

※ 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 22 年度

食品に残留する農薬等の成分である物質
(ピリミルスルファン)の試験法開発事業
報告書

ピリミスルファン試験法の検討結果

[緒言]

1. 目的及び試験法の検討方針等

ピリミスルファンは、クマイ化学工業株式会社、株式会社ケイ・アイ研究所及びイハラケミカル工業株式会社の共同研究において見出されたピリミジニルカルボキシ系化合物の中から開発されたスルホンアニリド系の除草剤である。

「薬事食品衛生審議会 食品衛生分科会 農薬・動物用医薬品部会 部会報告案」に記載されている規制対象物質及び残留基準値案を踏まえ、試験法の開発を行った。玄米以外の食品は一律基準となっており、様々な食品に対応できる試験法を確立するため、一斉分析法や既存の他の個別試験法の適用確認は実施せず、新規に個別試験法を検討した。

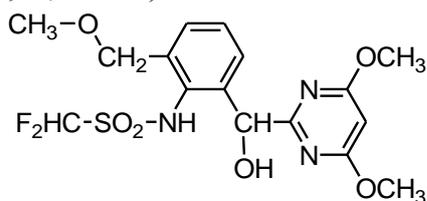
1) 規制対象物質

ピリミスルファン

2. 分析対象化合物の構造式、物理化学的性質、基準値等に関する情報

1) 構造式及び物理化学的性質

ピリミスルファン



ピリミスルファン

化学式：C₁₆H₁₉F₂N₃O₆S

分子量：419.40

化学名 (IUPAC)：(RS)-2'-[(4,6-dimethoxypyrimidin-2-yl)(hydroxy)methyl]-1,1-difluoro-6'-(methoxymethyl)methanesulfonamide

外 観：白色粒状結晶

融 点：98.8℃

蒸気圧：2.1×10⁻⁸ Pa (25℃)

溶解性：水 89.3 mg/L (純水)、114 mg/L (pH 5)、2676 mg/L (pH 7)、8438 mg/L (pH 9)
n-ヘキサン 0.210 g/L、トルエン 64.4 g/L、ジクロロメタン 250 g/L以上、
メタノール 105 g/L、アセトン 250 g/L以上、酢酸エチル 250 g/L以上
(以上 20℃)

オクタノール/水分配係数：log Pow=2.15 (pH 3)、2.01 (pH 5)、0.52 (pH 7)、-1.28 (pH 9)
(以上 20℃)

解離定数(pKa)：<1.16及び5.40 (20℃)

安定性：pH 4、7及び9の水溶液中で1年以上安定 (25℃)

水中光分解性；半減期38日 (蒸留水、25℃、47.5 W/m²、300-400 nm)

(出典：ピリミスルファン農薬抄録)

2) 基準値

玄米	0.05 ppm*
大豆	一律基準
ばれいしょ	一律基準
ほうれんそう	一律基準
キャベツ	一律基準
りんご	一律基準
オレンジ	一律基準
茶	一律基準
コーヒー生豆	一律基準
ごま	一律基準

* 施行通知 食安発1109第1号（平成22年11月9日）

[実験方法]

1. 試料

1) 購入先

コーヒー生豆は愛知県の業者にて、その他の試料については都内のスーパーにて購入した。

2) 試料の採取方法

- ①玄米は425 μmの標準網ふるいを通るように粉碎し均一化した。
- ②大豆は425 μmの標準網ふるいを通るように粉碎し均一化した。
- ③ばれいしょは泥を水で軽く洗い落とし細切均一化した。
- ④ほうれんそうはひげ根及び変質葉を除き細切均一化した。
- ⑤キャベツは外側変質葉及びしんを除き細切均一化した。
- ⑥りんごは花おち、しん及び果梗の基部を除き細切均一化した。
- ⑦オレンジは全体について細切均一化した。
- ⑧茶は425 μmの標準網ふるいを通るように粉碎し均一化した。
- ⑨コーヒー生豆は425 μmの標準網ふるいを通るように粉碎し均一化した。
- ⑩ごまは425 μmの標準網ふるいを通るように粉碎し均一化した。

2. 試薬・試液

1) 標準品

ピリミスルファン標準品（純度99.9%、林純薬工業製）

2) 試薬

アセトニトリル、アセトン、*n*-ヘキサン（以上、残留農薬試験用）

アセトニトリル（高速液体クロマトグラフィー用）

アセトン（特級）

ケイソウ土（セライト545）

ギ酸（分析用，純度98%以上）

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム（Bond Elut C18、充てん量1,000 mg、アジレントテクノロジーズ製）

グラファイトカーボンミニカラム（InertSep GC、充てん量500 mg、ジーエルサイエンス製）

シリカゲルミニカラム（Presep-Cシリカゲル、充てん量800 mg、和光純薬工業製）

ピリミルスルファン標準品（純度99.9%、林純薬工業製）

3) 標準溶液の調製方法

標準原液：ピリミルスルファン標準品25 mgを精秤し、アセトンで溶解して500 mg/L溶液を調製した。

検量線用標準溶液：標準原液をアセトンで適宜希釈した後、アセトニトリル及び0.05 vol%ギ酸（3：2）混液で適宜希釈し、0.0005～0.02 mg/Lの濃度の溶液を調製した。

添加用標準溶液：標準原液をアセトンで適宜希釈し、0.2及び4 mg/L溶液を調製した。

3. 装置

	型式	会社
MS 装置	G6140A	Agilent Technologies
LC 装置	1200 シリーズ	Agilent Technologies

4. 測定条件

LC 条件																					
カラム	Cadenza CD-C18 サイズ：内径 2.0 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm 会社：Imtakt 株式会社																				
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：0.05 vol%ギ酸 B液：アセトニトリル																				
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>75</td><td>25</td></tr><tr><td>15.00</td><td>25</td><td>75</td></tr><tr><td>18.00</td><td>25</td><td>75</td></tr><tr><td>18.01</td><td>5</td><td>95</td></tr><tr><td>25.00</td><td>5</td><td>95</td></tr></tbody></table>			時間(分)	A液(%)	B液(%)	0.00	75	25	15.00	25	75	18.00	25	75	18.01	5	95	25.00	5	95
時間(分)	A液(%)	B液(%)																			
0.00	75	25																			
15.00	25	75																			
18.00	25	75																			
18.01	5	95																			
25.00	5	95																			
MS 条件																					
測定モード	MS、選択イオン検出																				
イオン化モード	ESI (-)																				
キャピラリー電圧 (V)	3,000																				
ドラインガス	窒素 10 L/分、300°C																				
ネブライザー	窒素 50 psig																				
フラグメンター電圧	140 V																				
定量イオン (m/z)	418.1																				
保持時間の目安	15分																				

5. 定量

ピリミルスルファン標準品25 mgを精秤し、アセトンに溶解して500 mg/Lの標準原液を調製した。標準原液をアセトンで適宜希釈した後、アセトニトリル及び0.05 vol%ギ酸（3：2）混液で希釈し、0.0005、0.001、0.005、0.01、及び0.02 mg/Lの濃度の標準溶液を調製した。この溶液5 μLをLC-MSに注入し、得られたピーク高から検量線を作成した。試験溶液5 μLをLC-MSに注入し、得られたピーク高と作成した検量線からピリミルスルファンの含量を算出した。

1) 検量線の直線性 (図2)

4. の測定条件において、濃度0.0005 mg/L (0.0025 ng) ～0.02 mg/L (0.1 ng) の範囲で良好な直線性

を示した。

2) 標準溶液の検出感度 (図3)

定量限界相当の検出量：0.005 ng (0.001 mg/L×5 µL) のピークのS/N比は10以上であった。

6. 試験溶液の調製

1) 試験法の分析操作

ピリミスルファンを試料からアセトンで抽出した。グラファイトカーボンミニカラム(茶の場合のみ)、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム及びシリカゲルミニカラムで精製した後、LC-MSで定量・確認した。

① 抽出

a 穀類、豆類及び種実類の場合

試料10.0 gを200 mL遠心管に採り、水20 mLを加えた後、30分間放置した。アセトン100 mLを加え、ホモジナイズした後、ケイソウ土を1 cmの厚さに敷いたろ紙を用いて200 mL容メスフラスコに吸引ろ過した。ろ紙上の残留物にアセトン50 mLを加えてホモジナイズした後、上記と同様に吸引ろ過し、先のアセトン層と合わせた後、アセトンを加えて正確に200 mLとした。

抽出液20 mLを50 mLなす形フラスコに採り、40°C以下で約2 mLまで濃縮した。

b 果実及び野菜の場合

試料20.0 gを200 mL遠心管に採り、アセトン100 mLを加え、ホモジナイズした後、ケイソウ土を1 cmの厚さに敷いたろ紙を用いて200 mL容メスフラスコに吸引ろ過した。ろ紙上の残留物にアセトン50 mLを加えてホモジナイズした後、上記と同様に吸引ろ過し、先のアセトン層と合わせた後、アセトンを加えて正確に200 mLとした。

抽出液10 mLを50 mLなす形フラスコに採り、40°C以下で約1 mLまで濃縮した。

c 茶の場合

試料5.00 gを200 mL遠心管に採り、水20 mLを加えた後、30分間放置した。アセトン100 mLを加え、ホモジナイズした後、ケイソウ土を1 cmの厚さに敷いたろ紙を用いて200 mL容メスフラスコに吸引ろ過した。ろ紙上の残留物にアセトン50 mLを加えてホモジナイズした後、上記と同様に吸引ろ過し、先のアセトン層と合わせた後、アセトンを加えて正確に200 mLとした。

② 精製

a グラファイトカーボンカラムクロマトグラフィー (茶の場合のみ)

グラファイトカーボンミニカラム (500 mg) にアセトン5 mLを注入し、流出液は捨てた。このカラムに①で得られた抽出液20 mLを注入した後、アセトン10 mLを注入した。全溶出液を40°C以下で約2 mLまで濃縮した。

b 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 (1,000 mg) にアセトニトリル及び0.05 vol%ギ酸各5 mLを順次注入し、各流出液は捨てた。このカラムに穀類、豆類、種実類、果実及び野菜の場合は①で得られた濃縮液に、茶の場合は②aで得られた濃縮液に0.05 vol %ギ酸10 mLを加えたものを注入した後、容器をアセトニトリル及び0.05 vol%ギ酸 (3 : 7) 混液10 mLで洗い、洗液をカラムに注入し、流出液は捨てた。次いでアセトニトリル及び0.05 vol%ギ酸 (3 : 2) 混液10 mLを注入し、溶出液を10 mL容メスフラスコに採り、アセトニトリル及び0.05 vol%ギ酸 (3 : 2) 混液を加えて正確に10 mLとした。溶出液5

mLを採り、40°C以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物にアセトン1 mLを加え超音波処理して十分に溶解した後、*n*-ヘキサン19 mLを加えた。

c シリカゲルカラムクロマトグラフィー

シリカゲルミニカラム (800 mg) にアセトン及び*n*-ヘキサン (1 : 19) 混液5 mLを注入し、流出液は捨てた。このカラムにbで得られた溶液を注入し、流出液は捨てた。次いで超音波処理して容器を洗い込みながらアセトン及び*n*-ヘキサン (3 : 7) 混液20 mL (5 mL×4回) を注入し、40°C以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物をアセトニトリル及び0.05 vol%ギ酸 (3 : 2) 混液に溶解し、穀類、豆類、種実類、果実及び野菜の場合は正確に5 mL、茶の場合は正確に2.5 mLとしたものを試験溶液とした。

A 穀類、豆類、種実類、果実及び野菜の場合

秤 取

- | 穀類、豆類及び種実類：試料10.0 g (水20 mLを加えた後、30分間放置)
- ↓ 果実及び野菜：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、アセトン層を採る
- | 残留物にアセトン50 mLを加え、ホモジナイズ
- | 吸引ろ過、アセトン層を採る
- | アセトンを加え、正確に200 mLとする
- | 穀類、豆類及び種実類：抽出液20 mLを約2 mLまで減圧濃縮する (40°C以下)
- ↓ 果実及び野菜：抽出液10 mLを約1 mLまで減圧濃縮する (40°C以下)

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム

- | アセトニトリル及び0.05 vol%ギ酸各5 mLで予備洗浄
- | 0.05 vol%ギ酸10 mLを加えて負荷
- | アセトニトリル及び0.05 vol%ギ酸 (3 : 7) 混液10 mLで洗浄
- | アセトニトリル及び0.05 vol%ギ酸 (3 : 2) 混液10 mLで溶出
- | アセトニトリル及び0.05 vol%ギ酸 (3 : 2) 混液で正確に10 mLとする
- | 溶出液5 mLを減圧濃縮し窒素乾固する (40°C以下)
- | アセトン1 mLに溶かす
- ↓ *n*-ヘキサン19 mLを加える

シリカゲルミニカラム

- | アセトン及び*n*-ヘキサン (1 : 19) 混液5 mLで予備洗浄
- | 試料液負荷
- | アセトン及び*n*-ヘキサン (3 : 7) 混液20 mLで溶出
- | 溶出液を減圧濃縮し窒素乾固する (40°C以下)
- ↓ アセトニトリル及び0.05 vol%ギ酸 (3 : 2) 混液で正確に5 mLとし、試験溶液とする

LC-MS定量

5 µL注入

B 茶の場合

秤 取

↓ 試料5.00 g (水20 mLを加えた後、30分間放置)

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、アセトン層を採る
- | 残留物にアセトン50 mLを加え、ホモジナイズ
- | 吸引ろ過、アセトン層を採る
- ↓ アセトンを加え、正確に200 mLとする

グラファイトカーボンミニカラム

- | アセトン5 mLで予備洗浄
- | 抽出液20 mLを負荷及び溶出
- | アセトン10 mLで溶出
- ↓ 全溶出液を約2 mLまで減圧濃縮する (40°C以下)

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム

- | アセトニトリル及び0.05 vol%ギ酸各5 mLで予備洗浄
- | 0.05 vol%ギ酸10 mLを加えて負荷
- | アセトニトリル及び0.05 vol%ギ酸 (3 : 7) 混液10 mLで洗浄
- | アセトニトリル及び0.05 vol%ギ酸 (3 : 2) 混液10 mLで溶出
- | アセトニトリル及び0.05 vol%ギ酸 (3 : 2) 混液で正確に10 mLとする
- | 溶出液5 mLを減圧濃縮し窒素乾固する (40°C以下)
- | アセトン1 mLに溶かす
- ↓ *n*-ヘキサン19 mLを加える

シリカゲルミニカラム

- | アセトン及び*n*-ヘキサン (1 : 19) 混液5 mLで予備洗浄
- | 試料液負荷
- | アセトン及び*n*-ヘキサン (3 : 7) 混液20 mLで溶出
- | 溶出液を減圧濃縮し窒素乾固する (40°C以下)
- ↓ アセトニトリル及び0.05 vol%ギ酸 (3 : 2) 混液で正確に2.5 mLとし、試験溶液とする

LC-MS定量

5 µL注入

2) 定量限界

① 穀類、豆類、種実類、果実及び野菜

0.01 mg/kg [(5 mL/0.5 g^{*1}) × (0.005 ng/5 µL)]

^{*1} 10.0 g × 20 mL/200 mL × 5 mL/10 mL (穀類、豆類及び種実類の場合)

20.0 g × 10 mL/200 mL × 5 mL/10 mL (果実及び野菜類の場合)

② 茶

0.01 mg/kg [(2.5 mL/0.25 g^{*2}) × (0.005 ng/5 µL)]

^{*2} 5.00 g × 20 mL/200 mL × 5 mL/10 mL

7. マトリックス添加標準溶液の調製

① 玄米

0.2 mg/Lの標準溶液25 μ Lを分取し溶媒を除去した後、ブランク試料の試験溶液1 mLに溶解したものを、マトリックス添加標準溶液とした。なお、0.2 mg/Lの標準溶液25 μ Lを分取し溶媒を除去した後、アセトニトリル及び0.05 vol%ギ酸（3：2）混液1 mLに溶解したものを、比較用の標準溶液とした。

② 玄米以外

0.2 mg/Lの標準溶液5 μ Lを分取し溶媒を除去した後、ブランク試料の試験溶液1 mLに溶解したものを、マトリックス添加標準溶液とした。なお、0.2 mg/Lの標準溶液5 μ Lを分取し溶媒を除去した後、アセトニトリル及び0.05 vol%ギ酸（3：2）混液1 mLに溶解したものを、比較用の標準溶液とした。

[結果及び考察]

1. 測定条件の検討

1) LC 条件の検討

ピリミルスルファンは酸性物質であることから、移動相には0.05 vol%ギ酸及びアセトニトリルの混液を用いることとした。

2) MS 条件の検討

ESI（-）モードで、イオン源のドラインガス温度を300°Cと350°Cで比較したところ、300°Cの方が感度が良かったため、300°Cで測定することとした。また、キャピラリー電圧を3,000、3,500及び4,000 Vで比較したところ、感度には差異が見られなかったため、3,000 Vで測定することとした。ESI（-）モードのスペクトルを図1に示した。

ESI（+）モードの m/z 420.1でも測定可能であり、試験法の測定に用いた農作物では十分定量が可能であったが、ピリミルスルファンの保持時間前後に夾雑ピークが若干多い傾向が見られた。ESI（+）モードにおける添加回収率をTable1に示した。ESI（+）モードのスペクトルを図5に、クロマトグラムを図7に示した。

以上のことから、ESI（-）モードを定量用、ESI（+）モードを確認用とした。ピリミルスルファン標準溶液（0.001 mg/L）におけるS/NをTable2に示した。

Table1 添加回収試験結果

試料	添加濃度(ppm)	回収率 (%)
玄米	0.05	88
大豆	0.01	93
ばれいしょ	0.01	113
ほうれんそう	0.01	111
キャベツ	0.01	99
りんご	0.01	97
オレンジ	0.01	97
茶	0.01	108
コーヒー生豆	0.01	87
ごま	0.01	104

Table2 ピリミスルファンのS/N (0.001 mg/L)

モニターイオン	イオン化モード	S/N	Height (counts)
418.1	ESI (-)	333	463
420.1	ESI (+)	307	2893

3) MS/MS 条件の検討

LC-MS/MSの測定条件について検討した。LC条件は[実験方法] 4. に示したLC-MSと同じ条件に設定し、カラムも同一のものを使用した。MRMメソッド (Multiple Reaction Monitoring、MS/MSモード) のESI (+) モードで、 m/z 420→370、255で測定可能であった。試験法の検討に用いた農作物の試料溶液を注入したところ、試料共存下での注入再現性が悪い傾向が見られ、感度変動も大きかった。このMSMS装置をシングルMSとして使用した場合は定量性に問題はなかったため、カラムに残存した試料成分の影響によるものではないことが示唆された。また、LC-MS/MSへの注入量を2 μ Lに変更し、マトリックスが少ない条件で同一試験液の10回連続注入をしたところ、応答値のバラツキが大きく、イオン化が安定しないことが推測された。なお、定量限界相当の標準溶液の注入再現性も試料液と同程度であった。いずれも保持時間の変動はなかった。

大豆及びコーヒー生豆試料における添加回収率をTable3に示した。真度 (回収率) 及び併行精度の目標値を満たすことができなかつたため、MS/MSモードでの定量は不適當であると判断した。

	型式	会社
MSMS 装置	Xevo TQ MS	Waters
LC 装置	ACQUITY UPLC	Waters

LC 条件																					
カラム	Cadenza CD-C18 サイズ：内径 2.0 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μ m 会社：Imtakt 株式会社																				
移動相流速 (mL/min)	0.20																				
注入量 (μ L)	5																				
カラム温度 (°C)	40																				
移動相	A液：0.05 vol%ギ酸 B液：アセトニトリル																				
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>75</td> <td>25</td> </tr> <tr> <td>15.00</td> <td>25</td> <td>75</td> </tr> <tr> <td>18.00</td> <td>25</td> <td>75</td> </tr> <tr> <td>18.01</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>25.00</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> </tbody> </table>			時間(分)	A液 (%)	B液 (%)	0.00	75	25	15.00	25	75	18.00	25	75	18.01	5	95	25.00	5	95
時間(分)	A液 (%)	B液 (%)																			
0.00	75	25																			
15.00	25	75																			
18.00	25	75																			
18.01	5	95																			
25.00	5	95																			
MS 条件																					
測定モード	MS/MS、選択反応モニタリング																				
イオン化モード	ESI (+)																				
キャピラリ電圧 (kV)	2.00																				
ソース温度 (°C)	150																				
脱溶媒温度 (°C)	400																				
コーンガス	窒素、50 L/hr																				
脱溶媒ガス	窒素、800 L/hr																				
コリジョンガス	アルゴン、0.25 mL/min																				
定量イオン (m/z)	+420.00→369.94																				

	[コーン電圧 : 20 (V)、コリジョンエネルギー : 18 (eV)]
確認イオン (m/z)	+420.00→254.94 [コーン電圧 : 20 (V)、コリジョンエネルギー : 28 (eV)]
保持時間の目安	11分

Table3 添加回収試験結果

試料	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)					真度 (%)	併行精度 (RSD%)
		1	2	3	4	5		
大豆	0.01	97	86	153	105	143	117	25.2
コーヒー生豆	0.01	135	103	116	133	122	122	10.8

2. 試験溶液調製法の検討

1) 抽出方法の検討

ピリミスルファンの溶解性を考慮し、残留農薬等試験法検討実施要領で農作物の場合に原則として使用するアセトン抽出溶媒として選択した。高速ホモジナイザーを用いて1分間細砕し、ケイソウ土を1 cmの厚さに敷いたろ紙を用いて吸引ろ過した。

2) 精製方法の検討

① 減圧濃縮時の損失

ピリミスルファンの減圧濃縮時の損失について調査した。ピリミスルファン1 µgをなす形フラスコに取り、各溶媒50 mLに溶解した後、40 °C以下で各溶媒に適した減圧度で減圧濃縮した。乾固後、5分間減圧を継続した後、窒素ガスを穏やかに送って溶媒蒸気を除去した。減圧濃縮時の損失は認められなかった。結果をTable4に示した。

Table4 減圧濃縮時の残存率

溶媒	残存率 (%)
<i>n</i> -ヘキサン	101
酢酸エチル	105
アセトニトリル	102
メタノール	102

② カラム精製

a ケイソウ土カラムによる精製

ピリミスルファン1 µgを窒素乾固後、水又は1%リン酸10 mLに溶解し、負荷後5分間放置した。溶出状況をTable5に示した。*n*-ヘキサンでの溶出率は水層のpHに依存し、酢酸エチルでの溶出率はいずれの条件においても溶出バンドが広がった。

Table5 ケイソウ土カラムからの溶出状況 (%)

水層 (負荷)	<i>n</i> -ヘキサン	酢酸エチル				合計
	20 mL	0-20 mL	20-30 mL	30-40 mL	40-50 mL	
水 10 mL	0	25	27	22	24	98
1%リン酸 10 mL	23	53	11	9	9	105

ケイソールト (10 mL、ジーエルサイエンス製)

添加量 : 1 µg

b グラファイトカーボンミニカラムによる精製

グラファイトカーボンミニカラムをアセトン5 mLで予備洗浄した後、アセトン20 mLで負荷した。溶出状況をTable6に示した。アセトン30 mLで良好な回収率が得られた。

Table6 グラファイトカーボンミニカラムからの溶出状況 (%)

	アセトン			合計
	20 mL (負荷)	20-25 mL	25-30 mL	
溶出率	81	18	2	101

InertSep GC (充てん量 500 mg、ジーエルサイエンス製)

添加量 : 1 µg

c オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムによる精製

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムをアセトニトリル及び0.05 vol%ギ酸各5 mLで予備洗浄した後、0.05 vol%ギ酸10 mLで負荷した。溶出状況をTable7に示した。アセトニトリル及び0.05 vol%ギ酸 (3 : 2) 混液10 mLで大部分が溶出された。

Table7 オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムからの溶出状況 (%)

	0.05 vol%ギ酸 10 mL (負荷)	アセトニトリル及び0.05 vol%ギ酸混液			合計	
		(3 : 7)	(3 : 2)			
		10 mL	0-10 mL	10-15 mL		15-20 mL
回収率	0	0	96	tr	0	96

Bond Elut C18 (充てん量 1,000 mg、アジレント製)

添加量 : 1 µg

d シリカゲルミニカラムによる精製

シリカゲルミニカラムをアセトン及び*n*-ヘキサン (1 : 19) 混液5 mLで予備洗浄した後、アセトン及び*n*-ヘキサン (1 : 19) 混液20 mLで負荷した。溶出状況をTable8に示した。アセトン及び*n*-ヘキサン (3 : 7) 混液20 mLで大部分が溶出された。

Table8 シリカゲルミニカラムからの溶出状況 (%)

	アセトン及び <i>n</i> -ヘキサン混液				合計
	(1 : 19)	(3 : 7)			
	20 mL (負荷)	0-10 mL	10-20mL	20-30 mL	
回収率	0	94	1	tr	95

Presep-Cシリカゲル (充てん量 800 mg、和光純薬工業製)

添加量 : 1 µg

カラムによる精製の検討では、ケイソウ土カラム、グラファイトカーボンミニカラム、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム及びシリカゲルミニカラムで良好な回収率が得られた。これらのカラムの中で、ケイソウ土カラムは溶出バンドが広いと、回収が安定的に得られない可能性が示唆され、その後に必要となる脱脂操作においてピリミスルファンの器壁への残留が懸念されるため、採用しなかった。

水溶性が高い夾雑物と脂溶性の高い夾雑物を除く目的でオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムを採用した。液々分配(転溶)に比べ夾雑物の除去効果が高いことを期待したものである。

茶試料では色素等の夾雑物が多いため、グラファイトカーボンミニカラムを用いて抽出液を粗精製することとした。茶以外の農作物では、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム及びシリカゲルミニカラムにより十分な精製効果が得られた。りんごのように比較的夾雑物の少ない試料の場合はシリカゲルミニカラム精製を省略し、ODSカラム精製のみで定量することも可能であった。

大豆試料についてシリカゲルミニカラム精製での負荷の際、試料残留物を有機溶媒に溶解する工程で夾雑物が妨害となってピリミスルファンが十分溶解しないために、回収率の低下やばらつきの要因となった。試料残留物が有機溶媒に十分溶解するように留意しつつ超音波処理の操作を繰り返し行うことで回収率が安定した。よってシリカゲルミニカラム精製では試料残留物にアセトン1 mLを加え、超音波処理した後、*n*-ヘキサン19 mLを加えて負荷し、次の溶出溶媒でも超音波処理して容器を洗い込む方法を採用した。なお、溶出溶媒について、アセトン含有率15%の時、初めの10 mLで76%、次の10 mLで25%が溶出した。ピリミスルファンは*n*-ヘキサン溶解度が低いと、試料共存下で洗い込みが不十分になる可能

性があること及び溶出ずれで回収率が低下する可能性があることを懸念し、アセトン含有率15%は採用しなかった。また、アセトン含有率30%は溶出溶媒量が少ないことから採用した。

3) その他のデータ

本分析法では採用しなかったが、その他の検討事項を①～③に示した。

① 脱水剤

各溶媒50 mLにピリミスルファン1 µgを添加し、無水硫酸ナトリウム50 g又は液相分離ろ紙を載せたガラス漏斗を用いてろ過した後、漏斗上を同溶媒20 mLで洗浄した。全溶出液を減圧濃縮及び窒素乾固後定量し、回収率を求めた。無水硫酸ナトリウムには顕著な損失が認められたため、脱水剤としては不適當であると判断した。また、*n*-ヘキサン溶液中では液相分離ろ紙にも損失が認められるため、*n*-ヘキサンを用いた転溶においては脱水操作が困難であることが示唆された。酢酸エチルにおいては、液相分離ろ紙を用いての脱水操作が可能であることが示唆された。結果をTable9に示した。

溶媒	ろ過剤	回収率 (%)
<i>n</i> -ヘキサン	無水硫酸ナトリウム	0
	液相分離ろ紙	65
酢酸エチル	無水硫酸ナトリウム	73
	液相分離ろ紙	101

② 酢酸エチルへの転溶

ピリミスルファン1 µgに10%塩化ナトリウム100 mLを加え、酢酸エチル100 mL及び50 mLで2回振とう抽出を行った。結果をTable10に示した。酸性及び中性では、酢酸エチルでの1回転溶で良好な回収率が得られた。

水層	100 mL	50 mL	合計
	(1回目)	(2回目)	
10%塩化ナトリウム 100 mL	101	0	101
10%塩化ナトリウム 100 mL+リン酸 1 mL	99	0	99

③ アセトニトリル/ヘキサン分配

ピリミスルファン1 µgを窒素乾固後、*n*-ヘキサン30 mLに溶解し、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル30 mLで3回抽出を行った。結果をTable11に示した。アセトニトリル/ヘキサン分配で十分な回収率が得られた。ただし、ピリミスルファンは器壁に残存する傾向が見られたため、この点に留意が必要である。

	<i>n</i> -ヘキサン飽和アセトニトリル			合計
	30 mL (1回目)	30 mL (2回目)	30 mL (3回目)	
回収率	90	0	0	90

3. 添加回収試験

玄米、大豆、ばれいしょ、ほうれんそう、キャベツ、りんご、オレンジ及び茶の8品目にコーヒー生豆及びごまを加えた10品目を試料とした。

ピリミスルファンを玄米は0.05 ppm、玄米以外は0.01 ppm相当添加し、[実験方法]6の分析法に従って添加回収試験を行った。

ピリミスルファンの真度は84～112%、併行精度は2～13%であり、良好な回収率が得られた。結果をTable12に示した。

Table12 添加回収試験結果

試料	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)					真度 (%)	併行精度 (RSD%)
		1	2	3	4	5		
玄米	0.05	102	101	89	96	97	97	5.3
大豆	0.01	82	72	95	88	100	87	12.6
ばれいしょ	0.01	103	88	92	91	90	93	6.3
ほうれんそう	0.01	103	107	97	96	78	96	11.6
キャベツ	0.01	97	97	96	95	103	98	3.2
りんご	0.01	88	91	87	87	87	88	2.0
オレンジ	0.01	108	109	112	119	112	112	3.8
茶	0.01	115	107	114	109	114	112	3.2
コーヒー生豆	0.01	93	74	83	86	84	84	8.1
ごま	0.01	109	110	110	107	113	110	2.0

4. 試料マトリックスの測定への影響

試料由来の夾雑物質による測定への影響を把握するために、[実験方法]7に従ってマトリックス添加標準溶液を調製し、溶媒標準溶液に対するマトリックス添加標準溶液のピーク高の比を求めた。

ごま試料で添加濃度 0.01 ppm 相当に設定した場合、試料マトリックスの影響による促進が認められた。その他の試料では良好な結果が得られた。

結果をTable13に示した。

Table13 試料マトリックスの測定への影響

試料	添加濃度 (ppm)	ピリミスルファン
玄米	0.05	110
大豆	0.01	106
ばれいしょ	0.01	103
ほうれんそう	0.01	112
キャベツ	0.01	108
りんご	0.01	102
オレンジ	0.01	100
茶	0.01	111
コーヒー生豆	0.01	109
ごま	0.01	120

数値 (%) : (マトリックス標準溶液のピーク高/標準溶液のピーク高) × 100

5. 無添加試料の妨害状況

農産物10品目の何れの試料においても妨害ピークは認められなかった。ピリミスルファンのクロマトグラムを図4に示した。参考データとして、ポジティブモードにおけるピリミスルファンのクロマトグラムを図8に示した。

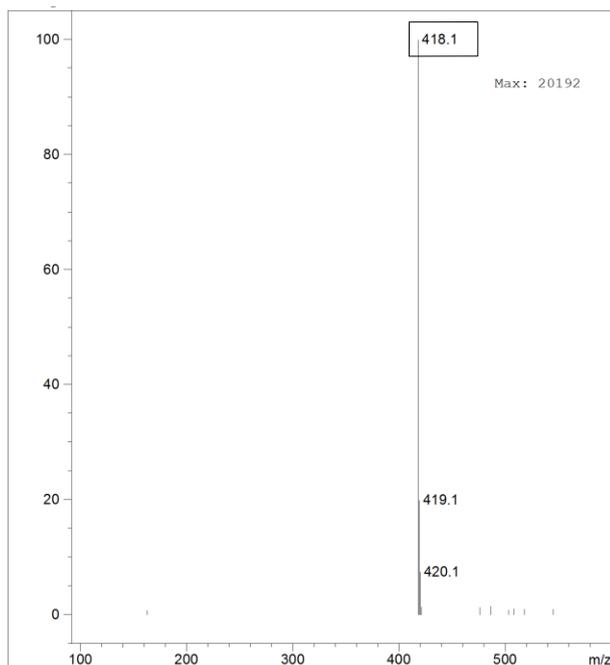
[結論]

ピリミスルファンを試料からアセトンで抽出し、グラファイトカーボン（茶試料のみ）、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム及びシリカゲルミニカラムで精製した後、LC-MSで定量及び確認する方法を提案する。

この試験法を玄米、大豆、ばれいしょ、ほうれんそう、キャベツ、りんご、オレンジ、茶、コーヒー生豆及びごまに適用した場合、ピリミスルファンの真度は84～112%、併行精度は2～13%であり、定量限界は0.01 mg/kgが可能であることが確認できた。

[参考文献]

ピリミスルファン農薬抄録



スキャン範囲：100～600 m/z

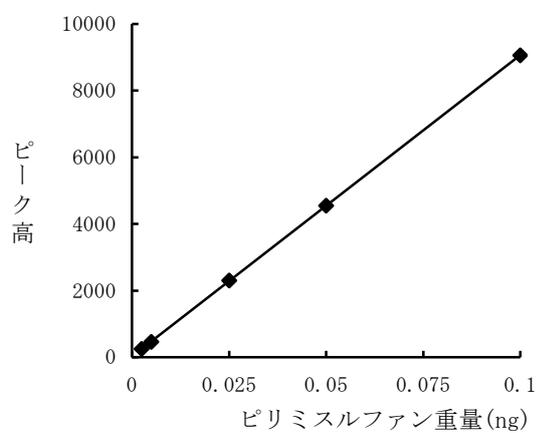
測定条件

イオン化モード：ESI (-)

キャピラリー電圧 (V)：-3000

フラグメンター電圧 (V)：100

図1 ピリミンスルファンのマススペクトル (ネガティブイオンモード)



データ処理装置設定条件の一例

機種 (メーカー)：ChemStation

(Agilent Technologies製)

ピークの定量方法：ピーク高法

検量線の種類：最小二乗法

検量線基準ピークの重量：0.0025 ng～0.1 ng

$$y = ax + b$$

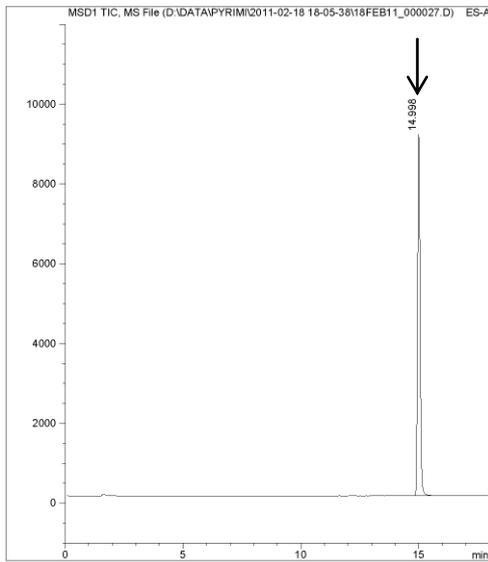
$$a : 9.04433E+04$$

$$b : 23.62086$$

$$r = 0.99999$$

図2 ピリミンスルファン検量線 (ネガティブイオンモード) (一例)

標準品0.1 ng



標準品0.005 ng

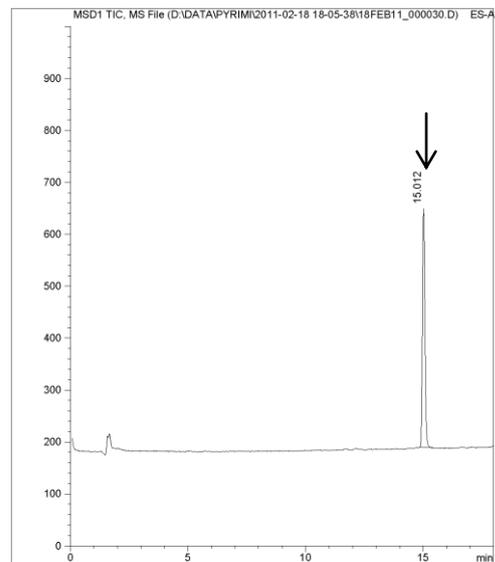
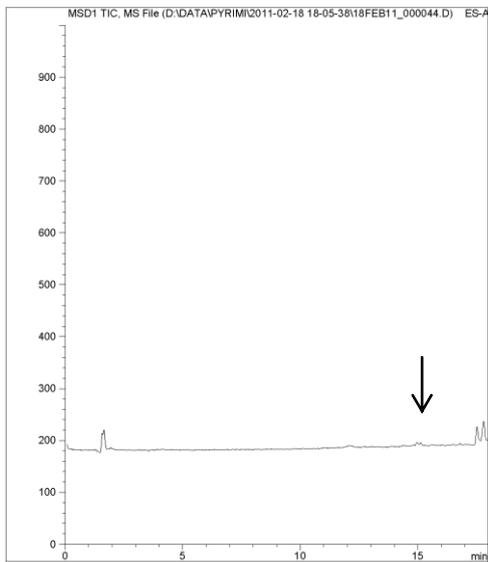


図3 ピリミスルファン標準溶液のクロマトグラム（ネガティブイオンモード）（一例）

玄米 無添加



玄米 0.05 ppm添加

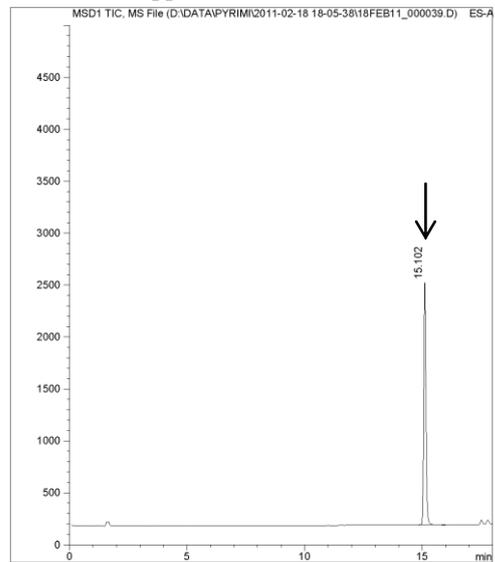
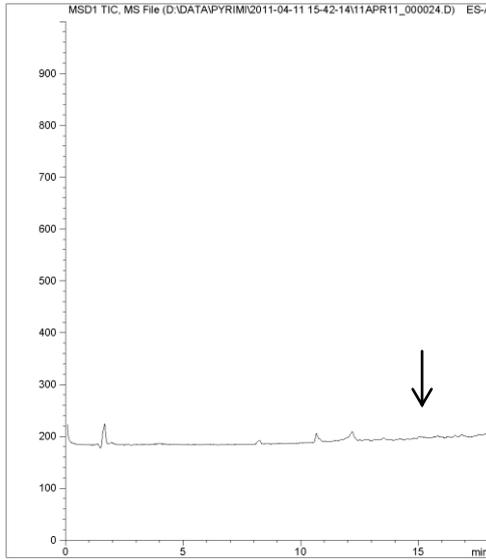
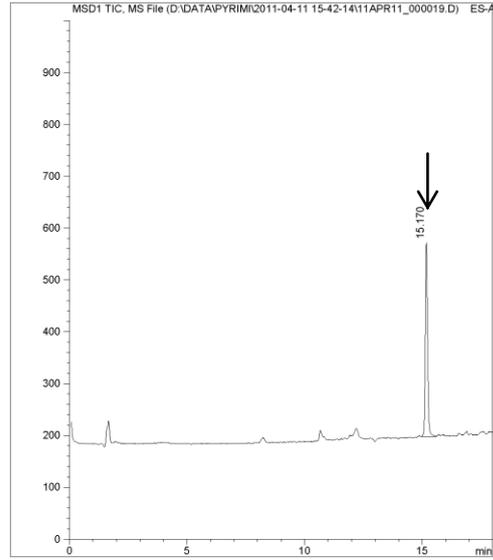


図 4-1 ピリミスルファンの試料のクロマトグラム（ネガティブイオンモード）

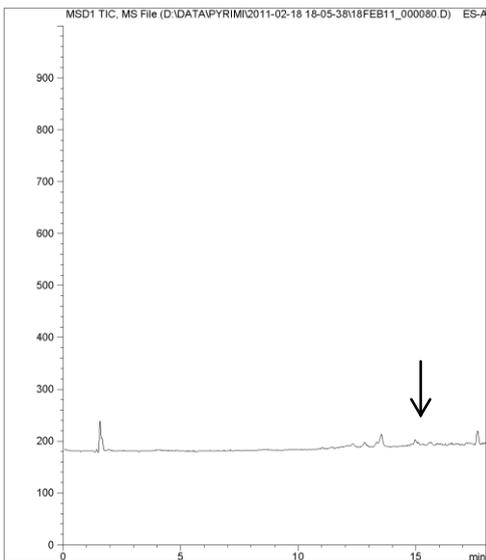
大豆 無添加



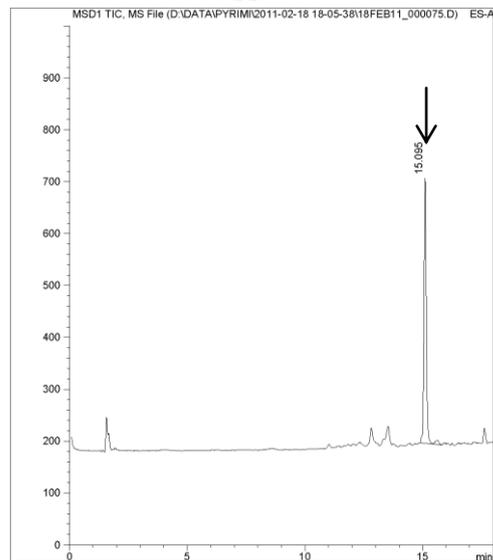
大豆 0.01 ppm添加



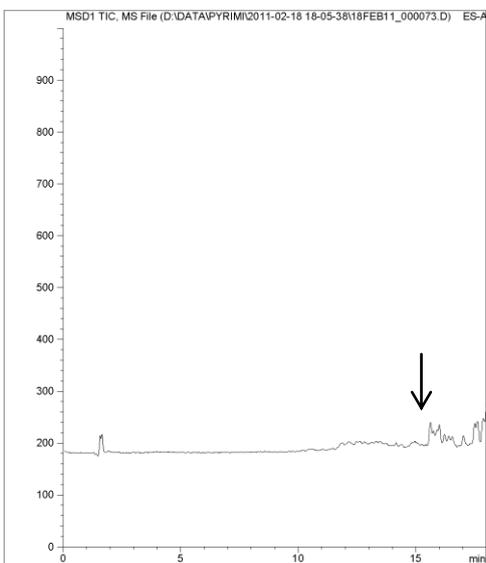
ばれいしょ 無添加



ばれいしょ 0.01 ppm添加



ほうれんそう 無添加



ほうれんそう 0.01 ppm添加

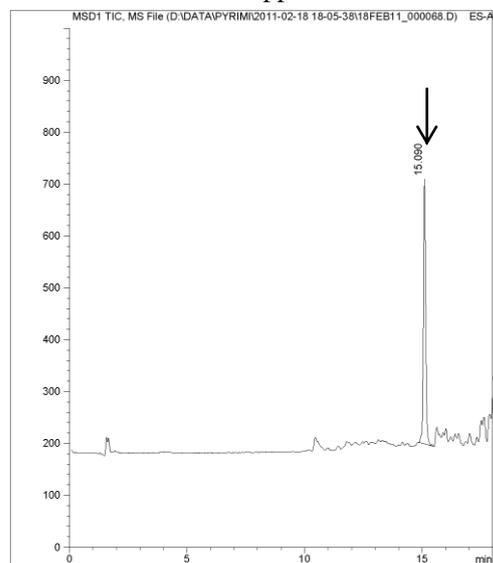
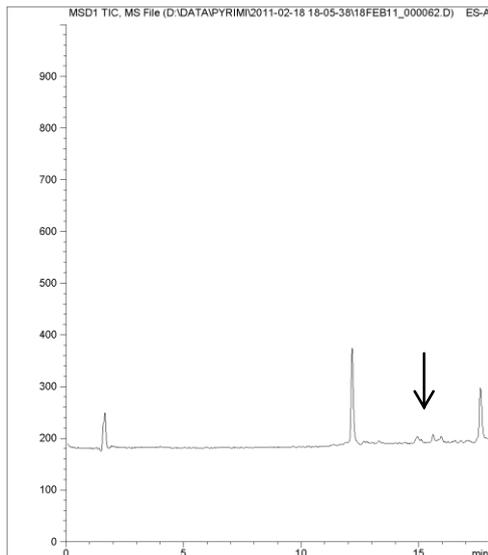
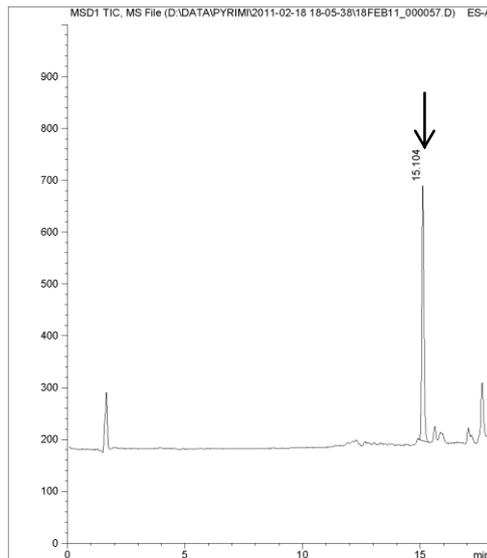


図 4-2 ピリミスルファンの試料のクロマトグラム (ネガティブイオンモード)

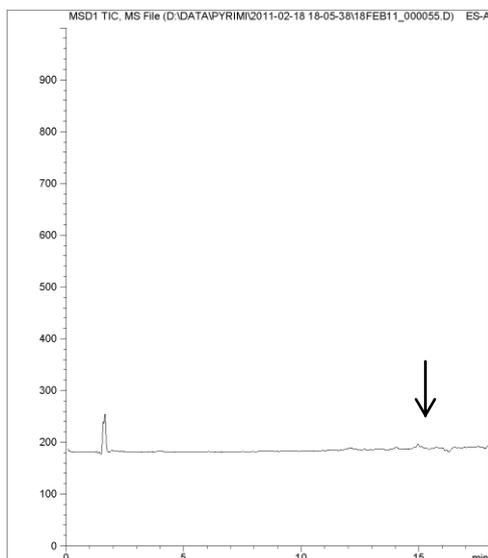
キャベツ 無添加



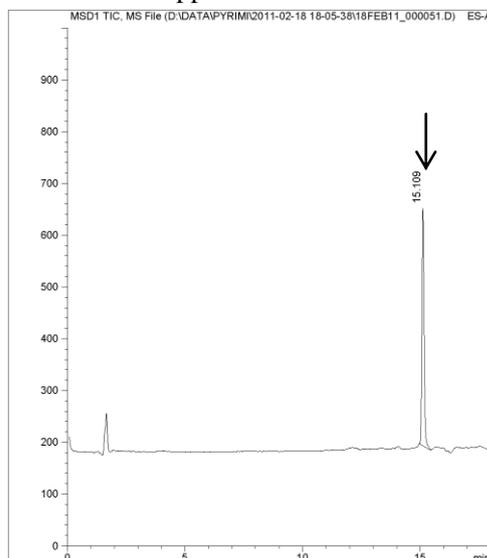
キャベツ 0.01 ppm添加



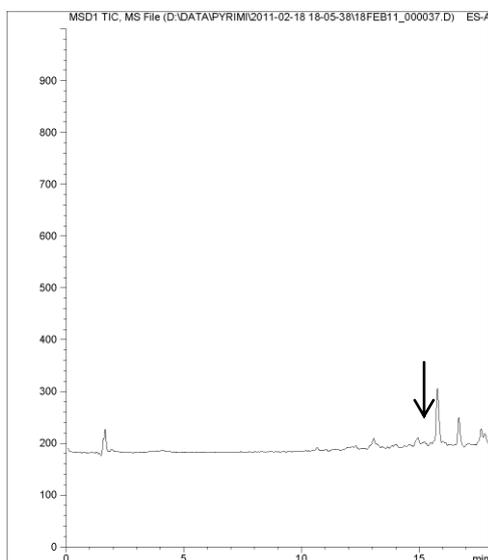
りんご 無添加



りんご 0.01 ppm添加



オレンジ 無添加



オレンジ 0.01 ppm添加

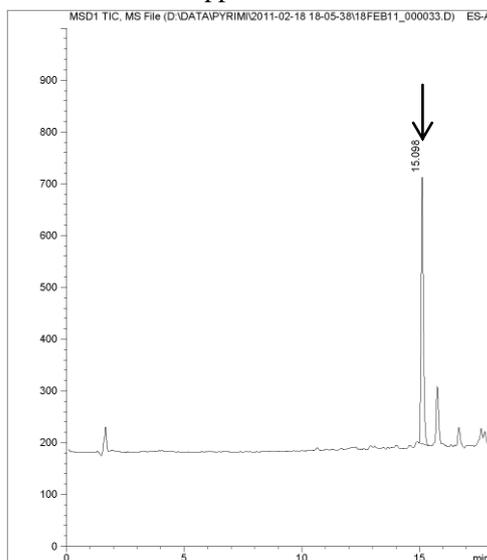
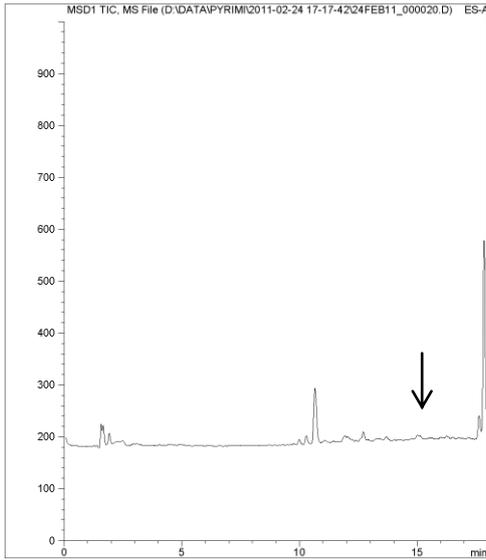
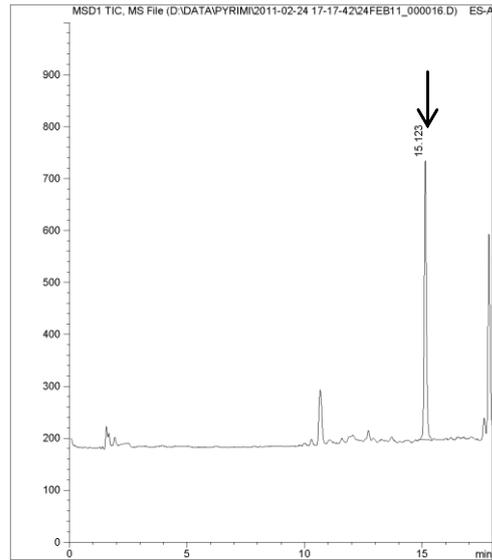


図 4-3 ピリミルスルファンの試料のクロマトグラム (ネガティブイオンモード)

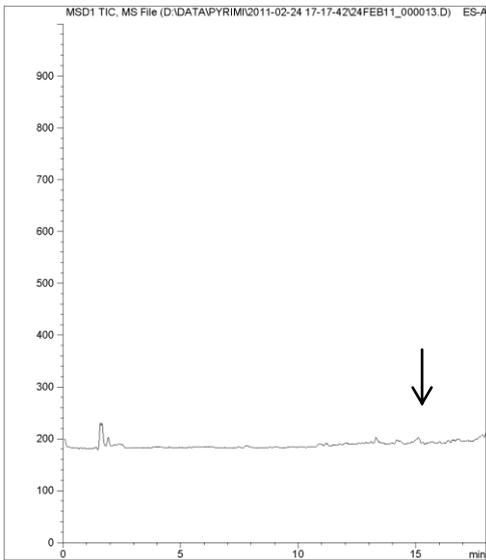
茶 無添加



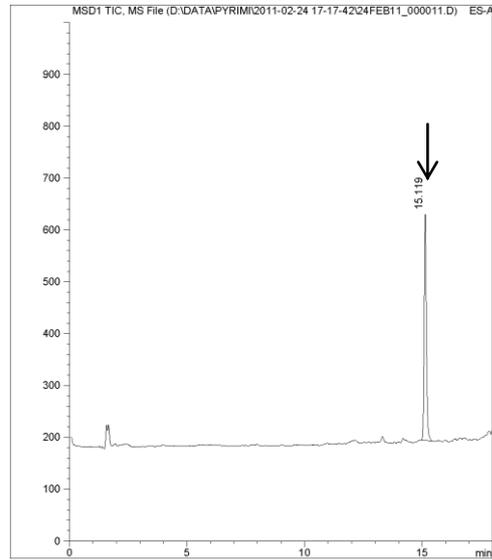
茶 0.01 ppm添加



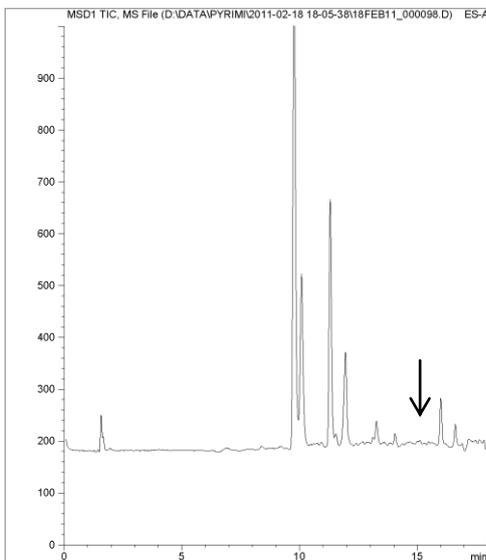
コーヒー生豆 無添加



コーヒー生豆 0.01 ppm添加



ごま 無添加



ごま 0.01 ppm添加

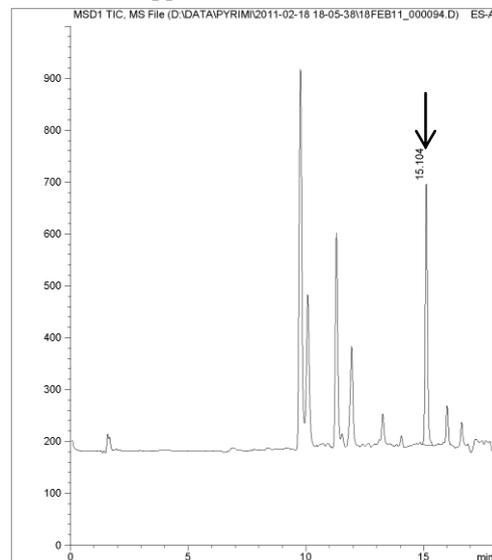
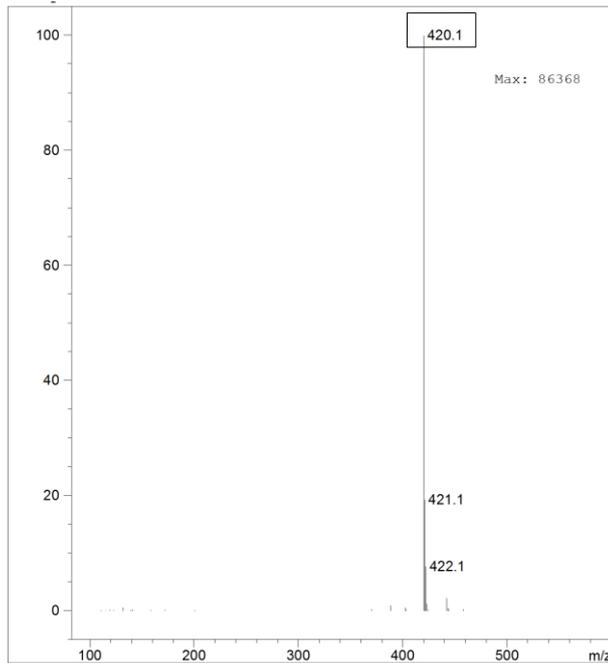


図 4-4 ピリミスルファンの試料のクロマトグラム (ネガティブイオンモード)



スキャン範囲：100～600 m/z

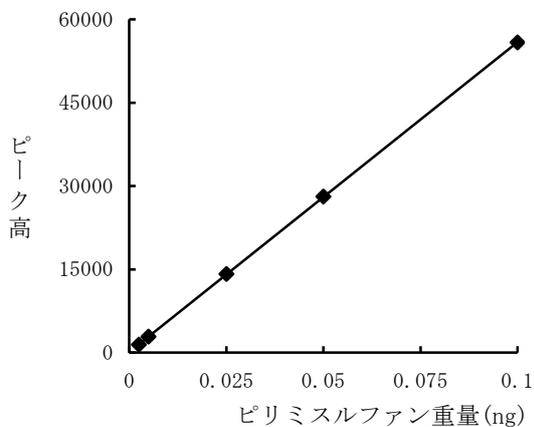
測定条件

イオン化モード：ESI (+)

キャピラリー電圧 (V)：3500

フラグメンター電圧 (V)：100

図5 ピリミスルファンのマススペクトル (ポジティブイオンモード)



データ処理装置設定条件の一例

機種 (メーカー)：ChemStation

(Agilent Technologies製)

ピークの定量方法：ピーク高法

検量線の種類：最小二乗法

検量線基準ピークの重量：0.0025 ng～0.1 ng

$$y = ax + b$$

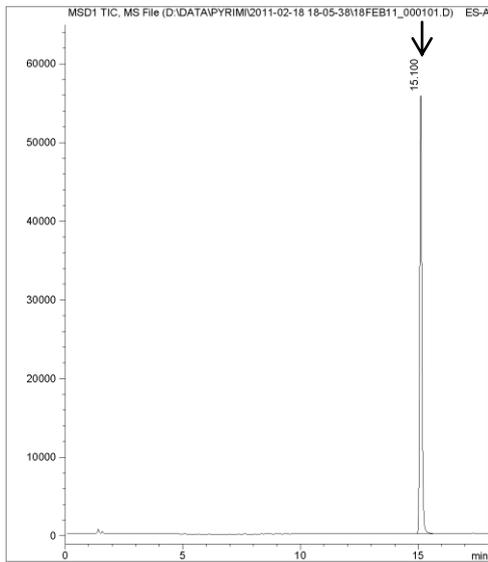
$$a : 5.57815E+05$$

$$b : 137.95208$$

$$r = 1.00000$$

図6 ピリミスルファン検量線 (ポジティブイオンモード) (一例)

標準品0.1 ng



標準品0.005 ng

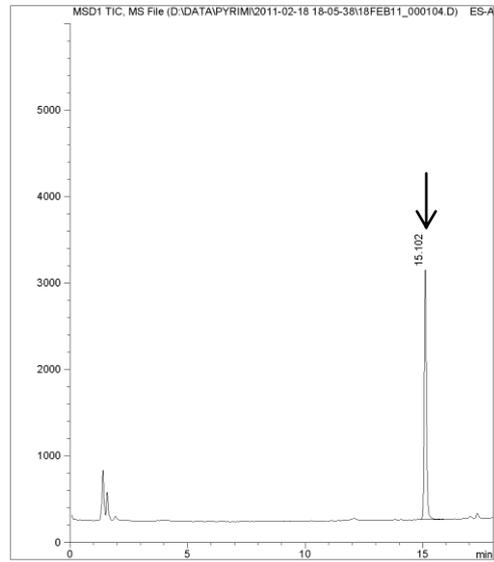
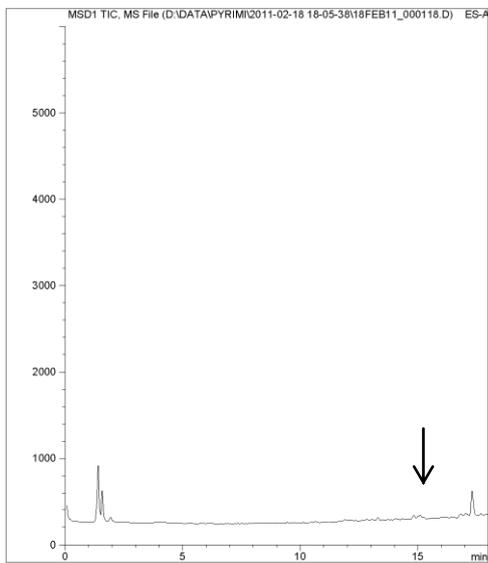


図7 ピリミスルファン標準溶液のクロマトグラム (ポジティブイオンモード) (一例)

玄米 無添加



玄米 0.05 ppm添加

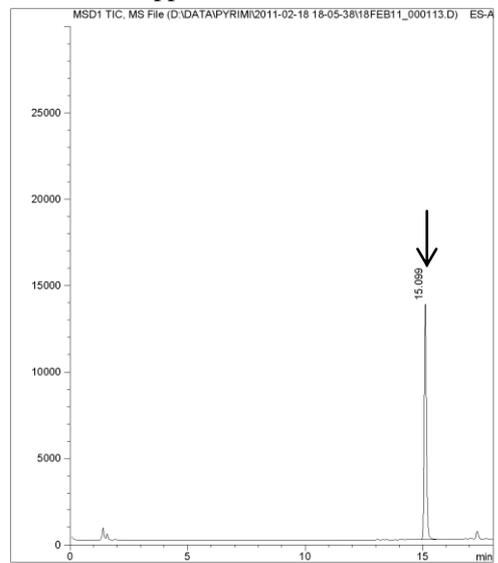
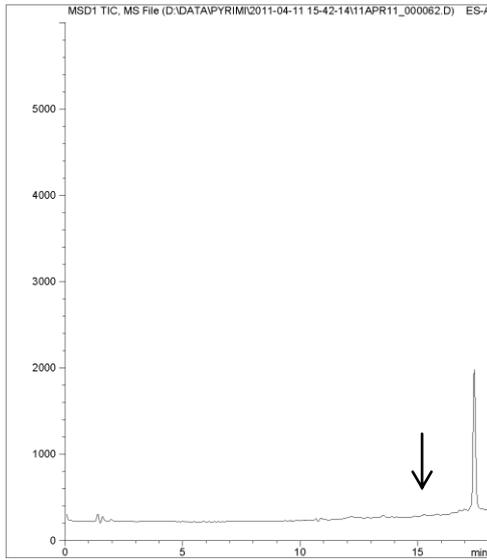
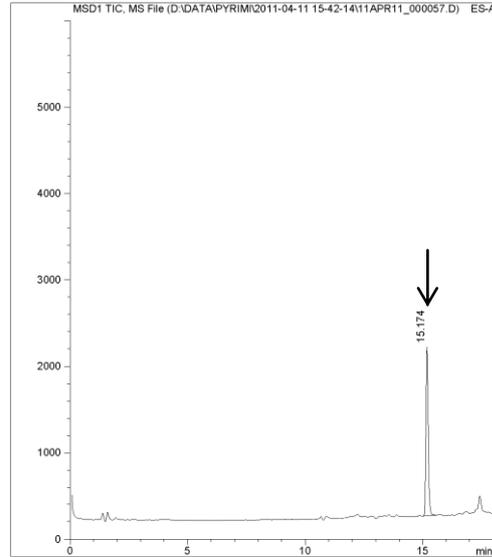


図 8-1 ピリミスルファンの試料のクロマトグラム (ポジティブイオンモード)

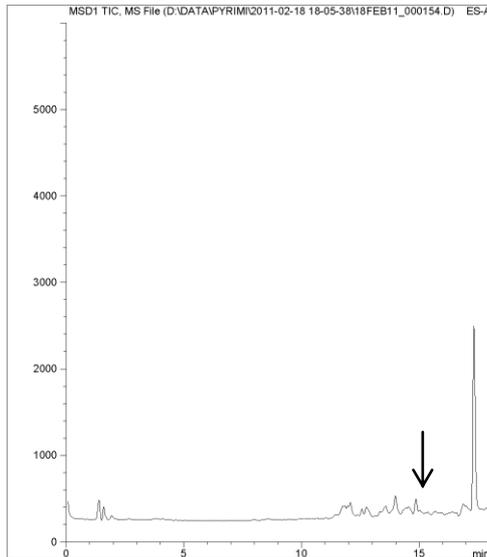
大豆 無添加



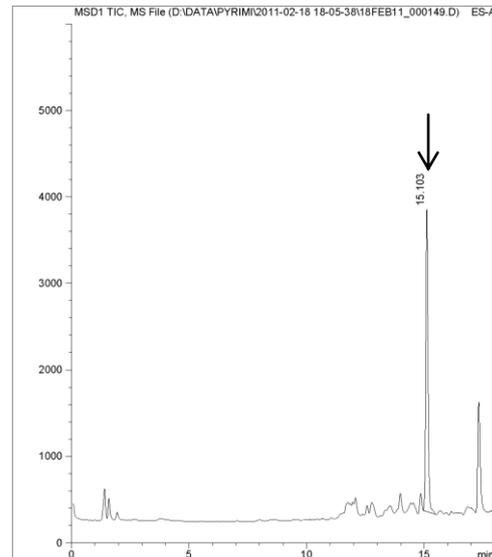
大豆 0.01 ppm添加



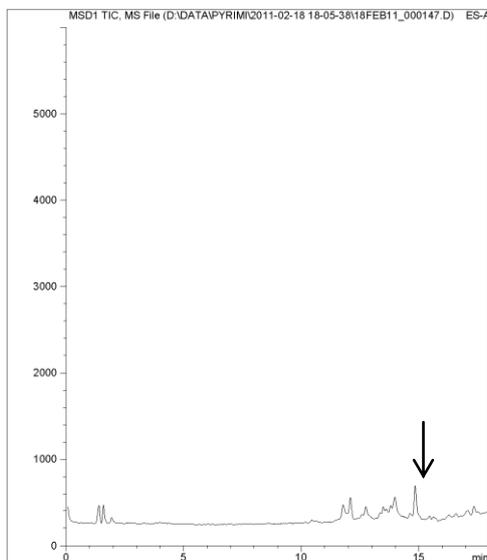
ばれいしよ 無添加



ばれいしよ 0.01 ppm添加



ほうれんそう 無添加



ほうれんそう 0.01 ppm添加

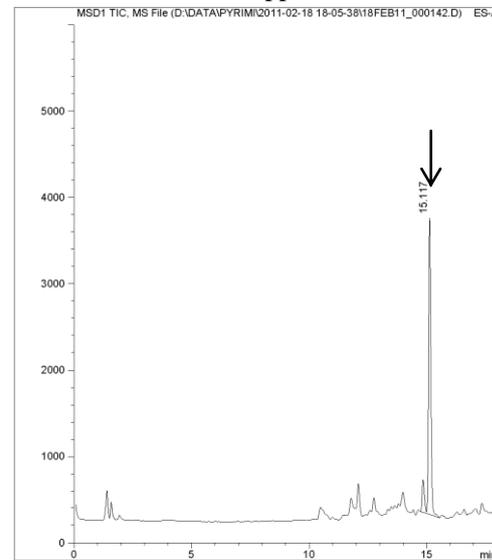
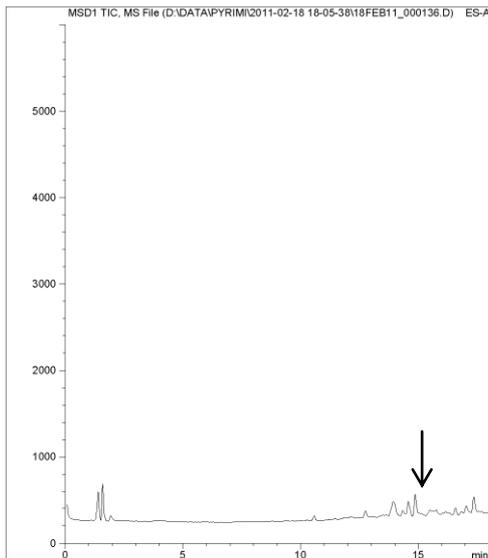
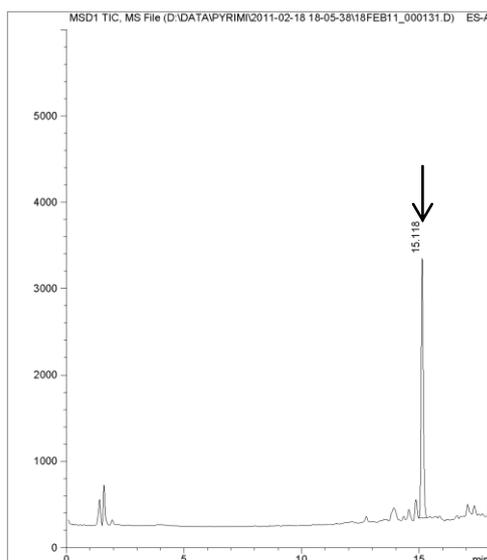


図 8-2 ピリミルスルファンの試料のクロマトグラム (ポジティブイオンモード)

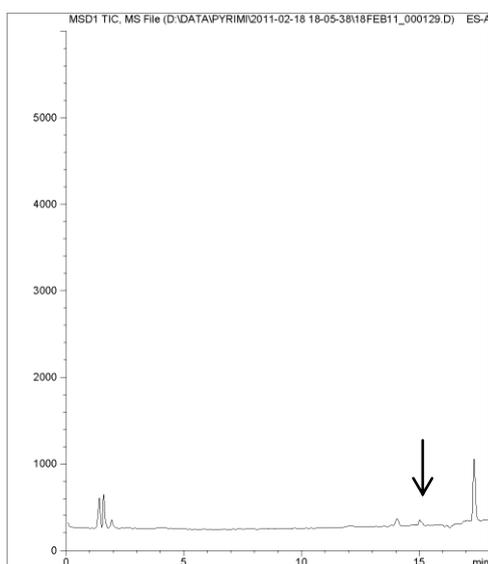
キャベツ 無添加



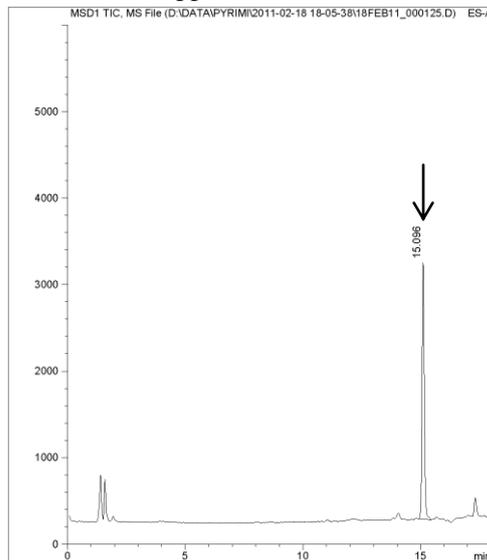
キャベツ 0.01 ppm添加



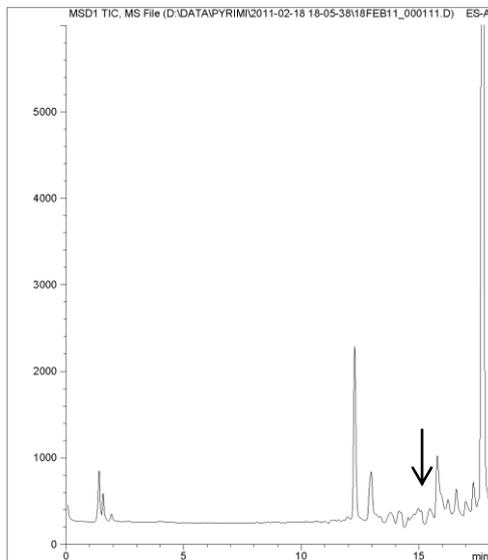
りんご 無添加



りんご 0.01 ppm添加



オレンジ 無添加



オレンジ 0.01 ppm添加

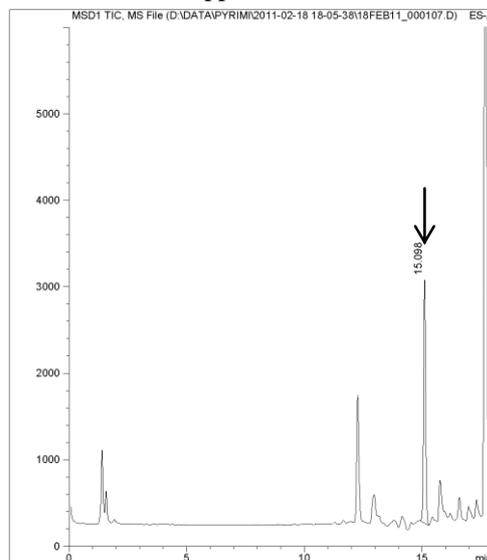
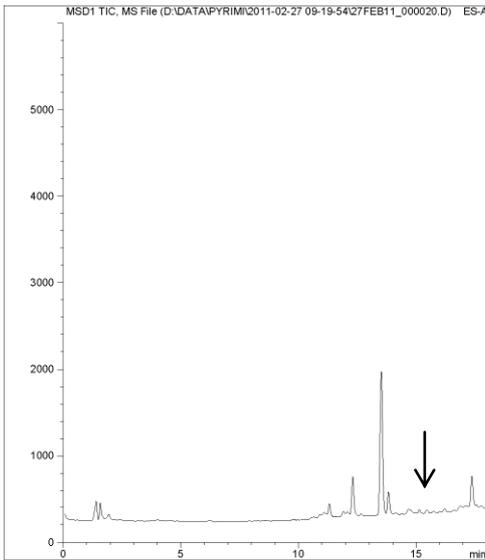
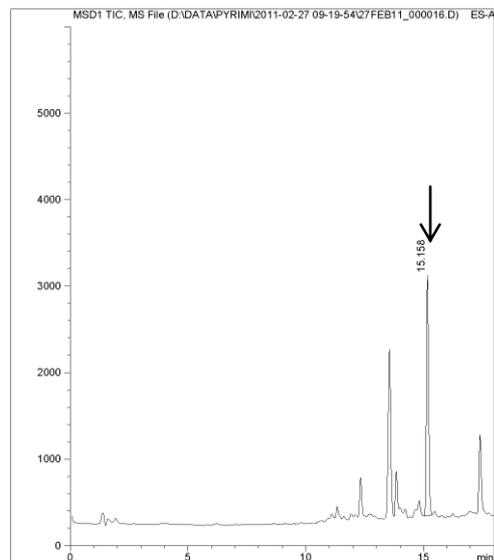


図 8-3 ピリミスルファンの試料のクロマトグラム (ポジティブイオンモード)

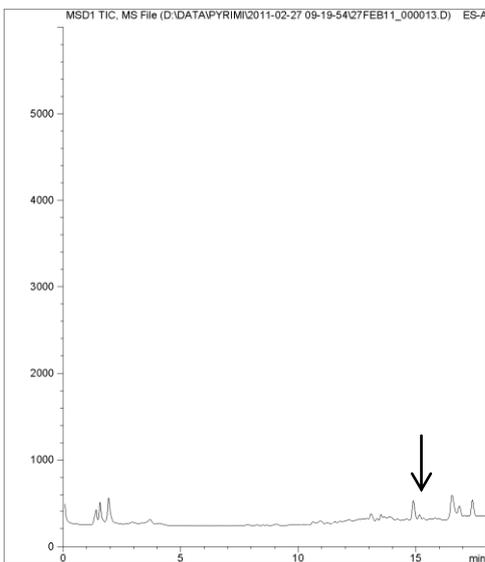
茶 無添加



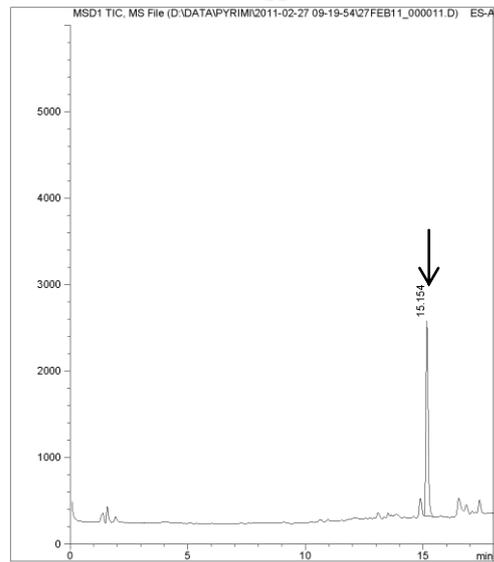
茶 0.01 ppm添加



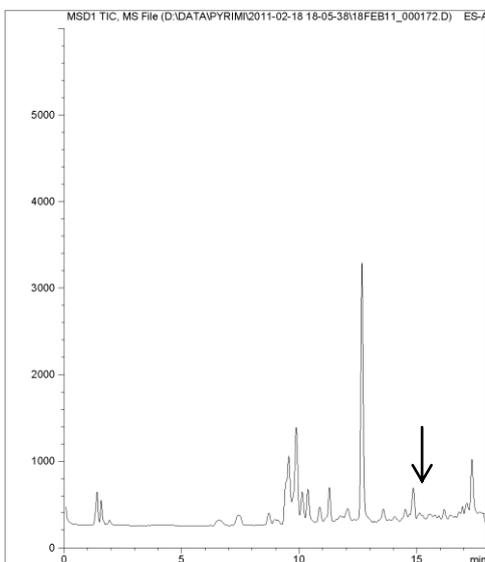
コーヒー生豆 無添加



コーヒー生豆 0.01 ppm添加



ごま 無添加



ごま 0.01 ppm添加

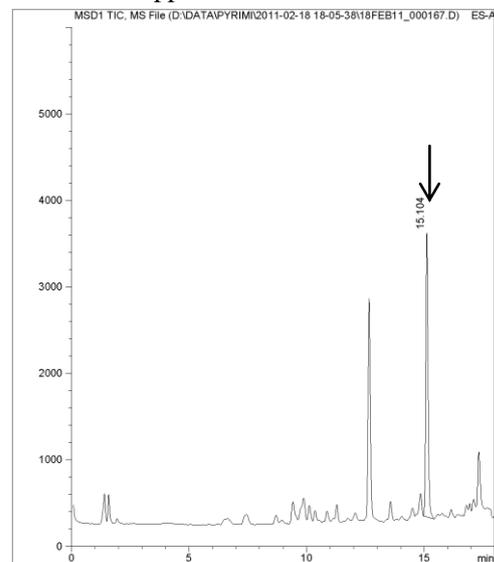


図 8-4 ピリミスルファンの試料のクロマトグラム (ポジティブイオンモード)