

※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。

平成18年度

食品・添加物等規格基準に関する試験検査について

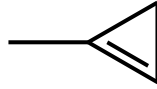
1-メチルシクロプロペン（農産物）に関する試験

1-メチルシクロプロペン (1-methylcyclopropene) に関する試験法 (検討内容)

[緒言]

1. 構造式等

1-メチルシクロプロペン



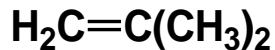
C₄H₆ : 54.1

1-methylcyclopropene

沸点 : 11°C.

【作物残留性試験報告書から引用】

イソブチレン



C₄H₈ : 56.1

Isobutylene

沸点 : -6.9°C. 蒸気圧 : 256 kPa(20°C).

【作物残留性試験報告書から引用】

2. 基準値案 (新規登録、ppm) *

小麦 0.2、みかん 0.1、なつみかん 0.2、レモン 0.3、オレンジ 0.3、グレープフルーツ 0.3、ライム、その他のかんきつ 0.3、みかんの果皮 3

*平成 25 年 9 月現在、りんご、日本なし、西洋なし及びかきにそれぞれ 0.01 ppm の基準値が設定されている。

3. 分析対象成分

1-メチルシクロプロペン

4. 試験法の組み立て

1-メチルシクロプロペンは単環式炭化水素の農薬であり、揮発性が極めて高く、既存の個別試験法及び一斉試験法への適用は困難である。したがって本剤については、単独の個別試験法を提案する。試験法の検討は行っていないが、提案法は、かきの作物残留性試験の分析法*¹をそのまま採用した。なお、なしの分析法は、抽出液に飽和硫酸アンモニウム溶液 1 L に対してアンモニア水 30 mL を加えたものを使用し、その他についてはかきと同様である。今回は、アンモニア水の量が多い、かきの方法を参考にした。

*¹ 作物残留性試験の分析法の概要：密閉式の抽出容器内で塩基性硫酸アンモニウム溶液を加えて抽出し、気相中に生成した1-メチルシクロプロペンをGC-FIDで測定し、イソブチレン検量線による間接定量を行い、GC-MSで確認する方法である。

[実験方法]

1. 試料

下記2種農産物試料を次の手順で前処理して分析法の検討に供した。

1) 日本なし（果実）

幸水（埼玉県産）を縦に12分割し、適宜包丁で切り分け200gに調節した。

2) かき（果実：へたを除去したもの）

刀根早生（和歌山県産）を縦に12分割し、適宜包丁で切り分け200gに調節した。

2. 試薬・機器

イソブチレン：純度99.94%，ローム・アンド・ハースジャパン株式会社

アンモニア水：特級28%アンモニア水（和光純薬工業製）

硫酸アンモニウム：特級（和光純薬工業製）

塩基性硫酸アンモニウム溶液：飽和硫酸アンモニウム溶液1Lに対しアンモニア水50 mLを加えたもの（pH 9.6（実測値））

1-メチルシクロプロペン製剤：スマートフレッシュ（含量3.3%）ローム・アンド・ハースジャパン株式会社

ミキサー：BB-900（WARING製）

抽出装置*：2.28 L容；内径約9 cm、高さ約35 cm（上部、下部各20 cm、接合部5 cm）
（ローム・アンド・ハースジャパン株式会社提供）

* 次図及び資料1の写真を参照（プランジャーおよびカッター刃については、実際に使用しないため図では省略）

A：サンプリングバルブ

B：固定用ナット

C：ふた

D：O-リング

E：ヘッドスペース

F：固定用ボルト

G：ミキサーカップ

H：ミキサー刃

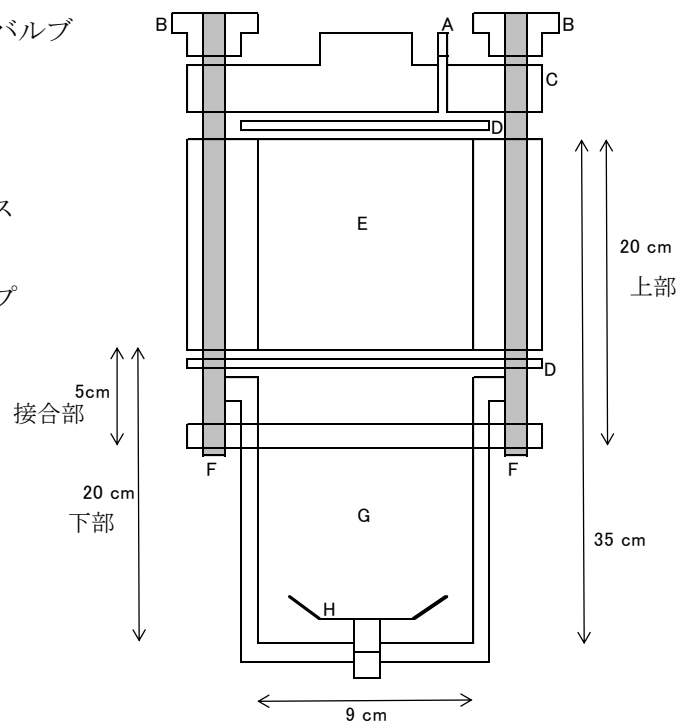


図 抽出装置の概略

3. GC-FID 測定装置

| | 型 式 | 会 社 |
|-----------|-----------------|------------------------|
| ガスクロマトグラフ | 6890 GC (FID 付) | Agilent Technologies 社 |
| データ処理装置 | ChemStation | Agilent Technologies 社 |

4. GC-FID 測定条件

| | |
|-------|---|
| カラム | PoraBOND Q 内径0.25 mm、長さ25 m、膜厚3μm 会社： Varian 社 |
| ガス流量 | キャリアー（ヘリウム） 2 mL/min、水素 40 mL/min、 空気 450 mL/min |
| 注入量 | 500 μL |
| カラム温度 | 50°C (0 min) – 20°C/min – 170°C (0 min) – 50°C/min – 275°C (0 min) |
| 注入口温度 | 75°C |
| 検出器温度 | 295°C |
| 保持時間 | 1-メチルシクロプロペン 4.8 min、イソブチレン 4.7 min |

5. 定量

1) 検量線の調製

ガスタイトシリンジを用いてイソブチレン 0.8 mL を分取し、予め空気 800 mL を入れたテドラーバッグに注入して、998.40 μL/L（イソブチレン純度 99.94%の場合）の標準ガスを調製した。この標準ガスをガスタイトシリンジを用いて 0.19, 0.39, 0.8, 4.0 および 8.0 mL を取り、各々を予め空気 800 mL を入れたテドラーバッグに注入し、0.237, 0.486, 0.997, 4.97 および 9.89 μL/L の検量線用ガスを調製した。この検量線用ガスの 500 μL をガスクロマトグラフに注入して、データ処理装置を用いてイソブチレンのピーク面積を測定し、横軸に重量、縦軸にピーク面積をとって検量線を作成した。

次項に従い調製した試験ガス 500 μL を GC-FID に注入し、イソブチレンの検量線より 1-メチルシクロプロペンの濃度を求め、下記の計算式により試料中の残留濃度を算出した。

試料重量 = 200 g

抽出操作後の抽出液の体積(実測値) = 日本なし 0.44 L、かき 0.45 L

室温 = 24°C = 297 K

気体定数 = 0.08206

抽出容器の体積 = 2.28 L

測定結果 = 0.486 μL/L の場合

式1: 抽出後の抽出容器内のヘッドスペース容量

抽出容器の容量 – 日本なし抽出溶液の体積 = 2.28 – 0.44 = 1.84 L

抽出容器の容量 – かき抽出溶液の体積 = 2.28 – 0.45 = 1.83 L

式2: ヘッドスペース中の1-メチルシクロプロペン分圧

$$P = 0.486 \mu\text{L/L} \times 1 \text{ atm} = 4.86 \times 10^{-7} \text{ atm}$$

式3: ヘッドスペース中の1-メチルシクロプロペンモル数 (n_A)

$$\text{日本なし; } n_A = PV/RT = 4.86 \times 10^{-7} \times 1.84 \div 0.08206 \div 297 = 3.669 \times 10^{-8}$$

$$\text{かき; } n_A = PV/RT = 4.86 \times 10^{-7} \times 1.83 \div 0.08206 \div 297 = 3.649 \times 10^{-8}$$

式4: ヘッドスペース中の1-メチルシクロプロペン重量

$$\text{日本なし; } 3.669 \times 10^{-8} \times 54.1 = 1.985 \times 10^{-6} \text{ g}$$

$$\text{かき; } 3.649 \times 10^{-8} \times 54.1 = 1.974 \times 10^{-6} \text{ g}$$

式5: 試料中の1-メチルシクロプロペン濃度

$$\text{日本なし; } 1.985 \times 10^{-6} \div 200 \times 10^6 = 0.00993 \text{ mg/kg}$$

$$\text{かき; } 1.974 \times 10^{-6} \div 200 \times 10^6 = 0.00987 \text{ mg/kg}$$

[参考]

イソブチレンの検量線より1-メチルシクロプロペン濃度を求め、以下の計算式より試料中の1-メチルシクロプロペン含量を求めることも可能である。なお試料の比重は1 g/cm³と仮定し、また計算には理想気体の状態方程式 $PV = nRT$ を使用する。

P: ヘッドスペース中の1-メチルシクロプロペン分圧 (atm)

V: 抽出後のヘッドスペースの体積 (L)

n: ヘッドスペース中の1-メチルシクロプロペン量 (mol)

R: 気体定数 0.08206

T: 室温 (K)

Va: 抽出容器の体積 (L)

Vb: 抽出操作後の抽出液の体積 (L)

W: 試料量 (kg)

A: 検量線より求めた1-メチルシクロプロペン濃度 ($\mu\text{L/L}$)

C: 1-メチルシクロプロペン含量 (mg/kg)

$$P = A \times 1 \text{ atm} = A \times 10^{-6}$$

$$V = V_a - V_b$$

$$n = (P \times V) / (0.08206 \times T)$$

$$C = (n \times 1\text{-メチルシクロプロペンの分子量} \times 10^3) / W$$

$$= ((P \times V) / (0.08206 \times T)) \times 54.1 \times 10^3 / W$$

$$= ((A \times 10^{-6} \times (V_a - V_b)) / (0.08206 \times T)) \times 54.1 \times 10^3 / W$$

$$= (A(V_a - V_b) / TW) \times 0.6593$$

(計算例1: 通知案の計算例)

$$V_a = 2.2 \text{ L}$$

$$V_b = \text{塩基性硫酸アンモニウム溶液の体積} + \text{試料の体積} = 0.25 + 0.2 = 0.45 \text{ L}$$

$$T = 24^\circ\text{C} = 297 \text{ K}$$

$$W = 0.2 \text{ kg}$$

の場合

$$C = (A(Va-Vb) / TW) \times 0.6593 = (A(2.2-0.45) / 0.2T) \times 0.6593 = (A/T) \times 5.77$$

(計算例2: 実際に検討で用いた抽出容器での計算例)

$$Va = 2.28 \text{ L}$$

$$Vb = \text{塩基性硫酸アンモニウム溶液の体積} + \text{試料の体積} = 0.25 + 0.2 = 0.45 \text{ L}$$

$$T = 24^\circ\text{C} = 297 \text{ K}$$

$$W = 0.2 \text{ kg}$$

の場合

$$C = (A(Va-Vb) / TW) \times 0.6593 = (A(2.28-0.45) / 0.2T) \times 0.6593 = (A/T) \times 6.03$$

(計算例 3: 検討に用いた日本なし及びかきでの実測値での計算例)

$$A = 0.486 \mu\text{L/L}$$

$$Va = 2.28 \text{ L}$$

$$Vb(\text{実測値}) = \text{日本なし } 0.44 \text{ L, かき } 0.45 \text{ L}$$

$$W = 0.2 \text{ kg}$$

$$T = 24^\circ\text{C} = 297 \text{ K}$$

の場合

$$\begin{aligned} \text{日本なし: } C &= (A(Va-Vb) / TW) \times 0.6593 \\ &= (A(2.28-0.44) / 0.2T) \times 0.6593 \\ &= (A/T) \times 6.066 \\ &= 0.00993 \text{ (mg/kg)} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{かき: } C &= (A(Va-Vb) / TW) \times 0.6593 \\ &= (A(2.28-0.45) / 0.2T) \times 0.6593 \\ &= (A/T) \times 6.033 \\ &= 0.00987 \text{ (mg/kg)} \end{aligned}$$

6. 試験ガスの調製

1) 概要

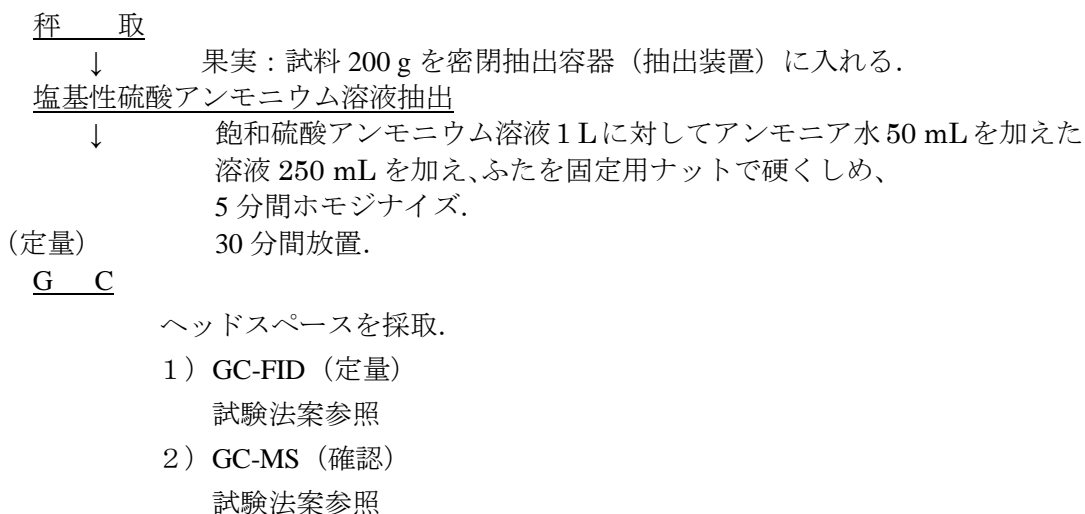
密閉式の抽出容器内で塩基性硫酸アンモニウム溶液を加えて抽出し、気相中に生成した1-メチルシクロプロペンをGC-FIDで測定し、イソブチレン検量線による間接定量を行い、GC-MSで確認する。

2) 抽出

試料200 gを抽出容器に入れ、塩基性硫酸アンモニウム溶液*250 mLを加えて、ふたをして密閉した。抽出装置にセットして、5分間磨砕抽出した。30分間放置し、抽出装置内のヘッドスペースガスを試験ガスとした。

* 飽和硫酸アンモニウム溶液1 Lに、日本なしではアンモニア水30 mLを、かきではアンモニア水50 mLをそれぞれ加えたもの。

分析フローチャート (抽出)



定量限界[室温が 24°C(297 K)の場合]

【残留基準値(案)：果実 0.1~0.3 ppm】 【基準値は未確認】 *

0.01 mg/kg [0.486 μL/L × 6.03/297 = 0.00987 mg/kg]

*平成25年9月現在、りんご、日本なし、西洋なし及びかきにそれぞれ

0.01 ppmの基準値が設定されている。

7. 基礎データ (標準品による検討)

特になし

8. 添加回収試験

1-メチルシクロプロペンの添加回収試料の調製は、製剤から発生した1-メチルシクロプロペンの添加用ガスを用いて行った。なお、発生した1-メチルシクロプロペンのガス濃度は、イソブチレン標準ガスから作成された検量線より求めた。以下に操作の概要を示す。

操作概要：1-メチルシクロプロペン3.3%製剤80 mgを250 mL容の密閉容器内で水3 mLに溶解すると4814 μL/L(理論値*)の1-メチルシクロプロペン添加用ガスが生成するため、添加濃度0.01 ppmとするためには、その0.187 mLを試料に添加することになる(理論値の計算例参照)。しかし、添加用ガス中の1-メチルシクロプロペンの実測濃度は4573 μL/Lであったため、その0.197 mLを試料200 gを入れた密閉抽出容器のヘッドスペースに添加した。

[添加用ガスの必要量の計算]

試料:200 g

添加濃度:0.01 ppm

室温:24°C

添加用ガス中濃度(実測濃度):4573 μL/L

式1: 0.01 ppm添加に必要な1-メチルシクロプロペン重量 (g)

$$\begin{aligned} \text{1-メチルシクロプロペン重量 (g)} &= \text{添加濃度 (ppm)} \times \text{試料重量 (kg)} \div 1000 \\ 2.0 \times 10^{-6} \text{ (g)} &= 0.01 \times 0.2 \div 1000 \end{aligned}$$

式2: 0.01 ppm添加に必要な1-メチルシクロプロペンモル数 (n_A)

$$\begin{aligned} \text{1-メチルシクロプロペンモル数} &= \text{1-メチルシクロプロペン重量 (g)} \div \text{分子量} \\ 3.70 \times 10^{-8} &= 2.0 \times 10^{-6} \div 54.1 \end{aligned}$$

式3: 添加ガス中の1-メチルシクロプロペンの分圧

$$P = 4573 \mu\text{L/L} \times 1\text{atm} = 4.573 \times 10^{-3} \text{ atm}$$

式4: 添加ガス中の1-メチルシクロプロペン濃度 (mol/mL)

$$\begin{aligned} n_A = PV/RT &= 4.573 \times 10^{-3} \times 0.001 \text{ L} \div 0.08206 \div 297 \\ \text{1-メチルシクロプロペン濃度 (mol/mL)} &= 1.876 \times 10^{-7} \end{aligned}$$

式5: 添加用ガスの必要量

$$\begin{aligned} \text{必要量 (mL)} &= \text{添加に必要な1-メチルシクロプロペンモル数 (mol)} \div \text{添加ガス中の} \\ &\quad \text{1-メチルシクロプロペン濃度 (mol/mL)} \\ 0.197 \text{ mL} &= 3.70 \times 10^{-8} \text{ (mol)} \div 1.876 \times 10^{-7} \text{ (mol/mL)} \end{aligned}$$

[添加用ガスの必要量の計算:理論値の計算例]

試料:200 g

添加濃度:0.01 ppm

室温:24°C

添加用ガス中濃度(理論値):4814 $\mu\text{L/L}$ *

式1: 0.01 ppm添加に必要な1-メチルシクロプロペン重量 (g)

$$\begin{aligned} \text{1-メチルシクロプロペン重量 (g)} &= \text{添加濃度 (ppm)} \times \text{試料重量 (kg)} \div 1000 \\ 2.0 \times 10^{-6} \text{ (g)} &= 0.01 \times 0.2 \div 1000 \end{aligned}$$

式2: 0.01 ppm添加に必要な1-メチルシクロプロペンモル数 (n_A)

$$\begin{aligned} \text{1-メチルシクロプロペンモル数} &= \text{1-メチルシクロプロペン重量 (g)} \div \text{分子量} \\ 3.70 \times 10^{-8} &= 2.0 \times 10^{-6} \div 54.1 \end{aligned}$$

式3: 添加ガス中の1-メチルシクロプロペンの分圧

$$P = 4814 \mu\text{L/L} \times 1\text{atm} = 4.814 \times 10^{-3} \text{ atm}$$

式4: 添加ガス中の1-メチルシクロプロペン濃度 (mol/mL)

$$\begin{aligned} n_A = PV/RT &= 4.814 \times 10^{-3} \times 0.001 \text{ L} \div 0.08206 \div 297 \\ \text{1-メチルシクロプロペン濃度 (mol/mL)} &= 1.98 \times 10^{-7} \end{aligned}$$

式5: 添加用ガスの必要量

$$\begin{aligned} \text{必要量 (mL)} &= \text{添加に必要な1-メチルシクロプロペンモル数 (mol)} \div \text{添加ガス中の} \\ &\quad \text{1-メチルシクロプロペン濃度 (mol/mL)} \\ 0.187 \text{ mL} &= 3.70 \times 10^{-8} \text{ (mol)} \div 1.98 \times 10^{-7} \text{ (mol/mL)} \end{aligned}$$

* 添加用ガス中の1-メチルシクロプロペンの量 $0.08 \text{ g} \times 0.033 \div 54.1 = 4.88 \times 10^{-5} \text{ mol}$
 同体積 $4.88 \times 10^{-5} \text{ mol} \times 22.4 \times 10^6 \mu\text{L} \times (273+24) \div 273\text{K} = 1189 \mu\text{L}$
 添加用ガス中濃度 $1189 \mu\text{L} \div (250 \text{ mL} - 3 \text{ mL}) \times 1000 = 4814 \mu\text{L/L}$

結果(図3)

なし及びかきおける回収試験の結果は、真度および併行精度とも良好であった。

添加濃度： 0.01 ppm

| (表1) | 回収率(%) (n=3) | 真度 (%) | 併行精度 (RSD%) |
|------|-----------------|-----------|----------------|
| なし | 101, 87, 86 | 91 | 9.2 |
| かき | 114, 110, 102 | 109 | 5.6 |

9. 測定条件の検討

9-1. GC (FID) (定量)

① 測定方法の選択

1-メチルシクロプロペン及びイソブチレンは、常温で気体のため、GCで測定する方法を提案する。

② 検出器の選択

1-メチルシクロプロペンは、環式不飽和炭化水素のため、測定はFIDまたはMSで可能である。また標準品であるイソブチレンもFIDまたはMSで測定可能である。1-メチルシクロプロペンとイソブチレンに対して感度がほぼ等しいことが分かっているFIDでの測定を提案する。

③ 測定条件

カラム： PoraBOND Q (Varian 社)、内径 0.25 mm、長さ 25 m、膜厚 3 μm

ガス流量： キャリヤー (ヘリウム) 2 mL/min、水素 40 mL/min、空気 450 mL/min

注入量： 500 μL

カラム温度： 50°C (0 min) -20°C/min-170°C (0 min) -50°C/min-275°C (0 min)

注入口温度： 75°C

検出器温度： 295°C

保持時間： 1-メチルシクロプロペン 4.8 min、イソブチレン 4.7 min

④ 検量線の直線性 (図1)

直線性は良好であった。

⑤ 検出感度 (図2)

定量限界： 0.01 mg/kg [0.486 μL/L (24°C) のイソブチレン標準品のクロマトグラムから判断]

検出限界： 0.005 mg/kg [0.237 μL/L (24°C) のイソブチレン標準品のクロマトグラムから判断]

⑥ 定量限界 (図2、3)

0.01 mg/kg [1-メチルシクロプロペンの添加用ガス4573 $\mu\text{L/L}$ を0.197 mL添加での回収率及び無添加試料のクロマトから判断]

⑦ 無添加試料の妨害状況 (図3)

1-メチルシクロプロペン及びイソブチレンの近傍に大きなピークが検出されたが、測定を大きく妨害するピークは認められなかった。

⑧ マトリックス効果

無添加試料のマトリックスを含む標準溶液の調製が困難なため、マトリックス効果は未確認である。

9-2. GC-MS (確認)

① マススペクトル (図4)

1-メチルシクロプロペンのマススペクトルは m/z 54 (親イオン) が基準ピークとして検出された。その他に低質量側に、 m/z 39 (M-15) と27 (M-27) が検出された。以上から、 m/z 54、39、27を主なイオンに選定した。

② 測定条件

カラム : PoraBOND Q (Varian社) 、内径0.25 mm、長さ25 m、膜厚3 μm

カラム温度 : 50 $^{\circ}\text{C}$ (0分) $-20^{\circ}\text{C}/\text{分}$ -270°C (0分)

注入口温度 : 75 $^{\circ}\text{C}$

キャリアーガス : ヘリウム

イオン化モード (イオン化エネルギー) : EI (70 eV)

主なイオン (m/z) : 54、39、27

注入量 : 500 μL

保持時間の目安 : 4.9分

10. 考察

本試験法は、基準値対象作物である果実を対象とした分析法であるが、分析対象成分が気体であること、標準品が分析対象物質と異なること、抽出装置が特殊なこと等、通常の農薬分析とは異なる部分が多い。そのため試験法の注意点について、6項目を記載した。

11. 留意事項

本検討内容においては、抽出容器の体積を2.28 Lとして計算例を記載した。この体積値は、実際に作物残留試験において採用され、その当時の委託者提供情報に基づいたものである。そのため定量限界相当のイソブチレン濃度の理論値は0.492 $\mu\text{L/L}$ となり、検量線用ガスとして調製可能な0.486 $\mu\text{L/L}$ を定量限界相当濃度として設定した。しかし、後日試験委託者から提供され、試験法案にて採用した抽出装置図から算出される体積は2.225 Lであることから、試験法案では2.2 Lを採用することとし、そこから算出される定量限界相

当のイソブチレン濃度の理論値は0.515 $\mu\text{L/L}$ となり、検量線用ガスとして調製可能な0.511 $\mu\text{L/L}$ を定量限界相当濃度として設定した。

1 2. 結論

1-メチルシクロプロペン試験法として、密閉式の抽出容器内において、塩基性硫酸アンモニウム溶液で抽出し、気相中に生成した1-メチルシクロプロペンをGC (FID) で測定し、イソブチレン検量線による間接定量を行い、GC-MSで確認する方法を提案する。なし及びかき試料における添加回収試験（添加濃度0.01 mg/kg）での真度はそれぞれ91及び109%であり、併行精度はそれぞれ9.2及び5.6%であった。定量限界は0.01 mg/kgが可能であることが確認された。

1 3. 文献

- 1) 1-メチルシクロプロペンの試験法開発に用いた密閉容器の概要（資料1参照）
- 2) 1-メチルシクロプロペンの作物残留性試験結果報告「なし」（資料2参照）
- 3) 1-メチルシクロプロペンの作物残留性試験結果報告「かき」（資料3参照）