

※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 22 年度

食品に残留する農薬等の成分である物質(メタフルミゾン)の試験法開発事業

メタフルミゾン試験法（農産物）の検討結果

[緒言]

1. 目的及び試験法の検討方針等

メタフルミゾンの農産物中の分析法の開発を行った。

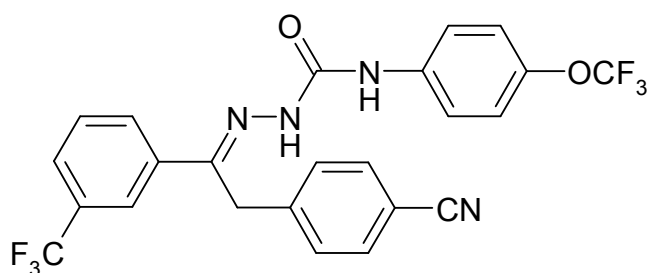
メタフルミゾンは、1989年に日本農薬株式会社により開発されたトリフルオロメトキシフェニル環を有する殺虫剤である。異性体を有し、原体中の含有率はE-異性体90%以上、Z-異性体10%以下となっている。

本試験法においては、通知一斉試験法「LC/MSによる農薬等の一斉試験法I（農産物）」の適用も試みたが、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。

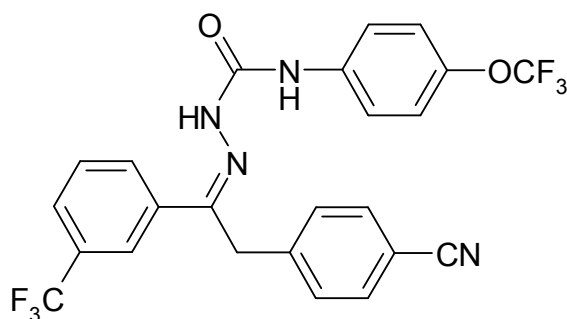
2. 分析対象化合物の構造式及び物理化学的性質

分析対象化合物： メタフルミゾン（metaflumizone）

構造式：



E-異性体



Z-異性体

分子式：	C ₂₄ H ₁₆ F ₆ N ₄ O ₂
分子量：	506.40
化学名：	IUPAC 名 (E _Z)-2'-[2-(4-cyanophenyl)-1-(<i>α,α,α</i> -trifluoro- <i>m</i> -tolyl)ethylidene]-4-(trifluoromethoxy)carbanilohydrazide CAS 名 (139968-49-3) 2-[2-(4-cyanophenyl)-1-[3-(trifluoromethyl)phenyl]ethylidene]-N-[4-(trifluoromethoxy)phenyl]hydrazinecarboxamide
外観：	白色粉末
融点：	E-異性体：197℃ Z-異性体：154℃
蒸気圧：	メタフルミゾン：1.24×10 ⁻⁸ Pa (20℃)、3.41×10 ⁻⁸ Pa (25℃)

E-異性体： 7.94×10^{-10} Pa (20°C)、 2.46×10^{-9} Pa (25°C)
Z-異性体： 2.42×10^{-7} Pa (20°C)、 5.82×10^{-7} Pa (25°C)

溶解性：

溶媒	溶解度 (g/L)		
	メタフルミゾン	<i>E</i> -異性体	<i>Z</i> -異性体
水	1.79×10^{-6}	1.07×10^{-6}	1.87×10^{-6}
<i>n</i> -ヘキサン	0.0084	0.0020	0.0064
トルエン	3.96	2.57	1.39
ジクロロメタン	92.7	72.9	19.8
アセトン	142.7	114.4	28.3
メタノール	13.95	10.5	3.45
酢酸エチル	159.7	114.6	45.1
アセトニトリル	60.3	44.7	15.6

オクタノール/水分配係数：*E*-異性体：logPow = 5.1(30°C、pH5)
Z-異性体：logPow = 4.4(30°C、pH5)

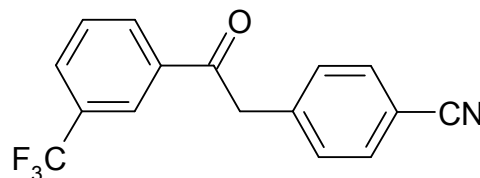
加水分解性加水分解：
 $t_{1/2}$ ：6日 (pH4、25°C)
 $t_{1/2}$ ：304~648日 (pH7、25°C)
 $t_{1/2}$ ：218~249日 (pH9、25°C)

熱安定性：
 メタフルミゾン：およそ 232°Cまで安定
E-異性体：およそ 300°Cまで安定
Z-異性体：およそ 300°Cまで安定

[出典：メタフルミゾン農薬抄録

<http://www.acis.famic.go.jp/syouroku/metaflumizone/index.htm>]

分析対象化合物：メタフルミゾン代謝物 (metaflumizone metabolite)
 構造式：



分子式： $C_{16}H_{10}F_3NO$
 分子量：289.25
 化学名：IUPAC名
p-[*m*-(トリフルオロメチル)フェナシル]ベンズニトリル
 CAS番号：146653-56-7

[出典：メタフルミゾン農薬抄録

<http://www.acis.famic.go.jp/syouroku/metaflumizone/index.htm>]

3. 基準値

メタフルミゾンの基準値を表1に示す。

表1 メタフルミゾンの基準値

食品名	基準値 (ppm)	
	最新の値*	試験法開発時時
大豆	0.5	
ばれいしょ	0.02	
さといも類 (やつがしらを含む)	0.2	
かんしょ	0.2	
だいこん類 (ラディッシュを含む) の根	0.5	
だいこん類 (ラディッシュを含む) の葉	40	
はくさい	10	10
キャベツ	5	5
芽キャベツ	0.8	
ケール	40	
こまつな	40	
きょうな	40	
チンゲンサイ	10	
ブロッコリー	10	
その他のあぶらな科野菜	40	
レタス (サラダ菜及びちしやを含む)	50	
トマト	0.6	
ピーマン	0.6	
なす	0.6	
その他のなす科野菜	0.6	
しょうが	0.3	
えだまめ	10	
その他のハーブ	40	

* 出典：食安発 0515 第1号 (平成25年5月15日)

[実験方法]

1. 試料

玄米、大豆、落花生、ばれいしょ、きゃべつ、ほうれんそう、オレンジ、りんご、茶及びコリアンダー (コエンドロ) の種子は埼玉県内の小売店で購入した。また、試料の採取方法を以下に記載した。

- (1) 玄米、大豆茶、コリアンダー (コエンドロ) の種子
試料を粉砕機を用いて 425 μ m の標準網ふるいを通るように粉砕し均一化した。
- (2) ばれいしょ、きゃべつ、ほうれんそう、オレンジ、りんご
試料を細切した後ミキサーを用いて磨砕均一化した。
- (3) 落花生
冷凍庫 (-18 $^{\circ}$ C) で冷却した試料を、ミキサーを用いて粉砕し 2 mm のふるいを通し均一化した。

2. 試薬・試液

(1) 試薬

メタフルミゾン標準品：純度 99.4%、融点 197 $^{\circ}$ C (FLUKA 製)

この標準品はメタフルミゾン E-異性体及び Z-異性体の混合品であり、メタフルミゾン E-異性体を 90%以上、Z-異性体を 10%以下で含有する。検討では全てこの混合品を使用した。混合品を使用することの試験への影響については「4. その他の試験法検討に関連する事項 (1) 試薬につい

て」に後述する。

メタフルミゾン *E*-異性体標準品：純度 98.7%、融点 192.4°C（和光純薬工業（株）製）

和光純薬製のメタフルミゾン *E*-異性体標準品は試験法の検討中は販売していなかったが、メタフルミゾンが未知量の試料の測定には *E*-異性体だけの標準品の使用が推奨されるため、通知（案）の試薬の記述はこの標準品を参考とした。*E*-異性体だけではなく、*Z*-異性体及び代謝物の標準物質についても和光純薬工業(株)が供給を開始したため、通知（案）の *Z*-異性体及び代謝物の記述も和光純薬工業(株)製の標準品を参考とした。

メタフルミゾン *Z*-異性体標準品：純度 99.7%、融点 154°C（日本農薬株式会社製）

メタフルミゾン代謝物：純度 97.5%（日本農薬株式会社製）

アセトン、*n*-ヘキサン：残留農薬試験用（関東化学（株）製）

アセトニトリル、メタノール、超純水：LCMS 用（和光純薬工業（株）製）

ケイソウ土：セライト 545（和光純薬工業（株）製）

合成ケイ酸マグネシウムミニカラム：Sep-Pak Plus Florisil（910 mg、Waters 製）

その他の試薬：特級（和光純薬工業（株））

(2) 試液

アセトン及び *n*-ヘキサン（1：4）混液：アセトン 200 mL に *n*-ヘキサン 800 mL を加えて混和した。

酢酸エチル及び *n*-ヘキサン（1：4）混液：酢酸エチル 200 mL に *n*-ヘキサン 800 mL を加えて混和した。

(3) 標準溶液

メタフルミゾン混合品 20 mg、メタフルミゾン *Z*-異性体 20 mg 及びメタフルミゾン 20 mg 相当のメタフルミゾン代謝物をアセトニトリルに溶解して 20 mL に定容したものを 1000 mg/L 標準原液とした。この標準原液をメタノールを用いて適宜希釈し、検量線作成用の 0.001~1.5 mg/L 標準溶液（メタノール）を調製した。以降記載するメタフルミゾン代謝物の濃度は全てメタフルミゾン換算した値として扱う。メタフルミゾン代謝物のメタフルミゾンへの換算係数の算出方法は次式によった。



$$\begin{aligned} \text{換算係数} &= \text{メタフルミゾンのモル質量} / \text{メタフルミゾン代謝物のモル質量} \\ &= 289.25 / 506.40 = 1.751 \end{aligned}$$

なお、その他の添加試料や検討に用いた標準溶液についても、この標準原液をメタノールを用いて適宜希釈し、それぞれ設定濃度の標準溶液を調製した。各試料への添加溶液を表 2 に示す。

表2 各試料への添加溶液

物質名	試料	基準値 (ppm)	試料量 (g)	添加溶液濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	添加量 (mL)
メタフルミゾン <i>E</i> -異性体	玄米	0.01 (一律)	10.0	0.200	0.5
	大豆	0.5	10.0	0.200	0.5
	落花生	0.01 (一律)	10.0	0.200	0.5
	ばれいしょ	0.01 (一律)	20.0	0.200	1.0
	キャベツ	5	20.0	100	1.0
	ほうれんそう	0.01 (一律)	20.0	0.200	1.0
	オレンジ	0.01 (一律)	20.0	0.200	1.0
	りんご	0.01 (一律)	20.0	0.200	1.0
	茶	0.01 (一律)	5.00	0.100	0.5
	コリアンダー (コエンドロ) の種子	0.01 (一律)	10.0	0.200	0.5
メタフルミゾン <i>Z</i> -異性体	玄米	0.01 (一律)	10.0	0.200	0.5
	大豆	0.5	10.0	0.200	0.5
	落花生	0.01 (一律)	10.0	0.200	0.5
	ばれいしょ	0.01 (一律)	20.0	0.200	1.0
	キャベツ	5	20.0	100	1.0
	ほうれんそう	0.01 (一律)	20.0	0.200	1.0
	オレンジ	0.01 (一律)	20.0	0.200	1.0
	りんご	0.01 (一律)	20.0	0.200	1.0
	茶	0.01 (一律)	5.00	0.100	0.5
	コリアンダー (コエンドロ) の種子	0.01 (一律)	10.0	0.200	0.5
メタフルミゾン 代謝物	玄米	0.01 (一律)	10.0	0.200	0.5
	大豆	0.5	10.0	0.200	0.5
	落花生	0.01 (一律)	10.0	0.200	0.5
	ばれいしょ	0.01 (一律)	20.0	0.200	1.0
	キャベツ	5	20.0	100	1.0
	ほうれんそう	0.01 (一律)	20.0	0.200	1.0
	オレンジ	0.01 (一律)	20.0	0.200	1.0
	りんご	0.01 (一律)	20.0	0.200	1.0
	茶	0.01 (一律)	5.00	0.100	0.5
	コリアンダー (コエンドロ) の種子	0.01 (一律)	10.0	0.200	0.5

和光純薬製のメタフルミゾン *E*-異性体標準品 20 mg をアセトニトリルに溶解して 20 mL に定容したものを 1000 mg/L 標準原液とした。この標準原液をメタノールを用いて適宜希釈し、1 mg/L 標準溶液 (メタノール) を調製した。この標準液は後述する「4. その他の試験法検討に関連する事項 (1) 試薬について」で使用した。

3. 装置

装 置	型 式	会 社
-----	-----	-----

MS 装置	API4000	AB SCIEX 社
LC 装置	Prominence UFLC XR	(株) 島津製作所
ホモジナイザー	マルチディスペンサー PB95	(株) エスエムテレー

4. 測定条件

LC 条件

カラム	L-column2 ODS サイズ：内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μ m (一財) 化学物質評価研究機構製		
移動相流速 (mL/min)	0.20		
注入量 (μ L)	5		
カラム温度 ($^{\circ}$ C)	40		
移動相	A 液：0.1vol%ギ酸 B 液：アセトニトリル		
グラジエント条件	時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)
	0.0	50	50
	15.0	20	80
	16.0	0	100
	26.0	0	100
	27.0	50	50
	37.0	50	50

MS 条件

測定モード	選択反応モニタリング (SRM)
イオン化モード	エレクトロスプレーイオン化法ネガティブモード (ESI-)
Collision Gas	窒素 5 (単位なし)
Curtain Gas	窒素 30 psi
Ion Source Gas1	50 psi
Ion Source Gas2	80 psi
IonSpray Voltage	4500 V
IonSpray Source 温度	600 $^{\circ}$ C
Declustering Potencial	メタフルミゾン：80 V メタフルミゾン代謝物：75 V
定量イオン (m/z)	メタフルミゾン：505 \rightarrow 302 (コリジョンエネルギー25 eV) メタフルミゾン代謝物：288 \rightarrow 142 (コリジョンエネルギー40 eV)

定性イオン (m/z)	メタフルミゾン : 505→117 (コリジョンエネルギー60 eV) メタフルミゾン代謝物 : 288→114 (コリジョンエネルギー65 eV)
保持時間 (min)	メタフルミゾン (<i>E</i> -異性体) : 14.7 メタフルミゾン (<i>Z</i> -異性体) : 13.8 メタフルミゾン代謝物 : 9.4

5. 定量

メタフルミゾン及びメタフルミゾン代謝物(メタフルミゾン換算濃度)の0.001~0.003 mg/L 及び0.25~1.5 mg/L 溶液(メタノール)を数点調製し、それぞれ5 µLをLC-MS/MSに注入し、ピーク面積法で検量線を作成した。この検量線を用い、絶対検量線法でメタフルミゾンの含量を求めた。

6. 試験溶液の調製

(1) 抽出

① 穀類、豆類及び種実類の場合

試料を425 µmの標準網ふるいを通るように粉碎した後、その10.0 gを量り採り、水20 mLを加え、よく混合して30分間放置した。

これにアセトン100 mLを加え、3分間ホモジナイズした後、ケイソウ土を1 cmの厚さに敷いたろ紙(直径60 mm、No.5B、桐山製)を用いて吸引ろ過した。ろ紙上の残留物に、アセトン50 mLを加え3分間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、アセトンを加えて正確に200 mLとした。この20 mLを採り、40°C以下で約5 mLに濃縮した。これに10%塩化ナトリウム溶液100 mLを加え、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン(1:4)混液100 mL及び50 mLで2回振とう抽出した。抽出液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、40°C以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物に*n*-ヘキサン30 mLを加え、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル30 mLずつで3回振とう抽出した。抽出液を合わせ、40°C以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物にアセトン及び*n*-ヘキサン(1:4)混液2 mLを加えて溶かした。

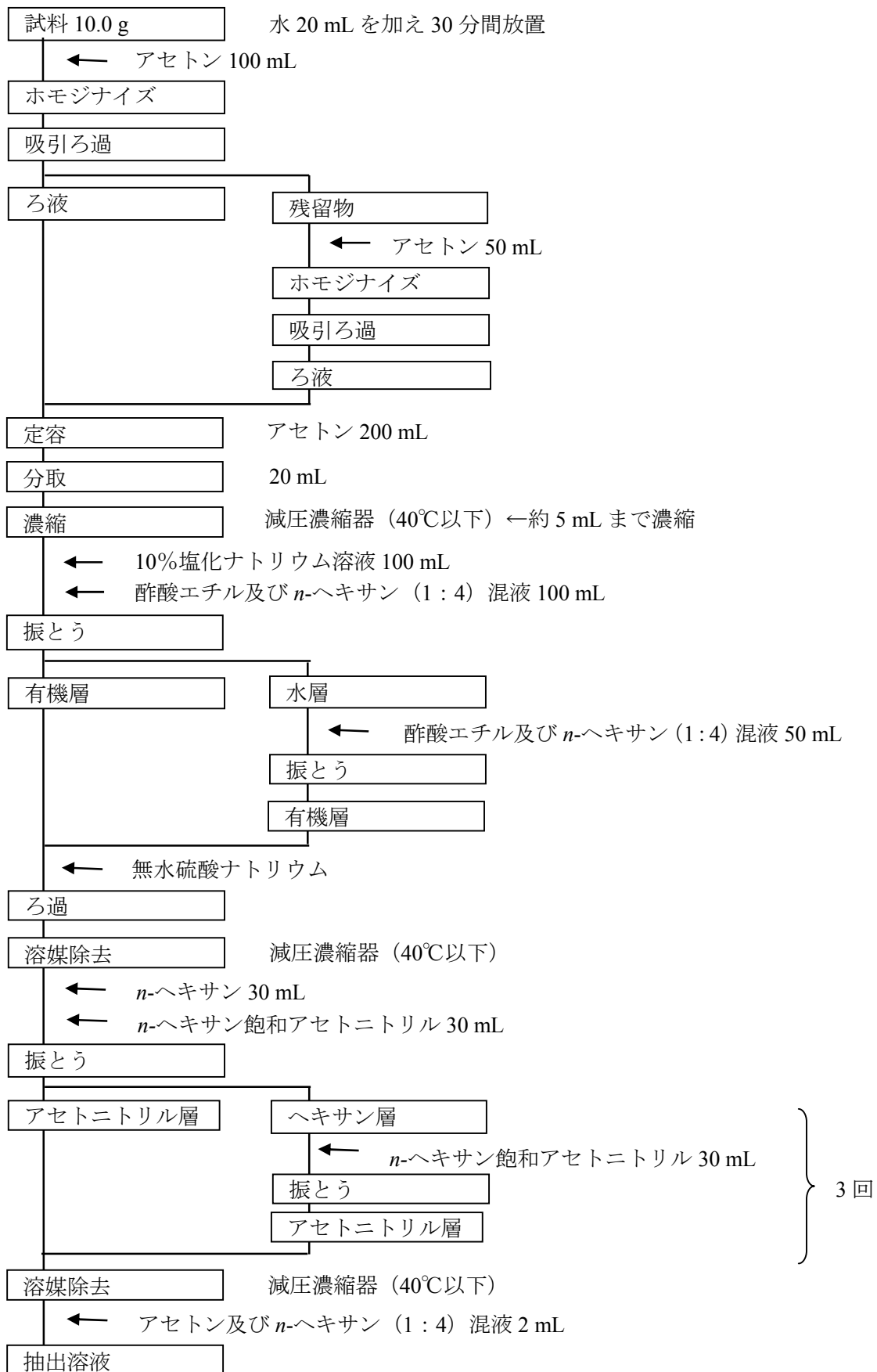


図1 抽出フローチャート（穀類、豆類及び種実類の場合の場合）

②果実、野菜及び茶の場合

試料を粉砕した後、果実及び野菜は 20.0 g を量り採った。茶はその 5.00 g を量り採り、水 20 mL を加え、よく混合して 30 分間放置した。

これにアセトン 100 mL を加え、3 分間ホモジナイズした後、ケイソウ土を 1 cm の厚さに敷いたろ紙（直径 60 mm、No.5B、桐山製）を用いて吸引ろ過した。ろ紙上の残留物に、アセトン 50 mL を加え 3 分間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、アセトンを加えて正確に 200 mL とした。果実及び野菜の場合は抽出液 10 mL、茶の場合は抽出液 40 mL を採り、40℃以下で約 5 mL に濃縮した。これに 10%塩化ナトリウム溶液 100 mL を加え、酢酸エチル及び *n*-ヘキサン（1：4）混液 100 mL 及び 50 mL で 2 回振とう抽出した。抽出液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、40℃以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物にアセトン及び *n*-ヘキサン（1：4）混液 2 mL を加えて溶かした。

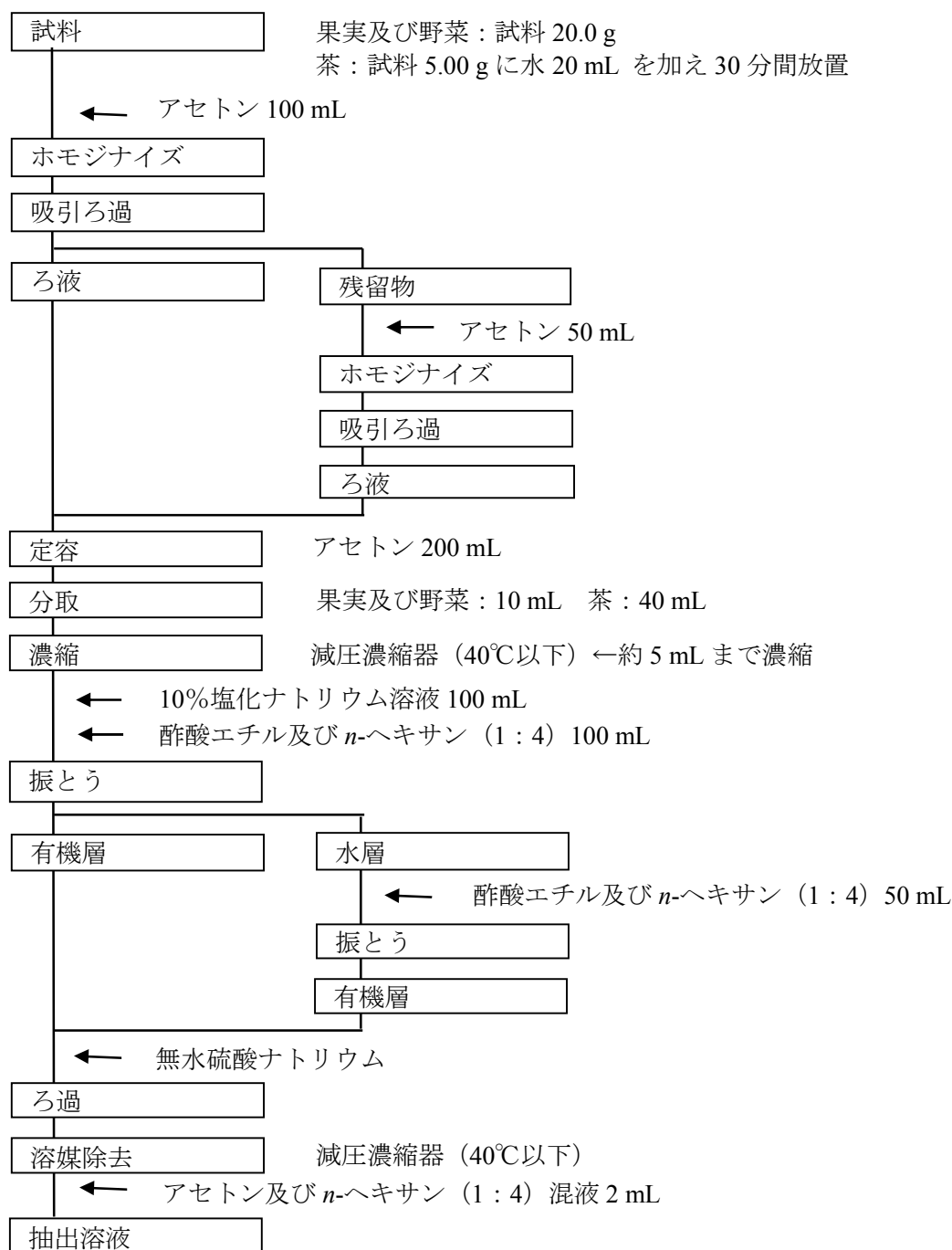


図2 抽出フローチャート (果実、野菜及び茶の場合)

(2) 精製

Sep-Pak Plus Florisil ミニカラム (910 mg) にアセトン及び *n*-ヘキサン (1 : 4) 混液 10 mL を注入し、流出液は捨てた。このカラムに 1) 抽出で得られた抽出溶液を注入し、さらにアセトン及び *n*-ヘキサン (1 : 4) 混液 15 mL を注入して全溶出液を採り、40°C以下で濃縮して溶媒を除去した。残留物にメタノールを正確に 5 mL 加えて溶かし、これを試験溶液とした。

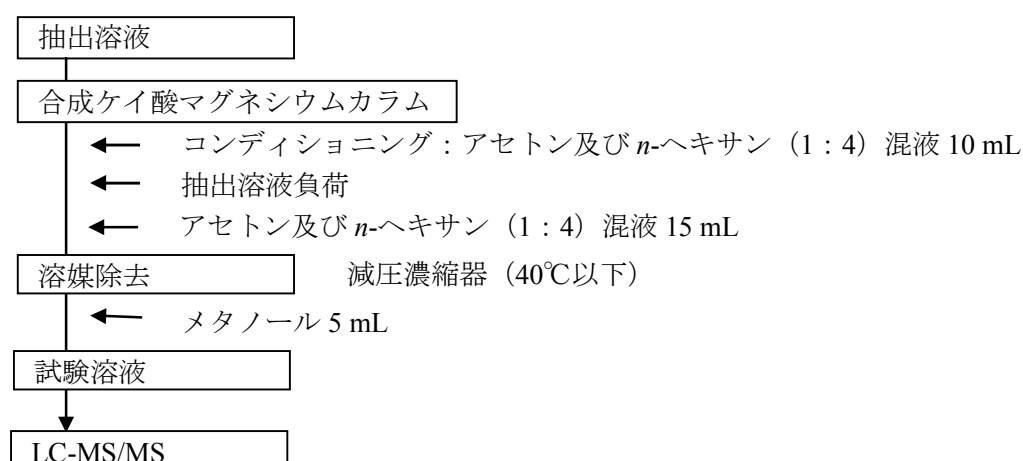


図3 精製フローチャート

7. マトリックス添加標準溶液の調製

添加回収試験における回収率が 100%と仮定した場合に基準値相当濃度となるよう、標準溶液をブランク試料の試験溶液（マトリックス添加標準溶液）及び溶媒（溶媒標準溶液）で調製し、溶媒標準溶液に対するマトリックス添加標準溶液のピーク面積の比を求めて、試料マトリックスの測定への影響について検討した。各標準溶液の詳細を以下に示す。

溶媒標準溶液 : メタフルミゾン標準溶液 1 mg/L 及び 0.002 mg/L (メタノール溶液)
 マトリックス添加標準溶液 : 各ブランク試料の試験溶液 1 mL を 40°C以下で濃縮乾固した後、上記の溶媒標準溶液を 1 mL 添加して溶解した溶液

なお、定量限界の推定においては、定量限界相当濃度のマトリックス添加標準溶液を同様にし、調製した。各標準溶液の詳細を以下に示す。

溶媒標準溶液 : メタフルミゾン標準溶液 0.001 mg/L (メタノール溶液)
 マトリックス添加標準溶液 : 各ブランク試料の試験溶液 1 mL を 40°C以下で濃縮乾固した後、上記の溶媒標準溶液を 1 mL 添加して溶解した溶液

[結果及び考察]

1. 測定条件の検討

(1) MS 条件の検討

メタフルミゾン及びその代謝物は ESI (-) モードでイオン化されるため、アセトニトリル及び 0.1 vol%ギ酸溶液 (v/v) の混液 (1 : 1) を移動相として、Declustering Potential (DP) 及び Collision energy (CE) について検討し最適化を行った。

メタフルミゾン ESI (-) モード測定時のマススペクトルを図 4~6 に示した。その結果から、メタフルミゾンは DP=80 V とした時 m/z 505 のイオン強度が最大となったため、メタフルミゾンの脱プロトン分子 (m/z 505 [M-H]⁻) をプリカーサーイオンとした。メタフルミゾン代謝物は DP=75 V とした時 m/z 288 のイオン強度が最大となったため、メタフルミゾン代謝物の脱プロトン分子 (m/z 288 [M-H]⁻) をプリカーサーイオンとした。

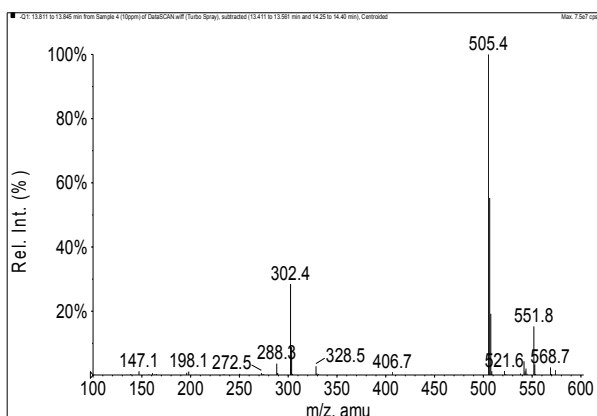


図 4 メタフルミゾン (*E*-異性体) の
マススペクトル
スキャン範囲 : 100~1000 amu
測定条件 : ESI (-), DP=80 V
(DP : Declustering Potential)
メタフルミゾン (*E*-異性体) : 1 mg/L

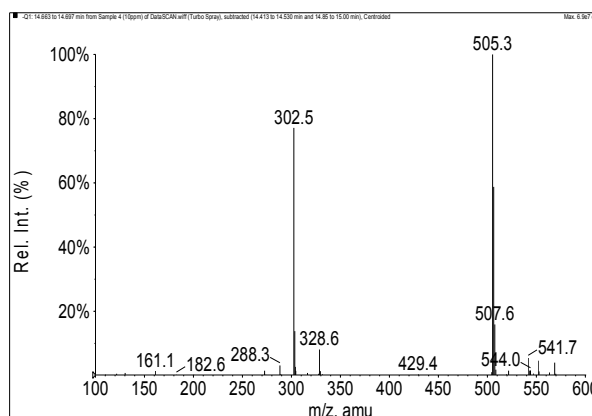


図 5 メタフルミゾン (*Z*-異性体) の
マススペクトル
スキャン範囲 : 100~1000 amu
測定条件 : ESI (-), DP=80 V
(DP : Declustering Potential)
メタフルミゾン (*Z*-異性体) : 1 mg/L

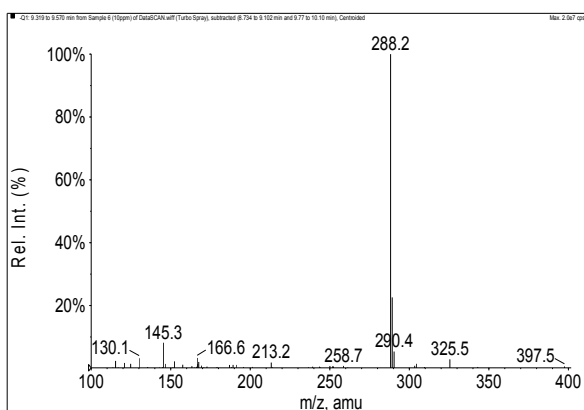


図 6 メタフルミゾン代謝物の
マススペクトル
スキャン範囲 : 100~1000 amu
測定条件 : ESI (-), DP=75 V
(DP : Declustering Potential)
メタフルミゾン代謝物 : 1 mg/L

m/z 505 をプリカーサーイオンとした場合のメタフルミゾンのプロダクトイオンスペクトルを図7~10に、 m/z 288をプリカーサーイオンとした場合のメタフルミゾン代謝物のプロダクトイオンスペクトルを図11~12に示した。メタフルミゾンはCE=25 eVとした時プロダクトイオン m/z 302のイオン強度が最大となり、次いでCE=60 eVとした時プロダクトイオン m/z 117のイオン強度が大きかったため、 m/z 505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 302を定量用イオンに、また m/z 117を定性用イオンとした。メタフルミゾン代謝物はCE=40 eVとした時プロダクトイオン m/z 142のイオン強度が最大となり、次いでCE=65 eVとした時プロダクトイオン m/z 114のイオン強度が大きかったため、 m/z 288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 142を定量用イオンに、また m/z 114を定性用イオンとした。

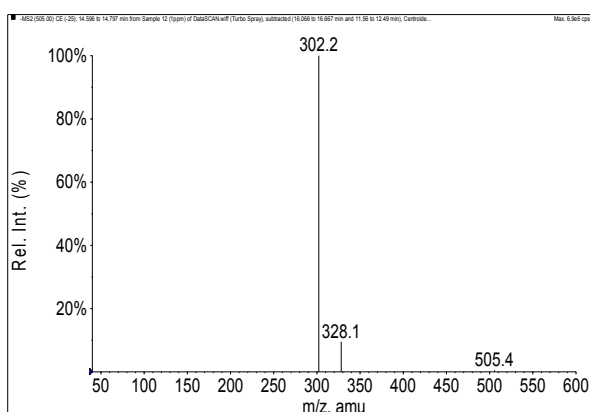


図7 メタフルミゾン (*E*-異性体) の
プロダクトイオンスペクトル
プリカーサーイオン : m/z 505
測定条件 : ESI (-), DP=80 V, CE=25 eV
(DP : Declustering Potential CE : Collision energy)
メタフルミゾン (*E*-異性体) : 1 mg/L

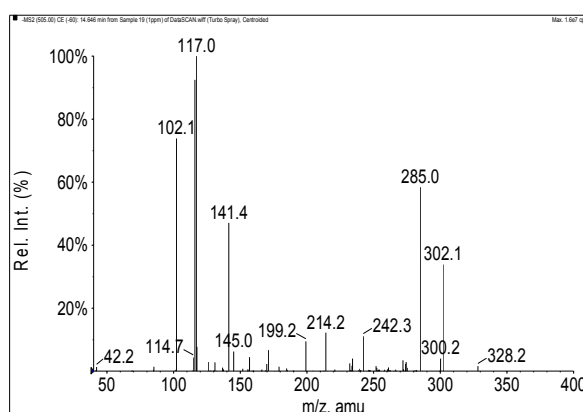


図8 メタフルミゾン (*E*-異性体) の
プロダクトイオンスペクトル
プリカーサーイオン : m/z 505
測定条件 : ESI (-), DP=80 V, CE=60 eV
(DP : Declustering Potential CE : Collision energy)
メタフルミゾン (*E*-異性体) : 1 mg/L

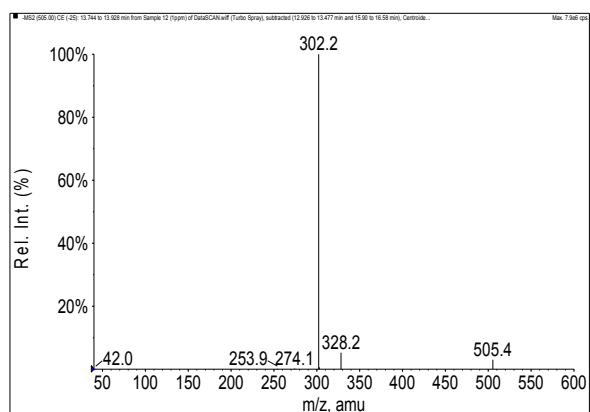


図9 メタフルミゾン (*Z*-異性体) の
プロダクトイオンスペクトル
プリカーサーイオン : m/z 505
測定条件 : ESI (-), DP=80 V, CE=25 eV
(DP : Declustering Potential CE : Collision energy)
メタフルミゾン (*Z*-異性体) : 1 mg/L

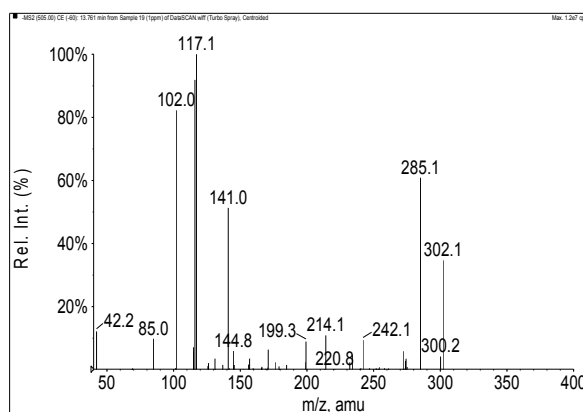


図10 メタフルミゾン (*Z*-異性体) の
プロダクトイオンスペクトル
プリカーサーイオン : m/z 505
測定条件 : ESI (-), DP=80 V, CE=60 eV
(DP : Declustering Potential CE : Collision energy)
メタフルミゾン (*Z*-異性体) : 1 mg/L

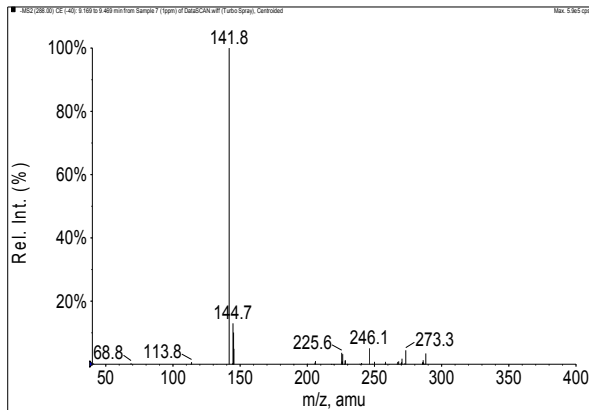


図 11 メタフルミゾン代謝物の
マススペクトル

プロダクトイオンスペクトル

プリカーサーイオン : m/z 288

測定条件 : ESI (-), DP=75 V, CE=40 eV

(DP : Declustering Potential CE : Collision energy)

メタフルミゾン代謝物 : 1 mg/L

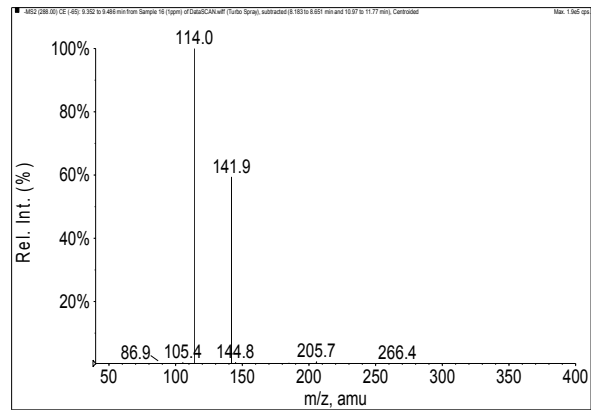


図 12 メタフルミゾン代謝物の
マススペクトル

プロダクトイオンスペクトル

プリカーサーイオン : m/z 288

測定条件 : ESI (-), DP=75 V, CE=65 eV

(DP : Declustering Potential CE : Collision energy)

メタフルミゾン代謝物 : 1 mg/L

(2)LC 条件の検討

分析カラムについては ODS カラム (L-column2 ODS、内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μ m (一財) 化学物質評価研究機構製) を用いて、アセトニトリル及び 0.1vol% ギ酸の混液 (50 : 50) から (80 : 20) までの濃度勾配を 15 分間で実施する条件で測定した。この測定条件ではメタフルミゾンは 14 分 (*Z*-異性体) 及び 15 分 (*E*-異性体) 付近、メタフルミゾン代謝物は 9 分付近にピークが認められ、*Z*-異性体と *E*-異性体の分離及び感度が良好であったため、この測定条件を用いることとした。溶媒標準溶液 (0.001 mg/L) を 7 回注入する繰り返し測定において、面積値及び保持時間の再現性が得られたので、この測定条件を用いることとした。

表 3 標準溶液の 7 回繰り返し測定の結果

物質名	(E-異性体) : 0.001 mg/L		(Z-異性体) : 0.001 mg/L		代謝物 : 0.001 mg/L	
	面積値	保持時間	面積値	保持時間	面積値	保持時間
測定結果 1	12533	14.7	13037	13.8	853	9.4
測定結果 2	12416	14.7	13141	13.8	897	9.4
測定結果 3	12828	14.7	12670	13.8	818	9.4
測定結果 4	12672	14.7	13607	13.8	838	9.4
測定結果 5	12660	14.7	13231	13.9	824	9.4
測定結果 6	13103	14.7	12647	13.9	886	9.4
測定結果 7	12815	14.7	13231	13.8	861	9.4
平均値	12718	14.7	13081	13.8	854	9.4
標準偏差	207	0.0	313	0.05	28	0.01
変動係数(%)	2	0.0	2	0.3	3	0.1

(3)検量線

図 13~18 にメタフルミゾン検量線の例を示した。0.001~0.003 mg/L 及び 0.25~1.5 mg/L の各濃度範囲で作成した検量線の決定係数(R^2)はいずれも 0.995 以上の良好な直線性を示した。

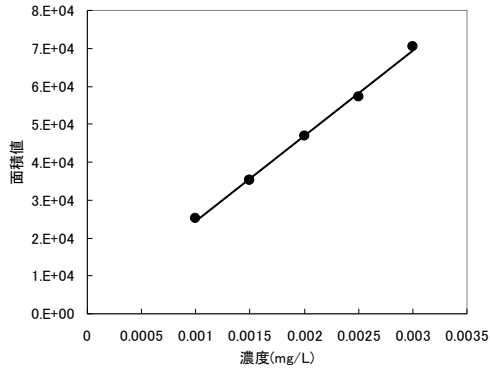


図 13 メタフルミゾン (*E*-異性体) 検量線の例
濃度範囲 : 0.001~0.003 mg/L
 $y=22563231x-1774$ $R^2=0.998$

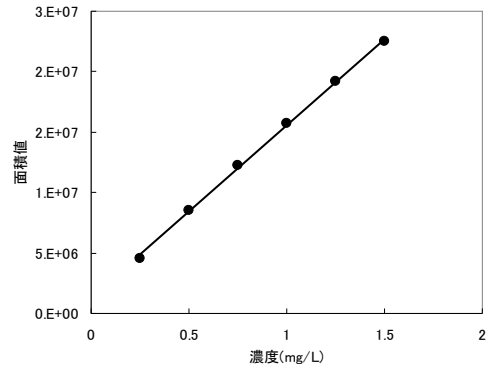


図 14 メタフルミゾン (*E*-異性体) 検量線の例
濃度範囲 : 0.25~1.5 mg/L mg/L
 $y=14277359x-1297797$ $R^2=0.999$

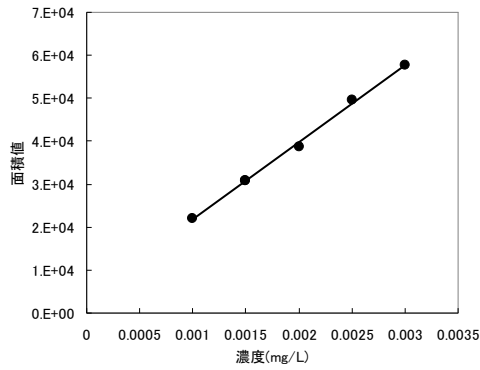


図 15 メタフルミゾン (*Z*-異性体) 検量線の例
濃度範囲 : 0.001~0.003 mg/L
 $y=17990646x-3809$ $R^2=0.998$

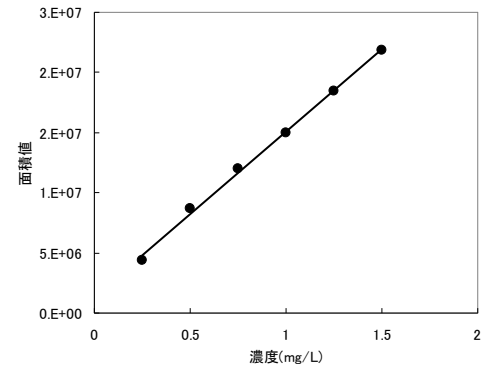


図 16 メタフルミゾン (*Z*-異性体) 検量線の例
濃度範囲 : 0.25~1.5 mg/L mg/L
 $y=13700670x-1415326$ $R^2=0.998$

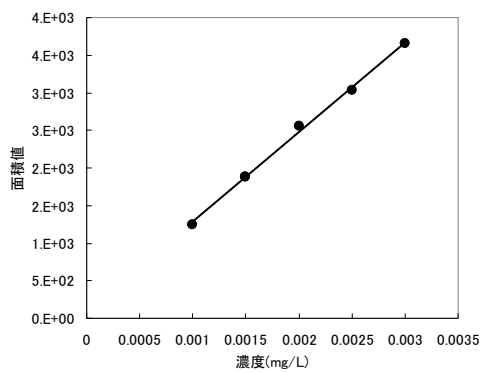


図 17 メタフルミゾン代謝物検量線の例
濃度範囲 : 0.001~0.003 mg/L
 $y=1197231x-81$ $R^2=0.998$

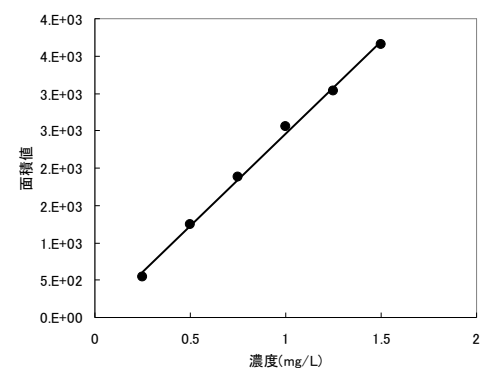


図 18 メタフルミゾン代謝物検量線の例
濃度範囲 : 0.25~1.5 mg/L mg/L
 $y=1097860x-25796$ $R^2=1.000$

(4)定量限界

定量限界の算出結果を以下に示した。

計算式：[試験用液量(mL)／試験溶液中の試料量(g)]×

[分析対象化合物の定量限界相当量(ng)／注入量(μL)]

穀類・豆類・種実類、野菜、果実、茶：0.01 mg/kg = 5 (mL)／1 (g) ×0.01 (ng)／5 (μL)

2. 試験溶液調製法の検討

(1)抽出方法の検討

大豆を試料としてアセトンによる抽出の検討を行った。検討の操作手順は次の通りとした。

試料を粉碎均一化した後、その 10.0 g を量り採り、メタノールで調製した標準溶液 (5 mg/L) をホールピペットを用いて 0.5 mL 添加し、よく混合して 30 分放置した。これに水を 20 mL 加えてよく混合して 30 分放置し、アセトン 100 mL を加え、3 分間ホモジナイズした後、ケイソウ土を敷いたろ紙 (No.5B) を用いて吸引ろ過した。ろ紙上の残留物を採り、新たにアセトン 50 mL を加え、3 分間ホモジナイズした後、吸引ろ過し、アセトンを用いて 200 mL に定容した。抽出溶液を 1 mL 分取し、40℃以下で濃縮して溶媒を除去後、残留物をメタノールに溶かし 1 mL としたものを試験溶液とした。結果を表 4 に示す。

マトリックス補正が無い場合の大豆からの回収率は、メタフルミゾン (*E*-異性体) は 81%、メタフルミゾン (*Z*-異性体) は 72%、メタフルミゾン代謝物は 82%であった。マトリックス補正によりいずれの物質も 100%近い十分な回収が得られたため、抽出溶媒はアセトンとし、ケイソウ土を用いた吸引ろ過を採用することとした。

表 4 アセトン抽出の検討結果 (n=2)

物質名	マトリックス 影響 (%) *1	回収率 (%)			
		マトリックス 補正有*2	マトリックス 補正有-平均	マトリックス 補正無	マトリックス 補正無-平均
メタフルミゾン (<i>E</i> -異性体)	79.8	102.8 100.6	101.7	82.0 80.3	81.2
メタフルミゾン (<i>Z</i> -異性体)	72.0	95.2 103.6	99.4	68.5 74.6	71.6
メタフルミゾン 代謝物	81.4	102.9 98.4	100.7	83.7 80.1	81.4

*1 マトリックス影響：マトリックス添加標準溶液の面積値を溶媒標準溶液の面積値で除した値に 100 を乗じて算出した。

*2 マトリックス添加標準溶液を基準として算出。

(2)転溶溶媒の検討

10%塩化ナトリウム水溶液 100 mL にメタノールで調製した標準溶液 0.01 mg/L を 1 mL 添加し、*n*-ヘキサン 100 mL 及び 50 mL で転溶した結果を表 5 に示す。抽出液は 40℃以下で濃縮して溶媒を除去後、残留物をメタノールに溶かし 1 mL とし、LC-MS/MS で測定した。

メタフルミゾン代謝物は *n*-ヘキサンで 100%近く回収されたが、メタフルミゾン (*E*-異性体) は 0.4%、メタフルミゾン (*Z*-異性体) は 6.9%と低い回収率となった。

表5 *n*-ヘキサンによる転溶溶媒の検討結果

物質名	回収率 (%)	回収率-平均 (%)
メタフルミゾン (<i>E</i> -異性体)	0.4	0.4
	0.4	
メタフルミゾン (<i>Z</i> -異性体)	7.2	7.2
	7.2	
メタフルミゾン代謝物	101.0	99.9
	98.8	

n-ヘキサンではメタフルミゾンの回収が不十分であったため、酢酸エチルと *n*-ヘキサンとの混液を用いて転溶溶媒の検討を行った。割合の異なる酢酸エチル及び *n*-ヘキサン混液により、上記と同様の試験を行った結果を表6に示す。酢酸エチル及び *n*-ヘキサン (1:9) 混液による転溶結果は他の混液と比較するとメタフルミゾンの回収が数%低い結果となった。酢酸エチル及び *n*-ヘキサンの混液は、1:4、1:3 及び 1:1 の割合で各々メタフルミゾン及びその代謝物において同程度の回収率となった以上の結果から、塩析の抽出溶媒として酢酸エチル及び *n*-ヘキサン (1:4) 混液を選択した。

表6 酢酸エチル及び *n*-ヘキサン混液による転溶溶媒の検討結果

転溶溶媒	物質名	回収率 (%)	回収率-平均 (%)
酢酸エチル及び <i>n</i> -ヘキサン (1:9) 混液	メタフルミゾン (<i>E</i> -異性体)	85.5	89.7
		93.9	
	メタフルミゾン (<i>Z</i> -異性体)	92.5	93.5
		94.5	
	メタフルミゾン代謝物	98.6	98.7
		98.8	
酢酸エチル及び <i>n</i> -ヘキサン (1:4) 混液	メタフルミゾン (<i>E</i> -異性体)	101.8	99.5
		97.3	
	メタフルミゾン (<i>Z</i> -異性体)	101.9	101.0
		100.0	
	メタフルミゾン代謝物	99.0	98.6
		98.3	
酢酸エチル及び <i>n</i> -ヘキサン (1:3) 混液	メタフルミゾン (<i>E</i> -異性体)	98.9	99.6
		100.3	
	メタフルミゾン (<i>Z</i> -異性体)	102.0	101.0
		100.0	
	メタフルミゾン代謝物	101.3	98.9
		96.4	
酢酸エチル及び <i>n</i> -ヘキサン (1:1) 混液	メタフルミゾン (<i>E</i> -異性体)	96.2	99.4
		101.9	
	メタフルミゾン (<i>Z</i> -異性体)	99.5	100.2
		103.4	
	メタフルミゾン代謝物	100.5	99.0
		97.5	

転溶操作における1段階目(溶媒量 100 mL)と2段階目(溶媒量 50 mL)における各々の回収率について表7に示す。メタフルミゾン(1段階目の転溶操作において100%近い十分な回収が得られることが確認された。この結果から転溶操作は2段階で十分であることが確認された。

表7 転溶操作の各段階における回収率

転溶溶媒	物質名	溶媒量 (mL)	回収率 (%)		
			個別	平均	合計
酢酸エチル及び <i>n</i> -ヘキサン (1:4) 混液	メタフルミゾン (<i>E</i> -異性体)	100	95.7 96.1	95.9	95.9
		50	0.0 0.0	0.0	
	メタフルミゾン (<i>Z</i> -異性体)	100	101.9 103.3	102.6	102.6
		50	0.0 0.0	0.0	
	メタフルミゾン代謝物	100	99.9 97.2	98.6	98.6
		50	0.0 0.0	0.0	

上記の『(1)抽出方法の検討』の結果に従い大豆試料をアセトンで抽出した粗抽出液を用いて、転溶操作の確認を行った。大豆試料の粗抽出液はその20 mLを採り、アセトンで調製した標準溶液0.01 mg/Lを1 mL添加した後、40°C以下で約5 mLに濃縮し、これを10%塩化ナトリウム水溶液100 mLに加え、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン(1:4)混液による転溶を行った。得られた抽出液は40°C以下で濃縮して溶媒を除去後、残留物をメタノールに溶かし5 mLとし、LC-MS/MSで測定した。検討結果を表8に示す。大豆試料を用いたところ、メタフルミゾンは転溶操作において95%以上の回収率が得られ、マトリックス影響は少なかった。

表8 大豆試料を用いた転溶操作の確認結果

物質名	マトリックス 影響 (%) *1	回収率 (%)			
		マトリックス 補正有*2	マトリックス 補正有-平均	マトリックス 補正無	マトリックス 補正無-平均
メタフルミゾン (<i>E</i> -異性体)	109.5	98.0	99.2	107.3	108.7
		100.5		110.0	
メタフルミゾン (<i>Z</i> -異性体)	101.2	92.4	94.7	93.5	95.9
		97.0		98.2	
メタフルミゾン 代謝物	99.9	94.4	96.0	94.3	96.0
		97.7		97.6	

*1 マトリックス影響：マトリックス添加標準溶液の面積値を溶媒標準溶液の面積値で除した値に100を乗じて算出した。

*2 マトリックス添加標準溶液を基準として算出。

(3) アセトニトリル/ヘキサン分配の検討

アセトニトリル/ヘキサン分配による脱脂を検討した。アセトンで調製した標準溶液0.01 mg/Lの1 mLをナス型フラスコに採り、窒素気流下で穏やかに溶媒を除去した後*n*-ヘキサン30 mLを

加え、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL で 3 回抽出を行った。各段階の抽出液を取り 40°C 以下で濃縮して溶媒を除去後、残留物をメタノールに溶かし 1 mL とし、LC-MS/MS で測定した。各抽出段階におけるメタフルミゾンの回収率を表 8 に示す。

メタフルミズンはアセトニトリル/ヘキサン分配 1 回目で約 100% が回収され、2 回目以降の回収は極微量であった。分析法開発時の妥当性確認はアセトニトリル/ヘキサン分配の回数は 3 回で行ったが、この結果よりアセトニトリル/ヘキサン分配の回数は 2 回で十分であると考えられるため、通知（案）にはアセトニトリル/ヘキサン分配の回数を 2 回として記載した。

表 8 アセトニトリル/ヘキサン分配の検討結果

物質名	抽出回数	回収率 (%)		
		個別	平均	平均-合算
メタフルミズン (<i>E</i> -異性体)	1 回	99.9	98.4	99.4
		96.9		
	2 回	1.1 0.9	1.0	
メタフルミズン (<i>Z</i> -異性体)	1 回	98.1	96.5	97.5
		94.9		
	2 回	0.9 1.0	1.0	
メタフルミズン代謝物	1 回	97.8	98.6	99.3
		99.3		
	2 回	1.5 0.0	0.8	
	3 回	0.0 0.0	0.0	

上記の『(1)抽出方法の検討』及び『(2) 転溶溶媒の検討』に従って処理した大豆試料を用いて、アセトニトリル/ヘキサン分配の確認を行った。大豆試料の粗抽出液 20 mL を採り 40°C 以下で約 5 mL に濃縮し、転溶操作後の抽出液にアセトンで調製した標準溶液 0.01 mg/L を 1 mL 加え、40°C 以下で濃縮して溶媒を除去後にアセトニトリル/ヘキサン分配を 3 回行った。得られたアセトニトリル溶液を 40°C 以下で濃縮して溶媒を除去後、残留物をメタノールに溶かし 5 mL とし、LC-MS/MS で測定した。検討結果を表 9 に示す。大豆試料を用いたところでは、メタフルミズンはアセトニトリル/ヘキサン分配においてほぼ 100% の回収率が得られ、マトリックス影響は少なかったため、本検討では転溶操作後にアセトニトリル/ヘキサン分配を 3 回行った。

表9 大豆試料を用いたアセトニトリル/ヘキサン分配の確認

物質名	マトリックス 影響 (%) *1	回収率 (%)			
		マトリックス 補正有*2	マトリックス 補正有-平均	マトリックス 補正無	マトリックス 補正無-平均
メタフルミゾン (E-異性体)	103.1	100.1 102.1	101.1	103.2 105.3	104.3
メタフルミゾン (Z-異性体)	100.3	99.5 99.2	99.4	99.8 99.5	99.7
メタフルミゾン 代謝物	96.3	102.8 103.6	103.2	99.0 99.8	99.4

*1 マトリックス影響：マトリックス添加標準溶液の面積値を溶媒標準溶液の面積値で除した値に100を乗じて算出した。

*2 マトリックス添加標準溶液を基準として算出。

(4) 精製方法の検討

①Sep-Pak Plus Florisil ミニカラム (910 mg)

Sep-Pak Plus Florisil ミニカラムを *n*-ヘキサン 10 mL でコンディショニングした後、ヘキサンの調製した標準溶液 0.01 mg/L を 1 mL 添加し、割合の異なる *n*-ヘキサン及びアセトン混液を 10 mL 流し、各溶出画分を測定した検討結果を表 10 に示す。画分は 40°C 以下で濃縮して溶媒を除去後、残留物をメタノールに溶かし 1 mL とし、LC-MS/MS で測定した。

メタフルミゾンはアセトン及び *n*-ヘキサン (1 : 9) 混液から溶出が始まり、アセトン及び *n*-ヘキサン (1 : 4) 混液の画分で約 100% が回収された。メタフルミゾン代謝物はアセトン及び *n*-ヘキサン (1 : 9) 混液の画分で約 100% が回収された。これらの結果から Florisil ミニカラムによる精製にはアセトン及び *n*-ヘキサン (1 : 4) 混液を用いることとした。

表 10 Sep-Pak Plus Florisil ミニカラム (910 mg) の溶出画分測定結果

物質名	溶出液	回収率 (%)	回収率 累計 (%)
メタフルミゾン (E-異性体)	<i>n</i> -ヘキサン 10 mL	0.1	0.1
	アセトン及び <i>n</i> -ヘキサン (1:9) 混液 10 mL	11.8	11.9
	アセトン及び <i>n</i> -ヘキサン (1:4) 混液 10 mL	86.7	98.6
	アセトン及び <i>n</i> -ヘキサン (3:7) 混液 10 mL	0.0	98.6
	アセトン及び <i>n</i> -ヘキサン (2:3) 混液 10 mL	0.0	98.6
	アセトン及び <i>n</i> -ヘキサン (1:1) 混液 10 mL	0.0	98.6
メタフルミゾン (Z-異性体)	<i>n</i> -ヘキサン 10 mL	0.4	0.4
	アセトン及び <i>n</i> -ヘキサン (1:9) 混液 10 mL	59.3	59.7
	アセトン及び <i>n</i> -ヘキサン (1:4) 混液 10 mL	40.9	100.6
	アセトン及び <i>n</i> -ヘキサン (3:7) 混液 10 mL	0.0	100.6
	アセトン及び <i>n</i> -ヘキサン (2:3) 混液 10 mL	0.0	100.6
	アセトン及び <i>n</i> -ヘキサン (1:1) 混液 10 mL	0.0	100.6
メタフルミゾン代謝物	<i>n</i> -ヘキサン 10 mL	0.0	0.0
	アセトン及び <i>n</i> -ヘキサン (1:9) 混液 10 mL	100.7	100.7
	アセトン及び <i>n</i> -ヘキサン (1:4) 混液 10 mL	0.0	100.7
	アセトン及び <i>n</i> -ヘキサン (3:7) 混液 10 mL	0.0	100.7
	アセトン及び <i>n</i> -ヘキサン (2:3) 混液 10 mL	0.0	100.7
	アセトン及び <i>n</i> -ヘキサン (1:1) 混液 10 mL	0.0	100.7

Florisil ミニカラムの精製に使用するアセトン及び *n*-ヘキサン (1:4) 混液の最適な用量について検討を行った。Sep-Pak Plus Florisil ミニカラムはアセトン及び *n*-ヘキサン (1:4) 混液 10 mL でコンディショニングした後、アセトン及び *n*-ヘキサン (1:4) 混液で調製した標準溶液 0.005 mg/L を 2 mL 添加し、アセトン及び *n*-ヘキサン (1:4) 混液を 5 mL ずつ計 25 mL まで流し、各溶出画分を得た。各溶出画分は 40°C 以下で濃縮して溶媒を除去後、残留物をメタノールに溶かし 5 mL とし、LC-MS/MS で測定した。また、同様の操作を大豆試料を用いて確認した。大豆試料は上記『(1)抽出方法の検討』、『(2) 転溶溶媒の検討』及び『(3) 脱脂方法の検討』の結果に従い処理を行い、得られたアセトニトリル溶液にアセトンで調製した標準溶液 0.01 mg/L を 1 mL 加え、40°C 以下で濃縮して溶媒を除去後、残留物をアセトン及び *n*-ヘキサン (1:4) 混液に溶かし 2 mL として、同様の精製操作を行った。検討結果を表 11 に示す。

Florisil ミニカラムからメタフルミゾン及びメタフルミゾン代謝物を溶出させるために必要なアセトン及び *n*-ヘキサン (1:4) 混液の量は 15 mL であった。この結果から、精製のプロセスは、抽出液をアセトン及び *n*-ヘキサン (1:4) 混液 2 mL に溶解し、これを Florisil ミニカラムに負荷後アセトン及び *n*-ヘキサン (1:4) 混液 15 mL を注入し、全溶出液を回収することとした。

表 11 Sep-Pak Plus Florisil ミニカラムからの溶出挙動

物質名	試料 マトリックス	溶出液量 (mL)	回収率 (%)	回収率累計 (%)
メタフルミゾン (<i>E</i> -異性体)	なし	0-5	61.1	61.1
		6-10	39.0	100.1
		11-15	1.2	101.3
		16-20	0.0	101.3
		21-25	0.0	101.3
	大豆	0-5	60.8	60.8
		6-10	42.4	103.2
		11-15	0.0	103.2
		16-20	0.0	103.2
		21-25	0.0	103.2
メタフルミゾン (<i>Z</i> -異性体)	なし	0-5	70.6	70.6
		6-10	28.3	98.9
		11-15	0.4	99.3
		16-20	0.0	99.3
		21-25	0.0	99.3
	大豆	0-5	45.2	45.2
		6-10	52.7	97.9
		11-15	0.1	98.0
		16-20	0.0	98.0
		21-25	0.0	98.0
メタフルミゾン代謝物	なし	0-5	82.1	82.1
		6-10	16.7	98.8
		11-15	0.0	98.8
		16-20	0.0	98.8
		21-25	0.0	98.8
	大豆	0-5	82.9	82.9
		6-10	22.3	105.2
		11-15	0.0	105.2
		16-20	0.0	105.2
		21-25	0.0	105.2

Florisil ミニカラムに試料溶液を負荷後、アセトン及び *n*-ヘキサン (1 : 4) 混液で溶出する前に *n*-ヘキサンを 10 mL 流すことで精製効果が向上するか確認を行った。大豆試料を用いて、上記『(1)抽出方法の検討』、『(2) 転溶溶媒の検討』及び『(3) 脱脂方法の検討』の結果に従い処理を行い、得られたアセトニトリル溶液にアセトンで調製した標準溶液 0.01 mg/L を 1 mL 加え、40°C以下で濃縮して溶媒を除去後、*n*-ヘキサン 2 mL を加え残留物を溶解したものについて精製操作を行った。Florisil ミニカラムは *n*-ヘキサン 10 mL でコンディショニングし、試料負荷後に *n*-ヘキサン 10 mL を流し、アセトン及び *n*-ヘキサン (1 : 4) 混液 15 mL で溶出を行った。溶出液は 40°C以下で濃縮して溶媒を除去後、残留物をメタノールに溶かし 5 mL とし、LC-MS/MS で測定した。表 12 に検討結果を示す。*n*-ヘキサンによるカラム洗浄を行った結果、メタフルミゾンは 100%に近い回収率を得られた。しかし、下記の試料マトリックスの測定影響を評価した際に *n*-ヘキサン洗浄を行わなかったところ同様に良好な回収率が得られていたため (表 16 及び 17)、*n*-ヘキサンによるカラム洗浄は行わないこととした。

表 12 *n*-ヘキサン洗浄による Florisil ミニカラムの精製効果の確認*1

物質名	マトリック ス影響 (%) *2	回収率 (%)			
		マトリックス 補正有*3	マトリックス 補正有-平均	マトリックス 補正無	マトリックス 補正無-平均
メタフルミゾン (<i>E</i> -異性体)	96.2 (95.6)	96.9 95.7	96.3 (101.6)	93.2 92.1	92.7 (97.1)
メタフルミゾン (<i>Z</i> -異性体)	100 (102.2)	95.6 99.3	97.5 (97.7)	95.6 99.3	97.5 (99.8)
メタフルミゾン 代謝物	97.4 (98.1)	98.0 102.9	100.5 (100.5)	95.5 100.2	97.9 (98.6)

*1 参考として *n*-ヘキサン洗浄を行わなかった際の値 (添加回収試験の平均値) を () 内に示す。

*2 マトリックス影響: マトリックス添加標準溶液の面積値を溶媒標準溶液の面積値で除した値に 100 を乗じて算出した。

*3 マトリックス添加標準溶液を基準として算出。

(5) 着色について

茶葉等の色素を多量に含む試料では最終溶液には着色が観察された。大豆や米、りんご等色素の少ない試料では無色に近い最終溶液が得られた。

試料に含まれる色素は、転溶操作及びアセトニトリル/ヘキサン分配でもその一部が除去されたが、Florisil ミニカラムを用いた精製操作による色素の除去効果が最も高いことが目視で確認された。

3. 添加回収試験

玄米、大豆、落花生、ばれいしょ、きゃべつ、ほうれんそう、オレンジ、りんご、茶及びコリアンダー (コエンドロ) の種子の 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。

玄米、大豆、落花生及びコリアンダー (コエンドロ) の種子はその 10.0 g を量り採り、添加後の濃度が各試料における基準値と同じ濃度になるように調製した標準溶液を、表 2 に従ってホールピペットを用いて添加し、よく混合して 30 分放置したものを添加回収試験の試料とした。ばれいしょ、きゃべつ、ほうれんそう、オレンジ及びりんごはその 20.0 g を量り採り、添加後の濃度が各試料における基準値と同じ濃度になるように調製した標準溶液を、表 2 に従ってホールピペットを用いて添加し、よく混合して 30 分放置したものを添加回収試験の試料とした。茶はその 5.00 g を量り採り、添加後の濃度が各試料における基準値と同じ濃度になるように調製した標準溶液を、表 2 に従ってホールピペットを用いて添加し、よく混合して 30 分放置したものを添加回収試験の試料とした。

添加回収試験における各食品のブランク試料、添加回収試料及び回収率 100% 相当の溶媒標準溶液の代表的なクロマトグラムを図 19~38 に示した。また、各食品のブランク試料のスクリーン測定による代表的な全イオン電流クロマトグラムを図 41~42 に示した。

(1) 選択性

選択性の検討結果を表 13 に示した。幾つかの試料からメタフルミゾンのピーク位置に微小なピークが検出されたが、妨害ピークの許容範囲の判定基準に適合していた。

表 13 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 (ppm)	添加濃度 (ppm)		妨害ピークの許容範囲			ピーク面積				選択性の評価 ³⁾	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)	面積比 (a)/(b)					
1	メタフルミゾン(E)	玄米	0.01	0.01	0.01		定量限界	0.01	< 0.333	面積	293	46911	0.006	○	定量限界=基準値
2	メタフルミゾン(E)	大豆	0.01	0.5	0.01	*	定量限界	0.01	< 0.333	面積	127	49853	0.003	○	定量限界<基準値
3	メタフルミゾン(E)	落花生	0.01	0.01	0.01		定量限界	0.01	< 0.333	面積	81	48912	0.002	○	定量限界=基準値
4	メタフルミゾン(E)	ばれいしょ	0.01	0.01	0.01		定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	51018	0.000	○	定量限界=基準値
5	メタフルミゾン(E)	きゃべつ	0.01	5	5	*	基準値	5	< 0.100	面積	0	17943279	0.000	○	定量限界<基準値
6	メタフルミゾン(E)	ほうれんそう	0.01	0.01	0.01		定量限界	0.01	< 0.333	面積	196	53379	0.004	○	定量限界=基準値
7	メタフルミゾン(E)	オレンジ	0.01	0.01	0.01		定量限界	0.01	< 0.333	面積	334	51195	0.007	○	定量限界=基準値
8	メタフルミゾン(E)	りんご	0.01	0.01	0.01		定量限界	0.01	< 0.333	面積	70	50827	0.001	○	定量限界=基準値
9	メタフルミゾン(E)	茶	0.01	0.01	0.01		定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	45525	0.000	○	定量限界=基準値
10	メタフルミゾン(E)	コリアンダー(コエンドロ)の種子	0.01	0.01	0.01		定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	54343	0.000	○	定量限界=基準値
11	メタフルミゾン(Z)	玄米	0.01	0.01	0.01		定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	43332	0.000	○	定量限界=基準値
12	メタフルミゾン(Z)	大豆	0.01	0.5	0.01	*	定量限界	0.01	< 0.333	面積	163	42624	0.004	○	定量限界<基準値
13	メタフルミゾン(Z)	落花生	0.01	0.01	0.01		定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	43781	0.000	○	定量限界=基準値
14	メタフルミゾン(Z)	ばれいしょ	0.01	0.01	0.01		基準値	5	< 0.100	面積	0	48846	0.000	○	定量限界<基準値
15	メタフルミゾン(Z)	きゃべつ	0.01	5	5	*	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	17391021	0.000	○	定量限界=基準値
16	メタフルミゾン(Z)	ほうれんそう	0.01	0.01	0.01		定量限界	0.01	< 0.333	面積	97	50390	0.002	○	定量限界=基準値
17	メタフルミゾン(Z)	オレンジ	0.01	0.01	0.01		定量限界	0.01	< 0.333	面積	192	49331	0.004	○	定量限界=基準値
18	メタフルミゾン(Z)	りんご	0.01	0.01	0.01		定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	49235	0.000	○	定量限界=基準値
19	メタフルミゾン(Z)	茶	0.01	0.01	0.01		定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	34441	0.000	○	定量限界=基準値
20	メタフルミゾン(Z)	コリアンダー(コエンドロ)の種子	0.01	0.01	0.01		定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	51287	0.000	○	定量限界=基準値
21	メタフルミゾン代謝物	玄米	0.01	0.01	0.01		定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	2884	0.000	○	定量限界=基準値
22	メタフルミゾン代謝物	大豆	0.01	0.5	0.01	*	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	2667	0.000	○	定量限界<基準値
23	メタフルミゾン代謝物	落花生	0.01	0.01	0.01		定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	2823	0.000	○	定量限界=基準値
24	メタフルミゾン代謝物	ばれいしょ	0.01	0.01	0.01		定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	2895	0.000	○	定量限界=基準値
25	メタフルミゾン代謝物	きゃべつ	0.01	5	5	*	基準値	5	< 0.100	面積	0	1461679	0.000	○	定量限界<基準値
26	メタフルミゾン代謝物	ほうれんそう	0.01	0.01	0.01		定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	3261	0.000	○	定量限界=基準値
27	メタフルミゾン代謝物	オレンジ	0.01	0.01	0.01		定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	3298	0.000	○	定量限界=基準値
28	メタフルミゾン代謝物	茶	0.01	0.01	0.01		定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	2474	0.000	○	定量限界=基準値
30	メタフルミゾン代謝物	コリアンダー(コエンドロ)の種子	0.01	0.01	0.01		定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	3477	0.000	○	定量限界=基準値

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

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した。大豆については試験法開発時点での基準値 (一律基準) で評価した。

*3 ブランク試料及び標準溶液の順に測定した。

*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)を用いた。大豆については試験法開発時点での基準値 (一律基準) で評価を行った。

*5 面積比が、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「×」を記載した。

(2) 真度、精度及び定量限界

真度及び併行精度の検討結果を表 14 に示した。メタフルミゾン (*E*-異性体) の真度は 92~102%、併行精度は 1~6%、メタフルミゾン (*Z*-異性体) の真度は 96~102%、併行精度は 1~5%、メタフルミゾン代謝物の真度は 98~100%、併行精度は 2~4% であり、検討に使用した 10 食品において良好な回収率を得られた。

添加濃度と定量限界濃度が異なる試料 (きゃべつ) について、定量限界の推定を行った結果を表 15 似示した。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 39~40 に示した。S/N 比はメタフルミゾン (*E*-異性体) が 2135、メタフルミゾン (*Z*-異性体) が 1886、メタフルミゾン代謝物は 71 であり、S/N 比 10 以上の感度を得ることができた。

表 14 真度及び併行精度の評価

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%)	備考
							傾き	切片	r ² 値	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5			
1	メタフルミゾン (<i>E</i>)	玄米	0.01	0.01	0.01		20294767	1189	0.998	98	100	96	101	97	98	2	定量限界=基準値
2	メタフルミゾン (<i>E</i>)	大豆	0.01	0.5	0.01	*	21505093	323	0.999	96	96	95	100	99	97	2	定量限界<基準値
3	メタフルミゾン (<i>E</i>)	落花生	0.01	0.01	0.01		21779116	-1136	1.000	103	100	103	97	101	101	2	定量限界=基準値
4	メタフルミゾン (<i>E</i>)	ばれいしょ	0.01	0.01	0.01		20677395	-866	0.998	99	100	100	98	102	100	2	定量限界=基準値
5	メタフルミゾン (<i>E</i>)	きゃべつ	0.01	5	5	*	14311017	1219261	0.999	99	100	102	101	101	101	1	定量限界<基準値
6	メタフルミゾン (<i>E</i>)	ほうれんそう	0.01	0.01	0.01		25265558	-1804	0.999	105	106	95	94	95	99	6	定量限界=基準値
7	メタフルミゾン (<i>E</i>)	オレンジ	0.01	0.01	0.01		20985837	-1161	0.997	100	97	99	98	106	100	4	定量限界=基準値
8	メタフルミゾン (<i>E</i>)	りんご	0.01	0.01	0.01		20011698	144	0.999	105	101	97	102	103	102	3	定量限界=基準値
9	メタフルミゾン (<i>E</i>)	茶	0.01	0.01	0.01		24614400	-2798	0.999	89	92	85	99	94	92	6	定量限界=基準値
10	メタフルミゾン (<i>E</i>)	コリアンダー (コエンドロ) の種子	0.01	0.01	0.01		22628814	1754	0.999	95	101	101	99	99	99	2	定量限界=基準値
11	メタフルミゾン (<i>Z</i>)	玄米	0.01	0.01	0.01		21302326	237	0.998	97	100	99	104	97	99	3	定量限界=基準値
12	メタフルミゾン (<i>Z</i>)	大豆	0.01	0.5	0.01	*	21443977	-2083	0.997	96	100	100	101	103	100	3	定量限界<基準値
13	メタフルミゾン (<i>Z</i>)	落花生	0.01	0.01	0.01		20427349	-1502	0.995	95	105	97	102	93	98	5	定量限界=基準値
14	メタフルミゾン (<i>Z</i>)	ばれいしょ	0.01	0.01	0.01		19255884	-1754	0.999	103	97	101	96	98	99	3	定量限界<基準値
15	メタフルミゾン (<i>Z</i>)	きゃべつ	0.01	5	5	*	13744276	1313579	0.998	100	98	102	99	100	100	2	定量限界=基準値
16	メタフルミゾン (<i>Z</i>)	ほうれんそう	0.01	0.01	0.01		21948977	-1543	0.997	93	95	96	97	96	96	2	定量限界=基準値
17	メタフルミゾン (<i>Z</i>)	オレンジ	0.01	0.01	0.01		19903581	-1171	0.999	96	95	98	101	94	97	3	定量限界=基準値
18	メタフルミゾン (<i>Z</i>)	りんご	0.01	0.01	0.01		17947200	1293	0.996	97	98	99	103	102	100	3	定量限界=基準値
19	メタフルミゾン (<i>Z</i>)	茶	0.01	0.01	0.01		16781800	656	1.000	100	98	93	101	101	99	3	定量限界=基準値
20	メタフルミゾン (<i>Z</i>)	コリアンダー (コエンドロ) の種子	0.01	0.01	0.01		18667209	2107	0.998	103	101	102	102	102	102	1	定量限界=基準値
21	メタフルミゾン代謝物	玄米	0.01	0.01	0.01		1264860	-6	0.999	96	102	99	98	96	98	3	定量限界=基準値
22	メタフルミゾン代謝物	大豆	0.01	0.5	0.01	*	1322209	-45	0.997	99	97	97	102	98	99	2	定量限界<基準値
23	メタフルミゾン代謝物	落花生	0.01	0.01	0.01		1416395	21	0.999	100	103	96	105	96	100	4	定量限界=基準値
24	メタフルミゾン代謝物	ばれいしょ	0.01	0.01	0.01		1128070	26	0.999	103	94	102	103	98	100	4	定量限界=基準値
25	メタフルミゾン代謝物	きゃべつ	0.01	5	5	*	1097238	27246	1.000	97	99	99	100	102	100	2	定量限界<基準値
26	メタフルミゾン代謝物	ほうれんそう	0.01	0.01	0.01		1173860	159	1.000	97	105	102	99	95	100	4	定量限界=基準値
27	メタフルミゾン代謝物	オレンジ	0.01	0.01	0.01		1410837	-229	0.999	93	99	96	103	100	98	4	定量限界=基準値
28	メタフルミゾン代謝物	りんご	0.01	0.01	0.01		1086256	68	0.999	101	98	99	94	99	98	3	定量限界=基準値
29	メタフルミゾン代謝物	茶	0.01	0.01	0.01		1274200	-77	0.999	95	98	97	101	93	97	3	定量限界=基準値
30	メタフルミゾン代謝物	コリアンダー (コエンドロ) の種子	0.01	0.01	0.01		1238837	-23	0.998	101	92	99	101	102	99	4	定量限界=基準値

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

2 添加濃度が定量限界濃度と異なる場合には『』を表示した。その場合には、別途、定量限界の推定を行った。大豆については試験法開発時点での基準値 (一律基準) で評価した。

表 15 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 (mg/L) ³⁾	ピーク面積 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		面積比 (%) ⁶⁾	S/N 比
										n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均					
1	メタフルミゾン(E)	きゃべつ	0.01	5	0.01	*	0.002	面積	0	35115	37181	36148	35641	38986	37314	2175	2095	97	2135	定量限界<基準値
2	メタフルミゾン(Z)	きゃべつ	0.01	5	0.01	*	0.002	面積	0	32428	32694	32561	31489	36398	33944	1879	1892	96	1886	定量限界<基準値
3	メタフルミゾン代謝物	きゃべつ	0.01	5	0.01	*	0.002	面積	0	2238	2450	2344	2242	2368	2303	67	76	102	71	定量限界<基準値

- *1 基準値は、基準値未設定の場合には一律基準 (0.01 ppm) を用いた。
- *2 添加濃度が定量限界濃度と異なる場合には『*』を表示した。
- *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)を作成した。
- *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測定した。
- *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た。
- *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の比を求めた。

(3) 試料マトリックスの測定への影響

試料マトリックスの測定への影響について検討した結果を表 16 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。面積比はメタフルミゾン (E-異性体) が 0.96~1.01、メタフルミゾン (Z-異性体) が 0.97~1.02、メタフルミゾン代謝物が 0.97~1.01 であり、検討に使用した 10 食品に関してはマトリックスの測定への影響は少ないものと考えられた。

添加回収試験における真度を表 3-4 で求めたピーク面積比で除して補正真度を求め、表 17 に示した。補正真度はメタフルミゾン (E-異性体) が 94~101%、メタフルミゾン (Z-異性体) が 97~102%、メタフルミゾン代謝物が 97~101%であり、検討に使用した 10 食品においては補正前と補正後とで真度の大きな変動は見られなかった。

表 16 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 (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 (mg/L) ^{*3}	ピーク面積 ^{*4}						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	平均	n=1			n=2	平均
1	メタフルミゾン(E)	玄米	0.01	0.01	0.01		0.002	面積	293	44666	48426	46546	44591	49230	46911	0.99	定量限界=基準値
2	メタフルミゾン(E)	大豆	0.01	0.5	0.01	*	0.002	面積	127	47596	47684	47640	48679	51027	49853	0.96	定量限界<基準値
3	メタフルミゾン(E)	落花生	0.01	0.01	0.01		0.002	面積	81	47942	49147	48545	46719	51105	48912	0.99	定量限界=基準値
4	メタフルミゾン(E)	ばれいしょ	0.01	0.01	0.01		0.002	面積	0	51192	51434	51313	51867	50168	51018	1.01	定量限界=基準値
5	メタフルミゾン(E)	きゃべつ	0.01	5	5	*	1	面積	0	17972949	18010862	17991906	17977093	17909465	17943279	1.00	定量限界<基準値
6	メタフルミゾン(E)	ほうれんそう	0.01	0.01	0.01		0.002	面積	196	53584	53067	53326	52624	54134	53379	1.00	定量限界=基準値
7	メタフルミゾン(E)	オレンジ	0.01	0.01	0.01		0.002	面積	334	52491	50933	51712	52010	50380	51195	1.01	定量限界=基準値
8	メタフルミゾン(E)	りんご	0.01	0.01	0.01		0.002	面積	70	51133	51700	51417	51541	50113	50827	1.01	定量限界=基準値
9	メタフルミゾン(E)	茶	0.01	0.01	0.01		0.002	面積	0	36225	38604	37415	40202	36225	38214	0.98	定量限界=基準値
10	メタフルミゾン(E)	コリアンダー(コエンドロ)の種子	0.01	0.01	0.01		0.002	面積	0	53352	53591	53472	53906	54779	54343	0.98	定量限界=基準値
11	メタフルミゾン(Z)	玄米	0.01	0.01	0.01		0.002	面積	0	43391	43126	43259	43556	43107	43332	1.00	定量限界=基準値
12	メタフルミゾン(Z)	大豆	0.01	0.5	0.01	*	0.002	面積	163	42821	44288	43555	43064	42183	42624	1.02	定量限界<基準値
13	メタフルミゾン(Z)	落花生	0.01	0.01	0.01		0.002	面積	0	44354	44256	44305	43062	44500	43781	1.01	定量限界=基準値
14	メタフルミゾン(Z)	ばれいしょ	0.01	0.01	0.01		0.002	面積	0	49326	48784	49055	49063	48628	48846	1.00	定量限界<基準値
15	メタフルミゾン(Z)	きゃべつ	0.01	5	5	*	1	面積	0	17791396	17704117	17747757	17240548	17541493	17391021	1.02	定量限界=基準値
16	メタフルミゾン(Z)	ほうれんそう	0.01	0.01	0.01		0.002	面積	97	50536	48543	49540	50650	50130	50390	0.98	定量限界=基準値
17	メタフルミゾン(Z)	オレンジ	0.01	0.01	0.01		0.002	面積	192	47253	49174	48214	48910	49751	49331	0.98	定量限界=基準値
18	メタフルミゾン(Z)	りんご	0.01	0.01	0.01		0.002	面積	0	49372	47252	48312	49890	48580	49235	0.98	定量限界=基準値
19	メタフルミゾン(Z)	茶	0.01	0.01	0.01		0.002	面積	0	29829	28439	29134	30164	29829	29997	0.97	定量限界=基準値
20	メタフルミゾン(Z)	コリアンダー(コエンドロ)の種子	0.01	0.01	0.01		0.002	面積	0	52595	51150	51873	51669	50904	51287	1.01	定量限界=基準値
21	メタフルミゾン代謝物	玄米	0.01	0.01	0.01		0.002	面積	0	2869	2849	2859	2923	2844	2884	0.99	定量限界=基準値
22	メタフルミゾン代謝物	大豆	0.01	0.5	0.01	*	0.002	面積	0	2502	2729	2616	2502	2831	2667	0.98	定量限界<基準値
23	メタフルミゾン代謝物	落花生	0.01	0.01	0.01		0.002	面積	0	2821	2901	2861	2908	2737	2823	1.01	定量限界=基準値
24	メタフルミゾン代謝物	ばれいしょ	0.01	0.01	0.01		0.002	面積	0	3006	2808	2907	3062	2727	2895	1.00	定量限界=基準値
25	メタフルミゾン代謝物	きゃべつ	0.01	5	5	*	1	面積	0	1470315	1430820	1450568	1474258	1449100	1461679	0.99	定量限界<基準値
26	メタフルミゾン代謝物	ほうれんそう	0.01	0.01	0.01		0.002	面積	0	3271	2985	3128	3424	3098	3261	0.96	定量限界=基準値
27	メタフルミゾン代謝物	オレンジ	0.01	0.01	0.01		0.002	面積	0	3154	3302	3228	3297	3299	3298	0.98	定量限界=基準値
28	メタフルミゾン代謝物	りんご	0.01	0.01	0.01		0.002	面積	0	3358	3228	3293	3399	3318	3359	0.98	定量限界=基準値
29	メタフルミゾン代謝物	茶	0.01	0.01	0.01		0.002	面積	0	2607	2495	2551	2653	2607	2630	0.97	定量限界=基準値
30	メタフルミゾン代謝物	コリアンダー(コエンドロ)の種子	0.01	0.01	0.01		0.002	面積	0	3314	3500	3407	3189	3764	3477	0.98	定量限界=基準値

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

2 添加濃度が定量限界濃度と異なる場合には『』を表示した。

*3 試料中の濃度が基準値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)を作成した。大豆については試験法開発時点での基準値 (一律基準) で評価した。

*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測定した。

*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た。

*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の比を求めた。

表 17 補正真度

分析対象化合物	食品名	真度(%)	ピーク面積比	補正真度(%)
メタフルミゾン (E)	玄米	98	0.99	99
メタフルミゾン (E)	大豆	97	0.96	102
メタフルミゾン (E)	落花生	101	0.99	102
メタフルミゾン (E)	ばれいしょ	100	1.01	99
メタフルミゾン (E)	きゃべつ	101	1.00	100
メタフルミゾン (E)	ほうれんそう	99	1.00	99
メタフルミゾン (E)	オレンジ	100	1.01	99
メタフルミゾン (E)	りんご	102	1.01	100
メタフルミゾン (E)	茶	92	0.98	94
メタフルミゾン (E)	コリアンダー (コエンドロ) の種子	99	0.98	101
メタフルミゾン (Z)	玄米	99	1.00	99
メタフルミゾン (Z)	大豆	100	1.02	98
メタフルミゾン (Z)	落花生	98	1.01	97
メタフルミゾン (Z)	ばれいしょ	99	1.00	99
メタフルミゾン (Z)	きゃべつ	100	1.02	98
メタフルミゾン (Z)	ほうれんそう	96	0.98	97
メタフルミゾン (Z)	オレンジ	97	0.98	99
メタフルミゾン (Z)	りんご	100	0.98	102
メタフルミゾン (Z)	茶	99	0.97	101
メタフルミゾン (Z)	コリアンダー (コエンドロ) の種子	101	1.01	100
メタフルミゾン代謝物	玄米	98	0.99	99
メタフルミゾン代謝物	大豆	99	0.98	101
メタフルミゾン代謝物	落花生	100	1.01	99
メタフルミゾン代謝物	ばれいしょ	100	1.00	100
メタフルミゾン代謝物	きゃべつ	100	0.99	100
メタフルミゾン代謝物	ほうれんそう	97	0.96	101
メタフルミゾン代謝物	オレンジ	98	0.98	100
メタフルミゾン代謝物	りんご	98	0.98	100
メタフルミゾン代謝物	茶	97	0.97	100
メタフルミゾン代謝物	コリアンダー (コエンドロ) の種子	99	0.98	101

① 添加回収試験における代表的なクロマトグラム

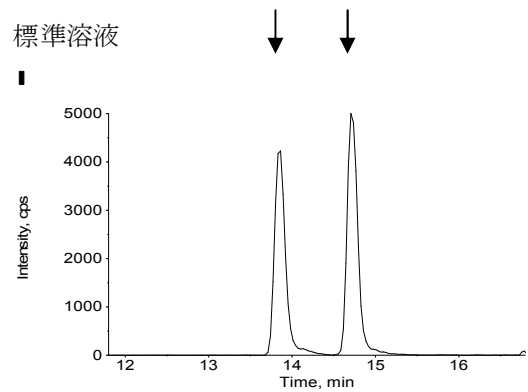
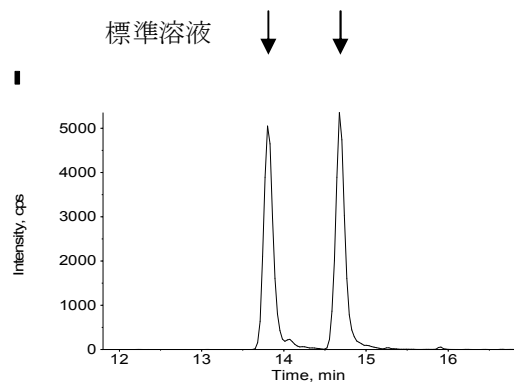
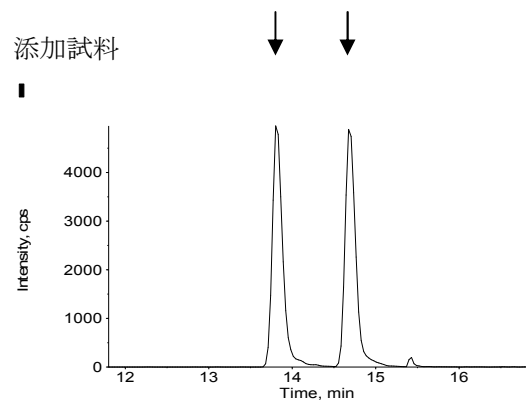
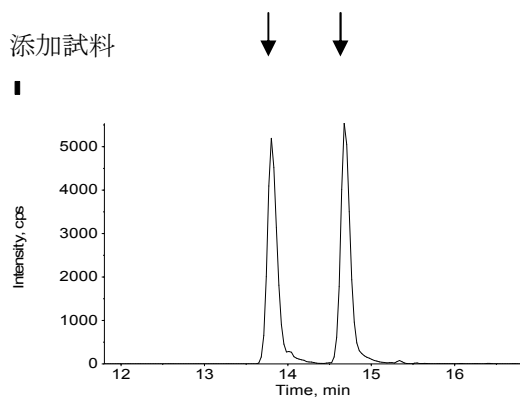
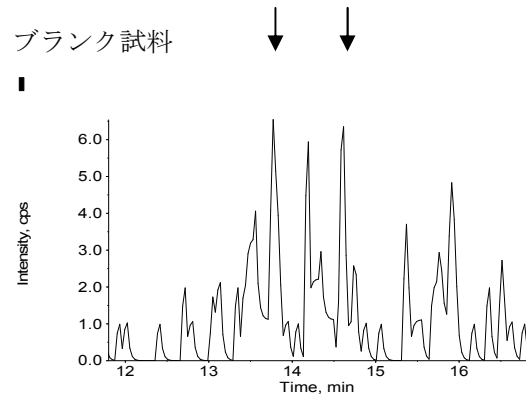
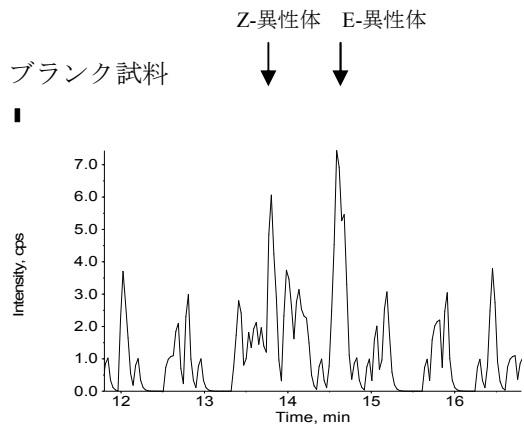


図 19 メタフルミゾンの SRM クロマトグラム
($m/z=505 \rightarrow 302$)
試料中 0.01 ppm 相当 (玄米)

図 20 メタフルミゾンの SRM クロマトグラム
($m/z=505 \rightarrow 302$)
試料中 0.01 ppm 相当 (大豆)

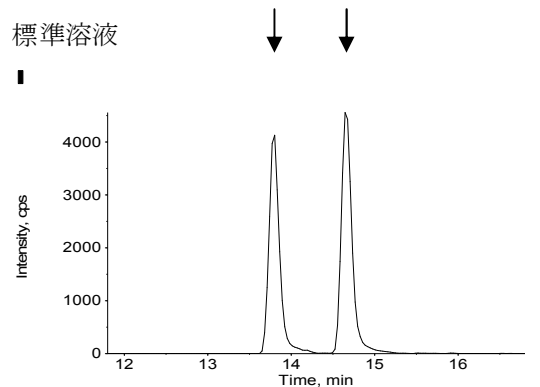
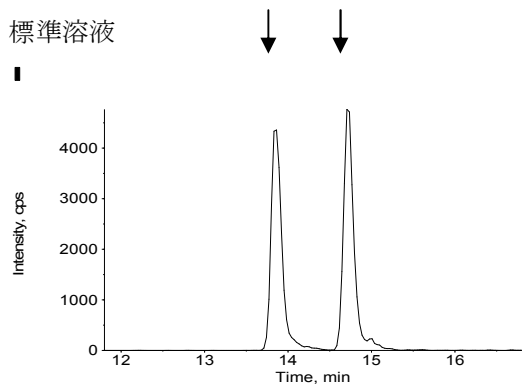
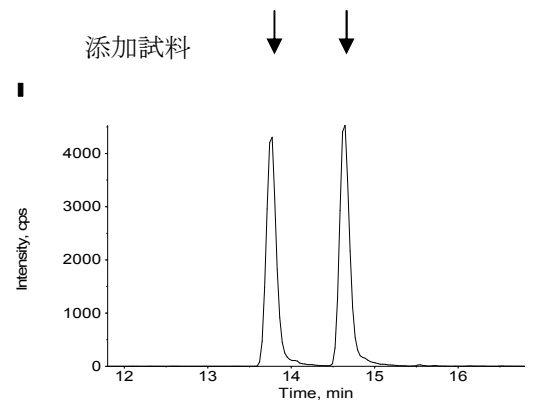
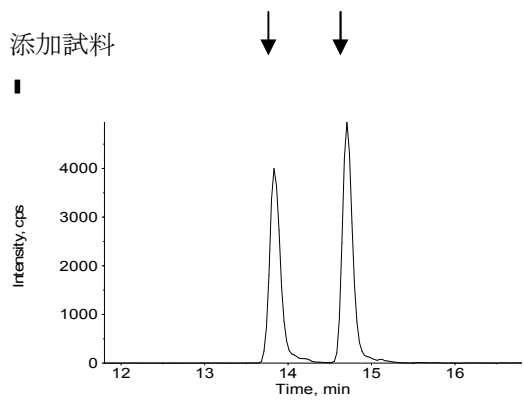
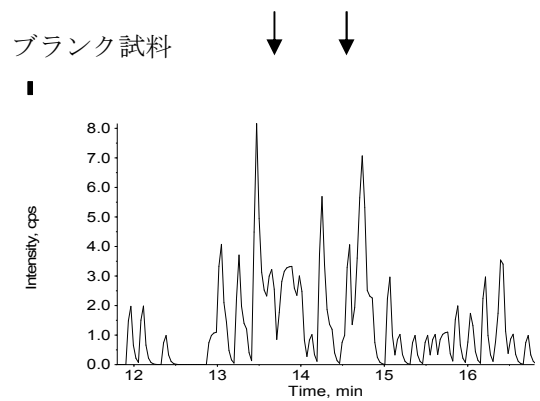
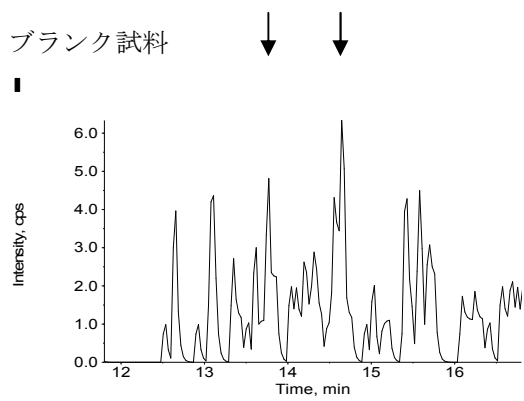


図 21 メタフルミゾンの SRM クロマトグラム
($m/z=505 \rightarrow 302$)
試料中 0.01 ppm 相当 (落花生)

図 22 メタフルミゾンの SRM クロマトグラム
($m/z=505 \rightarrow 302$)
試料中 0.01 ppm 相当 (ばれいしょ)

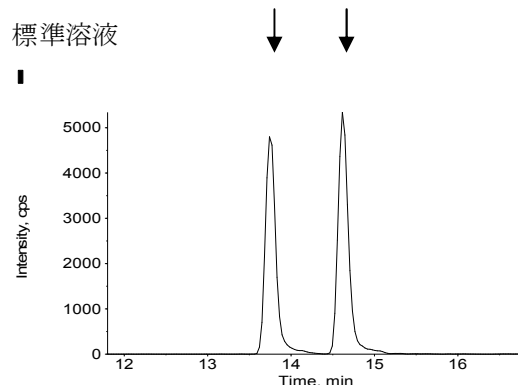
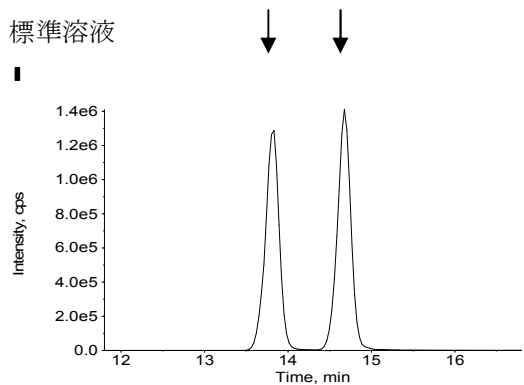
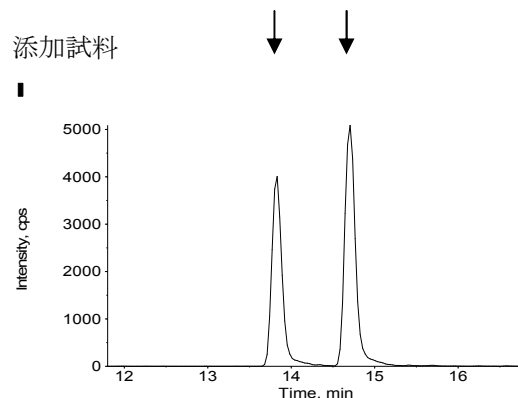
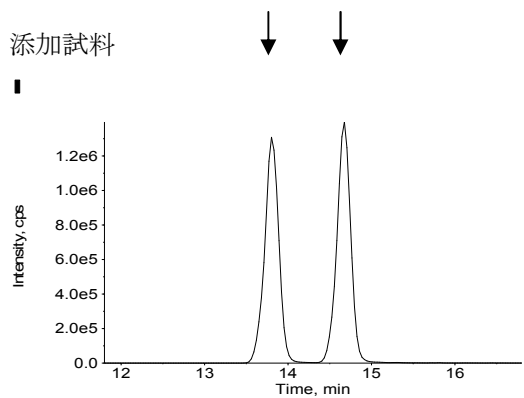
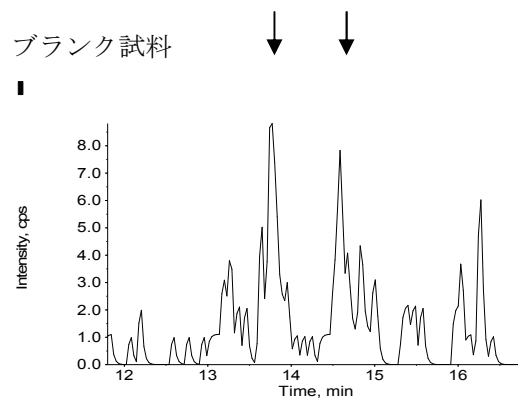
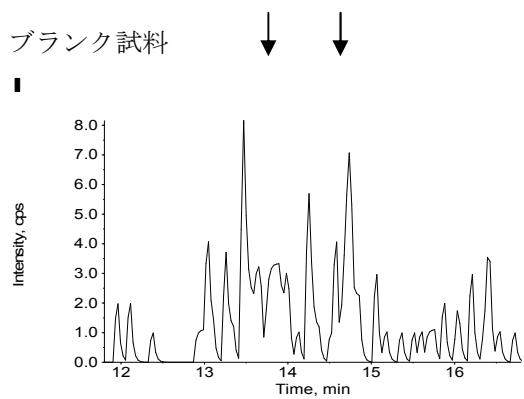


Figure 23 Metformin SRM chromatogram
 (m/z=505→302)
 Sample concentration: 5 ppm (Kiyabetsu)

Figure 24 Metformin SRM chromatogram
 (m/z=505→302)
 Sample concentration: 0.01 ppm (Hourensou)

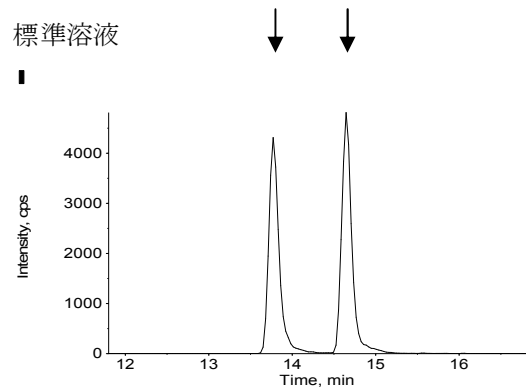
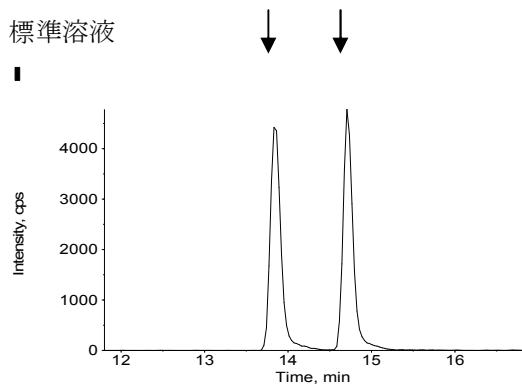
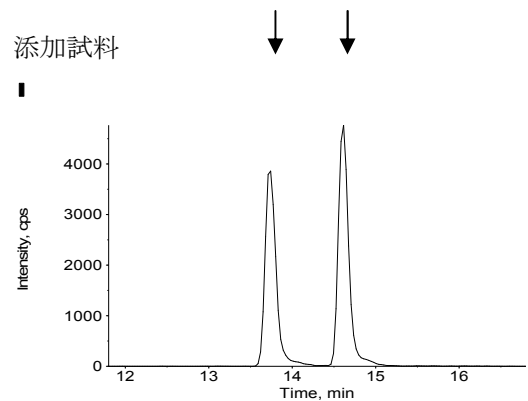
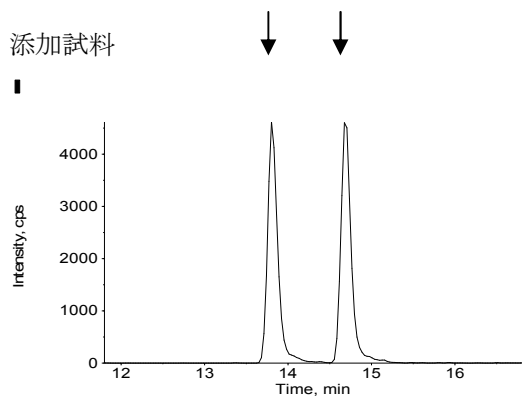
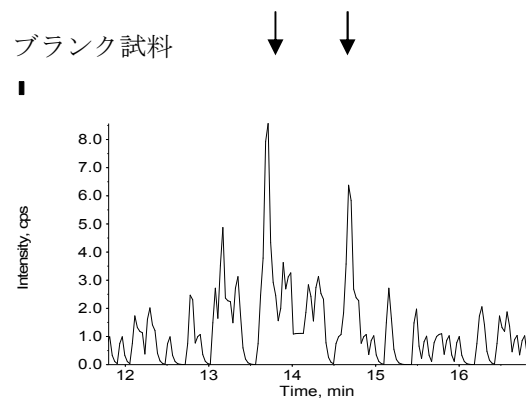
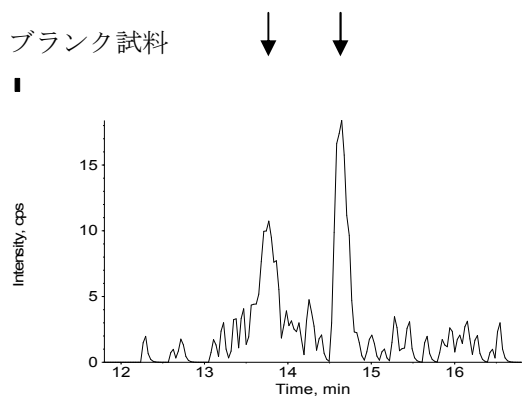


図25 メタフルミゾンのSRMクロマトグラム
($m/z=505 \rightarrow 302$)
試料中 0.01 ppm 相当 (オレンジ)

図26 メタフルミゾンのSRMクロマトグラム
($m/z=505 \rightarrow 302$)
試料中 0.01 ppm 相当 (りんご)

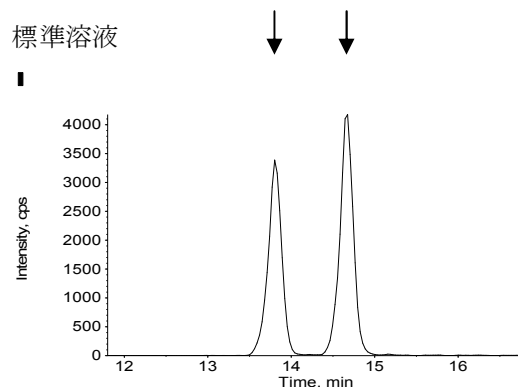
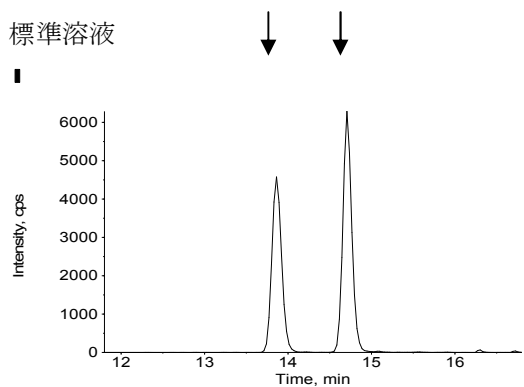
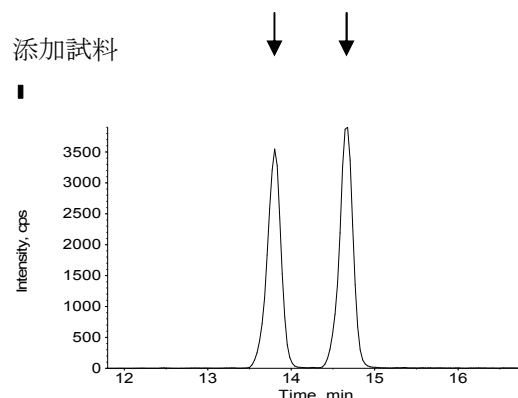
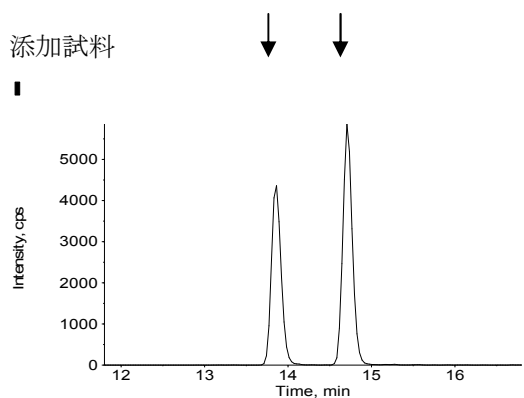
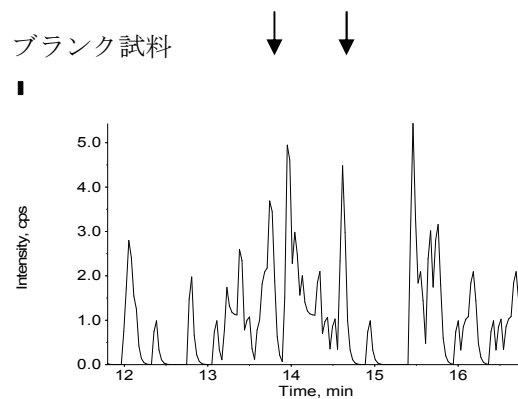
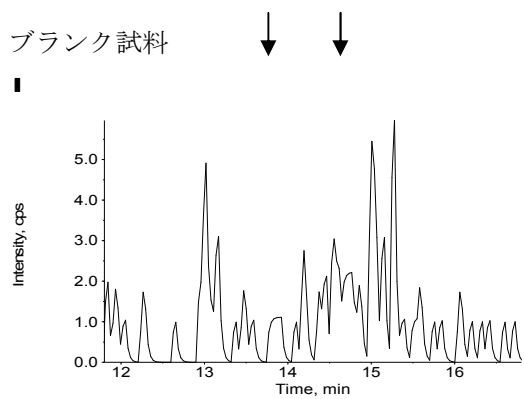
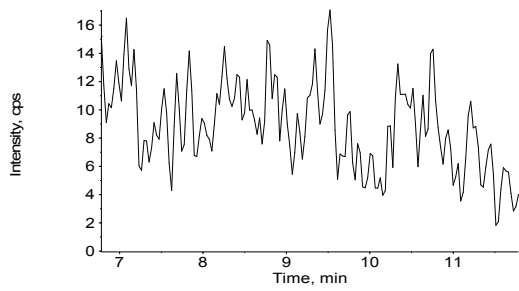


Figure 27 SRM chromatogram of metformin ($m/z=505 \rightarrow 302$) in a sample (tea) equivalent to 0.01 ppm.

Figure 28 SRM chromatogram of metformin ($m/z=505 \rightarrow 302$) in a sample (coffee seed) equivalent to 0.01 ppm.

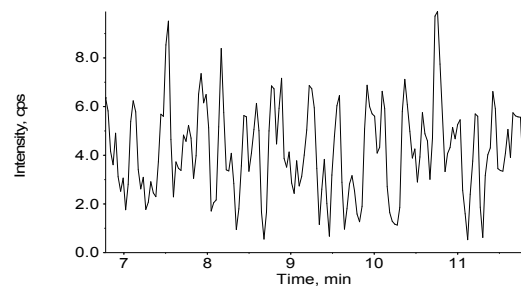
ブランク試料

■



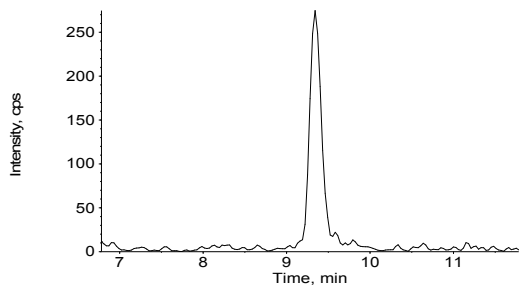
ブランク試料

■



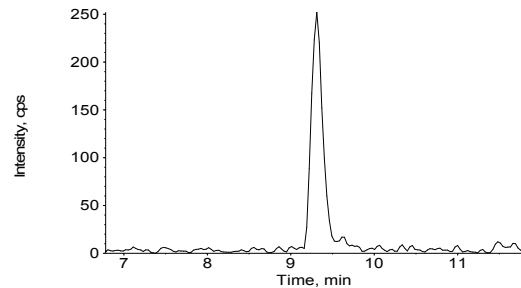
添加試料

■



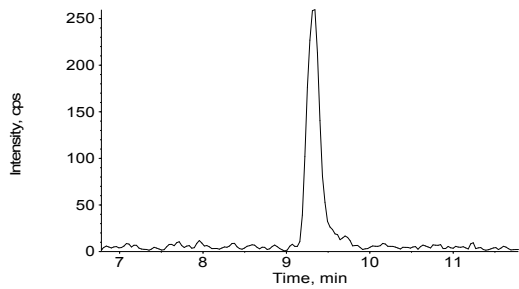
添加試料

■



標準溶液

■



標準溶液

■

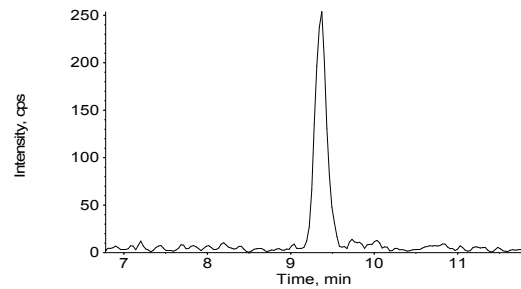


図 29 メタフルミゾン代謝物の SRM
クロマトグラム
($m/z=288 \rightarrow 142$)
試料中 0.01 ppm 相当 (玄米)

図 30 メタフルミゾン代謝物の SRM
クロマトグラム
($m/z=288 \rightarrow 142$)
試料中 0.01 ppm 相当 (大豆)

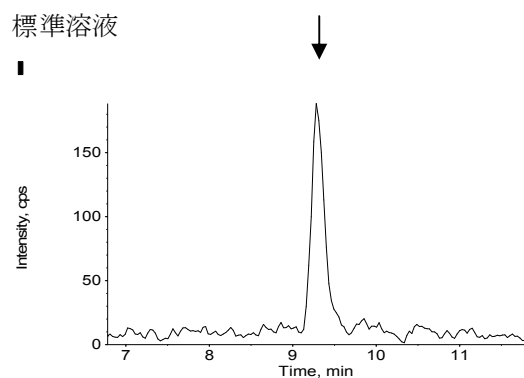
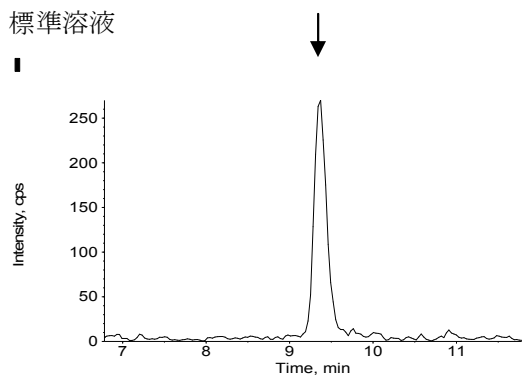
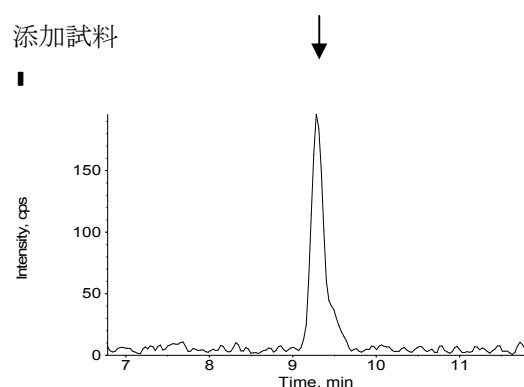
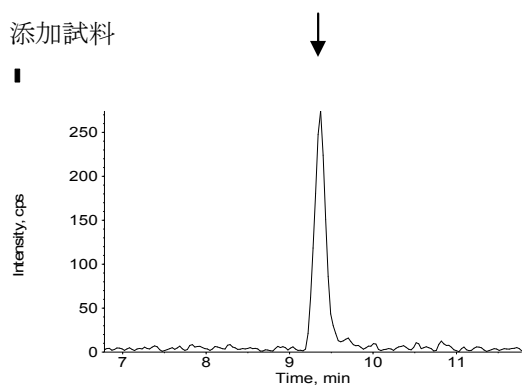
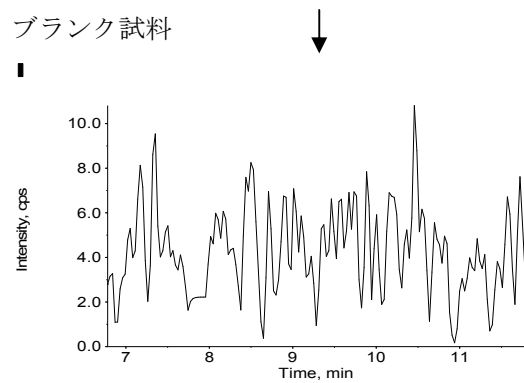
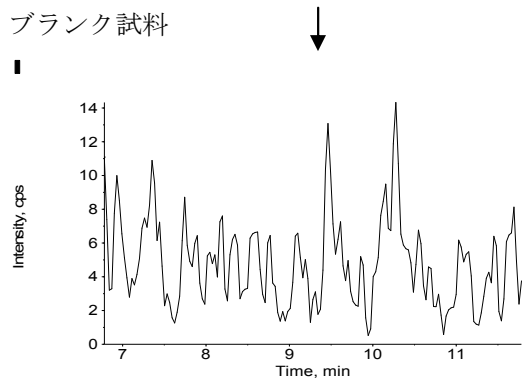
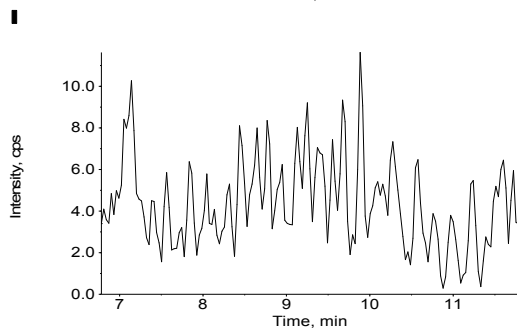


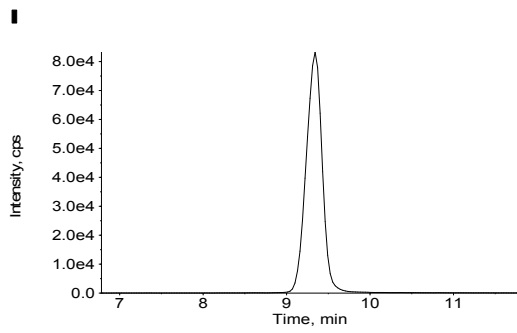
図 31 メタフルミゾン代謝物の SRM
クロマトグラム
($m/z=288 \rightarrow 142$)
試料中 0.01 ppm 相当 (落花生)

図 32 メタフルミゾン代謝物の SRM
クロマトグラム
($m/z=288 \rightarrow 142$)
試料中 0.01 ppm 相当 (ばれいしょ)

空白試料



添加試料



標準溶液

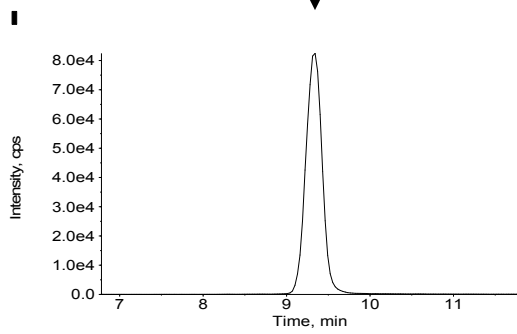
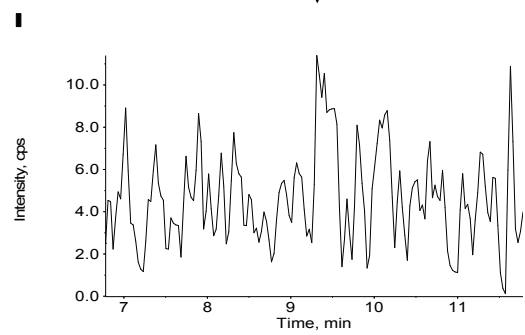
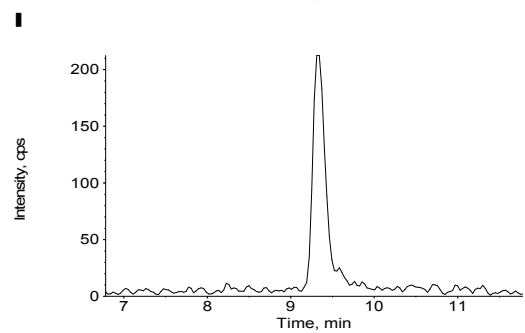


図 33 メタフルミゾン代謝物の SRM
クロマトグラム
($m/z=288 \rightarrow 142$)
試料中 5 ppm 相当 (きゃべつ)

空白試料



添加試料



標準溶液

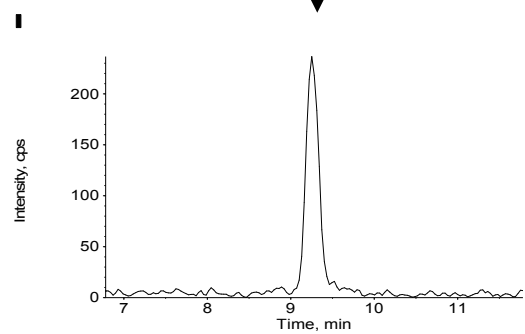
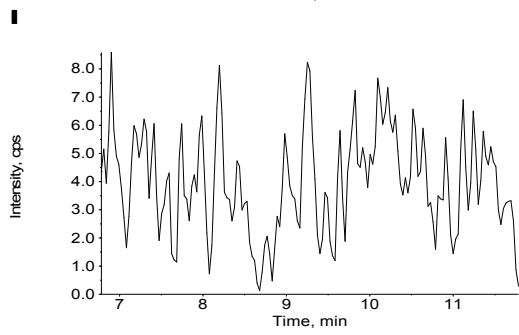
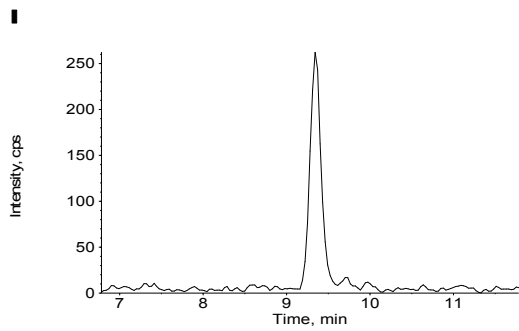


図 34 メタフルミゾン代謝物の SRM
クロマトグラム
($m/z=288 \rightarrow 142$)
試料中 0.01 ppm 相当 (ほうれんそう)

空白試料



添加試料



標準溶液

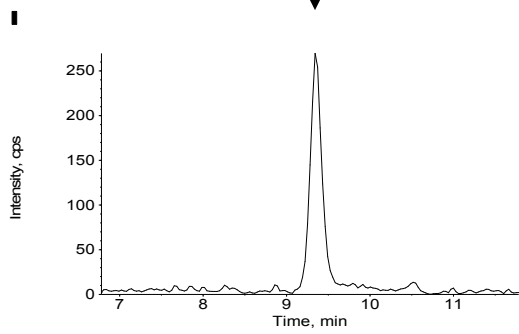
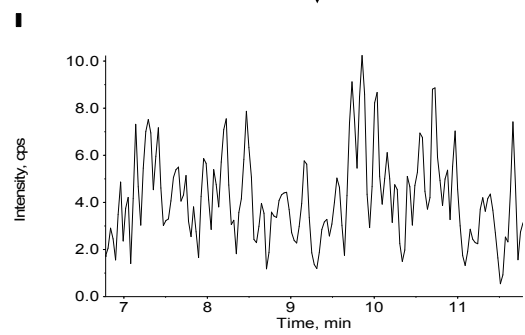
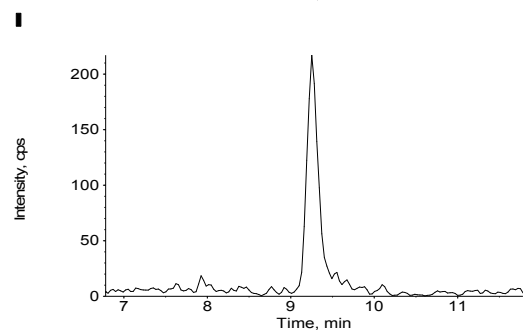


図 35 メタフルミゾン代謝物の SRM
クロマトグラム
($m/z=288 \rightarrow 142$)
試料中 0.01 ppm 相当 (オレンジ)

空白試料



添加試料



標準溶液

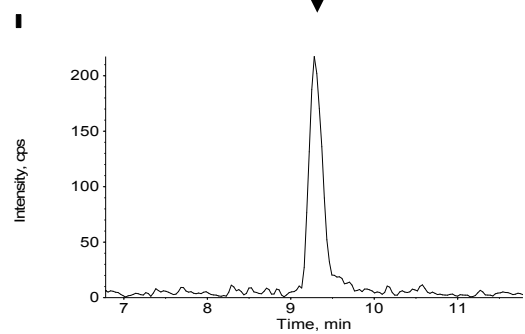
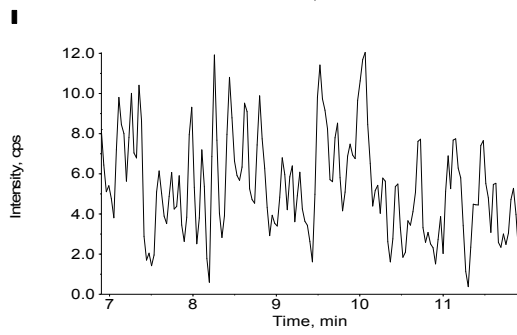
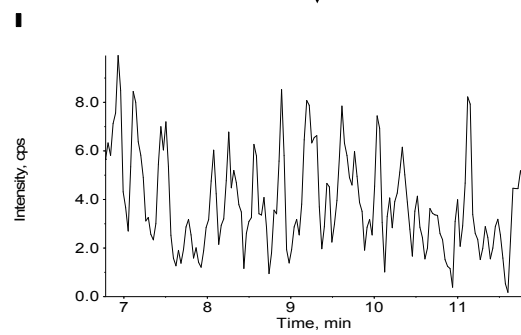


図 36 メタフルミゾン代謝物の SRM
クロマトグラム
($m/z=288 \rightarrow 142$)
試料中 0.01 ppm 相当 (りんご)

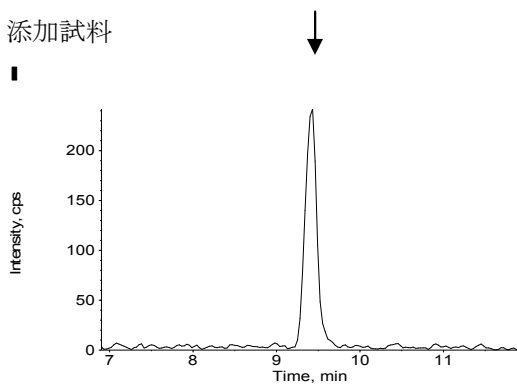
空白試料



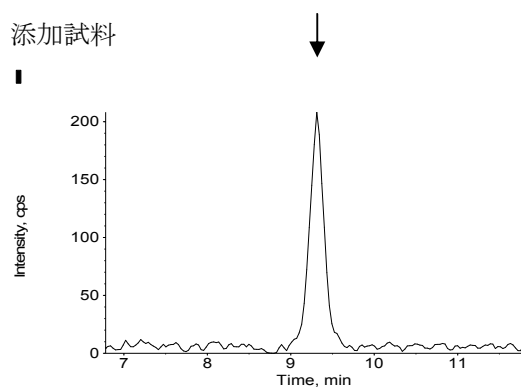
空白試料



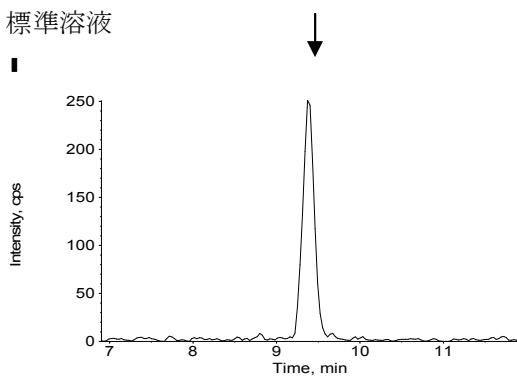
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

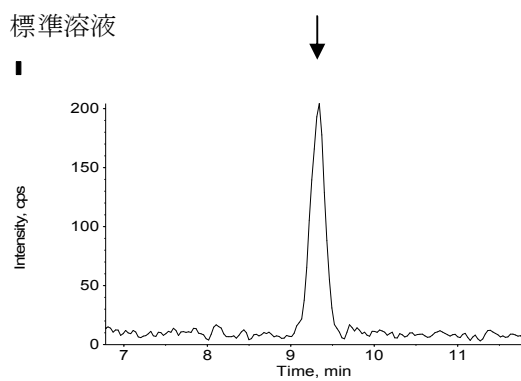


図 37 メタフルミゾン代謝物の SRM
クロマトグラム
($m/z=288 \rightarrow 142$)
試料中 0.01 ppm 相当 (茶)

図 38 メタフルミゾン代謝物の SRM
クロマトグラム
($m/z=288 \rightarrow 142$)
試料中 0.01 ppm 相当 (コリアンダー(コエン
ドロ)の種子)

② 定量下限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)

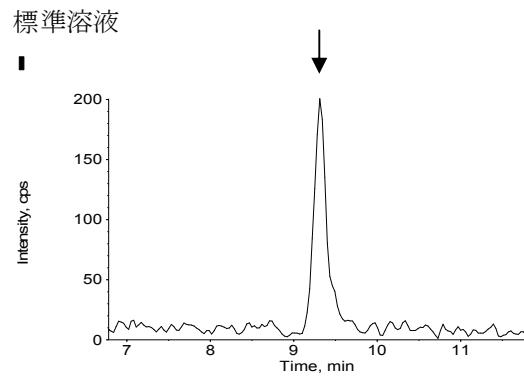
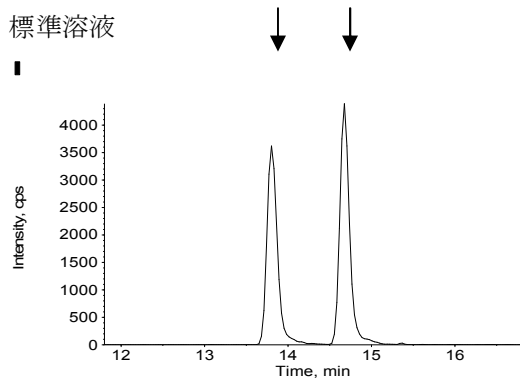
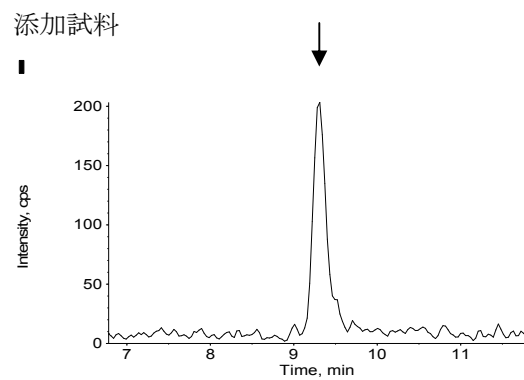
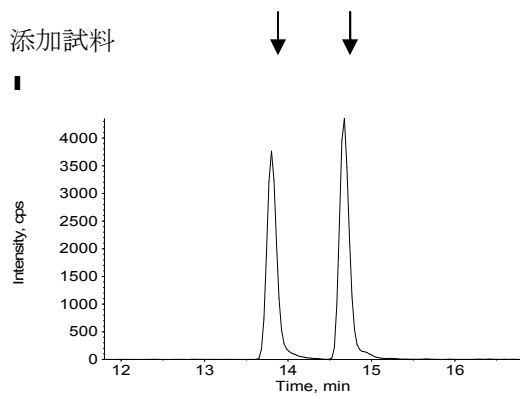
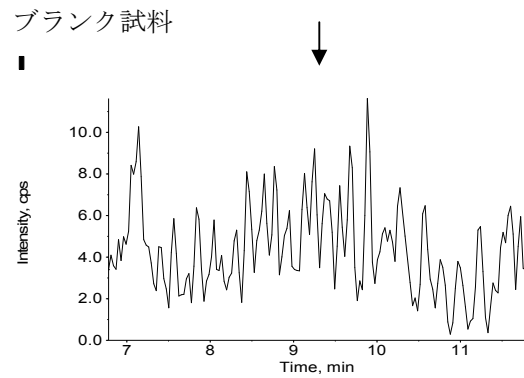
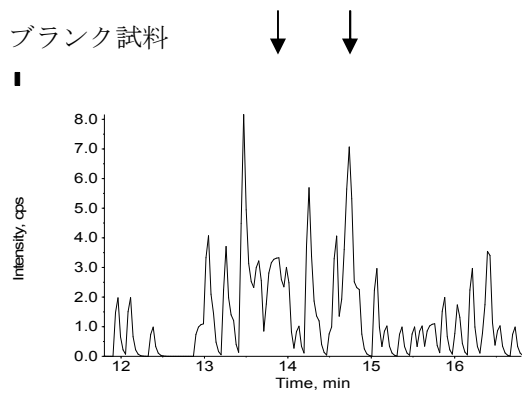


図 39 メタフルミゾンの SRM クロマトグラム
($m/z=505 \rightarrow 302$)
試料中 0.01 ppm 相当 (きゃべつ)

図 40 メタフルミゾン代謝物の SRM クロマトグラム
($m/z=288 \rightarrow 142$)
試料中 0.01 ppm 相当 (きゃべつ)

③ ブランク試料の代表的な全イオン電流クロマトグラム

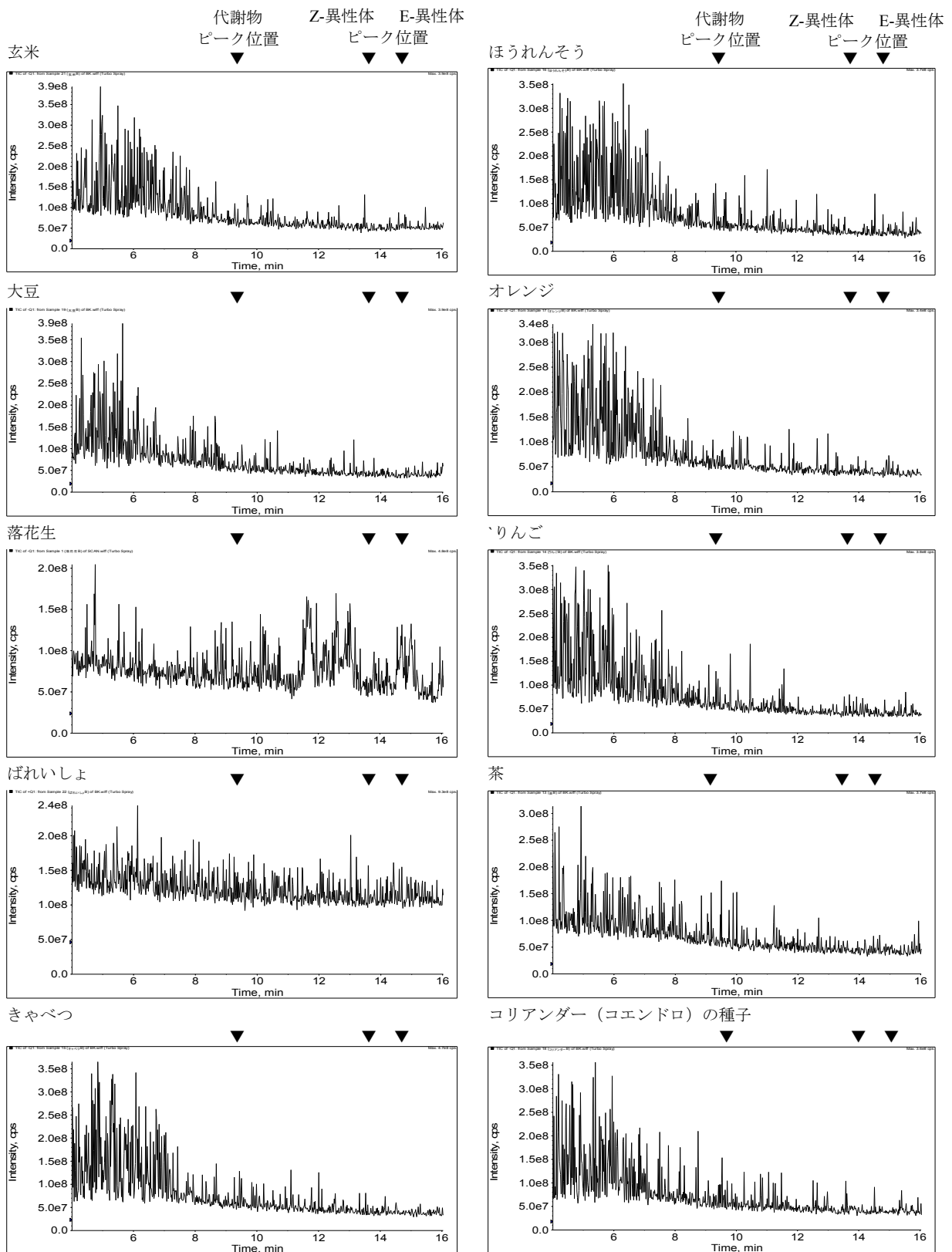


図 41 ブランク試料の全イオン電流クロマトグラム(ESI-)
(スキャン範囲：100～1000 amu)

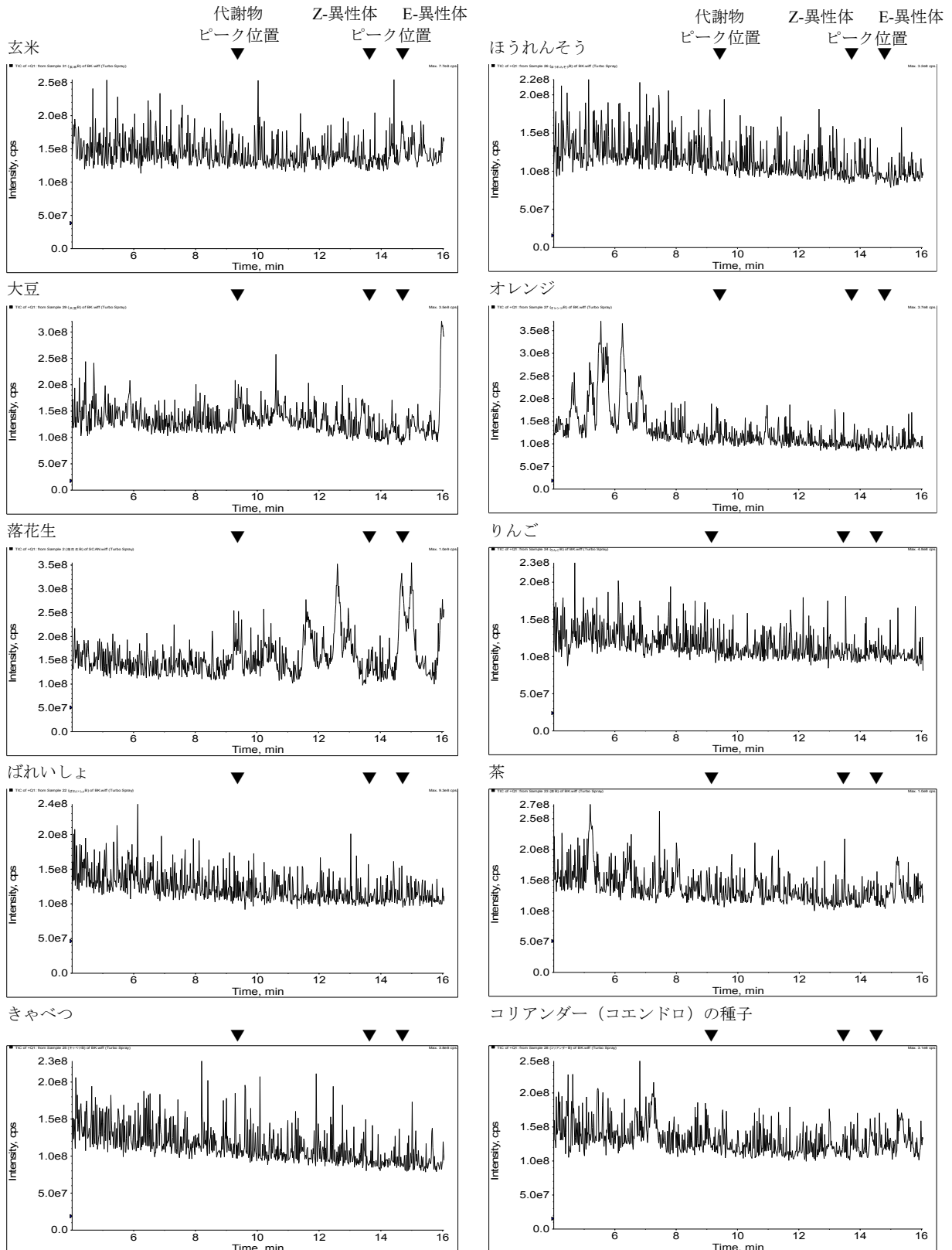


図 42 ブランク試料の全イオン電流クロマトグラム(ESI+)
(スキャン範囲：100~1000 amu)

4. その他の試験法検討に関連する事項

(1) 試薬について

検討に使用した FLUKA 製メタフルミゾン標準品(混合品)は *E* 体が 90%以上、*Z* 体が 10%以下の割合で含有されている Pestanal 標準品であったため、測定に及ぼす影響について調査した。混合品の標準溶液 0.01 mg/L (メタノール溶液) を注入し、*E*-異性体と *Z*-異性体の面積値の割合を確認した。図 43 に混合品の定量イオンのクロマトグラムを示す。混合品からは *E*-異性体と共に微量の *Z*-異性体が検出され、*E*-異性体に対する面積値の割合は約 3%であった。同濃度の *E*-異性体と *Z*-異性体の面積値は同程度となるため、この面積比が *E*-異性体と *Z*-異性体の濃度であると仮定すると、混合品と *Z*-異性体標準品を混合液として使用した場合、*Z*-異性体の測定値は実際の真値よりも約 3%低くなるものと考えられる。

また、和光純薬工業(株)で販売している *E*-異性体の高純度標準品を入手し、0.01 mg/L (メタノール溶液) を調製後、混合品の 0.01 mg/L (メタノール溶液) と比較したところ、混合品中の *E*-異性体は *E*-異性体高純度品の面積値に対して約 98%であった。標準として混合品を試料の測定に使用した場合、*E*-異性体の定量値は *E*-異性体高純度品を使用した場合に比較して若干高くなる可能性がある。

検討は全て、メタフルミゾン混合品と日本農薬(株)より提供されたメタフルミゾン *Z*-異性体及び代謝物の混合標準液で行ったが、検量線と添加回収試験で使用した標準液が同一であるため、報告書内の回収率等の結果に対する混合品使用の影響は無いものと考えられる。

使用した混合品は *Z*-異性体の含有量が比較的少なく、*E*-異性体のみの高純度品との面積値の差も僅差なものであったが、混合品のロット差を考慮すると、全てが検討で使用したものと混合比が同等であるとは限らない。したがって、試料の測定では、混合品ではなく *E*-異性体のみの高純度品の使用が推奨される。

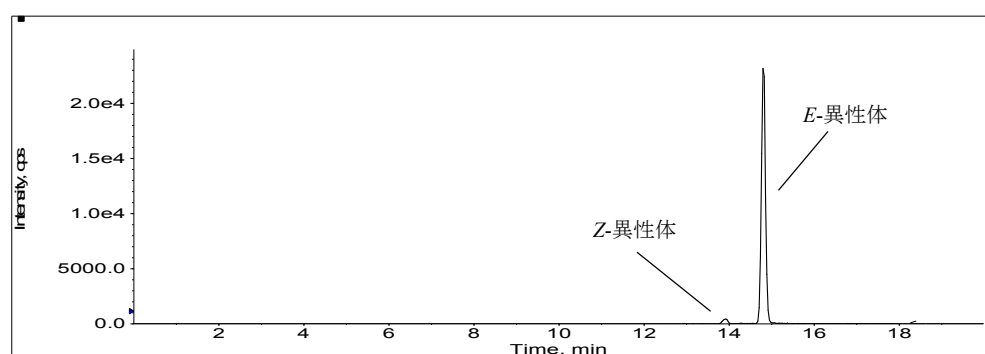


図 43 メタフルミゾン混合品の 0.01 mg/L (メタノール溶液) のクロマトグラム例

(2) グラファイトカーボンミニカラムによる精製の検討

Envi-carb (250 mg/6 mL) ミニカラムをアセトニトリル及びトルエン (3 : 1) 混液でコンデューションングした後、アセトニトリル及びトルエン (3 : 1) 混液で調製した標準溶液 0.01 mg/L を 1 mL 添加し、さらにアセトニトリル及びトルエン (3 : 1) 混液を 10 mL ずつ 50 mL まで流し、各溶出画分を測定した検討結果を表 18 に示す。画分は 40°C 以下で濃縮して溶媒を除去後、残留物をメタノールに溶かし 1 mL とし、LC-MS/MS で測定した。

メタフルミゾン (*E* 体) は及び代謝物のグラファイトカーボンからの溶出は不完全であり、アセトニトリル及びトルエン (3 : 1) 混液 10~20 mL で溶出が各々 46 及び 68%に留まり、50 mL まで流しても溶出されなかった。メタフルミゾン (*Z* 体) は、アセトニトリル及びトルエン (3 : 1) 混液を 20 mL 流すことで約 100%の回収が得られた。

本試験法開発で検討した方法では最終溶液には着色が観察されたが、メタフルミゾン (*E*-異性体) 及び代謝物の回収率が 70%未満であったため、グラファイトカーボンミニカラムによる

更なる精製は行わなかった。

表 18 グラファイトカーボンミニカラムの検討結果

物質名	溶出液量 (mL)	回収率 (%)	回収率累計 (%)
メタフルミゾン (<i>E</i> -異性体)	0-10	1.0	1.0
	11-20	46.3	46.3
	21-30	0.0	46.3
	31-40	0.0	46.3
	41-50	0.0	46.3
メタフルミゾン (<i>Z</i> -異性体)	0-10	107.0	107.0
	11-20	0.0	107.0
	21-30	0.0	107.0
	31-40	0.0	107.0
	41-50	0.0	107.0
メタフルミゾン代謝物	0-10	68.2	68.2
	11-20	0.0	68.2
	21-30	0.0	68.2
	31-40	0.0	68.2
	41-50	0.0	68.2

5. 考察

グラファイトカーボンミニカラムによる精製を検討するに当たっては、通知法「LC/MS による農薬等の一斉試験法 I (農産物)」²⁾ の精製法を参考にして、溶出液にアセトニトリル及びトルエン (3 : 1) 混液を使用した。この結果、メタフルミゾン (*E*-異性体) 及び代謝物の回収率が 70% 以下となったため、本試験法においては通知法の「LC/MS による農薬等の一斉試験法 I (農産物)」²⁾ の適用とグラファイトカーボンミニカラムによる精製は行わなかった。

添加回収試験の最も低い添加濃度が 0.01 mg/kg であったため、70~120% の回収を確保できる最低濃度として定量下限 0.01 mg/kg を設定した。

開発した方法を用いて、玄米等 10 食品の添加回収試験を行った結果、本試験法は野菜類、果実類、茶及び穀類・豆類・種実類等の農産物に適用可能であると判断された。

[結論]

農産物中のメタフルミゾン試験法として、メタフルミゾンを試料からアセトンで抽出し、酢酸エチル及び *n*-ヘキサン (1 : 4) 混液に転溶後、アセトニトリル/ヘキサン分配で脱脂し、合成ケイ酸マグネシウ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。開発した試験法を玄米、大豆、落花生、ばれいしょ、きゃべつ、ほうれんそう、オレンジ、りんご、茶及びコリアンダー (コエンドロ) の種子の 10 食品に適用した結果、メタフルミゾン (*E* 異性体) の真度は 92~102%、併行精度は 1~6%、メタフルミゾン (*Z* 異性体) の真度は 96~102%、併行精度は 1~5%、メタフルミゾン代謝物の真度は 98~100%、併行精度は 2~4% となり、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) メタフルミゾン農薬抄録

<http://www.acis.famic.go.jp/syouroku/metaflumizone/index.htm>

2) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知 食安発第 0124004 号「LC/MS による農薬等

の一斉試験法 I (農産物)」(平成 17 年 1 月 24 日)