

※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ください。

平成２８年度

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

ノルフルラゾン試験法（農産物）

ノルフルラゾン試験法（農産物）の検討結果

【緒言】

1. 目的

ノルフルラゾンはサンド社（現：シンジェンタ社）によって開発されたピリダジノン系除草剤であり、根から吸収されてカロテノイド生成を抑制することにより、除草作用を示すと考えられている。米国及び豪州で果実、豆類、わた等を対象に登録されているが、我が国では農薬として登録されていない。ポジティブリスト制度が導入されたことに伴い、基準値がらっかせい、アスパラガス、オレンジ等の果実、アーモンド等の種実類、ホップ及びその他のスパイスに 0.05～3 ppm 設定された。農薬評価書ではノルフルラゾンの一日摂取許容量を 0.015 mg/kg 体重/日と設定している¹⁾。

分析法として通知一斉試験法〔GC/MS による農薬等の一斉試験法 I（農産物）〕の適用が検討されており、ノルフルラゾンの平均回収率の中央値が 119%と良好な結果が得られている²⁾。そこで、〔GC/MS による農薬等の一斉試験法 I（農産物）〕及び〔LC/MS による農薬等の一斉試験法 I（農産物）〕が代謝物 B を含めた一律基準 0.01 ppm に適用できるか検討を行った。

2. 分析対象化合物の構造式及び物理化学的性質

(1) 分析対象化合物

① ノルフルラゾン

和名：ノルフルラゾン

英名：Norflurazon

分子式： $C_{12}H_9ClF_3N_3O$

分子量：303.668

CAS No.：27314-13-2

CAS 名

和名：4-クロロ-5-(メチルアミノ)-2-[3-(トリフルオロメチル)フェニル]-3(2H)-ピリダジノン

英名：4-chloro-5-(methylamino)-2-[3-(trifluoromethyl)phenyl]-3(2H)-pyridazinone

IUPAC 名

和名：4-クロロ-5-メチルアミノ-2-(α,α,α -トリフルオロ-*m*-トリル)ピリダジン-3(2H)-オン

英名：4-chloro-5-methylamino-2-(α,α,α -trifluoro-*m*-tolyl)pyridazin-3(2H)-one

外観 白色結晶性粉末

融点 174 – 180℃

蒸気圧 3.857×10^{-3} mPa (25℃)

1-オクタノール/水分配係数 (log Pow)

logPow = 2.45(pH6.5)

ヘンリー定数 3.5×10^{-5} Pa m³mol⁻¹

水溶解 34 mg/L(25℃)

有機溶媒溶解度

アセトン 50 g/L (20-25℃)

エタノール 142 g/L (20-25℃)

キシレン 2.5 g/L (20-25℃)

安定性

水溶液 (50℃) 8%損失 24 日

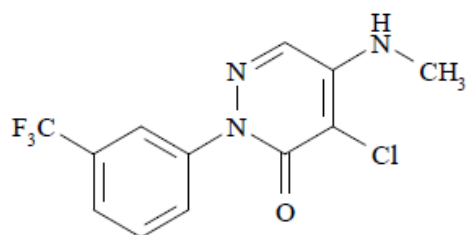
20℃で 4 年間安定

太陽光で分解

解離定数

pH 1～12 で解離しない (25℃)

構造式



②代謝物 B

和名 : 脱メチルノルフルラゾン

英名 : Desmethyl norflurazon

分子式 : $C_{11}H_7ClF_3N_3O$

分子量 : 289.641

CAS NO. : 23576-24-1

CAS 名

和名 : 4-クロロ-5-アミノ-2-(α,α,α -(トリフルオロ-*m*-トリル)-3(2*H*))-ピリダジノン

英名 : 4-chloro-5-(amino)-2-(α,α,α -trifluoro-*m*-tolyl)-3-(2*H*)-pyridazinone

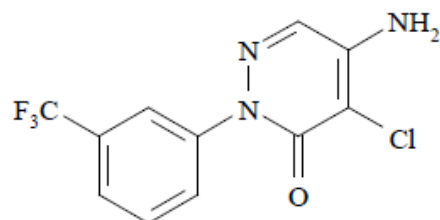
IUPAC 名

和名 : 4-クロロ-5-アミノ-2-[3-(トリフルオロメチル)フェニル]ピリダジン-3(2*H*)-オン

英名 : 4-Chloro-5-amino-2-[3-(trifluoromethyl)phenyl]pyridazine-3(2*H*)-one;

外観 白色結晶性粉末

構造式



[出典]

①農薬評価書 ノルフルラゾン, 2010 年 9 月食品安全委員会.

②The Pesticide Manual (17th edition) (British Crop Protection Council): 580 Norflurazon 804-805, 2015.

③US EPA: Reregistration Eligibility Decision Norflurazon

④Chemical Book

3. 基準値

ノルフルラゾン及び4-クロロ-5-(アミノ)-2-(α,α,α トリフルオロ-m-トリル)-3-(2H)-ピリダジノンをノルフルラゾンに換算したものの和をいうこと。

食品名	基準値(ppm)
らっかせい	0.05
アスパラガス	0.05
なつみかんの果実全体	0.2
レモン	0.2
オレンジ（ネーブルオレンジを含む）	0.2
グレープフルーツ	0.2
ライム	0.2
その他のかんきつ類果実	0.2
りんご	0.1
日本なし	0.1
西洋なし	0.1
ネクタリン	0.1
あんず（アプリコットを含む）	0.1
すもも（プルーンを含む）	0.1
おうとう（チェリーを含む）	0.1
ラズベリー	0.2
ブラックベリー	0.1
ブルーベリー	0.2
ぶどう	0.1
アボカド	0.2
アーモンド	0.1
くるみ	0.1
その他のナッツ類	0.1
ホップ	3
その他のスパイス	0.2

〔実験方法〕

1. 試料

検討には、らっかせい、アスパラガス、オレンジ及びりんごを試料として用いた。いずれも東京都内で流通していたものを購入した。

試料及び産地場所を以下に記載した。

試料名	産地
らっかせい	中国産
アスパラガス	オーストラリア産
オレンジ	アメリカ産
りんご	青森県産

各試料の採取方法を以下に記載した。

(1) らっかせい

試料の殻を除き、ミルを用いて粉砕した後、フードプロセッサーを用いて均一化した。

(2) アスパラガス

試料を細切した後、フードプロセッサーを用いて均一化した。

(3) オレンジ（全果）

試料を細切した後、フードプロセッサーを用いて均一化した。

(4) りんご（可食部）

試料のしん及び果梗の基部を除去したものを細切した後、フードプロセッサーを用いて均一化した。

2. 試薬・試液

ノルフルラゾン標準品：純度 98.0%（関東化学製）

ノルフルラゾン代謝物 B 標準品：純度 99.9%（林純薬工業製）

アセトニトリル：残留農薬試験用（和光純薬工業製）

メタノール：LC-MS 用（和光純薬工業製）

1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液：HPLC 用（和光純薬工業製）

ケイソウ土：セライト No.545（和光純薬工業製）

アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム：(500 mg)：InertSep NH₂（ジーエルサイエンス製）

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム（1 g）：InertSep C₁₈（ジーエルサイエンス製）

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

グラファイトカーボン/アミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム (500 mg/500 mg)：InertSep GC/NH₂（ジーエルサイエンス製）

標準原液：各標準品 20mg を精秤し、メタノールで溶解して 1,000 mg/L 溶液を調製した。

検量線用標準溶液：標準原液をメタノールで適宜希釈し、0.00125～0.3 mg/L の各溶液を調製した。

添加用標準溶液①：標準原液をアセトニトリルで希釈して 1 mg/L 溶液を調製した。

添加用標準溶液②：標準原液をアセトニトリルで希釈して 5 mg/L 溶液を調製した。

添加用標準溶液③：標準原液をアセトニトリルで希釈して 10 mg/L 溶液を調製した。

添加用標準溶液④：標準原液をアセトニトリルで希釈して 20 mg/L 溶液を調製した。

3. 装置

ホモジナイザー：EXCEL AUTO HOMOGENIZER ED-7（日本精機製作所製）

ミル：MA-X10GM（TOSHIBA 製）

フードプロセッサー：MK-K81（パナソニック製）

濃縮装置：R-215（ビュッヒ製）

振とう機：TAIYO RECIPRO SHAKER SR-II W（大洋化学工業製）

LC-MS/MS

装 置	型 式	会 社
MS	Quattro Premier XE	Waters
LC	ACQUITY UPLC	Waters
データ処理	MassLynx V.4.1 SCN805	Waters

4. 測定条件

LC-MS

LC 条件					
カラム	Mightysil RP-18GP 100（内径 2.1 mm、長さ 100 mm、粒子径 5μm：関東化学製）				
移動相流速（mL/min）	0.20				
注入量（μL）	5				
カラム温度（℃）	40				
移動相	A 液：5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 B 液：5 mmol/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（%）	
		0.0	85	15	
		1.0	60	40	
		3.5	60	40	
		6	50	50	
		8	45	55	
		17.5	5	95	
		30	5	95	
		30.1	85	15	
MS 条件					
測定モード	SRM（選択反応モニタリング）				
イオン化モード	ESI（+）				
キャピラリー電圧（kV）	3.00				
ソース温度（℃）	120				
脱溶媒温度（℃）	450				
コーンガス	窒素、50 L/hr				
脱溶媒ガス	窒素、850 L/hr				
コリジョンガス	アルゴン				
定量イオン（m/z）	ノルフルラゾン：MS/MS: +304→284 [コーン電圧 50（V）、コリジョンエネルギー15（eV）] 代謝物 B：MS/MS: +290→270 [コーン電圧 40（V）、コリジョンエネルギー24（eV）]				
定性イオン（m/z）	ノルフルラゾン：MS/MS: +304→102 [コーン電圧 50（V）、コリジョンエネルギー48（eV）] 代謝物 B：MS/MS: +290→160 [コーン電圧 40（V）、コリジョンエネルギー30（eV）]				
保持時間（min）	ノルフルラゾン：10.5 代謝物 B：9.3				

5. 定量

ノルフルラゾン及び代謝物 B 標準品をそれぞれメタノールに溶解して 1,000 mg/L 溶液を調製した。この溶液をメタノールで希釈して 0.00125、0.0025、0.00375、0.005、0.00625、0.0075、0.0125、0.025、0.0375、0.05、0.0625、0.075、0.1、0.125、0.15、0.2、0.25 及び 0.3 mg/mL の標準溶液を調製した。この溶液 5 µL を LC-MS/MS に注入して、得られたピーク面積を用いた絶対検量線法で定量した。

6. 添加試料の調製

(1) らっかせい (添加濃度 : 0.05 mg/kg)

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

らっかせい (添加濃度 : 0.005 mg/kg)

試料 10.0 g に添加用標準溶液①0.05 mL (アセトニトリル溶液) を添加しよく混合した後、30 分間放置した。

(2) アスパラガス (添加濃度 : 0.05 mg/kg)

試料 20.0 g に添加用標準溶液②0.2 mL (アセトニトリル溶液) を添加しよく混合した後、30 分間放置した。

アスパラガス (添加濃度 : 0.005 mg/kg)

試料 20.0 g に添加用標準溶液①0.1 mL (アセトニトリル溶液) を添加しよく混合した後、30 分間放置した。

(3) オレンジ (添加濃度 : 0.2 mg/kg)

試料 20.0 g に添加用標準溶液④0.2 mL (アセトニトリル溶液) を添加しよく混合した後、30 分間放置した。

オレンジ (添加濃度 : 0.005 mg/kg)

試料 20.0 g に添加用標準溶液①0.1 mL (アセトニトリル溶液) を添加しよく混合した後、30 分間放置した。

(4) りんご (添加濃度 : 0.1 mg/kg)

試料 20.0 g に添加用標準溶液③0.2 mL (アセトニトリル溶液) を添加しよく混合した後、30 分間放置した。

りんご (添加濃度 : 0.005 mg/kg)

試料 20.0 g に添加用標準溶液①0.1 mL (アセトニトリル溶液) を添加しよく混合した後、30 分間放置した。

7. 試験溶液の調製

概要

ノルフルラゾンを試料からアセトニトリルで抽出し、塩析で水を除いた後、果実、野菜等についてはそのまま、穀類、豆類及び種実類についてはオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムで精製後、いずれもグラファイトカーボン/アミノ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

試料 20.0 g を 100 mL 遠心管に採った。らっかせいは試料 10.0 g に水 20 mL を加え、30 分間放置した。これにアセトニトリル 50 mL を加えてホモジナイズした後、ケイソウ土を約 1 cm の厚さに敷いたろ紙 (直径 60 mm、No.5A、桐山製作所製) を用いて吸引ろ過した。ろ紙上の残留物にアセトニトリル 20 mL を加え、ホモジナイズした後、吸引ろ過した。得られたろ液を合わせ、アセトニトリルを加えて正確に 100 mL とした。

抽出液 20 mL を採り、塩化ナトリウム 10 g 及び 0.5 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 7.0) 20 mL を加え、10 分間振とうした。静置した後、分離した水層を捨て、アセトニトリル層を分取した。らっかせいはアセト

ニトリル10 mLでコンディショニングしておいたオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム (1,000 mg) にアセトニトリル層を注入し、さらに、アセトニトリル3 mLを注入して、全溶出液を採った。アセトニトリル層に無水硫酸ナトリウムを加えて脱水し、無水硫酸ナトリウムをろ別した後、ろ液を40 °C以下で濃縮し、残留物にアセトニトリル及びトルエン (3 : 1) 混液2 mLを加えて溶解した。

(2) 精製

① グラファイトカーボン/アミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラムクロマトグラフィー

グラファイトカーボン/アミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム (500 mg/500 mg) に、アセトニトリル及びトルエン (3 : 1) 混液 10 mL を注入し、流出液は捨てた。このカラムに (1) で得られた溶液を注入した後、アセトニトリル及びトルエン (3 : 1) 混液 20 mL を注入し、全溶出液を採り、減圧濃縮装置を用いて 40°C以下で溶媒を除去した。この残留物にメタノールを加えて溶解し、正確に 4 mL (らっかせいは 2 mL) としたものを試験溶液とした。

[分析法フローチャート]

秤 取

- ↓ 野菜及び果実：試料 20.0 g
- ↓ 玄米、大豆及び種実類：試料 10.0 g に水 20 mL を加え 30 分間放置

アセトニトリル抽出

- ↓ アセトニトリル 50 mL を加えホモジナイズ
- ↓ 吸引ろ過
- ↓ 残留物にアセトニトリル 20 mL を加えホモジナイズ
- ↓ 吸引ろ過
- ↓ ろ液を合わせる
- ↓ アセトニトリル 100 mL 定溶

液液分配

- ↓ 抽出液 20 mL 分取
- ↓ 塩化ナトリウム 10 g および 0.5 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 7.0) 20 mL を加え振とう
- ↓ 静置後水層を捨てる
- ↓
- ↓ オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム [InertSep C18 (1 g/6 mL)]
- ↓
- ↓ アセトニトリル 10 mL でコンディショニング
- ↓ 玄米、大豆及び種実類はアセトニトリル層全量を注入する
- ↓ アセトニトリル 3 mL で溶出
- ↓ 全量を採る
- ↓ アセトニトリル層に無水硫酸ナトリウムを加え脱水

濃縮 (溶媒除去)

- ↓ 残留物をアセトニトリル及びトルエン (3 : 1) 混液 2 mL に溶解

グラファイトカーボン/アミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム

[InertSep GC/NH₂ (500 mg/500 mg/6 mL)]

- ↓ アセトニトリル及びトルエン (3 : 1) 混液 10 mL でコンディショニング
- ↓ 抽出液 2 mL を注入
- ↓ アセトニトリル及びトルエン (3 : 1) 混液 20 mL で溶出 (全溶出液を採取)

濃縮 (溶媒除去)

- ↓ 残留物をメタノール 4 mL (玄米、大豆及び種実類は 2 mL) に溶解

試験溶液



LC-MS/MS

8. マトリックス添加標準溶液の調製

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

【結果及び考察】

1. 測定条件の検討

(1) MS条件の検討

スキャン測定においては、ESI の ESI (－) モードではノルフルラゾン及び代謝物 B は検出されなかった。このため、測定モードは十分な感度の得られた ESI (+) モードとした。

ESI (+) モード測定時のマスペクトルをノルフルラゾンは図 1 に、代謝物 B は図 2 に示した。

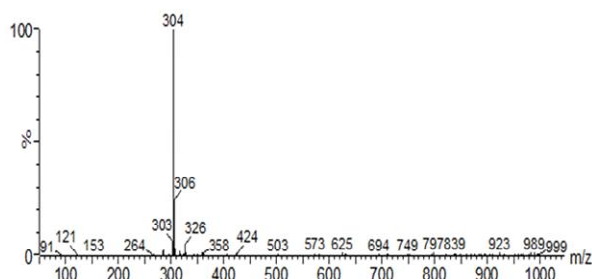


図 1 ノルフルラゾンのマスペクトル

スキャン範囲： 50～1,000 m/z

測定条件： ESI (+)

CV=50 V (CV : corn voltage)

ノルフルラゾン： 0.1 mg/L

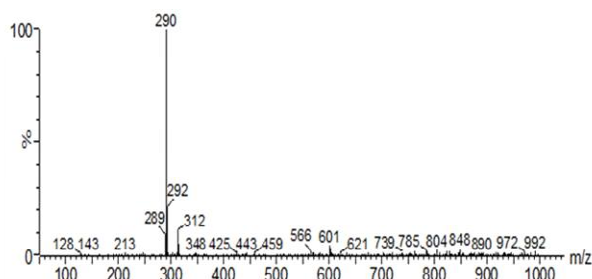


図 2 代謝物 B のマスペクトル

スキャン範囲： 50～1,000 m/z

測定条件： ESI (+)

CV=40 V (CV : corn voltage)

代謝物 B： 0.1 mg/L

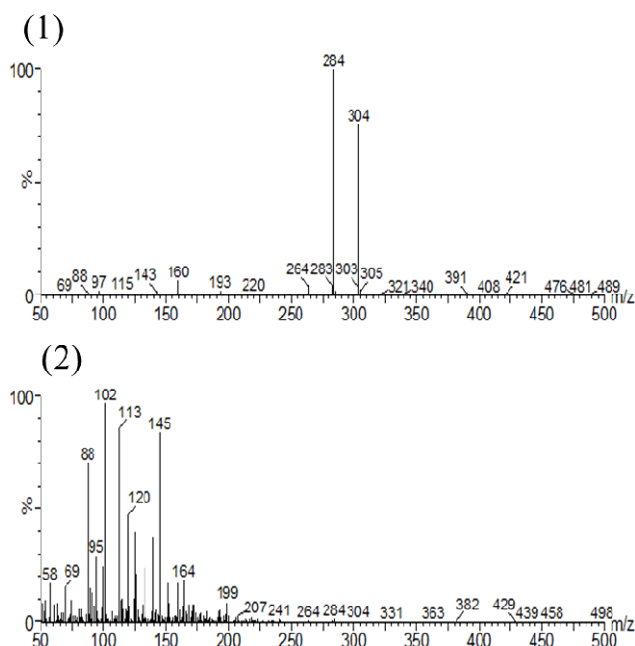


図 3 ノルフルラゾンのプロダクトイオン
スペクトル

プリカーサーイオン： m/z 304

測定条件： ESI (+)

(1) CV=50 V, CE=15 eV (定量用)

(2) CV=50 V, CE=48 eV (定性用)

(CV : corn voltage, CE : collision energy)

ノルフルラゾン： 0.1 mg/L

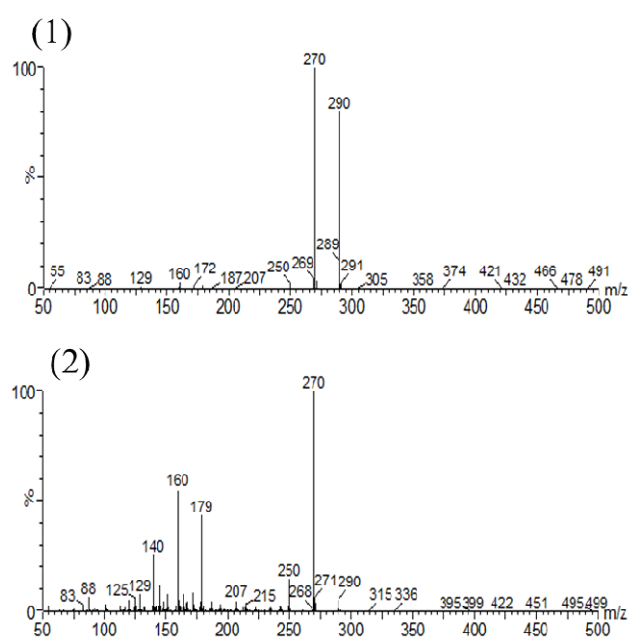


図 4 代謝物 B のプロダクトイオン
スペクトル

プリカーサーイオン： m/z 290

測定条件： ESI (+)

(1) CV=40 V, CE=24 eV (定量用)

(2) CV=40 V, CE=30 eV (定性用)

(CV : corn voltage, CE : collision energy)

代謝物 B： 0.1 mg/L

ESI (+) モードではノルフルラゾン (m/z 303.668) のプロトン付加分子 (m/z 304 $[M+H]^+$) のスペクトル及び代謝物B (m/z 289.641) のプロトン付加分子 (m/z 290 $[M+H]^+$) のスペクトルが、得られた。

ノルフルラゾンのプロトン付加分子 (m/z 304 $[M+H]^+$) をプリカーサーイオンとした場合のプロダクトイオンスペクトルを図3に示した。 m/z 304をプリカーサーイオンとした場合のプロダクトイオンのうち、イオン強度の最も強い m/z 284を定量用イオンに、次にイオン強度の強い m/z 102を定性用イオンとした。

代謝物Bのプロトン付加分子 (m/z 290 $[M+H]^+$) をプリカーサーイオンとした場合のプロダクトイオンスペクトルを図4に示した。 m/z 290をプリカーサーイオンとした場合のプロダクトイオンのうち、イオン強度の最も強い m/z 270を定量用イオンに、次にイオン強度の強い m/z 160を定性用イオンとした。

(2) LC条件の検討

分析カラムは、汎用されているオクタデシルシリル化シリカゲル (ODS) 充填カラムを比較検討した結果、関東化学製 Mightysil RP-18GP 100 (内径 2.1 mm、長さ 100 mm、粒子径 $5\mu\text{m}$:) を使用することで、ノルフルラゾンのピーク形状、分離及び再現性について良好な結果が得られたため、本カラムを用いて検討を実施した。

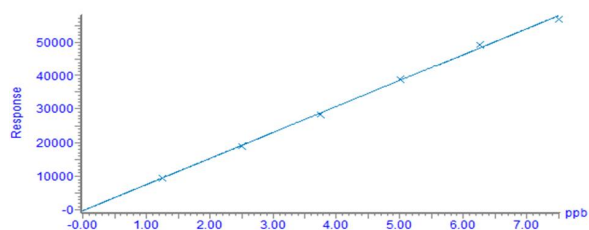
〔LC/MS による農薬等の一斉試験法 I (農産物)〕の移動相条件でメタノール及び酢酸アンモニウム混液について測定可能であるか検討した。

酢酸アンモニウム濃度について検討したところ、面積値は、5、6 及び 7 mmol/L で同様な値が得られ、それ以上では減少したことから、イオン化効率の安定する 5 mmol/L と 〔LC/MS による農薬等の一斉試験法 I (農産物)〕の移動相条件で測定可能であることを確認した。

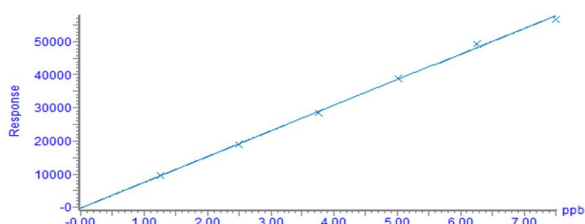
〔LC/MS による農薬等の一斉試験法 I (農産物)〕のグラジエント条件でのノルフルラゾンの保持時間は 10.5 分、代謝物 B は 9.3 分であった。

(3) 検量線

0.00125～0.0075 mg/L の濃度範囲で作成したノルフルラゾン検量線を図 5 に、代謝物 B の検量線を図 6 に示した。検量線の決定係数は、0.999 以上であり良好な直線性を示した。



$$y = 7746.49x + 178.934$$
$$r^2 = 0.999568$$



$$y = 6182.2x + 316.743$$
$$r^2 = 0.999758$$

(4) 定量限界

定量限界の算出結果を以下に示した。

ノルフルラゾン : $\left[\frac{20(\text{mL})}{4(\text{g})} \times \frac{0.005(\text{ng})}{5(\mu\text{L})} \right] = 0.005 \text{ mg/kg}$

2. 試験溶液調製法の検討

(1) アセトニトリル抽出での回収確認

水 10 mL にノルフルラゾン及び代謝物 B 1 mg/L (アセトニトリル溶液) 0.1 mL を添加し、アセトニトリル 50 mL、25 mL で 3 分間ホモジナイズ後、吸引ろ過した。得られたろ液をそれぞれ 100 mL に定容後、LC-MS/MS で測定した。表 1 に添加したノルフルラゾン及び代謝物 B の回収結果を示した。アセトニトリル 2 回抽出でほぼ 100% 回収できることを確認した。

表 1 アセトニトリルによる回収

化合物	回収率(%)		
	50 mL (1回目)	25 mL (2回目)	合計
ノルフルラゾン	84	16	100
代謝物 B	85	15	100

添加濃度 : 0.01 mg/kg (n=1)

(2) 塩析操作での回収確認

塩析時のノルフルラゾン及び代謝物 B の回収確認を行った。

塩化ナトリウム 10 g 及び 0.5 mol/L リン酸緩衝液 (pH7.0) 20 mL にノルフルラゾン及び代謝物 B 0.01 mg/L アセトニトリル溶液 1 mL を負荷し、アセトニトリル 20 mL を加えて 10 分間振とうした。アセトニトリル層に無水硫酸ナトリウムを加えて脱水し、無水硫酸ナトリウムをろ別した後、ろ液を 40 °C 以下で濃縮後、残留物にメタノール 2 mL を加えて溶解し、試験溶液とした。回収結果は、ノルフルラゾンで 97.4±2.4% (n=3) 及び代謝物 B で 96.7±2.1% (n=3) と十分に回収されることを確認した。

(3) オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムからの溶出状況

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムによる精製 [InertSep C₁₈ (1 g/6 mL)]

カラムをアセトニトリル 10 mL で予備洗浄した後、ノルフルラゾン及び代謝物 B 0.01 mg/kg (アセトニトリル溶液) 20 mL を負荷し、アセトニトリルで溶出したときの溶出状況を表 2 に示した。ノルフルラゾン及び代謝物 B は、3 mL で溶出された。

表 2 オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムからの溶出状況

化合物	アセトニトリル量(mL)					回収率(%)
	0-1	1-2	2-3	3-4	4-5	合計
ノルフルラゾン	54	46	tr	0	0	100
代謝物 B	59	40	tr	0	0	99

添加濃度 : 0.01 mg/kg (n=1), tr : 1% 未満

(4) 精製法の確認

通知法の適用に当たり、グラファイトカーボン、アミノプロピルシリル化シリカゲル及びそれらの積層ミニカラムでの溶出状況を確認した。

① グラファイトカーボンミニカラムによる精製 [InertSep GC (500 mg/6 mL)]

カラムをアセトニトリル・トルエン (3 : 1) 10 mL で予備洗浄した後、ノルフルラゾン及び代謝物 B 0.01 mg/kg (アセトニトリル溶液) 0.5 mL を負荷し、アセトニトリル・トルエン (3 : 1) で溶出したときの溶出状況を表 3 に示した。ノルフルラゾン及び代謝物 B は、10 mL で溶出された。

表3 グラファイトカーボンミニカラムからの溶出状況

化合物	アセトニトリル・トルエン（3：1）量(mL)					回収率(%)
	0-5	5-10	10-15	15-20	20-25	合計
ノルフルラゾン	96	1	0	0	0	97
代謝物 B	95	5	0	0	0	100

添加濃度：0.01 mg/kg (n=1)

② アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム [InertSep NH₂ (500 mg/3 mL)]

カラムをアセトニトリル・トルエン（3：1）10 mLで予備洗浄した後、ノルフルラゾン及び代謝物B 0.01 mg/kg（アセトニトリル溶液）0.5 mLを負荷し、アセトニトリル・トルエン（3：1）で溶出したときの溶出状況を表4に示した。ノルフルラゾンは、20 mLで、代謝物Bは15 mLで溶出された。

表4 アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムからの溶出状況

化合物	アセトニトリル・トルエン（3：1）量(mL)					回収率(%)
	0-5	5-10	10-15	15-20	20-25	合計
ノルフルラゾン	93	tr	tr	tr	0	93
代謝物B	98	3	tr	0	0	101

添加濃度：0.01 mg/kg (n=1), tr：1%未満

③ グラファイトカーボン/アミノプロピルシリル化シリカゲル積層カラム [InertSep GC/NH₂ (500 mg/500 mg/6 mL)]

カラムをアセトニトリル・トルエン（3：1）10 mLで予備洗浄した後、ノルフルラゾン及び代謝物B 0.01 mg/kg（アセトニトリル溶液）0.5 mLを負荷し、アセトニトリル・トルエン（3：1）で溶出したときの溶出状況を表5に示した。ノルフルラゾンは、20 mLで、代謝物Bは15 mLで溶出された。

表5 グラファイトカーボン/アミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラムからの溶出状況

化合物	アセトニトリル・トルエン（3：1）量(mL)					回収率(%)
	0-5	5-10	10-15	15-20	20-25	合計
ノルフルラゾン	93	1	1	tr	0	95
代謝物B	94	5	tr	0	0	99

添加濃度：0.01 mg/kg (n=1), tr：1%未満

④ グラファイトカーボン/アミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラムでの精製効果の確認

精製効果を確認するため、らっかせい、アスパラガス、オレンジ及びりんごを試料として、アセトニトリル抽出、塩析（らっかせいはオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムによる脱脂）、脱水後に減圧濃縮し、グラファイトカーボン/アミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラムで精製したブランク試験溶液 0.5 mL を採り、窒素気流下で溶媒を除去した後、各検討対象食品の添加回収試験における回収率 100%相当濃度の溶媒標準溶液 0.5 mL を加えて溶解したものをマトリックス添加標準溶液とした。マトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積比を求め、表 6 に示した。

ノルフルラゾンで 0.89～1.12、代謝物 B で 0.89～1.15 とマトリックスの測定への大きな影響は見られず、適用可能であることを確認した。

表6 溶解溶液による試料マトリックスの影響

食品名	ピーク面積比 ^{*1}			
	ノルフルラゾン		代謝物 B	
	0.01 mg/kg	基準値	0.01 mg/kg	基準値
らっかせい	1.10	1.03	1.15	1.14
アスパラガス	1.09	0.98	1.09	1.14
オレンジ	0.94	0.89	0.89	0.90
りんご	1.02	1.12	1.04	1.07

*1 マトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積の比

3. 添加回収試験

らっかせい、アスパラガス、オレンジ及びりんごの4食品を試料に用いて、実験方法の7. 試験溶液の調製に従って添加回収試験を実施した。

添加回収試験における回収率 100%相当の溶媒標準溶液、各食品のブランク試料及び添加試料のクロマトグラムを図9～24に示した。また、各食品のブランク試料のスキャン測定によるトータルイオンクロマトグラムを図25及び26に示した。

(1) 選択性

選択性の検討結果を表7に示した。検討したいずれの試料においても、ノルフルラゾンの定量を妨害するピークは認められず、選択性は良好であった。

表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) ^{*1}							選択性の 評価	
					評価濃度 (ppm)	評価基準	面積又は 高さの別	ブランク			マトリックス添加標準溶液 ^{*2}			面積(高さ) 比(a)/(b)		
								n=1	n=2	平均(a)	n=1	n=2	平均(b)			
1	ノルフルゾン	らっかせい	0.01	0.05	基準値	0.05	< 0.100	面積	0	2	1	381218	368925	375072	0.000	○
		アスパラガス	0.01	0.05	基準値	0.05	< 0.100	面積	3	5	4	394528	392355	393442	0.000	○
		オレンジ	0.01	0.2	基準値	0.2	< 0.100	面積	10	0	5	1200105	117588	658847	0.000	○
		りんご	0.01	0.1	基準値	0.1	< 0.100	面積	5	4	5	660552	640355	650454	0.000	○
2	代謝物B	らっかせい	0.01	0.05	基準値	0.05	< 0.100	面積	2	0	1	434200	421155	427678	0.000	○
		アスパラガス	0.01	0.05	基準値	0.05	< 0.100	面積	10	10	10	442468	426802	434635	0.000	○
		オレンジ	0.01	0.2	基準値	0.2	< 0.100	面積	5	3	4	1533880	1512755	1523318	0.000	○
		りんご	0.01	0.1	基準値	0.1	< 0.100	面積	3	3	3	758662	742155	750409	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、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。0.005 mg/kgでは真度78～90%、併行精度は2～7% (目標値: 真度70～120%及び併行精度15<)、0.05～0.2 mg/kgでは真度89～99%、併行精度は2～7% (目標値: 真度70～120%及び併行精度10<) といずれも目標値に適合する結果であった。

基準値及び定量限界濃度である0.005 mg/kgでの添加回収を行った。

0.005 mg/kg添加試料溶液でのS/N比の平均値は33～54であり、全ての食品でS/N $\geq$ 10を満たした。

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 ^{*1}	検量線			回収率(%)					真度 (%)	併行精度 (RSD%)	S/N ^{*2}		
							傾き	切片	r ² 値	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5			Max.	Mn.	平均値
1	ノルフルazon	らっかせい	0.005	0.05	0.005	S/N	7695	-465	0.9957	95.5	90.5	93.7	96.4	93.4	93.9	2.4	46.0	20.5	33.3
		らっかせい	0.005	0.05	0.05	—	7762	1111	0.9983	76.1	83.2	75.8	77.4	81.9	78.9	4.4	—	—	—
		アスパラガス	0.005	0.05	0.005	S/N	6933	155	0.9985	100.0	98.0	105.3	98.7	93.3	99.1	4.3	61.4	46.5	53.9
		アスパラガス	0.005	0.05	0.05	—	8405	3371	0.9980	77.7	84.4	89.7	87.5	83.6	84.6	5.4	—	—	—
		オレンジ	0.005	0.2	0.005	S/N	7713	-272	0.9975	97.5	82.6	94.5	87.0	93.3	91.0	6.6	38.3	31.6	34.9
		オレンジ	0.005	0.2	0.2	—	7729	80094	0.9982	78.0	81.2	81.2	72.7	75.5	77.7	4.7	—	—	—
		りんご	0.005	0.1	0.005	S/N	7601	1346	0.9979	89.4	95.0	97.6	89.2	98.0	93.8	4.6	46.5	38.3	42.4
		りんご	0.005	0.1	0.1	—	8243	17703	0.9983	92.6	92.6	84.9	85.7	84.7	88.1	4.7	—	—	—
2	代謝物B	らっかせい	0.005	0.05	0.005	S/N	6809	-351	0.9981	87.4	94.0	93.9	88.5	94.5	91.7	3.7	47.5	39.1	43.3
		らっかせい	0.005	0.05	0.05	—	6967	-780	0.9997	78.5	86.1	76.8	82.0	91.2	82.9	7.1	—	—	—
		アスパラガス	0.005	0.05	0.005	S/N	6182	-317	0.9995	97.1	90.7	93.9	90.9	94.1	93.3	2.9	46.5	37.8	42.2
		アスパラガス	0.005	0.05	0.05	—	7636	4864	0.9983	92.3	86.0	87.9	85.9	98.9	90.2	6.1	—	—	—
		オレンジ	0.005	0.2	0.005	S/N	6961	-691	0.9962	88.3	95.1	86.1	86.0	90.7	89.2	4.3	38.7	38.3	38.5
		オレンジ	0.005	0.2	0.2	—	6255	117338	0.9994	75.9	79.8	82.3	76.7	80.6	79.1	3.4	—	—	—
		りんご	0.005	0.1	0.005	S/N	7601	1347	0.9979	92.6	87.5	97.5	94.4	94.6	93.3	4.0	47.0	46.5	46.8
		りんご	0.005	0.1	0.1	—	7554	14783	0.9976	94.5	89.7	85.0	89.2	79.4	87.6	6.5	—	—	—

*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(Mn.)のそれぞれのS/Nを求める。

(3) 試料マトリックスの測定への影響

試料マトリックスの測定への影響について検討した結果を表9に示した。添加回収試験における回収率100%相当濃度になるように調製したマトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積比を求めた。面積比は0.91~1.11であり、いずれの試料においても、マトリックスの測定への大きな影響は認められなかった。

添加回収試験における真度を表9で求めたピーク面積比で除して補正真度を求め、表10に示した。補正真度は71~105%であり、目標値(真度70~120%)に適合する結果であった。

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 ¹ (mg/L)	ピーク面積(高さ) ²								
							面積又は 高さの別	ブランク ³	マトリックス添加標準溶液 ⁴			溶媒標準溶液			ピーク面積 (高さ)比 ⁵
									n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均	
1	ノルフルazon	らっかせい	0.005	0.05	0.005	0.005	面積	6	25735	25583	25653	23079	23081	23080	1.11
		らっかせい	0.005	0.05	0.05	0.05	面積	5	165391	166327	165854	174299	173997	174148	0.95
		アスパラガス	0.005	0.05	0.005	0.005	面積	125	22318	23613	22841	25127	24958	25043	0.91
		アスパラガス	0.005	0.05	0.05	0.05	面積	113	194206	198244	196112	206338	209167	207753	0.94
		オレンジ	0.005	0.2	0.005	0.005	面積	5	24733	25434	25079	23067	23207	23137	1.08
		オレンジ	0.005	0.2	0.2	0.2	面積	100	762352	776599	769376	787510	796190	791850	0.97
		りんご	0.005	0.1	0.005	0.005	面積	3	24972	24664	24815	24688	22227	23458	1.06
		りんご	0.005	0.1	0.1	0.1	面積	35	377613	361644	369594	358745	366348	362547	1.02
2	代謝物B	らっかせい	0.005	0.05	0.005	0.005	面積	3	17637	17847	17739	16421	16416	16419	1.08
		らっかせい	0.005	0.05	0.05	0.05	面積	0	126472	117066	121769	124369	123544	123957	0.98
		アスパラガス	0.005	0.05	0.005	0.005	面積	361	18095	18101	17128	17670	17522	17596	0.97
		アスパラガス	0.005	0.05	0.05	0.05	面積	354	157843	162108	159622	165750	165843	165797	0.96
		オレンジ	0.005	0.2	0.005	0.005	面積	147	17414	17600	17360	15544	15707	15626	1.11
		オレンジ	0.005	0.2	0.2	0.2	面積	1665	559019	565061	560375	585240	585610	585425	0.96
		りんご	0.005	0.1	0.005	0.005	面積	47	17446	16904	17128	15279	15853	15566	1.10
		りんご	0.005	0.1	0.1	0.1	面積	58	281889	280830	281302	282036	284317	283177	0.99

*1 添加回収試験における回収率100%相当濃度になるように、ブランク試料の試験溶液で調製した標準溶液(マトリックス添加標準溶液)及び溶媒で調製した標準溶液(溶媒標準溶液)を作成する。

*2 マトリックス添加標準溶液及び溶媒標準溶液の順に交互に2回以上測定した結果から評価する。(必要に応じて起爆注入を行う。)

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

*4 マトリックス添加標準溶液は試験当日のブランク試料の試験溶液を用いて調製する。

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

表 10 補正真度

化合物名	食品名	添加濃度 (mg/kg)	真度 (%)	ピーク面積比	補正真度 (%)
ノルフルラゾン	らっかせい	0.05	94	0.95	99
		0.005	79	1.11	71
	アスパラガス	0.05	99	0.94	105
		0.005	85	0.91	93
	オレンジ	0.2	91	0.97	94
		0.005	78	1.08	72
	りんご	0.1	94	1.02	92
		0.005	88	1.06	83
代謝物B	らっかせい	0.05	92	0.98	94
		0.005	83	1.08	77
	アスパラガス	0.05	93	0.96	97
		0.005	90	1.01	89
	オレンジ	0.2	89	0.96	93
		0.005	79	1.11	71
	りんご	0.1	93	0.99	94
		0.005	88	1.10	80

4. その他の試験法検討に関連する事項

〔LC/MS による農薬等の一斉試験法 I (農産物)〕 以外の検討事項について以下に示す。

(1) GC-MS 測定条件の検討

ノルフルラゾンは〔GC/MS による農薬等の一斉試験法 I (農産物)〕 の適用が検討されていることから、GC-MS での測定条件を検討した。

GC-MS

装 置	型 式	会 社
MS	5973MSD	Agilent Technologies
LC	6890N	Agilent Technologies
データ処理	MSD ケミステーション G1701DA D.01.02.16 15-JUNE-2004	Agilent Technologies

GC 条件

カラム	DB-XLB (内径 0.25 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25 μ m : Agilent 製)
カラム温度	50 $^{\circ}$ C (1 分) -25° C/分 -125° C (0 分) -10° C/分 300 $^{\circ}$ C (10 分)
注入口温度	250 $^{\circ}$ C
イオン源温度	230 $^{\circ}$ C
キャリアーガス	ヘリウム
イオン化モード	EI

スキャン測定時のマススペクトルをノルフルラゾンは図 7 に、代謝物 B は図 8 に示した。

保持時間はノルフルラゾンが 19.3 分、代謝物 B は 18.8 分であった。

次に、らっかせい、アスパラガス、オレンジ及びりんごを試料として、0.1 mg/kg になるようにアセトニトリル標準溶液を添加し良く混合し、試行数 2 で添加回収試験を行った。

ノルフルラゾン及び代謝物 B の 10 mg/L(アセトニトリル溶液)標準溶液 0.2 mL(らっかせいは 0.1 mL)を添加し、30 分放置後、アセトニトリル抽出、塩析(らっかせいはオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムによる脱脂)、グラファイトカーボン/アミノプロピルシリル化シリカゲル積層カラムで精製を行った後、試験溶液とした。回収結果を表 11 に示した。

代謝物 B のらっかせいでの結果以外は回収率が 120%以上となった。次に、マトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積比を求め、表 12 に示した。

面積比は、ノルフルラゾンで 1.04~1.39、代謝物 B で 1.02~1.54 とマトリックスの測定への影響が見られた。通知一斉試験法では最終測定溶液が LC-MS/MS 測定溶液の等倍(らっかせいは 2 倍希釈)に対し、GC-MS 測定溶液では 4 倍濃縮(らっかせいは 2 倍濃縮)となる。GC-MS 測定では試料マトリックスの濃度が高くなるため、イオン化促進等の影響を受けやすく、定量測定を GC-MS で行うことは適していないと判断した。

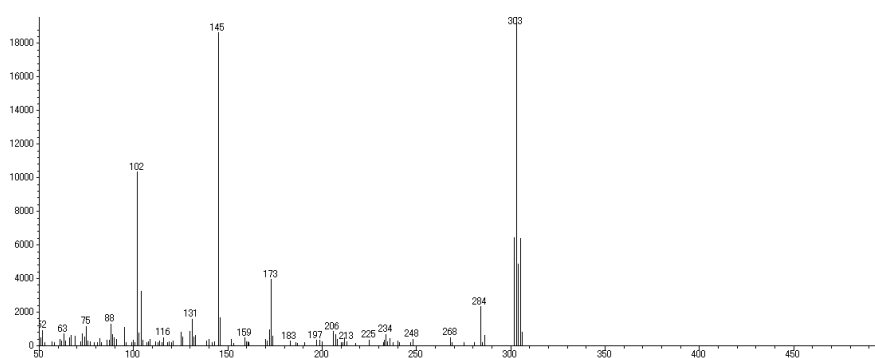


図 7 ノルフルラゾンのマススペクトル
スキャン範囲： 50~500 m/z , ノルフルラゾン：1 mg/L

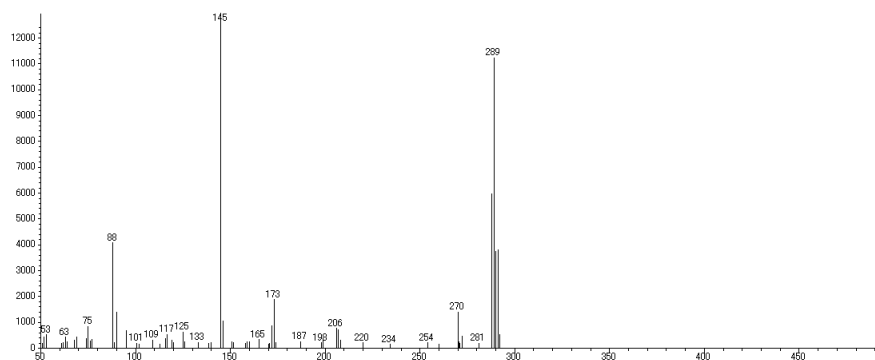


図 8 代謝物 B のマススペクトル
スキャン範囲： 50~500 m/z , 代謝物 B：1 mg/L

表 11 GC-MS 測定による回収率

食品名	回収率 (%)			
	ノルフルラゾン		代謝物 B	
	1	2	1	2
らっかせい	138	142	110	99
アスパラガス	115	128	120	132
オレンジ	135	128	124	135
りんご	118	130	110	124

添加濃度 : 0.1 mg/kg

表 12 GC-MS 測定での試料マトリックスの影響

食品名	ピーク面積比*1			
	ノルフルラゾン		代謝物 B	
	0.01 mg/kg	基準値	0.01 mg/kg	基準値
らっかせい	1.34	1.16	1.54	1.15
アスパラガス	1.18	1.04	1.24	1.05
オレンジ	1.39	1.05	1.11	1.02
りんご	1.25	1.04	1.20	1.05

*1 マトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積の比

(2) 抽出溶媒の検討

アセトニトリル以外にアセトン、アセトン及び *n*-ヘキサン混液 (1 : 1)、酢酸エチル及びメタノールを用いて抽出溶媒検討を行った。

水 10 mL にノルフルラゾン及び代謝物 B 1 mg/L (アセトニトリル溶液) 0.1 mL を添加し、各溶媒 50 mL、25 mL で 3 分間ホモジナイズ後、吸引ろ過した。得られたろ液を合わせ 100 mL に定容後、5 mL 分取し、メタノールに置換後、LC-MS/MS で測定した。表 13 にノルフルラゾン及び代謝物 B の回収結果を示した。アセトン及び *n*-ヘキサン (1 : 1) 以外では 2 回抽出でほぼ 100% 回収できた。次にらっかせい 10 g に水 20 mL 加え、30 分放置した後、各溶媒でホモジナイズ後、3,000 rpm で 5 分間遠心したところ、酢酸エチル、アセトン及び *n*-ヘキサン混液 (1 : 1) ではエマルジョンを形成し、上層を分取することが困難であった。アセトニトリル、アセトン及びメタノールでは上澄液を分取することが可能であった。

表 13 抽出溶媒の検討

化合物名	溶媒	回収率 (%)		
		50 mL (1 回目)	25 mL (2 回目)	合計
ノルフルラゾン	アセトン	83	17	100
	アセトン・ <i>n</i> -ヘキサン(1:1)	43	31	74
	酢酸エチル	80	19	99
	メタノール	81	18	99
代謝物 B	アセトン	83	17	100
	アセトン・ <i>n</i> -ヘキサン(1:1)	39	29	69
	酢酸エチル	81	19	100
	メタノール	82	18	100

添加濃度 : 0.01 mg/L (*n*=1)

(3) 脱脂方法の検討

① アセトニトリル/ヘキサン分配

ノルフルラゾン及び代謝物 B 0.01 mg/L 溶液 1 mL を *n*-ヘキサン 30 mL に加え、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL で 3 回抽出を行ったときの結果を表 14 に示した。*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL 3 回で 100% の回収率が得られた。十分な回収率ではあったが、らっかせいのアセトニトリル抽出溶液及び前述の (2) 抽出溶媒の検討で抽出溶液を分取できたらっかせいのアセトン及びメタノールの各抽出溶液 10 mL を濃縮後、同様に操作したところ、いずれも若干のエマルジョン形成が見られた。

表14 アセトニトリル/ヘキサン分配の検討

化合物	<i>n</i> -ヘキサン飽和アセトニトリル			回収率(%)
	30 mL (1回目)	30 mL (2回目)	30 mL (3回目)	合計
ノルフルラゾン	97	3	tr	100
代謝物B	97	3	tr	100

添加濃度：0.01 mg/kg (*n*=1) , tr : 1%未満

②多孔性ケイソウ土カラム [InertSep K-solute (10 mL 保持用)]

操作の簡便性向上及びエマルジョンによる回収率低下を考慮し、多孔性ケイソウ土カラムクロマトグラフィーによる脱脂を検討した。

10 mL 保持用カラムに、ノルフルラゾン及び代謝物 B 0.01 mg/L (アセトニトリル溶液) 1 mL 及びアセトニトリル 9 mL を負荷し、室温条件下-0.02 Mpa で 5 分間吸引乾燥後、アセトニトリル 30 mL 1 分画及び 10 mL 10 分画で溶出し、各溶出液にアセトニトリルを加え 10 mL に定容後、LC-MS/MS で測定したときの結果を表 15 に示した。アセトニトリル 100 mL で 99% 以上の回収率が得られた。

表 15 多孔性ケイソウ土カラムの検討

アセトニトリル量 (mL)	回収率(%)	
	ノルフルラゾン	代謝物 B
0 - 30	37	39
30 - 40	26	26
40 - 50	19	19
50 - 60	11	9
60 - 70	4	4
70 - 80	2	2
80 - 90	tr	tr
90 - 100	tr	tr
100 - 110	0	0
110 - 120	0	0
120 - 130	0	0
合計	99	99

添加濃度：0.01 mg/kg (*n*=1) , tr : 1%未満

(4) 精製法の検討

脂肪酸の除去に用いられるエチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラム及びグラフアイトカーボン/エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲル積層カラムについて検討した。

① 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/3 mL)]

カラムをアセトニトリル・トルエン（3：1）10 mLで予備洗浄した後、ノルフルラゾン及び代謝物B 0.01 mg/kg（アセトニトリル溶液）0.5 mLを負荷し、アセトニトリル・トルエン（3：1）で溶出したときの溶出状況を表16に示した。ノルフルラゾンは、10 mLで、代謝物Bは15 mLで溶出された。

表16 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からの溶出状況

化合物	アセトニトリル・トルエン（3：1）量(mL)					回収率(%)
	0-5	5-10	10-15	15-20	20-25	合計
ノルフルラゾン	98	tr	0	0	0	98
代謝物B	87	8	5	0	0	100

添加濃度：0.01mg/kg（*n*=1），tr：1%未満

② 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カラム [InertSep GC/PSA（500 mg/500 mg/6 mL）]

カラムをアセトニトリル・トルエン（3：1）10 mLで予備洗浄した後、ノルフルラゾン及び代謝物B 0.01 mg/kg（アセトニトリル溶液）0.5 mLを負荷し、アセトニトリル・トルエン（3：1）で溶出したときの溶出状況を表17に示した。ノルフルラゾンは、10 mLで、代謝物Bは15 mLで溶出された。

表17 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からの溶出状況

化合物	アセトニトリル・トルエン（3：1）量(mL)					回収率(%)
	0-5	5-10	10-15	15-20	20-25	合計
ノルフルラゾン	95	7	0	0	0	102
代謝物B	86	7	4	0	0	97

添加濃度：0.01mg/kg（*n*=1）

5. 考察

ノルフルラゾン及び代謝物Bに、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）] の適用を試みたところ、抽出、精製及び測定条件といずれも適用可能であり、安定した回収が得られることを確認した。

らっかせい、アスパラガス、オレンジ及びりんごの4食品を試料に用いて、添加回収試験を実施した。その結果、選択性は良好で、いずれの試料においても測定を妨害するようなピークは認められなかった。0.005 mg/kgでは真度78～90%、併行精度は3～7%、0.05～0.2 mg/kgでは真度89～99%、併行精度は2～7%の良好な結果が得られたことから、[LC/MSによる農薬等の一斉試験法I（農産物）] は、ノルフルラゾン試験法として適用可能であると判断された。

【結論】

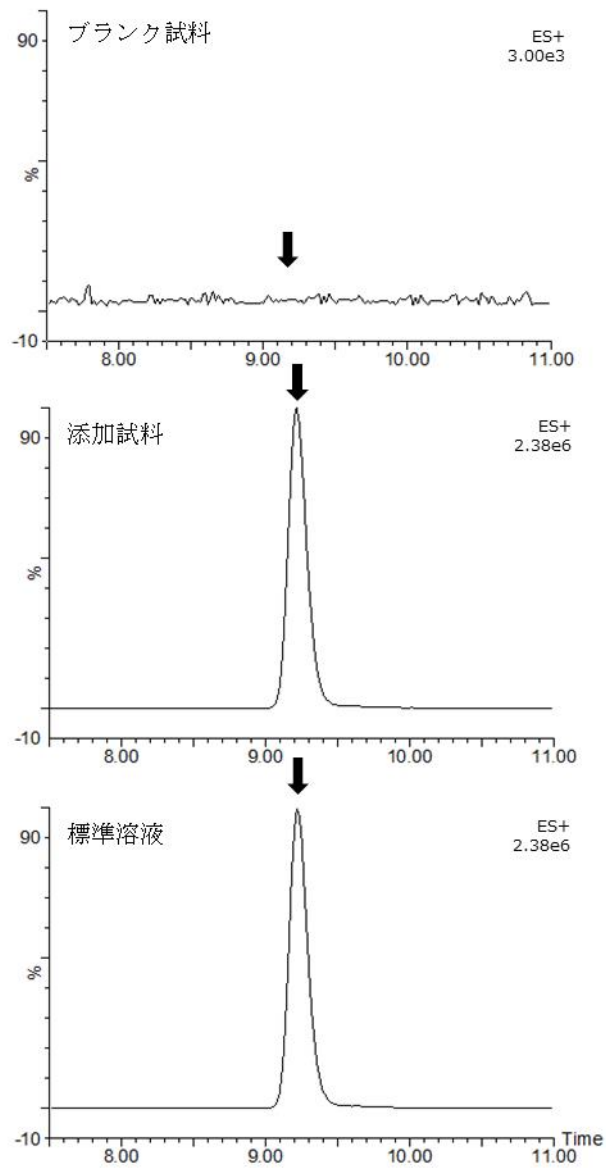
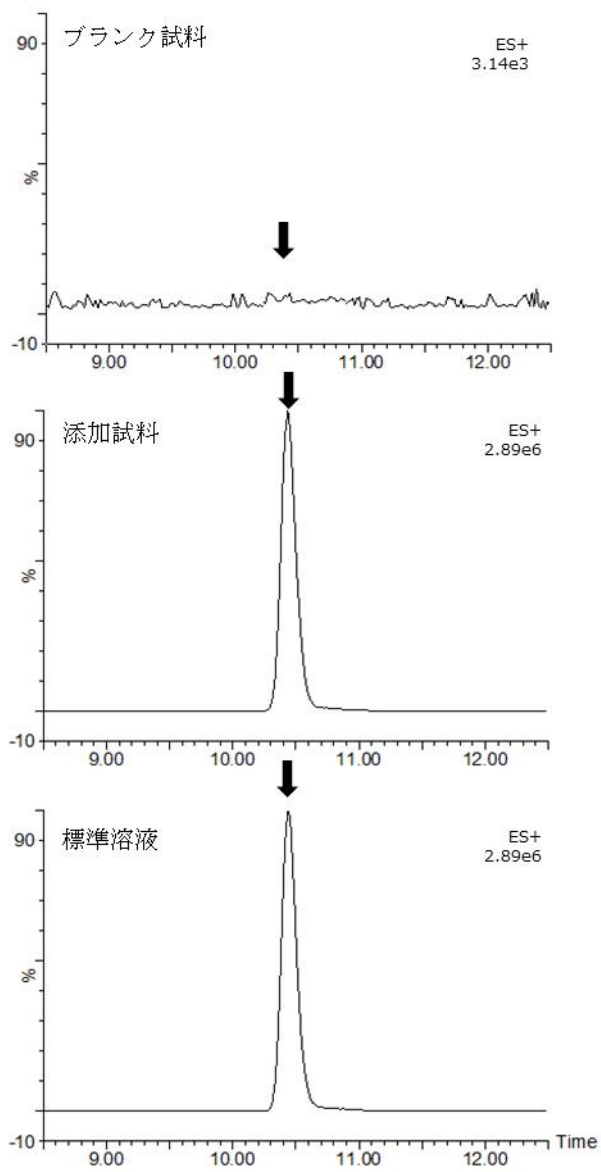
農産物中のノルフルラゾン試験法として、[LC/MSによる農薬等の一斉試験法I（農産物）] の適用を検討した。ノルフルラゾン及び代謝物Bを試料からアセトニトリルで抽出し、塩析後、グラファイトカーボン/アミノプロピルシリル化シリカゲル積層カラムで精製した後、LC-MS/MSで定量及び確認した。

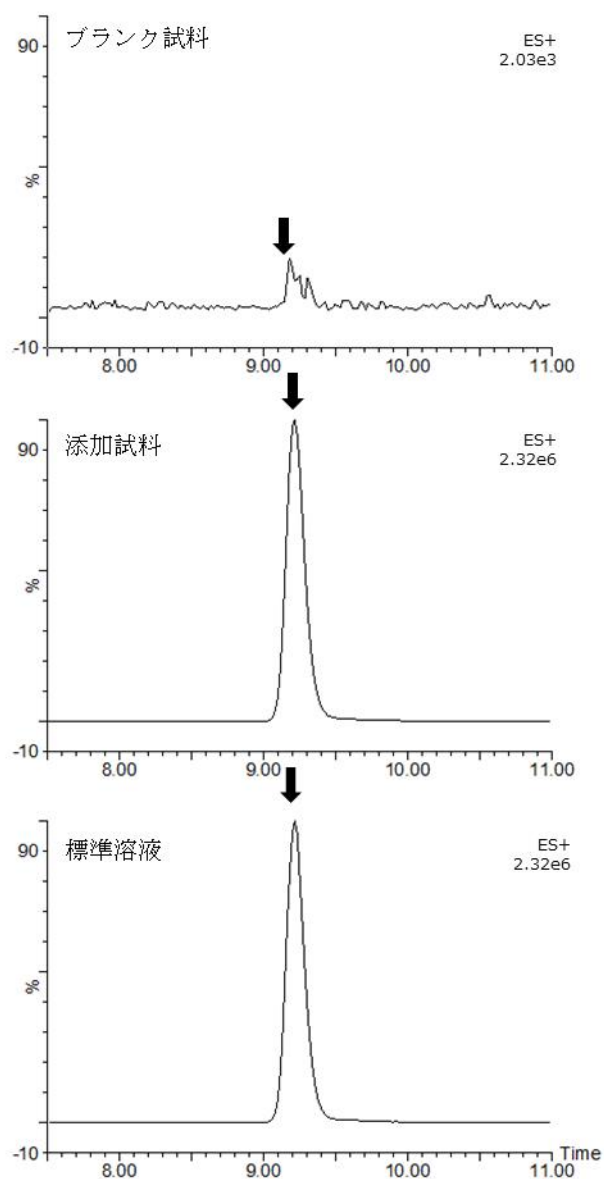
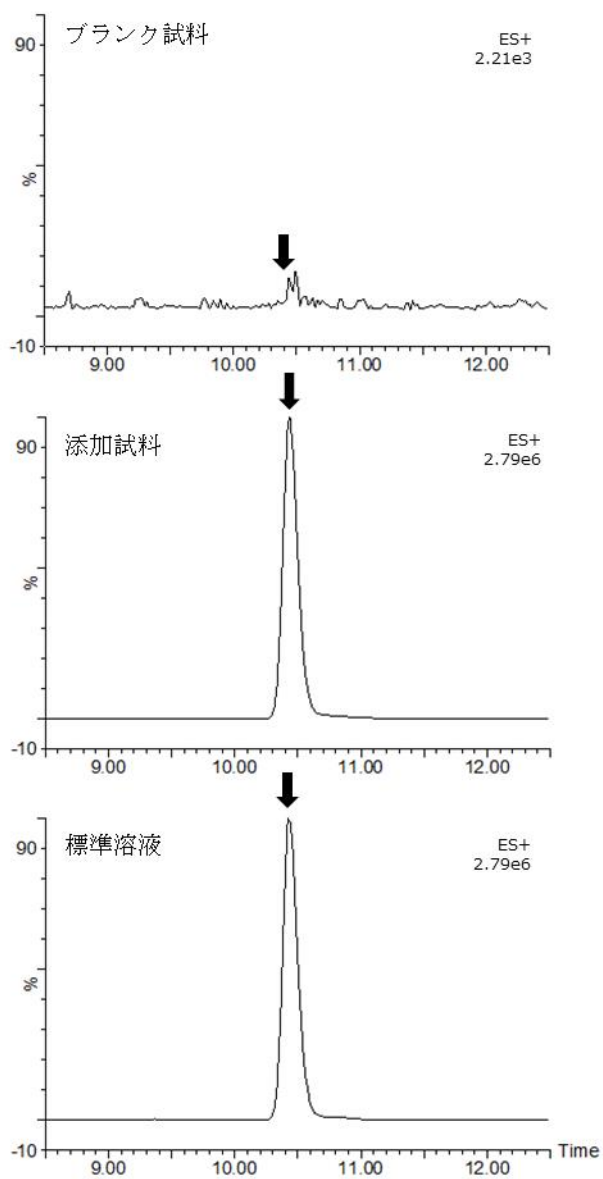
[LC/MSによる農薬等の一斉試験法I（農産物）] をらっかせい、アスパラガス、オレンジ及びりんごの4食品に適用した結果、0.005 mg/kgでは真度78～90%、併行精度は3～7%、0.05～0.2 mg/kgでは真度89～99%、併行精度は2～7%の良好な結果が得られた。また、定量限界として、0.005 mg/kgを設定可能であることが確認された。

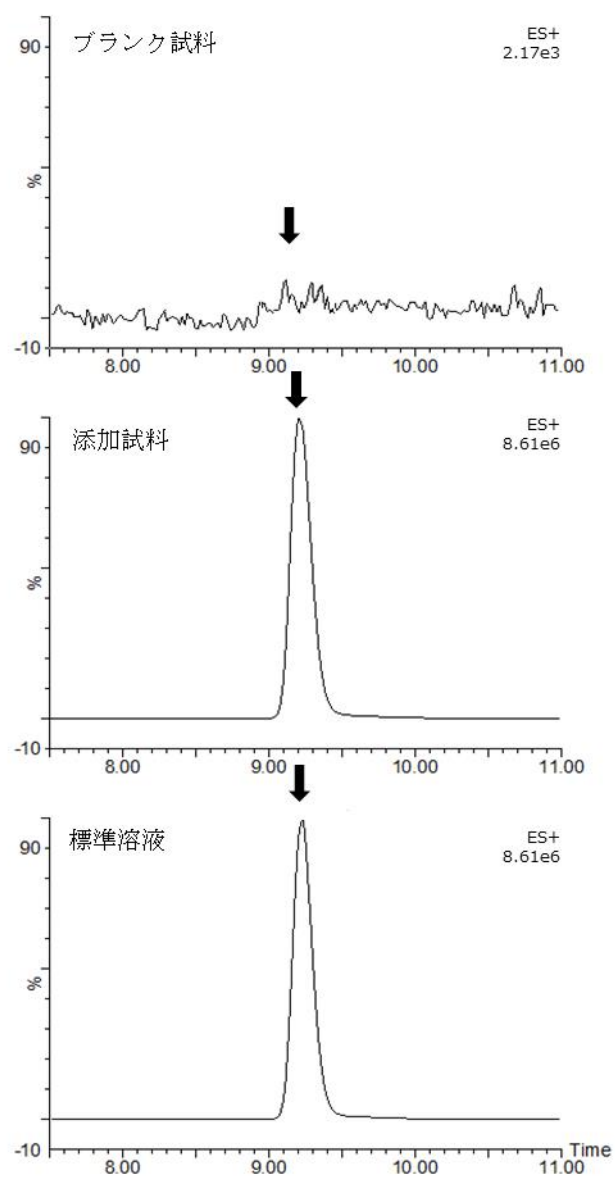
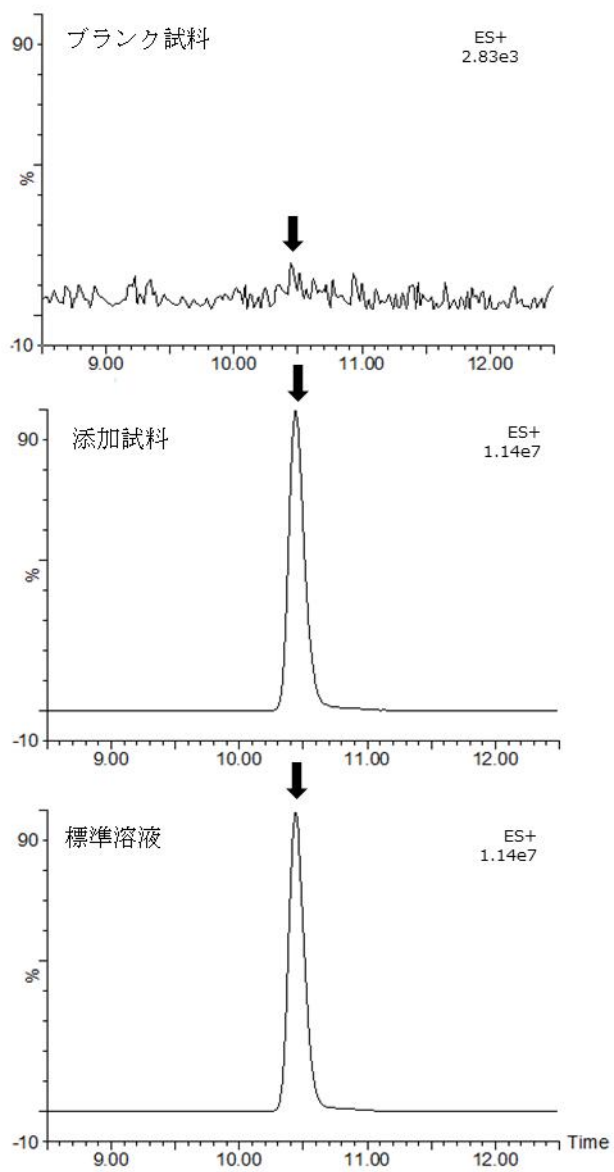
【参考文献】

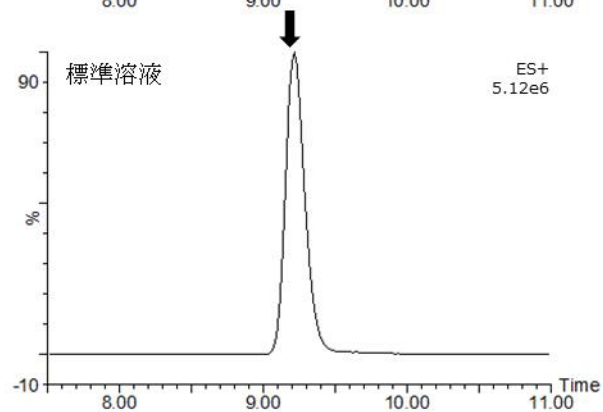
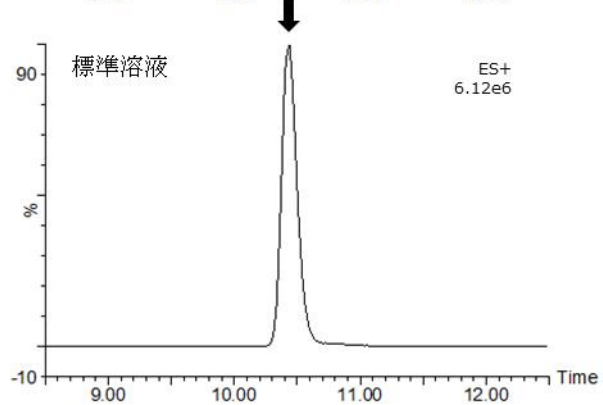
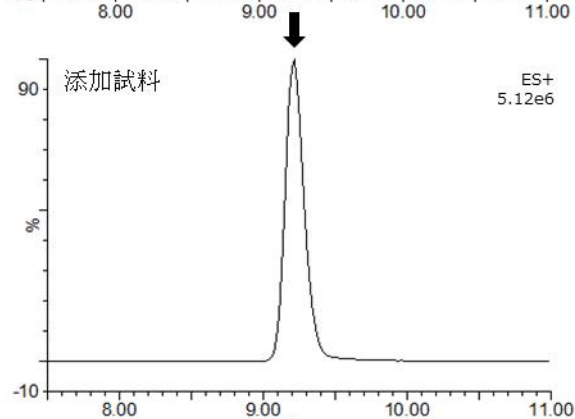
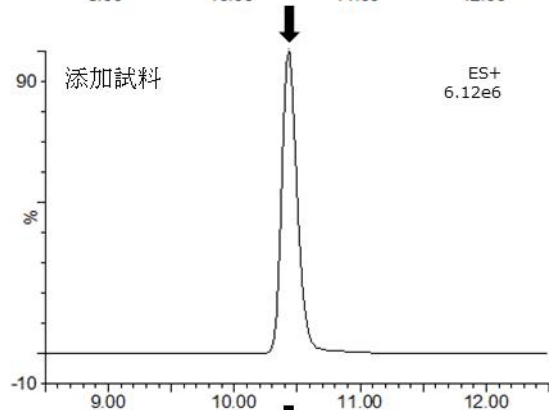
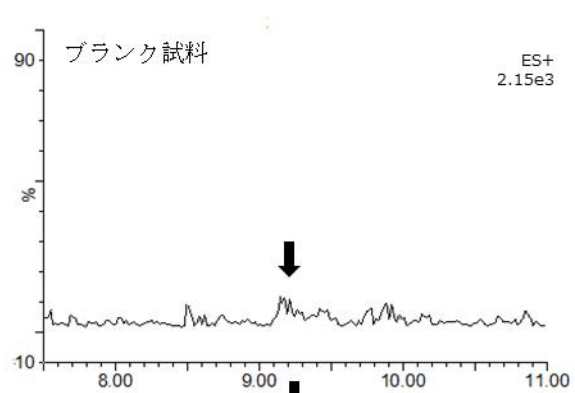
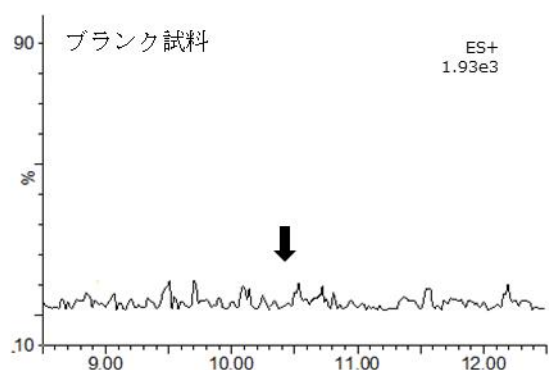
- 1) 農薬評価書 ノルフルラゾン，2010 年 1 月 食品安全委員会農薬専門調査会．
- 2) 厚生労働省，農作物対象の GC/MS 一斉分析法及び LC-MS 一斉分析法、並びに畜水産物対象の GC/MS 一斉分析法の検討結果（平成 15・16 年度），
<http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/syoku-anzen/positivelist/dl/040806-111.pdf>

① 添加回収試験における代表的なクロマトグラム

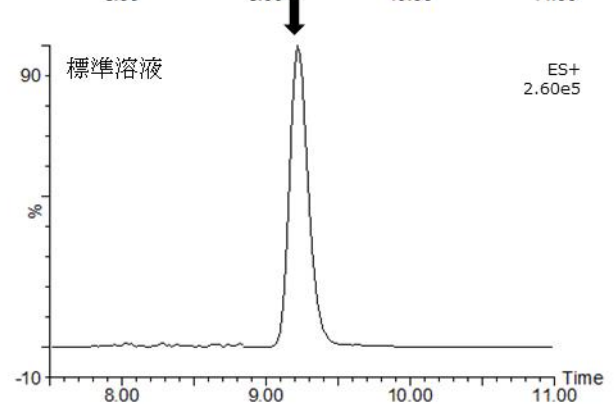
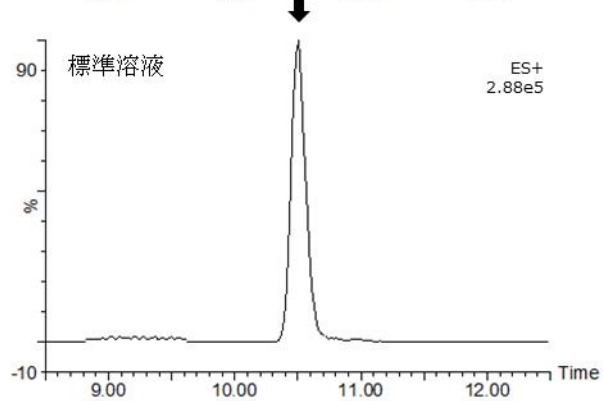
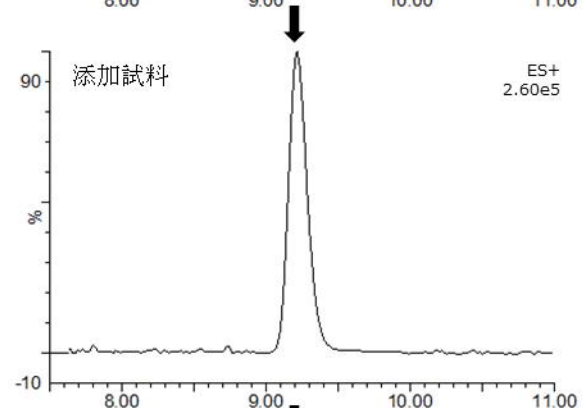
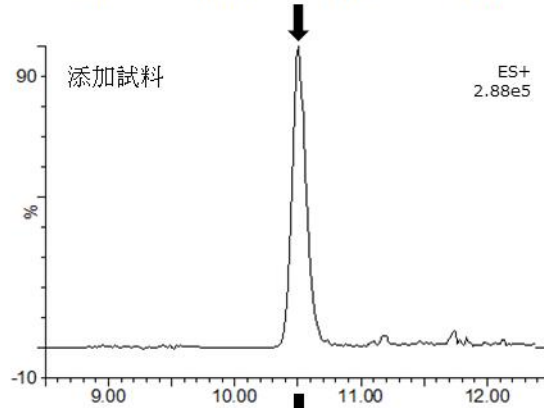
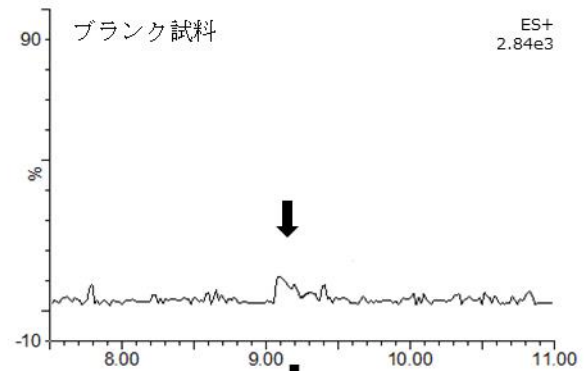
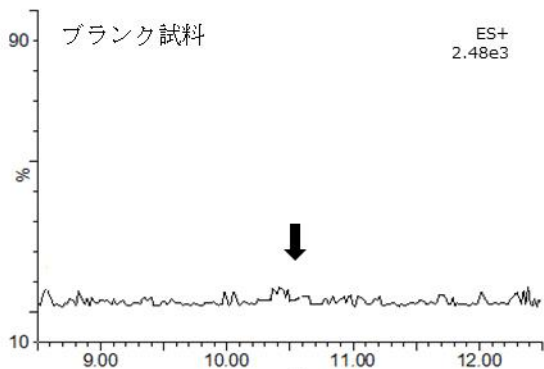


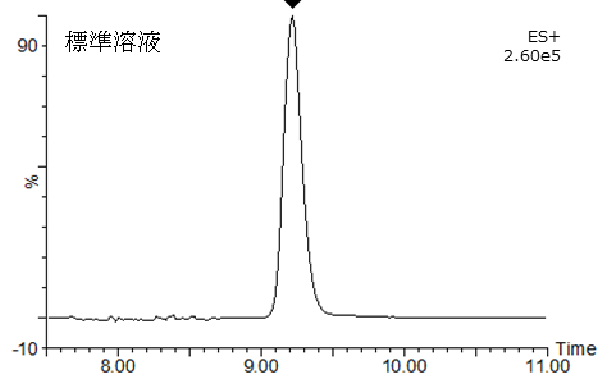
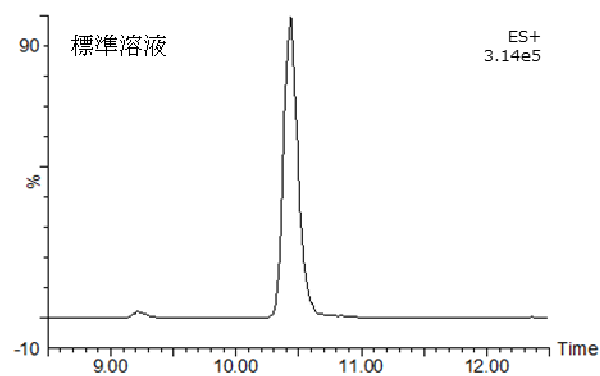
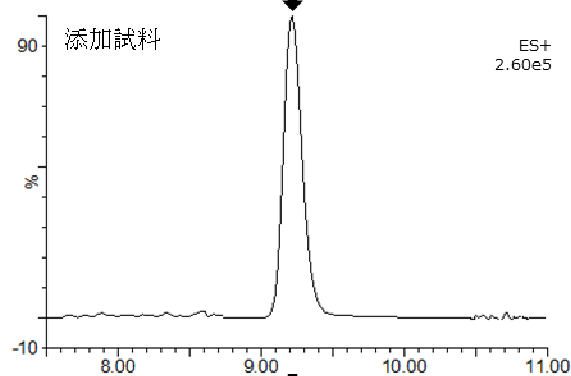
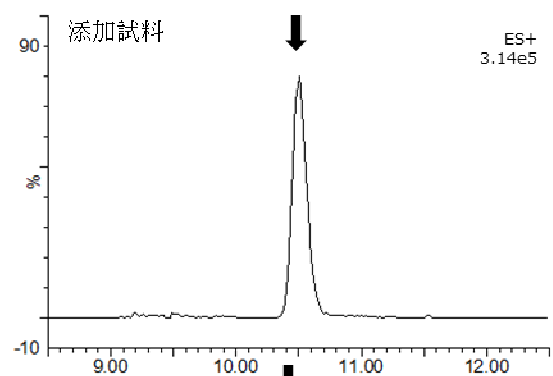
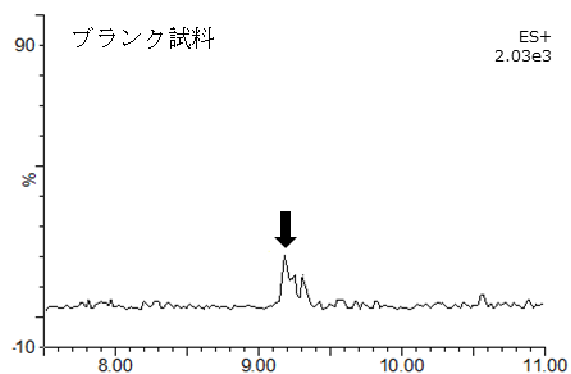
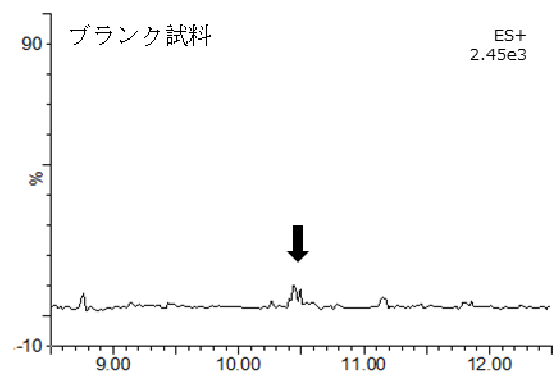




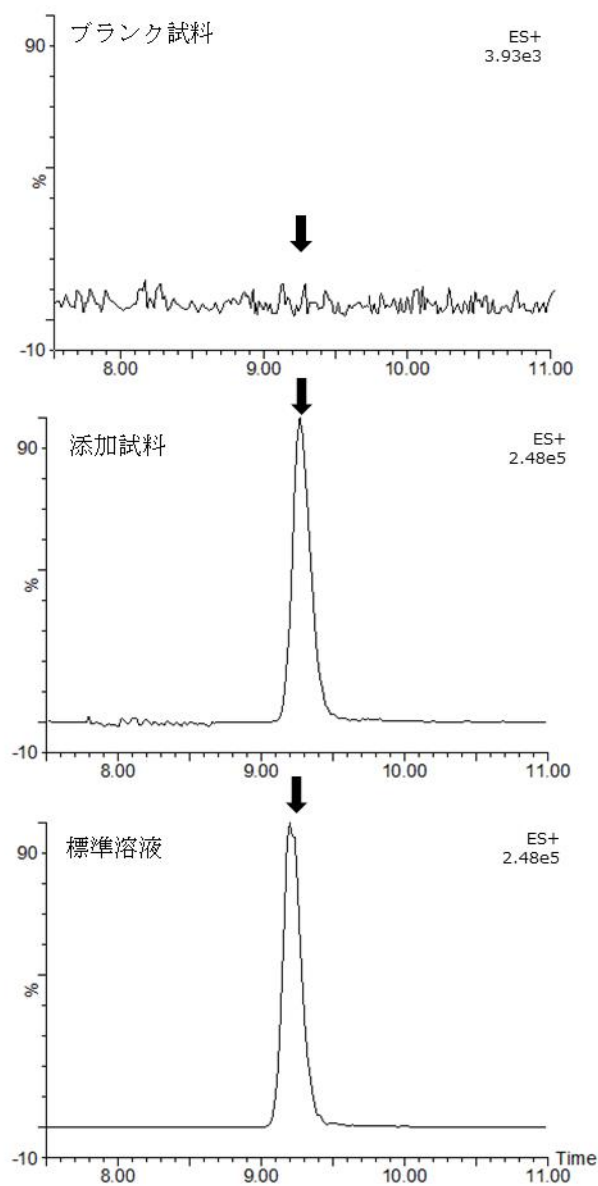
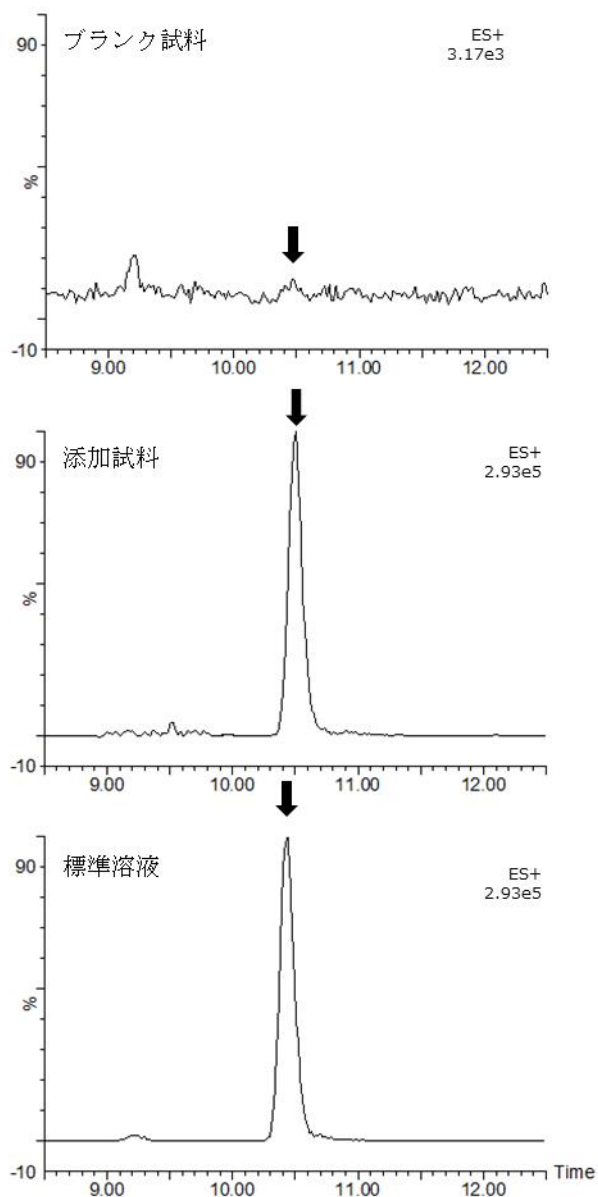


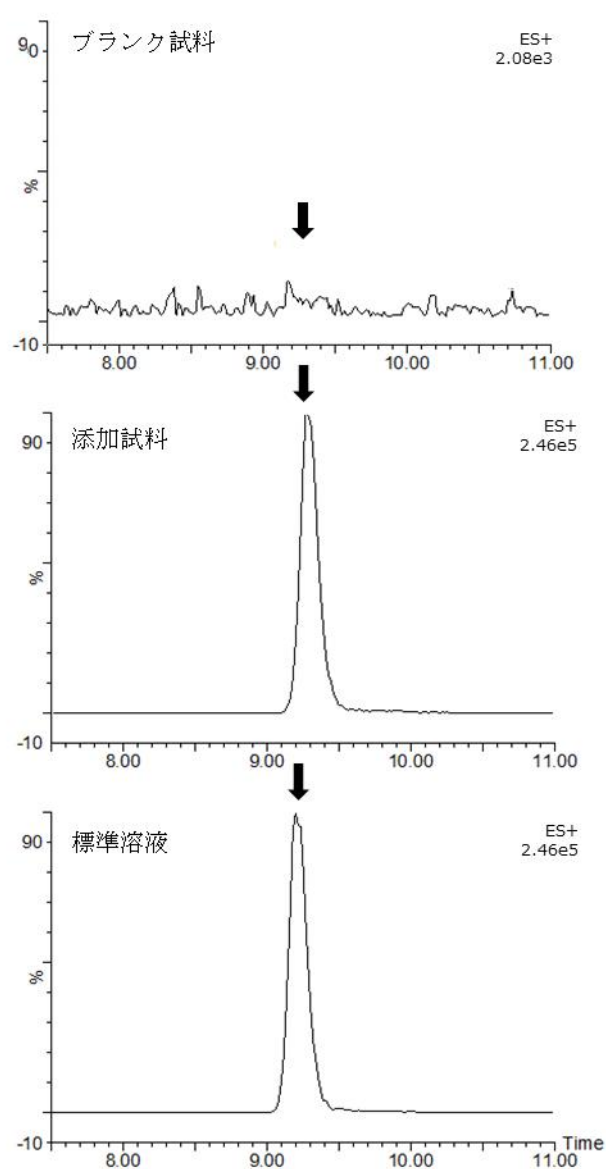
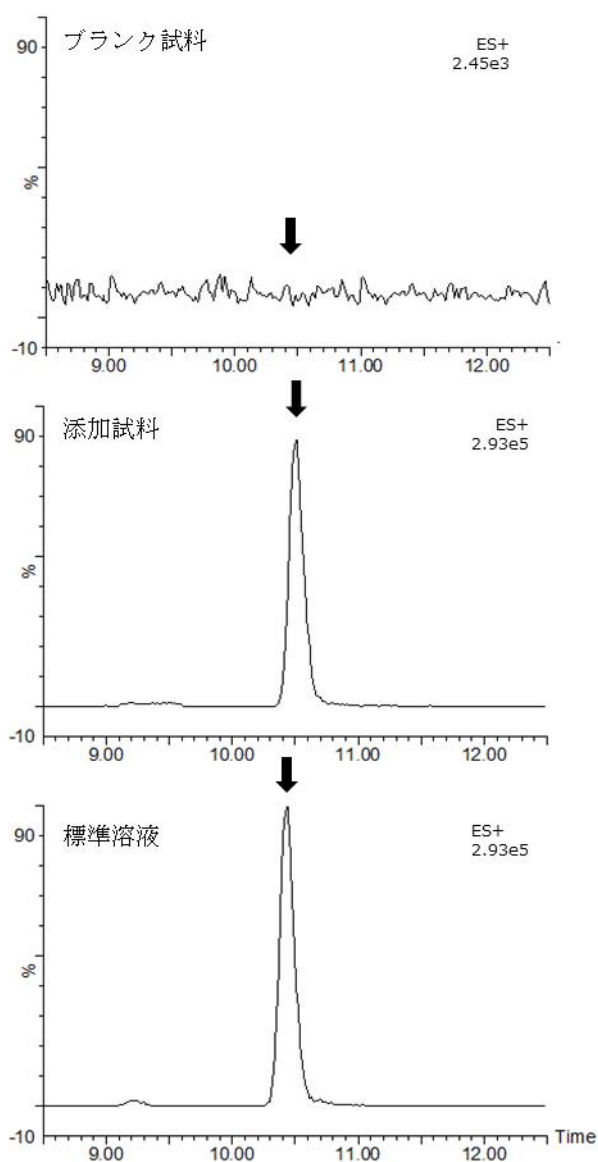
②定量限界における代表的なクロマトグラム（定量限界濃度）





図





③ ブランク試料の代表的なトータルイオンクロマトグラム

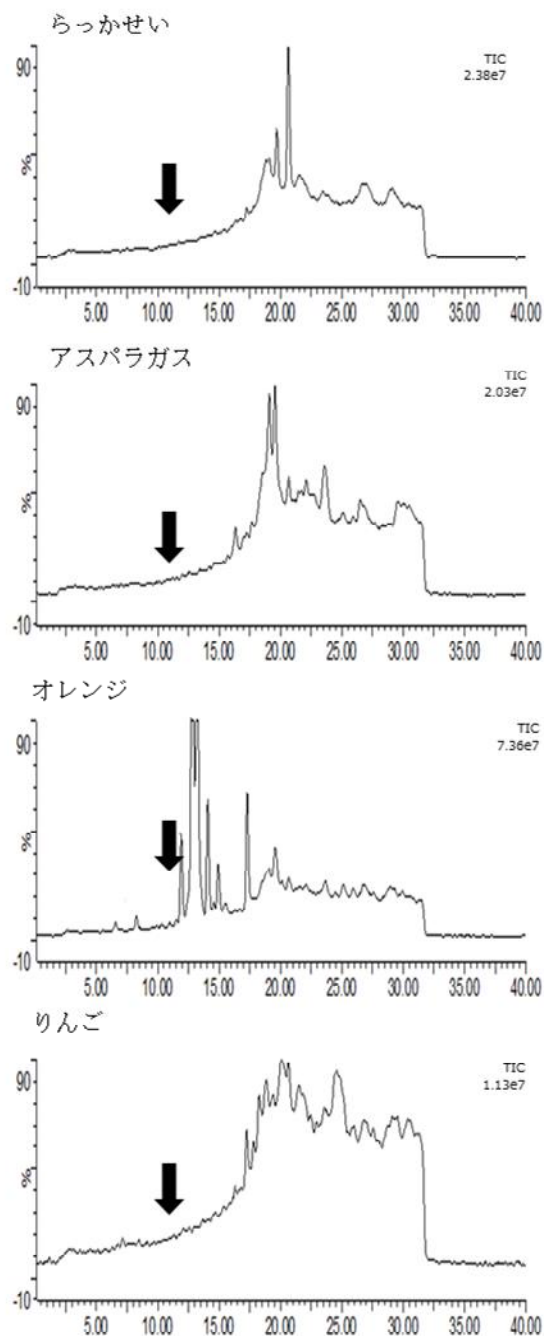


図 25 ブランク試料のトータルイオンクロマトム
測定条件： CV=50 V (CV : corn voltage)
(スキャン範囲： 50~1,000 m/z)

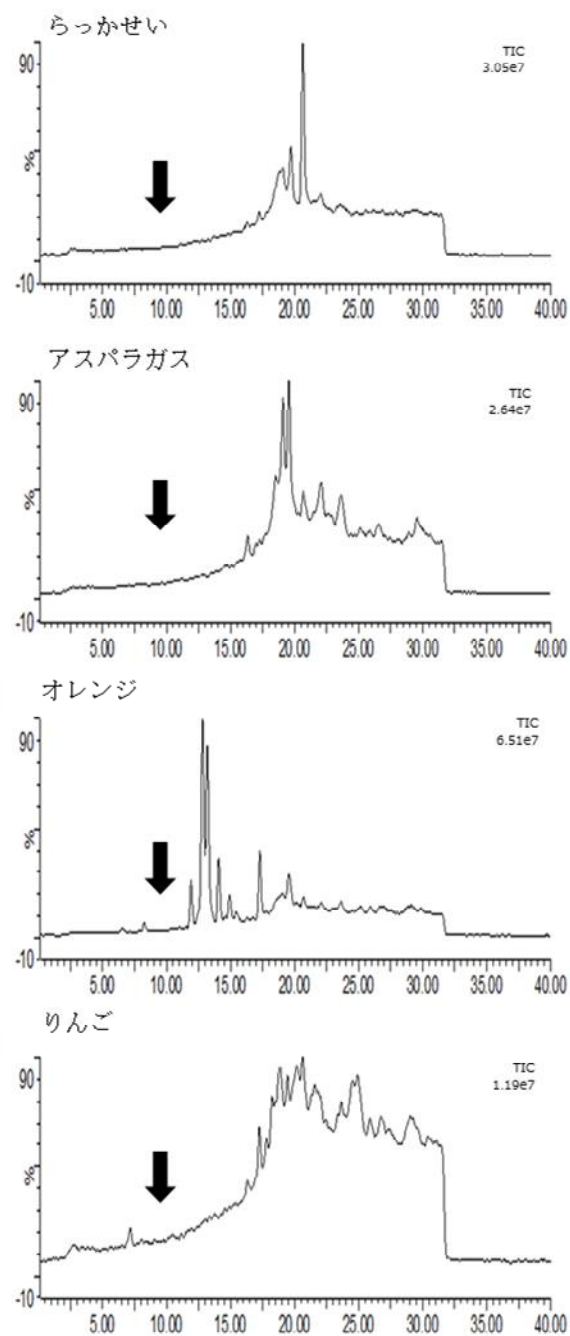


図 26 ブランク試料のトータルイオンクロマトグラム
測定条件： CV=40 V (CV : corn voltage)
(スキャン範囲： 50~1,000 m/z)