

※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 25 年度

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

ジニコナゾール試験法（農産物、畜水産物）

ジニコナゾール試験法（農産物、畜水産物）の検討結果

[緒言]

1. 目的

ジニコナゾールの農産物及び畜水産物中の分析法の開発を行った。

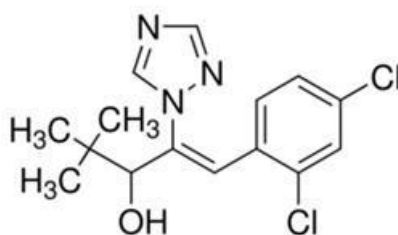
ジニコナゾールはトリアゾール系の、農作物に対する殺菌剤である。主として菌類の成長段階に作用するステロイド脱メチル化阻害剤で、寄主植物の内部あるいは表面上の菌糸生長の阻害により作用すると考えられている。うどん粉病、黒星病、褐さび病、斑点病および雲形病のような広範囲の疾病を抑制するのに有効である。¹⁾ また、農産物だけではなく、それらを介して畜水産物中から検出される可能性も考えられる。

本検討においては、通知個別試験法 [カフェンストロール、ジフェノコナゾール、シプロコナゾール、シメトリン、チフルザミド、テトラコナゾール、テブコナゾール、トリアジメノール、フルジオキシニル、プロピコナゾール、ヘキサコナゾール及びペンコナゾール試験法（農産物）] 及び通知一斉試験法 [GC/MS による農薬等の一斉試験法（畜水産物）] の適用も試みたが、良好な結果が得られなかったことから、新たに個別試験法を開発した。

2. 分析対象化合物の構造式及び物理化学的性質²⁾

分析対象化合物：ジニコナゾール

構造式：



分子式：C₁₅H₁₇Cl₂N₃O

分子量：326.2

化学名：Diniconazole

IUPAC 名：(E)-(RS)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4,4-dimethyl-2-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)pent-1-en-3-ol

CAS 名：(E)-(±)-β-[(2,4-dichlorophenyl)methylene]-α-(1,1-dimethylethyl)-1H-1,2,4-triazol-1-ethanol

外観：無色透明結晶

融点：134-156°C

蒸気圧：2.93mPa (20°C)、4.9 mPa (25°C)

溶解性 (25°C)：水 4.01 mg/L、アセトン 95 g/kg、メタノール 95 g/kg、キシレン 14 g/kg、ヘキサン 0.7 g/kg

1-オクタノール/水分分配係数 (log P_{ow})：4.3 (25°C)

安定性：熱、光、水に安定

その他の情報：3位にキラル中心を有する光学異性体である。本検討においてはラセミ体で測定を行っ

ている。

S 体に比べ R 体の抗菌活性が強く³⁾、欧州では R 体を主成分としたジニコナゾール-M が製剤への混合を認可されていたが、2009 年までに認可が取り消されている。

出典：1) Hany H. Monir *et al.*, *YAKUGAKU ZASSHI*, **127**(6), 993-999 (2007).

2) C D S Tomlin, *The Pesticide Manual Fourteenth Edition* (BRITISH CROP PROTECTION COUNCIL, 2006).

3) 環境保全型農業技術 農林水産研究文献解題 No.21、農林水産技術会議事務局編

3. 基準値

なし。一律基準適用。

[実験方法]

1. 試料

うなぎは、千葉県内の養殖業者から購入した。その他の試料は、神奈川県内の小売店で購入した。また、試料の調製方法を以下に記載した。

(1) 玄米、大豆、緑茶

試料を粉砕機 (150 mL) を用いて 425 μm の標準網ふるいを通るように粉砕し均一化した。

(2) ほうれんそう、キャベツ、ばれいしょ、オレンジ、りんご

試料を細切したのち粉砕機 (2 L) を用いて粉砕し均一化した。

(3) 牛の筋肉

可能な限り脂肪層を除き、細切りしたのちフードプロセッサーを用いて粉砕し均一化した。

(4) 牛の脂肪

可能な限り筋肉層を除き、細切りしたのちフードプロセッサーを用いて粉砕し均一化した。

(5) 牛の肝臓

試料を細切したのちフードプロセッサーを用いて粉砕し均一化した。

(6) 牛乳

よく混合して均一化した。

(7) はちみつ

40°C以下で加温して溶かしてから単花蜜 3 種 (アンジェリカ、メリーロート、リンデン) を混合し攪拌して均一化した。

(8) うなぎ

頭を除去し、細切したのちフードプロセッサーを用いて粉砕し均一化した。

(9) しじみ

殻を除去し、フードプロセッサーを用いて粉砕し均一化した。

(10) 鶏卵

殻を除去し、卵白と卵黄を合わせて粉砕機 (2 L) を用いて均一化した。

2. 試薬・試液

ジニコナゾール標準品：純度 99.8%、融点 134-156°C (Sigma-Aldrich 社製)

アセトン：残留農薬試験用 (和光純薬工業(株)製)

アセトニトリル、*n*-ヘキサン：残留農薬試験用 (関東化学(株)製)

アセトニトリル：LC/MS 用 (関東化学(株)製)

ギ酸：LC/MS 用 (和光純薬工業(株)製)

ケイソウ土：ハイフロスーパーセル (和光純薬工業(株)製)

フロリジルミニカラム：Inert Sep FL-PR (1 g/6 mL) (ジーエルサイエンス(株)製)

グラファイトカーボンミニカラム：Inert Sep GC (500 mg/6 mL) (ジーエルサイエンス(株)製)

標準原液：ジニコナゾール標準品 10 mg を精秤し、アセトニトリルで 10 mL に溶解して 1000 mg/L 溶液を調製した。

検量線用標準溶液：標準原液をアセトニトリル/水 (1:1) で適宜希釈し、0.00125~0.0075 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 溶液を調製した。

3. 装置

ホモジナイザー：マルチディスパーサー PB-95 (シャフト：HG-2) (SMT COMPANY 社製)

粉碎機 (150 mL)：X TREME MX1100XTBUJ (WARING 社製)

粉碎機 (2 L)：X TREME MX1100XTBUJ (WARING 社製)

フードプロセッサ：MK-K58 (National 社製)

濃縮装置：有機溶媒回収装置 V-703 (BUCHI 社製)

遠心分離器：ユニバーサル冷却遠心機 5930 (久保田商事(株)製)

LC-MS/MS

装置	型式	会社
MS	API4000	AB SCIEX
LC	Prominence	SHIMADZU
データ処理	Analyst Software	AB SCIEX

4. 測定条件

LC-MS/MS

LC 条件																					
カラム	Inertsil ODS-3 (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm : ジーエルサイエンス(株)製)																				
移動相流速 (mL/min)	0.20																				
注入量 (μL)	10																				
カラム温度 (°C)	40																				
移動相	A 液 : 0.1vol% ギ酸溶液 B 液 : アセトニトリル																				
グラジエント条件	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間 (分)</th> <th>A 液 (%)</th> <th>B 液 (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.0</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>10.0</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>20.0</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>20.1</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>30.0</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> </tbody> </table>			時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)	0.0	90	10	10.0	10	90	20.0	10	90	20.1	90	10	30.0	90	10
時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)																			
0.0	90	10																			
10.0	10	90																			
20.0	10	90																			
20.1	90	10																			
30.0	90	10																			
MS 条件																					
測定モード	MS/MS																				
イオン化モード	ESI (+)																				
キャピラリ電圧 (V)	4500																				
脱溶媒温度 (°C)	520																				
コーンガス	窒素、30 psi																				
脱溶媒ガス	窒素、20 psi																				
コリジョンガス	窒素、8																				
定量イオン (m/z)	+326.2→70.1 [CV 71 (V)、コリジョンエネルギー57 (eV)、CXP 6 (V)]																				
定性イオン (m/z)	+326.2→159.0 [CV 71 (V)、コリジョンエネルギー49 (eV)、CXP 10 (V)]																				
保持時間 (min)	12.3																				

5. 定量

ジニコナゾール標準原液をアセトニトリル/水 (1:1) で希釈して 0.00125、0.0025、0.00375、0.005、0.00625 及び 0.0075 mg/L の標準溶液を調製した。この溶液 10 μL を LC-MS/MS に注入して、得られたピーク面積を用いて絶対検量線法により検量線を作成した。同様に試験溶液 10 μL を LC-MS/MS に注入し、得られたピーク面積を用いて、作成した検量線から試料中のジニコナゾールの含量を算出

した。

6. 添加試料の調製

(1) 農産物

ほうれんそう、キャベツ、ばれいしょ、オレンジ及びりんご（添加濃度：0.01 ppm）：試料 20.0 g に添加用標準溶液 2 mL を添加しよく混合した後、30 分間放置した。

玄米、大豆（添加濃度：0.01 ppm）：試料 10.0 g に添加用標準溶液 1 mL を添加しよく混合した後、30 分間放置した。

緑茶（添加濃度：0.01 ppm）：試料 5.00 g に添加用標準溶液 0.5 mL を添加しよく混合した後、30 分間放置した。

(2) 畜水産物

牛の筋肉、牛の肝臓、鶏卵、牛乳、はちみつ、うなぎ及びしじみ（添加濃度：0.01 ppm）：試料 20.0 g に添加用標準溶液 2 mL を添加しよく混合した後、30 分間放置した。

牛の脂肪（添加濃度：0.01 ppm）：試料 5.00 g を 40℃以下で加温して溶かし、添加用標準溶液 0.5 mL を添加しよく混合した後、室温で再凝固させてから 30 分間放置した。

7. 試験溶液の調製

1) 農産物

概要

ジニコナゾールを試料からアセトンで抽出し、*n*-ヘキサンに転溶後、玄米及び大豆はアセトニトリル/ヘキサン分配で脱脂した。フロリジルミニカラムで精製し、ほうれんそう及び緑茶についてはグラフアイトカーボンミニカラムで追加精製を行った後、LC-MS/MS で定量及び確認した。

(1) 抽出

a ほうれんそう、キャベツ、ばれいしょ、オレンジ及びりんごの場合

試料 20.0 g を 250 mL 遠心管に採り、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 1 cm の厚さに敷いたろ紙（直径 60 mm、No.5A、桐山製作所製）を用いて吸引ろ過した。ろ紙上の残留物にアセトン 50 mL を加えてホモジナイズし、上記と同様にろ過した。ろ液を合わせ 40℃以下で約 15 mL まで濃縮した。これをあらかじめ 10%塩化ナトリウム溶液 100 mL を入れた 300 mL 分液漏斗に移し、*n*-ヘキサン 100 mL を加えて 5 分間振とうした。*n*-ヘキサン層は 300 mL 三角フラスコに移し、水層は 200 mL 分液漏斗に分取し、*n*-ヘキサン 50 mL を加えて 5 分間振とうした。*n*-ヘキサン層を上記の三角フラスコに合わせ、適量の無水硫酸ナトリウムを加えて脱水した後、無水硫酸ナトリウムをろ別した。ろ液を 40℃以下で濃縮し、溶媒を除去した後、*n*-ヘキサンに溶解し、正確に 10 mL とした。

b 玄米、大豆の場合

試料 10.0 g を 250 mL 遠心管に採り、水 20 mL を加え、30 分間放置した。これにアセトン 100 mL を加えてホモジナイズした後、ケイソウ土を 1 cm の厚さに敷いたろ紙（直径 60 mm、No.5A、桐山製作所製）を用いて吸引ろ過した。ろ紙上の残留物にアセトン 50 mL を加えてホモジナイズし、

上記と同様にろ過した。ろ液を合わせ 40℃以下で約 15 mL まで濃縮した。これをあらかじめ 10% 塩化ナトリウム溶液 100 mL を入れた 300 mL 分液漏斗に移し、*n*-ヘキサン 100 mL を加えて 5 分間振とうした。*n*-ヘキサン層は 300 mL 三角フラスコに移し、水層は 200 mL 分液漏斗に分取し、*n*-ヘキサン 50 mL を加えて 5 分間振とうした。*n*-ヘキサン層を上記の三角フラスコに合わせ、適量の無水硫酸ナトリウムを加えて脱水した後、無水硫酸ナトリウムをろ別した。ろ液を 40℃以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物に *n*-ヘキサン 30 mL を加えて、100 mL 分液漏斗に移した。これに *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL を加えて 5 分間振とうした。アセトニトリル層を 100 mL ナスフラスコに移し、*n*-ヘキサン層に *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL を加え、上記と同様の操作を 2 回繰り返した。アセトニトリル層を上記の 100 mL ナスフラスコに合わせ、40℃以下でアセトニトリルを除去した。この残留物に *n*-ヘキサンを加えて溶解し、正確に 10 mL とした。

c 茶の場合

試料 5.00 g を 250 mL 遠心管に採り、水 20 mL を加え、30 分間放置した。これにアセトン 100 mL を加えてホモジナイズした後、ケイソウ土を 1 cm の厚さに敷いたろ紙（直径 60 mm、No.5A、桐山製作所製）を用いて吸引ろ過した。ろ紙上の残留物にアセトン 50 mL を加えてホモジナイズし、上記と同様にろ過した。ろ液を合わせ 40℃以下で約 15 mL まで濃縮した。これをあらかじめ 10% 塩化ナトリウム溶液 100 mL を入れた 300 mL 分液漏斗に移し、*n*-ヘキサン 100 mL を加えて 5 分間振とうした。*n*-ヘキサン層は 300 mL 三角フラスコに移し、水層は 200 mL 分液漏斗に分取し、*n*-ヘキサン 50 mL を加えて 5 分間振とうした。*n*-ヘキサン層を上記の三角フラスコに合わせ、適量の無水硫酸ナトリウムを加えて脱水した後、無水硫酸ナトリウムをろ別した。ろ液を 40℃以下で濃縮し、溶媒を除去した後、*n*-ヘキサンに溶解し、正確に 10 mL とした。

(2) 精製

a 玄米、大豆、キャベツ、ばれいしょ、オレンジ及びりんごの場合

フロリジルミニカラム [Inert Sep FL-PR (1 g/6 mL)] に *n*-ヘキサン 20 mL を注入し、流出液は捨てた。このカラムに、(1) で得られた溶液を 1 mL 注入した後、*n*-ヘキサン 20 mL を注入し、流出液を捨てた。ここにアセトン/*n*-ヘキサン (4 : 6) 10 mL を注入し、溶出液を 40℃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/水 (1 : 1) に溶解し、キャベツ、ばれいしょ、オレンジ及びりんごの場合は正確に 4 mL、玄米及び大豆の場合は正確に 2 mL としたものを試験溶液とした。

b ほうれんそう及び茶の場合

フロリジルミニカラム [Inert Sep FL-PR (1 g/6 mL)] に *n*-ヘキサン 20 mL を注入し、流出液は捨てた。グラファイトカーボンミニカラム [Inert Sep GC (500 mg/6 mL)] にアセトン/*n*-ヘキサン (4 : 6) 20 mL を注入し流出液を捨てた。フロリジルミニカラムに (1) で得られた溶液を 1 mL 分取し注入した後、*n*-ヘキサン 20 mL を注入し、流出液を捨てた。このカラムの下部に、グラファイトカーボンミニカラムを接続し、アセトン/*n*-ヘキサン (4 : 6) 10 mL を注入し、溶出液を採った。上部のフロリジルミニカラムを取り外し、グラファイトカーボンミニカラムにアセトン/*n*-ヘキサン (4 :

6) 10 mL を注入し、溶出液を先の溶出液に合わせ、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/水 (1 : 1) に溶解し、ほうれんそうは正確に 4 mL、緑茶は正確に 1 mL としたものを試験溶液とした。

2) 畜水産物

概要

ジニコナゾールを試料からアセトン/*n*-ヘキサン (1 : 2) で抽出後、はちみつ以外についてはアセトニトリル/ヘキサン分配で脱脂した。フロリジルミニカラムで精製し、LC-MS/MS で定量及び確認した。

(1) 抽出

a 牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、鶏卵、牛乳、うなぎ及びしじみの場合

鶏卵及び牛乳は試料 20.0 g を 250 mL 遠心管に採った。牛の筋肉、牛の肝臓、鶏卵、牛乳、うなぎ及びしじみは試料 20.0 g、脂肪は 5.00 g を 250 mL 遠心管に採り、水 20 mL を加えホモジナイズした。これにアセトン/*n*-ヘキサン (1 : 2) 100 mL を加えホモジナイズした後、毎分 2,500 回転で 5 分間遠心分離し、有機層を採った。残留物に *n*-ヘキサン 50 mL を加え、ホモジナイズした後、毎分 2,500 回転で 5 分間遠心分離した。得られた有機層を三角フラスコに合わせ、適量の無水硫酸ナトリウムを加えて脱水した後、無水硫酸ナトリウムをろ別した。ろ液を 40°C以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物に *n*-ヘキサン 30 mL を加えて、100 mL 分液漏斗に移した。これに *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL を加えて 5 分間振とうした。アセトニトリル層を 100 mL ナスフラスコに移し、*n*-ヘキサン層に *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL を加え、上記と同様の操作を 2 回繰り返した。アセトニトリル層を上記の 100 mL ナスフラスコに合わせ、40°C以下でアセトニトリルを除去した。この残留物に *n*-ヘキサンを加えて溶解し、正確に 10 mL とした。

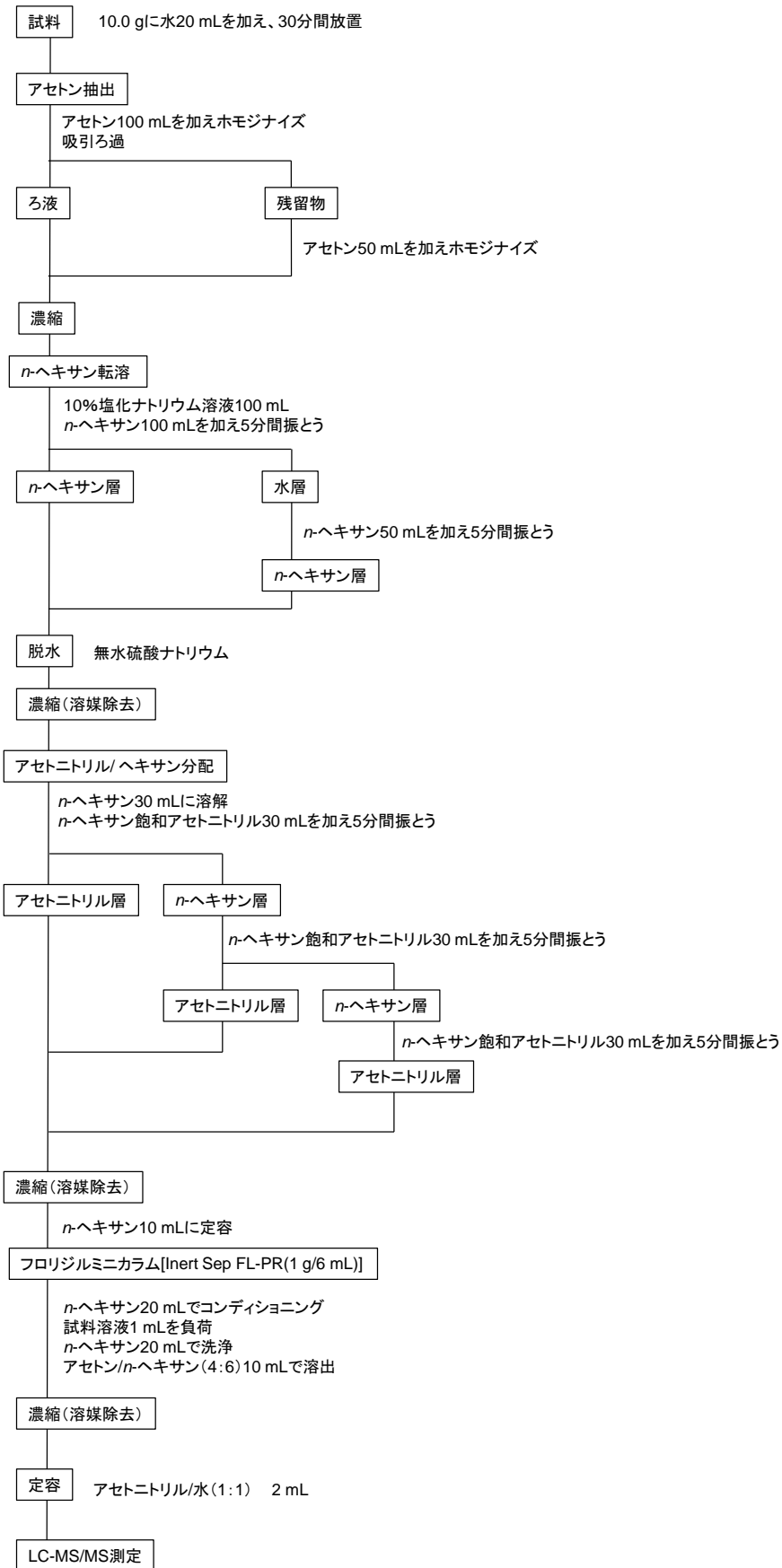
b はちみつの場合

試料 20.0 g を 250 mL 遠心管に採り、水 20 mL を加えて溶かし、アセトン/*n*-ヘキサン (1 : 2) 100 mL を加えホモジナイズした後、毎分 2,500 回転で 5 分間遠心分離し、有機層を採った。残留物に *n*-ヘキサン 50 mL を加え、ホモジナイズした後、毎分 2,500 回転で 5 分間遠心分離した。得られた有機層を三角フラスコに合わせ、適量の無水硫酸ナトリウムを加えて脱水した後、無水硫酸ナトリウムをろ別した。ろ液を 40°C以下で濃縮し、溶媒を除去した後、*n*-ヘキサンに溶解し、正確に 10 mL とした。

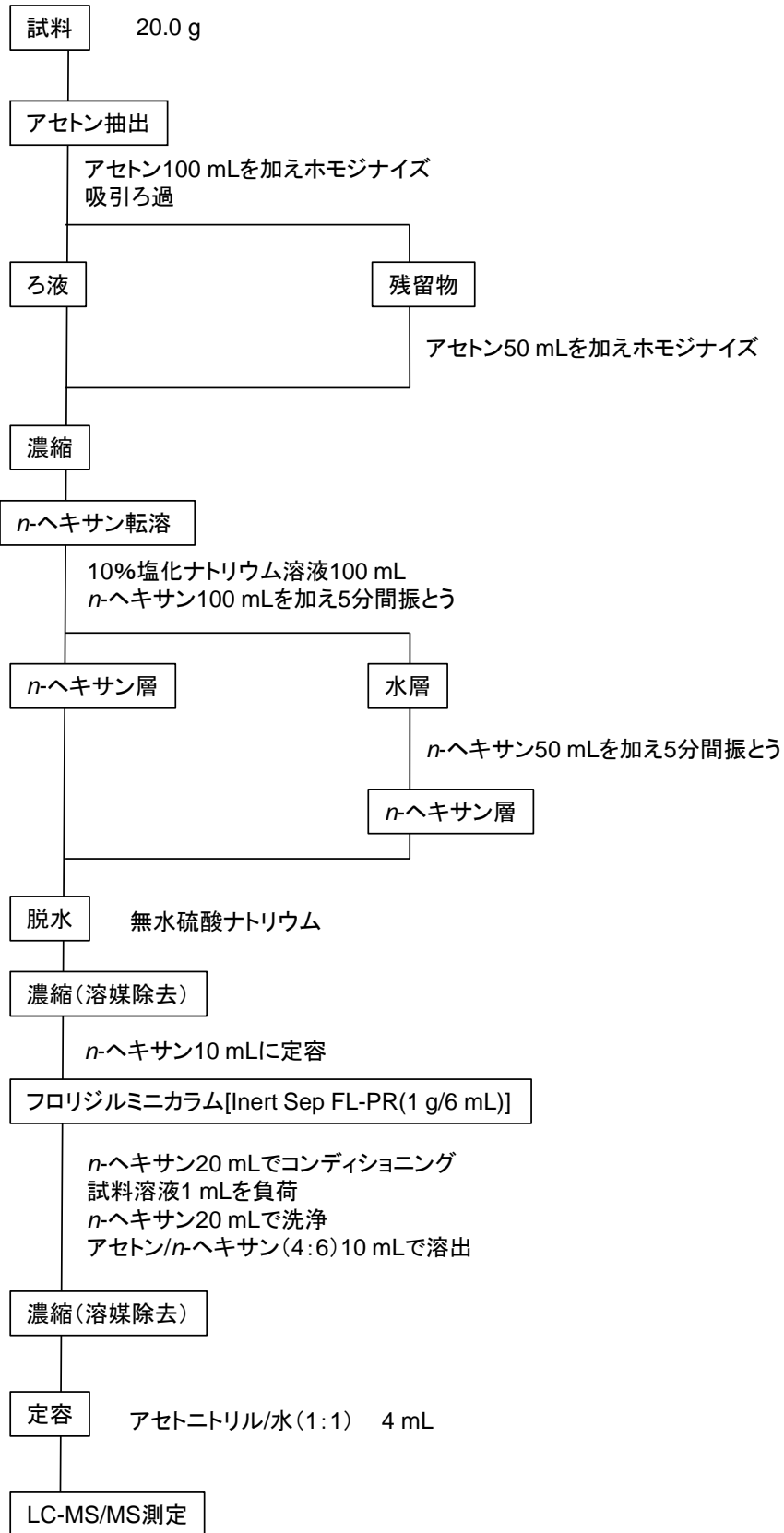
(2) 精製

フロリジルミニカラム [Inert Sep FL-PR (1 g/6 mL)] に *n*-ヘキサン 20 mL を注入し、流出液は捨てた。このカラムに、(1) で得られた溶液を 1 mL 注入した後、*n*-ヘキサン 20 mL を注入し、流出液を捨てた。ここにアセトン/*n*-ヘキサン (4 : 6) 10 mL を注入し、溶出液を 40°C以下で濃縮し溶媒を除去した。この残留物をアセトニトリル/水 (1 : 1) に溶解し、牛の脂肪以外は正確に 4 mL、牛の脂肪は正確に 1 mL としたものを試験溶液とした。

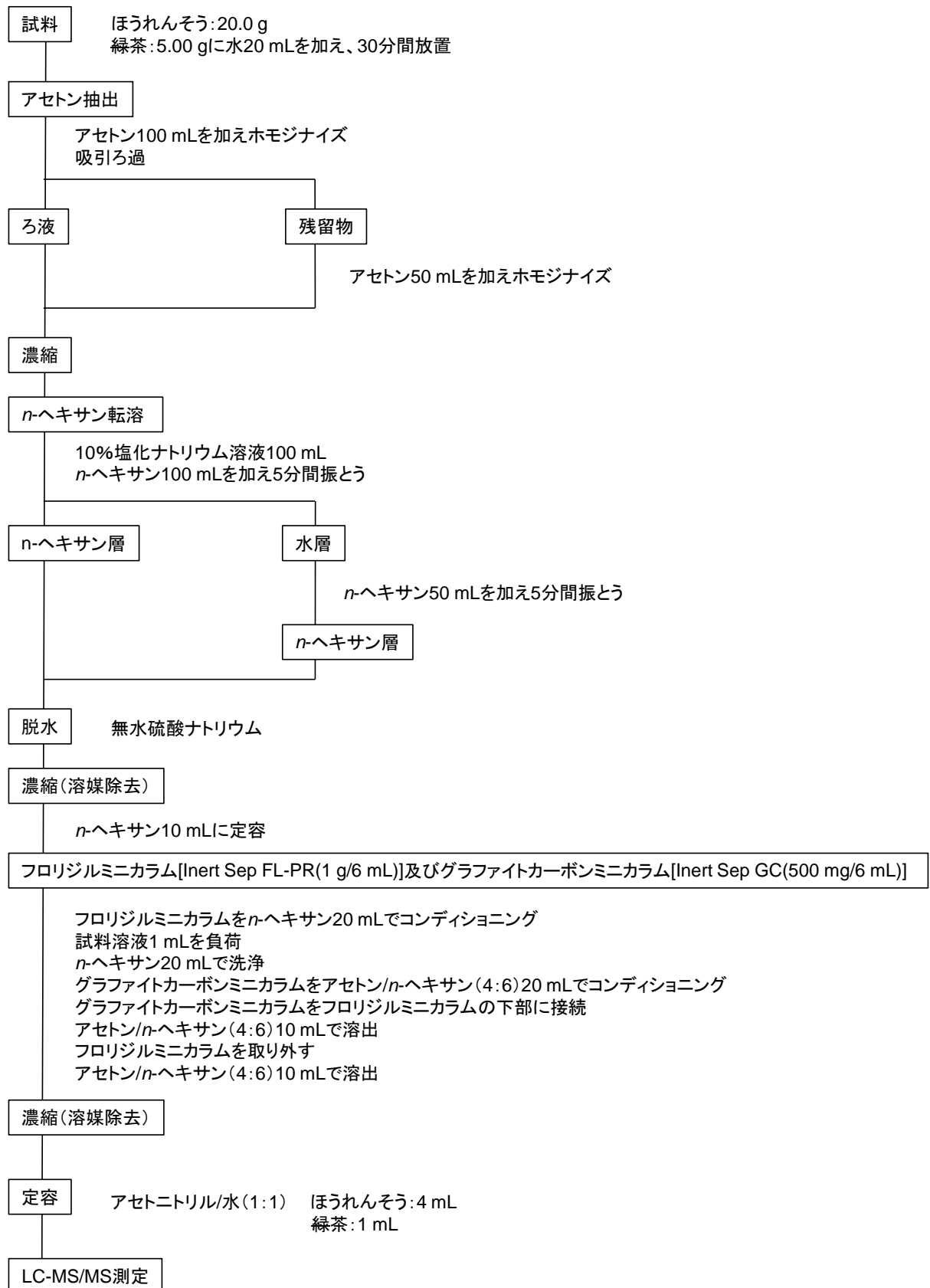
[分析法フローチャート (玄米及び大豆)]



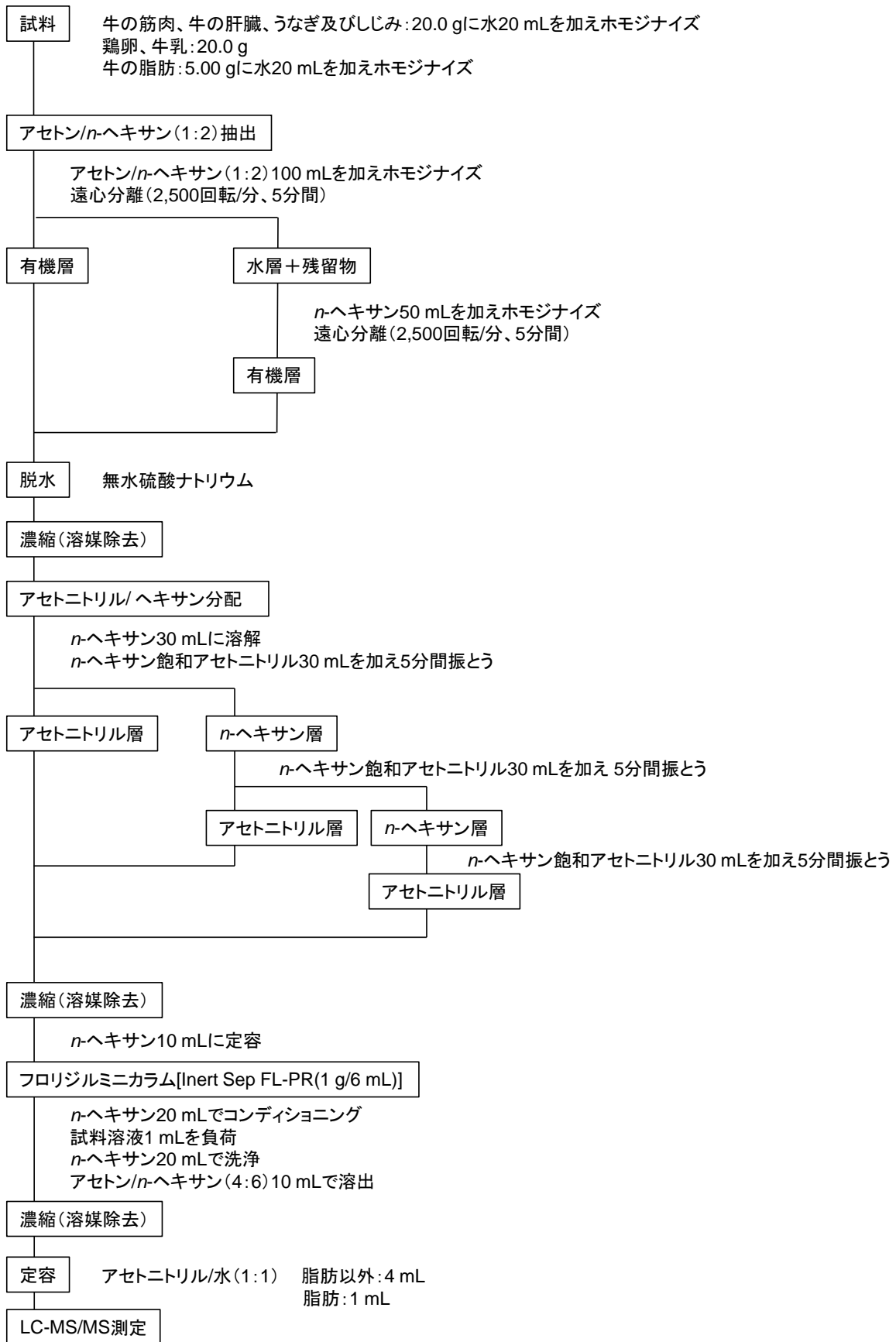
[分析法フローチャート (キャベツ、ばれいしょ、オレンジ及びりんご)]



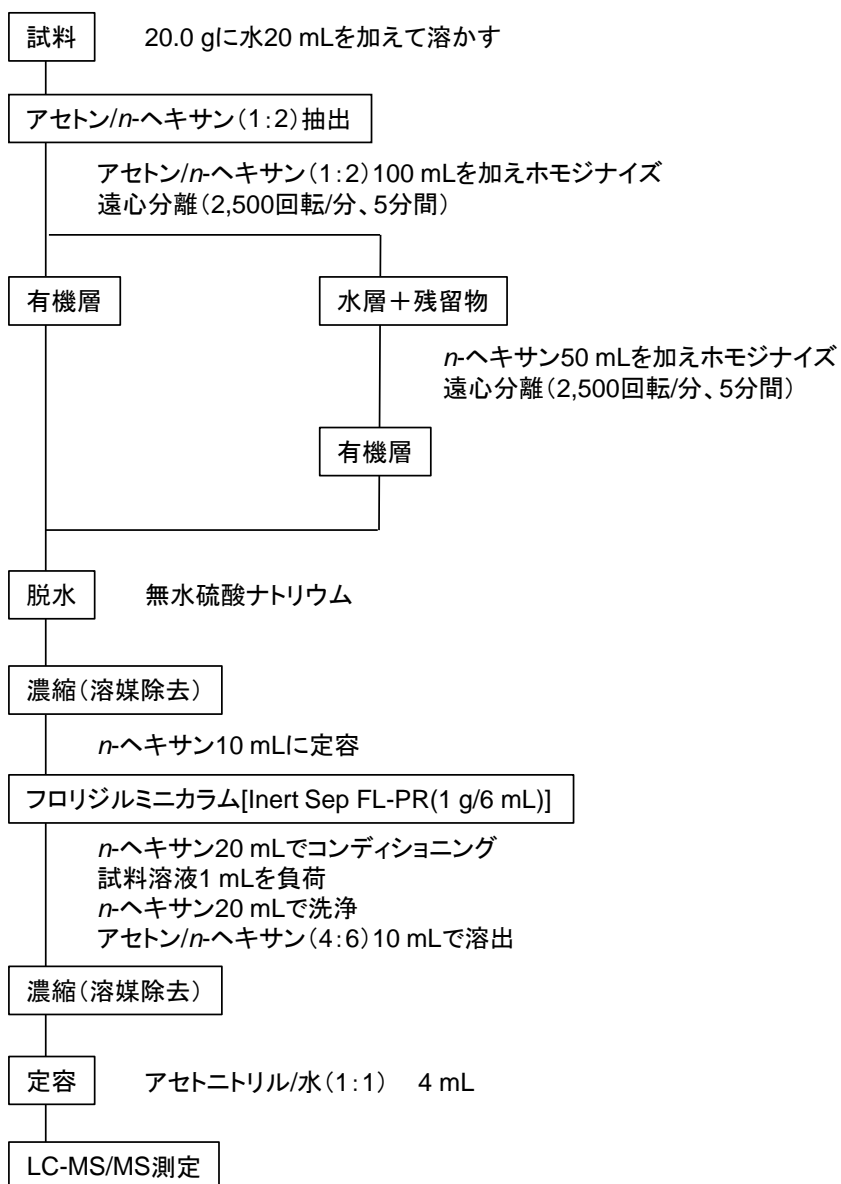
[分析法フローチャート (ほうれんそう及び緑茶)]



[分析法フローチャート (牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、鶏卵、牛乳、うなぎ及びしじみ)]



[分析法フローチャート (はちみつ)]



8. マトリックス添加標準溶液の調製

各検討対象食品のブランク試験溶液 0.2 mL を採り、窒素気流下で溶媒を除去した後、添加回収試験における回収率 100%相当濃度 (0.005 mg/L) の溶媒標準溶液 0.2 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。

[結果及び考察]

1. 測定条件の検討

(1) MS 条件の検討

イオン化モードを選択するために、インフュージョン測定を行ったところ、ESI (+) モードではジニコナゾールのプロトン付加分子である m/z 326.2 $[M+H]^+$ が検出されたが、ESI (-) モードではジニコナゾールに由来するイオンが検出されなかったことから、測定には ESI (+) モードを用いることとした。

ESI (+) モードで、最適な条件を検討するために、アセトニトリル/0.1vol%ギ酸 (1:1) を移動相としてフローインジェクションにて検討したところ、ジニコナゾールのプロトン付加分子である m/z 326.2 $[M+H]^+$ が検出された為、 m/z 326.2 $[M+H]^+$ をプリカーサーイオンとした。このときのマススペクトルを図1に示した。

ジニコナゾールのプロトン付加分子 (m/z 326.2 $[M+H]^+$) をプリカーサーイオンとした場合のプロダクトイオンスペクトルを図2及び図3に示した。 m/z 70.1 が非常に高い強度で検出され、次いで m/z 159.0 も検出されたことから、 m/z 70.1 を定量イオン、 m/z 159.0 を定性用イオンとした。

以上のことから、ESI (+) モードで測定し、 m/z +326.2 \rightarrow 70.1 を定量用、 m/z +326.2 \rightarrow 159.0 を定性用の測定イオンとした。

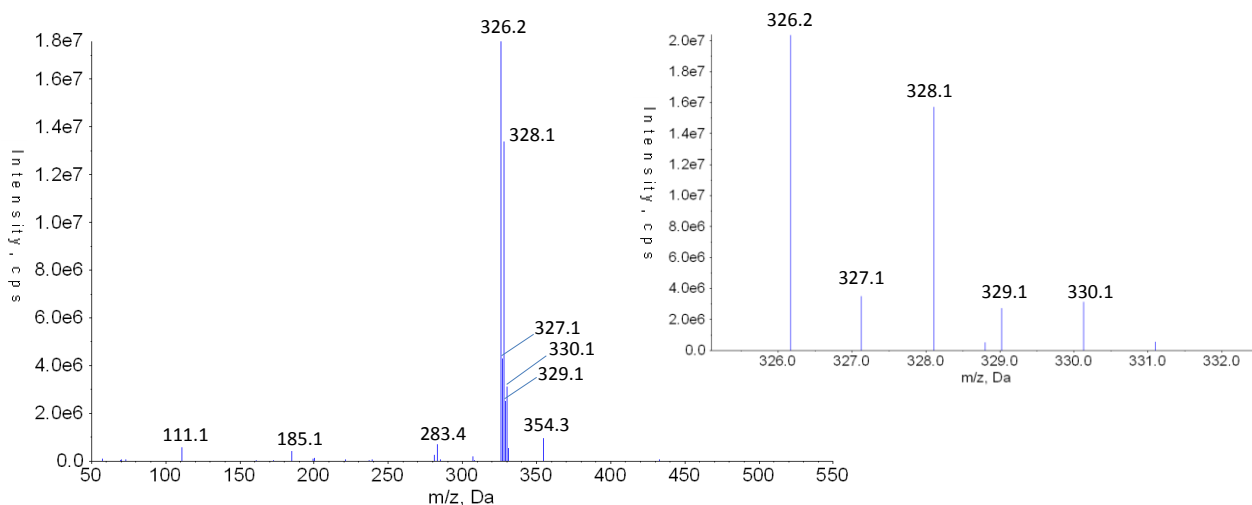


図1 ジニコナゾール標準溶液のマススペクトル
スキャン範囲：50～550amu
測定条件：ESI+, CV=71 V
(CV : corn voltage)

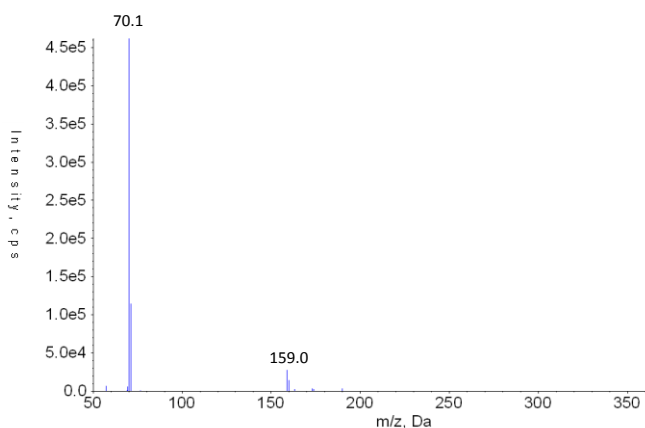


図 2 ジニコナゾールの

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 326.2

測定条件 : ESI+, CV=71 V, CE= 57 eV

(CV : corn voltage, CE=collision energy)

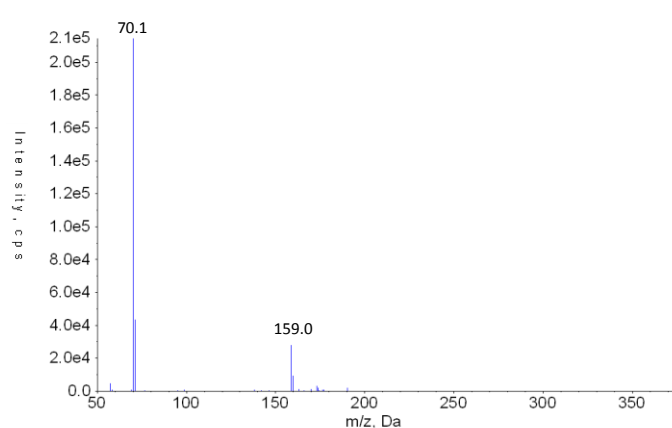


図 3 ジニコナゾールの

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 326.2

測定条件 : ESI+, CV=71 V, CE=49 eV

(CV : corn voltage, CE=collision energy)

(2) LC 条件の検討

分析カラムについてオクタデシルシリル化シリカゲルカラム[Inertsil ODS-3(内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm)] を用いて検討を行ったところ、良好な結果 (ピーク形状、分離、再現性、感度) が得られたので、オクタデシルシリル化シリカゲルカラムを使用することにした。

移動相条件について、アセトニトリル - ギ酸、アセトニトリル - 酢酸について、添加剤の 3 濃度 (0.05、0.1 及び 0.2vol%) について検討した結果 0.1vol% ギ酸 - アセトニトリルを用いた場合に最も良好な感度を得られたのでアセトニトリル - 0.1vol% ギ酸を移動相として用いることにした。

(3) 検量線

図 4 に検量線の例を示した。0.00125~0.0075 mg/L の濃度範囲で作成した検量線の相関係数は、いずれの食品においても 0.995 以上であり良好な直線性を示した。

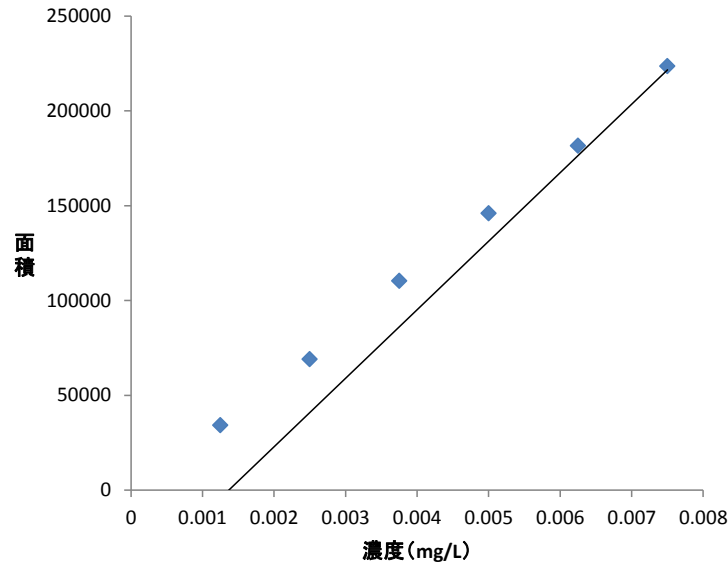


図 4 ジニコナゾール検量線の例

$$y = 30100x - 4580 \quad r=0.9997$$

2. 試験溶液調製法の検討

(1) 抽出溶媒の選択

農産物はアセトン抽出溶媒として用いた。畜水産物は通知一斉試験法〔GC/MS による農薬等の一斉試験法（畜水産物）〕の抽出溶媒であるアセトン/*n*-ヘキサン（1：2）を抽出溶媒として用いた。通知一斉試験法〔GC/MS による農薬等の一斉試験法（畜水産物）〕では乳、卵及びはちみつの場合にはアセトニトリル抽出溶媒として用いているが、今回の検討では有機層の凝固や回収率の低下などの問題はみられなかったため、これらの試料についてもアセトン/*n*-ヘキサン（1：2）を抽出溶媒として用いた。

(2) 転溶溶媒の検討

10%塩化ナトリウム溶液 100 mL にジニコナゾール 1 mg/L のアセトン溶液を 1 mL 添加し、*n*-ヘキサン 100 mL で 1 回、50 mL で 2 回、計 3 回振とう抽出を行った結果を表 1 に示した。2 回の振とうでほぼ全量回収されたことから、転溶操作は、*n*-ヘキサン 100 mL 及び 50 mL で 2 回振とう抽出を行うこととした。

表 1 ヘキサンへの転溶の検討

	100 mL (1 回目)	50 mL (2 回目)	50 mL (3 回目)	合計
回収率 (%) *	108.8±0.1	0.4±0.0	<0.2	109.2±6.0

*n=3 の平均値±SD

(3) 脱脂方法の検討

脱脂方法としてアセトニトリル/ヘキサン分配について検討した。*n*-ヘキサン 30 mL にジニコナ

ゾール 1 mg/L のアセトニトリル溶液を 1 mL 添加し、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL ずつで 3 回抽出を行った結果を表 2 に示した。3 回の抽出操作でほぼ全量回収されたことから、*n*-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 2 アセトニトリル/ヘキサン分配の検討

	<i>n</i> -ヘキサン飽和アセトニトリル			合計
	30 mL (1 回目)	30 mL (2 回目)	30 mL (3 回目)	
回収率 (%) *	91.6±2.7	8.4±0.2	0.7±0.0	100.7±2.9

*n=3 の平均値±SD

(3) カラム精製の検討

① フロリジルミニカラムによる精製 [Inert Sep FL-PR (1 g/6 mL)]

フロリジルミニカラムにおける溶出挙動の検討を行った。カラムを溶出溶媒 20 mL で予備洗浄した後、ジニコナゾール 0.25 mg/L 溶液（溶媒組成は溶出溶媒と同じ）を 2 mL 負荷し、溶出溶媒を 5 mL ずつ負荷して各分画を分取した。溶出溶媒には *n*-ヘキサン、アセトン/*n*-ヘキサン (3 : 7) 及びアセトン/*n*-ヘキサン (4 : 6) を用いた。このときの結果を表 3 に示した。この結果より、*n*-ヘキサン 20 mL で洗浄を行うこととした。また、アセトン/*n*-ヘキサン (3 : 7) 20 mL またはアセトン/*n*-ヘキサン (4 : 6) 10 mL で溶出可能であることがわかった。

表 3 フロリジルミニカラムからの溶出状況

溶出溶媒量 (mL)	溶出率 (%)		
	ヘキサン	アセトン/ <i>n</i> -ヘキサン (3 : 7)	アセトン/ <i>n</i> -ヘキサン (4 : 6)
負荷	<2.0	<2.0	<2.0
0~5	<2.0	22.2	103.3
5~10	<2.0	71.1	<2.0
10~15	<2.0	9.1	<2.0
15~20	<2.0	<2.0	<2.0
20~25	<2.0	<2.0	<2.0
25~30	<2.0	<2.0	<2.0
計	<2.0	102.4	103.3

負荷量 : 0.5 µg (溶出溶媒 2 mL に溶解)

② グラファイトカーボンミニカラムによる精製 [Inert Sep GC (500 mg/6 mL)]

ほうれんそう、緑茶については、フロリジルミニカラムのみの精製では、試験溶液に色素や不溶物が多く残り、分析カラム、装置及び測定への影響が懸念された。そこで、追加精製の検討を行った。

カラムを溶出溶媒 20 mL で予備洗浄した後、ジニコナゾール 0.25 mg/L 溶液（溶媒組成は溶出溶媒と同じ）を 2 mL 負荷し、溶出溶媒を 5 mL ずつ負荷して各分画を分取した。溶出溶媒にはアセトン/*n*-ヘキサン（3：7）及びアセトン/*n*-ヘキサン（4：6）を用いた。このときの結果を表 4 に示した。この結果より、ジニコナゾールはアセトン/*n*-ヘキサン（3：7）では溶出されにくく、アセトン/*n*-ヘキサン（4：6）では 15 mL でほぼ全量溶出できることがわかった。

表 4 グラファイトカーボンミニカラムからの溶出状況

溶出溶媒量 (mL)	溶出率 (%)	
	アセトン/ <i>n</i> -ヘキサン (3 : 7)	アセトン/ <i>n</i> -ヘキサン (4 : 6)
負荷	<2.0	<2.0
0~5	<2.0	78.2
5~10	<2.0	39.1
10~15	3.1	<2.0
15~20	11.7	<2.0
20~25	27.3	<2.0
25~30	27.6	<2.0
30~35	18.0	<2.0
35~40	8.2	<2.0
40~45	3.7	<2.0
45~50	<2.0	<2.0
計	99.6	117.3

負荷量 : 0.5 µg (溶出溶媒 2 mL に溶解)

③ フロリジルミニカラム [Inert Sep FL-PR (1 g/6 mL)] 及びグラファイトカーボンミニカラム [Inert Sep GC (500 mg/6 mL)] 連結カラムによる精製

フロリジルミニカラムとグラファイトカーボンを連結した場合の溶出状況を確認した。①フロリジルミニカラムによる精製 [Inert Sep FL-PR (1 g/6 mL)] 及び②グラファイトカーボンミニカラムによる精製 [Inert Sep GC (500 mg/6 mL)] の検討結果より、溶出溶媒にはアセトン/*n*-ヘキサン（4：6）を用いることとした。

フロリジルミニカラム及びグラファイトカーボンミニカラムをそれぞれ（4：6）20mL で予備洗浄した後、フロリジルミニカラムの下部にグラファイトカーボンミニカラムを接続した。ここにジニコナゾール 0.25 mg/L のアセトン/*n*-ヘキサン（4：6）溶液を 2 mL 負荷し、アセトン/*n*-ヘキサン（4：6）を 5 mL ずつ負荷して各分画を分取した。①の検討結果より、フロリジルミニカラムからは 10 mL でほぼ全量溶出されることから、アセトン/*n*-ヘキサン（4：6）を 10 mL 負荷した後、上部のフロリジルミニカラムを取り外し、グラファイトカーボンミニカラムに 5 mL ずつ溶媒を負荷して各分画を分取した。このときの結果を表 5 に示した。ジニコナゾールの溶出

は溶出溶媒を 5 mL 負荷した時点から始まり、接続を取り外した後は、グラファイトカーボンからアセトン/*n*-ヘキサン (4 : 6) 10 mL でほぼ全量溶出した。また、確認のため接続を取り外した後のフロリジルミニカラムについても、アセトン/*n*-ヘキサン (4 : 6) で 30 mL まで溶出したが、ジニコナゾールは溶出しなかった。

この結果より、追加精製を行う場合は、フロリジルミニカラムをヘキサン 20 mL で洗浄後、グラファイトカーボンを下部に連結し、アセトン/*n*-ヘキサン (4 : 6) 10 mL で溶出後、フロリジルミニカラムを取り外し、グラファイトカーボンミニカラムからアセトン/*n*-ヘキサン (4 : 6) 10 mL で溶出して、上記の溶出液と合わせることにした。

表 5 フロリジルミニカラム及びグラファイトカーボンミニカラムからの溶出状況

溶出溶媒量 (mL) *	溶出率 (%)		
	フロリジルミニカラム及び グラファイトカーボン ミニカラム連結	接続を外した後の グラファイトカーボン ミニカラム	接続を外した後の フロリジルミニカラム
負荷	< 2.0	—	—
0~5	2.3	—	—
5~10	88.9	—	—
10~15	—	12.7	< 2.0
15~20	—	2.0	< 2.0
20~25	—	< 2.0	< 2.0
25~30	—	< 2.0	< 2.0
計	105.9		< 2.0

— : 分取できなかった分画

*アセトン/*n*-ヘキサン (4 : 6) を順次 5 mL ずつ流下

④ 実試料を用いた検討

マトリックス存在下においても同様な溶出挙動を示すことを確認するため、実試料を用いて溶出挙動の検討を行った。

まず、フロリジルミニカラムのみを用いる場合の溶出状況を検討した。実験方法の「7.試験溶液の調製 (1) 抽出」に従って抽出を行い、試料溶液を調製した。ここから 1 mL を分取してフロリジルミニカラムに負荷し、ヘキサン 20 mL、アセトン/*n*-ヘキサン (4 : 6) を 10 mL ずつ 2 回負荷して各分画を分取した。このときの溶出状況を表 6 及び表 7 に示した。ほうれんそう、緑茶以外のいずれの食品においても 10 mL でジニコナゾールは全量溶出され、マトリックスの有無に関わらず同様な溶出挙動を示すことが確認された。また、妨害ピークやマトリックスの影響は認められなかった。

表 6 農産物（ほうれんそう、緑茶以外）を用いたフロリジルミニカラムからの溶出挙動

食品名	ヘキサン 20 mL	アセトン/ <i>n</i> -ヘキサン (4 : 6)		合計	マトリックス 影響
		0-10 mL	10-20 mL		
玄米	<2.0	105.1	<2.0	105.1	1.009
大豆	<2.0	97.6	<2.0	97.6	1.006
キャベツ	<2.0	103.8	<2.0	103.8	0.992
ばれいしょ	<2.0	101.1	<2.0	101.1	0.995
オレンジ	<2.0	102.7	<2.0	102.7	0.966
りんご	<2.0	101.2	<2.0	101.2	0.974

マトリックス影響：マトリックス標準のピーク面積／同一濃度の溶媒標準のピーク面積

表 7 畜水産物を用いたフロリジルミニカラムからの溶出挙動

食品名	ヘキサン 20 mL	アセトン/ <i>n</i> -ヘキサン (4 : 6)		合計	マトリックス 影響
		0-10 mL	10-20 mL		
牛の筋肉	<2.0	107.3	<2.0	107.3	1.054
牛の脂肪	<2.0	104.0	<2.0	104.0	0.998
牛の肝臓	<2.0	105.3	<2.0	105.3	0.984
鶏卵	<2.0	103.9	<2.0	103.9	1.004
牛乳	<2.0	105.8	<2.0	105.8	1.027
はちみつ	<2.0	104.4	<2.0	104.4	1.013
うなぎ	<2.0	92.5	<2.0	92.5	0.930
しじみ	<2.0	106.8	<2.0	106.8	1.011

マトリックス影響：マトリックス標準のピーク面積／同一濃度の溶媒標準のピーク面積

次にほうれんそう、緑茶について、フロリジルミニカラム及びグラファイトカーボンミニカラムの連結カラムを用いて検討を行った。実験方法の「7.試験溶液の調製（1）抽出」に従って抽出を行い、試料溶液を調製した。ここから 1 mL を分取してフロリジルミニカラムに負荷し、ヘキサン 20 mL を負荷した後、グラファイトカーボンミニカラムを下部に連結し、アセトン/*n*-ヘキサン (4 : 6) を 10 mL 負荷した後、フロリジルミニカラムを取り外し、グラファイトカーボンミニカラムにアセトン/*n*-ヘキサン (4 : 6) を 10 mL ずつ 2 回負荷して各分画を分取した。このときの溶出状況を表 8 に示した。アセトン/*n*-ヘキサン (4 : 6) 20 mL でジニコナゾールはほぼ全量溶出され、マトリックス存在下でも前述の検討結果と同様の溶出挙動を示すことが確認された。

表 8 実試料を用いたフロリジルミニカラム及びグラファイトカーボンミニカラム
連結カラムからの溶出挙動

	回収率 (%)				マトリックス 影響	
	ヘキサン 20ml	アセトン/ヘキサン (4 : 6) 溶出量				計
		0-10ml	10-20ml	20-30ml		
ほうれんそう	<2.0	76.3	26.7	<2.0	103.0	0.959
緑茶	<2.0	93.8	13.6	<2.0	107.3	0.948

マトリックス影響：マトリックス標準のピーク面積/同一濃度の溶媒標準のピーク面積

以上の結果より、フロリジルミニカラム精製においては、*n*-ヘキサン 20 mL で洗浄、アセトン/ヘキサン (4 : 6) 10 mL で溶出を行うこととした。

また、ほうれんそう、緑茶についてはグラファイトカーボンで追加精製を行い、試料溶液をフロリジルミニカラムへ負荷後 *n*-ヘキサン 20 mL で洗浄し、グラファイトカーボンを下部に連結した後、アセトン/ヘキサン (4 : 6) 10 mL で溶出し、フロリジルミニカラムを取り外した後、アセトン/ヘキサン (4 : 6) 10 mL で溶出を行うこととした。

3. 添加回収試験

玄米、大豆、ほうれんそう、キャベツ、ばれいしょ、オレンジ、りんご、緑茶、牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、鶏卵、牛乳、はちみつ、うなぎ及びしじみの 16 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を実施した。添加回収試験において玄米、大豆、オレンジ、りんご、牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓については、アセトニトリル/水 (1 : 1) に溶解後に懸濁が認められたため、遠心分離 (2500 回転/分、5 分間) を行った後、上清を分取して試験溶液とした。

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 5~20 に示した。また、各食品のブランク試料のフルスキャン測定によるトータルイオンクロマトグラムを図 21、22 に、プロダクトスキャン測定によるトータルイオンクロマトグラムを図 23、24 に示した。

(1) 選択性

選択性の検討結果を表 9 に示した。検討したいずれの試料においても、ジニコナゾールの定量を妨害するピークは認められなかった。

表 9 選択性の評価

担当機関: 東京顕微鏡院

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 ²⁾ (ppm)	妨害ピークの許容範囲		ピーク面積 ³⁾				選択性の評価 ⁵⁾	備考	
						評価対象濃度 (ppm)	判定基準	面積又は高さの別	ブランク試料 (a)	標準溶液 ⁴⁾ (b)	面積(高さ)比 (a)/(b)			
	ジコナゾール	玄米	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	92760	0.000	○	
	ジコナゾール	大豆	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	111600	0.000	○	
	ジコナゾール	ほうれんそう	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	123200	0.000	○	
	ジコナゾール	キャベツ	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	131200	0.000	○	
	ジコナゾール	ばれいしょ	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	129200	0.000	○	
	ジコナゾール	オレンジ	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	129900	0.000	○	
	ジコナゾール	りんご	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	124000	0.000	○	
	ジコナゾール	緑茶	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	116000	0.000	○	
	ジコナゾール	牛の筋肉	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	110000	0.000	○	
	ジコナゾール	牛の脂肪	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	126500	0.000	○	
	ジコナゾール	牛の肝臓	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	114100	0.000	○	
	ジコナゾール	鶏卵	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	113100	0.000	○	
	ジコナゾール	牛乳	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	114300	0.000	○	
	ジコナゾール	はちみつ	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	110900	0.000	○	
	ジコナゾール	うなぎ	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	128300	0.000	○	
	ジコナゾール	しじみ	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	137000	0.000	○	

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。

(1) 真度、精度

真度及び併行精度の検討結果を表 10 に示した。

農産物における真度は 88.3~103.3%、併行精度は 0.5~5.1%であり、真度 70~120%、併行精度(RSD) <25%という目標値を満足した。また、S/N 比の平均値 は 176~1980 であり、S/N ≥ 10 を満足した。

畜水産物における真度は 101.7~108.3%、併行精度は 2.0~4.9%であり、真度 70~120%、併行精度(RSD) <25%という目標値を満足した。また、S/N 比の平均値 は 771~1735 であり、S/N ≥ 10 を満足した。

表 10 真度、精度及び定量限界の評価

担当機関: 東京顕微鏡院

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)	定量限界の評価 ²⁾	検量線					回収率(%)					真度 (%)	併行精度 (RSD%)	S/N比 ³⁾			備考
							傾き	切片	r ² 値	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5	Max.	Min.			平均値			
	ジコナゾール	玄米	0.01	0.01	0.01		26400	-2390	0.9992	99.4	100.9	99.8	100.5	102.2	100.6	1.1	583.2	905.9	744.5			
	ジコナゾール	大豆	0.01	0.01	0.01		20300	1620	0.9986	84.0	89.1	87.8	91.4	89.4	88.3	3.1	311.4	242.9	277.1			
	ジコナゾール	ほうれんそう	0.01	0.01	0.01		25500	1860	0.9984	98.6	100.6	99.0	98.8	100.7	99.5	1.0	2182.0	1788.3	1985.1			
	ジコナゾール	キャベツ	0.01	0.01	0.01		23400	5430	0.9914	98.5	104.2	105.6	108.8	99.6	103.3	4.1	1606.7	1271.2	1438.9			
	ジコナゾール	ばれいしょ	0.01	0.01	0.01		26000	1230	0.9960	96.2	92.3	89.1	89.9	88.2	91.1	3.5	1139.8	1029.5	1084.6			
	ジコナゾール	オレンジ	0.01	0.01	0.01		18100	5850	0.9992	100.0	94.4	93.9	88.9	89.0	93.2	4.9	200.0	241.9	221.0			
	ジコナゾール	りんご	0.01	0.01	0.01		19500	1340	0.9966	96.2	95.9	95.6	94.9	95.3	95.6	0.5	736.0	1368.4	1052.2			
	ジコナゾール	緑茶	0.01	0.01	0.01		22300	2640	0.9956	98.3	103.9	107.1	108.4	96.7	102.9	5.1	1018.2	1284.4	1151.3			
	ジコナゾール	牛の筋肉	0.01	0.01	0.01		22600	-4460	0.9974	100.9	107.8	109.0	111.9	111.9	108.3	4.2	1613.8	1608.8	1611.3			
	ジコナゾール	牛の脂肪	0.01	0.01	0.01		27800	703	0.9960	107.3	103.5	97.6	107.4	105.6	104.3	3.9	1172.8	1195.9	1184.3			
	ジコナゾール	牛の肝臓	0.01	0.01	0.01		23300	-2500	0.9962	100.2	105.0	108.9	101.8	100.7	103.3	3.5	1169.0	1169.5	1169.2			
	ジコナゾール	鶏卵	0.01	0.01	0.01		22600	5870	0.9956	102.7	106.6	111.6	108.9	110.5	108.1	3.3	841.4	700.4	770.9			
	ジコナゾール	牛乳	0.01	0.01	0.01		29700	-4770	0.9970	99.6	100.5	104.8	109.3	104.8	103.8	3.8	1128.1	1225.2	1176.6			
	ジコナゾール	はちみつ	0.01	0.01	0.01		32600	3820	0.9962	102.1	106.0	106.2	106.9	107.2	105.7	2.0	1178.4	1444.1	1311.3			
	ジコナゾール	うなぎ	0.01	0.01	0.01		29800	-5790	0.9978	102.9	101.0	97.8	97.4	109.8	101.8	4.9	1349.6	1483.3	1416.4			
	ジコナゾール	しじみ	0.01	0.01	0.01		30100	-4580	0.9994	98.2	100.1	104.9	97.8	107.6	101.7	4.3	1854.5	1615.1	1734.8			

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

(2) 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 11 に示した。添加回収試験における回収率 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の溶媒標準溶液に対するピーク面積

比を求めた。

農産物における面積比は0.87~1.03、畜水産物における面積比は0.96~1.03であり、いずれも試料マトリックスの測定への影響はほとんどみられなかった。

添加回収試験における真度を表11で求めたピーク面積比で除して補正真度を求め、表12に示した。農産物における補正真度は91.0~118.3%、畜水産物における補正真度は101.8~106.0%であり、試料マトリックスの影響を考慮した場合でも目標値70~120%を満足した。

表11 試料マトリックスの測定への影響

担当機関: 東京顕微鏡院

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)	面積又は高さの別	ブランク ⁴⁾	ピーク面積 ³⁾						備考
									マトリックス添加標準溶液 ⁵⁾			溶媒標準溶液			
									n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均	
ジニコナゾール	玄米	0.01	0.01	0.01	0.005	面積	0	92760	103200	97980.0	102900	117200	110050.0	0.89	
ジニコナゾール	大豆	0.01	0.01	0.01	0.005	面積	0	111600	117100	114350.0	119100	122000	120550.0	0.95	
ジニコナゾール	ほうれんそう	0.01	0.01	0.01	0.005	面積	0	123200	118600	120900.0	123400	122200	122800.0	0.98	
ジニコナゾール	キャベツ	0.01	0.01	0.01	0.005	面積	0	131200	130700	130950.0	127400	127600	127500.0	1.03	
ジニコナゾール	ばれいしょ	0.01	0.01	0.01	0.005	面積	0	129200	130900	130050.0	130300	127300	128800.0	1.01	
ジニコナゾール	オレンジ	0.01	0.01	0.01	0.005	面積	0	129900	128700	129300.0	129700	130300	130000.0	0.99	
ジニコナゾール	りんご	0.01	0.01	0.01	0.005	面積	0	124000	125800	124900.0	127200	124900	126050.0	0.99	
ジニコナゾール	緑茶	0.01	0.01	0.01	0.005	面積	0	116000	99250	107625.0	120500	127600	124050.0	0.87	
ジニコナゾール	牛の筋肉	0.01	0.01	0.01	0.005	面積	0	110000	112500	111250.0	106100	109600	107850.0	1.03	
ジニコナゾール	牛の脂肪	0.01	0.01	0.01	0.005	面積	0	126500	126100	126300.0	129900	124600	127250.0	0.99	
ジニコナゾール	牛の肝臓	0.01	0.01	0.01	0.005	面積	0	114100	115500	114800.0	116900	113100	115000.0	1.00	
ジニコナゾール	鶏卵	0.01	0.01	0.01	0.005	面積	0	113100	107700	110400.0	104500	110500	107500.0	1.03	
ジニコナゾール	牛乳	0.01	0.01	0.01	0.005	面積	0	114300	110500	112400.0	112300	107900	110100.0	1.02	
ジニコナゾール	はちみつ	0.01	0.01	0.01	0.005	面積	0	110900	109800	110350.0	114500	105400	109950.0	1.00	
ジニコナゾール	うなぎ	0.01	0.01	0.01	0.005	面積	0	128300	140300	134300.0	137900	142900	140400.0	0.96	
ジニコナゾール	しじみ	0.01	0.01	0.01	0.005	面積	0	137000	130900	133950.0	135400	135500	135450.0	0.99	

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。

表12 補正真度

分析対象化合物	真度 (%)	補正真度 (%)	分析対象化合物	真度 (%)	補正真度 (%)
玄米	100.6	113.0	牛の筋肉	108.3	105.1
大豆	88.3	92.9	牛の脂肪	104.3	105.4
ほうれんそう	99.5	101.5	牛の肝臓	103.3	103.3
キャベツ	103.3	100.3	鶏卵	108.1	105.0
ばれいしょ	91.1	91.0	牛乳	103.8	101.8
オレンジ	93.2	94.1	はちみつ	105.7	105.7
りんご	95.6	96.6	うなぎ	101.8	106.0
緑茶	102.9	118.3	しじみ	101.7	102.7

4. その他の試験法検討に関連する事項

農産物において通知のカフェンストロール、ジフェノコナゾール、シプロコナゾール、シメトリン、チフルザミド、テトラコナゾール、テブコナゾール、トリアジメノール、フルジオキサソニル、プロピコナゾール、ヘキサコナゾール及びペンコナゾール試験法(農産物)の適用を試みたが、玄米、大豆、緑茶において妨害ピークが認められた。昇温条件の検討や、分析カラムとして100%ジメチルポリシロキ

サンのような低極性カラムやトリフルオロプロピルメチルポリシロキサンのような中極性のカラムを用いた検討を行ったが、ジニコナゾールのピークと妨害ピークの分離はできなかった。また、GC-MSによる分析も行ったが、大きなマトリックス効果がみられた。

畜水産物において通知の GC/MS 一斉試験法（畜水産物）の適用を試みたが、大きなマトリックス効果がみられた。精製カラムとしてフロリジルミニカラムについても検討したが、マトリックス効果は改善されなかった。

畜水産物の脱脂方法として GPC を用いる検討を行ったところ、表 13 に示す条件で適用可能であることがわかった。しかし、農産物と畜水産物の操作を極力統一するため、今回はアセトニトリル/ヘキサン分配を採用した。

表 13 GPC 条件

カラム	スチレンジビニルベンゼン共重合体カラム (内径 20 mm、長さ 300 mm)
ガードカラム	スチレンジビニルベンゼン共重合体カラム (内径 20 mm、長さ 100 mm)
移動相流速 (mL/min)	5
注入量 (mL)	5
カラム温度 (°C)	40
移動相	アセトン及びシクロヘキサン (1 : 4) 混液
分取範囲	アクリナトリンの溶出終了から 30 mL

5. 考察

(1) LC-MS/MS 測定における定量イオンとしては、基本骨格が残存している大きなフラグメントを用いる事が望ましいと考えられる。フラグメントイオンとして m/z 70.1 と m/z 159.0 が観測され、一般的には高質量側の方が定性的に有利であるが、 m/z 159.0 は m/z 70.1 と比較して強度が非常に小さかった。定量に当たっては十分な感度を担保する必要がある為、 m/z 70.1 を定量イオン、 m/z 159.0 を定性イオンとして用いることとした。

(2) ほうれんそう、緑茶（葉緑素を多く含む試料）については、フロリジルミニカラムのみでは試験溶液に色素や不溶物が多く残っており、分析カラム、装置及び測定への影響が懸念された。そのため、ほうれんそう、緑茶については追加精製の方法について検討し、色素除去に効果が高いグラファイトカーボンミニカラムを使用することにより精製を行うことができた。操作の簡便性の点から、フロリジルミニカラムとグラファイトカーボンミニカラムを連結して用いることとした。

フロリジルミニカラムではアセトン/ n -ヘキサン (3 : 7) でも溶出可能であったが、グラファイトカーボンミニカラムではアセトン/ n -ヘキサン (4 : 6) での溶出が必要だった。その為、フロリジルミニカラムからの溶出もアセトン/ n -ヘキサン (4 : 6) で行うこととした。溶出溶媒量はアセトン/ n -ヘキサン (3 : 7) の場合は 20 mL であるのに対し、アセトン/ n -ヘキサン (4 : 6) の場合は 10 mL と少なく抑えることができたが、夾雑成分の溶出が懸念された。実試料（ほうれんそう、緑茶以外の 14 食品）を用いて、アセトン/ n -ヘキサン (4 : 6) を溶出溶媒としてフロリジルミニカラムからの溶出検討を行ったところ、妨害ピークやマトリックス効果は認められなかったことから、溶出溶媒としてアセトン/ n -ヘキサン (4 : 6) を用いて問題ないと判断した。

- (3) 試験溶液をアセトニトリル/水（1：1）で定容する操作で、試験溶液が懸濁する場合は遠心分離を行い、上清を分取して試験溶液とする必要があった。
- (4) 開発した試験法を用いて、農産物及び畜水産物 16 食品の添加回収試験を行った結果、いずれの食品においてもジニコナゾールの定量を妨害するピークやマトリックスの影響はみられず、真度及び精度は、真度 70～120%、平行精度（RSD）＜25%という目標値を満たしていたことから、本試験法は、農産物及び畜水産物に適用可能であると判断された。

[結論]

農産物中ジニコナゾール試験法として、ジニコナゾールを試料からアセトンで抽出し、*n*-ヘキサンに転溶後、穀類、豆類についてはアセトニトリル/ヘキサン分配で脱脂し、フロリジルミニカラムで精製した後、葉緑素を多く含む食品ではグラファイトカーボンミニカラムによる追加精製を行い、LC-MS/MS で定量 及び確認する方法を開発した。

また、畜水産物のジニコナゾール試験法として、アセトン/*n*-ヘキサン（1：2）で抽出し、はちみつ以外についてはアセトニトリル/ヘキサン分配で脱脂し、フロリジル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。

開発した試験法を玄米、大豆、ほうれんそう、キャベツ、ばれいしょ、オレンジ、りんご、緑茶の農産物 8 食品に適用した結果、真度 88.3～103.3%、併行精度 0.5～5.1%の良好な結果が得られた。

また、牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、鶏卵、牛乳、はちみつ、うなぎ及びびじみの畜水産物 8 食品に適用した結果、真度 101.7～108.3%、併行精度 2.0～4.9%の良好な結果が得られた。

ジニコナゾール試験法（農産物）の追加検討結果

2014年6月26日の公示分析法検討会において、ジニコナゾールの野菜の試験法でほうれんそうのみフロリジルミニカラム及びグラファイトカーボンミニカラムの連結カラムを使用した追加精製を行うのは適切ではないというご指摘をいただいた。そこで、ほうれんそうについて、連結カラムによる精製を行わず、フロリジルミニカラムのみの精製に改良を加えることにより試験可能か再検討を行った。

検討事項

1. 希釈による方法

グラファイトカーボンミニカラムによる精製を行わず、果実及び野菜の試験法をそのまま適用すると、試験溶液に不溶物が残留することや、マトリックス効果が現れるといった問題が生じる。そこで、これらの問題の解決策として、試験溶液の希釈による方法（以下、希釈法）を検討した。

(1) 希釈法の検討

グラファイトカーボンミニカラムによる精製を行わない場合、最終定容の際に色素がアセトニトリル/水（1：1）に溶解せず、容器壁面に残留してしまう。そこで、不溶物が生じないような希釈方法を検討した。

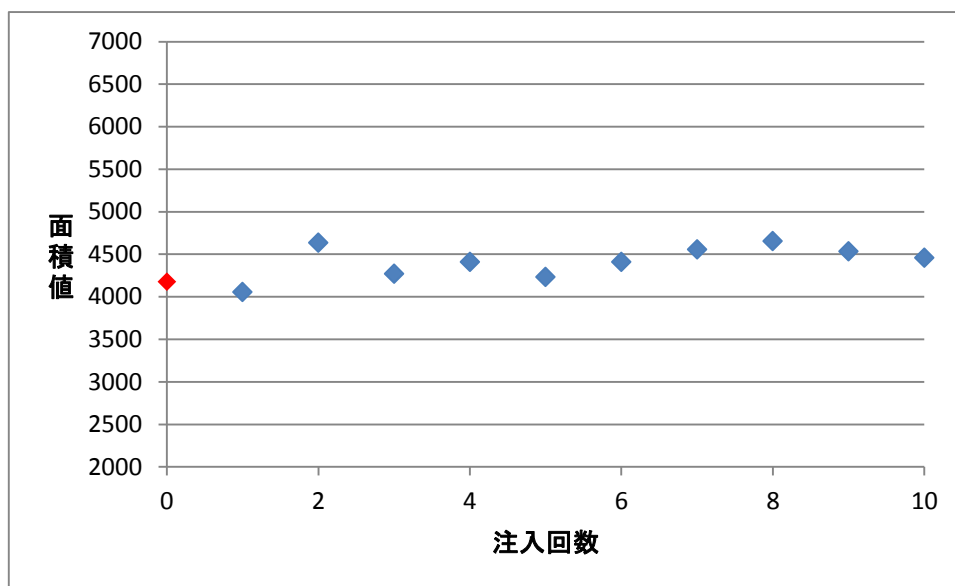
フロリジルミニカラム精製後の溶出液を濃縮し、アセトン/*n*-ヘキサン（4：6）で10 mLに定容した。ここから1 mLを分取して5 mLメスフラスコに取り、窒素気流下で溶媒を除去した。この残留物にアセトニトリル/水（1：1）を加えると容器壁面に付着した色素が溶解しないため、まずアセトニトリル2 mLを加え、1分間超音波処理を行って溶解した後、水2 mLを加えて振り混ぜ、アセトニトリル/水（1：1）で定容することで、容器壁面に色素が残留することなく希釈を行うことができた。わずかに懸濁が認められた為、遠心分離（2500回転/分、5分間）を行った後、上清を分取して試験溶液とした。

(2) 連続分析の検討

希釈法により試験溶液を調製した場合、検液に色素が残留する為、LC-MS/MSで繰返し分析を行った際にカラムへの詰まりや感度の低下等の問題が生じる事が懸念される。そこで、定量限界相当の濃度のマトリックス標準溶液を調製し、10回繰返し分析を行った際の面積値の変化について確認した。この結果を表14及び図25に示す。大きな面積値の変化はみられず、連続分析への影響は認められなかった。

表 14 連続分析時の面積値の変化

	溶媒 標準	マトリックス標準											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	平均	RSD (%)
面積値	4178	4056	4636	4270	4410	4233	4411	4557	4654	4533	4460	4422	4.3



◆：溶媒標準 ◆：マトリックス標準

図 25 連続分析時の面積値の変化

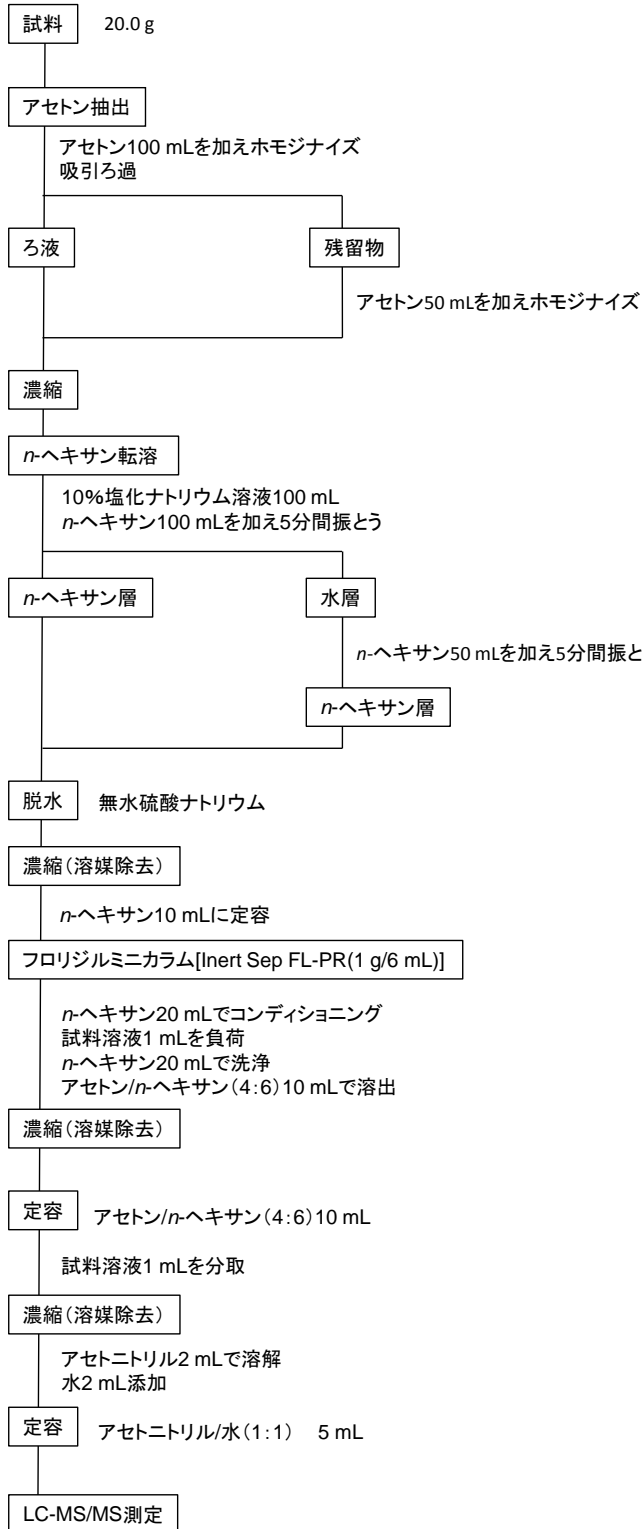
以上の結果から、希釈を行うことによりフロリジルミニカラムのみの精製で試験可能であることが示唆された。しかし、色素がアセトニトリル/水（1：1）に溶解しにくい為、希釈の方法が煩雑であるという問題がある。また、通常の実験法及び野菜の実験法と希釈倍率が異なることにより、装置によっては挙動が変わってしまう可能性や感度不足になる可能性が考えられる。そこで、フロリジルミニカラムで精製した後、グラファイトカーボンミニカラムにより追加精製を行う方法（以下、追加精製法）についても合わせて添加回収試験を行うこととした。

追加精製法

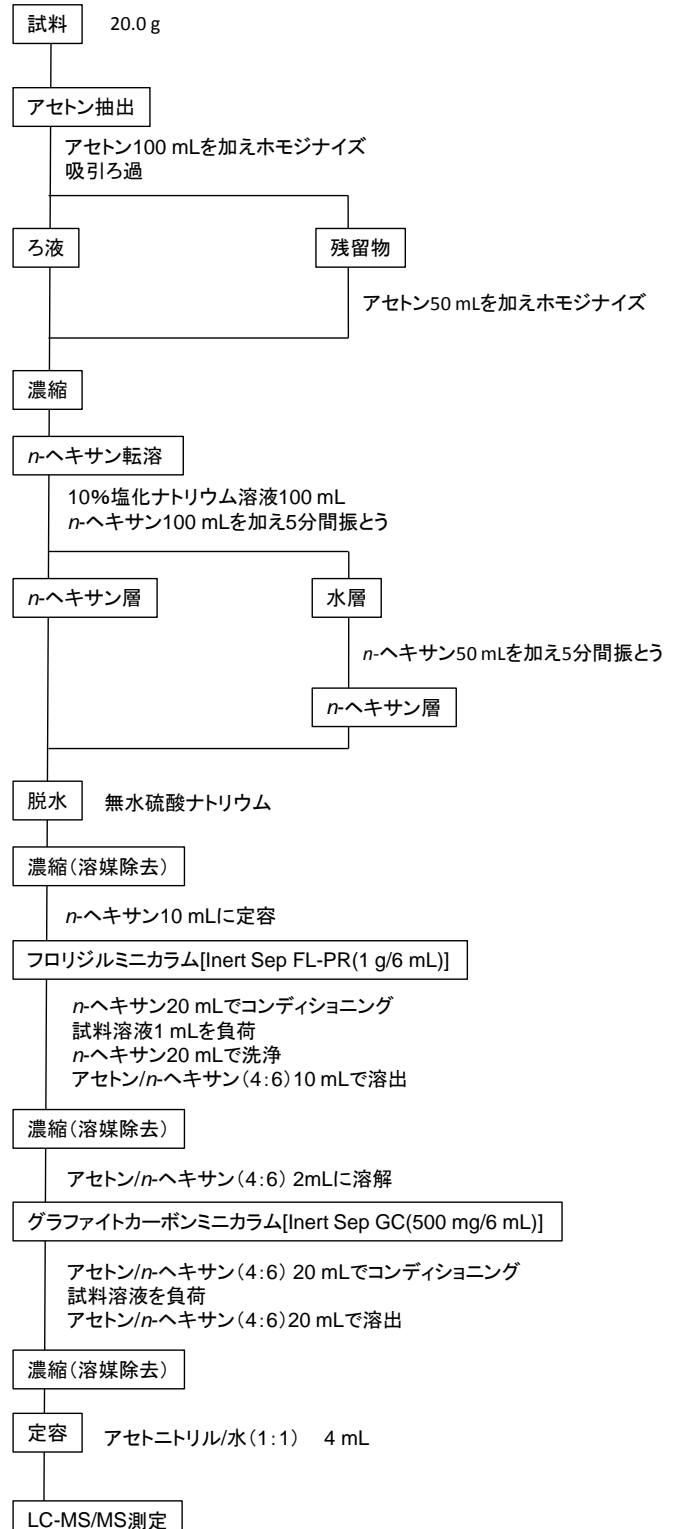
フロリジルミニカラム精製後の溶出液を濃縮し、アセトン/*n*-ヘキサン（4：6）2 mL に溶解した。これをグラファイトカーボンミニカラムに負荷し、アセトン/*n*-ヘキサン（4：6）20 mL で溶出し、溶出液を溶媒除去した。この残留物をアセトニトリル/水（1：1）で正確に 4 mL としたものを試験溶液とした。

[分析法フローチャート]

希釈法



追加精製法



3. 添加回収試験

希釈法および追加精製法により n=5 にて添加回収試験を行った。添加回収試験における回収率 100% 相当の溶媒標準溶液、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 26 及び図 27 に示した。また、ブランク試料のフルスキャン測定によるトータルイオンクロマトグラムを図 28 に、プロダクトスキャン測定によるトータルイオンクロマトグラムを図 29 に示した。

(1) 選択性

選択性の検討結果を表 15 に示した。いずれの方法においてもジニコナゾールの定量を妨害するピークは認められなかった。

表 15 選択性の評価

担当機関: 東京顕微鏡院

試験方法	食品名	定量限界 (mg/kg)	基準値 ^{*1} (ppm)	添加濃度 ^{*2} (ppm)	妨害ピークの許容範囲		ピーク面積 ^{*3}			選択性の評価 ^{*5}	備考		
					評価対象濃度 (ppm)	判定基準	面積又は高さの別	ブランク試料 (a)	標準溶液 ^{*4} (b)			面積(高さ)比 (a)/(b)	
希釈法	ほうれんそう	0.01	0.01	0.01	***	0.01	<	面積	0	3658	0.000	○	
追加精製法	ほうれんそう	0.01	0.01	0.01	***	0.01	<	面積	0	46550	0.000	○	

- *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

真度及び併行精度の検討結果を表 16 に示した。真度は希釈法 106.1%、追加精製法 102.9%、併行精度は希釈法 5.0%、追加精製法 2.0%であり、いずれの方法においても真度 70~120%、併行精度<25% という目標値を満足した。また、S/N 比の平均値は希釈法 109.8、追加精製法 744.8 であり、いずれの方法においても S/N ≥ 10 を満足した。

表 16 真度、精度及び定量限界の評価

担当機関: 東京顕微鏡院

試験方法	食品名	定量限界 (mg/kg)	基準値 ^{*1} (ppm)	添加濃度 (ppm)	定量限界の評価 ^{*2}	検量線			回収率 (%)					真度 (%)	併行精度 (RSD%)	S/N比 ^{*3}			備考
						傾き	切片	r ² 値	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5			Max.	Min.	平均値	
希釈法	ほうれんそう	0.01	0.01	0.01		9120	413	0.9986	110.9	97.2	106.6	109.6	106.1	106.1	5.0	112.3	107.3	109.8	
追加精製法	ほうれんそう	0.01	0.01	0.01		9640	1550	0.9980	102.5	105.9	103.1	103.0	100.0	102.9	2.0	836.6	653.0	744.8	

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

(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 17 に示した。添加回収試験における回収率 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の溶媒標準溶液に対するピーク面積比を求めた。面積比は希釈法 1.06、追加精製法 1.05 であり、いずれもマトリックスの測定への影響はほとんどみられなかった。

添加回収試験における真度を表 17 で求めたピーク面積比で除して補正真度を求め、表 18 に示した。補正真度は希釈法 100.1%、追加精製法 98.0%であり、試料マトリックスの影響を考慮した場合でも目標値 70~120%を満足した。

表 17 試料マトリックスの測定への影響

担当機関:東京顕微鏡院

試験方法	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 ^{*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 比 ^{*6}	
								n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均		
希釈法	ほうれんそう	0.01	0.01	0.01	0.0004	面積	0	3658	3260	3459.0	3273	3248	3260.5	1.06	
追加精製法	ほうれんそう	0.01	0.01	0.01	0.005	面積	0	46550	43960	45255.0	43880	42190	43035.0	1.05	

*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。

表 18 補正真度

試験方法	真度 (%)	補正真度 (%)
希釈法	106.1	100.1
追加精製法	102.9	98.0

考察

- ほうれんそうについて、希釈法及び追加精製法のいずれの方法においても試験可能であることが示された。しかし希釈法は操作が煩雑であるという問題や、通常の果実及び野菜の試験法と希釈倍率が異なることにより、装置によっては挙動が変わってしまう可能性や感度不足になる可能性が考えられる。したがって、フロリジルミニカラムのみで精製不十分な場合には、追加精製を行うことが望ましいと考えられる。
- 以上の結果をふまえ、ジニコナゾール試験法(農産物)通知案の「2) 注意点」に以下の文章を追記する。

③野菜及び果実において色素等の精製が不十分な場合は、以下に示した方法により、グラファイトカーボンクロマトグラフィーを用いた追加精製が有効である。

グラファイトカーボンミニカラム(500 mg)にアセトン及び *n*-ヘキサン(2:3)混液 20 mL を注入し、流出液は捨てる。合成ケイ酸マグネシウムミニカラム(1,000 mg) 精製後の溶出液を 40°C 以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物をアセトン及び *n*-ヘキサン(2:3)混液 2 mL に溶解し、グラファイトカーボンミニカラムに注入する。次いで、アセトン及び *n*-ヘキサン(2:3)混液 20 mL を注入し、溶出液を 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水(1:1)混液に溶解し、正確に 4 mL としたものを試験溶液とする。なお、茶の方法を用いて精製することも可能である。

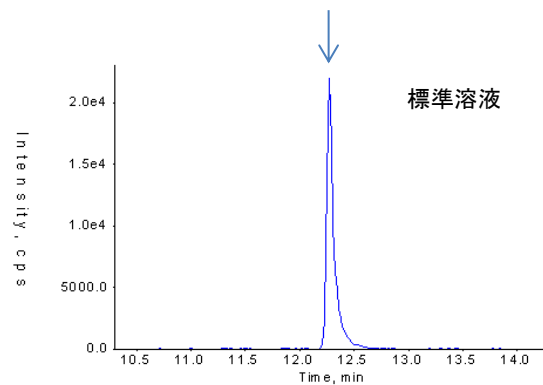
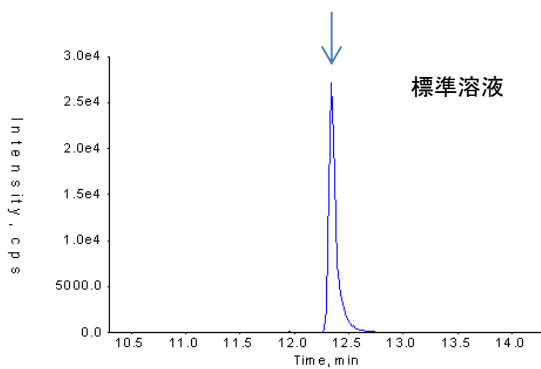
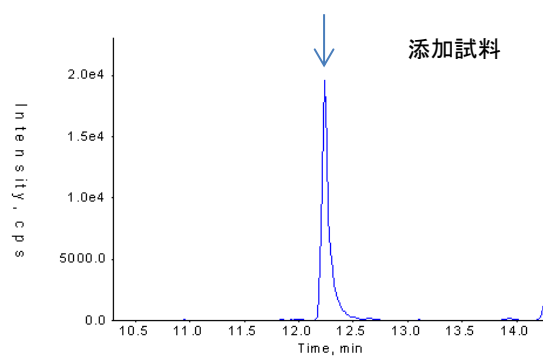
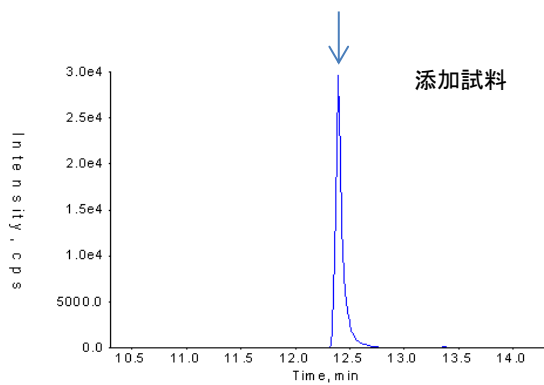
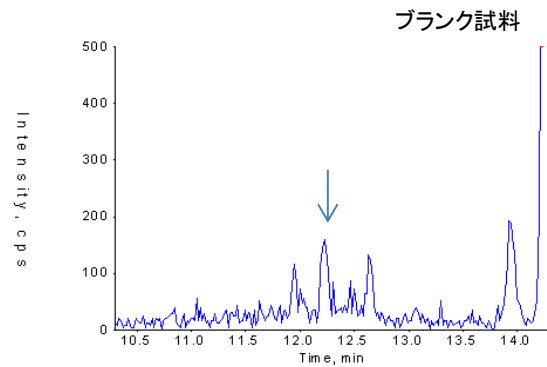
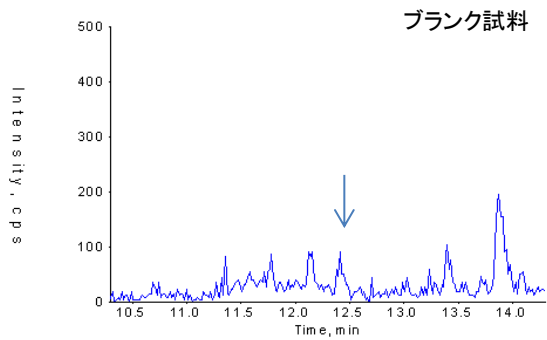


図5 玄米の SRM クロマトグラム
 ($m/z + 326.2 \rightarrow 70.1$)
 試料中 0.01 ppm 相当

図6 大豆の SRM クロマトグラム
 ($m/z + 326.2 \rightarrow 70.1$)
 試料中 0.01 ppm 相当

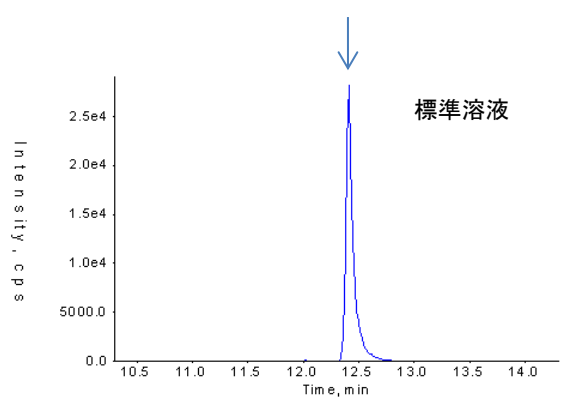
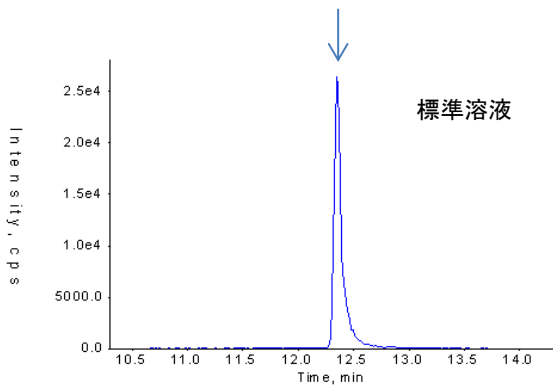
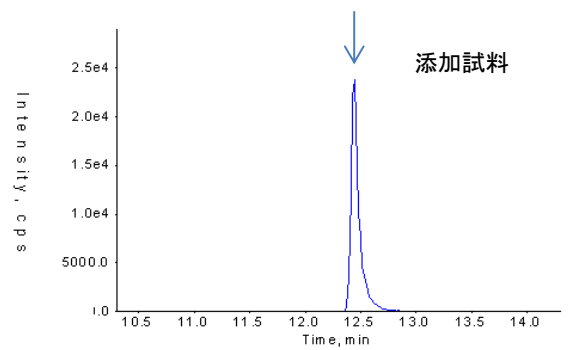
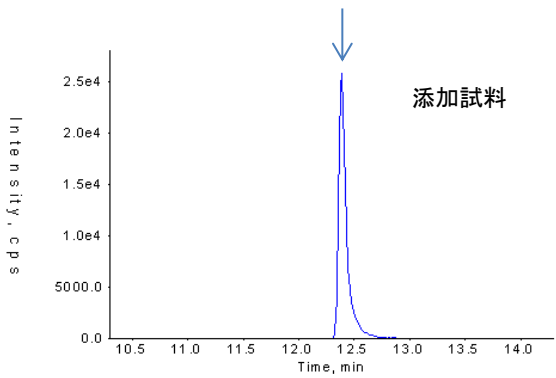
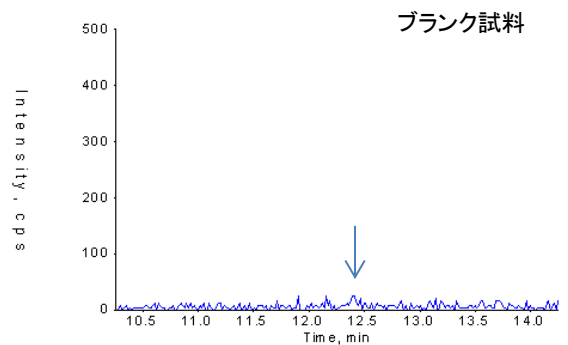
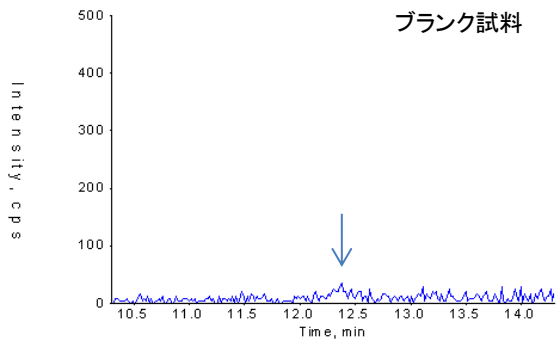


図7 ほうれんそう SRM クロマトグラム
($m/z + 326.2 \rightarrow 70.1$)
試料中 0.01 ppm 相当

図8 キャベツの SRM クロマトグラム
($m/z + 326.2 \rightarrow 70.1$)
試料中 0.01 ppm 相当

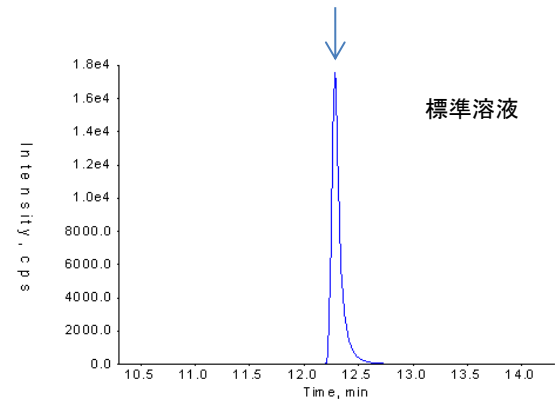
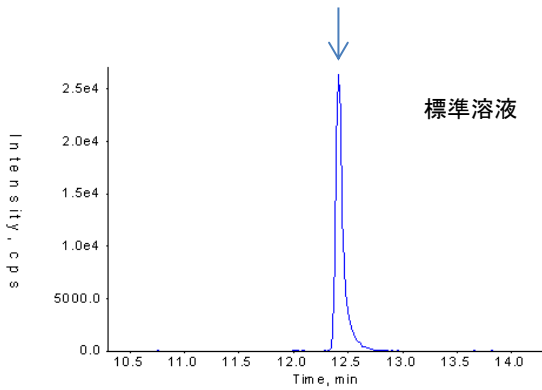
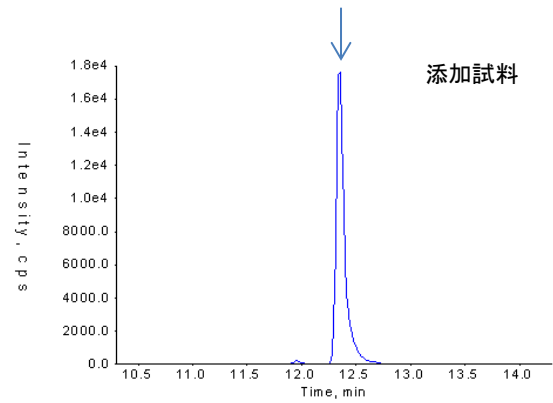
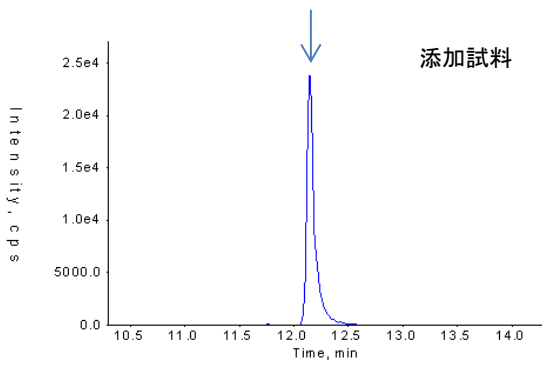
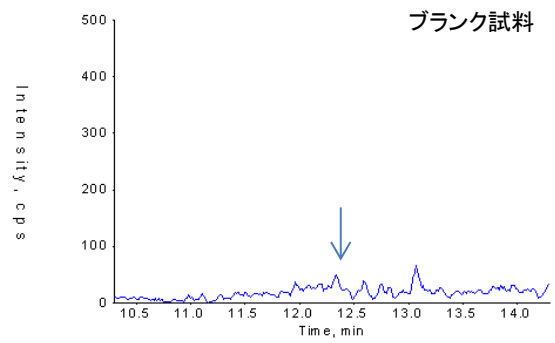
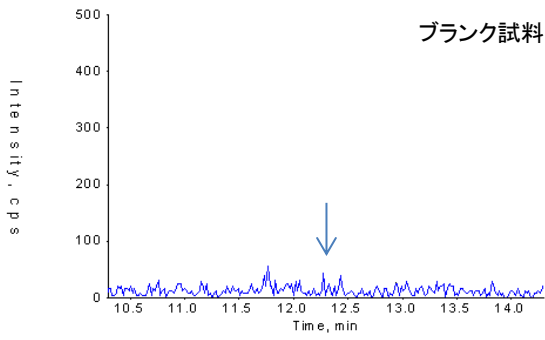


図9 ばれいしょのSRMクロマトグラム
($m/z + 326.2 \rightarrow 70.1$)
試料中 0.01 ppm 相当

図10 オレンジのSRMクロマトグラム
($m/z + 326.2 \rightarrow 70.1$)
試料中 0.01 ppm 相当

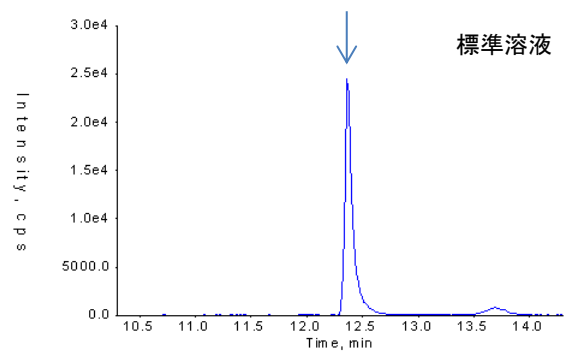
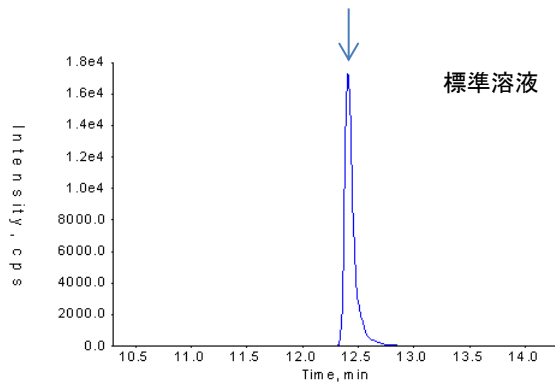
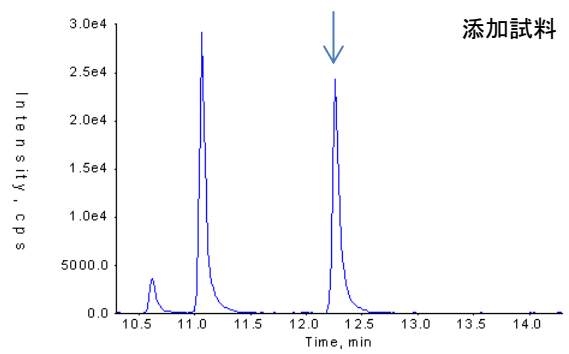
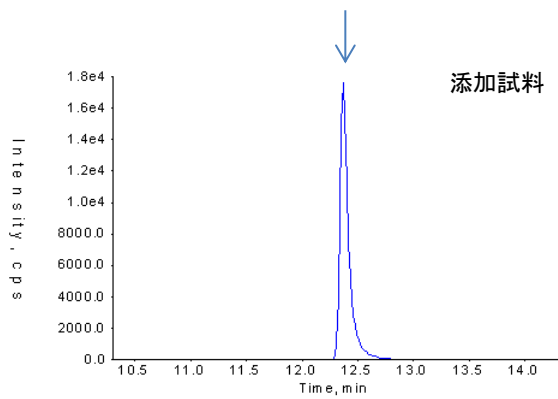
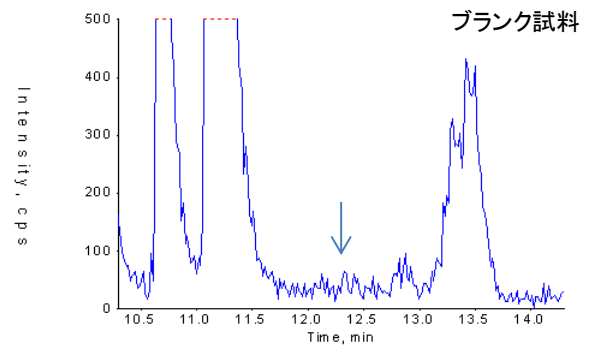
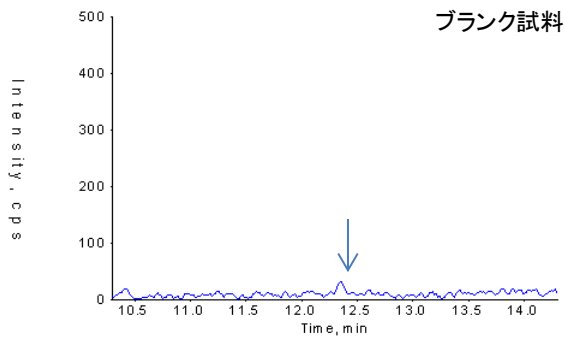


図 11 りんごの SRM クロマトグラム
($m/z + 326.2 \rightarrow 70.1$)
試料中 0.01 ppm 相当

図 12 緑茶の SRM クロマトグラム
($m/z + 326.2 \rightarrow 70.1$)
試料中 0.01 ppm 相当

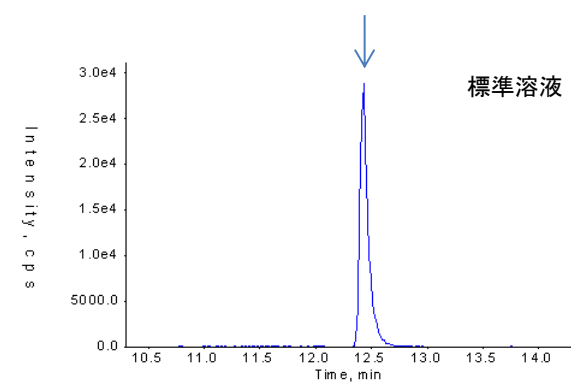
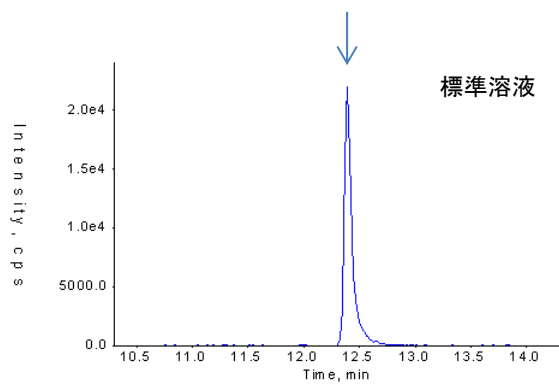
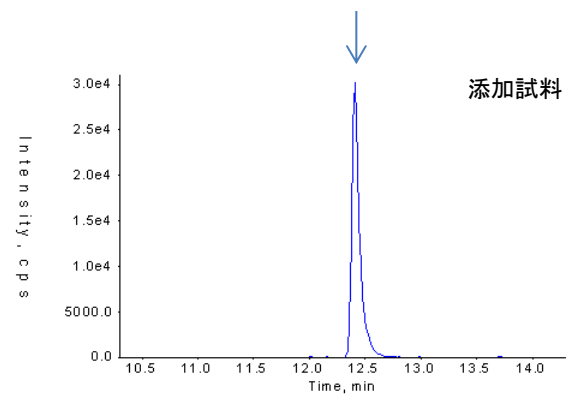
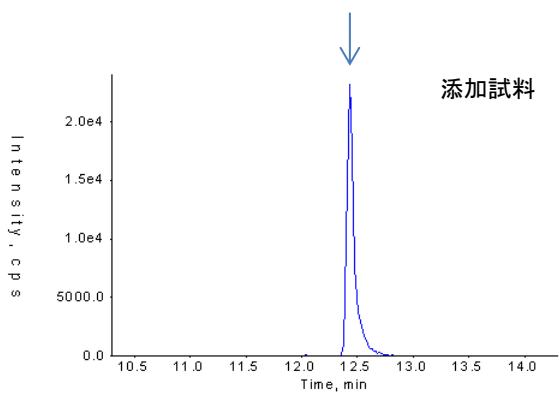
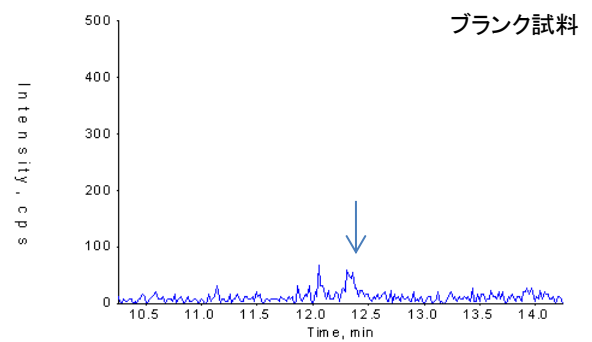
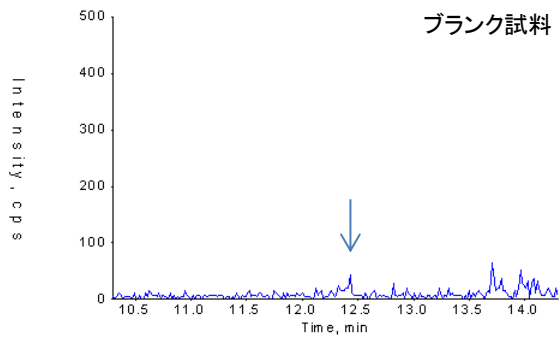


図 13 牛の筋肉の SRM クロマトグラム
($m/z + 326.2 \rightarrow 70.1$)
試料中 0.01 ppm 相当

図 14 牛の脂肪の SRM クロマトグラム
($m/z + 326.2 \rightarrow 70.1$)
試料中 0.01 ppm 相当

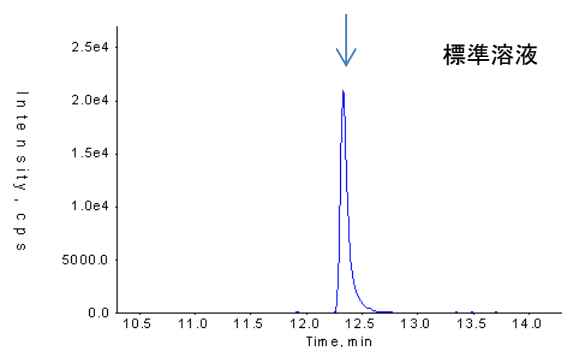
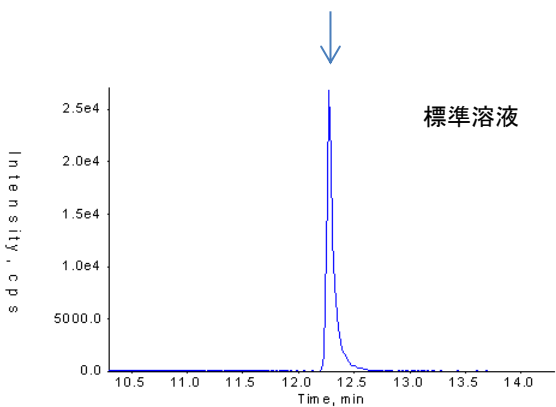
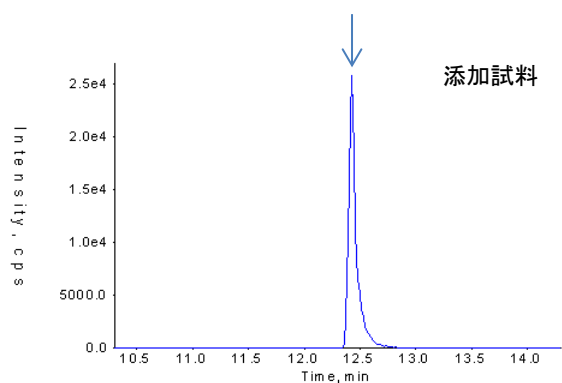
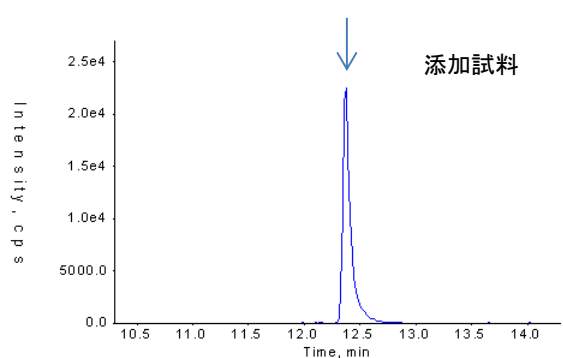
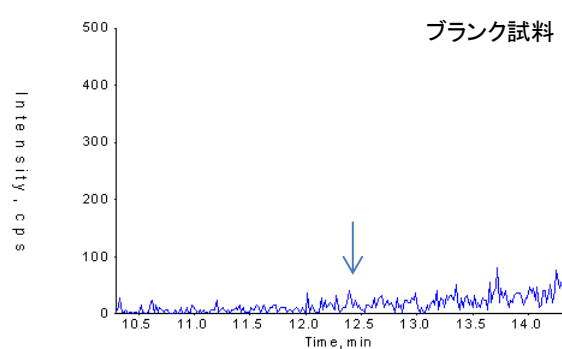
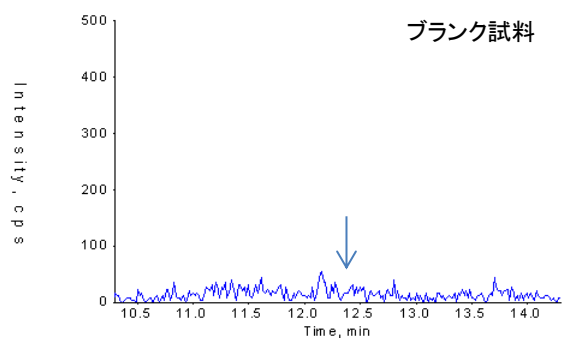


図 15 牛の肝臓の SRM クロマトグラム
($m/z + 326.2 \rightarrow 70.1$)
試料中 0.01 ppm 相当

図 16 鶏卵の SRM クロマトグラム
($m/z + 326.2 \rightarrow 70.1$)
試料中 0.01 ppm 相当

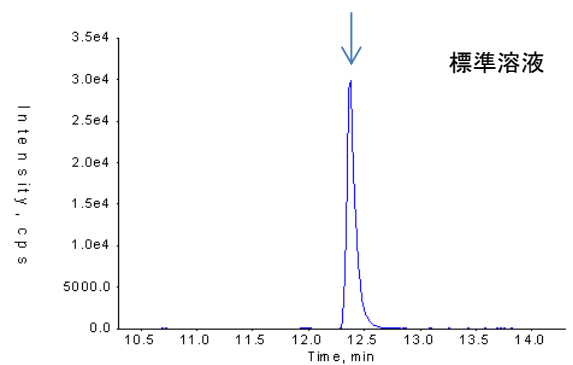
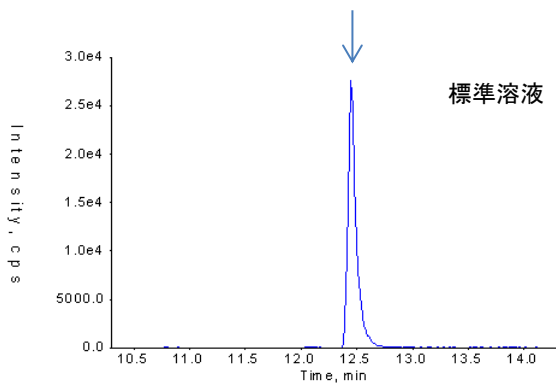
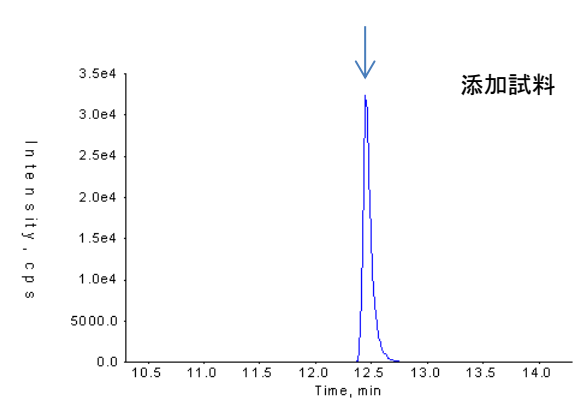
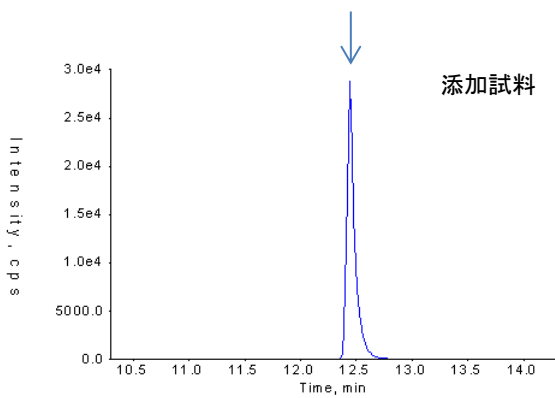
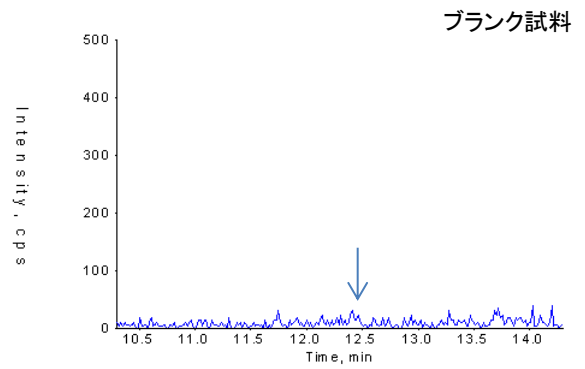
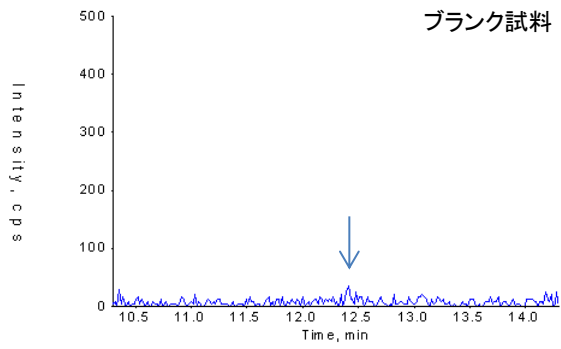


図 17 牛乳の SRM クロマトグラム
($m/z + 326.2 \rightarrow 70.1$)
試料中 0.01 ppm 相当

図 18 はちみつの SRM クロマトグラム
($m/z + 326.2 \rightarrow 70.1$)
試料中 0.01 ppm 相当

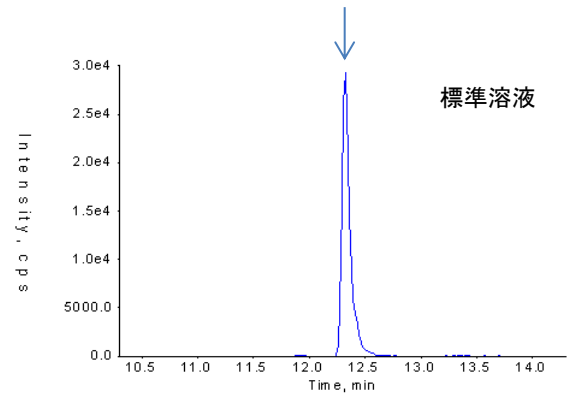
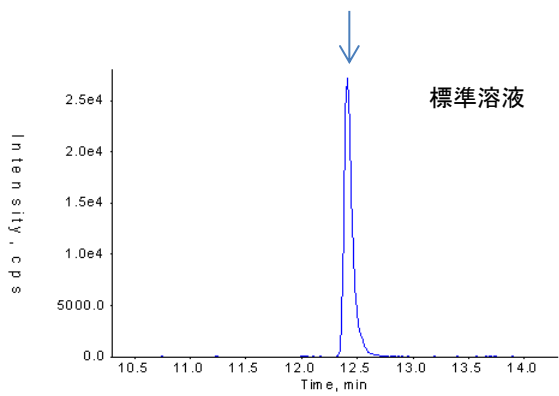
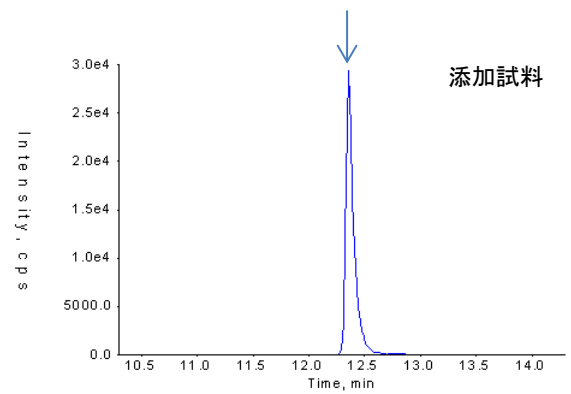
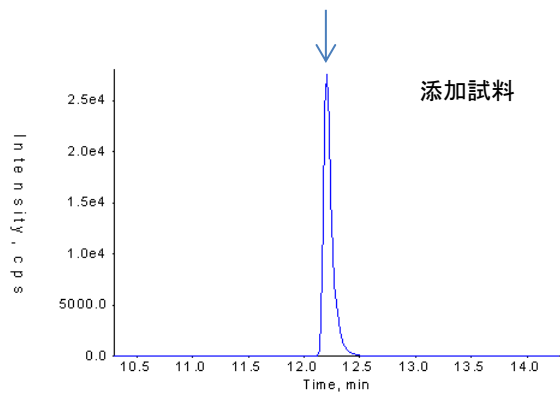
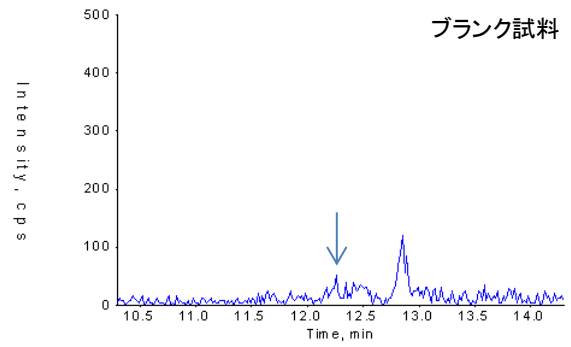
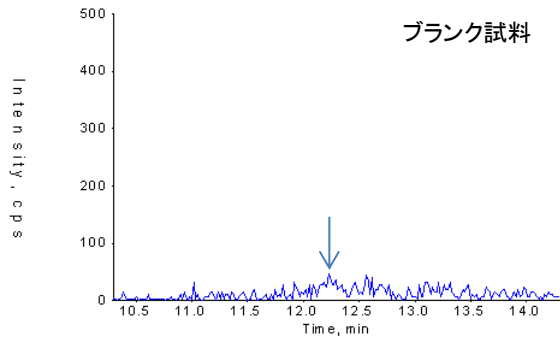


図19 うなぎのSRMクロマトグラム
($m/z + 326.2 \rightarrow 70.1$)
試料中 0.01 ppm 相当

図20 しじみのSRMクロマトグラム
($m/z + 326.2 \rightarrow 70.1$)
試料中 0.01 ppm 相当

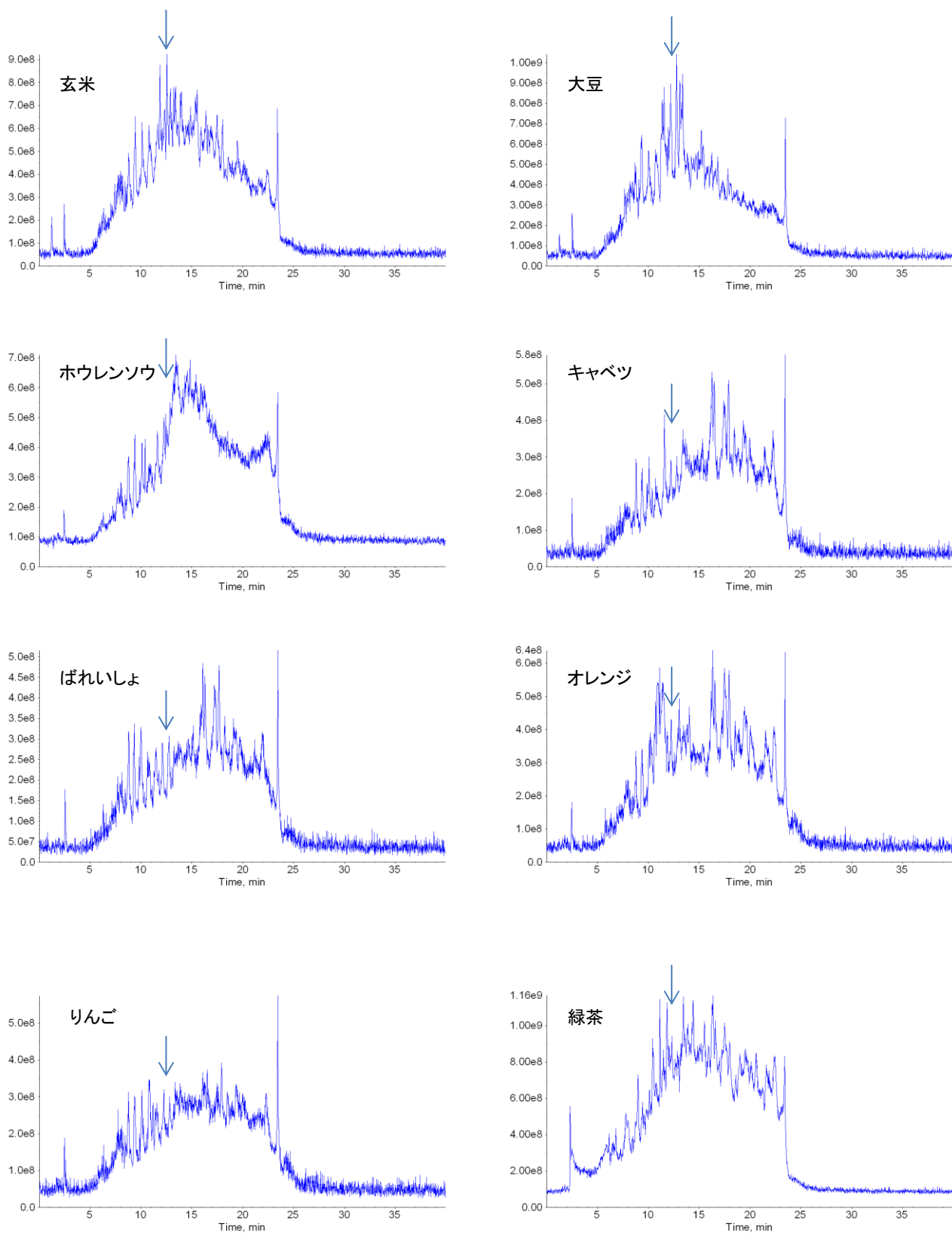


図 21 農産物ブランク試料のフルスキャン測定におけるトータルイオンクロマトグラム
(スキャン範囲：50~550 amu)

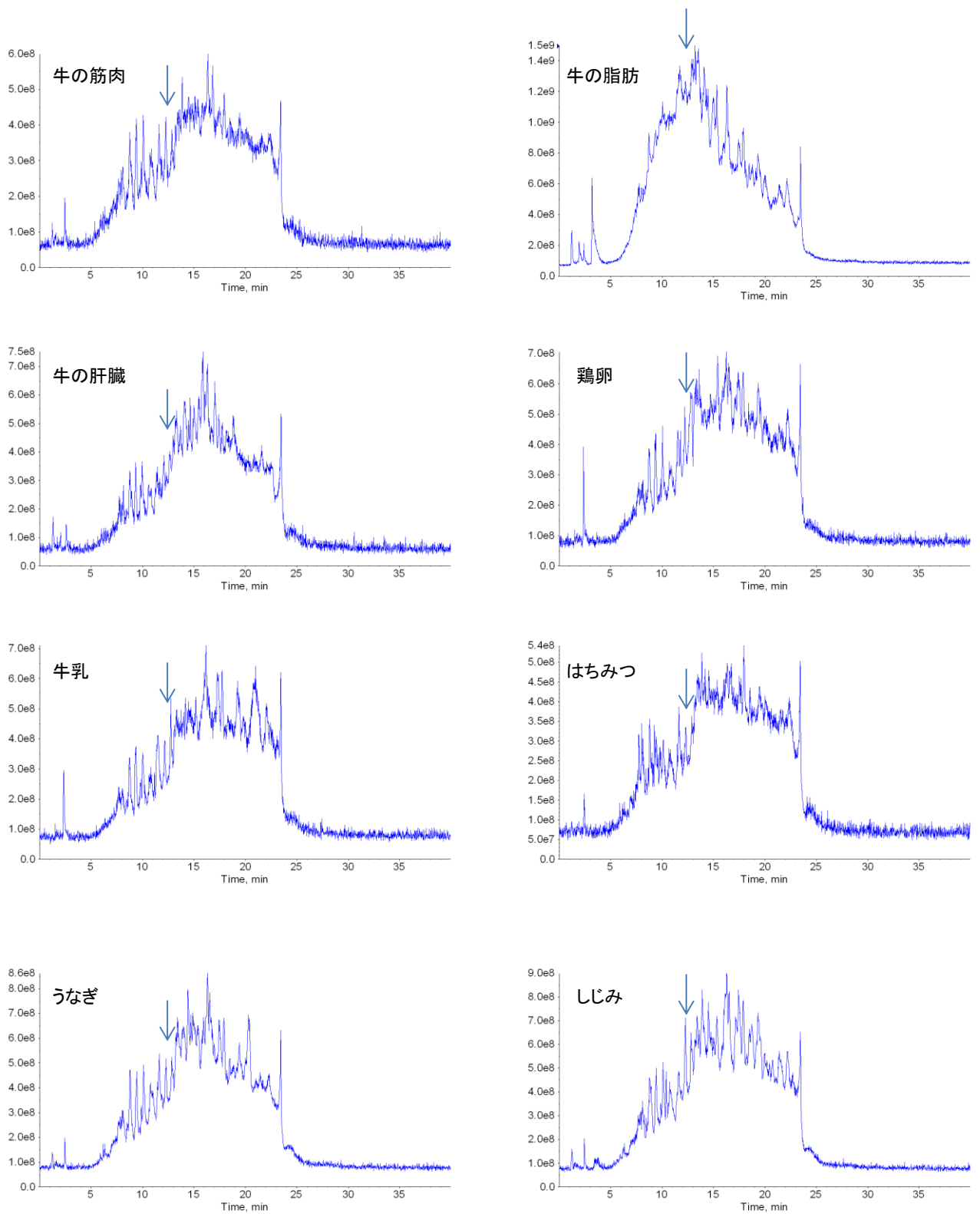


図 22 畜水産物ブランク試料のフルスキャン測定におけるトータルイオンクロマトグラム
(スキャン範囲：50～550 amu)

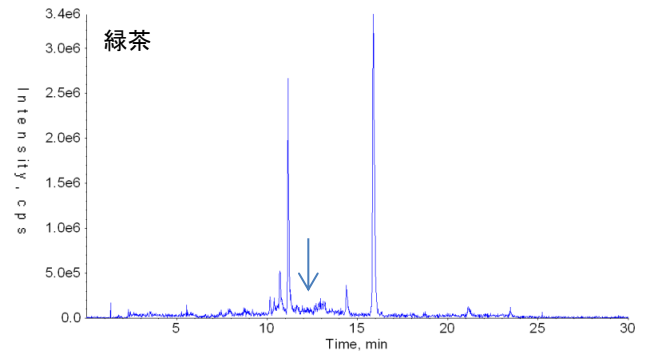
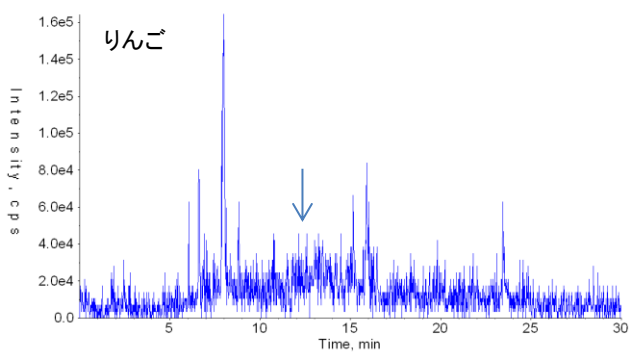
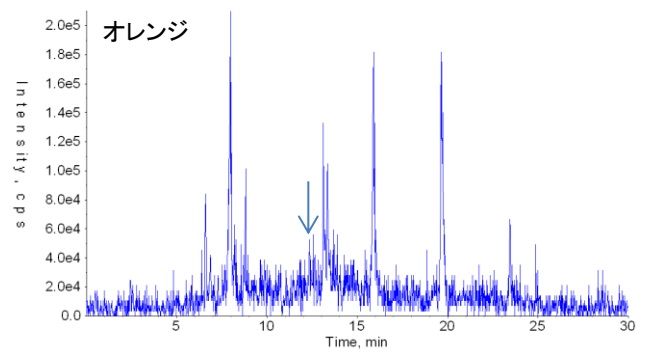
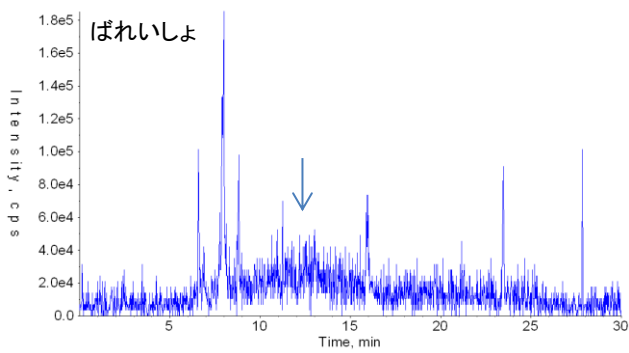
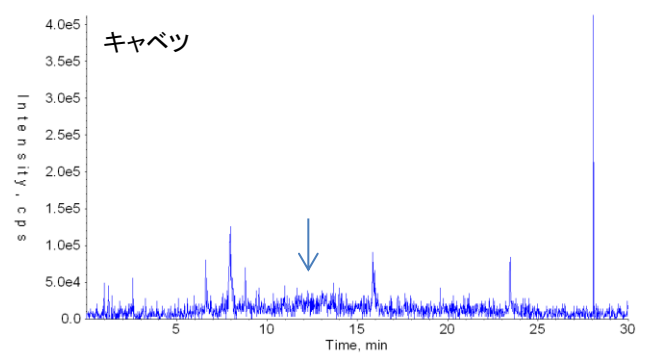
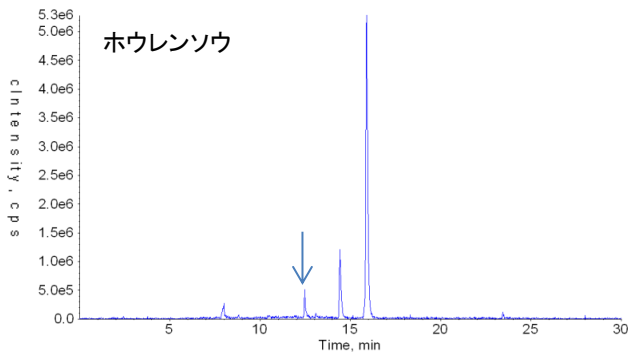
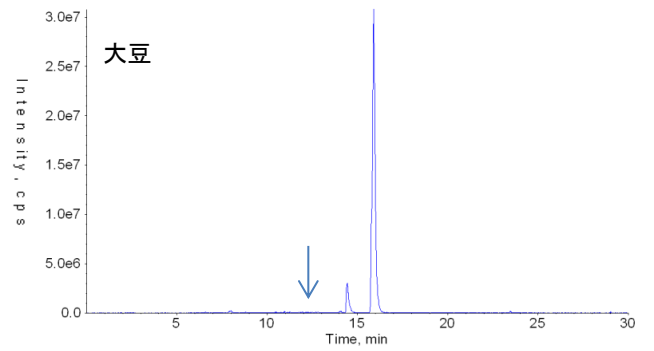
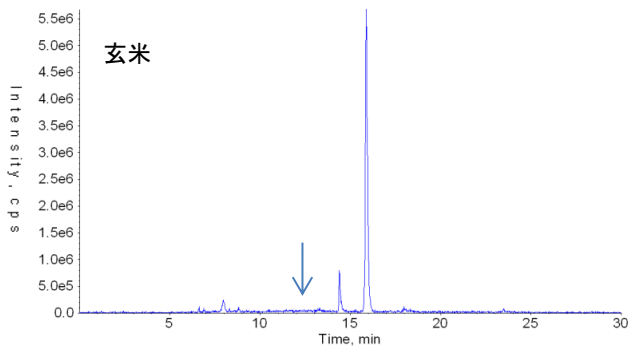


図 23 農産物空白試料のプロダクトスキャン測定におけるトータルイオンクロマトグラム
(スキャン範囲：50~400 amu)

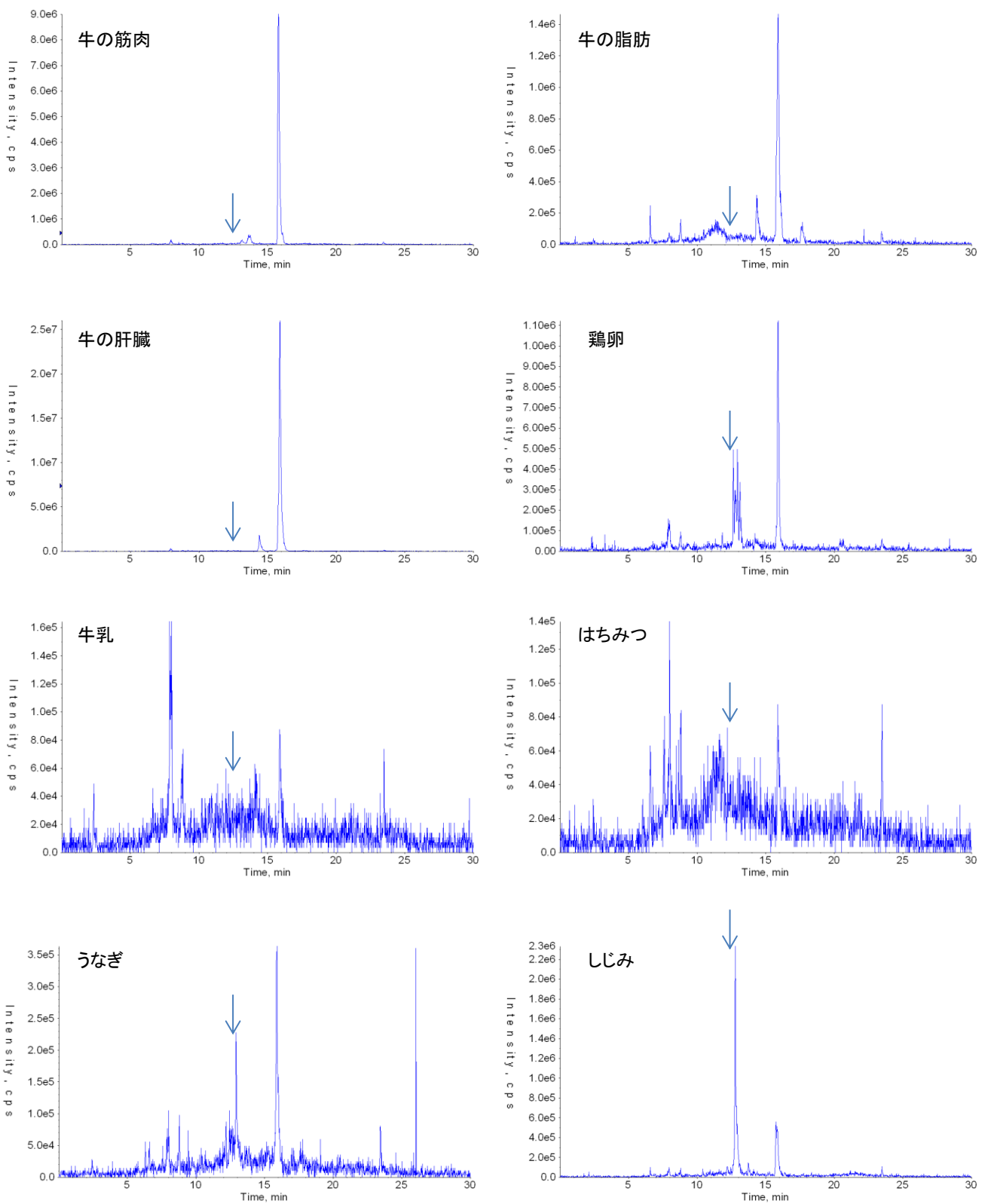


図 24 畜水産物空白試料のプロダクトスキャン測定におけるトータルイオンクロマトグラム
(スキャン範囲：50～400 amu)

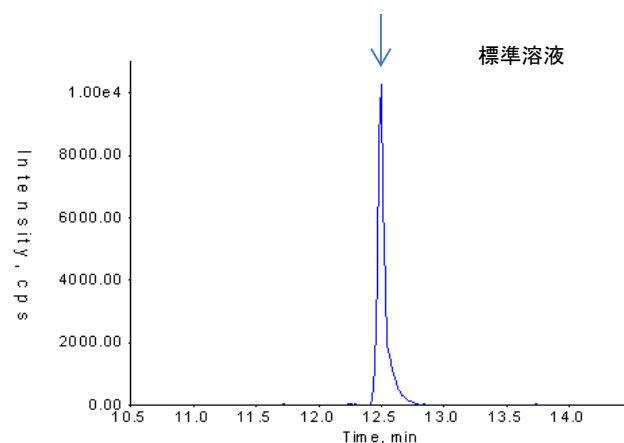
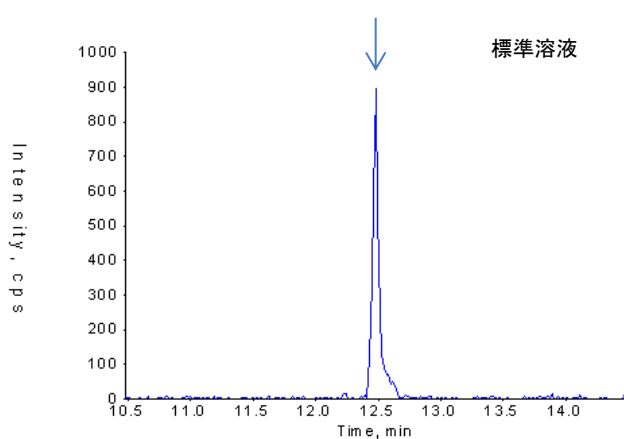
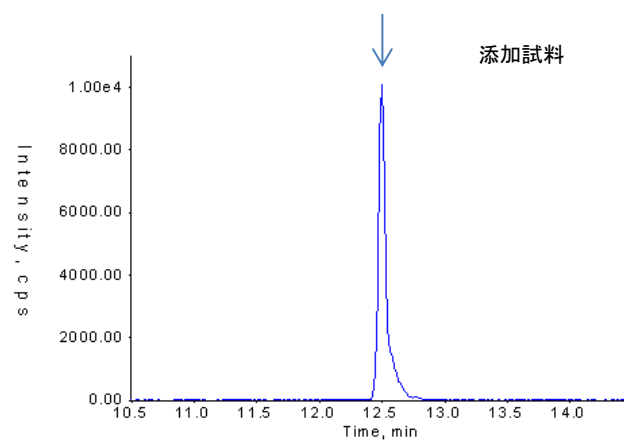
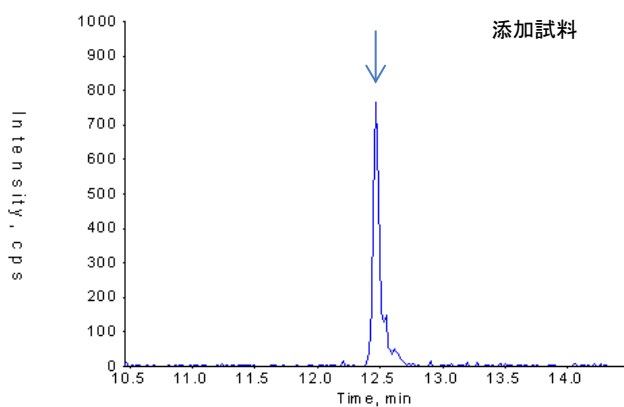
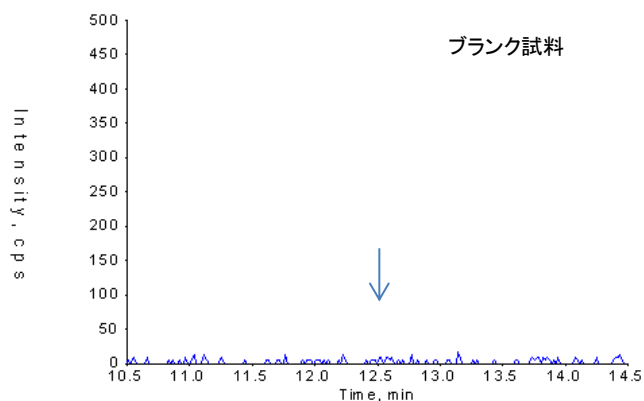
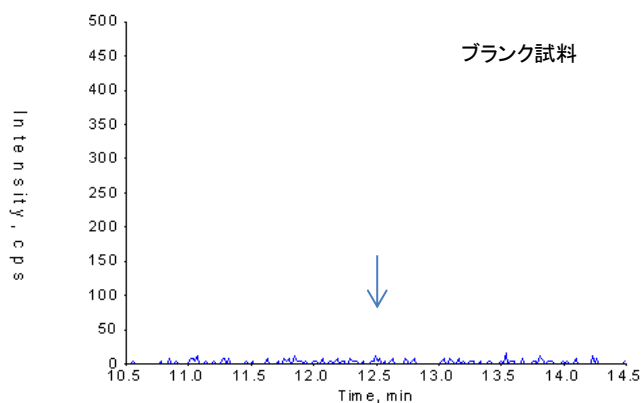


図 26 希釈法における MRM クロマトグラム
($m/z + 326.6 \rightarrow 70.1$)
試料中 0.01 ppm 相当

図 27 追加精製法における MRM クロマトグラム
($m/z + 326.6 \rightarrow 70.1$)
試料中 0.01 ppm 相当

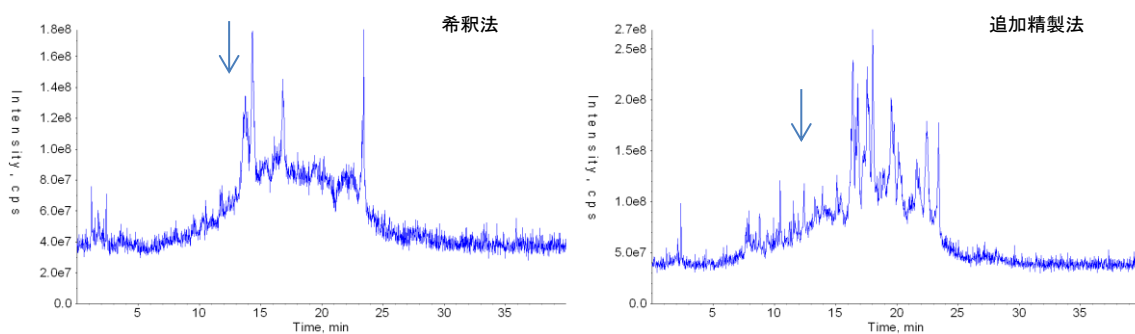


図 28 ブランク試料のフルスキャン測定におけるトータルイオンクロマトグラム
(スキャン範囲：50～400 amu)

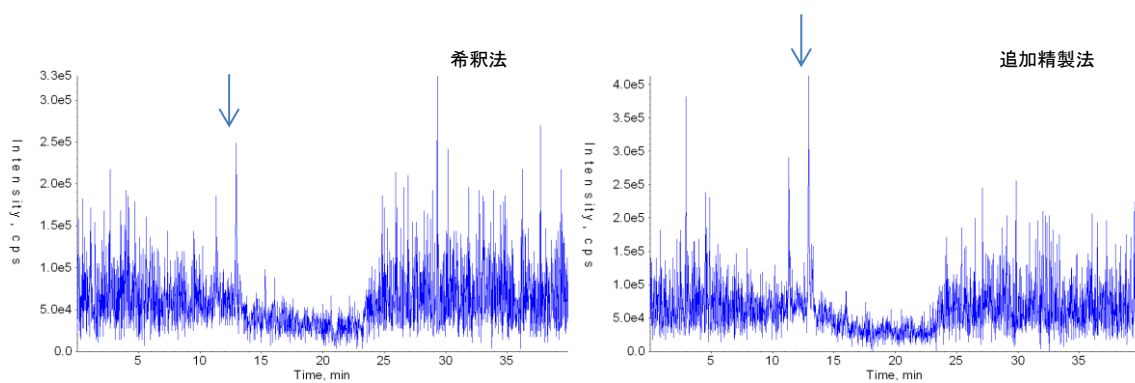


図 29 ブランク試料のプロダクトスキャン測定におけるトータルイオンクロマトグラム
(スキャン範囲：50～400 amu)