

※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 試験法開発業務に関する報告書

クロルプロマジン試験法（畜水産物）

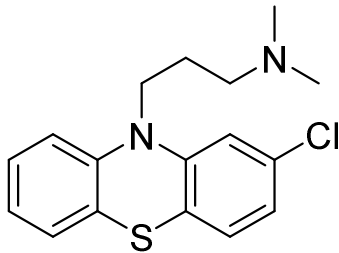
クロルプロマジン試験法

[緒言]

1. 目的及び試験法の検討方針

クロルプロマジンは、フェノチアジン系の鎮静剤及び制吐剤である。主にドーパミン、ノルアドレナリン及びセロトニン受容体を非特異的に阻害することにより、中枢神経系のそれらの行動性神経を抑制する。ヒト用医薬品としては、クロルプロマジン塩酸塩が統合失調症、器質性精神障害及び躁うつ病の躁病期の治療等に広く使用されているが、日本では動物用医薬品としての承認はない。本化合物は、遺伝毒性などを有しているものと考えられることなどから、ポジティブリスト制度導入に際して、その基準値が「不検出」とされた。農薬・動物用医薬品部会（平成27年10月2日）により、食品中に「不検出」とする農薬等の成分である物質として定める現行の管理措置を維持することとし、クロルプロマジンは食品に含有されるものであってはならないものとされた。現行の告示試験法では、十分な回収率が得られない等の問題が報告されていることから、新たにクロルプロマジンを精確に測定可能な試験法を検討した。

2. 分析対象化合物の構造式及び物理化学的性質



クロルプロマジン

クロルプロマジン

分子式：C₁₇H₁₉ClN₂S

化学名（IUPAC）：3-(2-chlorophenothiazin-10-yl)-N,N-dimethylpropan-1-amine

分子量：318.86

外観：白色粉末

沸点：200-205℃

融点：< 25℃

蒸気圧：1.77 x 10⁻⁷ mmHg (25℃)

酸解離定数（pKa）：9.3

1-オクタノール/水分配係数（log Pow）：5.4

溶解性：アルコール、ベンゼン、クロロホルム、酸に溶解する

光安定性：不安定なため、遮光する

[出典] ChemIDplus (U.S. National Library of Medicine)、SciFinder（化学情報協会）、The MERCK INDEX (FIFTEENTH EDITION)、富士フイルム和光純薬データシート

3. 基準値

不検出とされる農薬等の成分に該当する。施行通知に示されるクロルプロマジンの検出限界は0.0001 ppmである。

[実験方法]

1. 試料

1) 購入先

牛の筋肉、牛乳、鶏卵、しじみは、神奈川県内のスーパーマーケットで購入したものをを用いた。牛の脂肪、牛の肝臓、うなぎ（国産）、はちみつ（国産）は、インターネットを介して購入したものをを用いた。

2) 試料の採取方法

- ① 牛の筋肉は、可能な限り脂肪層を除き細切均一化した。
- ② 牛の脂肪は、可能な限り筋肉部を除き細切均一化した。
- ③ 牛の肝臓は、全体を細切均一化した。
- ④ 牛の乳は、全体を混合し均一化した。
- ⑤ 鶏卵は、殻を除去し卵黄と卵白をよく混合し均一化した。
- ⑥ はちみつは、そばはちみつを用い、全体を混合し均一化した。
- ⑦ うなぎは、頭部を除き、内臓、骨及び皮を含む可食部を細切均一化した。
- ⑧ 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、約5分間水切りを行ったものを細切均一化した。

2. 試薬・試液

1) 標準品

クロルプロマジン塩酸塩：純度99.3%以上（関東化学製）

2) 試薬

アセトン：残留農薬試験用（関東化学製）

アンモニア水：特級（関東化学製）

ギ酸：LC/MS用（富士フイルム和光純薬製）

メタノール：残留農薬試験用（富士フイルム和光純薬製）

0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液、0.1 vol%ギ酸-蒸留水：LC-MS用（関東化学製）

スルホン酸塩修飾メタクリレート共重合体ミニカラム：InertSep MC-1（1,000 mg/20 mL）

（ジーエルサイエンス製）

3) 標準溶液、試液の調製方法

① 標準溶液の調製方法

クロルプロマジン標準原液：クロルプロマジン塩酸塩を精秤し、ポリプロピレン製メスフラスコでアセトニトリルに溶解して1 mg/mL溶液（クロルプロマジンとして）を調製した。本標準原液は、ポリプロピレン製チューブで、-20℃の保存条件において、6ヵ月程度は安定である。

クロルプロマジン添加用標準溶液：クロルプロマジン標準原液をアセトンで希釈し、ポリプロピレン製のチューブに1 ng/mLの濃度の溶液を調製した。

② 試液の調製方法

アセトン及びアンモニア水（19：1）混液：アセトン95 mL及びアンモニア水5 mLを混合した。

アセトン、ギ酸及び水（10：0.13：3）混液：アセトン10 mL及びギ酸130 µL及び水3 mLを混合

した。

アセトン、ギ酸及び水（10：0.11：1）混液：アセトン10 mL及びギ酸110 µL及び水1 mLを混合した。

ギ酸及びメタノール（1：99）混液：ギ酸1 mL及びメタノール99 mLを混合した。

3. 装置

ホモジナイザー：PT 3100（キネマティカ製）

遠心分離機：5930（久保田商事製）

LC-MS/MS

装置	型式	会社
LC	ACQUITY UPLC I-Class	Waters
MS	Xevo TQ-S	Waters
データ処理	TargetLynx Ver.4.1	Waters

4. 測定条件

LC 条件																								
カラム	InertSustainSwift C18 HP サイズ:内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 µm 会社：ジューエルサイエンス株式会社																							
流速 (mL/min)	0.3																							
注入量(µL)	5																							
カラム温度 (°C)	40																							
移動相	A 液：0.1 vol%ギ酸 B 液：0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液																							
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>0.0</td> <td>60</td> <td>40</td> </tr> <tr> <td>6.0</td> <td>60</td> <td>40</td> </tr> <tr> <td>6.1</td> <td>1</td> <td>99</td> </tr> <tr> <td>11.0</td> <td>1</td> <td>99</td> </tr> <tr> <td>11.1</td> <td>60</td> <td>40</td> </tr> <tr> <td>20.0</td> <td>60</td> <td>40</td> </tr> </tbody> </table>			時間 (分)	A 液 (%)	B 液(%)	0.0	60	40	6.0	60	40	6.1	1	99	11.0	1	99	11.1	60	40	20.0	60	40
時間 (分)	A 液 (%)	B 液(%)																						
0.0	60	40																						
6.0	60	40																						
6.1	1	99																						
11.0	1	99																						
11.1	60	40																						
20.0	60	40																						
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)	0.6																							
脱溶媒温度 (°C)	500																							
イオンソース温度 (°C)	150																							
脱溶媒ガス流量 (L/hr)	1,000																							
コーンガス流量 (L/hr)	150																							
ネブライザーガス (Bar)	7																							
コリジョンガス (ml/min)	0.2（アルゴン）																							
定量イオン (m/z)	+391.1→86.1 [コーン電圧：20 V、コリジョンエネルギー：18 eV]																							
定性イオン (m/z)	+391.1→58.1 [コーン電圧：20 V、コリジョンエネルギー：20 eV]																							
保持時間 (分)	4.2																							

5. 定量

クロルプロマジン標準原液を0.1 vol%ギ酸及び0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液（3：2）混液で希釈して、0.000005、0.00001、0.000015、0.00002、0.000025、0.00003 mg/Lの検量溶液を調製した。各濃度に調製した検量溶液5 µLをLC-MS/MSに注入して、得られたピーク面積値を用いて検量線を作成し、絶対検量線法によりクロルプロマジンの含量を求めた。

6. 添加試料の調製

牛の脂肪（添加濃度：0.0001 mg/kg）：試料10.0 gを量り採り、約40℃の湯浴で融解し添加用標準溶液1 mLを添加し混合後、-30℃で30分間放置して凝固した。

はちみつ（添加濃度：0.0001 mg/kg）：試料10.0 gに水10 gを加えて溶かした。添加用標準溶液1 mLを添加し混合した後、30分間放置した。

上記以外の試料（添加濃度：0.0001 mg/kg）：試料10.0 gに添加用標準溶液1 mLを添加し混合後、30分間放置した。

7. 試験溶液の調製

概要

クロルプロマジンを試料からアセトンで抽出し、スルホン酸塩修飾メタクリレート共重合体ミニカラムで精製した後、LC-MS/MSで定量及び確認する方法である。

1) 抽出

筋肉、脂肪、肝臓、腎臓、乳、卵及び魚介類等の場合は、試料 10.0 g を 100 mL 容ポリプロピレン製チューブに量り採った。はちみつの場合は、試料 10.0 g を 100 mL 容ポリプロピレン製チューブに量り採り、水 10 g を加えて溶かした。これにアセトン 50 mL を加え、ホモジナイズした後、毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離し、上澄液を 100 mL 容ポリプロピレン製メスフラスコに採った。残留物にアセトン 30 mL を加えてホモジナイズした後、上記と同様に遠心分離した。上澄液を採り、先の上澄液を合わせ、アセトンで正確に 100 mL とした。この溶液から正確に 10 mL を分取し、脂肪以外の場合は水 3 mL 及びギ酸 130 µL を、脂肪の場合は、水 1 mL 及びギ酸 110 µL を添加した。

2) 精製

スルホン酸塩修飾メタクリレート共重合体ミニカラム（1,000 mg）に、脂肪以外の場合はメタノール10 mL並びにアセトン、ギ酸及び水（10：0.13：3）混液10 mLを、脂肪の場合は、メタノール10 mL並びにアセトン、ギ酸及び水（10：0.11：1）混液10 mLを順次注入し、各流出液は捨てた。このカラムに1) 抽出で得られた溶液を注入し、流出液は捨てた。更に、ギ酸及びメタノール（1：99）混液、メタノール、アセトン各20 mLを順次注入し、各流出液は捨てた。次いで、アセトン及びアンモニア水（19：1）混液15 mLを注入し、溶出液を40℃以下で約1 mLまで濃縮し、0.1 vol%ギ酸及び0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液（3：2）混液で正確に5 mLとしたものを試験溶液とした。

[分析法フローチャート]

試料

- ↓ 試料10.0 gを100 mL容ポリプロピレン (PP) 製容器に量り採る
- ↓ はちみつの場合は、10.0 gを100 mL容PP製容器に量り採り、水10 gを加えて溶かす

抽出

- ↓ アセトン 50 mL を加え、ホモジナイズ
- ↓ 遠心分離 (3,000 回転、5 分間) し、PP 製メスフラスコに抽出液を採る
- ↓ 残留物にアセトン 30 mL を加え、ホモジナイズ
- ↓ 遠心分離 (3,000 回転、5 分間) し、抽出液を合わせ、アセトンで 100 mL に定容する
- ↓ 抽出液 10 mL を正確に分取し、水 3 mL、ギ酸 130 μ L を添加する (脂肪の場合は抽出液 10 mL を正確に分取し、水 1 mL、ギ酸 110 μ L を添加する)

強酸性陽イオン交換樹脂ミニカラム (InertSep MC-1、1,000 mg)

- ↓ 予めメタノール10 mL、アセトン、ギ酸及び水 (10 : 0.13 : 3) 混液10 mL (脂肪の場合はアセトン、ギ酸及び水 (10 : 0.11 : 1) 混液10 mL) を通液して、流出を捨てる
- ↓ 上記で得られた溶液全量をカラムに注入し、流出液を捨てる
- ↓ ギ酸及びメタノール (1 : 99) 混液、メタノール、アセトン各20 mLを順次注入し、流出液は捨てる
- ↓ アセトン及びアンモニア水 (19 : 1) 混液15 mLを注入し、溶出液を採る
- ↓ 溶出液を40°C以下で1 mL程度まで濃縮した後、0.1 vol%ギ酸及び0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液 (3 : 2) 混液を加えて、メスフラスコで正確に5 mLとする

LC-MS/MS測定 (0.2 g 試料/mL) 試験溶液5 μ Lを注入

8. マトリックス添加標準溶液の調製

0.2 ng/mLクロルプロマジン標準溶液50 μ Lを700 μ L容PP製バイアルに採り、室温で窒素ガスを吹き付け乾固した。これに、ブランク試験溶液0.5 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。

[結果及び考察]

1. 測定条件の検討

1) MS条件の検討

① クロルプロマジンのMS条件の検討

図1に示すように、ESIのスキャン測定において、ネガティブモードではクロルプロマジンの脱プロトン化分子に由来するイオンは検出されなかった。一方で、ポジティブモードではプロトン付加分子 (m/z 319.1 [M+H]⁺) が強く観察されたため、本イオンをプリカーサーイオンとした。図2及び3には、本イオンをプリカーサーイオンとした場合のプロダクトイオンスペクトルを示した。最も高感度に測定できた m/z 319.1 \rightarrow 86.1 (コーン電圧 : 20 V、コリジョンエネルギー (CE) : 18 eV) を定量イオンとし、 m/z 319.1 \rightarrow 58.1 (コーン電圧 : 20 V、CE : 20 eV) を定性イオンとした。

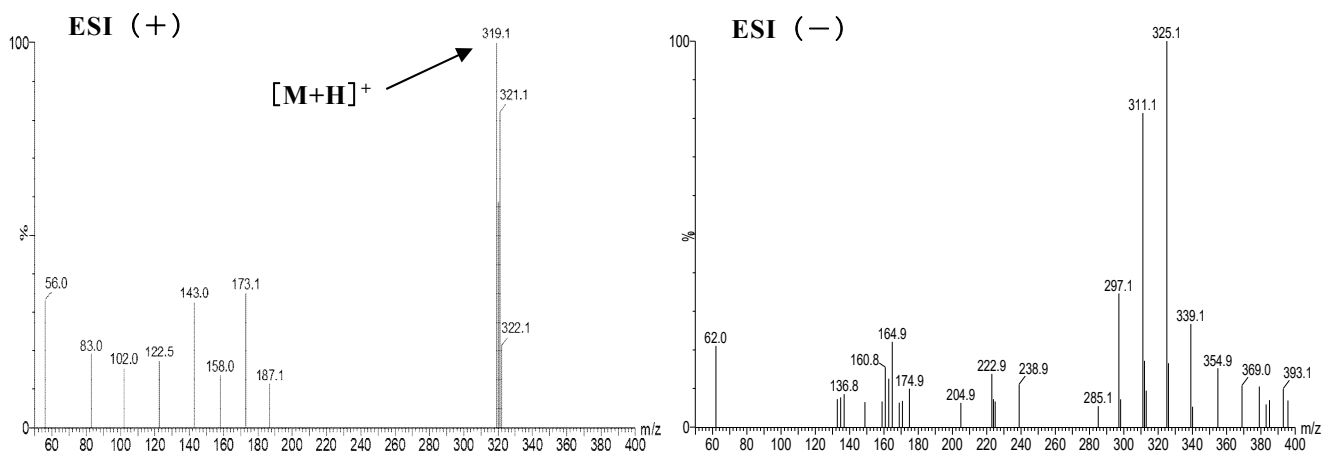


図1 クロルプロマジンのマススペクトル (スキャン測定)
 スキャン範囲 : 50~400 m/z 、測定条件 : ESI (+) 及び (-)、コーン電圧 = 20 V

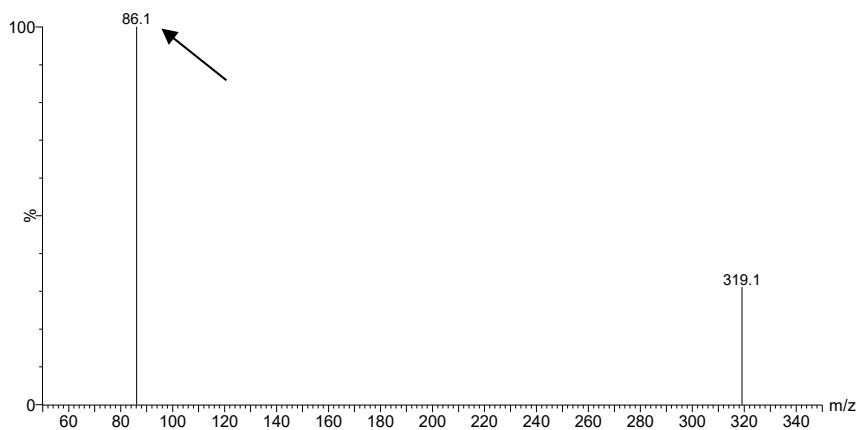


図2 クロルプロマジンのプロダクトイオンスペクトル (定量用)
 プリカーサーイオン : m/z 319.1、測定条件 : ESI (+)、コーン電圧 = 20 V、CE = 18 eV

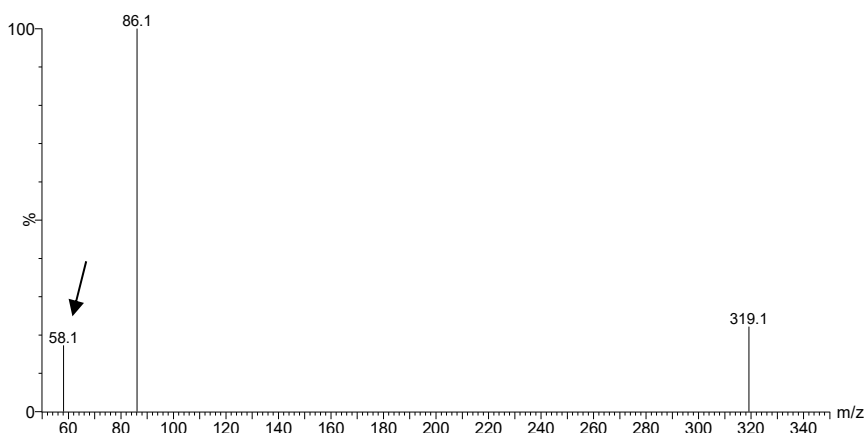


図3 クロルプロマジンのプロダクトイオンスペクトル (定性用)
 プリカーサーイオン : m/z 319.1、測定条件 : ESI (+)、コーン電圧 = 20 V、CE = 20 eV

2) LC条件の検討

① 移動相条件の検討

有機系の移動相（B液）をアセトニトリルとし、水系の移動相（A液）には、4種の移動相（0.1 vol%ギ酸、0.1 vol%酢酸、5 mmol/Lギ酸アンモニウム溶液、5 mmol/L酢酸アンモニウム溶液）を用いた。各移動相の組み合わせにより、クロルプロマジン標準溶液を繰り返し測定して、クロルプロマジンのピーク形状及びS/Nを指標に最適な移動相を検討した。表1に示すように、4種類の水系移動相の中では、0.1 vol%ギ酸を用いた場合にクロルプロマジンのピークのS/Nが最大（2,685±337）となり、良好なピーク形状が得られた。次に、有機系の移動相（B液）へのギ酸の添加について検討するため、B液をアセトニトリルから0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液に代えて同様に検討したところ、より高いS/N（5,243±1,143）が得られ、ピーク形状も良好であった。以上のことから、移動相には、0.1 vol%ギ酸及び0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液の混液を用いることにした。

表1. LCの移動相条件の検討結果

移動相		保持時間 (分)	定量イオン		
水系 (A液)	有機系 (B液)		ピーク面積値	ピークの S/N	ピーク形状
0.1 vol%ギ酸	アセトニトリル	2.3	39,942 ± 670	2,685 ± 337	良好
0.1 vol%酢酸	アセトニトリル	2.1	27,444 ± 899	1,187 ± 166	良好
5 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液	アセトニトリル	2.7	35,218 ± 963	2,193 ± 290	ブロード
5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液	アセトニトリル	3.7	34,349 ± 1,115	1,167 ± 190	ブロード
0.1 vol%ギ酸	0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液	2.3	39,393 ± 516	5,243 ± 1,143	良好

試料：0.1 ng/mLクロルプロマジン標準溶液 5 µLを注入

カラム：InertSustainSwift C18 HP (2.1 x 150 mm, 3 µm)、流速：0.3 mL/min

移動相：水系及び有機系（1：1）混液、併行数：5

② 分析カラムの検討

一般的な6種のODSカラムを用いて、クロルプロマジン標準溶液を測定し、ピーク形状及びS/Nを指標として分析カラムを選択した。表2に示すように、カラムの種類により、保持時間、ピーク面積値、ピーク形状が大きく異なったが、InertSustainSwift C18 HPカラムを用いたときに、クロルプロマジンのピークのS/Nが検討したカラムの中では最大（3,326 ± 761）となり、ピーク形状も良好であった。以上のことから、本検討ではInertSustainSwift C18 HPカラムを用いることにした。

表2 各分析カラムを用いたときの、クロルプロマジンのピーク面積値、SN比、ピーク形状等

分析カラム	保持時間 (分)	ピーク面積値	S/N	ピーク形状等
InertSustainSwift C18 HP 内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 µm (ジエールサイエンス製)	4.3	32,247 ± 401	3,326 ± 761	良好
InertSustain C18 HP 内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 µm (ジエールサイエンス製)	4.1	31,423 ± 597	2,356 ± 293	良好

InertSustain AQ-C18 HP 内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm (ジーエルサイエンス製)	6.0	26,791 ± 1,490	630 ± 59	ブロード
Inertsil ODS-HL HP 内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm (ジーエルサイエンス製)	4.9	24,123 ± 302	1,416 ± 181	ブロード
Mightysil RP-18 GP 内径 3.0 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm (関東化学製)	3.7	34,177 ± 497	2,023 ± 589	良好
CAPCELL PAK C18 MG III 内径 2.0 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm (大阪ソーダ製)	1.7	31,810 ± 613	1,470 ± 115	良好

試料：1 ng/mLクロルプロマジン標準溶液 5 μLを注入

移動相：0.1 vol%ギ酸及び0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液（3：2）混液、流速：0.3 mL/min、併行数：5

3) 検量線

添加濃度（0.0001 mg/kg）に対する回収率25%（0.000005 mg/L）、50%（0.00001 mg/L）、75%（0.000015 mg/L）100%（0.00002 mg/L）125%（0.000025 mg/L）150%（0.00003 mg/L）に相当する濃度の検量溶液を0.1 vol%ギ酸及び0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液（3：2）で調製し、5 μLをLC-MS/MSに注入して検量線を作成した。図4に示すように、上記の濃度範囲で作成した検量線の決定係数 R^2 は0.990以上と良好な直線性が得られ、最下点濃度の検量溶液（0.000005 mg/L）から得られるピークのSN比は100以上であった。

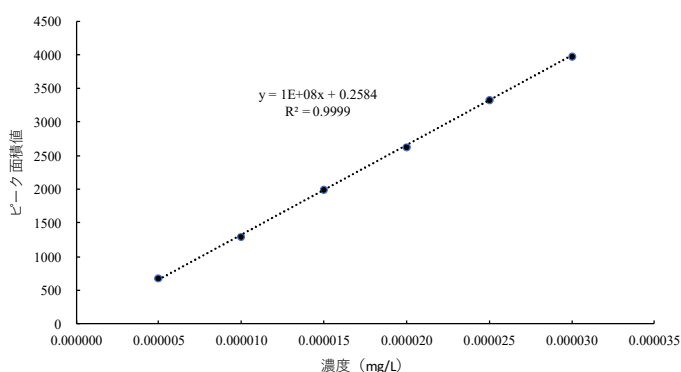


図4 クロルプロマジンの検量線の例

2. 試験溶液調製方法の検討

1) 抽出方法の検討

① 抽出溶媒の検討

抽出溶媒は、添加試料からの回収率及びホモジナイズ時の試料の分散状況を指標として選定した。本検討では、牛の脂肪との混和性が良好であり、除タンパク効果も期待出来る、メタノール、エタノール、アセトンの3溶媒を抽出溶媒の候補とした。はじめに、メタノールを用いて8食品の添加試料を対象に回収率と溶媒への分散状況を確認した。その結果、全ての食品において、ホモジナイズ時の溶媒への分散状況は良好であった。また、各食品における回収率は、牛の筋肉の場合（50%程度）を除き90%以上の回収率が得られた。クロルプロマジン、血漿中の特定のタンパク質との結合性が高いことが報告されており、牛の筋肉の場合に低回収となったことは、メタノール抽出液中で、クロルプロマジンがタンパク質に結合することが原因であると考えられた。そこで、このことをより明確にするため、上記の3溶媒を用いて抽出操作を行い、抽出溶媒中でのクロルプロマジンの減少を経時的に追跡した。牛の筋肉のブランク試料10 gに各溶媒50 mLを加えホモジナイズ後に遠心分離し、上澄液を採取した。残留物に同溶媒30 mLを加え同様に操作

し、1 mg/Lクロルプロマジン標準溶液 1 mL (1 µg) 加えて、同溶媒で100 mLに定容した。0、30、60、90分後に定容した抽出液100 µLを分取して、0.1 vol%ギ酸及び0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液 (3 : 2) 混液で10 mLに定容し、LC-MS/MSで分析した。図5に示すように、メタノール及びエタノールではクロルプロマジンの経時的な減少が観察されたのに対して、アセトンでは減少が見られなかったことから、抽出溶媒の第一候補をアセトンとした。

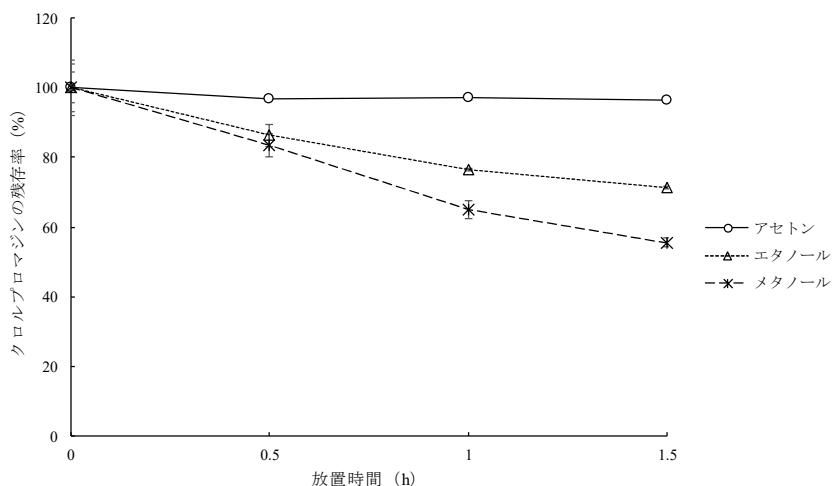


図5. 各溶媒での牛の筋肉の抽出液中におけるクロルプロマジンの経時変化 (n = 3)
残存率 (%) は、抽出操作後に直ちにLC-MS/MSに注入して得られたクロルプロマジンのピーク面積値を100%とした。

② アセトンを用いた場合の回収率と分散状況

8食品についてブランク試料及び0.1 mg/kgとなるようにクロルプロマジンを追加した添加試料を調製した。アセトンを抽出溶媒として、50 mL及び30 mLでホモジナイズ抽出を行い、アセトンで100 mLに定容した抽出液を調製した。ブランク試料の抽出液を1 mL分取し、窒素を吹き付けて溶媒を除去し、添加試料と同濃度になるようにクロルプロマジン標準溶液を追加して10 mLとしたものをマトリックス添加標準溶液とした。得られた溶液をLC-MS/MSで測定し、マトリックス添加標準溶液から得られたピーク面積値に対する添加試料から得られたピーク面積値の比を求め回収率とした。検討した全ての食品試料でホモジナイズ時に均一に分散することが確認され、表3に示すように、各食品からの回収率は、91~104%と良好な回収率が得られた。以上のことから、抽出溶媒にはアセトンを用いることに決定した。

表3 アセトンを抽出溶媒としたときの回収率

試料	回収率(%)*
牛の筋肉	92
牛の脂肪	104
牛の肝臓	100
牛乳	102
鶏卵	99
はちみつ	98
うなぎ	93
しじみ	91

*添加試料から得られるピーク面積値/マトリックス添加標準溶液から得られるピーク面積値 x 100
n = 1

2) カラム精製方法の検討

① ミニカラムの検討

クロルプロマジン塩基性化合物であるため、強酸性陽イオン交換樹脂ミニカラムによる精製方法を検討した。表4に示すミニカラムを用いて、下記の〔精製方法〕に示す方法で検討した。負荷溶液は、PP製チューブにアセトン10 mL、水500 μ L、ギ酸100 μ Lを加え、10 ng/mLクロルプロマジン標準溶液20 μ L (0.2 ng) を添加した溶液とした。表5に各画分からの溶出状況を示した。Oasis MCX、Strata-X-C、Bond Elut Plexa PCXを用いた場合は、全ての画分においてクロルプロマジンは検出されなかったが、InertSep MC-1を使用した場合は、溶出画分（アセトン及びアンモニア水（19：1）混液）において、約80%が溶出した。100%程度の十分な回収率は得られなかったが、InertSep MC-1をミニカラムの候補とした。

表4 検討に使用した強酸性陽イオン交換樹脂ミニカラム

固相カラム (500 mg)	充填剤	製造会社
InertSep MC-1	スルホン酸塩修飾メタクリレート共重合体	ジーエルサイエンス製
Oasis MCX	スルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体	Waters 製
Strata-X-C	スルホン酸塩修飾スチレンジビニルベンゼン共重合体	Phenomenex 製
Bond Elut Plexa PCX	スルホン酸塩修飾スチレンジビニルベンゼン共重合体	アジレント製

〔精製方法〕

強酸性陽イオン交換樹脂ミニカラム (500 mg)

- ↓ 予めメタノール5 mL、アセトン、ギ酸及び水（95：1：5）混液5 mLを順次通液して平衡化
- ↓ 負荷溶液全量をカラムに注入
- ↓ ギ酸及びメタノール（1：99）混液5 mLを4回カラムに注入
- ↓ メタノール5 mLを4回カラムに注入
- ↓ アセトン5 mLを4回カラムに注入
- ↓ アセトン及びアンモニア水（19：1）混液5 mLで4回溶出
- ↓ 各画分をエバポレーターで1 mL程度まで濃縮後、0.1 vol%ギ酸及び0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液（3：2）混液で10 mLに定容する

試験溶液

↓

LC-MS/MS測定 試験溶液5 μ Lを注入

表5 各画分からの溶出状況

ミニカラム (500 mg)	回収率 (%)								合計
	負荷液	ギ酸及び メタノール (1:99) 混 液	メタノール	アセトン	アセトン及びアンモニア水 (19:1) 混液				
	10 mL	20 mL	20 mL	20 mL	5 mL	5 mL	5 mL	5 mL	
InertSep MC-1	0	0	0	0	79	0	0	0	79
Oasis MCX	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Strata-X-C	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bond Elut Plexa PCX	0	0	0	0	3	0	0	0	3

クロルプロマジン添加量：0.2 ng

② カラム充填剤量の検討

①の検討結果から、InertSep MC-1 (500 mg) を用いた場合には、約20%がミニカラムに吸着したままであると考えられた。そこで、充填剤量を小さくすることで回収率が上昇するかを牛の筋肉のブランク抽出溶液を用いて検討した。より少ない充填剤量が好ましいが、市販されている3種の充填剤量 (250、500、1,000 mg) で検討した。その結果、表6に示すように、標準溶液を用いた①の検討結果と比べて、溶出状況が大きく異なった。いずれの充填剤量においても、負荷及び洗浄画分に、クロルプロマジンが溶出することが確認された。これは、マトリックスによる影響であると考えられた。また、充填剤量別に比較すると、1,000 mgのときに負荷及び洗浄で溶出するクロルプロマジンが最小となった。

表6 各画分からの溶出状況

固相ミニ カラム	充填剤量 (mg)	回収率 (%)								合計
		負荷液	ギ酸及び メタノール (1:99) 混液	メタノール	アセトン	アセトン及びアンモニア水 (19:1) 混液				
		10 mL	20 mL	20 mL	20 mL	5 mL	5 mL	5 mL	5 mL	
InertSep MC-1	250	64	14	0	0	17	0	0	0	95
	500	44	21	0	0	32	0	0	0	97
	1,000	3	32	0	0	59	6	0	0	100

試料：牛の筋肉、クロルプロマジン添加量：0.2 ng

③ アセトン抽出液への水添加の検討

②の検討において、負荷及び洗浄の画分においてもクロルプロマジンの溶出が確認された。このことは、試料マトリックスの影響や、負荷液 (アセトン溶液) の極性が低いため疎水性相互作用が十分に生じなかったことが原因の一つであると考えられた。そこで、試料のアセトン抽出液に水を添加して、マトリックスを希釈、及び負荷液の極性を上げてから、カラムに負荷する方法を検討した。牛の脂肪の抽出液の場合には、水の添加により脂肪が析出する可能性があったため、牛の筋肉と脂肪の抽出液を用いて、添加する水の量を検討した。抽出液10 mLに水0~5 mLを添

加し、ギ酸で酸性とした後に、①と同様の方法で検討した。表7に示すように、牛の筋肉の場合には、水の添加量が2 mL以上で100%程度の回収率が得られた。以上のことから、抽出液10 mLに対して、水3 mL、ギ酸130 μ Lを添加してからカラムに負荷することとした。一方で、牛の脂肪の場合は、水の添加量が2 mL以上で抽出液が白濁し、ミニカラムが目詰まりしたが、1 mL以下では抽出液の白濁等は認められず100%程度の回収率が得られた。以上の結果から、脂肪の場合は、アセトン抽出液10 mLに対して、水1 mL及びギ酸110 μ Lを添加することとした。

表7 水の添加量による回収率

牛の筋肉または脂肪の抽出液量 (mL)	水 (mL)	ギ酸 (μ L) *	回収率 (%)		備考
			牛の筋肉	牛の脂肪	
10	0	100	75	97	
	1	110	86	105	
	2	120	99	90	脂肪の場合は白濁し、カラムが目詰まりした
	3	130	104	48	
	4	140	101	-	
	5	150	104	-	

カラム：Inertsep MC-1 (1,000 mg)

クロルプロマジン添加量：0.1 ng

* 1 vol%となるようにギ酸を添加した

④ 充填剤量と溶出液量の検討

牛の筋肉のアセトン抽出液10 mLに水3 mL、ギ酸130 μ Lを添加した負荷液を調製して、①と同様の方法で、InertSep MC-1の充填剤量を検討した。充填剤の量は、250、500、1,000 mgを検討した。その結果、充填剤量が1,000 mgのときには、負荷及び洗浄の画分ではクロルプロマジンは溶出せずに、アセトン及びアンモニア水（19：1）混液では、10 mLでほぼ100%が溶出した。以上のことから、InertSep MC-1の充填剤量は1,000 mgを使用することとして、精製方法は、ギ酸及びメタノール（1：99）混液、メタノール、アセトン、各20 mLで洗浄した後、アセトン及びアンモニア（19：1）混液15 mLで溶出することにした。

表8 各画分からの溶出状況

固相ミニカラム	充填剤量 (mg)	回収率 (%)								合計
		負荷液	ギ酸及びメタノール (1：99) 混液	メタノール	アセトン	アセトン及びアンモニア水 (19：1) 混液				
						10 mL	20 mL	20 mL	20 mL	
InertSep MC-1	250	29	10	0	0	52	0	0	0	91
	500	3	4	0	0	89	1	0	0	97
	1,000	0	0	0	0	93	6	0	0	99

クロルプロマジン添加量：0.2 ng

3. 添加回収試験

畜水産物8食品（牛の筋肉・脂肪・肝臓・乳、鶏卵、はちみつ、うなぎ、しじみ）を用いて、
 [実験方法] 7. 試験溶液の調製に示す方法に従い、添加濃度を0.0001 mg/kgとして添加回収試験を実施した。添加回収試験における回収率100%相当の溶媒標準溶液、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6～13に示した。また、各食品のブランク試料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14に示した。

1) 選択性の評価

選択性の評価結果を表9に示した。すべての食品において、クロルプロマジンの定量を妨害するピークは検出されなかった。以上のことから、選択性は問題が無いと判断した。

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)	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)	
							n=1	n=2	平均(a)	n=1	n=2	平均(b)			
1	クロルプロマジン	牛の筋肉	0.0001	定量限界	0.0001	< 0.333	面積	0	0	0	2983	3007	2995	0.000	○
2		牛の脂肪	0.0001	定量限界	0.0001	< 0.333	面積	0	0	0	2801	2731	2766	0.000	○
3		牛の肝臓	0.0001	定量限界	0.0001	< 0.333	面積	0	0	0	2740	2582	2661	0.000	○
4		牛乳	0.0001	定量限界	0.0001	< 0.333	面積	0	0	0	2921	2951	2936	0.000	○
5		鶏卵	0.0001	定量限界	0.0001	< 0.333	面積	0	0	0	2736	2781	2758	0.000	○
6		はちみつ	0.0001	定量限界	0.0001	< 0.333	面積	0	0	0	2497	2507	2502	0.000	○
7		うなぎ	0.0001	定量限界	0.0001	< 0.333	面積	0	0	0	2600	2647	2624	0.000	○
8		しじみ	0.0001	定量限界	0.0001	< 0.333	面積	0	0	0	2615	2650	2632	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、精度

定量限界濃度における真度、精度の検討結果を表10に示した。真度及び併行精度は、それぞれ86～106%及び2.4～5.8%であり、ガイドラインの目標値を十分に満たした。また、添加試料のピークのS/Nの平均値は498～1628であり、S/N≥10以上を十分に満たした。

表10 真度、精度の評価

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 [検出限界] (mg/kg)	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
1	クロルプロマジン	牛の筋肉	0.0001	0.0001	S/N	154274063	-49	0.9992	88.6	96.7	95.3	90.7	93.2	92.9	3.5	733.0	440.8	586.9
2		牛の脂肪	0.0001	0.0001	S/N	137907166	-8	0.9992	95.4	102.9	94.2	100.3	97.5	98.1	3.6	1424.3	1202.1	1313.2
3		牛の肝臓	0.0001	0.0001	S/N	130798589	-2	0.9995	97.8	109.0	104.6	102.2	104.5	103.6	3.9	423.6	267.9	345.7
4		牛乳	0.0001	0.0001	S/N	140554954	41	0.9995	108.1	106.2	107.3	103.6	102.1	105.5	2.4	1487.1	1769.1	1628.1
5		鶏卵	0.0001	0.0001	S/N	150815349	-47	0.9995	106.0	94.2	98.3	108.0	106.1	102.5	5.8	1897.1	915.2	1406.1
6		はちみつ	0.0001	0.0001	S/N	140660046	47	0.9993	93.8	105.2	109.3	104.3	100.6	102.6	5.7	1161.1	902.3	1031.7
7		うなぎ	0.0001	0.0001	S/N	123872549	39	0.9997	99.2	102.7	107.9	101.2	99.5	102.1	3.5	522.4	830.5	676.5
8		しじみ	0.0001	0.0001	S/N	132780177	0	0.9999	81.6	88.1	86.0	87.0	86.2	85.8	2.9	518.7	477.8	498.3

*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。

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検討した結果を表11に示した。添加回収試験における回収率100%相当濃度となるように調製した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比を求めた。その結果、ピーク面積比は、0.95～1.02であったことから、本法は試料由来のマトリックスの影響をほとんど受けずに測定することが可能と考えられた。

表11 試料マトリックスの測定への影響

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 [検出限界] (mg/kg)	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	
1	クロルプロマジン	牛の筋肉	0.0001	0.0001	0.00002	面積	0	2983	3007	2995	3166	3136	3151	0.95
2		牛の脂肪	0.0001	0.0001	0.00002	面積	0	2801	2731	2766	2743	2747	2745	1.01
3		牛の肝臓	0.0001	0.0001	0.00002	面積	0	2740	2582	2661	2689	2583	2636	1.01
4		牛乳	0.0001	0.0001	0.00002	面積	0	2921	2951	2936	2936	2858	2897	1.01
5		鶏卵	0.0001	0.0001	0.00002	面積	0	2736	2781	2758	2912	2881	2896	0.95
6		はちみつ	0.0001	0.0001	0.00002	面積	0	2497	2507	2502	2488	2539	2513	1.00
7		うなぎ	0.0001	0.0001	0.00002	面積	0	2600	2647	2624	2610	2537	2574	1.02
8		しじみ	0.0001	0.0001	0.00002	面積	0	2615	2650	2632	2643	2641	2642	1.00

- *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

1) クロルプロマジンの光安定性の確認

クロルプロマジン標準品のに付属するデータシートには、保存時には遮光する必要があるとの記載がされていた。そこで、試験法開発の検討を始める前に、本化合物の光に対する安定性について検討を行った。1 ng/mLクロルプロマジン標準溶液を調製して、透明の1.5 mL容バイアル、透明の1.5 mL容バイアルにアルミ箔を巻いて、完全に遮光したもの、褐色の1.5 mL容バイアルに1.5 mLを入れて、室温で8時間放置した。その後、LC-MS/MS分析を行いそれぞれのピーク面積値を比較した。表12に示すように、すべての条件で同程度のピーク面積値が得られた。以上のことから、少なくとも8時間程度は光に対して安定であると考えられた。

表12 クロルプロマジンの光に対する安定性（8時間後）

条件	クロルプロマジンのピーク面積値
透明バイアル	20,233 ± 252
透明バイアル+アルミ箔	19,800 ± 608
褐色バイアル	20,133 ± 351

クロルプロマジンの濃度：1 ng/mL、n = 3

2) クロルプロマジンのガラス器具への吸着に関する検討

試験法開発の基礎的な検討を進める中で、クロルプロマジンがガラスに吸着する可能性があることが疑われた。そこで、ガラス製及びポリプロピレン製の10 mL容メスフラスコを用いて、1 ng/mLの標準溶液を調製して、それぞれのピーク面積値を比較した。その結果、表13に示すように、ガラス製のメスフラスコを使用した場合には、ピーク面積値が40%程度低下することが分かった。以上のことから、可能な限り、ポリプロピレン製の容器を用いて分析操作を行うことが好ましいと考えられた。

表13 クロルプロマジンのガラスへの吸着

容器	クロルプロマジンのピーク面積値
ガラス製メスフラスコ	39,200 ± 1,833
PP製メスフラスコ	63,933 ± 603

クロルプロマジンの濃度：1 ng/mL、n = 3

[結論]

クロルプロマジンを試料からアセトンで抽出し、強酸性陽イオン交換樹脂ミニカラムで精製した後、LC-MS/MSで定量及び確認する方法を開発した。開発した分析法を検出限界濃度（0.0001 mg/kg）で、牛の筋肉・肝臓・乳、鶏卵、はちみつ、うなぎ、しじみの8食品に適用した。真度及び併行精度（RSD%）は、それぞれ86～106%及び2.4～5.8%であった。また、各食品におけるマトリックス添加標準溶液に対する溶媒標準溶液のピーク面積比は、0.95～1.02であったことから、本法は試料由来のマトリックスの影響をほとんど受けずに測定することが可能と考えられた。以上のことから、開発した分析法は、食品中のクロルプロマジンを検出限界濃度（0.0001 mg/kg）で精度良く定量することが可能であると考えられた。

添加回収試験における代表的なクロマトグラム

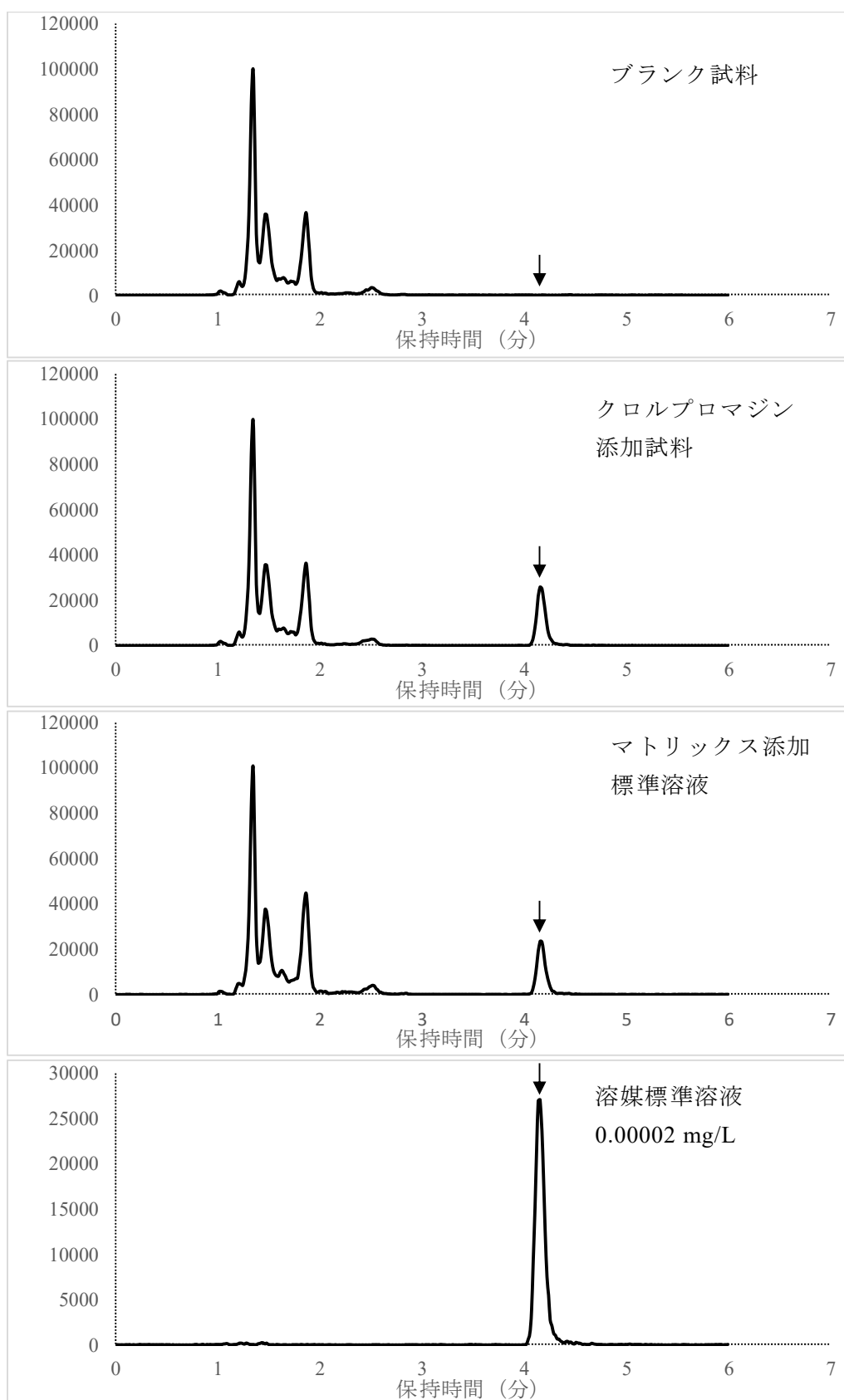


図6 牛の筋肉のSRMクロマトグラム
クロルプロマジン (m/z 319.1 \rightarrow 86.1) 添加濃度 : 0.0001 mg/kg

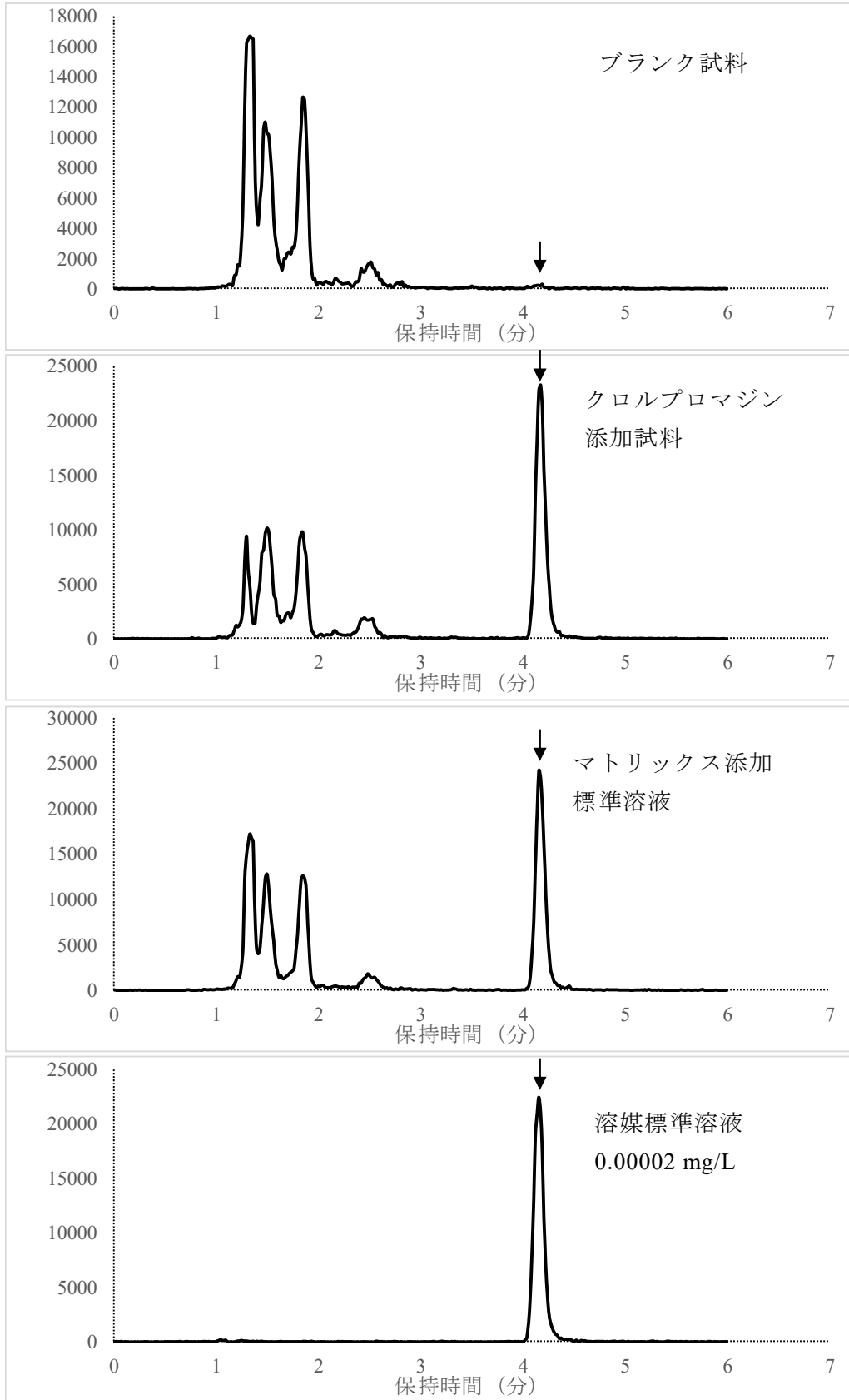


図7 牛の肝臓のSRMクロマトグラム
 クロルプロマジン (m/z 319.1 \rightarrow 86.1) 添加濃度 : 0.0001 mg/kg

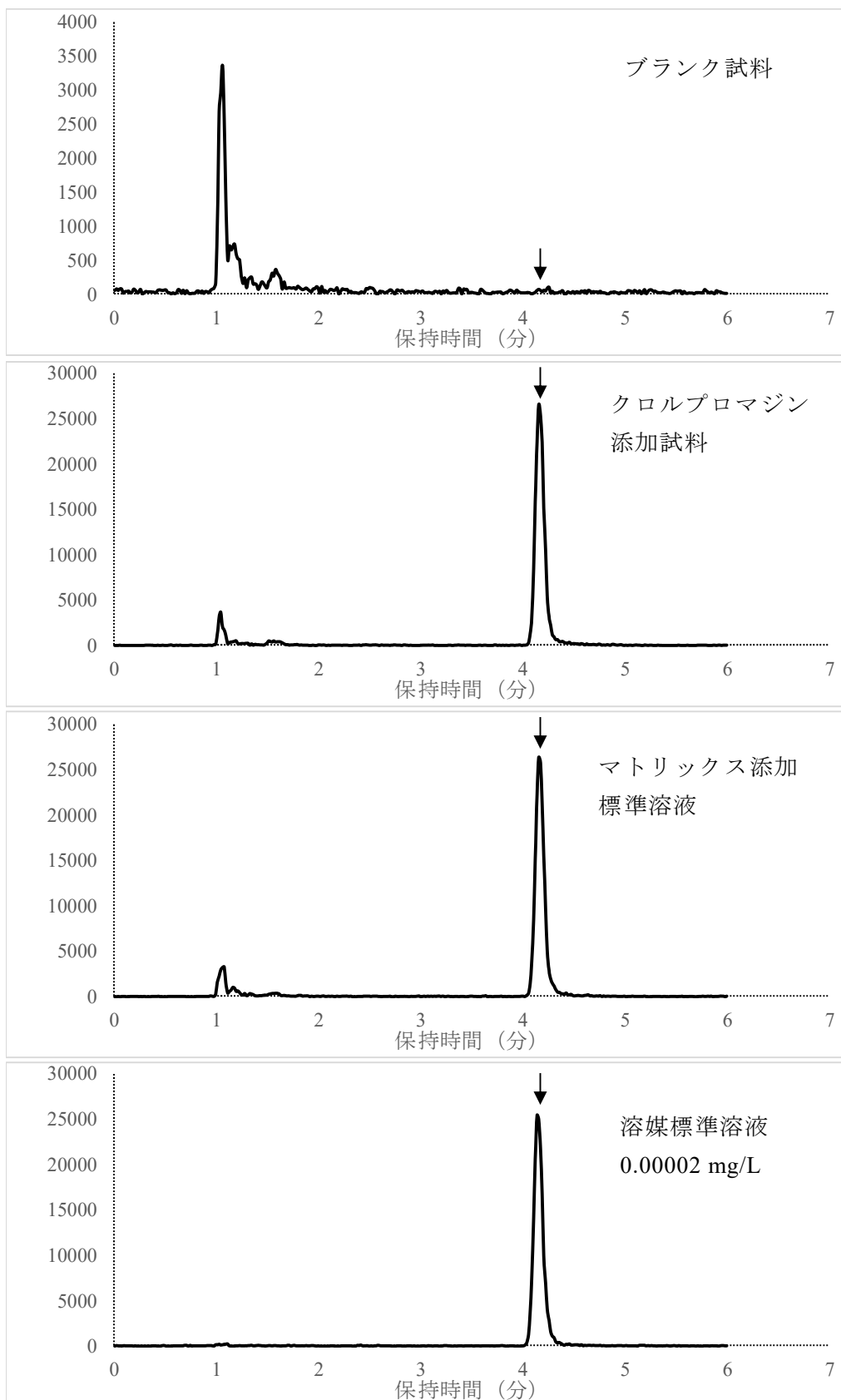


図8 牛の脂肪のSRMクロマトグラム
 クロルプロマジン (m/z 319.1→86.1) 添加濃度 : 0.0001 mg/kg

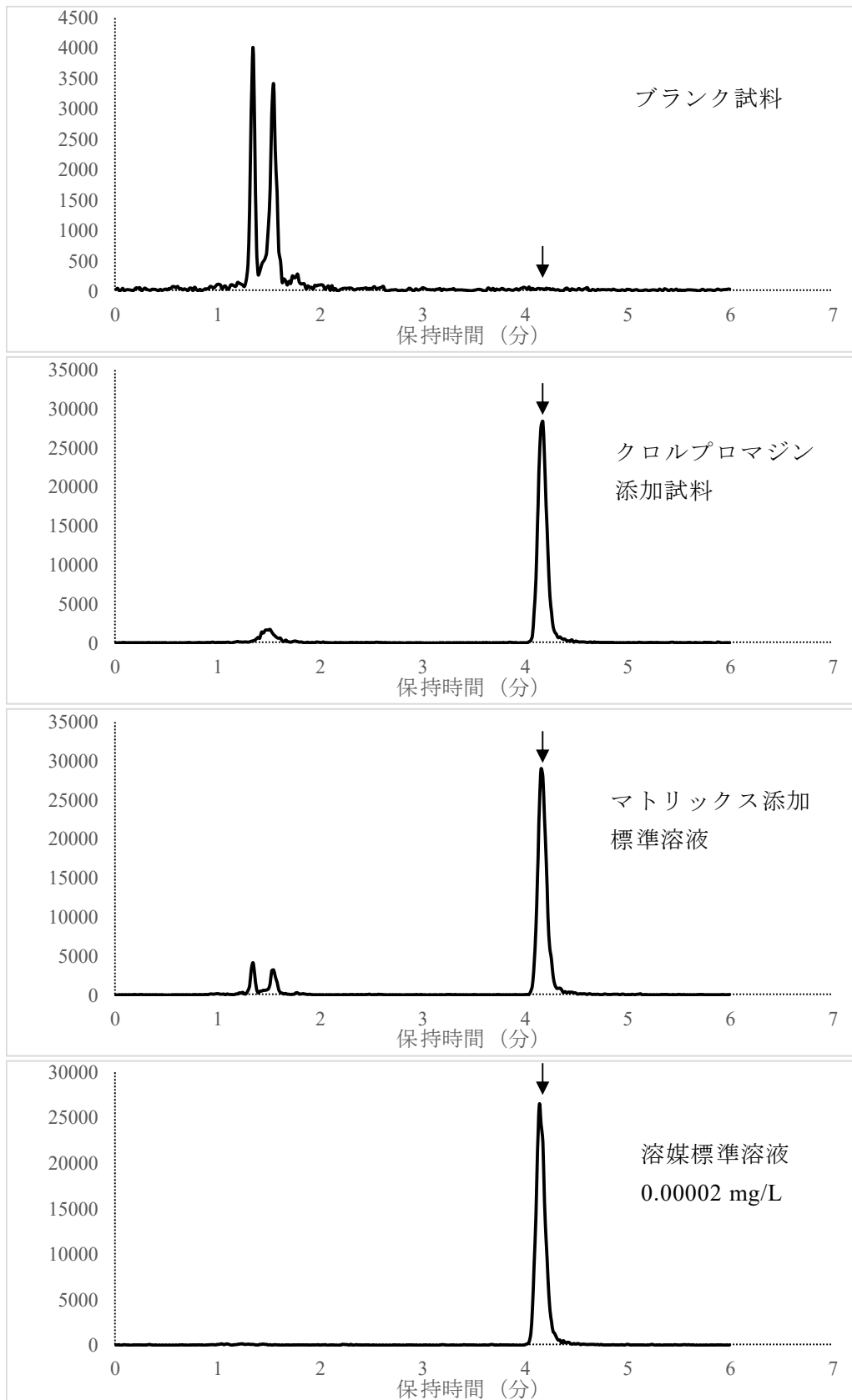


図9 牛乳のSRMクロマトグラム
 クロルプロマジン (m/z 319.1 \rightarrow 86.1) 添加濃度 : 0.0001 mg/kg

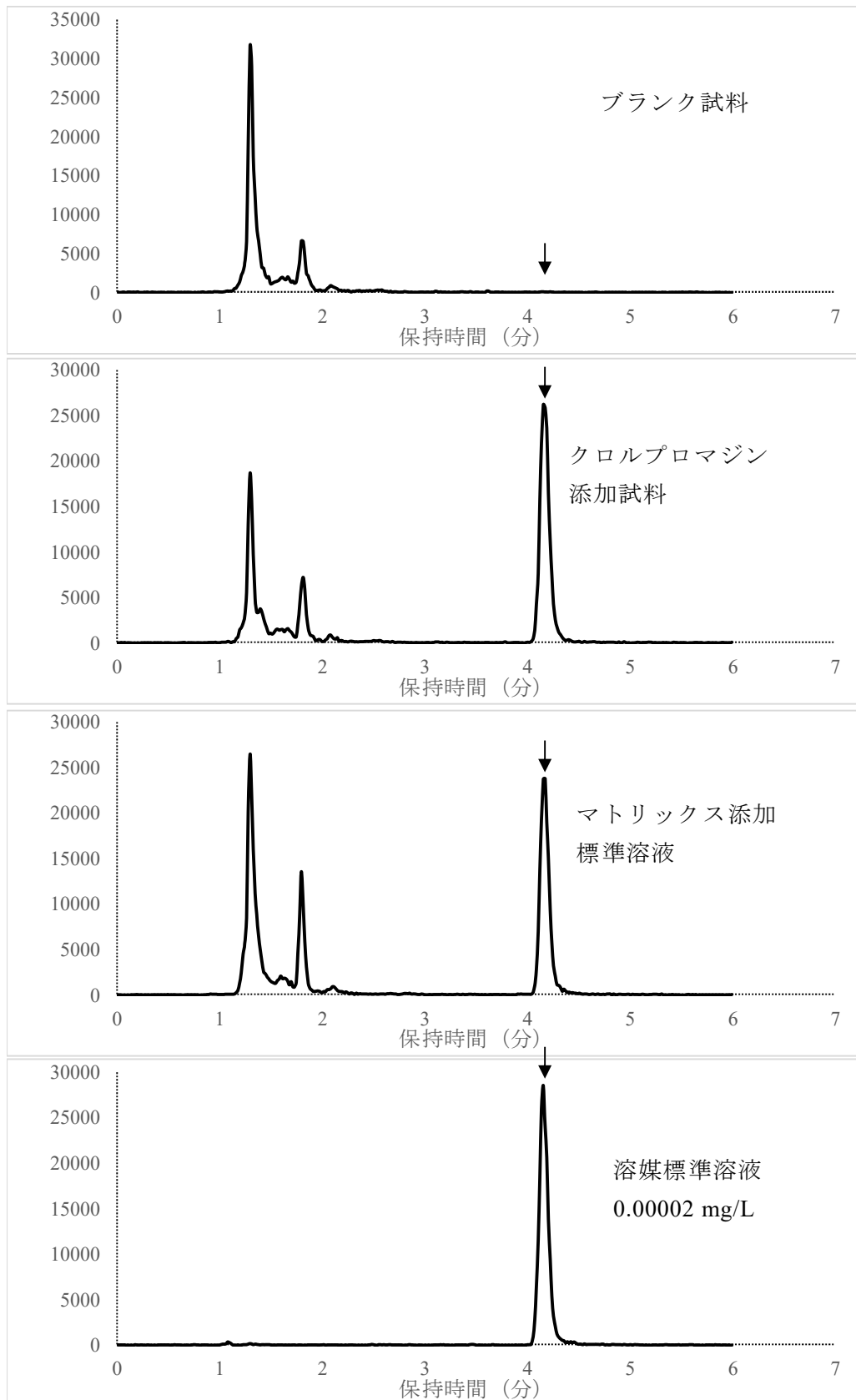


図10 はちみつのSRMクロマトグラム
 クロルプロマジン (m/z 319.1 \rightarrow 86.1) 添加濃度 : 0.0001 mg/kg

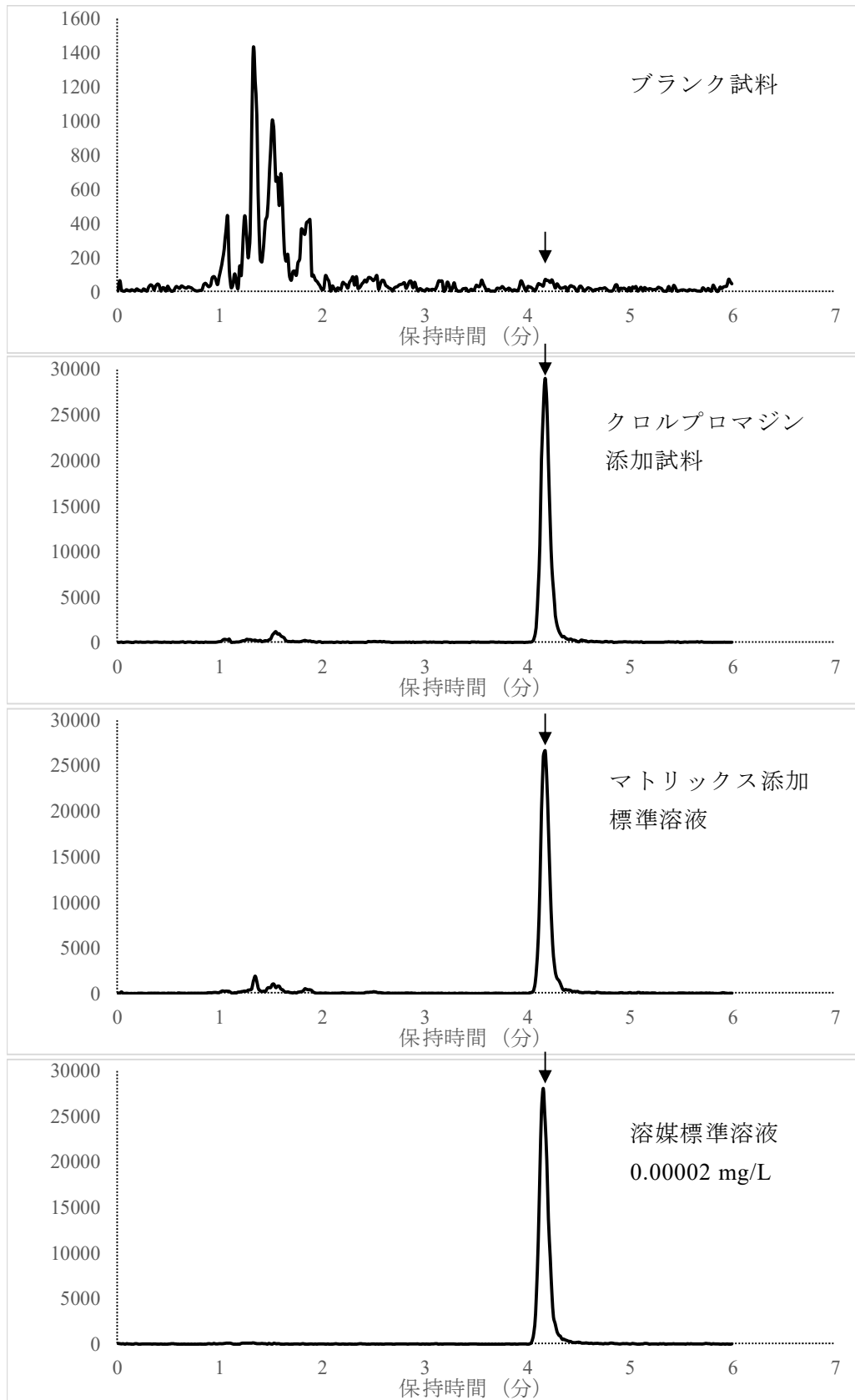


図11 鶏卵のSRMクロマトグラム
 クロルプロマジン (m/z 319.1 \rightarrow 86.1) 添加濃度 : 0.0001 mg/kg

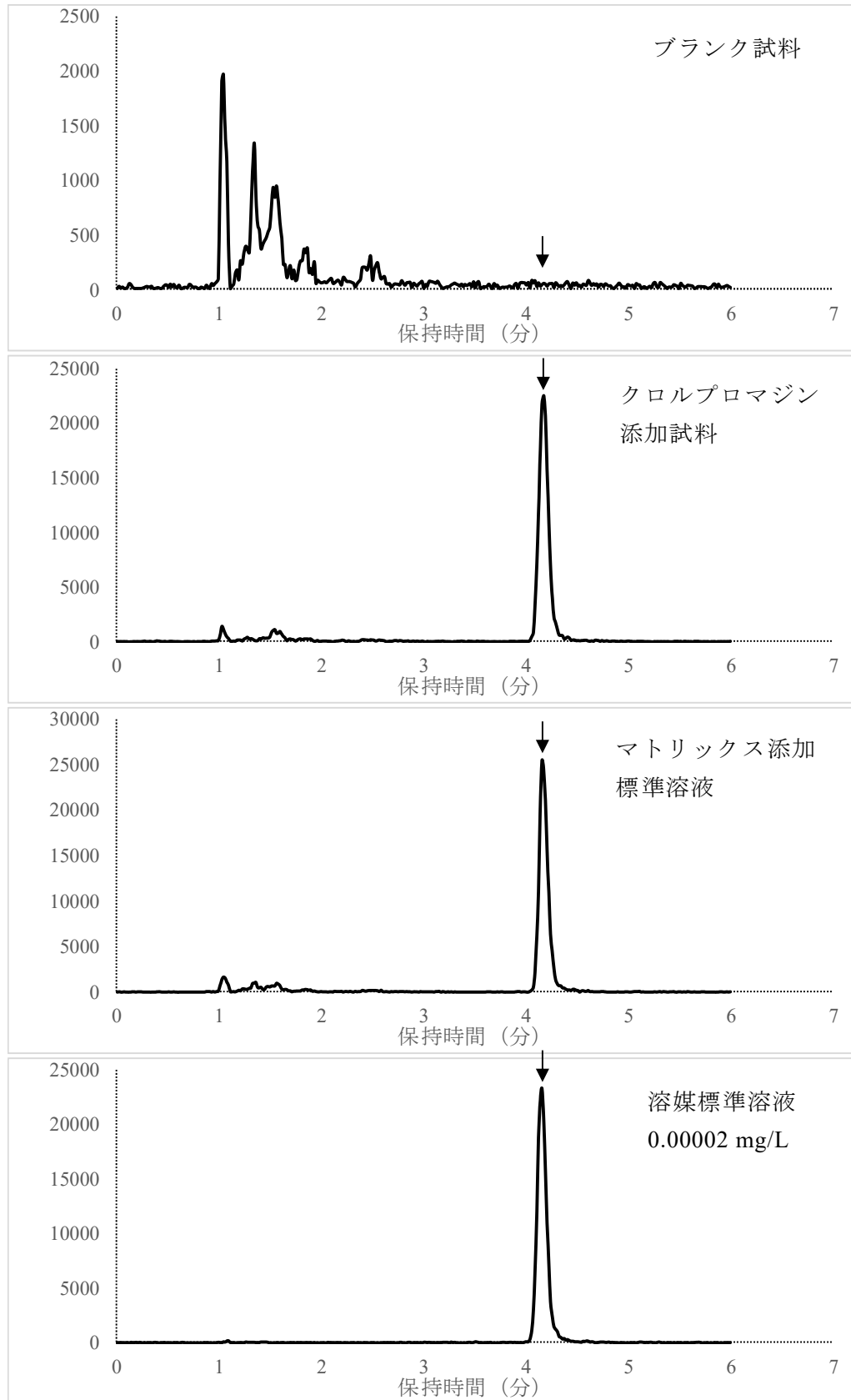


図12 うなぎのSRMクロマトグラム
 クロルプロマジン (m/z 319.1 \rightarrow 86.1) 添加濃度 : 0.0001 mg/kg

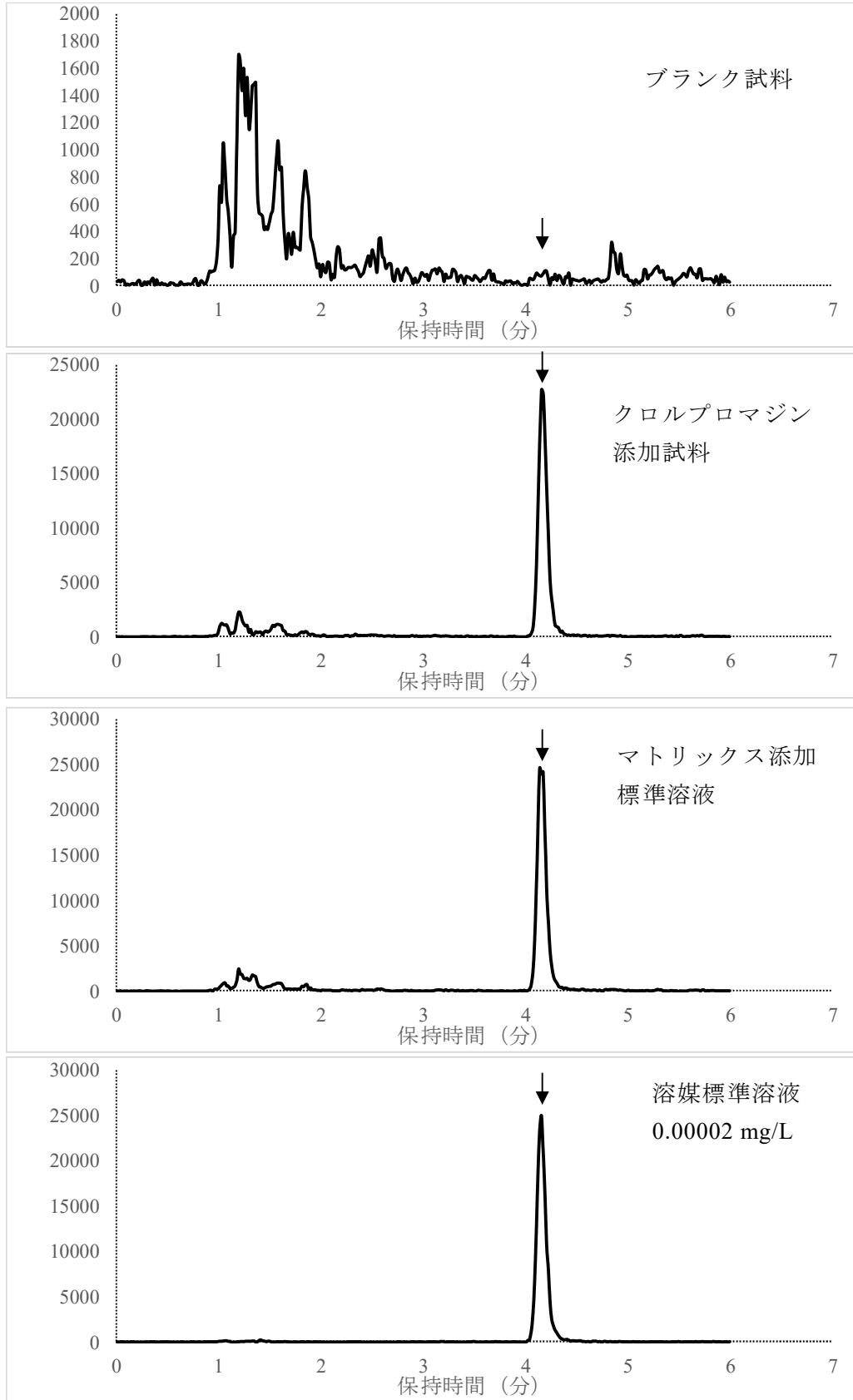


図13 しじみのSRMクロマトグラム
 クロルプロマジン (m/z 319.1 \rightarrow 86.1) 添加濃度 : 0.0001 mg/kg

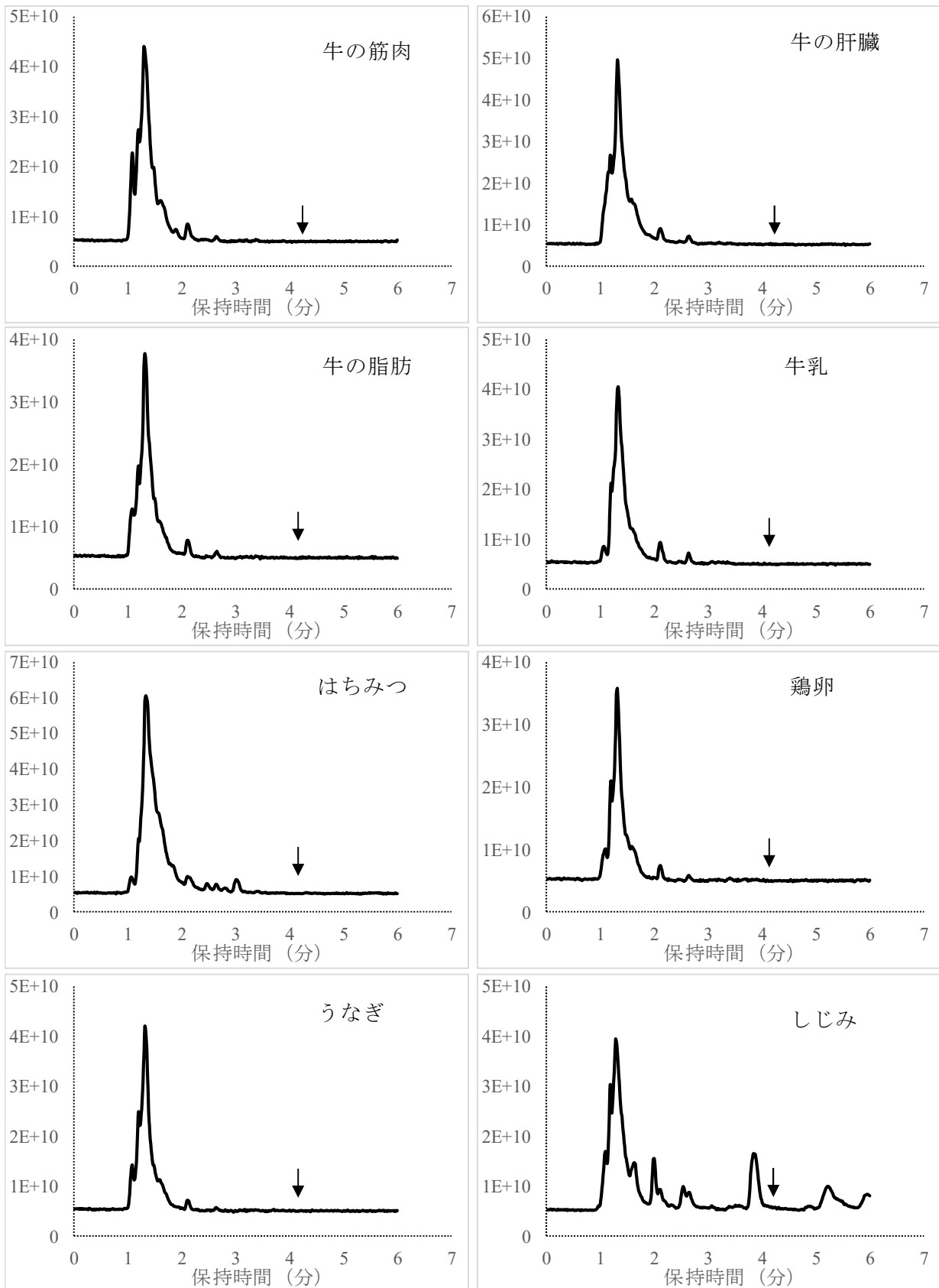


図14 ブランク試料のトータルイオンクロマトグラム
(スキャン範囲：50～500 amu)