

※ 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26年度

食品に残留する農薬等の成分である物質の  
試験法開発事業報告書

フェンピラザミン試験法(農産物)

## フェンピラザミン試験法(農産物)の検討結果

### [緒言]

#### 1. 目的及び試験法の検討方針等

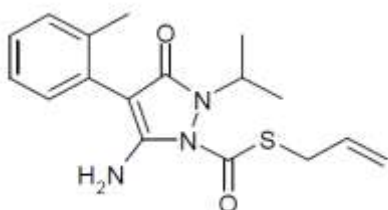
フェンピラザミンの農産物中の分析法の開発を行った。フェンピラザミンは、住友化学(株)で開発されたピラゾリン系の殺菌剤である。作用機構として、エルゴステロール生合成経路を阻害することにより、病原菌の胞子発芽管の伸長と菌糸生育に対する阻害作用を示すものと考えられている。<sup>\*1, 2</sup>

本検討においては、通知一斉試験法[GC/MSによる農薬等の一斉試験法(農産物)またはLC/MSによる農薬等の一斉試験法 I (農産物)]の適用の可能性も考えられたが、今年度の妥当性評価の検討対象項目となっていることから、通知一斉試験法適用の可否の評価はそちらに委ね、ここでは新たに個別試験法を開発することとした。

#### 2. 分析対象化合物の構造式及び物理化学的性質<sup>\*1, 3</sup>

分析対象化合物: フェンピラザミン

構造式:



分子式: C<sub>17</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>S

分子量: 331.43

化学名: S-allyl 5-amino-2,3-dihydro-2-isopropyl-3-oxo-4-(o-tolyl)pyrazole-1-carbothioate (IUPAC)、  
S-2-propen-1-yl 5-amino-2,3-dihydro-2-(1-methylethyl)-4-(2-methylphenyl)-3-oxo-1H-pyrazole-1-carbothioate (CAS)

外観: 白色、固体粉末

融点: 116.4°C (389.6 K)

沸点: 239.8°C (513.0 K)

蒸気圧: 2.89 × 10<sup>-8</sup> Pa (25°C)

溶解性: 水 20.4 mg/L (20±0.5°C、pH 7.14)

n-ヘキサン 902 mg/L

アセトン > 250 g/L

メタノール > 250 g/L

酢酸エチル > 250 g/L

1-オクタノール/水分配係数(log Pow): 3.52 (25±1°C、pH 7.2)

解離定数(pKa): pH 1~pH 13 の範囲において解離せず

安定性:

| 加水分解性 | 半減期 | 安定      | (pH, 温度)    |
|-------|-----|---------|-------------|
|       |     | 2,503 日 | (pH4, 50°C) |
|       |     | 1,145 日 | (pH7, 20°C) |
|       |     | 32.6 日  | (pH7, 25°C) |
|       |     | 24 日    | (pH7, 50°C) |
|       |     | 11 日    | (pH9, 20°C) |
|       |     | 25 時間   | (pH9, 25°C) |
|       |     | 7 時間    | (pH9, 40°C) |
|       |     |         | (pH9, 50°C) |

水中光分解性 半減期 5.8-5.9 日(東京春季太陽光換算 11.8-12.0 日)  
 (滅菌自然水、25°C、15.8W/m<sup>2</sup>、300-400nm)  
 1.6-1.7 日(東京春季太陽光換算 5.2-5.5 日)  
 (滅菌緩衝液、25°C、25.4W/m<sup>2</sup>、300-400nm)

熱安定性 熱に対して安定 ( ≤230°C)

### 3. 基準値

|                   |         |
|-------------------|---------|
| トマト               | 5 ppm   |
| なす                | 2 ppm   |
| きゅうり(ガーキンを含む)     | 0.7 ppm |
| みかん               | 0.1 ppm |
| なつみかんの果実全体        | 5 ppm   |
| レモン               | 5 ppm   |
| オレンジ(ネーブルオレンジを含む) | 5 ppm   |
| グレープフルーツ          | 5 ppm   |
| ライム               | 5 ppm   |
| その他のかんきつ類果実       | 5 ppm   |
| いちご               | 10 ppm  |
| ぶどう               | 10 ppm  |
| その他のスパイス          | 15 ppm  |

施行通知 食安発 0702 第 1 号(平成 25 年 7 月 2 日)

#### [出典]

- \* 1 独立行政法人農林水産消費安全技術センター(FAMIC) フェンピラザミン農薬抄録  
<http://www.acis.famic.go.jp/syouroku/fenpyrazamine/index.htm>
- \* 2 厚生労働省 薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会農薬・動物用医薬品部会報告 フェンピラザミン  
<http://www.mhlw.go.jp/shingi/2004/04/s0420-4.html>
- \* 3 環境省 水産動植物の被害防止に係る農薬登録保留基準について フェンピラザミン評価書  
<https://www.env.go.jp/water/sui-kaitei/kijun.html>

## 【実験方法】

### 1. 試料

検討に用いた試料は、新潟県内の小売店で購入した。玄米、大豆、キャベツ、ぶどう(ピオーネ)は新潟県産、ばれいしょは北海道産、なすは高知県産、ほうれんそうは千葉県産、オレンジ(ネーブルオレンジ)はオーストラリア産である。ぶどうのみ、検討を行った時期に生鮮品の入手が困難であったため、冷凍保存品を用いた。

試料の採取方法を以下に記載した。

#### (1) 玄米

試料をミルを用いて 425  $\mu\text{m}$  の標準網ふるいを通して均一化した。

#### (2) 大豆

試料をミルを用いて 425  $\mu\text{m}$  の標準網ふるいを通して均一化した。

#### (3) ばれいしょ(泥を水で軽く洗い落としたもの)

試料を包丁で 2 cm 程度に切った後、クッキングカッターを用いて細切均一化した。

#### (4) キャベツ(外側変質葉及びしんを除去したもの)

試料を包丁で 2 cm 程度に切った後、クッキングカッターを用いて細切均一化した。

#### (5) なす(へたを除去したもの)

試料を包丁で 2 cm 程度に切った後、クッキングカッターを用いて細切均一化した。

#### (6) ほうれんそう(赤色根部を含み、ひげ根及び変質葉を除去したもの)

試料を包丁で 2 cm 程度に切った後、クッキングカッターを用いて細切均一化した。

#### (7) オレンジ(果実全体)

試料を包丁で 2 cm 程度に切った後、クッキングカッターを用いて細切均一化した。

#### (8) ぶどう

果梗を除去した状態でポリ袋に密封し、 $-30^{\circ}\text{C}$  で約3か月間保存してあったものを、室温に放置して解凍し、クッキングカッターを用いて細切均一化した。

### 2. 試薬・試液

フェンピラザミン標準品：純度 99.9% (和光純薬工業(株)製)

アセトン、*n*-ヘキサン：残留農薬試験用 (関東化学株(株)製)

酢酸エチル：残留農薬試験用 (和光純薬工業(株)製)

アセトニトリル：残留農薬試験用または高速液体クロマトグラフ用 (関東化学株(株)製)

メタノール：LC/MS 用 (和光純薬工業(株)製)

ケイソウ土：セライト No.545 (和光純薬工業(株)製)

エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラム：InertSep PSA (500 mg / 6 mL、ジーエルサイエンス(株)製)

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム：Bond Elut C18 (1g / 6 mL、Agilent Technologies 製)

グラファイトカーボンミニカラム：Supelclean ENVI-Carb (500 mg / 6 mL、Sigma-Aldrich 製)

グラファイトカーボン/アミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム：Supelclean ENVI-Carb/LC-NH2 (500 mg / 500 mg / 6 mL、Sigma-Aldrich 製)

グラファイトカーボン/エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム：InertSep GC/PSA (500 mg / 500 mg / 6mL、ジーエルサイエンス(株)製)

合成ケイ酸マグネシウムミニカラム：InertSep FL-PR(1,000 mg / 6 mL、ジーエルサイエンス(株)製)

ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム：Oasis HLB(500 mg / 6 mL、Waters 製)

シリカゲルミニカラム：InertSep SI(500 mg / 6 mL、ジーエルサイエンス(株)製)

その他の試薬：特級(和光純薬工業(株)製)

標準原液：フェンピラザミン標準品 20 mg を精秤し、アセトニトリルで溶解して 1,000 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(7:3)混液で適宜希釈し、0.000125~0.00075 mg/L の濃度の溶液を調製した。または、標準原液をアセトンで適宜希釈し、0.0125~0.075 mg/L の濃度の溶

液を調製した。

添加用標準溶液： 標準原液をアセトニトリルで希釈して 10 mg/L 及び 0.5 mg/L 溶液を調製した。

### 3. 装置

ホモジナイザー： ULTRA-TURRAX T25 (IKA 製)

粉碎器： MILLSER-II IFM-200 (岩谷産業(株)製)、

クッキングカッター： CQM-62 ((株)東芝製)

濃縮装置： ロータリーエバポレーターN1100 (東京理化工機(株)製)、

試験管濃縮装置： ドライサーモユニット DTU-1B (タイテック(株)製)

遠心分離器： ユニバーサル冷却遠心機 5930 (久保田商事(株)製)

振とう器： SR-2DW (タイテック(株)製)

#### LC-MS/MS

| 装置    | 型式              | 会社     |
|-------|-----------------|--------|
| MS    | XEVO-TQD        | Waters |
| LC    | Acquity I Class | Waters |
| データ処理 | MassLynx        | Waters |

#### GC-MS/MS

| 装置    | 型式            | 会社       |
|-------|---------------|----------|
| MS    | TQ-8040       | (株)島津製作所 |
| GC    | GC-2010Plus   | (株)島津製作所 |
| データ処理 | GCMS Solution | (株)島津製作所 |

### 4. 測定条件

#### LC-MS/MS

| LC条件           |   |        |        |        |     |    |    |      |    |    |      |    |    |      |    |    |      |    |    |
|----------------|---|--------|--------|--------|-----|----|----|------|----|----|------|----|----|------|----|----|------|----|----|
| カラム            | XTerra MS C18 (内径 2.1 mm、長さ150 mm、粒子径3.5 μm :Waters製)   |        |        |        |     |    |    |      |    |    |      |    |    |      |    |    |      |    |    |
| 移動相流速 (mL/min) | 0.20  |        |        |        |     |    |    |      |    |    |      |    |    |      |    |    |      |    |    |
| 注入量 (μL)       | 5   |        |        |        |     |    |    |      |    |    |      |    |    |      |    |    |      |    |    |
| カラム温度 (°C)     | 40  |        |        |        |     |    |    |      |    |    |      |    |    |      |    |    |      |    |    |
| 移動相            | A液: 0.1 vol% ギ酸<br>B液: アセトニトリル  |        |        |        |     |    |    |      |    |    |      |    |    |      |    |    |      |    |    |
| グラジエント条件       | <table border="1"> <thead> <tr> <th>時間(分)</th> <th>A液 (%)</th> <th>B液 (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.0</td> <td>70</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>10.0</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>15.0</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>15.1</td> <td>70</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>19.0</td> <td>70</td> <td>30</td> </tr> </tbody> </table> | 時間(分)  | A液 (%) | B液 (%) | 0.0 | 70 | 30 | 10.0 | 10 | 90 | 15.0 | 10 | 90 | 15.1 | 70 | 30 | 19.0 | 70 | 30 |
| 時間(分)          | A液 (%)  | B液 (%) |        |        |     |    |    |      |    |    |      |    |    |      |    |    |      |    |    |
| 0.0            | 70  | 30     |        |        |     |    |    |      |    |    |      |    |    |      |    |    |      |    |    |
| 10.0           | 10  | 90     |        |        |     |    |    |      |    |    |      |    |    |      |    |    |      |    |    |
| 15.0           | 10  | 90     |        |        |     |    |    |      |    |    |      |    |    |      |    |    |      |    |    |
| 15.1           | 70  | 30     |        |        |     |    |    |      |    |    |      |    |    |      |    |    |      |    |    |
| 19.0           | 70  | 30     |        |        |     |    |    |      |    |    |      |    |    |      |    |    |      |    |    |

| MS条件       |  |
|------------|--|
| 測定モード      | SRM、選択反応モニタリング<br>(ブランクのスキャン測定範囲: 50~1000 amu)   |
| イオン化モード    | ESI(+)   |
| キャピラリ電圧(V) | 1000   |
| ソース温度(°C)  | 150  |
| 脱溶媒温度(°C)  | 300  |
| コーンガス      | 窒素、50 L/hr   |
| 脱溶媒ガス      | 窒素、900 L/hr  |
| コリジョンガス    | アルゴン   |
| 定量イオン(m/z) | SRM:+332.1→230.4[コーン電圧(33 V)、コリジョンエネルギー(19 e V)]   |
| 定性イオン(m/z) | SRM:+332.1→189.2[コーン電圧(33 V)、コリジョンエネルギー(29 e V)]、+332.1→216.1[コーン電圧(33 V)、コリジョンエネルギー(29 e V)]、 |
| 保持時間(min)  | 7.7  |

#### GC-MS/MS

| GC条件                  |  |
|-----------------------|--|
| カラム                   | Rxi-5Sil MS(内径 0.25 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25 µm:Restek製)             |
| ガードカラム                |  |
| カラム温度(°C)             | 80°C(1 min)–20°C/min–300°C(10 min)                             |
| 注入口温度(°C)             | 250  |
| インターフェース温度(°C)        | 250  |
| キャリアーガス               | ヘリウム   |
| キャリアーガス流量<br>(mL/min) | 1.64   |
| 注入法                   | スプリットレス法   |
| 注入量(µL)               | 1  |
| MS条件                  |  |
| 測定モード                 | SIM、選択イオンモニタリング又はSRM、選択反応モニタリング<br>(ブランクのスキャン測定範囲: 70~500 amu) |
| イオン化法                 | EI(+)  |
| イオン化エネルギー(eV)         | 70   |
| EM電圧(V)               | オートチューニングでの設定値+0.15kV  |
| イオン源温度(°C)            | 200  |
| コリジョンガス               | アルゴン(MS/MSの場合)   |
| 定量イオン(m/z)            | SIMの場合230.0<br>SRMの場合 331.0→230.2[コリジョンエネルギー(10 eV)]           |
| 定性イオン(m/z)            | SIMの場合331.0<br>SRMの場合 230.0→132.1[コリジョンエネルギー(10 eV)]           |
| 保持時間(min)             | 12.0   |

#### 5. 定量

フェンピラザミン標準品 20 mg を精秤し、アセトニトリルに溶解して 1,000 mg/L 溶液 (標準原液) を調製した。標準原液をアセトニトリル/水 (7:3) 混液で希釈して、0.000125、0.00025、0.000375、0.0005、0.000625、0.00075 mg/L の濃度の溶液を調製した。この溶液 5  $\mu$ L 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  $\mu$ L 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ピラザミンの含量を算出した。

または、標準原液をアセトンで希釈して、0.0125、0.025、0.0375、0.05、0.0625、0.075 mg/L の濃度の溶液を調製した。この溶液 1  $\mu$ L を GC-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 1  $\mu$ L 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ピラザミンの含量を算出した。

## 6. 添加試料の調製

玄米 (添加濃度: 0.01 ppm): 試料 10.0 g に添加用標準溶液 (0.5 mg/L) 0.2 mL を添加しよく混合した後、30 分間放置した。

大豆 (添加濃度: 0.01 ppm): 試料 10.0 g に添加用標準溶液 (0.5 mg/L) 0.2 mL を添加しよく混合した後、30 分間放置した。

ばれいしょ (添加濃度: 0.01 ppm): 細切均一化前の試料 200.0 g に添加用標準溶液 (10 mg/L) 0.2 mL を添加しクッキングカッターで細切均一化後、20.0 g をはかりとり、30 分間放置した。

キャベツ (添加濃度: 0.01 ppm): 細切均一化前の試料 200.0 g に添加用標準溶液 (10 mg/L) 0.2 mL を添加しクッキングカッターで細切均一化後、20.0 g をはかりとり、30 分間放置した。

なす (添加濃度: 0.01 ppm): 細切均一化前の試料 200.0 g に添加用標準溶液 (10 mg/L) 0.2 mL を添加しクッキングカッターで細切均一化後、20.0 g をはかりとり、30 分間放置した。

なす (添加濃度: 2 ppm): 細切均一化前の試料 200.0 g に標準原液 (1000 mg/L) 0.4 mL を添加しクッキングカッターで細切均一化後、20.0 g をはかりとり、30 分間放置した。

ほうれんそう (添加濃度: 0.01 ppm): 細切均一化前の試料 200.0 g に添加用標準溶液 (10 mg/L) 0.2 mL を添加しクッキングカッターで細切均一化後、20.0 g をはかりとり、30 分間放置した。

オレンジ (添加濃度: 0.01 ppm): 細切均一化前の試料 200.0 g に添加用標準溶液 (10 mg/L) 0.2 mL を添加しクッキングカッターで細切均一化後、20.0 g をはかりとり、30 分間放置した。

オレンジ (添加濃度: 5 ppm): 細切均一化前の試料 200.0 g に標準原液 (1000 mg/L) 1 mL を添加しクッキングカッターで細切均一化後、20.0 g をはかりとり、30 分間放置した。

ぶどう (添加濃度: 0.01 ppm): 細切均一化前の試料 200.0 g に添加用標準溶液 (10 mg/L) 0.2 mL を添加しクッキングカッターで細切均一化後、かき混ぜながら均一になるように十分注意して 20.0 g をはかりとり、30 分間放置した。

ぶどう (添加濃度: 10 ppm): 細切均一化前の試料 200.0 g に標準原液 (1000 mg/L) 2 mL を添加しクッキングカッターで細切均一化後、かき混ぜながら均一になるように十分注意して 20.0 g をはかりとり、30 分間放置した。

## 7. 試験溶液の調製

### 概要

フェンピラザミンを試料からアセトンで抽出し、ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムで精製した後、LC-MS/MS で定量及び確認した。

または、同様に抽出し、*n*-ヘキサンで転溶後、エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムで精製した後、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムで脱脂し、GC-MS/(MS) で定量及び確認した。

### LC-MS/MS による試験法

#### (1) 抽出

野菜及び果実の場合は試料 20.0 g を 350 mL 遠沈管に採った。穀類及び豆類の場合は試料 10.0 g を 350 mL 遠沈管に採り、水 20 mL を加え、30 分間放置した。これにアセトン 100 mL を加えてホモジナイズした後、ケイソウ土を 1 cm の厚さに敷いたガラスろ過器 (直径 40 mm、11G-4) を用いて吸引ろ過した。ろ過器上の残留物にアセトン 50 mL を加えてホモジナイズし、上記と同様にろ過した\*。ろ液を合わせ、アセトンを加えて正確

に 200 mL とした。野菜及び果実の場合は、この液 5 mL をとり、水 10 mL を加えて混和した。穀類及び豆類の場合は、この液 10 mL をとり、水 20 mL を加えて混和した。

\* ぶどうは、吸引ろ過に替えて遠心分離(3,000 rpm、5 分間)を行った。

## (2) 精製

### ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体カラムクロマトグラフィー

ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム[Oasis HLB(500 mg / 6 mL)]にアセトニトリル 10 mL を注入し、流出液は捨てた。次いで水 10 mL を注入し、流出液は捨てた。このカラムに、(1)で得られた溶液を注入し、流出液は捨てた。容器をアセトニトリル及び水(3:7)混液 2 mL で 2 回洗浄し、洗浄液をカラムに注入した後、さらにアセトニトリル及び水(3:7)混液 6 mL をカラムに注入し、流出液は捨てた。次いで、アセトニトリル及び水(7:3)混液 10 mL を注入し、溶出液を採り、アセトニトリル及び水(7:3)混液で正確に 10 mL としたものを試験溶液とした。

なお、なす(添加濃度:2ppm)、オレンジ(添加濃度:5ppm)及びぶどう(添加濃度:10ppm)については、得られた試験溶液をアセトニトリル及び水(7:3)混液で希釈して測定した。希釈倍率は、それぞれ 200 倍、500 倍、1000 倍とした。

## GC-MS(MS)による試験法

### (1) 抽出

野菜及び果実の場合は試料 20.0 g を 350 mL 遠沈管に採った。穀類及び豆類の場合は試料 10.0 g を 350 mL 遠沈管に採り、水 20 mL を加え、30 分間放置した。これにアセトン 100 mL を加えてホモジナイズした後、ケイソウ土を 1 cm の厚さに敷いたガラスろ過器(直径 40 mm、11G-4)を用いて吸引ろ過した。ろ過器上の残留物にアセトン 50 mL を加えてホモジナイズし、上記と同様にろ過した\*。ろ液を合わせ、アセトンを加えて正確に 200 mL とした。この液 100 mL をとり、ロータリーエバポレーターを用いて 40°C 以下で濃縮し、約 20 mL とした。これに 10w/v% 塩化ナトリウム溶液 100 mL を加え、*n*-ヘキサン 100 mL 及び 50 mL で 2 回振とう抽出した。抽出液を、グラスウールを詰めて無水硫酸ナトリウム約 20 g を載せたロートに通液して脱水し、無水硫酸ナトリウムを *n*-ヘキサン約 20 mL で洗浄して抽出液と合わせた。この液をロータリーエバポレーターを用いて 40°C 以下で約 2 mL まで濃縮した。

\* ぶどうは、吸引ろ過に替えて遠心分離(3,000 rpm、5 分間)を行った。

### (2) 精製

#### ① エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルカラムクロマトグラフィー

エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラム[InertSep PSA (500 mg / 6 mL)]\*\*に *n*-ヘキサン 10 mL を注入し、流出液は捨てた。このカラムに、(1)で得られた溶液を注入し、流出液は捨てた。容器を *n*-ヘキサン 2 mL で 2 回洗浄し、洗浄液をカラムに注入した後、さらに *n*-ヘキサン 6 mL をカラムに注入し、流出液は捨てた。次いでアセトン及び *n*-ヘキサン(1:9)混液 10 mL を注入し、溶出液を採り、試験管濃縮装置を用いて 40°C 以下で窒素吹きつけにより溶媒を除去した。野菜及び果実(オレンジを除く)の場合はこの残留物にアセトン 2 mL を正確に加えて溶解し、試験溶液とした。穀類、豆類及びオレンジの場合はこの残留物にアセトニトリル 1 mL を加えて溶解し、②の精製を行った。

なお、なす(添加濃度:2ppm)及びぶどう(添加濃度:10ppm)については、得られた試験溶液をアセトンで希釈して測定した。希釈倍率はそれぞれ 200 倍、1000 倍とした。

\*\* ほうれんそうは、エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムに替えて、グラファイトカーボン/エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム[InertSep GC/PSA (500 mg / 500 mg / 6 mL)]を用いて同様に操作した。

#### ② オクタデシルシリル化シリカゲルカラムクロマトグラフィー

穀類、豆類及びオレンジの場合、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム[Bond Elut C18 (1 g / 6 mL)]にアセトニトリル 10 mL を注入し、流出液は捨てた。このカラムに、①で得られた溶液を注入した後、



容器をアセトニトリル 1 mL で 2 回洗浄して洗浄液を注入し、さらにアセトニトリル 2 mL を注入し、負荷時を含めた全溶出液を採り、試験管濃縮装置を用いて 40°C以下で窒素吹きつけにより溶媒を除去した。オレンジの場合は、この残留物にアセトン 2 mL を正確に加えて溶解し、試験溶液とした。穀類及び豆類の場合は、この残留物にアセトン 1 mL を正確に加えて溶解し、試験溶液とした。

なお、オレンジ(添加濃度:5ppm)については、得られた試験溶液をアセトンで 500 倍希釈して測定した。

[分析法フローチャート]

秤 取

- ↓ 野菜、果実: 試料 20.0 g
- ↓ 穀類、豆類: 試料 10.0 g に水 20 mL を加え 30 分間放置

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(ぶどうは遠心分離(3,000 rpm、5分間))
- ↓ 残留物はアセトン 50 mL を加えホモジナイズ
- ↓ 吸引ろ過(ぶどうは遠心分離(3,000 rpm、5分間))

ろ液(ぶどうは上澄み液)を合わせ、アセトンで 200 mL 定容

野菜、果実: 5 mL 分取+水 10 mL

...①

穀類、豆類: 10 mL 分取+水 20 mL

↓  
↓

ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム

[Oasis HLB(500 mg / 6 mL)]

- ↓ アセトニトリル 10 mL でコンディショニング
- ↓ 水 10 mL でコンディショニング
- ↓ ①を注入
- ↓ アセトニトリル/水(3:7)10 mL を注入
- ↓ (うち、2 mL × 2 回容器洗い込み)(流出液捨てる)
- ↓ アセトニトリル/水(7:3)10 mL で溶出(溶出液を採取)
- ↓ アセトニトリル/水(7:3)で 10 mL 定容

試験溶液

↓  
LC-MS/MS

100 mL 分取

- ↓ 濃 縮
- ↓ 約 20 mL まで濃縮
- ↓ 転 溶
- ↓ 10%塩化ナトリウム 100 mL
- ↓ *n*-ヘキサン 1 回目 100 mL
- ↓ 2 回目 50 mL
- ↓ 振とう 5 分
- ↓ ヘキサン層
- ↓ 脱 水
- ↓ 濃 縮
- ↓ 約 2 mL まで濃縮

エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラム

[InertSep PSA (500 mg / 6 mL)]

- ↓ ほうれんそうのみ、グラファイトカーボン積層
- ↓ [InertSep GC/PSA (500 mg / 500 mg / 6 mL)]
- ↓ *n*-ヘキサン 10 mL でコンディショニング
- ↓ 濃縮液を注入
- ↓ *n*-ヘキサン 10 mL を注入
- ↓ (うち、2 mL × 2 回容器洗い込み)(流出液捨てる)
- ↓ アセトン/ *n*-ヘキサン(1:9)10 mL で溶出(溶出液を採取)

濃縮(溶媒除去)

右記以外

穀類、豆類、オレンジ

↓ 残留物をアセトニトリル 1 mL に溶解 ...②

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム

[Bond Elut C18 (1g / 6 mL)]

- ↓ アセトニトリル 10 mL でコンディショニング
- ↓ ②を注入、アセトニトリル 1 mL × 2 回容器洗い込み
- ↓ アセトニトリル 2 mL で溶出(全溶出液を採取)
- ↓ 濃縮(溶媒除去)

↓ 残留物をアセトンに溶解(野菜、果実: 2 mL、穀類、豆類: 1 mL)

試験溶液

↓  
GC-MS(/MS)

## 8. マトリックス添加標準溶液の調製

LC-MS/MS 測定用は、ブランク試験溶液 10 mL を採り、窒素吹きつけにより 9.5 mL 以下まで濃縮した後、各検討対象食品の添加回収試験における回収率 100%相当濃度の 20 倍濃度の溶媒標準溶液 0.5 mL を加え、アセトニトリル及び水(7:3)混液で 10 mL としたものをマトリックス添加標準溶液とした。

GC-MS(MS)測定用は、ブランク試験溶液と同様に抽出、精製したものを、最終段階でアセトンに溶解する操作にかえて、各検討対象食品の添加回収試験における回収率 100%相当濃度の溶媒標準溶液 2 mL(穀類、豆類は 1 mL)を加えて溶解したものをマトリックス添加標準溶液とした。

なお、なす、オレンジ及びぶどうについては、7.試験溶液の調製に記載したものと同一の希釈倍率で希釈して測定を行った。

## 【結果及び考察】

### 1. LC-MS/MS 測定条件の検討

#### (1)MS 条件の検討

MS 条件についてインフュージョン測定により検討した。ESI(+ )モードでコーン電圧 33 V とした場合に、フェンピラザミンのプロトン付加分子( $m/z$  332.1 [M+H]<sup>+</sup>)を良好に検出できたので、これをプリカーサーイオンとした。フェンピラザミンの ESI(+ )モード測定時のマススペクトル図1に示した。ESI(- )モードでは、良好なイオンを検出できなかった。

また、 $m/z$  332.1 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及び3に示した。最もイオン強度が大きい  $m/z$  +332.1→230.4 を定量用、次いでイオン強度が大きい  $m/z$  +332.1→189.2 及び  $m/z$  +332.1→216.1 を定性用の測定イオンとした。

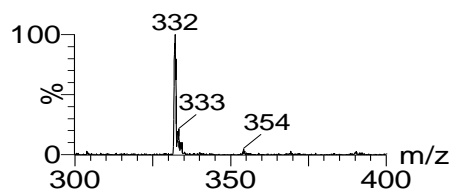


図1 フェンピラザミンのマススペクトル  
スキャン範囲: 300~400 amu  
測定条件: ESI(+ )、CV=33 V  
(CV: corn voltage)

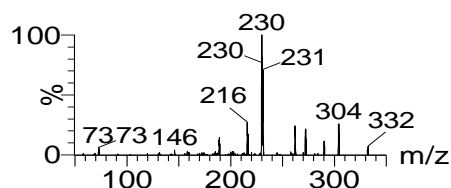


図2 フェンピラザミンのプロダクトイオン  
スペクトル(定量用)  
プリカーサーイオン:  $m/z$  332.1  
測定条件: ESI(+ )、CV=33 V、CE=19 eV  
(CV: corn voltage, CE: collision energy)

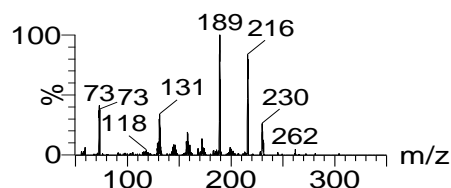


図3 フェンピラザミンのプロダクトイオン  
スペクトル(定性用)  
プリカーサーイオン:  $m/z$  332.1  
測定条件: ESI(+ )、CV=33 V、CE=29 eV  
(CV: corn voltage, CE: collision energy)

#### (2)LC 条件の検討

分析カラムについて、XTerra MS C18(内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3.5  $\mu$ m: Waters 製)を用いて検討を行った。移動相条件について、①5 mM 酢酸アンモニウム溶液と 5 mM 酢酸アンモニウム・メタノール溶液によるグラジエント条件、②0.1 vol%ギ酸とアセトニトリルによるグラジエント条件(いずれも 70:30→10:90(10 分))とを比較した。フェンピラザミンの保持時間は①では 9.6 分、②では 7.7 分であり、標準溶液

0.00005 mg/L × 5 μL 注入でいずれも S/N ≥ 10 のピークが得られた。フェンピラザミンのピーク面積は、条件①が条件②の約 70%であった。条件②の方がやや感度が良好と考えられたため、条件②を採用した。

なお、別の測定機器(Quattro Premier XE; Waters 製)での検討であるが、移動相を 5 mM 酢酸アンモニウム溶液及びアセトニトリル(1:1)とした場合と、0.1 vol%ギ酸及びアセトニトリル(1:1)とした場合とで、感度の差はほとんど無かった。

### (3) 検量線

図4にフェンピラザミン検量線の例を示した。0.000125~0.00075 mg/L の濃度範囲で作成した検量線の決定係数は、いずれの食品においても 0.99 以上であり良好な直線性を示した。

参考として 0.001~0.04 mg/L の濃度範囲についても確認したが、同様に良好な直線性を示した(図5)。

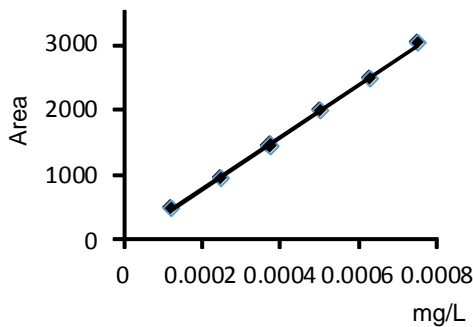


図4 フェンピラザミン検量線の例(1)

$$y = 4033990x - 36.11$$

$$r^2 = 0.9993$$

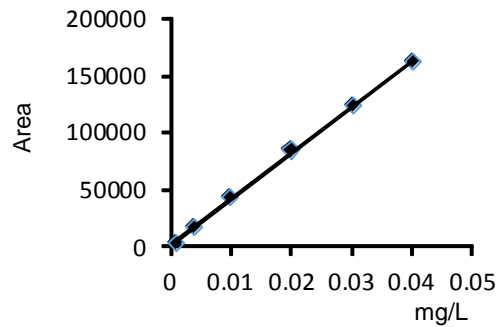


図5 フェンピラザミン検量線の例(2)

$$y = 4056015x + 1565.9$$

$$r^2 = 0.9996$$

### (4) 定量限界

定量限界の算出結果を以下に示した。

$$0.01 \text{ mg/kg} \left[ \left[ \frac{\text{試験溶液量 (10 mL)}}{\text{試験溶液中の試料量 (0.5 g)}} \right] \times \left[ \frac{\text{分析対象化合物の定量限界相当量 (0.0025 ng)}}{\text{注入量 (5 } \mu\text{L)}} \right] \right]$$

## 2. GC-MS(/MS)測定条件の検討

### (1) MS 条件の検討

フェンピラザミンのマスペクトルを図6に示した。図6から、SIM 測定では、最も強度の大きい  $m/z$  230 を定量に、次いで強度の大きいものの内、分子量の大きい  $m/z$  331 を定性に用いることとした。

また、SRM 測定条件について、プリカーサーイオンを  $m/z$  230 または  $m/z$  331 として検討した。プロダクトイオンスペクトルを図7および8に示した。図7及び8から、SRM 測定では、最もイオン強度が大きい  $m/z$  331.0 → 230.2 を定量用、次いでイオン強度が大きい  $m/z$  230.0 → 132.1 を定性用の測定イオンとした。

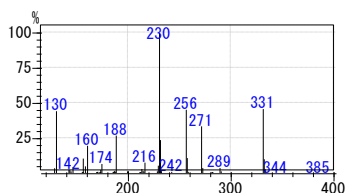


図6 フェンピラザミンのマスペクトル  
スキャン範囲: 70~400 amu

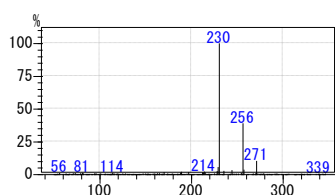


図7 フェンピラザミンのプロダクトイオン  
スペクトル(定量用)  
プリカーサーイオン:  $m/z$  331.0  
測定条件: CE=10 eV  
(CE: collision energy)

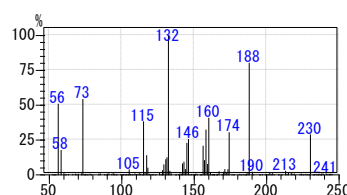


図8 フェンピラザミンのプロダクトイオン  
スペクトル(定性用)  
プリカーサーイオン:  $m/z$  230.0  
測定条件: CE=10 eV  
(CE: collision energy)

## (2) GC 条件の検討

分析カラムについて、Rxi-5Sil MS(内径 0.25 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25  $\mu\text{m}$ : Restek 製)を用いて検討した。検討を行った中で、標準溶液を繰り返し測定するとピーク面積が低下し、試料液を注入すると回復する現象が見られた(図9)。このことから、注入口インサート等へのフェンピラザミンの吸着を疑った。測定値を安定させるため、標準溶液と試料液は交互に注入して測定することとした。さらに、測定値を安定させるため、測定液にポリエチレングリコールを添加することを検討した<sup>1)</sup>。ポリエチレングリコール 300(以下、PEG)のアセトン溶液 10 g/L を調製し、フェンピラザミンの 0.05 mg/L アセトン溶液 1 mL にこれを 2~20  $\mu\text{L}$  添加して測定し、ピーク面積の変化を確認したところ、PEG 添加量が増えるにしたがってフェンピラザミンのピーク面積が大きくなった(図 10)。しかし、フェンピラザミンの直前の保持時間に出現する PEG のピークがあるため、PEG 添加量が過大になると、これが MS のイオン源を飽和してフェンピラザミンの定量を妨げるおそれがあった。このため、PEG を添加する場合、添加量は 100 mg/L(標準液または試料液 1 mL に対し PEG 10 g/L 溶液を 10  $\mu\text{L}$  添加)として検討を進めることとした。

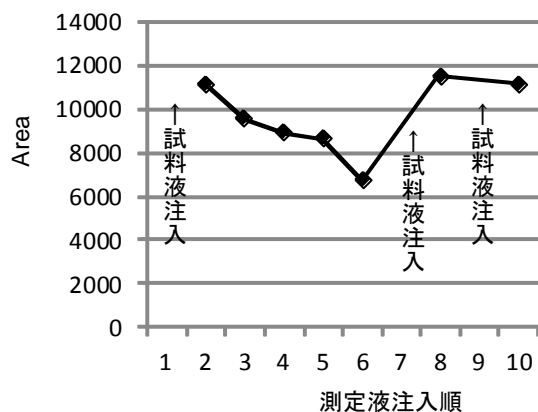


図9 連続測定時のピーク面積の変化  
フェンピラザミン 0.05 mg/L アセトン溶液  
1  $\mu\text{L}$  注入、GC-MS(SIM)測定

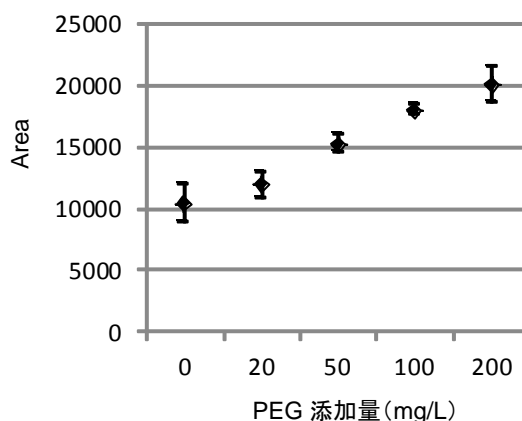


図10 ポリエチレングリコール(PEG)添加量の検討  
フェンピラザミン 0.05 mg/L アセトン溶液 1  $\mu\text{L}$  注入、  
GC-MS(SIM)測定  
6 回ずつ繰り返し測定し、平均±標準偏差をプロット

## (3) 検量線

図 11~13 にフェンピラザミン検量線の例を示した。0.0125~0.075 mg/L の濃度範囲で作成した検量線の決定係数は、いずれの食品及び測定方法においても 0.99 以上であり良好な直線性を示した。

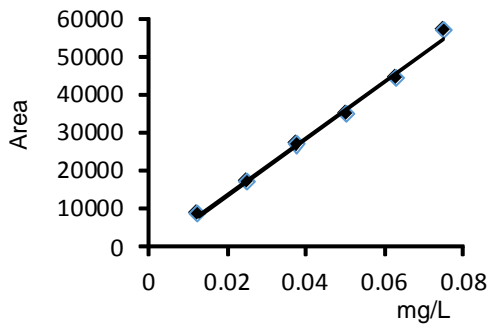


図 11 フェンピラザミン検量線の例(1)  
(SIM 測定、PEG 添加なし)  
 $y = 748306x - 1227.7$   
 $r^2 = 0.9940$

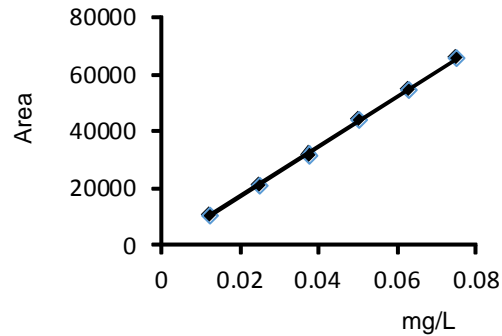


図 12 フェンピラザミン検量線の例(2)  
(SIM 測定、PEG 添加あり)  
 $y = 878010x - 708.72$   
 $r^2 = 0.9997$

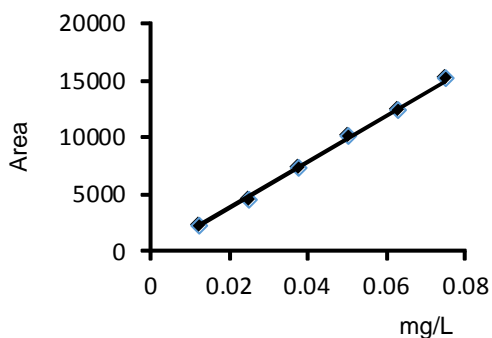


図 13 フェンピラザミン検量線の例(3)  
(SRM 測定、PEG 添加あり)  
 $y = 204109x - 298.82$   
 $r^2 = 0.9993$

#### (4) 定量限界

定量限界の算出結果を以下に示した。

- 野菜、果実: 0.01 mg/kg 【[試験溶液量(2 mL) / 試験溶液中の試料量(10 g)]  
× [分析対象化合物の定量限界相当量(0.05 ng) / 注入量(1 μL)】  
穀類、豆類: 0.01 mg/kg 【[試験溶液量(1 mL) / 試験溶液中の試料量(5 g)]  
× [分析対象化合物の定量限界相当量(0.05 ng) / 注入量(1 μL)】

### 3. 試験溶液調製法の検討

#### (1) 抽出方法の検討

フェンピラザミン農業抄録<sup>2)</sup>によれば、フェンピラザミンの試験には、アスコルビン酸ナトリウムを添加して試料の均一化を行い、アセトン及び水(4:1)混液で抽出する方法を用いている。これを参考に、抽出溶媒としてアセトン、アセトン及び水(4:1)混液について検討した。検討は、比較的アスコルビン酸含有量の少ない<sup>3)</sup>なす及び玄米を用いた添加回収試験により実施した。

①なす 200 g に、フェンピラザミン標準液 10 mg/L を 0.2 mL 添加し(0.01 ppm 相当)、クッキングカッターで均一化した試料 20 g をアセトン及び水(4:1)混液で抽出、②なす 200 g に、フェンピラザミン標準液 10 mg/L を 0.2 mL 添加し、0.3 w/v%アスコルビン酸溶液 100 mL を加えてクッキングカッターで均一化した試料 30 g をアセトン及び水(4:1)混液で抽出、③なす 200 g に、フェンピラザミン標準液 10 mg/L を 0.2 mL 添加し、クッキングカッターで均一化した試料 20 g をアセトンで抽出、の 3 種類の抽出法について、7. 試験

溶液の調製(LC-MS/MS 測定用)に準じて操作し、回収率を求めた。ただし、③は、①及び②とは異なる日に試験を実施した。

また、粉碎した玄米 10 g に、フェンピラザミン標準液 0.5 mg/L を 0.2 mL 添加した試料(0.01 ppm 相当)に、水 20 mL または 0.1 w/v%アスコルビン酸溶液 20 mL を加えて 30 分放置した後、アセトンで抽出し、7. 試験溶液の調製(LC-MS/MS 測定用)に準じて操作し、回収率を求めた。

結果を表1に示した。なす、玄米ともに、アスコルビン酸添加なしでも概ね良好な回収率が得られた。抽出溶媒の違いは、日間変動も考慮しなければならないため、この結果のみで明確に差があるとはいえないが、アセトン抽出の方が、アセトン及び水(4:1)混液抽出よりもやや良好な結果となったことから、アセトンを抽出溶媒として用いることとした。

表1 抽出条件の検討 (平均回収率(相対標準偏差)(%))

|         | アセトン/水(4:1)抽出   |                 | アセトン抽出          |                 |
|---------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|         | アスコルビン酸<br>添加なし | アスコルビン酸<br>添加あり | アスコルビン酸<br>添加なし | アスコルビン酸<br>添加あり |
| なす(n=5) | 77 (4.1)        | 79 (4.1)        | 89 (2.2)        |                 |
| 玄米(n=3) |                 |                 | 97 (6.1)        | 98 (9.3)        |

添加濃度:0.01 ppm

### (2) 転溶溶媒の検討

フェンピラザミン 0.2 µg を 10 w/v%塩化ナトリウム溶液 25 mL に添加し、酢酸エチルまたは *n*-ヘキサン 25 mL で 1 回振とう抽出を行い、抽出液のうち 10 mL はそのまま濃縮し、別の 10 mL は、脱水操作後に濃縮して測定した。脱水操作は、ガラスウールを詰めて無水硫酸ナトリウム約 20 g を載せたロートに、予め、使用溶媒を通液して湿らせ、これに抽出液を通液し、さらに当該溶媒 20 mL で洗い込む手法で行った。結果を表2に示した。この結果、*n*-ヘキサンの方が酢酸エチルよりもフェンピラザミンを良好に回収できたが、脱水操作を行うとフェンピラザミンの回収率が低下した。このことから、フェンピラザミンがガラスウールまたは無水硫酸ナトリウムに吸着する可能性が考えられた。

溶媒量を減らして試行したことで影響が大きくなった可能性もあるため、フェンピラザミン 0.2 µg を *n*-ヘキサン 100 mL に添加し、上記と同様の脱水操作を行ったところ、回収率は 95 %であった。また、フェンピラザミン 1 µg を 10 w/v%塩化ナトリウム溶液 100 mL に添加し、*n*-ヘキサン 100 mL 及び 50 mL で 2 回振とう抽出を行い、それぞれ脱水操作後濃縮して測定した結果を表3に示した。1 回の転溶で 90%が回収できた。以上の結果から、転溶操作は、*n*-ヘキサン 100 mL 及び 50 mL で 2 回振とう抽出することとした。

表2 転溶溶媒の検討(1) (回収率(%))

|        | <i>n</i> -ヘキサン (n=3) |    |    |    | 酢酸エチル (n=3) |    |    |    |
|--------|----------------------|----|----|----|-------------|----|----|----|
|        | ①                    | ②  | ③  | 平均 | ①           | ②  | ③  | 平均 |
| 脱水操作なし | 98                   | 93 | 94 | 95 | 74          | 75 | 50 | 66 |
| 脱水操作あり | 54                   | 54 | 64 | 57 | 12          | 10 | 10 | 11 |

0.2 µg/ 10 w/v%塩化ナトリウム溶液 25 mL を溶媒 25 mL で 1 回振とう抽出

表3 転溶溶媒の検討(2) (回収率(%))

|        | <i>n</i> -ヘキサン  |                |    |
|--------|-----------------|----------------|----|
|        | 100 mL<br>(1回目) | 50 mL<br>(2回目) | 合計 |
| 脱水操作あり | 90              | 2              | 92 |

1 µg/ 10 w/v%塩化ナトリウム溶液 100 mL を 100 mL、50 mL で 2 回振とう抽出

### (3) 脱脂方法の検討

脱脂方法としてアセトニトリル/ヘキサン分配について検討した。フェンピラザミン 1 µg をとり、*n*-ヘキサン 30 mL に溶解し、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL で 3 回抽出を行ったときの結果を表4に示した。フェンピラザミンは、2 回の抽出でほぼ回収できた。

ただし、アセトニトリル/ヘキサン分配後にアセトニトリルを除去して *n*-ヘキサンに溶解し、エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラム精製を行うことを想定した場合、下記(4)の結果から、*n*-ヘキサンに溶解する段階で回収率が低下する可能性が推測された。ミニカラム精製後にアセトニトリル/ヘキサン分配を行うことも可能だが、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムによる脱脂の方が、溶媒消費量や濃縮時間の点で効率が良いと考え、アセトニトリル/ヘキサン分配による脱脂は採用しないことにした。

表4 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<br>(1回目)          | 30 mL<br>(2回目) | 30 mL<br>(3回目) |    |
| 回収率(%) | 90                      | 2              | 0              | 92 |

1 µg/ *n*-ヘキサン 30 mL を振とう抽出、n=3 の平均値

#### (4) *n*-ヘキサン溶解性の確認

フェンピラザミン 10 mg/L アセトニトリル溶液 0.2 mL を試験管にとり、窒素吹きつけで完全に乾固し、*n*-ヘキサン 2 mL を加えて試験管ミキサーで攪拌した。この液 0.1 mL をとり、再度窒素吹きつけで完全に乾固し、アセトニトリルに溶解して測定した。比較のため、*n*-ヘキサンのかわりにアセトニトリルを用いて同様の操作を行った。結果を表5に示した。試料マトリックス存在下での挙動は確認していないが、フェンピラザミンは、完全に乾固すると *n*-ヘキサンでは再溶解しにくい可能性が考えられた。

表5 溶解性の確認

|        | アセトニトリル<br>(n=1) | <i>n</i> -ヘキサン (n=3) |    |    | 平均 |
|--------|------------------|----------------------|----|----|----|
|        |                  | ①                    | ②  | ③  |    |
| 回収率(%) | 104              | 31                   | 34 | 29 | 31 |

フェンピラザミン 2 µg を各溶媒 2 mL に再溶解

#### (5) カラム精製の検討

##### ①ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムによる精製[Oasis HLB(500 mg / 6 mL)]

カラムをアセトニトリル 10 mL、次いで水 10 mL で予備洗浄した後、フェンピラザミン 1 mg/L アセトニトリル及び水(3:7)溶液 0.1 mL を負荷し、アセトニトリル及び水混液で溶出したときの溶出状況を表6に示した。フェンピラザミンは、アセトニトリル及び水(3:7)混液 20 mL では溶出されず、アセトニトリル及び水(7:3)混液 10 mL で溶出されたことから、アセトニトリル及び水(3:7)混液 10 mL で洗浄し、アセトニトリル及び水(7:3)混液 10 mL で溶出することとした。

この溶出条件は、通知のピリフルキナゾン試験法に類似していることから、ピリフルキナゾンとの同時分析を考慮に入れてさらに検討した。カラムをアセトニトリル 10 mL、次いで水 10 mL で予備洗浄した後、フェンピラザミン 10 mg/L アセトニトリル溶液 0.01 mL を負荷し、アセトン及び水混液またはアセトニトリル及び水混液で溶出したときの溶出状況を表7に示した。試料をアセトン抽出した抽出液を水で希釈してカラムに負荷することを想定したものである。抽出液をアセトン 100%と仮定すると、抽出液と水を 1:2 の比率にすれば、カラム負荷時に目的物質が流出せず、精製可能と考えられた。なお、試料をアセトニトリル抽出した場合も想定して試したところ、1:2 の希釈率では、フェンピラザミンは流出しなかったがピリフルキナゾンは流出することがわかった。

以上の結果から、試料をアセトン抽出した抽出液 10 mL に水 20 mL を加え(野菜、果実は抽出液 5 mL + 水 10 mL)、これをカラムに負荷し、アセトニトリル及び水(3:7)混液 10 mL で洗浄し、アセトニトリル及び水(7:3)混液 10 mL で溶出することとし、再度溶出状況を確認したところ、各農薬を良好に回収できると考えられた(表8)。



表6 ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムからのフェンピラザミンの溶出状況(1)  
(回収率(%))

| 溶出溶媒           | 0-5 mL<br>(負荷時含む) | 5-10 mL | 10-15 mL | 15-20 mL | 合計  |
|----------------|-------------------|---------|----------|----------|-----|
| アセトニトリル/水(3:7) | 0                 | 0       | 0        | 0        | 0   |
| アセトニトリル/水(1:1) | 0                 | 15      | 81       |          | 96  |
| アセトニトリル/水(3:2) | 9                 | 97      | 2        | 0        | 108 |
| アセトニトリル/水(7:3) | 103               | 7       |          |          | 110 |

負荷量:0.1 µg(アセトニトリル及び水(3:7)混液 0.1 mL に溶解)

表7 ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムからの溶出状況(2)(回収率(%))

| 溶出溶媒           | 農薬          | 0-10 mL<br>(負荷時含む) | 10-20 mL | 20-30 mL | 合計  |
|----------------|-------------|--------------------|----------|----------|-----|
| アセトン/水(1:1)    | フェンピラザミン    | 0                  | 16       |          | 16  |
|                | ピリフルキナゾン    | 71                 | 21       |          | 92  |
|                | ピリフルキナゾン代謝物 | 86                 | 9        |          | 95  |
| アセトン/水(1:2)    | フェンピラザミン    | 0                  | 0        | 0        | 0   |
|                | ピリフルキナゾン    | 0                  | 0        | 0        | 0   |
|                | ピリフルキナゾン代謝物 | 0                  | 0        | 0        | 0   |
| アセトニトリル/水(1:2) | フェンピラザミン    | 0                  | 0        | 0        | 0   |
|                | ピリフルキナゾン    | 0                  | 44       | 54       | 98  |
|                | ピリフルキナゾン代謝物 | 0                  | 88       | 12       | 100 |

負荷量:0.1 µg(アセトニトリル 0.01 mL に溶解)

表8 ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムからの溶出状況(3)(回収率(%))

| 農薬          | アセトン/水(1:2)        | アセトニトリル/水(3:7) | アセトニトリル/水(7:3) |         | 合計 |
|-------------|--------------------|----------------|----------------|---------|----|
|             | 0-30 mL<br>(負荷時含む) | 0-10 mL        | 0-5 mL         | 5-10 mL |    |
| フェンピラザミン    | 0                  | 0              | 91             | 5       | 96 |
| ピリフルキナゾン    | 0                  | 0              | 98             | 1       | 99 |
| ピリフルキナゾン代謝物 | 0                  | 0              | 94             | 1       | 95 |

負荷量:0.1 µg(アセトニトリル 0.01 mL に溶解)

②エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムによる精製[InertSep PSA (500 mg / 6 mL)]

カラムを *n*-ヘキサン 10 mL で予備洗浄した後、フェンピラザミン 1 mg/L *n*-ヘキサン溶液 0.1 mL を負荷し、アセトン及び *n*-ヘキサン混液で溶出したときの溶出状況を表9に示した。フェンピラザミンは、*n*-ヘキサン 10 mL では溶出されず、アセトン及び *n*-ヘキサン(1:9)混液 10 mL で溶出されたことから、*n*-ヘキサン 10 mL で洗浄し、アセトン及び *n*-ヘキサン(1:9)混液 10 mL で溶出することとした。

なお、以下に示すように、合成ケイ酸マグネシウムミニカラムまたはシリカゲルミニカラムを用いても同様の溶出条件でフェンピラザミンを回収できたが、キャベツ抽出液を *n*-ヘキサン転溶した液を用いて精製状況を比較したところ、これら 3 種のミニカラムの内、エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムにおいて、アセトン及び *n*-ヘキサン(1:9)混液溶出画分への着色成分の溶出が最も少なかったため、このカラムで検討を進めることとした。

表9 エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムからのフェンピラザミンの溶出状況  
(回収率(%))

| 溶出溶媒                       | 0-5 mL<br>(負荷時含む) | 5-10 mL | 10-15 mL | 15-20 mL | 合計  |
|----------------------------|-------------------|---------|----------|----------|-----|
| <i>n</i> -ヘキサン             | 0                 | 0       | 0        | 0        | 0   |
| アセトン/ <i>n</i> -ヘキサン(1:19) | 0                 | 84      | 22       | 0        | 106 |
| アセトン/ <i>n</i> -ヘキサン(1:9)  | 95                | 12      | 0        |          | 107 |
| アセトン/ <i>n</i> -ヘキサン(1:4)  | 94                | 10      | 0        |          | 104 |

負荷量:0.1 µg(*n*-ヘキサン 0.1 mLに溶解)

③合成ケイ酸マグネシウムミニカラムによる精製[InertSep FL-PR(1,000 mg / 6 mL)]

カラムを*n*-ヘキサン 10 mLで予備洗浄した後、フェンピラザミン 1 mg/L *n*-ヘキサン溶液 0.1 mLを負荷し、アセトン及び *n*-ヘキサン混液で溶出したときの溶出状況を表 10 に示した。フェンピラザミンは、*n*-ヘキサン 10 mL では溶出されず、アセトン及び *n*-ヘキサン(1:9)混液 10 mL で溶出された。

表 10 合成ケイ酸マグネシウムミニカラムからのフェンピラザミンの溶出状況(回収率(%))

| 溶出溶媒                       | 0-5 mL<br>(負荷時含む) | 5-10 mL | 10-15 mL | 15-20 mL | 合計  |
|----------------------------|-------------------|---------|----------|----------|-----|
| <i>n</i> -ヘキサン             | 0                 | 0       | 0        | 0        | 0   |
| アセトン/ <i>n</i> -ヘキサン(1:19) | 6                 | 62      | 27       | 5        | 100 |
| アセトン/ <i>n</i> -ヘキサン(1:9)  | 81                | 19      | 0        |          | 100 |
| アセトン/ <i>n</i> -ヘキサン(1:4)  | 96                | 5       | 0        |          | 101 |

負荷量:0.1 µg(*n*-ヘキサン 0.1 mLに溶解)

④シリカゲルミニカラムによる精製[InertSep SI(500 mg / 6 mL)]

カラムを*n*-ヘキサン 10 mLで予備洗浄した後、フェンピラザミン 1 mg/L *n*-ヘキサン溶液 0.1 mLを負荷し、アセトン及び *n*-ヘキサン混液で溶出したときの溶出状況を表 11 に示した。フェンピラザミンは、*n*-ヘキサン 10 mL では溶出されず、アセトン及び *n*-ヘキサン(1:9)混液 10 mL で溶出された。

表 11 シリカゲルミニカラムからのフェンピラザミンの溶出状況(回収率(%))

| 溶出溶媒                       | 0-5 mL<br>(負荷時含む) | 5-10 mL | 10-15 mL | 15-20 mL | 合計 |
|----------------------------|-------------------|---------|----------|----------|----|
| <i>n</i> -ヘキサン             | 0                 | 0       | 0        | 0        | 0  |
| アセトン/ <i>n</i> -ヘキサン(1:19) | 0                 | 18      | 74       | 5        | 97 |
| アセトン/ <i>n</i> -ヘキサン(1:9)  | 63                | 29      | 0        |          | 92 |
| アセトン/ <i>n</i> -ヘキサン(1:4)  | 90                | 2       | 0        |          | 92 |

負荷量:0.1 µg(*n*-ヘキサン 0.1 mLに溶解)

⑤グラファイトカーボンミニカラムによる精製[Supelclean ENVI-Carb (500 mg / 6 mL)]

ほうれんそうでは、エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラム精製のみでは着色成分の除去が不十分であったため、追加精製を検討した。

カラムを*n*-ヘキサン 10 mLで予備洗浄した後、フェンピラザミン 10 mg/L アセトニトリル溶液 2 µLを負荷し、アセトン及び *n*-ヘキサン混液で溶出したときの溶出状況を表 12 に示した。フェンピラザミンは、*n*-ヘキサン 10 mL で一部溶出された後、アセトン及び *n*-ヘキサン(1:9)混液 5 mL までに溶出された。この結果から、積層ミニカラムの使用が可能と考えられた。

表 12 グラファイトカーボンミニカラムからのフェンピラザミンの溶出状況(回収率(%))

| <i>n</i> -ヘキサン |         | アセトン/ <i>n</i> -ヘキサン(1:9) |         |          | 合計 |
|----------------|---------|---------------------------|---------|----------|----|
| 0-5 mL         | 5-10 mL | 0-5 mL                    | 5-10 mL | 10-15 mL |    |
| 0              | 26      | 67                        | 0       | 0        | 93 |

負荷量:0.02 µg(アセトニトリル 2 µLに溶解)

⑥グラファイトカーボン/エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラムによる精製 [InertSep GC/PSA (500 mg / 500 mg / 6 mL)]

カラムを *n*-ヘキサン 10 mL で予備洗浄した後、フェンピラザミン 10 mg/L アセトニトリル溶液 2 μL を負荷し、アセトン及び *n*-ヘキサン混液で溶出したときの溶出状況を表 13 に示した。フェンピラザミンは、*n*-ヘキサン 10 mL では溶出されず、アセトン及び *n*-ヘキサン(1:9)混液 10 mL で溶出された。

表 13 グラファイトカーボン/エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラムからのフェンピラザミンの溶出状況(回収率(%))

| <i>n</i> -ヘキサン |         | アセトン/ <i>n</i> -ヘキサン(1:9) |         |          | 合計 |
|----------------|---------|---------------------------|---------|----------|----|
| 0-5 mL         | 5-10 mL | 0-5 mL                    | 5-10 mL | 10-15 mL |    |
| 0              | 0       | 0                         | 82      | 0        | 82 |

負荷量: 0.02 μg (アセトニトリル 2 μL に溶解)

⑦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 [Bond Elut C18 (1g / 6 mL)]

アセトニトリル/ヘキサン分配にかわる脱脂方法として、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を検討した。

カラムをアセトニトリル 10 mL で予備洗浄した後、フェンピラザミン 0.01 mg/L アセトニトリル溶液 2 mL を負荷し、アセトニトリルで溶出したときの溶出状況を表 14 に示した。フェンピラザミンは、アセトニトリル 2 mL で溶出された。

オレンジについては、エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムによる精製のみでは着色成分の除去が十分でなかった。このため、ほうれんそうと同様にグラファイトカーボン精製を追加することも検討したが、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方が、システロールと見られるピークを除去できた(図 59)ため、こちらの精製法を採用することにした。ただし、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム精製のため試料をアセトニトリルに溶解する際、残留物が十分に溶解できず、不溶物が残ることが不安要素であった。

表 14 オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムからのフェンピラザミンの溶出状況(回収率(%))

| 負荷時 | アセトニトリル |        | 合計  |
|-----|---------|--------|-----|
|     | 0-2 mL  | 2-4 mL |     |
| 22  | 84      | 0      | 106 |

負荷量: 0.01 μg (アセトニトリル 2 mL に溶解)

⑧グラファイトカーボン/アミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラムによる精製 [Supelclean ENVI-Carb/LC-NH2 (500 mg / 500 mg / 6 mL)]

参考として、通知一斉試験法で用いられる条件でのフェンピラザミン溶出状況を確認した。カラムをアセトニトリル及びトルエン(3:1)混液 10 mL で予備洗浄した後、フェンピラザミン 1 mg/L アセトニトリル及びトルエン(3:1)溶液 0.1 mL を負荷し、アセトニトリル及びトルエン(3:1)混液で溶出したときの溶出状況を表 15 に示した。フェンピラザミンは、アセトニトリル及びトルエン(3:1)混液 10 mL で溶出された。

表 15 グラファイトカーボン/アミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラムからのフェンピラザミンの溶出状況(回収率(%))

| アセトニトリル/トルエン(3:1) |         |          | 合計 |
|-------------------|---------|----------|----|
| 0-5 mL<br>(負荷時含む) | 5-10 mL | 10-15 mL |    |
| 88                | 2       | 0        | 90 |

負荷量: 0.1 μg (アセトニトリル及びトルエン(3:1)混液 0.1 mL に溶解)

(6) 試験溶液調製法検討結果まとめ

上記(1)~(5)の検討結果から、①ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム精製後、LC-MS/MS 測定する方法、②エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラム精製後、GC-MS(MS)測定する方法の2つの方法で添加回収試験を試みることにした。

(7) 農薬添加試料の調製について

なすを用いて、クッキングカッターで均一化した後に農薬標準液を添加した場合(20 gに混合標準液 0.5 mg/Lを0.4 mL添加;0.01 ppm)と、農薬標準液を添加した後にクッキングカッターで均一化した場合(200 gに混合標準液 10 mg/Lを0.2 mL添加;0.01 ppm)の回収率を比較した。結果を表 16 に示した。フェンピラザミンについては、大きな差はなかったが、農薬添加後に均一化を行ったものの方が回収率がやや低かった。フェンピラザミンとの同時分析が可能か考慮した、ピリフルキナゾン及びその代謝物については、農薬添加後に均一化を行ったものは著しく回収率が低かった。均一化操作によって、農薬の分解等の影響が生じる可能性があると考えられたため、添加回収試験においては、農薬添加後に均一化した試料を用いることで、均一化操作による影響もあわせて確認することとした。

表 16 農薬添加試料の調製の検討 (平均回収率(相対標準偏差)(%))

|             | 均一化後に農薬添加 | 農薬添加後に均一化 |
|-------------|-----------|-----------|
| フェンピラザミン    | 91 (1.8)  | 82 (4.0)  |
| ピリフルキナゾン    | 60 (8.2)  | 7 (9.6)   |
| ピリフルキナゾン代謝物 | 56 (7.2)  | 13 (7.8)  |

試料: なす、添加濃度: 0.01 ppm (n=5 (「農薬添加後に均一化」は添加時 n=1、試験は n=5))

(8) 参考

今回検討したジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム精製の条件について、フェンピラザミン、ピリフルキナゾン以外にも数種の農薬の溶出状況を確認したので、参考までに表 17 に示した。

表 17 ジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムからの溶出状況 (回収率(%))

| 農薬         | アセトン/水 (1:2) |          |          | アセトニトリル/水 (3:7) | アセトニトリル/水 (7:3) |         | 合計  |
|------------|--------------|----------|----------|-----------------|-----------------|---------|-----|
|            | 0-10 mL      | 10-20 mL | 20-30 mL | 0-10 mL         | 0-5 mL          | 5-10 mL |     |
| アメクトラジン    | 0            | 0        | 0        | 0               | 101             | 1       | 102 |
| イソチアニル     | 0            | 0        | 0        | 0               | 8               | 83      | 91  |
| イプフェカルバゾン  | 0            | 0        | 0        | 0               | 38              | 58      | 96  |
| スピロテトラマト   | 0            | 0        | 0        | 0               | 99              | 0       | 99  |
| テフリルトリオン   | 95           | 2        | 0        | 0               | 0               | 0       | 97  |
| ビキサフェン     | 0            | 0        | 0        | 0               | 63              | 33      | 96  |
| ピラスルホトール   | 91           | 4        | 0        | 0               | 0               | 0       | 95  |
| ピリベンカルブ(E) | 0            | 0        | 0        | 0               | 95              | 2       | 97  |
| ピリベンカルブ(Z) | 0            | 0        | 0        | 0               | 102             | 1       | 103 |
| フルオピラム     | 0            | 0        | 0        | 0               | 96              | 1       | 97  |
| プロピリスルフロロン | 0            | 0        | 0        | 1               | 101             | 1       | 103 |

負荷量: 0.01 µg (アセトニトリル及び水(3:7)混液 0.01 mL に溶解)

4. 添加回収試験

玄米、大豆、ばれいしょ、キャベツ、なす、ほうれんそう、オレンジ及びぶどうの 8 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。なす、オレンジ及びぶどうについては、基準値濃度での添加回収試験の他、一律基準濃度での添加回収試験も行い、定量限界の評価とした。なお、一律基準濃度での添加回収試験に限り、フェンピラザミンに加え、表 25 に示す農薬の混合標準液を用いて実施した。

ぶどう試料は、抽出時の吸引ろ過操作で、目詰まりによりろ過が困難であったため、遠心分離による固液分離を行った。

(1) LC-MS/MS による試験法

大豆試料では、抽出液に水を加えてジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム精製に負荷す

る際、試料液が白濁した。白濁した成分は、ミニカラム負荷からアセトニトリル/水(3:7)洗浄の過程で流出したように見られ、アセトニトリル/水(7:3)溶出液は概ね澄明であった。通常、ミニカラム精製は自然流下で行い、大豆以外の試料では問題なく通液可能であった。大豆試料ではカラムが詰まり気味となり、加圧する必要が生じたことがあったが、通液が不可能となるほどの大きな問題はなかった。

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 14~24 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 25 に示した。

### ①選択性

LC-MS/MS 測定における選択性の検討結果を表 18 に示した。なす及びオレンジで微量のフェンピラザミンが検出されたが、検討したいずれの試料においても、フェンピラザミンの定量を妨害するピークは認められず、良好な選択性が得られた。

表 18 選択性の評価(LC-MS/MS)

| No. | 食品名    | 定量限界<br>(mg/kg) | 基準値 <sup>1</sup><br>(ppm) | 添加<br>濃度 <sup>2</sup><br>(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<br>評価 <sup>5</sup> | 備 考 |           |
|-----|--------|-----------------|---------------------------|--------------------------------|-----------------|------|------------------------|---------------|--------------------------|---------------------|-------------------------|-----|-----------|
|     |        |                 |                           |                                | 評価対象濃度<br>(ppm) | 判定基準 | 面積又は<br>高さの別           | ブランク試料<br>(a) | 標準溶液 <sup>4</sup><br>(b) | 面積(高さ)<br>比 (a)/(b) |                         |     |           |
| 1   | 玄米     | 0.01            | 0.01                      | 0.01                           | 定量限界            | 0.01 | < 0.333                | 面積            | 0                        |                     | #DIV/0!                 | ○   |           |
| 2   | 大豆     | 0.01            | 0.01                      | 0.01                           | 定量限界            | 0.01 | < 0.333                | 面積            | 0                        |                     | #DIV/0!                 | ○   |           |
| 3   | ばれいしょ  | 0.01            | 0.01                      | 0.01                           | 定量限界            | 0.01 | < 0.333                | 面積            | 0                        |                     | #DIV/0!                 | ○   |           |
| 4   | キャベツ   | 0.01            | 0.01                      | 0.01                           | 定量限界            | 0.01 | < 0.333                | 面積            | 0                        |                     | #DIV/0!                 | ○   |           |
| 5   | なす     | 0.01            | 2.                        | 2.                             | 基準値             | 2.   | < 0.100                | 面積            | 5                        | 2032                | 0.003                   | ○   | 200倍希釈測定  |
| 6   | ほうれんそう | 0.01            | 0.01                      | 0.01                           | 定量限界            | 0.01 | < 0.333                | 面積            | 0                        |                     | #DIV/0!                 | ○   |           |
| 7   | オレンジ   | 0.01            | 5.                        | 5.                             | 基準値             | 5.   | < 0.100                | 面積            | 4                        | 2392                | 0.002                   | ○   | 500倍希釈測定  |
| 8   | ぶどう    | 0.01            | 10.                       | 10.                            | 基準値             | 10.  | < 0.100                | 面積            | 0                        |                     | #DIV/0!                 | ○   | 1000倍希釈測定 |

\*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

LC-MS/MS 測定における真度及び併行精度の検討結果を表 19 に示した。真度は 82.3~96.7%、併行精度は 1.2~5.3%であり、いずれも目標値(真度;70~120%、併行精度;添加濃度 0.01 ppm の時 25%未満、添加濃度 0.1 ppm 超の時 10%未満)を満足した。また、定量限界濃度での添加時に、S/N 比は最低でも 250 であり、目標値(10 以上)を満足した。

表 19 真度、精度及び定量限界の評価(LC-MS/MS)

| No. | 食品名    | 定量限界<br>(mg/kg) | 基準値 <sup>1</sup><br>(ppm) | 添加濃度<br>(ppm) | 定量限界<br>の評価 <sup>2</sup> | 検量線     |     |                  | 回収率(%) |      |      |      |      | 真度<br>(%) | 併行精度<br>(RSD%) | S/N比 <sup>3</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   | 玄米     | 0.01            | 0.01                      | 0.01          |                          | 3382300 | -39 | 0.9972           | 93.6   | 95.6 | 89.8 | 94.8 | 96.8 | 94.1      | 2.8            | 572.8             | 250.0  | 411.4   |         |
| 2   | 大豆     | 0.01            | 0.01                      | 0.01          |                          | 3271990 | 43  | 0.9990           | 89.4   | 86.0 | 93.4 | 90.0 | 90.4 | 89.8      | 2.9            | 1136.3            | 493.1  | 814.7   |         |
| 3   | ばれいしょ  | 0.01            | 0.01                      | 0.01          |                          | 4033990 | -36 | 0.9993           | 82.7   | 85.6 | 86.1 | 86.3 | 85.1 | 85.2      | 1.7            | 3444.1            | 1292.0 | 2368.0  |         |
| 4   | キャベツ   | 0.01            | 0.01                      | 0.01          |                          | 3861390 | -45 | 0.9980           | 94.3   | 90.8 | 86.1 | 90.4 | 89.6 | 90.2      | 3.3            | 406.5             | 284.2  | 345.3   |         |
| 5   | なす     | 0.01            | 2.                        | 2.            | *                        | 4191340 | -0  | 0.9989           | 98.6   | 96.3 | 96.4 | 96.9 | 95.4 | 96.7      | 1.2            |                   |        | #DIV/0! | 200倍希釈  |
| 5.2 | なす     | 0.01            | 2.                        | 0.01          |                          | 5257180 | -43 | 0.9987           | 81.4   | 78.8 | 82.4 | 81.2 | 87.6 | 82.3      | 4.0            | 788.5             | 455.3  | 621.9   |         |
| 6   | ほうれんそう | 0.01            | 0.01                      | 0.01          |                          | 3319400 | -49 | 0.9993           | 80.5   | 82.9 | 83.1 | 84.4 | 85.8 | 83.3      | 2.4            | 4863.0            | 1669.7 | 3266.3  |         |
| 7   | オレンジ   | 0.01            | 5.                        | 5.            | *                        | 4736660 | -10 | 0.9999           | 85.3   | 84.6 | 81.8 | 88.1 | 83.1 | 84.6      | 2.8            |                   |        | #DIV/0! | 500倍希釈  |
| 7.2 | オレンジ   | 0.01            | 5.                        | 0.01          |                          | 4736660 | -10 | 0.9999           | 82.8   | 87.4 | 85.3 | 81.6 | 87.6 | 84.9      | 3.2            | 2918.4            | 1341.0 | 2129.7  |         |
| 8   | ぶどう    | 0.01            | 10.                       | 10.           | *                        | 6245780 | -64 | 0.9991           | 88.6   | 84.1 | 83.0 | 77.1 | 79.9 | 82.6      | 5.3            |                   |        | #DIV/0! | 1000倍希釈 |
| 8.2 | ぶどう    | 0.01            | 10.                       | 0.01          |                          | 6245780 | -64 | 0.9991           | 86.5   | 84.4 | 88.2 | 86.8 | 87.4 | 86.6      | 1.6            | 1289.7            | 700.3  | 995.0   |         |

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

\*3 得られた回収率の中で最大値を与えるピーク(Max.)及び最小値を与えるピーク(Min.)のそれぞれの S/N 比を求める。

### ③試料マトリックスの測定への影響

LC-MS/MS 測定における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 20 に示した。添加回収試験における回収率 100%相当濃度になるように調製したマトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積比を求めた。面積比は 0.95~1.01 であり、試料マトリックスの測定への影響は小さいと考えられた。

添加回収試験における真度を表 20 で求めたピーク面積比で除して補正真度を求め、表 21 に示した。補正真度は 81.8~99.7%であり、補正前と大差なく、良好な値であった。

表 20 試料マトリックスの測定への影響(LC-MS/MS)

| No. | 食品名    | 定量限界<br>(mg/kg) | 基準値 <sup>*1</sup><br>(ppm) | 添加濃度<br>(ppm) | 標準溶液<br>濃度 <sup>*2</sup><br>(mg/L) | ピーク面積(高さ) <sup>*3</sup> |                    |                            |      |        |        |      |        | 備考   |                              |
|-----|--------|-----------------|----------------------------|---------------|------------------------------------|-------------------------|--------------------|----------------------------|------|--------|--------|------|--------|------|------------------------------|
|     |        |                 |                            |               |                                    | 面積又は<br>高さの別            | ブランク <sup>*4</sup> | マトリックス添加標準溶液 <sup>*5</sup> |      |        | 溶媒標準溶液 |      |        |      | ピーク面積<br>(高さ)比 <sup>*6</sup> |
|     |        |                 |                            |               |                                    |                         |                    | n=1                        | n=2  | 平均     | n=1    | n=2  | 平均     |      |                              |
| 1   | 玄米     | 0.01            | 0.01                       | 0.01          | 0.0005                             | 面積                      | 0                  | 1608                       | 1595 | 1601.5 | 1670   | 1645 | 1657.3 | 0.97 |                              |
| 2   | 大豆     | 0.01            | 0.01                       | 0.01          | 0.0005                             | 面積                      | 0                  | 1639                       | 1651 | 1645.4 | 1648   | 1673 | 1660.3 | 0.99 |                              |
| 3   | ばれいしょ  | 0.01            | 0.01                       | 0.01          | 0.0005                             | 面積                      | 0                  | 1972                       | 1966 | 1969.0 | 1993   | 1993 | 1992.7 | 0.99 |                              |
| 4   | キャベツ   | 0.01            | 0.01                       | 0.01          | 0.0005                             | 面積                      | 0                  | 1945                       | 1940 | 1942.3 | 1942   | 1952 | 1947.1 | 1.00 |                              |
| 5   | なす     | 0.01            | 2                          | 2             | 0.0005                             | 面積                      | 5                  | 2031                       | 2033 | 2026.4 | 2068   | 2103 | 2085.2 | 0.97 | 200倍希釈                       |
| 5.2 | なす     | 0.01            | 2                          | 0.01          | 0.0005                             | 面積                      | 420                | 2900                       | 2912 | 2485.6 | 2632   | 2627 | 2629.1 | 0.95 |                              |
| 6   | ほうれんそう | 0.01            | 0.01                       | 0.01          | 0.0005                             | 面積                      | 0                  | 1580                       | 1599 | 1589.5 | 1607   | 1613 | 1610.1 | 0.99 |                              |
| 7   | オレンジ   | 0.01            | 5                          | 5             | 0.0005                             | 面積                      | 4                  | 2391                       | 2393 | 2388.1 | 2374   | 2380 | 2377.1 | 1.00 | 500倍希釈                       |
| 7.2 | オレンジ   | 0.01            | 5                          | 0.01          | 0.0005                             | 面積                      | 45                 | 2282                       | 2358 | 2275.0 | 2374   | 2380 | 2377.1 | 0.96 |                              |
| 8   | ぶどう    | 0.01            | 10                         | 10            | 0.0005                             | 面積                      | 0                  | 3043                       | 3057 | 3050.0 | 3001   | 3033 | 3016.9 | 1.01 | 1000倍希釈                      |
| 8.2 | ぶどう    | 0.01            | 10                         | 0.01          | 0.0005                             | 面積                      | 18                 | 3019                       | 3017 | 2999.8 | 3001   | 3033 | 3016.9 | 0.99 |                              |

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

\*2 添加回収試験における回収率 100%相当濃度になるように、ブランク試料の試験溶液で調製した標準溶液(マトリックス添加標準溶液)及び溶媒で調製した標準溶液(溶媒標準溶液)を作成する。

\*3 マトリックス添加標準溶液及び溶媒標準溶液の順に交互に 2 回以上測定した結果から評価する。(必要に応じて起爆注入を行う。)

\*4 ブランクにピークが認められた場合には、マトリックス添加標準溶液の値はブランク値を差し引いた値を用いる。

\*5 マトリックス添加標準溶液は試験当日のブランク試料の試験溶液を用いて調製する。

\*6 マトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積(又は高さ)の比を求める。

表 21 補正真度(LC-MS/MS)

| 食品名    | 添加濃度(ppm) | 真度(%) | ピーク面積比 | 補正真度(%) | 備考      |
|--------|-----------|-------|--------|---------|---------|
| 玄米     | 0.01      | 94.1  | 0.97   | 97.0    |         |
| 大豆     | 0.01      | 89.8  | 0.99   | 90.7    |         |
| ばれいしょ  | 0.01      | 85.2  | 0.99   | 86.1    |         |
| キャベツ   | 0.01      | 90.2  | 1.00   | 90.2    |         |
| なす     | 2         | 96.7  | 0.97   | 99.7    | 200倍希釈  |
| なす     | 0.01      | 82.3  | 0.95   | 86.6    |         |
| ほうれんそう | 0.01      | 83.3  | 0.99   | 84.1    |         |
| オレンジ   | 5         | 84.6  | 1.00   | 84.6    | 500倍希釈  |
| オレンジ   | 0.01      | 84.9  | 0.96   | 88.4    |         |
| ぶどう    | 10        | 82.6  | 1.01   | 81.8    | 1000倍希釈 |
| ぶどう    | 0.01      | 86.6  | 0.99   | 87.5    |         |

ピーク面積比 = マトリックス添加標準溶液のピーク面積 / 溶媒標準溶液のピーク面積

補正真度 = 真度 / ピーク面積比

### (2)GC-MS(MS)による試験法

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 26~58 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トータルイオンクロマトグラムを図 59 に示した。

#### ①選択性

GC-MS(MS)測定においては、検討した何れの試料においても、フェンピラザミンの定量を妨害するピークは認められず、良好な選択性が得られた。

②真度、精度及び定量限界

GC-MS(/MS)測定における真度及び併行精度の検討結果を表 22 に示した。

通常の測定法(PEG 添加なし)では、基準値濃度における検討では玄米及び大豆を除く 6 食品で真度 83.9 ~96.7%、併行精度 1.9~9.5%であり、目標値を満足した。玄米では真度 183%、大豆では真度 138%と目標値を超過する結果であった。また、定量限界の評価では、S/N 比は最低でも大豆の 10.9 であり、全食品で 10 以上が得られたが、なす及びオレンジで 0.01 mg/kg 添加における真度が目標値を超過した。定量限界として 0.01 mg/kg を設定することが可能なのは、ばれいしょ、キャベツ、ほうれんそう及びぶどうの 4 食品という結果であった。

測定時に PEG を添加することにより安定して測定できるか試みた結果、基準値濃度における検討では、SIM 測定、SRM 測定ともに、8 食品全てで真度 74~104%、併行精度 1.4~9.8 と良好な結果が得られた。定量限界の評価では、S/N 比は SIM 測定で最低 22.6、SRM 測定では最低 155 であり、0.01 mg/kg 添加における真度もぶどうを除き良好な結果が得られた。ぶどうは、PEG 添加なしで測定したときには良好な結果が得られたが、PEG 添加ありで測定した 0.01 mg/kg 添加における真度は 150%を上回り、PEG 添加が必ずしも有効でない結果であった。

表 22 真度、精度及び定量限界の評価(GC-MS(/MS))

| No.          | 食品名    | 定量限界<br>(mg/kg) | 基準値 <sup>1)</sup><br>(ppm) | 添加濃度<br>(ppm) | 定量限界<br>の評価 <sup>2)</sup> | 検量線     |       |                  | 回収率(%) |       |       |       |       | 真度    | 併行  | S/N比 <sup>3)</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     |         |
| SIM測定(PEGなし) |        |                 |                            |               |                           |         |       |                  |        |       |       |       |       |       |     |                    |       |         |         |
| 1            | 玄米     | 0.01            | 0.01                       | 0.01          |                           | 124782  | -568  | 0.9988           | 177.6  | 200.6 | 168.2 | 184.0 | 184.5 | 183.0 | 6.5 | 27.8               | 14.7  | 21.3    |         |
| 2            | 大豆     | 0.01            | 0.01                       | 0.01          |                           | 72685   | 29    | 0.9999           | 146.4  | 125.2 | 139.9 | 141.1 | 136.8 | 137.9 | 5.7 | 41.7               | 10.9  | 26.3    |         |
| 3            | ばれいしょ  | 0.01            | 0.01                       | 0.01          |                           | 748306  | -1228 | 0.9940           | 96.2   | 89.8  | 89.9  | 89.5  | 94.1  | 91.9  | 3.3 | 69.2               | 61.0  | 65.1    |         |
| 4            | キャベツ   | 0.01            | 0.01                       | 0.01          |                           | 768626  | -4349 | 0.9983           | 91.7   | 96.7  | 97.8  | 97.3  | 99.9  | 96.7  | 3.2 | 63.2               | 53.5  | 58.3    |         |
| 5            | なす     | 0.01            | 2.                         | 2.            | *                         | 321942  | -645  | 0.9959           | 93.1   | 90.9  | 90.4  | 89.8  | 88.3  | 90.5  | 1.9 |                    |       | #DIV/0! | 200倍希釈  |
| 5.2          | なす     | 0.01            | 2.                         | 0.01          |                           | 321942  | -645  | 0.9959           | 124.4  | 123.0 | 124.7 | 120.8 | 128.2 | 124.2 | 2.2 | 50.5               | 41.7  | 46.1    |         |
| 6            | ほうれんそう | 0.01            | 0.01                       | 0.01          |                           | 1015209 | -3734 | 0.9993           | 79.7   | 85.0  | 82.8  | 84.7  | 87.1  | 83.9  | 3.3 | 106.1              | 52.2  | 79.2    |         |
| 7            | オレンジ   | 0.01            | 5.                         | 5.            | *                         | 179323  | 384   | 0.9974           | 109.1  | 90.5  | 85.3  | 93.8  | 91.5  | 94.0  | 9.5 |                    |       | #DIV/0! | 500倍希釈  |
| 7.2          | オレンジ   | 0.01            | 5.                         | 0.01          |                           | 179323  | 384   | 0.9974           | 202.2  | 192.6 | 165.8 | 181.8 | 185.1 | 185.5 | 7.3 | 57.4               | 45.0  | 51.2    |         |
| 8            | ぶどう    | 0.01            | 10.                        | 10.           | *                         | 415194  | -1556 | 0.9975           | 99.0   | 100.0 | 88.1  | 88.1  | 89.0  | 92.8  | 6.6 |                    |       | #DIV/0! | 1000倍希釈 |
| 8.2          | ぶどう    | 0.01            | 10.                        | 0.01          |                           | 415194  | -1556 | 0.9975           | 112.8  | 106.9 | 107.7 | 113.1 | 107.7 | 109.6 | 2.8 | 53.2               | 41.9  | 47.6    |         |
| SIM測定(PEGあり) |        |                 |                            |               |                           |         |       |                  |        |       |       |       |       |       |     |                    |       |         |         |
| 1            | 玄米     | 0.01            | 0.01                       | 0.01          |                           | 771672  | -2830 | 0.9988           | 94.0   | 107.9 | 99.5  | 103.3 | 102.0 | 101.4 | 5.1 | 38.3               | 25.1  | 31.7    |         |
| 2            | 大豆     | 0.01            | 0.01                       | 0.01          |                           | 677421  | -3434 | 0.9974           | 86.2   | 82.9  | 94.7  | 97.3  | 100.0 | 92.2  | 8.0 | 102.5              | 22.6  | 62.6    |         |
| 3            | ばれいしょ  | 0.01            | 0.01                       | 0.01          |                           | 878010  | -709  | 0.9997           | 96.0   | 92.2  | 89.7  | 91.3  | 94.1  | 92.7  | 2.7 | 80.3               | 73.1  | 76.7    |         |
| 4            | キャベツ   | 0.01            | 0.01                       | 0.01          |                           | 1065348 | -1372 | 0.9977           | 90.0   | 87.4  | 86.3  | 88.3  | 89.6  | 88.3  | 1.7 | 77.9               | 66.8  | 72.4    |         |
| 5            | なす     | 0.01            | 2.                         | 2.            | *                         | 722456  | -1663 | 0.9985           | 91.2   | 88.1  | 91.3  | 90.4  | 90.1  | 90.2  | 1.4 |                    |       | #DIV/0! | 200倍希釈  |
| 5.2          | なす     | 0.01            | 2.                         | 0.01          |                           | 722456  | -1663 | 0.9985           | 93.5   | 96.5  | 94.5  | 96.3  | 101.6 | 96.5  | 3.2 | 79.3               | 62.1  | 70.7    |         |
| 6            | ほうれんそう | 0.01            | 0.01                       | 0.01          |                           | 1108919 | -288  | 0.9995           | 78.8   | 77.6  | 74.8  | 77.4  | 78.3  | 77.4  | 2.0 | 76.4               | 42.4  | 59.4    |         |
| 7            | オレンジ   | 0.01            | 5.                         | 5.            | *                         | 494395  | -380  | 0.9968           | 87.9   | 84.2  | 83.1  | 82.4  | 83.3  | 84.2  | 2.6 |                    |       | #DIV/0! | 500倍希釈  |
| 7.2          | オレンジ   | 0.01            | 5.                         | 0.01          |                           | 494395  | -380  | 0.9968           | 117.5  | 113.3 | 106.2 | 112.3 | 121.0 | 114.1 | 4.9 | 84.5               | 64.0  | 74.3    |         |
| 8            | ぶどう    | 0.01            | 10.                        | 10.           | *                         | 368626  | -1041 | 0.9933           | 90.0   | 79.2  | 81.1  | 74.1  | 80.5  | 81.0  | 7.1 |                    |       | #DIV/0! | 1000倍希釈 |
| 8.2          | ぶどう    | 0.01            | 10.                        | 0.01          |                           | 368626  | -1041 | 0.9933           | 157.3  | 152.5 | 149.8 | 152.2 | 151.6 | 152.7 | 1.8 | 49.8               | 44.3  | 47.0    |         |
| SRM測定(PEGあり) |        |                 |                            |               |                           |         |       |                  |        |       |       |       |       |       |     |                    |       |         |         |
| 1            | 玄米     | 0.01            | 0.01                       | 0.01          |                           | 174041  | -558  | 0.9911           | 104.9  | 114.8 | 98.2  | 97.7  | 106.5 | 104.4 | 6.7 | 280.3              | 233.8 | 257.0   |         |
| 2            | 大豆     | 0.01            | 0.01                       | 0.01          |                           | 165820  | 234   | 0.9921           | 109.7  | 92.0  | 91.3  | 100.2 | 105.1 | 99.6  | 8.1 | 270.1              | 201.5 | 235.8   |         |
| 3            | ばれいしょ  | 0.01            | 0.01                       | 0.01          |                           | 204109  | -299  | 0.9993           | 95.4   | 92.4  | 95.0  | 91.2  | 94.8  | 93.7  | 2.0 | 337.1              | 250.4 | 293.7   |         |
| 4            | キャベツ   | 0.01            | 0.01                       | 0.01          |                           | 205638  | -436  | 0.9958           | 90.1   | 90.5  | 87.1  | 93.0  | 90.8  | 90.3  | 2.4 | 300.2              | 232.3 | 266.2   |         |
| 5            | なす     | 0.01            | 2.                         | 2.            | *                         | 174597  | -390  | 0.9990           | 94.8   | 90.7  | 93.8  | 91.7  | 92.1  | 92.6  | 1.8 |                    |       | #DIV/0! | 200倍希釈  |
| 5.2          | なす     | 0.01            | 2.                         | 0.01          |                           | 174597  | -390  | 0.9990           | 95.9   | 99.6  | 96.4  | 96.3  | 100.4 | 97.7  | 2.2 | 411.1              | 245.2 | 328.1   |         |
| 6            | ほうれんそう | 0.01            | 0.01                       | 0.01          |                           | 252398  | -188  | 0.9986           | 76.2   | 74.3  | 70.8  | 73.6  | 76.3  | 74.3  | 3.0 | 233.4              | 155.1 | 194.3   |         |
| 7            | オレンジ   | 0.01            | 5.                         | 5.            | *                         | 122998  | -370  | 0.9959           | 84.1   | 86.0  | 83.3  | 81.1  | 85.6  | 84.0  | 2.3 |                    |       | #DIV/0! | 500倍希釈  |
| 7.2          | オレンジ   | 0.01            | 5.                         | 0.01          |                           | 122998  | -370  | 0.9959           | 123.9  | 120.0 | 114.5 | 117.5 | 123.9 | 120.0 | 3.4 | 308.8              | 167.1 | 237.9   |         |
| 8            | ぶどう    | 0.01            | 10.                        | 10.           | *                         | 96978   | -437  | 0.9969           | 92.0   | 84.0  | 72.7  | 75.7  | 87.1  | 81.6  | 9.8 |                    |       | #DIV/0! | 1000倍希釈 |
| 8.2          | ぶどう    | 0.01            | 10.                        | 0.01          |                           | 96978   | -437  | 0.9969           | 156.2  | 151.8 | 160.0 | 154.4 | 156.1 | 155.7 | 1.9 | 234.1              | 174.3 | 204.2   |         |

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

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

\*3 得られた回収率の中で最大値を与えるピーク(Max.)及び最小値を与えるピーク(Min.)のそれぞれの S/N 比を求める。

③試料マトリックスの測定への影響

GC-MS(/MS)測定における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 23 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、PEG 添加なしで SIM 測定した結果では 1.04~2.11 であり、特に大豆及びオレンジ(希釈なし)で面積比が 2 を超えた。PEG 添加ありで SIM 測定した結果ではぶどう(希釈なし)のみ面積比が 1.91 と高く、他は 1.00~1.27 であった。PEG 添加ありで SRM 測定した結果は、PEG 添加ありで SIM 測定した結果と同様の傾向であった。

添加回収試験における真度を表 23 で求めたピーク面積比で除して補正真度を求め、表 24 に示した。補正真度は、いずれの測定方法でも 70~120%の範囲内となった。

表 23 試料マトリックスの測定への影響(GC-MS(/MS))

| No.           | 食品名    | 定量限界<br>(mg/kg) | 基準値 <sup>1)</sup><br>(ppm) | 添加濃度<br>(ppm) | 標準溶液<br>濃度 <sup>2)</sup><br>(mg/L) | ピーク面積(高さ) <sup>3)</sup> |                        |                            |       |         |        |       | 備考      |                                      |         |
|---------------|--------|-----------------|----------------------------|---------------|------------------------------------|-------------------------|------------------------|----------------------------|-------|---------|--------|-------|---------|--------------------------------------|---------|
|               |        |                 |                            |               |                                    | 面積又は<br>高さの<br>別        | ブラン<br>ク <sup>4)</sup> | マトリックス添加標準溶液 <sup>5)</sup> |       |         | 溶媒標準溶液 |       |         | ピーク面<br>積<br>(高さ)<br>比 <sup>6)</sup> |         |
|               |        |                 |                            |               |                                    |                         | n=1                    | n=2                        | 平均    | n=1     | n=2    | 平均    |         |                                      |         |
| SIM測定 (PEGなし) |        |                 |                            |               |                                    |                         |                        |                            |       |         |        |       |         |                                      |         |
| 1             | 玄米     | 0.01            | 0.01                       | 0.01          | 0.05                               | 面積                      | 0                      | 11815                      | 11906 | 11860.5 | 5660   | 5562  | 5611.0  | 2.11                                 |         |
| 2             | 大豆     | 0.01            | 0.01                       | 0.01          | 0.05                               | 面積                      | 0                      | 5788                       | 5720  | 5754.0  | 3730   | 3756  | 3743.0  | 1.54                                 |         |
| 3             | ばれいしょ  | 0.01            | 0.01                       | 0.01          | 0.05                               | 面積                      | 0                      | 38338                      | 39472 | 38905.0 | 34762  | 35657 | 35209.5 | 1.10                                 |         |
| 4             | キャベツ   | 0.01            | 0.01                       | 0.01          | 0.05                               | 面積                      | 0                      | 40889                      | 41023 | 40956.0 | 35276  | 35761 | 35518.5 | 1.15                                 |         |
| 5             | なす     | 0.01            | 2.                         | 2.            | 0.05                               | 面積                      | 0                      | 16084                      | 15884 | 15984.0 | 14337  | 14332 | 14334.5 | 1.12                                 | 200倍希釈  |
| 5.2           | なす     | 0.01            | 2.                         | 0.01          | 0.05                               | 面積                      | 0                      | 20848                      | 19997 | 20422.5 | 14337  | 14332 | 14334.5 | 1.42                                 |         |
| 6             | ほうれんそう | 0.01            | 0.01                       | 0.01          | 0.05                               | 面積                      | 0                      | 51412                      | 50519 | 50965.5 | 48294  | 49709 | 49001.5 | 1.04                                 |         |
| 7             | オレンジ   | 0.01            | 5.                         | 5.            | 0.05                               | 面積                      | 0                      | 10732                      | 10572 | 10652.0 | 9183   | 8767  | 8975.0  | 1.19                                 | 500倍希釈  |
| 7.2           | オレンジ   | 0.01            | 5.                         | 0.01          | 0.05                               | 面積                      | 0                      | 18051                      | 17832 | 17941.5 | 9183   | 8767  | 8975.0  | 2.00                                 |         |
| 8             | ぶどう    | 0.01            | 10.                        | 10.           | 0.05                               | 面積                      | 0                      | 23524                      | 22927 | 23225.5 | 19378  | 19894 | 19636.0 | 1.18                                 | 1000倍希釈 |
| 8.2           | ぶどう    | 0.01            | 10.                        | 0.01          | 0.05                               | 面積                      | 0                      | 24804                      | 25008 | 24906.0 | 19378  | 19894 | 19636.0 | 1.27                                 |         |
| SIM測定 (PEGあり) |        |                 |                            |               |                                    |                         |                        |                            |       |         |        |       |         |                                      |         |
| 1             | 玄米     | 0.01            | 0.01                       | 0.01          | 0.05                               | 面積                      | 0                      | 40258                      | 40075 | 40166.5 | 37180  | 37588 | 37384.0 | 1.07                                 |         |
| 2             | 大豆     | 0.01            | 0.01                       | 0.01          | 0.05                               | 面積                      | 0                      | 35015                      | 35659 | 35337.0 | 30325  | 31213 | 30769.0 | 1.15                                 |         |
| 3             | ばれいしょ  | 0.01            | 0.01                       | 0.01          | 0.05                               | 面積                      | 0                      | 46531                      | 46609 | 46570.0 | 43818  | 43310 | 43564.0 | 1.07                                 |         |
| 4             | キャベツ   | 0.01            | 0.01                       | 0.01          | 0.05                               | 面積                      | 0                      | 52061                      | 53003 | 52532.0 | 50816  | 52443 | 51629.5 | 1.02                                 |         |
| 5             | なす     | 0.01            | 2.                         | 2.            | 0.05                               | 面積                      | 0                      | 35524                      | 35691 | 35607.5 | 34197  | 34656 | 34426.5 | 1.03                                 | 200倍希釈  |
| 5.2           | なす     | 0.01            | 2.                         | 0.01          | 0.05                               | 面積                      | 0                      | 36746                      | 36448 | 36597.0 | 34197  | 34656 | 34426.5 | 1.06                                 |         |
| 6             | ほうれんそう | 0.01            | 0.01                       | 0.01          | 0.05                               | 面積                      | 0                      | 57345                      | 57215 | 57280.0 | 56239  | 56451 | 56345.0 | 1.02                                 |         |
| 7             | オレンジ   | 0.01            | 5.                         | 5.            | 0.05                               | 面積                      | 0                      | 24157                      | 24085 | 24121.0 | 24409  | 23837 | 24123.0 | 1.00                                 | 500倍希釈  |
| 7.2           | オレンジ   | 0.01            | 5.                         | 0.01          | 0.05                               | 面積                      | 0                      | 30246                      | 30901 | 30573.5 | 24409  | 23837 | 24123.0 | 1.27                                 |         |
| 8             | ぶどう    | 0.01            | 10.                        | 10.           | 0.05                               | 面積                      | 0                      | 19141                      | 18724 | 18932.5 | 16871  | 16339 | 16605.0 | 1.14                                 | 1000倍希釈 |
| 8.2           | ぶどう    | 0.01            | 10.                        | 0.01          | 0.05                               | 面積                      | 0                      | 31817                      | 31658 | 31737.5 | 16871  | 16339 | 16605.0 | 1.91                                 |         |
| SRM測定 (PEGあり) |        |                 |                            |               |                                    |                         |                        |                            |       |         |        |       |         |                                      |         |
| 1             | 玄米     | 0.01            | 0.01                       | 0.01          | 0.05                               | 面積                      | 0                      | 9494                       | 9523  | 9508.5  | 8333   | 8176  | 8254.5  | 1.15                                 |         |
| 2             | 大豆     | 0.01            | 0.01                       | 0.01          | 0.05                               | 面積                      | 0                      | 8662                       | 8108  | 8385.0  | 7407   | 6965  | 7186.0  | 1.17                                 |         |
| 3             | ばれいしょ  | 0.01            | 0.01                       | 0.01          | 0.05                               | 面積                      | 0                      | 10756                      | 10783 | 10769.5 | 10051  | 10204 | 10127.5 | 1.06                                 |         |
| 4             | キャベツ   | 0.01            | 0.01                       | 0.01          | 0.05                               | 面積                      | 0                      | 10730                      | 10462 | 10596.0 | 10517  | 10563 | 10540.0 | 1.01                                 |         |
| 5             | なす     | 0.01            | 2.                         | 2.            | 0.05                               | 面積                      | 0                      | 8853                       | 8850  | 8851.5  | 8506   | 8376  | 8441.0  | 1.05                                 | 200倍希釈  |
| 5.2           | なす     | 0.01            | 2.                         | 0.01          | 0.05                               | 面積                      | 0                      | 9113                       | 9088  | 9100.5  | 8506   | 8376  | 8441.0  | 1.08                                 |         |
| 6             | ほうれんそう | 0.01            | 0.01                       | 0.01          | 0.05                               | 面積                      | 0                      | 12048                      | 12093 | 12070.5 | 12183  | 12123 | 12153.0 | 0.99                                 |         |
| 7             | オレンジ   | 0.01            | 5.                         | 5.            | 0.05                               | 面積                      | 0                      | 5887                       | 6003  | 5945.0  | 5794   | 5841  | 5817.5  | 1.02                                 | 500倍希釈  |
| 7.2           | オレンジ   | 0.01            | 5.                         | 0.01          | 0.05                               | 面積                      | 0                      | 7808                       | 7783  | 7795.5  | 5794   | 5841  | 5817.5  | 1.34                                 |         |
| 8             | ぶどう    | 0.01            | 10.                        | 10.           | 0.05                               | 面積                      | 0                      | 5044                       | 4803  | 4923.5  | 4173   | 4388  | 4255.5  | 1.16                                 | 1000倍希釈 |
| 8.2           | ぶどう    | 0.01            | 10.                        | 0.01          | 0.05                               | 面積                      | 0                      | 8313                       | 8147  | 8230.0  | 4173   | 4338  | 4255.5  | 1.93                                 |         |

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

\*2 添加回収試験における回収率 100%相当濃度になるように、ブランク試料の試験溶液で調製した標準溶液(マトリックス添加標準溶液)及び溶媒で調製した標準溶液(溶媒標準溶液)を作成する。

\*3 マトリックス添加標準溶液及び溶媒標準溶液の順に交互に 2 回以上測定した結果から評価する。(必要に応じて起爆注入を行う。)

\*4 ブランクにピークが認められた場合には、マトリックス添加標準溶液の値はブランク値を差し引いた値を用いる。

\*5 マトリックス添加標準溶液は試験当日のブランク試料の試験溶液を用いて調製する。

\*6 マトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積(又は高さ)の比を求める。



表 24 補正真度(GC-MS/MS)

| 食品名          | 添加濃度(ppm) | 真度(%) | ピーク面積比 | 補正真度(%) | 備考      |
|--------------|-----------|-------|--------|---------|---------|
| SIM測定(PEGなし) |           |       |        |         |         |
| 玄米           | 0.01      | 183.0 | 2.11   | 86.7    |         |
| 大豆           | 0.01      | 137.9 | 1.54   | 89.5    |         |
| ばれいしょ        | 0.01      | 91.9  | 1.10   | 83.5    |         |
| キャベツ         | 0.01      | 96.7  | 1.15   | 84.1    |         |
| なす           | 2         | 90.5  | 1.12   | 80.8    | 200倍希釈  |
| なす           | 0.01      | 124.2 | 1.42   | 87.5    |         |
| ほうれんそう       | 0.01      | 83.9  | 1.04   | 80.7    |         |
| オレンジ         | 5         | 94.0  | 1.19   | 79.0    | 500倍希釈  |
| オレンジ         | 0.01      | 185.5 | 2.00   | 92.8    |         |
| ぶどう          | 10        | 92.8  | 1.18   | 78.6    | 1000倍希釈 |
| ぶどう          | 0.01      | 109.6 | 1.27   | 86.3    |         |
| SIM測定(PEGあり) |           |       |        |         |         |
| 玄米           | 0.01      | 101.4 | 1.07   | 94.8    |         |
| 大豆           | 0.01      | 92.2  | 1.15   | 80.2    |         |
| ばれいしょ        | 0.01      | 92.7  | 1.07   | 86.6    |         |
| キャベツ         | 0.01      | 88.3  | 1.02   | 86.6    |         |
| なす           | 2         | 90.2  | 1.03   | 87.6    | 200倍希釈  |
| なす           | 0.01      | 96.5  | 1.06   | 91.0    |         |
| ほうれんそう       | 0.01      | 77.4  | 1.02   | 75.9    |         |
| オレンジ         | 5         | 84.2  | 1.00   | 84.2    | 500倍希釈  |
| オレンジ         | 0.01      | 114.1 | 1.27   | 89.8    |         |
| ぶどう          | 10        | 81.0  | 1.14   | 71.1    | 1000倍希釈 |
| ぶどう          | 0.01      | 152.7 | 1.91   | 79.9    |         |
| SRM測定(PEGあり) |           |       |        |         |         |
| 玄米           | 0.01      | 104.4 | 1.15   | 90.8    |         |
| 大豆           | 0.01      | 99.6  | 1.17   | 85.1    |         |
| ばれいしょ        | 0.01      | 93.7  | 1.06   | 88.4    |         |
| キャベツ         | 0.01      | 90.3  | 1.01   | 89.4    |         |
| なす           | 2         | 92.6  | 1.05   | 88.2    | 200倍希釈  |
| なす           | 0.01      | 97.7  | 1.08   | 90.5    |         |
| ほうれんそう       | 0.01      | 74.3  | 0.99   | 75.1    |         |
| オレンジ         | 5         | 84.0  | 1.02   | 82.4    | 500倍希釈  |
| オレンジ         | 0.01      | 120.0 | 1.34   | 89.6    |         |
| ぶどう          | 10        | 81.6  | 1.16   | 70.3    | 1000倍希釈 |
| ぶどう          | 0.01      | 155.7 | 1.93   | 80.7    |         |

ピーク面積比 = マトリックス添加標準溶液のピーク面積 / 溶媒標準溶液のピーク面積

補正真度 = 真度 / ピーク面積比

## 5. その他の試験法検討に関連する事項

今回検討したLC-MS/MSによる試験法について、通知のピリフルキナゾン試験法を参考とした。両試験法では、ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム精製における溶出条件が若干異なり、目的物質が溶出される条件が、今回検討した溶出条件ではアセトニトリル及び水(7:3)混液による溶出、ピリフルキナゾン試験法ではアセトニトリル及び水(1:1)混液による溶出である。今回検討した試験法がピリフルキナゾンにも適用可能か確認するため、一律基準濃度のみであるが、フェンピラザミンと同時に添加回収試験を実施した。同時に、通知試験法が定められていない数種の農薬についても参考として検討を行った。結果を表 25 に示した。

表25 (参考)各農薬の真度・精度等

| No. | 分析対象化合物        | 玄米     |             |        |          | 大豆     |             |        |          |
|-----|----------------|--------|-------------|--------|----------|--------|-------------|--------|----------|
|     |                | 真度 (%) | 併行精度 (RSD%) | ピーク面積比 | 補正真度 (%) | 真度 (%) | 併行精度 (RSD%) | ピーク面積比 | 補正真度 (%) |
| 2   | ピリフルキナゾン       | 72.8   | 2.3         | 0.96   | 75.5     | 84.5   | 6.3         | 0.96   | 87.8     |
| 2.2 | ピリフルキナゾン代謝物    | 139.8  | 4.7         | 1.10   | 127.6    | 92.4   | 1.4         | 1.02   | 90.3     |
| 2.3 | 計(ピリフルキナゾンとして) | 109.4  | 3.2         |        |          | 90.0   | 2.7         |        |          |
| 3   | アメトクトラジン       | 98.4   | 3.0         | 0.99   | 99.3     | 86.9   | 1.9         | 0.99   | 87.6     |
| 4   | イソチアニル         | 109.0  | 8.2         | 1.01   | 107.7    | 96.3   | 6.7         | 1.05   | 91.7     |
| 5   | イプフェンカルバゾン     | 103.2  | 3.5         | 1.03   | 100.6    | 95.0   | 4.0         | 1.03   | 92.2     |
| 6   | スピロテトラマト       | 97.3   | 3.9         | 1.05   | 92.9     | 91.4   | 7.6         | 1.20   | 76.0     |
| 8   | ビキサフェン         | 101.6  | 3.8         | 1.03   | 98.7     | 98.6   | 8.0         | 0.95   | 103.9    |
| 10  | ピリベンカルブ(E)     | 100.8  | 2.1         | 1.02   | 98.6     | 96.6   | 3.0         | 1.00   | 96.2     |
| 11  | ピリベンカルブ(Z)     | 108.6  | 3.3         | 1.07   | 101.8    | 101.3  | 2.1         | 1.01   | 99.8     |
| 12  | フルオピラム         | 93.5   | 1.2         | 0.95   | 98.3     | 94.8   | 4.9         | 0.99   | 96.1     |
| 13  | プロピリスルフロ       | 104.9  | 8.5         | 1.06   | 99.2     | 67.5   | 13.8        | 0.83   | 81.5     |

| No. | 分析対象化合物        | ばれいしょ  |             |        |          | キャベツ   |             |        |          |
|-----|----------------|--------|-------------|--------|----------|--------|-------------|--------|----------|
|     |                | 真度 (%) | 併行精度 (RSD%) | ピーク面積比 | 補正真度 (%) | 真度 (%) | 併行精度 (RSD%) | ピーク面積比 | 補正真度 (%) |
| 2   | ピリフルキナゾン       | 29.4   | 1.3         | 1.04   | 28.4     | 63.7   | 8.4         | 0.99   | 64.6     |
| 2.2 | ピリフルキナゾン代謝物    | 52.5   | 7.5         | 1.21   | 43.2     | 113.6  | 3.2         | 1.09   | 104.5    |
| 2.3 | 計(ピリフルキナゾンとして) | 41.5   | 4.8         |        |          | 89.8   | 4.0         |        |          |
| 3   | アメトクトラジン       | 79.9   | 3.2         | 1.00   | 79.8     | 93.0   | 2.9         | 0.99   | 94.1     |
| 4   | イソチアニル         | 82.5   | 11.0        | 0.97   | 84.7     | 88.1   | 5.9         | 0.99   | 88.7     |
| 5   | イプフェンカルバゾン     | 89.2   | 1.4         | 1.01   | 88.2     | 89.1   | 7.7         | 1.00   | 89.3     |
| 6   | スピロテトラマト       | 17.1   | 15.9        | 1.12   | 15.2     | 78.8   | 9.5         | 0.97   | 81.5     |
| 8   | ビキサフェン         | 91.5   | 7.8         | 0.91   | 101.0    | 87.1   | 5.4         | 1.01   | 86.1     |
| 10  | ピリベンカルブ(E)     | 96.1   | 2.7         | 1.01   | 94.9     | 92.7   | 3.8         | 0.98   | 94.1     |
| 11  | ピリベンカルブ(Z)     | 108.3  | 1.5         | 1.08   | 100.3    | 96.2   | 4.2         | 1.00   | 96.0     |
| 12  | フルオピラム         | 97.7   | 3.5         | 1.00   | 98.0     | 93.6   | 3.5         | 1.01   | 92.7     |
| 13  | プロピリスルフロ       | 98.2   | 4.5         | 1.08   | 91.2     | 91.6   | 8.8         | 1.01   | 91.0     |

| No. | 分析対象化合物        | なす     |             |        |          | ほうれんそう |             |        |          |
|-----|----------------|--------|-------------|--------|----------|--------|-------------|--------|----------|
|     |                | 真度 (%) | 併行精度 (RSD%) | ピーク面積比 | 補正真度 (%) | 真度 (%) | 併行精度 (RSD%) | ピーク面積比 | 補正真度 (%) |
| 2   | ピリフルキナゾン       | 7.2    | 9.6         | 1.00   | 7.2      | 6.0    | 5.2         | 1.00   | 6.0      |
| 2.2 | ピリフルキナゾン代謝物    | 13.1   | 7.8         | 1.09   | 12.1     | 191.6  | 4.1         | 1.18   | 162.5    |
| 2.3 | 計(ピリフルキナゾンとして) | 10.3   | 7.6         |        |          | 103.2  | 4.0         |        |          |
| 3   | アメトクトラジン       | 40.1   | 7.4         | 1.02   | 39.4     | 91.3   | 4.0         | 0.97   | 93.9     |
| 4   | イソチアニル         | 96.2   | 2.4         | 0.96   | 99.8     | 91.5   | 6.0         | 1.01   | 91.0     |
| 5   | イプフェンカルバゾン     | 95.1   | 1.1         | 0.98   | 97.2     | 80.9   | 2.7         | 0.94   | 86.0     |
| 6   | スピロテトラマト       | 113.1  | 2.6         | 1.40   | 80.9     | 75.0   | 10.0        | 1.01   | 74.4     |
| 8   | ビキサフェン         | 101.6  | 3.6         | 1.08   | 93.9     | 86.4   | 7.9         | 0.89   | 97.3     |
| 10  | ピリベンカルブ(E)     | 96.1   | 2.1         | 1.01   | 95.4     | 95.9   | 2.4         | 1.05   | 91.3     |
| 11  | ピリベンカルブ(Z)     | 103.0  | 3.6         | 1.03   | 100.0    | 107.1  | 2.4         | 1.11   | 96.6     |
| 12  | フルオピラム         | 95.4   | 1.8         | 0.97   | 98.4     | 93.7   | 3.4         | 1.01   | 92.8     |
| 13  | プロピリスルフロ       | 129.4  | 4.2         | 1.23   | 105.5    | 127.9  | 4.2         | 1.31   | 97.5     |

| No. | 分析対象化合物        | オレンジ   |             |        |          | ぶどう    |             |        |          |
|-----|----------------|--------|-------------|--------|----------|--------|-------------|--------|----------|
|     |                | 真度 (%) | 併行精度 (RSD%) | ピーク面積比 | 補正真度 (%) | 真度 (%) | 併行精度 (RSD%) | ピーク面積比 | 補正真度 (%) |
| 2   | ピリフルキナゾン       | 91.7   | 2.5         | 1.03   | 89.4     | 77.1   | 4.1         | 0.98   | 78.5     |
| 2.2 | ピリフルキナゾン代謝物    | 118.6  | 4.5         | 1.23   | 96.1     | 86.5   | 2.5         | 1.13   | 76.9     |
| 2.3 | 計(ピリフルキナゾンとして) | 105.8  | 2.5         |        |          | 82.0   | 3.0         |        |          |
| 3   | アメトクトラジン       | 74.7   | 3.1         | 0.96   | 77.9     | 84.7   | 2.3         | 1.03   | 82.5     |
| 4   | イソチアニル         | 91.1   | 3.3         | 0.98   | 92.7     | 91.6   | 5.4         | 0.94   | 97.4     |
| 5   | イプフェンカルバゾン     | 93.9   | 3.1         | 1.01   | 93.4     | 82.4   | 3.8         | 0.98   | 83.7     |
| 6   | スピロテトラマト       | 99.1   | 2.8         | 0.98   | 100.7    | 93.4   | 4.0         | 1.02   | 91.5     |
| 8   | ビキサフェン         | 89.7   | 8.3         | 0.95   | 94.2     | 93.5   | 4.9         | 1.07   | 87.3     |
| 10  | ピリベンカルブ(E)     | 94.0   | 2.7         | 1.04   | 90.0     | 88.2   | 1.9         | 1.01   | 87.7     |
| 11  | ピリベンカルブ(Z)     | 104.9  | 0.7         | 1.16   | 90.3     | 100.3  | 1.7         | 1.11   | 90.4     |
| 12  | フルオピラム         | 95.7   | 1.0         | 1.01   | 95.1     | 87.6   | 1.7         | 1.01   | 87.0     |
| 13  | プロピリスルフロ       | 58.1   | 3.4         | 0.69   | 84.2     | 93.5   | 1.6         | 0.99   | 94.2     |

ピーク面積比 = マトリックス添加標準溶液のピーク面積 / 溶媒標準溶液のピーク面積

補正真度 = 真度 / ピーク面積比

添加濃度; 0.01 mg/kg

## 6. 考察

### (1) LC-MS/MS による試験法

フェンピラザミンを試料からアセトンで抽出し、ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムで精製する方法を検討した。抽出液を濃縮しアセトン除去してミニカラムに負荷する方法も考慮したが、濃縮時に不溶物を生じ、ミニカラム通液前にろ過操作が必要となる可能性があるため、操作が簡便となるよう、抽出液に水を加えてミニカラムに負荷する方法とした。

農産物 8 食品を用いた添加回収試験の結果では、フェンピラザミンの定量を妨害するピークは見られず、試料マトリックスの影響もほとんどなく、良好な真度及び併行精度が得られたことから、本試験法は農産物に適用可能であると判断した。

なお、本試験法の検討に当たって参考とした、ピリフルキナゾンについて、フェンピラザミンとの同時分析が可能か検討したが、ばれいしょ及びなすでは、ピリフルキナゾン本体、代謝物とも真度が低かった。玄米、キャベツ及びほうれんそうではピリフルキナゾン本体の真度が低めで代謝物の真度が高めの値となっており、ピリフルキナゾンが分解した可能性が考えられた。また、参考として検討した各農薬では、アメクトラジンがなすで、スピロテトラマトがばれいしょで真度が低かった他、プロピリスルフロロンが複数の食品で試料マトリックスの影響が見られた。今後、これらの農薬の試験法開発の参考になればと考える。

### (2) GC-MS(/MS)による試験法

フェンピラザミンを試料からアセトンで抽出し、*n*-ヘキサンで転溶後、エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムで精製した後、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムで脱脂する方法について検討した。

標準溶液を用いた検討で、脱水操作時に無水硫酸ナトリウムまたはグラスウールにフェンピラザミンが吸着された疑いのある事例が生じたが、添加回収試験結果からは特に問題はないと考えられた。

GC-MS(/MS)に試験溶液注入後に標準溶液を注入した場合と、標準溶液のみを連続して注入した場合とで、フェンピラザミンのピーク強度に変化が見られたことから、注入口インサート等へのフェンピラザミンの吸着の可能性が考えられたが、試料液と標準溶液を交互に注入することで概ね安定した測定が可能であった。さらに、測定液に PEG を添加することにより、試料マトリックスの影響も低減できると考えられた。

農産物 8 食品を用いた添加回収試験の結果では、フェンピラザミンの定量を妨害するピークは見られなかった。なお、LC-MS/MS による試験でなすのブランク試料から約 0.002 mg/kg 検出されたフェンピラザミンのピークが GC-MS(/MS)による試験では全く認められなかったが、なすのみ、両試験で異なるロットの試料を用いたものである。

ほうれんそう及びオレンジは、エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムのみの精製では試料液の着色が著しかったため、追加精製方法について検討した。ほうれんそうについてはグラファイトカーボンミニカラム精製により着色成分の除去が可能であったため、これを追加することとし、操作が容易な積層ミニカラムを採用することとした。オレンジについては、グラファイトカーボンミニカラム精製によって着色成分が除去できたが、システロールとみられる成分が除去できず、GC-MS(/MS)測定における試料マトリックスの影響が大きくなる可能性が考えられた。オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム精製を追加することにより、システロールとみられる成分は除去できた。

添加回収試験の結果では、PEG 添加なしで測定した場合、食品によっては、試料マトリックスの影響が大きかった。なす、オレンジ及びぶどうは、基準値濃度での添加の場合は、希釈して測定したことで試料マトリックスの影響が低減されたと考えられた。各食品とも、試料マトリックスの影響を補正した真度は良好な値が得られたことから、マトリックス添加標準液で定量する方法とすれば、本試験法を農産物に適用することが可能と考えられた。

測定液に PEG を添加して測定することで測定値の安定化を試みた結果、試料マトリックスの影響も低減され、概ね良好な結果が得られた。ただし、定量限界の評価におけるぶどうでは、PEG 添加なしのときよりも試料マトリックスの影響が大きくなった。多くの場合、PEG 添加が有効であったが、食品によってはなお試料マトリックスが測定に及ぼす影響に留意する必要があると考えられた。

## 【結論】

農産物中のフェンピラザミン試験法として、フェンピラザミンを試料からアセトンで抽出し、ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体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、ばれいしょ、キャベツ、なす、ほうれんそう、オレンジ及びぶどうの 8 食品に適用した結果、真度 82.3～96.7%、併行精度 1.2～5.3%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。

また、フェンピラザミンを試料からアセトンで抽出し、*n*-ヘキサンで転溶後、エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムで精製した後、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムで脱脂し、GC-MS(/MS)で定量及び確認する方法についても検討した。検討した試験法を玄米、大豆、ばれいしょ、キャベツ、なす、ほうれんそう、オレンジ及びぶどうの 8 食品に適用した結果、通常の測定方法(PEG 添加なし)では、ばれいしょ、キャベツ、ほうれんそう及びぶどうの 4 食品のみ、真度、併行精度ともに良好な結果で、かつ、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。測定時に PEG を添加する方法とすることで、ぶどうを除く 7 食品について、真度、併行精度ともに良好な結果で、かつ、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が、ぶどうのみ、定量限界濃度での真度が評価基準から外れる結果となった。

以上の結果から、後者の試験法でも食品によっては適用可能であるが、前者の試験法の方がより安定した試験が可能と考え、前者の試験法を案として採用した。

## 【参考文献】

- 1) 高橋邦彦、堀江正一、広瀬義文:GC/MS による農産物中のジフェニルおよびオルトフェニルフェノールの分析、食品衛生学雑誌 49(6)、403-406、2008
- 2) 独立行政法人農林水産消費安全技術センター(FAMIC) フェンピラザミン農薬抄録  
<http://www.acis.famic.go.jp/syouroku/fenpyrazamine/index.htm>
- 3) 香川芳子監修:五訂食品成分表、女子栄養大学出版社、2003

# フェンピラザミン試験法(農産物)

## 追加検討 ろ紙への吸着性の確認について

### 【実験方法】

#### 1. 試薬・装置・測定条件

「平成26年度 食品に残留する農薬等の成分である物質の試験法開発事業報告書 フェンピラザミン試験法(農産物)」に準ずる。

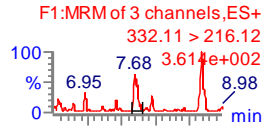
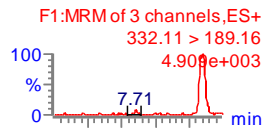
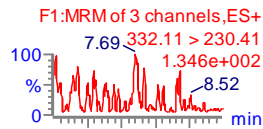
#### 2. 試験溶液の調製

容器に精製水 20mL をとり、フェンピラザミン 0.5 mg/L アセトニトリル溶液 0.2mL を加え、アセトン 100mL を加えて混和した。この液全量を、ろ紙 5B(90mm)を敷いた桐山ロートで吸引ろ過した。アセトン 50mL で容器を洗い、洗液を前述の桐山ロート及びろ紙で吸引ろ過した。ろ液をあわせ、約 20mL まで減圧濃縮し、アセトニトリルを加えて正確に 25mL としたものを試験溶液とし、LC-MS/MS により測定した。

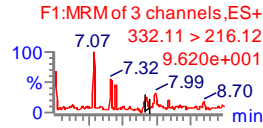
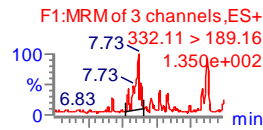
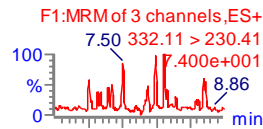
### 【結果及び考察】

今回の試験操作は、玄米 10 g にフェンピラザミンを 0.01 ppm となるよう添加し、アセトン 100mL、次いでアセトン 50mL で抽出する操作を想定して実施したものである。

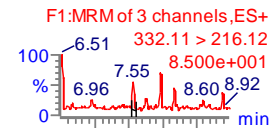
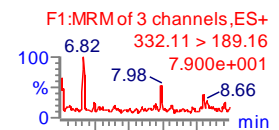
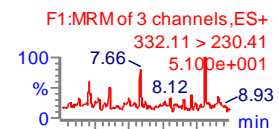
n=3 併行で試験を実施した結果、フェンピラザミンの回収率は 99.7%(相対標準偏差 0.82%)であった。この結果から、抽出操作においてフェンピラザミンのろ紙への吸着はほとんどないと考えられた。



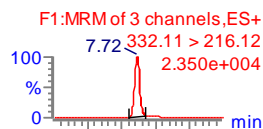
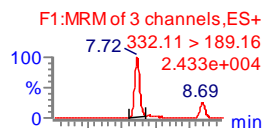
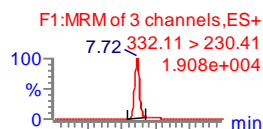
ブランク試料



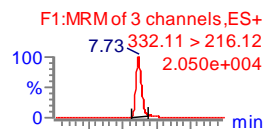
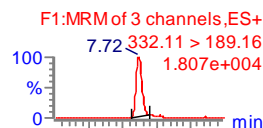
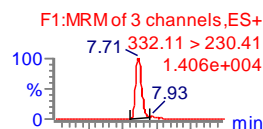
ブランク試料



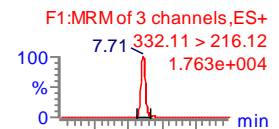
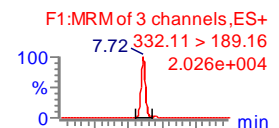
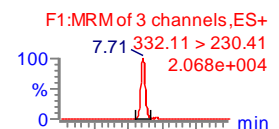
ブランク試料



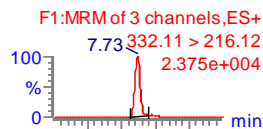
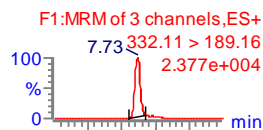
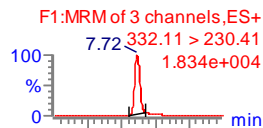
添加試料



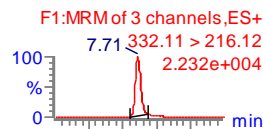
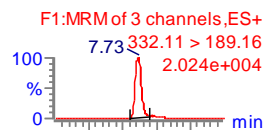
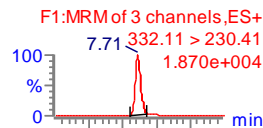
添加試料



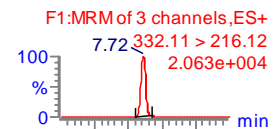
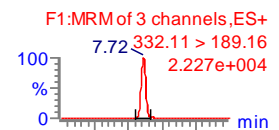
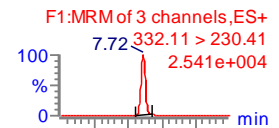
添加試料



標準溶液



標準溶液



標準溶液

図 14 玄米の SRM クロマトグラム (LC-MS/MS)

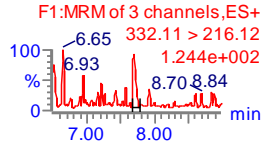
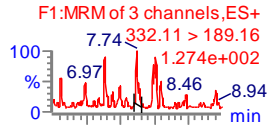
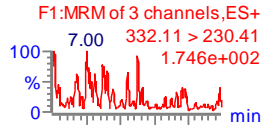
上段; 定量イオン  
 $m/z$  +332.1→230.4  
 中段; 定性イオン  
 $m/z$  +332.1→189.2  
 下段; 定性イオン  
 $m/z$  +332.1→216.1  
 添加濃度: 0.01 ppm

図 15 大豆の SRM クロマトグラム (LC-MS/MS)

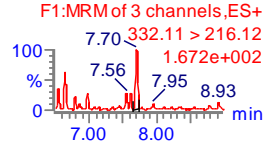
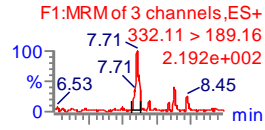
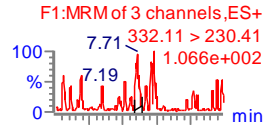
上段; 定量イオン  
 $m/z$  +332.1→230.4  
 中段; 定性イオン  
 $m/z$  +332.1→189.2  
 下段; 定性イオン  
 $m/z$  +332.1→216.1  
 添加濃度: 0.01 ppm

図 16 ばれいしょの SRM クロマトグラム (LC-MS/MS)

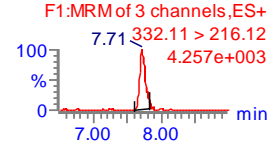
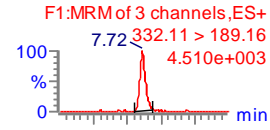
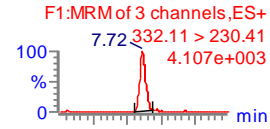
上段; 定量イオン  
 $m/z$  +332.1→230.4  
 中段; 定性イオン  
 $m/z$  +332.1→189.2  
 下段; 定性イオン  
 $m/z$  +332.1→216.1  
 添加濃度: 0.01 ppm



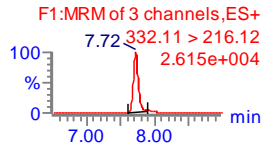
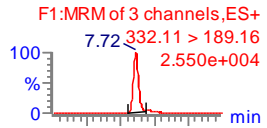
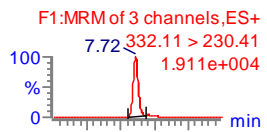
ブランク試料



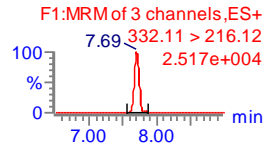
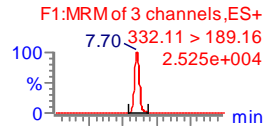
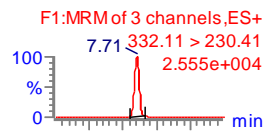
ブランク試料 (200 倍希釈)



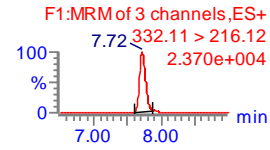
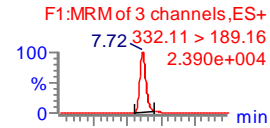
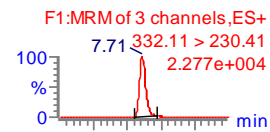
ブランク試料



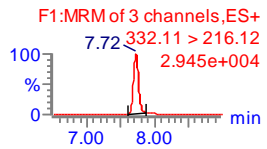
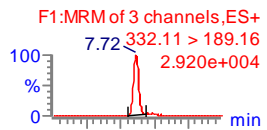
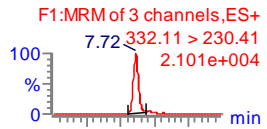
添加試料



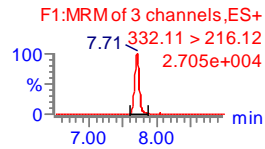
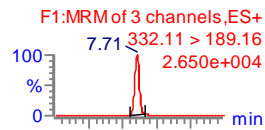
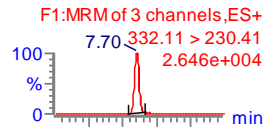
添加試料 (200 倍希釈)



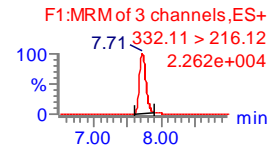
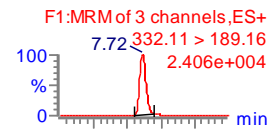
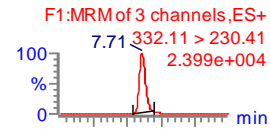
添加試料



標準溶液



標準溶液



標準溶液

図 17 キャベツの SRM クロマトグラム (LC-MS/MS)

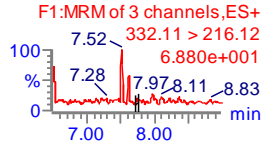
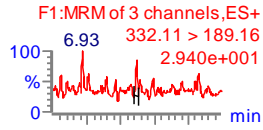
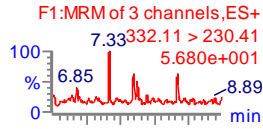
上段: 定量イオン  
 $m/z$  +332.1→230.4  
 中段: 定性イオン  
 $m/z$  +332.1→189.2  
 下段: 定性イオン  
 $m/z$  +332.1→216.1  
 添加濃度: 0.01 ppm

図 18 なすの SRM クロマトグラム (LC-MS/MS)

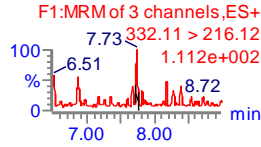
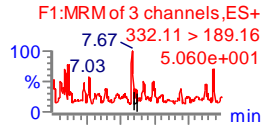
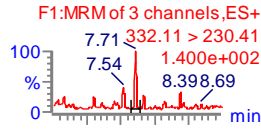
上段: 定量イオン  
 $m/z$  +332.1→230.4  
 中段: 定性イオン  
 $m/z$  +332.1→189.2  
 下段: 定性イオン  
 $m/z$  +332.1→216.1  
 添加濃度: 2 ppm

図 19 なすの SRM クロマトグラム (LC-MS/MS)

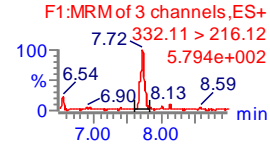
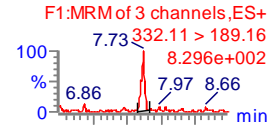
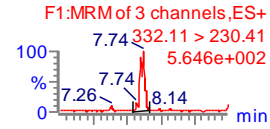
上段: 定量イオン  
 $m/z$  +332.1→230.4  
 中段: 定性イオン  
 $m/z$  +332.1→189.2  
 下段: 定性イオン  
 $m/z$  +332.1→216.1  
 添加濃度: 0.01 ppm



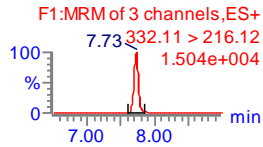
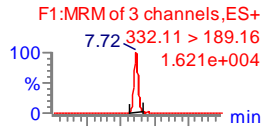
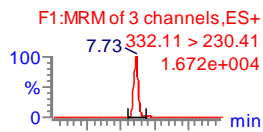
ブランク試料



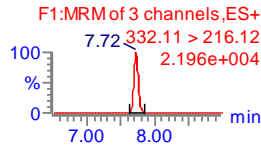
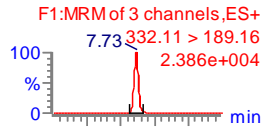
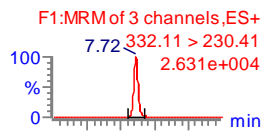
ブランク試料 (500 倍希釈)



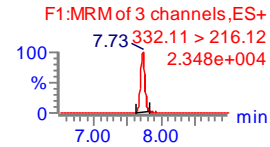
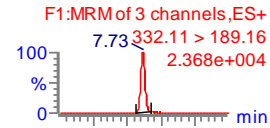
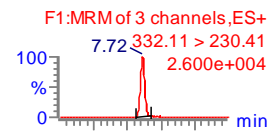
ブランク試料



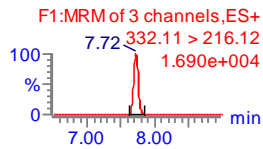
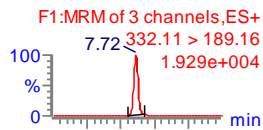
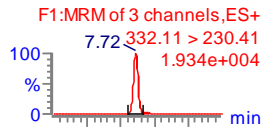
添加試料



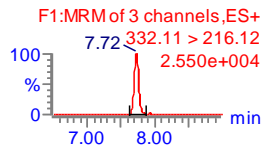
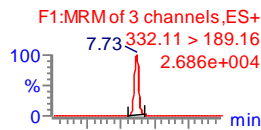
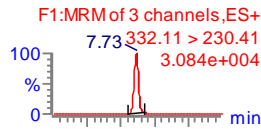
添加試料 (500 倍希釈)



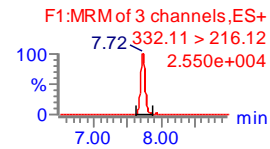
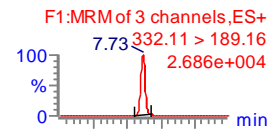
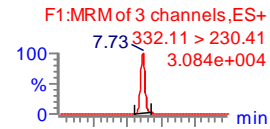
添加試料



標準溶液



標準溶液



標準溶液

図 20 ほうれんそうの SRM クロマトグラム (LC-MS/MS)

上段: 定量イオン  
 $m/z$  +332.1→230.4  
 中段: 定性イオン  
 $m/z$  +332.1→189.2  
 下段: 定性イオン  
 $m/z$  +332.1→216.1  
 添加濃度: 0.01 ppm

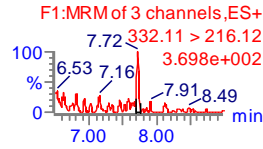
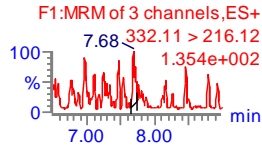
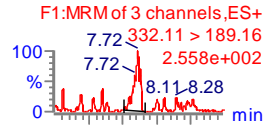
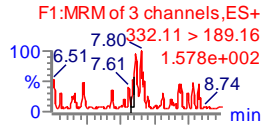
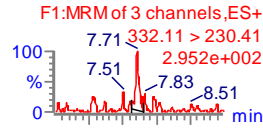
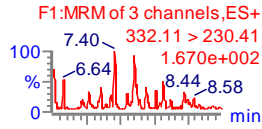
図 21 オレンジの SRM クロマトグラム (LC-MS/MS)

上段: 定量イオン  
 $m/z$  +332.1→230.4  
 中段: 定性イオン  
 $m/z$  +332.1→189.2  
 下段: 定性イオン  
 $m/z$  +332.1→216.1  
 添加濃度: 5 ppm

図 22 オレンジの SRM クロマトグラム (LC-MS/MS)

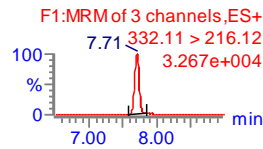
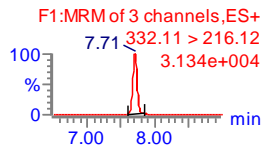
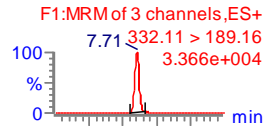
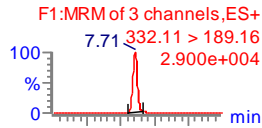
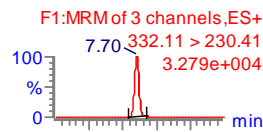
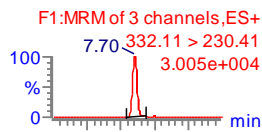
上段: 定量イオン  
 $m/z$  +332.1→230.4  
 中段: 定性イオン  
 $m/z$  +332.1→189.2  
 下段: 定性イオン  
 $m/z$  +332.1→216.1  
 添加濃度: 0.01 ppm





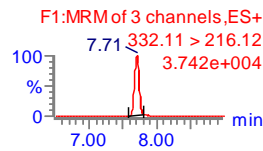
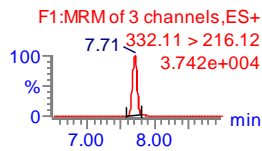
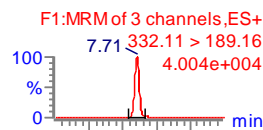
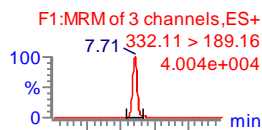
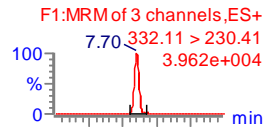
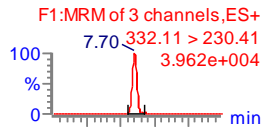
ブランク試料(1000倍希釈)

ブランク試料



添加試料(1000倍希釈)

添加試料



標準溶液

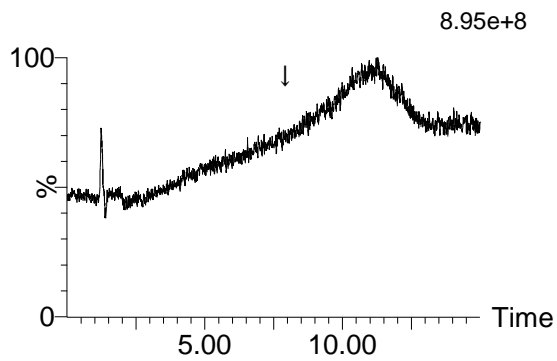
標準溶液

図 23 ぶどうの SRM クロマトグラム (LC-MS/MS)

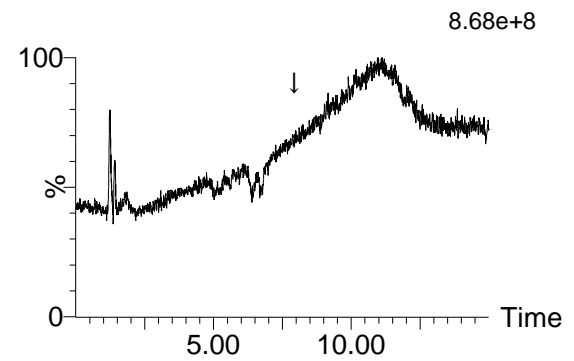
上段: 定量イオン  
 $m/z$  +332.1→230.4  
中段: 定性イオン  
 $m/z$  +332.1→189.2  
下段: 定性イオン  
 $m/z$  +332.1→216.1  
添加濃度: 10 ppm

図 24 ぶどうの SRM クロマトグラム (LC-MS/MS)

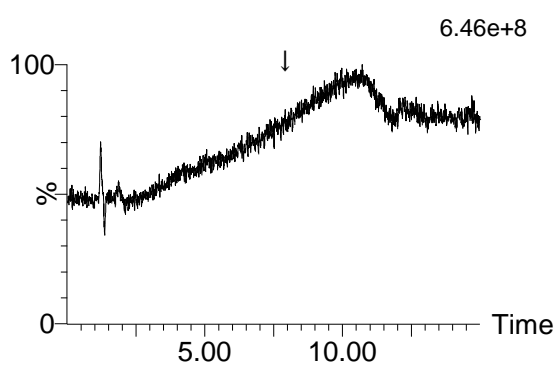
上段: 定量イオン  
 $m/z$  +332.1→230.4  
中段: 定性イオン  
 $m/z$  +332.1→189.2  
下段: 定性イオン  
 $m/z$  +332.1→216.1  
添加濃度: 0.01 ppm



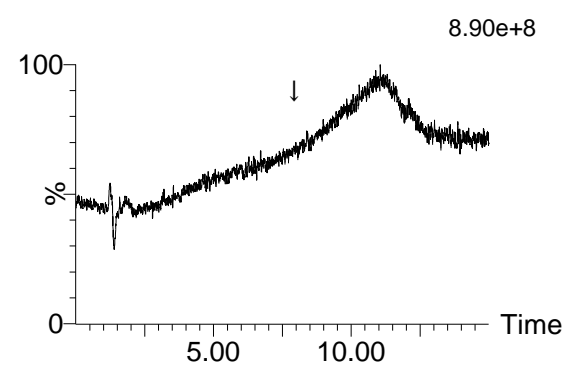
玄米



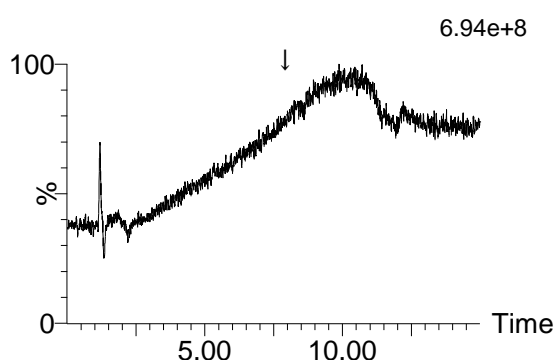
大豆



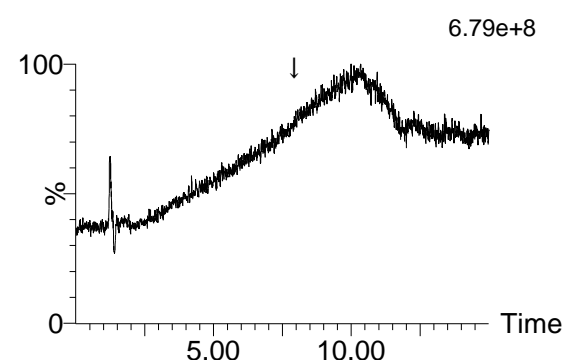
ばれいしょ



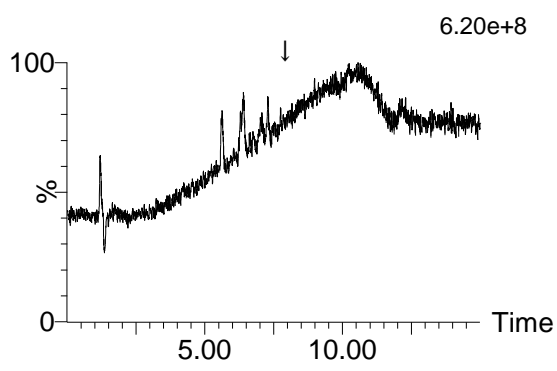
キャベツ



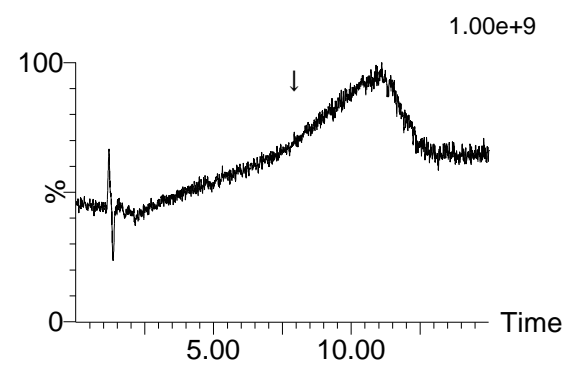
なす



ほうれんそう

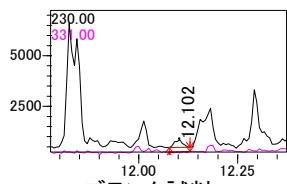


オレンジ

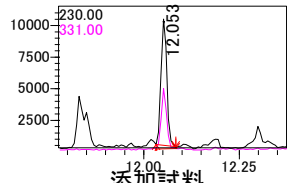


ぶどう

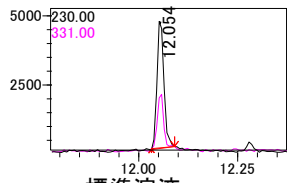
図 25 ブランク試料のトータルイオンクロマトグラム (LC-MS)  
 (スキャン範囲: 50~1000 amu, CV=30 V)



ブランク試料



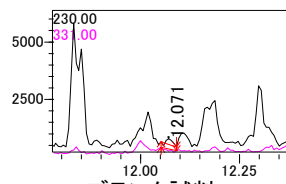
添加試料



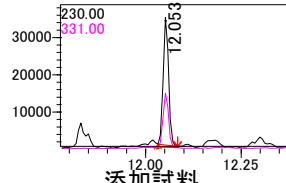
標準溶液

図 26 玄米の SIM クロマトグラム (GC-MS)

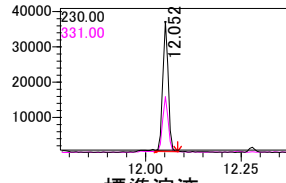
定量イオン  $m/z$  230  
 定性イオン  $m/z$  331  
 添加濃度: 0.01 ppm  
 PEG 添加なし



ブランク試料



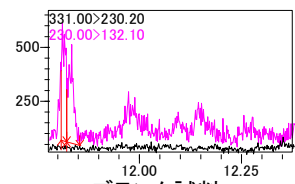
添加試料



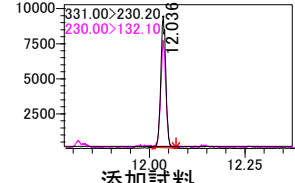
標準溶液

図 27 玄米の SIM クロマトグラム (GC-MS)

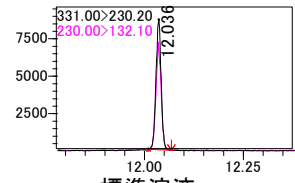
定量イオン  $m/z$  230  
 定性イオン  $m/z$  331  
 添加濃度: 0.01 ppm  
 PEG 添加あり



ブランク試料



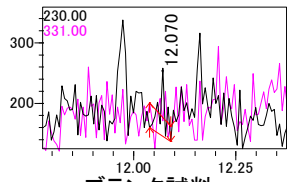
添加試料



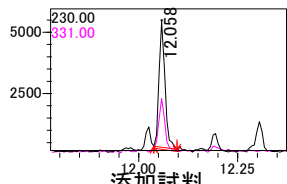
標準溶液

図 28 玄米の SRM クロマトグラム (GC-MS/MS)

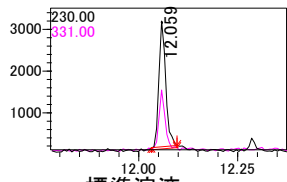
定量イオン  $m/z$  331→230.2  
 定性イオン  $m/z$  230→132.1  
 添加濃度: 0.01 ppm  
 PEG 添加あり



ブランク試料



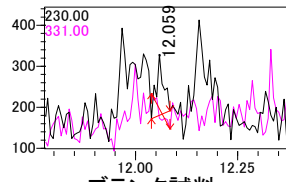
添加試料



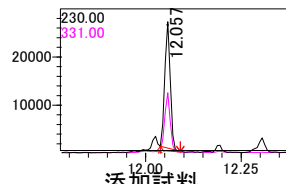
標準溶液

図 29 大豆の SIM クロマトグラム (GC-MS)

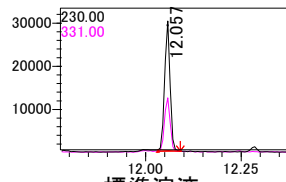
定量イオン  $m/z$  230  
 定性イオン  $m/z$  331  
 添加濃度: 0.01 ppm  
 PEG 添加なし



ブランク試料



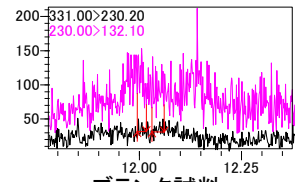
添加試料



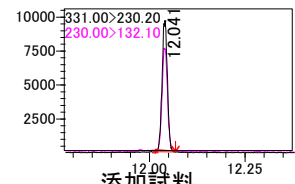
標準溶液

図 30 大豆の SIM クロマトグラム (GC-MS)

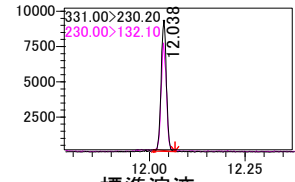
定量イオン  $m/z$  230  
 定性イオン  $m/z$  331  
 添加濃度: 0.01 ppm  
 PEG 添加あり



ブランク試料



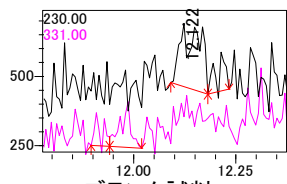
添加試料



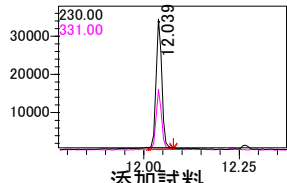
標準溶液

図 31 大豆の SRM クロマトグラム (GC-MS/MS)

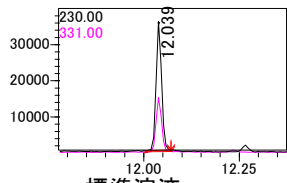
定量イオン  $m/z$  331→230.2  
 定性イオン  $m/z$  230→132.1  
 添加濃度: 0.01 ppm  
 PEG 添加あり



ブランク試料



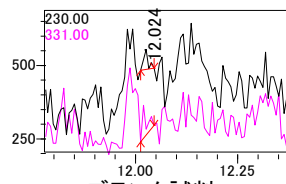
添加試料



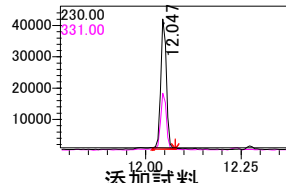
標準溶液

図 32 ばれいしょの SIM クロマトグラム (GC-MS)

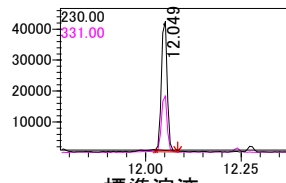
定量イオン  $m/z$  230  
 定性イオン  $m/z$  331  
 添加濃度: 0.01 ppm  
 PEG 添加なし



ブランク試料



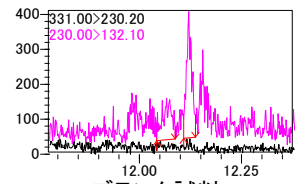
添加試料



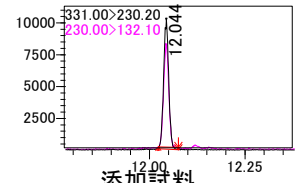
標準溶液

図 33 ばれいしょの SIM クロマトグラム (GC-MS)

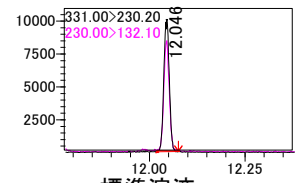
定量イオン  $m/z$  230  
 定性イオン  $m/z$  331  
 添加濃度: 0.01 ppm  
 PEG 添加あり



ブランク試料



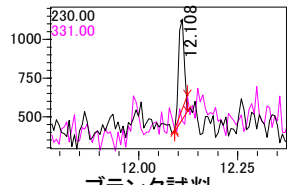
添加試料



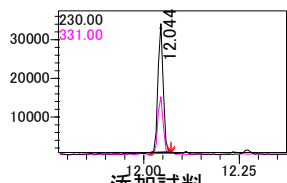
標準溶液

図 34 ばれいしょの SRM クロマトグラム (GC-MS/MS)

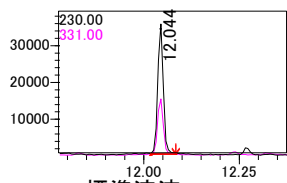
定量イオン  $m/z$  331→230.2  
 定性イオン  $m/z$  230→132.1  
 添加濃度: 0.01 ppm  
 PEG 添加あり



ブランク試料



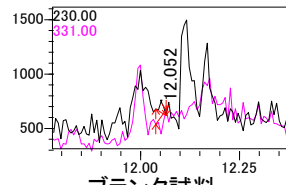
添加試料



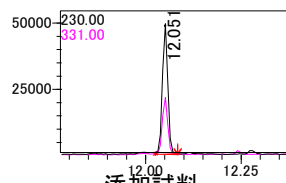
標準溶液

図 35 キャベツの SIM クロマトグラム (GC-MS)

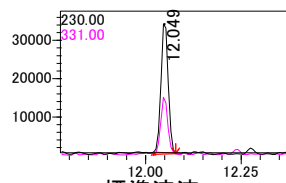
定量イオン  $m/z$  230  
 定性イオン  $m/z$  331  
 添加濃度: 0.01 ppm  
 PEG 添加なし



ブランク試料



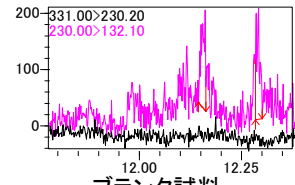
添加試料



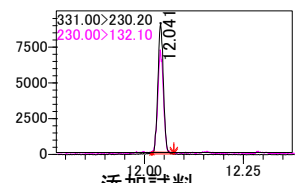
標準溶液

図 36 キャベツの SIM クロマトグラム (GC-MS)

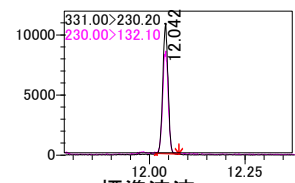
定量イオン  $m/z$  230  
 定性イオン  $m/z$  331  
 添加濃度: 0.01 ppm  
 PEG 添加あり



ブランク試料



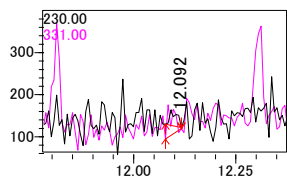
添加試料



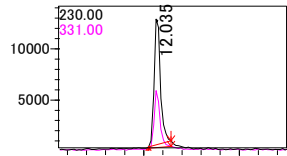
標準溶液

図 37 キャベツの SRM クロマトグラム (GC-MS/MS)

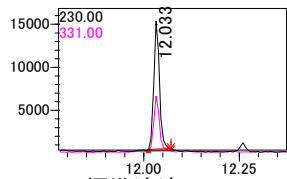
定量イオン  $m/z$  331→230.2  
 定性イオン  $m/z$  230→132.1  
 添加濃度: 0.01 ppm  
 PEG 添加あり



ブランク試料 (200 倍希釈)



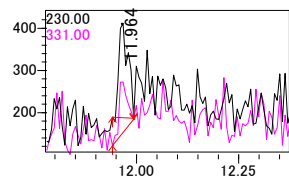
添加試料 (200 倍希釈)



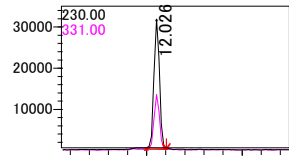
標準溶液

図 38 なすの SIM クロマトグラム (GC-MS)

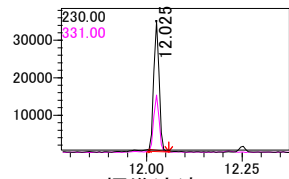
定量イオン  $m/z$  230  
 定性イオン  $m/z$  331  
 添加濃度: 2 ppm  
 PEG 添加なし



ブランク試料 (200 倍希釈)



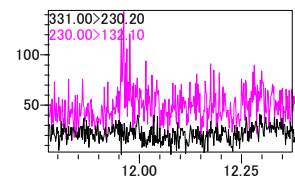
添加試料 (200 倍希釈)



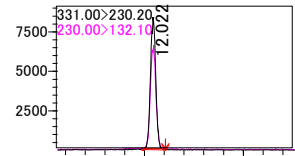
標準溶液

図 39 なすの SIM クロマトグラム (GC-MS)

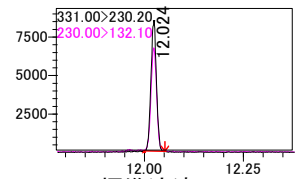
定量イオン  $m/z$  230  
 定性イオン  $m/z$  331  
 添加濃度: 2 ppm  
 PEG 添加あり



ブランク試料 (200 倍希釈)



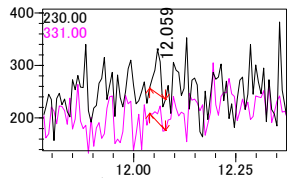
添加試料 (200 倍希釈)



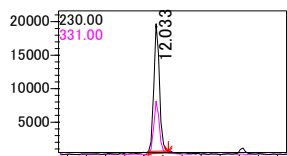
標準溶液

図 40 なすの SRM クロマトグラム (GC-MS/MS)

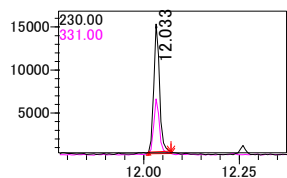
定量イオン  $m/z$  331→230.2  
 定性イオン  $m/z$  230→132.1  
 添加濃度: 2 ppm  
 PEG 添加あり



ブランク試料



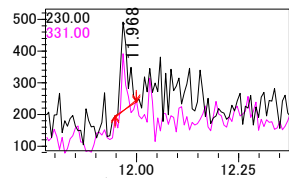
添加試料



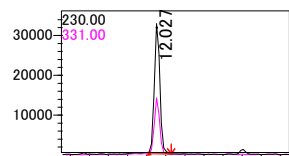
標準溶液

図 41 なすの SIM クロマトグラム (GC-MS)

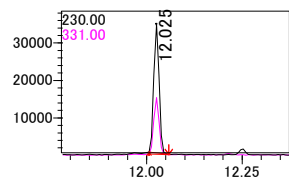
定量イオン  $m/z$  230  
 定性イオン  $m/z$  331  
 添加濃度: 0.01 ppm  
 PEG 添加なし



ブランク試料



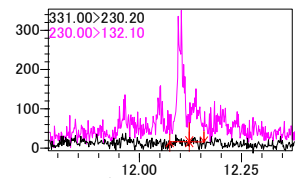
添加試料



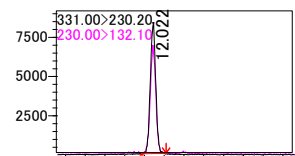
標準溶液

図 42 なすの SIM クロマトグラム (GC-MS)

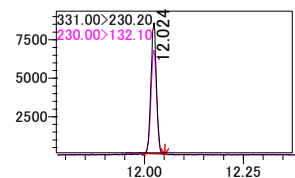
定量イオン  $m/z$  230  
 定性イオン  $m/z$  331  
 添加濃度: 0.01 ppm  
 PEG 添加あり



ブランク試料



添加試料



標準溶液

図 43 なすの SRM クロマトグラム (GC-MS/MS)

定量イオン  $m/z$  331→230.2  
 定性イオン  $m/z$  230→132.1  
 添加濃度: 0.01 ppm  
 PEG 添加あり

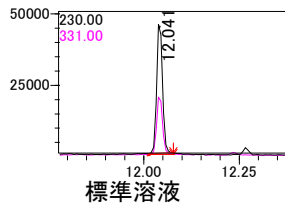
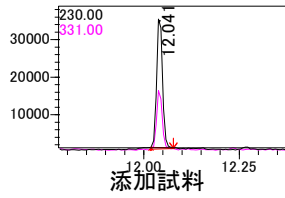
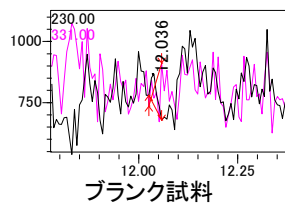


図 44 ほうれんそうの SIM クロマトグラム (GC-MS)  
 定量イオン  $m/z$  230  
 定性イオン  $m/z$  331  
 添加濃度: 0.01 ppm  
 PEG 添加なし

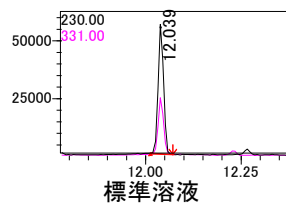
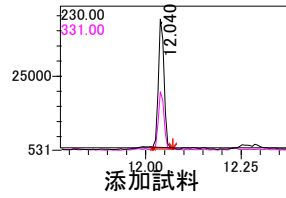
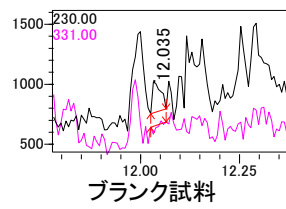


図 45 ほうれんそうの SIM クロマトグラム (GC-MS)  
 定量イオン  $m/z$  230  
 定性イオン  $m/z$  331  
 添加濃度: 0.01 ppm  
 PEG 添加あり

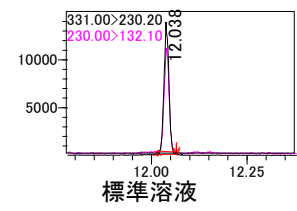
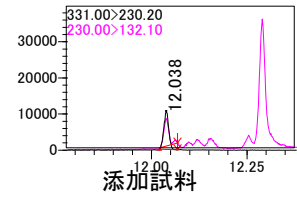
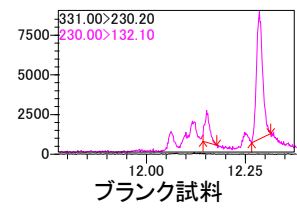
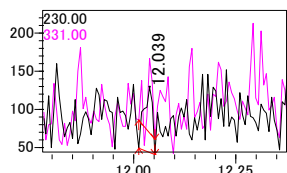
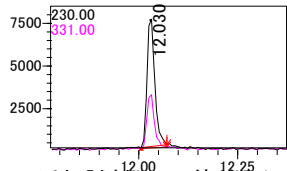


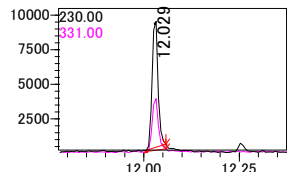
図 46 ほうれんそうの SRM クロマトグラム (GC-MS/MS)  
 定量イオン  $m/z$  331→230.2  
 定性イオン  $m/z$  230→132.1  
 添加濃度: 0.01 ppm  
 PEG 添加あり



ブランク試料 (500 倍希釈)



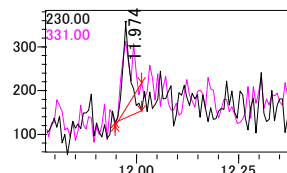
添加試料 (500 倍希釈)



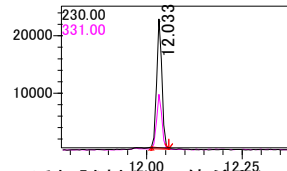
標準溶液

図 47 オレンジの SIM クロマトグラム (GC-MS)

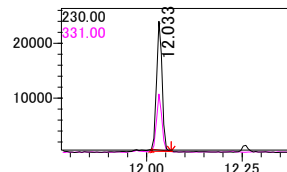
定量イオン  $m/z$  230  
 定性イオン  $m/z$  331  
 添加濃度: 5 ppm  
 PEG 添加なし



ブランク試料 (500 倍希釈)



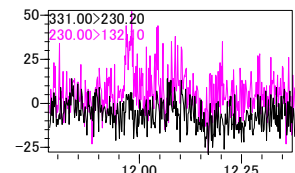
添加試料 (500 倍希釈)



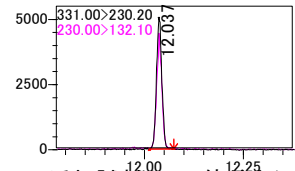
標準溶液

図 48 オレンジの SIM クロマトグラム (GC-MS)

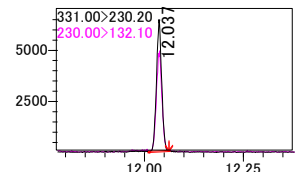
定量イオン  $m/z$  230  
 定性イオン  $m/z$  331  
 添加濃度: 5 ppm  
 PEG 添加あり



ブランク試料 (500 倍希釈)



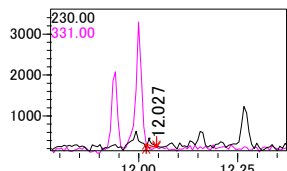
添加試料 (500 倍希釈)



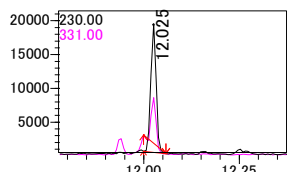
標準溶液

図 49 オレンジの SRM クロマトグラム (GC-MS/MS)

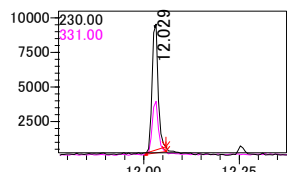
定量イオン  $m/z$  331→230.2  
 定性イオン  $m/z$  230→132.1  
 添加濃度: 5 ppm  
 PEG 添加あり



ブランク試料



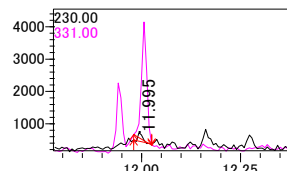
添加試料



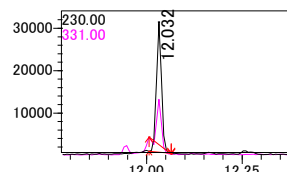
標準溶液

図 50 オレンジの SIM クロマトグラム (GC-MS)

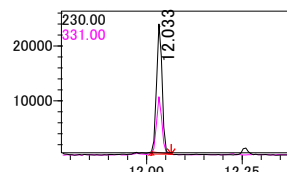
定量イオン  $m/z$  230  
 定性イオン  $m/z$  331  
 添加濃度: 0.01 ppm  
 PEG 添加なし



ブランク試料



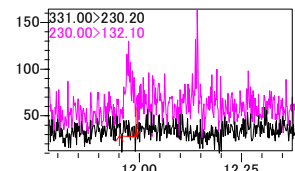
添加試料



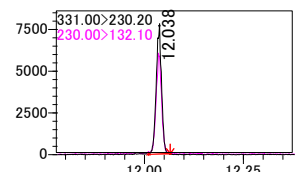
標準溶液

図 51 オレンジの SIM クロマトグラム (GC-MS)

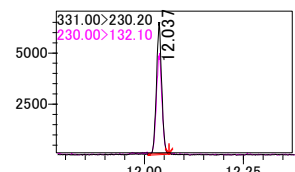
定量イオン  $m/z$  230  
 定性イオン  $m/z$  331  
 添加濃度: 0.01 ppm  
 PEG 添加あり



ブランク試料



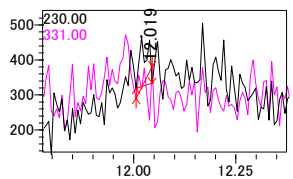
添加試料



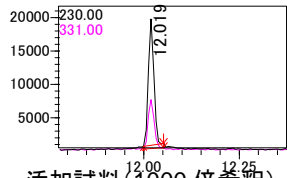
標準溶液

図 52 オレンジの SRM クロマトグラム (GC-MS/MS)

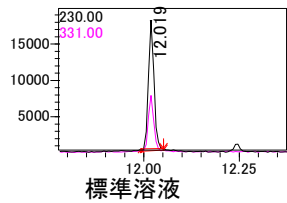
定量イオン  $m/z$  331→230.2  
 定性イオン  $m/z$  230→132.1  
 添加濃度: 0.01 ppm  
 PEG 添加あり



ブランク試料 (1000 倍希釈)



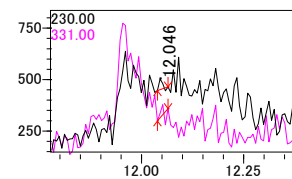
添加試料 (1000 倍希釈)



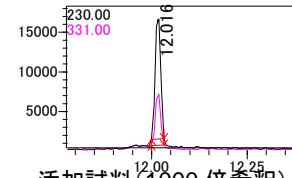
標準溶液

図 53 ぶどうの SIM クロマトグラム (GC-MS)

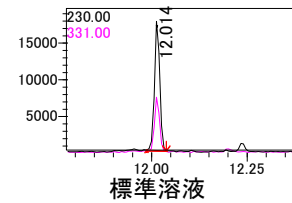
定量イオン  $m/z$  230  
 定性イオン  $m/z$  331  
 添加濃度: 10 ppm  
 PEG 添加なし



ブランク試料 (1000 倍希釈)



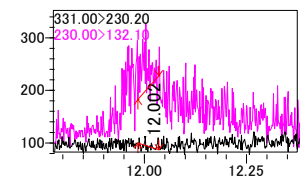
添加試料 (1000 倍希釈)



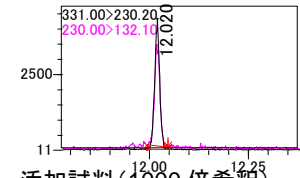
標準溶液

図 54 ぶどうの SIM クロマトグラム (GC-MS)

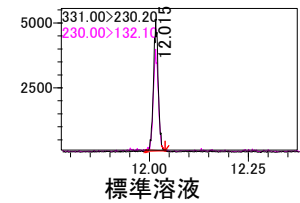
定量イオン  $m/z$  230  
 定性イオン  $m/z$  331  
 添加濃度: 10 ppm  
 PEG 添加あり



ブランク試料 (1000 倍希釈)



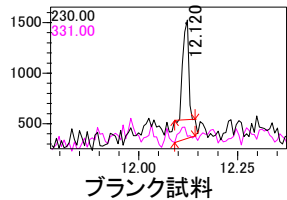
添加試料 (1000 倍希釈)



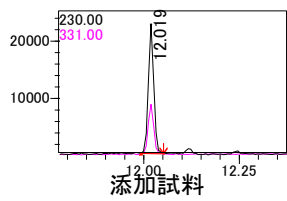
標準溶液

図 55 ぶどうの SRM クロマトグラム (GC-MS/MS)

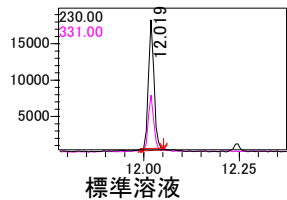
定量イオン  $m/z$  331→230.2  
 定性イオン  $m/z$  230→132.1  
 添加濃度: 10 ppm  
 PEG 添加あり



ブランク試料



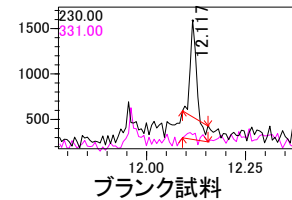
添加試料



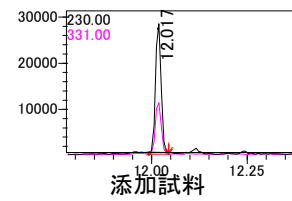
標準溶液

図 56 ぶどうの SIM クロマトグラム (GC-MS)

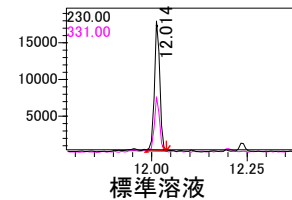
定量イオン  $m/z$  230  
 定性イオン  $m/z$  331  
 添加濃度: 0.01 ppm  
 PEG 添加なし



ブランク試料



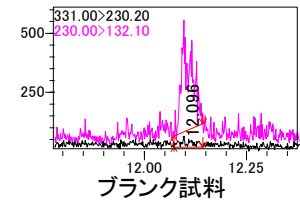
添加試料



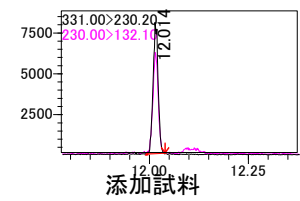
標準溶液

図 57 ぶどうの SIM クロマトグラム (GC-MS)

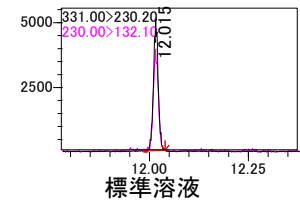
定量イオン  $m/z$  230  
 定性イオン  $m/z$  331  
 添加濃度: 0.01 ppm  
 PEG 添加あり



ブランク試料



添加試料

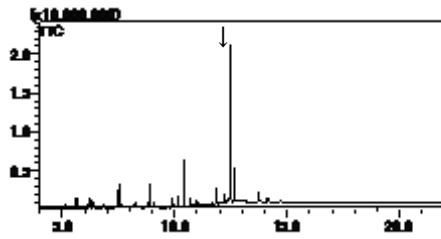


標準溶液

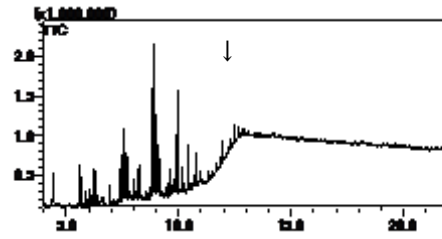
図 58 ぶどうの SRM クロマトグラム (GC-MS/MS)

定量イオン  $m/z$  331→230.2  
 定性イオン  $m/z$  230→132.1  
 添加濃度: 0.01 ppm  
 PEG 添加あり

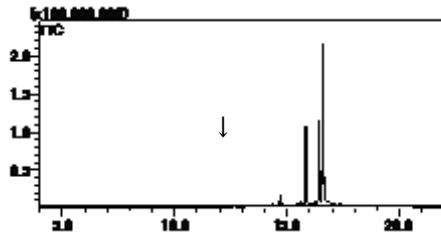




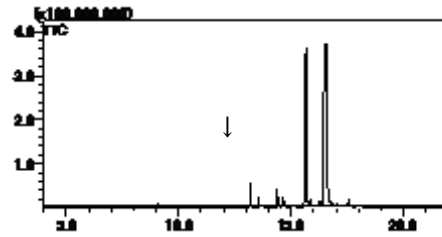
玄米



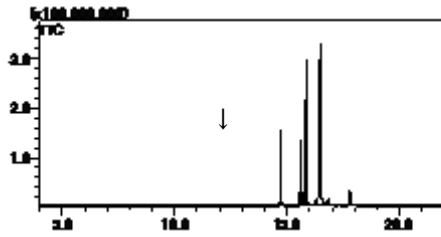
大豆



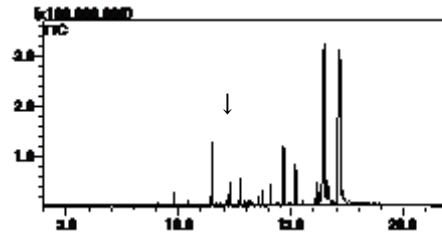
ばれいしょ



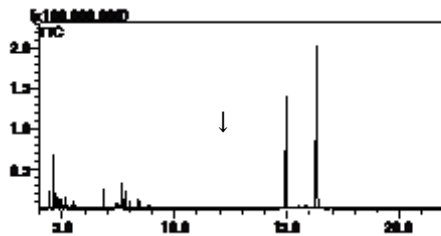
キャベツ



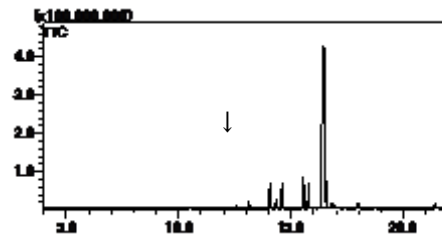
なす



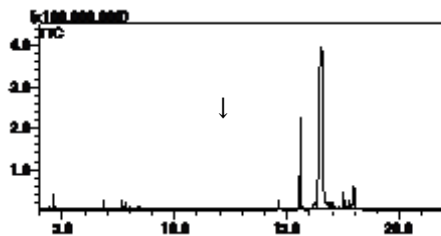
ほうれんそう



オレンジ



ぶどう



(参考)オレンジ

追加精製にオクタデシル化シリル化シリカゲルミニカラムでなく、  
グラファイトカーボンミニカラムを用いた場合

図 59 ブランク試料のトータルイオンクロマトグラム (GC-MS)  
(スキャン範囲: 70~500 amu)