

※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ください。

食品に残留する農薬等の成分である物質（プロファム）の 試験法開発事業報告書

プロファム試験法 (農産物及び畜水産物)

[緒言]

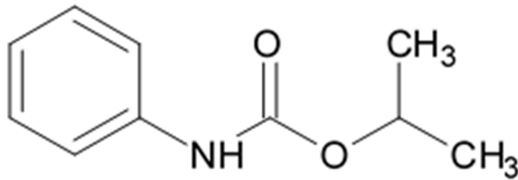
1. 目的及び試験法の検討方針

農薬等のポジティブリスト制度の施行に伴い、食品衛生法に基づく残留農薬基準が設定されている農薬のうち、現在までに公定試験法が確立されていないプロファムの個別試験法を開発することを目的とする。

2. 分析対象物質の構造式、物理化学的性質、基準値等に関する情報

1) 構造式及び物理化学的性質

プロファムはカーバメート系除草剤として、また、ばれいしょの発芽防止を目的に植物成長調整剤として海外で用いられる物質で、日本では農薬として登録されていない。



CAS No. : 122-42-9

化学式 : C₁₀H₁₃NO₂

分子量 : 179.2

化学名(IUPAC) : propan-2-yl *N*-phenylcarbamate

外観 : 無色結晶

融点 : 87~87.6°C

沸点 : 昇華

溶解性 : 水 250.0 mg/L(20~25 °C)

アセトン、アルコール類、ベンゼン、シクロヘキサン、エステル類、キシレンに可溶

安定性 : 100°Cまで安定、光に安定、酸性及びアルカリ性で徐々に加水分解。

(出典 : The Pesticide Manual 17th Edition)

2) 基準値

不検出

通知 [生食発0404第2号 (H28.4.4)] の検出限界 : 0.01 ppm

[実験方法]

1. 試料

1) 購入先

うなぎは愛知県の養鰻業者から入手した。その他の試料は愛知県内の小売店にて購入した。

2) 試料の採取方法

農産物

- ① 玄米、大豆及び茶は、検体を425 μm の標準網ふるいを通して均一化した。
- ② ばれいしょ、ほうれんそう、キャベツ、りんご及びオレンジは、検体約1 kgを細切均一化した。

畜水産物

- ③ 牛の筋肉は、可能な限り脂肪層を除き、細切均一化した。
- ④ 牛の脂肪は、可能な限り筋肉層を除き、細切均一化した。
- ⑤ 牛の肝臓は、細切均一化した。
- ⑥ 牛乳は、よく混合して均一化した。
- ⑦ はちみつは百花蜜を用い、概ね40°Cに加熱して溶かしてから、よく混合して均一化した。
- ⑧ しじみは、殻を除去し、得られたむき身を目の細かい網にのせ、5分間水切りを行ったものを細切均一化した。
- ⑨ うなぎは、頭部を除き、細切均一化した。
- ⑩ 鶏卵は、殻を除去し、卵白と卵黄を合わせてよく混合し均一化した。

2. 試薬・試液等

1) 標準品

プロファム標準品・・・純度99.9%、和光純薬工業製

2) 試薬

アセトニトリル・・・残留農薬試験用300倍 和光純薬工業製

アセトン・・・残留農薬試験用300倍 和光純薬工業製

塩化ナトリウム・・・特級 関東化学製

ケイソウ土・・・セライトNo.545 和光純薬工業製

ジエチレングリコール・・・特級 関東化学製

ヘキサン・・・残留農薬試験用300倍 和光純薬工業製

水・・・ミリポア精製水

無水硫酸ナトリウム・・・特級 関東化学製

メタノール・・・残留農薬試験用300倍 和光純薬工業製

超純水・・・LC/MS用 和光純薬工業製(移動相に用いた。)

メタノール・・・LC/MS用 和光純薬工業製(移動相に用いた。)

アセトニトリル・・・LC/MS用 和光純薬工業製(移動相に用いた。)

ギ酸・・・LC/MS用 和光純薬工業製(移動相に用いた。)

酢酸・・・特級 関東化学製(移動相に用いた。)

酢酸アンモニウム・・・特級 関東化学製(移動相に用いた。)

ギ酸アンモニウム・・・特級 関東化学製(移動相に用いた。)

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム(1000 mg)・・・

Inertsep C18(1 g/20 mL) ジーエルサイエンス製

Sep-Pak Vac C18(1000 mg) Waters製

MEGA BondElut C18(1 g/6 mL) Agilent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(500 mg)・・・

Inertsep PSA SlimJ ジーエルサイエンス製

3) 標準溶液、試液の調製方法

① 標準溶液の調製方法

プロファム標準原液・・・プロファム標準品10 mgを精密に量り採り、アセトニトリルを加えて溶解し、10 mLとした(1000 mg/L)。

添加用標準溶液・・・プロファム標準品10 mgを精密に量り採り、アセトンを加えて溶解し、10 mLとしたものを、さらにアセトンで適宜希釈したものを添加用標準溶液(1 mg/L)とした。

② 試液の調製方法

0.1 vol%ギ酸・・・ギ酸1 mLに水を加えて1000 mLとした。

0.1 vol%酢酸・・・酢酸1 mLに水を加えて1000 mLとした。

2 vol%ジエチレングリコール・アセトン溶液・・・ジエチレングリコール0.2 mLにアセトンを加えて10 mLとした。

2 mmol/Lギ酸アンモニウム溶液・・・ギ酸アンモニウム0.126 gを量り採り、水を加えて溶解し、1000 mLとした。

5 mmol/Lギ酸アンモニウム溶液・・・ギ酸アンモニウム0.315 gを量り採り、水を加えて溶解し、1000 mLとした。

10 mmol/Lギ酸アンモニウム溶液・・・ギ酸アンモニウム0.631 gを量り採り、水を加えて溶解し、1000 mLとした。

20 mmol/Lギ酸アンモニウム溶液・・・ギ酸アンモニウム1.26 gを量り採り、水を加えて溶解し、1000 mLとした。

10 mmol/L酢酸アンモニウム溶液・・・酢酸アンモニウム0.771 gを量り採り、水を加えて溶解し、1000 mLとした。

10 w/v%塩化ナトリウム溶液・・・塩化ナトリウム100 gを量り採り、水を加えて溶解し、1000 mLとした。

3. 装置

前処理装置	型式	会社
純水製造装置	Elix UV-3	メルクミリポア
フードプロセッサー	DLC-7 SUPER PRO	Cuisinart
ホモジナイザー	T-18	IKA
ロータリーエバポレーター	R-210	BÜCHI
振とう機	SR-2w	TAITEC

測定装置	型式	会社
LC	Nexera X2	島津製作所
MS	4000 QTRAP	Sciex

4. 測定条件

LC条件																		
カラム	InertSustain C18 サイズ：内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm 会社：ジーエルサイエンス																	
移動相流速 (mL/分)	0.20																	
注入量 (μL)	5																	
カラム温度 (°C)	40																	
移動相	A液：2 mmol/Lギ酸アンモニウム溶液 B液：メタノール																	
グラジエント条件	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間 (分)</th> <th>A液 (%)</th> <th>B液 (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>10.0</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>10.1</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>15.0</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> </tbody> </table>			時間 (分)	A液 (%)	B液 (%)	0	50	50	10.0	10	90	10.1	50	50	15.0	50	50
時間 (分)	A液 (%)	B液 (%)																
0	50	50																
10.0	10	90																
10.1	50	50																
15.0	50	50																
MS条件																		
測定モード	選択反応モニタリング (SRM)																	
イオン化モード	エレクトロスプレーイオン化法-ポジティブモード (ESI (+))																	
キャピラリ電圧 (V)	5500																	
ソース温度 (°C)	350																	
DP*1 (V)	46																	
コリジョンガス	窒素																	
定量イオン (m/z)	180>138 (コリジョンエネルギー：11eV)																	

定性イオン (m/z)	180>120 (コリジョンエネルギー : 23eV)
保持時間 (分)	7.9

※1 Declustering Potential。カーテンプレートにかかる電圧

5. 定量

プロファム標準原液をアセトニトリル及び水 (7:3) 混液で希釈し、0.00025、0.0005、0.00075、0.001、0.00125、0.0015 mg/Lの濃度で標準溶液を調製した。標準溶液5 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5 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ファムの含量を算出した。

1) 検量線の直線性 (図5 プロファムの検量線参照)

4. の測定条件において、濃度0.00025 mg/L (0.00125 ng) ~0.0015 mg/L (0.0075 ng) の範囲で良好な直線性を示した。

2) 標準溶液の検出感度

通知 [生食発0404第2号 (H28.4.4)] に示された検出限界相当の検出量 : 0.005 ng (0.001 mg/L \times 5 μ L) のピーク S/N比は578と良好であった。

6. 添加試料の調製

1. 試料 2) 試料の採取方法に従って採取した試料200 gに添加用標準溶液 (1 mg/L) 2 mL添加してよく混合し、30分間放置したものを添加試料とした。なお、牛の脂肪は概ね40°Cに加温して融解し、添加してよく混合した後、30分間放置して再凝固させた。

7. 試験溶液の調製

1) 試験法の分析操作

プロファムを試料からアセトンで抽出、*n*-ヘキサンに転溶し、脂質等が多い試料についてはアセトニトリル/ヘキサン分配で精製した後、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム及びエチレンジアミン-*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で定量及び確認した。

① 抽出

a 穀類及び豆類の場合

試料10.0 gを量り採り、水20 mLを加え、30分間放置した。これにアセトン100 mLを加え、3分間ホモジナイズした後、ケイソウ土を1 cmの厚さに敷いたろ紙 (直径40 mm、No.5A、桐山製作所製) を用いて吸引ろ過した。ろ紙上の残留物を採り、アセトン50 mLを加えて3分間ホモジナイズし、上記と同様に操作した。得られたろ液を合わせ、アセトンで正確に200 mLとした。この溶液から50 mLナス型フラスコ中に正確に20 mL分取し、40°C以下で約3 mLまで濃縮した。これをあらかじめ10 w/v%塩化ナトリウム溶液100 mLを入れた300 mL分液漏斗に移した。*n*-ヘキサン100 mLを用いて上記のナス型フラスコを洗い、洗液を分液漏斗に合わせた。振とう機を用いて5分間激しく振り混ぜた後、静置し、*n*-ヘキサン層を300 mL三角フラスコに移した。水層に*n*-ヘキサン50 mL

を加えて上記と同様に操作して、*n*-ヘキサン層を上記の三角フラスコに合わせた。これに、無水硫酸ナトリウムを加え、時々振り混ぜながら15分間放置して脱水し、ろ紙（直径125 mm、No.5A、アドバンテック製）を用いて300 mLナス型フラスコ中にろ過した後、*n*-ヘキサン約20 mLでろ紙を洗い込んだ。このナス型フラスコに2 vol%ジエチレングリコール・アセトン溶液0.2 mLを加え、40℃以下で濃縮し、窒素を吹き付けて溶媒を除去した。この残留物に *n*-ヘキサン30 mLを加え、100 mL分液漏斗に移した。これに*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル30 mLを加えて振とう機を用いて5分間激しく振り混ぜた後、静置し、アセトニトリル層を300 mLナス型フラスコ中に移した。*n*-ヘキサン層に*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル30 mLを加えて上記と同様に操作して、アセトニトリル層を300 mLナス型フラスコ中に合わせた。これを、40℃以下で濃縮し、窒素を吹き付けて溶媒を除去した。この残留物にアセトン4 mLを加えて溶かし、水16 mLを加えた。

b 果実及び野菜の場合

試料20.0 gにアセトン100 mLを加え、3分間ホモジナイズした後、ケイソウ土を1 cmの厚さに敷いたろ紙（直径40 mm、No.5A、桐山製作所製）を用いて吸引ろ過した。ろ紙上の残留物を採り、アセトン50 mLを加えて3分間ホモジナイズし、上記と同様に操作した。得られたろ液を合わせ、アセトンで正確に200 mLとした。この溶液から50 mLナス型フラスコ中に正確に10 mL分取し、40℃以下で約2 mLまで濃縮した。これをあらかじめ10 w/v%塩化ナトリウム溶液100 mLを入れた300 mL分液漏斗に移した。*n*-ヘキサン100 mLを用いて上記のナス型フラスコを洗い、洗液を分液漏斗に合わせた。振とう機を用いて5分間激しく振り混ぜた後、静置し、*n*-ヘキサン層を300 mL三角フラスコに移した。水層に*n*-ヘキサン50 mLを加えて上記と同様に操作して、*n*-ヘキサン層を上記の三角フラスコに合わせた。これに、無水硫酸ナトリウムを加え、時々振り混ぜながら15分間放置して脱水し、ろ紙（直径125 mm、No.5A、アドバンテック製）を用いて300 mLナス型フラスコ中にろ過した後、*n*-ヘキサン約20 mLでろ紙を洗い込んだ。このナス型フラスコに2 vol%ジエチレングリコール・アセトン溶液0.2 mLを加え、40℃以下で濃縮し、窒素を吹き付けて溶媒を除去した。この残留物にアセトン4 mLを加えて溶かし、水16 mLを加えた。

c 茶の場合

試料5.00 gに水20 mLを加え、30 分間放置した。これにアセトン100 mLを加え、3分間ホモジナイズした後、ケイソウ土を1 cmの厚さに敷いたろ紙（直径40 mm、No.5A、桐山製作所製）を用いて吸引ろ過した。ろ紙上の残留物を採り、アセトン50 mLを加えて3分間ホモジナイズし、上記と同様に操作した。得られたろ液を合わせ、アセトンで正確に200 mLとした。この溶液から50 mLナス型フラスコ中に正確に40 mL分取し、40℃以下で約6 mLまで濃縮した。これをあらかじめ10 w/v%塩化ナトリウム溶液100 mLを入れた300 mL分液漏斗に移した。*n*-ヘキサン100 mLを用いて上記のナス型フラスコを洗い、洗液を分液漏斗に合わせた。振とう機を用いて5分間激しく振り混ぜた後、静置し、*n*-ヘキサン層を300 mL三角フラスコに移した。水層に*n*-ヘキサン50 mLを加えて上記と同様に操作して、*n*-ヘキサン層を上記の三角フラスコに合わせた。これに、無水硫酸ナトリウムを加え、時々振り混ぜながら15分間放置して脱水し、ろ紙（直径125 mm、No.5A、アドバンテック製）を用いて300 mLナス型フラスコ中にろ過した後、*n*-ヘキサン約20 mLでろ紙を洗い込んだ。このナス型フラスコに2 vol%ジエチレングリコール・アセトン溶液0.2 mLを加え、40℃以下

で濃縮し、窒素を吹き付けて溶媒を除去した。この残留物にアセトン4 mLを加えて溶かし、水16 mLを加えた。

d 筋肉、脂肪、肝臓、乳、卵及び魚介類の場合

試料10.0 gにアセトン100 mLを加え、3分間ホモジナイズした後、ケイソウ土を1 cmの厚さに敷いたろ紙（直径40 mm、No.5A、桐山製作所製）を用いて吸引ろ過した。ろ紙上の残留物を採り、アセトン50 mLを加えて3分間ホモジナイズし、上記と同様に操作した。得られたろ液を合わせ、アセトンで正確に200 mLとした。この溶液から50 mLナス型フラスコ中に正確に20 mL分取し、40°C以下で約3 mLまで濃縮した。これをあらかじめ10 w/v%塩化ナトリウム溶液100 mLを入れた300 mL分液漏斗に移した。*n*-ヘキサン100 mLを用いて上記のナス型フラスコを洗い、洗液を分液漏斗に合わせた。振とう機を用いて5分間激しく振り混ぜた後、静置し、*n*-ヘキサン層を300 mL三角フラスコに移した。水層に*n*-ヘキサン50 mLを加えて上記と同様に操作して、*n*-ヘキサン層を上記の三角フラスコに合わせた。これに、無水硫酸ナトリウムを加え、時々振り混ぜながら15分間放置して脱水し、ろ紙（直径125 mm、No.5A、アドバンテック製）を用いて300 mLナス型フラスコ中にろ過した後、*n*-ヘキサン約20 mLでろ紙を洗い込んだ。このナス型フラスコに2 vol%ジエチレングリコール・アセトン溶液0.2 mLを加え、40°C以下で濃縮し、窒素を吹き付けて溶媒を除去した。この残留物に *n*-ヘキサン30 mLを加え、100 mL分液漏斗に移した。これに*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル30 mLを加えて振とう機を用いて5分間激しく振り混ぜた後、静置し、アセトニトリル層を300 mLナス型フラスコ中に移した。*n*-ヘキサン層に*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル30 mLを加えて上記と同様に操作して、アセトニトリル層を300 mLナス型フラスコ中に合わせた。これを、40°C以下で濃縮し、窒素を吹き付けて溶媒を除去した。この残留物にアセトン4 mLを加えて溶かし、水16 mLを加えた。

e はちみつの場合

試料10.0 gに水20 mLを加えて溶かした。これにアセトン100 mLを加え、3分間ホモジナイズした後、ケイソウ土を1 cmの厚さに敷いたろ紙（直径40 mm、No.5A、桐山製作所製）を用いて吸引ろ過した。ろ紙上の残留物を採り、アセトン50 mLを加えて3分間ホモジナイズし、上記と同様に操作した。得られたろ液を合わせ、アセトンで正確に200 mLとした。この溶液から50 mLナス型フラスコ中に正確に20 mL分取し、40°C以下で約3 mLまで濃縮した。これをあらかじめ10 w/v%塩化ナトリウム溶液100 mLを入れた300 mL分液漏斗に移した。*n*-ヘキサン100 mLを用いて上記のナス型フラスコを洗い、洗液を分液漏斗に合わせた。振とう機を用いて5分間激しく振り混ぜた後、静置し、*n*-ヘキサン層を300 mL三角フラスコに移した。水層に*n*-ヘキサン50 mLを加えて上記と同様に操作して、*n*-ヘキサン層を上記の三角フラスコに合わせた。これに、無水硫酸ナトリウムを加え、時々振り混ぜながら15分間放置して脱水し、ろ紙（直径125 mm、No.5A、アドバンテック製）を用いて300 mLナス型フラスコ中にろ過した後、*n*-ヘキサン約20 mLでろ紙を洗い込んだ。このナス型フラスコに2 vol%ジエチレングリコール・アセトン溶液0.2 mLを加え、40°C以下で濃縮し、窒素を吹き付けて溶媒を除去した。この残留物にアセトン4 mLを加えて溶かし、水16 mLを加えた。

② 精製

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム (1,000 mg) にアセトニトリル10 mL及びアセトン及び水 (1 : 4) 混液10 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 (500 mg) にアセトニトリル及び水 (7 : 3) 混液10 mLを注入、流出液は捨てた。

オクタデシ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、さらにアセトニトリル及び水 (1 : 4) 混液10 mLを注入し、流出液は捨てた。このミニカラムの下部に、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 (500 mg) を接続し、アセトニトリル及び水 (7 : 3) 混液10 mLを注入し、溶出液を採った。この溶液にアセトニトリル及び水 (7 : 3) を加えて正確に10 mLとしたものを試験溶液とした。

2) フローチャート

農産物：野菜類、果実類及び茶

畜水産物：はちみつ

秤 取

- | 野菜類及び果実類：試料20.0 g
- | 茶：試料5.00 gに水20 mLを加えて30分間放置
- | はちみつ：試料10.0 gに水20 mLを加えて溶かす

アセトン抽出

- | アセトン100 mLを加えてホモジナイズ
- | 吸引ろ過し、ろ紙上の残留物を採る
- | 残留物にアセトン50 mLを加えてホモジナイズ
- | 吸引ろ過し、ろ液を合わせアセトンで正確に200 mLとする
- | 野菜類及び果実類：抽出液を正確に10 mL分取し、約2 mLまで減圧濃縮
- | 茶：抽出液を正確に40 mL分取し、約6 mLまで減圧濃縮
- | はちみつ：抽出液を正確に20 mL分取し、約3 mLまで減圧濃縮

n-ヘキサン転溶

- | 10 w/v%塩化ナトリウム溶液100 mLを加えて混合
- | *n*-ヘキサン100 mLを加えて5分間振とう
- | *n*-ヘキサン層を採取
- | 水層に*n*-ヘキサン50 mLを加えて5分間振とう
- | *n*-ヘキサン層を合わせて脱水ろ過
- | 2 vol%ジエチレングリコール・アセトン溶液0.2 mLを加えて混合
- | ろ液を減圧濃縮、窒素乾固

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム

- | アセトニトリル10 mLで予備洗浄
- | アセトン及び水 (1 : 4) 混液10 mLで予備洗浄
- | 試料残留物にアセトン4 mLを加えて溶解
- | 水16 mLを加えて混合し、負荷

| アセトニトリル及び水 (1 : 4) 混液10 mLで洗浄

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

| アセトニトリル及び水 (7 : 3) 混液10 mLで予備洗浄

| 先のオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムの下部に接続

| 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とする

LC-MS/MS定量

5 μ L注入

農産物：穀類及び豆類

畜水産物：はちみつ以外

秤 取

| 穀類及び豆類：試料10.0 gに水20 mLを加えて30分間放置

| 畜水産物：試料10.0 g

アセトン抽出

| アセトン100 mLを加えてホモジナイズ

| 吸引ろ過し、ろ紙上の残留物を採る

| 残留物にアセトン50 mLを加えてホモジナイズ

| 吸引ろ過し、ろ液を合わせアセトンで正確に200 mLとする

| 抽出液を正確に20 mL分取し、約3 mLまで減圧濃縮

n-ヘキサン転溶

| 10 w/v%塩化ナトリウム溶液100 mLを加えて混合

| *n*-ヘキサン100 mLを加えて5分間振とう

| *n*-ヘキサン層を採取

| 水層に*n*-ヘキサン50 mLを加えて5分間振とう

| *n*-ヘキサン層を合わせて脱水ろ過

| 2 vol%ジエチレングリコール・アセトン溶液0.2 mLを加えて混合

| ろ液を減圧濃縮、窒素乾固

アセトニトリル/*n*-ヘキサン分配

| *n*-ヘキサン30 mLを加えて溶解

| *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

| アセトニトリル層を採取

| *n*-ヘキサン層に*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

| アセトニトリル層を合わせて減圧濃縮、窒素乾固

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム

| アセトニトリル10 mLで予備洗浄

| アセトン及び水 (1 : 4) 混液10 mLで予備洗浄

| 試料残留物にアセトン4 mLを加えて溶解

- | 水16 mLを加えて混合し、負荷
- | アセトニトリル及び水 (1 : 4) 混液10 mLで洗浄

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

- | アセトニトリル及び水 (7 : 3) 混液10 mLで予備洗浄
- | 先のオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムの下部に接続
- | 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とする

LC-MS/MS定量

5 μ L注入

8. マトリックス添加標準溶液の調製

ブランク試験溶液から1 mL分取し、溶媒を除去した後、0.001 mg/Lの標準溶液1 mLに溶解したものをマトリックス添加標準溶液とした。

[検討結果及び考察]

1. 測定条件の検討

1) MS条件の検討

メタノール及び水 (1 : 1) 混液で0.1 mg/Lプロファム標準液を調製し、インフュージョンでESI法によるスキャン測定を行った結果、プロファムはESI(-)モードでは検出せず、ESI(+)モードで十分な感度が得られた。したがって、ESI(+)モードで測定することとした。

図1にESI(+)モードスキャン測定時のマススペクトルを示した。プロファム(モノアイソトピック質量179.0946)のプロトン付加分子(m/z 180 [M+H⁺])のイオン強度が最も高かったため、プリカーサーイオンに m/z 180を選択した。

図2にプロトン付加分子(m/z 180 [M+H⁺])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示した。この結果より、 m/z 180をプリカーサーイオンとした場合のプロダクトイオンのうち、イオン強度の最も高い m/z 138を定量用イオンに、次にイオン強度の高い m/z 120を定性用イオンに選択した。

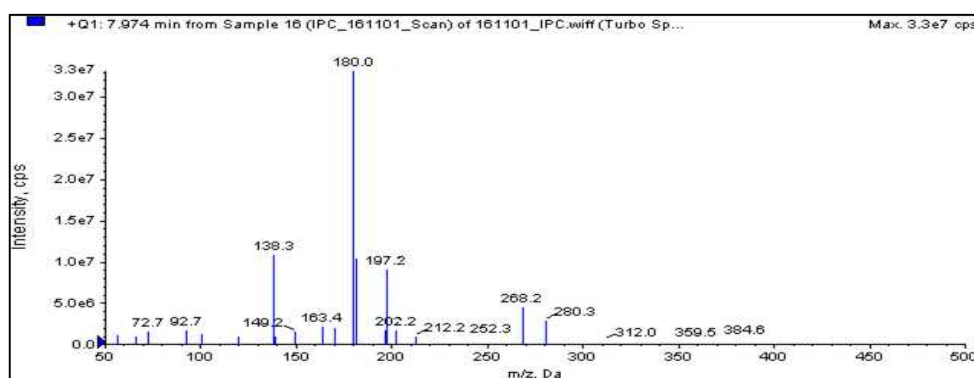


図1 プロファムのマススペクトル

スキャン範囲 : m/z 50~500

測定条件：ESI(+)、DP=46 (DP：Declustering Potential)

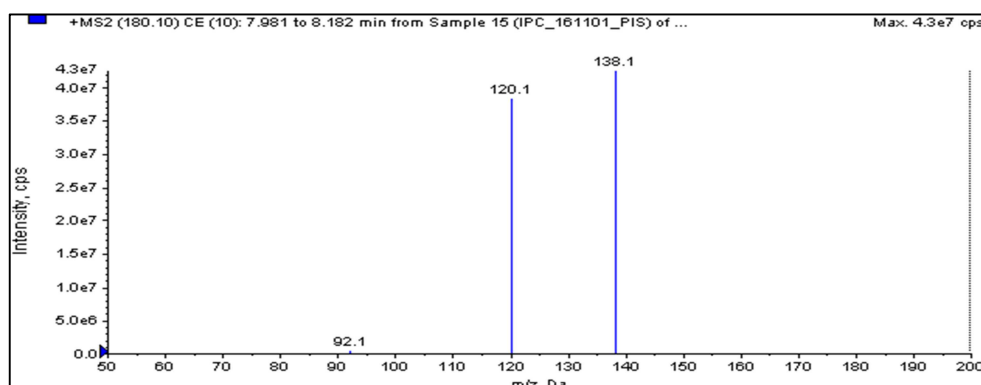


図2 プロファムのプロダクトイオンスペクトル

プリカーサーイオン： m/z 180

スキャン範囲： m/z 50～200

測定条件：ESI(+)、DP=46、CE=10～30eV

(DP：Declustering Potential、CE：Collision Energy)

2) LC条件の検討① (移動相に使用する有機溶媒)

移動相にメタノール及び水の混液を使用した条件とアセトニトリル及び水の混液を使用した条件とで0.005 mg/Lプロファム標準液を測定用カラムを用いて測定し、S/N比を算出した。

その結果、S/N比はメタノールの場合の場合が8574、アセトニトリルの場合が1496とメタノールを用いた場合の方が高かったため、移動相の有機溶媒にはメタノールを採用することとした。

3) LC条件の検討② (移動相に使用する添加剤)

移動相の添加剤に0.1 vol%ギ酸 (約17.5 mmol/L)、0.1 vol%酢酸 (約26.5 mmol/L)、10 mmol/Lギ酸アンモニウム溶液及び10 mmol/L酢酸アンモニウム溶液を使用した条件で0.005 mg/Lプロファム標準液を測定し、S/N比を算出した結果を表1に示した。

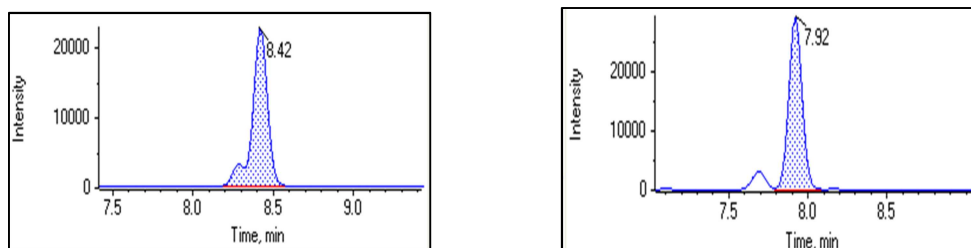
S/N比は10 mmol/Lギ酸アンモニウム溶液を用いた条件で測定した場合が最も高かった。

また、茶の試験溶液を測定した場合、添加剤にギ酸を用いるとプロファムのピークと近接して現れる夾雑ピークとの分離が悪かった(図3)。これらの理由で、本試験法開発ではギ酸アンモニウムを添加剤として用いることとした。

表1 移動相に用いる各添加剤におけるS/N比

	ギ酸	酢酸	ギ酸アンモニウム	酢酸アンモニウム
	0.1 vol%	0.1 vol%	10mmol/L	10mmol/L
SN比	3307	2346	<u>3367</u>	1067

測定溶液：0.005 mg/Lプロファム標準液 5 μL注入 (0.025 ng)



添加剤：ギ酸

添加剤：ギ酸アンモニウム

図3 茶の試験溶液測定クロマトグラム (m/z 180>138)

4) LC条件の検討③ (移動相に使用する添加剤濃度)

移動相に添加するギ酸アンモニウム濃度を0 mmol/L、2 mmol/L、5 mmol/L、10 mmol/L、20 mmol/L、40 mmol/Lと変えて0.005 mg/Lプロファム標準液を測定し、S/N比を算出した結果を表2-1に示した。

最もS/N比が高かった条件は、ギ酸アンモニウムを添加しない(0 mmol/L)場合であった。しかし、茶、牛の肝臓、しじみの抽出液にプロファムを0.005 mg/Lになるように添加した試験溶液の測定を行ったところ、添加しない場合は、107%~116%の正のマトリックス効果を示した。その結果を表2-2に示した。

これらの結果から、S/N比が高く、試料マトリックスによる定量値への影響がより少ない条件であった、2 mmol/Lをギ酸アンモニウム添加濃度とした。

表2-1 各ギ酸アンモニウム濃度におけるS/N比

S/N比	ギ酸アンモニウム濃度					
	0 mmol/L	2 mmol/L	5 mmol/L	10 mmol/L	20 mmol/L	40 mmol/L
	7185	<u>6108</u>	3121	2145	1969	1627

測定溶液：0.005 mg/Lプロファム標準液 5 μL注入 (0.025 ng)

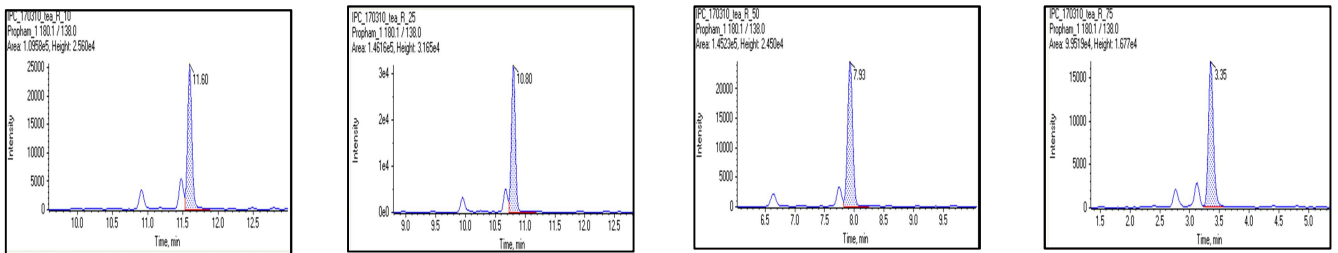
表2-2 添加剤の有無によるマトリックス効果の状況 (回収率 (%))

ギ酸アンモニウム濃度	茶	しじみ	牛の肝臓
0 mmol/L	107	117	111
2 mmol/L	<u>95</u>	<u>99</u>	<u>97</u>

測定溶液：各ブランクマトリックスで調製した0.005 mg/Lプロファム標準液 5 μL注入 (0.025 ng)

5) LC条件の検討④ (移動相初期条件)

茶の試験溶液を測定したときの夾雑ピークとプロファムのピークとの分離に最適な移動相の初期比率を検討した。まず、2 mmol/Lギ酸アンモニウム溶液及びメタノール (1 : 1) 混液を用いてアイソクラティック分析を行ったところ、茶の夾雑ピークとプロファムのピークが重なってしまったため、グラジエント分析を行うこととした。2 mmol/Lギ酸アンモニウム溶液及びメタノールの混液のグラジエント初期比率を、それぞれ (9 : 1)、(3 : 1)、(1 : 1)、(1 : 3) とし、10分間で (1 : 9) まで有機溶媒比率を上げて測定を行った。試験溶液は、茶の抽出液に0.005 mg/Lになるように添加したものをを用いた。そのときのクロマトグラムを図4に示した。移動相初期条件の有機溶媒比率が高いほど、茶の夾雑ピークとプロファムのピークとの分離は良い傾向にあると思われた。また、このときの回収率を比較した結果を表3に示した。2 mmol/Lギ酸アンモニウム溶液及びメタノール (1 : 3) 混液を初期条件とした場合に、回収率の低下が見られたため、移動相は、2 mmol/Lギ酸アンモニウム溶液及びメタノール (1 : 1) 混液を、10分間で (1 : 9) とする条件を採用することとした。



(A : B) = (9 : 1)

(A : B) = (3 : 1)

(A : B) = (1 : 1)

(A : B) = (1 : 3)

A : 2 mmol/Lギ酸アンモニウム溶液、B : メタノール

図4 茶の試験溶液測定クロマトグラム (m/z 180>138) のグラジエント溶媒初期比率による違い

表3 移動相初期条件の違いによるマトリックス効果の状況

2 mmol/Lギ酸アンモニウム溶液 : メタノール		
初期比率	(1 : 1)	(1 : 3)
回収率 (%)	<u>93</u>	52

移動相 : 2 mmol/Lギ酸アンモニウム溶液及びメタノールの混液

測定溶液 : 茶のブランクマトリックスで調製した0.005 mg/Lプロファム標準液 5 μ L注入 (0.025 ng)

6) 検量線の直線性について

検量線を図5に示した。

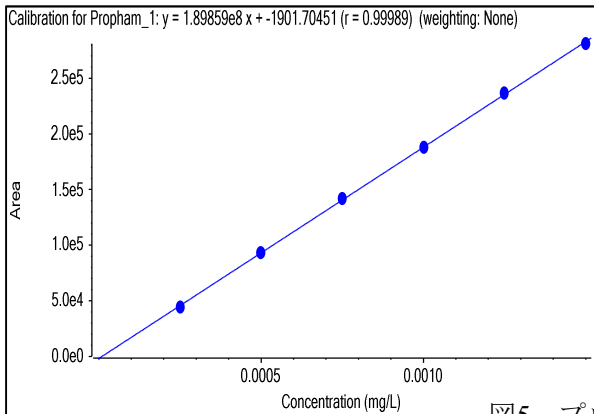


図5 プロファムの検量線 (一例)

データ処理装置設定条件の一例

データ処理ソフトウェア：MultiQuant2.1.1 (Sciex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：0.00125ng~0.0075ng

検量線の傾き (a) : $a = 1.89859 \times 10^8$

検量線の切片 (b) : $b = -1901.70451$

相関係数 (r) : $r = 0.99989$

7) 定量限界について

定量限界の算出結果について以下に示した。

$$0.01 \text{ mg/kg} \left[\frac{\text{試験溶液量 (10 mL)}}{\text{試験溶液中の試料量 (1 g}^*)} \right] \times \frac{\text{分析対象化合物の定量限界相当量 (0.005 ng)}}{\text{注入量 (5 } \mu\text{L)}}]$$

*1 野菜類及び果実類：20.0 g × 10 mL/200 mL

茶：5.00 g × 40 mL/200 mL

その他の食品：10.0 g × 20 mL/200 mL

2. 試験溶液調製法の検討

1) 抽出方法の検討

プロファムの溶解性や脂肪等との混和性を考慮し、抽出溶媒にアセトンを選択した。高速ホモジナイザーを用いて1分間細砕し、ろ紙上にケイソウ土を1 cmの厚さに敷いたものを用いて吸引ろ過した。

2) 溶媒転溶の検討

牛乳や大豆のアセトン抽出液など、吸引ろ過後に不溶分が析出する場合があります。液々抽出時のエマルジョンや固相抽出時の固相の詰まりの原因となる。このような夾雑物を除く目的で溶媒転溶の検討を行った。

アセトン3 mL、10 w/v%塩化ナトリウム溶液100 mL及びプロファムを混合し、酢酸エチルまたはn-ヘキサンで転溶した。その結果を表4に示した。酢酸エチルとn-ヘキサンともに2回で良好な回収率が得られた。茶や大豆を用いて実施した場合に、n-ヘキサンは酢酸エチルに比べて、色素や不溶物の精製効果が高かったため、転溶の溶媒にはn-ヘキサンを用い、その回数は2回とした。

表4 溶媒転溶の状況 (回収率 (%))

	1回目	2回目	3回目	合計
	100 mL	50 mL	50 mL	
酢酸エチル	92	5	1	98
<i>n</i> -ヘキサン	<u>94</u>	<u>2</u>	<u>0</u>	<u>96</u>

供試量：プロファム0.5 µg

3) アセトニトリル/ヘキサン分配方法の検討

穀類、豆類及び畜水産物（はちみつを除く）の脱脂方法として、アセトニトリル/ヘキサン分配方法を検討した。*n*-ヘキサン30 mLにプロファムを添加し、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル30 mLずつで抽出した結果を表5に示した。*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル30 mLの2回で良好な回収率が得られたため、アセトニトリル/ヘキサン分配は2回行うこととした。

表5 アセトニトリル/ヘキサン分配の状況

	1回目	2回目	3回目	合計
	30 mL	30 mL	30 mL	
回収率 (%)	91	6	0	97

供試量：プロファム30 µg

4) 減圧濃縮の検討①

プロファムの減圧濃縮時の損失について検討した。

プロファム0.1 µgを各溶媒に溶解した後、ロータリーエバポレーターを用いて減圧濃縮した。その結果を表6-1～6-3に示した。どの溶媒を用いた場合も、溶媒が残っていれば減圧濃縮による損失は認められなかった。さらに、キーパーとしてジエチレングリコール・アセトン溶液を加えることで、乾固後に減圧し続けた場合でも損失は認められなかった。したがって、前処理工程の流れも考慮し、アセトン抽出液を濃縮する際は乾固させないこととし、*n*-ヘキサン転溶後やアセトニトリル/ヘキサン分配後の濃縮乾固の際はジエチレングリコール・アセトン溶液を加えることとした。

表6-1 アセトン濃縮条件の比較

減圧の終点	乾固から5分後まで	乾固から5分後まで	1 mLまで
キーパー添加量	0 mL	0.2 mL	0 mL
回収率 (%)	87	104	<u>102</u>

減圧度：280 mbar、バス温度：40℃、冷却水温度：0～5℃

供試量：プロファム0.1 µg

表6-2 *n*-ヘキサン濃縮条件の比較

減圧の終点	乾固から5分後まで	乾固から5分後まで	1 mLまで
キーパー添加量	0 mL	0.2 mL	0 mL
回収率 (%)	70	<u>100</u>	96

減圧度：240 mbar、バス温度：40℃、冷却水温度：0～5℃

供試量：プロファム0.1 μg

表6-3 アセトニトリル濃縮条件の比較

減圧の終点	乾固から5分後まで	乾固から5分後まで	1 mLまで
キーパー添加量	0 mL	0.2 mL	0 mL
回収率 (%)	73	<u>93</u>	95

減圧度：150 mbar、バス温度：40℃、冷却水温度：0～5℃

供試量：プロファム0.1 μg

5) 減圧濃縮の検討②

プロファムの減圧濃縮時に添加するキーパー（2 vol%ジエチレングリコール・アセトン溶液）の添加量について検討した。

n-ヘキサンにプロファム0.05 μgを添加した後、キーパーを添加して濃縮し、乾固後5分間減圧を続けた。その結果を表7に示した。添加量0.1 mLでも十分効果が認められたが、多少多く添加しても後の操作に影響を及ぼさないことから、2 vol%ジエチレングリコール・アセトン溶液の添加量は0.2 mLとした。また、*n*-ヘキサン転溶後に加えたジエチレングリコールは、アセトニトリル/ヘキサン分配でアセトニトリル層にはほぼ全量分配されるので、2 vol%ジエチレングリコール・アセトン溶液を加えるタイミングは*n*-ヘキサン転溶後のみとした。

表7 キーパー添加量の検討

	キーパー添加量				
	0 mL	0.1 mL	0.2 mL	0.5 mL	1 mL
回収率 (%)	70	96	<u>100</u>	94	96

減圧度：280 mbar、バス温度：40℃、冷却水温度：0～5℃

供試量：プロファム0.05 μg

6) 減圧濃縮の検討③

ばれいしょ、りんご、牛の筋肉、はちみつの試料マトリックス存在下で、キーパー（2 vol%ジエチレングリコール・アセトン溶液）を添加しない場合のプロファム濃縮損失について検討した。

ブランク試料をアセトン抽出し、正確に200 mLとした。この抽出液から、試料1 gに相当する量を正確に量り採り、ロータリーエバポレーターで濃縮した。ヘキサン転溶した後、無水硫酸ナトリウムで

脱水した。無水硫酸ナトリウムをろ別した後、プロファム0.01 µg（試料中濃度として0.01 ppm）を添加した。この溶液をロータリーエバポレーターで濃縮し、窒素吹き付けにより乾固させた。牛の筋肉については、さらにアセトニトリル/ヘキサン分配を行い、得られたアセトニトリル層をロータリーエバポレーターで濃縮し、窒素吹き付けにより乾固させた。残留物にアセトニトリル及び水（7：3）混液を加えて正確に10 mLとした。この試験を3回併行試験で行い、平均回収率及び併行精度を求めた。

その結果を表8に示した。いずれの食品もキーパー未添加時の回収率及び併行精度は良好であった。したがって、試料マトリックス存在下では、キーパーを添加せずとも減圧濃縮時のプロファムの損失は少ないと思われる。

表8 試料マトリックス存在下、キーパー未添加時の濃縮損失（n = 3）

	ばれいしょ	りんご	牛の筋肉	はちみつ
平均回収率（%）	96	95	97	92
併行精度（RSD%）	0.4	1.3	0.7	0.8

減圧度：220～240 mbar、バス温度：40℃、冷却水温度：0～5℃

供試量：プロファム0.01 µg

7) 試料負荷液の検討

特に茶において、濃縮残留物が溶解しにくく、プロファムが濃縮残留物中に残り、回収率のばらつきがみられた。したがって、茶の濃縮残留物を十分溶解する溶媒検討を行った。アセトン及び水（1：4）混液で溶解する方法や、アセトニトリルまたはメタノールに溶解後、水を加える方法を検討したが、残留物が完全には溶解しなかった。アセトンに残留物を溶解し、水を加えた溶液をミニカラムに負荷することで回収率が安定したため、この方法を採用した。

8) オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムによる精製の検討①

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムにプロファムを保持させて洗浄、溶出させることで高極性の夾雑物や脂溶性の高い夾雑物及び色素等を除くことを目的として、精製法の検討を行った。

カラムをアセトニトリル10 mL、次いでアセトン及び水（1：4）混液10 mLで予備洗浄し、プロファム0.05 µgを添加したアセトン及び水（1：4）混液20 mLを負荷し、各溶媒比率のアセトニトリル及び水混液10 mLで溶出したときの結果を表9-1に示した。プロファムはアセトニトリル及び水（1：4）混液10 mLでは溶出せず、アセトニトリル及び水（7：3）混液10 mLでほぼ全て溶出した。したがって、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム精製の洗浄溶媒はアセトニトリル及び水（1：4）混液とし、溶出溶媒はアセトニトリル及び水（7：3）混液とした。

さらに、決定した洗浄溶媒及び溶出溶媒の5 mLごとの溶出状況を調べた。その結果を表9-2に示した。洗浄溶媒は通液量20 mLでもプロファムは溶出しなかった。溶出溶媒は通液量5 mLでほぼ全てプロファムは溶出した。これらの結果から、洗浄溶媒はアセトニトリル及び水（1：4）混液10 mLとし、溶出溶媒はアセトニトリル及び水（7：3）混液10 mLとした。

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムを用いた精製において、洗浄溶媒を通液することにより、

茶やほうれんそうの緑色色素の一部を溶出除去できることを確認した。また、ほうれんそう、キャベツ、りんご、オレンジ、茶、鶏卵、うなぎ及びしじみ由来の色素やアセトニトリル/ヘキサン分配で除去しきれなかった脂肪分はミニカラムから溶出することなく、精製除去できた。しかし、この精製を用いても茶、ほうれんそう及びしじみ等は溶出液が着色していたため、さらに精製を加える必要があると考えられた。

また、洗浄及び溶出溶媒のアセトニトリルに代えてメタノールを用いた場合も検討を行ったが、茶の試験溶液を測定したとき、アセトニトリルの場合と比較して夾雑ピークが強く現れたため、アセトニトリルを用いて洗浄及び溶出を行うこととした。

表9-1 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状況① (回収率 (%))

溶出液 (10 mL)	アセトニトリル/水混液の比率						合計
	(1 : 4)	(3 : 7)	(2 : 3)	(5 : 5)	(3 : 2)	(7 : 3)	
	0	1	76	90	94	98	96

カラム：ジーエルサイエンス製 InertSep C18(1,000 mg)、試料負荷液：アセトン及び水 (1 : 4) 混液
供試量：プロファム0.05 µg

表9-2 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状況② (回収率 (%))

アセトニトリル/水	負荷液 (20 mL)	0-5 mL	5-10 mL	10-15 mL	15-20 mL	合計
洗浄溶媒 (1 : 4)	0	0	0	0	0	0
溶出溶媒 (7 : 3)	0	96	1	0	0	97

カラム：ジーエルサイエンス製 InertSep C18(1,000 mg)、試料負荷液：アセトン及び水 (1 : 4) 混液
供試量：プロファム0.05 µg

9) オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムによる精製の検討②

本試験法開発では、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムにジーエルサイエンス製InertSep C18(1,000 mg) を使用している。他メーカーのオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムも使用することができるかを調べた。

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム(1,000 mg)を、アセトニトリル10 mL、次いでアセトン及び水 (1 : 4) 混液10 mLで予備洗浄し、プロファム0.05 µgを添加したアセトン及び水 (1 : 4) 混液20 mLを負荷し、アセトニトリル及び水 (1 : 4) 混液10 mLで洗浄後、アセトニトリル及び水 (7 : 3) 混液5 mLごとの溶出状況を調べた。その結果を表9に示した。今回調査した全ての製品について、溶出状況の差は認められなかったため、本試験法にこれら製品を使用しても差し支えないと考えられる。

表10 オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム製品間の溶出状況（回収率（%））

	負荷液 (20 mL)	0-5 mL	5-10 mL	10-15 mL	15-20 mL	合計
InertSep C18 (ジーエルサイエンス製)	0	<u>96</u>	1	0	0	97
Sep-Pak Vac C18 (Waters製)	0	<u>100</u>	0	0	0	100
MEGA BondElut C18 (Agilent製)	0	<u>98</u>	0	0	0	98

試料負荷液：アセトン及び水（1：4）混液

供試量：プロファム0.05 µg

10) 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よる精製の検討

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム精製では除去しきれなかった脂肪酸等の酸性夾雑物や色素等を除去する目的で精製法の検討を行った。

まず、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム(1,000 mg)を、アセトニトリル10 mL、次いでアセトン及び水（1：4）混液10 mLで予備洗浄し、プロファム0.05 µgを添加したアセトン及び水（1：4）混液20 mLを負荷し、アセトニトリル及び水（1：4）混液10 mLで洗浄した。このミニカラムの下部に、あらかじめアセトニトリル及び水（7：3）混液10 mLで予備洗浄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(500 mg)を接続し、アセトニトリル及び水（7：3）混液5 mLを3回通液して、それぞれ溶出液を採った。この結果を表11に示した。オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムとエチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムを接続しても溶出状況に変わりがなかったため、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムから溶出したプロファムは、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保持されずに溶出すると考えられた。したがって、これらのカラムを接続した場合の溶出溶媒比及び溶出溶媒量は、6) で検討したオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム精製の条件を採用した。この精製を行うことによって、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムによる精製では除去できなかった、牛の脂肪、うなぎ及びしじみに含まれる色素を除去できることを確認した。なお、茶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よる精製を行っても溶出液に若干着色が見られたが、定量を著しく妨害するピークがないことや、添加回収試験の結果が良好なことから、これ以上の精製は行わないこととした。

表11 ミニカラムからの溶出状況（%）

	負荷液	洗浄溶媒	アセトニトリル及び水（7：3）混液			合計
	20 mL	10 mL	0-5 mL	5-10 mL	10-15 mL	
回収率（%）	0	0	95	0	0	95

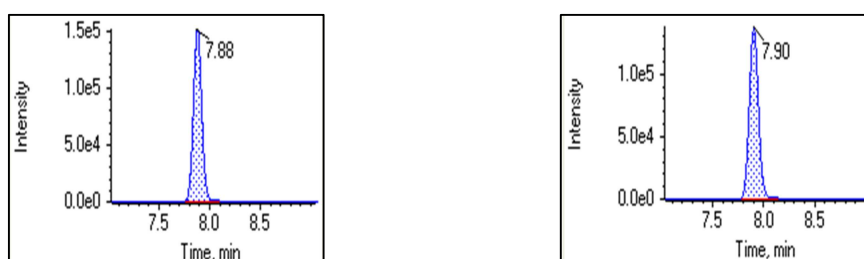
カラム：ジーエルサイエンス製 InertSep PSA(500 mg)、試料負荷液：アセトン及び水（1：4）混液
洗浄溶媒：アセトニトリル及び水（1：4）混液、供試量：プロファム0.05 µg

1 1) 注入溶媒の検討

測定に使用する移動相の初期条件は、2 mmol/Lギ酸アンモニウム溶液とメタノール (1 : 1) 混液である。通常、標準溶液や試験溶液は移動相と同一溶媒で調製するが、プロファムは減圧濃縮や窒素吹き付けにより損失する可能性があるため、ミニカラム精製後の溶液であるアセトニトリル及び水 (7 : 3) 混液を測定装置に注入して測定することは可能かを検討した。移動相ならびにアセトニトリル及び水 (7 : 3) 混液で調製した標準溶液5 μ LをLC-MS/MSに注入した結果を図6に示した。

ピーク半値幅 (0.09分) やリテンションタイム等は、移動相で調製した場合と変化はなかった。したがって、測定装置に注入する溶液は、アセトニトリル及び水 (7 : 3) 混液で調製することとした。

なお、注入量を5 μ Lから10 μ Lへ変更するとピーク形状の悪化やリテンションタイムのずれが生じた。



移動相調製

アセトニトリル及び水 (7 : 3) 混液調製

図6 標準溶液調製溶媒の比較

1 2) その他精製検討

茶の試験溶液は、プロファムのピークに近接する夾雑ピークがある。これを除くことを目的として合成ケイ酸マグネシウムミニカラムやグラファイトカーボンミニカラムを用いた精製を検討した。

まず、合成ケイ酸マグネシウムミニカラムを用いた精製では、茶抽出物をヘキサンで溶解し、これにプロファムを添加した溶液を負荷した後、エーテル・*n*-ヘキサン (1 : 9) ~ (9 : 1) 混液20 mLをミニカラムに注入し、溶出液を採り、溶媒を除去したものをアセトニトリル及び水 (7 : 3) 混液で溶解し測定した。その結果、茶に由来する夾雑ピークは除去されなかった。溶出溶媒のエーテル比率が (3 : 7) 以上の混液で回収率は79%~99%と良好な範囲であったが、目的とする精製効果が得られなかったことや、精製工程と溶媒除去工程の追加により、回収率の低下、ばらつきが見られたため合成ケイ酸マグネシウムミニカラムによる精製は採用しなかった。

また、グラファイトカーボンミニカラムによる精製では、グラファイトカーボンに吸着したプロファムを溶出するために、トルエンを溶出溶媒に用いる必要があった。LC-MS/MSに注入するためにはトルエンを濃縮、除去する必要があるが、トルエンは揮発しにくく、作業の煩雑さや溶媒除去工程の追加による回収率の低下、ばらつきの原因となると考えられたため、グラファイトカーボンミニカラムによる精製も採用しなかった。

3. 添加回収試験

農産物8種類（玄米、大豆、ほうれんそう、キャベツ、ばれいしょ、りんご、オレンジ、緑茶（煎茶））及び畜水産物8種類（牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳、鶏卵、はちみつ、うなぎ、しじみ）を用いて、添加濃度0.01 mg/kg、5併行の添加回収試験を行った。標準品の添加はすべてアセトンで調製した標準溶液（1 mg/L）をアセトンで希釈した溶液を添加した。

1) 選択性

選択性の検討結果を表12に示した。検討した16食品についてプロファムの定量を妨害するピークは認められず、良好な選択性が得られた。

表12 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⁾	
					評価濃度 (ppm)		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)		
					評価標準	面積		n=1	n=2	平均(a)	n=1	n=2	平均(b)			
1	プロファム	玄米	0.01	不検出	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	200180	202950	201565	0.000	○
		大豆	0.01	不検出	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	160410	164280	162345	0.000	○
		ほうれんそう	0.01	不検出	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	181720	181560	181640	0.000	○
		キャベツ	0.01	不検出	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	147210	150980	149095	0.000	○
		ばれいしょ	0.01	不検出	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	153650	154330	153990	0.000	○
		りんご	0.01	不検出	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	153700	155420	154560	0.000	○
		オレンジ	0.01	不検出	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	195700	189920	192810	0.000	○
		緑茶(煎茶)	0.01	不検出	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	190030	192040	191035	0.000	○
		牛の筋肉	0.01	不検出	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	194450	192530	193490	0.000	○
		牛の脂肪	0.01	不検出	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	159790	165320	162555	0.000	○
		牛の肝臓	0.01	不検出	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	193030	190510	191770	0.000	○
		牛乳	0.01	不検出	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	184330	183180	183755	0.000	○
		鶏卵	0.01	不検出	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	168320	169270	168795	0.000	○
		はちみつ	0.01	不検出	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	184240	181070	182655	0.000	○
		うなぎ	0.01	不検出	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	197690	194380	196035	0.000	○
		しじみ	0.01	不検出	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	189670	193750	191710	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13に示した。真度は82.7~95.7%、併行精度は1.2~5.2%であり、検討した16食品について目標値(真度70~120%、併行精度25%未満)を満足した。また、S/N比についても495以上あり、目標値(10以上)を満足した。

表13 真度、併行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%)	SN ²⁾		
							傾き	切片	r ² 値	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5			Max.	Min.	平均値
							1	プロファム	玄米	0.01	不検出	0.01	S/N	207229			561	0.9998	92.3
大豆	0.01	不検出	0.01	S/N	166280	-2487			0.9997	91.2	87.7	83.3	91.8	93.4	89.5	4.5	900	648	774
ほうれんそう	0.01	不検出	0.01	S/N	190323	-3541			0.9998	89.4	94.9	89.2	89.6	92.2	91.1	2.7	1701	1197	1449
キャベツ	0.01	不検出	0.01	S/N	156451	-221			0.9995	88.8	90.4	92.6	86.9	89.2	89.6	2.4	1094	1050	1072
ばれいしょ	0.01	不検出	0.01	S/N	160502	-11727			0.9996	84.4	89.9	90.0	91.6	89.3	89.0	3.0	793	574	683
りんご	0.01	不検出	0.01	S/N	162992	-1901			0.9997	91.8	95.3	95.8	98.3	96.0	95.5	2.5	1120	728	924
オレンジ	0.01	不検出	0.01	S/N	193570	2135			0.9988	90.1	92.5	90.5	95.4	94.2	92.5	2.5	1508	1730	1619
緑茶(煎茶)	0.01	不検出	0.01	S/N	200629	-886			0.9989	83.1	82.3	88.0	85.6	83.7	84.5	2.7	566	424	495
牛の筋肉	0.01	不検出	0.01	S/N	188037	1181			0.9992	87.2	96.0	87.0	96.4	93.5	92.0	5.0	1512	1513	1512
牛の脂肪	0.01	不検出	0.01	S/N	170963	-1816			0.9999	89.0	84.3	89.1	89.7	79.3	86.3	5.2	949	926	937
牛の肝臓	0.01	不検出	0.01	S/N	208602	-2983			0.9977	83.8	86.6	85.5	89.6	90.6	87.2	3.2	873	746	810
牛乳	0.01	不検出	0.01	S/N	188360	-1893			0.9999	96.7	96.8	96.2	95.1	94.0	95.7	1.2	1558	1704	1631
鶏卵	0.01	不検出	0.01	S/N	167821	-5031			0.9996	86.9	83.2	89.2	89.2	93.7	88.4	4.3	682	506	594
はちみつ	0.01	不検出	0.01	S/N	185638	-4868			0.9995	84.3	86.6	87.1	92.6	89.6	88.0	3.6	2004	1513	1759
うなぎ	0.01	不検出	0.01	S/N	188589	2292			0.9992	93.7	96.6	90.0	96.9	96.7	95.2	3.6	1240	1635	1437
しじみ	0.01	不検出	0.01	S/N	204243	-398			0.9995	79.8	80.4	80.7	86.6	85.9	82.7	4.0	514	540	527

*1 SN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SN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14に示した。添加回収試験における回収率100%相当濃度に調製したマトリックス添加標準溶液のピーク面積と、溶媒で回収率100%相当濃度に調製した溶媒添加標準溶液とのピーク面積の比を求めて評価した。面積比は0.94~1.04であり、試料マトリックスの測定への影響は小さいと考えられた。

表14 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								
							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	プロファム	玄米	0.01	不検出	0.01	0.001	面積	0	200180	202950	201565	209510	212680	211095	0.95
		大豆	0.01	不検出	0.01	0.001	面積	0	160410	164280	162345	161430	164510	162970	1.00
		ほうれんそう	0.01	不検出	0.01	0.001	面積	0	181720	181560	181640	186230	185550	185890	0.98
		キャベツ	0.01	不検出	0.01	0.001	面積	0	147210	150980	149095	159350	155360	157355	0.95
		ばれいしょ	0.01	不検出	0.01	0.001	面積	0	153650	154330	153990	150360	156740	153550	1.00
		りんご	0.01	不検出	0.01	0.001	面積	0	153700	155420	154560	163090	160530	161810	0.96
		オレンジ	0.01	不検出	0.01	0.001	面積	0	195700	189920	192810	198630	197390	198010	0.97
		緑茶(煎茶)	0.01	不検出	0.01	0.001	面積	0	190030	192040	191035	196820	200890	198855	0.96
		牛の筋肉	0.01	不検出	0.01	0.001	面積	0	194450	192530	193490	190110	188070	189090	1.02
		牛の脂肪	0.01	不検出	0.01	0.001	面積	0	159790	165320	162555	168320	169270	168795	0.96
		牛の肝臓	0.01	不検出	0.01	0.001	面積	0	193030	190510	191770	198790	206360	202575	0.95
		牛乳	0.01	不検出	0.01	0.001	面積	0	184330	183180	183755	185430	185700	185565	0.99
		鶏卵	0.01	不検出	0.01	0.001	面積	0	168320	169270	168795	159790	165320	162555	1.04
		はちみつ	0.01	不検出	0.01	0.001	面積	0	184240	181070	182655	180080	183030	181555	1.01
		うなぎ	0.01	不検出	0.01	0.001	面積	0	197690	194380	196035	192020	195320	193670	1.01
		しじみ	0.01	不検出	0.01	0.001	面積	0	189670	193750	191710	202500	205120	203810	0.94

*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。

[結論]

プロファムを試料からアセトンで抽出し、*n*-ヘキサンに転溶する。脂質等が多い試料についてはアセトントリル/ヘキサン分配により脱脂を行う。さらにオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム及びエチレンジアミン-*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提案する。

この試験法を農産物(玄米、大豆、ほうれんそう、キャベツ、ばれいしょ、りんご、オレンジ、緑茶(煎茶))及び畜水産物8種類(牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳、鶏卵、はちみつ、うなぎ、しじみ)に適用した場合、選択性はいずれの試料においても妨害ピークは認められず、添加濃度0.01 mg/kgにおける真度は82.7~95.7%、併行精度は1.2~5.2%であり、定量限界濃度0.01 mg/kgの定量が可能であると確認できた。

[参考文献]

なし

[添加回収試験における代表的なクロマトグラム]

プロファム (ESI (+)、m/z 180.0>138.1)

添加濃度0.01 mg/kg

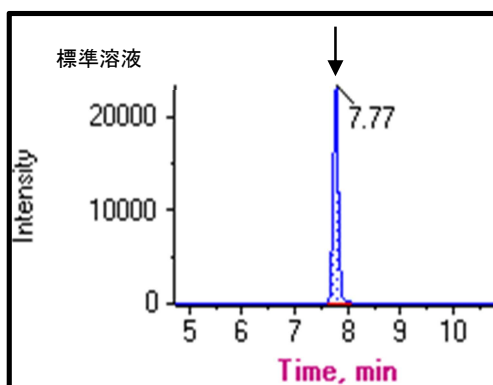
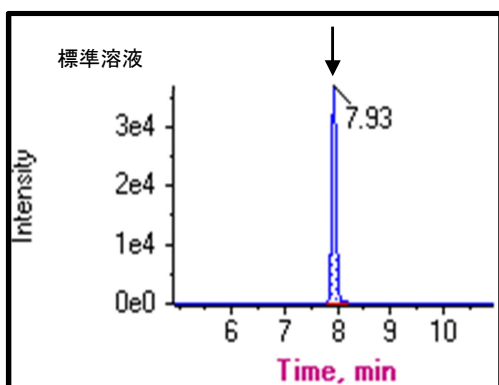
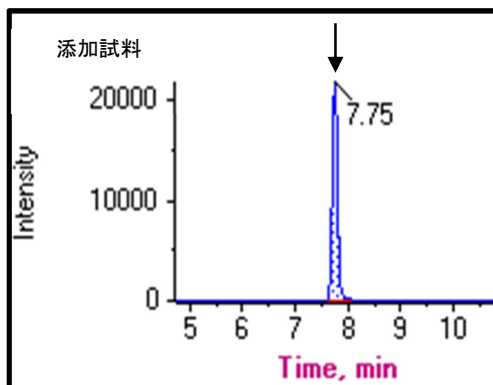
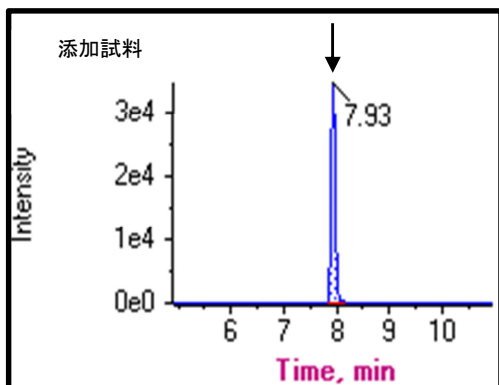
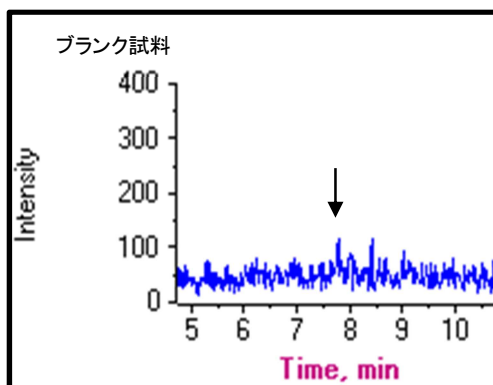
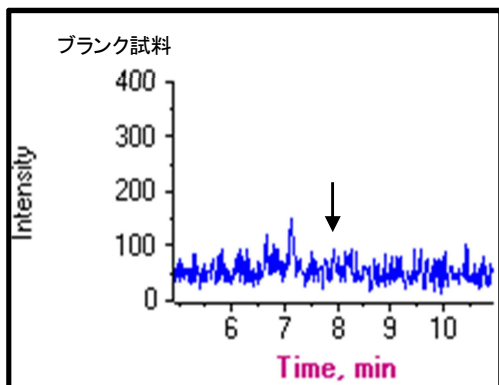


図7 玄米のSRMクロマトグラム

図8 大豆のSRMクロマトグラム

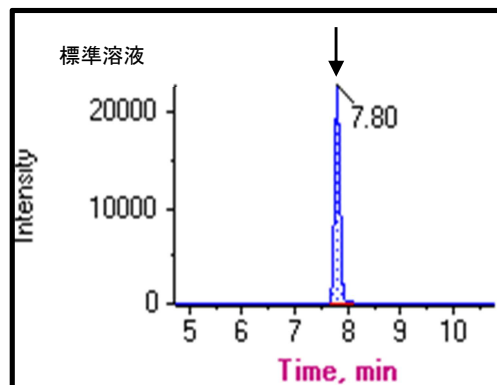
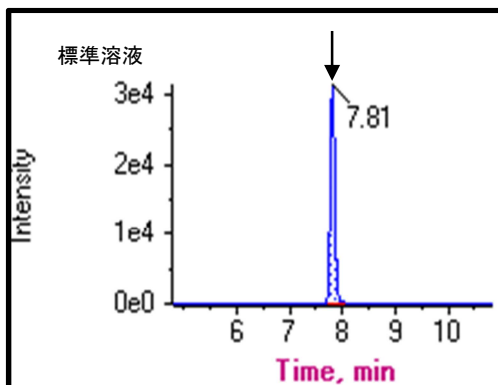
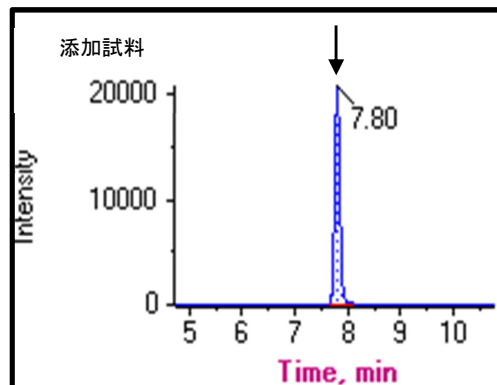
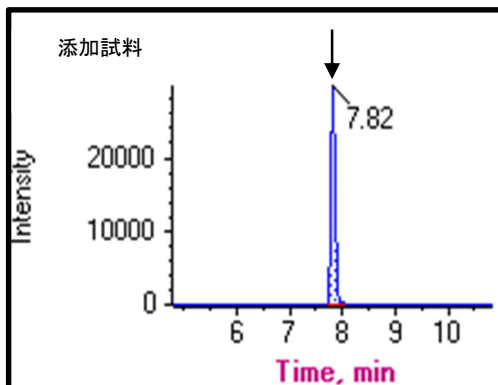
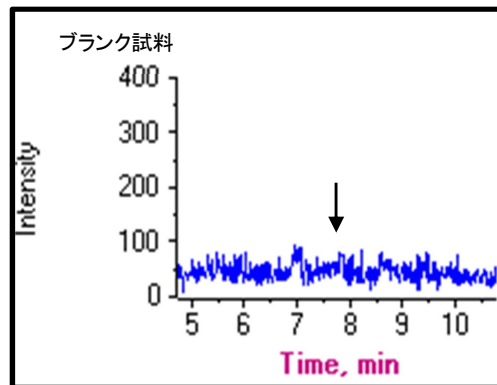
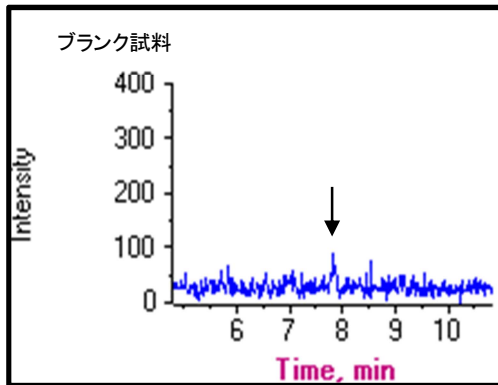


図9 ほうれんそうのSRMクロマトグラム

図10 キャベツのSRMクロマトグラム

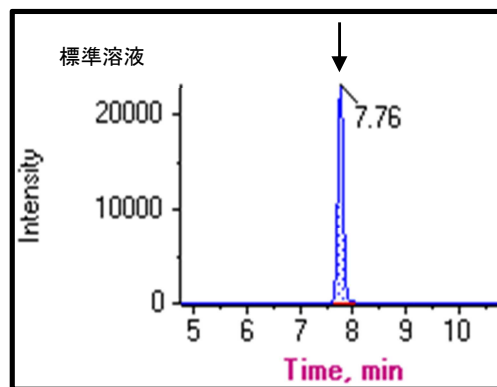
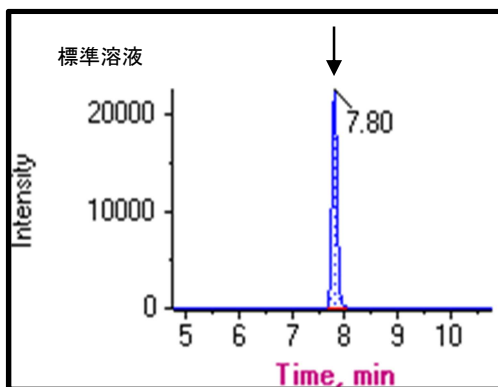
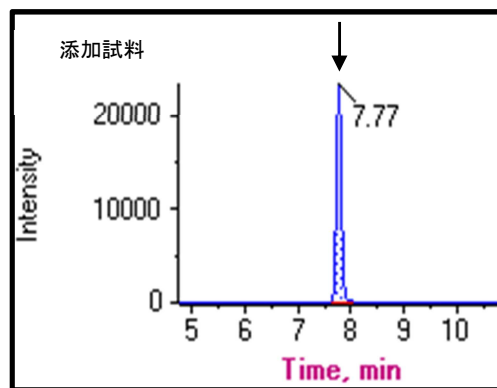
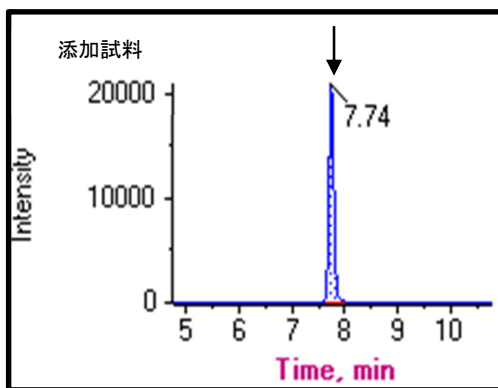
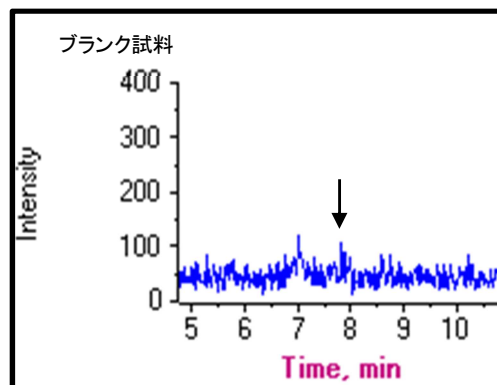
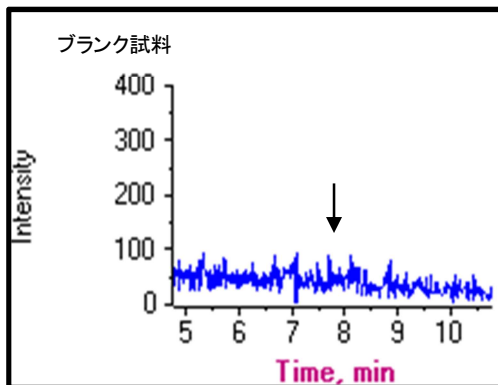


図11 ばれいしょのSRMクロマトグラム

図12 りんごのSRMクロマトグラム

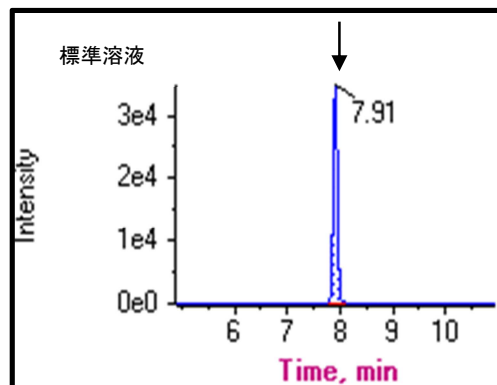
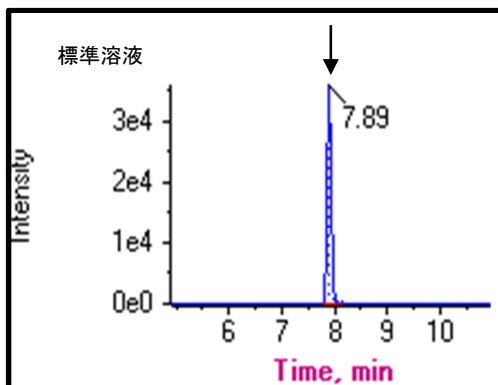
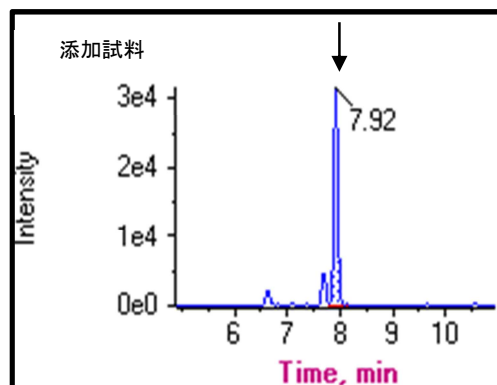
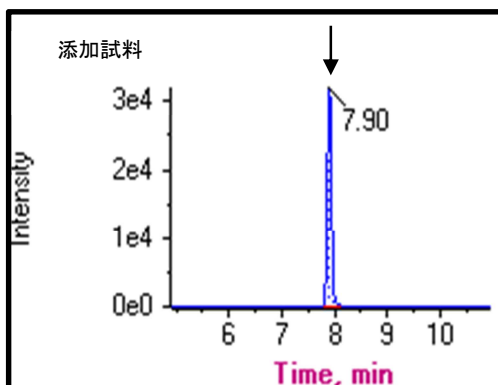
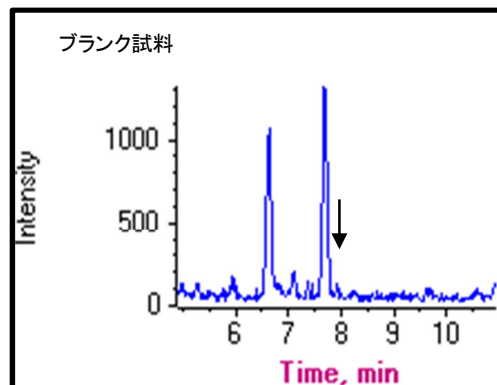
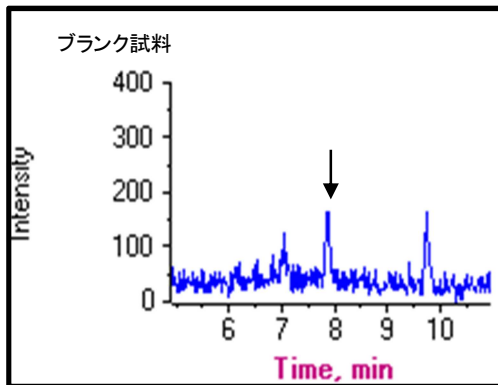


図13 オレンジのSRMクロマトグラム

図14 茶のSRMクロマトグラム

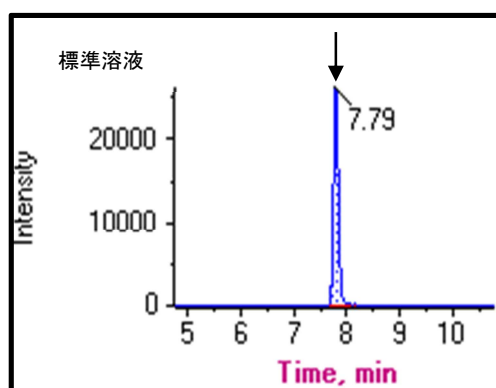
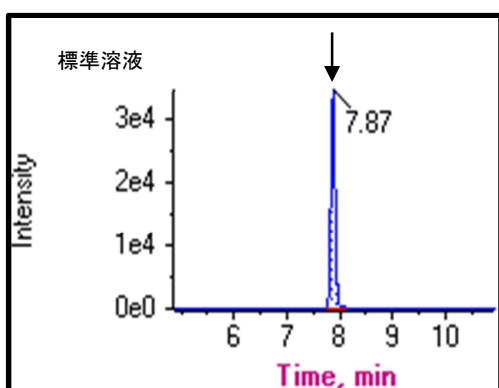
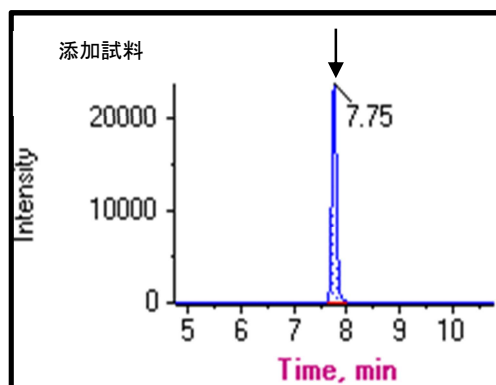
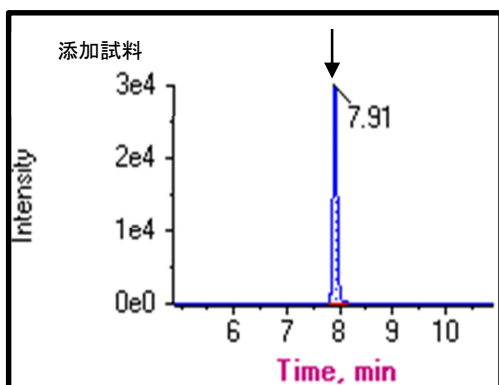
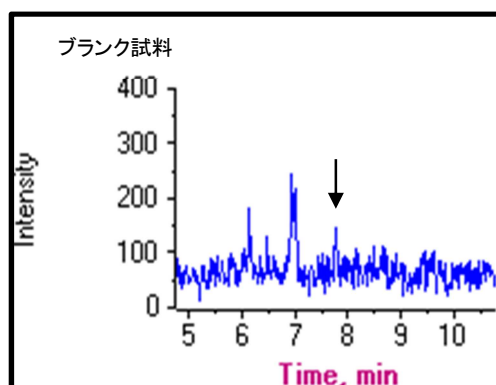
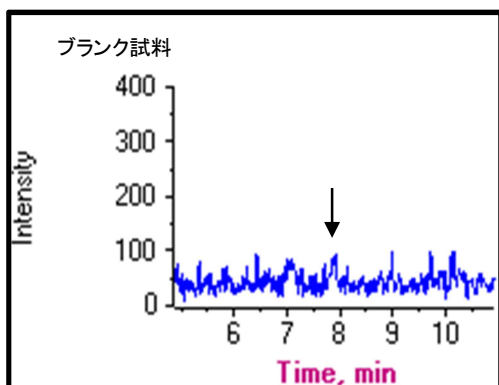


図15 牛の筋肉のSRMクロマトグラム

図16 牛の脂肪のSRMクロマトグラム

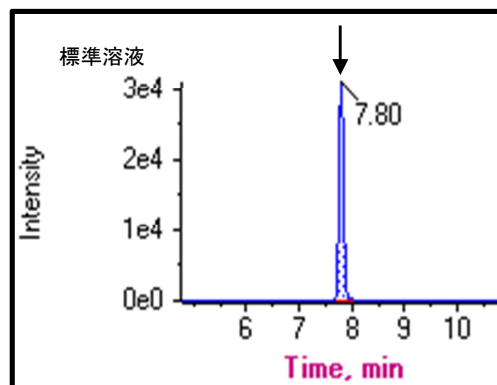
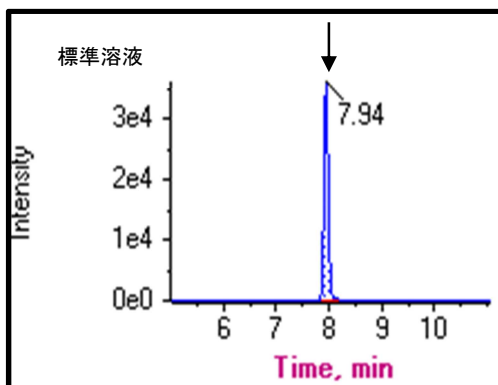
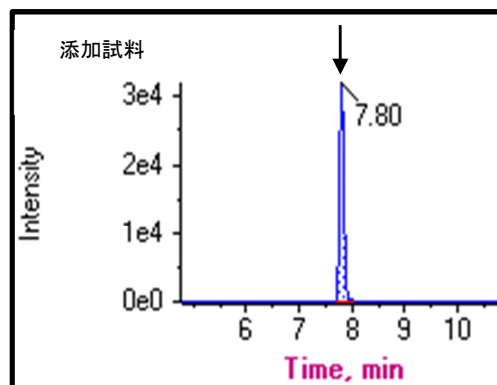
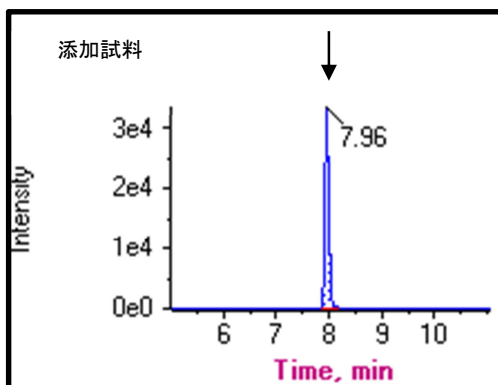
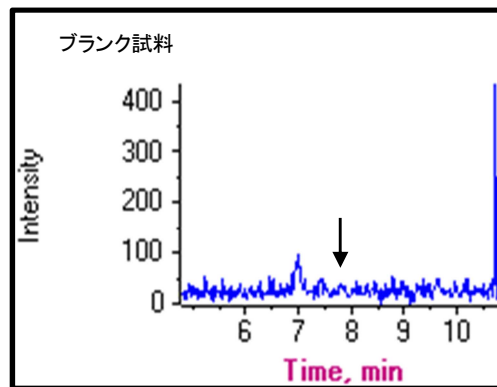
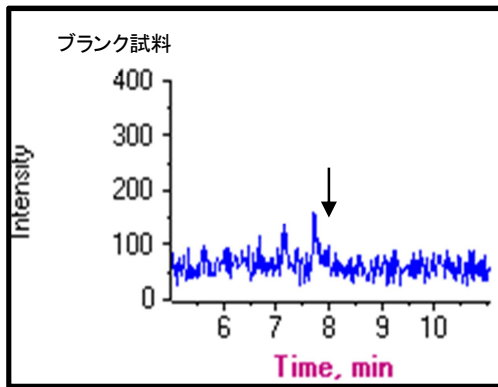


図17 牛の肝臓のSRMクロマトグラム

図18 牛乳のSRMクロマトグラム

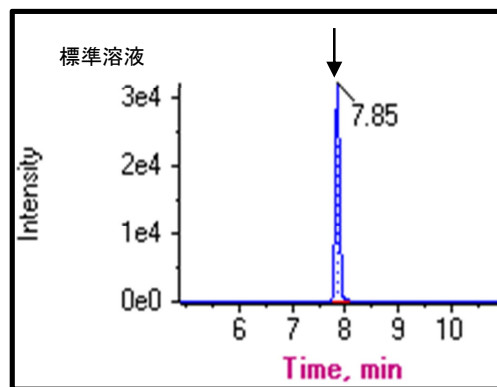
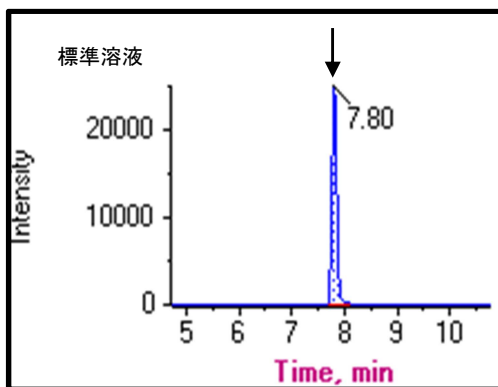
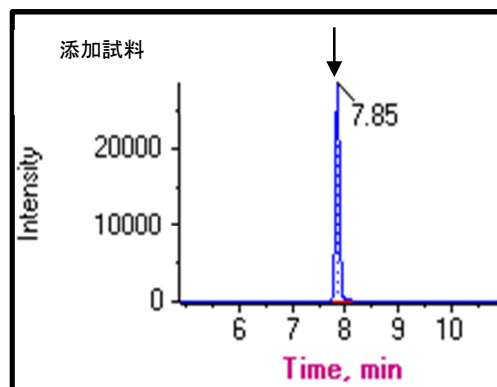
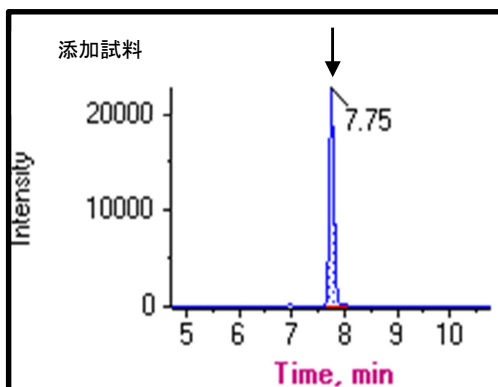
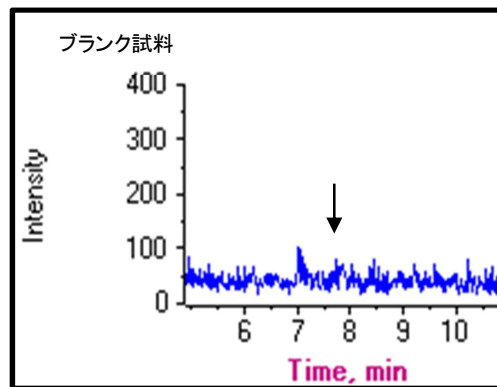
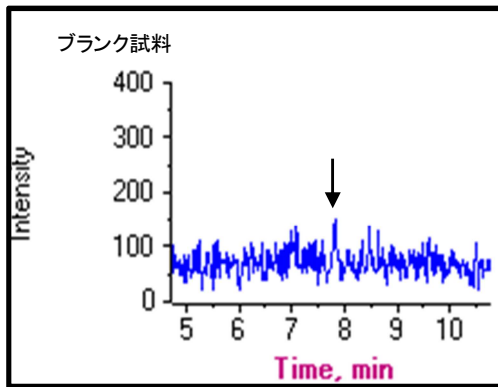


図19 鶏卵のSRMクロマトグラム

図20 はちみつのSRMクロマトグラム

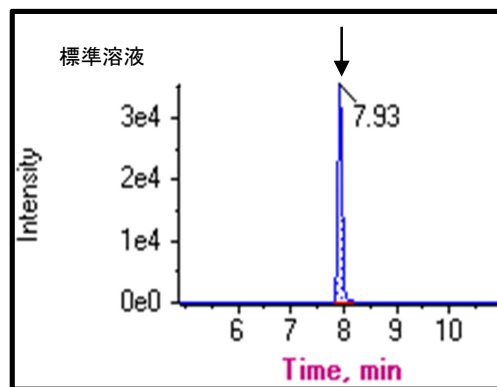
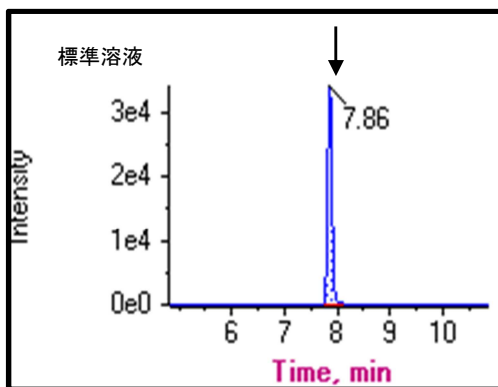
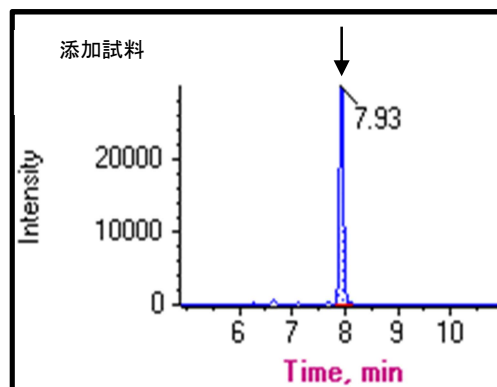
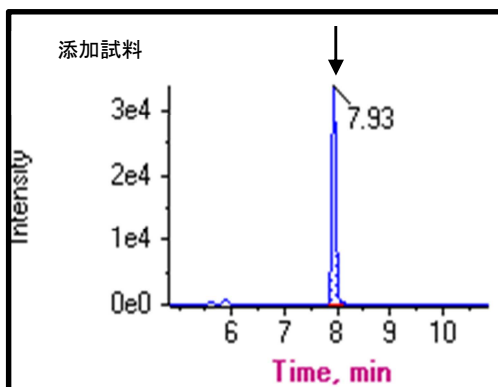
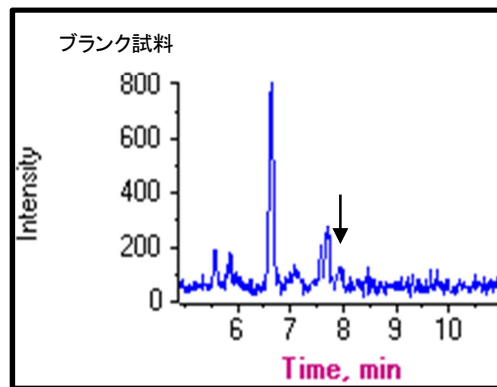
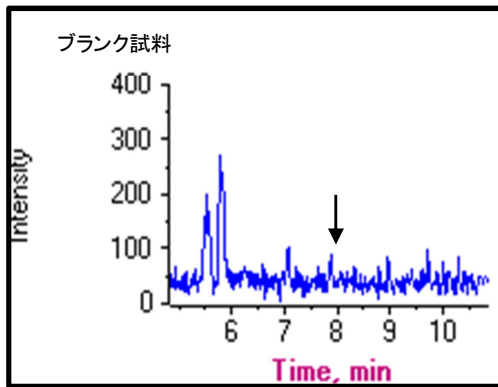


図21 うなぎのSRMクロマトグラム

図22 しじみのSRMクロマトグラム

[各食品の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(m/z) : 50~1000

ESI (+)、DP : 46

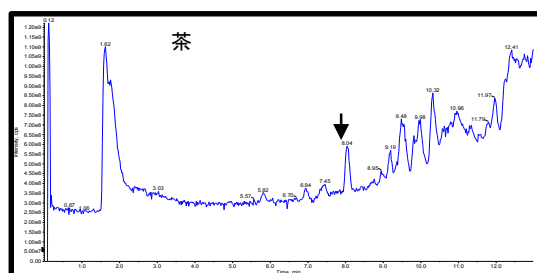
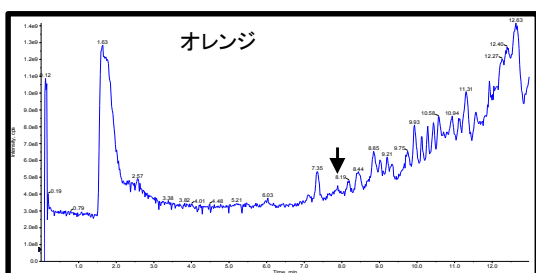
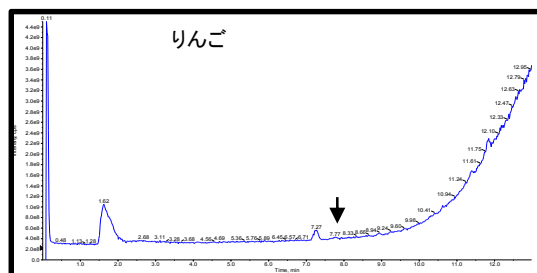
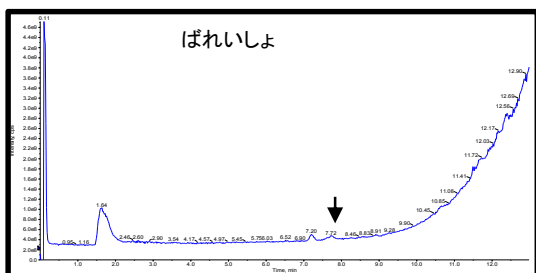
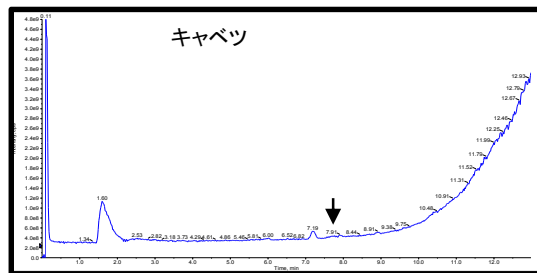
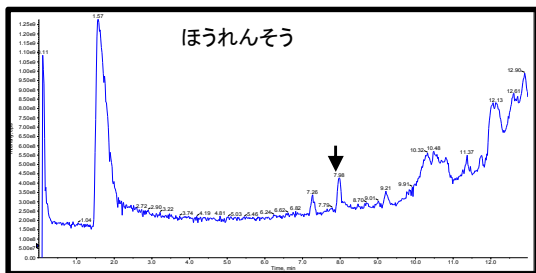
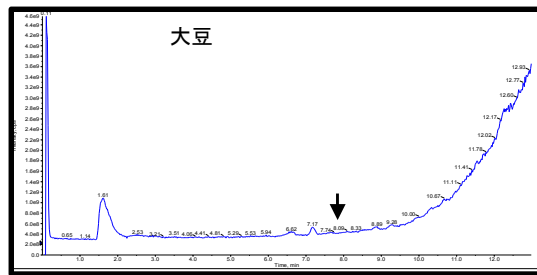
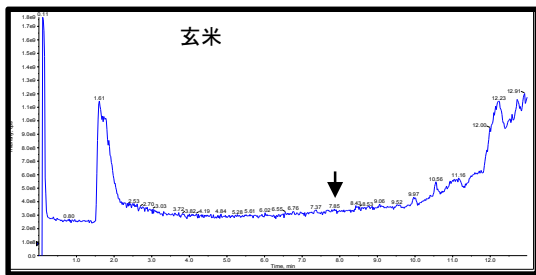


図23 各農産物のトータルイオンクロマトグラム

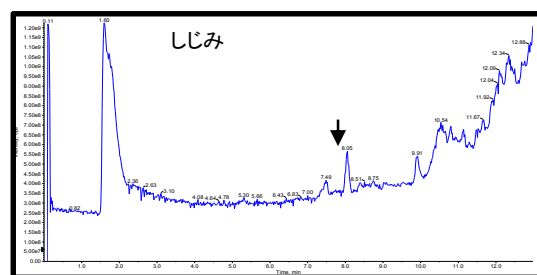
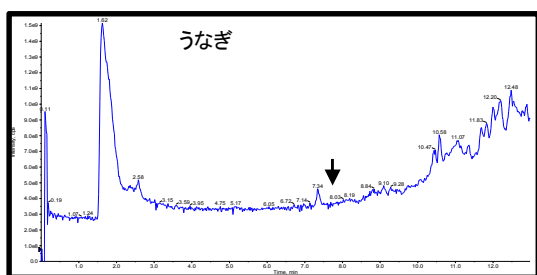
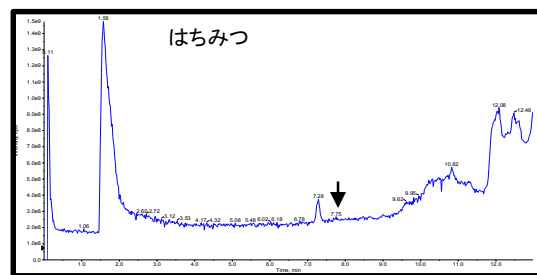
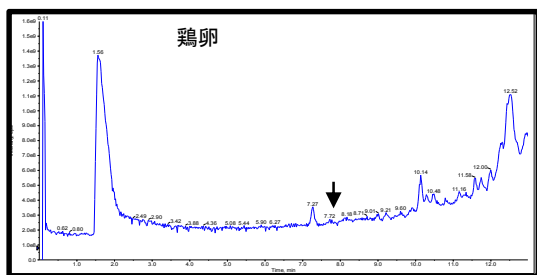
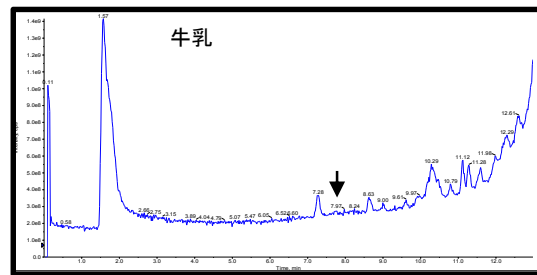
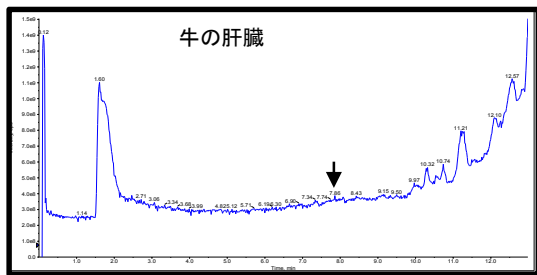
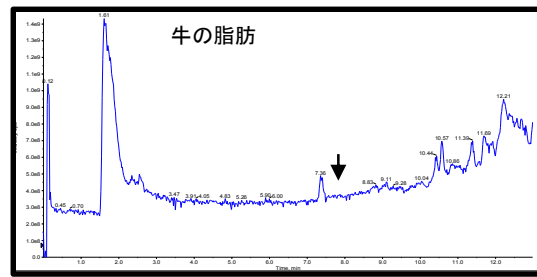
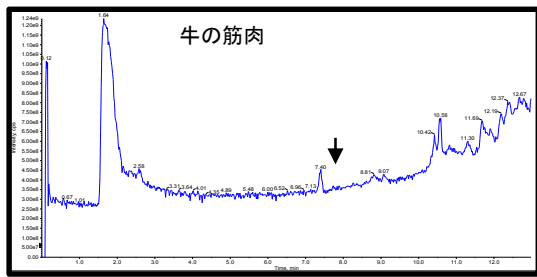


図24 各畜水産物のトータルイオンクロマトグラム