

※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ください。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。

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

フロルフェニコール試験法（畜水産物）

フロルフェニコール試験法（畜水産物）の検討結果

【緒言】

1. 背景・目的

フロルフェニコール（FF）は、構造的、作用的にクロラムフェニコールと類似しており、広い抗菌スペクトルを持つ合成抗菌剤である。FFは、細菌の70Sリボソームの50Sサブユニットに結合することにより、ペプチド転移酵素を阻害し、タンパク質合成を阻害すると考えられている。FFは、国内外において、牛、豚及び鶏等の家畜や、一部の魚類に対して動物用医薬品として使用されている。ヒト用医薬品としては使用されていない。

FFの主な代謝物としては、図1に示した化合物（FFCl、FFCOOH及びFFOH）がある。FFの残留基準値は、FF及び加水分解によりフロルフェニコールアミン（FFNH₂）に変換される代謝物をFFNH₂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。そこで本研究では、畜水産物中のFF試験法を開発することを目的とした。

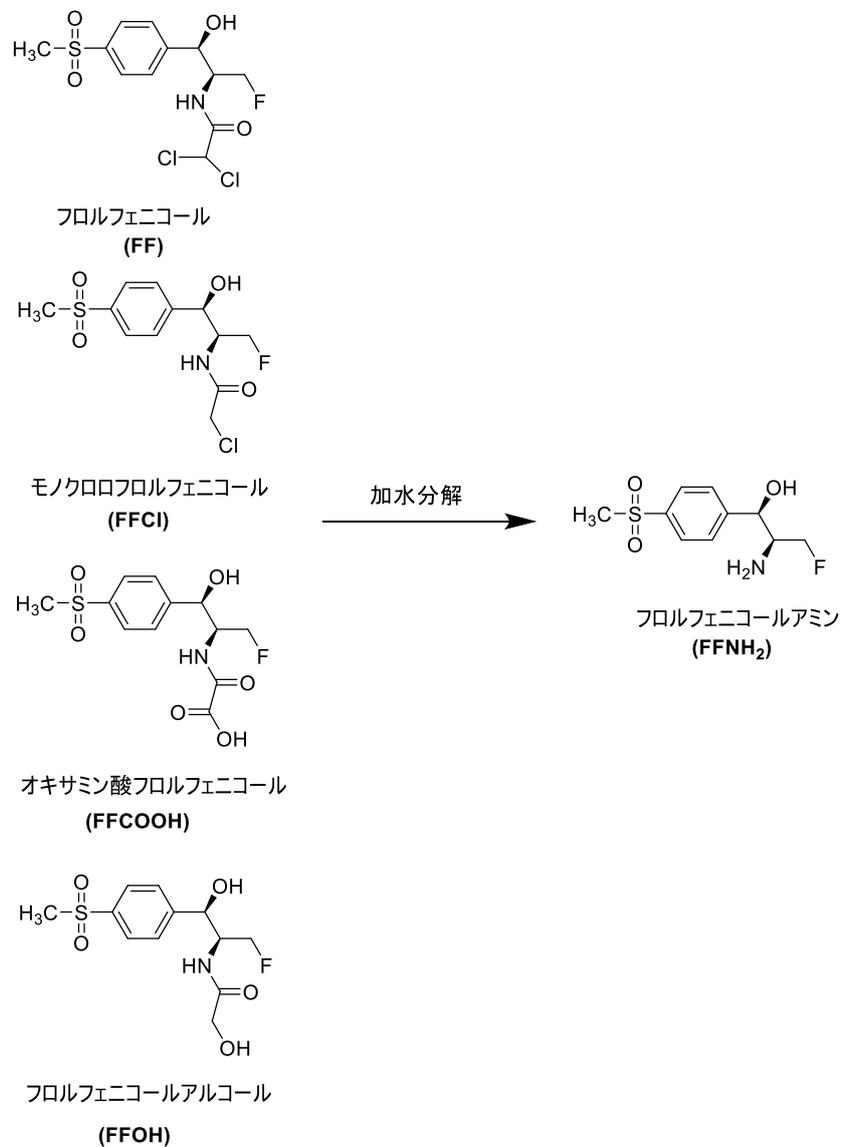


図1 フロルフェニコール（FF）及びその代謝物

2. 基準値

フロルフェニコールとは、フロルフェニコール及び加水分解により代謝物 FFNH₂ ((*1R,2S*)-1-(4-メチルスルホニルフェニル)-2-アミノ-3-フルオロ-1-プロパノール) に変換される代謝物を代謝物 FFNH₂ に換算したものの和をいう。〔生食発 0916 第 1 号 (H28.9.16) 〕

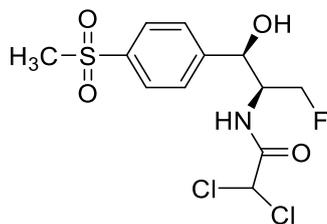
食品名	基準値 (ppm)
牛の筋肉	0.3
豚の筋肉	0.3
牛の脂肪	0.3
豚の脂肪	0.3
牛の肝臓	4
豚の肝臓	7
牛の腎臓	0.3
豚の腎臓	1
牛の食用部分	4
豚の食用部分	7
鶏の筋肉	0.2
鶏の脂肪	0.4
鶏の肝臓	3
鶏の腎臓	1
鶏の食用部分	3
魚介類 (さけ目魚類に限る。)	1
魚介類 (うなぎ目魚類に限る。)	8
魚介類 (すずき目魚類に限る。)	0.3
魚介類 (その他の魚類に限る。)	1

基準値設定のない食品：含有するものであってはならない。

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： フロルフェニコール (Florfenicol, FF)

構造式：



分子式： $C_{12}H_{14}Cl_2FNO_4S$

分子量： 358.21

化学名： 2,2-Dichloro-*N*-[(1*R*,2*S*)-3-fluoro-1-hydroxy-1-{4-(methylsulfonyl)phenyl}propan-2-yl]ethanamide

CAS 番号： 73231-34-2

外観： 白色粉末

融点^{a)}： 153-154°C

沸点 (計算値)^{b)}： $617.5 \pm 55.0^\circ\text{C}$ (760 Torr)

1-オクタノール/水分配係数 ($\log P_{ow}$, 計算値)^{b)}： 1.175 ± 0.597 (25°C)

解離定数 (pK_a , 計算値)^{b)}： 10.73 ± 0.46 (Most acidic, 25 °C)

-1.79 ± 0.70 (Most basic, 25 °C)

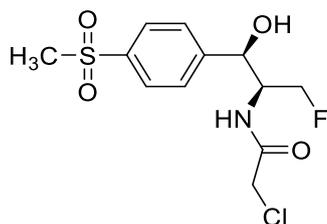
蒸気圧 (計算値)^{b)}： 4.16×10^{-16} Torr (25 °C)

^{a)} SciFinder ("Drugs - Synonyms and Properties" data were obtained from Ashgate Publishing Co. (US) CAPLUS)

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

分析対象化合物： モノクロフロルフェニコール (Monochloroflorfenicol, FFCl)

構造式：



化学名： 2-Chloro-*N*-[(1*R*,2*S*)-3-fluoro-1-hydroxy-1-{4-(methylsulfonyl)phenyl}propan-2-yl]ethanamide

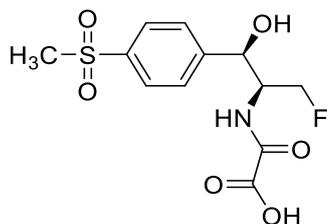
分子式： $C_{12}H_{15}ClFNO_4S$

分子量： 323.76

外観： 白色粉末

分析対象化合物： オキサミン酸フロルフエニコール (Florfenicol oxamic acid, FFCOOH)

構造式：



化学名： 2-([(1*R*,2*S*)-3-fluoro-1-hydroxy-1-{4-(methylsulfonyl)phenyl}propan-2-yl]amino)-2-oxoacetic acid

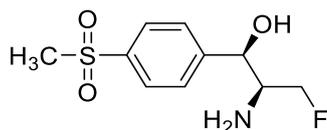
分子式： C₁₂H₁₄FNO₆S

分子量： 319.30

外観： 白色粉末

分析対象化合物： フロルフエニコールアミン (Florfenicol amine, FFNH₂)

構造式：



分子式： C₁₀H₁₄FNO₃S

分子量： 247.28

化学名： (1*R*,2*S*)-2-Amino-3-fluoro-1-{4-(methylsulfonyl)phenyl}propan-1-ol

CAS 番号： 76639-93-5

外観： 白色粉末

沸点 (計算値)^{a)}： 488.7 ± 45.0°C (760 Torr)

1-オクタノール/水分配係数 (log P_{ow}, 計算値)^{a)}： -0.398 ± 0.417 (25°C)

解離定数 (pK_a, 計算値)^{a)}： 10.90 ± 0.45 (Most acidic, 25 °C)

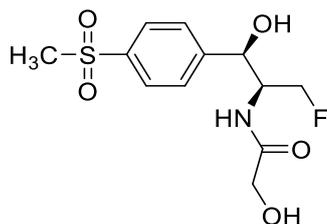
7.59 ± 0.29 (Most basic, 25 °C)

蒸気圧 (計算値)^{a)}： 2.31 × 10⁻¹⁰ Torr (25 °C)

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

分析対象化合物： フロルフェニコールアルコール (Florfenicol alcohol, FFOH)

構造式：



化学名： *N*-[(1*R*,2*S*)-3-Fluoro-1-hydroxy-1-{4-(methylsulfonyl)phenyl}propan-2-yl]-2-hydroxyethanamide

分子式： C₁₂H₁₆FNO₅S

分子量： 305.32

外観： 白色粉末

4. USDA の分析法¹⁾

(1) 試験溶液調製方法の概要

秤 取

↓ 試料 2 g

加水分解

↓ 6 mol/L 塩酸 8 mL を加え、95~100°C で 2 時間 (以上) 加熱

酢酸エチル洗浄

↓ 放冷後、酢酸エチル 20 mL を加えて振とう

↓ 遠心分離 (毎分 2000~2500 回転、5 分間)

↓ 酢酸エチル層を捨てる

↓ 30% 水酸化ナトリウム溶液 8 mL を加え、pH 12.5 以上に調整

多孔性ケイソウ土カラムクロマトグラフィー [Chem Elut (20 mL 保持用)]

↓ 負荷。15~60 分間放置

↓ 酢酸エチルまたはジクロロメタン 60 mL で溶出

↓ 溶媒を除去

↓ 残留物をアセトニトリル/10 mmol/L リン酸二水素カリウム溶液 (pH 4.0) (1 : 99) 2 mL に溶解 (試料 1 g 相当/mL)

HPLC-UV 測定 (定量)、LC-MS/MS 測定 (確認)

スキーム 1. USDA の試験溶液調製方法の概要

(2) 測定条件

① 定量

装置	型 式	会 社
LC	ポンプ : 600E インジェクター : 715 (WISP)	Waters 製
UV 検出器	Spectroflow 783 UV detector	Kratos 製
LC 条件		

カラム	Zorbax Rx-C8(内径 4.6 mm、長さ 250 mm、粒子径 5 μm: Agilent technologies 製)		
プレカラム	Nova-Pak C8 cartridge (Waters 製)		
移動相流速	1 mL/min		
注入量	80~100 μL		
移動相	A 液: 1%アセトニトリル及び 0.01%トリエチルアミン含有 10 mmol/L リン酸二水素カリウム溶液 (pH 4.0) 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	100 0
		10	100 0
		20	20 80
		25	20 80
		35	100 0
		50	100 0
UV 波長	220 (nm)		

② 確認

装置	型式	会社
LC	記載無し	Waters
MS	Quattro Micro API	Waters

LC 条件			
カラム	Zorbax Rx-C8(内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 5 μm: Agilent technologies 製)		
ガードカラム	Zorbax XDB-CN (内径 2.1 mm、長さ 12.5 mm、粒子径 5 μm : Agilent technologies 製)		
移動相流速	0.3 mL/min		
注入量	50 μL		
移動相	A 液: 10 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 B 液: メタノール		
グラジエント条件		時間 (分)	A 液 (%) B 液 (%)
		0.0	100 0
		1.0	100 0
		6.0	80 20
		11.0	80 20
		21.0	0 100
		23.0	0 100
		28.0	100 0
		32.5	100 0
MS 条件			
イオン化モード	APCI (+)		
コロナ電圧 (μA)	2		

コーン電圧 (V)	25
ソース温度 (°C)	130
プローブ温度 (°C)	500
コーンガス (L/h)	100
脱溶媒ガス (L/h)	300
測定モード	選択反応モニタリング (SRM)
モニターイオン (<i>m/z</i>)	248→230、248→197、248→151、248→130
保持時間	8.7 min

[実験方法]

1. 試料

牛の筋肉（オーストラリア産）、牛の脂肪（国産）、牛の肝臓（国産）及びうなぎ（国産）は、インターネットで購入した。試料の調製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、ナイフミルを用いて細切均一化した。
- (2) 牛の脂肪： 可能な限り筋肉層を除き、ナイフミルを用いて細切均一化した。
- (3) 牛の肝臓： ナイフミルを用いて細切均一化した。
- (4) うなぎ： 頭を除き、内臓、骨及び皮を含む可食部をナイフミルを用いて細切均一化した。

2. 試薬・試液

(1) 標準品

FF 標準品：純度 98.9%（富士フィルム和光純薬製）

FFCl 標準品：純度 99.5%（株式会社インターベットより供与）

FFCOOH 標準品：純度 99.9%（林純薬工業製）

FFNH₂ 標準品：純度 99.5%（Sigma-Aldrich 製）

FFOH 標準品：純度 99.9%（林純薬工業製）

(2) 試薬

アセトン、酢酸エチル、ヘキサン： 残留農薬試験用（関東化学製）

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

酢酸：特級（富士フィルム和光純薬製）

アンモニア水： 特級、アンモニア含量 28.0～30.0%（関東化学製）

塩化ナトリウム： 残留農薬試験用（富士フィルム和光純薬製）

酢酸アンモニウム：特級（富士フィルム和光純薬製）

6 mol/L 塩酸：容量分析用（富士フィルム和光純薬製）

7.5 mol/L 水酸化ナトリウム溶液：30 w/v%（7.5 mol/L）水酸化ナトリウム溶液（富士フィルム和光純薬製）

ケイソウ土： セライト No.545（富士フィルム和光純薬製）

多孔性ケイソウ土ミニカラム： Chem Elut（5 mL 保持用、Agilent technologies 製）

スルホン酸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 MCX（150 mg/6 mL、Waters 製）

ガラス繊維ろ紙： GA-10（アドバンテック製）

ろ紙： 桐山ロート用ろ紙、No.5B（桐山製作所製）

分解容器： DigiTUBEs（100 mL、ポリプロピレン）（SCP Science 製）

遠心管：遠心管（100 mL、ポリプロピレン）（AGC テクノグラス製）

(3) 試液

① 標準原液

FF、FFCl、FFCOOH、FFNH₂及びFFOH 標準原液：各標準品 10 mg を精秤し、メタノールに溶解して 1 mg/mL の濃度の溶液を調製した。

② 添加用標準溶液（定量限界濃度）

FF、FFCl、FFCOOH、FFNH₂及びFFOH の各標準原液をメタノールで希釈し、FFNH₂として 0.2 µg/mL（FF 0.290 µg/mL；FFCl 0.262 µg/mL；FFCOOH 0.258 µg/mL；FFNH₂ 0.2 µg/mL；FFOH 0.247 µg/mL）の濃度の溶液を調製した。

③ 添加用標準溶液（基準値濃度）

a. 牛の筋肉及び牛の脂肪（基準値 0.3 ppm）

FF、FFCl、FFCOOH、FFNH₂ 及び FFOH の各標準原液をメタノールで希釈し、FFNH₂ として 6 µg/mL（FF 8.69 µg/mL；FFCl 7.86 µg/mL；FFCOOH 7.75 µg/mL；FFNH₂ 6 µg/mL；FFOH 7.41 µg/mL）の濃度の溶液を調製した。

b. 牛の肝臓（基準値 4 ppm）

FF、FFCl、FFCOOH、FFNH₂ 及び FFOH の各標準原液をメタノールで希釈し、FFNH₂ として 80 µg/mL（FF 116 µg/mL；FFCl 105 µg/mL；FFCOOH 103 µg/mL；FFNH₂ 80 µg/mL；FFOH 98.8 µg/mL）の濃度の溶液を調製した。

c. うなぎ（基準値 8 ppm）

FF、FFCl、FFCOOH、FFNH₂ 及び FFOH の各標準原液をメタノールで希釈し、FFNH₂ として 160 µg/mL（FF 232 µg/mL；FFCl 209 µg/mL；FFCOOH 207 µg/mL；FFNH₂ 160 µg/mL；FFOH 198 µg/mL）の濃度の溶液を調製した。

なお、FFNH₂ の濃度から各化合物の濃度への換算は、以下の換算係数（各化合物の分子量を FFNH₂ の分子量で除した値）を用いて行った。

化合物	換算係数
FF	1.449
FFCl	1.309
FFCOOH	1.291
FFOH	1.235

3. 装置等

ナイフミル： Grindomix GM200（Verder Scientific 製）

遠心分離機： テーブルトップ遠心機 4000（久保田商事製）

ヒートブロック： 酸分解前処理システム DigiPREP Jr（SCP Science 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

4. 測定条件

LC 条件	
カラム	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）
移動相流速	0.2 mL/min
注入量	5 µL
カラム温度	40°C

移動相	A 液：0.1 vol%酢酸 B 液：アセトニトリル				
グラジエント条件*					
グラジエント条件 1 (FFNH ₂ のみを測定 する場合)	時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)		
	0.0	99	1		
	6.0	99	1		
	7.0	5	95		
	12.0	5	95		
	22.0	99	1		
グラジエント条件 2 (FF、FFCl、 FFCOOH、FFNH ₂ 及 び FFOH を測定する 場合)	時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)		
	0.0	99	1		
	6.0	99	1		
	12.0	5	95		
	17.0	5	95		
	27.0	99	1		
保持時間	11.4 min (FF)、10.9 min (FFCl)、9.8 min (FFCOOH)、5.1 min (FFNH ₂)、 10.1 min (FFOH)				
MS 条件					
測定モード	SRM				
イオン化モード	FFNH ₂ ESI (+) ; FFNH ₂ 以外 ESI (-)				
イオンスプレー電圧	FFNH ₂ 5500 V ; FFNH ₂ 以外 -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 , 30 psi				
ネブライザーガス	N ₂ , 50 psi				
ターボガス	N ₂ , 80 psi				
コリジョンガス	N ₂ , 9 (任意単位)				
測定イオン					
		イオン (m/z)	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)
FF	定量イオン	356.0→336.1	30	12	11
	定性イオン	356.0→185.0	30	26	13
FFCl	定量イオン	322.0→185.1	75	20	17
	定性イオン	322.0→119.1	75	40	13
FFCOOH	定量イオン	318.0→185.1	30	26	21
	定性イオン	318.0→121.1	30	60	13
FFNH ₂	定量イオン	248.0→230.0	31	19	12
	定性イオン	248.0→130.1	31	29	10
FFOH	定量イオン	304.0→284.1	100	12	23
	定性イオン	304.0→100.1	100	18	9

* 添加回収試験は「グラジエント条件1」で行った。

5. 定量

FFNH₂ 標準原液を 0.1 vol% 酢酸/メタノール (9 : 1) で希釈し、0.625、1.25、1.875、2.5、3.125 及び 3.75 ng/mL の濃度を調製した。これらの溶液 5 µL を LC-MS/MS に注入して、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 5 µL を LC-MS/MS に注入し、検量線から絶対検量線法により FFNH₂ の含量を算出した (検量線の例を図 6 に示した。)

6. 添加試料の調製

添加濃度は FFNH₂ としての濃度で示した。

(1) 定量限界濃度 (添加濃度 0.01 mg/kg)

試料 10.0 g に、0.2 µg/mL (FFNH₂ 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。

(2) 基準値濃度

牛の筋肉及び牛の脂肪 (添加濃度 0.3 mg/kg) : 試料 10.0 g に、6 µg/mL (FFNH₂ 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。

牛の肝臓 (添加濃度 4 mg/kg) : 試料 10.0 g に、80 µg/mL (FFNH₂ 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。

うなぎ (添加濃度 8 mg/kg) : 試料 10.0 g に、160 µg/mL (FFNH₂ 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。

7. 試験溶液の調製

[概要]

試料に塩酸を加えて FF 及びその代謝物を FFNH₂ に加水分解後、ヘキサンの洗浄し、多孔性ケイソウ土カラムで精製 (定量限界濃度の検討ではスルホン酸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追加精製) した後、LC-MS/MS で定量及び確認した。

(1) 加水分解

ポリプロピレン製の容器 (DigiTUBEs, 100 mL, SCP Science 製) に試料 10.0 g を量り採り、6 mol/L 塩酸 20 mL を加え、密栓して 100°C で 3 時間加熱した。(30 分毎に容器を穏やかに 5 秒間程度振とうした。) 放冷後、加水分解物を遠心管 (100 mL 容) に移し、加水分解後の容器を水 10 mL 及びヘキサン 40 mL で順次洗浄して、洗液を遠心管に合わせた。この溶液を 5 分間振とう後、毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離した。ヘキサン層を捨て、水層にケイソウ土 2 g を加えて混合した後、ガラス繊維ろ紙を用いて吸引ろ過した。遠心管及びろ紙上の残留物をアセトン/水 (1 : 1) 10 mL で 2 回洗い、洗液を吸引ろ過した。ろ液を合わせ、水を加えて正確に 100 mL とした。

(2) 多孔性ケイソウ土カラムクロマトグラフィー

(1) で得られた溶液から正確に 2.5 mL を分取し、7.5 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 1 mL 及び塩化ナトリウム 1 g を加え、よく混合後、多孔性ケイソウ土カラム (5 mL 保持用) に注入した。このカラムを 30 分間放置した後、酢酸エチル 30 mL (うち 5 mL ずつで 3 回容器を洗い込んだ) を注入した。溶出液をロータリーエバポレーターを用いて 40°C 以下で約 1 mL まで減圧濃縮後、窒素気流により溶媒を除去した。この残留物を 0.1 vol% 酢酸/メタノール (9 : 1) 1 mL に溶解したものを試験溶液とした。なお、基準値濃度の添加回収試験における添加試料は、0.1 vol% 酢酸/メタノール (9 : 1) を用いて、牛の筋肉及び脂肪では 30 倍、牛の肝臓では 400 倍、うなぎでは 800 倍希釈したものを LC-MS/MS に供した (いずれの食品も回収率 100% 相当濃度は 2.5 ng/mL)。また、添加回収試験におけ

るブランク試料は、残留物をメタノール1 mLに溶解した（基準値濃度の添加回収試験では、メタノールを用いて、牛の筋肉及び脂肪では30倍、牛の肝臓では400倍、うなぎでは800倍希釈した。）。

(3) スルホン酸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による追加精製（定量限界濃度の検討のみ実施）

スルホン酸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 MCX (150 mg)] にメタノール2 mL及び0.1 vol%酢酸/メタノール (1 : 1) 3 mLを順次注入し、各流出液は捨てた。(2) で得られた残留物を0.1 vol%酢酸/メタノール (1 : 1) 1 mLに溶かしてスルホン酸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に注入した後、0.1 vol%酢酸/メタノール (1 : 1) 3 mL及びメタノール2 mLを順次注入し、各流出液を捨てた。アンモニア水/メタノール (1 : 99) 5 mLを注入し、溶出液を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まで減圧濃縮後、エタノールを約2 mL加えて、再度約1 mLまで減圧濃縮し、窒素気流により溶媒を除去した。この残留物を0.1 vol%酢酸/メタノール (9 : 1) に溶かして正確に1 mLとしたものを試験溶液とした。なお、添加回収試験におけるブランク試料は、残留物をメタノールに溶かして正確に1 mLとした。

8. ブランク試験溶液の調製

ブランク試料を『7. 試験溶液の調製』に従って調製した溶液（メタノール溶液）を0.1 mL採り、窒素気流により溶媒を除去した。これに0.1 vol%酢酸/メタノール (9 : 1) 0.1 mLを加えて溶解したものをブランク試験溶液とした。

9. マトリックス添加標準溶液の調製

ブランク試料を『7. 試験溶液の調製』に従って調製した溶液を0.1 mL採り、窒素気流により溶媒を除去した。これに、0.1 vol%酢酸/メタノール (9 : 1) で調製した添加回収試験における回収率100%相当濃度のFFNH₂溶媒標準溶液を0.1 mL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。

[分析法フローチャート]

秤 取

↓ 試料 10.0 g

加水分解

↓ 6 mol/L 塩酸 20 mL を加え、100°C で 3 時間加熱

ヘキサン洗淨

↓ 放冷後、遠心管に移す

↓ 水 10 mL 及びヘキサン 40 mL を用いて容器を洗い、遠心管に合わせる

↓ 5 分間振とう。遠心分離（毎分 3000 回転、5 分間）

↓ ヘキサン層を捨てる

定容

↓ 水層にセライト 2 g を加えて混合後、吸引ろ過

↓ 遠心管及びろ紙上の残留物をアセトン/水（1 : 1）10 mL で 2 回洗い、洗液を吸引ろ過

↓ 水で 100 mL に定容 (①)

多孔性ケイソウ土カラムクロマトグラフィー [Chem Elut (5 mL 保持用)]

↓ ①を 2.5 mL (0.25 g 相当) 採る

↓ 7.5 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 1 mL 及び塩化ナトリウム 1 g を加える

↓ 負荷。30 分間放置

↓ 酢酸エチル 30 mL で溶出

↓ 溶媒を除去

-----追加精製-----

↓ 0.1 vol% 酢酸/メタノール（1 : 1）1 mL に溶解 (②)

Oasis MCX [150 mg] 精製

↓ メタノール 2 mL 及び 0.1 vol% 酢酸/メタノール（1 : 1）3 mL でコンディショニング

↓ ②を負荷

↓ 0.1 vol% 酢酸/メタノール（1 : 1）3 mL で洗淨

↓ メタノール 2 mL で洗淨

↓ アンモニア水/メタノール（1 : 99）5 mL で溶出

↓ 溶媒を除去

↓ 残留物を 0.1 vol% 酢酸/メタノール（9 : 1）1 mL に溶解（試料 0.25 g 相当/mL）*

LC-MS/MS 測定

スキーム 2. 確立した試験溶液調製方法の概要

* 基準値濃度の添加回収試験では、牛の筋肉及び脂肪は 30 倍、牛の肝臓は 400 倍、うなぎは 800 倍に希釈して測定

[結果及び考察]

1. 測定条件の検討

(1) FFNH₂の測定条件

①MS条件

FFNH₂標準溶液をESI (+) 及びESI (-) モードでスキャン測定を行ったところ、ESI (+) モードにおいて、より高感度に測定が可能であったため、ESI (+) モードで測定を行うこととした。ESI (+) モードでのスキャン測定におけるマススペクトルを図2に示した。FFNH₂のプロトン付加分子 (m/z 248.0、 $[M+H]^+$) が強く観測された。本イオン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 230.0及び130.1が観測された(図3)。後述するLC条件で測定を行い、S/Nが高かった m/z 248.0→230.0を定量用、 m/z 248.0→130.1を定性用イオンとすることとした。

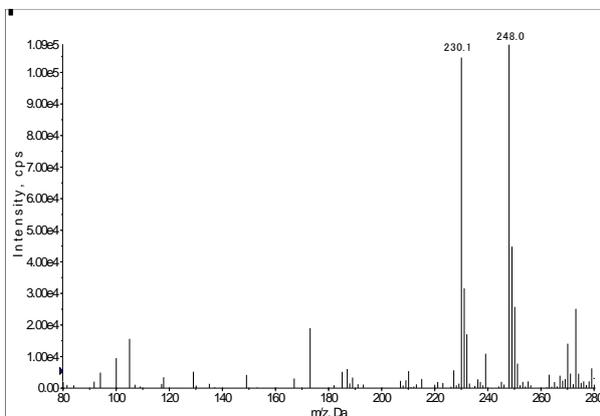


図2 FFNH₂のマススペクトル

スキャン範囲： m/z 80~280、測定条件：ESI (+)、デクラスタリング電位 31 V

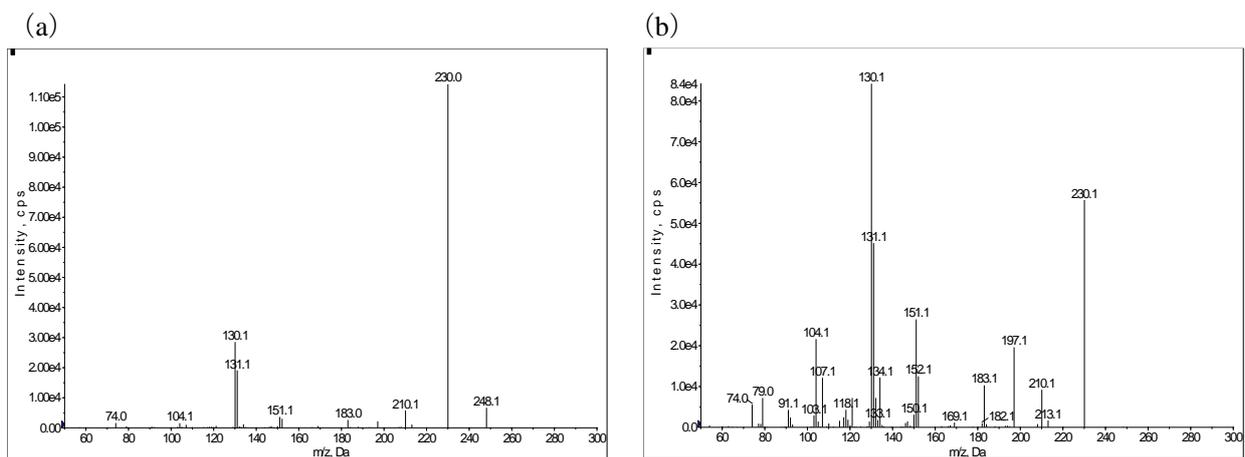


図3 FFNH₂のプロダクトイオンスペクトル

プリカーサーイオン： m/z 248.0、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31 V、コリジョンエネルギー (a) 19 eV、(b) 29 eV

②LC条件

a. 移動相及び分析カラム

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、同程度のピーク強度が得られた。添加剤として酢酸、ギ酸、酢酸アンモニウム及びアンモニア水を用いた場合と、添加剤を加えない場合を比較した。その結果、添加剤を加えない場合が最もピーク強度が高く、いずれの添加剤を用いた場合も、添加剤を加えない場合と比較して感度が 1/2 以下となった。そこで、添加剤を加えない条件での測定を検討した。標準溶液を ODS カラム (InertSustain C18、ジューエルサイエンス製) で水/アセトニトリルまたは水/メタノールを用いて測定したところ、良好なピーク形状、再現性及び検量線の直線性が得られた (図 4 (a))。しかしながら、多孔性ケイソウ土カラム等のミニカラムを通したり、試験溶液中にマトリックスが存在するとピーク形状が悪くなり (図 4 (b))、再現性が得られなかった。

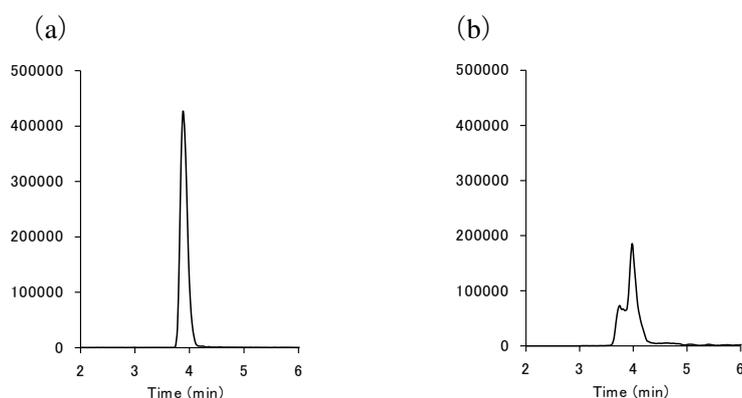


図 4 FFNH₂ のクロマトグラム (Acquity UPLC/TQD (Waters 製) で測定)

(a) FFNH₂ 標準溶液 (0.05 µg/mL)、(b) 多孔性ケイソウ土カラムクロマトグラフィー後に、FFNH₂ を添加した溶液 (FFNH₂ 0.05 µg/mL) *

*操作方法： 1.2 mol/L 塩酸 (6 mol/L 塩酸 20 mL を用いて加水分解後、反応液を 100 mL に定容した場合の濃度に相当) 2.5 mL に、7.5 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を 1 mL 加え、混合した。これを多孔性ケイソウ土カラムに負荷し、30 分間放置後、酢酸エチル 40 mL で溶出した。FFNH₂ 標準溶液 (1 µg/mL) 50 µL を加え、溶媒を除去後、メタノール 1 mL に溶解したものを LC-MS/MS で測定した。

分析カラム： InertSustain C18

測定条件： A 液 水、B 液 メタノール

グラジエント条件： 0 分 (A:B=95 : 5) →10 分 (A:B=5 : 95) →10.1 分 (A:B=95 : 5)

流速： 0.2 ml/min

注入量 3 µL

そこで、添加剤を加えた条件での測定を検討した。酢酸、ギ酸及び酢酸アンモニウムを比較したところ、酢酸で最も高いピーク強度が得られた。酢酸の添加濃度について検討したところ、低濃度の方がピーク強度は高かったが (0.01 vol%でのピーク面積に対する 0.1 vol%でのピーク面積比は約 0.7)、マトリックス存在下においてもピーク形状の良い、0.1 vol%酢酸を用いることとした。

移動相として 0.1 vol%酢酸/メタノールまたは 0.1 vol%酢酸/アセトニトリルを用いて、InertSustain C18、Inertsil ODS-4 (ジューエルサイエンス製)、Xbridge C18 (Waters 製)、Capcell Pak MG2 (資生堂製) でのピーク形状や感度等を比較した。その結果、InertSustain C18 及び Inertsil ODS-4 で良好なピーク形状が得られた (図 5)。InertSustain C18 及び Inertsil ODS-4 のピーク強度は同

程度であったが、Inertsil ODS-4の方が若干保持が強かった。移動相は0.1 vol%酢酸/メタノールよりも、0.1 vol%酢酸/アセトニトリルを用いた方が良好なピーク形状が得られた。

以上の結果から、分析カラムとしてInertsil ODS-4、移動相として0.1 vol%酢酸/アセトニトリルを用いて測定を行うこととした。なお、本条件では、マトリックス存在下においてもピーク形状の悪化等の問題は認められなかった。

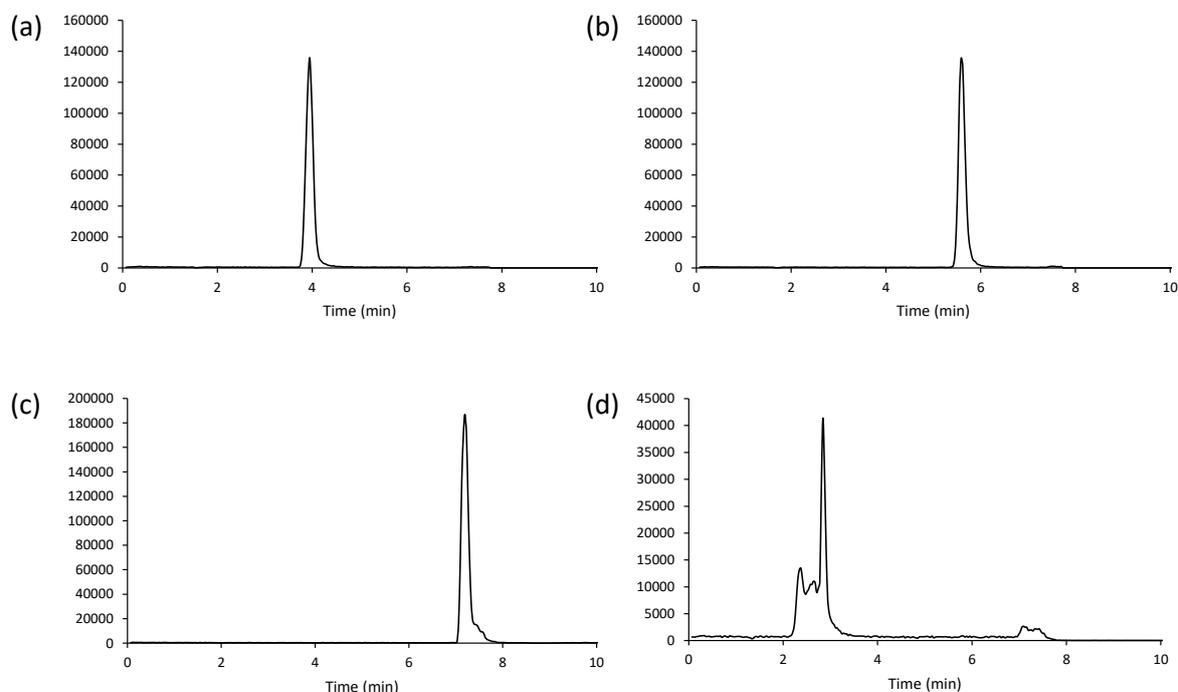


図5 FFNH₂標準溶液 (0.1 µg/mL) のクロマトグラム (Acquity UPLC/TQD (Waters 製) で測定)

分析カラム: (a) InertSustain C18、(b) Inertsil ODS-4、(c) Xbridge C18、(d) Capcell Pak MG2

測定条件: 『実験方法の4. 測定条件』参照

注入溶媒: 0.1 vol%酢酸/メタノール (9:1)

b. 注入溶媒 (試験溶液の調製溶媒)

0.1 vol%酢酸/アセトニトリル (9:1) で調製したFFNH₂標準溶液を、『実験方法 4. 測定条件』に示した測定条件で測定 (注入量5 µL) したところ、ピーク割れが見られた。0.1 vol%酢酸/アセトニトリル (19:1) で標準溶液を調製した場合は、ピーク割れは認められなかったものの、若干リーディングした。また、牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓及びうなぎを用いて、実験方法の『7. 試験溶液の調製』に従って調製したところ、スルホン酸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精製後の残留物は0.1 vol%酢酸/アセトニトリル (19:1) に溶解しなかった。一方、0.1 vol%酢酸/メタノール (9:1) では良好なピーク形状が得られ、残留物の溶解性も良好であった。これらの結果から、注入溶媒には0.1 vol%酢酸/メタノール (9:1) を用いることとした。検量線の例を図6に示した。

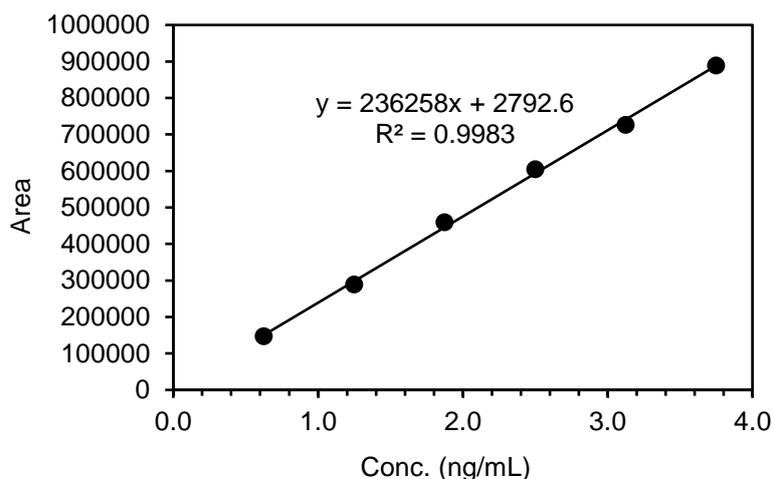


図 6 FFNH₂ の検量線の例 (0.625~3.75 ng/mL)

③定量限界

定量限界の算出結果を以下に示した。

$$0.01 \text{ mg/kg} \left[\left[\text{試験溶液量 } 1 \text{ (mL)} / \text{試験溶液中の試料量 } 0.25 \text{ (g)} \right] \times \left[\text{分析対象化合物の定量限界相当量 } 0.0125 \text{ (ng)} / \text{注入量 } 5 \text{ (}\mu\text{L)} \right] \right]$$

(2) FF、FFCl、FFCOOH 及び FFOH の測定条件

FF の基準値は FF 及びその代謝物を加水分解することで得られる FFNH₂ に対して設定されているため、基準値判定の目的では FF、FFCl、FFCOOH 及び FFOH を測定する必要はない。しかし、加水分解反応の進行状況を確認するためには、FF、FFCl、FFCOOH 及び FFOH についても測定した方が良くと考え、FF、FFCl、FFCOOH 及び FFOH についても測定条件を検討した。

①MS条件の検討

a. FF

FF の標準溶液を ESI (+) 及び ESI (-) モードでスキャン測定を行った。その結果、ESI (-) モードにおいて、より高感度に測定が可能であったため、ESI (-) モードで測定を行うこととした。ESI (-) モードでのスキャン測定におけるマススペクトルを図 7 に示した。FF の脱プロトン分子 (m/z 356.0、[M - H]⁻) 及びその塩素原子同位体イオン (m/z 358.0) が強く観測された。 m/z 356.0 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、 m/z 336.1 及び 185.0 等が観測された (図 8)。実験方法の『4. 測定条件』に示した「グラジエント条件 2」で測定を行った結果、S/N が高かった m/z 356.0→336.1 を定量用、 m/z 356.0→185.0 を定性用イオンとすることとした。

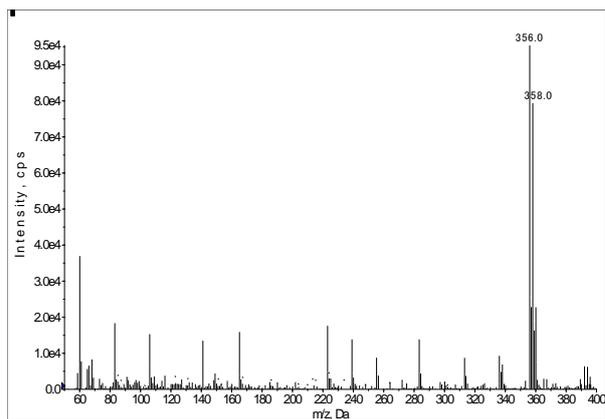


図7 FFのマススペクトル

スキャン範囲： m/z 50~400、測定条件：ESI（-）、デクラスタリング電位 30 V

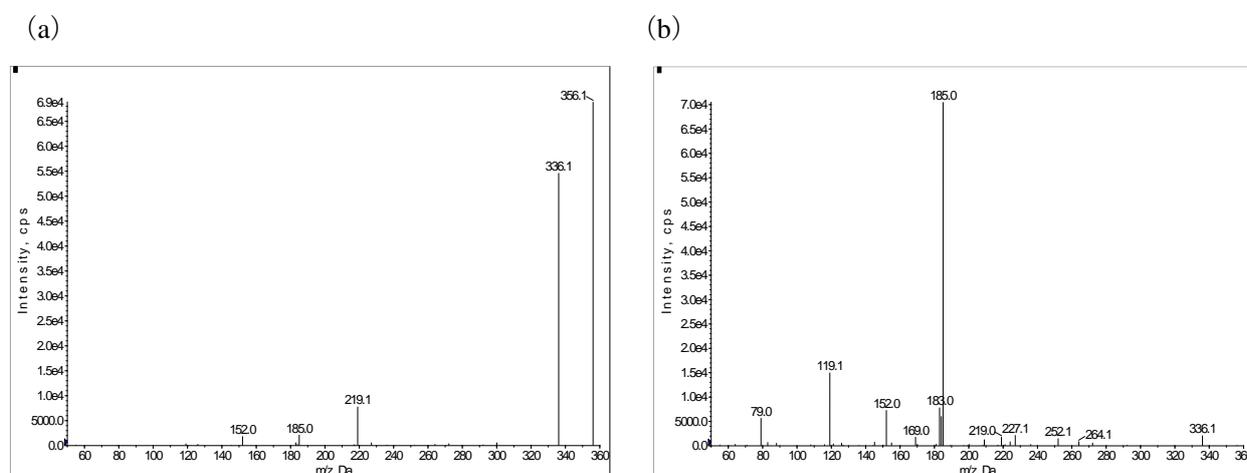


図8 FFのプロダクトイオンスペクトル

プリカーサーイオン： m/z 356.0、スキャン範囲： m/z 50~360、測定条件：ESI（-）、デクラスタリング電位30 V、コリジョンエネルギー（a）12 eV、（b）26 eV

b. FFCI

FFCIの標準溶液をESI（+）及びESI（-）モードでスキャン測定を行った。その結果、ESI（-）モードにおいて、より高感度に測定が可能であったため、ESI（-）モードで測定を行うこととした。ESI（-）モードでのスキャン測定におけるマススペクトルを図9に示した。FFCIの脱プロトン分子（ m/z 322.0、 $[M - H]^-$ ）及びその塩素原子同位体イオン（ m/z 324.0）が強く観測された。 m/z 322.0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、 m/z 185.1及び119.1等が観測された（図10）。実験方法の『4. 測定条件』に示した「グラジエント条件2」で測定を行った結果、S/Nが高かった m/z 322.0→185.1を定量用、 m/z 322.0→119.1を定性用イオンとすることとした。

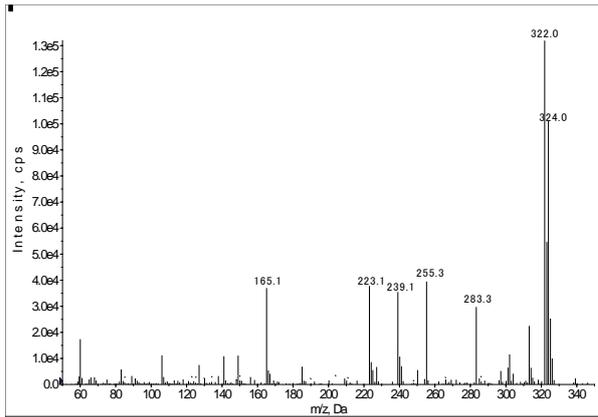


図9 FFC1のマススペクトル

スキャン範囲： m/z 100～360、測定条件：ESI（－）、デクラスタリング電位 75 V

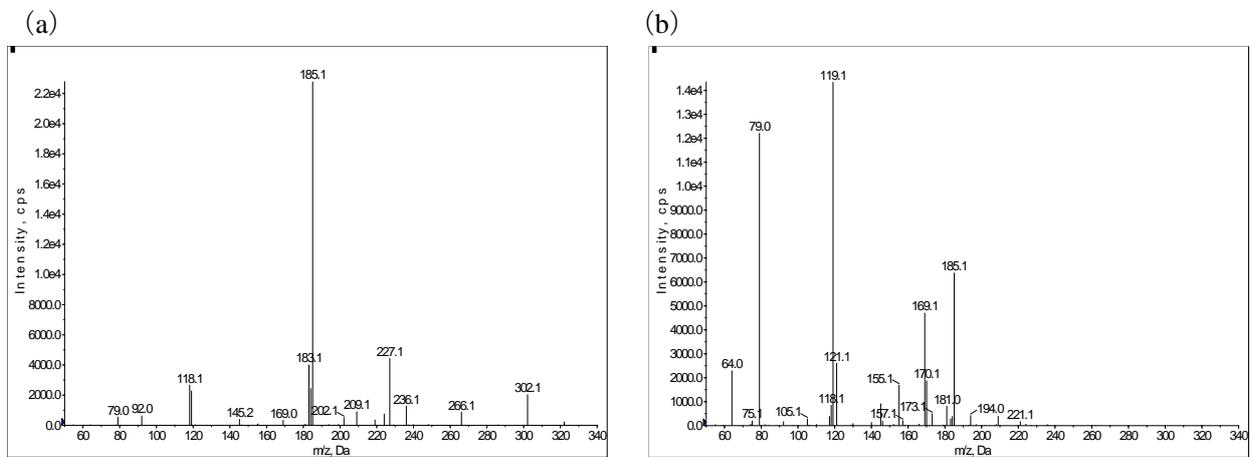


図10 FFC1のプロダクトイオンスペクトル

プリカーサーイオン： m/z 322.0、スキャン範囲： m/z 50～340、測定条件：ESI（－）、デクラスタリング電位75 V、コリジョンエネルギー (a) 20 eV、(b) 40 eV

c. FFCOOH

FFCOOH の標準溶液を ESI（+）及び ESI（－）モードでスキャン測定を行った。その結果、ESI（－）モードにおいて、より高感度に測定が可能であったため、ESI（－）モードで測定を行うこととした。ESI（－）モードでのスキャン測定におけるマススペクトルを図 11 に示した。FFCOOH の脱プロトン分子 (m/z 318.0、 $[M - H]^-$) が強く観測された。本イオン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、 m/z 185.1 及び 121.1 等が観測された (図 12)。実験方法の『4. 測定条件』に示した「グラジエント条件 2」で測定を行った結果、S/N が高かった m/z 318.0→185.1 を定量用、 m/z 318.0→121.1 を定性用イオンとすることとした。

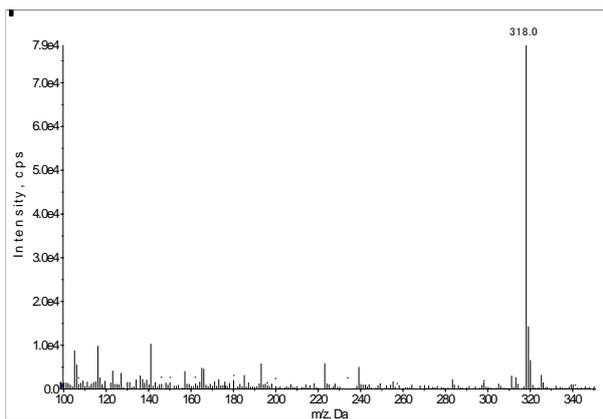


図11 FFCOOHのマススペクトル

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 30 V

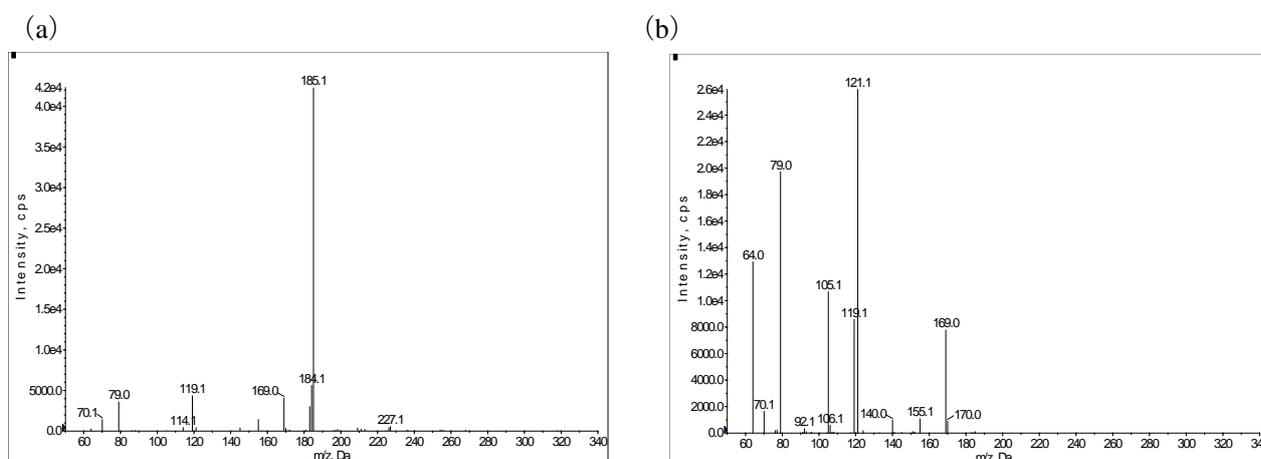


図12 FFCOOHのプロダクトイオンスペクトル

プリカーサーイオン： m/z 318.0、スキャン範囲： m/z 50～340、測定条件：ESI（－）、デクラスタリング電位30 V、コリジョンエネルギー (a) 26 eV、(b) 60 eV

d. FFOH

FFOHの標準溶液をESI（+）及びESI（－）モードでスキャン測定を行った。その結果、ESI（－）モードにおいて、より高感度に測定が可能であったため、ESI（－）モードで測定を行うこととした。ESI（－）モードでのスキャン測定におけるマススペクトルを図13に示した。FFOHの脱プロトン分子（ m/z 304.0、 $[M - H]^-$ ）が強く観測された。本イオン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、 m/z 284.1及び100.0等が観測された（図14）。実験方法の『4. 測定条件』に示した「グラジエント条件2」で測定を行った結果、S/Nが高かった m/z 304.0→284.1を定量用、 m/z 304.0→100.1を定性用イオンとすることとした。

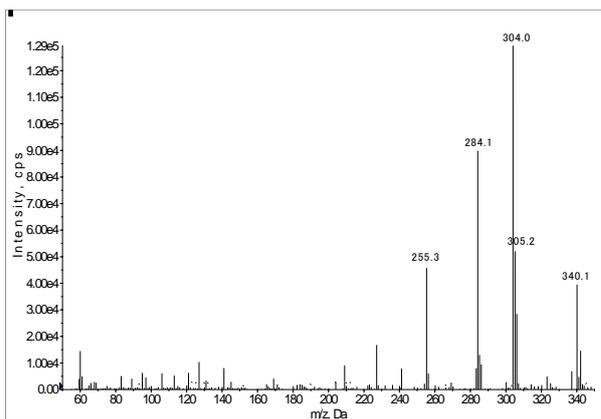


図13 FFOHのマススペクトル

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 100 V

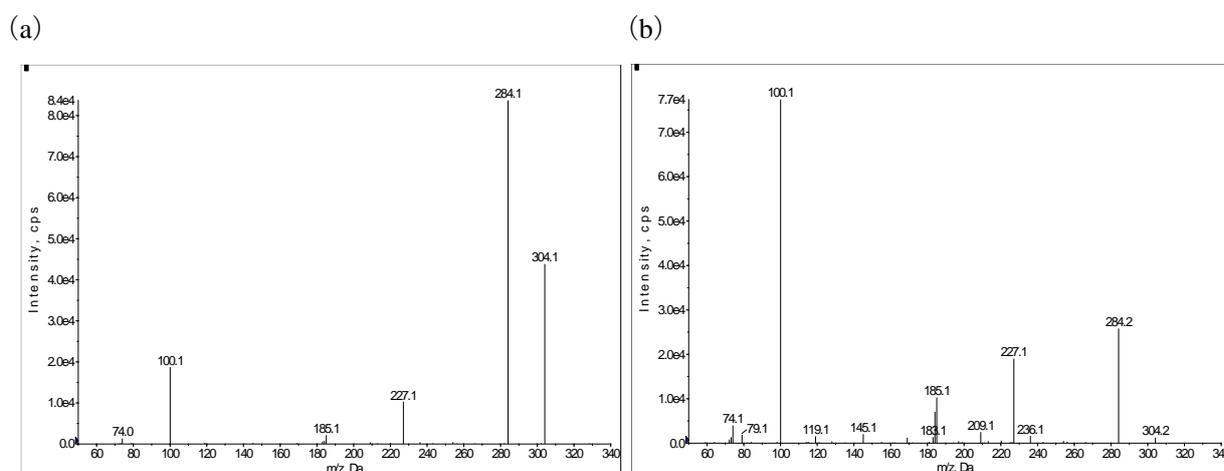


図14 FFOHのプロダクトイオンスペクトル

プリカーサーイオン： m/z 304.0、スキャン範囲： m/z 50～340、測定条件：ESI（－）、デクラスタリング電位100 V、コリジョンエネルギー (a) 12 eV、(b) 18 eV

②LC 条件の検討

FF、FFCl、FFCOOH及びFFOHを実験方法の『4. 測定条件』に示した「グラジエント条件2」で測定を行った結果、いずれも良好なピーク形状が得られた（図15）。

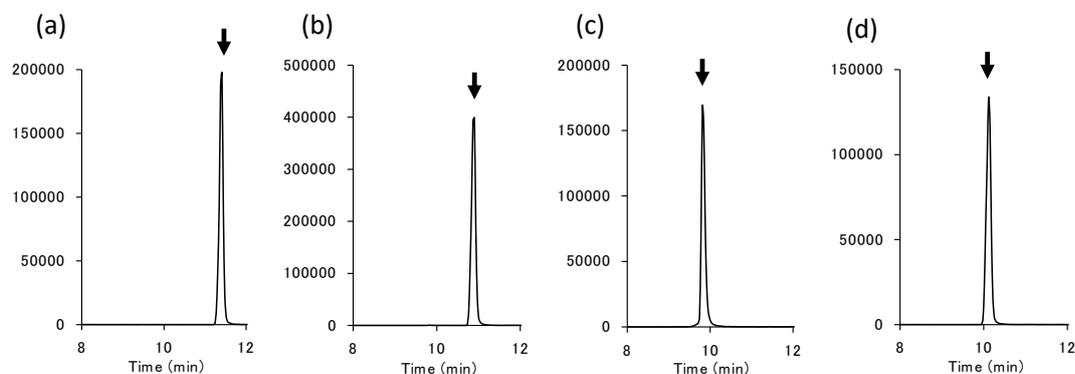


図15 FF、FFCl、FFCOOH及びFFOHの標準溶液（FFNH₂として0.01 μg/mL）のクロマトグラム (a) FF、(b) FFCl、(c) FFCOOH、(d) FFOH

3. 試験溶液の調製方法の検討

(1) 加水分解

① 標準品の加水分解

USDA の方法¹⁾では、試料に 6 mol/L 塩酸を加えて 95~100°C で 2 時間 (以上) 加熱し、試料に結合している FF 及びその代謝物を遊離するとともに FFNH₂ に変換する方法を採用している。そこで、USDA の方法¹⁾に準拠し、FF、FFCl、FFCOOH 及び FFOH 標準品に 6 mol/L 塩酸を加え、密栓して 100°C で 0.25~5 時間加熱し、FFNH₂ の回収率を求めた (図 16)。その結果、いずれの化合物も反応 1 時間で 93~97% の良好な回収率が得られた。また、いずれの化合物も 1 時間以上加熱しても回収率は向上しなかった。

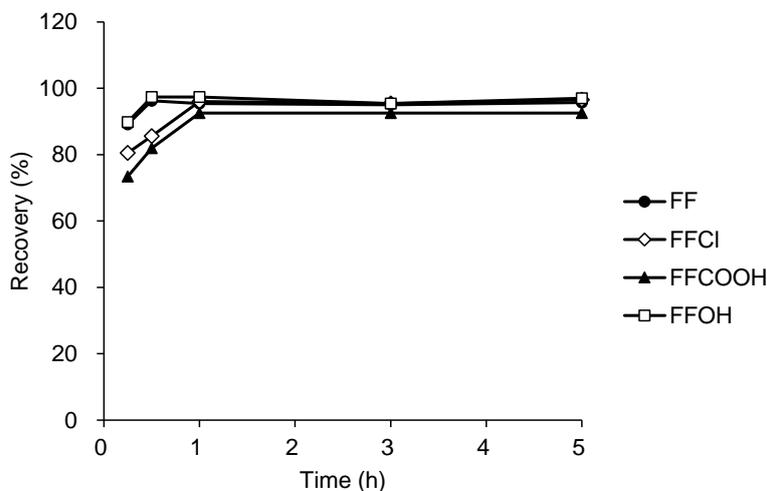


図 16 各反応時間における FFNH₂ の回収率

操作方法： 各化合物の標準溶液 (FFNH₂として 1 µg/mL) を 100 µL 採り、溶媒を除去した。これに、6 mol/L 塩酸 20 mL を加えて、100°C で加熱 (0.25、0.5、1、3 及び 5 時間) した後、水で 100 mL に定容した。これを 2.5 mL 採り、7.5 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 1 mL 及び塩化ナトリウム 1 g を加えて混合後、多孔性ケイソウ土カラムに負荷した。酢酸エチル 30 mL で溶出後、溶媒を除去し、0.1 vol% 酢酸/メタノール (9 : 1) に溶解して LC-MS/MS で測定した。

② 試料の分解

試料 (牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓及びうなぎ) 10 g を採り、6 mol/L 塩酸 20 mL を加えて密栓して 100°C で加熱した。その結果、試料の塊がなくなり、暗褐色~黒色の溶液状態になるまで、うなぎでは 1.5 時間、牛の脂肪及び肝臓では 2 時間、牛の筋肉では 2.5 時間の加熱が必要であった (図 17)。いずれの食品も、3 時間以上加熱してもほとんど変化は見られなかった。

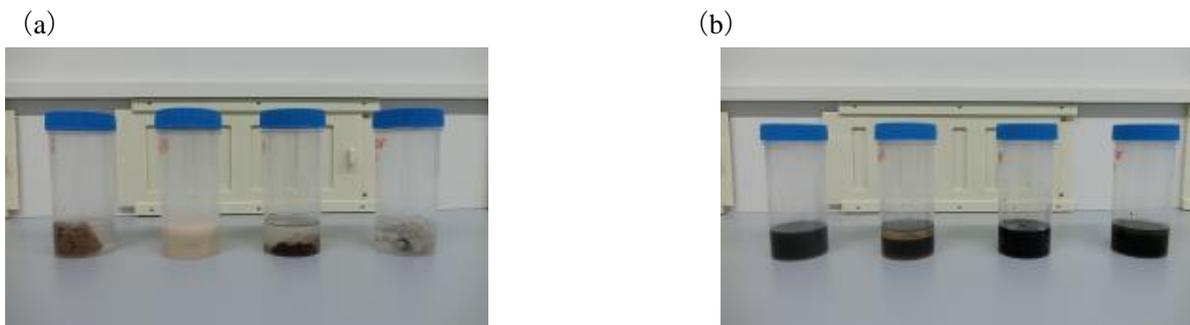


図17 各反応時間における試料の分解状況

(a) 0時間、(b) 3時間

試料：左から、牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、うなぎ

③ マトリックス存在下での加水分解

牛の筋肉にFF、FFCl、FFCOOH及びFFOHを添加し、6 mol/L塩酸を加えた後、密栓して100°Cで0.25～5時間加熱し、FFNH₂の回収率を求めた(図18)。その結果、標準品での検討と同様に、いずれの化合物も反応1時間で95～100%の良好な回収率が得られた。いずれの化合物も1時間以上加熱しても回収率は向上しなかった。

①～③の結果から、試料 10 g に 6 mol/L 塩酸 20 mL を加えて 100°C で 3 時間加熱することとした。なお、本検討では、ポリプロピレン製容器 (100 mL 容) を用いて密栓して加熱したが、試料が漏れる等の問題はなかった。また、加熱は、主に無機分析に用いられるヒートブロック (酸分解前処理システム DigiPREP Jr, SCP Science 製) を使用したが、その他のヒートブロックや水浴、油浴を用いることも可能と考えられる。

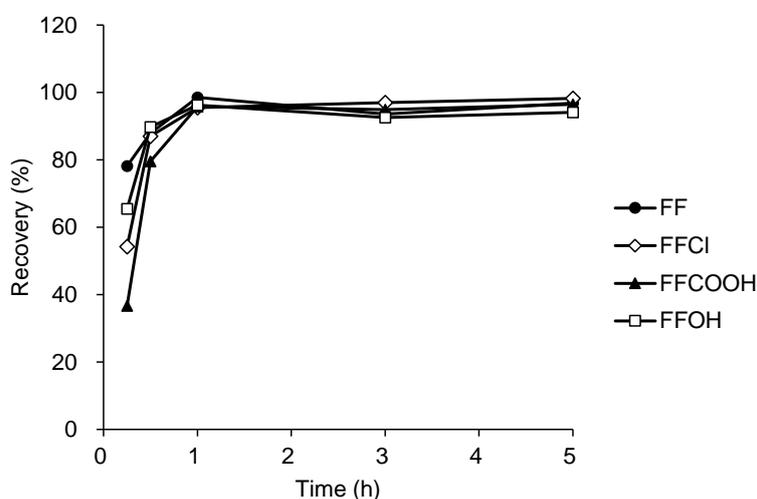


図 18 加水分解反応 (牛の筋肉) における各反応時間での FFNH₂ の回収率

操作方法： 牛の筋肉に FF、FFCl、FFCOOH 及び FFOH を添加 (FFNH₂ として 0.3 ppm) し、実験方法の『7. 試験溶液の調製』に従い、添加回収試験を行った。

(2) 加水分解後の定容操作の検討

試料 10 g に 6 mol/L 塩酸 20 mL を加え、100°C で 3 時間加熱したところ、牛の脂肪を除き、加水分解後の溶液には、黒色の粘性の高い浮遊物が少量観察された (図 19-1 及び 19-2)。この浮遊物

はヘキサン洗浄や遠心分離（毎分 3000 回転、5 分間）では除去することができなかった。定容や定容後の分取を正確に行うためにはろ過等で除去する必要があると考え、ろ過方法について検討した。

まず、残留農薬等の分析で一般的に用いられるろ紙（桐山ロート用ろ紙、No.5B）及びセライトを用いてヘキサン洗浄後の水層を吸引ろ過（残留物を水 10 mL で 2 回洗浄）した。その結果、流速が非常に遅く、うなぎ等の試料では吸引ろ過中に気泡が大量に発生し、ろ過操作が困難であった。

次に、ガラス繊維ろ紙（GA-10、アドバンテック製）及びセライトを用いて吸引ろ過を行った。その結果、ろ紙（桐山ロート用ろ紙、No.5B）を用いた場合と比較して流速は速かったが、容器及びろ紙上の残留物を水（10 mL で 2 回）で洗浄すると気泡が発生し、ろ過操作が困難であった。気泡は、アセトンを加えると消失しやすいため、アセトン/水（1：1）（10 mL で 2 回）を用いて容器及びろ紙上の残留物を洗浄したところ、気泡の発生が抑えられた。

これらの結果から、加水分解及びヘキサン洗浄をした後、水層にセライト（2 g）を加え、ガラス繊維ろ紙を用いて吸引ろ過（容器及びろ紙上の残留物をアセトン/水（1：1）10 mL で 2 回洗浄）し、得られたろ液に水を加えて 100 mL に定容することとした。なお、牛の脂肪等の浮遊物がほとんどない試料においては、ろ過を行う必要はないが、本検討では全ての食品について本操作を行った。

うなぎでは、吸引ろ過操作中に発生した気泡が消失せず、ろ過直後には定容操作を行うことができない場合があった。このような場合はろ液を 30 分程度静置した後、水を加えて定容するか、ろ液を遠心分離（毎分 3000 回転、5 分間）するのが良いと考えられた。また、定容の際、メスフラスコを激しく振とうすると、試料によっては泡立つ場合があるため、穏やかに転倒混和するのがよいと考えられた。

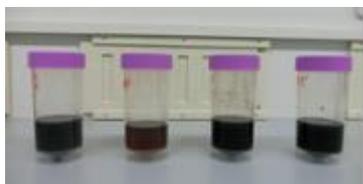


図19-1 試料を加水分解後、ヘキサンで洗浄した溶液
試料：左から、牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、うなぎ

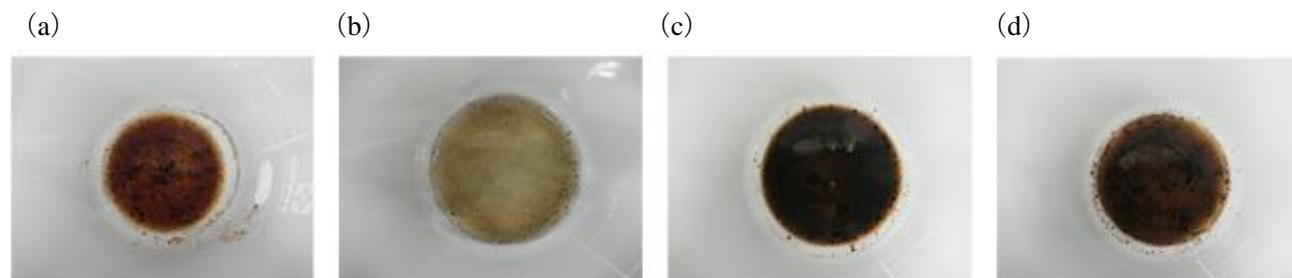


図19-2 試料を加水分解後、ヘキサンで洗浄した溶液*

(a) 牛の筋肉、(b) 牛の脂肪、(c) 牛の肝臓、(d) うなぎ

* 図19-1の溶液をビーカー（500 mL）に約15 mL採り、上から撮影した。

(3) 洗浄

加水分解（酸性条件）後の反応液をヘキサン等で洗浄し、その後、塩基性条件下、転溶等により FFNH_2 を抽出することができれば、中性及び酸性の低極性夾雑成分を除去することが可能であ

るため、洗浄溶媒について検討した。強酸性条件では、酢酸エチルは加水分解し、エタノール及び酢酸が生成するため、ヘキサンでの洗浄を検討した。FF、FFCl、FFCOOH、FFNH₂ 及び FFOH をそれぞれ 6 mol/L 塩酸 20 mL に溶解後、水 10 mL 及びヘキサン 40 mL を加えて振とうしたところ、いずれの化合物もヘキサン層への移行は認められなかった（表 1）。これらの結果から加水分解後、反応液をヘキサンで洗浄することとした。

表 1 酸性条件下でのヘキサン層への移行率 (%)

	移行率 (%)
FF	0
FFCl	0
FFCOOH	0
FFNH ₂	0
FFOH	0

操作方法：各標準溶液（1 µg/mL）を 100 µL 採り、溶媒を除去後、6 mol/L 塩酸 20 mL に溶解した。これに水 10 mL 及びヘキサン 40 mL を加え、5 分間振とう後、遠心分離し、ヘキサン層を採った。溶媒を除去後、0.1 vol% 酢酸/メタノール（9：1）に溶解し、LC-MS/MS で測定した。

(4) 転溶

塩基性条件下での転溶を検討した。FFNH₂を6 mol/L塩酸20 mLに溶解し、水10 mLと7.5 mol/L水酸化ナトリウム溶液20 mLを加えて塩基性（pH 約12.9）にした後、酢酸エチルまたはヘキサンをを用いて2回転溶を行った（表2）。その結果、酢酸エチル及びヘキサンのいずれの溶媒を用いた場合も低回収率となったため、転溶は行わないこととした。

表2 転溶におけるFFNH₂の回収率 (%)

	1 回目	2 回目	合計
酢酸エチル	43	21	64
ヘキサン	0	0	0

操作方法：FFNH₂標準溶液（1 µg/mL）を 100 µL 採り、溶媒を除去後、6 mol/L 塩酸 20 mL に溶解した。これに水 10 mL 及び 7.5 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 20 mL を加えた後、酢酸エチルまたはヘキサン 40 mL を加え、5 分間振とうし、遠心分離後、有機層を採った（1 回目）。水層に酢酸エチルまたはヘキサン 40 mL を加え、5 分間振とう後、遠心分離し、有機層を採った（2 回目）。溶媒を除去後、0.1 vol% 酢酸/メタノール（9：1）に溶解し、LC-MS/MS で測定した。

(5) 多孔性ケイソウ土カラムクロマトグラフィー

① FFNH₂の回収率

FFNH₂は、転溶では十分な回収率が得られなかったため、多孔性ケイソウ土カラムクロマトグラフィー [Chem Elut (5 mL保持用)] を検討した（表3）。塩基性（pH 約13.5）に調整した溶液に FFNH₂を溶解してカラムに負荷し、酢酸エチルで溶出したところ30 mLで良好な回収率が得られた。FFNH₂は、負荷液に塩化ナトリウム（1 g）を加えることにより、若干溶出しやすくなった。このため、ヘキサン洗浄後の溶液を塩基性に調整し、塩化ナトリウムを加えた後、多孔性ケイソウ土カラムに供することとした。なお、牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓及びうなぎでの負荷液のpHはいずれの食品も約13.5であった。

表3 多孔性ケイソウ土カラムからのFFNH₂の回収率 (%)

	塩化ナトリウムの添加量	酢酸エチル				合計
		0-10 mL	10-20 mL	20-30 mL	30-40 mL	
①	0 g	56	33	2	0	91
②	1 g	63	29	1	0	93

操作方法：FFNH₂標準溶液（1 µg/mL）を100 µL採り、溶媒を除去した。これに1.2 mol/L塩酸（6 mol/L塩酸20 mL）を用いて加水分解後、反応液を100 mLに定容した場合の濃度に相当）を2.5 mL加えた後、7.5 mol/L水酸化ナトリウム溶液を1 mL加え、混合した。①はそのまま、②は塩化ナトリウム1 gを加えた後、多孔性ケイソウ土カラムに負荷し、30分間放置後、酢酸エチル40 mLで溶出した。溶媒を除去後、0.1 vol%酢酸/メタノール（9：1）に溶解し、LC-MS/MSで測定した。

② FF、FFCl、FFCOOH及びFFOHの回収率

表3②の条件でのFF、FFCl、FFCOOH及びFFOHの溶出状況を表4に示した。FFは、大部分が操作中にFFNH₂へ変換した。FFClは、多孔性ケイソウ土カラムから溶出せず、一部はFFNH₂へ変換した。FFCOOHは、FFClと同様、多孔性ケイソウ土カラムから溶出せず、FFNH₂への変換も認められなかった。FFOHは多孔性ケイソウ土カラムから溶出し、FFNH₂への変換は認められなかった。

これらの結果から、化合物によってFFNH₂への変換のしやすさは異なるものと考えられた。化合物によっては多孔性ケイソウ土カラムから十分溶出しないこと、一部が操作中にFFNH₂に変換することから、加水分解状況の確認のための、FF、FFCl、FFCOOH及びFFOHの測定は行わないこととした。

表4 多孔性ケイソウ土カラムからのFF、FFCl、FFCOOH及びFFOHの回収率 (%)

負荷	定量	0-10 mL	10-20 mL	20-30 mL	30-40 mL	合計	合計 (FFNH ₂ を含む)
FF	FF	0	0	0	0	0	83
	FFNH ₂	55	28	0	0	83	
FFCl	FFCl	0	0	0	0	0	23
	FFNH ₂	15	8	0	0	23	
FFCOOH	FFCOOH	0	0	0	0	0	1
	FFNH ₂	1	0	0	0	1	
FFOH	FFOH	10	73	22	1	106	107
	FFNH ₂	1	0	0	0	1	

操作方法：各標準溶液（1 µg/mL）を100 µL採り、溶媒を除去した。これに1.2 mol/L塩酸（6 mol/L塩酸20 mL）を用いて加水分解後、反応液を100 mLに定容した場合の濃度に相当）を2.5 mL加えた後、7.5 mol/L水酸化ナトリウム溶液1 mL及び塩化ナトリウム1 gを加え、多孔性ケイソウ土カラムに負荷した。30分間放置後、酢酸エチル40 mLで溶出し、溶媒を除去後、0.1 vol%酢酸/メタノール（9：1）に溶解してLC-MS/MSで測定した。

③ 負荷液にアセトンを含む場合のFFNH₂の回収率

『3 (2) 加水分解後の定容操作の検討』で述べたように、定容操作の際にアセトンを加える必要があったため、負荷液にアセトン（約10 vol%）を含む場合のFFNH₂の回収率を確認した（表5）。その結果、酢酸エチル30 mLで良好な回収率が得られた。このため、負荷液中のアセトンを除去せずに多孔性ケイソウ土カラムに供することとした。この条件で多孔性ケイソウ土カラムクロマトグラフィーを行うことにより、検討した食品では、溶媒除去後に残留物は見られず、無色の試験

溶液が得られた。

表5 負荷液にアセトンを含む場合の多孔性ケイソウ土カラムからのFFNH₂の回収率 (%)

酢酸エチル				合計
0-10 mL	10-20 mL	20-30 mL	30-40 mL	
65	27	5	0	97

操作方法：6 mol/L 塩酸 20 mL にアセトン 10 mL を加えた後、水を加えて 100 mL に定容した (①)。FFNH₂ 標準溶液 (1 µg/mL) を 100 µL 採り、溶媒を除去した。これに①を 2.5 mL 加えて溶解した後、7.5 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を 1 mL 及び塩化ナトリウム 1 g を加え、多孔性ケイソウ土カラムに負荷した。30 分間放置後、酢酸エチル 40 mL で溶出し、溶媒を除去後、0.1 vol% 酢酸/メタノール (9 : 1) に溶解して LC-MS/MS で測定した。

(6) スルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体 (Oasis MCX) ミニカラム精製

多孔性ケイソウ土カラムクロマトグラフィーのみでは、試料中濃度 0.01 ppm の分析において牛の筋肉で FFNH₂ の定量を妨害するピークが認められたため (図 20)、スルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体 [Oasis MCX (150 mg/6 mL)] を用いた精製を検討した (表 6)。FFNH₂ は、0.1 vol% 酢酸/メタノール (1 : 1) 4 mL 及びメタノール 2 mL では溶出せず、アンモニア水/メタノール (1 : 99) 4 mL で溶出した。このため、0.1 vol% 酢酸/メタノール (1 : 1) 4 mL 及びメタノール 2 mL で洗浄後、アンモニア水/メタノール (1 : 99) 5 mL で溶出することとした。この条件で精製することにより、試料中濃度 0.01 ppm における分析においても、FFNH₂ 定量を妨害する夾雑成分のピークは認められなかった。

表6 Oasis MCX ミニカラムからの回収率 (%)

0.1 vol% 酢酸/メタノール (1 : 1)	メタノール	アンモニア水/メタノール (1 : 99)			合計
		0-2 (mL)	2-4 (mL)	4-6 (mL)	
4 (mL)	2 (mL)	0-2 (mL)	2-4 (mL)	4-6 (mL)	
0	0	66	28	0	94

操作方法：FFNH₂ 標準溶液 (1 µg/mL、メタノール) を 100 µL 採り、溶媒を除去後、0.1 vol% 酢酸/メタノール (1 : 1) 1 mL に溶解した。これを、予めメタノール 2 mL 及び 0.1 vol% 酢酸/メタノール (1 : 1) 3 mL でコンディショニングしたカラムに負荷し、0.1 vol% 酢酸/メタノール (1 : 1) 3 mL (負荷液と合わせて 4 mL)、メタノール 2 mL、アンモニア水/メタノール (1 : 99) 6 mL で順次溶出した。各画分の溶媒を除去後、0.1 vol% 酢酸/メタノール (9 : 1) に溶解して LC-MS/MS で測定した。

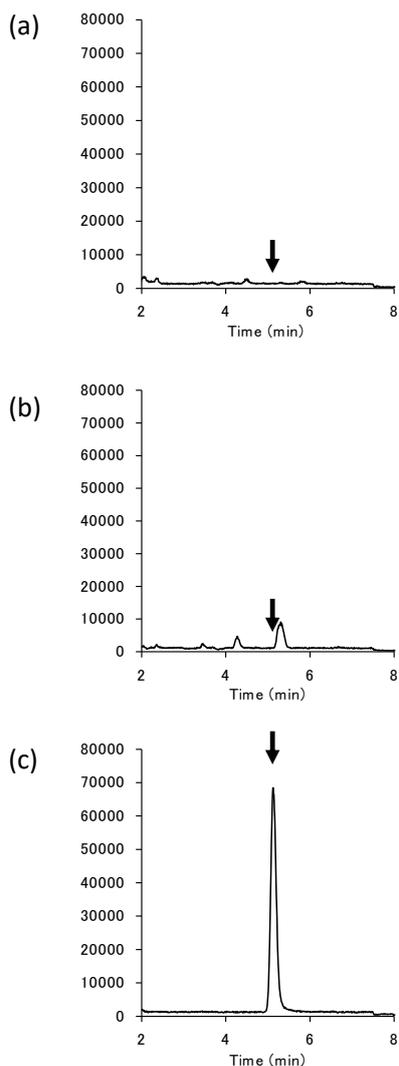


図 20 牛の筋肉のブランク試験溶液（試料 0.25 g/mL）及び FFNH₂ 標準溶液のクロマトグラム
 (a) Oasis MCX による追加精製あり、(b) 追加精製なし、(c) FFNH₂ 標準溶液 (0.0025 µg/mL)

4. 添加回収試験

畜水産物4食品（牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓及びうなぎ）を用いて、試料に定量限界（0.01 ppm）及び基準値濃度のFF、FFCl、FFCOOH、FFNH₂及びFFOHを添加し、実験方法の『7. 試験溶液の調製』に従い、5併行の添加回収試験を実施した。なお、各化合物は別々に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21及び22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23に示した。

(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7)。

表7 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)	添加濃度 (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)			
FF	牛の筋肉	0.01	0.3	0.3	基準値	0.3	< 0.100	面積	0	0	0	536100	563100	549600	0.000	○
		0.01		0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	665528	662041	663784	0.000	○
	牛の脂肪	0.01	0.3	0.3	基準値	0.3	< 0.100	面積	0	0	0	533300	535600	534450	0.000	○
		0.01		0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	658373	688094	673233	0.000	○
	牛の肝臓	0.01	4.	4.	基準値	4.	< 0.100	面積	0	0	0	564500	591500	578000	0.000	○
		0.01		0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	622785	615302	619044	0.000	○
	うなぎ	0.01	8.	8.	基準値	8.	< 0.100	面積	0	0	0	517400	514300	515850	0.000	○
		0.01		0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	589682	588013	588847	0.000	○
FFCI	牛の筋肉	0.01	0.3	0.3	基準値	0.3	< 0.100	面積	0	0	0	552700	506100	529400	0.000	○
		0.01		0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	675825	681762	678794	0.000	○
	牛の脂肪	0.01	0.3	0.3	基準値	0.3	< 0.100	面積	0	0	0	557400	548100	552750	0.000	○
		0.01		0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	628296	646715	637505	0.000	○
	牛の肝臓	0.01	4.	4.	基準値	4.	< 0.100	面積	0	0	0	555900	542200	549050	0.000	○
		0.01		0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	621400	596100	608750	0.000	○
	うなぎ	0.01	8.	8.	基準値	8.	< 0.100	面積	0	0	0	677000	623000	650000	0.000	○
		0.01		0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	643037	638614	640825	0.000	○
FFCOOH	牛の筋肉	0.01	0.3	0.3	基準値	0.3	< 0.100	面積	0	0	0	540500	513900	527200	0.000	○
		0.01		0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	665528	662041	663784	0.000	○
	牛の脂肪	0.01	0.3	0.3	基準値	0.3	< 0.100	面積	0	0	0	582400	593200	587800	0.000	○
		0.01		0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	671788	678343	675066	0.000	○
	牛の肝臓	0.01	4.	4.	基準値	4.	< 0.100	面積	0	0	0	562400	542000	552200	0.000	○
		0.01		0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	575600	604700	590150	0.000	○
	うなぎ	0.01	8.	8.	基準値	8.	< 0.100	面積	0	0	0	636500	648500	642500	0.000	○
		0.01		0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	621862	603206	612534	0.000	○
FFNH ₂	牛の筋肉	0.01	0.3	0.3	基準値	0.3	< 0.100	面積	0	0	0	532300	524600	528450	0.000	○
		0.01		0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	675849	671492	673671	0.000	○
	牛の脂肪	0.01	0.3	0.3	基準値	0.3	< 0.100	面積	0	0	0	543900	504800	524350	0.000	○
		0.01		0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	716708	715836	716272	0.000	○
	牛の肝臓	0.01	4.	4.	基準値	4.	< 0.100	面積	0	0	0	592700	609000	596800	0.000	○
		0.01		0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	608352	626857	617605	0.000	○
	うなぎ	0.01	8.	8.	基準値	8.	< 0.100	面積	0	0	0	558300	514600	536450	0.000	○
		0.01		0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	639862	640641	640251	0.000	○
FFOH	牛の筋肉	0.01	0.3	0.3	基準値	0.3	< 0.100	面積	0	0	0	538700	527000	532850	0.000	○
		0.01		0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	675825	681762	678794	0.000	○
	牛の脂肪	0.01	0.3	0.3	基準値	0.3	< 0.100	面積	0	0	0	552000	531500	541750	0.000	○
		0.01		0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	660219	653663	656941	0.000	○
	牛の肝臓	0.01	4.	4.	基準値	4.	< 0.100	面積	0	0	0	676800	648100	662450	0.000	○
		0.01		0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	607113	571243	589178	0.000	○
	うなぎ	0.01	8.	8.	基準値	8.	< 0.100	面積	0	0	0	677100	638600	657850	0.000	○
		0.01		0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	562500	587571	575035	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

定量限界及び基準値濃度での真度及び併行精度を表8に示した。定量限界濃度では真度93~104%、併行精度1.4~5.2%、基準値濃度では真度93~101%、併行精度1.9~5.6%と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。また、定量限界濃度の添加試料から得られたピークのS/Nは118~309であり、S/N≥10が得られた(表9)。

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		
FF	牛の筋肉	0.01	0.3	0.3	211428	-1716	0.9999	95	96	100	97	99	98	2.3
		0.01	0.3	0.01	241480	251	0.9979	103	102	99	113	104	104	5.2
	牛の脂肪	0.01	0.3	0.3	212662	-2020	0.9994	96	96	101	96	101	98	3.0
		0.01	0.3	0.01	261162	7791	0.9970	104	103	103	100	104	103	1.7
	牛の肝臓	0.01	4.	4.	253045	-32424	0.9940	90	91	99	94	91	93	3.8
		0.01	4.	0.01	227452	14147	0.9933	105	106	103	102	99	103	2.9
うなぎ	0.01	8.	8.	215607	-4702	0.9978	94	99	97	86	93	94	5.3	
	0.01	8.	0.01	237101	14341	0.9957	92	101	101	103	100	99	4.2	
FFCI	牛の筋肉	0.01	0.3	0.3	211980	7005	0.9941	95	96	97	94	100	96	2.2
		0.01	0.3	0.01	245457	17629	0.9943	100	106	100	103	103	102	2.4
	牛の脂肪	0.01	0.3	0.3	240453	-13591	0.9989	101	97	96	96	95	97	2.3
		0.01	0.3	0.01	241221	13189	0.9987	97	97	99	94	99	97	2.0
	牛の肝臓	0.01	4.	4.	216842	2657	0.9985	96	101	101	97	95	98	2.9
		0.01	4.	0.01	233430	-471	0.9993	106	98	104	101	105	103	3.1
うなぎ	0.01	8.	8.	271175	-20678	0.9942	96	98	92	97	92	95	3.2	
	0.01	8.	0.01	258667	-22265	0.9962	94	92	99	100	95	96	3.7	
FFCOOH	牛の筋肉	0.01	0.3	0.3	212733	-5179	0.9978	93	100	95	97	97	96	2.5
		0.01	0.3	0.01	230481	16206	0.9980	97	94	96	97	96	96	1.4
	牛の脂肪	0.01	0.3	0.3	241081	-10621	0.9950	94	93	100	97	90	95	4.2
		0.01	0.3	0.01	279564	-30842	0.9930	90	93	93	95	91	93	2.0
	牛の肝臓	0.01	4.	4.	216279	17612	0.9982	93	97	99	98	91	95	3.5
		0.01	4.	0.01	236450	-2352	0.9984	94	93	94	87	95	93	3.8
うなぎ	0.01	8.	8.	251062	10034	0.9991	100	96	94	100	97	97	2.8	
	0.01	8.	0.01	236258	2793	0.9983	96	95	99	96	100	97	2.6	
FFNH ₂	牛の筋肉	0.01	0.3	0.3	213158	13248	0.9979	97	99	99	102	98	99	1.9
		0.01	0.3	0.01	271107	-24372	0.9983	92	98	99	98	99	97	2.8
	牛の脂肪	0.01	0.3	0.3	212123	7002	0.9958	103	95	103	94	105	100	4.9
		0.01	0.3	0.01	275467	-22103	0.9960	96	92	93	91	95	93	2.0
	牛の肝臓	0.01	4.	4.	253045	-32424	0.9940	99	96	100	97	94	97	2.3
		0.01	4.	0.01	227452	14147	0.9933	97	96	91	98	96	96	2.8
うなぎ	0.01	8.	8.	215607	-4702	0.9978	104	98	106	101	97	101	3.7	
	0.01	8.	0.01	238549	-5959	0.9979	101	101	99	99	102	101	1.5	
FFOH	牛の筋肉	0.01	0.3	0.3	222426	-5533	0.9967	93	96	102	104	92	98	5.6
		0.01	0.3	0.01	243960	18650	0.9983	103	100	100	99	98	100	1.7
	牛の脂肪	0.01	0.3	0.3	213819	-6945	0.9971	97	98	102	103	104	101	2.9
		0.01	0.3	0.01	270342	-33495	0.9916	100	96	97	97	102	98	2.6
	牛の肝臓	0.01	4.	4.	268411	-15401	0.9960	97	99	97	92	90	95	3.9
		0.01	4.	0.01	221339	2041	0.9971	105	104	105	102	101	103	2.0
うなぎ	0.01	8.	8.	268411	-15401	0.9960	97	99	97	92	90	95	3.9	
	0.01	8.	0.01	219653	16377	0.9931	100	106	103	105	107	104	2.8	

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)	定量限界の評価 ¹⁾	S/N ²⁾		
						Max.	Min.	平均値
FF	牛の筋肉	0.01	0.3	0.01	S/N	140	135	138
	牛の脂肪	0.01	0.3	0.01	S/N	156	130	143
	牛の肝臓	0.01	4.	0.01	S/N	437	181	309
	うなぎ	0.01	8.	0.01	S/N	219	164	191
FFCI	牛の筋肉	0.01	0.3	0.01	S/N	161	176	168
	牛の脂肪	0.01	0.3	0.01	S/N	227	222	225
	牛の肝臓	0.01	4.	0.01	S/N	147	341	244
	うなぎ	0.01	8.	0.01	S/N	157	153	155
FFCOOH	牛の筋肉	0.01	0.3	0.01	S/N	134	140	137
	牛の脂肪	0.01	0.3	0.01	S/N	136	151	143
	牛の肝臓	0.01	4.	0.01	S/N	266	242	254
	うなぎ	0.01	8.	0.01	S/N	139	155	147
FFNH ₂	牛の筋肉	0.01	0.3	0.01	S/N	178	188	183
	牛の脂肪	0.01	0.3	0.01	S/N	179	162	171
	牛の肝臓	0.01	4.	0.01	S/N	172	64	118
	うなぎ	0.01	8.	0.01	S/N	218	169	194
FFOH	牛の筋肉	0.01	0.3	0.01	S/N	225	228	226
	牛の脂肪	0.01	0.3	0.01	S/N	212	173	192
	牛の肝臓	0.01	4.	0.01	S/N	171	181	176
	うなぎ	0.01	8.	0.01	S/N	163	145	154

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

定量限界及び基準値濃度での添加回収試験における試料マトリックスの測定への影響を表 10 に示した。分析対象化合物には添加回収試験において添加した化合物を示した。添加回収試験における回収率 100%相当濃度の FFNH₂ 溶媒標準溶液に対する FFNH₂ 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、0.96~1.11 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が可能と考えられた。

表10 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)	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	
FF	牛の筋肉	0.01	0.3	0.3	0.0025	面積	0	536100	563100	549600	508000	498400	503200	1.09
		0.01	0.3	0.01	0.0025	面積	0	665528	662041	663784	634507	618183	626345	1.06
	牛の脂肪	0.01	0.3	0.3	0.0025	面積	0	533300	535600	534450	523000	538400	530700	1.01
		0.01	0.3	0.01	0.0025	面積	0	658373	688094	673233	661038	654033	657535	1.02
	牛の肝臓	0.01	4.	4.	0.0025	面積	0	564500	591500	578000	565600	585600	575600	1.00
		0.01	4.	0.01	0.0025	面積	0	622785	615302	619044	565872	550168	558020	1.11
うなぎ	0.01	8.	8.	0.0025	面積	0	517400	514300	515850	509700	514500	512100	1.01	
	0.01	8.	0.01	0.0025	面積	0	589682	588013	588847	610234	604961	607597	0.97	
FFCI	牛の筋肉	0.01	0.3	0.3	0.0025	面積	0	552700	506100	529400	518500	537000	527750	1.00
		0.01	0.3	0.01	0.0025	面積	0	675825	681762	678794	689655	686956	688305	0.99
	牛の脂肪	0.01	0.3	0.3	0.0025	面積	0	557400	548100	552750	553000	581800	567400	0.97
		0.01	0.3	0.01	0.0025	面積	0	628296	646715	637505	606488	654305	630396	1.01
	牛の肝臓	0.01	4.	4.	0.0025	面積	0	555900	542200	549050	555100	549600	552350	0.99
		0.01	4.	0.01	0.0025	面積	0	621400	596100	608750	587900	640300	614100	0.99
うなぎ	0.01	8.	8.	0.0025	面積	0	677000	623000	650000	665000	618900	641950	1.01	
	0.01	8.	0.01	0.0025	面積	0	643037	638614	640825	622424	575201	598813	1.07	
FFCOOH	牛の筋肉	0.01	0.3	0.3	0.0025	面積	0	540500	513900	527200	531100	539000	535050	0.99
		0.01	0.3	0.01	0.0025	面積	0	665528	662041	663784	634507	618183	626345	1.06
	牛の脂肪	0.01	0.3	0.3	0.0025	面積	0	582400	593200	587800	574800	609000	591900	0.99
		0.01	0.3	0.01	0.0025	面積	0	671788	678343	675066	661821	625302	643562	1.05
	牛の肝臓	0.01	4.	4.	0.0025	面積	0	562400	542000	552200	578100	567900	573000	0.96
		0.01	4.	0.01	0.0025	面積	0	575600	604700	590150	546900	561600	554250	1.06
うなぎ	0.01	8.	8.	0.0025	面積	0	636500	648500	642500	649700	620100	634900	1.01	
	0.01	8.	0.01	0.0025	面積	0	621862	603206	612534	620421	613058	616739	0.99	
FFNH ₂	牛の筋肉	0.01	0.3	0.3	0.0025	面積	0	532300	524600	528450	548200	515500	531850	0.99
		0.01	0.3	0.01	0.0025	面積	0	675849	671492	673671	653078	692684	672881	1.00
	牛の脂肪	0.01	0.3	0.3	0.0025	面積	0	543900	504800	524350	537100	522000	529550	0.99
		0.01	0.3	0.01	0.0025	面積	0	716708	715836	716272	679192	692686	685939	1.04
	牛の肝臓	0.01	4.	4.	0.0025	面積	0	592700	600900	596800	568800	572400	570600	1.05
		0.01	4.	0.01	0.0025	面積	0	608352	626857	617605	614452	651265	632858	0.98
うなぎ	0.01	8.	8.	0.0025	面積	0	558300	514600	536450	506500	524500	515500	1.04	
	0.01	8.	0.01	0.0025	面積	0	639862	640641	640251	610234	604961	607597	1.05	
FFOH	牛の筋肉	0.01	0.3	0.3	0.0025	面積	0	538700	527000	532850	546000	541500	543750	0.98
		0.01	0.3	0.01	0.0025	面積	0	675825	681762	678794	689655	686956	688305	0.99
	牛の脂肪	0.01	0.3	0.3	0.0025	面積	0	552000	531500	541750	514200	533000	523600	1.03
		0.01	0.3	0.01	0.0025	面積	0	660219	653663	656941	601050	632220	616635	1.07
	牛の肝臓	0.01	4.	4.	0.0025	面積	0	676800	648100	662450	637600	666200	651900	1.02
		0.01	4.	0.01	0.0025	面積	0	607113	571243	589178	591369	553365	572367	1.03
うなぎ	0.01	8.	8.	0.0025	面積	0	677100	638600	657850	669400	647000	658200	1.00	
	0.01	8.	0.01	0.0025	面積	0	562500	587571	575035	547269	575102	561186	1.02	

*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。)

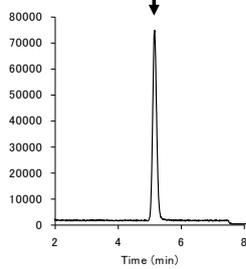
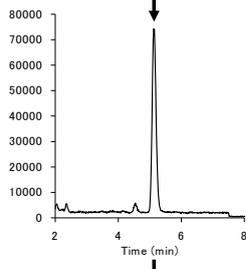
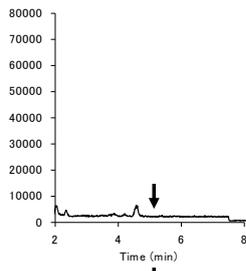
*3 ブランクにピークが認められた場合には、マトリックス添加標準溶液の値はブランク値を差し引いた値を用いる。

*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。

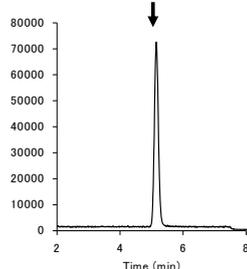
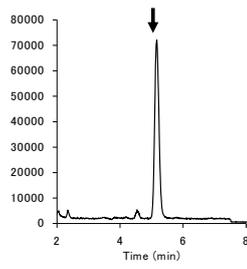
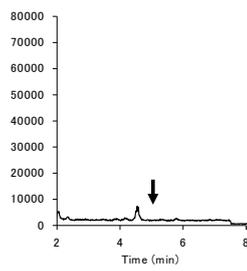
*5 マトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積(又は高さ)の比を求める。

① 牛の筋肉

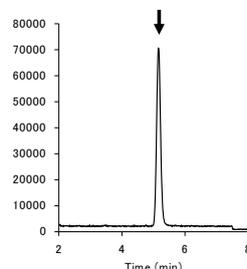
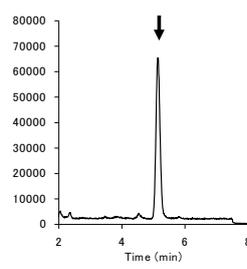
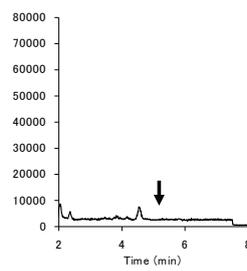
FF



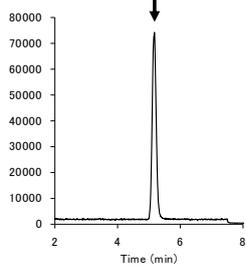
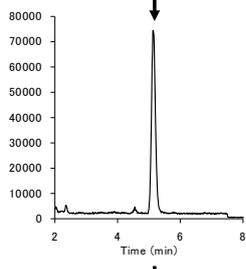
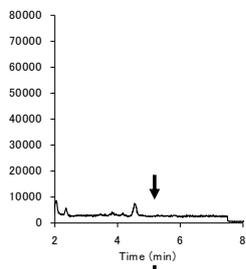
FFCl



FFCOOH



FFNH₂



FFOH

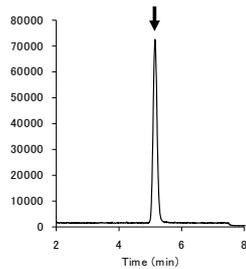
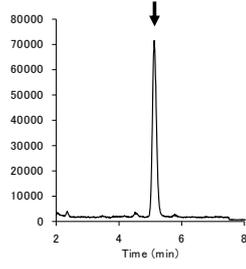
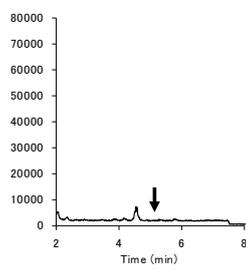
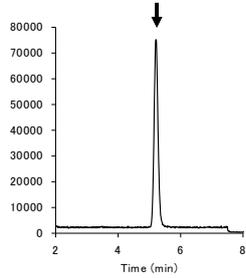
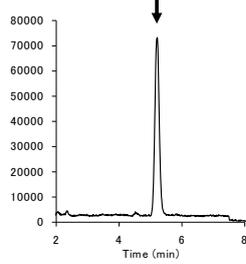
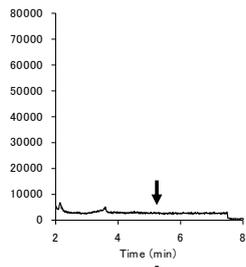


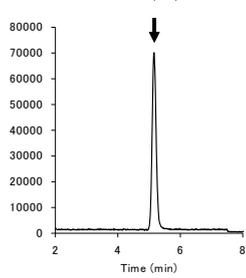
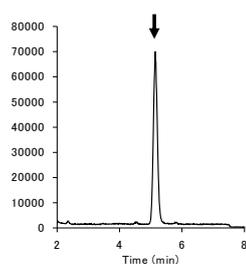
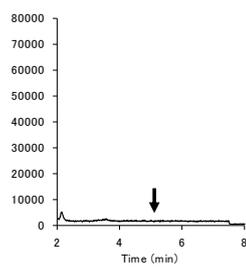
図 21-1 定量限界濃度 (0.01 ppm) での添加回収試験における代表的なクロマトグラム
上：ブランク試料、中：添加試料、下：回収率 100%相当の標準溶液 (0.0025 µg/mL)

②牛の脂肪

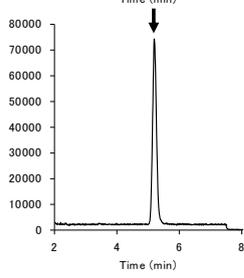
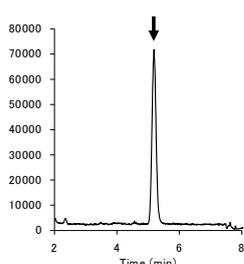
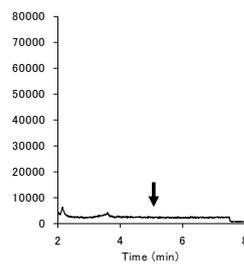
FF



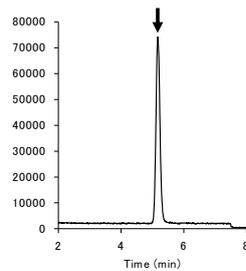
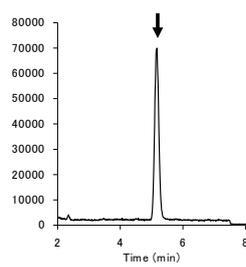
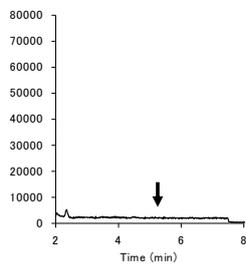
FFCI



FFCOOH



FFNH₂



FFOH

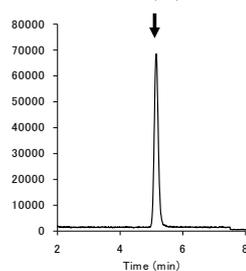
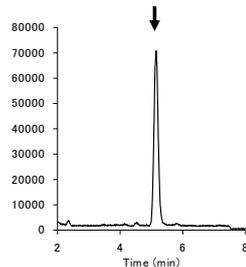
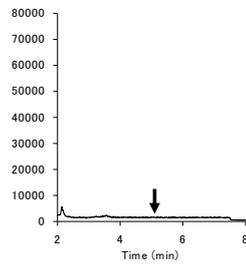
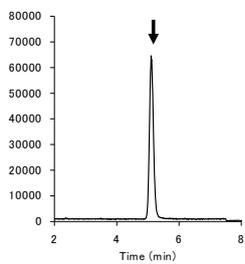
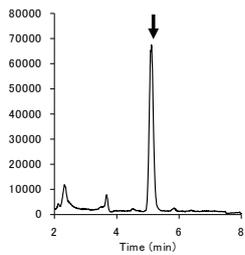
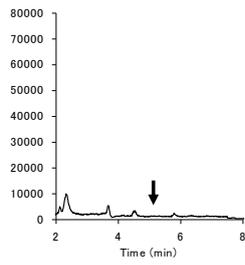


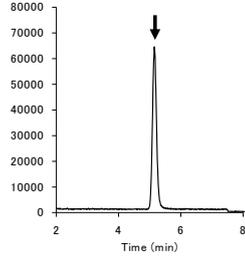
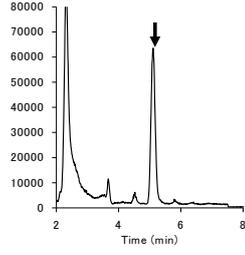
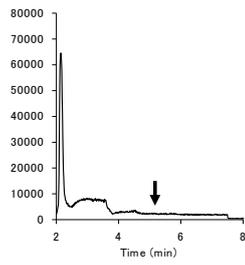
図 21-2 定量限界濃度 (0.01 ppm) での添加回収試験における代表的なクロマトグラム
上：ブランク試料、中：添加試料、下：回収率 100%相当の標準溶液 (0.0025 μg/mL)

③牛の肝臓

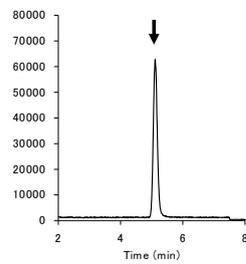
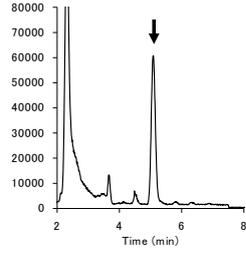
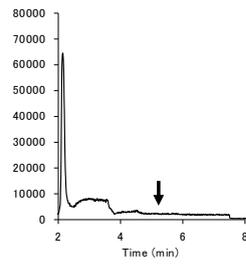
FF



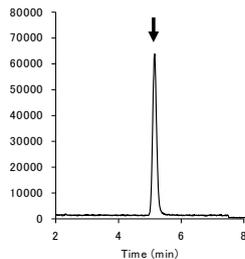
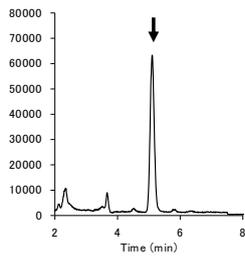
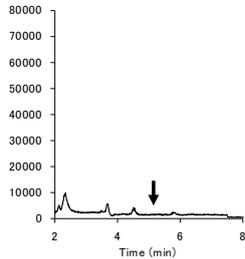
FFCI



FFCOOH



FFNH₂



FFOH

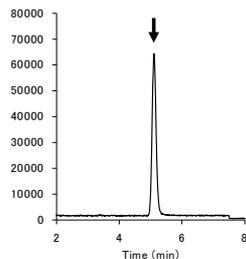
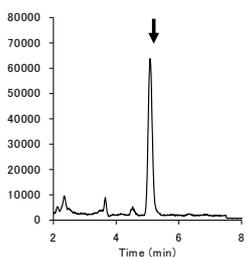
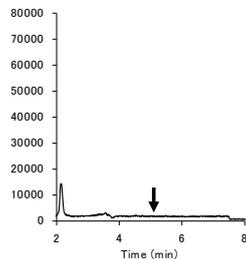
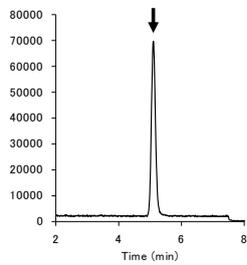
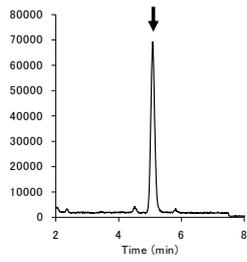
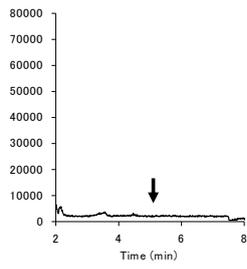


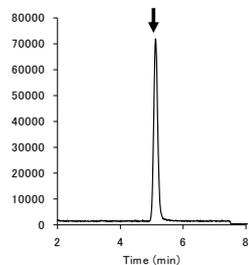
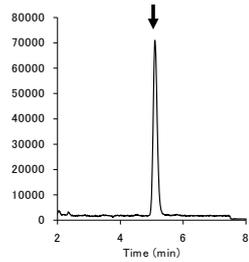
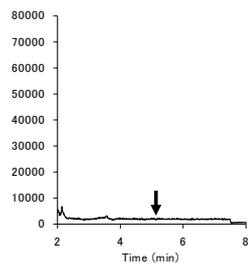
図 21-3 定量限界濃度 (0.01 ppm) での添加回収試験における代表的なクロマトグラム
上：ブランク試料、中：添加試料、下：回収率 100%相当の標準溶液 (0.0025 μg/mL)

④うなぎ

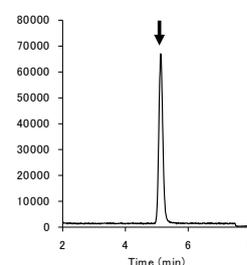
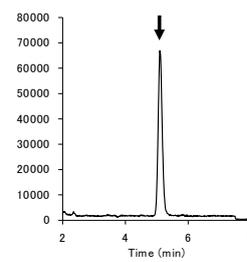
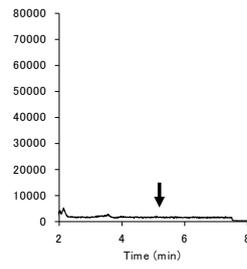
FF



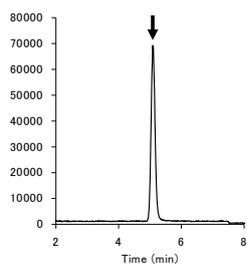
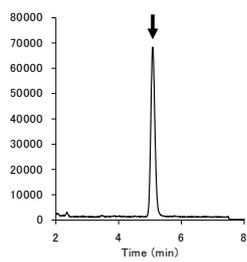
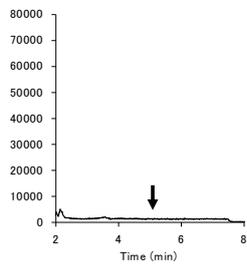
FFCl



FFCOOH



FFNH₂



FFOH

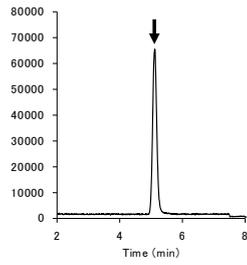
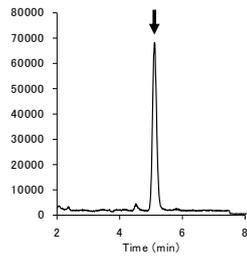
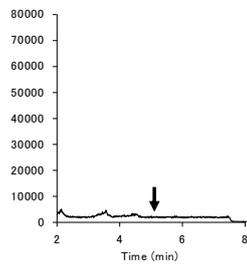
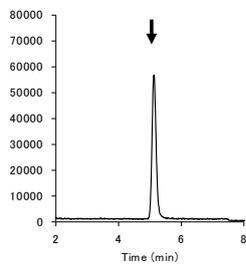
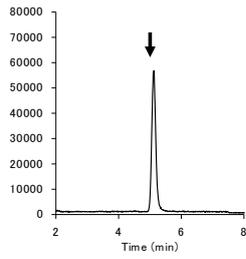
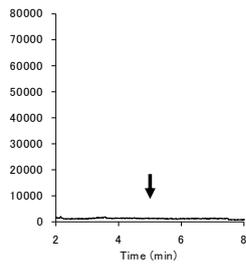


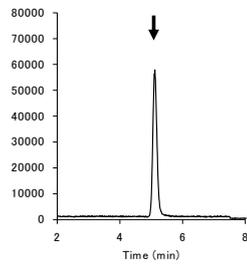
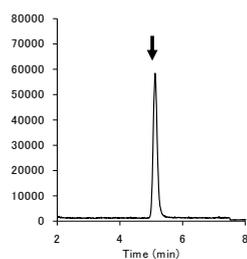
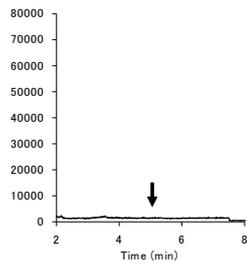
図 21-4 定量限界濃度 (0.01 ppm) での添加回収試験における代表的なクロマトグラム
上：ブランク試料、中：添加試料、下：回収率 100%相当の標準溶液 (0.0025 µg/mL)

①牛の筋肉 (基準値 0.3 ppm)

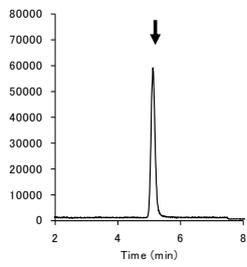
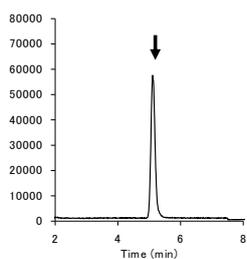
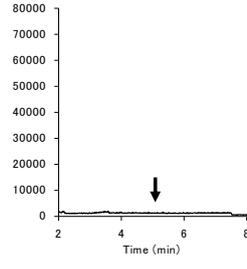
FF



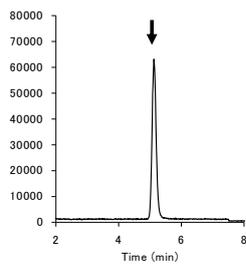
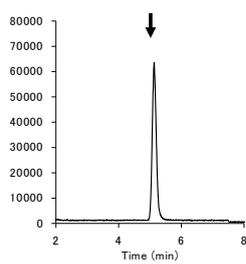
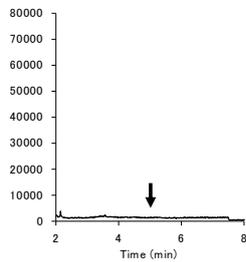
FFCl



FFCOOH



FFNH₂



FFOH

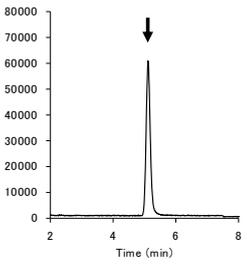
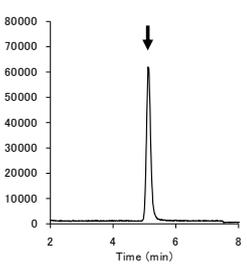
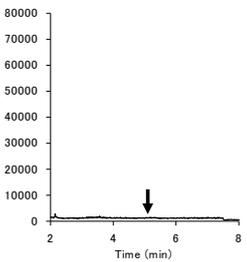
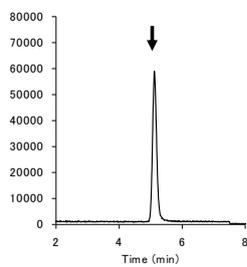
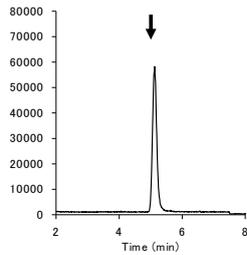
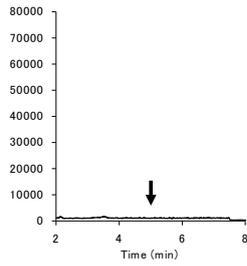


図 22-1 基準値濃度での添加回収試験における代表的なクロマトグラム

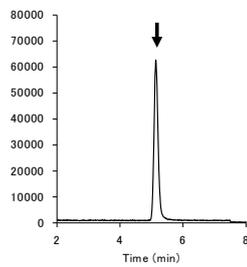
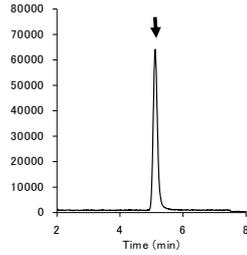
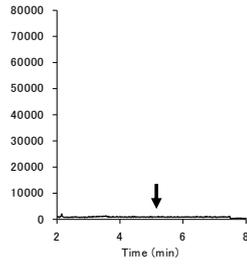
上：ブランク試料、中：添加試料、下：回収率 100%相当の標準溶液 (0.0025 μg/mL)

②牛の脂肪 (基準値 0.3 ppm)

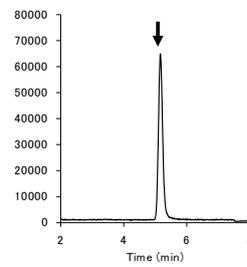
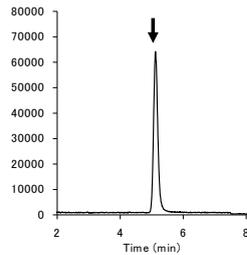
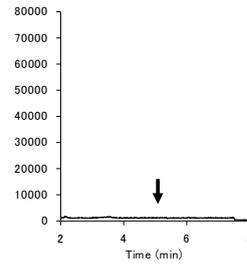
FF



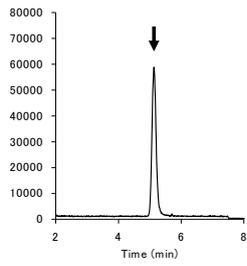
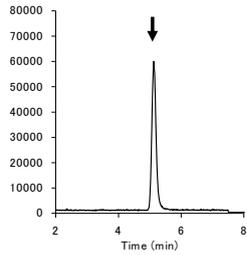
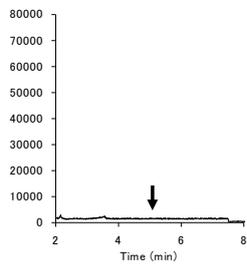
FFCI



FFCOOH



FFNH₂



FFOH

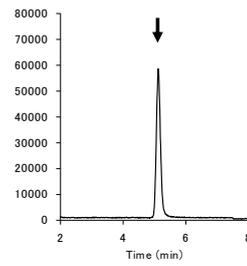
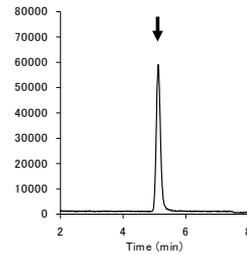
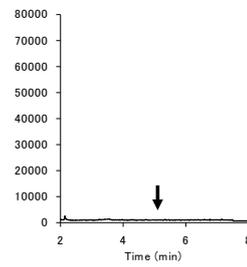
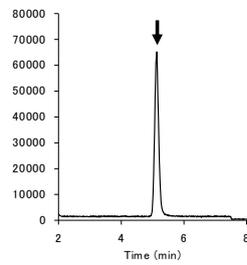
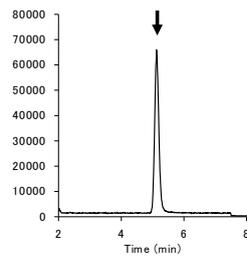
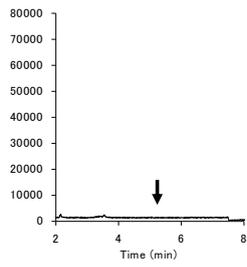


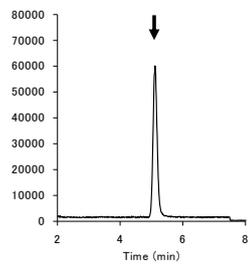
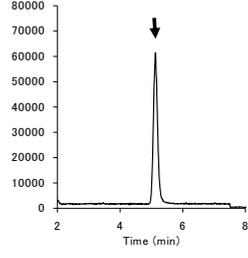
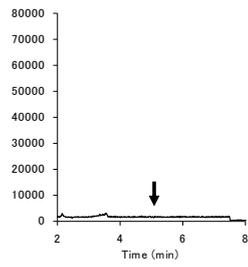
図 22-2 基準値濃度での添加回収試験における代表的なクロマトグラム
 上：ブランク試料、中：添加試料、下：回収率 100%相当の標準溶液 (0.0025 μg/mL)

③牛の肝臓 (基準値 4 ppm)

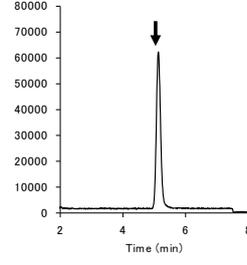
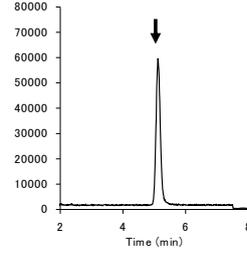
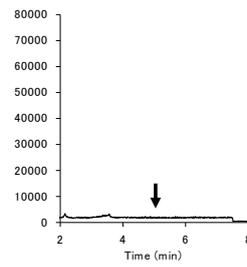
FF



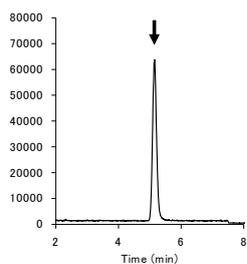
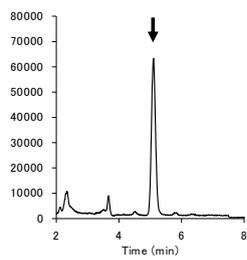
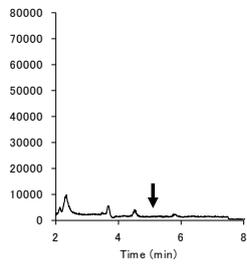
FFCl



FFCOOH



FFNH₂



FFOH

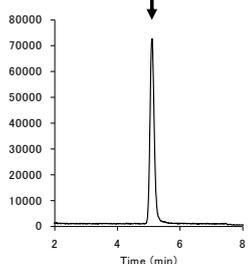
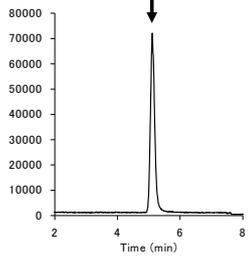
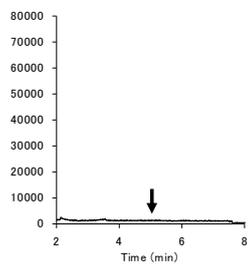
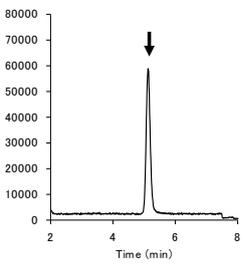
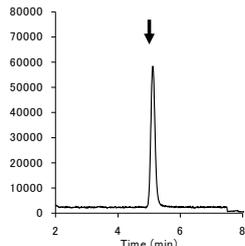
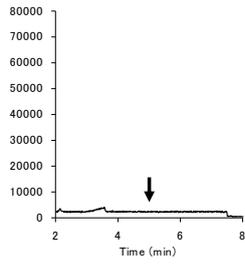


図 22-3 基準値濃度での添加回収試験における代表的なクロマトグラム

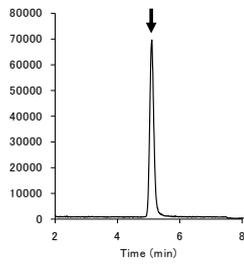
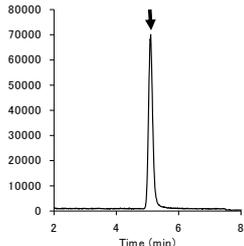
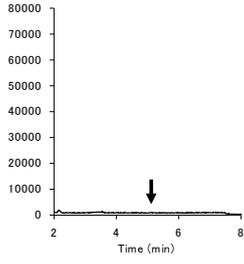
上：ブランク試料、中：添加試料、下：回収率 100%相当の標準溶液 (0.0025 μg/mL)

④うなぎ（基準値 8 ppm）

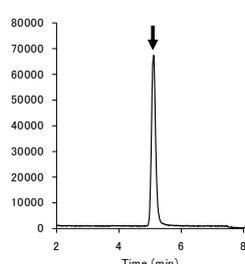
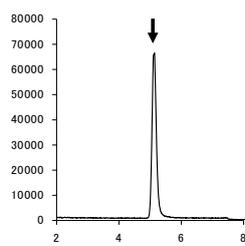
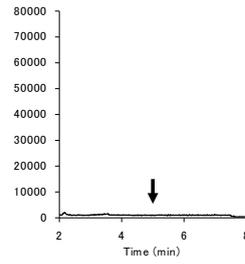
FF



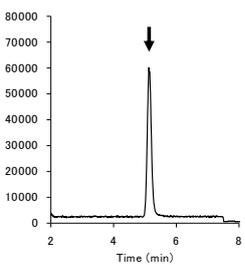
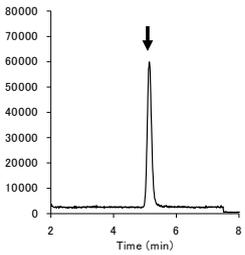
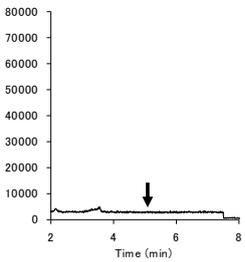
FFCl



FFCOOH



FFNH₂



FFOH

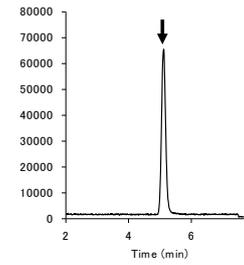
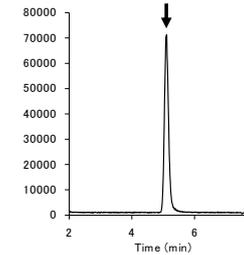
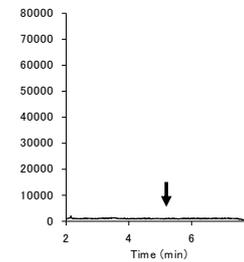
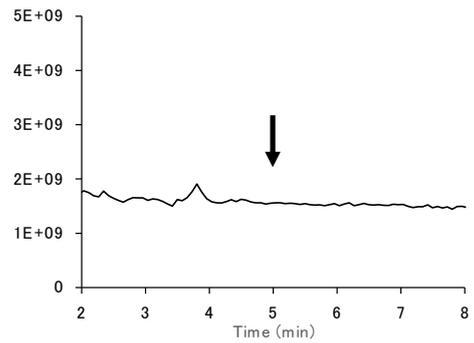
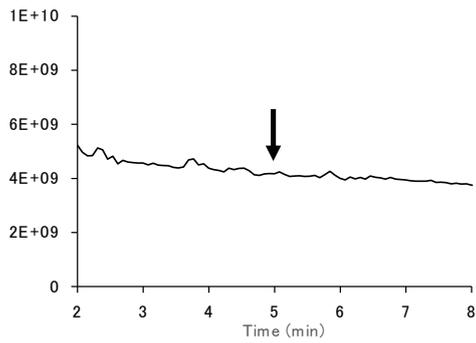


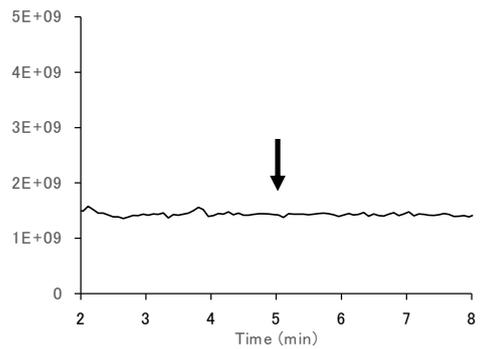
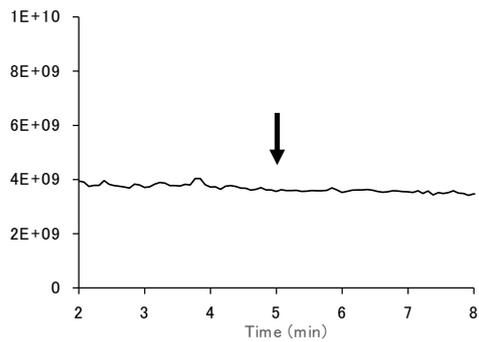
図 22-4 基準値濃度での添加回収試験における代表的なクロマトグラム

上：ブランク試料、中：添加試料、下：回収率 100%相当の標準溶液 (0.0025 μg/mL)

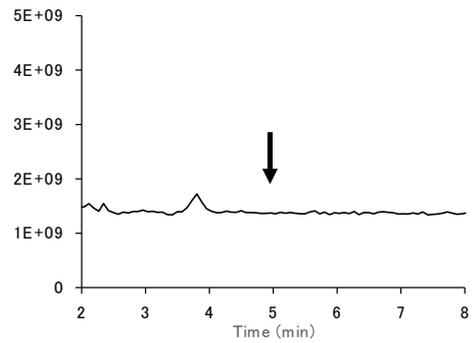
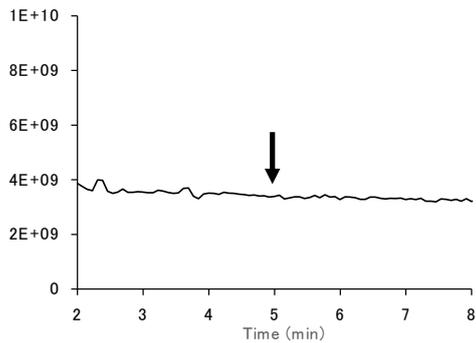
①牛の筋肉



②牛の脂肪



③牛の肝臓



④うなぎ

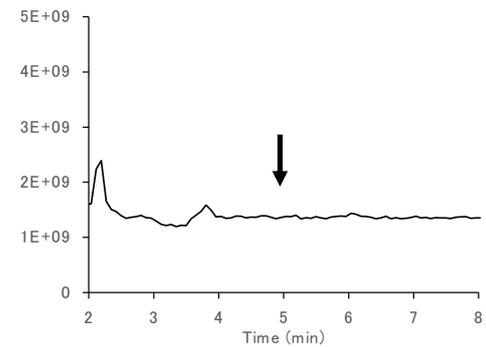
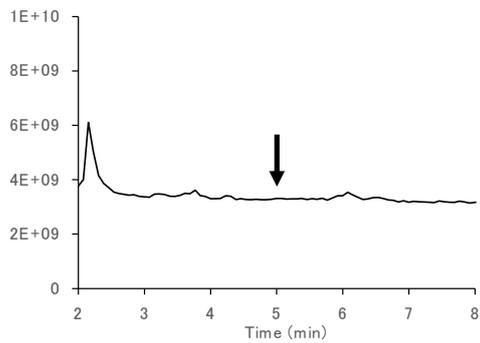
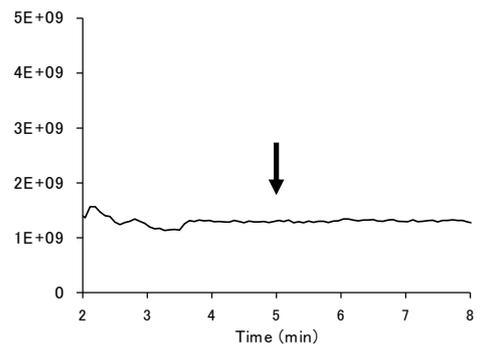
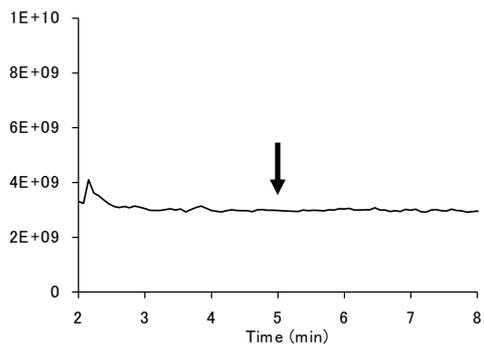


図 23-1 定量限界濃度での添加回収試験におけるブランク試料の代表的なトータルイオンカレントクロマトグラム

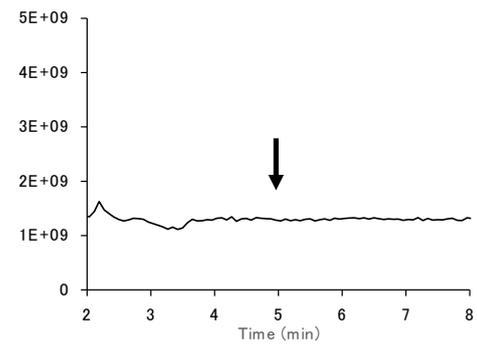
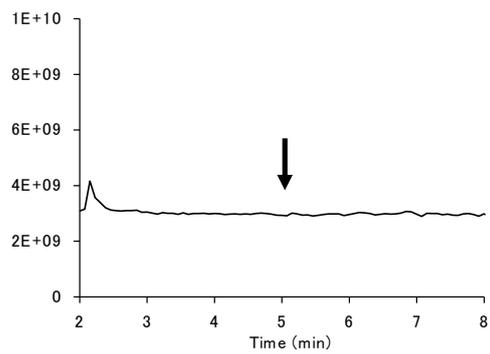
スキャン範囲 : m/z 50~500

左: ESI (+) 、デクラスタリング電位 30 V ; 右: ESI (-) デクラスタリング電位 -30 V

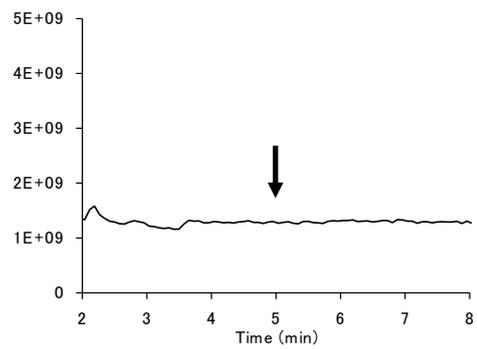
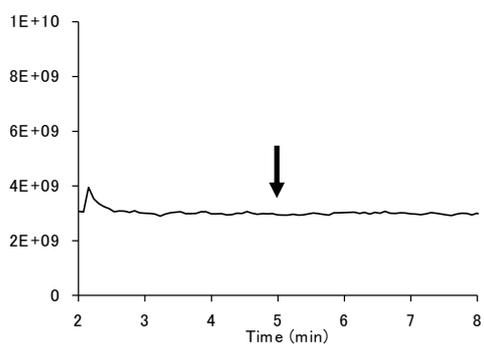
①牛の筋肉



②牛の脂肪



③牛の肝臓



④うなぎ

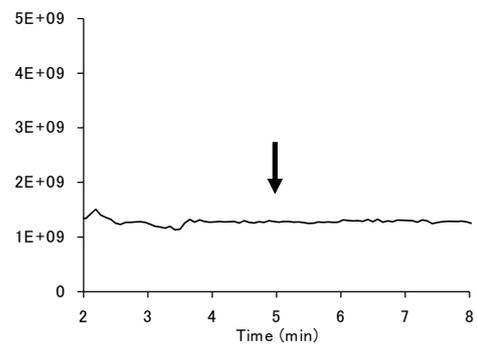
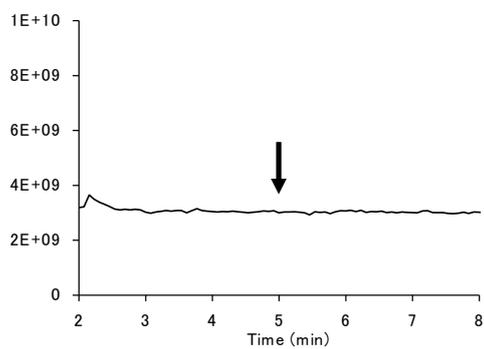


図 23-2 基準値濃度での添加回収試験におけるブランク試料の代表的なトータルイオンカレントクロマトグラム

スキャン範囲 : m/z 50~500

左: ESI (+)、デクラスタリング電位 30 V ; 右: ESI (-) デクラスタリング電位 -30 V

【結論】

畜水産物中の FF 試験法として、試料に塩酸を加えて FF 及びその代謝物を FFNH₂ に加水分解後、ヘキサンで洗浄し、多孔性ケイソウ土カラムで精製した後（精製が不足する場合はスルホン酸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追加精製をする）、LC-MS/MS で定量及び確認する方法を開発した。本法を用いて牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓及びうなぎを対象に、FF 及びその代謝物（FFCl、FFCOOH、FFNH₂ 及び FFOH）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、真度 93～104%、併行精度 1.4～5.6% 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。また、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 0.96～1.11 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。これらの結果から、本法は FF 及びその代謝物を精確に分析可能な方法と考えられた。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) Determination and Confirmation of Florfenicol. CLG-FLOR 1.04. Revision 04. United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service, Office of Public Health Science, 2010.