

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

# 食品に残留する農薬等の成分である物質の 試験法開発事業報告書

## オキシシン銅試験法（農産物）

## オキシシン銅試験法（農産物）の検討結果

### 【緒言】

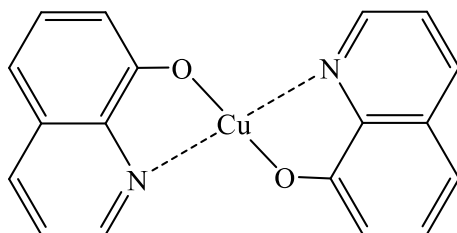
#### 1. 目的及び試験法の検討方針等

オキシシン銅は、農業用としては 1946 年に Gamma Chemical 社が農産物用容器・包装に使用して、かび、りんごの黒星病の防除に実用化された。国内においては、1964 年に「なしの黒斑病、黒星病」、「ぶどうの晩腐病」に対して農薬登録された。1969 年以降、みかん、りんごを中心に使用され、病害防除の基幹防除剤として評価されている。現在、アグロ カネショウ（株）、サンケイ化学（株）及び日本農薬（株）から販売されている。海外では韓国及び台湾において農薬登録されている。オキシシン銅は、銅イオンがオキシシン（8-キノリノール）とキレート結合した構造の殺菌剤であり、その作用機序は、脱水素酵素の SH 基の阻害であると考えられている。本検討において、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、新たに個別分析法を開発した。

#### 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：オキシシン銅

構造式：



分子式：C<sub>18</sub>H<sub>12</sub>CuN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

分子量：351.83

化学名：bis (quinolin-8-olato) copper (IUPAC 名)

外観：暗黄緑色・粉末固体・無臭

融点：>300°C

沸点：熱分解のため測定不能

蒸気圧：4.60×10<sup>-8</sup> Pa (25°C)

溶解性：水：1.04 mg/L、*n*-ヘキサン：0.17 mg/L、トルエン：45.9 mg/L、

ジクロロメタン：410 mg/L、アセトン：27.6 mg/L、メタノール：150 mg/L、

酢酸エチル：28.6 mg/L

オクタノール/水分配係数：log Pow 2.46 (25°C)

解離定数 (pKa)：4.29 (24.5°C)

[出典：農薬抄録 一般名：オキシシン銅]

### 3. 基準値

海外では、韓国（りんご、なし、かんきつ、唐辛子）、台湾（うり類、きゅうり、なし、メロン、びわ、茶、レイシ、ヒユナ、ぶどう、かんきつ、ゴレンシ、ラン）及び米国（木材の防腐剤）等にて有機銅が登録・販売されている。しかしながら、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。

#### オキシ銅の基準値一覧

| 食品名                | 基準値<br>(ppm) |
|--------------------|--------------|
| 小麦                 | 0.1          |
| 大麦                 | 0.1          |
| ライ麦                | 0.1          |
| その他の穀類             | 0.1          |
| ばれいしょ              | 0.1          |
| やまいも（長いもをいう）       | 0.05         |
| こんにやくいも            | 0.1          |
| だいこん類（ラディッシュを含む）の根 | 0.3          |
| だいこん類（ラディッシュを含む）の葉 | 5            |
| はくさい               | 0.7          |
| キャベツ               | 0.7          |
| ブロッコリー             | 1            |
| レタス（サラダ菜及びちしやを含む）  | 1            |
| たまねぎ               | 0.2          |
| ねぎ（リーキを含む）         | 1            |
| にんにく               | 0.1          |
| アスパラガス             | 1            |
| その他のゆり科野菜          | 0.05         |
| にんじん               | 0.3          |
| パセリ                | 0.3          |
| トマト                | 3            |
| きゅうり（ガーキンを含む）      | 3            |
| かぼちゃ（スカッシュを含む）     | 3            |
| すいか                | 0.5          |
| メロン類果実             | 0.1          |
| しょうが               | 0.05         |
| みかん                | 1            |
| なつみかんの果実全体         | 5            |

|                    |      |
|--------------------|------|
| レモン                | 5    |
| オレンジ (ネーブルオレンジを含む) | 5    |
| グレープフルーツ           | 5    |
| ライム                | 5    |
| その他のかんきつ類果実        | 5    |
| りんご                | 2    |
| 日本なし               | 2    |
| 西洋なし               | 2    |
| マルメロ               | 2    |
| もも                 | 0.2  |
| ネクタリン              | 0.2  |
| うめ                 | 0.05 |
| おうとう (チェリーを含む)     | 0.2  |
| いちご                | 0.1  |
| ラズベリー              | 1    |
| ブラックベリー            | 1    |
| ブルーベリー             | 1    |
| クランベリー             | 1    |
| ハックルベリー            | 1    |
| その他のベリー類果実         | 1    |
| ぶどう                | 1    |
| かき                 | 2    |
| マンゴー               | 0.5  |
| その他の果実             | 2    |
| ホップ                | 10   |
| その他のスパイス           | 60   |
| その他のハーブ            | 0.3  |

### 【実験方法】

#### 1. 試料

試料は埼玉県内で市販されていた 1) 小麦、2) パセリ、3) キャベツ、4) ばれいしょ、5) オレンジ及び6) りんごを用いた。

各食品の試料採取の方法を以下に示した。

- 1) 小麦：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) パセリ：根及び変質葉を除去し、重量比で 1/10 量の 2 mol/L 塩酸を加え、粉砕機を用いて細切均一化した。
- 3) キャベツ：外側変質葉及びしんを除去し、重量比で 1/10 量の 2 mol/L 塩酸を加え、粉砕機を用

いて細切均一化した。

- 4) ばれいしょ：泥を水で軽く洗い落とし、重量比で 1/10 量の 2 mol/L 塩酸を加え、粉砕機を用いて細切均一化した。
- 5) オレンジ：果実全体に重量比で 1/10 量の 2 mol/L 塩酸を加え、粉砕機を用いて細切均一化した。
- 6) りんご：花おち、しん及び果梗の基部を除去し、重量比で 1/10 量の 2 mol/L 塩酸を加え、粉砕機を用いて細切均一化した。

## 2. 試薬

オキシシン銅標準品：純度 100.0 %（富士フィルム和光純薬製）

アセトニトリル：LC-MS 用（富士フィルム和光純薬製）

蒸留水：LC-MS 用（関東化学製）

メタノール：HPLC 用（富士フィルム和光純薬製）

アセトン：残留農薬試験用（富士フィルム和光純薬製）

酢酸エチル：残留農薬試験用（関東化学製）

酢酸：LC-MS 用（富士フィルム和光純薬製）

6 mol/L 塩酸：容量分析用（富士フィルム和光純薬製）

2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液：容量分析用（富士フィルム和光純薬製）

ケイソウ土：ハイフロスーパーセル（富士フィルム和光純薬製）

エチレンジアミン四酢酸四ナトリウム四水和物（EDTA-4Na）：試験検査用（同仁化学研究所）

塩化ナトリウム：特級（関東化学製）

スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラム：InertSep PLS-2（500 mg /20 mL、GL サイエンス製）

標準原液：オキシシン銅標準品 10 mg を精秤し、アセトンで溶解して 20 mg/L 溶液を調製した。ただし、オレンジの基準値添加に関しては、オキシシン銅標準品 10 mg を精秤し、メタノールで溶解して 100 mg/L 溶液を調製した。

検量線用標準溶液：標準原液を水及びメタノール（1：1）混液で適宜希釈し、0.000125~0.070 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 0.1 mg/L、1 mg/L、3 mg/L、7 mg/L、20 mg/L 及び 50 mg/L 溶液を調製した。

## 3. 装置

粉砕機：FP-25（Cuisinart 製）

ホモジナイザー：ヒスコトロン（マイクロテック・ニチオン製）

遠心分離器：テーブルトップ遠心機 4000（KUBOTA 製）

LC-MS/MS

| 装置 | 型式           | 会社     |
|----|--------------|--------|
| MS | Xevo TQS     | Waters |
| LC | ACQUITY UPLC | Waters |

|       |                  |        |
|-------|------------------|--------|
| データ処理 | MassLynx Ver.4.1 | Waters |
|-------|------------------|--------|

#### 4. 測定条件

##### LC-MS/MS

| LC 条件                        |  |         |         |         |
|------------------------------|--|---------|---------|---------|
| カラム                          | InertSustain C18 (内径 2.1 mm、長さ 100 mm、<br>粒子径 3 $\mu\text{m}$ : GL サイエンス製) |         |         |         |
| 移動相流速 (mL/min)               | 0.20   |         |         |         |
| 注入量 ( $\mu\text{L}$ )        | 5  |         |         |         |
| カラム温度 ( $^{\circ}\text{C}$ ) | 40   |         |         |         |
| 移動相                          | A 液 : 蒸留水<br>B 液 : アセトニトリル<br>C 液 : 1 vol% 酢酸                              |         |         |         |
| グラジエント条件                     | 時間 (分)   | A 液 (%) | B 液 (%) | C 液 (%) |
|                              | 0.0  | 90      | 5       | 5       |
|                              | 0.5  | 90      | 5       | 5       |
|                              | 5.0  | 5       | 90      | 5       |
|                              | 10.0   | 5       | 90      | 5       |
|                              | 10.1   | 90      | 5       | 5       |
|                              | 16.0   | 90      | 5       | 5       |
| MS 条件                        |  |         |         |         |
| 測定モード                        | 選択反応モニタリング (SRM)   |         |         |         |
| イオン化モード                      | ESI (+)  |         |         |         |
| キャピラリ電圧 (V)                  | 500  |         |         |         |
| ソース温度 ( $^{\circ}\text{C}$ ) | 150  |         |         |         |
| 脱溶媒温度 ( $^{\circ}\text{C}$ ) | 560  |         |         |         |
| コーンガス                        | 窒素、150 L/hr  |         |         |         |
| 脱溶媒ガス                        | 窒素、1000 L/hr   |         |         |         |
| コリジョンガス                      | アルゴン   |         |         |         |
| 定量イオン ( $m/z$ )              | MS/MS: +146 $\rightarrow$ 118 [コーン電圧 : 44 (V)、コリジョン<br>エネルギー : 20 (eV)]    |         |         |         |
| 定性イオン ( $m/z$ )              | MS/MS: +146 $\rightarrow$ 128 [コーン電圧 : 44 (V)、コリジョン<br>エネルギー : 24 (eV)]    |         |         |         |
| 保持時間 (min)                   | 4.5  |         |         |         |

#### 5. 定量

オキシシン銅標準原液を水及びメタノール (1 : 1) 混液で希釈し、0.000125~0.07 mg/L 濃度範囲の数点

の標準溶液を調製した。この溶液 5  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  を LC-MS/MS に注入し、検量線から絶対検量線法によりオキシニ銅の含量を算出した。

## 6. 添加試料の調製

- 1) 小麦 (添加濃度 : 0.1 ppm または 0.01 ppm) : 試料 10.0 g に添加用標準溶液 (1 mg/L または 0.1 mg/L) 1 mL を添加しよく混合した後、30 分間放置した。
- 2) パセリ (添加濃度 : 0.3 ppm または 0.01 ppm) : 試料 20.0 g 相当に添加用標準溶液 (3 mg/L または 0.1 mg/L) 2 mL を添加しよく混合した後、30 分間放置した。
- 3) キャベツ (添加濃度 : 0.7 ppm または 0.01 ppm) : 試料 20.0 g 相当に添加用標準溶液 (7 mg/L または 0.1 mg/L) 2 mL を添加しよく混合した後、30 分間放置した。
- 4) ばれいしょ (添加濃度 : 0.1 ppm または 0.01 ppm) : 試料 20.0 g 相当に添加用標準溶液 (1 mg/L または 0.1 mg/L) 2 mL を添加しよく混合した後、30 分間放置した。
- 5) オレンジ (添加濃度 : 5 ppm または 0.01 ppm) : 試料 20.0 g 相当に添加用標準溶液 (50 mg/L または 0.1 mg/L) 2 mL を添加しよく混合した後、30 分間放置した。
- 6) りんご (添加濃度 : 2 ppm または 0.01 ppm) : 試料 20.0 g 相当に添加用標準溶液 (20 mg/L または 0.1 mg/L) 2 mL を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

### 1) 抽出

パセリ、キャベツ、ばれいしょ、オレンジ及びりんごの場合は、試料 1 kg を正確に量り、2 mol/L 塩酸 100 g を加え磨砕均一化した後、試料 20.0 g に相当する量を量り採った。これにアセトン 100 mL を加えてホモジナイズした後、ケイソウ土を約 1 cm の厚さに敷いたろ紙 (直径 60 mm、No. 5B、桐山製作所製) を用いて吸引ろ過した。残留物にアセトン 50 mL を加えて同様に操作し、得られたろ液を合わせ、アセトンを加えて正確に 200 mL とした。

小麦の場合は、試料 10.0 g に 0.1 mol/L 塩酸 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、ケイソウ土を約 1 cm の厚さに敷いたろ紙を用いて吸引ろ過した。残留物にアセトン 50 mL を加えて同様に操作し、得られたろ液を合わせ、アセトンを加えて正確に 200 mL とした。

### 2) 酢酸エチル転溶

1) で得られた溶液から正確に 10 mL を 50 mL 容ポリプロピレン製遠心管に分取し、30 mmol/L EDTA-4Na 溶液 10 mL、酢酸エチル 10 mL 及び塩化ナトリウム 2g を加えて振とう抽出した。毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離し、上層のアセトン-酢酸エチル層を 50 mL 容ポリプロピレン製遠心管に採取した。なお、配位化合物であるオキシニ銅の容器への吸着を防ぐため、ポリプロピレン製遠心管を使用した。

### 3) 塩酸転溶

アセトン-酢酸エチル層に 30 mmol/L EDTA-4Na 溶液 10 mL、塩化ナトリウム 2 g 及び 2 mol/L 塩

酸 3 mL を加えて振とう抽出した。毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離し、上層を除去した。残った水層に 2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 3 mL 及び水 10 mL を加えて混合した。

#### 4) 精製

スチレンジビニルベンゼン共重合体カラムクロマトグラフィー

スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラム [InertSep PLS-2 (500 mg/20 mL)] にメタノール、水及び 30 mmol/L EDTA-4Na 溶液各 10 mL を順次注入し、各流出液は捨てた。このカラムに 3) で得られた溶液を注入し流出液は捨てた。ミニカラムを水、次いで、水及びメタノール (2 : 3) 混液各 10 mL で洗浄した後、メタノール 10 mL で溶出し、水で正確に 20 mL としたものを試験溶液とした。なお、オレンジ及びりんごの基準値添加試料については、さらに水及びメタノール (1 : 1) 混液で 10 倍及び 4 倍に希釈したものを試験溶液とした。また、小麦の場合は溶出液を 40°C 以下で濃縮し、溶媒を除去した後、水及びメタノール (1 : 1) 混液に溶かし、正確に 10 mL と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：試料を正確に量り、重量比で 1/10 量の 2 mol/L 塩酸を加え

↓ 磨砕均一化した後、試料 20.0 g に相当する量

↓ 穀類：試料 10.0 g に予め 0.1 mol/L 塩酸 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

↓ アセトンで 200 mL に定容

##### 酢酸エチル転溶

↓ 抽出液 10 mL (試料 1 g 相当分、ただし、小麦試料は 0.5 g 相当分)

↓ 30 mmol/L EDTA-4Na 溶液 10 mL、酢酸エチル 10 mL 及び塩化ナトリウム 2 g 添加

↓ 5 分間振とう

↓ 毎分 3,000 回転、5 分間遠心分離

↓ 上清 (アセトン-酢酸エチル層) を採取

##### 塩酸転溶

↓ 30 mmol/L EDTA-4Na 溶液 10 mL、塩化ナトリウム 2 g 及び 2 mol/L 塩酸 3 mL 添加

↓ 5 分間振とう

↓ 毎分 3,000 回転、5 分間遠心分離

↓ 上清 (アセトン-酢酸エチル層) を除去

↓ 2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 3 mL 及び水 10 mL 添加・・・①

↓ 5 分間振とう



スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラム (500 mg/20 mL)

- ↓ メタノール、水及び 30 mmol/L EDTA-4Na 溶液 各 10 mL でコンディショニング
- ↓ ① を注入 (流出液は捨てた)
- ↓ 水、水及びメタノール (2 : 3) 混液 各 10 mL で洗浄
- ↓ メタノール 10 mL で溶出 (全溶出液を採取)
- ↓ 全溶出液を水で正確に 20 mL とした

試験溶液

- ↓ 小麦の場合は溶出液を 40℃以下で濃縮し、溶媒を除去した後、水及びメタノール (1 : 1) 混液に溶かし、正確に 10 mL としたものを試験溶液とした。

LC-MS/MS

なお、オレンジ及びりんごの基準値添加試料は、さらに水及びメタノール (1 : 1) 混液で 10 倍及び 4 倍に希釈した

## 8. マトリックス添加標準溶液の調製

オキシ銅が含有されていないことを確認した試料から 7. 試験溶液の調製に従い、試験溶液を調製した。スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラムでのメタノール溶出液 10 mL のうち 1 mL を量り採り、40 °C 以下で窒素ガス気流下にて溶媒を除去した後、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 (水及びメタノール (1 : 1) 混液) 2 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。小麦の場合は、スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラムでのメタノール溶出液 10 mL のうち 2 mL を量り採り、40 °C 以下で窒素ガス気流下にて溶媒を除去した後、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 2 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。ただし、オレンジ及びりんごの基準値添加濃度については、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 20 mL 及び 8 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) LC 及び MS 条件の検討

###### ① LC 条件

シリカベースの逆相系カラムについて、4. 測定条件に従い、ピーク形状や MS 検出の感度が良好なカラムを検討した。L-column ODS ((一財) 化学物質評価研究機構製)、Cadenza CD-C18 (Imtakt 製)、Symmetry C18、Atlantis T3 及び XBridge C18 (Waters 製)、InertSustain C18 (GL サイエンス製) の内径 2~2.1 mm、長さ 100 mm、粒子径 3~3.5 µm のカラムについて検討したところ、L-column ODS 及び InertSustain C18 以外の ODS カラムでは、テーリングによるピーク形状の悪化が確認された。L-column ODS 及び InertSustain C18 については、概ね良好な結果が得られたが、MS の感度 (S/N 比) が高かった InertSustain C18 を採用した。配位化合物であるオキシ銅の微量分析には、高純度シリカゲルベースの充填剤かつエンドキャッピング処理が充分行われている分析カラムを選択することが重要であった。

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、ギ酸及び酢酸の添加において良好な感度が得られたが、ギ酸添加時には保持時間の短縮が認められたため、酢酸

を採用し、かつ、その至適濃度は 0.05 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。

オキシシン銅は、オキシシン (8-キノリノール) と銅との錯体であり、酸性域では、銅とのキレート結合がはずれオキシシンと銅とに解離する<sup>1)</sup>。そこで、HPLC-UV を用いて採用した移動相のグラジエント初期組成である 0.05 vol % 酢酸含有アセトニトリル及び 0.05 vol % 酢酸 (1 : 19) 混液でのアイソクラティック分析を行って、オキシシン銅の解離型及び非解離型の有無について確認した。その結果、検出されたピークは 1 本のみであり、その後 60 分後でも他のピークは検出されなかった。検出されたピークが 1 本であり、かつ、移動相組成が酢酸酸性条件下であることを考慮すると、検出されたピークは 8-キノリノールであると推察される。

## ② MS 条件

オキシシン銅標準品を 0.1 vol% ギ酸含有アセトニトリル及び水 (1 : 1) 混液に溶解し、インフュージョン測定を行ったところ、オキシシン銅は、ポジティブモードのみ測定が可能であった。コーン電圧 44 V で測定したマススペクトルを図 1 に示した。ポジティブモードではプロトン付加分子  $[M+H]^+$  の  $m/z$  352 または  $[M]^+$  の  $m/z$  351 は確認されなかったが、8-キノリノール由来の  $m/z$  146.0 が感度良く検出された。

Selected Reaction Monitoring (SRM) モード測定条件について検討した。オキシシン銅から解離した 8-キノリノールのプロトン付加分子イオン由来の  $m/z$  146.0 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  $m/z$  146.0→117.8 を定量イオン (図 2) に、 $m/z$  146.0→127.8 を定性イオン (図 3) に採用した。

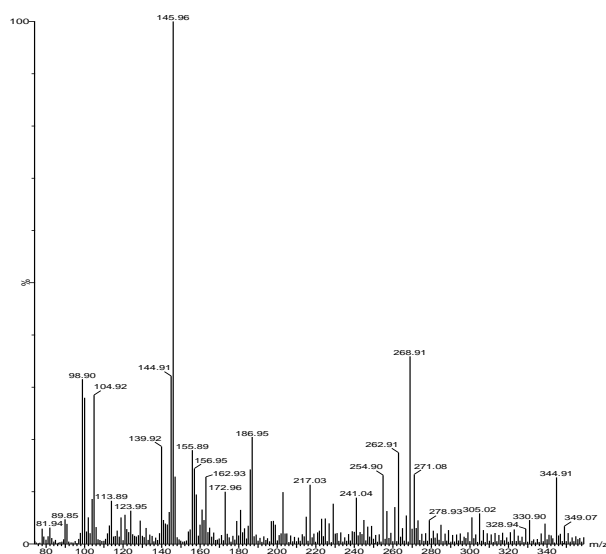


図 1 オキシシン銅 (500 ppb) のマススペクトル

スキャン範囲 : 50~550 amu  
測定条件 : ESI(+), CV=44 V

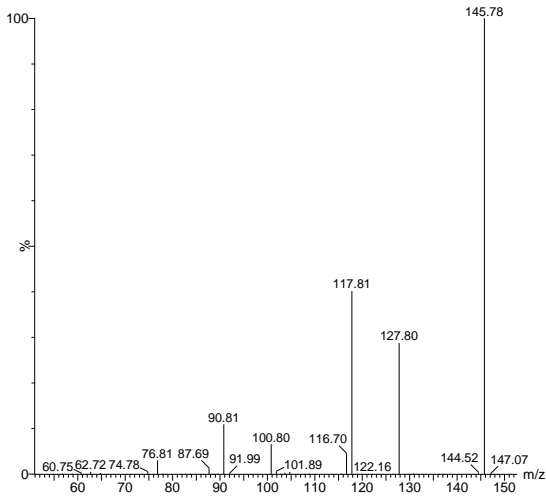


図 2 オキシ銅のプロダクトイオンスペクトル (定量用)  
 プリカーサーイオン:  $m/z$  146  
 測定条件: ESI(+), CV=44 V, CE=20 eV  
 (CV: corn voltage, CE: collision energy)

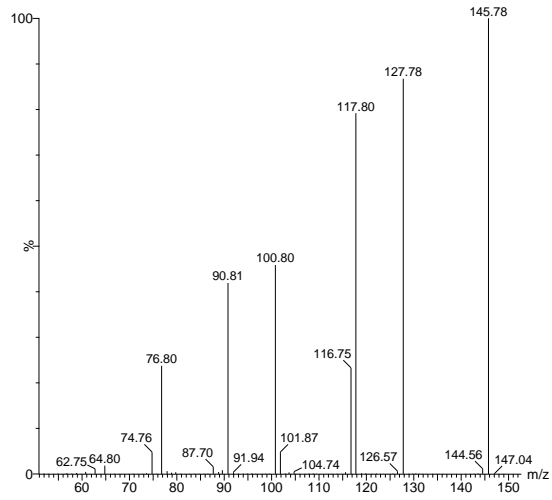


図 3 オキシ銅のプロダクトイオンスペクトル (定性用)  
 プリカーサーイオン:  $m/z$  146  
 測定条件: ESI(+), CV=44 V, CE=24 eV  
 (CV: corn voltage, CE: collision energy)

## 2) 検量線

各定量用イオンのピーク面積値を用いて、絶対検量線法により検量線を作成した。図 4~8 にオキシ銅 (定量イオン測定) の検量線の例を示した。0.000125~0.001 mg/L、0.00125~0.01 mg/L、0.00375~0.03 mg/L、0.00625~0.05 mg/L 及び 0.00875~0.07 mg/L の各濃度範囲で、それぞれ作成した検量線の相関係数は、0.9992~0.9999 の良好な直線性を示した。

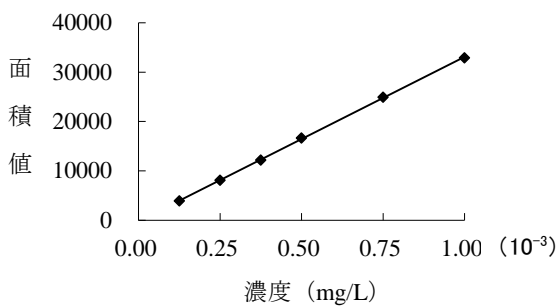


図 4 オキシ銅の検量線例  
 濃度範囲: 0.000125~0.001 mg/L  
 $y=33390x-231$   $r=0.9999$

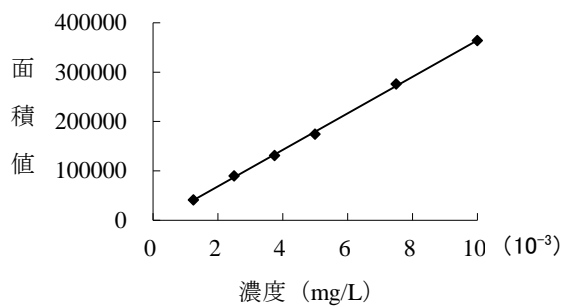


図 5 オキシ銅の検量線例  
 濃度範囲: 0.00125~0.01 mg/L  
 $y=36866x-4897$   $r=0.9992$

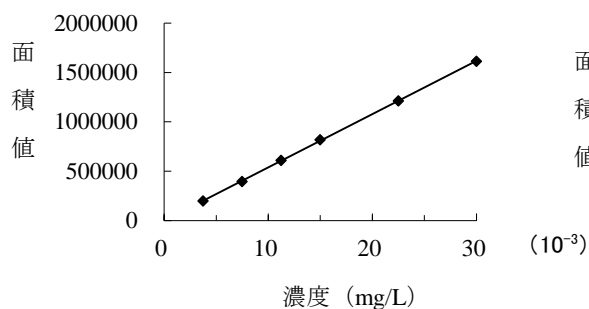


図6 オキシシン銅の検量線例  
濃度範囲：0.00375~0.03 mg/L  
 $y=54174x-4258$   $r=0.9998$

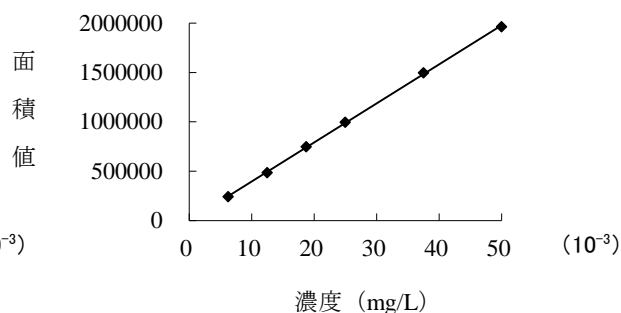


図7 オキシシン銅の検量線例  
濃度範囲：0.00625~0.05 mg/L  
 $y=39774x+5302$   $r=0.9998$

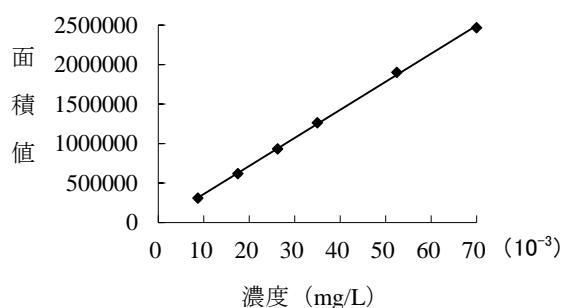


図8 オキシシン銅の検量線例  
濃度範囲：0.00875~0.07 mg/L  
 $y=35776x-2799$   $r=0.9996$

## 2. 既存試験法の適用確認

最初に、通知一斉試験法を用いてオキシシン銅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）をキャベツ、オレンジ及びりんごに適用し、添加回収試験を行った。その結果、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）は、ともに十分な回収率が認められず、いずれも適用が困難であった（表 1）。したがって、新規に個別分析法を開発することとした。

表 1 通知試験法での添加回収試験

|      | 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 (%)             |
| キャベツ | 18.3              | N.D.               |
| オレンジ | 28.1              | 15.6               |
| りんご  | 9.1               | 6.1                |

0.05 mg/kg 相当添加、 $n = 2$

N.D., not detected

### 3. 試験溶液調製法の検討

#### 1) 抽出条件の検討

オキシシン銅は作物の種類によっては磨砕均一化した試料中で極めて不安定であり、ほうれんそう、ピーマン、さやいんげん、ばれいしょ等の中性の試料中では特に不安定で、みかん等の酸性の試料中では比較的安定である。また、その分解は試料を磨砕均一化する際の酸添加により防止されることが知られている<sup>1)</sup>。そこで、塩酸添加によるオキシシン銅の分解防止操作について、オレンジ、ばれいしょ及び小麦試料を用いて検討した(表2)。分解防止操作を行わない場合、オレンジ試料では、十分な回収率が認められたが、ばれいしょ及び小麦試料での回収率は、それぞれ約80%及び約60%であり、回収率の低下が確認された。一方、塩酸を用いて分解防止操作を行った場合、比較的安定とされるオレンジ試料では、目立った回収率の改善は確認されなかったが、ばれいしょ及び小麦試料において回収率の改善が認められた。なつみかん作物残留試験では、重量比で1/10量の1 mol/L塩酸を加え磨砕均一化した後、試料20.0 gに相当する量を量り採っている<sup>2)</sup>。本検討では、小麦試料において、塩酸添加による分解防止効果は、2 mol/L塩酸を用いた場合に最適であったことから、試料に重量比で1/10量の2 mol/L塩酸を添加する操作を採用した。オキシシン銅は、酸性条件下にて銅とのキレート結合がはずれオキシシン(8-キノリノール)と銅に分離する。アセトン抽出液中でのオキシシン銅は、試料に重量比で1/10量の2 mol/L塩酸を添加していることから、解離して存在しているものと推察される。

表2 分解防止操作によるオキシシン銅の回収率 (%)

|       | 分解防止操作    |            |            |            |
|-------|-----------|------------|------------|------------|
|       | 塩酸<br>無添加 | 1 mol/L 塩酸 | 2 mol/L 塩酸 | 3 mol/L 塩酸 |
| オレンジ  | 95.3      | 95.1       | 92.4       | -*         |
| ばれいしょ | 81.5      | 94.5       | 90.0       | -*         |
| 小麦    | 60.1      | 67.1       | 80.4       | 78.7       |

(0.1 mg/kg 相当添加、n = 2)

本検討は以下の手順で行った。

- \* 未実施
- 1) 小麦以外の試料を正確に量り、重量比で1/10量の1または2 mol/L塩酸を加え磨砕均一化した後、試料20.0 gに相当する量を量り採り、オキシシン銅標準溶液(1 µg/mLアセトン溶液)2 mL添加して30分間放置した。小麦試料は試料10.0 gに0.05 mol/L塩酸20 mL(1 mol/L塩酸相当)、0.1 mol/L塩酸20 mL(2 mol/L塩酸相当)または0.15 mol/L塩酸20 mL(3 mol/L塩酸相当)を加えて30分間放置した後、オキシシン銅標準溶液(1 µg/mLアセトン溶液)1 mL添加して、さらに30分間放置した。
  - 2) アセトン100 mLを加えてホモジナイズした後、吸引ろ過した。残留物にアセトン50 mLを加えてホモジナイズし、同様に操作した。得られたろ液を合わせ、アセトンを加えて正確に200 mLとした。
  - 3) アセトン抽出液10 mLに酢酸エチル10 mL、30 mmol/L EDTA-4Na溶液10 mL及び塩化ナトリウム2 gを添加し、酢酸エチル転溶した。
  - 4) 有機層に30 mmol/L EDTA-4Na溶液10 mL、塩化ナトリウム2 g及び2 mol/L塩酸3 mLを添加し、水層転溶した。
  - 5) 水層に2 mol/L水酸化ナトリウム溶液3 mL及び水10 mLを添加した。
  - 6) InertSep PLS-2 ミニカラムにて精製後、LC-MS/MS測定した。

## 2) 有機溶媒への転溶

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抽出する方法を検討した。さらに、オキシシン銅は配位化合物であるため混入金属等による吸着等の影響が考えられる。吸着等による影響を抑えるためには、キレート剤の添加が有効であることから、有機溶媒への転溶操作の際、アセトン抽出液に EDTA-4Na 溶液、酢酸エチル及び塩化ナトリウムを加えて抽出する方法を検討した。

最初に、添加する EDTA-4Na 溶液の濃度によるオキシシン銅の回収率への影響について、オレンジ試料及び小麦試料を用いて比較した (表 3)。その結果、添加する EDTA-4Na 溶液の濃度は 30 mmol/L を採用した。一方、酢酸エチル転溶操作に 30 mmol/L EDTA-2Na 溶液を用いた場合、オキシシン銅の回収率は著しく低下していた。この点に関しては、オレンジ試料では、30 mmol/L EDTA-4Na 溶液を用いた場合のアセトン-水層の pH が 8.3 であったのに対して、30 mmol/L EDTA-2Na 溶液を用いた場合のアセトン-水層の pH が 2.6 であったことから、EDTA-2Na 溶液が酸性なので、オキシシン銅は遊離型となり水に溶けて有機溶媒に転溶されていなかったと推察される。

表 3 EDTA-4Na 及び EDTA-2Na の濃度によるオキシシン銅の回収率 (%)

|      | EDTA-4Na  |           |           |           |           |           | EDTA-2Na  |
|------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
|      | 10 mmol/L | 20 mmol/L | 25 mmol/L | 30 mmol/L | 40 mmol/L | 50 mmol/L | 30 mmol/L |
| オレンジ | 45.5      | 89.1      | 97.9      | 97.7      | 94.9      | 95.6      | 10.8      |
| 小麦   | 43.0      | 93.8      | 94.9      | 95.2      | 93.2      | 92.2      | 20.4      |

(0.1 mg/kg 相当添加、n = 2)

本検討は以下の手順で行った。

- 1) アセトン抽出液 10 mL にオキシシン銅標準溶液 (1 µg/mL アセトン溶液) 0.1 mL、酢酸エチル 10 mL、各濃度の EDTA-4Na 溶液 10 mL (または 30 mmol/L EDTA-2Na 10 mL) 及び塩化ナトリウム 2 g を添加し、酢酸エチル転溶した。
- 2) 有機層に各濃度の EDTA-4Na 溶液 10 mL (または 30 mmol/L EDTA-2Na 10 mL)、塩化ナトリウム 2 g 及び 2 mol/L 塩酸 3 mL を添加し、水層転溶した。
- 3) 水層に 2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 3 mL 及び水 10 mL を添加した。
- 4) InertSep PLS-2 ミニカラムにて精製後、LC-MS/MS 測定した。

次に、30 mmol/L EDTA-4Na 溶液及び酢酸エチルの添加量によるオキシシン銅の回収率をオレンジ試料及び小麦試料を用いて検討した (表 4)。その結果、アセトン抽出液、30 mmol/L EDTA-4Na 溶液及び酢酸エチルが 1:1:1 で、オキシシン銅は有機層へほぼ 100% 移行した。そこで、酢酸エチル転溶操作は 50 mL 容ポリプロピレン製の遠心管を用いたことから、操作性を考慮し、アセトン抽出液、30 mmol/L EDTA-4Na 溶液及び酢酸エチル各 10 mL による転溶操作を採用した。

表 4 酢酸エチル転溶時の酢酸エチル及び 30 mmol/L EDTA-4Na 溶液の添加量によるオキシ  
ン銅の回収率 (%)

|      | 酢酸エチル 5 mL         |       |       | 酢酸エチル 10 mL        |       |       | 酢酸エチル 15 mL        |       |       |
|------|--------------------|-------|-------|--------------------|-------|-------|--------------------|-------|-------|
|      | 30 mmol/L EDTA-4Na |       |       | 30 mmol/L EDTA-4Na |       |       | 30 mmol/L EDTA-4Na |       |       |
|      | 5 mL               | 10 mL | 15 mL | 5 mL               | 10 mL | 15 mL | 5 mL               | 10 mL | 15 mL |
| オレンジ | 95.7               | 96.6  | 97.1  | 97.4               | 98.8  | 99.0  | 89.7               | 97.2  | 96.7  |
| 小麦   | 88.9               | 73.4  | 62.9  | 94.5               | 96.6  | 95.6  | 95.1               | 96.2  | 90.4  |

(0.1 mg/kg 相当添加、n = 2)

本検討は以下の手順で行った。

- 1) アセトン抽出液 10 mL にオキシ銅標準溶液 (1 µg/mL アセトン溶液) 0.1 mL、酢酸エチル 5、10 または 15 mL、30 mmol/L EDTA-4Na 溶液 5、10 または 15 mL を添加した。さらに、30 mmol/L EDTA-4Na 溶液 5 mL に対して 1 g、30 mmol/L EDTA-4Na 溶液 10 mL に対して 2 g、30 mmol/L EDTA-4Na 溶液 15 mL に対して 3 g の塩化ナトリウムを添加し、酢酸エチル転溶した。
- 2) 有機層に 30 mmol/L EDTA-4Na 溶液 10 mL、塩化ナトリウム 2 g 及び 2 mol/L 塩酸 3 mL を添加し、水層転溶した。
- 3) 水層に 2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 3 mL 及び水 10 mL を添加した。
- 4) InertSep PLS-2 ミニカラムにて精製後、LC-MS/MS 測定した。

さらに、酢酸エチル転溶時の転溶回数におけるオキシ銅の回収率についてオレンジ試料及び小麦試料を用いて検討した (表 5)。その結果、酢酸エチル転溶操作 1 回目でオキシ銅は有機層にほぼ 100% 回収され、酢酸エチル転溶操作 2 回目及び 3 回目からオキシ銅の回収は認められなかったことから、酢酸エチルによる転溶操作は 1 回とした。

表 5 酢酸エチル転溶時の転溶回数によるオキシ銅の回収率 (%)

|      | 酢酸エチル転溶操作 |     |     | 計    |
|------|-----------|-----|-----|------|
|      | 1回目       | 2回目 | 3回目 |      |
| オレンジ | 99.0      | 0   | 0   | 99.0 |
| 小麦   | 98.7      | 0   | 0   | 98.7 |

(0.1 mg/kg 相当添加、n = 2)

本検討は以下の手順で行った。

- 1) アセトン抽出液 10 mL にオキシ銅標準溶液 (1 µg/mL アセトン溶液) 0.1 mL を添加した後、酢酸エチル 10 mL、30 mmol/L EDTA-4Na 溶液 10 mL 及び塩化ナトリウム 2 g を添加し、酢酸エチル転溶した。酢酸エチル転溶操作 2 回目及び 3 回目は、水層に酢酸エチル 10 mL を添加し、同様に操作した。
- 2) 各酢酸エチル層に 30 mmol/L EDTA-4Na 溶液 10 mL、塩化ナトリウム 2 g 及び 2 mol/L 塩酸 3 mL を添加し、水層転溶した。
- 3) 水層に 2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 3 mL 及び水 10 mL を添加した。
- 4) InertSep PLS-2 ミニカラムにて精製後、LC-MS/MS 測定した。

最後に、酢酸エチル転溶時の塩化ナトリウム添加量によるオキシ銅の回収率についてオレンジ試料及び小麦試料を用いて検討した結果、2 g を採用した (表 6)。

表 6 酢酸エチル転溶時の塩化ナトリウム添加量によるオキシシン銅の回収率 (%)

|      | 添加する塩化ナトリウムの量 |      |       |       |      |
|------|---------------|------|-------|-------|------|
|      | 0 g           | 1 g  | 1.5 g | 2 g   | 3 g  |
| オレンジ | 44.9          | 93.1 | 99.6  | 100.1 | 97.1 |
| 小麦   | 46.7          | 92.5 | 96.0  | 95.9  | 94.3 |

(0.1 mg/kg 相当添加、 $n = 2$ )

本検討は以下の手順で行った。

- 1) アセトン抽出液 10 mL にオキシシン銅標準溶液 (1  $\mu\text{g/mL}$  アセトン溶液) 0.1 mL、酢酸エチル 10 mL、30 mmol/L EDTA-4Na 溶液 10 mL 及び塩化ナトリウム 0~3 g を添加し、酢酸エチル転溶した。
- 2) 有機層に 30 mmol/L EDTA-4Na 溶液 10 mL、塩化ナトリウム 2 g 及び 2 mol/L 塩酸 3 mL を添加し、水層転溶した。
- 3) 水層に 2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 3 mL 及び水 10 mL を添加した。
- 4) InertSep PLS-2 ミニカラムにて精製後、LC-MS/MS 測定した。

### 3) 塩酸転溶

オキシシン銅は、酸性域では銅とのキレート結合がはずれオキシシン (8-キノリノール) と銅とに解離する。そこで、30 mmol/L EDTA-4Na 溶液を用いることで pH 調整をすることなくアセトン抽出液から酢酸エチルにて有機溶媒転溶させたオキシシン銅を塩酸酸性条件下、水層に転溶させることにより夾雑物質との分離を試みた。また、ミニカラム精製を考慮して、塩酸添加により水層転溶後、等量の水酸化ナトリウム溶液を添加する操作を検討した。2 mol/L 塩酸及び 2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液の添加量におけるオキシシン銅の回収率をオレンジ試料及び小麦試料を用いて比較した結果、2 mol/L 塩酸及び 2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液の添加量は各 3 mL を採用とした (表 7)。

表 7 塩酸転溶時の 2 mol/L 塩酸及び 2 mol/L 水酸化ナトリウムの添加量によるオキシシン銅の回収率 (%)

|      | 添加する 2 mol/L 塩酸及び 2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液の量 |        |          |        |        |
|------|--|--------|----------|--------|--------|
|      | 各 1 mL                                 | 各 2 mL | 各 2.5 mL | 各 3 mL | 各 4 mL |
| オレンジ | 94.9                                   | 94.0   | 99.2     | 100.3  | 101.4  |
| 小麦   | 85.8                                   | 92.9   | 98.7     | 99.3   | 99.1   |

(0.1 mg/kg 相当添加、 $n = 2$ )

本検討は以下の手順で行った。

- 1) アセトン抽出液 10 mL に酢酸エチル 10 mL、30 mmol/L EDTA-4Na 溶液 10 mL 及び塩化ナトリウム 2 g で酢酸エチル転溶した。
- 2) 有機層にオキシシン銅標準溶液 (1  $\mu\text{g/mL}$  アセトン溶液) 0.1 mL、30 mmol/L EDTA-4Na 溶液 10 mL、塩化ナトリウム 2 g 及び 2 mol/L 塩酸 1~4 mL を添加し、水層転溶した。
- 3) 水層に 2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 1~4 mL 及び水 10 mL を添加した。
- 4) InertSep PLS-2 ミニカラムにて精製後、LC-MS/MS 測定した。

塩酸転溶時の 30 mmol/L EDTA-4Na 溶液の添加量によるオキシシン銅の回収率をオレンジ試料及び小麦試料を用いて検討した結果、アセトン-酢酸エチル層に添加する 30 mmol/L EDTA-4Na 溶液の添加量は 10 mL を採用した (表 8)。



表 8 塩酸転溶時の 30 mmol/L EDTA-4Na 溶液の添加量によるオキシシン銅の回収率 (%)

|      | 30 mM EDTA-4Na 溶液 |        |       |
|------|-------------------|--------|-------|
|      | 5 mL              | 7.5 mL | 10 mL |
| オレンジ | 89.2              | 98.2   | 99.0  |
| 小麦   | 95.8              | 99.0   | 99.1  |

(0.1 mg/kg 相当添加、 $n = 2$ )

本検討は以下の手順で行った。

- 1) アセトン抽出液 10 mL に酢酸エチル 10 mL、30 mmol/L EDTA-4Na 溶液 10 mL 及び塩化ナトリウム 2 g で酢酸エチル転溶した。
- 2) 有機層にオキシシン銅標準溶液 (1 µg/mL アセトン溶液) 0.1 mL、30 mmol/L EDTA-4Na 溶液 5、10 または 15 mL、30 mmol/L EDTA-4Na 溶液 5 mL に対して 1 g、30 mmol/L EDTA-4Na 溶液 7.5 mL に対して 1.5 g、30 mmol/L EDTA-4Na 溶液 10 mL に対して 2 g の塩化ナトリウム及び 2 mol/L 塩酸 3 mL を添加し、水層転溶した。
- 3) 水層に 2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 3 mL 及び水 10 mL を添加した。
- 4) InertSep PLS-2 ミニカラムにて精製後、LC-MS/MS 測定した。

また、塩酸転溶時の塩化ナトリウム添加量によるオキシシン銅の回収率についてオレンジ試料及び小麦試料を用いて検討した結果、塩化ナトリウムの添加量は、2 g を採用した (表 9)。

表 9 塩酸転溶時の塩化ナトリウム添加量によるオキシシン銅の回収率 (%)

|      | 添加する塩化ナトリウムの量 |      |       |       |
|------|---------------|------|-------|-------|
|      | 0 g           | 1 g  | 1.5 g | 2 g   |
| オレンジ | 46.4          | 94.3 | 100.4 | 100.5 |
| 小麦   | 56.5          | 93.4 | 98.6  | 98.9  |

(0.1 mg/kg 相当添加、 $n = 2$ )

本検討は以下の手順で行った。

- 1) アセトン抽出液 10 mL に酢酸エチル 10 mL、30 mmol/L EDTA-4Na 溶液 10 mL 及び塩化ナトリウム 2 g で酢酸エチル転溶した。
- 2) 有機層にオキシシン銅標準溶液 (1 µg/mL アセトン溶液) 0.1 mL、30 mmol/L EDTA-4Na 溶液 10 mL、塩化ナトリウム 0~2 g 及び 2 mol/L 塩酸 3 mL を添加し、水層転溶した。
- 3) 水層に 2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 3 mL 及び水 10 mL を添加した。
- 4) InertSep PLS-2 ミニカラムにて精製後、LC-MS/MS 測定した。

塩酸転溶時の転溶回数によるオキシシン銅の回収率についてオレンジ試料及び小麦試料を用いて検討した (表 10)。その結果、塩酸転溶操作 1 回目でオキシシン銅は水層にほぼ 100% 回収され、塩酸転溶操作

2 回目及び 3 回目からオキシシン銅の回収は認められなかったことから、塩酸による水層への転溶操作は 1 回とした。

表 10 塩酸転溶時の転溶回数によるオキシシン銅の回収率 (%)

|      | 塩酸転溶操作 |     |     | 計    |
|------|--------|-----|-----|------|
|      | 1回目    | 2回目 | 3回目 |      |
| オレンジ | 99.2   | 0   | 0   | 99.2 |
| 小麦   | 99.3   | 0   | 0   | 99.3 |

(0.1 mg/kg 相当添加、 $n = 2$ )

本検討は以下の手順で行った。

- 1) アセトン抽出液 10 mL に酢酸エチル 10 mL、30 mmol/L EDTA-4Na 溶液 10 mL 及び塩化ナトリウム 2 g で酢酸エチル転溶した。
- 2) 有機層にオキシシン銅標準溶液 (1 µg/mL アセトン溶液) 0.1 mL を加えた後、30 mmol/L EDTA-4Na 溶液 10 mL、塩化ナトリウム 2g 及び 2 mol/L 塩酸 3 mL を添加し、水層転溶した。塩酸転溶操作 2 回目及び 3 回目は、有機層に 30 mmol/L EDTA-4Na 溶液 10 mL、塩化ナトリウム 2g 及び 2 mol/L 塩酸 3 mL を添加し、同様に操作した。
- 3) 各水層に 2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 3 mL 及び水 10 mL を添加した。
- 4) InertSep PLS-2 ミニカラムにて精製後、LC-MS/MS 測定した

#### 4) ミニカラム精製

オキシシン銅は配位化合物であるためシリカゲル中の金属不純物や混入金属による吸着が考えられる。C18 ミニカラム及びグラファイトカーボンミニカラムからはオキシシン銅はほとんど溶出されてこなかったことから (5. その他の試験法検討に関連する事項参照)、スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラムを用いた精製を試みた。InertSep PLS-2 500 mg/20 mL (ジーエルサイエンス社製) からのオキシシン銅の溶出パターンを表 11 に示す。オキシシン銅は水及びメタノール (1 : 1) 混液では全く溶出されず、水及びメタノール (4 : 6) 混液では 20 mL まで溶出されなかった。また、メタノール 10 mL で溶出させることにより、ほぼ 100% のオキシシン銅が回収された。

表 11 InertSep PLS-2 (500 mg/20 mL) からのオキシシン銅溶出率 (%)

| 溶出液 (mL) | 水及びメタノール混液の比率 |       |       |       |       |        |
|----------|---------------|-------|-------|-------|-------|--------|
|          | 5 : 5         | 4 : 6 | 3 : 7 | 2 : 8 | 1 : 9 | 0 : 10 |
| 0-10     | 0             | 0     | 0     | 20    | 93    | 99     |
| 10-20    | 0             | 0     | 19    | 74    | 5     | 0      |
| 20-30    | 0             | 2     | 56    | 2     | 0     | 0      |
| 30-40    | 0             | 7     | 20    | 0     | 0     | 0      |
| 40-50 *  | 101           | 89    | 3     | 0     | 0     | 0      |
| 合計       | 101           | 98    | 98    | 96    | 98    | 99     |

\*メタノール10 mLで溶出させた。

マトリックス存在下においても、表 11 と同様の InertSep PLS-2 (500 mg/20 mL) 溶出挙動を示すか否か、ミニカラムの洗浄液に水及びメタノール (2 : 3) 混液 10 mL、溶出液にメタノール 10 mL を用いてオレンジ試料及び小麦試料でのオキシシン銅のカラム回収率を検討した。さらに、2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 3 mL を加えた PLS-2 ミニカラム負荷液の塩濃度によるカラム回収率への影響についても検討するため、2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 3 mL を加えた PLS-2 ミニカラム負荷液に水を添加した場合のオキシシン銅のカラム回収率についても検討した。その結果、2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 3 mL を加えた PLS-2 ミニカラム負荷液に水を添加しない場合、オキシシン銅のカラム回収率はオレンジ試料で約 80%、小麦試料で約 90% であった (表 12)。この点に関しては、負荷液の塩濃度が高いことが、InertSep PLS-2 (500 mg/20 mL) 溶出挙動に影響を及ぼしていることが推察される。一方、2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 3 mL を加えた PLS-2 ミニカラム負荷液に水を添加することにより、オレンジ試料及び小麦試料ともに、カラム回収率は概ね 100% であった (表 12)。以上の結果より、PLS-2 ミニカラム負荷液には、2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 3 mL を加えた後、水 10 mL を添加することとし、水及びメタノール (2 : 3) 混液 10 mL で洗浄し、メタノール 10 mL で溶出することとした。

表 12 PLS-2 負荷液への水の添加量によるオキシシン銅の回収率 (%)

|      | H <sub>2</sub> O |      |        |       |
|------|------------------|------|--------|-------|
|      | 0 mL             | 5 mL | 7.5 mL | 10 mL |
| オレンジ | 79.1             | 97.1 | 99.4   | 99.2  |
| 小麦   | 89.3             | 97.6 | 99.9   | 100.8 |

(0.1 mg/kg 相当添加、n = 2)

本検討は以下の手順で行った。

- 1) アセトン抽出液 10 mL に酢酸エチル 10 mL、30 mmol/L EDTA-4Na 溶液 10 mL 及び塩化ナトリウム 2 g で酢酸エチル転溶した。
- 2) 有機層に 30 mmol/L EDTA-4Na 溶液 10 mL、塩化ナトリウム 2 g 及び 2 mol/L 塩酸 3 mL を添加し、水層転溶した。
- 3) 水層にオキシシン銅標準溶液 (1 µg/mL アセトン溶液) 0.1 mL、2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 3 mL 及び水 0~10 mL を添加した。
- 4) InertSep PLS-2 ミニカラム精製後、LC-MS/MS 測定した。

オキシシン銅は、酸性域ではオキシシン (8-キノリノール) と銅とに解離する。オキシシン (8-キノリノール) の等電点が中性付近<sup>3)</sup> であることから、PLS-2 ミニカラムの負荷液の pH による影響を検討した (表 13)。その結果、オキシシン銅の回収率は PLS-2 負荷液の pH 4.0 で約 45%、PLS-2 負荷液の pH 3.0 で約 9% にまで低下していたが、PLS-2 負荷液の pH 4.5~9.0 の範囲では、何れも 100% の固相カラムからの回収率であった。

表 13 PLS-2 負荷液の pH によるオキシシン銅の回収率 (%)

|      | PLS-2 ミニカラム負荷液の pH |        |        |        |        |        |        |        |
|------|--------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
|      | pH 3.0             | pH 4.0 | pH 4.5 | pH 5.0 | pH 6.0 | pH 7.0 | pH 8.0 | pH 9.0 |
| オレンジ | 8.9                | 45.2   | 100.0  | 101.2  | 101.0  | 101.0  | 100.3  | 101.0  |

(0.1 mg/kg 相当添加,  $n = 2$ )

本検討は以下の手順で行った。

- 1) アセトン抽出液 10 mL に酢酸エチル 10 mL、30 mmol/L EDTA-4Na 溶液 10 mL 及び塩化ナトリウム 2 g で酢酸エチル転溶した。
- 2) 有機層に 30 mmol/L EDTA-4Na 溶液 10 mL、塩化ナトリウム 2 g 及び 2 mol/L 塩酸 3 mL を添加し、水層転溶した。
- 3) 水層にオキシシン銅標準溶液 (1 µg/mL アセトン溶液) 0.1 mL、2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 3 mL 及び水 10 mL を添加した。
- 4) 塩酸または水酸化ナトリウム溶液で PLS-2 ミニカラム負荷液の pH を調整した。
- 5) InertSep PLS-2 ミニカラム精製後、LC-MS/MS 測定した。

検討する各試料の 2 mol/L 塩酸 3 mL 添加時の水-アセトン層及び PLS-2 負荷液の pH について、pH メーターを用いて比較した (表 14)。その結果、何れの試料においても 2 mol/L 塩酸 3 mL 添加時の水-アセトン層の pH は、概ね 0.30 付近であった。環境省公示によるオキシシン銅分析法<sup>4)</sup>では、オキシシン銅を 2 mol/L 塩酸を用いて pH 2 以下とし水層転溶させていることから、2 mol/L 塩酸 3 mL 添加により、その pH は十分な酸性であった。また、2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 3 mL 及び水 10 mL 添加後の PLS-2 負荷液の pH は、概ね pH 5.0 付近であり、カラムからの回収が充分に見込まれる pH 域であった。PLS-2 負荷液にはアセトンを含有しているため pH 測定に影響を与えることも考えられたため、pH 試験紙を用いて同様の操作を行ったところ、pH の目立った差異は認められなかった。

表 14 2 mol/L 塩酸 3 mL 添加時の水-アセトン層及び PLS-2 負荷液の pH

|       | 2 mol/L 塩酸添加時の<br>水-アセトン層の pH | PLS-2 負荷液の pH |
|-------|-------------------------------|---------------|
| 小麦    | 0.32                          | 5.45          |
| パセリ   | 0.31                          | 5.02          |
| キャベツ  | 0.31                          | 5.04          |
| ばれいしょ | 0.30                          | 5.04          |
| オレンジ  | 0.30                          | 4.91          |
| りんご   | 0.30                          | 5.01          |

(0.1 mg/kg 相当添加,  $n = 2$ )

本検討は以下の手順で行った。

- 1) アセトン抽出液 10 mL に酢酸エチル 10 mL、30 mmol/L EDTA-4Na 溶液 10 mL 及び塩化ナトリウム 2 g で酢酸エチル転溶した。
- 2) 有機層に 30 mmol/L EDTA-4Na 溶液 10 mL、塩化ナトリウム 2 g 及び 2 mol/L 塩酸 3 mL で、水層転溶した後、水-アセトン層の pH を測定した。
- 3) 水層に 2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 3 mL 及び水 10 mL を添加した後、PLS-2 負荷液の pH を測定した。

オキシシン銅は水への溶解度が低いことから、PLS-2 ミニカラム負荷液中でオキシシン銅が析出する現象も考えられたため、PLS-2 ミニカラム負荷液にメタノールを添加することにより回収率の改善が図れるかを検討した。基準値の一番高いオレンジ試料を用いて、PLS-2 ミニカラム負荷液にメタノール 5 mL 添加及びメタノールを添加せずに負荷したものと回収率の比較を行った。その結果、基準値の一番高いオレンジ試料において、PLS-2 ミニカラム負荷液の有機溶媒比率による影響は認められなかった（表 15）。

表 15 PLS-2 ミニカラム負荷液へのメタノール添加によるオキシシン銅の回収率（%）

|      | PLS-2 ミニカラム負荷液 |             |
|------|----------------|-------------|
|      | メタノール添加なし      | メタノール5 mL添加 |
| オレンジ | 102.7          | 102.3       |

(5 mg/kg 相当添加、 $n = 2$ )

本検討は以下の手順で行った。

- 1) アセトン抽出液 10 mL に酢酸エチル 10 mL、30 mmol/L EDTA-4Na 溶液 10 mL 及び塩化ナトリウム 2 g で酢酸エチル転溶した。
- 2) 有機層に 30 mmol/L EDTA-4Na 溶液 10 mL、塩化ナトリウム 2 g 及び 2 mol/L 塩酸 3 mL で、水層転溶した。
- 3) 水層にオキシシン銅標準溶液 (50 µg/mL アセトン溶液) 0.1 mL、2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 3 mL、メタノール 0 または 5 mL 及び水 10 mL を添加した。
- 4) InertSep PLS-2 ミニカラム精製 (水及びメタノール (2 : 3) 混液 10 mL で洗浄、メタノール 10 mL で溶出) 後、LC-MS/MS 測定した。

同じ官能基を持つ固相であっても、メーカーが異なると溶出位置がずれる可能性があることから、同じスチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラムである Sep-Pak Vac 6cc PS-2 Cartridges (500 mg/6 mL、Waters 社製) 及び InertSep PLS-2 (500 mg/20 mL、GL サイエンス社製) との回収率の比較を行ったところ、両者とも同等の回収率が得られた (表 16)。

表 16 スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラムからのオキシシン銅溶出率（%）

|      | Sep-Pak PS-2 | InertSep PLS-2 |
|------|--------------|----------------|
| オレンジ | 100.6        | 99.9           |

(0.1 mg/kg 相当添加、 $n = 2$ )

本検討は以下の手順で行った。

- 1) アセトン抽出液 10 mL に酢酸エチル 10 mL、30 mmol/L EDTA-4Na 溶液 10 mL 及び塩化ナトリウム 2 g で酢酸エチル転溶した。
- 2) 有機層に 30 mmol/L EDTA-4Na 溶液 10 mL、塩化ナトリウム 2 g 及び 2 mol/L 塩酸 3 mL を添加し、水層転溶した。
- 3) 水層にオキシシン銅標準溶液 (1 µg/mL アセトン溶液) 0.1 mL、2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 3 mL 及び水 10 mL を添加した。
- 4) 各 SDB ミニカラム精製後、LC-MS/MS 測定した。

検討した本分析法が適用可能であるか、小麦、パセリ、キャベツ、ばれいしょ、オレンジ及びびりんご試料を用いて回収率の確認を行った。実験方法の 7. 試験溶液の調製に従って試験溶液を調製した。その結果、各検討試料から調製した試験溶液は、ほとんど無色であり、何れの試料においても概ね良好な回収率が得られた (表 17)。

表 17 オキシシン銅の回収率 (%)

|       | 回収率 (%) |
|-------|---------|
| 小麦    | 87.2    |
| パセリ   | 93.3    |
| キャベツ  | 90.1    |
| ばれいしょ | 90.2    |
| オレンジ  | 91.0    |
| りんご   | 92.8    |

(0.1 mg/kg 相当添加、 $n = 2$ )

本検討は以下の手順で行った。

- 1) 小麦以外の試料を正確に量り、重量比で 1/10 量の 2mol/L 塩酸を加え磨砕均一化した後、試料 20.0 g に相当する量を量り採り、オキシシン銅標準溶液 (1 µg/mL アセトン溶液) 2 mL 添加して 30 分間放置した。小麦試料は試料 10.0 g に 0.1 mol/L 塩酸 20 mL を加えて 30 分間放置した後、オキシシン銅標準溶液 (1 µg/mL アセトン溶液) 1 mL 添加して、さらに 30 分間放置した。
- 2) アセトン 100 mL を加えてホモジナイズした後、吸引ろ過した。残留物にアセトン 50 mL を加えてホモジナイズし、同様に操作した。得られたろ液を合わせ、アセトンを加えて正確に 200 mL とした。
- 3) アセトン抽出液 10 mL に酢酸エチル 10 mL、30 mmol/L EDTA-4Na 溶液 10 mL 及び塩化ナトリウム 2 g を添加し、酢酸エチル転溶した。
- 4) 有機層に 30 mmol/L EDTA-4Na 溶液 10 mL、塩化ナトリウム 2 g 及び 2mol/L 塩酸 3 mL を添加し、水層転溶した。
- 5) 水層に 2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 3 mL 及び水 10 mL を添加した。
- 6) InertSep PLS-2 ミニカラムにて精製後、LC-MS/MS 測定した。

#### 4. 添加回収試験

小麦、パセリ、キャベツ、ばれいしょ、オレンジ及びびりんごの 6 食品を試料に用いて、実験方法の 7. 試験溶液の調製に従って添加回収試験 (基準値濃度または定量限界値濃度の 2 濃度) を実施した。添加回収試験における回収率 100% 相当の溶媒標準溶液、各食品のブランク試料及び添加試料の代表的なクロマトグラムを図 9~20 に示した。また、各食品のスキャン測定による代表的なトータルイオンクロマトグラムを図 21 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。

## 1) 選択性

選択性の検討結果を表 18 に示した。検討した何れの試料においても、ブランク試料にオキシ銅の定量を妨害するピークは認められなかった。

表 18 選択性の評価

| No. | 分析対象化合物 | 食品名   | 定量限界<br>[検出限界]<br>(mg/kg) | 基準値<br>(ppm) | 妨害ピークの許容範囲の評価 |     |         | ピーク面積(高さ) <sup>1)</sup> |      |     |       |                           |         |         | 選択性の<br>評価 <sup>3)</sup> | 備考 |                    |
|-----|---------|-------|---------------------------|--------------|---------------|-----|---------|-------------------------|------|-----|-------|---------------------------|---------|---------|--------------------------|----|--------------------|
|     |         |       |                           |              | 評価濃度<br>(ppm) |     | 評価基準    | 面積又は<br>高さの別            | ブランク |     |       | マトリクス添加標準溶液 <sup>2)</sup> |         |         |                          |    | 面積(高さ)<br>比(a)/(b) |
|     |         |       |                           |              | 基準値           | 0.1 |         |                         | n=1  | n=2 | 平均(a) | n=1                       | n=2     | 平均(b)   |                          |    |                    |
|     | オキシ銅    | 小麦    | 0.01                      | 0.1          | 基準値           | 0.1 | < 0.100 | 面積                      | 172  | 277 | 225   | 81801                     | 81240   | 81521   | 0.003                    | ○  |                    |
|     |         | バゼリ   | 0.01                      | 0.3          | 基準値           | 0.3 | < 0.100 | 面積                      | 506  | 638 | 572   | 572959                    | 581632  | 577296  | 0.001                    | ○  |                    |
|     |         | キャベツ  | 0.01                      | 0.7          | 基準値           | 0.7 | < 0.100 | 面積                      | 18   | 19  | 19    | 1151084                   | 1154446 | 1152765 | 0.000                    | ○  |                    |
|     |         | ばれいしょ | 0.01                      | 0.1          | 基準値           | 0.1 | < 0.100 | 面積                      | 260  | 332 | 296   | 165058                    | 163777  | 164418  | 0.002                    | ○  |                    |
|     |         | オレンジ  | 0.01                      | 5.           | 基準値           | 5.  | < 0.100 | 面積                      | 314  | 440 | 377   | 823352                    | 829715  | 826534  | 0.000                    | ○  |                    |
|     |         | りんご   | 0.01                      | 2.           | 基準値           | 2.  | < 0.100 | 面積                      | 64   | 174 | 119   | 832938                    | 833027  | 832983  | 0.000                    | ○  |                    |

\*1 ブランク試料、標準溶液の順に注入して測定した結果から評価する。(必要に応じて起爆注入を行う。)

\*2 試料中の濃度が「評価濃度」相当になるように、ブランク試料の試験溶液で調整した標準溶液(マトリクス添加標準溶液)を用いる。  
ブランク試料に妨害ピークが観察されなかった場合には、標準溶液のピーク面積(高さ)は求めなくても良い。

\*3 面積(高さ)比が、妨害ピークの許容範囲の評価基準に適合する場合には「○」、適合しない場合には「×」を記載する。

## 2) 真度及び精度

真度及び併行精度の検討結果を表 19 に示した。残留基準値濃度 (0.1~5 ppm) での添加回収試験における真度は 84.5~93.5 %、併行精度の相対標準偏差は 1.0~2.1%であった。また、定量限界値濃度 (一律基準値) での添加回収試験における真度は 82.8~92.9 %、併行精度の相対標準偏差は 1.5~2.1 %であった。回収率及び併行精度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。さらに、定量限界値濃度での添加回収試験のクロマトグラムより算出した S/N 比の平均値は 53.6~96.6 であり、検討した何れの試料においても S/N ≥ 10 を満たしていた(表 20)。

表 19 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<br>[検出限界]<br>(mg/kg) | 基準値<br>(ppm) | 添加濃度<br>(ppm) | 定量限界<br>の評価 <sup>1)</sup> | 検量線   |       |                  | 回収率(%) |      |      |      |      | 真度<br>(%) | 併行精度<br>(RSD%) | SN <sup>2)</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  |        |  |
|     |         |       |                           |              |               |                           | 検量線   | 検量線   | 検量線              | 検量線    | 検量線  | 検量線  | 検量線  | 検量線  |           |                | 検量線              | 検量線  | 検量線  |        |  |
|     | オキシ銅    | 小麦    | 0.01                      | 0.1          | 0.1           | —                         | 46016 | -614  | 0.9998           | 85.6   | 82.8 | 84.6 | 83.9 | 85.7 | 84.5      | 1.4            | 89.0             | 61.8 | 75.4 | #DN/0! |  |
|     |         | 小麦    | 0.01                      | 0.1          | 0.01          | S/N                       | 36340 | -204  | 0.9996           | 81.6   | 80.9 | 83.4 | 84.1 | 83.9 | 82.8      | 1.7            | 77.6             | 61.8 | 69.7 | #DN/0! |  |
|     |         | バゼリ   | 0.01                      | 0.3          | 0.3           | —                         | 54174 | -4258 | 0.9998           | 93.0   | 95.2 | 93.5 | 91.5 | 94.1 | 93.5      | 1.5            | —                | —    | —    | #DN/0! |  |
|     |         | バゼリ   | 0.01                      | 0.3          | 0.01          | S/N                       | 37709 | -358  | 0.9993           | 93.5   | 92.5 | 93.6 | 90.5 | 91.1 | 92.2      | 1.5            | 89.0             | 61.8 | 75.4 | #DN/0! |  |
|     |         | キャベツ  | 0.01                      | 0.7          | 0.7           | —                         | 35776 | -2799 | 0.9996           | 90.8   | 90.7 | 91.3 | 93.1 | 90.4 | 91.3      | 1.2            | —                | —    | —    | #DN/0! |  |
|     |         | キャベツ  | 0.01                      | 0.7          | 0.01          | S/N                       | 31862 | -57   | 0.9993           | 94.0   | 95.4 | 91.3 | 93.0 | 90.7 | 92.9      | 2.1            | 61.8             | 56.0 | 58.9 | #DN/0! |  |
|     |         | ばれいしょ | 0.01                      | 0.1          | 0.1           | —                         | 36866 | -4897 | 0.9992           | 87.4   | 91.2 | 90.0 | 90.0 | 92.4 | 90.2      | 2.1            | —                | —    | —    | #DN/0! |  |
|     |         | ばれいしょ | 0.01                      | 0.1          | 0.01          | S/N                       | 39799 | -250  | 0.9996           | 91.8   | 92.0 | 89.8 | 89.3 | 93.6 | 91.3      | 1.9            | 104.1            | 77.6 | 90.9 | #DN/0! |  |
|     |         | オレンジ  | 0.01                      | 5.           | 5.            | —                         | 39774 | -5302 | 0.9998           | 94.6   | 91.7 | 90.4 | 92.3 | 92.5 | 92.3      | 1.7            | —                | —    | —    | #DN/0! |  |
|     |         | オレンジ  | 0.01                      | 5.           | 0.01          | S/N                       | 33390 | -231  | 0.9999           | 92.4   | 93.9 | 91.3 | 94.8 | 91.8 | 92.8      | 1.6            | 56.0             | 51.2 | 53.6 | #DN/0! |  |
|     |         | りんご   | 0.01                      | 2.           | 2.            | —                         | 28433 | 1679  | 0.9997           | 91.7   | 90.0 | 91.4 | 89.7 | 90.4 | 90.6      | 1.0            | —                | —    | —    | #DN/0! |  |
|     |         | りんご   | 0.01                      | 2.           | 0.01          | S/N                       | 33390 | -231  | 0.9999           | 94.1   | 93.0 | 90.8 | 92.7 | 90.0 | 92.1      | 1.8            | 104.1            | 89.0 | 96.6 | #DN/0! |  |

\*1 SN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SNを求める。

表 20 定量限界濃度での S/N 比

| No. | 分析対象化合物 | 食品名   | 定量<br>イオン<br>(m/z) | 定量限界<br>(mg/kg) | 基準値<br>(ppm) | 添加濃度<br>(ppm) | Max.                  |             |             |             |                  |                  |             | Min.                  |             |             |             |                  |                  |             | SN    |      | 備考 |
|-----|---------|-------|--------------------|-----------------|--------------|---------------|-----------------------|-------------|-------------|-------------|------------------|------------------|-------------|-----------------------|-------------|-------------|-------------|------------------|------------------|-------------|-------|------|----|
|     |         |       |                    |                 |              |               | ピークの<br>最大値<br>(Dmax) | ノイズ         |             |             | ピーク<br>高さ<br>(D) | ピーク<br>高さ<br>(S) | ノイズ幅<br>(N) | ピークの<br>最大値<br>(Dmax) | ノイズ         |             |             | ピーク<br>高さ<br>(D) | ピーク<br>高さ<br>(S) | ノイズ幅<br>(N) | Max.  | Min. |    |
|     |         |       |                    |                 |              |               |                       | 最大値<br>(E1) | 最小値<br>(E2) | 中央値<br>(C)* |                  |                  |             |                       | 最大値<br>(E1) | 最小値<br>(E2) | 中央値<br>(C)* |                  |                  |             |       |      |    |
|     | オキシ銅    | 小麦    | 118                | 0.01            | 0.1          | 0.01          | 254                   | 8           | 0           | 4           | 252.4            | 248.4            | 3.2         | 254                   | 10          | 0           | 5           | 252.0            | 247.0            | 4.0         | 77.6  | 61.8 |    |
|     |         | バゼリ   | 118                | 0.01            | 0.3          | 0.01          | 254                   | 7           | 0           | 4           | 252.6            | 249.1            | 2.8         | 254                   | 10          | 0           | 5           | 252.0            | 247.0            | 4.0         | 89.0  | 61.8 |    |
|     |         | キャベツ  | 118                | 0.01            | 0.7          | 0.01          | 254                   | 10          | 0           | 5           | 252.0            | 247.0            | 4.0         | 254                   | 11          | 0           | 6           | 251.8            | 246.3            | 4.4         | 61.8  | 56.0 |    |
|     |         | ばれいしょ | 118                | 0.01            | 0.1          | 0.01          | 254                   | 6           | 0           | 3           | 252.8            | 249.8            | 2.4         | 254                   | 8           | 0           | 4           | 252.4            | 248.4            | 3.2         | 104.1 | 77.6 |    |
|     |         | オレンジ  | 118                | 0.01            | 5.           | 0.01          | 254                   | 11          | 0           | 6           | 251.8            | 248.3            | 4.4         | 254                   | 12          | 0           | 6           | 251.6            | 245.6            | 4.8         | 56.0  | 51.2 |    |
|     |         | りんご   | 118                | 0.01            | 2.           | 0.01          | 254                   | 6           | 0           | 3           | 252.8            | 249.8            | 2.4         | 254                   | 7           | 0           | 4           | 252.6            | 249.1            | 2.8         | 104.1 | 89.0 |    |

\* ベースラインにはノイズの中央値(C)を用いることが望ましいが、それが困難な場合にはノイズの最大値(E1)と最小値(E2)の平均値[(E1+E2)/2]を用いても良い。

### 3) 試料マトリックスの測定値への影響

添加回収試験（基準値濃度または定量限界濃度の2濃度）における回収率100%相当濃度になるように調製したマトリックス添加標準溶液と溶媒標準溶液を交互に2回測定し、そのピーク面積比から試料マトリックスの測定への影響を評価した。ピーク面積比は0.97~1.04の範囲であり、検討した何れの試料においても、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21)。

表21 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<br>〔検出限<br>界〕<br>(mg/kg) | 基準値<br>(ppm) | 添加濃度<br>(ppm) | 標準溶液<br>濃度 <sup>1)</sup><br>(mg/L) | ピーク面積(高さ) <sup>2)</sup> |                    |                            |         |         |         |         | 備考      |                              |    |
|-----|---------|-------|-------------------------------|--------------|---------------|------------------------------------|-------------------------|--------------------|----------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|------------------------------|----|
|     |         |       |                               |              |               |                                    | 面積又は<br>高さの別            | ブランク <sup>3)</sup> | マトリックス添加標準溶液 <sup>4)</sup> |         |         | 溶媒標準溶液  |         |         | ピーク面積<br>(高さ)比 <sup>5)</sup> |    |
|     |         |       |                               |              |               |                                    |                         |                    | n=1                        | n=2     | 平均      | n=1     | n=2     |         |                              | 平均 |
|     | オキシニ銅   | 小麦    | 0.01                          | 0.1          | 0.1           | 0.0025                             | 面積                      | 172                | 81801                      | 81240   | 81349   | 79929   | 80307   | 80118   | 1.02                         |    |
|     |         | 小麦    | 0.01                          | 0.1          | 0.01          | 0.00025                            | 面積                      | 172                | 7946                       | 7743    | 7673    | 7488    | 7479    | 7484    | 1.03                         |    |
|     |         | バセリ   | 0.01                          | 0.3          | 0.3           | 0.015                              | 面積                      | 506                | 572959                     | 581632  | 576790  | 554481  | 557904  | 556193  | 1.04                         |    |
|     |         | バセリ   | 0.01                          | 0.3          | 0.01          | 0.0005                             | 面積                      | 506                | 18457                      | 18775   | 18110   | 18257   | 17823   | 18040   | 1.00                         |    |
|     |         | キャベツ  | 0.01                          | 0.7          | 0.7           | 0.035                              | 面積                      | 18                 | 1151084                    | 1154446 | 1152747 | 1151003 | 1143533 | 1147268 | 1.00                         |    |
|     |         | キャベツ  | 0.01                          | 0.7          | 0.01          | 0.0005                             | 面積                      | 18                 | 16160                      | 15760   | 15942   | 16870   | 15981   | 16426   | 0.97                         |    |
|     |         | ばれいしょ | 0.01                          | 0.1          | 0.1           | 0.005                              | 面積                      | 260                | 165058                     | 163777  | 164158  | 164640  | 163507  | 164074  | 1.00                         |    |
|     |         | ばれいしょ | 0.01                          | 0.1          | 0.01          | 0.0005                             | 面積                      | 260                | 15508                      | 15360   | 15174   | 15454   | 14973   | 15214   | 1.00                         |    |
|     |         | オレンジ  | 0.01                          | 5.           | 5.            | 0.025                              | 面積                      | 314                | 823352                     | 829715  | 826220  | 812786  | 823815  | 818301  | 1.01                         |    |
|     |         | オレンジ  | 0.01                          | 5.           | 0.01          | 0.0005                             | 面積                      | 314                | 15648                      | 15780   | 15400   | 16017   | 15284   | 15651   | 0.98                         |    |
|     |         | りんご   | 0.01                          | 2.           | 2.            | 0.025                              | 面積                      | 64                 | 832938                     | 833027  | 832919  | 827767  | 828929  | 828348  | 1.01                         |    |
|     |         | りんご   | 0.01                          | 2.           | 0.01          | 0.0005                             | 面積                      | 64                 | 16003                      | 16327   | 16101   | 16085   | 16267   | 16176   | 1.00                         |    |

<sup>1)</sup> 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。

<sup>2)</sup> 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。)

<sup>3)</sup> 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。

<sup>4)</sup> 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。

<sup>5)</sup> 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。

### 5. その他の試験法検討に関連する事項

#### 1) グラファイトカーボンミニカラム精製

色素除去に優れたグラファイトカーボンミニカラム(InertSep GC 500 mg/6 mL、ジーエルサイエンス社製)からのオキシニ銅の溶出率を確認した(表22)。その結果、オキシニ銅はグラファイトカーボンミニカラムからは全く溶出されなかった。この点に関しては、グラファイトカーボンは、平面構造を有する化合物に対して強い保持能力を発揮する。オキシニ銅はオキシニ(8-キノリノール)2分子と銅との錯体であり、オキシニ(8-キノリノール)が平面構造を有しているためグラファイトカーボンに保持されている可能性が推察される。

表22 InertSep GC (500 mg/6 mL) からのオキシニ銅溶出率 (%)

| 溶出液 (mL) | InertSep GC (500 mg/6 mL) |
|----------|---------------------------|
| 0-10     | <1                        |
| 10-20    | <1                        |
| 20-30    | <1                        |
| 30-40 *  | 2                         |
| 合計       | 3                         |

\*トルエン10 mLで溶出させた。

本検討は以下の手順で行った。

- 1) 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を実施した。
- 2) メタノールで調製したオキシニ銅標準溶液(0.1 mg/mL)1 mLにアセトニトリル及びトルエン(3:1)混液4 mLを混和して、負荷した。
- 3) 負荷液が入っていた容器をアセトニトリル及びトルエン(3:1)混液5 mLで洗いこんだ。
- 4) アセトニトリル及びトルエン(3:1)混液10 mLで溶出させた。



## 2) オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム精製

脂肪酸や色素等を除去するためにオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム (InertSep C18 500 mg/6 mL、ジーエルサイエンス社製) からのオキシシン銅の溶出率を確認した (表 23)。その結果、オキシシン銅はオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムからあまり溶出されなかった。この点に関しては、金属配位性化合物であるオキシシン銅とシリカゲル表面の金属不純物との吸着による影響が推察される。

表 23 InertSep C18 (500 mg/6 mL) からのオキシシン銅溶出率 (%)

| 溶出液 (mL) | InertSep C18 (500 mg/6 mL) |
|----------|----------------------------|
| 0-10     | 4                          |
| 10-20    | 8                          |
| 20-30    | 8                          |
| 30-40 *  | <1                         |
| 合計       | 21                         |

\* アセトニトリル 10 mL で溶出させた。

本検討は以下の手順で行った。

- 1) メタノール及び水各 10 mL でコンディショニングを実施した。
- 2) 水及びメタノール (1 : 1) 混液で調製したオキシシン銅標準溶液 (0.02 mg/mL) を 5 mL 負荷した。
- 3) 負荷液が入っていた容器を水及びメタノール (1 : 1) 混液 5 mL で洗いこんだ。
- 4) メタノール 10 mL で溶出させた。

## まとめ

検討した何れの試料においても、ブランク試料のクロマトグラムに定量を妨害するピークは認められなかった。真度 82.8~93.5%、併行精度 1.0~2.1 は目標値に適合する結果であった。マトリックス添加標準溶液及び溶媒標準溶液のピーク面積比は 0.97~1.04 であり、本法では明らかなマトリックス効果は認められなかった。定量限界濃度 (一律基準値) での添加回収試験の S/N 比は、検討した何れの試料においても S/N $\geq$ 10 を満たした。

## 【結論】

農産物中オキシシン銅試験法として、オキシシン銅を試料から塩酸酸性条件下アセトンで抽出し、EDTA-4Na 溶液、酢酸エチル及び塩化ナトリウムを加え有機溶媒転溶後、塩酸酸性条件下にて水層に転溶させ、水酸化ナトリウム溶液を添加し、スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラムで精製した後、LC-MS/MS で定量及び確認する方法を開発した。開発した試験法を小麦、パセリ、キャベツ、ばれいしょ、オレンジ及びりんごの農産物 6 食品に適用した結果、良好な結果が認められたため、本法は農産物の残留分析法として適用可能であることが確認された。

【参考文献】

- 1) 増補 残留農薬分析法 P131-132, ソフトサイエンス社 (1987)
- 2) 有機銅 (バッチレート) 塗布剤 なつみかん 作物残留試験 最終報告書 (2014)
- 3) 分析化学 vol 8 P66-73 (1959)
- 4) 水質汚濁に係る人の健康の保護に関する環境基準の測定方法及び要監視項目の測定方法について  
平成5年4月28日環水規 121号 (1993)

【クロマトグラム報告】

① 添加回収試験（基準値添加）における代表的なクロマトグラム

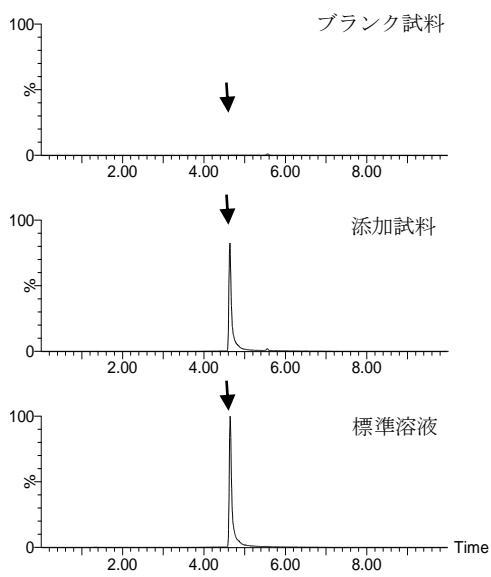


図 9 小麦の SRM クロマトグラム  
( $m/z$  146→118)  
添加濃度：0.1 ppm

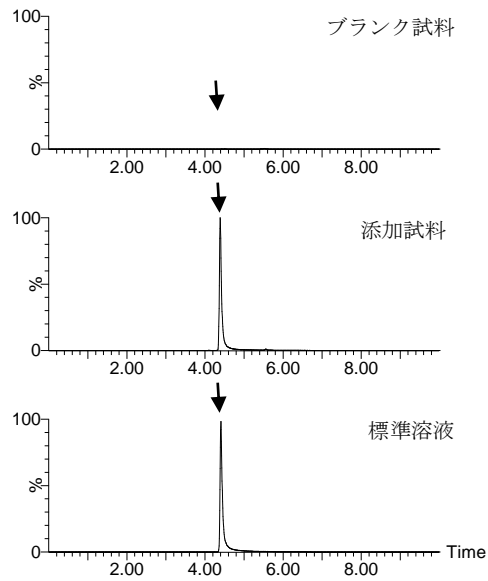


図 10 バセリの SRM クロマトグラム  
( $m/z$  146→118)  
添加濃度：0.3 ppm

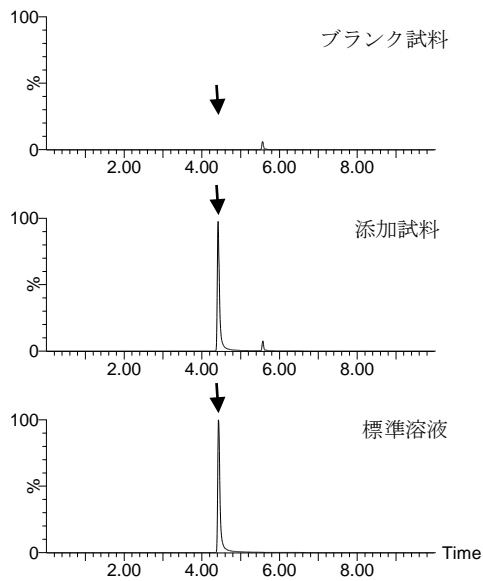


図 11 キャベツの SRM クロマトグラム  
( $m/z$  146→118)  
添加濃度：0.7 ppm

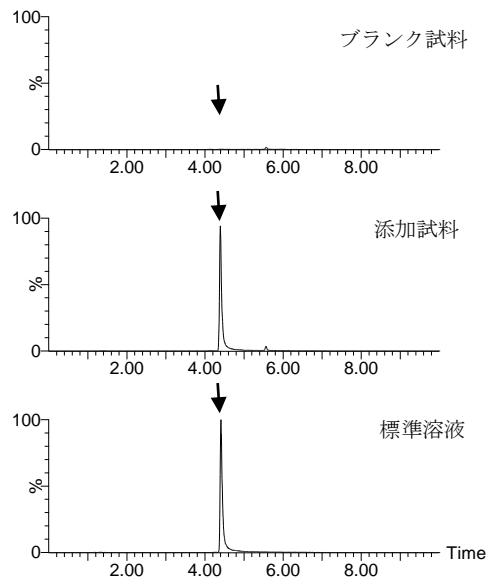


図 12 ばれいしょの SRM クロマトグラム  
( $m/z$  146→118)  
添加濃度：0.1 ppm

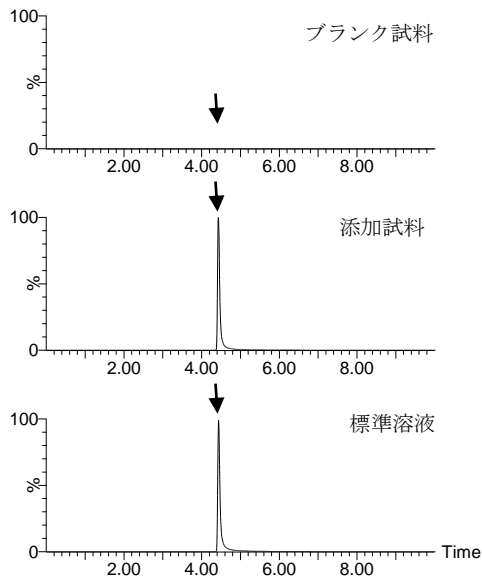


図 13 オレンジの SRM クロマトグラム  
( $m/z$  146→118)  
添加濃度 : 5 ppm

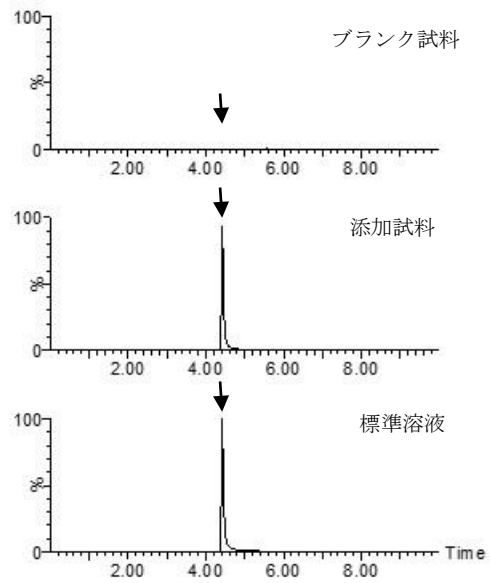


図 14 りんごの SRM クロマトグラム  
( $m/z$  146→118)  
添加濃度 : 2 ppm

② 添加回収試験 (定量限界値添加) における代表的なクロマトグラム

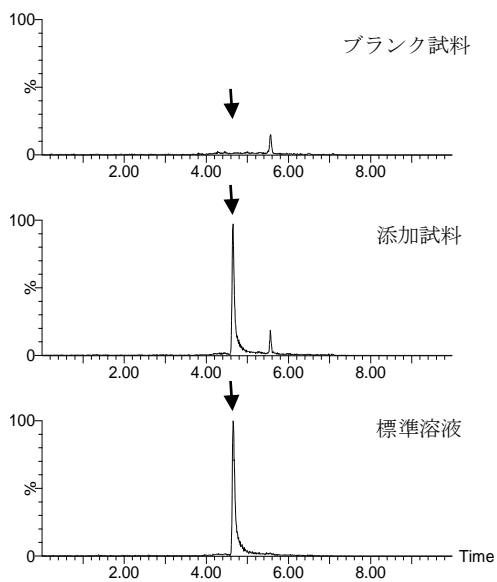


図 15 小麦の SRM クロマトグラム  
( $m/z$  146→118)  
添加濃度 : 0.01 ppm

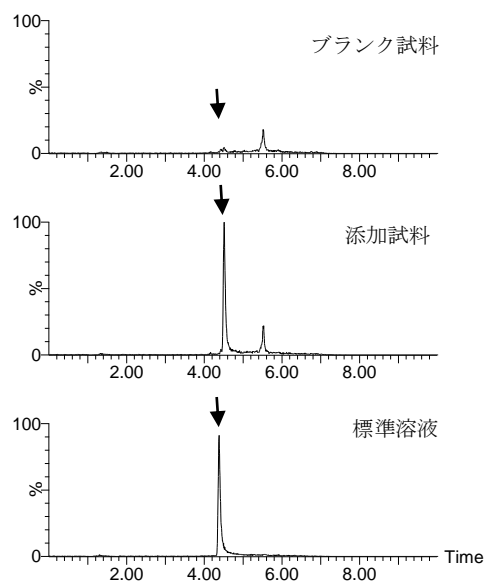


図 16 パセリの SRM クロマトグラム  
( $m/z$  146→118)  
添加濃度 : 0.01 ppm

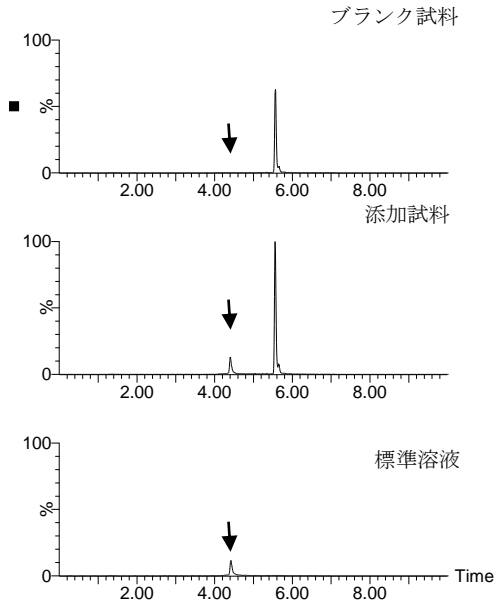


図 17 キャベツの SRM クロマトグラム  
( $m/z$  146→118)  
添加濃度 : 0.01 ppm

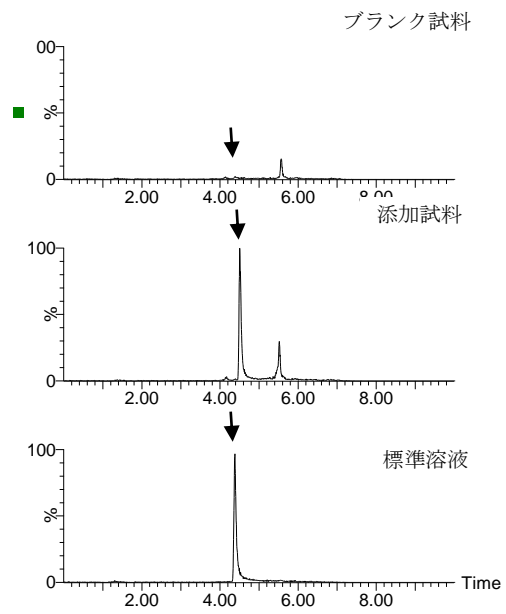


図 18 ばれいしょの SRM クロマトグラム  
( $m/z$  146→118)  
添加濃度 : 0.01 ppm

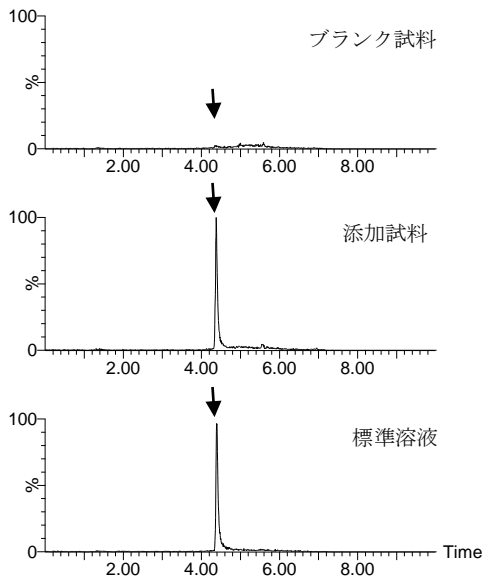


図 19 オレンジの SRM クロマトグラム  
( $m/z$  146→118)  
添加濃度 : 0.01 ppm

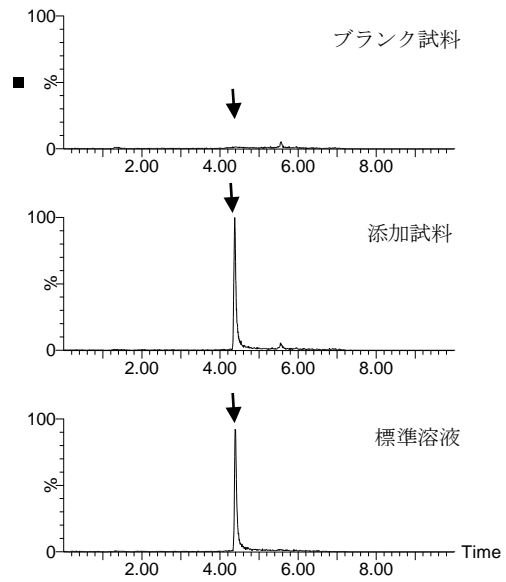


図 20 りんごの SRM クロマトグラム  
( $m/z$  146→118)  
添加濃度 : 0.01 ppm

③ ブランク試料の代表的なトータルイオンクロマトグラム

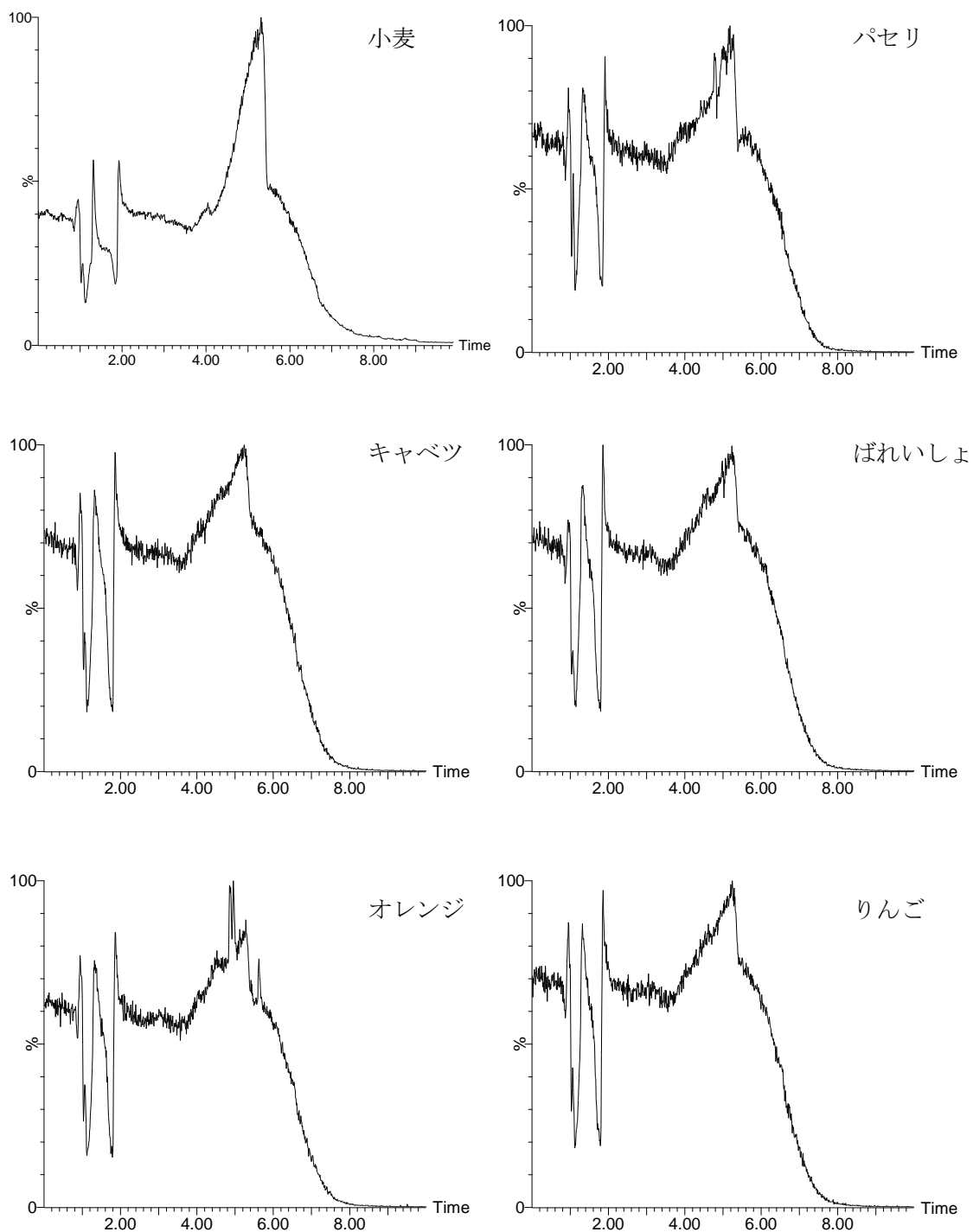


図 21 ブランク試料のトータルイオンクロマトグラム  
スキャン範囲 : 50~550 amu  
測定条件 : ESI(+), CV=44 V (CV: corn voltage)