

※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に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。

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

ヘキシチアゾクス試験法（畜産物）

ヘキシチアゾクス試験法（畜産物）の検討結果

[緒言]

1. 目的

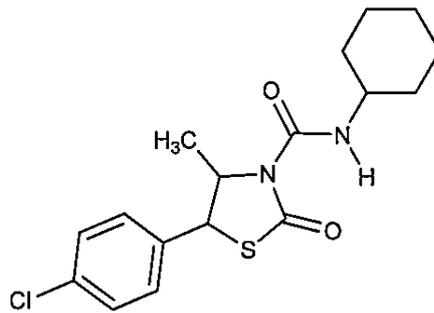
ヘキシチアゾクスはチアゾリン骨格を有する殺ダニ剤である。作用機構については不明であるが、脱皮阻害作用と雌成虫の不妊により卵・成虫及び若虫に対して殺虫効果を示すと考えられている。

本検討においては、薬事食品衛生審議会食品衛生分科会報告書に記載されている内容を踏まえ、畜産物中のヘキシチアゾクス試験法の開発を行った。なお、今回検討対象としたヘキシチアゾクスは、畜産物にあってはヘキシチアゾクス及び塩基性条件下の加水分解でPT-1-3「*trans*-5-(4-クロロフェニル)-4-メチルチアゾリン-2-オン」に変換される代謝物をヘキシチアゾクス含量に変換したものの和として残留基準値が設定（生食発 0411 第 1 号（平成 29 年 4 月 11 日））されている。

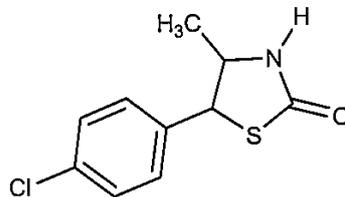
2. 分析対象化合物の構造式及び物理化学的性質

分析対象化合物：ヘキシチアゾクス及び塩基性条件下の加水分解により PT-1-3 に変換される代謝物
構造式

ヘキシチアゾクス



PT-1-3



ヘキシチアゾクス

IUPAC 名：(4*RS*, 5*RS*)-5-(4-Chlorophenyl)-*N*-cyclohexyl-4-methyl-2-oxo-1, 3-thiazolidine-3-carboxamide

分子式：C₁₇H₂₁ClN₂O₂S

分子量：352.88

溶解性：水 0.41 mg/L、クロロホルム 1389 g/L、アセトン 160 g/L、キシレン 362 g/L、メタノール 206

g/L、アセトニトリル 28.6 g/L、ヘキサン 4 g/L (20°C)
1-オクタノール/水分配係数 (log P_{ow}) : 2.74 (pH 5.2、25°C)

PT-1-3

IUPAC 名 : *trans*-5-(4-Chlorophenyl)-4-methyl-2-oxothiazolidine

分子式 : C₁₀H₁₀ClNOS

分子量 : 227.71

溶解性 : 水 28.8 mg/L (20°C)

1-オクタノール/水分配係数 (log P_{ow}) : 2.90 (25°C)

出典 : The Pesticide Manual 12th edition, British Crop Protection Council, p. 679-680.

Safety Data Sheet (PT-1-3) , Nisso Chemical Analysis Service Co., Ltd.

3. 基準値 (案)

牛の筋肉	0.05 ppm
牛の脂肪	0.05 ppm
牛の肝臓	0.05 ppm
牛乳	0.05 ppm
鶏卵	0.05 ppm

[実験方法]

1. 試料

東京都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) 牛の筋肉

可能な限り脂肪層を除き、細切りした後、フードプロセッサーを用いて均一化した。

2) 牛の脂肪

可能な限り筋肉層を除き、細切りした後、フードプロセッサーを用いて均一化した。

3) 牛の肝臓

細切りした後、フードプロセッサーを用いて均一化した。

4) 牛乳

よく混合して均一化した。

5) 鶏卵

殻を除去し、卵白と卵黄を合わせて、フードプロセッサーを用いて均一化した。

2. 試薬・試液

ヘキシチアゾクス標準品 : 純度 99.7% (関東化学 (株) 製)

PT-1-3 標準品 : 純度 >99.9% ((株) 日曹分析センターより提供)

アセトニトリル：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）

アセトン：残留農薬試験用（富士フイルム和光純薬（株）製）

n-ヘキサン：残留農薬試験用（関東化学（株）製）

メタノール：残留農薬試験用（富士フイルム和光純薬（株）製）

メタノール：LC/MS用（関東化学（株）製）

ギ酸：LC/MS用（富士フイルム和光純薬（株）製）

ミニカラム：Inert Sep PSA（500 mg/3 mL）（ジューエルサイエンス（株）製）

ミニカラム：Oasis HLB（500 mg/6 mL）（日本ウォーターズ（株）製）

ヘキシチアゾクス標準原液：ヘキシチアゾクス標準品 10.0 mg を精秤し、アセトンで 100 mL に溶解して、ヘキシチアゾクス 100 mg/L 溶液を調製した。PT-1-3 標準原液：PT-1-3 標準品 64.5 mg を精秤し、アセトンで 100 mL に溶解して、PT-1-3 645 mg/L（ヘキシチアゾクスとして 1000 mg/L）溶液を調製した。なお、PT-1-3 の濃度は以降すべてヘキシチアゾクス換算値とする。

PT-1-3 検量線用標準溶液：PT-1-3 標準原液をメタノールで適宜希釈し、0.00005～0.0003 mg/L の濃度の溶液を調製した。

ヘキシチアゾクス添加用標準溶液：ヘキシチアゾクス標準原液をアセトンを用いて希釈して 0.1 mg/L（定量限界値相当評価用）及び 0.5 mg/L（基準値相当評価用）の濃度の溶液を調製した。

3. 装置

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

フードプロセッサー：MK-K58（パナソニック（株）製）

濃縮装置：ロータリーエバポレーター N-1100（東京理化工械（株）製）、ポンプ V-703（BÜCHI 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）

恒温振とう水槽：NTS-4000BH（東京理化工械（株）製）

LC-MS/MS

装置	型式	会社
MS	API4000QTRAP	SCIEX 社
LC	Prominence LC-20A	（株）島津製作所
データ処理	Analyst Software	SCIEX 社

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：ジューエルサイエンス（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 : メタノール																		
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>1</td> <td>99</td> </tr> <tr> <td>20.0</td> <td>1</td> <td>99</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	1	99	20.0	1	99	20.1	90	10	30.0	90	10
時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)																	
0.0	90	10																	
10.0	1	99																	
20.0	1	99																	
20.1	90	10																	
30.0	90	10																	
MS 条件																			
測定モード	SRM (選択反応モニタリング)																		
イオン化モード	ESI (+)																		
キャピラリ電圧 (V)	4500																		
脱溶媒温度 (°C)	600																		
ネブライザーガス	窒素、30 psi																		
脱溶媒ガス	窒素、80 psi																		
コリジョンガス	窒素																		
定量イオン (m/z)	ヘキシチアゾクス : +353.2→228.1 [DP : 36 (V)、CE : 23 (eV)] PT-1-3 : +228.1→168.1 [DP : 56 (V)、CE : 21 (eV)]																		
定性イオン (m/z)	ヘキシチアゾクス : +353.2→168.1 [DP : 36 (V)、CE : 35 (eV)] PT-1-3 : +228.1→116.1 [DP : 56 (V)、CE : 43 (eV)]																		
保持時間 (min)	ヘキシチアゾクス : 14.0 PT-1-3 : 12.0																		

5. 定量

PT-1-3 標準原液をメタノールで希釈して 0.00005、0.0001、0.00015、0.0002、0.00025、及び 0.0003 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 PT-1-3 の含量を算出した。なお、基準値相当の添加試料については、検量線の範囲内に収まるように、5 倍希釈した後に注入した。

6. 試験溶液の調製

1) 添加試料の調製

試料 10.0 g に 0.1 mg/L (定量限界値相当評価用) または 0.5 mg/L (基準値相当評価用) のヘキシチアゾクス添加用標準溶液 1 mL を添加してよく混合した後、30 分間放置した。

2) 抽出

試料 10.0 g にアセトン 100 mL を加え、ホモジナイズした後、毎分 3,000 回転で 10 分間遠心分離し、上清を採る。残留物にアセトン 50 mL を加えてホモジナイズした後、毎分 3,000 回転で 10 分間遠心分離し、得られた上清を合わせ、アセトンを加えて正確に 200 mL とした。この溶液から正確に 2 mL を分取し、40°C以下で溶媒を除去した。この残留物に *n*-ヘキサン 30 mL を加え、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL ずつで 3 回振とう抽出した。抽出液を合わせ、40 °C以下で約 2 mL まで濃縮した。エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラム [Inert Sep PSA (500 mg/3 mL)] にアセトニトリル 10 mL を注入し、流出液は捨てた。このカラムに先の溶液を注入した後、アセトニトリル 10 mL を注入し、全溶出液を採り、40°C以下で溶媒を除去した。この残留物にメタノール 2 mL を加えて溶かした。

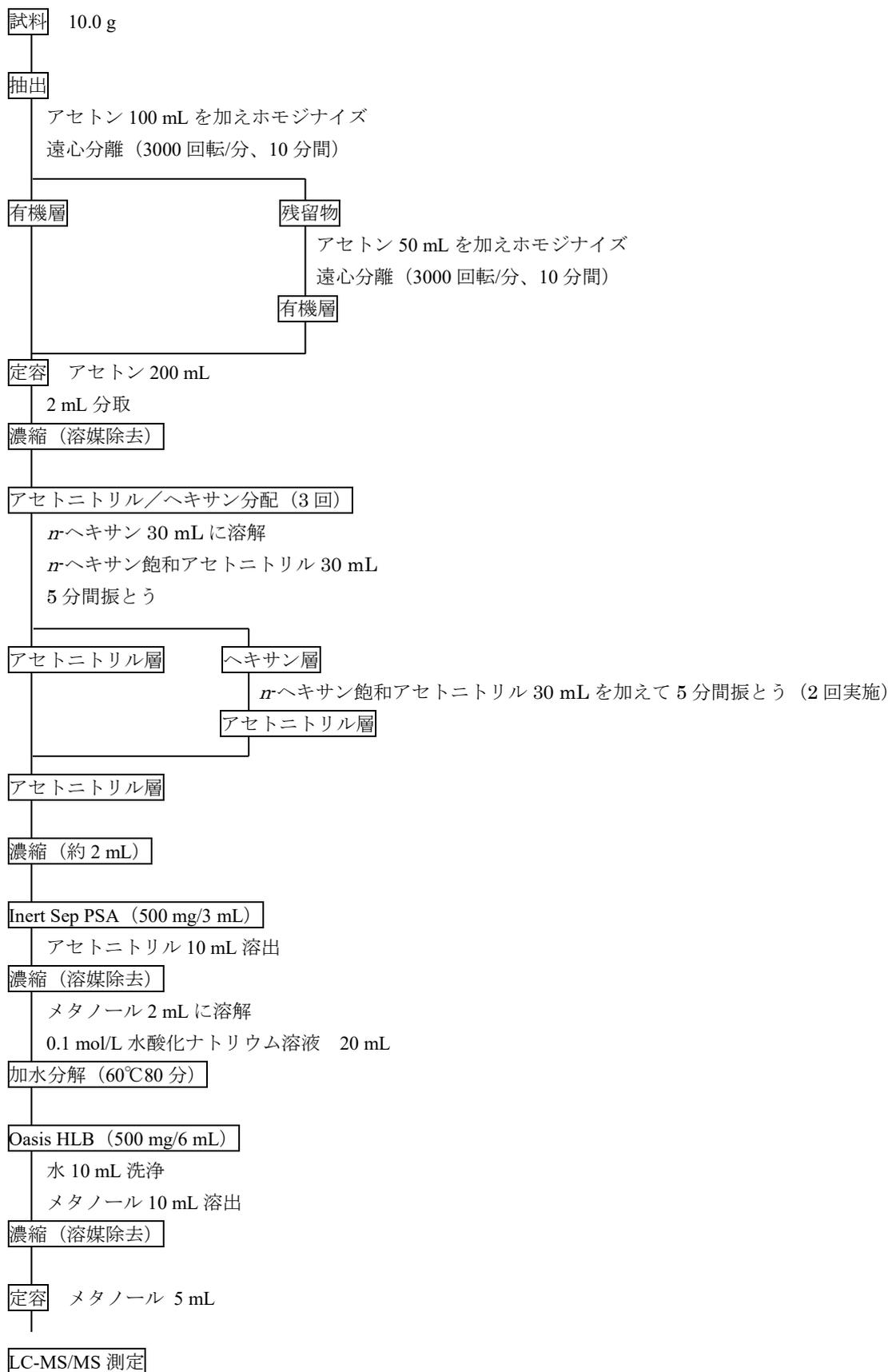
3) 加水分解

2) で得られた溶液に 0.1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 20 mL を加えて混合し、密栓して 60°Cで 80 分間加熱した。加熱後の溶液を放冷し、室温まで戻した。

4) 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 [Oasis HLB (500 mg/6 mL)] にメタノール及び水各 10 mL を順次注入し、各流出液は捨てた。このカラムに 3) で得られた溶液を注入した後、水 10 mL を注入し、流出液を捨てた。次いで、メタノール 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。この残留物をメタノールに溶解し、正確に 5 mL としたものを試験溶液とした。

[分析法フローチャート]



7. 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%相当濃度の溶媒標準溶液（メタノール溶液）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 (+) モードではヘキシチアゾクス及びPT-1-3のプロトン付加分子が検出されたが、ESI (-) モードではヘキシチアゾクス及びPT-1-3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。

次に、ESI (+) モードで、0.1vol%ギ酸及びメタノール (1:1) 混液を移動相としてフローインジェクションにて測定を行ったところ、ヘキシチアゾクスのプロトン付加分子である m/z 353.1[M+H]⁺及びPT-1-3のプロトン付加分子である m/z 228.1[M+H]⁺が検出された為、 m/z 353.1[M+H]⁺をヘキシチアゾクスのプリカーサーイオンとし、 m/z 228.1[M+H]⁺をPT-1-3の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及び図2に示す。

ヘキシチアゾクスのプロトン付加分子 (m/z 353.1[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3及び図4に示した。 m/z 228.1が非常に高い強度で検出され、次いで m/z 168.1が検出されたことから、 m/z +353.1→228.1を定量用、 m/z +353.1→168.1を定性用の測定イオンとした。

PT-1-3のプロトン付加分子 (m/z 228.1[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5及び図6に示した。 m/z 168.1が非常に高い強度で検出され、次いで m/z 116.1が検出されたことから、 m/z +228.1→168.1を定量用、 m/z +228.1→116.1を定性用の測定イオンとした。

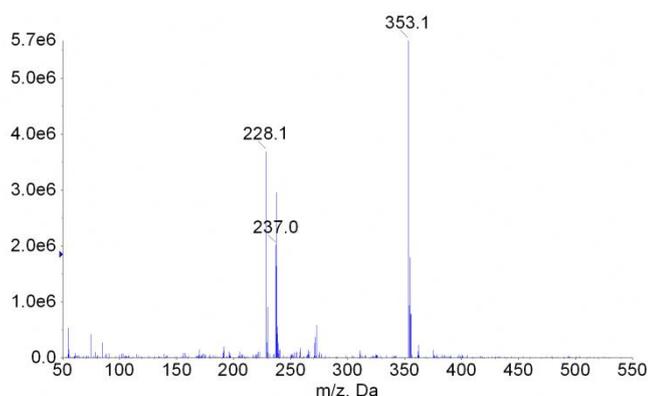


図1 ヘキシチアゾクス標準溶液のマススペクトル

スキャン範囲：50～550amu

測定条件：ESI+, DP=36 V

(DP : declustering potential)

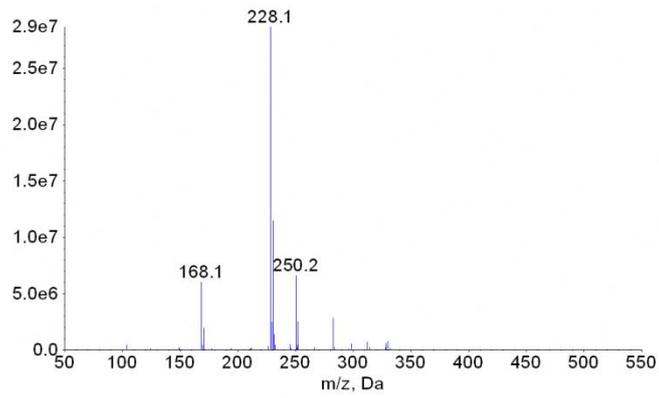


図2 PT-1-3 標準溶液のマススペクトル
 スキャン範囲：50～550amu
 測定条件：ESI+, DP=56 V
 (DP : declustering potential)

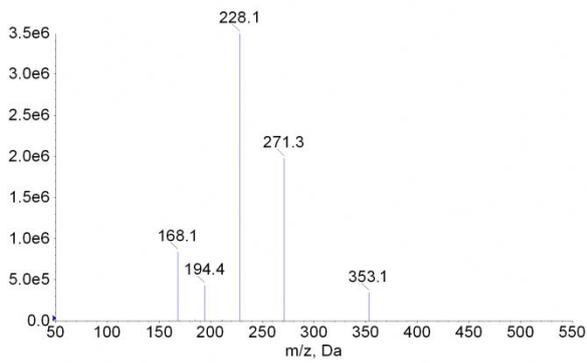


図3 ヘキシチアゾクスのプロダクトイオンスペクトル (定量用)

プリカーサーイオン : m/z 353.1
 測定条件 : ESI+, DP=36V, CE= 21 eV
 (CE=collision energy)

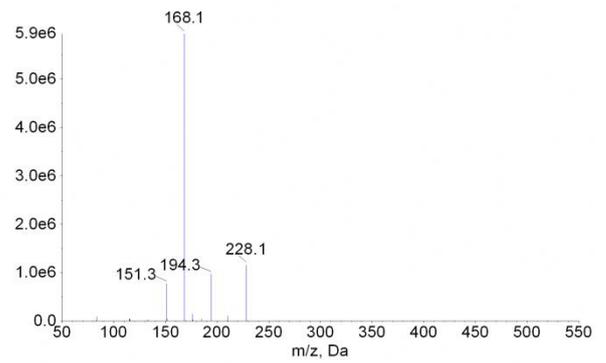


図4 ヘキシチアゾクスのプロダクトイオンスペクトル (定性用)

プリカーサーイオン : m/z 353.1
 測定条件 : ESI+, DP=36 V, CE=35 eV

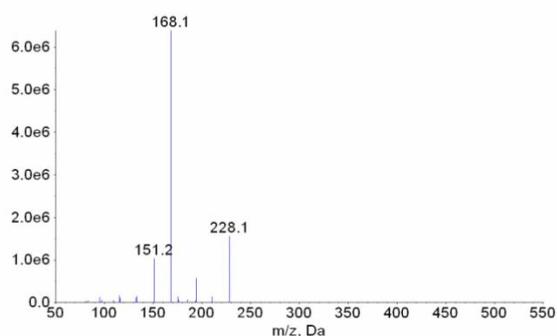


図5 PT-1-3のプロダクトイオンスペクトル（定量用）

プリカーサーイオン： m/z 228.1

測定条件：ESI+， DP=56 V， CE= 21 eV
（CE=collision energy）

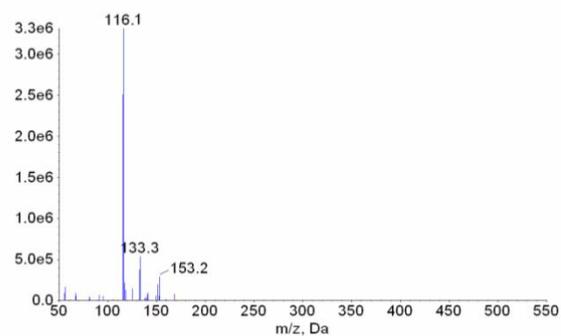


図6 PT-1-3のプロダクトイオンスペクトル（定性用）

プリカーサーイオン： m/z 228.1

測定条件：ESI+， DP=56 V， CE=43 eV

2) LC 条件の検討

分析カラムについて Inertsil ODS-3（内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μ m）、InertSustain C18（内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μ m、以上、ジューエルサイエンス（株）製）、L-column 2（内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μ m、（一財）化学物質評価機構製）、XBridge C18（内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3.5 μ m、waters 社製）、Hypersil GOLD aQ（内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μ m、Thermo Fisher Scientific 社製）を用いて検討を行ったところ、いずれのカラムにおいても比較的良好な保持とピーク形状が得られた。PT-1-3 の測定において最も良好な感度が得られたことから、測定には Inertsil ODS-3 を用いることとした。

移動相条件については、ギ酸-アセトニトリル及びギ酸 - メタノールについて、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 - メタノールを用いた場合に最も良好な感度、ピーク形状、保持が得られたので、0.1vol%ギ酸 - メタノールを移動相として用いることにした。

有機溶媒比率を 10%から 90%までのグラジエント条件において実サンプルを用いた場合に、キャリアオーバーと思われるピークが現れる試料があった。そこで、有機溶媒比率を 99%まで増加させたところ、キャリアオーバーと思われるピークは現れなくなった。

3) 検量線

図 7 に検量線の例を示した。0.00005～0.0003 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 0.999 以上であり良好な直線性を示した。

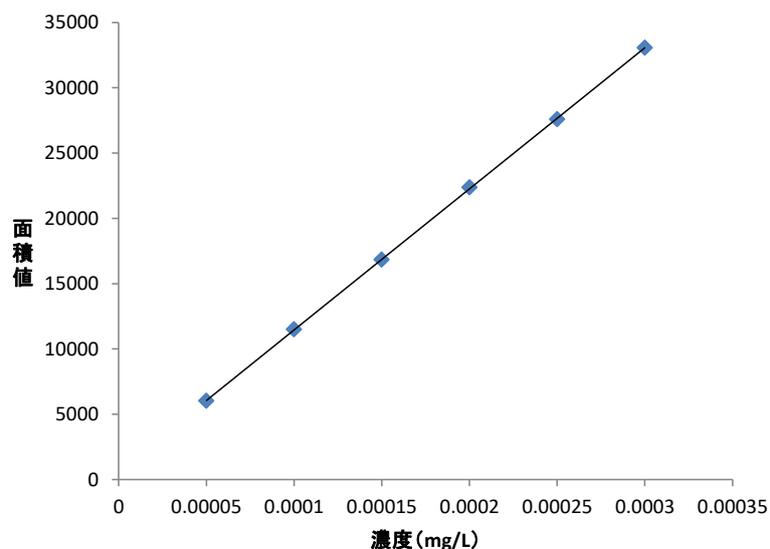


図 7 PT-1-3 検量線の例

$$y = 108001714x + 664 \quad r^2 = 1.0000$$

2. 試験溶液調製法の検討

1) 抽出溶媒の検討

牛の脂肪を用いて抽出溶媒の検討を行った。試料 10.0 g を 40℃以下で融解し、ヘキシチアゾクス及び PT-1-3 10 mg/L 溶液（アセトン溶液）1 mL を添加して再凝固させた後、30 分放置した。ここにアセトン 100 mL、50 mL を加えてホモジナイズ、遠心分離を行い、上清を 200 mL 定容した。ここから 1 mL を分取しアセトニトリルを加えて 10 mL としたものを試験液とした。結果は表 1 に示したとおり、良好な回収が得られたため、抽出溶媒にはアセトンを用いることとした。

表 1 抽出溶媒の検討結果（マトリックス添加標準溶液による補正值）

分析対象化合物	回収率 (%)
ヘキシチアゾクス	102.5
PT-1-3	95.7

添加量：10 µg

2) 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 1 mg/L ヘキシチアゾクス及び PT-1-3 溶液（*n*-ヘキサン溶液）1 mL を添加し、*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。このときの結果を表 2 に示した。ヘキシチアゾクス及び PT-1-3 ともに 3 回の抽出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結果 (%) .

分析対象化合物	<i>n</i> -ヘキサン飽和アセトニトリル				<i>n</i> -ヘキサン	計
	1回目	2回目	3回目	4回目		
ヘキシチアゾクス	86.0	16.1	5.0	0	0	107.1
PT-1-3	76.3	13.5	4.1	0	0	93.9

添加量 : 1 µg

3) 加水分解条件の検討

開発メーカーの分析法¹⁾を参考に加水分解を行った。0.01 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液 50 mL に 1 mg/L ヘキシチアゾクス溶液 (メタノール溶液) 1 mL 及びメタノール 4 mL を加え、120°C のオイルバスで 20 分間加熱還流を行ったところ、PT-1-3 への変換率は 72.7% であった。海外の作物残留試験の分析法²⁾においては 0.1 mol/L 水酸化ナトリウムを用いて 60°C で 30 分間加熱していることから、0.01 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液では濃度が低かった可能性が考えられた。そこで、海外の作物残留試験の分析法²⁾を参考にして、加水分解条件の検討を行うこととした。

①加熱温度の検討

0.1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 20 mL に 0.1 mg/L ヘキシチアゾクス溶液 (メタノール溶液) 1 mL 及びメタノール 1 mL を加え、ブロック恒温槽を用いて 37、60、80、120°C で 60 分間加熱した。この溶液をメタノール 10 mL、水 10 mL で予備洗浄した Oasis HLB (500 mg/6 mL) に負荷し、水 10 mL で洗浄、メタノール 10 mL で溶出した。この溶出液を 1 mL 分取し、メタノールを加えて正確に 10 mL とした。このときの結果を表 3 に示した。加熱温度 60°C の場合に最も良好な回収が得られたことから、加水分解における加熱温度は 60°C とすることとした。

表3 加水分解加熱温度の検討結果 (%)

分析対象化合物	加熱温度			
	37°C	60°C	80°C	120°C
ヘキシチアゾクス	0	0	0	0
PT-1-3	79.1	89.8	74.9	47.9

添加量 : 0.1 µg

②水酸化ナトリウム濃度の検討

0.01、0.05、0.1、0.5、1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 20 mL に 0.1 mg/L ヘキシチアゾクス溶液 (メタノール溶液) 1 mL 及びメタノール 1 mL を加え、60°C で 60 分間加熱した。この溶液をメタノール 10 mL、水 10 mL で予備洗浄した Oasis HLB (500 mg/6 mL) に負荷し、水 10 mL で洗浄、メタノール 10 mL で溶出した。この溶出液を 1 mL 分取し、メタノールを加えて正確に 10 mL とした。このときの結果を表 4 に示した。0.1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を用いた場合に最も良好な回収が得られた。

表4 水酸化ナトリウム濃度の検討結果 (%)

分析対象化合物	水酸化ナトリウム濃度				
	0.01 mol/L	0.05 mol/L	0.1 mol/L	0.5 mol/L	1 mol/L
ヘキシチアゾクス	0	0	0	0	0
PT-1-3	84.8	89.7	90.2	75.6	69.7

添加量：0.1 µg

次に、牛の脂肪を用いて、加水分解における水酸化ナトリウム濃度の検討を行った。牛の脂肪 10.0 g を 40℃以下で融解し、0.1 mg/L ヘキシチアゾクス溶液（アセトン溶液）1 mL を添加して再凝固させた後、30 分放置した。ここにアセトン 100 mL、50 mL を加えてホモジナイズ、遠心分離を行い、上澄液を 200 mL 定容した。ここから 20 mL を分取し、40℃以下で濃縮して溶媒を除去した。この残留物に *n*-ヘキサン 30 mL を加え、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL ずつで 3 回振とう抽出した。抽出液を合わせ、40℃以下で溶媒を除去した。この残留物にメタノール 2 mL を加えて溶解し、0.01、0.05、0.1、0.5 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を加えて、60℃で 60 分間加熱した。この溶液をメタノール 10 mL 及び水 10 mL で予備洗浄した Oasis HLB（500 mg/6 mL）に負荷し、水 10 mL で洗浄、メタノール 10 mL で溶出した。溶出液を 40℃以下で濃縮して溶媒を除去し、残留物にメタノール 10 mL を加えて溶解したものを試験液とした。このときの結果を表 5 に示した。標準溶液による検討結果と同様に、牛の脂肪を用いた検討においても 0.1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液において最も良好な回収が得られた。これらの結果より、加水分解における水酸化ナトリウム溶液の濃度は 0.1 mol/L とすることとした。

表5 牛の脂肪の添加回収試験における水酸化ナトリウム濃度の検討結果 (%)

分析対象化合物	水酸化ナトリウム濃度			
	0.01 mol/L	0.05 mol/L	0.1 mol/L	0.5 mol/L
ヘキシチアゾクス	17.1	3.0	0	0
PT-1-3	34.1	83.2	87.8	84.2

添加量：0.1 µg

③加熱時間の検討

0.1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 20 mL に 0.1 mg/L ヘキシチアゾクス溶液（メタノール溶液）1 mL 及びメタノール 1 mL を加え、60℃で 30、40、50、60、70、80、90、120 分間加熱した。この溶液をメタノール 10 mL、水 10 mL で予備洗浄した Oasis HLB（500 mg/6 mL）に負荷し、水 10 mL で洗浄、メタノール 10 mL で溶出した。この溶出液を 1 mL 分取し、メタノールを加えて正確に 10 mL とした。このときの結果を表 6 に示した。40～70 分において回収率 90%程度であり、80 分以降は回収率が低下した。

表 6 標準溶液を用いた加水分解加熱時間の検討結果 (%)

分析対象 化合物	加熱時間							
	30分	40分	50分	60分	70分	80分	90分	120分
ヘキシチアゾクス	0	0	0	0	0	0	0	0
PT-1-3	86.7	90.0	91.9	90.9	89.2	84.2	79.9	75.2

添加量 : 0.1 µg

次に牛の脂肪及び肝臓を用いて、添加回収試験における加水分解の加熱時間の検討を行った。牛の脂肪 10.0 g を 40°C 以下で融解し、0.1 mg/L ヘキシチアゾクス溶液（アセトン溶液）1 mL を添加して再凝固させた後、30 分放置した。また、牛の肝臓 10.0 g に 0.1 mg/L ヘキシチアゾクス溶液（アセトン溶液）1 mL を添加し、30 分放置した。ここにアセトン 100 mL、50 mL を加えてホモジナイズ、遠心分離を行い、上澄液を 200 mL 定容した。ここから 20 mL を分取し、40°C 以下で濃縮して溶媒を除去した。この残留物に *n*-ヘキサン 30 mL を加え、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL ずつで 3 回振とう抽出した。抽出液を合わせ、40 °C 以下で約 2 mL まで濃縮した。この溶液をアセトニトリル 10 mL で予備洗浄した Inert Sep PSA (500 mg/3 mL) ※に負荷し、アセトニトリル 10 mL を注入して全溶出液を採り、40°C 以下で濃縮して溶媒を除去した。この残留物にメタノール 2 mL を加えて溶解し、0.1 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液を加えて 60°C で 30、60、90、120 分間加熱した。この溶液をメタノール 10 mL 及び水 10 mL で予備洗浄した Oasis HLB (500 mg/6 mL) に負荷し、水 10 mL で洗浄、メタノール 10 mL で溶出した。溶出液を 40°C 以下で濃縮して溶媒を除去し、残留物にメタノール 10 mL を加えて溶解したものを試験液とした。このときの結果を表 7 に示した。牛の脂肪では 60~120 分において、牛の肝臓では 60~90 分において 90% 程度の回収が得られた。また、牛の肝臓では 120 分において回収率が低下したことから、極力長時間の加熱は行わないこととした。これらの結果から、加水分解における加熱時間は 80 分とすることとした。

表 7 牛の脂肪及び肝臓の添加回収試験における加水分解加熱時間の検討結果 (%)

食品名	分析対象化合物	加水分解加熱時間			
		30分	60分	90分	120分
牛の脂肪	ヘキシチアゾクス	0	0	0	0
	PT-1-3	76.5	89.4	91.0	93.2
牛の肝臓	ヘキシチアゾクス	0	0	0	0
	PT-1-3	81.1	86.7	90.5	78.2

添加量 : 0.1 µg

※牛の肝臓を用いた場合に Oasis HLB (500 mg/6 mL) が詰まったことから、HLB ミニカラムによる精製を行う前に更に精製操作が必要であると考えられた。そこで、加水分解にかける試験液のマトリックスを極力減少させることも考慮して、加水分解前（アセトニトリル／ヘキサン分配の後）に Inert Sep PSA (500 mg/3 mL) による追加精製を検討した。アセトニトリル 10 mL で予備洗浄した Inert Sep PSA (500 mg/3 mL) に 0.1 mg/L ヘキシチアゾクス及び PT-1-3 溶液（アセトニトリル

ル溶液) 1 mL を負荷し、アセトニトリルを 10 mL ずつ注入して各分画を分取し、溶出率の確認を行った。この結果を表 8 に示した。ヘキシチアゾクス及び PT-1-3 とともにアセトニトリル 10mL ではほぼ全量溶出したことから、Inert Sep PSA (500 mg/3 mL) による精製では、アセトニトリル/ヘキサン分配におけるアセトニトリル層を合わせて 40℃以下で約 2 mL 程度まで濃縮し、カラムに負荷した後、アセトニトリル 10 mL を注入して全溶出液を採ることとした。そこで、マトリックスの影響を減少させるため、すべての試料において PSA ミニカラムによる追加精製を行うこととした。PSA ミニカラムによる追加精製を行うことで、牛の肝臓を含むすべての試料において、HLB ミニカラムにおける詰まりが起こらないことも確認した。

表 8 Inert Sep PSA (500 mg/3 mL) からの溶出状況 (%)

分析対象化合物	アセトニトリル			計
	0-5 mL	5-10 mL	10-15 mL	
ヘキシチアゾクス	100.2	0.6	0	100.8
PT-1-3	98.7	0.4	0	99.1

添加量 : 0.1 µg

4) カラム精製の検討

Oasis HLB (500 mg/6 mL) をメタノール 10 mL 及び水 10 mL で予備洗浄した後、1 mg/L PT-1-3 溶液 (水溶液) を 1 mL 負荷し、水またはメタノールを 10 mL ずつ負荷して各分画を分取した。このときの結果を表 9 に示した。PT-1-3 は水では HLB ミニカラムから溶出されず、メタノール 10 mL で溶出された。

表 9 Oasis HLB (500 mg/6 mL) からの溶出状況 (%) .

溶出溶媒	溶出溶媒量			計
	0-10 mL	10-20 mL	20-30 mL	
水	0	0	0	0
メタノール	99.9	0	0	99.9

添加量 : 1 µg

次に、加水分解後のアルカリ溶液をそのまま負荷する場合を想定して、負荷液を 0.1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液とした場合の溶出状況を確認した。カラムをメタノール 10 mL 及び水 10 mL で予備洗浄した後、0.1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 20 mL に 1 mg/L PT-1-3 溶液 (メタノール溶液) 1 mL 及びメタノール 1 mL を加えた溶液を負荷し、水 10 mL 及びメタノール 10 mL を順次負荷して各分画を分取した。このときの結果を表 10 に示した。PT-1-3 は水 10 mL では HLB ミニカラムから溶出されず、メタノール 10 mL で溶出された。

表 10 アルカリ溶液を負荷した場合の Oasis HLB (500 mg/6 mL) からの溶出状況 (%)

負荷	水	メタノール	計
20 mL	0-10 mL	0-10 mL	
0	0	100.7	100.7

添加量：1 µg

3. 添加回収試験

牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳及び鶏卵の5食品を試料に用いて、試料にヘキシチアゾクスを添加し、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 5~9 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 10 に示した。

1) 選択性

選択性の検討結果を表 11 に示した。検討を行ったいずれの試料においても、PT-1-3 の定量を妨害するピークは認められなかった。

表 11 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 (ppm)	妨害ピークの許容範囲		ピーク面積(高さ) ^{*1}							選択性の評価 ^{*3}	備考		
					評価対象濃度 (ppm)	評価基準	面積又は高さの別	ブランク試料			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)				
PT-1-3		牛の筋肉	0.01	0.05	基準値	0.05	< 0.100	面積	0	0	0	20062	20167	20115	0.000	○	
		牛の脂肪	0.01	0.05	基準値	0.05	< 0.100	面積	0	0	0	24444	24309	24377	0.000	○	
		牛の肝臓	0.01	0.05	基準値	0.05	< 0.100	面積	0	0	0	24124	23560	23842	0.000	○	
		牛乳	0.01	0.05	基準値	0.05	< 0.100	面積	0	0	0	20558	20594	20576	0.000	○	
		鶏卵	0.01	0.05	基準値	0.05	< 0.100	面積	0	0	0	19924	19750	19837	0.000	○	

*1 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。)

*2 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。

*3 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 12 に示した。定量限界相当の添加回収試験における真度は 88.8~92.5%、併行精度は 0.3~1.6%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、基準値相当の添加回収試験における真度は 87.8~92.8%、併行精度は 1.0~1.8%であり、真度 70~120%、併行精度 (RSD) <15%という目標値を満足した。定量限界相当の添加回収試験における PT-1-3 のピークの S/N 比の平均値は 39.0~77.1 であり、S/N ≥ 10 を満足した。

表 12 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 (mg/kg)	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比 ^{*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	
PT-1-3	牛の筋肉	0.01	0.05	0.01	S/N	114698857	1037	0.9999	91.3	91.3	91.1	90.6	91.1	91.1	0.3	68.5	42.2	55.3		
		0.01	0.05	0.05	—	114128000	-950	0.9997	91.1	91.8	93.1	90.4	92.0	91.7	1.1	—	—	#DIV/0!		
	牛の脂肪	0.01	0.05	0.01	S/N	109128571	1081	0.9996	91.6	91.2	93.1	91.7	94.8	92.5	1.6	94.5	59.8	77.1		
		0.01	0.05	0.05	—	108001714	664	1.0000	91.0	92.5	94.1	94.9	91.5	92.8	1.8	—	—	#DIV/0!		
	牛の肝臓	0.01	0.05	0.01	S/N	108898286	573	0.9999	89.6	88.6	87.6	90.1	88.1	88.8	1.2	66.1	70.7	68.4		
		0.01	0.05	0.05	—	102902857	1046	0.9996	90.1	86.5	86.7	87.4	88.5	87.8	1.7	—	—	#DIV/0!		
	牛乳	0.01	0.05	0.01	S/N	121821143	-319	0.9999	92.0	94.3	90.6	91.5	93.5	92.4	1.6	42.2	35.8	39.0		
		0.01	0.05	0.05	—	112015429	-100	0.9999	91.9	93.4	91.4	91.5	93.1	92.3	1.0	—	—	#DIV/0!		
	鶏卵	0.01	0.05	0.01	S/N	113038286	1070	0.9999	91.4	91.3	91.9	93.1	90.4	91.6	1.1	51.0	58.9	54.9		
		0.01	0.05	0.05	—	111891429	2349	0.9998	92.2	90.4	93.6	93.4	92.5	92.4	1.4	—	—	#DIV/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 13 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 0.97~1.00 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 13 で求めたピーク面積比で除して補正真度を求め、表 14 に示した。補正真度は 87.8~93.7%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 13 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 (ppm)	添加濃度 (ppm)	標準溶液 濃度 ^{*1} (mg/L)	ピーク面積 ^{*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 比 ^{*5}	
									n=1	n=2	平均	n=1	n=2			平均
PT-1-3	牛の筋肉	0.01	0.05	0.01	0.0002	面積	0	19905	19958	19931.5	20047	20143	20095.0	0.99		
		0.01	0.05	0.05	0.0002	面積	0	20062	20167	20114.5	20219	20192	20205.5	1.00		
	牛の脂肪	0.01	0.05	0.01	0.0002	面積	0	24336	23966	24151.0	24531	24368	24449.5	0.99		
		0.01	0.05	0.05	0.0002	面積	0	24444	24309	24376.5	24477	24538	24507.5	0.99		
	牛の肝臓	0.01	0.05	0.01	0.0002	面積	0	23576	23448	23512.0	23638	24696	24167.0	0.97		
		0.01	0.05	0.05	0.0002	面積	0	24124	23560	23842.0	23645	23879	23762.0	1.00		
	牛乳	0.01	0.05	0.01	0.0002	面積	0	20565	20602	20583.5	20651	20650	20650.5	1.00		
		0.01	0.05	0.05	0.0002	面積	0	20558	20594	20576.0	20669	20614	20641.5	1.00		
	鶏卵	0.01	0.05	0.01	0.0002	面積	0	19690	19709	19699.5	19707	19810	19758.5	1.00		
		0.01	0.05	0.05	0.0002	面積	0	19924	19750	19837.0	20260	19935	20097.5	0.99		

*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。

表 14 補正真度

分析対象化合物	添加濃度 (ppm)	真度 (%)	補正真度 (%)
牛の筋肉	0.01	91.1	92.0
	0.05	91.7	91.7
牛の脂肪	0.01	92.5	93.4
	0.05	92.8	93.7
牛の肝臓	0.01	88.8	91.5
	0.05	87.8	87.8
牛乳	0.01	92.4	92.4
	0.05	92.3	92.3
鶏卵	0.01	91.6	91.6
	0.05	92.4	93.3

4. 考察

開発した試験法を用いて、牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳及び鶏卵の添加回収試験を行った結果、いずれの食品においても PT-1-3 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、定量限界相当の添加回収試験において真度 70~120%、併行精度 (RSD) <25%、また、基準値相当の添加回収試験において真度 70~120%、併行精度 (RSD) <15%という目標値を満たしていたことから、本試験法は、牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳、鶏卵のような畜産物に適用可能であると判断された。

[結論]

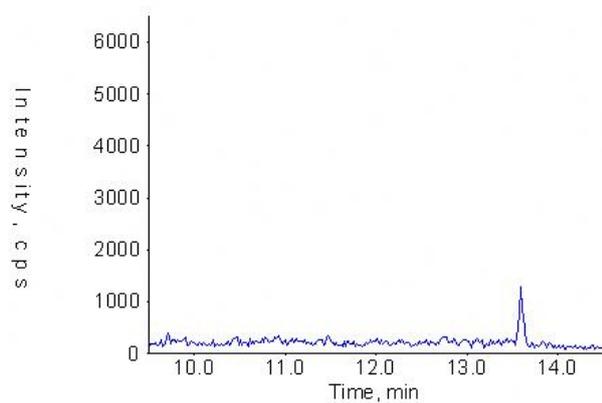
畜産物中のヘキシチアゾクス試験法として、ヘキシチアゾクス及び代謝物を試料からアセトンで抽出し、アセトニトリル/ヘキサン分配による脱脂及びエチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムによる精製を行い、水酸化ナトリウム溶液を加えてヘキシチアゾクス及び代謝物を PT-1-3 へ変換した後、ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体で精製し、LC-MS/MS で定量及び確認する方法を開発した。

牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳及び鶏卵に適用した結果、真度 87.8~92.8%、併行精度 0.3~1.8% の良好な結果が得られた。

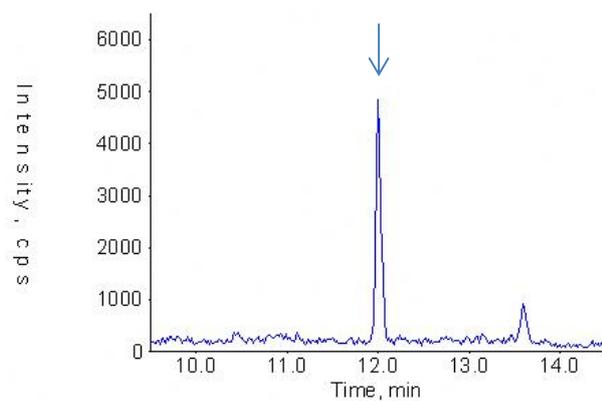
参考文献

- 1) 時枝正則, 立花輝雄, 小林茂, 五明健, 小野成男, 「殺ダニ剤ヘキシチアゾクスの作物残留分析」日本農薬学会誌, **12**, 711-719 (1987)
- 2) JMPR Evaluation (2011)

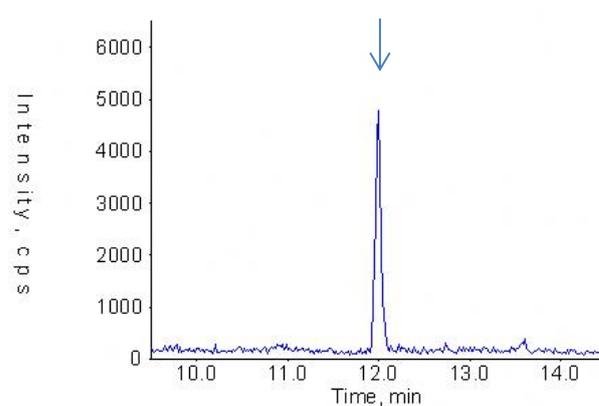
ブランク試料



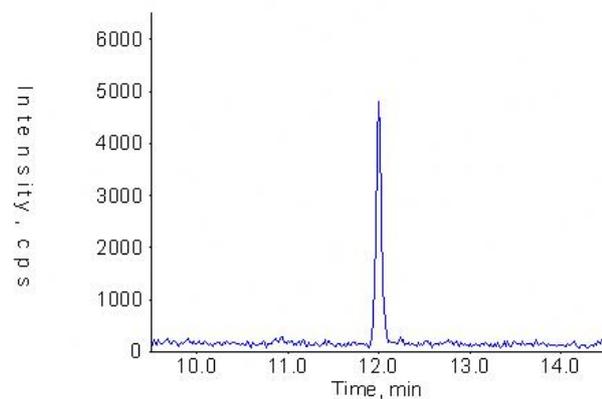
添加試料 (試料中 0.01 ppm 相当)



添加試料 (試料中 0.05 ppm 相当、5 倍希釈)



標準溶液 (0.0002 mg/L)



標準溶液 (0.0002 mg/L)

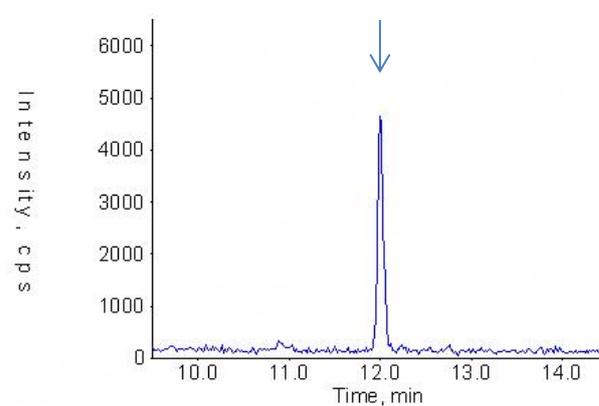
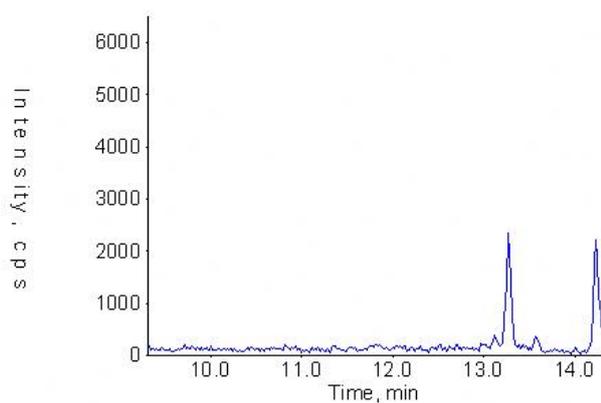
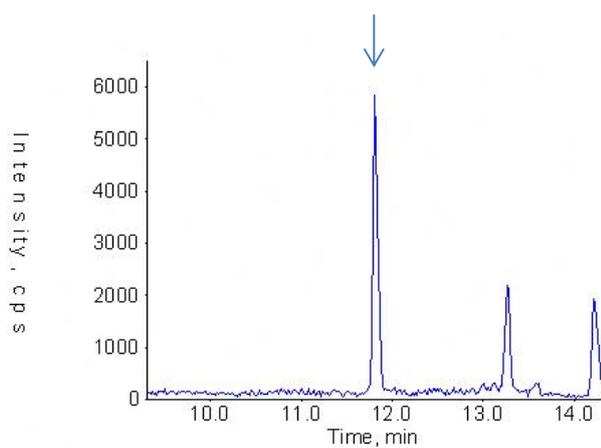


図 8 牛の筋肉の SRM クロマトグラム (m/z +228.1→168.1)

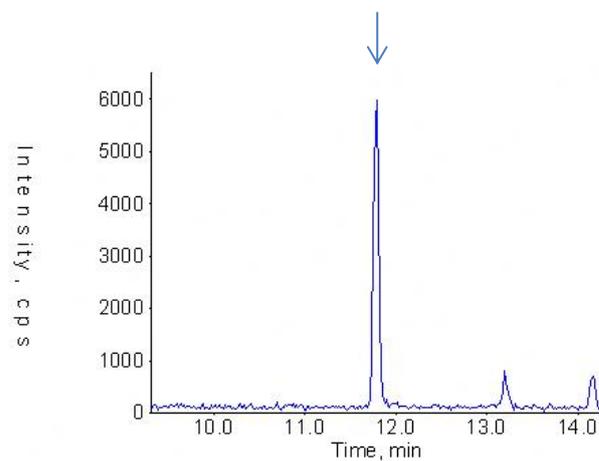
ブランク試料



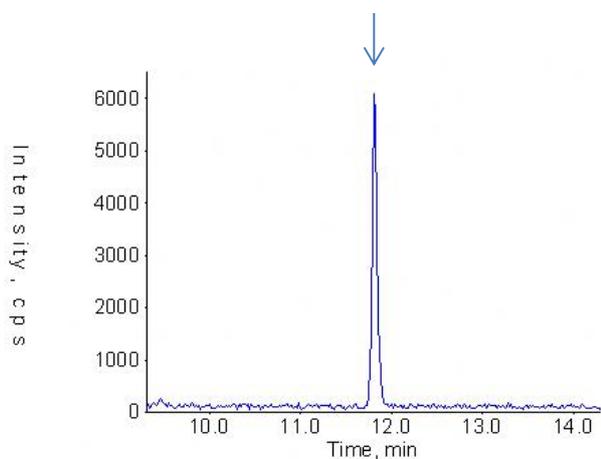
添加試料 (試料中 0.01 ppm 相当)



添加試料 (試料中 0.05 ppm 相当、5 倍希釈)



標準溶液 (0.0002 mg/L)



標準溶液 (0.0002 mg/L)

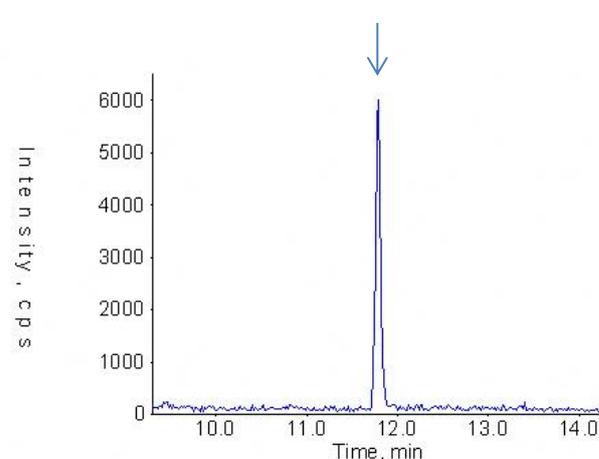
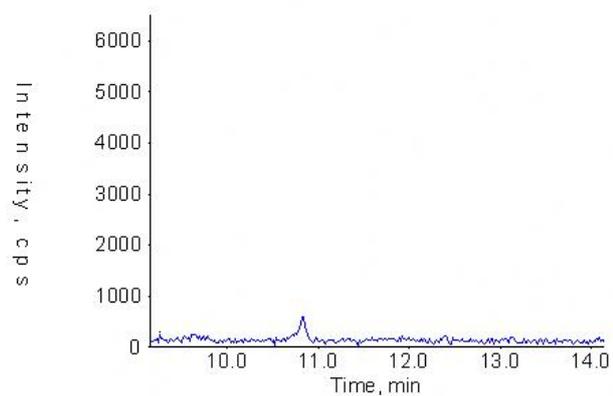
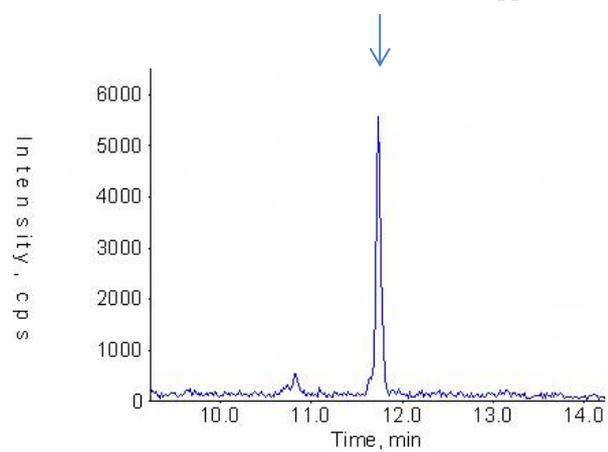


図9 牛の脂肪の SRM クロマトグラム (m/z +228.1→168.1)

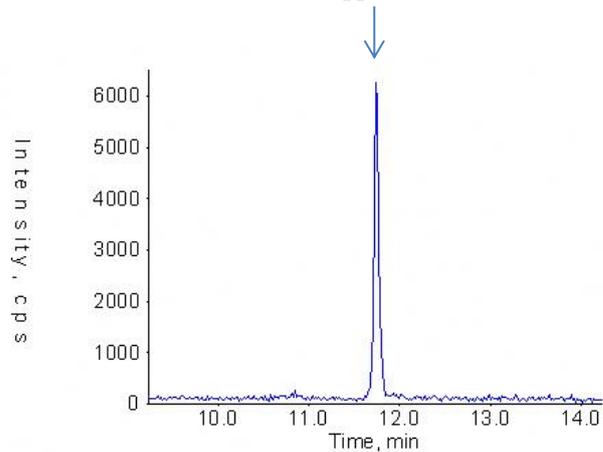
ブランク試料



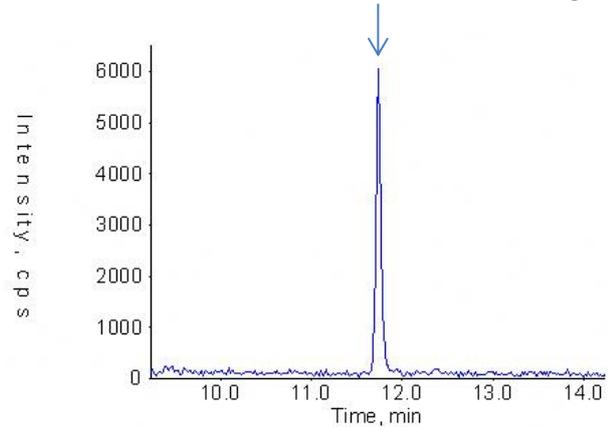
添加試料 (試料中 0.01 ppm 相当)



添加試料 (試料中 0.05 ppm 相当、5 倍希釈)



標準溶液 (0.0002 mg/L)



標準溶液 (0.0002 mg/L)

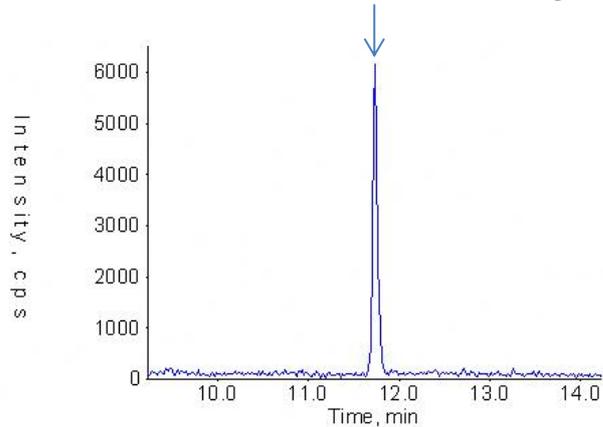
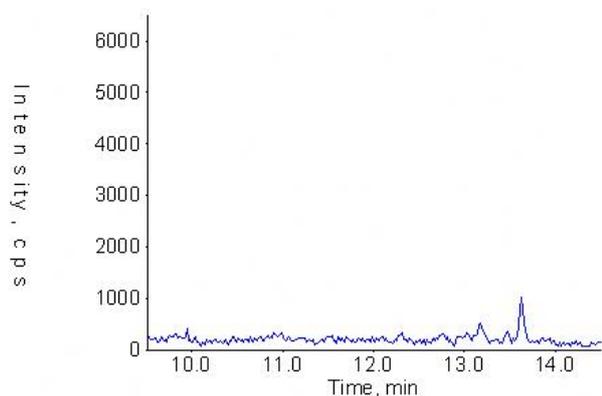
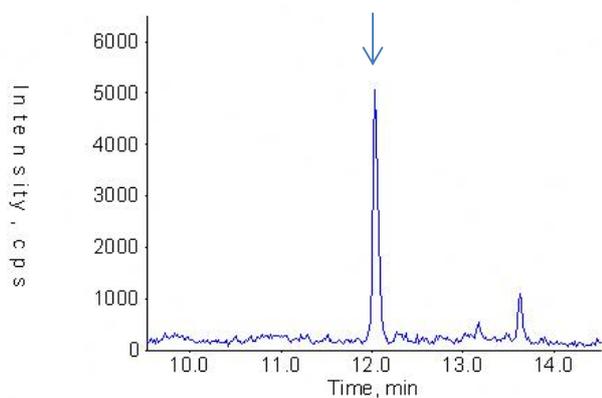


図 10 牛の肝臓の SRM クロマトグラム (m/z +228.1 \rightarrow 168.1)

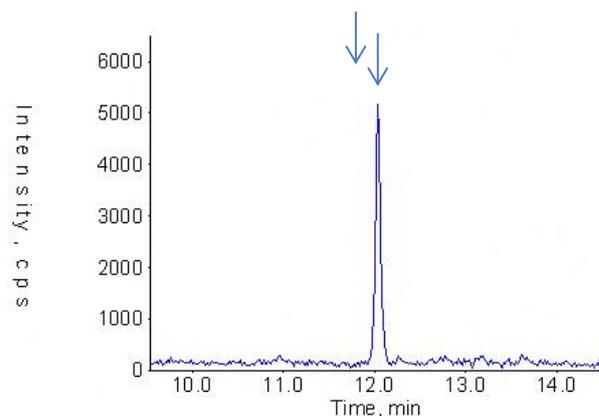
ブランク試料



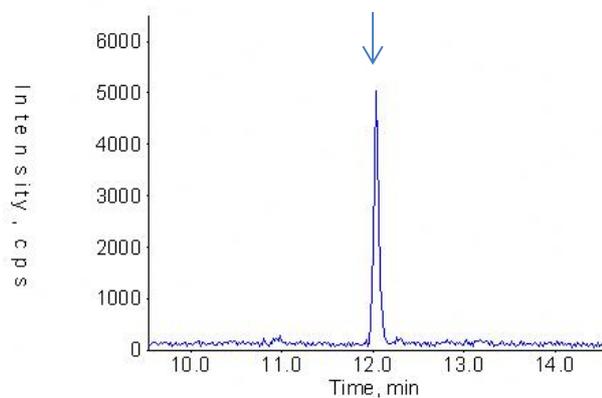
添加試料 (試料中 0.01 ppm 相当)



添加試料 (試料中 0.05 ppm 相当、5 倍希釈)



標準溶液 (0.0002 mg/L)



標準溶液 (0.0002 mg/L)

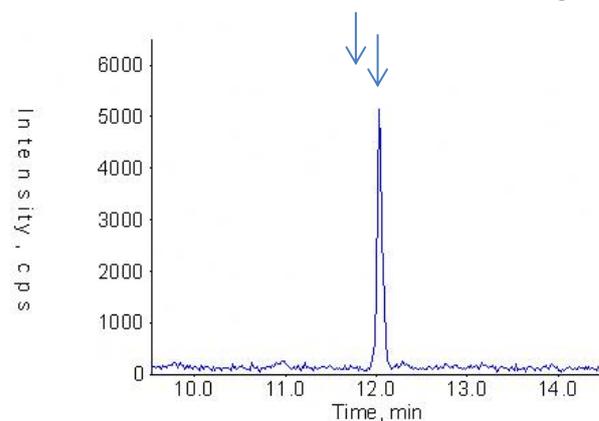
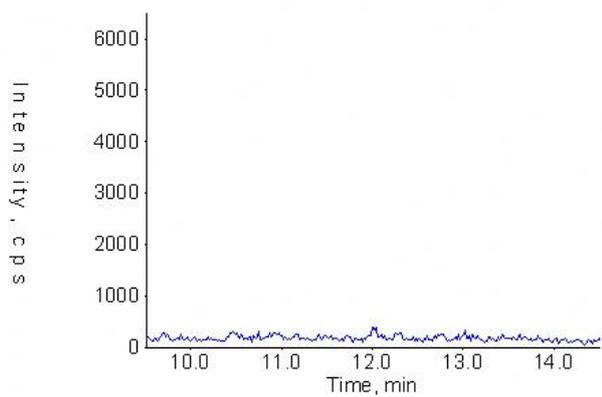
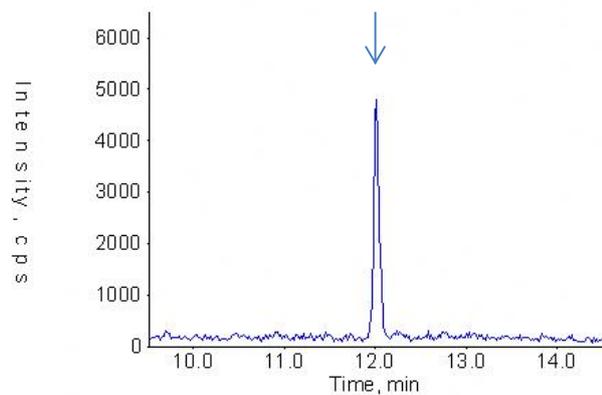


図 11 牛乳の SRM クロマトグラム (m/z +228.1→168.1)

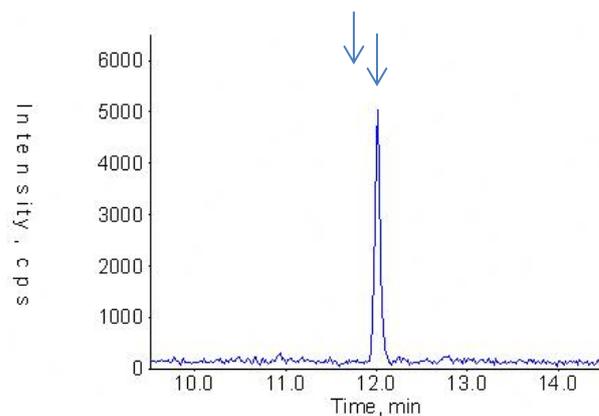
ブランク試料



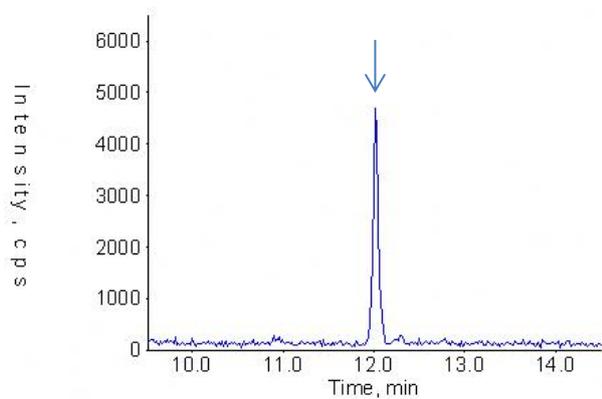
添加試料 (試料中 0.01 ppm 相当)



添加試料 (試料中 0.05 ppm 相当、5 倍希釈)



標準溶液 (0.0002 mg/L)



標準溶液 (0.0002 mg/L)

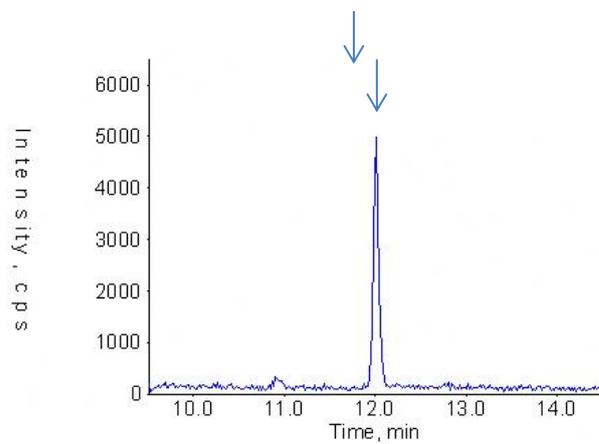
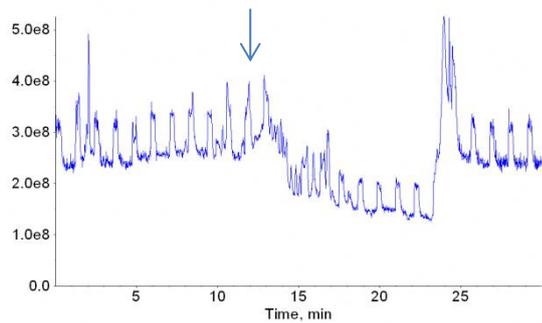


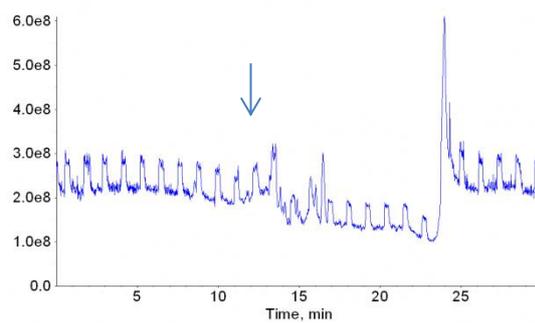
図 12 鶏卵の SRM クロマトグラム (m/z

+228.1→168.1)

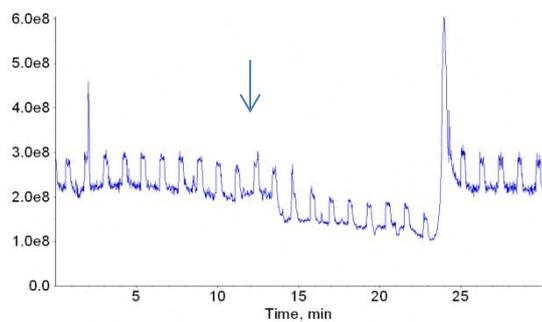
牛の筋肉



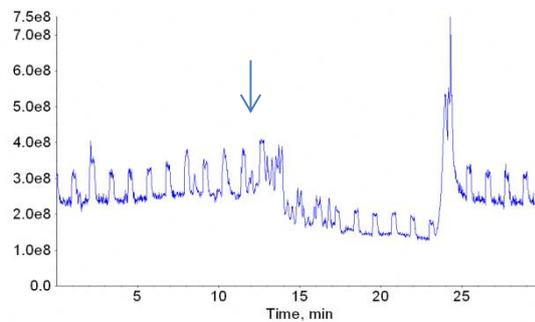
牛の脂肪



牛の肝臓



牛乳



鶏卵

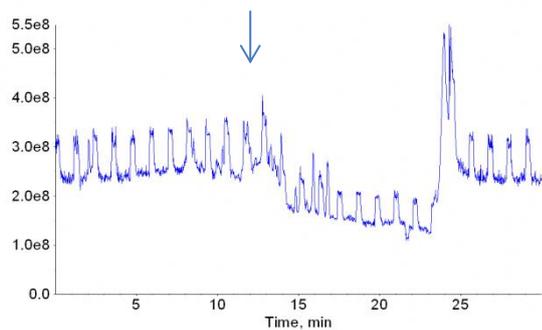


図 13 ブランク試料のフルスキャン測定におけるトータルイオンクロマトグラム
(スキャン範囲：50～550 amu)