

## チアジニル試験法（農産物）

### 1. 分析対象化合物

チアジニル

4-メチル-1,2,3-チアジアゾール-5-カルボン酸（以下、「カルボン酸体」という。）

4-ヒドロキシメチル-1,2,3-チアジアゾール-5-カルボン酸（以下、「ヒドロキシメチルカルボン酸体」という。）

### 2. 装置

液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計（LC-MS/MS）

### 3. 試薬、試液

次に示すもの以外は、総則の3に示すものを用いる。

チアジニル標準品 本品はチアジニル98%以上を含む。

カルボン酸体標準品 本品はカルボン酸体95%以上を含む。

ヒドロキシメチルカルボン酸体標準品 本品はヒドロキシメチルカルボン酸体95%以上を含む。

強塩基性陰イオン交換樹脂ミニカラム（500 mg） 内径12～13 mmのポリエチレン製のカラム管に、強塩基性陰イオン交換樹脂500 mgを充てんしたもの又はこれと同等の分離特性を有するものを用いる。

0.05%アンモニア水 アンモニア水（28%）と水を1：559の比率で混合する。

アセトニトリル及び10 mmol/L酢酸アンモニウム溶液（17：3）混液（pH 5.0） 酢酸アンモニウム0.77 gを量り採り、水約950 mLに溶解し、5 vol%酢酸を用いてpHを5.0に調整した後、水を加えて1 Lとし、その150 mLをアセトニトリル850 mLと混合する。

### 4. 試験溶液の調製

#### 1) 抽出

穀類の場合は試料10.0 g、茶の場合は試料5.00 gを量り採り、0.1 mol/L塩酸20 mLを加え、30分間放置する。果実及び野菜の場合は試料20.0 gに0.1 mol/L塩酸20 mLを加える。これにアセトニトリル80 mLを加え、ホモジナイズした後、吸引ろ過する。ろ紙上の残留物に、アセトニトリル及び水（4：1）混液50 mLを加えてホモジナイズし、上記と同様にろ過する。ろ液を合わせ、アセトニトリル及び水（4：1）混液を加えて正確に200 mLとする。穀類の場合はその4 mL、茶の場合は8 mL、果実及び野菜の場合は2 mLを採り、これにアセトニトリル及び0.05 mol/L塩酸（4：1）混液を、穀類の場合は4 mL、果実及び野菜の場合は6 mL加え、40℃以下で約2 mLに濃縮する。この濃縮液に0.05%アンモニア水4 mLを加える。

#### 2) 精製

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム (1,000 mg) にメタノール及び水各5 mLを順次注入し、各流出液は捨てる。このカラムに、1) で得られた溶液を注入し、さらに、水及びメタノール (4:1) 混液5 mLを注入し、全溶出液を採り、カルボン酸体及びヒドロキシメチルカルボン酸体画分 (溶出液 I) とする。次いで、水及びメタノール (1:4) 混液10 mLを注入し、溶出液を採り、チアジニル画分 (溶出液 II) とする。

#### ① チアジニルの試験溶液

溶出液 II を40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物にメタノール1 mLを加え溶解した後、酢酸エチル9 mLを加えて混合する。

アルミナ (中性) ミニカラム (1,710 mg) に酢酸エチル5 mLを注入し、流出液は捨てる。このカラムに上記の溶液を注入し、さらに、酢酸エチル及びメタノール (9:1) 混液10 mLを注入し、全溶出液を採り、40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物を水及びメタノール (3:7) 混液に溶解し、正確に20 mLとしたものを試験溶液とする。

#### ② カルボン酸体及びヒドロキシメチルカルボン酸体の試験溶液

強塩基性陰イオン交換樹脂ミニカラム (500 mg) にメタノール及び水各5 mLを順次注入し、各流出液は捨てる。このカラムに溶出液 I を注入し、さらに、メタノール5 mLを注入し、各流出液は捨てる。次いで、0.01 mol/L塩酸・メタノール溶液10 mLを注入し、溶出液を採り、40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物をアセトニトリル及び10 mmol/L酢酸アンモニウム溶液 (17:3) 混液 (pH 5.0) に溶解し、正確に20 mLとしたものを試験溶液とする。

### 5. 検量線の作成

チアジニル標準品をアセトニトリルに溶解して標準原液とする。標準原液を水及びメタノール (3:7) 混液で希釈した溶液を数点調製し、それぞれLC-MS/MSに注入し、ピーク高法又はピーク面積法で検量線を作成する。なお、本法に従って試験溶液を調製した場合、試料中0.01 mg/kgに相当する試験溶液中濃度は0.0001 mg/Lである。

カルボン酸体標準品及びヒドロキシメチルカルボン酸体標準品をそれぞれアセトニトリルに溶解して標準原液とする。各標準原液を適宜混合してアセトニトリル及び10 mmol/L酢酸アンモニウム溶液 (17:3) 混液 (pH 5.0) で希釈した溶液を数点調製し、それぞれLC-MS/MSに注入し、ピーク高法又はピーク面積法で検量線を作成する。なお、本法に従って試験溶液を調製した場合、試料中0.02 mg/kgに相当する試験溶液中濃度は各化合物ともに0.0002 mg/L (チアジニル換算) である。

### 6. 定量

試験溶液をLC-MS/MSに注入し、5の検量線でチアジニル、カルボン酸体及びヒドロキシメチルカルボン酸体の各含量を求める。カルボン酸体及びヒドロキシメチルカルボン酸体を

含むチアジニルの含量を求める場合には、次式により求める。

チアジニル（カルボン酸体及びヒドロキシメチルカルボン酸体を含む。）の含量（ppm）

$$=A+B\times 1.857+C\times 1.672$$

A：チアジニルの含量（ppm）

B：カルボン酸体の含量（ppm）

C：ヒドロキシメチルカルボン酸体の含量（ppm）

## 7. 確認試験

LC-MS/MSにより確認する。

## 8. 測定条件

(例)

### ① チアジニル

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲル、内径2.1 mm、長さ150 mm、粒径3 μm

カラム温度：40℃

移動相：0.1 vol%ギ酸及びメタノール（3:7）混液

イオン化モード：ESI（-）

主なイオン（*m/z*）：プリカーサーイオン 266、プロダクトイオン 238、71

注入量：5 μL

保持時間の目安：7分

### ② カルボン酸体及びヒドロキシメチルカルボン酸体

カラム：トリアゾール結合型シリカゲル、内径2.0 mm、長さ150 mm、粒径5 μm

移動相：アセトニトリル及び10 mmol/L酢酸アンモニウム溶液（17:3）混液（pH 5.0）

カラム温度：40℃

イオン化モード：ESI（-）

主なイオン（*m/z*）

カルボン酸体：プリカーサーイオン 143、プロダクトイオン 71

ヒドロキシメチルカルボン酸体：プリカーサーイオン 159、プロダクトイオン 87

注入量：5 μL

保持時間の目安：カルボン酸体 13分、ヒドロキシメチルカルボン酸体 11分

## 9. 定量限界

チアジニル 0.01 mg/kg

カルボン酸体 0.02 mg/kg（チアジニル換算）

ヒドロキシメチルカルボン酸体 0.02 mg/kg（チアジニル換算）

## 10. 留意事項

### 1) 試験法の概要

チアジニル、カルボン酸体及びヒドロキシメチルカルボン酸体を試料から塩酸酸性下アセトニトリルで抽出し、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムでチアジニル画分並びにカルボン酸体及びヒドロキシメチルカルボン酸体画分に分画する。チアジニル画分はアルミナ（中性）ミニカラムで精製し、カルボン酸体及びヒドロキシメチルカルボン酸体画分は強塩基性陰イオン交換樹脂ミニカラムで精製し、LC-MS/MSで定量及び確認する方法である。なお、チアジニル、カルボン酸体及びヒドロキシメチルカルボン酸体のそれぞれについて定量を行い、カルボン酸体及びヒドロキシメチルカルボン酸体を含むチアジニルの含量を求める場合には、カルボン酸体及びヒドロキシメチルカルボン酸体の含量にそれぞれ換算係数を乗じてチアジニルの含量に換算し、これらの和を分析値とする。

### 2) 注意点

- ① チアジニルのLC-MS/MS測定で、試験法開発時に使用したイオンを以下に示す。

定量イオン( $m/z$ ) : プリカーサーイオン 266、プロダクトイオン 71

定性イオン( $m/z$ ) : プリカーサーイオン 266、プロダクトイオン 238

なお、カルボン酸体及びヒドロキシメチルカルボン酸体については、本法における測定条件下で適切な定性イオンを選択することは出来なかった。

- ② 一律基準値が適用される農産物を試験する際には、可能であればカルボン酸体及びヒドロキシメチルカルボン酸体を定量限界 0.01 mg/kg（チアジニル換算）で分析することが望ましい。
- ③ 試験溶液の調製における1)の操作では、濃縮液を中性から弱塩基性に調整するために0.05%アンモニア水4 mLを加える。pH試験紙等を用いて試料におけるpHを確認し、必要に応じて添加量を調節する。
- ④ アルミナ（中性）ミニカラムで精製する際、残留物は酢酸エチル及びメタノール（9:1）混液に溶解し難いので、初めにメタノール1 mLを加え溶解した後、酢酸エチル9 mLを加えて混合する。また、試料によっては残留物がメタノールに溶解し難いことがあるので、そのような場合は超音波処理を行うとよい。
- ⑤ LC-MS/MS測定において、夾雑成分の多い農産物では、各分析対象化合物溶出後に移動相を十分に流し、カラム内に残存する夾雑物を溶出させた後に、次の測定を行うとよい。

## 11. 参考文献

なし

## 12. 類型

