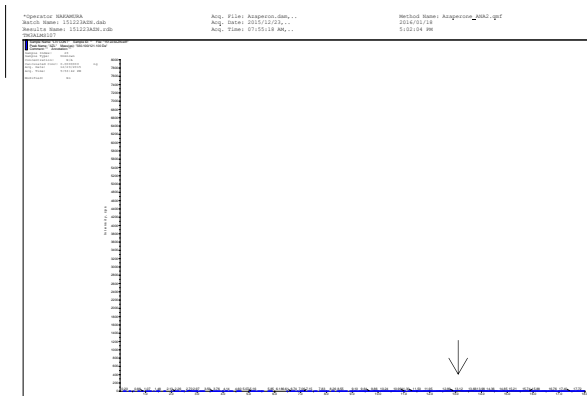


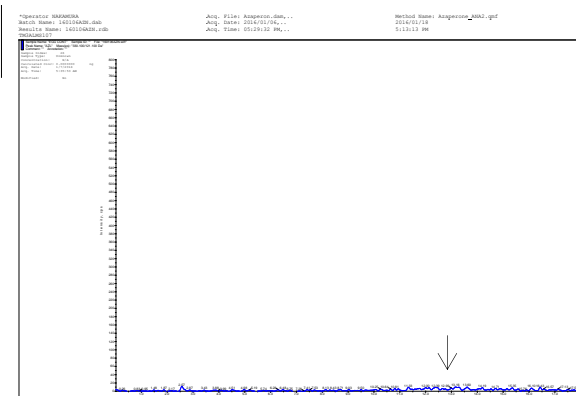
図 8-1 豚の筋肉の SRM クロマトグラム  
 アザペロール ( $m/z$  +330→121)  
 添加濃度 : 0.06 ppm

図 8-2 豚の脂肪の SRM クロマトグラム  
 アザペロール ( $m/z$  +330→121)  
 添加濃度 : 0.06 ppm

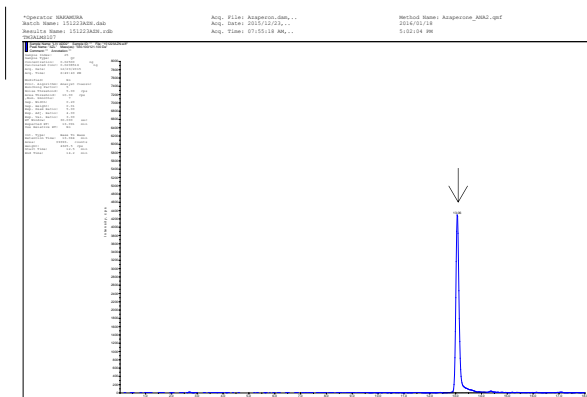
ブランク試料



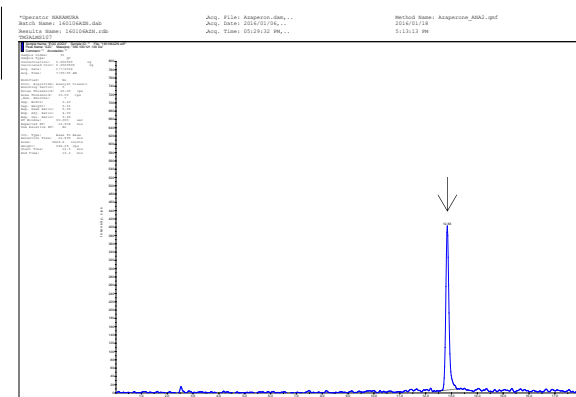
ブランク試料



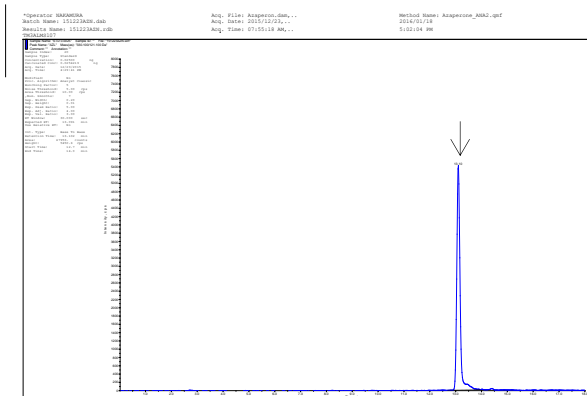
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

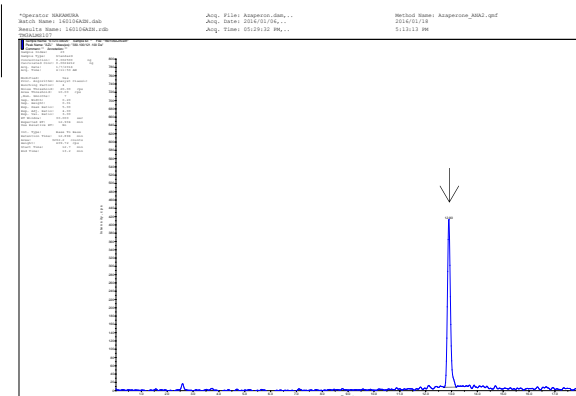
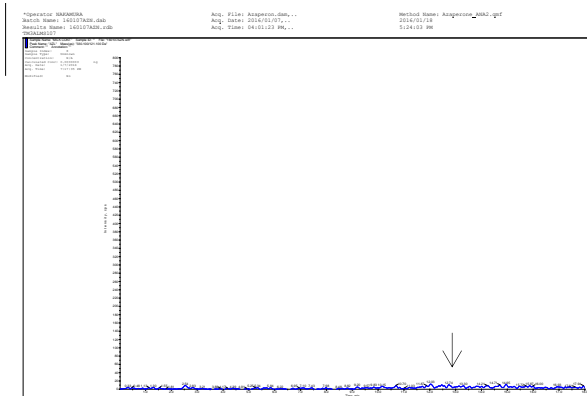


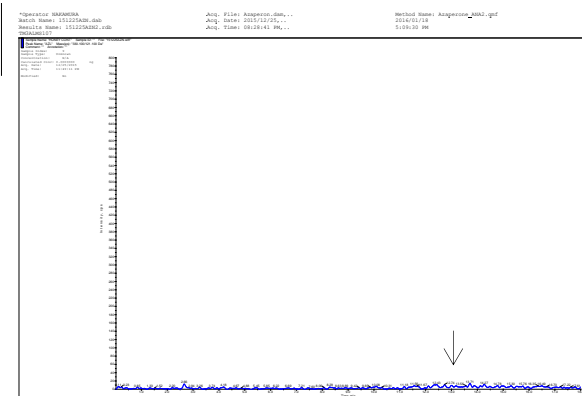
図 8-3 豚の肝臓の SRM クロマトグラム  
アザペロール ( $m/z$  +330→121)  
添加濃度 : 0.1 ppm

図 8-4 鶏卵の SRM クロマトグラム  
アザペロール ( $m/z$  +330→121)  
添加濃度 : 0.01 ppm

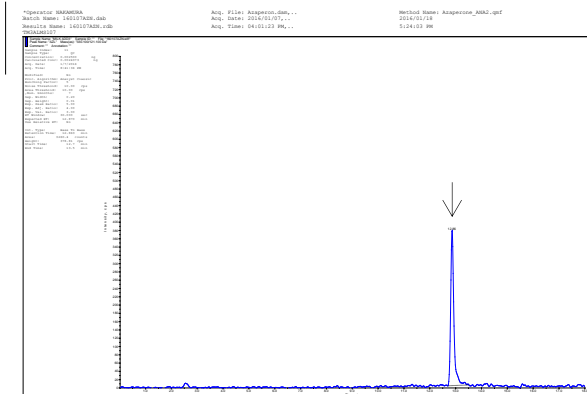
ブランク試料



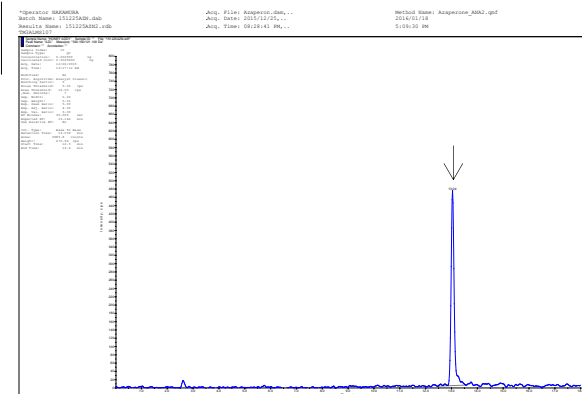
ブランク試料



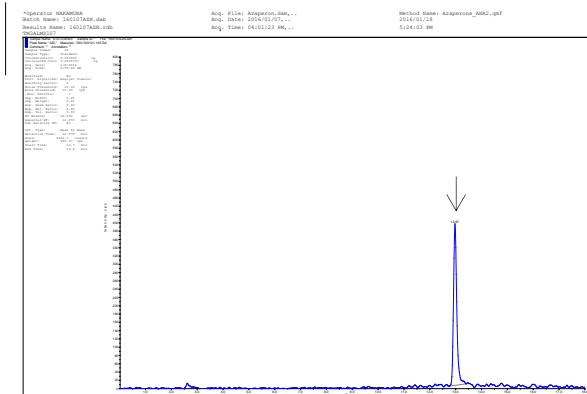
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

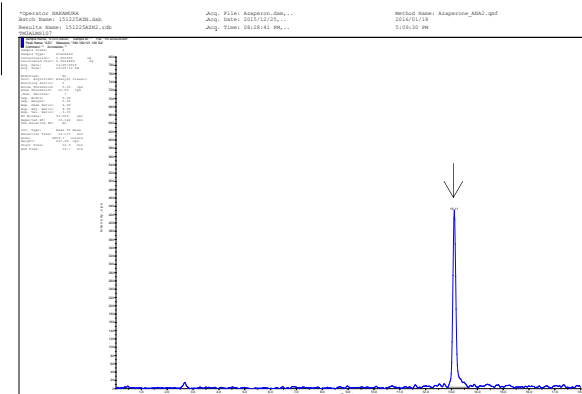
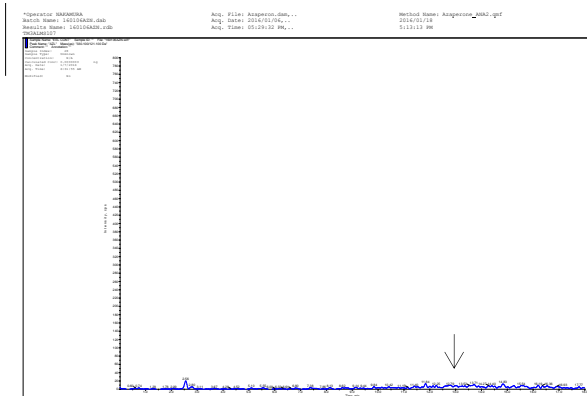


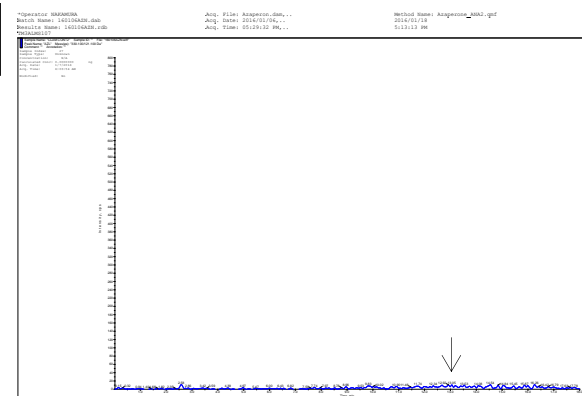
図 8-5 牛乳の SRM クロマトグラム  
 アザペロール ( $m/z +330 \rightarrow 121$ )  
 添加濃度 : 0.01 ppm

図 8-6 はちみつの SRM クロマトグラム  
 アザペロール ( $m/z +330 \rightarrow 121$ )  
 添加濃度 : 0.01 ppm

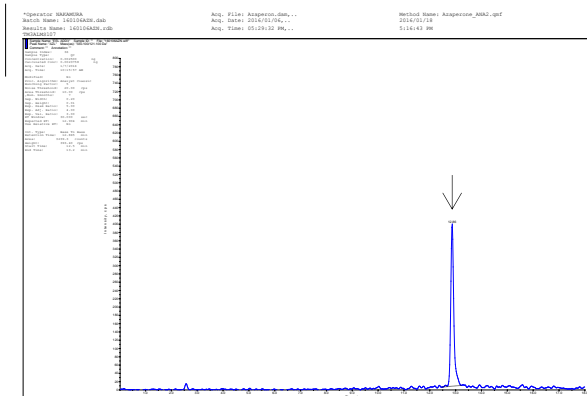
ブランク試料



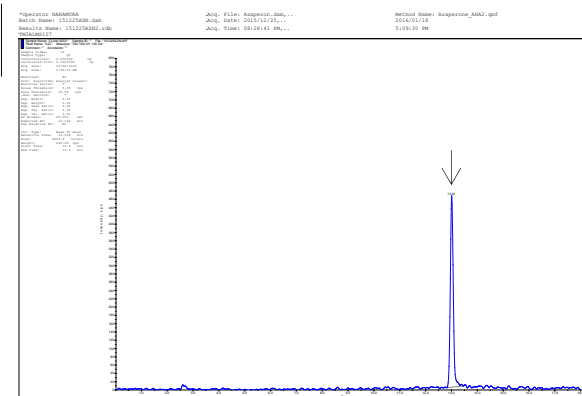
ブランク試料



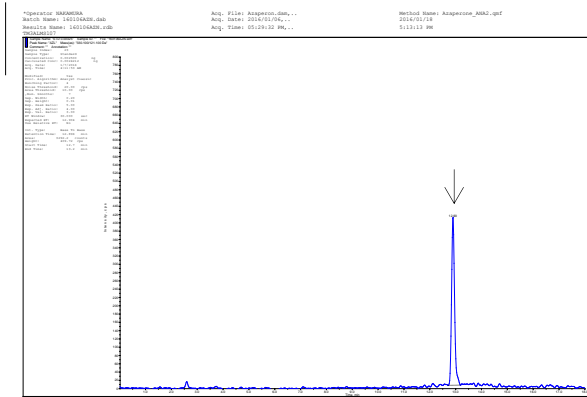
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

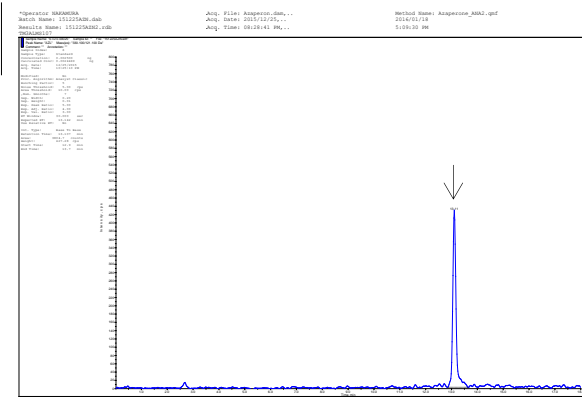
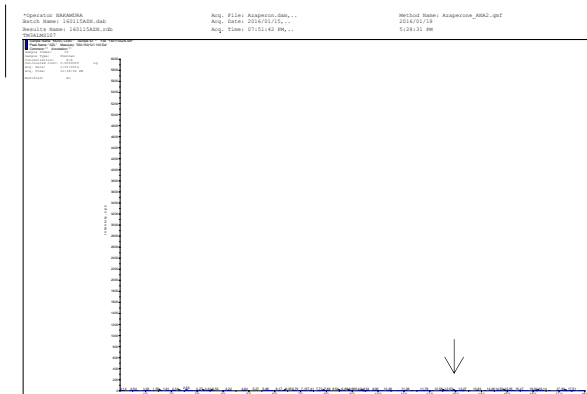


図 8-7 うなぎの SRM クロマトグラム  
アザペロール ( $m/z$  +330→121)  
添加濃度 : 0.01 ppm

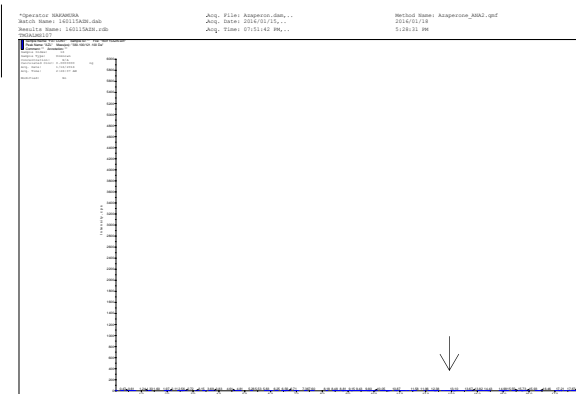
図 8-8 しじみの SRM クロマトグラム  
アザペロール ( $m/z$  +330→121)  
添加濃度 : 0.01 ppm

アザペロールの定量限界の推定におけるクロマトグラム

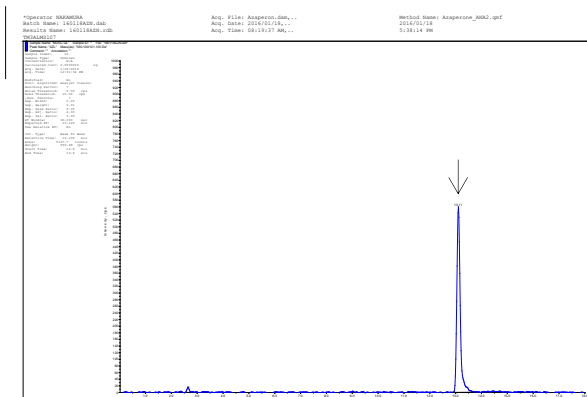
ブランク試料



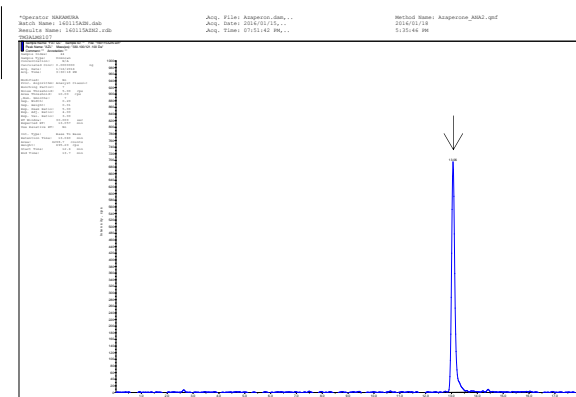
ブランク試料



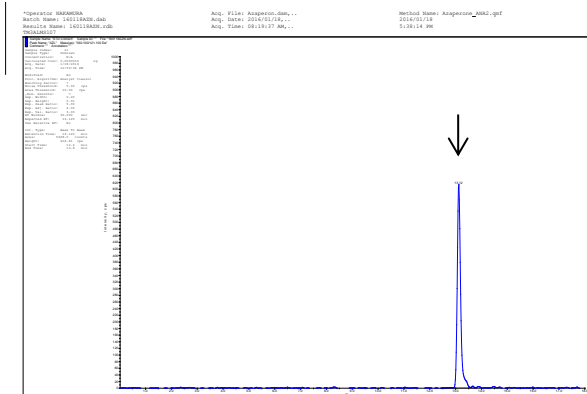
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

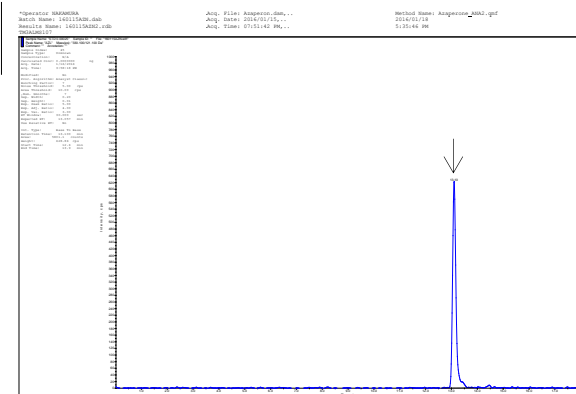
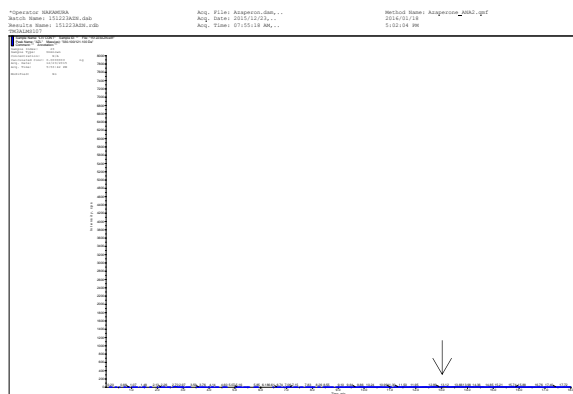


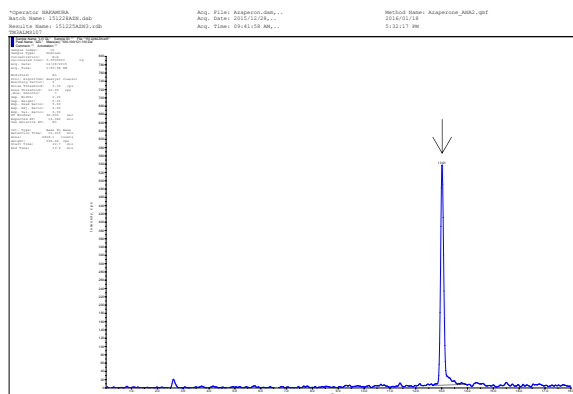
図 9-1 豚の筋肉の SRM クロマトグラム  
アザペロール ( $m/z$  +330→121)  
試料中 0.01 ppm 相当

図 9-2 豚の脂肪の SRM クロマトグラム  
アザペロール ( $m/z$  +330→121)  
試料中 0.01 ppm 相当

### ブランク試料



### 添加試料



### 標準溶液

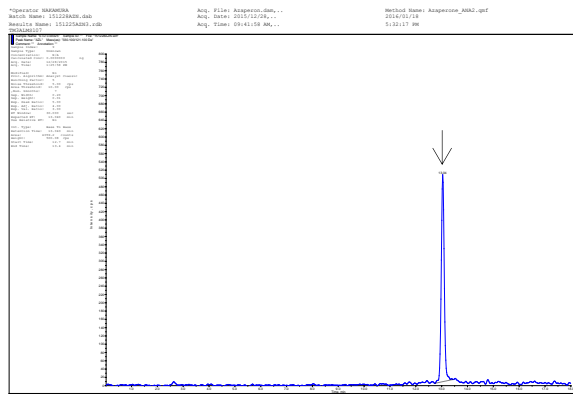
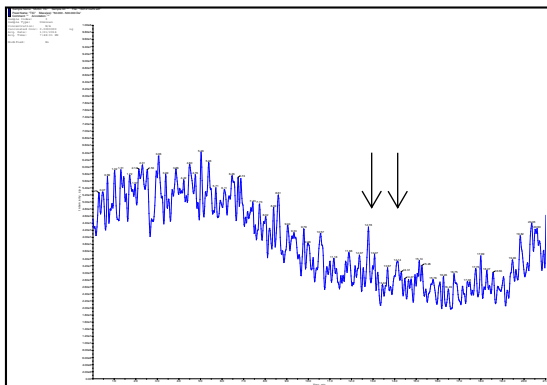
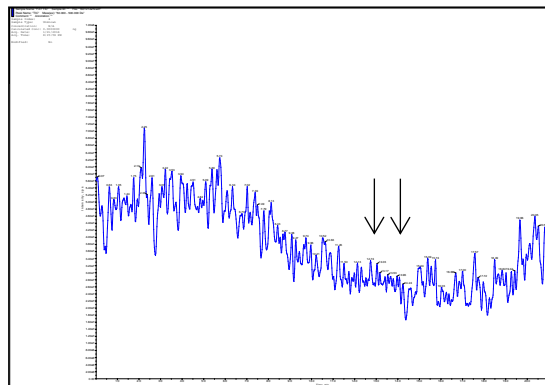


図 9-3 豚の肝臓の SRM クロマトグラム  
アザペロール ( $m/z$  +330→121)  
試料中 0.01 ppm 相当

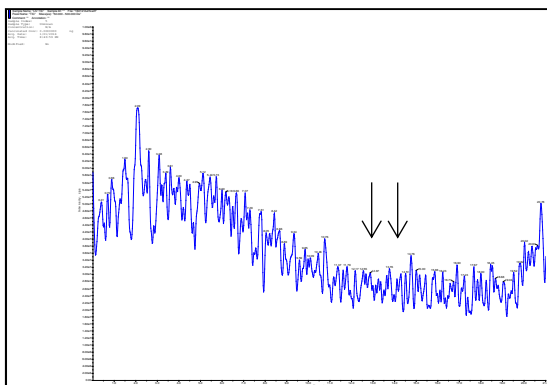
豚の筋肉



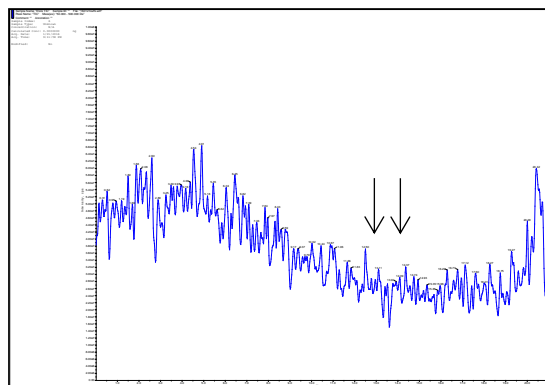
豚の脂肪



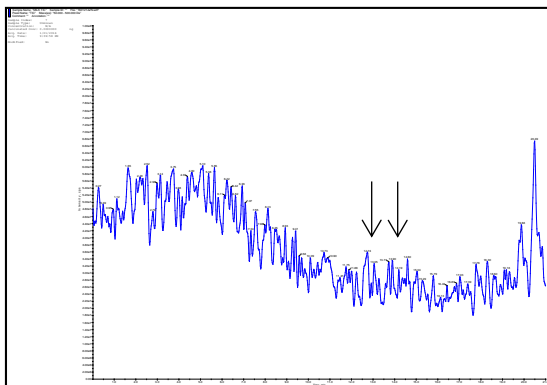
豚の肝臓



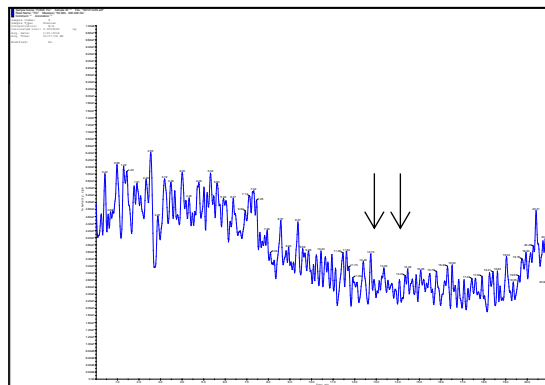
鶏卵



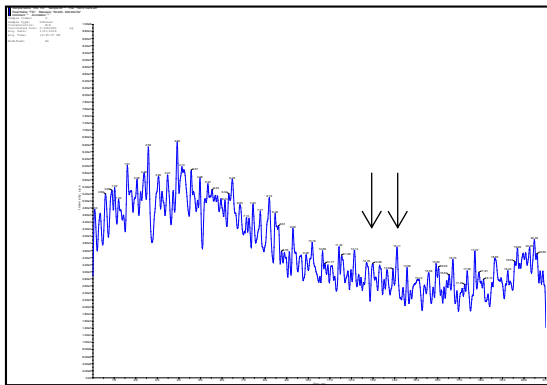
牛乳



はちみつ



うなぎ



しじみ

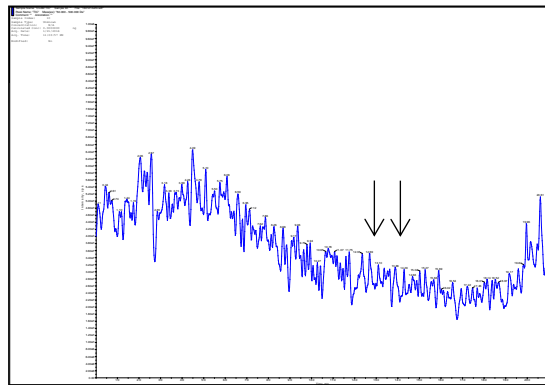


図10 ブランク試料のトータルイオンクロマトグラム (スキャン範囲 : 50~500 m/z)