

※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 試験法開発事業報告書

プロピリスルフロン（水産物）

プロピリスルフロンの試験法（水産物）の検討結果

[緒言]

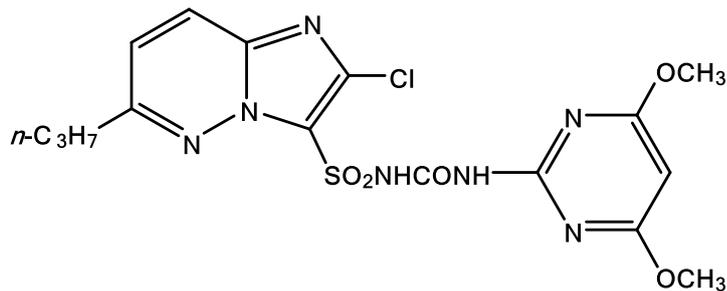
1. 目的

プロピリスルフロンはスルホニルウレア系除草剤であり、広葉雑草各種やイヌホタルイやタイヌビエに対しても高い除草効果を示す。また、スルホニルウレア系除草剤抵抗性雑草の除草に有効である。作用機序は分岐鎖アミノ酸（バリン、ロイシン及びイソロイシン）生合成の初期段階に關与するアセトラクテート合成酵素の活性阻害と考えられている。

FAO/WHO合同残留農薬専門家会議（JMPR）における毒性評価はなされておらず、国際基準も設定されていない。米国、カナダ、欧州連合（EU）、オーストラリア及びニュージーランドにおいても基準値は設定されていない。わが国ではプロピリスルフロンは食品衛生法の規格基準で米（玄米）に0.05 ppm、魚介類に0.02 ppmの基準値が設定されている。しかしながら、水産物を対象としたプロピリスルフロンの残留分析法は報告されていないため、新たに水産物を対象とした試験法の開発を実施した。

2. 分析対象化合物の構造式及び物理化学的性質

分析対象化合物：プロピリスルフロンの構造式：



分子式：C₁₆H₁₈ClN₇O₅S

CAS No.: 570415-88-2

分子量：455.88

化学名：1-(2-chloro-6-propylimidazo[1,2-b]pyridazin-3-ylsulfonyl)-3-(4,6-dimethoxypyrimidin-2-yl)urea (IUPAC名)

外観：白色固体、無臭

融点：測定不能 (>193.5°Cで分解)

沸点：測定不能 (218.9°Cで分解)

溶解性：水：0.98 mg/L、*n*-ヘキサン：<0.01 mg/L、トルエン：0.156 g/L、メタノール：0.434 g/L、アセトン：7.03 g/L、クロロホルム：28.6 g/L、酢酸エチル：1.61 g/L

1-オクタノール/水分配係数 (log Pow)：2.9 (25°C)

解離定数 (pKa)：4.89 (20°C)

[出典：農薬抄録 一般名：プロピリスルフロンの]

www.acis.famic.go.jp/syouroku/propyrisulfuron/propyrisulfuron_01.pdf

3. 基準値

魚介類：0.02 ppm [食安発1213第1号 (H22.12.13)]

[実験方法]

1. 試料

試料は埼玉県内で市販されていた1)うなぎ及び2)しじみを用いた。

各食品の試料採取の方法を以下に示した。

1) うなぎ：活鰻を使用し、頭を除いた可食部（内臓、骨及び皮を含む）を細切均一化した。

2) しじみ：殻を除去し得られたむき身を目の細かい金網にのせ、5分間水切りを行ったものを細切均一化した。

2. 試薬

標準品：プロピリスルフロンは富士フィルム和光純薬製、純度99.7%のものを使用した。

標準原液：標準品50 mgを精秤し、アセトンに溶解して50 mLとしたものを標準原液とした。

添加用標準溶液：標準原液をアセトンで希釈し、0.2 mg/L 及び0.1 mg/Lとしたものを添加用標準溶液とした。

検量線用標準溶液：添加用標準溶液0.1 mg/Lをアセトニトリル及び水(3:2)混液で希釈し、0.00025～0.003 mg/L濃度範囲の数点を調製したものを検量線用標準溶液とした。

アセトニトリル、メタノール及び蒸留水は高速液体クロマトグラフィー用（富士フィルム和光純薬製）を、*n*-ヘキサン及びアセトンは残留農薬試験用（関東化学製）を、その他の試薬はすべて特級品を用いた。

精製用固相抽出カートリッジにはInertSep PSA（500 mg/6 mL）（GL Sciences製）及びInertSep C18（500 mg/6 mL）（GL Sciences製）を用いた。InertSep PSAは、アセトン及びアセトニトリル各10 mLで順次、コンディショニングして使用した。InertSep C18は、アセトニトリル及び水各10 mLで順次、コンディショニングして使用した。

3. 装置

粉砕機：FP-25（Cuisinart製）

ホモジナイザー：ヒスコトロン（マイクロテック・ニチオン製）

遠心分離機：テーブルトップ遠心機4000(KUBOTA製)LC-MS/MS

装置	型式	会社
MS	Xevo TQS	Waters
LC	ACQUITY UPLC	Waters
データ処理	MassLynx Ver.4.1	Waters

4. 測定条件

分析カラムにAtlantis T3（2.1×100 mm、粒子径3 μm）（Waters製）を、検出にはMS検出器を用い、SRM（Selected Reaction Monitoring）モードで測定した。

LC-MS/MSの測定条件は以下のとおりである（表1）。

表1. LC-MS/MS 測定条件

LC条件				
カラム	Atlantis T3（内径 2.1 mm、長さ100 mm、 粒子径3 μm : Waters製）			
移動相流速（mL/min）	0.20			
注入量（μL）	5			
カラム温度（℃）	40			
移動相	A液：蒸留水 B液：アセトニトリル C液：0.1 vol% 酢酸			
グラジエント条件	時間（分）	A液（%）	B液（%）	C液（%）
	0.0	60	30	10
	0.5	60	30	10
	3.0	10	80	10
	9.0	10	80	10
	9.1	60	30	10
	15.0	60	30	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）	3.5			
ソース温度（℃）	150			
脱溶媒温度（℃）	500			
コーンガス	窒素、150 L/hr			
脱溶媒ガス	窒素、1000 L/hr			
コリジョンガス	アルゴン			
定量イオン（ <i>m/z</i> ）	MS/MS: +456→261 [コーン電圧：60（V）、コリジョン エネルギー：15（eV）]			
定性イオン（ <i>m/z</i> ）	MS/MS: +456→196 [コーン電圧：60（V）、コリジョン エネルギー：15（eV）]			
保持時間（min）	5.6			

5. 定量

プロピリスルフロンの標準原液をアセトニトリル及び水（3：2）混液で希釈し、0.00025～0.0030

μg/mL濃度範囲の数点の標準溶液を調製し、5 μLをLC-MS/MSに注入した。得られたクロマトグラムからプロピリスルフロンのピーク面積を求め、絶対検量線法で検量線を作成し、定量を行った。

6. 添加試料の調製

- 1) うなぎ（添加濃度：0.02 ppmまたは0.01 ppm）：試料10.0 gに添加用標準溶液（0.2 mg/Lまたは0.1 mg/L）1 mLを添加しよく混合した後、30 分間放置した。
- 2) しじみ（添加濃度：0.02 ppmまたは0.01 ppm）：試料10.0 gに添加用標準溶液（0.2 mg/Lまたは0.1 mg/L）1 mLを添加しよく混合した後、30 分間放置した。

7. 試験溶液の調製

1) 抽出

試料10.0 gを量り採り、アセトン及び*n*-ヘキサン（1：2）混液70 mL、1 mol/L塩酸6 mL及び塩化ナトリウム8 gを加え、1分間ホモジナイズした。毎分3,000回転で5分間遠心分離し、有機層を採取した。残留物とアセトン及び水層にアセトン及び*n*-ヘキサン（1：2）混液30 mLを加え、同様に操作した後、毎分3,000回転で5分間遠心分離した。得られた有機層を先の有機層に合わせ、アセトン及び*n*-ヘキサン（1：2）混液で正確に100 mLとした。この溶液から正確に10 mLをポリプロピレン製遠心管に分取し、窒素気流下で40°C以下で濃縮し溶媒を除去した。残留物に*n*-ヘキサン20 mLを加え、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル20 mLずつで3分間2回振とう抽出し、毎分3,000回転で5分間遠心分離し、アセトニトリル層を採取した。

2) 精製

①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

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）にアセトン及びアセトニトリル各10 mLを順次注入し、各流出液は捨てた。このカラムに1) で得られた溶液を注入した後、アセトニトリル5 mL及びアセトン10 mLを順に注入し、各流出液を捨てた。次いで、1 vol%ギ酸・アセトン溶液10 mLを注入し、溶出液を40°C以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物をアセトニトリル及び水（3：7）混液10 mLに溶解した。

②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

オクタデシ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各10 mLを順次注入し、各流出液は捨てた。このカラムに①で得られた溶液を注入し、流出液は捨てた。次いで、アセトニトリル及び水（3：2）混液10 mLを注入し、溶出液を正確に10 mLとしたものを試験溶液とした。

試験溶液調製法の概略を以下に示す（図1）。

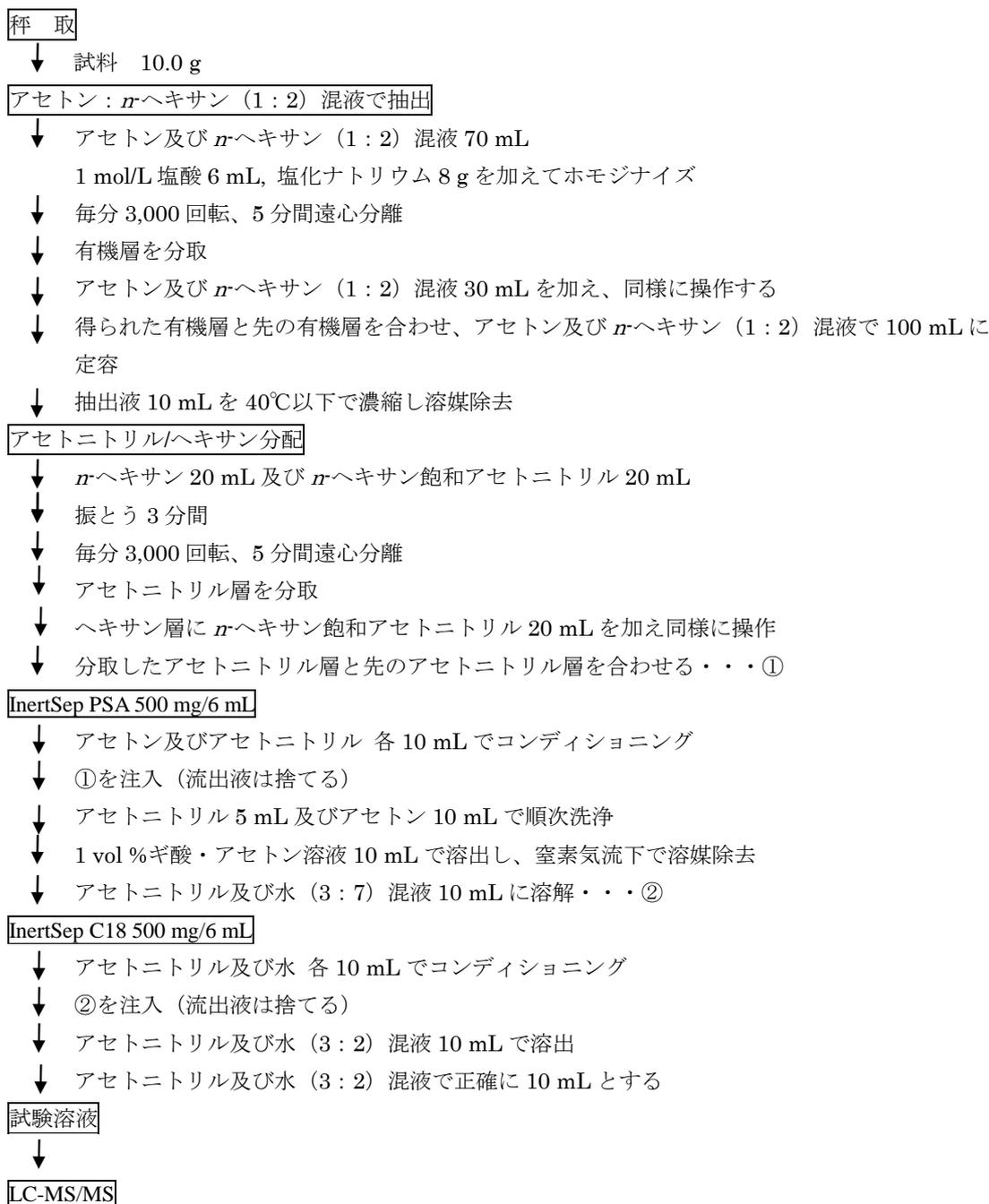


図1 試験溶液の調製手順

8. マトリックスの測定値への影響

1) ブランク溶液の調製

プロピリスルフロロンが含有されていないことを確認した試料を 6. 試験溶液の調製に従って試

験溶液を調製した。

2) マトリックスの測定値への影響の検討

各検討対象食品の添加回収試験における回収率100%相当濃度の10倍濃度に相当する標準溶液0.1 mLの溶媒を除去した後、調製したブランク溶液1 mLに溶解し、マトリックス添加標準溶液を作製した（添加回収試験での100%回収率に相当する濃度）。溶媒標準溶液とのピーク面積値と比較し、試料マトリックスの測定値への影響を検討した。

[結果及び考察]

1. 測定条件の検討

1) MS条件の検討

プロピリスルフロンはポジティブモードのみ測定が可能であった。コーン電圧60Vで測定したマススペクトルを以下に示す（図2）。プロトン付加分子の $[M+H]^+$ の m/z 456及び塩素原子同位体由来のイオン m/z 458が感度良く検出され、そのほか m/z 178、196、261及び283がフラグメントイオンとして検出された。

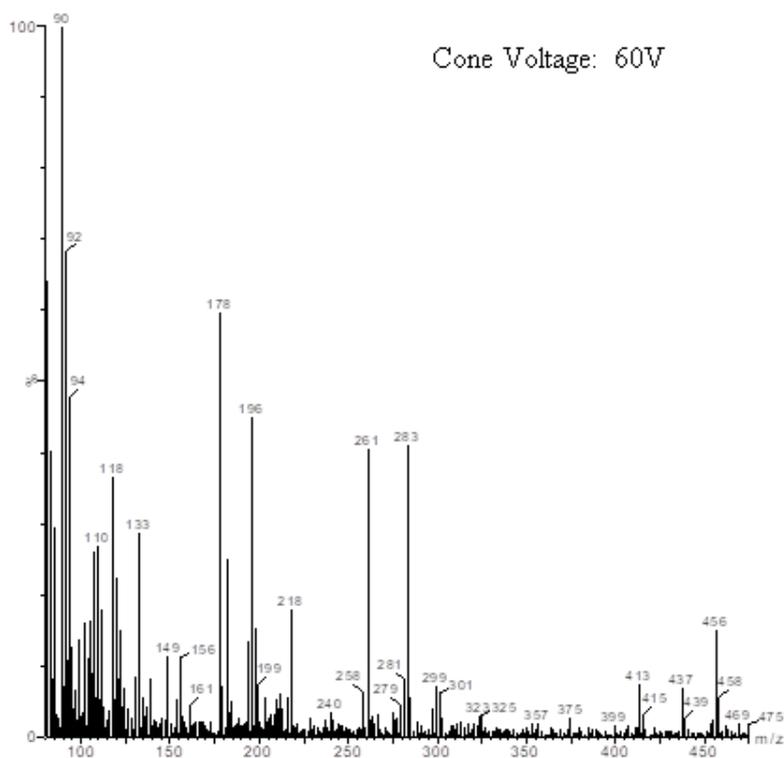


図2 MS spectrum of propyrisulfuron in positive mode

SRM (Selected Reaction Monitoring) モード測定条件についてプロトン付加分子の[M+H]⁺をプリカーサーイオンとして、衝突誘起解離によって得られる m/z 456→261を定量イオンに、 m/z 456→196を定性イオンに採用した。それぞれのモニターイオンに最適な条件を設定した。プロピリスルフロンの m/z 456のプロダクトイオンスキャンの結果を示す (図3)。

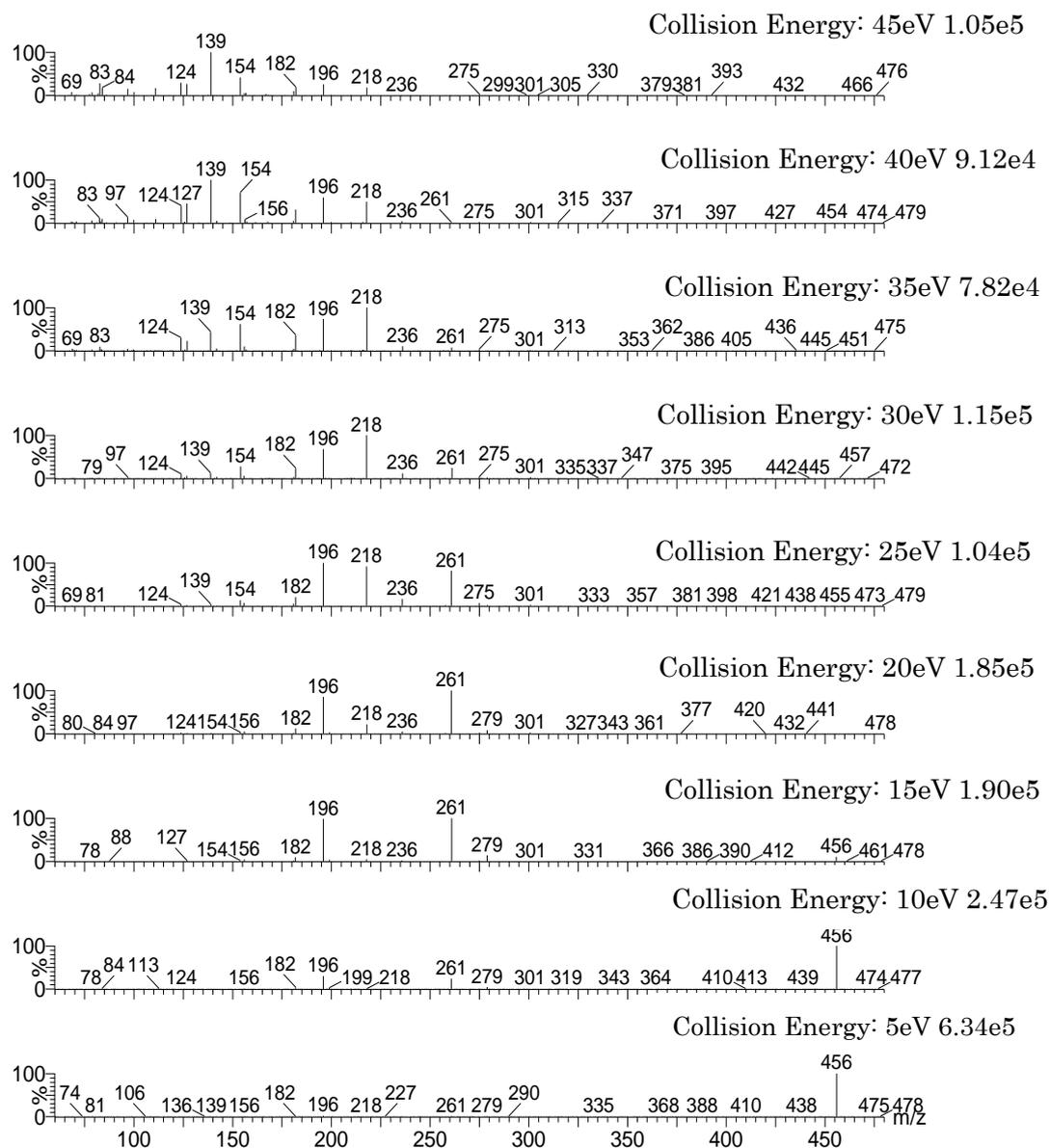


図3 MS spectra obtained by product ion scan of m/z 456

2) LC条件の検討

シリカベースの逆相系カラムについて、ピーク形状やMS検出の感度が良好なカラムを検討した。L-column ODS ((一財) 化学物質評価研究機構製)、CadenzaCD-C18 (Imtakt製)、Atlantis T3、Symmetry C18及びXbridge C18 (Waters製)、InertSustain C18 (GL Sciences製) の内径2~2.1 mm、長さ100 mmのカラムについて検討したところ、すべてのカラムで概ね良好な結果が得られたが、

最もMSの感度（S/Nが高かったAtlantis T3を採用した。なお、各カラムの保持時間については、L-column ODS（5.5分）、CadenzaCD-C18（4.9分）、Atlantis T3（5.6分）、Symmetry C18（5.0分）、Xbridge C18（5.0分）、InertSustain C18（5.2分）であった。

移動相への添加剤について、ギ酸と酢酸を比較したところ、酢酸の方が良好な感度が得られ、かつ、その至適濃度は0.01 vol %であった。10 mmol/L酢酸アンモニウムの添加では、感度が酢酸添加時の1/6に低下した。なお、各添加剤の添加によるS/Nは、0.01 vol%ギ酸添加（S/N 5500）、0.01 vol%酢酸添加（S/N 6000）及び10 mmol/L酢酸アンモニウム添加（S/N 1000）であった。

有機溶媒についてメタノールとアセトニトリルを比較したところ、感度では顕著な差は認められなかったが、アセトニトリルの方がよりカラム圧が低かったことからアセトニトリルを採用した。以上の検討結果から、表1のLC-MS/MS測定条件とした。

3) 検量線

各定量用イオンのピーク面積値を用いて、絶対検量線法により検量線を作成した。0.00025～0.0030 mg/Lの範囲で検量線は、良好な直線性が認められた。（相関係数（r）：0.9970～0.9996、平均0.9980）。代表的な検量線を示す（図4、図5）。添加回収試験においては、定量限界濃度（0.01 ppm）添加では、0.00025、0.0005、0.00075、0.001、0.00125及び0.0015 mg/Lの標準溶液を、水産物の基準値濃度（0.02 ppm）添加では、0.0005、0.001、0.0015、0.002、0.0025及び0.003 mg/Lの標準溶液を用いて検量線を作成した。

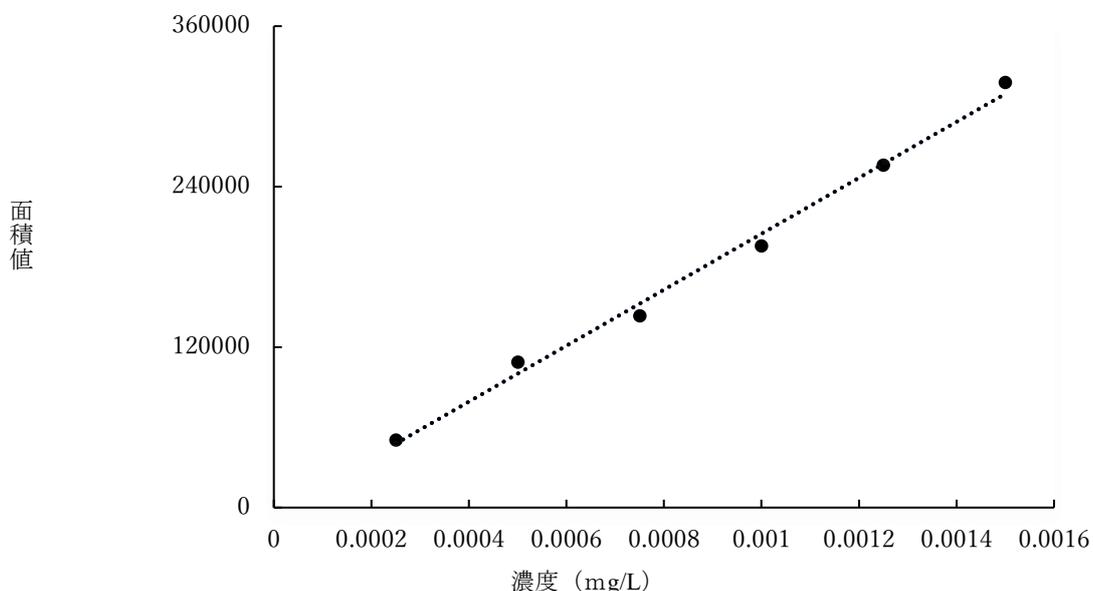


図4 プロピルスルフロンの検量線例
濃度範囲：0.00025～0.0015 mg/L
 $y=205170x-940$ $r=0.9972$

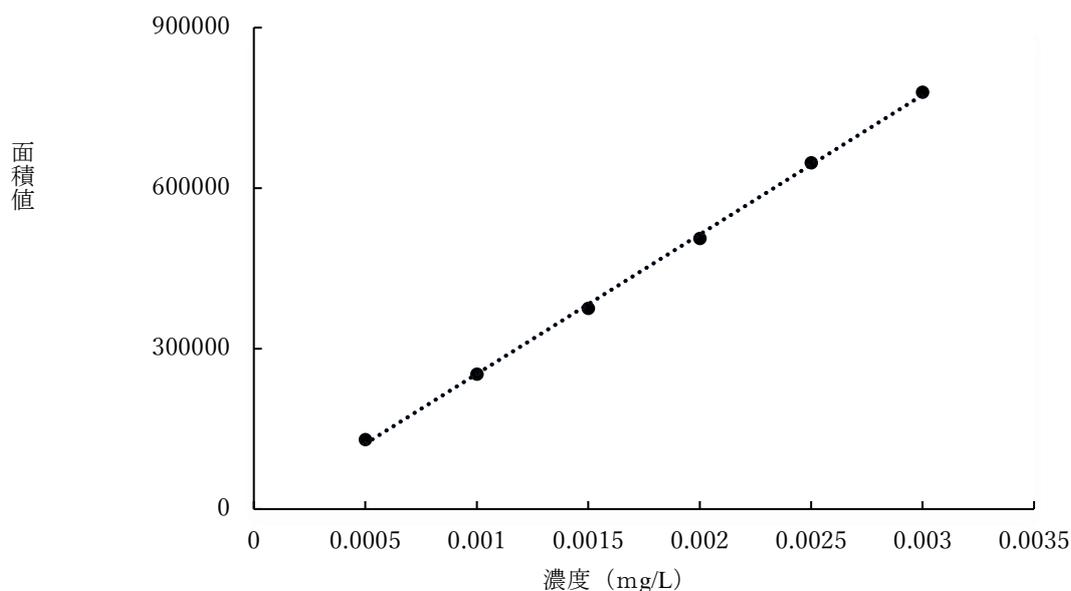


図5 プロピリスルフロンの検量線例
 濃度範囲：0.0005～0.003 mg/L
 $y=257383x-2334$ $r=0.9996$

2. 前処理法の検討

1) 抽出溶媒の検討

抽出溶媒は脂質と、分析対象としているプロピリスルフロンを同時に抽出できる溶媒として、通知一斉試験法「LC/MSによる農薬等の一斉試験法 I (畜水産物)」でも採用されているアセトン及び*n*-ヘキサン (1:2) 混液を用いた。プロピリスルフロンの回収率を、①抽出溶媒のみ、②1 mol/L塩酸6 mL及び抽出溶媒、③塩化ナトリウム8 g、水6 mL及び抽出溶媒、④1 mol/L塩酸6 mL、塩化ナトリウム8 g及び抽出溶媒の組み合わせで検討した (表2)。なお、試料には鶏卵*を使用した。①は下層のアセトン及び水層のpHは約8で、回収率は20%、②はpH2~3で回収率は36%、③はpH 8で、回収率は33%、④はpH 2~3で回収率は87%であった。従って、プロピリスルフロンは試料から酸性条件下で塩析効果によって、アセトン及び*n*-ヘキサン層に抽出することが必要であった。

※平成24年の試験法開発開始時は、畜水産物を対象として、牛筋肉、牛脂、牛肝臓、豚筋肉、鶏卵、牛乳、はちみつ、うなぎ、さけの9食品での検討を実施した。抽出溶媒の検討では、プロピリスルフロンのpKaを考慮し、抽出時のpHの影響を受けやすいと想定される塩基性食品である鶏卵試料を用いて検討を実施した。その後、水産物のみを対象とした試験法に変更となった。

表2 抽出溶媒によるpHとプロピリスルフロンの回収率 (%)

	①	②	③	④
回収率	20	36	33	87
pH	8	2~3	8	2~3

①抽出溶媒のみ

②1 mol/L塩酸6 mL及び抽出溶媒

③塩化ナトリウム8 g、水6 mL及び抽出溶媒

④1 mol/L 塩酸6 mL、塩化ナトリウム8 g及び抽出溶媒

2) 脱脂方法の検討

脱脂方法についてアセトニトリル/ヘキサン分配の溶媒量を検討した。実施要領では*n*-ヘキサン 30 mLに対して*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル30 mLで3回抽出することになっている。先の抽出液を一定量に定容し、その一部(試料1 g分相当)についてのみ精製操作を行ったことから溶媒量を20 mLに削減した。次に、アセトニトリル/ヘキサン分配の分配回数におけるプロピリスルフロンの回収率について、うなぎ試料を用いて抽出液10 mLを40 °C以下で濃縮し溶媒を除去し、標準溶液を添加した後、アセトニトリル/ヘキサン分配回数(1~3回目)における回収率を検討した(表3)。その結果、アセトニトリル/ヘキサン分配操作2回目以降は、プロピリスルフロンの回収されなかった。従って、アセトニトリル/ヘキサン分配を2回操作することとした。

表3 アセトニトリル/ヘキサン分配の分配回数によるプロピリスルフロンの回収率 (%)

うなぎ	分配回数			計
	1回目	2回目	3回目	
プロピリスルフロン	92	0	0	92

(0.1 mg/kg相当添加、n=2)

3) ミニカラム精製

水産食品では、脂質以外にも分析妨害物質として高級脂肪酸、高級脂肪酸エステル及び色素成分等が考えられる。これらを除去することを目的として、InertSep PSA (500 mg) (GL sciences製)による精製効果を検証した。試料には牛肝臓^{*}を使用した。アセトニトリル/ヘキサン分配後のアセトニトリル層に標準溶液を添加した後、PSAに負荷し、順次、アセトニトリル、アセトン、メタノール、1 vol%ギ酸・メタノール溶液それぞれ10 mLで溶出した。プロピリスルフロンはアセトニトリル画分及びアセトン画分には溶出されず、メタノール画分に約10%、1 vol%ギ酸・メタノール溶液画分に約86%溶出した(表4)。PSAからのプロピリスルフロンの溶出には、ギ酸添加が有効であると考えられた。

^{*}平成24年の試験法開発開始時は、畜水産物を対象として、牛筋肉、牛脂、牛肝臓、豚筋肉、鶏卵、牛乳、はちみつ、うなぎ、さけの9食品での検討を実施した。ミニカラム精製の検討では、

分析が困難であると想定される肝臓試料を用いて検討を実施した。その後、水産物のみを対象とした試験法に変更となった。

表4 PSAの溶出溶媒におけるプロピリスルフロンの回収率 (%)

		回収率
負荷液	アセトニトリル 10 mL	0
	アセトニトリル 10 mL	0
洗浄液	アセトン 10 mL	0
	メタノール 10 mL	10
	1 vol%ギ酸・メタノール 10 mL	86

(0.1 mg/kg相当添加、n=1)

また、溶出液の溶媒除去の工程を考慮し、1 vol%ギ酸・アセトン溶液での溶出を検討した。アセトニトリル/ヘキサン分配後のアセトニトリル層に標準溶液を添加し、PSAに負荷した後、アセトニトリル5 mL及びアセトン10 mLで洗浄し、1 vol%ギ酸・メタノール溶液及び1 vol%ギ酸・アセトン溶液で溶出した。その結果、1 vol%ギ酸・メタノール溶液と同等の溶出が認められ、ともに溶出量5 mLでプロピリスルフロンはすべて溶出され、次の各溶出液からの溶出は認められなかった(表5)。PSAミニカラムからの溶出液は溶媒を除去するため、より沸点の低い1 vol%ギ酸・アセトン溶液10 mLを採用した。

表5 InertSep PSAからのプロピリスルフロンの溶出率 (%)

液量 (mL)	溶出液	
	1 vol % ギ酸・メタノール	1 vol % ギ酸・アセトン
0~5	88	90
5~10	0	0
10~15	0	0

(0.1 mg/kg相当添加、n=2)

表4より、アセトニトリル及びアセトン各10 mLではプロピリスルフロンはPSAミニカラムから溶出されなかったことから、PSAミニカラムの洗浄溶媒の種類及び洗浄溶媒量について、アセトニトリル及びアセトンを用いてプロピリスルフロンの回収率に差異があるか検討した。アセトニトリル/ヘキサン分配を2回実施した後、得られたアセトニトリル層に標準溶液を添加し、PSAに負荷した。アセトニトリル5 mLのみ、アセトニトリル10 mLのみ、アセトン5 mLのみ、アセトン10 mLのみ、アセトン20 mLのみ、アセトニトリル5 mL及びアセトン5 mL、

アセトニトリル5 mL及びアセトン10 mL、アセトニトリル10 mL及びアセトン5 mL、アセトニトリル10 mL及びアセトン10 mLでPSAを洗浄し、1 vol%ギ酸・アセトン溶液10 mLで溶出した。その結果、アセトニトリルまたはアセトンを単独でPSAミニカラム洗浄するより、アセトニトリルとアセトンを組み合わせてPSAミニカラムを洗浄した方が、回収率が良好であった(表6)。以上の結果より、アセトニトリル層を負荷したPSAミニカラムをアセトニトリル5 mL、アセトン10 mLで順次洗浄した後、1vol%ギ酸・アセトン溶液10 mLで溶出する操作を採用した。

表6 InertSep PSAの洗浄工程別のプロピリスルフロンの回収率 (%)

洗浄液 (mL)	アセトニトリル	5	10	0	0	0	5	5	10	10
	アセトン	0	0	5	10	20	5	10	5	10
プロピリスルフロン		88	92	93	89	78	96	98	98	99

(0.1 mg/kg相当添加、n=2)

PSAミニカラムによる精製効果を検討するため、PSAミニカラム精製前後の溶液でマトリックス添加標準溶液を作製し、溶媒標準溶液と面積を比較した(表7)。アセトニトリル/ヘキサン分配を2回実施した後、「PSAなし」では得られたアセトニトリル層の溶媒を除去し、アセトニトリル及び水(3:7)混液10 mLで溶解した。「PSAあり」では、得られたアセトニトリル層をPSAに負荷し、6. 試験溶液の調製に従って洗浄と溶出を行い、溶媒を除去した後にアセトニトリル及び水(3:7)混液10 mLで溶解した。標準溶液0.01 mg/L 0.3 mL及び0.6 mLを上記で調製した溶液3 mLで溶解し、0.001 mg/L及び0.002 mg/Lで検出するようにした(マトリックス添加標準溶液)。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の比をピーク面積比とした。その結果、PSAミニカラム精製により、マトリックスの影響が改善されていた。さらに、PSAミニカラム精製により、濁り及びにおいも減少していた。

表7 InertSep PSAの有無によるピーク面積比

標準溶液濃度 (mg/L)	ピーク面積比	
	PSAあり	PSAなし
0.002	0.97	0.81
0.001	0.91	0.80

アセトニトリル/ヘキサン分配では一部の脂肪酸は除去することができない。また、PSAミニカラムからの溶出液にギ酸を含有していることから、脂肪酸の除去が不十分であると考え、C18ミニカラムによる追加精製を試みた。うなぎ試料を用いてInertSep C18 (500 mg) からのプロピリスルフロンの溶出パターンについて検討した(表8)。PSA溶出液を乾固後、アセトニトリル及び水(3:7)混液10 mLで溶解し標準溶液を添加してC18に負荷した。アセトニトリル及び水(3:7、2:3、1:1、3:2、7:3、4:1、9:1、10:0)混液30 mLで溶出させ、最後にアセトニトリル

10 mLで追加溶出した。その結果、負荷液（アセトニトリル及び水（3：7）混液10 mL）からのプロピリスルフロンの回収は認められなかった。アセトニトリル及び水（3：2）混液以上のアセトニトリル比率の場合、各溶出液5 mLでプロピリスルフロンはほぼ100 %回収されていた。また、アセトニトリル及び水（3：2）溶液からアセトニトリル含有が増えるにつれてプロピリスルフロンの回収率が低下しているのは、試料マトリックスによるイオン化抑制効果による影響であると推測される。以上の結果より、C18ミニカラムによる追加精製では、アセトニトリル及び水（3：7）混液10 mLで負荷し、アセトニトリル及び水（3：2）混液10 mLで溶出する操作を採用した。なお、PSAミニカラム精製時には濁っていた溶出液であったが、C18ミニカラム精製することにより、透明な試験溶液が得られた。

表8 InertSep C18からのプロピリスルフロンの溶出率(%)

	液量 (mL)	アセトニトリル及び水混液の比率							
		3:7	2:3	1:1	3:2	7:3	4:1	9:1	10:0
負荷液	10	0	0	0	0	0	0	0	0
	0~5	0	31	83	107	101	91	92	89
	5~10	5	57	5	1	0	0	0	0
溶出液	10~20	41	5	3	0	0	0	0	0
	20~30	34	0	0	0	0	0	0	0
	30~40*	11	0	0	0	0	0	0	0
合計		91	93	91	108	101	91	92	89

負荷液はアセトニトリル及び水（3：7）

*アセトニトリル10mLで溶出させた。

(0.1 mg/kg相当添加、n=1)

3. 添加回収実験

うなぎ及びしじみを用いて、6. 試験溶液の調製に従って添加回収試験（基準値濃度及び定量限界濃度の2濃度）を実施した。添加回収試験で100%回収率に相当する溶媒標準溶液、各食品のブランク溶液及び添加回収試験のクロマトグラムを図6～図9に示した。また、各食品のスキャン測定による代表的なトータルイオンクロマトグラムを図10に示した。測定を妨害するような顕著なピークは認められなかった。

① 添加回収試験（基準値濃度添加）における代表的なクロマトグラム

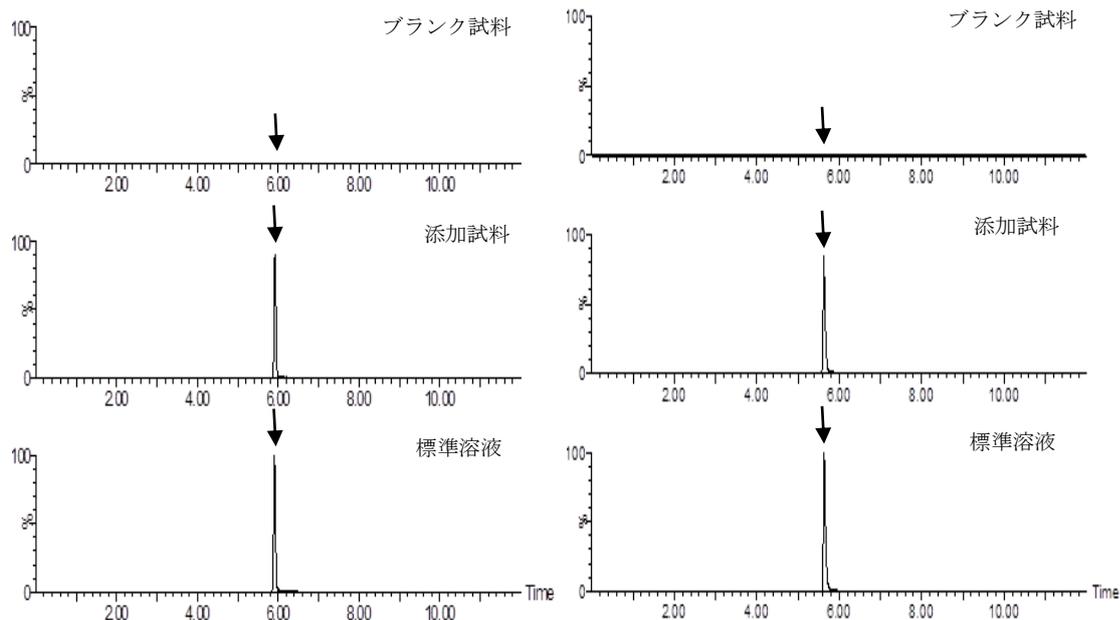


図 6 うなぎの SRM クロマトグラム
(m/z 456→261)
添加濃度：0.02 ppm

図 7 しじみの SRM クロマトグラム
(m/z 456→261)
添加濃度：0.02 ppm

② 添加回収試験（定量限界濃度）における代表的なクロマトグラム

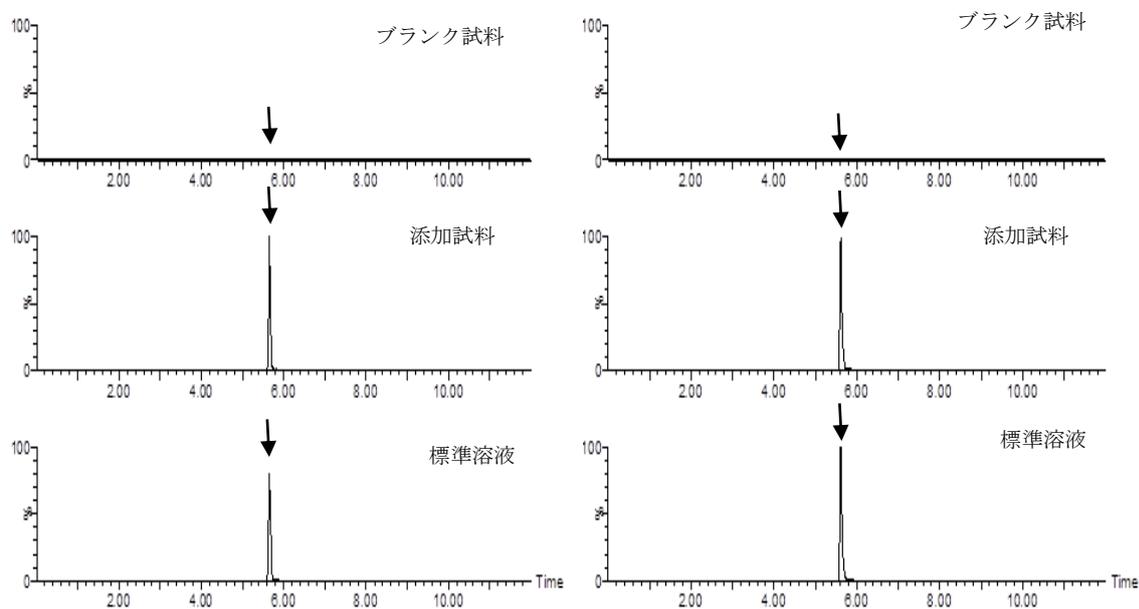


図 8 うなぎの SRM クロマトグラム
(m/z 456→261)
添加濃度：0.01 ppm

図 9 しじみの SRM クロマトグラム
(m/z 456→261)
添加濃度：0.01 ppm

③ 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

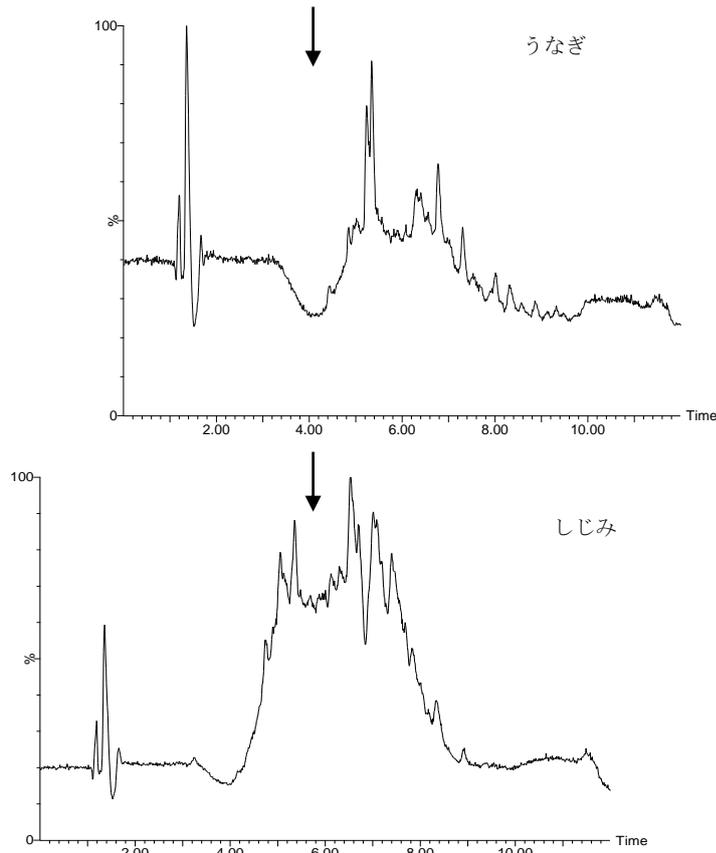


図 10 ブランク試料のトータルイオンクロマトグラム

スキャン範囲：50～550 amu

測定条件：ESI (+) CV=60V (CV=coron voltage)

1) 選択性

検討したいずれの試料においても、ブランク試料にプロピリスルフロンの定量を妨害するピークは認められなかった (表9)。

表9 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)	添加濃度 (ppm)	妨害ピークの許容範囲 の評価		ピーク面積 (高さ) ^{*1}						選択性 の評価 ^{*3}	備考			
						評価濃度 (ppm)	評価基準	面積又は 高さの別	ブランク			マトリックス添加標準溶液 ^{*2}				面積 (高さ) 比 (a)/(b)		
									n=1	n=2	平均 (a)	n=1	n=2				平均 (b)	
	ピロピリスルフロンのうなぎ	うなぎ	0.01	0.02	0.02	定量限界	0.01	< 0.333	面積	820	629	725	330900	335758	333329	0.002	○	
	ピロピリスルフロンのうなぎ	うなぎ	0.01	0.02	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	820	629	725	165827	166830	166329	0.004	○	
	ピロピリスルフロンのしじみ	しじみ	0.01	0.02	0.02	定量限界	0.01	< 0.333	面積	62	59	61	304115	301237	302676	0.000	○	
	ピロピリスルフロンのしじみ	しじみ	0.01	0.02	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	62	59	61	150878	150653	150766	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。(必要に応じて起機注入を行う。)
 *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) 真度及び精度

わが国の食品衛生法では現在のところ、プロピリスルフロンの残留基準値は魚介類に0.02 ppmの基準値が設定されている。そこで、添加回収試験はうなぎ及びしじみ試料に、基準値濃度及び定量限界濃度を添加し、回収率を検討した (表10)。

表10 真度・精度・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]	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	定量限界 の評価 ^{*1}	検量線					回収率 (%)					真度 (%)	併行精度 (RSD%)	S/N ²			備考
							傾き	切片	r ² 値	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5	Max.	Min.			平均値			
	プロピリスルフロシ	うなぎ	0.01	0.02	0.02	—	257383	-2334	0.9993	87.0	89.0	87.1	85.4	88.7	87.4	1.7						
	プロピリスルフロシ	うなぎ	0.01	0.02	0.01	S/N	205170	-940	0.9943	92.2	89.6	97.7	85.0	92.3	91.4	5.1	4627.4	5737.2	5182.3			
	プロピリスルフロシ	しじみ	0.01	0.02	0.02	—	233013	16245	0.9940	82.8	76.9	77.9	76.9	75.2	77.9	3.7						
	プロピリスルフロシ	しじみ	0.01	0.02	0.01	S/N	134920	-473	0.9971	94.4	93.5	82.6	79.1	86.1	87.1	7.7	1315.1	2135.0	1725.0			

*1 S/Nを求める必要がある場合には『S/N』と表示される。

*2 得られた回収率の中で最大値を与えるピーク (Max.) 及び最小値を与えるピーク (Min.) のそれぞれのS/Nを求める。

これら水産食品に対する平均回収率は77.9~91.4%であった。また、併行精度の相対標準偏差は1.7~7.7%であった。回収率及び併行精度の相対標準偏差は厚生労働省から通知されている「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインについて」（平成19年11月15日、平成22年12月24日改正）で示されている目標値を満足するものであった。

定量限界濃度での添加回収試験のクロマトグラムより算出したS/Nの平均値は、何れの試料においてもS/N≧10を満たしていた（表11）。

表11 定量限界濃度でのS/N

No.	分析対象化合物	食品名	定量イオン (m/z)	定量限界 (ng/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	Max.					Min.					S/N		備考				
							ピークの 最大値 (Dmax)	最大値 (E1)	最小値 (E2)	中央値 (C) *	ピーク トップ (D)	ピーク 高さ (S)	ノイズ 幅 (N)	ピークの 最大値 (Dmax)	最大値 (E1)	最小値 (E2)	中央値 (C) *	ピーク トップ (D)		ピーク 高さ (S)	ノイズ 幅 (N)	Max.	Min.
	プロピリスルフロシ	うなぎ	456-261	0.01	0.02	0.01	4543975	2454	0	1227	4544842	4542572	981.6	3358410	1463	0	732	33881174	3378858	585.2	4627.4	5737.2	
	プロピリスルフロシ	しじみ	456-261	0.01	0.02	0.01	2166420	4113	0	2057	21658974	2163409	1645.2	1837568	2150	0	1075	18371389	1836650	860.0	1315.1	2135.0	

* ベースラインにはノイズの中央値 (C) を用いることが望ましいが、それが困難な場合にはノイズの最大値 (E1) と最小値 (E2) の平均値 [(E1+E2)/2] を用いても良い。

3) 試料マトリックスの測定値への影響

添加回収濃度（基準値濃度または定量限界濃度の2濃度）における回収率100%相当濃度になるように調製したマトリックス添加標準溶液と溶媒標準溶液を交互に2回測定し、そのピーク面積比から試料マトリックスの測定への影響を評価した。ピーク面積比は1.03~1.08の範囲であり、検討した何れの試料においても、顕著なイオン化抑制及び増強効果は認められず、許容できる範囲であると考えられた（表12）。

表12 試料マトリックスの測定値への影響

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)	面積又は 高さの別	ブラン ク ^{*3}	ピーク面積 (高さ) ^{*2}						備考
									マトリックス添加標準溶液 ^{*4}			溶媒標準溶液			
								n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均		
	プロピリスルフロシ	うなぎ	0.01	0.02	0.02	0.002	面積	629	330900	335758	332700	307507	306338	306923	1.08
	プロピリスルフロシ	うなぎ	0.01	0.02	0.01	0.001	面積	629	165827	166830	165700	154835	153369	154102	1.08
	プロピリスルフロシ	しじみ	0.01	0.02	0.02	0.002	面積	59	304115	301237	302617	292181	298155	295168	1.03
	プロピリスルフロシ	しじみ	0.01	0.02	0.01	0.001	面積	59	159878	150653	155207	153635	149164	151400	1.03

*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を入力する。）

*3 ブランクにピークが認められた場合には、マトリックス添加標準溶液の値はブランク値を差し引いた値を用いる。

*4 マトリックス添加標準溶液は試験当日のブランク試料の試験溶液を用いて調製する。

*5 マトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積（又は高さ）の比を求める。

4. その他の試験法検討に関連する事項

標準品の安定性については、アセトンで調製した標準原液は4℃以下で6ヶ月は安定であった。

5. 結論

検討したうなぎ及びしじみ試料において、ブランク試料のクロマトグラムに定量を妨害するピークは認められなかった。真度77.9～91.4%、併行精度1.7～7.7%は目標値に適合する結果であった。マトリックス標準溶液及び溶媒標準溶液のピーク面積比は1.03～1.08であり、本法で明らかなマトリックス効果は認められなかった。定量限界濃度（一律基準）での添加回収試験のS/Nは、検討した試料において $S/N \geq 10$ を満たした。

参考文献

- 1) 農薬抄録 : http://www.acis.famic.go.jp/syouroku/propyrisulfuron/propyrisulfuron_01.pdf