報 文

LC-MS/MSを用いた畜産物中のヘキサジノンおよび主要代謝物の分析法

(平成30年2月9日受理)

久保田晶子¹ 岡部 亮¹ 柿本洋一郎¹ 根本 了² 青柳光敏^{1,*}

Determination of Hexazinone and Its Major Metabolites in Livestock Products by LC-MS/MS

Akiko KUBOTA¹, Ryo OKABE¹, Youichiro KAKIMOTO¹, Satoru NEMOTO² and Mitsutoshi AOYAGI^{1,*}¹ Hokkaido Institute of Public Health: Kita-19, Nishi-12, Kita-ku, Sapporo 060-0819, Japan;² National Institute of Health Sciences: 3-25-26 Tonomachi, Kawasaki-ku, Kawasaki 210-9501, Japan;

* Corresponding author

A method for the determination of hexazinone and three metabolites (hexazinone metabolite B, hexazinone metabolite C, hexazinone metabolite F) in livestock products by LC-MS/MS was developed. Hexazinone and the three metabolites were extracted from a sample with acetonitrile in the presence of *n*-hexane, and lipid was removed by acetonitrile/*n*-hexane partition. The acetonitrile extract was cleaned up using a SAX/PSA cartridge column. Average recoveries ($n=5$) of hexazinone and the three metabolites from cattle meat, fat, liver and milk spiked at the maximum residue limits (MRLs) or at 0.0025 mg/kg ranged from 85.6 to 96.0%, and the relative standard deviations ranged from 0.8 to 4.9%.

(Received February 9, 2018)

Key words: ヘキサジノン hexazinone; 主要代謝物 major metabolites; 除草剤 herbicide; 畜産物 livestock products; 液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析計 LC-MS/MS

緒 言

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¹⁾。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暫定基準値が設定されたが、食品安全委員会による食品健康影響評価を踏まえ、平成24年度に基準値の見直しが行われた^{*1,*2}。この改正により、農産物はヘキサジノンのみが規制対象となり、畜産物(乳を除く)はヘキサジノン、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(以下代謝物Bとする)および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(以下代謝物Fとする)、畜産物(乳

に限る)はヘキサジノン、代謝物B、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(以下代謝物Cとする)および代謝物Fが規制対象となった(Fig. 1)。これまでに食品中のヘキサジノン分析法として、ヘキサジノンのみを測定対象としたGC-MS(/MS)^{*3,2)~5)}またはLC-MS/MS^{6),7)}による一斉分析法の報告や一部の代謝物を含めたものとしてGC-NPDによる分析法の報告⁸⁾等があるが、畜産物中の上記規制対象物質すべてを分析可能な方法の報告は見られない。そこで、高感度で選択性の高いLC-MS/MSを用い、畜産物中のヘキサジノン、代謝物B、代謝物Cおよび代謝物Fを対象とした分析法を開発したので報告する。

実験方法

1. 試 料

試料は、札幌市内のスーパーマーケットで販売されていた牛の筋肉、脂肪、肝臓および牛乳の計4種を用いた。牛乳はそのまま、牛乳以外の試料については、細切した後、フードプロセッサーを用いて均一化した。

* 連絡先 aoyagi.mitsutoshi@pref.hokkaido.lg.jp

¹ 北海道立衛生研究所: 〒060-0819 札幌市北区北19条西12丁目² 国立医薬品食品衛生研究所: 〒210-9501 川崎市川崎区殿町3-25-26^{*1} 農薬評価書 ヘキサジノン <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“食品衛生法施行規則の一部を改正する省令及び食品、添加物等の規格基準の一部を改正する件について”平成24年12月28日、食安発第1228第4号(2012)。^{*3} 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、飼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)。

Fig. 1. Structures of analytes

2. 試薬・試液

ヘキサジノン標準品：和光純薬工業(株)製の残留農薬試験用農薬標準品（純度98%）を用いた。

代謝物B標準品：和光純薬工業(株)製の残留農薬試験用農薬標準品（純度98%）を用いた。

代謝物C標準品（異性体混合物）：和光純薬工業(株)製の残留農薬試験用農薬標準品（純度98%）を用いた。

代謝物F標準品：和光純薬工業(株)製の残留農薬試験用農薬標準品（純度98%）を用いた。

標準溶液：各標準品10 mgを精密に秤量し、メタノールに溶解して1,000 mg/L溶液としたものを標準原液とした。各標準原液を混合した後、メタノールで適宜希釈し、各標準品の濃度が0.0125, 0.025, 0.5, 5, 40および110 mg/Lの添加回収試験用標準溶液を調製した。添加回収試験用標準溶液をメタノールで適宜希釈し、0.0001~0.0825 mg/Lの検量線作成用標準溶液を調製した。

試薬：水およびメタノールは関東化学(株)製LC-MS用を、アセトニトリルおよび*n*-ヘキサンは関東化学(株)または和光純薬工業(株)製残留農薬試験用を、酢酸アンモニウムは和光純薬工業(株)製特級を用いた。

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（以下SAX/PSAミニカラムとする）：SIGMA-ALDRICH社製Supelclean SAX/PSA（500 mg/500 mg, 6 mL）をあらかじめアセトニトリル10 mLでコンディショニングした後、用いた。

ろ紙：東洋濾紙(株)製定量ろ紙No. 5A（直径110 mm）を用いた。

3. 装置

ホモジナイザー：IKA社製ウルトラタラックスT25デジタル（シャフトジェネレーター：S25N-18G）。

フードプロセッサー：パナソニック(株)製MK-K77。

遠心分離機：久保田商事(株)製ユニバーサル冷却遠心機5930。

LC-MS/MS：LC部(株)島津製作所製Prominence高圧グラジエントシステム、MS部(株)島津製作所製LCMS-8040。

4. LC-MS/MS条件

LC-MS/MS条件はTable 1に示した。

5. 試験溶液の調製

試料10 g（脂肪の場合は5 g）を量り採り、*n*-ヘキサン50 mLおよび*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル50 mLを加え、ホモジナイズした後、毎分3,000回転で10分間遠心分離し、アセトニトリル層を採り、ろ紙でろ過した。残留物および*n*-ヘキサン層に*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル25 mLを加えてホモジナイズした後、上記と同様に遠心分離し、アセトニトリル層をろ過した。得られたろ液を合わせ、アセトニトリルで100 mLに定容し、アセトニトリル抽出液とした。

SAX/PSAミニカラムに上記アセトニトリル抽出液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℃以下で減圧下濃縮し、窒素気流下で溶媒を除去した。この残留物をメタノール4 mL（脂肪の場合は2 mL）に溶解し、試験溶液とした。

6. 定量

検量線は、ヘキサジノン、代謝物B、代謝物Cおよび代謝物Fの添加回収試験における回収率25, 50, 75, 100, 125および150%相当の標準溶液5 μLをLC-MS/MSに注入し、ピーク面積により作成した。試験溶液についても5 μLを注入し、得られたピーク面積を用いて絶対検量線法により各化合物を定量した。

7. 添加回収試験

試料に添加回収試験用標準溶液を残留基準値濃度および定量下限値濃度（0.0025 mg/kg）で添加し、30分間静置した後、回収試験を行い、真度および併行精度を求めた。なお、牛の脂肪については、40℃以下の水浴で融解したものに添加し、冷凍庫で再凝固後、室温で30分間静置した後、回収試験を行った。試行回数は、無添加試料1回および添加試料5回で行った。

8. 試料マトリックスの測定への影響

無添加試料を実験方法5. 試料溶液の調製に従って操作し、ブランク試験溶液を調製した。この0.2 mLを採って溶媒除去した後、残留物に添加回収試験における回収率100%相当濃度の標準溶液0.2 mLを加えて溶解し、マトリックス添加標準溶液とした。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（各2回測定の平均値）を求めて試料マトリックスの測定への影響を検討した。

Table 1. LC-MS/MS operating conditions

Parameters		Setting		
LC Conditions				
	LC column	Inertsil ODS-4 (2.1 mm i.d.×150 mm, 3 μm)		
	Mobile phase	A = 5 mmol/L ammonium acetate		
		B = 5 mmol/L ammonium acetate in methanol		
	Linear gradient elution			
		Time (min)	A (%)	B (%)
		0	85	15
		1	60	40
		3.5	60	40
		6	50	50
		8	45	55
		17.5	5	95
		30	5	95
	Flow rate	0.2 mL/min		
	Injection volume	5 μL		
	Column temperature	40°C		
	Run time	45 min		
MS Conditions				
	Ionization mode	ESI (positive mode)		
	Probe voltage	4 kV		
	Desolvation Line temperature	150°C		
	Heat block temperature	500°C		
	Nebulizer gas flow	3 L/min		
	Drying gas flow	15 L/min		
Transition				
	Compound	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion (<i>m/z</i>)	Collision energy (V)
	Hexazinone	253	171 ^{a)}	17
		253	71 ^{b)}	35
	Metabolite B	239	157 ^{a)}	15
		239	71 ^{b)}	35
	Metabolite C	255	157 ^{a)}	18
		255	71 ^{b)}	35
	Metabolite F	225	143 ^{a)}	14
		225	101 ^{b)}	28

a) Used for quantitation b) Used for confirmation

結果および考察

1. LC-MS/MS測定条件の検討

1.1 MS測定条件の検討

ヘキサジノンおよび各代謝物をLC-MS/MSで測定するため、MS測定条件の検討を行った。まず、イオン化法としてESI法を採用し、イオン化条件を検討したところ、ポジティブモードにおいて各化合物のプロトン付加分子 ($[M+H]^+$) が強く観察された。次に各化合物のプロトン付加分子 ($[M+H]^+$) をプリカーサーイオンとして Selective Reaction Monitoring (SRM) モードにおける測定条件について検討した。衝突誘起解離によって得られたフラグメントイオンから選択した各化合物のモニターイオンをTable 1に示した。

1.2 LC条件の検討

食品中の残留農薬一斉試験法である厚生労働省通知「LC/MSを用いた農薬等の一斉試験法I (畜産物)」の移動相条件^{*2}を用いて、ヘキサジノン、代謝物B、代謝物Cお

よび代謝物Fの検出について検討を行った。Inertsil ODS-4 (ジーエルサイエンス(株)製)、L-column2 ODS ((一財)化学物質評価研究機構製)およびMightysil RP-18 AP (関東化学(株)製)について、5 mmol/L酢酸アンモニウム溶液および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結果、各化合物について最も良好なピーク形状が得られたInertsil ODS-4を分析カラムに選択した。

1.3 検量線

ヘキサジノン、代謝物B、代謝物Cおよび代謝物FをLC-MS/MSに注入し、検量線を作成した。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、おのおののピーク面積の合計を用いて検量線を作成した。各化合物について添加回収試験における回収率25, 50, 75, 100, 125および150%相当の標準溶液の濃度範囲で作成した検量線の決定係数 r^2 は0.995以上であり、良好な直線性を示した。

Table 2. Recoveries of analytes from the clean-up cartridge column

Compound	Recovery (%)					Total
	Acetonitrile					
	0–5 mL	5–10 mL	10–15 mL	15–20 mL	20–25 mL	
Hexazinone	100	<0.5	N.D.	N.D.	N.D.	100
Metabolite B	97	<0.5	N.D.	N.D.	N.D.	97
Metabolite C	1	94	3	<0.5	N.D.	98
Metabolite F	N.D.	37	56	4	N.D.	97

N.D.: not detected.

Table 3. Results of recovery tests from livestock products

Compound	Sample	Added (mg/kg)	Mean recovery ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)	Peak area ratio ^{c)}
Hexazinone	Cattle meat	0.5	95.4	1.3	0.97
		0.0025	90.4	2.2	0.97
	Cattle fat	0.1	92.2	2.4	1.00
		0.0025	96.0	3.2	1.02
	Cattle liver	4 ^{d)}	94.1	1.3	0.99
		0.0025	90.3	1.8	1.00
Metabolite B	Cattle milk	11 ^{e)}	90.9	4.8	0.99
		0.0025	87.3	4.0	1.02
	Cattle meat	0.5	93.3	1.6	0.97
		0.0025	91.1	2.8	1.01
	Cattle fat	0.1	91.7	2.6	1.00
		0.0025	93.4	3.1	1.03
Metabolite C	Cattle liver	4 ^{d)}	93.7	1.0	0.99
		0.0025	89.5	0.8	0.97
	Cattle milk	11 ^{e)}	90.6	4.8	1.00
		0.0025	89.9	3.8	1.00
	Cattle meat	0.5	89.3	1.9	0.96
		0.0025	89.2	2.1	0.99
Metabolite F	Cattle fat	0.1	89.7	2.3	1.00
		0.0025	90.6	3.7	1.02
	Cattle liver	4 ^{d)}	90.7	1.4	0.99
		0.0025	85.6	1.1	0.98
	Cattle milk	11 ^{e)}	89.7	4.6	0.99
		0.0025	86.4	3.6	1.00
Metabolite F	Cattle meat	0.5	93.5	1.5	0.96
		0.0025	90.0	2.2	0.96
	Cattle fat	0.1	90.7	2.6	1.00
		0.0025	94.9	4.2	1.02
	Cattle liver	4 ^{d)}	93.4	1.0	0.99
		0.0025	91.0	4.0	1.00
Metabolite F	Cattle milk	11 ^{e)}	92.4	4.6	1.00
		0.0025	86.9	4.9	1.02

^{a)} $n = 5$ ^{b)} RSD: relative standard deviation^{c)} Matrix-matched standard / standard in solvent ($n = 2$)^{d)} The test solution was diluted 10-fold and measured by LC-MS/MS^{e)} The test solution was diluted 20-fold and measured by LC-MS/MS

2. 試験溶液調製法の検討

2.1 抽出方法の検討

対象とする食品は畜産物のため、抽出溶媒は、脂肪を溶解するアセトンまたはアセトンおよび n -ヘキサン混液を考えた。しかし、各標準品の安全データシートから、代謝物B^{*4}、代謝物C^{*5}および代謝物F^{*6}は、アセトンにはほとんど溶解しないこと、また、構造式から、各化合物は n -ヘキサンに対する溶解性も非常に低いと考えられたこと

から、これらの溶媒を不採用とし、 n -ヘキサン存在下アセトニトリルによる抽出を検討することとした。この抽出方

*4 http://www.siyaku.com/uh/Msh.do?msds_no=W01W0108-1017JGHEJP&pop_zenkai_gst=1&now=1524212457073

*5 http://www.siyaku.com/uh/Msh.do?msds_no=W01W0108-1021JGHEJP&pop_zenkai_gst=1&now=1524212475577

*6 http://www.siyaku.com/uh/Msh.do?msds_no=W01W0108-1018JGHEJP&pop_zenkai_gst=1&now=1524211512102

Fig. 2. Typical SRM chromatograms of analytes

- (A) Standard solution (0.00025 mg/L)
 (B) Blank sample of milk
 (C) Fortified sample of milk (0.0025 mg/kg)

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。牛の脂肪5g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、代謝物Cおよび代謝物F各0.1 mg（各標準原液0.1 mL）を添加し、混和した後、冷凍庫内に10分間静置し、凝固

させ、さらに室温で30分間静置した。これに*n*-ヘキサン50 mLを加え、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル50 mL（抽出1回目）および25 mL（抽出2回目）を加えてホモジナイズし、遠心分離後、得られたアセトニトリル抽出液中の各化合物の回収率を求めた。その結果、各化合物の回収率は、1回目の抽出では全化合物において96%、2回目の抽

出では1~6%であり、2回の抽出で得られた回収率は、ヘキサジノン98%、代謝物Bは101%、代謝物Cは97%、代謝物Fは102%であった。以上の結果から、ヘキサジノン、代謝物B、代謝物Cおよび代謝物Fを n -ヘキサン存在下アセトニトリルにより抽出することとした。

2.2 精製の検討

アセトニトリル抽出液をそのままLC-MS/MSに注入すると試料により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0.80~0.92となり、イオン化抑制が認められたことから、固相ミニカラムによる精製を検討した。ヘキサジノンおよび各代謝物はアミノ基を有しているため、強酸性陽イオン交換体(SCX)ミニカラム(500 mg)による精製を検討したが、各化合物の保持がロットおよびメーカーにより大きく異なるなどしたことから不採用とした。次にエチレンジアミン- N -プロピルシリル化シリカゲルミニカラム(Bond Elut Jr-PSA (500 mg)) (以下PSAミニカラムとする)およびSAX/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両ミニカラムにアセトニトリル抽出液を負荷し、アセトニトリルで溶出する検討を行ったところ、PSAミニカラムでは、試料により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。一方、SAX/PSAミニカラムではイオン化抑制がほとんど認められず、夾雑物の影響なく測定が可能であったことから、本ミニカラムを選択した。Table 2にアセトニトリルでコンディショニングしたSAX/PSAミニカラムに1 mg/L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示した。ヘキサジノンおよび代謝物Bは10 mL、代謝物Cおよび代謝物Fは20 mLまでの画分に溶出したため、抽出液をSAX/PSAミニカラムに負荷した後、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。

3. 添加回収試験

畜産物4種に対し、回収試験を行った結果をTable 3に示した。なお、牛の肝臓および牛乳の残留基準値濃度添加については、試験溶液をメタノールでそれぞれ10倍および20倍に希釈した後、測定した結果である。代謝物Cについては、牛乳のみが規制対象となるが、今回すべての試料に添加した。5回試行による真度および併行精度は、ヘキサジノンで87.3~96.0%および1.3~4.8%、代謝物Bで89.5~93.7%および0.8~4.8%、代謝物Cで85.6~90.7%および1.1~4.6%、代謝物Fで86.9~94.9%および1.0~4.9%であり、良好な結果が得られた。また、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、選択性は問題がないことが確認された。LC-MS/MSで測定したクロマトグラムの一例として、ヘキサジノン、代謝物B、代謝物Cおよび代謝物F標準溶液(0.00025 mg/L)、牛乳の無添加試料および添加試料から得られた試験溶液のSRMクロマトグラムをFig. 2に示し

た。

4. 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Table 3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0.96~1.02、代謝物Fで0.96~1.02であり、マトリックスの測定値への顕著な影響は認められなかった。

0.00025 mg/Lのマトリックス添加標準溶液での S/N 比を求めたところ、ヘキサジノンは184~235、代謝物Bは117~151、代謝物Cは一方の異性体が45~103、他方が355~701、代謝物Fは75~105であり、すべての食品で $S/N \geq 10$ を満たしていた。

ま と め

畜産物中のヘキサジノン分析法として、試料からヘキサジノン、代謝物B、代謝物Cおよび代謝物Fを 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で定量および確認する方法を開発した。開発した分析法を用いて、牛の筋肉、脂肪、肝臓および牛乳の4畜産物に対し、各化合物を残留基準値濃度および定量下限値濃度(0.0025 mg/kg)で添加し、回収試験を行った結果、真度85.6~96.0%、併行精度0.8~4.9%の良好な結果が得られた。これらの結果から、本法はヘキサジノンの分析法として有用と考えられた。

謝 辞

本研究の一部は厚生労働省医薬食品局食品安全部の平成28年度残留農薬等分析法検討事業費により実施したものである。関係各位に深謝いたします。

文 献

- 1) MacBean, C. ed. The pesticide manual, 16th ed. Alton, UK, British Crop Protection Council, 2012, p. 613-614. (ISBN 978-1-901396-86-7)
- 2) Kitagawa, Y., Okihashi, M., Takatori, S., Okamoto, Y., Fukui, N., Murata, H., Sumitomo, T., Obana, H. Multi-residue method for determination of pesticide residues in processed foods by GC/MS/MS. Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan), **50**, 243-252 (2009).
- 3) Uranishi, K., Yamashita, H., Yamamoto, K. Validation study on a method for multiresidue analysis of pesticides in vegetables and fruits with supercritical fluid extraction. Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Saf. Sci.), **53**, 63-74 (2012).
- 4) Kondo, T., Kaburagi, Y., Shibata, M., Kurokawa, C., Inoue, Y., Yamamoto, Y., Miyazaki, M. New clean-up method with dispersive solid-phase extraction for simultaneous determination of pesticide residues in livestock products by GC-MS/MS. Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Saf. Sci.), **53**, 75-84 (2012).

- 5) Schenck, F. J., Brown, A. N., Podhorniak, L. V., Parker, A., Reliford, M., Wong, J. W. A rapid multiresidue method for determination of pesticides in fruits and vegetables by using acetonitrile extraction/partitioning and solid-phase extraction column cleanup. *J. AOAC Int.*, **91**, 422–438 (2008).
- 6) Takatori, S., Yamamoto, H., Fukui, N., Yamaguchi, S., Kitagawa, Y., Kakimoto, Y., Osakada, M., Okihashi, M., Kajimura, K., Obana, H. Validation study on a rapid multi-residue method for determination of pesticide residues in vegetables and fruits by LC-MS/MS. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Saf. Sci.)*, **54**, 237–249 (2013).
- 7) Attallah, E. R., Amer, M. E., Gomaa, A. M., EL Gohary, A. A. QuEChERS analytical method for determination of 93 pesticide residues in apples and potatoes using LC-MS/MS. *J. Appl. Sci. Res.*, **8**, 5690–5697 (2012).
- 8) Holt, R. F. Determination of hexazinone and metabolite residue using nitrogen-selective gas chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, **29**, 165–172 (1981).