

※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。

平成27年度

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

カルボキシシン試験法（農産物）

カルボキシシン試験法（農産物）の検討結果

〔緒言〕

1. 目的及び試験法の検討方針等

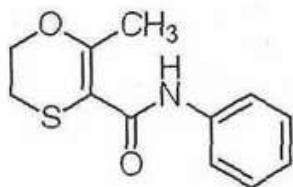
カルボキシシンの農産物中の分析法の開発を行った。カルボキシシンは小麦等の穀物、豆類、タマネギ、アブラナ等の種子において主に黒穂病菌、腐敗病菌、胴枯れ病菌などの消毒のために用いられる浸透性殺菌剤である。ミトコンドリアの呼吸酵素であるコハク酸脱水素酵素を阻害することにより殺菌作用を示すと考えられている。日本では農薬として登録されておらず、ポジティブリスト制度導入に伴い諸外国の基準値などを参考に暫定基準値が設定され、平成 24 年 11 月 2 日付け食安発 1102 第 2 号により基準値が設定され規制対象にカルボキシシン代謝物である 5,6-ジヒドロ-3-カルボキシアニリド-2-メチル-1,4-オキサシン-4-オキシド（スルホキシド体）が追加された。

カルボキシシンはその構造にチオエーテル（スルフィド）を有し、植物体内でスルホキシド体、次いでスルホン体に代謝される。本検討においては分析操作中にカルボキシシンがスルホキシド体やスルホン体に変換される可能性もあることから分析対象化合物ではないがスルホン体（オキシカルボキシシン）への変換の有無を確認する必要がある。そのためスルホン体も同時分析可能な試験法の開発をおこなうこととした。また、カルボキシシン（親化合物のみ）は通知一斉試験法「GC/MS による農薬等の一斉試験法（農産物）」の分析対象化合物であることから適用を試みるため、同法の GC/MS 測定条件でカルボキシシンとスルホキシド体のスキャン測定を行ったところ、リテンションタイム、フラグメントイオンとも同じであり、分別定量が困難であったことから、LC-MS/MS での検討を試み、抽出・精製については同法を基に開発をおこなった。

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： カルボキシシン

構造式：



分子式： C₁₂H₁₃NO₂S

分子量： 235.30

化学名： IUPAC 名

5,6-ジヒドロ-2-メチル-1,4-オキサシン-3-カルボキシアニリド

5,6-dihydro-2-methyl-1,4-oxathine-3-carboxanilide

CAS 名 (5234-68-4)

5,6-ジヒドロ-2-メチル-N-フェニル-1,4-オキサシン-3-カルボキシアミド

5,6-dihydro-2-methyl-N-phenyl-1,4-oxathin-3-carboxamide

外観： 白色結晶

融点： 91-92℃

蒸気圧： 0.020mPa (25℃)

溶解性： 水：0.147g/L (20℃)

アセトン：221.2 g/L (20℃)

メタノール：89.33 g/L (20℃)

酢酸エチル：107.7 g/L (20℃)

logPow： 2.3

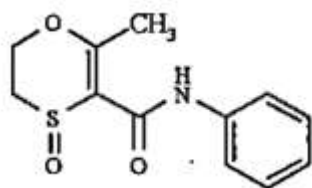
解離定数 (pKa)： <0.5

安定性： pH 5,7,9 で加水分解に安定 (25℃)

[出典： The e-Pesticide Manual Version3.0 2003-04]

分析対象化合物： 5,6-ジヒドロ-3-カルボキシアニリド-2-メチル-1,4-オキサシン-4-オキシド
(スルホキシド体)

構造式：



分子式： C₁₂H₁₃NO₃S

分子量： 251.30

化学名： IUPAC 名

5,6-ジヒドロ-3-カルボキシアニリド-2-メチル-1,4-オキサシン-4-オキシド
5,6-dihydro-3-carboxanilide-2-methyl-1,4-oxathiine-4-oxide

外観： 白色結晶性粉末

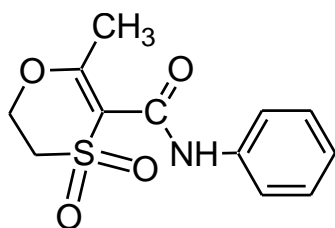
融点： 120-121℃

[出典： 和光純薬工業株式会社カルボキシンスルホキシド体標準品試験証明書及び
Carboxamido oxathiin oxides as systemic fungicides and bactericides
By: Von Schmeling, Bogislaw; Von Schmeling, Bogislaw; Thiara, Dalel S.; Harrison,
William Ashley
Assignee: Uniroyal, Inc.]

オキシカルボキシンは分析対象化合物ではないが、測定及び添加回収試験を行ったことから参考として構造式及び物理化学的性質を以下に示した。

化合物： オキシカルボキシン(スルホン体)

構造式：



分子式： C₁₂H₁₃NO₄S

分子量： 267.30

化学名： IUPAC 名

5,6-ジヒドロ-2-メチル-1,4-オキサシン-3-カルボキシアニリド-4,4-ジオキシド
5,6-dihydro-2-methyl-1,4-oxathiine-3-carboxanilide-4,4-dioxide
CAS 名 (5259-88-1)

5,6-ジヒドロ-2-メチル-N-フェニル-1,4-オキサシン-3-カルボキシアミド-
4,4-ジオキシド

5,6-dihydro-2-methyl-N-phenyl-1,4-oxathiin-3-carboxamide-4,4-dioxide

外観： 白色～うすい褐色、結晶性粉末～粉末

融点： 119.5-121.5 °C

蒸気圧： <5.6 × 10⁻³ mPa (25 °C)

溶解性： 水： 1.4 g/L (25 °C)

アセトン： 83.7 g/L (25 °C)

n -ヘキサン : 8.8 mg/L (25 °C)
 logPow : 0.772
 [出典 : The e-Pesticide Manual Version3.0 2003-04]

3. 基準値

カルボキシンの基準値を表 1 に示す。

表 1. カルボキシンの基準値

物質名	食品名	基準値 (ppm)
カルボキン	小麦	0.2
	大麦	0.2
	とうもろこし	0.2
	その他の穀類	0.2
	小豆類	0.2
	らっかせい	0.2
	たまねぎ	0.2
	未成熟いんげん	0.2
	えだまめ	0.2
	その他の野菜	0.2
	べにばなの種子	0.2
	綿実	0.2
	なたね	0.03

施行通知 : 食安発 1102 第 2 号 (平成 24 年 11 月 2 日)

[実験方法]

1. 試料

小麦 (石川県産)、えだまめ (台湾産)、小豆 (北海道産)、たまねぎ (北海道産)、未成熟いんげん (鹿児島県産) をインターネットや小売店から購入した。また、試料の採取方法を以下に記載した。

(1) 小麦、小豆

試料を粉砕機 (Retsch 社 [現 ヴァーダー・サイエンティフィック社] 製 ZM200) を用いて 425 μ m の標準網ふるいを通して均一化した。

(2) たまねぎ (外皮及びひげ根を除去したもの)、未成熟いんげん及びえだまめ (花梗を除去したもの)

試料を細切したのち検体約 1 kg を精密に量り、重量比で等量の 5 w/v% チオ尿素溶液を加え、カッターミキサー (Robot coupe 社製 Blixer-5Plus) を用いて摩砕均一化した。

2. 試薬・試液

カルボキン標準品 : 純度 99.6 % (和光純薬工業(株)製)

カルボキシンスルホキシド体標準品 : 純度 99.6 % (和光純薬工業(株)製)

オキシカルボキン標準品 : 純度 99.9 %、融点 121.5 °C (和光純薬工業(株)製)

アセトン、アセトニトリル、トルエン、 n -ヘキサン*、酢酸エチル* : 残留農薬試験用(和光純薬工業(株)製)

アセトニトリル*、ギ酸*、メタノール : LCMS 用(和光純薬工業(株)製)

塩酸*、リン酸* : 試薬特級(和光純薬工業(株)製)

ジブチルヒドロキシルトレン(以下 BHT)*、L-アスコルビン酸ナトリウム*、塩化ナトリウム、チオ尿素 : 試薬特級(和光純薬工業(株)製)

リン酸水素二カリウム、リン酸二水素カリウム : 試薬特級(和光純薬工業(株)製)

リン酸緩衝剤粉末* (1/15 mol/L, pH7.0) : 生化学用(和光純薬工業(株)製)

ギ酸アンモニウム、酢酸アンモニウム* : 試薬特級(和光純薬工業(株)製)

硫酸ナトリウム(無水)* : 残留農薬試験用(和光純薬工業(株)製)

けいそう土 : セライト 545(和光純薬工業(株)製)

水：milliQ 水

5 w/v%チオ尿素溶液：チオ尿素50 gを量り採り、水約500 mLに溶解した後、水を加えて1 Lとした。

0.5 mol/Lリン酸緩衝液 (pH 7.0)：リン酸水素二カリウム52.7 g及びリン酸二水素カリウム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。

アセトニトリル及びトルエン (3:1) 混液：アセトニトリル 750 mL とトルエン 250 mL を合わせて、よく混合した。

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム (Bond Elut C18 ミニカラム)：1,000 mg (アジレントテクノロジ (株) 製)

グラファイトカーボン及びアミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム (Envi-Carb/NH₂ ミニカラム)：500 mg/500 mg (シグマアルドリッチジャパン合同会社製)

グラファイトカーボン及びエチレンジアミン-N-プロピル積層ミニカラム* (GC/PSA ミニカラム)：500 mg/500 mg (ジーエルサイエンス (株) 製)

標準原液 (検討用)：各標準品 20 mg を精秤し、アセトンで 20 mL に溶解して 1,000 mg/L 溶液を調製した。検討に用いた標準溶液について、この標準原液を窒素気流下で溶媒を除去しメタノールに溶解したものをメタノールを用いて適宜希釈し、それぞれ設定濃度の標準溶液を調製した。

標準原液 (添加用及び検量線用)：カルボキシン標準品 20 mg を精秤し、アセトンで 20 mL に溶解して 1,000 mg/L 溶液を調製した。カルボキシンスルホキシド体標準品 21.36 mg を精秤し、アセトンで 20 mL に溶解して 1,068 mg/L 溶液を調製した。オキシカルボキシン標準品 22.72 mg を精秤し、アセトンで 20 mL に溶解して 1,136 mg/L 溶液を調製した。

検量線用混合標準溶液：カルボキシン標準原液を窒素気流下で溶媒を除去しメタノールに溶解したものを適宜希釈し 0.00002~0.06 mg/L の濃度の溶液を調製した。カルボキシンスルホキシド体標準原液を窒素気流下で溶媒を除去しメタノールに溶解したものを適宜希釈し 0.00002136~0.06408 mg/L の濃度の溶液を調製した。オキシカルボキシン標準原液を窒素気流下で溶媒を除去しメタノールに溶解したものを適宜希釈し 0.00002272~0.06816 mg/L の濃度の溶液を調製した。

添加用標準溶液 (基準値添加用) カルボキシン添加用標準溶液 4 mg/L、カルボキシンスルホキシド体添加用標準溶液 4.272 mg/L、オキシカルボキシン添加用標準溶液 4.544 mg/L：カルボキシン標準原液、カルボキシンスルホキシド体標準原液及びオキシカルボキシンの標準原液を 5 mL ずつ採取し、それぞれアセトンにて 50 mL に定容した。これを 2 mL ずつ採取し、それぞれアセトンにて 50 mL に定容した。

添加用標準溶液 (定量限界添加用) カルボキシン添加用標準溶液 0.1 mg/L、カルボキシンスルホキシド体添加用標準溶液 0.1068 mg/L、オキシカルボキシン添加用標準溶液 0.1136 mg/L：カルボキシン、カルボキシンスルホキシド体及びオキシカルボキシンの添加用標準溶液 (基準値添加用) を 2.5 mL ずつ採取し、それぞれアセトンにて 100 mL に定容した。

上記で「*」を付したものは採用しなかった検討のみで使用した試薬である。

3. 装置

ホモジナイザー：ポリトロン PT10-35 GT (KINEMATICA 社製)

遠心粉碎器：ZM200 (Retsch 社 [現 ヴァーダー・サイエンティフィック社] 製)

カッターミキサー：Blixer-5Plus (Robot coupe 社製)

濃縮装置：ロータリーエバポレーター EYELA N-1100V-W (東京理化工機 (株) 製)

純水製造装置：Milli-Q Integral 超純水製造装置 (ミリポア社製)

LC-MS/MS

装置	型式	製造元
MS 装置	LCMS-8050	(株)島津製作所
LC 装置	Prominence UFLC	(株)島津製作所
データ処理	LabSolutions	(株)島津製作所

4. 測定条件

LC-MS/MS

LC 条件																			
カラム	InertSustainC18 (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 5 μm : ジーエルサイエンス(株)製)																		
移動相流速 (mL/min)	0.20																		
注入量 (μL)	2																		
カラム温度 (°C)	40																		
移動相	A 液: 2 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液 B 液: 2 mmol/L ギ酸アンモニウム・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>70</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>20.00</td> <td>20</td> <td>80</td> </tr> <tr> <td>20.01</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>30.00</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>30.01</td> <td>70</td> <td>30</td> </tr> </tbody> </table>	時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)	0.00	70	30	20.00	20	80	20.01	0	100	30.00	0	100	30.01	70	30
時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)																	
0.00	70	30																	
20.00	20	80																	
20.01	0	100																	
30.00	0	100																	
30.01	70	30																	
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	エレクトロスプレーイオン化法(ポジティブモード)																		
インターフェイス温度 (°C)	300																		
DL 温度 (°C)	250																		
ヒートブロック温度 (°C)	400																		
ネブライザーガス	窒素、3 L/min																		
ヒーティングガス	ドライエア 10 L/min																		
ドライイングガス	窒素、10 L/min																		
コリジョンガス	アルゴン																		
定量イオン (m/z)	カルボキシシン: 236→143(Q1 プリバイアス 30 V、Q3 プリバイアス 30 V、コリジョンエネルギー 20 eV) スルホキシド体: 252→159(Q1 プリバイアス 18 V、Q3 プリバイアス 30 V、コリジョンエネルギー 15 eV) スルホン体: 268→175(Q1 プリバイアス 15 V、Q3 プリバイアス 27 V、コリジョンエネルギー 15 eV)																		
定性イオン (m/z)	カルボキシシン: 236→87(Q1 プリバイアス 30 V、Q3 プリバイアス 16 V、コリジョンエネルギー 25 eV) 236→43(Q1 プリバイアス 30 V、Q3 プリバイアス 17 V、コリジョンエネルギー 37 eV) スルホキシド体: 252→131(Q1 プリバイアス 18 V、Q3 プリバイアス 25 V、コリジョンエネルギー 19 eV) 252→43(Q1 プリバイアス 17 V、Q3 プリバイアス 17 V、コリジョンエネルギー 29 eV)																		

	スルホン体： 268→43(Q1 プリバイアス 19 V、Q3 プリバイアス 27 V、コリジョンエネルギー36 eV) 268→147(Q1 プリバイアス 19 V、Q3 プリバイアス 24 V、コリジョンエネルギー23 eV)
保持時間 (min)	カルボキシシン：16.9 スルホキシド体：9.8 スルホン体：10.6

5. 定量

カルボキシシン標準品の 0.00002~0.0015 mg/L 及び 0.0008~0.06 mg/L の濃度範囲、カルボキシンスルホキシド体標準品の 0.00002136~0.001602 mg/L 及び 0.0008544~0.06408 mg/L の濃度範囲、及びオキシカルボキシシン標準品の 0.00002272~0.001704 mg/L 及び 0.0009088~0.06816 mg/L の濃度範囲の混合標準溶液(メタノール)を数点調製し、それぞれ 2 µL を LC-MS/MS に注入し、ピーク面積法で検量線を作成した。この検量線を用い、絶対検量線法でカルボキシシン、カルボキシンスルホキシド体及びオキシカルボキシシンの含量を求めた。

6. 添加試料の調製

(1) 穀類、豆類及び種実類

小麦、小豆(添加濃度：カルボキシシン換算濃度 0.005 ppm)：試料 10.0 g に 5 w/v%チオ尿素溶液 20 mL を加えよく混合した後 30 分間放置し、カルボキシシンのアセトン溶液(0.1 mg/L) 0.5 mL、スルホキシド体のアセトン溶液(0.1068 mg/L) 0.5 mL、スルホン体のアセトン溶液(0.1136 mg/L) 0.5 mL を別々の試料に添加しよく混合した後、30 分間放置した。

小麦、小豆(添加濃度：カルボキシシン換算濃度 0.2 ppm)：試料 10.0 g に 5 w/v%チオ尿素溶液 20 mL を加えよく混合した後 30 分間放置し、カルボキシシンのアセトン溶液(4 mg/L) 0.5 mL、スルホキシド体のアセトン溶液(4.272 mg/L) 0.5 mL、スルホン体のアセトン溶液(4.544 mg/L) 0.5 mL を別々の試料に添加しよく混合した後、30 分間放置した。

(2) 野菜

たまねぎ、未成熟いんげん及びえだまめ(添加濃度：カルボキシシン換算濃度 0.005 ppm)：検体 20.0 g に相当する量(秤取 40.0 g)にカルボキシシンのアセトン溶液(0.1 mg/L) 1 mL、スルホキシド体のアセトン溶液(0.1068 mg/L) 1 mL、スルホン体のアセトン溶液(0.1136 mg/L) 1 mL を別々の試料に添加しよく混合した後、30 分間放置した。

たまねぎ、未成熟いんげん及びえだまめ(添加濃度：カルボキシシン換算濃度 0.2 ppm)：検体 20.0 g に相当する量(秤取 40.0 g)にカルボキシシンのアセトン溶液(4 mg/L) 1 mL、スルホキシド体のアセトン溶液(4.272 mg/L) 1 mL、スルホン体のアセトン溶液(4.544 mg/L) 1 mL を別々の試料に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

概要

試料にチオ尿素を加え、カルボキシシン、カルボキシンスルホキシド体及びオキシカルボキシシンをアセトニトリルで抽出し、塩析で水を除いた後、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムで精製後、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で精製し、LC-MS/MSで定量及び確認した。

(1) 抽出

穀類、豆類及び種実類は試料 10.0 g を量り採り、5 w/v%チオ尿素溶液 20 mL を加えよく混ぜ 30 分間

放置した。野菜は検体 20.0 g に相当する量を量り採った（秤取 40.0 g）。

これにアセトニトリル 100 mL 加えホモジナイズした後、ろ過助剤(セライト)を用いて吸引ろ過を行い、ろ紙上の残留物にアセトニトリル 50 mL 加えホモジナイズした後、再度吸引ろ過を行い得られたろ液を合わせアセトニトリルで正確に 200 mL とした。正確に 20 mL 分取し塩化ナトリウム 10 g と 0.5 mol/L リン酸緩衝液 20 mL を加え 10 分間振とうし、静置した後、分離した水層を捨てアセトニトリル層を採取した。

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム(Bond Elut C18 ミニカラム)1,000 mg にアセトニトリル 10 mL を注入し、流出液は捨てた。このカラムに上記のアセトニトリル層を注入し、さらにアセトニトリル 6 mL を注入し全溶出液をナス型フラスコに採り、減圧濃縮器(40℃以下)で濃縮し、窒素気流下で溶媒除去した。残留物にアセトニトリル及びトルエン (3:1) 混液 2 mL を加えて超音波処理をして溶かし、抽出液とした。

(2) 精製

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(Envi-Carb/NH₂ ミニカラム)500 mg/500 mg にアセトニトリル及びトルエン(3:1)混液 10 mL を注入し、流出液は捨てた。このカラムに上記の抽出液を注入し、さらにアセトニトリル及びトルエン(3:1)混液 15 mL を注入し全溶出液をナス型フラスコに採り、減圧濃縮器(40℃以下)で濃縮し、窒素気流下で溶媒除去した。残留物にメタノールを穀類、豆類及び種実類は正確に 5 mL、野菜は正確に 10 mL 加え溶解し、これを試験溶液とした。

[分析法フローチャート]

前処理

- ↓ 穀類、豆類及び種実類：425 μm の標準網ふるいを通るように粉碎し均一化
- ↓ 野菜：試料を細切したのち検体約 1 kg を精密に量り、重量比で等量の 5 w/v% チオ尿素溶液を加え、摩砕均一化

秤 取

- ↓ 穀類、豆類及び種実類：試料 10.0 g に 5 w/v% チオ尿素溶液 20 mL を加え 30 分間放置
- ↓ 野菜：検体 20.0 g 相当（秤取 40.0 g）

アセトニトリル抽出

- ↓ アセトニトリル 100 mL を加えホモジナイズ
- ↓ 吸引ろ過
- ↓ 残留物にアセトニトリル 50 mL を加えホモジナイズ
- ↓ 吸引ろ過
- ↓ ろ液を合わせ、アセトニトリルで 200 mL に定容

塩 析

- ↓ 正確に 20 mL 分取
- ↓ 塩化ナトリウム 10 g と 0.5 mol/L リン酸緩衝液 20 mL を加える
- ↓ 振とう 10 分間
- ↓ 静置
- ↓ 分離した水層を捨てアセトニトリル層を採取

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム(Bond Elut C18 ミニカラム)1,000 mg

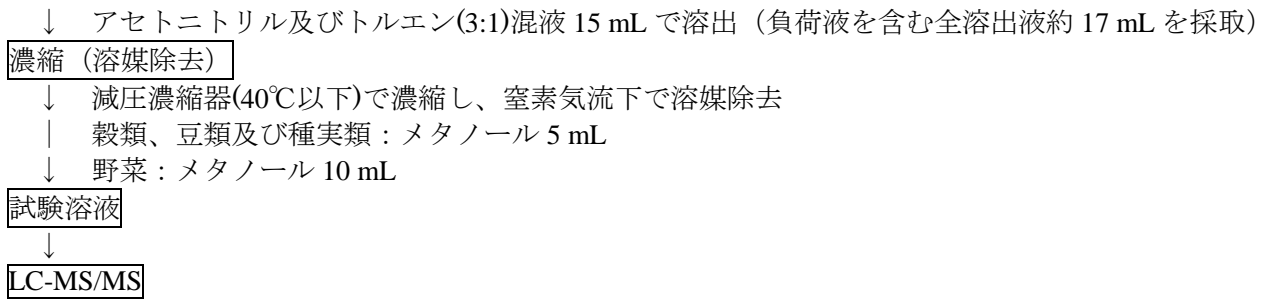
- ↓ アセトニトリル 10 mL でコンディショニング
- ↓ アセトニトリル層を負荷
- ↓ アセトニトリル 6 mL で溶出（負荷液を含む全溶出液約 24 mL を採取）

濃縮（溶媒除去）

- ↓ 減圧濃縮器(40℃以下)で濃縮し、窒素気流下で溶媒除去
- ↓ 残留物にアセトニトリル及びトルエン (3:1) 混液 2 mL を加え溶解（抽出液）

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(Envi-Carb/NH₂ ミニカラム)500 mg/500 mg

- ↓ アセトニトリル及びトルエン(3:1)混液 10 mL でコンディショニング
- ↓ 抽出液を負荷



8. マトリックス添加標準溶液の調製

ブランク試験溶液3 mLを採り、窒素気流下で溶媒を除去した後、各検討対象食品の添加回収試験における回収率100%相当濃度の溶媒標準溶液3 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) スキャン測定

最適な条件を検討する為に、インフュージョン測定を行ったところ、カルボキシシ、スルホキシド体及びスルホン体の3成分ともにESI(+)モードではプロトン付加分子 $[M+H]^+$ がESI(-)モードでは脱プロトン分子 $[M-H]^-$ が検出された。

カルボキシシのESI(+)モード測定時のマススペクトルの例を図1に、スルホキシド体のESI(+)モード測定時のマススペクトルの例を図2、スルホン体のESI(+)モード測定時のマススペクトルの例を図3に示した。その結果からESI(+)モードではプロトン付加分子である m/z 236 (カルボキシシ)、 m/z 252 (スルホキシド体) 及び m/z 268 (スルホン体) をプリカーサーイオンとした。また、ESI(-)モードでは脱プロトン分子である m/z 234 (カルボキシシ)、 m/z 250 (スルホキシド体) 及び m/z 266 (スルホン体) が検出されたが、ESI(+)モードと比較して強度は低かった。

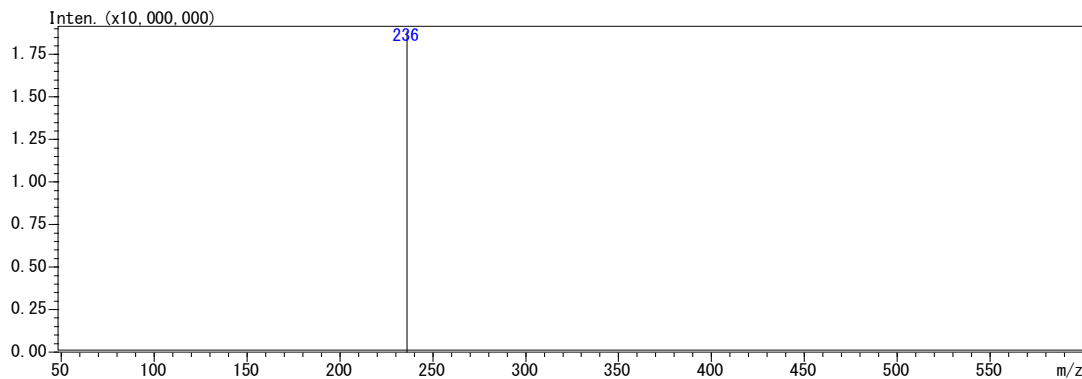


図1. カルボキシシのマススペクトル
 スキャン範囲： m/z 50～600
 測定条件：ESI(+)

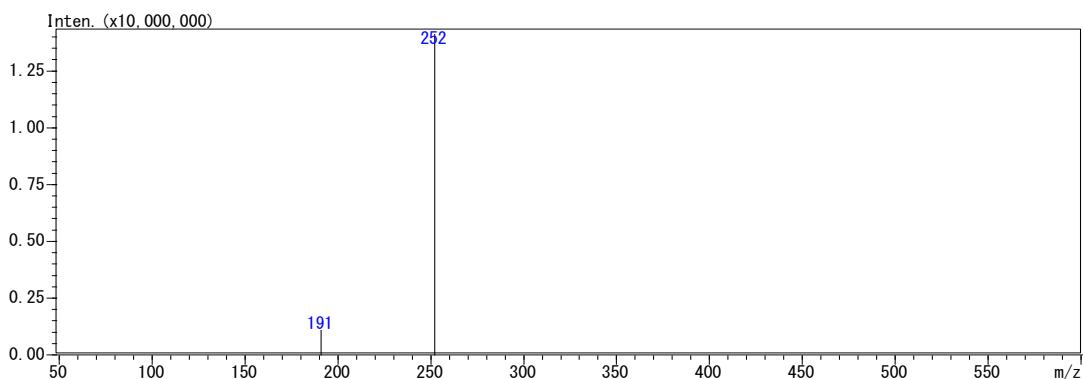


図 2. スルホキシド体のマススペクトル

スキャン範囲： m/z 50～600

測定条件：ESI(+)

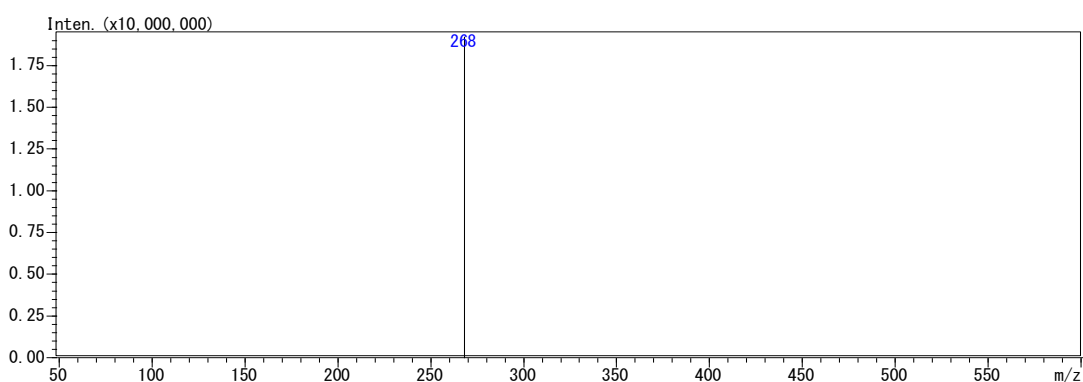


図 3. スルホン体のマススペクトル

スキャン範囲： m/z 50～600

測定条件：ESI(+)

(2) プロダクトイオンスキャン測定

ESI(+)モードではカルボキシンは m/z 236→143、スルホキシド体は m/z 252→159、スルホン体は m/z 268→175 が高い強度で検出されたので、これを定量イオンとした。次いでカルボキシンは m/z 236→87、 m/z 236→43、スルホキシド体は m/z 252→131、 m/z 252→43、スルホン体は m/z 268→43、 m/z 268→147 の順で高い強度で検出された為、それぞれ定性イオンとした。カルボキシンの ESI(+)モード測定時のマススペクトルの例を図 4～6 に、スルホキシド体の ESI(+)モード測定時のマススペクトルの例を図 7～9、スルホン体の ESI(+)モード測定時のマススペクトルの例を図 10～11 に示した。

ESI(-)モードでは強度の順にそれぞれ、カルボキシスが m/z 234→164、 m/z 234→71、 m/z 234→178、スルホキシド体が m/z 250→103、 m/z 250→222、 m/z 250→61、スルホン体が m/z 266→147、 m/z 266→83、 m/z 266→57 が検出されたが ESI(+)モードに比べ ESI(-)モードは強度が低かった為、ESI(+)モードを用いることにした。

プリカーサーイオン及びプロダクトイオンスキャンの結果を表 2 に示した。

表 2. プリカーサーイオン及びプロダクトイオンスキャンの結果

		プリカーサー (m/z)	プロダクト (m/z)
カルボキシ	ESI(+)	236	143, 87, 43
	ESI(-)	234	164, 71, 178
スルホキシド	ESI(+)	252	159, 131, 43
	ESI(-)	250	103, 222, 61
スルホン	ESI(+)	268	175, 43, 147
	ESI(-)	266	147, 83, 57

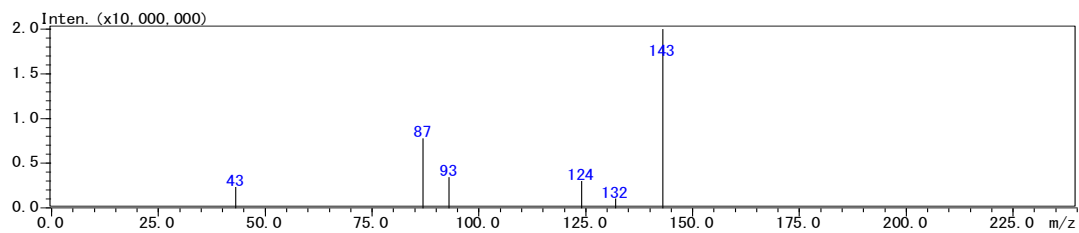


図 4. カルボキシンのプロダクトイオンスペクトル(定量用)

プリカーサーイオン : m/z 236

測定条件 : ESI(+), Q1 プリバイアス 30 V、Q3 プリバイアス 30 V、
 コリジョンエネルギー 20 eV

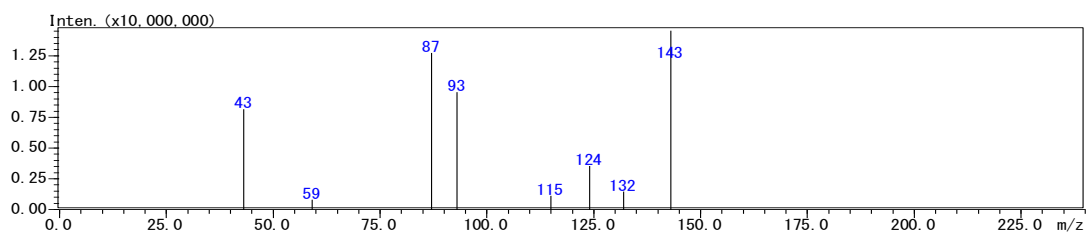


図 5. カルボキシンのプロダクトイオンスペクトル(定性用)

プリカーサーイオン : m/z 236

測定条件 : ESI(+), Q1 プリバイアス 30 V、Q3 プリバイアス 16 V、
 コリジョンエネルギー 25 eV

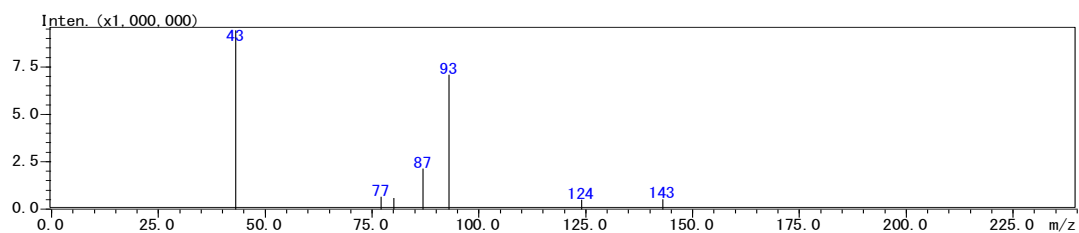


図 6. カルボキシンのプロダクトイオンスペクトル(定性用)

プリカーサーイオン : m/z 236

測定条件 : ESI(+), Q1 プリバイアス 30 V、Q3 プリバイアス 17 V、
 コリジョンエネルギー 37 eV

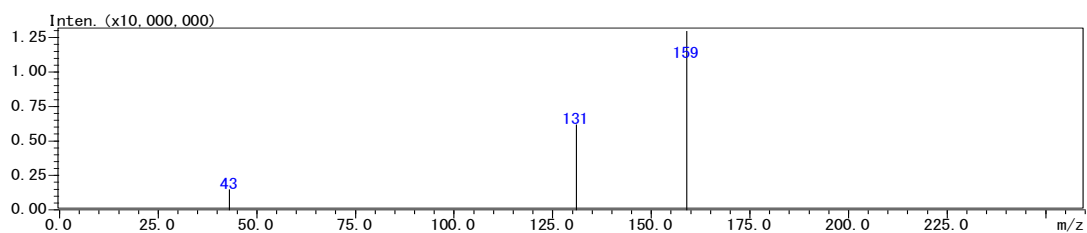


図 7. スルホキシド体のプロダクトイオンスペクトル(定量用)

プリカーサーイオン : m/z 252

測定条件 : ESI(+), Q1 プリバイアス 18 V、Q3 プリバイアス 30 V、
 コリジョンエネルギー 15 eV

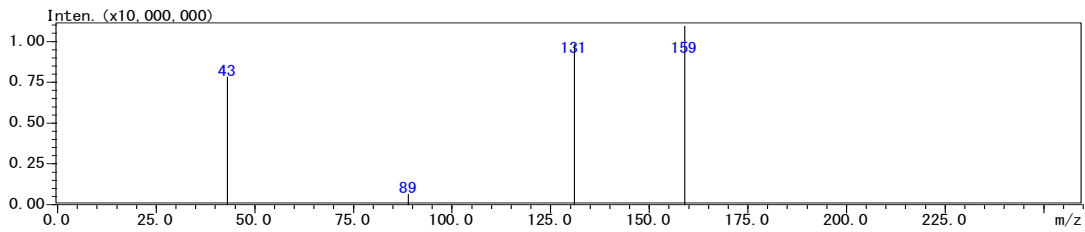


図 8. スルホキシド体のプロダクトイオンスペクトル(定性用)
 プリカーサーイオン : m/z 252
 測定条件 : ESI(+), Q1 プリバイアス 18 V、Q3 プリバイアス 25 V、
 コリジョンエネルギー 19 eV

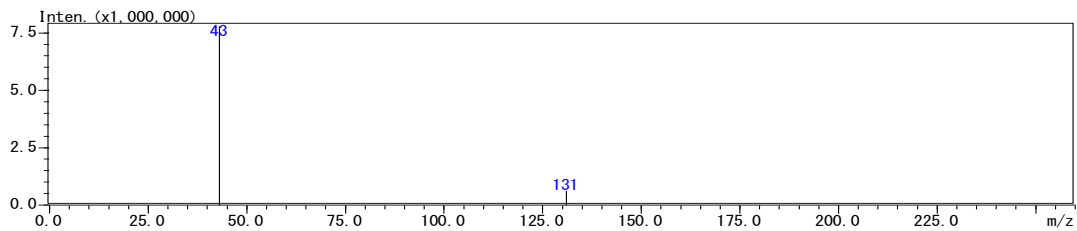


図 9. スルホキシド体のプロダクトイオンスペクトル(定性用)
 プリカーサーイオン : m/z 252
 測定条件 : ESI(+), Q1 プリバイアス 17 V、Q3 プリバイアス 17 V、
 コリジョンエネルギー 29 eV

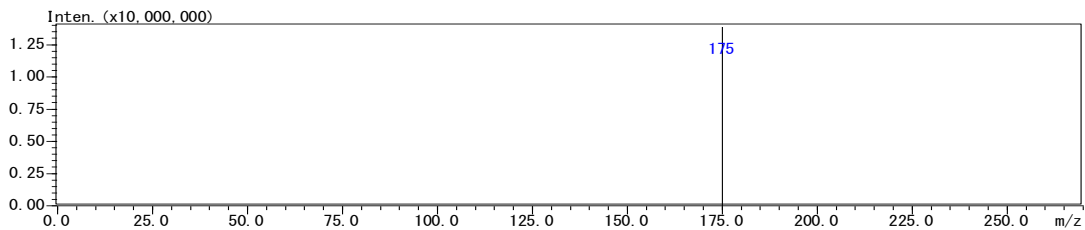


図 10. スルホン体のプロダクトイオンスペクトル(定量用)
 プリカーサーイオン : m/z 268
 測定条件 : ESI(+), Q1 プリバイアス 15 V、Q3 プリバイアス 27 V、
 コリジョンエネルギー 15 eV

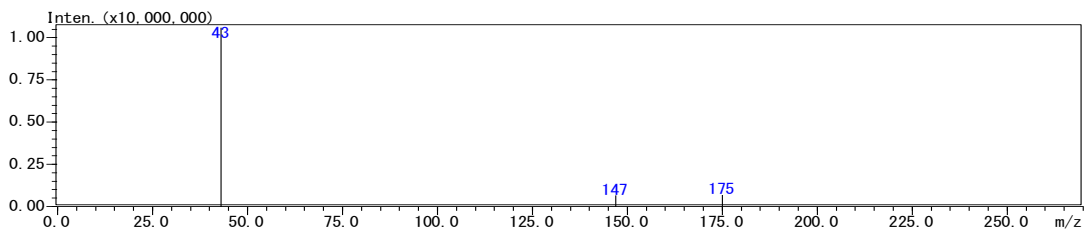


図 11. スルホン体のプロダクトイオンスペクトル(定性用)
 プリカーサーイオン : m/z 268
 測定条件 : ESI(+), Q1 プリバイアス 19 V、Q3 プリバイアス 27 V
 コリジョンエネルギー 36 eV

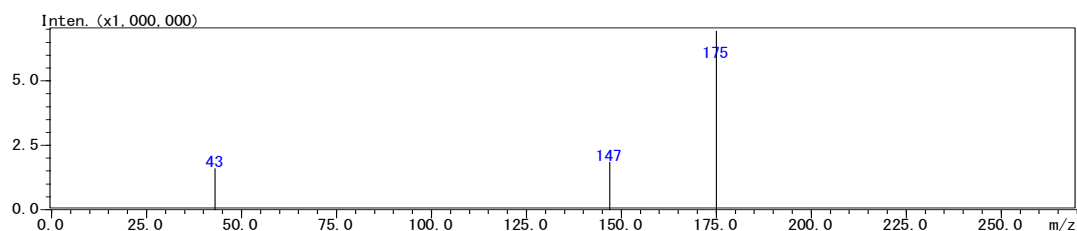


図 12. スルホン体のプロダクトイオンスペクトル(定性用)

プリカーサーイオン : m/z 268

測定条件 : ESI(+), Q1 プリバイアス 19 V、Q3 プリバイアス 24 V、
 コリジョンエネルギー 23 eV

2. LC 条件の検討

(1) 移動相の検討

分析カラムについては、オクタデシルシリル化カラム (InertSustainC18 サイズ : 内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 5 μm (ジーエルサイエンス株)) を用いて検討した。

移動相については、酢酸アンモニウム溶液、ギ酸アンモニウム溶液、アセトニトリル及びメタノールを用いて表 3 に示した組み合わせでの比較を行った。溶媒標準溶液 (0.001 mg/L) を 7 回注入 (注入量: 2 μL) する繰り返し測定をおこないピーク面積の平均値を比較した。結果を表 3 に示した。各化合物において平均ピーク面積値が最も大きかったものを 1 としてピーク面積比を算出した。酢酸アンモニウム溶液よりもギ酸アンモニウム溶液、アセトニトリルよりもメタノールを用いた移動相の方が、3 化合物ともピーク面積比が大きかった為、移動相にはギ酸アンモニウム溶液とメタノールの組み合わせを採用した。

表 3. 移動相の組み合わせによるピーク面積比の比較

		カルボキシシ	スルホン体	スルホキシド体
5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液	アセトニトリル	0.49	0.42	0.59
	メタノール	0.66	0.69	0.77
5 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液	アセトニトリル	0.78	0.51	0.91
	メタノール	1	1	1

(2) ギ酸アンモニウム濃度の検討

ギ酸アンモニウムの濃度を決定するために、0 mmol/L~20 mmol/L のギ酸アンモニウム・メタノール溶液とギ酸アンモニウム溶液の組み合わせでの比較を行った。溶媒標準溶液 (0.001 mg/L) を 5 回注入 (注入量 : 2 μL) する繰り返し測定をおこないピーク面積の平均値を比較した。結果を表 4~6 に示し、その数値をグラフ化したものを図 13~15 に示した。

平均ピーク面積値が最も大きかったものを 1 としてピーク面積比を算出した。

ギ酸アンモニウムを含まない条件では、分析対象化合物の保持時間の再現性に影響を及ぼす可能性があると思われた為、ギ酸アンモニウムを含む条件を採用することとした。3 化合物とも 1.25 mmol/L~5 mmol/L の間で感度が安定していた為、2 mmol/L を選択した。

表 4. ギ酸アンモニウムの各濃度におけるピーク面積比の比較(カルボキシシ)

ピーク面積比	ギ酸アンモニウム濃度						
	0 mmol/L	1.25 mmol/L	2 mmol/L	5 mmol/L	7.5 mmol/L	10 mmol/L	20 mmol/L
ピーク面積比	1	0.36	0.38	0.38	0.31	0.30	0.28

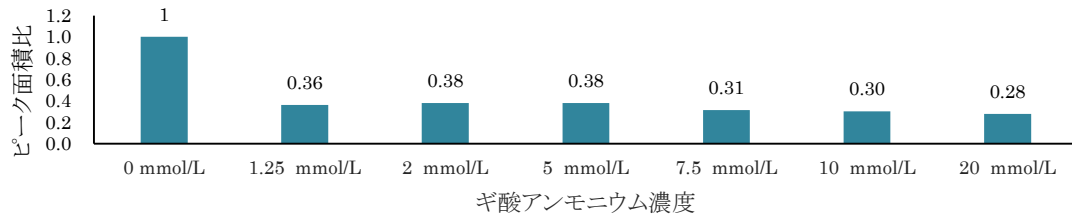


図 13. ギ酸アンモニウムの各濃度におけるピーク面積比の比較(カルボキシシン)

表 5. ギ酸アンモニウムの各濃度におけるピーク面積比の比較(スルホキシド体)

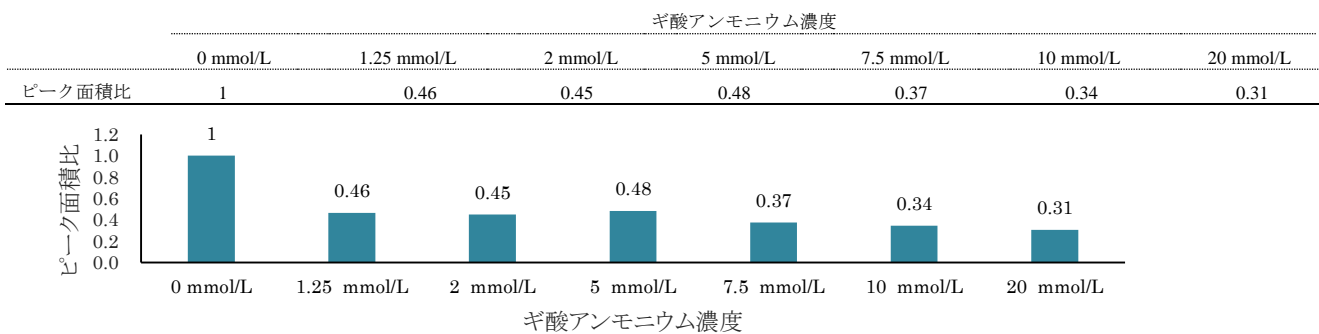


図 14. ギ酸アンモニウムの各濃度におけるピーク面積比の比較(スルホキシド体)

表 6. ギ酸アンモニウムの各濃度におけるピーク面積比の比較(スルホン体)

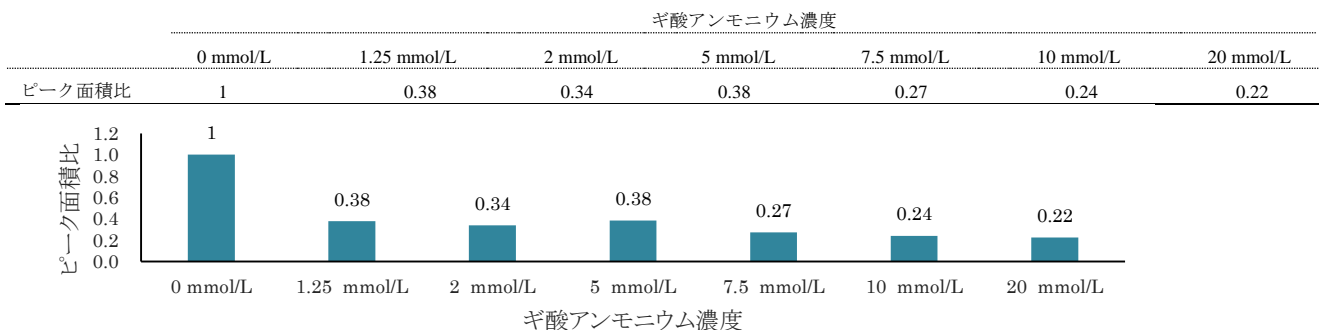


図 15. ギ酸アンモニウムの各濃度におけるピーク面積比の比較(スルホン体)

(3) グラジエント条件の検討

2 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液及び2 mmol/L ギ酸アンモニウム・メタノール溶液混液 (70 : 30) から (20 : 80) までの濃度勾配を 20 分間で実施する条件で測定したところ、カルボキシシンは 16.9 分付近、スルホキシド体は 9.8 分付近、スルホン体は 10.6 分付近にピークが認められた。溶媒標準溶液 (0.001 mg/L) を 5 回注入 (注入量 : 2 μ L) する繰り返し測定において得られた面積及び保持時間の平均値及び相対標準偏差を表 7 に示した。

面積値及び保持時間の再現性が得られ、ピーク形状、分離も良好だったので、この測定条件を用いることとした。

表 7. 標準溶液の繰り返し測定の結果

化合物	カルボキシシン (0.001 mg/L)		スルホキシド体 (0.001 mg/L)		スルホン体 (0.001 mg/L)	
	面積値	保持時間	面積値	保持時間	面積値	保持時間
平均値	349597	16.89	323277	9.79	840184	10.59
相対標準偏差	2.5	0.19	1.5	0.39	1.8	0.30

また、LC-MS/MS 測定中における分析対象化合物の変換の有無を確認する為に、カルボキシシン及びスルホキシド体の溶媒標準溶液 (0.1 mg/L) を 10 回測定した結果、カルボキシシンからスルホキシド体、スルホキシド体からスルホン体への測定中の変換は見られなかった。

(4) 検量線

図 16~21 にカルボキシシン、スルホキシド体及びスルホン体の検量線の例を示した。分析中のカルボキシシンからスルホキシド体、スルホキシド体からスルホン体への変換の有無の確認を行う為に、回収率 25%未満から検量線を作成した。回収率 2、5、10、25、50、75、100、125 及び 150%相当濃度の標準溶液を調製し、カルボキシシンは 0.00002~0.0015 mg/L 及び 0.0008~0.06 mg/L の濃度範囲で、スルホキシド体は 0.00002136~0.001602 mg/L 及び 0.0008544~0.06408 mg/L の濃度範囲で、スルホン体は 0.00002272~0.001704 mg/L 及び 0.0009088~0.06816 mg/L の濃度範囲で作成した。それぞれ各濃度範囲で、作成した検量線の決定係数 (R^2) はいずれも 0.995 以上の良好な直線性を示した。

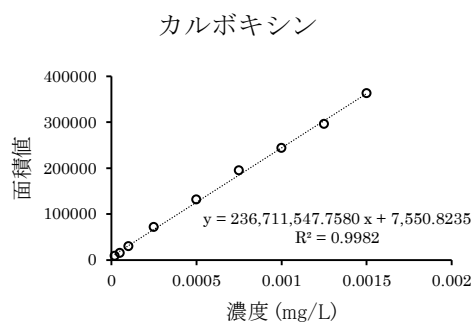


図 16. カルボキシシン検量線の例
濃度範囲：0.00002~0.0015 mg/L

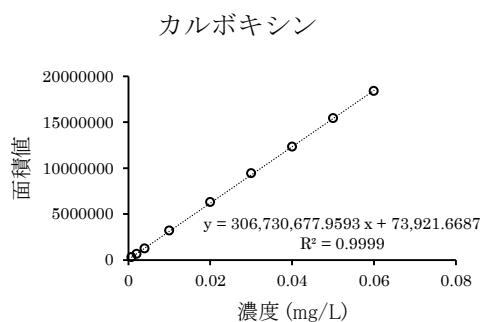


図 17. カルボキシシン検量線の例
濃度範囲：0.0008~0.06 mg/L

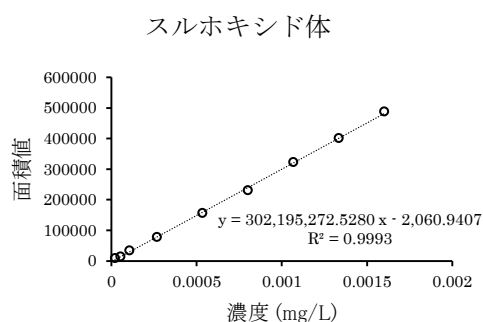


図 18. スルホキシド体検量線の例
濃度範囲：0.00002136~0.001602 mg/L

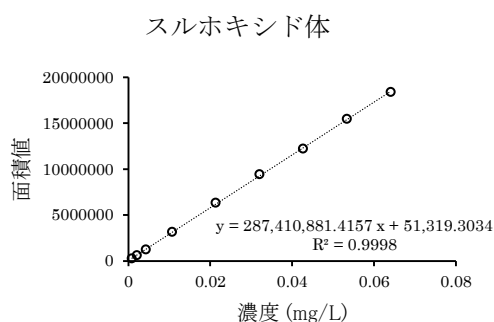


図 19. スルホキシド体検量線の例
濃度範囲：0.0008544~0.06408 mg/L

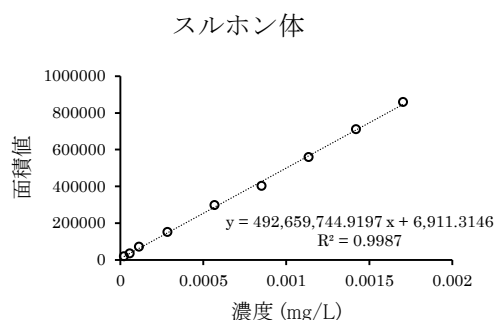


図 20. スルホン体検量線の例
濃度範囲：0.00002272～0.001704 mg/L

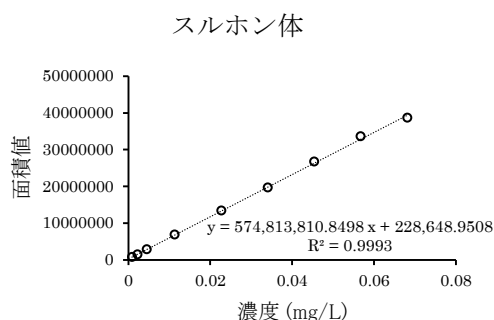


図 21. スルホン体検量線の例
濃度範囲：0.0009088～0.06816 mg/L

(5) 定量限界

本法による定量下限値は、カルボキシンは 0.005mg/kg、スルホキシド体は 0.00534mg/kg、スルホン体は 0.00568mg/kg であった。スルホキシド体及びスルホン体をカルボキシんに換算すると 0.005mg/kg となる。

算出結果を以下に示した。

$$\text{計算式：} \left[\frac{\text{試験用量量 (mL)}}{\text{試験溶液中の試料量 (g)}} \right] \times \left[\frac{\text{分析対象化合物の定量限界相当量 (ng)}}{\text{注入量 (\mu L)}} \right]$$

カルボキシンの定量限界

$$\text{穀類、豆類及び種実類：} 0.005 \text{ mg/kg} = \left[\frac{5(\text{mL})}{1(\text{g})} \right] \times \left[\frac{0.002(\text{ng})}{2(\mu\text{L})} \right]$$

$$\text{野菜：} 0.005 \text{ mg/kg} = \left[\frac{10(\text{mL})}{2(\text{g})} \right] \times \left[\frac{0.002(\text{ng})}{2(\mu\text{L})} \right]$$

スルホキシド体の定量限界

$$\text{穀類、豆類及び種実類：} 0.00534 \text{ mg/kg} = \left[\frac{5(\text{mL})}{1(\text{g})} \right] \times \left[\frac{0.002136(\text{ng})}{2(\mu\text{L})} \right]$$

$$\text{野菜：} 0.00534 \text{ mg/kg} = \left[\frac{10(\text{mL})}{2(\text{g})} \right] \times \left[\frac{0.002136(\text{ng})}{2(\mu\text{L})} \right]$$

スルホン体の定量限界

$$\text{穀類、豆類及び種実類：} 0.00568 \text{ mg/kg} = \left[\frac{5(\text{mL})}{1(\text{g})} \right] \times \left[\frac{0.002272(\text{ng})}{2(\mu\text{L})} \right]$$

$$\text{野菜：} 0.00568 \text{ mg/kg} = \left[\frac{10(\text{mL})}{2(\text{g})} \right] \times \left[\frac{0.002272(\text{ng})}{2(\mu\text{L})} \right]$$

(換算係数：カルボキシンの分子量/スルホキシド体の分子量=235.30/251.30=0.9363)

カルボキシンの分子量/スルホン体の分子量=235.30/267.30=0.8803)

3. 試験溶液調製法の検討

(1) GC/MS による農薬等の一斉試験法(農産物) を用いて実施した添加回収試験結果

小麦及び小豆 10.0 g に水 20 mL を加え均一化し 30 分放置後、カルボキシンのアセトン溶液(4 mg/L)、スルホキシド体のアセトン溶液(4.272 mg/L)、スルホン体のアセトン溶液(4.544 mg/L)を別々の試料にそれぞれ 0.5 mL 添加しよく混ぜ、30 分放置後アセトニトリル 100 mL 加え、以下通知一斉試験法「GC/MS による農薬等の一斉試験法(農産物)」に従い抽出、精製を行い、LC-MS/MS による測定を行った(本化合物は GC/MS による分別定量が困難であったため)。結果を表 8 に示した。

表 8. GC/MS による農薬等の一斉試験法(農産物) 実施時の小麦及び小豆の回収率

食品名	添加農薬	回収率 (%) n=2 の平均値			
		カルボキシシン	スルホキシド体	スルホン体	合計
小麦	カルボキシシン	83.9	9.4	N.D.	93.3
	スルホキシド体	N.D.	88.9	N.D.	88.9
	スルホン体	N.D.	N.D.	91.7	91.7

小豆	カルボキシシ	87.7	6.7	N.D.	94.4
	スルホキシド体	N.D.	89.3	N.D.	89.3
	スルホン体	N.D.	N.D.	93.5	93.5

N.D. : Not Detected

いずれも回収率は 80%を上回ったが、カルボキシシ添加時に小麦と小豆ともにスルホキシド体への変換が見られた。

同様に野菜についても添加回収試験を行った。未成熟いんげん、えだまめ及びたまねぎ 20.0 g にカルボキシシのアセトン溶液(4 mg/L)、スルホキシド体のアセトン溶液(4.272 mg/L)を別々の試料にそれぞれ 1 mL 添加しよく混ぜ、30 分放置後アセトニトリル 100 mL 加え、以下通知一斉試験法「GC/MS による農薬等の一斉試験法(農産物)」に従い添加回収試験を行った。小麦及び小豆と同様に測定機器は LC-MS/MS を使用した。回収率をまとめた結果を表 9 に示した。

表 9. GC/MS による農薬等の一斉試験法(農産物) 実施時の野菜の回収率

食品名	添加農薬	回収率 (%)			
		カルボキシシ	スルホキシド体	スルホン体	合計
未成熟 いんげん	カルボキシシ	42.4	9.1	N.D.	51.5
	スルホキシド体	N.D.	86.8	N.D.	86.8
えだまめ	カルボキシシ	39.9	8.0	N.D.	47.9
	スルホキシド体	N.D.	87.4	N.D.	87.4
たまねぎ	カルボキシシ	97.0	N.D.	N.D.	97.0
	スルホキシド体	N.D.	88.9	N.D.	88.9

N.D. : Not Detected

未成熟いんげんとえだまめにおいて、カルボキシシを添加した時の回収率がそれぞれ 51.5%と 47.9%と低くスルホキシド体への変換が見られた。

(2) 抽出方法の検討

1) 添加試薬の検討

カルボキシシのスルホキシド体への変換を防止するためチオ尿素、L-アスコルビン酸ナトリウム、リン酸及び塩酸を用いて、抽出方法の検討を行った。試料には表 9 でカルボキシシの回収率が 47.9%と一番低かったえだまめを選択した。チオ尿素、L-アスコルビン酸ナトリウム、リン酸及び塩酸の水溶液を調製して、えだまめ 20.0 g にチオ尿素溶液、L-アスコルビン酸ナトリウム溶液、リン酸溶液及び塩酸溶液をそれぞれ 20.0 g 加えよく混ぜ、30 分後にカルボキシシのアセトン溶液(4 mg/L)1 mL を添加してよく混ぜ 30 分放置し、アセトニトリル 100 mL 加えホモジナイズ以降の操作は[実験方法] 7. 試験溶液の調製法に従い添加回収試験を行った。

① チオ尿素

試料に 0.1 w/v%~10 w/v%チオ尿素溶液を添加して各濃度における添加回収率を比較した。結果を表 10 と図 22 に示した。

表 10. チオ尿素溶液添加時のカルボキシシの添加回収率

チオ尿素濃度 (w/v%)	回収率 (%) n=2 の平均値			
	カルボキシシ	スルホキシド体	スルホン体	合計
0.1	53.3	7.6	N.D.	60.9
0.5	59.2	4.5	N.D.	63.7
1	68.6	3.9	N.D.	72.5
2	73.1	3.7	N.D.	76.8
4	74.3	N.D.	N.D.	74.3
5	75.7	N.D.	N.D.	75.7
7	75.3	N.D.	N.D.	75.3

10	76.8	N.D.	N.D.	76.8
----	------	------	------	------

N.D. : Not Detected

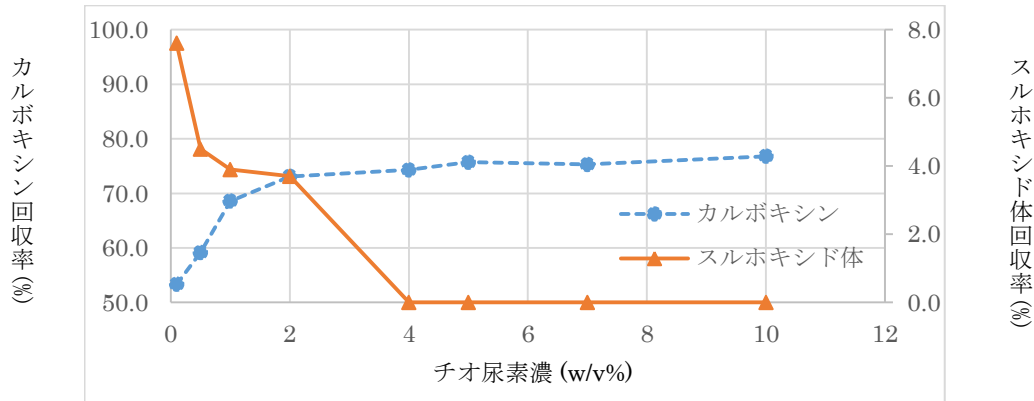


図 22. チオ尿素溶液添加時のカルボキシの添加回収率

チオ尿素溶液の濃度が 2 w/v%以上で回収率はほぼ一定となり、4 w/v%以上でスルホキシド体への変換を防止する事ができた。

② L-アスコルビン酸ナトリウム

試料に 0.5 w/v%~40 w/v%L-アスコルビン酸ナトリウム溶液を添加して添加回収率を比較した。結果を表 11 と図 23 に示した。

表 11. L-アスコルビン酸ナトリウム溶液添加時のカルボキシの添加回収率

L-アスコルビン酸 ナトリウム濃度 (w/v%)	回収率 (%) n=2 の平均値			
	カルボキシ	スルホキシド体	スルホン体	合計
0.5	52.3	7.2	N.D.	59.5
5	68.1	4.3	N.D.	72.4
10	70.1	5.2	N.D.	75.3
20	79.9	2.6	N.D.	82.5
40	73.3	3.1	N.D.	76.4

N.D. : Not Detected

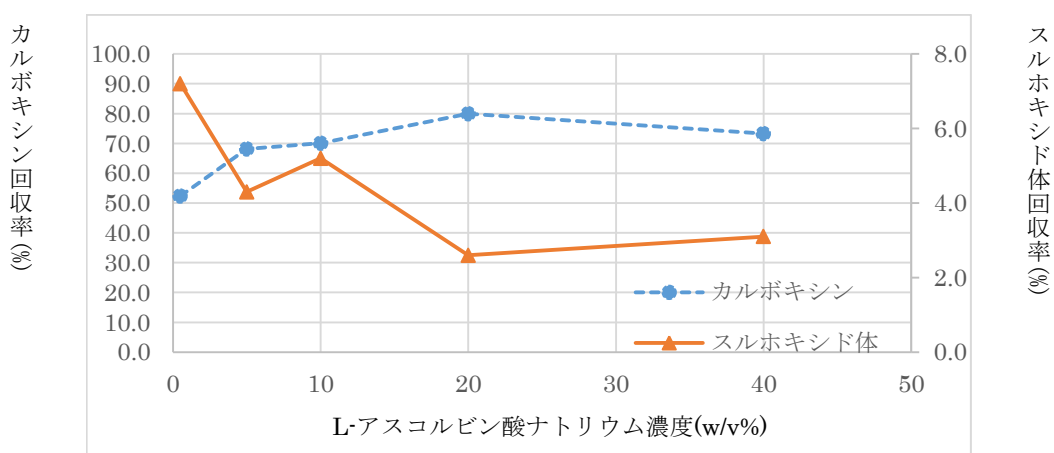


図 23. L-アスコルビン酸ナトリウム溶液添加時のカルボキシの添加回収率

L-アスコルビン酸ナトリウム溶液ではスルホキシド体への変換を防ぐことはできなかった。

③ リン酸

試料に 0.1 w/v%~40 w/v% リン酸溶液を添加して添加回収率を比較した。結果を表 12 と図 24 に示した。

表 12. リン酸溶液添加時のカルボキシンの添加回収率

リン酸濃度 (w/v%)	回収率 (%) n=2 の平均値			合計
	カルボキシン	スルホキシド体	スルホン体	
0.1	30.7	27.8	N.D.	58.5
0.5	32.6	29.5	N.D.	62.1
1	40.4	18.6	N.D.	59.0
5	58.3	12.4	N.D.	70.7
10	62.8	10.6	N.D.	73.4
20	61.7	12.3	N.D.	74.0
40	48.1	21.1	N.D.	69.2

N.D. : Not Detected

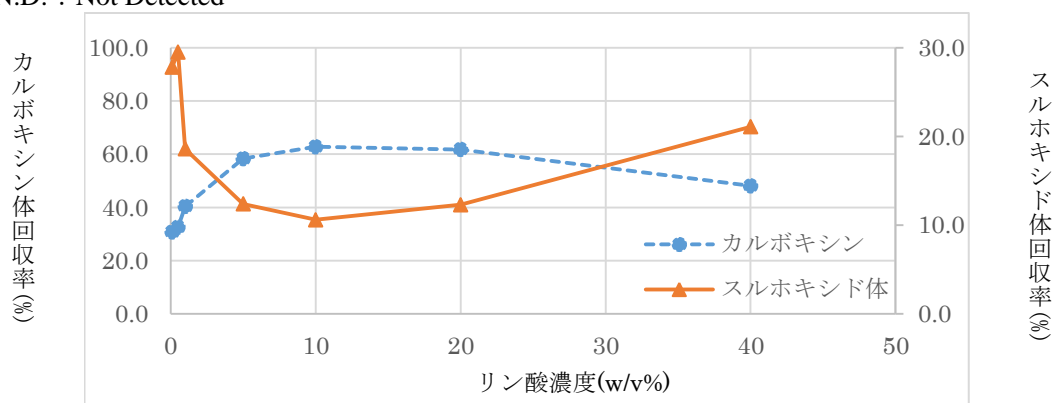


図 24. リン酸溶液添加時のカルボキシンの添加回収率

リン酸溶液ではスルホキシド体への変換を防ぐことはできなかった。

④ 塩酸

試料に 0.1 w/v%~40 w/v%塩酸を添加して添加回収率を比較した。結果を表 13 と図 25 に示した。

表 13. 塩酸添加時のカルボキシンの添加回収率

塩酸濃度 (w/v%)	回収率 (%) n=2 の平均値			合計
	カルボキシン	スルホキシド体	スルホン体	
0.1	49.6	17.3	N.D.	66.9
1	45.3	16.8	N.D.	62.1
5	41.1	22.9	N.D.	64.0
10	54.2	16.6	N.D.	70.8

N.D. : Not Detected

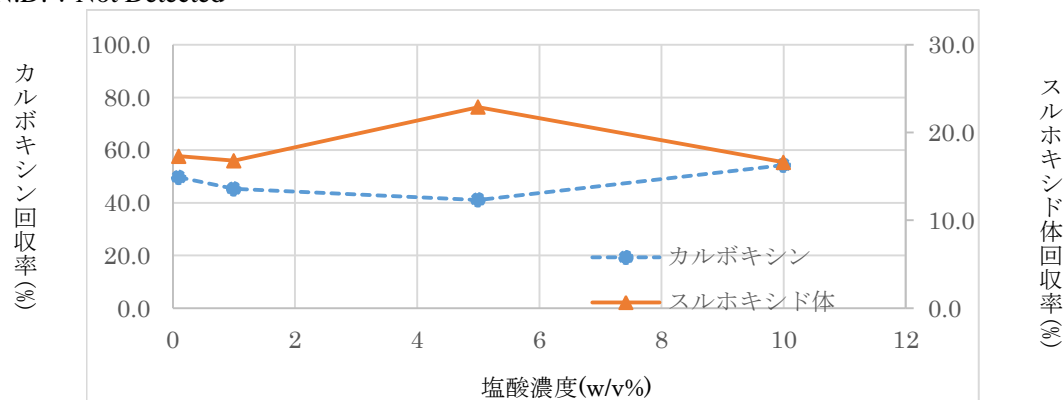


図 25. 塩酸添加時のカルボキシンの添加回収率

塩酸添加ではスルホキシド体への変換を防ぐことはできなかった。
 以上の検討結果よりチオ尿素溶液を採用した。

2) 未成熟いんげんを用いたチオ尿素の効果について

続いて、表 2 でカルボキシンの回収率が 51.5%と低かった未成熟いんげんについてチオ尿素溶液を用いて添加回収試験を行った。2 w/v%~10 w/v%チオ尿素溶液を調製して、未成熟いんげん 20.0 g に 2 w/v%~10 w/v%チオ尿素溶液 20 g を加えよく混ぜ、30 分後にカルボキシンのアセトン溶液(4 mg/L)1 mL を添加してよく混ぜ 30 分放置し、アセトニトリル 100 mL 加えホモジナイズ以降の操作は[実験方法] 7. 試験溶液の調製法に従い添加回収試験を行った。回収率の結果を表 14 と図 26 に示した。

表 14. 未成熟いんげんにチオ尿素溶液添加時のカルボキシンの(基準値相当)の添加回収率

チオ尿素濃度 (w/v%)	回収率 (%) n=2 の平均値			
	カルボキシン	スルホキシド体	スルホン体	合計
2	71.8	4.2	N.D.	76.0
4	77.1	2.6	N.D.	79.7
5	80.0	N.D.	N.D.	80.0
7	80.2	N.D.	N.D.	80.2
10	80.5	N.D.	N.D.	80.5

N.D. : Not Detected

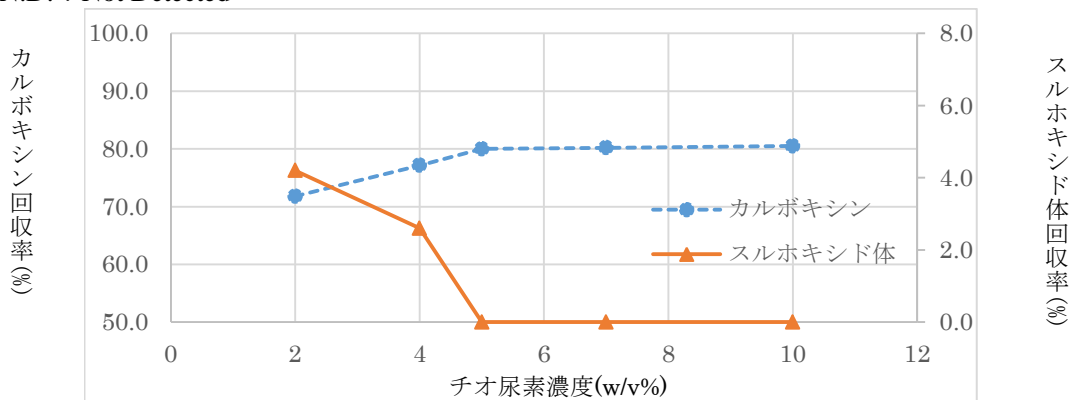


図 26. 未成熟いんげんにチオ尿素溶液添加時のカルボキシンの(基準値相当)の添加回収率

未成熟いんげんは 5 w/v%チオ尿素溶液で回収率は約 80%確保でき、スルホキシド体への変換も防止できた。

続いて定量限界相当の添加濃度の未成熟いんげんについて 4 w/v%~10 w/v%チオ尿素溶液を用いて添加回収試験を行った。未成熟いんげん 20.0 g に 4 w/v%~10 w/v%チオ尿素溶液を 20 g 加えよく混ぜ、30 分後にカルボキシンのアセトン溶液(0.1 mg/L)1 mL を添加してよく混ぜ 30 分放置し、アセトニトリル 100 mL 加え、以下[実験方法] 7. 試験溶液の調製法に従い添加回収試験を行った。回収率の結果を表 15 と図 27 に示した。なお、定量限界未満のデータは本来 Trace もしくは N.D.となるが、定量限界相当添加のデータは回収率を求めるため、便宜的に定量限界の 5%未満でピークを検出したものは Trace とした。

表 15. 未成熟いんげんにチオ尿素溶液添加時のカルボキシンの(定量限界相当)の添加回収率

チオ尿素濃度 (w/v%)	回収率 (%) n=2 の平均値			
	カルボキシン	スルホキシド体	スルホン体	合計
4	78.0	Tr.	N.D.	78.0
5	84.4	Tr.	N.D.	84.4
7	83.4	Tr.	N.D.	83.4
10	83.1	N.D.	N.D.	83.1

N.D. : Not Detected Tr. : Trace

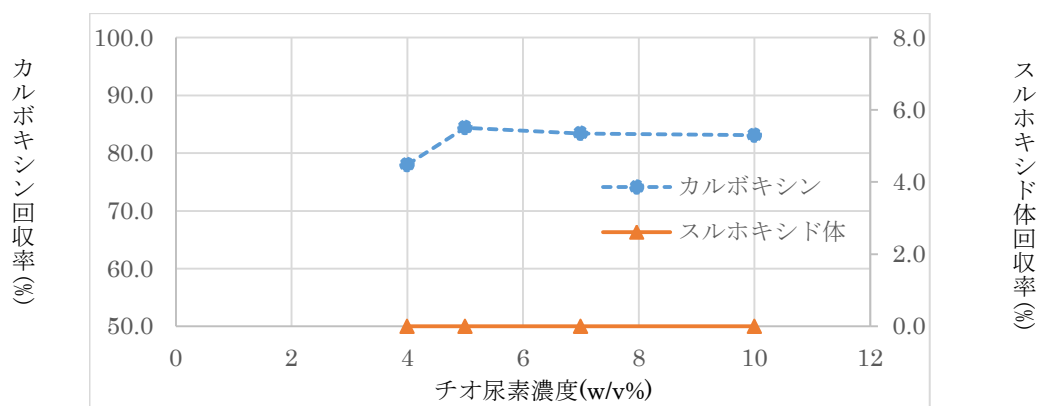


図 27. 未成熟いんげんにチオ尿素溶液添加時のカルボキシシン(定量限界相当)の添加回収率

定量限界相当の添加濃度の未成熟いんげんについても 5 w/v%チオ尿素溶液で回収率は約 80%確保でき、スルホキシド体への変換も防止できた。

1)及び2)の結果より、えだまめ、未成熟いんげんともに 5 w/v%チオ尿素溶液を用いる事により回収率はほぼ一定となり、カルボキシシンのスルホキシド体への変換も防止できたので、5 w/v%チオ尿素溶液を用いてアセトニトリルで抽出する方法を選択することとした。

(3) 精製カラムの検討

精製に用いる精製カラムについて、添加用標準溶液としてカルボキシシンのアセトン溶液(0.4 mg/L)、スルホキシド体のアセトン溶液(0.4272 mg/L)、スルホン体のアセトン溶液(0.4544 mg/L)を 0.5 mL 添加した標準溶液を調製した。これを精製カラムに負荷し、各溶出液画分を測定した。画分は 40°C以下で濃縮して溶媒を除去後、残留物をメタノールに溶かし 5 mL とし LC-MS/MS で測定した。

1) Bond Elut C18 ミニカラム(1,000 mg)

水 20 mL を全量フラスコに採りアセトニトリルで 200 mL に定容し、20 mL 分取後、塩化ナトリウム 10 g と 0.5 mol/L リン酸緩衝液 20 mL を加え振とうし、塩化ナトリウムと水層を除去した残りのアセトニトリル層を採取した。カルボキシシンのアセトン溶液(0.4 mg/L)、スルホキシド体のアセトン溶液(0.4272 mg/L)、スルホン体のアセトン溶液(0.4544 mg/L)0.5 mL を窒素気流下で溶媒を除去し、採取したアセトニトリル層に溶解させ負荷液とした。Bond Elut C18 ミニカラムをアセトニトリル 10 mL でコンディショニングした後、上記にて調製した負荷液を負荷し、アセトニトリルを 2 mL ずつ計 10 mL まで流した画分を測定した結果を表 16 に示した。

表 16. Bond Elut C18 ミニカラムからの溶出挙動

農薬	負荷液及びアセトニトリル画分	回収率 (%) n=2 の平均値			
		カルボキシシン	スルホキシド体	スルホン体	合計
カルボキシシン	負荷液	84.2	N.D.	N.D.	84.2
	0~2 mL	11.8	N.D.	N.D.	11.8
	2~4 mL	3.0	N.D.	N.D.	3.0
	4~6 mL	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	6~8 mL	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	8~10 mL	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	合計	99.0	N.D.	N.D.	99.0
スルホキシド体	負荷液	N.D.	72.6	N.D.	72.6
	0~2 mL	N.D.	14.2	N.D.	14.2
	2~4 mL	N.D.	15.7	N.D.	15.7
	4~6 mL	N.D.	7.3	N.D.	7.3

	6~8 mL	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	8~10 mL	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	合計	N.D.	109.8	N.D.	109.8
スルホン体	負荷液	N.D.	N.D.	96.9	96.9
	0~2 mL	N.D.	N.D.	12.4	12.4
	2~4 mL	N.D.	N.D.	2.9	2.9
	4~6 mL	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	6~8 mL	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	8~10 mL	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	合計	N.D.	N.D.	112.2	112.2

N.D. : Not Detected

Bond Elut C18 ミニカラムからの回収率は、カルボキシシン添加では溶出量 4 mL で 99.0%、スルホキシド体添加では溶出量 6 mL で 109.8%、スルホン体添加では溶出量 4 mL で 112.2%と良好な結果が得られた。そこで溶出溶媒量は溶出を確実にを行うため 6 mL を選択する事とした。

2) GC/PSA ミニカラム(500 mg/500 mg)

カルボキシシンのアセトン溶液(0.4 mg/L)、スルホキシド体のアセトン溶液(0.4272 mg/L)、スルホン体のアセトン溶液(0.4544 mg/L)0.5 mL を窒素気流下で溶媒を除去し、アセトニトリル及びトルエン(3:1)混液 2 mL に溶解させたものを負荷液とした。GC/PSA ミニカラムをアセトニトリル及びトルエン(3:1)混液 10 mL でコンディショニングした後、上記にて調製した各標準溶液 2 mL を負荷し、アセトニトリル及びトルエン(3:1)混液を 5 mL ずつ計 25 mL まで流した画分を測定した結果を表 17 に示した。

表 17. GC/PSA ミニカラムからの溶出挙動

農薬	負荷液及びアセトニトリル及びトルエン(3:1)混液画分	回収率 (%) n=2 の平均値			
		カルボキシシン	スルホキシド体	スルホン体	合計
カルボキシシン	負荷液	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	0~5 mL	54.7	39.4	N.D.	94.1
	5~10 mL	2.7	4.5	N.D.	7.2
	10~15 mL	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	15~20 mL	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	20~25 mL	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	合計	57.4	43.9	N.D.	101.3
スルホキシド体	負荷液	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	0~5mL	N.D.	89.5	N.D.	89.5
	5~10mL	N.D.	6.4	N.D.	6.4
	10~15mL	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	15~20mL	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	20~25mL	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	合計	N.D.	95.9	N.D.	95.9
スルホン体	負荷液	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	0~5 mL	N.D.	N.D.	57.3	57.3
	5~10 mL	N.D.	N.D.	4.7	4.7
	10~15 mL	N.D.	N.D.	2.1	2.1
	15~20 mL	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	20~25 mL	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	合計	N.D.	N.D.	64.1	64.1

N.D. : Not Detected

GC/PSA ミニカラムによる精製において、カルボキシシン及びスルホキシド体は良好な結果だったが、スルホン体添加では溶出量 15 mL で回収率が 64.1%に留まり、それ以降アセトニトリル及びトルエン(3:1)混液の量を増やしても溶出されなかった。スルホン体の回収率が低かったため選択しない事とした。

3) Envi-Carb/NH₂ ミニカラム(500 mg/500 mg)

カルボキシシンのアセトン溶液(0.4 mg/L)、スルホキシド体のアセトン溶液(0.4272 mg/L)、スルホン体のアセトン溶液(0.4544 mg/L)を採り、窒素気流下で溶媒を除去し、アセトニトリル及びトルエン(3:1)混液 2 mL に溶解させたものを負荷液とした。Envi-Carb/NH₂ ミニカラムをアセトニトリル及びトルエン(3:1)混液 10 mL でコンディショニングした後、上記にて調製した負荷液 2 mL を負荷し、アセトニトリル及びトルエン(3:1)混液を 5 mL ずつ計 25 mL まで流した画分を測定した結果を表 18 に示した。

表 18. Envi-Carb/NH₂ ミニカラムからの溶出挙動

農薬	負荷液及びアセトニトリル及びトルエン(3:1)混液画分	回収率 (%) n=2 の平均値			
		カルボキシシン	スルホキシド体	スルホン体	合計
カルボキシシン	負荷液	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	0~5 mL	31.1	61.3	N.D.	92.4
	5~10 mL	N.D.	5.7	N.D.	5.7
	10~15 mL	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	15~20 mL	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	20~25 mL	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	合計	31.1	67.0	N.D.	98.1
スルホキシド体	負荷液	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	0~5 mL	N.D.	86.7	N.D.	86.7
	5~10 mL	N.D.	9.7	N.D.	9.7
	10~15 mL	N.D.	Tr.	N.D.	Tr.
	15~20 mL	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	20~25 mL	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	合計	N.D.	96.4	N.D.	96.4
スルホン体	負荷液	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	0~5 mL	N.D.	N.D.	89.8	89.8
	5~10 mL	N.D.	N.D.	5.5	5.5
	10~15 mL	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	15~20 mL	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	20~25 mL	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	合計	N.D.	N.D.	95.3	95.3

N.D. : Not Detected Tr. : Trace (定量限界未満)

Envi-Carb/NH₂ ミニカラムによる精製において回収率は、カルボキシシン添加では溶出量 10 mL で 98.1%、スルホキシド体添加では溶出量 10 mL で 96.4%、スルホン体添加では溶出量 10 mL で 95.3%と良好な結果が得られた。よって Envi-Carb/NH₂ ミニカラムを選択する事とした。スルホキシド体は 10 mL から 15 mL の画分で定量限界未満ではあるが、ピークを検出した。そのため溶媒量は溶出を確実にを行うため余裕をもって 15 mL とした。

4) カラム精製におけるチオ尿素の効果について

精製カラムの検討においてもカルボキシシンの変換が見られたので、チオ尿素溶液を用いて Bond Elut C18 ミニカラムと Envi-Carb/NH₂ ミニカラムの溶出挙動の確認を行った。

5 w/v%チオ尿素溶液 20 mL を全量フラスコに採りアセトニトリルで 200 mL に定容し、20 mL 分取後、塩化ナトリウム 10 g と 0.5 mol/L リン酸緩衝液 20 mL を加え振とうし、塩化ナトリウムと水層を除去した残りのアセトニトリル層を採取した。カルボキシシンのアセトン溶液(0.4 mg/L) 0.5mL を窒素気流下で

溶媒を除去し、採取したアセトニトリル層に溶解させ負荷液とした。Bond Elut C18 ミニカラムをアセトニトリル 10 mL でコンディショニングした後、上記にて調製した負荷液を負荷し、アセトニトリルを 2 mL ずつ計 10 mL まで流した画分を測定した結果を表 19 に示した。

5 w/v% チオ尿素溶液 20 mL を全量フラスコに採りアセトニトリルで 200 mL に定容し、上記と同じ手順で調製したアセトニトリル層を濃縮し、カルボキシンのアセトン溶液(0.4 mg/L) 0.5mL を添加し、窒素気流下で溶媒を除去後、アセトニトリル及びトルエン(3:1)混液 2 mL に溶解して負荷液とした。Envi-Carb/NH₂ ミニカラムをアセトニトリル及びトルエン(3:1)混液 10 mL でコンディショニングした後、上記にて調製した負荷液 2 mL を負荷し、アセトニトリル及びトルエン(3:1)混液を 5 mL ずつ計 25 mL まで流した画分を測定した結果を表 20 に示した。

表 19. チオ尿素溶液存在下の Bond Elut C18 ミニカラムからの溶出挙動

農薬	負荷液及びアセトニトリル及びトルエン(3:1)混液画分	回収率 (%) n=2 の平均値			
		カルボキシン	スルホキシド体	スルホン体	合計
カルボキシン	負荷液	93.8	N.D.	N.D.	93.8
	0~2 mL	12.4	N.D.	N.D.	12.4
	2~4 mL	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	4~6 mL	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	6~8 mL	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	8~10 mL	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	合計	106.2	N.D.	N.D.	106.2

N.D. : Not Detected

表 20. チオ尿素溶液存在下の Envi-Carb/NH₂ ミニカラムからの溶出挙動

農薬	負荷液及びアセトニトリル及びトルエン(3:1)混液画分	回収率 (%) n=2 の平均値			
		カルボキシン	スルホキシド体	スルホン体	合計
カルボキシン	負荷液	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	0~5 mL	49.0	N.D.	N.D.	49.0
	5~10 mL	51.9	N.D.	N.D.	51.9
	10~15 mL	3.2	N.D.	N.D.	3.2
	15~20 mL	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	20~25 mL	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	合計	104.1	N.D.	N.D.	104.1

N.D. : Not Detected

チオ尿素存在下において、Bond Elut C18 ミニカラムと Envi-Carb/NH₂ ミニカラムともにカルボキシンからスルホキシド体への変換はない事が確認できた。また、今回の検討から抽出時に添加したチオ尿素が残っているため、カラム負荷時にチオ尿素を含む溶媒を用いる必要のないことが確認できた。

4. 添加回収試験

小麦、小豆、未成熟いんげん、えだまめ及びたまねぎの 5 食品を、[実験方法] 6. (1) 穀類、豆類及び種実類、(2) 野菜に従い調製した添加試料を用いて、[実験方法] 7. 試験溶液の調製法に従い添加回収試験を行った。結果を表 21~23 に示した。

添加回収試験における小麦、小豆、未成熟いんげん、えだまめ及びたまねぎのブランク試料、添加回収試料及び回収率 100%相当の溶媒標準溶液の代表的なクロマトグラムを図 28~32 に示した。また、小麦、小豆、未成熟いんげん、えだまめ及びたまねぎ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カレントクロマトグラムを図 33~42 に示した。

(1) 選択性の評価

評価濃度(基準値濃度)のマトリックス添加標準溶液のピーク面積に対する、ブランク試料の妨害ピークの面積の比を求めて評価した。結果を表 21 に示した。

表 21. 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)	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)				
1	カルボキシ	小麦	0.005	0.2	基準値	0.2	< 0.100	面積	0	0	0	12349242	12480736	12414989	0.000	○	定量限界<基準値
2	カルボキシ	小豆	0.005	0.2	基準値	0.2	< 0.100	面積	0	0	0	13664091	13422284	13543188	0.000	○	定量限界<基準値
3	カルボキシ	未成熟いんげん	0.005	0.2	基準値	0.2	< 0.100	面積	0	0	0	13760588	13751279	13755934	0.000	○	定量限界<基準値
4	カルボキシ	えだまめ	0.005	0.2	基準値	0.2	< 0.100	面積	0	0	0	11367880	11214541	11291211	0.000	○	定量限界<基準値
5	カルボキシ	たまねぎ	0.005	0.2	基準値	0.2	< 0.100	面積	0	0	0	13295143	13495933	13395538	0.000	○	定量限界<基準値
6	スルホキシド	小麦	0.005	0.2	基準値	0.2	< 0.100	面積	0	0	0	12391728	12469128	12430428	0.000	○	定量限界<基準値
7	スルホキシド	小豆	0.005	0.2	基準値	0.2	< 0.100	面積	0	0	0	11429876	11868466	11649171	0.000	○	定量限界<基準値
8	スルホキシド	未成熟いんげん	0.005	0.2	基準値	0.2	< 0.100	面積	0	0	0	12340577	12463983	12402280	0.000	○	定量限界<基準値
9	スルホキシド	えだまめ	0.005	0.2	基準値	0.2	< 0.100	面積	0	0	0	12903389	13131898	13017644	0.000	○	定量限界<基準値
10	スルホキシド	たまねぎ	0.005	0.2	基準値	0.2	< 0.100	面積	0	0	0	12601568	12665549	12633559	0.000	○	定量限界<基準値
11	スルホン	小麦	0.005	0.2	基準値	0.2	< 0.100	面積	0	0	0	24847693	24805776	24826735	0.000	○	定量限界<基準値
12	スルホン	小豆	0.005	0.2	基準値	0.2	< 0.100	面積	0	0	0	20078903	20466185	20272544	0.000	○	定量限界<基準値
13	スルホン	未成熟いんげん	0.005	0.2	基準値	0.2	< 0.100	面積	0	0	0	25656187	26082393	25869290	0.000	○	定量限界<基準値
14	スルホン	えだまめ	0.005	0.2	基準値	0.2	< 0.100	面積	0	0	0	21406067	22741304	22073686	0.000	○	定量限界<基準値
15	スルホン	たまねぎ	0.005	0.2	基準値	0.2	< 0.100	面積	0	0	0	25477582	25695186	25586384	0.000	○	定量限界<基準値

*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。

検討に使用した 5 食品すべてにおいて、面積比が妨害ピークの許容範囲の評価基準に適合した。

(2) 真度、精度

真度及び併行精度の検討結果を表 22 に示した。

表 22. 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 [検出限界] (mg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度	定量限界 の評価 ¹⁾	検査線					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			
																				n=1	n=2	
1	カルボキシ	小麦	0.005	0.2	0.005	S/N	13237739	228	0.9986	89.8	91.4	94.4	89.0	88.4	90.6	2.7	210.1	270.6	240.3	添加濃度=定量限界		
2	カルボキシ	小豆	0.005	0.2	0.005	S/N	14835980	-3033	1.0000	90.9	83.5	96.2	92.9	98.0	92.3	6.1	270.7	251.8	261.2	添加濃度=定量限界		
3	カルボキシ	未成熟いんげん	0.005	0.2	0.005	S/N	149936008	-2982	1.0000	84.8	82.0	82.0	81.5	83.0	82.7	1.6	185.9	148.3	167.1	添加濃度=定量限界		
4	カルボキシ	えだまめ	0.005	0.2	0.005	S/N	139853262	-1829	1.0000	82.7	84.8	84.2	86.9	85.1	84.8	1.8	248.4	339.4	293.9	添加濃度=定量限界		
5	カルボキシ	たまねぎ	0.005	0.2	0.005	S/N	118355774	7551	0.9982	92.6	95.4	97.8	99.5	99.8	97.0	3.1	67.1	92.0	79.6	添加濃度=定量限界		
6	カルボキシ	小麦	0.005	0.2	0.2	-	151578610	-17024	0.9985	87.9	91.3	87.6	84.5	88.0	87.9	2.7				添加濃度=基準値		
7	カルボキシ	小豆	0.005	0.2	0.2	-	174340912	-26530	1.0000	84.3	82.3	79.4	77.3	82.2	81.1	3.4				添加濃度=基準値		
8	カルボキシ	未成熟いんげん	0.005	0.2	0.2	-	148744668	-63405	1.0000	80.5	79.5	82.1	78.1	81.1	80.3	1.9				添加濃度=基準値		
9	カルボキシ	えだまめ	0.005	0.2	0.2	-	139669203	-61115	0.9968	82.7	87.1	85.0	85.6	86.1	85.3	1.9				添加濃度=基準値		
10	カルボキシ	たまねぎ	0.005	0.2	0.2	-	166842188	-12931	1.0000	93.0	93.3	92.6	89.3	90.3	91.7	1.9				添加濃度=基準値		
11	スルホキシド	小麦	0.005	0.2	0.005	S/N	141473114	1916	0.9976	84.3	82.5	84.4	83.6	84.8	83.9	1.1	135.1	177.4	156.2	添加濃度=定量限界		
12	スルホキシド	小豆	0.005	0.2	0.005	S/N	105014779	-2315	0.9969	92.6	98.2	99.4	98.5	100.0	97.7	3.0	119.5	123.7	121.6	添加濃度=定量限界		
13	スルホキシド	未成熟いんげん	0.005	0.2	0.005	S/N	161372276	-2061	0.9993	81.1	83.3	81.8	81.7	82.8	82.1	1.1	117.9	91.1	104.5	添加濃度=定量限界		
14	スルホキシド	えだまめ	0.005	0.2	0.005	S/N	178420539	681	1.0000	80.9	86.0	87.7	86.5	91.1	86.4	4.3	299.4	214.0	256.7	添加濃度=定量限界		
15	スルホキシド	たまねぎ	0.005	0.2	0.005	S/N	162123780	-4092	0.9995	84.7	84.7	85.4	85.2	83.0	84.6	1.1	105.4	98.3	101.8	添加濃度=定量限界		
16	スルホキシド	小麦	0.005	0.2	0.2	-	153773018	70524	1.0000	81.0	81.8	76.0	84.3	86.2	81.9	4.7				添加濃度=基準値		
17	スルホキシド	小豆	0.005	0.2	0.2	-	142410068	-31306	1.0000	88.7	87.2	93.4	79.7	88.5	87.5	5.7				添加濃度=基準値		
18	スルホキシド	未成熟いんげん	0.005	0.2	0.2	-	153459213	52873	1.0000	84.7	85.2	85.4	86.1	85.0	85.3	0.6				添加濃度=基準値		
19	スルホキシド	えだまめ	0.005	0.2	0.2	-	156055752	87359	0.9997	82.9	82.9	83.2	84.0	86.6	83.9	1.8				添加濃度=基準値		
20	スルホキシド	たまねぎ	0.005	0.2	0.2	-	159654108	45706	1.0000	87.0	85.2	86.3	82.3	87.6	85.7	2.4				添加濃度=基準値		
21	スルホン	小麦	0.005	0.2	0.005	S/N	294936027	-381	0.9967	88.5	86.5	88.2	92.6	85.9	88.3	3.0	373.9	339.2	356.5	添加濃度=定量限界		
22	スルホン	小豆	0.005	0.2	0.005	S/N	189309564	-6289	0.9992	98.1	101.7	94.5	102.5	109.2	101.2	5.4	249.3	414.9	332.1	添加濃度=定量限界		
23	スルホン	未成熟いんげん	0.005	0.2	0.005	S/N	334825877	-318	1.0000	84.5	86.6	86.4	89.0	92.4	87.8	3.5	501.1	374.5	437.8	添加濃度=定量限界		
24	スルホン	えだまめ	0.005	0.2	0.005	S/N	327254696	-7092	0.9994	91.8	93.5	94.5	97.1	93.3	94.0	2.1	249.1	220.2	234.6	添加濃度=定量限界		
25	スルホン	たまねぎ	0.005	0.2	0.005	S/N	328188916	-4167	1.0000	83.0	90.7	89.6	90.4	89.9	88.7	3.6	340.3	395.6	368.0	添加濃度=定量限界		
26	スルホン	小麦	0.005	0.2	0.2	-	316972206	264789	1.0000	82.7	81.9	82.8	80.8	82.7	82.2	1.0				添加濃度=基準値		
27	スルホン	小豆	0.005	0.2	0.2	-	250841311	-18596	1.0000	86.9	87.8	91.5	85.7	92.9	89.0	3.5				添加濃度=基準値		
28	スルホン	未成熟いんげん	0.005	0.2	0.2	-	323337884	141874	1.0000	83.7	84.7	83.8	84.7	79.3	83.2	2.7				添加濃度=基準値		
29	スルホン	えだまめ	0.005	0.2	0.2	-	270071035	443306	0.9989	88.5	87.2	89.2	89.8	91.2	89.2	1.7				添加濃度=基準値		
30	スルホン	たまねぎ	0.005	0.2	0.2	-	329737478	115808	1.0000	89.5	90.3	87.3	88.0	87.6	88.5	1.5				添加濃度=基準値		

*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。

カルボキシでは真度 80.3~97.0%、併行精度 1.6~6.1%、カルボキシスルホキシド体では真度は 81.9~97.7%、併行精度 0.6~5.7%、オキシカルボキシ(スルホン体)では真度は 82.2~101.2%、併行精度 1.0~5.4%の良好な結果が得られた。

(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 23 に示した。添加回収試験における回収率 100%相当の濃度に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。

表 23. 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)	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				ピーク面積 (高さ)比 ⁵⁾
									n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均		
1	カルボキシ	小麦	0.005	0.2	0.005	0.001	面積	0	271366	275220	273293	253805	275337	264571	1.03	
2	カルボキシ	小豆	0.005	0.2	0.005	0.001	面積	0	305232	309672	307452	307475	306824	307150	1.00	
3	カルボキシ	未成熟いんげん	0.005	0.2	0.005	0.001	面積	0	353890	351519	352705	356734	351489	354112	1.00	
4	カルボキシ	えだまめ	0.005	0.2	0.005	0.001	面積	0	295812	291833	293823	293700	298697	296199	0.99	
5	カルボキシ	たまねぎ	0.005	0.2	0.005	0.001	面積	0	310313	297869	304091	306712	303877	305295	1.00	
6	カルボキシ	小麦	0.005	0.2	0.2	0.04	面積	0	12368655	12383489	12376072	12360829	11921066	12140948	1.02	
7	カルボキシ	小豆	0.005	0.2	0.2	0.04	面積	0	13098846	12766246	12932546	13201615	12710084	12956850	1.00	
8	カルボキシ	未成熟いんげん	0.005	0.2	0.2	0.04	面積	0	13507654	13387941	13447798	13339473	13566024	13452749	1.00	
9	カルボキシ	えだまめ	0.005	0.2	0.2	0.04	面積	0	11946420	12158481	12052451	11884213	11891239	11887726	1.01	
10	カルボキシ	たまねぎ	0.005	0.2	0.2	0.04	面積	0	13005636	12882886	12944261	13660503	11532285	12596394	1.03	
11	スルホキシド	小麦	0.005	0.2	0.005	0.001	面積	0	299900	308707	304304	293074	304231	298653	1.02	
12	スルホキシド	小豆	0.005	0.2	0.005	0.001	面積	0	248776	258897	253837	260796	277819	269308	0.94	
13	スルホキシド	未成熟いんげん	0.005	0.2	0.005	0.001	面積	0	347308	349212	348260	345425	346528	345977	1.01	
14	スルホキシド	えだまめ	0.005	0.2	0.005	0.001	面積	0	383195	377975	380585	386161	380334	383248	0.99	
15	スルホキシド	たまねぎ	0.005	0.2	0.005	0.001	面積	0	328289	326203	327246	328440	324110	326275	1.00	
16	スルホキシド	小麦	0.005	0.2	0.2	0.04	面積	0	12514030	12549476	12531753	12077275	12697039	12387157	1.01	
17	スルホキシド	小豆	0.005	0.2	0.2	0.04	面積	0	11794823	12004435	11899629	12064458	12095699	12080079	0.99	
18	スルホキシド	未成熟いんげん	0.005	0.2	0.2	0.04	面積	0	12525814	12437176	12481495	12537390	12849065	12693228	0.98	
19	スルホキシド	えだまめ	0.005	0.2	0.2	0.04	面積	0	13237783	13266037	13251910	13273786	13191130	13232458	1.00	
20	スルホキシド	たまねぎ	0.005	0.2	0.2	0.04	面積	0	12827352	12661677	12744515	13063811	12840755	12952283	0.98	
21	スルホン	小麦	0.005	0.2	0.005	0.001	面積	0	595289	601229	598259	605600	608689	607145	0.99	
22	スルホン	小豆	0.005	0.2	0.005	0.001	面積	0	458060	465779	461920	473801	469156	471479	0.98	
23	スルホン	未成熟いんげん	0.005	0.2	0.005	0.001	面積	0	694390	697363	695877	687109	693433	690271	1.01	
24	スルホン	えだまめ	0.005	0.2	0.005	0.001	面積	0	695195	679207	687201	691356	704717	698037	0.98	
25	スルホン	たまねぎ	0.005	0.2	0.005	0.001	面積	0	654687	661889	658288	682314	667177	674746	0.98	
26	スルホン	小麦	0.005	0.2	0.2	0.04	面積	0	25243953	25800228	25522091	24150090	25855663	25002877	1.02	
27	スルホン	小豆	0.005	0.2	0.2	0.04	面積	0	21209846	21250774	21230310	22099284	21387113	21743199	0.98	
28	スルホン	未成熟いんげん	0.005	0.2	0.2	0.04	面積	0	24199585	24519315	24359450	24836667	24598209	24717438	0.99	
29	スルホン	えだまめ	0.005	0.2	0.2	0.04	面積	0	24155216	23905317	24030267	23811224	23434572	23622898	1.02	
30	スルホン	たまねぎ	0.005	0.2	0.2	0.04	面積	0	26523873	25030355	25777114	27259589	23719197	25489393	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。

カルボキシンの面積比は 0.99~1.03、スルホキシド体の面積比は 0.94~1.02、スルホン体の面積比は 0.98~1.02 であり、検討に使用した 5 食品に関してはマトリックスの測定への影響は少ないものと考えられる。

5. その他の試験法検討に関連する事項

(1) アセトン抽出法の検討

採用しなかったが抽出法の検討としてはじめに残留農薬等試験法検討実施要領に従いアセトン抽出法での検討を行った。

穀類、豆類及び種実類(小麦、小豆)の場合は試料を 425 μm の標準網ふるいを通るように粉砕した後、試料 10.0 g を量り採り、水 20 mL を加え、30 分間放置した。野菜(たまねぎ、未成熟いんげん、えだまめ)の場合は、細切し摩砕均一化した後、試料 20.0 g を量り採った。

これにアセトン 100 mL を加えホモジナイズした後、ろ過助剤(セライト)を用いて吸引ろ過を行い、ろ紙上の残留物にアセトン 50 mL を加えホモジナイズした後、再度吸引ろ過を行い得られたろ液を合わせアセトンで正確に 200 mL とした。この抽出液 20 mL を採り、40°C 以下で約 2 mL に濃縮した。これに飽和塩化ナトリウム溶液 100 mL を加え、n-ヘキサン 100 mL 及び 50 mL で 2 回振とう抽出(カルボキシンの転溶)した。続いて、先の飽和塩化ナトリウム溶液に酢酸エチル 100 mL 及び 50 mL で 2 回振とう抽出(スルホキシド体転溶)した。ヘキサン抽出液及び酢酸エチル抽出液にそれぞれ硫酸ナトリウム(無水)を加えて脱水し、硫酸ナトリウム(無水)をろ別した後、40°C 以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物に n-ヘキサンを各 15 mL ずつ加えた後合わせて 30 mL とし、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（アセトニトリル層）を合わせ、40℃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 2 mL を加えて溶かし抽出溶液とした。

グラファイトカーボン及びアミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム(Envi-Carb/NH₂ ミニカラム)にアセトニトリル 10 mL を注入し、流出液は捨てた。このカラムに上記の抽出溶液を注入し、さらにアセトニトリル 22 mL を注入し全溶出液をナス型フラスコに採り、減圧濃縮器(40℃以下)で濃縮し、窒素気流下で溶媒除去した。残留物にアセトニトリルを穀類、豆類及び種実類は正確に 5 mL、野菜は正確に 10 mL 加え溶解し、これを試験溶液とした。

[アセトン抽出法の検討に関わる参考文献]

- 1) The e-Pesticide Manual Version3.0 2003-04
- 2) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知 食安発第 0124001 号「イソチアニル及びプロスルホカルブ試験法（農産物）」（平成 17 年 1 月 24 日）
- 3) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知 食安発第 0124001 号「カルボスルファン、カルボフラン、フラチオカルブ及びベンフラカルブ試験法（農産物）」（平成 17 年 1 月 24 日）

[フローチャート]

前処理

- | 穀類、豆類及び種実類：425 μm の標準網ふるいを通るように粉碎し均一化
- | 野菜：試料を細切し、摩砕均一化

秤 取

- | 穀類、豆類及び種実類：試料 10.0 g に水 20 mL を加え 30 分間放置
- ↓ 野菜：試料 20.0 g

アセトン抽出

- ↓ アセトン 100 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、アセトンで 200 mL に定容
- ↓ 抽出液 20 mL を分取

濃 縮

- ↓ 約 2 mL まで濃縮

転 溶

- ↓ 飽和塩化ナトリウム溶液 100 mL
- ↓ *n*-ヘキサン 100 mL、50 mL（カルボキシン転溶）振とう 5 分間
- ↓ ヘキサン層を脱水、濃縮し、窒素気流下で溶媒除去し、*n*-ヘキサン 15 mL に溶解（①）
- ↓ 先の飽和塩化ナトリウム溶液に酢酸エチル 100 mL、50 mL（スルホキシド体転溶）振とう 5 分間
- ↓ 酢酸エチル層を脱水、濃縮し、窒素気流下で溶媒除去し、*n*-ヘキサン 15 mL に溶解（②）

アセトニトリル/ヘキサン分配

- | ①と②を合わせ、この *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 2 回
- ↓ 抽出
- | 抽出液（アセトニトリル層）を合わせ濃縮し、窒素気流下で溶媒除去し、アセトニトリル 2 mL
- ↓ に溶解

グラファイトカーボン及びアミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム

(Envi-Carb/NH₂ ミニカラム)500 mg/500 mg

- ↓ アセトニトリル 10 mL でコンディショニング
- ↓ 抽出液を負荷
- ↓ アセトニトリル 22 mL で溶出（負荷液を含む全溶出液約 24mL を採取）

溶媒除去

- | 減圧濃縮器（40℃以下）で濃縮し、窒素気流下で溶媒除去
- | 穀類、豆類及び種実類：アセトニトリル 5 mL
- ↓ 野菜：アセトニトリル 10 mL

試験溶液



LC-MS/MS

(2) アセトン抽出法による添加回収試験の結果

小麦、小豆、未成熟いんげん、えだまめ及びたまねぎの5食品を試料に用いて、添加回収試験を実施した。

添加試料について、穀類、豆類及び種実類は試料 10.0 g 採取し、水 20 mL を加えよく混ぜ 30 分間放置後、カルボキシンのアセトン溶液(4 mg/L)、スルホキシド体のアセトン溶液(4 mg/L)、スルホン体のアセトン溶液(4 mg/L)を別々の試料に 0.5 mL 添加し、よく混ぜ 30 分放置後アセトニトリル 100 mL 加えホモジナイズを行った。野菜は細切し、磨砕均一化した後、試料 20.0 g を量り採りカルボキシンのアセトン溶液(4 mg/L)、スルホキシド体のアセトン溶液(4 mg/L)、スルホン体のアセトン溶液(4 mg/L)を別々の試料に 1 mL 添加しよく混ぜ、30 分放置後アセトン 100 mL を加えホモジナイズを行った。以下、5.(1)アセトン抽出法の検討に従い添加回収試験を行った。結果を表 24 に示した。

表 24. アセトン抽出法による添加回収率

食品名	添加農薬	回収率 (%) n=2 の平均値			
		カルボキシン	スルホキシド体	スルホン体	合計
小麦	カルボキシン	17.6	64.9	N.D.	82.5
	スルホキシド体	N.D.	82.7	N.D.	82.7
	スルホン体	N.D.	N.D.	83.2	83.2
小豆	カルボキシン	16.5	58.9	N.D.	75.4
	スルホキシド体	N.D.	78.4	N.D.	78.4
	スルホン体	N.D.	N.D.	78.7	78.7
未成熟 いんげん	カルボキシン	14.5	42.9	N.D.	57.4
	スルホキシド体	N.D.	83.1	N.D.	83.1
	スルホン体	N.D.	N.D.	96.2	96.2
えだまめ	カルボキシン	31.4	27.9	N.D.	59.3
	スルホキシド体	N.D.	86.9	N.D.	86.9
	スルホン体	N.D.	N.D.	83.9	83.9
たまねぎ	カルボキシン	34.1	40.2	N.D.	74.3
	スルホキシド体	N.D.	89.1	N.D.	89.1
	スルホン体	N.D.	N.D.	89.8	89.8

N.D. : Not Detected

未成熟いんげん及びえだまめにおいて、カルボキシンを添加した時の回収率が低かった。また全ての食品においてカルボキシンを添加した時にスルホキシド体への変換が見られたので、各ブランク試料抽出液に段階を追ってカルボキシンを添加して、回収率の減少している場所及びスルホキシド体への変換場所の特定を試みた。

1 段階目はろ過後アセトンで 200 mL に定容し、20 mL 採った試料溶液にカルボキシンのアセトン溶液(0.4 mg/L)を 0.5 mL 添加して、以下 5.(1)アセトン抽出法の検討に従い添加回収試験を行った。

2 段階目はヘキサン転溶と酢酸エチル転溶を行った試験溶液を濃縮し、溶媒を除去した残留物に *n*-ヘキサンを各 15 mL ずつ加えた後合わせて 30 mL とした試験溶液にカルボキシンのヘキサン溶液(0.4 mg/L)を 0.5 mL 添加して、以下 5.(1)アセトン抽出法の検討に従い添加回収試験を行った。

3 段階目はヘキサン転溶と酢酸エチル転溶を行った試験溶液を濃縮し、溶媒を除去した残留物に *n*-ヘキサンを各 15 mL ずつ加えた後合わせて 30 mL とし、*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°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 1.5 mL を加えて溶かした試験溶液にカルボキシンのアセトニトリル溶液(0.4 mg/L)を 0.5 mL 添加して、以下 5.(1)アセトン抽出法の検討に従い添加回収試験を行った。結果を表 25 に示した。

表 25. 途中添加による添加回収率

食品名	回収率 (%)								
	1 段階目			2 段階目			3 段階目		
	カルボキシ	スルホキシド体	合計	カルボキシ	スルホキシド体	合計	カルボキシ	スルホキシド体	合計
小麦	13.2	75.4	88.6	16.3	78.6	94.9	5.0	92.8	97.8
小豆	5.8	72.1	77.9	6.7	88.0	94.7	82.1	14.5	96.6
未成熟いんげん	27.8	54.3	82.1	29.9	62.7	92.6	13.7	88.0	101.7
えだまめ	60.6	16.8	77.4	70.6	12.7	83.3	79.1	11.9	91.0
たまねぎ	80.1	13.7	93.8	93.0	6.3	99.3	101.2	5.7	106.9

どの作物においても転溶以降の操作ではカルボキシとカルボキシ由来のスルホキシド体の合計回収率が 75%以上を確保できていたため、転溶操作前の抽出段階で今回得られた結果に表 24 の結果を加味すると 20%~30%程度の回収率の損失があると思われた。また、スルホン体への変換は見られなかったが、カルボキシのスルホキシド体への変換は 3 段階目でも起きており、これを防ぐ必要もあることが明らかとなった。

(3) 抽出方法の検討

抽出段階での回収率の損失を改善するため抽出方法の検討を行った。

1) アセトン抽出法による添加回収率 (表 24) でカルボキシの回収率が一番低かった未成熟いんげんを試料とした。試料 20.0 g にカルボキシのアセトン溶液(4 mg/L) を 1 mL 添加しよく混ぜ 30 分放置後、①0.1 w/v%BHT 含有アセトン 100 mL を加え、以下 5. (1)アセトン抽出法の検討に従い添加回収試験を行った。結果を表 26 に示した。

データ比較のため表 24 の未成熟いんげんのカルボキシ添加の結果を②として示した。

表 26. 未成熟いんげんにおける抽出溶媒ごとのカルボキシ添加の回収率

抽出溶媒		回収率 (%)			
		カルボキシ	スルホキシド体	スルホン体	合計
①	0.1 w/v%BHT 含有アセトン	15.5	46.0	N.D.	61.5
②	アセトン	14.5	42.9	N.D.	57.4

N.D. : Not Detected

酸化防止効果も期待される BHT であるが、BHT を入れていない②と比べるとほぼ同じようにスルホキシド体への変換も見られ、合計回収率もほぼ同じものとなり、改善は見られなかった。標準溶液を添加後の 30 分間の放置の間にスルホキシド体への変換が起きている可能性もあると思われたため、水の抽出溶媒での検討を次に試みた。

2) 試料に未成熟いんげんを用いてチオ尿素、L-アスコルビン酸ナトリウムを用いた抽出方法の検討を行った。試料 20.0 g に①チオ尿素 0.5 g、②チオ尿素 2 g、③L-アスコルビン酸ナトリウム 2 g、④L-アスコルビン酸ナトリウム 4 g を加えよく混ぜ 30 分間放置後、カルボキシのアセトン溶液(4 mg/L) を 1 mL 添加しよく混ぜ 30 分放置後、アセトン 100 mL を加え、以下 5. (1)アセトン抽出法の検討に従い添加回収試験を行った。結果を表 27 に示した。

表 27. 未成熟いんげんにおける抽出溶媒ごとのカルボキシ添加の回収率

抽出溶媒		回収率 (%)			
		カルボキシ	スルホキシド体	スルホン体	合計
①	チオ尿素 0.5 g	53.3	6.2	N.D.	59.5
②	チオ尿素 2 g	43.4	11.9	N.D.	55.3

③	L-アスコルビン酸ナトリウム 2 g	3.2	79.3	N.D.	82.5
④	L-アスコルビン酸ナトリウム 4 g	4.8	79.0	N.D.	83.8

N.D. : Not Detected

唯一 L-アスコルビン酸ナトリウムを用いて抽出を行ったものが回収率 80%を上回った。しかし、酸化防止効果も期待される L-アスコルビン酸ナトリウムであるが大部分がスルホキシド体に変換していた。

以上の結果から抽出段階での回収率の損失を改善するための抽出方法を見いだすことはできなかったため、アセトンでの抽出を採用しないこととし、アセトニトリルでの抽出を検討することとした。

(4) 補足

1) 転溶の検討

転溶効率の向上のため、転溶の際に使用する塩化ナトリウム溶液の濃度の検討を行った。5 w/v%~20 w/v%の濃度と飽和塩化ナトリウム溶液 100 mL にカルボキシシン及びスルホキシド体のヘキサン溶液(0.4 mg/L)を 0.5 mL 添加し、*n*-ヘキサン 100 mL と 50 mL を 2 回に分けて加え振とうし、ヘキサン層を採取した。残った水層に酢酸エチル 100 mL と 50 mL を 2 回に分けて加え振とうし、酢酸エチル層を採取した。それぞれ脱水及び濃縮を行い窒素気流下で溶媒を除去後、アセトニトリル 5 mL に溶解し、ヘキサン層と酢酸エチル層の回収率を求めた。結果を表 28 に示した。(表 28 には 10 w/v%と飽和の濃度のみ記載した。)

表 28. 転溶操作におけるカルボキシシンとスルホキシド体の回収率

農薬	塩化ナトリウム溶液の濃度	転溶溶媒	回収率 (%) n=2 の平均値				合計	
			カルボキシシン	スルホキシド体	スルホン体	合計		
カルボキシシン	10 w/v%	<i>n</i> -ヘキサン	77.1	11.3	N.D.	88.4	91.0	
		酢酸エチル	N.D.	2.6	N.D.	2.6		
	飽和	<i>n</i> -ヘキサン	87.6	5.1	N.D.	92.7	96.5	
		酢酸エチル	N.D.	3.8	N.D.	3.8		
スルホキシド体	10 w/v%	<i>n</i> -ヘキサン	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	87.5	
		酢酸エチル	N.D.	87.5	N.D.	87.5		
	飽和	<i>n</i> -ヘキサン	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	90.0	
		酢酸エチル	N.D.	90.0	N.D.	90.0		

N.D. : Not Detected

カルボキシシンは 5 w/v%~20 w/v%塩化ナトリウム溶液で転溶を行うと回収率は約 90%だったが、飽和塩化ナトリウム溶液を用いると 96.5%に改善された。スルホキシド体は 5 w/v%~20 w/v%塩化ナトリウム溶液の時の回収率は 90%未満だったが、飽和塩化ナトリウム溶液を用いると 90.0%と一番高い回収率が得られた。この結果より、転溶操作は飽和塩化ナトリウム溶液を用いて行うこととし、カルボキシシンはヘキサン転溶、スルホキシド体は酢酸エチル転溶で行うこととした。また、表には示していないが、スルホン体も酢酸エチル転溶で 90.0%の回収率が得られた。

2) アセトニトリル/ヘキサン分配の検討

脱脂のため、アセトニトリル/ヘキサン分配の検討を行った。*n*-ヘキサン 30 mL にカルボキシシン、スルホキシド体及びスルホン体のヘキサン溶液(0.4 mg/L)を 0.5 mL 添加し *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL で 3 回抽出し、画分ごとに濃縮を行い窒素気流下で溶媒を除去後、アセトニトリル 5 mL に溶解し、回収率を求めた。結果を表 29 に示した。

表 29. アセトニトリル/ヘキサン分配の抽出挙動

農薬		回収率 (%) n=2 の平均値				
		カルボキシシ	スルホキシド体	スルホン体	合計	
カルボキシシ	1回目	71.1	16.7	N.D.	87.8	91.0
	2回目	3.2	N.D.	N.D.	3.2	
	3回目	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
スルホキシド体	1回目	N.D.	95.3	N.D.	95.3	95.3
	2回目	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
	3回目	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
スルホン体	1回目	N.D.	N.D.	103.2	103.2	103.2
	2回目	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
	3回目	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	

N.D. : Not Detected

カルボキシシは2回の抽出で回収率は91.0%、スルホキシド体は1回の抽出で回収率は95.3%、スルホン体は1回の抽出で回収率は103.2%となり、いずれの農薬も3回目には検出しなかった。この結果よりn-ヘキサン飽和アセトニトリル30 mLで2回抽出することとした。

3) 試験溶液の検討

メタノールに溶解した試験溶液とアセトニトリルに溶解した試験溶液の比較の検討を行った。小麦、小豆、未成熟いんげん、えだまめ及びたまねぎのブランク試料5 mLを1 mLまで濃縮し、標準溶液濃度がカルボキシシ換算で0.001 mg/L及び0.04 mg/Lになるようにカルボキシシのアセトン溶液(0.005 mg/L及び0.2 mg/L)、スルホキシド体のアセトン溶液(0.00534 mg/L及び0.2136 mg/L)、スルホン体のアセトン溶液(0.00568 mg/L及び0.2272 mg/L)を1 mL添加し窒素気流下で溶媒を除去して、アセトン5 mLに溶解した。これを2 mLずつ分取し窒素気流下で溶媒を除去後、一方はメタノール2 mLに、もう一方はアセトニトリル2 mLに溶解し試験溶液とした。それぞれ交互に3回ずつ分析してピーク面積の平均値の比較を行った。結果を表30に示した。

表 30. メタノールに溶解した試験溶液とアセトニトリルに溶解した試験溶液の比較

食品名	農薬	標準溶液濃度 (µg/mL)	ピーク面積 n=3 の平均値		面積比 (メタノール/アセトニトリル)
			メタノール標準溶液	アセトニトリル標準溶液	
小麦	カルボキシシ	0.001	345807	339755	1.02
	スルホキシド体	0.001	355205	350569	1.01
	スルホン体	0.001	728265	711741	1.02
小豆	カルボキシシ	0.001	310009	310511	1.00
	スルホキシド体	0.001	277198	274465	1.01
	スルホン体	0.001	649006	645759	1.01
未成熟いんげん	カルボキシシ	0.001	312374	311295	1.00
	スルホキシド体	0.001	283195	277063	1.02
	スルホン体	0.001	608830	596057	1.02
えだまめ	カルボキシシ	0.001	327271	322156	1.02
	スルホキシド体	0.001	295682	290891	1.02
	スルホン体	0.001	629492	627533	1.00
たまねぎ	カルボキシシ	0.001	333794	331449	1.01
	スルホキシド体	0.001	303099	302562	1.00
	スルホン体	0.001	654629	647680	1.01

小麦	カルボキシシ	0.04	12718825	12534321	1.01
	スルホキシド体	0.04	14538766	14484383	1.00
	スルホン体	0.04	23301028	23142129	1.01
小豆	カルボキシシ	0.04	12593561	12516315	1.01
	スルホキシド体	0.04	14985108	14925011	1.00
	スルホン体	0.04	23439679	23468111	1.00
未成熟 いんげん	カルボキシシ	0.04	13146137	12835908	1.02
	スルホキシド体	0.04	16065666	15690307	1.02
	スルホン体	0.04	24978177	24421016	1.02
えだまめ	カルボキシシ	0.04	12422046	12111661	1.03
	スルホキシド体	0.04	15250540	14905906	1.02
	スルホン体	0.04	23770063	23256396	1.02
たまねぎ	カルボキシシ	0.04	12243333	12263183	1.00
	スルホキシド体	0.04	14709035	15007598	0.98
	スルホン体	0.04	22984864	23534150	0.98

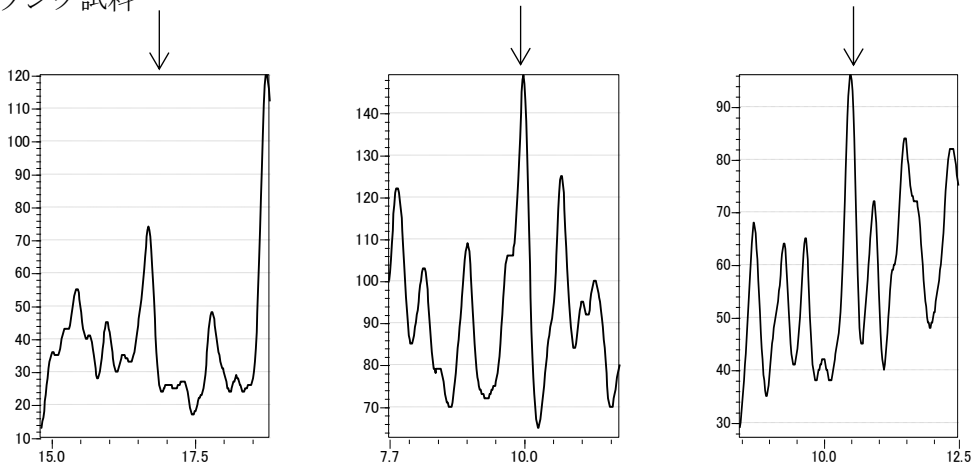
カルボキシシの面積比は 1.00～1.03、スルホキシド体の面積比は 0.98～1.02、スルホン体の面積比は 0.98～1.02 であり、検討に使用した 5 食品に関してメタノールに溶解した試験溶液とアセトニトリルに溶解した試験溶液に大きな差は見られなかった。

6. クロマトグラム

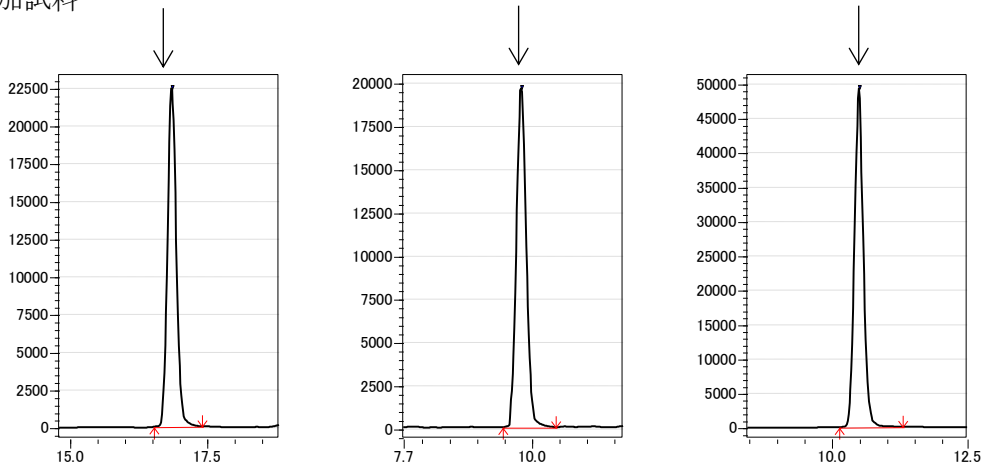
1) 添加回収試験における代表的なクロマトグラム

(1) 小麦

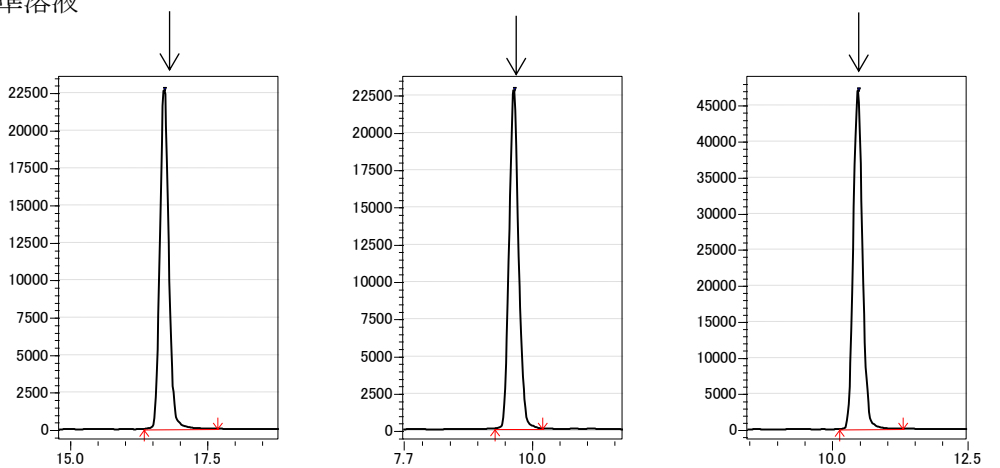
ブランク試料



添加試料



標準溶液



カルボキシシシ (m/z 236 \rightarrow 143)

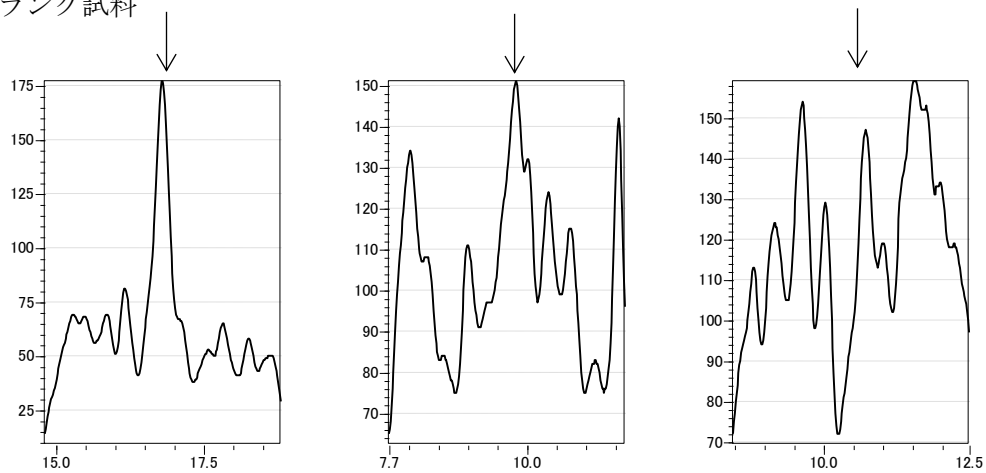
スルホキシド体 (m/z 252 \rightarrow 159)

スルホン体 (m/z 268 \rightarrow 175)

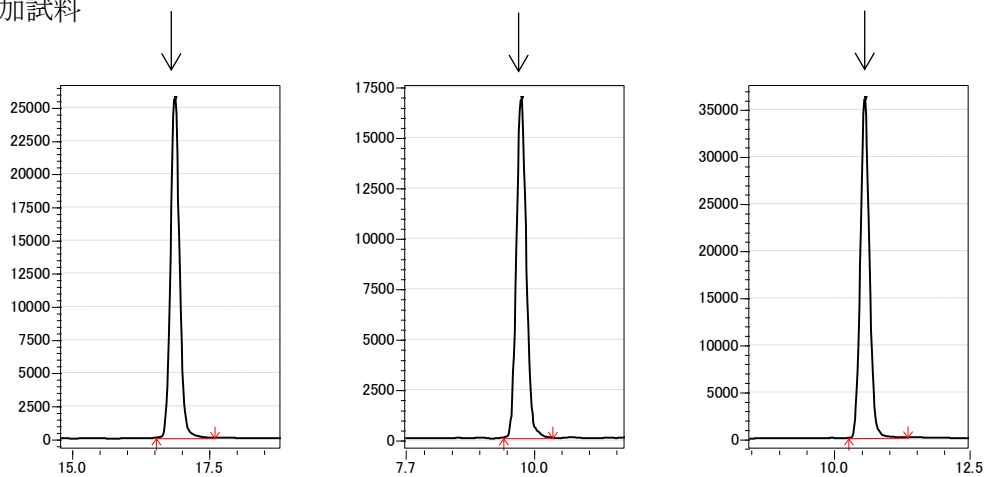
図 28. 小麦の SRM クロマトグラム 試料中 0.005 ppm 相当

(2) 小豆

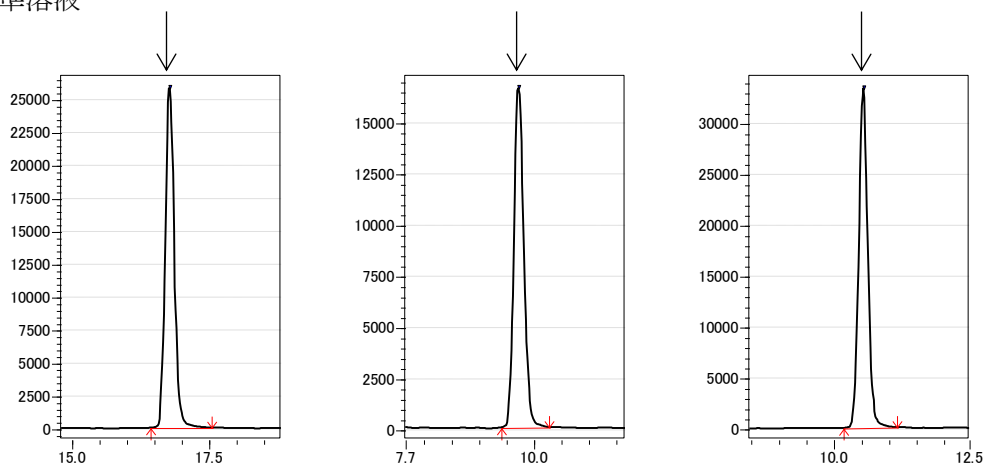
ブランク試料



添加試料



標準溶液



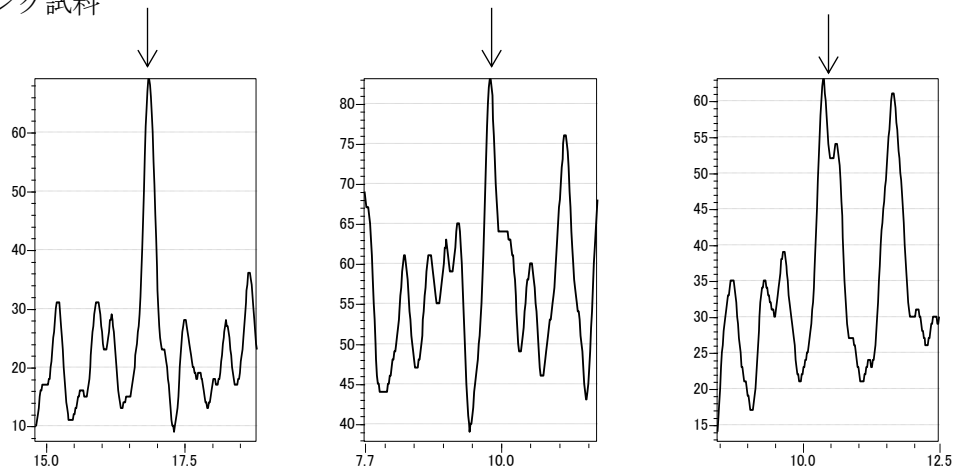
カルボキシシン(m/z 236→143)

スルホキシド体(m/z 252→159)

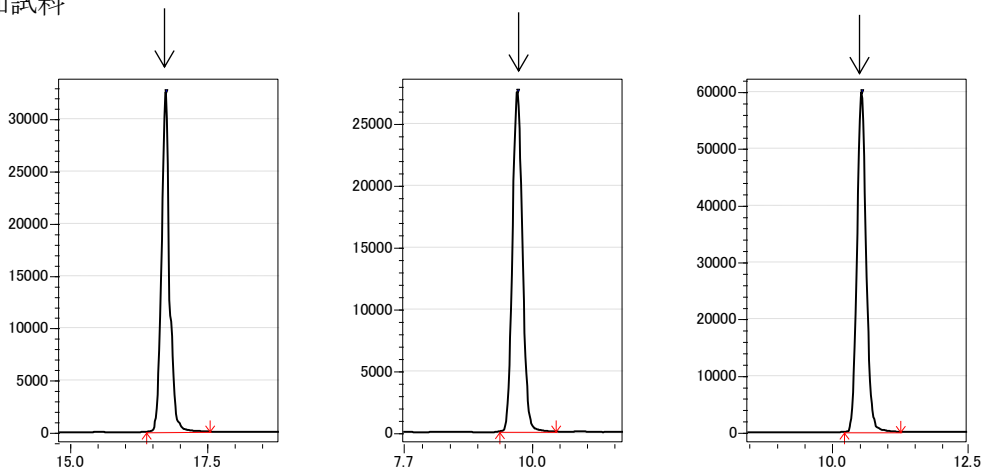
スルホン体(m/z 268→175)

図 29. 小豆の SRM クロマトグラム 試料中 0.005 ppm 相当

(3) 未成熟いんげん
 ブランク試料



添加試料



標準溶液

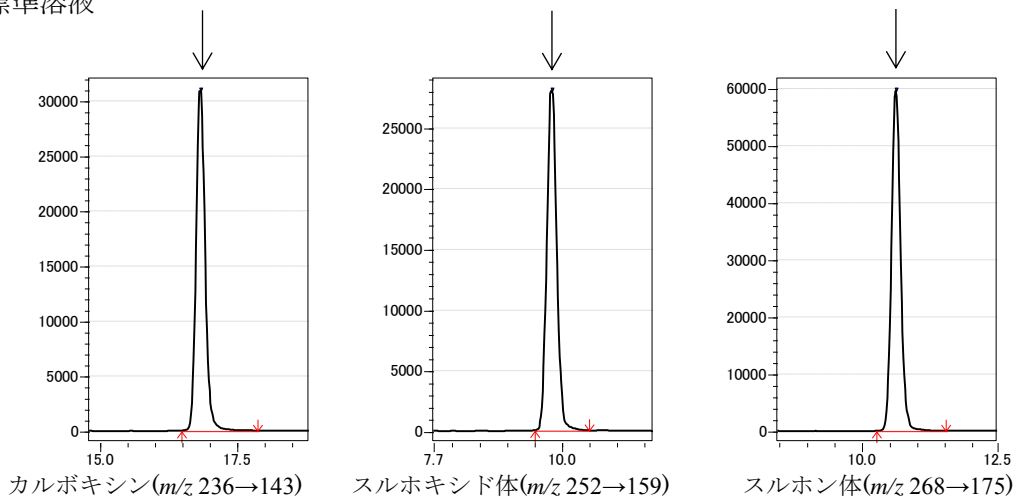
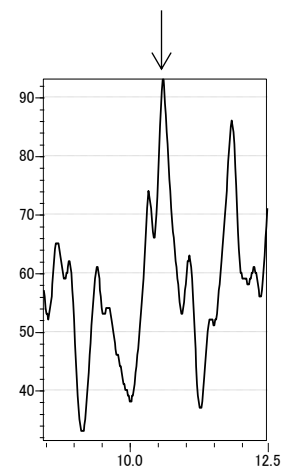
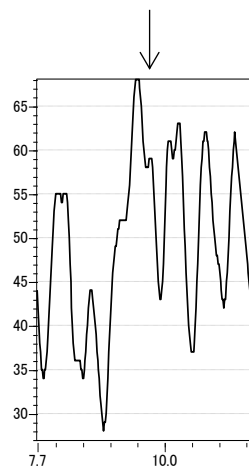
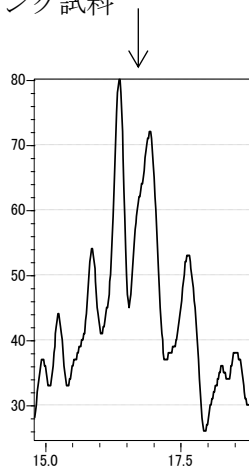
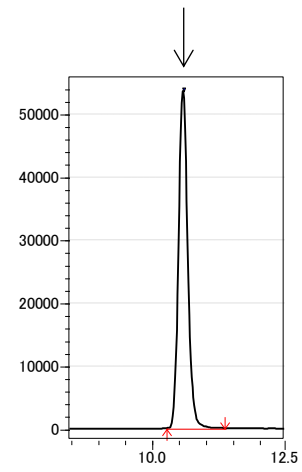
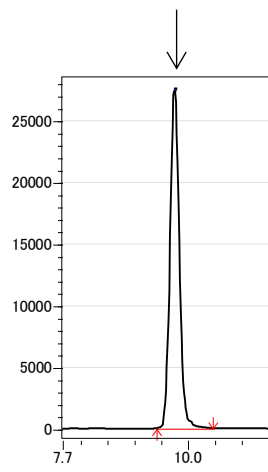
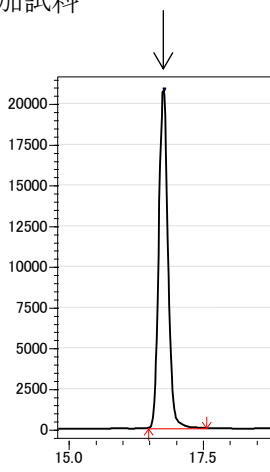


図 30. 未成熟いんげんの SRM クロマトグラム 試料中 0.005 ppm 相当

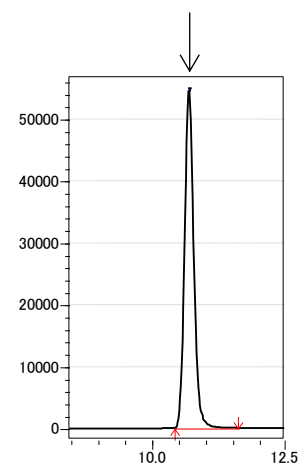
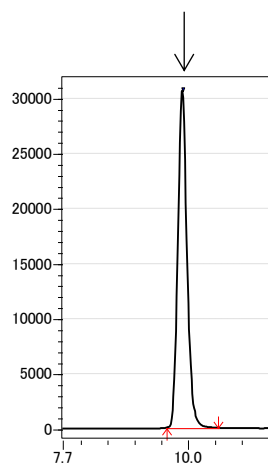
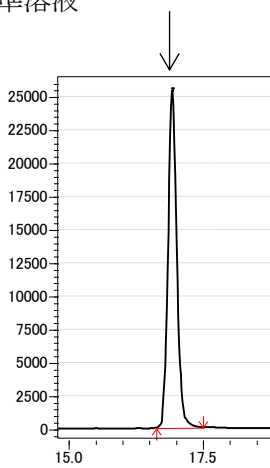
(4) えだまめ
ブランク試料



添加試料



標準溶液



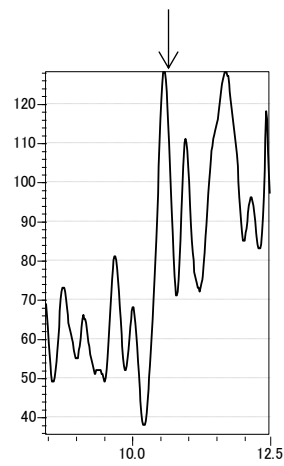
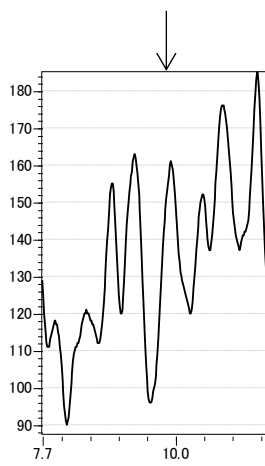
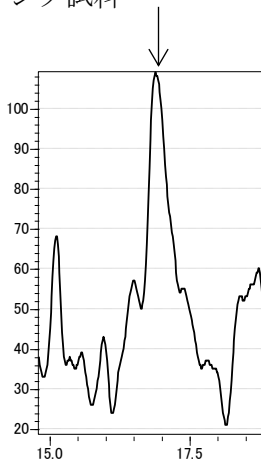
カルボキシシ(m/z 236→143)

スルホキシド体(m/z 252→159)

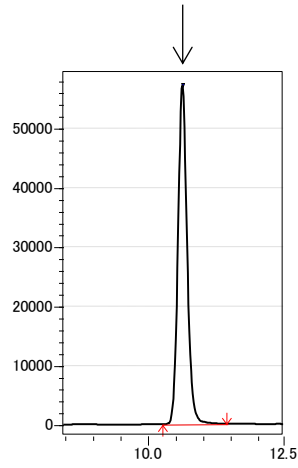
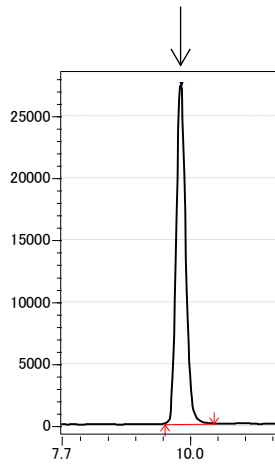
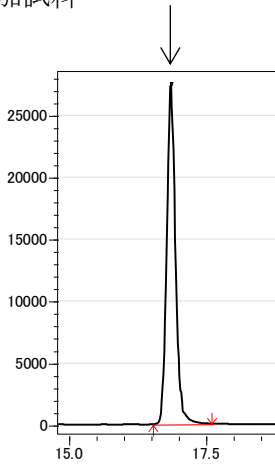
スルホン体(m/z 268→175)

図 31. えだまめの SRM クロマトグラム 試料中 0.005 ppm 相当

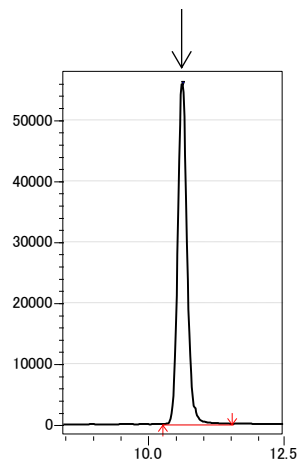
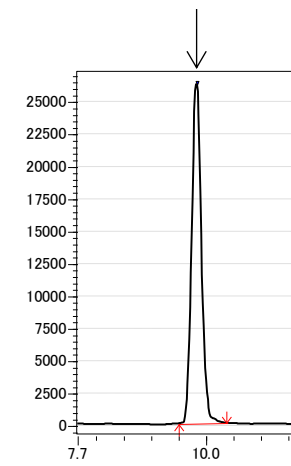
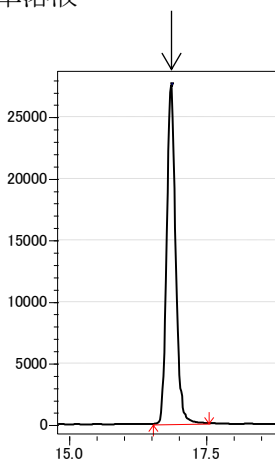
(5) たまねぎ
ブランク試料



添加試料



標準溶液



カルボキシシ(m/z 236→143)

スルホキシド体(m/z 252→159)

スルホン体(m/z 268→175)

図 32. たまねぎの SRM クロマトグラム 試料中 0.005 ppm 相当

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

(1) 小麦

スルホキシド体ピーク位置 スルホン体ピーク位置 カルボキシシンピーク位置

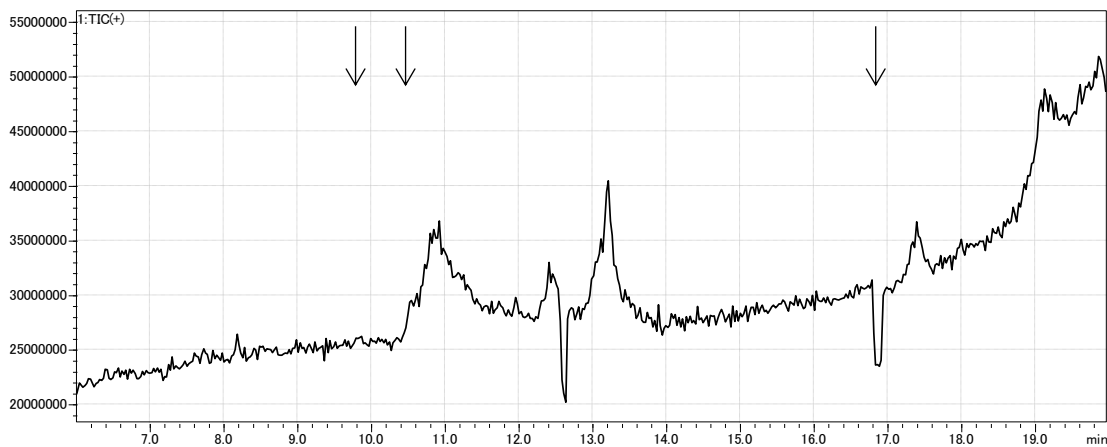


図 33. ブランク試料のトータルイオンクロマトグラム ESI(+)
(スキャン範囲： m/z 100~1,000)

スルホキシド体ピーク位置 スルホン体ピーク位置 カルボキシシンピーク位置

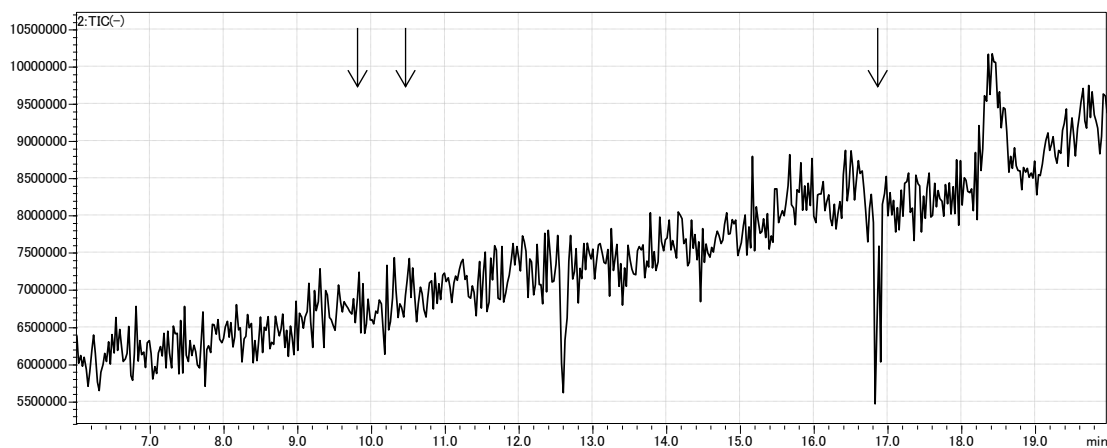


図 34. ブランク試料のトータルイオンクロマトグラム ESI(-)
(スキャン範囲： m/z 100~1,000)

(2) 小豆

スルホキシド体ピーク位置 スルホン体ピーク位置 カルボキシシンピーク位置

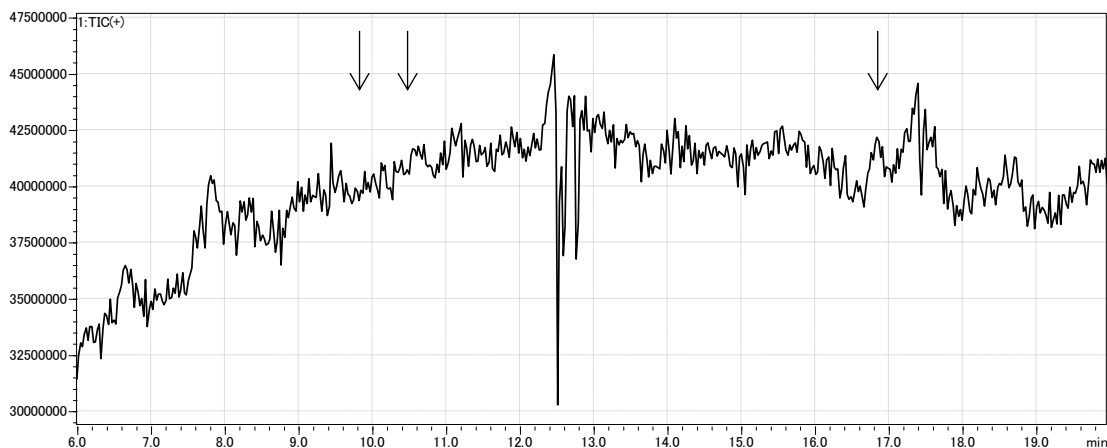


図 35. ブランク試料のトータルイオンクロマトグラム ESI(+)

(スキャン範囲 : m/z 100~1,000)

スルホキシド体ピーク位置 スルホン体ピーク位置 カルボキシシンピーク位置

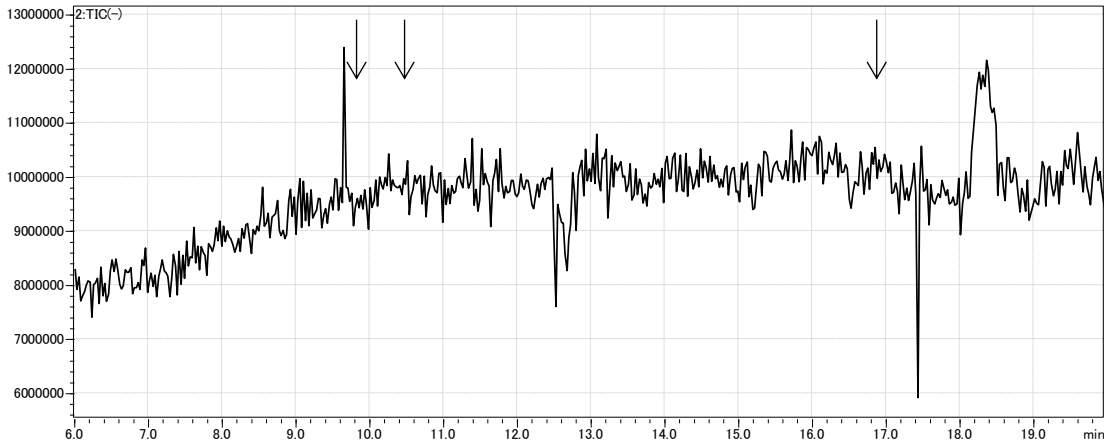


図 36. ブランク試料のトータルイオンクロマトグラム ESI(-)
(スキャン範囲 : m/z 100~1,000)

(3) 未成熟いんげん

スルホキシド体ピーク位置 スルホン体ピーク位置 カルボキシシンピーク位置

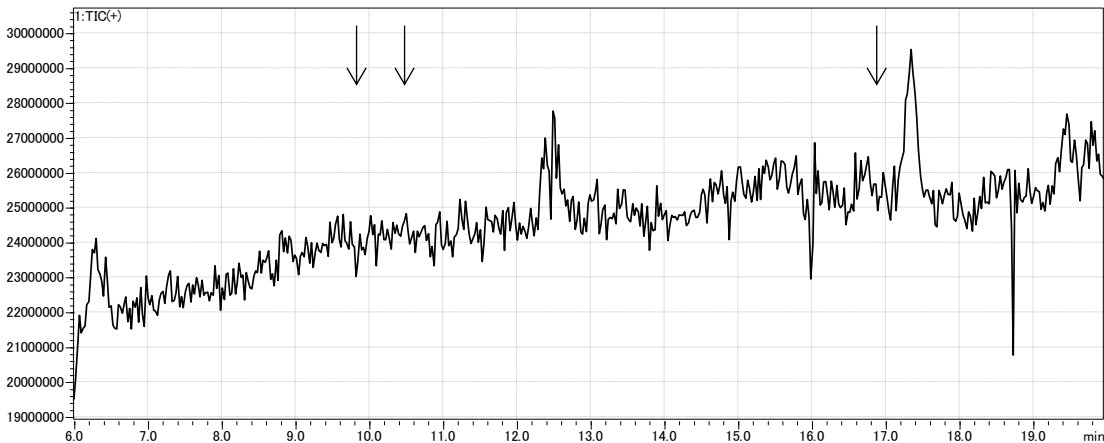


図 37. ブランク試料のトータルイオンクロマトグラム ESI(+)
(スキャン範囲 : m/z 100~1,000)

スルホキシド体ピーク位置 スルホン体ピーク位置 カルボキシシンピーク位置

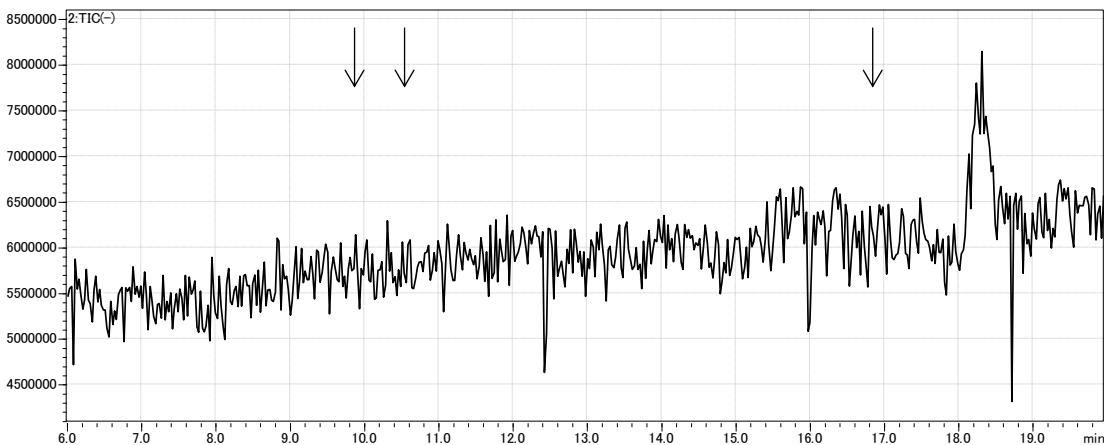


図 38. ブランク試料のトータルイオンクロマトグラム ESI(-)
(スキャン範囲 : m/z 100~1,000)

(4) えだまめ

スルホキシド体ピーク位置 スルホン体ピーク位置 カルボキシシンピーク位置

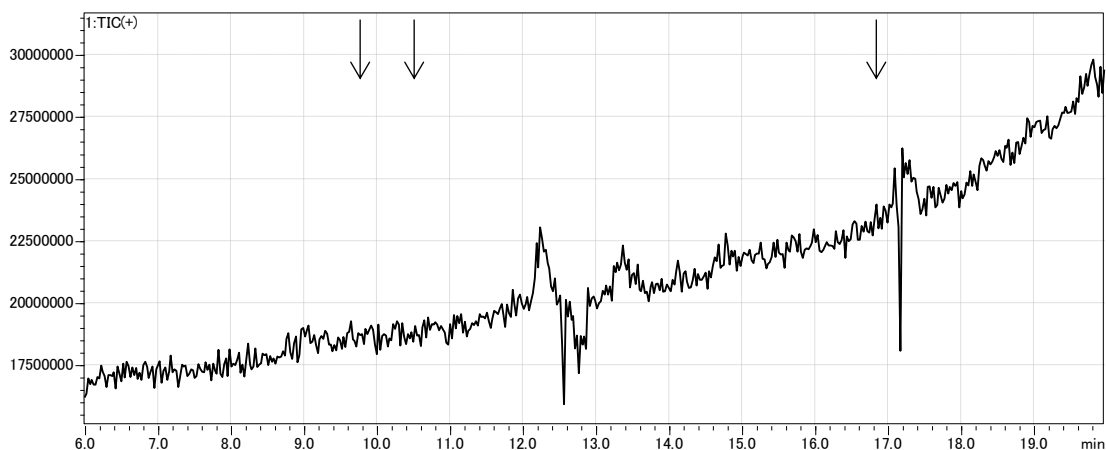


図 39. ブランク試料のトータルイオンクロマトグラム ESI(+)
(スキャン範囲 : m/z 100~1,000)

スルホキシド体ピーク位置 スルホン体ピーク位置 カルボキシシンピーク位置

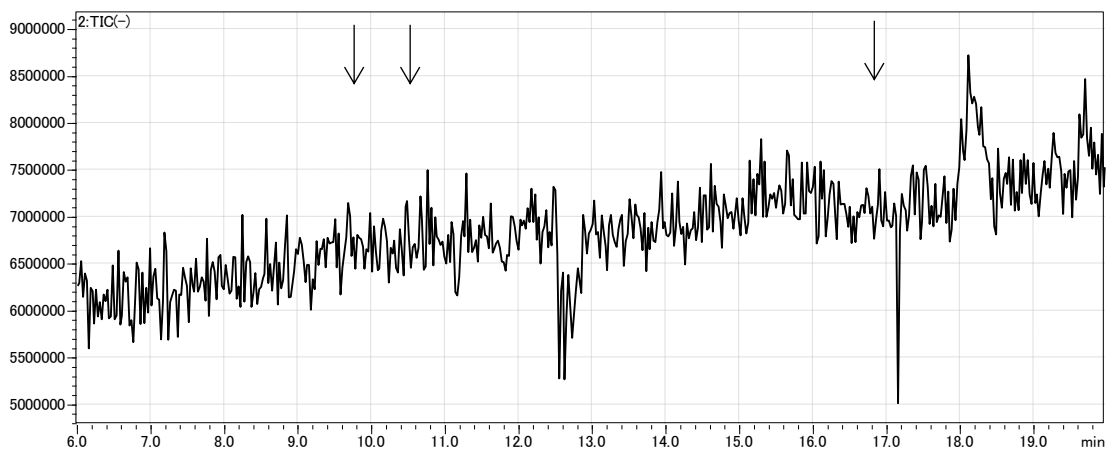


図 40. ブランク試料のトータルイオンクロマトグラム ESI(-)
(スキャン範囲 : m/z 100~1,000)

(5) たまねぎ

スルホキシド体ピーク位置 スルホン体ピーク位置 カルボキシシンピーク位置

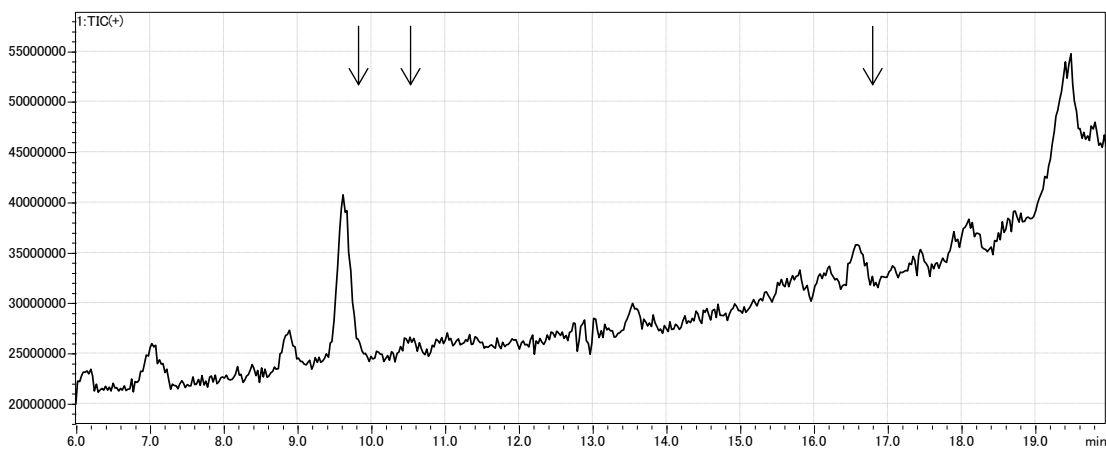


図 41. ブランク試料のトータルイオンクロマトグラム ESI(+)
(スキャン範囲 : m/z 100~1,000)

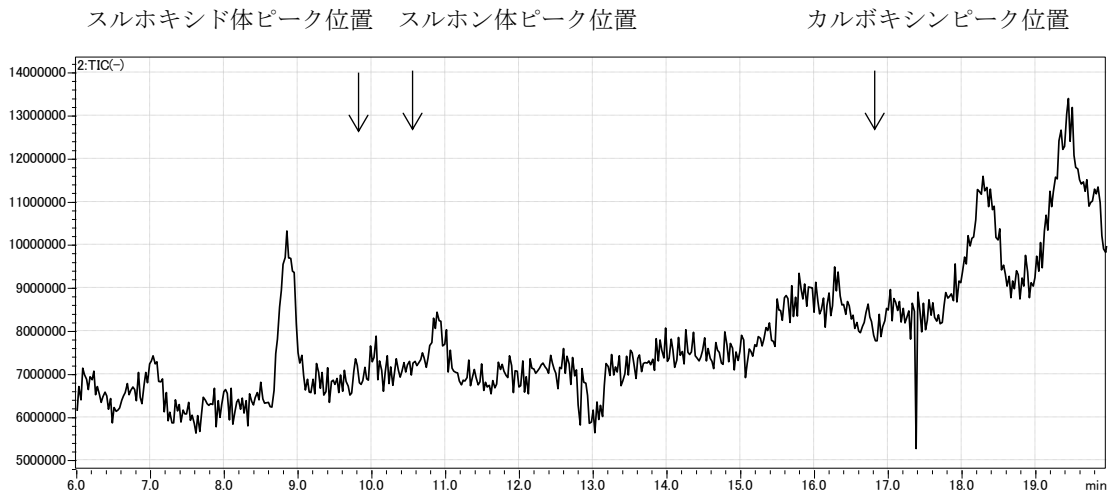


図 42. ブランク試料のトータルイオンクロマトグラム ESI(-)
(スキャン範囲 : m/z 100~1,000)

7. 考察

今回検討した農産物において、分析操作中にカルボキシシンがスルホキシド体に変換することを確認した。そのため、5 w/v%チオ尿素溶液にて変換を防止する必要がある。5 w/v%チオ尿素溶液を用いることで、カルボキシシンのスルホキシド体への変換をわずかな量に抑えることができた。スルホキシド体のスルホン体への変換は見られなかった。また、カルボキシシンのスルホキシド体への変換があったことから添加回収試験は3化合物を個別に添加して行うこととし、カルボキシシンの回収率は変換によって生じたスルホキシド体をカルボキシシンに換算した合算値で算出した。

精製カラムはグラファイトカーボン及びエチレンジアミン-*N*-プロピル積層ミニカラムを用いるとスルホン体の回収率が64.1%と低かったため、グラファイトカーボン及びアミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラムを選択した。

開発した方法を用いて、小麦等5食品の添加回収試験を行った結果、選択性は良好でいずれの試料においても測定を妨害するようなピークは認められず、カルボキシシンでは真度80.3~97.0%、併行精度1.6~6.1%、カルボキシシンスルホキシド体では真度は81.9~97.7%、併行精度0.6~5.7%、オキシカルボキシシン（スルホン体）では真度は82.2~101.2%、併行精度1.0~5.4%の良好な結果が得られたことから、本試験法は、穀類、豆類及び種実類、野菜の農産物に適用可能であると判定された。

[結論]

農産物中のカルボキシシン試験法として、試料にチオ尿素を加え、カルボキシシン、カルボキシシンスルホキシド体及びカルボキシシンスルホン体をアセトニトリルで抽出し、塩析で水を除いた後、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムで精製後、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。

開発した試験法を小麦、小豆、未成熟いんげん、えだまめ及びたまねぎの農産物5食品に適用した結果、カルボキシシンでは真度80.3~97.0%、併行精度1.6~6.1%、カルボキシシンスルホキシド体では真度は81.9~97.7%、併行精度0.6~5.7%、オキシカルボキシシン（スルホン体）では真度は82.2~101.2%、併行精度1.0~5.4%の良好な結果が得られた。また、定量限界として、カルボキシシンは0.005 mg/kg、カルボキシシンスルホキシド体は0.00534 mg/kg（カルボキシシンとして0.005 mg/kg相当）を設定可能であることが確認された。

[参考文献]

- 1) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知 食安発第1003001号「GC/MSによる農薬等の一斉試験法（農産物）」及び「LC/MSによる農薬等の一斉試験法 I（農産物）」（平成18年10月3日）
- 2) 佐々木久美子ら、果実中のエトキシキン分析法の評価、食衛誌、43、366-370（2002）