

※ 本報告書は、試験法開発における検討結果を取りまとめたものであり、試験法の実施に際しての参考としてください。なお、報告書の内容と通知又は告示試験法との間に齟齬がある場合には、通知又は告示試験法が優先することに御留意ください。

食品に残留する農薬等の成分である物質の 試験法開発事業報告書

ジチアノン試験法 (畜産物)

ジチアノン試験法（畜産物）の検討結果

[緒言]

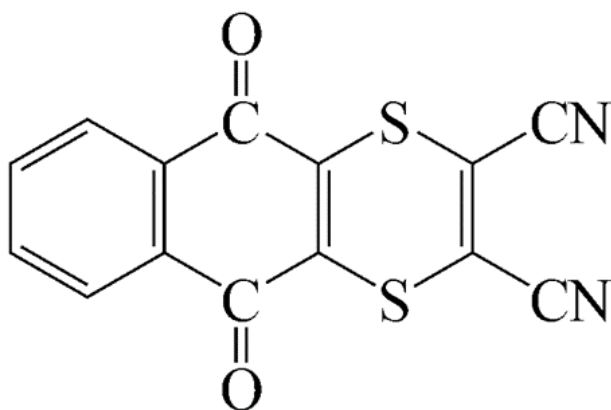
1. 目的

ジチアノンはニトリル基を有するキノン系殺菌剤であり、その作用機序は酵素タンパクなどのSH基と不可逆的に反応して、菌の代謝経路を阻害することによって殺菌作用を示すと考えられている。ジチアノンの安全性についてはJMPRでも評価されており、わが国ではADIは0.01 mg/kg体重/日（ラットの慢性毒性より得られた無毒性量1 mg/kg体重/日、及び安全係数100より算出）と設定されている。現在、農産物に対する個別試験法は通知されているが、畜産物を対象とした試験法は通知されていない。今回、畜産物の試験法を整備するために、畜産物のジチアノン試験法について検討した。

2. 対象化合物の構造式及び物理化学的性質

分析対象化合物：ジチアノン

構造式：



分子式：C₁₄H₄O₂N₂S₂

CAS No. : 3347-22-6

分子量：296.32

化学名：5,10-Dihydro-5,10-dioxonaphtho[2,3-*b*]-1,4-dithiine-2,3-dicarbonitrile (IUPAC 名)

外観：暗褐色固体、わずかなカビ臭

融点：216°C（分解を伴う）

沸点：分解のため測定不能

蒸気圧：2.71×10⁻⁹ Pa（25°C）

溶解度：水：0.27 mg/L、*n*-ヘキサン：6.34 mg/L、ジクロロメタン：2.01 g/L、アセトン：1.76 g/L、メタノール：0.08 g/L、トルエン：1.59 g/L 酢酸エチル：0.77 g/L

オクタノール/水分配係数：log Pow ≥3.50（20°C）

解離定数（pKa）：水溶解度が低い為測定不能

[出典：農薬抄録 一般名：ジチアノン¹⁾]

3. 基準値

ジチアノンの基準値を表1に示す [生食発 1031 第1号（令和元年10月31日）、抜粋]。

表1 ジチアノン基準値

食品分類名	基準値(ppm)
ピーマン	2
その他のなす科野菜	2
その他の野菜	0.2
みかん(外果皮を含む。)	5
なつみかんの果実全体	3
レモン	5
オレンジ(ネーブルオレンジを含む)	5
グレープフルーツ	5
ライム	5
その他のかんきつ類果実	5
りんご	2
日本なし	1
西洋なし	1
マルメロ	1
びわ(果梗を除き、果皮及び種子を含む。)	1
もも(果皮及び種子を含む。)	10
ネクタリン	5
あんず(アプリコットを含む)	2
すもも(プルーンを含む)	2
うめ	10
おうとう(チェリーを含む)	2
いちご	0.05
その他のベリー類果実	2
ぶどう	2
かき	1
その他の果実	0.3
アーモンド	0.05
ホップ	300
その他のスパイス	20
牛の筋肉	0.01
豚の筋肉	0.01
その他の陸棲哺乳類に属する動物の筋肉	0.01
牛の脂肪	0.01
豚の脂肪	0.01

その他の陸棲哺乳類に属する動物の脂肪	0.01
牛の肝臓	0.01
豚の肝臓	0.01
その他の陸棲哺乳類に属する動物の肝臓	0.01
牛の腎臓	0.01
豚の腎臓	0.01
その他の陸棲哺乳類に属する動物の腎臓	0.01
牛の食用部分	0.01
豚の食用部分	0.01
その他の陸棲哺乳類に属する動物の食用部分	0.01
乳	0.01
鶏の筋肉	0.01
その他の家きんの筋肉	0.01
鶏の脂肪	0.01
その他の家きんの脂肪	0.01
鶏の肝臓	0.01
その他の家きんの肝臓	0.01
鶏の腎臓	0.01
その他の家きんの腎臓	0.01
鶏の食用部分	0.01
その他の家きんの食用部分	0.01
鶏の卵	0.01
その他の家きんの卵	0.01
干しぶどう	4

[実験方法]

1. 試料

試料は埼玉県内で市販されていた 1) 牛の筋肉、2) 牛の脂肪、3) 牛の肝臓、4) 牛乳及び 5) 鶏卵を用いた。

各食品の試料採取の方法を以下に示した。

- 1) 牛の筋肉：可能な限り脂肪層を除いた試料 100 g に、重量比で 3/10 量のエタノール及び重量比で 3/10 量の 6 mol/L 塩酸を加えて磨砕均一化した。
- 2) 牛の脂肪：可能な限り筋肉層を除いた試料 100 g に、重量比で 3/10 量のエタノール及び重量比で 3/10 量の 6 mol/L 塩酸を加えて磨砕均一化した。
- 3) 牛の肝臓：試料 100 g に重量比で 3/10 量のエタノール及び重量比で 3/10 量の 6 mol/L 塩酸を加えて磨砕均一化した。
- 4) 牛乳：試料 100 g に重量比で 3/10 量のエタノール及び重量比で 3/10 量の 6 mol/L 塩酸を加えよ

く混合し均一化した。

5) 鶏卵：殻を除去し卵白と卵黄をよく混合した試料 100 g に、重量比で 3/10 量のエタノール及び重量比で 3/10 量の 6 mol/L 塩酸を加えよく混合し均一化した。

2. 試薬

標準品：ジチアノン[®]は富士フィルム和光純薬社製、純度 99.6% のものを使用した。

標準原液：標準品 50 mg を精秤し、アセトンに溶解して 50 mL としたものを標準原液 (1000 mg/L) とした。調製後は -20°C で保管した。

添加用標準溶液：標準原液をアセトンで希釈し 0.1 mg/L としたものを添加用標準溶液とした。用時調製し、使用した。

検量線用標準溶液：添加用標準溶液 0.1 mg/L をアセトニトリル、酢酸及び水 (19 : 1 : 20) 混液で希釈し、0.000125 ~ 0.00075 mg/L 濃度範囲の数点を調製したものを、検量線用標準溶液とした。用時調製し、使用した。

アセトニトリル、酢酸及び水 (6 : 1 : 13) 混液：アセトニトリル 300 mL、酢酸 50 mL 及び水 650 mL を混合した。

アセトニトリル及び酢酸 (19 : 1) 混液：アセトニトリル 950 mL 及び酢酸 50 mL を混合した。

アセトニトリル、メタノール及び蒸留水は高速液体クロマトグラフィー用 (富士フィルム和光純薬社製) を、*n*-ヘキサンは残留農薬・PCB 試験用 (関東化学社製) を、アセトンは残留農薬試験・PCB 試験用 (富士フィルム和光純薬社製) を、その他の試薬はすべて特級品を用いた。

ろ過補助剤としてハイフロスーパーセル (富士フィルム和光純薬社製) を用いた。

精製用固相抽出カートリッジには Oasis HLB (200 mg) (Waters 社製) を用いた。Oasis HLB は、アセトニトリル及び水各 5 mL で順次、コンディショニングして使用した。

3. 装置

粉砕機：FP-25 (Cuisinart 社製)

ホモジナイザー：ヒスコトロン (マイクロテック・ニチオン社製)

遠心分離器：テーブルトップ遠心機 4000 (KUBOTA 社製)

LC-MS/MS

装置	型式	会社
MS	Xevo TQ-S	Waters
LC	ACQUITY UPLC	Waters
データ処理	MassLynx Ver.4.1	Waters

4. 測定条件

分析カラムに XBridge C18 (2.1×100 mm、粒子径 3.5 µm) (Waters 社製) を、検出には MS 検出器を用い、SRM (Selected Reaction Monitoring) モードで測定した。

LC-MS/MS の測定条件は以下のとおり (表 2、表 3)。

表 2. SRM 条件

Selected Reaction Monitoring Precursor m/z >product m/z	Dwell Time (s)	Cone Voltage (V)	Collision Energy (eV)
295.9 > 263.9 ^a	0.233	-35	-20
295.9 > 237.9 ^b	0.233	-35	-20

^a used for quantitation

^b used for confirmation.

表 3. LC-MS/MS 測定条件

LC column	XBridge C18	2.1×100 mm	3.5 μm
parameter	Settings		

LC parameters

Mobile phase
 A = water
 B = acetonitrile
 C = 0.2 vol %formic acid

Linear gradient elution

time (min)	A (%)	B (%)	C (%)
0	65	30	5
1	65	30	5
16	35	60	5
16.1	0	95	5
26	0	95	5
26.1	65	30	5

Flow rate
0.2 mL/min
 Column temperature
40 °C
 Injection volume
5 μL
 Retention time
13.4 min

AP intrface parameters^a

Ionization mode
Electrospray ionization (negative mode)
 Capillary voltage
1.50 kV
 Source temperature
150 °C
 Desolvation temperature
500 °C

Cone gas flow	150 L/hr
Desolvation gas flow	1000 L/hr
Collision gas	Argon

^aAP= Atmospheric pressure

5. 定量

ジチアノン添加用標準溶液 0.1 mg/L をアセトニトリル、酢酸及び水 (19 : 1 : 20) 混液で希釈し、0.000125~0.00075 mg/L 濃度範囲の数点を調製し、5 µL を LC-MS/MS に注入した。得られたクロマトグラムからジチアノンのピーク面積を求め、絶対検量線法で検量線を作成し、定量を行った。

6. 添加試料の調製

1) 牛の筋肉 (添加濃度 : 0.01 mg/kg) : 可能な限り脂肪層を除いた試料 100 g に、重量比で 3/10 量のエタノール及び重量比で 3/10 量の 6 mol/L 塩酸を加えて磨砕均一化後、試料 10.0 g 相当量に添加用標準溶液を 1 mL 添加し、よく混合した後、30 分間放置した。

2) 牛の脂肪 (添加濃度 : 0.01 mg/kg) : 可能な限り筋肉層を除いた試料 100 g を採り、重量比で 3/10 量のエタノール及び重量比で 3/10 量の 6 mol/L 塩酸を加えよく混合し均一化した後、試料 10.0 g 相当量を約 40°C で加温して融解させたものに添加用標準溶液を 1 mL 添加し、よく混合した後、放置 (室温) して再度凝固させた後、30 分間放置した。

3) 牛の肝臓 (添加濃度 : 0.01 mg/kg) : 試料 100 g に重量比で 3/10 量のエタノール及び重量比で 3/10 量の 6 mol/L 塩酸を加えて磨砕均一化後、試料 10.0 g 相当量に添加用標準溶液を 1 mL 添加し、よく混合した後、30 分間放置した。

4) 牛乳 (添加濃度 : 0.01 mg/kg) : 試料 100 g に重量比で 3/10 量のエタノール及び重量比で 3/10 量の 6 mol/L 塩酸を加えよく混合し均一化した後、試料 10.0 g 相当量に添加用標準溶液を 1 mL 添加し、よく混合した後、30 分間放置した。

5) 鶏卵 (添加濃度 : 0.01 mg/kg) : 殻を除去し卵白と卵黄をよく混合した試料 100 g に、重量比で 3/10 量のエタノール及び重量比で 3/10 量の 6 mol/L 塩酸を加えよく混合し均一化した後、試料 10.0 g 相当量に添加用標準溶液を 1 mL 添加し、よく混合した後、30 分間放置した。

7. 試験溶液の調製

1) 抽出

試料を正確に量り、重量比で 3/10 量のエタノール及び重量比で 3/10 量の 6 mol/L 塩酸を加えて磨砕均一化した後、試料 10.0 g に相当する量を量り採った。これにアセトン 50 mL を加えホモジナイズした後、ろ過補助剤 (ハイフロスーパーセル) を用いて吸引ろ過した。残留物にアセトン 25 mL を加えて同様に操作し、得られたろ液を合わせ、アセトンで 100 mL に定容した。この液 10 mL を正確に量り採り、窒素気流下で溶媒を除去した。残留物に *n*-ヘキサン 20 mL を加え、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 20 mL ずつで 5 分間 2 回振とう抽出した。採取したアセトニトリルを 40°C

以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物にアセトニトリル、酢酸及び水（6：1：13）混液 10 mL を加えて溶かした。

2) 精製

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（200 mg）にアセトニトリル及び水各 5 mL を順次注入し、各流出液を捨てた。このカラムに 1) で得られた溶液を注入した後、アセトニトリル、酢酸及び水（6：1：13）混液 10 mL を注入し、流出液を捨てた。次いで、アセトニトリル及び酢酸（19：1）混液 10 mL を注入し、溶出液にアセトニトリル及び酢酸（19：1）混液を加えて正確に 10 mL とし、水で 2 倍に希釈したものを試験溶液とした。

試験溶液調製法の概略を図 1 に示す。

秤 取

↓ 試料を正確に量り、重量比で 3/10 量のエタノール及び重量比で 3/10 量の 6 mol/L 塩酸を加えて磨碎均一化した後、試料 10.0 g に相当する量

アセトンで抽出

↓ アセトン 50 mL を加えホモジナイズ
↓ 吸引ろ過
↓ 残留物にアセトン 25 mL を加えホモジナイズ
↓ 吸引ろ過
↓ ろ液を合わせてアセトンで 100 mL に定容
↓ 抽出液 10 mL を窒素気流下で溶媒除去

アセトニトリル/ヘキサン分配

↓ *n*-ヘキサン 20 mL 及び *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 20 mL
↓ 振とう 5 分間
↓ アセトニトリル層を分取
↓ *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 20 mL を添加し同様に操作
↓ 分取したアセトニトリル層と先のアセトニトリル層を合わせ、減圧濃縮し溶媒を除去
↓ アセトニトリル、酢酸及び水 (6 : 1 : 13) 混液 10 mL で溶解・・・①

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

↓ アセトニトリル及び水 各 5 mL でコンディショニング
↓ ①を注入 (流出液は捨てる)
↓ アセトニトリル、酢酸及び水 (6 : 1 : 13) 混液 10 mL で洗浄
↓ アセトニトリル及び酢酸 (19 : 1) 混液 10 mL で溶出
↓ アセトニトリル及び酢酸 (19 : 1) 混液で正確に 10 mL とし、水で 2 倍に希釈したものを試験溶液とする

LC-MS/MS

図 1 試験溶液の調製手順

8. マトリックスの測定値への影響

1) ブランク溶液の調製

ジチアノンが含有されていないことを確認した試料を 7. 試験溶液の調製に従って試験溶液を作製した。

2) マトリックスの測定値への影響の検討

各検討対象食品の添加回収試験における回収率 100%相当濃度の 100 倍濃度に相当する標準液 0.05 mL の溶媒を除去した後、調製したブランク溶液 5 mL に溶解し、マトリックス添加標準溶液を作製した (添加回収試験での 100%回収率に相当する濃度)。マトリックス添加標準溶液および溶媒標準溶液を、水で 2 倍に希釈したものを試験溶液とし、ピーク面積値と比較し、試料マトリックスの測定値への影響を検討した。

[結果及び考察]

1. 測定条件の検討

1) MS 条件の検討

アセトンで 0.1 mg/L に調製した標準溶液を MS に直接導入し、MS 条件の検討を行った。ジチアノンはネガティブイオンモードでのみ測定が可能であった。コーン電圧-35V で測定したマススペクトルを以下に示す (図 2)。 m/z 295.9 のイオンが感度良く検出されたため、これをプリカーサーイオンとした。ジチアノンの m/z 295.9 のプロダクトイオンスキンの結果を示す (図 3)。 m/z 237.9、250.9、263.9 及び 266.9 がフラグメントイオンとして検出された。

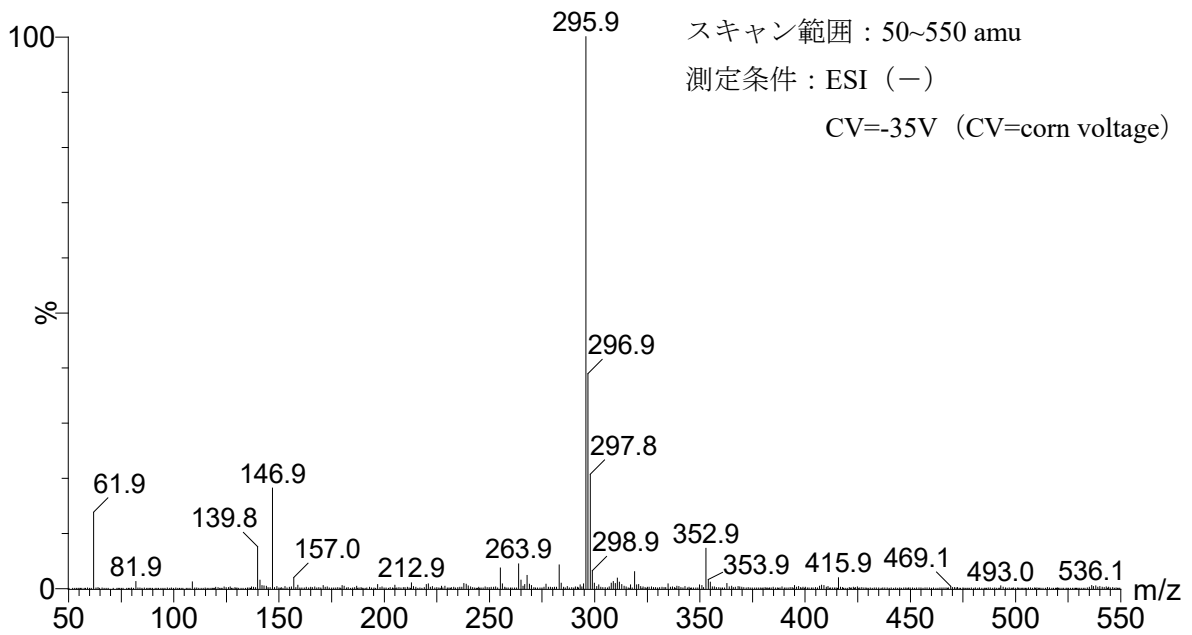


図 2 ネガティブイオンモードでのジチアノンのマススペクトル

SRM (Selected Reaction Monitoring) モード測定条件では、最も強度の高い m/z 295.9→263.9 を定量イオンに、次に強度の高い m/z 295.9→237.9 を定性イオンに採用した。それぞれのモニターイオンに最適な条件を表 2 のとおり設定した。

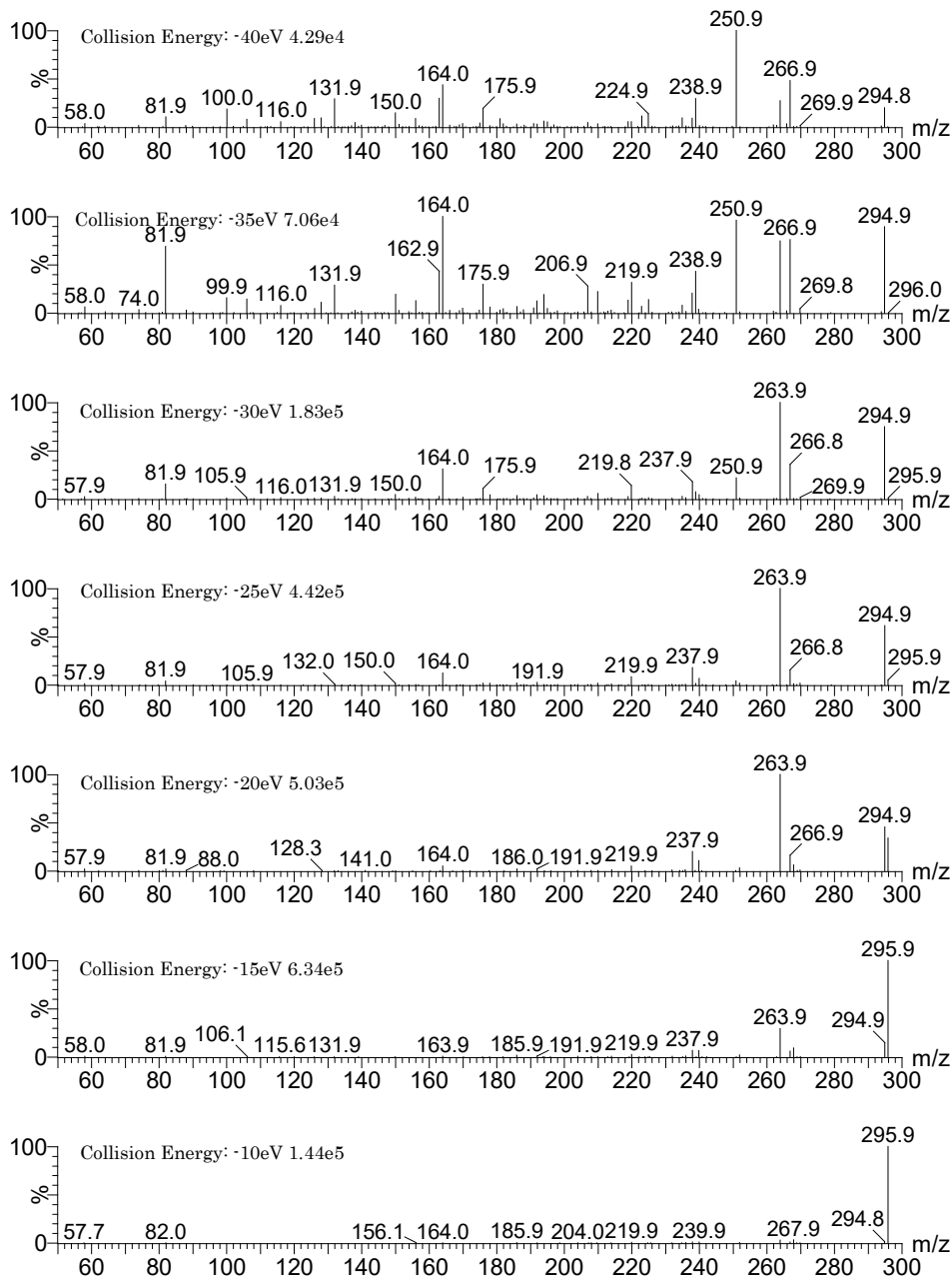


図 3 ジチアノンの m/z 295.9 のプロダクトイオンスペクトル

2) LC 条件の検討

シリカベースの逆相系カラムについて、ピーク形状や MS 検出の感度が良好なカラムを検討した。内径 2.1 mm、長さ 100 mm の L-column ODS 粒子径 3 μm ((一財) 化学物質評価研究機構製)、Atlantis T3 粒子径 3 μm 及び Xbridge C18 粒子径 3.5 μm (Waters 社製)、InertSustain C18 粒子径 3 μm (GL Sciences 社製) のカラムについて検討したところ、MS の感度 (S/N) とピーク形状が良好 (表 4) であった Xbridge C18 を採用した。

移動相への添加剤について、ギ酸、酢酸、ギ酸アンモニウム及び酢酸アンモニウムを使用し、検討を行った。アンモニウム塩を添加した場合より、酸を添加した場合の方が良好な感度（表 5）が得られた。また、感度とピーク形状から、ギ酸を添加剤に選択した。うめ作物残留試験²⁾ではギ酸濃度は 0.1 vol%であったが、カラムの劣化を抑えるため、感度が 0.1 vol%と同等であった 0.01 vol%を採用した。

有機溶媒についてメタノールとアセトニトリルを比較したところ、ピーク形状がより良好であったアセトニトリルを採用した。以上の検討結果から、表 3 の LC-MSMS 測定条件とした。

表 4 分析カラムの検討

分析カラム	ジチアノン	
	S/N	イオン強度
L-column ODS 3 μm, 2.1×100 mm	32876	1.17e7
Atlantis T3 3 μm, 2.1×100 mm	21980	4.32e6
XBridge C18 3.5 μm, 2.1×100 mm	44597	2.43e7
InertSustain C18 3 μm, 2.1×100 mm	295	8.41e6

移動相：0.01 vol%酢酸溶液及び0.01 vol%酢酸・アセトニトリル溶液（1：1）混液
測定サンプル：100 ppb ジチアノン標準溶液（アセトニトリル及び酢酸（19：1）混液にて希釈）

表 5 添加剤の比較

添加剤	濃度	ジチアノン	
		S/N	イオン強度
ギ酸	0.01 vol%	66161	1.37e7
酢酸	0.01 vol%	31740	4.48e7
ギ酸アンモニウム	5 mmol/L	2253	4.45e6
酢酸アンモニウム	5 mmol/L	1663	4.46e6

各濃度の添加剤を加えた水及び各濃度の添加剤を加えたアセトニトリル溶液（6：4）混液で開始後、（1：9）までの濃度勾配を6分間で行い、（1：9）で5分間保持。

3) 検量線

定量用イオンのピーク面積値を用いて、絶対検量線を作成した。0.000125～0.00075 mg/L の範囲で検量線を作成したところ、良好な直線性が認められた。（決定係数 (r^2): 0.9960~0.9986)。代表的な検量線を示す（図 4）。添加回収試験においては、0.000125、0.00025、0.000375、0.0005、0.000625 及び 0.00075 mg/L の標準系列を使用して、検量線を作成した。

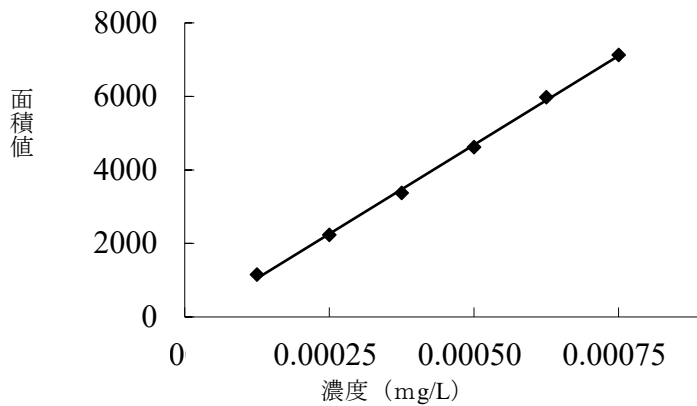


図4 ジチアノンの検量線例
濃度範囲：0.000125 ～0.00075 mg/L
 $y = 9686401x - 161 \quad r^2 = 0.9986$

2. 前処理法の検討

本分析法はうめ作物残留試験を参考にした。うめ作物残留試験では、ジチアノンを試料から塩酸酸性下アセトンで抽出し、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で精製した後、LC-MS/MS で定量及び確認する方法である。

1) 試料の前処理の検討

ジチアノンは極性溶媒中アルカリ性では極めて不安定な物質であるため、うめ作物残留試験で用いられている塩酸を加えて酸性として磨砕することとした。分析対象試料のうち、最も塩基性である鶏卵試料、また塩酸と均質化が困難である脂肪試料を用いて、エタノール及び塩酸添加によるジチアノン分解防止操作について検討を行った。

まず、塩酸添加量を検討するため、重量比で 3/10 量のエタノールを添加した試料に対し 6 mol/L 塩酸添加量によるジチアノンの回収率を 7. 試験溶液の調製に従い、溶媒検量線を用いて検討した (表 6)。鶏卵試料及び脂肪試料ともに塩酸を添加しない場合、ジチアノンは全く回収されなかった。一方、鶏卵試料では重量比 1/5 量以上の 6 mol/L 塩酸、脂肪試料では重量比 1/10 量以上の 6 mol/L 塩酸の添加により、良好な回収率が認められた。このことから、6 mol/L 塩酸の添加量は重量比で 3/10 量を採用した。

次に、重量比で 3/10 量の 6 mol/L 塩酸と牛の脂肪とを均一に混和することが可能なエタノールの添加量について検討した。その結果、6 mol/L 塩酸と重量比で等量のエタノールを加えることで、層分離することなく均質化できることが確認された。したがって、試料に重量比で 3/10 量のエタノール及び重量比で 3/10 量の 6 mol/L 塩酸を添加する操作を採用した。

最後に、融解脂肪を用いてジチアノンの回収率について検討した。試料 10.0 g を採り、約 40°C で加温して融解させたものに添加用標準溶液 1 mL を添加し、よく混合した後、放置 (室温) して再度凝固させた後、30 分間放置した。これを、重量比で 3/10 量のエタノール及び重量比で 3/10 量の 6 mol/L 塩酸を加えて磨砕均一化し、7. 試験溶液の調製に従い回収率を評価した結果、回収率は 96% (n=2) であった。

表6 塩酸添加によるジチアノンの回収率 (%)

ジチアノン	添加なし	6mol/L HCl (重量比)				
		1/10量	1/5量	3/10量	2/5量	
鶏卵	pH	8.4	0.3	0.2	測定不能	測定不能
	回収率(%)	0	55	93	99	96
牛の脂肪	pH	2.2	測定不能	測定不能	測定不能	測定不能
	回収率(%)	0	91	92	95	96

(0.01mg/kg相当量添加、n=2)

【実験方法】

7. 試験溶液の調製に従って調製した。ただし、重量比で3/10量のエタノール、重量比で0、1/10~2/5量の6 mol/L 塩酸を加えて磨砕均一化した。回収率は溶媒検量線を用いて算出した。pHは7. 試験溶液の調製に従ってアセトンで100 mLに定容したろ液を測定した。

2) 脱脂方法の検討

脱脂方法についてアセトニトリル/ヘキサン分配を検討した。実施要領ではn-ヘキサン30 mLに対してn-ヘキサン飽和アセトニトリル30 mLで3回抽出することになっている。7. 試験溶液の調製に従って調製した抽出液の一部(試料1g分相当)についてのみ精製操作を行ったことから溶媒量を20 mLに削減した。次に、アセトニトリル/ヘキサン分配の分配回数におけるジチアノンの回収率について、鶏卵試料および脂肪試料を用いて検討した(表7)。その結果、アセトニトリル/ヘキサン分配操作1回目及び2回目ではほとんどのジチアノンが回収され、3回目以降は、ジチアノンが回収されなかった。従って、アセトニトリル/ヘキサン分配を2回操作することとした。

表7 アセトニトリル/ヘキサン分配の分配回数によるジチアノンの回収率 (%)

ジチアノン	分配回数			計
	1回目	2回目	3回目	
鶏卵	99	0	0	99
牛の脂肪	97	3	0	100

(0.01mg/kg相当量添加、n=2)

【実験方法】

7. 試験溶液の調製に従って調製した。抽出液10 mLを40℃以下で濃縮し溶媒を除去し、添加用標準溶液0.1 mLを添加した。アセトニトリル/ヘキサン分配回数(1~3回目)における回収率は溶媒検量線を用いて算出し、比較した。

3) ミニカラム精製

畜産物では、脂質以外にも分析妨害物質として高級脂肪酸、高級脂肪酸エステル及び色素成分等が考えられる。これらを除去することを目的として、うめ作物残留試験で用いられているジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム(Oasis HLB (200 mg))による精製を試みた。まず、標準溶液を用いて負荷液のアセトニトリル濃度によるジチアノンの流出状況について検討を実施した(表8)。うめ作物残留試験では、負荷液を塩酸酸性下Oasis HLBに負荷し、メタノール及び酢酸(19:1)混液で溶出を行っている。本検討においても、うめ作物残留試験と同様

にジチアノンの分解を防止するために 5 vol%となるように負荷液に酢酸を添加した。アセトニトリル、酢酸及び水混液中のアセトニトリル比率が 10 : 1 : 9 以上になると、負荷液 10 mL 中にジチアノンの溶出が確認された。一方、アセトニトリル、酢酸及び水混液の比率が 6 : 1 : 13 では、負荷後に同濃度のアセトニトリル、酢酸及び水混液 30 mL で洗浄を行ってもジチアノンの溶出は認められなかった。よって、負荷液にはアセトニトリル、酢酸及び水 (6 : 1 : 13) 混液 10 mL、洗浄液にはアセトニトリル、酢酸及び水 (6 : 1 : 13) 混液 10 mL を採用することとした。

表 8 Oasis HLB(200 mg)負荷液のアセトニトリル濃度と回収率(%)

	液量 (mL)	アセトニトリル、酢酸及び水の比率			
		6:1:13	8:1:11	10:1:9	12:1:7
負荷液	10	0	0	4	71
	0~5	0	0	41	19
	5~10	0	1	27	4
溶出液	10~20	0	13	11	0
	20~30	0	31	7	0
	30~40*	85	33	0	0
合計		85	78	90	94

*アセトニトリル及び酢酸 (19 : 1) 10 mL で溶出させた。

【実験方法】

アセトニトリル、酢酸及び水 (6 : 1 : 13)、(8 : 1 : 11)、(10 : 1 : 9) 及び (12 : 1 : 7) 混液各 10 mL に添加用標準溶液 0.1 mL を添加し、アセトニトリル及び水、各 5 mL でコンディショニングしたミニカラムに負荷した。負荷液と同濃度のアセトニトリル、酢酸及び水混液、及びアセトニトリル及び酢酸 (19 : 1) 混液で溶出し、回収率を比較した。

HLB ミニカラムからの溶出条件について、標準溶液を用いて検討した (表 9)。アセトニトリル、酢酸及び水 (14 : 1 : 5) 混液から (18 : 1 : 1) では溶出液 0~20 mL でジチアノンが回収された。アセトニトリル、酢酸及び水 (19 : 1 : 0) 混液では 0~10 mL でジチアノンは回収され、次の溶出液からのジチアノンの溶出は認められなかった。

表 9 Oasis HLB(200 mg)からのジチアノンの溶出挙動 (%)

	液量(mL)	アセトニトリル、酢酸及び水の比率			
		14:1:5	16:1:3	18:1:1	19:1:0
	0~5	75	81	81	87
溶出液	5~10	6	4	3	2
	10~20	3	3	2	0
	20~30*	0	0	0	0
合計		84	88	86	89

*アセトニトリル及び酢酸 (19 : 1) 10 mL で溶出させた。

【実験方法】

アセトニトリル、酢酸及び水 (6 : 1 : 13) 混液 10 mL に添加用標準溶液 0.1 mL を添加し、アセトニトリル及び水、各 5 mL でコンディショニングしたミニカラムに負荷した。アセトニトリル、酢酸及び水 (6 : 1 : 13) 混液 10 mL で洗浄

後、アセトニトリル、酢酸及び水（14：1：5）、（16：1：3）、（18：1：1）及び（19：1：0）混液で溶出し、回収率を比較した。

次に、試料マトリックス存在下でも標準溶液と同様の溶出パターンを示すか確認するため、鶏卵及び牛の脂肪試料を用いて、HLB ミニカラムからの溶出条件について検討を実施した（表 10 及び表 11）。鶏卵試料ではアセトニトリル、酢酸及び水（14：1：5）混液から（18：1：1）で溶出液 0～20 mL でジチアノンが回収された。一方、牛の脂肪試料ではアセトニトリル、酢酸及び水（14：1：5）混液から（16：1：3）で溶出液 0～20 mL でジチアノンが回収された。鶏卵及び牛の試料ともにアセトニトリル、酢酸及び水（19：1：0）混液では 0～10 mL でジチアノンは回収され、次の溶出液からのジチアノンの溶出は認められなかった。以上の結果より、HLB ミニカラムからのジチアノンの溶出にはアセトニトリル及び酢酸（19：1）混液 10 mL を使用することとした。

標準溶液を用いた溶出挙動の検討では、どの組成においても合計値が 90%を下回ったが、試料マトリックス存在下で検討を実施した場合は合計値が改善した。これは、標準溶液を用いた検討では負荷液にアセトンを用いて検討を実施したのに対して、試料マトリックスを用いた検討では塩酸酸性下で磨砕均一化を実施したため、極性溶媒中アルカリ性で極めて不安定なジチアノンの溶出挙動に影響したことが原因と推察された。

表 10 鶏卵試料での Oasis HLB(200 mg)からのジチアノンの溶出挙動(%)

鶏卵	液量(mL)	アセトニトリル、酢酸及び水の比率			
		14:1:5	16:1:3	18:1:1	19:1:0
溶出液	0～5	80	84	88	95
	5～10	4	3	2	2
	10～20	1	1	1	0
	20～30*	1	1	0	0
合計		86	89	91	97

*アセトニトリル及び酢酸（19：1）10mLで溶出させた。

表 11 牛の脂肪試料での Oasis HLB(200 mg)からのジチアノンの溶出挙動(%)

牛の脂肪	液量(mL)	アセトニトリル、酢酸及び水の比率			
		14:1:5	16:1:3	18:1:1	19:1:0
溶出液	0～5	81	83	91	93
	5～10	6	5	3	5
	10～20	5	6	0	0
	20～30*	0	0	0	0
合計		92	94	94	98

*アセトニトリル及び酢酸（19：1）10mLで溶出させた。

【実験方法】

7. 試験溶液の調製に従って調製した。Oasis HLB(200 mg)負荷液に添加用標準溶液 0.1 mL を添加し、コンディショニングしたミニカラムに負荷した。アセトニトリル、酢酸及び水（6：1：13）混液 10 mL で洗浄後、アセトニトリル、酢

酸及び水（14：1：5）、（16：1：3）、（18：1：1）及び（19：1：0）混液で溶出し、溶媒検量線で算出した回収率を比較した。

また、HLB ミニカラム溶出液を試験溶液とする場合、ピーク形状が悪化し、リーディングが確認された。そこで、溶出液を移動相初期液（0.01 vol%ギ酸及び0.01 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液（7：3）混液）、または水で2倍に希釈し、クロマトグラムが改善されるか検討を行った。その結果、何れの溶液を用いても、ピーク形状および検出感度が良好であったことから、溶出液をより簡易な操作で測定可能な水で2倍に希釈したものを試験溶液とした。

使用するジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムについて、Oasis HLB（200 mg）（Waters 社製）、Oasis PRiME HLB（200 mg）（Waters 社製）及び InertSep HLB FF（200mg）（ジーエルサイエンス社製）を使用し、その回収率を比較した（表 12）。回収率に大きな差は認められず、何れのミニカラムの使用も可能であると考えられた。本検討では回収率も高く明らかなマトリックス効果が認められなかった Oasis HLB（200 mg）を採用した。

表 12 各種 HLB ミニカラムからのジチアノンの溶出挙動(%)

ジチアノン	Oasis HLB	Oasis PRiME HLB	InertSep HLB FF
鶏卵	98	95	97
牛の脂肪	95	92	102

(0.01mg/kg相当量添加、*n*=2)

【実験方法】

7. 試験溶液の調製に従って調製した。アセトニトリル/ヘキサン分配後に採取したアセトニトリルを 40℃以下で濃縮し、溶媒を除去した。残留物にアセトニトリル、酢酸及び水（6：1：13）混液 10 mL を加えて溶かしたものに、添加用標準溶液 0.1 mL を添加し、溶媒検量線で算出した回収率を比較した。

3. 添加回収実験

牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳及び鶏卵を用いて、7. 試験溶液の調製に従って添加回収試験を実施した。添加用標準溶液は、重量比で 3/10 量のエタノール及び重量比で 3/10 量の 6 mol/L 塩酸を加えて磨砕均一化した試料に添加した。添加回収試験で 100%回収率に相当する溶媒標準溶液、各食品のブランク溶液及び添加回収試験のクロマトグラムを図 5～図 9 に示した。また、各食品のスキャン測定による代表的なトータルイオンクロマトグラムを図 10 に示した。

1) 選択性

検討した何れの試料においても、ブランク試料にジチアノンの定量を妨害するピークは認められなかった（表 13）。

表 13 選択性の評価

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 [検出限界] (mg/kg)	基準値 (ppm)	妨害ピークの許容範囲の評 価		ピーク面積 (高さ) *1										選択性 の評価*3	備 考
					評価濃度 (ppm)	評価基準	面積又は 高さの別	ブランク			マトリックス添加標準溶液*2			面積 (高さ) 比 (a)/(b)				
								n=1	n=2	平均 (a)	n=1	n=2	平均 (b)					
	ジチアノン	牛の筋肉	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	1	1	1	989	1010	1000	0.001	○		
	ジチアノン	牛の脂肪	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	1	1	1	1904	1832	1868	0.001	○		
	ジチアノン	牛の肝臓	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	3	2	3	1704	1784	1744	0.001	○		
	ジチアノン	牛乳	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	2	4	3	746	771	759	0.004	○		
	ジチアノン	鶏卵	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	3	4	4	1175	1280	1228	0.003	○		

*1 ブランク試料、標準溶液の順に注入して測定した結果から評価する。(必要に応じて起爆注入を行う。)
 *2 試料中の濃度が「評価濃度」相当になるように、ブランク試料の試験溶液で調製した標準溶液(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。
 *3 面積(高さ)比が、妨害ピークの許容範囲の評価基準に適合する場合には「○」、適合しない場合には「×」を記載する。

2) 真度及び精度

わが国の食品衛生法では、畜産物におけるジチアノンの残留基準値は 0.01 ppm の基準値が設定されている。そこで、添加回収試験は牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳及び鶏卵試料に、定量限界値濃度を添加し、真度及び併行精度を検討した(表 14)。

表 14 真度・精度・定量限界の評価

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 [検出限 界]	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	定量限界 の評価*1	検量線		回収率 (%)					真度 (%)	併行精度 (RSD%)	S/N*2			備 考	
							傾き	切片	r ² 値	n=1	n=2	n=3	n=4			n=5	Max.	Min.		平均値
	ジチアノン	牛の筋肉	0.01	0.01	0.01	S/N	5078	-38	0.9963	99.4	97.5	96.3	92.5	93.0	95.7	3.1	307.0	204.1	255.5	
	ジチアノン	牛の脂肪	0.01	0.01	0.01	S/N	1746	44	0.9960	87.7	98.8	91.2	87.8	86.5	90.4	5.5	152.6	75.4	114.0	
	ジチアノン	牛の肝臓	0.01	0.01	0.01	S/N	4821	47	0.9975	95.3	87.3	86.8	94.3	92.6	91.3	4.3	204.1	204.1	204.1	
	ジチアノン	牛乳	0.01	0.01	0.01	S/N	4764	-92	0.9986	86.7	83.6	84.6	95.5	82.0	86.5	6.2	307.0	101.2	204.1	
	ジチアノン	鶏卵	0.01	0.01	0.01	S/N	2510	-108	0.9980	80.7	82.8	89.1	84.8	82.1	83.9	3.9	86.5	75.4	81.0	

*1 S/Nを求める必要がある場合には「S/N」と表示される。
 *2 得られた回収率の中で最大値を与えるピーク(Max.)及び最小値を与えるピーク(Min.)のそれぞれのS/Nを求める。

筋肉、脂肪、肝臓、牛乳及び鶏卵の平均回収率は 83.9~95.7%であった。また、併行精度の相対標準偏差は 3.1~6.2%であった。これらの回収率及び併行精度の相対標準偏差は、厚生労働省から通知されている「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインについて」(平成 19 年 11 月 15 日、平成 22 年 12 月 24 日改正)で示されている目標値を満足するものであった。

定量限界値濃度での添加回収試験のクロマトグラムより算出した S/N の平均値は、何れの試料においても S/N ≥ 10 を満たしていた(表 15)。

表 15 定量限界濃度での S/N

No.	分析対象化合物	食品名	定量 イオン (m/z)	定量限界 (mg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	ピークの 最大値 (Dmax)	Max.					ピーク の 最大値 (Dmax)	Min.					S/N		備 考		
								ノイズ			ピーク トップ (D)	ピーク 高さ (S)		ノイズ幅 (N)	ノイズ			ピーク トップ (D)	ピーク 高さ (S)	ノイズ 幅 (N)		Max.	Min.
								最大値 (E1)	最小値 (E2)	中央値 (C) *					最大値 (E1)	最小値 (E2)	中央値 (C) *						
	ジチアノン	牛の筋肉	296-264	0.01	0.01	0.01	247	2	0	1	246.6	245.6	0.8	247	3	0	2	246.4	244.9	1.2	307.0	204.1	
	ジチアノン	牛の脂肪	296-264	0.01	0.01	0.01	247	4	0	2	246.2	244.2	1.6	247	8	0	4	245.4	241.4	3.2	152.6	75.4	
	ジチアノン	牛の肝臓	296-264	0.01	0.01	0.01	247	3	0	2	246.4	244.9	1.2	247	3	0	2	246.4	244.9	1.2	204.1	204.1	
	ジチアノン	牛乳	296-264	0.01	0.01	0.01	247	2	0	1	246.6	245.6	0.8	247	6	0	3	245.8	245.8	2.4	307.0	101.2	
	ジチアノン	鶏卵	296-264	0.01	0.01	0.01	247	7	0	4	245.6	242.1	2.8	247	8	0	4	245.4	241.4	3.2	86.5	75.4	

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

3) 試料マトリックスの測定値への影響

添加回収濃度(定量限界値濃度)における回収率 100%相当濃度になるように調製したマトリックス添加標準溶液と溶媒標準溶液を交互に 2 回測定し、そのピーク面積比から試料マトリックスの測定への影響を評価した。ピーク面積比は 0.98~1.04 であり、検討した何れの試料においても顕著なイオン化抑制及び増強効果は低く、顕著なイオン化抑制及び増強効果は低く、許容できる範囲であると考えられた(表 16)。

表 16 試料マトリックスの測定値への影響

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 〔検出限界〕 (mg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	標準溶液 濃度*1 (mg/L)	ピーク面積 (高さ) *2									備考
							面積又は 高さの別	ブランク *3	マトリックス添加標準溶液*4			溶媒標準溶液			ピーク面積 (高さ) 比*5	
									n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均		
	ジチアノン	牛の筋肉	0.01	0.01	0.01	0.001	面積	8	1057	1016	1029	1000	1012	1006	1.02	
	ジチアノン	牛の脂肪	0.01	0.01	0.01	0.001	面積	1	2068	1906	1986	2015	2029	2022	0.98	
	ジチアノン	牛の肝臓	0.01	0.01	0.01	0.001	面積	4	1790	1799	1791	1787	1688	1738	1.03	
	ジチアノン	牛乳	0.01	0.01	0.01	0.001	面積	7	1052	1068	1053	1016	1000	1008	1.04	
	ジチアノン	鶏卵	0.01	0.01	0.01	0.001	面積	2	1280	1213	1245	1169	1228	1199	1.04	

*1 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。

*2 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。）

*3 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。

*4 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。

*5 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。

①添加回収試験における代表的なクロマトグラム

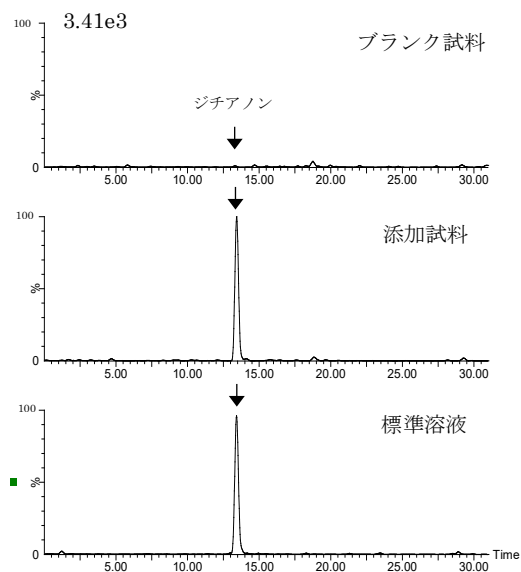


図 5 牛の筋肉の SRM クロマトグラム
(m/z 295.9→263.9)
添加濃度 : 0.01 ppm

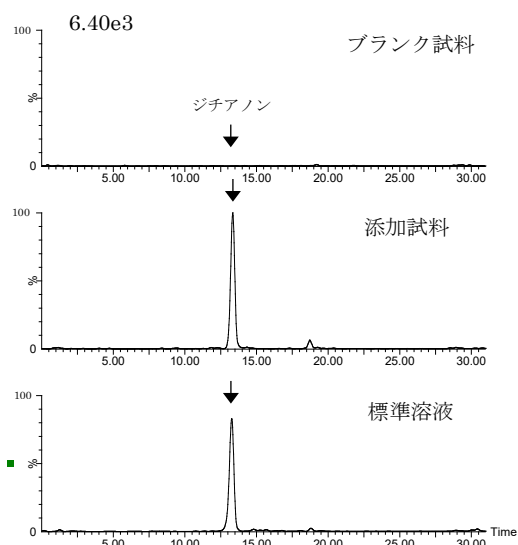


図 6 牛の脂肪の SRM クロマトグラム
(m/z 295.9→263.9)
添加濃度 : 0.01 ppm

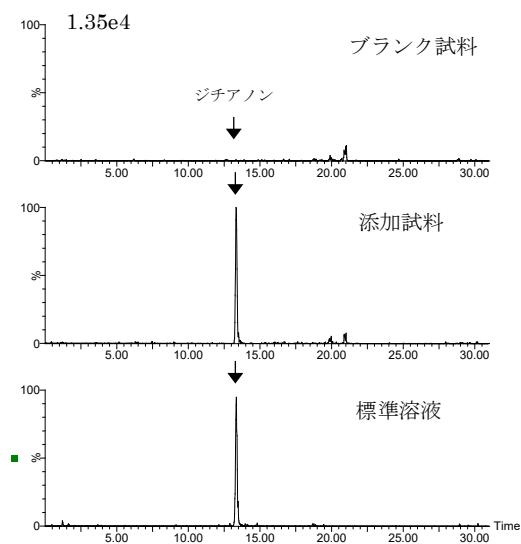


図 7 牛の肝臓の SRM クロマトグラム
(m/z 295.9→263.9)
添加濃度 : 0.01 ppm

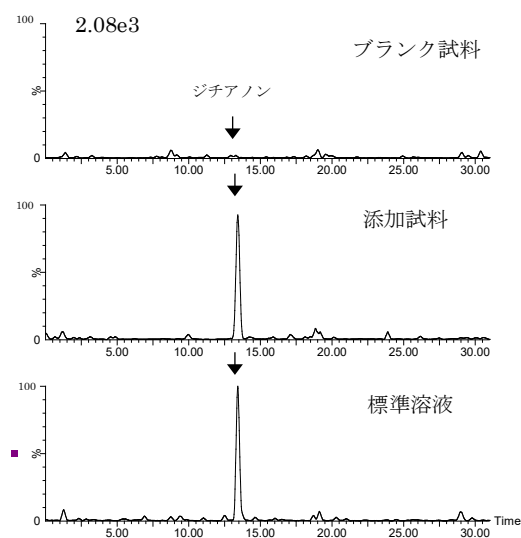


図 8 牛乳の SRM クロマトグラム
(m/z 295.9→263.9)
添加濃度 : 0.01 ppm

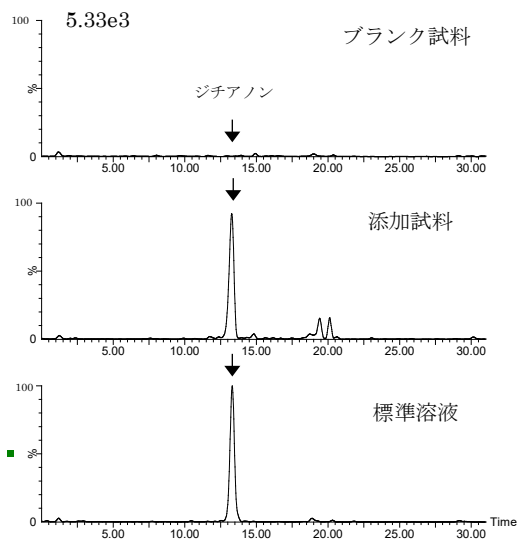


図 9 鶏卵の SRM クロマトグラム
 (m/z 295.9→263.9)
 添加濃度 : 0.01 ppm

②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

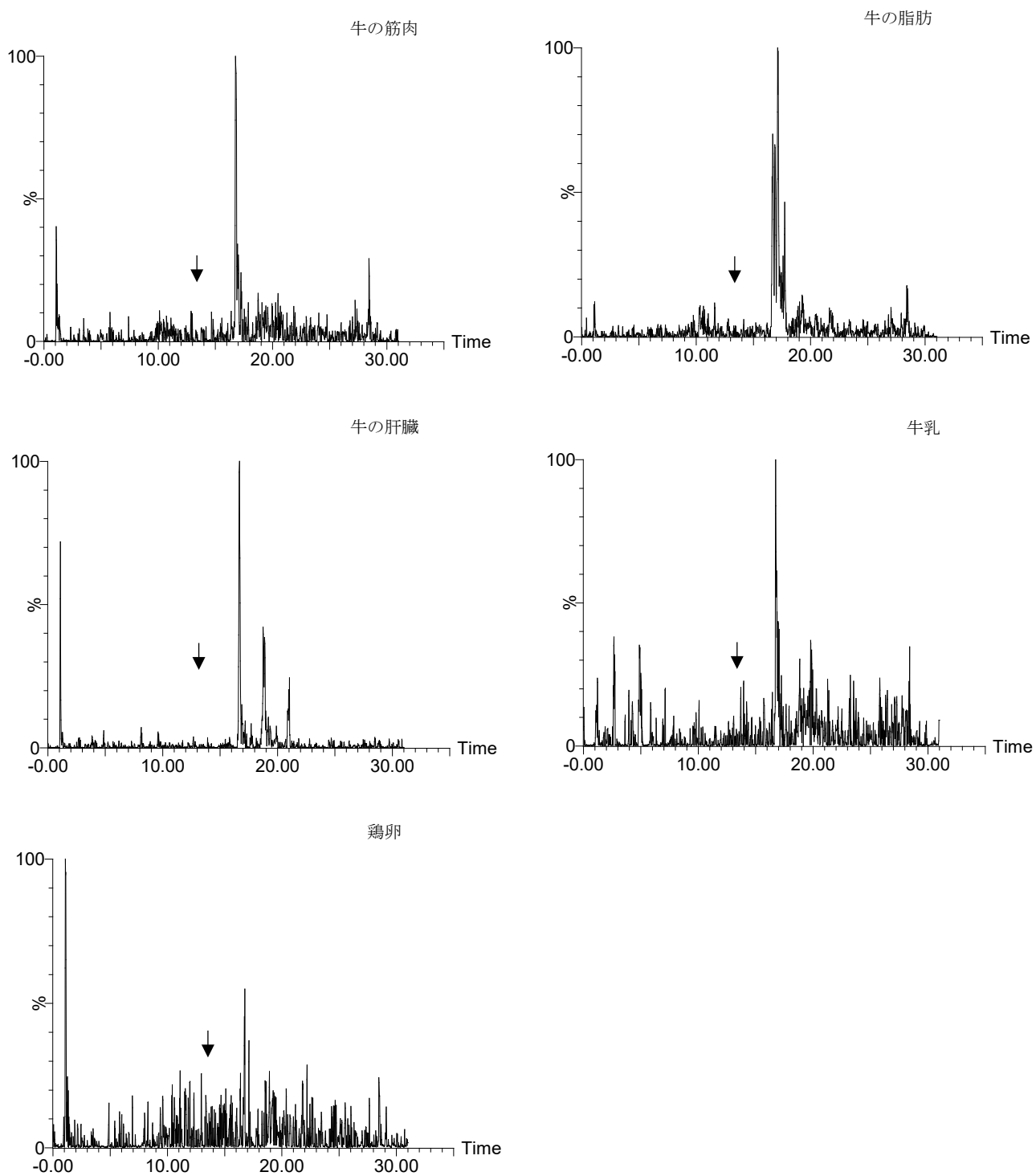


図 10 ブランク試料のトータルイオンクロマトグラム

スキャン範囲 : 50~550 amu

測定条件 : ESI (-) CV=-35V (CV=coren voltage)

4. その他の試験法検討に関連する事項

標準品の安定性については、アセトンで調製した標準原液は4℃以下で6ヶ月は安定であった。また、アセトン抽出液の溶媒を除去する工程として、ロータリーエバポレーターを用いた減圧濃縮及び窒素気流下による溶媒除去での回収率に与える影響について検討した結果、溶媒除去方法による回収率の差異は認められなかった(表17)。

表17 各溶媒除去方法によるジチアノンの回収率(%)

ジチアノン	ロータリーエバポレーター	窒素気流下
筋肉	92	104
牛乳	107	97

(0.01mg/kg相当量添加、n=2)

【実験方法】

7. 試験溶液の調製に従って調製した。ただし、アセトンで100 mLに定容した液はロータリーエバポレーターまたは窒素気流下で除去した。また、回収率は溶媒検量線を用いて算出し比較した。

5. 結論

検討した試料において、ブランク試料のクロマトグラムに定量を妨害するピークは認められなかった。牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳及び鶏卵試料において、真度83.9~95.7%、併行精度3.1~6.2%となり目標値に適合する結果であった。また、マトリックス標準溶液及び溶媒標準溶液のピーク面積比は0.98~1.04であり、本法で明らかなマトリックス効果は認められなかった。定量限界値濃度での添加回収試験のS/Nは、検討した試料においてS/N \geq 10を満たした。

参考文献

- 1) 農薬抄録 : https://www.acis.famic.go.jp/syouroku/dithianon/dithianon_01.pdf
- 2) 企業提供資料