

※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。

## 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

フェントラザミド試験法（畜水産物）

## フェントラザ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

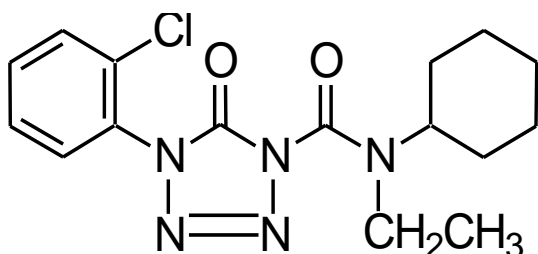
フェントラザミドはバイエルクロップサイエンス株式会社により開発されたテトラゾリノン系を基本骨格とする除草剤で、稲の移植直後から長期間効果を持続するので、稲の移植と同時に施用しただけで、収穫期までの長期間雑草制御が可能である。「薬事食品衛生審議会 食品衛生分科会報告書」に記載されている規制対象物質及び残留基準値案を踏まえ、試験法の開発を行った。

#### 1) 規制対象物質

フェントラザミド

#### 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<sub>16</sub>H<sub>20</sub>ClN<sub>5</sub>O<sub>2</sub>

分子量 : 349.8

化学名 (IUPAC) : 4-(2-chlorophenyl)-N-cyclohexyl-N-ethyl-4,5-dihydro-5-oxo-1H-tetrazole-1-carboxamide

外 観 : 無色結晶

融 点 : 79°C

蒸気圧 : 5×10<sup>-5</sup> mPa (20°C)

溶解性 : 水 2.3 mg/L (20°C)

*n*-ヘプタン 2.1、イソプロパノール 32、ジクロロメタン及びキシレン >250 (以上 g/L、20°C)

オクタノール/水分配係数 : log Pow=3.60 (20°C)

安定性 : 加水分解半減期 ; pH 5 >300日、pH 7 >500日、pH 9 >約7日 (以上 25°C)

光分解半減期 ; 純水 約20日、自然水 約10日 (以上 25°C)

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

##### 2) 基準値

魚介類 0.03 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牛の筋肉は脂肪層を除き、細切均一化後100 gを量り、リン酸30 gを加え、ホモジナイズした。
- ②牛の脂肪は筋肉部を除き、細切均一化後100 gを量り、リン酸30 gを加え、ホモジナイズした。
- ③牛の肝臓は細切均一化後100 gを量り、リン酸30 gを加え、ホモジナイズした。
- ④さけは可食部（皮を含む）を細切均一化後100 gを量り、リン酸30 gを加え、ホモジナイズした。
- ⑤うなぎは、活鰻を使用し、頭部を除いた可食部（内臓、骨及び皮を含む）を細切均一化後100 gを量り、リン酸30 gを加え、ホモジナイズした。
- ⑥しじみは、貝殻を除き細切均一化後100 gを量り、リン酸30 gを加え、ホモジナイズした。
- ⑦牛乳は100 gを量り、リン酸30 gを加え、ホモジナイズした。
- ⑧鶏卵は、殻を除き卵白と卵黄をよく混合し100 gを量り、リン酸30 gを加え、ホモジナイズした。
- ⑨はちみつは百花蜜を使用し、ホモジナイズした。
- ⑩鶏の筋肉は脂肪層を除き、細切均一化後100 gを量り、リン酸30 gを加え、ホモジナイズした。

### 2. 試薬・試液

#### 1) 標準品

フェントラザミド標準品：純度99.7%、融点79°C（関東化学製）

#### 2) 試薬

アセトニトリル、アセトン：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）

酢酸アンモニウム：特級（関東化学製）

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：MEGA Bond elut C18（1 g、アジレント・テクノロジー製）

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

#### 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：フェントラザミド標準品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 mg/L～0.02 mg/Lの濃度の溶液を調製した。

添加用標準溶液：標準原液をアセトンで希釈して0.2及び0.6 mg/L溶液を調製した。

##### ②試液の調製方法

10 vol%リン酸：リン酸10 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（2：3）混液：アセトニトリル400 mL及び水600 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 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	API3200	AB SCIEX
LC 装置	Prominence	島津製作所
データ処理	Analyst	AB SCIEX

### 4. 測定条件

LC 条件																					
カラム	TSK-gel ODS-100 サイズ：内径 2.0 mm、長さ 150 mm、粒子径 5 μm 会社：東ソー株式会社																				
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>90</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>10</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>10.1</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>15</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> </tbody> </table>			時間 (分)	A液 (%)	B液 (%)	0.0	90	10	5	10	90	10	10	90	10.1	90	10	15	90	10
時間 (分)	A液 (%)	B液 (%)																			
0.0	90	10																			
5	10	90																			
10	10	90																			
10.1	90	10																			
15	90	10																			
MS 条件																					
測定モード	MS/MS、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 (V)	5000																				
脱溶媒温度 (°C)	500																				
脱溶媒ガス	窒素 70 psi																				
コリジョンガス	窒素																				
定量イオン (m/z)	+350→154[コーン電圧：21(V)、コリジョンエネルギー：15(eV)]																				
定性イオン (m/z)	+350→197[コーン電圧：21(V)、コリジョンエネルギー：15(eV)]																				
保持時間の目安	9.1分																				

### 5. 定量

フェントラザミド標準品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トラザミドの含量を算出した。

### 6. 添加試料の調製

牛の筋肉、牛の肝臓、牛乳、鶏卵及び鶏の筋肉（添加濃度：0.01 ppm）：試料10.0 g相当量に添加用標準溶液0.2 mg/Lを0.5 mL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：0.01 ppm）：試料5.0 g相当量に添加用標準溶液0.2 mg/Lを0.25 mL添加しよく混合した後、30分間放置した。

さけ、うなぎ及びしじみ（添加濃度：0.03 ppm）：試料10.0 g相当量に添加用標準溶液0.6 mg/Lを0.5 mL

添加しよく混合した後、30分間放置した。

はちみつ(添加濃度:0.01 ppm):試料10.0 gに添加用標準溶液0.2 mg/Lを0.5 mL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

フェントラザミドを試料からリン酸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筋肉、肝臓、乳、鶏卵及び魚介類の場合

試料10.0 g相当量を200 mL遠心管に量り採り、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。この溶液から正確に4 mLを採り、水 16 mLを加えた。

#### ②脂肪の場合

試料5.00 g相当量を200 mL遠心管に量り採り、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。この溶液から正確に8 mLを採り、水20 mLを加えた。

#### ③はちみつの場合

試料10.0 gを200 mL遠心管に量り採り、10 vol%リン酸20 mLを加え、溶解した。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。この溶液から正確に4 mLを採り、水 16 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 [MEGA Bond Elut C18 (1 g)] 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、さらにアセトニトリル及び水(2:3)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、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アセトニトリル20 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**

- | 筋肉、肝臓、乳、鶏卵及び魚介類：試料100 gにリン酸30 gを加え、細切均一化後、
- | 試料10.0 g相当量を量り採る
- | 脂肪：試料100 gにリン酸30 gを加え、細切均一化後、試料5.00 g相当量を量り採る
- ↓ はちみつ：試料10.0 gに10 vol%リン酸20 mLを加え、溶解する

**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
- | ろ液を合わせて、アセトンを加えて、正確に200 mLとする
- ↓ 4 mL（脂肪は8 mL）分取し、水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
- | アセトニトリル及び水（2：3）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
- | アセトニトリル及び水（7：3）混液10 mLで溶出、注入
- | オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムを除去
- ↓ アセトニトリル20 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（定量限界の推定用）

さけ、うなぎ及びしじみ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、フェントラザミド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）

さけ、うなぎ及びしじみ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、フェントラザミド0.003 mg/Lの標準溶液0.5 mLに溶解したものを、牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳、鶏卵、はちみつ及び鶏の筋肉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、フェントラザミド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

分析カラムについて、TSK-gel ODS-100V (内径 2.0 mm、長さ 150 mm、粒子径 5  $\mu\text{m}$ ) 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TSK-gel ODS-100V (内径 2.0 mm、長さ 150 mm、粒子径 5  $\mu\text{m}$ ) 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

フェントラザミドはESI (+) モードでのイオン化の感度が良好であったためESI (+) モードを採用した。定量限界相当濃度であるフェントラザミドの標準溶液 (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。フェントラザミドのESI (+) モードでのマススペクトルを図1-1に示した。その結果からプロトン付加分子 ( $m/z$  350) をプリカーサーイオンとした。 $m/z$  350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 $m/z$  350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 $m/z$  154を定量用イオンとし、また $m/z$  197を定性用イオンとした。

以上のことからESI (+) モードでの $m/z$  350 $\rightarrow$ 154を定量用、 $m/z$  350 $\rightarrow$ 197を定性用の測定イオンとした。

表1 フェントラザミドの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)
350	154	ESI (+)	110	10329
350	197	ESI (+)	99	7690

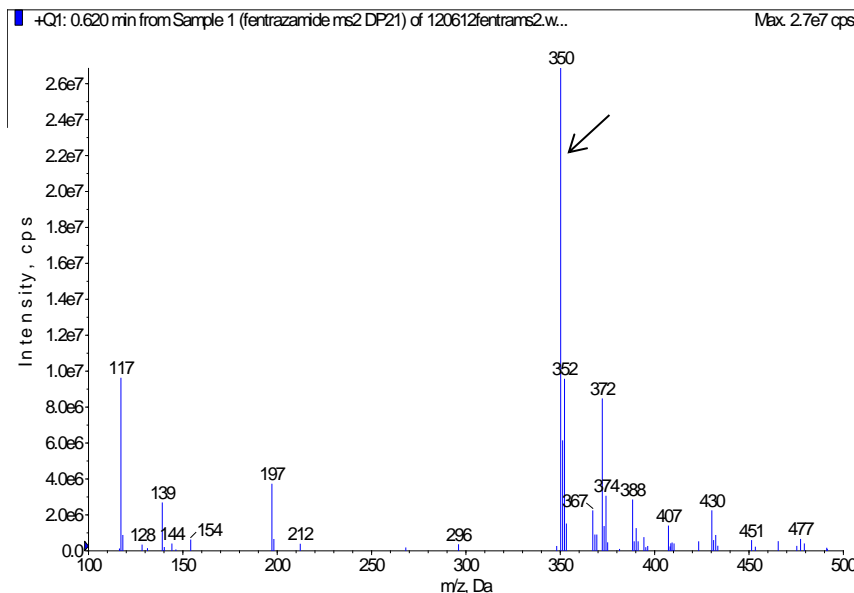


図 1-1 フェントラザミドのマススペクトル

スキャン範囲：100~500  $m/z$

測定条件：ESI (+)、CV=21 (CV=コーン電圧)

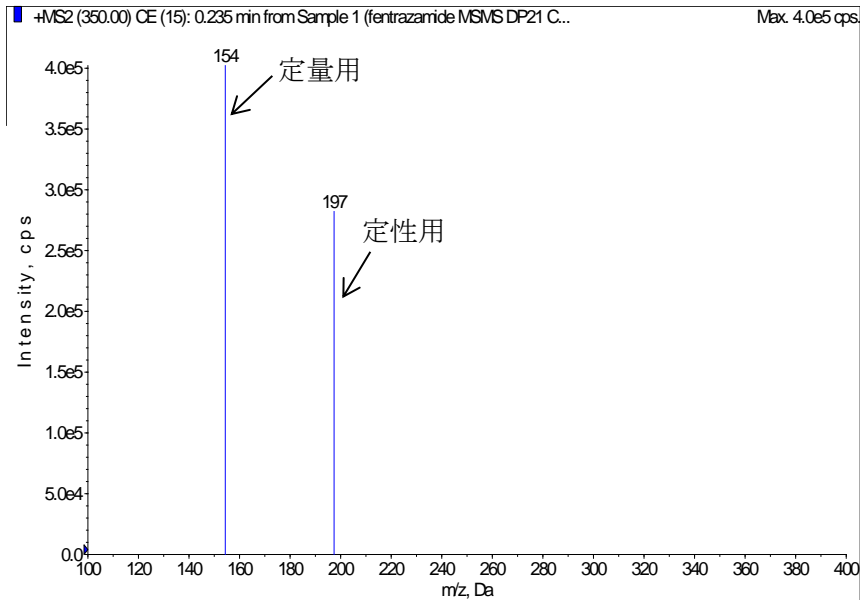
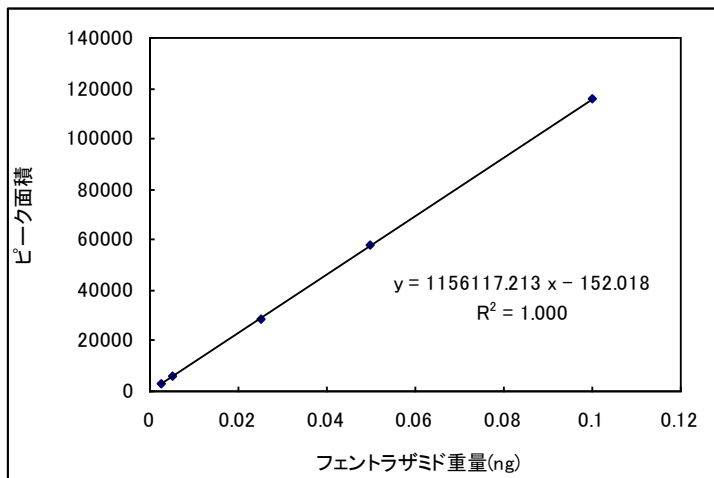


図 1-2 フェントラザミドのプリカーサーイオン  $m/z$  350 のプロダクトイオンスペクトル  
 スキャン範囲：100～400  $m/z$   
 測定条件：ESI+、CV=21、CE=15（CV=コーン電圧、CE=コリジョンエネルギー）

### 3) 検量線の直線性

図2にフェントラザ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 $r^2=0.994$ 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）：Analyst  
 （AB SCIEX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) :  $a=1156117.213$   
 検量線切片 (b) :  $b=-152.018$

図2 フェントラザミド検量線例 ( $m/z$  +350→154)

### 4) 定量限界

定量限界の算出結果を以下に示した。

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

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

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



## 2. 試験溶液調製法の検討

### 1) 抽出方法の検討

#### ①試料調製について

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「フェントラザミド試験法」に従い、高速ホモジナイザーを用いて1分間細砕し、ケイソウ土を1 cmの厚さに敷いたろ紙を用いて吸引ろ過する方法で検討を行ったが、牛の肝臓の添加回収試験においてフェントラザミドの分解が認められた(表2)。牛の肝臓試料100 gに対しリン酸30 gを加えて細切均一化した試料において〔実験方法〕7の分析法に従って分析を行った。その結果、時間経過後も良好な回収率が得られたため、リン酸を添加し調製を行った試料をアセトンで抽出する方法を採用した。

表2 肝臓におけるフェントラザミドの添加後時間経過による回収率 (%)

	添加後の経過時間				
	0分	10分	20分	30分	60分
リン酸添加なし	97	78	54	54	—
リン酸添加調製	89	94	87	96	97

フェントラザミド添加濃度 : 0.01 ppm相当

肝臓試料 : 10 g相当

#### ②添加に使用する酸の種類及び添加量について

牛の肝臓10 gにリン酸又は酢酸をそれぞれ0.25 g、0.5 g、1 g、2 g及び3 g添加し、細切均一化した。調製した各試料において〔実験方法〕7の分析法に従って分析を行った。また、各試料10 g相当量に水10 mLを加えそれぞれのpH値を測定し、その結果を表3に示した。添加する酸にリン酸又は酢酸を用いた場合は添加する量が少ないほどフェントラザミドの回収率が低下する傾向が認められた。

表3 リン酸及び酢酸の各添加量でのフェントラザミドの回収率 (%) (上段) 及びpH値 (下段)

	添加量				
	0.25 g	0.5 g	1 g	2 g	3 g
リン酸	78	91	94	98	99
(pH 値)	(3.61)	(2.59)	(1.86)	(1.34)	(0.96)
酢酸	5	89	86	91	98
(pH 値)	(4.21)	(3.92)	(3.61)	(3.35)	(3.13)

フェントラザミド添加濃度 : 0.01 ppm相当

肝臓試料 : 10 g相当

③各試料のリン酸添加量によるpH値について

試験に使用した牛の肝臓およびはちみつ以外の各試料10 gにリン酸をそれぞれ1 g、2 g及び3 g添加し、細切均一化後、それぞれに水10 mLまたは20 mLを加え、pH値を測定した。その結果を表4に示した。肝臓との同添加量相当の結果と比較し、どの試料においても低いpH値または同程度のpH値となったため、肝臓を添加量の基準として考え、②で示したように試料100 gにリン酸30 gを添加する方法を採用した。

表4 リン酸の各添加量でのpH値

	リン酸添加量		
	1 g	2 g	3 g
牛の筋肉 <sup>*3</sup>	1.87	1.41	1.16
牛の脂肪 <sup>*4</sup>	1.38	1.20	0.97
さけ <sup>*3</sup>	1.83	1.33	1.10
うなぎ <sup>*3</sup>	1.83	1.40	1.13
しじみ <sup>*2</sup>	1.48	1.17	0.95
牛乳 <sup>*2</sup>	1.50	1.24	1.07
鶏卵 <sup>*2</sup>	1.47	1.18	0.96
鶏の筋肉 <sup>*3</sup>	1.80	1.36	1.14

\*2 水を10 mL加え、測定

\*3 水を20 mL加え、測定

\*4 水を20 mL加え、綿栓ろ過後測定

各試料10 g相当で実施

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、フェントラザミド0.1 µg (0.1 µg/mL標準溶液1 mLの溶媒を窒素により除去) を水10 mLに再溶解し、~~水を10 mL~~ 負荷した。溶出状況を表5に示した。フェントラザ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イオン化阻害の影響が大きく、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6参照)、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 (2 : 3) 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5 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 (%)

	アセトニトリル及び水							合計
	水							
	10 mL	(3 : 7) 10 mL	(2 : 3) 10 mL	(1 : 1) 10 mL	(3 : 2) 10 mL	(7 : 3) 10 mL	(4 : 1) 10 mL	
フェントラザミド	0	0	0	0	93	4	tr	97

MEGA Bond elut C18 (1 g、アジレント・テクノロジー製)

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、フェントラザミド0.1 µg (0.1 µg/mL標準溶液1 mLの溶媒を窒素により除去) を水10 mLに再溶解し負荷した。溶出状況を表6に示した。フェントラザミドはアセトニトリル及び水 (7:3) で溶出せず、アセトニトリル及び水 (4:1) 混液からアセトニトリル10 mLまででほぼ100%溶出することが確認された。

表6 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) 10 mL	(7:3) 10 mL	(4:1) 10 mL	(9:1) 10 mL	0-10 mL	10-20 mL	20-30 mL	
フェントラザミド	0	0	0	17	83	10	0	0	110

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7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 に水 20 mL を加えて負荷した後、アセトニトリル及び水 (2:3) 混液で洗浄した。両者ともフェントラザミドは溶出しなかった。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、アセトニトリル及び水 (7:3) 混液で洗浄 (移行) したところフェントラザ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アセトニトリル 20 mL でフェントラザミドを溶出したところ、良好な結果が得られたため、この方法を採用した。

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水の比率が異なるが、脂肪の場合と比較し水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7 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\*<sup>2</sup>及びグラファイトカーボンミニカラム\*<sup>3</sup>からの溶出状況 (%)

	抽出溶液8 mL + 水20 mL* <sup>4</sup>	アセトニトリル及 び水 (2:3) * <sup>4</sup> 10 mL	アセトニトリル及 び水 (7:3) * <sup>5</sup> 10 mL	アセトニトリル* <sup>6</sup>		合計
				0-20 mL	20-30 mL	
フェントラザミド	0	0	0	88	0	88

\*<sup>2</sup> MEGA Bond elut C18、(充てん量1 g、アジレント・テクノロジー製)

\*<sup>3</sup> Inertsep GC、(充てん量500 mg、ジーエルサイエンス製)

\*<sup>4</sup> オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム

\*<sup>5</sup> 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

\*<sup>6</sup> 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品目に鶏の筋肉を加えた10品目を試料に用いて、[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。

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8に示した。検討した10品目何れの試料においてもフェントラザ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8 選択性の評価

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 <sup>1)</sup> (ppm)	基準値 <sup>1)</sup> (ppm)	添加濃度 <sup>2)</sup> (ppm)	妨害ピークの許容範囲		ピーク面積(高さ) <sup>3)</sup>			選択性の評価 <sup>5)</sup>	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 <sup>4)</sup> (b)			面積(高さ) 比(s)(b)
フェントラザミド	牛の筋肉	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	#DIV/0!	○	
		0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	#DIV/0!	○	
	牛の脂肪	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	#DIV/0!	○	
		0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	#DIV/0!	○	
	牛の肝臓	0.01	0.03	0.03	基準値	0.03	< 0.100	面積	0	0	#DIV/0!	○	
		0.01	0.03	0.03	基準値	0.03	< 0.100	面積	0	0	#DIV/0!	○	
	うなぎ	0.01	0.03	0.03	基準値	0.03	< 0.100	面積	0	0	#DIV/0!	○	
		0.01	0.03	0.03	基準値	0.03	< 0.100	面積	0	0	#DIV/0!	○	
	しじみ	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	#DIV/0!	○	
		0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	#DIV/0!	○	
鶏卵	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	#DIV/0!	○		
	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	#DIV/0!	○		
はちみつ	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	#DIV/0!	○		
	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	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、精度及び定量限界の評価

真度及び併行精度の検討結果を表9に示した。真度は81~108%、併行精度は1~8%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、牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳、鶏卵、はちみつ及び鶏の筋肉の添加回収試験におけるS/N比の平均値は258~330でありS/N $\geq$ 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71~90でありS/N $\geq$ 10を十分に満たした。

表9 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 <sup>1)</sup> (ppm)	基準値 <sup>1)</sup> (ppm)	添加濃度 <sup>2)</sup> (ppm)	定量限界 <sup>2)</sup> の評価 <sup>2)</sup>	検量線					回収率(%)					真度 (%)	併行精度 (RSD%)	S/N比 <sup>3)</sup>			備考
							検量	切片	r <sup>2</sup>	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5	Max	Min			平均値			
フェントラザミド	牛の筋肉	0.01	0.01	0.01		818026	692	0.999	86	87	85	87	81	85	0	268	248	258				
		0.01	0.01	0.01		821004	743	1.000	79	83	86	85	71	81	0	341	286	314				
	牛の脂肪	0.01	0.01	0.01		894441	-162	0.998	98	111	102	104	113	106	8	303	243	273				
		0.01	0.03	0.03	*	892668	1783	0.997	100	97	100	101	93	98	0	#DIV/0!						
	うなぎ	0.01	0.03	0.03	*	930388	1273	0.999	104	94	98	95	86	98	4	#DIV/0!						
		0.01	0.03	0.03	*	884819	982	0.999	109	119	112	107	107	108	4	#DIV/0!						
	牛乳	0.01	0.01	0.01		1158117	-162	1.000	107	97	89	97	98	97	7	361	276	319				
		0.01	0.01	0.01		926744	934	0.999	86	79	87	82	85	84	4	333	283	313				
	鶏卵	0.01	0.01	0.01		924758	-291	0.999	106	103	104	106	105	105	7	321	306	314				
		0.01	0.01	0.01		1442138	-548	0.994	103	109	134	101	111	107	5	356	303	330				

\*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4回測定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10 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)	標準溶液濃度*2 (mg/L)	面積又は高さの別	ブランク*4	ピーク面積(高さ)*3			溶媒標準溶液			SN比		回収率		備考			
									マトリックス添加標準溶液	溶媒標準溶液	平均	nc1	nc2	平均	nc1	nc2	比(%)	SN比				
フェントラザミド		牛の筋肉	0.01	0.01	0.01	0.001	面積	0														
		牛の脂肪	0.01	0.01	0.01	0.001	面積	0														
		牛の肝臓	0.01	0.01	0.01	0.001	面積	0														
		さけ	0.01	0.03	0.03	*	0.001	面積	0	1859	1347	1523	1071	1749	1710	88	75	89	71			
		うなぎ	0.01	0.03	0.03	*	0.001	面積	0	1403	1839	1621	1082	1730	1700	124	96	95	90			
		しじみ	0.01	0.03	0.03	*	0.001	面積	0	1674	1699	1698	1099	1071	1070	80	79	101	73			
		牛乳	0.01	0.01	0.01	0.001	面積	0														
		鶏卵	0.01	0.01	0.01	0.001	面積	0														
		はちみつ	0.01	0.01	0.01	0.001	面積	0														
		鶏の筋肉	0.01	0.01	0.01	0.001	面積	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に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となるように、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濃度に実測値を2倍以上測定する。(必要に応じて乾燥進入を行う。)  
 \*5 ブランク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11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。面積値は0.91~1.02であり、測定への影響は無いものと考えられた。

添加回収試験における真度を表11で求めたピーク面積比で除して補正真度を求め、表12に示した。補正真度は84~111%であり、目標値を十分に満たした。

表11 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)	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*3			溶媒標準溶液			ピーク面積(高さ)比*6	備考
									nc1	nc2	平均	nc1	nc2	平均		
フェントラザミド		牛の筋肉	0.01	0.01	0.01	0.001	面積	0	5597.5	5232.8	5415	5948	5301	5624	0.96	
		牛の脂肪	0.01	0.01	0.01	0.001	面積	0	5394.3	5396.3	5367	5615	5527	5571	0.98	
		牛の肝臓	0.01	0.01	0.01	0.001	面積	0	5370.1	5534.8	5455	5590	5425	5506	0.99	
		さけ	0.01	0.03	0.03	0.001	面積	0	18687	19220	17444	16613	17638	17126	1.02	
		うなぎ	0.01	0.03	0.03	0.001	面積	0	17244	16412	16826	17340	17526	17436	0.97	
		しじみ	0.01	0.03	0.03	0.001	面積	0	17469	16415	16942	16998	16908	16983	1.00	
		牛乳	0.01	0.01	0.01	0.001	面積	0	5827	5268	5447	5849	5658	5603	0.97	
		鶏卵	0.01	0.01	0.01	0.001	面積	0	5130	4881	5006	5649	5347	5406	0.91	
		はちみつ	0.01	0.01	0.01	0.001	面積	0	5428	5780	5606	5594	5870	6732	0.88	
		鶏の筋肉	0.01	0.01	0.01	0.001	面積	0	5791	5304	5542	5874	5531	6782	0.96	

\*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%相当濃度となるように、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濃度に実測値を2倍以上測定した結果から評価する。(必要に応じて乾燥進入を行う。)  
 \*4 ブランク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12 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	フェントラザミド	牛の筋肉	0.01	0.01	0.01	85	0.96	89	
		牛の脂肪	0.01	0.01	0.01	81	0.96	84	
		牛の肝臓	0.01	0.01	0.01	106	0.99	107	
		さけ	0.01	0.03	0.03	98	1.02	96	
		うなぎ	0.01	0.03	0.03	98	0.97	101	
		しじみ	0.01	0.03	0.03	108	1.00	109	
		牛乳	0.01	0.01	0.01	97	0.97	100	
		鶏卵	0.01	0.01	0.01	84	0.91	92	
		はちみつ	0.01	0.01	0.01	105	0.98	107	
		鶏の筋肉	0.01	0.01	0.01	107	0.96	111	

4. 考察

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「フェントラザミド試験法」に従い、高速ホモジナイザーを用いて1分間細砕し、ケイソウ土を1 cmの厚さに敷いたろ紙を用いて吸引ろ過する方法で検討を行ったが、牛の肝臓の添加回収試験においてフェントラザミドの分解が認

められた。そこで、試料調製の段階で肝臓試料10 gに対しリン酸3 gを添加し試験を行ったところ、時間経過によるフェントラザミドの分解を防ぐことが可能であったため、試料調製時にリン酸添加を行うこととした。

次いで、リン酸の添加量及び酢酸についても検討を行った。リン酸については肝臓試料10 gに対しリン酸1 g及び3 g添加を行い試験した結果で差がないことから添加量は試料10 gに対しリン酸1 gで十分であると判断した。酢酸についてはリン酸よりもpH値が下がりづらかったため、リン酸を用いることとした。

また、牛の肝臓及びはちみつ以外の試料についてもリン酸添加量によるpH値を測定した。その結果、どの試料においても肝臓試料より低いpH値または同程度のpH値となったため、肝臓を添加量の基準として考え、試料100 gにリン酸10 gを添加する方法を採用した。

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。

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81～108%、併行精度は1～8%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、肝臓、魚介類、鶏の卵及び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]

フェントラザミドをリン酸添加した試料からアセトンで抽出し、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提案する。

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、はちみつ及び鶏の筋肉に適用した場合、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81～108%、併行精度は1～8%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。

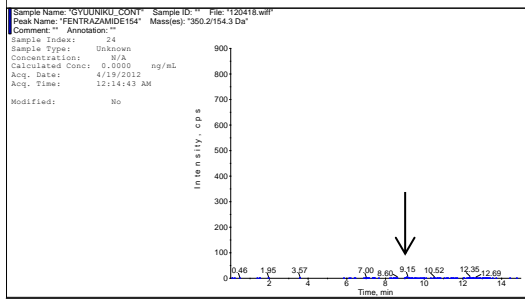
#### [参考文献]

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 フェントラザミドの個別試験法(厚生労働省)

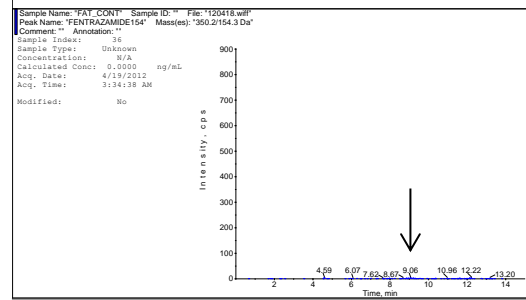
社団法人日本植物防疫協会編：“農薬ハンドブック2011年版（改定新版）”、社団法人日本植物防疫協会

## フェントラザミドの添加回収試験におけるクロマトグラム

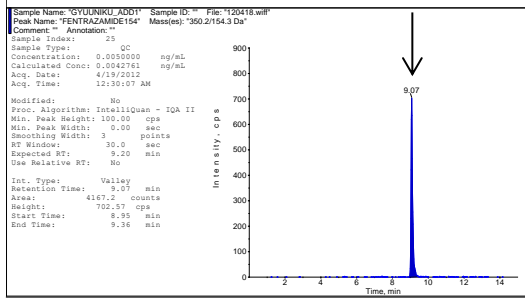
### ブランク



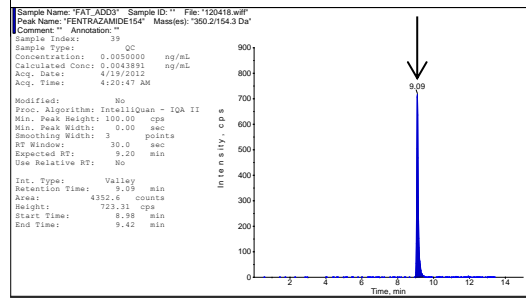
### ブランク



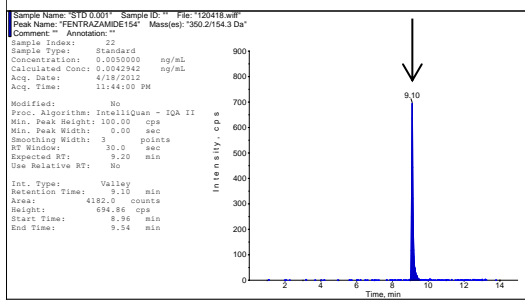
### 添加試料



### 添加試料



### 標準溶液



### 標準溶液

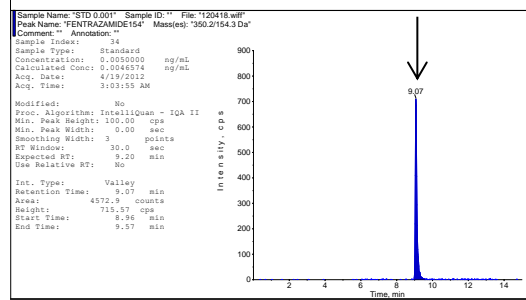
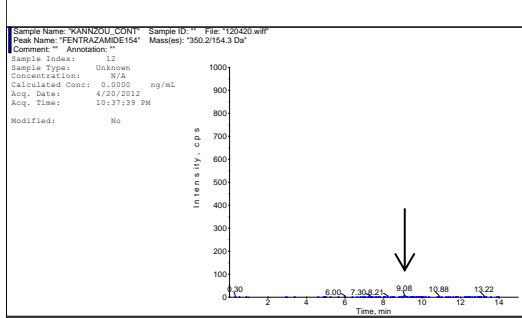


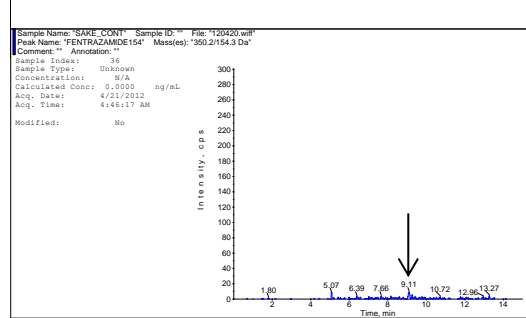
図 3-1 牛の筋肉の SRM クロマトグラム  
フェントラザミド ( $m/z+350 \rightarrow 154$ )  
添加濃度 : 0.01 ppm

図 3-2 牛の脂肪の SRM クロマトグラム  
フェントラザミド ( $m/z+350 \rightarrow 154$ )  
添加濃度 : 0.01 ppm

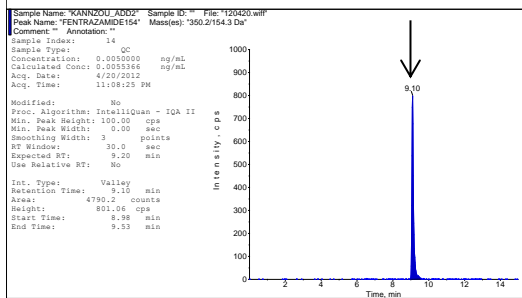
ブランク



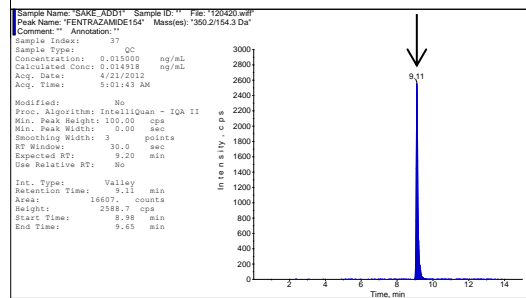
ブランク



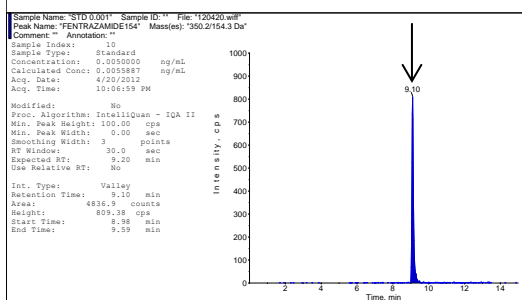
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

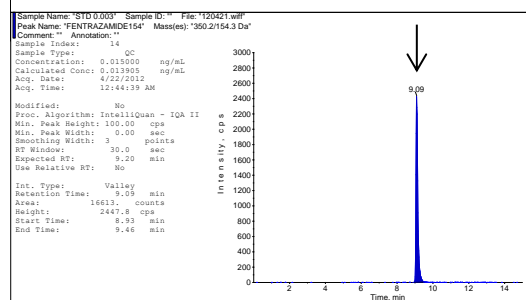
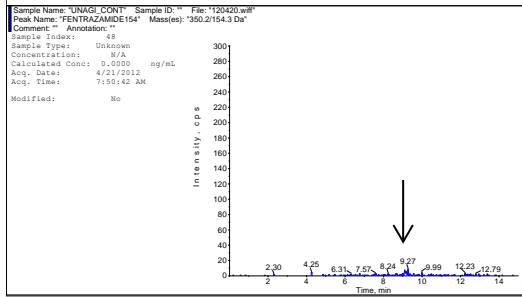


図 3-3 牛の肝臓の SRM クロマトグラム  
 フェントラザミド ( $m/z +350 \rightarrow 154$ )  
 添加濃度 : 0.01 ppm

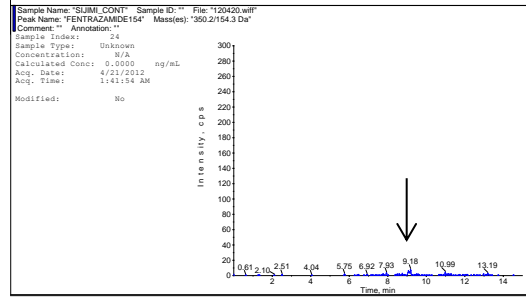
図 3-4 さけの SRM クロマトグラム  
 フェントラザミド ( $m/z +350 \rightarrow 154$ )  
 添加濃度 : 0.03 ppm



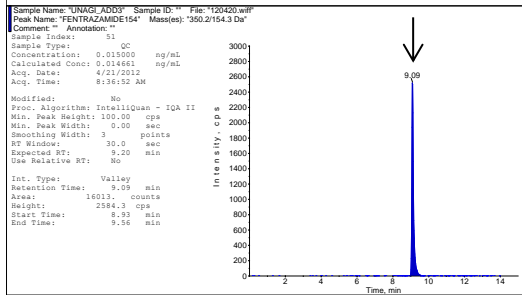
ブランク



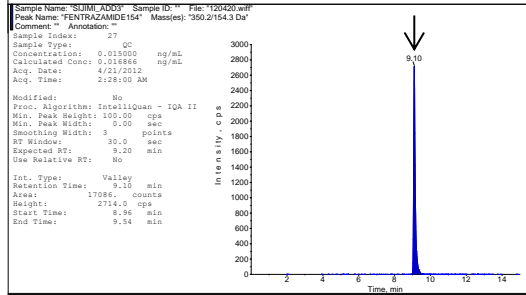
ブランク



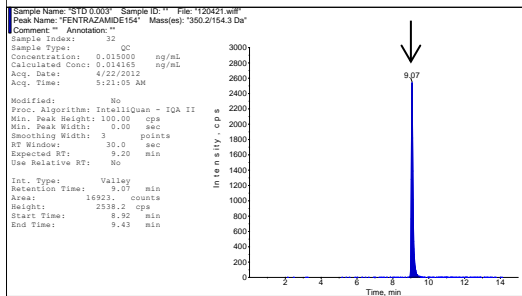
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

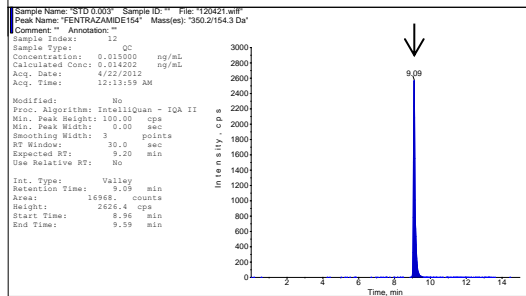
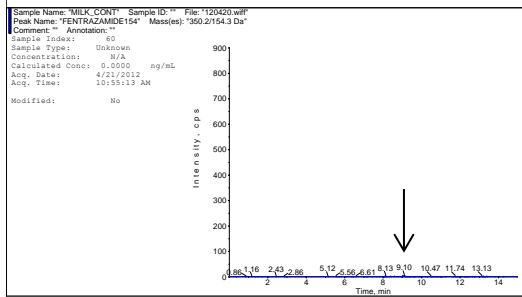


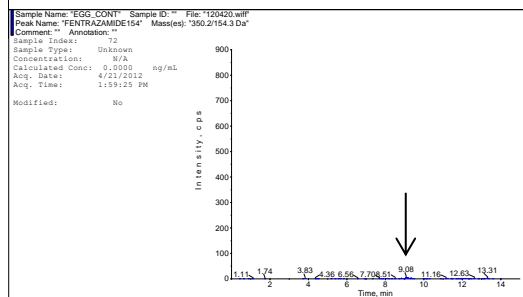
図 3-5 うなぎの SRM クロマトグラム  
フェントラザミド ( $m/z+350 \rightarrow 154$ )  
添加濃度 : 0.03 ppm

図 3-6 しじみの SRM クロマトグラム  
フェントラザミド ( $m/z+350 \rightarrow 154$ )  
添加濃度 : 0.03 ppm

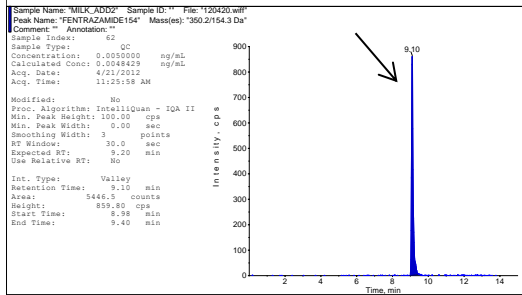
ブランク



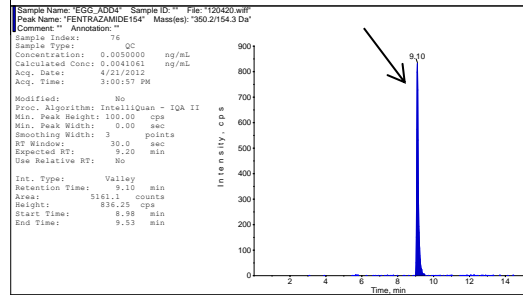
ブランク



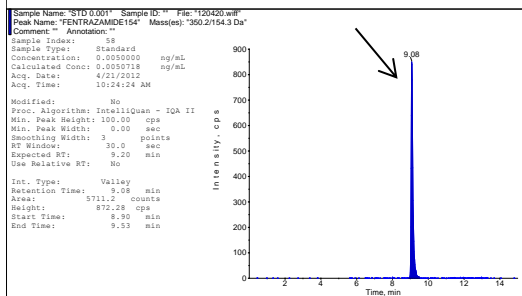
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

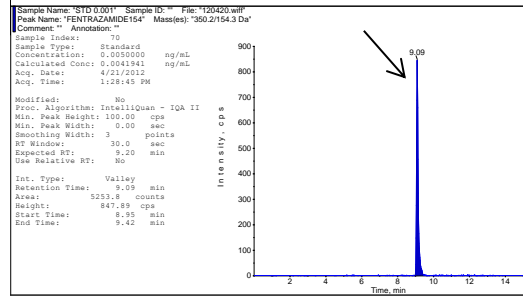
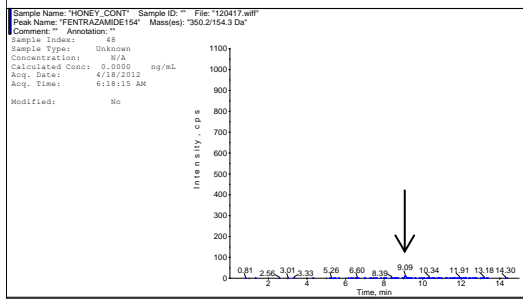


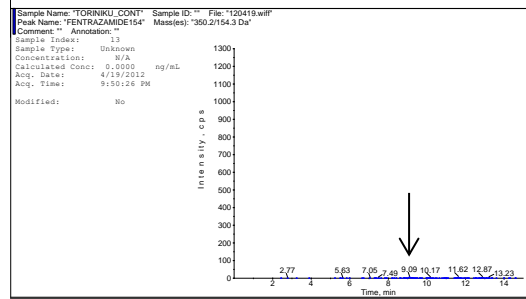
図 3-7 牛乳の SRM クロマトグラム  
 フェントラザミド ( $m/z$ +350→154)  
 添加濃度 : 0.01 ppm

図 3-8 鶏卵の SRM クロマトグラム  
 フェントラザミド ( $m/z$ +350→154)  
 添加濃度 : 0.01 ppm

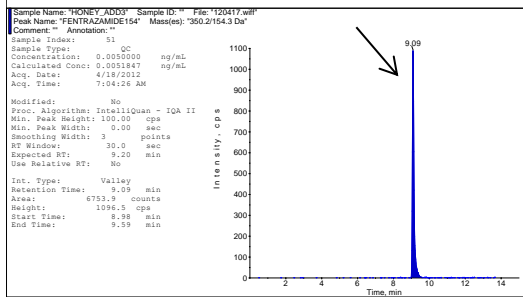
ブランク



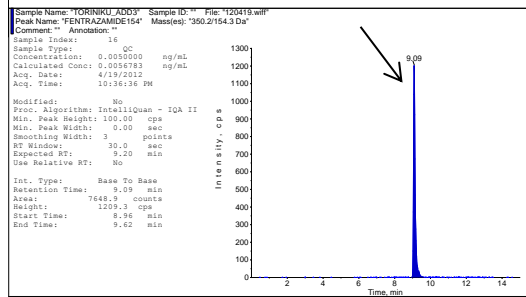
ブランク



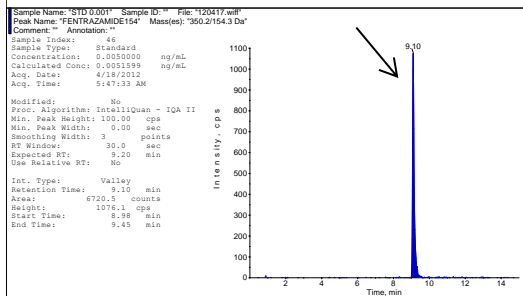
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

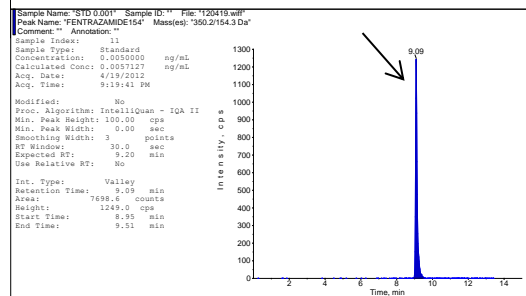
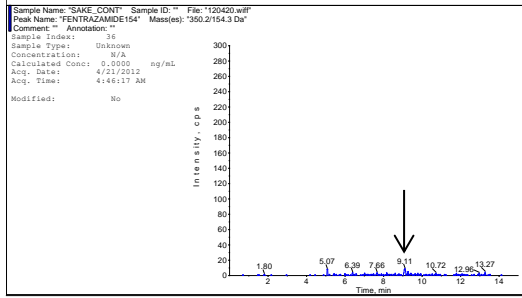


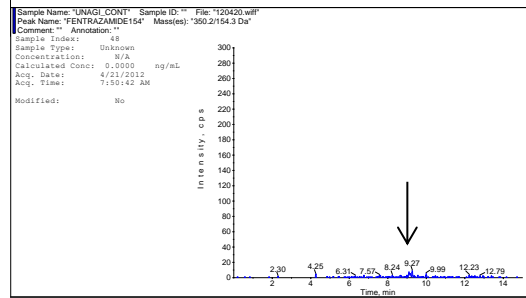
図 3-9 はちみつの SRM クロマトグラム  
 フェントラザミド ( $m/z+350 \rightarrow 154$ )  
 添加濃度 : 0.01 ppm

図 3-10 鶏の筋肉の SRM クロマトグラム  
 フェントラザミド ( $m/z+350 \rightarrow 154$ )  
 添加濃度 : 0.01 ppm

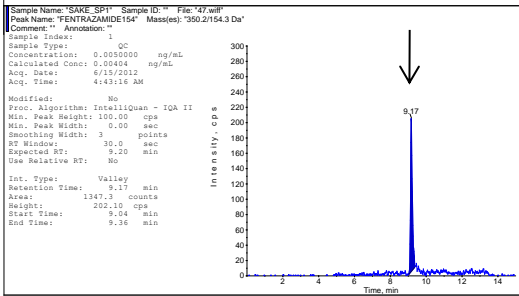
フェントラザミドの定量限界の推定におけるクロマトグラム  
 ブランク



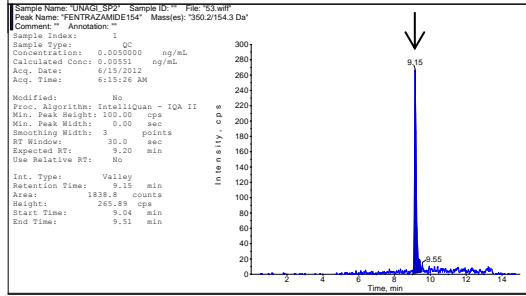
ブランク



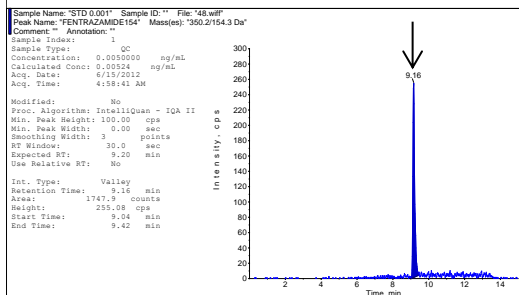
マトリックス添加標準溶液



マトリックス添加標準溶液



溶媒標準溶液



溶媒標準溶液

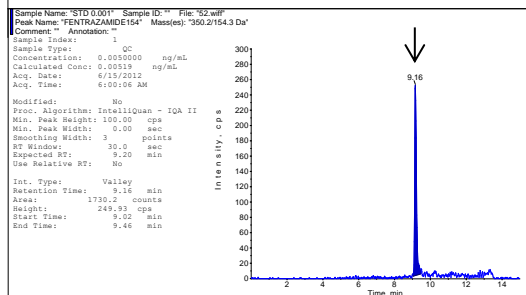
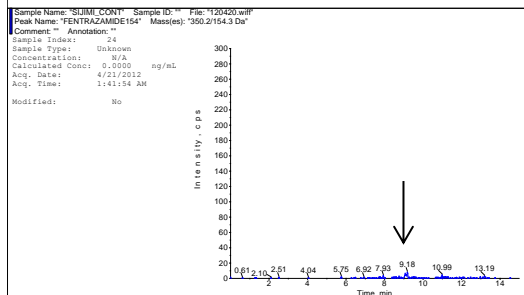


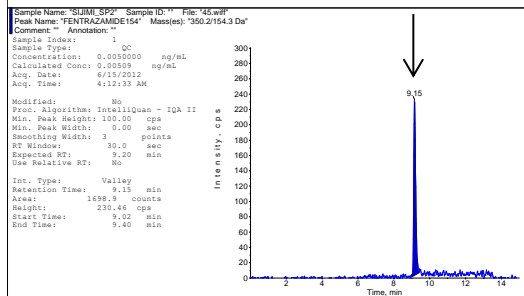
図 4-1 さけの SRM クロマトグラム  
 フェントラザミド ( $m/z+350 \rightarrow 154$ )  
 試料中 0.01 ppm 相当

図 4-2 うなぎの SRM クロマトグラム  
 フェントラザミド ( $m/z+350 \rightarrow 154$ )  
 試料中 0.01 ppm 相当

### ブランク



### マトリックス添加標準溶液



### 溶媒標準溶液

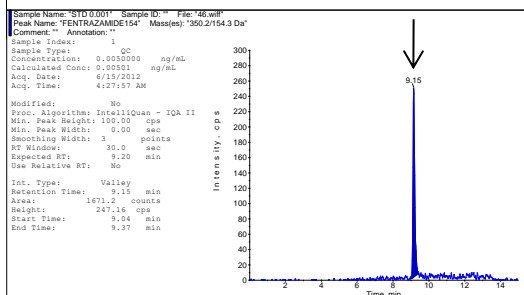
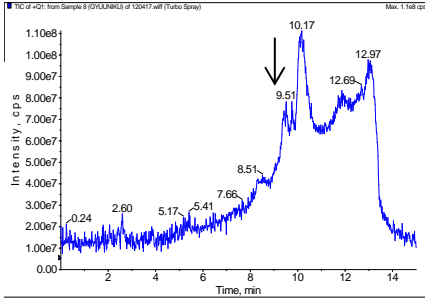
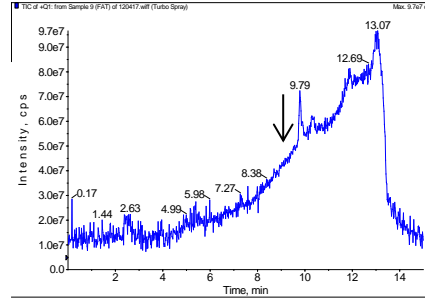


図 4-3 しじみの SRM クロマトグラム  
 フェントラザミド ( $m/z +350 \rightarrow 154$ )  
 試料中 0.01 ppm 相当

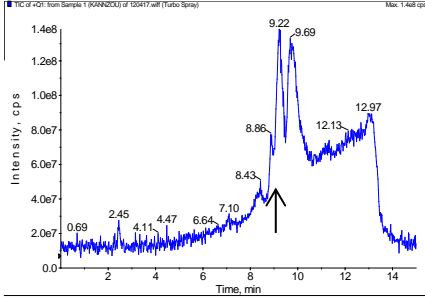
牛の筋肉 無添加



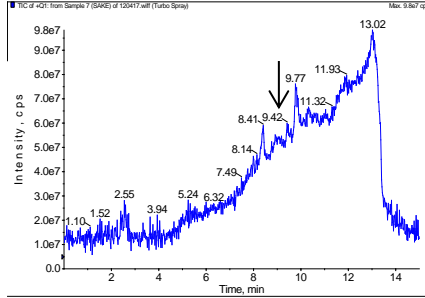
牛の脂肪 無添加



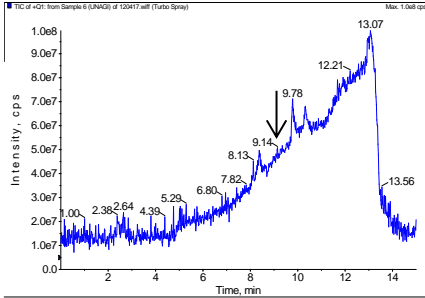
牛の肝臓 無添加



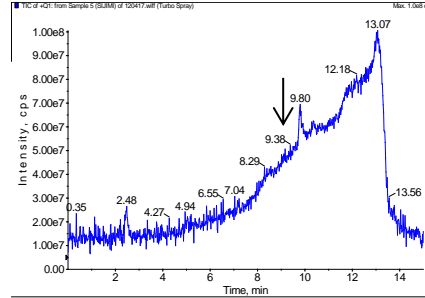
さけ 無添加



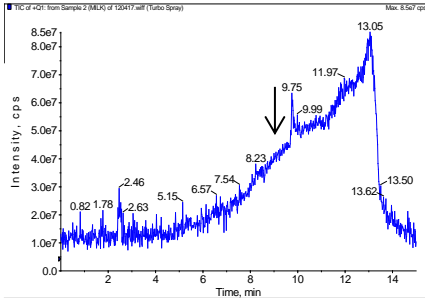
うなぎ 無添加



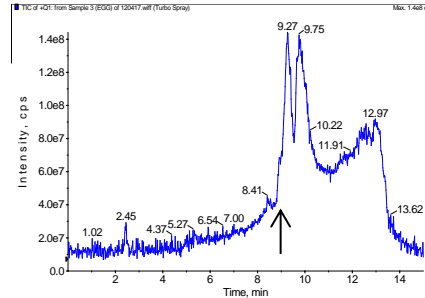
しじみ 無添加



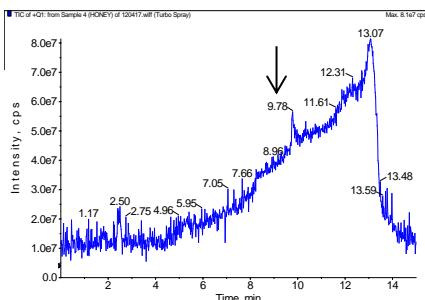
牛乳 無添加



鶏卵 無添加



はちみつ 無添加



鶏の筋肉 無添加

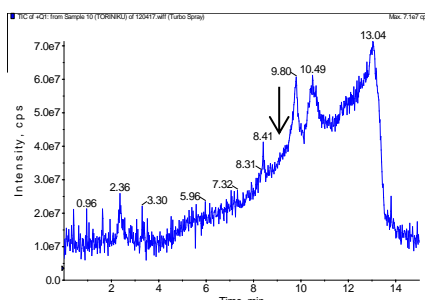


図 5 ブランク試料のトータルイオンクロマトグラム (スキャン範囲: 50~1000 m/z)