

※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。

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

ジクロベニル試験法（水産物）

ジクロベニル試験法（水産物）の検討結果

〔緒言〕

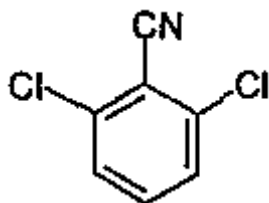
1. 目的

ジクロベニルは、主として根からの吸収により植物組織内を生長点部に移行し、細胞の異常分化を起こし枯死させると考えられている除草剤であり、残留基準値は、りんご、日本なし、西洋なし、もも及び魚介類に設定されている。国内では、1963年に初回農薬登録され、海外では米国及び豪州で登録されている*¹。ジクロベニルは、農産物及び畜水産物を対象とした厚生労働省通知一斉試験法の適用外農薬であり*²、³、ジクロベニル試験法として通知されているのは、農産物を対象とした個別試験法のみである*²ため、今回、水産物を対象とした個別試験法の開発を検討した。

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：ジクロベニル

構造式：



分子式：C₇H₃Cl₂N

分子量：172.01

化学名：IUPAC名：2,6-dichlorobenzonitrile、CAS番号：1194-65-6

外観：白色結晶

融点：143.8-144.3℃

蒸気圧：144 mPa (25℃)

溶解性：水 21 mg/L (25℃)

アセトン 86.0、メタノール 17.2、酢酸エチル 59.3、ジクロロメタン 151 g/L (20℃)

キシレン 53、エタノール 15、シクロヘキサン 3.7 g/L (25℃)

オクタノール/水分配係数 (log Pow)：2.70

安定性：270℃まで熱に安定、酸に安定、強アルカリには速やかに加水分解し、2,6-ジクロロベンズアミドとなる。

〔出典〕 BCPC(British Crop Protection Council), The Pesticide Manual sixteen Edition, 2012

3. 基準値

食品名	基準値(ppm)
りんご	0.1
日本なし	0.2
西洋なし	0.2
もも	0.1
魚介類	0.05

[実験方法]

1. 試料

うなぎ（国産養殖）は北海道石狩市内の小売店、しじみ（北海道網走産）は札幌市内の小売店で購入した。

(1) うなぎ

うなぎの頭部を除去し、内臓、骨及び皮を含む可食部を包丁でできるだけミンチ状にした後、松下電器産業（株）〔現 パナソニック（株）〕製スピードカッターMK-K77を用いて均一化した。

(2) しじみ

殻を除去し、得られたむき身を金網にのせ、5分間水切りした後、松下電器産業（株）〔現 パナソニック（株）〕製スピードカッターMK-K77を用いて均一化した。

2. 試薬・試液

ジクロベニル標準品：純度 98%、融点 145~146°C [和光純薬工業（株）製]

アセトニトリル、アセトン、*n*-ヘキサン：残留農薬試験用 [関東化学（株）及び和光純薬工業（株）製]

メタノール：LC/MS 用 [関東化学（株）及び和光純薬工業（株）製]

蒸留水：LC/MS 用 [関東化学（株）及び和光純薬工業（株）製]

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム：Agilent Technologies 社製 MEGA BE-C18（1,000 mg、6 mL）（以下 C18 ミニカラムとする）をあらかじめアセトニトリル 10 mL でコンディショニングした後、用いた。

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：Agilent Technologies 社製 Bond Elut-PSA（500 mg、3 mL）（以下 PSA ミニカラムとする）をあらかじめ *n*-ヘキサン 10 mL でコンディショニングした後、用いた。

無水硫酸ナトリウム：残留農薬試験用 [関東化学（株）及び和光純薬工業（株）製]

塩化ナトリウム：特級 [関東化学（株）製]

標準原液：ジクロベニル標準品 10.0 mg を精秤し、アセトンに溶解して 1,000 mg/L 溶液を調製した。

検量線用標準溶液：標準原液を *n*-ヘキサンの適宜希釈し、回収率 25、50、75、100、125 及び 150% 相当濃度の標準溶液を調製した。

添加用標準溶液：標準原液をアセトンで希釈して 0.05 及び 0.5 mg/L 溶液を調製した。

3. 装置

ホモジナイザー：ウルトラタラックス T25 デジタルにシャフトジェネレーターS25N-18G を装着 (IKA 社製)

スピードカッター：MK-K77 [松下電器産業 (株) (現 パナソニック (株)) 製]

遠心分離機：ユニバーサル冷却遠心機 5930 [久保田商事 (株) 製]

濃縮装置：エバポレーター；N-1000 [東京理化工械 (株) 製]、真空ポンプ；FTP-34A [AGC テクノグラス (株) 製]、真空コントローラ；NVC-2100 [東京理化工械 (株) 製]、クーリングシステム；CA-112 [東京理化工械 (株) 製]

GC-MS/MS：GCMS-TQ8030 [(株) 島津製作所製]

HPLC-UV：Prominence [(株) 島津製作所製]

装 置	型 式	会 社
ポンプ	LC-20AB	(株) 島津製作所
デガッサー	DGU-20A5	(株) 島津製作所
インジェクター	SIL-20AC	(株) 島津製作所
UV 検出器	SPD-20A	(株) 島津製作所
システムコントローラ	CBM-20A	(株) 島津製作所
カラムオープン	CTO-20AC	(株) 島津製作所
データ処理	LabSolution	(株) 島津製作所

4. 測定条件

GC-MS/MS

GC 条件	
カラム	DB-5MS (内径 0.25 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25 μ m : Agilent Technologies 社製)
カラム温度 (°C)	50°C(1 min)–25°C/min–125°C(0 min)–10°C/min–300°C(10 min)
注入口温度 (°C)	250
インターフェース温度 (°C)	300
キャリアガス	ヘリウム
キャリアガス流量 (mL/min)	1
注入法	スプリットレス法
注入量 (μ L)	1
MS 条件	
測定モード	選択イオンモニタリング (SIM)、選択反応モニタリング (SRM)
イオン化法	EI
イオン化エネルギー (eV)	70
EM 電圧 (V)	オートチューニングでの設定値
イオン源温度 (°C)	250
コリジョンガス	アルゴン (SRM モード)
定量イオン (m/z)	SIM : 171、SRM : 171.0→100.1 (CE 24 eV)
定性イオン (m/z)	SIM : 173、SRM : 171.0→136.1 (CE 14 eV)
保持時間 (min)	8.4

HPLC-UV

カラム	Mightysil RP-18GP [内径 4.6 mm、長さ 250 mm、粒子径 5 μm : 関東化学 (株) 製]
移動相流速 (mL/min)	1.0
注入量 (μL)	10
カラム温度 (°C)	40
移動相	A : 水、B : アセトニトリル (A : B = 3 : 7)
検出器波長	240 nm
保持時間 (min)	5.3

5. 定量

標準原液を *n*-ヘキサンで希釈して添加濃度 0.005 mg/kg の試料では 0.000625、0.00125、0.001875、0.0025、0.003125 及び 0.00375 mg/L、添加濃度 0.05 mg/kg の試料では 0.00625、0.0125、0.01875、0.025、0.03125 及び 0.0375 mg/L の標準溶液を調製した。この溶液 1 μL を GC-MS(MS) に注入して、得られたピーク面積を用いて検量線を作成した。試験溶液 1 μL を GC-MS(MS) に注入し、絶対検量線法によりジクロベニルの含量を算出した。

6. 添加試料の調製

うなぎ及びしじみ (残留基準値はともに 0.05 ppm) : 添加濃度 0.005 mg/kg (定量限界濃度) の場合は、試料 10.0 g に添加用標準溶液 (0.05 mg/L) 1.0 mL、添加濃度 0.05 mg/kg (残留基準値濃度) の場合は、試料 10.0 g に添加用標準溶液 (0.5 mg/L) 1.0 mL を添加し、よく混合した後、30 分間放置した。

7. 試験溶液の調製

概要

アセトニトリル及び *n*-ヘキサン混合溶媒を用いて、ジクロベニルを試料からアセトニトリルに抽出し、C18ミニカラムで精製した後、*n*-ヘキサンに転溶し、PSAミニカラムで精製した後、GC-MS(MS) で定量及び確認した。

(1) 抽出

試料 10.0 g をガラス製遠沈管に採った。これに *n*-ヘキサン 25 mL 及び *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 50 mL を加えてホモジナイズした後、遠心分離 (3,000 rpm、5 分間) した。アセトニトリル層を駒込ピペットで分取し、ろ紙 [定量ろ紙 No. 5 A、直径 110 mm、東洋濾紙 (株) 製] を用いてろ過した。残留物及び *n*-ヘキサン層に *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 25 mL を加え、ホモジナイズした後、先と同様にアセトニトリル層をろ過し、ろ液を合わせ、アセトニトリルで 100 mL に定容した。C18 ミニカラム (1,000 mg/6 mL) にアセトニトリル 10 mL を注入し、流出液は捨てた。このカラムに上記アセトニトリル抽出液 25 mL を注入した後、アセトニトリル 5 mL を注入し、負荷液を含む全溶出液を採り、40°C 以下で 4 mL 以下に濃縮した。これに 10 w/v% 塩化ナトリウム溶液 40 mL を加え、*n*-ヘキサン 40 mL 及び 20 mL で 2 回振とう抽出した。ただし、しじみについては、2 回目の振とう抽出時にエマルジョンが形成したため、遠心分離 (3,000 rpm、5 分間) した後、*n*-ヘキサン層を分取した。抽出液を合わせ、無水硫酸ナトリウムを加えて脱水し、無水硫酸ナトリウムをろ別した後、40°C 以下で約 2 mL に濃縮した。

(2) 精製

エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルカラムクロマトグラフィー

PSA ミニカラム (500 mg/3 mL) に *n*-ヘキサン 10 mL を注入し、流出液は捨てた。このカラムに (1) で得られた溶液を注入した後、*n*-ヘキサン 8 mL を注入し、負荷液を含む全溶出液を採り、40°C以下で約 2 mL に濃縮した。この溶液を *n*-ヘキサンで 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]

秤 取

↓ うなぎ、しじみ： 試料 10.0 g

アセトニトリル抽出

- ↓ *n*-ヘキサン 25 mL 及び *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 50 mL を加えホモジナイズ
- ↓ 遠心分離 (3,000 rpm、5 分間)
- ↓ アセトニトリル層を分取、ろ過
- ↓ *n*-ヘキサン層及び残留物に *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 25 mL を加えホモジナイズ
- ↓ アセトニトリル層を分取、ろ過
- ↓ ろ液を合わせ、アセトニトリルで 100 mL に定容

C18 ミニカラム (1,000 mg/6 mL)

- ↓ アセトニトリル 10 mL でコンディショニング
- ↓ 抽出液 25 mL を注入
- ↓ アセトニトリル 5 mL で溶出 (負荷液を含む全溶出液を採取)

濃 縮

↓ 4 mL 以下に減圧濃縮

転 溶

- ↓ 10 w/v%塩化ナトリウム溶液 40 mL
 - ↓ *n*-ヘキサン 40 mL、20 mL
- [しじみでは、2回目の振とう抽出時にエマルジョンが形成されたため、遠心分離 (3,000 rpm、5 分間) を行った。]

脱 水

↓ 無水硫酸ナトリウム、ろ過

濃 縮

↓ 約 2 mL に減圧濃縮

PSA ミニカラム (500 mg/3 mL)

- ↓ *n*-ヘキサン 10 mL でコンディショニング
- ↓ 濃縮液を注入
- ↓ *n*-ヘキサン 8 mL で溶出 (負荷液を含む全溶出液を採取)

濃 縮

- ↓ 約 2 mL に減圧濃縮
- ↓ *n*-ヘキサンで 5 mL にする

試験溶液



GC-MS(MS)

8. マトリックス添加標準溶液の調製

ブランク試験溶液 0.5 mL を採り、窒素気流下で溶媒を除去した後、各検討対象水産物の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 0.5 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

GC-MS(/MS)におけるジクロベニルのSIM及びSRMでの測定条件を検討するために、まず、SCAN測定を行った。マススペクトルを図1に示した。分子イオンピークの m/z 171がベースピークとして観察され、その同位体ピークである m/z 173が2番目に強度が強かった。そこで、SIM測定では、 m/z 171を定量イオン、 m/z 173を定性イオンに選択した。SRM測定用のプリカーサーイオンは、 m/z 171.0を選択した。 m/z 171.0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。プロダクトイオンには、強度の強い m/z 100.1及び136.1を選択し、 m/z 171.0→100.1を定量イオンに、 m/z 171.0→136.1を定性イオンに選択した。

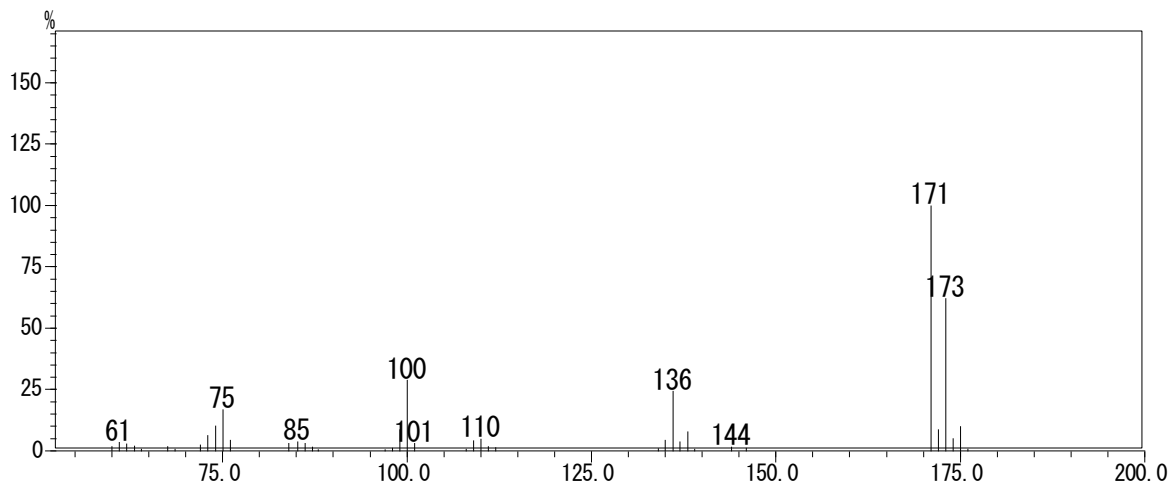


図1 ジクロベニルのマススペクトル
スキャン範囲：50～200 amu
測定条件：EI
ジクロベニル：1 mg/L

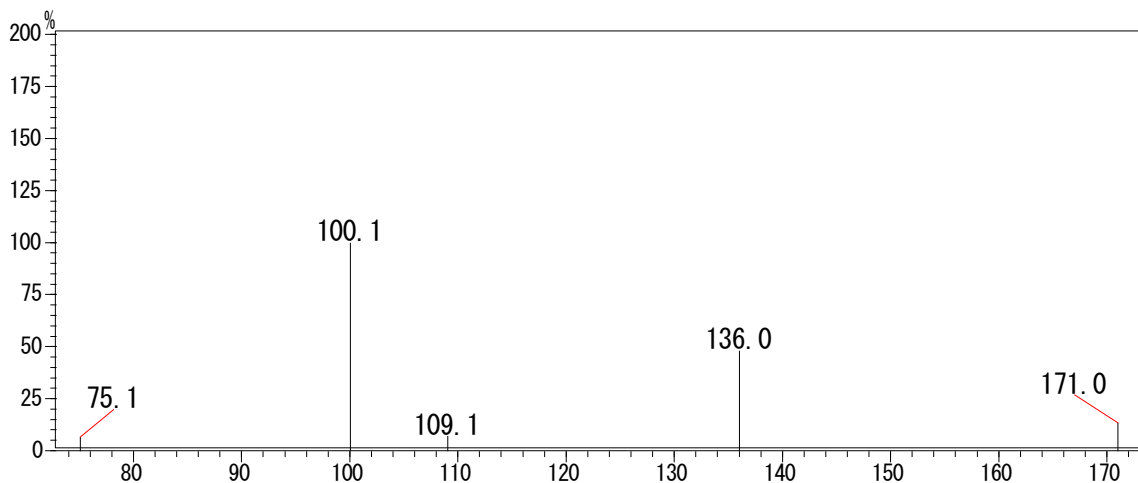


図2 ジクロベニルのプロダクトイオンスペクトル
プリカーサーイオン： m/z 171.0
測定条件：EI, CE=24 eV (CE : collision energy)
ジクロベニル：1 mg/L

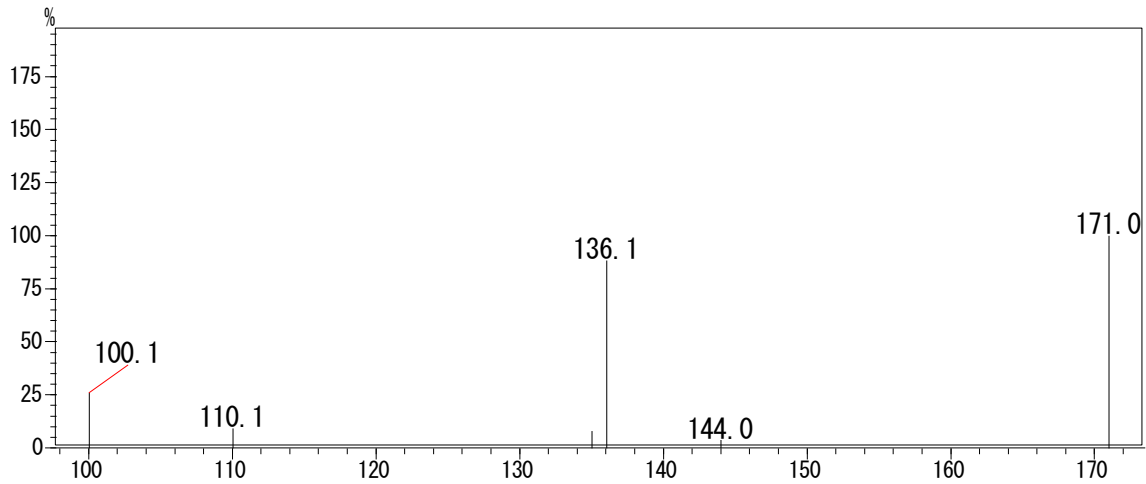


図3 ジクロベニルのプロダクトイオンペクトル
 プリカーサーイオン： m/z 171.0
 測定条件：EI, CE=14 eV (CE : collision energy)
 ジクロベニル：1 mg/L

(2) GC条件の検討

GC条件は、厚生労働省通知「GC/MSによる農薬等の一斉試験法I（農産物）」*²に示されたものと同等のカラム（Agilent Technologies社製DB-5MS、内径 0.25 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25 μ m）及び昇温条件を用いたところ、保持時間は8.4分であり、ピーク形状も良好であったことから、上記一斉試験法のGC条件を用いることとした。

(3) 検量線

SIM (m/z 171) 及び SRM (m/z 171.0 \rightarrow 100.1) で測定したジクロベニルの検量線を示した（図4及び5）。0.0025~1 mg/L の濃度範囲で作成した検量線の決定係数 r^2 は 0.999 以上であり良好な直線性を示した。

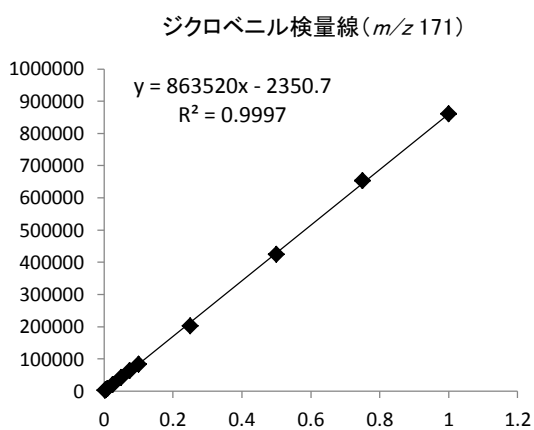


図4 ジクロベニル検量線 (SIM m/z 171)

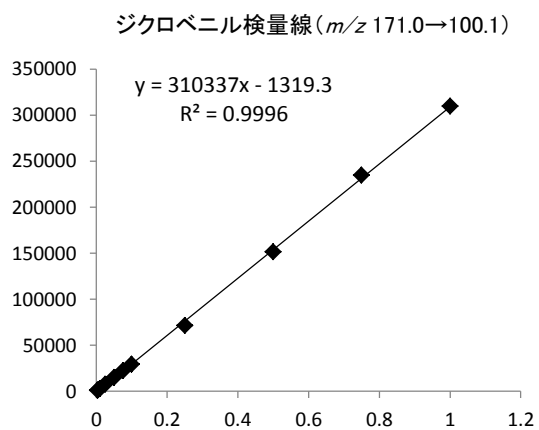


図5 ジクロベニル検量線 (SRM m/z 171.0 \rightarrow 100.1)

(5) 定量限界

定量限界の算出結果を以下に示した。

$$\begin{aligned} & \text{ジクロベニル } 0.005 \text{ mg/kg} \quad [\text{試験溶液量 } 5 \text{ (mL)/試験溶液中の試料量 } 2.5 \text{ (g)}] \\ & \quad \times [\text{ジクロベニルの定量限界相当量 } 0.0025 \text{ (ng)/注入量 } 1 \text{ (}\mu\text{L)}] \end{aligned}$$

2. 試験溶液調製法の検討

ジクロベニルは揮発性が高い [V_p 144 mPa (25°C)] 農薬であり、ジクロベニル試験法 (農産物) では、「濃縮時にはキーパーとしてジエチレングリコールを加え、乾固させないように充分注意する」との注意点が記載されている*2。そこで今回の試験法開発では、可能な限り溶媒除去 (乾固) の少ない方法を検討した。

(1) 抽出方法の検討

可能な限り溶媒除去 (乾固) 操作の少ない方法を開発するという方針から試験法を考案した結果、今回は、アセトニトリルと *n*-ヘキサン混合溶媒を用いて、アセトニトリルに抽出する方法を採用することとした。また、この方法を採用することで、抽出と同時に脱脂操作も行える利点もあった。そこで、水にジクロベニルを添加し、アセトニトリルと *n*-ヘキサン量を変化させたときの回収率を検討した。

水 10 mL にジクロベニル 100 μ g (100 μ g/mL アセトニトリル溶液 1 mL) を添加し、*n*-ヘキサン及び *n*-ヘキサン飽和アセトニトリルを加え、5 分間振とうした後、遠心分離 (3,000 rpm、5 分間) し、アセトニトリル層を採り、アセトニトリルで 100 mL に定容した (1 回目抽出液)。 *n*-ヘキサン層に *n*-ヘキサン飽和アセトニトリルを加え、同様に操作した (2 回目抽出液)。検討した溶媒量は、条件①及び②とした。

条件① *n*-ヘキサン 30 mL、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 30 及び 30 mL で抽出

条件② *n*-ヘキサン 25 mL、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 50 及び 25 mL で抽出

各抽出液を HPLC-UV で測定し、ジクロベニルの回収率を算出した結果を表 1 に示した。

条件①及び②の合計回収率は、各々 95.2 及び 96.3% であり、ともに良好な結果であった。しかし、両条件の 1 回目抽出における回収率を比較すると、条件①は 76.3%、条件②は 87.8% であり、条件②の方の回収率が高く、抽出効率がより高いと考えられた。

表 1 アセトニトリル及び *n*-ヘキサン混合溶媒による抽出の検討結果

		<i>n</i> -ヘキサン (mL)	<i>n</i> -ヘキサン飽和アセトニトリル (mL)		合計
			1 回目	2 回目	
条件①	溶媒量	30 mL	30 mL	30 mL	—
	回収率	—	76.3%	18.9%	95.2%
条件②	溶媒量	25 mL	50 mL	25 mL	—
	回収率	—	87.8%	8.5%	96.3%

水にジクロベニル 100 μ g (100 μ g/mL アセトニトリル溶液 1 mL) を添加

次に、うなぎ及びしじみ試料を用いて、条件①及び②の溶媒量を用いたときに抽出される試料マトリックスの差について検討した。抽出溶媒量を条件①及び②とし、その他は実験方法の 7. 試験溶液の調製に従い、試験溶液を調製した。各々の試験溶液を GC-MS において SCAN 測定 (スキャン範囲:

50~550 amu) した結果を図6及び7に示した。うなぎ及びしじみ試料ともに、条件①及び②においてトータルイオンクロマトグラムに大きな差は認められなかったため、1回目の抽出でジクロベニルの回収率がより高かった条件②を選択した。

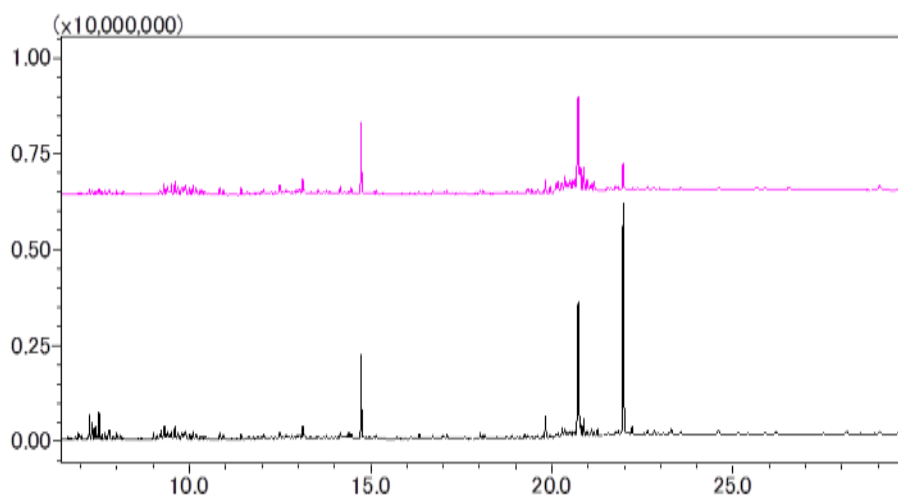


図6 うなぎのトータルイオンクロマトグラム (スキャン範囲：50~550 amu)
(黒：条件①、赤：条件②)

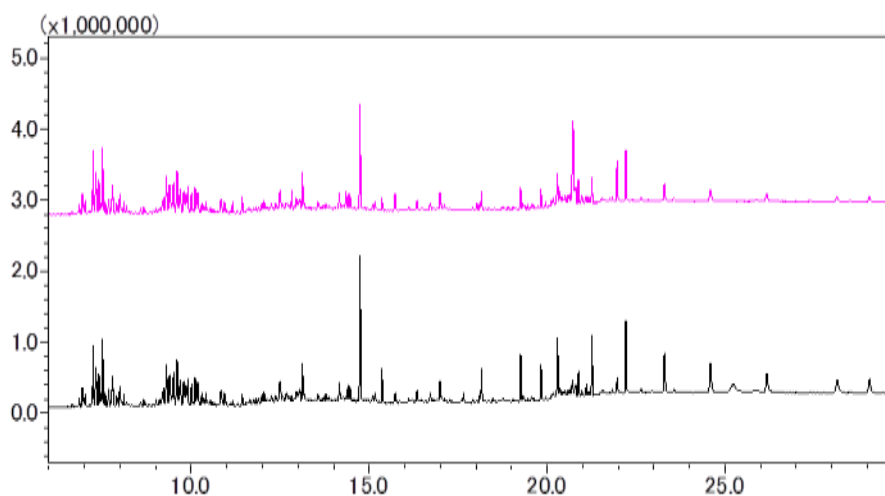


図7 しじみのトータルイオンクロマトグラム (スキャン範囲：50~550 amu)
(黒：条件①、赤：条件②)

今回選択した抽出溶媒は、脂肪を溶解しないアセトニトリルであるため、脂肪からのジクロベニルの抽出状況の評価する必要があった。そこで、以下のように牛の脂肪からの回収状況を確認した。

牛脂肪5gを採り、40℃の水浴で融解させた後、ジクロベニル0.5mgを添加し、充分混和した後、冷凍庫内(-19℃)に10分間放置し、再凝固させた。その後、室温で30分間放置した後、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル50mL及び*n*-ヘキサン25mLを加え、ホモジナイズした。遠心分離(3,000rpm、5分間)した後、アセトニトリル層を採り、アセトニトリルで100mLに定容した(1回目抽出液)。残留物及び*n*-ヘキサン層に*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル25mLを加え、上記と同様に操作し、アセトニトリルで100mLに定容した(2回目抽出液)。各抽出液10mLを採り、アセトニトリル10mLで予備洗浄したC18ミニカラムに各々負荷し、アセトニトリル5mLで溶出した。負荷液を含む全溶出

液を採り、アセトニトリルで 50 mL に定容し、試験溶液とした。HPLC-UV により測定し、各抽出液におけるジクロベニルの回収率を算出した結果を表 2 に示した。ジクロベニルの回収率は、1 回目の抽出で 89.5%、2 回目の抽出で 6.8% となり、2 回の抽出により 96.3% が回収された。

表 2 アセトニトリル及び *n*-ヘキサン混合溶媒による抽出の検討結果

	アセトニトリル		合計
	50 mL (1 回目)	25 mL (2 回目)	
回収率 (%)	89.5	6.8	96.3

添加量：牛脂肪 5 g に対し、0.5 mg (1,000 mg/L アセトン溶液 0.5 mL)

(2) C18 ミニカラム (1,000 mg/6 mL) による精製の検討

低極性化合物を除去する目的で、C18 ミニカラムによる精製を検討した。カラムをアセトニトリル 10 mL で予備洗浄した後、ジクロベニル 2 µg を負荷し、アセトニトリルで溶出したときの溶出状況を表 3 に示した。測定は HPLC-UV により行った。ジクロベニルは、アセトニトリル 2 mL で 97% が溶出され、3 mL でほぼ全量が溶出された。そこでカラムのロット間差等を考慮し、アセトニトリル 5 mL で溶出することとした。この操作により、色素の一部が除去可能であった。また、C18 ミニカラム精製を行わなかった場合、アセトニトリル抽出液を減圧濃縮していくと、濃縮された液がナス型フラスコの中で跳ねたり、泡が膨らんだりして、操作性が悪かったが、C18 ミニカラム処理をすることによりこれらの現象が認められなくなり、操作性が改善された。

表 3 C18 ミニカラムからの溶出状況

	アセトニトリル				合計
	0-1 mL	1-2 mL	2-3 mL	3-4 mL	
回収率 (%)	nd	96.6	3.3	nd	99.9

負荷量：2 µg (10 mg/L アセトニトリル溶液 0.2 mL を C18 ミニカラムに負荷)

(3) 転溶溶媒の検討

10 w/v% 塩化ナトリウム溶液 30 mL にジクロベニル 600 µg を加え、*n*-ヘキサン 30 mL 及び 15 mL で振とう抽出を行った。抽出した各 *n*-ヘキサン層を無水硫酸ナトリウムで脱水した後、適宜濃縮し、*n*-ヘキサンで 30 mL とした。これを 50 µL 採り、メタノールで 1 mL としたものを HPLC-UV で測定し、回収率を計算した結果を表 4 に示した。ジクロベニルは、*n*-ヘキサン 1 回の転溶で 95% が回収され、2 回目を合わせて 96% 回収された。この結果から、転溶操作は、10 w/v% 塩化ナトリウム溶液から *n*-ヘキサンによる 2 回の振とう抽出で行うこととした。

表 4 *n*-ヘキサンへの転溶の検討

	30 mL (1 回目)	15 mL (2 回目)	合計
回収率 (%)	94.9	0.9	95.8

(4) PSA ミニカラムによる精製 (500 mg/3 mL) の検討

カラムを *n*-ヘキサン 10 mL で予備洗浄した後、ジクロベニル 20 µg を負荷し、*n*-ヘキサンで溶出した。各

フラクションの溶出液を50 μ L採り、メタノールで1 mLとしたものをHPLC-UVで測定し、回収率を計算した結果を表5に示した。ジクロベニルは、*n*-ヘキサン6 mLでほぼ全量が溶出された。以上の結果から、カラムのロット間差等を考慮し、*n*-ヘキサン8 mLで溶出することとした。この操作により色素が除去され、試験溶液はほぼ無色となった。また、ミニカラム精製前は、ナス型フラスコ上に目視で充分確認できる量の残留物が認められたが、ミニカラム精製後は、残留物は目視ではほとんど確認できなかった。PSAミニカラムで精製する前のしじみ試料抽出液及びPSAミニカラムで精製した後のしじみ抽出液をスキャン測定したトータルイオンクロマトグラム（スキャン範囲：50～550 amu）を図8に示した。

表5 PSAミニカラムからの溶出状況

	<i>n</i> -ヘキサン							合計
	0-1 mL	1-2 mL	2-3 mL	3-4 mL	4-5 mL	5-6 mL	6-7 mL	
回収率 (%)	nd	nd	21.7	67.3	11.9	1.3	nd	102.2

負荷量：20 μ g（1,000 mg/L *n*-ヘキサン溶液20 μ LをPSAミニカラムに負荷）

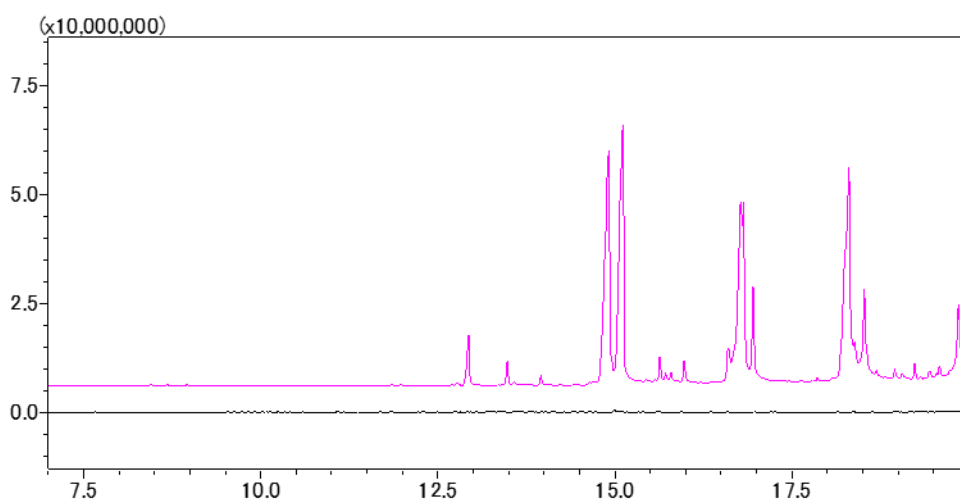


図8 PSAミニカラム精製前後のトータルイオンクロマトグラム（しじみ試料抽出液）
（スキャン範囲：50～550 amu、赤：PSAミニカラム前、黒：PSAミニカラム後）

（5）溶媒濃縮方法の検討

ジクロベニルは揮発性が高い [V.p 144 mPa (25 $^{\circ}$ C)] 農薬であり、ジクロベニル試験法（農産物）では、濃縮時にキーパーとして2%ジエチレングリコール・アセトン溶液を加えている*²。そこで、以下の実験を行い、濃縮方法により回収率等に差が認められるか検討した。

しじみにジクロベニル0.01 μ g/gを添加し、*n*-ヘキサン存在下、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル50 mL及び25 mLでホモジナイズ抽出し、アセトニトリル層を合わせ100 mLに定容した。アセトニトリル抽出液20 mLずつを3つ採り、各々C18ミニカラムで精製し、濃縮した後、10 w/v%塩化ナトリウム溶液40 mLを加え、*n*-ヘキサン40 mL及び20 mLで2回振とう抽出した。*n*-ヘキサン抽出を合わせ、無水硫酸ナトリウムを加え脱水した後、無水硫酸ナトリウムをろ別した。

①ろ液を2 mLまで減圧下濃縮し、濃縮液をPSAミニカラムに負荷した。*n*-ヘキサン8 mLで溶出した後、

溶出液を減圧下濃縮し、その後窒素気流下溶媒を除去し、アセトンで4 mLとした。

②ろ液に2%ジエチレングリコール・アセトン溶液0.5 mLを加え、2 mLまで減圧下濃縮し、濃縮液をPSAミニカラムに負荷した。n-ヘキサン8 mLで溶出した後、溶出液に2%ジエチレングリコール・アセトン溶液0.5 mL加え、減圧下濃縮し、その後窒素気流下溶媒を除去し、アセトンで4 mLとした。

③ろ液を2 mLまで減圧下濃縮し、濃縮液をPSAミニカラムに負荷した。n-ヘキサン8 mLで溶出した後、溶出液を2 mL以下まで減圧下濃縮し、n-ヘキサンで4 mLとした。

なお、溶媒濃縮時の減圧度は140 mmHgに設定し、窒素による溶媒除去は穏やかに行った。

各条件により調製した添加回収試験溶液、マトリックス添加標準溶液及び溶媒標準溶液をSRM測定し、回収率と試料マトリックスの測定値に与える影響について検討した結果を表6に示した。回収率は、条件③が最も高く、条件①及び②では、窒素乾固によりジクロベニルが揮散したため、回収率が低下したと考えられた。また、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 (Mt/Std) を求めたところ、条件①及び③では1.00に近い値であり、マトリックスの測定値への影響は小さかったが、②では面積比は1.18であり、20%近くの増感が認められた。これはキーパーとして使用したジエチレングリコールが測定値に大きな影響を与えているためと思われた。以上の結果より、試験溶液調製では、条件③の方法を採用することとした。

表6 溶媒濃縮方法の検討結果

条件	回収率 (%)	Mt/Std
①キーパー無、濃縮・窒素乾固	73.1	1.04
②キーパー有、濃縮・窒素乾固	84.7	1.18
③キーパー無、濃縮	88.1	1.03

回収率は、各無添加試料より調製したマトリックス添加標準溶液により計算した。

3. 添加回収試験

うなぎ及びしじみの2水産物を試料に用いて、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9~16に示した。また、各食品のブランク試料のスキャン測定による代表的なトータルイオンクロマトグラムを図17に示した。なお、測定に使用した機器はGC-MS/MSであるが、Q3SIMモードでの測定については、GC-MS SIM測定と表記した。

(1) 選択性

選択性の検討結果を表7に示した。検討したうなぎ及びしじみ試料ともに定量を妨害するピークは認められなかった。

表7 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)			
	GC-MS SIM測定															
	ジクロベニル	うなぎ	0.005	0.05	基準値	0.05	< 0.100	面積	0	0	0	37227	31693	34460	0.000	○
		しじみ	0.005	0.05	基準値	0.05	< 0.100	面積	0	0	0	26126	24308	25217	0.000	○
	GC-MS/MS SRM測定															
	ジクロベニル	うなぎ	0.005	0.05	基準値	0.05	< 0.100	面積	0	0	0	12477	10883	11680	0.000	○
		しじみ	0.005	0.05	基準値	0.05	< 0.100	面積	0	0	0	9378	8743	9061	0.000	○

*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、精度及び定量限界

真度及び併行精度の検討結果を表8に示した。GC-MS SIM測定では、真度は89.7~100.0%、併行精度は2.7~4.8%であり、GC-MS/MS SRM測定では、真度は90.9~99.3%、併行精度は1.8~4.8%と良好な結果が得られた。また、定量限界濃度で添加した時のジクロベニルピークのS/N比はGC-MS SIM測定では74.2~82.9、GC-MS/MS SRM測定では、36.4~42.3であり、十分な感度が得られていた。

表8 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 [検出限界] (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 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	
	GC-MS SIM測定																			
	ジクロベニル	うなぎ	0.005	0.05	0.005	S/N	21	-4	0.9965	94.0	84.6	89.6	94.0	86.5	89.7	4.8	81.6	66.9	74.2	
		うなぎ	0.005	0.05	0.05	—	309	-186	0.9976	99.6	96.9	93.5	94.8	93.5	95.7	2.7				
		しじみ	0.005	0.05	0.005	S/N	22	46	0.9961	95.4	103.3	102.5	99.0	99.6	100.0	3.1	74.2	91.5	82.9	
		しじみ	0.005	0.05	0.05	—	240	251	0.9992	90.3	87.2	90.0	89.3	96.8	90.7	4.0				
	GC-MS/MS SRM測定																			
	ジクロベニル	うなぎ	0.005	0.05	0.005	S/N	8	1	0.9950	92.8	83.7	92.1	92.3	95.2	91.2	4.8	36.4	36.4	36.4	
		うなぎ	0.005	0.05	0.05	—	107	-94	0.9984	97.2	93.5	95.0	96.1	93.3	95.0	1.8				
		しじみ	0.005	0.05	0.005	S/N	8	15	0.9970	99.1	93.4	100.6	103.7	99.8	99.3	3.8	47.2	37.5	42.3	
		しじみ	0.005	0.05	0.05	—	84	27	0.9998	89.3	87.5	89.5	90.4	97.7	90.9	4.3				

*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。

(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9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ところ、GC-MS SIM 測定では 1.00~1.04、GC-MS/MS SRM 測定では 1.01~1.05 であり、測定値へのマトリックスの影響は小さかった。

表9 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 [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		
	GC-MS SIM測定															
	ジクロベニル	うなぎ	0.005	0.05	0.005	0.0025	面積	0	1957	2024	1991	1994	1988	1991	1.00	
		うなぎ	0.005	0.05	0.05	0.025	面積	0	37227	31398	34313	33563	32225	32894	1.04	
		しじみ	0.005	0.05	0.005	0.0025	面積	0	2548	2467	2508	2393	2432	2413	1.04	
		しじみ	0.005	0.05	0.05	0.025	面積	0	26126	25746	25936	25099	25976	25538	1.02	
	GC-MS/MS SRM測定															
	ジクロベニル	うなぎ	0.005	0.05	0.005	0.0025	面積	0	784	776	780	767	747	757	1.03	
		うなぎ	0.005	0.05	0.05	0.025	面積	0	12477	10646	11562	11219	10735	10977	1.05	
		しじみ	0.005	0.05	0.005	0.0025	面積	0	914	849	882	886	816	851	1.04	
		しじみ	0.005	0.05	0.05	0.025	面積	0	9378	9259	9319	9204	9212	9208	1.01	

*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。

(4) その他

シリカゲルミニカラム及びフロリジルミニカラムによる溶出状況を確認した。*n*-ヘキサン 10 mL で予備洗浄した Sep-Pak プラスシリカゲルミニカラム (690 mg、Waters 社製) または Sep-Pak プラスフロリジルミニカラム (910 mg、Waters 社製) にジクロベニル 20µg (1,000µg/mL ヘキサン溶液を 20µL) を負荷し、各種溶媒を順次注入したときのジクロベニル溶出状況を表 10 及び 11 に示した。シリカゲルミニカラムまたはフロリジルミニカラムにおいて、ジクロベニルは *n*-ヘキサン 10 mL では溶出が認められず、エーテル及び *n*-ヘキサン混液により溶出した。エーテル及び *n*-ヘキサン混液を用いた場合、最終試験溶液を調製するには、溶媒を乾固する必要があるがあった。ジクロベニルは揮発性が高い農薬であることから、今回の試験法は、溶媒を乾固することなく試験溶液を調製する方法を採用する方針であったため、*n*-ヘキサンにより溶出するミニカラムを採用することとしていた。これらのことから、シリカゲルミニカラムまたはフロリジルミニカラムによる精製は採用しなかった。

表 10 Sep-Pak プラスシリカゲルミニカラムからの溶出状況

	<i>n</i> -ヘキサン	エーテル： <i>n</i> -ヘキサン			合計
		1：9	2：8	3：7	
	0-10 mL	0-10 mL	0-10 mL	0-10 mL	
回収率 (%)	nd	103.6	nd	nd	103.6

表 11 Sep-Pak プラスフロリジルミニカラムからの溶出状況

	<i>n</i> -ヘキサン	エーテル： <i>n</i> -ヘキサン			合計
		1：9	2：8	3：7	
	0-10 mL	0-10 mL	0-10 mL	0-10 mL	
回収率 (%)	nd	9.3	93.7	nd	103.0

4. 考察

ジクロベニルは揮発性が高い [V.p 144 mPa (25°C)] 農薬であり、ジクロベニル試験法（農産物）では、「濃縮時にはキーパーとしてジエチレングリコールを加え、乾固させないように充分注意する」との注意点が記載されている*2。そこで今回の試験法開発では、溶媒除去（乾固）をしない方法を考案し、各種検討を行った。

抽出方法は、アセトニトリルと *n*-ヘキサンの混合溶媒を用いて、アセトニトリルに抽出する方法を採用することとした。抽出操作で用いる *n*-ヘキサン及びアセトニトリルの量を①*n*-ヘキサン 30 mL を加え、アセトニトリル 30 mL 及び 30 mL で 2 回抽出、②*n*-ヘキサン 25 mL を加え、アセトニトリル 50 mL 及び 25 mL で 2 回抽出の 2 条件で比較したところ、2 回抽出の合計回収率に差はほとんど認められなかった。しかし、1 回目及び 2 回目の回収率には差が認められ、②の方が 1 回目の回収率が高く、より抽出効率が高いと考えられた。条件①及び②におけるうなぎ及びしじみ試料マトリックスの差をスキャン測定のとータルイオンクロマトグラムで確認したところ、大きな差は認められなかった。そこで、条件②を用いて牛脂肪中のジクロベニルの回収試験を行ったところ、回収率は良好であったことから、抽出方法は条件②とした。

C18 ミニカラムで精製することで、色素の一部が除去され、また、アセトニトリル抽出液の減圧濃縮の操作性が向上した。

PSA ミニカラムに負荷した後、*n*-ヘキサンにより溶出することで、色素が除去された。また、ミニカラム精製前は目視で充分確認できる量の残留物が認められたが、ミニカラム精製後の残留物は、目視ではほとんど確認できず、十分な精製効果があった。

PSA ミニカラムの溶出液の溶媒を除去（乾固）した場合、ジクロベニルの回収率の低下が認められた。また、ジクロベニル試験法（農産物）*2 で用いられているジエチレングリコールをキーパーとした場合、GC-MS(MS)測定において増感作用が認められた。そこで、キーパーを用いることなく溶出液を濃縮した後、*n*-ヘキサンで規定量として試験溶液を調製したところ、回収率の低下及び試料マトリックスの増感作用もほとんど認められなかったことから、この方法を採用した。

開発した方法を用いて、うなぎ及びしじみに残留基準値（ともに 0.05 mg/kg）及び定量限界濃度（ともに 0.005 mg/kg）を添加し、回収試験を行ったところ、選択性、真度及び併行精度は妥当性評価ガイドライン*4 の目標値を満足し、試料マトリックスの測定値への影響も少なく、良好な結果が得られた。

以上の結果から、本ジクロベニル試験法は、水産物に適用可能であると判断された。

【結論】

水産物中のジクロベニル試験法として、ジクロベニルを試料から *n*-ヘキサン存在下アセトニトリルで抽出し、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムで精製した後、*n*-ヘキサンに転溶し、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で精製した後、GC-MS または GC-MS/MS で定量し、確認する方法を開発した。開発した試験法をうなぎ及びしじみの 2 水産物に適用した結果、GC-MS SIM 測定では、真度は 89.7~100.0%、併行精度は 2.7~4.8%であり、GC-MS/MS SRM 測定では、真度は 90.9~99.3%、併行精度は 1.8~4.8%の良好な結果が得られた。また、定量限界として 0.005 mg/kg を設定可能であることが確認された。

[参考文献]

- *1 食品安全委員会“農薬評価書 ジクロベニル”平成 26 年 7 月,
<http://www.mhlw.go.jp/file/05-Shingikai-11121000-Iyakushokuhinkyoku-Soumuka/0000070032.pdf>
- *2 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知“食品に残留する農薬, 試料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について (一部改正)”平成 17 年 11 月 29 日, 食安発第 1129002 号 (2005).
- *3 厚生労働省, 農作物対象の GC/MS 一斉分析法及び LC/MS 一斉試験法, 並びに畜水産物対象の GC/MS 一斉分析法の検討結果 (平成 15・16 年度),
<http://www-bm.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/syoku-anzen/positivelist/dl/040806-111.pdf>
- *4 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知“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の一部改正について”平成 22 年 12 月 24 日、食安発第 1224 第 1 号 (2010).

① 添加回収試験における代表的なクロマトグラム

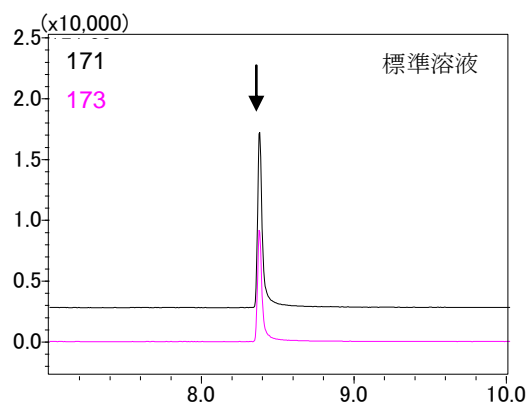
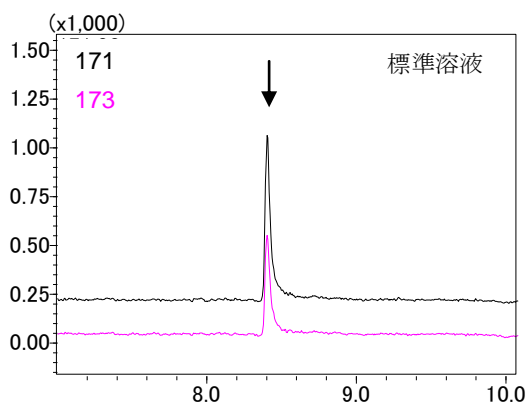
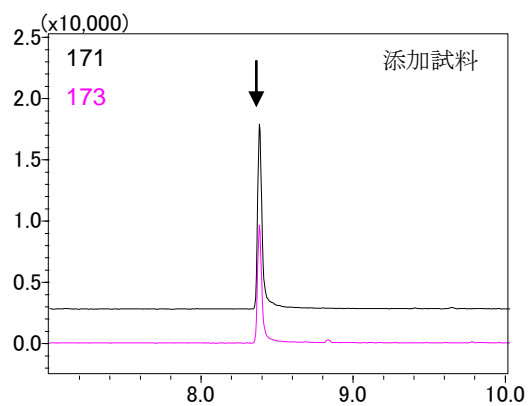
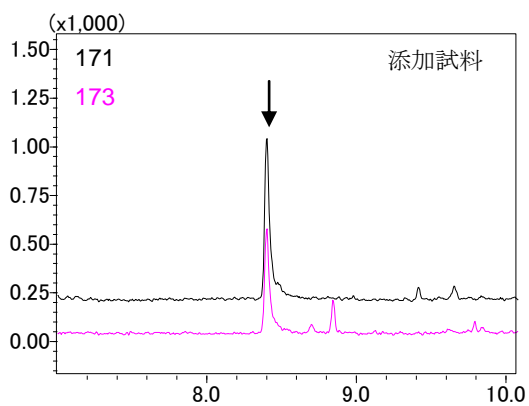
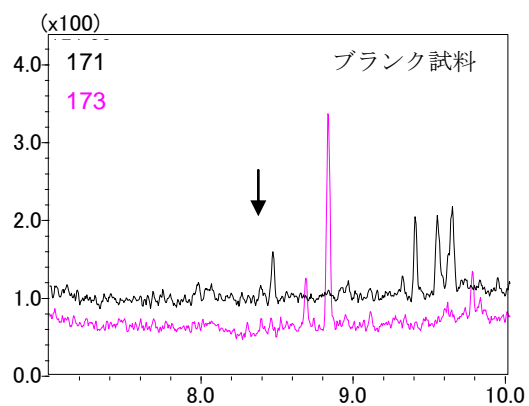
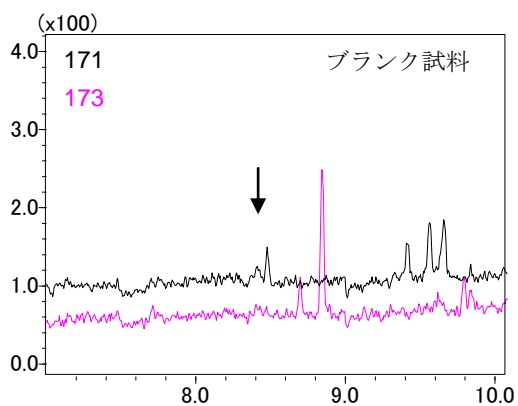


図9 うなぎのSIMクロマトグラム
(添加濃度 0.005 mg/kg)

図10 うなぎのSIMクロマトグラム
(添加濃度 0.05 mg/kg)

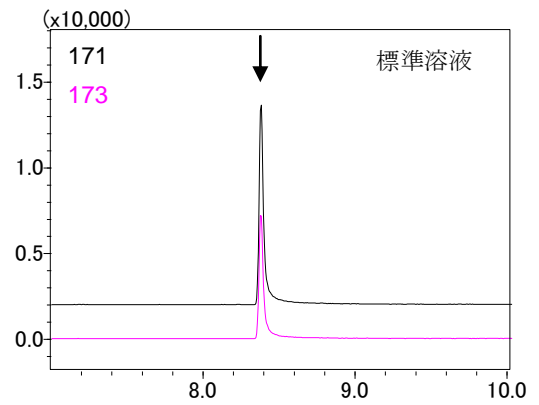
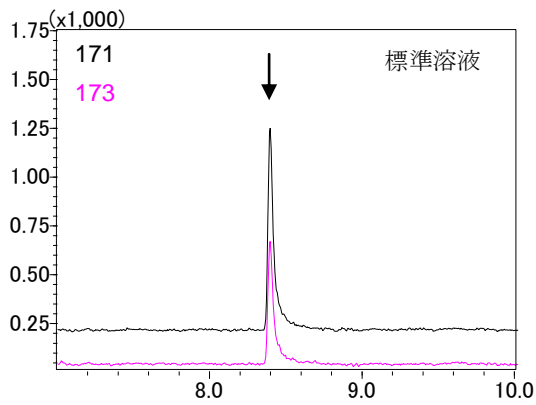
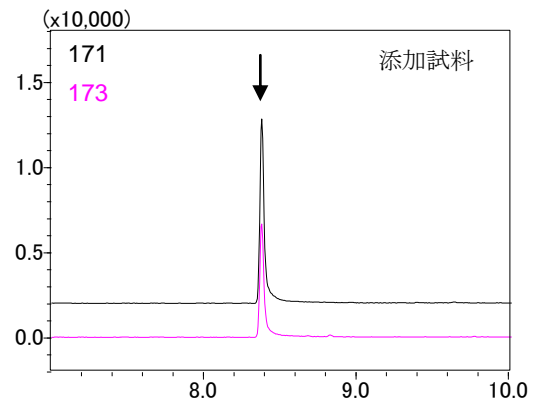
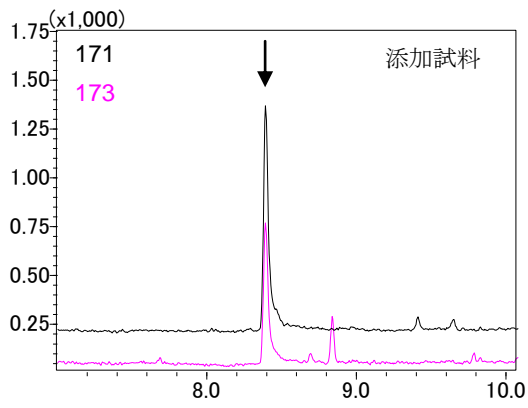
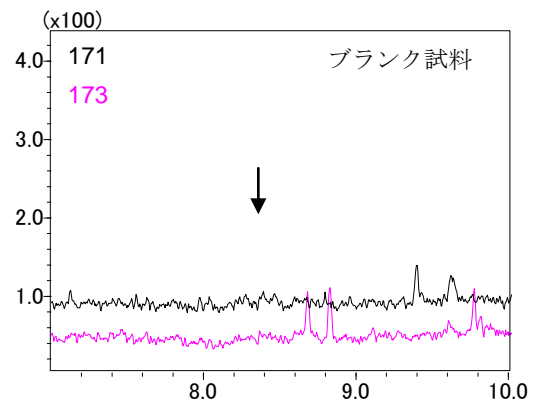
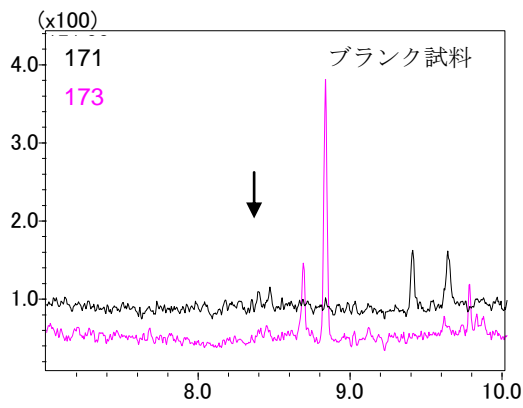


図 11 しじみの SIM クロマトグラム
(添加濃度 0.005 mg/kg)

図 12 しじみの SIM クロマトグラム
(添加濃度 0.05 mg/kg)

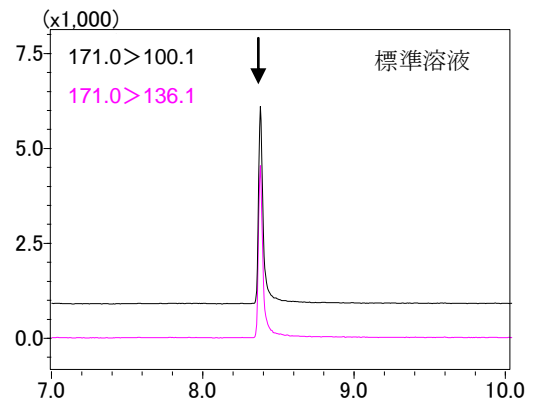
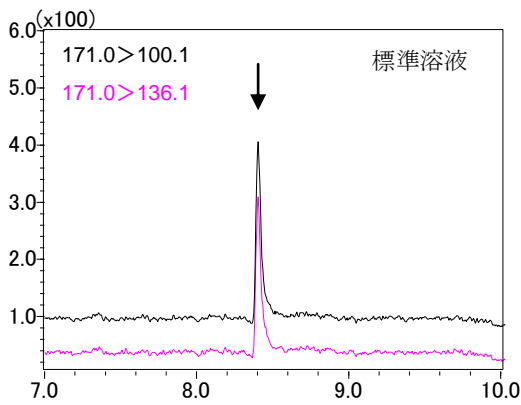
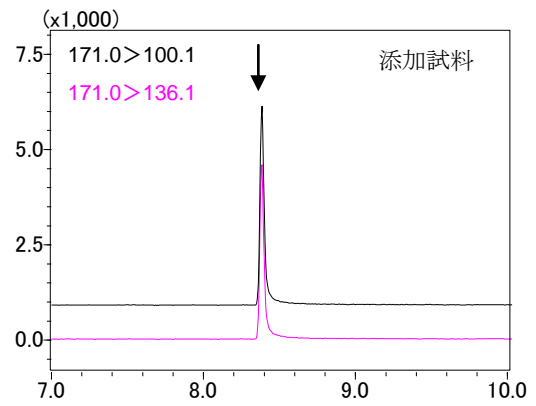
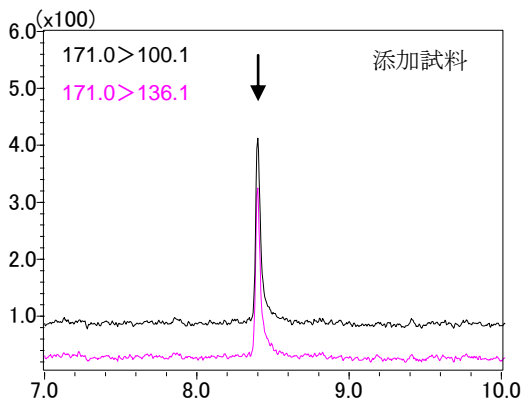
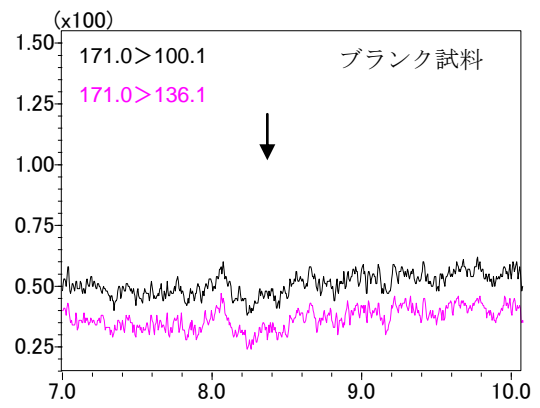
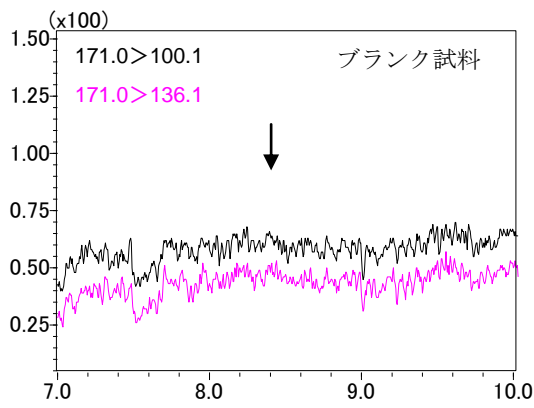


図 13 うなぎの SRM クロマトグラム
(添加濃度 0.005 mg/kg)

図 14 うなぎの SRM クロマトグラム
(添加濃度 0.05 mg/kg)

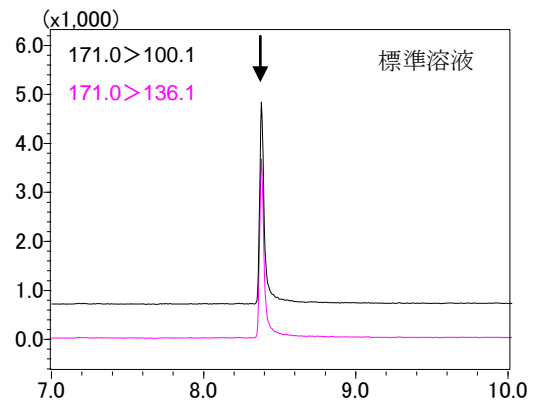
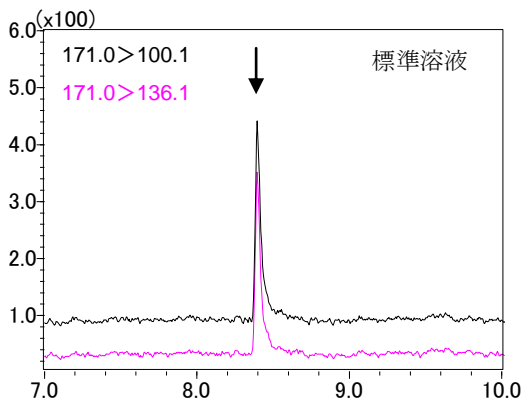
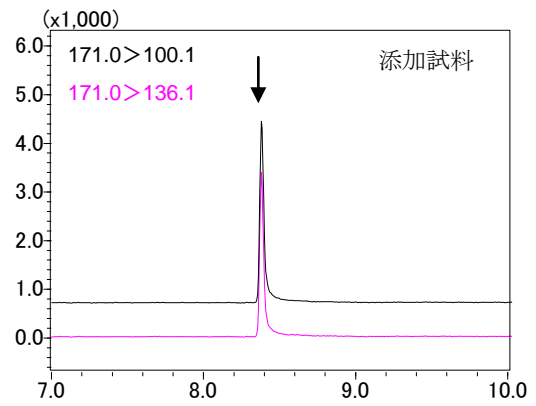
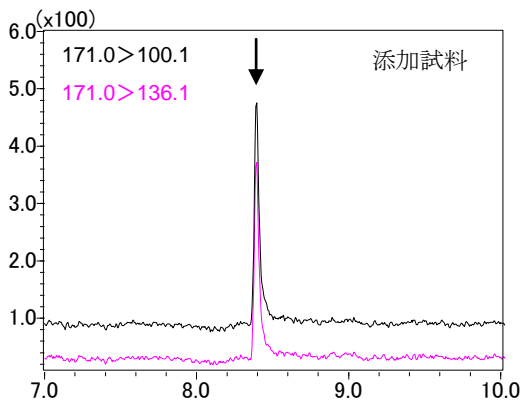
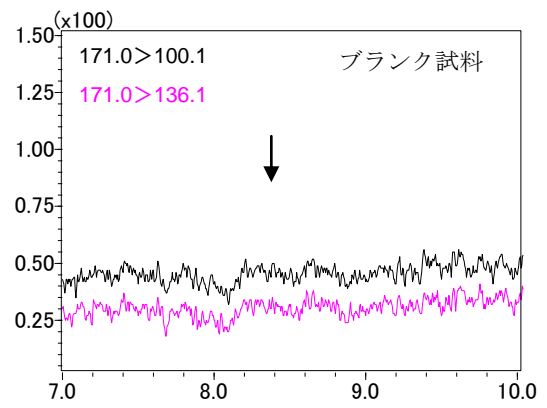
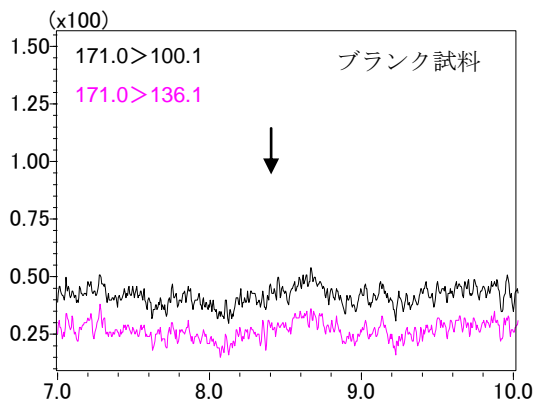


図 15 しじみの SRM クロマトグラム
(添加濃度 0.005 mg/kg)

図 16 しじみの SRM クロマトグラム
(添加濃度 0.05 mg/kg)

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

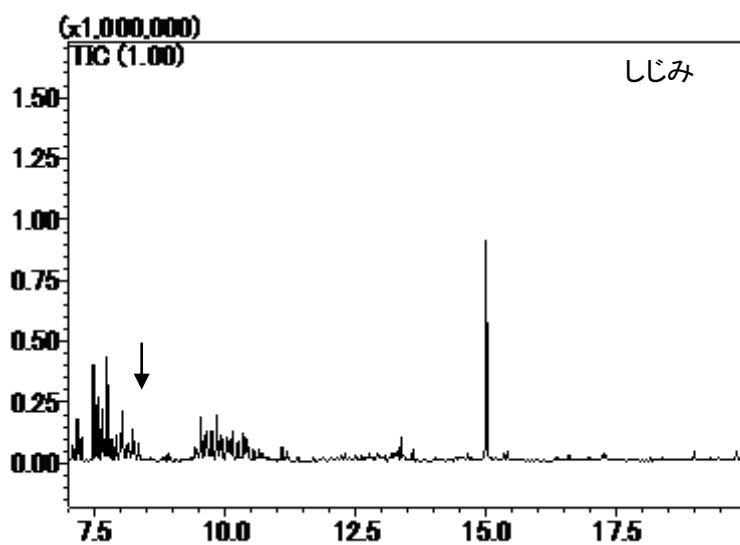
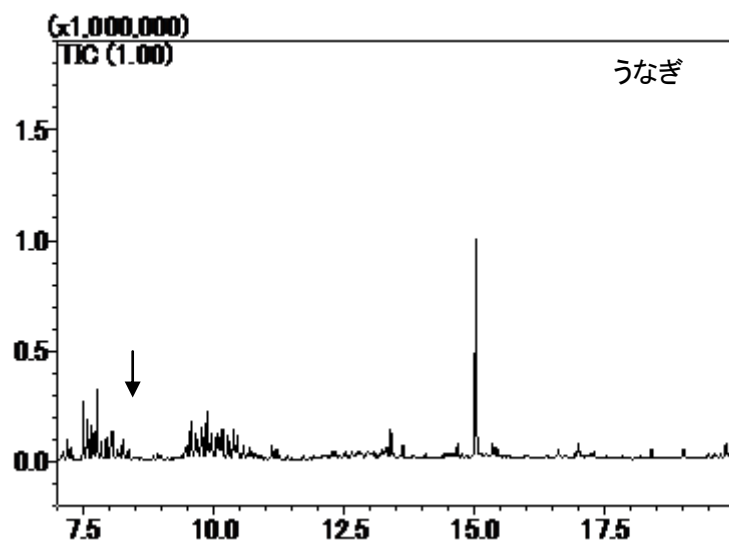


図 17 ブランク試料のトータルイオンクロマトグラム (スキャン範囲 : 50~550 amu)