

イプフェンカルバゾン試験法（農産物）

1. 分析対象化合物

イプフェンカルバゾン

2. 適用食品

農産物

3. 装置

液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計（LC-MS/MS）

4. 試薬、試液

次に示すもの以外は、総則の3に示すものを用いる。

イプフェンカルバゾン標準品 本品はイプフェンカルバゾン 98 %以上を含む。

5. 試験溶液の調製

1) 抽出

① 穀類、豆類及び種実類の場合

試料 10.0 g に水 20 mL を加え、30 分間放置する。これにアセトン 100 mL を加え、ホモジナイズした後、吸引ろ過する。ろ紙上の残留物にアセトン 50 mL を加えホモジナイズし、上記と同様にろ過する。得られたろ液を合わせ、アセトンを加えて正確に 200 mL とする。この溶液から正確に 20 mL を分取し、飽和塩化ナトリウム溶液 20 mL を加え、*n*-ヘキサン 20 mL で振とう抽出した後、毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離し、上澄液を採る。水層に *n*-ヘキサン 20 mL を加えて振とう抽出し、上記と同様に遠心分離し、上澄液を採る。得られた上澄液を先の上澄液に合わせ、40°C 以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物にアセトン及び *n*-ヘキサン（1 : 9）混液 5 mL を加えて溶かす。

② 果実及び野菜の場合

試料 20.0 g にアセトン 100 mL を加え、ホモジナイズした後、吸引ろ過する。ろ紙上の残留物にアセトン 50 mL を加えホモジナイズし、上記と同様にろ過する。得られたろ液を合わせ、アセトンを加えて正確に 200 mL とする。この溶液から正確に 10 mL を分取し、飽和塩化ナトリウム溶液 10 mL を加え、*n*-ヘキサン 10 mL で振とう抽出した後、毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離し、上澄液を採る。水層に *n*-ヘキサン 10 mL を加えて振とう抽出し、上記と同様に遠心分離し、上澄液を採る。得られた上澄液を先の上澄液に合わせ、40°C 以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物にアセトン及び *n*-ヘキサン（1 : 9）混液 5 mL を加えて溶かす。

③ 茶の場合

試料 5.00 g に水 20 mL を加え、30 分間放置する。これにアセトン 100 mL を加え、ホモジナイズした後、吸引ろ過する。ろ紙上の残留物にアセトン 50 mL を加えホモジナイズし、上記と同様にろ過する。得られたろ液を合わせ、アセトンを加えて正確に 200 mL とする。この溶液から正確に 40 mL を分取し、飽和塩化ナトリウム溶液 40 mL を加え、*n*-ヘキサン 40 mL で振とう抽出した後、毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離し、上澄液を採る。水層に *n*-ヘキサン 40 mL を加えて振とう抽出し、上記と同様に遠心分離し、上澄液を採る。得られた上澄液を先の上澄液に合わせ、40°C 以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物にアセトン及び *n*-ヘキサン (1 : 9) 混液 5 mL を加えて溶かす。

2) 精製

① グラファイトカーボン/エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲル積層カラムクロマトグラフィー

グラファイトカーボン/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 (500 mg/500 mg) にアセトン及び *n*-ヘキサン各 10 mL を順次注入し、各流出液は捨てる。このカラムに 1) で得られた溶液を注入した後、アセトン及び *n*-ヘキサン (1 : 9) 混液 5 mL を注入し、負荷液を含む全溶出液を採り、40°C 以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物にアセトニトリル及び水 (3 : 7) 混液 5 mL を加えて溶かす。

② オクタデシルシリル化シリカゲルカラムクロマトグラフィー

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム (500 mg) にアセトニトリル及び水各 10 mL を順次注入し、各流出液は捨てる。このカラムに①で得られた溶液を注入した後、アセトニトリル及び水 (3 : 7) 混液 5 mL を注入し、流出液は捨てる。アセトニトリル及び水 (3 : 2) 混液 10 mL を注入し、溶出液をアセトニトリル及び水 (3 : 2) 混液で正確に 10 mL としたものを試験溶液とする。

6. 検量線の作成

イプフェンカルバゾン標準品のアセトニトリル及び水 (3 : 2) 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 0.01 mg/kg に相当する試験溶液中濃度は 0.001 mg/L である。

7. 定量

試験溶液を LC-MS/MS に注入し、6 の検量線でイプフェンカルバゾンの含量を求める。

8. 確認試験

LC-MS/MS により確認する。

9. 測定条件

(例)

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲル 内径 2.1 mm、長さ 100 mm、粒子径 3.5 μm

カラム温度：40 $^{\circ}\text{C}$

移動相：0.01 vol% 酢酸・アセトニトリル溶液及び 0.01 vol% 酢酸の混液 (1 : 1) で 0.5 分間保持した後、(4 : 1) までの濃度勾配を 7.5 分間で行い 4 分間保持する。

イオン化モード：ESI (+)

主なイオン (m/z)：プリカーサーイオン 427、プロダクトイオン 198

プリカーサーイオン 429、プロダクトイオン 198

注入量：5 μL

保持時間の目安：6 分

10. 定量限界

0.01 mg/kg

11. 留意事項

1) 試験法の概要

イプフェンカルバゾンを試料からアセトンで抽出し、*n*-ヘキサンに転溶した後、グラファイトカーボン/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 で定量及び確認する方法である。

2) 注意点

- ① イプフェンカルバゾンの LC-MS/MS 測定で、試験法開発時に使用したイオンを以下に示す。

定量イオン (m/z)：プリカーサーイオン 427、プロダクトイオン 198

定性イオン (m/z)：プリカーサーイオン 429、プロダクトイオン 198

- ② 試験法開発時に検討した食品：玄米、大豆、ほうれんそう、キャベツ、ばれいしょ、オレンジ、りんご、及び緑茶

12. 参考文献

なし

13. 類型

C