

フルエンズルホン試験法（農産物）

1. 分析対象化合物

フルエンズルホン

3,4,4-トリフルオロブタ-3-エン-1-イルズルホン酸（以下「代謝物 BSA」という。）

2. 適用食品

野菜、果実（酸性を示す食品）

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。

トリメチルアンモニウム塩修飾メタクリレート重合体ミニカラム（500 mg） 内径 12~13 mm のポリエチレン製のカラム管に、トリメチルアンモニウム塩修飾メタクリレート重合体 500 mg を充てんしたもの又はこれと同等の分離特性を有するものを用いる。

フルエンズルホン標準品 本品はフルエンズルホン 95%以上を含む。

代謝物 BSA ナトリウム塩標準品 純度が明らかなもの。

5. 試験溶液の調製

1) 抽出

① 葉緑素を多く含む野菜の場合

試料 20.0 g にアセトニトリル 100 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、上澄液を採る。残留物にアセトニトリル 50 mL を加えてホモジナイズした後、毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離し、得られた上澄液を合わせ、アセトニトリルを加えて正確に 200 mL とする。この溶液から正確に 20 mL を分取し、40°C以下で約 5 mL に濃縮する。

② その他の野菜及び果実の場合

試料 20.0 g にアセトニトリル 100 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、上澄液を採る。残留物にアセトニトリル 50 mL を加えてホモジナイズした後、毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離し、得られた上澄液を合わせ、アセトニトリルを加えて正確に 200 mL とする。この溶液から正確に 20 mL を分取し、水 5 mL を加え、40°C以下で約 2 mL に濃縮する。

2) 精製

① 葉緑素を多く含む野菜の場合

a グラファイトカーボンカラムクロマトグラフィー

グラファイトカーボンミニカラム（500 mg）にアセトニトリル10 mL、アセトニトリル及び水（9：

1) 混液10 mLを順次注入し、各流出液は捨てる。このカラムに1) ①で得られた溶液を注入し、さらにアセトニトリル及び水 (9 : 1) 混液20 mLを注入して、負荷液を含む全溶出液を採り、これに水5 mLを加え、40°C以下で約2 mLに濃縮する。

b トリメチルアンモニウム塩修飾メタクリレート重合体カラムクロマトグラフィー

トリメチルアンモニウム塩修飾メタクリレート重合体ミニカラム (500 mg) にアセトニトリル10 mL、アセトニトリル及び水 (1 : 4) 混液10 mLを順次注入し、各流出液は捨てる。このカラムにaで得られた溶液を注入した後、アセトニトリル及び水 (1 : 4) 混液10 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで、アセトニトリル及び水 (2 : 3) 混液10 mLを注入し、溶出液を採り、水を加えて正確に20 mLとしたものをフルエンシルホン試験溶液とする。このカラムにアセトニトリル10 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで、アセトニトリル及び0.2 mol/L塩酸 (9 : 1) 混液20 mLを注入し、溶出液を採り、アセトニトリル及び25%アンモニア水 (9 : 1) 混液5 mLを加えて振り混ぜる。この溶液を40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物をアセトニトリル及び水 (1 : 4) 混液に溶解し、正確に20 mLとしたものを代謝物BSA試験溶液とする。

② その他の野菜及び果実の場合

トリメチルアンモニウム塩修飾メタクリレート重合体ミニカラム (500 mg) にアセトニトリル10 mL、アセトニトリル及び水 (1 : 4) 混液 10 mL を順次注入し、各流出液は捨てる。このカラムに1) ②で得られた溶液を注入した後、アセトニトリル及び水 (1 : 4) 混液 10 mL を注入し、流出液は捨てる。次いで、アセトニトリル及び水 (2 : 3) 混液 10 mL を注入し、溶出液を採り、水を加えて正確に 20 mL としたものをフルエンシルホン試験溶液とする。このカラムにアセトニトリル 10 mL を注入し、流出液は捨てる。次いで、アセトニトリル及び 0.2 mol/L 塩酸 (9 : 1) 混液 20 mL を注入し、溶出液を採り、アセトニトリル及び 25%アンモニア水 (9 : 1) 混液 5 mL を加えて振り混ぜる。この溶液を 40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物をアセトニトリル及び水 (1 : 4) 混液に溶解し、正確に 20 mL としたものを代謝物 BSA 試験溶液とする。

6. 検量線の作成

フルエンシルホン標準品及び代謝物 BSA ナトリウム塩標準品のアセトニトリル及び水 (1 : 4) 混液の溶液を数点調製し、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、試料中 0.005 mg/kg (代謝物 BSA はフルエンシルホン換算) に相当する試験溶液中の濃度は 0.0005 mg/L (代謝物 BSA はフルエンシルホン換算) である。

7. 定量

試験溶液を LC-MS/MS に注入し、6. の検量線でフルエンシルホン及び代謝物 BSA の含量を求める。代謝物 BSA を含むフルエンシルホンの含量を求める場合には、次式により求める。

フルエンシルホン (代謝物 BSA を含む) の含量 (ppm) = A + B × 1.534

A : フルエンシルホンの含量 (ppm)

B : 代謝物 BSA 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：極性基導入型オクタデシルシリル化シリカゲル 内径 2.0 mm、長さ 150 mm、粒子径 4 μm

カラム温度：40°C

移動相：アセトニトリル及び 0.1 vol%ギ酸の混液 (1:4) で 5 分間保持し、(1:4) から (99:1) までの濃度勾配を 10 分間で行い、10 分間保持する。

イオン化モード

フルエンシルホン：ESI (+)

代謝物 BSA：ESI (-)

主なイオン (*m/z*)

フルエンシルホン：プリカーサーイオン 292、プロダクトイオン 166、109

代謝物 BSA：プリカーサーイオン 189、プロダクトイオン 81、80

注入量：10 μL

保持時間の目安

フルエンシルホン：15 分

代謝物 BSA：10 分

10. 定量限界

各化合物 0.005 mg/kg (代謝物 BSA はフルエンシルホン換算)

11. 留意事項

1) 試験法の概要

フルエンシルホン及び代謝物 BSA を試料からアセトニトリルで抽出し、葉緑素を多く含む野菜についてはグラファイトカーボンミニカラムで精製した後、トリメチルアンモニウム塩修飾メタクリレート重合体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 トリメチルアンモニウム塩修飾メタクリレート重合体ミニカラムにフルエンシルホンを保持させるため、負荷する際には極力アセトニトリルを除去する必要がある。ただし、乾固をさせるとフルエンシルホンが損失するため、カラムへの負荷液の調製にあたっては、水 5 mL を加え、乾固させないように注意して 40°C 以下で約 2 mL に濃縮すること。
- ② 代謝物 BSA は、グラファイトカーボンミニカラムのロットにより溶出状況が変わる場合があるため注意すること。
- ③ フルエンシルホン及び代謝物 BSA 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。

フルエンズルホン

定量イオン (m/z) : プリカーサーイオン 292、プロダクトイオン 166

定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン 292、プロダクトイオン 109

代謝物 BSA

定量イオン (m/z) : プリカーサーイオン 189、プロダクトイオン 81

定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン 189、プロダクトイオン 80

- ④ 試験法開発時には、代謝物 BSA ナトリウム塩標準品は高純度の標準品が入手できなかったため、
4. 試薬、試液では「代謝物 BSA ナトリウム塩標準品 純度が明らかなもの。」とされたが、入手可能な場合には純度 95%以上の標準品を試験に用いることが望ましい。
- ⑤ 試験法開発時に検討した食品：ほうれんそう、キャベツ、かんしょ、すいか、いちご

12. 参考文献

なし

13. 類型

C