

※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20年度

食品・添加物等規格基準に関する試験検査等について

食品に残留する農薬等の成分である物質の試験法開発

チアジニル（農産物）に関する試験

チアジニル(Tiadinil)に関する試験法(農産物)の検討結果

【緒言】

1. 目的及び試験法の検討方針等

チアジニルは日本農薬株式会社が開発したチアゾールカルボキサミド系のいもち病用の殺菌剤であり、チアジニル単独の試験法としては既に通知試験法(厚生労働省)として公示されている。ただし、本剤については、代謝物の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も規制対象物質に規定されたことから、今回はそれらの物質も含めた試験法の開発を行った。なお、参考資料として、作物残留性試験の分析法、並びに環境省告示試験法(同代謝物を含む)がある。

作物残留性試験の分析法には、代謝物をメチル誘導体化した後、HPLC(UV)で個別測定する方法である。環境省告示試験法もほぼこれに準拠した方法となっている。ただし、これらの分析法は米のみを対象とした方法である。今回は、ポジティブリスト制度に対応した試験法の開発が目標であることから、従来よりも高感度な測定機器(LC-MS/MS)を採用することにより、広範囲な農産物に対応した分析法の開発を目指した。なお、分析法の開発に際しては、精製等に関する基礎データを改めて採取し、これに基づき試験法を試作した。当該試験法の適合性については、登録申請作物(米)を含む10品目の農産物における妥当性確認により検証した。

はじめに、変化生成物を含む3成分の同時分析を試みたが、各化合物の物理化学性が大きく異なるため、同時測定による分析法では精製が不十分であった。このため、3成分を2分画して測定する方法を試みた。すなわち、塩酸酸性下アセトニトリルで抽出後、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及びカルボン酸体を含むヒドロキシメチルカルボン酸体画分に分画し、チアジニル画分はアルミナ(中性)ミニカラムで精製した後、LC-MS/MSで測定する。一方、カルボン酸体を含むヒドロキシメチルカルボン酸体画分はポリマー基材の陰イオン交換ミニカラムで精製した後、LC-MS/MSで同時測定する。

[作物残留性試験で採用された分析法の概要]

塩酸酸性下アセトニトリル抽出後、多孔性ケイソウ土カラムでチアジニル画分とカルボン酸体を含む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、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム、シリカゲルミニカラム、フロリジルミニカラムで順次精製し、HPLC(UV)で定量する。

カルボン酸体を含むヒドロキシメチルカルボン酸体画分は、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムで精製した後、ポリマー系ミニカラム(PLS-2)でカルボン酸体とヒドロキシメチルカルボン酸体に分画する。

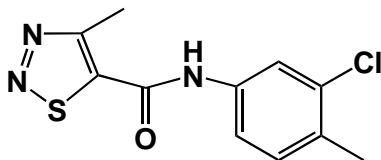
カルボン酸体画分は、シリカゲルミニカラムで精製後、トリメチルシリルジアゾメタン(TMSDM)でメチル誘導体化し、さらにシリカゲルミニカラム精製後、HPLC(UV)で測定する。一方、ヒドロキシメチルカルボン酸体画分は、TMSDMでメチル誘導体化し、さらにシリカゲルミニカラムで精製した後、HPLC(UV)で測定する。

定量限界は、チアジニルは0.01 mg/kg、カルボン酸体及びヒドロキシメチルカルボン酸体はチアジニルとして0.02 mg/kg(各代謝物としての定量限界は0.01 mg/kg)である。

2. 分析対象化合物の構造式及び物理化学的性質

チアジニル本体、並びにその代謝物のカルボン酸体及びヒドロキシメチルカルボン酸体

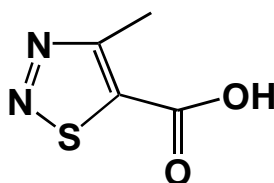
(1) チアジニル



分子式： $C_{11}H_{10}ClN_3OS$
分子量： 267.73
化学名： *N*-(3-chloro-4-methylphenyl)-4-methyl-1,2,3-thiadiazole-5-carboxamide
外観： 無色結晶
融点： 112.2°C
水溶解度： 0.0132 g/L (20°C)
分配係数： $\log Pow = 3.68$

【出典： 作物残留性試験報告書から引用】

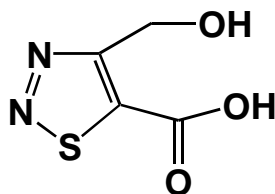
(2) カルボン酸体



分子式： $C_4H_4N_2O_2S$
分子量： 144.15
化学名： 4-Methyl-1,2,3-thiadiazole-5-carboxylic acid
外観： 白色粉末
融点： 197.0°C(分解)
水溶解度： 4.0 g/L (pH 1.9~2.2, 20°C)
分配係数： $\log Pow = -0.94$ (pH 4, 25°C)、 -1.96 (pH 7, 25°C)、 -2.06 (pH 10, 25°C)

【出典： 日本農薬株式会社提供情報】

(3) ヒドロキシメチルカルボン酸体



分子式： $C_4H_4N_2O_3S$
分子量： 160.15
化学式： 4-Hydroxymethyl-1,2,3-thiadiazole-5-carboxylic acid
外観： 類白色粉末
融点： 165.5°C(分解)

【出典： 作物残留性試験報告書から引用】

3. 基準値

1 mg/kg (米)

[実験方法]

茨城県内の小売店で購入した下記 10 種農産物試料を次の手順で前処理して分析法の検討に供した。

1. 試料

(1) 玄米

試料(約 500 g)を超遠心粉碎機で磨砕均一化した。

(2) 大豆 (乾燥子実)

試料(約 500 g)を超遠心粉碎機で磨砕均一化した。

(3) ごま

試料(約 100 g)をミキサーで均一化した。

(4) ほうれんそう(茎葉: 赤色根部を含み、ひげ根及び変質葉を除去したもの)

試料(約 500 g)を細切し、ミキサーで均一化した。

(5) キャベツ(葉球: 外側変質葉及び芯を除去したもの)

各試料を縦に 8~16 分割し、対角に 2 ずつを取り合わせ芯を除去して細切した。

その一部(約 800 g)を無作為に取り、ミキサーで均一化した。

(6) トマト(果実: へたを除去したもの)

試料(約 800 g)をミキサーで均一化した。

(7) ばれいしょ(塊茎: 泥を水で軽く洗い落としたもの)

各試料を 2~4 分割したのから対角に 1~2 ずつを取り合わせて細切した。

その一部(約 800 g)を無作為に取り、ミキサーで均一化した。

(8) りんご(果実: 花落ち、芯及び果梗の基部を除去したもの)

試料(約 800 g)をミキサーで均一化した。

(9) オレンジ(果実: へたを除去したもの)

試料(約 800 g)をミキサーで均一化した。

(10) 茶(荒茶)

試料(約 100 g)をミキサーで均一化した。

2. 試薬・機器

アセトン、アセトニトリル、酢酸エチル、ヘキサン、メタノール: 残留農薬試験用 (和光純薬工業株式会社)

アセトニトリル: LC-MS 用 (和光純薬工業株式会社)

水: 脱イオン水を Milli-Q System (Millipore 社) で精製したもの

0.05%アンモニア水: 28%アンモニア水 (和光純薬工業株式会社) を水で 560 倍に希釈したもの

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と混合したもの
 トリメチルシリルジアゾメタン： 10%ヘキサン溶液（東京化成工業株式会社）
 チアジニル標準品： 純度 99.8%（日本農薬株式会社）
 カルボン酸体標準品： 純度 99.4%（日本農薬株式会社）
 ヒドロキシメチルカルボン酸体標準品： 純度 99.8%（日本農薬株式会社）
 その他の試薬： 特級
 ケイソウ土： セライト 545（和光純薬工業株式会社）
 オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム（C18 ミニカラム）： InertSep C18-C, 1 g/6 mL
 （ジーエルサイエンス株式会社）
 アルミナ（中性）ミニカラム： Sep-Pak アルミナ N カートリッジ、プラス、1,710 mg（Waters 社）
 強塩基性陰イオン交換樹脂ミニカラム： Oasis MAX, 500 mg（Waters 社）
 グラファイトカーボンミニカラム： Supelclean ENVI-Carb（500mg、Supelco 社）
 ポリマーミニカラム： GL-Pak PLS-2, 500 mg/6 mL（ジーエルサイエンス株式会社）
 シリカゲルミニカラム： Sep-Pak シリカゲルカートリッジ、プラス、690 mg（Waters 社）
 フロリジルミニカラム： Sep-Pak フロリジルカートリッジ、プラス、910 mg（Waters 社）
 pHメーター： F-72（株式会社堀場製作所）
 ミキサー： MX-V100（パナソニック株式会社）
 超遠心粉碎機： ZM100（Retsch 社）
 ホモジナイザー： PT 10/35（Kinematica 社）

LC-MS(/MS)測定装置

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

装置	型式	会社
MS	6460（タンデム四重極型）	Agilent Technologies 社
LC	1290 HPLC ポンプ：G4220A、2液高压グラジェント式 オートサンプラー：G4226A	Agilent Technologies 社
データ処理	Masshunter	Agilent Technologies 社

チアジニルの LC-MS による検討用

装置	型式	会社
MS	G1946D（四重極型）	Agilent Technologies 社
LC	1100 HPLC ポンプ：G1312A、2液高压グラジェント式 オートサンプラー：G1329A	Agilent Technologies 社
データ処理	ChemStation	Agilent Technologies 社

カルボン酸体及びヒドロキシメチルカルボン酸体のほうれんそう、キャベツ、トマト、ばれいしょ、りんご及びオレンジの検討用

装置	型式	会社
MS	6410（タンデム四重極型）	Agilent Technologies 社
LC	1200 HPLC	Agilent Technologies 社

	ポンプ : G1312B、2液高压グラジェント式 オートサンプラー : G1367C	
データ処理	Masshunter	Agilent Technologies 社

4. LC-MS(/MS)測定条件

(1) チアジニル

LC 条件	
カラム	InertSustain C18 サイズ : 内径 2.1mm, 長さ 150mm, 粒径 3 μ m 会社 : ジーエルサイエンス株式会社
移動相流速 (mL/min)	0.2
注入量 (μ L)	5
カラム温度 (°C)	40
移動相 (v/v)	0.1 vol%ギ酸及びメタノール (3:7) 混液
保持時間 (min)	6.7
MS 条件	
測定モード	MRM
イオン化モード	ESI (-)
イオン導入電圧 (V)	3500
フラグメンター電圧 (V)	100
乾燥ガス流量 (L/min)	窒素、5 (Sheath gas; 11)
乾燥ガス温度 (°C)	350 (Sheath gas; 150)
ネブライザー圧力 (psi)	45
コリジョン電圧 (V)	10 (コリジョンガス ; N ₂)
モニタリングイオン	定量イオン ; プリカーサーイオン 266、プロダクトイオン 71 定性イオン ; プリカーサーイオン 266、プロダクトイオン 238

(2) カルボン酸体及びヒドロキシメチルカルボン酸体

LC 条件	
カラム	Cosmosil HILIC サイズ : 内径 2mm, 長さ 150mm, 粒径 5 μ m 会社 : ナカライテスク株式会社
移動相流速 (mL/min)	0.2
注入量 (μ L)	5
カラム温度 (°C)	40
移動相 (v/v)	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)
保持時間 (min)	カルボン酸体 12.8、ヒドロキシメチルカルボン酸体 11.4
MS 条件	
測定モード	MRM
イオン化モード	ESI (-)
イオン導入電圧 (V)	3500
フラグメンター電圧 (V)	50 (2成分共通)
乾燥ガス流量 (L/min)	窒素、5 (Sheath gas; 11)
乾燥ガス温度 (°C)	350 (Sheath gas; 150)

ネブライザー圧力 (psi)	45
コリジョン電圧 (V)	5 (2成分共通、コリジョンガス; N ₂)
モニタリングイオン	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 (定性イオンは設定できず)

(3) チアジニル (LC-MS による検討時の条件; 提案法としては不採用)

LC 条件	
カラム	Atlantis dC18 サイズ: 内径 2.1mm, 長さ 150mm, 粒径 3 μ m 会社: Waters 社
移動相流速 (mL/min)	0.2
注入量 (μ L)	10
カラム温度 (°C)	40
移動相 (v/v)	0.1 vol% ギ酸及びメタノール (3:7) 混液
保持時間 (min)	6.6
MS 条件	
測定モード	MS、選択イオン検出
イオン化モード	ESI (-)
イオン導入電圧 (V)	3000
フラグメンター電圧 (V)	100
乾燥ガス流量 (L/min)	窒素、12
乾燥ガス温度 (°C)	350
ネブライザー圧力 (psi)	50
モニタリングイオン	266

(4) カルボン酸体及びヒドロキシメチルカルボン酸体 (ほうれんそう、キャベツ、トマト、ばれいしょ、りんご及びオレンジ検討時の条件; 提案法としては不採用)

LC 条件	
カラム	Cosmosil HILIC サイズ: 内径 2mm, 長さ 150mm, 粒径 5 μ m 会社: ナカライテスク株式会社
移動相流速 (mL/min)	0.2
注入量 (μ L)	5
カラム温度 (°C)	40
移動相 (v/v)	アセトニトリル及び 5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 (17:3) 混液
保持時間 (min)	カルボン酸体 14.5、ヒドロキシメチルカルボン酸体 12.5
MS 条件	
測定モード	MRM
イオン化モード	ESI (-)
イオン導入電圧 (V)	4000
フラグメンター電圧 (V)	50 (2成分共通)
乾燥ガス流量 (L/min)	窒素、11
乾燥ガス温度 (°C)	350

ネブライザー圧力 (psi)	35
コリジョン電圧 (V)	5 (2成分共通、コリジョンガス ; N ₂)
モニタリングイオン	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 (定性イオンは設定できず)

5. 定量

チアジニル標準品 20.0 mg を 100 mL 容メスフラスコに精秤し、アセトニトリルで定容して 200 mg/L 溶液を調製した。この溶液を水及びメタノール (3:7) 混液で希釈して 0.00005, 0.0001, 0.00025, 0.001 及び 0.002 mg/L の標準溶液を調製した。この溶液の 5 µL を LC-MS/MS に注入して、データ処理装置を用いてチアジニルのピーク面積を測定し、横軸に重量、縦軸にピーク面積をとって検量線を作成した。次項に従い調製した試験溶液 5 µL を LC-MS/MS に注入し、検量線よりチアジニルの含量を求め、試料中の残留濃度を算出した。なお、試験法検討時 (ごま及び茶への適用性が検討されていない、改良前の試験法案) は、検量線用標準溶液の濃度を 0.01, 0.02, 0.05, 0.10 及び 0.20 mg/L とし、溶液の注入量を 10 µL として LC-MS 測定した。

カルボン酸体及びヒドロキシメチルカルボン酸体の各標準品 20.1 及び 20.0 mg (チアジニルとしてそれぞれ 37.14 mg 及び 33.44 mg 相当) をそれぞれ 100 mL 容メスフラスコに精秤し、アセトニトリルで定容して各 200 mg/L 溶液を調製した (チアジニルとしてそれぞれ 371.4 mg/L 及び 334.4 mg/L)。これらの溶液を 10 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液及びアセトニトリル (3:17) 混液 (pH 5.0) で希釈して 0.00005, 0.0001, 0.00025, 0.001 及び 0.002 mg/L の標準溶液 (カルボン酸体及びヒドロキシメチルカルボン酸体それぞれのチアジニル換算濃度として 0.00009285~0.003714 mg/L 及び 0.0000836~0.003344 mg/L) を調製した。この溶液の 5 µL を LC-MS/MS に注入して、データ処理装置を用いてカルボン酸体及びヒドロキシメチルカルボン酸体の各ピーク面積を測定し、横軸に重量、縦軸にピーク面積をとって各検量線を作成した。次項に従い調製した試験溶液 5 µL を LC-MS/MS に注入し、検量線より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を求め、試料中の残留濃度を算出した。そして、次式により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た。なお、試験法検討時の条件 (ごま、大豆及び茶への適用ができない、改良前の試験法案) は、検量線用標準溶液の濃度が 0.0025, 0.005, 0.01, 0.025 及び 0.05 mg/L (アセトニトリル溶液、カルボン酸体及びヒドロキシメチルカルボン酸体それぞれのチアジニル換算濃度として 0.0046425~0.09285 mg/L 及び 0.00418~0.0836 mg/L) であった。

$$\text{チアジニル含量}^* (\text{mg/kg}) = A + B \times 1.857 + C \times 1.672$$

A: チアジニルの含量 (mg/kg)

B: カルボン酸体の含量 (mg/kg)

C: ヒドロキシメチルカルボン酸体の含量 (mg/kg)

* カルボン酸体及びヒドロキシメチルカルボン酸体を含めた値

6. 添加試料の調製

基準値対象作物 (米) の他に、代表的な 9 農産物について検討した。野菜及び果物については、

三角フラスコにブランク試料20 gを秤取し、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0.2 mg/L混合アセトニトリル標準溶液1 mLを添加してよく混合した後、室温に30分間放置した(添加濃度 0.01 mg/kg、各成分としての濃度)。玄米及び大豆については、三角フラスコにブランク試料10 gを採取し、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0.1 mg/L混合アセトニトリル標準溶液1 mLを添加してよく混合した後、0.1 mol/L塩酸20 mLを加えて室温に30分間放置した(添加濃度 0.01 mg/kg、各成分としての濃度)。玄米については、別途10 mg/L混合アセトニトリル標準溶液1 mLを添加して同様に操作し、各成分濃度として1 mg/kgの添加試料も調製した(検討段階においては1 mg/L混合アセトニトリル標準溶液を用いて0.1 mg/kg添加試料を調製)。茶については、三角フラスコにブランク試料5 gを採取し、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0.1 mg/L混合アセトニトリル標準溶液0.5 mLを添加してよく混合した後、0.1 mol/L塩酸20 mLを加えて室温に30分間放置した(添加濃度 0.01 mg/kg、各成分としての濃度)。なお、カルボン酸体0.01 mg/kg、0.1 mg/kg及び1 mg/kg添加試料のチアジニルとしての濃度は、それぞれ0.01857 mg/kg、0.1857 mg/kg及び1.857 mg/kgである。又、ヒドロキシメチルカルボン酸体0.01 mg/kg、0.1 mg/kg及び1 mg/kg添加試料のチアジニルとしての濃度は、それぞれ0.01672 mg/kg、0.1672 mg/kg及び1.672 mg/kgである。

7. 試験溶液の調製

(1) 概要

試料を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と、代謝物画分(カルボン酸体及びヒドロキシメチルカルボン酸体)に分画した。チアジニル画分及び代謝物画分は、それぞれアルミナ(中性)ミニカラム及び強塩基性陰イオン交換樹脂ミニカラムで精製した後、LC-MS/MSで定量及び確認した。

(2) 抽出

果実及び野菜の場合は試料20.0 gを三角フラスコに量り採り、0.1 mol/L塩酸20 mLを加えた。穀類、豆類及び種実類の場合は試料10.0 g、茶の場合は試料5.00 gを三角フラスコに量り採り、それぞれ0.1 mol/L塩酸20 mLを加え、30分間放置した。これにアセトニトリル80 mLを加え、ホモジナイズした後、ろ紙の上に厚さ約1 cmのケイソウ土を敷いた桐山ロートをを用いて吸引ろ過した。ケイソウ土上の残留物を三角フラスコに掻き取り、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、上記と同様にろ過した。ろ液を共栓付きメスシリンダーに合わせ、アセトニトリル及び水(4:1)混液を加えて正確に200 mLとした。穀類等の場合はその4 mL、茶の場合は8 mL、果実及び野菜の場合は2 mLを採り、これに穀類の場合は4 mL、果実及び野菜の場合は6 mLのアセトニトリル及び0.05 mol/L塩酸(4:1)混液を加え、ロータリーエバポレーターを用いて40°C以下で約2 mLまで濃縮し、0.05%アンモニア水4 mLを加えた。

なお、ごま、大豆及び茶への適用ができない、改良前の試験法案では、抽出液の定容までは同様の操作で、その20 mL(茶の場合は40 mLを想定)を分取して同様に濃縮し、0.2%アンモニア水2 mLを加えた。

(3) 精製

減圧マニホールドにオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム(InertSep C18-C、1 g)

を装着し、メタノール及び水各5 mLを順次注入し、各流出液を捨てた。このカラムに、(2)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(I:カルボン酸体及びヒドロキシメチルカルボン酸体画分)を採った。次いで、水及びメタノール(1:4)混液10 mLを注入し、溶出液(II:チアジニル画分)を採った。

① チアジニルの試験溶液

溶出液(II)を40°C以下で濃縮し、溶媒を除去した。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を加えて混合した。減圧マニホールドにアルミナ(中性)ミニカラム(Sep-PakアルミナN, 1,710 mg)を装着し、酢酸エチル5 mLを注入して流出液を捨てた。このカラムに前述の溶液を注入し、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、全溶出液を採った。溶出液を、ロータリーエバポレーターを用いて40°C以下で濃縮し、溶媒を除去した。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した。改良前の試験法では、試験溶液の液量を1 mL(果実及び野菜の場合は2 mL)とした。

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

減圧マニホールドに強塩基性陰イオン交換樹脂ミニカラム(Oasis MAX, 500 mg)を装着し、メタノール及び水各5 mLを順次注入して各流出液を捨てた。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、各流出液を捨てた。次いで、0.01 mol/L塩酸・メタノール10 mLを注入し、溶出液を採り、ロータリーエバポレーターを用いて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した。改良前の試験法では、試験溶液をアセトニトリルにて4 mL(果実及び野菜の場合は8 mL)とした。

[分析フローチャート]

秤 取

↓ 穀類等: 試料 10.0g(茶 5.00 g)に 0.1mol/L 塩酸 20mL を加え 30 分間放置

↓ 果実・野菜: 試料 20.0g に 0.1mol/L 塩酸 20mL を添加

アセトニトリル抽出

↓ アセトニトリル 80mL を加え、ホモジナイズ、抽出後・吸引ろ過

↓ 残渣はアセトニトリル・水(4:1)50mL で同様に抽出・吸引ろ過

↓ ろ液を合わせ、同混液で 200mL 定容

↓ 穀類等はその4mL、茶は8mL、果実・野菜は2mL(各試料0.2g相当)を採取

↓ アセトニトリル・0.05 mol/L 塩酸(4:1)を穀類等には4mL、果実・野菜には6mL 添加

濃縮

↓ 約 2mL まで減圧濃縮(<40°C)し、0.05%アンモニア水 4mL を添加

C18 ミニカラム [InertSep C18-C (1g/6mL)]

↓ メタノール、水各 5mL でコンディショニング

↓ 濃縮液を流下

↓ 水・メタノール(4:1)5mL で溶出(全溶出液を採取【溶出液 I :代謝物画分】)

↓ 水・メタノール(1:4)10mL で溶出(全溶出液を採取【溶出液 II : チアジニル画分】)

【チアジニル画分】

濃縮(溶媒留去)

↓ 溶出液Ⅱを減圧濃縮して乾固 (<40°C)
 ↓ メタノール 1mL (必要に応じて超音波処理) と酢酸エチル 9mL に溶解し、混合
アルミナ(中性)ミニカラム [Sep-pak アルミナ N (1,710mg)]
 ↓ 酢酸エチル 5mL で洗浄
 ↓ 上記溶液を注入
 ↓ 酢酸エチル・メタノール (9:1) 10mL で溶出 (全溶出液を採取)
濃縮 (溶媒留去)
 ↓ 溶出液を減圧濃縮して乾固 (<40°C)
 ↓ 残留物を水・メタノール (3:7) 20mL に溶解
試験溶液
 ↓
LC-MS/MS

【代謝物画分】

強塩基性陰イオン交換樹脂ミニカラム [Oasis MAX (500mg)]
 ↓ メタノール、水各 5mL で洗浄
 ↓ 溶出液Ⅰをカラムに注入
 ↓ メタノール 5mL で洗浄
 ↓ 0.01mol/L 塩酸・メタノール 10mL で両代謝物を溶出 (採取)
濃縮 (溶媒留去)
 ↓ 溶出液を減圧濃縮して乾固 (<40°C)
 ↓ 残留物をアセトニトリル・10 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 (17:3) 混液 (pH 5.0)
 20mL に溶解
試験溶液
 ↓
LC-MS/MS

8. マトリックス添加標準溶液の調製

各種検討作物のブランク試料から作成した検液 1 mL を試験管にとり、窒素気流下で溶媒を留去した後、各成分の 0.0001 mg/L 標準溶液 1 mL に溶解したものをマトリックス添加標準溶液とした (試料濃度として 0.01 mg/kg 相当)。さらに、米については、1 mg/kg 添加試料を測定した際、検液を 10 倍希釈した為、これに合わせてブランク試料の検液を 10 倍希釈した上で同様の分取と溶媒の留去操作を行い、0.001 mg/L 溶液に溶解した残留基準値相当のマトリックス添加標準溶液も調製した。なお、カルボン酸体として 0.01 mg/kg 及び 1 mg/kg 相当のチアジニルとしての濃度は、それぞれ 0.01857 mg/kg 及び 1.857 mg/kg である。又、ヒドロキシメチルカルボン酸体として 0.01 mg/kg 及び 1 mg/kg 相当のチアジニルとしての濃度は、それぞれ 0.01672 mg/kg 及び 1.672 mg/kg である。

【結果及び考察】

1. 測定条件の検討

(1) MS/MS 測定条件の検討

チアジニルは正負の両イオンが測定可能であったが、そのイオン強度は負イオンの方が強かった (正イオンの約 1.5 倍強度)。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、正イオンは検出されなかったことから、負イオンモードでの測定を選択した。

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負イオンモード測定における各マススペクトルを図 1 に示す。これらの結果に基づき、チアジニルについてはプロトン脱離分子 (m/z 266 [M-H]⁻) をプリカーサーイオンとし、そのプロダクトイオンである、 m/z 71 を定量用イオンとし、 m/z 238 を参照用イオンとした。カルボン酸体についてはプロトン脱離分子 (m/z 143 [M-H]⁻) をプ

リカーサーイオンとし、そのプロダクトイオンである、 m/z 71 を定量用イオンとした。ヒドロキシメチルカルボン酸体についてはプロトン脱離分子 (m/z 159 [M-H]⁻) をプリカーサーイオンとし、そのプロダクトイオンである、 m/z 87 を定量用イオンとした。

本検討においては、始めに LC-MS 測定の適用を試みたが、大豆、ごま及び茶などの比較的夾雑成分の多い試料では分析法の確立が困難であった為、LC-MS/MS 測定法を採用した。しかしながら、LC-MS/MS 測定法においても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十分な測定感度を得ることは困難で、両代謝物の目標定量限界であるチアジニル換算値として 0.01 mg/kg が評価可能な測定条件を確立することは困難であった。又、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定量限界相当濃度で測定可能な定性用イオンを、今回検討した測定条件では選択できなかった。

(2) LC条件の検討

チアジニルについては、溶離液条件を弱酸性側に調製することで一般的なオクタデシルシリル化シリカゲルカラムを用いて適切な測定条件(ピーク形状、分離、再現性、感度など)を設定することが可能であった。しかしながら、カルボン酸体及びヒドロキシメチルカルボン酸体の両代謝物については比較的極性の強い酸性物質であることから、溶離液条件を弱酸性側に調製しても一般的なオクタデシルシリル化シリカゲルカラムに保持させることは困難であった。そこで、極性物質の保持が強いとされるオクタデシルシリル化シリカゲルカラム(Waters atlantis 等)の使用を検討したが、酸性かつ水比率の高い溶離液条件を設定しなくてはならない為、LC-MS では十分な検出感度が得られなかった。炭素鎖の長いカラムや極性基導入型カラムも含めて、今回検討したカラムでは、Supelco ascentis RP-amide が最も良好に両代謝物を保持することが可能であった。又、逆相/イオン交換のミックスモードカラム(imtakt SM-C18)でも比較的良好に両代謝物を保持することが可能であった。多孔性グラファイトカーボンカラム(ThermoFisher Hypercarb)では安定した測定条件の設定が困難であった。最終的に、両代謝物に対して、強酸性とすることなく溶媒比率が高い溶離液を適用できた HILIC カラム(nakaraitesque cosmosil-hilic)を用いた測定条件を採用した。

(3) 検量線

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検量線の一例を図 2 に示す。チアジニル、カルボン酸体、ヒドロキシメチルカルボン酸体のそれぞれについて、0.00005~0.002 mg/L(0.00025~0.01 ng)の濃度範囲で作成した検量線の相関係数の相関係数はいずれも 0.999 以上で良好な直線性を示した。なお、カルボン酸体及びヒドロキシメチルカルボン酸体のチアジニル換算としての検量線濃度範囲は、それぞれ 0.00009285~0.003714 mg/L 及び 0.0000836~0.003344 mg/L の濃度範囲である。

(4) 定量限界

定量限界は、チアジニルは0.01 mg/kg、カルボン酸体及びヒドロキシメチルカルボン酸体はチアジニルとして0.02 mg/kg(各代謝物としての定量限界は0.01 mg/kg)である。そして、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チアジニル換算値の総和としての定量限界は0.05 mg/kgであった。定量限界の算出結果を以下に示す。

チアジニル: $0.01 \text{ mg/kg} = (20\text{mL}/0.2\text{g}) \times (0.0005\text{ng}/5\mu\text{L})$

カルボン酸体*: $0.02 \text{ mg/kg} = (20\text{mL}/0.2\text{g}) \times (0.0005\text{ng}/5\mu\text{L}) \times 1.857$

ヒドロキシメチルカルボン酸体*: $0.02 \text{ mg/kg} = (20\text{mL}/0.2\text{g}) \times (0.0005\text{ng}/5\mu\text{L}) \times 1.672$

* チアジニル換算値

2. 試験溶液調製法の検討

(1) 抽出方法の検討

抽出条件は作物残留試験と同一とした。

(2) カラム精製条件の検討

① オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム [InertSep C18-C (1,000 mg)]

カラムをメタノール及び水各5 mLで前処理した後、3種分析対象成分10 µgを負荷し、各種混合比の水・メタノール混液を流下した場合の溶出状況を表1に示す。チアジニルは、水・メタノール(1:4, v/v)混液 5 mL画分に105%相当が溶出された。カルボン酸体及びヒドロキシメチルカルボン酸体は、負荷液及び水・メタノール(4:1, v/v)混液 5 mL画分に添加量相当が溶出された。なお、後者の溶液組成はLC-MSでの直接測定が困難であった為、強塩基性陰イオン交換樹脂ミニカラムで精製した後に測定した(詳細は表4を参照)。これらの溶出挙動調査に基づき、試験法に採用したオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムでの精製条件を設定した。

表1. オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムからの溶出挙動

	チアジニル	カルボン酸体	ヒドロキシメチル カルボン酸体
負荷、 水・メタノール(4:1) 5mL*	—	—	—
水・メタノール(3:2) 5mL	<1%	<1%	<1%
水・メタノール(1:4) 5mL	105%	<1%	<1%
メタノール 5mL	<1%	<1%	<1%
合計	105%	<3%	<3%

* 負荷量:3種分析対象成分10 µg (20 mg/L/アセトニトリル混合標準溶液0.5 mLを窒素気流下で溶媒留去した後、水8 mL、0.1 mol/L塩酸2 mL及び0.2%アンモニア水2 mLに溶解して負荷)、当該画分は直接測定せず(表 4参照)

② アルミナ(中性)ミニカラム [Sep-pakアルミナN (1,710mg)]

カラムを酢酸エチル5 mLで前処理した後、チアジニル10 µgを負荷し、各種混合比の酢酸エチル・メタノール混液を流下した場合の溶出状況を表2に示す。その結果、保持液として想定した酢酸エチル画分にもチアジニルが53%相当溶出したことから、酢酸エチル・メタノール(9:1, v/v)混液に溶解してアルミナ(中性)ミニカラムを通過させることとした。

表2. アルミナ(中性)ミニカラムからの溶出挙動

	チアジニル
酢酸エチル(負荷) 10 mL	53%
酢酸エチル・メタノール(9:1) 5mL	47%
酢酸エチル・メタノール(4:1) 5mL	<1%
合計	100%

負荷量:10 µg(チアジニル20 mg/L/アセトニトリル標準溶液0.5 mLを窒素気流下で溶媒留去した後、酢酸エチル5 mLで溶解・流下する操作を2回繰り返して負荷)

③ 強塩基性陰イオン交換樹脂ミニカラム [Oasis MAX (500mg)]

カラムをメタノール及び水各5 mLで前処理した後、カルボン酸体及びヒドロキシメチルカルボン酸体各10 µgを負荷し、各種混合比の水・メタノール混液を流下した場合の溶出状況を表3及び表4に示す。これらの結果に基づき、2代謝物のオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム溶出画分を強塩基性陰イオン交換樹脂ミニカラムに保持させた後、メタノール5 mLで洗浄し、0.01 mol/L塩酸・メタノール混液で溶出することとした。

表3. 強塩基性陰イオン交換樹脂ミニカラムからの溶出挙動-I

		カルボン酸体	ヒドロキシメチルカルボン酸体
水(負荷)	10mL	<1%	<1%
水・メタノール(1:1)	5mL	<1%	<1%
メタノール	5mL	<1%	<1%
0.01mol/L塩酸・メタノール	5mL	83%	97%
0.1mol/L塩酸・メタノール	5mL	<1%	<1%
合計		83%	97%

負荷量:10 µg (20 mg/L/アセトニトリル混合標準溶液0.5 mLを窒素気流下で溶媒留去した後、水5 mLで溶解・流下する操作を2回繰り返して実施。

表4. 強塩基性陰イオン交換樹脂ミニカラムからの溶出挙動-II

		カルボン酸体	ヒドロキシメチルカルボン酸体
供試溶液を負荷	5mL*	—	—
メタノール	5mL	<1%	<1%
0.01mol/L塩酸・メタノール	5mL	87%	96%
0.1mol/L塩酸・メタノール	5mL	<1%	<1%
合計		87%	96%

「—」測定せず

* 負荷量10 µg (供試溶液はオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムの負荷液と水・メタノール(4:1)5mL溶出液の混液、表1参照)。

④ 多孔性ケイソウ土カラム [ChemElut CE1020 (20mL保持用)]

3種分析対象成分10 µgをカラムに負荷し、各種溶媒を流下した場合の溶出状況を表5に示す。その結果、チアジニルはヘキサン100 mLで、カルボン酸体及びヒドロキシメチルカルボン酸体はギ酸・酢酸エチル(1:99, v/v)混液で、各成分の添加量相当が溶出された。しかしながら、多孔性ケイソウ土カラムへの保持液のpH調整操作が煩雑な為、当該精製法は採用しなかった。

表 5. 多孔性ケイソウ土カラムからの溶出挙動

	チアジニル	カルボン酸体	ヒドロキシメチル カルボン酸体
負荷(5分間放置) ヘキサン 100mL	104%	<1%	<1%
4mol/L塩酸3mL滴下(5分間放置) ギ酸・酢酸エチル(1:99) 100mL	2%	91%	94%
ギ酸・酢酸エチル(1:99) 50mL	3%	<1%	<1%
合計	109%	91%	94%

負荷量:10 µg(20 mg/L/アセトニトリル混合標準溶液0.5 mLを窒素気流下で溶媒留去し、0.05 mol/L塩酸16 mLを加えて溶解したものを負荷)。

⑤ シリカゲルミニカラム [Sep-pak Plus シリカ (690mg)]及び合成ケイ酸マグネシウムミニカラム[Sep-pak Plus フロリジル (910mg)]

シリカゲルミニカラム及びフロリジルミニカラムをヘキサン 5 mL で前処理した後、チアジニル 10 µg を負荷し、各種混合比の酢酸エチル・ヘキサン混液を流下した場合の溶出状況を表 6 に示す。チアジニルについては、酢酸エチル・ヘキサン (1:9, v/v) ~同 (1:4, v/v) 混液により、いずれのカラムにおいても一定の溶出率が確認されたが、実試料共存下では良好な回収率を得ることが出来なかった為、当該精製操作は採用しなかった。

表6. シリカゲルミニカラム及びフロリジルミニカラムからの溶出挙動

	チアジニル	
	シリカゲル	フロリジル
ヘキサン(負荷) 10mL	<1%	<1%
酢酸エチル・ヘキサン(1:9) 10mL	17%	56%
酢酸エチル・ヘキサン(1:4) 10mL	82%	42%
酢酸エチル・ヘキサン(3:7) 10mL	<1%	<1%
合計	99%	98%

負荷量:10 µg(チアジニル20 mg/L/アセトニトリル標準溶液0.5 mLを窒素気流下で溶媒留去した後、ヘキサン5 mLで溶解・流下する操作を2回繰り返して負荷)

シリカゲルミニカラムをヘキサン 5 mL で予備洗浄した後、カルボン酸体及びヒドロキシメチルカルボン酸体各 10 µg を負荷し、アセトン・ヘキサン・ギ酸 (60:40:1, v/v/v) 混液及びアセトン・ギ酸 (100:1, v/v) 混液を流下した場合の溶出状況を表 7 に示す。カルボン酸体については当該溶出条件で一定の溶出率が確認されたが、ヒドロキシメチルカルボン酸体についてはカラムからの溶出を確認できなかった。そして、カルボン酸体について実試料の分析を検討したところ、精製効果及び回収率とも不良であった。そのため、当該精製操作は採用しなかった。

表 7. シリカゲルミニカラムからの溶出挙動[Sep-pak Plus Silica gel (690mg)]

	カルボン酸体	ヒドロキシメチル カルボン酸体
アセトン・ヘキサン・ギ酸(60:40:1) 10mL	67%	ND
アセトン・ギ酸(100:1) 10mL	36%	ND
合計	103%	

ND: 不検出

負荷量: 10 µg (両代謝物の 20 mg/L/アセトニトリル混合標準溶液0.5 mLを窒素気流下で溶媒留去した後、アセトン・ヘキサン・ギ酸(60:40:1, v/v/v) 混液5 mLで溶解・流下する操作を2回繰り返して負荷)

⑥ ポリマー系ミニカラム

スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラム[GL-pak PLS-2 (500 mg)]及びジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム [Oasis HLB (200 mg)]を、メタノール及び水各5 mLで前処理した後、カルボン酸体及びヒドロキシメチルカルボン酸体各10 µgを負荷し、各種混合比の塩酸・メタノール混液を流下した場合の溶出状況を表8及び表9にそれぞれ示す。これらのカラム精製では、両代謝物を同一画分へ溶出させないと分析操作が煩雑になるが、同一画分へ溶出させる条件では精製効果が認められなかった為、当該精製操作は採用しなかった。

表8. スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラムからの溶出挙動

	カルボン酸体	ヒドロキシメチル カルボン酸体
0.05mol/L塩酸(負荷) 8mL	—	—
0.01mol/L塩酸・メタノール(4:1) 10mL	<1%	96%
0.01mol/L塩酸・メタノール(3:2) 10mL	6%	2%
0.01mol/L塩酸・メタノール(2:3) 10mL	84%	<1%
0.01mol/L塩酸・メタノール(1:4) 10mL	<1%	<1%
合計	90%	98%

「—」測定せず

負荷量: 10 µg (両代謝物の 20 mg/L/アセトニトリル混合標準溶液0.5 mLを窒素気流下で溶媒留去した後、0.05mol/L塩酸4 mLで溶解・流下する操作を2回繰り返して負荷)

表9. ジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムからの溶出挙動

		カルボン酸体	ヒドロキシメチル カルボン酸体
0.05mol/L塩酸(負荷)	8mL	—	—
0.01mol/L塩酸・メタノール(4:1)	10mL	<1%	102%
0.01mol/L塩酸・メタノール(3:2)	10mL	34%	2%
0.01mol/L塩酸・メタノール(2:3)	10mL	52%	3%
0.01mol/L塩酸・メタノール(1:4)	10mL	<1%	<1%
合計		86%	107%

「—」測定せず

負荷量: 10 µg (両代謝物の20 mg/L/アセトニトリル混合標準溶液0.5 mLを窒素気流下で溶媒除去した後、0.05mol/L塩酸4 mLで溶解・流下する操作を2回繰り返して負荷)

⑦ アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム [Sep-pak Plus NH₂(360mg)]及びトリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム [Intert Sep SAX(500mg)]

アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム及びトリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムを水10 mLで洗浄した後、カルボン酸体及びヒドロキシメチルカルボン酸体各10 µgを負荷し、各種混合比の塩酸・メタノール混液を流下した場合の溶出状況を表10及び表11にそれぞれ示す。弱陰イオン交換のアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムでは両代謝物への保持が弱く、逆に、強陰イオン交換のトリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムでは吸着が強すぎて溶出が不十分であった。又、固相に由来すると考えられる夾雑成分が測定に影響を及ぼす場合が認められた為、当該精製操作は採用しなかった。

表10. アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムからの溶出挙動

		カルボン酸体	ヒドロキシメチル カルボン酸体
水(負荷)	10mL	80%	79%
水・メタノール(1:1)	10mL	13%	10%
メタノール	10mL	<1%	<1%
合計		93%	89%

負荷量: 10 µg (両代謝物の20 mg/L/アセトニトリル混合標準溶液0.5 mLを窒素気流下で溶媒除去した後、水5 mLで溶解・流下する操作を2回繰り返して負荷)

表11. トリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムからの溶出挙動

		カルボン酸体	ヒドロキシメチル カルボン酸体
水(負荷)	10mL	<1%	<1%
水・メタノール(1:1)	10mL	<1%	<1%
メタノール	10mL	<1%	<1%
0.01mol/L塩酸・メタノール	10mL	<1%	<1%
0.1mol/L塩酸・メタノール	10mL	72%	86%
合計		72%	86%

負荷量: 10 µg (両代謝物の20 mg/L/アセトニトリル混合標準溶液0.5 mLを窒素気流下で溶媒留去した後、水5 mLで溶解・流下する操作を2回繰り返して負荷)

⑧ グラファイトカーボンミニカラム[Intert Sep GC (150mg)]

グラファイトカーボンミニカラムを、酢酸エチル又は水各5 mLで洗浄した後、カルボン酸体及びヒドロキシメチルカルボン酸体各10 µgを負荷し、各種溶液を流下した場合の溶出状況を表12及び表13に示す。これらの検討結果から、両代謝物を水・メタノール混液でカラムに保持させメタノールで溶出する条件を設定して実試料への適用を検討したが、良好な精製効果が得られなかった為、当該精製操作は採用しなかった。

表12. グラファイトカーボンミニカラムからの溶出挙動- I

		カルボン酸体	ヒドロキシメチル カルボン酸体
酢酸エチル(負荷)	10mL	60%	16%
メタノール	10mL	26%	84%
ギ酸・メタノール(1:1000)	10mL	11%	14%
ギ酸・メタノール(1:100)	10mL	<1%	13%
合計		97%	127%

負荷量: 10 µg (両代謝物の20 mg/L/アセトニトリル混合標準溶液0.5 mLを窒素気流下で溶媒留去した後、酢酸エチル5 mLで溶解・流下する操作を2回繰り返して負荷)

表13. グラファイトカーボンミニカラムからの溶出挙動- II

		カルボン酸体	ヒドロキシメチル カルボン酸体
水(負荷)	10mL	<1%	<1%
水・メタノール(4:1)	10mL	<1%	<1%
メタノール	10mL	115%	80%
0.1mol/L塩酸・メタノール	10mL	<1%	<1%
合計		115%	80%

負荷量: 10 µg (両代謝物の20 mg/L/アセトニトリル混合標準溶液0.5 mLを窒素気流下で溶媒留去した後、水5 mLで溶解・流下する操作を2回繰り返して負荷)

⑨ シアノプロピルミニカラム[Sep-pak Plus CN (360mg)]

シアノプロピルミニカラムを、アセトン5 mLで洗浄した後、カルボン酸体及びヒドロキシメチルカルボン酸体各10 µgを負荷し、各種混合比のアセトン・メタノール混液を流下した場合の溶出状況を表14に示す。これらの検討結果から、両代謝物を0.1%ギ酸含有アセトンでカラムに溶解して通過させる条件で実試料での適用を検討したが、良好な精製効果及び回収率が得られなかった為、当該精製操作は採用しなかった。

表14. シアノプロピルミニカラムからの溶出挙動

	カルボン酸体	ヒドロキシメチル カルボン酸体
0.1%ギ酸含有アセトン(負荷) 10mL	72%	85%
アセトン・メタノール・ギ酸(90:10:0.1) 10mL	3%	3%
アセトン・メタノール・ギ酸(80:20:0.1) 10mL	<1%	<1%
合計	75%	88%

負荷量:10 µg(両代謝物の20 mg/L/アセトニトリル混合標準溶液0.5 mLを窒素気流下で溶媒留去した後、0.1%ギ酸含有アセトン5 mLで溶解・流下する操作を2回繰り返して負荷)

(3) 転溶溶媒の検討

① アセトニトリル・ヘキサン分配

各化合物1 µgをヘキサン飽和アセトニトリル50 mLに添加し、ヘキサン50 mLを加えて約3分間振とうし、アセトニトリル層を分取した。更にヘキサン飽和アセトニトリル50 mLを加えて同様の振とう及び分取を繰り返した結果を表15に示す。アセトニトリル・ヘキサン分配では、カルボン酸体及びヒドロキシメチルカルボン酸体を良好に回収出来なかった為、当該精製操作は採用しなかった。

表15. アセトニトリル・ヘキサン分配での転溶率

	チアジニル	カルボン酸体	ヒドロキシメチルカ ルボン酸体
アセトニトリル層(50mL×2)	91%	43%	51%

負荷量:1 µg(3種分析対象成分の2 mg/L/アセトニトリル混合標準溶液0.5 mL)

② アルカリ洗浄

カルボン酸体及びヒドロキシメチルカルボン酸体の0.1 µgを水4 mLに添加し、10%塩化ナトリウム溶液14 mL、10 mol/L水酸化ナトリウム溶液2 mL及び酢酸エチル20 mLを加えて約3分間振とうした。酢酸エチル層を廃棄画分とし、水層を取って塩酸3 mLを添加した後、酢酸エチル20mLを加えて約3分間振とうし、酢酸エチル層を分取した。水層に酢酸エチル20 mLを加えて振とうする操作を更に2回繰り返し、酢酸エチル層を合わせ(計60 mL)、溶媒を留去後、転溶率を求めた結果を表16に示す。

この結果に基づき、大豆試料抽出液の20 mL(試料1 g相当)を減圧濃縮し、上記操作及び強塩基性陰イオン交換樹脂ミニカラム(Oasis MAX)による精製を行い測定したところ、カルボン酸体

1 mg/kg添加試料の回収率は91%、ヒドロキシメチルカルボン酸体1 mg/kg添加試料の回収率は88%となり、無添加(ブランク)試料において測定の障害となるピーク等は認められなかった(<0.01 mg/kg)。しかしながら、同様の精製条件で玄米、ごま及び茶への適用を試行したところ、カルボン酸体で91、69及び77%、ヒドロキシメチルカルボン酸体で86、78及び18%の回収率となり、問題が認められた為、当該精製操作は採用しなかった。

表 16. アルカリ洗浄での転溶率

	カルボン酸体	ヒドロキシメチル カルボン酸体
塩基性下：酢酸エチル層(20mL、廃棄画分)	<1%	<1%
酸性下：酢酸エチル層(20mL×3)	82%	82%

負荷量:0.1 µg(両代謝物の0.2 mg/L/アセトニトリル混合標準溶液0.5 mL)

3. 添加回収実験

残留基準値が設定されている米の他、大豆、ごま、ほうれんそう、キャベツ、トマト、ばれいしょ、りんご、オレンジ及び茶の計10食品を試料に用いて、前述の実験方法に従い分析して添加回収率を算出した。添加回収実験における回収率100%相当の標準溶液、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3に示す。又、各食品のブランク試料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4に示す。

(1) 選択性

選択性の検討結果を表17に示す。何れの検討試料においても、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定量を妨害するピークは認められなかった。ただし、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、チアジニル換算として定量限界0.01 mg/kgを目標としたが、本試験法で確立できた定量限界は0.02 mg/kgであった(両代謝物そのものとして0.01 mg/kg)。

表17. 選択性の評価

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (mg/kg)	基準値 ¹ (mg/kg)	添加濃度 ² (mg/kg)	妨害ピークの許容範囲		ピーク面積(高さ) ³				選択性の評価 ⁵	備考	
						評価対象濃度 (mg/kg)	判定基準	面積又は高さの別	ブランク試料 (a)	標準溶液 ⁴ (b)	面積(高さ)比 (a)/(b)			
1	チアジニル	米	0.01	1.	1.	基準値	1.	< 0.100	面積	0	99.661	0.000	○	
2	チアジニル	大豆	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	99.661	0.000	○	
3	チアジニル	ごま	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	99.661	0.000	○	
4	チアジニル	ほうれんそう	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	80.240	0.000	○	
5	チアジニル	キャベツ	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	80.240	0.000	○	
6	チアジニル	トマト	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	80.240	0.000	○	
7	チアジニル	ばれいしょ	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	80.240	0.000	○	
8	チアジニル	りんご	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	80.240	0.000	○	
9	チアジニル	オレンジ	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	80.240	0.000	○	
10	チアジニル	茶	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	113.163	0.000	○	
11	カルボン酸体	米	0.01857	1.	1.857	* 基準値	1.	< 0.100	面積	0	728.777	0.000	○	
12	カルボン酸体	大豆	0.01857	0.01	0.01857	定量限界	0.01857	< 0.333	面積	0	278.777	0.000	○	
13	カルボン酸体	ごま	0.01857	0.01	0.01857	定量限界	0.01857	< 0.333	面積	0	719.751	0.000	○	
14	カルボン酸体	ほうれんそう	0.01857	0.01	0.01857	定量限界	0.01857	< 0.333	面積	0	778.898	0.000	○	
15	カルボン酸体	キャベツ	0.01857	0.01	0.01857	定量限界	0.01857	< 0.333	面積	0	778.898	0.000	○	
16	カルボン酸体	トマト	0.01857	0.01	0.01857	定量限界	0.01857	< 0.333	面積	0	778.898	0.000	○	
17	カルボン酸体	ばれいしょ	0.01857	0.01	0.01857	定量限界	0.01857	< 0.333	面積	0	778.898	0.000	○	
18	カルボン酸体	りんご	0.01857	0.01	0.01857	定量限界	0.01857	< 0.333	面積	0	778.898	0.000	○	
19	カルボン酸体	オレンジ	0.01857	0.01	0.01857	定量限界	0.01857	< 0.333	面積	0	778.898	0.000	○	
20	カルボン酸体	茶	0.01857	0.01	0.01857	定量限界	0.01857	< 0.333	面積	0	719.751	0.000	○	
21	ヒドロキシメチルカルボン酸体	米	0.01672	1.	1.672	基準値	1.	< 0.100	面積	0	273.829	0.000	○	
22	ヒドロキシメチルカルボン酸体	大豆	0.01672	0.01	0.01672	定量限界	0.01672	< 0.333	面積	0	273.829	0.000	○	
23	ヒドロキシメチルカルボン酸体	ごま	0.01672	0.01	0.01672	定量限界	0.01672	< 0.333	面積	0	277.200	0.000	○	
24	ヒドロキシメチルカルボン酸体	ほうれんそう	0.01672	0.01	0.01672	定量限界	0.01672	< 0.333	面積	0	272.056	0.000	○	
25	ヒドロキシメチルカルボン酸体	キャベツ	0.01672	0.01	0.01672	定量限界	0.01672	< 0.333	面積	0	272.056	0.000	○	
26	ヒドロキシメチルカルボン酸体	トマト	0.01672	0.01	0.01672	定量限界	0.01672	< 0.333	面積	0	272.056	0.000	○	
27	ヒドロキシメチルカルボン酸体	ばれいしょ	0.01672	0.01	0.01672	定量限界	0.01672	< 0.333	面積	0	272.056	0.000	○	
28	ヒドロキシメチルカルボン酸体	りんご	0.01672	0.01	0.01672	定量限界	0.01672	< 0.333	面積	0	272.056	0.000	○	
29	ヒドロキシメチルカルボン酸体	オレンジ	0.01672	0.01	0.01672	定量限界	0.01672	< 0.333	面積	0	272.056	0.000	○	
30	ヒドロキシメチルカルボン酸体	茶	0.01672	0.01	0.01672	定量限界	0.01672	< 0.333	面積	0	277.200	0.000	○	

カルボン酸及びヒドロキシメチルカルボン酸としての値で表記(両代謝物のチアジニル換算した定量限界は0.02 mg/kg)

*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。

(2) 真度、精度及び定量限界

真度及び併行精度の検討結果を表18に示す。チアジニルについて真度は96～111%、併行精度(RSD)は2～7%の範囲、カルボン酸体について真度は78～100%、併行精度は3～7%の範囲、ヒドロキシメチルカルボン酸体について真度は73～97%、併行精度は1～8%の範囲であり、全ての検討試料及び分析対象成分について良好であった。又、定量限界相当濃度0.01 mg/kg(カルボン酸及びヒドロキシメチルカルボン酸としての値、両代謝物のチアジニル換算した定量限界は0.02 mg/kg)を添加した場合のクロマトグラムを図3に示す。定量限界相当添加試料におけるS/N比の平均値はチアジニルについて53～77、カルボン酸体について12～25、ヒドロキシメチルカルボン酸体について18～36であり、全ての検討試料及び分析対象成分について10以上であった。ただし、カルボン酸における個々のS/N比については、ほうれんそう試料において目標値(10以上)を下回る場合もあった。

表18. 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 (ppm)	基準値 ¹⁾ (ppm)	添加濃度 (ppm)	定量限界の評価 ²⁾	検量線 ³⁾					回収率(%)					真度 (%)	併行精度 (RSD%)	S/N比 ⁴⁾			備考
							傾き	切片	r ²	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5	Max.	Min.			平均値			
1	チアジニル	米	0.01	1.	1.	*	235681	-14.3404	0.9990	105	104	100	100	99	102	3	-	-	-			
2	チアジニル	米	0.01	1.	0.01		200591	-0.6503	1.0000	110	107	106	105	102	106	3	74	72	73			
3	チアジニル	大豆	0.01	0.01	0.01		200591	-0.6503	1.0000	104	103	103	101	96	101	3	77	47	62			
4	チアジニル	ごま	0.01	0.01	0.01		200591	-0.6503	1.0000	104	101	100	100	100	101	2	62	44	53			
5	チアジニル	ほうれんそう	0.01	0.01	0.01		183519	-2.3297	1.0000	106	102	100	100	98	101	3	74	54	64			
6	チアジニル	キャベツ	0.01	0.01	0.01		183519	-2.3297	1.0000	105	101	101	101	98	101	2	71	65	68			
7	チアジニル	トマト	0.01	0.01	0.01		183519	-2.3297	1.0000	109	105	105	98	96	103	5	79	59	69			
8	チアジニル	ばれいしょ	0.01	0.01	0.01		183519	-2.3297	1.0000	102	99	99	90	89	96	6	74	41	58			
9	チアジニル	りんご	0.01	0.01	0.01		183519	-2.3297	1.0000	113	112	109	105	100	108	5	78	77	77			
10	チアジニル	オレンジ	0.01	0.01	0.01		183519	-2.3297	1.0000	116	116	107	103	101	109	7	77	76	76			
11	チアジニル	茶	0.01	0.01	0.01		235681	-14.3404	0.9990	115	113	111	108	107	111	3	63	62	63			
12	カルボン酸体	米	0.01857	1.	1.857	*	546387	-12.9870	0.9998	92	89	87	85	81	87	5	-	-	-			
13	カルボン酸体	米	0.01857	1.	0.01857		558996	-11.9830	1.0000	104	104	101	98	95	100	4	26	21	24			
14	カルボン酸体	大豆	0.01857	0.01	0.01857		558996	-11.9830	1.0000	89	85	81	78	77	82	6	13	12	12			
15	カルボン酸体	ごま	0.01857	0.01	0.01857		546387	-12.9870	0.9998	87	84	84	83	81	84	3	18	17	17			
16	カルボン酸体	ほうれんそう	0.01857	0.01	0.01857		379349	-3.0244	0.9998	85	85	81	80	80	82	3	15	9	12			
17	カルボン酸体	キャベツ	0.01857	0.01	0.01857		379349	-3.0244	0.9998	86	79	78	77	77	79	5	19	13	16			
18	カルボン酸体	トマト	0.01857	0.01	0.01857		379349	-3.0244	0.9998	87	81	77	76	74	79	7	19	17	18			
19	カルボン酸体	ばれいしょ	0.01857	0.01	0.01857		379349	-3.0244	0.9998	82	79	78	75	75	78	4	14	13	13			
20	カルボン酸体	りんご	0.01857	0.01	0.01857		379349	-3.0244	0.9998	95	92	90	87	84	90	5	25	23	24			
21	カルボン酸体	オレンジ	0.01857	0.01	0.01857		379349	-3.0244	0.9998	88	87	87	83	80	85	4	28	21	25			
22	カルボン酸体	茶	0.01857	0.01	0.01857		546387	-12.9870	0.9998	102	101	99	92	90	97	6	27	24	25			
23	ヒドロキシメチルカルボン酸体	米	0.01672	1.	1.672	*	1502446	-26.8193	1.0000	99	98	98	96	94	97	2	-	-	-			
24	ヒドロキシメチルカルボン酸体	米	0.01672	1.	0.01672		1505497	-15.4403	1.0000	100	98	97	95	93	97	3	27	27	27			
25	ヒドロキシメチルカルボン酸体	大豆	0.01672	0.01	0.01672		1505497	-15.4403	1.0000	91	91	90	89	74	87	8	20	16	18			
26	ヒドロキシメチルカルボン酸体	ごま	0.01672	0.01	0.01672		1502446	-26.8193	1.0000	76	74	73	72	71	73	3	22	15	18			
27	ヒドロキシメチルカルボン酸体	ほうれんそう	0.01672	0.01	0.01672		968782	-26.8893	1.0000	99	95	94	93	90	94	3	36	31	34			
28	ヒドロキシメチルカルボン酸体	キャベツ	0.01672	0.01	0.01672		968782	-26.8893	1.0000	99	93	91	88	88	92	5	23	19	21			
29	ヒドロキシメチルカルボン酸体	トマト	0.01672	0.01	0.01672		968782	-26.8893	1.0000	97	97	97	96	95	96	1	24	22	23			
30	ヒドロキシメチルカルボン酸体	ばれいしょ	0.01672	0.01	0.01672		968782	-26.8893	1.0000	99	98	98	96	95	97	2	27	19	23			
31	ヒドロキシメチルカルボン酸体	りんご	0.01672	0.01	0.01672		968782	-26.8893	1.0000	95	95	94	93	91	94	2	29	27	28			
32	ヒドロキシメチルカルボン酸体	オレンジ	0.01672	0.01	0.01672		968782	-26.8893	1.0000	96	94	94	93	93	94	1	28	22	25			
33	ヒドロキシメチルカルボン酸体	茶	0.01672	0.01	0.01672		1502446	-26.8193	1.0000	99	99	98	95	93	97	3	37	36	36			

カルボン酸及びヒドロキシメチルカルボン酸としての値で表記(両代謝物のチアジニル換算した定量限界は0.02 mg/kg)

¹⁾ 基準値は、基準値未設定の場合には「*」が表示される。

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⁾ カルボン酸体及びヒドロキシメチルカルボン酸体濃度で作成した検量線

⁴⁾ 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(Mn.)のそれぞれのS/N比を求める。

(3) 試料マトリックスの測定への影響

試料マトリックスの測定への影響について検討した結果を表 19 に示す。実試料濃度として 0.01 mg/kg 相当濃度になるように調製した 10 種検討対象作物の各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比を求めた。又、米試料については、残留基準値 1 mg/kg 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の溶媒標準溶液に対するピーク面積比も求めた。それらの面積比はチアジニルについて 0.95~1.06 の範囲、カルボン酸体について 0.96~1.08 の範囲、ヒドロキシメチルカルボン酸体について 0.94~1.02 の範囲であり、試料マトリックスの測定への影響は認められ無かった。

表 19. 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 (mg/kg)	基準値 ¹⁾ (ppm)	添加濃度 (ppm)	標準溶液 濃度 ²⁾ (mg/L)	ピーク面積(高さ) ³⁾										備考
							面積又は 高さの別	ブランク ⁴⁾	マトリックス添加標準溶液 ⁵⁾			溶媒標準溶液			ピーク面積 (高さ)比 ⁶⁾		
									n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均			
1	チアジニル	米	0.01	1.	1.	0.001	面積	0	927	962	945	921	973	947	1.00		
2	チアジニル	米	0.01	1.	0.01	0.0001	面積	0	109	110	110	103	105	104	1.06		
3	チアジニル	大豆	0.01	0.01	0.01	0.0001	面積	0	104	109	106	105	108	106	1.00		
4	チアジニル	ごま	0.01	0.01	0.01	0.0001	面積	0	108	109	108	103	105	104	1.04		
5	チアジニル	ほうれんそう	0.01	0.01	0.01	0.0001	面積	0	112	113	112	115	121	118	0.95		
6	チアジニル	キャベツ	0.01	0.01	0.01	0.0001	面積	0	122	120	121	115	121	118	1.03		
7	チアジニル	トマト	0.01	0.01	0.01	0.0001	面積	0	121	118	119	114	115	115	1.04		
8	チアジニル	ばれいしょ	0.01	0.01	0.01	0.0001	面積	0	114	111	112	114	115	115	0.98		
9	チアジニル	りんご	0.01	0.01	0.01	0.0001	面積	0	113	109	111	105	108	106	1.05		
10	チアジニル	オレンジ	0.01	0.01	0.01	0.0001	面積	0	110	117	114	108	114	111	1.02		
11	チアジニル	茶	0.01	0.01	0.01	0.0001	面積	0	111	113	112	108	114	111	1.01		
12	カルボン酸体	米	0.01857	1.	1.857	0.001	面積	0	935	928	932	914	883	898	1.04		
13	カルボン酸体	米	0.01857	1.	0.01857	0.0001	面積	0	99	101	100	95	105	100	1.00		
14	カルボン酸体	大豆	0.01857	0.01	0.01857	0.0001	面積	0	100	108	104	105	98	102	1.02		
15	カルボン酸体	ごま	0.01857	0.01	0.01857	0.0001	面積	0	97	95	96	95	105	100	0.96		
16	カルボン酸体	ほうれんそう	0.01857	0.01	0.01857	0.0001	面積	0	97	101	99	104	103	103	0.96		
17	カルボン酸体	キャベツ	0.01857	0.01	0.01857	0.0001	面積	0	104	103	104	104	103	103	1.01		
18	カルボン酸体	トマト	0.01857	0.01	0.01857	0.0001	面積	0	107	100	103	105	104	104	0.99		
19	カルボン酸体	ばれいしょ	0.01857	0.01	0.01857	0.0001	面積	0	103	100	102	105	104	104	0.97		
20	カルボン酸体	りんご	0.01857	0.01	0.01857	0.0001	面積	0	106	101	104	105	98	102	1.02		
21	カルボン酸体	オレンジ	0.01857	0.01	0.01857	0.0001	面積	0	103	107	105	98	105	101	1.04		
22	カルボン酸体	茶	0.01857	0.01	0.01857	0.0001	面積	0	108	111	109	98	105	101	1.08		
23	ヒドロキシメチルカルボン酸体	米	0.01672	1.	1.672	0.001	面積	0	2695	2703	2699	2606	2675	2641	1.02		
24	ヒドロキシメチルカルボン酸体	米	0.01672	1.	0.01672	0.0001	面積	0	268	275	272	281	288	285	0.95		
25	ヒドロキシメチルカルボン酸体	大豆	0.01672	0.01	0.01672	0.0001	面積	0	284	283	284	288	286	287	0.99		
26	ヒドロキシメチルカルボン酸体	ごま	0.01672	0.01	0.01672	0.0001	面積	0	275	283	279	281	288	285	0.98		
27	ヒドロキシメチルカルボン酸体	ほうれんそう	0.01672	0.01	0.01672	0.0001	面積	0	292	287	290	292	285	289	1.00		
28	ヒドロキシメチルカルボン酸体	キャベツ	0.01672	0.01	0.01672	0.0001	面積	0	284	296	290	292	285	289	1.00		
29	ヒドロキシメチルカルボン酸体	トマト	0.01672	0.01	0.01672	0.0001	面積	0	284	276	280	295	292	294	0.95		
30	ヒドロキシメチルカルボン酸体	ばれいしょ	0.01672	0.01	0.01672	0.0001	面積	0	299	288	294	295	292	294	1.00		
31	ヒドロキシメチルカルボン酸体	りんご	0.01672	0.01	0.01672	0.0001	面積	0	283	289	286	288	286	287	1.00		
32	ヒドロキシメチルカルボン酸体	オレンジ	0.01672	0.01	0.01672	0.0001	面積	0	270	274	272	286	295	291	0.94		
33	ヒドロキシメチルカルボン酸体	茶	0.01672	0.01	0.01672	0.0001	面積	0	278	282	280	286	295	291	0.96		

カルボン酸及びヒドロキシメチルカルボン酸としての値で表記(両代謝物のチアジニル換算した定量限界は0.02 mg/kg)

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。

4. その他の試験法検討に関連する事項

(1) 試験法の検討経緯

検討当初、大豆、ごま及び茶におけるカルボン酸体及びヒドロキシメチルカルボン酸体の分析は困難であると判断し、チアジニルも含めた 3 成分について、米、ほうれんそう、キャベツ、トマト、ばれいしょ、りんご、オレンジの試験法案を構築した。検討段階でのチアジニル、カルボン酸体及びヒドロキシメチルカルボン酸体の回収実験結果を表 20~22 にそれぞれ示す。その際、チアジニルについては LC-MS、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 LC-MS/MS を用いて測定する方法を設定した。そして、この試験法案の測定条件と供試試料量を最適化したところ、両代謝物の目標定量限界(チアジニルとして 0.01 mg/kg)を確保することは困難であったが、10 種全ての検討対象作物に適用可能な試験法を確立できた。なお、試験法について対象作物を拡大

するために改良した点は、精製に供する試料量を削減し、検液量を増やし(希釈率を上げた)、測定をLC-MS/MSに統一したことであり、精製手法は変更しなかった。

表20. 検討段階でのチアジニルの回収率(LC-MS測定)

試料 (基準値)	添加濃度 (mg/kg)	チアジニル		
		回収率(%)	真度(%)	RSD(%)
玄米 (1mg/kg)	0.1	94、90、83、79、77	85	8.5
	0.01	93、93、91、90、85	90	3.6
大豆	0.01	78、76、75、73、70	74	4.1
ごま*	0.01	(51)	(-)	(-)
ほうれんそう	0.01	83、81、79、78、77	80	3.0
キャベツ	0.01	90、90、90、89、89	90	0.6
トマト	0.01	90、89、89、89、88	89	0.8
ばれいしょ	0.01	97、93、92、86、85	91	5.6
りんご	0.01	90、89、88、87、86	88	1.8
オレンジ	0.01	82、76、75、70、70	75	6.7
茶*	0.01	(95)	(-)	(-)

「-」は算出不能。

* 予備データ(ごま及び茶は1点での試行結果)

表21. 検討段階でのカルボン酸体の回収率

試料 (基準値)	添加濃度 (mg/kg)*	カルボン酸体		
		回収率(%)	真度(%)	RSD(%)
玄米 (1mg/kg)	1.857 (1)	84、83、75、74、72	78	7.1
	0.01857 (0.01)	97、93、83、83、81	87	8.2
大豆	0.01857 (0.01)	(75、74、65、52、37)	(61)	(26.6)
ごま**	0.01857 (0.01)	(<1)	(-)	(-)
ほうれんそう	0.01857 (0.01)	73、72、71、71、70	71	1.6
キャベツ	0.01857 (0.01)	82、79、78、72、71	76	6.2
トマト	0.01857 (0.01)	84、79、75、71、70	76	7.7
ばれいしょ	0.01857 (0.01)	86、83、81、72、72	79	8.2
りんご	0.01857 (0.01)	86、83、83、78、77	81	4.6
オレンジ	0.01857 (0.01)	77、76、73、71、71	74	3.8
茶**	0.01857 (0.01)	(<1)	(-)	(-)

「-」は算出不能。

* チアジニル換算濃度(カルボン酸体としての濃度)

** 予備データ(ごま及び茶は1点での試行結果)

表22. 検討段階でのヒドロキシメチルカルボン酸体の回収率

試料 (基準値)	添加濃度 (mg/kg)*	ヒドロキシメチルカルボン酸体		
		回収率(%)	真度(%)	RSD(%)
玄米 (1mg/kg)	1.672 (1)	96、91、86、82、79	87	7.9
	0.01672 (0.01)	91、89、88、84、82	87	4.3
大豆	0.01672 (0.01)	(70、60、55、47、36)	(54)	(24.1)
ごま**	0.01672 (0.01)	(<1)	(-)	(-)
ほうれんそう	0.01672 (0.01)	74、73、73、71、71	72	1.9
キャベツ	0.01672 (0.01)	93、85、84、84、73	84	8.5
トマト	0.01672 (0.01)	96、84、78、71、70	80	13.4
ばれいしょ	0.01672 (0.01)	95、93、89、86、82	89	5.9
りんご	0.01672 (0.01)	100、91、87、86、74	88	10.7
オレンジ	0.01672 (0.01)	96、96、95、95、95	95	0.6
茶**	0.01672 (0.01)	(<1)	(-)	(-)

「-」は算出不能。

* チアジニル換算濃度(ヒドロキシメチルカルボン酸体としての濃度)

** 予備データ(ごま及び茶は1点での試行結果)

(2) 定量限界について

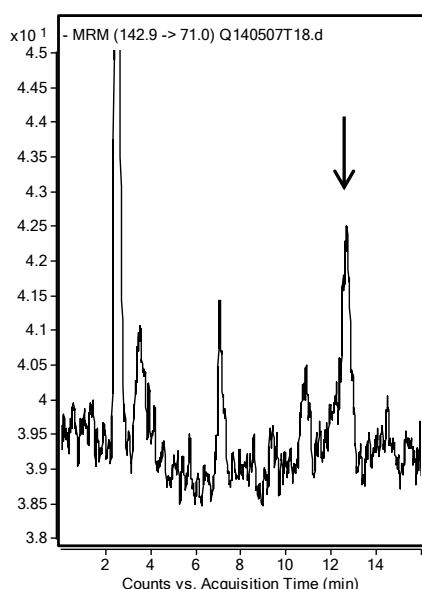
定量限界は、チアジニルについて 0.01 mg/kg、カルボン酸体及びヒドロキシメチルカルボン酸体について 0.02 mg/kg(チアジニル換算値)とした。カルボン酸体及びヒドロキシメチルカルボン酸体については、定量限界を 0.01 mg/kg とすることを目標としたが、以下の検討結果から当該試験条件においては困難であると判断した。

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、十分な精製が困難であり(第 2 項「試験溶液調製法の検討」参照)、試料の希釈倍率が小さい(濃縮倍率が高い)状況では、夾雑成分を多く含む検液を測定装置に注入せざるを得ない分析法となった。測定装置への負担を軽減し、試料マトリックスの測定への影響を回避することを重視して、提案法では検液の希釈倍率を可能な限り高めた設定(試料濃縮倍率 1/100)を採用した。この濃縮倍率は、検討に用いた測定装置における最小検出量に基づく設定である。

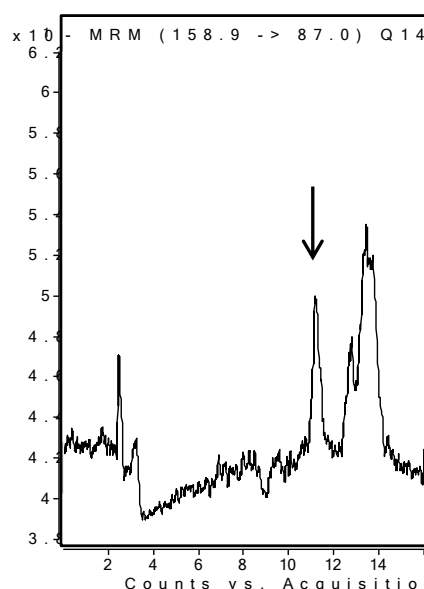
前述したカルボン酸 0.01 mg/kg(チアジニル換算値 0.02 mg/kg)を添加した場合の S/N 比で、さらに定量限界を下げる余裕(S/N 比 20 以上)が認められた試料数は、全 10 種検討試料の内 4 種のみであった(表 18 参照)。又、ヒドロキシメチルカルボン酸体 0.01 mg/kg(チアジニル換算値 0.02 mg/kg)を添加した場合の S/N 比でも、大豆及びごままでの S/N 比が 20 未満であった。これらの結果から、多様な食品に対して当該試験法を適用して、カルボン酸体及びヒドロキシメチルカルボン酸体の定量限界を各 0.005 mg/kg(それぞれチアジニルとして 0.01 mg/kg)とすることは困難であると判断した。なお、採用した測定条件において各成分の 0.00005 mg/L 標準溶液を 5 µL 注入した場合の標準的な S/N 比は、カルボン酸体で 9.8、ヒドロキシメチルカルボン酸体で 21.1 であった。又、精製を追加して夾雑成分の影響を低減する操作も検討したが、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良好な回収率を確保することは困難であった。

カルボン酸体及びヒドロキシメチルカルボン酸体の定量限界を各 0.005 mg/kg(それぞれチアジニルとして 0.01 mg/kg)とする場合には、濃縮倍率を 1/50 とすればよいが、この条件では夾雑成分の影響に起因すると考えられる添加回収率の低下や、クロマトグラム上 S/N 比の悪化が認められた。茶について、提案法における最終溶液量を 10 mL に半減し、カルボン酸体の定量限界を 0.005 mg/kg(チアジニル換算値として 0.009285 mg/kg)、ヒドロキシメチルカルボン酸体の定量限界を 0.005 mg/kg(チアジニル換算値として 0.00836 mg/kg)に設定した上で、両成分の定量限界相当添加の回収率を求めた(n=2)。その結果、カルボン酸体は 68 及び 65%、ヒドロキシメチルカルボン酸体は 84 及び 80%であった。カルボン酸体及びヒドロキシメチルカルボン酸体の各定量限界相当濃度添加時のクロマトグラムにおける各ピークの S/N 比は、カルボン酸体で 4.2、ヒドロキシメチルカルボン酸体で 8.9 であった(次図参照)。

以上より、カルボン酸体及びヒドロキシメチルカルボン酸体の定量限界を各 0.005 mg/kg とし、それぞれチアジニルとしての定量限界を 0.01 mg/kg とすることは困難であると判断した。



カルボン酸体 0.005 mg/kg 添加
(チアジニルとして 0.009285 mg/kg 添加)
5 μ L/10 mL/0.2 g



ヒドロキシメチルカルボン酸体 0.005 mg/kg 添加
(チアジニルとして 0.00836 mg/kg 添加)
5 μ L/10 mL/0.2 g

【結論】

チアジニル試験法として、塩酸酸性下アセトニトリル抽出、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と代謝物画分(カルボン酸体とヒドロキシメチルカルボン酸体)に分画、チアジニル画分はアルミナ(中性)ミニカラムで精製し、LC-MS/MSで定量及び確認、代謝物画分(カルボン酸体+ヒドロキシメチルカルボン酸体)は陰イオン交換ミニカラム(ポリマー基材)で精製し、LC-MS/MSで定量及び確認する方法を提案する。

玄米等10種農産物における回収実験において、真度は、チアジニルで96~111%、カルボン酸体で78~100%、ヒドロキシメチルカルボン酸体で73~97%であり、それらの併行精度はチアジニルで2~7%、カルボン酸体で3~7%、ヒドロキシメチルカルボン酸体で1~8%の範囲であった。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定量限界は、それぞれ0.01 mg/kg、0.02

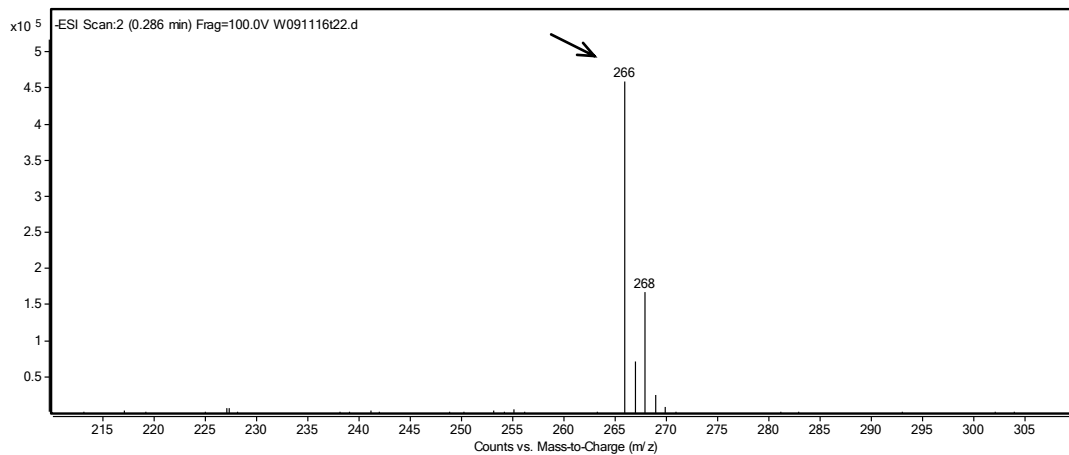
mg/kg及び0.02 mg/kg(チアジニルとしての濃度)であり、その総和としての定量限界は0.05 mg/kgであった。

【参考文献】

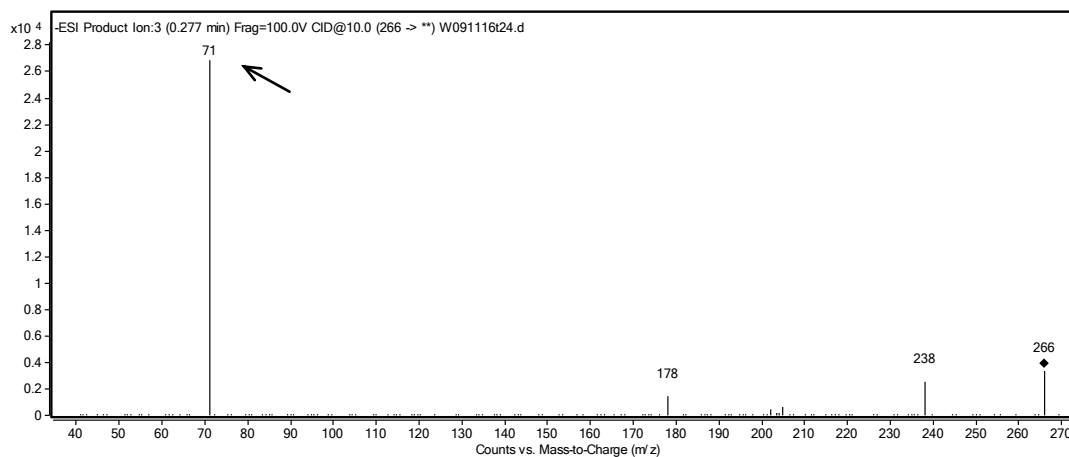
- 1) チアジニル試験法(農産物)(厚生労働省通知試験法)
- 2) チアジニルの登録保留基準試験法(環境省告示試験法)
- 3) チアジニルの作物残留性試験結果報告(非公開資料)

図 1. マススペクトル

チアジニルのマススペクトル(一次イオン)
1 mg/L アセトニトリル溶液



チアジニルのプロダクトスキンスペクトル(プリカーサーイオン; $m/z=266$)
1 mg/L アセトニトリル溶液



[操作条件]

測定装置: 6410 タンデム四重極型質量分析計、1200 高速液体クロマトグラフ (Agilent Technologies 社)

移動相: メタノール/0.1%ギ酸 (7:3, v/v) 混液、フローインジェクション

流速: 0.2mL/min

注入量: 5 μ L

イオン化モード: ESI(-)

イオン導入電圧: 4000V

フラグメンター電圧: 100V

コリジョン電圧: 10V (コリジョンガス; 窒素)

乾燥ガス流量: 11 L/min (窒素)

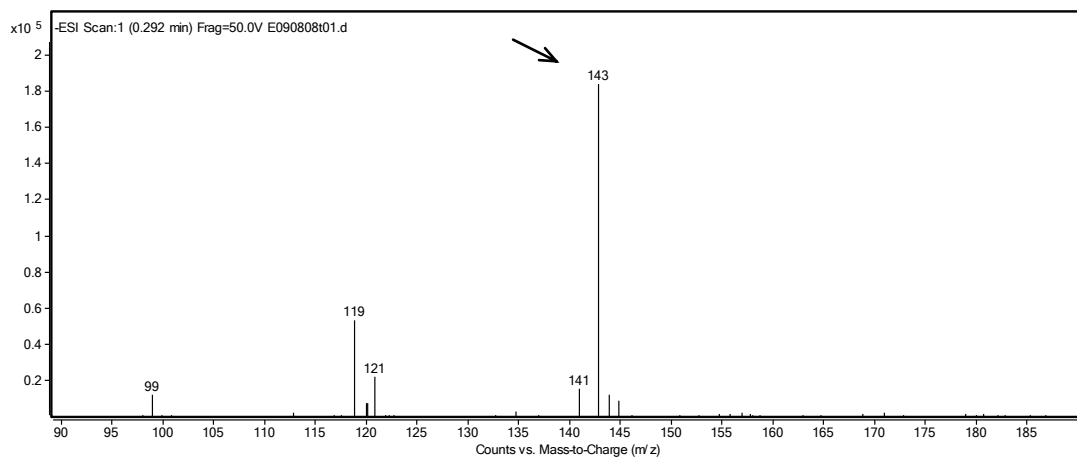
乾燥ガス温度: 350 $^{\circ}$ C

ネブライザー圧力: 35psi

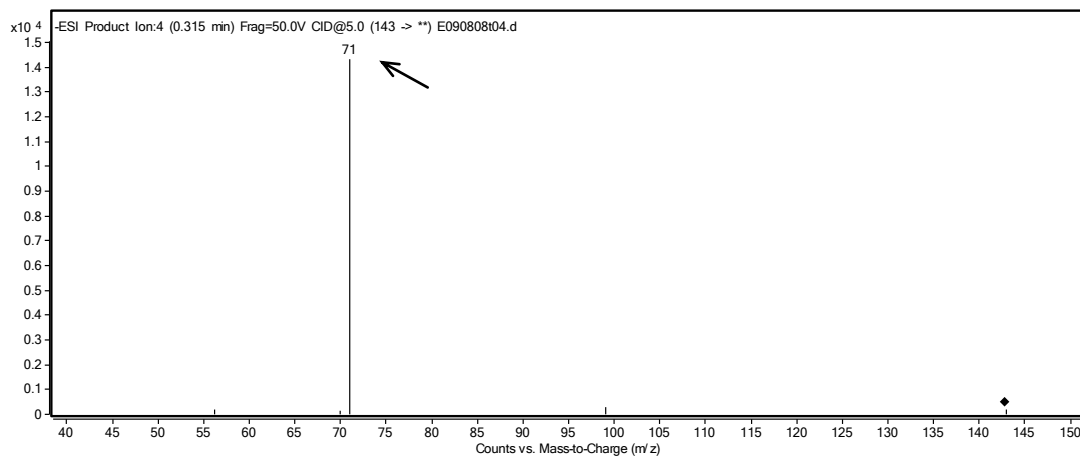
Scan 走査範囲: 一次イオン; m/z 40~320, 二次イオン; m/z 40~280

カルボン酸体のマススペクトル(一次イオン)

5 mg/L(チアジニルとして 9.285 mg/L)アセトニトリル溶液



カルボン酸体のプロダクトスキンスペクトル(プリカーサーイオン; m/z=143)



[操作条件]

測定装置: 6410 タンデム四重極型質量分析計、1200 高速液体クロマトグラフ (Agilent Technologies 社)

移動相: メタノール/水(1:1, v/v) 混液、フローインジェクション

流速: 0.2mL/min

注入量: 5 μ L

イオン化モード: ESI(-)

イオン導入電圧: 4000V

フラグメンター電圧: 50V

コリジョン電圧: 5V(コリジョンガス;窒素)

乾燥ガス流量: 11 L/min(窒素)

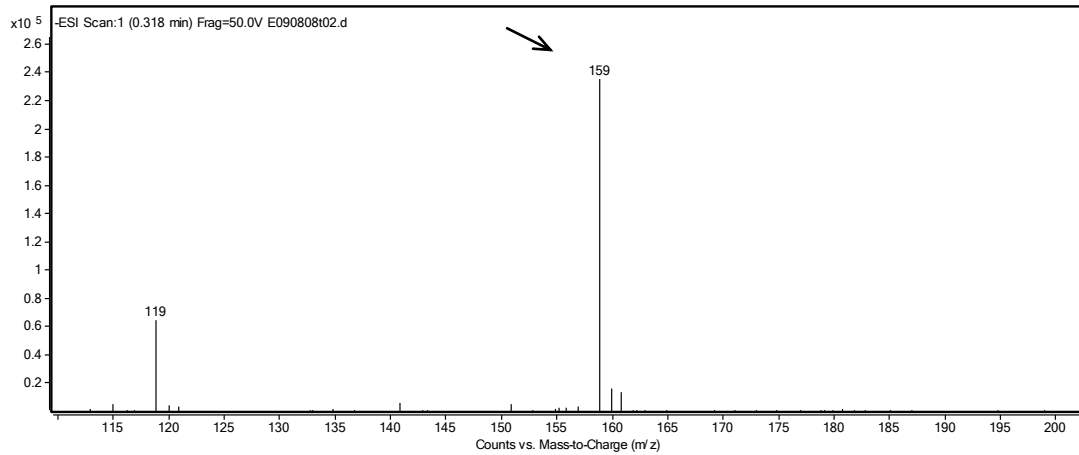
乾燥ガス温度: 350 $^{\circ}$ C

ネブライザー圧力: 35psi

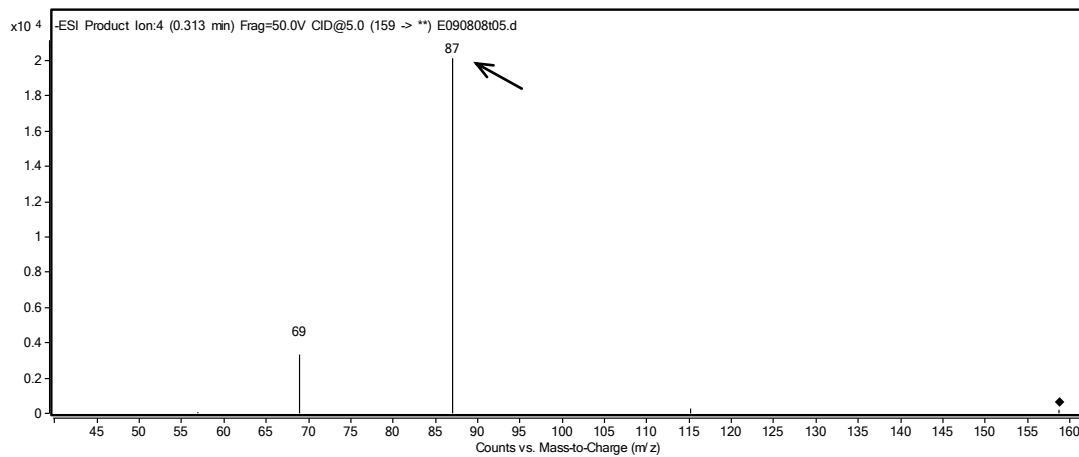
Scan 走査範囲: 一次イオン; m/z 40~200, 二次イオン; m/z 40~150

ヒドロキシメチルカルボン酸体のマススペクトル(一次イオン)

5 mg/L(チアジニルとして 8.36 mg/L)アセトニトリル溶液



ヒドロキシメチルカルボン酸体のプロダクトスキャンスペクトル(プリカーサーイオン; $m/z=159$)



[操作条件]

測定装置: 6410 タンデム四重極型質量分析計、1200 高速液体クロマトグラフ (Agilent Technologies 社)

移動相: メタノール/水(1:1, v/v) 混液、フローインジェクション

流速: 0.2mL/min

注入量: 5 μ L

イオン化モード: ESI(-)

イオン導入電圧: 4000V

フラグメンター電圧: 50V

コリジョン電圧: 5V(コリジョンガス;窒素)

乾燥ガス流量: 11 L/min(窒素)

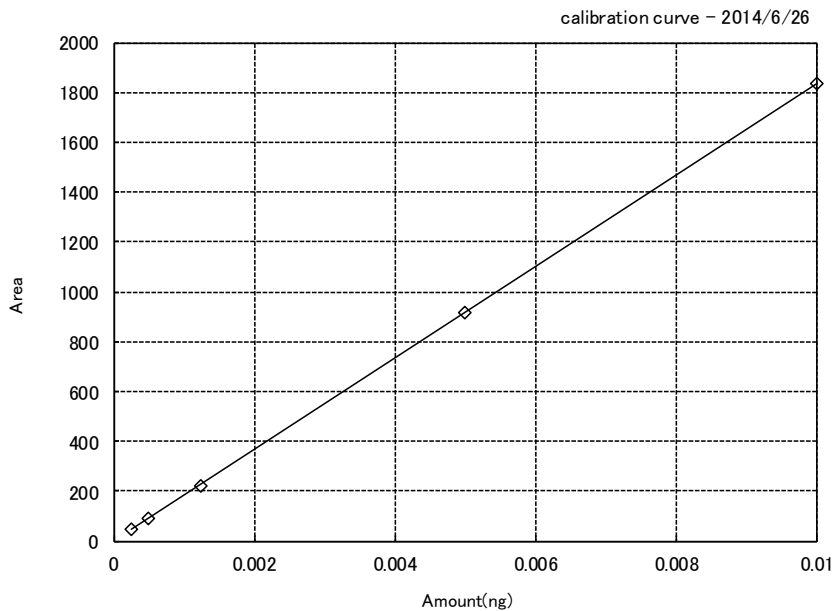
乾燥ガス温度: 350 $^{\circ}$ C

ネブライザー圧力: 35psi

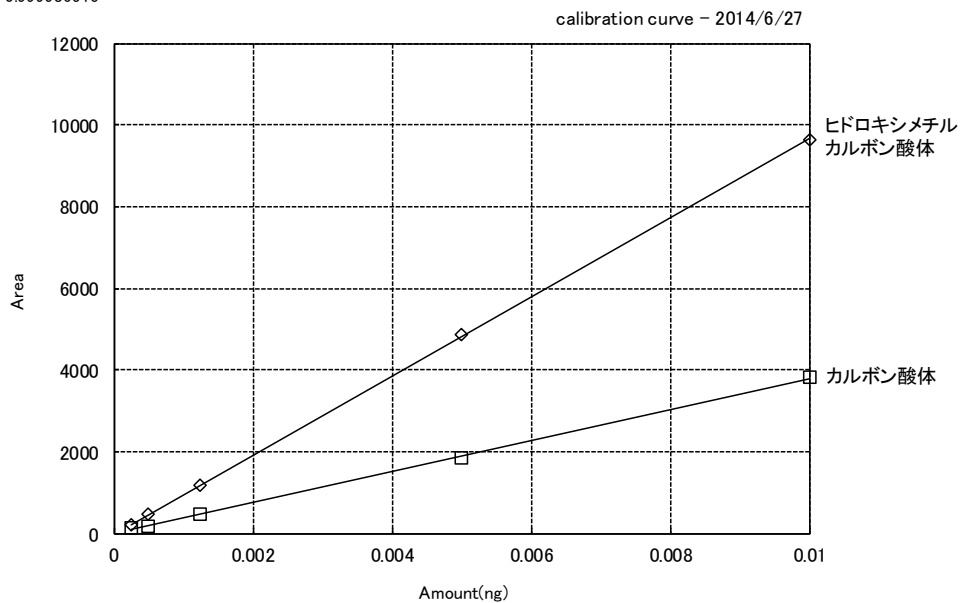
Scan 走査範囲: 一次イオン; m/z 40~200, 二次イオン; m/z 40~160

図 2. 検量線の一例

CalibrationCurve --- 2014/6/26
 チアジニル
 $y = 183518.6811 x - 2.329715889$
 $r = 0.999995458$



CalibrationCurve --- 2014/6/27
 カルボン酸体
 $y = 379348.5422 x - 3.024443359$
 $r = 0.999914445$
 ヒドロキシメチルカルボン酸体
 $y = 968781.9124 x - 26.88930221$
 $r = 0.999986515$



横軸はカルボン酸体及びヒドロキシカルボン酸体重量
 (チアジニルとして 0.0004643~0.01857 ng及び0.000418~0.01672 ng)

図 3. クロマトグラム

図 3-1. チアジニル

図 3-1-1. 玄米試料

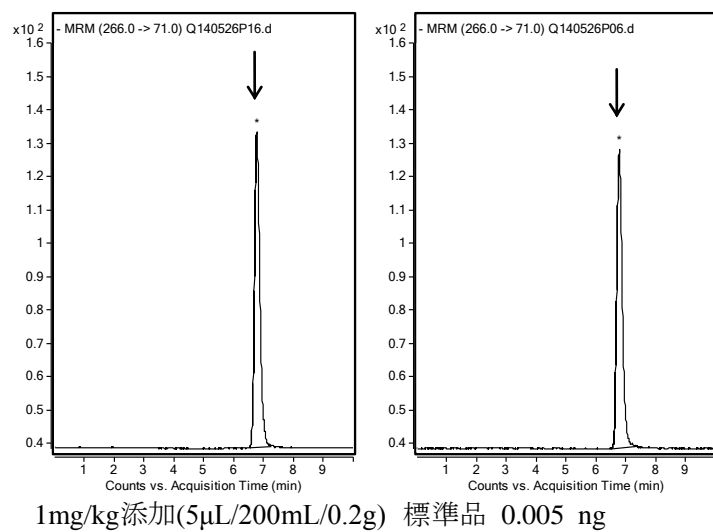
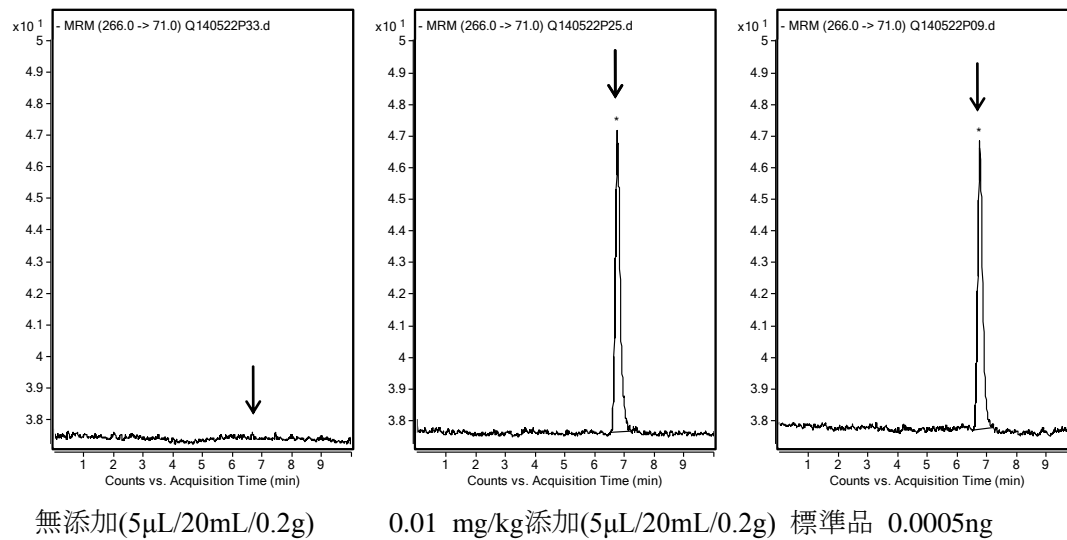


図 3-1-2. だいず試料

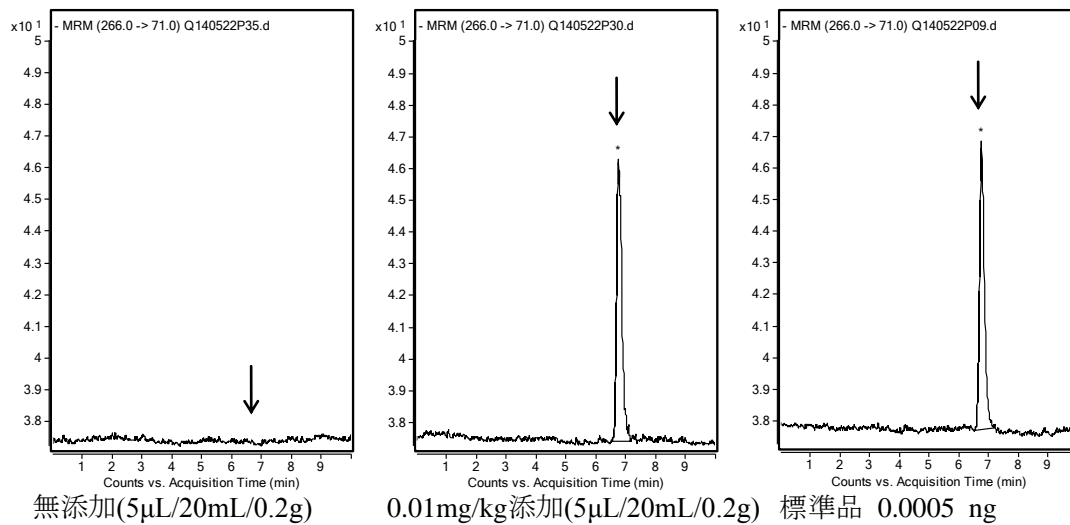


図 3-1-3. ごま試料

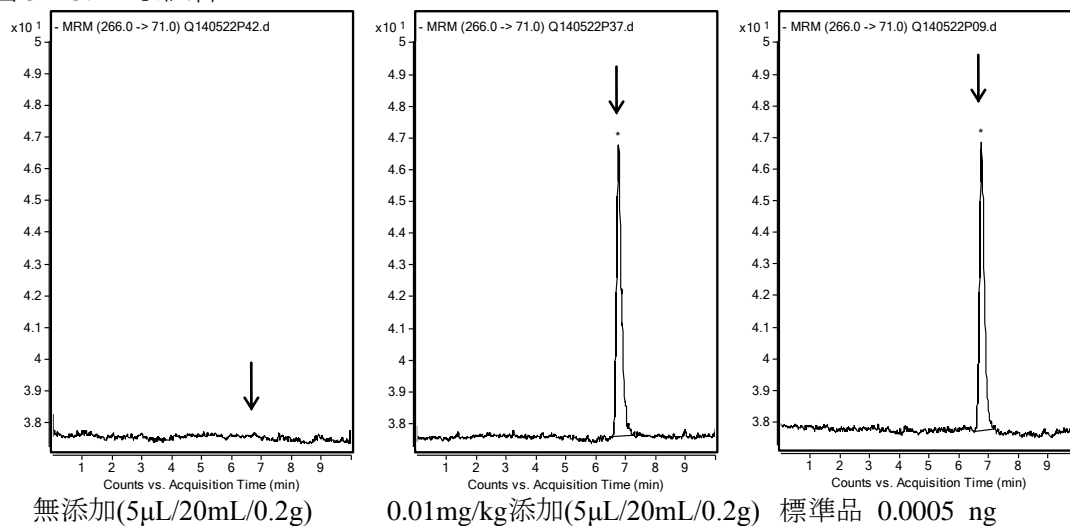


図 3-1-4. ほうれんそう試料

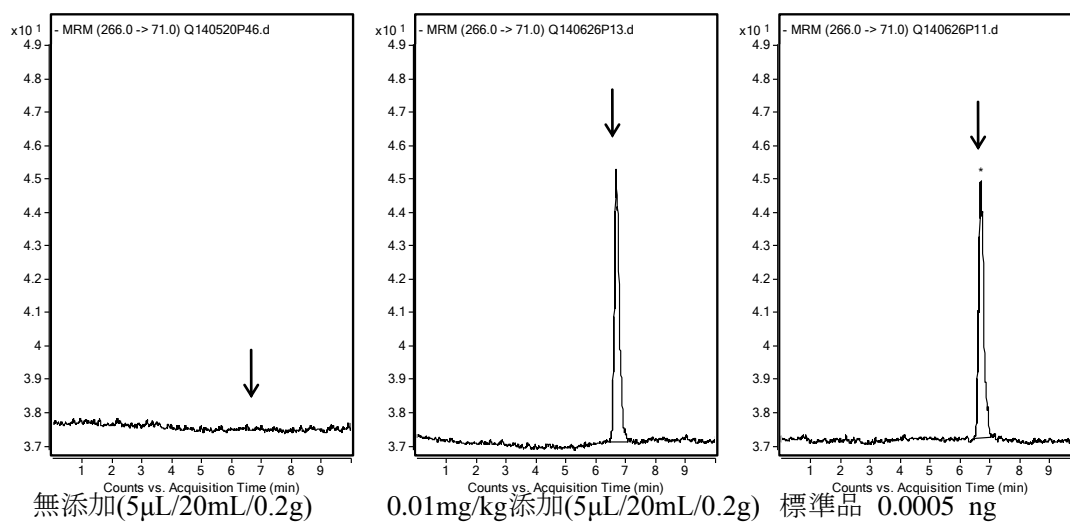


図 3-1-5. キャベツ試料

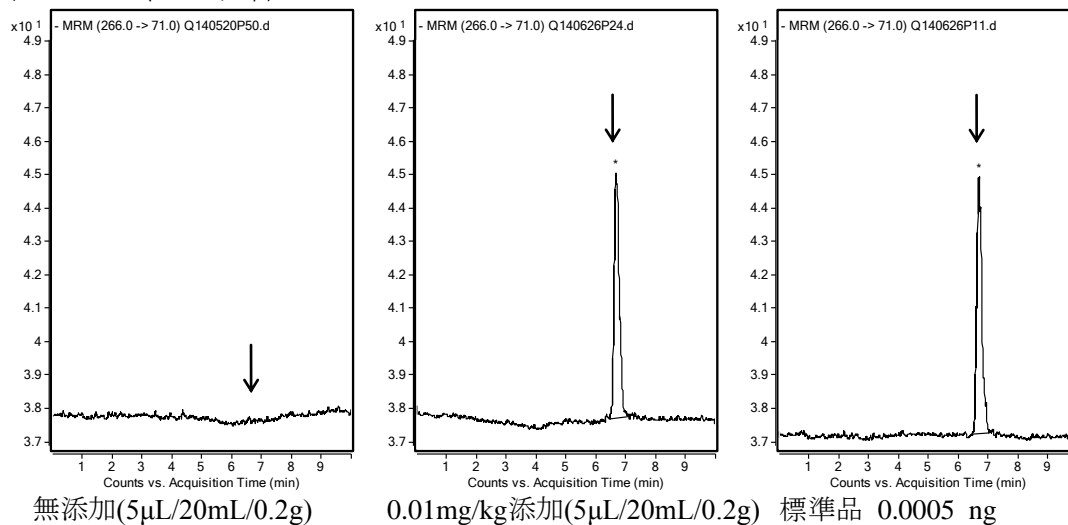


図 3-1-6. トマト試料

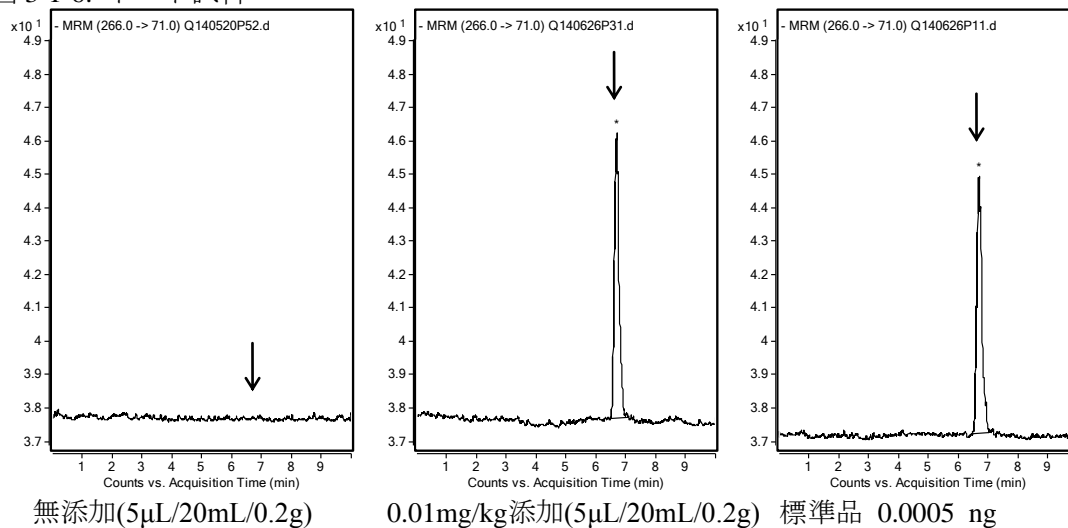


図 3-1-7. ばれいしょ試料

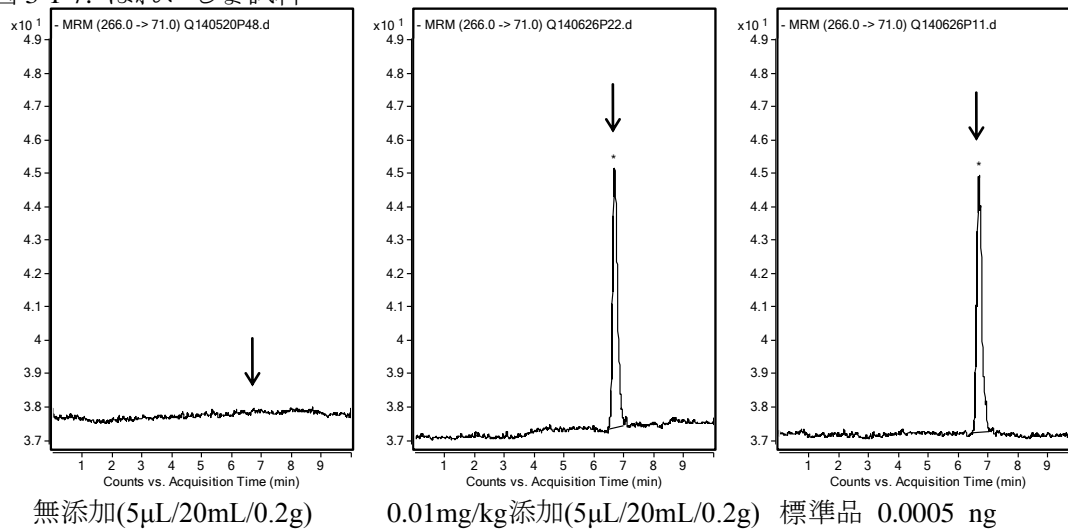
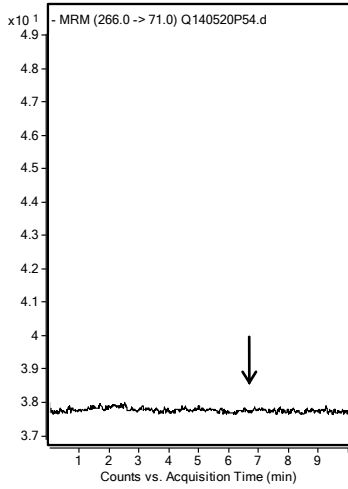
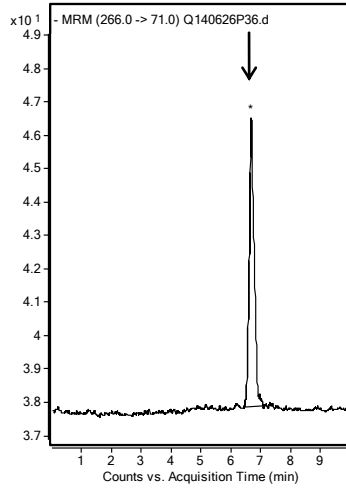


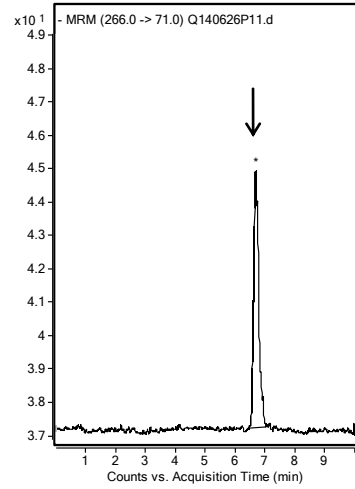
図 3-1-8. りんご試料



無添加(5 μ L/20mL/0.2g)

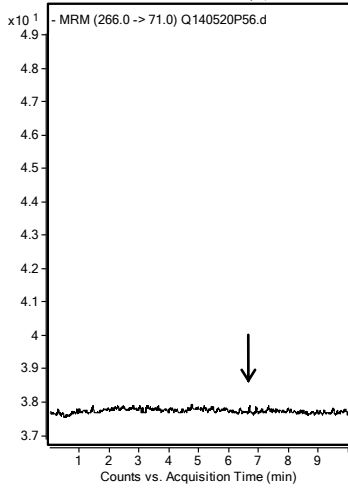


0.01mg/kg添加(5 μ L/20mL/0.2g)

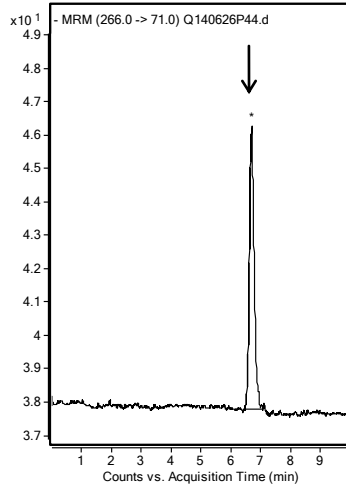


標準品 0.0005 ng

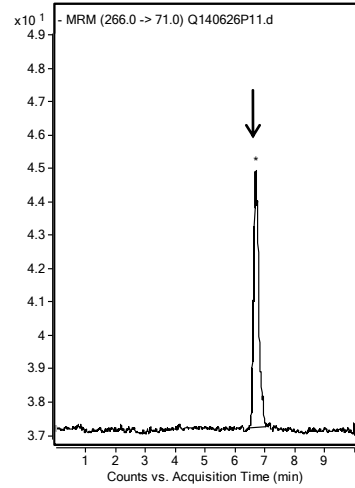
図 3-1-9. オレンジ試料



無添加(5 μ L/20mL/0.2g)

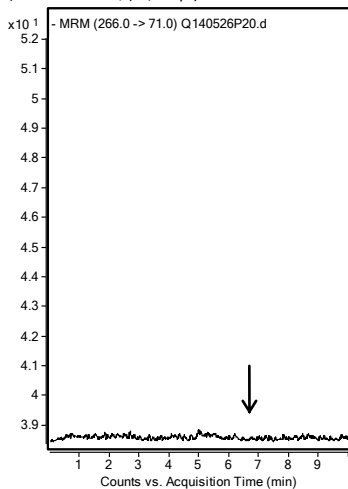


0.01mg/kg添加(5 μ L/20mL/0.2g)

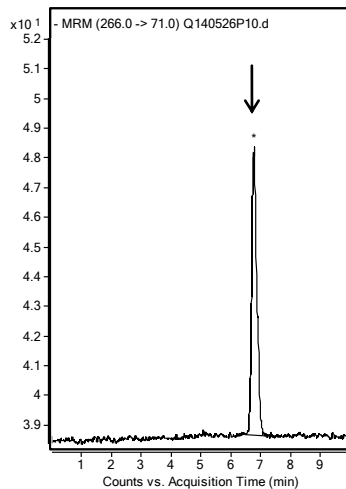


標準品 0.0005 ng

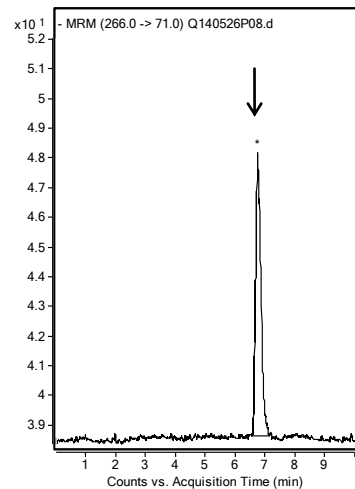
図 3-1-10. 茶試料



無添加(5 μ L/20mL/0.2g)



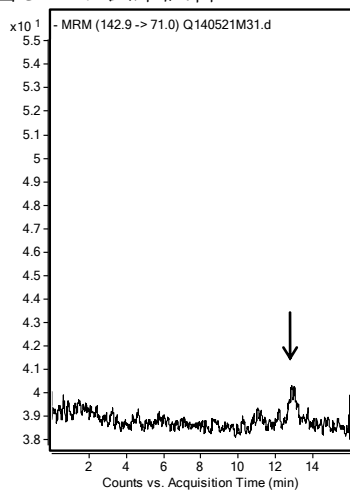
0.01mg/kg添加(5 μ L/20mL/0.2g)



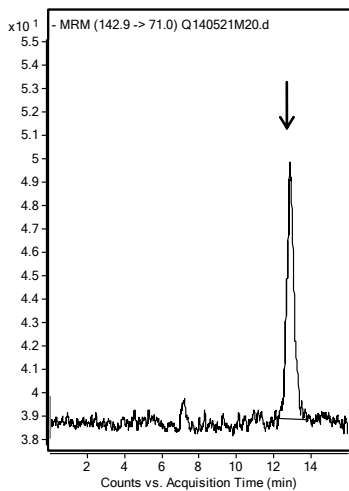
標準品 0.0005 ng

図 3-2. カルボン酸体

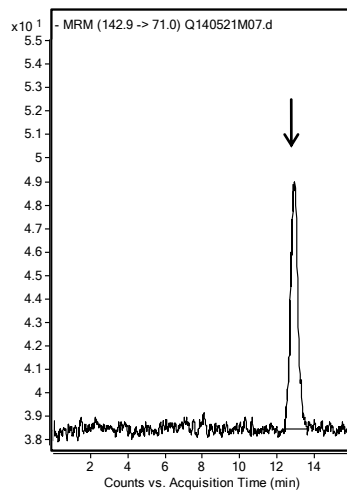
図 3-2-1. 玄米試料



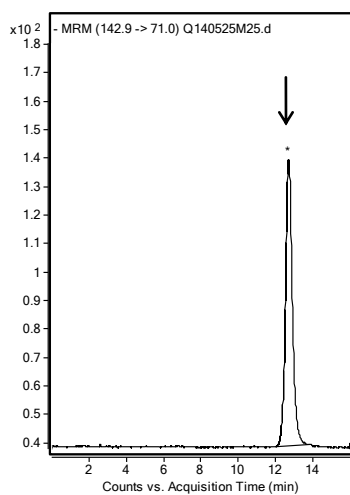
無添加
(5 μ L/20mL/0.2g)



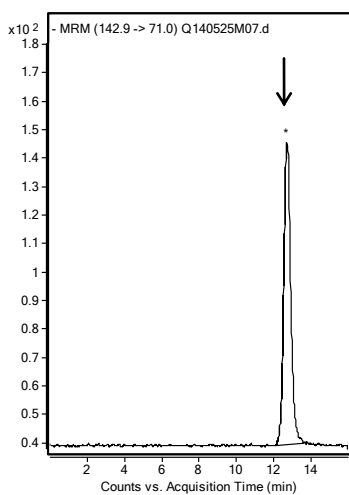
0.01 mg/kg 添加
(チアジニルとして 0.02 mg/kg)
(5 μ L/20mL/0.2g)



標準品 0.0005 ng



1 mg/kg 添加
(チアジニルとして 1.672 mg/kg)
(5 μ L/200mL/0.2g)



標準品 0.005 ng

図 3-2-2. だいず試料

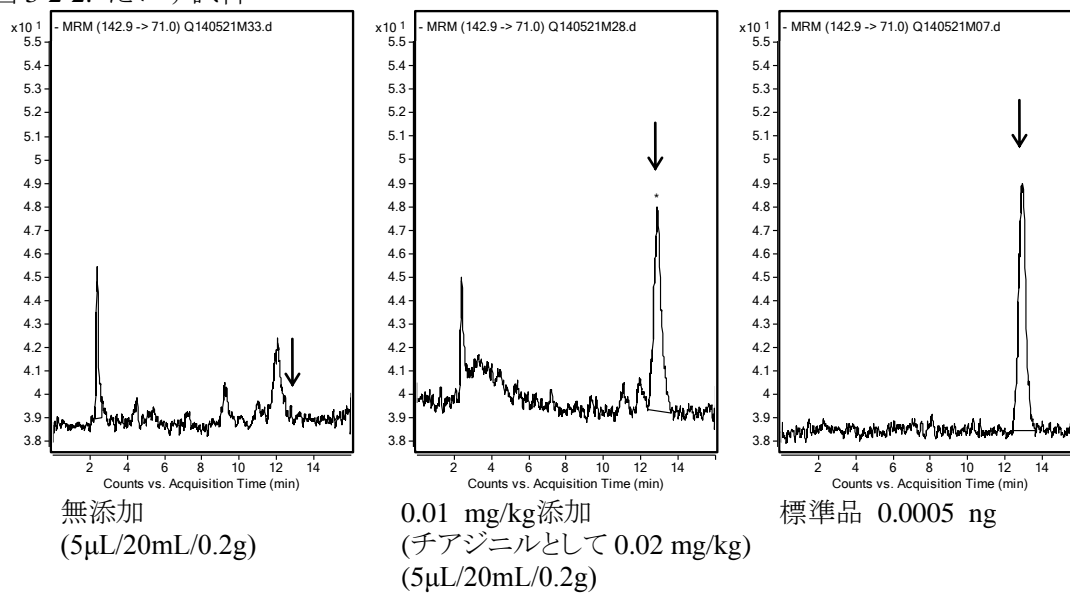


図 3-2-3. ごま試料

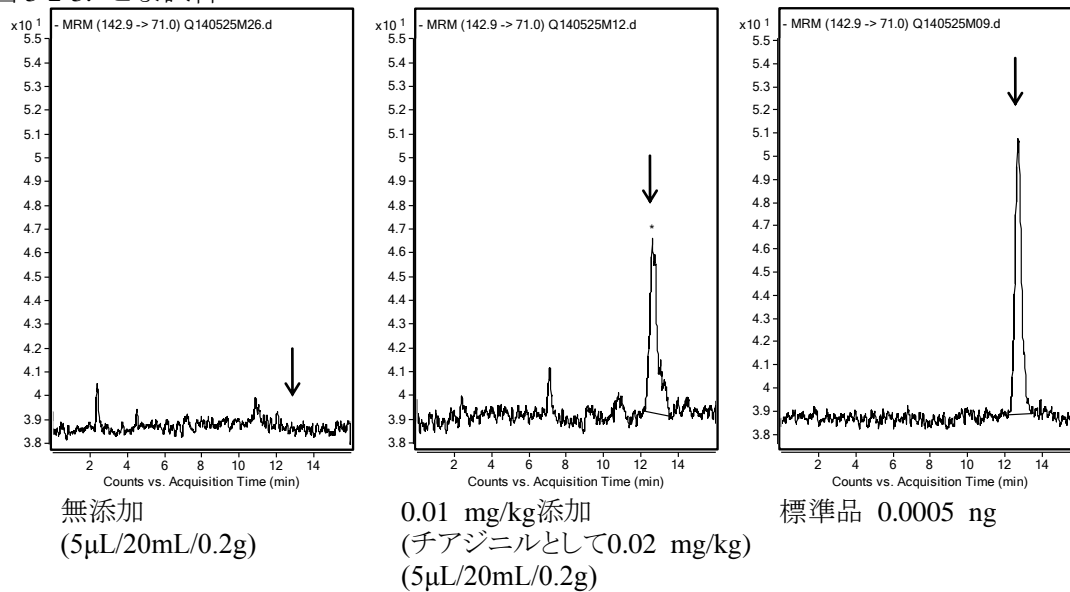


図 3-2-4. ほうれんそう試料

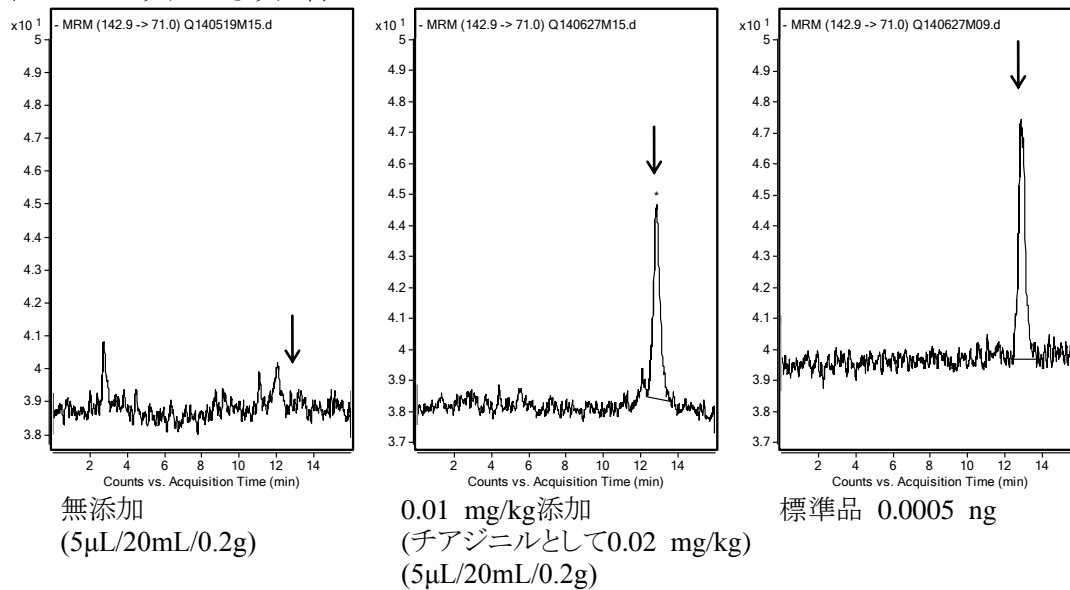


図 3-2-5. キャベツ試料

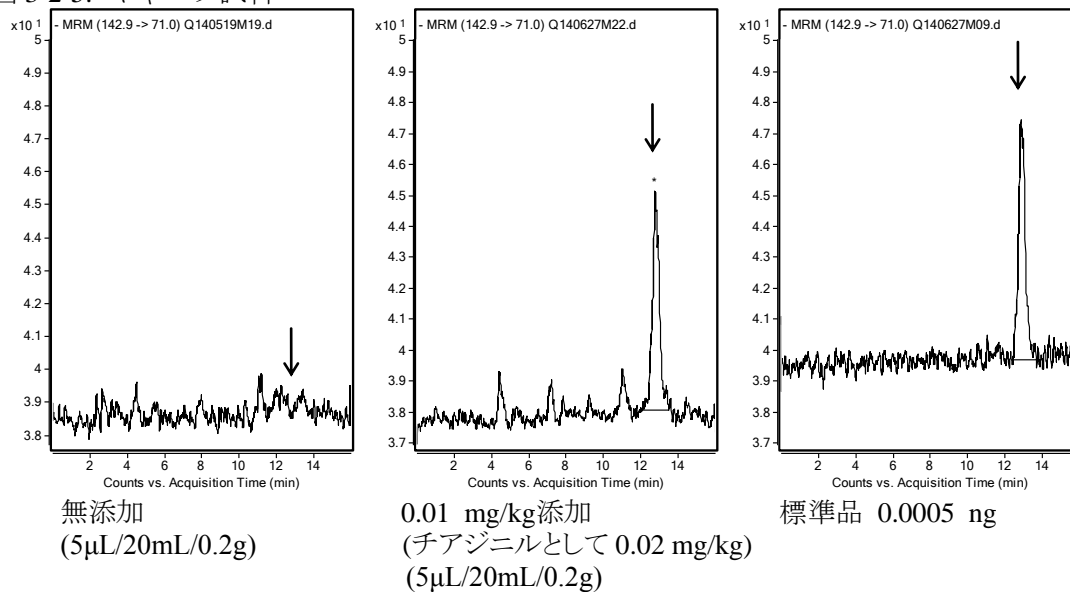


図 3-2-6. トマト試料

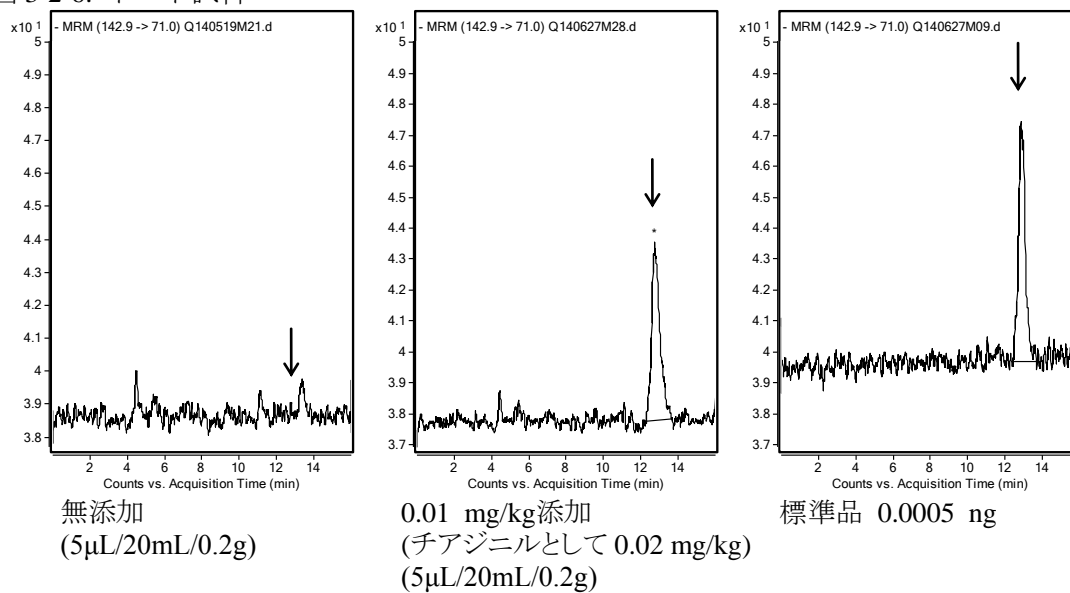


図 3-2-7. ばれいしょ試料

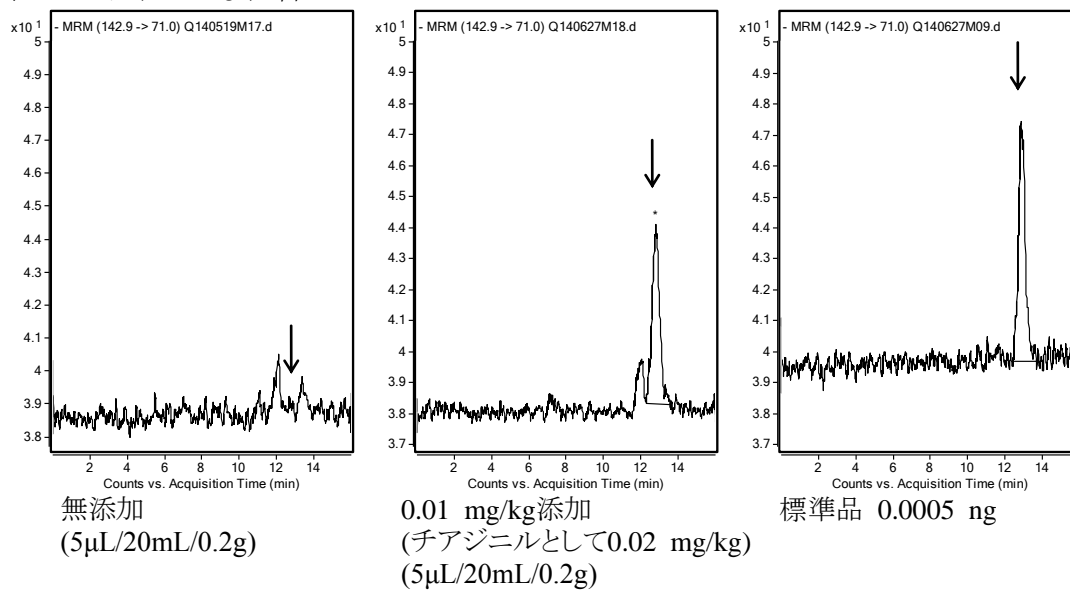


図 3-2-8. りんご試料

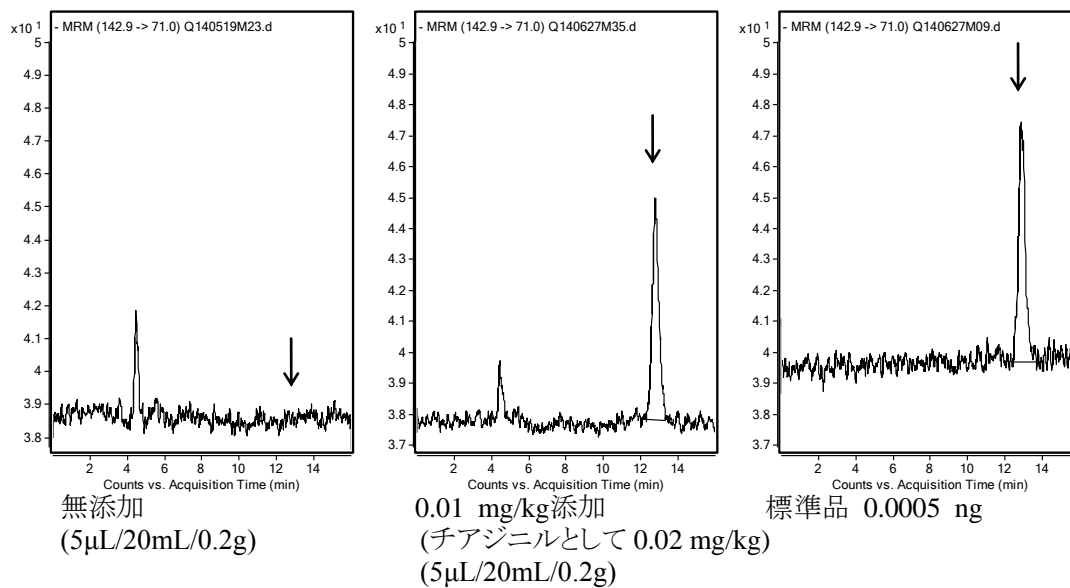


図 3-2-9. オレンジ試料

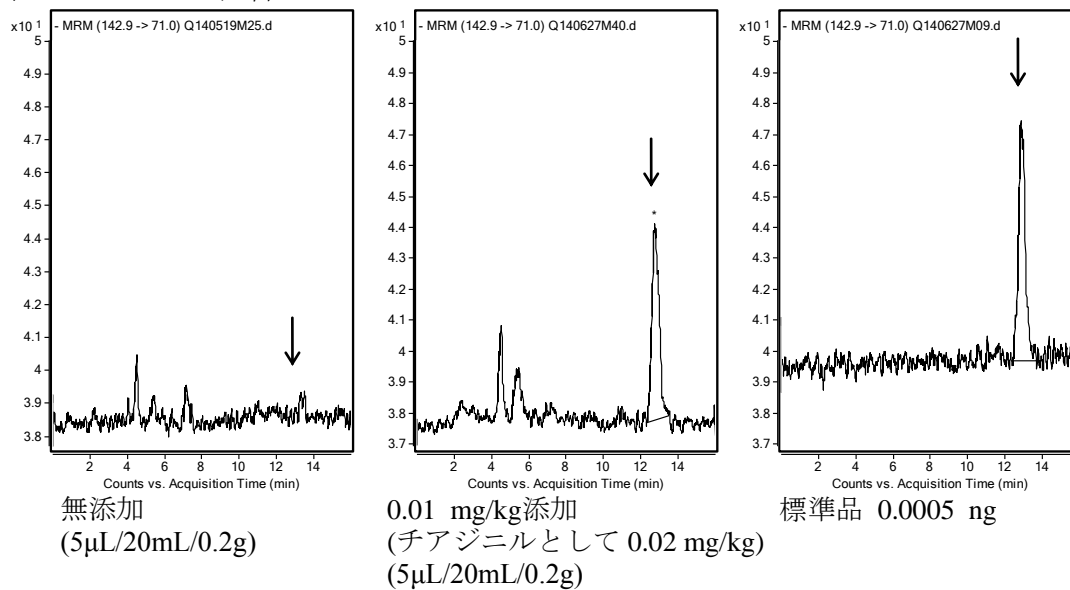
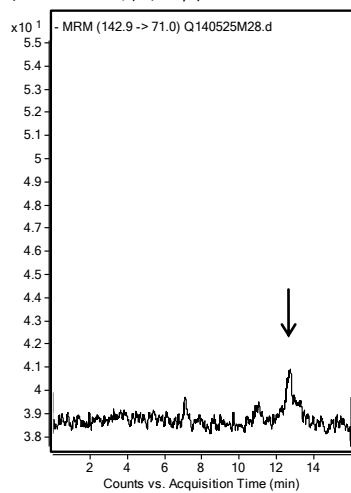
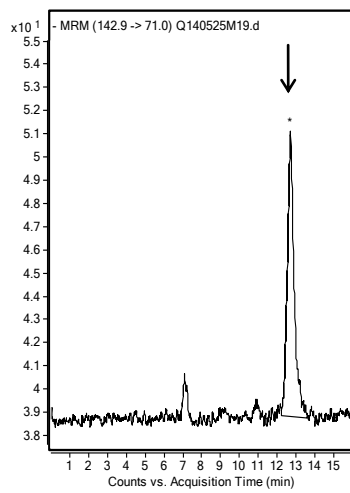


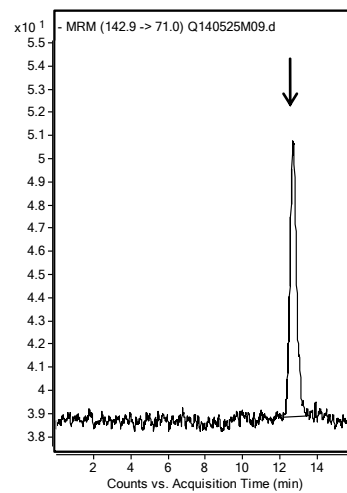
図 3-2-10. 茶試料



無添加
($5\mu\text{L}/20\text{mL}/0.2\text{g}$)



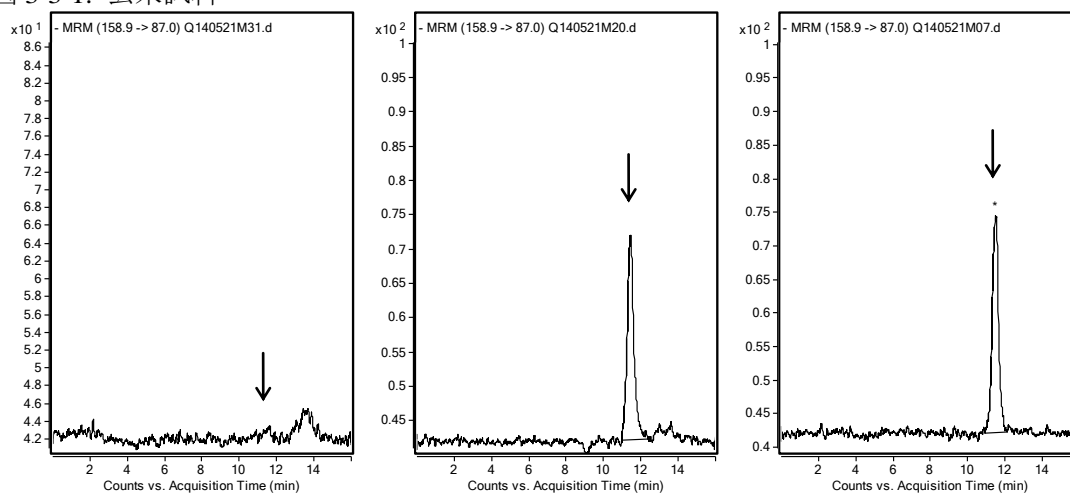
0.01 mg/kg 添加
(チアジニルとして 0.02 mg/kg)
($5\mu\text{L}/20\text{mL}/0.2\text{g}$)



標準品 0.0005 ng

図 3-3. ヒドロキシメチルカルボン酸体

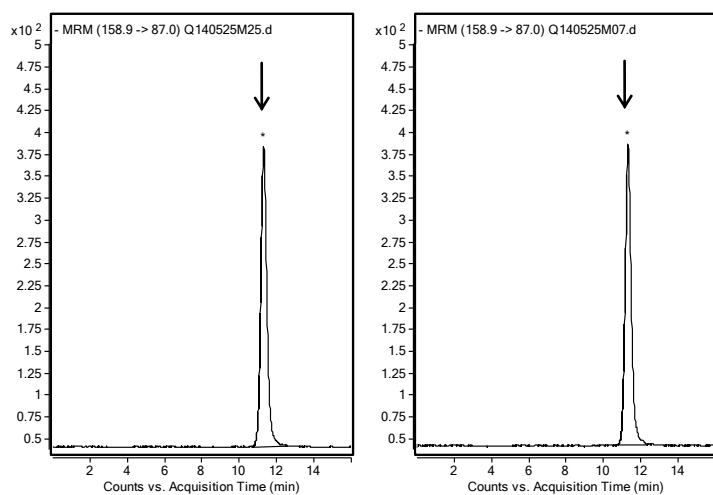
図 3-3-1. 玄米試料



無添加
(5 μ L/20mL/0.2g)

0.01 mg/kg添加
(チアジニルとして0.02 mg/kg)
(5 μ L/20mL/0.2g)

標準品 0.0005 ng



1 mg/kg添加
(チアジニルとして1.67 mg/kg)
(5 μ L/200mL/0.2g)

標準品 0.005 ng

図 3-3-2. だいず試料

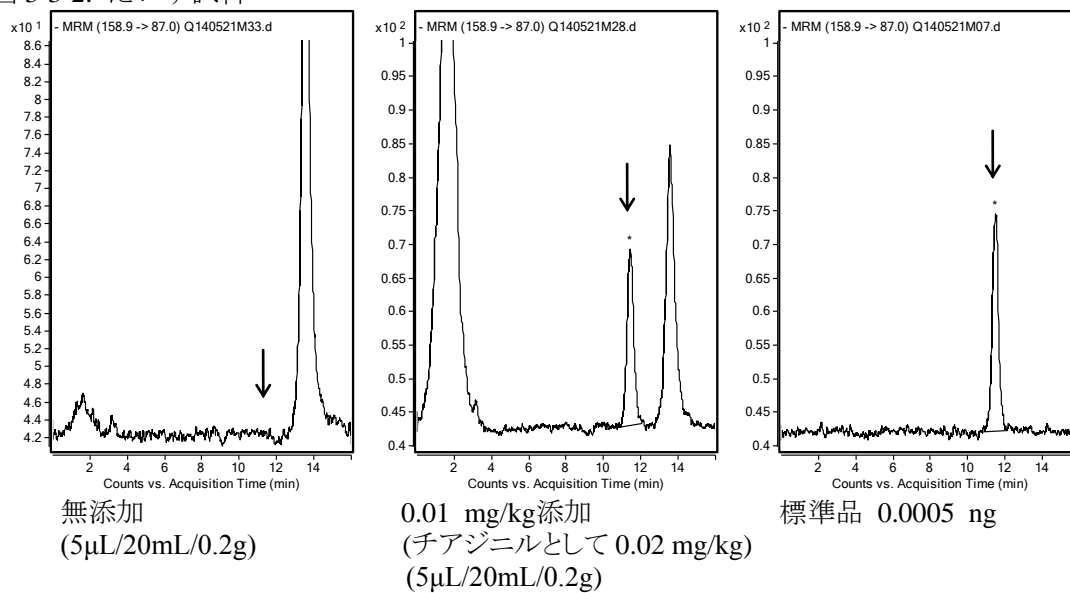


図 3-3-3. ごま試料

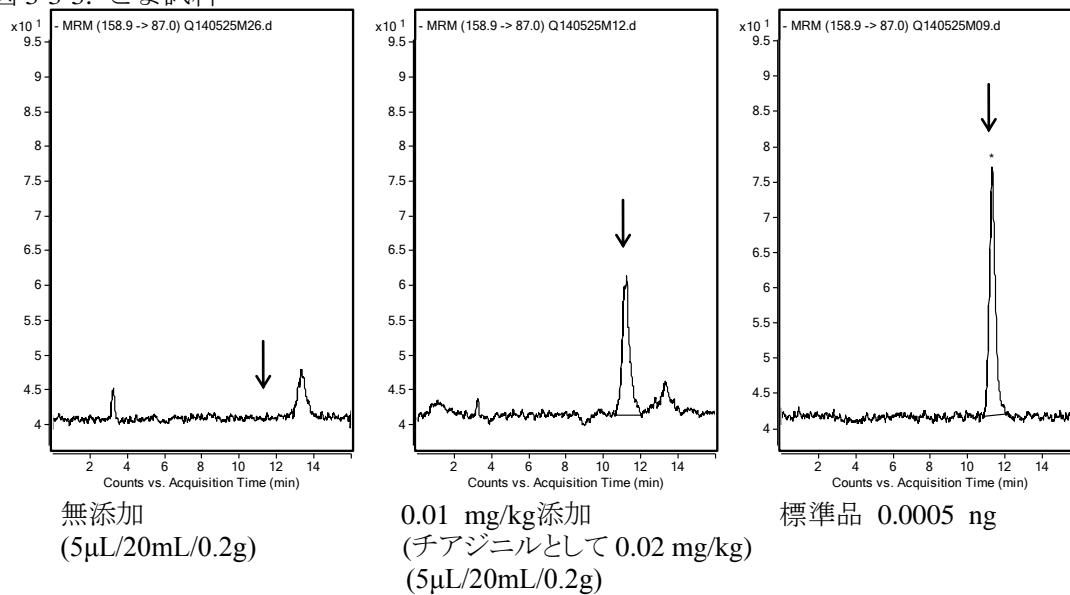
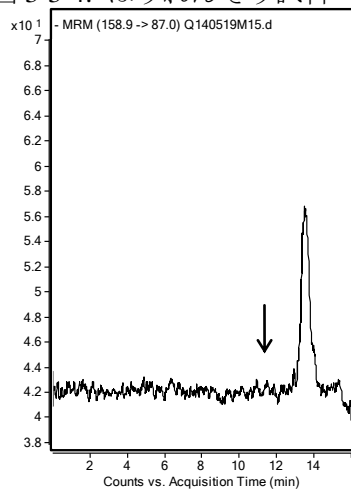
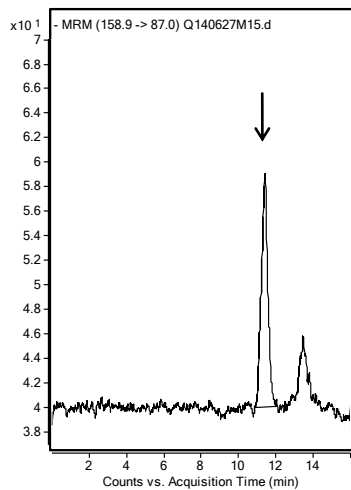


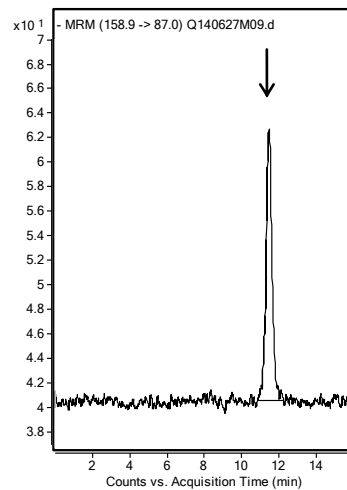
図 3-3-4. ほうれんそう試料



無添加
(5 μ L/20mL/0.2g)

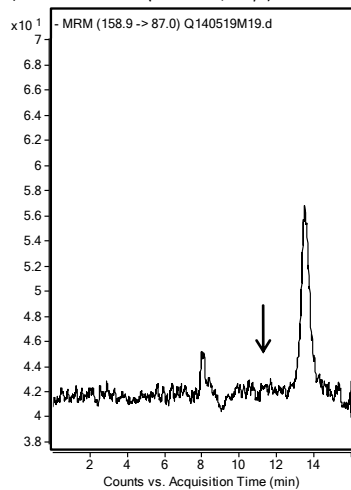


0.01 mg/kg添加
(チアジニルとして0.02 mg/kg)
(5 μ L/20mL/0.2g)

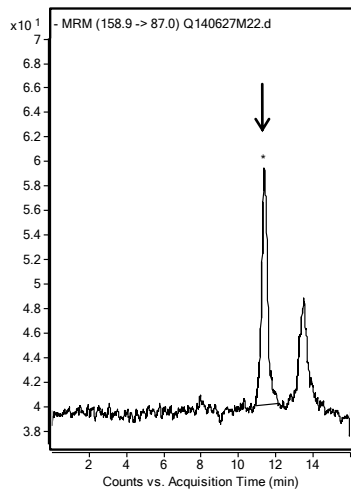


標準品 0.0005 ng

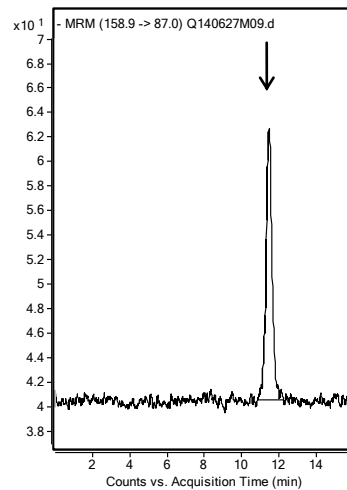
図 3-3-5. キャベツ試料



無添加
(5 μ L/20mL/0.2g)



0.01 mg/kg添加
(チアジニルとして0.02 mg/kg)
(5 μ L/20mL/0.2g)



標準品 0.0005 ng

図 3-3-6. トマト試料

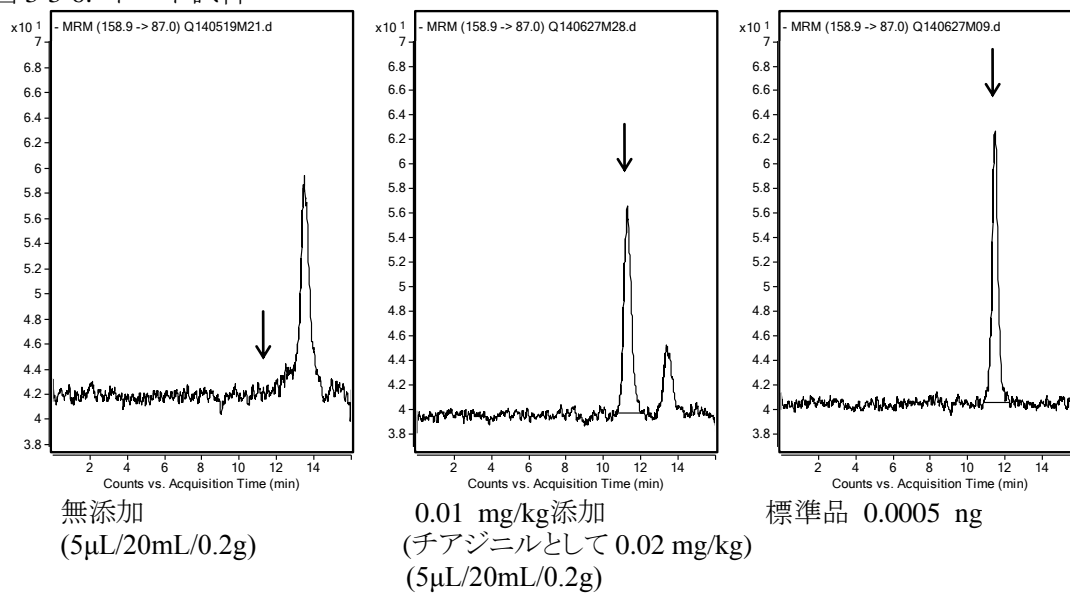


図 3-3-7. ばれいしょ試料

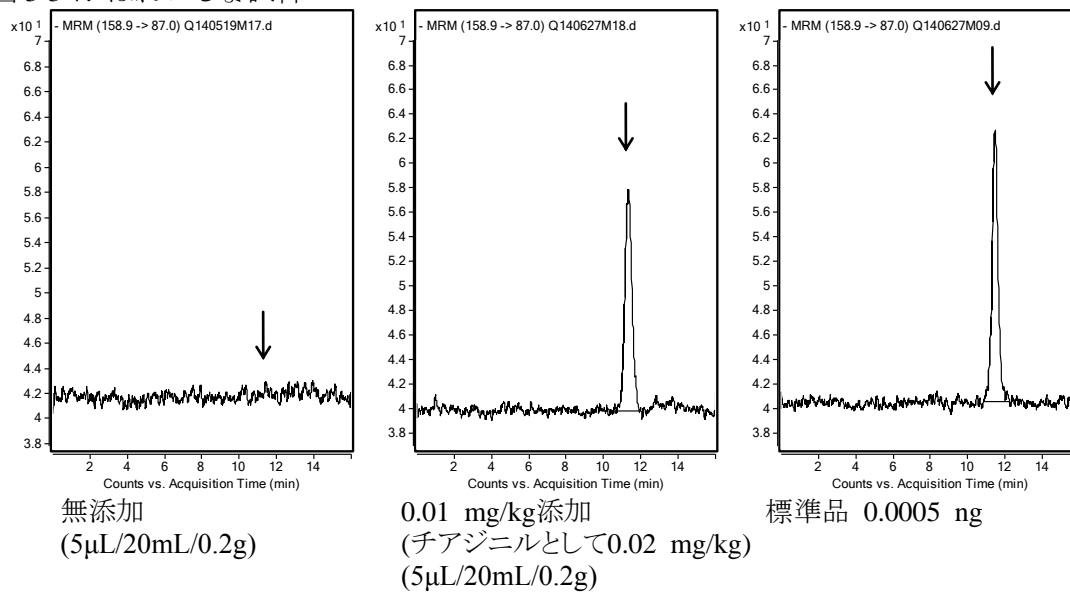
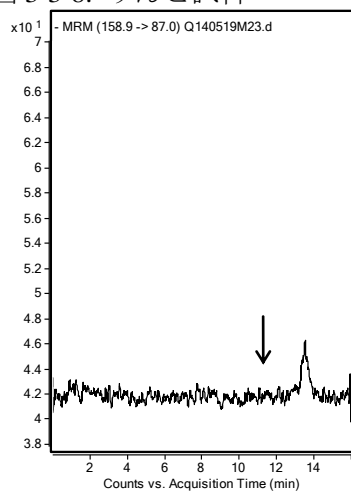
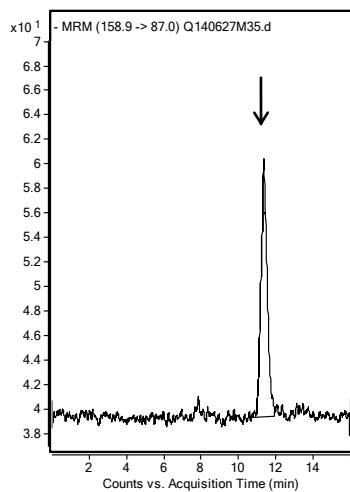


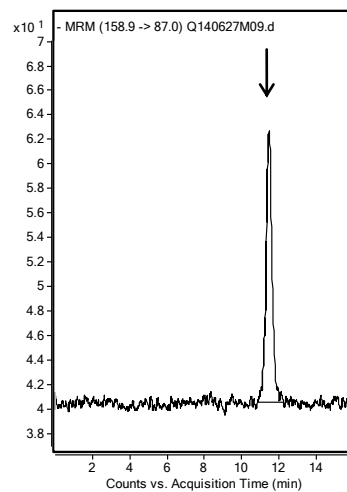
図 3-3-8. りんご試料



無添加
(5 μ L/20mL/0.2g)

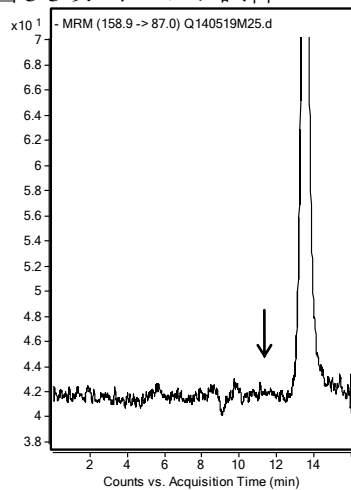


0.01 mg/kg添加
(チアジニルとして 0.02 mg/kg)
(5 μ L/20mL/0.2g)

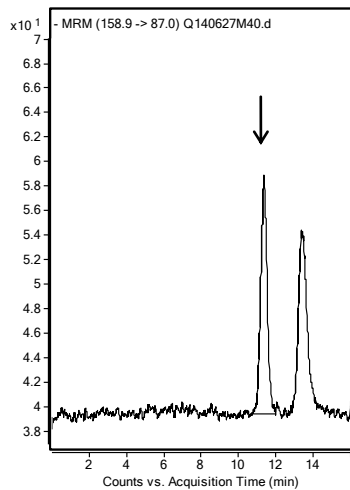


標準品 0.0005 ng

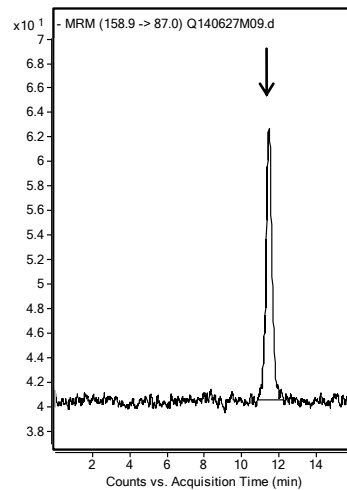
図 3-3-9. オレンジ試料



無添加
(5 μ L/20mL/0.2g)

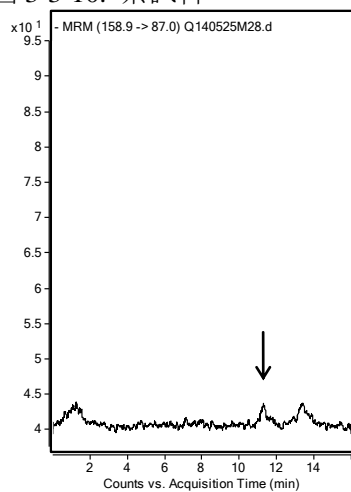


0.01 mg/kg添加
(チアジニルとして 0.02 mg/kg)
(5 μ L/20mL/0.2g)

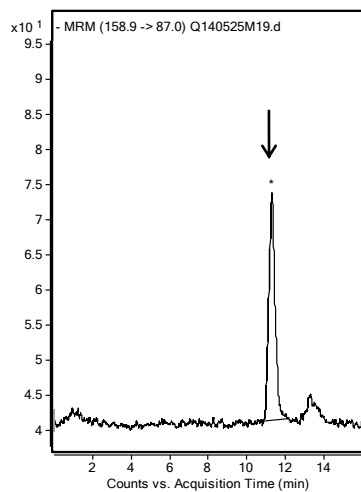


標準品 0.0005 ng

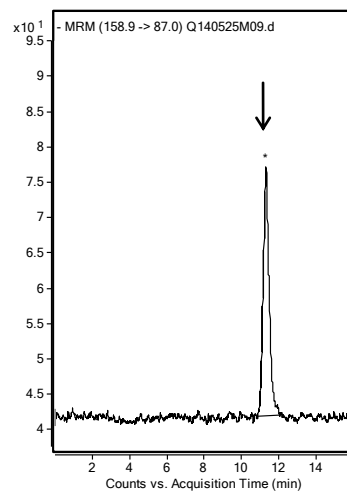
図 3-3-10. 茶試料



無添加
(5 μ L/20mL/0.2g)



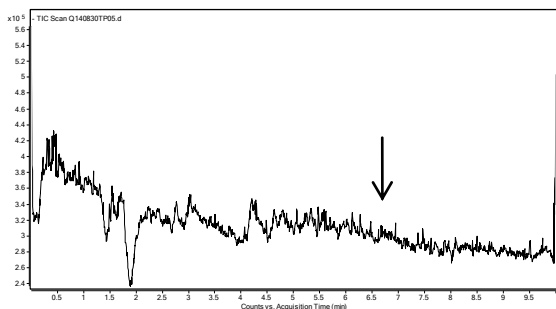
0.01 mg/kg添加
(チアジニルとして0.02 mg/kg)
(5 μ L/20mL/0.2g)



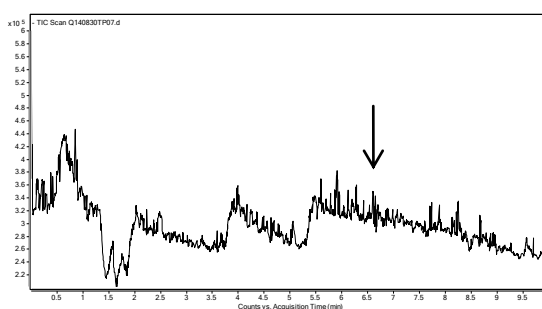
標準品0.0005 ng

図 4. 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

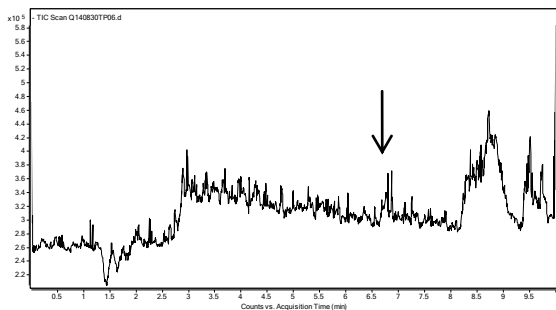
図 4-1. チアジニルの測定条件 (スキャン範囲 : m/z 40~550)



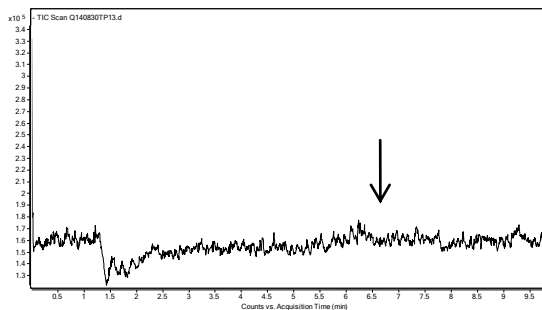
玄米



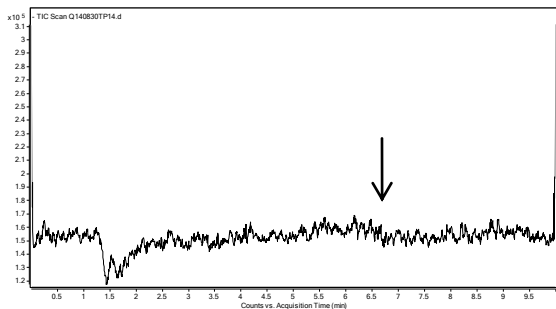
大豆



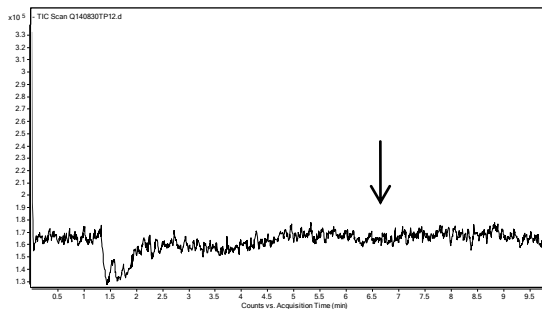
ごま



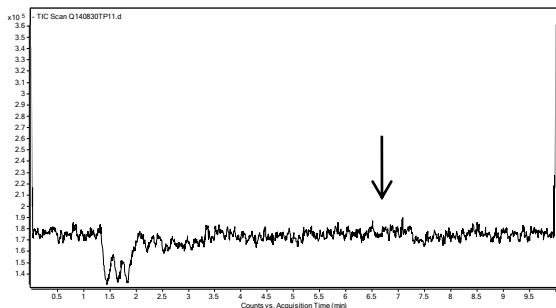
ぼうれんそう



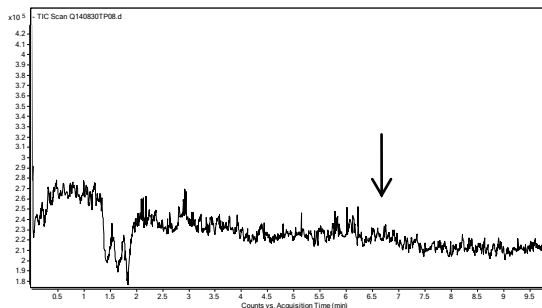
キャベツ



トマト



ばれいしょ



りんご

図 4-1. チアジニルの測定条件 (続き)

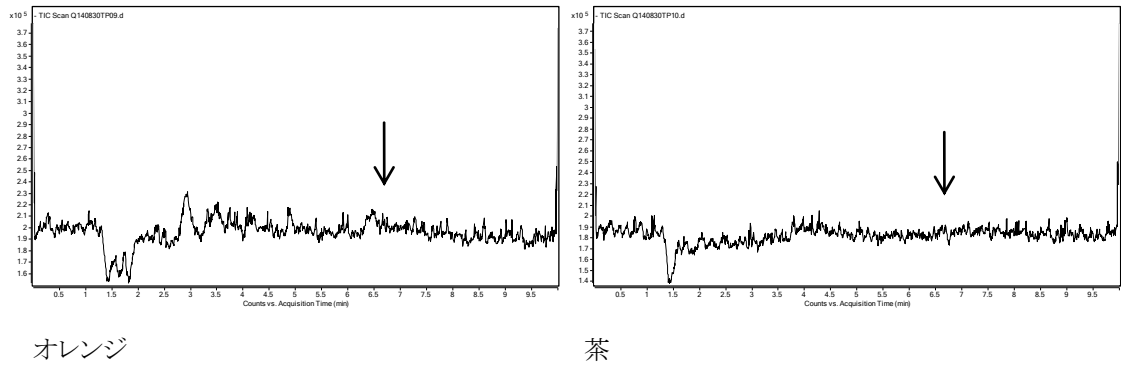


図 4-2. カルボン酸体及びヒドロキシメチルカルボン酸体の測定条件 (スキャン範囲: m/z 40 ~ 350)

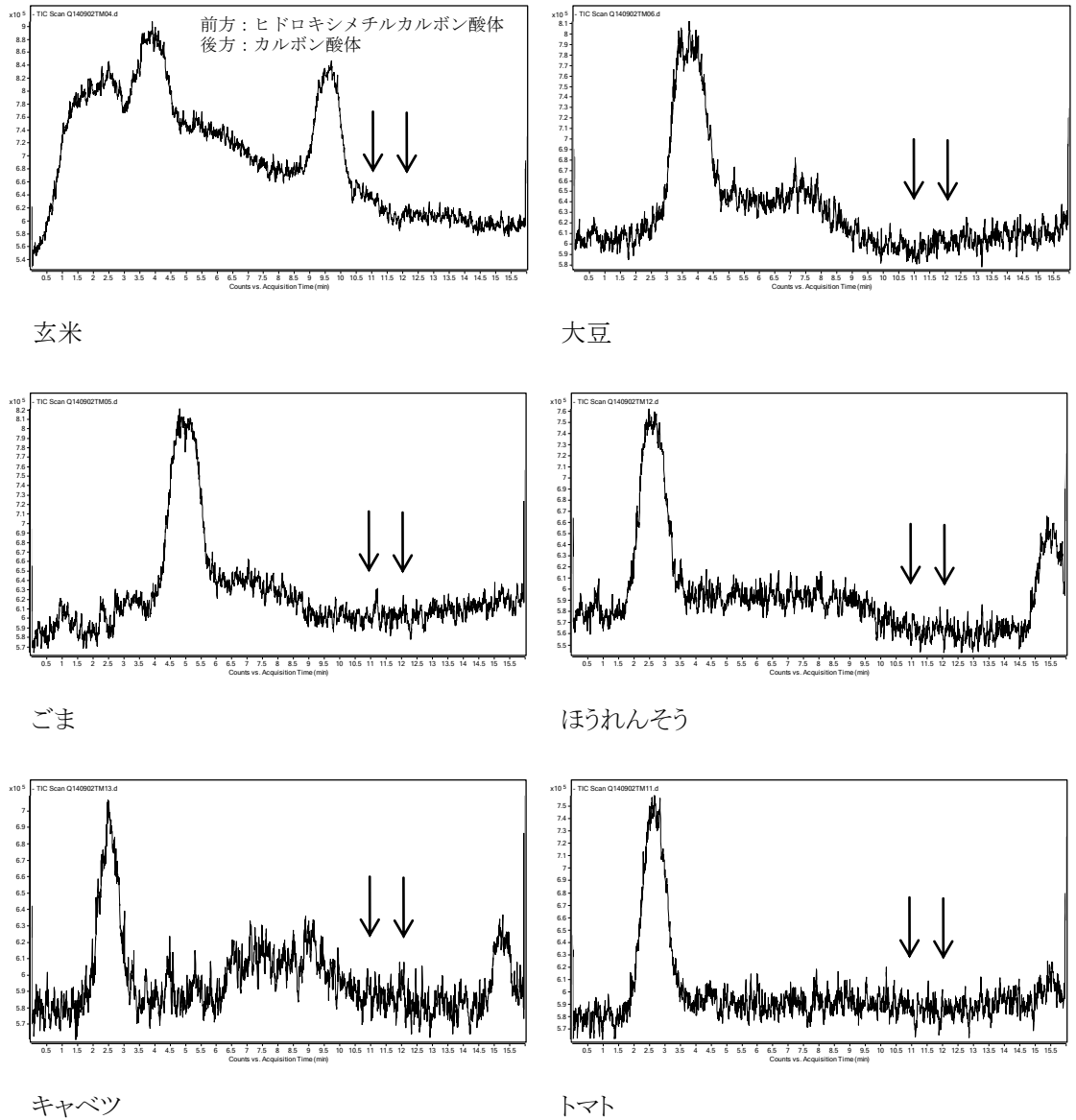
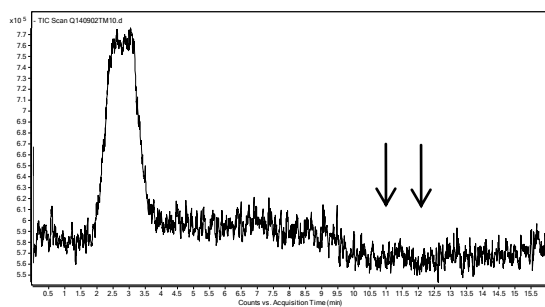
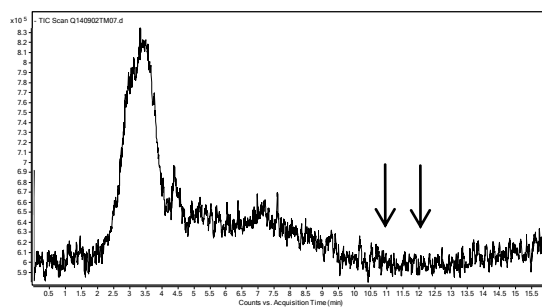


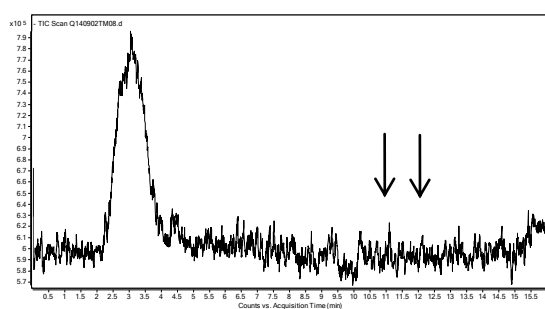
図 4-2. カルボン酸体及びヒドロキシメチルカルボン酸体の測定条件 (続き)



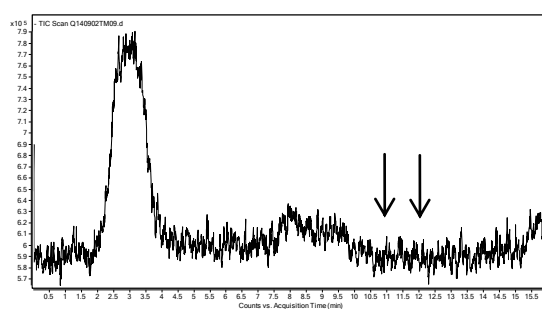
ばれいしょ



りんご



オレンジ



茶