

※ 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の参考としてください。なお、報告書の内容と通知又は告示試験法との間に齟齬がある場合には、通知又は告示試験法が優先することに御留意ください。

食品に残留する農薬等の成分である物質の 試験法開発事業報告書

クロフェンテジン試験法 (畜産物)

クロフェンテジン試験法（畜産物）の検討結果

〔緒言〕

1. 目的

クロフェンテジンは、テトラジン骨格を有する殺ダニ剤として 1979 年に開発された。果樹等を食害するハダニ類の卵及び幼虫に対する接触により、発育時におけるクチクラ形成が阻害され効果が発現すると考えられている。国内では 1989 年に初回農薬登録された。海外では米国、カナダ、EU、オーストラリア等でりんご及びもも等に対して使用されている。

食品安全委員会ではクロフェンテジンの許容一日摂取量を 0.017 mg/kg 体重/日と設定している。

生食発 0718 第 2 号（平成 29 年 7 月 18 日）において「今回残留基準値を設定するクロフェンテジンとは、農産物にあつてはクロフェンテジンとし、畜産物にあつてはクロフェンテジン及び臭化水素酸によって 2-クロロ安息香酸に変換される代謝物をクロフェンテジンに換算したものの和とする。」とされた。畜産物を対象とした臭化水素酸によって 2-クロロ安息香酸に変換されるクロフェンテジン及び代謝物の試験法は報告されていない。そこで、定量限界が一律基準 0.01 ppm を満たすクロフェンテジン個別試験法の検討を行った。

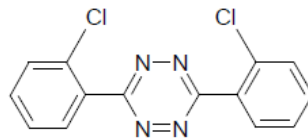
2. 分析対象化合物の構造式及び物理化学的性質

(1) 分析対象化合物

和名 : クロフェンテジン

英名 : Clofentezine

構造式



分子式 : C₁₄H₈Cl₂N₄

分子量 : 303.15

Cas NO. : 74115-24-5

化学名 (IUPAC) : 3,6-bis(2-chlorophenyl)-1,2,4,5-tetrazine

外観 : 赤紫色 結晶性固体

密度 : 1.52 g/cm³ (21.2°C)

融点 : 183°C

沸点 : 大気圧では沸点を持たない

蒸気圧 : P (20°C) = 6.0 × 10⁻⁹ hPa、

P (25°C) = 1.4 × 10⁻⁸ hPa、

P (50°C) = 6.1 × 10⁻⁷ hPa、

水溶解度 : 2.52 µg/L (pH5.0) (22°C)、

< 2.0 µg/L (pH7.0) (22°C)、

< 2.0 µg/L (pH9.2) (22°C)

有機溶媒溶解度 : アセトン 9.3 g/L (25°C)、

エタノール 0.49 g/L (25°C)、

キシレン 5.0 g/L (25°C)、

酢酸エチル 5.67 g/L (20 ± 0.5°C)、

ジクロロメタン 37.4 g/L (25°C)、*n*-ヘプタン 111.4 g/L (20 ± 0.5°C)、

1-オクタノール/水分配係数 (Log Pow) : 4.1 (pH 2、40°C)、
4.1 (pH 7、40°C)、
4.1 (pH 9、40°C)

生物濃縮係数 : BCF_{SS} = 248 (試験濃度 0.03 µg/L)

加水分解性 : t_{1/2} > 5 日 (pH 4、50°C)、
t_{1/2} = 1.1 日 (pH 7、25°C)
t_{1/2} = 0.6 日 (pH 7、35°C)、
t_{1/2} < 2.4 時間 (pH 9、50°C)
t_{1/2} < 1 日 (25°C) (外挿)

水中光分解性

蒸留水 (滅菌) : 半減期 0.7 日 (53.1 W/m²、300-400 nm、25°C)

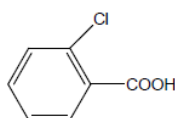
河川水 : 半減期 0.4 日 (53.5 W/m²、300-400nm、25°C)

安定性 : 190~250°Cの温度範囲で分解 (分解エネルギー : 752 J/g、737 J/g 及び 785 J/g)

和名 : 2-クロロ安息香酸

英名 : 2-Chlorobenzoic acid

構造式



分子式 : C₇H₅O₂Cl

分子量 : 156.57

CAS NO. : 118-91-2

外観 : 白色~わずかに薄い黄色、結晶~粉末

融点 : 140-143°C

沸点 : 285°C

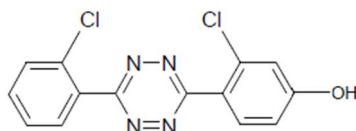
溶解度 : 水にほとんど溶けない。アセトン、エタノールに溶ける。

主要代謝物 : 代謝物 D

和名 : 4-ヒドロキシクロフェンテジン

英名 : 4-hydroxyclofentezine

構造式



分子式 : C₁₄H₈N₄OCl₂

分子量 : 319.15

化学名 (IUPAC) : 3-(2-chloro-4-hydroxyphenyl)-6-(2-chlorophenyl)-1,2,4,5-tetrazine

外観 : 赤紫色 結晶性固体

[出典]

- ① 独立行政法人農林水産消費安全技術センター（FAMIC），農薬抄録及び評価書，農薬抄録，一般名クロフェンテジン（植物成長調整剤）<http://www.acis.famic.go.jp/syouroku/chlormequat%20chloride/index.htm>
- ② 富士フイルム和光純薬 o-クロロ安息香酸 データシート
- ③ ADAMA, 4-Hydroxy Clofentezine, Certificate of Analysis

3. 基準値

畜産物にあつてはクロフェンテジン及び臭化水素酸によって 2-クロロ安息香酸に変換される代謝物をクロフェンテジンに換算したものの和とする。生食発 0718 第 2 号(平成 29 年 7 月 18 日)

食品名	基準値(ppm)
牛の筋肉	0.05
豚の筋肉	0.05
その他の陸棲哺乳類に属する動物の筋肉	0.05
牛の脂肪	0.05
豚の脂肪	0.05
その他の陸棲哺乳類に属する動物の脂肪	0.05
牛の肝臓	0.05
豚の肝臓	0.05
その他の陸棲哺乳類に属する動物の肝臓	0.05
牛の腎臓	0.05
豚の腎臓	0.05
その他の陸棲哺乳類に属する動物の腎臓	0.05
牛の食用部分	0.05
豚の食用部分	0.05
その他の陸棲哺乳類に属する動物の食用部分	0.05
乳	0.05
鶏の筋肉	0.05
その他の家きんの筋肉	0.05
鶏の脂肪	0.05
その他の家きんの脂肪	0.05
鶏の肝臓	0.05
その他の家きんの肝臓	0.05
鶏の腎臓	0.05
その他の家きんの腎臓	0.05
鶏の食用部分	0.05
その他の家きんの食用部分	0.05
鶏の卵	0.05
その他の家きんの卵	0.05

畜産物の基準値を抜粋

[実験方法]

1. 試料

検討には、牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳及び鶏の卵を試料として用いた。いずれも東京都内で流通していたものを購入した。

試料及び産地を以下に記載した。

試料名	産地
牛の筋肉	国産
牛の脂肪	国産
牛の肝臓	国産
牛乳	国産
鶏の卵	国産

各試料の採取方法を以下に記載した。

(1) 牛の筋肉

可能な限り脂肪層を除き、試料を細切した後、フードプロセッサーを用いて均一化した。

(2) 牛の脂肪

可能な限り筋肉層を除き、試料を細切した後、フードプロセッサーを用いて均一化した。

(3) 牛の肝臓

試料を細切した後、フードプロセッサーを用いて均一化した。

(4) 牛乳

振とう混和して均一化した。

(5) 鶏の卵

殻を除去し、卵白と卵黄を合わせてフードプロセッサーを用いて均一化した。

2. 試薬・試液

1) 標準品

クロフェンテジン標準品：純度 98% (富士フィルム和光純薬製)

2-クロロ安息香酸標準品：純度 99.6% (Dr.Ehrenstorfer 製)

4-ヒドロキシクロフェンテジン標準品：純度 91% (アダマ・ジャパンより譲受)

2) 試薬

アセトン：残留農薬試験用 (富士フィルム和光純薬製)

アセトニトリル：残留農薬試験用 (富士フィルム和光純薬製) 及び LC-MS 用 (富士フィルム和光純薬製)

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 (500 mg) : InertSep PSA (ジーエルサイエンス製)

塩酸：5 mol/L 塩酸 容量分析用 (富士フィルム和光純薬製)

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム (500 mg) : InertSep C₁₈ (ジーエルサイエンス製)

ギ酸：LC-MS 用 (富士フィルム和光純薬製)

グラスファイバーろ紙：GFP φ 60 mm (桐山製作所製)

グラファイトカーボンミニカラム (500 mg) : InertSep GC (ジーエルサイエンス製)

合成ケイ酸マグネシウムミニカラム (500 mg) : InertSep FL (ジーエルサイエンス製)

酢酸：LC-MS 用 (富士フィルム和光純薬製)

ジエチルエーテル：残留農薬試験用 (富士フィルム和光純薬製)

臭化水素酸：特級 (関東化学製)

シリカゲルミニカラム (500 mg) : InertSep SI (ジーエルサイエンス製)

トリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム (500 mg) : InertSep SAX (ジーエルサイエンス製)

n-ヘキサン : 残留農薬・PCB 試験用 (富士フイルム和光純薬製)

メタノール : LC-MS 用 (富士フイルム和光純薬製)

ポリプロピレン製遠心管 : 50 mL (TPP 製)

3) 標準溶液の調製方法

クロフェンテジン標準原液:クロフェンテジン標準品 10 mg を精秤し、アセトンで溶解して 1,000 mg/L 溶液を調製した。

2-クロロ安息香酸標準原液:2-クロロ安息香酸標準品 10 mg を精秤し、アセトンで溶解して 1,000 mg/L 溶液を調製した。

4-ヒドロキシクロフェンテジン標準原液:4-ヒドロキシクロフェンテジン標準品 10 mg を精秤し、アセトンで溶解して 1,000 mg/L 溶液を調製した。

検量線用標準溶液:2-クロロ安息香酸標準原液をアセトニトリルで適宜希釈し、0.0000625~0.001875 mg/L (クロフェンテジンとして:0.000121~0.00363 mg/L) の各溶液を調製した。

添加用標準溶液① (定量限界相当濃度):クロフェンテジン標準原液をアセトンで希釈して 1 mg/L 溶液を調製した。

添加用標準溶液② (基準値相当濃度):クロフェンテジン標準原液をアセトンで希釈して 5 mg/L 溶液を調製した。

分解確認用標準溶液:4-ヒドロキシクロフェンテジン標準原液をアセトンで希釈して 5 mg/L 溶液を調製した。

3. 装置

アスピレーター : MDA-015 (アルバック機工製)

ウォーターバス : BS660 (ヤマト科学製)

遠心分離器 : AX-321 (トミー精工製)

吸引マニホールド : GL-SPE吸引マニホールド (ジーエルサイエンス製)

減圧濃縮装置 : R-215 (ビュッヒ製)

振とう機 : SR-2WD (タイテック製)

濃縮装置 : TurboVap® LV (バイオタージ製)

フードプロセッサ : MK-K81 (パナソニック製)

ホモジナイザー : ヒスコトロン NS-52 (マイクロテック・ニチオン製)

LC-MS/MS

装置	型式	会社
MS	Xevo TQ-S micro	Waters
LC	ACQUITY UPLC I-Class PLUS	Waters
データ処理	MassLynx V.4.1 SCN962	Waters

4. 測定条件

LC-MS

LC 条件				
カラム	XSelect HSS T3 (内径 2.1 mm, 長さ 100 mm, 粒子径 2.5 μm : Waters 社製)			
移動相流速 (mL/min)	0.20			
注入量 (μL)	2			
カラム温度 (°C)	40			
移動相	A 液 : 0.05 vol% 酢酸溶液 B 液 : アセトニトリル			
グラジエント条件	時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)	
	0	98	2	
	1	70	30	
	5	2	98	
	8	2	98	
	8.1	98	2	
	13	98	2	
MS 条件				
測定モード	SRM、選択反応モニタリング			
イオン化モード	ESI (-)			
キャピラリ電圧 (kV)	1.50			
ソース温度 (°C)	150			
脱溶媒温度 (°C)	650			
コーンガス	窒素、50 L/hr			
脱溶媒ガス	窒素、1200 L/hr			
コリジョンガス	アルゴン			
定量イオン (m/z)	2-クロロ安息香酸 : MS/MS: -155.0→35.0 [コーン電圧 5 (V)、コリジョンエネルギー10 (eV)]			
定性イオン (m/z)	2-クロロ安息香酸 : MS/MS: -155.0→111.0 [コーン電圧 5 (V)、コリジョンエネルギー6 (eV)]			
保持時間 (min)	2-クロロ安息香酸 : 3.9			

5. 定量

アセトニトリルで調製した場合とミニカラム精製の溶出溶媒である 1 vol% ギ酸・アセトニトリルで調整した場合で測定結果が同様であったことから、2-クロロ安息香酸標準原液をアセトニトリルで希釈して、

定量限界濃度 : 0.0000625、0.000125、0.0001875、0.00025、0.0003125 及び 0.000375 mg/L

(クロフェンテジンとして : 0.000121、0.000242、0.000363、0.000484、0.000605 及び 0.000726 mg/L)

基準値濃度 : 0.0003125、0.000625、0.0009375、0.00125、0.0015625 及び 0.001875 mg/L (クロフェンテジンとして : 0.000605、0.00121、0.001875、0.00242、0.003025 及び 0.00363 mg/L) の標準溶液を調製した。この溶液 2 μL を LC-MS/MS に注入して、得られたピーク面積により絶対検量線法で定量した。以降の検討では、2-クロロ安息香酸としての濃度を求め、必要に応じて換算係数 1.936 を乗じてクロフェンテジン濃度に換算した。

6. 添加試料の調製

(1) 牛の筋肉 (添加濃度 : 0.05 mg/kg)

試料 10.0 g に添加用標準溶液②0.1 mL (アセトン溶液) を添加しよく混合した後、30 分間放置した。

牛の筋肉 (添加濃度 : 0.01 mg/kg)

試料 10.0 g に添加用標準溶液①0.1 mL (アセトン溶液) を添加しよく混合した後、30 分間放置した。

(2) 牛の脂肪 (添加濃度 : 0.05 mg/kg)

試料 10.0 g を採り、約 40°C で加温して融解させたものに添加用標準溶液②0.1 mL (アセトン溶液) を添加してよく混合した後、放置 (室温) して再度凝固させた後、30 分間放置した。

牛の脂肪 (添加濃度 : 0.01 mg/kg)

試料 10.0 g を採り、約 40°C で加温して融解させたものに添加用標準溶液①0.1 mL (アセトン溶液) を添加してよく混合した後、放置 (室温) して再度凝固させた後、30 分間放置した。

(3) 牛の肝臓 (添加濃度 : 0.05 mg/kg)

試料 10.0 g に添加用標準溶液②0.1 mL (アセトン溶液) を添加しよく混合した後、30 分間放置した。

牛の肝臓 (添加濃度 : 0.01 mg/kg)

試料 10.0 g に添加用標準溶液①0.1 mL (アセトン溶液) を添加しよく混合した後、30 分間放置した。

(4) 牛乳 (添加濃度 : 0.05 mg/kg)

試料 10.0 g に添加用標準溶液②0.1 mL (アセトン溶液) を添加しよく混合した後、30 分間放置した。

牛乳 (添加濃度 : 0.01 mg/kg)

試料 10.0 g に添加用標準溶液①0.1 mL (アセトン溶液) を添加しよく混合した後、30 分間放置した。

(5) 鶏の卵 (添加濃度 : 0.05 mg/kg)

試料 10.0 g に添加用標準溶液②0.1 mL (アセトン溶液) を添加しよく混合した後、30 分間放置した。

鶏の卵 (添加濃度 : 0.01 mg/kg)

試料 10.0 g に添加用標準溶液①0.1 mL (アセトン溶液) を添加しよく混合した後、30 分間放置した。

7. 試験溶液の調製

概要

試料に臭化水素酸を加えて、分析対象化合物を2-クロロ安息香酸に加水分解し、ジエチルエーテル及び *n*-ヘキサン (3 : 1) 混液で抽出した後、アルカリ溶液とジエチルエーテル及び *n*-ヘキサン (3 : 1) 混液による液々分配、トリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム及びシリカゲルミニカラムで精製し、LC-MS/MSで定量及び確認した。2-クロロ安息香酸については換算係数1.936でクロフェンテジンに換算した。

(1) 加水分解

試料10.0 gをナス型フラスコに採り、臭化水素酸50 mLを加え、還流冷却器をつけ、2時間加熱還流した。放冷後、還流冷却器の内壁をジエチルエーテル及び *n*-ヘキサン (3 : 1) 混液10 mLで洗い、洗液をナス型フラスコに合わせ、還流冷却器からはずした。

(2) 抽出

(1) の液をグラスファイバーろ紙を用いて吸引ろ過し、ろ液を採った。ろ紙上の残留物に水30 mLを加え、攪拌した後、吸引ろ過する操作を3回行い、ろ液を採った。ろ紙上の残留物にジエチルエーテル及び *n*-ヘキサン (3 : 1) 混液30 mLを加え、攪拌した後、吸引ろ過する操作を3回行い、ろ液を採った。ろ液をすべて合わせ、1 L分液ロートに移した後、ジエチルエーテル及び *n*-ヘキサン (3 : 1) 混液100 mLで受け器を洗浄し、分液ロートに加えた。水200 mLを加え、5分間振とうし、静置した後、上層のジエチルエーテル及び *n*-ヘキサン混液を分取した。水層にジエチルエーテル及び *n*-ヘキサン (3 : 1) 混液100 mLを加え、上記と同様の操作を繰り返し、ジエチルエーテル及び *n*-ヘキサン混液層を合わせ、無水硫酸ナトリウムを

加えて脱水し、無水硫酸ナトリウムをろ別した後、40℃以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物にジエチルエーテル及び*n*-ヘキサン（3：1）混液を加えて溶かし、50 mLに定容した。

この溶液を50 mLポリプロピレン製遠心管に正確に5 mL採り、0.1 mol/L炭酸水素ナトリウム溶液5 mLを加え、5分間振とうした。静置した後、水層を分取した。ジエチルエーテル及び*n*-ヘキサン層に0.1 mol/L炭酸水素ナトリウム溶液5 mLを加え、上記と同様の操作を繰り返し、水層を合わせた。水層に5 mol/L塩酸溶液0.3 mLを加え、pH3以下となったことを確認し、ジエチルエーテル及び*n*-ヘキサン（3：1）混液10 mLを加え、5分間振とうした。静置した後、上層のジエチルエーテル及び*n*-ヘキサン混液を分取した。水層にジエチルエーテル及び*n*-ヘキサン（3：1）混液10 mLを加え、上記と同様の操作を繰り返し、ジエチルエーテル及び*n*-ヘキサン混液層を合わせ、40℃以下で窒素吹き付け濃縮装置を用いて濃縮した。残留物にジエチルエーテルを加え、超音波溶解し、2 mLに定容した。

(3) 精製

トリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム [InertSep SAX (500 mg/6 mL)] にアセトニトリル 10 mL を注入し、流出液は捨てた。このカラムに (2) で得られた溶液から正確に 1 mL を注入した後、アセトニトリル 10 mL を注入し、流出液は捨てた。シリカゲルミニカラム [InertSep SI (500 mg/6 mL)] に、アセトニトリル 10 mL を注入し、流出液は捨てた。トリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムの下にシリカゲルミニカラムを接続し、1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液 10 mL をカラムに注入し、溶出液を採り、1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液で正確に 10 mL としたものを試験溶液とした。

[分析法フローチャート]

秤 取

- ↓ 試料 10.0 g
- ↓ 臭化水素酸 50 mL

加水分解

- ↓ 100℃で2時間加熱還流
- ↓ 放冷

吸引ろ過

- ↓ ろ紙上残留物に水 30 mL を加え攪拌して洗浄する操作を3回行う
- ↓ ろ紙上残留物にジエチルエーテル及び*n*-ヘキサン（3：1）混液 30 mL を加え攪拌して洗浄する
- ↓ 操作を3回行う
- ↓ ろ液をすべて合わせる

ジエチルエーテル及び*n*-ヘキサン転溶①

- ↓ ジエチルエーテル及び*n*-ヘキサン（3：1）混液 100 mL で分液ロートに移し、水 200 mL を加え、振とう
- ↓ 上層を分取
- ↓ ジエチルエーテル及び*n*-ヘキサン（3：1）混液 100 mL を加え振とう
- ↓ 上層を分取し、先のジエチルエーテル及び*n*-ヘキサン混液と合わせる
- ↓ 無水硫酸ナトリウムを加えて脱水
- ↓ 無水硫酸ナトリウムをろ別後、40℃以下で減圧濃縮
- ↓ ジエチルエーテル及び*n*-ヘキサン（3：1）混液で 50 mL に定容①

アルカリ転溶（脱脂）

- ↓ ①を 5 mL 分取

- ↓ 0.1 mol/L 炭酸水素ナトリウム溶液 5 mL を加え振とう
- ↓ 水層を分取
- ↓ 0.1 mol/L 炭酸水素ナトリウム溶液 5 mL を加え振とう
- ↓ 水層を分取し、先の炭酸水素ナトリウム溶液と合わせる

ジエチルエーテル及び *n*-ヘキサン転溶②

- ↓ 先の炭酸水素ナトリウム溶液層全量に 5 mol/L 塩酸溶液 0.3 mL 添加 (pH 3 以下を確認)
- ↓ ジエチルエーテル及び *n*-ヘキサン (3 : 1) 混液 10 mL を加え振とう
- ↓ 上層を分取
- ↓ ジエチルエーテル及び *n*-ヘキサン (3 : 1) 混液 10 mL を加え振とう
- ↓ 上層を分取し、先のジエチルエーテル及び *n*-ヘキサン混液と合わせ、濃縮
- ↓ ジエチルエーテルを加え、超音波溶解し、2 mL 定容②

トリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム [InertSep SAX (500 mg/6 mL)]

- ↓ アセトニトリル 10 mL でコンディショニング
- ↓ ②を 1 mL 注入
- ↓ アセトニトリル 10 mL で洗浄

シリカゲルミニカラム [InertSep SI (500 mg/6 mL)]

- ↓ アセトニトリル 10 mL でコンディショニング
- ↓ トリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムの下にシリカゲルミニカラムを接続
- ↓ 1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液 10 mL で溶出 (全溶出液を採取)
- ↓ 1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液で正確に 10 mL に定容

試験溶液

↓

LC-MS/MS

8. マトリックス添加標準溶液の調製

ブランク試験溶液 0.5 mL を採り、窒素気流下で溶媒を除去した後、各検討対象食品の添加回収試験における回収率 100%相当濃度の溶媒標準溶液 0.5 mL を加えて溶解したものをマトリックス添加標準溶液とした。

[結果及び考察]

1. 測定条件の検討

(1) MS条件の検討

スキャン測定において、2-クロロ安息香酸はESI(+)モードでは明確なピークが検出されず、ESI(-)モードでイオン化した。測定時のマススペクトルをESI(+)モード図1-1に、ESI(-)モードを図1-2に示した。2-クロロ安息香酸のモル質量156.57の脱プロトン分子(m/z 155.0 $[M-H]^-$)に関するスペクトルが得られた。

2-クロロ安息香酸の脱プロトン分子の m/z 155.0 をプリカーサーイオンとした場合のプロダクトイオンスペクトルを図2及び図3に示した。 m/z 155.0 をプリカーサーイオンとした場合のプロダクトイオンとして、 m/z 35.0 及び 111.0 が観測された。SRM測定を行った結果、高いS/Nが得られた m/z 35.0 を定量用イオンに、 m/z 111.0 を定性用イオンとすることとした。

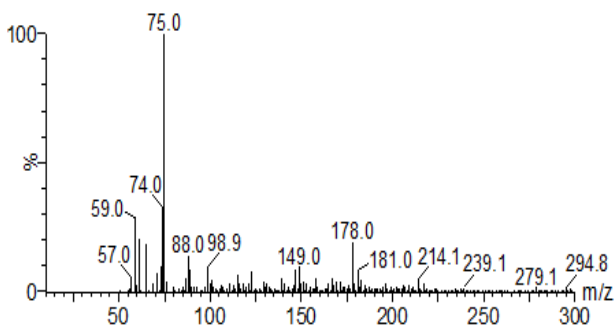


図 1-1 2-クロロ安息香酸のマススペクトル
スキャン範囲： 20~300 m/z
測定条件：ESI (+)
CV=5 V (CV : cone voltage)
2-クロロ安息香酸：10 mg/L

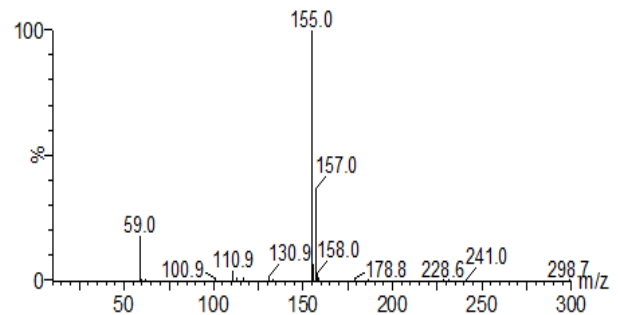


図 1-2 2-クロロ安息香酸のマススペクトル
スキャン範囲： 20~300 m/z
測定条件：ESI (-)
CV=5 V (CV : cone voltage)
2-クロロ安息香酸：10 mg/L

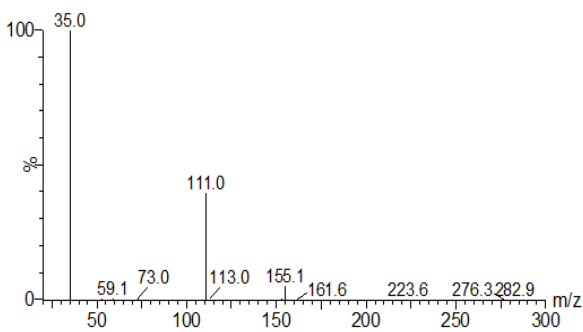


図 2 2-クロロ安息香酸のプロダクトイオン
スペクトル
プリカーサーイオン： m/z 155.0
測定条件：ESI (-)
CV=5 V, CE=10 eV (定量用)
(CV : cone voltage, CE : collision energy)
2-クロロ安息香酸：0.1 mg/L

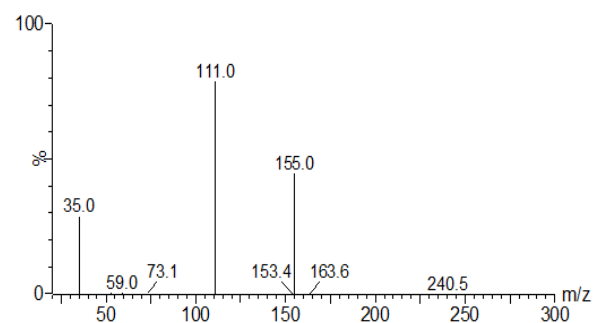


図 3 2-クロロ安息香酸のプロダクトイオン
スペクトル
プリカーサーイオン： m/z 155.0
測定条件：ESI (-)
CV=5 V, CE=6 eV (定性用)
(CV : cone voltage, CE : collision energy)
2-クロロ安息香酸：0.1 mg/L

(2) LC条件の検討

分析カラムは、汎用されているオクタデシルシリル (ODS) 化シリカゲル充填カラム Zorbax Eclipse Plus C18 (内径 2.1 mm、長さ 100 mm、粒子径 2.6 μm : アジレント製)、InertSustain C18 (内径 2.1 mm、長さ 100 mm、粒子径 5 μm : ジーエルサイエンス製)、Mightysil RP-18 (内径 2.1 mm、長さ 100 mm、粒子径 3 μm : 関東化学製) 及び Xselect HSS T3 (内径 2.1 mm、長さ 100 mm、粒子径 2.5 μm : Waters 社製) を比較検討した結果、Xselect HSS T3 を使用することで、2-クロロ安息香酸の保持、ピーク強度及び再現性について良好な結果が得られた。0.05 vol% 酢酸溶液及びアセトニトリルでグラジエント溶出した各カラムのクロマトグラムを図 4 に示した。

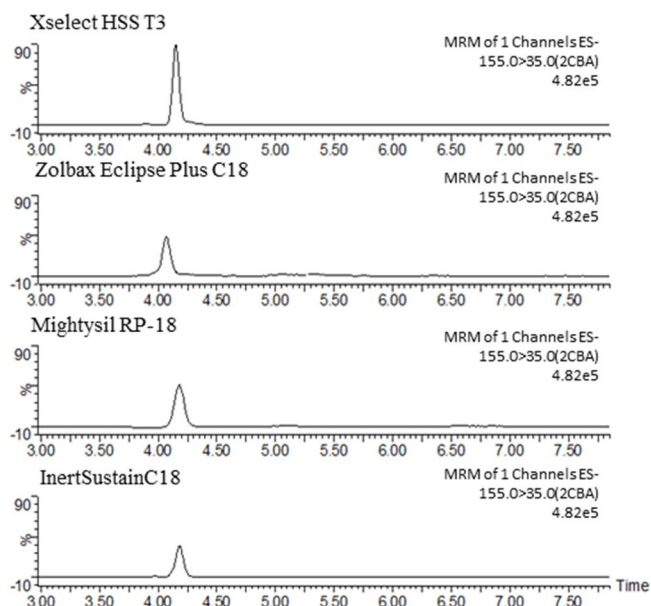


図 4 2-クロロ安息香酸の各カラムにおけるピーク形状
2-クロロ安息香酸 : 0.01 mg/L

移動相条件については、ギ酸、酢酸及び酢酸アンモニウム溶液について検討したところ、酢酸溶液で 2-クロロ安息香酸のピーク強度が最も高く、また、メタノール混液よりもアセトニトリル混液のほうが良好なピーク形状であったため、酢酸溶液及びアセトニトリルとの混液について検討した。酢酸の添加濃度については、0.05~1 vol%濃度を比較したところ、0.05 vol%で保持、ピーク強度及びピーク形状が良好となったことから、移動相は 0.05 vol%酢酸溶液及びアセトニトリルを用いることとした。各酢酸濃度でのピーク面積値を表 1 に示した。

表 1 酢酸添加濃度による 2-クロロ安息香酸ピーク面積値

酢酸濃度 (vol%)	ピーク面積値
0.05	46474
0.1	40990
0.2	35093
0.5	23455
1	17432

2-クロロ安息香酸 : 0.01 mg/L

アイソクラティックの条件を検討したが、2-クロロ安息香酸のピーク強度を確保するためには酢酸溶液及びアセトニトリル（1：9）混液程度が必要であったが、保持時間が1分と早かった。ピーク形状及び強度を確保するためグラジエント測定の場合を検討した。

0.05 vol%酢酸溶液及びアセトニトリル溶液（49：1）から、1分までに（7：3）、5分までに（1：49）のグラジエント条件で分析カラムからの試料成分流出のため、（1：49）で3分間保持した場合、2-クロロ安息香酸の保持時間は3.9分であった。

(3) 検量線

図 5-1 に 0.0000625～0.000375 mg/L（クロフェンテジンとして：0.000121～0.000726 mg/L）及び図 5-2 に 0.0003125～0.0001875 mg/L（クロフェンテジンとして：0.000605～0.00363mg/L）の濃度範囲で作成した検量線を示した。検量線の決定係数は、0.999 以上であり良好な直線性を示した。

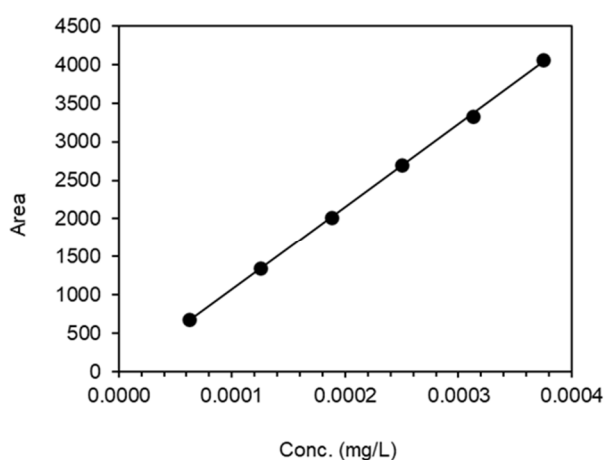


図 5-1 2-クロロ安息香酸検量線の例
 $y = 10788983x - 4$
 $r^2 = 0.99965$

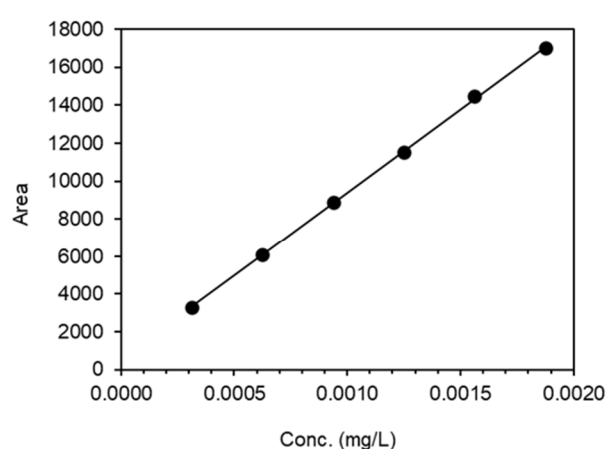


図 5-2 2-クロロ安息香酸検量線の例
 $y = 8801305x + 583$
 $r^2 = 0.99974$

2. 試験溶液調製法の検討

申請企業の試験法の概略を下記に示した。

試料に臭化水素酸を加えて、分析対象化合物を2-クロロ安息香酸に加水分解し、エーテル及びn-ヘキサン混液で抽出した後、アルカリ溶液とエーテル及びn-ヘキサンによる液々分配及び陰イオン交換クロマトグラフィーで精製、トリメチルシリル化し、GC-MSで定量する方法である。

使用溶媒量が多いことから、使用溶媒量の少量化、また、トリメチルシリル化せずにLC-MS/MSで測定する方法を検討した。

(1) 加水分解時間の検討

加水分解時間及び臭化水素酸量について検討した。

クロフェンテジンまたは代表的な代謝物として代謝物 D（4-ヒドロキシクロフェンテジン）を用いて加水分解条件を検討した。なお、代謝物 D の濃度は2-クロロ安息香酸濃度に換算係数 2.038 を乗じて換算した。

臭化水素酸 50 mL または 100 mL にクロフェンテジン又は代謝物 D のアセトン溶液（5 mg/L、クロフェンテジンとして）0.1 mL を添加し、1～5 時間加水分解後、水 200 mL を加え、ジエチルエーテル及び

n-ヘキサン（3：1）混液 100 mL ずつで 2 回転溶し、200 mL に定容後、1 mL を分取し、40℃以下で窒素吹付濃縮装置を用いて濃縮し、溶媒を除去した後、1 vol% 酢酸・アセトニトリル溶液に溶かして 2-クロロ安息香酸を LC-MS/MS で測定した。

表 2 に添加したクロフェンテジンまたは代謝物 D の 2-クロロ安息香酸への変換結果を示した。

クロフェンテジン及び代謝物 D は、臭化水素水 50 mL を用いて 2 時間以上加水分解を行うことで、99%以上の変換率が得られた。この結果から、加水分解は臭化水素酸 50 mL を加えることとした。

表 2 クロフェンテジン及び代謝物 D の変換結果¹⁾

加水分解時間	変換率(%)			
	クロフェンテジン ²⁾		代謝物D ³⁾	
	50 mL	100 mL	50 mL	100 mL
1 時間	63	65	55	58
2 時間	100	100	100	100
3 時間	100	100	99	100
4 時間	100	100	100	100
5 時間	100	100	99	100

1)添加量：0.5 µg (n=1)

2)クロフェンテジンの含量 (ppm) =2-クロロ安息香酸の含量 (ppm) ×1.936

3)代謝物 D の含量 (ppm) =2-クロロ安息香酸の含量 (ppm) ×2.038

次に牛の肝臓 10.0 g にクロフェンテジン及び代謝物 D のアセトン溶液（5 mg/L、クロフェンテジンとして）0.1 mL を添加し、30 分放置後、0.5～5 時間加水分解後、実験方法の 7. 試験溶液の調製に従って操作を行い、LC-MS/MS で測定した。表 3 に添加したクロフェンテジンまたは代謝物 D の 2-クロロ安息香酸への変換結果を示した。

クロフェンテジン及び代謝物 D とともに 2 時間以上で 100%の回収率が得られた。

この結果から、加水分解は 2 時間行うこととした。

表 3 牛の肝臓におけるクロフェンテジン及び代謝物 D の変換結果

加水分解時間 (時間)	変換率(%)	
	クロフェンテジン	代謝物D
0.5	32	40
1	63	52
1.5	82	75
2	100	100
2.5	100	100
3	100	100
3.5	100	100
4	100	100
4.5	100	100
5	100	100

添加量：0.5 µg (n=1)

(2) 加水分解溶液のろ過

①固形物の確認

牛の脂肪を除くと、加水分解溶液は黒色となり、また、牛の筋肉及び牛の肝臓では固形物が見られた。固形物を除去する必要があるか、固形物及びその量を測定した。

牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳及び鶏の卵 10.0 g に臭化水素酸 50 mL を加え、2 時間加水分解後、ろ紙ろ過を行い、ろ紙上の残留物重量を測定し、表 4 に示した。

その結果、牛の肝臓及び牛乳で固形物量が多く、分液ロートの活栓の詰まり及びエマルジョン形成の原因になると考えられた。

表 4 ろ紙上残留物重量

試料	残留物重量(mg)
牛の筋肉	2844.56
牛の脂肪	765.21
牛の肝臓	6998.12
牛乳	6064.45
鶏の卵	2442.52

n=1

②吸引ろ過による固形物ろ別の検討

吸引ろ過による固形物のろ別を検討した。ろ過後のろ紙上残留物に 2-クロロ安息香酸が付着している可能性があることから、ろ紙上残留物への 2-クロロ安息香酸の残留状況を確認した。

牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳及び鶏の卵 10.0 g にクロフェンテジンのアセトン溶液 (5 mg/L、クロフェンテジンとして) 0.1 mL を添加し、30 分放置後、臭化水素酸 50 mL を加え、2 時間加水分解後、吸引ろ過を行い、ろ紙上の残留物にジエチルエーテル・ヘキサン (3 : 1) 混液を 30 mL を 1~3 回加えスパークルで攪拌して残留物を洗浄した。洗浄後のろ紙を含む残留物にジエチルエーテル・*n*-ヘキサン (3 : 1) 混液 30 mL を加え、5 分間振とうする操作を 3 回を行い、ジエチルエーテル・ヘキサン (3 : 1) 混液を合わせ、減圧濃縮して溶媒を除去し、ジエチルエーテル・ヘキサン (3 : 1) 混液で 10 mL に定容した。この 5 mL を分取し、0.1 mol/L 炭酸水素ナトリウム溶液 5 mL で 2 回転溶した。5 mol/L 塩酸 0.3 mL を加え、ジエチルエーテル・ヘキサン (3 : 1) 混液 10 mL で 2 回転溶し、窒素吹付濃縮装置で溶媒を除去した。濃縮後の残さにジエチルエーテル 1 mL を加え、超音波溶解後、InertSep SAX (500 mg/6 mL) 及び InertSep SI で精製し (SAX 及び SI ミニカラムによる精製で回収率の確認後に実施した。詳細は (3) 精製法の検討④で後述)、試験溶液とした。

その結果、3 回の洗浄で牛の筋肉、牛の脂肪及び鶏の卵では 0~0.2% とほぼ回収できていたが、牛の肝臓及び牛乳で 1.1~1.6% の残留が見られた (表 5)。

表 5. ろ紙上残留物の 2-クロロ安息香酸の残留状況

ろ紙を含むろ紙上残留物洗浄回数	2-クロロ安息香酸の残留率 (%)				
	牛の筋肉	牛の脂肪	牛の肝臓	牛乳	鶏の卵
0	1.3	0.1	3.7	3.2	2.5
1	0.2	0.1	2.3	2.5	0.4
2	0.2	0.1	2.1	2.4	0.3
3	0.2	0	1.6	1.1	0.1

添加量 : 0.5 µg (n=1)

次に、水で残留物を洗浄した場合の 2-クロロ安息香酸の残留状況について確認した。

残留の見られた牛の肝臓及び牛乳を用いて上記と同様に添加及び加水分解を行い、吸引ろ過後、ろ紙上残留物を水 30 mL を 1~3 回加えスパーテルで攪拌して残留物を洗浄した。洗浄後のろ紙を含む残留物にジエチルエーテル・*n*-ヘキサン (3 : 1) 混液 30 mL を加え、5 分間振とうする操作を 3 回行い、ジエチルエーテル・ヘキサン (3 : 1) 混液を合わせ、減圧濃縮して溶媒を除去し、ジエチルエーテル・ヘキサン (3 : 1) 混液で 10 mL に定容した。この 5 mL を分取し、0.1 mol/L 炭酸水素ナトリウム溶液 5 mL で 2 回転溶した。5 mol/L 塩酸 0.3 mL を加え、ジエチルエーテル・ヘキサン (3 : 1) 混液 10 mL で 2 回転溶し、窒素吹付濃縮装置で溶媒を除去した。濃縮後の残さにジエチルエーテル 1 mL を加え、超音波溶解後、InertSep SAX (500 mg/6 mL) 及び InertSep SI で精製し、試験溶液とした。

その結果、牛の肝臓で 1.9%、牛乳で 1.6%の残留が見られた (表 6)。

表 6. ろ紙上残留物の 2-クロロ安息香酸の残留状況

ろ紙洗浄回数	2-クロロ安息香酸の残留率 (%)	
	牛の肝臓	牛乳
1	3.3	2.3
2	2.5	2.1
3	1.9	1.6

添加量 : 0.5 µg (n=1)

ジエチルエーテル・ヘキサン (3 : 1) 混液及び水の両方でろ紙上残留物を洗浄した場合の 2-クロロ安息香酸残留状況についての確認を行った。

牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳及び鶏の卵を用いて上記と同様に添加及び加水分解を行い、吸引ろ過後、ろ紙上残留物に水 30 mL を 2~4 回加えスパーテルで攪拌して残留物を洗浄した。次いで、ジエチルエーテル・ヘキサン (3 : 1) 混液 30 mL を 1~4 回加えスパーテルで攪拌して残留物を洗浄した。洗浄後のろ紙を含む残留物にジエチルエーテル・*n*-ヘキサン (3 : 1) 混液 30 mL を加え、5 分間振とうする操作を 3 回行い、ジエチルエーテル・ヘキサン (3 : 1) 混液を合わせ、減圧濃縮して溶媒を除去し、ジエチルエーテル・ヘキサン (3 : 1) 混液で 10 mL に定容した。この 5 mL を分取し、0.1 mol/L 炭酸水素ナトリウム溶液 5 mL で 2 回転溶した。5 mol/L 塩酸 0.3 mL を加え、ジエチルエーテル・ヘキサン (3 : 1) 混液 10 mL で 2 回転溶し、窒素吹付濃縮装置で溶媒を除去した。濃縮後の残さにジエチルエーテル 1 mL を加え、超音波溶解後、InertSep SAX (500 mg/6 mL) 及び InertSep SI で精製し、試験溶液とした。

その結果、牛の肝臓で 1.5%、牛乳で 0.2%の残留が見られたが (表 7)、残留率が 1%程度であり、水 30 mL 3 回及びジエチルエーテル・ヘキサン (3 : 1) 混液 30 mL 3 回以上の洗浄でも 2-クロロ安息香酸の残留率はあまり変化しなかったことから、ろ紙上の残留物の洗浄は水 30 mL で 3 回及びジエチルエーテル・*n*-ヘキサン (3 : 1) 混液 30 mL 3 回及び水 30 mL 3 回で行うこととした。

表 7. ろ紙上残留物の 2-クロロ安息香酸の残留状況

ろ紙洗浄回数		2-クロロ安息香酸の残留率 (%)				
水	ジエチルエーテル・ヘキサン (3 : 1)	牛の筋肉	牛の脂肪	牛の肝臓	牛乳	鶏の卵
2	1	0	0	2.9	0.6	0
3	1	0	0	2.5	0.3	0
	2	0	0	1.9	0.3	0
	3	0	0	1.5	0.2	0
	4	0	0	1.5	0.2	0
4	4	0	0	1.5	0.2	0

添加量 : 0.5 µg (n=1)

(3) 抽出・転溶の検討

①加水分解溶液からジエチルエーテル及び *n*-ヘキサン (3 : 1) 混液への転溶確認

臭化水素酸 50 mL を 2 時間加熱還流後、分液ロートに移し、2-クロロ安息香酸 5 mg/L (アセトン溶液) 0.1 mL、水 200 mL を加え、ジエチルエーテル及び *n*-ヘキサン (3 : 1) 混液 100 mL ずつで 3 回抽出を行った。ジエチルエーテル及び *n*-ヘキサン混液を 200 mL に定容後、1 mL を 1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液に置換後、試験溶液とした。表 8 に添加した 2-クロロ安息香酸の回収結果を示した。

その結果、2 回転溶で 100%の回収が得られたため、2 回転溶することとした。

表 8 ジエチルエーテル及び *n*-ヘキサン (3 : 1) 混液での回収率

転溶回数	回収率(%)
1 回	94
2 回	6
3 回	0
合計	100

添加量 : 0.5 µg (n=1)

吸引ろ過操作に使用したジエチルエーテル及び *n*-ヘキサン (3 : 1) 混液量を合わせると 300 mL 以上となるため、無水硫酸ナトリウムで脱水後、減圧濃縮し、ジエチルエーテル及び *n*-ヘキサン (3 : 1) 混液で定容し、その一部を用いることを検討した。

牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳及び鶏の卵を用いて加水分解を行い、吸引ろ過後、ジエチルエーテル及び *n*-ヘキサン (3 : 1) 混液に転溶し、脱水後、減圧濃縮した。残さにジエチルエーテル及び *n*-ヘキサン (3 : 1) 混液を加え、定容しようとしたところ、牛の脂肪でジエチルエーテル及び *n*-ヘキサン (3 : 1) 混液 20~30 mL では十分に溶解しなかった。40~50 mL で牛の脂肪が溶解し、均一な溶液となったため、濃縮後はジエチルエーテル及び *n*-ヘキサン (3 : 1) 混液で 50 mL に定容することとした。

②炭酸水素ナトリウム溶液への転溶確認

ジエチルエーテル及び *n*-ヘキサン混液からの 0.1 mol/L 炭酸水素ナトリウム溶液 (pH 9~10 : pH 試験紙) への転溶を確認した。

ジエチルエーテル及び *n*-ヘキサン (3 : 1) 混液 5 mL に 2-クロロ安息香酸 5 mg/L (ジエチルエーテル溶液) 0.1 mL を添加し、0.1 mol/L 炭酸水素ナトリウム溶液 5 mL で 3 回転溶した。それぞれに 5 mol/L 塩酸 0.3 mL を加え、ジエチルエーテル及び *n*-ヘキサン (3 : 1) 混液 10 mL で 2 回転溶し、1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液に置換後、試験溶液とした。

各転溶回数の回収結果を表 9 に示した。

その結果、2 回で 100%の回収が得られたため、0.1 mol/L 炭酸水素ナトリウム溶液での転溶は 2 回行うこととした。

表 9 炭酸水素ナトリウム溶液での転溶回数

転溶回数	回収率(%)
1 回	97
2 回	3
3 回	0
合計	100

添加量 : 0.5 µg (n=1)

③炭酸水素ナトリウム溶液からジエチルエーテル及びヘキサン転溶時の pH 確認

操作の簡略化のため、振とう及び遠心分離が可能な 50 mL ポリプロピレン製遠心管を用いて検討した。0.1 mol/L 炭酸水素ナトリウム溶液からジエチルエーテル及びヘキサン (3 : 1) 混液への転溶時の pH について検討した。

0.1 mol/L 炭酸水素ナトリウム溶液 10 mL に 2-クロロ安息香酸 5 mg/L (アセトン溶液) 0.1 mL を添加し、5 mol/L 塩酸溶液を 0.1~0.5 mL 加え、ジエチルエーテル及び *n*-ヘキサン (3 : 1) 混液 10 mL で 3 回転溶し、1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液に置換後、試験溶液とした。

表 10 に添加した 2-クロロ安息香酸の回収結果を示した。

pH 試験紙で各溶液の pH を確認したところ、pH 3 以下の場合、2 回転溶で 100%の回収率が得られた。そこで、5 mol/L 塩酸量 0.3 mL 加え、pH 3 以下であることを確認し、2 回転溶することとした。

表 10 塩酸溶液量による回収率への影響

転溶回数	回収率(%)				
	5 mol/L 塩酸量(mL)				
	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
	pH 8	pH 5	pH 3	pH 3	pH 2
1 回	0	89	96	91	88
2 回	0	7	4	9	12
3 回	0	1	0	0	0
合計	0	97	100	100	100

添加量 : 0.5 µg (n=1)

④濃縮後の溶解溶媒の検討

濃縮後にアセトニトリルに溶解して LC-MS/MS で測定した場合に回収率が 80、89 及び 95%と数値にバラつきが見られた。濃縮乾固後にアセトニトリルに十分に溶解していない可能性が考えられた。

試験管に 2-クロロ安息香酸 0.1 mg/L (アセトン溶液) 0.1 mL を加え、窒素気流下で濃縮乾固後、各溶媒 1 mL を加え超音波溶解し、アセトニトリルで 10 mL に定容後、LC-MS/MS で測定した結果を表 11 に示した。

その結果、アセトニトリルでは 90%、エチルエーテル及び *n*-ヘキサン(3 : 1)混液では 98%の回収であった。1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液では InertSep SAX ミニカラムに負荷した場合に 2-クロロ安息香酸が保持されないことから、濃縮後の残留物にジエチルエーテルを加え、超音波溶解後、ミニカラムに負荷することとした。

表 11 各溶解溶媒の回収率

溶解溶媒	回収率(%)
アセトニトリル	90
1 vol%ギ酸・アセトニトリル	100
ジエチルエーテル	100
ジエチルエーテル及び <i>n</i> -ヘキサン(3 : 1)	98

n=1

(4) 精製法検討

①トリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム [InertSep SAX (500 mg/6 mL)]

申請企業の方法では陰イオン交換クロマトグラフィーを用いていることから InertSep SAX (500 mg/6 mL) について検討した。

カラムをアセトニトリル 10 mL で予備洗浄した後、2-クロロ安息香酸 0.05 mg/L (ジエチルエーテル溶液) 0.5 mL を負荷し、アセトニトリルで溶出したが、2-クロロ安息香酸は溶出されなかった。

次に、ギ酸・アセトニトリル溶液を用いて溶出を行った。

カラムをアセトニトリル 10 mL で予備洗浄した後、2-クロロ安息香酸 0.05 mg/L (ジエチルエーテル溶液) 0.5 mL を負荷し、0.1~1 vol%ギ酸・アセトニトリルで溶出したときの溶出状況を表 12 に示した。

その結果 2-クロロ安息香酸は 0.5 vol%以上のギ酸濃度の場合 10 mL で 100%回収された。

InertSep SAX (500 mg/6 mL) からの溶出は調製のしやすい 1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液で溶出することとした。

表 12 InertSep SAX (500 mg/6 mL) からの溶出状況

溶出液	溶出液量 (mL)							回収率 (%)
	0-5	5-10	10-15	15-20	20-25	25-30	30-35	
0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル	1	83	16	0	0	0	0	100
0.2 vol%ギ酸・アセトニトリル	2	96	2	0	0	0	0	100
0.5 vol%ギ酸・アセトニトリル	97	3	0	0	0	0	0	100
1 vol%ギ酸・アセトニトリル	98	2	0	0	0	0	0	100

添加量：0.025 µg (n=1)

② シリカゲルミニカラム [InertSep SI (500 mg/6 mL)]

クロフェンテジン試験法（農産物）では、精製にシリカゲルが用いられていることから、シリカゲルミニカラムとして InertSep SI (500 mg/6 mL) による精製を検討した。

InertSep SI (500 mg/6 mL) をアセトニトリル 10 mL で予備洗浄した後、2-クロロ安息香酸 0.05 mg/L（ジエチルエーテル溶液）0.5 mL を負荷し、0.1～1 vol%ギ酸・アセトニトリル混液で溶出したときの溶出状況を表 13 に示した。いずれの濃度においても 2-クロロ安息香酸は 10 mL で 100%回収された。

表 13 InertSep SI (500 mg/6 mL) からの溶出状況

溶出液	溶出液量 (mL)							回収率 (%)
	0-5	5-10	10-15	15-20	20-25	25-30	30-35	
0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル	97	3	0	0	0	0	0	100
0.2 vol%ギ酸・アセトニトリル	98	2	0	0	0	0	0	100
0.5 vol%ギ酸・アセトニトリル	98	2	0	0	0	0	0	100
1 vol%ギ酸・アセトニトリル	99	1	0	0	0	0	0	100

添加量：0.025 µg (n=1)

③マトリックスの影響確認

次にマトリックスの影響を確認した。

牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳及び鶏の卵を分析法フローチャートに従い加水分解、ジエチルエーテル及びヘキサン転溶①、アルカリ転溶、ジエチルエーテル及びヘキサン転溶②を行い、各食品のブランク試料溶液を調製し、0.01 mg/kg 添加相当濃度（2-クロロ安息香酸 0.0005 mg/L）試験溶液中濃度 0.001 mg/L、クロフェンテジンとして）のマトリックス添加標準溶液を調製した。

この溶液を InertSep SAX (500 mg/6 mL) 又は InertSep SI (500 mg/6 mL) を用いて精製し、各食品のマトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対する面積比を求め、表 14 に示した。

その結果、いずれも牛の肝臓及び牛乳での色素除去が不十分であり、面積比も 0.62～0.78 とイオン化抑制がみられた。

表 14 試料マトリックスの影響

ミニカラム	試料	ピーク面積							ピーク面積比 ¹⁾
		ブランク	マトリックス添加標準溶液			溶媒標準溶液			
			n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均	
SAX 500 mg	牛の筋肉	58	1899	1905	1844	1802	1790	1796	1.03
	牛の脂肪	41	1929	1978	1913	1765	1784	1775	1.08
	牛の肝臓	36	1505	1520	1477	1931	1938	1935	0.76
	牛乳	28	1226	1258	1214	1931	1938	1935	0.63
	鶏の卵	37	2054	2159	2070	1831	1838	1835	1.13
SI 500 mg	牛の筋肉	39	1965	1977	1932	1790	1780	1785	1.08
	牛の脂肪	92	2152	2146	2057	1904	1902	1903	1.08
	牛の肝臓	41	1597	1525	1520	1980	1931	1956	0.78
	牛乳	36	1378	1365	1336	2155	2122	2139	0.62
	鶏の卵	44	1940	1932	1892	1820	1880	1850	1.02

1)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の比 (n=2)

④InertSep SAX (500 mg/6 mL) 及び InertSep SI (500 mg/6 mL) を連結しての検討

次に InertSep SAX (500 mg/6 mL) 及び InertSep SI (500 mg/6 mL) の連結を検討した。

InertSep SAX (500 mg/6 mL) 及び InertSep SI (500 mg/6 mL) をそれぞれアセトニトリル 10 mL で予備洗浄した後、InertSep SAX (500 mg/6 mL) に 2-クロロ安息香酸 0.05 mg/L (ジエチルエーテル溶液) 0.5 mL を負荷した。アセトニトリル 10 mL で洗浄後、InertSep SAX (500 mg/6 mL) の下に InertSep SI (500 mg/6 mL) を接続し、1 vol%ギ酸・アセトニトリル 5 mL ずつで溶出したときの溶出状況を表 15 に示した。

その結果、10 mL で 2-クロロ安息香酸は 100%溶出された。

そこで、InertSep SAX (500 mg/6 mL) に負荷後、アセトニトリル 10 mL で洗浄し、InertSep SAX (500 mg/6 mL) の下に InertSep SI (500 mg/6 mL) を接続して 1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液 10 mL で溶出することとした。

表 15 トリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム及びシリカゲルミニカラムからの溶出状況

ミニカラム	溶出液量 (mL)							回収率 (%)
	0-5	5-10	10-15	15-20	20-25	25-30	30-35	
InertSep SAX+SI	96	4	0	0	0	0	0	100

添加量 : 0.025 µg (n=1)

次に InertSep SAX (500 mg/6 mL) 及び InertSep SI (500 mg/6 mL) の組み合わせを用いて、マトリックスの影響を検討した。

牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳及び鶏の卵における 0.01 mg/kg 添加相当濃度 (溶液中濃度 0.001 mg/L) でのマトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対する面積比を求め、表 16 に示した。

その結果、牛の肝臓 及び牛乳での色素除去が可能となり、面積比も 0.88~0.96 とマトリックスの影響を軽減可能であった。

表 16 試料マトリックスの影響

ミニカラム	試料	ピーク面積							ピーク面積比 ¹⁾
		ブランク	マトリックス添加標準溶液			溶媒標準溶液			
			n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均	
SAX 500 mg + SI 500 mg	牛の筋肉	2	1226	1206	1214	1378	1314	1346	0.90
	牛の脂肪	9	1180	1204	1183	1364	1254	1309	0.90
	牛の肝臓	0	1118	1142	1130	1246	1268	1257	0.90
	牛乳	2	1116	1128	1120	1286	1268	1277	0.88
	鶏の卵	3	1246	1272	1256	1352	1274	1313	0.96

1)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の比 (n=2)

3. 添加回収試験

牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳及び鶏の卵の5食品を試料に用いて、実験方法の7. 試験溶液の調製に従ってクロフェンテジンの添加回収試験を実施した。

添加回収試験における回収率 100%相当の溶媒標準溶液、各食品のブランク試料及び添加試料のクロマトグラムを図 6~15 に示した。また、各食品のブランク試料のスキャン測定によるトータルイオンクロマトグラムを図 16 に示した。

(1) 選択性

選択性の検討結果を表17に示した。検討したいずれの試料においても、2-クロロ安息香酸の定量を妨害するピークは認められず、選択性は良好であった。

表17 選択性の評価

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 [検出限界] (mg/kg)	基準値 (ppm)	妨害ピークの許容範囲の評価			ピーク面積(高さ) ¹⁾						選択性 の評価 ³⁾		
					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)			
1	クロフェンテジン	牛の筋肉	0.01	0.05	基準値	0.05	< 0.100	面積	49	24	37	13333	13248	13291	0.003	○
		牛の脂肪	0.01	0.05	基準値	0.05	< 0.100	面積	18	21	20	13974	13312	13643	0.001	○
		牛の肝臓	0.01	0.05	基準値	0.05	< 0.100	面積	26	25	26	13010	13124	13067	0.002	○
		牛乳	0.01	0.05	基準値	0.05	< 0.100	面積	58	64	61	12825	12353	12589	0.005	○
		鶏の卵	0.01	0.05	基準値	0.05	< 0.100	面積	18	26	22	14835	14742	14789	0.001	○

*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、精度及び定量限界

クロフェンテジンとして基準値 (0.05 mg/kg) 及び定量限界濃度である0.01 mg/kgでの添加回収を行った。

真度及び併行精度の検討結果を表18に示した。0.05 mg/kgでは真度77~87%、併行精度は4~11% (目標値: 真度70~120%及び併行精度15>)、0.01 mg/kgでは真度75~85%、併行精度は7~14% (目標値: 真度70~120%、併行精度25>) といずれも目標値に適合する結果であった。

0.01 mg/kg添加試料溶液でのS/Nの平均値は24~25であり、全ての食品でS/N≥10を満たした。

表18 真度、精度及び定量限界の評価

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 [検出限界] (mg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	定量限界 の評価 ¹	検量線		回収率(%)					真度 (%)	併行精度 (RSD%)	S/N ²			
							傾き	切片	r ² 値	n=1	n=2	n=3	n=4			n=5	Max.	Min.	平均値
1	クロフェンテジン	牛の筋肉	0.01	0.05	0.05	—	2653	-2390	0.9998	86	84	91	84	91	87	3.8	—	—	—
		牛の筋肉	0.01	0.05	0.01	S/N	1295	31	0.9984	76	88	92	86	84	85	7.1	27	23	25
		牛の脂肪	0.01	0.05	0.05	—	2083	-1404	0.9992	94	70	78	86	85	83	10.9	—	—	—
		牛の脂肪	0.01	0.05	0.01	S/N	861	112	0.9988	81	90	67	78	73	78	11.1	27	20	23
		牛の肝臓	0.01	0.05	0.05	—	2110	-931	0.9809	88	81	86	77	98	86	9.4	—	—	—
		牛の肝臓	0.01	0.05	0.01	S/N	2048	362	0.9966	69	78	66	78	85	75	10.1	27	23	25
		牛乳	0.01	0.05	0.05	—	2718	388	0.9968	73	75	70	81	87	77	8.8	—	—	—
		牛乳	0.01	0.05	0.01	S/N	2201	317	0.9988	73	60	77	88	75	75	13.5	23	26	25
		鶏の卵	0.01	0.05	0.05	—	1900	-1264	0.9999	93	78	81	89	86	85	7.1	—	—	—
		鶏の卵	0.01	0.05	0.01	S/N	2017	-94	0.9990	83	71	89	79	75	79	8.8	23	26	24

*1 S/Nを求める必要がある場合には「S/N」と表示される。

*2 得られた回収率の中で最大値を与えるピーク(Max.)及び最小値を与えるピーク(Min.)のそれぞれのS/Nを求める。

(3) 試料マトリックスの測定への影響

試料マトリックスの測定への影響について検討した結果を表 19 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。面積比は 0.94~1.09 であり、いずれの試料においても、顕著なマトリックスの測定への影響は認められなかった。

添加回収試験における真度を表 19 で求めたピーク面積比で除して補正真度を求め、表 20 に示した。補正真度は 77~91%であった。

表 19 試料マトリックスの測定への影響

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 [検出限界] (mg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	標準溶液 濃度 ¹ (mg/L)	ピーク面積(高さ) ²								
							面積又は 高さの別	ブランク ³	マトリックス添加標準溶液 ⁴			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			
1	クロフェンテジン	牛の筋肉	0.01	0.05	0.05	0.0025	面積	66	11362	11670	11450	11617	11670	11644	0.98
		牛の筋肉	0.01	0.05	0.01	0.0005	面積	63	2275	2252	2201	1981	2068	2025	1.09
		牛の脂肪	0.01	0.05	0.05	0.0025	面積	17	11324	11445	11367	11324	11445	11384	1.00
		牛の脂肪	0.01	0.05	0.01	0.0005	面積	21	1007	1992	1879	2018	1992	2005	0.94
		牛の肝臓	0.01	0.05	0.05	0.0025	面積	157	12080	12220	11993	12643	12834	12739	0.94
		牛の肝臓	0.01	0.05	0.01	0.0005	面積	121	2416	2259	2217	2266	2244	2255	0.98
		牛乳	0.01	0.05	0.05	0.0025	面積	77	10455	10282	10291	11122	11298	11210	0.92
		牛乳	0.01	0.05	0.01	0.0005	面積	64	2091	1988	1976	2015	2133	2074	0.95
		鶏の卵	0.01	0.05	0.05	0.0025	面積	98	11310	12705	11910	12531	12705	12618	0.94
		鶏の卵	0.01	0.05	0.01	0.0005	面積	80	2262	2079	2091	2044	2094	2069	1.01

*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。

表 20 補正真度

化合物名	食品名	添加濃度 (mg/kg)	真度 (%)	ピーク面積比	補正真度 (%)
クロフェンテジン	牛の筋肉	0.05	87	0.98	89
		0.01	85	1.09	78
	牛の脂肪	0.05	83	1.00	83
		0.01	78	0.94	83
	牛の肝臓	0.05	86	0.94	91
		0.01	75	0.98	77
	牛乳	0.05	77	0.92	84
		0.01	75	0.95	79
	鶏の卵	0.05	85	0.94	90
		0.01	79	1.01	78

4. その他の試験法検討に関連する事項

採用しなかった検討事項について以下に示す。

(1) 精製法の検討

報告例のあるオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム^{1,2)}、合成ケイ酸マグネシウムミニカラム³⁾及び色素除去のためにグラファイトカーボンミニカラムについて検討を加えた。

① オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム精製 [InertSep C18 (500 mg/6 mL)]

InertSep C18 (500 mg/6 mL) をアセトニトリル10 mLで予備洗浄した後、2-クロロ安息香酸0.05 mg/L (アセトニトリル溶液) 0.5 mLを負荷し、1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液で溶出したときの溶出状況を表21に示した。2-クロロ安息香酸は15 mLで100%溶出された。

表 21 InertSep C18 (500 mg/6 mL) の溶出状況

ミニカラム	溶出液量 (mL)							回収率 (%)
	0-5	5-10	10-15	15-20	20-25	25-30	30-35	
InertSep C ₁₈ (500 mg/6 mL)	92	6	2	0	0	0	0	100

添加量 : 0.025 µg (n=1)

② グラファイトカーボンミニカラム [InertSep GC (500 mg/6 mL)]

InertSep GC (500 mg/6 mL) をアセトニトリル10 mLで予備洗浄した後、2-クロロ安息香酸0.05 mg/L (アセトニトリル溶液) 0.5 mLを負荷し1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液で溶出したときの溶出状況を表22に示した。2-クロロ安息香酸は15 mLで81%と全量溶出されなかった。

表 22 InertSep GC (500 mg/6 mL) の溶出状況

ミニカラム	溶出液量 (mL)							回収率 (%)
	0-5	5-10	10-15	15-20	20-25	25-30	30-35	
InertSep GC (500 mg/6 mL)	55	24	2	0	0	0	0	81

添加量 : 0.025 µg (n=1)

③ 合成ケイ酸マグネシウムミニカラム : ([InertSep FL (500 mg/6 mL)])

InertSep FL (500 mg/6 mL) をアセトニトリル10 mLで予備洗浄した後、2-クロロ安息香酸0.05 mg/L (アセトニトリル溶液) 0.5 mLを負荷し、1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液で溶出したときの溶出状況を表23に示した。2-クロロ安息香酸は15 mLで100%溶出された。

表23 InertSep FL (500 mg/6 mL) からの溶出状況

ミニカラム	溶出液量 (mL)						回収率 (%)
	0-5	5-10	10-15	15-20	20-25	25-30	
InertSep FL (500 mg/6 mL)	77	22	1	0	0	0	100

添加量 : 0.025 µg (n=1)

④ 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 : ([InertSep PSA (500 mg/6 mL)])

InertSep PSA (500 mg/6 mL) をアセトニトリル10 mLで予備洗浄した後、2-クロロ安息香酸0.05 mg/L (アセトニトリル溶液) 0.5 mLを負荷し、1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液で溶出したときの溶出状況を表24に示した。2-クロロ安息香酸は15 mLで100%溶出された。

セトニトリル溶液) 0.5 mLを負荷し、1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液で溶出したときの溶出状況を表24に示した。2-クロロ安息香酸は15 mLで74%と全量溶出されなかった。

表24 InertSep PSA (500 mg/6 mL) からの溶出状況

ミニカラム	溶出液量(mL)						回収率 (%)
	0-5	5-10	10-15	15-20	20-25	25-30	
InertSep PSA (500 mg/6 mL)	72	2	0	0	0	0	74

添加量 : 0.025 µg (n=1)

⑤ オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム及び合成ケイ酸マグネシウムミニカラムでの試料マトリックスの影響確認

100%の回収の得られた InertSep C18 (500 mg/6 mL) 及び InertSep FL (500 mg/6 mL) を用いて、マトリックスの影響を確認した。

牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳及び鶏の卵における 0.01 mg/kg 添加相当濃度 (溶液中濃度 0.0005 mg/L) でのマトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対する面積比を求め、表 25 に示した。

面積比は 0.61~0.84 であり、マトリックスの測定への影響が認められた。

表 25 試料マトリックスの影響

試料	ピーク面積比 ¹⁾	
	C18 500 mg	Fl 500 mg
牛の筋肉	0.80	0.81
牛の脂肪	0.84	0.82
牛の肝臓	0.63	0.61
牛乳	0.65	0.61
鶏の卵	0.72	0.74

1) 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の比 (n=2)

5. 考察

クロフェンテジンを臭化水素酸で2時間加水分解して、2-クロロ安息香酸に変換した。

加水分解溶液に固形物がみられたことから、吸引ろ過によりろ別した後、水及びジエチルエーテル及びn-ヘキサン (3 : 1) 混液で洗浄した。抽出はジエチルエーテル及びn-ヘキサン (3 : 1) 混液を用いた。抽出液を定容し、一部を用いることで操作の簡易化を検討した。分解物である2-クロロ安息香酸を0.1 mol/L炭酸水素ナトリウム溶液へ転溶することにより、脱脂を行った。炭酸水素ナトリウム溶液を塩酸でpH 3以下にし、ジエチルエーテル及びn-ヘキサン (3 : 1) 混液で転溶した。

カラムによる精製では、充てん剤が種類のカラムのみでは精製が不十分であったことから、試料溶液中の色素及び脂肪酸等を除去するため、トリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム及びシリカゲルミニカラムを接続して用いた。

検討した試験法を用いて、牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳及び鶏の卵の5食品を試料として、添加回収試験を実施した。その結果、選択性は良好でいずれの試料においても測定を妨害するようなピークは認められなかった。0.01 mg/kgでは真度75~85%、併行精度は7~14%、0.05 mg/kgでは真度77~87%、併行精度は4~11%の結果が得られた。

[結論]

畜産物中のクロフェンテジン試験法を検討した。クロフェンテジンを臭化水素酸で加水分解し、2-クロロ安息香酸に変換した。ジエチルエーテル及び *n*-ヘキサン (3 : 1) 混液で抽出し、脱脂は 0.1 mol/L 炭酸水素ナトリウム溶液に転溶することで行った。炭酸水素ナトリウム溶液を塩酸で pH 3 以下にし、ジエチルエーテル及び *n*-ヘキサン (3 : 1) 混液に転溶した。トリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム及びシリカゲルミニカラムで精製した後、LC-MS/MS で定量及び確認した。

牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳及び鶏の卵の 5 食品に適用した結果、0.01 mg/kg では真度 75～85%、併行精度は 7～14%、0.05 mg/kg では真度 77～87%、併行精度は 4～11%の結果が得られた。また、定量限界として、0.01 mg/kg を設定可能であることが確認された。

[参考文献]

- 1) C. Bicchi, et al, Simultaneous determination of clofentezine, fenoxycarb and hexythiazox by HPLC on apples, pears and their pulps, J Pesticide Sci, 30, 13-19 (1990).
- 2) H.Hong, et al, Analysis of residue dynamics of clofentezine in tangerine and field soil by QuEChER Sand HPLC-UV methods, Int J Environ Anal Chem, 94, 639-651 (2014).
- 3) 橋本亮, 日比野洋, 高速液体クロマトグラフィーによる飼料中のクロフェンテジンの定量, 飼料研究報告, 23, 24-32 (1998).

① 添加回収試験における代表的なクロマトグラム

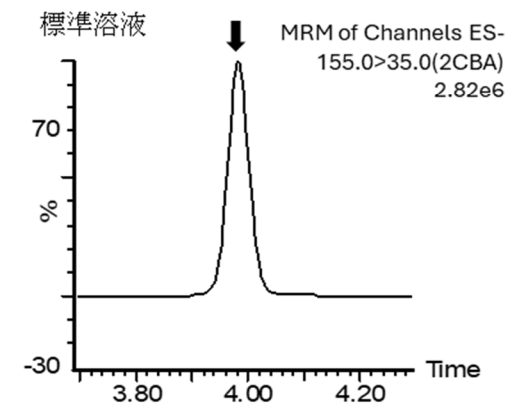
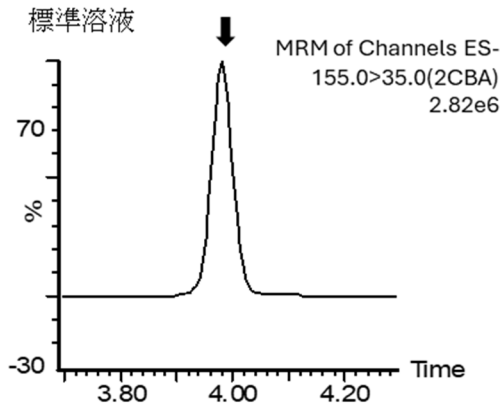
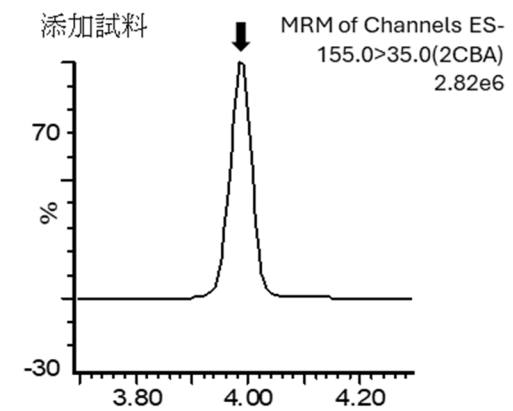
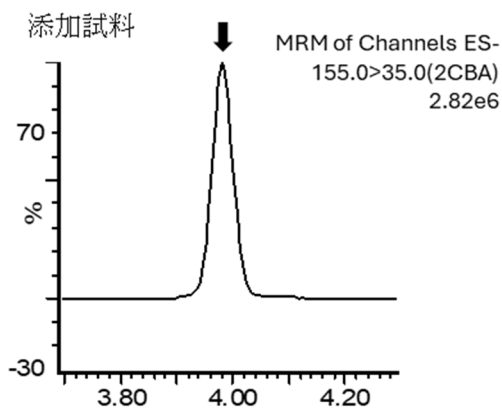
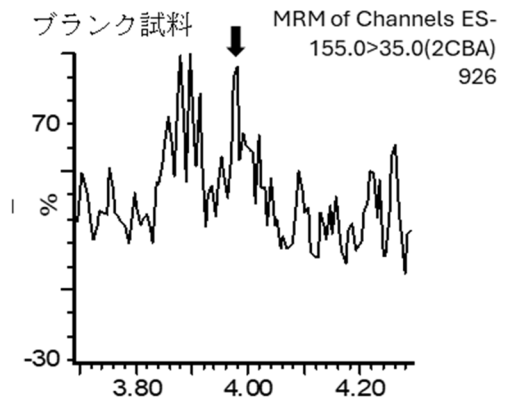
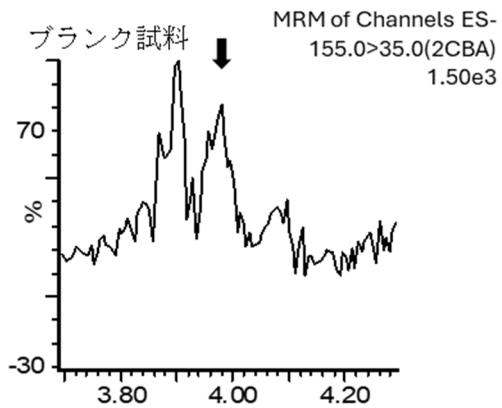


図 6 牛の筋肉の SRM クロマトグラム
(2-クロロ安息香酸 : m/z - 155.0→35.0)
クロフェンテジン添加濃度 : 0.05 mg/kg

図 7 牛の脂肪の SRM クロマトグラム
(2-クロロ安息香酸 : m/z - 155.0→35.0)
クロフェンテジン添加濃度 : 0.05 mg/kg

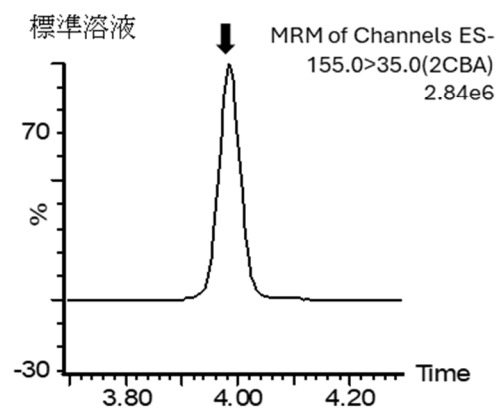
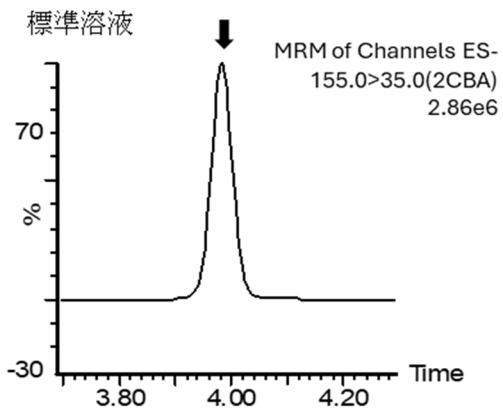
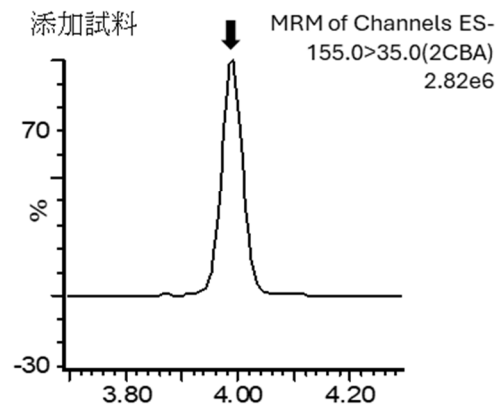
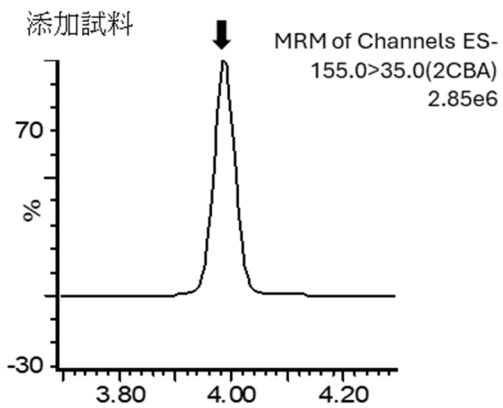
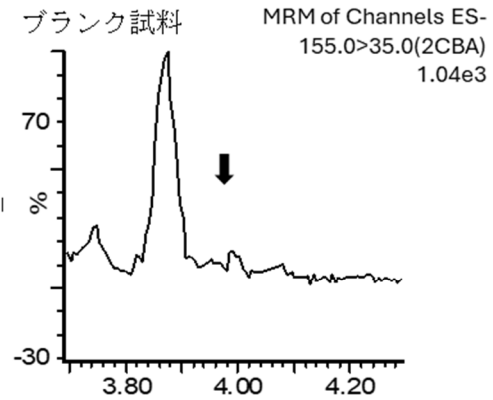
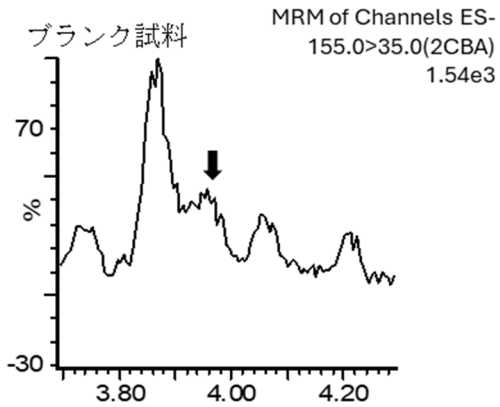


図 8 牛の肝臓の SRM クロマトグラム
(2-クロロ安息香酸 : m/z - 155.0→35.0)
クロフェンテジン添加濃度 : 0.05 mg/kg

図 9 牛乳の SRM クロマトグラム
(2-クロロ安息香酸 : m/z - 155.0→35.0)
クロフェンテジン添加濃度 : 0.05 mg/kg

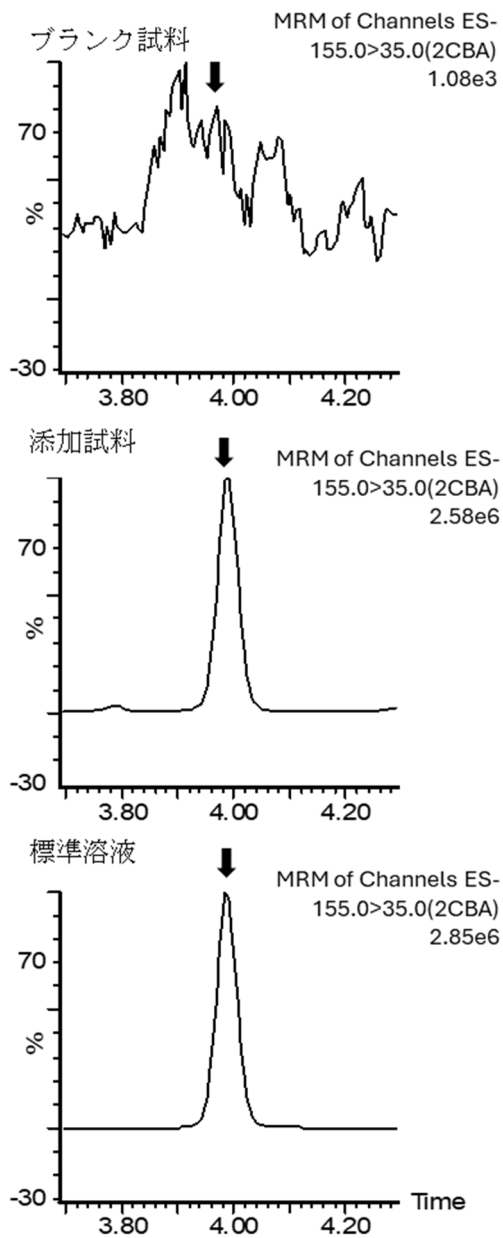


図 10 鶏の卵の SRM クロマトグラム
 (2-クロロ安息香酸: m/z - 155.0→35.0)
 クロフェンテジン添加濃度: 0.05 mg/kg

② 定量限界における代表的なクロマトグラム (定量限界濃度)

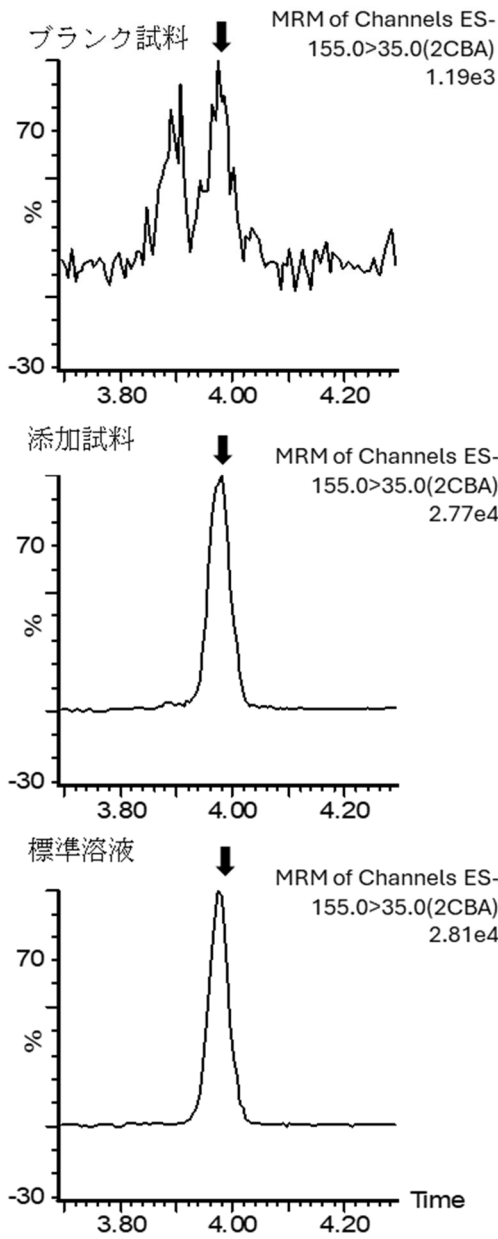


図 11 牛の筋肉の SRM クロマトグラム
(2-クロロ安息香酸 : m/z - 155.0 \rightarrow 35.0)
クロフェンテジン添加濃度 : 0.01 mg/kg

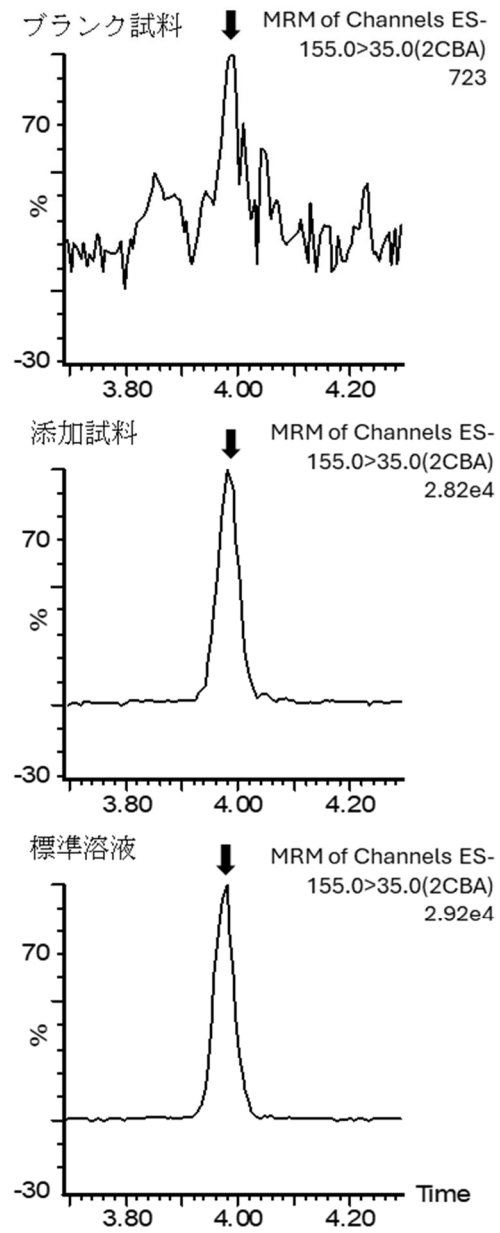


図 12 牛の脂肪の SRM クロマトグラム
(2-クロロ安息香酸 : m/z - 155.0 \rightarrow 35.0)
クロフェンテジン添加濃度 : 0.01 mg/kg

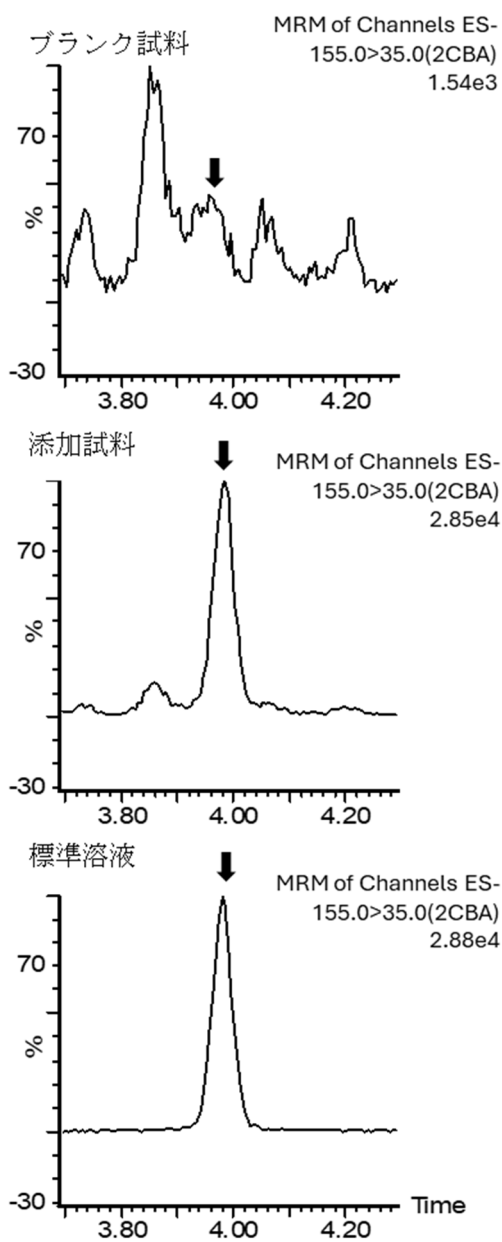


図 13 牛の肝臓の SRM クロマトグラム
 (2-クロロ安息香酸 : m/z - 155.0→35.0)
 クロフェンテジン添加濃度 : 0.01 mg/kg

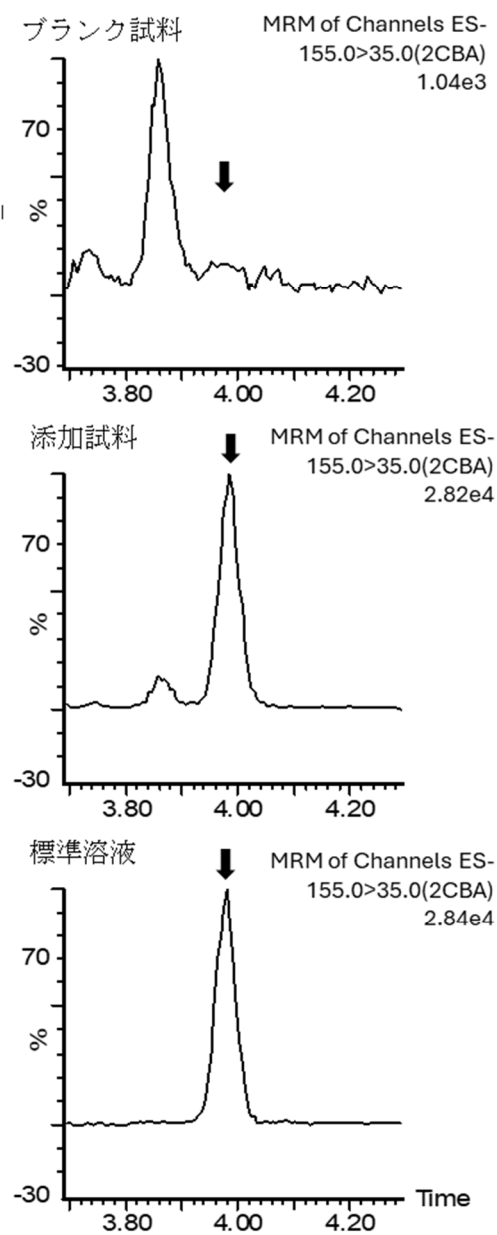


図 14 牛乳の SRM クロマトグラム
 (2-クロロ安息香酸 : m/z - 155.0→35.0)
 クロフェンテジン添加濃度 : 0.01 mg/kg

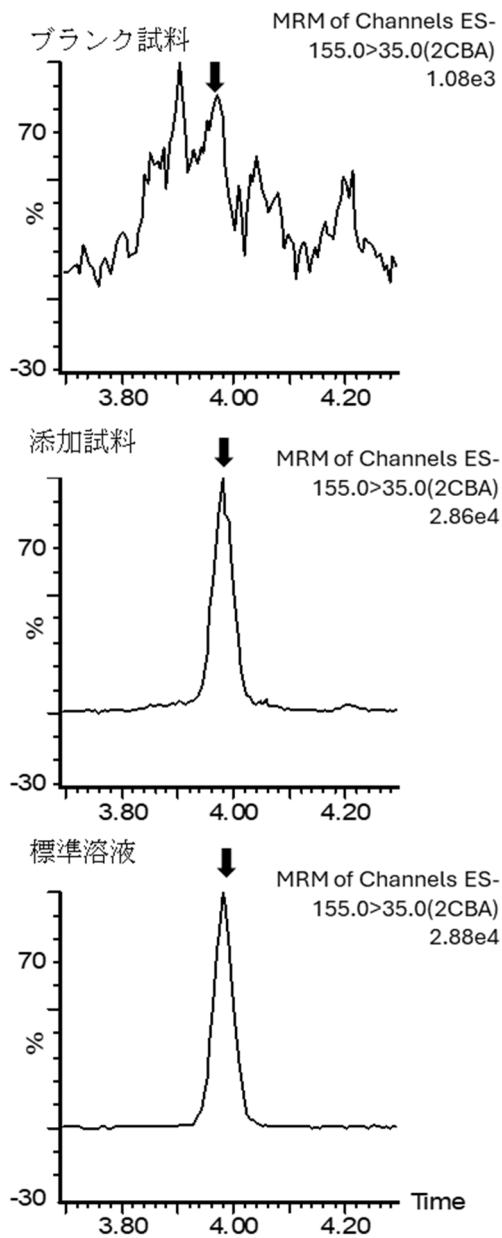


図 15 鶏の卵の SRM クロマトグラム
 (2-クロロ安息香酸： m/z - 155.0→35.0)
 クロフェンテジン添加濃度：0.01 mg/kg

③ ブランク試料の代表的なトータルイオンクロマトグラム

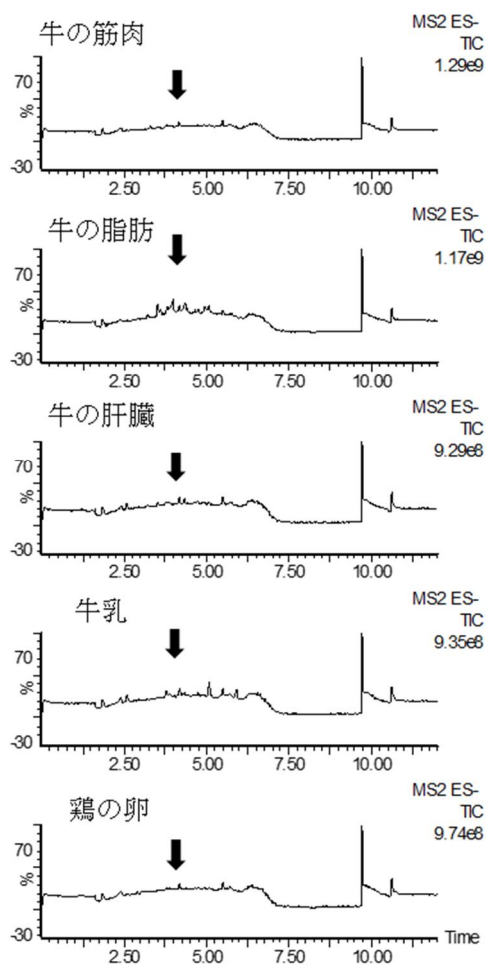


図 16 ブランク試料のトータルイオンクロマトグラム
測定条件： CV=5 V (CV : cone voltage)
(スキャン範囲： 50~1,000 m/z)