

※本報告書は、試験法開発における検討結果を取り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下さい。

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

アセトクロール試験法（農産物）

アセトクロール試験法（農産物）の検討結果

〔緒言〕

1. 背景・目的

アセトクロール（図1）は酸アミド系除草剤であり、植物の炭素数 20 以上の超長鎖脂肪酸の生合成酵素阻害作用により、雑草の主に幼芽部の伸長を抑制し、殺草活性を示すと考えられている。アセトクロールの残留基準値は、「アセトクロール並びに塩基性条件下で EMA【2-エチル-6-メチルアニリン】及び HEMA【2-(1-ヒドロキシエチル)-6-メチルアニリン】に変換される代謝物をアセトクロールに換算したものの和」として設定されているが、公示試験法は示されていない。本研究では、農産物中のアセトクロール試験法を開発することを目的とした。なお、変換反応の検討に当たっては、EMA への変換についてはアセトクロールを用い、HEMA への変換については、申請企業の残留分析法¹⁾を参考に 2-[(Ethoxymethyl){2-(1-hydroxyethyl)-6-methylphenyl}amino]-2-oxoacetic acid を HEMA に変換される代謝物 (HEMA producing metabolite ; HPM) として用いた（図1）。

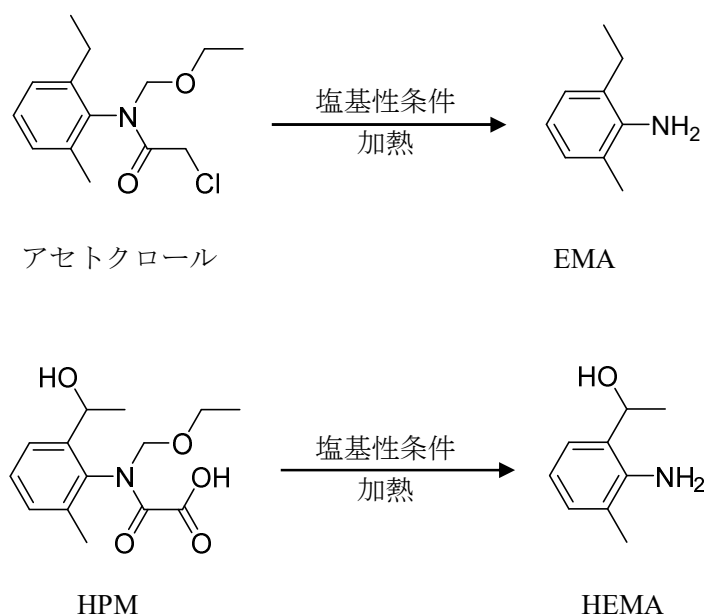


図1 EMA 及び HEMA への変換

2. 基準値

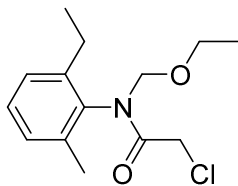
アセトクロールとは、アセトクロール並びに塩基性条件下で EMA【2-エチル-6-メチルアニリン】及び HEMA【2-(1-ヒドロキシエチル)-6-メチルアニリン】に変換される代謝物をアセトクロールに換算したものの和とする。〔生食発 0916 第1号 (H28.9.16) 〕

食品名	基準値 (ppm)
大豆	1
とうもろこし	0.05

3. 分析対象化合物の構造式及び物理化学的性質

分析対象化合物： アセトクロール (Acetochlor)

構造式：



分子式： $C_{14}H_{20}ClNO_2$

分子量： 269.77

化学名： 2-Chloro-N-(ethoxymethyl)-N-(2-ethyl-6-methylphenyl)acetamide

CAS 番号： 34256-82-1

外観： 黄色透明液体

溶解性： 水 282 mg/L (20°C) ^{a)}

1-オクタノール/水分配係数 (log P_{ow}) : 4.14 (20°C) ^{a)}

沸点： 172°C (5 mmHg) ^{a)}

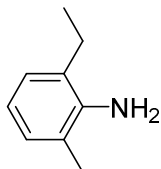
融点： 10.6°C ^{a)}

蒸気圧： 2.2×10^{-2} mPa (20°C) ^{a)}、 4.6×10^{-2} mPa (25°C) ^{a)}

^{a)} The Pesticide Manual sixteenth Edition, BCPC

分析対象化合物： 2-エチル-6-メチルアニリン (EMA)

構造式：



分子式： $C_9H_{13}N$

分子量： 135.21

化学名： 2-Ethyl-6-methylaniline

CAS 番号： 24549-06-2

外観： 褐色透明液体

1-オクタノール/水分配係数 (log P_{ow} 、計算値) : 2.141 ± 0.223 (25°C) ^{a)}

沸点： 231°C ^{b,c)}

融点： -33°C ^{c)}

蒸気圧 (計算値) : 0.0741 Torr (25°C) ^{a)}

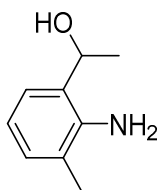
^{a)} SciFinder (Calculated using Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software V11.02)

^{b)} SciFinder (Apelblat, Alexander; Journal of Chemical Thermodynamics 2008, V40(10), P1477-1484 CAPLUS)

^{c)} SciFinder ("PhysProp" data were obtained from Syracuse Research Corporation of Syracuse, New York (US))

分析対象化合物： 2-(1-ヒドロキシエチル)-6-メチルアニリン (HEMA)

構造式：



化学名： 1-(2-Amino-3-methylphenyl)ethan-1-ol

CAS 番号： 196611-19-5

分子式： C₉H₁₃NO

分子量： 151.21

外観： 白色綿状物質

沸点 (計算値)： 291.1±25.0°C (760 Torr) ^{a)}

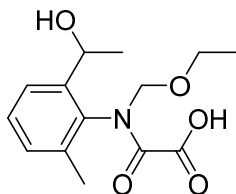
1-オクタノール/水分配係数 (log P_{ow}, 計算値)： 0.510±0.314 (25°C) ^{a)}

蒸気圧 (計算値)： 9.13 × 10⁻⁴ Torr (25°C) ^{a)}

^{a)} SciFinder (Calculated using Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software V11.02)

分析対象化合物： HEMA に変換される代謝物 (HEMA producing metabolite ; HPM)

構造式：



化学名： 2-[(Ethoxymethyl){2-(1-hydroxyethyl)-6-methylphenyl}amino]-2-oxoacetic acid

分子式： C₁₄H₁₉NO₅

分子量： 281.31

4. 申請企業の残留分析法¹⁾

(1) 試験溶液の調製方法

秤取

↓ 試料 5.0 g

抽出

↓ メタノール/水 (4 : 1) 17.5 mL を加え、振とう抽出

↓ 遠心分離 (4500 g、10 分間)

↓ ヘッドスペース用バイアル (6 mL 容) に上清 0.225 mL を入れる

↓ IS [(¹³C,²H₃)EMA^{a)} 及び(¹³C,²H₃)HEMA^{b)}] 0.025 mL を加える

EMA 及び HEMA への変換

↓ 50%水酸化ナトリウム溶液 (0.250 mL) を加え、キャップをする

↓ 95°Cで1時間以上加熱

↓ 放冷

↓ 50%ギ酸 (4°C以下) 約 2 mL をシリンジで加える。5 秒間攪拌

↓ キャップを外す

↓ 得られた溶液 300 µL を 96-ウェル GHP フィルタープレート (Pall 製) に入れる

↓ 遠心分離 (1500 g、1 分間)

LC-MS/MS

a) 2-Ethyl-6-(¹³C,²H₃)methylaniline

b) 1-[2-Amino-3-(¹³C,²H₃)methylphenyl]ethan-1-ol

(2) 測定条件

装置	型式	会社
LC	Prominence 20A	島津製作所
MS	API 5000/5500	Sciex

LC 条件																									
カラム	Acquity HSS T3 (内径 2.1 mm、長さ 75 mm、粒子径 1.8 µm : Waters 製)																								
移動相流速	0.4 mL/min																								
移動相	A 液 : 0.5%ギ酸 B 液 : 0.5%ギ酸含有アセトニトリル																								
グラジエント条件	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間 (分)</th> <th>A 液 (%)</th> <th>B 液 (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.0</td> <td>99</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>1.0</td> <td>99</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>2.5</td> <td>96.3</td> <td>3.7</td> </tr> <tr> <td>10.0</td> <td>83</td> <td>17</td> </tr> <tr> <td>10.01</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>12.0</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>12.01</td> <td>99</td> <td>1</td> </tr> </tbody> </table>	時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)	0.0	99	1	1.0	99	1	2.5	96.3	3.7	10.0	83	17	10.01	0	100	12.0	0	100	12.01	99	1
時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)																							
0.0	99	1																							
1.0	99	1																							
2.5	96.3	3.7																							
10.0	83	17																							
10.01	0	100																							
12.0	0	100																							
12.01	99	1																							

保持時間			時間 (分)		
	EMA		8.8		
	HEMA		5.2		
MS 条件					
測定モード	選択反応モニタリング (SRM)				
イオン化モード	ESI (+)				
イオンスプレー電圧	5500 V				
ヒーター温度	600°C				
エントランス電位	10 V				
カーテンガス	20 psi				
ネブライザーガス	N ₂ , 60 psi				
コリジョンガス	N ₂ , 9 (任意単位)				
測定イオン					
		イオン (<i>m/z</i>)	デクラスタリング電位 (V)	コリジョンエネルギー (eV)	コリジョンセルイグジット電位 (V)
EMA	定量イオン	136.0→119.0	106	21	10
HEMA	定量イオン	134.0→119.0	141	21	16

[実験方法]

1. 試料

試料は東京都内の小売店で購入した。試料の調製方法を以下に記載した。

大豆： 425 μm の標準網ふるいに通るように遠心粉碎機で粉碎した。

とうもろこし（未成熟）： 外皮、ひげ及びしんを除いた種子を磨碎装置で細切均一化した。

2. 試薬・試液

(1) 標準品

アセトクロール標準品：純度 97.1% (Merck 製)

EMA 標準品：純度 99.2% (LGC Standards 製)

HEMA 標準品：純度 98.1% (林純薬工業製)

HPM ナトリウム塩・エタノール溶液：564.3 $\mu\text{g/mL}$ (分子式 $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{NNaO}_5$ 、分子量 303.29) [林純薬工業製 (合成依頼)]

(2) 試薬等

蒸留水、アセトニトリル、メタノール： LC-MS 用 (関東化学製)

水 (試験溶液調製用)： 超高純度蒸留水精製装置で精製したもの

ギ酸、酢酸アンモニウム： 特級 (富士フイルム和光純薬製)

酢酸： 精密分析用 (富士フイルム和光純薬製)

50%水酸化ナトリウム溶液： 精密分析用 (富士フイルム和光純薬製)

4 級アンモニウム塩修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム： Oasis MAX (150 mg/6 mL、Waters 製)

ケイソウ土： セライト No.545 (富士フイルム和光純薬製)

ろ紙： 定量濾紙、No.5A (アドバンテック製)

アルミシールバイアル：アルミシールバイアル (100 mL 容、ガラス透明：ジーエルサイエンス製)、アルミシール TS-OFF 型 (ジーエルサイエンス製)、PTFE/シリコンセプタム (ジーエルサイエンス製)

分析カラム： InertSustain C18 (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm ：ジーエルサイエンス製)、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製)、Symmetry C18 (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3.5 μm ：Waters 製)、XSelect HSS C18 (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3.5 μm ：Waters 製)、XSelect HSS C18 SB (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3.5 μm ：Waters 製)、XSelect HSS T3 (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3.5 μm ：Waters 製)、L-column3 ODS (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm ：化学物質評価研究機構製)、TSK gel ODS-100V (内径 2 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm ：東ソー製)、TSK gel ODS-100Z (内径 2 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm ：東ソー製)

(3) 試液

① 標準原液

アセトクロール、EMA 及び HEMA 標準原液： 各標準品 10 mg を精秤し、それぞれアセトニトリルに溶解して 1 mg/mL の濃度の溶液を調製した。

HPM ナトリウム塩標準原液： HPM ナトリウム塩・エタノール溶液 [564.3 $\mu\text{g/mL}$ (アセトクロールとして 501.9 $\mu\text{g/mL}$) 林純薬工業製] を標準原液として用いた。なお、HPM ナトリウム塩の濃度からアセトクロールの濃度への換算は、換算係数 0.8895 (アセトクロールの分子量を HPM ナトリウム塩の分子量で除した値) を用いて行った。

② HPM ナトリウム塩標準溶液（アセトクロールとして 50 µg/mL）

HPM ナトリウム塩標準原液をメタノールで希釈して 50 µg/mL（アセトクロールとして）の濃度の溶液を調製した。

③ 添加用標準溶液（定量限界濃度（0.01 ppm））

アセトクロール標準原液及び HPM ナトリウム塩標準溶液を適宜混合し、メタノールで希釈してそれぞれアセトクロールとして 0.2 µg/mL の濃度の溶液を調製した。

④ 添加用標準溶液（大豆：基準値濃度（1 ppm））

アセトクロール標準原液及び HPM ナトリウム塩標準溶液を適宜混合し、メタノールで希釈してそれぞれアセトクロールとして 20 µg/mL の濃度の溶液を調製した。

⑤ 添加用標準溶液（とうもろこし：基準値濃度（0.05 ppm））

アセトクロール標準原液及び HPM ナトリウム塩標準溶液を適宜混合し、メタノールで希釈してそれぞれアセトクロールとして 1 µg/mL の濃度の溶液を調製した。

3. 装置等

遠心粉碎機： ZM200（Verder Scientific 製）

磨砕装置： Grindomix GM200（Verder Scientific 製）

ホモジナイザー： Polytron PT 10-35 GT（Kinematica 社製）

遠心分離機： フロア型冷却遠心機 S700FR（久保田商事製）

オーブン： 小型高温チャンバーST-110（エスペック製）

蒸留水精製装置： 超高純度蒸留水精製装置 NZJ-2DSYW（藤原製作所製）

ロータリーエバポレーター： N-1000/NVC-2100/DPE-1300/CCA-1111/SB-1000（東京理化工械製）

LC-MS/MS

装置	型式	会社
LC	Acquity UPLC I-Class	Waters
MS	Triple Quad 5500	Sciex
データ処理	Analyst 1.6.2	Sciex

4. 測定条件

(1) LC-MS/MS 測定条件

①EMA 及び HEMA

LC 条件	
カラム	InertSustain C18（内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 µm：ジューエルサイエンス製）
移動相流速	0.2 mL/min
注入量	3 µL
カラム温度	40°C

移動相	A 液 : 0.01 vol%ギ酸 B 液 : 0.01 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液																									
グラジエント条件	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間 (分)</th> <th>A 液 (%)</th> <th>B 液 (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.0</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>5.0</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>20.0</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>20.1</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>30.0</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>30.1</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> </tbody> </table>					時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)	0.0	90	10	5.0	90	10	20.0	5	95	20.1	0	100	30.0	0	100	30.1	90	10
時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)																								
0.0	90	10																								
5.0	90	10																								
20.0	5	95																								
20.1	0	100																								
30.0	0	100																								
30.1	90	10																								
保持時間	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>時間 (分)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>EMA</td> <td>14.8</td> </tr> <tr> <td>HEMA</td> <td>9.3</td> </tr> </tbody> </table>						時間 (分)	EMA	14.8	HEMA	9.3															
	時間 (分)																									
EMA	14.8																									
HEMA	9.3																									
MS 条件																										
測定モード	選択反応モニタリング (SRM)																									
イオン化モード	ESI (+)																									
イオンスプレー電圧	4500 V																									
ヒーター温度	400°C																									
エントランス電位	10 V																									
カーテングス	N ₂ , 10 psi																									
ネブライザーガス	N ₂ , 40 psi																									
ターボガス	N ₂ , 80 psi																									
コリジョンガス	N ₂ , 8 (任意単位)																									
測定イオン																										
		イオン (<i>m/z</i>)	デクラスタリング電位 (V)	コリジョンエネルギー (eV)	コリジョンセルイグジット電位 (V)																					
EMA	定量	136.0→119.0	101	21	10																					
	定性	136.0→117.0	101	33	10																					
HEMA	定量	152.0→119.0	36	31	10																					
	定性	152.0→91.0	36	45	10																					
	定性	134.0→115.0	121	31	10																					
	定性	134.0→119.0	121	25	10																					

②アセトクロール及び HPM

LC 条件	
カラム	InertSustain C18 (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm : ジーエルサイエンス製)
移動相流速	0.2 mL/min

注入量	3 μ L																									
カラム温度	40°C																									
移動相	A 液 : 0.01 vol%ギ酸 B 液 : 0.01 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液																									
グラジエント条件	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間 (分)</th> <th>A 液 (%)</th> <th>B 液 (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.0</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>8.0</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>13.0</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>13.1</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>23.0</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>23.1</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> </tbody> </table>					時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)	0.0	90	10	8.0	5	95	13.0	5	95	13.1	0	100	23.0	0	100	23.1	90	10
時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)																								
0.0	90	10																								
8.0	5	95																								
13.0	5	95																								
13.1	0	100																								
23.0	0	100																								
23.1	90	10																								
保持時間	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>時間 (分)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>アセトクロール</td> <td>8.6</td> </tr> <tr> <td>HPM</td> <td>4.1、4.4</td> </tr> </tbody> </table>						時間 (分)	アセトクロール	8.6	HPM	4.1、4.4															
	時間 (分)																									
アセトクロール	8.6																									
HPM	4.1、4.4																									
MS 条件																										
測定モード	選択反応モニタリング (SRM)																									
イオン化モード	アセトクロール : ESI (+) 、 HPM : ESI (-)																									
イオンスプレー電圧	アセトクロール : 4500 V、 HPM : -4500 V																									
ヒーター温度	400°C																									
エントランス電位	10 V																									
カーテンガス	N ₂ , 10 psi																									
ネブライザーガス	N ₂ , 40 psi																									
ターボガス	N ₂ , 80 psi																									
コリジョンガス	N ₂ , 8 (任意単位)																									
測定イオン																										
		イオン (<i>m/z</i>)	デクラスタリング電位 (V)	コリジョンエネルギー (eV)	コリジョンセルイグジット電位 (V)																					
アセトクロール	定量	270.0→224.0	70	15	15																					
	定性	270.0→148.0	70	25	10																					
HPM	定量	280.0→162.0	-25	-15	-10																					
	定性	280.0→120.0	-25	-30	-10																					

5. 定量

EMA 及び HEMA の標準原液を混合してアセトニトリル/水 (7 : 3) で希釈し、定量限界濃度での添加回収試験においては 0.00025、0.0005、0.00075、0.001、0.00125 及び 0.0015 μ g/mL、大豆の基準値濃度での添加回収試験においては 0.025、0.05、0.075、0.1、0.125 及び 0.15 μ g/mL、とうもろこしの基準値濃度での添加回収試験においては 0.00125、0.0025、0.00375、0.005、0.00625 及び 0.0075 μ g/mL 濃度の溶液を調製した。これらの溶液 3 μ L を LC-MS/MS に注入し、得られたピーク面積を用いて検量線を作成した。試験溶液 3 μ L を LC-MS/MS に注入し、検量線から絶対検量線法によりアセトクロールの含量を算出し

た。なお、検量線作成用の標準溶液は、アセトクロールとしての濃度で調製した。なお、アセトクロールとしての濃度から EMA 濃度及び HEMA 濃度への換算は、以下の換算係数（各化合物の分子量をアセトクロールの分子量で除した値）を用いて行った。

	換算係数
EMA	0.5012
HEMA	0.5605

6. 添加試料の調製

(1) 定量限界濃度

大豆の場合（添加濃度 0.01 mg/kg）は、試料 10.0 g に 0.2 µg/mL（アセトクロールとして）添加用標準溶液 0.5 mL を添加して混合後、30 分間放置した。

とうもろこしの場合（添加濃度 0.01 mg/kg）は、試料 20.0 g に 0.2 µg/mL（アセトクロールとして）添加用標準溶液 1 mL を添加して混合後、30 分間放置した。

(2) 基準値濃度

大豆の場合（添加濃度 1 mg/kg）は、試料 10.0 g に 20 µg/mL（アセトクロールとして）添加用標準溶液 0.5 mL を添加して混合後、30 分間放置した。

とうもろこしの場合（添加濃度 0.05 mg/kg）は、試料 20.0 g に 1 µg/mL（アセトクロールとして）添加用標準溶液 1 mL を添加して混合後、30 分間放置した。

7. 試験溶液の調製

(1) 抽出

大豆の場合は試料10.0 gを量り採り、水を加えて30分間放置した。とうもろこし（未成熟）の場合は試料20.0 gを量り採った。これにメタノール100 mLを加えてホモジナイズした後、ケイソウ土を厚さ約1 cmに敷いたろ紙を用いて吸引ろ過した。ろ紙上の残留物にメタノール50 mLを加えてホモジナイズした後、上記と同様に吸引ろ過した。得られたろ液を合わせ、メタノールを加えて200 mLに定容した。この抽出液から正確に大豆の場合は20 mL（試料1 g相当）、とうもろこし場合は10 mL（試料1 g相当）をナスフラスコに分取し、エタノールを約5 mL加えた後、ロータリーエバポレーターを用いて40°C以下で約1 mLまで減圧濃縮した。これに、エタノール約5 mLを加えて再度ロータリーエバポレーターを用いて40°C以下で約0.5 mLまで減圧濃縮した後、窒素気流により溶媒を除去した。

(2) EMA及びHEMAへの変換

(1) で得られた残留物をメタノール1 mLに溶解し、反応容器（アルミシールバイアル：100 mL容）に移した。ナスフラスコをメタノール3 mL（1回目2 mL、2回目1 mL）で洗い、洗液を合わせた。反応容器を氷冷しながら、50%水酸化ナトリウム溶液4 mLを加えた後、密栓した。これをオープンに入れ、120°Cで4時間加熱した。反応容器を室温程度まで放冷した後、氷冷し、開栓した。反応液を氷冷した水30 mLに全量滴下し、反応容器を水10 mLで洗い、洗液を合わせた。

(3) Oasis MAXミニカラム精製

Oasis MAXミニカラム（150 mg）にアセトニトリル2 mL及び水3 mLを順次注入し、各流出液は捨てた。(2) で得られた溶液を注入した後、水10 mLを注入し、流出液は捨てた。次いで、アセトニトリル/水（7：3）4 mLを注入し、溶出液にアセトニトリル/水（7：3）を加えて正確に10 mLとしたものを試験

溶液とした。なお、(2) で得られた溶液に浮遊物がある場合は流速が遅くなることがあるため、まず溶液を注入し、次いで浮遊物を洗浄操作で用いる水 (5 mL程度) に懸濁してミニカラムに注入した。また、負荷・洗浄操作は適宜、吸引して行った。

8. マトリックス添加標準溶液の調製

ブランク試験溶液の溶媒を除去後、アセトニトリル/水 (7:3) に再溶解した溶液を LC-MS/MS で測定したところ、溶媒除去前のブランク試験溶液と比較して、夾雑成分の保持時間やピーク形状に変化が見られた。溶媒を除去してから再溶解すると夾雑成分が変化する可能性が示唆されたことから、マトリックス添加標準溶液は、ブランク試験溶液の溶媒を除去せずに、以下のように調製した。ブランク試料を『7. 試験溶液の調製』に従って Oasis MAX ミニカラム精製まで行い、得られた溶出液に EMA 及び HEMA の混合標準溶液 (アセトニトリル/水 (7:3)) 0.1 mL を加えた後、アセトニトリル/水 (7:3) を加えて正確に 10 mL とした。なお、添加した混合標準溶液の濃度は、添加回収試験における回収率 100%相当濃度となるように、定量限界濃度では 0.1 µg/mL、基準値濃度では大豆 10 µg/mL、とうもろこし 0.5 µg/mL とした。

[分析法フローチャート]

秤取

- ↓ 大豆の場合：試料 10.0 g を量り採る
- とうもろこし（未成熟）の場合：試料 20.0 g を量り採る
- ↓ 大豆の場合：水 20 mL を加え、30 分間放置

抽出

- ↓ メタノール 100 mL を加え、ホモジナイズ
- ↓ 吸引ろ過
- ↓ 残留物にメタノール 50 mL を加え、ホモジナイズ
- ↓ 吸引ろ過

定容

- ↓ ろ液を合わせ、メタノールで 200 mL に定容（抽出液）
- ↓ 大豆の場合：抽出液 20 mL（試料 1 g 相当）を分取
- とうもろこしの場合：抽出液 10 mL（試料 1 g 相当）を分取
- ↓ 溶媒を除去

EMA 及び HEMA への変換

- ↓ 残留物をメタノール 4 mL に溶解し、反応容器に移す
- ↓ 反応容器を氷冷しながら 50%水酸化ナトリウム溶液 4 mL を加える
- ↓ 密栓して 120°C で 4 時間加熱
- ↓ 反応容器を室温まで放冷後、氷冷
- ↓ 反応液を氷冷した水 30 mL に全量滴下
- ↓ 反応容器を水 10 mL で洗い、洗液を合わせる

Oasis MAX ミニカラム精製

- ↓ アセトニトリル 2 mL 及び水 3 mL でコンディショニング
- ↓ 負荷
- ↓ 水 10 mL で洗浄
- ↓ アセトニトリル/水（7：3）4 mL で溶出
- ↓ アセトニトリル/水（7：3）で 10 mL に定容

LC-MS/MS 測定

スキーム 1. 確立した試験溶液の調製方法

[結果及び考察]

1. 測定条件の検討

(1) MS 条件

①EMA

ESI (+) 及びESI (-) モードでスキャン測定を行ったところ、ESI (-) モードでは脱プロトン分子等のEMA由来のイオンは検出されなかった。一方、ESI (+) モードではプロトン付加分子 (m/z 136.0、 $[M+H]^+$) が強く観測された (図2)。これをプリカーサーイオンとしてプロダクトイオンスキャンを行ったところ、プロダクトイオンとして m/z 119.0、117.0、91.0及び77.0等が観測された (図3)。後述するLC条件で測定を行い、ピークのS/Nが高かった順に m/z 136.0→119.0を定量イオン、 m/z 136.0→117.0を定性イオンとすることとした。

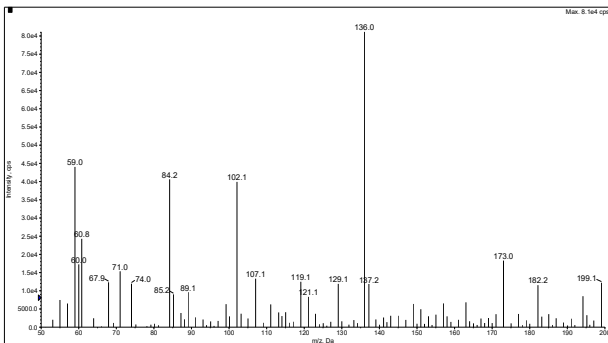


図2 EMAのマススペクトル

スキャン範囲： m/z 50~200、測定条件：ESI (+)、デクラスタリング電位 101 V

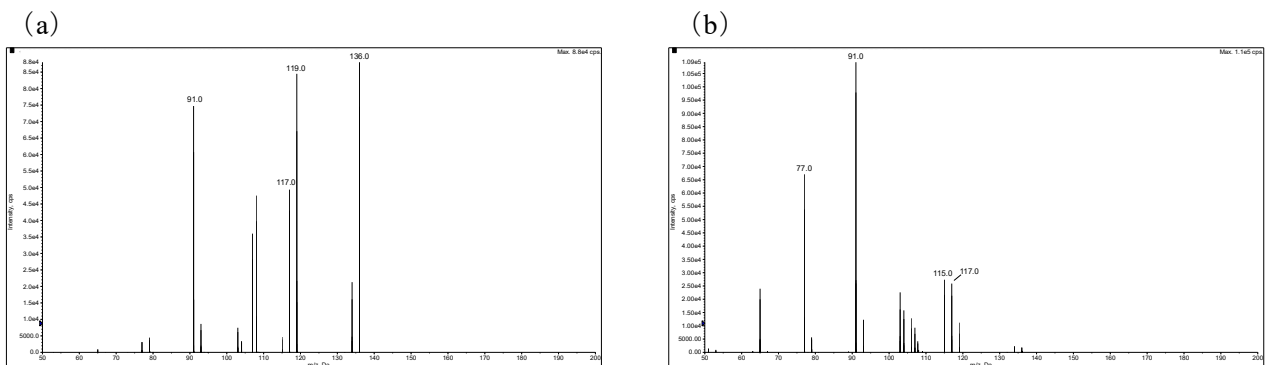


図3 EMAのプロダクトイオンスペクトル

プリカーサーイオン： m/z 136.0、スキャン範囲： m/z 50~200、測定条件：ESI (+)、デクラスタリング電位101 V
コリジョンエネルギー：(a) 21 eV、(b) 33 eV

②HEMA

ESI (+) 及びESI (-) モードでスキャン測定を行ったところ、ESI (-) モードでは脱プロトン分子等のHEMA由来のイオンは検出されなかった。一方、ESI (+) モードではプロトン付加分子 (m/z 152.0、 $[M+H]^+$) 及びフラグメントイオン (m/z 134.0) が強く観測された (図4)。プロトン付加分子 (m/z 152.0) をプリカーサーイオンとしてプロダクトイオンスキャンを行ったところ、プロダクトイオンとして m/z 134.0、119.0、118.0、115.0及び91.0等が観測された (図5)。一方、フラグメントイオン m/z 134.0をプリカーサーイオンとしてプロダクトイオンスキャンを行ったところ、プロダクトイオンとして m/z 119.0、118.0、115.0及び91.0等が観測された (図6)。後述するLC条件で測定を行いピークのS/Nを比較したところ、プロトン付加分子をプリカーサーイオンとした場合は m/z 152.0→119.0及び m/z 152.0→91.0、フラグ

メントイオンをプリカーサーイオンとした場合は m/z 134.0 \rightarrow 115.0及び m/z 134.0 \rightarrow 119.0で高いS/Nが得られた。また、フラグメントイオン (m/z 134.0) をプリカーサーイオンとして用いた場合の方が、プロトン付加分子を用いた場合よりも高感度に測定することができた (図11)。これらの結果から、 m/z 152.0 \rightarrow 119.0を定量イオン、 m/z 152.0 \rightarrow 91.0を定性イオンとして用いることとしたが、本報告書には参考として m/z 134.0 \rightarrow 115.0を定量イオンとした場合の結果も記載した。

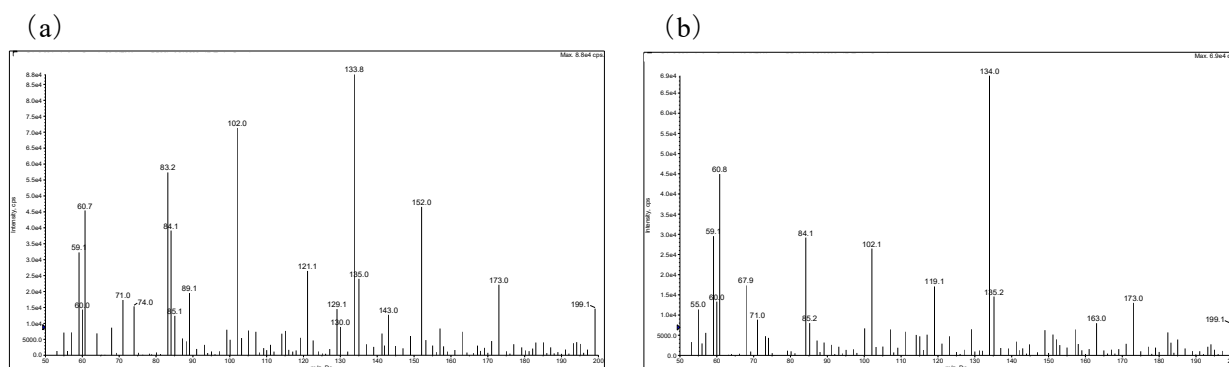


図4 HEMAのマススペクトル

スキャン範囲： m/z 50~200、測定条件：ESI (+)、デクラスタリング電位：(a) 36 V、(b) 121 V

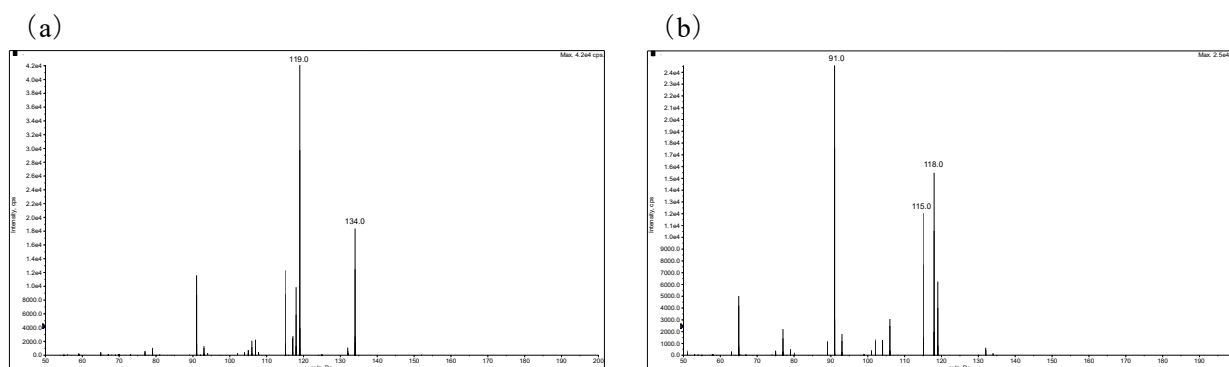


図5 HEMAのプロダクトイオンスペクトル

プリカーサーイオン： m/z 152.0、スキャン範囲： m/z 50~200、測定条件：ESI (+)、デクラスタリング電位36 V
コリジョンエネルギー：(a) 31 eV、(b) 45 eV

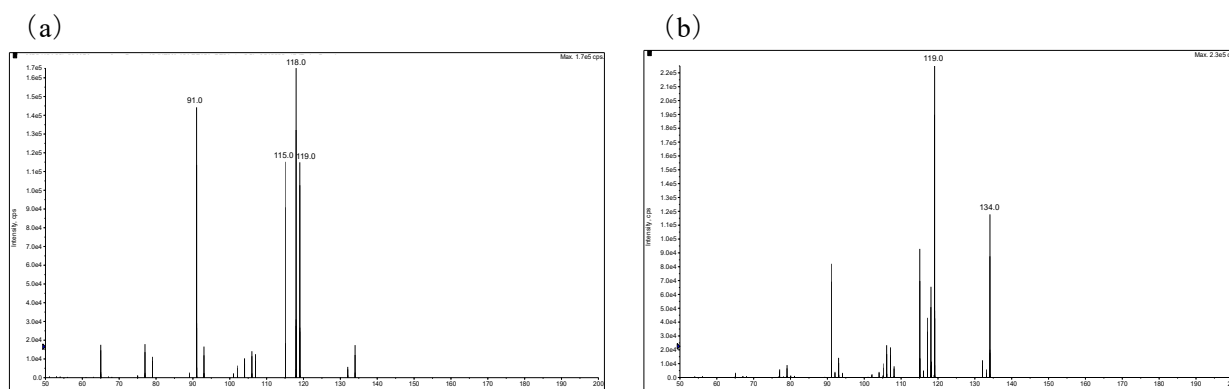


図6 HEMAのプロダクトイオンスペクトル

プリカーサーイオン： m/z 134.0、スキャン範囲： m/z 50~200、測定条件：ESI (+)、デクラスタリング電位121 V
コリジョンエネルギー：(a) 31 eV、(b) 25 eV

本試験法ではアセトクロール及びその代謝物をEMA及びHEMAへ変換して測定を行うため、アセトクロールやHPMを測定する必要はないが、抽出操作での回収率を確認するため、測定条件を検討した。

③アセトクロール

ESI (+) 及びESI (-) モードでスキャン測定を行ったところ、ESI (-) モードでは脱プロトン分子等のアセトクロール由来のイオンは検出されなかった。一方、ESI (+) モードではプロトン付加分子 (m/z 270.0、 $[M+H]^+$) 及びその同位体イオン (m/z 272.0、 $[M+H]^+$) 等が観測された (図7)。 m/z 270.0をプリカーサーイオンとしてプロダクトイオンスキャンを行ったところ、プロダクトイオンとして m/z 224.0及び148.0等が観測された (図8)。後述するLC条件で測定を行い、ピークのS/Nが高かった m/z 270.0→224.0を定量イオン、 m/z 270.0→148.0を定性イオンとすることとした。

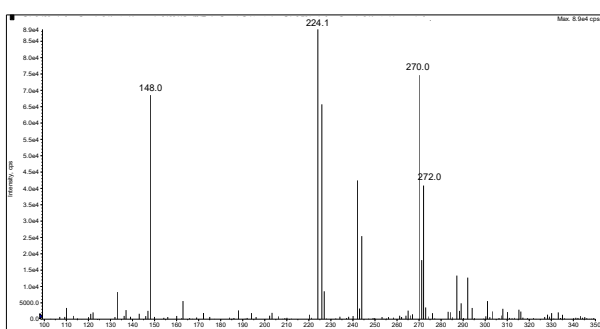


図7 アセトクロールのマススペクトル

スキャン範囲： m/z 100～350、測定条件：ESI (+)、デクラスタリング電位 70 V

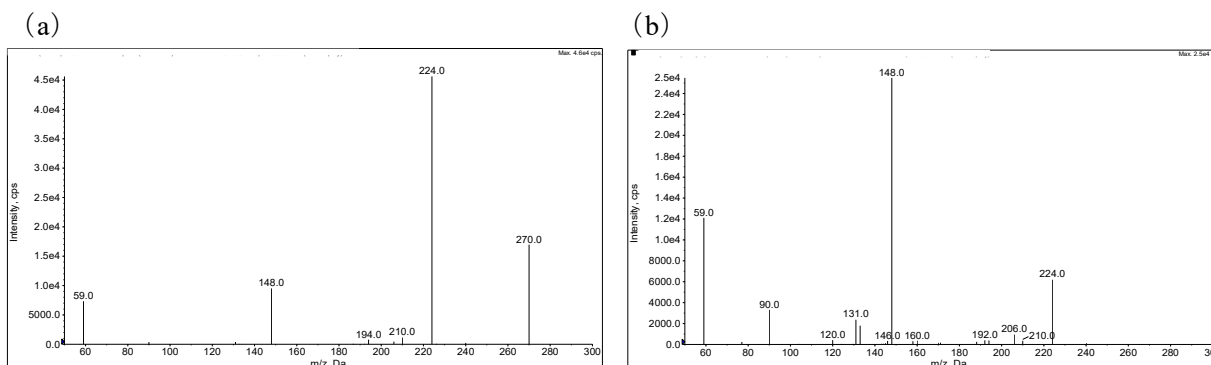


図8 アセトクロールのプロダクトイオンスペクトル

プリカーサーイオン： m/z 270.0、スキャン範囲： m/z 50～300、測定条件：ESI (+)、デクラスタリング：電位70 V、コリジョンエネルギー：(a) 15 eV、(b) 25 eV

④HPM

ESI (+) 及びESI (-) モードでスキャン測定を行ったところ、ESI (+) モードではプロトン付加分子等のHPM由来のイオンは検出されなかった。一方、ESI (-) モードでは脱プロトン分子 (m/z 280.0、 $[M-H]^-$) が強く観測された (図9)。これをプリカーサーイオンとしてプロダクトイオンスキャンを行ったところ、プロダクトイオンとして m/z 162.0及び120.0等が観測された (図10)。後述するLC条件で測定を行い、ピークのS/Nが高かった m/z 280.0→162.0を定量イオン、 m/z 280.0→120.0を定性イオンとすることとした。

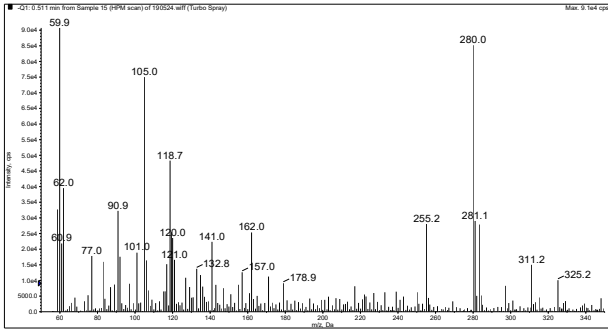


図9 HPMのマススペクトル

スキャン範囲： m/z 50～350、測定条件：ESI（-）、デクラスタリング電位：-25 V

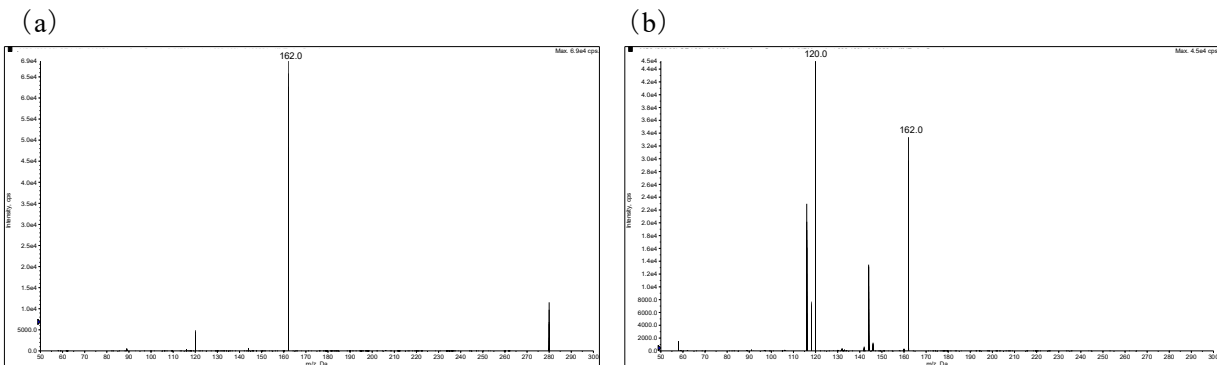


図10 HPMのプロダクトイオンスペクトル

プリカーサーイオン： m/z 280.0、スキャン範囲： m/z 50～300、測定条件：ESI（-）、
デクラスタリング電位：-25 V、コリジョンエネルギー：（a）-15 eV、（b）-30 eV

(2) LC条件

ODS カラム（InertSustain C18、ジールサイエンス製）を用いて EMA 及び HEMA の移動相条件を検討した。移動相の有機溶媒としてメタノール及びアセトニトリルを比較したところ、両化合物ともアセトニトリルを用いた方が高いピーク強度が得られたため、アセトニトリルを用いることとした。移動相の添加剤（酢酸、ギ酸及び酢酸アンモニウム）を検討したところ、両化合物とも酢酸またはギ酸を加えた場合に高いピーク強度が得られた。そこで、添加する酢酸またはギ酸の濃度（0.01、0.02、0.05、0.1 vol%）を検討した。その結果、ピーク形状に大きな違いは見られなかったが、両化合物とも 0.01 vol% ギ酸を用いた場合に最も高いピーク強度が得られた。このため、移動相には 0.01 vol% ギ酸及び 0.01 vol% ギ酸・アセトニトリル溶液を用いることとした。

次に、9 種類の ODS カラム [InertSustain C18、Inertsil ODS-4（ジールサイエンス製）、Symmetry C18（Waters 製）、XSelect HSS C18（Waters 製）、XSelect HSS C18 SB（Waters 製）、XSelect HSS T3（Waters 製）、L-column3 ODS（化学物質評価研究機構製）、TSKgel ODS-100V（東ソー製）及び TSKgel ODS-100Z（東ソー製）] を用いてピーク形状やピーク強度を比較した。その結果、ピーク形状に大きな違いは見られなかったが、両化合物とも InertSustain C18 を用いた場合に最も高いピーク強度が得られた。このため、InertSustain C18 を用いて測定を行うこととした。

以上の結果から、分析カラムとして InertSustain C18、移動相として 0.01 vol% ギ酸及び 0.01 vol% ギ酸・アセトニトリル溶液を用いて測定を行うこととした。本条件を用いて EMA 及び HEMA 標準溶液を測定したところ、良好なピーク形状が得られた（図 11）。また、検量線を作成したところ、両化合物とも良好な直線性が得られた（図 12 及び 13）。

(a) EMA (m/z 136.0→119.0) (b) HEMA (m/z 152.0→119.0) (c) HEMA (m/z 134.0→115.0)

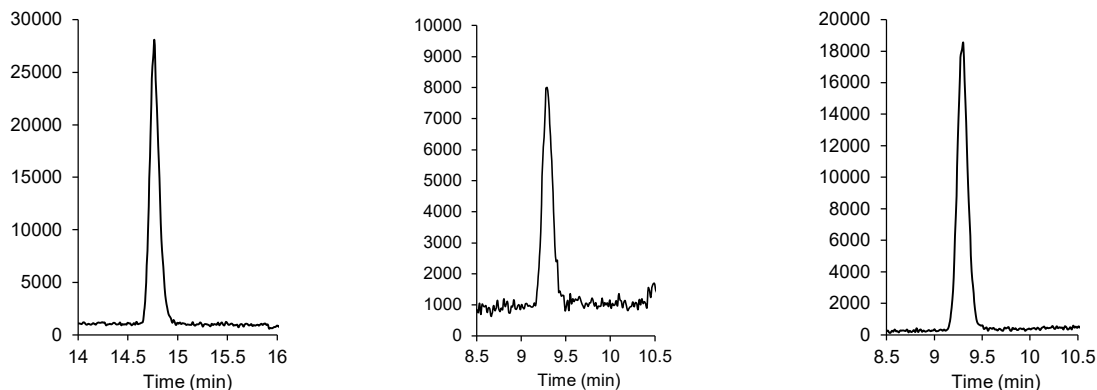
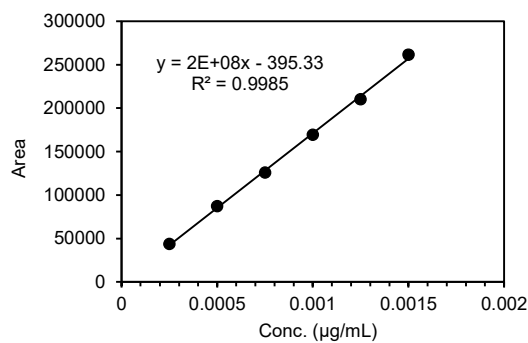
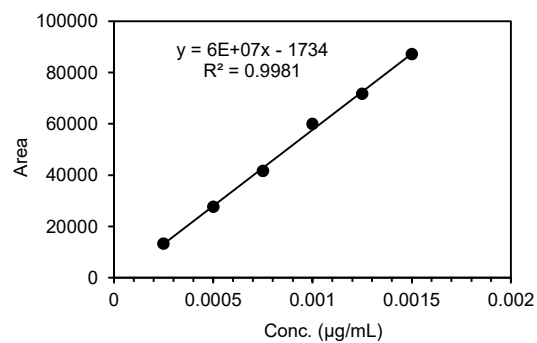


図 11 EMA 及び HEMA 標準溶液 (アセトクロールとして 0.001 $\mu\text{g/mL}$) のクロマトグラム

(a) EMA (m/z 136.0→119.0)



(b) HEMA (m/z 152.0→119.0)



(c) HEMA (m/z 134.0→115.0)

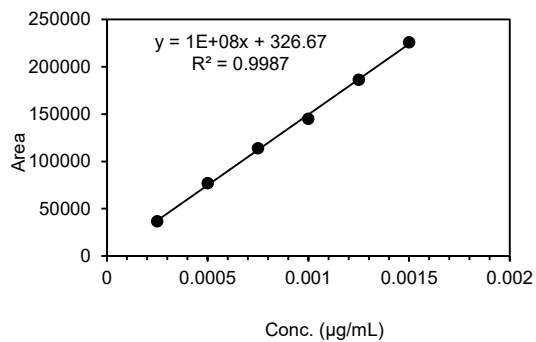


図 12 検量線の例 (アセトクロールとして 0.00025~0.0015 $\mu\text{g/mL}$)

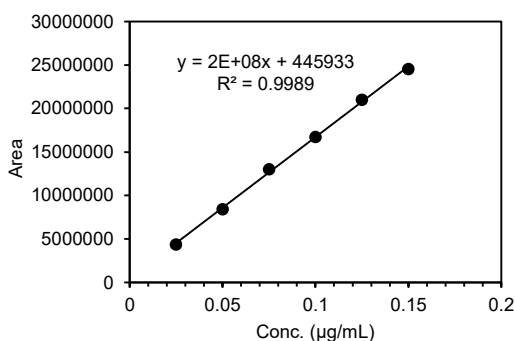
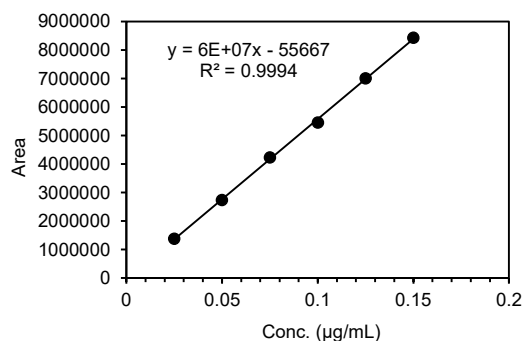
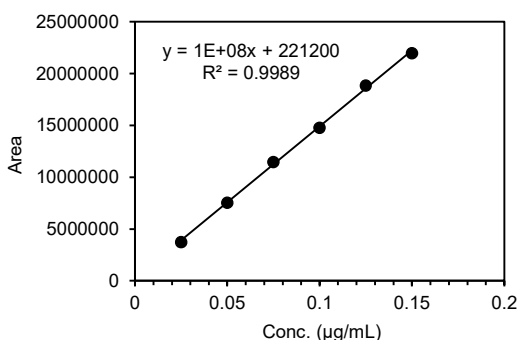
(a) EMA (m/z 136.0→119.0)(b) HEMA (m/z 152.0→119.0)(c) HEMA (m/z 134.0→115.0)

図 13 検量線の例 (アセトクロールとして 0.025~0.15 µg/mL)

アセトクロール及び HPM のクロマトグラムを図 14 に示した。EMA 及び HEMA の測定と同様に、分析カラムは InertSustain C18、移動相は 0.01 vol%ギ酸及び 0.01 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液を用いた。グラジエント条件は『4. 測定条件』に示した条件で行った。その結果、アセトクロールは良好なピーク形状が得られた。一方、HPM は 2 本のピークが検出された。注入溶媒の組成や移動相のギ酸濃度、グラジエント条件を変えても 2 本のピークが検出された。これはベンゼン環に結合したヒドロキシエチル基に不斉中心が存在しているのに加え、ベンゼン環に結合した窒素にかさ高い置換基が結合しているため、回転異性体が生じていることが原因と推測される。すなわち、①アミド結合の回転が妨げられることによる *E*-及び *Z*-配座異性体及び②ベンゼン環と窒素の結合において軸不斉となることによるアトロプ異性体を生じている可能性が高いと考えられる²⁾ (図 15)。アセトクロールやその他の代謝物も①及び②の回転異性体が存在することが示唆されているが^{2,3)}、窒素に結合した置換基が比較的小さい化合物は回転しやすく、1 本のピークとして検出されるものと推測される。なお、HPM を用いて後述する変換反応を行ったところ、1 本のピーク (HEMA) として検出された。

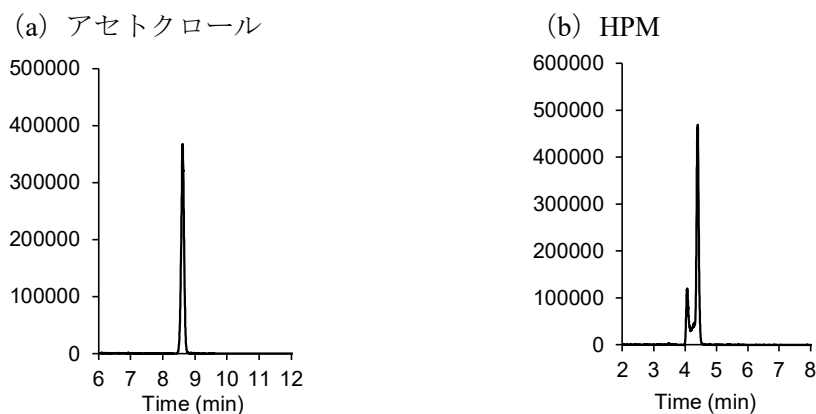


図 14 アセトクロール (0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 及び HPM (アセトクロールとして 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 標準溶液のクロマトグラム

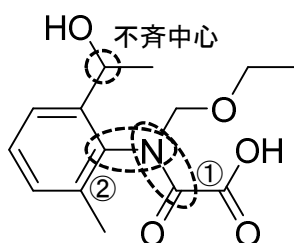


図 15 HPM の構造

①及び②の回転が妨げられることによって、それぞれ *E,Z*-配座異性体及びアトロプ異性体を生じている可能性が高い

2. 試験溶液の調製方法の検討

(1) 抽出

申請企業の分析法¹⁾では、(大豆においても水で膨潤せずに)メタノール/水(4:1)で抽出する方法を採用している。そこで、基準値が設定されている大豆及びとうもろこしを用いてメタノールでホモジナイズ抽出し、回収率に問題がないか確認した。大豆については試料を水で膨潤後、メタノールで抽出した。その結果、アセトクロール及び HPM のいずれも、良好な回収率が得られた(表 1)。これらの結果から、メタノールを用いて抽出を行うこととした。

表 1 抽出における回収率 (%)

	メタノール	
	大豆	とうもろこし
アセトクロール	101	99
HPM	99	98

アセトクロール、HPM : 各 10 μg

マトリックス添加標準溶液を用いて定量した。

(2) EMA 及び HEMA への変換

①標準品の反応

申請企業の分析法¹⁾を参考に変換反応を検討した。変換反応で生成する EMA や HEMA は揮発性が高いため、反応容器には、スクリーキャップ型バイアルと比べて気密性が高い、アルミシールバイアルを用いた。

まず、標準品を用いて反応液の組成 (①メタノール/50%水酸化ナトリウム溶液 (3:1)、②メタノール/50%水酸化ナトリウム溶液 (1:1)、③50%水酸化ナトリウム溶液) について検討を行った。アルミシールバイアル (100 mL 容) にアセトクロール及び HPM を採り、各反応液 (①~③) 8 mL を加え、密栓して 120°C で加熱した。反応後、スキーム 1 に従って水で希釈し、Oasis MAX ミニカラムで精製して LC-MS/MS で測定した。結果を図 16 及び図 17 に示した。①メタノール/50%水酸化ナトリウム溶液 (3:1) と②メタノール/50%水酸化ナトリウム溶液 (1:1) を比較したところ、HPM から HEMA への変換は、反応の速さに大きな差は認められなかった。一方、アセトクロールから EMA への変換は、②メタノール/50%水酸化ナトリウム溶液 (1:1) の方が顕著に反応の進行が速かった。③50%水酸化ナトリウム溶液ではアセトクロールから EMA、HPM から HEMA のいずれの変換も反応時間によらず低回収率となった。これらの結果から、②メタノール/50%水酸化ナトリウム溶液 (1:1) で反応を行うこととした。

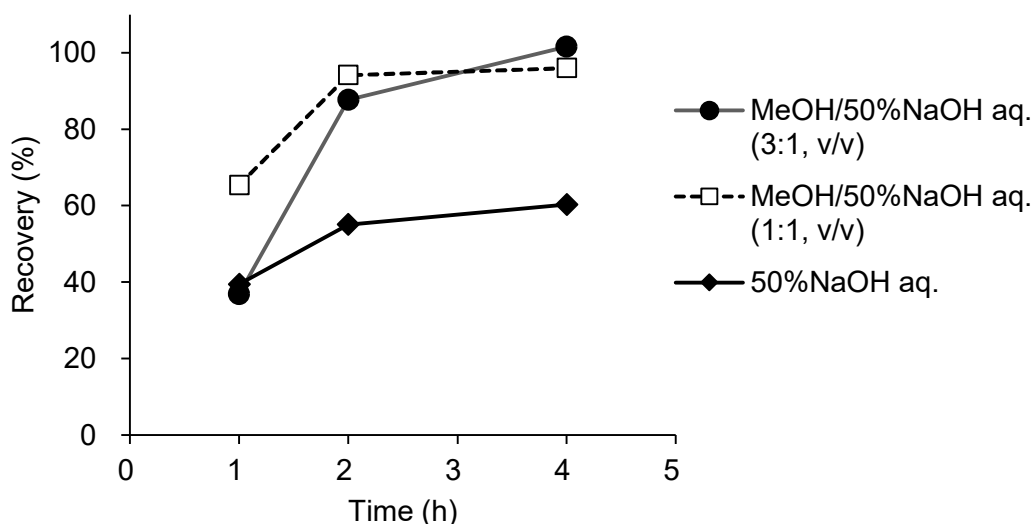


図 16 アセトクロールから EMA への変換反応における回収率

添加量：アセトクロール 0.05 μg

反応温度：120°C

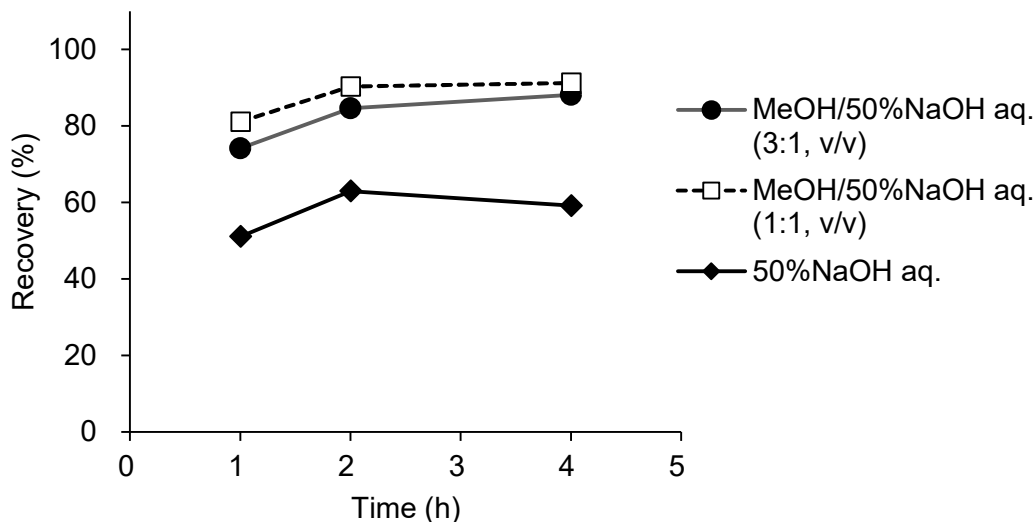


図 17 HPM から HEMA への変換反応における回収率

添加量：HPM (アセトクロールとして) 0.05 μg

反応温度：120°C

次に反応温度 (100、110、120°C) について検討した。アルミシールバイアル (100 mL 容) にアセトクロール及び HPM を採り、メタノール/50%水酸化ナトリウム溶液 (1 : 1) 8 mL を加え、密栓して加熱した。反応後、スキーム 1 に従って水で希釈し、Oasis MAX ミニカラムで精製して LC-MS/MS で測定した。結果を図 18 及び図 19 に示した。反応温度を高くすることにより、アセトクロールから EMA、HPM から HEMA のいずれの変換も反応の進行が速くなり、120°C では反応 2 時間で両化合物とも 90% 以上の回収率が得られた。なお、130°C 以上で加熱すると、反応容器内の圧力が高くなり、アルミシールが割れる場合があるため、120°C で行うこととした。

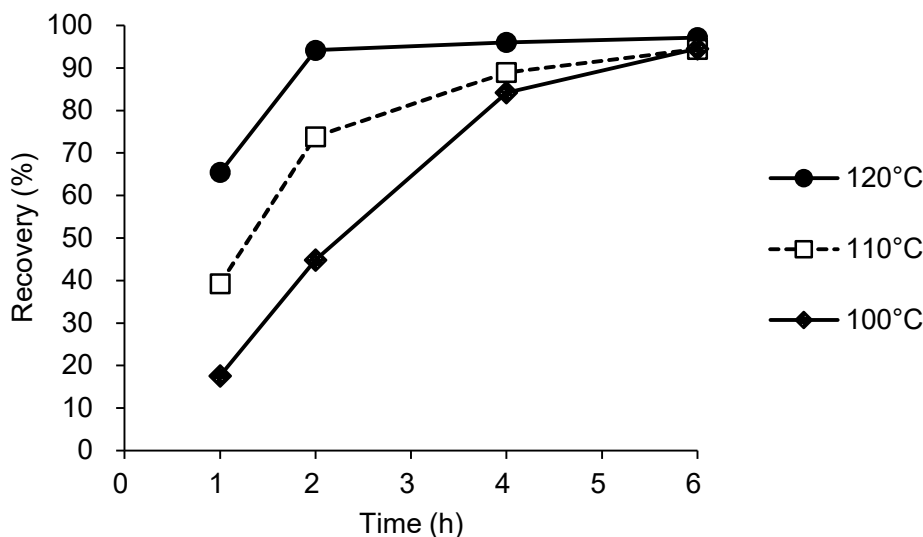


図 18 アセトクロールから EMA への変換反応における反応温度の影響

添加量：アセトクロール 0.05 μg

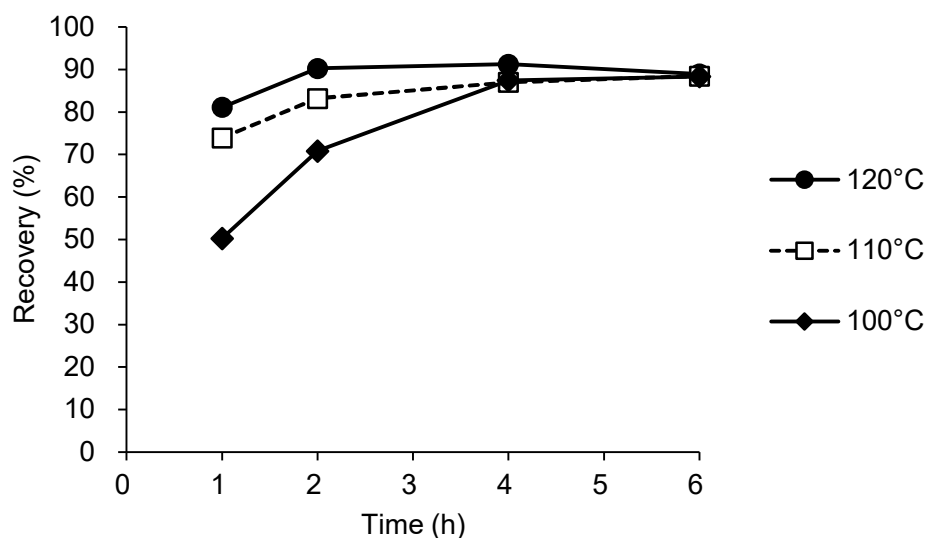


図 19 HPM から HEMA への変換反応における反応温度の影響
 添加量：HPM (アセトクロールとして) 0.05 μg

②マトリックス共存下での反応

まず、①で最適化した条件（反応液の組成：メタノール/50%水酸化ナトリウム溶液（1：1）、反応温度：120°C）で、マトリックス共存下、EMA 及び HEMA が安定であるか検討を行った。とうもろこしをスキーム 1 に従って抽出後、溶媒を除去し、残留物をメタノール（4 mL）に溶解してアルミシールバイアルに移した。これに EMA 及び HEMA（アセトクロールとして各 0.05 μg ）を添加し、50%水酸化ナトリウム溶液（4 mL）を加え、密栓して 120°C で加熱した。得られた溶液をスキーム 1 に従って精製し、LC-MS/MS で定量した。その結果、両化合物とも反応 4 時間までは安定であった（図 20）。

次に、マトリックス共存下においても、①で最適化した条件でアセトクロールから EMA、及び HPM から HEMA へ変換するか検討を行った。とうもろこしをスキーム 1 に従って抽出後、溶媒を除去し、残留物をメタノール（4 mL）に溶解してアルミシールバイアルに移した。これにアセトクロール及び HPM（アセトクロールとして各 0.05 μg ）を添加し、50%水酸化ナトリウム溶液（4 mL）を加え、密栓して 120°C で加熱した。得られた溶液をスキーム 1 に従って精製し、LC-MS/MS で定量した。その結果、アセトクロールから EMA への変換は 3 時間以上、HPM から HEMA への変換は 2 時間以上加熱することで 90% 以上の回収率が得られた（図 21）。これらの結果から、反応時間は 4 時間とすることとした。

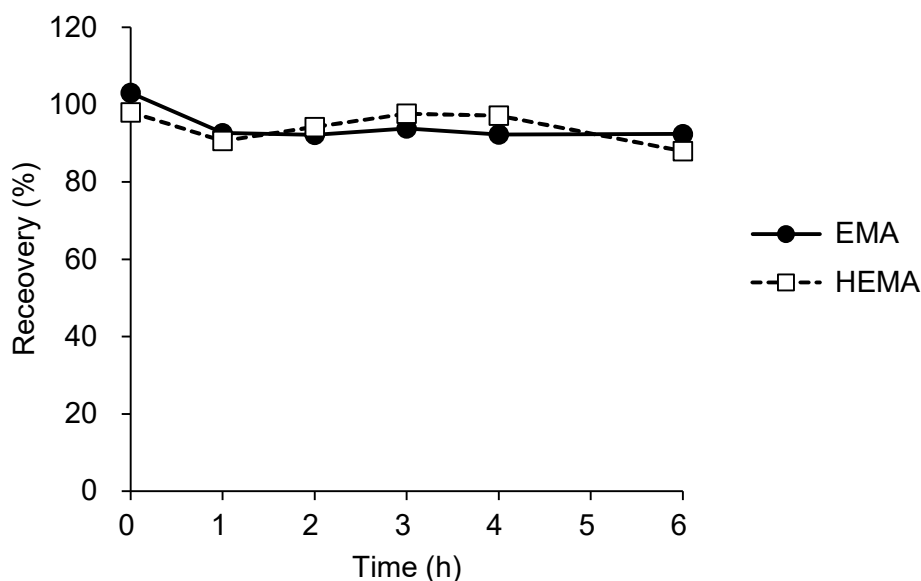


図20 マトリックス（とうもろこし）共存下での反応におけるEMA及びHEMAの安定性

添加量：EMA 及び HEMA（アセトクロールとして）各 0.05 μg

反応温度：120°C

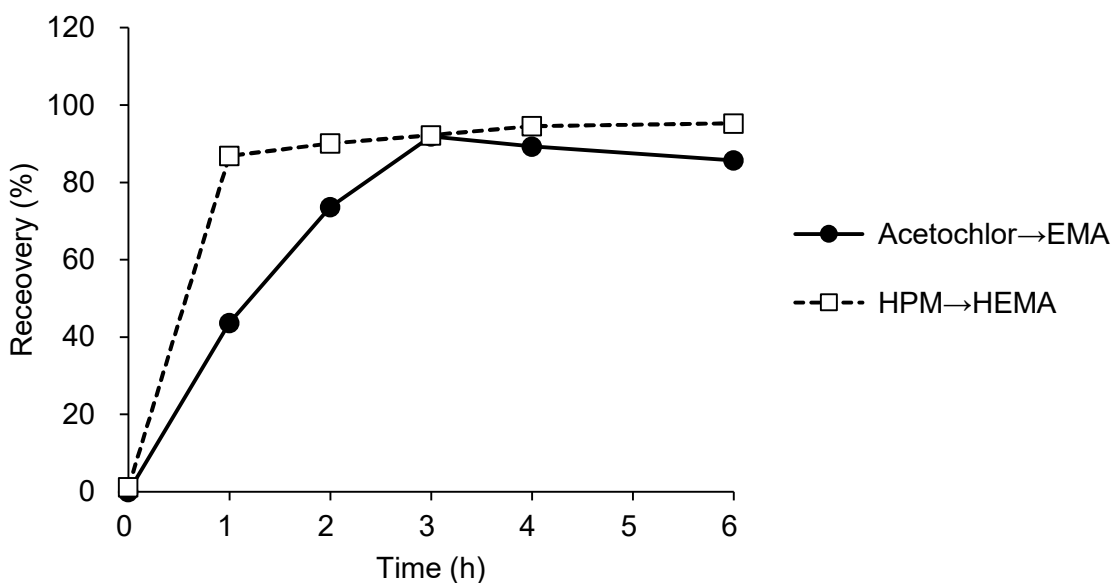


図21 マトリックス（とうもろこし）共存下でのアセトクロールからEMA及びHPMからHEMAへの変換反応におけるEMA及びHEMAの回収率

添加量：アセトクロール及び HPM（アセトクロールとして）各 0.05 μg

反応温度：120°C

(3) ミニカラム精製

申請企業の分析法¹⁾では、反応後の溶液に50%ギ酸を加えて酸性にする方法を採用している。しかし、反応液は高濃度の水酸化ナトリウムを含むため、反応液に酸を添加すると激しく発熱し、危険を伴う。加えて、EMAは蒸気圧が高く（0.0741 Torr* \approx 9.88 Pa、計算値）、溶液の温度が上昇すると揮散するおそれがある。そこで本検討では、反応液（メタノール/50%水酸化ナトリウム溶液（1：1）8 mL）を水（40 mL）

で希釈し、得られた溶液をミニカラムに負荷する方法を採用することとした。EMAは濃縮操作の際に揮散しやすく、濃縮前にキーパーとしてジエチレングリコールを添加しても回収率が低下するため(表2)、エバポレーター等による濃縮操作は行わず、ミニカラムからの溶出液を定容後、そのままLC-MS/MSで測定する方法を検討した。検討にはOasis HLB (Waters製、500 mg)、Oasis MAX (Waters製、500 mg)、InertSep PLS-2 (ジーエルサイエンス製、500 mg)、InertSep RP-1 (ジーエルサイエンス製、500 mg) 及び InertSep RP-C18 (ジーエルサイエンス製、500 mg) を用いた。その結果、いずれのミニカラムを用いた場合も、EMA、HEMAともに96%以上の良好な回収率が得られた(表3-1、3-2)。精製効果を比較するため、とうもろこしの反応後の溶液を各ミニカラムで精製した。その結果、Oasis MAXでは無色の溶出液が得られたのに対し、その他のミニカラムでは薄い黄色であった。また、試料マトリックスの測定への影響はOasis MAXを用いた場合が最も小さかった(表4)。これらの結果から、最も精製効果が高かったOasis MAXを用いて精製することとした。Oasis MAXの充填量500 mgと150 mgを比較した結果、溶出液の色や試料マトリックスの測定への影響に大きな差は認められなかった。このため、充填量150 mgのミニカラムを用いて洗浄及び溶出操作での溶媒組成や溶媒量を種々検討した。その結果、水で希釈した反応液を負荷し、水10 mLで洗浄した後、アセトニトリル/水(7:3) 4 mLで溶出することとした(表5)。なお、反応液に水を加えると発熱するため、氷冷した水30 mLに反応液を滴下し、反応に用いた容器を水10 mLで洗って洗液を合わせ、得られた溶液をミニカラムに負荷することとした。

マトリックス共存下では、反応液を水で希釈すると浮遊物が生成する場合があった。ミニカラムに注入する際、初めにこの浮遊物を注入すると流速が遅くなる場合があったため、できるだけ浮遊物を採らないようにして、まず溶液を注入し、次いで浮遊物を洗浄操作で用いる水(5 mL程度)に懸濁してミニカラムに注入することとした。また、負荷・洗浄操作は適宜、吸引して行うこととした。なお、浮遊物は水での洗浄操作中に溶解し、アセトニトリル/水(7:3)での溶出の際、吸引は不要であった。

*SciFinder (Calculated using Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software V11.02)

表 2 濃縮操作での回収率 (%)

溶媒	ジエチレングリコール の添加 ^{a)}	EMA	HEMA
アセトン	-	31	78
	+	89	93
メタノール	-	43	88
	+	87	95
酢酸エチル	-	38	81
	+	84	95
アセトニトリル	-	45	46
	+	90	97

添加量：EMA、HEMA (アセトクロールとして) 各0.01 µg

a) -：溶媒(30 mL)に標準溶液を添加後、エバポレーターで濃縮、窒素乾固した

+：溶媒(30 mL)に標準溶液を添加後、2 vol%ジエチレングリコール・アセトン溶液(0.5 mL)を加え、エバポレーターで濃縮、窒素乾固した

表 3-1 EMA の各ミニカラムからの回収率 (%)

溶出液	Oasis HLB	Oasis MAX	InertSep PLS-2	InertSep RP-1	InertSep RP-C18
アセトニトリル/水 (1:9)	0	0	0	0	0
アセトニトリル/水 (3:7)	0	2	0	0	0
アセトニトリル/水 (1:1)	90	99	59	96	101
アセトニトリル/水 (7:3)	6	2	45	4	1
アセトニトリル/水 (9:1)	0	0	0	0	0
アセトニトリル	0	0	0	0	0
合計	96	103	104	100	102

添加量：EMA (アセトクロールとして) 0.1 µg

コンディショニング：アセトニトリル5 mL及び水10 mL

負荷液：メタノール/50%水酸化ナトリウム溶液 (1:1) 8 mLを水40 mLで希釈した溶液

操作手順：負荷液を注入し、水 10 mL で洗浄した後、アセトニトリル/水 (1:9)、アセトニトリル/水 (3:7)、アセトニトリル/水 (1:1)、アセトニトリル/水 (7:3)、アセトニトリル/水 (9:1) 及びアセトニトリル各 9 mL で順次溶出した。

表 3-2 HEMA の各ミニカラムからの回収率 (%)

溶出液	Oasis HLB	Oasis MAX	InertSep PLS-2	InertSep RP-1	InertSep RP-C18
アセトニトリル/水 (1:9)	0	0	0	0	49
アセトニトリル/水 (3:7)	98	97	102	101	52
アセトニトリル/水 (1:1)	1	1	0	0	0
アセトニトリル/水 (7:3)	0	0	0	0	0
アセトニトリル/水 (9:1)	0	0	0	0	0
アセトニトリル	0	0	0	0	0
合計	99	98	102	101	101

添加量：HEMA (アセトクロールとして) 0.1 µg

コンディショニング：アセトニトリル5 mL及び水10 mL

負荷液：メタノール/50%水酸化ナトリウム溶液 (1:1) 8 mLを水40 mLで希釈した溶液

操作手順：負荷液を注入し、水 10 mL で洗浄した後、アセトニトリル/水 (1:9)、アセトニトリル/水 (3:7)、アセトニトリル/水 (1:1)、アセトニトリル/水 (7:3)、アセトニトリル/水 (9:1) 及びアセトニトリル各 9 mL で順次溶出した。

表 4 試料マトリックスの影響*1

	EMA	HEMA
Oasis HLB	0.99	0.88
Oasis MAX	1.05	0.98
InertSep PLS-2	0.96	0.88
InertSep RP-1	0.91	0.83
InertSep RP-C18	0.99	0.90

*1 溶媒標準溶液に対するマトリックス添加標準溶液 (0.001 µg/mL、試料中濃度 0.01 ppm 相当) のピーク面積比
コンディショニング：アセトニトリル5 mL及び水10 mL

マトリックス添加標準溶液の調製：とうもろこしを用いて『7. 試験溶液の調製』の『(2) EMA及びHEMAへの変換』まで行った。
これを、予めアセトニトリル5 mL及び水10 mLでコンディショニングしたミニカラムに負荷し、水10 mLで洗浄後、アセトニトリル/水 (7 : 3) 9 mLで溶出した。得られた溶液にEMA及びHEMA混合標準溶液 (0.1 µg/mL、アセトニトリル/水 (7 : 3)) 100 µLを添加した後、アセトニトリル/水 (7 : 3) で10 mLに定容した。

表5 Oasis MAX (150 mg) ミニカラムからの回収率 (%)

	負荷液	水	アセトニトリル/水 (7 : 3)					合計
		10 mL	0-1 mL	1-2 mL	2-3 mL	3-4 mL	4-5 mL	
EMA	0	0	14	77	6	1	0	98
HEMA	0	0	33	65	3	0	0	101

添加量：EMA、HEMA (アセトクロールとして) 各0.05 µg

コンディショニング：アセトニトリル2 mL及び水3 mL

負荷液：メタノール/50%水酸化ナトリウム溶液 (1 : 1) 8 mLを水40 mLで希釈した溶液

3. 添加回収試験

基準値が設定されている大豆及びとうもろこし (未成熟) を用いて、実験方法の『7. 試験溶液の調製』に従い、アセトクロール及びHPMについて定量限界濃度 (0.01 ppm) 及び基準値濃度で5併行の添加回収試験を行った。添加回収試験におけるブランク試料、添加試料及び回収率100%相当の溶媒標準溶液の代表的なクロマトグラムを図22及び23に示した。また、各食品のブランク試料の代表的なトータルイオンカレントクロマトグラムを図25に示した。なお、アセトクロールを添加した場合にはEMAを、HPMを添加した場合にはHEMAをそれぞれ測定した。

(1) 選択性

いずれの食品においても定量を妨害するピークは検出されず、選択性は良好であった (表6)。参考として、HPMの添加回収試験において m/z 134.0→115.0を定量イオン (HEMA) として用いた結果を表7に示した。いずれの食品においても定量を妨害するピークは検出されず、選択性は良好であった。

表6 選択性の評価

分析対象化合物	食品名	定量限界 (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}	
				評価濃度 (ppm)	評価基準	面積又は高さの別	ブランク			マトリックス添加標準溶液 ^{*2}				面積 (高さ) 比 (a)/(b)
							n=1	n=2	平均 (a)	n=1	n=2	平均 (b)		
アセトクロール	大豆	0.01	1.	基準値 1.	< 0.100	面積	0	0	0	16870000	16550000	16710000	0.000	○
		0.01		定量限界 0.01	< 0.333	面積	0	0	0	165400	163500	164450	0.000	○
	とうもろこし	0.01	0.05	基準値 0.05	< 0.100	面積	0	0	0	887000	901100	894050	0.000	○
		0.01		定量限界 0.01	< 0.333	面積	0	0	0	162600	167800	165200	0.000	○
HPM	大豆	0.01	1.	基準値 1.	< 0.100	面積	0	0	0	5416000	5422000	5419000	0.000	○
		0.01		定量限界 0.01	< 0.333	面積	0	0	0	57340	55110	56225	0.000	○
	とうもろこし	0.01	0.05	基準値 0.05	< 0.100	面積	0	0	0	298600	293200	295900	0.000	○
		0.01		定量限界 0.01	< 0.333	面積	0	0	0	55930	56640	56285	0.000	○

*1 ブランク試料、標準溶液の順に注入して測定した結果から評価する。(必要に応じて起爆注入を行う。)

*2 試料中の濃度が「評価濃度」相当になるように、ブランク試料の試験溶液で調製した標準溶液 (マトリックス添加標準溶液) を用いる。ブランク試料に妨害ピークが観察されなかった場合には、標準溶液のピーク面積 (高さ) は求めなくても良い。

*3 面積 (高さ) 比が、妨害ピークの許容範囲の評価基準に適合する場合には「○」、適合しない場合には「×」を記載する。

(参考) 表7 選択性の評価 (定量イオン m/z 134.0→115.0)

分析対象化合物	食品名	定量限界 (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}	
				評価濃度 (ppm)	評価基準	面積又は 高さの別	ブランク			マトリックス添加標準溶液 ^{*2}			面積(高さ) 比(a)/(b)		
							n=1	n=2	平均(a)	n=1	n=2	平均(b)			
HPM	大豆	0.01	1	基準値	1.	< 0.100	面積	0	0	0	14630000	14470000	14550000	0.000	○
		0.01		定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	142000	143100	142550	0.000	○
	とうもろこし	0.01	0.05	基準値	0.05	< 0.100	面積	0	0	0	776600	758900	767750	0.000	○
		0.01		定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	143800	144100	143950	0.000	○

*1 ブランク試料、標準溶液の順に注入して測定した結果から評価する。(必要に応じて起爆注入を行う。)

*2 試料中の濃度が「評価濃度」相当になるように、ブランク試料の試験溶液で調製した標準溶液(マトリックス添加標準溶液)を用いる。
ブランク試料に妨害ピークが観察されなかった場合には、標準溶液のピーク面積(高さ)は求めなくても良い。

*3 面積(高さ)比が、妨害ピークの許容範囲の評価基準に適合する場合には「○」、適合しない場合には「×」を記載する。

(2) 真度及び併行精度

定量限界濃度及び基準値濃度での添加回収試験における真度及び併行精度を表8に示した。アセトクロールは真度82~84%、併行精度1~2%、HPMは真度84~93%、併行精度2~4%の良好な結果が得られ、妥当性評価ガイドラインの真度及び併行精度の目標値を満たした。定量限界濃度(0.01 ppm)の添加試料から得られたピークのS/N(平均値)はアセトクロールで96~106、HPMで17~19となり、S/N \geq 10が得られた(表9)。

参考として、HPMの添加回収試験においてm/z 134.0→115.0を定量イオン(HEMA)として用いた場合の真度及び併行精度の結果を表10、定量限界濃度の添加試料から得られたピークのS/Nを表11、代表的なクロマトグラムを図24に示した。m/z 134.0→115.0を定量イオンとして用いた場合も、真度86~92%、併行精度1~3%の良好な結果が得られた。また、定量限界濃度(0.01 ppm)の添加試料から得られたピークのS/N(平均値)は105~111であった。これらの結果から、定量限界濃度での測定において感度が不足する場合はm/z 134.0→115.0を定量イオンとして用いることが可能であると考えられた。

表8 真度及び併行精度

分析対象化合物	食品名	定量限界 (mg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	検量線			回収率(%)					真度 (%)	併行精度 (RSD%)
					傾き	切片	r ² 値	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5		
アセトクロール	大豆	0.01	1	1	162570286	445933	0.9989	81	81	81	85	81	82	2
		0.01		0.01	171522286	-395	0.9985	84	84	82	81	85	83	2
	とうもろこし	0.01	0.05	0.05	182002286	17040	0.9981	83	86	83	84	84	84	1
		0.01		0.01	170774857	4815	0.9972	82	80	81	81	84	82	2
HPM	大豆	0.01	1	1.	56291429	-55667	0.9994	86	81	87	84	84	84	3
		0.01		0.01	64364000	-4195	0.9965	92	93	88	87	86	89	4
	とうもろこし	0.01	0.05	0.05	59400000	7647	0.9996	95	95	93	90	91	93	2
		0.01		0.01	59404571	-1734	0.9981	86	88	92	85	88	88	3

表9 定量限界濃度の添加試料から得られたピークのS/N

分析対象化合物	食品名	定量限界 (mg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	S/N		
					Max.	Min.	平均値
アセトクロール	大豆	0.01	1	0.01	102	90	96
	とうもろこし	0.01	0.05	0.01	111	102	106
HPM	大豆	0.01	1	0.01	22	16	19
	とうもろこし	0.01	0.05	0.01	13	20	17

*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

(参考) 表10 真度及び併行精度 (定量イオンm/z 134.0→115.0)

分析対象化合物	食品名	定量限界 (mg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	検量線			回収率 (%)					真度 (%)	併行精度 (RSD%)
					傾き	切片	r ² 値	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5		
HPM	大豆	0.01	1	1	146603429	221200	0.9989	86	83	88	86	84	86	2
		0.01		0.01	144929143	1859	0.9964	91	87	89	85	88	88	3
	とうもろこし	0.01	0.05	0.05	155654857	10993	0.9995	93	94	91	90	91	92	2
		0.01		0.01	149160000	327	0.9987	91	89	90	92	91	91	1

(参考) 表11 定量限界濃度の添加試料から得られたピークのS/N (定量イオンm/z 134.0→115.0)

分析対象化合物	食品名	定量限界 (mg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	S/N		
					Max.	Min.	平均値
HPM	大豆	0.01	1	0.01	112	111	111
	とうもろこし	0.01	0.05	0.01	113	97	105

*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

(3) 試料マトリックスの測定への影響

定量限界濃度及び基準値濃度での試料マトリックスの測定への影響を表 12 に示した。添加回収試験における回収率 100%相当の溶媒標準溶液に対するマトリックス添加標準溶液のピーク面積比を求めた結果、EMA は 0.94~0.99、HEMA は 0.95~1.01 となり、本試験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であると考えられた。

参考として、HPM の添加回収試験において m/z 134.0→115.0 を定量イオン (HEMA) として用いた場合の結果を表 13 に示した。ピーク面積比は 0.97~1.00 となり、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できた。

表12 試料マトリックスの測定への影響

分析対象化合物	食品名	定量限界 (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	ピーク面積(高さ) ²						
								マトリックス添加標準溶液 ⁴			溶媒標準溶液			ピーク面積 (高さ)比 ⁵
								n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均	
アセトクロール ⁶	大豆	0.01	1	1	0.1	面積	0	16870000	16550000	16710000	16810000	16990000	16900000	0.99
		0.01		0.01	0.001	面積	0	165400	163500	164450	170300	172000	171150	0.96
	とうもろこし	0.01	0.05	0.05	0.005	面積	0	887000	901100	894050	923200	925100	924150	0.97
		0.01		0.01	0.001	面積	0	162600	167800	165200	172200	177700	174950	0.94
HPM ⁷	大豆	0.01	0.1	1.	0.1	面積	0	5416000	5422000	5419000	5293000	5425000	5359000	1.01
		0.01		0.01	0.001	面積	0	57340	55110	56225	54310	56890	55600	1.01
	とうもろこし	0.01	0.1	0.05	0.005	面積	0	298600	293200	295900	302300	300500	301400	0.98
		0.01		0.01	0.001	面積	0	55930	56640	56285	59140	59620	59380	0.95

¹ 添加回収試験における回収率100%相当濃度になるように、ブランク試料の試験溶液で調製した標準溶液(マトリックス添加標準溶液)及び溶媒で調製した標準溶液(溶媒標準溶液)を作成する。

² マトリックス添加標準溶液及び溶媒標準溶液の順に交互に2回以上測定した結果から評価する。(必要に応じて起爆注入を行う。)

³ ブランクにピークが認められた場合には、マトリックス添加標準溶液の値はブランク値を差し引いた値を用いる。

⁴ マトリックス添加標準溶液は試験当日のブランク試料の試験溶液を用いて調製する。

⁵ マトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積(又は高さ)の比を求める。

⁶ EMAのマトリックス添加標準溶液及び溶媒標準溶液を用いた。

⁷ HEMAのマトリックス添加標準溶液及び溶媒標準溶液を用いた。

(参考) 表13 試料マトリックスの測定への影響 (定量イオンm/z 134.0→115.0)

分析対象化合物	食品名	定量限界 (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	ピーク面積(高さ) ²						
								マトリックス添加標準溶液 ⁴			溶媒標準溶液			ピーク面積 (高さ)比 ⁵
								n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均	
HPM ⁶	大豆	0.01	1	1	0.1	面積	0	14630000	14470000	14550000	14760000	14430000	14595000	1.00
		0.01		0.01	0.001	面積	0	142000	143100	142550	144400	142200	143300	0.99
	とうもろこし	0.01	0.05	0.05	0.005	面積	0	776600	758900	767750	776000	804300	790150	0.97
		0.01		0.01	0.001	面積	0	143800	144100	143950	145500	149600	147550	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)及び溶媒で調製した標準溶液(溶媒標準溶液)を作成する。

² マトリックス添加標準溶液及び溶媒標準溶液の順に交互に2回以上測定した結果から評価する。(必要に応じて起爆注入を行う。)

³ ブランクにピークが認められた場合には、マトリックス添加標準溶液の値はブランク値を差し引いた値を用いる。

⁴ マトリックス添加標準溶液は試験当日のブランク試料の試験溶液を用いて調製する。

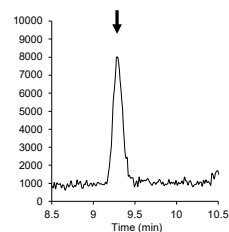
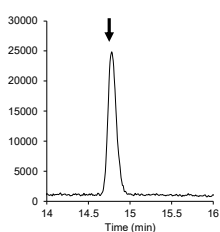
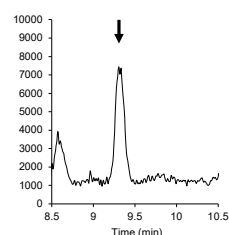
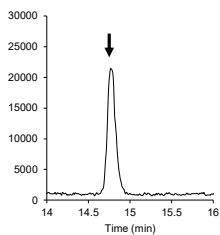
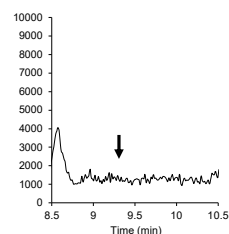
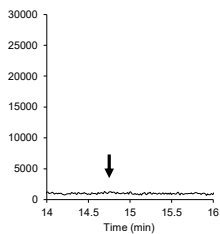
⁵ マトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積(又は高さ)の比を求める。

⁶ HEMAのマトリックス添加標準溶液及び溶媒標準溶液を用いた。

①大豆

(a) アセトクロール

(b) HPM



②とうもろこし

(a) アセトクロール

(b) HPM

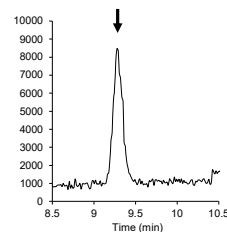
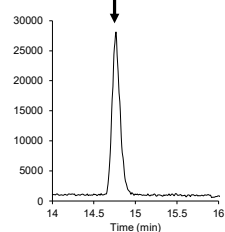
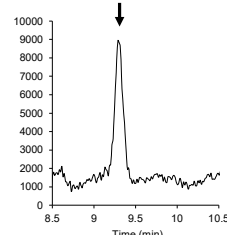
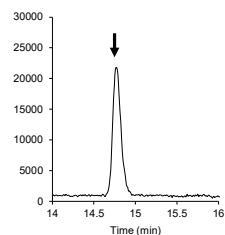
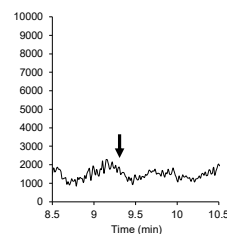
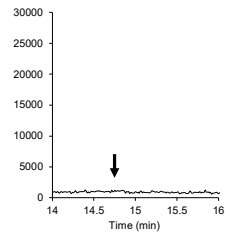
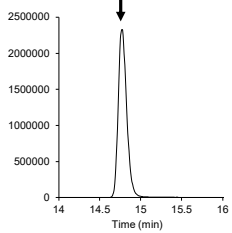
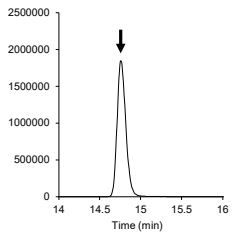
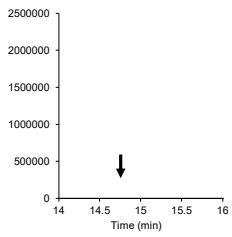


図 22 定量限界濃度 (0.01 ppm) での添加回収試験における代表的なクロマトグラム

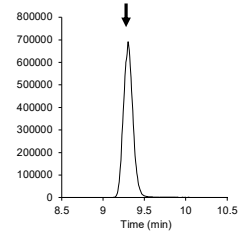
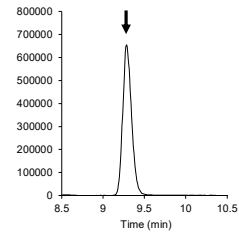
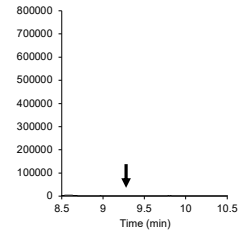
上：ブランク試料、中：添加試料、下：回収率 100%相当の (a) EMA 及び (b) HEMA 溶媒標準溶液 (0.001 μg/mL)

①大豆

(a) アセトクロール

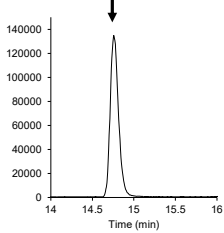
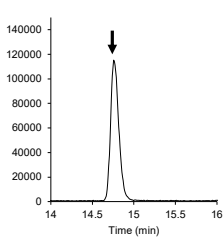
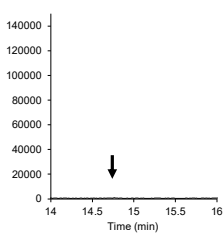


(b) HPM



②とうもろこし

(a) アセトクロール



(b) HPM

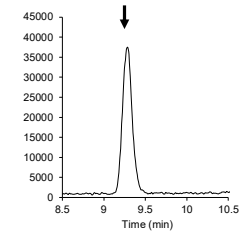
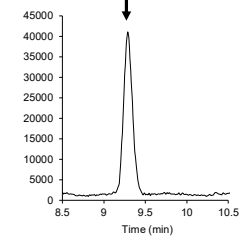
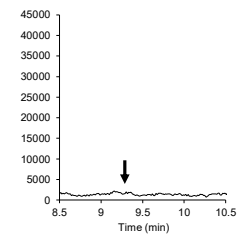
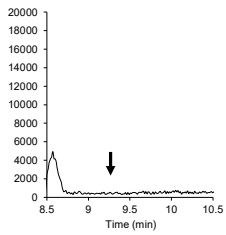


図 23 基準値濃度（大豆 1 ppm、とうもろこし 0.05 ppm）での添加回収試験における代表的なクロマトグラム

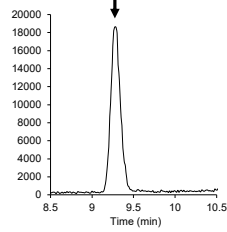
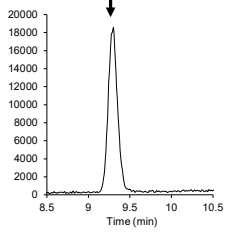
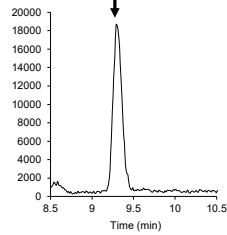
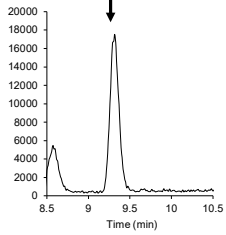
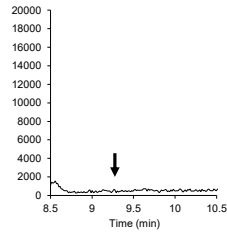
上：ブランク試料、中：添加試料、下：回収率 100%相当の (a) EMA 及び (b) HEMA 溶媒標準溶液

①定量限界濃度

(a) 大豆

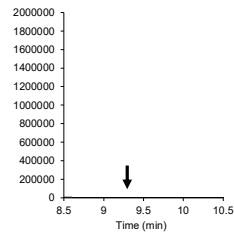


(b) とうもろこし

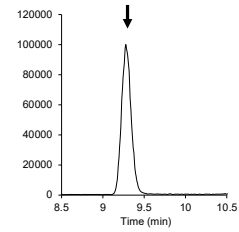
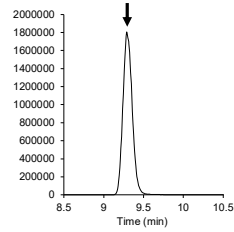
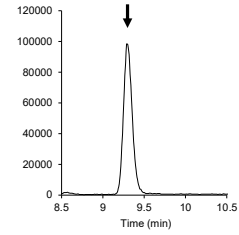
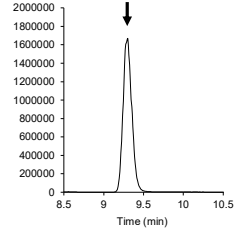
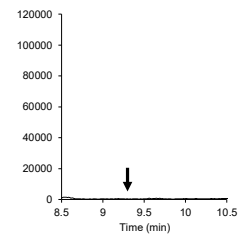


②基準値濃度

(a) 大豆



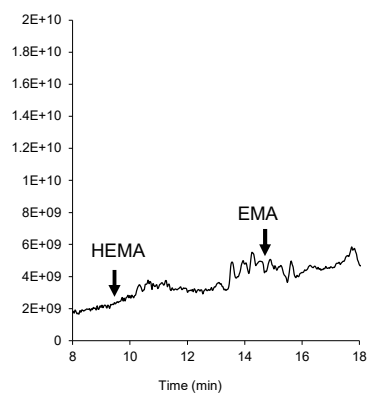
(b) とうもろこし



(参考) 図 24 HPM の添加回収試験における代表的なクロマトグラム
(HEMA 定量イオン m/z 134.0→115.0)

上：ブランク試料、中：添加試料、下：回収率 100%相当の HEMA 溶媒標準溶液

①大豆



②とうもろこし

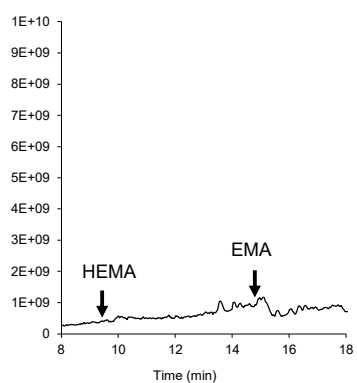
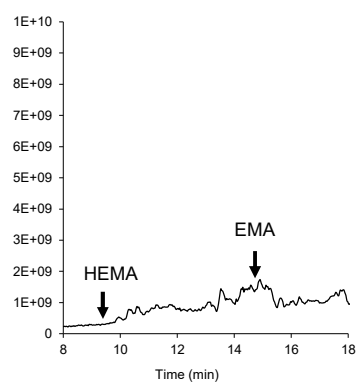
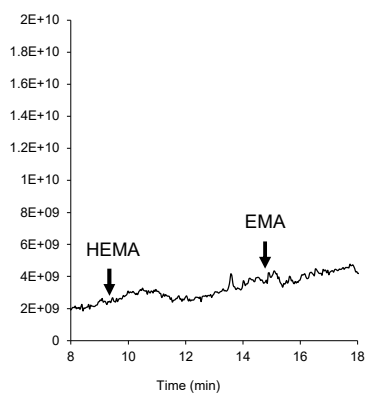


図 25 添加回収試験における空白試料の代表的なトータルイオンカレントクロマトグラム
スキャン範囲： m/z 50～1000

上：ESI (+)、デクラスタリング電位 100 V

下：ESI (-)、デクラスタリング電位 -100 V

4. その他の試験法検討に関連する事項

(1) LC-MS/MS 測定におけるグラジエント条件の検討

EMA、HEMA、アセトクロール及び HPM の測定には、当初は「4. 測定条件 (1) LC-MS/MS 測定条件 ②アセトクロール及び HPM」で示したグラジエント条件を用いた。その後、マトリックス添加標準溶液を測定したところ、各化合物の保持時間に定量を妨害するピークは認められなかったものの、大豆及びとうもろこしのいずれも、夾雑成分のピークが HEMA のピークと近接していた(図 26)。そこで、グラジエント条件についてさらに検討したところ、「①EMA 及び HEMA」で示したグラジエント条件では夾雑成分と十分分離することができたため(図 22~24)、EMA 及び HEMA は本グラジエント条件で測定することとした。

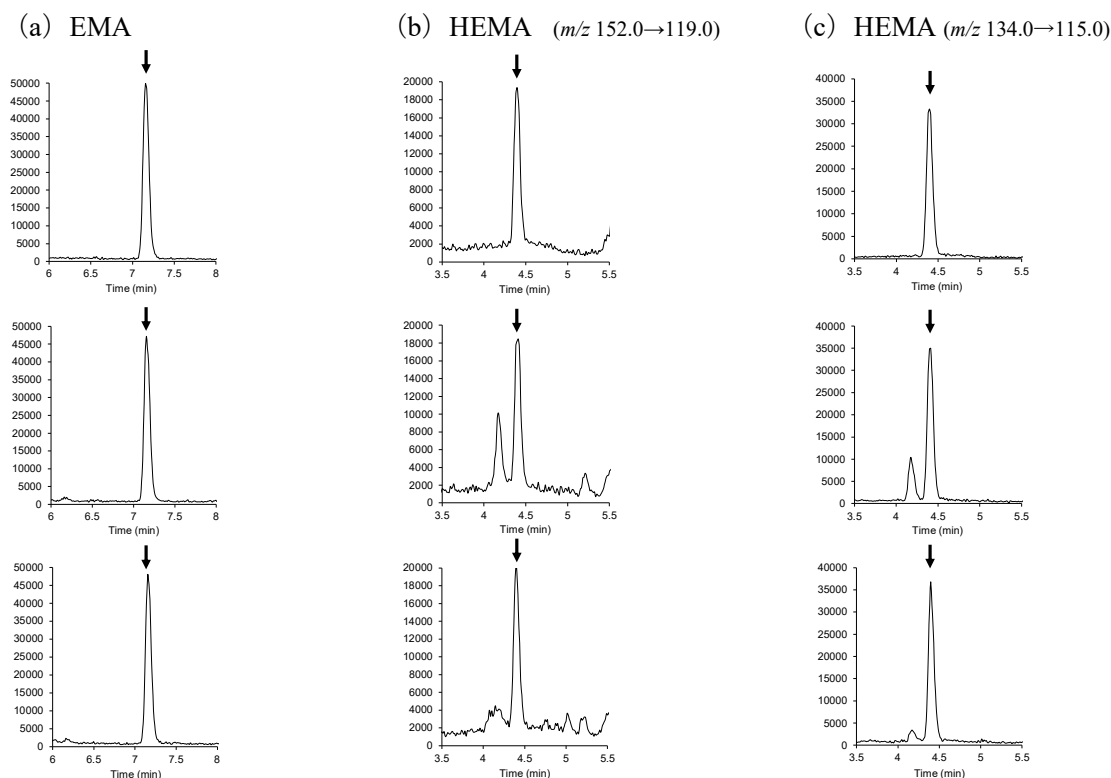


図 26 溶媒標準溶液及びマトリックス添加標準溶液 (0.001 $\mu\text{g/mL}$) のクロマトグラム*

上：溶媒標準溶液、中：大豆のマトリックス添加標準溶液、下：とうもろこしのマトリックス添加標準溶液

* 「4. 測定条件 (1) LC-MS/MS 測定条件 ②アセトクロール及び HPM」のグラジエント条件を用いて測定した

【結論】

農産物中のアセトクロール試験法として、アセトクロール及びその代謝物を試料からメタノールで抽出した後、塩基性条件下で加熱して EMA 及び HEMA に変換し、4 級アンモニウム塩修飾ジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体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。大豆及びとうもろこし(未成熟)を用いて、アセトクロール及び HPM について定量限界及び基準値濃度で添加回収試験を行った結果、アセトクロールは真度 82~84%、併行精度 1~2%、HPM は真度 84~93%、併行精度 2~4%の良好な結果が得られた。いずれの試料についても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。溶媒標準溶液に対するマトリックス添加標準溶液のピーク

面積比は 0.94～1.01 となり、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であった。これらの結果から、本試験法はアセトクロール及びその代謝物を精確に分析可能な方法と考えられた。なお、定量限界濃度での測定において感度が不足する場合は m/z 134.0→115.0 を定量イオンとして用いることが可能であると考えられた。

〔参考文献〕

- 1) Monsanto Company, ME-2024-01. Method for determination of acetochlor residues in crop matrices using LC-MS/MS. September 9, 2016.
- 2) B. Diehl. NMR Spectroscopy in Pharmaceutical Analysis. Chapter 1 – Principles in NMR Spectroscopy. Elsevier, 1–41, 2008.
- 3) Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues. Pesticide residues in food 2015. Evaluations 2015 Part I – Residues. 155–351, 2015.