

※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（農産物）

プロピリスルフロンの試験法（農産物）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ム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関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。

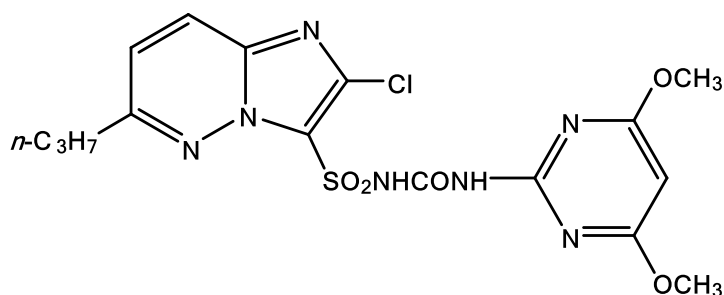
適用作物は水稻である。

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、農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、新たに農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：

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

米（玄米）：0.05 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玄米を用いた。

玄米：425 µmの標準網ふるいを通して均一化した。

2. 試薬・試液

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、0.5 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、0.000125～0.00375 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、酢酸エチル、*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、ケイソウ土はハイフロスーパーセル（富士フィルム和光純薬製）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）

ロータリーエバポレーター：R-210（BUCHI製）

MS装置：Xevo TQS（Waters製）

LC装置：ACQUITY UPLC（Waters製）

データ処理：MassLynx Ver.4.1（Waters製）

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

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 (°C)	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 (°C)	150			
脱溶媒温度 (°C)	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 (m/z)	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 (m/z)	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ンで0.1 mg/Lに希釈した。さらにこれをアセトニトリル及び水 (3 : 2) 混液で希釈し、0.000125~0.00375 mg/L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

玄米（添加濃度：0.05 ppmまたは0.01 ppm）：試料10.0 gに添加用標準溶液（0.5 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. 試験溶液調製法

1) 抽出

試料10.0 gに水20 mLを加え30分間放置した。これにアセトン100 mL及び1 mol/L塩酸2 mLを加え、ホモジナイズした後、ろ過補助剤（ハイフロスーパーセル）を用いて吸引ろ過した。残留物にアセトン50 mLを加えて同様に操作し、得られた液を合わせ、アセトンで200 mLに定容した。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40℃以下で濃縮し、溶媒を除去した。残留物に飽和塩化ナトリウム溶液10 mL及び酢酸エチル10 mLを加えて振とう抽出した。毎分3,000回転で5分間遠心分離し、酢酸エチル層を得た。水層に酢酸エチル10 mLを加え振とう抽出し、同様に遠心分離した。得られた酢酸エチル層と先の酢酸エチル層を合わせ、ロータリーエバポレーターを用いて40℃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10 mLに溶解した。

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℃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（1：4）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図1に示す。

秤 取

↓ 玄米 10.0 g に水 20 mL を添加し、30 分間放置

アセトンで抽出

↓ アセトン 100 mL 及び 1 mol/L 塩酸 2 mL を加えホモジナイズ

↓ 吸引ろ過

↓ 残留物にアセトン 50 mL を加えホモジナイズ

↓ 吸引ろ過

↓ ろ液を合わせてアセトンで 200 mL に定容

↓ 抽出液 10 mL を窒素気流下で溶媒除去

酢酸エチル転溶

↓ 酢酸エチル 10 mL 及び飽和塩化ナトリウム溶液 10 mL

↓ 振とう 5 分間

↓ 毎分 3,000 回転、5 分間遠心分離

↓ 酢酸エチル層を分取

↓ 酢酸エチル 10 mL を添加し同様に操作

↓ 分取した酢酸エチル層と先の酢酸エチル層を合わせ、減圧濃縮し窒素気流下で溶媒除去

↓ アセトニトリル 10 mL に溶解・・・①

InertSep PSA 500 mg/6 mL

↓ アセトン及びアセトニトリル 各 10 mL でコンディショニング

↓ ①を注入（流出液は捨てる）

↓ アセトニトリル 5 mL 及びアセトン 10 mL で順次洗浄

↓ 1 vol% ギ酸・アセトン溶液 10 mL で溶出し、窒素気流下で溶媒除去

↓ アセトニトリル及び水（1：4）混液 10 mL に溶解・・・②

InertSep C18 500 mg/6 mL

↓ アセトニトリル及び水 各 10 mL でコンディショニング

↓ ②を注入（流出液は捨てる）

↓ アセトニトリル及び水（3：2）混液 10 mL で溶出

↓ アセトニトリル及び水（3：2）混液で正確に 10 mL とする

試験溶液

↓

LC-MS/MS

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. 試験溶液調製法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

玄米試料の添加回収試験における回収率100%相当濃度の10倍濃度標準溶液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。

[検討結果及び考察]

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。

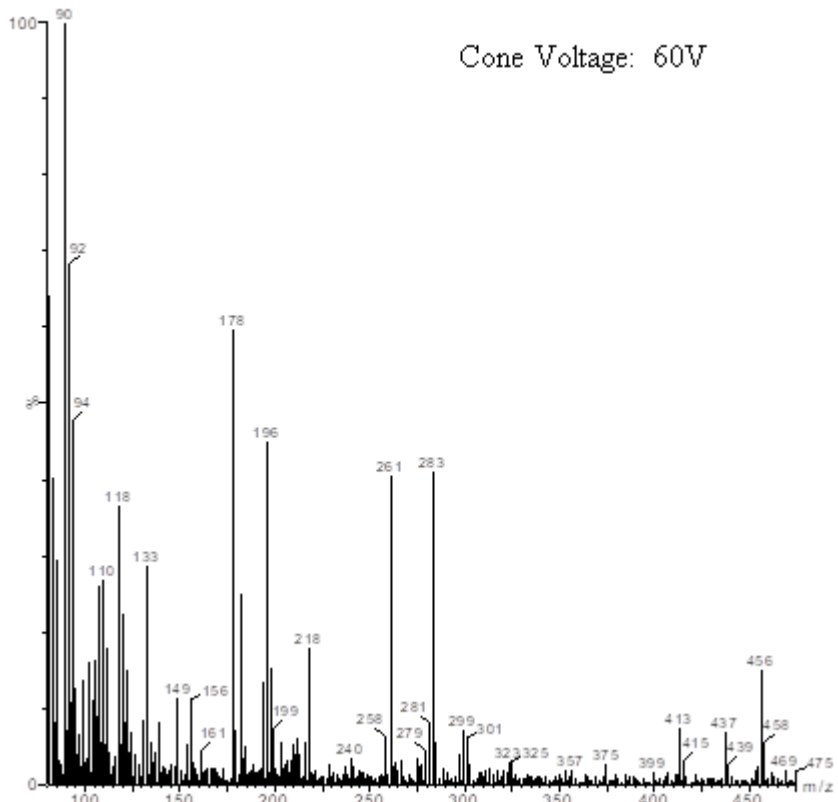


図2 MS spectrum of propyrisulfuron in positive mode

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。プロピルスルフロンの m/z 456のプロダクトイオンスキャンの結果を示す (図3)。

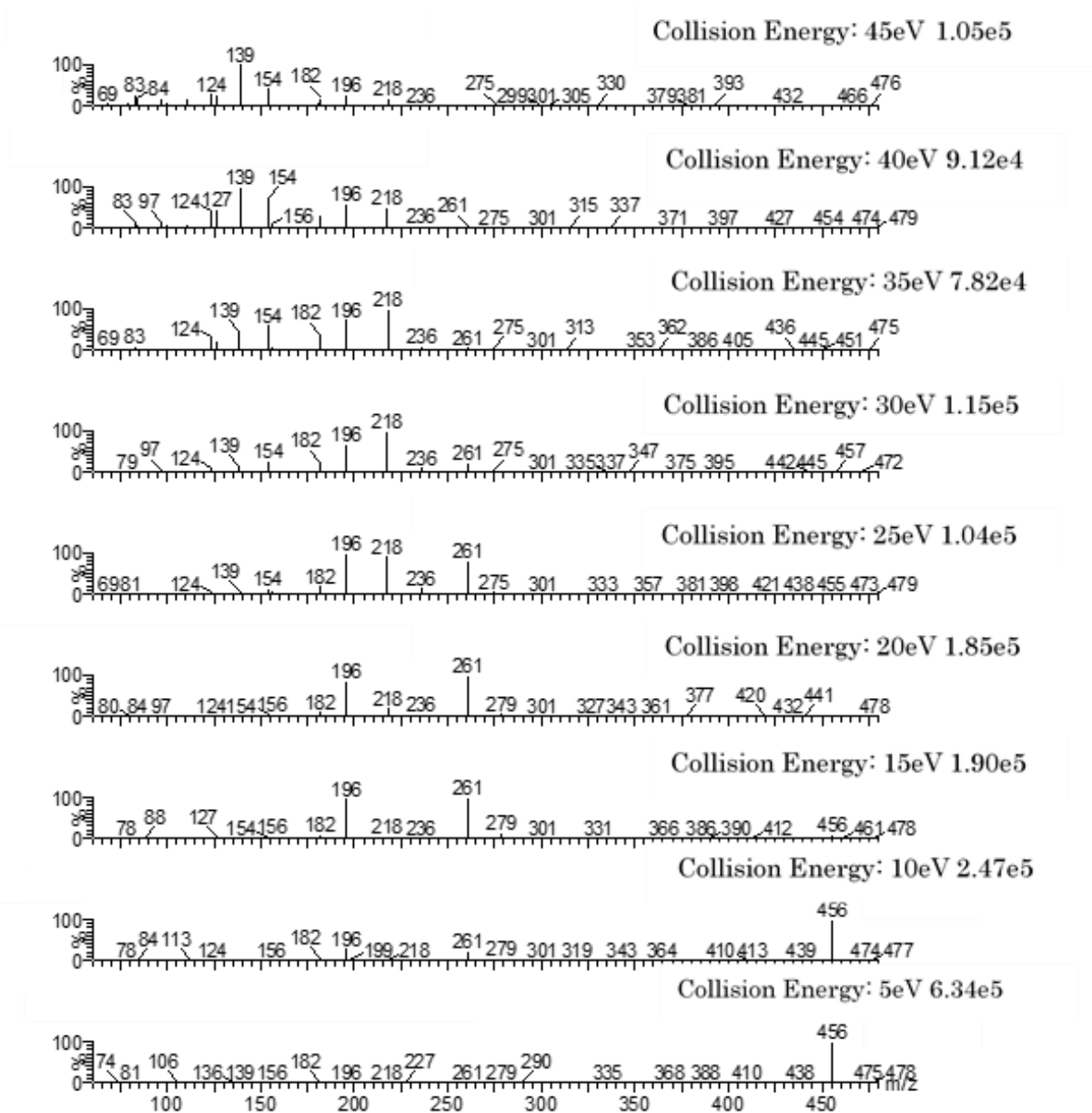


図3 MS spectra obtained by product ion scan of m/z 456

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については、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。0.000125～0.00375 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) : 0.9992~0.9994、平均0.9993)。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、0.000125、0.00025、0.000375、0.0005、0.000625及び0.0075 mg/Lの標準溶液を、農産物の基準値濃度 (0.05 ppm) 添加では、0.000625、0.00125、0.001875、0.0025、0.003125及び0.00375 mg/Lの標準溶液を用いて検量線を作成した。

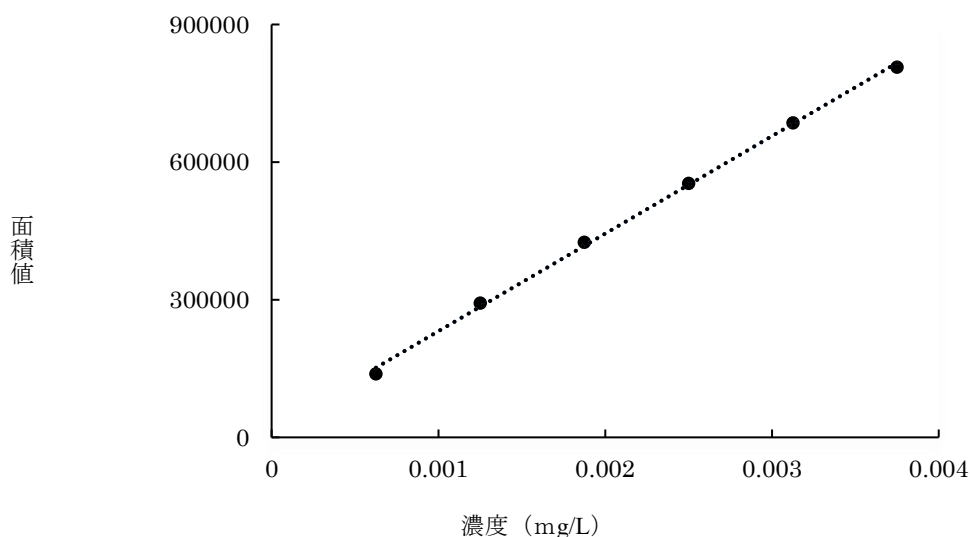


図4 プロピリスルフロンの検量線例

濃度範囲 : 0.000625 ~0.00375 mg/L

$$y=216688x+9939 \quad r=0.9992$$

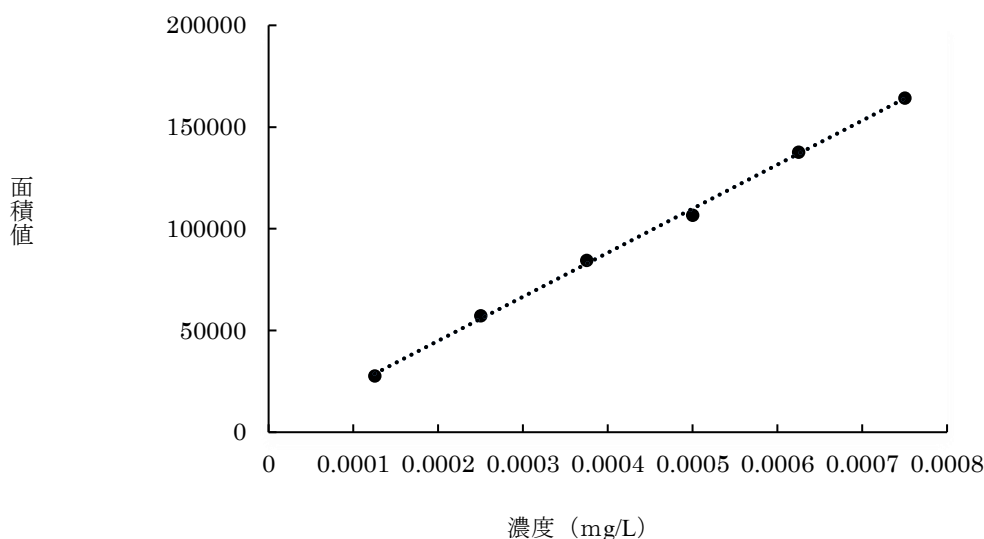


図5 プロピリスルフロンの検量線例
 濃度範囲：0.000125～0.00075 mg/L
 $y=217606x+1148$ $r=0.9994$

2. 前処理法の検討

1) 抽出溶媒の検討

抽出溶媒及び抽出操作は残留農薬等試験開発事業実施要領に従い、アセトンを用いて100 mL及び50 mLで2回抽出する方法とした。プロピリスルフロンは酸性物質 ($pK_a=4.89$) であるため、pHを変化させることで回収率が影響を受ける可能性が考えられた。そこで、塩酸を添加することで回収率に変化があるか否かを検討した。最初に、添加する塩酸の濃度によるプロピリスルフロンの回収率への影響について、玄米試料を用いて、アセトン抽出1回目の操作時に0.5~2 mol/L塩酸各2 mLを添加し、プロピリスルフロンの回収率を比較した(表2)。0.5~2 mol/L塩酸を各2 mL添加した場合、良好な回収が認められた。一方、塩酸を添加しなかった場合、その回収率は13%に低下していた。この点に関しては、抽出液のpHが関係していると推察される。以上の結果より、抽出に添加する塩酸の濃度は1 mol/Lを採用することとした。

表2 抽出時の塩酸添加濃度によるプロピリスルフロンの回収率 (%)

玄米	添加なし	塩酸濃度				
		0.5 mol/L	0.75 mol/L	1 mol/L	1.5 mol/L	2 mol/L
プロピリスルフロン	13	93	92	97	95	96
pH	8.9	4.0	2.0	1.5	1.1	0.9

(0.1 mg/kg相当量添加、n=2)

次に、添加する1 mol/L塩酸の添加量によるプロピリスルフロンの回収率への影響について、玄米試料を用いて、アセトン抽出1回目の操作時に1 mol/L塩酸を0~2.5 mL添加し、プロピリスルフロ

ンの回収率を検討した（表3）。その結果、抽出時に1 mol/L塩酸1 mL以上添加することによりプロピリスルフロンの良好な回収が認められたことから、抽出時に1 mol/L塩酸2 mLを添加する操作を採用した。

表3 抽出時の塩酸添加量によるプロピリスルフロンの回収率（%）

玄米	添加なし	1mol/L HCl			
		1mL	1.5mL	2mL	2.5mL
プロピリスルフロン	5	95	95	95	94
pH	8.9	3.9	1.7	1.4	1.2

(0.1 mg/kg相当量添加、n=2)

2) 有機溶媒への転溶

n-ヘキサンまたは酢酸エチルを転溶溶媒として、有機溶媒転溶時の有機溶媒によるプロピリスルフロンの回収率について玄米試料を用いて、アセトン抽出液10 mLから溶媒を除去した残留物に標準溶液を添加した後、飽和塩化ナトリウム溶液及び有機溶媒（*n*-ヘキサン又は酢酸エチル）を加え液-液分配を行い、プロピリスルフロンの回収率を検討した（表4）。なお、各有機溶媒での転溶操作については2回実施し、その回収率を比較した。*n*-ヘキサンに比べ、酢酸エチルを使用した際の回収率の方が良好であった。この結果から、酢酸エチルを使用することとした。

表4 有機溶媒転溶におけるプロピリスルフロンの回収率（%）

玄米	<i>n</i> -ヘキサン	酢酸エチル
プロピリスルフロン	69	93

(0.1 mg/kg相当量添加、n=1)

酢酸エチルの転溶時の転溶回数によるプロピリスルフロンの回収率について、玄米試料を用いてアセトン抽出液10 mLから溶媒を除去した残留物に、標準溶液を添加した後、液-液分配回数（1～3回）におけるプロピリスルフロンの回収率を検討した（表5）。その結果、1回目の酢酸エチル転溶操作でプロピリスルフロンは有機層に94 %回収され、3回目の酢酸エチル転溶操作では、その回収が認められなかった。その結果から、酢酸エチル転溶操作は2回実施することとした。

表5 酢酸エチル転溶時の転溶回数におけるプロピリスルフロンの回収率 (%)

玄米	分配回数			計
	1回目	2回目	3回目	
プロピリスルフロン	94	2	0	96

(0.1 mg/kg相当量添加、n=1)

残留農薬等試験法開発事業実施要領では、転溶操作は塩化ナトリウム溶液を用いて行うこととされている。そこで、酢酸エチル転溶時の塩化ナトリウム濃度 (w/v %) におけるプロピリスルフロンの回収率について、玄米試料を用いてアセトン抽出液10 mLから溶媒を除去した残留物に、標準溶液を添加した後、酢酸エチル及び塩化ナトリウム溶液 (0 w/v%、10 w/v%、20 w/v%、飽和) を加えて、液-液分配を行いプロピリスルフロンの回収率を検討した (表6)。最も塩析効果が高いと考えられる飽和塩化ナトリウム溶液での回収率が良好であったため、これを採用した。

表6 塩化ナトリウム濃度 (w/v%) によるプロピリスルフロンの回収率 (%)

玄米	塩化ナトリウム溶液 (w/v%)			
	0%	10%	20%	飽和
プロピリスルフロン	92	81	71	94

(0.1 mg/kg相当量添加、n=1)

3) ミニカラム精製

玄米試料を用いてPSAミニカラムによる精製が可能か否かについて検討した。プロピリスルフロン試験法 (水産物) の検討において、牛肝臓試料を用いてPSAミニカラムからのプロピリスルフロンの溶出状況を検討し、順次、アセトニトリル、アセトン、メタノール及び1 vol%ギ酸・メタノール溶液各10 mLで溶出させた結果、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。このことから、PSAミニカラムからの溶出にはギ酸添加が有効であると考えられたため、1 vol%ギ酸・メタノール溶液及び1 vol%ギ酸・アセトン溶液での溶出について玄米試料を用いて、転溶後の酢酸エチル層を乾固しアセトニトリルで溶解後、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・メタノール溶液または1 vol%ギ酸・アセトン溶液で溶出し、C18ミニカラムでの精製を行ったものを試験溶液としプロピリスルフロンの回収率を検討した (表7)。どちらの溶出液を使用した場合も10 mLで全てのプロピリスルフロンは回収され、次の溶出液からプロピリスルフロンの回収は認められなかった。PSAミニカラムからの溶出液は40 °C以下で濃縮し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PSAミニカラムからの溶出液に採用した。

表7 InertSep PSAからのプロピリスルフロンの溶出率(%)

液量 (mL)	溶出液	
	1vol % ギ酸・メタノール	1vol % ギ酸・アセトン
0～5	32	22
5～10	63	71
10～15	0	0
15～20	0	0

(0.1 mg/kg相当添加、n=2)

PSAミニカラム洗浄液の洗浄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玄米試料を用いて、転溶後の酢酸エチル層を乾固しアセトニトリルで溶解後、標準溶液を添加した。PSAに負荷した後、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。溶出液を乾固した後、C18ミニカラムでの精製を行ったものを試験溶液としプロピリスルフロンの回収率を検討した(表8)。その結果、洗浄液にアセトン及びアセトニトリルを用いた場合、洗浄液の種類や液量による回収率の差異はみられず、何れも良好な回収が認められた。そこで、負荷液がアセトニトリル、溶出液が1 vol%ギ酸・アセトン溶液であること、アセトニトリル5 mL及びアセトン10 mLで洗浄する工程を採用した。

表8 InertSep PSAの洗浄工程別のプロピリスルフロンの回収率 (%)

玄米	洗浄液							
	アセトニトリル 5 mL	アセトニトリル 10 mL	アセトン 5 mL	アセトン 10 mL	アセトニトリル5 mL アセトン5 mL	アセトニトリル5 mL アセトン10 mL	アセトニトリル10 mL アセトン5 mL	アセトニトリル10 mL アセトン10 mL
プロピリスルフロン	95	96	94	93	94	96	94	95

(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成し、溶媒標準溶液と面積を比較した(表9)。転溶後の酢酸エチル層を乾固し、「PSAなし」ではアセトニトリル及び水(3:2)混液10 mLで溶解した。「PSAあり」ではPSA溶出液から1 vol%ギ酸・アセトン溶液を除去しアセトニトリル及び水(3:2)混液10 mLで溶解した。標準溶液0.05 mg/L及び0.01 mg/L(各0.1 mL)を乾固後、上記で調製した溶液2 mLで溶解し、

0.0025 mg/L及び0.0005 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ミニカラム精製前後でピーク面積比の差異は認められなかった。しかしながら、PSAミニカラム精製前の試験溶液は白濁していたのに対して、PSAミニカラム精製後の試験溶液は無色透明であった。

表9 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
0.0025	1.10	1.15
0.0005	1.09	1.10

プロピリスルフロンの試験法（水産物）で採用したC18ミニカラムによる精製が可能か否かについて検討したところ、回収率の低下が認められた。そこで、C18ミニカラムの負荷液または洗浄液へプロピリスルフロンの溶出されている可能性が考えられたため、負荷液のアセトニトリル濃度におけるC18ミニカラムからの溶出状況について玄米試料を用いて確認した（表10）。PSA溶出液を窒素気流下で溶媒除去した後、残留物に標準溶液を添加した。これをアセトニトリル及び水（1：19、1：9、3：17、1：4、1：3、3：7）混液で溶解し、C18に負荷した。溶解に使用したアセトニトリル及び水混液と同濃度のアセトニトリル及び水混液20 mLで溶出させ、アセトニトリル及び水（3：2）混液10 mLで追加溶出し回収率を比較した。C18ミニカラムに負荷後、負荷液と同濃度のアセトニトリル及び水混液10 mL、アセトニトリル及び水（3：2）混液10 mLで順に洗浄を行った。その結果、アセトニトリル及び水（1：3）混液では負荷液から27%、アセトニトリル及び水（3：7）混液では負荷液から43%のプロピリスルフロンの溶出が確認された。アセトニトリル及び水（1：4）混液以下のアセトニトリル比率では、負荷液10 mL及び溶出液10 mLでは全く溶出されなかった。また、プロピリスルフロンの試験法（水産物）と同様、アセトニトリル及び水（3：2）混液10 mLでほぼ100%のプロピリスルフロンの回収することができ、次の溶出液10 mLからのプロピリスルフロンの溶出は認められなかった。以上の結果から、玄米試料におけるC18ミニカラム精製方法は、アセトニトリル及び水（1：4）混液10 mLで負荷し、アセトニトリル及び水（3：2）混液10 mLで溶出することとした。

表10 C18負荷液のアセトニトリル濃度と回収率 (%)

	液量 (mL)	アセトニトリル及び水混液の比率					
		1:19	1:9	3:17	1:4	1:3	3:7
負荷液	0~5	0	0	0	0	0	7
	5~10	0	0	0	0	27	36
溶出液	10~15	0	0	0	0	8	13
	15~20	0	0	0	0	5	10
	20~30 *	81	93	101	101	60	32
	30~40 *	0	0	0	0	0	0
合計		81	93	101	101	100	98

*アセトニトリル及び水 (3:2) 混液10 mLで溶出した。

(0.1 mg/kg相当添加、n=1)

なお、C18ミニカラムの洗浄操作による精製効果について、C18ミニカラムの洗浄操作の有無によりマトリックス添加標準溶液を作成し、溶媒標準溶液と面積を比較した。「洗浄あり」では、C18負荷後にアセトニトリル及び水 (1:4) 混液10 mLで洗浄し、アセトニトリル及び水 (3:2) 混液10 mLで溶出し正確に10 mLとした。「洗浄なし」では、C18負荷後にアセトニトリル及び水 (3:2) 混液10 mLで溶出し正確に10 mLとした。標準溶液0.025 mg/L及び0.005 mg/L 0.1 mLを乾固後、上記で調製した溶液1 mLで溶解し、0.0025 mg/L及び0.0005 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、C18ミニカラムの洗浄操作の有無によるピーク面積比の差異は認められなかったことから、C18ミニカラムの洗浄操作は省略することとした (表11)。

表11 InertSep C18の洗浄によるピーク面積比

標準溶液濃度 (mg/L)	ピーク面積比	
	洗浄あり	洗浄なし
0.0025	0.96	0.93
0.0005	0.97	0.99

さらに、C18ミニカラムによる精製効果を検討するため、C18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成し、溶媒標準溶液と面積を比較した。(表12)。「C18なし」は、PSA溶出液から1 vol%ギ酸・アセトン溶液を除去しアセトニトリル及び水 (3:2) 混液10 mLで溶解した。「C18あり」は、C18負荷後にアセトニトリル及び水 (3:2) 混液10 mLで溶出し正確に10 mLとした。標準溶液0.025 mg/L及び0.005 mg/L 0.1 mLを乾固後、上記で調製した溶液1 mLで溶解し、0.0025 mg/L及び0.0005 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、C18ミニカラム精製により、ピーク面積比の若干の改善が認められた。

表12 InertSep C18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	
	C18あり	C18なし
0.0025	0.94	1.05
0.0005	1.02	1.13

3. 添加回収実験

玄米を用いて、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値の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、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及び図7に示した。また、玄米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8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

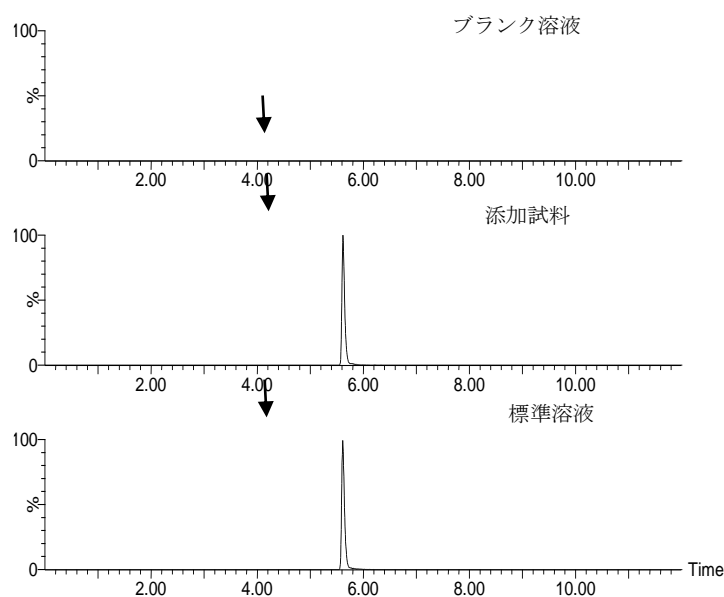


図6 玄米のSRMクロマトグラム

(m/z 456→261)

添加濃度：0.05 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

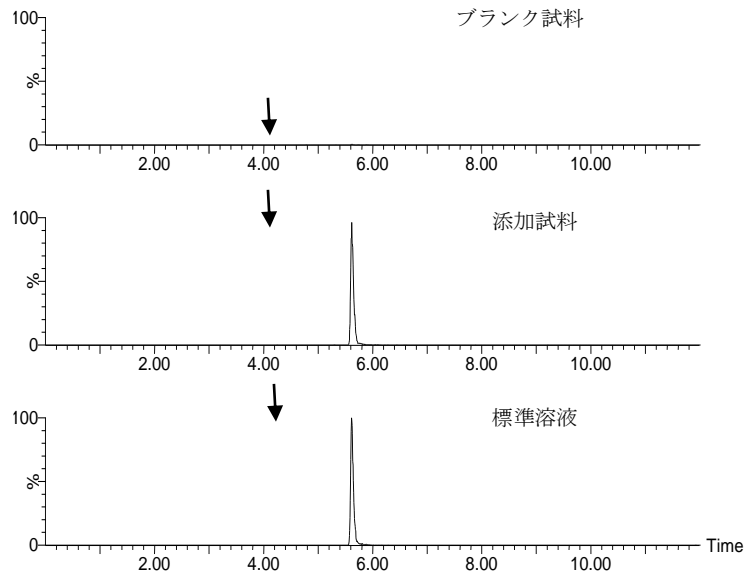


図7 玄米のSRMクロマトグラム
(m/z 456→261)
添加濃度：0.01 ppm

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

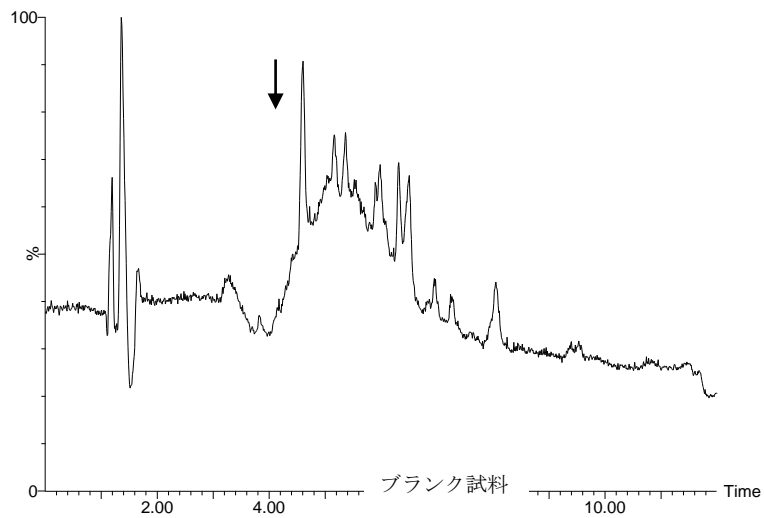


図8 玄米ブランク試料のトータルイオンクロマトグラム
スキャン範囲：50 ~550 amu
測定条件：ESI (+) CV=60 V (CV=coren voltage)

1) 選択性

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13)。

表13 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*2	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)
	プロピリスルフロン	玄米	0.01	0.05	0.05	基準値	0.05 < 0.100	面積	398	367	383	591919	581436	586678	0.001	○	
	プロピリスルフロン	玄米	0.01	0.05	0.01	定量限界	0.01 < 0.333	面積	398	367	383	126265	120895	123580	0.003	○	

*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米 (玄米) に0.05 ppmの基準値が設定されている。そこで、添加回収試験は玄米に、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14)。

表14 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
	プロピリスルフロン	玄米	0.01	0.05	0.05	—	216688	9939	0.9984	94.6	94.5	95.4	98.1	96.7	95.9	1.6	618.3	308.3	463.3	
	プロピリスルフロン	玄米	0.01	0.05	0.01	S/N	217606	1148	0.9988	93.0	88.2	94.8	96.2	93.4	93.1	3.2	618.3	308.3	463.3	

*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。

玄米に対する平均回収率は基準値濃度で95.9%、定量限界濃度で93.1%であった。また、併行精度の相対標準偏差は基準値濃度で1.6%、定量限界濃度で3.2%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463.3であり、S/N ≥ 10を満たしていた (表15)。

表15 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 (mg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	Max.						Min.						S/N		備考		
							ピーク の 最大値 (Dmax)	ノイズ			ピーク トップ 高さ (D)	ピーク 高さ (S)	ノイズ 幅 (N)	ピーク の 最大値 (Dmax)	ノイズ			ピーク トップ 高さ (D)	ピーク 高さ (S)	ノイズ 幅 (N)		Max.	Min.
								最大値 (E1)	最小値 (E2)	中央値 (C) *					最大値 (E1)	最小値 (E2)	中央値 (C) *						
	プロピリスルフロン	玄米	456-261	0.01	0.05	0.01	248	1	0	1	247.8	247.3	0.4	248	2	0	1	247.6	246.6	0.8	618.3	308.3	

*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0.89及び0.99であったが、許容できる範囲であると考えられた（表16）。

表16 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 面積 ^{*3}	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				ピーク面積 （高さ）比 ^{*5}
									n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均		
	プロピリスルフロ	玄米	0.01	0.05	0.05	0.0025	面積	398	591919	581436	586280	668256	650160	659208	0.89	
	プロピリスルフロ	玄米	0.01	0.05	0.01	0.0005	面積	398	126265	120895	123182	126530	123084	124807	0.99	

*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。

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

検討した玄米試料において、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。回収率95.9%（基準値濃度）及び93.1%（定量限界濃度）、併行精度1.6%（基準値濃度）及び3.2%（定量限界濃度）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0.89及び0.99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。定量限界濃度での添加回収試験のS/Nは、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