

※ 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 23 年度

食品中に残留する農薬等の成分である物質フェンヘキサミドの
公示試験法検討審議のための追加試験事業報告書

フェンヘキサミド試験法の検討結果

[緒言]

1. 目的及び試験法の検討方針

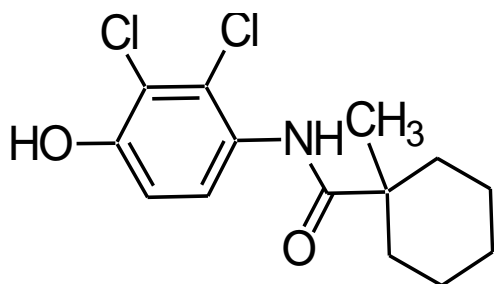
フェンヘキサミドはバイエルクロップサイエンス株式会社により開発された殺菌剤で、灰色かび病、灰星病等に卓効を示し、病原菌の分生孢子発芽管伸長を抑え、予防効果に優れている。「薬事食品衛生審議会 食品衛生分科会報告書」に記載されている規制対象物質及び残留基準値案を踏まえ、試験法の開発を行った。

1) 規制対象物質

フェンヘキサミド

2. 分析対象化合物の構造式、物理化学的性質及び基準値等に関する情報

1) 構造式及び物理化学的性質



化学式 : $C_{14}H_{17}Cl_2NO_2$

分子量 : 302.2

化学名 (IUPAC) : 2',3'-dichloro-4'-hydroxy-1-methylcyclohexanecarboxanilide

外 観 : 白色粉末

融 点 : 153°C

蒸気圧 : 4×10^{-4} mPa (20°C)

溶解性 : 水 20 mg/L (pH 5~7, 20°C)

ジクロロメタン 31、イソプロパノール 91、アセトニトリル 15、トルエン 5.7、
n-ヘキサン <0.1 (以上 g/L, 20°C)

オクタノール/水分配係数 : $\log Pow = 3.51$ (pH 7, 20°C)

安定性 : pH 5、7及び9の水溶液中 (25°C) で30日間安定。

(出典 : The e-Pesticide Manual 15th ed.,ver.5.0)

2) 基準値

牛、豚、その他の陸棲哺乳類に属する動物の筋肉 0.05 ppm

牛、豚、その他の陸棲哺乳類に属する動物の脂肪 0.05 ppm

牛、豚、その他の陸棲哺乳類に属する動物の肝臓 0.05 ppm

牛、豚、その他の陸棲哺乳類に属する動物の腎臓 0.05 ppm

牛、豚、その他の陸棲哺乳類に属する動物の食用部分 0.05 ppm

その他の陸棲哺乳類に属する動物の食用部分 0.05 ppm

乳 0.01 ppm

[実験方法]

1. 試料

1) 購入先

うなぎは愛知県の業者から、しじみは熊本県の業者から、その他の試料は都内のスーパーにて購入した。

2) 試料の採取方法

- ① 牛の筋肉：可能な限り脂肪層を除き、細切均一化した。
- ② 牛の脂肪：可能な限り筋肉部を除き、細切均一化した。
- ③ 牛の肝臓：全体を細切均一化した。
- ④ さけ：可食部（皮を含む）を細切均一化した。
- ⑤ うなぎ：活鰻を使用し、頭部を除いた可食部（内臓、骨及び皮を含む）を細切均一化した。
- ⑥ しじみ：貝殻を除き細切均一化した。
- ⑦ 牛乳：全体をよく混合して均一化した。
- ⑧ 鶏卵：殻を除き卵白と卵黄を合わせてよく混合し均一化した。
- ⑨ はちみつ：百花蜜を使用し、よく混合して均一化した。
- ⑩ えび：頭部及び殻を除き、細切均一化した。

2. 試薬・試液

1) 標準品

フェンヘキサミド標準品：純度99.7%、融点154.4～155.4℃（Sigma-Aldrich製）

2) 試薬

アセトン、アセトニトリル：残留農薬試験用（関東化学製）

アセトニトリル：高速液体クロマトグラフ用（関東化学製）

ギ酸、酢酸アンモニウム：特級（関東化学製）

リン酸：特級（小宗化学製）

ケイソウ土：セライト545（関東化学製）

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム：Inertsep C18（1000 mg、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：Inertsep GC（500 mg、ジーエルサイエンス製）

3) 標準溶液、試液の調製方法

① 標準溶液の調製方法

標準原液：フェンヘキサミド標準品25 mgを精秤し、アセトンで溶解して500 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及び水（1：1）混液で適宜希釈し、0.0005～0.02 mg/Lの濃度の溶液を調製した。

添加用標準溶液①：標準原液をアセトンで希釈して0.5 mg/L溶液を調製した。

添加用標準溶液②：標準原液をアセトンで希釈して0.1 mg/L溶液を調製した。

② 試液の調製方法

1.5 mol/Lリン酸

リン酸10 mLに水を加えて混合し、100 mLとした。

1 vol%ギ酸

ギ酸1 mLに水を加えて混合し、100 mLとした。

アセトニトリル及び水 (3 : 7) 混液

アセトニトリル300 mL及び水700 mLを混合した。

アセトニトリル及び水 (7 : 3) 混液

アセトニトリル700 mL及び水300 mLを混合した。

アセトニトリル及び水 (1 : 1) 混液

アセトニトリル500 mL及び水500 mLを混合した。

1 vol%ギ酸含有 {アセトニトリル及び水 (3 : 7) 混液}

ギ酸10 mLにアセトニトリル及び水 (3 : 7) 混液を加えて1000 mLとした。

1 vol%ギ酸含有 {アセトニトリル及び水 (7 : 3) 混液}

ギ酸10 mLにアセトニトリル及び水 (7 : 3) 混液を加えて1000 mLとした。

1 vol%ギ酸含有アセトニトリル

ギ酸10 mLにアセトニトリルを加えて1000 mLとした。

1 mol/L酢酸アンモニウム溶液

酢酸アンモニウム15.43 gを水に溶解し200 mLとした

2 mmol/L酢酸アンモニウム溶液

1 mol/L酢酸アンモニウム溶液2 mLに水を加えて1000 mLとした

3. 装置

ホモジナイザー：ウルトラタラックスT-25ベーシック（イカ・ジャパン製）

ロータリーエバポレーター：R-200（柴田科学製）等

LC-MS/MS

	型式	会社
MS 装置	Xevo-TQ-MS	Waters
LC 装置	AQUITY UPLC	Waters
データ処理	MassLynx	Waters

4. 測定条件

LC 条件																			
カラム	Mightysil RP-18 GP サイズ：内径 2.0 mm、長さ 150 mm、粒子径 5 μm 会社：関東化学株式会社																		
移動相流速 (mL/min)	0.2																		
注入量 (μL)	5																		
カラム温度 (°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>70</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>10</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>15</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>15.1</td> <td>70</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>20</td> <td>70</td> <td>30</td> </tr> </tbody> </table>	時間 (分)	A液 (%)	B液 (%)	0.0	70	30	10	10	90	15	10	90	15.1	70	30	20	70	30
時間 (分)	A液 (%)	B液 (%)																	
0.0	70	30																	
10	10	90																	
15	10	90																	
15.1	70	30																	
20	70	30																	

MS 条件	
測定モード	MS/MS、選択反応モニタリング
イオン化モード	ESI（－又は＋）
キャピラリ電圧（V）	500
ソース温度（℃）	150
コーンガス	窒素 50 L/Hr
脱溶媒ガス	窒素 1200 L/Hr、550℃
コリジョンガス	アルゴン
定量イオン（ <i>m/z</i> ）	-300→264[コーン電圧：32(V)、コリジョンエネルギー：22(eV)]
定性イオン（ <i>m/z</i> ）	+302→97[コーン電圧：32(V)、コリジョンエネルギー：24(eV)]
保持時間の目安	8分

5. 定量

フェンヘキサミド標準品25 mgを精秤し、アセトンに溶解して500 mg/Lの標準原液を調製した。この溶液をアセトニトリル及び水（1：1）混液で希釈して0.0005、0.001、0.002、0.01及び0.02 mg/Lの濃度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て検量線を作成した。試験溶液5 µLをLC-MS/MSに注入し、検量線から絶対検量線法によりフェンヘキサミドの含量を算出した。

6. 添加試料の調製

牛の筋肉及び牛の肝臓（添加濃度：0.05 ppm相当）：試料10.0 gに添加用標準溶液①1 mLを添加しよく混合した後、30分間放置した。

牛の脂肪（添加濃度：0.05 ppm相当）：試料5.0 gに添加用標準溶液①0.5 mLを添加しよく混合した後、30分間放置した。

さけ、うなぎ、しじみ、牛乳、鶏卵、はちみつ及びえび（添加濃度：0.01 ppm相当）：試料10.0 gに添加用標準溶液②1 mL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

フェンヘキサミドを試料から酸性下アセトンで抽出し、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ァイトカーボン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

① 脂肪以外の場合

試料10.0 gを200 mL遠心管に量り採り、1.5 mol/Lリン酸30 mLを加え、混合した。これにアセトン100 mLを加え、ホモジナイズした後、ケイソウ土を厚さ約1 cmに敷いたろ紙（直径60 mm、No. 4、桐山製作所製）を用いて吸引ろ過し、200 mL容メスフラスコに採取した。ろ紙上の残留物にアセトン50 mLを加えてホモジナイズした後、上記と同様にろ過した。得られたろ液を合わせて、アセトンで正確に200 mLとした。この4 mLを採り、1 vol%ギ酸16 mLを加えた。

② 脂肪の場合

試料5.00 gを200 mL遠心管に採り、1.5 mol/Lリン酸30 mLを加え、混合した。これにアセトン100 mLを加え、ホモジナイズした後、ケイソウ土を厚さ約1 cmに敷いたろ紙（直径60 mm、No. 4、桐山製作所製）を用いて吸引ろ過し、200 mL容メスフラスコに採取した。ろ紙上の残留物にアセトン50 mLを加えてホモジナイズした後、上記と同様にろ過した。得られたろ液を合わせて、アセトンで正確に200 mLとした。この8 mLを採り、1 vol%ギ酸20 mLを加えた。

2) 精製

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム [Inertsep C18 (1000 mg)] 及びグラファイトカーボンミニカラム [Inertsep GC (500 mg)] それぞれにアセトニトリル及び水各5 mLを順次注入し、流出液は捨てた。オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムに1) で得られた溶液を注入した後、さらに1 vol%ギ酸含有 {アセトニトリル及び水 (3 : 7) 混液} 10 mLを注入し、流出液は捨てた。次いで、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムの下部にグラファイトカーボンミニカラムを接続し、1 vol%ギ酸含有 {アセトニトリル及び水 (7 : 3) 混液} 10 mLを注入し、流出液は捨てた。オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムを除去した後、グラファイトカーボンミニカラムに1 vol%ギ酸含有アセトニトリル30 mLを注入し、溶出液を採り、ロータリーエバポレーターを用いて40 °C以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物をアセトニトリル及び水 (1 : 1) 混液に溶解し、正確に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

- | 脂肪以外：試料10.0 gに1.5 mol/Lリン酸30 mLを加え、混合する
- ↓ 脂肪：試料5.00 gに1.5 mol/Lリン酸30 mLを加え、混合する

アセトン抽出

- | アセトン100 mLを加え、ホモジナイズ
- | 吸引ろ過
- | 残留物にアセトン50 mLを加え、ホモジナイズ
- | 吸引ろ過
- | ろ液を合わせ、アセトンで正確に200 mLとする
- ↓ 4 mL (脂肪は8 mL) 分取し、1 vol%ギ酸16 mL (脂肪は20 mL) を加える

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ァイトカーボンミニカラム精製

- | オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム (アセトニトリル及び水各5 mLで洗浄済) に注入
- | 1 vol%ギ酸含有 {アセトニトリル及び水 (3 : 7) 混液} 10 mLで洗浄
- | オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムの下部にグラファイトカーボンミニカラム (アセトニトリル及び水各5 mLで洗浄済) を接続
- | 1 vol%ギ酸含有 {アセトニトリル及び水 (7 : 3) 混液} 10 mLで洗浄 (移行)
- | オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムを除去
- | 1 vol%ギ酸含有アセトニトリル30 mLで溶出

濃縮 (溶媒除去)

- ↓ 残留物をアセトニトリル及び水 (1 : 1) 混液2 mLに溶解

試験溶液

↓

LC-MS/MS定量

5 µL注入

8. マトリックス添加標準溶液の調製

1) 定量限界相当濃度 (定量限界の推定及び試料マトリックスの測定への影響用)

牛の筋肉、牛の脂肪及び牛の肝臓はブランク試験溶液から0.5 mL分取し溶媒を除去した後、フェンヘキサミド0.001 mg/Lの標準溶液0.5 mLに溶解したものをマトリックス添加標準溶液とした。

2) 添加回収試験における回収率 100%相当濃度 (試料マトリックスの測定への影響用)

牛の筋肉、牛の脂肪及び牛の肝臓はブランク試験溶液から0.5 mL分取り溶媒を除去した後、フェンヘキサミド0.005 mg/Lの標準溶液0.5 mL に溶解したものを、さけ、うなぎ、しじみ、牛乳、鶏卵、はちみつ及びえびはブランク試験溶液から0.5 mL分取り溶媒を除去した後、フェンヘキサミド0.001 mg/Lの標準溶液0.5 mL に溶解したものを、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) LC 条件の検討

分離カラムについて、Mightysil RP-18GP (内径2.0 mm、長さ150 mm、粒子径5 µm) を、移動相条件について、2 mmol/L酢酸アンモニウム溶液及びアセトニトリルを用いて検討を行ったところ、ピーク形状、分離、再現性及び感度のいずれも良好な結果が得られたので、カラムはMightysil RP-18GP (内径2.0 mm、長さ150 mm、粒子径5 µm) を、移動相には、2 mmol/L酢酸アンモニウム溶液及びアセトニトリルを用いることとした。

2) MS 条件の検討

フェンヘキサミドはESI (+) モード及びESI (-) モードで測定が可能であった。定量限界相当濃度であるフェンヘキサミドの標準溶液 (0.001 mg/L) におけるS/N比を表1に示した。定量限界相当濃度のS/N比はいずれも10以上であった。両イオンモードで測定可能であったが、ESI (+) モードでは魚介類試料の測定時にフェンヘキサミドの保持時間付近に夾雑ピークが認められたため、選択性の良好であったESI (-) モードを定量用とし、ESI (+) モードを定性用とした。キャピラリー電圧は、正イオンモード及び負イオンモード共に500 Vが感度が最も良好であったため、500 Vとした。

フェンヘキサミドのESI (-) モードでのマススペクトルを図1-1に示した。その結果から脱プロトン分子 (m/z 300) をプリカーサーイオンとした。 m/z 300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1-2に示した。得られたスペクトルから m/z 300をプリカーサーイオンとした場合のプロダクトイオンである m/z 264を定量用イオンとした。

フェンヘキサミドのESI (+) モードでのマススペクトルを図1-3に示した。その結果からプロトン付加分子 (m/z 302) をプリカーサーイオンとした。 m/z 302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1-4に示した。得られたスペクトルから m/z 302をプリカーサーイオンとした場合のプロダクトイオンである m/z 97を定性用イオンとした。

以上のことからESI (-) モードでの m/z 300→264を定量用、ESI (+) モードでの m/z 302→97を定性用の測定イオンとした。

なお、他機種 (AB SCIEX API3200) であれば、本装置で感度が悪かったESI (-) モード、 m/z 300→249を定性用とすることも可能であった。

表1 フェンヘキサミドのS/N比 (0.001 mg/L)

プリカーサーイオン	プロダクトイオン	イオン化モード	S/N 比	Area (counts)
300	264	ESI (-)	170	193
302	97	ESI (+)	174	6445

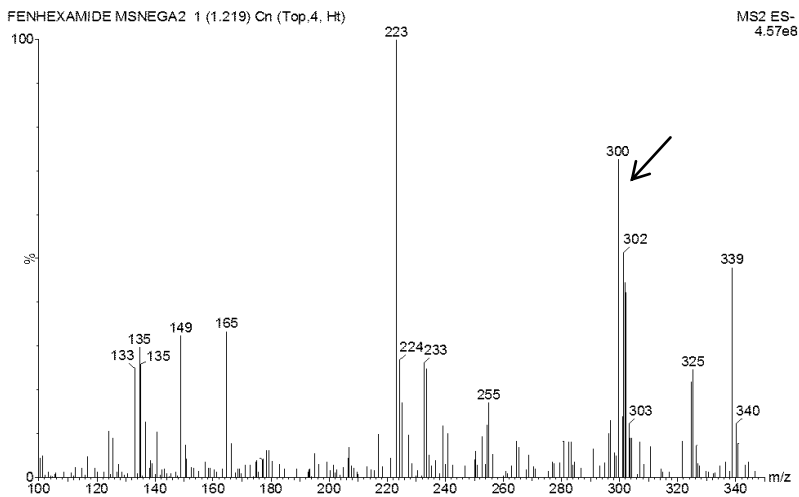


図 1-1 フェンヘキサミドのマススペクトル
 スキャン範囲：100～350 m/z
 測定条件：ESI-、CV=32 (CV=コーン電圧)

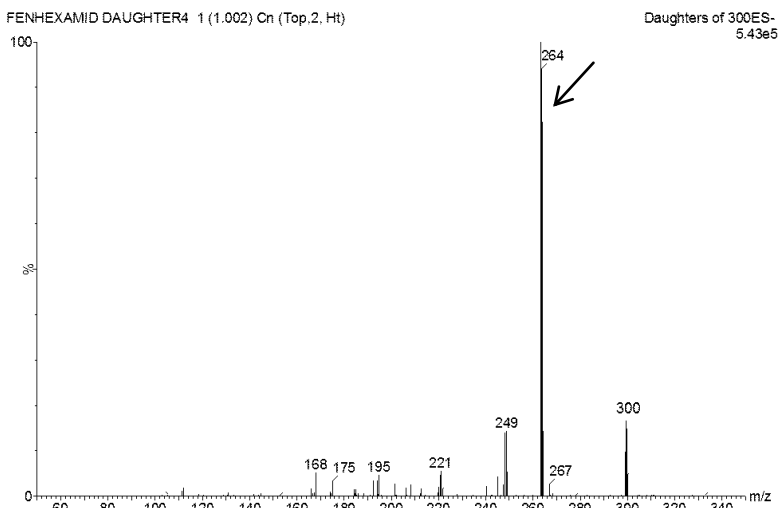


図 1-2 フェンヘキサミドのプリカーサーイオン m/z 300 のプロダクトイオンスペクトル (定量用)
 スキャン範囲：50～350 m/z
 測定条件：ESI-、CV=32、CE=22 (CV=コーン電圧、CE=コリジョンエネルギー)

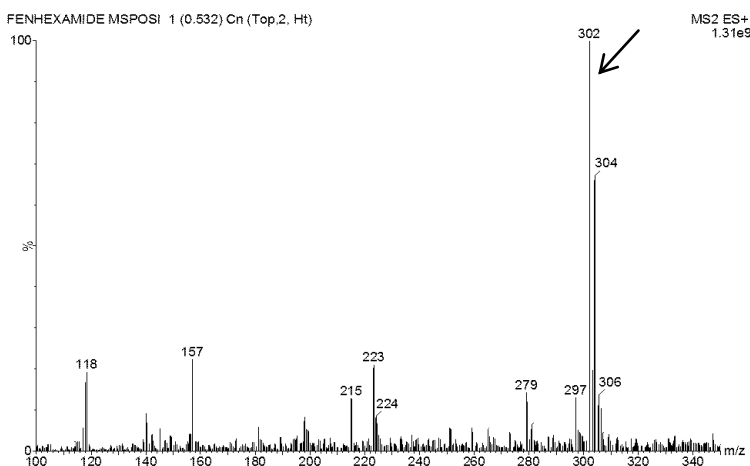


図 1-3 フェンヘキサミドのマススペクトル
 スキャン範囲：100～350 m/z
 測定条件：ESI+、CV=32 (CV=コーン電圧)

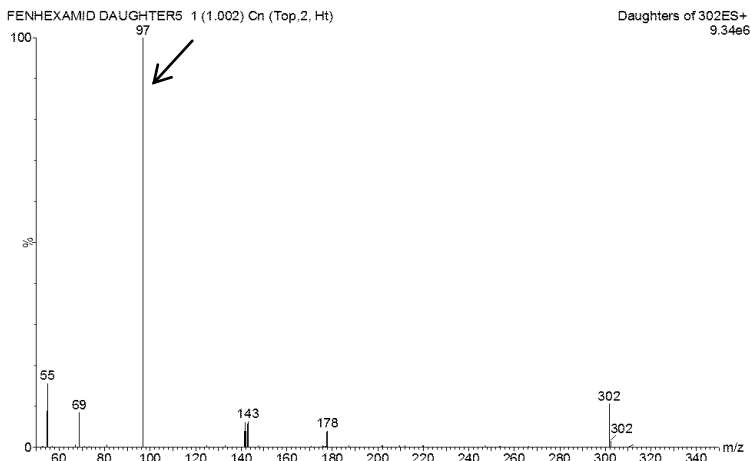
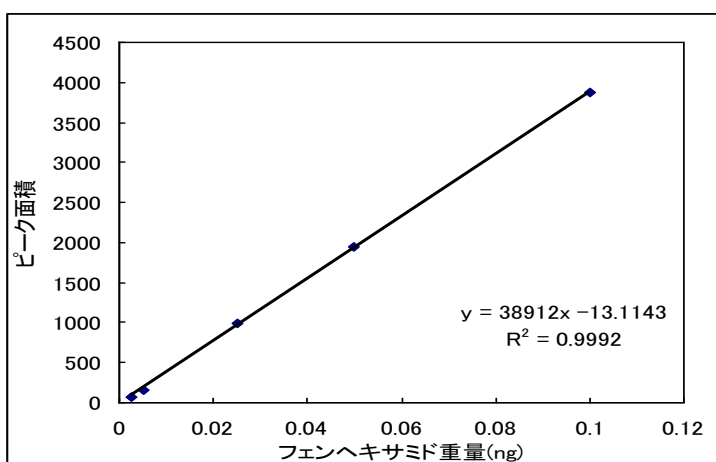


図1-4 フェンヘキサミドのプリカーサーイオン m/z 302 のプロダクトイオンスペクトル (定性用)
 スキャン範囲 : 50~350 m/z
 測定条件 : ESI+, CV=32, CE=24 (CV=コーン電圧, CE=コリジョンエネルギー)

3) 検量線の直線性

図2にフェンヘキサミド検量線の一例を示した。濃度0.0005 mg/L (0.0025 ng) ~0.02 mg/L (0.1 ng) の範囲で作成した検量線の相関係数は、いずれも $r^2=0.993$ 以上であり良好な直線性を示した。



データ処理装置設定条件の一例
 機種 (メーカー) : MassLynx (Waters製)
 ピークの定量方法 : ピーク面積法
 検量線の種類 : 最小二乗法
 検量線基準ピークの重量 : 0.0025 ng~0.1 ng
 検量線傾き (a) : a=38912
 検量線切片 (b) : b=-13.1143

図2 フェンヘキサミド検量線例 (m/z 300→264)

4) 定量限界の算出方法

$$0.01 \text{ mg/kg} [(2 \text{ mL}/0.2 \text{ g}^{*1}) \times (0.005 \text{ ng}/5 \text{ } \mu\text{L})]$$

$$*1 \quad 10.0 \text{ g} \times 4 \text{ mL}/200 \text{ mL} \text{ (脂肪以外の場合)}$$

$$5.00 \text{ g} \times 8 \text{ mL}/200 \text{ mL} \text{ (脂肪の場合)}$$

2. 試験溶液調製法の検討

1) 抽出溶媒について

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「フェンヘキサミド試験法」を参考にリン酸を加える方法を検討し、1.5 mol/Lリン酸溶液30 mLを加えてアセトンで抽出したところ良好な結果が得られたため、この方法を採用した。

2) 精製方法について

①オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムの溶出状況

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムをアセトニトリル及び水各5 mLで予備洗浄した後、フェンヘキサミド0.1 µgを水10 mLで負荷した。溶出状況を表2に示した。フェンヘキサミドはオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム精製のみでは精製効果が不十分であったため、グラファイトカーボンミニカラム精製を追加することとした。グラファイトカーボンミニカラムはアセトニトリル及び水 (7 : 3) 混液10 mLで洗浄できるため (表3参照)、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムの溶出液をそのまま負荷することを考慮し、アセトニトリル及び水 (3 : 7) 混液10 mLで洗浄し、アセトニトリル及び水 (7 : 3) 混液10 mLで溶出する方法を採用した。

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 (%)

	水 10 mL	アセトニトリル及び水						合計
		(1 : 4)	(3 : 7)	(2 : 3)	(1 : 1)	(3 : 2)	(7 : 3)	
		10 mL	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL	
フェンヘキサミド	0	0	0	0	97	tr	0	97

Inertsep C18、(充てん量1000 mg、ジーエルサイエンス製)

供試量 : 0.1 µg

②グラファイトカーボンミニカラムの溶出状況

グラファイトカーボンミニカラムをアセトニトリル及び水各5 mLで予備洗浄した後、フェンヘキサミド0.1 µgを水10 mLで負荷した。溶出状況を表3に示した。アセトニトリル及び水 (7 : 3) 混液10 mLで洗浄し、アセトニトリル20 mLで溶出する方法を採用した。

表3 グラファイトカーボンミニカラムからの溶出状況 (%)

	水 10 mL	アセトニトリル及び水				アセトニトリル			合計
		(3 : 2)	(7 : 3)	(4 : 1)	(9 : 1)	0-10 mL	10-20 mL	20-30 mL	
		10 mL	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL	
フェンヘキサミド	0	0	0	5	41	50	2	tr	98

Inertsep GC、(充てん量500 mg、ジーエルサイエンス製)

供試量 : 0.1 µg

③牛の肝臓における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ァイトカーボンミニカラムの溶出状況

試料 (牛の肝臓) 共存下で精製操作を行ったところ低回収率となった (表4参照)。1 vol%ギ酸含有の溶出溶媒を使用したところ、1 vol%ギ酸含有 {アセトニトリル及び水 (7 : 3) 混液} で溶出せず、1 vol%ギ酸含有アセトニトリル30 mLでほぼ100%溶出したため (表5参照)、これを採用した。

表4 オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム*1
及びグラファイトカーボンミニカラム*2からの溶出状況 (%)

	アセトニトリル及び水		アセトニトリル*4		合計	
	(7:3) *3		0-20 mL	20-30 mL		30-40 mL
	10 mL					
フェンヘキサミド	0	18	0	0	18	

*1 Inertsep C18、(充てん量1000 mg、ジーエルサイエンス製)

*2 Inertsep GC、(充てん量500 mg、ジーエルサイエンス製)

*3 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ァイトカーボンミニカラム

*4 オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム除去後のグラファイトカーボンミニカラム

供試量：0.1 µg、試料（牛の肝臓）共存下

表5 オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム*5
及びグラファイトカーボンミニカラム*6からの溶出状況 (1 vol%ギ酸含有) (%)

	1 vol%ギ酸含有アセトニトリル及び水 (7:3) *7		1 vol%ギ酸含有アセトニトリル*8		合計	
	10 mL		0-20 mL	20-30 mL		30-40 mL
フェンヘキサミド	0	84	16	1	101	

*5 Inertsep C18、(充てん量1000 mg、ジーエルサイエンス製)

*6 Inertsep GC、(充てん量500 mg、ジーエルサイエンス製)

*7 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ァイトカーボンミニカラム

*8 オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム除去後のグラファイトカーボンミニカラム

供試量：0.1 µg、試料（牛の肝臓）共存下

④脂肪における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ァイトカーボンミニカラムの溶出状況

試料（脂肪）共存下で精製操作を行った結果を表6に示した。オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムへ抽出溶媒 8 mL に 1 vol%ギ酸 20 mL を加えて負荷した後、1 vol%ギ酸含有 {アセトニトリル及び水 (7:3) 混液} で洗浄した。負荷液及び洗浄液では溶出しなかった。次いで、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムの下部にグラファイトカーボンミニカラムを接続し、1 vol%ギ酸含有 {アセトニトリル及び水 (7:3) 混液} で洗浄（移行）したところフェンヘキサミドは溶出しなかった。最後にオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムを除去し、グラファイトカーボンミニカラムから 1 vol%ギ酸含有アセトニトリル 30 mL でフェンヘキサミドを溶出したところ、ほぼ 100%溶出したため、この方法を採用した。

なお、フェンヘキサミドをオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムからグラファイトカーボンミニカラムに移行させる際の {アセトニトリル及び水 (7:3) 混液} に、1 vol%ギ酸を加えなかった場合、イオン化障害や妨害ピークが認められたため、1 vol%ギ酸含有 {アセトニトリル及び水 (7:3) 混液} を用いることとした。

また、脂肪以外の9食品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への負荷時の抽出溶液と 1 vol%ギ酸の比率が異なるが、脂肪の場合と比較し 1 vol%ギ酸の比率が抽出溶液より多い設計のため溶出することはないと考え、脂肪と同工程での精製方法を採用した。

表6 脂肪におけるオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム*9

及びグラファイトカーボンミニカラム*10からの溶出状況 (1 vol%ギ酸含有) (%)

	抽出溶液8 mL	1 vol%ギ酸含有ア	1 vol%ギ酸含有ア	1 vol%ギ酸含有		合計
	+	セトニトリル及び	セトニトリル及び	アセトニトリル*13		
	1 vol%ギ酸20 mL	水 (3 : 7) *11	水 (7 : 3) *12	0-30 mL	30-40 mL	
	*11	10 mL	10 mL			
フェンヘキサミド	0	0	0	101	0	101

*9 Inertsep C18、(充てん量1000 mg、ジーエルサイエンス製)

*10 Inertsep GC、(充てん量500 mg、ジーエルサイエンス製)

*11 オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム

*12 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ァイトカーボンミニカラム

*13 オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム除去後のグラファイトカーボンミニカラム

供試量：0.1 µg、試料 (脂肪) 共存下

3. 添加回収試験

牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、さけ、うなぎ、しじみ、牛乳、鶏卵及びはちみつの9品目にえびを加えた10品目を試料に用いて、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代表的なクロマトグラムを図3及び図4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5に示した。

1) 選択性の評価

選択性の検討結果を表7に示した。検討した10品目何れの試料においてもフェンヘキサミ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7 選択性の評価

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	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)				
フェンヘキサミド		牛の筋肉	0.01	0.05	0.05	*	基準値	0.05	< 0.100	面積	0		#DIV/0!	○	
		牛の脂肪	0.01	0.05	0.05	*	基準値	0.05	< 0.100	面積	0		#DIV/0!	○	
		牛の肝臓	0.01	0.05	0.05	*	基準値	0.05	< 0.100	面積	0		#DIV/0!	○	
		さけ	0.01	0.01	0.01		定量限界	0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		うなぎ	0.01	0.01	0.01		定量限界	0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		しじみ	0.01	0.01	0.01		定量限界	0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		牛乳	0.01	0.01	0.01		定量限界	0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		鶏卵	0.01	0.01	0.01		定量限界	0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		はちみつ	0.01	0.01	0.01		定量限界	0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		えび	0.01	0.01	0.01		定量限界	0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	

*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、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。真度は79~94%、併行精度は4~8%で良好な結果が得られた。また定量限界濃度の添加回収試験を行った、さけ、うなぎ、しじみ、牛乳、鶏卵、はちみつ及びえびの添加回収試験におけるS/N比の平均値は96~179でありS/N≥10を十分に満たした。

添加濃度が定量限界濃度と異なる試料について、定量限界の推定を行った結果を表9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4に示した。S/N比の平均値は240~362でありS/N ≥ 10 を十分に満たした。

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 (ppm)	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			
	フェンヘキサミド	牛の筋肉	0.01	0.05	0.05	*	39912	-13	0.999	94	82	93	102	97	94	8	/	/	/	#DIV/0!		
		牛の脂肪	0.01	0.05	0.05	*	42895	-13	0.998	75	80	84	78	79	79	4	/	/	/	#DIV/0!		
		牛の肝臓	0.01	0.05	0.05	*	43476	-30	0.993	81	86	83	77	78	81	5	/	/	/	#DIV/0!		
		さけ	0.01	0.01	0.01		39937	-8	0.999	84	82	88	80	85	84	4	132	59	96			
		うなぎ	0.01	0.01	0.01		39912	-13	0.999	80	89	79	81	73	80	7	165	81	123			
		しじみ	0.01	0.01	0.01		39937	-8	0.999	85	88	82	83	91	86	4	111	94	103			
		牛乳	0.01	0.01	0.01		39912	-13	0.999	81	87	84	81	91	85	5	166	110	138			
		鶏卵	0.01	0.01	0.01		42895	-13	0.998	95	86	86	85	90	88	5	167	95	131			
		はちみつ	0.01	0.01	0.01		39937	-8	0.999	96	89	80	83	88	87	7	224	133	179			
		えび	0.01	0.01	0.01		42895	-13	0.998	80	78	93	88	84	85	7	168	111	140			

*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。

表9 定量限界の推定

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	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
	フェンヘキサミド	牛の筋肉	0.01	0.05	0.05	*	0.001	面積	0	427	406	416	451	461	456	273	206	91	240	
		牛の脂肪	0.01	0.05	0.05	*	0.001	面積	0	362	368	365	360	376	368	335	312	99	324	
		牛の肝臓	0.01	0.05	0.05	*	0.001	面積	0	399	422	410	415	407	411	445	279	100	362	
		さけ	0.01	0.01	0.01													#DIV/0!	#DIV/0!	
		うなぎ	0.01	0.01	0.01														#DIV/0!	#DIV/0!
		しじみ	0.01	0.01	0.01														#DIV/0!	#DIV/0!
		牛乳	0.01	0.01	0.01														#DIV/0!	#DIV/0!
		鶏卵	0.01	0.01	0.01														#DIV/0!	#DIV/0!
		はちみつ	0.01	0.01	0.01														#DIV/0!	#DIV/0!
		えび	0.01	0.01	0.01														#DIV/0!	#DIV/0!

*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 定量限界の推定を行う対象(添加濃度と定量限界濃度が異なる場合)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。

3) 試料マトリックスの影響

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10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、ブランク試料の試験溶液で調製したマトリックス添加標準溶液と溶媒で調製した標準溶液の面積比の平均値は0.90~1.08であった。

添加回収試験における真度を表10で求めたピーク面積比で除して補正真度を求め、表11に示した。補正真度は77~102%であり、試料マトリックスの測定への影響と真度との間に問題は見られなかった。

表10 試料マトリックスの影響

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	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}						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			ピーク面積(高さ)比 ^{*6}
	フェンヘキサミド	牛の筋肉	0.01	0.05	0.05	0.005	面積	0	2479	2432	2455	2600	2744	2672	0.92
		牛の脂肪	0.01	0.05	0.05	0.005	面積	0	1492	1466	1479	1539	1345	1442	1.03
		牛の肝臓	0.01	0.05	0.05	0.005	面積	0	1542	1518	1530	1563	1539	1551	0.99
		さけ	0.01	0.01	0.01	0.001	面積	0	236	245	241	236	242	239	1.01
		うなぎ	0.01	0.01	0.01	0.001	面積	0	284	264	274	253	310	282	0.97
		しじみ	0.01	0.01	0.01	0.001	面積	0	232	257	244	263	266	265	0.92
		牛乳	0.01	0.01	0.01	0.001	面積	0	256	267	261	274	250	262	1.00
		鶏卵	0.01	0.01	0.01	0.001	面積	0	249	273	261	253	248	250	1.04
		はちみつ	0.01	0.01	0.01	0.001	面積	0	266	279	272	265	263	264	1.03
		えび	0.01	0.01	0.01	0.001	面積	0	269	297	283	261	260	261	1.08

*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11 補正真度

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	基準値 ¹ (ppm)	添加濃度 (ppm)	真度 (%)	ピーク面積 比 (%)	補正真度 (%)	備考
1	フェンヘキサミド	牛の筋肉	0.01	0.05	0.05	94	0.92	102	
		牛の脂肪	0.01	0.05	0.05	79	1.03	77	
		牛の肝臓	0.01	0.05	0.05	81	0.99	82	
		さけ	0.01	0.01	0.01	84	1.01	83	
		うなぎ	0.01	0.01	0.01	80	0.97	83	
		しじみ	0.01	0.01	0.01	86	0.92	93	
		牛乳	0.01	0.01	0.01	85	1.00	85	
		鶏卵	0.01	0.01	0.01	88	1.04	85	
		はちみつ	0.01	0.01	0.01	87	1.03	85	
		えび	0.01	0.01	0.01	85	1.08	78	

4. 考察

通知のフェンヘキサミド試験法（農産物）の抽出を参考に1.5 mol/Lリン酸溶液を加え、アセトンで抽出する方法を検討し、良好な結果が得られたためこれを採用した。

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムのみの精製では全ての試料においてイオン化阻害が起こり、精製不十分であった。グラファイトカーボンミニカラムを追加することにより良好な結果が得られたため、グラファイトカーボンミニカラムを追加することとした。

肝臓試料において、ミニカラム精製の工程でミニカラムへの吸着により溶出率が低下したと考えられたため、使用する混液に1 vol%ギ酸を加えたところ良好な結果が得られた。このことから使用する混液に1 vol%ギ酸を加えることとした。

開発した方法を用いて、牛の筋肉等10食品の添加回収試験を行った結果、選択性は良好で何れの試料においても妨害ピークは認められず、真度は79～94%、併行精度は4～8%の良好な結果が得られたことから、本試験法は、陸棲哺乳類に属する動物の筋肉、脂肪及び肝臓並びに魚介類、鶏の卵、はちみつ等の畜水産物に適応可能であると判断された。

[結論]

畜水産物中のフェンヘキサミド試験法として、フェンヘキサミドを試料から酸性下アセトンで抽出し、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ァイトカーボン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。

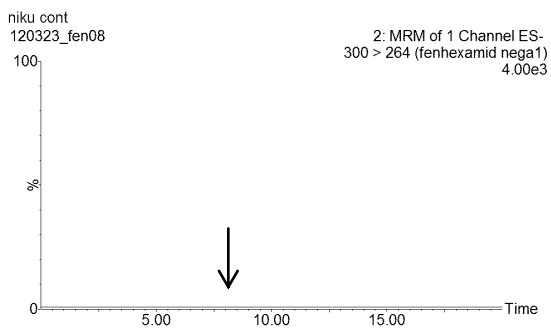
開発した試験法を牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、さけ、うなぎ、しじみ、牛乳、鶏卵、はちみつ及びえびの10食品に適用した場合、選択性は良好で何れの試料においても妨害ピークは認められず、真度は79～94%、併行精度は4～8%の良好な結果が得られた。また、定量限界として、0.01 mg/kgを設定可能であることが確認された。

[参考文献]

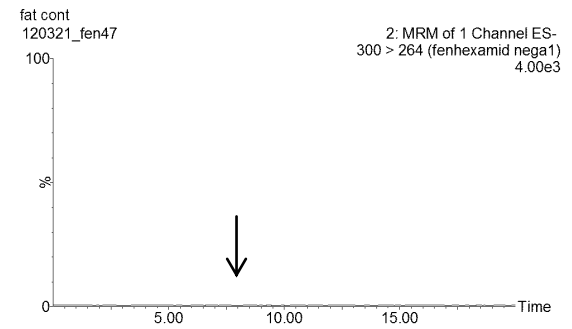
食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法 フェンヘキサミドの個別試験法(厚生労働省)

フェンヘキサミドの添加回収試験におけるクロマトグラム

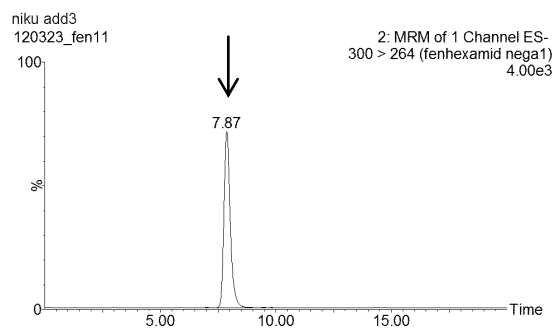
ブランク



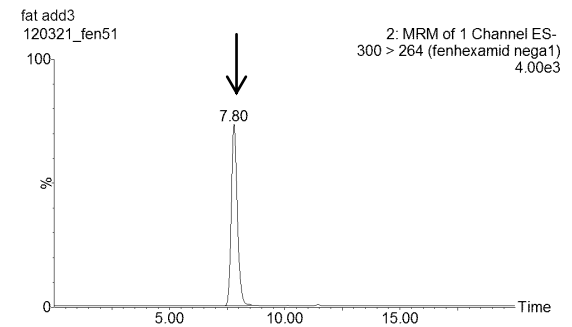
ブランク



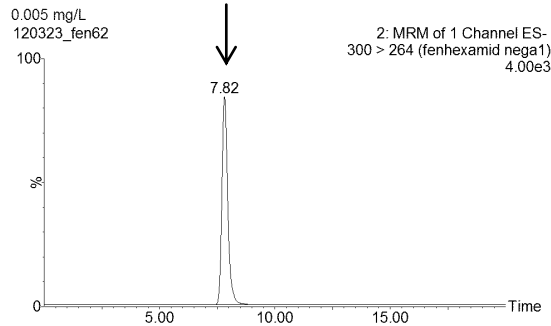
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

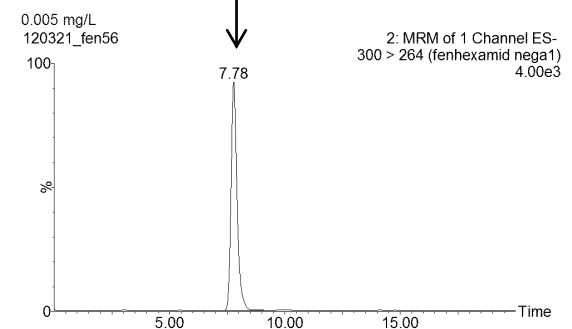


図 3-1 牛の筋肉の SRM クロマトグラム
フェンヘキサミド (m/z -300→264)
添加濃度 : 0.05 ppm

図 3-2 牛の脂肪の SRM クロマトグラム
フェンヘキサミド (m/z -300→264)
添加濃度 : 0.05 ppm

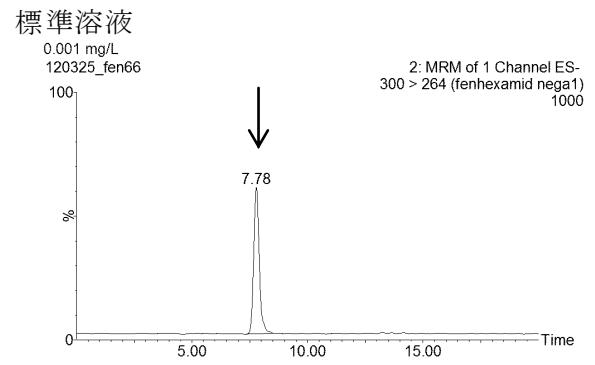
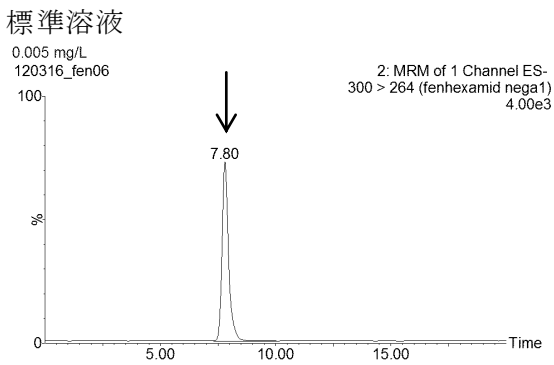
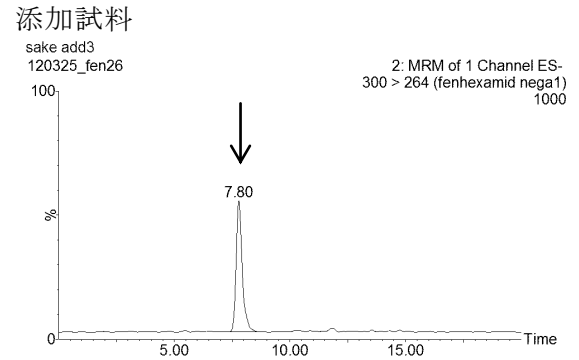
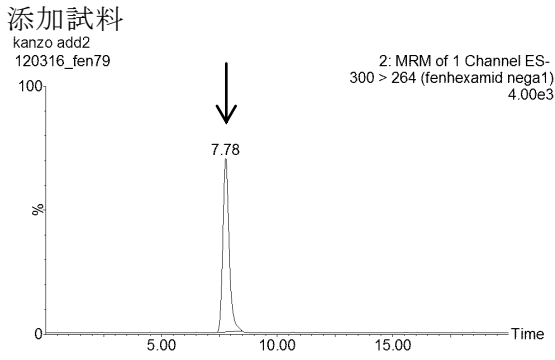
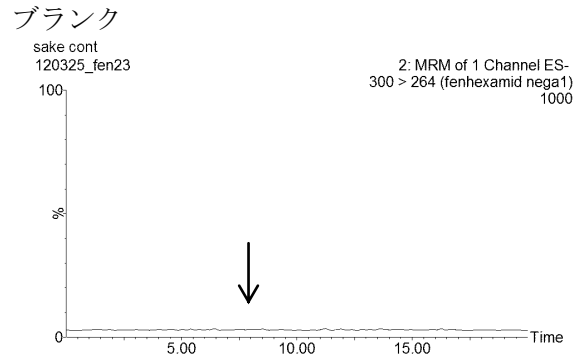
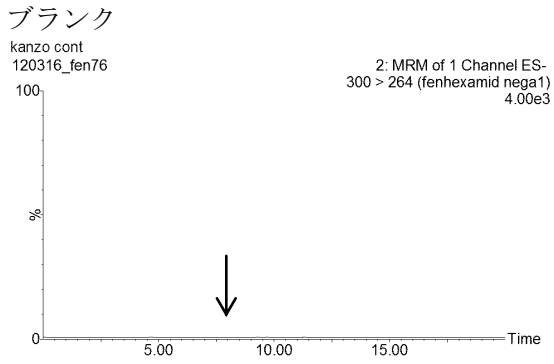


図 3-3 牛の肝臓の SRM クロマトグラム
フェンヘキサミド (m/z -300→264)
添加濃度 : 0.05 ppm

図 3-4 さけの SRM クロマトグラム
フェンヘキサミド (m/z -300→264)
添加濃度 : 0.01 ppm

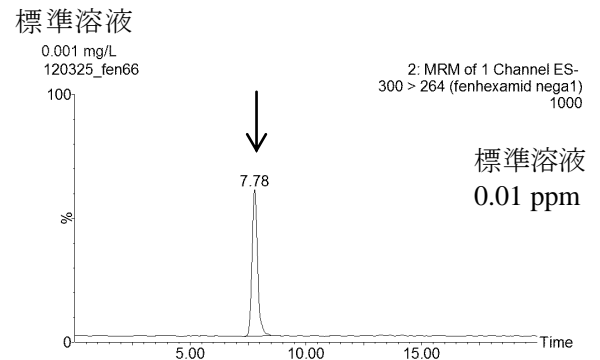
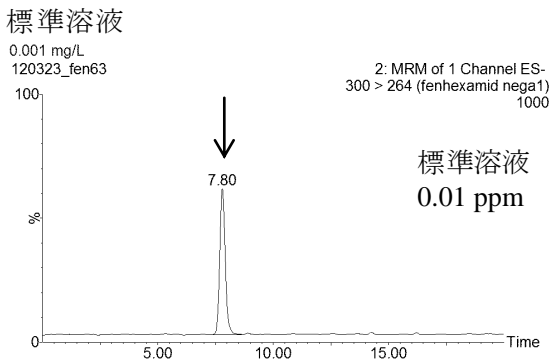
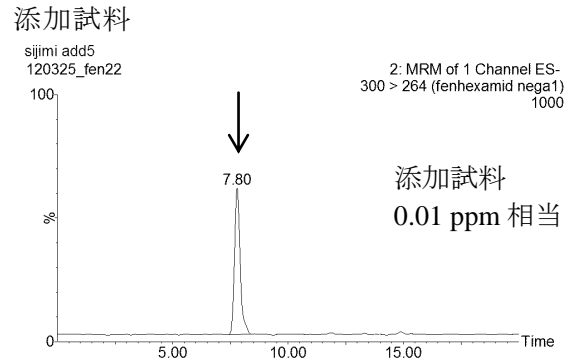
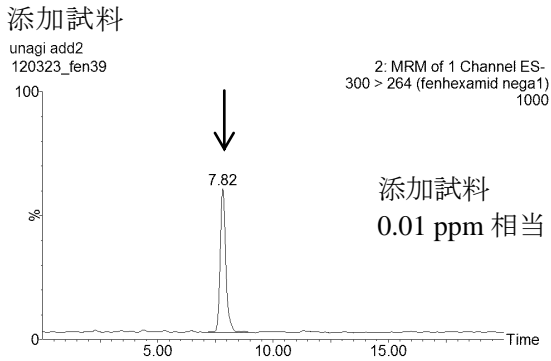
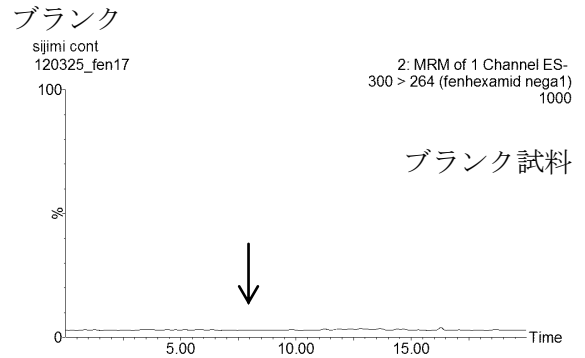
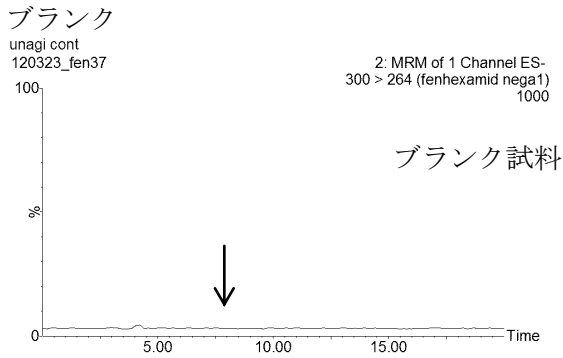


図 3-5 うなぎの SRM クロマトグラム
フェンヘキサミド (m/z -300→264)
添加濃度 : 0.01 ppm

図 3-6 しじみの SRM クロマトグラム
フェンヘキサミド (m/z -300→264)
添加濃度 : 0.01 ppm

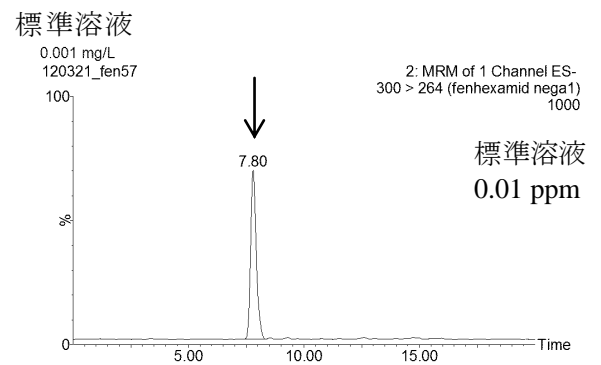
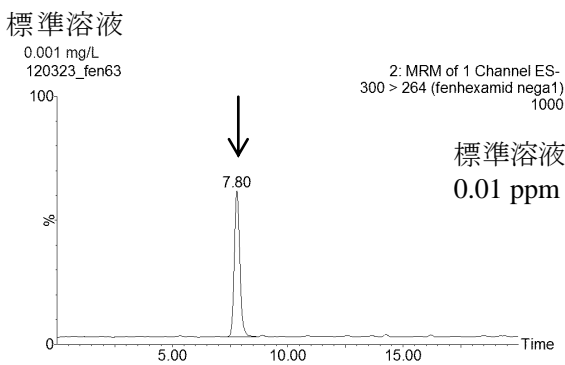
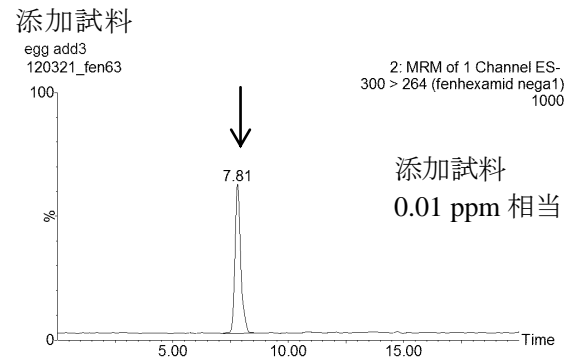
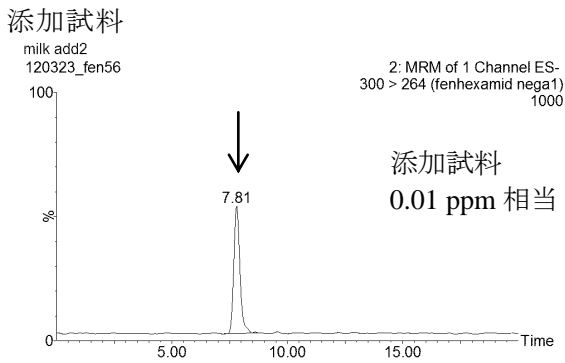
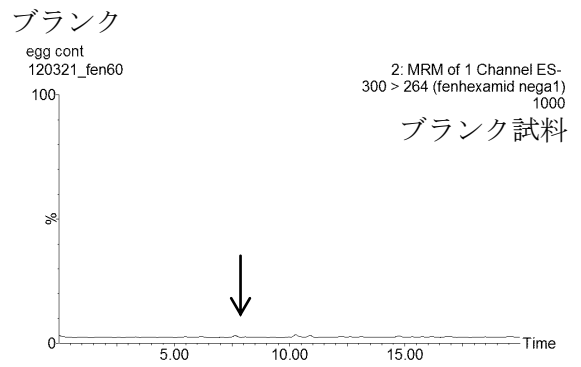
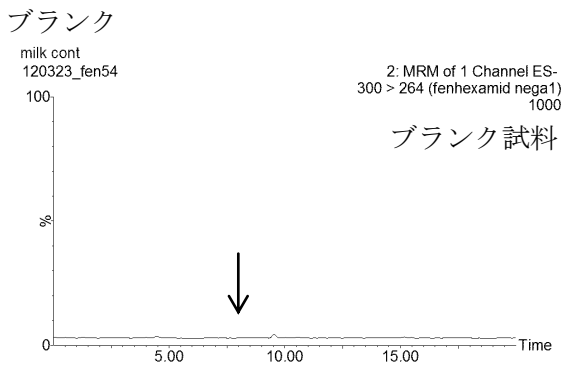


図 3-7 牛乳の SRM クロマトグラム
フェンヘキサミド (m/z -300→264)
添加濃度 : 0.01 ppm

図 3-8 鶏卵の SRM クロマトグラム
フェンヘキサミド (m/z -300→264)
添加濃度 : 0.01 ppm

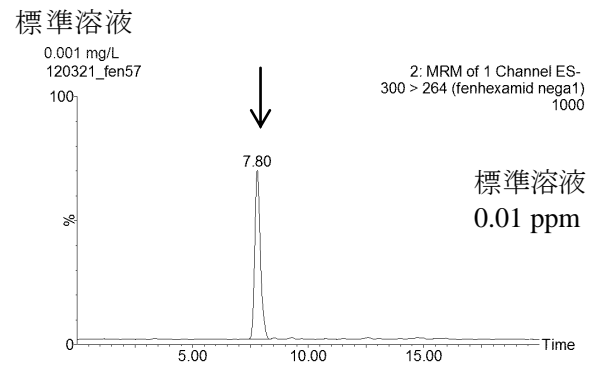
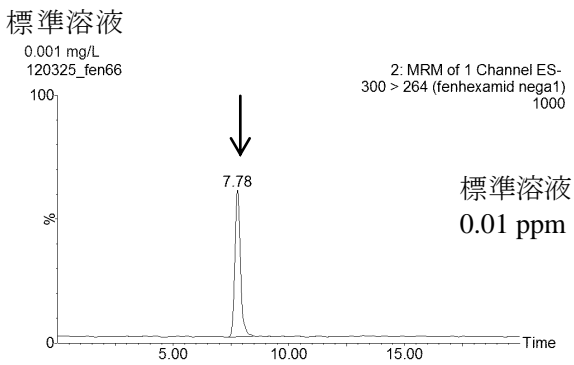
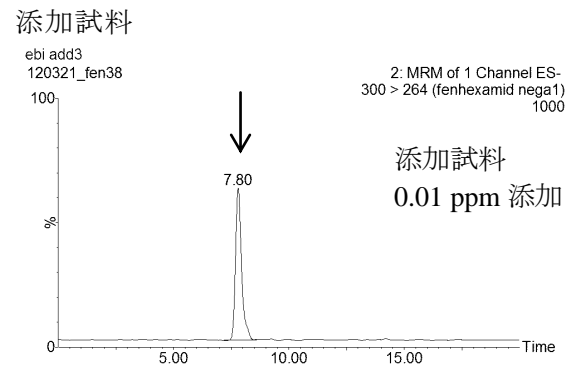
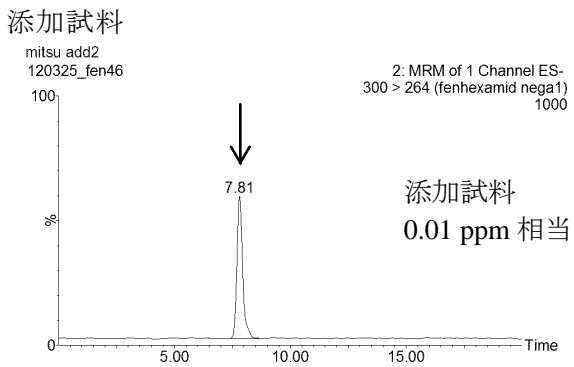
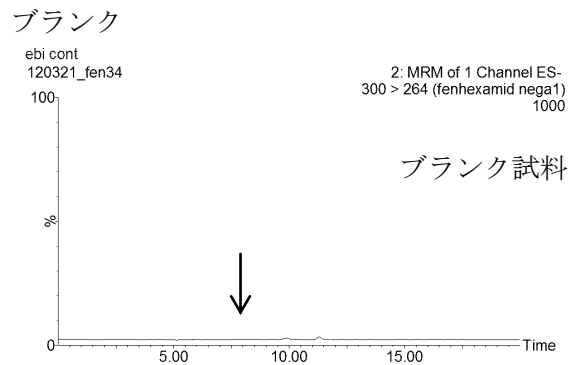
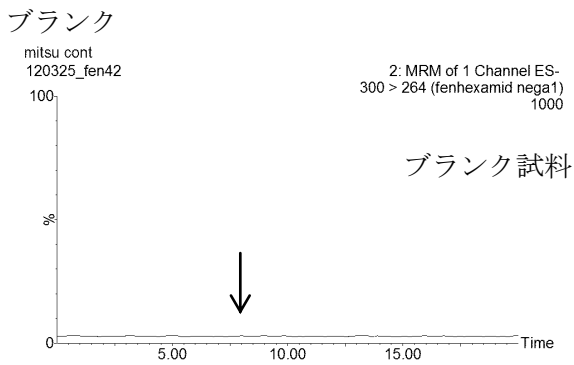
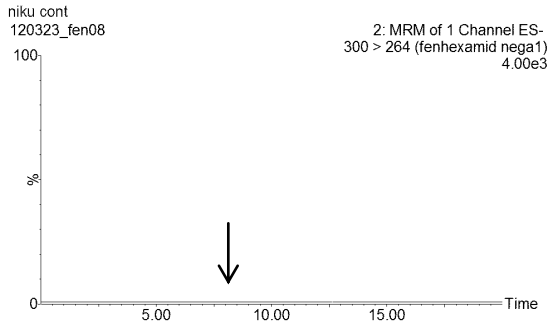


図 3-9 はちみつの SRM クロマトグラム
フェンヘキサミド (m/z -300→264)
添加濃度 : 0.01 ppm

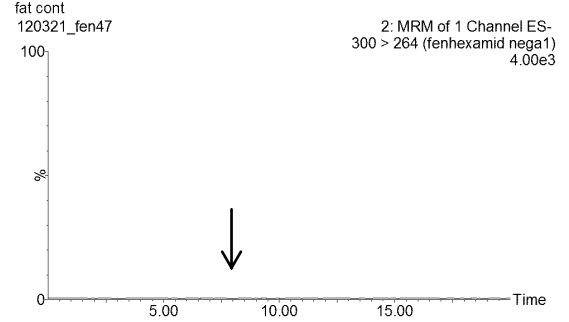
図 3-10 えびの SRM クロマトグラム
フェンヘキサミド (m/z -300→264)
添加濃度 : 0.01 ppm

フェンヘキサミドの定量限界の推定におけるクロマトグラム

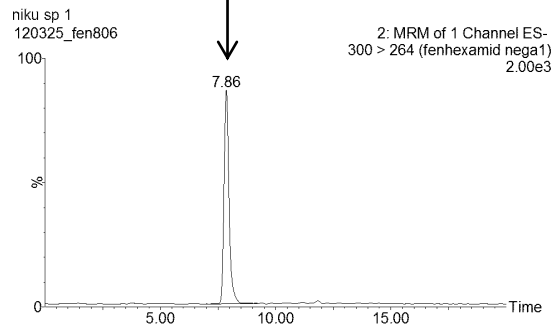
ブランク



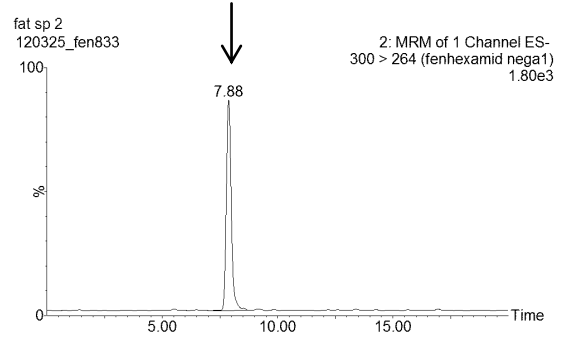
ブランク



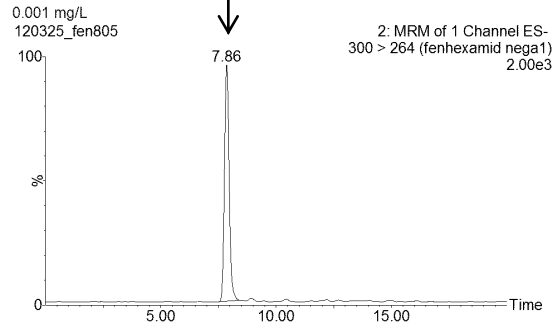
マトリックス添加標準溶液



マトリックス添加標準溶液



溶媒標準溶液



溶媒標準溶液

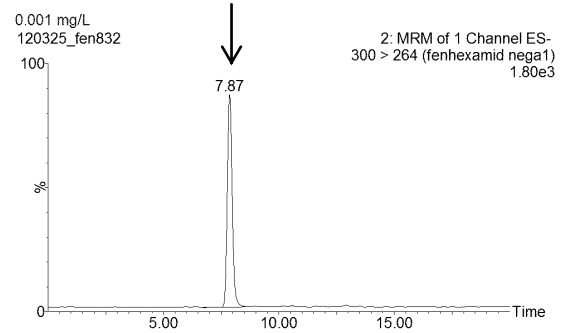
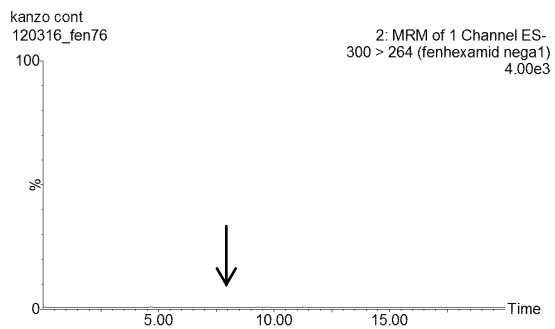


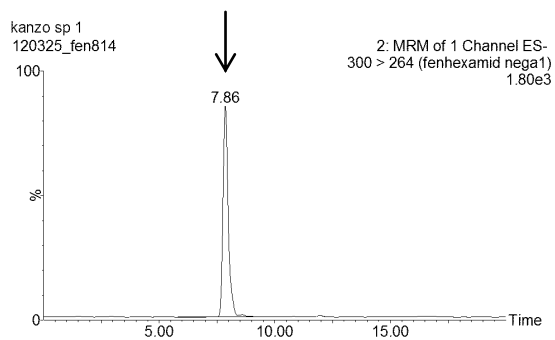
図 4-1 牛の筋肉の SRM クロマトグラム
フェンヘキサミド (m/z -300→264)
試料中 0.01 ppm 相当

図 4-2 牛の脂肪の SRM クロマトグラム
フェンヘキサミド (m/z -300→264)
試料中 0.01 ppm 相当

ブランク



マトリクス添加標準溶液



溶媒標準溶液

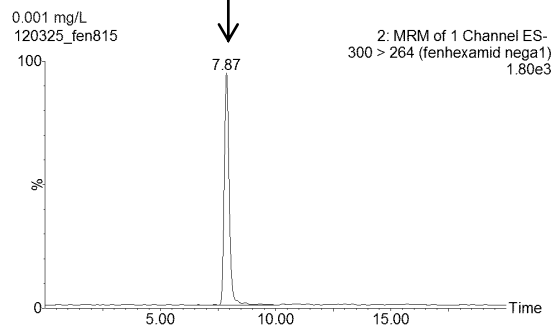
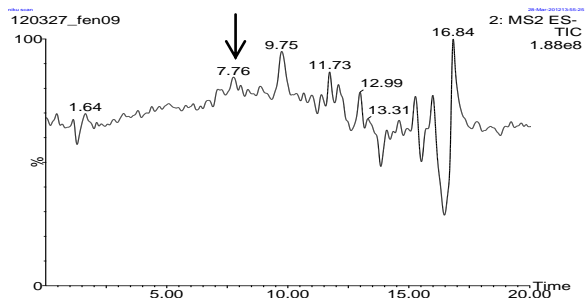
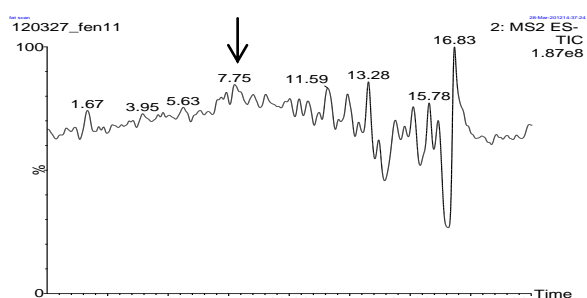


図 4-3 牛の肝臓の SRM クロマトグラム
フェンヘキサミド (m/z -300→264)
試料中 0.01 ppm 相当

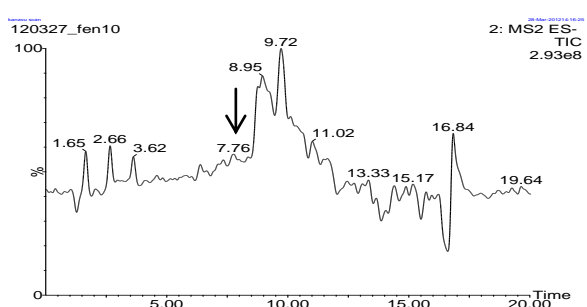
牛の筋肉 無添加



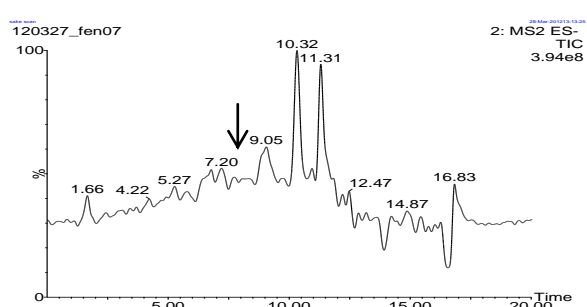
牛の脂肪 無添加



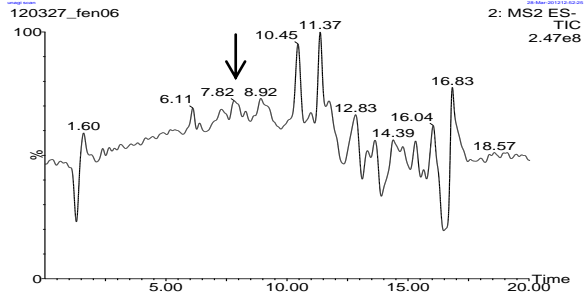
牛の肝臓 無添加



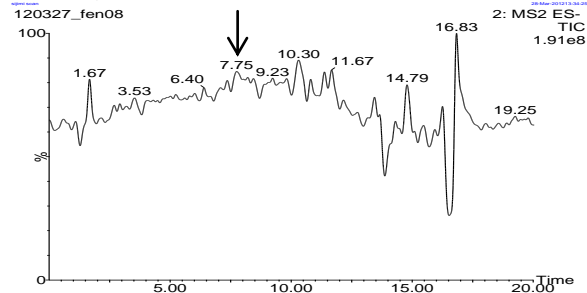
さけ 無添加



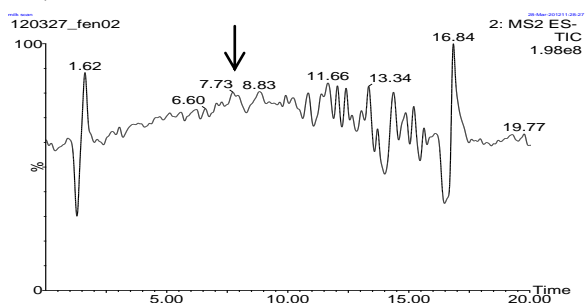
うなぎ 無添加



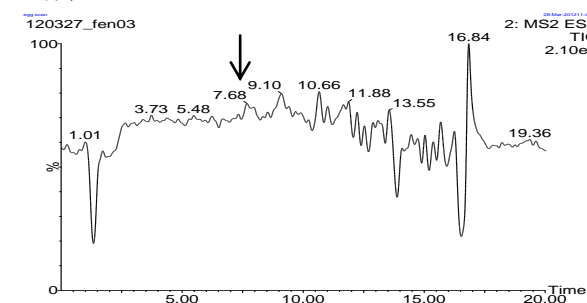
しじみ 無添加



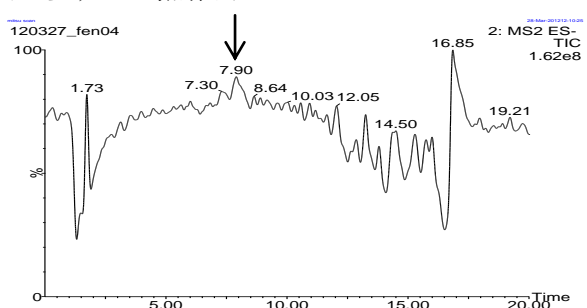
牛乳 無添加



鶏卵 無添加



はちみつ 無添加



えび 無添加

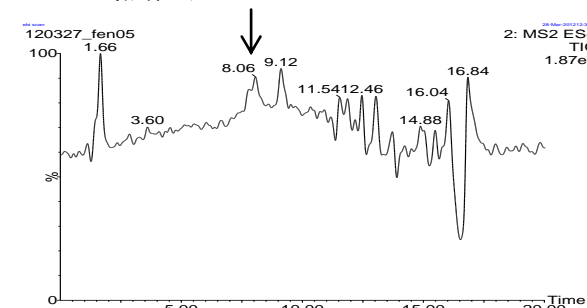


図 5 ブランク試料のトータルイオンクロマトグラム (ESI (-)、スキャン範囲：50~1000 amu)