

※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の試験法開発事業報告書

イプフェンカルバゾン試験法
(畜水産物)

イプフェンカルバゾン試験法（畜水産物）の検討結果

【緒言】

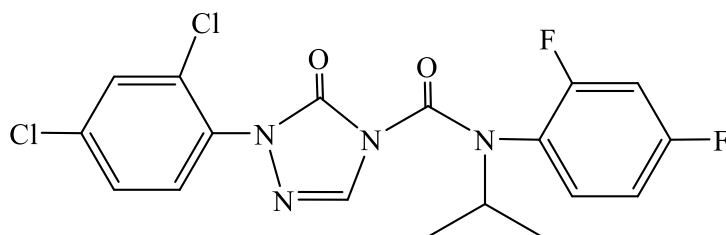
1. 目的

イプフェンカルバゾンの畜水産物中の分析法の開発を行った。イプフェンカルバゾンは北興化学工業（株）で開発されたトリアゾリノン系除草剤であり、水田の主要雑草であるノビエに対して高い除草効果を示し、カヤツリグサ科雑草及びミズガヤツリ、マツバイに対して除草活性を有する。その作用機序は、植物体内での超長鎖脂肪酸の生合成阻害と考えられている。わが国において2013年8月に農薬登録され、現在までのところ、海外では農薬登録はされていない。農薬登録されて間もないことから公定試験法は整備されていない。本検討において、新たに個別試験法を開発した。

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：イプフェンカルバゾン

構造式：



分子式：C₁₈H₁₄Cl₂F₂N₄O₂

分子量：427.23

化学名：1-(2,4-dichlorophenyl)-2',4'-difluoro-1,5-dihydro-N-isopropyl-5-oxo-4H-1,2,4-triazole-4-carboxanilide (IUPAC名)

外観：白色個体（微粉末）、無臭

融点：133.8~137.3℃

沸点：367.2℃

蒸気圧：2.5×10⁻⁷ Pa (25℃)、9.8×10⁻⁸ Pa (20℃)

溶解性：水：0.151 mg/L、*n*-ヘキサン：0.279 g/L、キシレン：26.8 g/L、ジクロロメタン：237 g/L、アセトン：78.9 g/L、メタノール：9.44 g/L、酢酸エチル：63.8 g/L

1-オクタノール/水分配係数 (log Pow)：3.0 (25℃)

解離定数 (pKa)：測定不可

[出典：農薬抄録 一般名：イプフェンカルバゾン

www.acis.famic.go.jp/syouroku/ipfencarbazone/index.htm]

3. 基準値

適用作物は水稻である。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。わが国ではイプフェンカルバゾン食品衛生法の規格基準で米 (玄米) に 0.05 ppm、魚介類に 0.04 ppm の基準値が設定されている。現在、わが国以外でイプフェンカルバゾン単剤について、中国及び韓国で開発中である。

【実験方法】

1. 試料

試料は埼玉県内で市販されていた 1) 牛筋肉、2) 牛脂、3) 牛肝臓、4) 鶏卵、5) 牛乳、6) はちみつ (そば蜜)、7) うなぎ及び 8) 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) 牛筋肉：可能な限り脂肪層を除き、細切均一化した。
- 2) 牛脂：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) 鶏卵：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。
- 5) 牛乳：全体をよく混合して均一化した。
- 6) はちみつ：そば蜜を使用し、よく混合して均一化した。
- 7) 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。
- 8) しじみ：殻を除去し、細切均一化した。

2. 試薬

標準品：イプフェンカルバゾンは北興化学工業 (株) より提供され、純度 99.7% のものを使用した。

標準原液：イプフェンカルバゾン標準品 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。

検量線用標準溶液：標準原液をアセトニトリル及び水 (3 : 2) 混液で適宜希釈し、0.0001~0.008 mg/L の濃度の溶液を調製した。

添加用標準溶液：標準原液をアセトンで希釈して 0.4 mg/L 及び 0.1 mg/L 溶液を調製した。

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用を、*n*-ヘキサン及びアセトンは残留農薬試験用を、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、GL サイエンス社製) 及び InertSep C18 (500 mg、GL サイエンス社製) を用いた。あらかじめ InertSep PSA カートリッジはアセトン及び *n*-ヘキサン各 10 mL で、InertSep C18 カートリッジ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

粉碎機：MK-K57（松下電器社製）

ホモジナイザー：ヒスコトロン（マイクロテック・ニチオン社製）

ロータリーエバポレーター：R-210（Buchi 社）

遠心分離器：テーブルトップ遠心機 4000（KUBOTA 社製）

LC 装置：ACQUITY UPLC（Waters 社製）

MS 装置：Xevo TQ MS（Waters 社製）

データ処理：MassLynx Ver. 4.1

4. 測定条件

LC-MS/MS の測定条件を表 1 に示した。

表 1 LC-MS/MS 測定条件

| LC条件 | | |
|---------------------|--|-------|
| カラム | XBridge C18（内径2.1 mm、長さ100 mm、粒子径3.5 μm） Waters社製 | |
| 移動相流速（mL/min） | 0.2 | |
| 注入量（μL） | 5 | |
| カラム温度（℃） | 40 | |
| 移動相 | A液：0.01 vol%酢酸含有アセトニトリル B液：0.01 vol%酢酸 | |
| グラジエント条件 | | |
| 時間 | A液(%) | B液(%) |
| 0.0 | 50 | 50 |
| 0.5 | 50 | 50 |
| 8.0 | 80 | 20 |
| 12.0 | 80 | 20 |
| 12.1 | 50 | 50 |
| 17.0 | 50 | 50 |
| MS条件 | | |
| 測定モード | 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（℃） | 150 | |
| 脱溶媒温度（℃） | 400 | |
| コーンガス | 窒素、50 L/hr | |
| 脱溶媒ガス | 窒素、800 L/hr | |
| コリジョンガス | アルゴン | |
| 定量イオン（ <i>m/z</i> ） | 427→198 [コーン電圧22V、コリジョンエネルギー12eV] | |
| 定性イオン（ <i>m/z</i> ） | 429→198 [コーン電圧22V、コリジョンエネルギー12eV] | |
| 保持時間（min） | 5.5 | |

5. 定量

イプフェンカルバゾン標準原液をアセトニトリル及び水（3：2）混液で希釈し、0.0001~0.008 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。検量線から得られたクロマトグラムからイプフェンカルバゾンのピーク面積を求め、絶対検量線法で検量線を作成した。

6. 添加試料の調製

牛の筋肉、牛の肝臓、鶏卵、牛乳及びはちみつ（添加濃度：0.01 ppm）：試料 10.0 g に添加用標準溶液（0.1 mg/L）1 mL を添加し、混合した後、30 分間放置した。

牛の脂肪（添加濃度：0.01 ppm）：試料 5.0 g に添加用標準溶液（0.1 mg/L）0.5 mL を添加し、混合した後、30 分間放置した。

うなぎ及びしじみ（添加濃度：0.04 ppm）：試料 10.0 g に添加用標準溶液（0.4 mg/L）1 mL を添加し、混合した後、30 分間放置した。

7. 試験溶液の調製

1) 抽出

脂肪以外の場合は試料 10.0 g を、脂肪の場合は試料 5.00 g を量り採った。はちみつ以外の試料はアセトン及び *n*-ヘキサン（1：2）混液 70 mL を加え、1 分間ホモジナイズした。はちみつ試料は水 6 mL を加えて溶解した後、アセトン及び *n*-ヘキサン（1：2）混液 70 mL を加えて 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。水層及び残留物にアセトン及び *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。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 100 mL に定容した。

2) 脱脂

この溶液から、脂肪以外の場合は正確に 10 mL（試料 1g 相当分）を、脂肪の場合は正確に 20 mL（試料 1g 相当分）を採取し、40 °C 以下で減圧濃縮し、溶媒を留去した。残留物に *n*-ヘキサン 20 mL と *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 20 mL を加え、50 mL 容のポリプロピレンチューブに移した。5 分間振とうした後、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、40 °C 以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物にアセトン及び *n*-ヘキサン（1：9）混液 5 mL を加えて溶解した。なお、はちみつ試料については、アセトニトリル/ヘキサン分配の脱脂工程を省略した。

3) 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 [InertSep PSA (500 mg/6 mL)] に、アセトン及び *n*-ヘキサン各 10 mL を順次注入し、流出液は捨てた。

このカラムに2) で得られた溶液を注入した後、先の負荷液が入っていた容器をアセトン及び *n*-ヘキサン (1 : 9) 混液 5 mL で洗い、洗液をカラムに注入し、負荷液を含む全溶出液を 40 °C 以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物にアセトニトリル及び水 (3 : 7) 混液 5 mL を加えて溶解した。

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[InertSep C18 (500 mg/6 mL)] に、アセトニトリル及び水各 10 mL を順次注入し、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、先の負荷液が入っていた容器をアセトニトリル及び水 (3 : 7) 混液 5 mL で洗い、洗液をカラムに注入し、流出液は捨てた。アセトニトリル及び水 (3 : 2) 混液 10 mL を注入し、溶出液をアセトニトリル及び水 (3 : 2) 混液で正確に 10 mL としたものをイプフェンカルバゾン試験溶液とした。

なお、はちみつ試料については、1) で得られた抽出液 10 mL (試料 1 g 相当分) を 40°C 以下で濃縮し、溶媒を除去した後、残留物にアセトン及び *n*-ヘキサン (1 : 9) 混液 5 mL を加えて溶解した。この溶液を、予めアセトン及び *n*-ヘキサン各 10 mL で洗浄した InertSep PSA (500 mg/6 mL) に注入した後、アセトン及び *n*-ヘキサン (1 : 9) 混液 5 mL を注入し、負荷液を含む全溶出液を採り、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水 (3 : 7) 混液 5 mL を加えて溶解した。この溶液を、予めアセトニトリル及び水各 10 mL で洗浄した InertSep C18 (500 mg/6 mL) に注入した後、アセトニトリル及び (3 : 7) 混液 5 mL を注入し、流出液は捨てた。アセトニトリル及び (3 : 2) 混液 10 mL を注入し、溶出液をアセトニトリル及び水 (3 : 2) 混液で正確に 10 mL としたものをイプフェンカルバゾン試験溶液とした。

試験溶液調製法の概略を図 1-1 及び図 1-2 に示す。

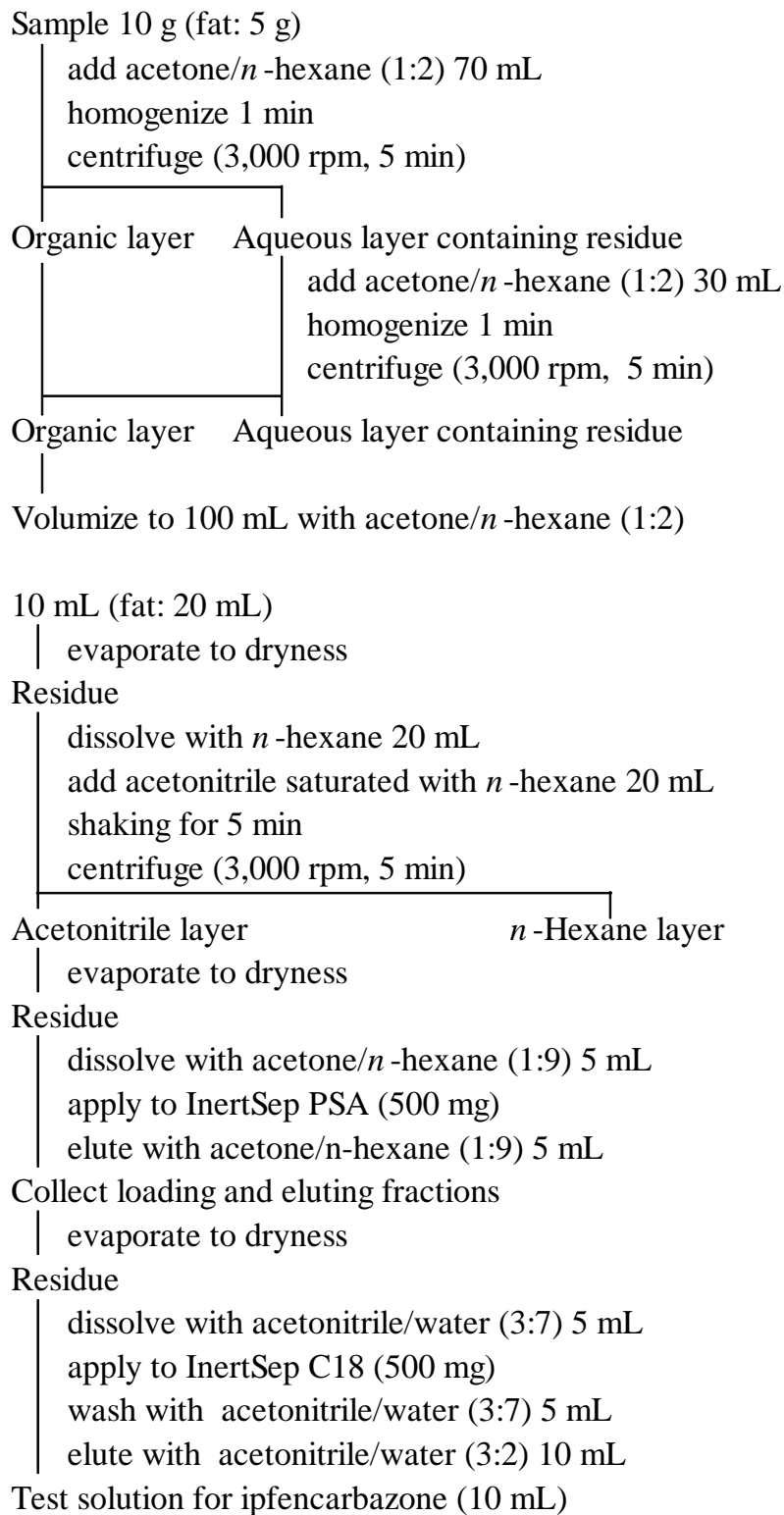


図 1-1 分析法フローチャート (牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳、鶏卵、うなぎ及びしじみ)

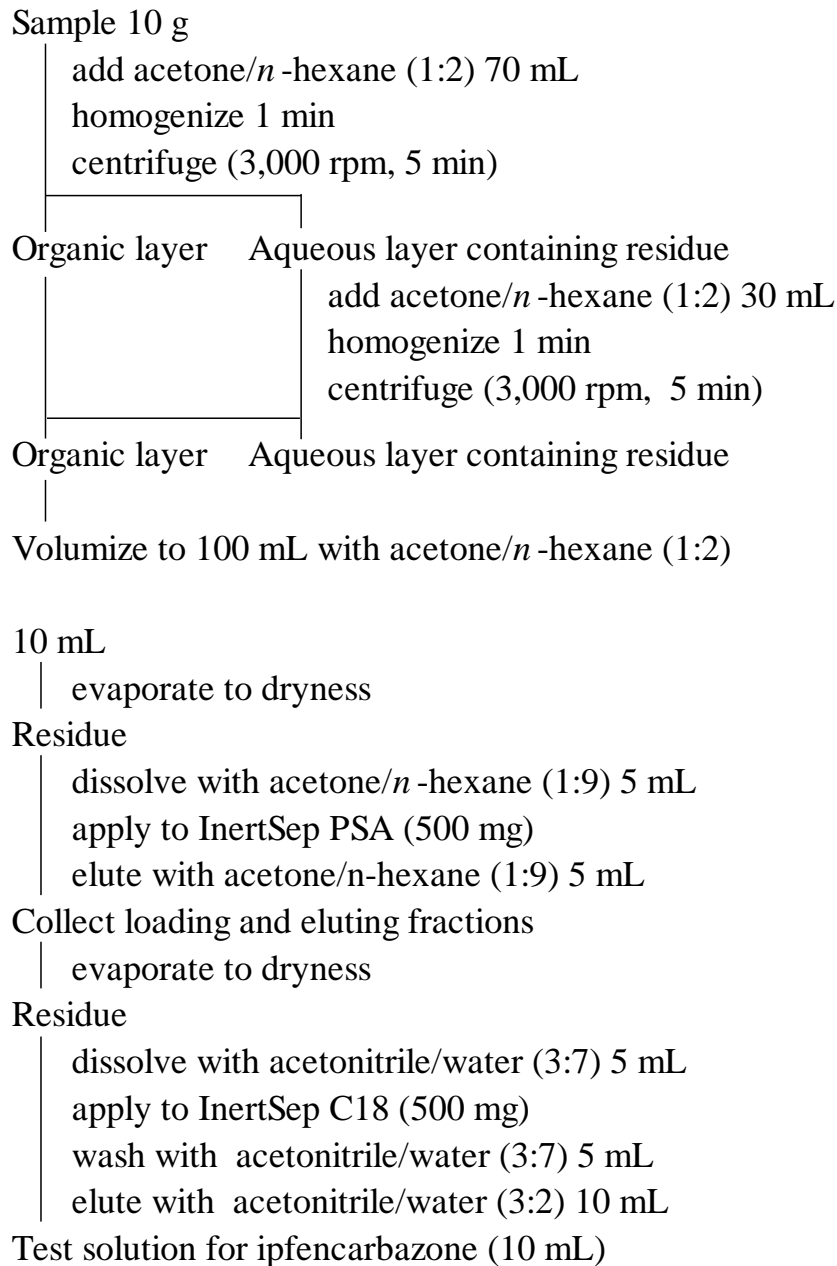


図 1-2 分析法フローチャート (はちみつ)

8. マトリックスの測定値への影響及び定量限界値の推定

1) ブランク溶液の調製

イプフェンカルバゾンが含有されていないことを確認した試料を 7 に示した「試験溶液の調製」に従って試験溶液を作製した。

2) マトリックスの測定値への影響

あらかじめ添加回収試験で添加した濃度の 10 倍濃度に相当する標準溶液 0.2 mL を 40 °C 以下で濃縮し、溶媒を除去した後、ブランク試験溶液又はアセトニトリル及び水 (3 : 2) 混液 2 mL を加えて溶解した。マトリックス添加標準溶液 (添加回収試験での 100 % 回収率に相当する濃度) と溶媒標準溶液のピーク面積値を比較し、試料マトリックスの測定値への影響を検討した。

3) 定量限界値の推定

あらかじめ定量限界推定値の濃度の 10 倍濃度に相当する標準溶液 0.2 mL を 40 °C 以下で濃縮し、溶媒を除去した後、ブランク試験溶液 2 mL を加えて溶解したものをマトリックス添加標準溶液とした (試料中濃度として 0.001 mg/kg)。試料マトリックス存在下における S/N 比を算出し、定量限界値を推定した。

【結果及び考察】

1. 測定条件の検討

1) LC 及び MS 条件の検討

① LC 条件

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 ((財) 化学物質評価研究機構製)、Cadenza CD-C18 (Imtakt 社製)、Symmetry C18、Atlantis T3 及び XBridge C18 (Waters 社製)、Myghtysil RP-18 GP (関東化学社製) 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 比) が高かった XBridge C18 を採用した。

移動相への添加剤について、ギ酸、酢酸及び酢酸アンモニウムを比較したところ、酢酸において良好な感度が得られ、かつ、その至適濃度は 0.01 % 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。

② MS 条件

イプフェンカルバゾンは、ポジティブモードのみ測定が可能であった。コーン電圧 22 V で測定したマススペクトルを図 2 に示した。プロトン付加分子 $[M+H]^+$ の m/z 427 及び塩素原子同位体由来のイオン m/z 429 が感度良く検出された。

SRM (Selected Reaction Monitoring) モード測定についてプロトン化分子の[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 427→198 を定量イオン (図 3) に、 m/z 429→198 を定性イオン (図 4) に採用した。それぞれのモニターイオンに最適な条件を表 2 のとおり設定した。

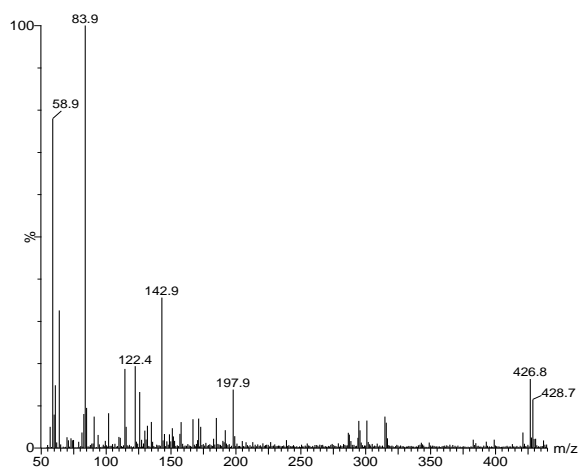


図 2 イブフェンカルバゾンのマススペクトル
 スキャン範囲：50~550 amu
 測定条件：ESI(+), CV=22 V
 (CV: corn voltage)

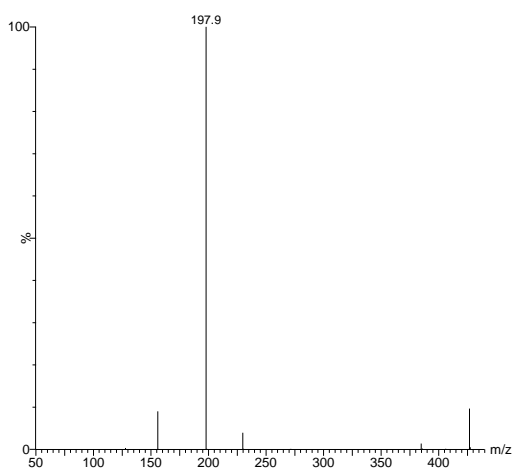


図 3 イブフェンカルバゾンのプロダクトイオンスペクトル (定量用)
 プリカーサーイオン： m/z 427
 測定条件：ESI(+), CV=22 V, CE=12 eV
 (CV: corn voltage, CE: collision energy)

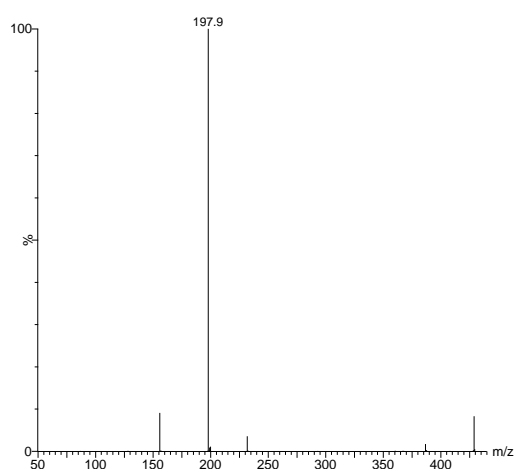


図 4 イブフェンカルバゾンのプロダクトイオンスペクトル (定性用)
 プリカーサーイオン： m/z 429
 測定条件：ESI(+), CV=22 V, CE=12 eV
 (CV: corn voltage, CE: collision energy)

表2 SRM 条件

| | Monitored reactions precursor m/z > product m/z | Dwell time (s) | Cone voltage (V) | Collision energy (eV) |
|-----------------|---|-------------------|---------------------|--------------------------|
| Ipfen carbazone | 427 > 198 ^a | 0.5 | 22 | 12 |
| | 429 > 198 ^b | 0.5 | 22 | 12 |

^a Used for quantification

^b Used for confirmation

2) 検量線

各定量用イオンのピーク面積値を用いて、絶対検量線を作成した。0.1~8.0 ng/mL の範囲で検量線を作成したところ、良好な直線性が認められた。代表的な検量線を図5に示した。添加回収試験においては、一律基準値添加では、0.25、0.50、0.75、1.00、1.50 及び 2.00 ng/mL の標準系列を、魚介類の 0.04 mg/kg 濃度添加では、1.00、2.00、3.00、4.00、6.00 及び 8.00 ng/mL の標準系列を用いて検量線を作成した。検討した 8 食品の添加回収試験での相関係数 (r) は、0.9997~1.000 (平均 $r=0.9999$) であった。

| | | | | | | | |
|-----------------------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Concentration (ng/mL) | 0.1 | 1 | 2 | 3 | 4 | 6 | 8 |
| Area | 1161 | 11892 | 23239 | 34910 | 46050 | 68421 | 90655 |

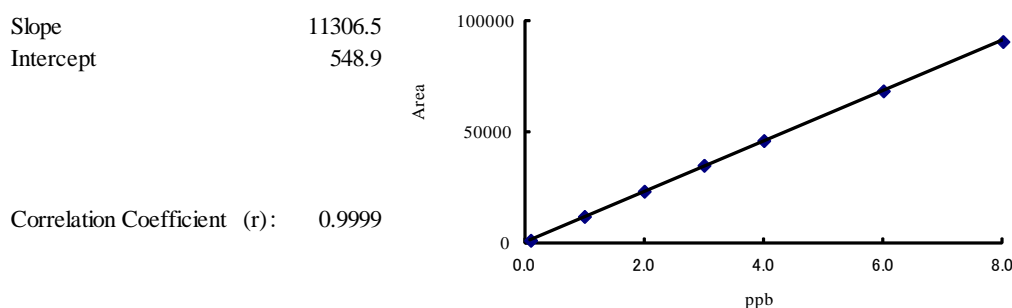


図5 検量線

2. 試験溶液調製法の検討

1) 抽出溶媒

抽出溶媒は脂質と、分析対象としているイプフェンカルバゾンと同時に抽出できる溶媒として、通知一斉試験法「LC-MS/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。

2) 脱脂方法の検討

脱脂方法としてアセトニトリル/ヘキサン分配について検討した。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。抽出液の一部 (試料 1 g 相当分) 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。牛肝臓試料を用いてアセトニトリル/ヘキサン分配の分配操作を検討した結果、分配操作 1 回と分配操作 2 回でのイプフェンカルバゾンの回収率は、ともに約 90% であり、分配操作を 2 回行っても回収率の目立った改善は認められなかった (表 3)。

表 3 アセトニトリル/ヘキサン分配におけるイプフェンカルバゾン回収率 (%)

| | アセトニトリル/ヘキサン分配 | |
|-----|----------------|------|
| | 1回 | 2回 |
| 牛肝臓 | 89.0 | 88.0 |

(0.1 mg/kg 相当添加、 $n = 2$)

本検討は以下の手順で行った。

- 1) 牛肝臓のブランク試料をアセトン及び *n*-ヘキサン (1 : 2) 混液で抽出した。
- 2) 抽出液 10 mL の溶媒を除去した後、*n*-ヘキサン 20 mL、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 20 mL 及びイプフェンカルバゾン標準溶液を添加し、アセトニトリル/ヘキサン分配により脱脂した。
- 3) アセトニトリル層の溶媒を除去し、アセトン及び *n*-ヘキサン (1 : 9) 混液 5 mL に溶解した後、PSA ミニカラムに負荷し、アセトン及び *n*-ヘキサン (1 : 9) 混液 5 mL で溶出した。
- 4) 全溶出液の溶媒を除去し、アセトニトリル及び水 (3 : 7) 混液 5 mL に溶解した後、C18 ミニカラムに負荷し、アセトニトリル及び水 (3 : 7) 混液 5 mL で洗浄した。
- 5) アセトニトリル及び水 (3 : 2) 混液 10 mL で C18 ミニカラムから溶出した。
- 6) 絶対検量線により LC-MS/MS により定量した。

アセトニトリル/ヘキサン分配 1 回操作と 2 回操作によるイプフェンカルバゾンの回収率が牛肝臓試料において 100% より若干低かったことが、試料マトリックスによる影響か否か判断するため、アセトニトリル/ヘキサン分配の各分配回数におけるイプフェンカルバゾンの回収率についてマトリックス検量線を用いて検討した (表 4)。その結果、アセトニトリル/ヘキサン分配操作 1 回目でイプフェンカルバゾンは 100% 回収され、アセトニトリル/ヘキサン分配操作 2 回目及びアセトニトリル/ヘキサン分配操作 3 回目からのイプフェンカルバゾンの回収は認められなかった。そこで、アセトニトリル/ヘキサン分配による脱脂操作は 1 回とした。表 3 において、アセトニトリル/ヘキサン分配操作 1 回とアセトニトリル/ヘキサン分配操作 2 回ともに約 90% しか回収されていなかったのは、試料マトリックスによるイオン化抑制が原因であると推察される。実際に、溶媒標準溶液に対するマトリックス標準溶液のピーク面積比は、牛肝臓において 0.88 であり、若干のイオン化抑制が認められていた (表 15)。また、はちみつ試料では脂質をほとんど含有しないことから、アセトニトリル/ヘキサン分配を省略し、抽出溶媒 10 mL の溶媒を除去した後、残留物にアセトン及び *n*-

キサン (1:9) 混液 5 mL を加えて溶解し、固相カートリッジに負荷し精製操作を行ったが、妨害となるピークはなく、良好な回収率が得られた。

表 4 アセトニトリル/ヘキサン分配の分配回数によるイプフェンカルバゾンの回収率 (%)

| | アセトニトリル/ヘキサン分配 | | | |
|-----|----------------|-----|-----|-----|
| | 1回目 | 2回目 | 3回目 | 計 |
| 牛肝臓 | 100 | 0 | 0 | 100 |

(0.1 mg/kg 相当添加、 $n = 2$)

本検討は以下の手順で行った。

- 1) 牛肝臓のブランク試料をアセトン及び *n*-ヘキサン (1:2) 混液で抽出した。
- 2) 抽出液 10 mL の溶媒を除去してイプフェンカルバゾン標準溶液を添加した後、*n*-ヘキサン 20 mL 及び *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 20 mL を添加し、アセトニトリル/ヘキサン分配 (3 回) により脱脂した。
- 3) 各アセトニトリル/ヘキサン分配操作のアセトニトリル層を採取し、その溶媒を除去し、アセトン及び *n*-ヘキサン (1:9) 混液 5 mL に溶解した後、PSA ミニカラムに負荷し、アセトン及び *n*-ヘキサン (1:9) 混液 5 mL で溶出した。
- 4) 全溶出液の溶媒を除去し、アセトニトリル及び水 (3:7) 混液 5 mL に溶解した後、C18 ミニカラムに負荷し、アセトニトリル及び水 (3:7) 混液 5 mL で洗浄した。
- 5) アセトニトリル及び水 (3:2) 混液 10 mL で C18 ミニカラムから溶出した。
- 6) マトリックス検量線により LC-MS/MS により定量した。

3) PSA ミニカラム精製

畜水産食品では、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、PSA ミニカラム (InertSep PSA、500 mg/6 mL、GL サイエンス社製) による精製効果を検証した。脂肪酸等が多く、分析が困難と考えられた牛肝臓を用いて検討した。アセトニトリル/ヘキサン分配後のアセトニトリル層を PSA ミニカラムに負荷したところ、イプフェンカルバゾンは保持されずに溶出した。そこで、アセトニトリル/ヘキサン分配後のアセトニトリル層を溶媒除去し、各濃度に調製したアセトン及び *n*-ヘキサン混液で溶解し、PSA ミニカラムに負荷し回収率を比較した。その結果、アセトン及び *n*-ヘキサン (10:90) 混液、アセトン及び *n*-ヘキサン (15:85) 混液及びアセトン及び *n*-ヘキサン (20:80) 混液各 10 mL で溶出させることにより、どれも約 90% の十分な回収率が得られた (表 5)。アセトン比率が増えると夾雑物が PSA ミニカラムから溶出されてしまう可能性も考えられることから、アセトニトリル/ヘキサン分配後のアセトニトリル層の溶媒を除去し、アセトン及び *n*-ヘキサン (1:9) 混液 5 mL で溶解し、PSA ミニカラムに負荷し、負荷液が入っていた容器をアセトン及び *n*-ヘキサン (1:9) 混液 5 mL で洗い、洗液をカラムに注入し、負荷液を含む全溶出液を採取する操作を採用した。

アセトニトリル/ヘキサン分配と同様に、PSA ミニカラムからの回収率が牛肝臓試料にお

いて 100%より若干低かったことが、試料マトリックスによる影響か否か判断するため、マトリックス検量線を用いて、採用した条件での回収率を検討した。その結果、マトリックス検量線を用いた場合、イプフェンカルバゾンの PSA ミニカラムからの回収率は、100.4%($n=2$)であった。

表 5 InertSep PSA ミニカラムからのイプフェンカルバゾン回収率 (%)

| | アセトン及び n -ヘキサン混液 (10 mL) | | | | | |
|-----|----------------------------|------|------|-------|-------|-------|
| | 0:100 | 2:98 | 5:95 | 10:90 | 15:85 | 20:80 |
| 牛肝臓 | 2.7 | 64.8 | 75.8 | 92.3 | 94.2 | 89.5 |

(0.1 mg/kg 相当添加、 $n = 2$)

本検討は以下の手順で行った。

- 1) 牛肝臓のブランク試料をアセトン及び n -ヘキサン (1 : 2) 混液で抽出した。
- 2) 抽出液 10 mL の溶媒を除去した後、 n -ヘキサン 20 mL 及び n -ヘキサン飽和アセトニトリル 20 mL を添加し、アセトニトリル/ヘキサン分配により脱脂した。
- 3) アセトニトリル層の溶媒を除去し、イプフェンカルバゾン標準溶液を添加し、各混合比率のアセトン及び n -ヘキサン混液 5 mL に溶解した後、PSA ミニカラムに負荷し、各混合比率のアセトン及び n -ヘキサン混液 5 mL で溶出した。
- 4) 全溶出液の溶媒を除去し、アセトニトリル及び水 (3 : 7) 混液 5 mL に溶解した後、C18 ミニカラムに負荷し、アセトニトリル及び水 (3 : 7) 混液 5 mL で洗浄した。
- 5) アセトニトリル及び水 (3 : 2) 混液 10 mL で C18 ミニカラムから溶出した。

さらに、Varian 社製の Bond Elut LRC PSA (500 mg/10 mL) 及び Waters 社製の Sep-Pak Vac 6cc PSA Cartridges (500 mg) についても検討したが、InertSep PSA (GL サイエンス社製) と同等の回収率が得られた (表 6)。

表 6 各メーカーの PSA ミニカラムからのイプフェンカルバゾン回収率 (%)

| | InertSep PSA GL サイエンス | Bond Elut PSA VARIAN | Sep-Pak Vac 6cc PSA Waters |
|-----|--------------------------|-------------------------|-------------------------------|
| 牛肝臓 | 92.1 | 96.4 | 95.9 |

(0.1 mg/kg 相当添加、 $n=2$)

本検討は以下の手順で行った。

- 1) 牛肝臓のブランク試料をアセトン及び n -ヘキサン (1 : 2) 混液で抽出した。
- 2) 抽出液 10 mL の溶媒を除去した後、 n -ヘキサン 20 mL 及び n -ヘキサン飽和アセトニトリル 20 mL を添加し、アセトニトリル/ヘキサン分配により脱脂した。
- 3) アセトニトリル層の溶媒を除去し、イプフェンカルバゾン標準溶液を添加し、アセトン及び n -ヘキサン (1 : 9) 混液 5 mL に溶解した後、PSA ミニカラムに負荷し、アセトン及び n -ヘキサン (1 : 9) 混液 5 mL で溶出した。
- 4) 全溶出液の溶媒を除去し、アセトニトリル及び水 (3 : 7) 混液 5 mL に溶解した後、C18 ミニカラムに負荷し、アセトニトリル及び水 (3 : 7) 混液 5 mL で洗浄した。
- 5) アセトニトリル及び水 (3 : 2) 混液 10 mL で C18 ミニカラムから溶出した。
- 6) 絶対検量線により LC-MS/MS により定量した。

4) C18 ミニカラム精製

PSA ミニカラム精製のみでは、夾雑物の除去が不十分であり透明な試験溶液が得られなかった。そこで、イプフェンカルバゾンの更なる精製及び分析カラムの保護を目的として、C18 ミニカラム (InertSep C18、500 mg/6 mL、GL サイエンス社製) による精製を試みた。PSA ミニカラムの溶出液の溶媒を除去し、残留物をアセトニトリル及び水 (3 : 7) 混液に溶解後、C18 ミニカラムに負荷し、アセトニトリル及び水 (3 : 7) 混液、(4 : 6) 混液、(5 : 5) 混液、(6 : 4) 混液及び (7 : 3) 混液 各 10 mL で溶出させ、目的成分の溶出状況について溶媒標準溶液 (マトリックスフリー) 及び牛肝臓を用いて確認した (表 7 及び表 8)。溶媒標準溶液を用いた場合、イプフェンカルバゾンはアセトニトリル及び水 (3 : 7) 混液及び (4 : 6) 混液各 10 mL では溶出されず、アセトニトリル及び水 (5 : 5) 混液 10 mL では約 60 %溶出した。アセトニトリル及び水 (6 : 4) 混液及び (7 : 3) 混液各 10 mL では、ともに 100 %の回収率であった。さらに、C18 ミニカラムをアセトニトリル 10mL で追加溶出させた結果、何れの C18 ミニカラムでもイプフェンカルバゾンは 100%回収されていた。一方、牛肝臓試料を用いた場合、イプフェンカルバゾンはアセトニトリル及び水 (3 : 7) 混液及び (4 : 6) 混液では溶出されず、アセトニトリル及び水 (5 : 5) 混液では約 50 %溶出した。アセトニトリル及び水 (6 : 4) 混液及び (7 : 3) 混液では、ともに約 90 %の回収率であった。さらに、アセトニトリル 10mL で追加溶出させた結果、アセトニトリル及び水 (6 : 4) 混液及び (7 : 3) 混液各 10mL で溶出させた C18 ミニカラムからのイプフェンカルバゾンの溶出は認められなかった。したがって、精製効率を考慮しアセトニトリル及び水 (6 : 4) 混液での溶出を採用した。

アセトニトリル/ヘキサン分配や PSA ミニカラムからの回収率と同様に、C18 ミニカラムからの回収率が牛肝臓試料において 100%より若干低かったことが、試料マトリックスによる影響か否か判断するため、マトリックス検量線を用いて、採用した条件での回収率を検討した。その結果、マトリックス検量線を用いた場合、イプフェンカルバゾンの C18 ミニカラムからの回収率は、100.0% (n=2) であった。

表 7 InertSep C18 (500 mg)からのイプフェンカルバゾン溶出率 (%)

| 溶出液 (mL) | アセトニトリル及び水混液の比率 | | | | |
|--------------|-----------------|-----|-----|-----|-----|
| | 3:7 | 4:6 | 5:5 | 6:4 | 7:3 |
| 0-10* | ND | ND | 57 | 106 | 106 |
| 標準溶液 10-20** | 101 | 101 | 49 | ND | ND |
| 計 | 101 | 101 | 106 | 106 | 106 |

* 各比率のアセトニトリル及び水混液10mLにて溶出

**アセトニトリル10mLにて溶出

表 8 InertSep C18 (500 mg)からのイブフェンカルバゾン溶出率 (%)

| 溶出液 (mL) | アセトニトリル及び水混液の比率 | | | | |
|----------------|-----------------|-----|-----|-----|-----|
| | 3:7 | 4:6 | 5:5 | 6:4 | 7:3 |
| 0-10* | ND | ND | 51 | 90 | 89 |
| 牛肝臓 10-20** | 80 | 85 | 36 | 0 | 0 |
| 計 | 80 | 85 | 87 | 90 | 89 |

*各比率のアセトニトリル及び水混液10mLにて溶出

**アセトニトリル10mLにて溶出

さらに、Varian 社製の Bond Elut C18 (500 mg/3 mL) についても検討したが、InertSep C18 (GL サイエンス社製) と同等の回収率が得られた (表 9)。

表 9 各メーカーの C18 ミニカラム (500mg) からのイブフェンカルバゾン回収率 (%)

| | InertSep C18 GL サイエンス | Bond Elut C18 VARIAN |
|-----|--------------------------|-------------------------|
| 牛肝臓 | 83.2 | 87.7 |

(0.1 mg/kg 相当添加、n=2)

本検討は以下の手順で行った。

- 1) 牛肝臓のブランク試料をアセトン及び *n*-ヘキサン (1:2) 混液で抽出した。
- 2) 抽出液 10 mL の溶媒を除去した後、*n*-ヘキサン 20 mL 及び *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 20 mL を添加し、アセトニトリル/ヘキサン分配により脱脂した。
- 3) アセトニトリル層の溶媒を除去し、アセトン及び *n*-ヘキサン (1:9) 混液 5 mL に溶解した後、PSA ミニカラムに負荷し、アセトン及び *n*-ヘキサン (1:9) 混液 5 mL で溶出した。
- 4) 全溶出液の溶媒を除去し、イブフェンカルバゾン標準溶液を添加し、アセトニトリル及び水 (3:7) 混液 5 mL に溶解した後、C18 ミニカラムに負荷し、アセトニトリル及び水 (3:7) 混液 5 mL で洗浄した
- 5) アセトニトリル及び水 (3:2) 混液 10 mL で C18 ミニカラムから溶出した。
- 6) 絶対検量線により LC-MS/MS により定量した。

3. 添加回収試験

牛筋肉、牛脂、牛肝臓、牛乳、鶏卵、はちみつ、うなぎ及びしじみの 8 食品を試料に用いて、実験方法の 7. 試験溶液の調製に従って添加回収試験 (基準値濃度または定量限界値濃度) を実施した。代表的な添加回収試験で 100%回収率に相当する溶媒標準溶液、各ブランク試料及び添加回収試験のクロマトグラムを図 6-1 及び図 6-2 に、ブランク試料の SCAN 測定におけるクロマトグラムを図 7-1 及び図 7-2 に示した。特に、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) 選択性

選択性の検討結果を表 10 に示した。検討した何れの試料においても、定量イオン及び定性イオンともにイプフェンカルバゾンの定量を妨害するピークは認められなかった。

表 10 選択性の評価

| 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*4 | 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) |
| 1 | イプフェンカルバゾン | 牛の筋肉 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 定量限界 0.01 | < 0.333 | 面積 | 53 | 12049 | 0.004 | ○ | |
| 2 | イプフェンカルバゾン | 牛の脂肪 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 定量限界 0.01 | < 0.333 | 面積 | 24 | 7138 | 0.003 | ○ | |
| 3 | イプフェンカルバゾン | 牛の肝臓 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 定量限界 0.01 | < 0.333 | 面積 | 11 | 10455 | 0.001 | ○ | |
| 4 | イプフェンカルバゾン | 鶏卵 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 定量限界 0.01 | < 0.333 | 面積 | 14 | 9289 | 0.002 | ○ | |
| 5 | イプフェンカルバゾン | 牛乳 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 定量限界 0.01 | < 0.333 | 面積 | 15 | 7167 | 0.002 | ○ | |
| 6 | イプフェンカルバゾン | はちみつ | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 定量限界 0.01 | < 0.333 | 面積 | 20 | 7570 | 0.003 | ○ | |
| 7 | イプフェンカルバゾン | うなぎ | 0.04 | 0.04 | 0.04 | 定量限界 0.04 | < 0.333 | 面積 | 56 | 28965 | 0.002 | ○ | |
| 8 | イプフェンカルバゾン | しじみ | 0.04 | 0.04 | 0.04 | 定量限界 0.04 | < 0.333 | 面積 | 34 | 28387 | 0.001 | ○ | |

*1 基準値は、基準値未設定の場合には一律基準(0.01 ppm)を用いる。

2 添加濃度と評価対象濃度が異なる場合(定量限界と基準値との関係が、『定量限界<基準値<定量限界×3』となる場合)には、『』が表示される。『*』が表示された分析対象化合物は、添加濃度と評価対象濃度が異なるため、別途、定量限界濃度相当のマトリックス添加標準溶液を調製して評価する。

*3 ブランク試料及び標準溶液の順に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。)

*4 試料中の濃度が「評価対象濃度(基準値濃度又は定量限界濃度)」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。

*5 面積(高さ)比が、妨害ピークの許容範囲の判定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、現在までのところ、イプフェンカルバゾンの残留基準値は米(玄米)に 0.05 ppm、魚介類に 0.04 ppm の基準値が設定されている。その他の食品には一律基準値が適用される。そこで、添加回収試験は残留基準値の設定されているうなぎ及びしじみ試料には、基準値濃度を、その他試料には一律基準値濃度を添加し、回収率を検討した。

真度及び併行精度の検討結果を表 11 に示した。鶏卵以外の畜水産食品に対する平均回収率は 83.8~98.2%であった。一方、鶏卵試料における平均回収率は 73.4%であった。また、併行精度の相対標準偏差は 1.6~5.1%であった。鶏卵試料において回収率の低下が認められたが、回収率及び併行精度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。さらに、添加回収試験のクロマトグラムより計算した S/N 比の平均値は 1370.1~3491.5 であった。

表 11 真度、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 (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 | | | |
| 1 | イプフェンカルバゾン | 牛の筋肉 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | | 11825 | 5 | 0.9996 | 93.7 | 95.9 | 93.7 | 94.7 | 90.5 | 93.7 | 2.1 | 2238.2 | 1693.0 | 1965.6 | | | |
| 2 | イプフェンカルバゾン | 牛の脂肪 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | | 14491 | 19 | 0.9999 | 85.2 | 81.0 | 85.2 | 85.2 | 86.0 | 84.5 | 2.3 | 2212.0 | 1519.9 | 1866.0 | | | |
| 3 | イプフェンカルバゾン | 牛の肝臓 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | | 11562 | -46 | 1.0000 | 84.4 | 87.5 | 81.4 | 82.7 | 85.0 | 84.2 | 2.8 | 2270.9 | 1441.3 | 1856.1 | | | |
| 4 | イプフェンカルバゾン | 鶏卵 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | | 11734 | -64 | 0.9997 | 74.1 | 74.0 | 72.3 | 71.9 | 74.7 | 73.4 | 1.6 | 1573.9 | 1166.2 | 1370.1 | | | |
| 5 | イプフェンカルバゾン | 牛乳 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | | 14491 | 19 | 0.9999 | 86.8 | 87.4 | 91.1 | 89.3 | 85.8 | 88.1 | 2.4 | 2071.6 | 1635.3 | 1853.5 | | | |
| 6 | イプフェンカルバゾン | はちみつ | 0.01 | 0.01 | 0.01 | | 16713 | -201 | 0.9994 | 83.8 | 89.4 | 86.5 | 79.3 | 80.0 | 83.8 | 5.1 | 2322.8 | 1488.8 | 1905.8 | | | |
| 7 | イプフェンカルバゾン | うなぎ | 0.04 | 0.04 | 0.04 | | 11293 | 690 | 0.9999 | 93.7 | 99.2 | 101.2 | 100.7 | 96.3 | 98.2 | 3.2 | 3788.8 | 2887.5 | 3338.2 | | | |
| 8 | イプフェンカルバゾン | しじみ | 0.04 | 0.04 | 0.04 | | 11293 | 690 | 0.9999 | 93.1 | 95.4 | 92.7 | 93.1 | 97.1 | 94.3 | 2.0 | 3835.7 | 3147.2 | 3491.5 | | | |

*1 基準値は、基準値未設定の場合には一律基準(0.01 ppm)を用いる。

2 添加濃度が定量限界濃度と異なる場合には、『』が表示される。その場合には、S/N比の算出は不要であるが、別途、定量限界の推定を行う。

*3 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比を求める。

鶏卵試料では、溶媒標準溶液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、0.75 であり若干のイオン化抑制が認められた（表 15）。添加回収試験における鶏卵試料の真度（ $n=5$ ）は 73.4%であり、鶏卵以外の試料と比較して回収率が低かったのは、マトリックスによるイオン化抑制効果の影響であると推察される。鶏卵試料で確認されたマトリックスによるイオン化抑制効果について、試験溶液の希釈により回収率が改善されるかについて検討した（表 12）。鶏卵試料の試験溶液を 5 倍希釈して分析した結果、真度（ $n=5$ ）は 83.3%、併行精度は 3.0%及び溶媒標準溶液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、0.92 にまで改善された。

表 12 鶏卵試料におけるマトリックス効果の影響

| | 希釈 | 添加回収試験 ($n=5$) | | Peak area ratio * |
|----|----|------------------|---------|-------------------|
| | | 回収率 (%) | RSD (%) | |
| 鶏卵 | なし | 73.4 | 1.6 | 0.75 |
| | 5倍 | 83.3 | 3.0 | 0.92 |

(0.01 mg/kg 相当添加)

* Matrix standard/standard in solvent ($n=2$)

本検討は以下の手順で行った。

- 1) 鶏卵試料にイプフェンカルバゾン標準溶液を添加し、アセトン及び n -ヘキサン（1 : 2）混液で抽出した。
- 2) 抽出液 10 mL の溶媒を除去した後、 n -ヘキサン 20 mL 及び n -ヘキサン飽和アセトニトリル 20 mL を添加し、アセトニトリル/ヘキサン分配により脱脂した。
- 3) アセトニトリル層の溶媒を除去し、アセトン及び n -ヘキサン（1 : 9）混液 10 mL に溶解した後、PSA ミニカラムに負荷した。
- 4) 全溶出液の溶媒を除去し、アセトニトリル及び水（3 : 7）混液 10 mL に溶解した後、C18 ミニカラムに負荷した。
- 5) アセトニトリル及び水（3 : 2）混液 10 mL で C18 ミニカラムから溶出した。
- 6) 必要により、試験溶液をアセトニトリル及び水（3 : 2）混液で 5 倍希釈した。
- 7) 絶対検量線により LC-MS/MS により定量した。

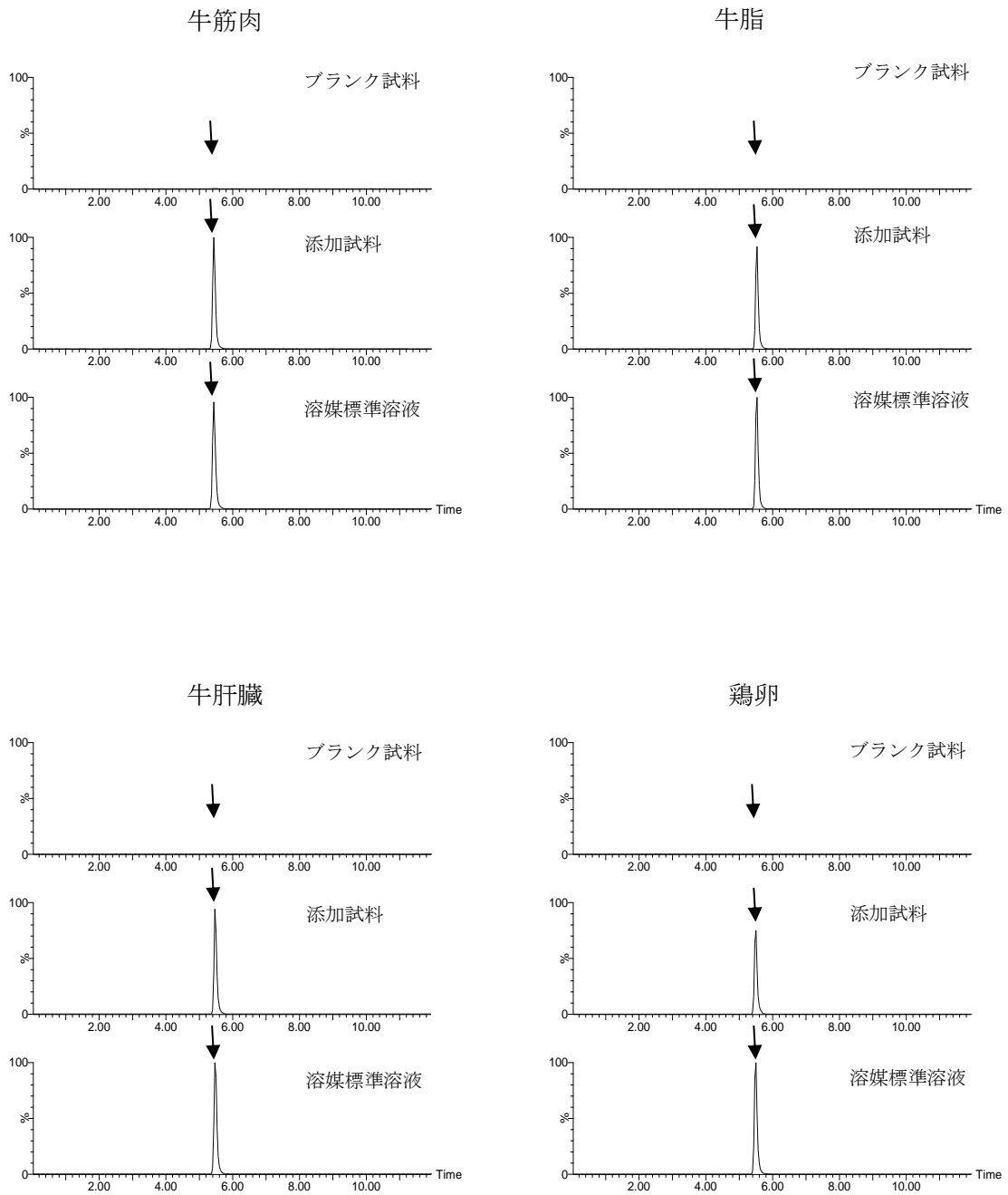


図 6-1 添加回収試験の代表的なイプフェンカルバゾンの SRM クロマトグラム (m/z 427 \rightarrow 198)、添加濃度 : 0.01 ppm

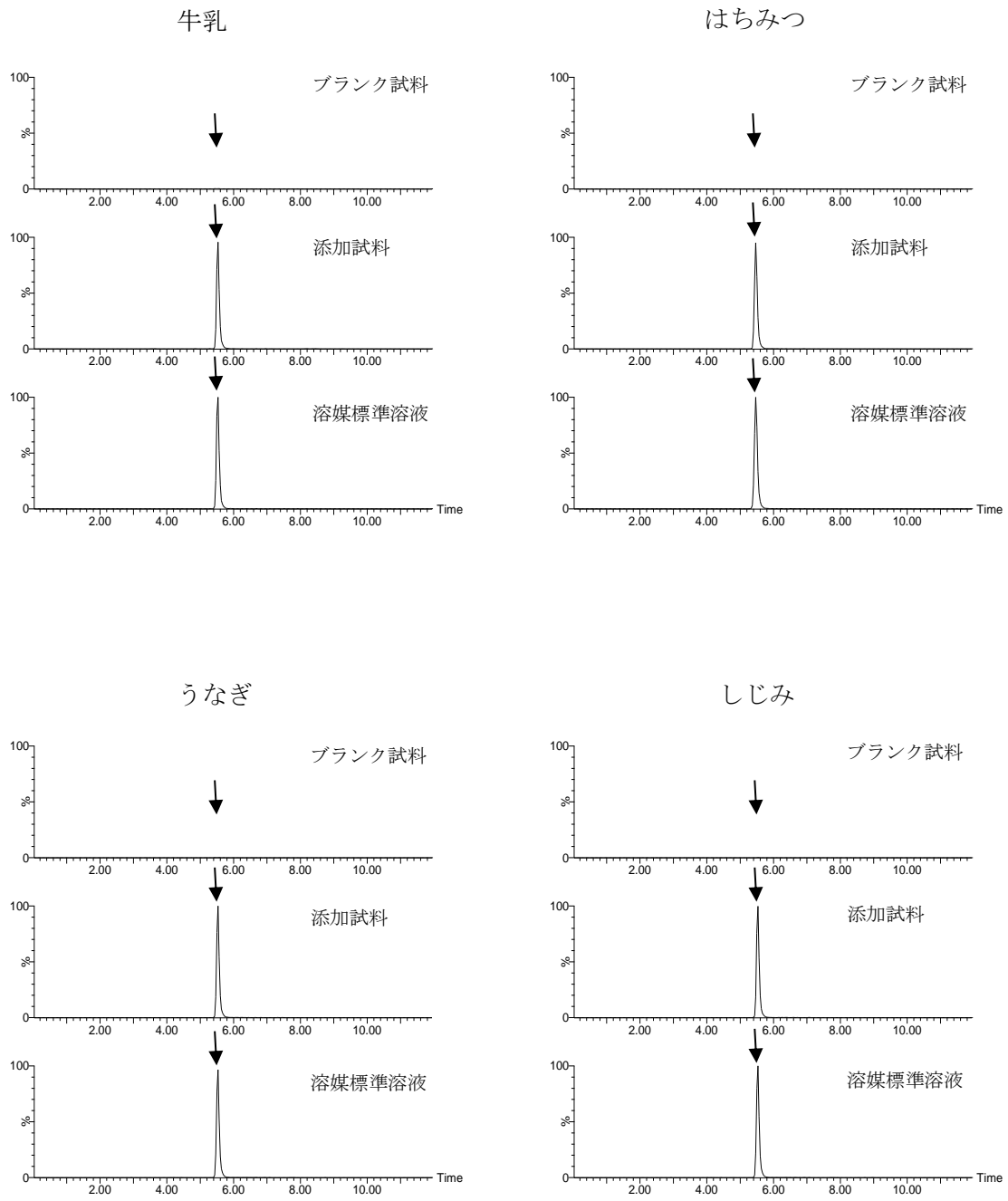


図 6-2 添加回収試験の代表的なイプフェンカルバゾンの SRM クロマトグラム (m/z 427 \rightarrow 198)、添加濃度 : 0.01 ppm (うなぎ及びしじみは 0.04 ppm)

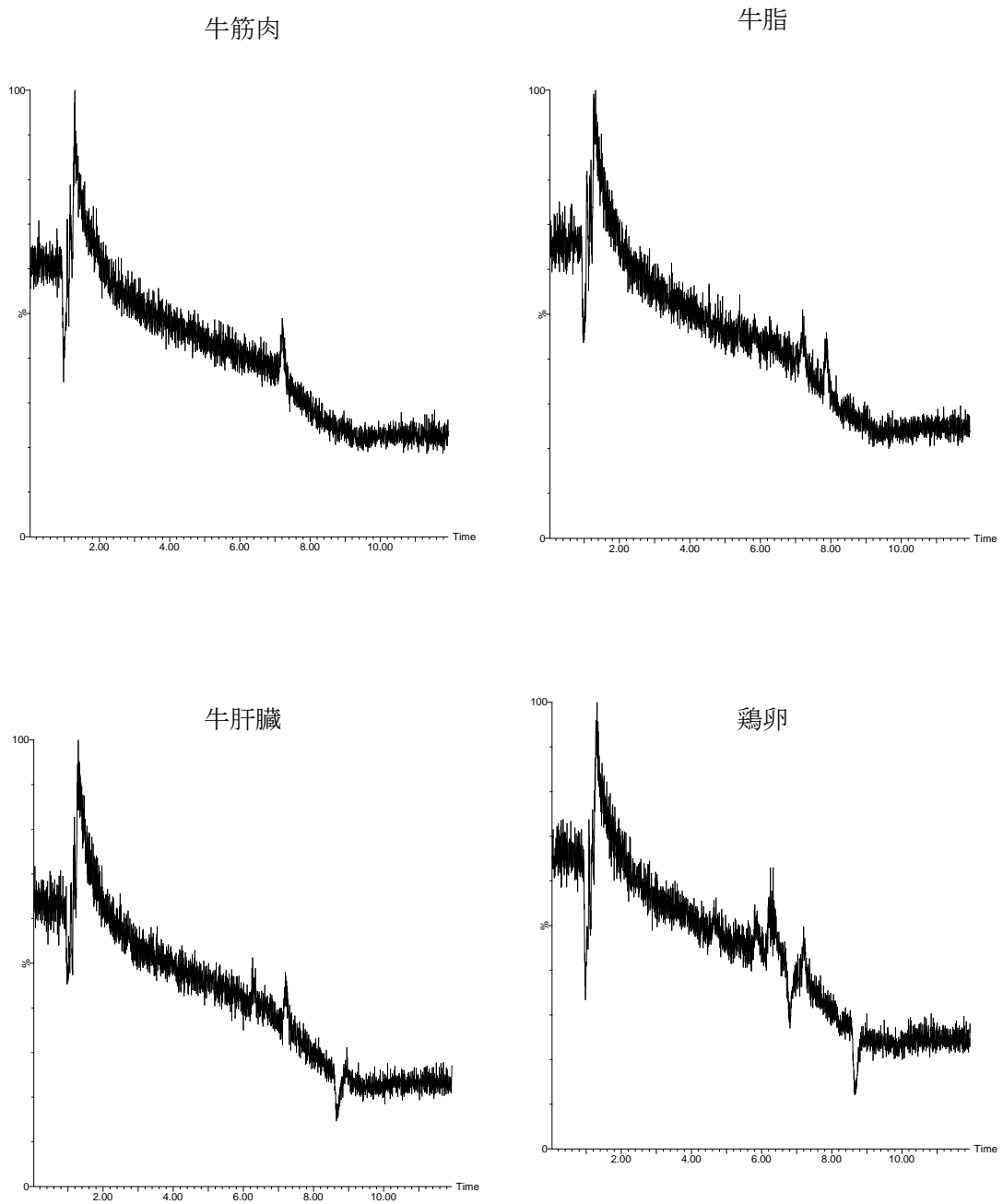


図 7-1 ブランク試料の代表的なトータルイオンクロマトグラム
 スキャン範囲：50~550 amu
 測定条件：ESI(+)、CV=22 V (CV: corn voltage)

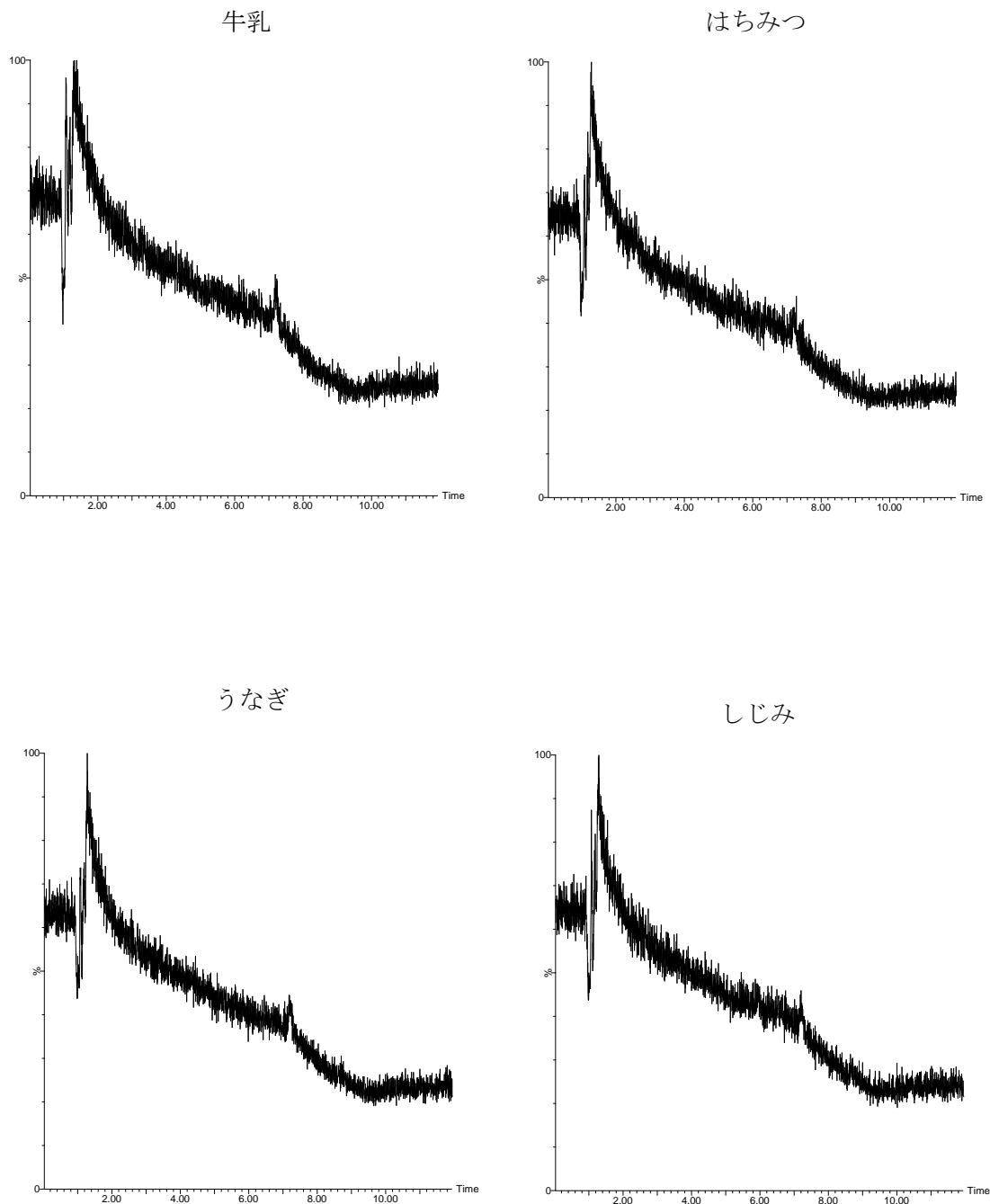


図 7-2 ブランク試料の代表的なトータルイオンクロマトグラム
 スキャン範囲：50~550 amu
 測定条件：ESI(+)、CV=22 V (CV: corn voltage)

3) 定量限界の推定

本検討に用いた装置 (Xevo TQ MS) における定量限界の推定を行った。各試料における代表的なブランク試料、定量限界推定値の添加試料及び溶媒標準溶液のクロマトグラムを図 8-1 及び図 8-2 に示した。定量限界の推定濃度を試料換算で一律基準の 1/10 の 0.001 mg/kg として評価したが、何れの試料においても S/N 比は 86 以上あり、十分測定できる結果であった (表 13 及び表 14)。

表 13 定量限界の推定

| 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 | ブランク ^{*5} | 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 | 面積比(A1/A2) | S/N比 |
| | | | | | | | | | | n=1 | n=2 | 平均 | n=1 | n=2 | 平均 | | | | | | | | | |
| 1 | イブフェンカルバゾン | 牛の筋肉 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | | 0.0001 | 面積 | 53 | 1302 | 1338 | 1267.0 | 1249 | 1191 | 1220.0 | | | 103.9 | #DIV/0! | | | | | |
| 2 | イブフェンカルバゾン | 牛の脂肪 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | | 0.0001 | 面積 | 24 | 746 | 727 | 712.5 | 732 | 748 | 740.0 | | | 96.3 | #DIV/0! | | | | | |
| 3 | イブフェンカルバゾン | 牛の肝臓 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | | 0.0001 | 面積 | 11 | 1118 | 1056 | 1076.0 | 1189 | 1170 | 1179.5 | | | 91.2 | #DIV/0! | | | | | |
| 4 | イブフェンカルバゾン | 鶏卵 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | | 0.0001 | 面積 | 14 | 912 | 910 | 897.0 | 1213 | 1161 | 1187.0 | | | 75.6 | #DIV/0! | | | | | |
| 5 | イブフェンカルバゾン | 牛乳 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | | 0.0001 | 面積 | 15 | 834 | 760 | 782.0 | 770 | 763 | 766.5 | | | 102.0 | #DIV/0! | | | | | |
| 6 | イブフェンカルバゾン | はちみつ | 0.01 | 0.01 | 0.01 | | 0.0001 | 面積 | 20 | 772 | 777 | 754.5 | 758 | 778 | 768.0 | | | 98.2 | #DIV/0! | | | | | |
| 7 | イブフェンカルバゾン | うなぎ | 0.04 | 0.04 | 0.04 | | 0.0001 | 面積 | 56 | 736 | 727 | 675.5 | 746 | 691 | 718.5 | | | 94.0 | #DIV/0! | | | | | |
| 8 | イブフェンカルバゾン | ししめ | 0.04 | 0.04 | 0.04 | | 0.0001 | 面積 | 34 | 727 | 758 | 708.5 | 714 | 708 | 711.0 | | | 99.6 | #DIV/0! | | | | | |

*1 基準値は、基準値未設定の場合には一律基準(0.01 ppm)を用いる。
 2 定量限界の推定を行う対象(添加濃度と定量限界濃度とが異なる場合)には、『』が表示される。
 *3 試料中の濃度が定量限界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。
 *4 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回以上測定する。(必要に応じて超純注入を行う。)
 *5 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。
 *6 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 14 S/N 比

| No. | 分析対象化合物 | 食品名 | 定量イオン(m/z) | 定量限界(ppm) | 基準値 ^{*1} (ppm) | 添加濃度(ppm) | S/N比を求め対象 ^{*2} | マトリックス添加標準溶液濃度 ^{*3} (mg/L) | Max. n=1 | | | | | | | | | | Min. n=2 | | | | S/N比 | | 備考 |
|-----|------------|------|------------|-----------|-------------------------|-----------|-------------------------|-------------------------------------|---------------|-----------|---------|---------|---------|--------|---------------|-----------|---------|---------|----------|--------|----------|----------|-------|--|----|
| | | | | | | | | | ピークの最大値(Dmax) | ピークの高さ(S) | ピーク幅(N) | ノイズ | | | ピークの最大値(Dmax) | ピークの高さ(S) | ピーク幅(N) | ノイズ | | | Max. n=1 | Min. n=2 | | | |
| | | | | | | | | | | | | 最大値(E1) | 最小値(E2) | 中央値(C) | | | | 最大値(E1) | 最小値(E2) | 中央値(C) | | | | | |
| 1 | イブフェンカルバゾン | 牛の筋肉 | 198 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 添加 | 0.0005 | 248 | 2 | 0 | 1 | 247.8 | 245.2 | 0.8 | 248 | 5 | 0 | 247.0 | 244.5 | 2.0 | 308.3 | 122.3 | | |
| 2 | イブフェンカルバゾン | 牛の脂肪 | 198 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 添加 | 0.0005 | 248 | 4 | 0 | 2 | 247.2 | 245.2 | 1.6 | 248 | 6 | 0 | 246.8 | 243.8 | 2.4 | 153.3 | 101.6 | | |
| 3 | イブフェンカルバゾン | 牛の肝臓 | 198 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 添加 | 0.0005 | 248 | 2 | 0 | 1 | 247.6 | 246.6 | 0.8 | 248 | 3 | 0 | 247.4 | 245.9 | 1.2 | 308.3 | 204.9 | | |
| 4 | イブフェンカルバゾン | 鶏卵 | 198 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 添加 | 0.0005 | 248 | 4 | 0 | 2 | 247.2 | 245.2 | 1.6 | 248 | 6 | 0 | 246.8 | 243.8 | 2.4 | 153.3 | 101.6 | | |
| 5 | イブフェンカルバゾン | 牛乳 | 198 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 添加 | 0.0005 | 248 | 5 | 0 | 3 | 247.0 | 244.5 | 2.0 | 248 | 6 | 0 | 246.8 | 243.8 | 2.4 | 122.3 | 101.6 | | |
| 6 | イブフェンカルバゾン | はちみつ | 198 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 添加 | 0.0005 | 248 | 5 | 0 | 3 | 247.0 | 244.5 | 2.0 | 248 | 7 | 0 | 246.6 | 243.1 | 2.8 | 122.3 | 86.8 | | |
| 7 | イブフェンカルバゾン | うなぎ | 198 | 0.04 | 0.04 | 0.04 | 添加 | 0.0005 | 248 | 4 | 0 | 2 | 247.2 | 245.2 | 1.6 | 248 | 6 | 0 | 246.8 | 243.8 | 2.4 | 153.3 | 101.6 | | |
| 8 | イブフェンカルバゾン | ししめ | 198 | 0.04 | 0.04 | 0.04 | 添加 | 0.0005 | 248 | 5 | 0 | 3 | 247.0 | 244.5 | 2.0 | 248 | 6 | 0 | 246.8 | 243.8 | 2.4 | 122.3 | 101.6 | | |

*1 基準値は、基準値未設定の場合には一律基準(0.01 ppm)を用いる。
 *2 添加試料から得られるピークのS/N比を求める場合には『添加』が、マトリックス添加標準溶液から得られるピークのS/N比を求める場合には『標準』が表示される。
 *3 試料中の濃度が定量限界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)を作成する。
 *4 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。

4) 試料マトリックスの測定値への影響

添加回収濃度(基準値相当又は一律基準値相当)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ピーク面積値の比を比較し、試料マトリックスの測定値への影響について検討したところ、鶏卵以外の試料では、0.88~0.98 の範囲であり、顕著なイオン化抑制及び増強効果は低く、許容できる範囲であると考えられた。一方、鶏卵試料では、溶媒標準溶液に対するマトリックス添加標準溶液のピーク面積値の比は、0.75 であり若干のイオン化抑制が認められた(表 15)。

表 15 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 (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 | | | | | | 備考 | | | |
|-----|------------|------|---------------|----------------|---------------|------------------------|--------------|------------|----------------|-------|---------|--------|-------|---------|------------------|----|
| | | | | | | | 面積又は 高さの別 | ブランク *4 | マトリックス添加標準溶液*5 | | | 溶媒標準溶液 | | | ピーク面積 (高さ)比*6 | |
| | | | | | | | | | n=1 | n=2 | 平均 | n=1 | | n=2 | | 平均 |
| 1 | イブフェンカルバゾン | 牛の筋肉 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.001 | 面積 | 53 | 12049 | 11921 | 11932.0 | 12192 | 12228 | 12210.0 | 0.98 | |
| 2 | イブフェンカルバゾン | 牛の脂肪 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.001 | 面積 | 24 | 7138 | 6952 | 7021.0 | 7383 | 7067 | 7225.0 | 0.97 | |
| 3 | イブフェンカルバゾン | 牛の肝臓 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.001 | 面積 | 11 | 10455 | 10441 | 10437.0 | 11765 | 11890 | 11827.5 | 0.88 | |
| 4 | イブフェンカルバゾン | 鶏卵 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.001 | 面積 | 14 | 9289 | 9400 | 9330.5 | 12502 | 12262 | 12382.0 | 0.75 | |
| 5 | イブフェンカルバゾン | 牛乳 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.001 | 面積 | 15 | 7167 | 7370 | 7253.5 | 7401 | 7434 | 7417.5 | 0.98 | |
| 6 | イブフェンカルバゾン | はちみつ | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.001 | 面積 | 20 | 7570 | 7552 | 7541.0 | 7923 | 7964 | 7943.5 | 0.95 | |
| 7 | イブフェンカルバゾン | うなぎ | 0.04 | 0.04 | 0.04 | 0.004 | 面積 | 56 | 28965 | 28970 | 28911.5 | 29733 | 29444 | 29588.5 | 0.98 | |
| 8 | イブフェンカルバゾン | しじみ | 0.04 | 0.04 | 0.04 | 0.004 | 面積 | 34 | 28387 | 27866 | 28092.5 | 28441 | 28844 | 28642.5 | 0.98 | |

- *1 基準値は、基準値未設定の場合には一律基準(0.01 ppm)を用いる。
- *2 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(溶媒標準溶液)を作成する。
- *3 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。)
- *4 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。
- *5 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。
- *6 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。

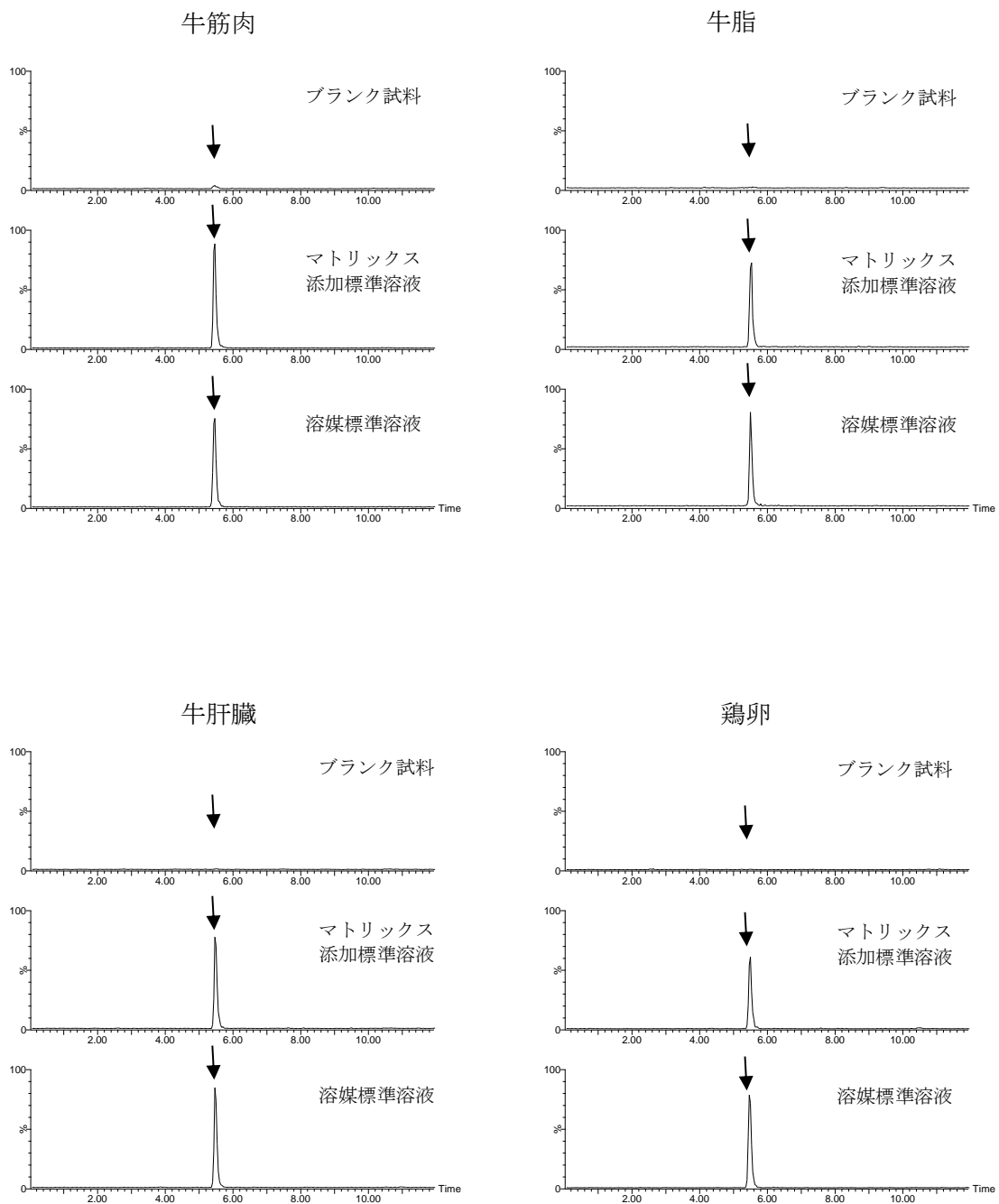


図 8-1 定量限界の推定における代表的なイプフェンカルバジンの SRM クロマトグラム (m/z 427 \rightarrow 198)、添加濃度 : 0.001 ppm

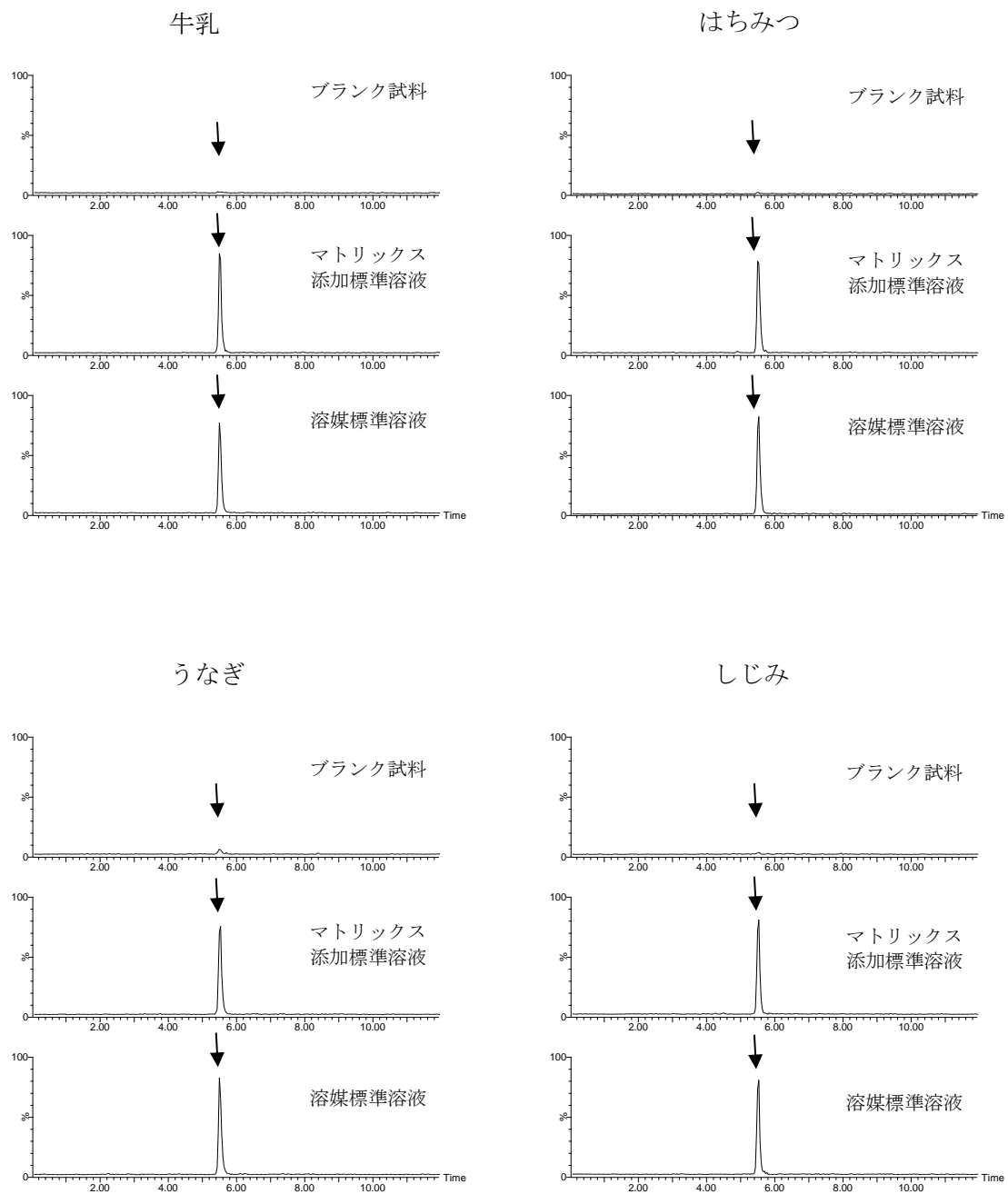


図 8-2 定量限界の推定における代表的なイプフェンカルバゾンの SRM クロマトグラム (m/z 427 \rightarrow 198)、添加濃度 : 0.001 ppm