

※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ください。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。

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

イプフェンカルバゾン試験法（農産物）

イプフェンカルバゾン試験法（農産物）の検討結果

【緒言】

イプフェンカルバゾンの農産物中の分析法の開発を行った。本検討において、通知一斉試験法「LC-MSによる農薬等の一斉試験法Ⅰ（農産物）」及び「LC-MSによる農薬等の一斉試験法Ⅱ（農産物）」の適用を試みたが、良好な結果が得られなかったことから、新たに個別分析法を開発した。農産物に対するイプフェンカルバゾンの残留基準は米（玄米）に0.05 ppmが設定されているだけである。

イプフェンカルバゾンの農薬としての特性、構造式及び物理化学的性質は、同時に提出するイプフェンカルバゾン試験法（畜水産物）に同じ。

【実験方法】

1. 試料

試料は埼玉県内で市販されていた1) 玄米、2) 大豆、3) ほうれんそう、4) キャベツ、5) ばれいしょ、6) オレンジ、7) りんご及び8) 緑茶を用いた。

各食品の試料採取の方法を以下に示した。

- 1) 玄米：粉碎機を用いて425 µmの標準網ふるいを通るように粉碎し均一化した。
- 2) 大豆：粉碎機を用いて425 µmの標準網ふるいを通るように粉碎し均一化した。
- 3) ほうれんそう：赤色根部を含み、ひげ根及び変質葉を除去し、細切したのち粉碎機を用いて磨砕均一化した。
- 4) キャベツ：外側変質葉及びしんを除去したもの4個をそれぞれ4等分し、各々から1等分を集め、細切したのち粉碎機を用いて磨砕均一化した。
- 5) ばれいしょ：泥を水で軽く洗い落とし、細切したのち粉碎機を用いて磨砕均一化した。
- 6) オレンジ：果実全体を細切したのち粉碎機を用いて磨砕均一化した。
- 7) りんご：花おち、しん及び果梗の基部を除去し、細切したのち粉碎機を用いて磨砕均一化した。
- 8) 緑茶：粉碎機を用いて425 µmの標準網ふるいを通るように粉碎し均一化した。

2. 試薬

標準品：イプフェンカルバゾンは北興化学工業（株）より提供され、純度99.7%のものを使用した。

標準原液：イプフェンカルバゾン標準品50 mgを精秤し、アセトンに溶解して50 mLとしたものを標準原液とした。

検量線用標準溶液：標準原液をアセトニトリル及び水（3：2）混液で適宜希釈し、0.0001~0.010 mg/Lの濃度の溶液を調製した。

添加用標準溶液：標準原液をアセトンで希釈して0.5 mg/L及び0.1 mg/L溶液を調製し

た。

アセトニトリル、メタノール及び蒸留水は高速液体クロマトグラフ用を、*n*-ヘキサン及びアセトンは残留農薬試験用を、ろ過補助剤はハイフロスーパーセル（和光純薬工業社製）を、その他の試薬はすべて特級品を用いた。精製用固相抽出カートリッジには InertSep GC/PSA（500 mg/500 mg/6 mL、GL サイエンス社製）及び InertSep C18（500 mg/6 mL、GL サイエンス社製）を用いた。あらかじめ InertSep GC/PSA カートリッジはアセトン及び *n*-ヘキサン各 10 mL で、InertSep C18 カートリッジはアセトニトリル及び水各 10 mL で順次、コンディショニングして使用した。

3. 装置

粉碎機：FP-25（Cuisinart 社製）

ホモジナイザー：ヒスコトロン（マイクロテック・ニチオン社製）

ロータリーエバポレーター：R-210（Buchi 社）

遠心分離器：テーブルトップ遠心機 4000（KUBOTA 社製）

LC 装置：ACQUITY UPLC（Waters 社製）

MS 装置：Xevo TQ MS（Waters 社製）

データ処理：MassLynx Ver.4.1

4. 測定条件

LC-MS/MS の測定条件を表 1 に示した。

表 1 LC-MS/MS 測定条件

LC条件																
カラム	XBridge C18 (内径2.1 mm、長さ100 mm、粒子径3.5 μm) Waters社製															
移動相流速 (mL/min)	0.2															
注入量 (μL)	5															
カラム温度 (°C)	40															
移動相	A液 : 0.01 vol% 酢酸含有アセトニトリル B液 : 0.01 vol% 酢酸															
グラジエント条件	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間</th> <th>A液(%)</th> <th>B液(%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.0</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>0.5</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>8.0</td> <td>80</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>12.0</td> <td>80</td> <td>20</td> </tr> </tbody> </table>	時間	A液(%)	B液(%)	0.0	50	50	0.5	50	50	8.0	80	20	12.0	80	20
時間	A液(%)	B液(%)														
0.0	50	50														
0.5	50	50														
8.0	80	20														
12.0	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(+)															
キャピラリー電圧 (kV)	3.0															
ソース温度 (°C)	150															
脱溶媒温度 (°C)	400															
コーンガス	窒素、50 L/hr															
脱溶媒ガス	窒素、800 L/hr															
コリジョンガス	アルゴン															
定量イオン (<i>m/z</i>)	427→198 [コーン電圧22V、コリジョンエネルギー12eV]															
定性イオン (<i>m/z</i>)	429→198 [コーン電圧22V、コリジョンエネルギー12eV]															
保持時間 (min)	5.5															

5. 定量

イプフェンカルバゾン標準原液をアセトニトリル及び水（3：2）混液で希釈し、0.0001~0.010 μg/mL 濃度範囲の数点の標準溶液を調製し、5 μL を LC-MS/MS に注入した。検量線から得られたクロマトグラムからイプフェンカルバゾンのピーク面積を求め、絶対検量線法で検量線を作成した。

6. 添加試料の調製

玄米（添加濃度：0.05 ppm）：試料 10.0 g に添加用標準溶液（0.5 mg/L）1 mL を添加し、混合した後、30 分間放置した。

大豆（添加濃度：0.01 ppm）：試料 10.0 g に添加用標準溶液（0.1 mg/L）1 mL を添加し、混合した後、30 分間放置した。

ほうれんそう、キャベツ、ばれいしょ、オレンジ及びりんご（添加濃度：0.01 ppm）：試料 20.0 g に添加用標準溶液（0.1 mg/L）2 mL を添加し、混合した後、30 分間放置した。

緑茶（添加濃度：0.01 ppm）：試料 5.0 g に添加用標準溶液（0.1 mg/L）0.5 mL を添加し、混合した後、30 分間放置した。

7. 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 を採り、水 20 mL を加えて 30 分間放置した後、アセトン 100 mL を加え、1 分間ホモジナイズした後、ろ過補助剤を用いて吸引ろ過した。残留物及び受器はアセトン 50 mL で同様に操作し、得られた液を合わせ、アセトンで 200 mL に定容した。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 及び *n*-ヘキサン 20 mL を加えて振とうした。毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離し、有機層を採取し、40 °C 以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物にアセトン及び *n*-ヘキサン (1 : 9) 混液 5 mL を加えて溶解した。

②果実及び野菜の場合

試料 20.0 g を採り、アセトン 100 mL を加え、1 分間ホモジナイズした後、ろ過補助剤を用いて吸引ろ過した。残留物及び受器はアセトン 50 mL で同様に操作し、得られた液を合わせ、アセトンで 200 mL に定容した。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 及び *n*-ヘキサン 10 mL を加えて振とうした。毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離し、有機層を採取し、40 °C 以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物にアセトン及び *n*-ヘキサン (1 : 9) 混液 5 mL を加えて溶解した。

③茶の場合

試料 5.00 g を採り、水 20 mL を加えて 30 分間放置した後、アセトン 100 mL を加え、1 分間ホモジナイズした後、ろ過補助剤を用いて吸引ろ過した。残留物及び受器はアセトン 50 mL で同様に操作し、得られた液を合わせ、アセトンで 200 mL に定容した。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 及び *n*-ヘキサン 40 mL を加えて振とうした。毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離し、有機層を採取し、40 °C 以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物にアセトン及び *n*-ヘキサン (1 : 9) 混液 5 mL を加えて溶解した。

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

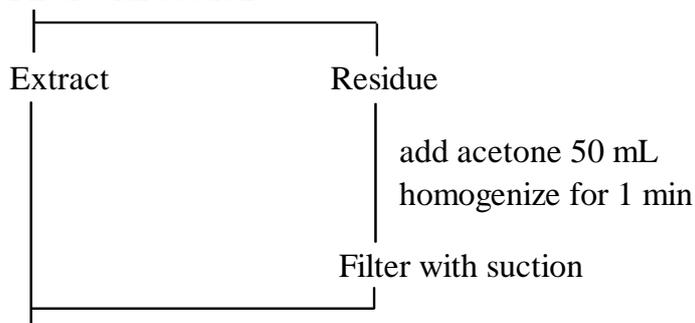
グラファイトカーボン/エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム (500 mg/500 mg/6 mL) に、アセトン及び *n*-ヘキサン各 10 mL を順次注入し、流出液は捨てた。このカラムに 1) で得られた溶液を注入した後、先の負荷液が入っていた容器をアセトン及び *n*-ヘキサン (1 : 9) 混液 5 mL で洗い、洗液をカラムに注入し、負荷液を含む全溶出液を 40 °C 以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物にアセトニトリル及び水 (3 : 7) 混液 5 mL を加えて溶解した。

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/6 mL) に、アセトニトリル及び水各 10 mL を順次注入し、流出液は捨てた。このカラムに①で得られた溶液を注入した後、先の負荷液が入っていた容器をアセトニトリル及び水 (3 : 7) 混液 5 mL で洗い、洗液をカラムに注入し、流出液は捨てた。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 としたものをイプフェンカルバゾン試験溶液とした。試験溶液調製法の概略を図 1 に示す。

Sample 20 g (cereals and beans: 10 g, tea: 5 g)
 | add water 20 mL (cereals, beans and tea) and
 | stand for 30 min before extraction
 | add acetone 100 mL
 | homogenize for 1 min

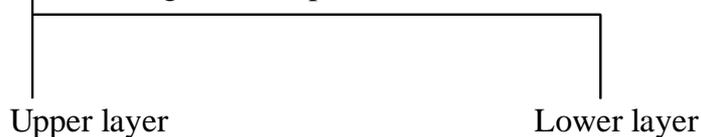
Filter with suction



Volumize to 200 mL with acetone

10 mL (cereals and beans: 20 mL, tea: 40 mL)

| add 10 mL of *n*-hexane and 10 mL of saturated NaCl aq.
 (cereals and beans: add 20 mL of *n*-hexane and 20 mL of saturated NaCl aq.)
 tea: add 40 mL of *n*-hexane and 40 mL of saturated NaCl aq.)
 | shaking for 5 min
 | centrifuge (3,000 rpm, 5 min)



| evaporate to dryness

Residue

| dissolve with acetone/*n*-hexane (1:9) 5 mL
 | apply to InertSep GC/PSA (500 mg/500 mg)
 | elute with acetone/*n*-hexane (1:9) 5 mL

Collect loading and eluting fractions

| evaporate to dryness

Residue

| dissolve with acetonitrile/water (3:7) 5 mL
 | apply to InertSep C18 (500 mg)
 | wash with acetonitrile/water (3:7) 5 mL
 | elute with acetonitrile/water (3:2) 10 mL

Test solution for ipfencarbazone (10 mL)

図1 分析法フローチャート

8. マトリックスの測定値への影響及び定量限界値の推定

1) ブランク溶液の調製

イプフェンカルバゾンが含有されていないことを確認した試料を7に示した「試験溶液の調製」に従って試験溶液を作製した。

2) マトリックスの測定値への影響

あらかじめ添加回収試験で添加した濃度の10倍濃度に相当する標準溶液0.2 mLを40℃以下で濃縮し、溶媒を除去した後、ブランク試験溶液又はアセトニトリル及び水(3:2)混液2 mLを加えて溶解した。マトリックス添加標準溶液(添加回収試験での100%回収率に相当する濃度)と溶媒標準溶液のピーク面積値を比較し、試料マトリックスの測定値への影響を検討した。

3) 定量限界値の推定

あらかじめ定量限界推定値の濃度の10倍濃度に相当する標準溶液0.2 mLを40℃以下で濃縮し、溶媒を除去した後、ブランク試験溶液2 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(試料中濃度として0.001 mg/kg)。試料マトリックス存在下におけるS/N比を算出し、定量限界値を推定した。

【結果及び考察】

1. 既存試験法の適用確認

最初に、通知一斉試験法を用いてイプフェンカルバゾンの分析が可能であるかを検討した。LC-MSによる農薬等の一斉試験法Ⅰ(農産物)及びLC-MSによる農薬等の一斉試験法Ⅱ(農産物)を玄米、オレンジ及び緑茶に適用し、添加回収試験を行った。その結果、LC-MSによる農薬等の一斉試験法Ⅰ(農産物)では十分な回収率が認められず、LC-MSによる農薬等の一斉試験法Ⅱ(農産物)ではシリカゲルミニカラムから溶出せず、いずれも適用が困難であった(表2)。したがって、新規に個別分析法を開発することとした。

表2 通知試験法での添加回収試験

	LC/MS一斉試験法Ⅰ(農作物)		LC/MS一斉試験法Ⅱ(農作物)	
	真度(%)	マトリックス添加標準溶液 /溶媒標準溶液	真度(%)	マトリックス添加標準溶液 /溶媒標準溶液
玄米	65.4	0.85	1.4	0.71
オレンジ	51.8	0.75	5.9	0.22
緑茶	34.9	0.70	6.3	0.45

(0.1 mg/kg相当添加、n=2)

2. 試料調製法の検討

1) 有機溶媒への転溶

残留農薬等試験法検討実施要領では、アセトン抽出後にアセトン除去し有機溶媒転溶操

作を行うこととされている。しかしながら、アセトン抽出液を減圧濃縮する際に突沸する場合があります、また、有機溶媒抽出ではエマルジョンが生成し、遠心分離や長時間の放置が必要となるなどの問題点が生じることが知られている。これらの問題点を解消するため、有機溶媒への転溶操作の際、アセトンを除去せずに飽和塩化ナトリウム溶液及び *n*-ヘキサンを加えて抽出する方法を検討した。キャベツ試料を用いてアセトン抽出液 10 mL (試料 1 g 相当量) に対する飽和塩化ナトリウム溶液及び *n*-ヘキサンの添加量におけるイプフェンカルバゾンの回収率について検討した結果、検討した何れの飽和塩化ナトリウム溶液及び *n*-ヘキサンの添加量においても、イプフェンカルバゾンの回収率は、ほぼ 100%であった (表 3)。さらに、アセトン抽出液、飽和塩化ナトリウム溶液及び *n*-ヘキサンが 1 : 1 : 1 で有機層に水分が残留することはなかったことから、アセトン抽出液 (試料 1 g 相当量) に等量の飽和塩化ナトリウム溶液及び *n*-ヘキサンを添加する転溶操作を採用した。この方法で抽出時のエマルジョンの発生が抑えられ、減圧濃縮操作を 1 回省略することが可能であった。また、LC-MS/MS 測定では感度が高く、抽出液のすべてを用いる必要がないため、アセトン抽出液の一部 (試料 1 g 相当量) を用いることとした。その結果、使用溶媒量の減少と操作時間の短縮が図れた。

表3 *n*-ヘキサン転溶時の飽和塩化ナトリウム溶液及び *n*-ヘキサンの添加量によるイプフェンカルバゾンの回収率 (%)

	飽和塩化ナトリウム溶液 5 mL			飽和塩化ナトリウム溶液 10 mL			飽和塩化ナトリウム溶液 15 mL		
	<i>n</i> -ヘキサン			<i>n</i> -ヘキサン			<i>n</i> -ヘキサン		
	5 mL	10 mL	15 mL	5 mL	10 mL	15 mL	5 mL	10 mL	15 mL
キャベツ	96.1	100.1	101.4	99.1	100.2	100.7	98.8	99.2	99.3

(0.1 mg/kg 相当添加、*n* = 2)

本検討は以下の手順で行った。

- 1) キャベツのブランク試料をアセトンで抽出した。
- 2) アセトン抽出液 10 mL に飽和塩化ナトリウム溶液 5-15 mL、*n*-ヘキサン 5-15 mL 及びイプフェンカルバゾン標準溶液を添加し、*n*-ヘキサンに転溶した。
- 3) 有機層の溶媒を除去し、アセトン及び *n*-ヘキサン (1 : 9) 混液 5 mL に溶解した後、GC/PSA ミニカラムに負荷し、アセトン及び *n*-ヘキサン (1 : 9) 混液 5 mL で溶出した。
- 4) 全溶出液の溶媒を除去し、アセトニトリル及び水 (3 : 7) 混液 5 mL に溶解した後、C18 ミニカラムに負荷し、アセトニトリル及び水 (3 : 7) 混液 5 mL で洗浄した。
- 5) アセトニトリル及び水 (3 : 2) 混液 10 mL で C18 ミニカラムから溶出した。
- 6) LC-MS/MS により定量した。

次に、*n*-ヘキサン転溶回数におけるイプフェンカルバゾンの回収率について、キャベツ試料を用いて検討した (表 4)。その結果、1 回の *n*-ヘキサン転溶操作でイプフェンカルバゾンは有機層に 100%回収され、転溶操作 2 回目からは回収されなかったことから、*n*-ヘキサンによる転溶操作は 1 回とした。

表4 *n*-ヘキサン転溶時の転溶回数によるイプフェンカルバゾンの回収率 (%)

	<i>n</i> -ヘキサン転溶	
	1回	2回
キャベツ	102.2	0.0

本検討は以下の手順で行った。

- 1) キャベツのブランク試料をアセトンで抽出した。
- 2) アセトン抽出液 10 mL に飽和塩化ナトリウム溶液 10 mL、*n*-ヘキサン 10 mL 及びイプフェンカルバゾン標準溶液を添加し、*n*-ヘキサンで2回転溶した。
- 3) 有機層の溶媒を除去し、アセトン及び*n*-ヘキサン (1 : 9) 混液 5 mL に溶解した後、GC/PSA ミニカラムに負荷し、アセトン及び*n*-ヘキサン (1 : 9) 混液 5 mL で溶出した。
- 4) 全溶出液の溶媒を除去し、アセトニトリル及び水 (3 : 7) 混液 5 mL に溶解した後、C18 ミニカラムに負荷し、アセトニトリル及び水 (3 : 7) 混液 5 mL で洗浄した。
- 5) アセトニトリル及び水 (3 : 2) 混液 10 mL で C18 ミニカラムから溶出した。
- 6) LC-MS/MS により定量した。

2) GC/PSA ミニカラムの検討

色素等の夾雑物を除去するために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 (GC/PSA ミニカラム) を用いて精製効果の確認を行った。GC/PSA ミニカラム (InertSep GC/PSA、500 mg/500 mg/6 mL、GLサイエンス社製) からのイプフェンカルバゾンの回収率を表5に示す。アセトン及び*n*-ヘキサン (2 : 98) 混液 10 mL では約 60%の回収率であったが、アセトン及び*n*-ヘキサン (5 : 95) 混液以上のアセトン含有比率のアセトン及び*n*-ヘキサン混液 10 mL により、95%以上のイプフェンカルバゾンが回収された (表5)。

表5 InertSep GC/PSA ミニカラムからのイプフェンカルバゾン溶出率 (%)

	アセトン及び <i>n</i> -ヘキサン混液 (10 mL)					
	0:100	2:98	5:95	10:90	15:85	20:80
ほうれんそう	N.D.	63.6	96.1	97.9	97.1	96.9

(0.1 mg/kg 相当添加、*n* = 2)

本検討は以下の手順で行った。

- 1) ほうれんそうのブランク試料をアセトンで抽出した。
- 2) アセトン抽出液 10 mL に飽和塩化ナトリウム溶液 10 mL 及び*n*-ヘキサン 10 mL を添加し振とう後、有機層を採取し、イプフェンカルバゾン標準溶液を添加した。
- 3) 有機層の溶媒を除去し、各混合比率のアセトン及び*n*-ヘキサン混液 5 mL に溶解した後、GC/PSA ミニカラムに負荷し、各混合比率のアセトン及び*n*-ヘキサン混液 5 mL で溶出した。
- 4) 全溶出液の溶媒を除去し、アセトニトリル及び水 (3 : 7) 混液 5 mL に溶解した後、C18 ミニカラムに負荷し、アセトニトリル及び水 (3 : 7) 混液 5 mL で洗浄した。
- 5) アセトニトリル及び水 (3 : 2) 混液 10 mL で C18 ミニカラムから溶出した。
- 6) LC-MS/MS により定量した。

畜水産食品で採用した、PSA ミニカラムによる精製が可能か否か、ほうれんそう及び緑茶試料を用いて InertSep PSA (500 mg/6 mL、GL サイエンス社製) と InertSep GC/PSA の回収率の比較を行った (表 6)。その結果、両者とも同等の回収率が得られた。しかしながら、PSA ミニカラムによる精製では、色素の除去が不十分であり無色透明な試験溶液が得られなかった。一方、GC/PSA ミニカラムの使用により、すべての試料で無色透明な試験溶液が得られた。以上の結果より、アセトン抽出液に飽和塩化ナトリウム溶液及び *n*-ヘキサンを加えて液-液分配した有機層の溶媒を除去し、アセトン及び *n*-ヘキサン (1 : 9) 混液 5 mL で溶解し、GC/PSA ミニカラムに負荷し、負荷液が入っていた容器をアセトン及び *n*-ヘキサン (1 : 9) 混液 5 mL で洗い、洗液をカラムに注入し、負荷液を含む全溶出液を採取する操作を採用した。

表 6 GC/PSA 及び PSA ミニカラムからのイプフェンカルバゾン溶出率 (%)

	InertSep GC/PSA (500 mg/6 mL/6 mL)	InertSep PSA (500 mg/6 mL)
ほうれんそう	91.0	98.0
緑茶	93.5	87.0

(0.1 mg/kg 相当添加、*n*=2)

本検討は以下の手順で行った。

- 1) ほうれんそう及び緑茶のブランク試料をアセトンで抽出した。
- 2) アセトン抽出液 10 mL に飽和塩化ナトリウム溶液 10 mL 及び *n*-ヘキサン 10 mL を添加し振とう後、有機層を採取し、イプフェンカルバゾン標準溶液を添加した。
- 3) 有機層の溶媒を除去し、各混合比率のアセトン及び *n*-ヘキサン混液 5 mL に溶解した後、GC/PSA ミニカラムに負荷し、各混合比率のアセトン及び *n*-ヘキサン混液 5 mL で溶出した。
- 4) 全溶出液の溶媒を除去し、アセトニトリル及び水 (3 : 7) 混液 5 mL に溶解した後、C18 ミニカラムに負荷し、アセトニトリル及び水 (3 : 7) 混液 5 mL で洗浄した。
- 5) アセトニトリル及び水 (3 : 2) 混液 10 mL で C18 ミニカラムから溶出した。
- 6) LC-MS/MS により定量した。

3) その他の検討

その他、LC 条件、MS/MS 条件及び C18 ミニカラムの検討については、同時に提出した畜水産物に同じ。

3. 検量線

各定量用イオンのピーク面積値を用いて、絶対検量線を作成した。0.1~10 ng/mL の範囲で検量線を作成したところ、良好な直線性が認められた (相関係数 (*r*) : 0.9987~0.9999、平均 *r*=0.9994 (*n*=8))。代表的な検量線を図 2 に示した。添加回収試験においては、一律基準値添加では、0.25、0.50、0.75、1.00、1.50 及び 2.00 ng/mL の標準系列を、玄米試料の 0.05 mg/kg 濃度添加では、1.25、2.50、3.75、5.00、7.50 及び 10.0 ng/mL の標準系列を用いて検量線を作

成した。

Concentration (ng/mL)	0.1	1.25	2.5	3.75	5	7.5	10
Area	1747	21567	42675	63795	85272	125903	166616

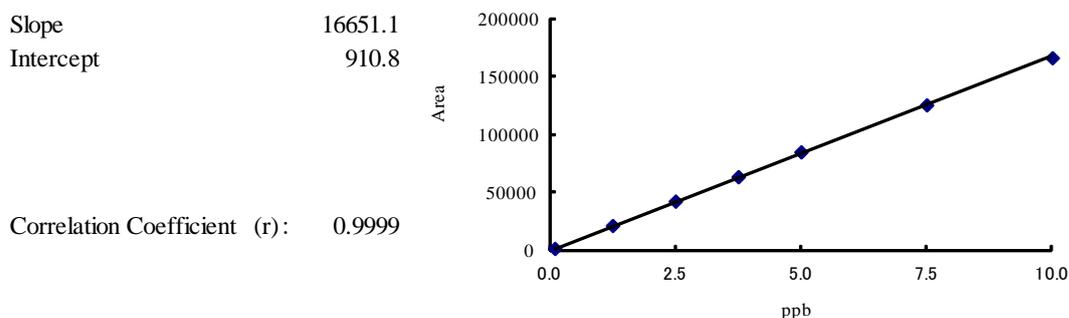


図 2 検量線

4. 添加回収試験

玄米、大豆、ほうれんそう、キャベツ、ばれいしょ、オレンジ、りんご及び緑茶の 8 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（基準値濃度または定量限界濃度）を実施した。代表的な添加回収試験で 100%回収率に相当する溶媒標準溶液、各ブランク試料及び添加回収試験のクロマトグラムを図 3-1 及び図 3-2 に、ブランク試料の SCAN 測定におけるクロマトグラムを図 4-1 及び図 4-2 に示した。特に、測定を妨害するような顕著なピークは認められなかった。

1) 選択性

選択性の検討結果を表 7 に示した。検討した何れの試料においても、定量イオン及び定性イオンともにイブフェンカルバゾンの定量を妨害するピークは認められなかった。

表 7 選択性の評価

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	基準値 ¹⁾ (ppm)	添加濃度 ²⁾ (ppm)	妨害ピークの許容範囲		ピーク面積 (高さ) ³⁾			選択性の評価 ⁵⁾	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 ⁴⁾ (b)			面積 (高さ) 比 (a)/(b)	
1	イブフェンカルバゾン	玄米	0.05	0.05	0.05	定量限界	0.05	< 0.333	面積	0	23994	0.000	○	
2	イブフェンカルバゾン	大豆	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	4922	0.000	○	
3	イブフェンカルバゾン	ほうれんそう	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	29	19597	0.001	○	
4	イブフェンカルバゾン	キャベツ	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	7	16890	0.000	○	
5	イブフェンカルバゾン	ばれいしょ	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	28	16183	0.002	○	
6	イブフェンカルバゾン	オレンジ	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	13	17081	0.001	○	
7	イブフェンカルバゾン	りんご	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	26	17214	0.002	○	
8	イブフェンカルバゾン	緑茶	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	8	4987	0.002	○	

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) 真度及び精度

わが国の食品衛生法では、現在までのところ、イプフェンカルバゾンの残留基準値は米（玄米）に 0.05 ppm、魚介類に 0.04 ppm の基準値が設定されている。その他の食品には一律基準値が適用される。そこで、添加回収試験は残留基準値の設定されている玄米試料には、基準値濃度を、その他試料には一律基準値濃度を添加し、回収率を検討した。

真度及び併行精度の検討結果を表 8 に示した。これら農産物に対する平均回収率は 86.7~100.5 %、併行精度の相対標準偏差は 1.3~2.9 %であった。回収率及び併行精度は厚生労働省から通知されている「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインについて」（平成 19 年 11 月 15 日、平成 22 年 12 月 24 日改正）で示されている目標値を満足するものであった。さらに、添加回収試験のクロマトグラムより計算した S/N 比の平均値は 783.5~4995.6 であった。

表 8 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 (ppm)	基準値*1 (ppm)	添加濃度 (ppm)	定量限界の評価*2	検量線		回収率 (%)					真度 (%)	併行精度 (RSD%)	S/N比*3			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	イプフェンカルバゾン	玄米	0.05	0.05	0.05		5100	-504	0.9997	92.3	95.4	94.4	92.4	92.7	93.4	1.5	5976.5	4014.6	4995.6	
2	イプフェンカルバゾン	大豆	0.01	0.01	0.01		5361	-162	0.9974	87.7	90.9	88.5	91.4	90.8	89.9	1.8	1238.1	951.6	1094.9	
3	イプフェンカルバゾン	ほうれんそう	0.01	0.01	0.01		15516	185	0.9998	93.5	96.3	97.6	96.8	97.4	96.3	1.7	3921.8	2272.1	3097.0	
4	イプフェンカルバゾン	キャベツ	0.01	0.01	0.01		7828	-71	0.9998	98.1	96.1	94.1	93.0	97.9	95.8	2.4	1863.2	1483.8	1673.5	
5	イプフェンカルバゾン	はれいしょ	0.01	0.01	0.01		7828	-71	0.9998	92.8	87.7	87.7	89.4	86.1	88.7	2.9	2237.3	1216.8	1727.1	
6	イプフェンカルバゾン	オレンジ	0.01	0.01	0.01		9307	-190	0.9983	85.4	87.6	86.0	88.0	86.6	86.7	1.3	1218.1	708.7	963.4	
7	イプフェンカルバゾン	りんご	0.01	0.01	0.01		9307	-190	0.9983	101.2	98.4	99.6	104.3	98.9	100.5	2.4	1525.2	993.4	1259.3	
8	イプフェンカルバゾン	緑茶	0.01	0.01	0.01		4937	4	0.9979	88.0	91.0	93.4	90.0	93.0	91.1	2.4	899.7	667.2	783.5	

*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 (Min.) のそれぞれの S/N比を求める。

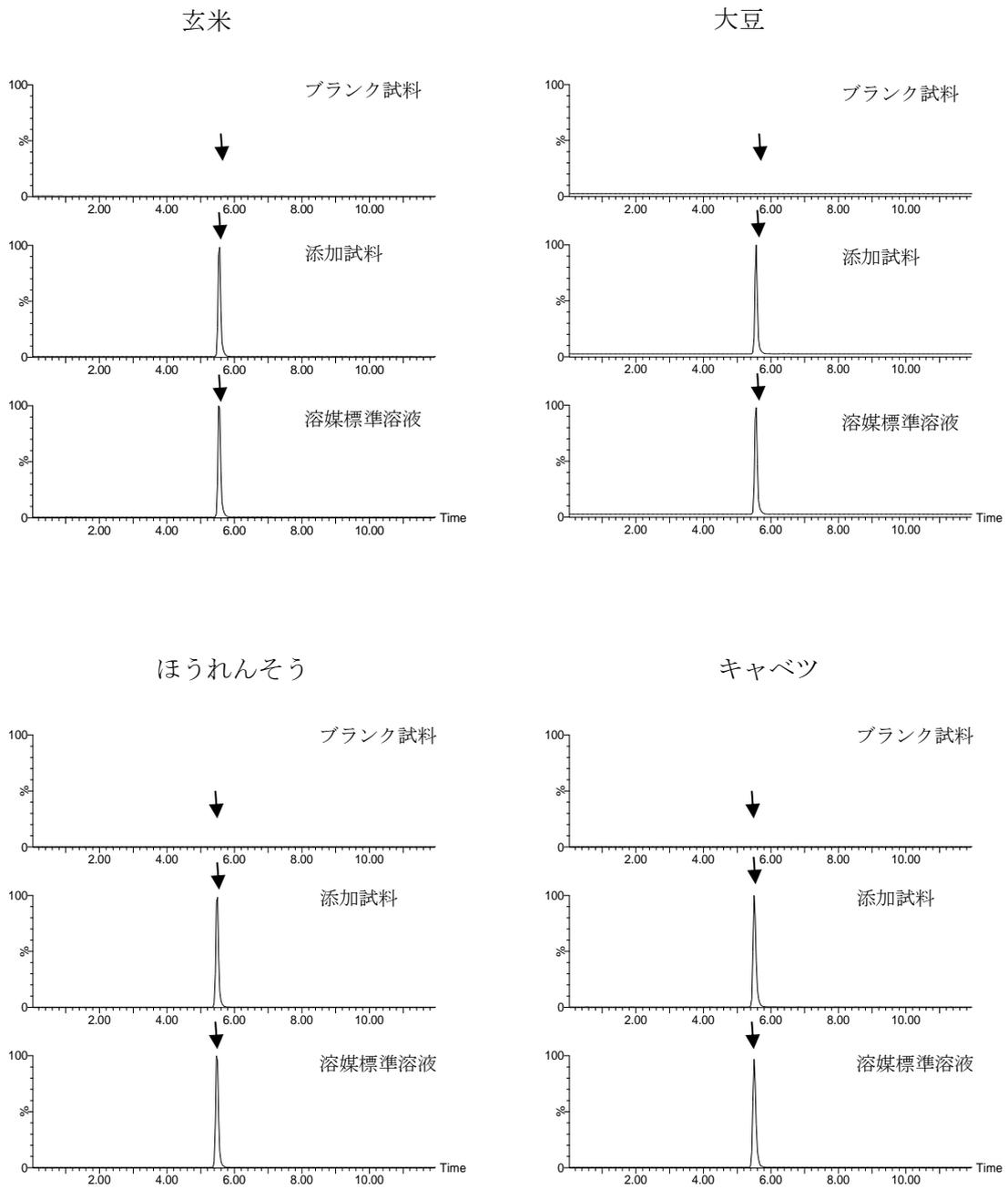


図 3-1 添加回収試験の代表的なイプフェンカルバゾンの SRM クロマトグラム (m/z 427 \rightarrow 198)、添加濃度 : 0.01 ppm (玄米は 0.05 ppm)

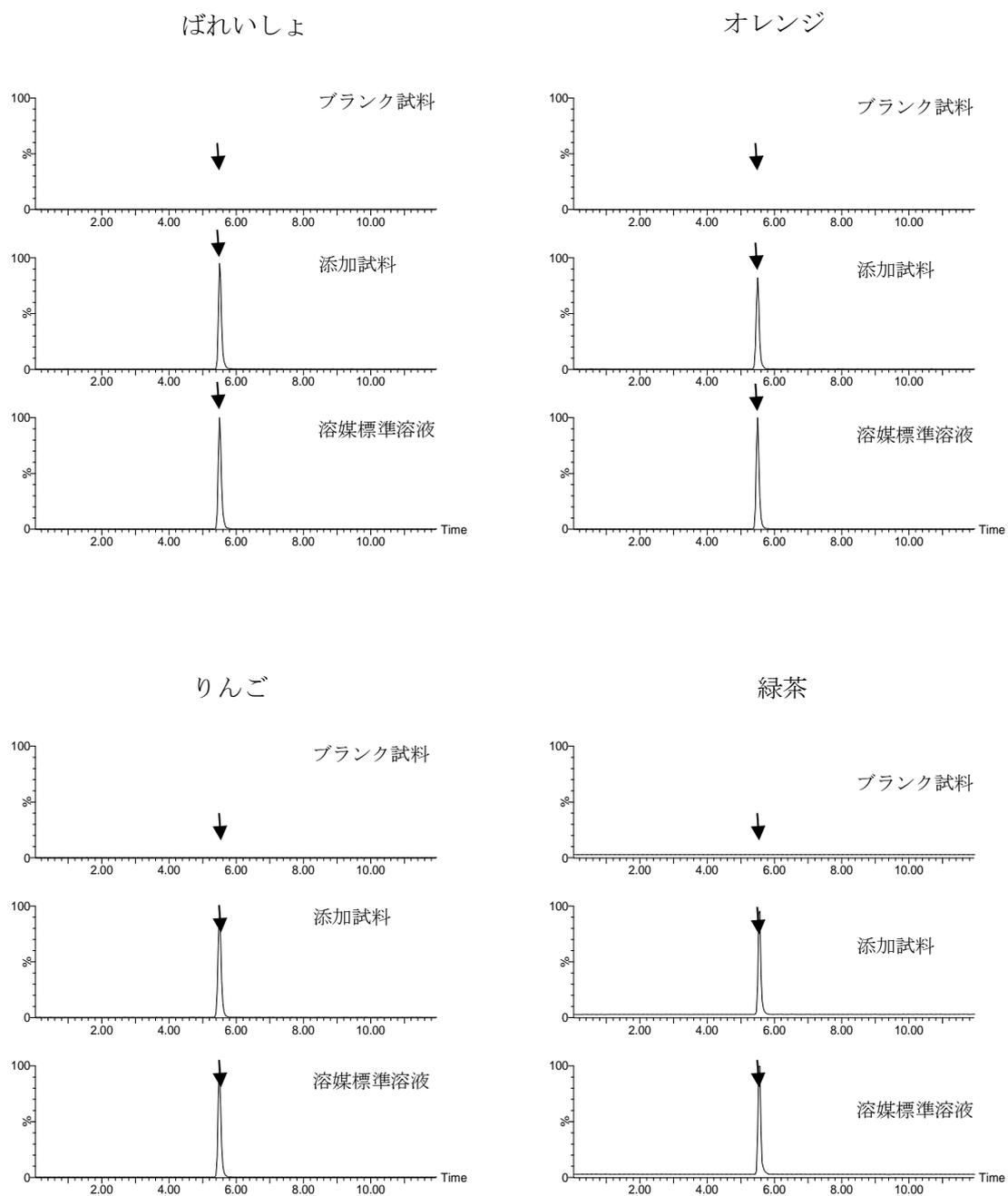
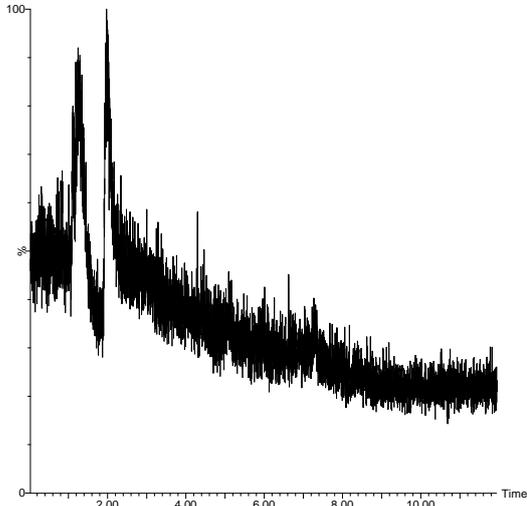
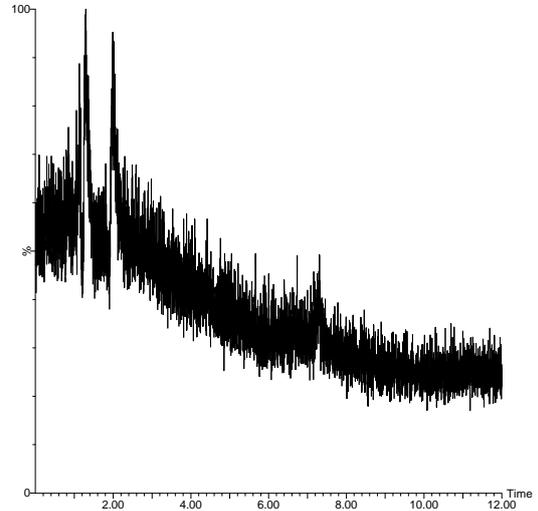


図 3-2 添加回収試験の代表的なイプフェンカルバゾンの SRM クロマトグラム
(m/z 427 \rightarrow 198)、添加濃度 : 0.01 ppm

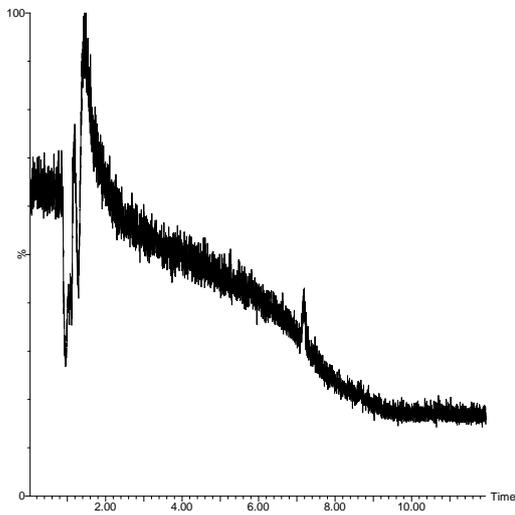
玄米



大豆



ほうれんそう



キャベツ

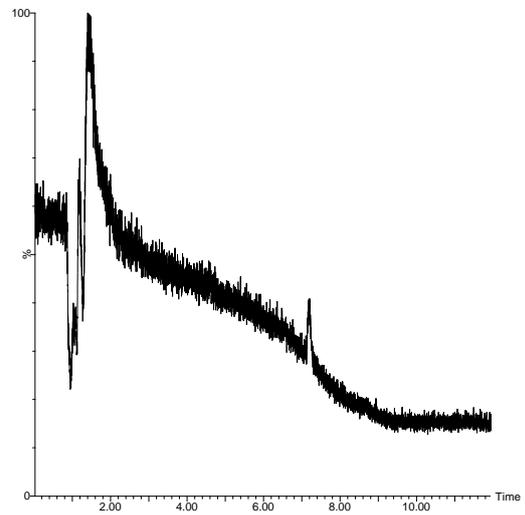


図 4-1 ブランク試料の代表的なトータルイオンクロマトグラム
スキャン範囲：50~550 amu
測定条件：ESI(+)、CV=22 V (CV: corn voltage)

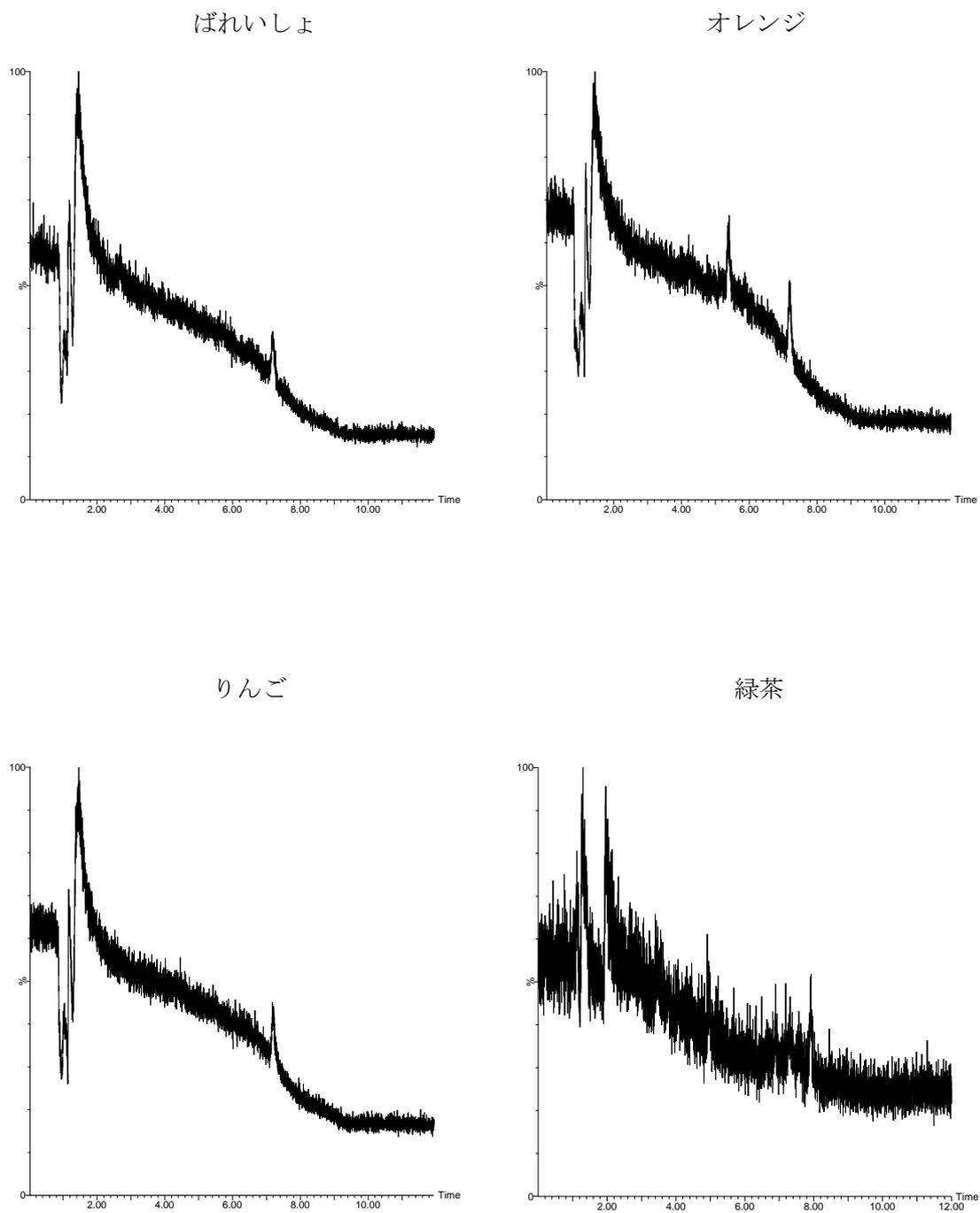


図 4-2 ブランク試料の代表的なトータルイオンクロマトグラム
 スキャン範囲：50~550 amu
 測定条件：ESI(+), CV=22 V (CV: corn voltage)

3) 定量限界の推定

本検討に用いた装置 (Xevo TQ MS) における定量限界の推定を行った。各試料における代表的なブランク試料、定量限界推定値の添加試料及び溶媒標準溶液のクロマトグラムを図 5-1 及び図 5-2 に示した。定量限界の推定濃度を試料換算で一律基準の 1/10 の 0.001 mg/kg として評価したが、何れの試料においても S/N 比は 153 以上あり、十分測定できる結果であった (表 9 及び表 10)。

表 9 定量限界の推定

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	基準値 ^{*1} (ppm)	添加濃度 (ppm)	定量限界の評価 ^{*2}	標準溶液濃度 ^{*3} (mg/L)	ピーク面積 (高さ) ^{*4}						S/N比		平均値		備考				
								面積又は高さの別	ブランク ^{*5}	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	面積 (高さ) 比 (%) ^{*6}	S/N比
										n=1	n=2	平均	n=1	n=2								
1	イブフェンカルバゾン	玄米	0.05	0.05	0.05		0.0001	面積	0	557	549	553.0	526	526	526.0			105.1	#DIV/0!			
2	イブフェンカルバゾン	大豆	0.01	0.01	0.01		0.0001	面積	0	491	519	505.0	519	505	512.0			98.6	#DIV/0!			
3	イブフェンカルバゾン	ほうれんそう	0.01	0.01	0.01		0.0001	面積	29	2050	2038	2015.0	2019	2015	2017.0			99.9	#DIV/0!			
4	イブフェンカルバゾン	キャベツ	0.01	0.01	0.01		0.0001	面積	7	1802	1826	1807.0	1899	1891	1895.0			95.4	#DIV/0!			
5	イブフェンカルバゾン	ばれいしょ	0.01	0.01	0.01		0.0001	面積	28	1825	1818	1793.5	1837	1859	1848.0			97.1	#DIV/0!			
6	イブフェンカルバゾン	オレンジ	0.01	0.01	0.01		0.0001	面積	13	1782	1775	1765.5	2062	2008	2035.0			86.8	#DIV/0!			
7	イブフェンカルバゾン	りんご	0.01	0.01	0.01		0.0001	面積	26	1937	1923	1904.0	1975	1924	1949.5			97.7	#DIV/0!			
8	イブフェンカルバゾン	緑茶	0.01	0.01	0.01		0.0001	面積	8	471	482	468.5	493	510	501.5			93.4	#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が異なる場合) 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。

表 10 S/N 比

No.	分析対象化合物	食品名	定量イオン (n/z)	定量限界 (ppm)	基準値 ^{*1} (ppm)	添加濃度 (ppm)	S/N比を求めめる対象 ^{*2}	マトリックス添加標準溶液濃度 ^{*3} (mg/L)	Max. n=1						Min. n=2						S/N比		備考		
									ピークの最大値 (Dmax)	ノイズ		ピークトップ (D)	ピーク高さ (S)	ノイズ幅 (N)	ピークの最大値 (Dmax)	ノイズ		ピークトップ (D)	ピーク高さ (S)	ノイズ幅 (N)	Max. n=1	Min. n=2			
										最小値 (E1)	最小値 (E2)					中央値 (C) ^{*4}	最小値 (E1)							最小値 (E2)	中央値 (C) ^{*4}
1	イブフェンカルバゾン	玄米	198	0.05	0.05	0.05	添加	0.0001	248	3	0	2	247.4	245.9	1.2	248	3	0	2	247.4	245.9	1.2	204.9	204.9	
2	イブフェンカルバゾン	大豆	198	0.01	0.01	0.01	添加	0.0001	248	3	0	2	247.4	245.9	1.2	248	4	0	2	247.2	245.2	1.6	204.9	153.3	
3	イブフェンカルバゾン	ほうれんそう	198	0.01	0.01	0.01	添加	0.0001	248	2	0	1	247.8	246.6	0.8	248	2	0	1	247.6	246.6	0.8	308.3	308.3	
4	イブフェンカルバゾン	キャベツ	198	0.01	0.01	0.01	添加	0.0001	248	3	0	2	247.4	245.9	1.2	248	4	0	2	247.2	245.2	1.6	204.9	153.3	
5	イブフェンカルバゾン	ばれいしょ	198	0.01	0.01	0.01	添加	0.0001	248	2	0	1	247.6	246.6	0.8	248	4	0	2	247.2	245.2	1.6	308.3	153.3	
6	イブフェンカルバゾン	オレンジ	198	0.01	0.01	0.01	添加	0.0001	248	2	0	1	247.6	246.6	0.8	248	4	0	2	247.2	245.2	1.6	308.3	153.3	
7	イブフェンカルバゾン	りんご	198	0.01	0.01	0.01	添加	0.0001	248	2	0	1	247.6	246.6	0.8	248	3	0	2	247.4	245.9	1.2	308.3	204.9	
8	イブフェンカルバゾン	緑茶	198	0.01	0.01	0.01	添加	0.0001	248	3	0	2	247.4	245.9	1.2	248	4	0	2	247.2	245.2	1.6	204.9	153.3	

*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 添加試料から得られるピークの S/N 比を求める場合には『添加』が、マトリックス添加標準溶液から得られるピークの S/N 比を求める場合には『標準』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) を作成する。
 *4 ベースラインにはノイズの中央値 (C) を用いることが望ましいが、それが困難な場合にはノイズの最大値 (E1) と最小値 (E2) の平均値 [(E1+E2)/2] を用いても良い。

4) 試料マトリックスの測定値への影響

添加回収濃度 (基準値相当又は一律基準値相当) レベルにおける溶媒標準溶液に対するマトリックス添加標準溶液のピーク面積値の比を比較し、試料マトリックスの測定値への影響について検討したところ、0.86~1.00 の範囲であり、顕著なイオン化抑制及び増強効果は低く、許容できる範囲であると考えられた (表 11)。

表 11 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 (ppm)	基準値 ^{*1} (ppm)	添加濃度 (ppm)	標準溶液濃度 ^{*2} (mg/L)	ピーク面積 (高さ) ^{*3}						ピーク面積 (高さ) 比 ^{*6}	備考		
							面積又は高さの別	ブランク ^{*4}	マトリックス添加標準溶液 ^{*5}			溶媒標準溶液				
									n=1	n=2	平均	n=1			n=2	平均
1	イブフェンカルバゾン	玄米	0.05	0.05	0.05	0.005	面積	0	23994	24010	24002.0	25076	24648	24862.0	0.97	
2	イブフェンカルバゾン	大豆	0.01	0.01	0.01	0.001	面積	0	4922	5044	4983.0	5045	5135	5090.0	0.98	
3	イブフェンカルバゾン	ほうれんそう	0.01	0.01	0.01	0.001	面積	29	19597	19398	19468.5	19924	19767	19845.5	0.98	
4	イブフェンカルバゾン	キャベツ	0.01	0.01	0.01	0.001	面積	7	16890	17019	16947.5	17721	17710	17715.5	0.96	
5	イブフェンカルバゾン	ばれいしょ	0.01	0.01	0.01	0.001	面積	28	16183	16199	16163.0	16757	16835	16796.0	0.96	
6	イブフェンカルバゾン	オレンジ	0.01	0.01	0.01	0.001	面積	13	17081	17061	17058.0	19961	19914	19937.5	0.86	
7	イブフェンカルバゾン	りんご	0.01	0.01	0.01	0.001	面積	26	17214	17183	17172.5	17273	17037	17155.0	1.00	
8	イブフェンカルバゾン	緑茶	0.01	0.01	0.01	0.001	面積	8	4987	4914	4942.5	5089	5033	5061.0	0.98	

*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。

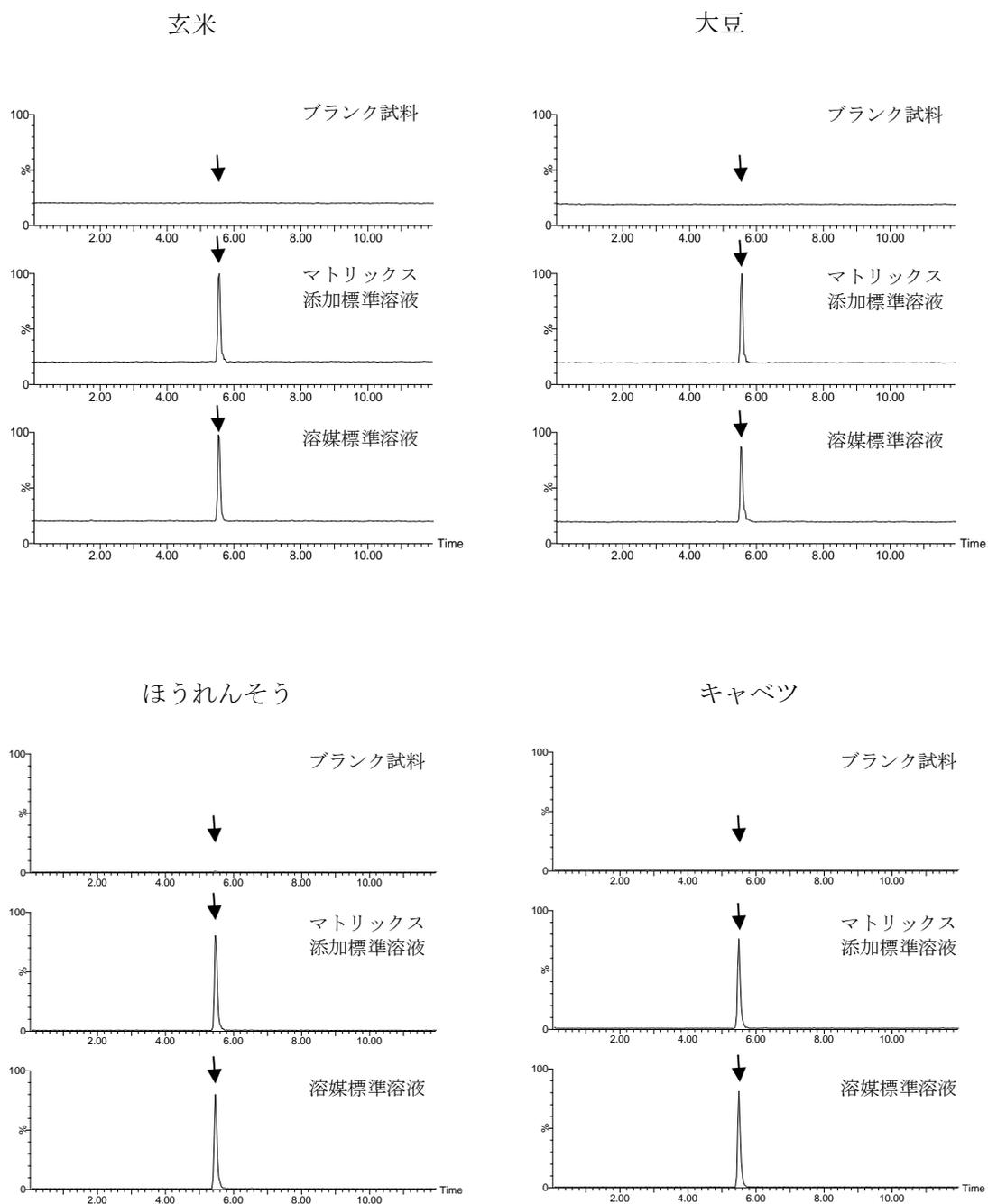


図 5-1 定量限界の推定における代表的なイプフェンカルバジンの SRM クロマトグラム (m/z 427 \rightarrow 198)、添加濃度 : 0.001 ppm

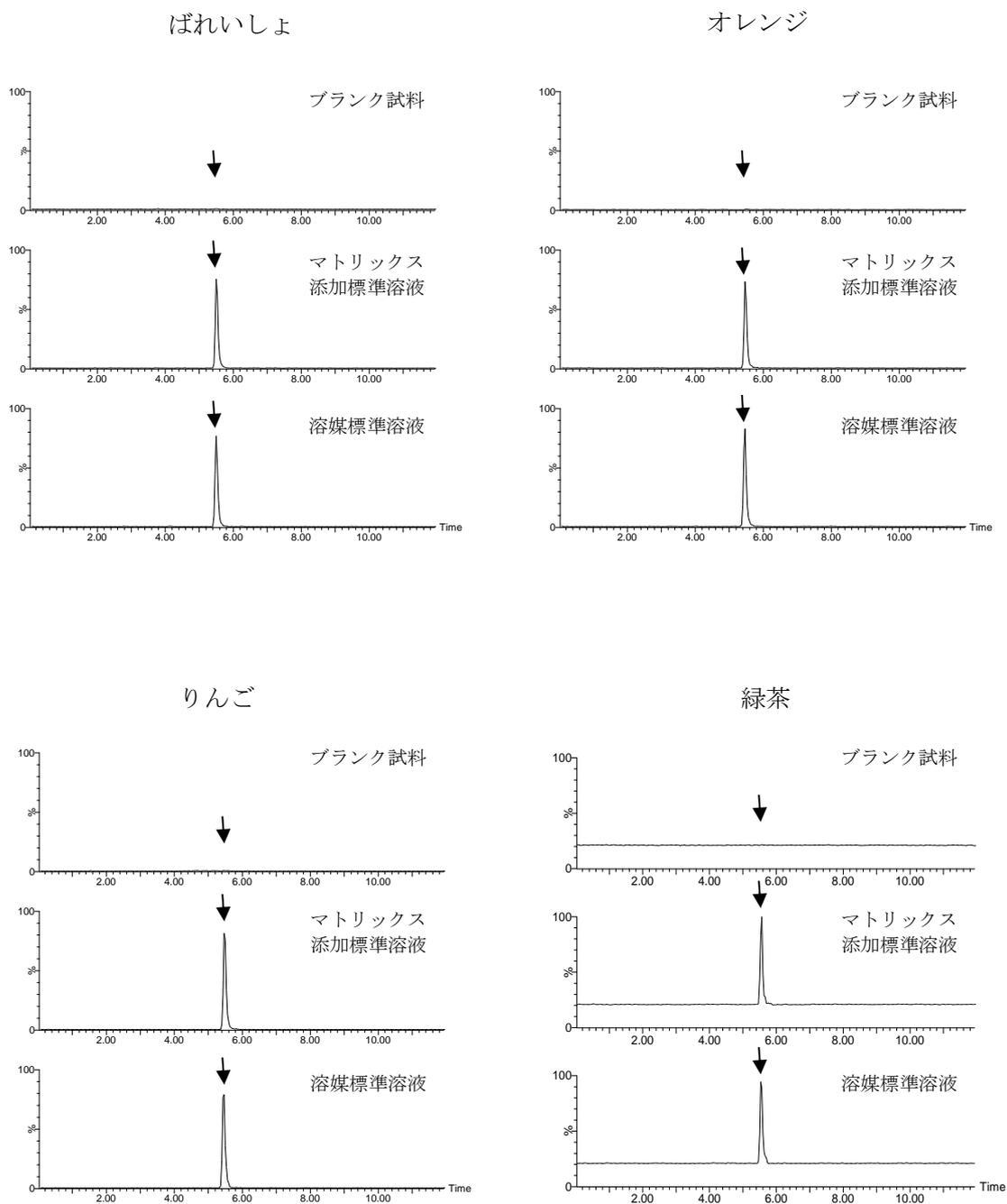


図 5-2 定量限界の推定における代表的なイプフェンカルバゾンの SRM クロマトグラム (m/z 427 \rightarrow 198)、添加濃度 : 0.001 ppm