

フルオキサストロビン分析法（農産物）

1. 分析対象化合物

- ・フルオキサストロビン（*E*体）
- ・（*Z*）- {2-[6-(2-クロロフェノキシ)-5-フルオロピリミジン-4-イルオキシ]フェニル}
（5,6-ジヒドロ-1,4,2-ジオキサジン-3-イル）メタノン=O-メチルオキシム（代謝物 *Z* 異性体）

2. 装置

液体クロマトグラフ・四重極質量分析計（LC-MS/MS）

3. 試薬、試液

アセトン、酢酸エチル	: 残留農薬試験用
アセトニトリル、メタノール	: LC-MS 用
水	: Milli-Q System（Millipore 製）で精製したもの
その他の試薬	: 特級
フルオキサストロビン（ <i>E</i> 体）	: 分析用標準品
代謝物 <i>Z</i> 異性体	: 分析用標準品
分析内部標準品	: フルオキサストロビンのジオキサジン環を重水素で標識した <i>E</i> 体／代謝物 <i>Z</i> 異性体混合物（17 : 3）
ポリマー系ミニカラム	: Bond Elut ENV 500 mg/6 mL（Agilent 製）

4. 試験溶液の調製

1) 抽出

① 果実（いちご）の場合

試料 5.00 g にアセトン及び水（3 : 1）混液 30 mL を加え、ホモジナイズした後、アセトン及び水（3 : 1）混液 5 mL で洗浄し、吸引ろ過する。ろ紙上の残留物をアセトン及び水（3 : 1）混液 30 mL で洗浄する。得られたろ液にアセトン及び水（3 : 1）混液を加えて正確に 100 mL とする。この溶液から正確に 5 mL を分取し、40°C 以下で約 1 mL まで濃縮する。

② 果実（オレンジ）の場合

試料 5.00 g に 5%炭酸水素ナトリウム溶液 1.5 mL を加え、更にアセトン及び水（3 : 1）混液 30 mL を加え、ホモジナイズした後、アセトン及び水（3 : 1）混液 5 mL で洗浄し、吸引ろ過する。ろ紙上の残留物をアセトン及び水（3 : 1）混液 30 mL で洗浄する。得られたろ液に、アセトン及び水（3 : 1）混液を加えて正確に 100 mL とする。この溶液から正確に 5 mL を分取し、40°C 以下で約 1 mL まで濃縮する。

③ 穀類の場合：マイクロ波抽出使用の場合

試料 5.00 g にアセトン及び水（3 : 1）混液 40 mL を加え攪拌し、30 分間放置する。次いで 3 分間 250W（約 40°C 相当）でマイクロ波抽出し、吸引ろ過する。ろ紙上の残留物にアセトン及び水（3 : 1）混液 20 mL を加え、2.5 分間 250W（約 40°C 相当）でマイクロ波抽出し、吸引ろ過する。ろ紙上の残留物をアセトン及び水（3 : 1）混液 30 mL で洗浄する。得られたろ液を合わせ、アセトン及び水（3 : 1）混液を加えて正確

に 100 mL とする。この溶液から正確に 10 mL を分取し、40°C以下で約 2 mL まで濃縮する。

④ いも類（ばれいしょ）：高速溶媒抽出装置（ASE）使用の場合

試料 2.00 g を抽出セルに入れ、溶媒として水及びメタノール（1：1）混液、圧力 1600 psi、オープン温度 65°C、静置時間 5 分間、静置サイクル 2 回、フラッシュ容量 150%、パージ時間 150 秒の条件で高速溶媒抽出装置（ASE）を用いて抽出する。この装置のバイアルを水 5 mL で洗浄し、抽出液とバイアルの洗浄液を合わせ、40°Cで濃縮し、溶媒を除去する。

2) 精製

① 果実（いちご、オレンジ）の場合

Bond Elut ENV ミニカラムに酢酸エチル、メタノール及び水各 5 mL を順次注入し、流出液は捨てる。このカラムに 1) ①または 1) ②で得られた濃縮液を注入した後、容器を水 5 mL、次いで水及びメタノール（1：1）混液 2.5 mL で 4 回洗浄し、順次カラムに注入して流出液は捨てる。カラムにメタノール 3 mL を注入し、流出液は捨てる。次いで、酢酸エチル 8 mL を注入し、溶出液を 40°Cで濃縮し、溶媒を除去する。この残留物をアセトニトリル及び水（3：2）混液に溶かし、正確に 5 mL としたものを試験溶液とする。

② 穀類の場合

Bond Elut ENV ミニカラムに酢酸エチル、メタノール及び水各 5 mL を順次注入し、流出液は捨てる。このカラムに 1) ③で得られた濃縮液を注入した後、容器を水 10 mL、次いで水及びメタノール（1：1）混液 2.5 mL で 4 回洗浄し、順次カラムに注入して流出液は捨てる。カラムにメタノール 3 mL を注入し、流出液は捨てる。次いで、酢酸エチル 8 mL を注入し、溶出液を 40°Cで濃縮し、溶媒を除去する。この残留物をアセトニトリル及び水（3：2）混液に溶かし、正確に 4 mL としたものを試験溶液とする。

③ いも類の場合

Bond Elut ENV ミニカラムにメタノール及び水各 5 mL を順次注入し、流出液は捨てる。このカラムに 1) ④で得られた濃縮液を注入した後、容器を水 10 mL、水及びメタノール（1：1）混液 10 mL 及びメタノール 3 mL で順次洗浄してカラムに注入し、流出液は捨てる。次いで、メタノール 12 mL を注入し、溶出液を濃縮し、溶媒を除去する。この残留物を水 3 mL に溶かし、さらに容器をアセトニトリル 3 mL で 2 回洗浄し、これらの溶液を合わせ内部標準液を加えた後、水で正確に 10 mL とする。この溶液 1 mL を分取し、アセトニトリル及び水（3：2）混液 2 mL を加えたものを試験溶液とする。

5. 検量線の作成

① 外部標準法の場合（果実、穀類）

E 体及び代謝物 Z 異性体をアセトニトリルに溶解し、各 1000 µg/mL の標準溶液を調製する。これらの溶液から E 体及び代謝物 Z 異性体（9：1）溶液を調製する。これをアセトニトリル及び水（3：2）混液で希釈して数点の標準溶液を調製し、それぞれ LC-

MS/MS に注入し、ピーク面積法で検量線を作成する。

② 内部標準法の場合 (いも類)

E 体及び代謝物 *Z* 異性体をアセトニトリルに溶解し、各 1000 µg/mL の標準溶液を調製する。これらの溶液から *E* 体及び代謝物 *Z* 異性体 (17 : 3) 溶液を調製した後、アセトニトリルで希釈し、250 µg/mL の標準溶液を調製する。また、重水素化フルオキサストロビン (*E* 体, 代謝物 *Z* 異性体) の 250 µg/mL を上記と同様に調製する。アセトニトリル及び水 (3 : 2) 混液で希釈して 0.002 µg/mL の内部標準溶液を含む数点の標準溶液を調製し、それぞれ LC-MS/MS に注入し、標準品ピーク及び内部標準ピークの面積比と濃度比から検量線を作成する。

6. 定量

① 外部標準法の場合

試験溶液を LC-MS/MS に注入し、5. の検量線を用いて含量を定量する。

② 内部標準法の場合

試験溶液を LC-MS/MS に注入し、試料ピーク及び内部標準ピークの面積比と濃度比を求めた後、5. の検量線を用いて *E* 体及び代謝物 *Z* 異性体の合計含量を定量する。

7. 測定条件

(例：果実、穀類)

装置 : Agilent 1100 HPLC System
Sciex API 3000

カラム : いちご
Luna C18(2)
3 µm、2.0 mm i.d.×150 mm (Phenomenex 製)
オレンジ、小麦
Superspher 60 RP-select B
4 µm、4.0 mm i.d.×125 mm (Merck 製)

カラム温度 : 40°C

移動相 : 移動相 A : 0.01 vol%酢酸含有水・0.01 vol%酢酸含有アセトニトリル (9 : 1, v/v) 混液
移動相 B : 0.01 vol%酢酸含有アセトニトリル溶液

グラジエント
(いちご)

(分)	0.0	0.5	5.0	7.0	7.5	11.0
移動相 A (%)	45	45	20	20	45	45
移動相 B (%)	55	55	80	80	55	55

(オレンジ、小麦)

(分)	0.0	5.0	6.0	9.0	10.0	12.0
移動相 A (%)	45	45	20	20	45	45
移動相 B (%)	55	55	80	80	55	55

流量 (カラム) : 1 mL/min.
 流量 (MS) : 0.2 mL/min.
 注入量 : いちご ; 2 μ L
 オレンジ、小麦 ; 25 μ L
 保持時間の目安 : いちご ; E 体 6.7 分、代謝物 Z 異性体 7.6 分
 オレンジ、小麦 ; E 体 4.0 分、代謝物 Z 異性体 5.0 分

イオン検出法 : MRM 法
 イオン化モード : ESI (positive)

	プリカーサーイオン (<i>m/z</i>)	プロダクトイオン (<i>m/z</i>)
フルオキサストロ ビン (E 体, 代謝 物 Z 異性体)	459.10	426.90

(例 : いも類)

装置 : Agilent 1100 HPLC System
 Sciex API 300
 分析カラム : Luna C18
 5 μ m、4.6 mm i.d.×150 mm (Phenomenex 製)
 カラム温度 : 40°C
 移動相 : 移動相 A : 0.01 vol%酢酸含有水溶液
 移動相 B : 0.01 vol%酢酸含有アセトニトリル溶液

グラジエント

(分)	0.0	5.0	6.0	9.0	10.0	12.0
移動相 A (%)	35	35	15	15	35	35
移動相 B (%)	65	65	85	85	65	65

流量 (カラム) : 1 mL/min.
 流量 (MS) : 0.15 mL/min.
 注入量 : 75 μ L
 保持時間の目安 : E 体 : 5.2 分
 代謝物 Z 異性体 : 6.4 分

イオン検出法 : MRM 法
 イオン化モード : ESI (positive)

	プリカーサーイオン (<i>m/z</i>)	プロダクトイオン (<i>m/z</i>)
フルオキサストロ ビン (E 体, 代謝 物 Z 異性体)	459	427
重水素化 フルオキサストロ ビン (E 体, 代謝 物 Z 異性体)	463	431

8. 定量限界

① いちご、オレンジ、小麦の場合

E 体 : 0.045 ppm

代謝物 *Z* 異性体 : 0.005 ppm

② ばれいしょの場合

E 体及び代謝物 *Z* 異性体の合計として : 0.01 ppm

9. 添加回収を実施した食品

いちご、オレンジ、小麦、ばれいしょ

10. 留意事項

特になし

※本分析法は、農産物における作物残留試験等において用いられた残留農薬分析法であり、新たな試験法の開発等に際して参考として下さい。なお、当該分析法をもとに開発した試験法を食品規格への適合判定のために使用する場合には、「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインの一部改正について（平成 22 年 12 月 24 日薬食発 1224 第 1 号）」に従って使用する試験法の妥当性を評価する必要があります。