

※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 試験法開発業務報告書

ベンジルアデニン試験法（農産物）

ベンジルアデニン試験法（農産物）の検討結果

【緒言】

1. 目的及び試験法の検討方針等

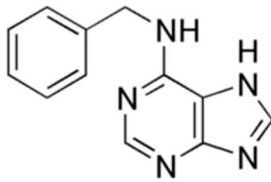
ベンジルアデニンはサイトカイン類似の植物生長調整剤である。生体内の核酸に取り込まれ RNA 合成が誘導されることで、タンパク質合成促進効果や生長促進効果が引き起こされると考えられている。

農産物中のベンジルアデニンの試験法については、多田ら^{1,2)}が報告しているが、添加濃度0.1~2 mg/kg における検討であり、低濃度での検討がされていないことから、あらためて検討することとし、あわせて操作の簡便化を試みることにした。

2. 分析対象化合物の構造式及び物理化学的性質*¹

分析対象化合物：ベンジルアデニン（benzyladenine） [ベンジルアミノプリン（benzylaminopurine）]

構造式：



分子式：C₁₂H₁₁N₅

分子量：225.25

IUPAC 名：N-(Phenylmethyl)-7H-purin-6-amine

CAS 番号：1214-39-7

CAS 名：N-(Phenylmethyl)-1H-purin-6-amine

外観：白色結晶

融点：232.4℃

沸点：306.2℃ (1330 Pa) 400℃付近で熱分解（大気圧下）

蒸気圧：1.48×10⁻⁴ Pa 以下（80℃） 3.53×10⁻⁹ Pa 以下（20℃；計算値）

溶解度（20℃）：

水	0.0622 g/L
ヘキサン	0.01 g/L 以下
トルエン	0.0214 g/L
ジクロロメタン	0.251 g/L
アセトン	1.39 g/L
メタノール	6.71 g/L
酢酸エチル	0.722 g/L

解離定数：pKa 3.80 及び 9.95 (22±2℃)

オクタノール/水分配係数：log Pow=2.19 (20℃、pH 7)

熱安定性：150℃まで安定

加水分解性：1年以上 (25℃/pH 4,7,9)

水中分解性：自然水 半減期 2.5 日 (25℃、400 W/m²、300~800 nm)

滅菌蒸留水 半減期 12.8 日 (25℃、400 W/m²、300~800 nm)

3. 基準値*²

アスパラガス	0.3 (ppm)
かぼちゃ (スカッシュを含む)	0.05
すいか	0.02
みかん	0.1
りんご	0.05
ぶどう	0.02
その他のスパイス	0.2

[出典]

* 1 独立行政法人農林水産消費安全技術センター (FAMIC) ベンジルアミノプリン農薬抄録

<https://www.acis.famic.go.jp/syouroku/benzylaminopurine/index.htm>

* 2 平成 27 年 9 月 18 日食安発 0918 第 1 号 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知

[実験方法]

1. 試料

検討に用いた試料のうち、アスパラガスはメキシコ産、かぼちゃ、すいかは新潟県産、りんご (サンふじ)、ぶどう (スチューベン) は青森県産のものを新潟県内の小売店で購入した。なお、すいかのみ、果皮を除去して-20℃で約 6 か月間保存してあったものを室温に戻して用いた。

試料の採取方法を以下に記載した。

- (1) アスパラガス (茎) : クッキングカッターを用いて細切均一化した。
- (2) かぼちゃ (つるを除去したもの) : クッキングカッターを用いて細切均一化した。
- (3) すいか (果皮を除去したもの) : クッキングカッターを用いて細切均一化した。
- (4) りんご (果梗を除去したもの) : クッキングカッターを用いて細切均一化した。
- (5) ぶどう (果梗を除去したもの) : クッキングカッターを用いて細切均一化した。

2. 試薬・試液

ベンジルアデニン標準品 : 純度 99.8% (富士フイルム和光純薬 (株) 製)

アセトン、アセトニトリル、酢酸エチル、*n*-ヘキサン : 残留農薬試験用 (関東化学 (株) 製)

メタノール : 残留農薬試験用 (関東化学 (株) 製) または LC/MS 用 (富士フイルム和光純薬 (株) 製)

アンモニア水 (25%) : 特級 (富士フイルム和光純薬 (株) 製)

ケイソウ土 : セライト No.545 (富士フイルム和光純薬 (株) 製)

ベンゼンスルホンプロピルシリル化シリカゲルミニカラム : InertSep SCX (500 mg / 6 mL、ジーエルサイエンス (株) 製) (以下、SCX 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 : InertSep C18 (1 g / 6 mL、ジーエルサイエンス (株) 製) (以下、InertSep C18 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 : Bond Elut C18 (1 g / 6 mL、Agilent Technologies 製) (以下、Bond Elut C18 ミニカラム)

合成ケイ酸マグネシウムミニカラム : InertSep FL-PR (500 mg / 6 mL、ジーエルサイエンス (株) 製) (以下、FL-PR ミニカラム)

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 / 6 mL、ジーエルサイエンス (株) 製) (以下、PSA ミニカラム)

シリカゲルミニカラム : InertSep SI (500 mg / 6 mL、ジーエルサイエンス (株) 製) (以下、SI ミニカラム)

4 級アンモニウム塩修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム : Oasis MAX (500 mg / 6 mL、Waters 製) (以下、MAX ミニカラム)

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 / 6 mL、ジーエルサイエンス (株) 製) (以下、SAX ミニカラム)

その他の試薬 : 特級 (富士フイルム和光純薬 (株) 製または関東化学 (株) 製)

0.5 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.0) : リン酸二水素カリウム 13.61 g を水に溶かして 200 mL とした (0.5 mol/L リン酸二水素カリウム溶液)。リン酸水素二カリウム 34.84 g を水に溶かして 400 mL とした (0.5 mol/L リン酸水素二カリウム溶液)。0.5 mol/L リン酸二水素カリウム溶液約 200 mL に、0.5 mol/L リン酸水素二カリウム溶液約 370 mL を少しずつ加え、pH 7.0 に調整した。

0.5 mol/L アンモニア・塩化アンモニウム緩衝液 (pH 9.0) : 塩化アンモニウム 5.35 g を水に溶かして 200 mL とした (0.5 mol/L 塩化アンモニウム溶液)。アンモニア水 (25%) に水を加えて 27 倍希釈した (0.5 mol/L アンモニア水)。0.5 mol/L 塩化アンモニウム溶液に 0.5 mol/L アンモニア水を少しずつ加え、pH 9.0 に調整した。

標準原液 : ベンジルアデニン標準品 20 mg を精秤し、メタノールで溶解して 1,000 mg/L 溶液を調製した。なお、アセトンを用いて 1,000 mg/L 溶液の調製も行ったが、4°C で冷蔵保存した場合に析出が見られたため、検討に使用しなかった。

添加用標準溶液 : 標準原液をメタノールで希釈して 6 mg/L、1 mg/L、0.4 mg/L 及び 0.1 mg/L 溶液を調製した。

検量線用標準溶液 : 添加用標準溶液をメタノールで適宜希釈し、0.00025~0.0015 mg/L (定量限界濃度添加の場合)、0.001~0.006 mg/L (すいか、ぶどうの基準値濃度添加の場合)、0.0025~0.015 mg/L (かぼちゃ、りんごの基準値濃度添加の場合)、0.015~0.09 mg/L (アスパラガスの基準値濃度添加の場合) の濃度の溶液を調製した。

3. 装置

ホモジナイザー : ULTRA-TURRAX T25 (IKA 製)

濃縮装置 : ロータリーエバポレーター N1100 (東京理化工機 (株) 製)、

振とう器 : SR-2DW (タイテック (株) 製)

LC-MS/MS

装置	型式	メーカー
MS	Xevo-TQD	Waters
LC	ACQUITY UPLC I Class	Waters
データ処理	MassLynx	Waters

4. 測定条件

LC 条件			
カラム	XTerra MS C18 (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3.5 μm : Waters 製)		
移動相流速 (mL/min)	0.2		
注入量 (μL)	2		
カラム温度 (°C)	40		
移動相	A 液 : 5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液、B 液 : メタノール		
グラジエント条件	時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)
	0.00	80	20
	15.00	5	95
	19.00	5	95
	19.01	80	20
	23.00	80	20
MS 条件			
測定モード	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)	1000		
ソース温度 (°C)	150		
脱溶媒温度 (°C)	300		
コーンガス	窒素、50 L/hr		
脱溶媒ガス	窒素、900 L/hr		
コリジョンガス	アルゴン		
定量イオン (m/z)	+226.1→90.9 [コーン電圧 44 V、コリジョンエネルギー 24 eV]		
定性イオン (m/z)	+226.1→64.9 [コーン電圧 44 V、コリジョンエネルギー 48 eV]		
保持時間 (min)	8.9		

5. 定量

検量線用標準溶液は 2 μL を LC-MS/MS に注入して、得られたピーク面積を用いて検量線を作成した。試験溶液 2 μL を LC-MS/MS に注入し、検量線から絶対検量線法により各化合物の含量を算出した。

6. 添加試料の調製

低濃度 (添加濃度 : 0.005 ppm) の場合 : 試料 20.0 g に添加用標準溶液 (0.1 mg/L) 1 mL を添加し、30 分間放置した。

高濃度 (基準値濃度) の場合 : 試料に以下のとおり添加用標準溶液を添加し、30 分間放置した。

アスパラガス : 20.0 g に添加用標準溶液 (6 mg/L) 1 mL を添加 (添加濃度 : 0.3 ppm)

かぼちゃ、りんご : 20.0 g に添加用標準溶液 (1 mg/L) 1 mL を添加 (添加濃度 : 0.05 ppm)

すいか、ぶどう : 20.0 g に添加用標準溶液 (0.4 mg/L) 1 mL を添加 (添加濃度 : 0.02 ppm)

7. 試験溶液の調製

概要

ベンジルアデニンを試料からアセトンで抽出し、酢酸エチルに転溶後、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精製し、LC-MS/MS で定量及び確認した。

(1) 抽出

試料 20.0 g にアセトン 100 mL を加えて 2 分間ホモジナイズした後、ケイソウ土を約 1 cm の厚さに敷いて吸引ろ過した。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、同様に吸引ろ過した。得られたろ液を合わせ、アセトンを加えて正確に 200 mL とした。この溶液から正確に

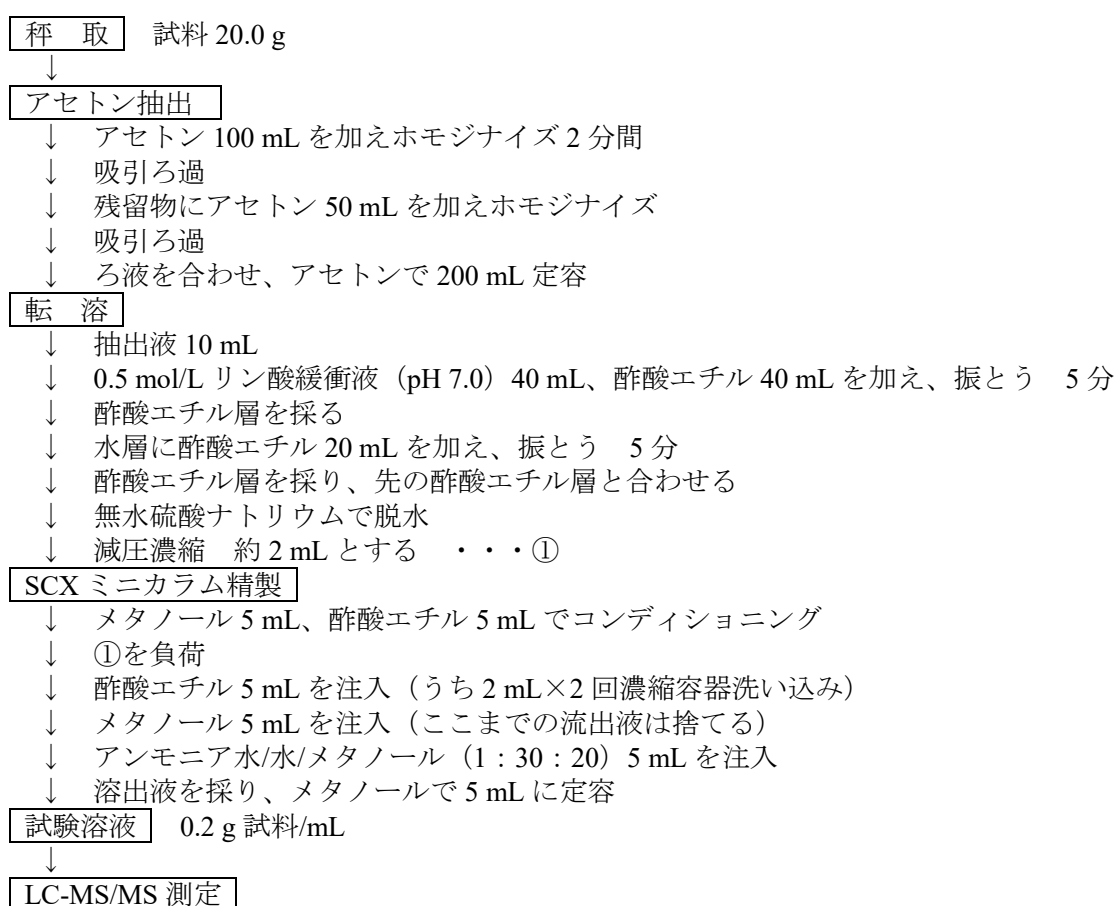
10 mL を分取し、0.5 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.0) 40 mL を加え、酢酸エチル 40 mL 及び 20 mL で 2 回振とう抽出した。

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、無水硫酸ナトリウムを酢酸エチル約 20 mL で洗い、同様にろ過した。ろ液を合わせて 40°C で約 2 mL まで濃縮した。

(2) 精製

SCX ミニカラムにメタノール 5 mL 及び酢酸エチル 5 mL を順次注入し、流出液を捨てた。このカラムに(1)で得られた溶液を注入した後、酢酸エチル 5 mL (うち 2 mL×2 回洗いこみ) 及びメタノール 5 mL を順次注入し、流出液を捨てた。アンモニア水、水及びメタノール (1 : 30 : 20) 混液 5 mL を注入して溶出液を採り、メタノールを加えて正確に 5 mL としたものを試験溶液とした。

[分析法フローチャート]



8. マトリックス添加標準溶液の調製

ブランク試料の試験溶液を 1 mL 分取し、各試料の添加回収試験における回収率 100%相当濃度になるよう、添加用標準溶液 10 µL をマイクロシリンジを用いて加え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. LC-MS/MS 測定条件の検討

(1) MS 条件の検討

MS 条件についてインフュージョン測定により検討した。

ベンジルアデニンは ESI (+) モードでコーン電圧 44 V とした場合に、プロトン付加分子 ($[M+H]^+$) を良好に検出できたため、これをプリカーサーイオンとした。プリカーサーイオンについて、コリジョンエネルギーを変えてプロダクトイオンを確認した。イオン強度の高いものから定量イオン、定性イオンを選択し、 $m/z +226.1 \rightarrow 90.9$ を定量用、 $m/z +226.1 \rightarrow 64.9$ を定性用とした。図 1 にマススペクトル、図 2 にプロダクトイオンスペクトルを示した。

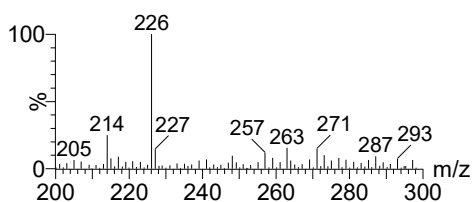


図 1 ベンジルアデニンのマススペクトル

(ESI (+)、corn voltage=44 V、スキャン範囲：200~300 amu)

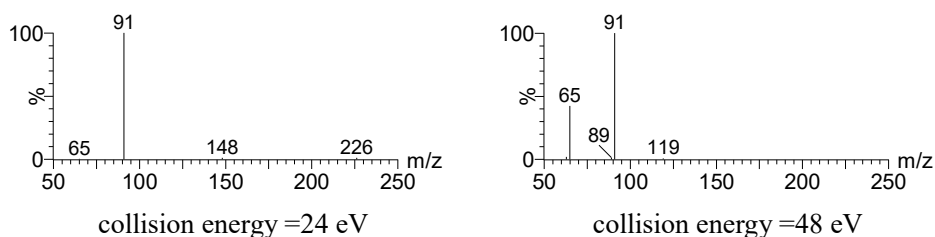


図 2 ベンジルアデニンのプロダクトイオンスペクトル

(ESI (+)、corn voltage=44 V、プリカーサーイオン (m/z) : 226.1、スキャン範囲：50~250 amu)

(2) LC 条件の検討

分析カラムについて、XTerra MS C18 (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3.5 μm : Waters 製) を用いて検討を行った。移動相条件について、A 液に 5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液または 0.1 vol% ギ酸、B 液に、メタノール、アセトニトリル又は 5 mmol/L 酢酸アンモニウム・メタノール溶液を用いてグラジエント条件を検討した。その結果、表 1 のとおり、酢酸アンモニウム溶液とメタノールの組み合わせが最も S/N 比が良かった。A 液が 5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液の場合、B 液はメタノールでも 5 mmol/L 酢酸アンモニウム・メタノール溶液でも大差はなかった。このため、5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液とメタノールによるグラジエント条件を採用した。

表1 移動相条件によるベンジルアデニンの検出感度の違い

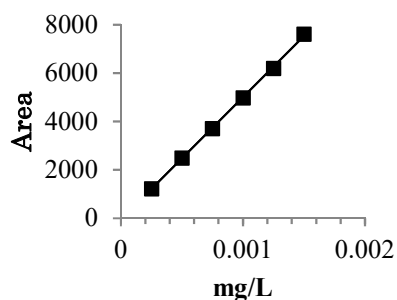
移動相		保持時間 (分)	ピーク面積 ($\times 10^4$)	ピーク高さ ($\times 10^5$)	ノイズ幅	S/N
A	B					
0.1 vol%ギ酸	アセトニトリル	3.3	2.58	3.08	442	697
5 mmol/L酢酸アンモニウム溶液	アセトニトリル	4.5	3.02	2.96	403	734
0.1 vol%ギ酸	メタノール	6.9	3.60	3.33	420	793
5 mmol/L酢酸アンモニウム溶液	メタノール	8.8	5.93	6.55	423	1548
0.1 vol%ギ酸	5 mmol/L酢酸アンモニウム・メタノール溶液	7.8	5.23	4.90	419	1169
5 mmol/L酢酸アンモニウム溶液	5 mmol/L酢酸アンモニウム・メタノール溶液	8.8	5.56	6.12	401	1526

グラジエント条件はいずれもB:20%(0分)→95%(15分)

注入量;0.01 mg/L \times 2 μ L

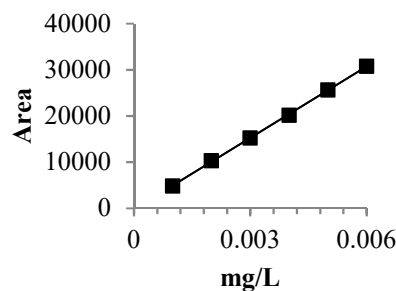
(3) 検量線

図3に検量線の例を示した。0.00025~0.0015 mg/L、0.001~0.006 mg/L、0.0025~0.015 mg/L、0.015~0.09 mg/L、の濃度範囲で作成した検量線の決定係数は、いずれも0.99以上であり良好な直線性を示した。



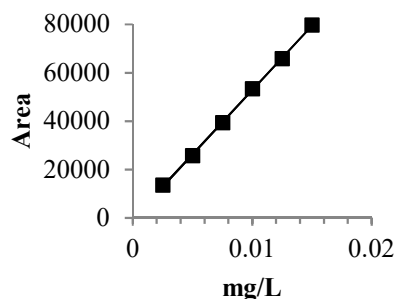
$$y = 5061302.9x - 57.14$$

$$r^2 = 0.9995$$



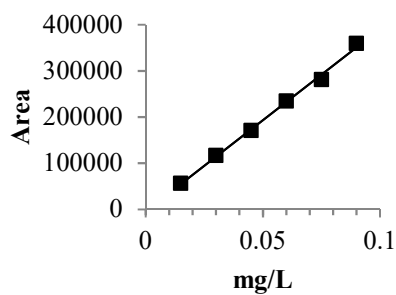
$$y = 5153417.1x - 216.19$$

$$r^2 = 0.9997$$



$$y = 5322324.6x - 351.34$$

$$r^2 = 0.9996$$



$$y = 3944002.3x - 3859.0867$$

$$r^2 = 0.9966$$

図3 ベンジルアデニン検量線の例

(4) 定量限界

定量限界の算出結果を以下に示した。

$$0.005 \text{ mg/kg} \left[\frac{\text{試験溶液量 (5 mL)}}{\text{試験溶液中の試料量 (1 g)}} \right] \\ \times \left[\frac{\text{分析対象化合物の定量限界相当量 (0.002 ng)}}{\text{注入量 (2 } \mu\text{L)}} \right]$$

2. 試験溶液調製法の検討

(1) 抽出条件の検討

多田ら¹⁾の結果から、アセトン抽出でベンジルアデニンを回収可能と判断した。

(2) 転溶条件の検討

多田ら¹⁾によれば、酢酸エチルへの転溶時、水層の pH を検討し、pH 6.5~10.5 の範囲では 8.0~9.0 付近が最適であるとされているが、pH の範囲を広げて検討した。

0.5 mol/L 塩化アンモニウム溶液、0.5 mol/L 塩酸、0.5 mol/L アンモニア水を適宜混合して pH 2.0~11.0 の溶液を調製し、この液をそれぞれ 4 mL とり、10 mg/L ベンジルアデニンメタノール溶液 4 μ L を添加した。これに酢酸エチル 2 mL を加え、1 分間振とうし静置後、酢酸エチル層から 1 mL を正確に分取した。窒素吹きつけにより乾固、メタノールを加えて正確に 1 mL として測定した。

結果を図 4 に示した。ベンジルアデニンの回収率は pH 9.0 が最も良好であったが、pH 5.0~9.0 の範囲であれば 95%以上回収できた。なお、転溶溶媒を *n*-ヘキサンとした場合は全く回収できなかった。

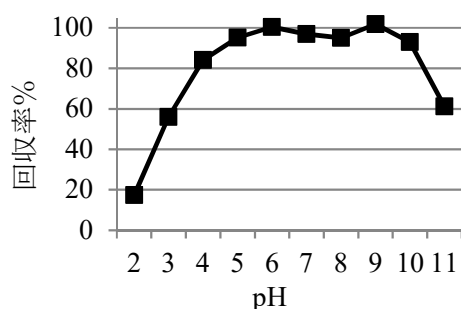


図 4 緩衝液の pH 変動による回収率の変化 (酢酸エチル転溶)

次に、0.5 mol/L アンモニア・塩化アンモニウム溶液 (pH 9.0) (そのまま、又は塩化ナトリウムを 10 w/v% の濃度となるように加えたもの)、0.5 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.0) を用いて比較検討した。水 10 mL に 10 mg/L ベンジルアデニンメタノール溶液 20 μ L を添加し、いずれかの緩衝液 40 mL を加えた。これに酢酸エチル 40 mL を加え、5 分間振とう抽出を行い、酢酸エチル層を無水硫酸ナトリウムで脱水した。水層にはさらに酢酸エチル 20 mL を加えて 5 分間振とう抽出し、酢酸エチル層を無水硫酸ナトリウムで脱水した。2 回の抽出で得られた酢酸エチル層をそれぞれ減圧濃縮、窒素吹きつけによる乾固後、メタノールを加えて正確に 1 mL として測定した。

結果を表 2 に示した (n=3 の平均値)。0.5 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.0) の方が、0.5 mol/L アンモニア・塩化アンモニウム緩衝液 (pH 9.0) より回収率は良好であった。0.5 mol/L アンモニア・塩化アンモニウム緩衝液 (pH 9.0) に 10 w/v% 塩化ナトリウムを含有させた場合は、塩化ナトリウムを含有しない場合に比べてやや回収率が向上したが、それでも、0.5 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.0) の方が良好であった。

表2 緩衝液の違いによるベンジルアデニン回収率の比較 (酢酸エチル転溶)

溶媒転溶条件	回収率%
0.5 mol/L アンモニア・塩化アンモニウム緩衝液 (pH 9.0)	1 回目 74.1
	2 回目 11.9
	計 86.0
10 w/v%塩化ナトリウム含有 0.5 mol/L アンモニア・塩化アンモニウム緩衝液 (pH 9.0)	1 回目 82.4
	2 回目 6.5
	計 88.9
0.5 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.0)	1 回目 87.3
	2 回目 4.9
	計 92.2

さらに、緩衝能について確認した。レモン果汁を水で10倍希釈したもの (pH 2.7) と0.5 mol/L アンモニア・塩化アンモニウム溶液 (pH 9.0) を等量混合した場合、pH 7.9 となり、1 : 4 の比で混合した場合は pH 8.8 となった。同様に、0.5 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.0) を等量混合した場合は、pH 6.7 となり、1 : 4 の比で混合した場合は pH 6.9 となった。このことから、農産物の抽出液と緩衝液を1 : 4 の比で混合する条件であれば、どちらの緩衝液を用いても、緩衝液の pH に近い pH を維持できると推察した。

以上から、回収率がより良好であった、0.5 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.0) を選択した。

また、試料の抽出にはアセトンを用いているが、アセトンが20%混ざっていても酢酸エチル転溶でベンジルアデニンを回収できることを確認したため、分取したアセトン抽出液を濃縮せずに転溶操作を行うこととした。

なお、7. 試験溶液の調製にしたがって操作したアスパラガス、すいか、りんご及びぶどうのアセトン抽出液10 mL にそれぞれ0.5 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.0) 40 mL に加えたときの pH はいずれも約7であり (かぼちゃについては確認していない)、0.5 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.0) の緩衝能は十分であった。

(3) カラム精製の検討

多田ら¹⁾は、精製にトリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲル/エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラムを用いて、水1%含有アセトン・*n*-ヘキサン (1 : 1) 混液で溶出する条件としていたが、溶出溶媒除去等の操作を簡便化するため、他の精製条件の検討を行った。

ベンジルアデニンは、アミン構造を持つことから、陽イオン交換による精製を試みることにし、SCX ミニカラムを用いて溶出条件を検討した。

表3に検討結果を示した。ベンジルアデニンは、SCX ミニカラムにおいて酢酸エチル10 mL 及びメタノール10 mL で溶出しなかった。データは示していないが、2 v/v%ギ酸・メタノール溶液10 mL でも溶出しなかった。アンモニアアルカリ性では、メタノールを含有しない、水のみ条件でも20 mL 以上用いれば溶出すると推測された。

夾雑成分の溶出を抑える効果を期待してメタノール比率をできるだけ低くし、かつ、溶出液の濃縮の手間を考慮して5 mL 以内にベンジルアデニンを全量溶出できる条件を検討した結果、アンモニア水、水及びメタノール (1 : 30 : 20) 混液で溶出する条件を採用した。

SCX ミニカラムに試料を負荷するときの条件は、試料を乾固した場合、残留物がメタノールに溶けにくくなる可能性を考慮し、酢酸エチル溶液のままとした。その後、メタノールを注入して夾雑物及び酢酸エチルを流出させて除去してから、溶出操作を行うこととした。

表3 SCX ミニカラムからの溶出状況

溶出条件		回収率%
(メタノール→アンモニア水/水 (2:98) でコンディショニング)		
アンモニア水/水 (2:98)	0-5 mL	0.2
	5-10 mL	19.3
アンモニア水/[水/メタノール (1:1)] (2:98)	0-5 mL	62.8
	5-10 mL	0
アンモニア水/メタノール (2:98)	0-10 mL	0
	5-10 mL	0
計		82.3
(酢酸エチルでコンディショニング)		
酢酸エチル	0-10 mL	0
メタノール	0-10 mL	0
アンモニア水/[水/メタノール (1:1)] (2:98)	0-5 mL	101.6
計		101.6
(メタノール→アンモニア水/水 (2:98) でコンディショニング)		
アンモニア水/水 (2:98)	0-5 mL	0
	5-10 mL	2.6
	10-15 mL	59.1
	15-20 mL	27.8
計		89.5
(メタノールでコンディショニング)		
アンモニア水/水/メタノール (1:25:25)	0-1 mL	0
	1-2 mL	47.1
	2-3 mL	68.7
	3-4 mL	0.1
	4-5 mL	0.1
	5-6 mL	0.1
	6-7 mL	0.1
計		116.1
(メタノールでコンディショニング)		
アンモニア水/水/メタノール (1:30:20)	0-1 mL	0
	1-2 mL	9.1
	2-3 mL	107.0
	3-4 mL	0.3
	4-5 mL	0
	5-6 mL	0
	6-7 mL	0
計		116.4

※いずれもコンディショニング後、10 mg/L ベンジルアデニンメタノール溶液 5 μ L を負荷

(4) 精製効果の検討

かぼちゃのブランク試料について、実験方法 7. 試験溶液の調製に従ってアセトン抽出し、200 mL 定容した液を 10 mL 分取し、これに 0.01 mg/L ベンジルアデニンメタノール溶液を 0.5 mL 添加した (試料中 0.005 ppm 相当)。実験方法 7. 試験溶液の調製に従って以後の操作を行い、測定した。また、同様の操作で、酢酸エチルによる転溶の前に、*n*-ヘキサン 20 mL を加えて 5 分間振とうし、*n*-ヘキサン層を捨てる操作を追加した場合に精製効果に影響があるか確認した。マトリックス添加標準溶液についても調製し、測定した。

結果を表4に示した。図5に *n*-ヘキサン洗浄の有無によるブランク試料のトータルイオンクロマトグラムの比較を示した。*n*-ヘキサン洗浄の有無により回収率に差は見られず、いずれも良好な結果が得られた。また、トータルイオンクロマトグラムにおいても明らかな違いは認められなかった。このため、*n*-ヘキサン洗浄を実施せず、実験方法7. 試験溶液の調製どおりの方法で概ね良好に測定できると推測した。なお、*n*-ヘキサン洗浄は、脂質の多い試料については脱脂方法として採用できる可能性があると考えられる。

表4 精製効果の検討結果

試料	<i>n</i> -ヘキサン洗浄なし		<i>n</i> -ヘキサン洗浄あり	
	回収率%	Mt 比	回収率%	Mt 比
かぼちゃ	91.2	0.947	91.6	0.943

Mt 比=マトリックス添加標準のピーク面積/溶媒標準のピーク面積

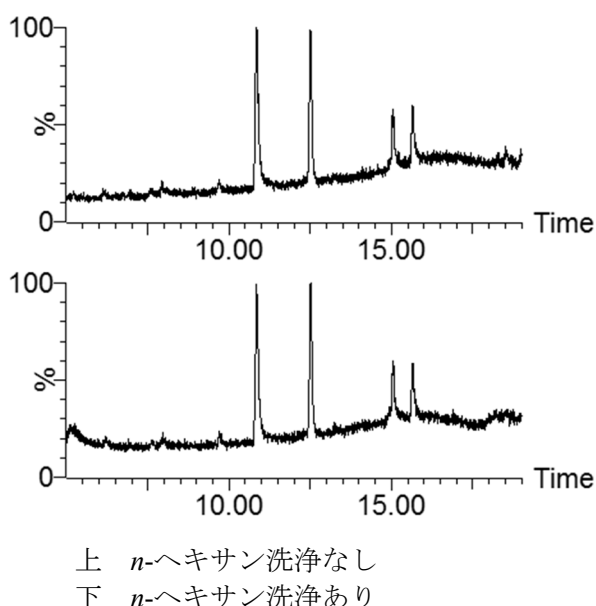


図5 *n*-ヘキサン洗浄の有無によるブランク試料（かぼちゃ）のトータルイオンクロマトグラムの違い

(5) 安定性の検討

アンモニア含有試料液の安定性を確認するため、前述(4) 精製効果の検討において調製した試験溶液を10℃で保存し、調製翌日に再測定したが、ピーク面積の明らかな減少は見られなかった。

3. 添加回収試験

アスパラガス、かぼちゃ、すいか、りんご及びぶどうの5食品を試料に用いて、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。

低濃度(0.005 ppm)添加の添加回収試験における回収率100%相当の標準溶液、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6~10に示した。また、各食品のブランク試料のスクリー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11に示した。

(1) 選択性

選択性の検討結果を表5に示した。かぼちゃで痕跡が認められたが、選択性の評価基準に適合した。

表5 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) ¹⁾						面積(高さ) 比(a)/(b)	選択性 の評価 ³⁾	備考	
					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 ²⁾						
								n=1	n=2	平均(a)	n=1	n=2	平均(b)				
1	ベンジル アデニン	アスパラ ガス	0.005	0.3	基準値	0.3	< 0.100	面積	0	0	0			#DIV/0!	#DIV/0!	○	
2	ベンジル アデニン	かぼちゃ	0.005	0.05	基準値	0.05	< 0.100	面積	164	170	167	20816	21559	21187	0.008	○	
3	ベンジル アデニン	すいか	0.005	0.02	基準値	0.02	< 0.100	面積	0	0	0			#DIV/0!	#DIV/0!	○	
4	ベンジル アデニン	りんご	0.005	0.05	基準値	0.05	< 0.100	面積	0	0	0			#DIV/0!	#DIV/0!	○	
5	ベンジル アデニン	ぶどう	0.005	0.02	基準値	0.02	< 0.100	面積	0	0	0			#DIV/0!	#DIV/0!	○	

*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

真度及び併行精度の検討結果を表6に示した。真度は、82.5~94.3%と概ね良好な結果であった。併行精度は、すべて10 RSD%未満であった。

低濃度添加時の各化合物のピークのS/N比は、最低52(アスパラガス)であり、S/N比10以上の感度が得られた。

表6 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 ¹⁾	検量線			回収率(%)					真度 (%)	併行精度 (RSD%)	S/N ²⁾			備考
							傾き	切片	r ² 値	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5			Max.	Min.	平均値	
1	ベンジル アデニン	アスパラ ガス	0.005	0.3	0.005	S/N	4220103	90	0.9984	91.5	86.5	88.5	88.5	94.9	90.0	3.6	54.9	52.3	53.6	
2	ベンジル アデニン	かぼちゃ	0.005	0.05	0.005	S/N	2344423	-97	0.9948	89.5	94.7	93.8	86.8	90.1	91.0	3.6	80.0	115.4	97.7	
3	ベンジル アデニン	すいか	0.005	0.02	0.005	S/N	5876171	-30	0.9990	90.1	93.0	90.4	96.0	90.9	92.1	2.7	279.8	193.9	236.9	
4	ベンジル アデニン	りんご	0.005	0.05	0.005	S/N	5061303	-57	0.9995	83.3	84.3	81.9	81.8	81.3	82.5	1.5	212.6	199.2	205.9	
5	ベンジル アデニン	ぶどう	0.005	0.02	0.005	S/N	4858069	-169	0.9972	91.4	98.0	92.2	95.1	94.9	94.3	2.8	386.3	510.0	448.1	
6	ベンジル アデニン	アスパラ ガス	0.005	0.3	0.3	-	3944002	-3859	0.9967	88.1	91.2	89.7	91.6	88.4	89.8	1.8			#DIV/0!	
7	ベンジル アデニン	かぼちゃ	0.005	0.05	0.05	-	2561135	-709	0.9990	80.8	83.8	85.3	88.5	87.1	85.1	3.5			#DIV/0!	
8	ベンジル アデニン	すいか	0.005	0.02	0.02	-	6479651	413	0.9992	92.9	91.0	87.6	91.1	84.3	89.4	3.9			#DIV/0!	
9	ベンジル アデニン	りんご	0.005	0.05	0.05	-	5322325	-351	0.9996	84.7	86.5	82.6	85.6	84.0	84.7	1.8			#DIV/0!	
10	ベンジル アデニン	ぶどう	0.005	0.02	0.02	-	5153417	-216	0.9997	90.4	92.2	92.0	91.1	92.0	91.6	0.8			#DIV/0!	

*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、表7に示した。試料マトリックスの影響を補正した真度を表8に示した。

溶媒標準のピーク面積に対するマトリックス添加標準のピーク面積の比は、0.94~1.01であり、試料マトリックスの影響はほとんどなかった。

表7 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 ^{*1} (mg/L)	ピーク面積(高さ) ²									備考
							面積又は 高さの別	ブランク ^{*3}	マトリックス添加標準溶液 ⁴			溶媒標準溶液			ピーク面積 (高さ)比 ⁵	
									n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均		
1	ベンジルアデニン	アスパラガス	0.005	0.3	0.005	0.005	面積	0	4768	4590	4679	4677	4624	4650	1.01	
2	ベンジルアデニン	かぼちゃ	0.005	0.05	0.005	0.005	面積	75	2761	2754	2682	2823	2866	2844	0.94	
3	ベンジルアデニン	すいか	0.005	0.02	0.005	0.005	面積	0	6081	6056	6068	6349	6314	6331	0.96	
4	ベンジルアデニン	りんご	0.005	0.05	0.005	0.005	面積	0	5022	5007	5015	5123	5149	5136	0.98	
5	ベンジルアデニン	ぶどう	0.005	0.02	0.005	0.005	面積	0	5487	5327	5407	5480	5311	5395	1.00	
6	ベンジルアデニン	アスパラガス	0.005	0.3	0.3	0.3	面積	0	258976	256985	257981	260695	262446	261571	0.99	
7	ベンジルアデニン	かぼちゃ	0.005	0.05	0.05	0.05	面積	170	20646	21389	20847	21781	21754	21768	0.96	
8	ベンジルアデニン	すいか	0.005	0.02	0.02	0.02	面積	0	24462	24396	24429	25102	24522	24812	0.98	
9	ベンジルアデニン	りんご	0.005	0.05	0.05	0.05	面積	0	48935	48966	48950	48529	48843	48686	1.01	
10	ベンジルアデニン	ぶどう	0.005	0.02	0.02	0.02	面積	0	20600	20684	20642	20307	20399	20353	1.01	

*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

*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8 補正真度

No.	分析対象化合物	食品名	添加濃度 (ppm)	真度 (%)	Mt比	補正真度 (%)
1	ベンジルアデニン	アスパラガス	0.005	90.0	1.01	89.1
2	ベンジルアデニン	かぼちゃ	0.005	91.0	0.94	96.8
3	ベンジルアデニン	すいか	0.005	92.1	0.96	95.9
4	ベンジルアデニン	りんご	0.005	82.5	0.98	84.2
5	ベンジルアデニン	ぶどう	0.005	94.3	1.00	94.3
6	ベンジルアデニン	アスパラガス	0.3	89.8	0.99	90.7
7	ベンジルアデニン	かぼちゃ	0.05	85.1	0.96	88.6
8	ベンジルアデニン	すいか	0.02	89.4	0.98	91.2
9	ベンジルアデニン	りんご	0.05	84.7	1.01	83.9
10	ベンジルアデニン	ぶどう	0.02	91.6	1.01	90.7

Mt比=マトリックス添加標準のピーク面積/溶媒標準のピーク面積

補正真度=真度/Mt比

4.その他の試験法検討に関連する事項

(1) 脱脂方法の検討

アセトニトリル/ヘキサン分配による脱脂について検討した。*n*-ヘキサン 30 mL に 10 mg/L ベンジルアデニンメタノール溶液 5 μ L を添加した後、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL を加えて 5 分間振とう抽出し、アセトニトリル層を分取した後、*n*-ヘキサン層に再度 *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL を加えて 5 分間振とう抽出した。アセトニトリル層と *n*-ヘキサン層をそれぞれ濃縮し、メタノールで 5 mL に定容して測定した。

結果を表 9 に示した ($n=3$ の平均値)。アセトニトリル層への回収率が 50%ほどで低かった一方、*n*-ヘキサン層からもベンジルアデニンが検出されなかったことから、ガラス容器への吸着や分解が考えられた。

表 9 アセトニトリル/ヘキサン分配の検討結果

回収率%	
アセトニトリル層 (1 回目)	52.2
アセトニトリル層 (2 回目)	1.4
<i>n</i> -ヘキサン層	0
計	53.6

(2) アセトニトリル溶液の安定性の確認

前述 (1) 脱脂方法の検討において、回収率が低く、ガラス容器への吸着や分解が考えられたことから、以下の実験を行った。

ガラス試験管に 10 mg/L ベンジルアデニンメタノール溶液 5 μ L をマイクロシリンジを用いて量り取り、アセトニトリル 5 mL を正確に加えて混合し測定した。そのピーク面積を、同様に調製したメタノール溶液と比較したところ、アセトニトリル溶液はメタノール溶液の約 67%のピーク面積であり、アセトニトリルを溶媒に用いた場合には、ガラスへの吸着や分解が生じると疑われた。

(3) カラム精製の検討

各種ミニカラムを用いて、ベンジルアデニンの溶出挙動を調べ、精製条件を検討した。

結果を表 10~16 に示した。Bond Elut C18 ミニカラムにおいて、中性条件ではカラムへの吸着が強く溶出しづらいが、ギ酸酸性条件では 5 mL から溶出し始め、15 mL までに 90%溶出した (表 10)。また、同じオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムである InertSep C18 ミニカラムの方が Bond Elut C18 ミニカラムより保持が弱く溶出しやすい結果となった (表 11)。SI ミニカラム、FL-PR ミニカラム、SAX ミニカラム、PSA ミニカラムでは保持が強く、溶媒の極性を上げることで回収率が僅かに改善した (表 12~15)。陰イオン交換カラムである MAX ミニカラムでは逆相カラムとしての働きが大きく影響したためか、ギ酸酸性条件における回収率がアンモニアアルカリ性条件の場合よりも良好な結果となった (表 16)。

表 10 Bond Elut C18 ミニカラムからの溶出状況

溶出条件		回収率%
(アセトニトリル→0.1%ギ酸溶液でコンディショニング、10 mg/L ベンジルアデニンメタノール溶液 5 μ L 負荷)		
アセトン/0.1%ギ酸溶液 (1:4)	0-5 mL	0
	5-10 mL	42.3
	10-15 mL	47.6
	15-20 mL	6.0
アセトニトリル	0-5 mL	0.9
計		96.8

表 11 InertSep C18 ミニカラムからの溶出状況

溶出条件		回収率%
(アセトニトリル→水でコンディショニング、10 mg/L ベンジルアデニンメタノール溶液 5 µL 負荷)		
アセトニトリル/水 (1 : 4)	0- 5 mL	5.8
	5-10 mL	70.8
	10-15 mL	13.2
	15-20 mL	2.9
アセトニトリル	0- 5 mL	1.0
計		93.7
(アセトニトリル→水でコンディショニング、10 mg/L ベンジルアデニンメタノール溶液 5 µL 負荷)		
アセトニトリル/水 (1 : 4)	0- 5 mL	0
	5-10 mL	35.0
	10-15 mL	37.2
	15-20 mL	6.1
アセトニトリル	0- 5 mL	1.8
計		80.2
(アセトニトリル→0.1%ギ酸溶液でコンディショニング、10 mg/L ベンジルアデニンメタノール溶液 5 µL 負荷)		
0.1 vol%ギ酸 [アセトン/水 (1 : 4)]	0- 5 mL	87.4
	5-10 mL	5.4
	10-15 mL	0.6
	15-20 mL	0.2
アセトニトリル	0- 5 mL	0
計		93.5

表 12 SI ミニカラムからの溶出状況

溶出条件		回収率%
(n-ヘキサンでコンディショニング、10 mg/L ベンジルアデニンメタノール溶液 5 µL 負荷)		
アセトン/n-ヘキサン (1 : 1)	0- 5 mL	9.9
	5-10 mL	7.3
計		17.3
(n-ヘキサンでコンディショニング、10 mg/L ベンジルアデニンメタノール溶液 5 µL 負荷)		
アセトン	0- 5 mL	13.6
	5-10 mL	3.3
計		16.9

表 13 FL-PR ミニカラムからの溶出状況

溶出条件		回収率%
(n-ヘキサンでコンディショニング、10 mg/L ベンジルアデニンアセトン溶液 5 µL 負荷)		
アセトン/n-ヘキサン (1:9)	0-5 mL	0
	5-10 mL	0
アセトン/n-ヘキサン (3:7)	0-5 mL	2.3
	5-10 mL	5.9
アセトン/n-ヘキサン (1:1)	0-5 mL	0.4
	5-10 mL	0
アセトン/n-ヘキサン (7:3)	0-5 mL	0
	5-10 mL	0
アセトン/n-ヘキサン (9:1)	0-5 mL	0.2
	5-10 mL	0
アセトン	0-5 mL	40.6
計		49.6

表 14 SAX ミニカラムからの溶出状況

溶出条件		回収率%
(n-ヘキサンでコンディショニング、10 mg/L ベンジルアデニンアセトン溶液 5 µL 負荷)		
アセトン/n-ヘキサン (1:9)	0-5 mL	0
	5-10 mL	0.3
アセトン/n-ヘキサン (3:7)	0-5 mL	0.2
	5-10 mL	1.0
アセトン/n-ヘキサン (1:1)	0-5 mL	1.6
	5-10 mL	0
アセトン/n-ヘキサン (7:3)	0-5 mL	0.8
	5-10 mL	35.8
アセトン/n-ヘキサン (9:1)	0-5 mL	13.8
	5-10 mL	0.5
アセトン	0-5 mL	0.5
	5-10 mL	0.7
メタノール	0-5 mL	1.0
計		56.0

表 15 PSA ミニカラムからの溶出状況

溶出条件		回収率%
(n-ヘキサンでコンディショニング、10 mg/L ベンジルアデニンアセトン溶液 5 µL 負荷)		
アセトン/n-ヘキサン (1 : 9)	0-10 mL	0
アセトン/n-ヘキサン (3 : 7)	0-10 mL	0
アセトン/n-ヘキサン (1 : 1)	0-10 mL	0
アセトン/n-ヘキサン (7 : 3)	0-10 mL	0
アセトン/n-ヘキサン (9 : 1)	0- 5 mL	0.5
	5-10 mL	7.0
アセトン	0- 5 mL	26.7
	5-10 mL	11.9
メタノール	0- 5 mL	9.5
計		55.6

表 16 MAX ミニカラムからの溶出状況

溶出条件		回収率%
(メタノール→水でコンディショニング、10 mg/L ベンジルアデニンメタノール溶液 5 µL 負荷)		
水	0-10 mL	0
水/メタノール (1 : 1)	0-10 mL	0
メタノール	0- 5 mL	83.7
	5-10 mL	2.0
計		85.7
(メタノール→2%ギ酸でコンディショニング、10 mg/L ベンジルアデニンメタノール溶液 5 µL 負荷)		
2 vol%ギ酸	0-10 mL	0.3
	0- 5 mL	0
2 vol%ギ酸 [水/メタノール (1 : 1)]	5-10 mL	110.1
	0- 5 mL	3.8
2 vol%ギ酸・メタノール	5-10 mL	0.8
	0-10 mL	0
計		115.0
(メタノール→アンモニア水/水 (2 : 98) でコンディショニング、10 mg/L ベンジルアデニンメタノール溶液 5 µL 負荷)		
アンモニア水/水 (2 : 98)	0-5 mL	0.2
	5-10 mL	0
アンモニア水 [水/メタノール (1 : 1)] (2 : 98)	0-10 mL	0
アンモニア水/メタノール (2 : 98)	0-10 mL	0
計		0.2
(アンモニア水/水 (2 : 98) でコンディショニング、10 mg/L ベンジルアデニンメタノール溶液 5 µL 負荷)		
アンモニア水/メタノール (2 : 98)	0-10 mL	0
2 vol%ギ酸 [水/メタノール (1 : 1)]	0- 5 mL	88.3
	5-10 mL	2.9
	10-15 mL	0.6
計		91.7

5. 考察

真度、併行精度とも良好な結果が得られており、今回開発した試験法が有用と考えられた。

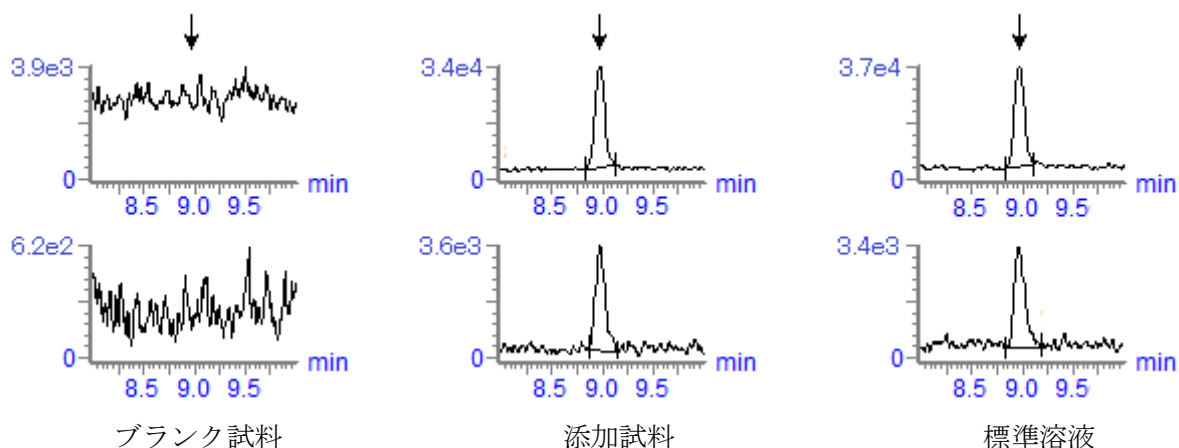
定量限界については、0.005 ppm 添加時の真度、併行精度が評価基準に適合し、かつ、S/N 比 10 以上が得られたことから、0.005 mg/kg を定量限界として設定可能と判断した。

[結論]

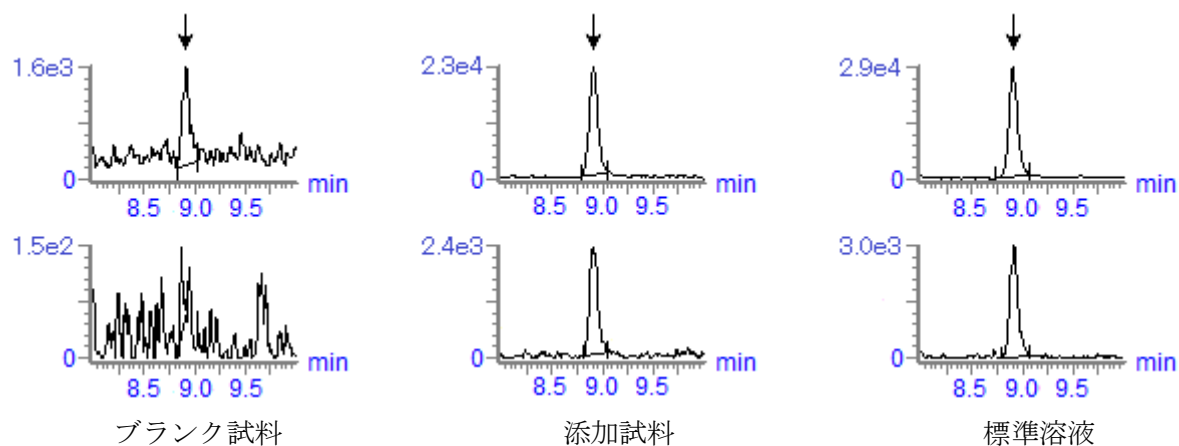
農産物中のベンジルアデニンの分析法として、試料からアセトンで抽出し、酢酸エチルによる転溶後、SCX ミニカラムで精製し、LC-MS/MS で定量及び確認する方法を開発した。開発した試験法をアスパラガス、かぼちゃ、すいか、りんご及びぶどうの 5 食品に適用した結果、真度は 82.5～94.3% であり、良好な結果が得られた。また、定量限界として 0.005 mg/kg を設定可能であることが確認された。

[参考文献]

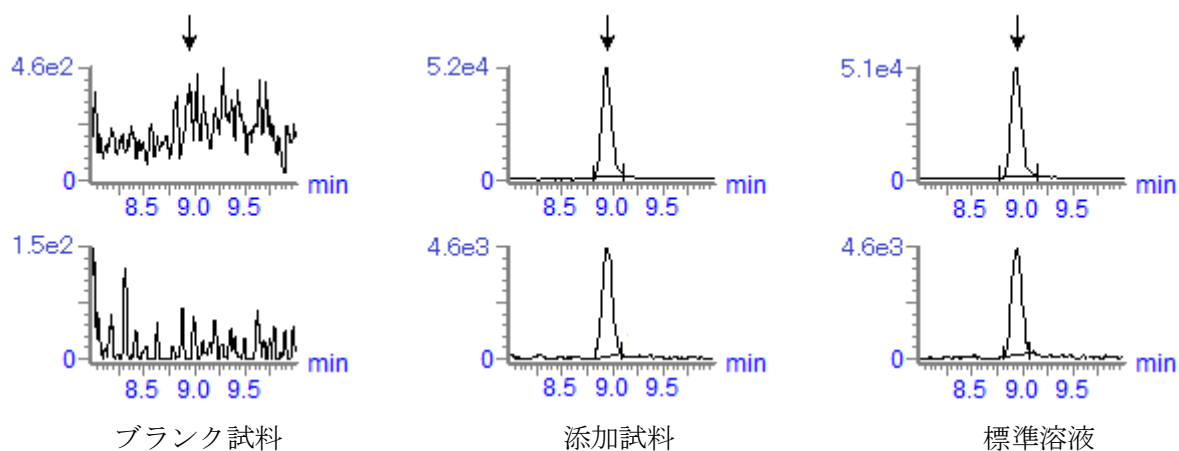
- 1) 多田 裕之ら、農産物中ベンジルアミノプリン分析法、食衛誌、**49**、136-140 (2008)
- 2) 多田 裕之ら、新規サロゲート物質を用いた農産物におけるベンジルアミノプリンの分析法、岐阜県保健環境研究所報、**17**、1-5 (2009)



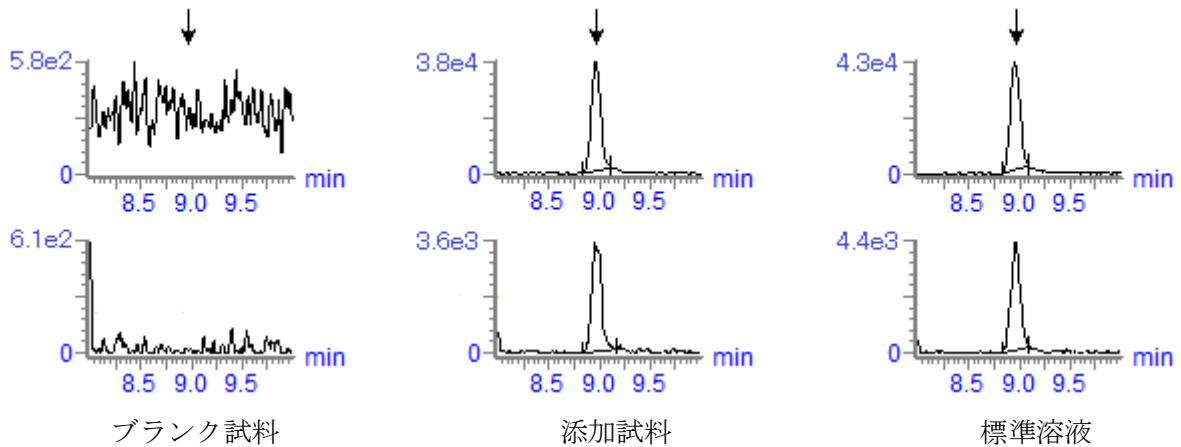
ブランク試料
 上 (定量) m/z 226.1→90.9
 下 (定性) m/z 226.1→64.9
 図6 アスパラガスのクロマトグラム 試料中 0.005 ppm 相当



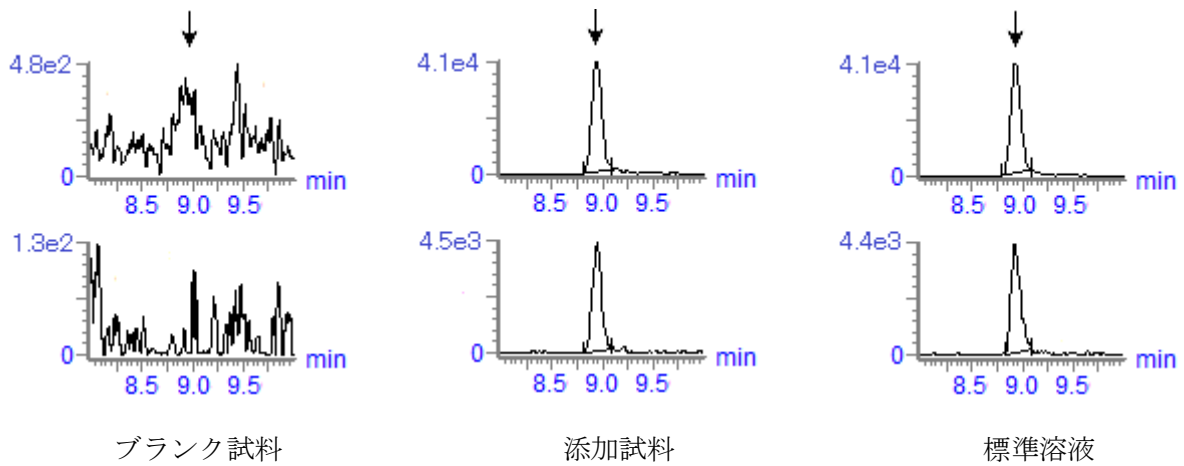
ブランク試料
 上 (定量) m/z 226.1→90.9
 下 (定性) m/z 226.1→64.9
 図7 かぼちゃのクロマトグラム 試料中 0.005 ppm 相当



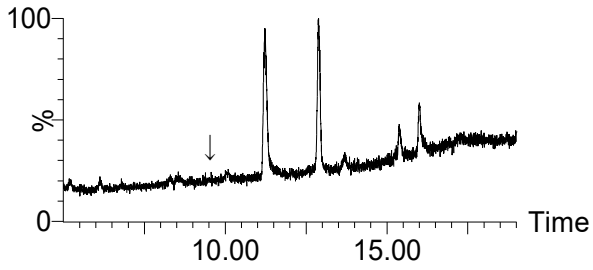
ブランク試料
 上 (定量) m/z 226.1→90.9
 下 (定性) m/z 226.1→64.9
 図8 すいかのクロマトグラム 試料中 0.005 ppm 相当



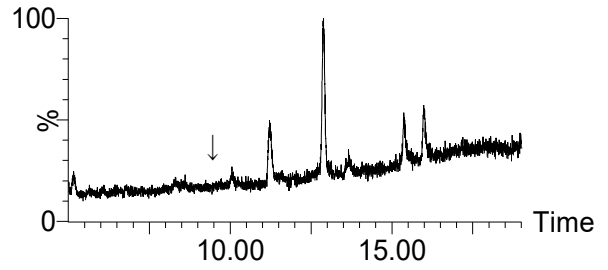
ブランク試料
 上 (定量) m/z 226.1→90.9
 下 (定性) m/z 226.1→64.9
 図9 りんごのクロマトグラム 試料中 0.005 ppm 相当



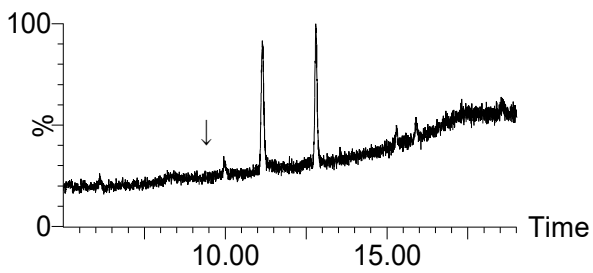
ブランク試料
 上 (定量) m/z 226.1→90.9
 下 (定性) m/z 226.1→64.9
 図10 ぶどうのクロマトグラム 試料中 0.005 ppm 相当



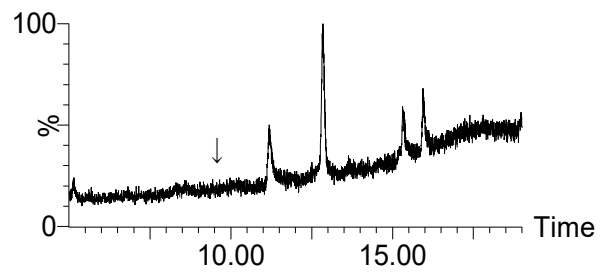
アスパラガス



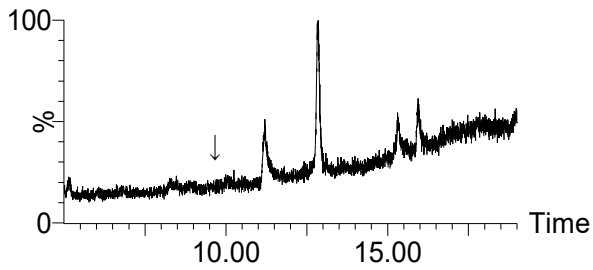
りんご



かぼちゃ



ぶどう



すいか

図 11 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：50~1000 amu、CV=44 V)