

## . 分担研究報告

### 1. 精確な定量法の確立

- 1) 安定同位体標識標準品による内標準法を用いた  
精確な定量法の検討

研究分担者 坂井隆敏

厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)  
平成 25 年度 分担研究報告書

1. 精確な定量法の確立

1) 安定同位体標識標準品による内標準法を用いた精確な定量法の検討

研究分担者 坂井隆敏 国立医薬品食品衛生研究所 食品部主任研究官

**研究要旨**

食品中残留農薬等分析における安定同位体標識標準品を用いた内標準法の標準的使用法及び評価基準を確立することを目的として、先ず、検討対象農薬等及び対応する安定同位体を LC-MS/MS で測定した。得られた結果を基に、安定同位体の種類や数、測定条件など、分析値に影響を及ぼす可能性がある因子について基礎的考察を行った。

**A. 研究目的**

食品に残留する農薬等(農薬、動物用医薬品及び飼料添加物)に関するポジティブリスト制度の導入に伴い、現在約 820 品目を超える農薬等に基準値が設定されている。食品の安全性を確保するためには、膨大な数の残留農薬等を分析し、精確かつ効率的に分析値を求める必要がある。しかしながら、分析する食品は多種多様であり、農薬等の中には測定の際に食品由来の夾雑成分の影響を受け易いものや、分析操作中に分解・揮散するものなどもあり、精確な分析値を求めることが困難な場合がある。

このような場合には、追加精製や分解等の防止処理などの検討を行うが、時間と手間を要する。精製等の操作を追加することなく、効率的に精確な分析値を求める手法として、安定同位体標識標準品(以下、安定同位体と略す。)による内標準法などの使用が提案されているが、これら手法を使用するための標準的な方法や評価基準などは示されておらず、また、どの程度まで精確な分析値が得られるかなどの詳細な情報はほとんど無い。

このように、標準的な方法や評価基準などが示されていない中でも、安定同位体による内標準法が使用されている理由としては、分析対象化合物である農薬等と対応する安定同位体は、質量数が異なることを除けば同一の物質であり、安定同位体を使用しさえすれば、どのような場合であっても精確な補正が可能、すなわち、分析対象農薬等の精確な分析値を得ることが可能と考えられているためと思われる。安定同位体による内標準法が使用されている文献等では、添加回収試験において分析対象化合物の補正後の回収率が 100%に近い値となっているものも多く、このような場合には、実際の分析においても内標準法で補正することにより精確な分析値が得られる可能性が高いと考えられる。一方で、添加回収試験における補正回収率が 100%に近い値となっていないものもあり、このような場合には、実際の分析においても精確な分析値が得られない可能性が高いと考えられる。

以上のような理由から、本研究では、安定同位体による内標準法を食品中残留農薬等分析に適用するに当たり、精確な分析値を得るため

に必要な標準的使用方法及び評価方法の確立について検討する。初年度である平成 25 年度は、先ず、検討対象化合物を液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計(LC-MS/MS)で測定し、安定同位体の標識同位体の種類や数、測定条件など、内標準法を適用する上で精確な定量に影響を及ぼす可能性がある因子について考察した。

## B. 研究方法

### 検討対象農薬等の選択

先ず、検討対象農薬等及び対応する安定同位体の選択を行った。化合物の物性等から、一般的な方法では精確な分析値を得ることが比較的困難と考えられる農薬等であること、対応する安定同位体が市販されていることなどを考慮し、検討対象農薬等としてスルファジアジン、スルファメトキサゾール、チアベンダゾール及びトリメトプリムを選択した。なお、これら農薬等は、以降それぞれ SDZ、SMXZ、TBZ 及び TMP と略して記載した。また、対応する安定同位体としては、重水素(d)標識もしくは炭素  $^{13}\text{C}$  標識された、SDZ- $d_4$ 、SDZ- $^{13}\text{C}_6$ 、SMXZ- $d_4$ 、SMXZ- $^{13}\text{C}_6$ 、TBZ- $d_6$ 、TBZ- $^{13}\text{C}_6$ 、TMP- $d_3$ 、TMP- $^{13}\text{C}_3$ 、TMP- $d_9$  を選択して用いた(表 1)。

### 標準原液及び標準溶液の調製

選択した検討対象農薬等及び対応する安定同位体について、それぞれ 1 mg/mL の標準原液を調製した。次いで、調製した標準原液を 0.1 vol% ギ酸及びアセトニトリル(1:1)混液を用いて希釈・混合し、必要な濃度の標準溶液もしくは混合標準溶液を調製した。

### タンデム型質量分析条件の設定

調製した標準溶液を用いて、タンデム型質量分析計(MS/MS)における測定条件の最適化を

行った。すなわち、各検討対象農薬等及び対応する安定同位体の 500 ng/mL 標準溶液をそれぞれフローインジェクション分析で MS/MS に注入し、プリカーサーイオン及びプロダクトイオン、コーン電圧及びコリジョンエネルギー等の測定パラメータを最適化した。

### 液体クロマトグラフィー測定条件の設定

次いで、液体クロマトグラフ(LC)における測定条件を検討した。測定は、汎用的な逆相クロマトグラフィーを選択した。分析カラムは、逆相クロマトグラフィーにおいて一般的に使用されるオクタデシルシリル化シリカゲルが充填されたものを使用した。また、移動相は、高極性移動相として 0.1 vol% ギ酸、低極性移動相としてアセトニトリルを選択した。分析カラムからの溶出は、経時的にアセトニトリル比率を増加させるグラジエント溶出を採用した。なお、逆相クロマトグラフィーにおいては、移動相中の低極性溶媒の比率が高いほど、一般的に分析対象化合物の溶出が早くなることから、本研究では、アセトニトリル比率の増加の勾配が異なる 3 つのグラジエント条件を設定した。

### LC-MS/MS 測定

設定した LC-MS/MS 測定条件を用いて各検討対象農薬等及び対応する安定同位体を測定し、保持時間やピーク面積等を求めた。得られた測定結果から、安定同位体の標識同位体の種類や数、測定条件など、内標準法を適用する上で精確な定量に影響を及ぼす可能性がある因子について考察した。

### 装置及び測定条件

以下に、研究で使用した装置及び測定条件を示した。

・LC

高速液体クロマトグラフ : Acquity UPLC (

Waters 製)

分析カラム: Inertsil ODS-4 HP(内径 3 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm、GL Sciences 製)

カラム温度: 40

移動相: 0.1 vol%ギ酸(A 液)及びアセトニトリル(B 液)

グラジエント条件 (t:時間(分))

t<sub>0</sub>, B=1%; t<sub>5</sub>, B=1%; t<sub>30</sub>, B=63.5%; t<sub>30.1</sub>, B=99%; t<sub>35</sub>, B=99%; t<sub>35.1</sub>, B=1%; t<sub>45</sub>, B=1%

グラジエント条件 (t:時間(分))

t<sub>0</sub>, B=1%; t<sub>5</sub>, B=1%; t<sub>25</sub>, B=67%; t<sub>25.1</sub>, B=99%; t<sub>30</sub>, B=99%; t<sub>30.1</sub>, B=1%; t<sub>40</sub>, B=1%

グラジエント条件 (t:時間(分))

t<sub>0</sub>, B=1%; t<sub>5</sub>, B=1%; t<sub>20</sub>, B=61%; t<sub>20.1</sub>, B=99%; t<sub>25</sub>, B=99%; t<sub>25.1</sub>, B=1%; t<sub>35</sub>, B=1%

流速: 0.4 mL/分

注入量: 5 μL

#### 質量分析

MS/MS: Acquity TQ Detector(Waters 製)

ソース温度: 150

脱溶媒温度: 400

窒素ガス流量: 800 L/hr

コーンガス流量: 50 L/hr

キャピラリー電圧: 1.5 kV

イオン化法: エレクトロスプレーイオン化法(ポジティブモード)

### C. 研究結果

MS/MS 条件について

MS/MS 条件の最適化において得られた、各検討対象農薬等及び対応する安定同位体のプリカーサーイオン及びプロダクトイオン、並びにコ

ーン電圧及びコリジョンエネルギーを表 2 に示した。表 2 に示されるように、全ての検討対象農薬等及び対応する安定同位体において、プリカーサーイオンとしては「プロトン付加イオン」が選択された。プロダクトイオンについては、検討対象農薬等と対応する安定同位体で同様のフラグメントが生じ、同様のプロダクトイオンが生成していることが推察された。

LC-MS/MS 条件について

設定した LC-MS/MS 測定条件下で、各検討対象農薬等及び対応する安定同位体 10 ng/mL の混合標準溶液を 5 併行で測定した。LC 条件は、設定した 3 つのグラジエント条件(グラジエント条件、及び)を用いた。その結果、保持時間については、各グラジエント条件下で全ての検討対象農薬等及び対応する安定同位体について変動は無いことが確認された。また、ピーク面積値については、各グラジエント条件下で全ての検討対象農薬等及び対応する安定同位体について 6 RSD%未満の良好な併行精度が得られた。

保持時間について

各グラジエント条件における検討対象農薬等及び対応する安定同位体の保持時間を表 3 に示した。表 3 に示されるように、検討対象農薬等と対応する安定同位体では、若干ではあるが保持時間が異なり、検討対象農薬等よりも、対応する安定同位体の方が保持時間が短いことが確認された。また、安定同位体の標識数の増加に伴い、保持時間はより短くなることが予想された。また、標識数が同じであれば、<sup>13</sup>C 標識安定同位体よりも d 標識安定同位体の方が保持時間が短い、すなわち、<sup>13</sup>C 標識よりも d 標識の方が保持時間が短くなることへの寄与が大きいことが推察された。

検討対象農薬等及び対応する安定同位体の保持時間に及ぼすグラジエント条件の影響については、表 3 に示されるように、グラジエントにおけるアセトニトリル比率の勾配増加に伴い、保持時間が短くなる傾向が確認された。更に、グラジエント勾配の増加に伴い、検討対象農薬等と対応する安定同位体の保持時間の差が小さくなる傾向が確認された。

各検討対象農薬等及び対応する安定同位体のクロマトグラムを図 1 に示した。

ピーク面積値について

各検討対象農薬等及び対応する安定同位体の 10 ng/mL 混合標準溶液を測定し、得られたピーク面積値を比較した。一部の場合を除いて、検討対象農薬等と対応する安定同位体で同程度のピーク面積値が得られた。一方、SDZ- $d_4$  では、SDZ 及び SDZ- $^{13}C_6$  よりも若干小さいピーク面積値が得られ、また、TBZ- $d_6$  のピーク面積値は、TBZ 及び TBZ- $^{13}C_6$  で得られたピーク面積値の半分程度であった(表 4)。

検討対象農薬等のピーク面積値に及ぼす安定同位体中の不純物の影響について

本研究で使用した検討対象農薬等及び対応する安定同位体は、純度の算出方法は異なるものの、SMXZ- $d_4$  (純度 97.4%)、TBZ- $d_6$  (純度 98.0%) 及び TBZ- $^{13}C_6$  (純度 97.1%) を除いて、全て純度 99% 以上のものを使用した。

安定同位体による内標準法を使用する場合、当然ではあるが検体に安定同位体を添加して分析を行う。したがって、添加する安定同位体中に標識されていない化合物、すなわち分析対象となる農薬等そのものが混在していれば、最終的に得られる分析対象農薬等の分析値は、実際の値よりも高い値となる。本研究では、使用した検討対象農薬等及び対応する安定同位体の

標準溶液をそれぞれ測定し、得られたピーク面積値について考察した。なお、前述の通り、設定した LC-MS/MS 条件下で良好な併行精度が得られたことから、測定回数は 1 回とし、LC 条件はグラジエント条件 を使用した。

表 5 に示されるように、本研究で使用した安定同位体では、高濃度(1  $\mu\text{g/mL}$ )の溶液を測定した場合においても、検討対象農薬等の測定イオンに由来するピークはほとんど得られず、安定同位体の標準品中には、標識されていない化合物、すなわち検討対象農薬等そのものはほとんど含まれていないことが確認された。

一方、 $d$  標識した安定同位体を測定した場合、検討対象農薬等の測定イオンに由来するピークはほとんど得られなかったが、 $^{13}C$  標識した安定同位体の測定イオンに由来するピークが確認され、特に、TBZ- $d_6$  を測定した際に、TBZ- $^{13}C_6$  の測定イオンで大きなピークが確認された。

#### D. 考察

MS/MS における測定について

本研究で最適化した MS/MS 条件において、プリカーサーイオンに関しては、全ての検討対象農薬等及び対応する安定同位体について「プロトン付加イオン」が選択された。また、プロダクトイオンについては、検討対象農薬等の構造、得られたプロダクトイオンの質量数、安定同位体の標識位置や標識数を考慮すると、検討対象農薬等と対応する安定同位体で同様のフラグメントが生じ、安定同位体標識の有無により質量数は異なるが、検討対象農薬等と対応する安定同位体で同様のプロダクトイオンが得られていることが推察された。なお、検討対象農薬等の構造と得られたプロダクトイオンの質量数を考慮すると、SDZ- $d_4$ 、SDZ- $^{13}C_6$ 、SMXZ- $d_4$ 、SMXZ- $^{13}C_6$ 、

TBZ-<sup>13</sup>C<sub>6</sub> 及び TMP-<sup>13</sup>C<sub>3</sub> のプロダクトイオンは、プロトン付加イオンから d もしくは <sup>13</sup>C 標識されていない部分が脱離したイオンであると推察された。TBZ-d<sub>6</sub> のプロダクトイオンは 6 つのうちの 1 つの d 標識部分が脱離したイオンであると推察された。また、TMP-d<sub>3</sub> のプロダクトイオンは全ての d 標識部分が脱離したものの、TMP-d<sub>9</sub> のプロダクトイオンは一部の d 標識部分が脱離したものであると推察された。

更に、各検討対象農薬等及び対応する安定同位体について設定された測定イオンは、ブリーカーイオンとプロダクトイオンを組み合わせるとそれぞれ異なることから、測定イオンの切り替えの際に他のイオンを測り込むことがなければ、各検討対象農薬等及び対応する安定同位体の特異的に検出することが可能であると考えられた。

#### LC-MS/MS における測定について

設定した LC-MS/MS 測定条件下で、各検討対象農薬等及び対応する安定同位体 10 ng/mL の混合標準溶液を 5 併行で測定したところ、全ての検討対象農薬等及び対応する安定同位体において保持時間の変動は無いことが確認された。また、ピーク面積値についても、全ての検討対象農薬等及び対応する安定同位体において 6 RSD%未満の良好な併行精度が得られた。

このことから、設定した LC-MS/MS 条件を用いて各検討対象農薬等及び対応する安定同位体を測定することにより、保持時間やピーク面積値など、検討対象農薬等と対応する安定同位体における測定の際の違いの有無を明らかにすることが可能であると考えられた。

#### 保持時間について

設定した LC-MS/MS 測定条件において各検討対象農薬等及び対応する安定同位体を測定

した結果、若干ではあるが、検討対象農薬等よりも、対応する安定同位体の方が保持時間が短いことが確認された。また、TMP-d<sub>3</sub> 及び TMP-d<sub>9</sub> の保持時間の比較などから、安定同位体の標識数の増加に伴い、保持時間はより短くなる傾向が確認された。更に、TBZ-d<sub>6</sub> 及び TBZ-<sup>13</sup>C<sub>6</sub> の保持時間の比較などから、安定同位体の標識数が同じであれば、<sup>13</sup>C 標識安定同位体よりも d 標識安定同位体の方が保持時間が短くなる傾向が確認された。これらのことから、検討対象農薬等と対応する安定同位体の保持時間の差は、安定同位体の標識の種類や数に依存して変化すると考えられた。

また、グラジエントにおけるアセトニトリル比率の勾配が異なる 3 種類のグラジエント条件(条件 :2.5%/分で増加、条件 :3.3%/分で増加、条件 :4.0%/分で増加)を用いて測定を行った結果、勾配の増加に伴い、保持時間が短くなる傾向が確認された。更に、勾配の増加に伴い、検討対象農薬等と対応する安定同位体の保持時間の差が小さくなる傾向が確認された。

これらの結果から、使用する安定同位体の標識の種類や標識数、使用する LC 条件によっては、分析対象である農薬等と対応する安定同位体の保持時間が大きく異なる可能性があることが示唆された。

測定の際の試料マトリックスの影響を効率的に補正する場合にも、安定同位体による内標準法の適用も一つの有用な手段であると考えられる。ただし、このような場合に精確な補正を行うためには、分析対象農薬等と使用する安定同位体が、測定の際に同等のマトリックスの影響を受けている必要がある。分析対象農薬等と安定同位体の保持時間が同じ場合には、同等のマトリックスの影響を受けていることが予想されるが、

保持時間が異なる場合には、どの程度の保持時間の違いでマトリックスの影響の程度が異なるかについては不明である。

以上のように、使用する安定同位体や測定条件によっては、農薬等と安定同位体の保持時間が大きく異なる可能性があり、また、このような保持時間の違いは補正の精度に大きく影響する可能性があることが推察された。したがって、次年度においては、実際の食品マトリックスの存在下で測定を行い、検討対象農薬等と対応する安定同位体の保持時間の違いが、精確な補正にどの程度影響するかについて検討する必要があると考えられた。

#### ピーク面積値について

各検討対象農薬等及び対応する安定同位体の 10 ng/mL 混合標準溶液を測定した結果、一部の化合物を除き、検討対象農薬等と対応する安定同位体で同程度のピーク面積値が得られた。SDZ- $d_4$  のピーク面積値は、SDZ 及び SDZ- $^{13}C_6$  のピーク面積値よりも若干小さく、また、TBZ- $d_6$  のピーク面積値は、TBZ 及び TBZ- $^{13}C_6$  のピーク面積値の半分程度であった。

安定同位体による内標準法においては、分析対象農薬等と対応する安定同位体のピーク面積比を用いて試料中の分析対象農薬等の濃度を計算するため、各濃度に依存したピーク面積値が得られる場合は、ピーク面積値自体は定量性に大きな影響を及ぼす可能性は低いと思われる。ただし、TBZ- $d_6$  のピーク面積値が TBZ 及び TBZ- $^{13}C_6$  よりも低くなる原因によっては、試料マトリックスの存在下では TBZ- $d_6$  と TBZ のピーク面積比が異なる場合があることも予想される。したがって、次年度においては、実際の食品マトリックスの存在下で測定を行い、TBZ- $d_6$  と TBZ のピーク面積比の変動の有無を調査するとともに、

TBZ- $d_6$  のピーク面積値が TBZ や TBZ- $^{13}C_6$  のピーク面積値よりも低くなる原因について調査する必要があると考えられた。

検討対象農薬等のピーク面積値に及ぼす安定同位体中の不純物の影響について

安定同位体による内標準法を使用する場合、検体に一定濃度の安定同位体を添加して分析を行う。したがって、使用する安定同位体中に標識されていない化合物、すなわち分析対象となる農薬等そのものが含まれていれば、分析対象となる農薬等について得られる分析値は、実際の値よりも高い値となる。

本研究で使用した検討対象農薬等及び対応する安定同位体の高濃度の標準溶液 (1  $\mu\text{g/mL}$ ) をそれぞれ測定し、安定同位体中の検討対象農薬等の含有の有無を確認した。その結果、本研究で使用した安定同位体の中で検討対象農薬等そのものに由来するピーク面積値が最も大きかったものは TMP- $d_3$  であったが、1  $\mu\text{g/mL}$  の TMP 標準溶液の測定で得られたピーク面積値の 0.4% 程度であった。その他の安定同位体については、検討対象農薬等そのものに由来するピークはほとんど検出されない、もしくは検出された場合であっても 1  $\mu\text{g/mL}$  の検討対象農薬等標準溶液の測定で得られたピーク面積値の 0.1% 未満であった。

仮に、本研究で使用した TMP- $d_3$  を用いた内標準法で TMP の分析を行い、1  $\mu\text{g/g}$  相当の TMP- $d_3$  を添加したとすると、検体中の実際の TMP 濃度が 10 ng/g であった場合には、添加した TMP- $d_3$  由来の TMP が加算され、分析値としては 13 ng/g 程度の値が得られることとなる。TMP- $d_3$  の添加濃度を 100 ng/g とした場合には、TMP- $d_3$  由来の TMP を加味しても分析値は 10.3 ng/g 程度となることから、添加する TMP- $d_3$  の分

析値に対する影響は小さくなると予想される。

以上のような結果及び考察から、安定同位体による内標準法を使用する場合には、予め、使用する安定同位体中の分析対象農薬等の有無、含まれる場合にはどの程度含まれるかを確認し、検体中の実際の分析対象農薬等の濃度に影響が無い濃度の安定同位体を添加することが重要であると考えられた。

実際の分析においては、検体中にどの程度の分析対象化合物が含まれているかを事前に把握することは出来ない。したがって、使用する安定同位体中に含まれる分析対象化合物の量を予め確認していた場合であっても、実際に添加する安定同位体濃度を決定し難いことも考えられる。一方、食品中残留農薬等分析においては、一般的には「当該食品に含まれる当該農薬等の量が、当該食品に設定された当該農薬等の基準値を超過しているか否か」が焦点となるため、基準値に近い濃度を精確に求めることが必要である。したがって、食品中残留農薬等分析において、安定同位体による内標準法を使用する場合には、各食品に設定された分析対象農薬等の基準値に相当する濃度の安定同位体を添加して分析を行うことが妥当と考えられた。

安定同位体の測定イオン等について

本研究で使用した安定同位体中の検討対象農薬等の含有の有無を確認したところ、前述の通り、検討対象農薬等そのものに由来するピークはほとんど検出されなかった。

一方で、d 標識安定同位体を測定した場合に<sup>13</sup>C 標識安定同位体の測定イオンに由来するピークや、<sup>13</sup>C 標識安定同位体を測定した場合にd 標識安定同位体の測定イオンに由来するピークが検出された。

本研究で使用した MS/MS 測定条件は、各検

討対象農薬等と各安定同位体でそれぞれ異なる測定イオン(プリカーサーイオンとプロダクトイオンの組み合わせ)が設定されている。したがって、このような原因としては、MS/MS 測定の際に、各安定同位体に設定された測定イオンで質量数の近い別の化合物を測り込んでいること、もしくは、安定同位体中に検討対象農薬等そのものが含まれている場合のように、測定した安定同位体中に、他の測定イオンで検出され得る化合物(不純物など)が含まれていることが考えられた。

SDZ-*d*<sub>4</sub> (1 µg/mL) 溶液を測定した場合、SDZ-<sup>13</sup>C<sub>6</sub> 測定イオン(*m/z* 257 *m/z* 162)では比較的大きなピークが得られた一方、SDZ-<sup>13</sup>C<sub>6</sub> (1 µg/mL) 溶液を測定した場合、SDZ-*d*<sub>4</sub> 測定イオン(*m/z* 255 *m/z* 160)で得られたピークは小さかった。このことから、SDZ の安定同位体において他の測定イオンに由来するピークが検出された原因としては、SDZ-*d*<sub>4</sub> 溶液中に、SDZ-<sup>13</sup>C<sub>6</sub> 測定イオンで検出され得る化合物が含まれている可能性が高いと推察された。

SMXZ の安定同位体と測定イオンにおいても、SDZ の安定同位体と測定イオンの場合と同様の現象が確認されたことから、原因についても同様に、SMXZ-*d*<sub>4</sub> 溶液中に、SMXZ-<sup>13</sup>C<sub>6</sub> 測定イオンで検出され得る化合物が含まれている可能性が高いと推察された。

一方、TBZ の安定同位体と測定イオンについては、TBZ-*d*<sub>6</sub> (1 µg/mL) 溶液を測定した場合の TBZ-<sup>13</sup>C<sub>6</sub> 測定イオン(*m/z* 208 *m/z* 181)においても、TBZ-<sup>13</sup>C<sub>6</sub> (1 µg/mL) 溶液を測定した場合の TBZ-*d*<sub>6</sub> 測定イオン(*m/z* 208 *m/z* 180)においても比較的大きなピークが得られた。TBZ-*d*<sub>6</sub> 測定イオンと TBZ-<sup>13</sup>C<sub>6</sub> 測定イオンは、測定イオンの質量数が近いことから、TBZ-<sup>13</sup>C<sub>6</sub> 測定イオン

で TBZ- $d_6$  を、TBZ- $d_6$  測定イオンで TBZ- $^{13}C_6$  を測り込んでいる可能性があることも推察された。加えて、TBZ- $d_6$  溶液を測定した場合に TBZ- $^{13}C_6$  測定イオンにおいてより大きなピークが検出されたことから、TBZ- $d_6$  溶液中に、TBZ- $^{13}C_6$  測定イオンで検出され得る化合物が含まれている可能性もあることが推察された。

TMP の安定同位体についても、TMP- $d_3$  (1  $\mu\text{g/mL}$ ) 溶液を測定した場合の TMP- $^{13}C_3$  測定イオン ( $m/z$  294  $m/z$  233) と TMP- $^{13}C_3$  (1  $\mu\text{g/mL}$ ) 溶液を測定した場合の TMP- $d_3$  測定イオン ( $m/z$  294  $m/z$  230) で比較的大きなピークが検出され、特に TMP- $d_3$  溶液を測定した場合の TMP- $^{13}C_3$  測定イオンでより大きなピークが検出されたことから、他のイオンを測り込んでいる可能性に加え、TMP- $d_3$  溶液中に、TMP- $^{13}C_3$  測定イオンで検出され得る化合物が含まれている可能性があることが推察された。一方で、TMP- $d_9$  (1  $\mu\text{g/mL}$ ) 溶液を測定した場合に他の測定イオン (TMP、TMP- $d_3$  及び TMP- $^{13}C_3$  測定イオン) ではピークが検出されず、また、他の溶液 (TMP、TMP- $d_3$  及び TMP- $^{13}C_3$  溶液) を測定した場合の TMP- $d_9$  測定イオン ( $m/z$  300  $m/z$  234) においてもピークは検出されなかった。この理由としては、TMP- $d_9$  測定イオンは、プロダクトイオンに関して他の測定イオンと大きく異なっているため、他のイオンを測り込むことがほとんど無かったことや、TMP- $d_9$  溶液中に他の測定イオンで検出され得る化合物がほとんど含まれていなかったためと推察された。

安定同位体を用いた内標準法を使用する場合には、一つの分析対象農薬等に対して複数の安定同位体を用いることは極めて稀であると考えられるため、上述のように、複数の安定同位体について他のイオンの測り込みや他の測定イ

オンで検出され得る化合物の存在などを考慮する必要はほとんど無いが、少なくとも、分析対象農薬等と使用する安定同位体については、互いの測定イオンで検出され得る化合物の含有の有無や程度、設定した測定イオンにおける測り込みの有無や程度などを調査し、分析対象農薬等の定量に影響が無いことを確認しておく必要があると考えられた。

TMP- $d_9$  溶液と測定イオンで得られた結果及び考察から、標識数の多い安定同位体を使用することにより、分析対象農薬等の測定イオンで安定同位体を測り込む可能性や、安定同位体中に分析対象農薬等の測定イオンで検出され得る化合物が含まれる可能性は少なくなることが予想された。このことから、質量分析においては、標識数の多い安定同位体を使用することにより、分析対象農薬等及び安定同位体について、それぞれ濃度に応じた正確なピーク面積値を得ることが可能であると推察された。一方で、LC 分析においては、標識数が多い程、分析対象農薬等と安定同位体の保持時間の差が大きくなり、測定の際に受ける試料マトリックスの影響の程度が異なる可能性があることが推察された。したがって、次年度においては、試料マトリックスの存在下で測定を行い、得られるピーク面積値や保持時間が精確な定量にどのような影響を及ぼし得るかについて詳細に検討する必要があると考えられた。

## E. 結論

研究初年度である平成 25 年度は、検討対象農薬等及び対応する安定同位体を LC-MS/MS で測定し、得られた結果を基に、安定同位体を用いた内標準法を使用した際に、分析結果に影響を及ぼし得る条件や因子等について考察した。

平成 26 年度は、実際の試料マトリックスの存在  
下で測定を行い、本年度に得られた知見を基に、  
安定同位体を用いた内標準法を使用して精確  
な分析値を得るために必要な条件等を明らかに  
する予定である。

**F. 研究発表**

なし

**G. 知的財産権の出願・登録状況**

なし

表 1 本研究で使用した検討対象農薬等及び対応する安定同位体

	分子量	記載純度 (%)	純度算出方法	標識位置	標識位置 (推定)
SDZ	250.3	99.8	HPLC		
SDZ- <i>d</i> <sub>4</sub>	254.3	99.9	記載無し	記載無し	フェニル基
SDZ- <sup>13</sup> C <sub>6</sub>	256.2	99.7	HPLC	フェニル基	
SMXZ	253.3	99.0	HPLC		
SMXZ- <i>d</i> <sub>4</sub>	257.3	97.4	記載無し	記載無し	フェニル基
SMXZ- <sup>13</sup> C <sub>6</sub>	259.2	99.3	HPLC	フェニル基	
TBZ	201.3	99.9	GC		
TBZ- <i>d</i> <sub>6</sub>	207.3	98.0	HPLC	記載無し	全てのC-H結合
TBZ- <sup>13</sup> C <sub>6</sub>	207.3	97.1	記載無し	フェニル基	
TMP	290.3	100.0	HPLC		
TMP- <i>d</i> <sub>3</sub>	293.3	99.6	atom%D	4-メトキシ基	
TMP- <sup>13</sup> C <sub>3</sub>	293.3	99.0	記載無し	記載無し	ピリミジン環 (4つの炭素の内の3つ)
TMP- <i>d</i> <sub>9</sub>	299.4	99.9	HPLC	3,4,5-トリメトキシ基	

表 2 本研究で使用した検討対象農薬等及び対応する安定同位体の MS/MS 条件

	分子量	プリカーサー イオン( $m/z$ )	プロダクト イオン( $m/z$ )	コロン電圧 (V)	CE <sup>*1</sup> (eV)
SDZ	250.3	251	156	30	15
SDZ- $d_4$	254.3	255	160	30	15
SDZ- $^{13}C_6$	256.2	257	162	30	15
SMXZ	253.3	254	156	30	15
SMXZ- $d_4$	257.3	258	160	30	15
SMXZ- $^{13}C_6$	259.2	260	162	30	15
TBZ	201.3	202	175	50	28
TBZ- $d_6$	207.3	208	180	50	28
TBZ- $^{13}C_6$	207.3	208	181	50	28
TMP	290.3	291	230	45	25
TMP- $d_3$	293.3	294	230	45	25
TMP- $^{13}C_3$	293.3	294	233	45	25
TMP- $d_9$	299.4	300	234	45	25

\*1 CE: コリジョンエネルギー

表 3 検討対象農薬等及び対応する安定同位体の保持時間等

	グラジエント条件 (勾配 2.5%/分)			グラジエント条件 (勾配 3.3%/分)			グラジエント条件 (勾配 4.0%/分)		
	保持時間 (分)	差(分)	差(秒)	保持時間 (分)	差(分)	差(秒)	保持時間 (分)	差(分)	差(秒)
SDZ	14.02	-	-	13.05	-	-	12.46	-	-
SDZ- <i>d</i> <sub>4</sub>	13.94	-0.08	-4.8	13.01	-0.04	-2.4	12.42	-0.04	-2.4
SDZ- <sup>13</sup> C <sub>6</sub>	14.02	0	0	13.05	0	0	12.46	0	0
SMXZ	19.76	-	-	17.52	-	-	16.22	-	-
SMXZ- <i>d</i> <sub>4</sub>	19.67	-0.09	-5.4	17.48	-0.04	-2.4	16.18	-0.04	-2.4
SMXZ- <sup>13</sup> C <sub>6</sub>	19.72	-0.04	-2.4	17.52	0	0	16.22	0	0
TBZ	14.40	-	-	13.18	-	-	12.46	-	-
TBZ- <i>d</i> <sub>6</sub>	14.28	-0.12	-7.2	13.10	-0.08	-4.8	12.38	-0.08	-4.8
TBZ- <sup>13</sup> C <sub>6</sub>	14.36	-0.04	-2.4	13.14	-0.04	-2.4	12.42	-0.04	-2.4
TMP	14.87	-	-	13.47	-	-	12.63	-	-
TMP- <i>d</i> <sub>3</sub>	14.78	-0.09	-5.4	13.43	-0.04	-2.4	12.59	-0.04	-2.4
TMP- <sup>13</sup> C <sub>3</sub>	14.82	-0.05	-3.0	13.43	-0.04	-2.4	12.63	0	0
TMP- <i>d</i> <sub>9</sub>	14.70	-0.17	-10.2	13.35	-0.12	-7.2	12.55	-0.08	-4.8

表 4 検討対象農薬等及び対応する安定同位体のピーク面積値

	グラジエント条件 (勾配 2.5%/分)		グラジエント条件 (勾配 3.3%/分)		グラジエント条件 (勾配 4.0%/分)	
	ピーク面積値 (平均値)	相対標準偏差 (RSD%)	ピーク面積値 (平均値)	相対標準偏差 (RSD%)	ピーク面積値 (平均値)	相対標準偏差 (RSD%)
SDZ	12660	1.8	12329	5.2	10099	0.9
SDZ- <i>d</i> <sub>4</sub>	7950	1.5	8477	1.6	6683	2.5
SDZ- <sup>13</sup> C <sub>6</sub>	12868	3.1	10884	0.5	10591	2.8
SMXZ	13029	1.3	11133	2.6	14096	1.2
SMXZ- <i>d</i> <sub>4</sub>	11074	0.6	11308	5.2	11866	1.9
SMXZ- <sup>13</sup> C <sub>6</sub>	12267	2.4	12739	1.9	13022	1.3
TBZ	18880	0.9	18157	2.0	16978	2.1
TBZ- <i>d</i> <sub>6</sub>	9169	1.4	10297	2.1	10321	2.9
TBZ- <sup>13</sup> C <sub>6</sub>	22896	2.2	21699	1.7	21136	2.4
TMP	10695	4.0	8938	1.6	11242	2.5
TMP- <i>d</i> <sub>3</sub>	8839	2.1	8525	3.0	10204	1.5
TMP- <sup>13</sup> C <sub>3</sub>	10325	2.5	10307	3.5	12135	2.5
TMP- <i>d</i> <sub>9</sub>	10704	2.9	12666	1.8	10159	3.1

表 5 各測定溶液と各測定イオンで得られるピーク面積値の関係

	ピーク面積値		
	SDZ 1 µg/mL	SDZ- <i>d</i> <sub>4</sub> 1 µg/mL	SDZ- <sup>13</sup> C <sub>6</sub> 1 µg/mL
SDZ測定イオン( <i>m/z</i> 251 <i>m/z</i> 156)	882648	361	ND
SDZ- <i>d</i> <sub>4</sub> 測定イオン( <i>m/z</i> 255 <i>m/z</i> 160)	302	589043	398
SDZ- <sup>13</sup> C <sub>6</sub> 測定イオン( <i>m/z</i> 257 <i>m/z</i> 162)	ND	28536	889566

	ピーク面積値		
	SMXZ 1 µg/mL	SMXZ- <i>d</i> <sub>4</sub> 1 µg/mL	SMXZ- <sup>13</sup> C <sub>6</sub> 1 µg/mL
SMZ測定イオン( <i>m/z</i> 254 <i>m/z</i> 156)	1194163	183	330
SMZ- <i>d</i> <sub>4</sub> 測定イオン( <i>m/z</i> 258 <i>m/z</i> 160)	643	1060817	794
SMZ- <sup>13</sup> C <sub>6</sub> 測定イオン( <i>m/z</i> 260 <i>m/z</i> 162)	36	46492	1140044

	ピーク面積値		
	TBZ 1 µg/mL	TBZ- <i>d</i> <sub>6</sub> 1 µg/mL	TBZ- <sup>13</sup> C <sub>6</sub> 1 µg/mL
TBZ測定イオン( <i>m/z</i> 202 <i>m/z</i> 175)	1621936	325	1037
TBZ- <i>d</i> <sub>6</sub> 測定イオン( <i>m/z</i> 208 <i>m/z</i> 180)	34	872134	24133
TBZ- <sup>13</sup> C <sub>6</sub> 測定イオン( <i>m/z</i> 208 <i>m/z</i> 181)	34	328719	1486423

	ピーク面積値			
	TMP 1 µg/mL	TMP- <i>d</i> <sub>3</sub> 1 µg/mL	TMP- <sup>13</sup> C <sub>3</sub> 1 µg/mL	TMP- <i>d</i> <sub>9</sub> 1 µg/mL
TMP測定イオン( <i>m/z</i> 291 <i>m/z</i> 230)	769943	3385	ND	ND
TMP- <i>d</i> <sub>3</sub> 測定イオン( <i>m/z</i> 294 <i>m/z</i> 230)	178	668048	1697	ND
TMP- <sup>13</sup> C <sub>3</sub> 測定イオン( <i>m/z</i> 294 <i>m/z</i> 233)	577	54090	694065	ND
TMP- <i>d</i> <sub>9</sub> 測定イオン( <i>m/z</i> 300 <i>m/z</i> 234)	ND	ND	ND	821120

ND: not detected

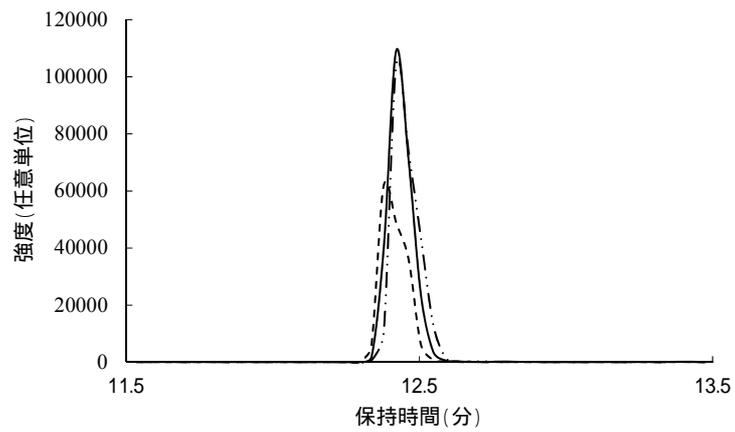
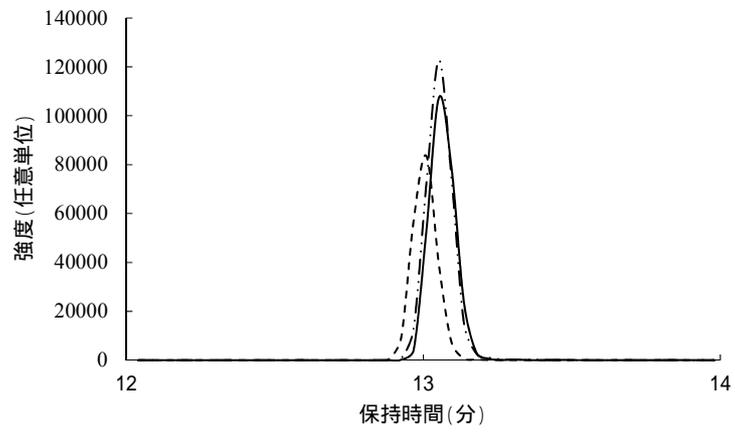
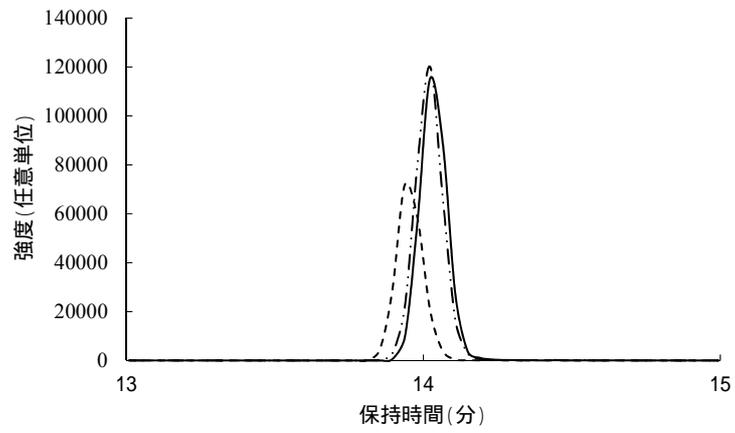


図 1-1 SDZ、SDZ- $d_4$  及び SDZ- $^{13}C_6$  のクロマトグラム  
 — : SDZ、 - - - - : SDZ- $d_4$ 、 - · - · : SDZ- $^{13}C_6$   
 上: グラジエント条件  
 中: グラジエント条件  
 下: グラジエント条件

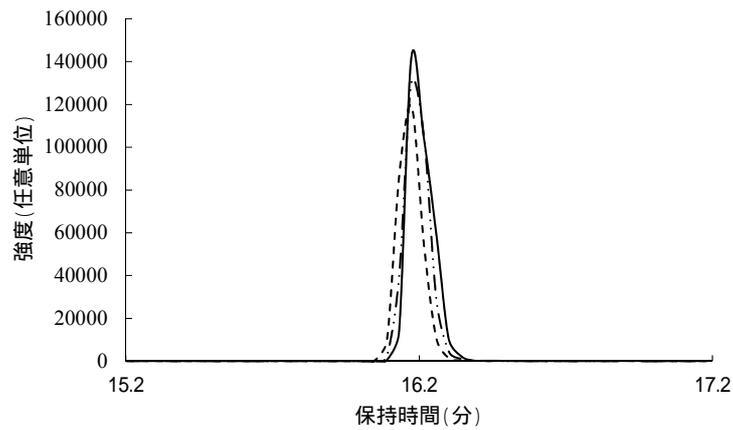
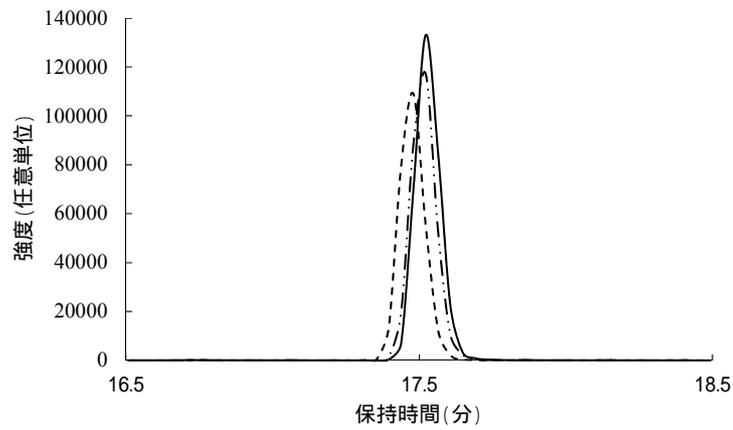
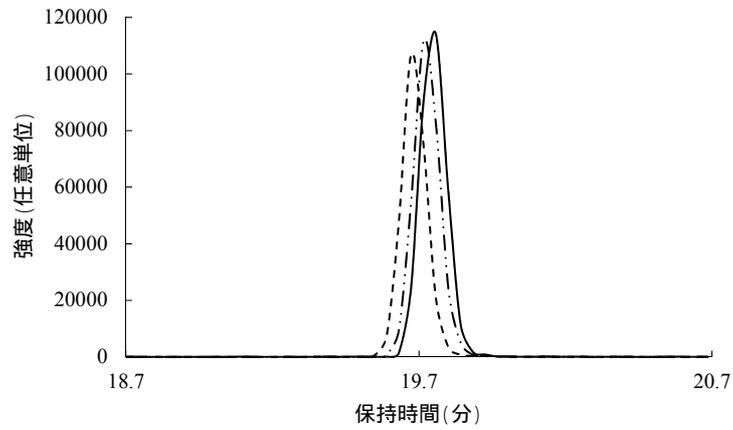


図 1-2 SMXZ、SMXZ- $d_4$  及び SMXZ- $^{13}C_6$  のクロマトグラム  
 — : SMXZ、 - - - : SMXZ- $d_4$ 、 - · - · : SMXZ- $^{13}C_6$   
 上 : グラジエント条件  
 中 : グラジエント条件  
 下 : グラジエント条件

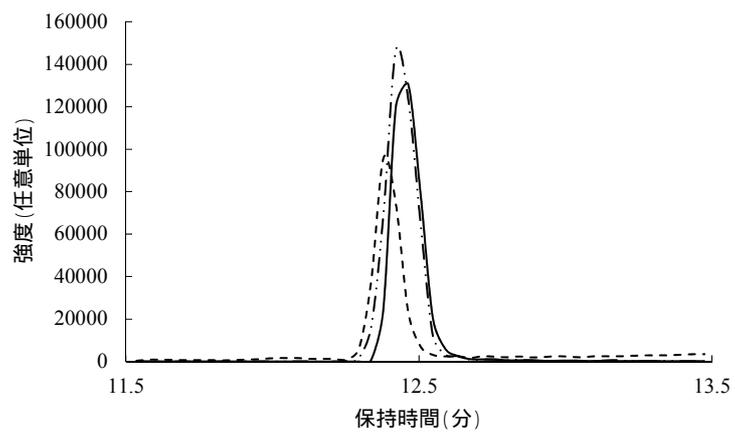
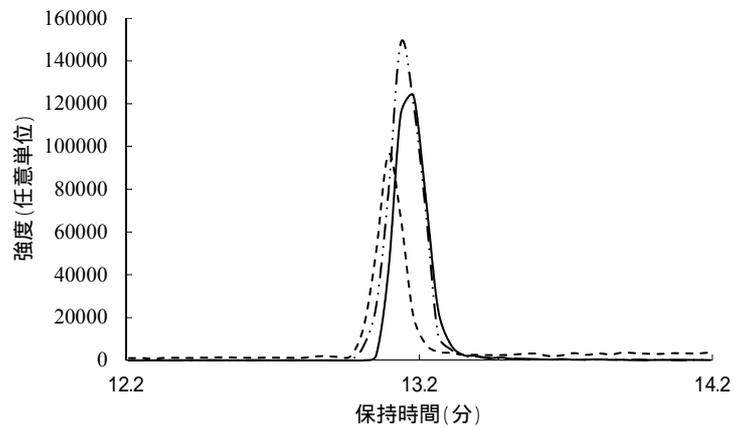
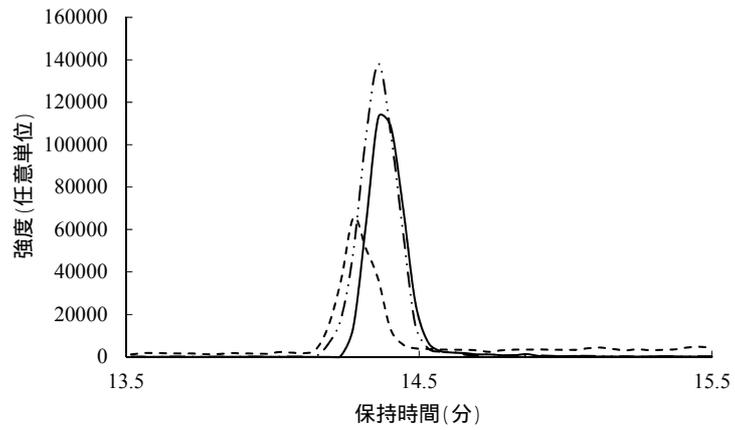


図 1-3 TBZ、TBZ-d<sub>4</sub> 及び TBZ-<sup>13</sup>C<sub>6</sub> のクロマトグラム

——:TBZ、 - - - - -:TBZ-d<sub>4</sub>、 - · - · -:TBZ-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>

上: グラジエント条件

中: グラジエント条件

下: グラジエント条件

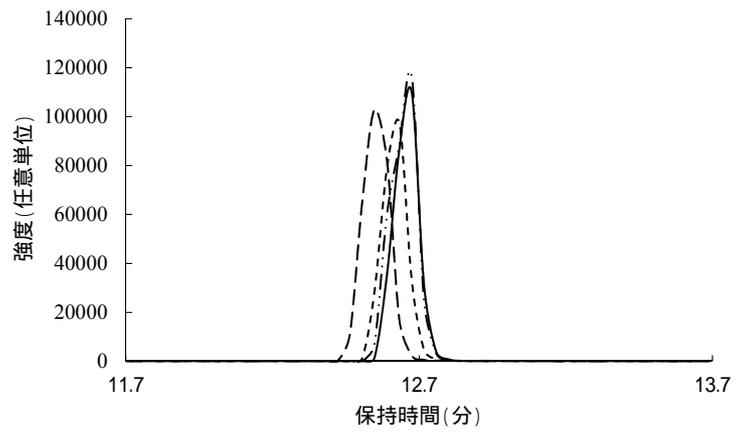
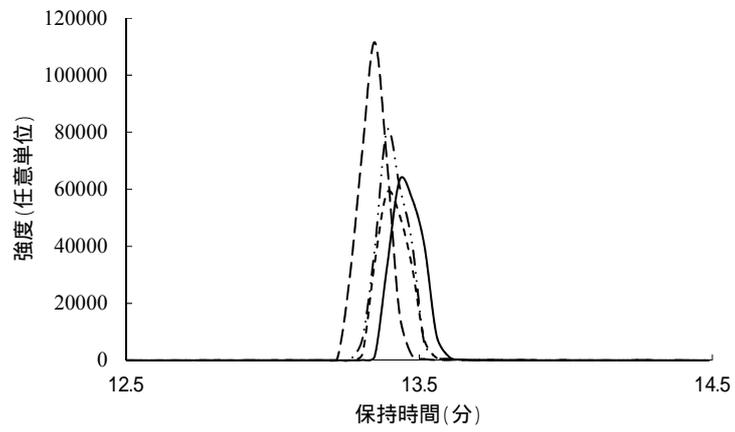
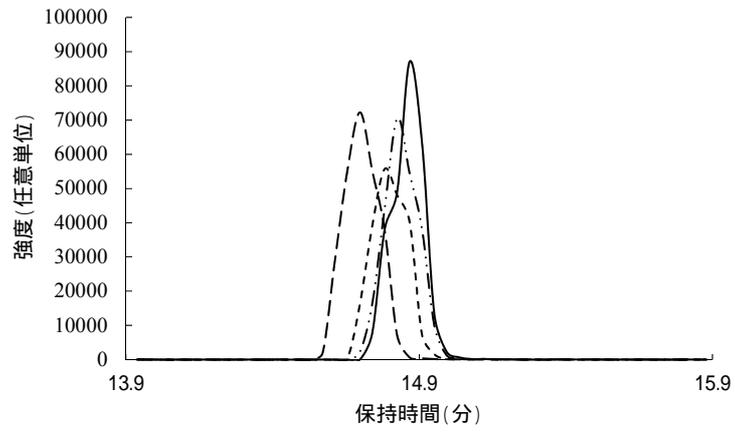


図 1-4 TMP、TMP- $d_3$ 、TMP- $^{13}C_3$  及び TMP- $d_9$  のクロマトグラム  
 ———:TMP、 - - - - -:TMP- $d_3$ 、 - · - · - :TMP- $^{13}C_3$ 、 - - - - -:TMP- $d_9$   
 上: グラジエント条件  
 中: グラジエント条件  
 下: グラジエント条件