

ドライアイス凍結粉碎法とSTQ法を用いた TPN、キャプタン、カプタホール、ホルペットの 分析法の検討

○佐々野 僚一¹, 土居 恵子¹, 小西 賢治¹, 斎藤 勲²

¹株式会社アイスティサイエンス, ²公益財団法人科学技術交流財団

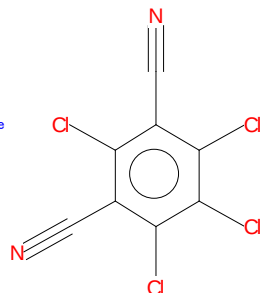
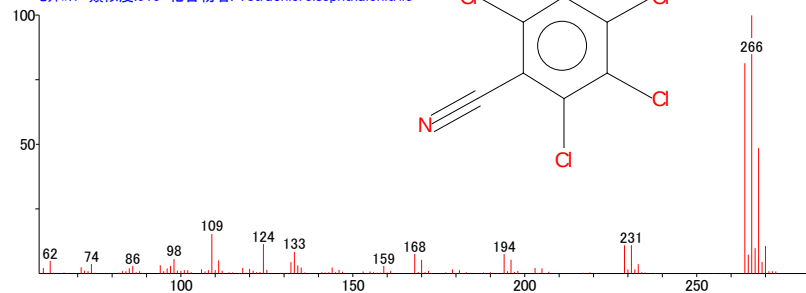
物性と構造式

TPN (Chlorothalonil)

MW : 265.9

LogPOW=2.9

ヒット#1 類似度:915 化合物名: Tetrachloroisophthalonitrile

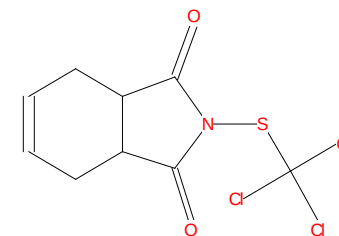
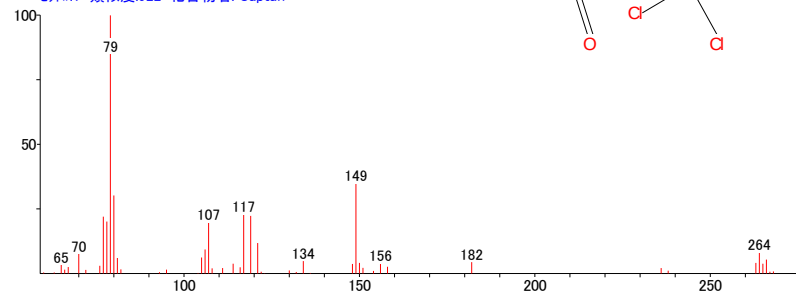


Captan

MW : 300.6

LogPOW=2.8

ヒット#1 類似度:922 化合物名: Captan

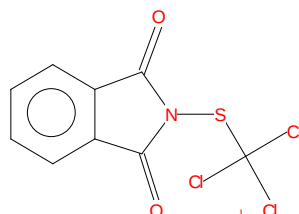
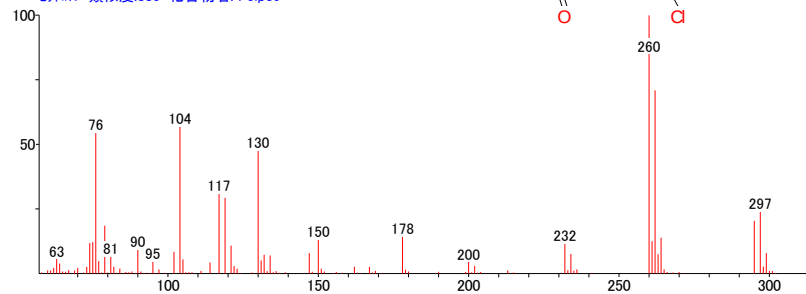


Folpet

MW : 296.6

LogPOW=3.1

ヒット#1 類似度:885 化合物名: Folpet

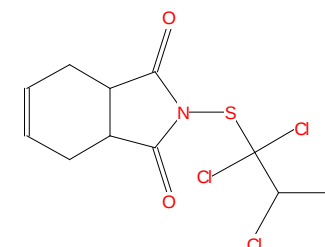
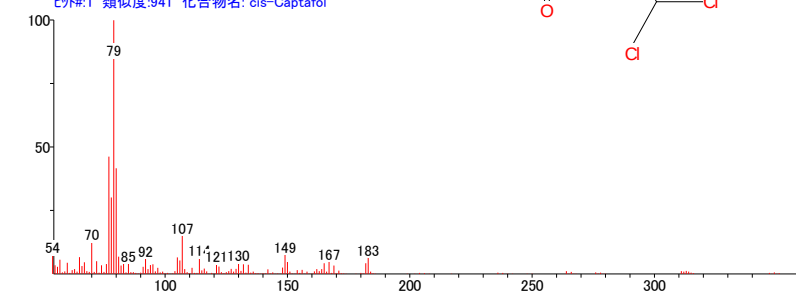


Captafol

MW : 349.1

LogPOW=3.8

ヒット#1 類似度:941 化合物名: cis-Captafol



基準値

農作物	TPN	キャプタン	カプタホール	ホルペット
キャベツ	2	5	不検出	*0.01
大根	0.1	5	不検出	*0.01
玉ねぎ	0.5	5	不検出	2
トマト	5	5	不検出	3
ほうれん草	4	5	不検出	*0.01
キュウリ	5	5	不検出	2
レタス	1	5	不検出	2

不検出：検出限界0.01ppm

*一律基準

経緯と目的

TPN、キャプタン、カプタホール、ホルペットの分析について

《試料粉碎工程》

- ・ 試料粉碎時に分解することが知られている。
- ・ 個別法：「**リン酸添加**」
- ・ QuEChERS法：「**凍結粉碎**」

《精製工程》

- ・ 硫黄夾雑成分を含む試料（キャベツや玉ねぎ）の場合、精製に用いた**固相PSA**が**TPN消失**の要因の可能性がある。



【目的】

「**ドライアイス凍結粉碎法**」と「**STQ法**」を用いた分析法の検討

ドライアイス予冷式凍結粉碎 ～メリットいろいろ～

斎藤勲先生：科学技術交流財団 知の拠点重点研究プロジェクト共同研究



凍結粉碎のメリット～その1～

さらさらパウダーで均一化、パウダーのまま保管

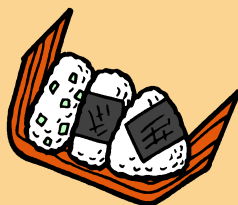
困った例



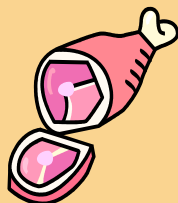
汁と皮が分離



粘性を帯びる



団子状に変化



筋が絡まる

ドライアイスと粉碎



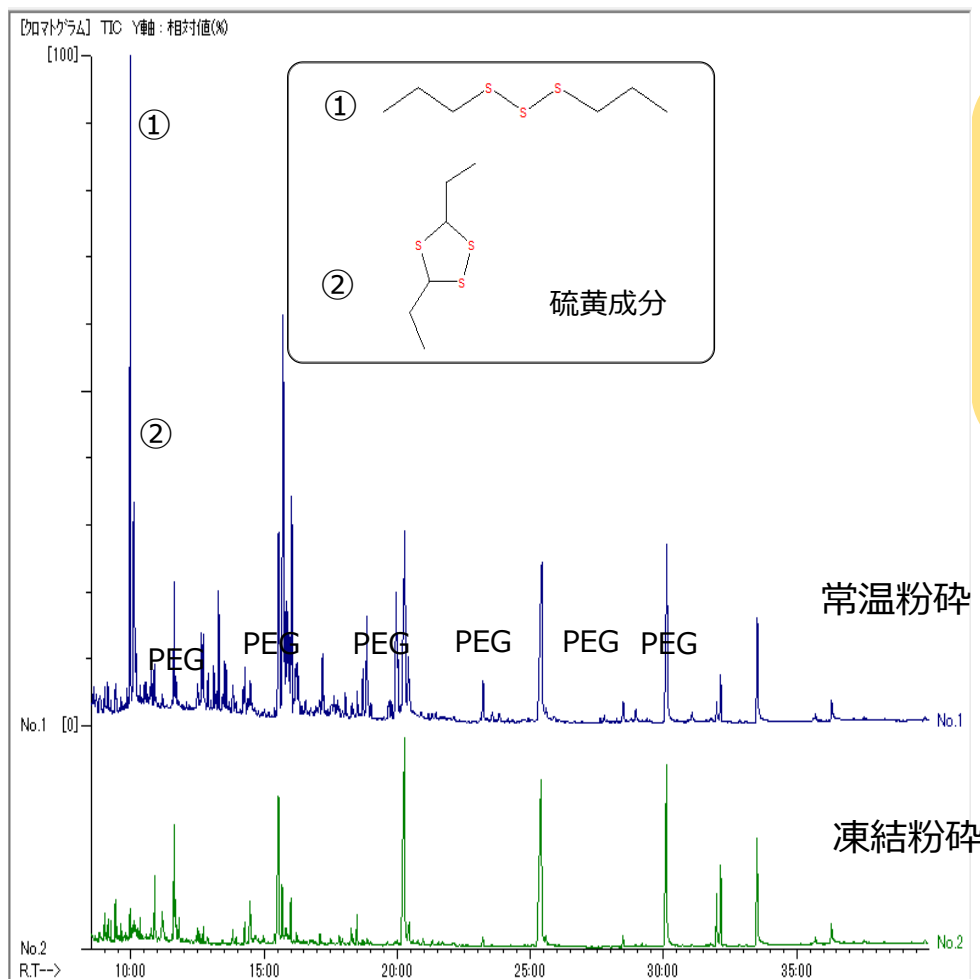
パウダー状に



コツがあります
失敗や事故防止のために
まずはお問い合わせください

凍結粉碎のメリット～その2～

粉碎時に悪さをする酵素活性の抑制



酵素活性による悪さの例

交雑成分の発生、上昇（ネギ類）

農薬の分解（クロロタロニルなど）

硫黄成分の発生抑制

図. タマネギを常温粉碎または凍結粉碎しSTQ法にて分析した時のそれぞれのSCANクロマトグラム

酵素活性抑制のためのサンプル調製

▶ 従来法

- ①リン酸処理：試料粉砕時10%リン酸を添加
→一斉分析に不向き
- ②レンジ処理：粉砕前に電子レンジで加熱処理
→レンジ処理による農薬分解の懸念
→処理前の試料に標準添加をしての回収率確認が難しい



- ▶ ドライアイス予冷式凍結粉砕：試料凍結後、粉砕
→酸や熱処理を行わないので、分解しやすい成分の
一斉分析への応用も可能

大根おろしの辛みについて

- ▶ 大根おろしの辛みは、辛み成分アリルイソチオシアネート（芥子油）によるものであるが、この物質は、そのままの大根の中には存在していない。イソチオシアネートは大根をすりおろしたり切ることによって、細胞が壊れると初めて化学反応により生成される。そもそも大根中の別々の場所に存在していたイソチオシアネートの前駆物質（グルコシノレート、芥子油配糖体）とミロシナーゼと呼ばれる酵素が、細胞が壊れることにより混ざりあい、イソチオシアネートを生成する化学反応を起こすことによる。イソチオシアネートの前駆物質は根の先端部分ほど含有量が多く、葉に近い部位の約10倍にもなる。また若い大根には多く、成長するにしたがって減少する。そのため辛い大根おろしには夏大根がより適している。
- ▶ 上述のように大根おろしの辛みを得るためには、細胞を効率良く壊すことが必要である。そのためには大根の切断面を繊維を断ち切るようにおろすとよい。おろし金に対して直線に力をこめて一気にすりおろすとより辛味が増す。さらに、おろしてから5分程度経過したら、辛みがピークに達しその後減少する。逆に辛味を減らしたい場合は、くびの方を使い、輪切りにした側面からゆっくりと円を書くようにすりおろす。繊維に沿っておろすことになり細胞が壊れにくいためである。さらに甘みを生かす為にはおろしたあと即加熱することで10分程度で加熱前より2倍程甘みが増す。イソチオシアネートは揮発性のため、おろしてからしばらくおいておくと辛みが減少する。それをさけるためには、食べる直前におろす。

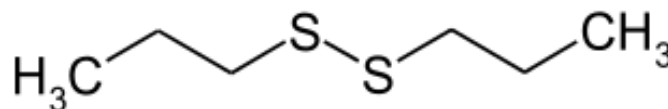
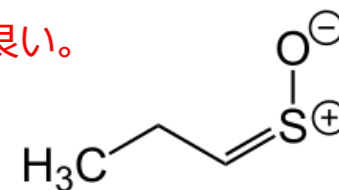
資料:Wikipedia

-

資料:Wikipedia

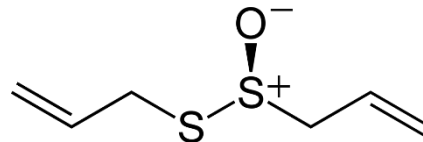
玉ねぎ

- ▶ タマネギを切ると涙が出るのは、タマネギの細胞がスライスされた時に発生するsyn-プロパンチアール-S-オキシドが気化し、目・鼻の粘膜を刺激するためである。これを防ぐにはゴーグル等で目を覆ったり鼻をつまむ。ほとんどにおいては鼻から侵入してくるため、目を洗い流すだけでは痛みを緩和することは難しい。
- ▶ タマネギをスライスして細胞を破壊すると、アリナーゼと呼ばれる酵素によってスルホキシドアミノ酸が分解され、スルフェン酸が生成する。生じた1-プロペンスルフェン酸は、催涙因子合成酵素 (lachrymatory factor synthase; LFS) により即座にsyn-プロパンチアール-S-オキシドに変換される。スルフェン酸は不安定な物質であり、自発的にsyn-プロパンチアール-S-オキシドになる。水につけながら切ると刺激成分が水に溶けて気化しなくなる。あらかじめ冷蔵庫で数時間冷やしておくのも良い。
- ▶ 生のタマネギの匂いは、主にジプロピルジスルフィドによるものである。
- ▶ ジプロピルジスルフィド（英: Dipropyl disulfide）は、ジスルフィドにプロピル基が結合した有機硫黄化合物である。生のタマネギの主要な匂い成分であり、長ネギにも含まれる。アルキルシステインスルホキシドが、リアーゼにより分解されて生じる。興奮・発汗・利尿や、消化液の分泌に効果があるとされる。



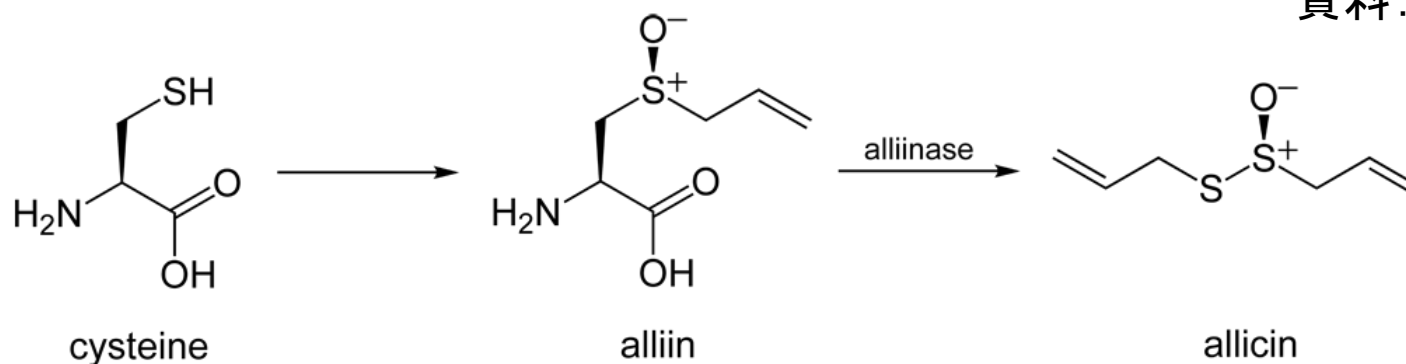
資料: Wikipedia

アリシン

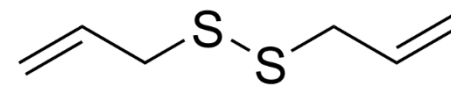


- ▶ アリシン (allicin) とはニンニク由来の強い抗菌・抗カビ作用をもつ化合物である。また、アリシンは生ニンニクを煮たり炒めたりしたときの臭いの元となる化合物でもある。
- ▶ アリシンは自生しているニンニクには存在しないが、ニンニクを刻んだり傷つけると、酵素アリナーゼの作用により化合物アリインから変換される化合物である。

資料: Wikipedia

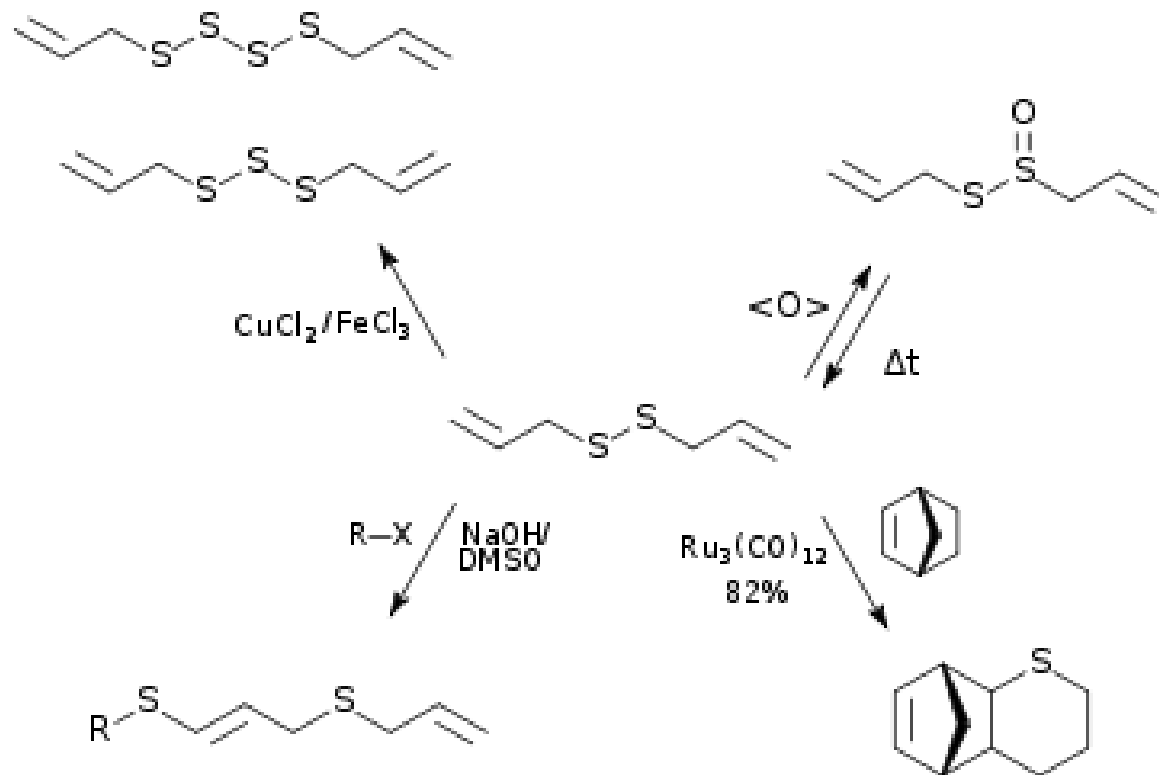


ジアリルジスルフィド



- ▶ 二硫化アリルまたはジアリルジスルフィド (diallyl disulfide) はネギ属の植物にみられる有機硫黄化合物である。硫化アリルやジアリルテトラスルフィドとともに、ニンニクの精油の主成分をなしている。黄色みを帯びた液体で、水には溶けず、強いニンニク臭を持つ。
- ▶ 主にニンニクやタマネギ、リーキなど、ネギ科の植物の細胞が壊れるときに放出される、アリシンの分解によって生成する。

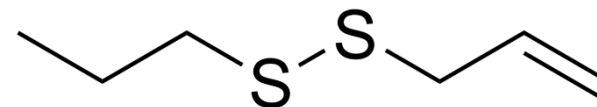
資料: Wikipedia



タマネギ中毒

- ▶ タマネギ中毒（タマネギちゅうどく、onion poisoning）とは、タマネギなどの摂食を原因とするイヌ、ネコや、ウシなどの食中毒のことである。タマネギ、ニンニク、ニラなどのネギ属に含まれるアリルプロピルジスルファイドなどがヘモグロビンを酸化させることにより、溶血性貧血を起こすことによるものとされており、血液塗抹標本ではハインツ小体が認められる。また、摂取する食品を加熱しても毒性は消えないとされている。
- ▶ アリルプロピルジスルフィド（英: allyl propyl disulfide）は、化学式C₆H₁₂S₂で表される有機硫黄化合物である。薄い黄色の液体で強い臭気を持つ。

資料:Wikipedia



アブラナ科

- ▶ 篩部に「ミロシン細胞」という特殊な細胞があり、柔細胞には**カラシ油配糖体を含む**のも大きな特徴である（近縁のフウチョウソウ科やワサビノキ科も含む）。**植物体が傷つくとミロシン細胞内の酵素（ミロシナーゼ）が配糖体を加水分解してイソチオシアン酸アリルを遊離する**。この物質がからしやワサビ、大根おろしなどに特有のツンとした辛味の成分であり、昆虫などの草食動物による食害から防御する手段である。
- ▶ アブラナ科の野菜にはがん予防効果があるといわれており、アブラナ科のイソチオシアネートの効果とも、イソチオシアン酸の誘導体が肝臓で抱合反応などによって解毒する作用を持っている酵素に働きかけるためだともいわれている。スルフォラファンはイソチオシアネートの一種でアブラナ科野菜の中でもブロッコリーに含まれ、がん予防効果があるとされている。
- ▶ S-メチルシステインスルフォキシド（S-methylcysteine sulfoxide）を含み、反芻動物の腸内での化学反応の結果、ジメチルジスルフィド（dimethyl disulfide）へと変化し、牛や羊などで溶血性貧血を起す。
- ▶ ワサビ、大根、キャベツ、ブロッコリー

資料:Wikipedia

ちょっとしたノウハウ

- 硫黄成分を含む試料は冷蔵庫で予め冷やしておく。
→冷やすことで、細切した時の酵素の働きを抑制する。
- 試料を切るときはできるだけ荒く切る。
→細かく切ると細胞が壊されて酵素が働いてしまう。
- 凍結粉碎後は、速やかに秤量し、アセトニトリルを添加する。
→酵素の働きをできるだけ抑制する。

前処理フロー

予冷方式ドライアイス凍結粉碎

試料 10g 20ppm ギ酸含有混合
標準溶液を50 μ L添加後、
30分間冷凍庫で静置

— アセトニトリル 10mL

ホモジナイズ

— NaCl (食塩) 1g
クエン酸3Na2水和物 1g
クエン酸水素2Na1.5水和物 0.5g
MgSO₄ (無水硫酸マグネシウム) 4g

手で振とう : 1分間

遠心分離 (3500rpm 5分間)

アセトニトリル層

分取 1mL

— アセトニトリル-水 1mL

抽出液

« 自動前処理装置 ST-L300 »

分取 1mL (試料 : 0.5g相当)

Smart-SPE C18-30 mg : 精製

— 洗液 アセトニトリル-水 (4/1) 1 mL

流出液

— 水 20mL

Smart-SPE C18-50mg : 保持

乾燥 (窒素ガス 2分)

連結 Smart-SPE PSA-30mg : 精製

*** 硫黄成分含有試料の場合 : AXi3-20mg**

— 溶出 アセトン-ヘキサン (1/3) 1mL

溶出液

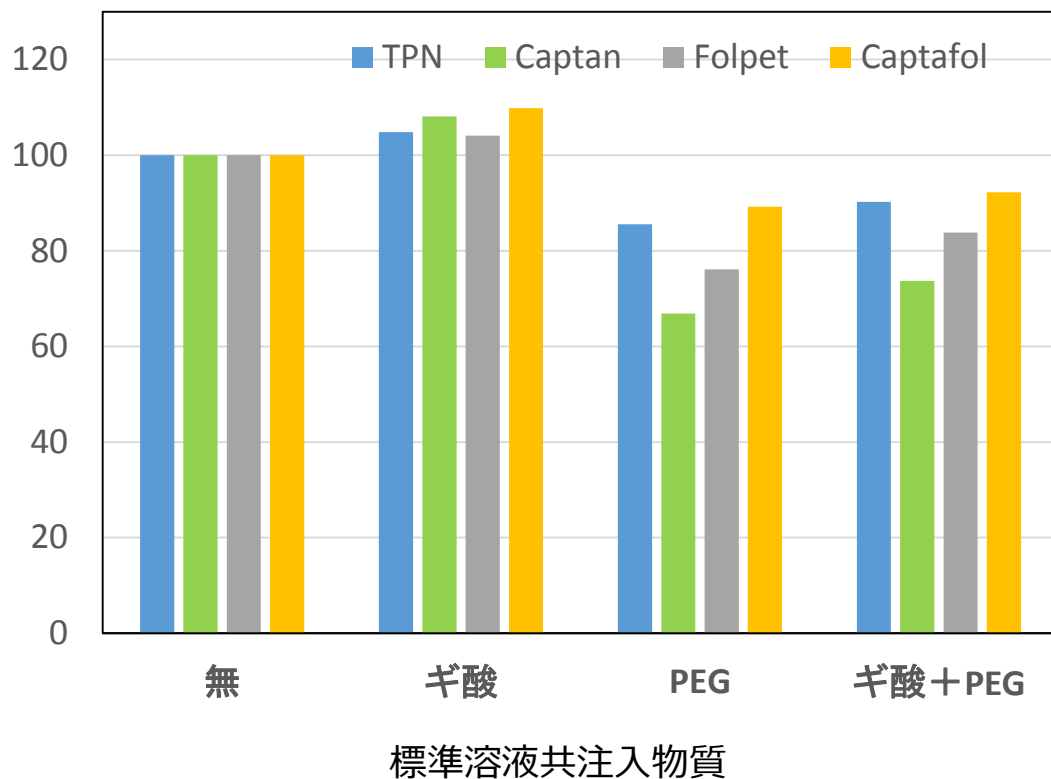
定容 (1 mL, アセトン-ヘキサンで調製)

GC/MS (大量注入25 μ L)

検討内容

1. 疑似マトリックスPEGの影響
2. 常温粉碎と凍結粉碎の比較
3. 添加時の標準溶液の溶媒について
4. 固相ミニカラムPSAについて

疑似マトリクスPEGの影響



混合標準溶液

- ・濃度：50ppb
- ・アセトン-ヘキサン（1/3）

共注入物質

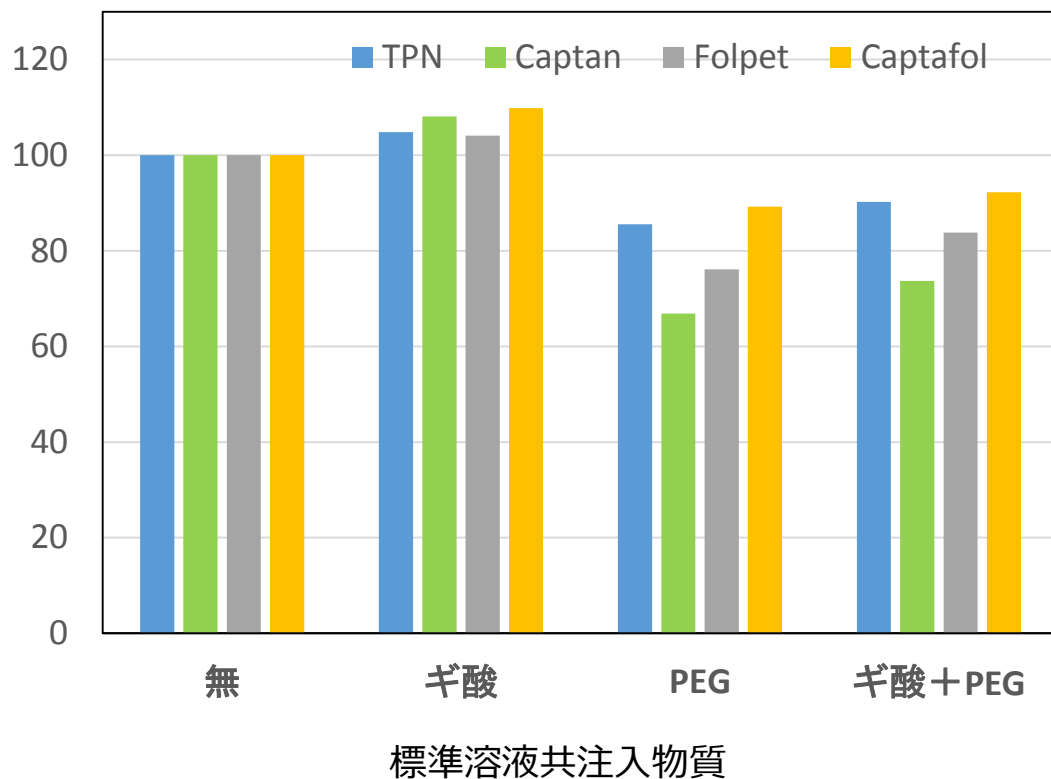
- ・ギ酸：1%
- ・PEG：200ppm

注入口条件

- ・注入量：25μL
- ・注入口温度
70℃-120℃/min-240℃-
50℃/min-280℃（26min）

PEG共注入した場合、ピーク面積値の減少が若干みられた。PEG共注入により、注入口で気化する時の温度が高くなるために分解することが懸念された。本研究では**PEG共注入を使用せず**に評価を行うこととした。

疑似マトリクスPEGの影響



混合標準溶液

- ・濃度：50ppb
- ・アセトン-ヘキサン（1/3）

共注入物質

- ・ギ酸：1%
- ・PEG：200ppm

注入口条件

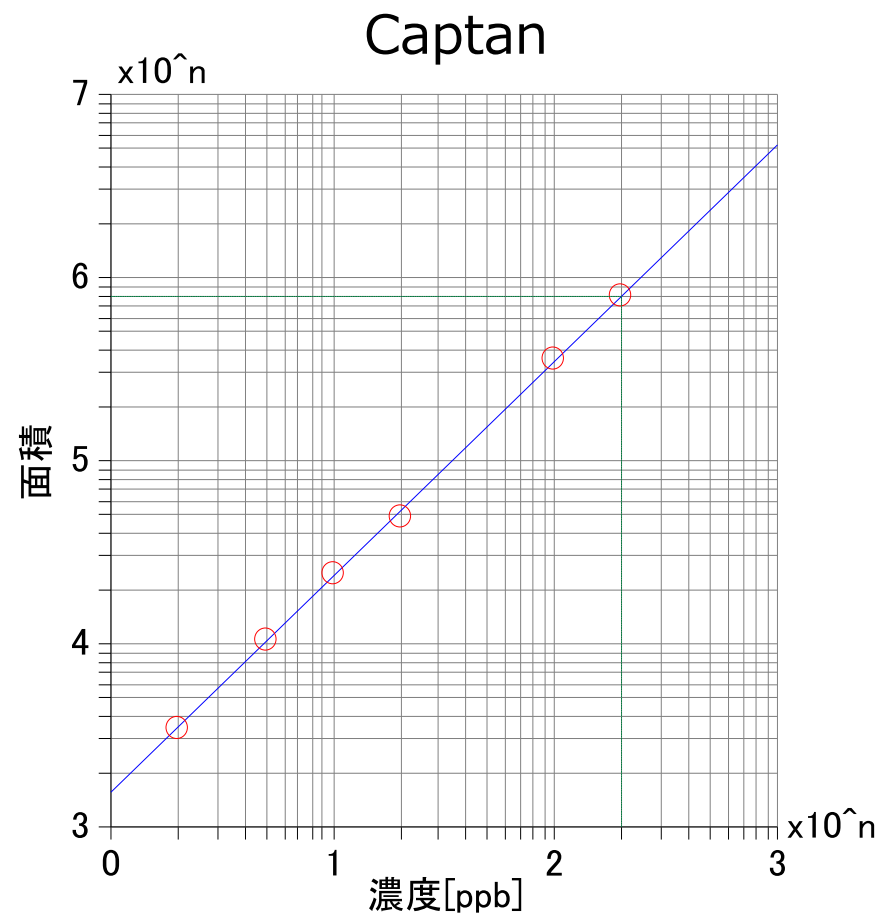
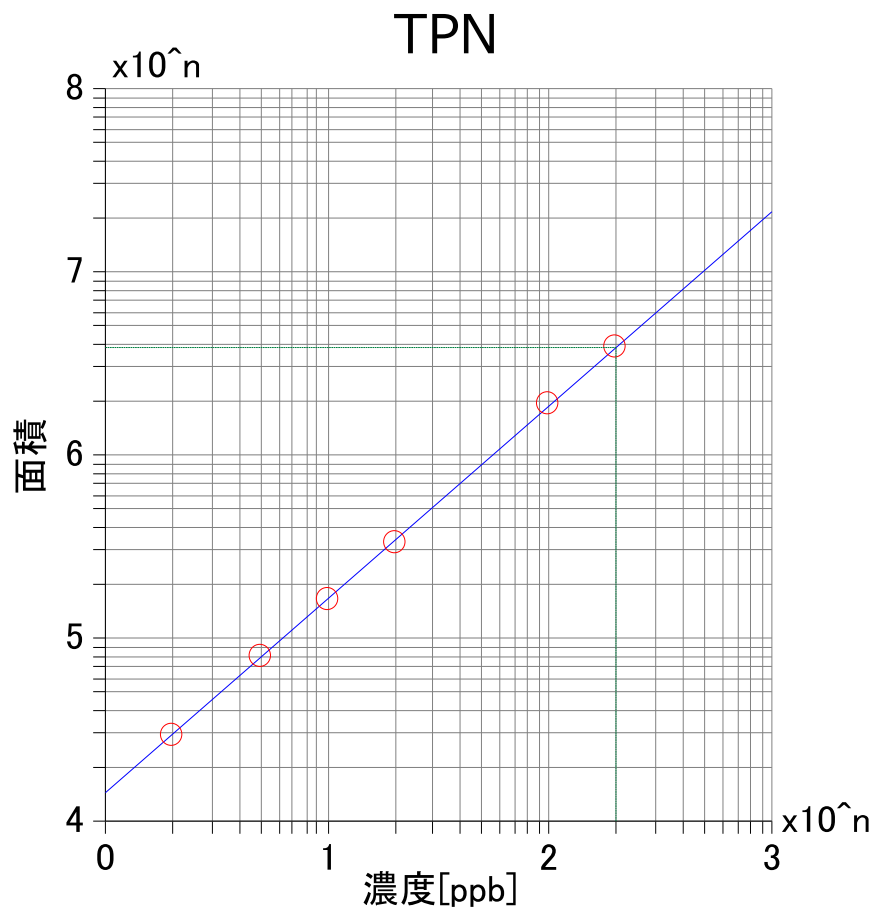
- ・注入量：25μL
- ・注入口温度
70℃-120℃/min-240℃-
50℃/min-280℃（26min）

PEG共注入した場合、ピーク面積値の減少が若干みられた。PEG共注入により、注入口で気化する時の温度が高くなるために分解することが懸念された。本研究では**PEG共注入を使用せず**に評価を行うこととした。

検量線

検量線:対数
面積(比率)= $14155.74485 \cdot Q^{1.061722}$
相関係数=0.9999027

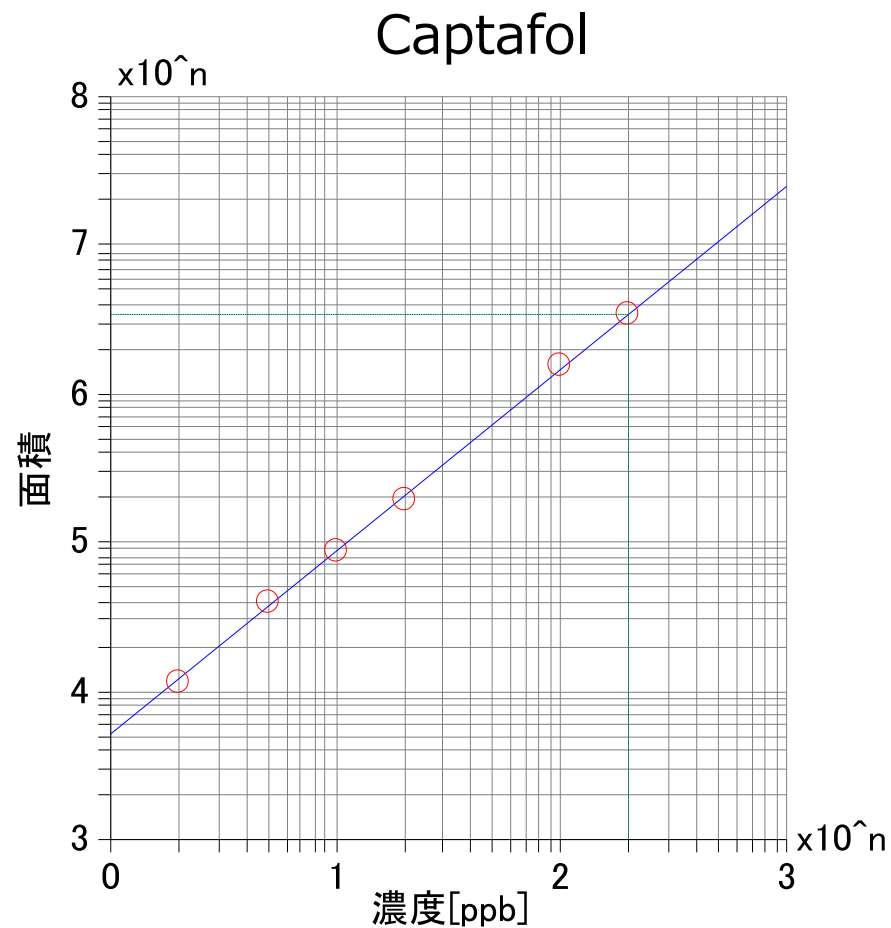
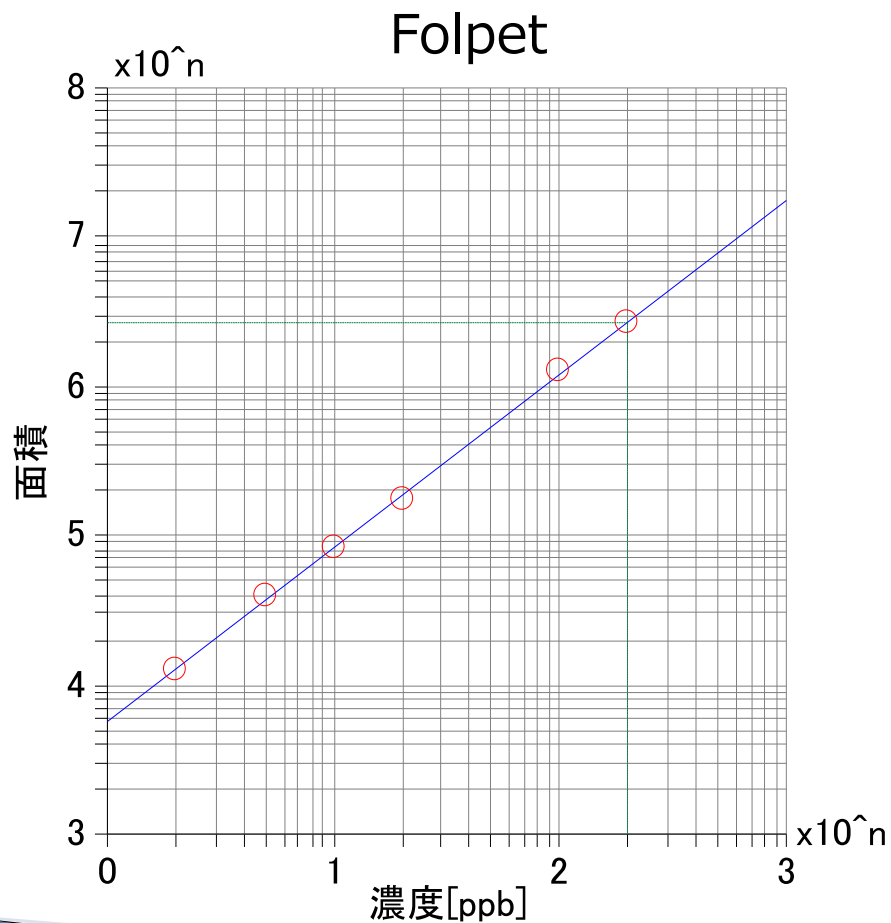
検量線:対数
面積(比率)= $1536.27711 \cdot Q^{1.17723}$
相関係数=0.9998825



検量線

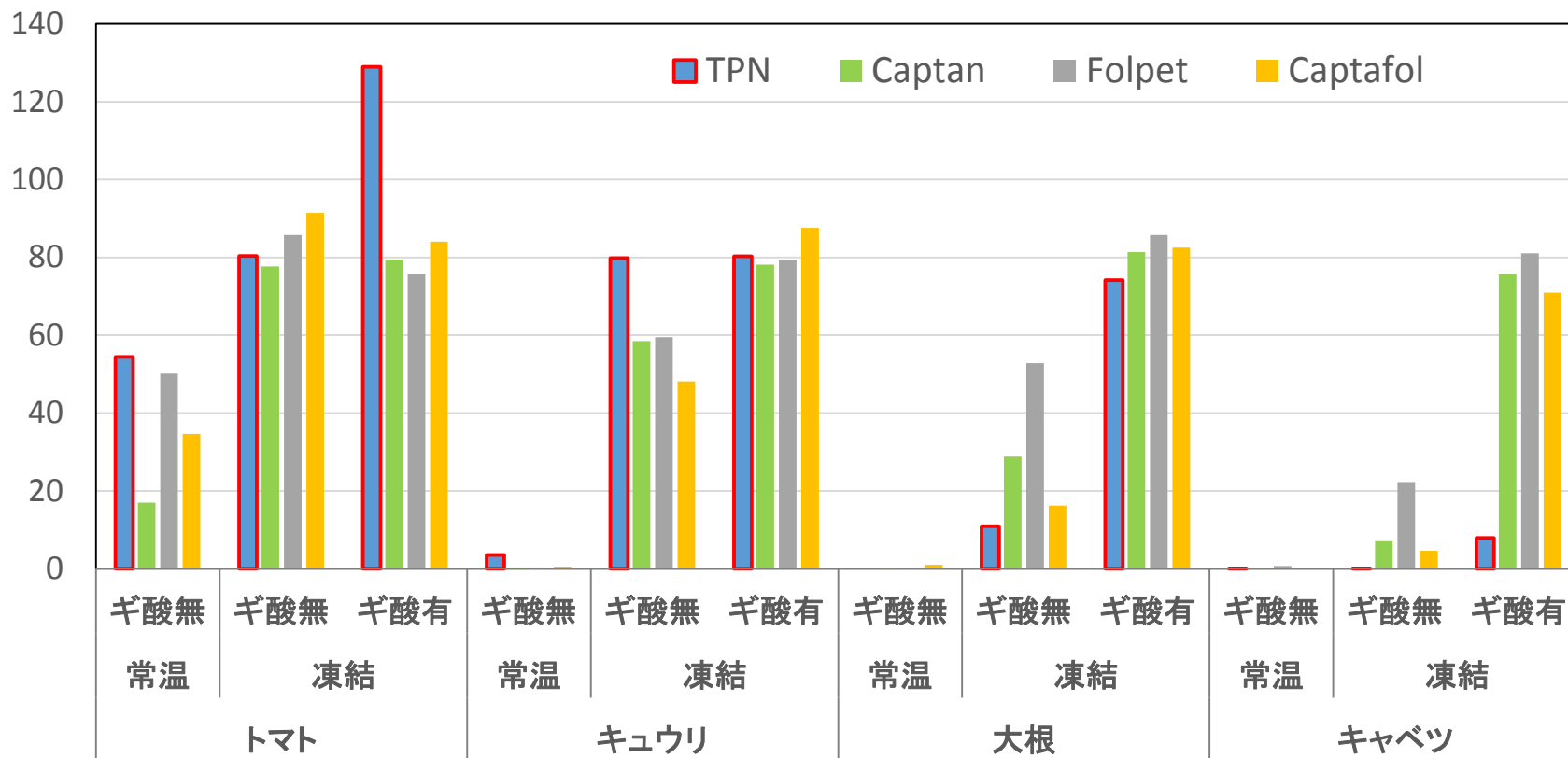
検量線:対数
面積(比率)= $5650.77541 \cdot Q^{1.16752}$
相関係数=0.9997090

検量線:対数
面積(比率)= $5054.52039 \cdot Q^{1.23364}$
相関係数=0.9997118



常温粉碎と凍結粉碎

回収率 (%)



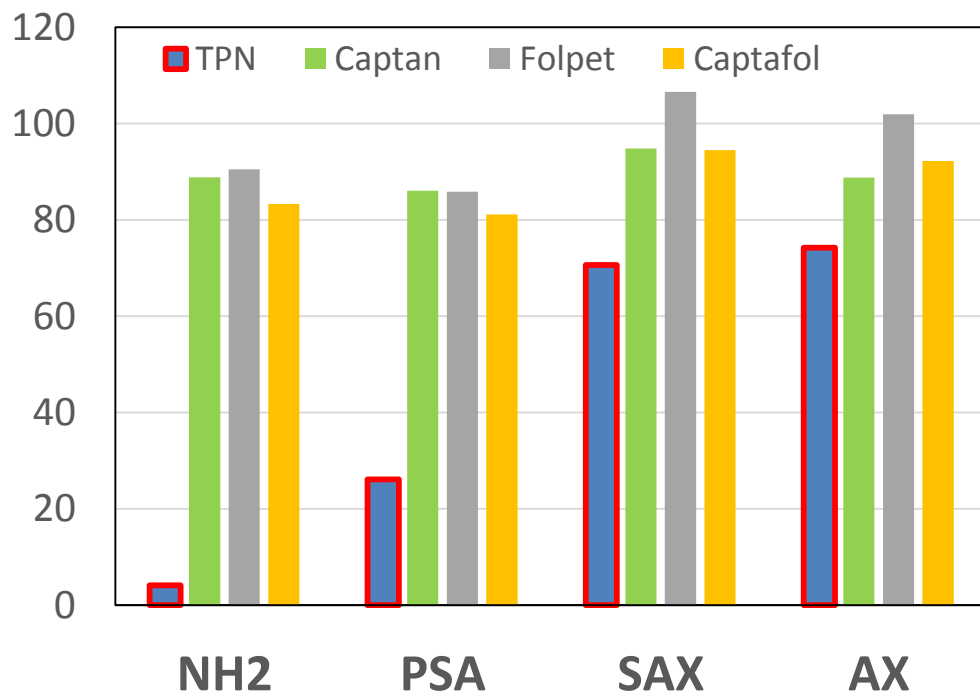
添加回収試験

- ・ 試料中濃度100ppb
- ・ 精製固相：PSA
- ・ 溶出：アセトン-ヘキサン (1/3)

- **ドライアイス凍結粉碎**により、回収率が向上した。
- 添加時の**ギ酸含有**混合標準溶液により、キャプタン、ホルペット、カプタホルの回収率が向上した。

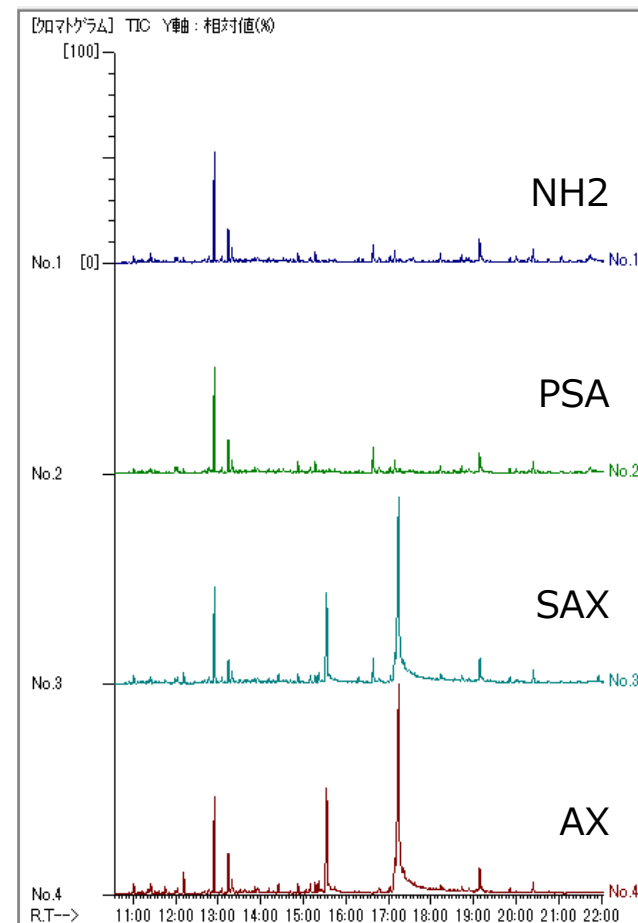
各固相による回収率と精製度

回収率 (%)



添加回収試験

- ・ 試料：キャベツ
- ・ 試料中濃度100ppb（ギ酸含有）
- ・ 凍結粉碎
- ・ 溶出：アセトン-ヘキサン（1/3）

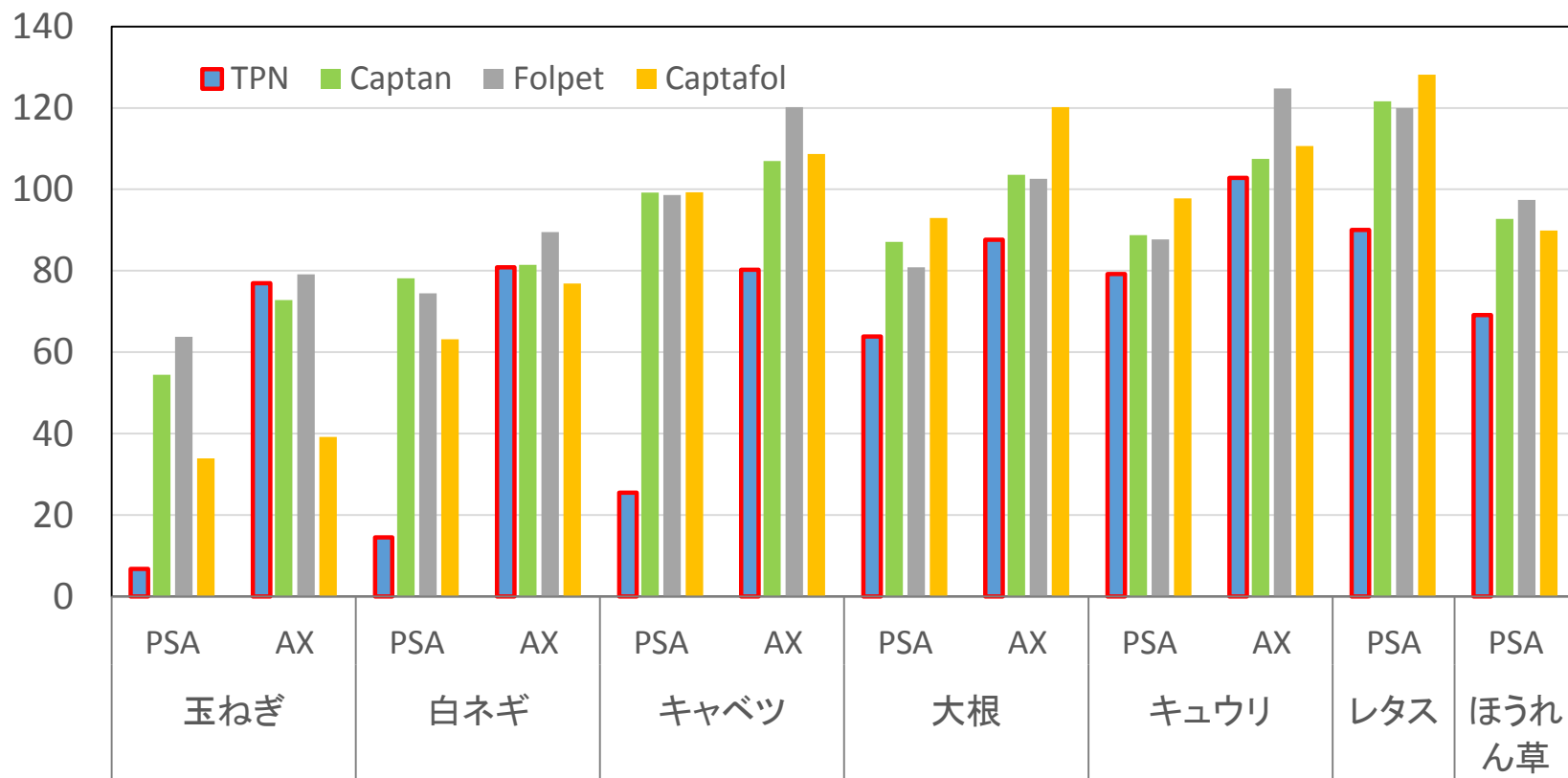


各固相によるSCANクロマトグラム

SAXやAXを用いることでTPNの回収率が向上したが、精製度は悪くなった。

各試料における固相PSAとAXの回収率

回収率 (%)



添加回収試験

- ・ 試料中濃度100ppb (ギ酸含有)
- ・ 凍結粉碎
- ・ 溶出：アセトン-ヘキサン (1/3)

特に硫黄化合物の夾雑成分を含む試料において、固相**PSA**を用いず、代わりに固相**AX**を用いることでTPNの回収率が向上することが分かった。

回収率と再現性

(単位：%)

化合物名	添加-1	添加-2	添加-3	添加-4	添加-5	Ave.	RSD
TPN	94	99	96	81	96	93	7.6
Captan	101	118	106	96	107	106	7.8
Folpet	115	121	120	111	120	118	3.7
Captafol	123	131	131	122	126	127	3.4

添加回収試験

- ・ 試料：キャベツ
- ・ 予冷方式凍結粉碎
- ・ 試料中濃度100ppb（ギ酸含有）
- ・ 固相：AX
- ・ 溶出：アセトン-ヘキサン（1/3）

まとめ

「**予冷方式ドライアイス凍結粉碎法**」と「**STQ法**」を用いてTPN、キャプタン、ホルペット、カプタホルの分析法の検討を行い以下のことが分かった。

- 予冷方式ドライアイス凍結粉碎により、試料粉碎時の分解を抑えることが分かった。
- 添加時の混合標準溶液にギ酸を含有させることにより、キャプタン、ホルペット、カプタホルの回収率が向上した。
- 硫黄夾雑成分を含む試料（キャベツや玉ねぎ）において固相NH₂やPSAを用いた場合、TPNの回収率が減少することが分かった。
- 硫黄夾雑成分を含む試料の場合、固相PSAの代わりにSAXやAXを用いることでTPNの良好な回収率を得ることができた。

参考文献

- 1) M.Anastassiades; www.quechers.com
- 2) 斎藤勲ら、日本食品衛生学会第98回A-17 (2008)
- 3) 永井ら、日本農薬学会誌,37(4),362-371(2012)
- 4) 永井ら、第35回農薬残留分析研究会要旨集, P98-116