

※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19年度

食品・添加物等規格基準に 関する試験検査等について

食品に残留する農薬等の成分である物質の試験法開発

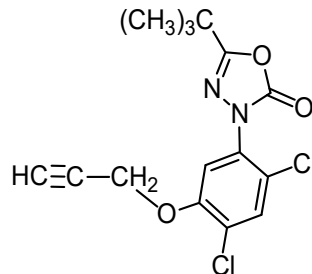
オキサジアルギル（農産物）に関する試験

オキサジアルギル (Oxadiargyl) に関する試験法 (検討内容)

[緒言]

1. 構造式等

オキサジアルギル



C₁₅H₁₄Cl₂N₂O₃ : 341.2

化学名 : 5-tert-ブチル-3-[2,4-ジクロロ-5-(プロパ-2-イニルオキシ)フェニル]-1,3,4-オキサジアゾール-2(3H)-オン

融点: 131°C. 蒸気圧: 2.5 × 10⁻⁶ Pa (25°C).

溶解性(20°C): 水 0.37 mg/L,

トルエン 77.6, メタノール 14.7, ヘキサン 0.9,

アセトン 250, アセトニトリル 94.6, 酢酸エチル 121.6 (g/L)

分配係数: log Pow=3.95

【The Pesticide Manual 14th Edition から引用】

2. 基準値案(新規登録、ppm)

米 0.05

3. 分析対象成分

オキサジアルギル(本体のみ)

4. 試験法の組み立て

オキサジアルギルはプロパルギル基とオキサジアゾール骨格を有する新規化合物ゆえ、既存の個別試験法の適用は不明である。また、一斉試験法(LC/MS-I法)の適用についても、玄米及び茶において検討を行ったが、結果は不良であった。したがって、オキサジアルギルについては、単独の試験法を提案する。

提案法は、作物残留性試験の分析法^{*1}を参考に、最近の精製手法(オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム及び合成ケイ酸マグネシウムミニカラム)の採用を検討した。また、測定法として、広範囲な農産物への適用を考慮し、高感度測定が可能なLC-MS法の採用を検討した。

検討作物として、米(残留基準設定作物)のほか、果実、野菜、豆類、いも類の中から代表的な8種作物、並びに難分析試料として茶を選定した。その結果、いずれの農産物に対しても良好な結果が得られた。

^{*1} 作物残留性試験の分析法(概要)

アセトニトリル抽出後、多孔性ケイソウ土カラム、C18ミニカラム及びフロリジルミニカラムで精製した後、GC(NPD)で定量する。

[実験方法]

1. 試料

下記 10 種農産物試料を次の手順で前処理して分析法の検討に供した。

1) 玄米

試料 (約 500 g) を超遠心粉碎機で磨砕均一化した。

2) 大豆 (乾燥子実)

試料 (約 500 g) を超遠心粉碎機で磨砕均一化した。

3) ばれいしょ (塊茎: 泥を水で軽く洗い落としたもの)

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

その一部 (約 800 g) を無作為に取り、ミキサーで磨砕均一化した。

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

試料 (約 500 g) を細切し、ミキサーで磨砕均一化した。

5) キャベツ (葉球: 外側変質葉及び芯を除去したもの)

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

その一部 (約 800g) を無作為に取り、ミキサーで磨砕均一化した。

6) りんご (果実: 花落ち、芯および果梗の基部を除去したもの)

試料 (約 800 g) をミキサーで磨砕均一化した。

7) オレンジ (果実: へたを除去したもの)

試料 (約 800 g) をミキサーで磨砕均一化した。

8) トマト (果実: へたを除去したもの)

試料 (約 800 g) をミキサーで磨砕均一化した。

9) いちご (果実: へたを除去したもの)

試料 (約 800 g) をミキサーで磨砕均一化した。

10) 茶 (荒茶)

試料 (約 100 g) をミキサーで磨砕均一化した。

2. 試薬・機器

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

アセトニトリル: LC-MS 用 (和光純薬工業株式会社)

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

オキサジアルギル標準品: 純度 99.9% (ローヌ・プーラン油化アグロ株式会社)

その他の試薬: 特級

C18 ミニカラム: Bond Elut C18, 1 g/6 mL (Varian 社)

グラファイトカーボンミニカラム: Supelclean ENVI-Carb (500mg, Supelco 社)

フロリジルミニカラム: Sep-Pak フロリジルカートリッジ、プラス (Waters 社)

ミキサー: MX-V100 (パナソニック株式会社)

超遠心粉碎機: ZM1 (Retsch 社)

3. LC-MS 測定装置

	型 式	会 社
MS 装置	1100 Series (四重極型)	Agilent Technologies 社
LC 装置	ポンプ: G1312A、2 液高压グラジェント式 フォトダイオードアレイ検出器: G1315B オートサンプラー: G1329A	Agilent Technologies 社

	質量分析計：G1946D	
データ処理装置	ChemStation	Agilent Technologies 社

4. LC-MS 測定条件

LC 条件	
カラム	Atlantis dC18 サイズ：内径 2.1mm, 長さ 150mm, 粒径 5 μ m 会社：Waters 社
移動相流速 (mL/min)	0.2
注入量 (μ L)	5
カラム温度 ($^{\circ}$ C)	40
移動相 (v/v)	5mmol/L 酢酸アンモニウム溶液及び 5mmol/L 酢酸アンモニウム含有メタノール溶液 (1 : 4) 混液
保持時間 (min)	6
MS 条件	
測定モード	MS、選択イオン検出
イオン化モード	ESI (+)
イオン導入電圧 (V)	3000
フラグメンター電圧 (V)	200
乾燥ガス流量 (L/min)	窒素、12
乾燥ガス温度 ($^{\circ}$ C)	350
ネブライザー圧力 (psi)	50
モニタリングイオン	343.0 (定性用)、341.0 (定量用)

5. 定量

オキサジアルギル標準品 10.0 mg を 50 mL 容メスフラスコに精秤し、アセトニトリルで定容して 200 mg/L 溶液を調製した。この溶液をアセトニトリル及び水 (1:4) 混液で希釈して 0.0005、0.001、0.002、0.005、0.01 および 0.02 mg/L の標準溶液を調製した。この溶液の 5 μ L を LC-MS に注入して、データ処理装置を用いてオキサジアルギルのピーク面積を測定し、横軸に重量、縦軸にピーク面積をとって検量線を作成した。

次項に従い調製した試験溶液 5 μ L を LC-MS に注入し、検量線よりオキサジアルギルの含量を求め、試料中の残留濃度を算出した。

6. 試験溶液の調製

1) 概要

アセトニトリル抽出、オクタデシルシリル化シリカゲル(C18)ミニカラム及び合成ケイ酸マグネシウム(FI)ミニカラムで精製した後、LC-MSで定量・確認した(分析フローチャート参照)。

2) 抽出

果実及び野菜の場合は試料20.0 gを三角フラスコに量り採った。穀類、豆類及び種実類の場合は試料10.0 g、茶の場合は試料5.00 gを三角フラスコに量り採り、それぞれ水20 mLを加え、30分間放置した。

これにアセトニトリル100 mLを加え、ホモジナイズした後、ろ紙 (ϕ 60 mm、日本理化

学器械 No.704) を敷いた桐山ロートを用いて吸引ろ過した。ろ紙上の残留物を三角フラスコに掻き取り、アセトニトリル50 mLを加えてホモジナイズし、上記と同様にろ過した。ろ液を共栓付きメスシリンダーに合わせ、アセトニトリルを加えて正確に200 mLとし、この10 mLに水10 mLを加えて、ロータリーエバポレーターを用いて40°C以下で約10 mLまで濃縮した。

3) 精製

① オクタデシルシリル化シリカゲルカラムクロマトグラフィー

減圧マニユホールドにオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム (1,000 mg) を装着し、アセトニトリル及び水各5 mLを順次注入し、流出液を捨てた。オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムに、2) で得られた溶液を注入した後、さらにアセトニトリル及び水 (1 : 1) 混液10 mLを注入し、流出液は捨てた。次いでアセトニトリル及び水 (7 : 3) 混液10 mLを注入し、溶出液を取り、ロータリーエバポレーターを用いて40°C以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物に*n*-ヘキサン5 mLを加えて溶かした。

② フロリジルカラムクロマトグラフィー

減圧マニユホールドにフロリジルミニカラム (900 mg) を装着し、*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、さらに*n*-ヘキサン5 mLを注入し、流出液は捨てた。次いで酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (1 : 9) 混液10 mLを注入し、溶出液をナス型フラスコに取り、ロータリーエバポレーターを用いて40°C以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物を水及びメタノール (1 : 4) 混液に溶解し、果実及び野菜の場合は正確に10 mL、穀類、豆類、種実類の場合は正確に5 mL、茶の場合は正確に2.5 mLとしたものを試験溶液とした。

分析フローチャート

(抽出)

秤 取

↓ 果実、野菜： 試料 20.0 g を採取
穀類、豆類、種実類： 試料 10.0 g に水 20 mL を加え 30 分間放置
茶： 試料 5.00 g に水 20 mL を加え 30 分間放置

アセトニトリル抽出

↓ アセトニトリル 100 mL、ホモジナイズ、抽出後・ろ過
残渣はアセトニトリル 50 mL で同様に抽出・ろ過
ろ液を合わせ、アセトニトリルで 200 mL に定容
10 mL 採取(果実等 1 g 相当、穀類等 0.5 g 相当、茶 0.25 g 相当)
水 10 mL 添加後、約 10 mL まで 40°C 以下で減圧濃縮

(精製)

C18 ミニカラム(1000 mg)

↓ 濃縮液を C18 ミニカラム(アセトニトリル、水各 5 mL で洗浄済)に流下
アセトニトリル・水(1:1) 10 mL で洗浄
アセトニトリル・水(7:3) 10 mL で溶出
40°C 以下で減圧濃縮乾固
ヘキサン 5 mL に溶解

FI ミニカラム(910 mg)

- ↓ 溶解液を FI ミニカラム(ヘキサン 10 mL で洗浄済)に流下
- ヘキサン 5 mL で洗浄
- 酢酸エチル・ヘキサン(1:9) 10 mL で溶出
- 40°C以下で減圧濃縮乾固
- 水・メタノール(1:4)で、果実等 10 mL、穀類等 5 mL、茶 2.5 mL に溶解

(定量)

LC-MS による定量

定量限界

【残留基準値(案): 米 0.05 ppm】

- 果実、野菜: 0.01 mg/kg [(10mL/1.0g)×(0.005ng/5μL)]
- 穀類、豆類、種実類: 0.01 mg/kg [(5mL/0.5g)×(0.005ng/5μL)]
- 茶: 0.01 mg/kg [(2.5mL/0.25g)×(0.005ng/5μL)]

7. マトリックス添加標準溶液の調製

イオン化に対する夾雑物の影響を把握するために、試料マトリックスを含む標準溶液を調製し、通常の標準溶液と比較した。なお、マトリックス添加標準溶液は、ブランク試験溶液 1 mL を試験管にとり、ロータリーエバポレーターを用いて 40°C以下で濃縮して溶媒を除去した後、添加回収試験における回収率 100%相当濃度（残留基準値に近い添加濃度のみ）の標準溶液に溶解して調製した。

[結果及び考察]

1. 基礎データ(標準品による検討)

① C18ミニカラム(1000 mg: Bond Elut C18)

アセトニトリルと水各5mLで予備洗浄したのち、各溶媒で展開した時の回収率を示す。

(表1) 展開溶媒		オキサジアルギル(%)
アセトニトリル・水(5:5)*	5mL	<1
アセトニトリル・水(6:4)	5mL	<1
アセトニトリル・水(7:3)	5mL	99
アセトニトリル・水(8:2)	5mL	<1
アセトニトリル・水(9:1)	5mL	<1
合計		99

* 供試溶液:標準品0.5 μg(0.2 mg/Lアセトニトリル標準溶液2.5 mL)+水2.5 mL

② 合成ケイ酸マグネシウムミニカラム(910 mg: Sep-pak フロリジル, プラス)

ヘキサン5mLで予備洗浄し、各溶媒で展開した時の回収率を示す。

(表2) 展開溶媒		オキサジアルギル(%)
酢酸エチル・ヘキサン(0:100)*	5mL	<1
酢酸エチル・ヘキサン(2:98)	5mL	<1
酢酸エチル・ヘキサン(5:95)	5mL	26

酢酸エチル・ヘキサン(10:90)	5mL	75
合計		101

* 供試溶液:標準品0.5 µg(1 mg/Lアセトニトリル標準溶液 0.5 mLを窒素気流下で乾固し、ヘキサン.5 mLに溶解したもの。

③ グラファイトカーボンミニカラム(500 mg: Supelclean ENVI-Carb)

アセトニトリルと水各5mLで予備洗浄したのち、各溶媒で展開した時の回収率を示す。

(表3)	展開溶媒	オキサジアルギル(%)
	アセトニトリル・水(5:5) 10mL	<1
	アセトニトリル・水(8:2) 10mL	43
	アセトニトリル 10mL	52
	アセトン 10mL	<1
	酢酸エチル 10mL	<1
	アセトニトリル・トルエン(75:25) 10mL	<1
	合計	95

* 供試溶液:標準品0.5 µg(0.2 mg/Lアセトニトリル標準溶液2.5 mL)+水2.5 mL

7. 添加回収試験

7-1. 個別試験法における添加回収結果

基準値対象作物(米)のほかに、代表的な9農産物について検定した。(図4~13)

玄米及び大豆の粉碎試料10.0 gを量り採りとり、オキサジアルギルの0.2 mg/Lアセトニトリル標準溶液0.5 mLを添加し、水20 mLを加え30分間放置した後に試験法案に従い操作して回収率を算出した(添加濃度0.1 ppm添加の場合は2 mg/Lアセトニトリル標準溶液0.5 mLを添加)。ばれいしょ、ほうれんそう、キャベツ、りんご、オレンジ、トマト及びいちごの各均一化試料20.0 gを量り採りとり、オキサジアルギルの0.2 mg/Lアセトニトリル標準溶液1 mLを添加し、30分間放置した後に試験法案に従い操作して回収率を算出した。茶の粉碎試料5.0 gを量り採りとり、オキサジアルギルの0.05 mg/Lアセトニトリル標準溶液1 mLを添加し、水20 mLを加え30分間放置した後に試験法案に従い操作して回収率を算出した。

(表4) 試料	添加濃度 (ppm)	オキサジアルギル		
		回収率(%) (n=5)	平均	CV%
玄米	0.1	97, 95, 94, 93, 92	95	3.7
	0.01	95, 84, 83, 81, 80	85	7.1
大豆	0.01	81, 77, 76, 73, 75	76	3.9
ばれいしょ	0.01	84, 83, 82, 80, 79	82	2.5
ほうれんそう	0.01	85, 84, 83, 82, 76	82	4.3
キャベツ	0.01	83, 81, 80, 79, 77	80	2.8
りんご	0.01	79, 78, 78, 76, 72	77	3.6

オレンジ	0.01	76, 75, 74, 72, 72	74	2.4
トマト	0.01	79, 74, 74, 72, 70	74	4.5
いちご	0.01	81, 79, 77, 75, 73	77	4.1
茶	0.01	77, 75, 74, 73, 71	74	3.0

ブランク試料の妨害状況(図4~13)

いずれの試料についても、測定を妨害するピークは認められなかった。

7-2. 一斉試験法における添加回収結果

玄米(基準値設定作物)及び茶について、一斉試験法(LC/MS-I法)への適用について検討を行ったが、測定妨害や精製不良のため、適用不可と判断した。

(表5) 試料	添加濃度 (ppm)	オキサジアルギル		
		回収率(%) (n=5)	平均	CV%
試薬BL	0.1	92 (n=1)		
玄米	0.01	測定妨害のため計測不可		
茶	0.01	精製不良のためLC-MSへの注入 を中止		

8. 測定条件の検討

① 測定感度及びマススペクトル

測定感度と移動相(移動相A及び移動相B(1:1)混液)の関係を比較した。

(表6) ポジティブモードで測定		
移動相A	移動相B	感度(相対値)
5mmol/L酢酸アンモニウム	メタノール	100
0.1%酢酸	メタノール	68
0.1%ギ酸	メタノール	67
5mmol/L酢酸アンモニウム	アセトニトリル	32
0.1%酢酸	アセトニトリル	29
0.1%ギ酸	アセトニトリル	24

以上より、5 mmol/L酢酸アンモニウム及びメタノール(1:1)の条件を選択した。
なお、ネガティブモードでは、適当なピークは得られなかった。

上記条件におけるマススペクトル(図1参照)から、定量イオンとして基準ピーク(341 [M+H]⁺)を選択した。

② 測定条件

最終的に選択した条件を以下に記す。

高速液体クロマトグラフの操作条件

カラム： Atlantis dC18、内径2.1 mm、長さ150 mm、粒径5 µm (Waters製)

カラム温度： 40°C

移動相： 5mmol/L酢酸アンモニウム溶液及び5 mmol/L酢酸アンモニウム含有メタノール溶液 (1 : 4) 混液

流量： 0.2mL/min

保持時間： 5.6 分

質量分析計

イオン化モード： ESI (+)

イオン導入電圧： 3000V

フラグメンター電圧： 200V

乾燥ガス流量： 12 L/min (窒素)

乾燥ガス温度： 350°C

ネブライザー圧力： 50 psi

モニタリングイオン： 343.0 (定性用)、341.0 (定量用)

検討内容： ①の移動相条件を参考に、通常、LC-MS測定する条件を設定した。

移動相条件 (1 : 1) では、保持時間が20分以上要したので、上記 (1 : 4) の条件に変更した。

③ 検量線の直線性 (図2)

直線性は良好であった。

④ 検出感度 (図3)

定量限界は、5. 試験法(案)の概要と分析フローチャートの項を参照

⑤ マトリックスの影響

試料マトリックスを含む標準溶液 (0.1ppm添加相当濃度) を調製し、標準溶液と比較した。

(標準品に対する相対値 (%) として表示)

試料	相対値(%)
玄米	106
大豆	101
ばれいしょ	104
ほうれんそう	101
キャベツ	104
りんご	104
オレンジ	102
トマト	98
いちご	101
茶	103
総平均	102

試料マトリックスの影響(イオン化阻害やイオン化促進)はほとんど認められなかった。

9. 考察

一斉試験法(LC/MS- I 法)への適用の可否について、米及び茶で検討したところ、結果はいずれも不良であった。米では、0.01 ppm濃度レベルで妨害ピークのため計測不良であり、茶では試験溶液中に多量の沈殿物が認められたため、注入を中止した。

新たに試作した個別試験法について、その適格性を10種農産物[米(基準値設定作物)、大豆、ばれいしょ、ほうれんそう、キャベツ、りんご、オレンジ、トマト、いちご及び茶]で検討したところ、いずれの農産物についても良好な結果が得られた。このことから、本試験法は穀類、豆類、種実類、果実、野菜及び茶等の農産物に適用可能であることが示された。

本試験法は、大部分の農産物に適用可能と考えられるが、万一、精製が不足する場合は、グラファイトカーボンミニカラム(500 mg)による精製を追加するとよい。操作概要は注意点に記載した。

本検討の抽出液ろ過操作では、ろ過助剤(セライト等)を使用しなかったが、多孔性ケイソウ土カラムでの精製事例があることから、セライト等のろ過助剤での損失の可能性は低いと考えられた。

10. 結論

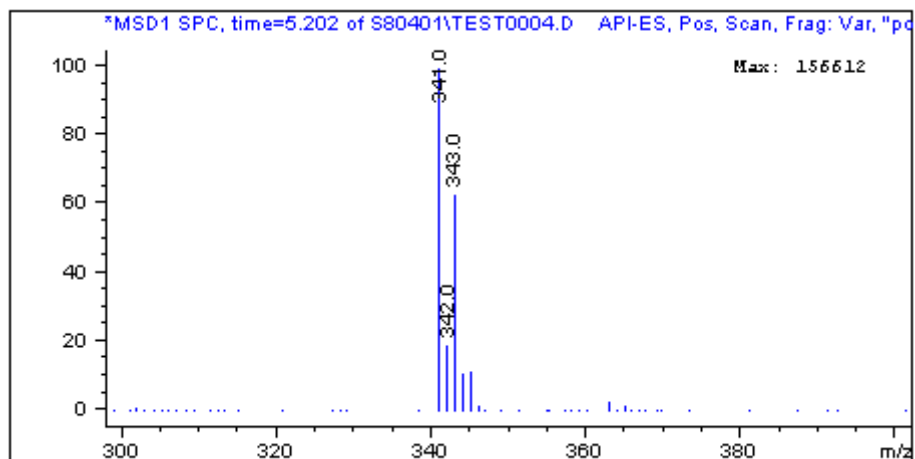
オキサジアルギル試験法として、試料からアセトニトリルで抽出し、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム及び合成ケイ酸マグネシウムミニカラムで精製した後、LC-MSで測定及び確認する方法を提案する。

玄米等の10農産物における 0.01~0.1 ppmでの添加回収試験において、真度は74~95%、併行精度は2~7%であり、定量限界はいずれの農産物においても 0.01 mg/kgが可能であった。

11. 文献

なし

図 1. オキサジアルギルのマススペクトル
10 mg/L/アセトニトリル溶液



質量分析計の操作条件(フローインジェクションモードで測定)

移動相： 5mmol/L酢酸アンモニウム溶液及び5 mmol/L酢酸アンモニウム含有メタノール溶液(1:4)混液

流量： 0.2mL/min

注入量： 5 μ L

イオン化モード： ESI (+)

イオン導入電圧： 3000V

フラグメンター電圧： 200V

乾燥ガス流量： 12 L/min (窒素)

乾燥ガス温度： 350 $^{\circ}$ C

ネブライザー圧力： 50 psi

SCAN走査範囲： m/z 200~500

図 2. 検量線の一例

検量線 (08/4/14)

オキサジアルギル

$$Y = 612.494145 + 1110121.519798 X$$

$$r = 0.999963$$

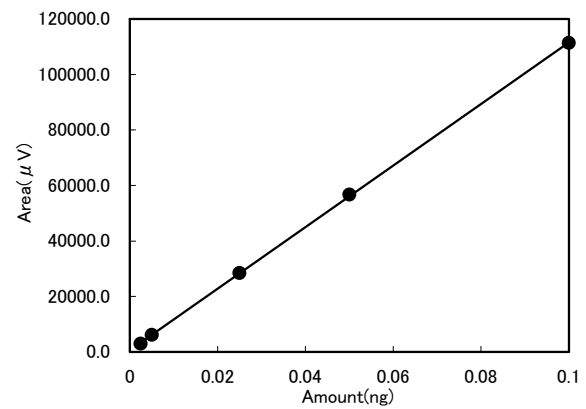


図 3. オキサジアルギル標準品のクロマトグラム

標準品 0.05 ng

標準品 0.005 ng (定量限界相当量)

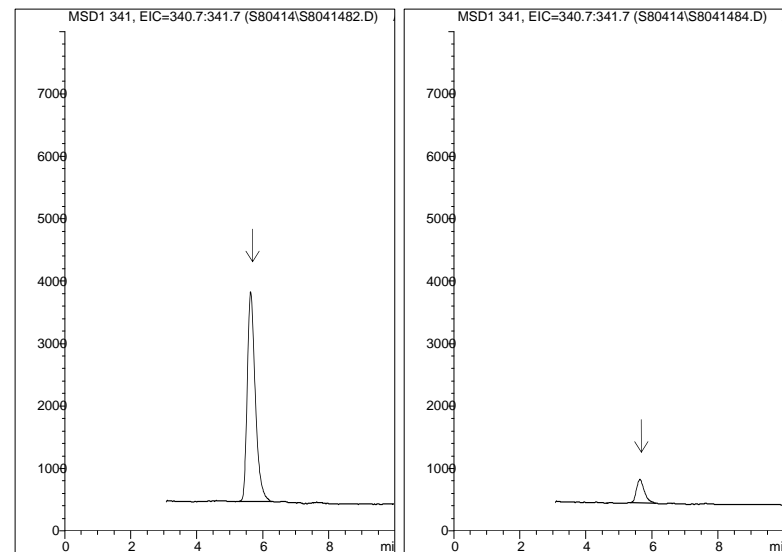


図 4-1. 玄米試料のクロマトグラム

無処理

5μL/5 mL/0.5 g

0.1 ppm 添加

5μL/5 mL/0.5 g

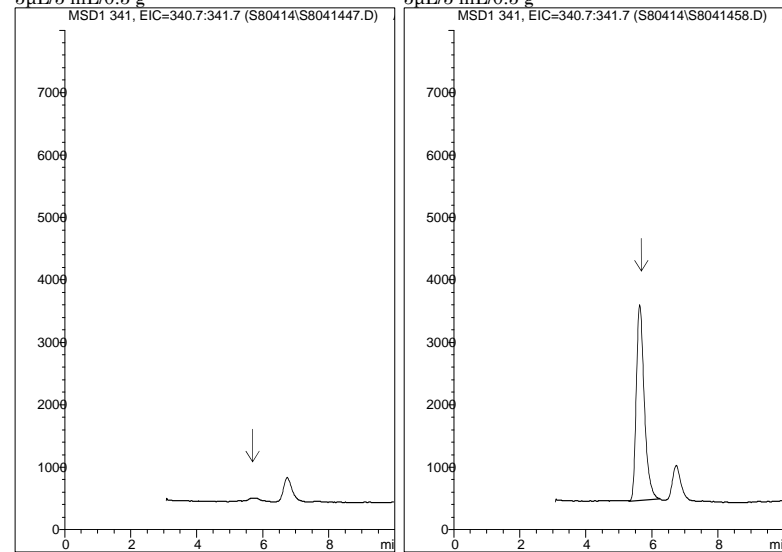


図 4-2.玄米試料のクロマトグラム

0.01 ppm 添加
5 μ L/5 mL/0.5 g

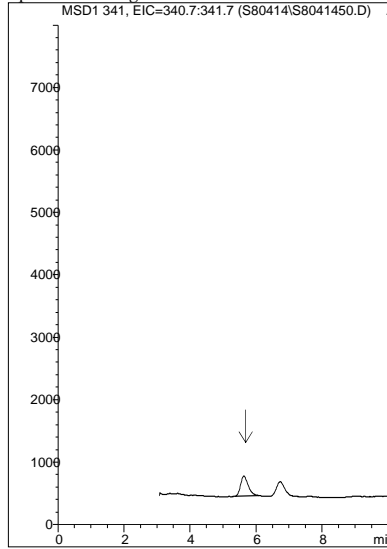
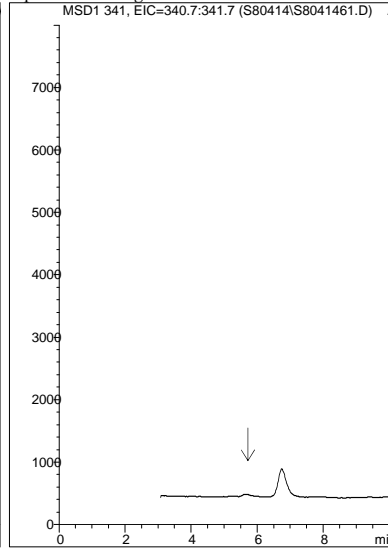


図 5.大豆試料のクロマトグラム

無処理
5 μ L/5 mL/0.5 g



0.01 ppm 添加
5 μ L/5 mL/0.5 g

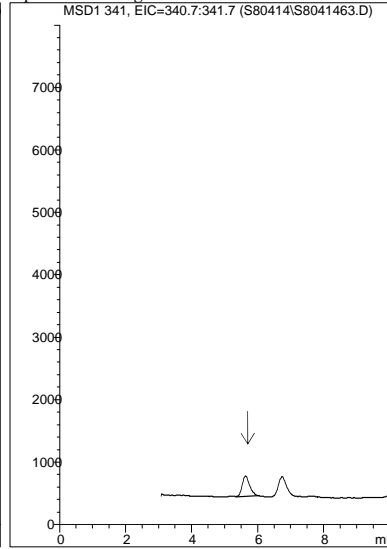
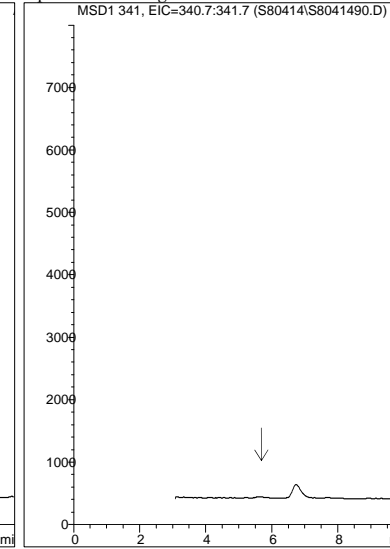


図 6.ばれいしょ試料のクロマトグラム

無処理
5 μ L/10 mL/1.0 g



0.01 ppm 添加
5 μ L/10 mL/1.0 g

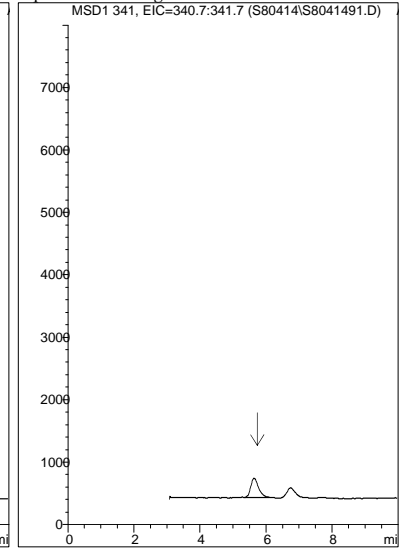
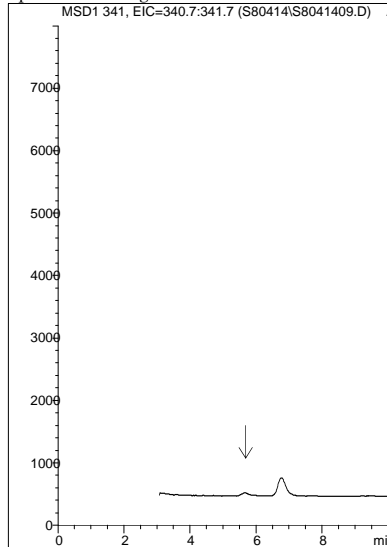


図 7.ほうれんそう試料のクロマトグラム

無処理
5 μ L/10 mL/1.0 g



0.01 ppm 添加
5 μ L/10 mL/1.0 g

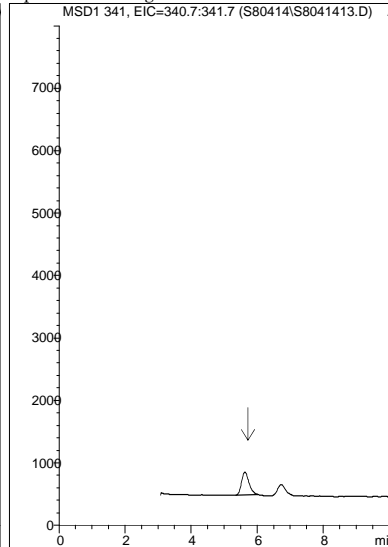
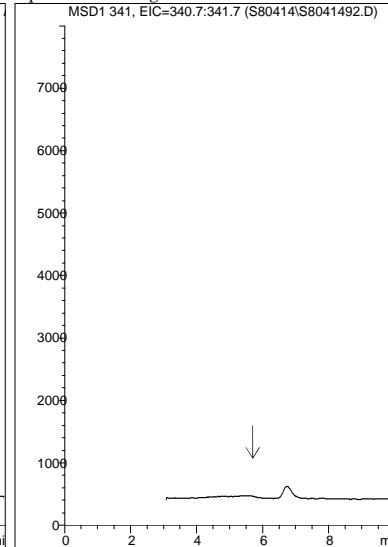


図 8.キャベツ試料のクロマトグラム

無処理
5 μ L/10 mL/1.0 g



0.01 ppm 添加
5 μ L/10 mL/1.0 g

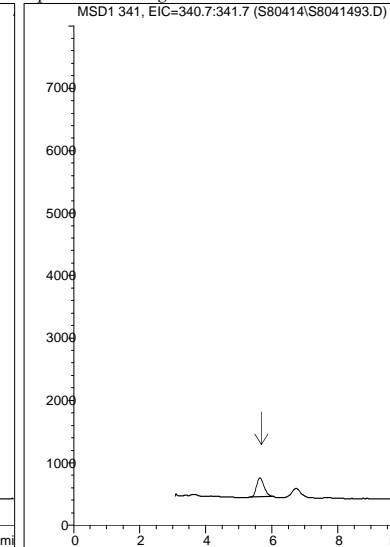


図 9-1.りんご試料のクロマトグラム

無処理
5 μ L/10 mL/1.0 g

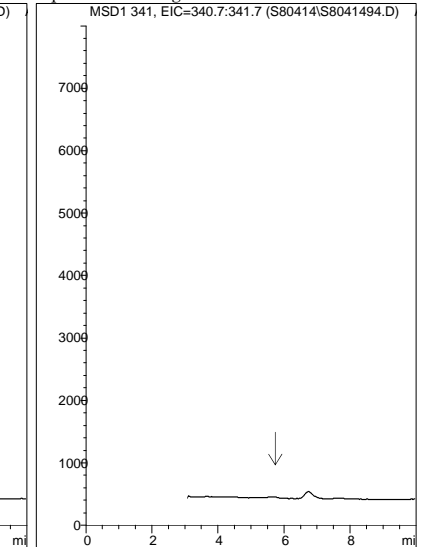


図 9-2.りんご試料のクロマトグラム

0.01 ppm 添加
5 μ L/10 mL/1.0 g

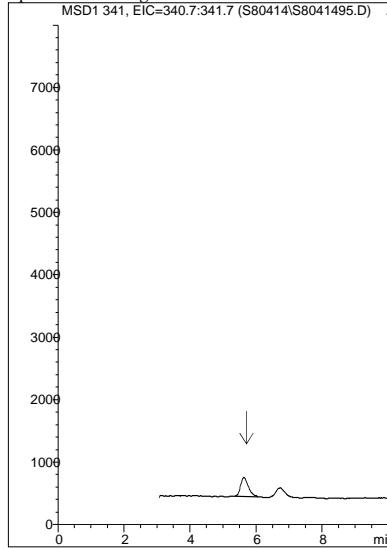
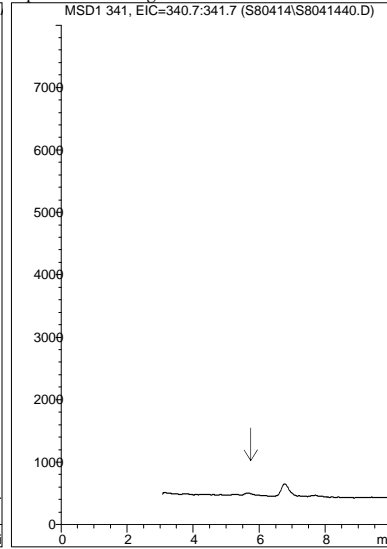


図 10.オレンジ試料のクロマトグラム

無処理
5 μ L/10 mL/1.0 g



0.01 ppm 添加
5 μ L/10 mL/1.0 g

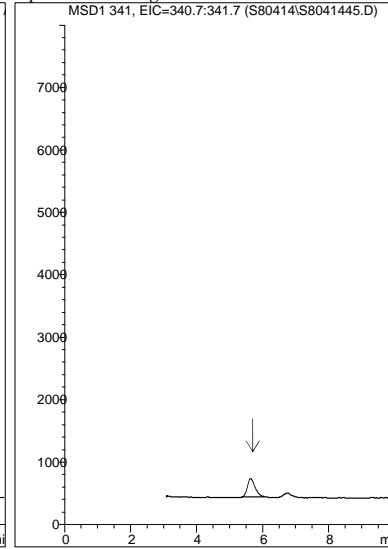
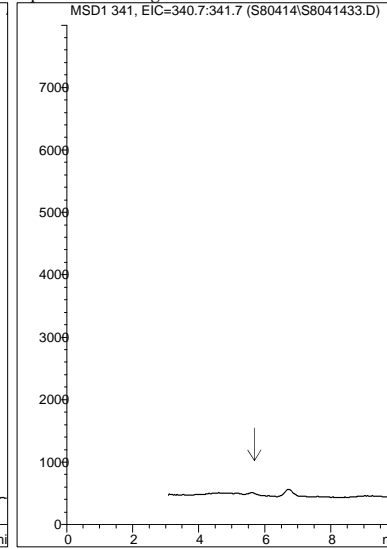


図 11.トマト試料のクロマトグラム

無処理
5 μ L/10 mL/1.0 g



0.01 ppm 添加
5 μ L/10 mL/1.0 g

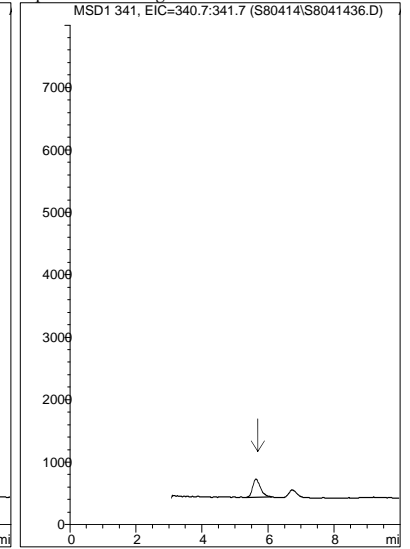
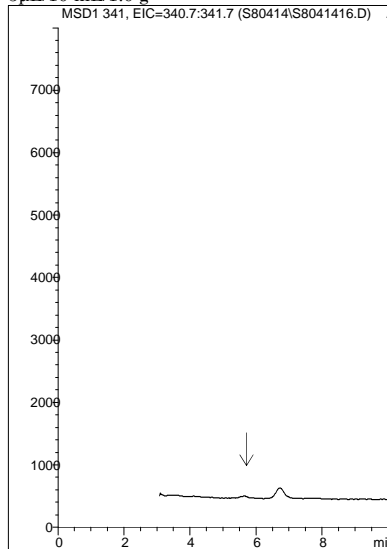


図 12.いちご試料のクロマトグラム

無処理
5 μ L/10 mL/1.0 g



0.01 ppm 添加
5 μ L/10 mL/1.0 g

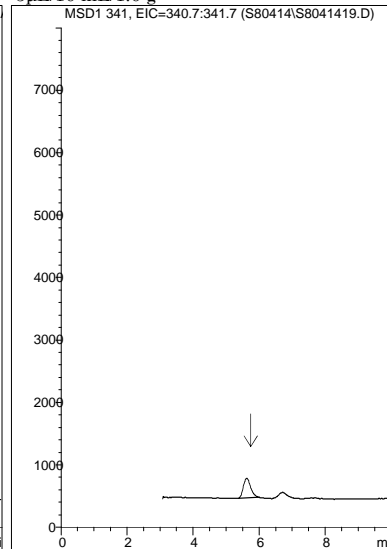
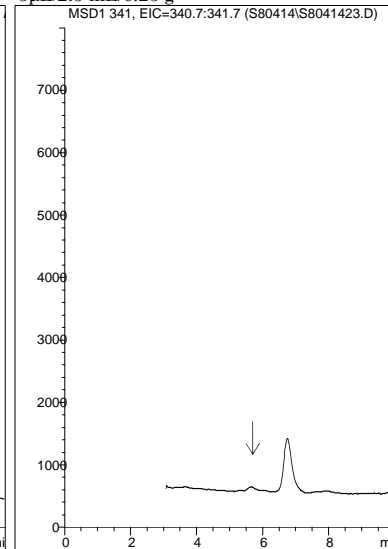


図 13.茶試料のクロマトグラム

無処理
5 μ L/2.5 mL/0.25 g



0.01 ppm 添加
5 μ L/2.5 mL/0.25 g

