

※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下さい。

平成23年度

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・検討結果報告書

農薬名 プロパモカルブ（畜水産物）

プロパモカルブ試験法（畜水産物）の検討結果

[緒言]

プロパモカルブ及びプロパモカルブ塩酸塩は図 1 に示すプロピルカルバマート骨格を有する殺菌剤である。日本では、プロパモカルブ塩酸塩が 1989 年にバイエルクロップサイエンス（株）より農薬登録がなされている。基準はプロパモカルブとして設定されているが、農薬は塩酸塩が使用されている。プロパモカルブの農薬評価書¹⁾においても各種試験はプロパモカルブ塩酸塩を用いて実施されている。農薬評価書ではプロパモカルブの一日摂取許容量を 0.29 mg/kg 体重/日（プロパモカルブ塩酸塩として）と設定している。

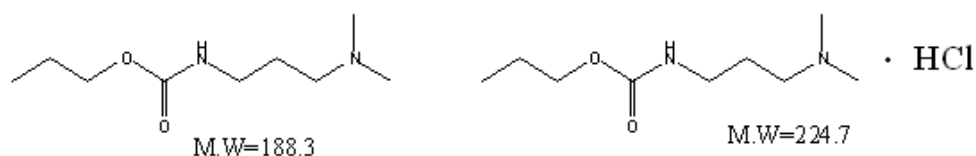


図 1 プロパモカルブ及びプロパモカルブ塩酸塩の構造

物理化学的性状（Pesticide Manual. 14th Ed. British Crop Production Council による）

プロパモカルブ：分子式； $C_9H_{20}N_2O_2$ 、分子量；188.3、V.P.；730mPa（25℃）、logP=0.84（20℃）、pKa；9.5（強塩基）、溶解度（g/L、20℃）；水>900（pH7.0）、ヘキサン>883、メタノール>933、ジクロロメタン>937、トルエン>852、アセトン>921、酢酸エチル>856

プロパモカルブ塩酸塩：分子式； $C_9H_{21}ClN_2O_2$ 、分子量；224.7、融点；64.2℃、V.P.； 3.8×10^{-2} mPa（25℃）、logP=-1.21（pH7）、pKa；9.3（20℃）、溶解度（g/L、20℃）；水>500、メタノール>656、ジクロロメタン>626、トルエン 0.14、アセトン 560、酢酸エチル 4.34、ヘキサン<0.01、安定性；加水分解、温度 400℃以上、光に安定。

プロパモカルブの残留基準はそれまで農産物のみ基準値が設定されていたが、平成 22 年 11 月 9 日「食品、添加物等の規格基準の一部改正する件（平成 22 年厚生労働省告示第 381 号）により、畜産物にも残留基準が設定された。畜産物の残留基準値は、牛、豚やその他の陸棲哺乳類に属する動物の筋肉、脂肪、肝臓、腎臓及び食用部分、鶏やその他の家きんの筋肉、脂肪及び卵と乳に 0.01 ppm が設定されている。その他の水産物等に対しては一律基準値が適用されることから、定量限界 0.01 ppm を満足する検査法が必要である。

プロパモカルブの試験法に関しては、厚生労働省通知「食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法」の個別分析法において穀類、果実及び野菜を対象として通知されている。また、農産物中のプロパモカルブの検査法²⁾やプロパモカ

ルブを含めた多成分一斉分析法³⁻⁵⁾の報告はある。しかし、畜水産物を対象とした試験法に関する報告はない。そこで、今回、畜水産物を対象とした定量限界 0.01 ppm を満足するプロパモカルブの試験法を検討した。

[実験方法]

1. 試料

添加回収実験用の牛筋肉、牛脂肪、牛肝臓、鶏筋肉、さけ、うなぎ、しじみ、牛乳、鶏卵及びはちみつ（そば蜜）計 10 種類の畜水産物を用い、それらは埼玉県内の生産者もしくは小売店から入手した。

- 1) 牛筋肉：可能なかぎり脂肪層を除き、細切均一化した。
- 2) 牛脂肪：可能な限り筋肉層を除き、細切均一化した。
- 3) 牛肝臓：全体を細切均一化した。
- 4) 鶏筋肉：可能なかぎり脂肪層を除き、細切均一化した。
- 5) さけ：可食部（皮を含む）を細切均一化した。
- 6) うなぎ：うなぎ蒲焼きをたれを除去せずに、細切均一化した。
- 7) しじみ：殻を除去し、細切均一化した。
- 8) 牛乳：全体を良く混合して均一化した。
- 9) 鶏卵：殻を除去し、卵白と卵黄を合わせてよく混合して均一化した。
- 10) はちみつ：そば蜜を使用し、よく混合して均一化した。

2. 試薬・試液

プロパモカルブ標準品（純度 99.0%）は和光純薬工業（株）、プロパモカルブ塩酸塩標準品（純度 99.0%）は Dr. Ehrenstorfer 製の残留農薬分析用標準品を用いた。アセトン、酢酸エチル及び *n*-ヘキサンは残留農薬分析用、メタノールは HPLC 用、その他の試薬は特級試薬を用いた。ケイソウ土は和光純薬工業（株）社製ハイフロスーパーセルを用いた。

3. 装置

装置	型式	会社
MS 装置	Micromass Quattro Micro	Waters
LC 装置	Alliance 2695	Waters

4. LC-MS(MS)測定条件

LC 条件																					
カラム	XBridge C18 サイズ：内径 2.1 mm、長さ× 150 nm、粒子径 3 μm 会社：Waters 社																				
移動相流速 (mL/min)	0.20																				
注入量 (μL)	5																				
カラム温度 (°C)	40																				
移動相	A 液：水 B 液：メタノール C 液：0.2mol/L 酢酸アンモニウム溶液																				
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> <th>C 液(%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.0</td> <td>85</td> <td>10</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>2.0</td> <td>0</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>6.0</td> <td>0</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>6.5</td> <td>85</td> <td>10</td> <td>5</td> </tr> </tbody> </table>	時間(分)	A 液(%)	B 液(%)	C 液(%)	0.0	85	10	5	2.0	0	95	5	6.0	0	95	5	6.5	85	10	5
時間(分)	A 液(%)	B 液(%)	C 液(%)																		
0.0	85	10	5																		
2.0	0	95	5																		
6.0	0	95	5																		
6.5	85	10	5																		
MS 条件																					
測定モード	SIM(選択イオンモニタリング)、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)	120																				
脱溶媒温度 (°C)	350																				
コーンガス	窒素、50 L/hr																				
脱溶媒ガス	窒素、650 L/hr																				
コリジョンガス	アルゴン (MS/MS の場合)																				
定量イオン (m/z)	MS : +102.0 [コーン電圧 45V] MS/MS : +189.3→102.0 [コーン電圧 25V、コリジョンエネルギー 15eV]																				
定性イオン (m/z)	MS : +189.3 [コーン電圧 25V]、+144.2 [コーン電圧 35V] MS/MS : +189.3→144.2 [コーン電圧 25V、コリジョンエネルギー 15eV]																				

保持時間 (min)	6.2~6.5
------------	---------

5. 定量

標準溶液の調製：プロパモカルブ標準品を 50 mg を精密に量り、アセトンを加えて 50 mL としたものを標準原液 (1 mg/mL) とした。これをアセトンで 100 倍に希釈したものを標準溶液とした。標準溶液を水-メタノール (9 : 1) 混液に溶解し、0.001~0.02 mg/L の濃度範囲で 5 点の標準溶液を調製した。それぞれ 5 μ L を LC-MS 又は LC-MS/MS に注入し、SIM 又は SRM で測定し、ピーク面積値を用いて検量線を作成した。定量は絶対検量線法を用いて行った。

6. 試験溶液調製法

1) 筋肉、脂肪、肝臓、腎臓、魚介類、乳及び鶏卵の場合

試料 10.0 g (脂肪の場合は 5.00 g) を量り採り、アセトン 50 mL を加えてホモジナイズ後、ケイソウ土を敷いたろ紙を用いて吸引ろ過した。残留物にアセトン 50 mL を加えて上記と同様に操作し、得られたろ液を合わせ、1 mol/L 塩酸 5 mL、飽和塩化ナトリウム溶液 50 mL 及び *n*-ヘキサン 50 mL を加えて振とうした。静置後、有機層 (上層) を捨て、水層 (下層) に *n*-ヘキサン 50 mL を加え上記と同様の操作を行った。水層に 10w/v% 水酸化ナトリウム溶液 5 mL 及び酢酸エチル 50 mL を加え、振とう静置し、酢酸エチル層を得た。水層に酢酸エチル 50 mL を加え上記と同様の操作を繰り返し、酢酸エチル層を得た。得られた酢酸エチル層を合わせ、適量の無水硫酸ナトリウムを加えて放置後、ろ過し、これを減圧濃縮乾固した。残留物に水及びメタノール (9 : 1) 混液を加えて正確に 10 mL (脂肪の場合は 5 mL) として、これを試験溶液とした。

2) はちみつの場合

試料 10.0 g を量り採り、飽和塩化ナトリウム溶液 50 mL を加えて溶解した。これにアセトン 50 mL を加えてホモジナイズ後、吸引ろ過し、残留物にアセトン 50 mL を加えて上記と同様に操作した。得られた液を合わせ、1 mol/L 塩酸 5 mL 及び *n*-ヘキサン 50 mL を加えて振とう静置後、有機層 (上層) を捨て、水層 (下層) に *n*-ヘキサン 50 mL を加え上記と同様の操作を行った。水層に 10% 水酸化ナトリウム溶液 5 mL 及び酢酸エチル 50 mL を加え、振とう静置後、酢酸エチル層を得た。水層に酢酸エチル 50 mL を加え上記と同様の操作を繰り返し、酢酸エチル層を得た。得られた酢酸エチル層を合わせ、これに適量の無水硫酸ナトリウムを加えて放置後、ろ過し、これを減圧濃縮乾固した。残留物に水及びメタノール (9 : 1) 混液を加えて正確に 10 mL として、これを試験溶液とした。

なお、添加回収試験においてプロパモカルブ標準品の 0.1 mg/L (アセトン溶液) 1 mL (脂肪の場合は 0.5 mL) を添加し、30 分間放置した後に抽出操作を行った。

[分析法のフローチャート]

(1) 筋肉、肝臓、魚介類、乳及び鶏卵、脂肪の場合

秤取

- ↓ 筋肉、肝臓、魚介類、乳及び鶏卵：試料 10.0g
- ↓ 脂肪：試料 5.0g

アセトン抽出

- ↓ アセトン 50mL を加えホモジナイズ
- ↓ 吸引ろ過
- ↓ 残留物はアセトン 50mL を加えホモジナイズ
- ↓ 吸引ろ過
- ↓ ろ液を合わせる
- ↓ 1mol/L 塩酸 5mL
- ↓ 飽和塩化ナトリウム溶液 50mL
- ↓ *n*-ヘキサン 50mL
- ↓ 振とう
- ↓ 有機層（上層）除去

水層（下層）※

- ↓ *n*-ヘキサン 50mL
- ↓ 振とう
- ↓ 有機層（上層除去）

水層（下層）

- ↓ 10w/v%水酸化ナトリウム溶液 5mL
- ↓ 酢酸エチル 50mL
- ↓ 振とう
- ↓ 酢酸エチル層を得る

水層（下層）

- ↓ 酢酸エチル 50mL
- ↓ 振とう
- ↓ 酢酸エチル層を得る
- ↓ 酢酸エチル層を合わせる
- ↓ 無水硫酸ナトリウムを添加
- ↓ 放置、ろ過

濃縮（溶媒除去）

↓ 残留物を水及びメタノール（9：1）に溶解（脂肪以外の試料：10mL、脂肪：5mL）

試験溶液

↓

LC-MS/MS

（2）はちみつの場合

秤取

↓ はちみつ：試料 10.0g

↓ 飽和塩化ナトリウム溶液 50mL

↓ アセトン 50mL を加えてホモジナイズ

↓ 吸引ろ過

↓ 残留物はアセトン 50mL を加えホモジナイズ

↓ 吸引ろ過

↓ ろ液を合わせる

↓ 1mol/L 塩酸 5mL

↓ *n*-ヘキサン 50mL

↓ 振とう

↓ 有機層(上層) 除去

水層（下層）※

上記（1）筋肉、肝臓、魚介類、乳及び鶏卵、脂肪の場合の水層（下層）※以下と同様に操作

7. マトリックス添加標準溶液の調製

ブランク試料の抽出操作で得られた酢酸エチル抽出後の残留物にアセトンを加えて 10 mL（脂肪の場合は 5mL）とした。このうち 1 mL を採り、窒素気流下で乾燥後、添加回収試験における添加濃度（0.01 mg/L）及びその 1/10 濃度（0.001 mg/L）の標準溶液をそれぞれ 1 mL 加え、マトリックス添加標準溶液を作製し、LC-MS 及び LC-MS/MS で測定し、溶媒標準溶液とマトリックス添加標準溶液とのピーク面積を比較した。

[検討結果及び考察]

1. プロパモカルブ塩酸塩標準品について

通知法におけるプロパモカルブ試験の分析対象化合物はプロパモカルブ及びプロパモカルブ塩酸塩で、基準値はプロパモカルブとして設定されている。一方、日本ではプロパモカルブ塩酸塩が農薬登録されており、プロパモカルブの農薬評価書における各種試験はプ

ロパモカルブ塩酸塩を用いて実施されている。しかし、通知法¹⁾や論文³⁻⁵⁾では標準物質としてプロパモカルブが用いられている。標準品としてプロパモカルブが和光純薬、関東化学、林純薬及びシグマアルドリッチから販売されている。プロパモカルブ塩酸塩は関東化学から Dr. Ehrenstoefer GmbH 社製が販売されている。当所でプロパモカルブ塩酸塩の標準品をアセトンで溶解したところ、17 mg/100 mL の濃度でも不溶性沈殿が生じ、また、LC/MS 測定でプロパモカルブ塩酸塩はプロパモカルブの半分程度の測定値であった。緒言で記載した Pesticide Manual によると、プロパモカルブ塩酸塩のアセトンに対する溶解度は 560 g/L であることからプロパモカルブ塩酸塩を標準品として用いることは不相当であると判断した。林純薬の担当者の私信によると、プロパモカルブ塩酸塩は潮解性があり取扱いが困難であるとしている。通知法や論文においてもプロパモカルブのみを標準品としてプロパモカルブを用いていることから、今回の検討においてもプロパモカルブを標準品として使用した。図 1 に示すように、プロパモカルブ塩酸塩は水溶液中ではプロパモカルブと塩酸は解離して存在しているものと考えられる。また、プロパモカルブ塩酸塩もヘキサン以外の有機溶媒や水への溶解度も高いため、アセトン抽出においてもプロパモカルブと同様の挙動を示すと考えられた。そこで、液性により抽出効率が変わることも考慮し、次の検討を行った。試料に牛乳 10 g を用い、①そのまま、②10%水酸化ナトリウム溶液 0.5 mL 添加、③1 mol/L 塩酸 1 mL 添加を準備し、プロパモカルブ塩酸塩またはプロパモカルブをそれぞれ 0.01 ppm となるように添加してアセトン抽出した結果、液性による回収率に大きな変化は認められなかった。そこで、標準品としてプロパモカルブを使用することとした。

2. 測定条件の検討

1) LC-MS 測定イオンの検討

プロパモカルブはその構造から特異的な UV 吸収はなく HPLC-UV では測定ができない。農産物の通知試験法では NPD-GC 等を測定機器として使用しているが、試料 20 g を 1 mL に濃縮 (20 倍濃縮) して測定している。通知試験法の定量限界は 0.01 ppm であるが、NPD-GC を用いてプロパモカルブの感度を検討したところ、0.1 ppm 溶液 2 μ L を注入したときのピーク高は非常に低く、定量するに十分な感度が得られなかった。基準値 0.01 ppm を精度良く試験するには、定量限界値が 0.01 ppm 以下であることが必要であり、NPD-GC では感度不足と判断した。GC-MS 測定ではフラグメントイオン m/z 58 のみが観測され、感度も悪く適用は困難であった。そこで、高感度で選択性のある LC-MS による測定を検討した。LC-MS では ESI ポジティブモードで感度良く検出され、プロトン付加イオン $[M+H]^+$ m/z 189 とフラグメントイオン m/z 144 及び m/z 102 (図 2) が観測された。また、LC-MS/MS では、プリカーサーイオンを m/z 189 とした場合、プロダクトイオン m/z 144 及び m/z 102 が観察された (図 3)。

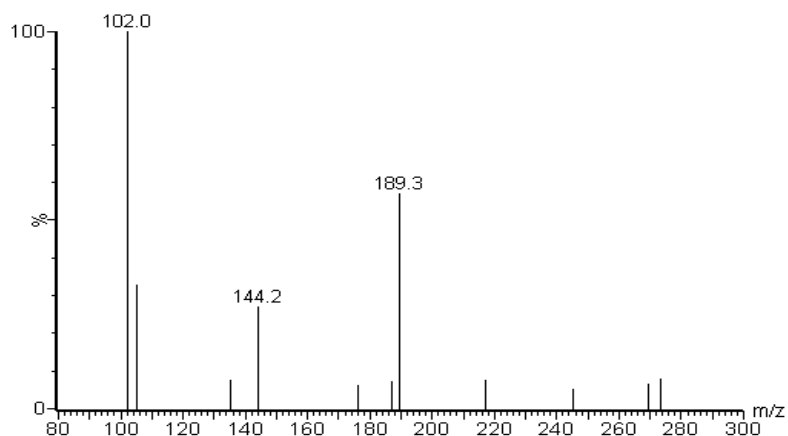


図 2 プロパモカルブのマスペクトル

スキャン範囲： 80～300 amu

測定条件： ESI+、 CV=35V (CV : cone voltage)

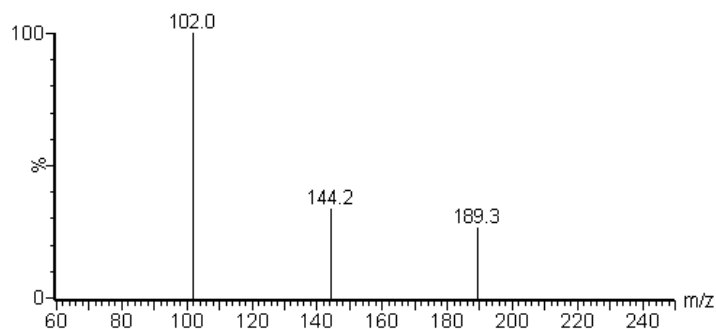


図 3 プロパモカルブのプロダクトスキャンスペクトル

プリカーサーイオン： m/z 189.3

測定条件： ESI+、 CV=25 V、 CE=15 eV

(CV : cone voltage、 CE : collision energy)

2) HPLC 条件の検討

カラムに逆相のオクタデシルシリル化シリカゲル (ODS) 系を用い、酢酸アンモニウム-メタノール系のアイソクラティックモードで検討した。分析カラムに YMC Pack ODS、L-Column ODS、Atlantis dC18 を用いたが、メタノール濃度 20～40%濃度で保持時間がいずれも 2 分から 4 分と早く、ピーク形状もテーリングしたブロードピークであった。これは図 1 に示すように、プロパモカルブはプロピルカルバマート骨格を有し、pKa9.5 の塩基性物質であるためと考えられた。グラジエント測定 (メタノール濃度 10%から 95%濃度を 2 分の直線勾配) したところ、保持時間は約 6 分と遅くなりピーク形状もシャープになった。

酢酸アンモニウムの濃度は 5 mmol から 20 mmol まで変化させても保持時間、感度やピーク形状に変化はなかったが、データのバラつきが小さかったことから添加することとした。多くの ODS 系カラムで測定が可能であったが、カラムによってテーリングが見られた。XBridge C18、Inertsil ODS4、Puresuit3 C18 で比較的シャープなピーク形状が得られた。

3) 検量線の直線性及び定量限界

LC-MS 及び LC-MS/MS 測定において、検量線は 0.1 mg/L まで直線性が得られた。定量限界は基準値の 0.01 mg/kg とした。なお、添加回収実験における検量線の範囲は添加濃度の 2 倍までの 0.001~0.02 mg/L とした（相関係数：0.998~1.000）。代表的な検量線を以下に示す（図 4-1 及び図 4-2）。

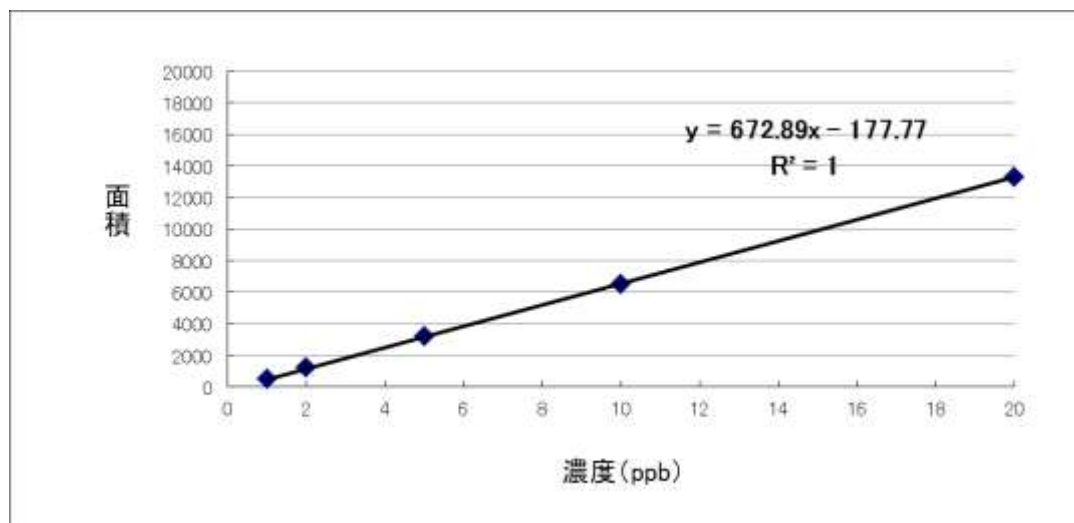


図 4-1. 検量線(SRM)

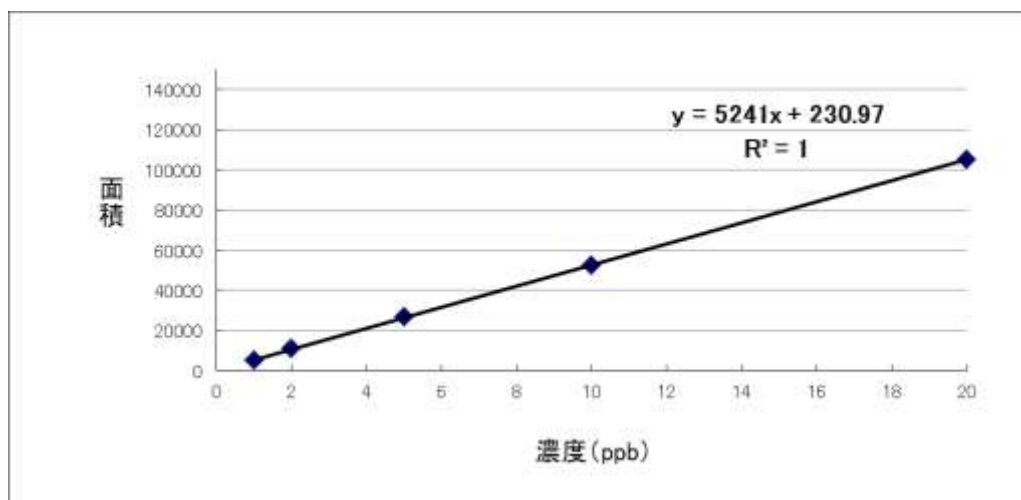


図 4-2. 検量線(SIM)

3. 試料調製法の検討

1) アセトン抽出

通知法の農産物のプロパモカルブ試験法ではアセトン-水（7：3）を抽出溶媒として用いている。しかし、実施要項（アセトン抽出）とは異なっており、牛脂肪などにおいて脂肪分が十分抽出されないことが考えられた。そこで、アセトンを抽出溶媒とした。はちみつでは、直接アセトンを加えてしまうと凝固してしまい十分に抽出が出来ないため、予め飽和塩化ナトリウム溶液を加えて溶解してからアセトン抽出を行った。抽出溶媒の量は試料量（10 g）の5倍量である50 mLとし、さらに50 mLのアセトンで残留物を洗浄した。

2) 液-液分配による抽出（精製）

通知法（農産物）は抽出液から減圧濃縮によりアセトンを除去し（約40mLまで）、塩化ナトリウム5 gとジエチルエーテル50 mLを加えて振とうし、ジエチルエーテル層を捨て、水層に炭酸ナトリウムを加えてアルカリ性としてジエチルエーテル抽出する。この方法を試料に牛脂肪、牛筋肉、牛及び鶏卵を用いて検討したところ、鶏卵においては減圧濃縮操作で激しく突沸し、全く濃縮することができなかった。牛筋肉及び牛乳でも突沸が起こり濃縮操作に注意が必要でかつ長時間を要した。そこで、濃縮操作なしに液-液分配抽出を行うことを検討した。

通知法（農産物）では穀類を除き抽出液をそのままジエチルエーテルでの洗浄操作を行っている。しかし、鶏卵の抽出液はアルカリ性を呈し、また、より確実にプロパモカルブを水層に移行させるため、全ての試料について液性を酸性として有機溶媒で抽出し、中性である脂質を有機層に移行させ除去する方法を検討した。まず、1 mol/L塩酸5 mLと飽和塩化ナトリウム溶液50 mLを基本とし、アセトン及びヘキサンの量を変化させ、抽出時の水層の液量を調べた。アセトン：ヘキサンの量を100:50、75:50、75:75 mLと変えて振とうしたところ、いずれにおいても水層の液量は65 mLと同じであった。この水層に再度ヘキサン50 mLを加えて振とうした時の水層の液量はいずれも60 mLでありアセトンとヘキサンの混合比率を変化させても、水層の液量に変化は見られなかった。そこで、試料抽出のアセトン量を50 mL+50 mLとし、ヘキサン50 mLで2回の抽出操作を行うこととし、実試料を用いて検討した。液-液分配抽出において塩化ナトリウム溶液ではなく水を用いた場合多くの試料でエマルジョンが発生した。塩化ナトリウム溶液の濃度は塩析効果をも高めるために飽和塩化ナトリウム溶液を用いた。牛筋肉10gに添加濃度が0.05mg/kgとなるようにプロパモカルブ標準溶液を添加して移行率について検討したところ、1回目の洗浄過程ではヘキサン層に1%程度、2回目の過程では0.1%程度のプロパモカルブが移行したが、ほとんど飽和塩化ナトリウム溶液に移行した。なお、鶏卵についてはエマルジョンが発生し、遠心処理を行っても消失しないこともあった。また、この操作で鶏卵の水層は緩いゲル状となったが、アルカリ性での抽出操作ではこの現象は解消された。

アルカリ性下でプロパモカルブの有機層への転溶を検討した。通知法では炭酸ナトリウムでアルカリ性としているが、炭酸ナトリウム添加後直ちに振とう溶解しないと炭酸ナトリウムが固化してしまうことから、水酸化ナトリウム溶液を用いた。10w/v%水酸化ナトリウム溶液 5 mL の添加で液性は十分なアルカリ性 (pH > 12) となった。転溶溶媒としてヘキサン及び酢酸エチルを検討した。通知法で使用しているジエチルエーテルは揮発性が高く、引火性や臭気性があるため検討対象から外した。牛筋肉ブランクのアセトン抽出液に試料中濃度として 0.05mg/kg となるようにプロパモカルブ標準溶液を添加し、「6. 試験溶液調製法」に記載した方法に従い、転溶溶媒のみを酢酸エチルまたは *n*-ヘキサンに変更し、検討した。結果、酢酸エチル抽出はヘキサン抽出より 10%以上高い回収率が得られた。抽出回数を検討したところ、酢酸エチル、ヘキサンとも 3 回目の抽出での回収は 1%以下であったので、抽出溶媒に酢酸エチルを用い、抽出回数は 2 回とした。(表 1)

表 1. アルカリ性下での転溶操作における平均移行率 (%) (n=3)

抽出溶媒	酢酸エチル	ヘキサン
1 回目	92	81
2 回目	2	1
3 回目	0.8	0.5

なお、鶏卵ではこの段階でも激しく振とうするとエマルジョンが形成され、遠心分離によっても消失しなかったため、緩やかな振とうに留めた。緩やかな振とうでも回収率の低下は認められなかった。

3) 操作容量について

LC-MS 測定は感度が良く、プロパモカルブも 1 ng/mL (5 μ L 注入) 以下の測定が可能である。抽出液の一部を用いることにより、省溶媒と操作時間の短縮が図れることが考えられた。しかし、脂質を多く含む試料 (特に牛脂肪や牛乳) をアセトンで抽出した場合、抽出液の脂質が時間の経過とともに不溶物として析出する現象が観察された。また、抽出液の一部を用いる場合、抽出液を定容する事が必要なこと、最終試験溶液量が少量となることも考慮して、抽出液全量を使用することとした。

4. 牛脂肪における問題点

牛脂肪における添加回収実験ではマトリックスの影響により、 $[M+H]^+$ m/z 189 の測定値が標準溶液と比較して、小さくなる傾向が認められた。フラグメントイオン m/z 102 及び 144 では良好な結果が得られた。また、 m/z 189 の値は操作間や日間でばらつきがあった。ブラ

ンク試料の試料調製で得られた酢酸エチル層に標準溶液を加えて乾固し、10%メタノールで定容した場合の m/z 189 のマトリックス含有標準溶液の面積/溶媒標準溶液の面積 (mt/st) 比は 0.7 程度となったが、 m/z 102 の mt/st 比は約 1 であった。一方、酢酸エチル層を減圧乾固した残留物に標準溶液 (10%メタノール) を加えた場合では、 m/z 189 及び 102 における mt/st 比は約 1 であった。

5. その他の検討

1) サンプルバイアルについて

LC/MS 測定に使用するバイアルを当初、National Scientific 社製シリコン不活性化ガラスバイアルを使用した。検討を重ねるうちに回収率の変動、マトリックス効果のバラツキなど試験に不具合な結果が得られた。プロパモカルブのようなアルカリ性の物質などではガラスに吸着することが考えられたため、原因追究としてサンプルバイアルを検討した。National Scientific 社製のガラスバイアルの他、Waters 社製 LC/MS 品質保証ガラスバイアル及び Waters 社製ポリプロピレン (PP) バイアルについて検討した。プロパモカルブの 10 ng/mL 溶液 (10%メタノール) を各バイアルに入れて測定した。その結果、PP バイアルの面積を 1 とすると National Scientific 社製のガラスバイアルは約 0.7、Waters 社製 LC/MS 品質保証ガラスバイアルは約 0.9 であった。マトリックスがある場合も比較するため、鶏卵試料についても同様に測定したところ、各バイアル間で面積に変化は認められなかった。そこで、サンプルバイアルは PP 製バイアルを用いた。

2) ガラス容器について

実験に使用するガラス製品についてプロパモカルブの吸着があるか以下の実験を行った。プロパモカルブ 1 ppm のアセトン溶液を①ガラスのメスピペットを用いてメスフラスコに入れ窒素ガスでアセトン留去、②PP 製マイクロピペットを用いて PP 製メスフラスコに入れ窒素ガスでアセトン留去、③ガラスのメスピペットを用いて 30 mL 容ナス型フラスコに入れアセトン 10 mL を加えてアセトンを減圧濃縮乾固した。それぞれを 10%メタノールで 20 ng/mL に希釈し測定した。その結果、プロパモカルブの面積に変化はなかった。これは、使用しているガラス器具では活性点がマスキングされており、プロパモカルブの吸着は少ないものと考えられた。しかし、吸着の心配もあるため、添加回収実験用の 0.1 ppm アセトン溶液及び検量線用標準溶液の希釈に関しては、PP 製チューブとピペットを使用した。また、添加回収試験には標準溶液添加の際にガラスへの吸着の可能性を除くために、検体試料を入れる容器はテフロン製のものを用いて実験を行った。

3) 採用しなかった抽出方法の検討

抽出法として、次の方法も行った。試料にアセトン 50 mL を加えてホモジナイズし、さらに 1 mol/L 塩酸 5 mL、飽和塩化ナトリウム溶液 45 mL 及びヘキサン 50 mL を加えてホモ

ジナイズ、遠心分離後上層（有機層）を捨てた。これにヘキサン 50 mL を加えて振とう、遠心分離後上層を捨てた。水層を吸引ろ過し、残留物を水 20 mL で洗い、ろ液に炭酸ナトリウム 5 g、塩化ナトリウム 5 g を加え及び酢酸エチル 50 mL+50 mL で振とう、遠心分離して酢酸エチル層を得、無水硫酸ナトリウムで脱水後減圧乾固後、10%メタノールで溶解後、試験溶液とした。この方法でも検査は可能であるが、遠心操作に時間が必要、多くのサンプルを扱う場合に遠心操作を複数回行わなければならないこと、分離した液層を採取（除去）するのに手間と時間がかかることなど試料調製に長時間を要することから、一度に多検体が操作できる分液ロートによる抽出とした。

6. 添加回収実験

添加回収実験用検体として、牛筋肉、牛脂肪、牛肝臓、鶏筋肉、さけ、うなぎ、しじみ、牛乳、鶏卵及びはちみつ（そば蜜）計 10 種類の畜水産物等を対象とした。これら対象食品で残留基準値が設定されているものは牛筋肉、脂肪、肝臓、牛乳、鶏卵であり、基準値はいずれも 0.01 mg/kg であった。そこで、添加濃度は 0.01 mg/kg とした。添加濃度の 10 倍高い標準溶液（アセトン溶液）を作成し、回収率を検討した。標準溶液を添加し 30 分間放置した後、添加回収実験を行った。

1) 選択性

プロパモカルブのプロトン付加イオン $[M+H]^+$ である $m/z189$ では牛筋肉、牛肝臓、さけ、はちみつで妨害ピークが認められた（図 5-2）。フラグメントイオン $m/z102$ では妨害ピークは小さいクロマトグラムが得られたので定量イオンとして $m/z102$ を用いた（図 5-1）。

SRM 測定においてはいずれの試料でも妨害となるピークは認められなかった。

表2-1 選択性の評価 (SRM)

担当機関: 埼玉県衛生研究所

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)	
	プロパモカルブ	牛の筋肉	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	11	5411	0.002	○	
	プロパモカルブ	牛の脂肪	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	66	5078	0.013	○	
	プロパモカルブ	牛の肝臓	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	5229	0.000	○	
	プロパモカルブ	鶏卵	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	5245	0.000	○	
	プロパモカルブ	牛乳	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	32	5236	0.006	○	
	プロパモカルブ	はちみつ	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	17	3965	0.004	○	
	プロパモカルブ	うなぎ	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	2	5456	0.000	○	
	プロパモカルブ	さけ	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	5	5338	0.001	○	
	プロパモカルブ	しじみ	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	2	5291	0.000	○	
	プロパモカルブ	鶏の筋肉	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	12	5163	0.002	○	

表2-2 選択性の評価 (SIM)

担当機関: 埼玉県衛生研究所

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)			
	プロパモカルブ	牛の筋肉	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	81	54009	0.002	○	
	プロパモカルブ	牛の脂肪	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	620	56091	0.011	○	
	プロパモカルブ	牛の肝臓	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	45	54401	0.001	○	
	プロパモカルブ	鶏卵	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	82	55424	0.001	○	
	プロパモカルブ	牛乳	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	376	54430	0.007	○	
	プロパモカルブ	はちみつ	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	894	55658	0.016	○	
	プロパモカルブ	うなぎ	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	400	54161	0.007	○	
	プロパモカルブ	さけ	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	70	54553	0.001	○	
	プロパモカルブ	じじみ	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	50	55703	0.001	○	
	プロパモカルブ	鶏の筋肉	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	99	55266	0.002	○	

2) 真度及び精度

10 試料における回収率の平均は SRM 測定では 82~97% (牛脂肪: 55%) (表 3-1)、SIM 測定では 79~116% (表 3-2) であった。また、併行精度は SRM 測定では 5~13%、SIM 測定では 2~19% の範囲内であった。SRM 測定で牛脂肪の回収率が悪かったのは、m/z189 の測定感度が小さくなるためと考えられた、その他は実施要領の目標値を満足するものであった。

各試料における代表的なブランク試料、添加試料及び溶媒標準溶液のクロマトグラムを 図 5 及び図 6 に示す。また、ブランク試料の SCAN 測定におけるクロマトグラムを 図 7 に示す。

表3-1 真度、精度及び定量限界の評価 (SRM)

担当機関: 埼玉県衛生研究所

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	
	プロパモカルブ	牛の筋肉	0.01	0.01	0.01		489	-8	1	93	80	71	74	94	82	13	94	70	82	
	プロパモカルブ	牛の脂肪	0.01	0.01	0.01		727	-35	1	60	61	55	49	50	55	11	94	70	82	
	プロパモカルブ	牛の肝臓	0.01	0.01	0.01		608	19	1	97	77	88	96	98	91	10	70	56	63	
	プロパモカルブ	鶏卵	0.01	0.01	0.01		504	-17	1	94	87	106	83	82	90	11	70	56	63	
	プロパモカルブ	牛乳	0.01	0.01	0.01		485	-13	1	94	99	90	84	97	93	6	56	56	56	
	プロパモカルブ	はちみつ	0.01	0.01	0.01		599	50	1	105	105	102	88	85	97	10	70	56	63	
	プロパモカルブ	うなぎ	0.01	0.01	0.01		611	70	1	89	91	92	82	82	87	6	56	56	56	
	プロパモカルブ	さけ	0.01	0.01	0.01		612	70	1	95	104	88	92	91	94	6	46	46	46	
	プロパモカルブ	じじみ	0.01	0.01	0.01		569	62	1	92	97	84	82	82	87	8	56	46	51	
	プロパモカルブ	鶏の筋肉	0.01	0.01	0.01		599	51	1	86	83	89	93	86	87	5	56	56	56	

表3-2 真度、精度及び定量限界の評価 (SIM)

担当機関: 埼玉県衛生研究所

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	
	プロパモカルブ	牛の筋肉	0.01	0.01	0.01		6024	985	1	113	108	119	124	116	116	5	224	210	217	
	プロパモカルブ	牛の脂肪	0.01	0.01	0.01		7712	856	1	70	81	87	102	95	87	14	265	232	249	
	プロパモカルブ	牛の肝臓	0.01	0.01	0.01		6327	325	1	107	82	83	86	86	89	12	178	135	157	
	プロパモカルブ	鶏卵	0.01	0.01	0.01		6024	984	1	88	88	85	81	93	87	5	129	105	117	
	プロパモカルブ	牛乳	0.01	0.01	0.01		5203	678	1	112	118	78	78	100	97	19	175	164	170	
	プロパモカルブ	はちみつ	0.01	0.01	0.01		5863	368	1	84	83	92	97	93	90	7	119	116	118	
	プロパモカルブ	うなぎ	0.01	0.01	0.01		5239	250	1	80	83	94	92	87	87	7	128	102	115	
	プロパモカルブ	さけ	0.01	0.01	0.01		6209	369	1	84	89	89	85	85	86	3	127	105	116	
	プロパモカルブ	じじみ	0.01	0.01	0.01		5896	369	1	89	85	85	81	84	84	2	134	118	126	
	プロパモカルブ	鶏の筋肉	0.01	0.01	0.01		5935	690	1	82	84	79	61	90	79	13	154	127	141	

3) 定量限界の推定

表 4-1 に SRM、表 4-2 に SIM による各試料における定量限界値を推定した結果を示す。

表4-1 定量限界の推定 (SRM)

担当機関: 埼玉県衛生研究所

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	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	平均	面積 (高さ) 比 (%) ⁵	S/N比
									ブラング ⁵	n=1	n=2	平均	n=1	n=2									
プロパモカルブ	牛の筋肉		0.001	0.01	0.01	*	0.001	面積	11	603	559	570	540	547	544	11	10	105	11				
プロパモカルブ	牛の脂肪		0.001	0.01	0.01	*	0.001	面積	66	643	639	575	578	563	571	10	10	101	10				
プロパモカルブ	牛の肝臓		0.001	0.01	0.01	*	0.001	面積	0	541	536	539	539	607	573	9	8	94	9				
プロパモカルブ	鶏卵		0.001	0.01	0.01	*	0.001	面積	0	565	561	563	580	585	583	9	9	97	9				
プロパモカルブ	牛乳		0.001	0.01	0.01	*	0.001	面積	32	580	583	550	551	579	565	8	8	97	8				
プロパモカルブ	はちみつ		0.001	0.01	0.01	*	0.001	面積	17	301	299	283	355	332	344	9	8	82	9				
プロパモカルブ	うなぎ		0.001	0.01	0.01	*	0.001	面積	2	547	545	544	578	547	563	8	8	97	8				
プロパモカルブ	さけ		0.001	0.01	0.01	*	0.001	面積	5	570	548	554	550	543	547	7	7	101	7				
プロパモカルブ	しじみ		0.001	0.01	0.01	*	0.001	面積	2	556	563	568	584	559	572	7	9	98	8				
プロパモカルブ	鶏の筋肉		0.001	0.01	0.01	*	0.001	面積	12	567	558	551	564	569	567	8	8	97	8				

表4-2 定量限界の推定 (SIM)

担当機関: 埼玉県衛生研究所

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	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	平均	面積 (高さ) 比 (%) ⁵	S/N比
									ブラング ⁵	n=1	n=2	平均	n=1	n=2									
プロパモカルブ	牛の筋肉		0.001	0.01	0.01	*	0.001	面積	81	5451	5459	5374	5303	5252	5278	21	23	102	22				
プロパモカルブ	牛の脂肪		0.001	0.01	0.01	*	0.001	面積	620	5839	5875	5237	5094	5080	5087	26	23	103	25				
プロパモカルブ	牛の肝臓		0.001	0.01	0.01	*	0.001	面積	45	4709	4743	4681	5348	5165	5257	17	14	89	15				
プロパモカルブ	鶏卵		0.001	0.01	0.01	*	0.001	面積	82	5085	5454	5188	5271	5451	5361	13	10	97	11				
プロパモカルブ	牛乳		0.001	0.01	0.01	*	0.001	面積	376	5448	5815	5256	5521	5546	5534	17	16	95	17				
プロパモカルブ	はちみつ		0.001	0.01	0.01	*	0.001	面積	894	4646	4906	3882	5089	5244	5167	11	11	75	11				
プロパモカルブ	うなぎ		0.001	0.01	0.01	*	0.001	面積	400	5131	5071	4701	5445	5488	5467	11	11	86	11				
プロパモカルブ	さけ		0.001	0.01	0.01	*	0.001	面積	70	5090	5157	5054	5197	5455	5326	11	12	95	12				
プロパモカルブ	しじみ		0.001	0.01	0.01	*	0.001	面積	50	5401	5333	5317	5493	5234	5364	10	12	99	11				
プロパモカルブ	鶏の筋肉		0.001	0.01	0.01	*	0.001	面積	99	5258	5289	5175	5311	5140	5226	12	14	99	13				

4) 試料マトリックスの測定値への影響

添加回収濃度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比は、SRM 測定では 0.80~1.03、SIM 測定では 0.82~1.00 であり、許容される範囲であると考えられた。(表 5-1 及び表 5-2)

表5-1 試料マトリックスの測定への影響 (SRM)

担当機関: 埼玉県衛生研究所

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	ブラング 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
プロパモカルブ	牛の筋肉		0.01	0.01	0.01	0.01	面積	11	5191	5293	5231	5411	5332	5372	0.97	
プロパモカルブ	牛の脂肪		0.01	0.01	0.01	0.01	面積	66	5366	5402	5318	5078	5425	5252	1.01	
プロパモカルブ	牛の肝臓		0.01	0.01	0.01	0.01	面積	0	5242	5165	5204	5229	5286	5258	0.99	
プロパモカルブ	鶏卵		0.01	0.01	0.01	0.01	面積	0	5247	5548	5398	5245	5222	5234	1.03	
プロパモカルブ	牛乳		0.01	0.01	0.01	0.01	面積	32	5255	5396	5294	5236	5443	5340	0.99	
プロパモカルブ	はちみつ		0.01	0.01	0.01	0.01	面積	17	3026	3188	3090	3965	3771	3868	0.80	
プロパモカルブ	うなぎ		0.01	0.01	0.01	0.01	面積	2	5315	5169	5240	5456	5321	5389	0.97	
プロパモカルブ	さけ		0.01	0.01	0.01	0.01	面積	5	5261	5321	5286	5338	5240	5289	1.00	
プロパモカルブ	しじみ		0.01	0.01	0.01	0.01	面積	2	5396	5059	5226	5291	5139	5215	1.00	
プロパモカルブ	鶏の筋肉		0.01	0.01	0.01	0.01	面積	12	5262	5219	5229	5163	5436	5300	0.99	

表5-2 試料マトリックスの測定への影響 (SIM)

担当機関: 埼玉県衛生研究所

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	ブラング 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
プロパモカルブ	牛の筋肉		0.01	0.01	0.01	0.01	面積	81	54336	52318	53246	54504	54009	54257	0.98	
プロパモカルブ	牛の脂肪		0.01	0.01	0.01	0.01	面積	620	54996	54132	53944	56091	56672	56382	0.96	
プロパモカルブ	牛の肝臓		0.01	0.01	0.01	0.01	面積	45	53301	53437	53324	55678	54401	55040	0.97	
プロパモカルブ	鶏卵		0.01	0.01	0.01	0.01	面積	82	54471	54593	54450	56113	55424	55769	0.98	
プロパモカルブ	牛乳		0.01	0.01	0.01	0.01	面積	376	54253	54926	54214	55863	54430	55147	0.98	
プロパモカルブ	はちみつ		0.01	0.01	0.01	0.01	面積	894	47119	45392	45362	55595	55658	55627	0.82	
プロパモカルブ	うなぎ		0.01	0.01	0.01	0.01	面積	400	54161	53537	53449	55676	54672	55174	0.97	
プロパモカルブ	さけ		0.01	0.01	0.01	0.01	面積	70	54917	54813	54795	54533	55370	54952	1.00	
プロパモカルブ	しじみ		0.01	0.01	0.01	0.01	面積	50	54289	51280	52735	55516	55703	55610	0.95	
プロパモカルブ	鶏の筋肉		0.01	0.01	0.01	0.01	面積	99	53486	50099	51694	55205	55266	55236	0.94	

[参考文献]

- 1) 食品安全委員会（平成 21 年 7 月 9 日府食第 659 号）「食品健康影響評価の結果の通知について」
- 2) Hiemstra, M. et al., Determination of propamocarb in vegetables using polymer-based high-performance liquid chromatography coupled with electrospray mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, **972**, 231-239(2002)
- 3) Hetherington C. L. et al., A multi-residue screening method for the determination of 73 pesticides and metabolites in fruit and vegetables using high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **18**, 2443-2450(2004)
- 4) 垣本芳久ら, GC/MS(SCAN)および LC/MS(SIM)による野菜・果実中残留農薬の多成分一斉分析法, *食衛誌*, **46**, 153-160(2005)
- 5) 畠山えり子ら, 限外ろ過法を用いた LC/MS/MS による農産物中の残留農薬一斉分析, *食衛誌*, **47**, 137-145(2006)

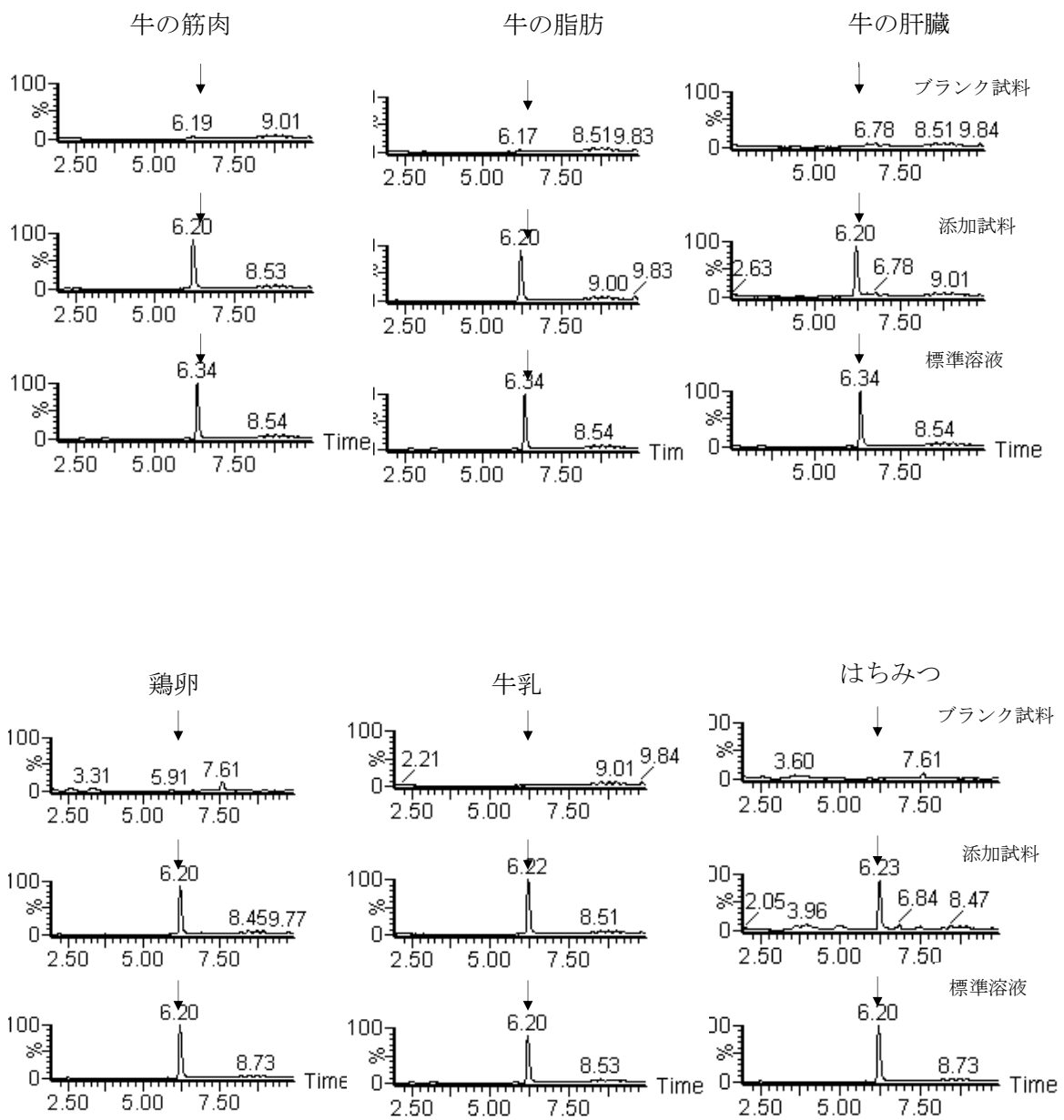


図 5-1 添加回収試験の代表的なプロパモカルブの SIM クロマトグラム
(m/z 102.0)、添加濃度 (0.01 ppm)

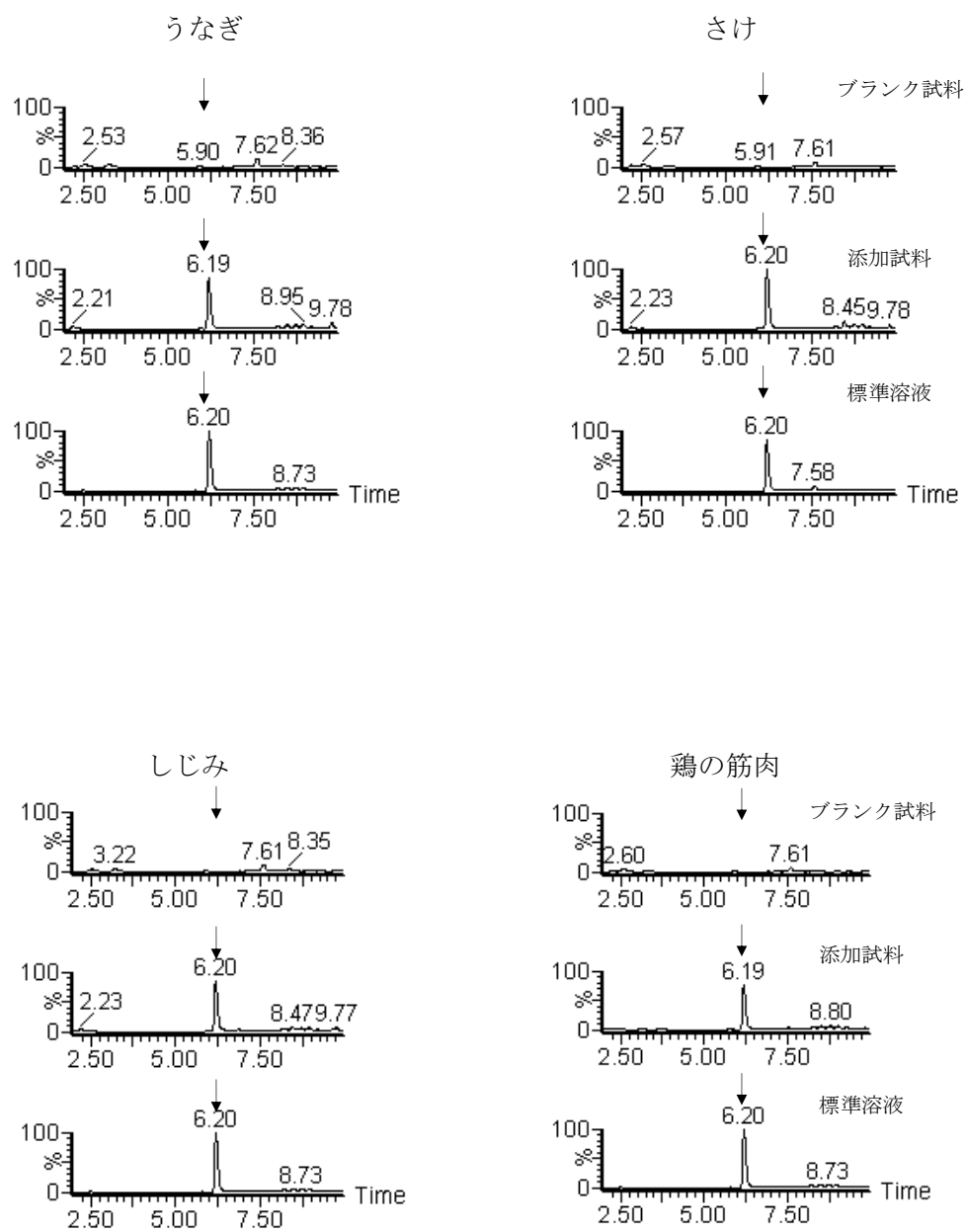


図 5-1 (続き) 添加回収試験の代表的なプロパモカルブの SIM クロマトグラム (m/z 102.0)、添加濃度 (0.01 ppm)

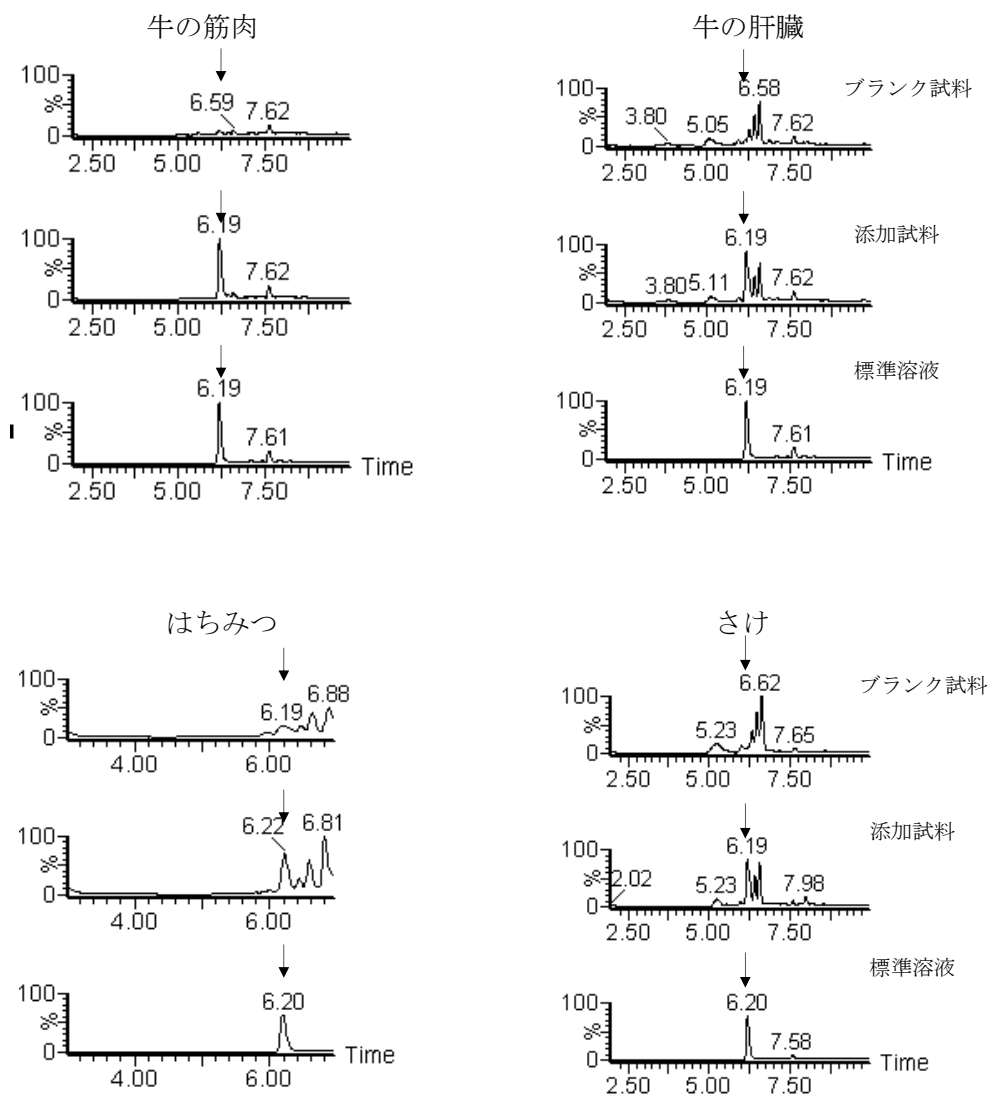


図 5-2 添加回収試験の代表的なプロパモカルブの SIM クロマトグラム (m/z 189.3)、添加濃度 (0.01 ppm)

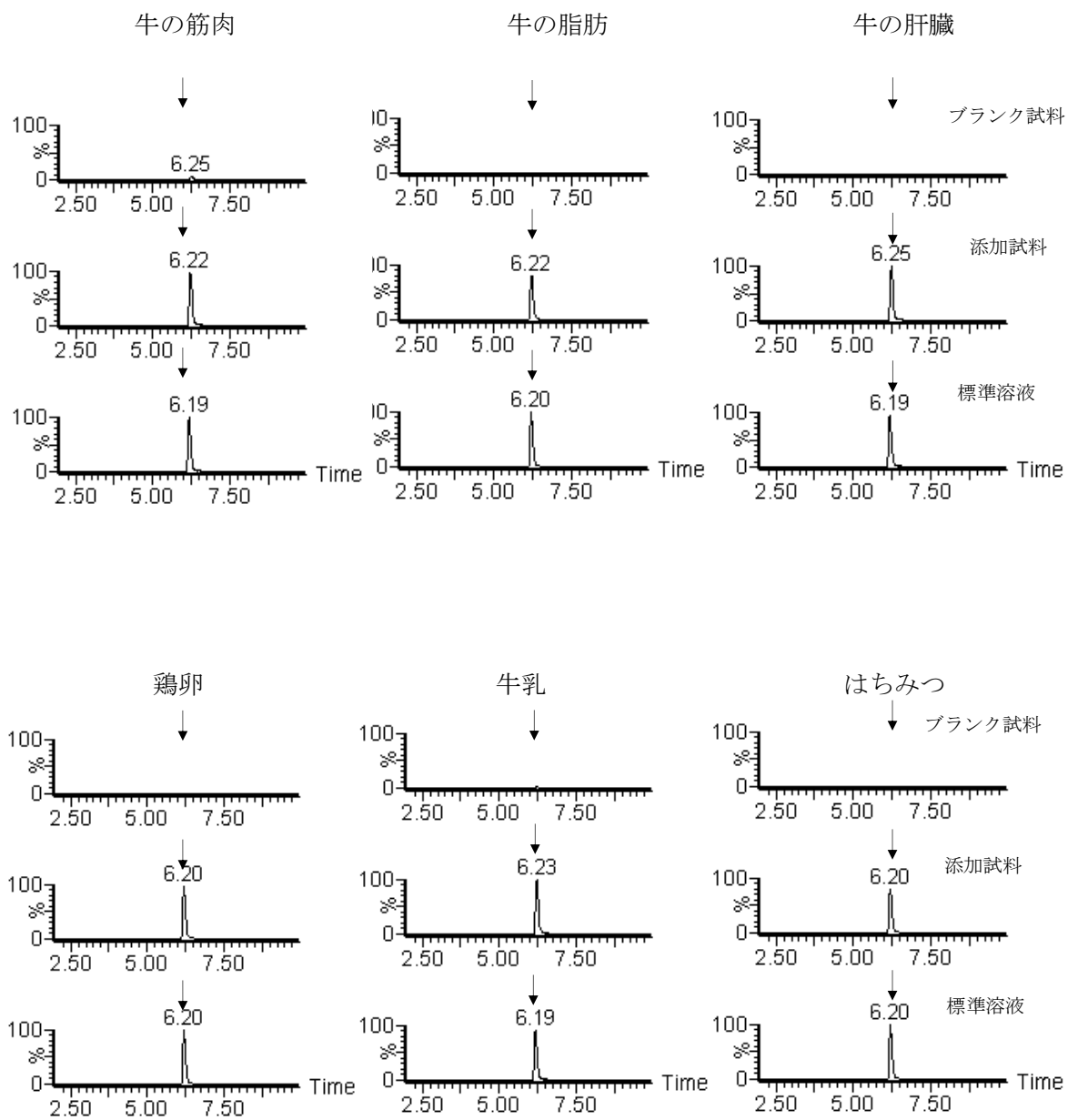


図 6 添加回収試験の代表的なプロパモカルブの SRM クロマトグラム
(m/z 189.3 \rightarrow 102.0)、添加濃度 (0.01 ppm)

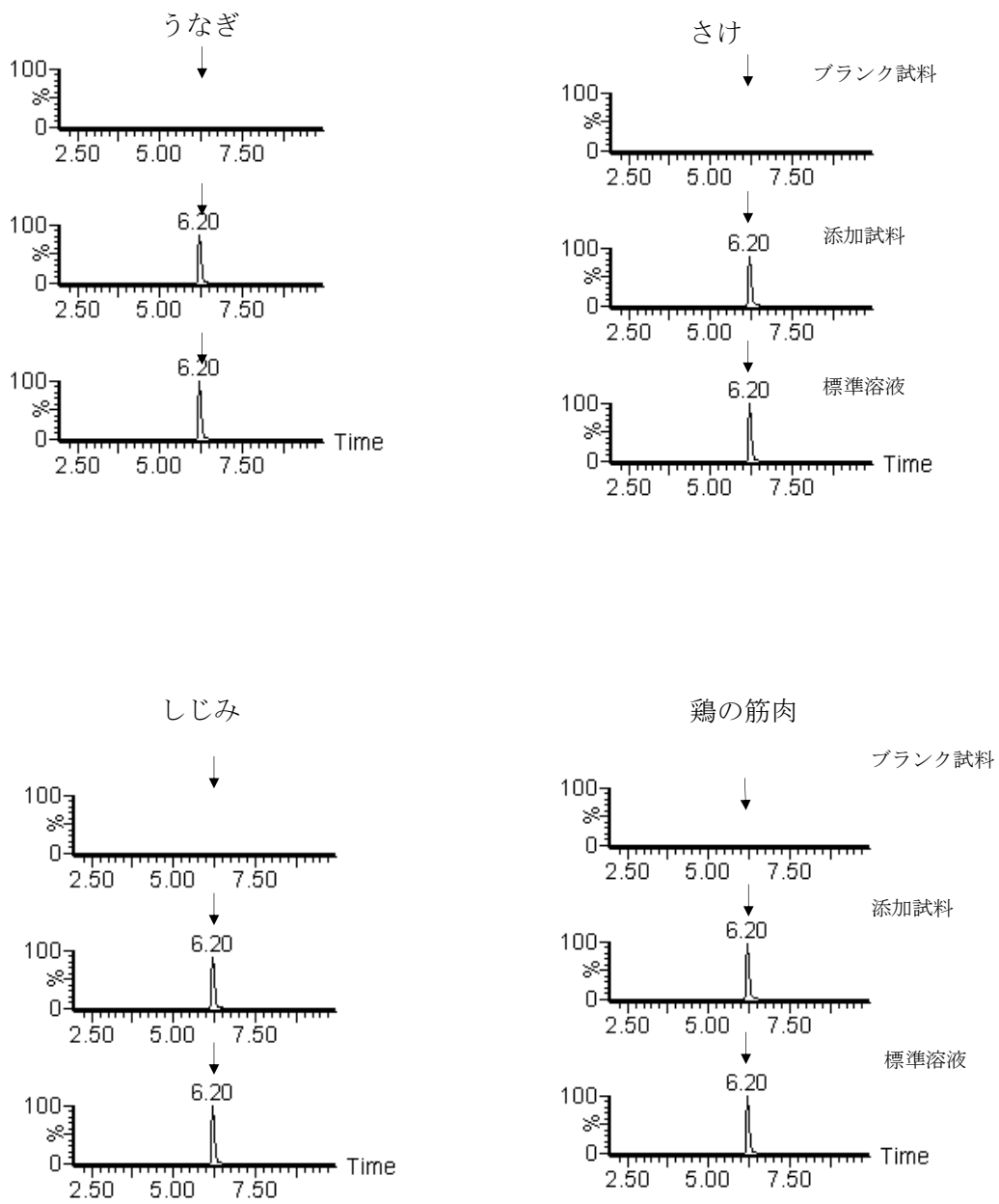


図 6 (続き) 添加回収試験の代表的なプロパモカルブの SRM クロマトグラム (m/z 189.3 → 102.0)、添加濃度 (0.01 ppm)

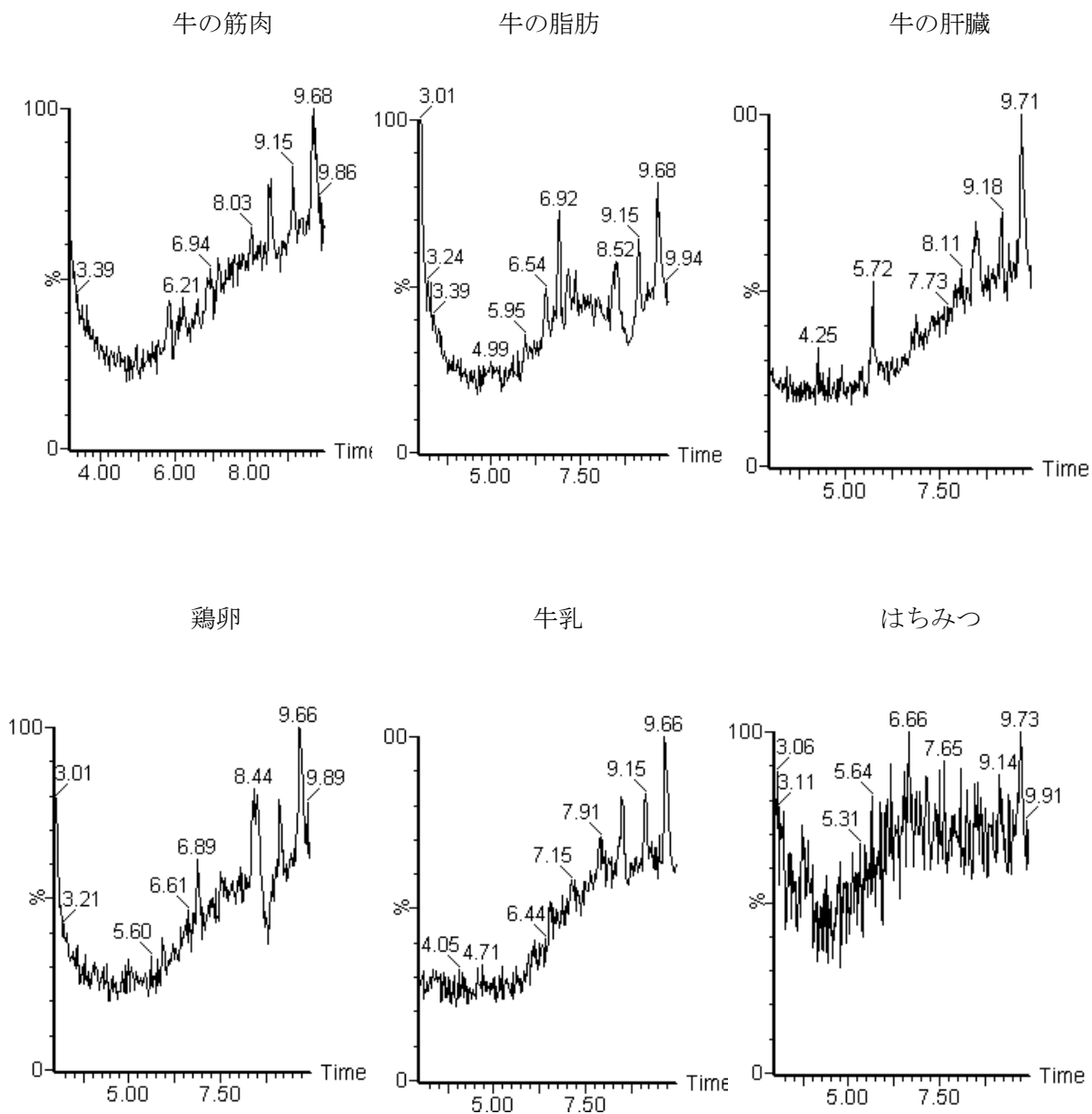


図7 ブランク試料の代表的なトータルイオンクロマトグラム

スキャン範囲： 80~300 amu

測定条件： ESI+, CV=35V (CV : cone voltage)

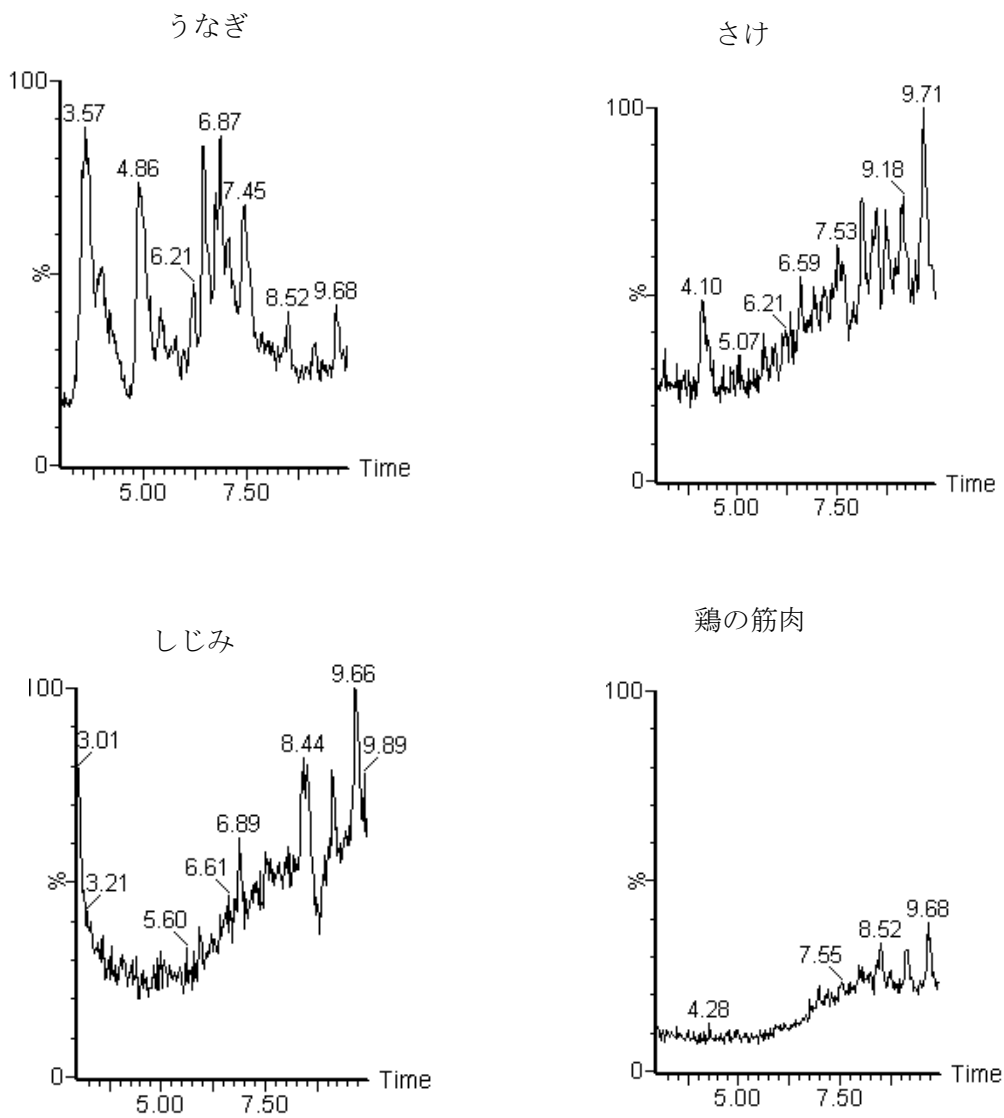


図7 (続き) ブランク試料の代表的なトータルイオンクロマトグラム

スキャン範囲： 80~300 amu

測定条件： ESI+, CV=35V (CV : cone voltage)