

※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

ヘキサジノン試験法（畜産物）

ヘキサジノン試験法（畜産物）の検討結果

〔緒言〕

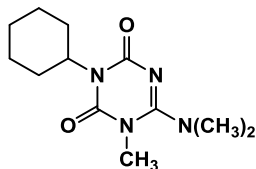
1. 目的

ヘキサジノンは、広範囲の雑草防除に用いられるトリアジノン系除草剤であり、作用機序は、葉緑素膜の電子伝達阻害による光合成阻害とされている。米国及び豪州ではアルファアルファ、ブルーベリー、パイナップル等を対象に登録されている。日本では食品中の農薬等のポジティブリスト制度導入時に海外基準を参考として基準値が設定された¹⁾。今回は畜産物を対象としたヘキサジノン試験法〔分析対象化合物：ヘキサジノン、代謝物 B 及び代謝物 F（乳の場合は、ヘキサジノン、代謝物 B、代謝物 C 及び代謝物 F）〕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

(1) 分析対象化合物：ヘキサジノン

構造式：



分子式：C₁₂H₂₀N₄O₂

分子量：252.31

IUPAC名：3-シクロヘキシル-6-ジメチルアミノ-1-メチル-1,3,5-トリアジン-2,4(1*H*,3*H*)-ジオン

CAS番号：51235-04-2

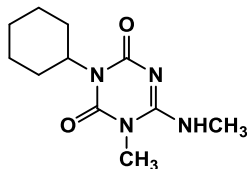
外観：白色、結晶～粉末

融点：116-120℃

溶解性：水、エタノール及びアセトンに溶ける。

(2) 分析対象化合物：ヘキサジノン代謝物 B

構造式：



分子式：C₁₁H₁₈N₄O₂

分子量：238.29

IUPAC名：3-シクロヘキシル-6-メチルアミノ-1-メチル-1,3,5-トリアジン-2,4-(1*H*,3*H*)-ジオン

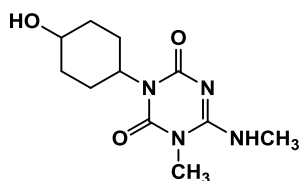
CAS番号：56611-54-2

外観：白色、結晶性粉末～粉末

溶解性：メタノールに溶け、水、エタノール及びアセトンに溶けない。

(3) 分析対象化合物：ヘキサジノン代謝物 C

構造式：



分子式： $C_{11}H_{18}N_4O_3$

分子量：254.29

IUPAC名：3-(4-ヒドロキシシクロヘキシル)-6-メチルアミノ-1-メチル-1,3,5-トリアジン-2,4-(1*H*,3*H*)-ジオン

CAS番号：72585-88-7

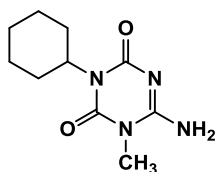
外観：白色、結晶性粉末～粉末

融点：約 255 °C (dec.)

溶解性：水に溶け、エタノール及びアセトンにほとんど溶けない。

(4) 分析対象化合物：ヘキサジノン代謝物 F

構造式：



分子式： $C_{10}H_{16}N_4O_2$

分子量：224.26

IUPAC名：3-シクロヘキシル-6-アミノ-1-メチル-1,3,5-トリアジン-2,4-(1*H*,3*H*)-ジオン

CAS番号：56611-55-3

外観：白色、結晶性粉末～粉末

溶解性：N,N-ジメチルホルムアミドに溶け、エタノール及びアセトンにほとんど溶けない。

[出典] 和光純薬製品詳細情報 <https://www.siyaku.com/>

3. 基準値

食品名	基準値 (ppm)
牛の筋肉	0.5
豚の筋肉	0.5
その他の陸棲哺乳類に属する動物の筋肉	0.5
牛の脂肪	0.1
豚の脂肪	0.1
その他の陸棲哺乳類に属する動物の脂肪	0.1
牛の肝臓	4
豚の肝臓	4
その他の陸棲哺乳類に属する動物の肝臓	4
牛の腎臓	4
豚の腎臓	4
その他の陸棲哺乳類に属する動物の腎臓	4
牛の食用部分	4
豚の食用部分	4
その他の陸棲哺乳類に属する動物の食用部分	4
乳	11

[実験方法]

1. 試料

牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓及び牛の乳は札幌市内の小売店で購入した。

(1) 牛の筋肉

脂肪層を取り除いた後、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) 牛の脂肪

筋肉層を取り除いた後、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。

(3) 牛の肝臓

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。

(4) 牛の乳

市販品をそのまま使用した。

2. 試薬・試液

ヘキサジノン標準品：純度 98%、融点 116~120℃〔和光純薬工業（株）製〕

ヘキサジノン代謝物 B 標準品：純度 98%〔和光純薬工業（株）製〕

ヘキサジノン代謝物 C 標準品 (mixture of isomer)：純度 98%、融点約 255℃ (dec.)
〔和光純薬工業（株）製〕

ヘキサジノン代謝物 F 標準品：純度 98%〔和光純薬工業（株）製〕

アセトニトリル、*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]

酢酸アンモニウム：特級 [和光純薬工業 (株) 製]

ろ紙：定量ろ紙 No. 5A、直径 110 mm [東洋濾紙 (株) 製]

トリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲル/エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム：SIGMA-ALDRICH 社製 Supelclean SAX/PSA (500 mg/500 mg、6 mL) (以下 SAX/PSA ミニカラムとする) をあらかじめアセトニトリル 10 mL でコンデューションングした後、用いた。

標準原液：ヘキサジノン標準品、代謝物 B 標準品、代謝物 C 標準品及び代謝物 F 標準品各 10.0 mg を精密に秤量し、メタノールに溶解して 1,000 mg/L 溶液を調製した。

添加用混合標準溶液：各標準原液を混合した後、メタノールで希釈して 0.0125 mg/L、0.025 mg/L、0.5 mg/L、5 mg/L、40 mg/L、110 mg/L の標準溶液を調製した。

検量線用混合標準溶液：添加用混合標準溶液をメタノールで適宜希釈し、0.0001~0.825 mg/L の標準溶液を調製した。

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 テクノガラス (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]

LC-MS/MS

装置	型式	会社
MS	LCMS-8040	(株) 島津製作所
LC	Prominence 高圧グラジエントシステム	
ポンプ	LC-20AD	(株) 島津製作所
デガッサー	DGU-20A	(株) 島津製作所
インジェクター	SIL-20AC	(株) 島津製作所
システムコントローラ	CBM-20A	(株) 島津製作所
カラムオーブン	CTO-20A	(株) 島津製作所
データ処理	LabSolution	(株) 島津製作所

4. 測定条件

LC-MS/MS

LC 条件			
カラム	Inertsil ODS-4 [内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm : ジーエルサイエンス (株) 製]		
移動相流速 (mL/min)	0.20		
注入量 (μL)	5		
カラム温度 (°C)	40		
移動相	A 液 : 5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 B 液 : 5 mmol/L 酢酸アンモニウム・メタノール溶液		
グラジエント条件	時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)
	0.0	85	15
	1.0	60	40
	3.5	60	40
	6.0	50	50
	8.0	45	55
	17.5	5	95
	30.0	5	95
	30.1	85	15
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 (+)		
プローブ電圧	Tune file 値を使用		
DL 温度	150°C		
ネブライザー流量	3.0 L/min		
ヒートブロック温度	500°C		
ドライイングガス流量	15.0 L/min		
コリジョンガス	アルゴン		
定量イオン (m/z)	ヘキサジノン : +253→171 (CE 17 V) 代謝物 B : +239→157 (CE 15 V) 代謝物 C : +255→157 (CE 18 V) 代謝物 F : +225→143 (CE 14 V)		
定性イオン (m/z)	ヘキサジノン : +253→71 (CE 35 V) 代謝物 B : +239→71 (CE 35 V) 代謝物 C : +255→71 (CE 35 V) 代謝物 F : +225→101 (CE 28 V)		
保持時間 (min)	ヘキサジノン : 14.6 代謝物 B : 14.3 代謝物 C : 6.4 及び 6.9 代謝物 F : 13.4		

5. 定量

添加用混合標準溶液をメタノールで希釈して以下の濃度の検量線用混合標準溶液を調製した。

基準値濃度添加

牛の筋肉 (基準値 0.5 mg/kg) : 0.0125、0.025、0.0375、0.05、0.0625 及び 0.075 mg/L

牛の脂肪 (基準値 0.1 mg/kg) : 0.0025、0.005、0.0075、0.01、0.0125 及び 0.015 mg/L

牛の肝臓 (基準値 4 mg/kg、試験溶液を 10 倍希釈して測定) : 0.01、0.02、0.03、0.04、0.05 及び 0.06 mg/L

牛の乳 (基準値 11 mg/kg、試験溶液を 20 倍希釈して測定) : 0.01375、0.0275、0.04125、0.055、0.06875 及び 0.0825 mg/L

定量限界濃度添加 : 0.0001、0.00015、0.0002、0.00025、0.0003 及び 0.00035 mg/L

この溶液 5 μ L を LC-MS/MS に注入して、得られたピーク面積を用いて各化合物の検量線を作成した。試験溶液 5 μ L を LC-MS/MS に注入し、絶対検量線法により各化合物の含量を算出した。なお、基準値濃度添加の牛の肝臓及び牛の乳は、各々試験溶液をメタノールで 10 倍及び 20 倍に希釈し測定した。

6. 添加試料の調製

牛の筋肉 (基準値 0.5 mg/kg) : 試料 10.0 g に 5 mg/L 添加用混合標準溶液 1 mL または 0.025 mg/L 添加用混合標準溶液 1 mL を添加し、混合した後、30 分間放置した。

牛の脂肪 : (基準値 0.1 mg/kg) : 試料 5.00 g を約 40°C で湯煎して融解し、0.5 mg/L 添加用混合標準溶液 1 mL または 0.0125 mg/L 添加用混合標準溶液 1 mL を添加し、混合した。
-19°C で 10 分間放置し、脂肪を凝固させた後、室温で 30 分間放置した。

牛の肝臓 : (基準値 4 mg/kg) : 試料 10.0 g に 40 mg/L 添加用混合標準溶液 1 mL または 0.025 mg/L 添加用混合標準溶液 1 mL を添加し、混合した後、30 分間放置した。

牛の乳 : (基準値 11 mg/kg) : 試料 10.0 g に 110 mg/L 添加用混合標準溶液 1 mL または 0.025 mg/L 添加用混合標準溶液 1 mL を添加し、混合した後、30 分間放置した。

7. 試験溶液の調製

概要

ヘキサジノン、代謝物B、代謝物C及び代謝物Fを試料から*n*-ヘキサン存在下アセトニトリルで抽出した。SAX/PSAミニカラムで精製した後、LC-MS/MSで定量及び確認した。

(1) 抽出

試料 10.0 g (牛の脂肪は 5.00 g) をガラス製遠沈管に採った。これに *n*-ヘキサン 50 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、10 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. 5A、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、先と同様に遠心分離した後、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。

(2) 精製

SAX/PSA ミニカラム (500 mg/500 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 (1) で得られた抽出液 4 mL を注入した後、アセトニトリル 20 mL を注入し、負荷液を含む全溶出液を採り、40℃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 4 mL (脂肪は 2 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

- ↓ 牛の筋肉、牛の肝臓、牛の乳： 試料 10.0 g
- ↓ 牛の脂肪： 試料 5.00 g

アセトニトリル抽出

- ↓ *n*-ヘキサン 50 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、10 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
- ↓ 遠心分離 (3,000 rpm、10 分間)
- ↓ 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

SAX/PSA ミニカラム [SIGMA-ALDRICH 社製 Spelclean SAX/PSA (500 mg/500 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 4 mL を注入
- ↓ アセトニトリル 20 mL で溶出 (負荷液を含む全溶出液を採取)

濃 縮 (溶媒除去)

- ↓ 残留物をメタノールに溶解 (牛の筋肉、牛の肝臓、牛の乳：4 mL、牛の脂肪：2 mL)

試験溶液

↓

LC-MS/MS

- 牛の肝臓 (基準値濃度添加)：試験溶液をメタノールで 10 倍に希釈し測定
- 牛の乳 (基準値濃度添加)：試験溶液をメタノールで 20 倍に希釈し測定

8. マトリックス添加標準溶液の調製

各検討対象食品の添加回収試験における回収率 100%相当濃度の検量線用混合標準溶液 0.2 mL を採り、窒素気流下で溶媒を除去した後、ブランク試験溶液 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。なお、基準値濃度添加の牛の肝臓及び牛の乳については、各々メタノールで 10 倍及び 20 倍に希釈したブランク試験溶液を加えた。

[結果及び考察]

1. 測定条件の検討

(1) MS条件の検討

ヘキサジノン、代謝物B、代謝物C及び代謝物FのLC-MS/MSでの測定条件を検討した。各化合物は、十分な感度が得られたESI(+)モードで測定することとした。

ヘキサジノンのスキャン測定におけるマススペクトルを図1に示した。ヘキサジノンのプロトン付加分子 (m/z 253 $[M+H]^+$) が強く観察されたため、本イオンをプリカーサーイオンとした。図2及び図3には、ヘキサジノンのプロトン付加分子 (m/z 253 $[M+H]^+$) 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示した。プロダクトイオンには、強度の強い m/z 171及び m/z 71を選択し、 m/z 253 \rightarrow 171を定量イオンに、 m/z 253 \rightarrow 71を定性イオンとした。

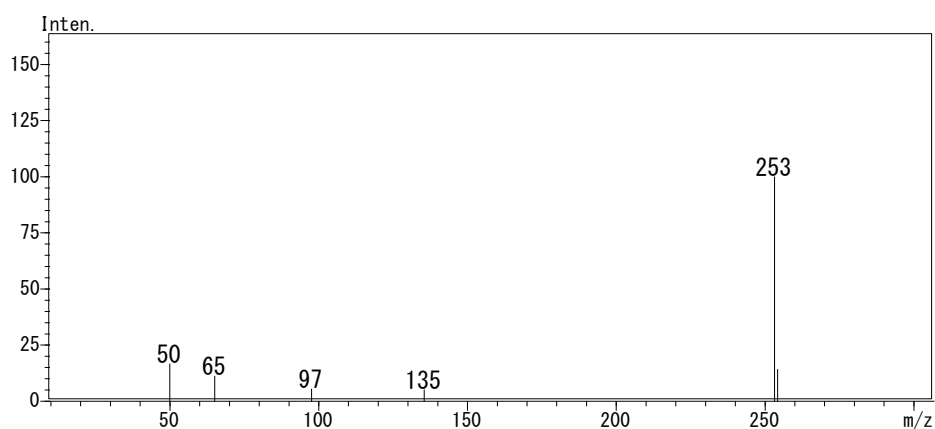


図1 ヘキサジノンのマススペクトル

スキャン範囲：50~300 amu、測定条件：ESI(+)

ヘキサジノン：0.1 mg/L

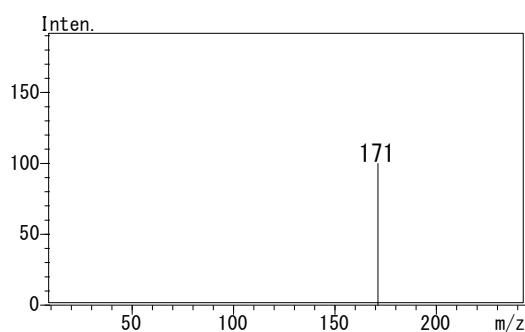


図2 プロダクトイオンペクトル(定量用)

プリカーサーイオン： m/z 253

測定条件：ESI(+)

CE=17 V (CE: collision energy)

ヘキサジノン：0.1 mg/L

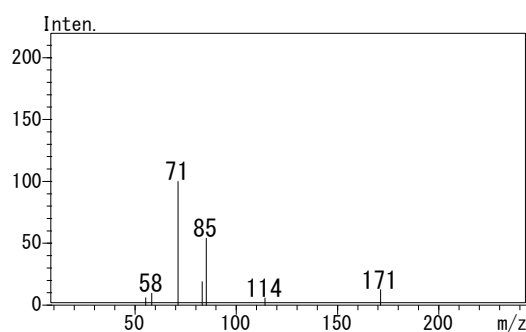


図3 プロダクトイオンペクトル(定性用)

プリカーサーイオン： m/z 253

測定条件：ESI(+)

CE=35 V (CE: collision energy)

ヘキサジノン：0.1 mg/L

代謝物Bのスクリーン測定におけるマススペクトルを図4に示した。代謝物Bのプロトン付加分子 (m/z 239[M+H]⁺) が強く観察されたため、本イオンをプリカーサーイオンとした。図5及び図6には、代謝物Bのプロトン付加分子 (m/z 239[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示した。プロダクトイオンには、強度の強い m/z 157及び m/z 71を選択し、 m/z 253→157を定量イオンに、 m/z 253→71を定性イオンとした。

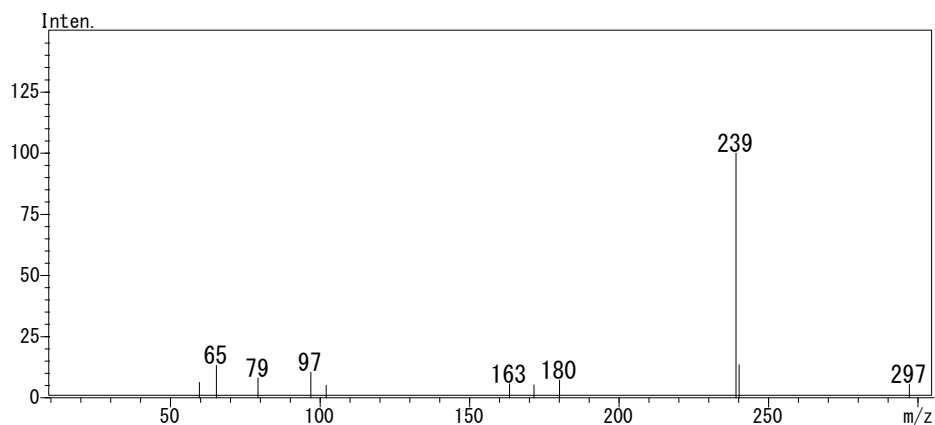


図4 代謝物Bのマススペクトル

スキャン範囲： 50～300 amu、測定条件：ESI(+)

代謝物B：0.1 mg/L

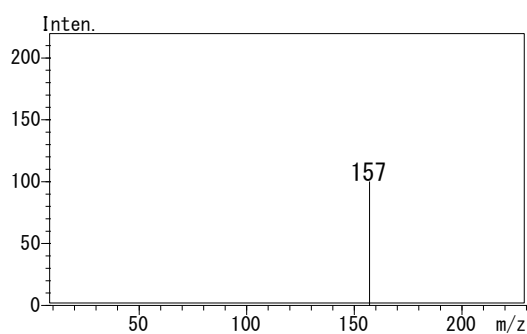


図5 プロダクトイオンスペクトル (定量用)

プリカーサーイオン： m/z 239

測定条件：ESI(+)

CE=15 V (CE: collision energy)

代謝物B：0.1 mg/L

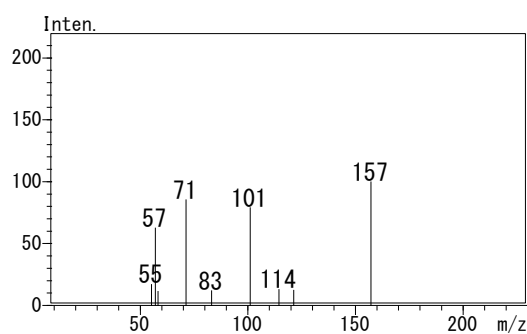


図6 プロダクトイオンスペクトル (定性用)

プリカーサーイオン： m/z 239

測定条件：ESI(+)

CE=35 V (CE: collision energy)

代謝物B：0.1 mg/L

代謝物Cのスクリーン測定におけるマススペクトルを図7に示した。代謝物Cのプロトン付加分子 (m/z 255[M+H]⁺) が強く観察されたため、本イオンをプリカーサーイオンとした。図8及び図9には、代謝物Cのプロトン付加分子 (m/z 255[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示した。プロダクトイオンには、強度の強い m/z 157及び m/z 71を選択し、 m/z 255→157を定量イオンに、 m/z 255→71を定性イオンとした。

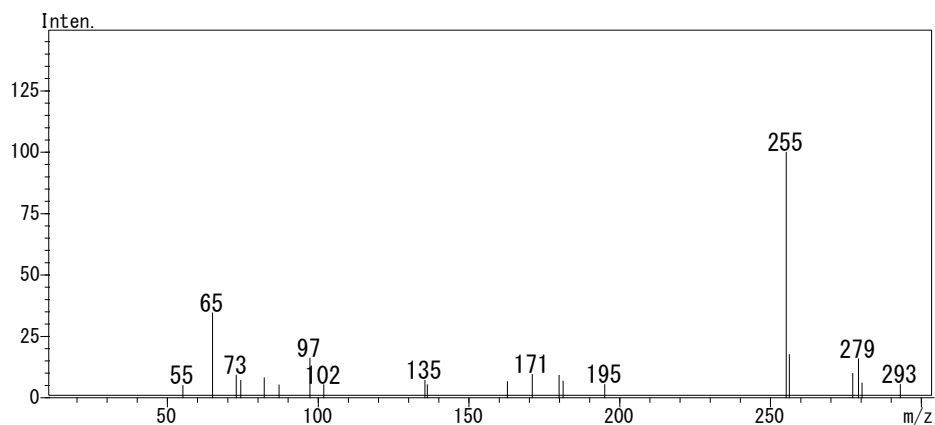


図7 代謝物Cのマススペクトル

スキャン範囲：50～300 amu、測定条件：ESI(+)

代謝物C：0.1 mg/L

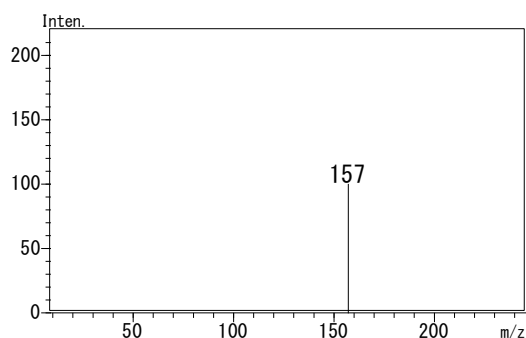


図8 プロダクトイオンスペクトル (定量用)

プリカーサーイオン： m/z 255

測定条件：ESI(+)

CE=18 V (CE: collision energy)

代謝物C：0.1 mg/L

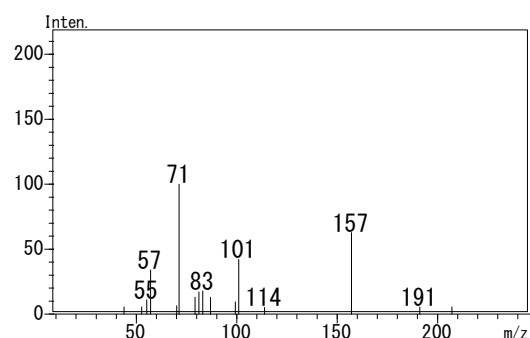


図9 プロダクトイオンスペクトル (定性用)

プリカーサーイオン： m/z 255

測定条件：ESI(+)

CE=35 V (CE: collision energy)

代謝物C：0.1 mg/L

代謝物Fのスクリーン測定におけるマススペクトルを図10に示した。代謝物Fのプロトン付加分子 (m/z 225[M+H]⁺) が強く観察されたため、本イオンをプリカーサーイオンとした。図11及び図12には、代謝物Fのプロトン付加分子 (m/z 225[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示した。プロダクトイオンには、強度の強い m/z 143及び m/z 101を選択し、 m/z 225→143を定量イオンに、 m/z 225→101を定性イオンとした。

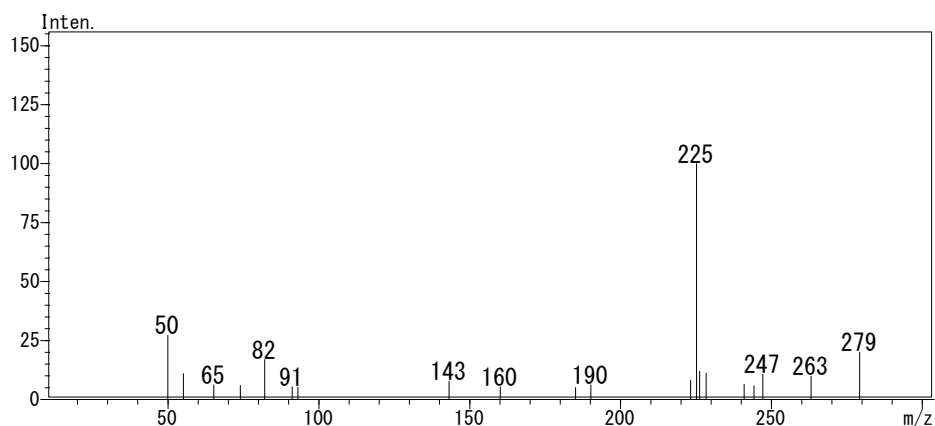


図10 代謝物Fのマススペクトル
 スキャン範囲：50～300 amu、測定条件：ESI(+)
 代謝物F：0.1 mg/L

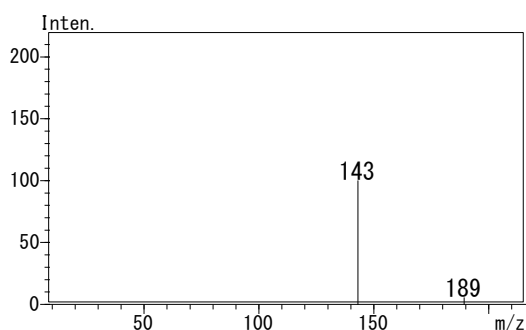


図11 プロダクトイオンスペクトル (定量用)
 プリカーサーイオン： m/z 225
 測定条件：ESI(+)
 CE=14 V (CE: collision energy)
 代謝物C：0.1 mg/L

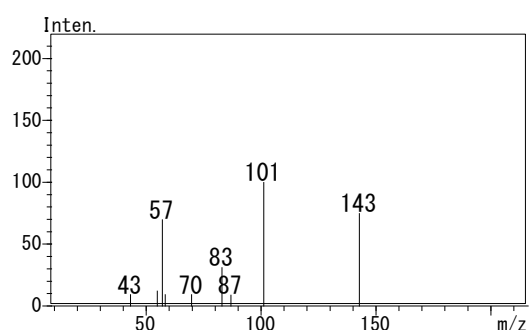


図12 プロダクトイオンスペクトル (定性用)
 プリカーサーイオン： m/z 225
 測定条件：ESI(+)
 CE=28 V (CE: collision energy)
 代謝物F：0.1 mg/L

また、フローインジェクション分析を用いて、プローブ電圧、脱溶媒管 (DL) 温度及びヒートブロック温度を検討した。プローブ電圧はtune fileの値及び1～5 kV、DL温度は100～300℃、ヒートブロック温度は100～500℃の範囲でパラメータを変化させたときの各化合物の面積値を比較した結果、プローブ電圧はtune file値、DL温度は150℃、ヒートブロック温度は500℃に設定することとした。

(2) LC 条件の検討

厚生労働省通知「LC/MSを用いた農薬等の一斉試験法 I (畜産物)」の測定条件²⁾を用いて、ヘキサジノン、代謝物B、代謝物C及び代謝物Fの検出について検討を行った。分析カラムにオクタデシルシリル化シリカゲルカラムのInertsil ODS-4 [ジーエルサイエンス (株) 社製、内径2.1 mm、長さ150 mm、粒子径3 μm] を用い、5 mmol/L酢酸アンモニウム溶液及び5 mmol/L酢酸アンモニウム・メタノール溶液のグラジエント溶出を行ったところ、各化合物のピーク形状はテーリング等も認められず良好であった。また、検出感度については、0.00025 mg/L混合標準溶液5 μLを注入した場合、各化合物ピークのS/Nは50以上であったことから、本一斉試験法の測定条件を用いることとした。分析カラムとしてInertsil ODS-4、L-columun2 ODS [(一財) 化学物質評価研究機構製] 及びmightysil RP-18 AP [関東化学 (株) 製] を比較したところ、Inertsil ODS-4のピーク形状が最も良好だったので、本カラムを用いることとした。

(3) 検量線

ヘキサジノン、代謝物B、代謝物C及び代謝物Fの検量線の例を図13～図16に示した。代謝物Cは2異性体の混合品であり、2ピーク認められたため、各々のピーク及び両ピークの和について検量線を作成した (以下、保持時間の短いピークをC1、長いピークをC2、両ピークの和をC(1+2)とする)。各化合物について0.00025～0.025 mg/Lの濃度範囲で作成した検量線の決定係数R²は0.997以上であり良好な直線性を示した。

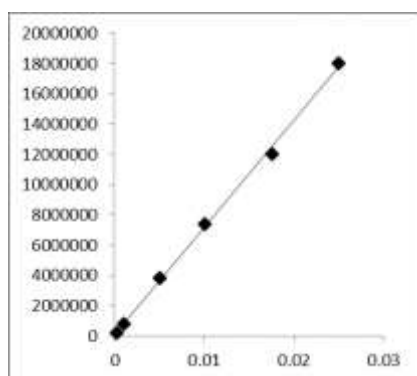


図13 ヘキサジノンの検量線
 $y=707983323x-116261$
 $R^2=0.9984$

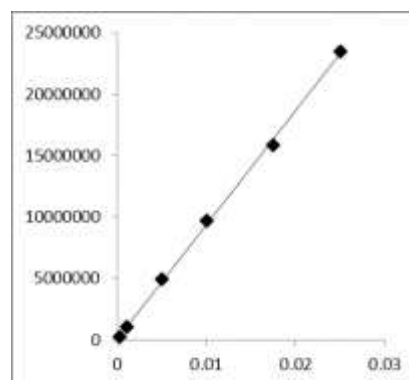


図14 代謝物Bの検量線
 $y=926075729x-151881$
 $R^2=0.9991$

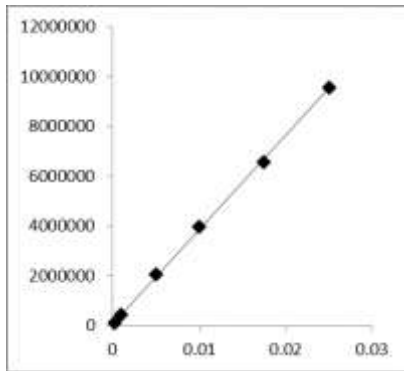


図 15 代謝物 C(1+2) の検量線
 $y=377908071x-74913$
 $R^2=0.9994$

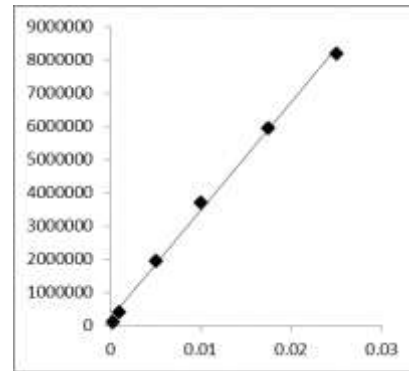


図 16 代謝物 F の検量線
 $y=325960297x-191800$
 $R^2=0.9974$

(4) 定量限界

定量限界の算出結果を以下に示した。

- ヘキサジノン : 0.0025 mg/kg [試験溶液量 4 (mL)/試験溶液中の試料量 0.4 (g)]
 × [ヘキサジノンの定量限界相当量 0.00125 (ng)/注入量 5 (μL)]
- 代謝物 B : 0.0025 mg/kg [試験溶液量 4 (mL)/試験溶液中の試料量 0.4 (g)]
 × [代謝物 B の定量限界相当量 0.00125 (ng)/注入量 5 (μL)]
- 代謝物 C : 0.0025 mg/kg [試験溶液量 4 (mL)/試験溶液中の試料量 0.4 (g)]
 × [代謝物 C の定量限界相当量 0.00125 (ng)/注入量 5 (μL)]
- 代謝物 F : 0.0025 mg/kg [試験溶液量 4 (mL)/試験溶液中の試料量 0.4 (g)]
 × [代謝物 F の定量限界相当量 0.00125 (ng)/注入量 5 (μL)]
- ただし、脂肪の場合は、試験溶液 2 mL、試験溶液中の試料量 0.2 g

2. 試験溶液調製法の検討

(1) 抽出方法の検討

今回、抽出方法として、*n*-ヘキサン存在下アセトニトリルで抽出する方法を採用することとした。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があった。アセトニトリルを抽出溶媒として用いるため、牛の脂肪からの回収状況を確認した。牛脂肪 5 g を採り、約 40℃ の水浴で融解させた後、ヘキサジノン、代謝物 B 及び代謝物 F 各 100 µg [各標準原液 (1,000 mg/L メタノール溶液) を 0.1 mL] を添加し、混和した後、冷凍庫内 (-19℃) に 10 分間放置し、凝固させた。さらに室温で 30 分間放置した後、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 50 mL 及び *n*-ヘキサン 50 mL を加え、ホモジナイズ抽出した。遠心分離 (3,000 rpm、10 分間) した後、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)。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、上記と同様に操作し、アセトニトリルで 100 mL に定容した (2 回目抽出液)。各抽出液をメタノールで 100 倍に希釈した後、LC-MS/MS で測定した結果を表 1 に示した。2 回の抽出で得られた回収率は、ヘキサジノンは 103%、代謝物 B は 100%、代謝物 F は 98% であった。また、牛乳にヘキサジノン、代謝物 B、代謝物 C 及び代謝物 F 各 100 µg [各標準原液 (1,000 mg/L メタノール溶液) を 0.1 mL] を添加し、同様に回収試験を行ったところ、ヘキサジノンは 93%、代謝物 B は 98%、代謝物 C は 97%、代謝物 F は 100% の回収率が得られた (表 2)。以上の結果より、試料よりヘキサジノン、代謝物 B 及び代謝物 F (乳の場合は、ヘキサジノン、代謝物 B、代謝物 C 及び代謝物 F) を *n*-ヘキサン共存下アセトニトリルにより抽出することとした。

表 1 融解脂肪から各化合物の回収状況

化合物名	回収率 (%)		
	1 回目抽出	2 回目抽出	合計
ヘキサジノン	101	2	103
代謝物 B	97	3	100
代謝物 F	95	3	98

添加量：牛脂肪 5 g に対し、ヘキサジノン、代謝物 B 及び代謝物 F 各 100 µg (1,000 mg/L メタノール溶液 0.1 mL)

表 2 牛乳から各化合物の回収状況

化合物名	回収率 (%)		
	1 回目抽出	2 回目抽出	合計
ヘキサジノン	92	1	93
代謝物 B	97	1	98
代謝物 C (1+2)	95	2	97
代謝物 C1	95	2	97
代謝物 C2	95	2	97
代謝物 F	98	2	100

添加量：牛乳 10 g に対し、ヘキサジノン、代謝物 B、代謝物 C 及び代謝物 F 各 100 µg (1,000 mg/L メタノール溶液 0.1 mL)

(2) SAX/PSA ミニカラム (500 mg/500 mg、6 mL) による精製の検討

アセトニトリル抽出液をそのままLC-MS/MSに注入するとイオン化抑制が認められたことから、SAX/PSAミニカラムによる精製について検討した。予めミニカラムにアセトニトリル 10 mLを注入し流出液は捨てた。このカラムに1 mg/L混合標準溶液1 mLを付加し、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。ヘキサジノン及び代謝物Bは10 mL、代謝物C及び代謝物Fは20 mLの画分までに溶出が完了した。以上の結果より、抽出液をSAX/PSAに負荷した後、アセトニトリル20 mLを注入し、負荷液を含む全溶出液を採ることとした。

表3 SAX/PSAミニカラムからの溶出状況

化合物名	回収率 (%)					
	0-5 mL	5-10 mL	10-15 mL	15-20 mL	20-25 mL	合計
ヘキサジノン	100	<0.5	nd	nd	nd	100
代謝物B	97	<0.5	nd	nd	nd	97
代謝物C(1+2)	1	94	3	<0.5	nd	98
代謝物C1	3	97	2	<0.5	nd	102
代謝物C2	1	94	3	<0.5	nd	98
代謝物F	0	37	56	4	nd	97

SAX/PSA (500 mg/500 mg、6 mL、SIGMA-ALDRICH社製)

負荷量：各1 μ

nd：不検出

3. 添加回収試験

畜産物4食品（牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓及び牛の乳）を用いて、実験方法の7. 試験溶液の調製に従って各分析対象化合物の添加回収試験を実施した。添加濃度は、残留基準値濃度及び定量限界濃度の2濃度とし、残留基準値濃度の場合は各化合物を基準値濃度で、定量限界濃度の場合は各化合物を0.0025 mg/kg添加した。なお、基準値濃度添加の牛の肝臓の試験溶液はメタノールで10倍に、牛の乳の試験溶液は20倍に希釈し、LC-MS/MS測定に供した。

添加回収試験における各食品のブランク試料、添加試料の代表的なクロマトグラム及び回収率100%相当の溶媒標準溶液を図17～図42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43に示した。

(1) 選択性

選択性の検討結果を表4に示した。検討したいずれの試料においても、各化合物の定量を妨害するピークは認められず、選択性は良好であった。

(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5に示した。真度及び併行精度は、ヘキサジノンで87.3～96.0%及び1.3～4.8%、代謝物Bで89.5～93.7%及び0.8～4.8%、代謝物CではC(1+2)で86.4～89.7%及び3.6～4.6%、C1で87.5～88.5%及び1.4～4.9%、C2で86.3～89.8%及び4.0～4.6%、代謝物Fで86.9～94.9%及び1.0～4.9%であり、目標値を満たした。また、定量限界濃度で添加した時の各化合物ピークのS/Nは、ヘキサジノンで184～235、代謝物Bで117～151、代謝物CではC1で45、C2で355、代謝物Fで75～105であり、S/N \geq 10を十分満たしていた。

(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6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、ヘキサジノンで0.97～1.02、代謝物Bで0.97～1.03、代謝物CではC1で0.99～1.01、C2で0.99～1.00、代謝物Fで0.96～1.02であり、顕著な測定値へのマトリックスの影響は認められなかった。表7に添加回収試験により得られた真度を上記に示すピーク面積比で除して補正した真度を示した。補正後の真度は、ヘキサジノンで85.6～97.9%、代謝物Bで89.5～96.1%、代謝物CではC1で86.3～89.2%、C2で86.5～90.7%、代謝物Fで85.2～97.3%であり、目標値を満たしていた。

表4 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)			
1	ヘキサジノン	牛の筋肉	0.0025	0.5	基準値	0.5	<0.100	面積	n=1	平均(a)	n=2	平均(b)	0.000	○		
			0.0025	0.1	基準値	0.1	<0.100	面積	0	0	32840156	32879775	0.000	○		
			0.0025	4.	基準値	4.	<0.100	面積	0	0	7052232	7117965	0.000	○		
			0.0025	11.	基準値	11.	<0.100	面積	0	0	28302746	28290717	28296732	0.000	○	10倍希釈して測定
2	代謝産物B	牛の筋肉	0.0025	0.5	基準値	0.5	<0.100	面積	0	0	31051990	30910266	30881128	0.000	○	
			0.0025	0.1	基準値	0.1	<0.100	面積	0	0	7147502	7206754	7177128	0.000	○	
			0.0025	4.	基準値	4.	<0.100	面積	0	0	28427265	28666229	28546747	0.000	○	10倍希釈して測定
			0.0025	11.	基準値	11.	<0.100	面積	0	0	35750279	35917971	35834125	0.000	○	20倍希釈して測定
3	代謝産物C(1+2)	牛の乳	0.0025	11.	基準値	11.	<0.100	面積	0	0	18972948	18862353	18917651	0.000	○	20倍希釈して測定
			0.0025	11.	基準値	11.	<0.100	面積	0	0	2137329	2168942	2153136	0.000	○	20倍希釈して測定
			0.0025	11.	基準値	11.	<0.100	面積	0	0	16835619	16693411	16764515	0.000	○	20倍希釈して測定
4	代謝産物F	牛の筋肉	0.0025	0.5	基準値	0.5	<0.100	面積	0	0	9397034	9412282	9404658	0.000	○	
			0.0025	0.1	基準値	0.1	<0.100	面積	0	0	2685668	2743755	2714712	0.000	○	
			0.0025	4.	基準値	4.	<0.100	面積	0	0	9675616	9672896	9674256	0.000	○	10倍希釈して測定
			0.0025	11.	基準値	11.	<0.100	面積	0	0	10740967	10817292	10779130	0.000	○	20倍希釈して測定

*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。(必要に応じて繰り注入を行う。)

*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。

表5 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		
							横き	切片	r ² 値	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5			Max.	平均値			
1	ヘキサジノン	牛の筋肉	0.0025	0.5	0.5	—	300427	4202237	0.9970	95.9	94.7	93.6	96.7	95.9	95.4	1.3	249	221	235		
		牛の筋肉	0.0025	0.5	0.0025	SN	4625	0.9976	88.6	88.0	92.6	88.6	91.2	93.3	90.4	2.2	249	221	235		
		牛の脂肪	0.0025	0.1	0.1	—	73991	752956	0.9985	88.7	94.2	93.6	88.7	91.2	92.2	2.4	240	176	208		
		牛の脂肪	0.0025	0.1	0.0025	SN	4623	0.9983	93.8	95.1	92.6	90.1	94.6	96.2	95.0	94.1	1.3	240	176	208	10倍希釈して測定
		牛の肝臓	0.0025	4	4	—	262998	419083	0.9987	93.6	92.8	94.6	93.8	95.9	94.1	1.3	190	224	207		
		牛の肝臓	0.0025	4	0.0025	SN	2007	0.9982	90.0	88.2	92.5	91.0	91.0	88.6	88.6	90.3	1.8	190	224	207	10倍希釈して測定
		牛の乳	0.0025	11	11	—	308957	252983	0.9986	94.6	84.4	89.0	91.9	94.7	90.9	4.8	200	184	184	20倍希釈して測定	
2	代謝産物B	牛の乳	0.0025	11	0.0025	SN	4639	732	0.9989	87.9	82.4	90.1	85.4	91.0	87.3	4.0	200	167	184		
		牛の筋肉	0.0025	0.5	0.5	—	301146	67846	0.9989	93.4	92.5	91.6	95.6	93.3	93.3	1.6	141	114	128		
		牛の筋肉	0.0025	0.5	0.0025	SN	4644	3527	0.9989	88.1	90.7	90.1	90.1	95.6	91.1	2.8	141	114	128		
		牛の脂肪	0.0025	0.1	0.1	—	72466	99174	0.9987	87.7	93.7	92.7	91.6	92.9	91.7	2.6	106	127	117		
		牛の脂肪	0.0025	0.1	0.0025	SN	4618	4242	0.9986	92.5	88.6	92.5	95.5	96.9	93.4	3.1	106	127	117	10倍希釈して測定	
		牛の肝臓	0.0025	4	4	—	281893	820886	0.9988	94.1	92.6	94.2	92.8	94.8	93.7	1.0	130	172	151		
		牛の肝臓	0.0025	4	0.0025	SN	2011	6782	0.9973	90.0	88.8	89.2	90.4	88.9	89.5	0.8	130	172	151	10倍希釈して測定	
3	代謝産物C(1+2)	牛の乳	0.0025	11	11	—	343483	68946	0.9983	92.7	84.1	89.0	91.5	95.5	90.6	4.8	116	124	120	20倍希釈して測定	
		牛の乳	0.0025	11	0.0025	SN	4637	2283	0.9982	91.0	84.4	92.1	89.0	93.1	89.9	3.8	116	124	120		
		牛の乳	0.0025	11	11	—	483853	249957	0.9981	91.0	83.1	88.8	91.1	94.3	89.7	4.6	—	—	—	20倍希釈して測定	
		牛の乳	0.0025	11	11	—	24880	33086	0.9987	90.1	81.8	87.1	90.3	93.3	88.5	4.9	—	—	—	20倍希釈して測定	
		牛の乳	0.0025	11	11	—	161873	283083	0.9989	91.1	83.3	89.0	91.3	94.4	89.8	4.6	—	—	—	20倍希釈して測定	
		牛の乳	0.0025	11	0.0025	SN	4626	342	0.9974	88.6	82.3	85.3	85.5	90.4	86.4	3.6	—	—	—		
		牛の乳	0.0025	11	0.0025	SN	95	494	0.9940	89.0	86.9	87.1	86.0	88.4	87.5	1.4	37	53	45		
4	代謝産物F	牛の乳	0.0025	11	0.0025	SN	732	966	0.9986	88.5	81.7	85.1	85.5	90.7	86.3	4.0	306	405	355		
		牛の筋肉	0.0025	0.5	0.5	—	42365	1123307	0.9975	94.2	93.0	91.8	95.5	93.1	93.5	1.5	—	—	—		
		牛の筋肉	0.0025	0.5	0.0025	SN	644	2980	0.9980	88.9	87.1	91.7	90.8	91.6	90.0	2.2	72	104	88		
		牛の脂肪	0.0025	0.1	0.1	—	26246	432280	0.9994	87.5	94.0	91.9	88.9	90.4	90.7	2.6	—	—	—		
		牛の脂肪	0.0025	0.1	0.0025	SN	571	818	0.9985	91.8	93.6	91.1	97.8	100.3	94.9	4.2	81	69	75	10倍希釈して測定	
		牛の肝臓	0.0025	4	4	—	89489	1052700	0.9994	93.2	92.4	93.9	93.0	94.7	93.4	1.0	—	—	—		
		牛の肝臓	0.0025	4	0.0025	SN	807	3739	0.9978	86.5	92.4	88.2	92.3	95.6	91.0	4.0	118	93	105	10倍希釈して測定	
	牛の乳	0.0025	11	11	—	94660	624941	0.9986	93.7	85.5	92.1	93.8	97.0	92.4	4.6	—	—	—	20倍希釈して測定		
	牛の乳	0.0025	11	0.0025	SN	579	2810	0.9986	83.9	81.9	91.0	86.3	91.4	86.9	4.9	93	87	90			

*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を添える。

表6 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)	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⁾			ピーク面積(高さ) ²⁾			備考		
								平均	n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均	n=1	n=2			
1	ヘキサジノン	牛の筋肉	0.0025	0.5	0.5	0.0025	面積	0	32840156	32919393	32879775	33490563	34006870	33748712	0.97				
		牛の筋肉	0.0025	0.5	0.0025	0.00025	面積	0	164769	164764	164767	168359	171237	169798	0.97				
		牛の脂肪	0.0025	0.1	0.1	0.01	面積	0	7052232	7183898	7117965	7183898	7058097	7120898	1.00				
		牛の脂肪	0.0025	0.1	0.0025	0.00025	面積	0	163588	162969	163269	159726	160235	159881	1.02				
		牛の肝臓	0.0025	4	4	0.04	面積	0	28302746	28290717	28298732	28622281	28590768	28606625	0.99	10倍希釈して測定			
		牛の肝臓	0.0025	4	0.0025	0.00025	面積	0	184277	183815	184046	186569	182904	184737	1.00				
		牛の乳	0.0025	11	11	0.055	面積	0	37760978	37796484	37778731	38111816	37964857	38038337	0.99	20倍希釈して測定			
2	代謝産物B	牛の乳	0.0025	11	0.0025	0.00025	面積	0	166276	162555	164416	159722	162682	161192	1.02				
		牛の筋肉	0.0025	0.5	0.5	0.05	面積	0	31051990	30910266	30981128	31858701	31964531	31911616	0.97				
		牛の筋肉	0.0025	0.5	0.0025	0.00025	面積	0	164928	162836	163882	157928	165380	161644	1.01				
		牛の脂肪	0.0025	0.1	0.1	0.01	面積	0	7147502	7206754	7177128	7206754	7189515	7198135	1.00				
		牛の脂肪	0.0025	0.1	0.0025	0.00025	面積	0	154294	160486	157390	154144	151028	152586	1.03				
		牛の肝臓	0.0025	4	4	0.04	面積	0	28427265	28666229	28546747	28759674	28884264	28821969	0.99	10倍希釈して測定			
		牛の肝臓	0.0025	4	0.0025	0.00025	面積	0	183289	183765	183517	189397	188246	188822	0.97				
3	代謝産物C(1+2)	牛の乳	0.0025	11	11	0.055	面積	0	35750279	35917971	35834125	35912591	35970015	35941303	1.00	20倍希釈して測定			
		牛の乳	0.0025	11	0.0025	0.00025	面積	0	158614	159367	158991	155291	161231	158261	1.00				
		牛の乳	0.0025	11	11	0.055	面積	0											
		牛の乳	0.0025	11	11	0.055	面積	0											
		牛の乳	0.0025	11	11	0.055	面積	0											
		牛の乳	0.0025	11	11	0.055	面積	0											
		牛の乳	0.0025	11	11	0.055	面積	0											
4	代謝産物F	牛の乳	0.0025	11	11	0.055	面積	0	2137329	2168942	2163136	2162007	2177359	2169683	0.99	20倍希釈して測定			
		牛の乳	0.0025	11	11	0.055	面積	0	16835619	16693411	16764515	16940685	16924997	16932841	0.99	20倍希釈して測定			
		牛の乳	0.0025	11	0.0025	0.00025	面積	0	8141	9006	8574	8140	8774	8457	1.01				
		牛の乳	0.0025	11	0.0025	0.00025	面積	0	73655	72904	73280	72433	74415	73424	1.00				
		牛の筋肉	0.0025	0.5	0.5	0.05	面積	0	9397034	9412282	9404658	9812611	9756994	9784803	0.96				
		牛の筋肉	0.0025	0.5	0.0025	0.00025	面積	0	60541	62084	61313	62830	64833	63832	0.96				
		牛の脂肪	0.0025	0.1	0.1	0.01	面積	0	2685688	2743755	2714712	2743755	2712600	2728178	1.00				
5	代謝産物C1	牛の脂肪	0.0025	0.1	0.0025	0.00025	面積	0	58868	58842	58855	58475	57269	57872	1.02				
		牛の脂肪	0.0025	4	4	0.04	面積	0	9675616	9672896	9674256	9800300	9764471	9782386	0.99	10倍希釈して測定			
		牛の肝臓	0.0025	4	0.0025	0.00025	面積	0	73692	75490	74591	73573	75059	74316	1.00				
		牛の肝臓	0.0025	11	11	0.055	面積	0	10740967	10817292	10779130	10754574	10864891	10809633	1.00	20倍希釈して測定			
		牛の乳	0.0025	11	0.0025	0.00025	面積	0	61528	59725	60627	58966	59857	59412	1.02				
		牛の乳	0.0025	11	11	0.055	面積	0											
		牛の乳	0.0025	11	11	0.055	面積	0											

*1 添加回収試験における回収率100%相当濃度となるように、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。(必要に応じて配量注入を行う。)

*3 ブランクにピークが認められた場合は、マトリックス添加標準溶液の値(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7 補正真度

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)	真度 (%)	ピーク面積比	補正真度 (%) ^{*1}	備考
1	ヘキサジノン	牛の筋肉	0.0025	0.5	0.5	95.4	0.97	98.3	
		牛の筋肉	0.0025	0.5	0.0025	90.4	0.97	93.2	
		牛の脂肪	0.0025	0.1	0.1	92.2	1.00	92.2	
		牛の脂肪	0.0025	0.1	0.0025	96.0	1.02	94.1	
		牛の肝臓	0.0025	4.	4.	94.1	0.99	95.1	10倍希釈して測定
		牛の肝臓	0.0025	4.	0.0025	90.3	1.00	90.3	
		牛の乳	0.0025	11.	11.	90.9	0.99	91.8	20倍希釈して測定
		牛の乳	0.0025	11.	0.0025	87.3	1.02	85.6	
2	代謝産物B	牛の筋肉	0.0025	0.5	0.5	93.3	0.97	96.2	
		牛の筋肉	0.0025	0.5	0.0025	91.1	1.01	90.2	
		牛の脂肪	0.0025	0.1	0.1	91.7	1.00	91.7	
		牛の脂肪	0.0025	0.1	0.0025	93.4	1.03	90.7	
		牛の肝臓	0.0025	4.	4.	93.7	0.99	94.6	10倍希釈して測定
		牛の肝臓	0.0025	4.	0.0025	89.5	0.97	92.2	
		牛の乳	0.0025	11.	11.	90.6	1.00	90.6	20倍希釈して測定
		牛の乳	0.0025	11.	0.0025	89.9	1.00	89.9	
3	代謝産物C(1+2)	牛の乳	0.0025	11.	11.	89.7			
	代謝産物C1	牛の乳	0.0025	11.	11.	88.5	0.99	89.4	20倍希釈して測定
	代謝産物C2	牛の乳	0.0025	11.	11.	89.8	0.99	90.7	20倍希釈して測定
	代謝産物C(1+2)	牛の乳	0.0025	11.	0.0025	86.4			
	代謝産物C1	牛の乳	0.0025	11.	0.0025	87.5	1.01	86.6	
	代謝産物C2	牛の乳	0.0025	11.	0.0025	86.3	1.00	86.3	
4	代謝産物F	牛の筋肉	0.0025	0.5	0.5	93.5	0.96	97.4	
		牛の筋肉	0.0025	0.5	0.0025	90.0	0.96	93.8	
		牛の脂肪	0.0025	0.1	0.1	90.7	1.00	90.7	
		牛の脂肪	0.0025	0.1	0.0025	94.9	1.02	93.1	
		牛の肝臓	0.0025	4.	4.	93.4	0.99	94.4	10倍希釈して測定
		牛の肝臓	0.0025	4.	0.0025	91.0	1.00	91.0	
		牛の乳	0.0025	11.	11.	92.4	1.00	92.4	20倍希釈して測定
		牛の乳	0.0025	11.	0.0025	86.9	1.02	85.2	

*1 添加回収試験により得られた真度/ピーク面積比

(4) その他の試験法検討に関連する事項

①SCX ミニカラムによる精製の検討

アセトニトリル抽出液のSCXミニカラムによる精製を検討した。アセトニトリルでコンディショニングしたSCXミニカラム (500 mg、6 mL) に1 mg/L混合標準溶液1 mLを負荷し、アセトニトリル、次いでアセトニトリル及びアンモニア水混液で溶出する検討を行った。しかし、ヘキサジノン及びその代謝物のSCXミニカラムに対する保持がロット及びメーカーにより大きく異なるなどしたことから、SCXミニカラムによる精製は不採用とした。

②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 (PSAミニカラム) による精製の検討

アセトニトリル抽出液のPSAミニカラムによる精製を検討した。アセトニトリルでコンディショニングしたPSAミニカラム [Bond Elut Jr-PSA (500 mg)] に1 mg/mL混合標準溶液1 mL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8に示した。この結果より、アセトニトリル抽出液を負荷した後、アセトニトリル15 mLで溶出することとした。しかし、PSAミニカラム精製により得られた牛の肝臓の試験溶液では、各化合物のマトリックス添加標準溶液と溶媒標準溶液のピーク面積比が0.88~0.95を示すなど試料マトリックスの測定値への影響が比較的大きかったことから、PSAミニカラムによる精製は不採用とした。

表8 PSAミニカラムからの溶出状況

化合物名	回収率 (%)					
	0-4 mL	4-8 mL	8-12 mL	12-14 mL	14-16 mL	合計
ヘキサジノン	93	<0.5	nd	nd	nd	93
代謝物B	97	<0.5	nd	nd	nd	97
代謝物C(1+2)	86	15	1	<0.5	nd	102
代謝物C1	88	10	<0.5	nd	nd	98
代謝物C2	86	16	<0.5	nd	nd	102
代謝物F	1	70	36	1	nd	108

nd : 不検出

③牛の筋肉、牛の脂肪及び牛の肝臓における代謝物 C の添加回収結果

牛の筋肉、牛の脂肪及び牛の肝臓の分析対象化合物は、ヘキサジノン、代謝物 B 及び代謝物 F であるが、今回、添加回収試験を行う際にヘキサジノン、代謝物 B、代謝物 C 及び代謝物 F の 4 化合物の混合標準溶液を添加した。そこで、参考データとして牛の筋肉、牛の脂肪及び牛の肝臓における代謝物 C の添加回収試験結果を表 9～表 12 に示した。

選択性の結果を表 9 に示した。いずれの試料においても代謝物 C の定量を妨害するピークは認められなかった。

真度、精度及び定量限界の結果を表 10 に示した。真度及び併行精度は、C(1+2)で 85.6～90.7%及び 1.1～3.7%、C1 で 86.2～91.4%及び 1.3～3.8%、C2 で 85.1～91.2%及び 1.4～4.1%であり、いずれの試料においても目標値を満たしていた。また、定量限界濃度で添加した時の S/N は、C1 で 58～103、C2 で 440～701 であり、 $S/N \geq 10$ を十分満たしていた。

試料マトリックスの測定値への影響の結果を表 11 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、C1 で 0.95～0.99、C2 で 0.96～1.02 であり、顕著な測定値へのマトリックスの影響は認められなかった。表 12 に添加回収試験により得られた真度を上記に示すピーク面積比で除して補正した真度を示した。補正後の真度は、C1 で 87.0～92.3%、C2 で 86.8～92.8%であり、目標値を満たしていた。

表9 選択性の評価(参考データ)

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)						
3	代謝産物C(1+2)	牛の筋肉	0.0025	0.5	評価濃度	0.5	< 0.100	n=1	0	0	0	n=1	16189995	16305281	16247638	0.000	○	
					基準値	0.5	< 0.100	n=2	0	0	1832179	1846046	1839113	0.000	○			
					評価濃度	0.5	< 0.100	n=1	0	0	14357816	14459235	14408526	0.000	○			
					基準値	0.1	< 0.100	n=2	0	0	3701614	3679364	3690489	0.000	○			
					評価濃度	0.1	< 0.100	n=1	0	0	388145	389666	388906	0.000	○			
					基準値	0.1	< 0.100	n=2	0	0	3313469	3289698	3301584	0.000	○			
					評価濃度	4.	< 0.100	n=1	0	0	14757883	14717266	14737575	0.000	○	10倍希釈して測定		
					基準値	4.	< 0.100	n=2	0	0	1625022	1586930	1605976	0.000	○	10倍希釈して測定		
代謝産物C1	牛の脂肪	0.0025	4.	評価濃度	4.	< 0.100	n=1	0	0	0	13132861	13130336	13131599	0.000	○	10倍希釈して測定		
代謝産物C2	牛の肝臓	0.0025	4.	基準値	4.	< 0.100	n=2	0	0	0								

*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。

表10 真度、精度及び定量限界の評価(参考データ)

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	
3	代謝産物C(1+2)	牛の筋肉	0.0025	0.5	0.5	-	157988	-62469	0.9998	90.4	88.4	87.2	91.6	89.2	89.3	1.9				
	代謝産物C1	牛の筋肉	0.0025	0.5	0.5	-	18793	-18870	0.9996	89.3	87.1	86.5	89.0	88.5	88.1	1.4				
	代謝産物C2	牛の筋肉	0.0025	0.5	0.5	-	138195	478338	0.9998	90.6	88.6	87.3	91.9	89.3	89.5	2.0				
	代謝産物C(1+2)	牛の筋肉	0.0025	0.5	0.0025	S/N	843	-240	0.9998	89.1	87.8	89.7	87.4	92.2	89.2	2.1				
	代謝産物C1	牛の筋肉	0.0025	0.5	0.0025	S/N	95	-433	0.9985	90.5	83.9	89.1	83.7	89.8	87.4	3.8	99	107	103	
	代謝産物C2	牛の筋肉	0.0025	0.5	0.0025	S/N	747	193	0.9998	88.9	88.3	89.8	87.9	92.5	89.5	2.0	568	834	701	
	代謝産物C(1+2)	牛の脂肪	0.0025	0.1	0.1	-	37390	19057	0.9996	86.4	91.0	91.4	88.2	90.6	89.7	2.3				
	代謝産物C1	牛の脂肪	0.0025	0.1	0.1	-	3650	6237	0.9977	85.2	92.6	93.2	88.4	91.9	90.4	3.6				
	代謝産物C2	牛の脂肪	0.0025	0.1	0.1	-	33540	12820	0.9997	86.6	90.9	91.2	89.2	90.4	89.7	2.1				
	代謝産物C(1+2)	牛の脂肪	0.0025	0.1	0.0025	S/N	840	-3189	0.9990	88.6	87.7	88.2	94.8	93.7	90.6	3.7				
	代謝産物C1	牛の脂肪	0.0025	0.1	0.0025	S/N	92	-223	0.9982	84.8	87.0	85.4	87.4	86.4	86.2	1.3	86	64	75	
	代謝産物C2	牛の脂肪	0.0025	0.1	0.0025	S/N	748	-2546	0.9989	89.0	87.8	88.6	95.8	94.6	91.2	4.1	604	526	565	
	代謝産物C(1+2)	牛の肝臓	0.0025	4.	4.	-	147041	241183	0.9995	90.3	88.9	91.9	90.3	91.9	90.7	1.4			10倍希釈して測定	
	代謝産物C1	牛の肝臓	0.0025	4.	4.	-	16741	-30568	0.9981	91.6	89.0	93.6	91.6	91.4	91.4	1.8			10倍希釈して測定	
	代謝産物C2	牛の肝臓	0.0025	4.	4.	-	130300	271749	0.9995	90.2	88.9	91.7	90.1	92.0	90.6	1.4			10倍希釈して測定	
	代謝産物C(1+2)	牛の肝臓	0.0025	4.	0.0025	S/N	970	-2382	0.9992	84.3	87.0	85.4	85.9	85.4	85.6	1.1				
	代謝産物C1	牛の肝臓	0.0025	4.	0.0025	S/N	100	-85	0.9948	91.7	86.8	89.9	90.7	89.0	89.6	2.1	58	58	58	
	代謝産物C2	牛の肝臓	0.0025	4.	0.0025	S/N	870	-2287	0.9988	83.5	87.0	84.9	85.4	84.9	85.1	1.5	457	424	440	

*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。

表11 試料マトリックスの測定への影響 (参考データ)

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 [検出限 値] ¹⁾ (mg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	標準溶液 濃度 ¹⁾ (mg/L)	面積又は 高さの別	ピーク面積(高さ) ²⁾				ピーク面積 (高さ)比 ³⁾	備考	
								マトリックス添加標準溶液 ⁴⁾ n=1	平均	n=2	平均			溶解標準溶液 n=2
3	代謝産物C(1+2)	牛の筋肉	0.0025	0.5	0.5	0.05	0							
	代謝産物C1	牛の筋肉	0.0025	0.5	0.5	0.05	0	1832179	1946046	1839113	1924989	1927625	1926307	0.95
	代謝産物C2	牛の筋肉	0.0025	0.5	0.5	0.05	0	14357816	14459235	14408526	14900923	14953052	14931988	0.96
	代謝産物C(1+2)	牛の筋肉	0.0025	0.5	0.0025	0.00025	0							
	代謝産物C1	牛の筋肉	0.0025	0.5	0.0025	0.00025	0	8593	8965	8779	8897	9355	9126	0.96
	代謝産物C2	牛の筋肉	0.0025	0.5	0.0025	0.00025	0	76967	76704	76786	76985	77261	77123	1.00
3	代謝産物C(1+2)	牛の脂肪	0.0025	0.1	0.1	0.01	0							
	代謝産物C1	牛の脂肪	0.0025	0.1	0.1	0.01	0	388145	389666	389006	389666	394352	392009	0.99
	代謝産物C2	牛の脂肪	0.0025	0.1	0.1	0.01	0	3313469	3289698	3301584	3289698	3303542	3296620	1.00
	代謝産物C(1+2)	牛の脂肪	0.0025	0.1	0.0025	0.00025	0							
	代謝産物C1	牛の脂肪	0.0025	0.1	0.0025	0.00025	0	8792	8908	8800	8861	8911	8886	0.99
	代謝産物C2	牛の脂肪	0.0025	0.1	0.0025	0.00025	0	72171	71123	71647	70536	70053	70295	1.02
3	代謝産物C(1+2)	牛の肝臓	0.0025	4	4	0.4	0							
	代謝産物C1	牛の肝臓	0.0025	4	4	0.4	0	1625022	1586930	1605976	1644191	1588980	1616586	0.99
	代謝産物C2	牛の肝臓	0.0025	4	4	0.4	0	13132861	13130336	13131599	13274562	13224356	13249459	0.99
	代謝産物C(1+2)	牛の肝臓	0.0025	4	0.0025	0.00025	0							
	代謝産物C1	牛の肝臓	0.0025	4	0.0025	0.00025	0	9347	9452	9400	9311	9699	9505	0.99
	代謝産物C2	牛の肝臓	0.0025	4	0.0025	0.00025	0	80590	81443	81017	82651	82510	82581	0.98

*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)及び溶解で調整した標準溶液(溶解標準溶液)を作成する。

*2 マトリックス添加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る場合には、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整する。

*5 マトリックス添加標準溶液の溶解標準溶液のピーク面積(又は高さ)の比を求める。

表12 補正真度(参考データ)

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)	真度(%)	ピーク面積比	補正真度(%) ^{*1}	備考
3	代謝産物C(1+2)	牛の筋肉	0.0025	0.5	0.5	89.3			
	代謝産物C1	牛の筋肉	0.0025	0.5	0.5	88.1	0.95	92.3	
	代謝産物C2	牛の筋肉	0.0025	0.5	0.5	89.5	0.96	92.8	
	代謝産物C(1+2)	牛の筋肉	0.0025	0.5	0.0025	89.2			
	代謝産物C1	牛の筋肉	0.0025	0.5	0.0025	87.4	0.96	90.9	
	代謝産物C2	牛の筋肉	0.0025	0.5	0.0025	89.5	1.00	89.9	
	代謝産物C(1+2)	牛の脂肪	0.0025	0.1	0.1	89.7			
	代謝産物C1	牛の脂肪	0.0025	0.1	0.1	90.4	0.99	91.2	
	代謝産物C2	牛の脂肪	0.0025	0.1	0.1	89.7	1.00	89.5	
	代謝産物C(1+2)	牛の脂肪	0.0025	0.1	0.0025	90.6			
	代謝産物C1	牛の脂肪	0.0025	0.1	0.0025	86.2	0.99	87.0	
	代謝産物C2	牛の脂肪	0.0025	0.1	0.0025	91.2	1.02	89.4	
	代謝産物C(1+2)	牛の肝臓	0.0025	4.	4.	90.7			
	代謝産物C1	牛の肝臓	0.0025	4.	4.	91.4	0.99	92.0	10倍希釈して測定
	代謝産物C2	牛の肝臓	0.0025	4.	4.	90.6	0.99	91.4	10倍希釈して測定
	代謝産物C(1+2)	牛の肝臓	0.0025	4.	0.0025	85.6			
	代謝産物C1	牛の肝臓	0.0025	4.	0.0025	89.6	0.99	90.6	
	代謝産物C2	牛の肝臓	0.0025	4.	0.0025	85.1	0.98	86.8	

*1 添加回収試験により得られた真度/ピーク面積比

4. 考察

牛の融解脂肪を用いてヘキサジノン、代謝物 B 及び代謝物 F の回収試験を行った。*n*-ヘキサン存在下アセトニトリルで抽出する方法を検討したところ、良好な回収率が得られた。また、牛乳を用いてヘキサジノン、代謝物 B、代謝物 C 及び代謝物 F について同様に回収率を検討したところ、良好な結果が得られたことから本抽出法を採用した。

アセトニトリル抽出液の精製については、SCX ミニカラムを用いた精製を検討したところ、ミニカラムのロット及びメーカーにより各化合物の保持力に大きな差が認められた。また、PSA ミニカラムを検討したところ、マトリックスの測定値への影響が認められた。一方、SAX/PSA ミニカラムを検討したところ、マトリックスの測定値への影響も小さく、良好な結果が得られたことから、SAX/PSA ミニカラムを選択した。

開発した方法を用いて牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓及び牛の乳について各分析対象化合物の添加回収試験を行なった結果、いずれの試料においても定量を妨害するピークは認められず、真度は 86.3~96.0%、併行精度は 0.8~4.9% の良好な結果が得られたことから、本試験法は、畜産物に適用可能であると判断された。

[結論]

畜産物中のヘキサジノン試験法として、ヘキサジノン、代謝物 B 及び代謝物 F (乳の場合は、ヘキサジノン、代謝物 B、代謝物 C 及び代謝物 F) を試料から *n*-ヘキサン存在下アセトニトリルで抽出し、SAX/PSA ミニカラムで精製した後、LC-MS/MS で定量及び確認する方法を開発した。開発した試験法を牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓及び牛の乳の 4 食品に適用した結果、真度は 86.3~96.0%、併行精度は 0.8~4.9% の良好な結果が得られた。また、すべての食品で定量を妨害するピークは認められなかった。さらに、各食品におけるマトリックス添加標準溶液に対する溶媒標準溶液のピーク面積比は、0.96~1.03 であったことから、本法は試料由来のマトリックスの影響をほとんど受けずに測定することが可能と考えられた。また、ヘキサジノン、代謝物 B、代謝物 C 及び代謝物 F の各化合物について定量限界 0.0025 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 ヘキサジノン” 2008 年 12 月,
<https://www.env.go.jp/council/10dojo/y104-36/ref12.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” 平成 17 年 1 月 24 日, 食安発第 0124001 号 (2005).

① 添加回収試験における代表的なクロマトグラム

【ヘキサジノン】

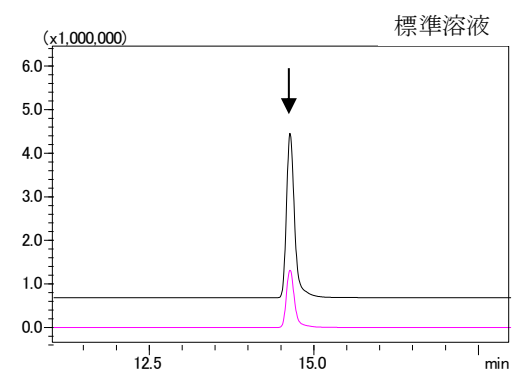
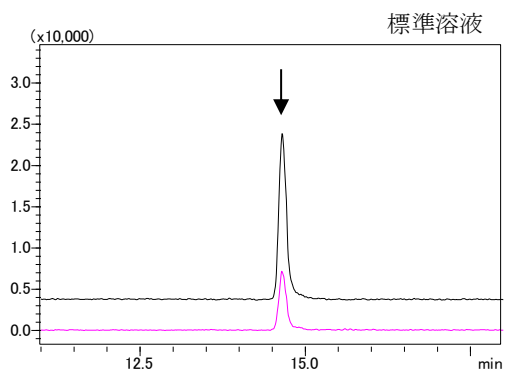
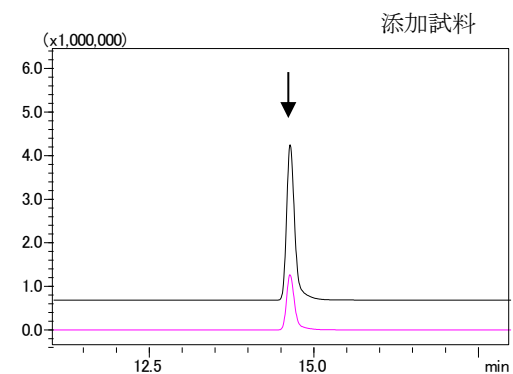
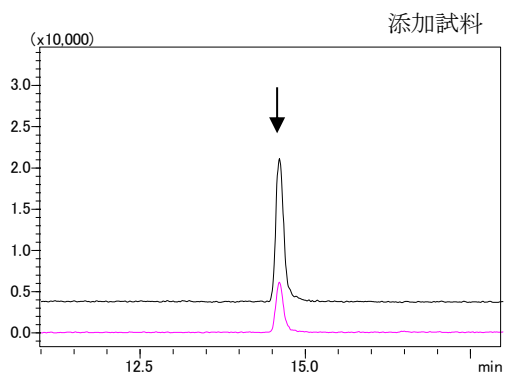
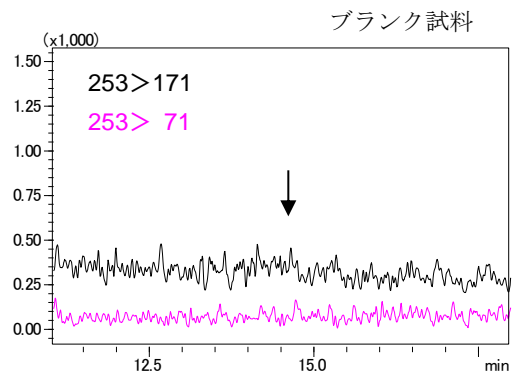
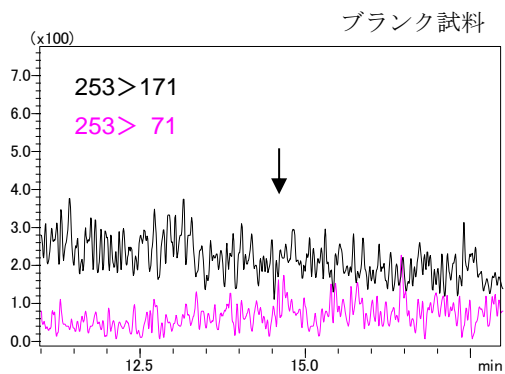


図 17 牛の筋肉の SRM クロマトグラム
(添加濃度 0.0025 mg/kg)

図 18 牛の筋肉の SRM クロマトグラム
(添加濃度 0.5 mg/kg)

【ヘキサジノン】

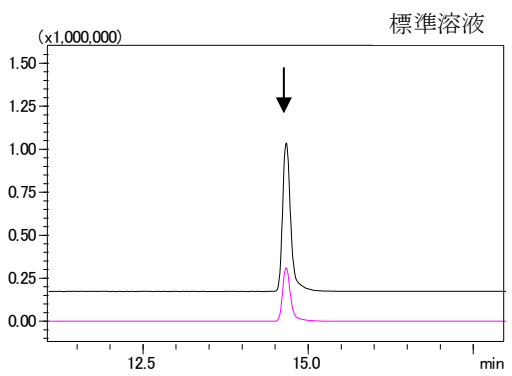
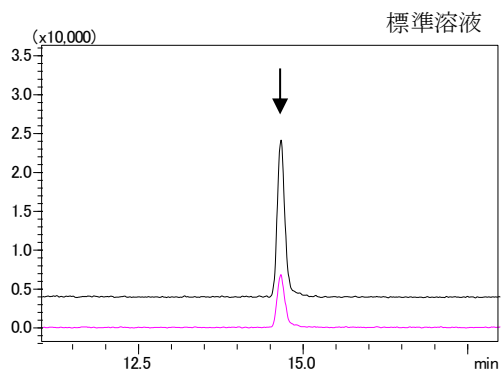
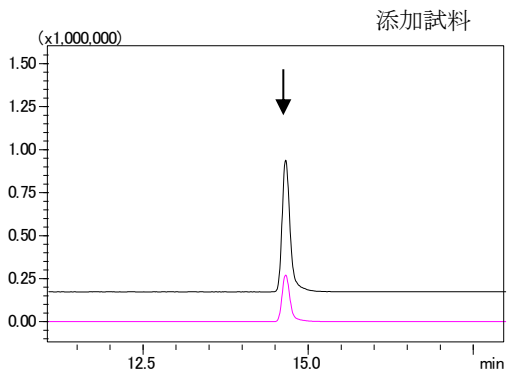
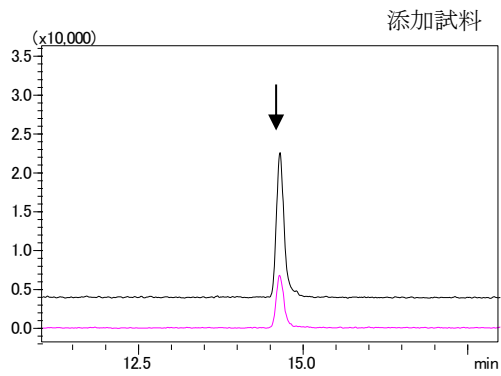
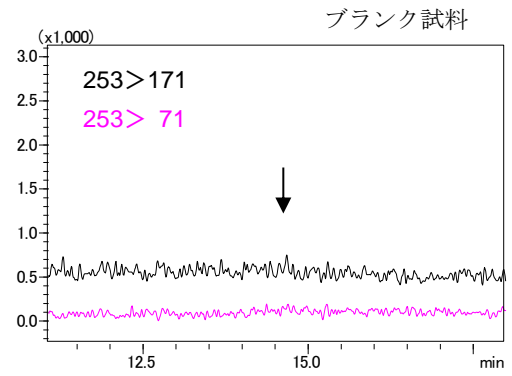
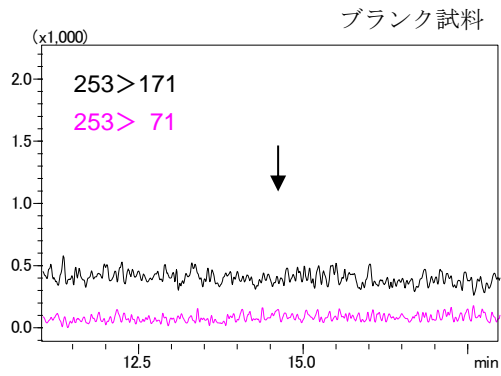


図 19 牛の脂肪の SRM クロマトグラム
(添加濃度 0.0025 mg/kg)

図 20 牛の脂肪の SRM クロマトグラム
(添加濃度 0.1 mg/kg)

【ヘキサジノン】

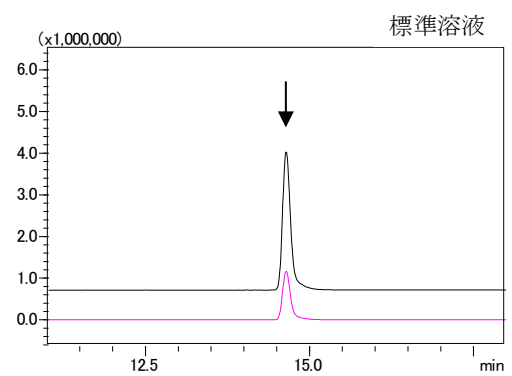
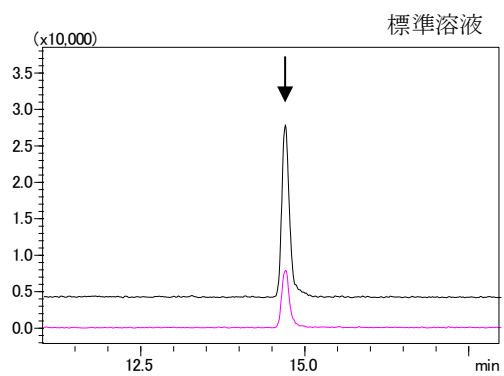
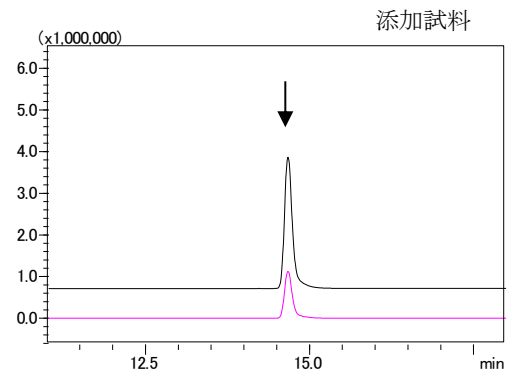
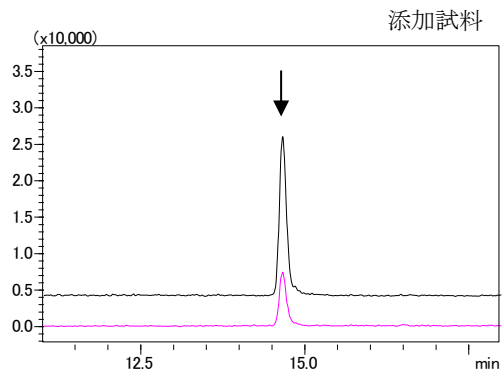
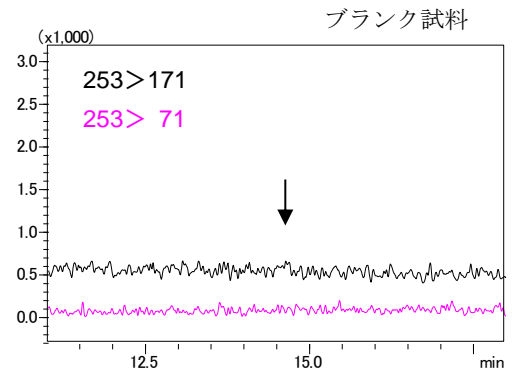
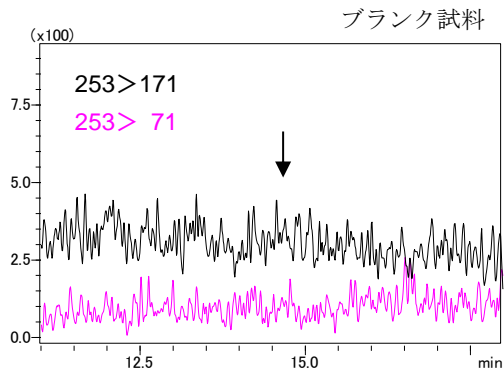


図 21 牛の肝臓の SRM クロマトグラム
(添加濃度 0.0025 mg/kg)

図 22 牛の肝臓の SRM クロマトグラム
(添加濃度 4 mg/kg)

【ヘキサジノン】

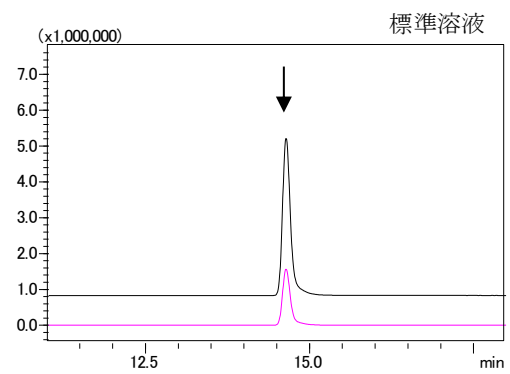
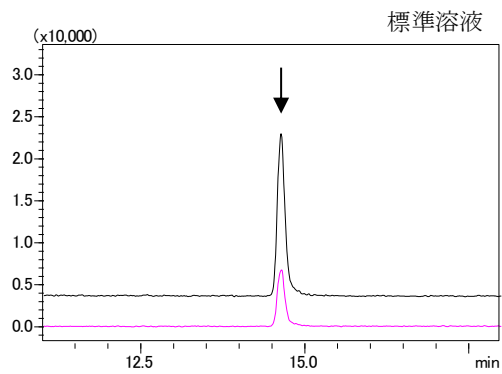
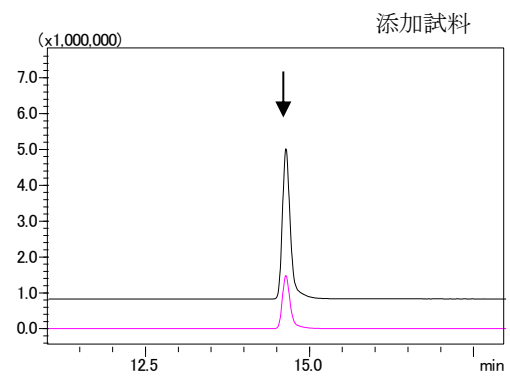
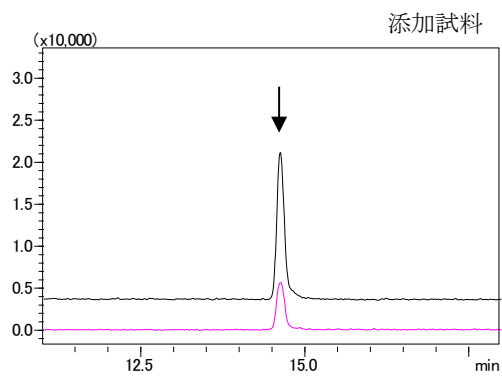
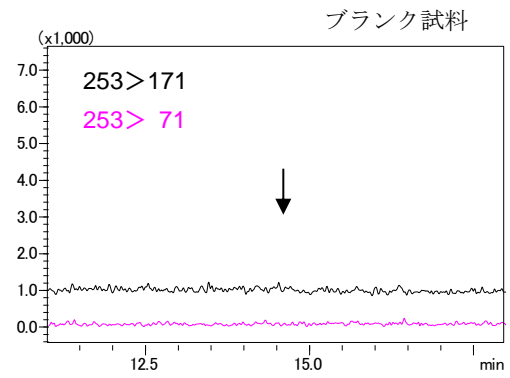
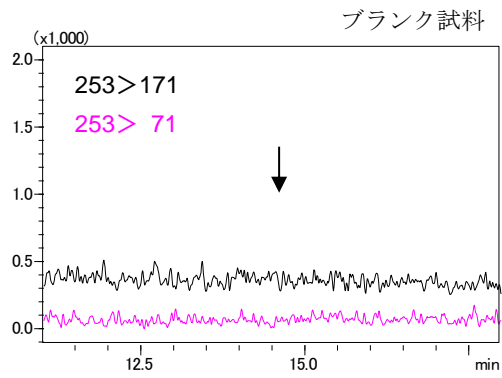


図 23 牛の乳の SRM クロマトグラム
(添加濃度 0.0025 mg/kg)

図 24 牛の乳の SRM クロマトグラム
(添加濃度 11 mg/kg)

【代謝物 B】

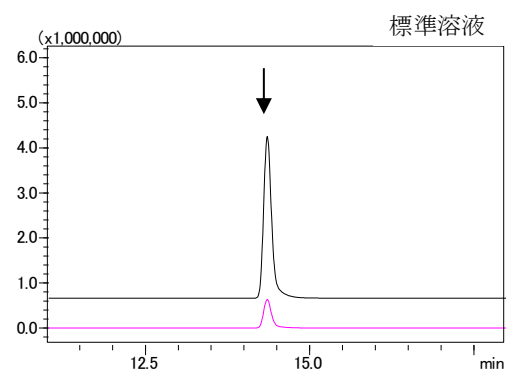
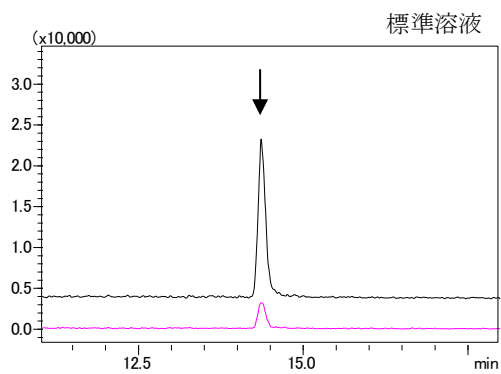
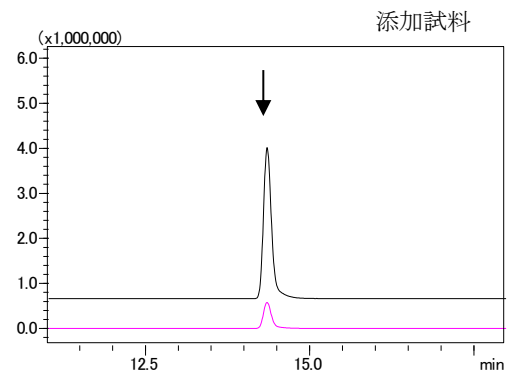
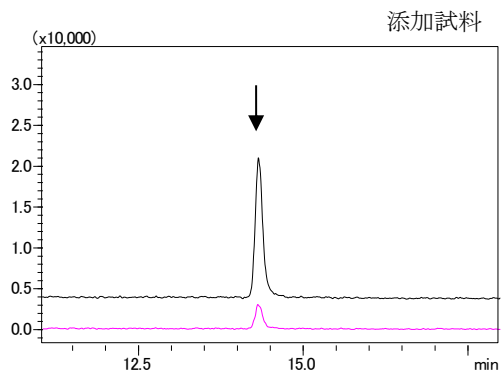
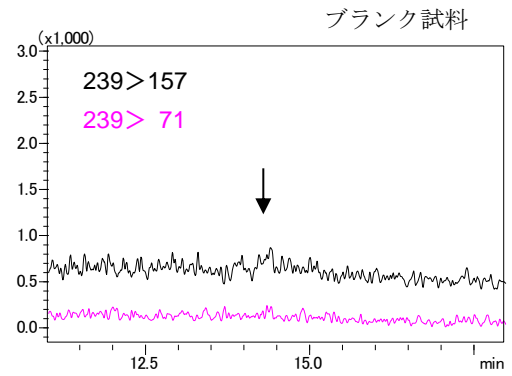
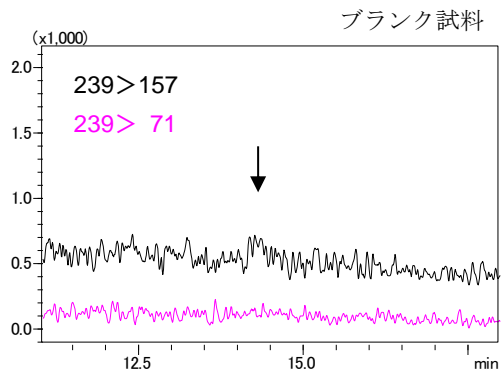


図 25 牛の筋肉の SRM クロマトグラム
(添加濃度 0.0025 mg/kg)

図 26 牛の筋肉の SRM クロマトグラム
(添加濃度 0.5 mg/kg)

【代謝物 B】

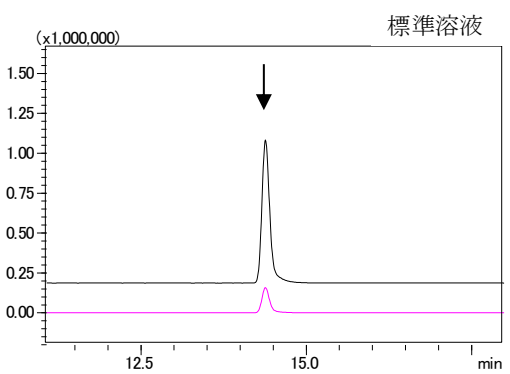
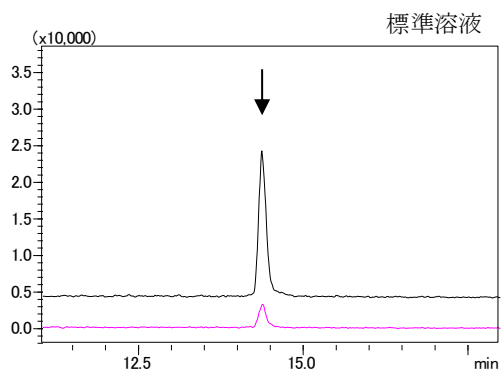
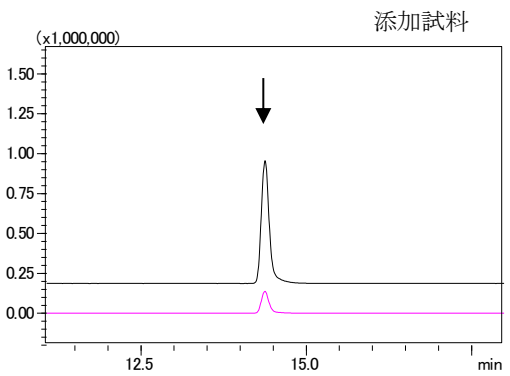
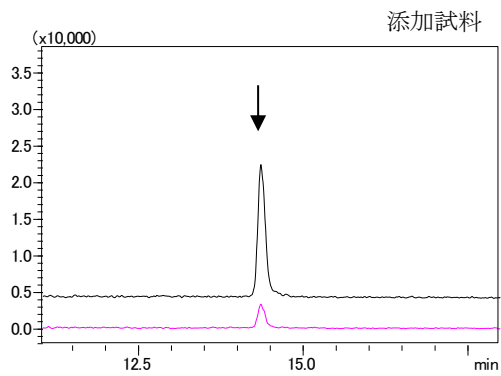
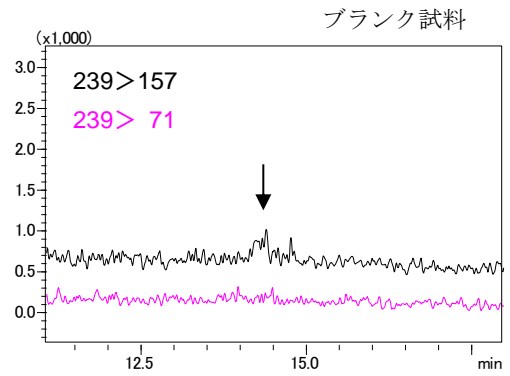
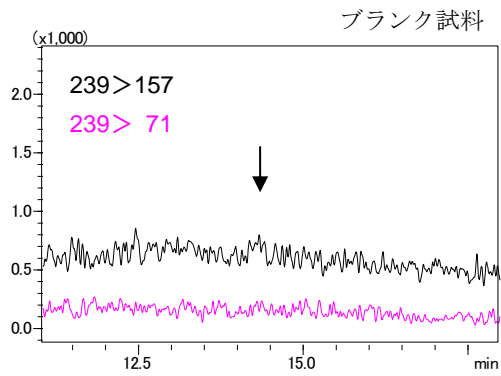


図 27 牛の脂肪の SRM クロマトグラム
(添加濃度 0.0025 mg/kg)

図 28 牛の脂肪の SRM クロマトグラム
(添加濃度 0.1 mg/kg)

【代謝物 B】

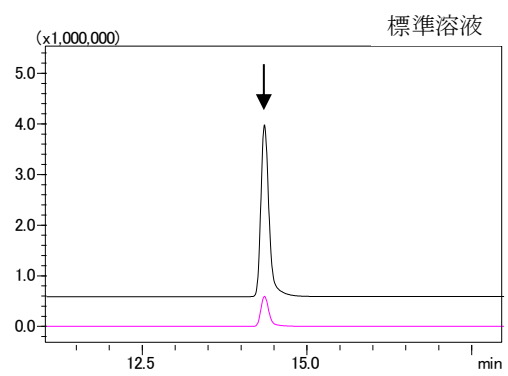
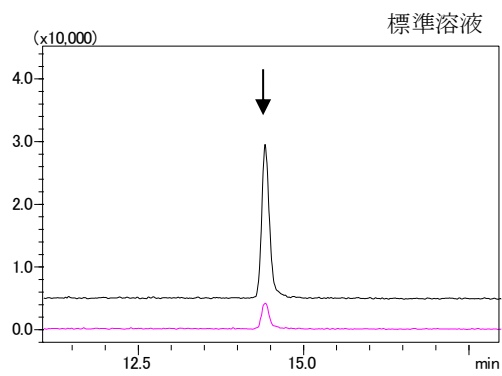
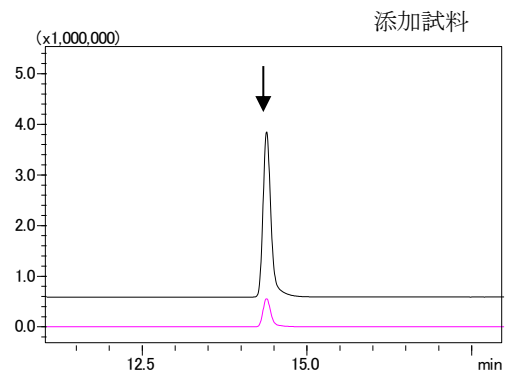
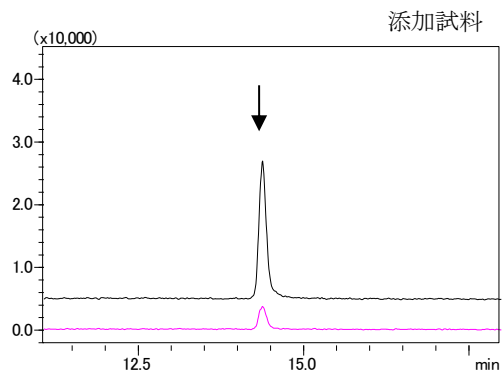
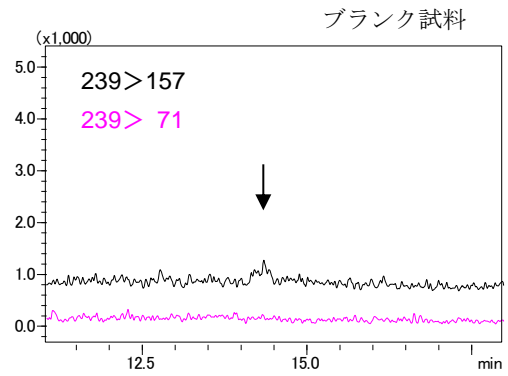
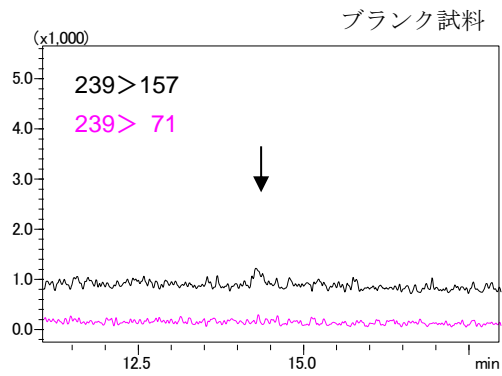


図 29 牛の肝臓の SRM クロマトグラム
(添加濃度 0.0025 mg/kg)

図 30 牛の肝臓の SRM クロマトグラム
(添加濃度 4 mg/kg)

【代謝物 B】

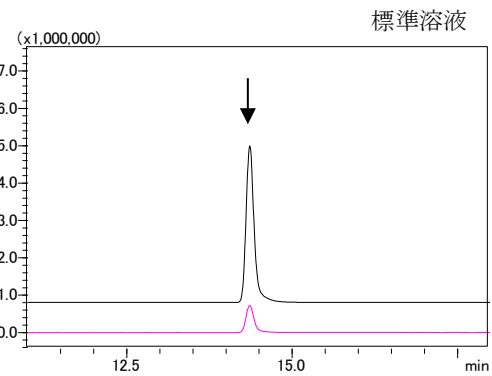
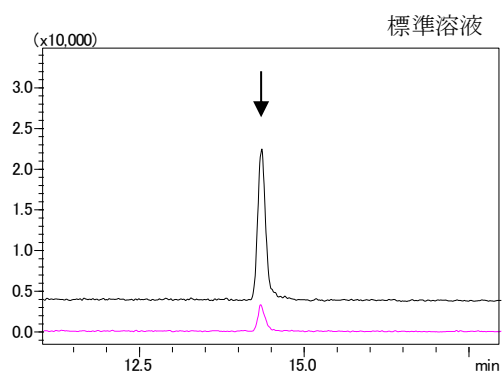
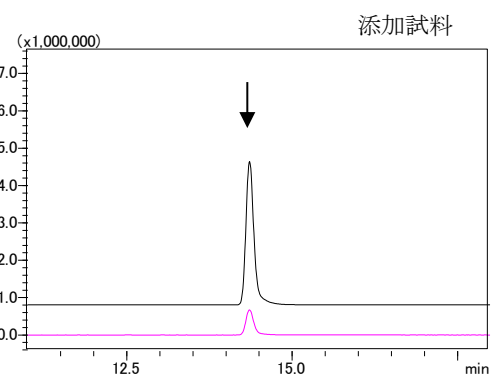
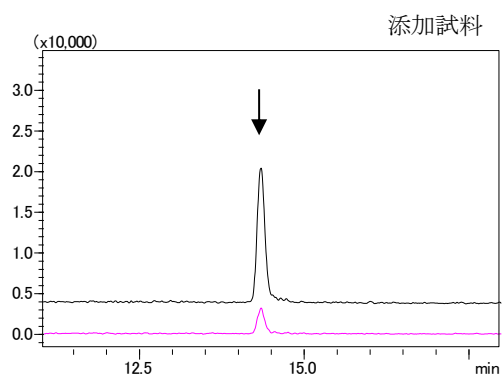
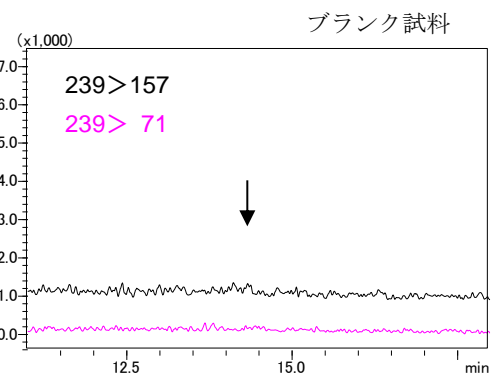
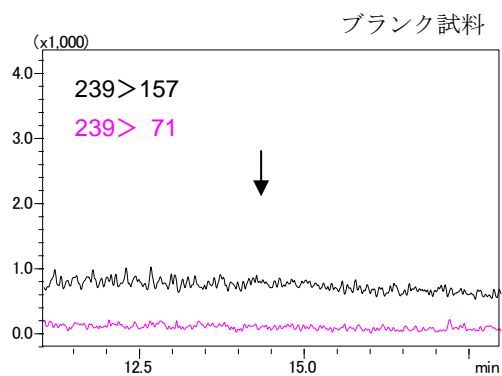


図 31 牛の乳の SRM クロマトグラム
(添加濃度 0.0025 mg/kg)

図 32 牛の乳の SRM クロマトグラム
(添加濃度 11 mg/kg)

【代謝物 C】

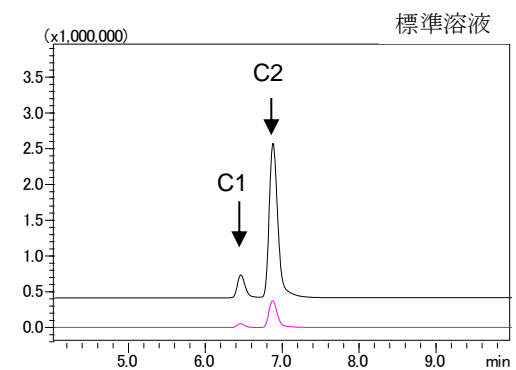
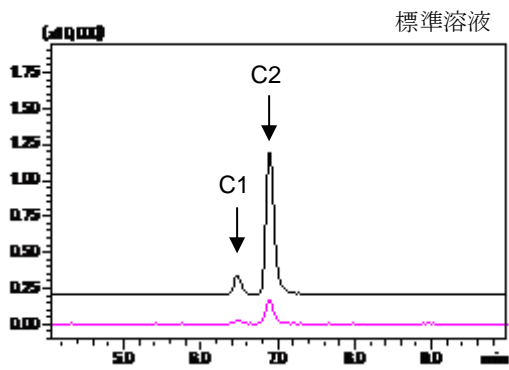
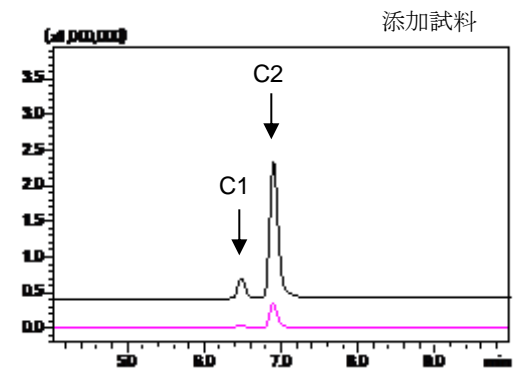
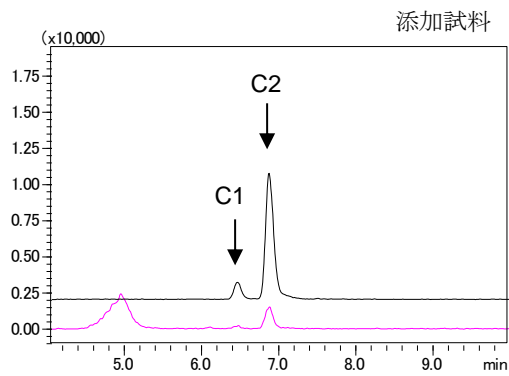
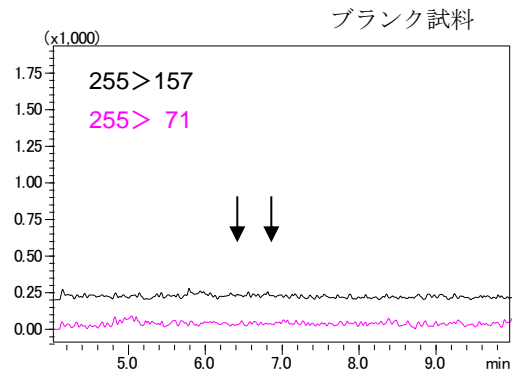
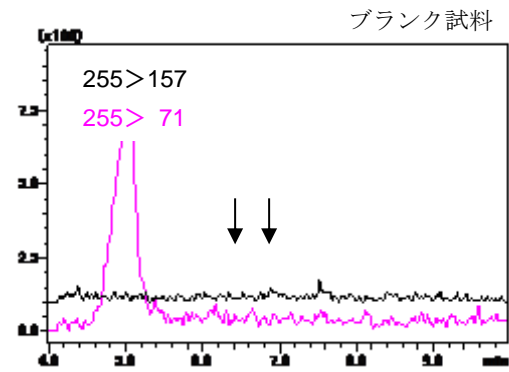


図 33 牛の乳の SRM クロマトグラム
(添加濃度 0.0025 mg/kg)

図 34 牛の乳の SRM クロマトグラム
(添加濃度 11 mg/kg)

【代謝物 F】

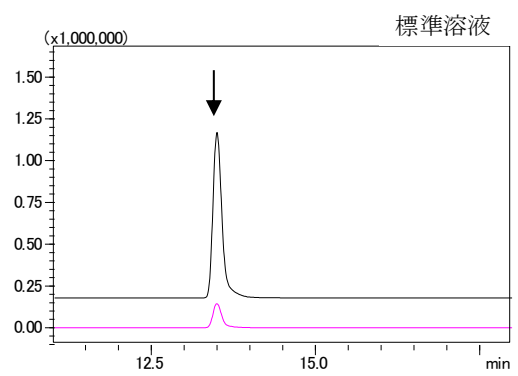
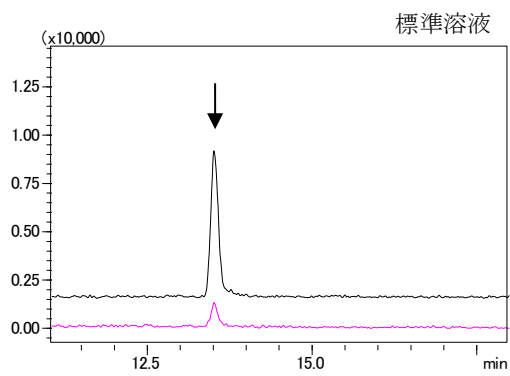
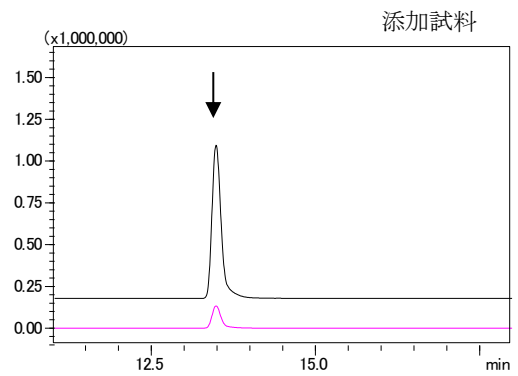
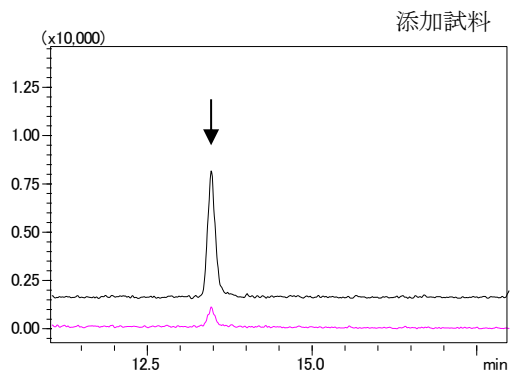
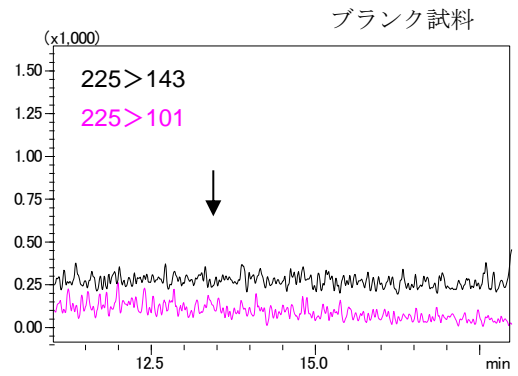
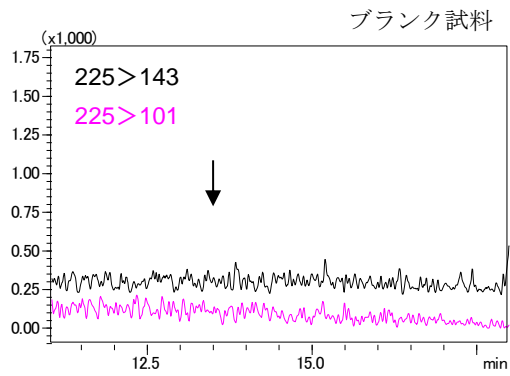


図 35 牛の筋肉の SRM クロマトグラム
(添加濃度 0.0025 mg/kg)

図 36 牛の筋肉の SRM クロマトグラム
(添加濃度 0.5 mg/kg)

【代謝物 F】

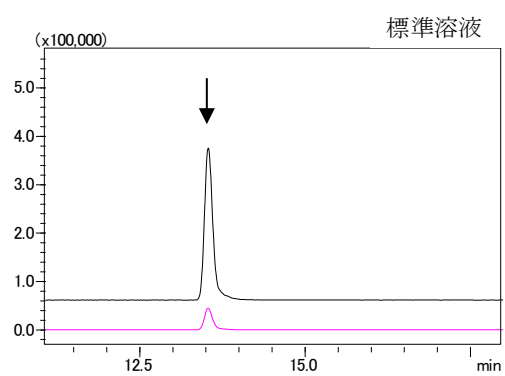
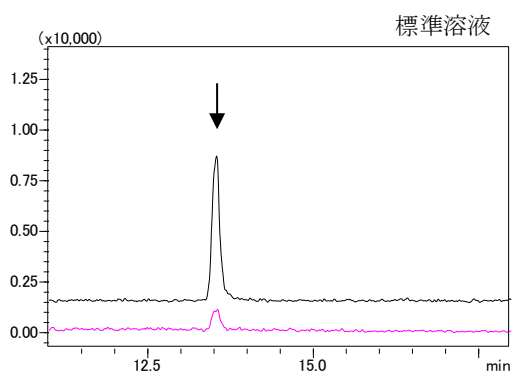
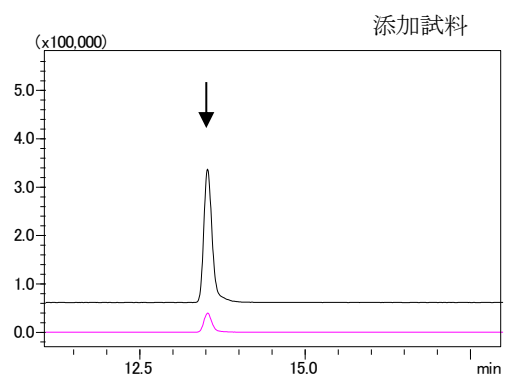
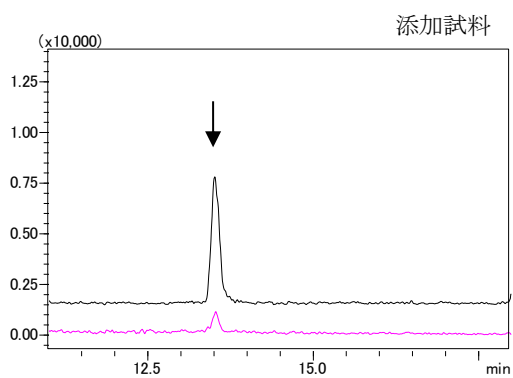
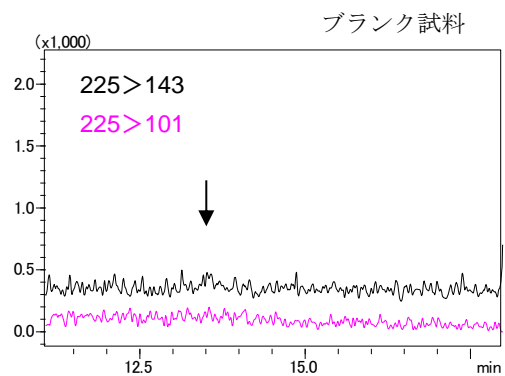
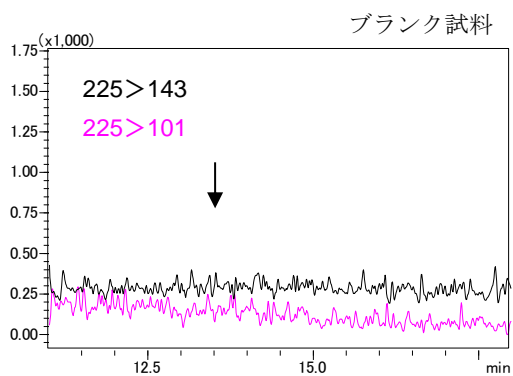


図 37 牛の脂肪の SRM クロマトグラム
(添加濃度 0.0025 mg/kg)

図 38 牛の脂肪の SRM クロマトグラム
(添加濃度 0.1 mg/kg)

【代謝物 F】

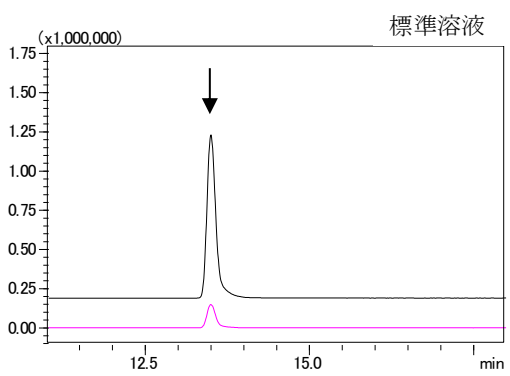
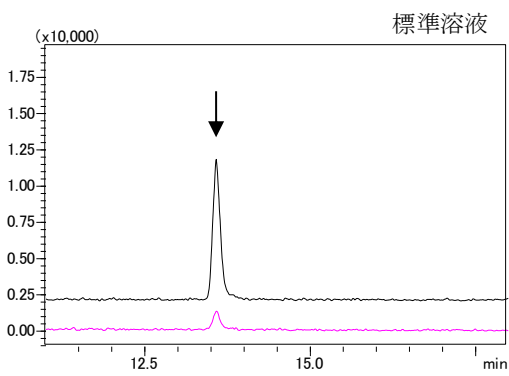
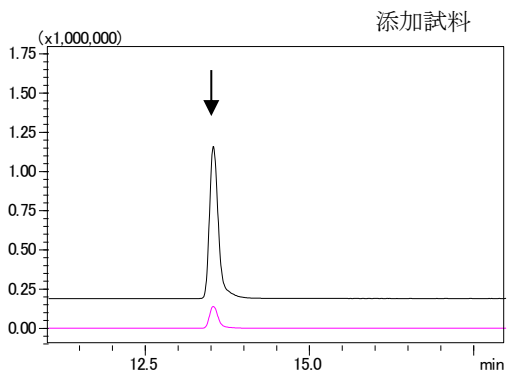
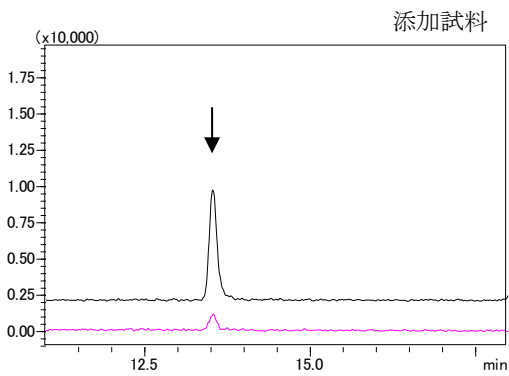
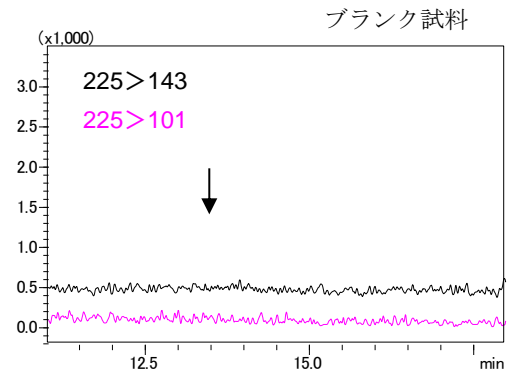
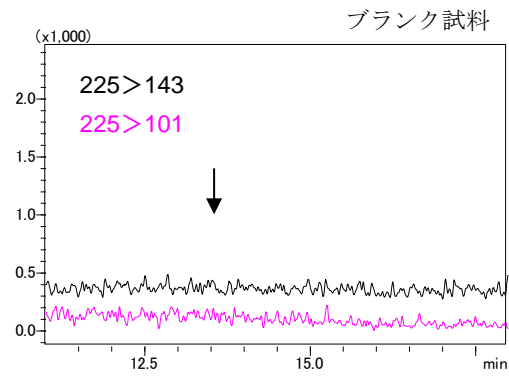


図 39 牛の肝臓の SRM クロマトグラム
(添加濃度 0.0025 mg/kg)

図 40 牛の肝臓の SRM クロマトグラム
(添加濃度 4 mg/kg)

【代謝物 F】

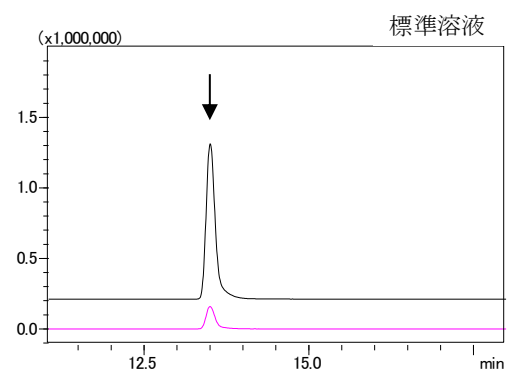
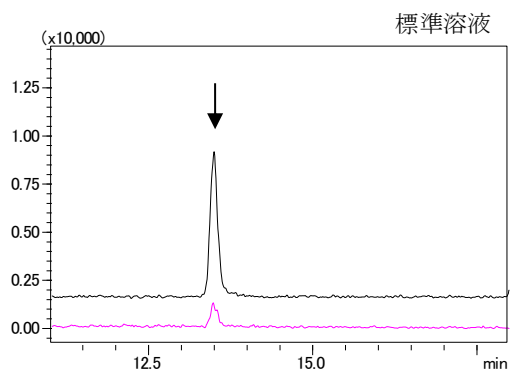
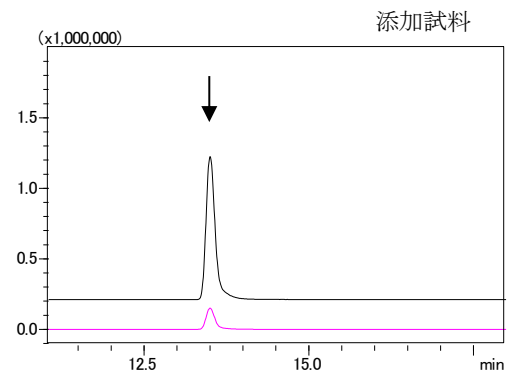
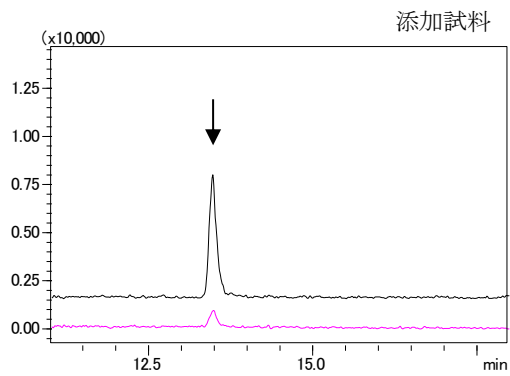
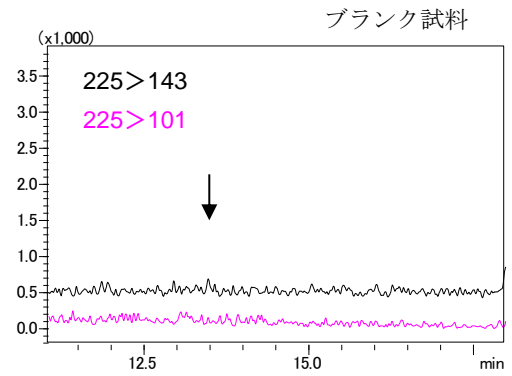
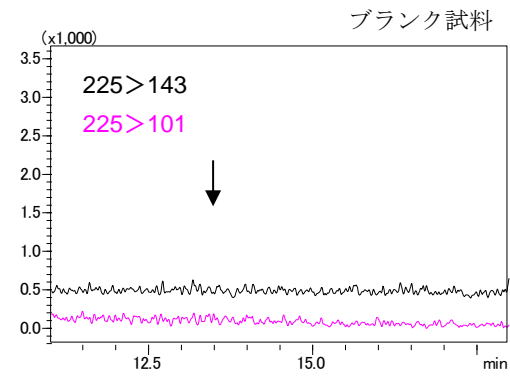


図 41 牛の乳の SRM クロマトグラム
(添加濃度 0.0025 mg/kg)

図 42 牛の乳の SRM クロマトグラム
(添加濃度 11 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

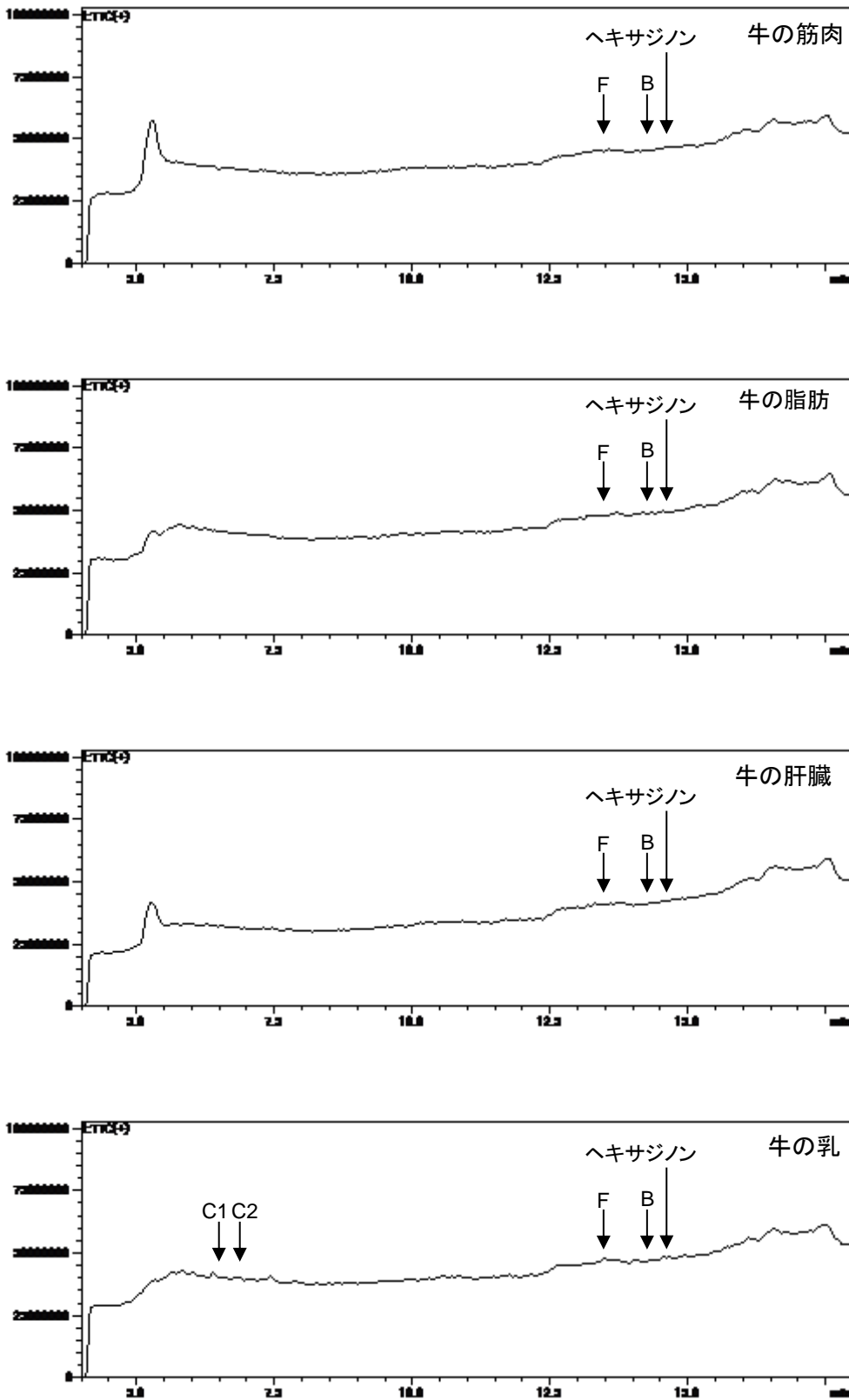


図 43 ブランク試料のトータルイオンクロマトグラム (スキャン範囲：50～550 amu)