

※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。

平成26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

フルオピコリド試験法(畜水産物)

フルオピコリド試験法(畜水産物)の検討結果

[緒言]

1. 目的及び試験法の検討方針等

フルオピコリドの畜水産物中の分析法の開発を行った。フルオピコリドは、1998年にドイツのアグレボ社(現バイエルクロップサイエンス社)により開発された酸アミド系殺菌剤である。卵菌綱(Oomycetes)に属する各種作物のべと病及び疫病に対して薬効を示し、トマト及びミニトマト、はくさい、たまねぎ及びきゅうり等のべと病及び疫病に対して実用性を有する。作用機序は解明に至っていないが、脱共役作用、rRNA合成阻害、呼吸阻害以外の作用機序を有する可能性が示唆されている。

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(畜水産物)]の適用も試みたが、良好な結果が得られなかったことから、新たに個別試験法を開発した。

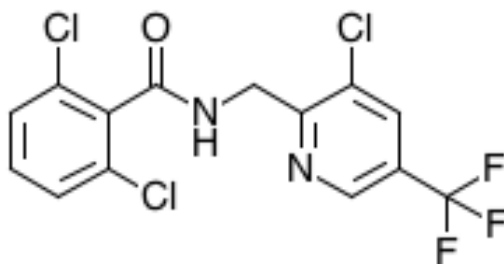
2. 分析対象化合物の構造式及び物理化学的性質

(1)分析対象化合物

和名 フルオピコリド

英名 fluopicolide

(2)構造式



(3)分子式 $C_{14}H_8Cl_3F_3N_2O$

(4)分子量 383.6

(5)CAS NO. 239110-15-7

(6)化学名

IUPAC名

和名 2,6-ジクロロ-N-[3-クロロ-5-(トリフルオロメチル)-2-ピリジルメチル]ベンズアミド

英名 2,6-dichloro-N-[3-chloro-5-(trifluoromethyl)-2-pyridylmethyl]benzamide

CAS名

和名 2,6-ジクロロ-N-[[3-クロロ-5-(トリフルオロメチル)-2-ピリジニル]メチル]ベンズアミド

英名 2,6-dichloro-N-[[3-chloro-5-(trifluoromethyl)-2-pyridinyl]methyl]benzamide

(7)外観 ベージュ色、粉末結晶

(8)融点 150°C

(9) 蒸気圧

3.03 × 10⁻⁷ Pa (20°C)

8.03 × 10⁻⁷ Pa (25°C)

(10) 解離定数 (pKa)

測定不能 (解離せず)

(11) 水溶解度 3.02mg/L (20°C)

(12) 有機溶媒溶解度

n-ヘキサン 0.20g/L (20°C)

トルエン 20.5g/L (20°C)

ジクロロメタン 126g/L (20°C)

酢酸エチル 37.7g/L (20°C)

アセトン 74.7g/L (20°C)

ジメチルスルホキシド 183g/L (20°C)

エタノール 19.2g/L (20°C)

(13) 1-オクタノール/水分配係数 (log Pow)

logPow = 2.9 (20°C)

logPow = 3.26 (22 ± 1°C)

(14) 加水分解性

分解率 (50°C) pH 4 3.7%

pH 7 7.9%

pH 9 11.0%

半減期 (25°C) pH 4 365 日

pH 7 330 日

pH 9 365 日

(15) 水中光分解性

pH 7 緩衝液 フェニル標識体

半減期 (25°C) 32.1 日 (太陽光 (春季、東京) に換算して 231 日)

光強度 55.88W/m² (300~400nm)

pH 7 緩衝液 ピリジル標識体

安定 (25°C) 試験期間 10 日間 (太陽光に換算して 64 日)

光強度 63W/m² (300~400nm)

(16) 熱安定性

320°C で分解 (常圧)

[出典: ① 沢田 勝鏡, 近年開発されたべと・疫病防除薬剤の各種特性と効果的な使用方法-新規化合物フルオピコリド-, EBC 研究会誌 5, 49-55, 2009.

② 独立行政法人農林水産消費安全技術センター (FAMIC), 農薬抄録及び評価書, 農薬抄録 一般名

フルオピコリド(殺菌剤), <http://www.acis.famic.go.jp/syouroku/fluopicolide/index.htm>, 2012 年 9 月 25 日掲載.]

3. 基準値

食品名	基準値(ppm)
牛の筋肉	0.01
豚の筋肉	0.01
その他の陸棲哺乳類に属する動物の筋肉	0.01
牛の脂肪	0.01
豚の脂肪	0.01
その他の陸棲哺乳類に属する動物の脂肪	0.01
牛の肝臓	0.01
豚の肝臓	0.01
その他の陸棲哺乳類に属する動物の肝臓	0.01
牛の腎臓	0.01
豚の腎臓	0.01
その他の陸棲哺乳類に属する動物の腎臓	0.01
牛の食用部分	0.01
豚の食用部分	0.01
その他の陸棲哺乳類に属する動物の食用部分	0.01
乳	0.02
鶏の筋肉	0.01
その他の家きんの筋肉	0.01
鶏の脂肪	0.01
その他の家きんの脂肪	0.01
鶏の肝臓	0.01
その他の家きんの肝臓	0.01
鶏の腎臓	0.01
その他の家きんの腎臓	0.01
鶏の食用部分	0.01
その他の家きんの食用部分	0.01
鶏の卵	0.01
その他の家きんの卵	0.01

[実験方法]

1. 試料

検討には、牛の筋肉、鶏の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、鶏卵、牛乳、はちみつ、うなぎ、さけ及びしじみを試料として用いた。うなぎ以外は、いずれも東京都内で流通していたものを購入した。うなぎは大阪府内より通販で購入した。

試料、産地を以下に記載した。

試料名	産地
牛の筋肉	アメリカ産
鶏の筋肉	国産
牛の脂肪	国産
牛の肝臓	オーストラリア産
鶏卵	国産
牛乳	国産
はちみつ	国産
うなぎ	うなぎ(養殖) 鹿児島県
さけ	生銀鮭(養殖) 宮城県
しじみ	島根県

各試料の採取方法を以下に記載した。

- (1) 牛の筋肉
試料を細切したのちフードプロセッサーを用いて均一化した。
- (2) 鶏の筋肉
試料を細切したのちフードプロセッサーを用いて均一化した。
- (3) 牛の脂肪
試料を約 40℃に加温したのちフードプロセッサーを用いて均一化した。
- (4) 牛の肝臓
試料を細切したのちフードプロセッサーを用いて均一化した。
- (5) 鶏卵(殻を除去したもの)
試料をフードプロセッサーを用いて均一化した。
- (6) 牛乳
試料をフードプロセッサーを用いて均一化した。
- (7) はちみつ
試料を 30℃に加温したのちフードプロセッサーを用いて均一化した。
- (8) うなぎ(頭を落としたもの)
試料を細切したのち粉砕器を用いて均一化した。
- (9) さけ(可食部)
試料をフードプロセッサーを用いて均一化した。
- (10) しじみ(殻を除去したもの)
試料をフードプロセッサーを用いて均一化した。

2. 試薬・試液

フルオピコリド標準品：純度 99.9%、融点 151.3~151.7℃(Sigma-Aldrich 製)

アセトン、アセトニトリル、*n*-ヘキサン、酢酸エチル、ジエチルエーテル：残留農薬試験用(和光純薬工業製)

アセトニトリル：LC-MS 用(和光純薬工業製)

ギ酸：LC-MS 用(和光純薬工業製)

多孔性ケイソウ土カラム(10 mL 保持用)：Chem Elut CE1020(アジレント製)、InertSep K-solute(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：InertSep C₁₈(1 mg/6mL、ジーエルサイエンス製)

エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラム(500 mg): InertSep PSA(ジーエルサイエンス製)
 グラファイトカーボンミニカラム(250mg 及び 500 mg): InertSep GC(ジーエルサイエンス製)

標準原液: フルオピコリド標準品 20mg を精秤し、アセトニトリルで溶解して 1000 mg/L 溶液を調製した。

検量線用標準溶液: 標準原液をアセトニトリルで適宜希釈し、0.0000125~0.00015 mg/L の各溶液を調製した。

添加用標準溶液: 標準原液をアセトンで希釈して 1 mg/L 溶液を調製した。

3. 装置

ホモジナイザー: ヒスコロン NS-52(マイクロテック・ニチオン製)

粉碎器: ダンシングアジテーター.(廣澤鉄工所製)

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)

遠心分離器: AX-321(トミー精工製)

アスピレーター: MDA-015(アルバック機工製)

吸引マニホールド: GL-SPE吸引マニホールド(ジーエルサイエンス製)

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	L-column2 ODS(内径 2.1 mm、長さ 100 mm、粒子径 5 μ m: 化学物質評価研究機構製)																	
移動相流速(mL/min)	0.30																	
注入量(μ L)	5																	
カラム温度($^{\circ}$ C)	40																	
移動相	A 液: 2 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 B 液: アセトニトリル																	
グラジエント条件	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間(分)</th> <th>A 液(%)</th> <th>B 液(%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.0</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>8.0</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>9.0</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>9.1</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> </tbody> </table>			時間(分)	A 液(%)	B 液(%)	0.0	90	10	8.0	10	90	9.0	10	90	9.1	90	10
時間(分)	A 液(%)	B 液(%)																
0.0	90	10																
8.0	10	90																
9.0	10	90																
9.1	90	10																
MS 条件																		
測定モード	SRM																	
イオン化モード	ESI(+)																	
キャピラリ電圧(kV)	3.00																	
ソース温度($^{\circ}$ C)	100																	
脱溶媒温度($^{\circ}$ C)	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 (<i>m/z</i>)	MS/MS: +383→173[コーン電圧 28(V)、コリジョンエネルギー24(eV)]
定性イオン (<i>m/z</i>)	MS/MS: +383→109[コーン電圧 28(V)、コリジョンエネルギー55(eV)]
保持時間 (min)	6.1

5. 定量

フルオピコリド標準品 20 mg を精秤し、アセトニトリルに溶解して 1000 mg/L 溶液を調製した。この溶液をアセトニトリルで希釈して 0.0000125、0.000025、0.0000375、0.00005、0.0000625、0.000075、0.0001、0.000125 及び 0.00015 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) 牛の筋肉(添加濃度:0.01 mg/kg)

試料 10.0 g に添加用標準溶液 0.1 mL(アセトン溶液)を添加しよく混合した後、30 分間放置した。

(2) 鶏の筋肉(添加濃度:0.01 mg/kg)

試料 10.0 g に添加用標準溶液 0.1 mL(アセトン溶液)を添加しよく混合した後、30 分間放置した。

(3) 牛の脂肪(添加濃度:0.01 mg/kg)

試料 10.0 g を採り、約 40°C で加温して融解させたものに添加用標準溶液 0.1 mL(アセトン溶液)を添加してよく混合した後、放置(室温)して再度凝固させた後、30 分間放置した。

(4) 牛の肝臓(添加濃度:0.01 mg/kg)

試料 10.0 g に添加用標準溶液 0.1 mL(アセトン溶液)を添加しよく混合し、30 分間放置した。

(5) 鶏卵(添加濃度:0.01 mg/kg)

試料 10.0 g に添加用標準溶液 0.1 mL(アセトン溶液)を添加しよく混合した後、30 分間放置した。

(6) 牛乳(添加濃度:0.02 mg/kg)

試料 10.0 g に添加用標準溶液 0.2 mL(アセトン溶液)を添加しよく混合した後、30 分間放置した。

(7) はちみつ(添加濃度:0.01 mg/kg)

試料 10.0 g に添加用標準溶液 0.1 mL(アセトン溶液)を添加しよく混合した後、30 分間放置した。

(8) うなぎ(添加濃度:0.01 mg/kg)

試料 10.0 g に添加用標準溶液 0.1 mL(アセトン溶液)を添加しよく混合した後、30 分間放置した。

(9) さけ(添加濃度:0.01 mg/kg)

試料 10.0 g に添加用標準溶液 0.1 mL(アセトン溶液)を添加しよく混合した後、30 分間放置した。

(10) しじみ(添加濃度:0.01 mg/kg)

試料 10.0 g に添加用標準溶液 0.1 mL(アセトン溶液)を添加しよく混合した後、30 分間放置した。

7. 試験溶液の調製

概要

フルオピコリドを試料からアセトンで抽出し、多孔性ケイソウ土カラムで脱脂し、グラファイトカーボンミニカラム及びエチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムで精製した後、LC-MS/MSで定量及び確認した。

(1) 抽出

試料 10.0 g を 100 mL ポリプロピレン製遠心管 (AGC テクノグラス製) に採り、塩化ナトリウム 1 g 及び 1 vol% ギ酸 10 mL を加えた。これにアセトン 50 mL を加えてホモジナイズした後、毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離し、上澄液を 100 mL 容メスフラスコに採取した。残留物にアセトン 25 mL を加え、ホモジナイズした後、毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離する。得られた有機層を合わせ、アセトンを加えて正確に 100 mL とした。

(2) 精製

① 多孔性ケイソウ土カラムクロマトグラフィー

多孔性ケイソウ土カラム[InertSep K-solute(10 mL 保持用)]に1)で得られた溶液 10 mL を注入し、吸引マニホールドを用いて、-0.02 MPa(バキュームゲージ)で 5 分間吸引して乾燥した。アセトニトリル 100 mL を注入し、全溶出液をナス型フラスコに採り、減圧濃縮装置を用いて 40°C以下で約 3 mL まで濃縮した。

②グラファイトカーボンミニカラム及びエチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムクロマトグラフィー

グラファイトカーボンミニカラム[InertSep GC(250 mg/3 mL)]にアセトニトリル 10 mL を注入し、流出液は捨てた。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)]にアセトニトリル 10 mL を注入し、流出液は捨てた。グラファイトカーボンミニカラムの下にエチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムを連結し、①で得られた溶液を注入した後、容器をアセトニトリル各 2 mL ずつで 3 回洗い、洗液をカラムに注入し、さらにアセトニトリル 10 mL 注入し、全溶出液を合わせ、正確に 20 mL としたものを試験溶液とした。

[分析法フローチャート]

秤取

- ↓ 試料 10.0 g に塩化ナトリウム 1 g 及び
- ↓ 1 vol%ギ酸 10 mL を加える

アセトン抽出

- ↓ アセトン 50 mL を加えホモジナイズ
- ↓ 遠心分離
- ↓ 残留物にアセトン 25 mL を加えホモジナイズ
- ↓ 遠心分離
- ↓ アセトン層を合わせ、100 mL に定容

多孔性ケイソウ土カラム [10 mL 保持用]

- ↓ 抽出液 10 mL を注入
- ↓ 吸引乾燥
- ↓ アセトニトリル 100 mL 溶出

濃縮 (溶媒除去)

- ↓ 約 3mL まで濃縮

グラファイトカーボンミニカラム [InertSep GC (250mg/3mL)]

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 (500mg/3mL)]

- ↓ アセトニトリル 10 mL でコンディショニング
- ↓ 濃縮液を注入
- ↓ 容器をアセトニトリル 2 mL で 3 回洗いこみ、注入
- ↓ アセトニトリル 10 mL を注入
- ↓ 全溶出液を合わせ 20 mL に定容

試験溶液

↓

LC-MS/MS

[結果及び考察]

1. 測定条件の検討

(1) MS条件の検討

フルオピコリド試験法(農産物)は、LC-MS又はLC-MS/MSを用いてESI(+)モードで測定及び確認する。同様にESIモードで測定する最適な条件を検討した。

フルオピコリドのESI(+)モード測定時のマスペクトルを図1に、ESI(-)モード測定時のマスペクトルを図2に示した。ESI(+)モードではフルオピコリドのプロトン付加分子(m/z 383 $[M+H]^+$)、ESI(-)モードでは脱プロトン化分子(m/z 381 $[M-H]^-$)のモル質量382に関するスペクトルが得られたが、ESI(-)モードでの感度はESI(+)モードの1/100以下の感度であったことから、測定にはESI(+)モードを用いることにした。

フルオピコリドのプロトン付加分子(m/z 383 $[M+H]^+$)をプリカーサーイオンとした。 m/z 383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及び図4に示した。フルオピコリド試験法(農産物)と同じく、 m/z 383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、イオン強度の最も高い m/z 173を定量用イオンに、次にイオン強度の高い m/z 109を定性用イオンとした。

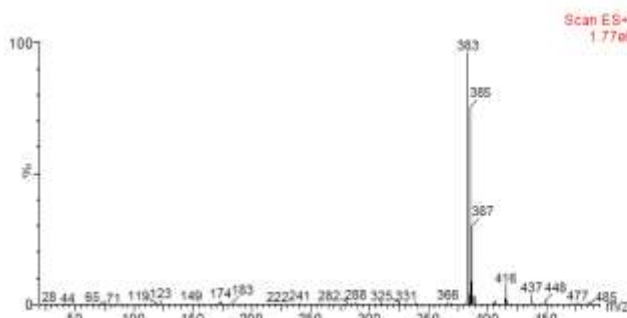


図1 フルオピコリドのマスペクトル
スキャン範囲: 50~1,000 amu
測定条件: ESI(+), CV=28 V
(CV: cone voltage),フルオピコリド: 0.1 mg/L

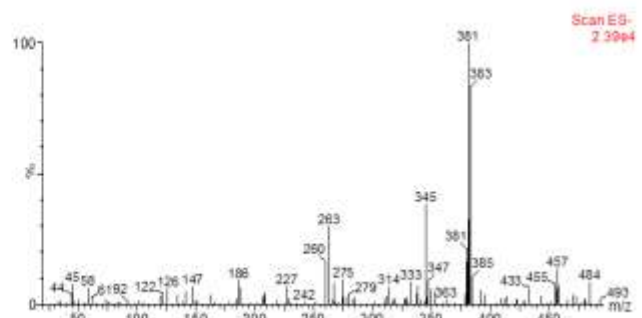


図2 フルオピコリドのマスペクトル
スキャン範囲: 50~1,000 amu
測定条件: ESI(-), CV=16 V
(CV: cone voltage),フルオピコリド: 0.1 mg/L

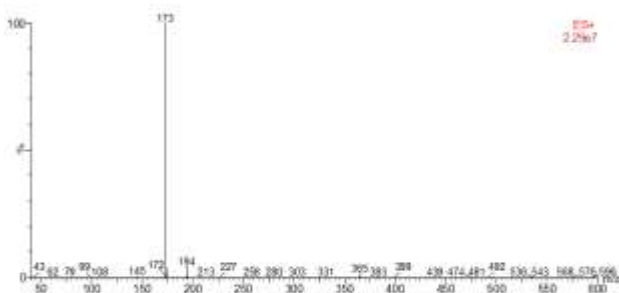


図3 フルオピコリドのプロダクトイオンスペクトル
(定量用)
プリカーサーイオン: m/z 383
測定条件: ESI(+), CV=28 V, CE=24 eV
(CV: cone voltage, CE: collision energy)
フルオピコリド: 0.1 mg/L

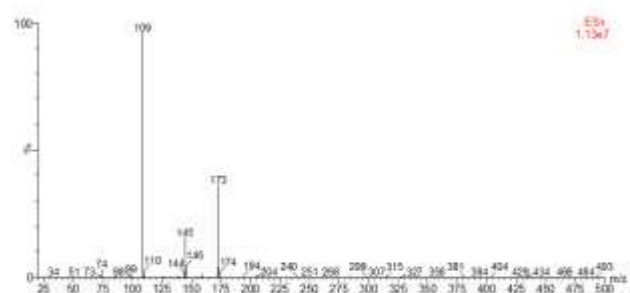


図4 フルオピコリドのプロダクトイオンスペクトル
(定性用)
プリカーサーイオン: m/z 383
測定条件: ESI(+), CV=28 V, CE=55 eV
(CV: cone voltage, CE: collision energy)
フルオピコリド: 0.1 mg/L

(2) LC条件の検討

フルオピコリド試験法(農産物)の検討に用いられている分析カラム及び移動相条件を確認し、同様の測定条件となるよう検討した。

分析カラムは、L-column2 ODS(内径 2.1 mm、長さ 100 mm、粒子径 5 μ m: 化学物質評価研究機構製)を用いて検討を行ったところ、フルオピコリドのピーク形状、分離及び再現性について良好な結果が得られたので、L-column2 ODS を使用することにした。

移動相条件については、アセトニトリル及び 2 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液(1:1) 混液でのアイソクラティック測定が用いられている。分析カラム内に残存するの試料由来の夾雑成分を迅速に流出させるため、また、後述する牛の肝臓での妨害ピークとの分離のため、グラジエントの測定の条件を検討した。

まず、酢酸アンモニウム濃度を検討した。その結果、面積値は、2 mmol/L 及び 3 mmol/L で同様な値が得られ、それ以上では減少した。フルオピコリド試験法(農産物)と同じく酢酸アンモニウム溶液はイオン化効率の安定する 2 mmol/L を用いることとした。次に、アセトニトリル及び 2 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液のグラジエント測定を検討した。アセトニトリル及び 2 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液(1:9)から(9:1)までの 8 分間のグラジエント条件で分析カラムからの試料成分流出のため、(9:1)で 1 分間保持した場合、フルオピコリドの保持時間は 6.1 分であった。

(3) 検量線

図 5 に 0.00125~0.00075 及び図 6 に 0.00025~0.0015 mg/L の濃度範囲で作成したフルオピコリド検量線を示した。検量線の決定係数は、いずれも 0.999 以上であり良好な直線性を示した。

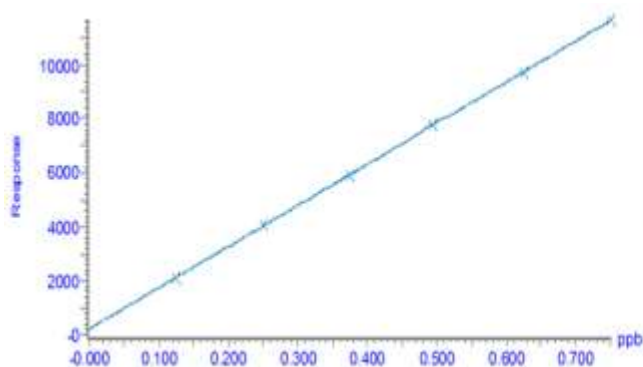


図 5-1. フルオピコリド検量線の例
 $y = 15222.8x + 227.695$
 $r^2 = 0.999910$

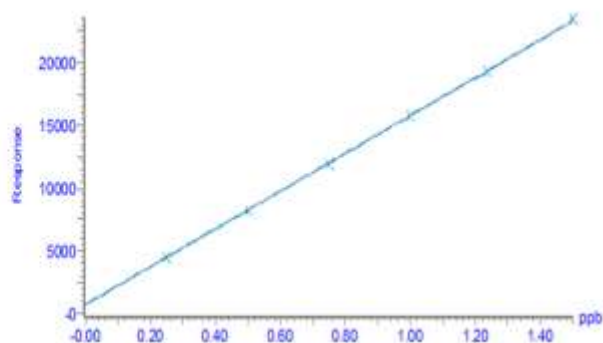


図 5-2. フルオピコリド検量線の例(乳)
 $y = 15027.4x + 741.62$
 $r^2 = 0.999829$

(4) 定量限界

定量限界の算出結果を以下に示した。

フルオピコリド: 0.01 mg/kg 【20(mL)/1(g)] × [0.005(ng)/5(μ L)]】

2. 試験溶液調製法の検討

(1) 抽出方法の検討

抽出溶媒としてアセトン、アセトン及び *n*-ヘキサン混液(1:1 及び 1:2)、アセトン及びアセトニトリル混液(1:1)、酢酸エチル、酢酸エチル及びアセトニトリル混液(1:1)、ジエチルエーテル及びアセトニトリル混液(1:1)について検討した。水 10mL に 1 mg/L(アセトン溶液)0.1mL を添加し、塩化ナトリウム 1g を加え、各溶媒 50 mL、25 mL で 1 分間ホモジナイズ後、毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離した。得られた上層を合わせ 100 mL に定容後、5 mL 分取し、アセトニトリルに置換後、LC-MS/MS で測定した。表 1 に添加したフルオピコリドの回収結果を示した。

アセトン、酢酸エチル及びジエチルエーテルで 99%以上の結果であった。通知一斉試験法[LC/MS による農薬等の一斉試験法(畜水産物)]で用いられるアセトン及び *n*-ヘキサン混液(1:2)では 60%未満と低かつ

た。これは、フルオピコリドの *n*-ヘキサンへの溶解性(溶解度 0.20g/L (20°C))が十分ではないことによると考えられる。

次に、回収率の高かったアセトン、酢酸エチル及びジエチルエーテルを用いて、牛の筋肉、鶏の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、鶏卵、牛乳、はちみつ、うなぎ、さけ及びしじみを試料として、水 10mL、塩化ナトリウム 1g、各溶媒 50 mLを加え、1 分間ホモジナイズ後、毎分 3000 回転で5 分間遠心分離した。その結果、アセトン以外ではエマルジョンを形成する試料があり、上層を分取することが困難であった。そこでフルオピコリドの回収率が高く、抽出液を分取しやすいアセトンを抽出溶媒に用いることにした。

表1 抽出溶媒の検討

溶媒	回収率(%)		
	50mL (1 回目)	25mL (2 回目)	合計
アセトン	95.8	3.6	99.4
アセトン・ <i>n</i> -ヘキサン(1:1)	56.8	5.3	62.1
アセトン・ <i>n</i> -ヘキサン(1:2)	55.2	4.7	59.9
アセトン・アセトニトリル(1:1)	94.9	4.7	99.6
酢酸エチル	95.6	4.3	99.9
酢酸エチル・アセトニトリル(1:1)	94.7	4.2	98.9
ジエチルエーテル	93.0	5.8	98.8
ジエチルエーテル・アセトニトリル(1:1)	91.9	4.2	96.1

添加濃度:0.01 mg/kg(*n*=1)

(2) 塩化ナトリウム及びギ酸添加の検討

回収率の向上のため塩化ナトリウム及びギ酸の添加を検討した。

牛の肝臓に 1 mg/L(アセトン溶液)0.1mL を添加し、30 分放置後、水 10 mL、塩化ナトリウム 1g を加え、アセトン抽出後、グラファイトカーボンミニカラム及びエチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムで精製を行った後、試験溶液とした。塩化ナトリウム 1g を加えた場合と加えなかった場合の回収結果を表 2 に示した。

塩化ナトリウムを加えた場合のほうが 91.5%と高いことから、塩析効果によると考えられる回収率の向上が見られた。

表 2 塩化ナトリウム添加による回収率への影響

塩化ナトリウム(g)	0	1
回収率(%)	79.6	91.5

添加濃度:0.01 mg/kg(*n*=1)

次に、牛の肝臓による分解の可能性も考慮し、ギ酸溶液添加による回収率の向上を検討した。

牛の肝臓に、1 mg/L(アセトン溶液)0.1mL を添加し、30 分放置後、塩化ナトリウム 1g を加え、ギ酸溶液を各 10 mL ずつ加え、アセトン抽出後、グラファイトカーボンミニカラム及びエチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムで精製を行った後、試験溶液とした。ギ酸溶液を加えた場合と加えなかった場合の回収結果を表 3 に示した。

ギ酸溶液を加えることにより、回収率の向上がみられ、また、ギ酸濃度が 1 vol%ではクロマトグラム上でフルオピコリドに近接していたマトリックスピークが減少したことから、1 vol%ギ酸溶液添加を採用することとした。

表 3 ギ酸溶液添加による回収率への影響

ギ酸濃度(vol%)	0	0.01	0.05	0.1	0.2	0.5	1
回収率(%)	91.5	99.2	99.2	99.4	96.6	99.6	99.9

添加濃度:0.01 mg/kg(n=1)

次に、1 vol%ギ酸溶液を加えた場合の塩化ナトリウムの添加量を検討した。

牛の筋肉、鶏の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、鶏卵、牛乳、はちみつ、うなぎ、さけ及びしじみを試料として、1 mg/L(アセトン溶液)0.1mLを添加し、30分放置後、1 vol%ギ酸溶液 10mL、塩化ナトリウム 0.5~3gを加えアセトン抽出後、グラファイトカーボンミニカラム及びエチレンジアミン-N-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムで精製を行った後、試験溶液とした。塩化ナトリウム 0.5~3gを加えた場合と加えなかった場合の回収結果を表 4 に示した。

その結果、はちみつでは塩化ナトリウムを添加した場合に、顕著な回収率の向上が見られた。その他の試料においても回収率の向上が見られたが、添加量は 1 g~3 g では回収率に大きな違いが見られなかった。1 g より多く塩化ナトリウムを加えた場合、ホモジナイズ時に試料の分散が均一に行われにくく、シャフトに付着しやすい傾向が見られたことから、回収率がよく、ホモジナイズ時に均一になる 1 g を採用することとした。

表 4 塩化ナトリウム量による回収率への影響

試料名	回収率(%)				
	塩化ナトリウム量(g)				
	0	0.5	1	2	3
牛の筋肉	84.3	91.5	98.3	98.0	98.2
鶏の筋肉	90.1	97.5	97.7	97.5	101.0
牛の肝臓	89.1	92.2	97.3	96.8	93.1
牛の脂肪	90.6	95.5	95.8	95.4	90.6
牛乳	95.7	95.5	100.6	97.5	100.3
鶏卵	88.0	93.1	95.6	95.2	96.5
はちみつ	69.3	79.6	93.5	92.3	92.6
うなぎ	97.1	100.0	100.3	99.7	99.0
さけ	98.8	98.2	99.8	99.1	98.1
しじみ	89.6	96.7	97.7	97.4	95.2

添加濃度:0.01 mg/kg(n=1)

(3) 脱脂方法の検討

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。

10mL 保持用カラムに、0.01 mg/L(アセトン溶液) 1 mL 及びアセトン 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 10mL に定容後 LC-MS/MS で測定したときの結果を表 2 に示した。

アセトニトリル 100 mL で 97.8%以上の回収率が得られたことから、アセトニトリル 100 mL で溶出することとした。

表5 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(%)	
	K-solute	ChemElute
0- 30	60.4	85.4
30- 40	21.9	8.9
40- 50	7.9	1.9
50- 60	3.7	0.7
60- 70	2.3	0.3
70- 80	1.6	0.3
80- 90	0.6	0.2
90-100	0.1	0.1
100-110	0.1	0
110-120	0	0
120-130	0	0
合計	98.6	97.8

フルオピコリド0.01 mg/L(アセトン溶液)1 mL及びアセトン9 mLを負荷($n=1$)

(4) 精製法検討ならびにその他の基礎データ

フルオピコリド試験法(農産物)では、グラファイトカーボンミニカラム及びオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムを用いて精製を行っている。同様にグラファイトカーボンミニカラム及びオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムについて、また脂肪酸等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について検討を行った。

① 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(1g/6mL)]

カラムをアセトニトリル10 mLで予備洗浄した後、フルオピコリド0.01 mg/L(アセトニトリル溶液)0.5 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6に示した。フルオピコリドは、10 mLで溶出された。

表6 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

ミニカラム	充てん量	アセトニトリル量(mL)						合計
		1-5	5-10	10-15	15-20	20-25	25-30	
InertSep C ₁₈	1 g	94.6	4.8	0	0	0	0	99.4

フルオピコリド 0.01 mg/L(アセトニトリル溶液)0.5 mLを負荷($n=1$)

② グラファイトカーボンミニカラムによる精製 [InertSep GC(250 mg/3 mL 及び 500 mg/6 mL)]

カラムをアセトニトリル10 mLで予備洗浄した後、フルオピコリド0.01 mg/L(アセトニトリル溶液)0.5 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7に示した。フルオピコリドは、250 mgでは20 mLで、500 mgでは30 mLで溶出された。

表7 グラファイトカーボンミニカラムからの溶出状況

ミニカラム	充てん量	アセトニトリル量(mL)						合計
		1-5	5-10	10-15	15-20	20-25	25-30	
InertSep GC	250 mg	69.9	27.8	1.5	0.3	0	0	99.5
	500 mg	0.8	48.4	45.2	3.8	0.3	0.4	98.9

フルオピコリド0.01 mg/L(アセトニトリル溶液)0.5 mLを負荷($n=1$)

③ 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10 mLで予備洗浄した後、フルオピコリド0.01 mg/L(アセトニトリル溶液)0.5 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8に示した。フルオピコリドは、20 mLで溶出された。

表8 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

ミニカラム	充てん量	アセトニトリル量(mL)						合計
		1-5	5-10	10-15	15-20	20-25	25-30	
InertSep PSA	500 mg	94.4	2.7	1.8	0.3	0	0	99.2

フルオピコリド0.01 mg/L(アセトニトリル溶液)0.5 mLを負荷($n=1$)

④ カラムの組合せの検討

それぞれ単独で精製した場合、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム及びエチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムでは試料溶液の色素除去が不十分であり、また、グラファイトカーボンミニカラムにおいても、溶媒標準溶液とマトリックス添加標準溶液のピーク面積比に試料マトリックスによる影響がみられた。

そこで、グラファイトカーボンミニカラム及びオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムの組合せと、グラファイトカーボンミニカラム及びエチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムの組合せについて検討した。

カラムをアセトニトリル10 mLで予備洗浄した後、グラファイトカーボンミニカラムを上にしてカラムを連結し、フルオピコリド0.01 mg/L(アセトニトリル溶液)1 mLを負荷し、アセトニトリルで溶出したときの溶出状況を表9に示した。

グラファイトカーボンミニカラム250 mgと連結した場合はアセトニトリル20 mLで、グラファイトカーボンミニカラム500 mgと連結した場合はアセトニトリル30 mLで溶出した。

表9 連結カラムからの溶出状況

ミニカラム	充てん量	アセトニトリル量(mL)						回収率 (%)
		1-5	5-10	10-15	15-20	20-25	25-30	合計
InertSep GC+C18	250/500mg	18.2	81.3	0.3	0.2	0	0	100
	500/500mg	0.3	38.7	57.6	2.4	0.3	0.1	99.3
InertSep GC+PSA	250/500mg	19.8	79.7	0.3	0.1	0	0	99.9
	500/500mg	0.3	36.2	59.3	2.8	0.3	0.1	99.0

添加濃度:0.01 mg/kg($n=1$)

次に、牛の筋肉、鶏の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、鶏卵、牛乳、はちみつ、うなぎ、さけ及びしじみを試料として、抽出した溶液を表9の組合せ及び溶出量で精製し、減圧濃縮後、残留物の重量を測定した結果を表10に示した。

組合せることにより、いずれの組合せにおいても試料の色素は十分に除去することは可能であったが、グラファイトカーボンミニカラム及びエチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムの組合せでは、残留物重量は0.001 g未満であり、グラファイトカーボンミニカラム及びオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムの組合せよりも試料マトリックスの影響が受けにくいと考えられた。そこで、溶出液量が少ないグラファイトカーボンミニカラム250 mg及びエチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラム500 mgの組合せ

を用い、アセトニトリル20mLで溶出する条件を採用した。

表10 試料溶液精製後の残留物重量(g)

試料名	GC + C18 1 g		GC+PSA 500 mg	
	1 g+250 mg	1 g+500 mg	250 mg+500 mg	500 mg+500 mg
牛の筋肉	0.003	0.001	<0.001	<0.001
鶏の筋肉	0.002	0.002	<0.001	<0.001
牛の肝臓	0.015	0.008	<0.001	<0.001
牛の脂肪	0.008	0.002	<0.001	<0.001
牛乳	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
鶏卵	0.013	0.003	<0.001	<0.001
はちみつ	0.015	<0.001	<0.001	<0.001
うなぎ	0.014	0.002	<0.001	<0.001
さけ	0.015	0.006	<0.001	<0.001
しじみ	0.006	0.005	<0.001	<0.001

n=1

3. 添加回収試験

牛の筋肉、鶏の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、鶏卵、牛乳、はちみつ、うなぎ、さけ及びしじみの10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7～16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27に示した。

(1) 選択性

選択性の検討結果を表11に示した。検討した何れの試料においても、フルオピコリド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11 選択性の評価

担当機関：東京都健康安全研究センター

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (mg/kg)	基準値 ¹ (ppm)	添加濃度 ² (ppm)	妨害ピークの許容範囲		ピーク面積(高さ) ³			選択性の評価 ⁵	備考		
						評価対象濃度 (ppm)	判定基準	面積又は高さの別	ブランク試料 (a)	標準溶液 ⁴ (b)			面積(高さ)比 (a)/(b)	
	フルオピコリド	牛の筋肉	0.001	0.01	0.01	基準値	0.01	< 0.100	面積	22	8154	0.003	○	
		鶏の筋肉	0.001	0.01	0.01	基準値	0.01	< 0.100	面積	46	8988	0.005	○	
		牛の脂肪	0.001	0.01	0.01	基準値	0.01	< 0.100	面積	44	8988	0.005	○	
		牛の肝臓	0.001	0.01	0.01	基準値	0.01	< 0.100	面積	84	8706	0.010	○	
		鶏卵	0.001	0.01	0.01	基準値	0.01	< 0.100	面積	35	8700	0.004	○	
		牛乳	0.001	0.02	0.02	基準値	0.02	< 0.100	面積	37	8531	0.004	○	
		はちみつ	0.001	0.01	0.01	基準値	0.01	< 0.100	面積	32	8676	0.004	○	
		うなぎ	0.001	0.01	0.01	基準値	0.01	< 0.100	面積	39	8634	0.005	○	
		さけ	0.001	0.01	0.01	基準値	0.01	< 0.100	面積	54	8437	0.006	○	
		しじみ	0.001	0.01	0.01	基準値	0.01	< 0.100	面積	121	8890	0.014	○	

*1 基準値は、基準値未設定の場合には一律基準(0.01 ppm)を用いる。

2 添加濃度と評価対象濃度が異なる場合(定量限界と基準値との関係が、『定量限界<基準値<定量限界×3』となる場合)には、『』が表示される。『*』が表示された分析対象化合物は、添加濃度と評価対象濃度が異なるため、別途、定量限界濃度相当のマトリックス添加標準溶液を調製して評価する。

*3 ブランク試料及び標準溶液の順に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。)

*4 試料中の濃度が「評価対象濃度(基準値濃度又は定量限界濃度)」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。

*5 面積(高さ)比が、妨害ピークの許容範囲の判定基準に適合する場合には「○」、適合しない場合には「×」を記載する。

(2) 真度及び精度

真度及び併行精度の検討結果を表12に示した。真度は97～100%、併行精度は2～6%であり、目標値(真

度70~120%及び併行精度15>)に適合する結果であった。

表12 真度、精度及び定量限界の評価

担当機関: 東京都健康安全研究センター

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (mg/kg)	基準値 ¹ (ppm)	添加濃度 (ppm)	定量限界の評価 ²	検量線			回収率 (%)					真度 (%)	併行精度 (RSD%)	S/N比 ³			備考
							傾き	切片	r ² 値	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5			Max.	Min.	平均値	
	フルオピコリド	牛の筋肉	0.001	0.01	0.01	*	11210	-159	0.9973	104	98	97	103	97	100	3	—	—	—	
		鶏の筋肉	0.001	0.01	0.01	*	11401	-427	0.9978	97	105	92	104	98	99	5	—	—	—	
		牛の脂肪	0.001	0.01	0.01	*	9612	12	0.9981	97	95	100	94	103	98	4	—	—	—	
		牛の肝臓	0.001	0.01	0.01	*	10587	-462	0.9981	93	97	100	100	98	98	3	—	—	—	
		鶏卵	0.001	0.01	0.01	*	6841	-249	0.9972	95	103	101	96	98	98	3	—	—	—	
		牛乳	0.001	0.02	0.02	*	7863	-812	0.9990	100	101	98	105	98	100	3	—	—	—	
		はちみつ	0.001	0.01	0.01	*	10277	61	0.9959	99	101	101	86	96	97	6	—	—	—	
		うなぎ	0.001	0.01	0.01	*	10796	-275	0.9978	96	97	94	103	98	98	3	—	—	—	
		さけ	0.001	0.01	0.01	*	10534	-260	0.9982	96	97	101	98	102	99	2	—	—	—	
		しじみ	0.001	0.01	0.01	*	10451	-341	0.9982	95	98	105	96	98	99	4	—	—	—	

*1 基準値は、基準値未設定の場合には一律基準(0.01 ppm)を用いる。

2 添加濃度が定量限界濃度と異なる場合には、『』が表示される。その場合には、S/N比の算出は不要であるが、別途、定量限界の推定を行う。

*3 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比を求める。

(3) 定量限界

何れの食品も添加濃度が定量限界濃度と異なったため、定量限界の推定を行った。結果を表13に示した。また、定量限界の推定における代表的なクロマトグラムを図17~26に示した。

0.001 ppm相当のマトリックス添加標準溶液でのS/N比の平均値は22~31であり、全ての食品でS/N≥10を満たした。

表13 定量限界の推定

担当機関: 東京都健康安全研究センター

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (mg/kg)	基準値 ¹ (ppm)	添加濃度 (ppm)	定量限界の評価 ²	標準溶液濃度 ³ (mg/L)	ピーク面積(高さ) ⁴						S/N比		平均値		備考		
								面積又は高さの別	ブランク ⁵	マトリックス添加標準溶液			溶媒標準溶液			n=1	n=2		面積(高さ)比(%) ⁶	S/N比
	フルオピコリド	牛の筋肉	0.001	0.01	0.01	*	0.0001	面積	152	2010	1733	1720	1928	1933	1930	23	21	89	22	
		鶏の筋肉	0.001	0.01	0.01	*	0.0001	面積	97	1584	1577	1483	1742	1677	1709	30	32	87	31	
		牛の脂肪	0.001	0.01	0.01	*	0.0001	面積	121	1620	1555	1466	1742	1677	1709	30	22	86	26	
		牛の肝臓	0.001	0.01	0.01	*	0.0001	面積	149	1517	1404	1312	1531	1428	1480	20	25	89	22	
		鶏卵	0.001	0.01	0.01	*	0.0001	面積	91	1267	1306	1195	1531	1428	1480	30	29	81	30	
		牛乳	0.001	0.02	0.02	*	0.0001	面積	83	1307	1293	1217	1425	1507	1466	25	30	83	27	
		はちみつ	0.001	0.01	0.01	*	0.0001	面積	117	1436	1483	1343	1501	1484	1493	30	21	90	25	
		うなぎ	0.001	0.01	0.01	*	0.0001	面積	158	1448	1535	1333	1507	1496	1502	26	31	89	28	
		さけ	0.001	0.01	0.01	*	0.0001	面積	126	1776	1677	1601	1747	1446	1596	25	25	100	25	
		しじみ	0.001	0.01	0.01	*	0.0001	面積	290	1586	1560	1283	1466	1442	1454	21	25	88	23	

2 定量限界の推定を行う対象(添加濃度と定量限界濃度と異なる場合)には、『』が表示される。

*3 試料中の濃度が定量限界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。

*4 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回以上測定する。(必要に応じて起爆注入を行う。)

*5 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。

*6 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。

(4) 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14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0.93~1.02であり、何れの試料においても、顕著なマトリックスの測定への影響は認められなかった。

添加回収試験における真度を表14で求めたピーク面積比で除して補正真度を求め、表15に示した。補正真度は95~108%であり、目標値(真度70~120%)に適合する結果であった。

表14 試料マトリックスの測定への影響

担当機関: 東京都健康安全研究センター

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (mg/kg)	基準値 ¹ (ppm)	添加濃度 (ppm)	標準溶液濃度 ² (mg/L)	ピーク面積(高さ) ³						ピーク面積(高さ)比 ⁶	備考		
							面積又は高さの別	ブランク ⁴	マトリックス添加標準溶液 ⁵			溶媒標準溶液				
	フルオピコリド	牛の筋肉	0.001	0.01	0.01	0.001	面積	21	8154	7862	7987.4	8822	8363	8592.7	0.93	
		鶏の筋肉	0.001	0.01	0.01	0.001	面積	46	8988	8537	8716.6	8891	8895	8892.9	0.98	
		牛の脂肪	0.001	0.01	0.01	0.001	面積	55	4536	4521	4473.1	4565	4577	4571.1	0.98	
		牛の肝臓	0.001	0.01	0.01	0.001	面積	83	8706	8702	8620.9	8603	8715	8658.6	1.00	
		鶏卵	0.001	0.01	0.01	0.001	面積	35	8700	8271	8450.6	8565	8577	8571.1	0.99	
		牛乳	0.001	0.02	0.02	0.002	面積	37	18224	17326	17738.2	17756	17440	17597.8	1.01	
		はちみつ	0.001	0.01	0.01	0.001	面積	31	9192	8676	8903.0	8712	8869	8790.5	1.01	
		うなぎ	0.001	0.01	0.01	0.001	面積	39	8634	9215	8885.5	8612	8827	8719.6	1.02	
		さけ	0.001	0.01	0.01	0.001	面積	53	10644	10462	10500.0	10180	10437	10308.2	1.02	
		しじみ	0.001	0.01	0.01	0.001	面積	120	8890	9065	8857.7	8639	9007	8823.5	1.00	

*1 基準値は、基準値未設定の場合には一律基準(0.01 ppm)を用いる。

*2 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。

*3 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。)

*4 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。

*5 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。

*6 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 15 補正真度

食品名	真度 (%)	ピーク面積比	補正真度 (%)
牛の筋肉	100	0.93	108
鶏の筋肉	99	0.98	101
牛の脂肪	98	0.98	100
牛の肝臓	98	1.00	98
鶏卵	98	0.99	100
牛乳	100	1.01	100
はちみつ	97	1.01	95
うなぎ	98	1.02	96
さけ	99	1.02	97
しじみ	99	1.00	98

4. その他の試験法検討に関連する事項

採用しなかった検討事項について以下に示す。

(1) 脱脂方法の検討

①ゲル浸透クロマトグラフィー

脱脂方法として通知一斉試験法[LC/MS による農薬等の一斉試験法(畜水産物)]で用いられるゲル浸透クロマトグラフィーについて検討した。

ゲル浸透クロマトグラフィーでは、通知法の条件でアセトン及びシクロヘキサン(1:4)混液で溶出したところ、UV 測定では、アクリナトリンの保持時間からトリシクラゾールの溶出終了までの溶出液を分取することで十分な回収が得られると考えられた。

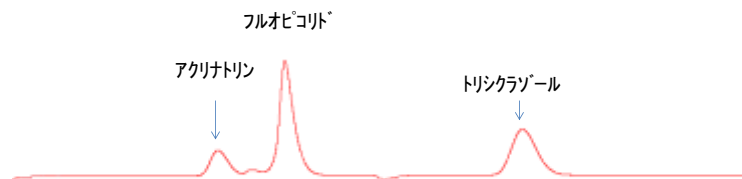


図 6 アクリナトリン、フルオピコリド及びトリシクラゾールの UV クロマトグラム

フルオピコリドの標準溶液を用いて検討を行った。フルオピコリド 1 mg/L アセトン溶液をアセトン及びシクロヘキサン(1:4)混液で希釈し、0.01 mg/L 溶液を作成した。その 5 mL をゲル浸透クロマトグラフィー用カラム(CLNpak EV-2000 AC(内径 20 mm、長さ 300 mm))に注入し、アセトン及びシクロヘキサン(1:4)混液で溶出し、40°C以下で濃縮後、残留物にアセトニトリルを加えて 10 mL に定容した。回収率は、54.8 ± 2.7%と(n=5)と低く、これは n-ヘキサン同様にフルオピコリドのシクロヘキサンへの溶解度が低いため、アセトン及びシクロヘキサン(1:4)混液に溶解しなかったことが原因と推察した。

②アセトニトリル/ヘキサン分配

フルオピコリド 0.01 mg/L 溶液 5 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 2 に示した。*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL で 99.5%の回収率が得られた。十分な回収率ではあったが、牛の筋肉、鶏の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、鶏卵、牛乳、はちみつ、うなぎ、さけ及びしじみの 10 食品のアセトン抽出溶液 10mL を濃縮後、同様に操作したところ若干のエマルジョン形成が見られ、操作性及びエマルジョン形成時の回収率低下を考慮し、多孔性ケイソウ土カラムによる脱脂を採用した。

表16 アセトニトリル/ヘキサン分配の検討

<i>n</i> -ヘキサン飽和 アセトニトリル	30 mL (1 回目)	30 mL (2 回目)	30 mL (3 回目)	合計
回収率 (%)	96.5±1.0	2.6±0.1	0.4±0.1	99.5±1.0

添加濃度:0.01 mg/kg (*n*=3)

(2)酸添加の検討

ギ酸の他に、リン酸及び塩酸の添加について検討した。

牛の肝臓に、1 mg/L(アセトン溶液)0.1mL を添加し、30 分放置後、塩化ナトリウム 1 g を加え、リン酸溶液を各 10 mL ずつ加えた場合の回収結果を表 17 に、塩酸溶液を各 10 mL ずつ加えた場合の回収結果を表 18 に示した。

リン酸では、いずれも添加した場合のほうが 93%以上の回収率であったが、塩酸では 0.1 mol/L より濃度が増加すると 89.5%以下の回収率であった。LC-MS/MS での測定を考慮し、析出しないギ酸を採用した(表 3 参照)。

表 17 リン酸溶液添加による回収率への影響

リン酸濃度 (vol%)	回収率(%)
0.01	93.0
0.05	95.7
0.1	97.4
0.2	96.4
0.5	95.4
1	95.8

添加濃度:0.01 mg/kg(n=1)

表 18 塩酸溶液添加による回収率への影響

塩酸濃度 (mol/L)	回収率(%)
0.01	92.8
0.05	94.8
0.1	96.7
0.2	86.6
0.5	89.5
1	87.6

添加濃度:0.01 mg/kg(n=1)

5. 考察

通知のLC/MS による農薬等の一斉試験法(畜水産物)を適用したところ、十分な回収率が得られなかった。低回収率の原因は、*n*-ヘキサン及びシクロヘキサンへの溶解性が十分ではないことによると考えられた。溶解度及び脂肪からの抽出を考慮し、抽出溶媒はアセトンを用い、回収率を高めることができた。

牛の肝臓での検討結果により、抽出の際に塩化ナトリウム及びギ酸を加えて抽出することとした。

脱脂操作では、操作の簡易性及び回収率低下の原因となるエマルジョン形成のない多孔性ケイソウ土カラムを採用した。

カラムによる精製では、一種類のカラムのみでは精製が不十分であったことから、試料溶液中の色素及び脂肪酸等を除去するため、グラファイトカーボンミニカラム及びエチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムを連結して用いた。

検討した試験法を用いて、牛の筋肉、鶏の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、鶏卵、牛乳、はちみつ、うなぎ、さけ及びしじみの10食品を試料に用いて、添加回収試験を実施した。その結果、選択性は良好で何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。真度97~100%、併行精度2~6%の良好な結果が得られたことから、本試験法は、畜水産物に適用可能であると判断された。

【結論】

畜水産物中のフルオピコリド試験法として、フルオピコリドを試料からアセトンで抽出し、多孔性ケイソウ土カラムで脱脂し、グラファイトカーボンミニカラム及びエチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムミニカラムで精製した後、LC-MS/MSで定量及び確認する方法を開発した。開発した試験法を牛の筋肉、鶏の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、鶏卵、牛乳、はちみつ、うなぎ、さけ及びしじみの10食品に適用した結果、真度97~100%、併行精度2~6%の良好な結果が得られた。また、定量限界として、0.01 mg/kgを設定可能であることが確認された。

【参考文献】

- 1) 残留農薬等公示分析法検討会, 通知法解説 食品中の残留農薬・動物用医薬品等試験法 37—食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法— (104)フルオピコリド(農産物), 食品衛生研究 Vol.5, 55-58, 2009.
- 2) 独立行政法人農林水産消費安全技術センター(FAMIC), 農薬抄録及び評価書, 農薬抄録 一般名 フルオピコリド(殺菌剤), <http://www.acis.famic.go.jp/syouroku/fluopicolide/index.htm>, 2012年9月25日掲載.

[クロマトグラム報告例]

① 添加回収試験における代表的なクロマトグラム

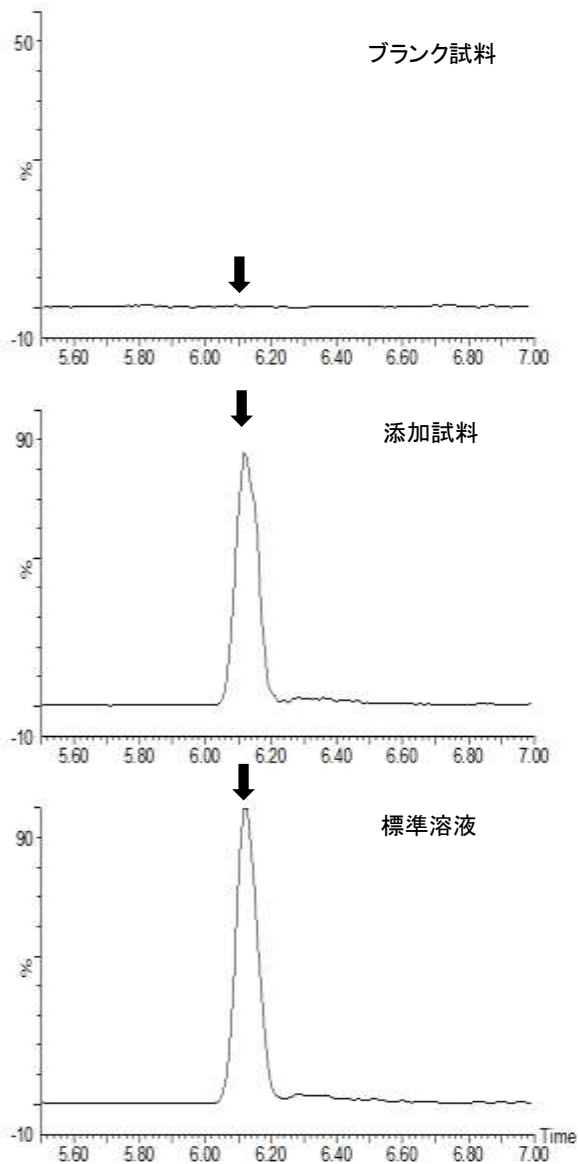


図 7 牛の筋肉の SRM クロマトグラム
(m/z +383→173)
添加濃度:0.01mg/kg

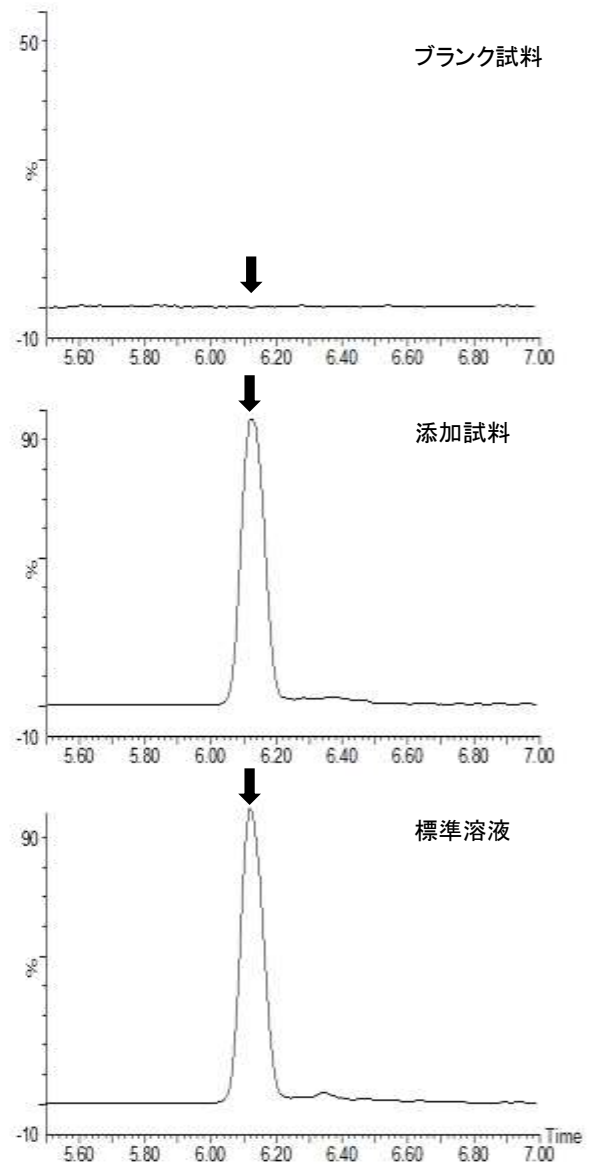


図 8 鶏の筋肉の SRM クロマトグラム
(m/z +383→173)
添加濃度:0.01mg/kg

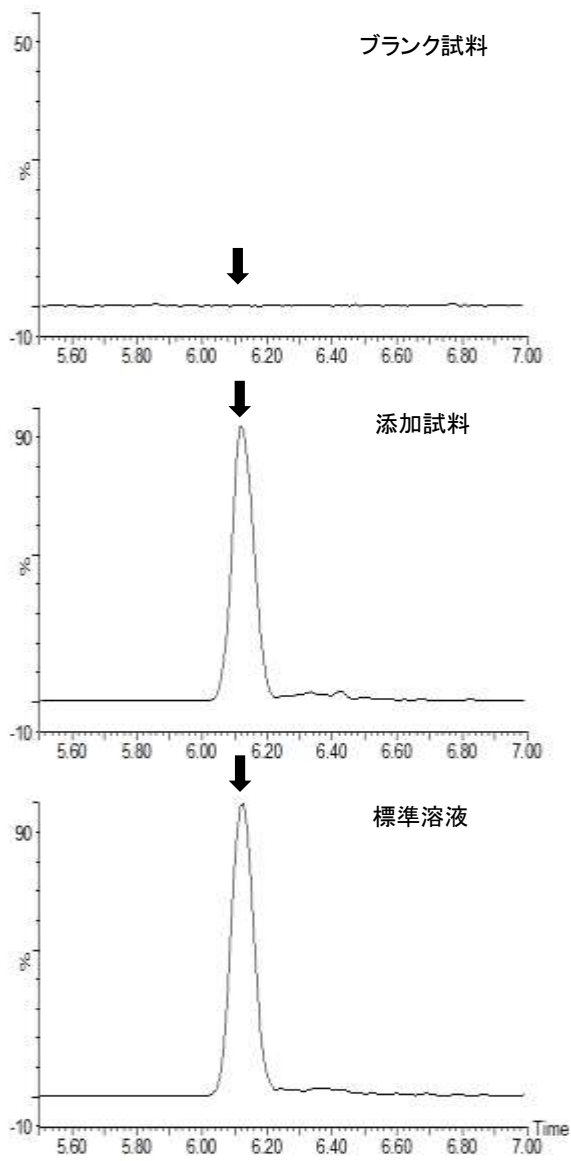


図 9 牛の脂肪の SRM クロマトグラム
(m/z +383→173)
添加濃度:0.01mg/kg

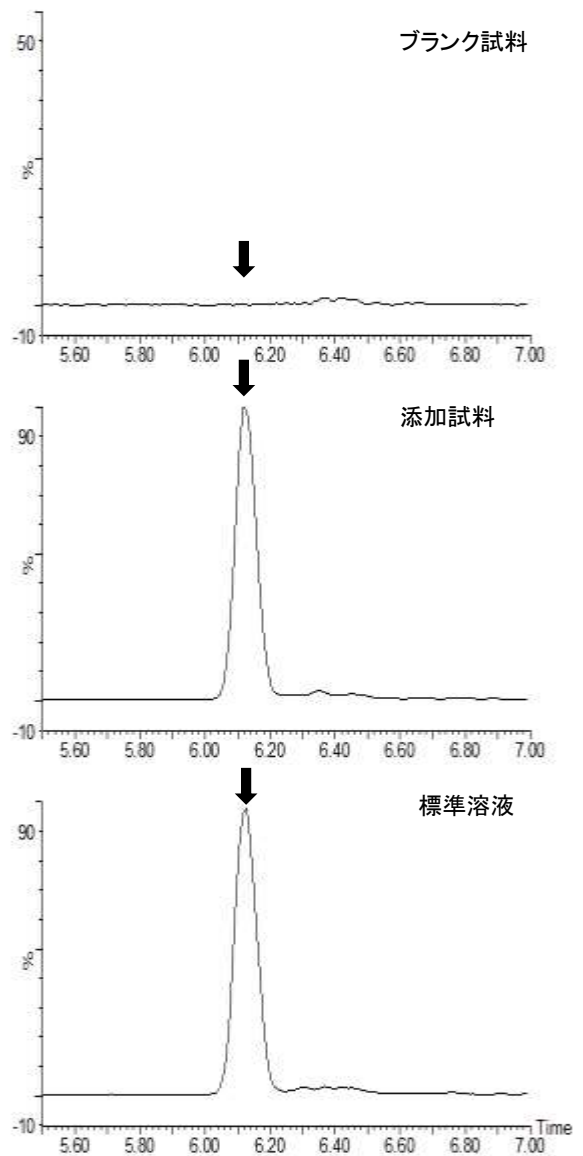


図 10 牛の肝臓 SRM クロマトグラム
(m/z +383→173)
添加濃度:0.01mg/kg

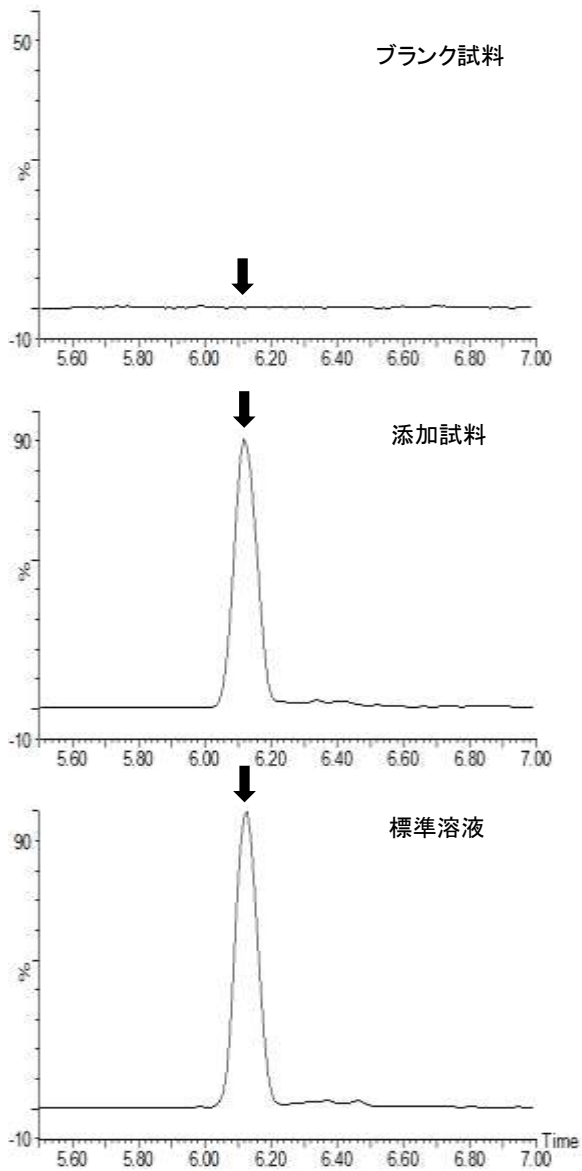


図 11 鶏卵の SRM クロマトグラム
 (m/z +383→173)
 添加濃度:0.01mg/kg

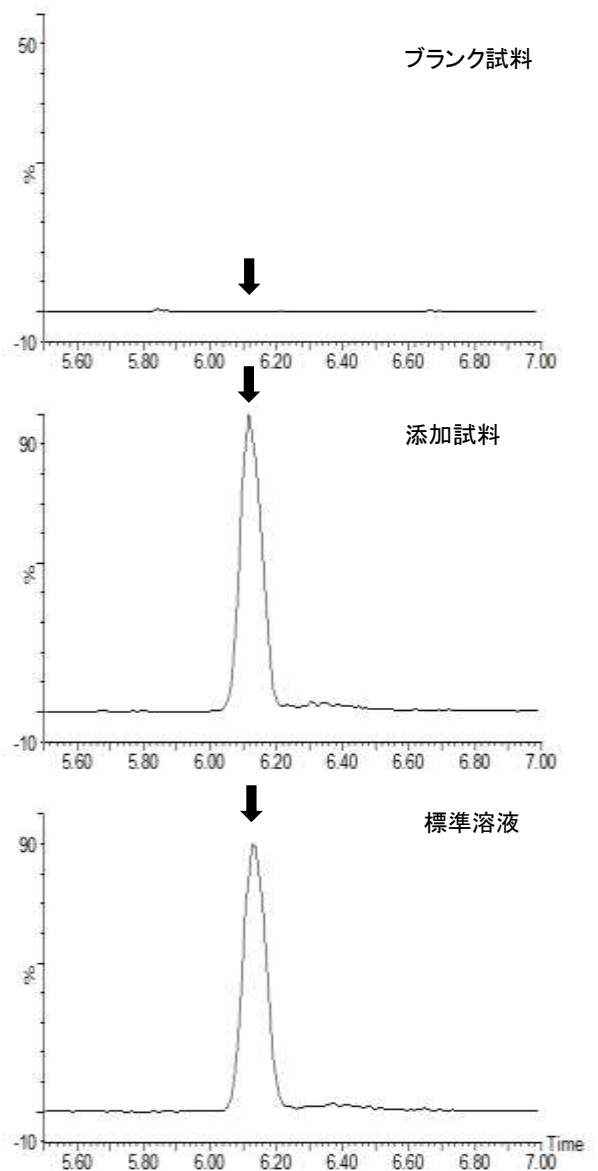


図 12 牛乳の SRM クロマトグラム
 (m/z +383→173)
 添加濃度:0.02mg/kg

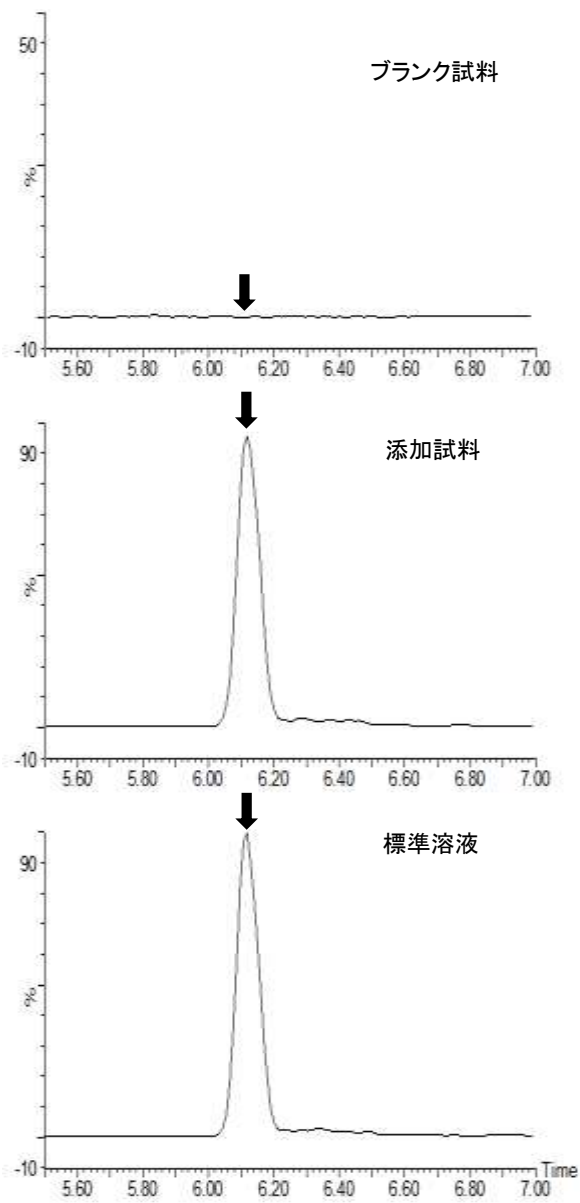


図 13 はちみつの SRM クロマトグラム
 (m/z +383→173)
 添加濃度:0.01mg/kg

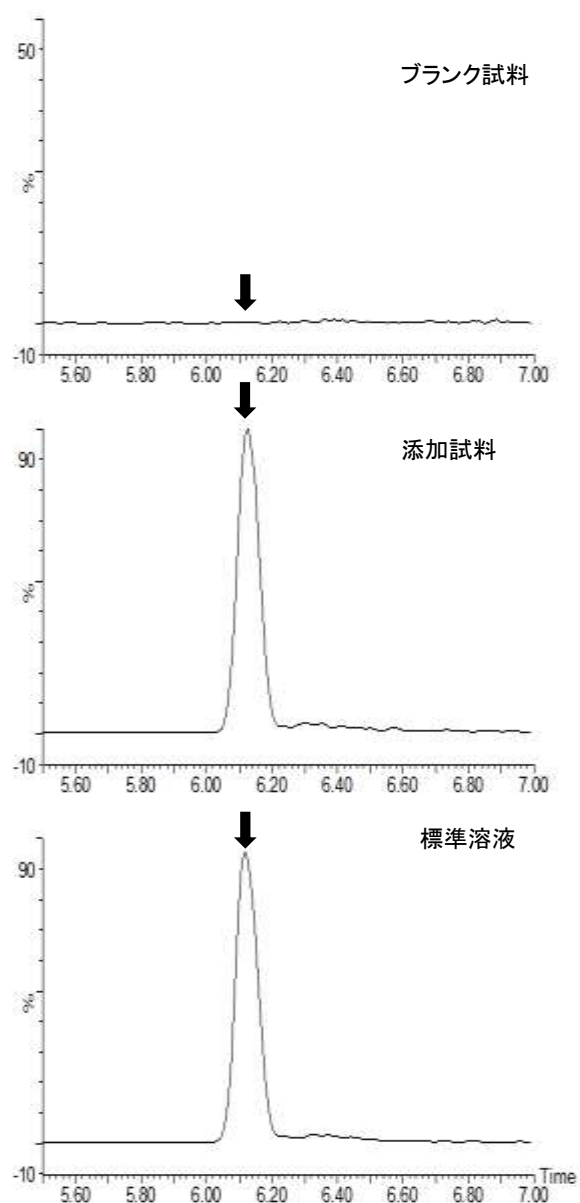


図 14 うなぎの SRM クロマトグラム
 (m/z +383→173)
 添加濃度:0.01mg/kg

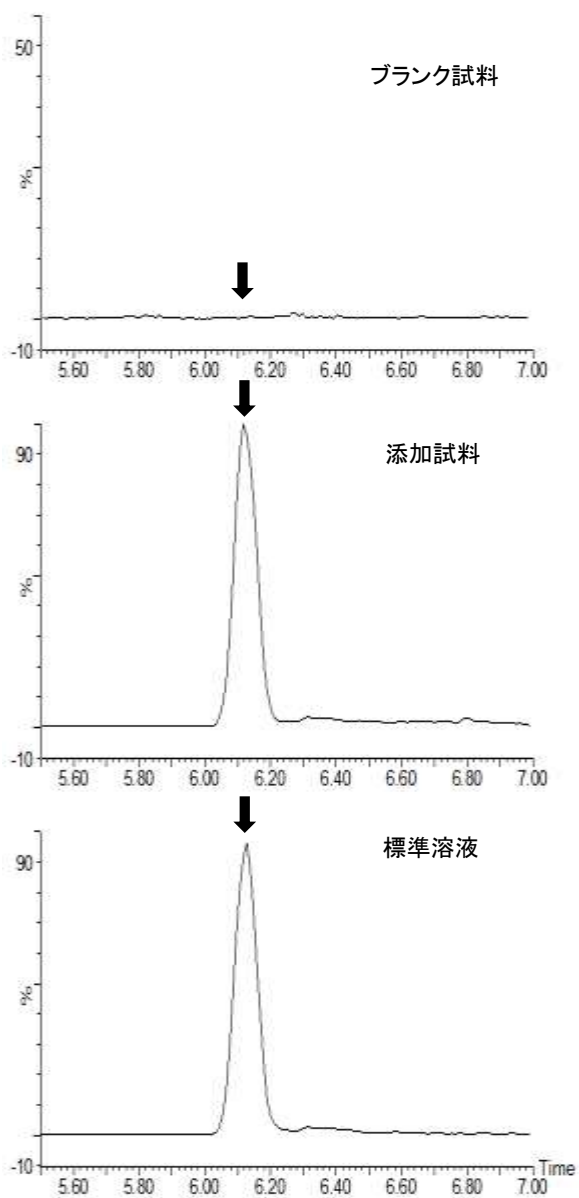


図 15 さけの SRM クロマトグラム
 (m/z +383→173)
 添加濃度:0.01mg/kg

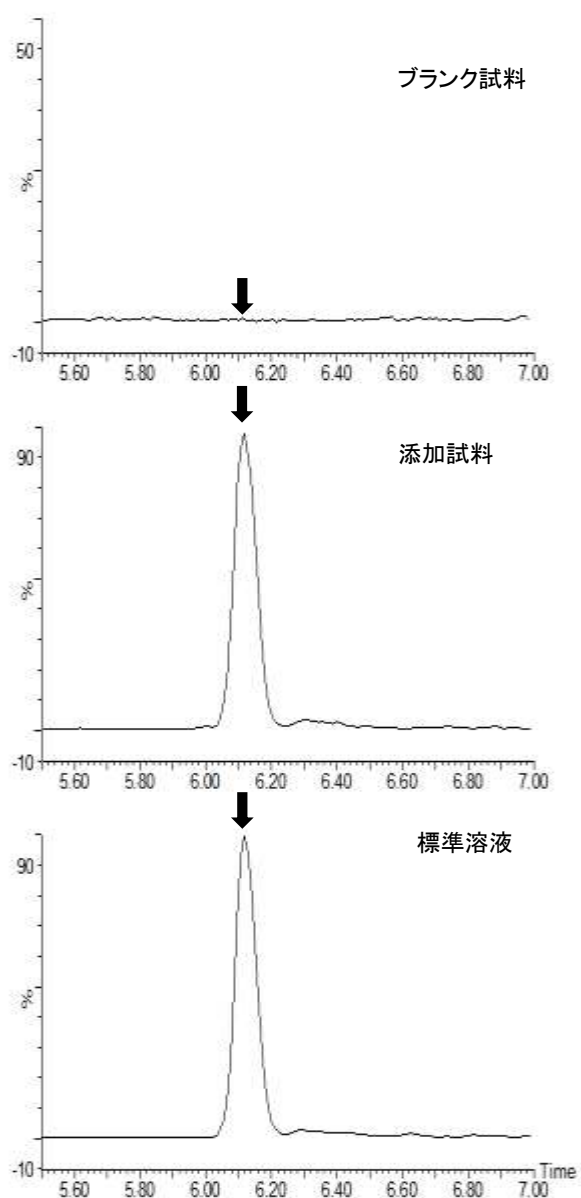


図 16 しじみの SRM クロマトグラム
 (m/z +383→173)
 添加濃度:0.01mg/kg

②定量限界の推定における代表的なクロマトグラム(定量限界相当濃度)

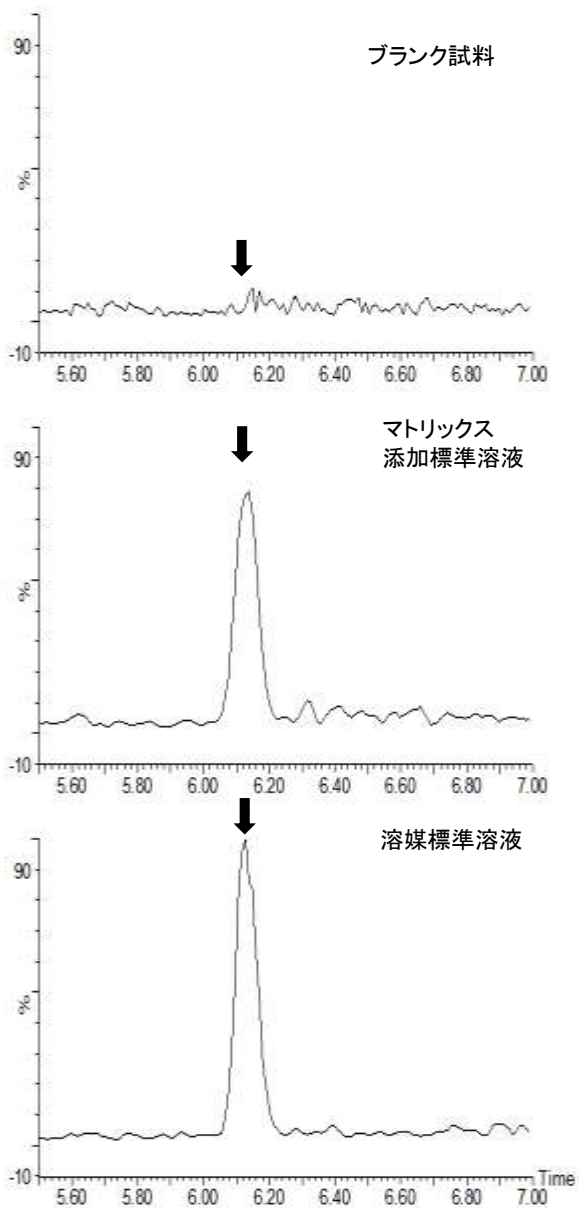


図 17 牛の筋肉 SRM クロマトグラム
(m/z +383→173)
試料中0.001 mg/kg相当

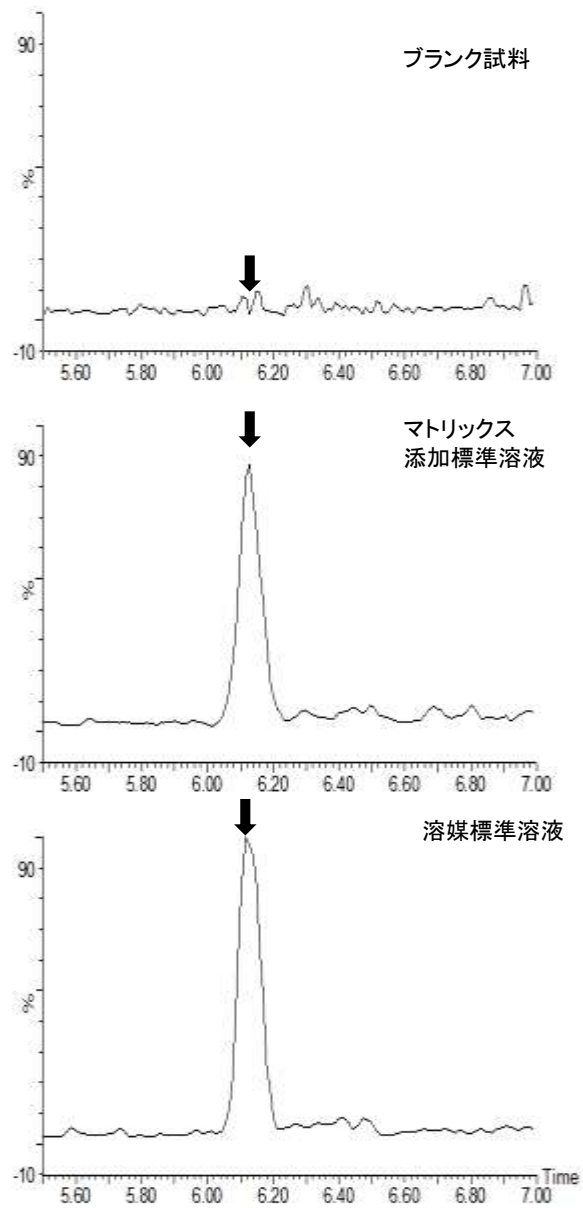


図 18 鶏の筋肉 SRM クロマトグラム
(m/z +383→173)
試料中0.001 mg/kg相当

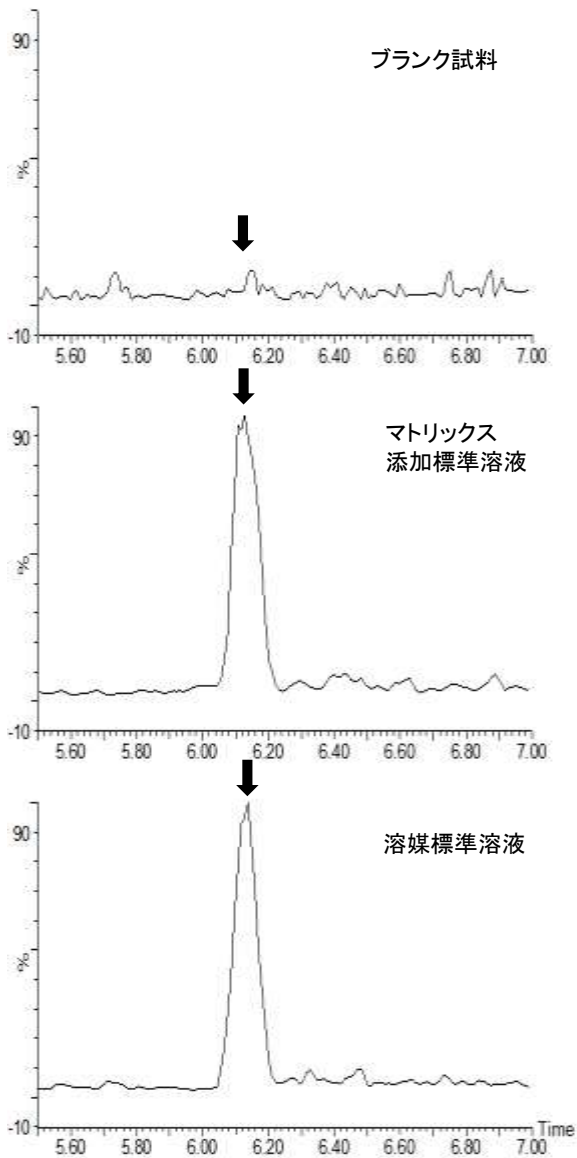


図 19 牛の脂肪 SRM クロマトグラム
(m/z +383→173)
試料中0.001 mg/kg相当

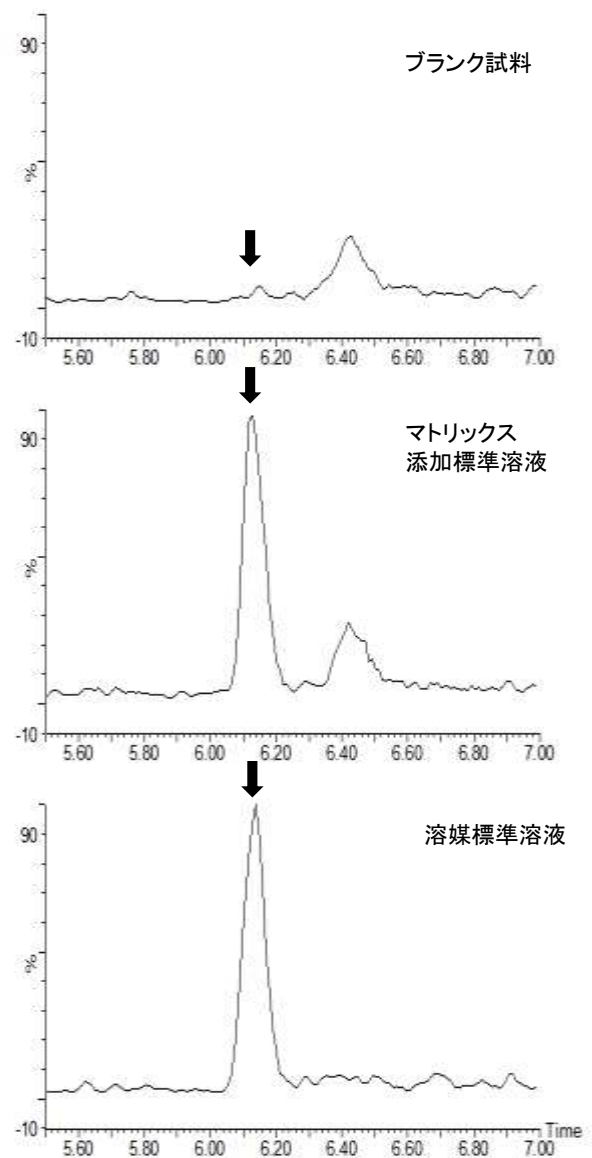


図 20 牛の肝臓 SRM クロマトグラム
(m/z +383→173)
試料中0.001 mg/kg相当

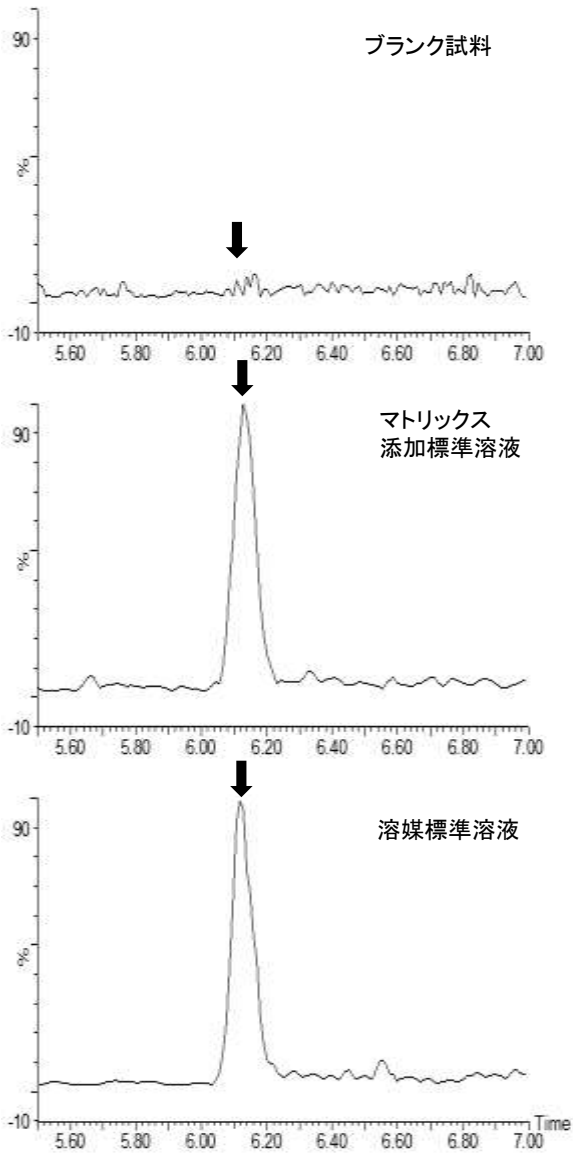


図 21 鶏卵 SRM クロマトグラム
 (m/z +383→173)
 試料中0.001 mg/kg相当

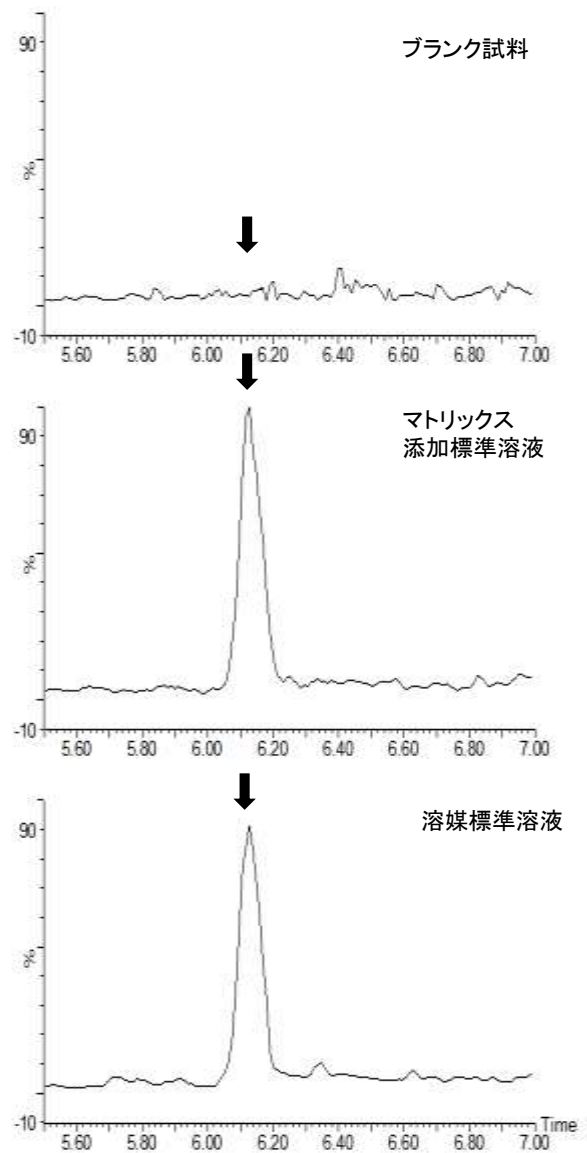


図 22 牛乳 SRM クロマトグラム
 (m/z +383→173)
 試料中0.001 mg/kg相当

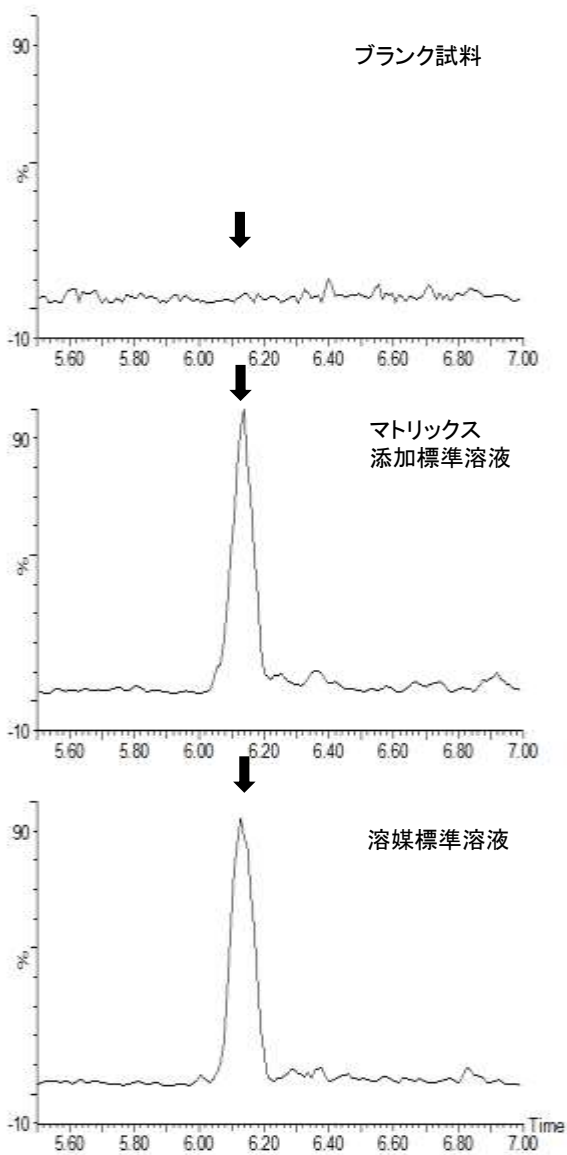


図 23 はちみつ SRM クロマトグラム
 (m/z +383→173)
 試料中0.001 mg/kg相当

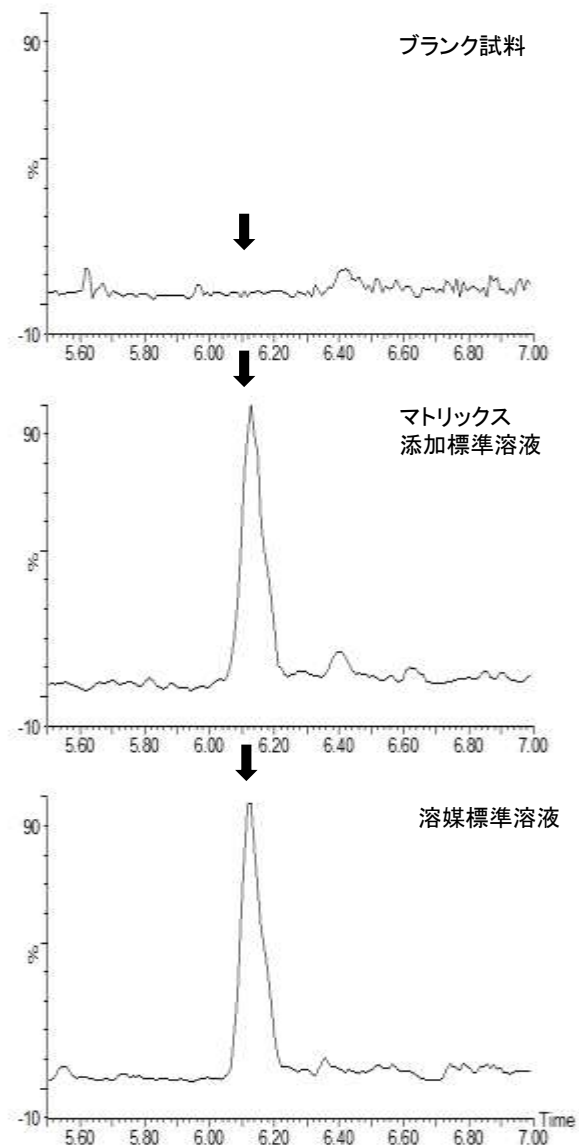


図 24 うなぎ SRM クロマトグラム
 (m/z +383→173)
 試料中0.001 mg/kg相当

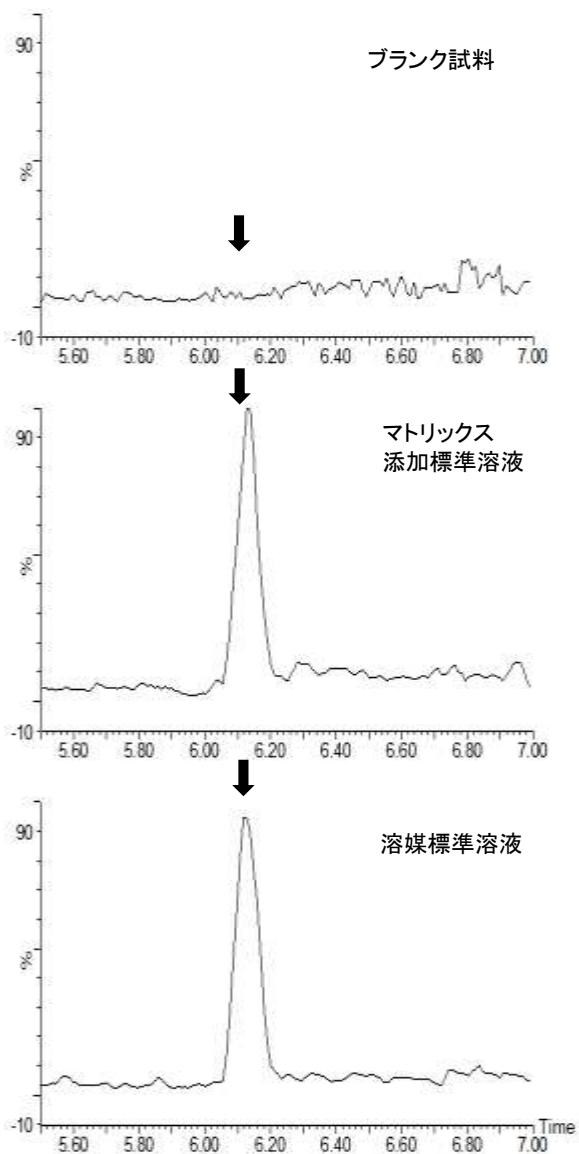


図 25 さけ SRM クロマトグラム
(m/z +383→173)
試料中0.001 mg/kg相当

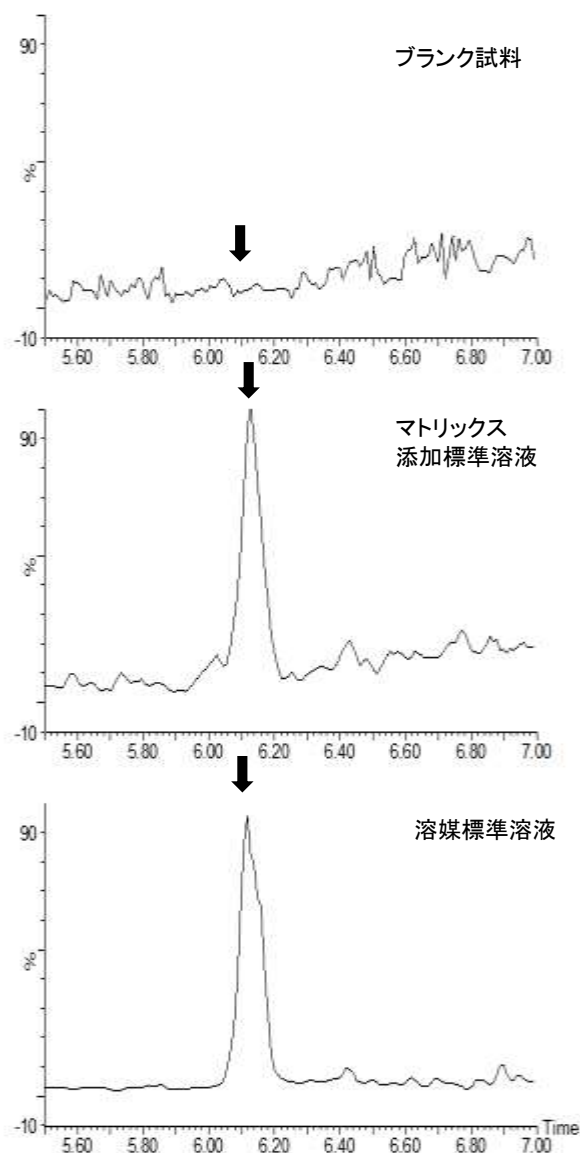


図 26 しじみ SRM クロマトグラム
(m/z +383→173)
試料中0.001 mg/kg相当

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

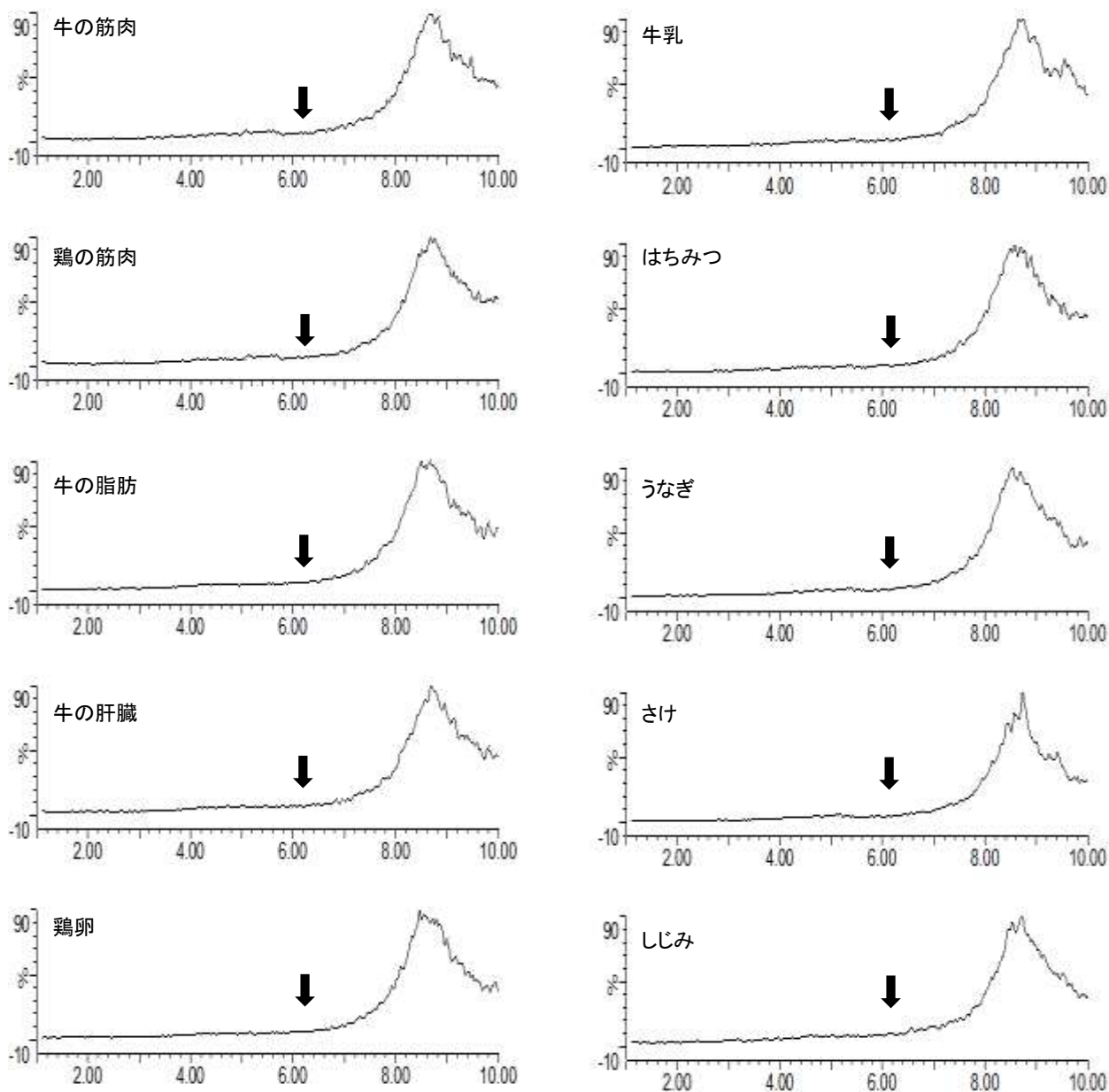


図 27 ブランク試料のトータルイオンクロマトグラム

(スキャン範囲 : m/z 50~550)