

※ 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 23 年度

残留農薬等に関するポジティブリスト制度導入に係る分析法の開発・検証に関する試験

ピンドン試験法(畜水産物)の検討

ピンドン試験法(畜水産物)の検討結果

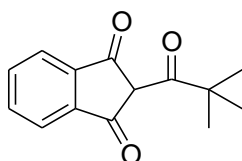
[緒言]

1. 目的

ピンドンは血液凝固抑制作用を示すインダンジオン系殺鼠剤であり、農産物及び畜水産物に 0.001 ppm の暫定基準値が設定されている。本研究では、畜水産物中のピンドンの分析法を開発することを目的とした。

2. 分析対象化合物の物理化学的性質及び構造

ピンドン(pindone)



IUPAC 名: 2-pivaloylindan-1,3-dione

分子式: C₁₄H₁₄O₃

分子量: 230.3

外観: 黄色結晶

Log P_{ow}: 1.57²⁾

pK_a: 4.81 ± 0.20²⁾

蒸気圧: 3.76 × 10⁻⁶ Torr²⁾

融点: 108.5-110.5°C¹⁾

安定性: 非常に安定¹⁾

¹⁾ The e-Pesticide Manual 14th ed., ver.4

²⁾ SciFinder

3. 基準値(暫定)

0.001 ppm(すべての畜水産物)

[実験方法]

1. 試料

市販の牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、鶏の筋肉、さけ、うなぎ、しじみ、鶏卵、牛乳及びはちみつを用いた。

- 1) 牛の筋肉、鶏の筋肉: 可能な限り脂肪層を除き、フードカッターで細切均一化した。
- 2) 牛の脂肪: 可能な限り筋肉層を除き、フードカッターで細切均一化した。
- 3) 牛の肝臓: フードカッターで細切均一化した。
- 4) さけ: 可食部(皮を含む)をフードカッターで細切均一化した。
- 5) うなぎ: 活鰻を使用し、頭を除いた可食部(内臓、骨及び皮を含む)をフードカッターで細切均一化した。
- 6) しじみ: 殻を除去後、フードカッターで細切均一化した。
- 7) 鶏卵: 殻を除去後、卵白と卵黄を合わせよく混合し攪拌均一化した。
- 8) 牛乳: よく混合して均一化した。
- 9) はちみつ: 百花密を用い、よく混合して均一化した。

2. 試薬・試液

有機溶媒及び試薬は、関東化学㈱または和光純薬工業㈱の残留農薬試験用試薬を用いた。

ピンドン標準品はDr. Ehrenstorfer GmbH社製(純度98.5%、融点109.8°C)の残留農薬試験用試薬を用いた。

標準原液(1000 mg/L)は、ピンドン10 mgを精秤し、アセトニトリル10 mLに溶解して調製した。検量線作成用及び添加回収試験用の標準溶液は、標準原液をメタノールで適宜希釈して調製した。なお、脂肪の添加回収試験においては、メタノールで調製した標準溶液(1 mg/L)をアセトンで希釈したものを添加回収試験用の標準溶液とした。

シリカゲルミニカラムは、Waters社製 Sep-Pak Silica(担体量1,000 mg)を用いた。オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムは、Varian社製 Bond Elut C-18(担体量500 mg)を用いた。

3. 装置及び測定条件

(1) LC-MS/MS

Waters 社製高速液体クロマトグラフ Alliance 2695 及び同社製質量分析計 Micromass Quattro Premier を使用した。

1) LC 条件

カラム: Inertsil ODS-4 (内径 2.1 mm, 長さ 150 mm, 粒子径 3 µm, GL Sciences 社製)
ガードカラム: Inertsil ODS-4 (内径 1.5 mm, 長さ 10 mm, 粒子径 3 µm, GL Sciences 社製)

カラム温度: 40°C

注入量: 5 µL

移動相

A 液: 10 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液

B 液: 10 mmol/L 酢酸アンモニウム・メタノール溶液

移動相流速: 0.20 mL/min

グラジエント条件:

時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)
0.0	80	20
15.0	5	95
25.0	5	95
25.1	0	100
35.0	0	100
35.1	80	20

Total run time: 47 min

保持時間: 14.1 分

2) MS 条件

イオン化モード: ESI(-)

測定モード: 選択反応モニタリング (SRM)

キャピラリー電圧: 0.5 kV

ソース温度: 120 °C

コーンガス: N₂, 50 L/hr

脱溶媒温度: 400 °C

脱溶媒ガス: N₂, 800 L/hr

コリジョンガス: Ar, $\pm 3.1 \times 10^{-3}$ mbar

測定イオン:

	<i>m/z</i>	コーン電圧 (V)	コリジョン エネルギー (eV)
定量イオン	-228.9→115.8	50	35
定性イオン	-228.9 →171.8	50	21

(2) フードカッター

BRAUN 社製 multiquick professional MR 5550 M CA を使用した。

(3) ホモジナイザー

Kinematica 社製 Polytron PT 10-35 GT を使用した。

(4) 遠心分離機

Kubota 社製 8100 を使用した。

4. 試験溶液の調製

(1) 抽出

試料 10.0 g (脂肪の場合は 5.00 g) を量り採った。牛の筋肉、牛の肝臓、鶏の筋肉、さけ、うなぎ、しじみ、鶏卵及び牛乳の添加回収試験において標準溶液を添加する場合は、メタノールで調製した 10 µg/L 標準溶液 1 mL を添加して 30 分間放置した。脂肪の添加回収試験において標準溶液を添加する場合は、アセトンで調製した 10 µg/L 標準溶液 0.5 mL を添加して 30 分間放置した。はちみつの添加回収試験において標準溶液を添加する場合は、メタノールで調製した 10 µg/L 標準溶液 1 mL を添加して 30 分間放置後、水 20 mL を加えて溶解した。

これに酢酸 1 mL 及びアセトン 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。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、吸引ろ過した。得られたろ液を合わせ、40°C 以下で約 10 mL (はちみつの場合は約 30 mL) に濃縮した。

これを 10% 塩化ナトリウム溶液 100 mL 及びヘキサン 100 mL で分液漏斗に移し、5 分間振とうした。有機層を採り、水層にヘキサン 50 mL を加え、5 分間振とうした。有機層を合わせ、適量の無水硫酸ナトリウムを加えて 15 分間放置後、無水硫酸ナトリウムをろ別し、ヘキサンを加えて、正確に 200 mL とした。

抽出液 40 mL (脂肪の場合は 80 mL、試料 2 g 相当) を採り、40°C 以下で溶媒を除去した。ヘキサン 30 mL を加え、ヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL で 3 回振とう抽出した。アセトニトリル層を合わせ、40°C 以下で溶媒を除去し、残留物を酢酸エチル/ヘキサン/ギ酸 (20:180:1) 2 mL に溶解した。

(2) 精製

この溶液を、予め酢酸エチル/ヘキサン/ギ酸 (20:180:1) 10 mL で洗浄したシリカゲルミニカラム (1,000 mg) に負荷し、さらに酢酸エチル/ヘキサン/ギ酸 (20:180:1) 18 mL を注入した。全溶出液を 40°C 以下で濃縮して溶媒を除去し、残留物をメタノール 2 mL に溶解した。

この溶液を、予めメタノール 10 mL で洗浄した ODS ミニカラム (500 mg) に負荷し、さらにメタノール 18 mL を注入した。全溶出液を 40°C 以下で濃縮して溶媒を除去し、残留物をメタノールに溶解して正確に 1 mL としたものを試験溶液 (2.0 g 試料/mL) とした。

5. 定量

標準溶液 0.25、0.50、1.0、1.5、2.0 及び 3.0 µg/L をメタノールで調製し、それぞれ 5 µL を LC-MS/MS に注入して、ピーク面積法で検量線を作成した。試験溶液 5 µL を LC-MS/MS に注入し、検量線から濃度を求めた。

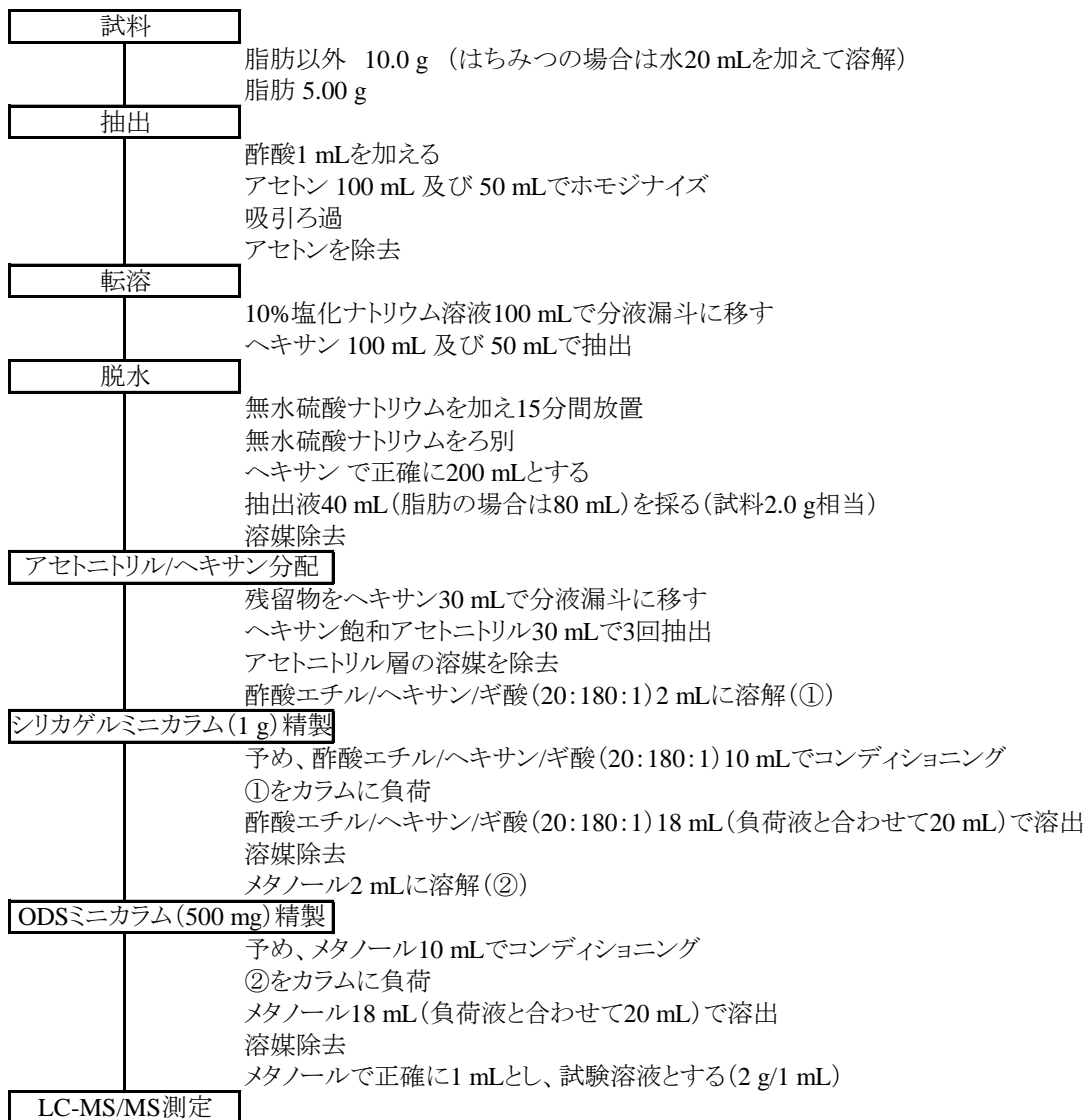
6. 試料マトリックスの測定への影響

ブランク試験溶液 100 µL をバイアルに採り、窒素を吹き付けて乾固した後、残留物を添加回収試験における回収率 100%相当濃度の標準溶液 100 µL に溶解してマトリックス標準溶液とした。マトリックス標準溶液と溶媒標準溶液をこの順番で交互に各 2 回測定し、溶媒標準溶液に対するマトリックス標準溶液のピーク面積比の平均値を求めて試料マトリックスの測定への影響を評価した。

7. 定量限界の評価

真度及び併行精度は、添加回収試験の結果を用いて評価した。また、添加回収試験で得られた回収率の中で最大値を与えたピーク(Max.)及び最小値を与えたピーク(Min.)のそれぞれの S/N 比の平均値を求めた。

<スキーム>



[結果及び考察]

1. 測定条件の検討

(1) LC-MS/MS

1)MS 条件

移動相として、20 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液及びメタノール(1:1)混液または 20 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液及びアセトニトリル(1:1)混液を用いてフローインジェクションで MS 条件及び測定イオンの最適化を行った。メタノール系とアセトニトリル系とでは、生成イオンや感度に大きな違いは見られなかった。イオン化モードについては、ESI(+)及び ESI(-)での測定を検討した結果、ESI(+)では良好な感度が得られなかったのに対して、ESI(-)では高い S/N 比が得られたため、ESI(-)を用いることとした。コーン電圧について 20~60(V)の範囲で 10 V 刻みで検討した結果、プリカーサーイオンとして脱プロトン化分子[M-H]⁻ m/z 229 が観察され、50 V で強度が最大となった(図 1-1)。また、コリジョンエネルギーについて 7~49(eV)の範囲で 7 eV 刻みで検討した結果、プロダクトイオンとして m/z 116、144、172 等が観察され、強度の強い m/z 116(コリジョンエネルギー 35 eV)を定量イオン、m/z 172(コリジョンエネルギー 21 eV)を定性イオンとした(図 1-2)。キャピラリー電圧について、0.5、1、1.5、2、2.5、3 kV を検討した結果、0.5 kV でイオン強度が最大となった。よって、測定は ESI(-)で行い、キャピラリー電圧は 0.5 kV を用いることとした。

2)LC 条件

酢酸アンモニウム溶液及びアセトニトリル混液、または酢酸アンモニウム溶液及びメタノール混液を用いて、分析カラムの検討を行った。ピンドンは ODS カラムではテーリングしやすかった。ピンドンは酸性化合物であるため、酸性条件での測定も検討したがピーク形状は改善されなかった。ピンドンは β-ジケトン構造を有するため、金属不純物との結合がテーリングの原因と予想された。そこで、種々の ODS カラムを検討したところ、残存シラノール基及び金属不純物が少ない Inertsil ODS-4(GL Sciences 社製)で良好な測定感度及びピーク形状が得られた。移動相条件を検討した結果、アセトニトリルよりもメタノールを用いて測定を行った方がピーク形状が良く、高いピーク強度が得られた。また、酢酸アンモニウムの濃度について 5、10、20 mmol/L を比較したところ、10 mmol/L でピーク強度が最大となった。

これらの結果から、分析カラムには Inertsil ODS-4、移動相には 10 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液及び 10 mmol/L 酢酸アンモニウム・メタノール溶液混液を用いて測定を行うこととした。

なお、10 食品の添加回収試験においては、ピンドンのピーク形状に大きな変化は見られなかった。

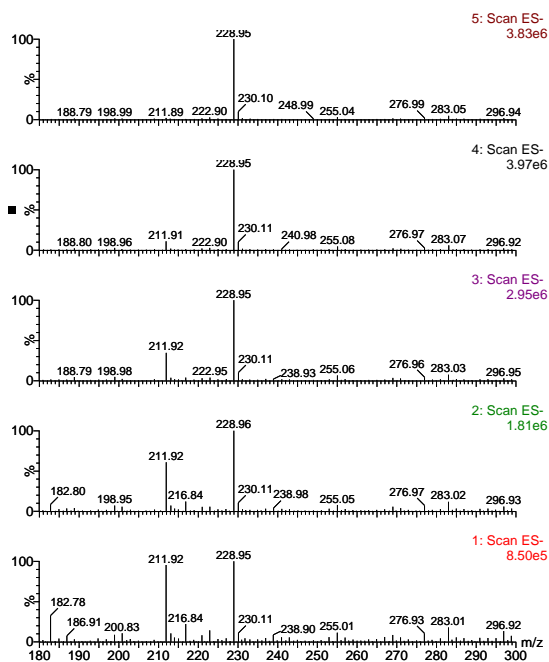


図 1-1 マススペクトル

コロン電圧 (V) : 下から 20、30、40、50、60

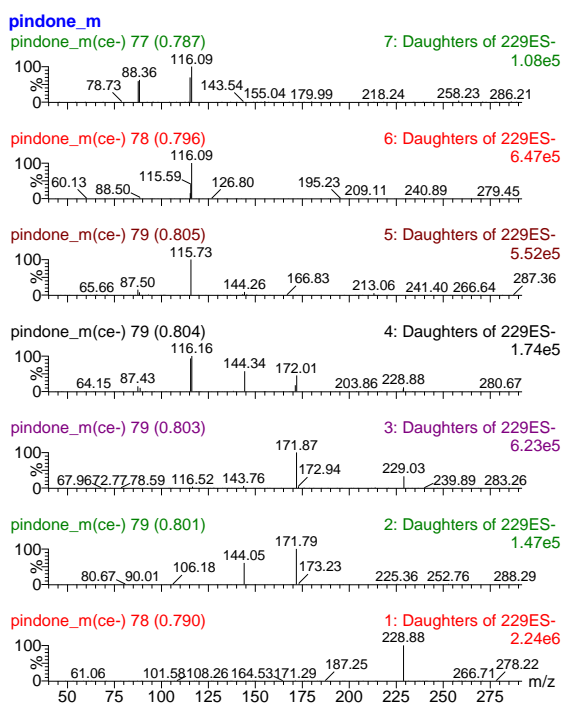


図 1-2 プロダクトイオンキャンスペクトル

コロン電圧 (V) : 50

プリカーサーイオン: m/z 229

コリジョンエネルギー (eV) : 下から 7、14、21、28、35、42、49

(2) 検量線

0.25～3.0 µg/L (図2) 及び0.5～20 µg/L (図3) の範囲で良好な直線性が認められた。

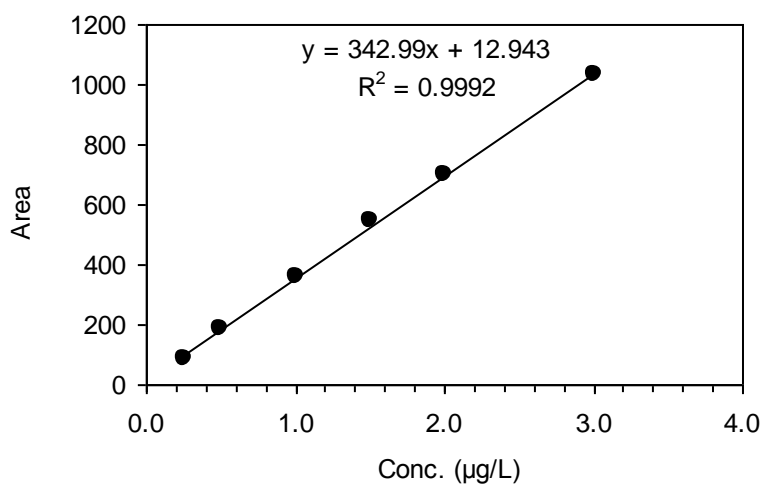


図2 ピンドンの検量線 (0.25～3.0 µg/L)

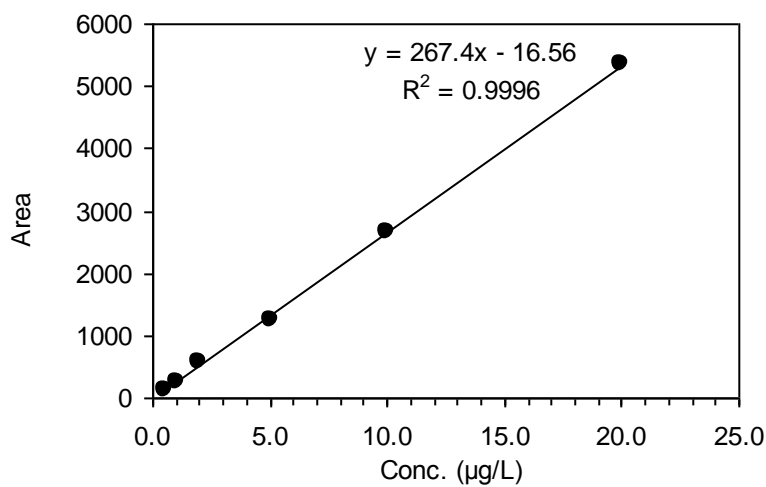


図3 ピンドンの検量線 (0.5～20 µg/L)

2. 試験溶液調製方法の検討

(1) 抽出溶媒

ピンドンは酸性化合物であるため、鶏卵等のアルカリ性を示す食品からはアセトンのみでは抽出されにくいと予想された。食品のpHによらず抽出可能な方法とするため、酸を加えてアセトンで抽出を行うこととした。

抽出時に加える酸について、塩酸、ギ酸及び酢酸を検討した。牛の肝臓 10.0 g に 2 mol/L

塩酸 1 mL またはギ酸 1 mL を加えた後、アセトン(1 回目 100 mL、2 回目 50 mL)で抽出したところ、赤色素が大量に抽出された。これに対して、酢酸 1 mL を添加して抽出した場合は色素の抽出量が非常に少なかった。表 1 に鶏卵の添加回収試験結果を示した。アセトンのみで抽出を行った場合は、回収率 50%以下となったが、酢酸 1 mL を添加することにより大幅に回収率が向上した。回収率 100%相当のマトリックス標準溶液と溶媒標準溶液のピーク面積比は 1.02~1.04 であったことから、回収率の差はマトリックスの影響によるものではないことが示唆された。よって、抽出は酢酸酸性下アセトンで行うこととした。

表 1 添加回収試験結果(鶏卵)

抽出溶媒	真度 (平均)	ピーク面積比 (マトリックス標準溶液/溶媒標準溶液)	補正回収率 (%)
アセトン(1回目 100 mL、2回目 50 mL)	41	1.04	39
酢酸1 mL及びアセトン(1回目 100 mL、2回目 50 mL)	85	1.02	84

添加濃度 0.01 mg/kg、3 併行

(2) 転溶溶媒

ヘキサン、酢酸エチル/ヘキサン(1:1)及び酢酸エチルを用いて、10%塩化ナトリウム溶液からの回収率を比較した(表 2)。いずれの溶媒でも、良好な回収率が得られた。一般に、低極性溶媒での転溶の方が精製効果が高いことから、10%塩化ナトリウム溶液 100 mL からヘキサンで 2 回(100 mL、50 mL)抽出を行うこととした。

表 2 10%塩化ナトリウム溶液 100 mL からのピンドン*の回収率(%)

転溶溶媒	1回目	2回目	合計
	100 mL	50 mL	
ヘキサン	105	2	107
酢酸エチル/ヘキサン(1:1)	98	1	99
酢酸エチル	101	1	102

* ピンドン 0.1 µg

(3) 精製方法

1) PSA ミニカラム

まず、PSA ミニカラム(500 mg)を用いた精製を検討した。ピンドンはアセトン/ヘキサン(1:1) 15 mL では溶出せず、アセトン/ヘキサン/ギ酸 (25:25:1) 5 mL で良好な回収率が得られた(表 3)。しかしながら、本条件では農薬溶出画分に高極性の夾雑成分も溶出してしまうため、他の精製方法を検討することとした。

表3 PSA ミニカラム(500 mg)からのピンドンの回収率(%)

アセトン/ヘキサン (1:1)	アセトン/ヘキサン/ギ酸 (25:25:1)					合計
	0-15 mL	0-5 mL	5-10 mL	10-15 mL	15-20 mL	
0	92	0	0	0	0	92

* ピンドン 0.1 µg

2) シリカゲルミニカラム

シリカゲルミニカラム(1,000 mg)での精製を検討した。ピンドンは酢酸エチル/ヘキサン(1:9)では溶出しなかったが、ギ酸を加えたところ良好な回収率が得られた(表4)。ギ酸の添加濃度について、酢酸エチル/ヘキサン/ギ酸(20:180:1)及び(20:180:0.2)を検討した。その結果、いずれの溶媒でも良好な回収率が得られたが、酢酸エチル/ヘキサン/ギ酸(20:180:0.2)では、酢酸エチル/ヘキサン/ギ酸(20:180:1)と比較して溶出されにくかった。マトリックス存在下、酢酸エチル/ヘキサン(1:9)で洗浄後に酢酸エチル/ヘキサン/ギ酸(20:180:1)で溶出したところ、洗浄画分に約5%溶出されたため、酢酸エチル/ヘキサン(1:9)での洗浄は行わず、酢酸エチル/ヘキサン/ギ酸(20:180:1)2 mLでカラムに負荷し、18 mL(負荷液と合わせて20 mL)で溶出することとした。本溶出条件で、さけ、しじみ、鶏卵などに含まれる色素等の高極性の夾雑成分を除去することが可能であった。

表4 シリカゲルミニカラム(1,000 mg)からのピンドンの回収率(%)

溶出溶媒	0-5 mL	5-10 mL	10-15 mL	15-20 mL	20-25 mL	合計
酢酸エチル/ヘキサン (1:9)	0	0	0	0	0	0
酢酸エチル/ヘキサン/ギ酸 (20:180:1)	81	16	1	0	0	98

* ピンドン 0.1 µg

3) ODS ミニカラム

シリカゲルミニカラム精製のみでは、うなぎ等の食品で、低極性成分の除去が不十分であった。そこで、ODS ミニカラム(500 mg)での精製を検討した。メタノールで溶出を行った結果、20 mLで良好な回収率が得られたことから(表5)、シリカゲルミニカラムで精製した後、ODS ミニカラム精製を行うこととした。

表 5 ODS ミニカラム (500 mg) からのピンドンの回収率 (%)

メタノール					合計
0-5 mL	5-10 mL	10-15 mL	15-20 mL	20-25 mL	
13	69	10	2	0	94

* ピンドン 0.1 µg

4) アセトニトリル/ヘキサン分配

脱脂方法としてアセトニトリル/ヘキサン分配を検討した。ピンドン 0.1 µg をヘキサン 30 mL に溶解し、ヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL で 3 回抽出を行ったところ、良好な回収率が得られた (表 6)。この結果から、ヘキサン 30 mL からヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL で 3 回抽出することとした。

表 6 アセトニトリル/ヘキサン分配におけるピンドン*の回収率 (%)

ヘキサン	ヘキサン飽和アセトニトリル			合計
	1回目	2回目	3回目	
30mL	30mL	30mL	30mL	
0	90	8	2	100

* ピンドン 0.1 µg

3. 添加回収試験

牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、鶏の筋肉、さけ、うなぎ、しじみ、鶏卵、牛乳及びはちみつを用いて、添加濃度 0.001 mg/kg、5 併行の添加回収試験を行った。なお、脂肪以外の食品ではメタノールで調製した標準溶液を添加した。脂肪においては、試料がメタノール溶液と混合しなかったため、メタノールで調製した標準溶液 (1 mg/L) をアセトンで希釈した溶液を添加した。

(1) 選択性

検討した 10 食品では、定量を妨害するピークはなかった (図 4 ①～⑩)。

(2) 真度及び精度

検討した 10 食品では、真度 76～92%、併行精度 4～8% の良好な結果が得られた (表 7)。

表 7 添加回収試験結果

試料	添加濃度 (mg/kg)	回収率(%)					真度 (平均)	RSD(%)
		1	2	3	4	5		
牛の筋肉	0.001	78	86	70	74	72	76	8
牛の脂肪	0.001	97	92	87	91	93	92	4
牛の肝臓	0.001	91	99	90	91	85	91	6
鶏の筋肉	0.001	88	87	81	81	83	84	4
さけ	0.001	98	97	90	84	84	91	7
うなぎ	0.001	94	92	88	86	81	88	6
しじみ	0.001	81	84	86	78	75	81	6
鶏卵	0.001	81	84	81	79	76	80	4
牛乳	0.001	78	92	88	83	79	84	7
はちみつ	0.001	90	77	84	81	82	83	6

(3) 定量限界

添加濃度 0.001 mg/kg で添加回収試験を行った結果、検討したすべての食品において真度及び併行精度の目標値を満足していた(表 7)。また、得られた回収率の中で最大値を与えたピーク(Max.)及び最小値を与えたピーク(Min.)のそれぞれの S/N 比の平均値も $S/N \geq 10$ であった(表 8)。よって、定量限界を 0.001 mg/kg と設定した。

表 8 添加試料から得られたピークの S/N 比

試料	S/N比		
	Max.	Min.	平均
牛の筋肉	51	42	47
牛の脂肪	45	37	41
牛の肝臓	75	55	65
鶏の筋肉	49	34	42
さけ	41	31	36
うなぎ	39	35	37
しじみ	44	36	40
鶏卵	42	41	42
牛乳	61	34	47
はちみつ	58	51	55

(4) 試料マトリックスの測定への影響

溶媒標準溶液に対するマトリックス標準溶液のピーク面積比を表 9 に示す。また、各食品のブランク試料のトータルイオンクロマトグラムを図 5 に示す。ピンドンは試料マトリックスによる大きな影響を受けることなく測定可能であった。

表 9 試料マトリックスの測定への影響

試料	ピーク面積比 (マトリックス標準溶液 /溶媒標準溶液)
牛の筋肉	0.98
牛の脂肪	1.03
牛の肝臓	0.98
鶏の筋肉	1.04
さけ	1.03
うなぎ	0.94
しじみ	1.00
鶏卵	0.98
牛乳	0.93
はちみつ	1.02

4. その他（標準品について）

各試薬メーカーのピンドン標準品の純度及び融点を表 10 に示す。融点の情報がない標準品があったため、通知試験法本文では、ピンドン標準品の純度は 98%以上とし、融点は記載しないこととした。

表 10 各試薬メーカーのピンドン標準品の純度及び融点

試薬メーカー	純度 (%)	融点 (°C)
Dr. Ehrenstorfer GmbH	98.5	108 ~ 110
AccuStandard	100	-
Riedel-de Haën	98.3	107.8 ~ 109.8

[まとめ]

畜水産物中のピンドン試験法として、酢酸酸性下アセトンで抽出し、ヘキサンで転溶後、アセトニトリル/ヘキサン分配、シリカゲルミニカラム及び ODS ミニカラムで精製して LC-MS/MS で定量及び確認する方法を開発した。牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、鶏の筋肉、さけ、うなぎ、しじみ、鶏卵、牛乳及びはちみつの 10 食品に適用した結果、真度 76~92%、併行精度 4~8% の良好な結果が得られた。また、定量限界として、0.001 mg/kg を設定可能であることが確認された。

[参考文献]

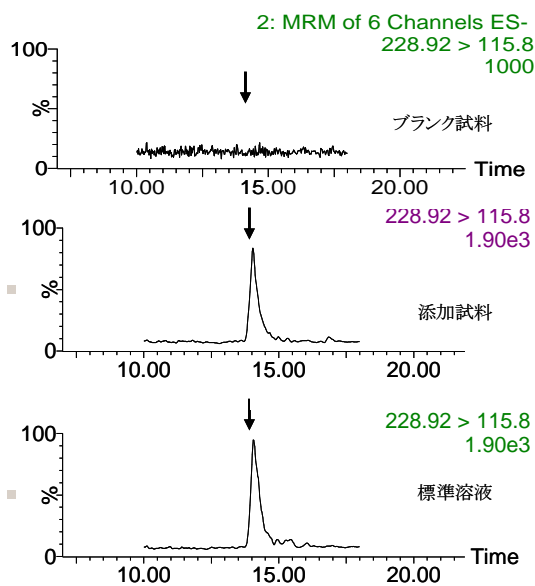
なし

図4 添加回収試験における代表的なクロマトグラム

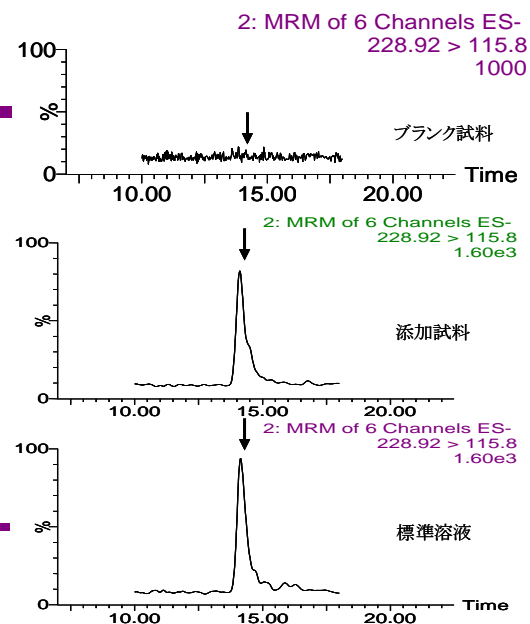
ピンドン (ESI(-), m/z 228.9→115.8)

添加濃度 0.001 mg/kg

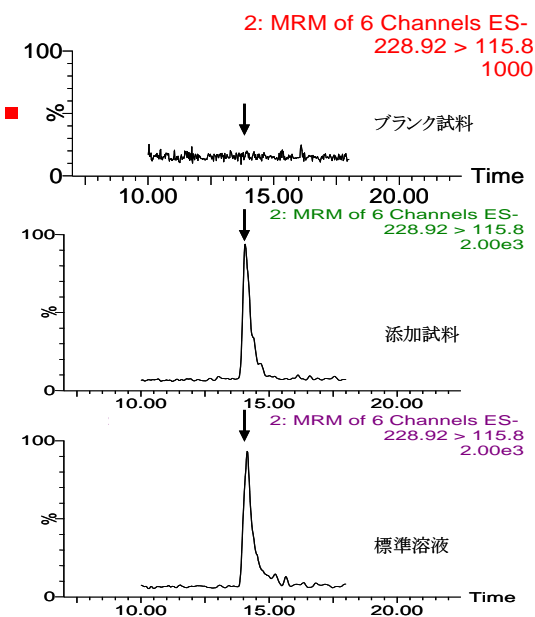
①牛の筋肉



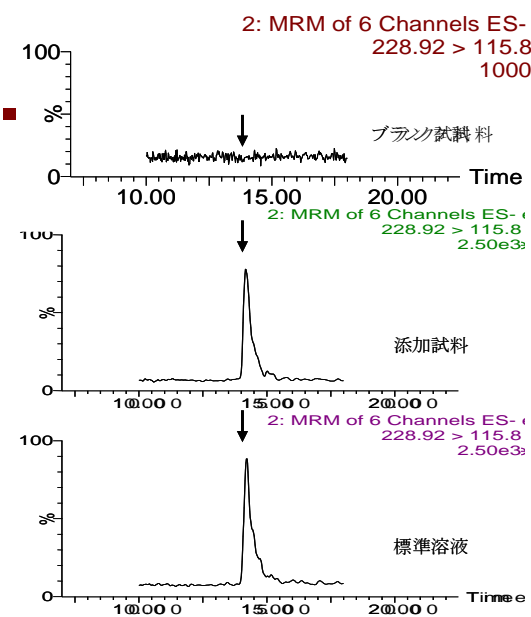
②牛の脂肪



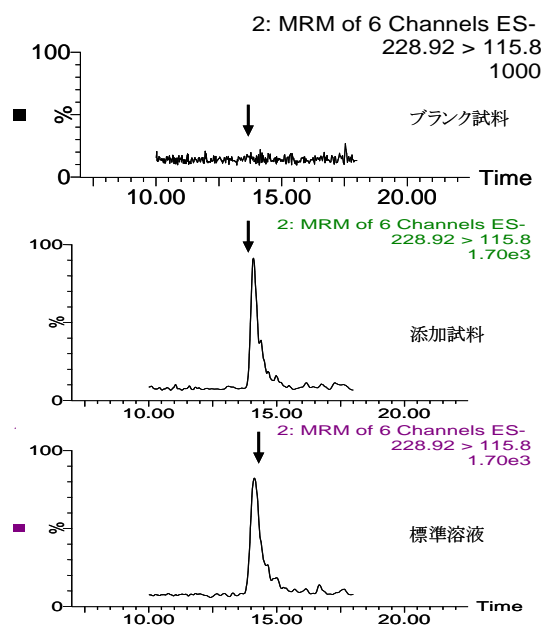
③牛の肝臓



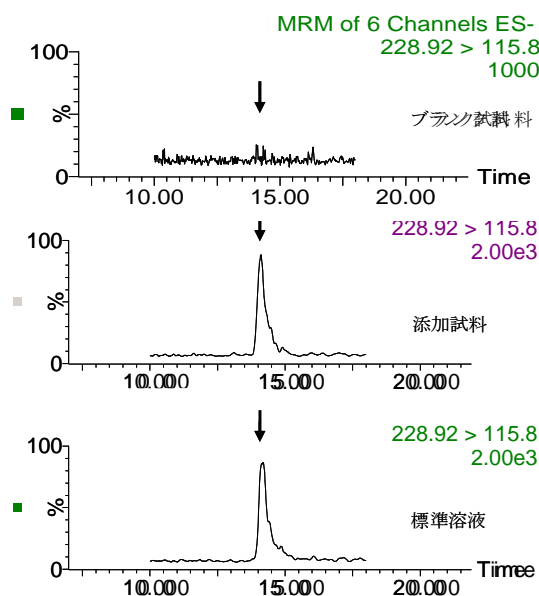
④鶏の筋肉



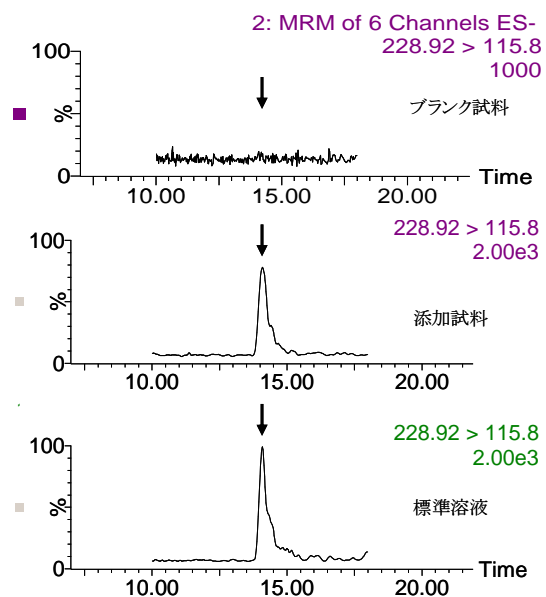
⑤さけ



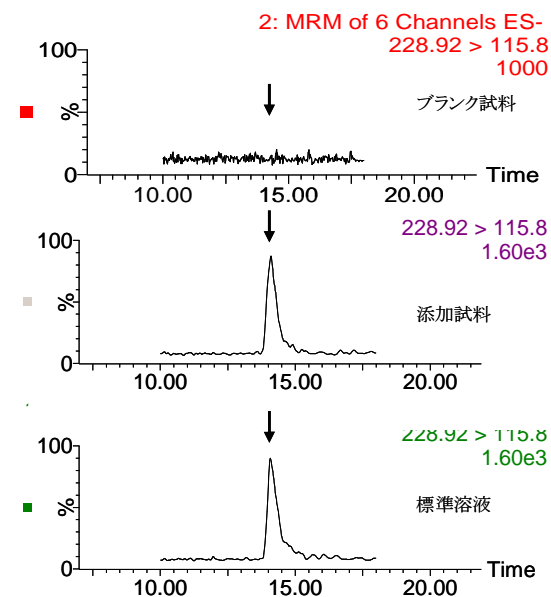
⑥うなぎ



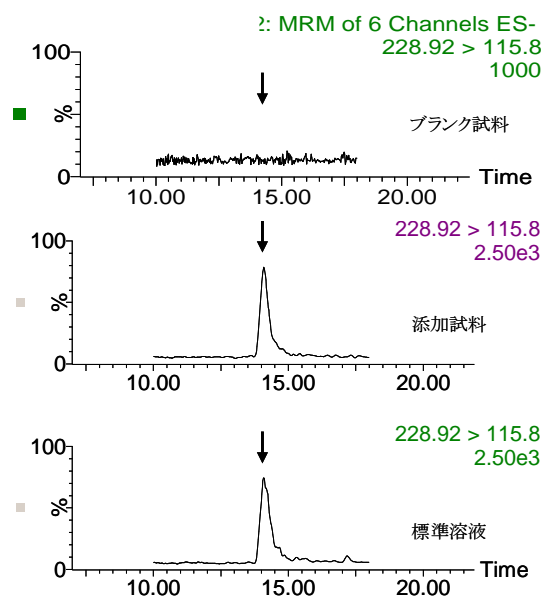
⑦しじみ



⑧鶏卵



⑨牛乳



⑩はちみつ

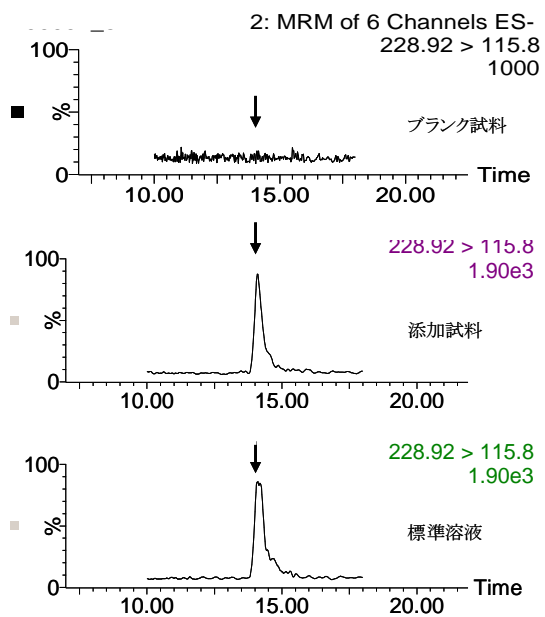


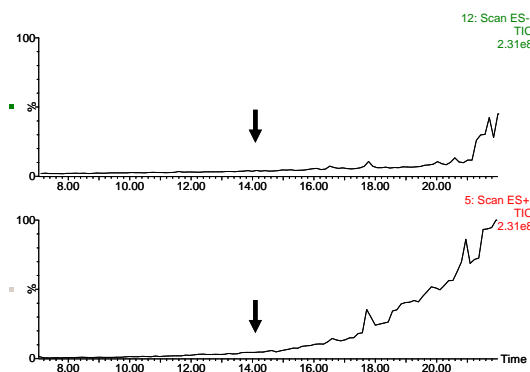
図5 各食品のブランク試料のトータルイオンクロマトグラム

スキャン範囲(m/z):50~1000

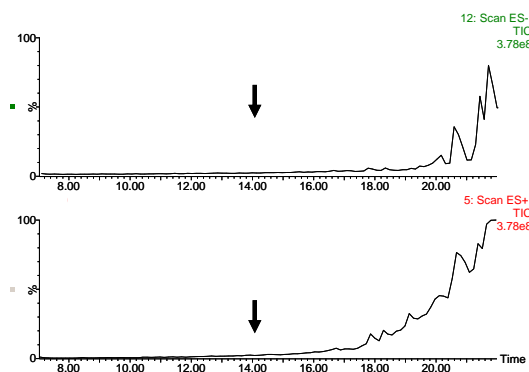
上: ESI(-)、コーン電圧 50 V

下: ESI(+)、コーン電圧 50 V

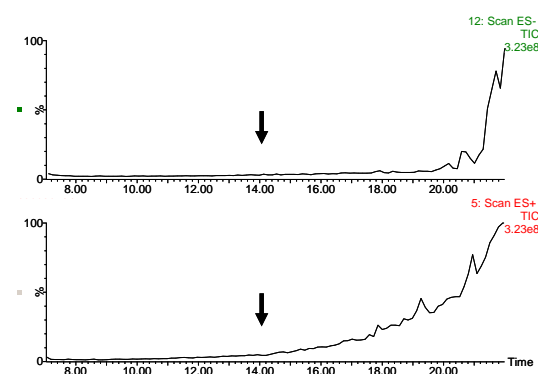
①牛の筋肉



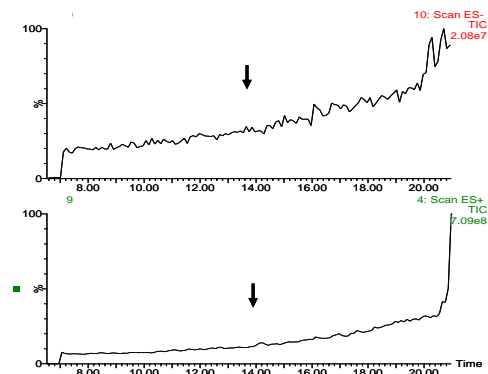
②牛の脂肪



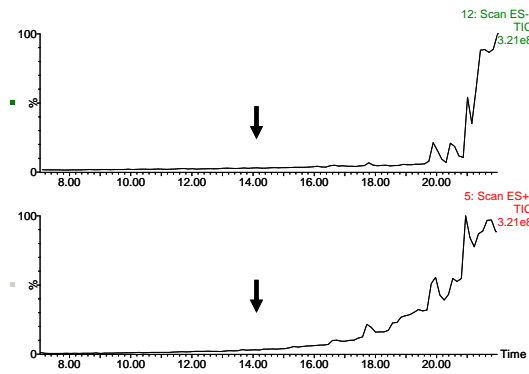
③牛の肝臓



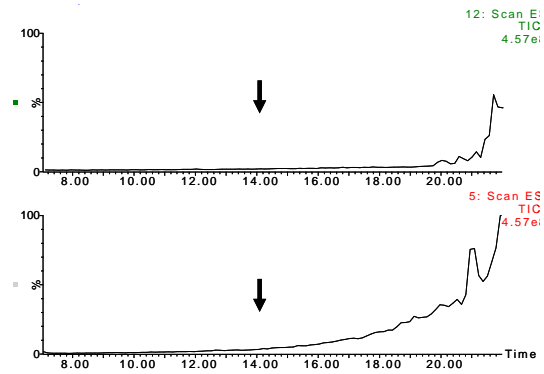
④鶏の筋肉



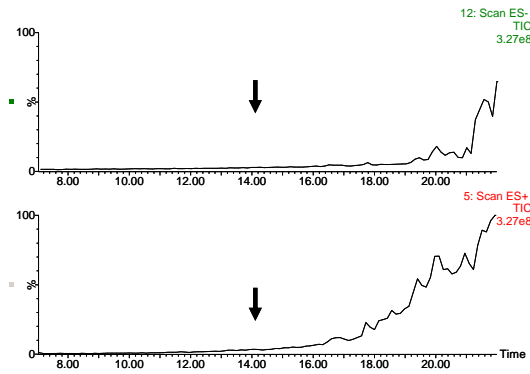
⑤さけ



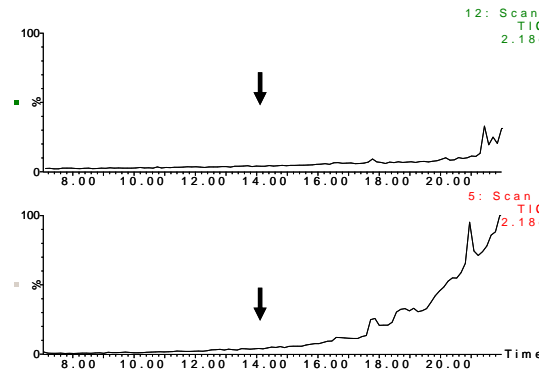
⑥うなぎ



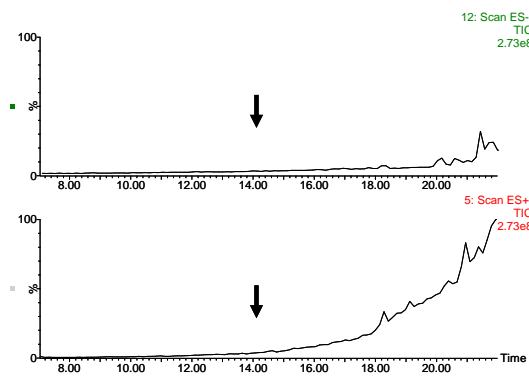
⑦しじみ



⑧鶏卵



⑨牛乳



⑩はちみつ

