

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

## 食品に残留する農薬等の成分である物質の 試験法開発業務報告書

### フルフェナセット試験法（農産物）

## フルフェナセット試験法（農産物）の検討結果

### 〔緒言〕

#### 1. 目的及び試験法の検討方針等

フルフェナセット並びにその代謝物である[(4-フルオロフェニル)(1-メチルエチル)アミノ]オキソ酢酸（以下、代謝物 W）及び[N-(4-フルオロフェニル)-N-(1-メチルエチル)アセトアミド]-2-スルフィニル酢酸（以下、代謝物 P1）の農産物中の分析法の開発を行った。

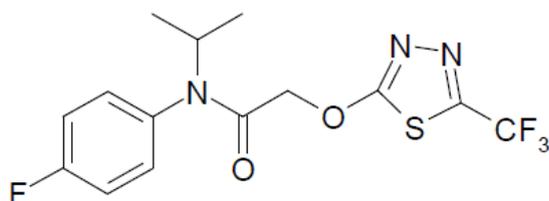
フルフェナセットは、バイエル社（現バイエルクロップサイエンス社）で見出された酸アミド系の除草剤である。長鎖脂肪酸合成阻害により、発芽抑制または幼芽部の伸長抑制が起こり除草効果を発現すると考えられている\*1。

本検討においては、通知一斉試験法「LC/MS による農薬等の一斉試験法 I（農産物）」の適用も試みたが、代謝物 W 及び代謝物 P1 については適用できなかったため、新たに個別試験法を開発した。

#### 2. 分析対象化合物の構造式及び物理化学的性質\*1、2

分析対象化合物：フルフェナセット（Flufenacet）

構造式：



分子式： C<sub>14</sub>H<sub>13</sub>F<sub>4</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>S

分子量： 363.33

化学名：

IUPAC 名

4'-fluoro-N-isopropyl-2-[5-(trifluoromethyl)-1,3,4-thiadiazol-2-yloxy]acetanilide

CAS 名(142459-58-3)

N-(4-fluorophenyl)-N-(1-methylethyl)-2-[[5-(trifluoromethyl)-1,3,4-thiadiazol-2-yl]oxy]acetamide

外観： 無色微細結晶性粉末

融点： 76～79℃

沸点： 150～160℃で分解するため測定不可能

蒸気圧： 9×10<sup>-7</sup> h Pa（20℃） 2×10<sup>-6</sup> h Pa（25℃）

溶解度（20℃）：

水	56 mg/L(pH4 及び 7)、53 mg/L(pH9)
n-ヘキサン	8.7 g/L
トルエン	>200 g/L
アセトン	>200 g/L
アセトニトリル	>200 g/L
メタノール	>280 g/L
酢酸エチル	>280 g/L

解離定数： 解離せず

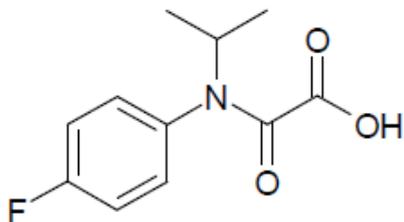
オクタノール/水分配係数： log Pow=3.20（24℃）

熱安定性： 150～160℃で分解

加水分解性： 半減期（25±1℃） 14835 日（pH5）、1547 日（pH7）、654 日（pH9）

分析対象化合物：代謝物 W

構造式：



分子式：C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>FNO<sub>3</sub>

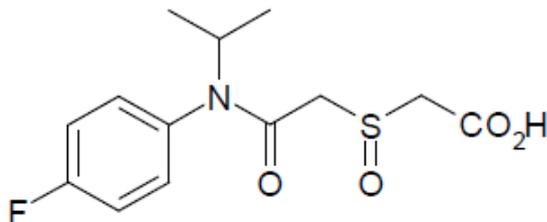
分子量：225.22

化学名：[(4-Fluorophenyl)(1-methylethyl)amino]oxo-acetic acid  
(CAS 201668-31-7)

外観：固体

分析対象化合物：代謝物 P1

構造式：



分子式：C<sub>13</sub>H<sub>16</sub>FNO<sub>4</sub>S

分子量：301.33

化学名：({2-[(4-Fluorophenyl)(isopropyl)amino]-2-oxoethyl}sulfinyl)acetic acid  
(CAS 201668-33-9)

外観：ベージュ色粉末

### 3. 基準値\*<sup>3</sup>

小麦	0.5 (ppm)
大麦	0.2
とうもろこし	0.05
大豆	0.1
ばれいしよ	0.1
トマト	0.05
ひまわりの種子	0.05

[出典]

- \* 1 独立行政法人農林水産消費安全技術センター(FAMIC) フルフェナセット農薬抄録  
<http://www.acis.famic.go.jp/syouroku/flufenacet/index.htm>
- \* 2 SIGMA-ALDRICH 製品データシート
- \* 3 平成 26 年 11 月 17 日食安発 1117 第 1 号 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知

## [実験方法]

### 1. 試料

検討に用いた試料のうち、大豆は新潟県産、ばれいしょは北海道産、トマトは長崎県産のものを新潟県内の小売店で購入した。小麦は兵庫県産のものを新潟県内の小売店を通して産地から取り寄せた。

試料の採取方法を以下に記載した。

- (1) 小麦（玄麦）：ミルを用いて 425  $\mu\text{m}$  の標準網ふるいを通して均一化した。
- (2) 大豆：ミルを用いて 425  $\mu\text{m}$  の標準網ふるいを通して均一化した。
- (3) ばれいしょ（泥を水で軽く洗い落としたもの）：クッキングカッターを用いて細切均一化した。
- (4) トマト（ヘタを除いたもの）：クッキングカッターを用いて細切均一化した。

### 2. 試薬・試液

フルフェナセット標準品：純度 99.0%（Dr.Ehrenstorfer GmbH 製）

代謝物 W 標準品：純度 99.8%（SIGMA-ALDRICH 製）

代謝物 P1 標準品：純度 98.8%（SIGMA-ALDRICH 製）

アセトン、アセトニトリル、酢酸エチル、*n*-ヘキサン：残留農薬試験用（関東化学（株）製）

トルエン：残留農薬試験用（富士フイルム和光純薬（株）製）

メタノール：残留農薬試験用（関東化学（株）製）または LC/MS 用（富士フイルム和光純薬（株）製）

アンモニア水（28%）：特級（富士フイルム和光純薬（株）製）

ケイソウ土：セライト No.545（富士フイルム和光純薬（株）製）

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム：MEGA Bond Elut C18（1g/6 mL、Agilent Technologies 製）（以下、「C18 ミニカラム」という。）

グラファイトカーボン/エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム：InertSep GC/PSA（500 mg/500 mg/6 mL、ジーエルサイエンス（株）製）（以下、「GC/PSA ミニカラム」という。）

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、ジーエルサイエンス（株）製）（以下、「PSA ミニカラム」という。）

グラファイトカーボンミニカラム：Supelclean ENVI-Carb（500 mg/6 mL、Sigma-Aldrich 製）

ケイソウ土カラム：InertSep K-Solute（5 mL 保持用、ジーエルサイエンス（株）製）

シリカゲルミニカラム：InertSep SI（500 mg/6 mL、ジーエルサイエンス（株）製）

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 HLB（500 mg/6 mL、Waters 製）（以下、「HLB ミニカラム」という。）

3 級アンモニウム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 WAX（500 mg/6 mL、Waters 製）（以下、「WAX ミニカラム」という。）

4 級アンモニウム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 MAX（500 mg/6 mL、Waters 製）（以下、「MAX ミニカラム」という。）

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、ジーエルサイエンス（株）製）（以下、「SAX ミニカラム」という。）

その他の試薬：特級（富士フイルム和光純薬（株）製または関東化学（株）製）

標準原液：フルフェナセット標準品は 20 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。代謝物 W、代謝物 P1 は 10 mg を精秤し、それぞれアセトンで溶解して 500 mg/L 溶液を調製した。

添加用標準溶液：標準原液をメタノールで希釈して 5 mg/L、2 mg/L 及び 0.2 mg/L 溶液を調製した。なお、代謝物については、フルフェナセット本体に換算して前述の濃度になるよう調製した。（本体 5 mg/L 相当＝代謝物 W；3.1 mg/L、代謝物 P1；4.15 mg/L）

検量線用標準溶液：添加用標準溶液をメタノールで適宜希釈し、0.00125～0.0075 mg/L（一律基準濃度添加の場合）、0.0025～0.015 mg/L（大豆及びばれいしょの基準値濃度添加、5 倍希釈測定の場合）

場合) または 0.00625~0.0375 mg/L (小麦の基準値濃度添加、10 倍希釈測定及びトマトの基準値濃度添加の場合) の濃度の溶液を調製した。

### 3. 装置

ホモジナイザー： ULTRA-TURRAX T25 (IKA 製)  
 濃縮装置： ロータリーエバポレーターN1100 (東京理化工機 (株) 製)  
 振とう器： SR-2DW (タイテック (株) 製)

#### LC-MS/MS

装置	型式	会社
MS	XEVO-TQD	Waters
LC	Acquity UPLC I Class	Waters
データ処理	MassLynx	Waters

### 4. 測定条件

LC 条件				
カラム	XTerra MS C18 (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3.5 μm : Waters 製)			
移動相流速 (mL/min)	0.2			
注入量 (μL)	2			
カラム温度 (°C)	40			
移動相	A 液 : 5mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 B 液 : 5mmol/L 酢酸アンモニウム・メタノール溶液			
グラジエント条件	時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)	
	0.00	90	10	
	14.00	10	90	
	16.00	10	90	
	16.01	5	95	
	20.00	5	95	
	20.01	90	10	
	24.00	90	10	
MS 条件				
測定モード	SRM、選択反応モニタリング (ブランクのスキャン測定範囲 50~1000 amu)			
イオン化モード	ESI (+)			
キャピラリー電圧 (V)	1000			
ソース温度 (°C)	150			
脱溶媒温度 (°C)	600			
コーンガス	窒素、50 L/hr			
脱溶媒ガス	窒素、1000 L/hr			
コリジョンガス	アルゴン			
モニターイオン等		フルフェナセット	代謝物 W	代謝物 P1
	【SRM】 定量イオン (m/z)	364.1→194.1 [CV 25 V、 CE 10 eV]	226.0→138.0 [CV 25 V、 CE 15 eV]	302.0→284.0 [CV 25 V、 CE 8 eV]
	【SRM】 定性イオン (m/z)	364.1→152.0 [CV 25 V、 CE 20 eV]	226.0→109.9 [CV 25 V、 CE 25 eV]	302.0→110.9 [CV 25 V、 CE 35 eV]
	保持時間 (min)	13.8	8.0	8.1

CV ; コーン電圧、CE ; コリジョンエネルギー

## 5. 定量

検量線用標準溶液 2  $\mu$ L 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 2  $\mu$ L を LC-MS/MS に注入し、検量線から絶対検量線法により各化合物の含量を算出した。

## 6. 添加試料の調製

一律基準濃度 (0.01 ppm) の場合：小麦及び大豆は、試料 10.0 g に添加用標準溶液 (0.2 mg/L) 0.5 mL を添加し、30 分間放置した。ばれいしょ及びトマトは、試料 20.0 g に添加用標準溶液 (0.2 mg/L) 1 mL を添加し、30 分間放置した。

基準値濃度の場合：試料に以下のとおり添加用標準溶液を添加し、30 分間放置した。

小麦：10.0 g に添加用標準溶液 (5 mg/L) 1 mL を添加 (添加濃度：0.5 ppm)

大豆：10.0 g に添加用標準溶液 (2 mg/L) 0.5 mL を添加 (添加濃度：0.1 ppm)

ばれいしょ：20.0 g に添加用標準溶液 (2 mg/L) 1 mL を添加 (添加濃度：0.1 ppm)

トマト：20.0 g に添加用標準溶液 (2 mg/L) 0.5 mL を添加 (添加濃度：0.05 ppm)

## 7. 試験溶液の調製

### 概要

各化合物を試料からメタノールで抽出し、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム及びグラフトイトカーボン/エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラムで精製し、LC-MS/MS で定量及び確認した。

### (1) 抽出

#### ① 小麦

試料 10.0 g に水 20 mL を加え、30 分放置した。これにメタノール 100 mL を加え、2 分間ホモジナイズした後、ケイソウ土を約 1 cm の厚さに敷いて吸引ろ過した。ろ紙上の残留物にメタノール 50 mL を加えてホモジナイズした後、同様に吸引ろ過した。得られたろ液を合わせ、メタノールを加えて正確に 200 mL とした。この溶液から正確に 20 mL を分取し、40  $^{\circ}$ C 以下で 1~1.5 mL まで濃縮した。残留物に 0.1 vol% ギ酸 4 mL を加えて混合した。

#### ② 大豆

試料 10.0 g に水 20 mL を加え、30 分放置した。これにメタノール 100 mL を加え、2 分間ホモジナイズした後、3,000 rpm で 5 分間遠心分離した。沈殿にメタノール 50 mL を加えてホモジナイズした後、同様に遠心分離した。得られた上清を合わせ、メタノールを加えて正確に 200 mL とした。この溶液から正確に 20 mL を分取し、40  $^{\circ}$ C 以下で 1~1.5 mL まで濃縮した。残留物に 0.1 vol% ギ酸 4 mL を加えて混合した。

#### ③ ばれいしょ及びトマト

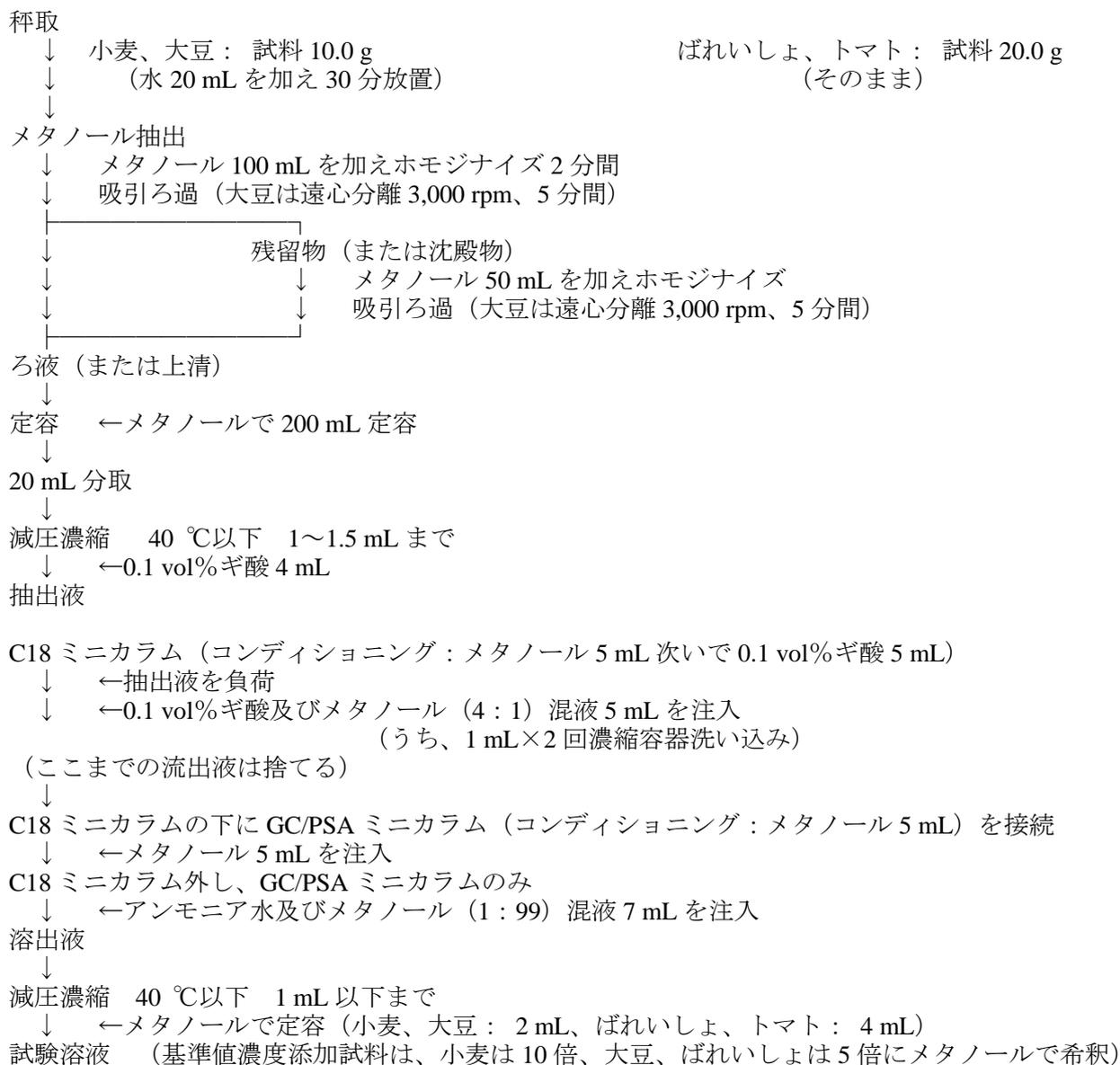
試料 20.0 g にメタノール 100 mL を加えて 2 分間ホモジナイズした後、ケイソウ土を約 1 cm の厚さに敷いて吸引ろ過した。ろ紙上の残留物にメタノール 50 mL を加えてホモジナイズした後、同様に吸引ろ過した。得られたろ液を合わせ、メタノールを加えて正確に 200 mL とした。この溶液から正確に 20 mL を分取し、40  $^{\circ}$ C 以下で 1~1.5 mL まで濃縮した。残留物に 0.1 vol% ギ酸 4 mL を加えて混合した。

### (2) 精製

C18 ミニカラムにメタノール 5 mL 及び 0.1 vol% ギ酸 5 mL を順次注入し、各流出液を捨てた。GC/PSA ミニカラムにメタノール 5 mL を注入し、流出液を捨てた。C18 ミニカラムに (1) で得られた溶液を注入した。濃縮容器を 0.1 vol% ギ酸及びメタノール (4 : 1) 混液 1 mL ずつで 2 回洗浄し、洗液を先のカラムに注入し、さらに 0.1 vol% ギ酸及びメタノール (4 : 1) 混液 3 mL を注入した。ここまでの流出液は捨てた。C18 ミニカラムの下に GC/PSA ミニカラムを接続し、メタノール 5 mL を注入し、溶出液を採った。次いで、C18 ミニカラムを取り外し、GC/PSA ミニカラムにアンモニア水及びメタノール (1 : 99) 混液 7 mL を注入し、溶出液を先の溶出液と合わせ、40  $^{\circ}$ C 以下で 1 mL 以下まで濃縮した。この残留物にメタノールを加え、小麦及び大豆は正確に 2 mL、ばれいしょ及びトマトは正確に 4 mL とし

たものを試験溶液とした。基準値濃度添加試料の試験溶液は、小麦の場合 10 倍に、大豆及びばれいしょの場合 5 倍に、それぞれメタノールで希釈して測定した。

#### [分析法フローチャート]



#### 8. マトリックス添加標準溶液の調製

ブランク試料の試験溶液を定容する際、各試料の添加回収試験における回収率 100%相当の濃度となるよう、溶媒標準溶液 (メタノール溶液) を加えてから定容したものをマトリックス添加標準溶液とした。基準値濃度添加に相当するマトリックス添加標準溶液は、添加試料と同様の希釈率となるよう希釈した。

#### [結果及び考察]

##### 1. LC-MS/MS 測定条件の検討

###### (1) MS 条件の検討

MS 条件についてインフュージョン測定により検討した。

フルフェナセット、代謝物 W、代謝物 P1 は、いずれも ESI (+) モードでコーン電圧 25 V とした場合に、プロトン付加分子 ( $[M+H]^+$ ) を良好に検出できたため、これをプリカーサーイオンとした。各化合物のプリカーサーイオンについて、コリジョンエネルギーを変えてプロダクトイオンを確認した。それぞれイオン強度の高いものから定量イオン、定性イオンを選択し、フルフェナセットは  $m/z +364.1 \rightarrow 194.1$  を定量用、 $m/z +364.1 \rightarrow 152.0$  を定性用、代謝物 W は  $m/z +226.0 \rightarrow 138.0$  を定量用、 $m/z +226.0 \rightarrow 109.9$  を定性用、代謝物 P1 は  $m/z +302.0 \rightarrow 284.0$  を定量用、 $m/z +302.0 \rightarrow 110.9$  を定性用とした。図 1 に各化合物のマススペクトル、図 2 に各化合物のプロダクトイオンスペクトルを示した。

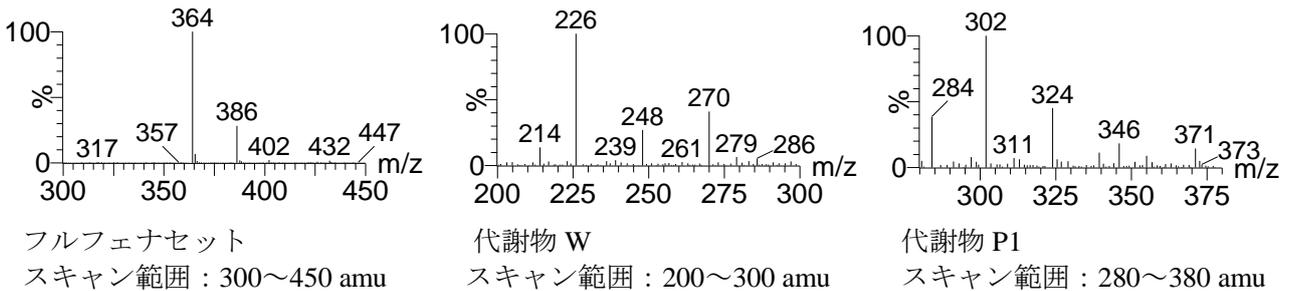


図 1 各化合物のマススペクトル (測定条件：ESI (+)、corn voltage=25 V)

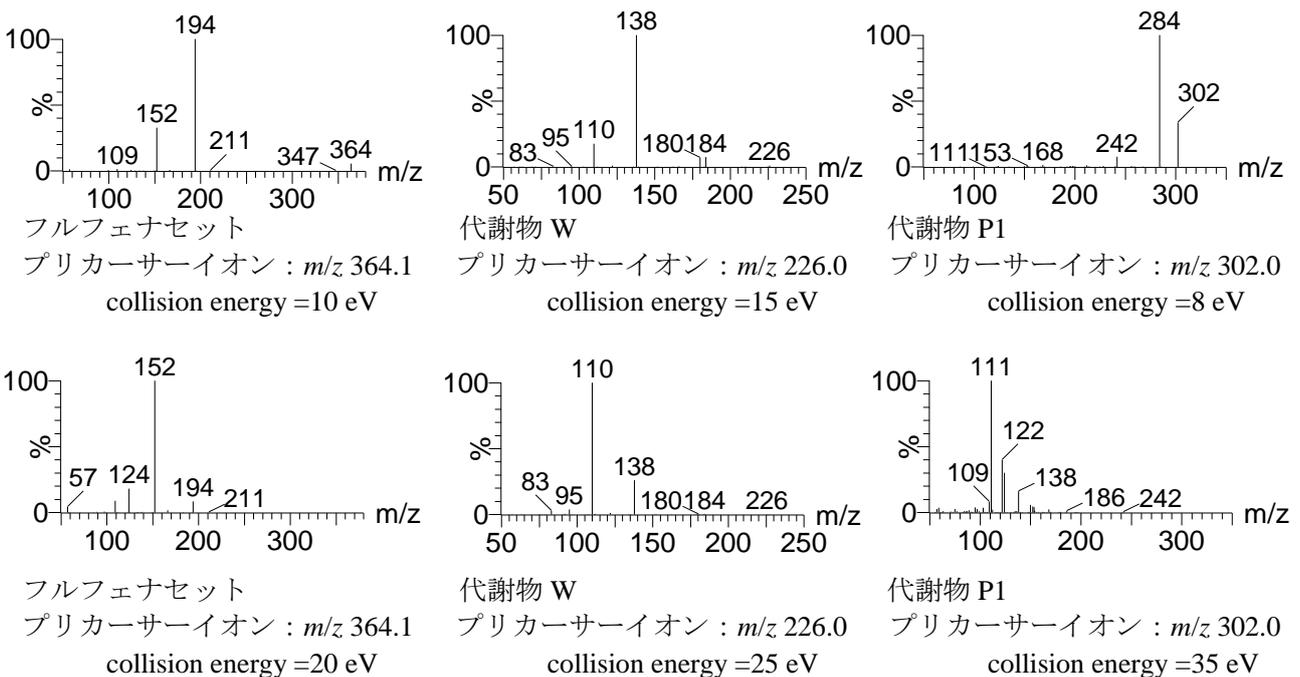


図 2 各化合物のプロダクトイオンスペクトル (測定条件：ESI (+)、corn voltage=25 V)

## (2) LC 条件の検討

分析カラムについて、XTerra MS C18 (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3.5  $\mu\text{m}$  : Waters 製) を用いて検討を行った。移動相条件について、A 液に 5 mM 酢酸アンモニウム溶液または 0.1 vol% ギ酸、B 液に、メタノールまたはアセトニトリルを用いてグラジエント条件を検討した。その結果、フルフェナセット及び代謝物 W は 5 mM 酢酸アンモニウム溶液とメタノールによるグラジエント条件で最も良好なイオン強度が得られた。フルフェナセットは B 液を 5 mM 酢酸アンモニウム・メタノール溶液にした方がさらに良好であった。代謝物 P1 は、5 mM 酢酸アンモニウム溶液とアセトニトリルによ

るグラジエント条件が最も良好であったが、5 mM 酢酸アンモニウム溶液とメタノールによるグラジエント条件でも概ね良好であった。このため、5 mM 酢酸アンモニウム溶液と 5 mM 酢酸アンモニウム・メタノール溶液によるグラジエント条件を採用した。

### (3) 検量線

図3に各化合物の検量線の例を示した。0.00125~0.0075 mg/L、0.0025~0.015 mg/L または 0.0625~0.0375 mg/L の濃度範囲で作成した検量線の決定係数は、いずれも 0.99 以上であり良好な直線性を示した。また、フルフェナセトは、0.000125~0.00075 mg/L の濃度範囲でも良好な直線性を示したが、代謝物 W 及び代謝物 P1 はこの濃度範囲ではやや直線性が劣った。

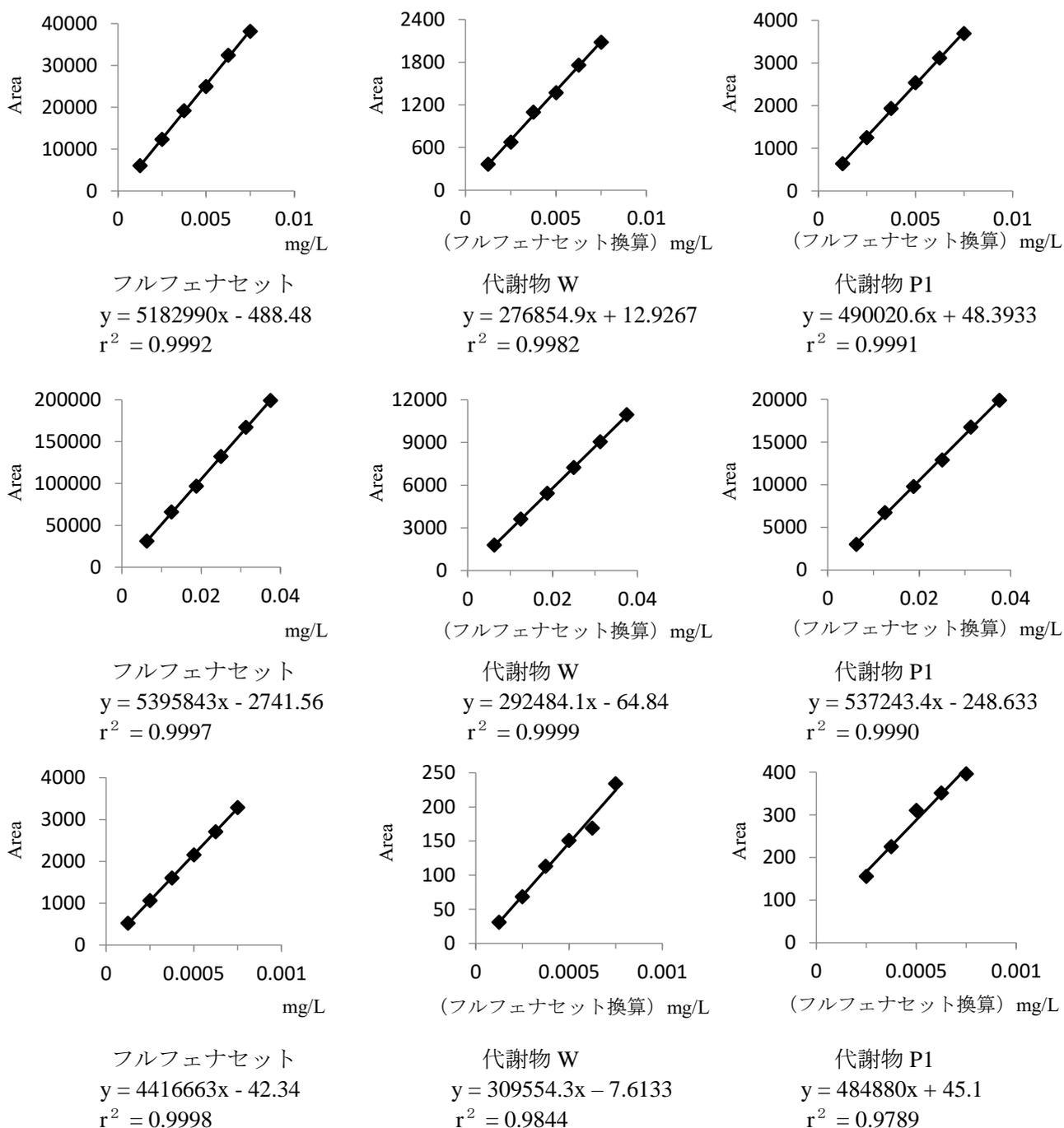


図3 各化合物の検量線の例

#### (4) 定量限界

定量限界の算出結果を以下に示した。

小麦及び大豆

$$0.01 \text{ mg/kg} \left[ \left[ \frac{\text{試験溶液量 (2 mL)}}{\text{試験溶液中の試料量 (1 g)}} \right] \times \left[ \frac{\text{分析対象化合物の定量限界相当量 (0.01 ng)}}{\text{注入量 (2 } \mu\text{L)}} \right] \right]$$

ばれいしょ及びトマト

$$0.01 \text{ mg/kg} \left[ \left[ \frac{\text{試験溶液量 (4 mL)}}{\text{試験溶液中の試料量 (2 g)}} \right] \times \left[ \frac{\text{分析対象化合物の定量限界相当量 (0.01 ng)}}{\text{注入量 (2 } \mu\text{L)}} \right] \right]$$

## 2. 試験溶液調製法の検討

### (1) 溶解性の検討

各化合物のメタノール溶液を試験管にとり、窒素吹きつけ乾固した後、各溶媒 2 mL を加えて試験管ミキサーで攪拌した。水を加えたもの以外は、それぞれ 1 mL を別の試験管にとり、窒素吹きつけ乾固した後、メタノール 1 mL を加えて溶かし、測定した。水を加えたものはそのまま測定用のバイアルビンに移して測定した。結果を表 1 に示した。

各化合物とも、標準原液調製の際は問題なくアセトンで溶解できたが、表 1 に示したとおり、一旦乾固後アセトンで再溶解を試みた場合は、特に代謝物で低い回収率となった。このことから、溶解性の問題だけではなく、分解や揮散、容器への吸着といった影響があった可能性が考えられた。

なお、代謝物は極性の低い溶媒には溶けにくいと考えられた。

表 1 溶解性の検討

(回収率%)

溶媒	フルフェナセット	代謝物 W	代謝物 P1
①水	53	98	97
③水	93	95	95
①メタノール	57	99	93
①アセトニトリル	62	36	18
①アセトン	48	29	15
②アセトン	90	54	15
①酢酸エチル	63	8	1
①トルエン	93	0	0
①n-ヘキサン	37	0	0
②0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液	102	97	85
②0.1 vol%ギ酸・アセトン溶液	74	98	94
②0.1 vol%ギ酸・酢酸エチル溶液	94	96	89
③0.1 vol%ギ酸・[水/メタノール (9:1)] 溶液	94	95	95

①0.08 mg/L メタノール溶液 1 mL を乾固してから再溶解を試みたもの。

②0.2 mg/L メタノール溶液 0.4 mL を乾固してから再溶解を試みたもの。

③2 mg/L メタノール溶液 0.1 mL を乾固してから再溶解を試みたもの。

### (2) 安定性の検討

各化合物の 0.01 mg/L 溶液を各種溶媒で調製し（マイクロシリンジを用いてガラスバイアルで直接調製）、ガラスバイアルビンで 10 °C、暗所で保管したものを 2 日後に測定し、新たに調製した 0.01 mg/L メタノール溶液と比較した。結果を表 2 に示した。

また、同様に、0.01 mg/L 溶液を、マイクロシリンジとガラス試験管を用いて調製し、直後にガラスバイアルに移して測定したものの、ガラス試験管を実験室内に放置し、約 5 時間後にガラスバイアルに移して測定したものの、約 22 時間後にガラスバイアルに移して測定したものを、それぞれ比較した。結果を表 3 に示した。

表2の結果から、フルフェナセットはアンモニア水及びメタノール（1：99）混液中で、代謝物はアセトニトリル中で、やや安定性が悪い可能性が考えられた。

表3の結果から、代謝物はアセトニトリル中で安定性が悪い可能性が考えられたが、アセトニトリルと水との混液またはギ酸含有アセトニトリルの場合は、安定性に概ね問題ないと考えられた。

表2 各種溶媒中での安定性の検討

（10℃、暗所、2日後、新たに調製した標準液（メタノール溶液）に対する％）

溶媒	フルフェナセット	代謝物 W	代謝物 P1
メタノール	96	110	100
アセトニトリル	96	75	71
0.1 vol%ギ酸・メタノール溶液	96	95	91
0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液	96	89	86
アンモニア水/メタノール (1:99)	86	97	90

表3 各種溶媒中での安定性の検討（室温）

（調製直後のメタノール溶液に対する％）

溶媒	経過時間	フルフェナセット			代謝物 W			代謝物 P1		
		0	5	22	0	5	22	0	5	22
メタノール		100	100	96	100	90	93	100	98	101
アセトニトリル		99	101	97	62	49	43	33	0	0
アセトニトリル/水 (3:1)		99	99	97	99	90	89	104	103	95
アセトニトリル/水 (1:1)		98	96	97	94	87	90	98	94	93
2 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液		100	96	97	91	82	86	93	94	92
2 vol%ギ酸・[アセトニトリル/水(3:1)]溶液		98	93	96	92	82	86	91	85	90
2 vol%ギ酸・[アセトニトリル/水(1:1)]溶液		98	92	96	91	82	86	92	89	87

### (3) 抽出条件の検討

(1)溶解性の検討及び(2)安定性の検討結果から、試料からギ酸酸性下アセトニトリルで抽出する方法を試みたが、十分な回収率が得られなかった。また、試料からアセトンで抽出する方法では、その後の精製操作に支障があった。そこで、試料からメタノールで抽出する方法とした。

なお、アセトニトリル抽出またはアセトン抽出では各試料とも問題なく吸引ろ過が可能であったが、メタノール抽出では、大豆はホモジナイズ後しばらく静置しても全体に懸濁したままであり、吸引ろ過を試みてもすぐに目詰まりしてろ過が困難であった。このため、大豆については抽出液の固液分離の際、遠心分離を行うこととした。

当初、溶媒使用量の低減を図り、[実験方法] 7. 試験溶液の調製に示す量の1/2量（100 mL 定容）での抽出を検討したが、大豆での試行の結果、回収率がやや低めであった。残留物への吸着等の影響を考え、[実験方法] 7. 試験溶液の調製に示す量に変更したところ、回収率の改善が見られた。

### (4) カラム精製の検討

① C18 ミニカラムでの各化合物の溶出挙動を表4に示した。水及びメタノール（4：1）混液では5 mL 以下で代謝物が流出し始めたが、0.1 vol%ギ酸及びメタノール（4：1）混液では3化合物とも15 mL までは流出せずミニカラムに保持できた。0.1 vol%ギ酸及びメタノール（2：1）混液では5 mL 以降に代謝物が流出し始めた。これらの結果から、試料のメタノール抽出液を濃縮してメタノールを概ね除去した後に、0.1 vol%ギ酸を加えてC18 ミニカラムに負荷、0.1 vol%ギ酸及びメタノール（4:1）混液を通液して高極性の共存物質を除去した後、メタノールで溶出して目的化合物を

回収する方法で検討を進めることとした。

試料抽出液には水分が含まれるため、約 2 mL 以下まで濃縮して 0.1 vol%ギ酸 4 mL を加えればメタノールの比率を 1/5 以下にできると考えた。なお、後述の添加回収において濃縮後に残った液量を確認したところ、1.0~1.5 mL であった。

なお、メタノールの溶出液量は、2 mL で 3 化合物とも大部分回収可能と考えられたが、代謝物 W がその後も若干溶出が続いたため、5 mL とすることにした。

表 4 C18 ミニカラムからの各化合物の溶出状況 (回収率%)

溶出条件	フルフェナセット	代謝物 W	代謝物 P1	
(メタノール→水でコンディショニング、20 mg/L メタノール溶液 10 µL 負荷)				
水/メタノール (4:1)				
0- 5 mL	0	67	58	
5-10 mL	0	23	35	
10-15 mL	0	3	2	
15-20 mL	0	1	0	
メタノール	0- 5 mL	87	2	0
計		87	96	95
(メタノール→0.1 vol%ギ酸でコンディショニング、20 mg/L メタノール溶液 10 µL 負荷)				
0.1 vol%ギ酸/メタノール (4:1)				
0-15 mL	0	0	0	
15-20 mL	0	3	0	
メタノール	0- 5 mL	87	79	87
計		87	82	87
(メタノール→0.1 vol%ギ酸でコンディショニング、20 mg/L メタノール溶液 10 µL 負荷)				
0.1 vol%ギ酸/メタノール (2:1)				
0- 5 mL	0	0	0	
5-10 mL	0	47	10	
10-15 mL	0	31	72	
15-20 mL	0	6	9	
メタノール	0- 5 mL	85	4	2
計		85	88	93
(メタノール→0.1 vol%ギ酸でコンディショニング、20 mg/L メタノール溶液 10 µL 負荷)				
0.1 vol%ギ酸/メタノール (4:1)				
0- 5 mL	0	0	0	
メタノール	0- 1 mL	0	0	
1- 2 mL	82	71	85	
2- 3 mL	2	5	0	
3- 4 mL	tr	2	0	
4- 5 mL	tr	1	0	
5- 6 mL	tr	tr	0	
計		84	79	85

② GC/PSA ミニカラムでの各化合物の溶出挙動を表 5 に示した。

フルフェナセットは、中性条件で負荷した場合と酸性条件で負荷した場合とで挙動に大きな違いはなかった。代謝物は、中性条件で負荷した場合はメタノール 5 mL で溶出し始めたが、酸性条件で負荷した場合はメタノール 10 mL で溶出が見られず、アンモニア水及びメタノールの混液で溶出できた。酸性条件となったことでイオン交換体としての作用が強くなり働いたと考えられた。このこと

から、各化合物を溶出させる条件としてはアンモニア水及びメタノール（1：99）混液を用いることとした。なお、この検討を行った際は試料のアセトニトリル抽出液を精製することを想定していたため、アセトニトリルでコンディショニングを行っている。

さらに、アンモニア水及びメタノール（1：99）混液単独での溶出を確認したところ、5 mL では溶出液量が不足したが、10 mL では3化合物とも概ね回収可能であった。

表 5 GC/PSA ミニカラムからの各化合物の溶出状況 (回収率%)

溶出条件		フルフェ ナセット	代謝物 W	代謝物 P1
(アセトニトリルでコンディショニング、0.1 mg/L アセトニトリル溶液 2 mL 負荷)				
負荷時		1	0	0
メタノール	0- 5 mL	92	43	3
	5-10 mL	2	45	47
	10-15 mL	0	4	32
	15-20 mL	0	1	10
アンモニア水/メタノール (1:99)	0- 5 mL	0	0	3
計		95	93	95
(アセトニトリルでコンディショニング、0.1 mg/L 0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液 2 mL 負荷)				
負荷時		0	0	0
メタノール	0- 5 mL	105	0	0
	5-10 mL	0	0	0
アンモニア水/メタノール (1:99)	0- 5 mL	0	100	84
	5-10 mL	0	0	0
計		105	100	84
(アンモニア水/メタノール (1:99) でコンディショニング、20 mg/L メタノール溶液 10 µL 負荷)				
アンモニア水/メタノール (1:99)	0- 5 mL	78	102	100
	5-10 mL	23	1	1
計		101	103	101

③ C18 ミニカラムのみでは、着色成分が十分除去できないなど精製が不十分であったため、C18 ミニカラムと GC/PSA ミニカラムの両方で精製を行うこととした。C18 ミニカラムからメタノール溶出後、あらためて GC/PSA ミニカラムに負荷するよりも、連結カラムで一度に精製を行った方が簡便と考え、連結カラムでの溶出条件を確認した。

C18 ミニカラムの下に GC/PSA ミニカラムを連結した場合の各化合物の溶出挙動を表 6 に示した。フルフェナセットは、連結カラムでメタノール 5 mL で微量溶出された。C18 ミニカラムを外した後、アンモニア水及びメタノール（1：99）混液 5 mL で3化合物とも概ね回収できたが、フルフェナセットがその後も若干溶出が続いたため、溶出液量は 7 mL とすることとした。

なお、GC/PSA ミニカラムのかわりにグラファイトカーボンを積層していない PSA ミニカラムを使用することも考えたが、トマト抽出液で試行した結果、C18 ミニカラムと PSA ミニカラムの連結カラムでは着色成分の除去が十分でなかったため、GC/PSA ミニカラムを採用した。

表 6 C18 ミニカラム及び GC/PSA ミニカラムの連結カラムからの各化合物の溶出状況  
(回収率%)

溶出条件	フルフェ ナセット	代謝物 W	代謝物 P1
(C18 ; メタノール→0.1 vol%ギ酸でコンディショニング、GC/PSA ; メタノールコンディショニング、C18 に 20 mg/L メタノール溶液 10 µL 負荷し連結)			
メタノール 0- 5 mL	1	0	0
(C18 外し GC/PSA のみ)			
アンモニア水/メタノール (1:99) 0- 1 mL	46	0	0
1- 2 mL	41	0	0
2- 3 mL	7	20	17
3- 4 mL	1	73	79
4- 5 mL	tr	tr	2
5- 6 mL	tr	0	0
6- 7 mL	tr	0	0
計	96	93	98

### 3. 添加回収試験

小麦、大豆、ばれいしょ及びトマトの 4 食品を試料に用いて、[実験方法] 7. 試験溶液の調製に従って添加回収試験を実施した。

一律基準濃度 (0.01 ppm) 添加の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代表的なクロマトグラムを図 4~7 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代表的なトータルイオンクロマトグラムを図 10 に示した。

抽出液を濃縮した際、小麦については析出物が濃縮容器に付着し、濃縮液を C18 ミニカラムに注入する際に、目的化合物を十分に洗い込めないことが懸念された。そのため、[実験方法] 7. 試験溶液の調製に示すとおりの方法 (以下、「通常操作」という。) と別に、連結カラムにメタノールを注入する際にそのメタノールの一部 (1 mL×2 回) を用いて濃縮容器を洗い込む操作を加えた場合 (以下、「メタノール洗い込み追加」という。) についても検討した。この時の代表的なクロマトグラムを図 8 に、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 11 に示した。

#### (1) 選択性

選択性の検討結果を表 7 に示した。フルフェナセットについては、各食品とも痕跡が認められたが、選択性の評価基準に適合した。代謝物 W については、小麦でわずかに妨害ピークが認められたが、選択性の評価基準に適合した。代謝物 P1 については、各食品とも妨害ピークは認められなかった。

なお、フルフェナセットについては、ブランク試料液を希釈した場合に、希釈前と同程度あるいは希釈前より大きなピークが認められることがあり、試料由来のピークではなく、機器のインジェクタ等に残存したものが検出されていると考えられた。

#### (2) 真度、精度及び定量限界

真度及び併行精度の検討結果を表 8 に示した。通常操作の場合、真度は、フルフェナセットが 70.6~92.2%、代謝物 W が 80.1~93.3%、代謝物 P1 が 84.1~97.0%といずれも目標値の 70~120%を満足した。併行精度はいずれも 5 RSD%未満であった。また、一律基準濃度添加時の各化合物のピークの S/N 比は、フルフェナセットで最低 11000 (大豆)、代謝物 W で最低 27 (小麦)、代謝物 P1 で最低 29 (大豆) であり、いずれも S/N 比 10 以上が得られた。これらのことから、定量限界として 0.01 ppm を設定可能であった。

小麦について、メタノール洗い込み追加の場合、フルフェナセットは一律基準濃度添加で真度 71.6% から 78.3%へ、基準値濃度添加で真度 73.2%から 89.4%へ、通常操作と比べ改善が見られた。代謝物 W は一律基準濃度添加では真度 80.1%から 86.5%へ改善が見られたが、基準値濃度添加ではほとんど差は無く、代謝物 P1 についてもメタノール洗い込みの有無で明確な差は無かった。

### (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、表 9 に示した。試料マトリックスの影響を補正した真度を表 10 に示した。

溶媒標準のピーク面積に対するマトリックス添加標準のピーク面積の比は、0.77~1.01 であった。

希釈せずに測定した試料液の内、大豆のフルフェナセットが最も試料マトリックスの影響を大きく受けていた。フルフェナセットはピークの S/N 比が十分大きいことから、一律基準濃度添加試料を希釈して測定しても定量可能と考え、参考として 10 倍希釈での測定も試みた。その結果、溶媒標準のピーク面積に対するマトリックス添加標準のピーク面積の比は 0.98 となり、マトリックスの影響を補正しなくても真度は 83.6%となった。ただし、同様に希釈した場合、代謝物 W 及び P1 については十分な S/N 比が得られず、また定量値のバラツキも大きくなり 10 RSD%を超えた。参考として、このときの代表的なクロマトグラムを図 9 に示した。

表7 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) <sup>1)</sup>										選択性 の評価 <sup>3)</sup>	備考
					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 <sup>2)</sup>				面積(高さ) 比(a)/(b)			
								n=1	n=2	平均(a)	n=1	n=2	平均(b)					
1	フルフェナセト	小麦	0.01	0.5	基準値 0.5	< 0.100	面積	42	42	42	24563	24461	24512	0.002	○			
2	代謝物W	小麦	0.01	0.5	基準値 0.5	< 0.100	面積	90	61	76	1279	1383	1331	0.060	○			
3	代謝物P1	小麦	0.01	0.5	基準値 0.5	< 0.100	面積			#DIV/0!			#DIV/0!	#DIV/0!	○			
4	フルフェナセト	大豆	0.01	0.1	基準値 0.1	< 0.100	面積	8	7	8	17515	17588	17552	0.000	○			
5	代謝物W	大豆	0.01	0.1	基準値 0.1	< 0.100	面積			#DIV/0!			#DIV/0!	#DIV/0!	○			
6	代謝物P1	大豆	0.01	0.1	基準値 0.1	< 0.100	面積			#DIV/0!			#DIV/0!	#DIV/0!	○			
7	フルフェナセト	ばれいしよ	0.01	0.1	基準値 0.1	< 0.100	面積	20	19	19	27892	27479	27686	0.001	○			
8	代謝物W	ばれいしよ	0.01	0.1	基準値 0.1	< 0.100	面積			#DIV/0!			#DIV/0!	#DIV/0!	○			
9	代謝物P1	ばれいしよ	0.01	0.1	基準値 0.1	< 0.100	面積			#DIV/0!			#DIV/0!	#DIV/0!	○			
10	フルフェナセト	トマト	0.01	0.05	基準値 0.05	< 0.100	面積	23	29	26	27334	27399	27367	0.001	○			
11	代謝物W	トマト	0.01	0.05	基準値 0.05	< 0.100	面積			#DIV/0!			#DIV/0!	#DIV/0!	○			
12	代謝物P1	トマト	0.01	0.05	基準値 0.05	< 0.100	面積			#DIV/0!			#DIV/0!	#DIV/0!	○			
参考	フルフェナセト	小麦	0.01	0.5	基準値 0.5	< 0.100	面積	36	32	34	22232	22161	22196	0.002	○	メタノール洗い込み追加		
参考	代謝物W	小麦	0.01	0.5	基準値 0.5	< 0.100	面積	97	72	84	1410	1372	1391	0.065	○	メタノール洗い込み追加		
参考	代謝物P1	小麦	0.01	0.5	基準値 0.5	< 0.100	面積			#DIV/0!			#DIV/0!	#DIV/0!	○	メタノール洗い込み追加		
参考	フルフェナセト	大豆	0.01	0.1	基準値 0.1	< 0.100	面積	30	26	28	2208	2168	2188	0.013	○	10倍希釈測定		
参考	代謝物W	大豆	0.01	0.1	基準値 0.1	< 0.100	面積			#DIV/0!			#DIV/0!	#DIV/0!	○	10倍希釈測定		
参考	代謝物P1	大豆	0.01	0.1	基準値 0.1	< 0.100	面積			#DIV/0!			#DIV/0!	#DIV/0!	○	10倍希釈測定		

\*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整した標準溶液(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。

表8 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 <sup>*1</sup>	検量線		回収率(%)					真度 (%)	併行精度 (RSD%)	S/N <sup>2</sup>		備考	
							傾き	切片	r <sup>2</sup> 値	n=1	n=2	n=3	n=4			n=5	Max.		平均値
1	フルフェナゼット	小麦	0.01	0.5	0.01	S/N	5182990	-488	0.9992	72.2	70.3	72.2	70.1	73.1	71.6	1.8	21700.5	20133.3	
2	代謝物W	小麦	0.01	0.5	0.01	S/N	276855	13	0.9982	80.7	79.3	77.0	78.4	85.3	80.1	4.0	39.3	27.3	33.3
3	代謝物P1	小麦	0.01	0.5	0.01	S/N	490021	48	0.9991	92.4	98.5	98.1	94.1	99.3	96.5	3.1	60.5	63.0	61.8
4	フルフェナゼット	大豆	0.01	0.1	0.01	S/N	4487472	-646	0.9997	70.9	68.8	68.8	70.1	74.5	70.6	3.3	11342.1	18825.7	15083.9
5	代謝物W	大豆	0.01	0.1	0.01	S/N	257243	-14	0.9990	90.2	90.5	88.0	91.9	85.6	89.2	2.8	55.5	45.0	50.2
6	代謝物P1	大豆	0.01	0.1	0.01	S/N	432926	-2	0.9985	99.6	94.9	93.1	97.8	99.8	97.0	3.0	28.7	37.0	32.9
7	フルフェナゼット	ばれいしよ	0.01	0.1	0.01	S/N	5560016	-95	0.9996	84.3	81.7	78.2	83.0	84.2	82.3	3.1	77723.6	41679.4	59701.5
8	代謝物W	ばれいしよ	0.01	0.1	0.01	S/N	340322	9	0.9974	84.4	81.7	79.1	80.1	82.2	81.5	2.5	129.0	117.8	123.4
9	代謝物P1	ばれいしよ	0.01	0.1	0.01	S/N	713703	35	0.9992	84.9	86.4	84.0	82.4	82.7	84.1	2.0	51.2	58.9	55.0
10	フルフェナゼット	トマト	0.01	0.05	0.01	S/N	5483632	-275	0.9999	87.5	91.5	94.4	91.0	92.1	91.3	2.7	56232.8	136515.8	96374.3
11	代謝物W	トマト	0.01	0.05	0.01	S/N	343760	-2	0.9992	83.1	87.8	89.2	82.4	83.2	85.1	3.7	130.1	126.1	128.1
12	代謝物P1	トマト	0.01	0.05	0.01	S/N	719698	44	0.9975	81.8	90.3	86.9	88.1	93.2	88.1	4.8	60.6	55.2	57.9
13	フルフェナゼット	小麦	0.01	0.5	0.5	-	5395843	-2742	0.9997	74.0	74.0	68.9	75.5	73.5	73.2	3.4			10倍希釈測定
14	代謝物W	小麦	0.01	0.5	0.5	-	292484	-65	0.9999	90.6	92.6	94.5	94.6	94.1	93.3	1.8			10倍希釈測定
15	代謝物P1	小麦	0.01	0.5	0.5	-	537243	-249	0.9990	90.0	89.3	94.2	91.9	92.6	91.6	2.2			10倍希釈測定
16	フルフェナゼット	大豆	0.01	0.1	0.1	-	4657145	159	0.9996	73.6	75.7	81.1	78.8	76.2	77.1	3.8			10倍希釈測定
17	代謝物W	大豆	0.01	0.1	0.1	-	296526	4	0.9988	80.0	88.3	86.6	91.0	86.3	86.4	4.7			5倍希釈測定
18	代謝物P1	大豆	0.01	0.1	0.1	-	540918	25	0.9993	88.1	88.0	90.4	90.6	86.7	88.7	1.9			5倍希釈測定
19	フルフェナゼット	ばれいしよ	0.01	0.1	0.1	-	5658926	-790	0.9997	92.2	89.6	85.9	90.4	87.8	89.2	2.7			5倍希釈測定
20	代謝物W	ばれいしよ	0.01	0.1	0.1	-	358651	-25	0.9999	91.7	92.2	88.7	94.8	92.1	91.9	2.4			5倍希釈測定
21	代謝物P1	ばれいしよ	0.01	0.1	0.1	-	741784	-54	0.9998	92.6	94.3	90.6	94.2	91.9	92.7	1.7			5倍希釈測定
22	フルフェナゼット	トマト	0.01	0.05	0.05	-	5701080	-1117	0.9998	93.9	90.3	87.5	94.3	95.1	92.2	3.5			5倍希釈測定
23	代謝物W	トマト	0.01	0.05	0.05	-	338951	-78	0.9985	90.2	86.3	82.3	89.4	90.7	87.8	4.0			5倍希釈測定
24	代謝物P1	トマト	0.01	0.05	0.05	-	735778	-60	0.9991	87.1	85.9	82.1	88.0	88.2	86.3	2.9			5倍希釈測定
参考	フルフェナゼット	小麦	0.01	0.5	0.01	S/N	5130667	21	0.9993	78.6	79.6	76.0	79.6	77.7	78.3	1.9	34619.9	18957.2	26788.6
参考	代謝物W	小麦	0.01	0.5	0.01	S/N	287659	-10	0.9990	86.7	89.0	83.1	87.8	86.0	86.5	2.6	25.2	26.4	25.8
参考	代謝物P1	小麦	0.01	0.5	0.01	S/N	504240	32	0.9991	92.5	91.3	89.5	98.2	91.3	92.6	3.6	29.2	40.3	34.7
参考	フルフェナゼット	小麦	0.01	0.5	0.5	-	5567791	-2533	0.9995	91.1	88.3	90.6	87.8	89.2	89.4	1.6			10倍希釈測定
参考	代謝物W	小麦	0.01	0.5	0.5	-	297809	-179	0.9999	92.6	91.0	94.2	91.8	96.6	93.2	2.4			10倍希釈測定
参考	代謝物P1	小麦	0.01	0.5	0.5	-	547463	-136	0.9994	90.9	91.2	94.4	91.0	93.1	92.1	1.7			10倍希釈測定
参考	フルフェナゼット	大豆	0.01	0.1	0.01	S/N	4416663	-42	0.9998	83.9	83.9	82.8	85.3	82.4	83.6	1.4	1945.6	4970.0	3457.8
参考	代謝物W	大豆	0.01	0.1	0.01	S/N	309554	-8	0.9844	86.7	78.7	105.3	86.4	81.6	87.7	11.8	11.0	9.9	10.4
参考	代謝物P1	大豆	0.01	0.1	0.01	S/N	484880	45	0.9789	81.4	81.1	97.5	78.6	99.2	87.6	11.3	4.8	6.1	5.5

\*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。

表9 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 <sup>1</sup> (mg/L)	面積又は 高さの別	ピーク面積(高さ) <sup>2</sup>					備考		
								フランク <sup>3</sup>	マトリックス添加標準溶液 <sup>4</sup> 平均	n=1	溶媒標準溶液 平均	ピーク面積 (高さ)比 <sup>5</sup>			
1	フルフェナゼット	小麦	0.01	0.5	0.01	0.01	面積	42	24470	25601	25920	25760	0.95		
2	代謝物W	小麦	0.01	0.5	0.01	0.01	面積	76	1279	1383	1429	1407	1418	0.88	
3	代謝物P1	小麦	0.01	0.5	0.01	0.01	面積		2442	2521	2552	2548	2550	0.97	
4	フルフェナゼット	大豆	0.01	0.1	0.01	0.01	面積	8	17515	17588	22815	22822	22818	0.77	
5	代謝物W	大豆	0.01	0.1	0.01	0.01	面積		1445	1447	1535	1534	1535	0.94	
6	代謝物P1	大豆	0.01	0.1	0.01	0.01	面積		2672	2645	2672	2763	2718	0.98	
7	フルフェナゼット	ばれいしよ	0.01	0.1	0.01	0.01	面積	19	27892	27479	28107	28175	28141	0.98	
8	代謝物W	ばれいしよ	0.01	0.1	0.01	0.01	面積		1635	1636	1763	1739	1751	0.93	
9	代謝物P1	ばれいしよ	0.01	0.1	0.01	0.01	面積		3336	3278	3611	3590	3601	0.92	
10	フルフェナゼット	トマト	0.01	0.05	0.01	0.01	面積	26	27334	27399	27387	27477	27432	1.00	
11	代謝物W	トマト	0.01	0.05	0.01	0.01	面積		1579	1559	1710	1708	1709	0.92	
12	代謝物P1	トマト	0.01	0.05	0.01	0.01	面積		3233	3235	3682	3666	3674	0.88	
13	フルフェナゼット	小麦	0.01	0.5	0.5	0.5	面積	33	131785	131429	133080	134551	133816	0.98	10倍希釈測定
14	代謝物W	小麦	0.01	0.5	0.5	0.5	面積		7340	7338	7252	7212	7232	1.01	10倍希釈測定
15	代謝物P1	小麦	0.01	0.5	0.5	0.5	面積		13376	13356	13406	13500	13453	0.99	10倍希釈測定
16	フルフェナゼット	大豆	0.01	0.1	0.1	0.1	面積	109	38329	38659	41150	41240	41195	0.93	5倍希釈測定
17	代謝物W	大豆	0.01	0.1	0.1	0.1	面積		2303	2378	2380	2387	2384	0.98	5倍希釈測定
18	代謝物P1	大豆	0.01	0.1	0.1	0.1	面積		3096	3172	3237	3339	3288	0.95	5倍希釈測定
19	フルフェナゼット	ばれいしよ	0.01	0.1	0.1	0.1	面積	7	56009	55846	56378	55337	55858	1.00	5倍希釈測定
20	代謝物W	ばれいしよ	0.01	0.1	0.1	0.1	面積		3473	3560	3565	3559	3562	0.99	5倍希釈測定
21	代謝物P1	ばれいしよ	0.01	0.1	0.1	0.1	面積		7207	7216	7212	7263	7372	0.99	5倍希釈測定
22	フルフェナゼット	トマト	0.01	0.05	0.05	0.05	面積	20	139796	141308	140532	141115	140718	1.00	
23	代謝物W	トマト	0.01	0.05	0.05	0.05	面積		7690	7721	7706	8248	8236	0.94	
24	代謝物P1	トマト	0.01	0.05	0.05	0.05	面積		16811	16835	16823	18369	18341	0.92	
参考	フルフェナゼット	小麦	0.01	0.5	0.01	0.01	面積	34	22232	22161	22163	25239	25115	0.88	メタノール洗い込み追加
参考	代謝物W	小麦	0.01	0.5	0.01	0.01	面積		1410	1372	1391	1401	1385	1.00	メタノール洗い込み追加
参考	代謝物P1	小麦	0.01	0.5	0.01	0.01	面積		2560	2356	2458	2486	2481	0.99	メタノール洗い込み追加
参考	フルフェナゼット	小麦	0.01	0.5	0.5	0.5	面積	31	131656	131575	134342	134574	134458	0.98	メタノール洗い込み追加, 10倍希釈測定
参考	代謝物W	小麦	0.01	0.5	0.5	0.5	面積	84	7179	7202	7252	7208	7230	0.98	メタノール洗い込み追加, 10倍希釈測定
参考	代謝物P1	小麦	0.01	0.5	0.5	0.5	面積		13216	13242	13229	13750	13639	0.97	メタノール洗い込み追加, 10倍希釈測定
参考	フルフェナゼット	大豆	0.01	0.1	0.01	0.01	面積	28	2208	2168	2160	2215	2214	0.98	10倍希釈測定
参考	代謝物W	大豆	0.01	0.1	0.01	0.01	面積		137	144	140	152	140	1.00	10倍希釈測定
参考	代謝物P1	大豆	0.01	0.1	0.01	0.01	面積		319	315	317	285	284	1.12	10倍希釈測定

\*1 添加回収試験における回収率100%相当濃度(0.05ppm)に、フ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 フ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フ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フ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10 補正真度

No.	分析対象化合物	食品名	添加濃度 (ppm)	真度 (%)	Mt比	補正真度 (%)	備考
1	フルフェナセット	小麦	0.01	71.6	0.95	75.4	
2	代謝物W	小麦	0.01	80.1	0.88	91.0	
3	代謝物P1	小麦	0.01	96.5	0.97	99.5	
4	フルフェナセット	大豆	0.01	70.6	0.77	91.7	
5	代謝物W	大豆	0.01	89.2	0.94	94.9	
6	代謝物P1	大豆	0.01	97.0	0.98	99.0	
7	フルフェナセット	ばれいしょ	0.01	82.3	0.98	84.0	
8	代謝物W	ばれいしょ	0.01	81.5	0.93	87.6	
9	代謝物P1	ばれいしょ	0.01	84.1	0.92	91.4	
10	フルフェナセット	トマト	0.01	91.3	1.00	91.3	
11	代謝物W	トマト	0.01	85.1	0.92	92.5	
12	代謝物P1	トマト	0.01	88.1	0.88	100.1	
13	フルフェナセット	小麦	0.5	73.2	0.98	74.7	10倍希釈測定
14	代謝物W	小麦	0.5	93.3	1.01	92.4	10倍希釈測定
15	代謝物P1	小麦	0.5	91.6	0.99	92.5	10倍希釈測定
16	フルフェナセット	大豆	0.1	77.1	0.93	82.9	5倍希釈測定
17	代謝物W	大豆	0.1	86.4	0.98	88.2	5倍希釈測定
18	代謝物P1	大豆	0.1	88.7	0.95	93.4	5倍希釈測定
19	フルフェナセット	ばれいしょ	0.1	89.2	1.00	89.2	5倍希釈測定
20	代謝物W	ばれいしょ	0.1	91.9	0.99	92.8	5倍希釈測定
21	代謝物P1	ばれいしょ	0.1	92.7	0.99	93.6	5倍希釈測定
22	フルフェナセット	トマト	0.05	92.2	1.00	92.2	
23	代謝物W	トマト	0.05	87.8	0.94	93.4	
24	代謝物P1	トマト	0.05	86.3	0.92	93.8	
参考	フルフェナセット	小麦	0.01	78.3	0.88	89.0	メタノール洗い込み追加
参考	代謝物W	小麦	0.01	86.5	0.98	88.3	メタノール洗い込み追加
参考	代謝物P1	小麦	0.01	92.6	0.99	93.5	メタノール洗い込み追加
参考	フルフェナセット	小麦	0.5	89.4	0.98	91.2	メタノール洗い込み追加、10倍希釈測定
参考	代謝物W	小麦	0.5	93.2	0.99	94.1	メタノール洗い込み追加、10倍希釈測定
参考	代謝物P1	小麦	0.5	92.1	0.97	94.9	メタノール洗い込み追加、10倍希釈測定
参考	フルフェナセット	大豆	0.01	83.6	0.98	85.3	10倍希釈測定
参考	代謝物W	大豆	0.01	87.7	1.00	87.7	10倍希釈測定
参考	代謝物P1	大豆	0.01	87.6	1.12	78.2	10倍希釈測定

Mt比＝マトリックス添加標準のピーク面積／溶媒標準のピーク面積

補正真度＝真度／Mt比

#### 4. その他の試験法検討に関連する事項

##### (1) ガラス吸着の確認

アセトニトリルで調製した標準溶液で代謝物の減少が見られ、ガラスに吸着する可能性が考えられたことから、以下の実験を行った。

ガラス試験管にアセトニトリル 5 mL を入れ、20 mg/L メタノール溶液 10  $\mu$ L を加えてボルテックスミキサーで攪拌、10 分放置し、再度攪拌後、一部をガラスバイアルに移した (A)。残りの液を捨て、空になった試験管に 5 mL の目盛までメタノールを入れて 5 分放置後攪拌し、その一部をガラスバイアルに移した (B)。A と B をそれぞれ測定した結果、添加量に対する比率は、フルフェナセットは A ; 98%、B ; 1%、代謝物 W は A ; 63%、B ; 30%、代謝物 P1 は A ; 15%、B ; 81% となり、アセトニトリル溶液では代謝物がガラスに吸着することを裏付ける結果となった。なお、ガラスバイアルは不活化処理されているため、吸着が起きにくかったと考えられた。

##### (2) アセトン抽出での操作条件の検討

当初、アセトン抽出、溶媒転溶後に精製する方法を検討する予定だったが、後述の(4)溶媒転溶条件の検討で記載したとおり、転溶操作は *n*-ヘキサン、酢酸エチルともに代謝物の回収率が良好でなかった。ケイソウ土カラムを用いる方法も検討したが、別途脱脂操作を行うのは操作が煩雑になると考え、とりやめた。

次に、アセトン抽出後そのまま濃縮してアセトンを除き C18 ミニカラムに通液して精製する方法を検討した。大豆に一律基準濃度で標準溶液を添加、水 20 mL または 2 vol% ギ酸 20 mL を添加して 30 分放置後、アセトンで抽出、抽出液を 200 mL 定容し、その 20 mL を分取して減圧濃縮し約 2 mL とした。この液を、C18 ミニカラムカラム (メタノール、次いで水でコンディショニングしたもの) に通液して精製しようとしたが、目詰まりがひどく操作が困難だった。C18 ミニカラムにかえて HLB ミニカラム (メタノール、次いで 0.1 vol% ギ酸でコンディショニングしたもの) を用いたところ、C18 ミニカラムよりは操作性が良かったが、ミニカラム上の液面に油が浮いたままカラム内に入らない状況となった。加圧して油分を強制的にカラムに押し込んだが、こういった操作の違いで目的化合物の回収に差が生じることが懸念された。その後 HLB ミニカラムに 0.1 vol% ギ酸含有 [水及びメタノール (7 : 3) 混液] 10 mL を通液して捨て、通気して水分を除いた後、0.1 vol% ギ酸・メタノール溶液 15 mL で溶出し、溶出液を濃縮して 0.1 vol% ギ酸・メタノール溶液で 1 mL 定容して測定した。その結果を表 11 に示した。この結果から、この条件では精製が不十分と判断した。また、操作性もあまり良いとはいえず、他の方法を検討することとした。なお、この結果からは、抽出時の液性は中性・酸性のいずれが良好とも判断できなかった。

表 11 アセトン抽出—HLB ミニカラム精製の検討結果 (大豆)

抽出条件	フルフェナセット		代謝物 W		代謝物 P1	
	回収率%	Mt 比	回収率%	Mt 比	回収率%	Mt 比
中性条件	67.9	0.825	70.0	0.811	74.9	0.921
ギ酸酸性条件	81.1	0.953	60.8	0.746	73.3	0.889

Mt 比 = マトリックス添加標準のピーク面積 / 溶媒標準のピーク面積

##### (3) アセトニトリル抽出での操作条件の検討

表 2、表 3 及び前述のガラス吸着の確認結果から、アセトニトリル抽出では代謝物の回収に問題があると考えられたが、水との混液またはギ酸を含有する条件であれば回収できる可能性があったため、ギ酸酸性下アセトニトリルで抽出し、塩析で水を除いた後、C18 ミニカラム及び GC/PSA ミニカラムで精

製する方法（ばれいしょ及びトマトは C18 ミニカラムを省略）を検討した。

なお、個別の操作段階ごとの検討結果については後述する。

小麦及び大豆は 2 vol%ギ酸 20 mL を加えて 30 分放置後、ばれいしょ及びトマトは 20 vol%ギ酸 2 mL を加えた後に、アセトニトリルで抽出、抽出液を 100 mL とした。これを 20 mL 分取し、塩化ナトリウム 6 g 及び水 10 mL を加えて振とうし、分離した水層を捨て、アセトニトリル層を採った。小麦及び大豆は、C18 ミニカラム（アセトニトリルコンディショニング）にアセトニトリル層を全量注入し、0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液 5 mL で溶出、全溶出液に無水硫酸ナトリウムを加えて脱水した。ばれいしょ及びトマトはアセトニトリル層をそのまま脱水した。無水硫酸ナトリウムの洗浄には 0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液を用いた。その後、約 2 mL まで濃縮した。GC/PSA ミニカラム（アセトニトリルコンディショニング）にこの液を注入し、メタノール 6 mL、アンモニア水及びメタノール（1：99）混液 10 mL で順次溶出し、全溶出液を濃縮してメタノールで小麦及び大豆は 2 mL、ばれいしょ及びトマトは 4 mL とした。

大豆及びトマトのブランク試料について、アセトニトリル抽出液 20 mL に試料中 0.01 ppm 相当となるよう標準溶液を添加し、その後の操作を行い、精製効果を確認したところ、表 12 に示すとおり概ね良好な結果が得られた。

表 12 アセトニトリル抽出ー塩析・GC/PSA ミニカラム精製の検討結果

試料	フルフェナセット		代謝物 W		代謝物 P1	
	回収率%	Mt 比	回収率%	Mt 比	回収率%	Mt 比
大豆	77.7	0.987	90.6	1.04	92.5	1.14
トマト	105	0.840	85.9	1.03	106	0.974

Mt 比＝マトリックス添加標準のピーク面積／溶媒標準のピーク面積

その後、この方法で添加回収試験を行った結果、フルフェナセットについては、真度 73.9～89.7%と概ね良好であった。代謝物 W については、ばれいしょの基準値濃度添加で 72.9%と目標値の 70～120%を満足したが、その他は 41.8～68.4%と低い値であった。代謝物 P1 については、ばれいしょの基準値濃度添加で 79.8%、トマトの基準値濃度添加で 72.3%、一律基準濃度添加で 72.0%と目標値の 70～120%を満足したが、その他は 53.7～64.6%と低い値であった。表 12 の結果とこの結果から、アセトニトリルによる抽出操作自体に問題があると考えられた。

#### (4) 溶媒転溶条件の検討

表 13 に示す条件で、各化合物の 2 mg/L メタノール溶液 0.1 mL を塩化ナトリウム溶液に添加して 10 分間振とう抽出を行い、有機層をそれぞれ無水硫酸ナトリウムで脱水後にギ酸 1 滴を加えて濃縮、溶媒を除去した後に水及びメタノール（1：1）混液に溶解して測定した。

結果を表 13 に示した。検討したいずれの条件でも代謝物 P1 については良好な回収率が得られなかった。

次に、ケイソウ土カラムを介して溶媒を換える方法を検討した。水 4 mL に、各化合物の 0.4 mg/L 0.1 vol%ギ酸・アセトン溶液 0.1 mL を加え、塩化ナトリウム 1 g を混ぜたものを、5 mL 保持用のケイソウ土カラムに負荷、10 分間放置後、0.1 vol%ギ酸・酢酸エチル溶液で溶出させ、溶出液を濃縮してメタノール定容して測定した。その結果、0.1 vol%ギ酸・酢酸エチル溶液 20 mL で各化合物とも概ね溶出できることがわかった。さらに、ケイソウ土カラムを用いて、先に *n*-ヘキサンを通液し試料の脱脂を行った後に 0.1 vol%ギ酸・酢酸エチル溶液で目的化合物を溶出させる方法を検討したが、フルフェナセットは *n*-ヘキサンで溶出されることがわかり、同時に脱脂を行うのは不可能と判断した。

表 13 溶媒転溶条件の検討結果

(回収率%)

溶媒転溶条件	フルフェナセット	代謝物 W	代謝物 P1
10 w/v%塩化ナトリウム溶液 20 mL 酢酸エチル 20 mL で 1 回抽出	101	1	0
10 w/v%塩化ナトリウム溶液 20 mL +りん酸 1 mL <i>n</i> -ヘキサン 20 mL で 2 回抽出	1 回目 87 2 回目 0 計 87	1 回目 0 2 回目 0 計 0	1 回目 0 2 回目 0 計 0
10 w/v%塩化ナトリウム溶液 20 mL +りん酸 1 mL 酢酸エチル 20 mL で 2 回抽出	1 回目 92 2 回目 0 計 92	1 回目 89 2 回目 1 計 90	1 回目 48 2 回目 10 計 58
飽和塩化ナトリウム溶液 20 mL +りん酸 1 mL 酢酸エチル 20 mL で 2 回抽出	1 回目 98 2 回目 0 計 98	1 回目 76 2 回目 0 計 76	1 回目 36 2 回目 6 計 42
10 w/v%塩化ナトリウム溶液 20 mL +1 mol/L 塩酸 0.2 mL 酢酸エチル 20 mL で 2 回抽出	1 回目 98 2 回目 0 計 98	1 回目 87 2 回目 4 計 91	1 回目 43 2 回目 9 計 52
飽和塩化ナトリウム溶液 20 mL +1 mol/L 塩酸 0.2 mL 酢酸エチル 20 mL で 2 回抽出	1 回目 98 2 回目 0 計 98	1 回目 82 2 回目 0 計 82	1 回目 14 2 回目 0 計 14

## (5) 塩析条件の検討

試料をアセトニトリル抽出し、抽出液を分取して塩析により水を除去することを想定して検討した。

試料のアセトニトリル抽出液にかえて、アセトニトリル及び水 (4 : 1) 混液 20 mL またはアセトニトリル及び 2 vol% ギ酸 (4 : 1) 混液 20 mL に、各化合物の 20 mg/L メタノール溶液 10 µL を添加し、表 14 に示した条件で塩析を行った。アセトニトリル層をそれぞれ濃縮し、メタノールで定容して測定した。

結果を表 14 に示した。フルフェナセットは各条件とも良好に回収できたが、中性条件では代謝物はほとんど回収されなかった。酸性条件では代謝物も回収できたが、水分が多いと回収率が低下する可能性があると思われる、抽出液 20 mL に対し水 10 mL 及び塩化ナトリウム 6 g 添加の条件が良好と判断した。

表 14 塩析条件の検討結果

(回収率%)

塩析条件	フルフェナセット	代謝物 W	代謝物 P1
アセトニトリル及び水 (4:1) 混液 20 mL +水 20 mL+NaCl 10 g	101	6	2
アセトニトリル及び 2 vol% ギ酸 (4:1) 混液 20 mL+水 20 mL+NaCl 10 g	104	96	92
アセトニトリル及び 2 vol% ギ酸 (4:1) 混液 20 mL+水 10 mL+NaCl 6 g	105	103	100
アセトニトリル及び 2 vol% ギ酸 (4:1) 混液 20 mL+水 5 mL+NaCl 4 g	100	98	98

## (6) 脱脂方法の検討

アセトニトリル/ヘキサン分配による脱脂について検討した。試料のアセトニトリル抽出液を分取してそのまま脱脂操作を行うことを想定し、水分が共存する条件で検討した。

水 5 mL に各化合物の 20 mg/L メタノール溶液 10  $\mu$ L を添加した後、*n*-ヘキサン 30 mL を加え、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL を加えて 10 分間振とう抽出し、アセトニトリル層を分取した後、*n*-ヘキサン層に再度 *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL を加えて 10 分間振とう抽出した。水 5 mL にかえて 2 vol% ギ酸 5 mL を用いて同様に操作した場合についても検討した。各アセトニトリル層を濃縮し、メタノール定容して測定した。

結果を表 15 に示した。1 回の分配ではフルフェナセットの回収率がやや低いですが、2 回の分配で各化合物とも概ね回収できると考えられた。

表 15 アセトニトリル/ヘキサン分配の検討結果 (回収率%)

	フルフェナセット	代謝物 W	代謝物 P1
中性条件	1 回目 87	1 回目 91	1 回目 93
	2 回目 5	2 回目 0	2 回目 0
	計 92	計 91	計 93
ギ酸酸性条件	1 回目 90	1 回目 94	1 回目 95
	2 回目 5	2 回目 1	2 回目 1
	計 95	計 95	計 96

#### (7) カラム精製の検討

各種ミニカラムを用いて、各化合物の溶出挙動を調べ、精製条件を検討した。

結果を表 16~23 に示した。

C18 ミニカラムでは、表 16 の結果をもとに、アセトン抽出あるいはアセトニトリル抽出後の精製条件を検討した。表 16 に示したとおり、標準溶液では 0.1 vol% ギ酸・アセトニトリル溶液で代謝物の溶出が十分でなかったが、試料抽出液を通液した場合は 0.1 vol% ギ酸・アセトニトリル溶液 5 mL で代謝物も概ね良好に溶出できた。

GC/PSA ミニカラムでは、表 17 に示したとおり、水及びメタノール (1 : 2) 混液 40 mL で各化合物とも流出せず保持されることから、試料のメタノール抽出液をそのまま水で希釈して GC/PSA ミニカラムに注入して精製する方法も検討した。大豆のメタノール抽出液 (この検討では 10 g をメタノール抽出し 100 mL 定容したもの) 20 mL に水 10 mL を加えて混合し、全量を GC/PSA ミニカラムに注入、アンモニア水及びメタノール (1 : 99) 混液で溶出する方法を試みたが、3 化合物ともほとんど回収できなかった。抽出液 10 mL に 0.1 vol% ギ酸 5 mL を加えて注入する方法に変えたところ、フルフェナセットは約 80%、代謝物 W 及び代謝物 P1 は約 30% の回収率となった。抽出液中に共存する物質の影響で、各化合物がミニカラムに保持されにくくなったものと考えられた。

HLB ミニカラム (表 18)、WAX ミニカラム (表 19)、シリカゲルミニカラム (表 21)、SAX ミニカラム (表 22) では、フルフェナセットと代謝物の挙動が異なり、これらを同時に回収できる条件では精製効果が十分でないと考えられた。WAX ミニカラムを用いて、大豆のメタノール抽出液について、水及びメタノール (1 : 1) 混液で洗浄、アンモニア水及びメタノール (1 : 99) 混液で溶出させる方法を試行したが、着色や濁りが除去できなかった。

MAX ミニカラム (表 20) では、代謝物 W を溶出できなかった。グラファイトカーボンミニカラム (表 23) については、参考として掲載した。

表 16 C18 ミニカラムからの各化合物の溶出状況 (回収率%)

溶出条件	フルフェ ナセット	代謝物 W	代謝物 P1
(アセトニトリルでコンディショニング、2.5 mg/L 0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液 0.1 mL 負荷)			
0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液 0- 5 mL	97	0	0
5-10 mL	0	2	6
10-15 mL	0	5	15
15-20 mL	0	6	14
20-25 mL	0	6	10
25-30 mL	0	5	8
計	97	24	53
(アセトニトリルでコンディショニング、2.5 mg/L 0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液 0.1 mL 負荷)			
0.1 vol%ギ酸・[アセトニトリル/水 (9:1)] 溶液 0- 5 mL	93	60	132
5-10 mL	1	35	1
10-15 mL	0	6	0
15-20 mL	0	3	0
20-25 mL	0	2	0
25-30 mL	0	1	0
計	94	107	133
(メタノール→2 vol%ギ酸でコンディショニング、20 mg/L メタノール溶液 10 μL 負荷)			
アセトン/2 vol%ギ酸 (1:5) 0- 6 mL	0	0	0
水 0- 4 mL	0	0	0
メタノール 0- 3 mL	97	86	93
計	97	86	3

表 17 GC/PSA ミニカラムからの各化合物の溶出状況 (回収率%)

溶出条件	フルフェ ナセット	代謝物 W	代謝物 P1
(アンモニア水/[アセトニトリル/トルエン (3:1)] (1:99) でコンディショニング、20 mg/L メタノール溶液 10 μL 負荷)			
アンモニア水/[アセトニトリル/トルエン (3:1)] (1:99) 0- 5 mL	97	0	0
5-20 mL	0	0	0
計	97	0	0
(メタノール→水/メタノール (1:2) でコンディショニング、20 mg/L メタノール溶液 10 μL 負荷)			
水/メタノール (1:2) 0-40 mL	0	0	0
アンモニア水/メタノール (1:99) 0- 5 mL	108	98	105
計	108	98	105

表 18 HLB ミニカラムからの各化合物の溶出状況

(回収率%)

溶出条件	フルフェ ナセット	代謝物 W	代謝物 P1
(アセトニトリル→0.1 vol%ギ酸・[アセトニトリル/水 (1:9)] 溶液でコンディショニング、20 mg/L メタノール溶液 10 μL 負荷)			
0.1 vol%ギ酸・[アセトニトリル/水 (1:9)] 溶液 0-20 mL	0	0	0
0.1 vol%ギ酸・[アセトニトリル/水 (1:1)] 溶液 0- 5 mL	0	102	102
5-10 mL	58	1	0
10-15 mL	40	0	0
15-20 mL	1	0	0
計	99	103	102
(メタノール→水でコンディショニング、20 mg/L メタノール溶液 10 μL 負荷)			
水 0-10 mL	0	0	0
水/メタノール (9:1) 0- 5 mL	0	0	0
5-10 mL	0	11	0
水/メタノール (7:3) 0- 5 mL	0	80	85
5-10 mL	0	1	10
水/メタノール (1:1) 0-10 mL	0	0	1
水/メタノール (3:7) 0-10 mL	0	0	0
水/メタノール (1:9) 0- 5 mL	88	0	0
5-10 mL	15	0	0
計	103	92	96
(メタノール→水でコンディショニング、2 mg/L メタノール溶液 100 μL 負荷)			
0.1 vol%ギ酸・[水/メタノール (7:3)] 溶液 0-10 mL	0	0	0
0.1 vol%ギ酸・[水/メタノール (1:1)] 溶液 0- 5 mL	0	0	0
5-10 mL	0	36	4
0.1 vol%ギ酸・[水/メタノール (3:7)] 溶液 0- 5 mL	0	60	91
5-10 mL	0	1	2
0.1 vol%ギ酸・[水/メタノール (1:9)] 溶液 0- 5 mL	81	1	1
5-10 mL	8	0	0
0.1 vol%ギ酸・メタノール溶液 0- 5 mL	4	0	0
5-10 mL	1	0	0
計	94	98	98

表 19 WAX ミニカラムからの各化合物の溶出状況 (回収率%)

溶出条件		フルフェ ナセット	代謝物 W	代謝物 P1
(メタノール→水でコンディショニング、20 mg/L メタノール溶液 10 µL 負荷)				
水	0-10 mL	0	0	0
水/メタノール (1:1)	0-10 mL	0	0	0
メタノール	0- 5 mL	93	0	0
計		93	0	0
(メタノール→アンモニア水/水 (1:49) でコンディショニング、20 mg/L メタノール溶液 10 µL 負荷)				
アンモニア水/水 (1:49)	0- 5 mL	0	1	0
	5-10 mL	0	1	0
アンモニア水/ [水/メタノール (1:1)] (1:49)	0- 5 mL	0	74	80
	5-10 mL	0	0	0
アンモニア水/メタノール (1:49)	0- 5 mL	82	0	0
計		82	76	80
(メタノール→水でコンディショニング、20 mg/L メタノール溶液 10 µL 負荷)				
水/メタノール (1:1)	0-10 mL	0	0	0
アンモニア水/メタノール (1:49)	0- 5 mL	89	88	87
計		89	88	87

表 20 MAX ミニカラムからの各化合物の溶出状況 (回収率%)

溶出条件		フルフェ ナセット	代謝物 W	代謝物 P1
(メタノール→水でコンディショニング、20 mg/L メタノール溶液 10 µL 負荷)				
水	0-10 mL	0	0	0
水/メタノール (1:1)	0-10 mL	0	0	0
メタノール	0-10 mL	84	0	0
計		84	0	0
(メタノール→2 vol%ギ酸でコンディショニング、20 mg/L メタノール溶液 10 µL 負荷)				
2 vol%ギ酸	0-10 mL	0	0	0
2 vol%ギ酸・[水/メタノール (1:1)] 溶液	0-10 mL	0	0	0
2 vol%ギ酸・メタノール溶液	0-10 mL	86	0	92
計		86	0	92
(メタノール→アンモニア水/水 (1:49) でコンディショニング、20 mg/L メタノール溶液 10 µL 負荷)				
アンモニア水/水 (1:49)	0-10 mL	0	0	0
アンモニア水/ [水/メタノール (1:1)] (1:49)	0-10 mL	0	0	0
アンモニア水/メタノール (1:49)	0-10 mL	17	0	0
計		17	0	0

表 21 シリカゲルミニカラムからの各化合物の溶出状況 (回収率%)

溶出条件	フルフェ ナセット	代謝物 W	代謝物 P1
(n-ヘキサンでコンディショニング、0.4 mg/L 0.1 vol%ギ 酸・アセトン溶液 0.1 mL 負荷)			
0.1vol%ギ酸・[アセトン/n-ヘキサン(1:9)] 溶液 0- 5 mL	7	0	0
5-10 mL	96	0	0
10-30 mL	0	0	0
計	103	0	0
(0.1vol%ギ酸・酢酸エチル溶液でコンディショニング、 0.4 mg/L 0.1 vol%ギ酸・アセトン溶液 0.1 mL 負荷)			
0.1vol%ギ酸・酢酸エチル溶液 0- 5 mL	98	0	0
5-10 mL	0	0	0
0.1vol%ギ酸・[アセトン/酢酸エチル(1:1)] 溶液 0- 5 mL	0	0	0
5-10 mL	0	0	0
0.1vol%ギ酸・アセトン溶液 0- 5 mL	0	0	2
5-10 mL	0	0	39
0.1vol%ギ酸・[アセトン/メタノール(1:1)] 溶液 0- 5 mL	0	96	54
5-10 mL	0	2	1
計	98	98	96

表 22 SAX ミニカラムからの各化合物の溶出状況 (回収率%)

溶出条件	フルフェ ナセット	代謝物 W	代謝物 P1
(n-ヘキサンでコンディショニング、20 mg/L メタノ ール溶液 10 µL 負荷)			
アセトン/n-ヘキサン (1:9) 0- 5 mL	96	0	0
アセトン 0- 5 mL	0	0	0
メタノール 0- 5 mL	0	0	0
アンモニア水/メタノール (1:99) 0- 4 mL	0	93	89
計	96	93	89

表 23 グラファイトカーボンミニカラムからの各化合物の溶出状況 (回収率%)

溶出条件	フルフェ ナセット	代謝物 W	代謝物 P1
(0.1vol%ギ酸・アセトン溶液でコンディショニング、0.4 mg/L 0.1 vol%ギ酸・アセトン溶液 0.1 mL 負荷)			
0.1vol%ギ酸・アセトン溶液 0- 5 mL	97	34	90
5-10 mL	0	36	6
10-15 mL	0	11	1
15-20 mL	0	4	0
20-25 mL	0	2	0
25-30 mL	0	2	0
計	97	89	97

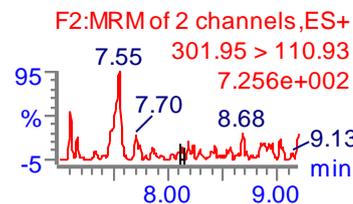
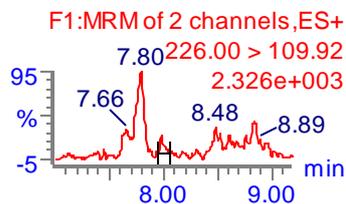
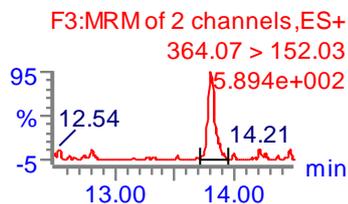
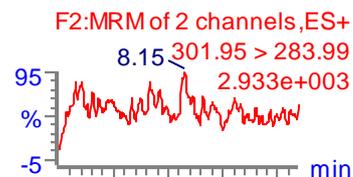
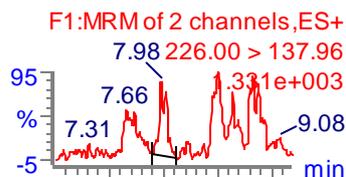
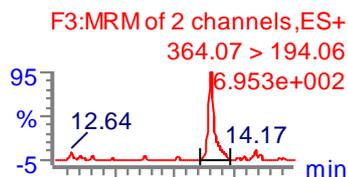
## 5. 考察

フルフェナセット及びその代謝物について、真度、併行精度とも良好な結果が得られており、今回開発した試験法が有用と考えられた。ただし、小麦については、精製前の濃縮時に析出物があり、C18 ミニカラムへ注入する際の洗い込みの手法によって回収率に差が生じることが懸念された。また、大豆のフルフェナセットについては、マトリックスの影響で真度が低めとなると考えられ、さらに希釈した方が良好な結果が得られた。

各化合物の定量限界については、0.01 ppm 添加時の真度、併行精度が評価基準に適合し、かつ、S/N 比 10 以上が得られたことから、0.01 ppm を定量限界として設定可能と判断した。

### 【結論】

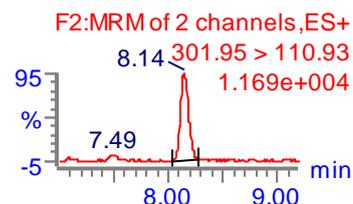
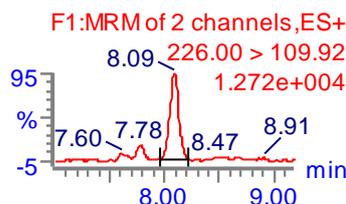
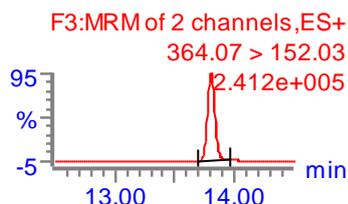
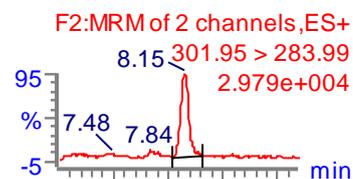
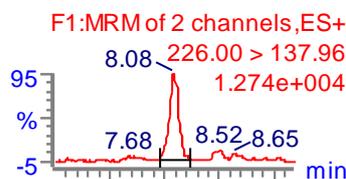
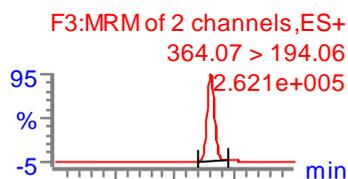
農産物中のフルフェナセット及びその代謝物の分析法として、各化合物を試料からメタノールで抽出し、C18 ミニカラム及び GC/PSA ミニカラムで精製し、LC-MS/MS で定量及び確認する方法を開発した。開発した試験法を小麦、大豆、ばれいしょ及びトマトの 4 食品に適用した結果、フルフェナセットの真度は 70.6~92.2%、代謝物 W の真度は 80.1~93.3%、代謝物 P1 の真度は 84.1~97.0%であり、概ね良好な結果が得られた。また、定量限界として、0.01 ppm を設定可能であることが確認された。



ブランク試料

ブランク試料

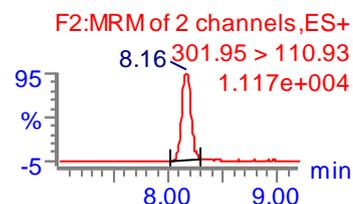
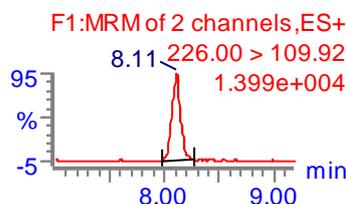
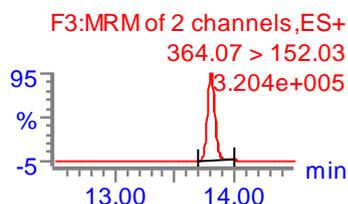
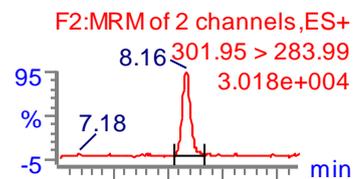
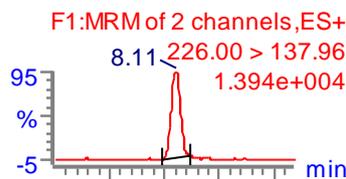
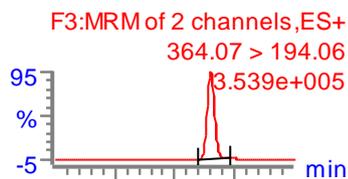
ブランク試料



添加試料

添加試料

添加試料



標準溶液

標準溶液

標準溶液

フルフェナセット

上 (定量)  $m/z$  364→194

下 (定性)  $m/z$  364→152

代謝物 W

上 (定量)  $m/z$  226→138

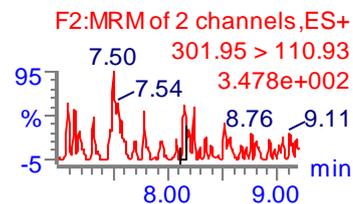
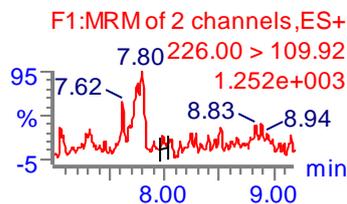
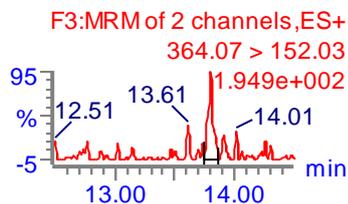
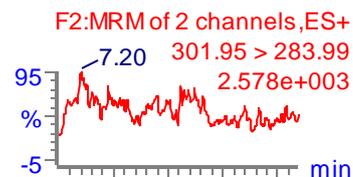
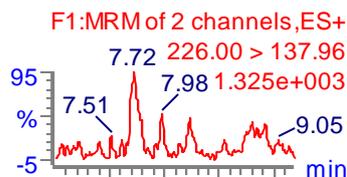
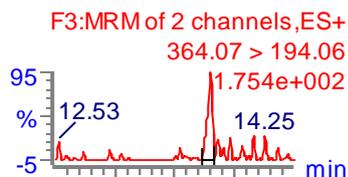
下 (定性)  $m/z$  226→110

代謝物 P1

上 (定量)  $m/z$  302→284

下 (定性)  $m/z$  302→111

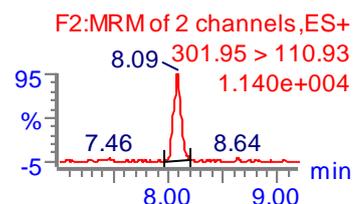
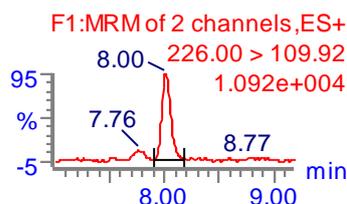
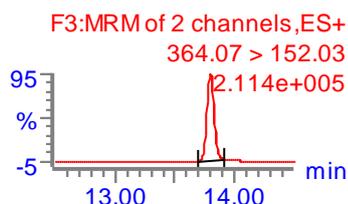
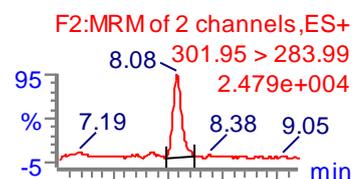
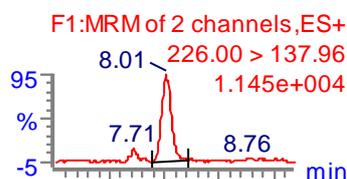
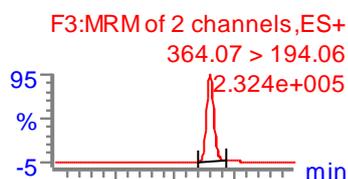
図4 小麦のクロマトグラム 試料中 0.01 ppm 相当



ブランク試料

ブランク試料

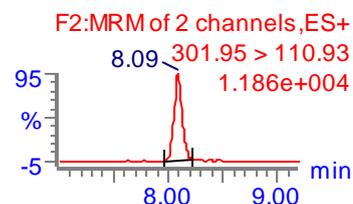
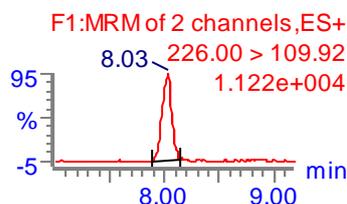
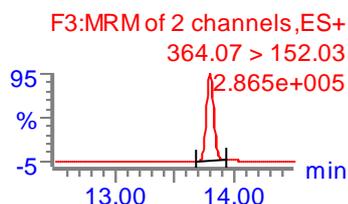
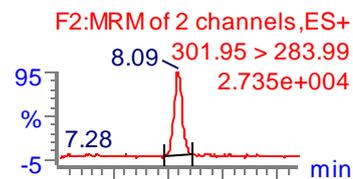
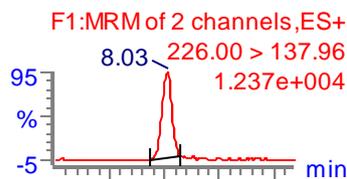
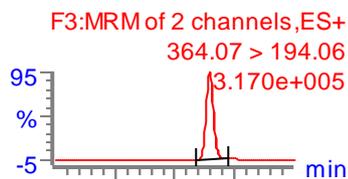
ブランク試料



添加試料

添加試料

添加試料



標準溶液

標準溶液

標準溶液

フルフェナセット

上 (定量)  $m/z$  364→194

下 (定性)  $m/z$  364→152

代謝物 W

上 (定量)  $m/z$  226→138

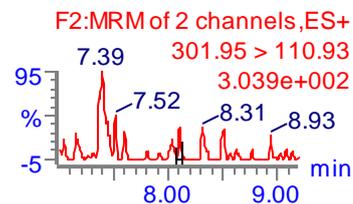
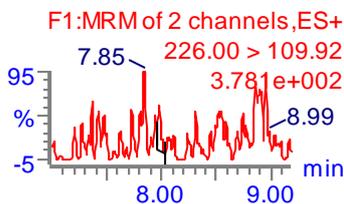
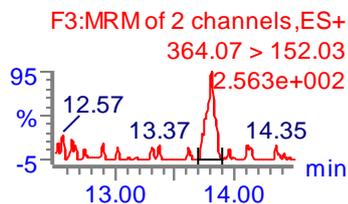
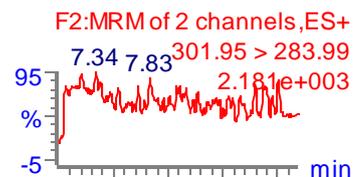
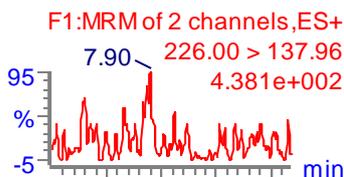
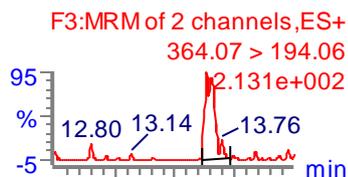
下 (定性)  $m/z$  226→110

代謝物 P1

上 (定量)  $m/z$  302→284

下 (定性)  $m/z$  302→111

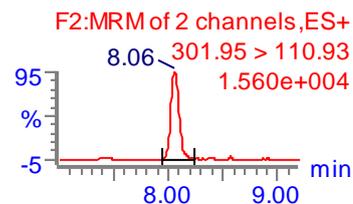
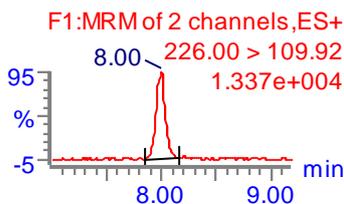
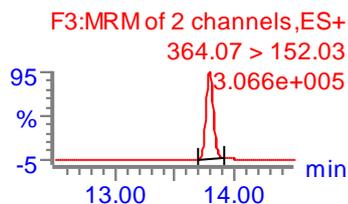
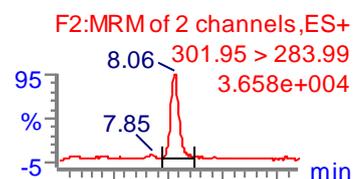
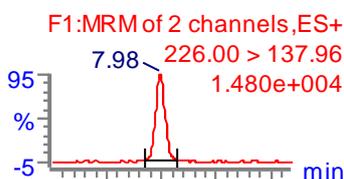
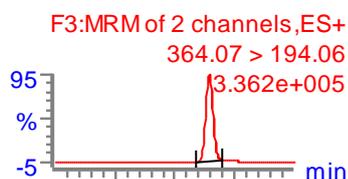
図5 大豆のクロマトグラム 試料中 0.01 ppm 相当



ブランク試料

ブランク試料

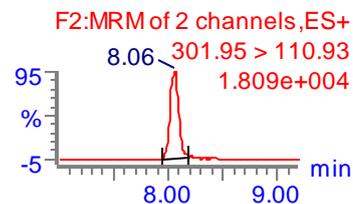
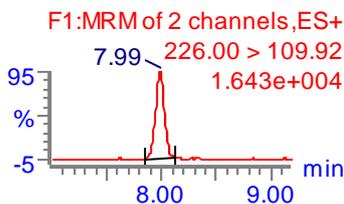
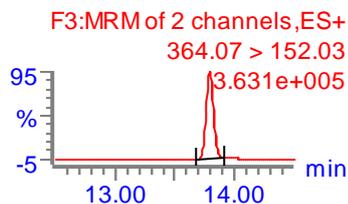
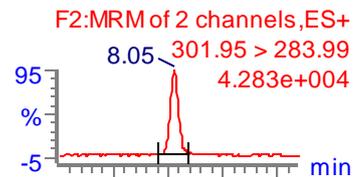
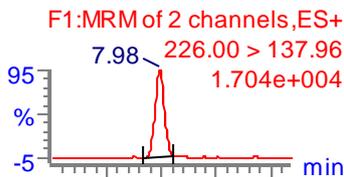
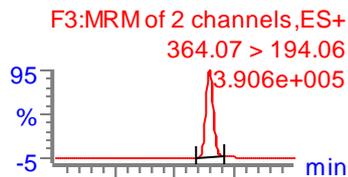
ブランク試料



添加試料

添加試料

添加試料



標準溶液

標準溶液

標準溶液

フルフェナセット

上 (定量)  $m/z$  364→194

下 (定性)  $m/z$  364→152

代謝物 W

上 (定量)  $m/z$  226→138

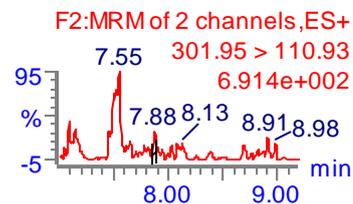
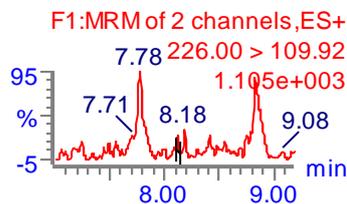
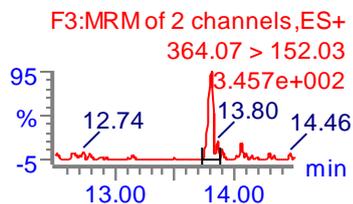
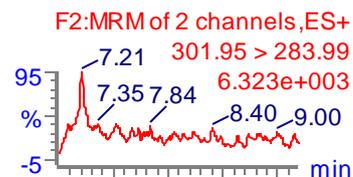
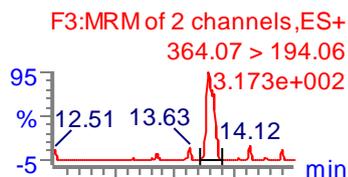
下 (定性)  $m/z$  226→110

代謝物 P1

上 (定量)  $m/z$  302→284

下 (定性)  $m/z$  302→111

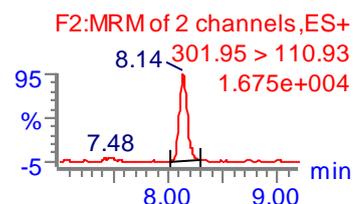
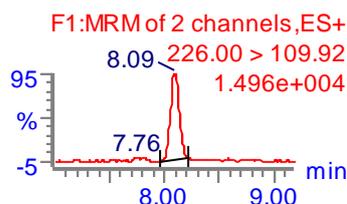
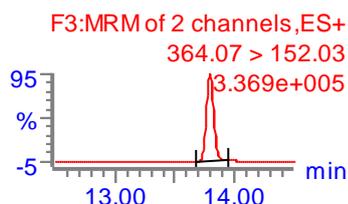
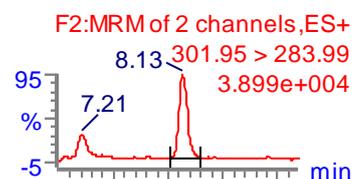
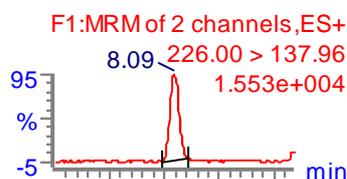
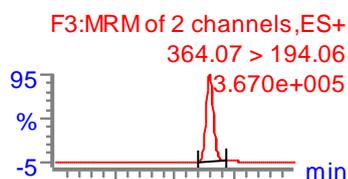
図6 ばれいしょのクロマトグラム 試料中 0.01 ppm 相当



ブランク試料

ブランク試料

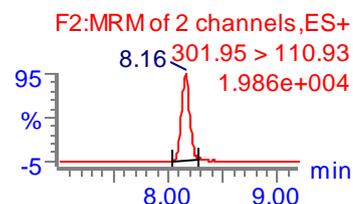
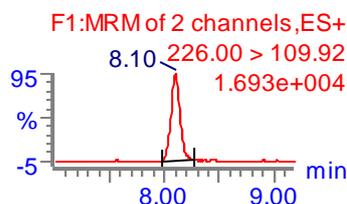
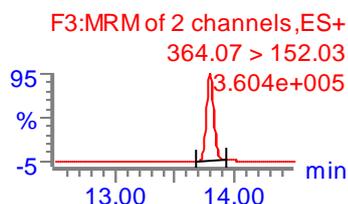
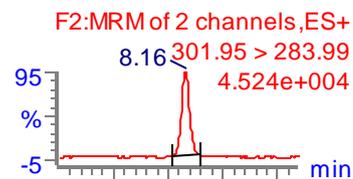
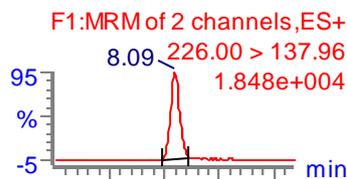
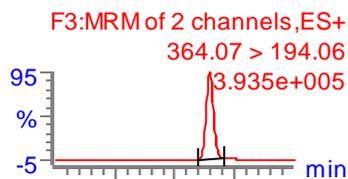
ブランク試料



添加試料

添加試料

添加試料



標準溶液

標準溶液

標準溶液

フルフェナセット

上 (定量)  $m/z$  364→194

下 (定性)  $m/z$  364→152

代謝物 W

上 (定量)  $m/z$  226→138

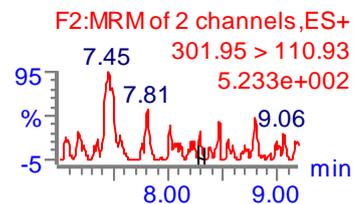
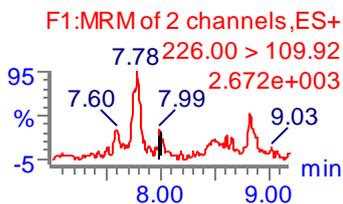
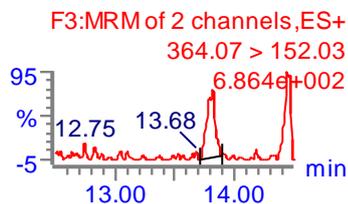
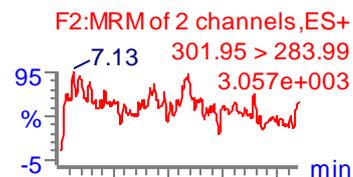
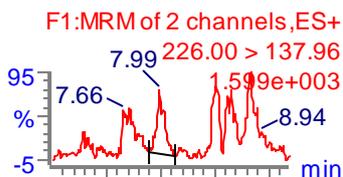
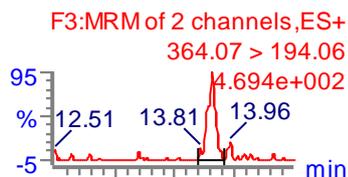
下 (定性)  $m/z$  226→110

代謝物 P1

上 (定量)  $m/z$  302→284

下 (定性)  $m/z$  302→111

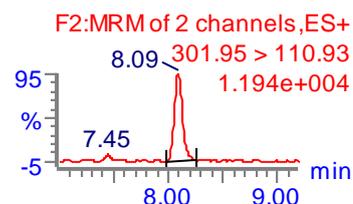
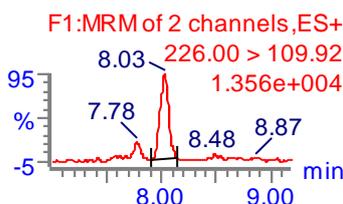
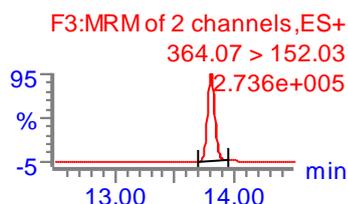
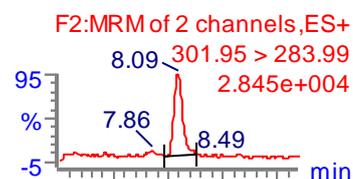
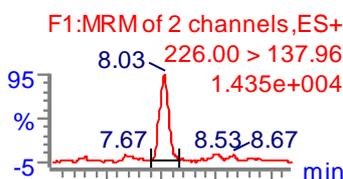
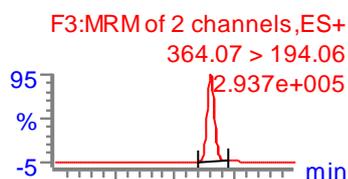
図7 トマトのクロマトグラム 試料中 0.01 ppm 相当



ブランク試料

ブランク試料

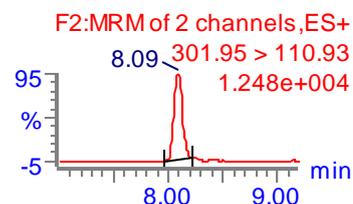
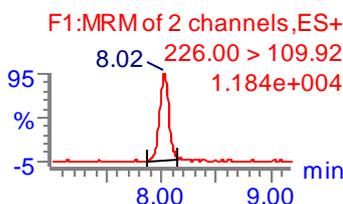
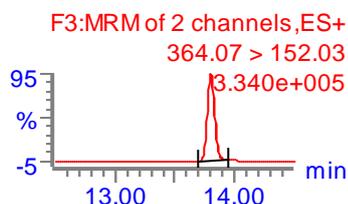
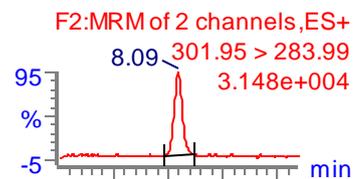
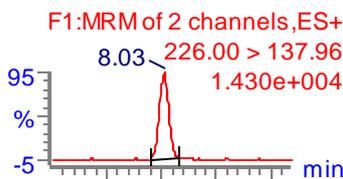
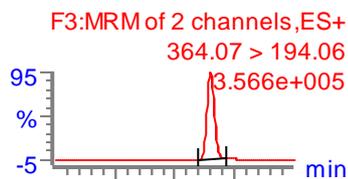
ブランク試料



添加試料

添加試料

添加試料



標準溶液

標準溶液

標準溶液

フルフェナセット

上 (定量)  $m/z$  364→194

下 (定性)  $m/z$  364→152

代謝物 W

上 (定量)  $m/z$  226→138

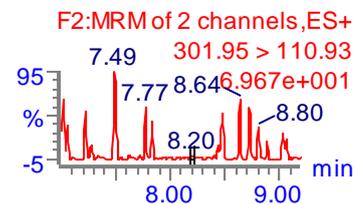
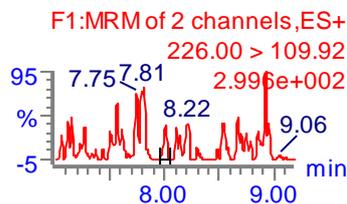
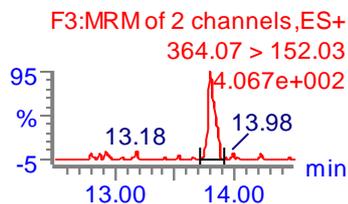
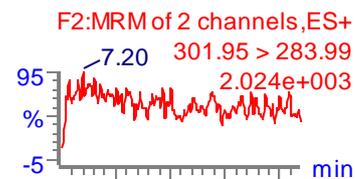
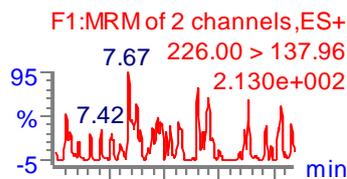
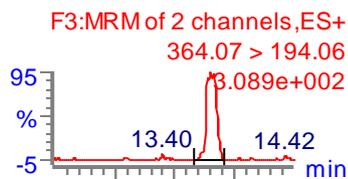
下 (定性)  $m/z$  226→110

代謝物 P1

上 (定量)  $m/z$  302→284

下 (定性)  $m/z$  302→111

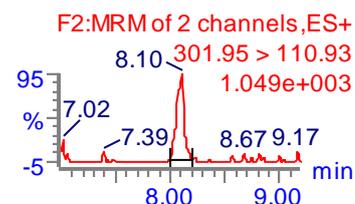
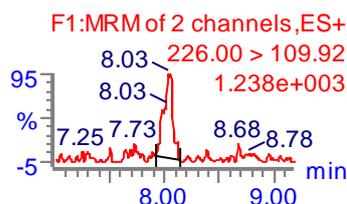
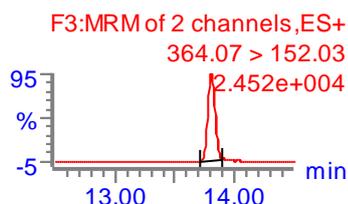
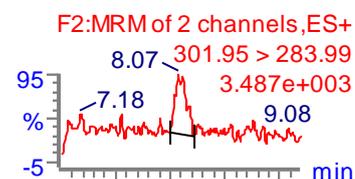
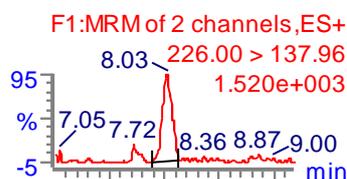
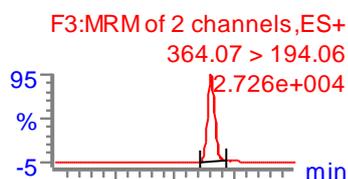
図 8 (参考) 小麦のクロマトグラム ; メタノール洗い込み追加の場合 試料中 0.01 ppm 相当



ブランク試料

ブランク試料

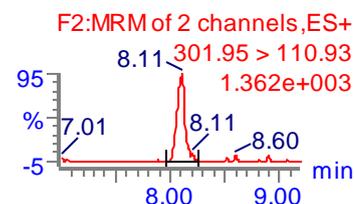
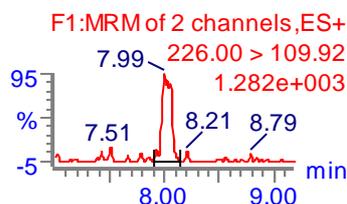
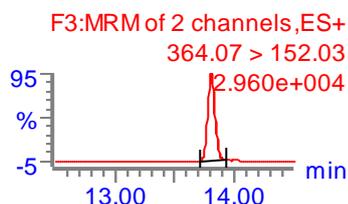
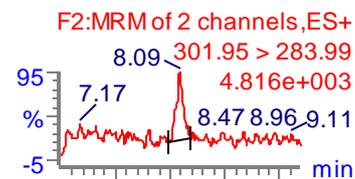
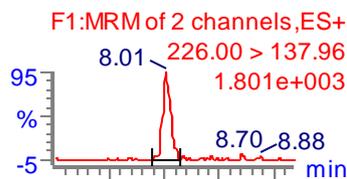
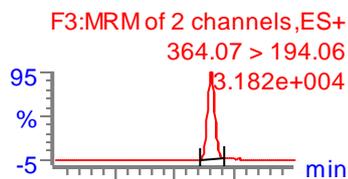
ブランク試料



添加試料

添加試料

添加試料



標準溶液

標準溶液

標準溶液

フルフェナセット

上 (定量)  $m/z$  364→194

下 (定性)  $m/z$  364→152

代謝物 W

上 (定量)  $m/z$  226→138

下 (定性)  $m/z$  226→110

代謝物 P1

上 (定量)  $m/z$  302→284

下 (定性)  $m/z$  302→111

図9 (参考) 大豆のクロマトグラム ; 10倍希釈測定 試料中 0.01 ppm 相当

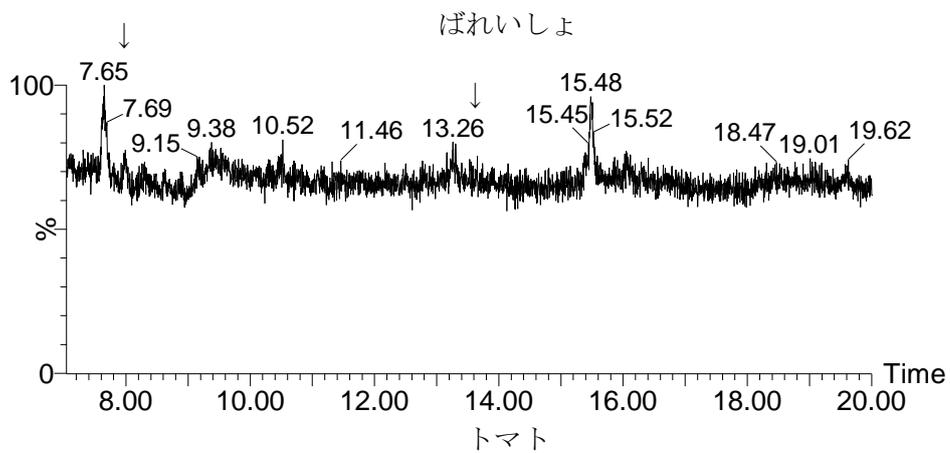
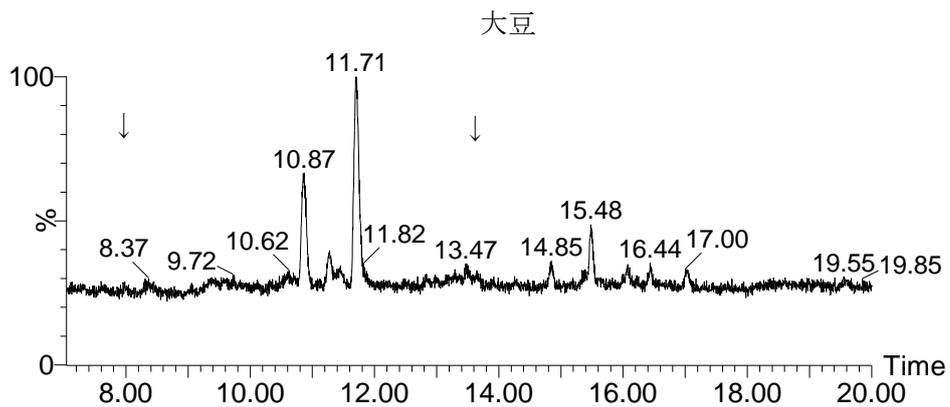
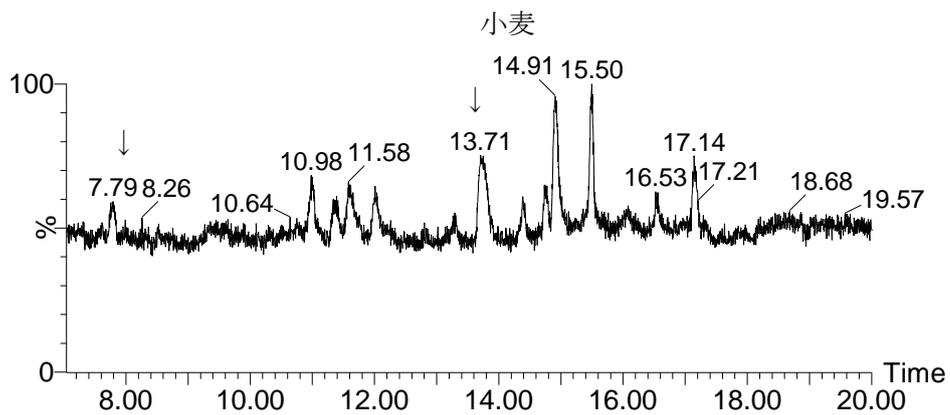
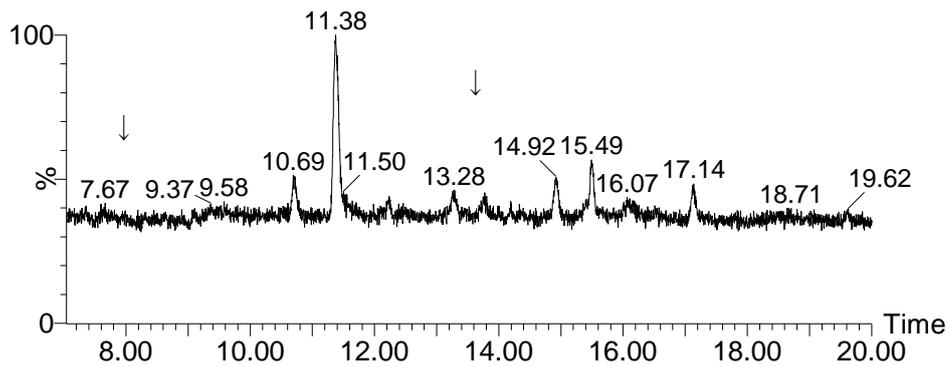
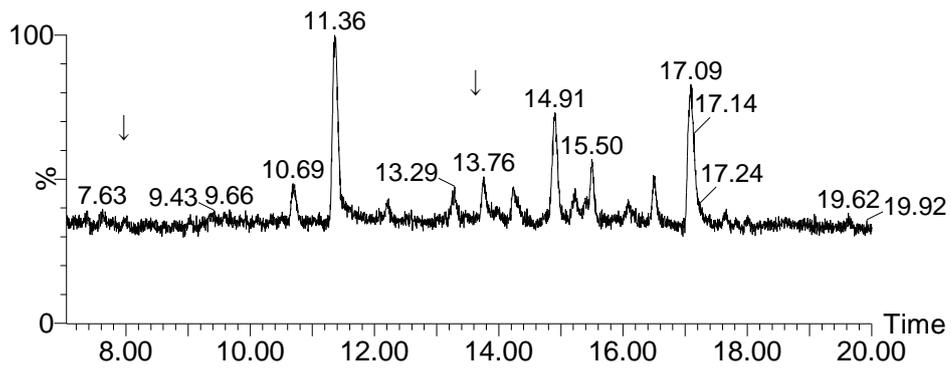


図 10 ブランク試料のトータルイオンクロマトグラム  
(スキャン範囲：50～1000 amu、CV=10 V)



小麦；メタノール洗い込み追加の場合

図 11 (参考) ブランク試料のトータルイオンクロマトグラム  
(スキャン範囲：50～1000 amu、CV=10 V)