

※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

プロポキシカルバゾン試験法（農産物及び畜産物）

プロポキシカルバゾン試験法の検討結果

1. 目的及び試験法の検討方針

プロポキシカルバゾンはバイエルクロップサイエンス社によって開発されたスルホニルウレア系除草剤であり、通常、ナトリウム塩（プロポキシカルバゾンナトリウム塩）として用いられる。米国等で小麦を対象に登録されているが、日本では農薬として登録されていない。ポジティブリスト制度導入に伴う暫定基準値が設定されており、農産物においてはプロポキシカルバゾン（プロポキシカルバゾンナトリウム塩を含む）及び代謝物Aが、畜産物にあつてはプロポキシカルバゾン（プロポキシカルバゾンナトリウム塩を含む）が規制の対象となっている。

「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、定量限界0.01 mg/kgが測定可能な試験法の検討を行った。

1) 規制対象物質

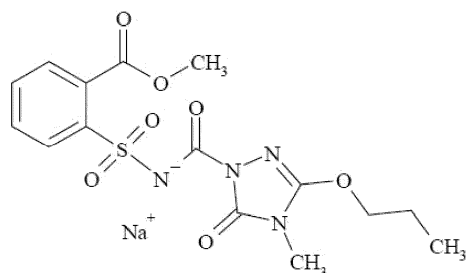
プロポキシカルバゾン

メチル 2- [[[[4,5-ジヒドロ-3- (2-ヒドロキシプロポキシ) -4-メチル-5-オキソ-1H-1,2,4-トリアゾール-1-イル] カルボニル] アミノ] スルホニル] ベンゾエート（以下「代謝物A」という。）

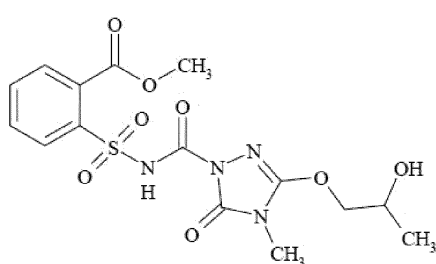
2. 分析対象化合物の構造式、物理化学的性質及び基準値等に関する情報

1) 構造式及び物理化学的性質

プロポキシカルバゾンナトリウム塩



代謝物A



プロポキシカルバゾンナトリウム塩

化学式：C₁₅H₁₇N₄O₇SNa、分子量：420.37

化学名（IUPAC）：1-methyltio-3,5-xylyl methylcarbamate

sodium(4,5-dihydro-4-methyl-5-oxo-3-propoxy-1H-1,2,4-triazol-1-ylcarbonyl)

融 点：230-240℃

溶解性：水 42.0 g/L (20℃、pH9.0、pH8.8、pH7.2)、2.9 g/L (20℃、pH4.5)

n-ヘプタン<0.1、キシレン<0.1、1-オクタノール<0.1、2-プロパノール<0.1、

酢酸エチル<0.1、ポリエチレングリコール5.2、アセトニトリル0.90、アセトン0.50、

ジクロロメタン1.5、ジメチルスルホキシド190 (以上 g/L、20℃)

オクタノール/水分配係数 (20℃)：-1.59 (pH9)、-1.55 (pH7)、-0.30 (pH4)

酸解離定数：2.1

加水分解半減期 (25℃)：いずれのpHでも安定

(出典：The Pesticide Manual及びhttp://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/04_Pflanzenschutzmittel/02_eu_berichte/Propoxycarbazon-DAR.pdf?__blob=publicationFile)

代謝物 A

化学式：C₁₅H₁₈N₄O₈S、分子量：414.39

化学名（IUPAC）：2-{{{{[4,5-Dihydro-3-(2-hydroxypropoxy)-4-methyl-5-oxo-1H-1,2,4-triazol-1-yl]carbonyl}amino}sulfonyl}benzoic acid methyl ester

溶解性：エタノール、アセトンに溶け、水にほとんど溶けない。

（出典：富士フイルム和光純薬）

2) 基準値の一例

小麦：0.02 ppm

牛の筋肉及び脂肪：0.05 ppm

牛の肝臓：0.3 ppm

乳：0.03 ppm

[実験方法]

1. 試料

1) 購入先

都内のスーパーにて購入した。

2) 試料の採取方法

①小麦は425 μmの標準網ふるいを通して均一化した。

②牛の筋肉は脂肪層を可能な限り除き、細切均一化した。

③牛の脂肪は筋肉部を可能な限り除き、細切均一化した。

④牛の肝臓は全体を細切均一化した。

⑤牛乳は全体をよく混合して均一化した。

2. 試薬・試液

1) 標準品

プロポキシカルバゾンナトリウム塩標準品：純度99.0%（Sigma-Aldrich®製）

代謝物A標準品：純度97.9%（富士フイルム和光純薬製）

2) 試薬

アセトニトリル、*n*-ヘキサン、メタノール：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%）：特級（小宗化学製）

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：Bond Elut PSA 500 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：プロポキシカルバゾンナトリウム塩標準品をプロポキシカルバゾンとして10 mg精秤し、メタノールに溶かして200 mg/L溶液を調製した。同様に代謝物A標準品を10 mg（プロポキシカルバゾン換算で9.614 mg）精秤し、メタノールに溶かして200 mg/L溶液を調製した。

検量線用混合標準溶液：プロポキシカルバゾン標準原液及び代謝物A標準原液をアセトニトリル及び水（7：3）混液で希釈し、0.0005～0.05 mg/Lの濃度（代謝物Aはプロポキシカルバゾン換算で0.00048～0.048 mg/L）の混合標準溶液を調製した。

添加用混合標準溶液：プロポキシカルバゾン標準原液及び代謝物A標準原液をメタノールで希釈して

0.1、0.2、0.3、0.5及び3 mg/Lの濃度（代謝物Aはプロポキシカルバゾン換算で0.096、0.19、0.29、0.48及び2.9 mg/L）の混合標準溶液を調製した。

②試液の調製方法

アセトニトリル及び水（7：3）混液

アセトニトリル350 mL及び水150 mLを混合した。

0.1 vol%ギ酸

ギ酸1 mLに水を加えて1000 mLとした。

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（Büchi製）等

LC-MS/MS

装置	型式	会社
MS	LC/MS-8050	島津製作所
LC	Nexera X2 (LC30AD)	島津製作所
解析ソフト	LabSolutions LCMS	島津製作所

4. 測定条件

LC 条件																								
カラム	Mightysil RP-18 GP サイズ：内径 2.0 mm、長さ 150 mm、粒子径 5 μm 会社：関東化学株式会社																							
移動相流速 (mL/min)	0.2																							
注入量 (μL)	4																							
カラム温度 (℃)	40																							
移動相	A液：0.1 vol%ギ酸溶液 B液：アセトニトリル																							
グラジエント条件	<table><tr><th>時間 (分)</th><th>A液 (%)</th><th>B液 (%)</th></tr><tr><td>0.00</td><td>70</td><td>30</td></tr><tr><td>10.00</td><td>30</td><td>70</td></tr><tr><td>10.01</td><td>10</td><td>90</td></tr><tr><td>15.00</td><td>10</td><td>90</td></tr><tr><td>15.01</td><td>70</td><td>30</td></tr><tr><td>20.00</td><td>70</td><td>30</td></tr></table>			時間 (分)	A液 (%)	B液 (%)	0.00	70	30	10.00	30	70	10.01	10	90	15.00	10	90	15.01	70	30	20.00	70	30
時間 (分)	A液 (%)	B液 (%)																						
0.00	70	30																						
10.00	30	70																						
10.01	10	90																						
15.00	10	90																						
15.01	70	30																						
20.00	70	30																						
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 (kV)	4.0																							
イオン化室温度 (℃)	300																							
脱溶媒ガス	窒素 10 L/min																							
コリジョンガス	アルゴン																							
定量イオン (m/z)	プロポキシカルバゾン：397→156 [コーン電圧：12 (V) コリジョンエネルギー：13 (eV)] 代謝物 A：413→172 [コーン電圧：12 (V) コリジョンエネルギー：13 (eV)]																							
定性イオン (m/z)	プロポキシカルバゾン：397→113 [コーン電圧：13 (V) コリジョンエネルギー：26 (eV)] 代謝物 A：413→113																							

	[コーン電圧：13 (V) コリジョンエネルギー：30 (eV)]
保持時間 (min)	プロポキシカルバゾン：8.5 代謝物A：4.9

5. 定量

[実験方法] 2. 3) ①に従い調製した標準溶液4 μ L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4 μ L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プロポキシカルバゾン及び代謝物A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。

小麦、牛の筋肉、牛の肝臓及び乳（添加濃度：0.01 ppm（代謝物Aはプロポキシカルバゾン換算で0.0096 ppm）相当）：1. 2) の試料10.0 gに添加用混合標準溶液0.1 mg/Lを1 mL添加しよく混合した後、30分間放置した。

牛の脂肪（添加濃度：0.01 ppm（代謝物Aはプロポキシカルバゾン換算で0.0096 ppm）相当）：1. 2) の試料10.0 gを40℃で加温して融解し、添加用混合標準溶液0.1 mg/Lを1 mL添加しよく混合した後、再度凝固させ、30分間放置した。

小麦（添加濃度：0.02 ppm（代謝物Aはプロポキシカルバゾン換算で0.019 ppm）相当）：1. 2) の試料10.0 gに添加用混合標準溶液0.2 mg/Lを1 mL添加しよく混合した後、30分間放置した。

牛の筋肉（添加濃度：0.05 ppm（代謝物Aはプロポキシカルバゾン換算で0.048 ppm）相当）：1. 2) の試料10.0 gに添加用混合標準溶液0.5 mg/Lを1 mL添加しよく混合した後、30分間放置した。

牛の脂肪（添加濃度：0.05 ppm（代謝物Aはプロポキシカルバゾン換算で0.048 ppm）相当）：1. 2) の試料10.0 gを40℃で加温して融解し、添加用混合標準溶液0.5 mg/Lを1 mL添加しよく混合した後、再度凝固させ、30分間放置した。

牛の肝臓（添加濃度：0.3 ppm（代謝物Aはプロポキシカルバゾン換算で0.29 ppm）相当）：1. 2) の試料10.0 gに添加用混合標準溶液3 mg/Lを1 mL添加しよく混合した後、30分間放置した。

牛乳（添加濃度：0.03 ppm（代謝物Aはプロポキシカルバゾン換算で0.029 ppm）相当）：1. 2) の試料10.0 gに添加用混合標準溶液0.3 mg/Lを1 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

プロポキシカルバゾン及び代謝物Aを試料からメタノールを用いて抽出し、アセトニトリル/ヘキサン分配で脱脂した（小麦の場合は省略）後、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で精製し、LC-MS/MSで定量及び確認した。

1) 抽出

① 小麦の場合

試料10.0 gを200 mL遠心管に量り採り、水20 mLを加え30分間放置した。これにメタノール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た。ろ紙上の残留物にメタノール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、メタノールを加えて正確に200 mLとした。この溶液から正確に20 mLを分取し、40℃以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物をアセトニトリル5 mLに溶かした。

② 牛の筋肉・脂肪・肝臓及び牛乳

試料10.0 gを200 mL遠心管に量り採り、メタノール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た。ろ紙上の残留物

にメタノール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、メタノールを加えて正確に200 mLとした。この溶液から正確に20 mLを分取し、40℃以下で約1 mLまで濃縮した後、100 mL分液漏斗に移し、*n*-ヘキサン30 mLを加え、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル30 mLずつで2回振とう抽出した。抽出液を合わせ、40℃以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物をアセトニトリル5 mLに溶かした。

2) 精製

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 [Bond Elut PSA (500 mg)] に水及びアセトニトリル各5 mLを順次注入し、流出液は捨てた。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に1) で得られた溶液を注入した後、アセトニトリル5 mLで容器を洗いこみながら注入し、流出液を捨てた。次いで、アセトニトリル及び水 (7 : 3) 混液10 mLで容器を洗いこみながら注入し、溶出液を10 mL容メスフラスコに採り、アセトニトリル及び水 (7 : 3) 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小麦

秤 取

↓ 試料10.0 gに水20 mLを加え30分間放置

メタノール抽出

- | メタノール100 mLを加え、ホモジナイズ
- | 吸引ろ過
- | 残留物にメタノール50 mLを加え、ホモジナイズ
- | 吸引ろ過
- | ろ液を合わせて、メタノールで正確に200 mLとする
- ↓ 抽出液20 mL分取

濃縮 (溶媒除去)

↓ 残留物をアセトニトリル5 mLに溶解

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 (500 mg) 精製

- | 水及びアセトニトリル各5 mLでコンディショニング
- | 全量注入
- | アセトニトリル5 mLで洗浄
- | アセトニトリル及び水 (7 : 3) 混液10 mLで溶出
- ↓ アセトニトリル及び水 (7 : 3) 混液で正確に10 mLとし、試験溶液とする

LC-MS/MS定量

4 µL注入

②小麦以外

秤 取

↓ 試料10.0 g

メタノール抽出

- | メタノール100 mLを加え、ホモジナイズ
- | 吸引ろ過
- | 残留物にメタノール50 mLを加え、ホモジナイズ

- | 吸引ろ過
- | ろ液を合わせて、メタノールで正確に200 mLとする
- ↓ 抽出液20 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合わせる

濃縮（溶媒除去）

- ↓ 残留物をアセトニトリル5 mLに溶解

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（500 mg）精製

- | 水及びアセトニトリル各5 mLでコンディショニング
- | 全量注入
- | アセトニトリル5 mLで洗浄
- | アセトニトリル及び水（7：3）混液10 mLで溶出
- ↓ アセトニトリル及び水（7：3）混液で正確に10 mLとし、試験溶液とする

LC-MS/MS定量

4 μ L注入

8. マトリックス添加混合標準溶液の調製

小麦、牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓及び乳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、0.001 mg/L（代謝物Aはプロポキシカルバゾン換算で0.00096 mg/L）の混合標準溶液0.5 mLに溶解したものを、マトリックス添加混合標準溶液とした。

小麦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、0.002 mg/L（代謝物Aはプロポキシカルバゾン換算で0.0019 mg/L）の混合標準溶液0.5 mLに溶解したものを、マトリックス添加混合標準溶液とした。

牛の筋肉及び牛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、0.005 mg/L（代謝物Aはプロポキシカルバゾン換算で0.0048 mg/L）の混合標準溶液0.5 mLに溶解したものを、マトリックス添加混合標準溶液とした。

牛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、0.03 mg/L（代謝物Aはプロポキシカルバゾン換算で0.029 mg/L）の混合標準溶液0.5 mLに溶解したものを、マトリックス添加混合標準溶液とした。

乳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、0.003 mg/L（代謝物Aはプロポキシカルバゾン換算で0.0029 mg/L）の混合標準溶液0.5 mLに溶解したものを、マトリックス添加混合標準溶液とした。

[結果及び考察]

1. 測定条件の検討

1) MS条件の検討

プロポキシカルバゾンの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397が得られたので、脱プロトン分子（ m/z 397 [M][－]）をプリカーサーイオンとした。

また、 m/z 397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 156のプロダクトイオンが強く、次いで m/z 113であったため、 m/z 156を定量用イオン、 m/z 113を定性用イオンとした。

代謝物A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413が得られたので、脱プロトン分子（ m/z 413 $[M]^-$ ）をプリカーサーイオンとした。また、 m/z 413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 172のプロダクトイオンが強く、次いで m/z 113であったため、 m/z 172を定量用イオン、 m/z 113を定性用イオンとした。

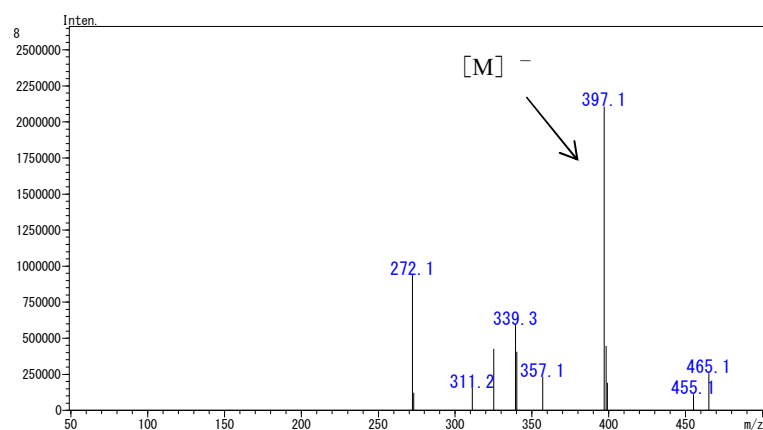


図1 プロボキシカルバゾンのマススペクトル

スキャン範囲：50～500 m/z

測定条件：ESI（－）、CV=12（CV：コロン電圧）

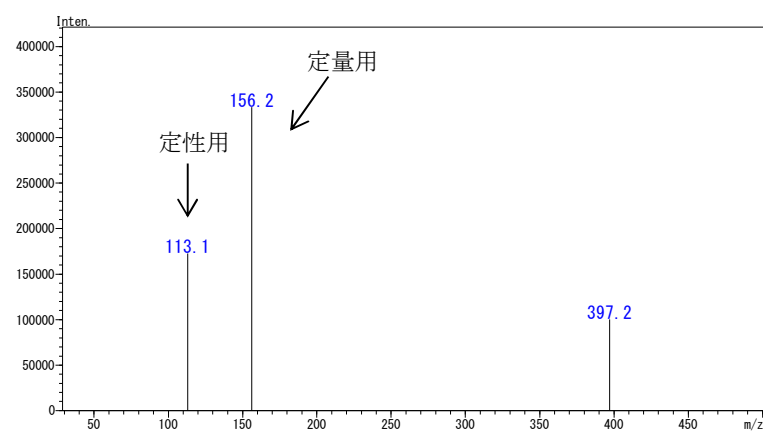


図2 プロボキシカルバゾンのプリカーサーイオン m/z 397 のプロダクトイオンスペクトル(定量及び定性)

スキャン範囲：30～500 m/z

測定条件：ESI（－）、CV=12、CE=13（CV：コロン電圧、CE：コリジョンエネルギー）

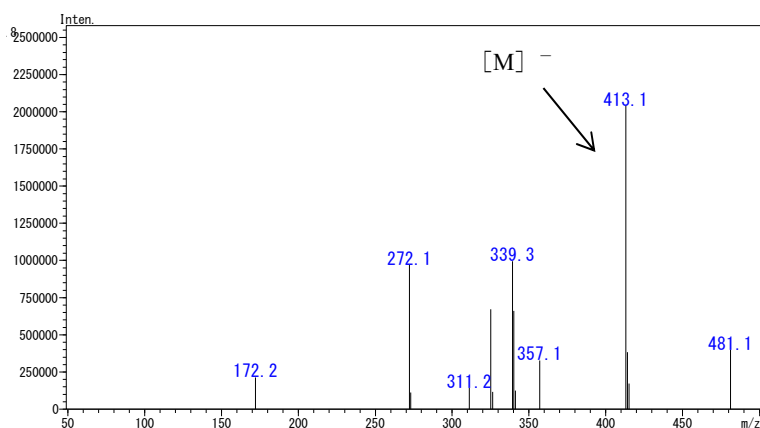


図3 代謝物 A のマスペクトル

スキャン範囲：50～500 m/z

測定条件：ESI（－）、CV=13（CV：コロン電圧）

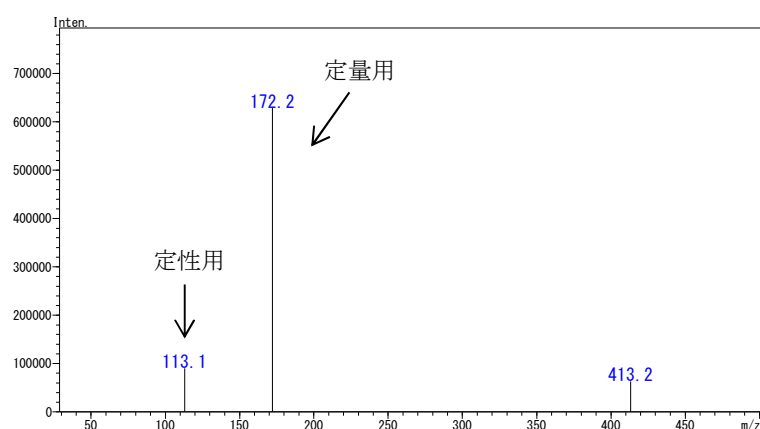


図4 代謝物 A のプリカーサーイオン m/z 413 のプロダクトイオンスペクトル（定量及び定性）

スキャン範囲：30～500 m/z

測定条件：ESI（－）、CV=13、CE=13（CV：コロン電圧、CE：コリジョンエネルギー）

2) LC 条件の検討

分離カラムにMightysil RP-18 GP（内径 2.0 mm、長さ 150 mm、粒子径 5 μm ）を、移動相にアセトニトリル及び0.1 vol%ギ酸溶液の混液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、分離カラムについてはMightysil RP-18GP（内径 2.0 mm、長さ 150 mm、粒子径 5 μm ）を、移動相についてはアセトニトリル及び0.1 vol%ギ酸溶液を用い、アセトニトリル及び0.1 vol%ギ酸溶液の混液（3：7）から（7：3）までの濃度勾配を10分間で行い、（9：1）で5分間保持することとした。なお、移動相溶媒としてメタノールも検討したところ、ピーク形状や測定感度はアセトニトリルと変わらずであったため、最終試験溶液の組成に含まれるアセトニトリルを選択し、また、使用する添加剤については、酢酸アンモニウムではピーク形状が不良であったため、ギ酸を選択した。

3) 検量線

図5にプロポキシカルバゾンの検量線の例を示した。0.0005 mg/L (0.002 ng) ～0.0015 mg/L (0.006 ng)、0.001 mg/L (0.004 ng) ～0.003 mg/L (0.012 ng)、0.0015 mg/L (0.006 ng) ～0.005 mg/L (0.02 ng)、0.0025 mg/L (0.01 ng) ～0.0075 mg/L (0.03 ng) 及び0.015 mg/L (0.06 ng) ～0.05 mg/L (0.2 ng) の濃度範囲で作成した検量線の相関係数は、いずれも0.999以上であり良好な直線性を示した。また、図6に代謝物Aの検量線の例を示した。0.0005 mg/L (0.002 ng) ～0.0015 mg/L (0.006 ng) 及び0.001 mg/L (0.004 ng)

～0.003 mg/L (0.012 ng) の濃度範囲で作成した検量線の相関係数は、いずれも0.999以上であり良好な直線性を示した。

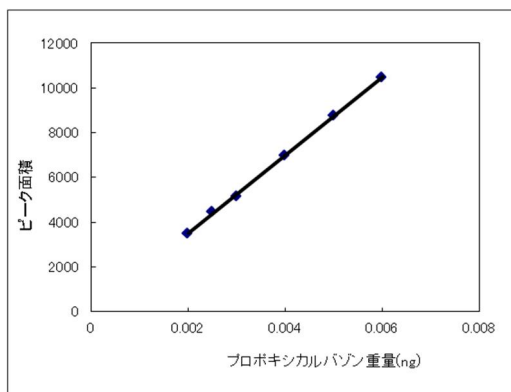


図 5-1 プロポキシカルバゾン検量線例 (m/z 397→156)

データ処理装置設定条件の一例

データ処理ソフト (メーカー)

: LabSolutions LCMS (島津製作所製)

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: 0.002 ng～0.006 ng

傾き (a) : $a=1741978.9$

切片 (b) : $b=28.6$

R : 0.999

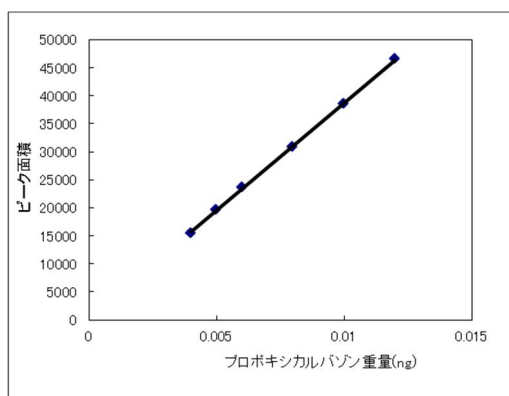


図 5-2 プロポキシカルバゾン検量線例 (m/z 397→156)

データ処理装置設定条件の一例

データ処理ソフト (メーカー)

: LabSolutions LCMS (島津製作所製)

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: 0.004 ng～0.012 ng

傾き (a) : $a=3838305.3$

切片 (b) : $b=362.5$

R : 0.999

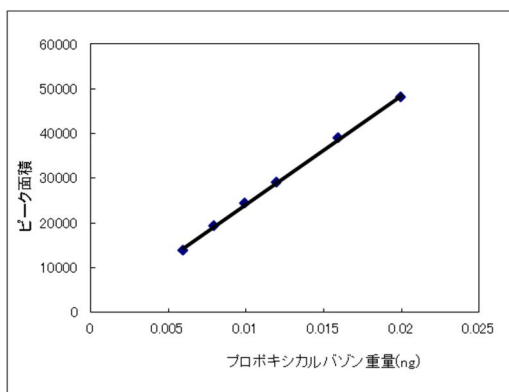


図 5-3 プロポキシカルバゾン検量線例 (m/z 397→156)

データ処理装置設定条件の一例

データ処理ソフト (メーカー)

: LabSolutions LCMS (島津製作所製)

ピークの定量方法: ピーク面積法

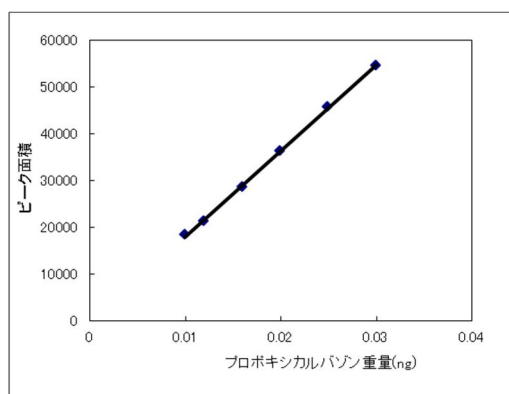
検量線の種類: 最小二乗法

検量線基準ピークの重量: 0.006 ng～0.02 ng

傾き (a) : $a=2445250.0$

切片 (b) : $b=-400.0$

R : 0.999



データ処理装置設定条件の一例

データ処理ソフト (メーカー)

: LabSolutions LCMS (島津製作所製)

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

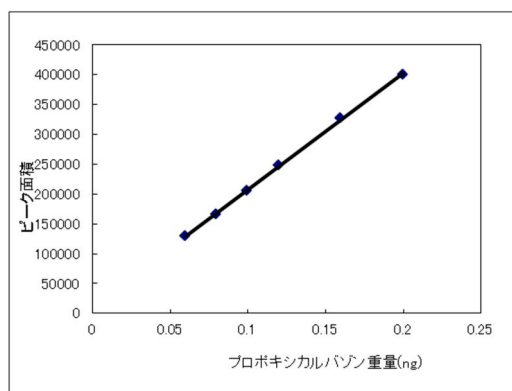
検量線基準ピークの重量: 0.01 ng～0.03 ng

傾き (a) : $a=1834103.3$

切片 (b) : $b=-367.3$

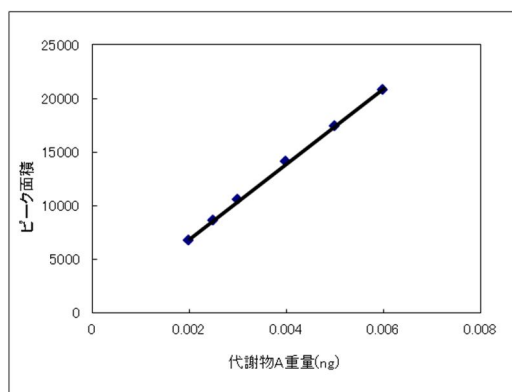
R : 0.999

図 5-4 プロポキシカルバゾン検量線例 (m/z 397→156)



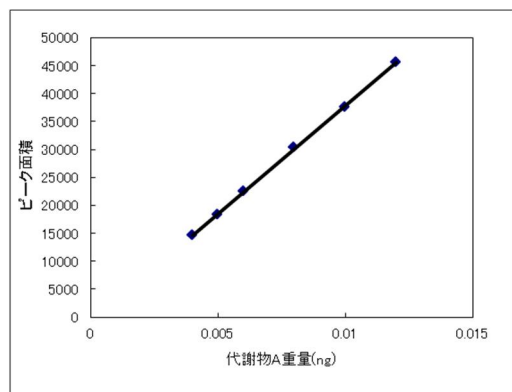
データ処理装置設定条件の一例
 データ処理ソフト (メーカー)
 : LabSolutions LCMS (島津製作所製)
 ピークの定量方法: ピーク面積法
 検量線の種類: 最小二乗法
 検量線基準ピークの重量: 0.06 ng~0.2 ng
 傾き (a) : $a=1956180.9$
 切片 (b) : $b=11414.6$
 R : 0.999

図 5-5 プロポキシカルバゾン検量線例 (m/z 397→156)



データ処理装置設定条件の一例
 データ処理ソフト (メーカー)
 : LabSolutions LCMS (島津製作所製)
 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: 0.002 ng~0.006 ng
 傾き (a) : $a=3493663.2$
 切片 (b) : $b=-32.7$
 R : 0.999

図 6-1 代謝物 A 検量線例 (m/z 413→172)



データ処理装置設定条件の一例
 データ処理ソフト (メーカー)
 : LabSolutions LCMS (島津製作所製)
 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: 0.004 ng~0.012 ng
 傾き (a) : $a=3867978.9$
 切片 (b) : $b=-839.8$
 R : 0.999

図 6-2 代謝物 A 検量線例 (m/z 413→172)

4) 定量限界

定量限界の算出結果を以下に示した。

$$0.01 \text{ mg/kg} \left[(10 \text{ mL/1 g}^*) \times (0.004 \text{ ng/4 } \mu\text{L}) \right]$$

$$* 10.0 \text{ g} \times 20 \text{ mL/200 mL}$$

2. 試験溶液調製法の検討

1) 溶解溶媒の検討

プロポキシカルバゾン及び代謝物 A を溶解させる溶媒について検討を行った。〔実験方法〕 2. 3)

①に従い、メタノールを用いたプロポキシカルバゾン及び代謝物 A 標準原液の調製に加え、アセトンでも同様の調製を実施した。その結果、代謝物 A はメタノール、アセトンいずれにも完全に溶解したが、

プロポキシカルバゾンについては、メタノールには溶解したが、アセトンでは僅かな不溶分の残存が目視で観察された。

次に調製する原液濃度を低くし、メタノールで完全に溶解した溶液を用いて、アセトン及びメタノールでの再溶解性を確認した。プロポキシカルバゾン及び代謝物Aそれぞれ1 µg/mL標準溶液0.5 mLを窒素吹き付けにより一度溶媒を除去し、アセトン及びメタノールそれぞれ5 mLで再溶解した結果を表1に示した。なお、結果は試行3で実施した平均値を示した。プロポキシカルバゾンはアセトン及びメタノールいずれの溶媒でも良好な回収率が得られたが、代謝物Aはアセトンにおいて回収率の低下が認められた。以上の結果よりプロポキシカルバゾン及び代謝物Aの溶解溶媒としてはアセトンよりもメタノールが妥当と判断した。

表 1 各溶媒での再溶解率 (%)

	アセトン	メタノール
プロポキシカルバゾン	99	99
代謝物A	80	99

2) 抽出方法の検討

抽出溶媒について、塩基性下での水抽出の情報があつたが、代謝物Aの水への溶解度が低い物理化学的性質や、農産物試料及び畜産物試料双方を対象とした抽出方法の選択が望ましいことを考慮し、アセトンまたはメタノールが妥当と考え、検討を行った。牛の肝臓及び牛の脂肪共存下での添加回収試験を行った結果を表2及び3に示した。牛の肝臓試料共存下ではアセトン及びメタノールいずれの溶媒でも良好な回収率が得られたが(表2)、牛の脂肪試料共存下ではアセトン抽出で代謝物Aに回収率の低下が認められた(表3)。牛の脂肪(畜産物)では代謝物Aは規制対象ではないが、抽出溶媒にはメタノールが妥当と判断した。

表 2 牛の肝臓からの回収率 (%)

	アセトン	メタノール
プロポキシカルバゾン	105	102
代謝物A	113	111

添加量：各1 µg

マトリックス標準溶液中のプロポキシカルバゾン及び代謝物Aの面積値を100%として算出

表 3 牛の脂肪からの回収率 (%)

	アセトン	メタノール
プロポキシカルバゾン	106	105
代謝物A	84	110

添加量：各1 µg

マトリックス標準溶液中のプロポキシカルバゾン及び代謝物Aの面積値を100%として算出

3) 脱脂方法の検討

脂溶性の妨害物質の除去を目的として、アセトニトリル/ヘキサン分配を検討した。実際の操作を想定してメタノール1 mLにプロポキシカルバゾン及び代謝物A 0.02 µgを添加し、*n*-ヘキサン30 mLを加えた後*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル30 mLずつで3回振とう抽出を行った結果を表4に示した。プロポキシカルバゾン及び代謝物Aは*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル2回で抽出できたことから、分配回数は*n*-ヘキサン30 mLに*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル30 mLずつで2回抽出することとした。

表4 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)	
プロポキシカルバゾン	103	5	0	108
代謝物 A	83	12	0	95

供試量：各0.02 µg

4) 精製カラムの検討

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の溶出状況

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をメタノール10 mLで予備洗浄した後、プロポキシカルバゾン及び代謝物A各0.02 µgをメタノール、ギ酸及びメタノール (3 : 97) 混液並びにアンモニア水及びメタノール混液で負荷、溶出したときの溶出状況を表5~9に示した。表5及び6の結果より、メタノール並びにギ酸及びメタノール (3 : 97) 混液では溶出されなかった。一方、表7~9の結果より、アンモニア水及びメタノール混液では溶出が確認され、アンモニア水の比率を若干変化させたが、結果に影響はなく、いずれも10 mLで溶出が確認された。

表5 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からの溶出状況 (%)

負荷溶液	メタノール			合計
	0-10 mL	10-20 mL	20-30 ml	
プロポキシカルバゾン	0	0	0	0
代謝物 A	0	0	0	0

Bond Elute PSA、充てん量500 mg、Agilent technologies製

添加量：各0.02 µg

表6 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からの溶出状況 (%)

負荷溶液	ギ酸及びメタノール (3 : 97) 混液			合計
	0-10 mL	10-20 mL	20-30 ml	
プロポキシカルバゾン	0	0	0	0
代謝物 A	0	0	0	0

Bond Elute PSA、充てん量500 mg、Agilent technologies製

添加量：各0.02 µg

表7 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からの溶出状況 (%)

負荷溶液	アンモニア水及びメタノール (1 : 99) 混液			合計
	0-10 mL	10-20 mL	20-30 ml	
プロポキシカルバゾン	101	0	0	101
代謝物 A	99	0	0	99

Bond Elute PSA、充てん量500 mg、Agilent technologies製

添加量：各0.02 µg

表8 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からの溶出状況 (%)

負荷溶液	アンモニア水及びメタノール (1 : 49) 混液			合計
	0-10 mL	10-20 mL	20-30 ml	
プロポキシカルバゾン	110	0	0	110
代謝物 A	108	0	0	118

Bond Elute PSA、充てん量500 mg、Agilent technologies製

添加量：各0.02 µg

表9 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からの溶出状況 (%)

負荷溶液	アンモニア水及びメタノール (3 : 97) 混液			合計
	0-10 mL	10-20 mL	20-30 ml	
プロポキシカルバゾン	109	0	0	109
代謝物 A	112	0	0	112

Bond Elute PSA、充てん量500 mg、Agilent technologies製

添加量：各0.02 µg

上記の結果を基に、実試料を用いて〔実験方法〕7. 1) ①及び②に従い調製した試料溶液について、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での精製検討を実施した。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をメタノール 10 mL で予備洗浄した後、プロポキシカルバゾン及び代謝物 A 各 0.02 µg をメタノール 10 mL で溶解後、負荷、アンモニア水及びメタノール (1 : 49) 混液 10 mL で溶出したときの溶出状況を表 10 及び 11 に示した。その結果、牛の筋肉試料共存下でのプロポキシカルバゾンの回収率が他の試料に比べ低く、試料マトリックスの測定への影響でもないことから、牛の筋肉試料において、溶出確認を実施した。結果を表 12 に示した。その結果、負荷画分となるメタノール画分に溶出しており、溶出条件の再検討が必要となった。

表10 プロポキシカルバゾンの添加回収試験結果 (%)

	添加回収試験			試料マトリックスの 測定への影響
	試行 1	試行 2	平均	
小麦	103	100	102	1.05
牛の筋肉	79	77	78	0.99
牛の脂肪	96	95	96	1.05
牛の肝臓	95	90	93	0.96
乳	87	84	86	1.07

Bond Elute PSA、充てん量500 mg、Agilent technologies製

添加量：各 0.02 µg

表11 代謝物Aの添加回収試験結果

	添加回収試験 (%)			試料マトリックスの 測定への影響
	試行 1	試行 2	平均	
小麦	106	97	102	1.00

Bond Elute PSA、充てん量500 mg、Agilent technologies製

添加量：各 0.02 µg

表 12 プロポキシカルバゾンの添加回収試験結果

	メタノール	アンモニア水及びメタノール (1 : 49) 混液		合計
	10 mL	0-10 mL	10-15 mL	
牛の筋肉	21	77	0	98

Bond Elute PSA、充てん量500 mg、Agilent technologies製

添加量：各 0.02 µg

溶出条件再検討として、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をアセトニトリル 10 mL で予備洗浄した後、プロポキシカルバゾン及び代謝物 A 各 0.02 µg をアセトニトリルで溶解後、負荷、溶出したときの溶出確認を実施した。結果を表 13 に示した。アセトニトリルではプロポキシカル

バゾン及び代謝物A共に溶出されないことが確認された。また、メタノールをアセトニトリルに変更し、表8と同様の条件で溶出確認を実施したところ、アンモニア水及びアセトニトリル（1：49）混液を20 mLまで流しても代謝物Aの溶出ができなかったことから、アセトニトリルを用いての溶出確認をイオン交換作用とは別の視点で再度検討することとした。

表 13 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からの溶出率（%）

負荷溶液	アセトニトリル			合計
	0-10 mL	10-20 mL	20-30 mL	
プロポキシカルバゾン	0	0	0	0
代謝物 A	0	0	0	0

Bond Elute PSA、充てん量500 mg、Agilent technologies製

添加量：各0.02 µg

次に、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を水及びアセトニトリル各5 mLで予備洗浄した後、プロポキシカルバゾン及び代謝物A各0.02 µgをアセトニトリル10 mLで溶解後、負荷、アセトニトリル及び水混液で溶出したときの溶出確認を実施した。結果を表14～16に示した。プロポキシカルバゾン及び代謝物Aは水の比率を20%以上にすることで、10 mLで溶出が可能であることが確認された。

表14 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からの溶出率（%）

負荷溶液	アセトニトリル	アセトニトリル及び水（9：1）混液			合計
	10 mL	0-5 mL	5-10 mL	10-15 mL	
プロポキシカルバゾン	0	86	18	0	104
代謝物 A	0	0	82	17	99

Bond Elute PSA、充てん量500 mg、Agilent technologies製

添加量：各0.02 µg

表-15 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からの溶出率（%）

負荷溶液	アセトニトリル	アセトニトリル及び水（8：2）混液			合計
	10 mL	0-5 mL	5-10 mL	10-15 mL	
プロポキシカルバゾン	0	92	7	0	99
代謝物 A	0	85	15	0	100

Bond Elute PSA、充てん量500 mg、Agilent technologies製

添加量：各0.02 µg

表16 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からの溶出率（単位：%）

負荷溶液	アセトニトリル	アセトニトリル及び水（7：3）混液			合計
	10 mL	0-5 mL	5-10 mL	10-15 mL	
プロポキシカルバゾン	0	93	7	0	100
代謝物 A	0	87	12	0	99

Bond Elute PSA、充てん量500 mg、Agilent technologies製

添加量：各0.02 µg

表14～16の検討結果より、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を水及びアセトニトリル各5 mLで予備洗浄した後、牛の筋肉試料共存下でプロポキシカルバゾン及び代謝物A各0.02 µgをアセトニトリル10 mLで溶解後、負荷、アセトニトリル及び水混液で溶出したときの溶出確認を実施

した。結果を表17及び18に示した。牛の筋肉試料共存下においてもアセトニトリルでの負荷、洗浄が可能であり、溶出はアセトニトリル及び水（8：2）混液10 mL、（7：3）混液10 mL共に可能であったが、アセトニトリル及び水（8：2）混液では代謝物Aの溶出挙動が標準溶液での溶出と異なっており、アセトニトリル及び水（7：3）混液10 mLで溶出する方法が妥当と判断した。

表17 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からの溶出率（単位：％）

負荷溶液	アセトニトリル	アセトニトリル及び水（8：2）混液			合計
	10 mL	0-5 mL	5-10 mL	10-15 ml	
プロポキシカルバゾン	0	84	20	0	104
代謝物 A	0	11	90	0	101

Bond Elute PSA、充てん量500 mg、Agilent technologies製

添加量：各0.02 µg

牛の筋肉試料共存下

表 18 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からの溶出率（単位：％）

負荷溶液	アセトニトリル	アセトニトリル及び水（7：3）混液			合計
	10 mL	0-5 mL	5-10 mL	10-15 ml	
プロポキシカルバゾン	0	99	6	0	105
代謝物 A	0	91	10	0	101

Bond Elute PSA、充てん量500 mg、Agilent technologies製

添加量：各0.02 µg

牛の筋肉試料共存下

5) その他の精製カラム検討

①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の溶出状況

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をメタノール10 mLで予備洗浄した後、プロポキシカルバゾン及び代謝物A各0.02 µgをメタノールで溶解後、負荷、溶出したときの溶出状況を表19に示した。プロポキシカルバゾン及び代謝物Aいずれもメタノールのみで溶出され、洗浄画分が設けられず、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以上の精製効果が期待できないため、不採用とした。

表19 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からの溶出状況（％）

負荷溶液	メタノール			合計
	0-10 mL	10-20 mL	20-30 ml	
プロポキシカルバゾン	73	26	3	102
代謝物 A	22	58	12	92

Bond Elute SAX、充てん量500 mg、Agilent technologies製

添加量：各0.02 µg

②オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムの溶出状況

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムをメタノール及び水 10 mL で予備洗浄した後、プロポキシカルバゾン及び代謝物 A 各 0.1 µg を水及びメタノール混液で溶解後、負荷、溶出したときの溶出状況を表 20 に示した。プロポキシカルバゾンは水及びメタノール（8：2）混液から溶出が始まり、水及びメタノール（6：4）混液で終了した。一方代謝物 A は水及びメタノール（9：1）混液から溶出が始まり、水及びメタノール（7：3）混液で終了した。

次に、カラムをメタノール及び水各 10 mL で予備洗浄した後、プロポキシカルバゾン及び代謝物 A 各 0.1 µg を水及びメタノール（6：4）混液で溶解後、負荷、溶出したときの溶出状況を表 21 に示した。水

及びメタノール（6：4）混液 20 mL で溶出が可能であったが、洗浄画分を設けられないこと、後の濃縮操作が困難なことから不採用とした。

表 20 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率（％）

負荷溶液	水及びメタノール混液					合計
	(9：1) 10 mL	(8：2) 10 mL	(7：3) 10 mL	(6：4) 10 mL	(5：5) 10 mL	
プロポキシカルバゾン	0	15	74	9	0	98
代謝物 A	3	94	7	0	0	104

Bond Elute C18、充てん量 500 mg、Agilent technologies 製
添加量：各 0.1 µg

表-21 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率（％）

負荷溶液	水及びメタノール（6：4）混液			合計
	0-10 mL	10-20 mL	20-30 ml	
プロポキシカルバゾン	71	25	0	96
代謝物 A	84	16	0	100

Bond Elute C18、充てん量 500 mg、Agilent technologies 製
添加量：各 0.1 µg

3. 添加回収試験

小麦、牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓及び乳の5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7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8に示した。

1) 選択性

選択性の結果を表22に示した。検討した何れの試料においてもプロポキシカルバゾン及び代謝物A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22 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}							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}					面積(高さ) 比(a)/(b)
								n=1	n=2	平均(a)	n=1	n=2	平均(b)			
1	プロポキシカルバゾン	小麦	0.01	0.02	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	15731	15844	15788	0.000	○
		牛の筋肉	0.01	0.05	基準値	0.05	< 0.100	面積	0	0	0	12094	12009	12052	0.000	○
		牛の脂肪	0.01	0.05	基準値	0.05	< 0.100	面積	0	0	0	7897	7928	7913	0.000	○
		牛の肝臓	0.01	0.3	基準値	0.3	< 0.100	面積	0	0	0	7699	7775	7737	0.000	○
		乳	0.01	0.03	基準値	0.03	< 0.100	面積	0	0	0	7864	7683	7774	0.000	○
2	代謝物A	小麦	0.01	0.02	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	14099	13882	13991	0.000	○

*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23に示した。プロポキシカルバゾンの真度は84.3～97.6%、併行精度は1.2～4.6%であり、目標値を十分に満たした。プロポキシカルバゾンのS/N比の平均値は94.5～255.7でありS/N≥10を十分に満たした。また、代謝物Aの真度は93.0～98.3%、併行精度は1.7～3.0%であり、目標値を十分に満たした。代謝物AのS/N比の平均値は89.4でありS/N≥10を十分に満たした。

表23 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	プロポキシカルバゾン	小麦	0.01	0.02	0.01	S/N	3830000	-44	0.9998	93.9	95.8	92.7	95.0	92.3	93.9	1.6	274.7	236.6	255.7	
		小麦	0.01	0.02	0.02	—	3840000	363	0.9996	90.7	91.1	92.3	89.1	91.1	90.9	1.3	-	-	#DIV/0!	
		牛の筋肉	0.01	0.05	0.01	S/N	2660000	216	0.9994	96.8	99.6	97.1	97.5	97.1	97.6	1.2	139.5	112.5	126.0	
		牛の筋肉	0.01	0.05	0.05	—	1880000	-803	0.9991	86.6	93.4	91.8	93.1	87.4	90.5	3.6	-	-	#DIV/0!	
		牛の脂肪	0.01	0.05	0.01	S/N	2820000	-302	0.9987	96.8	94.6	93.9	92.6	95.8	94.7	1.7	159.8	143.6	151.7	
		牛の脂肪	0.01	0.05	0.05	—	1830000	-367	0.9994	93.4	92.4	93.3	92.2	98.4	93.9	2.7	-	-	#DIV/0!	
		牛の肝臓	0.01	0.3	0.01	S/N	2320000	192	0.9989	90.2	85.5	80.6	89.8	84.8	86.2	4.6	133.6	55.4	94.5	
		牛の肝臓	0.01	0.3	0.3	—	2310000	3890	0.9998	86.5	82.8	83.1	85.6	83.6	84.3	1.9	-	-	#DIV/0!	
		乳	0.01	0.03	0.01	S/N	1990000	-406	0.9986	96.9	93.6	97.1	98.1	93.4	95.8	2.3	216.8	143.3	180.1	
		乳	0.01	0.03	0.03	—	2450000	-400	0.9993	92.6	94.9	87.4	94.8	93.5	92.6	3.3	-	-	#DIV/0!	
2	代謝物A	小麦	0.01	0.02	0.01	S/N	3490000	-33	0.9992	96.5	97.8	97.4	99.4	100.6	98.3	1.7	95.2	83.5	89.4	
		小麦	0.01	0.02	0.02	—	3870000	-840	0.9997	91.9	88.9	93.8	94.4	96.2	93.0	3.0	-	-	#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検討した結果を表24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。プロポキシカルバゾンの面積比は0.88~1.04であり、測定への影響は少ないものと考えられた。代謝物Aの面積比は1.00~1.03であり、測定への影響は少ないものと考えられた。

表 24 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	プロピキカルバゾン	小麦	0.01	0.02	0.01	0.001	面積	0	15731	15844	15788	15029	15706	15368	1.03	
		小麦	0.01	0.02	0.02	0.002	面積	0	30511	30369	30440	29382	30062	29722	1.02	
		牛の筋肉	0.01	0.05	0.01	0.001	面積	0	12094	12009	12052	11658	12057	11858	1.02	
		牛の筋肉	0.01	0.05	0.05	0.005	面積	0	61991	60973	61482	59129	59332	59231	1.04	
		牛の脂肪	0.01	0.05	0.01	0.001	面積	0	7897	7928	7913	7415	8112	7764	1.02	
		牛の脂肪	0.01	0.05	0.05	0.005	面積	0	43949	44839	44394	44497	42583	43540	1.02	
		牛の肝臓	0.01	0.3	0.01	0.001	面積	0	7699	7775	7737	8112	8466	8289	0.93	
		牛の肝臓	0.01	0.3	0.3	0.03	面積	0	241745	242544	242145	273635	278707	276171	0.88	
		乳	0.01	0.03	0.01	0.001	面積	0	7864	7683	7774	7961	7415	7688	1.01	
		乳	0.01	0.03	0.03	0.003	面積	0	25261	24889	25075	24910	24659	24785	1.01	
2	代謝物A	小麦	0.01	0.02	0.01	0.001	面積	0	14099	13882	13991	13631	13527	13579	1.03	
		小麦	0.01	0.02	0.02	0.002	面積	0	29892	30168	30030	29737	30233	29985	1.00	

*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)を作成する。

*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。

4. 考察

抽出はプロポキシカルバゾン及び代謝物Aの溶解性を考慮しメタノールを用いた。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は、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について検討したところ、良好な結果が得られた。

開発した方法を用いて、小麦、牛の筋肉・脂肪・肝臓及び牛乳を用いて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、プロポキシカルバゾンの真度は84.3~97.6%、併行精度は1.2~4.6%、代謝物Aの真度は93.0~98.3%、併行精度は1.7~3.0%の良好な結果が得られたことから、本試験法は、穀類、畜産物及び乳に適応可能であると考えられた。

[結論]

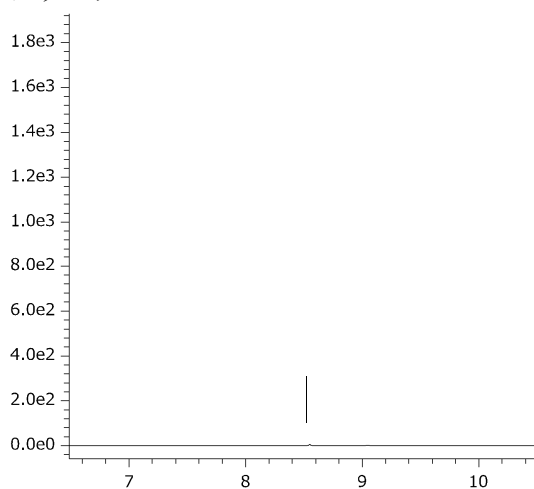
穀類、畜産物及び乳中のプロポキシカルバゾン及び代謝物Aの試験法として、試料からメタノールを用いて抽出し、アセトニトリル/ヘキサン分配を行った(小麦の場合は省略)後、エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムで精製した後、LC-MS/MSで定量及び確認する方法を開発した。

開発した試験法を小麦、牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓及び牛乳に適用した結果、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、プロポキシカルバゾンの真度は84.3~97.6%、併行精度は1.2~4.6%、代謝物Aの真度は93.0~98.3%、併行精度は1.7~3.0%、定量限界は0.01 mg/kgが可能であることが確認できた。

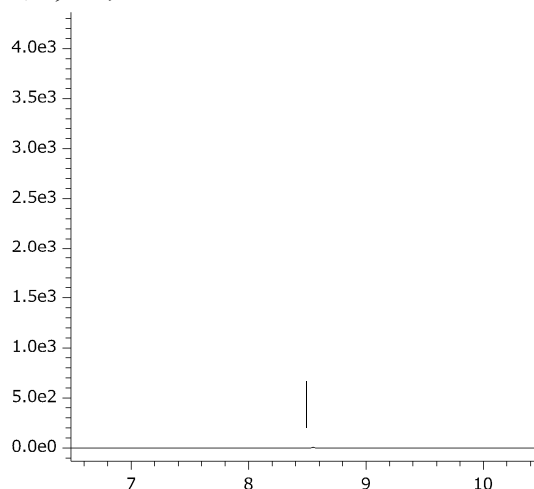
[参考文献]
なし

プロポキシカルバゾンの添加回収試験におけるクロマトグラム

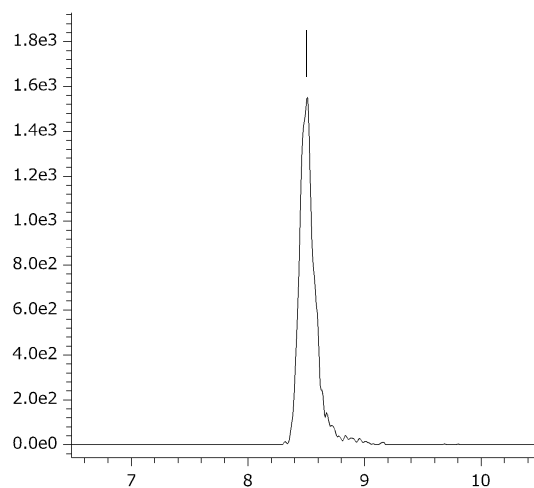
ブランク



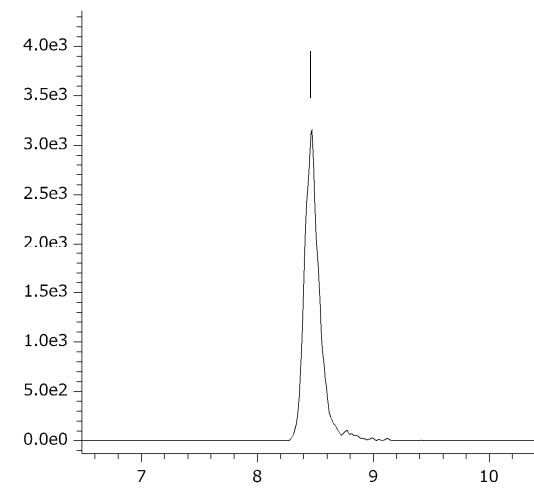
ブランク



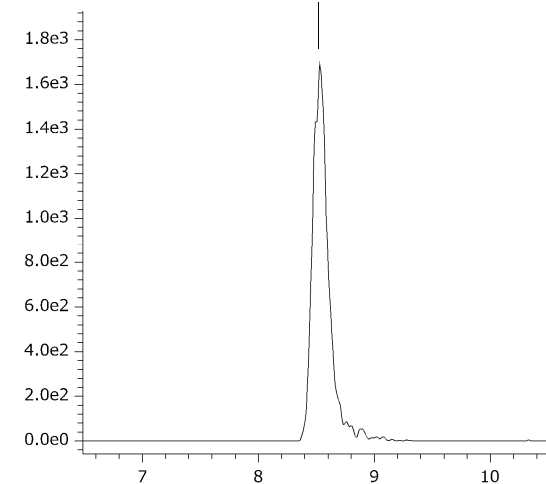
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

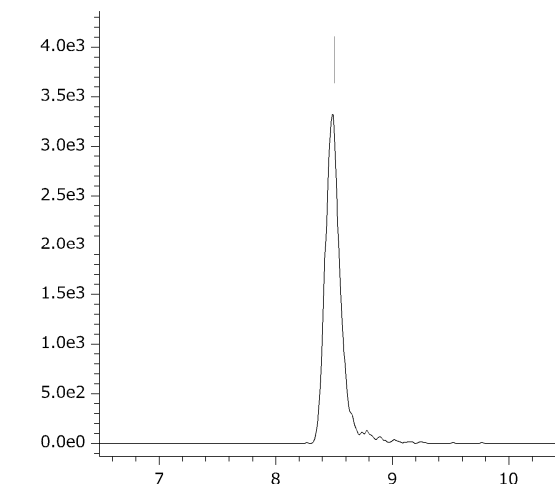
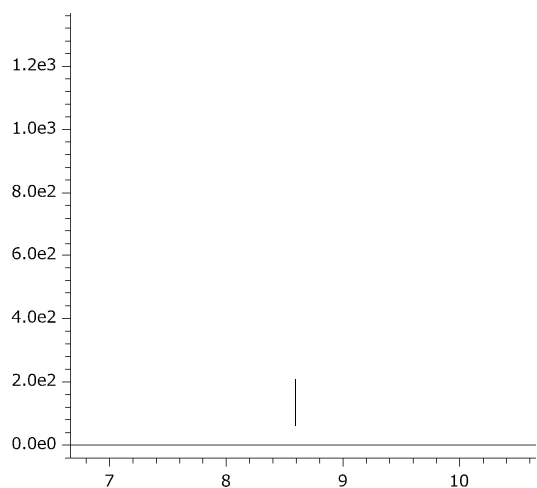


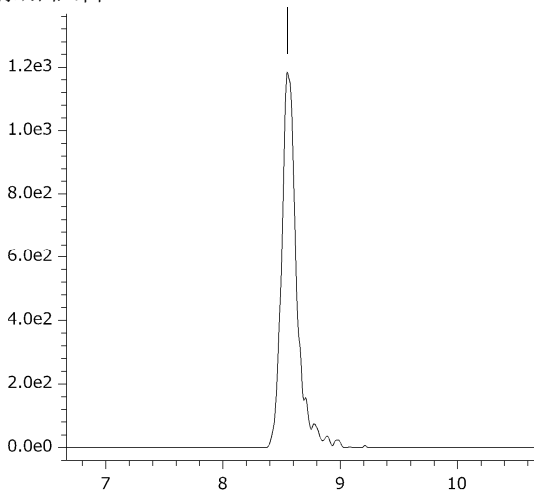
図 7-1 小麦の SRM クロマトグラム
プロポキシカルバゾン
(m/z -397→156)
添加濃度：0.01 ppm

図 7-2 小麦の SRM クロマトグラム
プロポキシカルバゾン
(m/z -397→156)
添加濃度：0.02 ppm

ブランク



添加試料



標準溶液

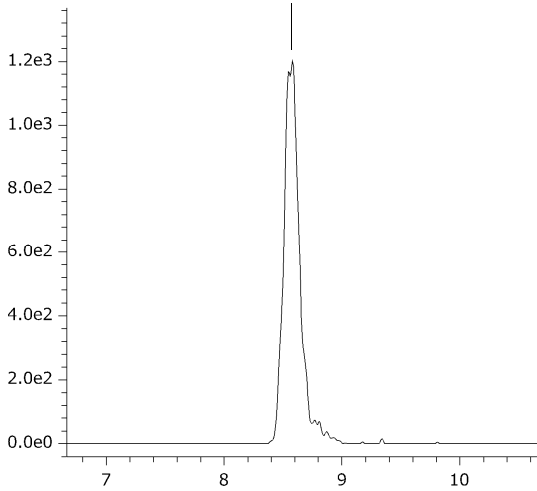
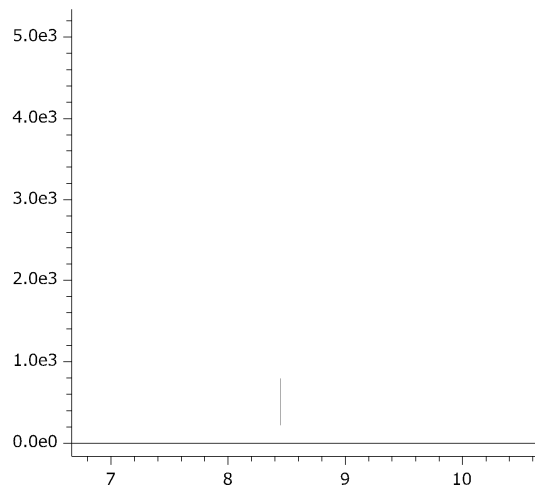
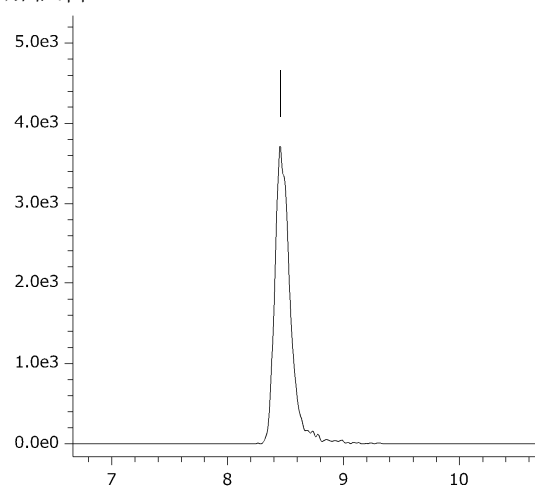


図 7-3 牛の筋肉の SRM クロマトグラム
プロポキシカルバゾン
(m/z -397→156)
添加濃度：0.01 ppm

ブランク



添加試料



標準溶液

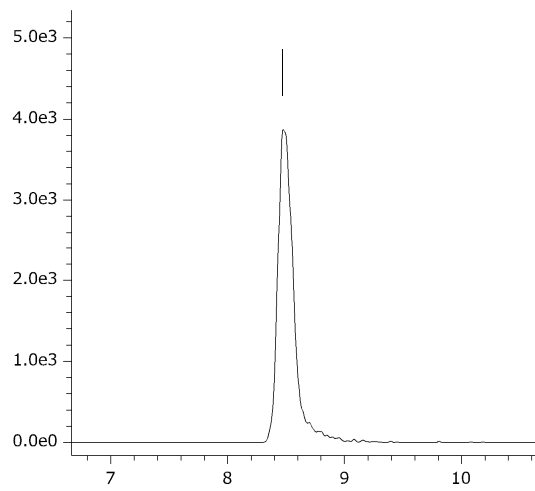
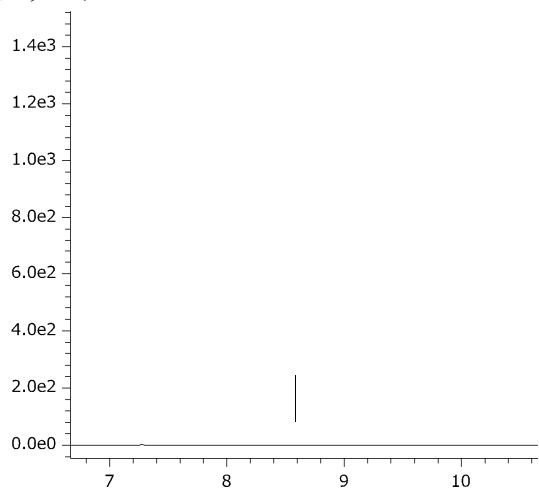
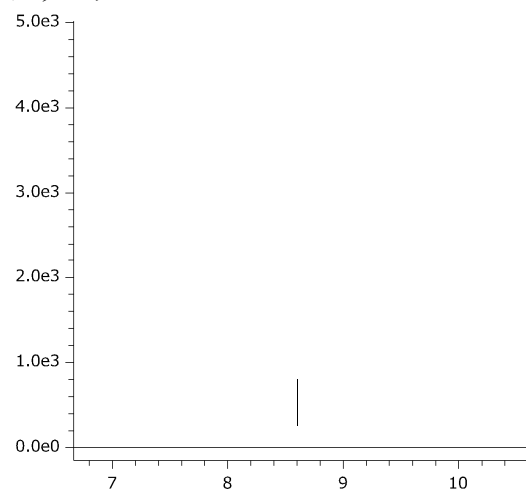


図 7-4 牛の筋肉の SRM クロマトグラム
プロポキシカルバゾン
(m/z -397→156)
添加濃度：0.05 ppm

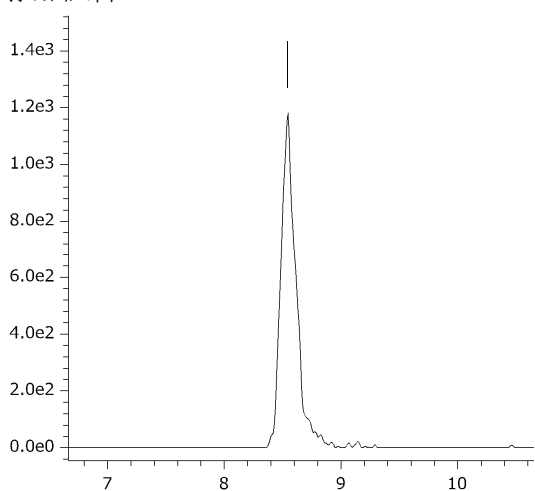
ブランク



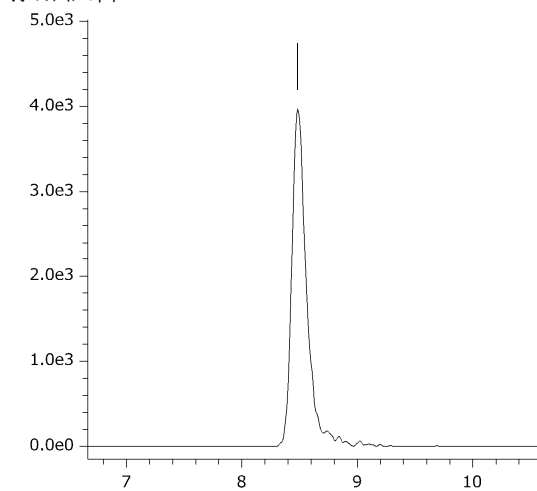
ブランク



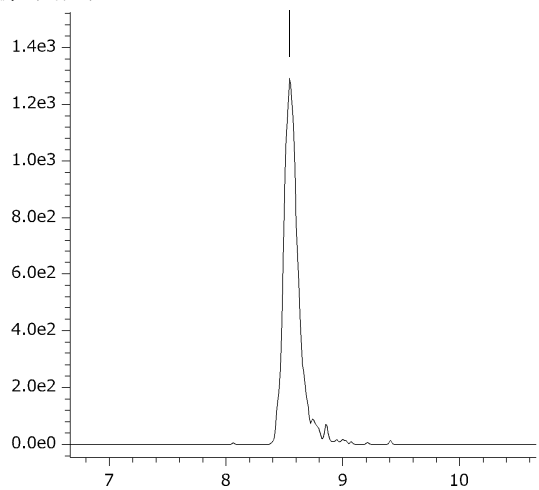
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

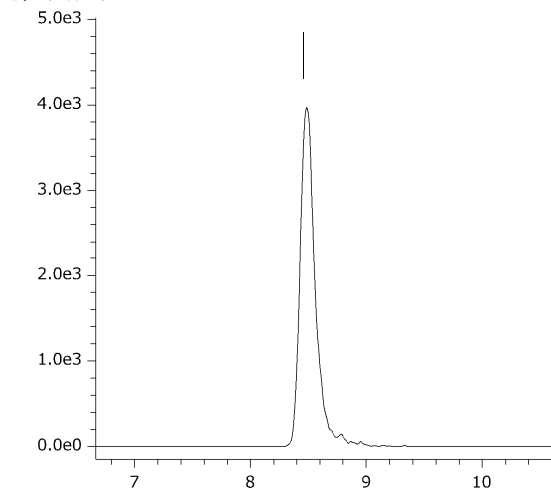
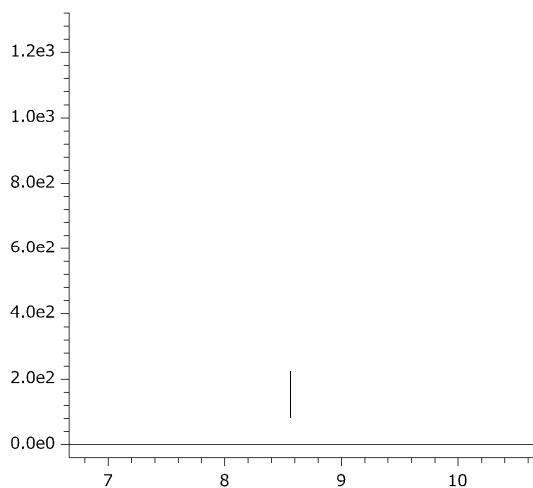


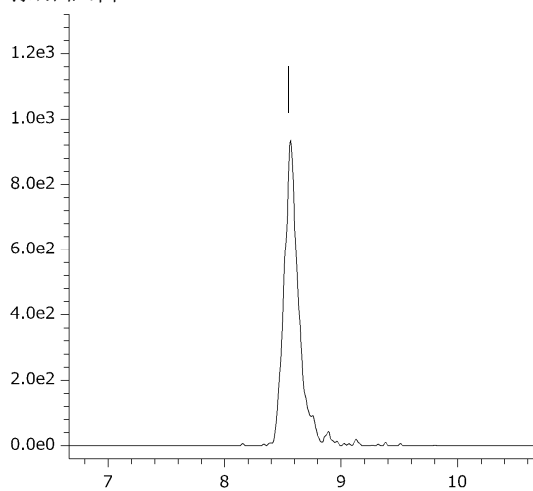
図 7-5 牛の脂肪の SRM クロマトグラム
プロポキシカルバゾン
(m/z -397→156)
添加濃度：0.01 ppm

図 7-6 牛の脂肪の SRM クロマトグラム
プロポキシカルバゾン
(m/z -397→156)
添加濃度：0.05 ppm

ブランク



添加試料



標準溶液

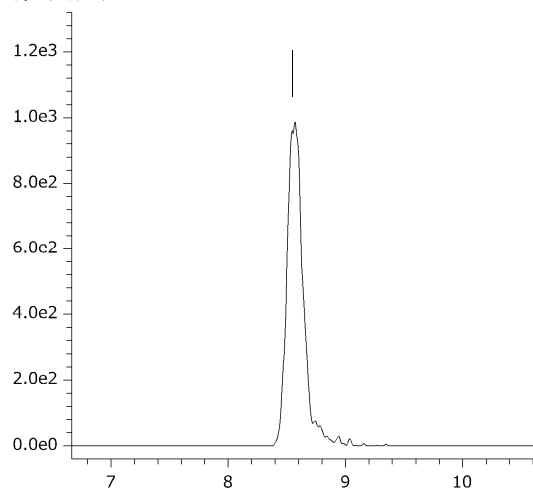


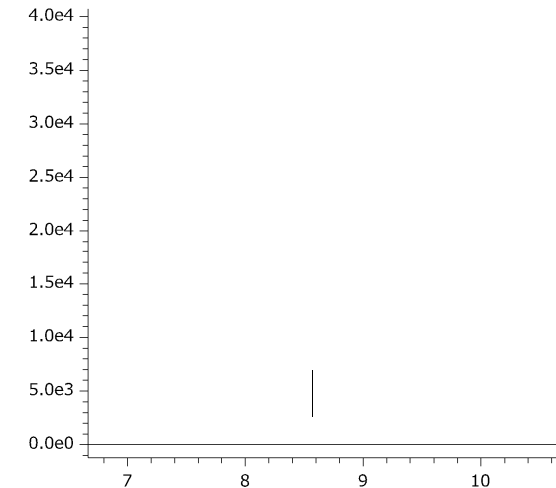
図 7-7 牛の肝臓の SRM クロマトグラム

プロポキシカルバゾン

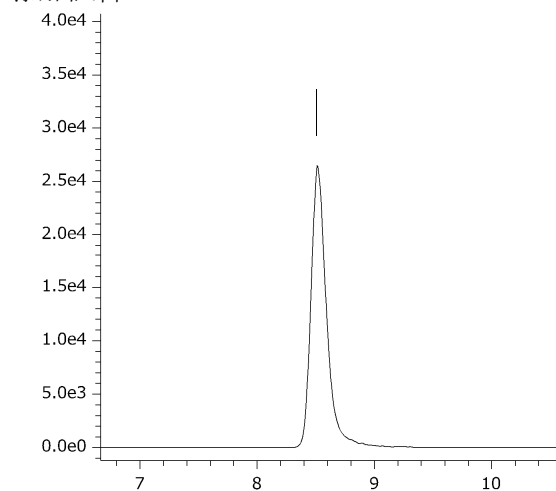
(m/z -397→156)

添加濃度：0.01 ppm

ブランク



添加試料



標準溶液

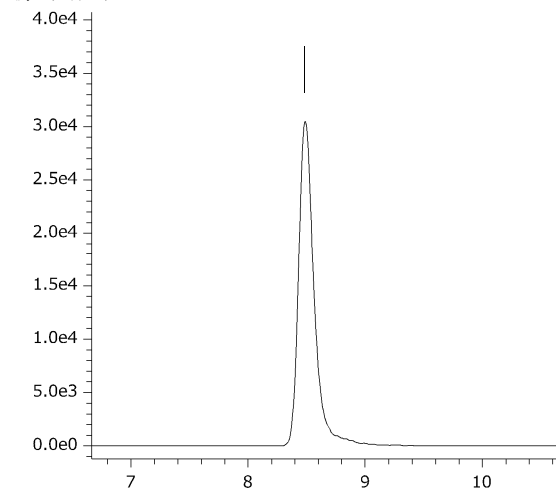


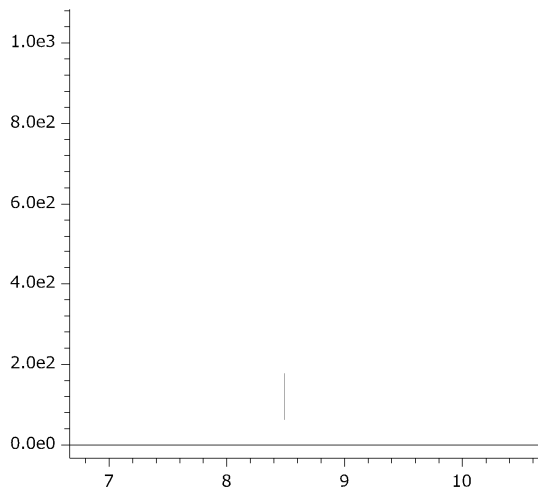
図 7-8 牛の肝臓の SRM クロマトグラム

プロポキシカルバゾン

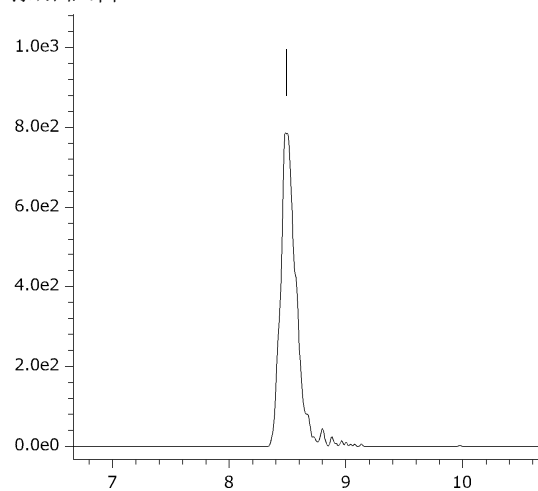
(m/z -397→156)

添加濃度：0.3 ppm

ブランク



添加試料



標準溶液

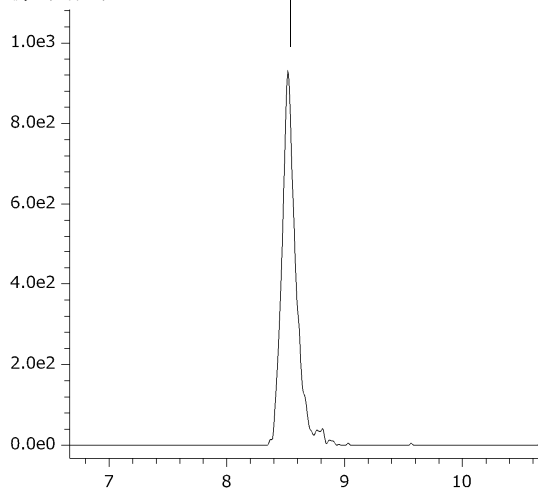
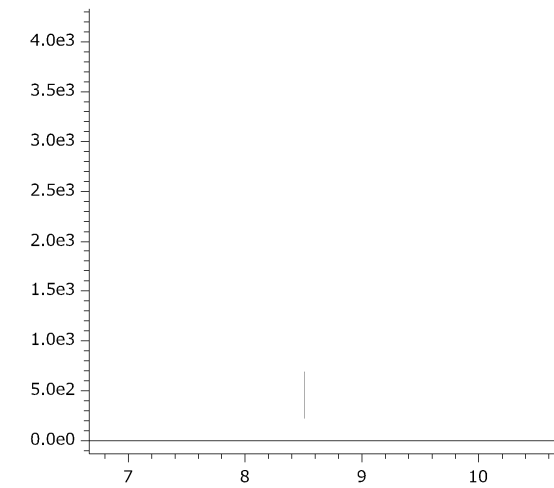
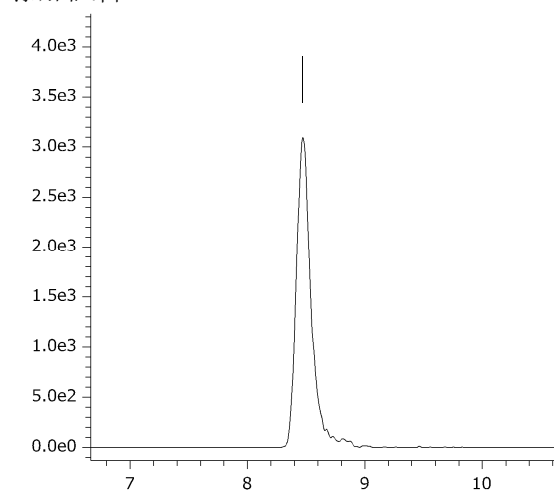


図 7-9 乳の SRM クロマトグラム
プロポキシカルバゾン
(m/z -397→156)
添加濃度：0.01 ppm

ブランク



添加試料



標準溶液

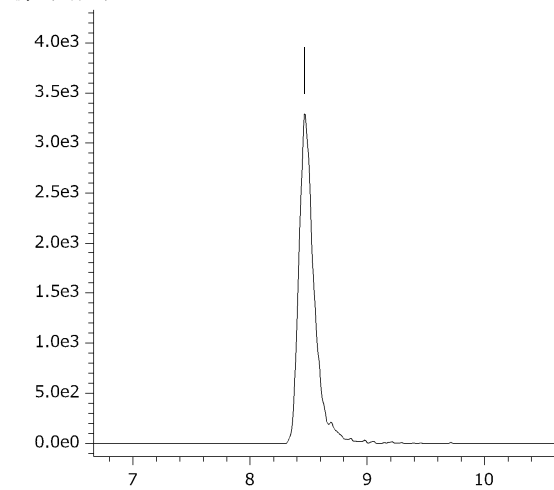
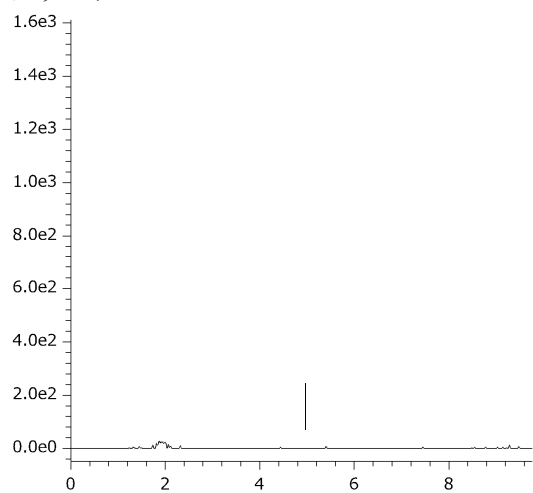


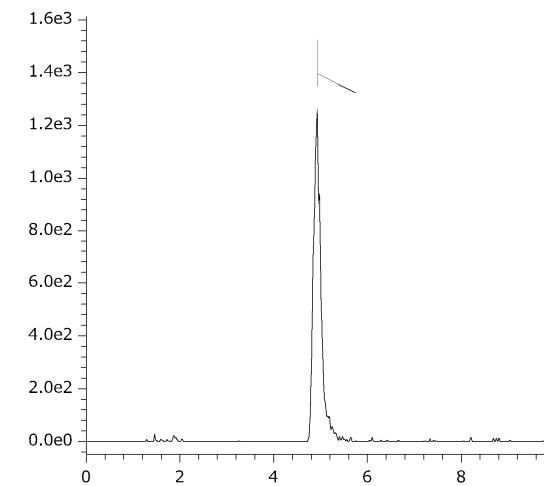
図 7-10 乳の SRM クロマトグラム
プロポキシカルバゾン
(m/z -397→156)
添加濃度：0.01 ppm

代謝物Aの添加回収試験におけるクロマトグラム

ブランク



添加試料



標準溶液

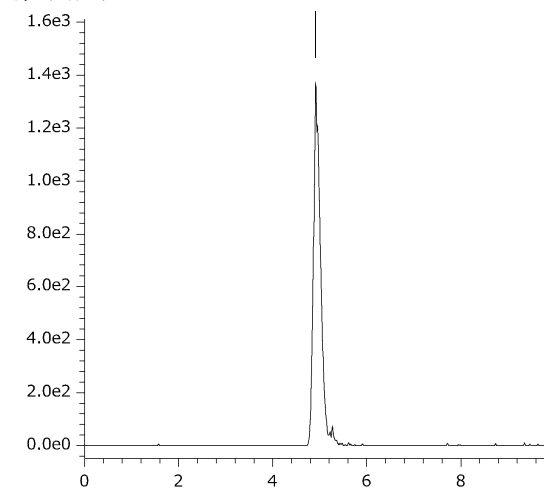


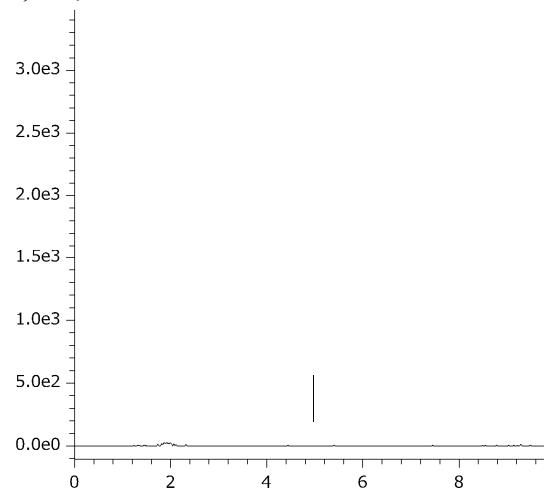
図 8-1 小麦の SRM クロマトグラム

代謝物 A

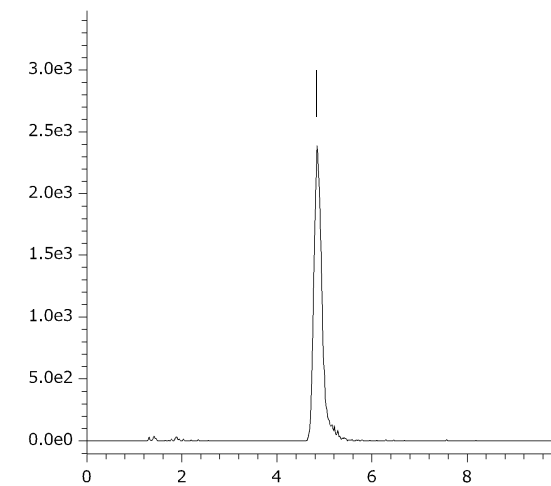
(m/z -413→172)

添加濃度 : 0.01 ppm

ブランク



添加試料



標準溶液

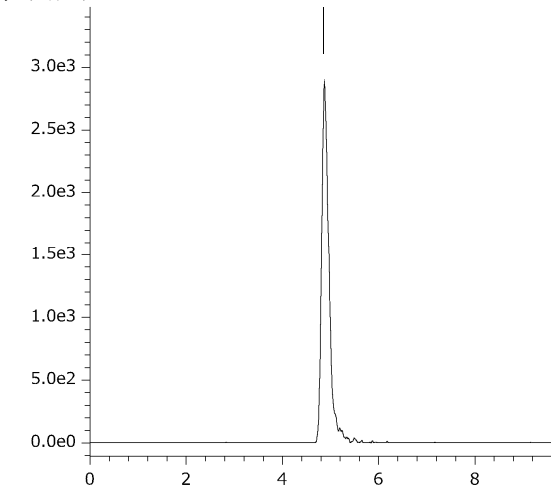


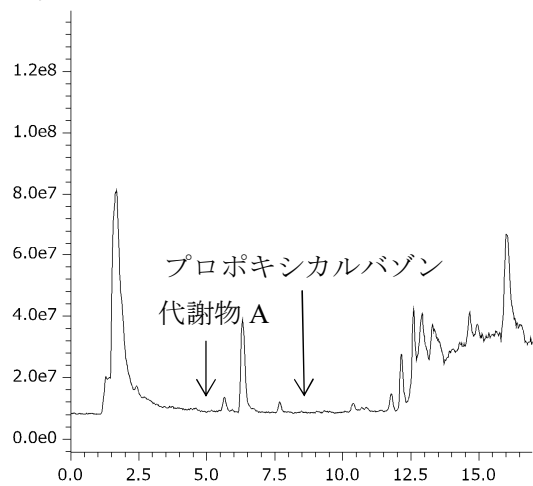
図 8-2 小麦の SRM クロマトグラム

代謝物 A

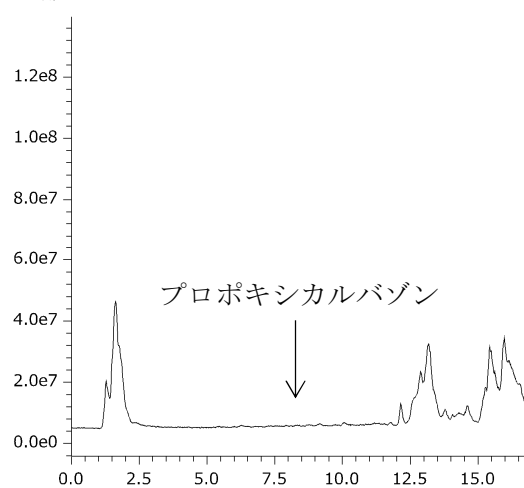
(m/z -413→172)

添加濃度 : 0.02 ppm

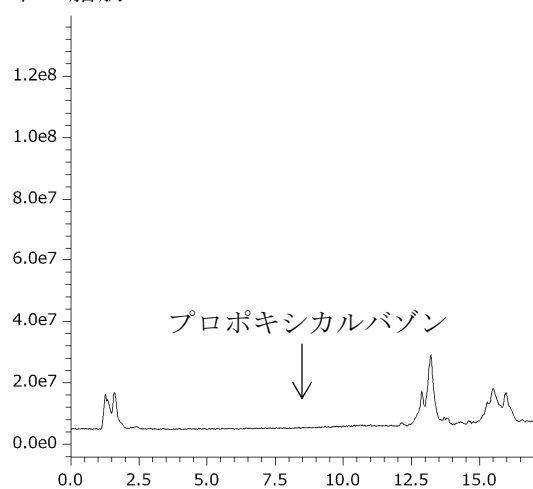
小麦



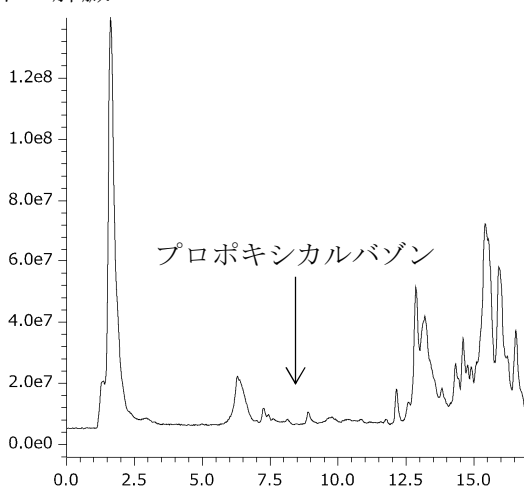
牛の筋肉



牛の脂肪



牛の肝臓



乳

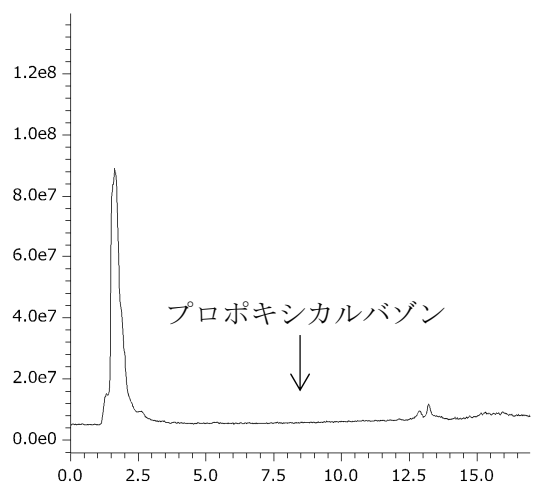


図 9 ブランク試料のトータルイオンクロマトグラム
(スキャン範囲：30～500 m/z)