

※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 試験法開発法報告書

## フルメトリン試験法（畜産物）

## フルメトリン試験法の検討結果

### 1. 目的及び試験法の検討方針

フルメトリンは、牛、ヒツジ、ヤギ、馬及びイヌの外部寄生虫を駆除するために使用されるピレスロイド系殺虫剤である。フルメトリンは8種の異性体を有するが、組成の90%以上がトランス-Z<sub>1</sub>異性体及びトランス-Z<sub>2</sub>異性体から成る（トランス-Z<sub>1</sub>異性体：トランス-Z<sub>2</sub>異性体=55：45）と報告されている。

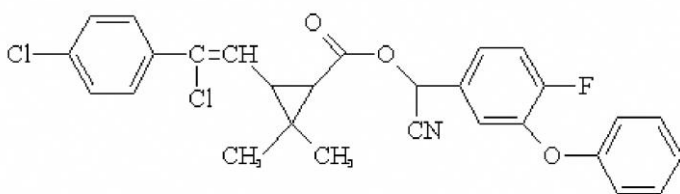
「薬事食品衛生審議会 食品衛生分科会報告書」に記載されている規制対象物質及び残留基準値案を踏まえ、定量限界0.01 mg/kg（はちみつの場合は0.005 mg/kg）が設定可能な試験法の検討を行った。

#### 1) 規制対象物質

フルメトリン（各異性体の和とする。）

### 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>28</sub>H<sub>22</sub>Cl<sub>2</sub>FNO<sub>3</sub>

分子量：510.38

化学名（IUPAC）：(R,S)-cyano-4-fluoro-3-phenoxybenzyl 3-(β,4-dichlorostyryl)-2,2-dimethylcyclopropane carboxylate

外 観：黄色粘状液体

沸 点：>250°C (760 mmHg)

蒸気圧：<10<sup>-11</sup> hPa (20°C)

溶解性：水 0.2 g/L (精製水、20°C)、<0.03 g/L (pH4及び7緩衝液、20°C)

n-ヘプタン 19、2-プロパノール 65、1-オクタノール 130、

ポリエチレングリコール 100~200、キシレン、1,2-ジクロロエタン、アセトン、

ジメチルホルムアミド、アセトニトリル、酢酸エチル及びジメチルスルホキシド>250

(以上 g/L、20°C)

比重：1.28 g/cm<sup>3</sup> (20°C)

オクタノール/水分配係数：Log P<sub>ow</sub>=6.2

安定性：pH9で加水分解

(出典：www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/.../Pests.../flumethr.pdf)

#### 2) 基準値の一例

牛の筋肉及び脂肪：0.2 ppm

牛の肝臓及び乳：0.05 ppm

鶏の筋肉：0.01 ppm

鶏の卵：0.03 ppm

はちみつ：0.005 ppm

## [実験方法]

### 1. 試料

#### 1) 購入先

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可能な限り除き、細切均一化した。
- ②牛の脂肪は筋肉部を可能な限り除き、細切均一化した。
- ③牛の肝臓は全体を細切均一化した。
- ④鶏の筋肉は脂肪層を可能な限り除き、細切均一化した。
- ⑤鶏卵は殻を除き、卵白と卵黄を合わせてよく混合し均一化した。
- ⑥牛乳は全体をよく混合して均一化した。
- ⑦はちみつはそば蜜を使用し、加温（40℃以下）してから、よく混合して均一化した。

### 2. 試薬・試液

#### 1) 標準品

フルメトリン標準品：純度95.7%（シグマアルドリッチ製）

#### 2) 試薬

アセトン、アセトニトリル、*n*-ヘキサン：残留農薬試験用（関東化学製）

メタノール：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：試薬特級（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：Bond Elut Jr.C18 500 mg（Agilent technologies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：フルメトリン標準品25 mgを精秤し、アセトンに溶かして50 mLに定容し、500 mg/L溶液を調製した。

検量線用標準溶液：フルメトリン標準原液をアセトニトリル及び水（9：1）混液で希釈し、0.0001～0.006 mg/Lの濃度の標準溶液を調製した。

添加用標準溶液：フルメトリン標準原液をメタノールで希釈して0.1、0.6、1及び4 mg/Lの濃度の標準溶液を調製した。

##### ②試液の調製方法

アセトニトリル及び水（7：3）混液

アセトニトリル210 mL及び水90 mLを混合した。

アセトニトリル及び水（9：1）混液

アセトニトリル450 mL及び水50 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。

4 mmol/L酢酸アンモニウム溶液

水996 mL及び1 mol/L酢酸アンモニウム溶液4 mLを混合した。

### 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（BÜCHI製）等

#### LC-MS/MS

	型式	会社
MS 装置	5500 QTRAP	SCIEX
LC 装置	ExionLC AD	SCIEX
解析ソフト	Analyst	SCIEX

#### 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)	10																				
カラム温度 (°C)	40																				
移動相	A液：4 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 B液：メタノール																				
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>0.00</td> <td>30</td> <td>70</td> </tr> <tr> <td>5.00</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>15.00</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>15.01</td> <td>30</td> <td>70</td> </tr> <tr> <td>20.00</td> <td>30</td> <td>70</td> </tr> </tbody> </table>			時間 (分)	A液 (%)	B液 (%)	0.00	30	70	5.00	0	100	15.00	0	100	15.01	30	70	20.00	30	70
時間 (分)	A液 (%)	B液 (%)																			
0.00	30	70																			
5.00	0	100																			
15.00	0	100																			
15.01	30	70																			
20.00	30	70																			
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（+）																				
キャピラリ電圧 (V)	5500																				
脱溶媒温度 (°C)	400																				
脱溶媒ガス	窒素 60 psi																				
コリジョンガス	窒素																				
定量イオン (m/z)	+527.1→267.0[コーン電圧：66(V)、コリジョンエネルギー：19(eV)]																				
定性イオン (m/z)	+527.1→239.0[コーン電圧：66(V)、コリジョンエネルギー：29(eV)]																				
保持時間 (min)	7.5																				

#### 5. 定量

[実験方法] 2. 3) ①に従い調製した標準溶液10 μLをLC-MS/MSに注入し、得られたピーク面積から絶対検量線法で検量線を作成した。試験溶液10 μLをLC-MS/MSに注入し、得られたピーク面積と作成した検量線からフルメトリンの量を算出した。

#### 6. 添加試料の調製

2. 3) で調製した添加用標準溶液を使用した。

牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、鶏の筋肉、鶏の卵及び乳（添加濃度：0.01 ppm相当）：1. 2) の試料10.0 gに添加用混合標準溶液0.1 mg/Lを1 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相当）：1. 2) の試料10.0 gに水20 mLを加えて溶かした。添加用標準溶液0.1 mg/Lを1 mL添加しよく混合した後、30分間放置した。

牛の筋肉及び脂肪（添加濃度：0.2 ppm相当）：1. 2) の試料10.0 gに添加用標準溶液4 mg/Lを0.5 mL

添加しよく混合した後、30分間放置した。

牛の肝臓及び乳（添加濃度：0.05 ppm相当）：1. 2）の試料10.0 gに添加用標準溶液1 mg/Lを0.5 mL添加しよく混合した後、30分間放置した。

鶏の筋肉及び鶏の卵（添加濃度：0.03 ppm相当）：1. 2）の試料10.0 g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：0.005 ppm相当）：1. 2）の試料10.0 gに水20 mLを加えて溶かした。添加用標準溶液0.1 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

フルメトリンを試料からアセトンを用いて抽出し、アセトニトリル/ヘキサン分配で脱脂した（はちみつの場合は省略）後、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムで精製し、LC-MS/MSで定量及び確認した。

### 1) 抽出

#### ①はちみつ以外の場合

試料10.0 gを200 mL遠心管に量り採り、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2 mLを100 mL分液漏斗に分取し、*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2回振とう抽出した。抽出液を合わせ、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（7：3）混液10 mLに溶かした。

#### ②はちみつの場合

試料10.0 gを200 mL遠心管に量り採り、水20 mLを加えて溶かした。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た。ろ紙上の残留物に水10 mL及びアセトン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を分取し100 mL遠心管に採り、ロータリーエバポレーターを用いて40°C以下で約0.5 mLまで濃縮した後アセトニトリル及び水（7：3）混液10 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 [Bond Elut Jr.C18 (500 mg)] 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) で得られた液を注入し、流出液は捨てた。次いで、アセトニトリル及び水（9：1）混液5 mLを注入し、溶出液を5 mL容メスフラスコに採り、アセトニトリル及び水（9：1）混液で正確に5 mLとしたものを試験溶液とした。

[分析法フローチャート]

①はちみつ以外

秤 取

↓ 試料10.0 g

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、アセトンで正確に200 mLとする
- ↓ 抽出液を正確に2 mL分取

アセトニトリル/ヘキサン分配

- | *n*-ヘキサン30 mL
  - | *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル30 mLを加え、5分間振とう
  - | アセトニトリル層を採る
  - | *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル30 mLを加え、5分間振とう
- ↓ アセトニトリル層を合わせる

濃縮 (溶媒除去)

↓ 残留物をアセトニトリル及び水 (7 : 3) 混液10 mLに溶解

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム (500 mg) 精製

- | アセトニトリル及び水各5 mLでコンディショニング
  - | 全量注入、流出液を捨てる
  - | アセトニトリル及び水 (9 : 1) 混液5 mLで溶出
- ↓ アセトニトリル及び水 (9 : 1) 混液で正確に5 mLとし、試験溶液とする

LC-MS/MS定量

10 µL注入

②はちみつ

秤 取

↓ 試料10.0 gに水20 mLを加え溶解

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
  - | 残留物に水10 mL及びアセトン50 mLを加え、ホモジナイズ
  - | 吸引ろ過
  - | ろ液を合わせて、アセトンで正確に200 mLとする
- ↓ 抽出液を正確に4 mL分取

濃 縮

↓ 約0.5 mLまで減圧濃縮した後アセトニトリル及び水 (7 : 3) 混液10 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 (500 mg) 精製

- | アセトニトリル及び水各5 mLでコンディショニング
- | 全量注入、流出液を捨てる
- | アセトニトリル及び水 (9 : 1) 混液5 mLで溶出

↓ アセトニトリル及び水（9：1）混液で正確に5 mLとし、試験溶液とする

**LC-MS/MS定量**

10  $\mu$ L注入

8. マトリックス添加標準溶液の調製

牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、鶏の筋肉、鶏の卵、乳及びはちみつ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、0.0002 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。

牛の筋肉及び牛の脂肪は、ブランク試験溶液から0.5 mL分取し溶媒を除去した後、0.004 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。

牛の肝臓及び乳は、ブランク試験溶液から0.5 mL分取し溶媒を除去した後、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。

鶏の卵は、ブランク試験溶液から0.5 mL分取し溶媒を除去した後、0.0006 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) MS条件の検討

1) 測定条件の検討

フルメトリンはESI (+) モードでの測定が可能であった。フルメトリンのESI (+) モード測定時のマススペクトルを図1に示した。フルメトリンのモノアイソトピック分子量は509.09であるが、移動相に4 mmol/L酢酸アンモニウム溶液及びメタノールを用いたところ、プロトン付加分子 ( $m/z$  510 [M+H]<sup>+</sup>) の他に、アンモニウム付加分子 ( $m/z$  527 [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>) が得られた。 $m/z$  510及び527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2に示した。

以下のピーク強度の順でプロダクトイオンが得られた。

①  $m/z$  527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  $m/z$  267

②  $m/z$  527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  $m/z$  239

③  $m/z$  510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  $m/z$  267

なお、 $m/z$  510をプリカーサーイオンとした場合、標準溶液のクロマトグラムに妨害ピークが確認された。このピークは、定容溶媒であるアセトニトリル及び水（9：1）混液のみの注入においても確認されたため、フルメトリン由来ではないと思われた。 $m/z$  527をプリカーサーイオンとした場合は標準溶液に妨害ピークは確認されず、ピーク強度及び選択性共に優れていたため、プリカーサーイオンとしてはアンモニウム付加分子  $m/z$  527を用い、プロダクトイオン  $m/z$  267を定量用イオン、 $m/z$  239を定性用イオンとした。 $m/z$  510及び527をプリカーサーイオンとした場合の標準溶液のクロマトグラムを図3に示した。

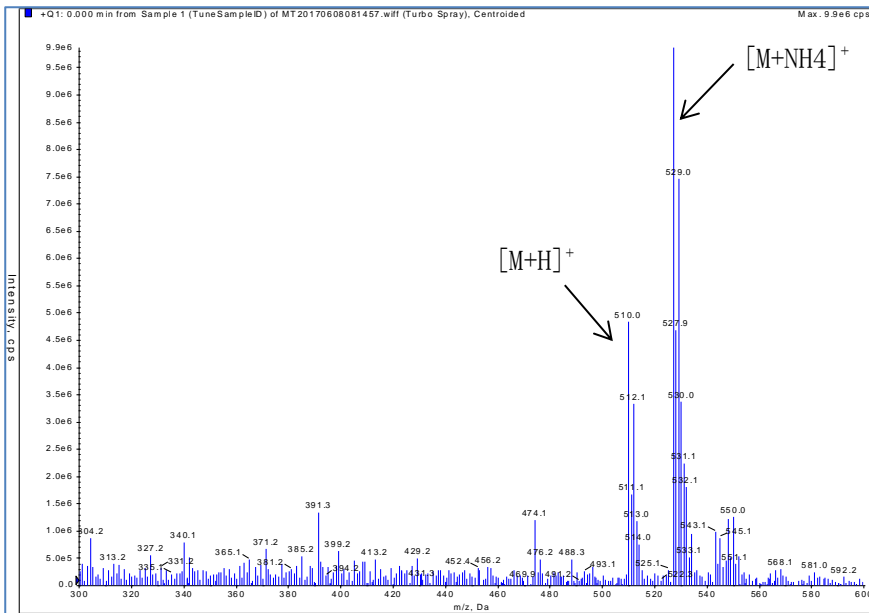


図1 フルメトリンのマススペクトル  
 スキャン範囲：300～600  $m/z$   
 測定条件：ESI (+)、CV=66 (CV：コーン電圧)

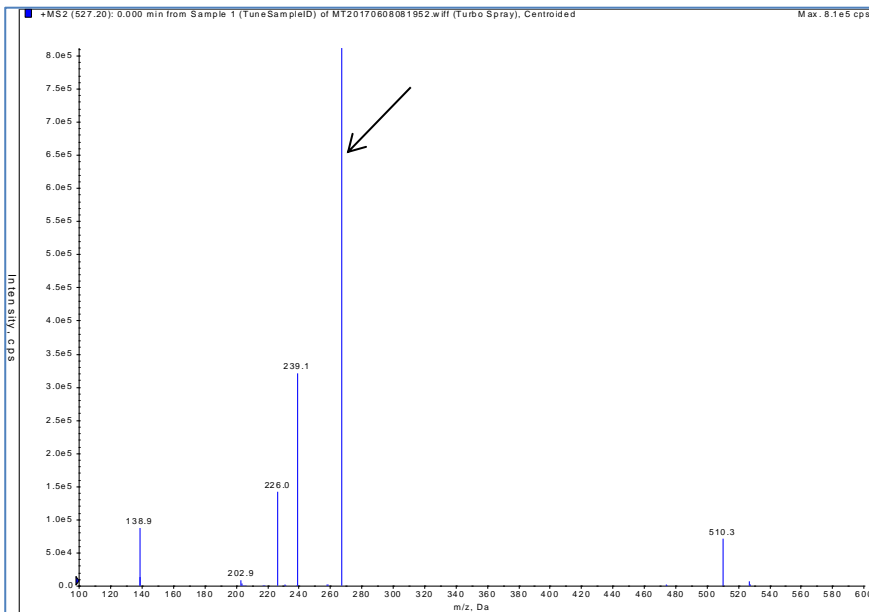


図2-1 フルメトリンのプリカーサーイオン  $m/z$  510 のプロダクトイオンスペクトル  
 スキャン範囲：100～600  $m/z$   
 測定条件：ESI (+)、CV=66、CE=19 (CV：コーン電圧、CE：コリジョンエネルギー)



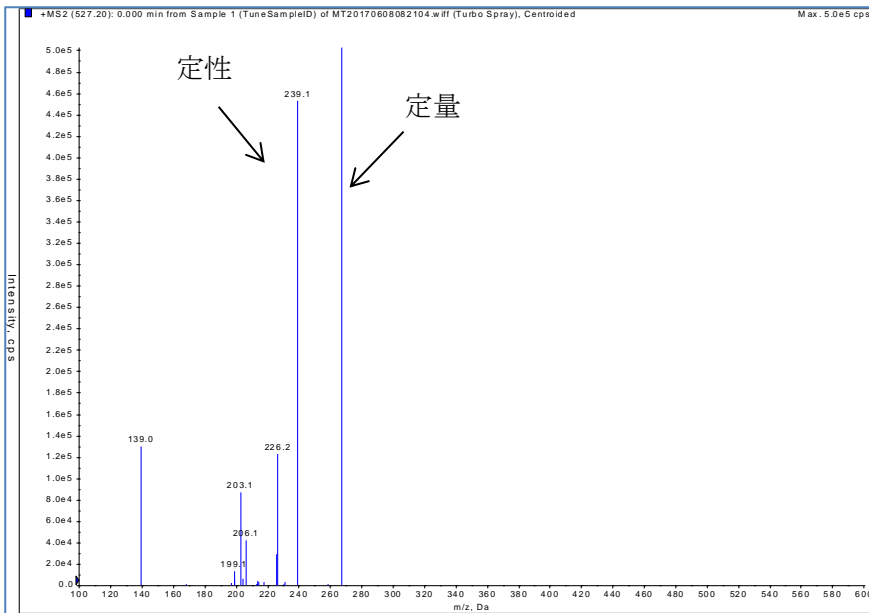


図 2-2 フルメトリンのプリカーサーイオン  $m/z$  527 のプロダクトイオンスペクトル  
スキャン範囲：100~600  $m/z$

測定条件：ESI (+)、CV=66、CE=19 (CV：コーン電圧、CE：コリジョンエネルギー)

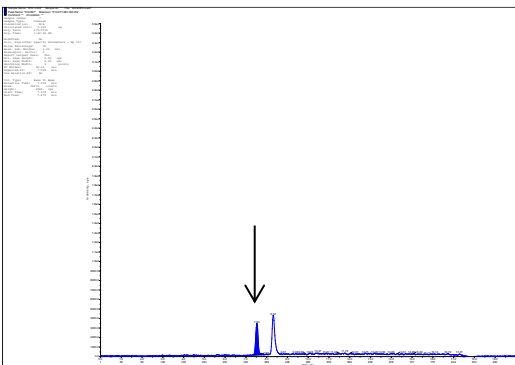


図 3-1 フルメトリンのクロマトグラム ( $m/z$  +510→267)

0.002 mg/L 標準溶液

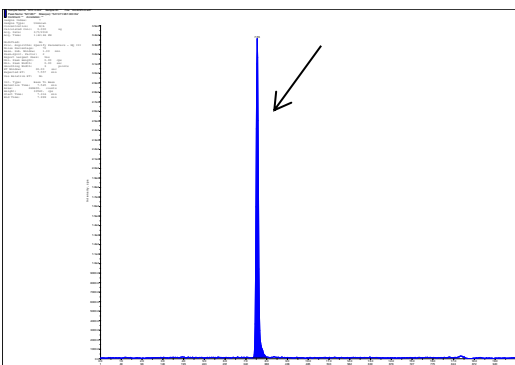


図 3-2 フルメトリンのクロマトグラム ( $m/z$  +527→267)

0.002 mg/L 標準溶液

## 2) LC 条件の検討

1) の検討結果より、アンモニウム付加イオンを測定するために移動相には酢酸アンモニウム溶液を用いて検討を行った。酢酸アンモニウム濃度を1、2、4、5及び10 mmol/Lとしてピーク強度を比較した結果を図4に示した。酢酸アンモニウム濃度4 mmol/Lでピーク強度が最大となり、それ以上濃度を上げるとピーク強度が減少する傾向が見られたため、酢酸アンモニウム濃度は4 mmol/Lとした。次に、用いる有機溶媒としてメタノール及びアセトニトリルでピーク強度を比較したところ、メタノールの方が感度が良好であった。移動相について、4 mmol/L酢酸アンモニウム溶液及びメタノー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、分離カラムはMightysil RP-18 GP (内径 2.0 mm、長さ 150 mm、粒子径 5  $\mu$ m) を、移動相は4 mmol/L酢酸アンモニウム溶液及びメタノール (3 : 7) から (0 : 1) までの濃度勾配を5分間で行い、(0 : 1) で10分間保持することとした。

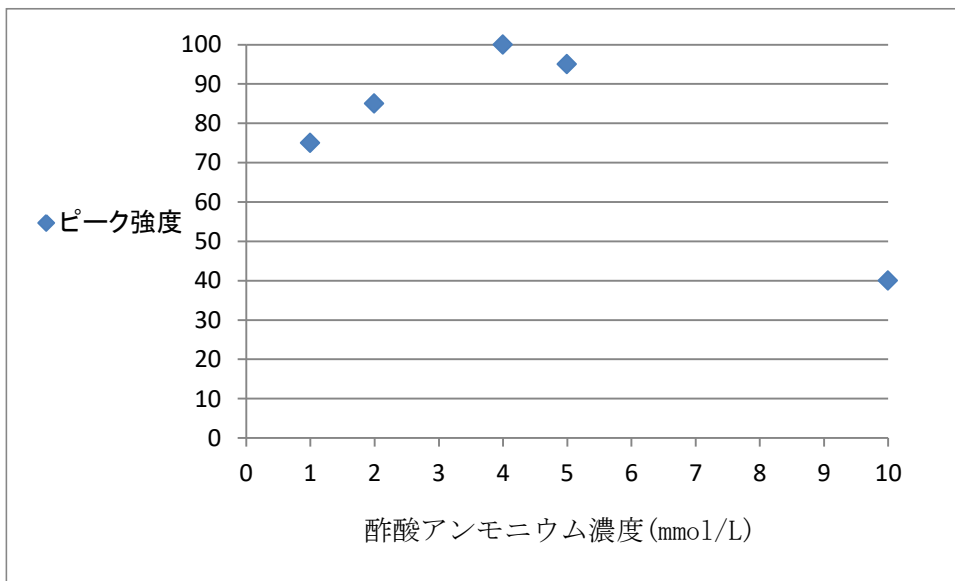
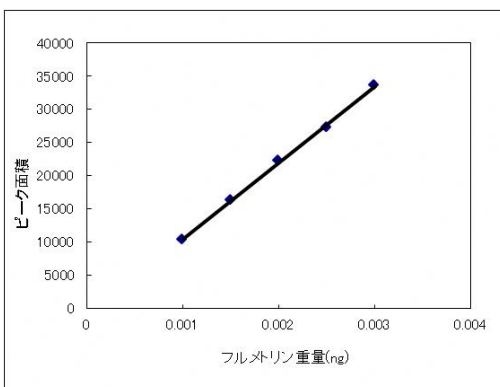


図4 移動相に用いる酢酸アンモニウム濃度の検討結果

## 3) 検量線

図5にフルメトリンの検量線の例を示した。0.0001 mg/L (0.001 ng) ~0.0003 mg/L (0.003 ng)、0.00015 mg/L (0.0015 ng) ~0.0009 mg/L (0.009 ng)、0.00025 mg/L (0.0025 ng) ~0.0015 mg/L (0.015 ng)、及び0.001 mg/L (0.01 ng) ~0.006 mg/L (0.06 ng) の濃度範囲で作成した検量線の相関係数は、いずれも0.999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  
データ処理ソフト (メーカー) : Analyst (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 : 0.001 ng~0.003 ng  
傾き (a) : a=11500000  
切片 (b) : b=-992  
R : 0.9995

図 5-1 フルメトリン検量線例 ( $m/z$  527 $\rightarrow$ 267)

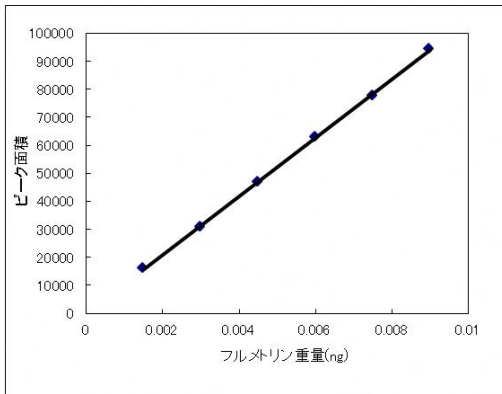


図 5-2 フルメトリン検量線例 ( $m/z$  527→267)

データ処理装置設定条件の一例  
 データ処理ソフト (メーカー) : Analyst (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 : 0.0015 ng~0.009 ng  
 傾き (a) : a=10400000  
 切片 (b) : b=109  
 R : 0.9999

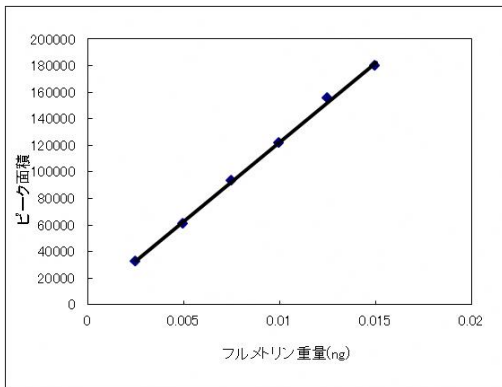


図 5-3 フルメトリン検量線例 ( $m/z$  527→267)

データ処理装置設定条件の一例  
 データ処理ソフト (メーカー) : Analyst (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~0.015 ng  
 傾き (a) : a=12000000  
 切片 (b) : b=2680  
 R : 0.9994

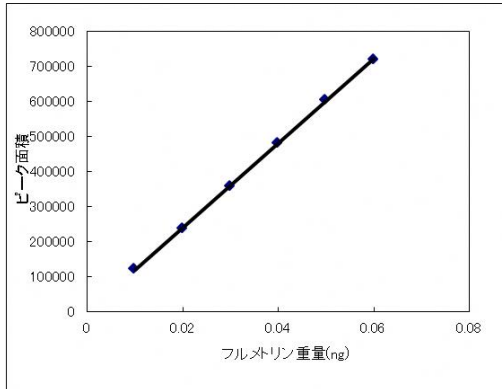


図 5-4 フルメトリン検量線例 ( $m/z$  527→267)

データ処理装置設定条件の一例  
 データ処理ソフト (メーカー) : Analyst (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 : 0.01 ng~0.06 ng  
 傾き (a) : a=12000000  
 切片 (b) : b=-943  
 R : 0.9999

#### 4) 定量限界

定量限界の算出結果を以下に示した。

##### ①はちみつ以外の場合

$$0.01 \text{ mg/kg} [ (5 \text{ mL}/0.1 \text{ g}^{*1}) \times (0.002 \text{ ng}/10 \mu\text{L}) ]$$

$$*1 \quad 10.0 \text{ g} \times 2 \text{ mL}/200 \text{ mL}$$

##### ②はちみつの場合

$$0.005 \text{ mg/kg} [ (5 \text{ mL}/0.2 \text{ g}^{*2}) \times (0.002 \text{ ng}/10 \mu\text{L}) ]$$

$$*2 \quad 10.0 \text{ g} \times 4 \text{ mL}/200 \text{ mL}$$

## 2. 試験溶液調製法の検討

### 1) 抽出方法の検討

フルメトリンのアセトンへの溶解性が>250 g/Lと、非常に溶解性が高いため、畜産物の脂肪組織との混和性を考慮し、アセトンを用いて抽出することとした。

### 2) 脱脂方法の検討

脂溶性の妨害物質の除去を目的として、アセトニトリル/ヘキサン分配を検討した。実際の操作を想定してアセトン2 mLにフルメトリン0.1 µgを添加し、*n*-ヘキサン30 mLを加えた後*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル30 mLずつで3回振とう抽出を行った結果を表1に示した。フルメトリンは*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル2回で抽出できたことから、分配回数は*n*-ヘキサン30 mLに*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル30 mLずつで2回抽出することとした。

表1 アセトニトリル/ヘキサン分配の検討 (%)

	<i>n</i> -ヘキサン飽和アセトニトリル			合計
	30 mL (1回目)	30 mL (2回目)	30 mL (3回目)	
フルメトリン	98	4	0	102

添加量：0.1 µg

### 3) 精製方法の検討

#### ①オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムによる精製の検討

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムを用いた精製を検討した。Bond Elut Jr C18 500 mgをアセトニトリル及び水各5 mLで予備洗浄した後、フルメトリン0.1 µgをアセトニトリル及び水の混液各10 mLでオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムに順次負荷、溶出したときの溶出状況を表2に示した。フルメトリンはアセトニトリル及び水 (7 : 3) 混液10 mLでは溶出せず、アセトニトリル及び水 (4 : 1) 混液10 mL及びアセトニトリル及び水 (9 : 1) 混液10 mLで溶出した。

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① (%)

	アセトニトリル及び水			アセトニトリル	合計
	7 : 3	4 : 1	9 : 1		
溶出量 (mL)	10	10	10	10	
フルメトリン	0	83	6	0	89

Bond Elut Jr C18 500 mg、Agilent technologies製

添加量：0.1 µg

表2の結果から、Bond Elut Jr C18 500 mgをアセトニトリル及び水各5 mLで予備洗浄した後、フルメトリン0.1 µgをアセトニトリル及び水 (7 : 3) 混液10 mLで溶解し、負荷した後、アセトニトリル及び水 (9 : 1) 混液5 mLで溶出したときの溶出状況を表3に示した。フルメトリンはアセトニトリル及び水 (7 : 3) 混液10 mLでは溶出せず、アセトニトリル及び水 (9 : 1) 混液5 mLで溶出することができたため、アセトニトリル及び水 (7 : 3) 混液10 mLで負荷した後、アセトニトリル及び水 (9 : 1) 混液5 mLで溶出することとした。

表3 オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムからの溶出状況② (%)

溶出量 (mL)	アセトニトリル及び水			合計
	(7 : 3)	(9 : 1)		
	10	0-5	5-10	
フルメトリン	0	101	0	101

Bond Elut Jr C18 500 mg、Agilent technologies製

添加量 : 0.1 µg

### ②アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムによる精製の検討

アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムを用いた精製を検討した。Sep-pak plus NH<sub>2</sub> 360 mgをn-ヘキサン5 mLで予備洗浄した後、フルメトリン0.1 µgをn-ヘキサン10 mLで負荷した後、n-ヘキサン及びアセトン (19 : 1) 混液で溶出したときの溶出状況を表4に示した。フルメトリンはn-ヘキサン10 mLでは溶出せず、n-ヘキサン及びアセトン (19 : 1) 混液10 mLで溶出した。しかし、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムによる精製のみで測定が可能であったためアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムによる精製は省略した。

表4 アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムからの溶出状況② (%)

溶出量 (mL)	n-ヘキサン及びアセトン			合計
	n-ヘキサン	(19 : 1)		
	10	0-10	10-20	
フルメトリン	0	104	0	104

Sep-pak plus NH<sub>2</sub> 360 mg、Waters製

添加量 : 0.1 µg

### 3. 添加回収試験

牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、鶏の筋肉、鶏の卵、乳及びはちみつの7食品を用いて、[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6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7に示した。

#### 1) 選択性

選択性の結果を表5に示した。検討した何れの試料においてもフルメトリンの定量を妨害するようなピークは認められず、選択性は良好であった。

表5 選択性の評価

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 [検出限界] (mg/kg)	基準値 (ppm)	妨害ピークの許容範囲の評価		ピーク面積(高さ) <sup>*1</sup>						選択性 の評価 <sup>*3</sup>	備考			
					評価濃度 (ppm)	評価基準	面積又は 高さの別	ブランク			マトリックス添加標準溶液 <sup>*2</sup>				面積(高さ) 比 (a)/(b)		
								n=1	n=2	平均 (a)	n=1	n=2				平均 (b)	
1	フルメトリン	牛の筋肉	0.01	0.2	基準値	0.2	< 0.100	面積	0	0	0			#DIV/0!	#DIV/0!	○	
		牛の脂肪	0.01	0.2	基準値	0.2	< 0.100	面積	0	0	0			#DIV/0!	#DIV/0!	○	
		牛の肝臓	0.01	0.05	基準値	0.05	< 0.100	面積	0	0	0			#DIV/0!	#DIV/0!	○	
		鶏の筋肉	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0			#DIV/0!	#DIV/0!	○	
		鶏の卵	0.01	0.03	基準値	0.03	< 0.100	面積	0	0	0			#DIV/0!	#DIV/0!	○	
		乳	0.01	0.05	基準値	0.05	< 0.100	面積	0	0	0			#DIV/0!	#DIV/0!	○	
		はちみつ	0.005	0.005	定量限界	0.005	< 0.333	面積	0	0	0			#DIV/0!	#DIV/0!	○	

\*1 ブランク試料、標準溶液の順に注入して測定した結果から評価する。(必要に応じて起爆注入を行う。)

\*2 試料中の濃度が「評価濃度」相当になるように、ブランク試料の試験溶液で調製した標準溶液(マトリックス添加標準溶液)を用いる。ブランク試料に妨害ピークが観察されなかった場合には、標準溶液のピーク面積(高さ)は求めなくても良い。

\*3 面積(高さ)比が、妨害ピークの許容範囲の評価基準に適合する場合には「○」、適合しない場合には「×」を記載する。

2) 真度、精度及び定量限界

真度及び併行精度の検討結果を表6に示した。フルメトリンの真度は82.9~94.2%、併行精度は0.7~4.8%であり、目標値を十分に満たした。定量限界濃度の添加回収試験におけるフルメトリンのピークのS/Nの平均値は86.5~121.6でありS/N≥10を十分に満たした。

表6 真度、精度及び定量限界の評価

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 [検出限界] (mg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	定量限界 の評価 <sup>1)</sup>	検量線			回収率 (%)					真度 (%)	併行精度 (RSD%)	S/N <sup>2)</sup>			備考
							傾き	切片	r <sup>2</sup> 値	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5			Max.	Min.	平均値	
1	フルメトリン	牛の筋肉	0.01	0.2	0.01	S/N	11500000	-992	0.9990	92.3	93.0	91.5	92.1	90.4	91.8	1.1	122.0	110.1	116.1	
		牛の筋肉	0.01	0.2	0.2	-	12000000	-943	0.9998	85.8	86.0	84.1	87.6	87.3	86.2	1.6	-	-	#DIV/0!	
		牛の脂肪	0.01	0.2	0.01	S/N	12200000	110	0.9994	95.2	96.3	92.7	91.9	94.7	94.2	1.9	103.8	93.7	98.8	
		牛の脂肪	0.01	0.2	0.2	-	12000000	-943	0.9998	87.2	87.0	88.3	87.0	87.1	87.3	0.7	-	-	#DIV/0!	
		牛の肝臓	0.01	0.05	0.01	S/N	11500000	-992	0.9990	88.2	81.2	83.3	86.5	83.4	84.5	3.3	100.8	88.3	94.6	
		牛の肝臓	0.01	0.05	0.05	-	12000000	2680	0.9988	82.3	84.9	82.7	82.3	82.5	82.9	1.3	-	-	#DIV/0!	
		鶏の筋肉	0.01	0.01	0.01	S/N	9860000	1230	0.9988	85.7	86.1	82.2	89.7	89.2	86.6	3.5	113.9	99.5	106.7	
		鶏の卵	0.01	0.03	0.01	S/N	12200000	110	0.9994	91.2	89.2	90.7	88.3	88.6	89.6	1.4	129.2	114.0	121.6	
		鶏の卵	0.01	0.03	0.03	-	10400000	109	0.9998	83.5	87.2	85.8	85.2	86.5	85.7	1.6	-	-	#DIV/0!	
		乳	0.01	0.05	0.01	S/N	12200000	110	0.9994	89.1	94.4	91.8	92.6	95.3	92.7	2.6	119.3	94.1	106.7	
		はちみつ	0.005	0.005	0.005	S/N	11500000	-992	0.9990	84.2	87.0	93.0	82.9	84.0	86.2	4.8	91.0	82.0	86.5	

\*1 S/Nを求める必要がある場合には「S/N」と表示される。

\*2 得られた回収率の中で最大値を与えるピーク(Max.)及び最小値を与えるピーク(Min.)のそれぞれのS/Nを求める。

3) 試料マトリックスの測定への影響

試料マトリックスの測定への影響について検討した結果を表7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。フルメトリンの面積比は0.90~0.99であり、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7で求めたピーク面積比で除して補正真度を求め、表8に示した。補正真度は87.4~102.5%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矛盾は見られなかった。

表7 試料マトリックスの測定への影響

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 [検出限界] (mg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	標準溶液 濃度 <sup>1)</sup> (mg/L)	ピーク面積(高さ) <sup>2)</sup>						備考			
							面積又は 高さの別	ブランク <sup>3)</sup>	マトリックス添加標準溶液 <sup>4)</sup>			溶媒標準溶液			ピーク面積 (高さ)比 <sup>5)</sup>	
									n=1	n=2	平均	n=1		n=2		平均
1	フルメトリン	牛の筋肉	0.01	0.2	0.01	0.0002	面積	0	20210	19790	20000	22640	22000	22320	0.90	
		牛の筋肉	0.01	0.2	0.2	0.004	面積	0	403500	390000	396750	441800	424700	433250	0.92	
		牛の脂肪	0.01	0.2	0.01	0.0002	面積	0	15600	16050	15825	16910	16850	16880	0.94	
		牛の脂肪	0.01	0.2	0.2	0.004	面積	0	385400	385400	385400	426800	413100	419950	0.92	
		牛の肝臓	0.01	0.05	0.01	0.0002	面積	0	21040	21790	21415	21950	23620	22785	0.94	
		牛の肝臓	0.01	0.05	0.05	0.001	面積	0	100600	99070	99835	112300	107100	109700	0.91	
		鶏の筋肉	0.01	0.01	0.01	0.0002	面積	0	18830	18460	18645	20060	20170	20115	0.93	
		鶏の卵	0.01	0.03	0.01	0.0002	面積	0	13920	12600	13260	14690	13790	14240	0.93	
		鶏の卵	0.01	0.03	0.03	0.0006	面積	0	67420	66020	66720	71340	69170	70255	0.95	
		乳	0.01	0.05	0.01	0.0002	面積	0	13780	13120	13450	13790	15070	14430	0.93	
		乳	0.01	0.05	0.05	0.001	面積	0	101600	99770	100685	107100	108600	107850	0.93	
		はちみつ	0.005	0.005	0.005	0.0002	面積	0	21560	21380	21470	21790	21750	21770	0.99	

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

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

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

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

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

表 8 補正真度

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	基準値 <sup>*1</sup> (ppm)	添加濃度 (ppm)	真度 (%)	ピーク面積 比 (%)	補正真度 (%)	備考
1	フルメトリン	牛の筋肉	0.01	0.2	0.01	91.8	0.90	102.5	
		牛の筋肉	0.01	0.2	0.2	86.2	0.92	94.1	
		牛の脂肪	0.01	0.2	0.01	94.2	0.94	100.4	
		牛の脂肪	0.01	0.2	0.2	87.3	0.92	95.2	
		牛の肝臓	0.01	0.05	0.01	84.5	0.94	89.9	
		牛の肝臓	0.01	0.05	0.05	82.9	0.91	91.1	
		鶏の筋肉	0.01	0.01	0.01	86.6	0.93	93.4	
		鶏の卵	0.01	0.03	0.01	89.6	0.93	96.2	
		鶏の卵	0.01	0.03	0.03	85.7	0.95	90.2	
		乳	0.01	0.05	0.01	92.7	0.93	99.4	
		乳	0.01	0.05	0.05	92.0	0.93	98.6	
		はちみつ	0.005	0.005	0.005	86.2	0.99	87.4	

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

#### 4. 考察

抽出はフルメトリンの溶解性及び脂肪組織との混和性を考慮しアセトンを用いた。脱脂操作として、アセトニトリル/ヘキサン分配を検討したところ、良好な結果が得られた。精製カラムについて、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムを検討したところ、良好な結果が得られた。

開発した方法を用いて、牛の筋肉等7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、フルメトリンの真度は82.9~94.2%、併行精度は0.7~4.8%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、鶏卵、はちみつ等の畜産物に適応可能であると判断された。

#### [結論]

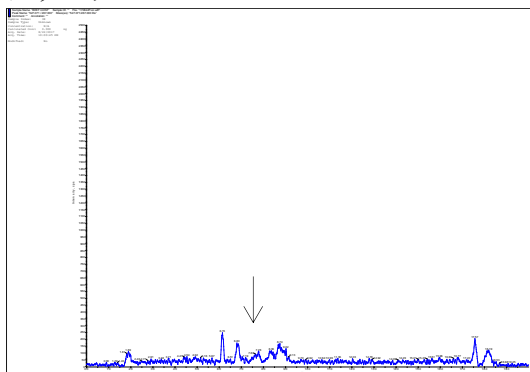
畜産物中のフルメトリンの試験法として、フルメトリンを試料からアセトンで抽出し、アセトニトリル/ヘキサン分配で脱脂した(はちみつの場合は省略)。オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムで精製した後、LC-MS/MSで定量及び確認する方法を開発した。

開発した試験法を牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、鶏の筋肉、鶏の卵、乳及びはちみつに適用した結果、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、フルメトリンの真度は82.9~94.2%、併行精度は0.7~4.8%、定量限界は0.01 mg/kg(はちみつの場合は0.005 mg/kg)が可能であることが確認できた。

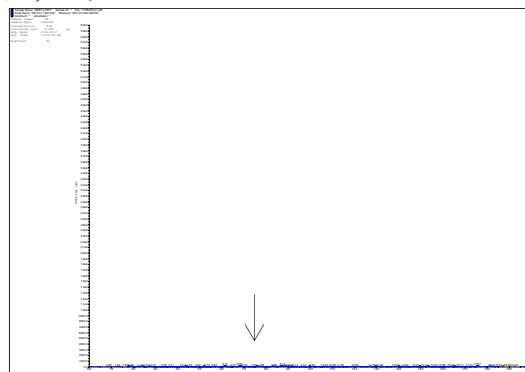
#### [参考文献]

なし

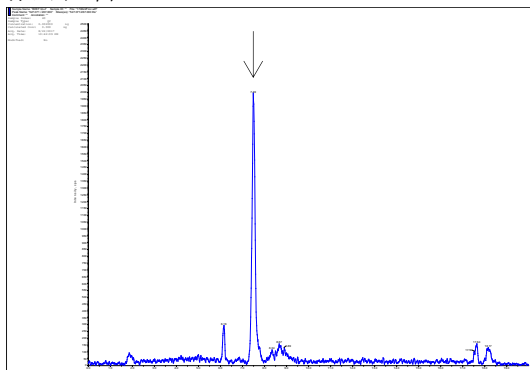
フルメトリンの添加回収試験におけるクロマトグラム  
ブランク



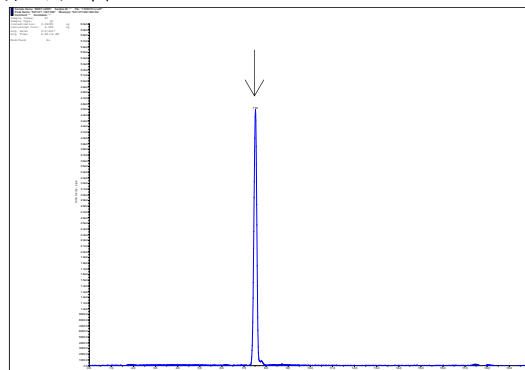
ブランク



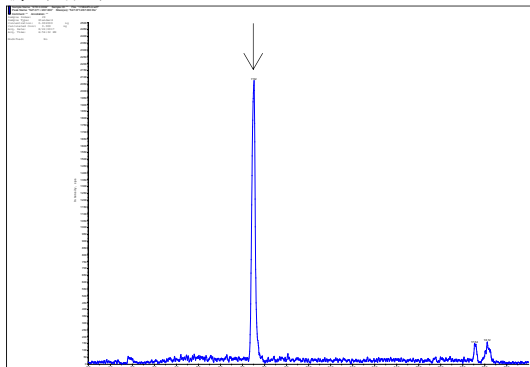
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

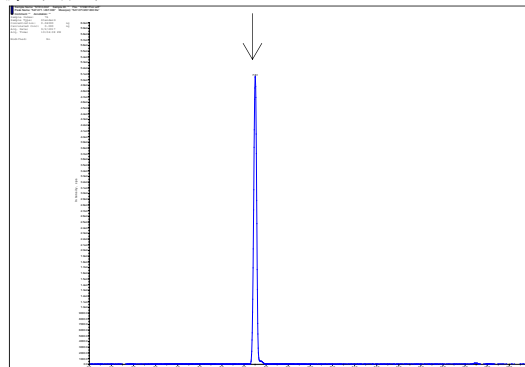


図 6-1 牛の筋肉の SRM クロマトグラム  
フルメトリン

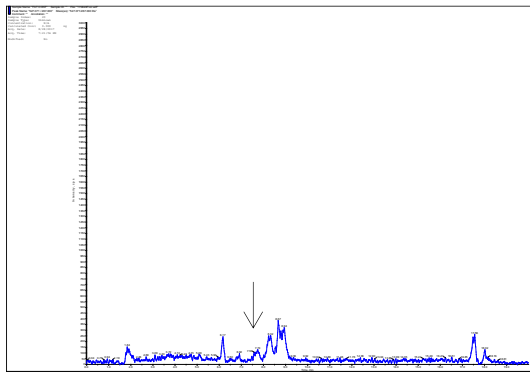
( $m/z$  +527→269)  
添加濃度 : 0.01 ppm

図 6-2 牛の筋肉の SRM クロマトグラム  
フルメトリン

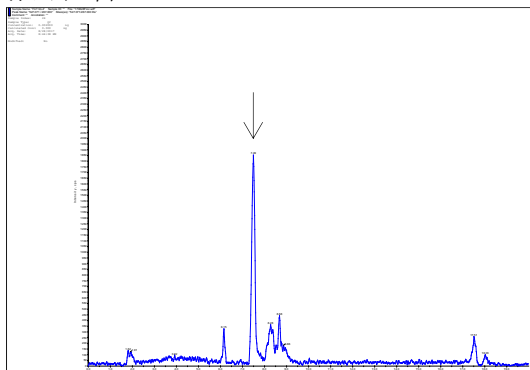
( $m/z$  +527→269)  
添加濃度 : 0.2 ppm



ブランク



添加試料



標準溶液

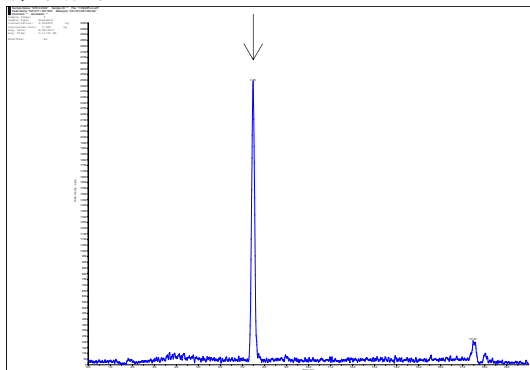
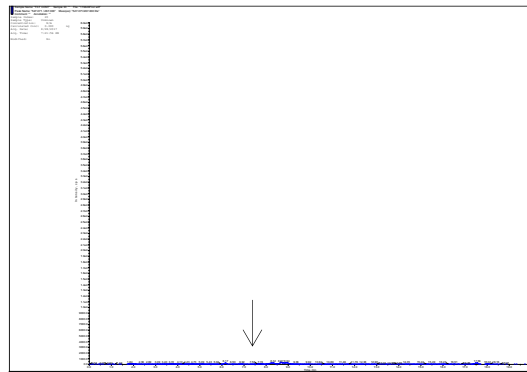
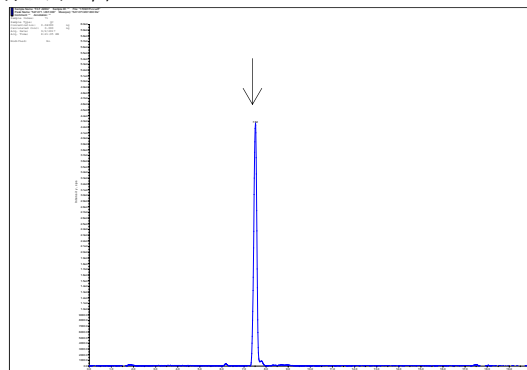


図 6-3 牛の脂肪の SRM クロマトグラム  
フルメトリン  
( $m/z$  +527→269)  
添加濃度 : 0.01 ppm

ブランク



添加試料



標準溶液

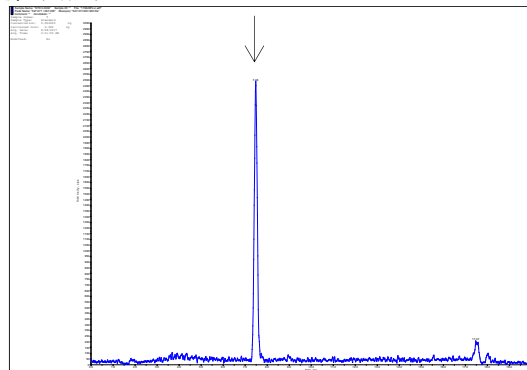
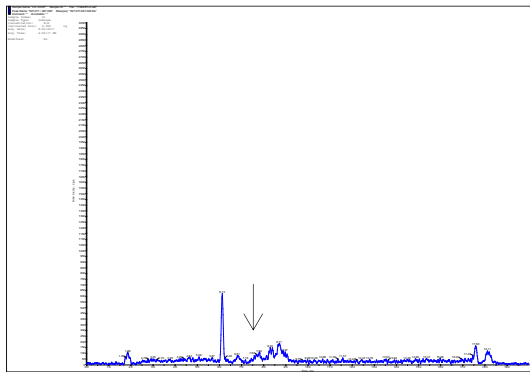
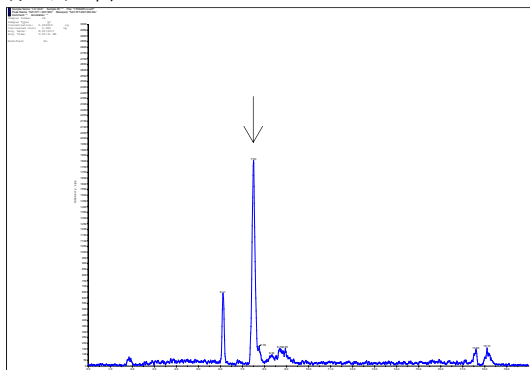


図 6-4 牛の脂肪の SRM クロマトグラム  
フルメトリン  
( $m/z$  +527→269)  
添加濃度 : 0.2 ppm

ブランク



添加試料



標準溶液

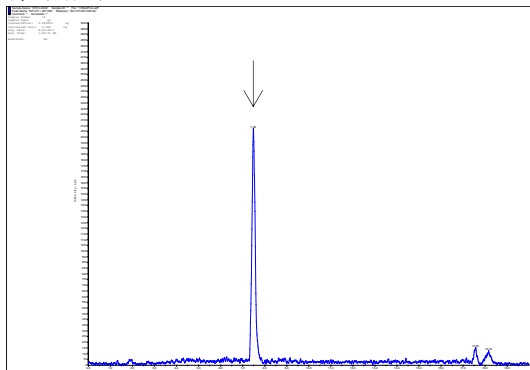
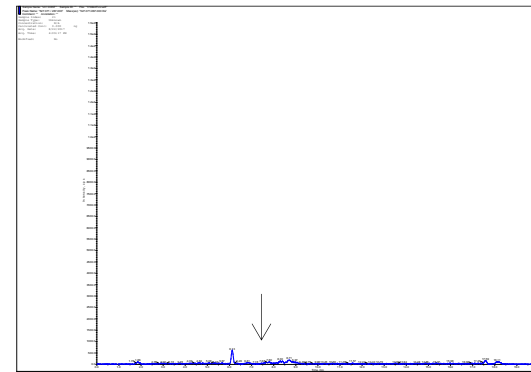
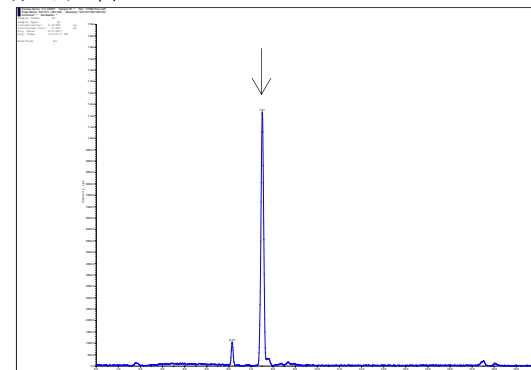


図 6-5 牛の肝臓の SRM クロマトグラム  
フルメトリン  
( $m/z$  +527→269)  
添加濃度 : 0.01 ppm

ブランク



添加試料



標準溶液

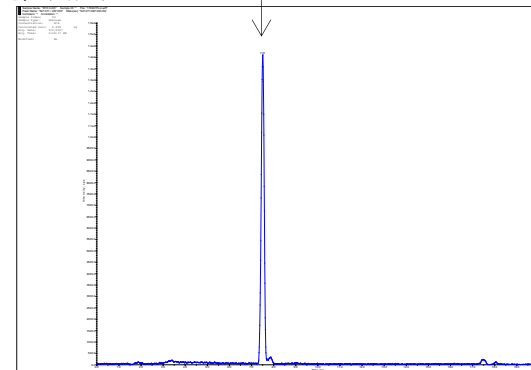
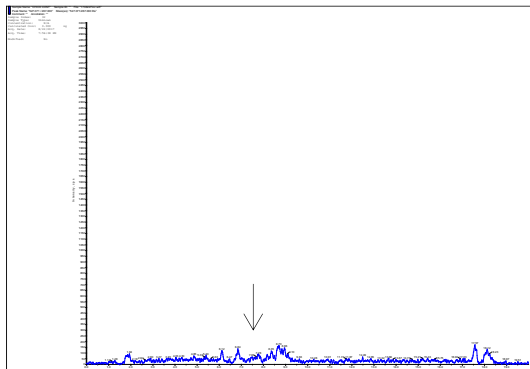
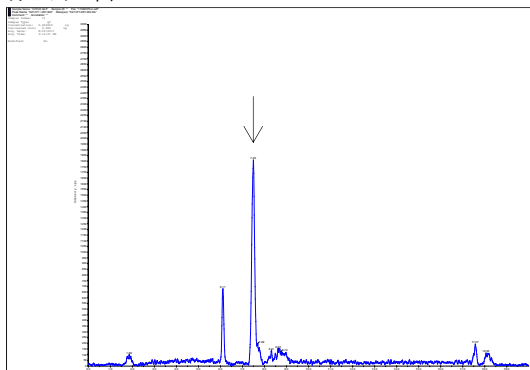


図 6-6 牛の肝臓の SRM クロマトグラム  
フルメトリン  
( $m/z$  +527→269)  
添加濃度 : 0.05 ppm

ブランク



添加試料



標準溶液

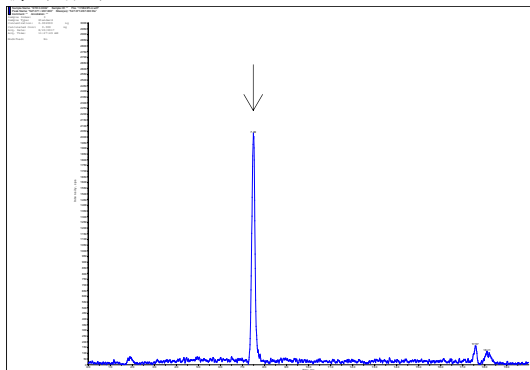
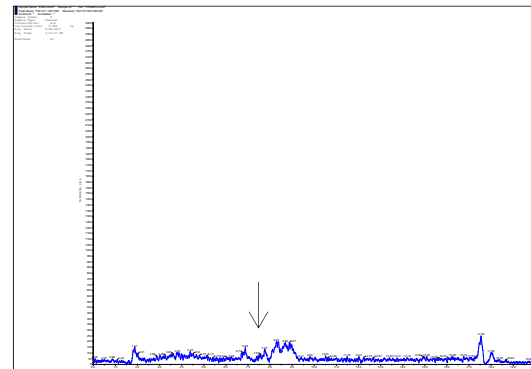
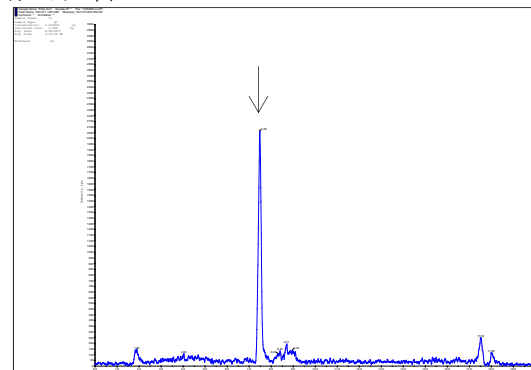


図 6-7 鶏の筋肉の SRM クロマトグラム  
フルメトリン  
( $m/z$  +527→269)  
添加濃度 : 0.01 ppm

ブランク



添加試料



標準溶液

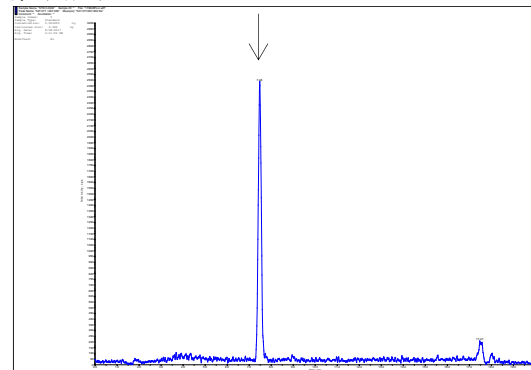
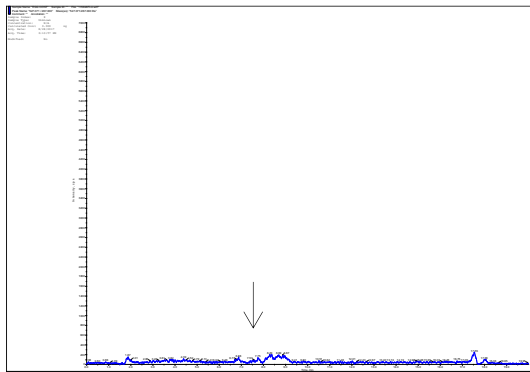
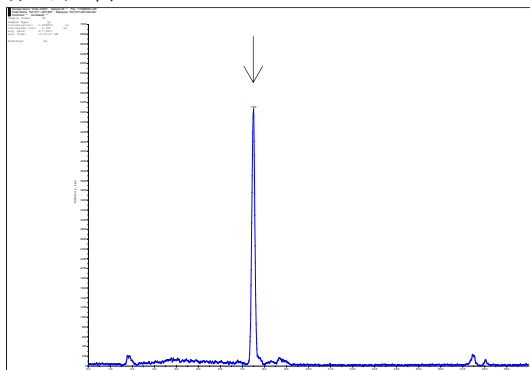


図 6-8 鶏の卵の SRM クロマトグラム  
フルメトリン  
( $m/z$  +527→269)  
添加濃度 : 0.01 ppm

ブランク



添加試料



標準溶液

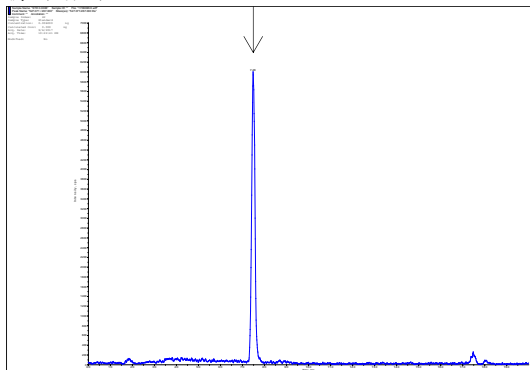
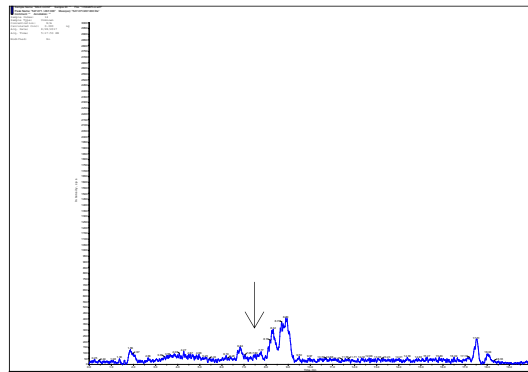
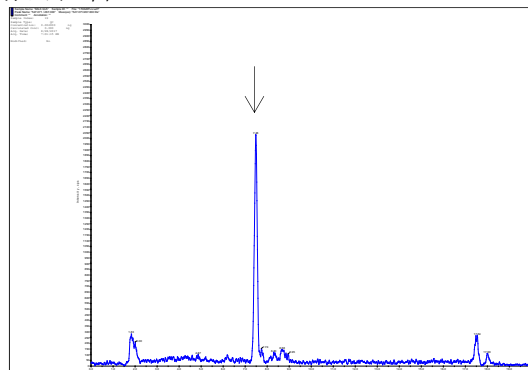


図 6-9 鶏の卵の SRM クロマトグラム  
フルメトリン  
( $m/z$  +527→269)  
添加濃度 : 0.03 ppm

ブランク



添加試料



標準溶液

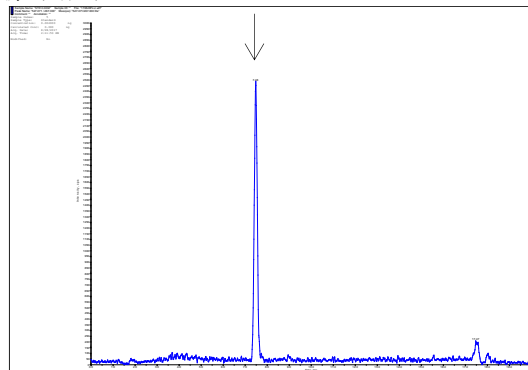
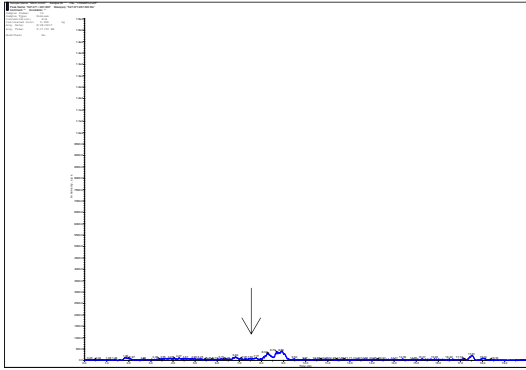
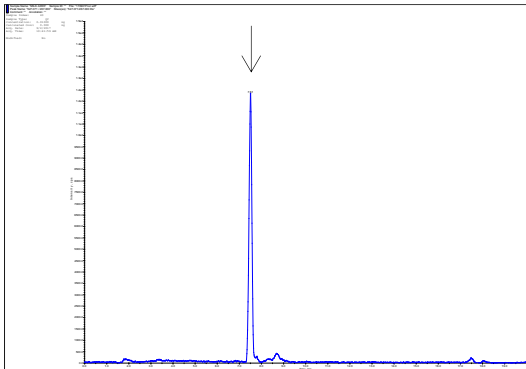


図 6-10 乳の SRM クロマトグラム  
フルメトリン  
( $m/z$  +527→269)  
添加濃度 : 0.01 ppm

ブランク



添加試料



標準溶液

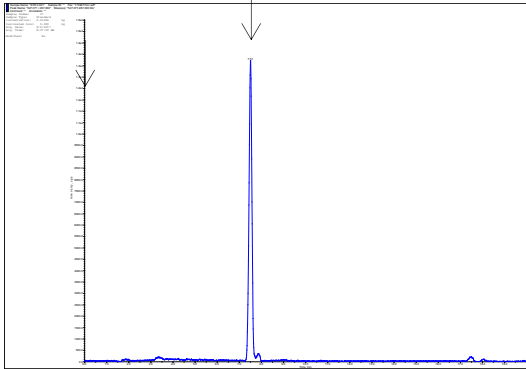
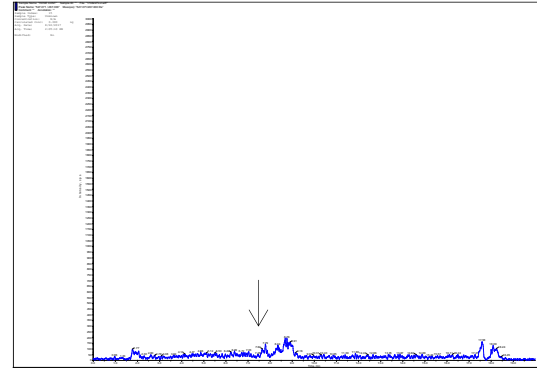
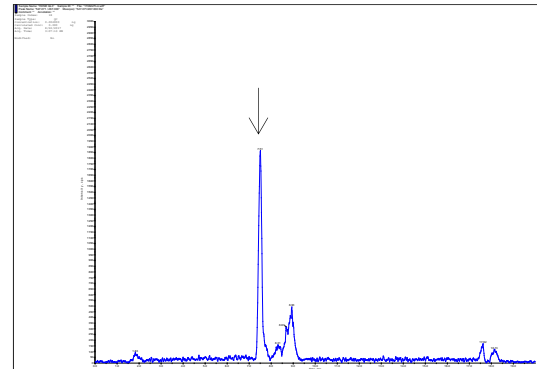


図 6-11 乳の SRM クロマトグラム  
フルメトリン  
( $m/z$  +527→269)  
添加濃度 : 0.05 ppm

ブランク



添加試料



標準溶液

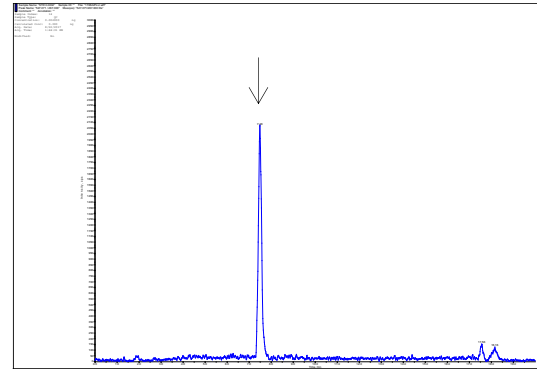
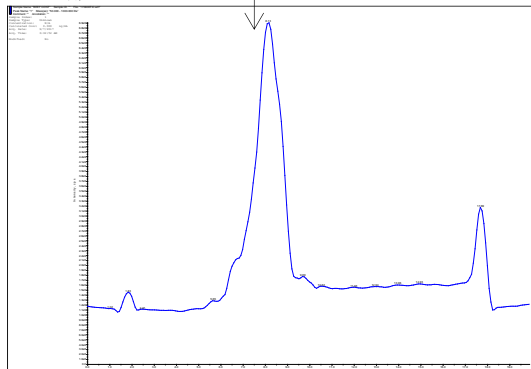
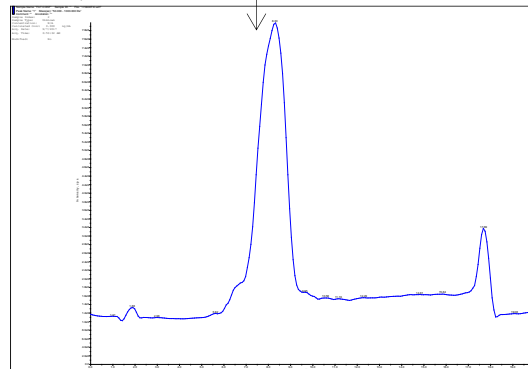


図 6-12 はちみつの SRM クロマトグラム  
フルメトリン  
( $m/z$  +527→269)  
添加濃度 : 0.005 ppm

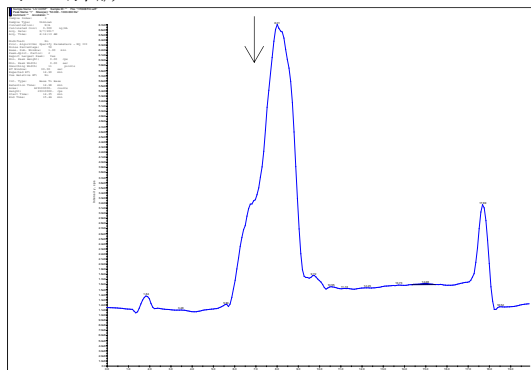
牛の筋肉



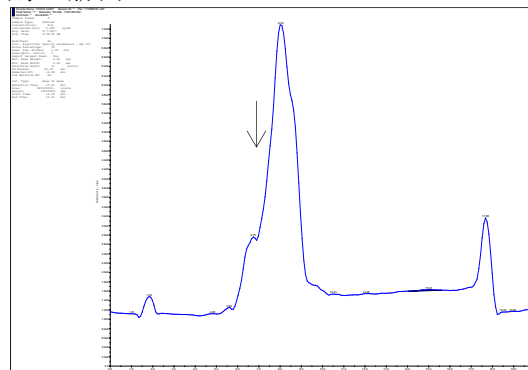
牛の脂肪



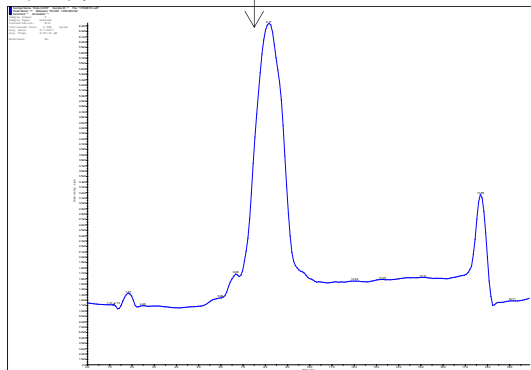
牛の肝臓



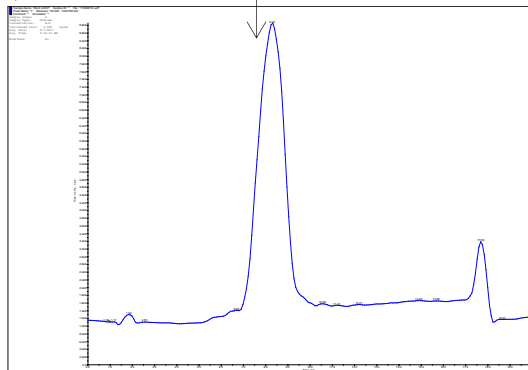
鶏の筋肉



鶏の卵



乳



はちみつ

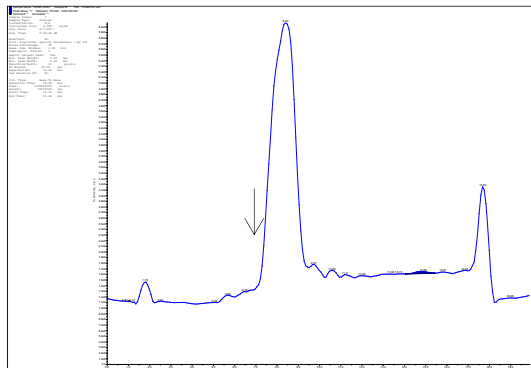


図7 ブランク試料のトータルイオンクロマトグラム  
(スキャン範囲：50～1000  $m/z$ )