

※本報告書は、試験法開発における検討結果をまとめたものであり、試験法の実施に際して参考として下さい。なお、報告書の内容と通知または告示試験法との間に齟齬がある場合には、通知または告示試験法が優先することをご留意ください。

# 食品に残留する農薬等の成分である物質の 試験法開発事業報告書

メタゾスルフロン試験法  
(農産物)

## [緒言]

### 1. 目的及び試験法の検討方針

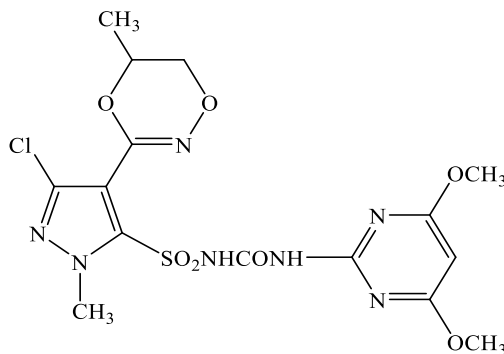
メタゾスルフロンは、日産化学工業（株）で開発されたスルホニルウレア系の除草剤であり、ノビエを含めた一年生雑草のみならず、イヌホタルイ等の多年草に対しても高い効果を示す。また、従来のスルホニルウレア系除草剤に抵抗性を示すイヌホタルイ、オモダカ等に対しても有効である。作用機構として、分岐アミノ酸（バリン、ロイシン及びイソロイシン）の生合成系酵素であるアセト乳酸合成酵素（アセトラクテートシンターゼ）の活性を阻害することにより発現するものと考えられている。

本検討においては、通知一斉試験法 [LC/MS による農薬等の一斉試験法 I（農産物）] 及び [LC/MS による農薬等の一斉試験法 II（農産物）] の適用を試みたが、良好な結果が得られなかったことから、新たに個別試験法を開発した。

### 2. 分析対象化合物の構造式及び物理化学的性質

分析対象化合物：メタゾスルフロン

構造式：



分子式：C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>ClN<sub>7</sub>O<sub>7</sub>S

CAS：868680-84-6

分子量：475.86（モノアイソトピック質量：475.0677）

化学名：

IUPAC 名：1-{3-chloro-1-methyl-4-[(5RS)-5,6-dihydro-5-methyl-1,4,2-dioxazin-3-yl]pyrazol-5-ylsulfonyl}-3-(4,6-dimethoxypyrimidin-2-yl) urea

CAS 名：3-chloro-4-(5,6-dihydro-5-methyl-1,4,2-dioxazin-3-yl)-N-[[4,6-dimethoxy-2-pyrimidinyl]amino] carbonyl]-1-methyl-1H-pyrazole-5-sulfonamide

外観：白色、結晶性固体、無臭

融点：175.5~177.6°C（分解）

蒸気圧：7.0×10<sup>-8</sup>Pa（25°C）、3.6×10<sup>-8</sup>Pa（20°C）

溶解性：蒸留水：33.3 mg/L、ヘキサン：6.738 mg/L、トルエン：3.150 g/L、ジクロロメタン：177.3 g/L、アセトン：61.72 g/L、酢酸エチル：27.88 g/L、メタノール 2.533 g/L、1-オクタノール：0.6944 g/L

1-オクタノール/水分配係数（log Pow）：pH4.0：1.87（25°C）、pH7.0：-0.349（25°C）、pH9.0：-0.584（25°C）

解離定数（pKa）：3.4（20°C）

安定性：150°C以下で熱に安定、185°C付近より熱分解を伴い融解

[出典：農薬抄録 一般名：メタゾスルフロン]

(<http://www.acis.famic.go.jp/syouroku/metazosulufuron/index.htm>)

### 3. 基準値

適用作物は水稻である。JMPR における毒性評価はなされておらず、国際基準も設定されていない。

米国、カナダ、欧州連合（EU）、オーストラリア及びニュージーランドにおいても基準値は設定されていない。韓国では、米に 0.05 ppm の基準値が設定されている。わが国では、食品衛生法の規格基準で、米（玄米）に 0.05 ppm の基準値が設定されている。

## 〔実験方法〕

### 1. 試料

試料は、埼玉県内で市販されていた 1) 玄米、2) 大豆、3) ほうれんそう、4) キャベツ、5) ばれいしょ、6) オレンジ、7) りんご及び 8) 緑茶を用いた。

各食品の試料採取の方法を以下に示した。

- 1) 玄米：粉砕機を用いて 425  $\mu\text{m}$  の標準網ふるいを通るように粉砕し均一化した。
- 2) 大豆：粉砕機を用いて 425  $\mu\text{m}$  の標準網ふるいを通るように粉砕し均一化した。
- 3) ほうれんそう：赤色根部を含み、ひげ根及び変質葉を除去し、細切したのち粉砕機を用いて磨砕化した。
- 4) キャベツ：外側変質葉及びしんを除去したもの 4 個をそれぞれ 4 等分し、各々から 1 等分を集め、細切したのち粉砕機を用いて磨砕化した。
- 5) ばれいしょ：泥を水で軽く洗い落とし、細切したのち粉砕機を用いて磨砕化した。
- 6) オレンジ：果実全体を細切したのち粉砕機を用いて磨砕化した。
- 7) りんご：花おち、しん及び果梗の基部を除去し、細切したのち粉砕機を用いて磨砕化した。
- 8) 緑茶：粉砕機を用いて 425  $\mu\text{m}$  の標準網ふるいを通るように粉砕し均一化した。

### 2. 試薬・試液

メタゾスルフロン標準品：日産化学工業（株）より提供され、純度 99.9% のものを使用した。

アセトン及び *n*-ヘキサン： 残留農薬試験用（和光純薬工業（株）製）

アセトニトリル及び蒸留水：高速液体クロマトグラフ用（和光純薬工業（株）製）

ケイソウ土：ハイフロスーパーセル（和光純薬工業（株）製）

グラファイトカーボン/エチレンジアミン-N-プロピルシリル化シリカゲルミニカラム：InertSepGC/P SA（500 mg/500 mg、GL サイエンス社製）

標準原液：メタゾスルフロン標準品 100 mg を精秤し、アセトンに溶解して 100 mL としたものを標準原液とした。

検量線用標準溶液：標準原液をアセトニトリル：水（1：1）混液で適宜希釈し、0.0005～0.015 mg/L の濃度の溶液を調製した。

添加用標準溶液：標準原液をアセトンで希釈して 0.5 mg/L 及び 0.1 mg/L 溶液を調製した。

### 3. 装置

装 置	型 式	会 社
粉砕機	FP-25	Cuisinart
ホモジナイザー	ヒスコトロン	マイクロテック・ニチオン
ロータリーエバポレーター	R-210	Buchi
遠心分離器	テーブルトップ遠心機 4000	KUBOTA

### LC-MS/MS

装 置	型 式	会 社
MS	Xevo TQ-S micro	Waters
LC	ACQUITY UPLC	Waters
データ処理	MassLynx Ver.4.1	Waters

#### 4. 測定条件

以下に測定条件を示した。

##### LC-MS/MS

LC 条件																																
カラム	Inertsil ODS-3 (内径 2.1 mm、長さ 100 mm、粒子径 3 $\mu$ m : GL サイエンス製)																															
移動相流速 (mL/min)	0.2																															
注入量 ( $\mu$ L)	5																															
カラム温度 ( $^{\circ}$ C)	40																															
移動相	A 液 : 水 B 液 : アセトニトリル C 液 : 2 vol% 酢酸																															
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> <th>C 液 (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.0</td> <td>45</td> <td>50</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>0.5</td> <td>45</td> <td>50</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>10</td> <td>5</td> <td>90</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>13</td> <td>5</td> <td>90</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>13.1</td> <td>45</td> <td>50</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>15</td> <td>45</td> <td>50</td> <td>5</td> </tr> </tbody> </table>				時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)	C 液 (%)	0.0	45	50	5	0.5	45	50	5	10	5	90	5	13	5	90	5	13.1	45	50	5	15	45	50	5
	時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)	C 液 (%)																												
	0.0	45	50	5																												
	0.5	45	50	5																												
	10	5	90	5																												
	13	5	90	5																												
	13.1	45	50	5																												
15	45	50	5																													
MS 条件																																
測定モード	SRM																															
イオン化モード	ESI (+)																															
キャピラリ電圧 (kV)	3.3																															
ソース温度 ( $^{\circ}$ C)	150																															
脱溶媒温度 ( $^{\circ}$ C)	500																															
コーンガス	窒素、50 L/hr																															
脱溶媒ガス	窒素、1000 L/hr																															
コリジョンガス	アルゴン																															
定量イオン ( $m/z$ )	MS/MS: +476 $\rightarrow$ 182 [コーン電圧 55 (V)、コリジョンエネルギー16 (eV)]																															
定性イオン ( $m/z$ )	MS/MS: +478 $\rightarrow$ 182 [コーン電圧 55 (V)、コリジョンエネルギー15 (eV)]																															
保持時間 (min)	9.2																															

#### 5. 定量

メタゾスルフロンの標準原液をアセトニトリル及び水 (1 : 1) 混液で希釈して 0.0005~0.015 mg/L の標準溶液を調製した。この溶液 5  $\mu$ L を LC-MS/MS に注入して、得られたピーク面積を用いて検量線を作成した。試験溶液 5  $\mu$ L を LC-MS/MS に注入し、検量線から絶対検量線法によりメタゾスルフロンの含量を算出した。

#### 6. 添加試料の調製

玄米 (添加濃度 : 0.05 ppm) : 試料 10.0 g に 0.5 mg/L の添加用標準溶液 1 mL を添加しよく混合し 30 分間放置した。

大豆 (添加濃度 : 0.01 ppm) : 試料 10.0 g に 0.1 mg/L の添加用標準溶液 1 mL を添加しよく混合し 30 分間放置した。

野菜及び果実（添加濃度：0.01 ppm）：試料 20.0 g に 0.1 mg/L の添加用標準溶液 2 mL を添加しよく混合し 30 分間放置した。

茶（添加濃度：0.01 ppm）：試料 5.00g に 0.1mg/L の添加用標準溶液 0.5mL を添加してよく混合し 30 分間放置した。

## 7. 試験溶液の調製

### 概要

メタゾスルフロンを試料からアセトンで抽出し、塩酸酸性下、飽和塩化ナトリウム及び*n*-ヘキサンを加え液-液分配抽出により有機層を得る。これをグラファイトカーボン/エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムで精製した後、LC-MS/MSで定量及び確認した。

#### (1) 抽出

野菜及び果実の場合は試料 20.0 g を採った。穀類及び豆類の場合は試料 10.0 g、茶の場合は試料 5.00 g を採り、それぞれ水 20 mL を加え、30 分間放置した。これにアセトン 100 mL を加えてホモジナイズした後、ケイソウ土を敷いたろ紙（直径 60 mm、No.5B、桐山製作所製）を用いて吸引ろ過した。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、上記と同様にろ過した。ろ液を合わせ、アセトンを加えて正確に 200 mL とした。

この液 10 mL を正確に量り採り、2 mol/L 塩酸 0.2 mL、飽和塩化ナトリウム溶液 10 mL 及び *n*-ヘキサン 10 mL を加えて振とう抽出した。これを、毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離し、上層を得た。

#### (2) 精製

##### ①グラファイトカーボン/エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲル積層カラムクロマトグラフィ

グラファイトカーボン/エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム [Inert Sep GC/PSA (500 mg/500 mg)] にアセトン及び*n*-ヘキサン各10 mLを順次注入し、流出液は捨てた。このカラムに (1) で得られた液を注入した後、さらにアセトン10 mLを注入し、流出液は捨てた。ついで5 vol%ギ酸・アセトン10 mLを注入し、溶出液を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水 (1:1) 混液5 mL (穀類、豆類及び種実類の場合は2.5 mL、茶の場合は1.25 mL) で溶解したものを試験溶液とした。

[分析法フローチャート]

秤 取

- ↓ 野菜及び果実： 試料 20.0 g
- ↓ 穀類及び豆類： 試料 10.0 g に水 20 mL を加え 30 分間放置
- ↓ 茶： 試料 5.00 g に水 20 mL を加え 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
- ↓ 残留物はアセトン 50 mL を加えホモジナイズ
- ↓ 吸引ろ過
- ↓ ろ液を合わせる
- ↓ アセトンを加え正確に 200 mL とする

抽出液 10 mL (試料 1 g 相当分) (穀類及び豆類については 0.5 g、茶については 0.25 g 相当分)

- ↓ 飽和塩化ナトリウム溶液 10 mL
- ↓ 2 mol/L 塩酸 0.2 mL
- ↓ *n*-ヘキサン 10 mL
- ↓ 5 分間振とう
- ↓ 毎分 3000 回転、5 分間遠心分離

上清

↓

グラファイトカーボン/エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム  
[InertSep GC/PSA (500 mg/500 mg) ]

- ↓ アセトン及び*n*-ヘキサン各10 mLでコンディショニング
- ↓ 上清を注入
- ↓ アセトン 10 mL (流出液は捨てる)
- ↓ 5 vol%ギ酸・アセトン溶液 10 mL で溶出 (全溶出液を採取)

乾固

- ↓ アセトニトリル及び水 (1 : 1) 5 mL (穀類及び豆類については 2.5 mL、茶については 1.25 mL)
- ↓ で溶解する

試験溶液

↓

LC-MS/MS

図 1 分析法フローチャート

## 8. マトリックス添加標準溶液の調製

玄米については、メタゾスルフロン添加用標準溶液を 10 ng/mL となるようアセトンで希釈し、この溶液 1 mL を窒素気流下 40°C 以下で溶媒を除去した後、ブランク試験溶液を 1 mL 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。

その他の食品については、メタゾスルフロン添加用標準溶液を 2 ng/mL となるようアセトンで溶解し、この溶液 1 mL を窒素気流下 40°C 以下で溶媒を除去した後、ブランク試験溶液を 1 mL 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. 既存試験法の適用確認

はじめに、通知一斉試験法を用いてメタゾスルフロンの分析が可能であるかを検討した。LC/MS による農薬等の一斉試験法 I (農産物) 及び LC/MS による農薬等の一斉試験法 II (農産物) を抽出工程については水を、精製工程については、キャベツを適用し、添加回収試験を行った。その結果、農薬等の一斉試験法 I (農産物) では、抽出工程では、アセトニトリル層に 40% 程度しか移行せず、精製工程において、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カラム (500 mg/500 mg) に吸着し、15% 程度しか溶出されなかった。また、LC/MS による農薬等の一斉試験法 II (農産物) では、抽出工程では、アセトニトリル層に 75% 程度移行したが、精製工程において、シリカゲルミニカラム (500 mg) に吸着し、35% 程度しか溶出されなかった (表 1)。このため、いずれの方法も適用が困難であり、新規に個別試験法を開発することとした。

表 1 通知法での添加回収試験 (n=2)

	LC/MS一斉試験法 I (農作物)	LC/MS一斉試験法 II (農作物)
	真度 (%)	真度 (%)
抽出工程	37	75
精製工程	15	35

#### 2. 測定条件の検討

##### (1) LC-MS/MS 条件

###### ①LC 条件

シリカベースの逆相系カラムについて、ピーク形状や MS 検出の感度が良好なカラムを検討した。L-column2 C18 ((財) 化学物質評価研究機構製)、Cadenza CD-C18 (Imtakt 社製)、Atlantis T3 及び、XBridge C18 (Waters 社製)、Myghtysil RP-18 GP (関東化学社製) Inertsil ODS-3 (GL Sciences 社製) の内径 2~2.1 mm、長さ 100 mm のカラムについて検討したところ、すべてのカラムで概ね良好な結果が得られたが、最も MS の感度 (S/N 比) が高かった Inertsil ODS-3 を採用した。

移動相への添加剤について、ギ酸、酢酸及び酢酸アンモニウムを比較したところ、酢酸において良好な感度が得られ、かつ、その至適濃度は、0.1 vol% であった。

有機溶媒についてメタノールとアセトニトリルを比較したところ、感度では顕著な差は認められなかったがアセトニトリルの方がよりカラム圧が低かったことからアセトニトリルを採用した。

###### ②MS 条件

メタゾスルフロンはポジティブモード及びネガティブモードのどちらでも測定可能であったが、

MSの感度(S/N比)が高かったポジティブモードを採用した。コーン電圧55Vで測定したマスペクトルを図2に示した。

プロトン付加分子[M+H]<sup>+</sup>のm/z476及び塩素原子同位体由来のイオンm/z478が感度良く検出された。SRM(Selected Reaction Monitoring)モード測定条件について、プロトン付加分子[M+H]<sup>+</sup>をプリカーサーイオンとして衝突誘起解離によって得られるm/z 476→182を定量イオン(図3)に、塩素原子同位体由来のイオンをプリカーサーイオンとして衝突誘起解離によって得られるm/z 478→182を定性イオン(図4)に採用した。それぞれのモニターイオンに最適な条件を表2のとおり設定した。

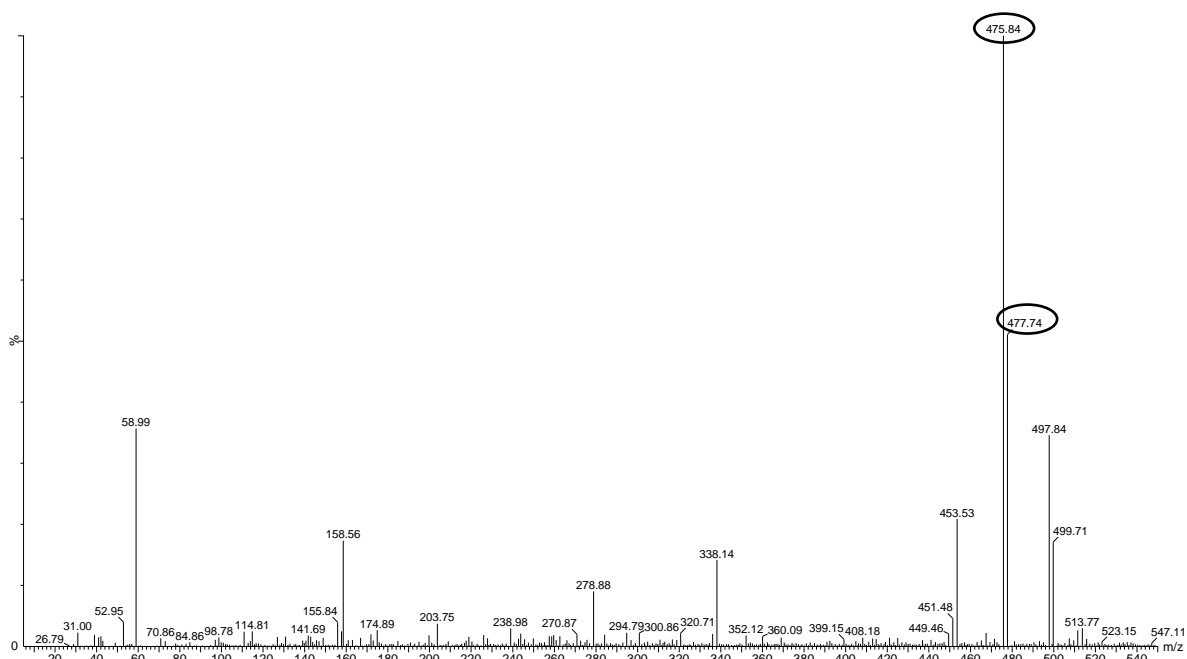


図2 メタゾスルフロンのマスペクトル

スキャン範囲：0～550 amu

測定条件：ESI(+), CV=55 V (CV : corn voltage)

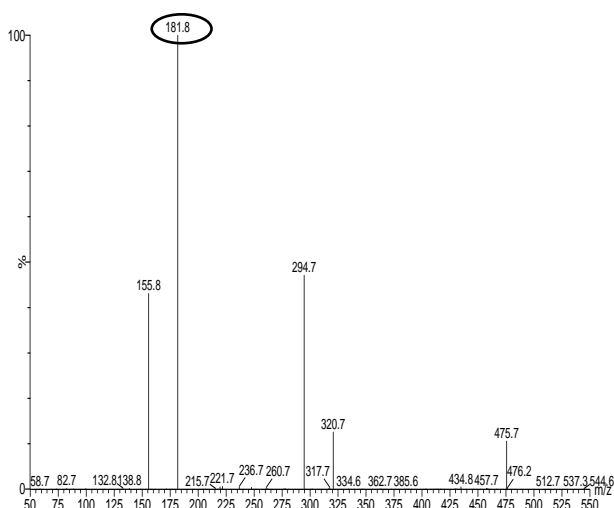


図3 メタゾスルフロンのプロダクトイオン  
スペクトル (定量用)

プリカーサーイオン：m/z 476

測定条件：ESI(+), CV=55 V, CE=16 eV  
(CV : corn voltage, CE : collision energy)

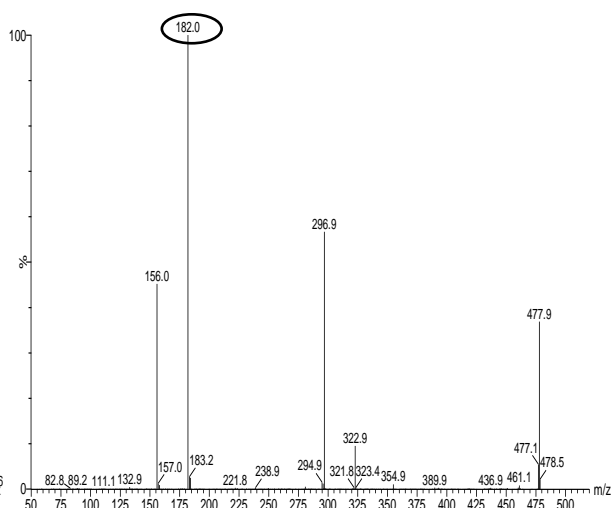


図4 メタゾスルフロンのプロダクトイオン  
スペクトル (定性用)

プリカーサーイオン：m/z 478

測定条件：ESI(+), CV=55 V, CE=15 eV  
(CV : corn voltage, CE : collision energy)



表 2 SRM 条件

Table SRM parameter

	Monitored reactions precursor <i>m/z</i> >product <i>m/z</i>	Dwell time (s)	Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
Metazosulfuron	476 > 182 <sup>a</sup>	0.056	55	16
	478 > 182 <sup>b</sup>	0.056	55	15

<sup>a</sup>Used for quantitation

<sup>b</sup>Used for confirmation

(2) 検量線

各定量用イオンのピーク面積値を用いて、絶対検量線を作成した。0.0001 mg/L~0.02 mg/L の範囲で検量線を作成したところ、良好な直線性が認められた (相関係数 (*r*) : 0.9993~1.000、平均 *r*=0.9996)。代表的な検量線を図 5 に示した。添加回収試験においては、一律基準値添加では、0.0005、0.001、0.0015、0.002、0.0025、及び 0.003 mg/L の標準系列を、玄米試料の 0.05 mg/kg 濃度添加では、0.0025、0.005、0.0075、0.01、0.0125 及び 0.015 mg/L の標準系列を用いて検量線を作成した。

Concentration(ng/mL)	0.1	0.5	1	2.5	5	10	15	20
Area	8265	42468	85293	208804	418196	838908	1237941	1640014

Slope 82172.5  
Intercept 4294.6

Correlation Coefficient(*r*): 0.9999

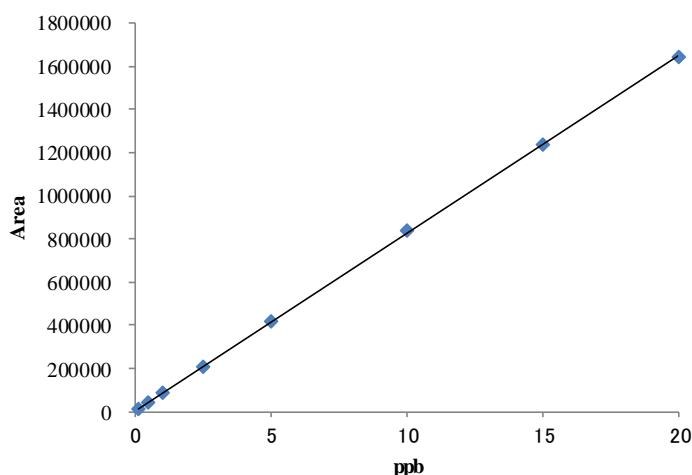


図 5 検量線

3. 前処理法の検討

以下の検討は、試験溶液中濃度として 0.01 mg/L で検出となるよう、メタゾスルフロン標準溶液を添加した。

(1) 転溶の検討

残留農薬等試験法検討実施要領では、アセトン抽出後にアセトンを除去し、有機溶媒転溶操作を行うこととされている。しかしながら、アセトン抽出液を減圧濃縮する際に突沸する場合があります。また、有機溶媒抽出ではエマルジョンが生成し、遠心分離や長時間の放置が必要となるなどの問題点が生じることが知られている。

これらの問題点を解消するため、有機溶媒への転溶操作の際、アセトン除去せずに飽和塩化ナトリウム溶液 10 mL 及び *n*-ヘキサン 10 mL を加えて抽出する方法を検討した。この方法で抽出時のエマルジョンの生成が抑えられ、減圧濃縮操作を省略することが可能であった。また、LC-MS/MS 測定では感度が高く、抽出液のすべてを用いる必要がないため、アセトン抽出液の一部 (10 mL) を用いることとした。その結果、使用溶媒量 (*n*-ヘキサン) の削減と操作時間の短縮が図れた。さらに、液性を酸性にすることで抽出効率が向上したので、抽出液 10 mL に対し、2 mol/L 塩酸 0.2 mL を加えることとした (表 3)。また、2 mol/L 塩酸 0.2 mL を加えた際の水-アセトン層の pH を表 4 に示した。すべての食品で pH が 1.8 以下となっており、食品による pH の大きな違いはみられなかった。

表 3 転溶における 2 mol/L 塩酸の添加量に対する回収率 (%)

2 mol/L 塩酸の 添加量	0 mL	0.1 mL	0.2 mL	0.3 mL	0.4 mL
回収率 (%)	78.8	99.9	101.1	102.1	102.3

※緑茶を検体として使用

表 4 2 mol/L 塩酸 0.2 mL 添加における水-アセトン層の pH

	玄米	大豆	ほうれんそう	キャベツ
pH	1.8	1.5	1.8	1.5
	ばれいしょ	オレンジ	リンゴ	緑茶
pH	1.8	1.5	1.5	1.8

飽和塩化ナトリウム溶液及び *n*-ヘキサンの量について、緑茶を試料として、アセトン抽出液を 10 mL に固定し、アセトン抽出液、*n*-ヘキサン及び飽和塩化ナトリウム溶液の比を 1 : 1 : 1、1 : 1 : 0.5、1 : 0.5 : 1 及び 1 : 0.5 : 0.5 と変化させ回収率と精製効果について検討した。試料のアセトン抽出液に標準溶液を添加し、飽和塩化ナトリウム溶液、*n*-ヘキサン及び 2 mol/L 塩酸 0.2 mL を加えて分配後の上層 (アセトン及びヘキサン層) を GC/PSA で精製し、回収率を算出した。ミニカラムからの溶出溶媒として 5%ギ酸・アセトンを使用した。いずれの場合でも概ね 100%の回収率が得られたが、1 : 1 : 1 が最も透明に近い溶出液を得ることができ、1 : 0.5 : 1 及び 1 : 0.5 : 0.5 では溶出液がわずかに緑色を呈した (表 5)。

また、上層 (アセトン及びヘキサン層) 採取時に少量 (約 50 µL) の下層が混入した場合の固相カラムからの溶出挙動について検討したところ、表 6 に示すとおり影響は認められなかったため、1 : 1 : 1 を採用することとした。

表 5 抽出溶媒等の量に対する回収率 (%) 及び溶出液の色

アセトン抽出液 : 飽和塩化ナトリウム : ヘキサン	1 : 1 : 1	1 : 1 : 0.5	1 : 0.5 : 1	1 : 0.5 : 0.5
回収率 (%)	100.6	100.5	99.5	97.8
カラム精製後の溶出液の色	ほぼ無色透明	極わずかに 緑色	わずかに緑色	わずかに緑色

表 6 分配後の上層 (アセトン及びヘキサン層) に少量の下層が混入した場合の溶出挙動

	洗浄 (10 mL)	溶出 (2 mL)	溶出 (4 mL)	溶出 (6 mL)	溶出 (8 mL)	溶出 (10 mL)
回収率 (%)	0	0	43.9	55.0	0	0

また、転溶回数による回収率について緑茶を検体として検討した。1回目の転溶操作で残留した下層（水-アセトン層）に、アセトン：*n*-ヘキサン（1：1）10 mLまたは酢酸エチル 10 mLを用いて再度抽出したところ、1回の抽出操作でメタゾスルフロンは概ね 100%有機層に回収され、2回目の抽出操作により抽出液からメタゾスルフロンは検出されなかったことから抽出操作は1回とした（表7）。

表7 転溶回数による回収率

抽出回数	1回目	2回目（アセトン： <i>n</i> -ヘキサン（1：1））
回収率（%）	99.6	0
抽出回数	1回目	2回目（酢酸エチル）
回収率（%）	100.0	0

## (2) カラム精製

ミニカラムに目的物質を吸着させ、アセトンで夾雑物を除去することを目的として、エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラム（PSAミニカラム：GL Sciences社製 InertSep PSA（500 mg））の使用を検討した。回収率は概ね良好結果が得られたが、ほうれんそう、緑茶等での色素の除去が不十分であった。そのため、グラファイトカーボン/エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム（GC/PSAミニカラム：GL Sciences社製 InertSep GC/PSA（500 mg/500 mg））を検討し、精製効果を検証した。

緑茶を試料としてアセトン抽出液10 mL、飽和塩化ナトリウム溶液10 mL及び *n*-ヘキサン10 mLに2 mol/L 塩酸 0.2 mLを加えて分配後に採取した上層（アセトン及びヘキサン層）に標準溶液を添加して、回収率を確認した。洗浄溶液としてアセトンを使用することとし、洗浄時の溶出挙動について確認した。

洗浄溶液量を、10 mL、15 mL、20 mLで確認したところ、20 mLでわずかに溶出（0.1%）が確認された。15 mLでも溶出されなかったが様々な食品に適用することを考慮し洗浄液量を10 mLとした（表8）。

表8 洗浄液（アセトン）量に対する溶出量（%）

アセトン洗浄液量	10 mL	15 mL	20 mL
回収率（%）	0	0	0.1

次に、溶出液について検討した。溶出液をギ酸・アセトンとし、ギ酸の濃度を2～6 vol%で検討した（表9）。5 vol%ギ酸・アセトンでは、6 mLで99.6%が溶出したことから、ギ酸の濃度を5 vol%、溶出液量を10 mLとした。

表9 InertSep GC/PSA からの溶出率 (%)

溶出液量	2 mL	4 mL	6 mL	8 mL	10 mL	15 mL
2 vol% ギ酸・アセトン	0	0	99.1	0.3	0.1	0.1
3 vol% ギ酸・アセトン	0	4.1	99.5	0.1	0.1	0
4 vol% ギ酸・アセトン	0	18.0	81.9	0.1	0	0
5 vol% ギ酸・アセトン	0	49.5	50.1	0	0	0
6 vol% ギ酸・アセトン	0	49.2	50.5	0	0	0

## (3) その他の検討

ミニカラムで精製した溶出液を40℃以下で濃縮し、溶媒を除去した残留物をアセトニトリル及び水(1:1)混液に溶かし、果実及び野菜の場合は正確に10 mL、穀類、豆類及び種実類の場合は正確に5 mL、茶の場合は正確に2.5 mLと、通知法では検討した方法の倍量としたものを試験溶液とした。そこで、緑茶を試料としてアセトン抽出液に標準溶液を添加して、[実験方法] 7. 試験溶液の調製で示した方法で調整調製し、溶媒を除去した残留物をアセトニトリル及び水(1:1)混液で溶解し、正確に2.5 mLとした試験溶液を作成し、S/N比及び回収率を確認した。S/N比は100以上、回収率も概ね100%であったことから、定量下限濃度が十分測定可能であることが確認できた(表10)。

表10 アセトニトリル及び水(1:1)混液2.5 mLとした場合のS/N比及び回収率

試料	S/N比	回収率
緑茶	164.2	99.7%

次に、3. (1) 転溶の検討の際に転溶を1回としたが、1回目の転溶で残留した下層(水-アセトン層)に、*n*-ヘキサン 10 mLを加えて振とう抽出した後遠心分離し、1回目の操作で得られた有機層に合わせた溶液について、同様に精製する方法を、緑茶を試料として検討した(表11)。アセトン 10 mLでの洗浄では溶出されず、5 vol% ギ酸・アセトン 10 mLで100%溶出し、さらに5 vol% ギ酸・アセトン 10 mLを追加した場合でも溶出されなかった。また、溶出液中の回収率も100%であったことから、転溶操作を2回にしても同様の精製方法が適用できることを確認できた。

表11 転溶操作を2回行った場合の回収率 (%)

	アセトン洗浄液 (10 mL)	溶出液 (10 mL)	追加溶出液 (10 mL)
回収率 (%)	0	100.4	0.0

## 4. 選択性

選択性の検討結果を表12に示した。検討した何れの試料においても、定量イオン及び定性イオンともメタゾスルフロンを妨害するピークは認められなかった。

表12 選択性の評価

担当機関: 埼玉県衛生研究所

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (mg/kg)	基準値 <sup>1</sup> (ppm)	添加濃度 <sup>2</sup> (ppm)	妨害ピークの許容範囲			ピーク面積(高さ) <sup>3</sup>			選択性の評価 <sup>5</sup>	備考	
						評価対象濃度 (ppm)	判定基準	面積又は高さの別	ブランク試料 (a)	標準溶液 <sup>4</sup> (b)	面積(高さ)比 (a)/(b)			
	メタゾスルフロン	玄米	0.01	0.05	0.05	基準値	0.05	< 0.100	面積	68	560092	0.000	○	
		大豆	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	104	186677	0.001	○	
		ほうれんそう	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	92	115291	0.001	○	
		キャベツ	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	65	109401	0.001	○	
		ばれいしょ	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	87	108159	0.001	○	
		オレンジ	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	115	109952	0.001	○	
		りんご	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	69	110764	0.001	○	
		緑茶	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	118	165213	0.001	○	

\*1 基準値は、基準値未設定の場合には一律基準(0.01 ppm)を用いる。  
 \*2 添加濃度と評価対象濃度が異なる場合(定量限界と基準値との関係が、『定量限界<基準値<定量限界×3』となる場合)には、『\*』が表示される。『\*』が表示された分析対象化合物は、添加濃度と評価対象濃度が異なるため、別途、定量限界濃度相当のマトリックス添加標準溶液を調製して評価する。  
 \*3 ブランク試料及び標準溶液の順に測定した結果から評価する。(必要に応じて起爆注入を行う。)  
 \*4 試料中の濃度が「評価対象濃度(基準値濃度又は定量限界濃度)」相当になるように、ブランク試料の試験溶液で調製した標準溶液(マトリックス添加標準溶液)を用いる。ブランク試料に妨害ピークが観察されなかった場合には、標準溶液のピーク面積(高さ)は求めなくても良い。  
 \*5 面積(高さ)比が、妨害ピークの許容範囲の判定基準に適合する場合には「○」、適合しない場合には「×」を記載する。

5. 真度及び精度

わが国の食品衛生法では、現在までのところ、メタゾスルフロンの残留基準値は米(玄米)に0.05 ppmが設定され、その他の食品には一律基準値が適用される。そこで、添加回収試験は残留基準値の設定されている玄米試料には、基準値濃度を、その他試料には一律基準値濃度を添加し、回収率を検討した。

真度及び併行精度の検討結果を表13に示した。これら農産物に対する平均回収率は93.4~98.7%、併行精度の相対標準偏差は0.7~3.0%であった。回収率及び併行精度の相対標準偏差は厚生労働省から通知されている「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインについて」(平成19年11月15日、平成22年12月24日改正)で示されている目標値を満足するものであった。

表13 真度、精度及び定量限界の評価

担当機関: 埼玉県衛生研究所

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (mg/kg)	基準値 <sup>1</sup> (ppm)	添加濃度 (ppm)	定量限界の評価 <sup>2</sup>	検量線			回収率(%)					真度 (%)	併行精度 (RSD%)	S/N比 <sup>3</sup>			備考
							傾き	切片	r <sup>2</sup> 値	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5			Max.	Min.	平均値	
	メタゾスルフロン	玄米	0.01	0.05	0.05	*	47685	-1927	0.9994	95.7	100.1	97.3	95.4	96.1	96.9	2.0			#DIV/0!	
		大豆	0.01	0.01	0.01		92059	-546	0.9993	92.8	94.2	94.9	92.7	92.6	93.4	1.1	332.9	765.8	549.4	
		ほうれんそう	0.01	0.01	0.01		96729	2005	0.9994	94.8	99.1	99.8	100.4	97.1	98.2	2.3	862.8	886.5	874.6	
		キャベツ	0.01	0.01	0.01		73339	193	1.0000	98.4	98.2	97.6	96.8	98.6	97.9	0.7	1018.7	721.2	870.0	
		ばれいしょ	0.01	0.01	0.01		66384	426	0.9998	95.8	99.7	98.6	98.2	101.1	98.7	2.0	591.1	696.7	643.9	
		オレンジ	0.01	0.01	0.01		66317	-1615	0.9997	97.6	97.3	100.1	97.6	99.6	98.4	1.3	887.5	940.3	913.9	
		りんご	0.01	0.01	0.01		80427	-184	0.9996	95.8	99.8	100.8	95.3	101.7	98.7	3.0	941.4	899.3	920.4	
		緑茶	0.01	0.01	0.01		74767	-1863	0.9996	92.4	95.3	94.9	92.8	94.9	94.1	1.4	259.8	287.4	273.6	

\*1 基準値は、基準値未設定の場合には一律基準(0.01 ppm)を用いる。  
 \*2 添加濃度が定量限界濃度と異なる場合には、『\*』が表示される。その場合には、S/N比の算出は不要であるが、別途、定量限界の推定を行う。  
 \*3 得られた回収率の中で最大値を与えるピーク(Max.)及び最小値を与えるピーク(Min.)のそれぞれのS/N比を求める。

添加回収試験で100%回収率に相当する溶媒標準溶液、各ブランク試料及び添加回収試験の代表的なクロマトグラムを図6-1及び図6-2に、ブランク試料のSCAN測定におけるクロマトグラムを図7-1及び図7-2に示した。特に、測定を妨害するような顕著なピークは認められなかった。

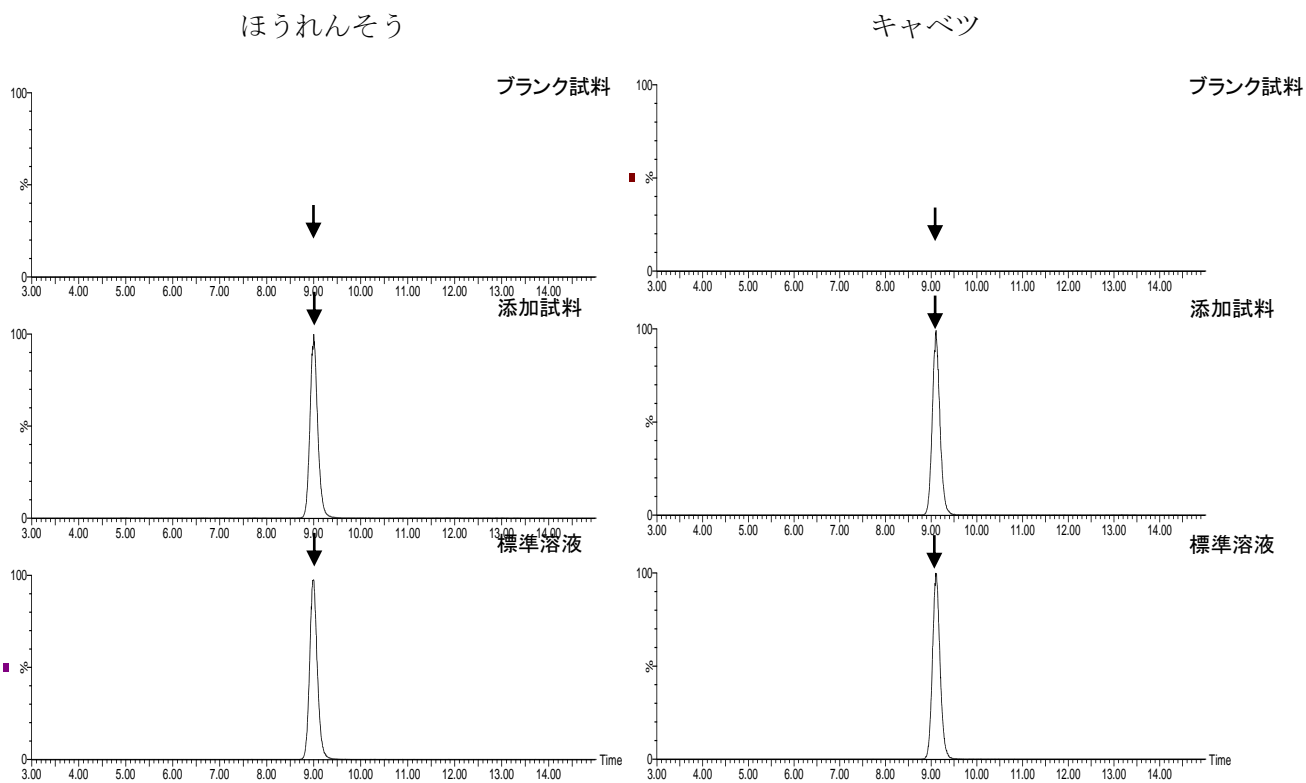
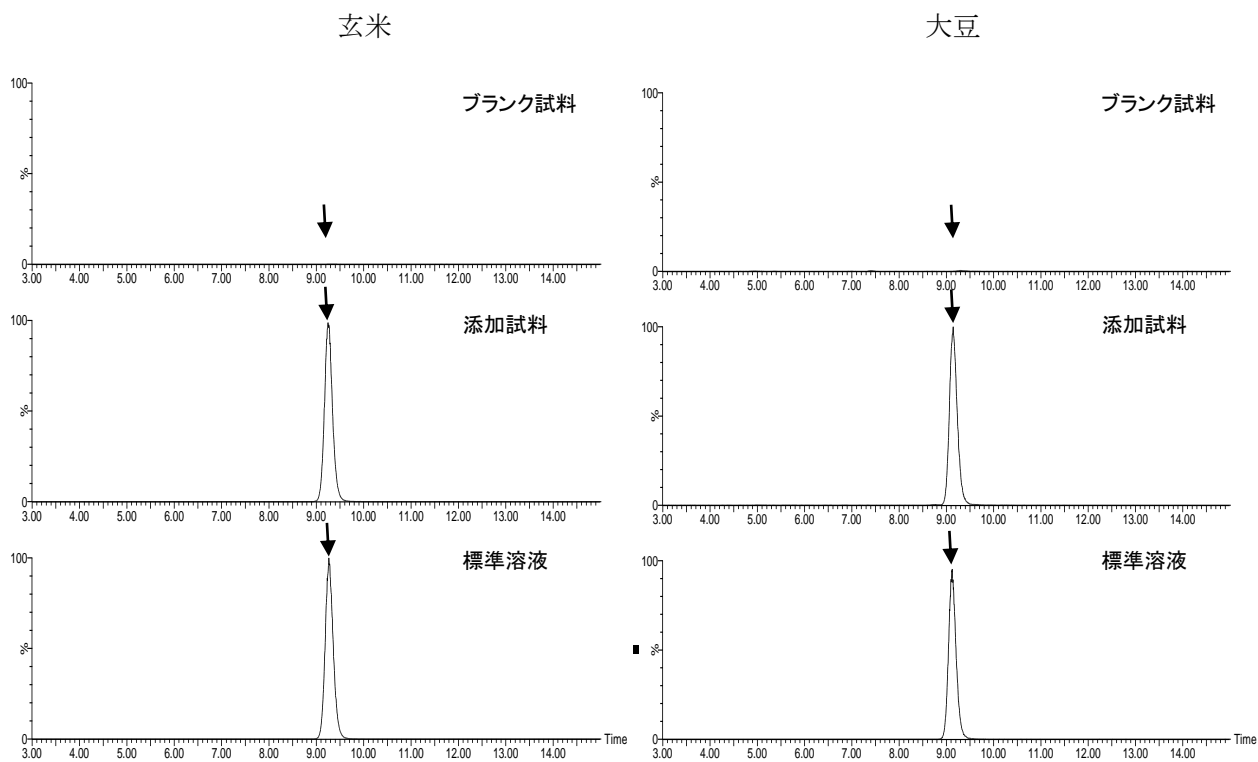


図 6-1 代表的なメタゾスルフロンの SRM クロマトグラム  
 ( $m/z$  476  $\rightarrow$  182)、添加濃度：0.01 ppm (玄米は、0.05 ppm)

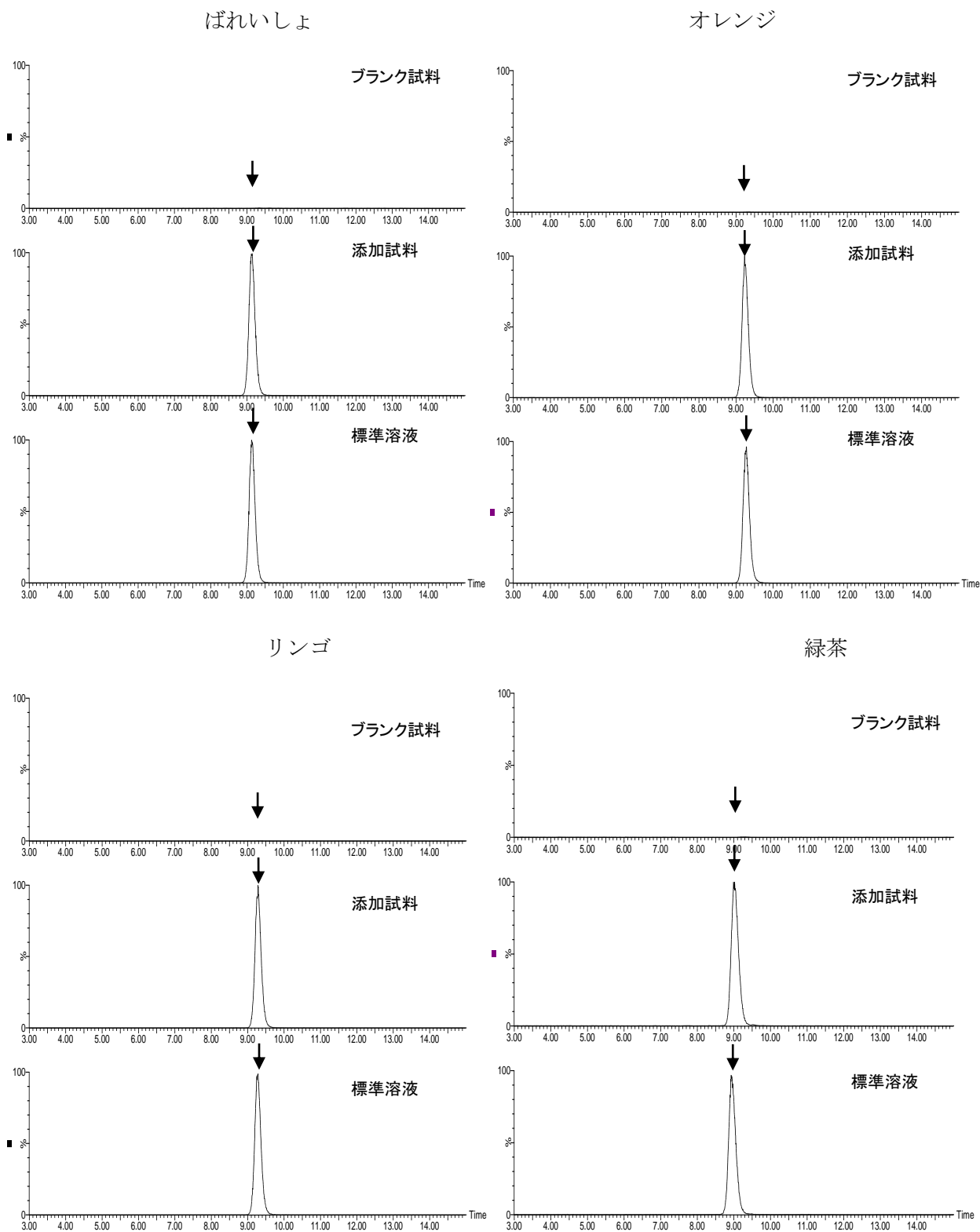
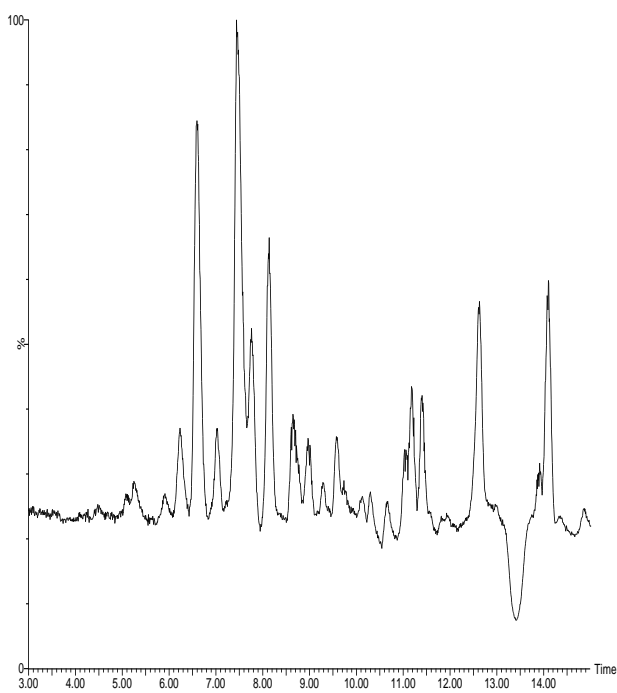
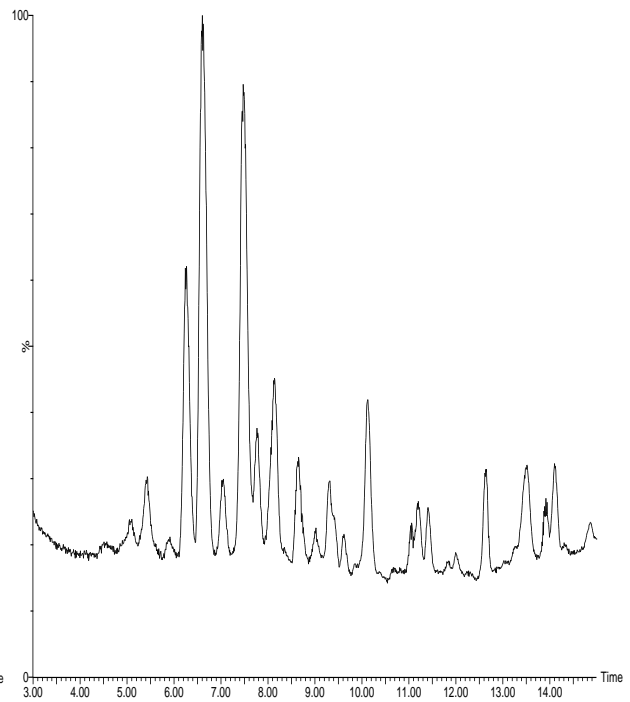


図 6-2 代表的なメタズスフロンの SRM クロマトグラム  
( $m/z$  476  $\rightarrow$  182)、添加濃度 : 0.01 ppm

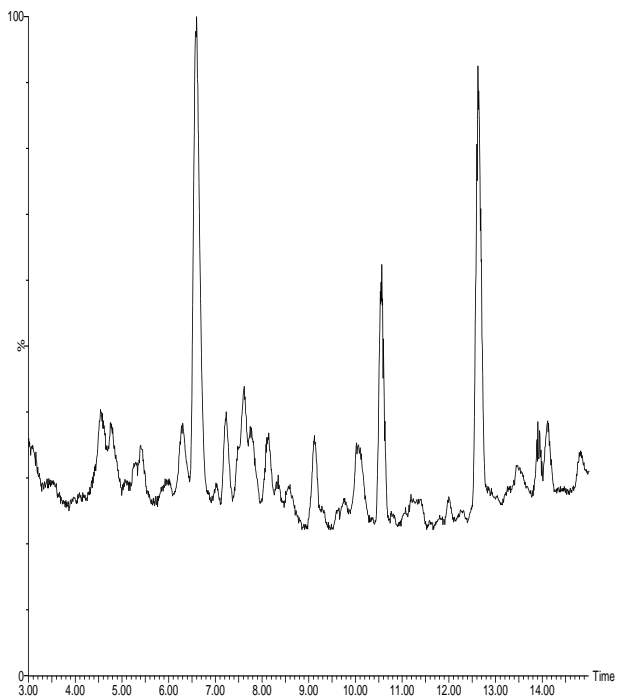
玄米



大豆



ほうれんそう



キャベツ

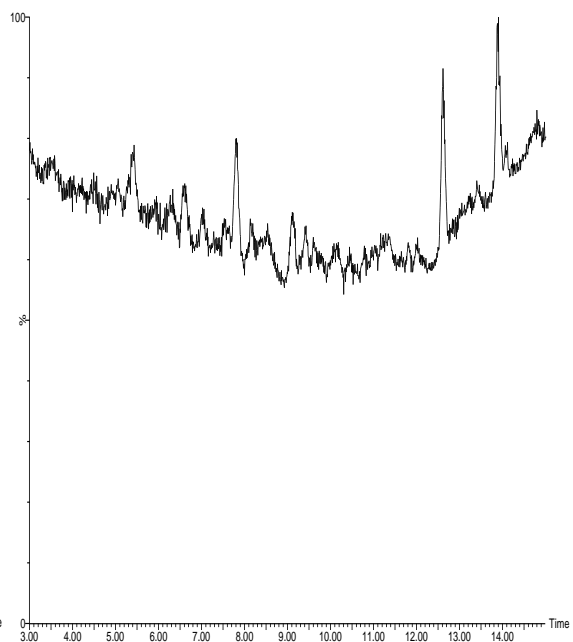


図 7-1 ブランク試料の代表的なトータルイオンクロマトグラム  
スキャン範囲：50~550 amu  
測定条件：ESI(+), CV=55 V (CV : corn voltage)



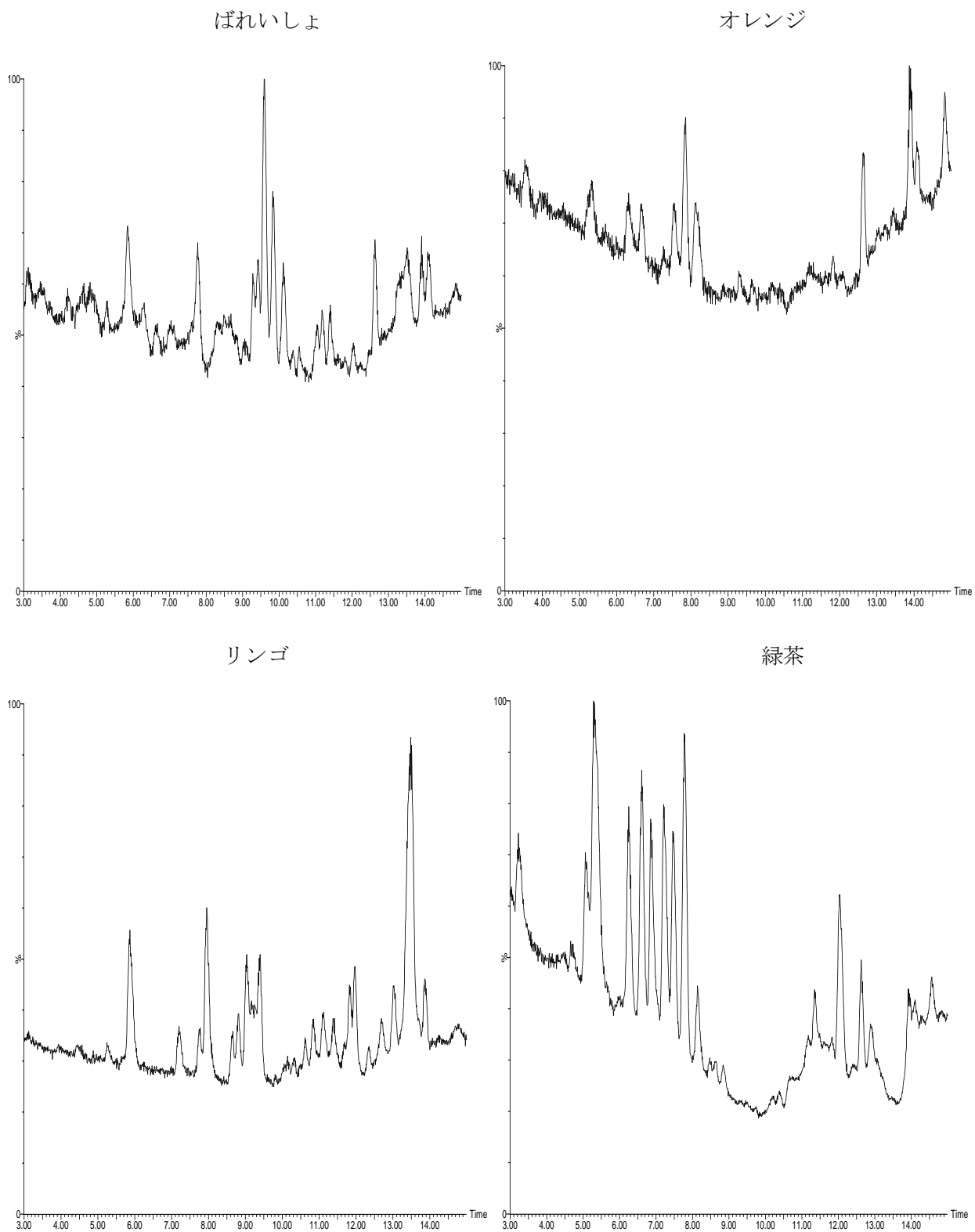


図 7-2 ブランク試料の代表的なトータルイオンクロマトグラム  
 スキャン範囲：50～550 amu  
 測定条件：ESI(+), CV=55 V (CV : corn voltage)

6. 定量限界の推定

各試料における代表的なブランク試料、「8. マトリックス添加標準液調製」に示した方法で作成した添加試料及び溶媒標準溶液のクロマトグラムを図 8-1 及び図 8-2 に示した。定量限界の推定濃度を試料換算で一律基準の 0.01 mg/kg として評価したが、何れの試料においても S/N 比は 250 以上あり、十分測定できる結果であった (表 14 及び表 15)。

表14 定量限界の推定

担当機関: 埼玉県衛生研究所

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (mg/kg)	基準値 <sup>1)</sup> (ppm)	添加濃度 (ppm)	定量限界の評価 <sup>2)</sup>	標準溶液濃度 <sup>3)</sup> (mg/L)	ピーク面積(高さ) <sup>4)</sup>						S/N比		平均値		備考		
								面積又は高さの別	ブランク <sup>5)</sup>	マトリックス添加標準溶液			溶媒標準溶液			n=1	n=2		面積(高さ)比(%) <sup>6)</sup>	S/N比
										n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均					
	メタソルフロロン	玄米	0.01	0.05	0.05	*	0.002	面積	68	106757	106818	106719.8	106213	106741	106476.7	517.0	579.3	100.2	548.2	

\*1 基準値は、基準値未設定の場合には一律基準(0.01 ppm)を用いる。  
 \*2 定量限界の推定を行う対象(添加濃度と定量限界濃度と異なる場合)には、『\*』が表示される。  
 \*3 試料中の濃度が定量限界相当濃度になるように、ブランク試料の試験溶液で調製した標準溶液(マトリックス添加標準溶液)及び溶媒で調製した標準溶液(溶媒標準溶液)を作成する。  
 \*4 マトリックス添加標準溶液及び溶媒標準溶液の順に交互に2回以上測定する。(必要に応じて起爆注入を行う。)  
 \*5 ブランクにピークが認められた場合には、マトリックス添加標準溶液の値はブランク値を差し引いた値を用いる。  
 \*6 マトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積(又は高さ)の比(%)を求める。

表15 S/N比計算用

No.	分析対象化合物	食品名	定量イオン (m/z)	定量限界 (mg/kg)	基準値 <sup>1)</sup> (ppm)	添加濃度 (ppm)	S/N比を求める対象 <sup>2)</sup>	マトリックス添加標準溶液濃度 <sup>3)</sup> (mg/L)	Max, n=1						Min, n=2						S/N比		備考		
									ピークの最大値 (Dmax)	ノイズ			ピークトップ (D)	ピーク高さ (S)	ノイズ幅 (N)	ピークの最大値 (E1)	ノイズ			ピークトップ (D)	ピーク高さ (S)	ノイズ幅 (N)		Max. n=1	Min. n=2
										最大値 (E1)	最小値 (E2)	中央値 (C) <sup>4)</sup>					最大値 (E1)	最小値 (E2)	中央値 (C) <sup>4)</sup>						
	メタソルフロロン	玄米	181.8	0.01	0.05	0.05	標準	0.002	249	1	0	1	248.8	248.2	0.5	249	1	0	1	248.5	247.9	0.4	517.0	579.3	
		大豆	181.8	0.01	0.01	0.01	添加	0.002	249	2	0	1	248.6	247.7	0.7	249	1	0	0	248.5	248.1	0.3	332.9	765.8	
		ほうれんそう	181.8	0.01	0.01	0.01	添加	0.002	249	1	0	0	248.9	248.5	0.3	249	1	0	0	248.6	248.2	0.3	862.8	886.5	
		キャベツ	181.8	0.01	0.01	0.01	添加	0.002	249	1	0	0	248.9	248.6	0.2	249	1	0	0	248.5	248.1	0.3	1018.7	721.2	
		ばれいしょ	181.8	0.01	0.01	0.01	添加	0.002	249	1	0	1	248.8	248.3	0.4	249	1	0	1	248.5	248.0	0.4	591.1	696.7	
		オレンジ	181.8	0.01	0.01	0.01	添加	0.002	249	1	0	0	248.9	248.5	0.3	249	1	0	0	248.6	248.2	0.3	887.5	940.3	
		りんご	181.8	0.01	0.01	0.01	添加	0.002	249	1	0	0	248.9	248.5	0.3	249	1	0	0	248.6	248.2	0.3	941.4	899.3	
		緑茶	181.8	0.01	0.01	0.01	添加	0.002	249	2	0	1	248.5	247.3	1.0	249	2	0	1	248.3	247.2	0.9	259.8	287.4	

\*1 基準値は、基準値未設定の場合には一律基準(0.01 ppm)を用いる。  
 \*2 添加試料から得られるピークのS/N比を求める場合には「添加」が、マトリックス添加標準溶液から得られるピークのS/N比を求める場合には「標準」が表示される。  
 \*3 試料中の濃度が定量限界相当濃度になるように、ブランク試料の試験溶液で調製した標準溶液(マトリックス添加標準溶液)を作成する。  
 \*4 ベースラインにはノイズの中央値(C)を用いることが望ましいが、それが困難な場合にはノイズの最大値(E1)と最小値(E2)の平均値[(E1+E2)/2]を用いても良い。

7. 試料マトリックスの測定への影響

添加回収濃度(基準値相当又は一律基準値相当)レベルにおける溶媒標準溶液に対するマトリックス添加標準溶液のピーク面積値の比を比較し、試料マトリックスの測定値への影響について検討したところ、100~104%の範囲であり、顕著なイオン化抑制及び増強効果は低く、許容できる範囲であると考えられた(表 16)

表16 試料マトリックスの測定への影響

担当機関: 埼玉県衛生研究所

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (mg/kg)	基準値 <sup>1)</sup> (ppm)	添加濃度 (ppm)	標準溶液濃度 <sup>2)</sup> (mg/L)	ピーク面積(高さ) <sup>3)</sup>									備考
							面積又は高さの別	ブランク <sup>4)</sup>	マトリックス添加標準溶液 <sup>5)</sup>			溶媒標準溶液			ピーク面積(高さ)比 <sup>6)</sup>	
									n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均		
	メタソルフロロン	玄米	0.01	0.05	0.05	0.01	面積	68	560092	550658	555307.6	554771	545391	550081.1	1.01	
		大豆	0.01	0.01	0.01	0.002	面積	104	186677	186158	186314.1	178904	178402	178653.1	1.04	
		ほうれんそう	0.01	0.01	0.01	0.002	面積	92	115291	114785	114946.3	113824	114048	113936.2	1.01	
		キャベツ	0.01	0.01	0.01	0.002	面積	65	109401	110957	110113.9	109801	111395	110598.2	1.00	
		ばれいしょ	0.01	0.01	0.01	0.002	面積	87	108159	112623	110304.4	108161	111116	109638.1	1.01	
		オレンジ	0.01	0.01	0.01	0.002	面積	115	109529	109529	109626.3	108810	108050	108430.0	1.01	
		りんご	0.01	0.01	0.01	0.002	面積	69	110764	109451	110038.4	107123	107894	107508.5	1.02	
		緑茶	0.01	0.01	0.01	0.002	面積	118	165213	165278	165127.0	165213	165143	165178.0	1.00	

\*1 基準値は、基準値未設定の場合には一律基準(0.01 ppm)を用いる。  
 \*2 添加回収試験における回収率100%相当濃度になるように、ブランク試料の試験溶液で調製した標準溶液(マトリックス添加標準溶液)及び溶媒で調製した標準溶液(溶媒標準溶液)を作成する。  
 \*3 マトリックス添加標準溶液及び溶媒標準溶液の順に交互に2回以上測定した結果から評価する。(必要に応じて起爆注入を行う。)  
 \*4 ブランクにピークが認められた場合には、マトリックス添加標準溶液の値はブランク値を差し引いた値を用いる。  
 \*5 マトリックス添加標準溶液は試験当日のブランク試料の試験溶液を用いて調製する。  
 \*6 マトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積(又は高さ)の比を求める。

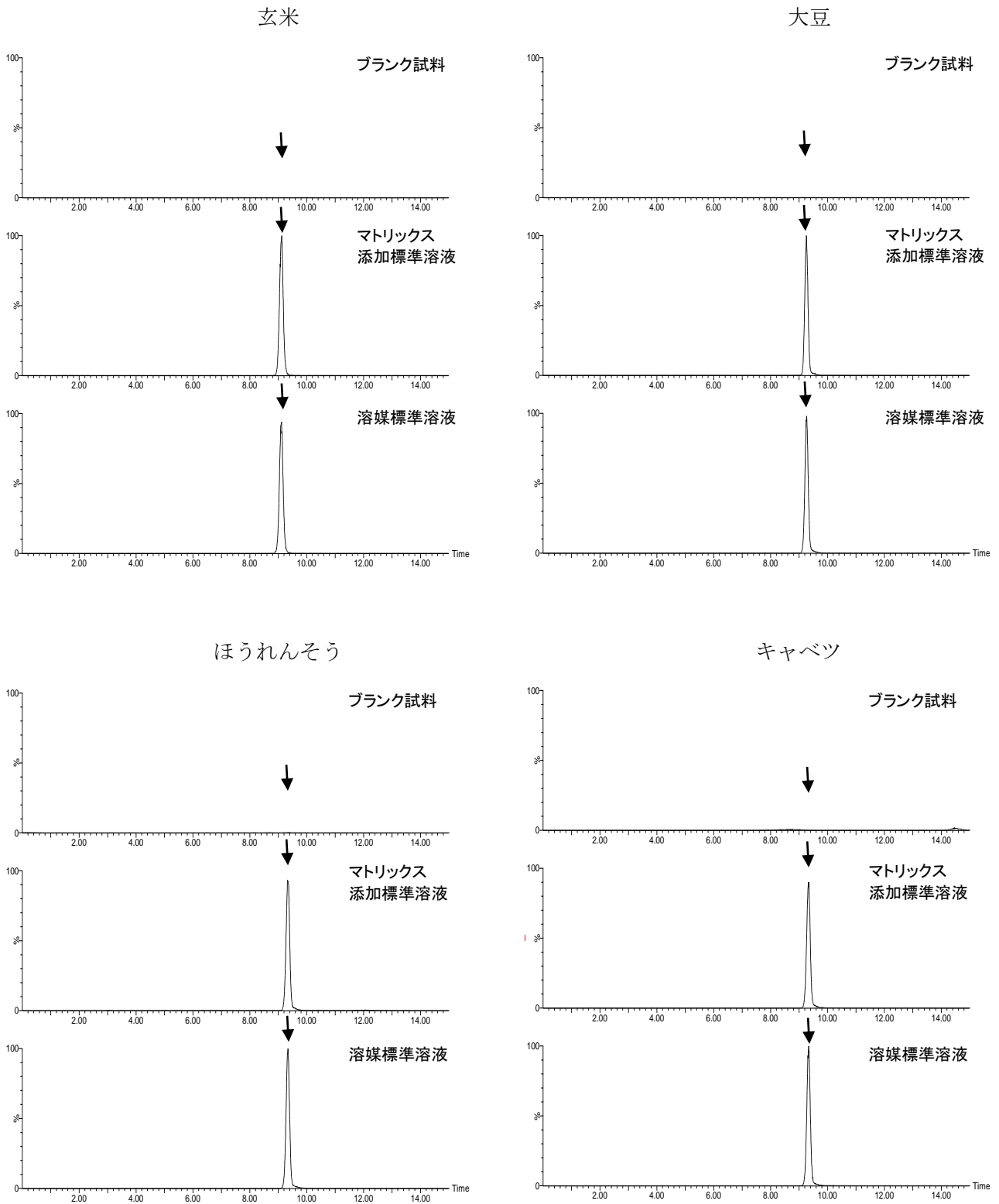


図8-1 定量限界相当濃度をマトリックスに添加した際の代表的なメタゾスルフロン<sup>®</sup>のSRMクロマトグラム

( $m/z$  476  $\rightarrow$  182)、添加濃度：0.01 ppm 相当

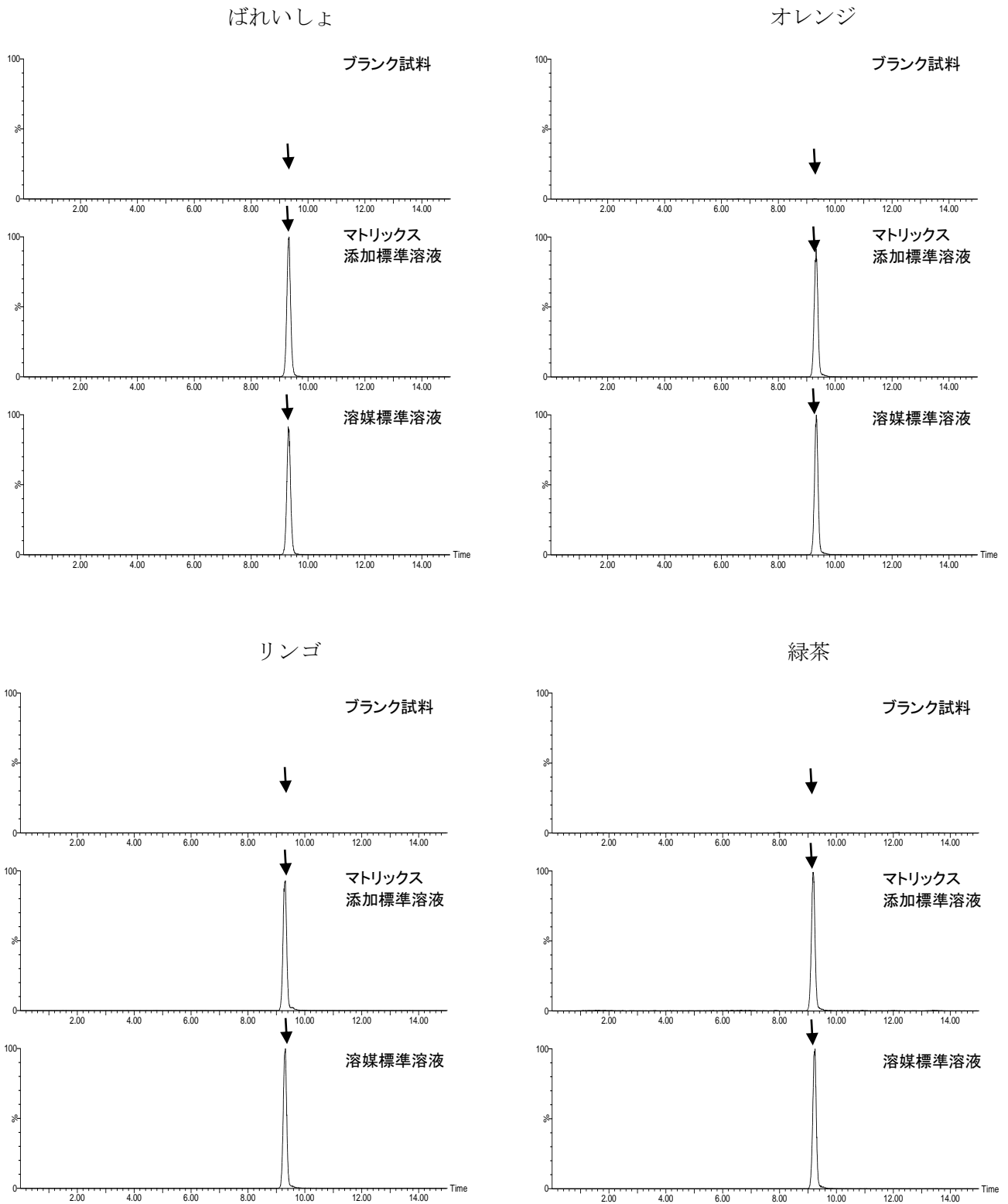


図 8-2 定量限界相当濃度をマトリックスに添加した際の代表的なメタゾスルフロン<sup>®</sup>のSRMクロマトグラム

( $m/z$  476  $\rightarrow$  182)、添加濃度 : 0.01 ppm 相当