

※本報告書は、試験法開発における検討結果をまとめたものであり、試験法の実施に際して参考として下さい。なお、報告書の内容と通知または告示試験法との間に齟齬がある場合には、通知または告示試験法が優先することをご留意ください。

平成21年度

食品・添加物等規格基準に 関する試験検査等について

食品に残留する農薬等の成分である物質の試験法開発

テフリルトリオン及びメソトリオン（農産物）に関する試験

食品残留農薬試験法作成に関する検査項目

農産物中のテフリトリオンに関する試験法

テフリルトリオン試験法（農産物中）の検討結果

[緒言]

1. 目的

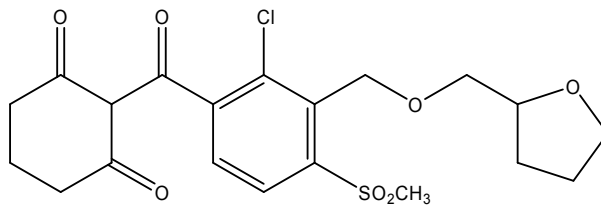
農産物中テフリルトリオンの分析法を開発すること。

2. 試験法の検討方針

テフリルトリオンは、トリケトン系の新規除草剤である。本剤は、ノビエ、一年生及び多年生広葉雑草、一年生及び多年生カヤツリグサ科に加え、スルホニルウレア抵抗性雑草に対して殺草活性を示す。テフリルトリオンについては、既存の個別試験法の適用は困難であると判断され、又、一斉試験法（LC/MS - I 法及び LC/MS - II 法）の適用についても、検討に供した 10 作物（対象作物は後出）の全てにおいて不可であることが確認された。新たな試験法を策定するにあたり、テフリルトリオン同様のトリケトン系新規除草剤であるメソトリオンについても同時に検討したところ、同一方法による分析が可能であると判断されたため、両成分で同一の試験法（測定条件を除く）を提案することとした。

3. 構造式等

テフリルトリオン



C₂₀H₂₃ClO₇S : 442.91

2- {2-chloro-4-methyl-3-[(tetrahydrofuran-2-yl-methoxy)methyl]benzoyl}
cyclohexane-1,3-dione

融点： 113.7－115.4℃

蒸気圧： <1.0×10⁻⁵ hPa (20℃)

溶解性： 水 0.106 (pH2), 64.2 (pH7), 57.5 (pH9) (以上 g/L, 20℃),

アセトン 200－300, 酢酸エチル 70.0, エタノール 6.7,

ヘキサン 0.0335 (以上 g/L, 20℃)

解離定数： pKa = 3.2 (20℃)

分配係数： log P_{OW} = 1.9 (pH2.0, 25±1℃)

【農薬抄録から引用】

4. 基準値

米(玄米) 0.02 ppm

5. 分析対象成分

テフリトリオン(本体のみ)

6. 試験法の組み立て

別途提案するメソトリオン試験法（メソトリオンの作物残留性試験における分析法に基づく）の適用を検討し、メソトリオン及びテフリトリオンの両分析対象成分について、不足なく固相抽出カラムへの保持と溶出が可能な条件を設定した。提案法は、ポリマー系ミニカラム（逆相）及び強塩基性陰イオン交換樹脂ミニカラムにより精製し、広範囲な農産物への適用を考慮し、高感度かつ高い選択性が期待できる LC-MS により測定する方法とした。又、精製効果が不足する場合、強酸性陽イオン交換体ミニカラムによる精製操作を追加することとした。検討作物として、基準設定作物である「米（玄米）」の他、「大豆、ばれいしょ、ほうれんそう、キャベツ、りんご、オレンジ、茶、トマト及びごま」を選定し、適用を試みたところ、良好な結果が得られた。

[実験方法]

1. 試料

下記 10 種農産物試料を次の手順で前処理して分析法の検討に供した。

1) 米（玄米）

試料（約 500 g）を超遠心粉砕機で 425 μm の標準網ふるいを通して粉砕均一化した。

2) 大豆（乾燥子実）

試料（約 500 g）を超遠心粉砕機で 425 μm の標準網ふるいを通して粉砕均一化した。

3) ばれいしょ（塊茎：泥を水で軽く洗い落としたもの）

試料（約 500 g）をミキサーで細切均一化した。

4) ほうれんそう（茎葉：赤色根部を含み、ひげ根及び変質葉を除去したもの）

試料（約 500 g）をミキサーで細切均一化した。

5) キャベツ（葉球：外側変質葉及びしんを除去したもの）

櫛切りにしてしんを除去した試料（約 500 g）をミキサーで細切均一化した。

6) りんご（果実：花落ち、しん及び果梗の基部を除去したもの）

櫛切りにして花落ち、しん及び果梗の基部を除去した試料（約 500 g）をミキサーで細切均一化した。

7) オレンジ（果実全体：へたを除去したもの）

試料（約 500 g）をミキサーで細切均一化した。

8) 茶（荒茶）

試料（約 100 g）をミキサーで細切均一化した。

9) トマト（果実：へたを除去したもの）

試料（約 500 g）をミキサーで細切均一化した。

10) ごま（種子）

試料（約 500 g）をミキサーで細切均一化した。

2. 試薬・機器

アセトニトリル、メタノール：

残留農薬試験用（和光純薬工業株式会社）

メタノール：

LC-MS 用（和光純薬工業株式会社）

水：

脱イオン水を Milli-Q System（日本ミリポア株式会社）で精製したもの

テフリルトリオン標準品：

純度 99.5%（バイエルクロップサイエンス株式会社）

その他の試薬：

特級

ケイソウ土：

Celite 545（和光純薬工業株式会社）

スチレンジビニルベンゼン共重合体カラム（ポリマー系ミニカラム）：

InertSep PLS-2、500 mg/6 mL（ジーエルサイエンス株式会社）

強塩基性陰イオン交換樹脂ミニカラム：Oasis MAX、500 mg/6 mL（日本ウォーターズ株式会社）

強酸性陽イオン交換体ミニカラム（ベンゼンスルホンプロピルシリル化シリカゲルミニカラム）：InertSep SCX、1 g/6 mL（ジーエルサイエンス株式会社）

電子天秤：

AG245、XS2002S（メトラー・トレド株式会社）

ミキサー：

MX-V100（パナソニック株式会社）

ラッセルホブズ 3901JP（Salton Europe Limited）

超遠心粉碎機：

ZM100（株式会社レッチェ）

3. LC-MS 測定装置

1) LC-MS

	型 式	会 社
MS 装置	G1946D（四重極型）	Agilent 社
LC 装置	1100 シリーズ ポンプ：G1312A、4 液低圧グラジェント式 オートサンプラー：G1329A	Agilent 社
データ処理装置	ChemStation	Agilent 社

4. LC-MS 測定条件

LC 条件	
カラム	L-column2 ODS サイズ：内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒径 3 μm 会社：化学物質評価研究機構
移動相流速 (mL/min)	0.2
注入量 (μL)	10
カラム温度 (°C)	40
移動相 (v/v)	0.1vol%酢酸含有メタノール/0.1vol%酢酸 (45:55)
保持時間 (min)	25.0

MS 条件	
測定モード	MS、選択イオン検出
イオン化モード	ESI (+)
イオン導入電圧 (V)	3000
フラグメンター電圧 (V)	155
乾燥ガス流量 (L/min)	窒素、12
乾燥ガス温度 (°C)	350
ネブライザー圧力 (psi)	50
モニタリングイオン	445, 443

5. 定量

テフリトリオン標準品 20.1 mg (20.0 mg 相当) を 100 mL 容メスフラスコに精秤し、アセトニトリルに溶解し、アセトニトリルで定容して 200 mg/L 溶液を調製した。この溶液を 0.1vol%酢酸及びメタノール (1 : 1) 混液で希釈して 0.001、0.002、0.008、0.02 及び 0.04 mg/L の標準溶液を調製した。この溶液の 10 μL を LC-MS に注入して、データ処理装置を用いてテフリトリオンのピーク面積を測定し、横軸に重量、縦軸にピーク面積をとって検量線を作成した。

次項に従い調製した試験溶液 10 μL を LC-MS に注入し、検量線よりテフリトリオンの含量を求め、試料中の残留濃度を算出した。

6. 試験溶液の調製

1) 概要

試料をアセトニトリルで抽出し、スチレンジビニルベンゼン共重合体カラム及び強塩基性陰イオン交換樹脂カラムで精製した後、茶の場合のみ強酸性陽イオン交換体ミニカラムで精製し、LC-MSで測定及び確認した

2) 抽出

果実及び野菜の場合は試料20.0 gを三角フラスコに量り採った。穀類、豆類及び種実類の場合は試料10.0 g、茶の場合は試料5.00 gを三角フラスコに量り採り、それぞれ水20 mLを加え、30分間放置した。これにアセトニトリル100 mLを加えてホモジナイズした。

予め、桐山ロートにろ紙（φ 60 mm、日本理化学器械 No.704）を敷き、ケイソウ土を約 1 cmの厚さに積層して少量のアセトニトリルで洗浄した。抽出懸濁液を吸引ろ過した後、ろ紙上の残留物を三角フラスコに掻き取り、アセトニトリル50 mLを加えてホモジナイズし、上記と同様にろ過した。ろ液を共栓付きメスシリンダーに合わせ、アセトニトリルを加えて正確に200 mLとし、果実及び野菜の場合はこの5 mL、穀類、豆類及び種実類の場合は10 mL、茶の場合は20 mLを採り、水10 mLを加えた後、40℃以下で約10 mLまで濃縮した。

3) 精製

① スチレンジビニルベンゼン共重合体カラムクロマトグラフィー

スチレンジビニルベンゼン共重合体カラム（InertSep PLS-2, 500 mg）にアセトニトリル及び水各5 mLを順次注入し、各流出液を捨てた。このカラムに、2) で得られた溶液を注入した後、水5 mLで容器を洗浄した溶液を注入し、各流出液を捨てた。次いで、水及びアセトニトリル（1 : 1）混液10 mLを注入し、溶出液をナス型フラスコに採った。

② 強塩基性陰イオン交換樹脂カラムクロマトグラフィー

強塩基性陰イオン交換樹脂ミニカラム（Oasis MAX, 500 mg）にアセトニトリル及び水各5 mLを順次注入し、各流出液を捨てた。このカラムに、①で得られた溶液を注入した後、アセトニトリル5 mLで容器内を洗浄した溶液を注入し、各流出液を捨てた。次いで、酢酸及びアセトニトリル（1 : 50）混液10 mLを注入し、溶出液をナス型フラスコに採った。

③ 強酸性陽イオン交換体カラムクロマトグラフィー（茶において実施）

強酸性陽イオン交換体ミニカラム（InertSep SCX, 1 g）に酢酸及びアセトニトリル（1 : 50）混液5 mLを注入し、流出液を捨てた。このカラムに、②で得られた溶液を注入した後、同混液5 mLで容器内を洗浄した溶液を注入し、全溶出液をナス型フラスコに採った。

④ 試験溶液の調製

②又は③で得られた溶出溶液について、ロータリーエバポレーターを用いて40℃以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物を0.1vol%酢酸及びメタノール（1 : 1）混液に溶解し、正確に2.5 mLとしたものを試験溶液とした。

分析フローチャート

(抽出)

秤 取

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

アセトニトリル抽出

- ↓ アセトニトリル 100 mL、ホモジナイズ、抽出・ろ過
- 残渣はアセトニトリル 50 mL で同様にホモジナイズ、抽出・ろ過
- ろ液を合わせ、アセトニトリルで 200 mL に定容
- 果実、野菜は 5 mL、穀類、豆類及び種実類は 10 mL、茶は 20 mL を採取
(各試料 0.5 g 相当)
- 水 10 mL を加えて減圧濃縮

(精製)

ポリマー系ミニカラム(500 mg: InertSep PLS-2)

- ↓ 濃縮液をカラム(アセトニトリル及び水各 5 mL で洗浄済)に負荷
- 水 5 mL を流下
- 水・アセトニトリル(1:1) 10 mL で溶出

強塩基性陰イオン交換樹脂ミニカラム(500 mg: Oasis MAX)

- ↓ 溶出液をカラム(アセトニトリル及び水各 5 mL で洗浄済)に負荷
- アセトニトリル 5 mL を流下
- 酢酸・アセトニトリル(1:50) 10 mL で溶出

強酸性陽イオン交換体ミニカラム(1g: InertSep SCX) [追加精製(茶で実施)]

- ↓ 溶出液をカラム(酢酸・アセトニトリル(1:50) 5 mL で洗浄済)に負荷
- 酢酸・アセトニトリル(1:50) 5 mL を流下(全溶出液分取)

試験溶液の調製

- 全溶出液を濃縮乾固
- 0.1vol%酢酸・メタノール(1:1) 混液 2.5 mL に溶解

7. マトリックス添加標準溶液の調製

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

[結果及び考察]

1. 測定条件の検討

1) 測定イオンの検討

2 mg/L 濃度の標準溶液をフローインジェクションで測定して得たテフリルトリオンのマススペクトルを図1に示す。その結果からテフリルトリオンのプロトン付加分子 (m/z 443 [M+H]⁺) を定量用として、同イオンの塩素同位体 (m/z 445) を定性用として、それぞれモニタリングイオンに選択した。

2) 測定条件の検討

一般的な ODS カラムを用い、カラムの保持及びイオン化の安定性を考慮して酢酸を混合したメタノール及び水の溶離液系において検討し、実験方法の第4項に記載した測定条件を採用した。

3) 検量線の直線性

本検討において 0.01~0.4 ng の濃度範囲に作成した検量線の相関係数は、いずれも 0.999 以上と良好な直線性であった (図2参照)。

4) 検出感度

定量限界相当量 (0.02 ng) のクロマトグラムを図3に、又、基準値対象作物 (玄米) を含む代表的な 10 農産物の無添加試料のクロマトグラムを図4~13に示す。テフリルトリオンの保持時間付近には、測定を妨害する夾雑成分ピークは認められなかった。定量限界の算出例を以下に示す。

定量限界

【残留基準値(案): 0.01 ppm】

0.01 mg/kg [(2.5 mL/0.5 g^{*1}) × (0.02 ng/10 µL)]

*1 20.0 g × 5 mL/200 mL (果実及び野菜の場合)

10.0 g × 10 mL/200 mL (穀類、豆類及び種実類の場合)

5.00 g × 20 mL/200 mL (茶の場合)

2. 試験溶液調製法の検討

1) 抽出条件の設定

分析条件を参照した作物残留性試験¹⁾における抽出溶媒と同様のアセトニトリルとした。

2) 精製方法の検討

採用した精製操作 (ポリマー系ミニカラム、強塩基性陰イオン交換樹脂ミニカラム及び強酸性陽イオン交換体ミニカラム) におけるテフリルトリオンの回収率を示す。

① ポリマー系ミニカラム(500 mg: InertSep PLS-2)

アセトニトリルと水各 5 mL で予備洗浄した後、下記溶媒で順次溶出した場合の回収率を示す。

供試溶液:標準品0.1 µgを水5 mLに溶解

(表1)	溶媒	テフリルトリオン(%)
	供試溶液(負荷)	<1
	水・アセトニトリル(9:1) 5 mL	<1
	水・アセトニトリル(7:3) 5 mL	103
	水・アセトニトリル(5:5) 5 mL	<1
	水・アセトニトリル(3:7) 5 mL	<1
	アセトニトリル 5 mL	<1
	合計	103

② ポリマー系ミニカラム(500 mg: InertSep PLS-2)

①の結果に基づき、下記条件について確認した。アセトニトリルと水各 5 mL で予備洗浄した後、下記溶媒で順次溶出した場合の回収率を示す。

供試溶液:標準品0.1 µgを水5 mLに溶解

(表2)	溶媒	テフリルトリオン(%)
	供試溶液(負荷)	<1
	水 5 mL	<1
	水 5 mL	<1
	水・アセトニトリル(1:1) 10 mL	96
	合計	96

③ 強塩基性陰イオン交換樹脂ミニカラム(500 mg: Oasis MAX)

アセトニトリルと水各 5 mL で予備洗浄した後、下記溶媒で順次溶出した場合の回収率を示す。

供試溶液:標準品0.1 µgを水・アセトニトリル(5:5)5 mLに溶解

(表3)	溶媒	テフリルトリオン(%)
	供試溶液(負荷)	<1
	水・アセトニトリル(5:5) 10 mL	<1
	アセトニトリル 10 mL	<1
	酢酸・アセトニトリル(1:50) 10 mL	101
	酢酸・アセトニトリル(1:50) 10 mL	<1
	合計	101

④ 強酸性陽イオン交換体ミニカラム(1 g: InertSep SCX)

酢酸・アセトニトリル(1:50) 5 mL で予備洗浄した後、下記溶媒で順次溶出した場合の回収率を示す。

供試溶液:標準品0.1 µgを酢酸・アセトニトリル(1:50) 10 mLに溶解

(表4)	溶媒	テフリトリオン(%)
	供試溶液(負荷)、酢酸・アセトニトリル(1:50) 5 mL	93
	酢酸・アセトニトリル(1:50) 5 mL	<1
	酢酸・アセトニトリル(1:50) 5 mL	<1
	合計	93

参考データとして、別途検討した、代表的な固相抽出カラムにおける保持、溶出パターンを以下に示す。

⑤ C18ミニカラム(1,000 mg: InertSep C18-C)

メタノールと水各 5 mL で予備洗浄した後、各溶媒で順次溶出した場合の回収率を示す。

供試溶液:標準品1 µgを水10 mLに溶解

(表5)	溶媒	テフリトリオン(%)
	供試溶液(負荷)	<1
	メタノール・水(2:8) 10 mL	<1
	メタノール・水(5:5) 10 mL	51
	メタノール・水(8:2) 10 mL	38
	メタノール 10 mL	7
	合計	96

C18ミニカラムにおいては、ポリマー系ミニカラムに比べて溶出バンドが広がる傾向が認められた。その為、安定した保持及び溶出が期待できるポリマー系ミニカラムを採用することとした。

⑥ 強塩基性陰イオン交換体ミニカラム(500 mg: InertSep SAX)

アセトニトリル 5 mL で予備洗浄した後、下記溶媒で順次溶出した場合の回収率を示す。

供試溶液:標準品0.1 µgをアセトニトリル20 mLに溶解

(表6)	溶媒	テフリトリオン(%)
	供試溶液(負荷)	<1
	アセトニトリル 10 mL	<1
	酢酸・アセトニトリル(1:50) 5 mL	69
	酢酸・アセトニトリル(1:50) 5 mL	11
	酢酸・アセトニトリル(1:50) 5 mL	4
	酢酸・アセトニトリル(1:50) 5 mL	2
	合計	86

シリカゲル基材の強塩基性陰イオン交換体ミニカラムにおいては、ポリマー系の強塩基性陰イオン交換樹脂ミニカラムに比べて溶出バンドが広がる傾向が認められた。その為、強塩基性陰イオン交換樹脂ミニカラムを採用することとした。

⑦ フロリジルミニカラム(910 mg: Sep-pakフロリジル)

アセトンとヘキサン各 10 mL で予備洗浄した後、各溶媒で順次溶出した場合の回収率を示す。

供試溶液:標準品1 µgをヘキサン10 mLに溶解(各溶媒各で順次洗い込み)

(表7)	溶媒	テフリトリオン(%)
	供試溶液(負荷)	<1
	アセトン 10 mL	<1
	ギ酸・アセトン(1:100) 10 mL	40
	ギ酸・アセトン(1:100) 10 mL	34
	ギ酸・アセトン(1:100) 10 mL	8
	ギ酸・アセトン(1:100) 20 mL	4
	合計	86

吸着が強く、溶出が不十分となった。又、上記結果に基づく保持、溶出条件においては、精製効果が認められなかった。

⑧ シリカゲルミニカラム(500 mg: Supelclean LC-Si)

メタノールとアセトン、ヘキサン各 5 mL で予備洗浄した後、各溶媒で順次溶出した場合の回収率を示す。

供試溶液:標準品0.5 µgをアセトン・ヘキサン(1:1) 2 mLに溶解(各溶媒各で順次洗い込み)

(表8)	溶媒	テフリルトリオン
供試溶液(負荷)、アセトン・ヘキサン(1:1)	2 mL	<1
アセトン	5 mL	1
アセトン	5 mL	<1
アセトン・メタノール(1:1)	5 mL	4
アセトン・メタノール(1:1)	5 mL	60
アセトン・メタノール(1:1)	5 mL	23
合計		88

吸着が強く、溶出が困難であった。又、精製効果が期待できないと判断された。

⑨ グラファイトカーボンミニカラム(500 mg: InertSep GC)

酢酸エチル 5 mL で予備洗浄した後、各溶媒で順次溶出した場合の回収率を示す。

供試溶液:標準品1 µgを酢酸エチル10 mLに溶解

(表9)	溶媒	テフリルトリオン(%)
供試溶液(負荷)		62
酢酸エチル	10 mL	28
酢酸エチル	10 mL	3
トルエン・酢酸エチル(1:3)	20 mL	2
トルエン・酢酸エチル(1:1)	20 mL	4
合計		96

試料マトリクスが加わった際、溶出不良となる傾向があり、又、精製効果が認められなかった。

3. 添加回収実験結果

1) 個別試験法における添加回収結果

野菜及び果物については、三角フラスコに均一化したブランク試料 20 g を秤取し、テフリトリオン標準溶液 0.1 µg/mL アセトニトリル標準溶液 2 mL を添加してよく混合し、30 分間放置した。玄米及び大豆については、三角フラスコに均一化したブランク試料 10 g を採取し、テフリトリオン標準溶液 0.1 µg/mL アセトニトリル標準溶液 1 mL を添加してよく混合し、30 分間放置した。茶については、三角フラスコに均一化したブランク試料 5 g を採取し、テフリトリオン標準溶液 0.1 µg/mL アセトニトリル標準溶液 0.5 mL を添加してよく混合し、30 分間放置した。玄米、大豆及び茶試料については、さらに水 20 mL を加えて室温に 2 時間放置した後、試験法に従って分析して添加回収率を算出した。0.01 ppm 添加試料での真度は 81~97% の範囲であり、その併行精度 (RSD%) は 8.2% 以下で良好であった。

試料	添加濃度 (ppm)	テフリトリオン		
		回収率 (%) (n=5)	真度 (%)	RSD%
玄米*	0.01	94, 91, 93, 97, 98	95	3.0
大豆	0.01	83, 89, 82, 73, 78	81	7.4
ばれいしょ	0.01	79, 82, 86, 84, 77	82	4.4
ほうれんそう	0.01	81, 81, 86, 84, 85	83	2.8
キャベツ	0.01	83, 97, 98, 94, 94	93	6.4
りんご	0.01	89, 102, 95, 99, 101	97	5.5
オレンジ	0.01	81, 85, 94, 95, 93	90	6.9
茶**	0.01	93, 88, 84, 79, 83	85	6.3
トマト	0.01	100, 89, 80, 86, 88	89	8.2
ごま	0.01	86, 92, 85, 87, 87	87	3.1

* 基準値; 0.02 ppm

** 強酸性陽イオン交換体ミニカラムによる精製を追加した試験法による

2) ブランク試料の妨害状況 (図 4~13)

テフリトリオンの測定に影響を及ぼす夾雑物ピークは、いずれの試料においても認められなかった。ただし、茶においては、強酸性陽イオン交換体ミニカラムを用いた精製が必要であった (図 11 参照)。

4. 試料マトリックスの測定への影響

マトリックス効果に関する検討結果を次表に示す。溶媒調製標準溶液に対するマトリックスを含む標準溶液（基準値相当濃度）の相対値（％）は、92～107％の範囲であり、イオン化に対する顕著な試料夾雑物の影響は認められなかった。

試料	添加濃度 (ppm)	テフリトリオン 相対値(%)
玄米	0.01	93
大豆	0.01	94
ばれいしょ	0.01	96
ほうれんそう	0.01	92
キャベツ	0.01	96
りんご	0.01	100
オレンジ	0.01	105
茶	0.01	107
トマト	0.01	99
ごま	0.01	97

相対値（％）は、溶媒調製標準溶液に対するマトリックス添加標準溶液の面積比で示した。茶は強酸性陽イオン交換体ミニカラムによる追加精製を行ったマトリックス溶液を用いた。

5. 考察

設定した試験法について、基準値設定作物である「玄米」の他、「大豆、ばれいしょ、ほうれんそう、キャベツ、りんご、オレンジ、茶、トマト及びごま」における妥当性を確認した評価結果は、いずれも良好であった。従って、本試験法は穀類、豆類、種実類、果実、野菜及び茶等の農産物に適用可能であると判断した。

提案法は、テフリトリオンについて、一斉試験法（LC/MS - I 法及び LC/MS - II 法）の適用が困難であること、又、より一般的な固相抽出系による精製法（C18 等シリカゲル基材の固相や順相系固相を用いた精製）は適用が困難であることを確認した上で、テフリトリオンと同様のトリケトン系除草剤であるメソトリオンにも適用可能な試験法として策定したものである。

6. 結論

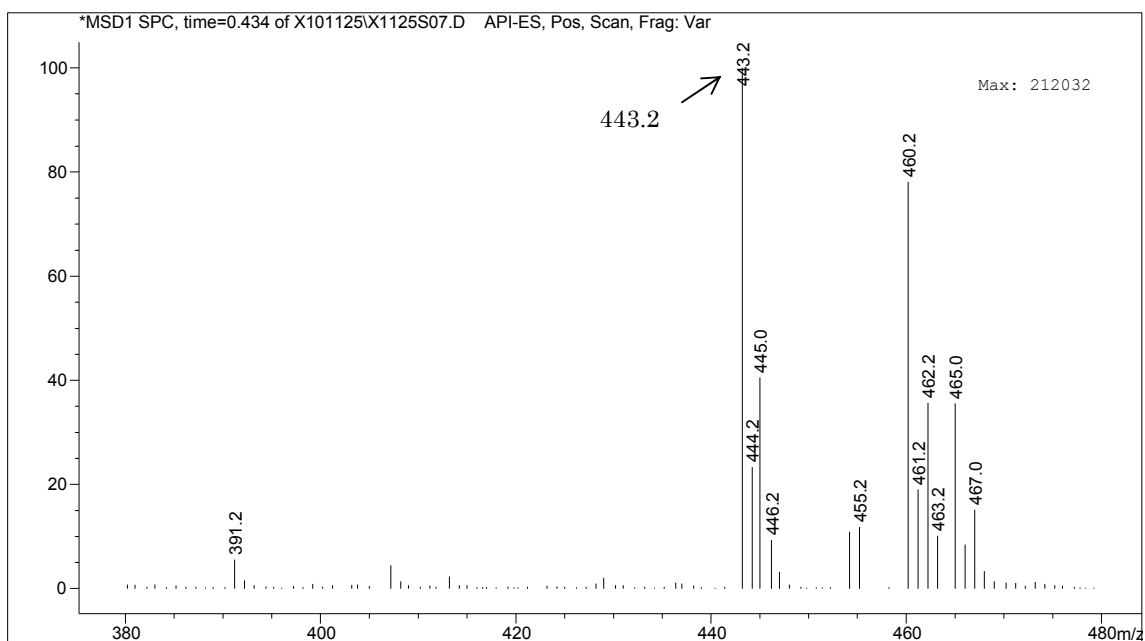
テフリトリオン試験法（農産物）として、アセトニトリルで抽出し、ポリマー系ミニカラム（逆相）、強塩基性陰イオン交換樹脂ミニカラム及び強酸性陽イオン交換体ミニカラム（茶のみ）により精製した後、LC-MS により測定する方法を提案する。

玄米等の 10 農産物における 0.01 ppm 添加での真度は 81~97%（併行精度 2.8~8.2%）であり、定量限界はいずれの農産物においても 0.01 mg/kg が可能であることが確認された。

[参考文献]

- 1) テフリトリオンの作物残留性（玄米）試験結果報告（未公開資料の抜粋）

図 1. テフリトリオンの MS スペクトル（試験法検討に用いた LC-MS による）
10 mg/L アセトニトリル溶液



[操作条件]

測定機器：G1946D 質量分析計、1100 シリーズ高速液体クロマトグラフ（Agilent 社）

移動相：0.1vol%酢酸含有メタノール／0.1vol%酢酸（5:5）混液、フローインジェクション

流速：0.2 mL/min

注入量：2 μ L

イオン化モード：ESI（+）

イオン導入電圧：3000 V

フラグメンター電圧：155 V

乾燥ガス流量：12 L/min（窒素）

乾燥ガス温度：350 $^{\circ}$ C

ネブライザー圧力：50 psi

Scan 走査範囲：m/z 200～600

図 2. 検量線の一例

CalibrationCurve --- 2011/03/22
 テフリルトリオン
 $y = 1381459.191x - 420.705$
 $r = 0.999975$

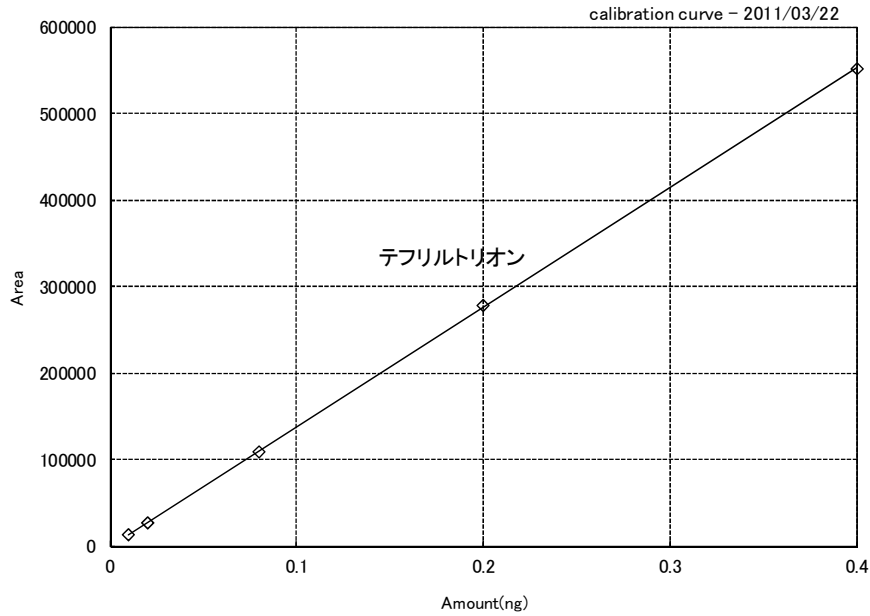


図 3. テフリルトリオン標準品のクロマトグラム

図 3-1. テフリルトリオン標準品のクロマトグラム

(玄米、大豆、りんご、茶及びごま測定時)

標準品 0.4 ng

標準品 0.02 ng (定量限界相当量)

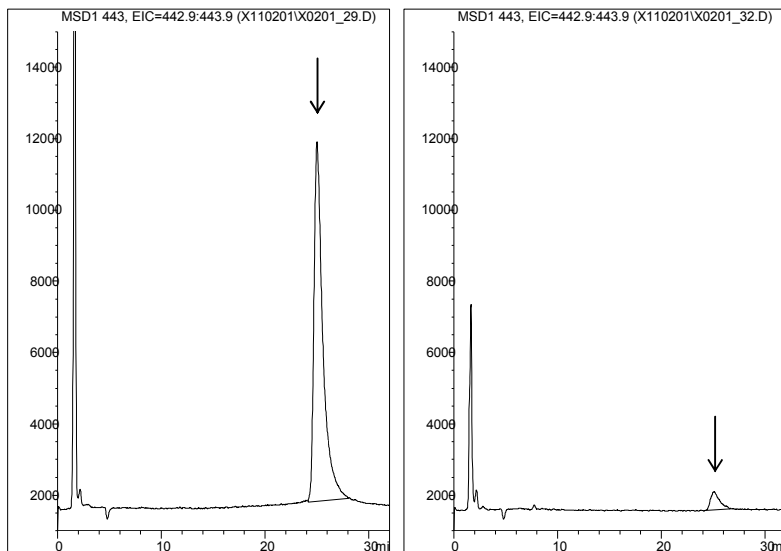


図 3-2. テフリトリオン標準品のクロマトグラム
(ばれいしょ及びトマト測定時)

標準品 0.4 ng

標準品 0.02 ng (定量限界相当量)

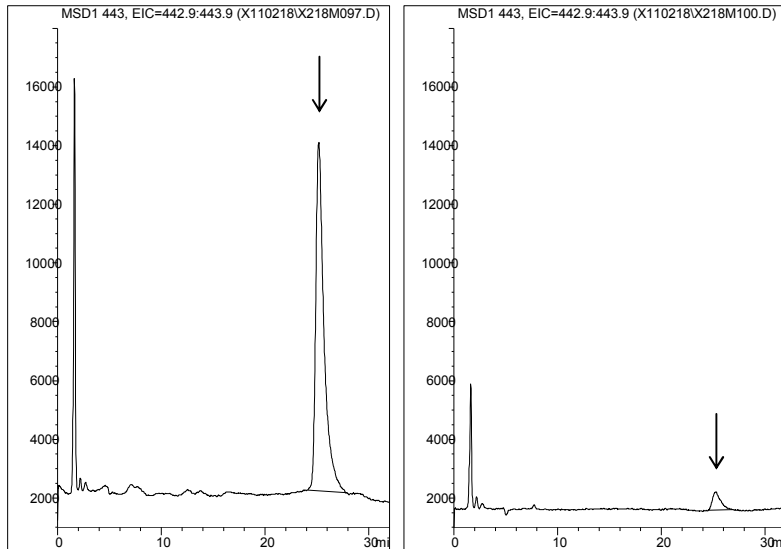


図 3-3. テフリトリオン標準品のクロマトグラム
(ほうれんそう、キャベツ及びオレンジ測定時)

標準品 0.4 ng

標準品 0.02 ng (定量限界相当量)

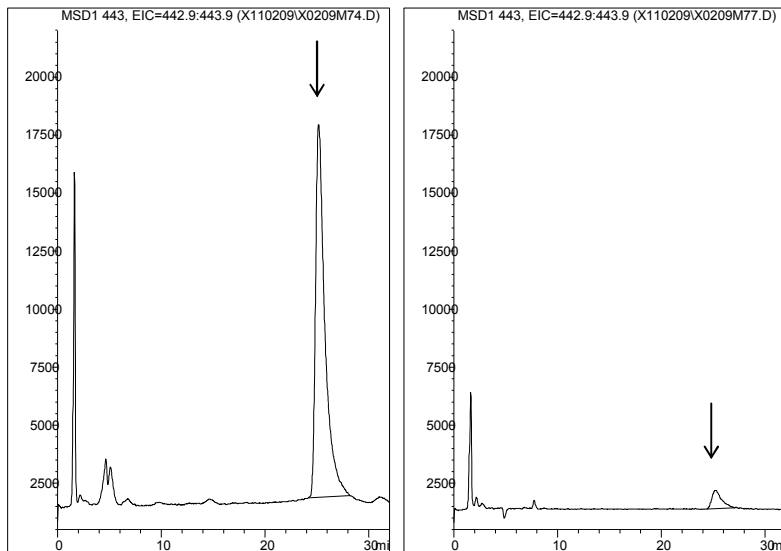
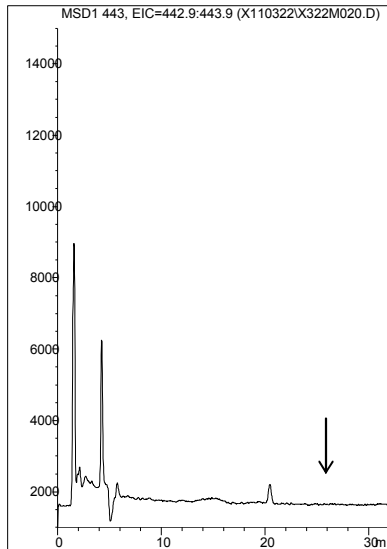


図 4. 玄米のクロマトグラム

無添加

10 μ L/2.5 mL/0.5 g



0.01 ppm 添加

10 μ L/2.5 mL/0.5 g

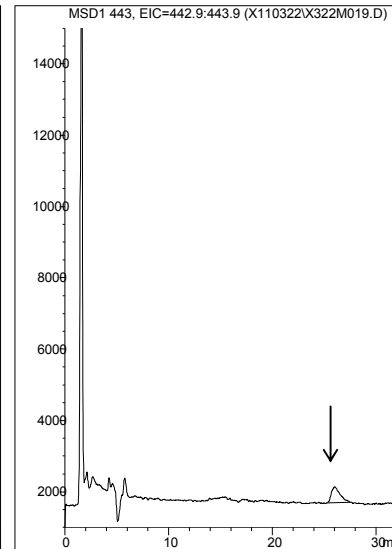
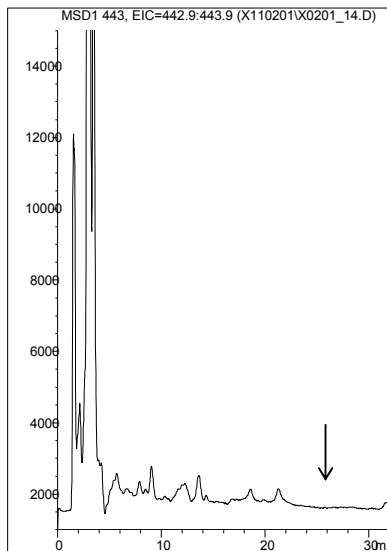


図 5. 大豆のクロマトグラム

無添加

10 μ L/2.5 mL/0.5 g



0.01 ppm 添加

10 μ L/2.5 mL/0.5 g

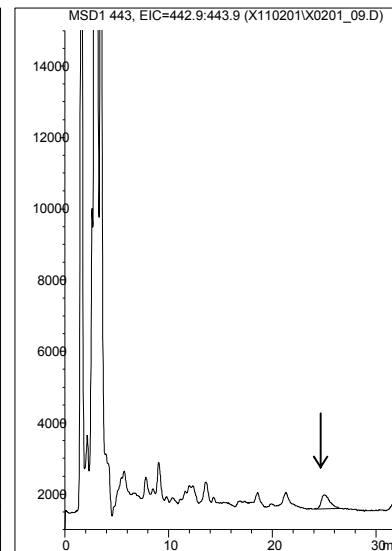


図 6. ばれいしょのクロマトグラム

無添加

0.01 ppm 添加

10 μ L/2.5 mL/0.5 g

10 μ L/2.5 mL/0.5 g

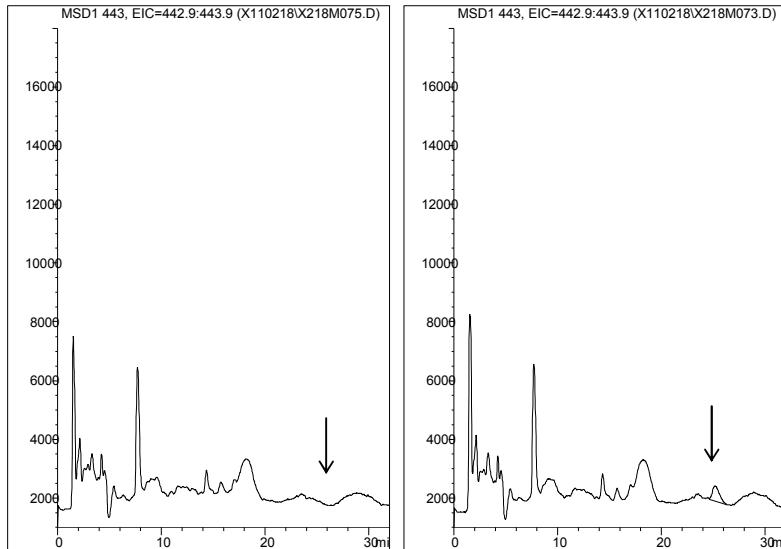


図 7. ほうれんそうのクロマトグラム

無添加

0.01 ppm 添加

10 μ L/2.5 mL/0.5 g

10 μ L/2.5 mL/0.5 g

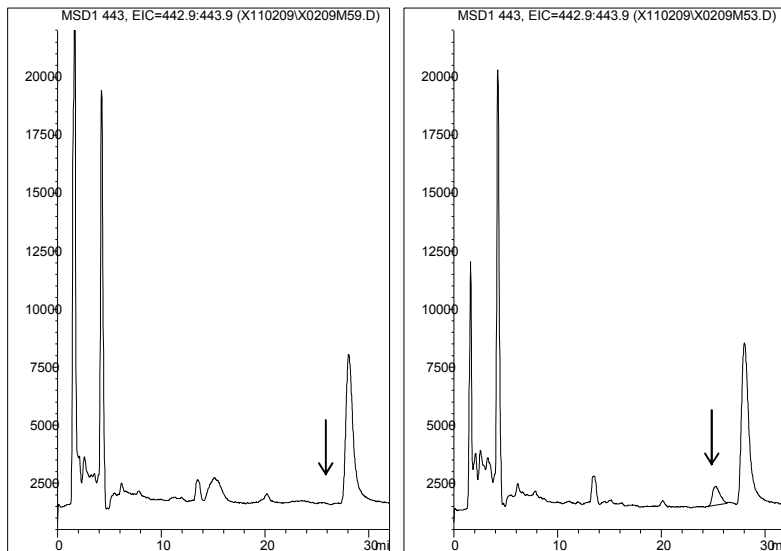


図 10. オレンジのクロマトグラム

無添加

0.01 ppm 添加

10 μ L/2.5 mL/0.5 g

10 μ L/2.5 mL/0.5 g

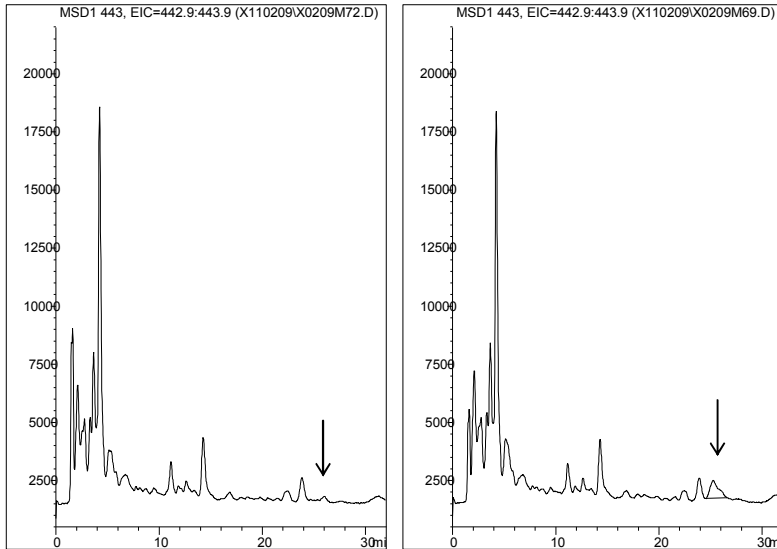


図 11. 茶のクロマトグラム

無添加

0.01 ppm 添加

10 μ L/2.5 mL/0.5 g

10 μ L/2.5 mL/0.5 g

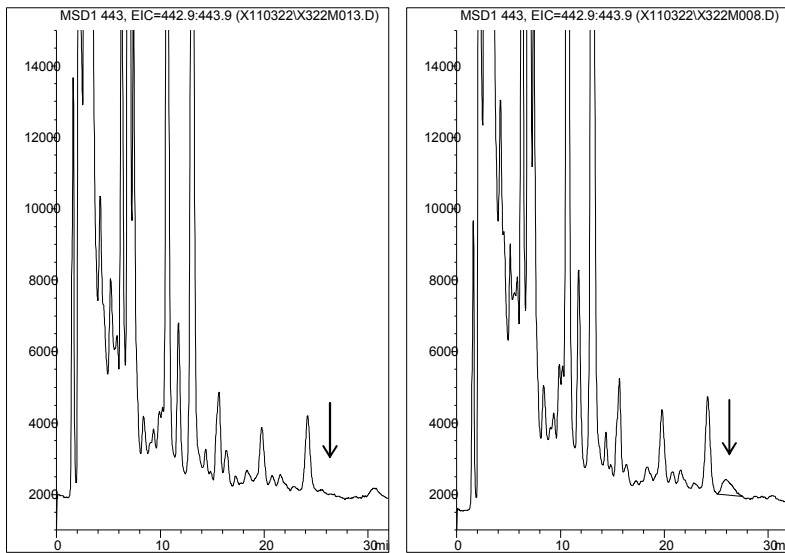


図 12. トマトのクロマトグラム

無添加

0.01 ppm 添加

10 μ L/2.5 mL/0.5 g

10 μ L/2.5 mL/0.5 g

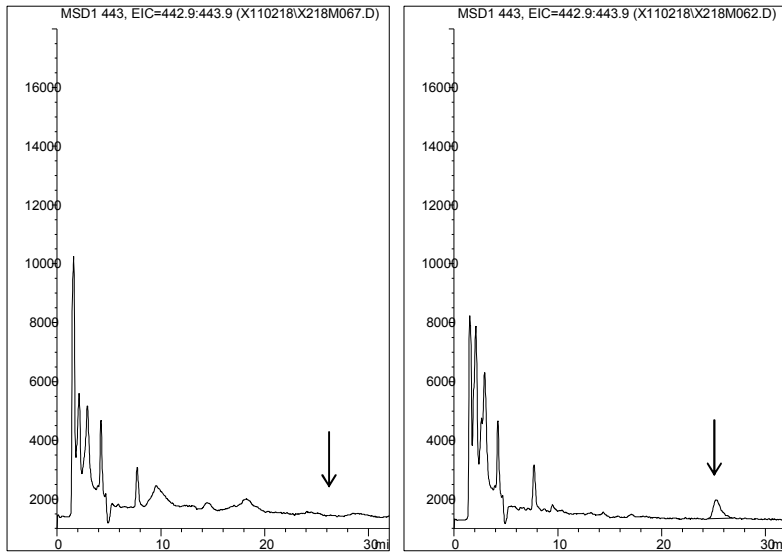


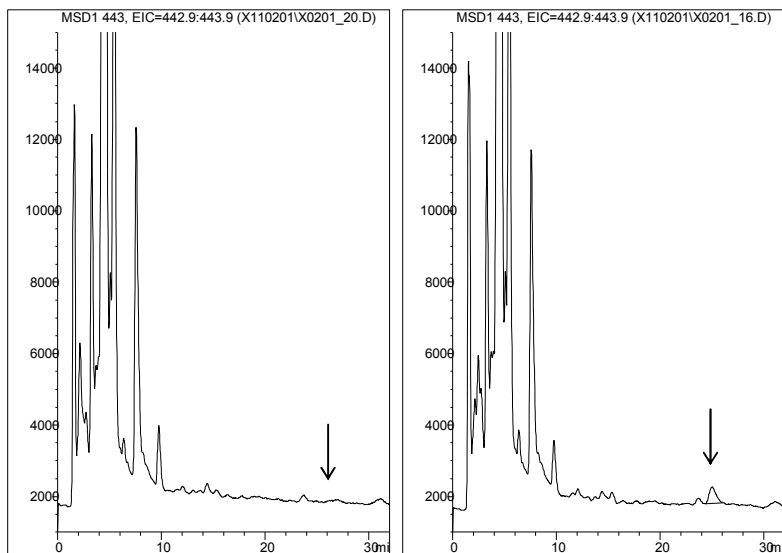
図 13. ごまのクロマトグラム

無添加

0.01 ppm 添加

10 μ L/2.5 mL/0.5 g

10 μ L/2.5 mL/0.5 g



[参考文献]

テフリルトリオンの作物残留性試験（玄米）結果報告（未公開資料の抜粋）

（文中、「AVH-301」はテフリルトリオンの開発時コード，代謝物の同時分析法）

1. 試薬及び機器

アセトニトリル，酢酸エチル	： 残留農薬試験用
アセトニトリル：	LC-MS 用
水：	脱イオン水を Milli-Q System(Millipore 製)で精製したもの
AVH-301 標準品：	純度 99.5%，試験委託者提供
その他の試薬：	特級
C ₁₈ ミニカラム：	Bond Elut C ₁₈ , 1 g/6 mL (Varian 製)
グラファイトカーボンミニカラム：	Supelclean ENVI-Carb, 0.5 g/6 mL(SUPELCO 製)
ガラス繊維ろ紙：	GFP (桐山製作所製)
超遠心粉碎機：	ZM1 (Retsch 製)
液体クロマトグラフ・質量分析計(LC-MS/MS)：	2695(高速液体クロマトグラフ, Waters 製)／ Quattro micro API(タンデム四重極質量分析計, Waters 製)
データ処理装置：	MassLynx 4.0(Waters 製)

2. 液体クロマトグラフ・質量分析計の操作条件

2-1. 高速液体クロマトグラフの操作条件

カラム：	Synergi 4 μ Hydro-RP 80A (phenomenex 製) 内径 2.0 mm, 長さ 150 mm
溶離液：	アセトニトリル／0.1vol%ギ酸 (v/v) 3:7(2.5 min) – (9.5 min) – 9:1(6 min)
流量：	0.2 mL/min
カラム温度：	40℃
保持時間：	12.5 min,

2-2. 質量分析計の操作条件

イオン化法：	エレクトロスプレーイオン化法 (ESI) 正モード
コーンガス流量：	50 L/h (N ₂)
脱溶媒ガス流量：	500 L/h (N ₂)
脱溶媒ガス温度：	350℃
ソースブロック温度：	100℃
キャピラリー電圧：	3.2 kV
コーン電圧：	20 V

コリジョン電圧: 15 V (コリジョンガス;Ar)

イオン検出法: MRM 法

モニタリングイオン: プリカーサーイオン m/z 442.9, プロダクトイオン m/z 340.8

3. 検量線の作成

AVH-301 標準品 20.1 mg(純品 20.0 mg 相当)を 100 mL 容メスフラスコに精秤し、アセトニトリルで定容して 200 mg/L 溶液を調製する。アセトニトリル/水(50:50, v/v)混液で希釈して 0.0025, 0.005, 0.05, 0.1 および 0.2 mg/L の標準溶液を調製する。この溶液の 10 μ L を前記条件の液体クロマトグラフ・質量分析計に注入して、データ処理装置を用いて AVH-301 のピーク面積を測定し、横軸に重量、縦軸にピーク面積をとって検量線を作成する。

4. 分析操作

4-1. 試料の前処理

試料全体から約 500 g を無作為に取り、超遠心粉砕機で粉砕する。

4-2. 抽出

粉砕した試料 10 g を三角フラスコにはかりとり、水 20 mL を加え 2 時間膨潤した後、アセトニトリル 100 mL を加え、30 分間振とうする。抽出物をガラス繊維ろ紙を敷いた桐山漏斗で吸引ろ過し、残渣をアセトニトリル 50 mL で洗い、同様にろ過する。ろ液を合わせアセトニトリルで 200 mL 定容とし、その 50 mL(試料 2.5 g 相当量)を取り、40°C 以下の水浴中で減圧濃縮し、アセトニトリルを留去する。

4-2-1. C₁₈ミニカラムによる精製

C₁₈ミニカラムにアセトニトリルおよび 0.01 mol/L 塩酸を順次 5 mL ずつ流下し前処理する。濃縮液に 0.01 mol/L 塩酸 10 mL を加えて混合した後、前処理した C₁₈ミニカラムに流下する。さらに、同溶液 5 mL で容器内を洗浄し、これを C₁₈ミニカラムに移して流下し、それらの流出液を捨てる。C₁₈ミニカラムを1分間吸引乾燥した後、アセトニトリル 15 mL を流下し、溶出液を分取する。

4-2-2. グラファイトカーボンミニカラムによる精製

グラファイトカーボンミニカラムにアセトニトリル 5 mL を流下し洗浄する。溶出液をグラファイトカーボンミニカラムに移して流下する。次に酢酸エチル 30 mL を流下し、全溶出液を取り、40°C 以下の水浴中で減圧濃縮し、最後は窒素気流下で溶媒を留去する。

4-3. 定量

残留物を適量(2.5~6 mL)のアセトニトリル/水(5:5, v/v)混液に溶解し、その 10 μ L を前記条件の液体クロマトグラフ・質量分析計に注入してピーク面積を求め、検量線より AVH-301 の重量を求め、試料中の残留濃度を算出する。

5. 定量限界および検出限界

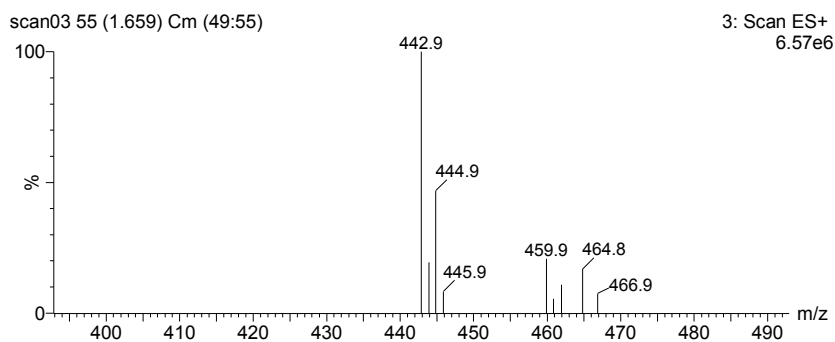
5-1. 定量限界

定量限界相当量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μ L)	定量限界 (ppm)
0.05	2.5	2.5	10	0.005

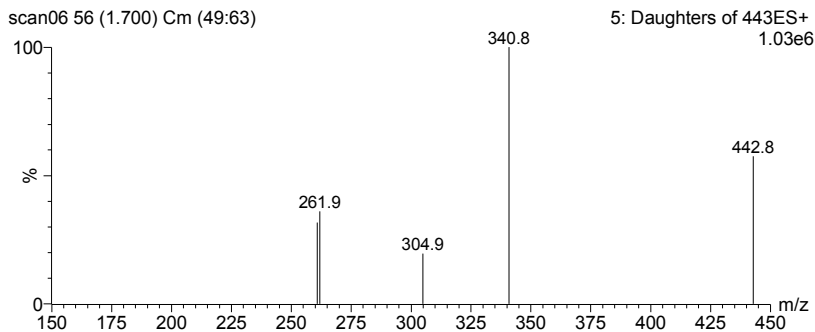
5-2. 検出限界

最小検出量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μ L)	検出限界 (ppm)
0.025	2.5	2.5	10	0.003

AVH-301 マススペクトル(プリカーサーイオン)の一例(正モード)



AVH-301 マススペクトル(プロダクトイオン)の一例(プリカーサーイオン; $m/z=442.9$, 正モード)



食品残留農薬試験法作成に関する検査項目

農産物中のメソトリオンに関する試験法

メソトリオン試験法（農産物中）の検討結果

[緒言]

1. 目的

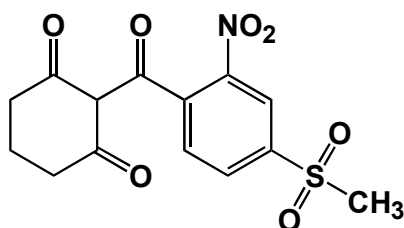
農産物中メソトリオンの分析法を開発すること。

2. 試験法の検討方針

メソトリオンは、キンポウジュ（別名：ブラシノキ）の産生するアレロパシー物質の派生研究により発見された新規トリケトン系除草剤である。メソトリオンについては、既存の個別試験法の適用は困難であると判断され、又、一斉試験法（LC/MS - I 法及び LC/MS - II 法）の適用についても、検討に供した 10 作物（対象作物は後出）の全てにおいて不可であることが確認された。新たな試験法を策定するにあたり、メソトリオン同様のトリケトン系新規除草剤であるテフリトリオンについても同時に検討したところ、同一方法による分析が可能であると判断されたため、両成分で同一の試験法（測定条件を除く）を提案することとした。

3. 構造式等

メソトリオン



C₁₄H₁₃NO₇S : 339.31

2-(4-mesylyl-2-nitrobenzoyl)cyclohexane-1,3-dione

融点：165.3℃(分解)

蒸気圧：5.7×10^{-6} Pa (20℃)

溶解性(20℃): 水 0.16 g/L(蒸留水, 20℃),

アセトン 76.4, アセトニトリル 96.1, 酢酸エチル 16.6, キシレン 1.4,

メタノール 3.6 (以上 g/L, 20℃)

解離定数: pKa = 3.12(20℃)

分配係数: logP_{OW} = 0.11(蒸留水, 20℃)

【農薬抄録から引用】

4. 基準値

米(玄米)、とうもろこし、その他の穀類、さとうきび、アスパラガス、オクラ、ラズベリー、ブラックベリー、ブルーベリー、クランベリー、その他のベリー類果実、その他のオイルシード、その他のハーブ 各 0.01 ppm

5. 分析対象成分

メソトリオン(本体のみ)

6. 試験法の組み立て

提案法は、メソトリオンの作物残留性試験の分析法¹⁾で採用されている、ポリマー系ミニカラム(逆相)、強塩基性陰イオン交換樹脂ミニカラム及び強酸性陽イオン交換体ミニカラム(茶のみ)により精製し、広範囲な農産物への適用を考慮し、高感度かつ高い選択性が期待できるLC-MSにより測定する方法とした。検討作物として、基準設定作物である「米(玄米)」の他、「大豆、ばれいしょ、ほうれんそう、キャベツ、りんご、オレンジ、茶、トマト及びごま」を選定し、適用を試みたところ、良好な結果が得られた。

[実験方法]

1. 試料

下記 10 種農産物試料を次の手順で前処理して分析法の検討に供した。

1) 米(玄米)

試料(約 500 g)を超遠心粉砕機で 425 µm の標準網ふるいを通るように粉砕均一化した。

2) 大豆(乾燥子実)

試料(約 500 g)を超遠心粉砕機で 425 µm の標準網ふるいを通るように粉砕均一化した。

3) ばれいしょ(塊茎: 泥を水で軽く洗い落としたもの)

試料(約 500 g)をミキサーで細切均一化した。

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

試料(約 500 g)をミキサーで細切均一化した。

5) キャベツ(葉球: 外側変質葉及びしんを除去したもの)

櫛切りにしてしんを除去した試料(約 500 g)をミキサーで細切均一化した。

6) りんご(果実: 花落ち、しん及び果梗の基部を除去したもの)

櫛切りにして花落ち、しん及び果梗の基部を除去した試料(約 500 g)をミキサーで細切均一化した。

7) オレンジ(果実全体: へたを除去したもの)

試料(約 500 g)をミキサーで細切均一化した。

8) 茶(荒茶)

試料(約 100 g)をミキサーで細切均一化した。

9) トマト(果実: へたを除去したもの)

試料(約 500 g)をミキサーで細切均一化した。

10) ごま(種子)

試料(約 500 g)をミキサーで細切均一化した。

2. 試薬・機器

アセトニトリル、メタノール： 残留農薬試験用（和光純薬工業株式会社）

メタノール： LC-MS 用（和光純薬工業株式会社）

水： 脱イオン水を Milli-Q System（日本ミリポア株式会社）で精製したもの

メソトリオン標準品： 純度 99.7%（シンジェンタジャパン株式会社）

その他の試薬： 特級

ケイソウ土： Celite 545（和光純薬工業株式会社）

スチレンジビニルベンゼン共重合体カラム（ポリマー系ミニカラム）：

InertSep PLS-2、500 mg/6 mL（ジーエルサイエンス株式会社）

強塩基性陰イオン交換樹脂ミニカラム： Oasis MAX、500 mg/6 mL（日本ウォーターズ株式会社）

強酸性陽イオン交換体ミニカラム（ベンゼンスルホンプロピルシリル化シリカゲルミニカラム）： InertSep SCX、1 g/6 mL（ジーエルサイエンス株式会社）

電子天秤： AG245、XS2002S（メトラー・トレド株式会社）

ミキサー： MX-V100（パナソニック株式会社）、
ラッセルホブズ 3901JP（Salton Europe Limited）

超遠心粉碎機： ZM100（株式会社レッチェ）

3. LC-MS 測定装置

1) LC-MS

	型 式	会 社
MS 装置	G1946D（四重極型）	Agilent 社
LC 装置	1100 シリーズ ポンプ： G1312A、4 液低圧グラジェント式 オートサンプラー： G1329A	Agilent 社
データ処理装置	ChemStation	Agilent 社

4. LC-MS 測定条件

LC 条件	
カラム	L-column2 ODS サイズ：内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒径 3 μ m 会社：化学物質評価研究機構
移動相流速 (mL/min)	0.2
注入量 (μ L)	5
カラム温度 ($^{\circ}$ C)	40
移動相 (v/v)	0.1vol%酢酸含有メタノール/0.1vol%酢酸 (25:75)
保持時間 (min)	25.9

MS 条件	
測定モード	MS、選択イオン検出
イオン化モード	ESI (+)
イオン導入電圧 (V)	3000
フラグメンター電圧 (V)	140
乾燥ガス流量 (L/min)	窒素、12
乾燥ガス温度 ($^{\circ}$ C)	350
ネブライザー圧力 (psi)	50
モニタリングイオン	340

5. 定量

メソトリオン標準品 20.1 mg (20.0 mg 相当) を 100 mL 容メスフラスコに精秤し、アセトニトリルに溶解し、アセトニトリルで定容して 200 mg/L 溶液を調製した。この溶液を 0.1vol%酢酸及びメタノール (1:1) 混液で希釈して 0.001、0.002、0.008、0.02 及び 0.04 mg/L の標準溶液を調製した。この溶液の 5 μ L を LC-MS に注入して、データ処理装置を用いてメソトリオンのピーク面積を測定し、横軸に重量、縦軸にピーク面積をとって検量線を作成した。

次項に従い調製した試験溶液 5 μ L を LC-MS に注入し、検量線よりメソトリオンの含量を求め、試料中の残留濃度を算出した。

6. 試験溶液の調製

1) 概要

試料をアセトニトリルで抽出し、スチレンジビニルベンゼン共重合体カラム、強塩基性陰イオン交換樹脂ミニカラム及び強酸性陽イオン交換体ミニカラム (茶のみ) で精製した後、LC-MSで測定及び確認した。

2) 抽出

果実及び野菜の場合は試料20.0 gを三角フラスコに量り採った。穀類、豆類及び種実類の場合は試料10.0 g、茶の場合は試料5.00 gを三角フラスコに量り採り、それぞれ水20 mLを加え、30分間放置した。これにアセトニトリル100 mLを加えてホモジナイズする。

予め、桐山ロートにろ紙（φ60 mm、日本理化学器械 No.704）を敷き、ケイソウ土を約1 cmの厚さに積層して少量のアセトニトリルで洗浄した。抽出懸濁液を吸引ろ過した後、ろ紙上の残留物を三角フラスコに掻き取り、アセトニトリル50 mLを加えてホモジナイズし、上記と同様にろ過した。ろ液を共栓付きメスシリンダーに合わせ、アセトニトリルを加えて正確に200 mLとし、果実及び野菜の場合はこの5 mL、穀類、豆類及び種実類の場合は10 mL、茶の場合は20 mLを採り、水10 mLを加えた後、40℃以下で約10 mLまで濃縮した。

3) 精製

① スチレンジビニルベンゼン共重合体カラムクロマトグラフィー

スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラム（InertSep PLS-2, 500 mg）にアセトニトリル及び水各5 mLを順次注入し、各流出液を捨てた。このカラムに、2) で得られた溶液を注入した後、水5 mLで容器を洗浄した溶液を注入し、各流出液を捨てた。次いで、水及びアセトニトリル（1：1）10 mL混液を注入し、溶出液をナス型フラスコに採った。

② 強塩基性陰イオン交換樹脂カラムクロマトグラフィー

強塩基性陰イオン交換樹脂ミニカラム（Oasis MAX, 500 mg）にアセトニトリル及び水各5 mLを順次注入し、各流出液を捨てた。このカラムに、①で得られた溶液を注入した後、アセトニトリル5 mLで容器内を洗浄した溶液を注入し、各流出液を捨てた。次いで、酢酸及びアセトニトリル（1：50）混液10 mLを注入し、溶出液をナス型フラスコに採った。

③ 強酸性陽イオン交換体カラムクロマトグラフィー（追加精製；茶において実施）

強酸性陽イオン交換体ミニカラム（InertSep SCX, 1 g）に酢酸及びアセトニトリル（1：50）混液5 mLを注入し、流出液を捨てた。このカラムに、②で得られた溶液を注入した後、同混液5 mLで容器内を洗浄した溶液を注入し、全溶出液をナス型フラスコに採った。

④ 試験溶液の調製

②又は③で得られた溶液について、ロータリーエバポレーターを用いて40℃以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物を0.1vol%酢酸及びメタノール（1：1）混液に溶解し、正確に2.5 mLとしたものを試験溶液とした。

分析フローチャート

(抽出)

秤 取

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

アセトニトリル抽出

- ↓ アセトニトリル 100 mL、ホモジナイズ、抽出・ろ過
- 残渣はアセトニトリル 50 mL で同様にホモジナイズ、抽出・ろ過
- ろ液を合わせ、アセトニトリルで 200 mL に定容
- 果実、野菜は 5 mL、穀類、豆類及び種実類は 10 mL、茶は 20 mL を採取
(各試料 0.5 g 相当)
- 水 10 mL を加えて減圧濃縮

(精製)

ポリマー系ミニカラム(500 mg: InertSep PLS-2)

- ↓ 濃縮液をカラム(アセトニトリル及び水各 5 mL で洗浄済)に負荷
- 水 5 mL を流下
- 水・アセトニトリル(1:1) 10 mL で溶出

強塩基性陰イオン交換樹脂ミニカラム(500 mg: Oasis MAX)

- ↓ 溶出液をカラム(アセトニトリル及び水各 5 mL で洗浄済)に負荷
- アセトニトリル 5 mL を流下
- 酢酸・アセトニトリル(1:50) 10 mL で溶出

強酸性陽イオン交換体ミニカラム(1 g: InertSep SCX) [追加精製(茶で実施)]

- ↓ 溶出液をカラム(酢酸・アセトニトリル(1:50) 5 mL で洗浄済)に負荷
- 酢酸・アセトニトリル(1:50) 5 mL を流下(全溶出液分取)

試験溶液の調製

- 全溶出液を濃縮乾固
- 0.1vol%酢酸・メタノール(1:1) 混液 2.5 mL に溶解

7. マトリックス添加標準溶液の調製

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

[結果及び考察]

1. 測定条件の検討

1) 測定イオンの検討

2 mg/L濃度の標準溶液をフローインジェクション測定して得たメソトリオンのマススペクトルを図1に示す。その結果からメソトリオンのプロトン付加分子(m/z 340 $[M+H]^+$)をモニタリングイオンに選択した。なお、メソトリオンはネガティブモードにおける検出も可能であり(作物残留性試験の分析法¹⁾参照)、本検討で用いたLC-MS装置では、ポジティブモードとほぼ同等の測定感度が得られたが、作物マトリックス存在下のクロマトグラムにおける夾雑物ピークについて比較検討し、ポジティブモードを選択した。

2) 測定条件の検討

一般的なODSカラムを用い、カラムの保持及びイオン化の安定を考慮して酢酸を混合したメタノール及び水の溶離液系において検討し、実験方法の第4項に記載した測定条件を採用した。

3) 検量線の直線性

本検討において0.005~0.2 ngの濃度範囲に作成した検量線の相関係数は、いずれも0.999以上と良好な直線性であった(図2参照)。

4) 検出感度

定量限界相当量(0.01 ng)のクロマトグラムを図3に、又、基準値対象作物(玄米)を含む代表的な10農産物の無添加試料のクロマトグラムを図4~13に示す。メソトリオンの保持時間付近には、測定を妨害する夾雑成分ピークは認められなかった。

定量限界の算出例を以下に示す。

定量限界

【残留基準値(案): 0.01 ppm】

0.01 mg/kg $[(2.5 \text{ mL}/0.5 \text{ g}^{*1}) \times (0.01 \text{ ng}/5 \text{ }\mu\text{L})]$

- *1
- 20.0 g \times 5 mL / 200 mL (果実及び野菜の場合)
 - 10.0 g \times 10 mL / 200 mL (穀類、豆類及び種実類の場合)
 - 5.00 g \times 20 mL / 200 mL (茶の場合)

2. 試験溶液調製法の検討

1) 抽出条件の設定

分析条件を参照した作物残留性試験¹⁾における抽出溶媒は、変化生成物(高極性物質)が分析対象に含まれるためアセトニトリル及び水(1:1)混液であったが、分析対象成分はメソトリオン本体のみとなることから、アセトニトリルで抽出する方法とした。

2) 精製方法の検討

採用した精製操作(ポリマー系ミニカラム、強塩基性陰イオン交換樹脂ミニカラム及び強酸性陽イオン交換体ミニカラム)におけるメソトリオンの回収率を示す。

① ポリマー系ミニカラム(500 mg: InertSep PLS-2)

アセトニトリルと水各5 mLで予備洗浄した後、下記溶媒で順次溶出した場合の回収率を示す。

供試溶液:標準品0.1 µgを水5 mLに溶解

(表1)	溶媒	メソトリオン(%)
供試溶液(負荷)		<1
水・アセトニトリル(9:1)	5 mL	20
水・アセトニトリル(7:3)	5 mL	69
水・アセトニトリル(5:5)	5 mL	<1
水・アセトニトリル(3:7)	5 mL	<1
アセトニトリル	5 mL	<1
合計		89

② ポリマー系ミニカラム(500 mg: InertSep PLS-2)

①の結果に基づき、下記条件について確認した。アセトニトリルと水各5 mLで予備洗浄した後、下記溶媒で順次溶出した場合の回収率を示す。

供試溶液:標準品0.1 µgを水5 mLに溶解

(表2)	溶媒	メソトリオン(%)
供試溶液(負荷)		<1
水	5 mL	<1
水	5 mL	<1
水・アセトニトリル(1:1)	10 mL	95
合計		95

③ 強塩基性陰イオン交換樹脂ミニカラム(500 mg: Oasis MAX)

アセトニトリルと水各5 mLで予備洗浄した後、下記溶媒で順次溶出した場合の回収率を示す。

供試溶液:標準品0.1 µgを水・アセトニトリル(5:5)5 mLに溶解

(表3)	溶媒	メソトリオン(%)
供試溶液(負荷)		<1
水・アセトニトリル(5:5)	10 mL	<1
アセトニトリル	10 mL	<1
酢酸・アセトニトリル(1:50)	10 mL	100
酢酸・アセトニトリル(1:50)	10 mL	<1
合計		100

④ 強酸性陽イオン交換体ミニカラム(1 g: InertSep SCX)

酢酸・アセトニトリル(1:50) 5 mLで予備洗浄した後、下記溶媒で順次溶出した場合の回収率を示す。

供試溶液:標準品0.1 µgを酢酸・アセトニトリル(1:50) 10 mLに溶解

(表4)	溶媒	メソトリオン(%)
供試溶液(負荷)、酢酸・アセトニトリル(1:50)	5 mL	92
酢酸・アセトニトリル(1:50)	5 mL	<1
酢酸・アセトニトリル(1:50)	5 mL	<1
合計		92

参考データとして、別途検討した、代表的な固相抽出カラムにおける保持、溶出パターンを以下に示す。

⑤ C18ミニカラム(1,000 mg: InertSep C18-C)

メタノールと水各5 mLで予備洗浄した後、各溶媒で順次溶出した場合の回収率を示す。

供試溶液:標準品0.2 µgを水5 mLに溶解

(表5)	溶媒	メソトリオン(%)
供試溶液(負荷)		<1
メタノール・水(1:9)	10 mL	<1
メタノール・水(3:7)	10 mL	41
メタノール・水(5:5)	10 mL	39
メタノール・水(8:2)	5 mL	11
メタノール	5 mL	3
合計		94

C18ミニカラムにおいては、ポリマー系ミニカラムに比べて溶出バンドが広がる傾向が認められた。その為、安定した保持及び溶出が期待できるポリマー系ミニカラムを採用することとした。

⑥ 強塩基性陰イオン交換体ミニカラム(500 mg: InertSep SAX)

アセトニトリル5 mLで予備洗浄した後、下記溶媒で順次溶出した場合の回収率を示す。

供試溶液:標準品0.1 µgをアセトニトリル20 mLに溶解

(表6)	溶媒	メソトリオン(%)
	供試溶液(負荷)	<1
	アセトニトリル 10 mL	<1
	酢酸・アセトニトリル(1:50) 5 mL	76
	酢酸・アセトニトリル(1:50) 5 mL	10
	酢酸・アセトニトリル(1:50) 5 mL	3
	酢酸・アセトニトリル(1:50) 5 mL	2
	合計	91

シリカゲル基材の強塩基性陰イオン交換体ミニカラムにおいては、ポリマー系の強塩基性陰イオン交換樹脂ミニカラムに比べて溶出バンドが広がる傾向が認められた。その為、強塩基性陰イオン交換樹脂ミニカラムを採用することとした。

⑦ フロリジルミニカラム(910 mg: Sep-pakフロリジル)

酢酸・アセトン(1:99)10 mLで予備洗浄した後、各溶媒で順次溶出した場合の回収率を示す。

供試溶液:標準品0.2 µgを酢酸・アセトン(1:99)5 mLに溶解(各溶媒で順次洗い込み)

(表7)	溶媒	メソトリオン(%)
	供試溶液(負荷)	<1
	酢酸・アセトン(1:100) 5 mL	<1
	酢酸・アセトン・メタノール(1:90:10) 10 mL	94
	酢酸・アセトン・メタノール(1:80:20) 10 mL	8
	酢酸・アセトン・メタノール(1:50:50) 10 mL	1
	合計	103

上記結果に基づく保持、溶出条件においては、精製効果が認められなかった。

⑧ シリカゲルミニカラム(910 mg: Sep-pakフロリジル)

酢酸・酢酸エチル(1:99)と酢酸・ヘキサン(1:99)各10 mLで予備洗浄した後、各溶媒で順次溶出した場合の回収率を示す。

供試溶液:標準品0.2 µgを酢酸・ヘキサン(1:99)5 mLに溶解(各溶媒で順次洗い込み)

(表8)	溶媒	メソトリオン(%)
	供試溶液(負荷)	<1
	酢酸・ヘキサン(1:100) 5 mL	<1
	酢酸・酢酸エチル(1:100) 10 mL	2
	酢酸・アセトン(1:100) 10 mL	58
	酢酸・アセトン・メタノール(1:50:50) 10 mL	25
	合計	85

吸着が強く、溶出が困難であった。

⑨ グラファイトカーボンミニカラム(500 mg: InertSep GC)

酢酸エチル5 mLで予備洗浄した後、各溶媒で順次溶出した場合の回収率を示す。

供試溶液:標準品1 µgを酢酸エチル10 mLに溶解

(表9)	溶媒	メソトリオン(%)
	供試溶液(負荷)	68
	酢酸エチル 10 mL	21
	酢酸エチル 10 mL	3
	トルエン・酢酸エチル(1:3) 20 mL	2
	トルエン・酢酸エチル(1:1) 20 mL	1
	合計	95

試料マトリクスが加わった際、溶出不良となる傾向があり、又、精製効果が認められなかった。

3. 添加回収実験結果

1) 個別試験法における添加回収結果

野菜及び果物については、三角フラスコに均一化したブランク試料20 gを秤取し、メソトリオン標準溶液0.1 µg/mLアセトニトリル標準溶液2 mLを添加してよく混合し、30分間放置した。玄米及び大豆については、三角フラスコに均一化したブランク試料10 gを採取し、メソトリオン標準溶液0.1 µg/mLアセトニトリル標準溶液1 mLを添加してよく混合し、30分間放置した。茶については、三角フラスコに均一化したブランク試料5 gを採取し、メソトリオン標準溶液0.1 µg/mLアセトニトリル標準溶液0.5 mLを添加してよく混合し、30分間放置した。玄米、大豆及び茶試料については、さらに水20 mLを加えて室温に2時間放置した後、試験法に従って分析して添加回収率を算出した。0.01 ppm添加試料での真度は74~100%の範囲であり、その併行精度 (RSD%) は8.5%以下で良好であった。

試料	添加濃度 (ppm)	メソトリオン		
		回収率 (%) (n=5)	真度	RSD%
玄米*	0.01	74, 72, 76, 72, 76	74	2.7
大豆	0.01	76, 86, 87, 76, 77	80	7.0
ばれいしょ	0.01	79, 82, 81, 80, 86	82	3.3
ほうれんそう	0.01	94, 84, 84, 90, 75	85	8.5
キャベツ	0.01	90, 77, 87, 82, 82	84	6.0
りんご	0.01	98, 92, 96, 94, 98	96	2.7
オレンジ	0.01	81, 83, 87, 85, 83	84	2.7
茶**	0.01	79, 88, 88, 75, 84	83	6.9
トマト	0.01	89, 83, 83, 90, 85	86	3.9
ごま	0.01	95, 103, 99, 103, 100	100	3.3

* 基準値; 0.01 ppm

** 強酸性陽イオン交換体ミニカラムによる精製を追加した試験法による

2) ブランク試料の妨害状況 (図4~13)

メソトリオンの測定に影響を及ぼす夾雑物ピークは、いずれの試料においても認められなかった。ただし、茶においては、強酸性陽イオン交換体ミニカラムによる追加精製が必要であった (図11参照)。

4. 試料マトリックスの測定への影響

マトリックス効果に関する検討結果を次表に示す。溶媒調製標準溶液に対するマトリックスを含む標準溶液（基準値相当濃度）の相対値（%）は、95～103%の範囲であり、何れの農産物においても、イオン化に対する試料夾雑物の影響はほとんど認められなかった。

試料	添加濃度 (ppm)	メソトリオン 相対値(%)
玄米	0.01	97
大豆	0.01	95
ばれいしょ	0.01	103
ほうれんそう	0.01	95
キャベツ	0.01	100
りんご	0.01	98
オレンジ	0.01	100
茶	0.01	98
トマト	0.01	98
ごま	0.01	98

相対値（%）は、溶媒調製標準溶液に対するマトリックス添加標準溶液の面積比で示した。茶は強酸性陽イオン交換体ミニカラムによる追加精製を行ったマトリックス溶液を用いた。

5. 考察

作物残留性試験における分析法に基づき設定した試験法により、基準値設定作物である「玄米」の他、「大豆、ばれいしょ、ほうれんそう、キャベツ、りんご、オレンジ、茶、トマト及びごま」における妥当性を確認した評価結果は、いずれも良好であった。従って、本試験法は穀類、豆類、種実類、果実、野菜及び茶等の農産物に適用可能であると判断した。

提案法は、メソトリオンについて、一斉試験法（LC/MS - I 法及びLC/MS - II 法）の適用が困難であること、又、より一般的な固相抽出系による精製法（C₁₈等シリカゲル基材の固相や順相系固相を用いた精製）は適用が困難であることを確認した上で、メソトリオンと同様のトリケトン系除草剤であるテフリルトリオンにも適用可能な試験法として策定したものである。

6. 結論

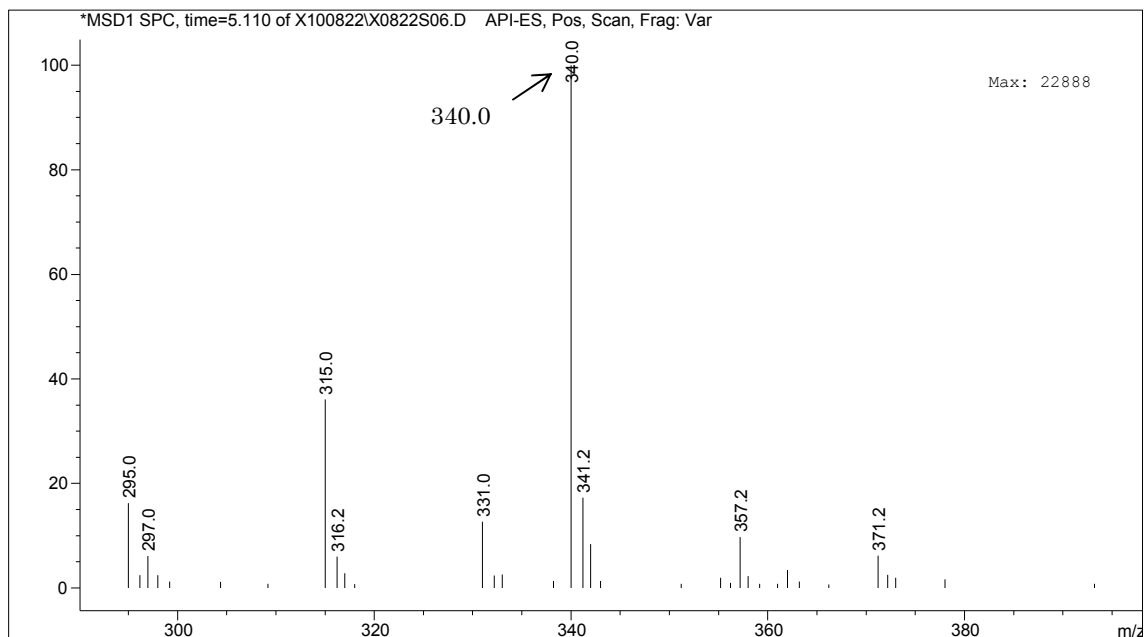
メソトリオン試験法（農産物）として、アセトニトリルで抽出し、ポリマー系ミニカラム（逆相）、強塩基性陰イオン交換樹脂ミニカラム及び強酸性陽イオン交換体ミニカラム（茶のみ）により精製した後、LC-MSにより測定する方法を提案する。

玄米等の10農産物における0.01 ppm添加での真度は74~100%（併行精度2.7~8.5%）であり、定量限界はいずれの農産物においても0.01 mg/kgが可能であることが確認された。

[参考文献]

- 1) メトリオンの作物残留性（玄米）試験結果報告（未公開資料の抜粋）

図 1. メソトリオンの MS スペクトル (試験法検討に用いた LC-MS による)



[操作条件]

測定機器：G1946D 質量分析計、1100 シリーズ高速液体クロマトグラフ (Agilent 社)

移動相：メタノール/0.1vol%ギ酸 (3:7) 混液、フローインジェクション

流速：0.2 mL/min

注入量：2 μ L

イオン化モード：ESI (+)

イオン導入電圧：3000 V

フラグメンター電圧：140 V

乾燥ガス流量：12 L/min (窒素)

乾燥ガス温度：350°C

ネブライザー圧力：50 psi

Scan 走査範囲：m/z 50~900

図 2. 検量線の一例

CalibrationCurve --- 2011/03/18
メソトリオン
 $y = 1686979.247x - 676.857$
 $r = 0.999988$

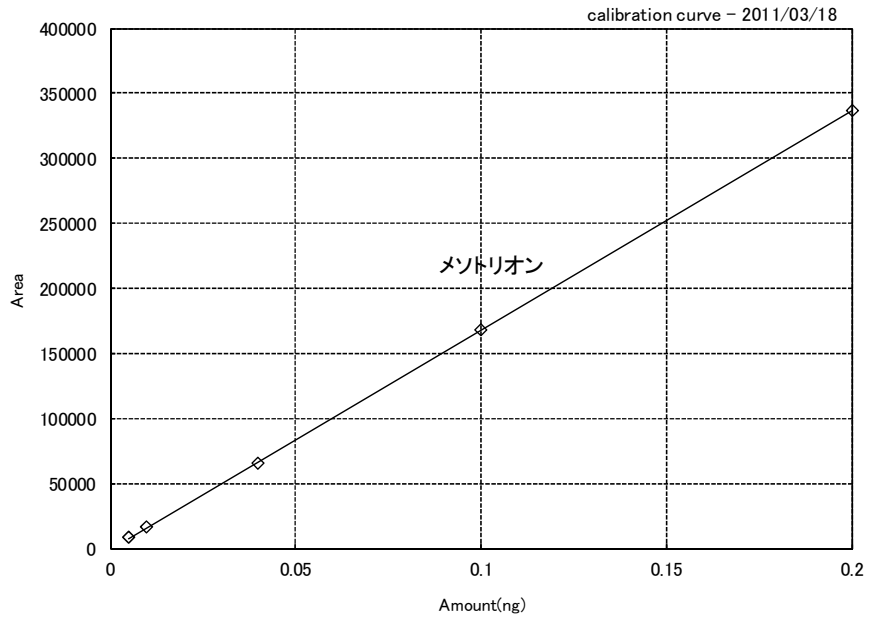


図 3. メソトリオン標準品のクロマトグラム

図 3-1. メソトリオン標準品のクロマトグラム

(玄米及び茶測定時)

標準品 0.2 ng

標準品 0.01 ng (定量限界相当量)

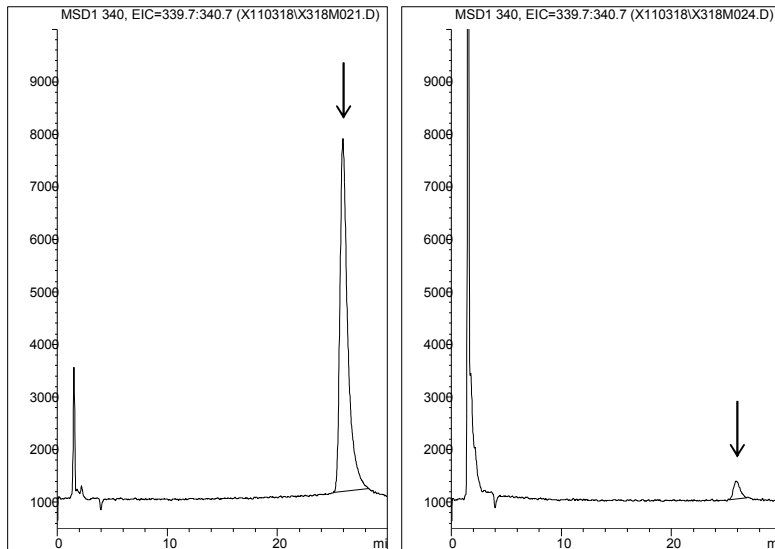


図 3-2. メソトリオン標準品のクロマトグラム

(大豆、ばれいしょ、りんご、トマト及びごま測定時)

標準品 0.2 ng

標準品 0.01 ng (定量限界相当量)

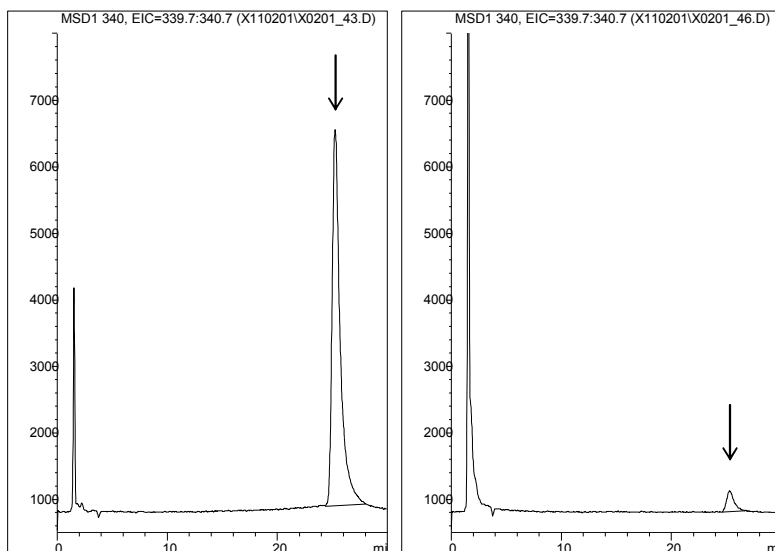


図 3-3. メソトリオン標準品のクロマトグラム
(ほうれんそう、キャベツ及びピーチ測定時)

標準品 0.2 ng

標準品 0.01 ng (定量限界相当量)

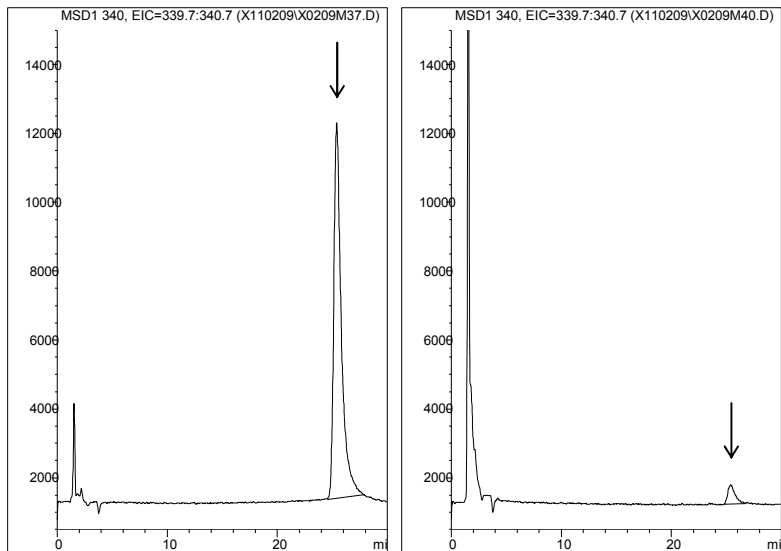
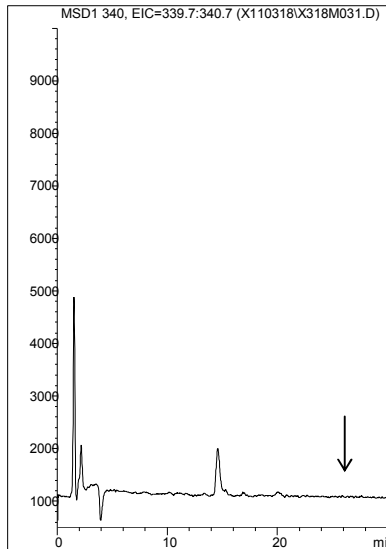


図 4. 玄米のクロマトグラム

無添加

5 μ L/2.5 mL/0.5 g



0.01 ppm 添加

5 μ L/2.5 mL/0.5 g

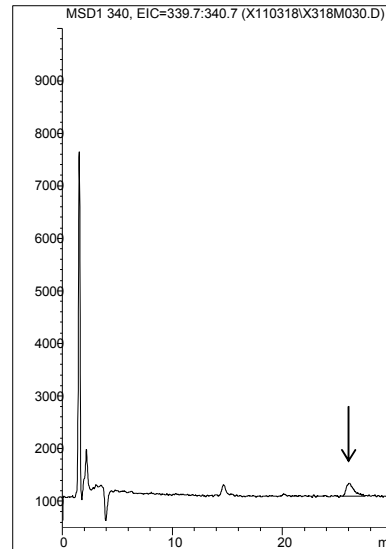
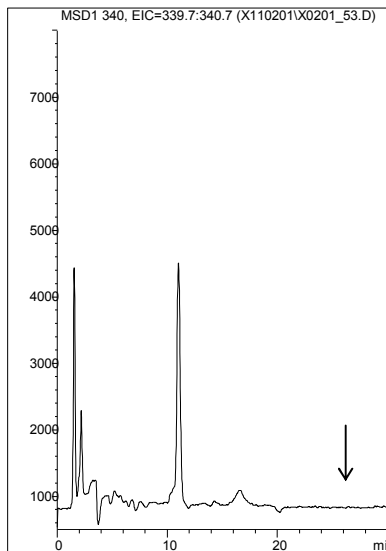


図 5. 大豆のクロマトグラム

無添加

5 μ L/2.5 mL/0.5 g



0.01 ppm 添加

5 μ L/2.5 mL/0.5 g

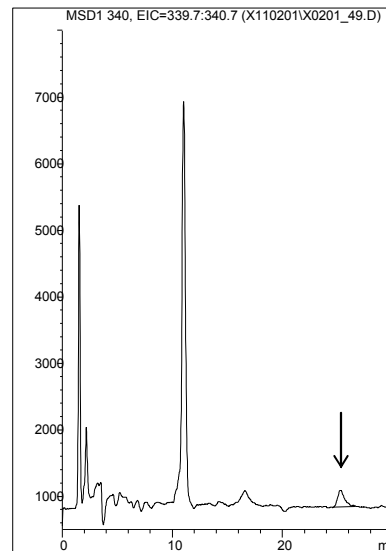


図 10. オレンジのクロマトグラム

無添加

0.01 ppm 添加

5 μ L/2.5 mL/0.5 g

5 μ L/2.5 mL/0.5 g

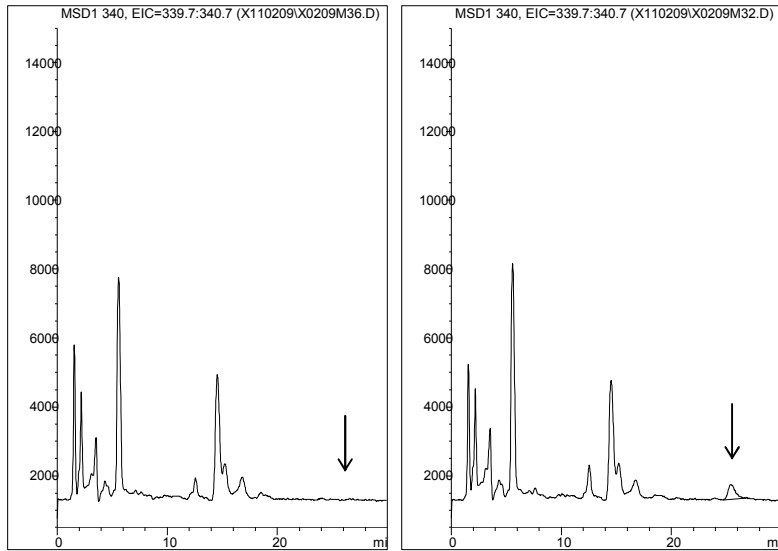


図 11. 茶のクロマトグラム

無添加

0.01 ppm 添加

5 μ L/2.5 mL/0.5 g

5 μ L/2.5 mL/0.5 g

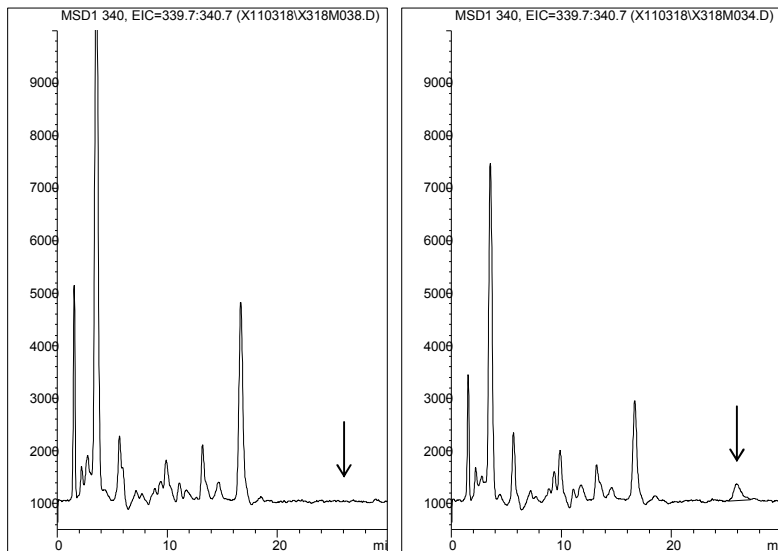


図 12. トマトのクロマトグラム

無添加

0.01 ppm 添加

5 μ L/2.5 mL/0.5 g

5 μ L/2.5 mL/0.5 g

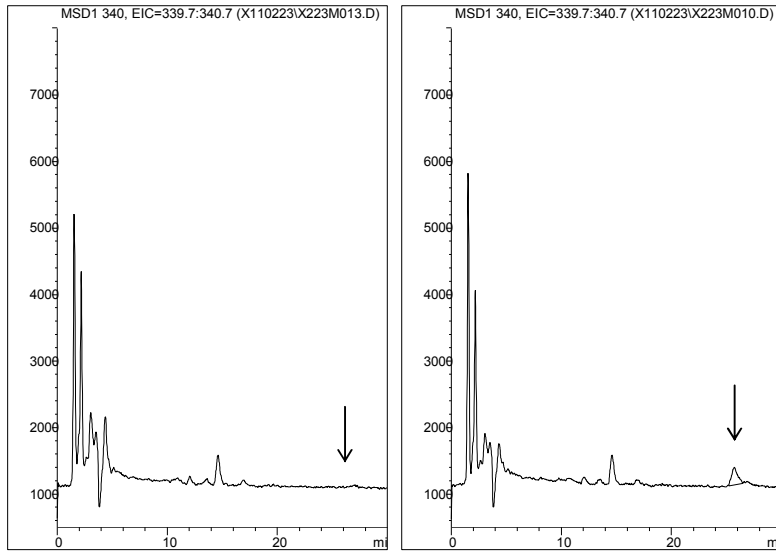


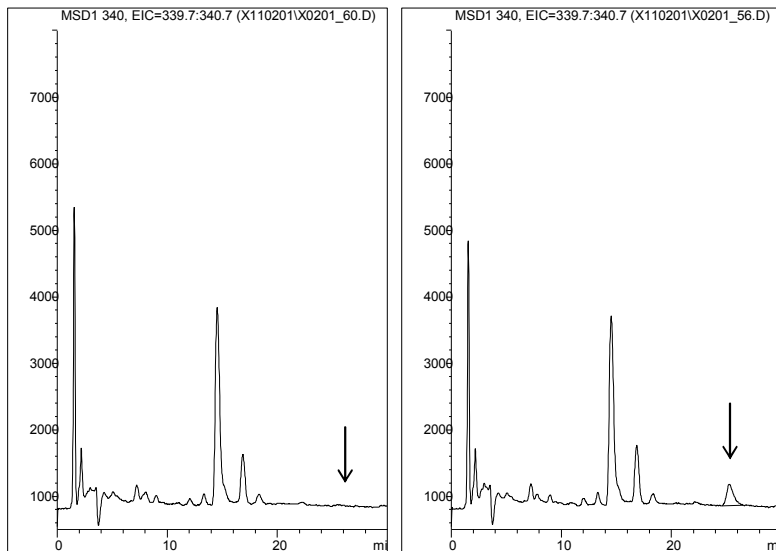
図 13. ごまのクロマトグラム

無添加

0.01 ppm 添加

5 μ L/2.5 mL/0.5 g

5 μ L/2.5 mL/0.5 g



[参考文献]

メトリオンの作物残留性（玄米）試験結果報告（未公開資料の抜粋、代謝物の同時分析法）

1. 試薬及び機器

アセトン, アセトニトリル, メタノール:	残留農薬試験用
水:	脱イオン水を Milli-Q System(Millipore 製)で精製したもの
メトリオン標準品:	純度 99.7%, 試験委託者提供
その他の試薬:	特級
グラファイトカーボンミニカラム:	Supelclean ENVI-Carb, 0.5 g/6 mL(SUPELCO 製)
陰イオン交換ミニカラム:	Oasis MAX, 0.5 g/6 mL(Waters 製)
ポリマー系ミニカラム:	Oasis HLB, 0.5 g/6 mL(Waters 製)
ろ過補助剤:	Celite 545(和光純薬工業製)
超遠心粉砕機:	ZM1 (Retsch 製)
液体クロマトグラフ・質量分析計(LC-MS/MS):	2795(高速液体クロマトグラフ, Waters 製) / Quattro Premier(タンデム四重極質量分析計, Waters 製)
データ処理装置:	MassLynx 4.0(Waters 製)

2. 液体クロマトグラフ・質量分析計(LC-MS/MS)の操作条件

2-1. 高速液体クロマトグラフの操作条件

カラム:	CAPCELL PAK C ₁₈ MG II, 5 µm (資生堂製) 内径 2.0 mm, 長さ 150 mm
溶離液:	A;0.1vol%酢酸, B;0.1vol%酢酸含有メタノール A:B (v/v) 90:10 – (20 min) – 40:60
流量:	0.2 mL/min
カラム温度:	40°C
保持時間:	17.1 min

2-2. 質量分析計の操作条件

イオン化法:	エレクトロスプレーイオン化法 (ESI) 負モード
コーンガス流量:	50 L/h (N ₂)
脱溶媒ガス流量:	850 L/h (N ₂)
脱溶媒ガス温度:	50°C
ソースブロック温度:	120°C
キャピラリー電圧:	3.2 kV
コーン電圧 :	15 V
コリジョン電圧:	10 V (コリジョンガス;Ar)

イオン検出法: MRM 法

モニタリングイオン: プリカーサーイオン m/z 338.0, プロダクトイオン m/z 290.6

3. 検量線の作成

メソトリオン標準品 10.0 mg を 50 mL 容のメスフラスコに精秤し、メタノールで定容して 200 mg/L 溶液を調製する。水／アセトニトリル(6:4, v/v)混液で希釈して 0.0005, 0.001, 0.005, 0.02 および 0.04 mg/L の標準溶液を調製する。この溶液の 10 μ L を前記条件の液体クロマトグラフ・質量分析計(LC-MS/MS)に注入して、データ処理装置を用いてメソトリオンのピーク高さを測定し、横軸に重量、縦軸にピーク高さをとって検量線を作成する。

4. 分析操作

4-1. 試料の前処理

試料全体から約 500 g を無作為に取り、超遠心粉砕機で粉砕する。

4-2. 抽出

粉砕した試料 10 g を三角フラスコにはかりとり、水 20 mL を加え 2 時間膨潤した後、アセトニトリル／水(5:5, v/v)混液 100 mL を加え、30 分間振とうする。抽出物をろ紙およびろ過補助剤を敷いた桐山漏斗で吸引ろ過し、残渣を同混液 50 mL で洗い、同様にろ過する。ろ液を合わせ同混液で 200 mL 定容とし、その 40 mL(試料 2 g 相当量)を分取する。

4-3. 精製

4-3-1. グラファイトカーボンミニカラムによる精製

グラファイトカーボンミニカラムにメタノールおよび水を順次 10 mL ずつ流下し前処理する。分取した抽出液を前処理したグラファイトカーボンミニカラムに流下する。さらに、2vol%ギ酸含有メタノール 10 mL をグラファイトカーボンミニカラム移して流下し、全溶出液を取り、40°C 以下の水浴中で約 20 mL まで減圧濃縮する。

4-3-2. 陰イオン交換ミニカラムによる精製

陰イオン交換ミニカラムにアセトニトリルおよび水を順次 10 mL ずつ流下し前処理する。濃縮液にアセトニトリル／水(5:5, v/v)混液 5 mL を添加し、前処理した陰イオン交換ミニカラムに流下する。さらに、アセトニトリル／水(1:9, v/v)混液 10 mL およびアセトニトリル 10 mL で容器内を順次洗浄し、これを陰イオン交換ミニカラム移して流下し、それらの流出液を捨てる。次に、2vol%ギ酸含有アセトニトリル 20 mL を流下し、溶出液を取り、40°C 以下の水浴中で減圧濃縮し、最後は窒素気流下で溶媒を留去する。

4-3-3. ポリマー系ミニカラムによる精製

ポリマー系ミニカラムにメタノールおよび水を順次 10 mL ずつ流下し前処理する。残留物を 0.5vol%酢酸 20 mL に溶解してポリマー系ミニカラムに移して流下する。さらに 1vol%酢酸 10 mL および 1vol%酢酸／メタノール(8:2, v/v)混液 10 mL で容器内を順次洗浄し、これをポリマー系ミニカラム移して流下し、それらの流出液を捨てる。次に 2vol%ギ酸含有メタノール 20 mL を流下し、溶出液を取り、40°C 以下の水浴中で減圧濃縮し、最後は窒素気流下で溶媒を留去する。

4-4. 定量

残留物を適量(4~10 mL)の水／アセトニトリル(6:4, v/v)混液に溶解し、その 10 μ L を前記条件の液体クロ

マトグラフ・質量分析計(LC-MS/MS)に注入してピーク高さを求め、検量線よりメソトリオンの重量を求め、試料中の残留濃度を算出する。

5. 定量限界および検出限界

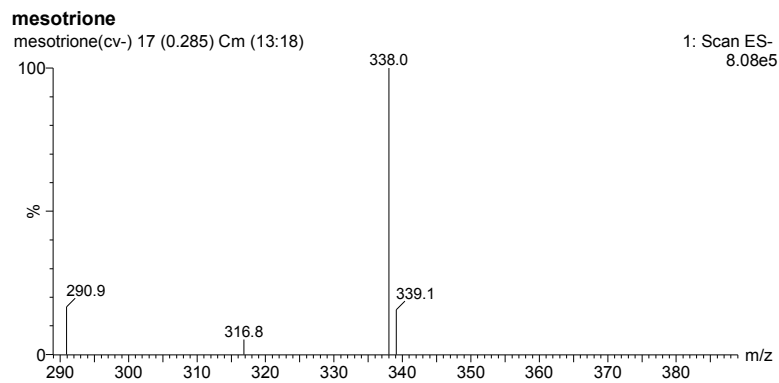
定量限界

定量限界相当量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μ L)	定量限界 (ppm)
0.01	2	4	10	0.002

検出限界

最小検出量 (ng)	試料採取量 (g)	最終溶液 (mL)	注入量 (μ L)	検出限界 (ppm)
0.005	2	4	10	0.001

メソトリオンのマススペクトル(一次イオン)の一例(負モード)



メソトリオンのプロダクトスキンスペクトルの一例
(プリカーサーイオン; $m/z=338.0$, 負モード)

