

※本報告書は、試験法開発における検討結果を取り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。

食品に残留する農薬等の成分である物質の 試験法開発業務報告書

シクロプロトリン試験法（農産物・水産物）

シクロプロトリン試験法(農産物・水産物)の検討結果

【緒言】

1. 目的及び試験法の検討方針等

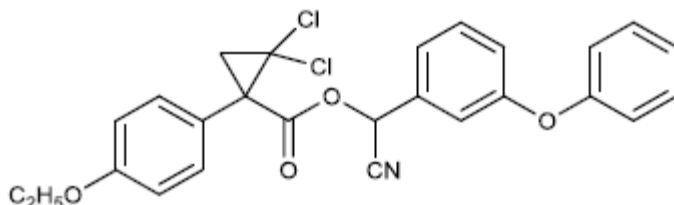
シクロプロトリンはピレスロイド系殺虫剤である。接触的に昆虫体内に浸透し、速やかに神経細胞の神経細胞膜に達し、Na チャネルを開口固定し異常興奮を惹起することで殺虫効果を発現すると考えられている。

農産物中のシクロプロトリンの試験法については、平成 18 年 10 月 3 日付け食安発第 1003001 号厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知において「LC/MS による農薬等の一斉試験法 I (農産物)」の分析対象化合物とされていたが、試験法の妥当性評価の結果、平成 26 年 11 月 26 日付け食安発 1126 第 1 号において除外された。その後、平成 29 年 6 月 20 日付け生食発 0620 第 1 号において、茶及びホップについてのみ分析対象化合物となったが、定量限界は 0.5 mg/kg とされている。このため、農産物については、「LC/MS による農薬等の一斉試験法 I (農産物)」¹⁾ (以下、通知一斉法) を元に、試料の濃縮率の変更について検討することとした。一方、水産物については既存の試験法がないことから、新たに検討することとした。

2. 分析対象化合物の構造式及び物理化学的性質*¹

分析対象化合物：シクロプロトリン (Cycloprothrin)

構造式：



分子式： C₂₆H₂₁Cl₂NO₄

分子量： 482.36

IUPAC 名： (RS)-α-Cyano-3-phenoxybenzyl(RS)-2,2-dichloro-1-(4-ethoxyphenyl)cyclopropanecarboxylate

CAS 名： Cyano(3-phenoxybenzyl)methyl 2,2-dichloro-1-(4-ethoxyphenyl)cyclopropanecarboxylate

CAS 番号： 63935-38-6

外観： 無色透明、粘稠液体※

融点： 1.8℃※

(※ 出典* 1 に基づく記載である。富士フィルム和光純薬 (株) によれば、外観は白色、結晶～結晶性粉末、融点は 75～81℃とされている。)

沸点： 測定不能

蒸気圧： 3.11×10⁻⁵ Pa 未満 (80℃)

溶解度 (20℃)：

水	0.32 mg/L
ヘキサン	12.4 g/L
トルエン	4589 g/L
ジクロロメタン	>5000 g/L
アセトン	>5000 g/L
メタノール	88.7 g/L
酢酸エチル	>5000 g/L

解離定数： 対水溶解度が低いため、試験不能

オクタノール/水分配係数： log Pow=4.19 (18℃)

熱安定性：150℃まで安定

加水分解性：半減期 1,153 日 (pH 4、25℃) 102-144 日 (pH 7、25℃) 1.4-1.6 日 (pH 9、25℃)

水中光分解性：pH 8.4 滅菌自然水 半減期 5.2-5.3 時間 (25℃、50.1 W/m²、300-400 nm)

(東京春季太陽光換算 1.2 日)

pH 7 滅菌緩衝液 半減期 3.4-6.3 時間 (25℃、50.1 W/m²、300-400 nm)

(東京春季太陽光換算 0.9-1.7 日)

3. 基準値*²

米 (玄米をいう。)	0.05 (ppm)
魚介類	0.4

[出典]

* 1 独立行政法人農林水産消費安全技術センター (FAMIC) シクロプロトリン農薬抄録

<http://www.acis.famic.go.jp/syouroku/cycloprothrin/index.htm>

* 2 平成 28 年 4 月 4 日 生食発 0404 第 2 号 厚生労働省医薬・生活衛生局生活衛生・食品安全部長通知

[実験方法]

1. 試料

検討に用いた試料のうち、玄米及びうなぎは新潟県産、しじみは青森県産のものを新潟県内の小売店で購入した。

玄米は、425 μm の標準網ふるいを通してミルで粉碎し均一化した。

うなぎは、そのままの状態に凍結したものを、検討時に解凍し、頭を除いた可食部 (内臓、骨及び皮を含む) を、ミルで細切均一化した。

しじみは、殻を除去し、得られたむき身を目の細かい金網にのせて約 5 分間水切りを行った後凍結したものを、検討時に解凍し、解凍時の浸出液を含めた全量をミルで細切均一化した。

2. 試薬・試液

シクロプロトリン標準品：純度 99.9% (富士フィルム和光純薬 (株) 製)

アセトニトリル、アセトン、*n*-ヘキサン：残留農薬試験用 (関東化学 (株) 製)

トルエン：残留農薬試験用 (富士フィルム和光純薬 (株) 製)

メタノール：残留農薬試験用 (関東化学 (株) 製) または LC/MS 用 (富士フィルム和光純薬 (株) 製)

ケイソウ土：セライト No.545 (富士フィルム和光純薬 (株) 製)

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム (1000 mg) : Bond Elut C18 (1 g / 6 mL, Agilent Technologies 製) (以下、C18 ミニカラム (1 g))

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム (2000 mg) : Bond Elut C18 (2 g / 12 mL, Agilent Technologies 製) (以下、C18 ミニカラム (2 g))

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 : InertSep PSA (500 mg / 6 mL, ジーエルサイエンス (株) 製) (以下、PSA ミニカラム)

グラファイトカーボン/アミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム : Supelclean ENVI-Carb/NH₂ (500 mg / 500 mg / 6 mL, MERCK 製) (以下、GC/NH₂ ミニカラム)

合成ケイ酸マグネシウムミニカラム : InertSep FL-PR (500 mg / 6 mL, ジーエルサイエンス (株) 製) (以下、FL ミニカラム)

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 : InertSep SAX (500 mg / 6 mL, ジーエルサイエンス (株) 製) (以下、SAX ミニカラム)

その他の試薬：特級（富士フイルム和光純薬（株）製または関東化学（株）製）

0.5 mol/L リン酸緩衝液（pH 7.0）：リン酸水素二カリウム（ K_2HPO_4 ）52.7 g 及びリン酸二水素カリウム（ KH_2PO_4 ）30.2 g を量り採り、水約 500 mL に溶解し、1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液又は 1 mol/L 塩酸を用いて pH を 7.0 に調整した後、水を加えて 1 L とした。

標準原液：シクロプロトリン標準品 20 mg を精秤し、アセトンで溶解して 1,000 mg/L 溶液を調製した。

中間標準液：標準原液をアセトンで希釈して 20 mg/L 溶液を調製した。

添加用標準溶液：中間標準液をアセトンで希釈して 4 mg/L、0.5 mg/L 及び 0.1 mg/L 溶液を調製した。

検量線用標準溶液：中間標準液をメタノールで適宜希釈して 0.005、0.01、0.015、0.02、0.025 及び 0.03 mg/L（定量限界濃度添加の場合）、0.025、0.05、0.075、0.1、0.125 及び 0.15 mg/L（玄米の基準値濃度添加の場合）並びに 0.2、0.4、0.6、0.8、1 及び 1.2 mg/L（うなぎ、しじみの基準値濃度添加の場合）の濃度の溶液を調製した。

3. 装置

ホモジナイザー：ULTRA-TURRAX T25（IKA 製）

濃縮装置：ロータリーエバポレーターN1100（東京理化工機（株）製）、

振とう器：SR-2DW（タイテック（株）製）

LC-MS/MS

装置	型式	メーカー
MS	Xevo-TQD	Waters
LC	ACQUITY UPLC I Class	Waters
データ処理	MassLynx	Waters

4. 測定条件

LC 条件																								
カラム	XTerra MS C18（内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3.5 μ m；Waters 製）																							
移動相流速（mL/min）	0.2																							
注入量（ μ L）	2																							
カラム温度（ $^{\circ}$ C）	40																							
移動相	A 液：5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 B 液：5 mmol/L 酢酸アンモニウム・メタノール溶液																							
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> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.00</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>3.00</td> <td>30</td> <td>70</td> </tr> <tr> <td>13.00</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>22.00</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>22.01</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>26.00</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> </tbody> </table>			時間（分）	A 液（%）	B 液（%）	0.00	90	10	3.00	30	70	13.00	10	90	22.00	10	90	22.01	90	10	26.00	90	10
時間（分）	A 液（%）	B 液（%）																						
0.00	90	10																						
3.00	30	70																						
13.00	10	90																						
22.00	10	90																						
22.01	90	10																						
26.00	90	10																						

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	ESI (+)
キャピラリ電圧 (V)	1000
ソース温度 (°C)	150
脱溶媒温度 (°C)	300
コーンガス	窒素、50 L/hr
脱溶媒ガス	窒素、900 L/hr
コリジョンガス	アルゴン
定量イオン (<i>m/z</i>)	+499.2→180.9 [コーン電圧 30 V、コリジョンエネルギー 40 eV]
定性イオン (<i>m/z</i>)	+499.2→257.1 [コーン電圧 30 V、コリジョンエネルギー 15 eV]
保持時間 (min)	12.9

5. 定量

検量線用標準溶液 2 μL を LC-MS/MS に注入して、得られたピーク面積を用いて検量線を作成した。試験溶液 2 μL を LC-MS/MS に注入し、検量線から絶対検量線法によりシクロプロトリンの含量を算出した。

6. 添加試料の調製

低濃度（添加濃度：0.01 mg/kg）の場合：試料 10.0 g に添加用標準溶液（0.1 mg/L）1 mL を添加し混合後、30 分間放置した。

高濃度（基準値濃度）の場合：試料に以下のとおり添加用標準溶液を添加し混合後、30 分間放置した。

玄米：10.0 g に添加用標準溶液（0.5 mg/L）1 mL を添加（添加濃度：0.05 mg/kg）

うなぎ、しじみ：10.0 g に添加用標準溶液（4 mg/L）1 mL を添加（添加濃度：0.4 mg/kg）

7. 試験溶液の調製

7-1. 農産物（穀類）の場合

概要

シクロプロトリンを試料からアセトニトリルで抽出し、塩析で水を除いた後、C18 ミニカラム（1 g）及び GC/NH₂ ミニカラムで精製し、LC-MS/MS で定量及び確認した。

(1) 抽出

試料 10.0 g に水 20 mL を加え、30 分間放置した。これにアセトニトリル 50 mL を加え、ホモジナイズした後、ケイソウ土を約 1 cm の厚さに敷いて吸引ろ過した。ろ紙上の残留物にアセトニトリル 20 mL を加え、ホモジナイズした後、同様に吸引ろ過した。得られたろ液を合わせ、アセトニトリルを加えて正確に 100 mL とした。この溶液から正確に 20 mL を分取し、塩化ナトリウム 10 g 及び 0.5 mol/L リン酸緩衝液（pH 7.0）20 mL を加え、5 分間振とうした。静置した後、分離した水層を捨てた。

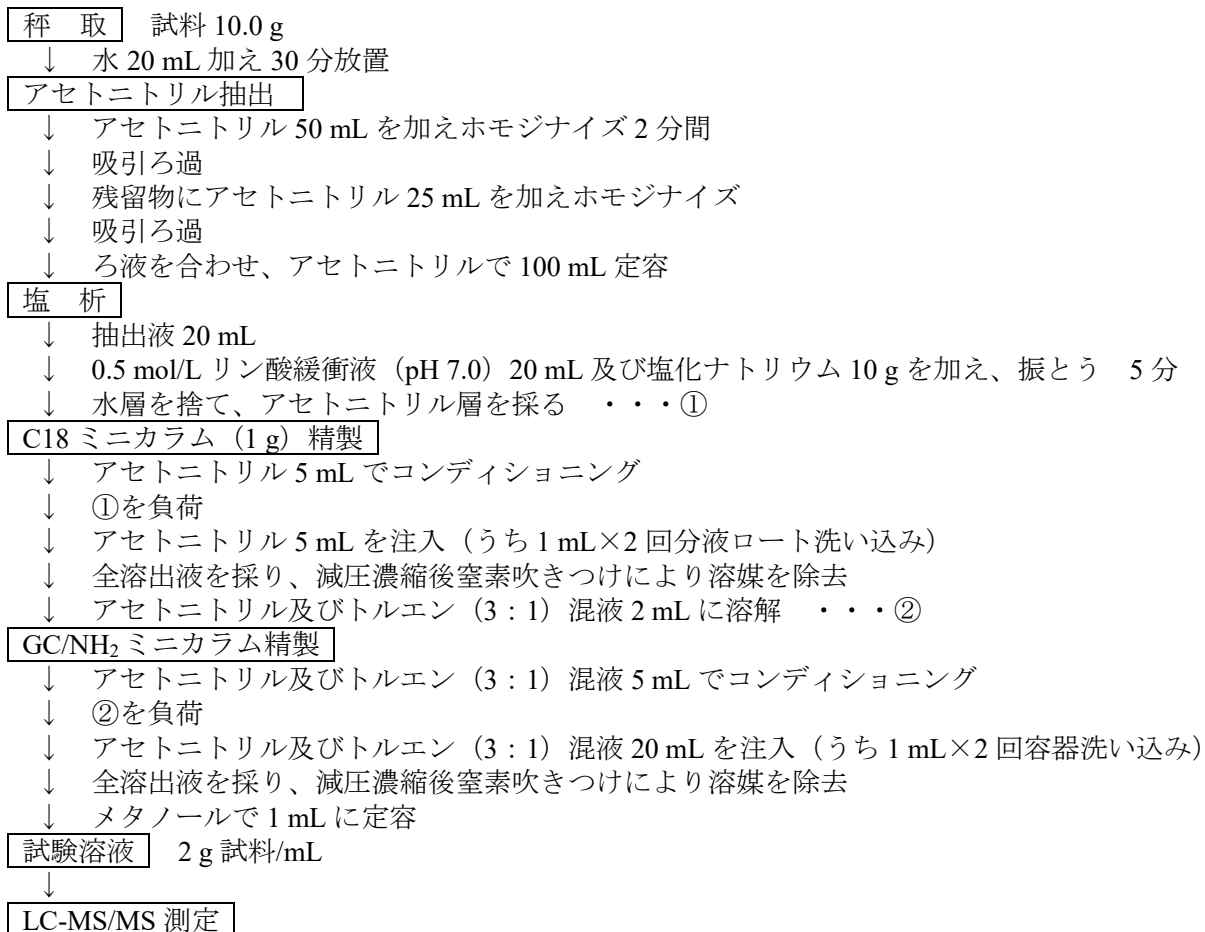
C18 ミニカラム（1 g）にアセトニトリル 5 mL を注入し、流出液は捨てた。このカラムに上記のアセトニトリル層を注入した後、使用した分液ロートをアセトニトリル 1 mL で 2 回洗って洗液を先のカラムに注入し、さらにアセトニトリル 3 mL をカラムに注入した。全溶出液を採り、40°C 以下で濃縮し、溶媒を除去した。残留物にアセトニトリル及びトルエン（3：1）混液 2 mL を加えて溶かした。

(2) 精製

GC/NH₂ ミニカラムに、アセトニトリル及びトルエン（3：1）混液 5 mL を注入し、流出液は捨てた。このカラムに（1）で得られた溶液を注入した後、容器をアセトニトリル及びトルエン（3：1）混液 1 mL で 2 回洗って洗液を先のカラムに注入し、さらにアセトニトリル及びトルエン（3：1）混液 18 mL

をカラムに注入した。全溶出液を 40℃以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物をメタノールに溶かし、正確に 1 mL としたものを試験溶液とした。

[分析法フローチャート（農産物（穀類）の場合）]



7-2. 水産物の場合

概要

シクロプロトリンを試料からアセトンで抽出し、*n*-ヘキサンに転溶、アセトニトリル/ヘキサン分配で脱脂した後、C18 ミニカラム (2 g) 及び PSA ミニカラムで精製し、LC-MS/MS で定量及び確認した。

(1) 抽出

試料 10.0 g にアセトン 50 mL を加えてホモジナイズした後、ケイソウ土を約 1 cm の厚さに敷いて吸引ろ過した。ろ紙上の残留物にアセトン 25 mL を加えてホモジナイズした後、同様に吸引ろ過した。得られたろ液を合わせ、アセトンを加えて正確に 100 mL とした。この溶液から正確に 20 mL を分取し、10 w/v% 塩化ナトリウム溶液 100 mL を加え、*n*-ヘキサン 50 mL 及び 25 mL で 2 回振とう抽出した。抽出液を合わせ、無水硫酸ナトリウムを加えて脱水し、無水硫酸ナトリウムをろ別した後、ろ液を 40℃以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物を *n*-ヘキサン 30 mL を用いて分液ロートに洗い込み、*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 1 mL 以下に濃縮した。

(2) 精製

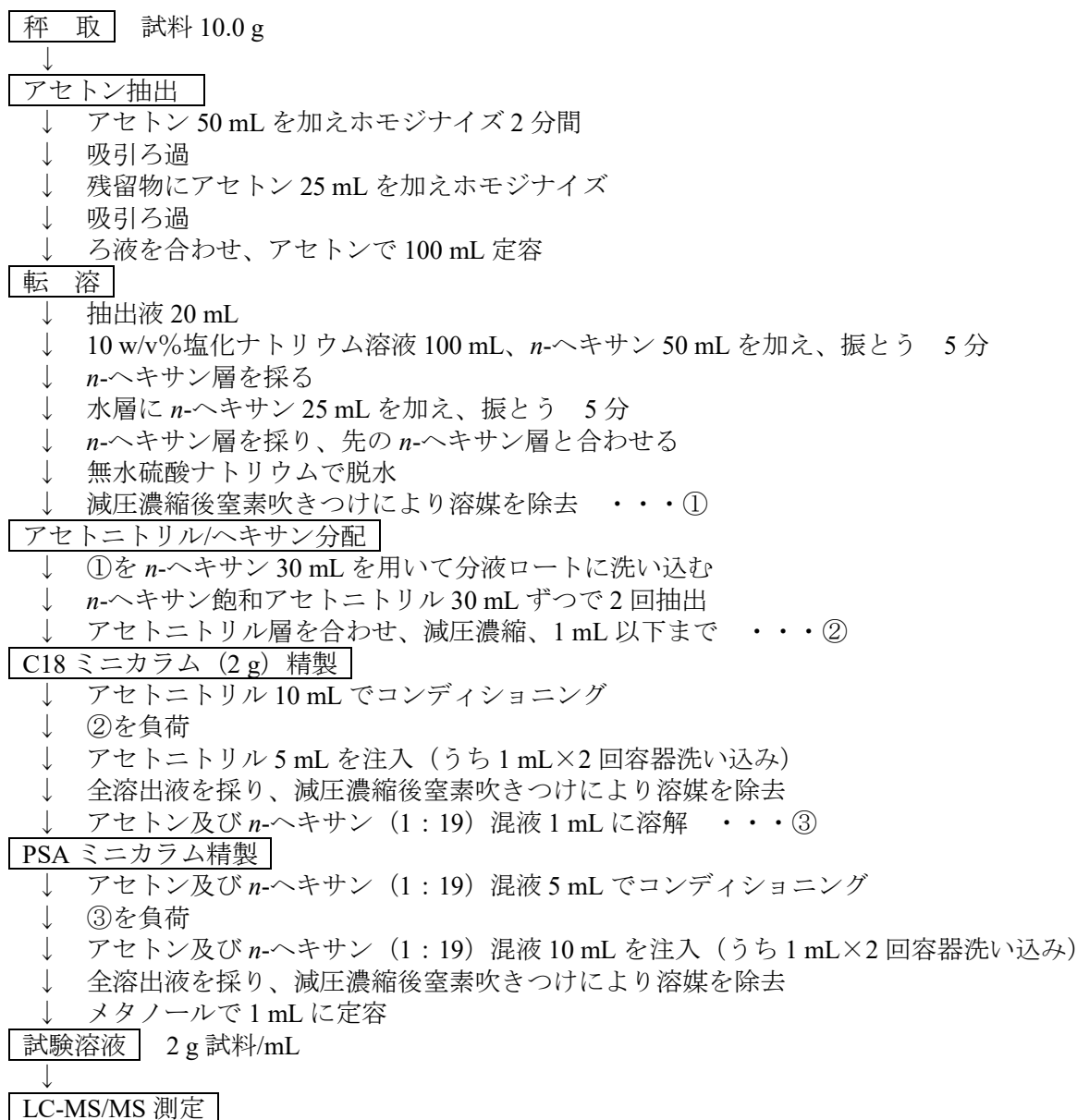
① オクタデシルシリル化シリカゲルカラムクロマトグラフィー

C18 ミニカラム (2 g) にアセトニトリル 10 mL を注入し、流出液は捨てた。このカラムに (1) で得られた溶液を注入した後、容器をアセトニトリル 1 mL で 2 回洗って洗液を先のカラムに注入し、さらに、アセトニトリル 3 mL をカラムに注入した。全溶出液を採り、40°C以下で濃縮し、溶媒を除去した。残留物にアセトン及び *n*-ヘキサン (1 : 19) 混液 1 mL を加えて溶かした。

② エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルカラムクロマトグラフィー

PSA ミニカラムにアセトン及び *n*-ヘキサン (1 : 19) 混液 5 mL を注入し、流出液は捨てた。このカラムに①で得られた溶液を注入した後、容器をアセトン及び *n*-ヘキサン (1 : 19) 混液 1 mL で 2 回洗って洗液を先のカラムに注入し、さらに、アセトン及び *n*-ヘキサン (1 : 19) 混液 8 mL をカラムに注入した。全溶出液を採り、40°C以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物をメタノールに溶かし、正確に 1 mL としたものを試験溶液とした。

[分析法フローチャート (水産物の場合)]



8. マトリックス添加標準溶液の調製

ブランク試料の試験溶液について、操作フローの最終段階で、各試料の添加回収試験における回収率100%相当濃度になるよう検量線用標準溶液を加えたものをマトリックス添加標準溶液とした。

[結果及び考察]

1. LC-MS/MS 測定条件の検討

(1) MS 条件の検討

MS 条件についてインフュージョン測定により検討した。検討には、5 mmol/L 酢酸アンモニウム・メタノール溶液で調製したシクロプロトリン標準液 (10 mg/L) を用いた。

シクロプロトリンは ESI (+) モードでコーン電圧 30 V とした場合に、アンモニウムイオン付加分子 ($[M+NH_4]^+$) である m/z 499.2 を良好に検出できたため、これをプリカーサーイオンとし、コリジョンエネルギーを変えてプロダクトイオンを確認した。また、塩素の安定同位体由来する m/z 501.1 をプリカーサーイオンとした場合のプロダクトイオンについても確認した。イオン強度の高いものから定量イオン、定性イオンを選択し、 m/z +499.2→180.9 を定量用、 m/z +499.2→257.1 を定性用とした。図 1 にマスペクトル、図 2 にプロダクトイオンスペクトルを示した。

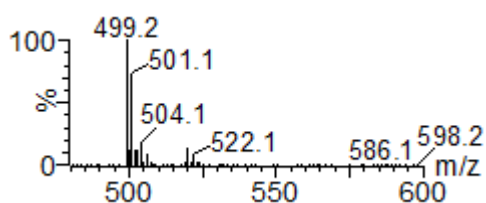


図 1 シクロプロトリンのマスペクトル

(ESI (+)、cone voltage=30 V、スキャン範囲：470~600 amu)

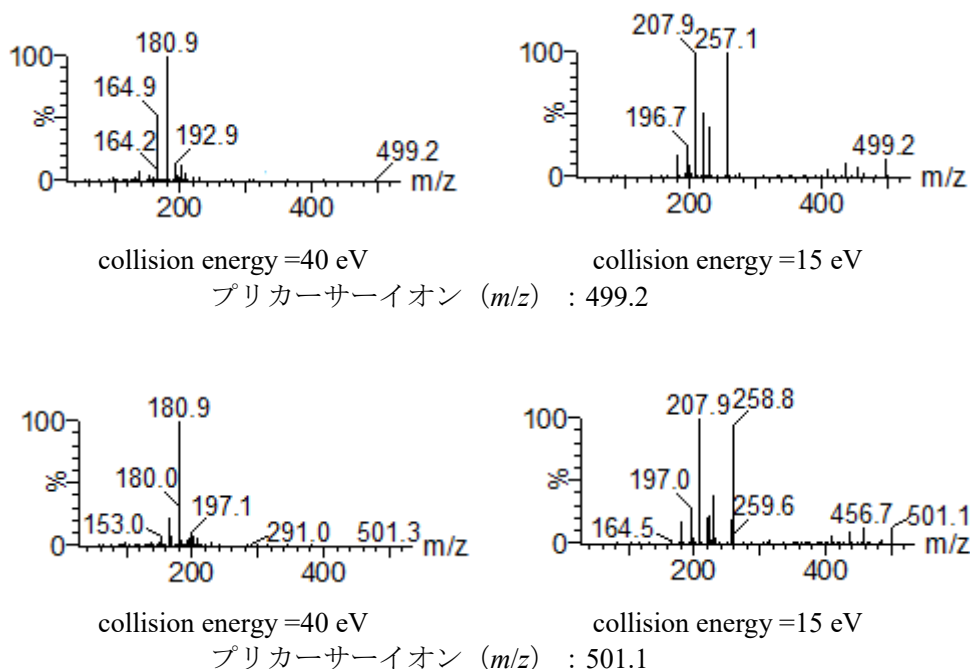


図 2 シクロプロトリンのプロダクトイオンスペクトル

(ESI (+)、cone voltage=30 V、スキャン範囲：50~520 amu)

(2) LC 条件の検討

分析カラムについて、XTerra MS C18（内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3.5 μm ：Waters 製）を用いて検討を行った。アンモニウムイオン付加分子をターゲットとすることから、移動相はアンモニウムイオンを含むものとし、通知一斉法の移動相条件を参考に、酢酸アンモニウムを含む溶媒を用いることとした。移動相をメタノール混液とした場合とアセトニトリル混液とした場合では、メタノール混液の方が 10 倍以上高いイオン強度が得られた。そこで、A 液；5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液、B 液；5 mmol/L 酢酸アンモニウム・メタノール溶液として条件を検討した。

シクロプロトリンは、アイソクラティック条件（B；85%）では約 5 分で溶出したが、図 3 に示したように、ピーク形状がややブロードとなった。このためグラジエント条件とし、通知一斉法に例示されているものより測定時間を短縮するよう、B；10%（0 分）→70%（3 分）→90%（13-22 分）の条件で以後の検討を試みることにした。

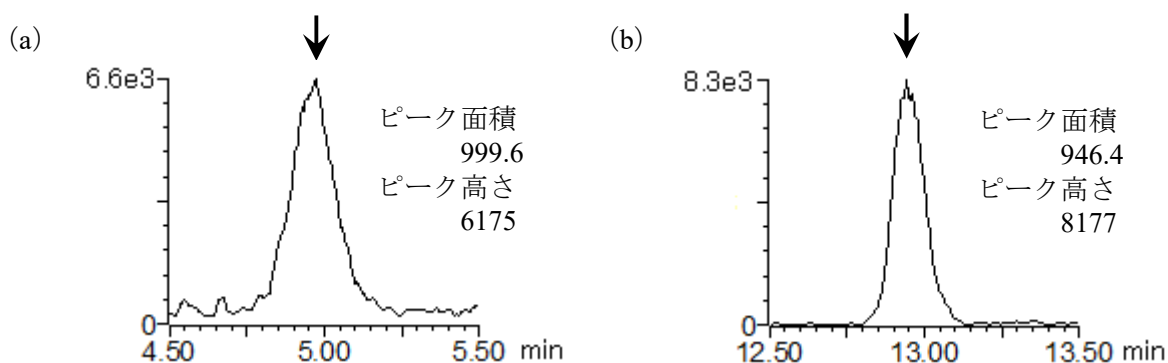


図 3 移動相条件によるシクロプロトリンのピーク形状の違い

(0.02 mg/L シクロプロトリン標準溶液の SRM クロマトグラム m/z 499.2→180.9)

- (a) アイソクラティック条件（A 液；5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液、B 液；5 mmol/L 酢酸アンモニウム・メタノール溶液、B；85%）
- (b) グラジエント条件（実験方法 4.測定条件のとおり）

(3) 検量線

図 4 に検量線の例を示した。0.005~0.03 mg/L、0.025~0.15 mg/L、0.2~1.2 mg/L の濃度範囲で作成した検量線の決定係数は、いずれも 0.99 以上であり良好な直線性を示した。

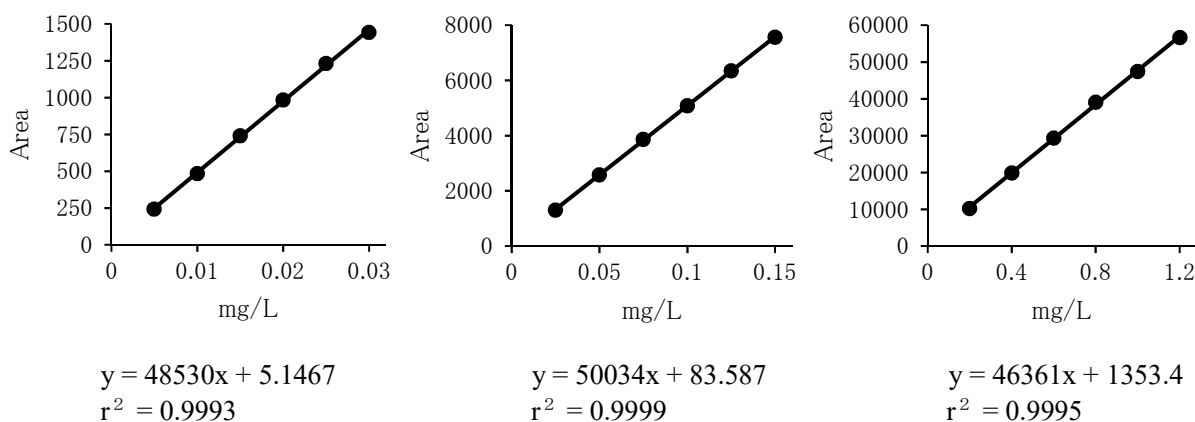


図 4 シクロプロトリン検量線の例

(4) 定量限界

定量限界の算出結果を以下に示した。

$$0.01 \text{ mg/kg} \left[\frac{\text{試験溶液量 (1 mL)}}{\text{試験溶液中の試料量 (2 g)}} \times \frac{\text{分析対象化合物の定量限界相当量 (0.04 ng)}}{\text{注入量 (2 } \mu\text{L)}} \right]$$

2. 試験溶液調製法の検討

2-1. 農産物（穀類）

農産物（穀類）については、通知一斉法に準拠し、試料濃縮率を変更することを検討した。

標準液を測定した結果、0.001 mg/L は検出困難であったが、0.005 mg/L は安定して検出できたため、これを検量線の最小濃度（回収率 25%相当）に設定し、0.01 mg/kg 添加試料の測定時濃度が 0.02 mg/L となる濃縮率で定量可能か検討することとした。これは、通知一斉法に従ったときの 4 倍濃縮に相当する。

結果は、後述の添加回収試験結果に示す。

2-2. 水産物

(1) 抽出条件の検討

水産物については、脂肪分を考慮して、アセトンを用いた抽出を検討した。うなぎ及びしじみを用いた試験で、操作上、特に問題は認められず、後述する添加回収試験でも良好な結果が得られたことから、アセトン抽出溶媒とした。

(2) 転溶条件の検討

試料のアセトン抽出液を分取して濃縮せずに直接転溶することを前提に検討した。0.005 mg/L シクロプロトリン・アセトン溶液 20 mL に、10 w/v% 塩化ナトリウム溶液 50 mL を加え、*n*-ヘキサン 50 mL 及び 25 mL で 2 回振とう抽出を行った。抽出液をそれぞれ無水硫酸ナトリウムで脱水後溶媒を除去し、メタノールで 1 mL に定容して測定した。その結果、表 1 に示すとおり、1 回目の抽出でほぼ全量回収され、2 回目の抽出液からはシクロプロトリンは検出されなかった。

しじみ試料のアセトン抽出液を 20 mL 分取し、10 w/v% 塩化ナトリウム溶液 50 mL を加え、*n*-ヘキサン 50 mL で振とう抽出を試みたところ、静置後、*n*-ヘキサン層の分離に時間がかかったため、10 w/v% 塩化ナトリウム溶液の量を倍にして再度検討した。

上記と同様の方法で、10 w/v% 塩化ナトリウム溶液の量のみ 100 mL として検討した。その結果、表 1 に示すとおり、1 回目の抽出でほぼ全量回収されたが、2 回目の抽出でも微量のシクロプロトリンが回収された。

しじみ試料のアセトン抽出液を 20 mL 分取し、10 w/v% 塩化ナトリウム溶液 100 mL を加え、*n*-ヘキサン 50 mL で振とう抽出を試みたところ、静置後速やかに *n*-ヘキサン層が分離したときと、分離が遅いときがあった。分離が遅いときでも、10~15 分静置することで概ね分離したことから、10 w/v% 塩化ナトリウム溶液 100 mL を加えて *n*-ヘキサン 50 mL 及び 25 mL で 2 回抽出する条件を採用した。

表 1 *n*-ヘキサン転溶の検討結果

水層	転溶溶媒	回収率 (%)
10 w/v% 塩化ナトリウム溶液 50 mL	<i>n</i> -ヘキサン 50 mL (1 回目)	107.8
	<i>n</i> -ヘキサン 25 mL (2 回目)	0.0
	計	107.8
10 w/v% 塩化ナトリウム溶液 100 mL	<i>n</i> -ヘキサン 50 mL (1 回目)	102.1
	<i>n</i> -ヘキサン 25 mL (2 回目)	0.2
	計	102.3

(3) 脱脂条件の検討

アセトニトリル/ヘキサン分配について、回収率を確認した。*n*-ヘキサン 30 mL に 10 mg/L シクロプロトリン・アセトニトリル溶液 20 μ L を添加し、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL ずつで 3 回抽出した。その結果、表 2 に示すとおり、1 回目の抽出で概ね回収され、3 回目の抽出は不要と考えられたため、アセトニトリル/ヘキサン分配は 2 回とした。

表 2 アセトニトリル/ヘキサン分配の検討結果

アセトニトリル層	回収率 (%)
1 回目	102.1
2 回目	2.7
3 回目	0.0
計	104.8

(4) C18 ミニカラム精製の検討

表 3 及び表 4 に、C18 ミニカラムからのシクロプロトリンの溶出状況の検討結果を示した。

表 3 の結果から、C18 ミニカラム (1 g) を用いてアセトニトリル 3 mL で溶出する条件で、しじみ試料 (実験方法 7-2 に従ってアセトニトリル/ヘキサン分配まで操作し濃縮したもの) の精製を試みた結果、着色成分の溶出が若干見られたが次の PSA ミニカラム精製で除去できた。しかし、C18 ミニカラム (1 g) の製造ロットが別のものになったときに、濃色の成分が保持されず溶出され、次の PSA ミニカラム精製でも除去できないことがあった。このため、着色成分を十分に保持させて除去できるように、C18 ミニカラム (2 g) を用いることを検討した。

C18 ミニカラム (2 g) を用いてアセトニトリル 5 mL で溶出する条件で、上記と同様にしじみ試料の精製を試みた結果、着色成分の溶出は若干見られたが次の PSA ミニカラム精製で除去できた。この結果から、C18 ミニカラム (2 g) を用いてアセトニトリル 5 mL で溶出する条件を採用した。

表 3 C18 ミニカラム (1 g) からの溶出状況

溶出条件		回収率 (%)
負荷時 (0.1 mg/L シクロプロトリン・アセトニトリル溶液 1 mL)	—	0.0
アセトニトリル	0-1 mL	61.0
	1-2 mL	35.5
	2-3 mL	1.4
	3-4 mL	0.0
	4-5 mL	0.0
計		97.9

表 4 C18 ミニカラム (2 g) からの溶出状況

溶出条件		回収率 (%)
負荷時 (0.1 mg/L シクロプロトリン・アセトニトリル溶液 1 mL)	—	0.0
アセトニトリル	0-1 mL	0.0
	1-2 mL	24.9
	2-3 mL	66.0
	3-4 mL	3.2
	4-5 mL	0.0
計		94.1

(5) PSA ミニカラム精製の検討

表 5 に、PSA ミニカラムからのシクロプロトリンの溶出状況の検討結果を示した。

表 5 PSA ミニカラムからの溶出状況

溶出条件		回収率 (%)
アセトン及び <i>n</i> -ヘキサン (1 : 99) 混液	0- 5 mL	0.0
	5-10 mL	0.0
	10-15 mL	51.2
	15-20 mL	42.1
計		93.3
アセトン及び <i>n</i> -ヘキサン (1 : 49) 混液	0- 5 mL	0.0
	5-10 mL	78.8
	10-15 mL	16.5
	15-20 mL	0.0
計		95.3
アセトン及び <i>n</i> -ヘキサン (1 : 19) 混液	0- 5 mL	90.5
	5-10 mL	11.6
	10-15 mL	0.0
	15-20 mL	0.0
計		102.1

いずれも *n*-ヘキサン 5 mL コンディショニング後、
10 mg/L シクロプロトリン・ヘキサン溶液 20 μL 負荷。
各フラクションを濃縮、溶媒除去後メタノール 2 mL 定容して測定。

表 5 の結果を元に、しじみ試料について表 6 に示す条件で精製条件を検討した。

その結果、洗浄操作のフラクションからシクロプロトリンは検出されなかったにも関わらず、洗浄操作を行わない条件が最も良好な回収率となった。この原因について、残留物の溶解時に、外観上は *n*-ヘキサン 1 mL で溶けていると思われたが実際には不溶分が残っており、容器の洗い込み操作にアセトンを含む溶媒を用いたことで回収率が改善したものと推測した。そこで、C18 ミニカラム (2 g) 精製後溶媒除去した残留物をアセトン及び *n*-ヘキサン (1 : 19) 混液 1 mL に溶解して PSA ミニカラムに注入し、同混液 10 mL で溶出することとした。

表 6 PSA ミニカラムによる精製条件の検討

溶出条件	回収率 (%)
負荷後 <i>n</i> -ヘキサン 5 mL 溶出 (洗浄) (うち、1 mL×2 回容器洗い込み)	0.0
アセトン及び <i>n</i> -ヘキサン (1 : 19) 混液 10 mL 溶出	60.2
負荷後アセトン及び <i>n</i> -ヘキサン (1 : 99) 混液 5 mL 溶出 (洗浄) (うち、1 mL×2 回容器洗い込み)	0.0
アセトン及び <i>n</i> -ヘキサン (1 : 19) 混液 10 mL 溶出	72.5
負荷後アセトン及び <i>n</i> -ヘキサン (1 : 19) 混液 10 mL 溶出 (うち、1 mL×2 回容器洗い込み)	94.8

いずれも *n*-ヘキサン 5 mL コンディショニング後、しじみ試料 (0.4 mg/kg 添加) を
実験方法 7-2 に従って C18 ミニカラム (2 g) 精製・溶媒除去まで操作し、*n*-ヘキサン
1 mL に溶解したものを負荷。
各フラクションを濃縮、溶媒除去後メタノール 1 mL 定容して測定。

3. 添加回収試験

玄米、うなぎ、しじみの3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。

低濃度(0.01 mg/kg) 添加の添加回収試験における回収率100%相当の標準溶液、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5~10に示した。また、各食品のブランク試料のスクリー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11に示した。

(1) 選択性

選択性の検討結果を表7に示した。玄米、うなぎ、しじみのいずれもシクロプロトリンの保持時間付近に妨害となるピークは見られず、選択性の評価基準に適合した。

表7 選択性の評価

分析対象化合物	食品名	定量限界 (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)		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)
				基準値	0.05			n=1	n=2	平均(a)	n=1	n=2	平均(b)		
シクロプロトリン	玄米	0.01	0.05	基準値	0.05	< 0.100	面積	0	0	0			#DIV/0!	#DIV/0!	○
	うなぎ	0.01	0.4	基準値	0.4	< 0.100	面積	0	0	0			#DIV/0!	#DIV/0!	○
	しじみ	0.01	0.4	基準値	0.4	< 0.100	面積	0	0	0			#DIV/0!	#DIV/0!	○

*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)は求めなくてもよい。

*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8に示した。真度は、81.5~98.8%と概ね良好な結果であった。併行精度は、すべて10 RSD%未満であった。

低濃度(0.01 mg/kg) 添加時のシクロプロトリンのピークのS/Nは、最低103であり、S/N 10以上の感度が得られた。

表8 真度、精度及び定量限界の評価

分析対象化合物	食品名	定量限界 (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		
						傾き	切片	r ² 値	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5			Max.	Min.	平均値
						シクロプロトリン	玄米	0.01	0.05	0.01	S/N	45335	18			0.9992	98.7	95.2
玄米	0.01	0.05	0.05	—	50034		84	0.9999	86.6	86.6	88.2	87.4	89.8	87.7	1.5			—
うなぎ	0.01	0.4	0.01	S/N	48530		5	0.9993	89.1	86.6	83.7	82.4	87.4	85.8	3.2	147.8	110.9	129.4
うなぎ	0.01	0.4	0.4	—	46361		1353	0.9995	79.4	82.4	83.4	83.0	82.9	82.2	2.0			—
しじみ	0.01	0.4	0.01	S/N	47390		-10	0.9998	73.3	80.6	86.5	80.2	86.9	81.5	6.8	135.0	108.7	121.8
しじみ	0.01	0.4	0.4	—	40879		838	0.9996	98.3	97.4	100.6	95.3	102.4	98.8	2.8			—

*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、表9に示した。試料マトリックスの影響を補正した真度を表10に示した。

溶媒標準のピーク面積に対するマトリックス添加標準溶液のピーク面積の比は、0.97~1.03であり、試料マトリックスの影響はほとんどなかった。

表9 試料マトリックスの測定への影響

分析対象化合物	食品名	定量限界 (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	
シクロプロトリン	玄米	0.01	0.05	0.01	0.02	面積	0	952.6	935.8	944	931	912	921	1.03
	玄米	0.01	0.05	0.05	0.1	面積	0	5032.7	5079.3	5056	5156	5242	5199	0.97
	うなぎ	0.01	0.4	0.01	0.02	面積	0	1006.7	1021.5	1014	1035	1039	1037	0.98
	うなぎ	0.01	0.4	0.4	0.8	面積	0	37338.2	38433.8	37886	39296	37993	38644	0.98
	しじみ	0.01	0.4	0.01	0.02	面積	0	985.1	1028.6	1007	981	1043	1012	0.99
	しじみ	0.01	0.4	0.4	0.8	面積	0	34954.3	33002.3	33978	34280	32743	33512	1.01

*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。

表10 補正真度

分析対象化合物	食品名	添加濃度 (mg/kg)	真度 (%)	ピーク面積比	補正真度 (%)
シクロプロトリン	玄米	0.01	95.0	1.03	92.2
	玄米	0.05	87.7	0.97	90.4
	うなぎ	0.01	85.8	0.98	87.6
	うなぎ	0.4	82.2	0.98	83.9
	しじみ	0.01	81.5	0.99	82.3
	しじみ	0.4	98.8	1.01	97.8

ピーク面積比 = マトリックス添加標準のピーク面積 / 溶媒標準のピーク面積

補正真度 = 真度 / ピーク面積比

なお、参考として、玄米のマトリックス添加標準溶液 (0.01 mg/kg 添加相当) について、通知一斉法に例示されているとおりのグラジエント条件 (B 液; 15% (0 分) - 40% (1 分) - 40% (3.5 分) - 50% (6 分) - 55% (8 分) - 95% (17.5 分) - 95% (35 分)) での測定も試みた。その結果、溶媒標準のピーク面積に対するマトリックス添加標準溶液のピーク面積の比は、1.00 であり、このグラジエント条件でも問題なく定量可能と推測された。

4. その他の試験法検討に関連する事項

(1) GC/NH₂ ミニカラムからの溶出状況の確認

GC/NH₂ ミニカラムからのシクロプロトリンの溶出状況を確認した結果を表 11 に示した。シクロプロトリンはアセトニトリル及びトルエン (3 : 1) 混液 5 mL で溶出可能であった。他の農薬と同時に測定する可能性を考慮し、今回の添加回収試験は通知一斉法に準拠して溶出液量 20 mL で行ったが、シクロプロトリンのみを測定対象とするのであれば溶出液量は 5 mL で足りると考えられた。

表 11 GC/NH₂ ミニカラムからの溶出状況

溶出条件		回収率 (%)
負荷時	-	} 98.6
アセトニトリル及びトルエン (3 : 1) 混液	0-5 mL	
	5-10 mL	
	10-15 mL	
	15-20 mL	
計		98.6

アセトニトリル及びトルエン (3 : 1) 混液 5 mL コンディショニング後、0.1 mg/L シクロプロトリン・[アセトニトリル及びトルエン (3 : 1)] 溶液 2 mL 負荷。各フラクションを濃縮、溶媒除去後メタノール 1 mL 定容して測定。

(2) その他のミニカラムからの溶出状況及の確認

SAX ミニカラム及び FL ミニカラムからのシクロプロトリンの溶出状況を確認した結果を表 12 及び表 13 に示した。

表 12 SAX ミニカラムからの溶出状況

溶出条件		回収率 (%)
アセトン及び <i>n</i> -ヘキサン (1 : 49) 混液	0- 5 mL	0.0
	5-10 mL	0.0
	10-15 mL	45.7
	15-20 mL	49.2
計		94.9
アセトン及び <i>n</i> -ヘキサン (1 : 19) 混液	0- 5 mL	69.3
	5-10 mL	28.2
	10-15 mL	0.0
	15-20 mL	0.0
計		97.5

いずれも *n*-ヘキサン 5 mL コンディショニング後、
10 mg/L シクロプロトリン・ヘキサン溶液 20 µL 負荷。
各フラクションを濃縮、溶媒除去後メタノール 2 mL 定容して測定。

表 13 FL ミニカラムからの溶出状況

溶出条件		回収率 (%)
<i>n</i> -ヘキサン	5 mL	0.0
アセトン及び <i>n</i> -ヘキサン (1 : 9) 混液	5 mL	92.3
アセトン及び <i>n</i> -ヘキサン (3 : 7) 混液	5 mL	1.7
アセトン及び <i>n</i> -ヘキサン (1 : 1) 混液	5 mL	0.0
計		94.0
アセトン及び <i>n</i> -ヘキサン (1 : 99) 混液	0- 5 mL	9.7
	5-10 mL	58.0
	10-15 mL	28.7
	15-20 mL	6.7
計		103.1
アセトン及び <i>n</i> -ヘキサン (1 : 19) 混液	0- 5 mL	101.6
	5-10 mL	3.4
	10-15 mL	0.0
	15-20 mL	0.0
計		105.0

いずれも *n*-ヘキサン 5 mL コンディショニング後、
10 mg/L シクロプロトリン・ヘキサン溶液 20 µL 負荷。
各フラクションを濃縮、溶媒除去後メタノール 2 mL 定容して測定。

(3) 各ミニカラムによる精製効果の確認

PSA ミニカラム、SAX ミニカラム、FL ミニカラムについて、精製効果を以下の方法で検討した。

しじみのブランク試料について、実験方法 7. 試験溶液の調製に従って抽出、*n*-ヘキサン転溶した後、アセトニトリル/ヘキサン分配は行わず、C18 ミニカラム (1 g) 精製 (アセトニトリル 3 mL 溶出)

後、各ミニカラムを用いて表 14 に記載の条件で溶出した。溶出液を減圧濃縮、溶媒除去後、0.02 mg/L となるよう標準液を添加してメタノールで正確に 1 mL とし、マトリックス添加標準液とした。これをメタノールで調製した標準液（溶媒標準）と比較した。なお、このときの LC への注入量は 5 μ L とした。

結果を表 14 に示した。この結果から、いずれの条件でも試料マトリックスの影響が見られ、精製不十分と考えられた。特に FL ミニカラムを用いた場合に精製不足であった。PSA ミニカラムと SAX ミニカラムは同程度の結果であったが、PSA ミニカラムの方が SAX ミニカラムよりも自然流下での通液がやや速く、扱いやすかったため、PSA ミニカラムを用いて検討を進めることとした。

表 14 各ミニカラムの精製効果

精製条件	ピーク面積比
PSA ミニカラム； アセトン及び <i>n</i> -ヘキサン（1：19）混液 10 mL 溶出	0.79
SAX ミニカラム； アセトン及び <i>n</i> -ヘキサン（1：19）混液 10 mL 溶出	0.78
FL ミニカラム； アセトン及び <i>n</i> -ヘキサン（1：19）混液 7 mL 溶出	0.50

ピーク面積比＝マトリックス添加標準のピーク面積／溶媒標準のピーク面積
（いずれも 0.02 mg/L）。

5. 考察

真度、併行精度とも良好な結果が得られており、今回開発した試験法が有用と考えられた。

定量限界については、0.01 mg/kg 添加時の真度、併行精度が評価基準に適合し、かつ、S/N 10 以上が得られたことから、0.01 mg/kg を定量限界として設定可能と判断した。

なお、今回、玄米については通知一斉法の 4 倍濃縮としたが、0.01 mg/kg 添加試料で S/N は 100 以上あり、これを 4 倍希釈した場合、計算上は S/N 25 以上である。一斉試験法では多成分に対応する SRM 条件が必要なため、これよりも感度が低くなる可能性が考えられるが、高性能の測定機器を用いるなど装置条件によっては通知一斉法をそのまま適用することも可能と推測する。

【結論】

農産物中のシクロプロトリンの試験法として、通知一斉法に準拠し濃縮率のみ変更した方法について、玄米に適用した結果、真度 87.7～95.0%であり、良好な結果が得られた。また、水産物中のシクロプロトリン試験法として、試料からアセトンで抽出し、*n*-ヘキサンに転溶後、アセトニトリル/ヘキサン分配で脱脂し、C18 ミニカラム及び PSA ミニカラムで精製し、LC-MS/MS で定量及び確認する方法を開発した。開発した試験法をうなぎ及びしじみに適用した結果、真度は 81.5～98.8%であり、良好な結果が得られた。いずれも定量限界として 0.01 mg/kg を設定可能であることが確認された。

【参考文献】

- 1) 厚生労働省医薬・生活衛生局生活衛生・食品安全部長通知 生食発第 0620 第 1 号「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について」の一部改正について別紙 2「LC/MS による農薬等の一斉試験法 I（農産物）」（平成 29 年 6 月 20 日）

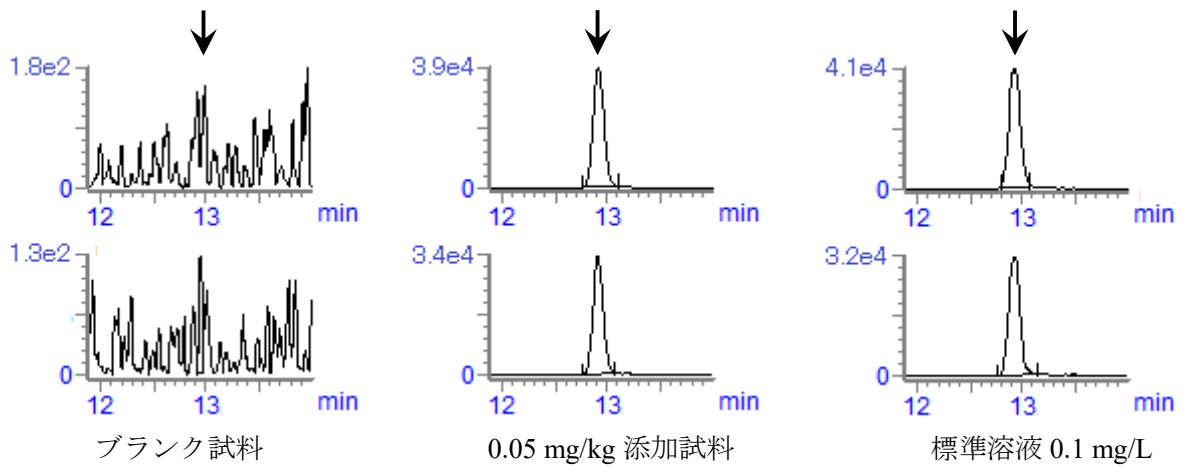


図5 玄米のSRMクロマトグラム（基準値濃度）
 （上（定量） m/z 499.2→180.9、下（定性） m/z 499.2→257.1）

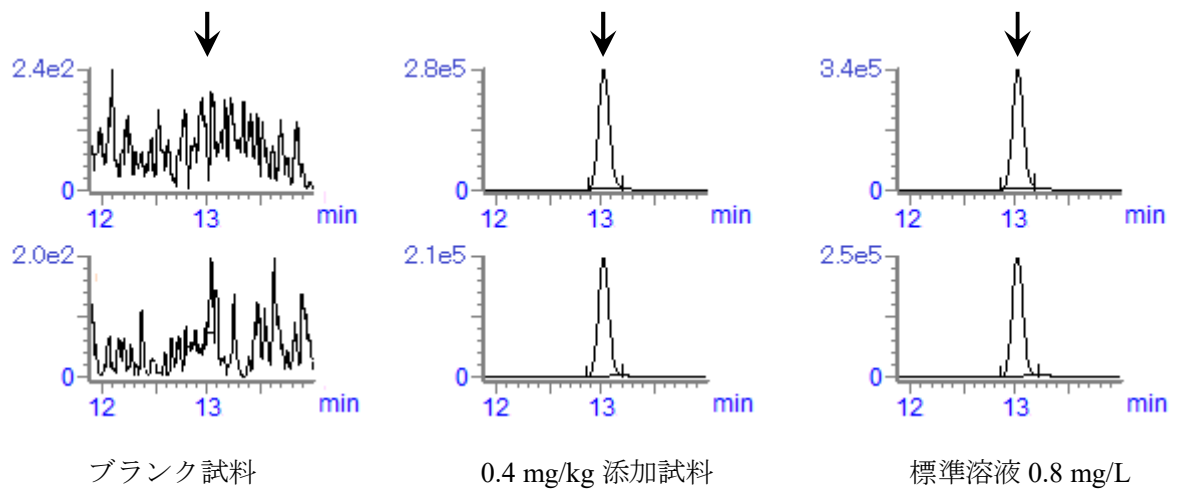


図6 うなぎのSRMクロマトグラム（基準値濃度）
 （上（定量） m/z 499.2→180.9、下（定性） m/z 499.2→257.1）

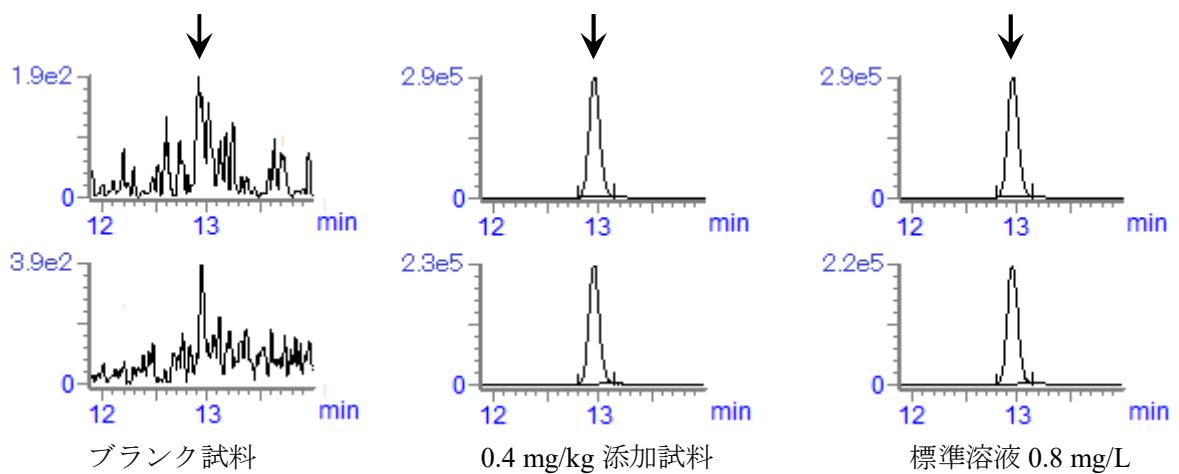


図7 しじみのSRMクロマトグラム（基準値濃度）
 （上（定量） m/z 499.2→180.9、下（定性） m/z 499.2→257.1）

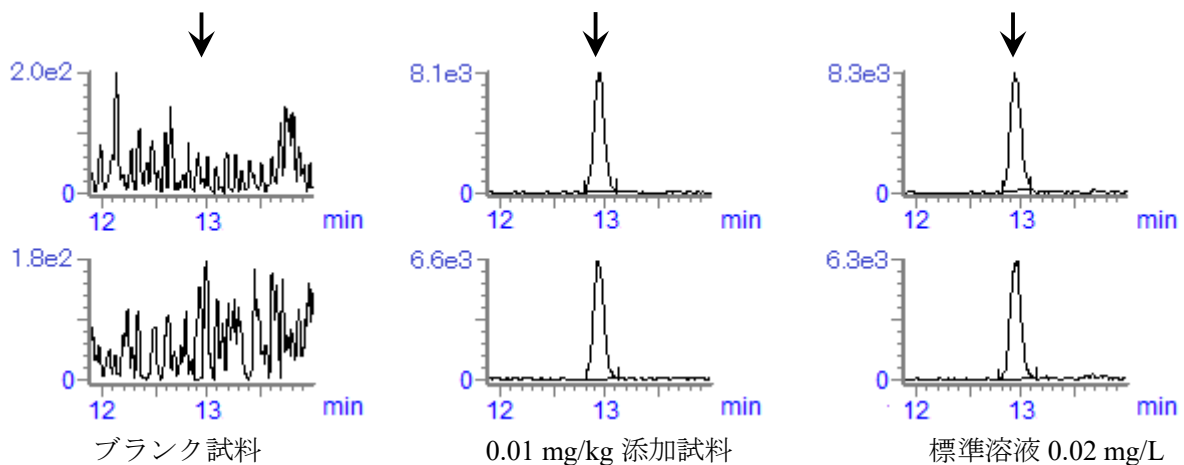


図8 玄米のSRMクロマトグラム (定量限界濃度)
 (上 (定量) m/z 499.2→180.9、下 (定性) m/z 499.2→257.1)

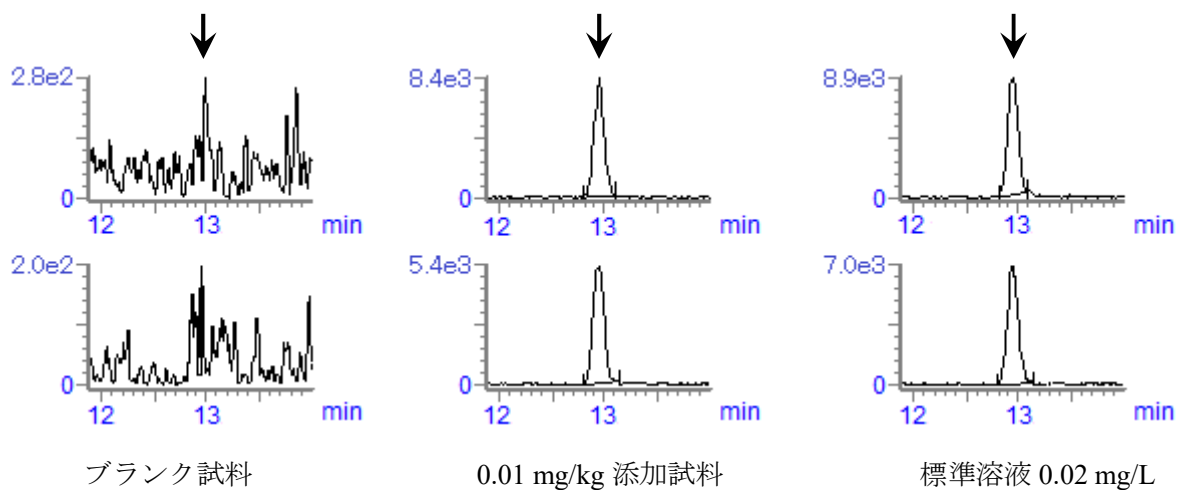


図9 うなぎのSRMクロマトグラム (定量限界濃度)
 (上 (定量) m/z 499.2→180.9、下 (定性) m/z 499.2→257.1)

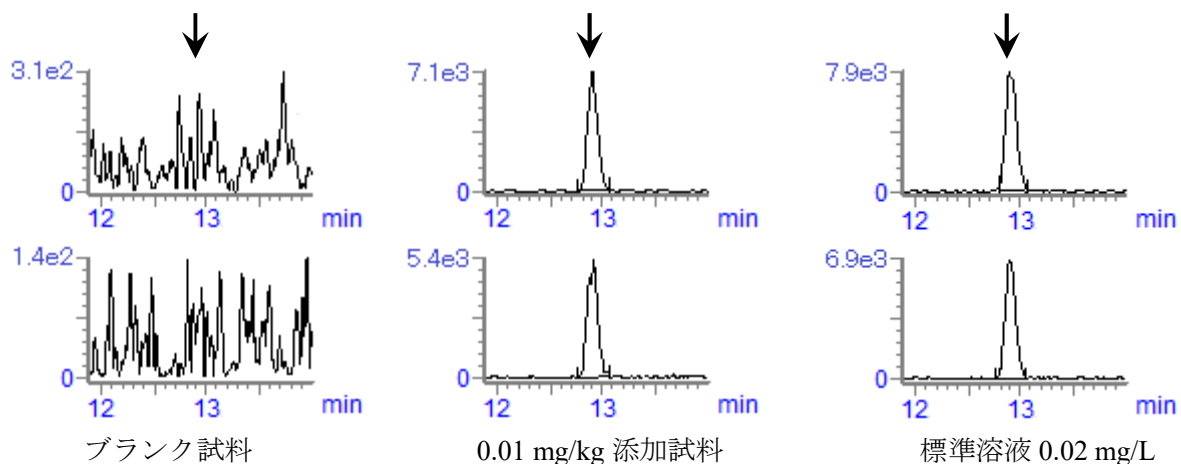
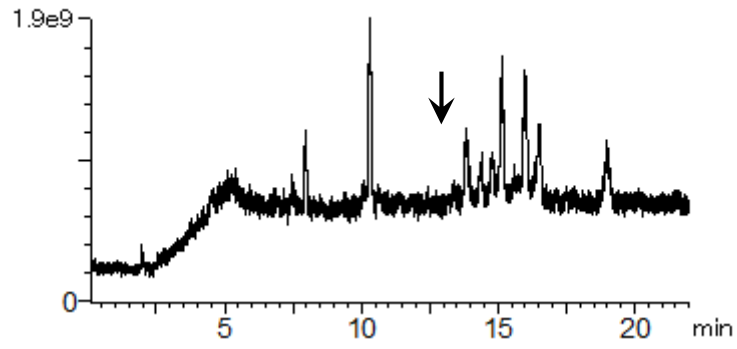
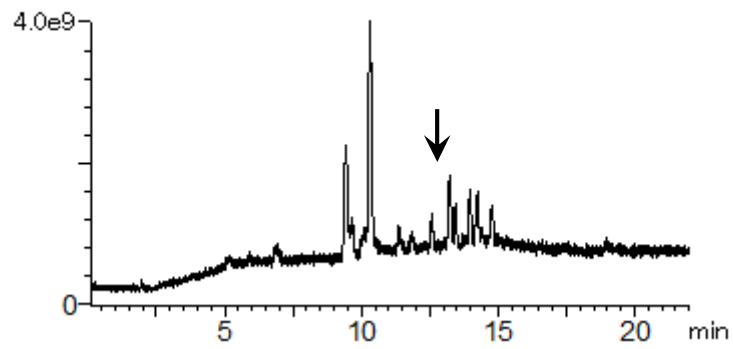


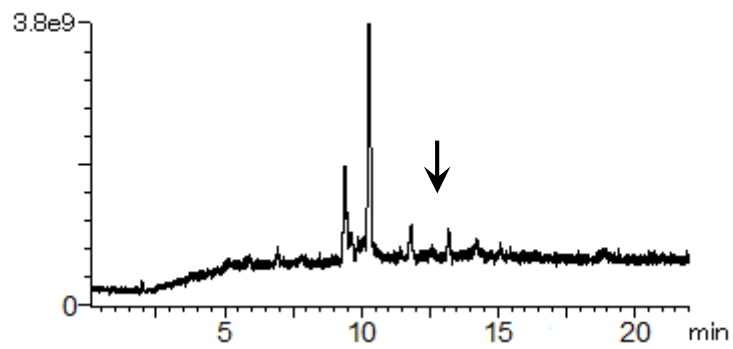
図10 しじみのSRMクロマトグラム (定量限界濃度)
 (上 (定量) m/z 499.2→180.9、下 (定性) m/z 499.2→257.1)



玄米



うなぎ



しじみ

図 11 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：50～1000 amu、CV=30 V)