

※本報告書は、試験法開発における検討結果を取り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下さい。

食品に残留する農薬等の成分である物質の 試験法開発事業報告書

フルエンスルホン試験法（農産物）

フルエンズルホン試験法（農産物）の検討結果

[緒言]

1. 目的

フルエンズルホンは、フルオロアルキルチオエーテル基を有する殺線虫剤である。作用機構は不明であるが、ネコブセンチュウに直接接触することにより殺虫効果を示すと考えられている。

関連企業から基準値の設定要請がなされたことに伴い、食品安全委員会において食品健康影響評価がなされた。評価結果を踏まえ、農薬・動物用医薬品部会において基準値が見直され、厚生労働大臣官房生活衛生・食品安全審議官通知「生食発 0530 第 1 号（令和元年 5 月 30 日）」において、「農産物についてはフルエンズルホン及び 3,4,4-トリフルオロブタ-3-エン-1-イルズルホン酸（以下「代謝物 BSA」という）をフルエンズルホンに換算したものの和」とすることに変更されたとともに、基準値も改正された。

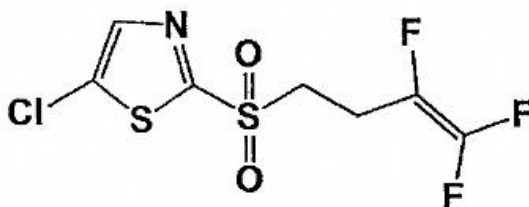
本検討においては、薬事食品衛生審議会食品衛生分科会報告書に記載されている内容を踏まえ、農産物中のフルエンズルホン試験法の開発を行った。

2. 分析対象化合物の構造式及び物理化学的性質

分析対象化合物：フルエンズルホン

IUPAC 名：5-Chloro-2-[(3, 4, 4-trifluorobut-3-en-1-yl)sulfonyl]thiazole

構造式：



分子式：C₇H₅ClF₃NO₂S₂

分子量：291.70

蒸気圧：3.1×10⁻² Pa (25℃)

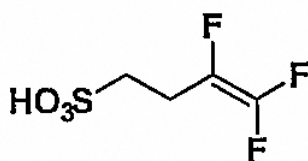
溶解性：水 545.3×10⁻³ g/L (20℃)

1-オクタノール／水分配係数 (log P_{ow})：1.96 (25℃)

分析対象化合物：代謝物 BSA (3, 4, 4-トリフルオロブタ-3-エン-1-イルズルホン酸)

IUPAC 名：3, 4, 4-Trifluorobut-3-en-1-ylsulfonic acid

構造式：



分子式：C₄H₅F₃O₃S

分子量：190.14

蒸気圧：7.5×10^{-5} Pa (25°C)

溶解性：水 580.9 g/L (20°C)

1-オクタノール／水分配係数 (log P_{ow})：-2.5 (pH 3.0, 22.2°C)

出典：農林水産省消費・安全局農産安全管理課、独立行政法人農林水産消費安全技術センター
平成 29 年 9 月 27 日審査報告書 (フルエンズルホン)

3. 基準値 (案)

ほうれんそう	4 ppm
キャベツ	2 ppm
かんしょ	5 ppm
すいか	0.2 ppm
いちご	0.5 ppm

[実験方法]

1. 試料

すべて東京都内の小売店で購入した。また、試料の調製方法を以下に記載した。

1) 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を細切りした後、フードプロセッサーを用いて均一化した。

2) キャベツ

外側変質葉及びしんを除去したものを細切りした後、フードプロセッサーを用いて均一化した。

3) かんしょ

泥を水で軽く洗い落としたものを細切りした後、フードプロセッサーを用いて均一化した。

4) すいか (果肉部のみ)

果皮を除去したものを細切りした後、フードプロセッサーを用いて均一化した。

5) すいか (果実全体)

細切りした後、フードプロセッサーを用いて均一化した。

6) いちご

へたを除去したものを細切りした後、フードプロセッサーを用いて均一化した。

2. 試薬・試液

フルエンズルホン標準品：純度 99.5% (ADAMA MAKHTESHIM より提供)

代謝物 BSA ナトリウム塩標準品 (A)：純度 51% (林純薬工業 (株) より提供)

代謝物 BSA ナトリウム塩標準品 (B)：純度 97.8% (ADAMA MAKHTESHIM より提供)

アセトニトリル：残留農薬試験用 (関東化学 (株) 製)

アセトニトリル：LC/MS 用 (関東化学 (株) 製)

25%アンモニア水：特級 25%アンモニア水（富士フィルム和光純薬（株）製）

塩酸：特級（富士フィルム和光純薬（株）製）

0.2 mol/L 塩酸：塩酸 4 mL に水を加え 240 mL とした。

ギ酸：LC/MS 用（富士フィルム和光純薬（株）製）

ミニカラム：InertSep GC（500 mg/6 mL）（ジーエルサイエンス（株）製）

ミニカラム：InertSep MA-1（500 mg/6 mL）（ジーエルサイエンス（株）製）

ミニカラム：InertSep SAX（500 mg/6mL）（ジーエルサイエンス（株）製）

標準原液

フルエンシルホン標準品 10.0 mg を精秤し、アセトニトリルで 100 mL に溶解して、フルエンシルホン 100 mg/L 溶液を調製した。

代謝物 BSA ナトリウム塩標準品（A）14.3 mg を精秤し、アセトニトリルで 100 mL に溶解して、代謝物 BSA65.4 mg/L（フルエンシルホンとして 100 mg/L）溶液を調製した*。なお、この標準原液は添加回収試験に用いた。

代謝物 BSA ナトリウム塩標準品（B）7.3 mg を精秤し、アセトニトリルで 100 mL に溶解して、代謝物 BSA65.4 mg/L（フルエンシルホンとして 100 mg/L）溶液を調製した。なお、この標準原液は添加回収試験以外の検討に用いた。

※標準品の純度（51%）を考慮して換算し、調製した。詳細は別紙に記載した。

なお、以降の代謝物 BSA 濃度はフルエンシルホン換算値とする。

検量線用標準溶液：標準原液をアセトニトリル及び水（1：4）混液で適宜希釈し、0.000125~0.0075 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を用いて適宜希釈して調製した。

3. 装置

ホモジナイザー： マルチディスペーサー PB-95（シャフト：HG-2）（SMT COMPANY 製）

フードプロセッサー：MK-K58（National 製）

濃縮装置：有機溶媒回収装置 V-703（BUCHI 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）

LC-MS/MS

装置	型式	会社
MS	Triple Quad 4500	SCIEX
LC	Prominence LC-20A	（株）島津製作所
データ処理	Analyst Software	SCIEX

4. 測定条件

LC-MS/MS

LC 条件																								
カラム	Synergi Fusion-RP (内径 2.0 mm、長さ 150 mm、粒子径 4 μm : Phenomenex 製)																							
移動相流速 (mL/min)	0.20																							
注入量 (μL)	10																							
カラム温度 ($^{\circ}\text{C}$)	40																							
移動相	A 液 : 0.1 vol%ギ酸 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>80</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>5.0</td> <td>80</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>15.0</td> <td>1</td> <td>99</td> </tr> <tr> <td>25.0</td> <td>1</td> <td>99</td> </tr> <tr> <td>25.1</td> <td>80</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>35.0</td> <td>80</td> <td>20</td> </tr> </tbody> </table>			時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)	0.0	80	20	5.0	80	20	15.0	1	99	25.0	1	99	25.1	80	20	35.0	80	20
時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)																						
0.0	80	20																						
5.0	80	20																						
15.0	1	99																						
25.0	1	99																						
25.1	80	20																						
35.0	80	20																						
MS 条件																								
測定モード	SRM (選択反応モニタリング)																							
イオン化モード	フルエンズルホン : ESI (+) 代謝物 BSA : ESI (-)																							
キャピラリ電圧 (V)	4500, -4500																							
脱溶媒温度 ($^{\circ}\text{C}$)	600																							
ネブライザーガス	窒素、70 psi																							
脱溶媒ガス	窒素、80 psi																							
コリジョンガス	窒素																							
定量イオン (m/z)	フルエンズルホン : 292.1 \rightarrow 166.1 [CV : 61 (V)、CE : 25 (eV)] 代謝物 BSA : 188.8 \rightarrow 80.9 [CV : -40 (V)、CE : -24 (eV)]																							
定性イオン (m/z)	フルエンズルホン : 292.1 \rightarrow 109.1 [CV : 61 (V)、CE : 27 (eV)] 代謝物 BSA : 188.8 \rightarrow 79.9 [CV : -40 (V)、CE : -50 (eV)]																							
保持時間 (min)	フルエンズルホン : 14.5 代謝物 BSA : 9.8																							

CV : Cone Voltage, CE : Collision Energy

5. 定量

フルエンズルホン及び代謝物 BSA 標準原液をアセトニトリル及び水 (1 : 4) 混液で希釈して

0.000125~0.0075 mg/L の標準溶液を調製した。この溶液 10 μ L を LC-MS/MS に注入して、得られたピーク面積を用いて絶対検量線法により検量線を作成した。同様に試験溶液 10 μ L を LC-MS/MS に注入し、得られたピーク面積を用いて、作成した検量線から試料中のフルエンズルホン及び代謝物 BSA の含量を算出した。なお定量限界値相当の添加濃度を評価する場合には 0.000125、0.00025、0.000375、0.0005、0.000625、0.00075 mg/L の濃度で検量線を作成し、基準値相当の添加濃度を評価する場合には 0.00125、0.0025、0.00375、0.005、0.00625、0.0075 mg/L の濃度で検量線を作成した。また、基準値相当の添加試料については検量線の範囲内に収まるよう、試験溶液をほうれんそうは 80 倍、キャベツは 40 倍、かんしょは 100 倍、すいか（果肉部のみ）及びすいか（果実全体）は 4 倍、いちごは 10 倍希釈した。

6. 試験溶液の調製

1) 添加試料の調製

試料 20.0 g に添加用標準溶液 1 mL（アセトニトリル溶液）を添加しよく混合した後、30 分間放置した。各試料において使用した添加用標準溶液の濃度を表 1 に示す。

表 1 各試料における添加用標準溶液の濃度

試料	添加濃度 (ppm)	添加用標準溶液濃度 (mg/L)
ほうれんそう	0.005	0.1
	4	80
キャベツ	0.005	0.1
	2	40
かんしょ	0.005	0.1
	5	100
すいか（果肉部のみ）	0.005	0.1
	0.2	4
すいか（果実全体）	0.005	0.1
	0.2	4
いちご	0.005	0.1
	0.5	10

2) 抽出

①ほうれんそうの場合

試料 20.0 g にアセトニトリル 100 mL を加え、ホモジナイズした後、毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離し、上澄液を採った。残留物にアセトニトリル 50 mL を加えてホモジナイズした後、毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離し、得られた上澄液を合わせ、アセトニトリルを加えて正確に 200 mL とした。この溶液 20 mL を採り、40°C 以下で約 5 mL まで濃縮した。

②キャベツ、かんしょ、すいか及びいちごの場合

試料 20.0 g にアセトニトリル 100 mL を加え、ホモジナイズした後、毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離し、上澄液を採った。残留物にアセトニトリル 50 mL を加えてホモジナイズした後、毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離し、得られた上澄液を合わせ、アセトニトリルを加えて正確に 200 mL とした。この溶液 20 mL を採り、水 5 mL を加え、40°C 以下で約 2 mL まで濃縮した。

3) 精製

①ほうれんそうの場合

a グラファイトカーボンミニカラム [InertSep GC (500 mg/6 mL)]

InertSep GC (500 mg/6 mL) にアセトニトリル及びアセトニトリル/水 (9 : 1) 各 10 mL を順次注入し、各流出液は捨てた。このカラムに 2) で得られた溶液を注入し、アセトニトリル/水 (9 : 1) 20 mL を注入して、全溶出液を採り、これに水 5 mL を加え、40°C 以下で約 2 mL まで濃縮した。

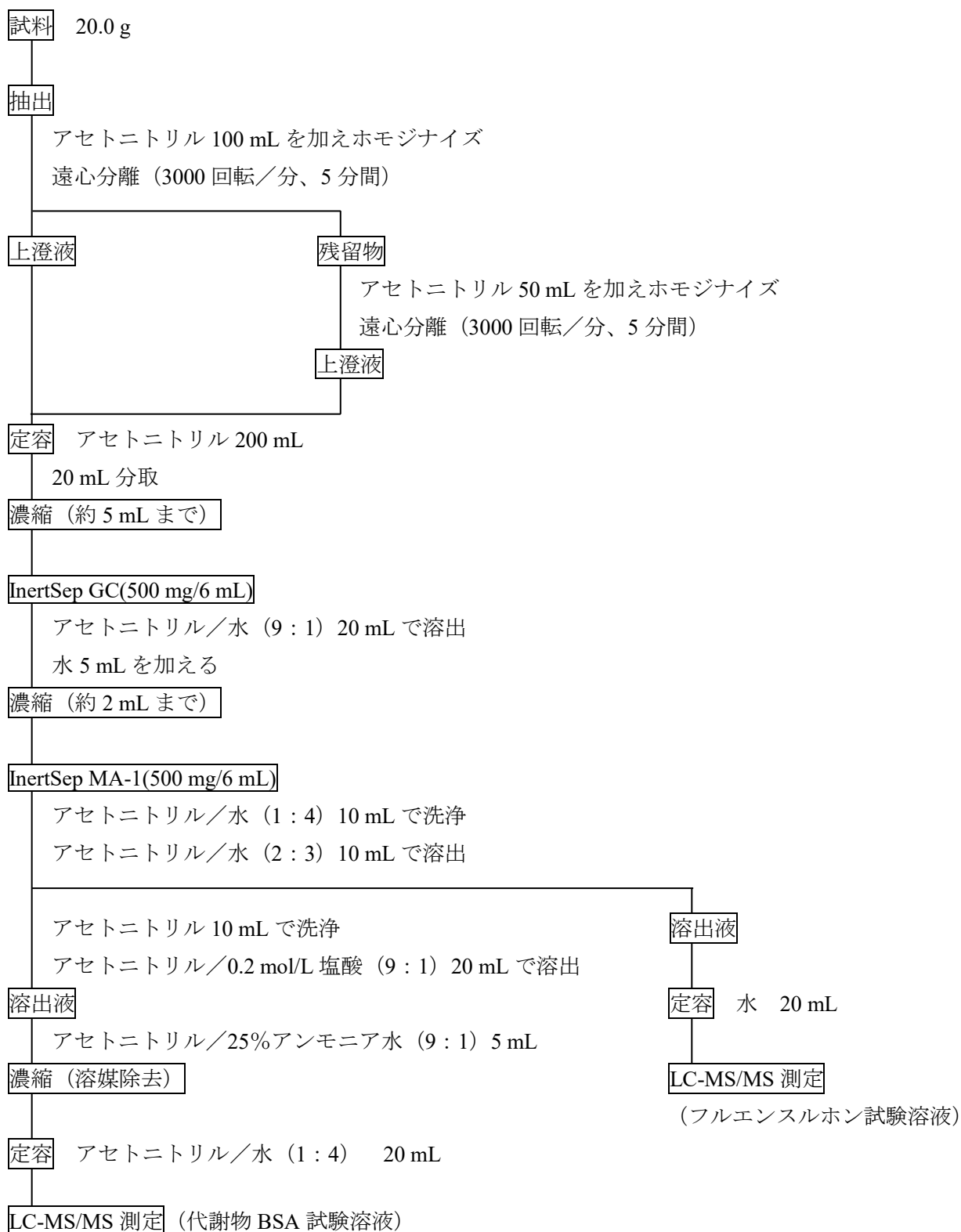
b トリメチルアンモニウム塩修飾メタクリレート重合体ミニカラム [InertSep MA-1 (500 mg/6 mL)]

InertSep MA-1 (500 mg/6 mL) にアセトニトリル及びアセトニトリル/水 (1 : 4) 各 10 mL を順次注入し、各流出液は捨てた。このカラムに a で得られた溶液を注入した後、アセトニトリル/水 (1 : 4) 10 mL を注入し、流出液を捨てた。次いで、アセトニトリル/水 (2 : 3) 10 mL を注入し、溶出液を採り、水を加えて正確に 20 mL としたものをフルエンスルホン試験溶液とした。このカラムにアセトニトリル 10 mL を注入し、流出液は捨てた。次いで、アセトニトリル/0.2 mol/L 塩酸 (9 : 1) 20 mL を注入し、溶出液を採り、アセトニトリル/25%アンモニア水 (9 : 1) 5 mL を加えて振り混ぜた。この溶液を 40°C 以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物をアセトニトリル/水 (1 : 4) に溶解し、正確に 20 mL としたものを代謝物 BSA 試験溶液とした。

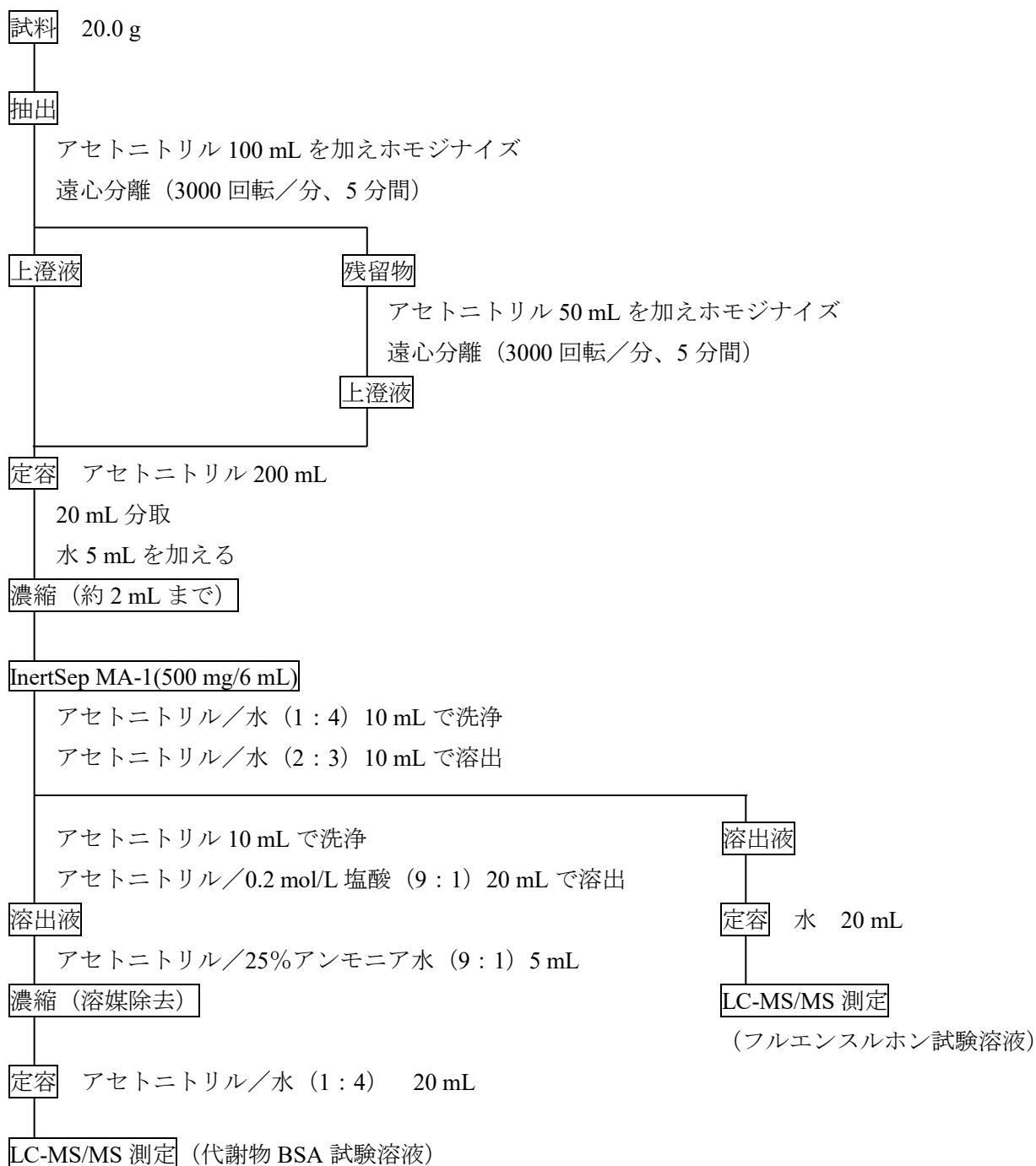
②キャベツ、かんしょ、すいか及びいちごの場合

InertSep MA-1 (500 mg/6 mL) にアセトニトリル及びアセトニトリル/水 (1 : 4) 各 10 mL を順次注入し、各流出液は捨てた。このカラムに 2) で得られた溶液を注入した後、アセトニトリル/水 (1 : 4) 10 mL を注入し、流出液を捨てた。次いで、アセトニトリル/水 (2 : 3) 10 mL を注入し、溶出液を採り、水を加えて正確に 20 mL としたものをフルエンスルホン試験溶液とした。このカラムにアセトニトリル 10 mL を注入し、流出液は捨てた。次いで、アセトニトリル/0.2 mol/L 塩酸 (9 : 1) 20 mL を注入し、溶出液を採り、アセトニトリル/25%アンモニア水 (9 : 1) 5 mL を加えて振り混ぜた。この溶液を 40°C 以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物をアセトニトリル/水 (1 : 4) に溶解し、正確に 20 mL としたものを代謝物 BSA 試験溶液とした。

[分析法フローチャート (ほうれんそう)]



[分析法フローチャート (かんしょ、キャベツ、すいか及びいちご)]



7. マトリックス添加標準溶液の調製

各検討対象食品のブランク試験溶液 0.2 mL を採り、窒素気流下で溶媒を除去した後、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 0.2 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。

[結果及び考察]

1. 測定条件の検討

1) MS 条件の検討

イオン化モードを選択するために、インフュージョン測定を行ったところ、フルエンシルホンはプロトン付加分子である m/z 292.1[M+H]⁺が検出された。一方、代謝物 BSA は脱プロトン化分子である m/z 188.8[M-H]⁻が検出された。そこで、フルエンシルホンの測定には ESI (+) モード、代謝物 BSA の測定には ESI (-) モードを用いることとした。このときのマススペクトルを図 1 及び図 2 に示す。

フルエンシルホンのプロトン付加分子である m/z 292.1[M+H]⁺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 3 及び図 4 に示した。 m/z 166.1 が非常に高い強度で検出され、次いで m/z 109.1 が検出されたことから、 m/z 292.1→166.1 を定量用、 m/z 292.1→109.1 を定性用の測定イオンとした。また、代謝物 BSA の脱プロトン化分子である m/z 188.8 [M-H]⁻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 5 及び図 6 に示した。 m/z 80.9 が非常に高い強度で検出され、次いで m/z 79.9 が検出されたことから、 m/z 188.8→80.9 を定量用、 m/z 188.8→79.9 を定性用の測定イオンとした。

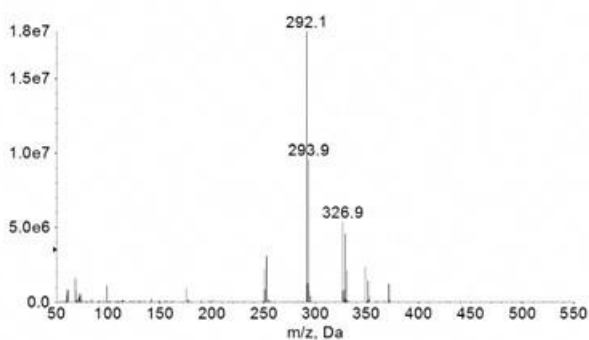


図 1 フルエンシルホン標準溶液のマススペクトル
スキャン範囲：50~550 amu
測定条件：ESI+, CV=61 V

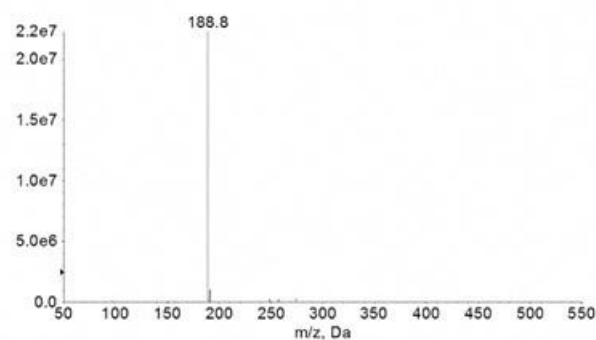


図 2 代謝物 BSA 標準溶液のマススペクトル
スキャン範囲：50~550 amu
測定条件：ESI-, CV=-40 V

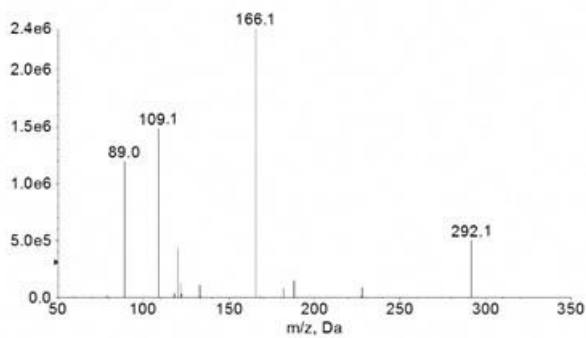


図3 フルエンシルホンのプロダクトイオン
スペクトル (定量用)
プリカーサーイオン : m/z 292.1
測定条件 : ESI+, CV=61 V, CE=25 eV

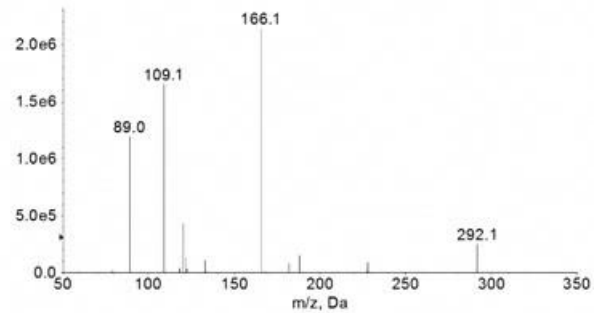


図4 フルエンシルホンのプロダクトイオン
スペクトル (定性用)
プリカーサーイオン : m/z 292.1
測定条件 : ESI+, CV=61 V, CE=27 eV

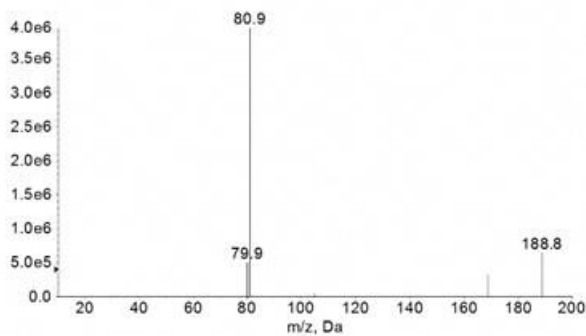


図5 代謝物 BSA のプロダクトイオンスペクトル
(定量用)
プリカーサーイオン : m/z 188.8
測定条件 : ESI-, DP=-40 V, CE=-24 eV

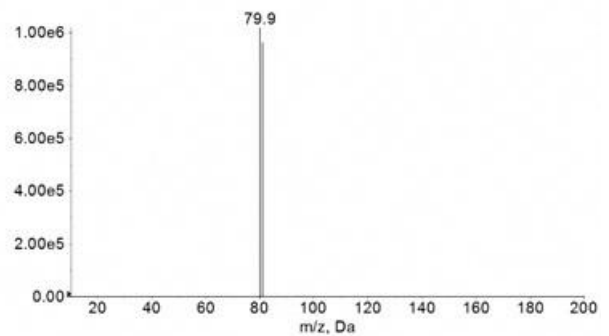


図6 代謝物 BSA のプロダクトイオンスペクトル
(定性用)
プリカーサーイオン : m/z 188.8
測定条件 : ESI-, DP=-40 V, CE=-50 eV

2) LC 条件の検討

分析カラムについて検討を行った。HILIC カラムではフルエンシルホン及び代謝物 BSA いずれも保持されず、オクタデシルシリル化シリカゲルカラムではフルエンシルホンの保持は良好だったが、代謝物 BSA の保持が強すぎるため溶出されなかった。国内及び海外の作物残留試験において使用されている Sunniest RP-AQUA ((株)クロマニックテクノロジー社製) 及び Synergi fusion-RP を用いて検討を行ったところ、いずれのカラムにおいてもフルエンシルホン及び代謝物 BSA は保持され、良好なピーク形状が得られた。しかし、Sunniest RP-AQUA では代謝物 BSA のピーク強度が Synergi fusion-RP を使用した場合の 1/2 程度しか得られず、また、試験溶液を測定した場合に夾雑ピークが代謝物 BSA のピ

ークと近接して現れたことから、測定には Synergi fusion-RP を用いることとした。

移動相条件については、アセトニトリル／ギ酸について、添加剤の 3 濃度 (0.05、0.1 及び 0.2vol%) 及び 5 mmol/L 酢酸アンモニウム／5 mmol/L 酢酸アンモニウム・メタノールについて検討した結果アセトニトリル／0.1vol%ギ酸を用いた場合にフルエンシルホン及び代謝物 BSA とともに最も良好な感度とピーク形状が得られたので、アセトニトリル／0.1vol%ギ酸を移動相として用いることにした。

3) 検量線

図 7~10 に検量線の例を示した。0.000125~0.00075 mg/L 及び 0.00125~0.0075 mg/L の濃度範囲で作成した検量線の決定係数は、いずれの検量線も 0.999 以上であり良好な直線性を示した。

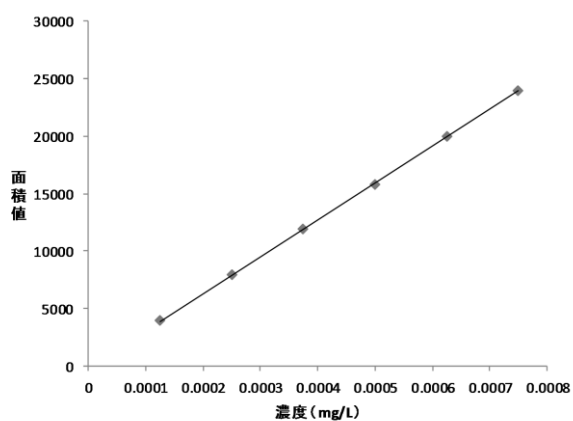


図 7 フルエンシルホン検量線の例
(定量限界値相当評価用)
濃度範囲 : 0.000125~0.00075 mg/L
 $y = 32077943x - 122 \quad r^2=0.9999$

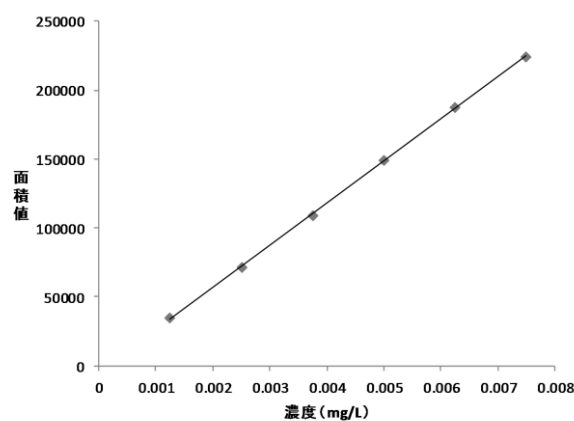


図 8 フルエンシルホン検量線の例
(基準値相当評価用)
濃度範囲 : 0.00125~0.0075 mg/L
 $y = 30563109x - 4364 \quad r^2=0.9999$

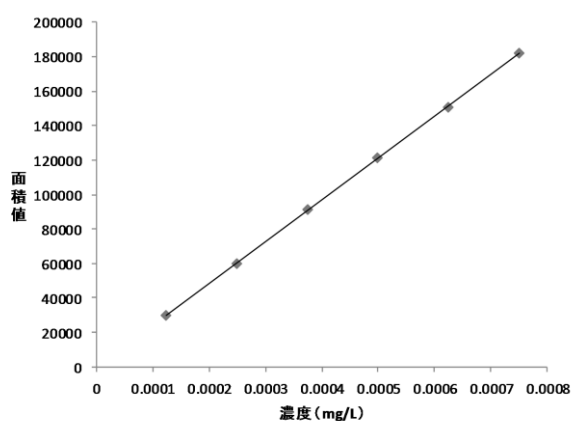


図 9 代謝物 BSA 検量線の例
(定量限界値相当評価用)
濃度範囲 : 0.000125~0.00075 mg/L
 $y = 243227657x - 496 \quad r^2=0.9999$

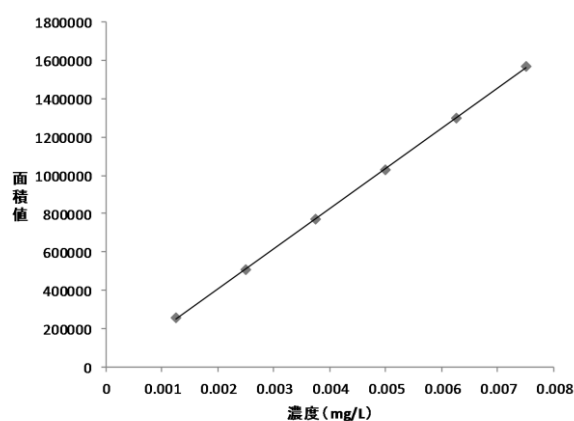


図 10 代謝物 BSA 検量線の例
(基準値相当評価用)
濃度範囲 : 0.00125~0.0075 mg/L
 $y = 209947589x - 13046 \quad r^2=0.9999$

2. 試験溶液調製法の検討

1) 抽出溶媒の検討

検討対象試料のうち、水分含量の比較的低いかんしょ及び比較的高いすいか（果実全体）を用いて抽出溶媒の検討を行った。試料 20.0 g にフルエンズルホン及び代謝物 BSA 10 mg/L 溶液（アセトニトリル溶液）2 mL を添加して、30 分放置した後、アセトニトリル及びアセトニトリル／水（1：1）100 mL（1 回目）、50 mL（2 回目）を加えてホモジナイズ後、遠心分離を行い、上澄液を 200 mL に定容した。ここから 1 mL を分取しアセトニトリルを加えて 10 mL としたものを試験溶液とした。結果は表 2 及び 3 に示したとおり、いずれの場合も良好な回収が得られたが、抽出後の濃縮操作における操作性を考慮して、抽出溶媒にはアセトニトリルを用いることとした。

表 2 抽出溶媒の検討におけるフルエンズルホンの回収率（%）

抽出溶媒	かんしょ	すいか（果実全体）
アセトニトリル	96.4	96.4
アセトニトリル／水（1：1）	98.4	97.6

添加量：20 µg

表 3 抽出溶媒の検討における代謝物 BSA の回収率（%）

抽出溶媒	かんしょ	すいか（果実全体）
アセトニトリル	96.5	99.0
アセトニトリル／水（1：1）	103.8	105.8

添加量：20 µg

2) カラム精製の検討

①陰イオン交換体ミニカラムによる精製 [InertSep SAX（500 mg/6 mL）]

InertSep SAX（500 mg/6 mL）における溶出状況の確認を行った。カラムをアセトニトリル 10 mL（及び水 10 mL）で予備洗浄した後、フルエンズルホン及び代謝物 BSA 0.1 mg/L 溶液（溶出溶媒の溶液）を 1 mL 負荷し、溶出溶媒を 5 mL ずつ負荷して各分画を分取した。結果は表 4 及び 5 に示したとおり、フルエンズルホンはアセトニトリル 5 mL 及び水 10 mL で溶出されたが、代謝物 BSA はいずれの溶媒においても溶出されなかった。

表 4 SAX ミニカラムからのフルエンズルホンの溶出状況（%）。

溶出溶媒	0-5 mL	5-10 mL	10-15 mL	15-20 mL	20-25 mL	25-30 mL	計
アセトニトリル	105.7	0	0	0	0	0	105.7
水	92.4	8.9	0	0	0	0	101.3

添加量：0.1 µg

表5 SAX ミニカラムからの代謝物 BSA の溶出状況 (%) .

溶出溶媒	0-5 mL	5-10 mL	10-15 mL	15-20 mL	20-25 mL	25-30 mL	計
アセトニトリル	0	0	0	0	0	0	0
水	0	0	0	0	0	0	0

添加量 : 0.1 µg

次に、1 vol%ギ酸・アセトニトリル、アセトニトリル/0.1 mol/L 塩酸 (9 : 1) 及びアセトニトリル/0.2 mol/L 塩酸 (9 : 1) を用いて代謝物 BSA の溶出状況を確認した。

カラムをアセトニトリル 10 mL 及び溶出溶媒 10 mL で予備洗浄した後、代謝物 BSA 0.1 mg/L 溶液 (溶出溶媒の溶液) を 1 mL 負荷し、溶出溶媒を 10 mL ずつ流下して各分画を分取した。この時の結果を表 6 に示した。代謝物 BSA は 1 vol%ギ酸・アセトニトリルでは溶出されず、アセトニトリル/0.1 mol/L 塩酸 (9 : 1) 10 mL またはアセトニトリル/0.2 mol/L 塩酸 (9 : 1) 10 mL で溶出された。この結果より、代謝物 BSA はスルホニル基を有するため、塩酸のような強酸を用いなければ SAX ミニカラムにおけるイオン交換が十分に促進されず、カラムから溶出されないことが示唆された。しかし、塩酸を含有した溶媒では SAX ミニカラムの使用可能 pH 範囲 (pH 2~8) の範囲外となってしまうことから、SAX ミニカラムによる精製は困難であると考えた。

表6 酸を用いた場合の SAX ミニカラムからの代謝物 BSA の溶出状況 (%) .

溶出溶媒	0-10 mL	10-20 mL	20-30 mL	計
1 vol%ギ酸・アセトニトリル (pH=2)	0	0	0	0
アセトニトリル/0.1 mol/L 塩酸 (9 : 1) (pH<1)	105.5	0	0	105.5
アセトニトリル/0.2 mol/L 塩酸 (9 : 1) (pH<1)	103.9	0	0	103.9

添加量 : 0.1 µg

②ポリマーベース陰イオン交換体ミニカラムによる精製 [InertSep MA-1 (500 mg/6 mL)]

SAX ミニカラムと比較して、より pH 使用範囲の広い (pH 1~14) ポリマーベースの陰イオン交換体ミニカラムである InertSep MA-1 (500 mg/6 mL) による精製の検討を行った。

カラムをアセトニトリル 10 mL 及び水 10 mL で予備洗浄した後、フルエンズルホン及び代謝物 BSA 0.1 mg/L 溶液 (溶出溶媒の溶液) を 1 mL 負荷し、溶出溶媒を 5 mL ずつ負荷して各分画を分取した。結果を表 7 及び 8 に示した。代謝物 BSA はいずれの溶媒においても溶出されなかった。フルエンズルホンは水及びアセトニトリル/水 (1 : 4) では溶出されず、アセトニトリル/水 (3 : 7) を用いた場合はフルエンズルホンを全量溶出するのに 25 mL と多量の溶媒が必要となった。また、アセトニトリルを用いた場合には 5 mL で溶出可能であったが、実試料 (かんしょ) を用いた際に色素の除去ができず、溶出液が着色した。一方、アセトニトリル/水 (2 : 3) を用いた場合には 10 mL で溶出可能であり、実試料 (かんしょ) を用いた場合にも溶出液の着色はほとんどなく、フルエンズル

ホンの定量を妨害するピークもみられなかった。これらの結果から、MA-1 ミニカラムを用いた精製では、アセトニトリル/水 (1 : 4) 10 mL で洗浄し、アセトニトリル/水 (2 : 3) 10 mL で溶出したものをフルエンシルホン画分とすることとした。

表7 MA-1 ミニカラムからのフルエンシルホンの溶出状況 (%) .

溶出溶媒	溶出溶媒量						
	0-5 mL	5-10 mL	10-15 mL	15-20 mL	20-25 mL	25-30 mL	計
水	0	0	0	0	0	0	0
アセトニトリル/ 水 (1 : 4)	0	0	0	0	0	0	0
アセトニトリル/ 水 (3 : 7)	0	16.6	26.8	27.5	23.6	0	94.5
アセトニトリル/ 水 (2 : 3)	37.7	60.4	0	0	0	0	98.1
アセトニトリル	103.3	0	0	0	0	0	103.3

添加量 : 0.1 µg

表8 MA-1 ミニカラムからの代謝物 BSA の溶出状況 (%)

溶出溶媒	溶出溶媒量						
	0-5 mL	5-10 mL	10-15 mL	15-20 mL	20-25 mL	25-30 mL	計
水	0	0	0	0	0	0	0
アセトニトリル/ 水 (1 : 4)	0	0	0	0	0	0	0
アセトニトリル/ 水 (3 : 7)	0	0	0	0	0	0	0
アセトニトリル/ 水 (2 : 3)	0	0	0	0	0	0	0
アセトニトリル	0	0	0	0	0	0	0

添加量 : 0.1 µg

次に、1 vol%ギ酸・アセトニトリル、アセトニトリル/0.1 mol/L 塩酸 (9 : 1) 及びアセトニトリル/0.2 mol/L 塩酸 (9 : 1) を用いて代謝物 BSA の溶出状況の確認を行った。カラムをアセトニトリル 10 mL 及び水 10 mL で予備洗浄した後、代謝物 BSA 0.1 mg/L 溶液 (溶出溶媒の溶液) を 1 mL 負荷し、溶出溶媒を 10 mL ずつ負荷して各分画を分取した。結果は表 9 に示したとおり、代謝物 BSA は 1 vol%ギ酸・アセトニトリルでは溶出されず、アセトニトリル/0.1 mol/L 塩酸 (9 : 1) 20 mL またはアセトニトリル/0.2 mol/L 塩酸 (9 : 1) 10 mL で溶出された。この結果より MA-1 ミニカラムからアセトニトリル/0.1 mol/L 塩酸 (9 : 1) 20 mL またはアセトニトリル/0.2 mol/L 塩酸 (9 : 1) 10 mL で代謝物 BSA を溶出できることがわかった。

表9 MA-1 ミニカラムからの代謝物 BSA の溶出状況 (%)

溶出溶媒	0-10 mL	10-20 mL	20-30 mL	計
1 vol%ギ酸・アセトニトリル (pH=2)	0	0	0	0
アセトニトリル/0.1 mol/L 塩酸 (9 : 1) (pH<1)	78.9	24.1	0	103.0
アセトニトリル/0.2 mol/L 塩酸 (9 : 1) (pH<1)	103.2	0	0	103.2

添加量 : 0.1 µg

次に、実試料 (かんしょ) を用いて MA-1 ミニカラムからの溶出状況を確認した。

かんしょ抽出液^{※1}20 mL にフルエンズルホン及び代謝物 BSA 0.1 mg/L 溶液 (アセトニトリル溶液) を 1 mL 加え、溶媒を除去した。残留物にアセトニトリル/水 (1 : 4) 5 mL を加えて溶解し、MA-1 ミニカラムに負荷した後、アセトニトリル/水 (1 : 4) 5 mL を 2 回流下し、アセトニトリル/水 (2 : 3) を 2 mL ずつ流下して各分画を分取した。結果を表 10 に示した。フルエンズルホンはアセトニトリル/水 (1 : 4) 10 mL では溶出されず、アセトニトリル/水 (2 : 3) 4 mL で溶出された。また、代謝物 BSA はいずれの溶媒においても溶出されなかった。この結果より、MA-1 ミニカラムを用いた精製では、実試料を用いた場合でもアセトニトリル/水 (1 : 4) 10 mL で洗浄し、アセトニトリル/水 (2 : 3) 10 mL でフルエンズルホンを溶出可能であることを確認した。

※1 抽出液の調製法

試料 20.0 g にアセトニトリル 100 mL を加え、ホモジナイズした後、毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離し、上澄液を採った。残留物にアセトニトリル 50 mL を加えてホモジナイズした後、毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離し、得られた上澄液を合わせ、アセトニトリルを加えて正確に 200 mL とした。

表 10 かんしょを用いた MA-1 ミニカラムからのフルエンズルホン及び代謝物 BSA の溶出状況 (%)

分析対象 化合物	負荷	アセトニトリル/水 (1 : 4)		アセトニトリル/水 (2 : 3)				計
		0-5 mL	5-10 mL	0-2 mL	2-4 mL	4-6 mL	6-8 mL	
フルエンズルホン	0	0	0	30.6	70.1	0	0	100.7
代謝物 BSA	0	0	0	0	0	0	0	0

添加量 : 0.1 µg

次に代謝物 BSA の溶出条件の検討を行った。かんしょ及びすいか (果実全体) 抽出液 20 mL に代謝物 BSA 0.1 mg/L 溶液 (アセトニトリル溶液) を 1 mL 加え、溶媒を除去した。残留物にアセトニトリル 5 mL を加えて溶解し、MA-1 ミニカラムに負荷した後、アセトニトリル 10 mL を流下し、アセトニトリル/0.1 mol/L 塩酸 (9 : 1) またはアセトニトリル/0.2 mol/L 塩酸 (9 : 1) を 5 mL ずつ流下して各分画を分取した。結果を表 11 及び 12 に示した。実試料を用いた場合にはアセトニトリル/0.1 mol/L 塩酸 (9 : 1) では代謝物 BSA の溶出が遅く、20 mL でも代謝物 BSA を全量溶出することは

できなかったが、アセトニトリル/0.2 mol/L 塩酸 (9 : 1) では 15 mL でほぼ全量溶出された。

表 11 かんしょ及びすいか (果実全体) を用いた MA-1 ミニカラムからの代謝物 BSA の溶出状況 (%)

試料	負荷	アセトニトリル	アセトニトリル/0.1 mol/L 塩酸 (9 : 1)				計
		0-10	0-5	5-10	10-15	15-20	
かんしょ	0	0	0	0	1.1	87.4	88.5
すいか	0	0	0	0	1.1	28.3	29.4

添加量 : 0.1 µg

表 12 かんしょ及びすいか (果実全体) を用いた MA-1 ミニカラムからの代謝物 BSA の溶出状況 (%)

試料	負荷	アセトニトリル	アセトニトリル/0.2 mol/L 塩酸 (9 : 1)				計
		0-10 mL	0-5 mL	5-10 mL	10-15 mL	15-20 mL	
かんしょ	0	0	0	30.2	64.5	0	94.7
すいか	0	0	0	39.0	56.0	0	95.0

添加量 : 0.1 µg

以上の結果より、MA-1 ミニカラムにおける精製では、抽出液 20 mL に水 5 mL を加えて約 2 mL まで濃縮した後^{※2}、MA-1 ミニカラムに負荷し、アセトニトリル/水 (1 : 4) 10 mL で洗浄した後、アセトニトリル/水 (2 : 3) 10 mL で溶出したものをフルエンズルホン画分とし、さらにアセトニトリル 10 mL で洗浄した後、アセトニトリル/0.2 mol/L 塩酸 (9 : 1) 20 mL で溶出したものを代謝物 BSA 画分とすることとした。なお、フルエンズルホン画分と代謝物 BSA 画分を併せると、図 11 に示したように、フルエンズルホンの SRM クロマトグラムにおいて定量を妨害するピークが確認されたことから、それぞれ別の試験溶液とすることとした。

※2 MA-1 ミニカラムにフルエンズルホンを保持させるためには、抽出液からアセトニトリルを極力除去する必要があるが、溶媒除去操作において乾固させてしまうとフルエンズルホンが損失する場合があったことから、抽出液に水を加えて濃縮を行うこととした。

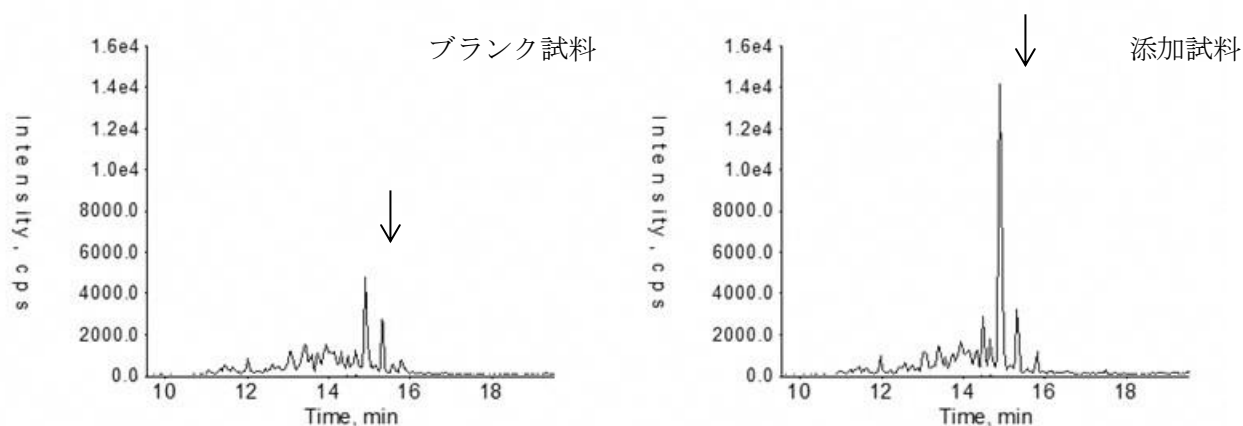


図 11 フルエンズルホンの SRM クロマトグラム (試料 : かんしょ)

③溶出液の pH 調整

MA-1 ミニカラムで精製を行った溶出液は塩酸を含む強酸であり、LC-MS/MS で測定するためには pH を調整する必要があった。そこで、かんしょ及びすいか（果実全体）溶出液にアセトニトリル/25%アンモニア水（9：1）0~6 mL を添加し、それぞれの添加量における pH を確認した。結果は表 13 に示したとおり、アセトニトリル/25%アンモニア水（9：1）3~6 mL を添加した範囲で溶液の pH は 8 のまま一定となった。この結果より、MA-1 ミニカラムによる精製の溶出液にアセトニトリル/25%アンモニア水（9：1）5 mL を添加することとした。

表 13 アセトニトリル/25%アンモニア水（9：1）の添加量と溶出液の pH

アセトニトリル/25%アンモニア水 （9：1）の添加量	溶出液の pH	
	かんしょ	すいか （果実全体）
0 mL	<1	<1
1 mL	4	4
2 mL	6	6
2.5 mL	7	7
3 mL	8	8
4 mL	8	8
5 mL	8	8
6 mL	8	8

④グラファイトカーボンミニカラムによる精製 [InertSep GC（500 mg/6 mL）]

ほうれんそうは MA-1 ミニカラム精製では葉緑素を除去しきれなかった。そこで InertSep GC（500 mg/6 mL）による追加精製の検討を行った。

検討において、GC ミニカラムのロットの違いにより代謝物 BSA の溶出状況に差がみられたことから、いくつかのロットの異なる GC ミニカラムを用いて、溶出溶媒の検討を行った。

GC ミニカラムをアセトニトリル 10 mL、次いで各溶出溶媒 10 mL で予備洗浄した後、フルエンスルホン及び代謝物 BSA 0.1 mg/L 溶液（溶出溶媒の溶液）を 1 mL 負荷し、各溶出溶媒をそれぞれ 10 mL ずつ負荷して分画を分取した。結果は表 14~19 に示したとおり、フルエンスルホンはいずれの溶媒でも 10 mL で溶出された。また、代謝物 BSA はいずれのロットにおいてもアセトニトリルでは溶出されなかった。また、アセトニトリル/水（19：1）では溶出が遅く、全量溶出するのに 30 mL を要したが、アセトニトリル/水（9：1）では 20 mL で全量溶出された。以上の結果より、GC ミニカラムにおける精製操作は、抽出溶液から分取した 20 mL を濃縮し、GC ミニカラムに負荷して溶出液を採り、さらにアセトニトリル/水（9：1）20 mL で溶出し、先の溶出液と合わせることにし、ほうれんそうについてはこの操作を MA-1 ミニカラム精製の前に行うこととした。

表 14 GC ミニカラムからのフルエンズルホンの溶出状況① (%) .

カラムロット番号	溶出溶媒：アセトニトリル					
	0-10 mL	10-20 mL	20-30 mL	30-40 mL	40-50 mL	計
7I840901	102.7	0	0	0	0	102.7
7L841218	99.2	0	0	0	0	99.2
8J841003	98.6	0	0	0	0	98.6
6A840118	100.0	0	0	0	0	100.0

添加量：0.1 µg

表 15 GC ミニカラムからのフルエンズルホンの溶出状況② (%)

カラムロット番号	溶出溶媒：アセトニトリル／水 (19 : 1)					
	0-10 mL	10-20 mL	20-30 mL	30-40 mL	40-50 mL	計
7I840901	111.7	0	0	0	0	111.7
7L841218	100.7	0	0	0	0	100.7
8J841003	101.9	0	0	0	0	101.9

添加量：0.1 µg

表 16 GC ミニカラムからのフルエンズルホンの溶出状況③ (%)

カラムロット番号	溶出溶媒：アセトニトリル／水 (9 : 1)					
	0-10 mL	10-20 mL	20-30 mL	30-40 mL	40-50 mL	計
7I840901	97.0	0	0	0	0	97.0
7L841218	104.8	0	0	0	0	104.8
8J841003	101.1	0	0	0	0	101.1
6A840118	101.3	0	0	0	0	101.3

添加量：0.1 µg

表 17 GC ミニカラムからの代謝物 BSA の溶出状況① (%)

カラムロット番号	溶出溶媒：アセトニトリル					
	0-10 mL	10-20 mL	20-30 mL	30-40 mL	40-50 mL	計
7I840901	0	0	0	0	0	0
7L841218	0	0	0	0	0	0
8J841003	0	0	0	2.8	12.4	15.2
6A840118	0	0	0	0	0	0

添加量：0.1 µg

表 18 GC ミニカラムからの代謝物 BSA の溶出状況② (%)

カラムロット番号	溶出溶媒：アセトニトリル／水 (19 : 1)					
	0-10 mL	10-20 mL	20-30 mL	30-40 mL	40-50 mL	計
7I840901	0	55.4	50.0	0	0	105.4
7L841218	0.8	71.0	25.0	0	0	96.8
8J841003	47.8	53.8	0	0	0	101.6

添加量：0.1 µg

表 19 GC ミニカラムからの代謝物 BSA の溶出状況③ (%)

カラムロット番号	溶出溶媒：アセトニトリル／水 (9 : 1)					
	0-10 mL	10-20 mL	20-30 mL	30-40 mL	40-50 mL	計
7I840901	100.6	0	0	0	0	100.6
7L841218	63.0	38.2	0	0	0	101.2
8J841003	96.1	1.4	0	0	0	97.5
6A840118	91.3	9.1	0	0	0	100.4

添加量：0.1 µg

3. 添加回収試験

ほうれんそう、キャベツ、かんしょ、すいか（果肉部のみ及び果実全体）及びいちごの 5 食品を試料に用いて、実験方法の「6. 試験溶液の調製」に従って添加回収試験を実施した。

添加回収試験における回収率 100%相当の溶媒標準溶液、各食品のブランク試料及び添加試料の代表的なクロマトグラムを図 12~23 に示した。また、各食品のブランク試料のフルスキャン測定によるトータルイオンクロマトグラムを図 24 及び図 25 に示した。

1) 選択性

選択性の検討結果を表 20 に示した。検討を行ったいずれの試料においても、フルエンズルホン及び代謝物 BSA の定量を妨害するピークは認められなかった。

表 20 選択性の評価

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (mg/kg)	基準値 (ppm)	妨害ピークの許容範囲の評価		ピーク面積 (高さ) ¹⁾							選択性の評価 ³⁾	備考	
					評価濃度 (ppm)	評価基準	面積又は高さの別	ブランク			マトリックス添加標準溶液 ²⁾					面積(高さ)比 (a)/(b)
								n=1	n=2	平均 (a)	n=1	n=2	平均 (b)			
1	フルエンズルホン	ほうれんそう	0.005		定量限界 0.005	< 0.333	面積	0	0	0	13503	13302	13403	0.000	○	
2		キャベツ	0.005		定量限界 0.005	< 0.333	面積	0	0	0	14227	14494	14361	0.000	○	
3		かんしょ	0.005		定量限界 0.005	< 0.333	面積	0	0	0	13185	13351	13268	0.000	○	
4		いちご	0.005		定量限界 0.005	< 0.333	面積	0	0	0	14609	13848	14229	0.000	○	
5		ずいか(果肉部のみ)	0.005		定量限界 0.005	< 0.333	面積	0	0	0	15019	14421	14720	0.000	○	
6		ずいか(全体)	0.005		定量限界 0.005	< 0.333	面積	0	0	0	14722	15426	15074	0.000	○	
7		ほうれんそう	0.005	4.	基準値 4.	< 0.100	面積	0	0	0	120048	122824	121436	0.000	○	
8		キャベツ	0.005	2.	基準値 2.	< 0.100	面積	0	0	0	157871	156086	156979	0.000	○	
9		かんしょ	0.005	5.	基準値 5.	< 0.100	面積	0	0	0	131477	132442	131960	0.000	○	
11		ずいか(果肉部のみ)	0.005	0.2	基準値 0.2	< 0.100	面積	0	0	0	149469	150050	149760	0.000	○	
12		ずいか(果実全体)	0.005	0.2	基準値 0.2	< 0.100	面積	0	0	0	157352	159656	158504	0.000	○	
10		いちご	0.005	0.5	基準値 0.5	< 0.100	面積	0	0	0	137519	134466	135993	0.000	○	
13	代謝物BSA	ほうれんそう	0.005		定量限界 0.005	< 0.333	面積	0	0	0	90343	87706	89025	0.000	○	
14		キャベツ	0.005		定量限界 0.005	< 0.333	面積	0	0	0	109769	107681	108725	0.000	○	
15		かんしょ	0.005		定量限界 0.005	< 0.333	面積	0	0	0	102276	104408	103342	0.000	○	
16		いちご	0.005		定量限界 0.005	< 0.333	面積	0	0	0	126437	123689	125063	0.000	○	
17		ずいか(果肉部のみ)	0.005		定量限界 0.005	< 0.333	面積	0	0	0	132588	126351	129470	0.000	○	
18		ずいか(全体)	0.005		定量限界 0.005	< 0.333	面積	0	0	0	128913	131709	130311	0.000	○	
19		ほうれんそう	0.005	4.	基準値 4.	< 0.100	面積	0	0	0	835252	843449	839351	0.000	○	
20		キャベツ	0.005	2.	基準値 2.	< 0.100	面積	0	0	0	1068986	1071713	1070350	0.000	○	
21		かんしょ	0.005	5.	基準値 5.	< 0.100	面積	0	0	0	1030157	1053612	1041885	0.000	○	
23		ずいか(果肉部のみ)	0.005	0.2	基準値 0.2	< 0.100	面積	0	0	0	1168262	1172999	1170631	0.000	○	
24		ずいか(果実全体)	0.005	0.2	基準値 0.2	< 0.100	面積	0	0	0	1192250	1190915	1191583	0.000	○	
22		いちご	0.005	0.5	基準値 0.5	< 0.100	面積	0	0	0	1060518	1064463	1062491	0.000	○	

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

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

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

2) 真度、精度

真度及び併行精度の検討結果を表 21 に示した。

定量限界相当濃度の添加回収試験では、フルエンズルホンは真度 91.8~98.9%、併行精度 0.6~2.5%、代謝物 BSA は真度 91.3~97.7%、併行精度 0.9~4.6%でありいずれも真度 70~120%、併行精度 (RSD) < 25%という目標値を満足した。また、S/N 比はフルエンズルホンでは 53.9~80.5、代謝物 BSA では 49.0~87.2 であり、S/N ≥ 10 を満足した。

基準値相当濃度の添加回収試験では、フルエンズルホンは真度 91.6~98.9%、併行精度 0.6~3.8%、代謝物 BSA は真度 93.7~101.6%、併行精度 1.3~5.2%でありいずれも真度 70~120%、併行精度 (RSD) < 10%という目標値を満足した。

表 21 真度、精度及び定量限界の評価

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (mg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	定量限界の評価 ¹⁾	検量線			回収率 (%)					真度 (%)	併行精度 (RSD%)	S/N ²⁾			備考
							傾き	切片	r ² 値	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5			Max.	Min.	平均値	
1	フルエンズルホン	ほうれんそう	0.005		0.005	S/N	26699896	646	0.9998	93.4	99.2	98.6	97.9	97.6	97.3	2.4	65.5	65.9	65.7	
2		キャベツ	0.005		0.005	S/N	28111314	-66	0.9997	97.1	94.0	93.1	92.3	93.0	93.9	2.0	68.3	92.7	80.5	
3		かんしょ	0.005		0.005	S/N	21578743	345	0.9997	98.3	98.6	98.6	99.6	99.5	98.9	0.6	73.7	72.2	72.9	
4		いちご	0.005		0.005	S/N	30169143	-380	0.9999	90.1	93.4	94.1	90.8	90.7	91.8	2.0	67.5	54.2	60.9	
5		ずいか(果肉部のみ)	0.005		0.005	S/N	32077943	-122	0.9999	93.1	89.8	90.3	95.4	91.8	92.1	2.5	84.4	70.6	77.5	
6		ずいか(全体)	0.005		0.005	S/N	21524571	506	0.9999	90.5	93.9	92.0	95.7	94.4	93.3	2.2	58.0	49.8	53.9	
7		ほうれんそう	0.005	4.	4.	—	24686560	-4366	0.9997	98.7	99.3	99.5	99.3	97.5	98.9	0.8	—	—	#VALUE!	
8		キャベツ	0.005	2.	2.	—	31228777	-9722	0.9998	99.6	93.3	94.9	91.4	90.7	94.0	3.8	—	—	#VALUE!	
9		かんしょ	0.005	5.	5.	—	26822560	-5898	0.9999	94.6	99.5	101.1	99.4	99.4	98.8	2.5	—	—	#VALUE!	
11		ずいか(果肉部のみ)	0.005	0.2	0.2	—	30563109	-4364	0.9999	92.0	92.0	92.4	93.3	92.6	92.5	0.6	—	—	#VALUE!	
12		ずいか(果実全体)	0.005	0.2	0.2	—	32775863	-2065	0.9998	91.3	91.6	90.4	91.8	93.1	91.6	1.1	—	—	#VALUE!	
10		いちご	0.005	0.5	0.5	—	27706720	-2864	0.9998	90.7	91.5	92.9	93.9	95.0	92.8	1.9	—	—	#VALUE!	
13	代謝物BSA	ほうれんそう	0.005		0.005	S/N	181865143	2486	0.9998	98.4	99.8	96.8	95.7	96.1	97.4	1.8	75.5	57.1	66.3	
14		キャベツ	0.005		0.005	S/N	210431314	-1821	0.9999	92.0	94.0	94.2	101.0	99.6	96.2	4.1	82.7	68.9	75.8	
15		かんしょ	0.005		0.005	S/N	205890571	-7794	0.9998	92.6	94.1	101.9	100.2	99.8	97.7	4.2	49.1	48.8	49.0	
16		いちご	0.005		0.005	S/N	228338971	-3008	0.9998	90.2	90.7	90.7	92.2	92.8	91.3	1.2	63.3	55.9	59.6	
17		ずいか(果肉部のみ)	0.005		0.005	S/N	243227657	-496	0.9999	91.8	90.1	95.7	94.4	101.3	94.7	4.6	88.2	86.3	87.2	
18		ずいか(全体)	0.005		0.005	S/N	208274971	-4035	0.9999	95.0	94.1	96.6	95.2	95.4	95.3	0.9	57.2	50.5	53.9	
19		ほうれんそう	0.005	4.	4.	—	189185280	-27574	0.9997	101.5	99.6	90.7	97.5	91.7	96.2	5.0	—	—	#VALUE!	
20		キャベツ	0.005	2.	2.	—	215905074	-63635	0.9998	90.1	93.9	98.1	101.5	98.0	96.3	4.6	—	—	#VALUE!	
21		かんしょ	0.005	5.	5.	—	209947589	-13046	0.9999	105.8	99.5	93.3	105.2	104.4	101.6	5.2	—	—	#VALUE!	
23		ずいか(果肉部のみ)	0.005	0.2	0.2	—	259053549	-34829	0.9997	90.3	92.8	99.6	95.4	94.4	94.5	3.6	—	—	#VALUE!	
24		ずいか(果実全体)	0.005	0.2	0.2	—	248179794	-7891	0.9998	97.4	97.1	99.8	99.6	98.0	98.4	1.3	—	—	#VALUE!	
22		いちご	0.005	0.5	0.5	—	228506743	-18703	0.9998	90.8	90.5	94.9	97.0	95.3	93.7	3.1	—	—	#VALUE!	

*1 S/Nを求める必要がある場合には「S/N」と表示される。

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

3) 試料マトリックスの測定への影響

試料マトリックスの測定への影響について検討した結果を表 22 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。定量限界相当濃度におけるフルエンシルホンの面積比は 0.97~1.00、代謝物 BSA の面積比は 0.97~1.05 であった。また、基準値相当濃度におけるフルエンシルホンの面積比は 0.99~1.01、代謝物 BSA の面積比は 0.97~1.00 であり、いずれも試料マトリックスの測定への影響はほとんどみられなかった。

添加回収試験における真度を表 22 で求めたピーク面積比で除して補正真度を求め、表 23 に示した。補正真度は 87.0~102.6%であり、試料マトリックスの影響を考慮した場合でも良好な結果が得られた。

表 22 試料マトリックスの測定への影響

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (mg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	標準溶液 濃度 ¹⁾ (mg/L)	面積又は 高さの別	ブランク ³⁾	ピーク面積(高さ) ²⁾						備考	
									マトリックス添加標準溶液 ⁴⁾			溶媒標準溶液				ピーク面積 (高さ)比 ⁵⁾
									n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均		
1	フルエンシルホン	ほうれんそう	0.005		0.005	0.005	面積	0	13503	13302	13403	13674	13399	13537	0.99	
2		キャベツ	0.005		0.005	0.005	面積	0	14227	14494	14361	14265	14773	14519	0.99	
3		かんしょ	0.005		0.005	0.005	面積	0	13185	13351	13268	13380	13605	13493	0.98	
4		いちご	0.005		0.005	0.005	面積	0	14609	13848	14229	14948	14366	14657	0.97	
5		すいか(果肉部のみ)	0.005		0.005	0.005	面積	0	15019	14421	14720	14868	14615	14742	1.00	
6		すいか(全体)	0.005		0.005	0.005	面積	0	14722	15426	15074	15091	15597	15344	0.98	
7		ほうれんそう	0.005	4.	4.	0.005	面積	0	120048	122824	121436	118677	126060	122369	0.99	
8		キャベツ	0.005	2.	2.	0.005	面積	0	157871	156086	156979	161615	156464	159040	0.99	
9		かんしょ	0.005	5.	5.	0.005	面積	0	131477	132442	131960	132119	132466	132293	1.00	
11		すいか(果肉部のみ)	0.005	0.2	0.2	0.005	面積	0	149469	150050	149760	150248	151942	151095	0.99	
12		すいか(果実全体)	0.005	0.2	0.2	0.005	面積	0	157352	159656	158504	156616	156754	156685	1.01	
10		いちご	0.005	0.5	0.5	0.005	面積	0	137519	134466	135993	135805	134454	135130	1.01	
13		代謝物BSA	ほうれんそう	0.005		0.005	0.005	面積	0	90343	87706	89025	93371	91057	92214	0.97
14	キャベツ		0.005		0.005	0.005	面積	0	109769	107681	108725	108450	106087	107269	1.01	
15	かんしょ		0.005		0.005	0.005	面積	0	102276	104408	103342	101067	101168	101118	1.02	
16	いちご		0.005		0.005	0.005	面積	0	126437	123689	125063	117686	121275	119481	1.05	
17	すいか(果肉部のみ)		0.005		0.005	0.005	面積	0	132588	126351	129470	124684	127717	126201	1.03	
18	すいか(全体)		0.005		0.005	0.005	面積	0	128913	131709	130311	126658	125159	125909	1.03	
19	ほうれんそう		0.005	4.	4.	0.005	面積	0	835252	843449	839351	827647	851730	839689	1.00	
20	キャベツ		0.005	2.	2.	0.005	面積	0	1068986	1071713	1070350	1100356	1094984	1097670	0.98	
21	かんしょ		0.005	5.	5.	0.005	面積	0	1030157	1053612	1041885	1052344	1048187	1050266	0.99	
23	すいか(果肉部のみ)		0.005	0.2	0.2	0.005	面積	0	1168262	1172999	1170631	1171960	1173907	1172934	1.00	
24	すいか(果実全体)		0.005	0.2	0.2	0.005	面積	0	1192250	1190915	1191583	1229826	1229875	1229851	0.97	
22	いちご	0.005	0.5	0.5	0.005	面積	0	1060518	1064463	1062491	1086996	1098864	1092930	0.97		

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

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

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

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

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

表 23 補正真度

分析対象化合物	食品名	添加濃度 (ppm)	真度 (%)	補正真度 (%)
フルエンシルホン	ほうれんそう	0.005	97.3	98.3
		4	98.9	99.9
	キャベツ	0.005	93.9	94.8
		2	94.0	94.9
	かんしょ	0.005	98.9	100.9
		5	98.8	98.8
	すいか (果肉部のみ)	0.005	92.1	92.1
		0.2	92.5	93.4
	すいか (果実全体)	0.005	93.3	95.2
		0.2	91.6	90.7
いちご	0.005	91.8	94.6	
	0.5	92.8	91.9	
代謝物 BSA	ほうれんそう	0.005	97.4	100.4
		4	96.2	96.2
	キャベツ	0.005	96.2	95.2
		2	96.3	98.3
	かんしょ	0.005	97.7	95.8
		5	101.6	102.6
	すいか (果肉部のみ)	0.005	94.7	91.9
		0.2	94.5	94.5
	すいか (果実全体)	0.005	95.3	92.5
		0.2	98.4	101.4
いちご	0.005	91.3	87.0	
	0.5	93.7	96.6	

4. 考察

開発した試験法を用いて、ほうれんそう、キャベツ、かんしょ、すいか (果肉部のみ)、すいか (果実全体) 及びいちごの添加回収試験を行った結果、いずれの食品においてもフルエンシルホン及び代謝物 BSA の定量を妨害するピークやマトリックスの影響はみられず、真度及び併行精度はいずれの化合物においても、定量限界相当では真度 70~120%、併行精度 (RSD) <25%、基準値相当では真度 70~120%、併行精度 (RSD) <10%という目標値を満たしていたことから、本試験法は、ほうれんそう、キャベツ、かんしょ、すいか及びいちごのような農産物に適用可能であると判断された。

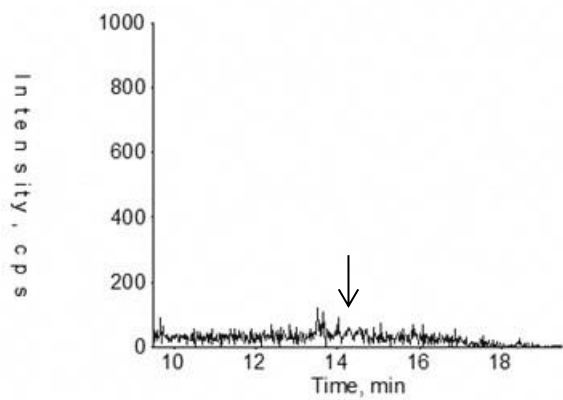
[結論]

農産物中のフルエンシルホン試験法として、フルエンシルホン及び代謝物 BSA を試料からアセトニト

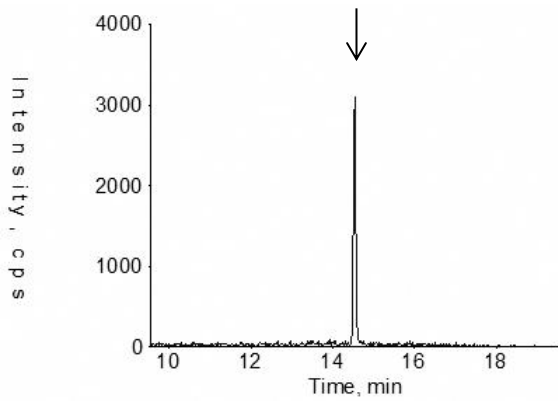
リルで抽出し、トリメチルアンモニウム塩修飾メタクリレート重合体ミニカラムで精製を行い(葉緑素を多く含む食品の場合には、トリメチルアンモニウム塩修飾メタクリレート重合体ミニカラムで精製する前にグラファイトカーボンミニカラムで追加精製する)、LC-MS/MSで定量及び確認する方法を開発した。

ほうれんそう、キャベツ、かんしょ、すいか(果肉部のみ)、すいか(果実全体)及びいちごに適用した結果、いずれの化合物においても選択性には問題なく、真度、併行精度、S/Nの目標値を満足する良好な結果が得られた。

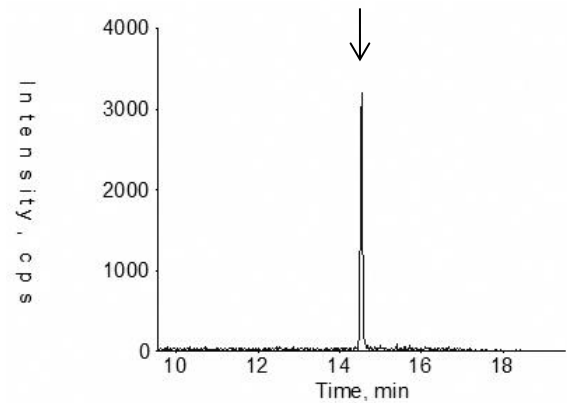
ブランク試料



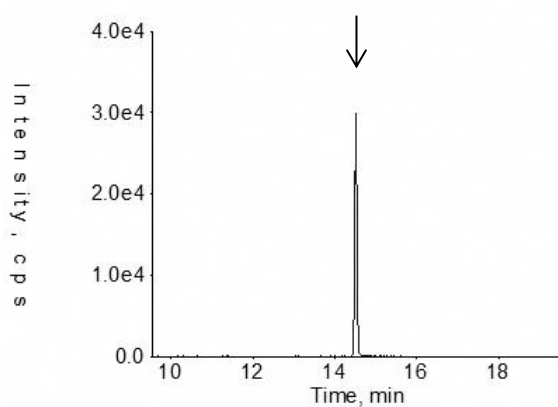
添加試料 (試料中 0.005 ppm 相当)



標準溶液 (0.0005 mg/L)



添加試料 (試料中 4 ppm 相当、80 倍希釈)



標準溶液 (0.005 mg/L)

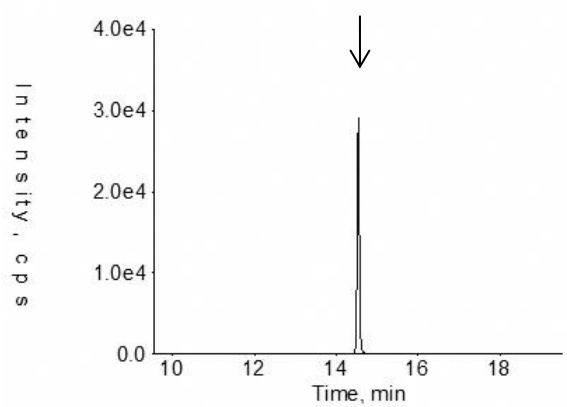
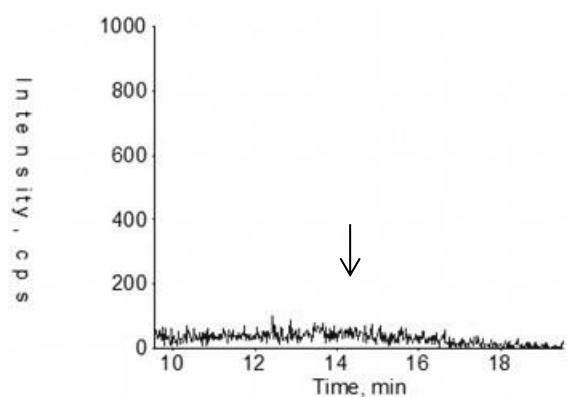
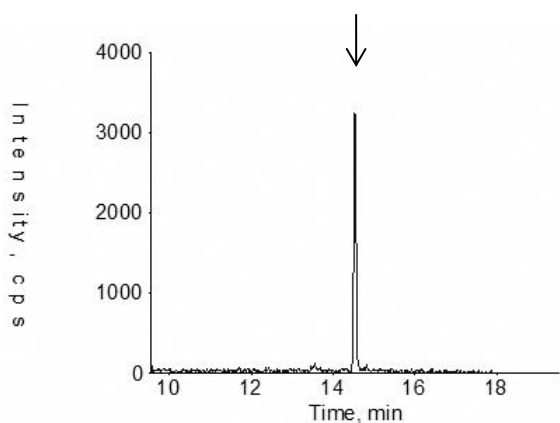


図 12 フルエンスルホンの SRM クロマトグラム (m/z 292.1→166.1)
試料：ほうれんそう

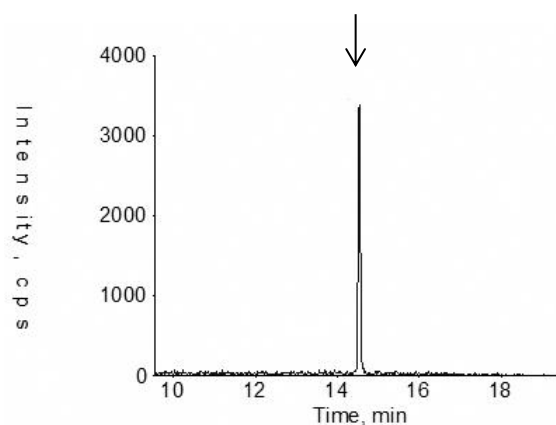
ブランク試料



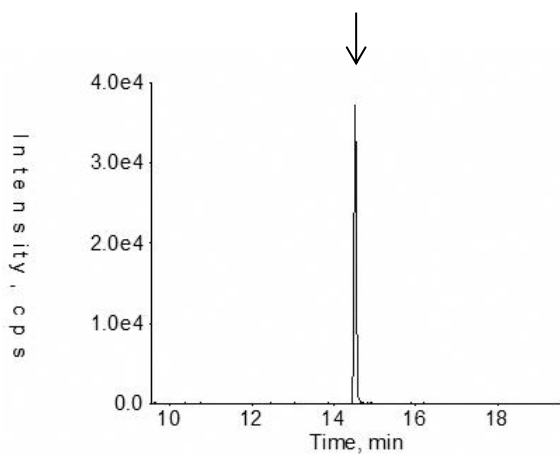
添加試料 (試料中 0.005 ppm 相当)



標準溶液 (0.0005 mg/L)



添加試料 (試料中 2 ppm 相当、40 倍希釈)



標準溶液 (0.005 mg/L)

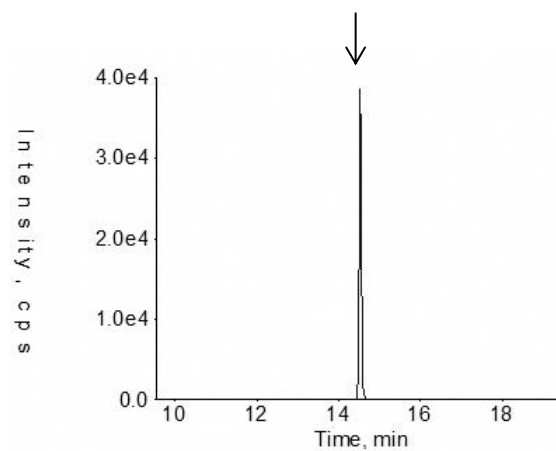
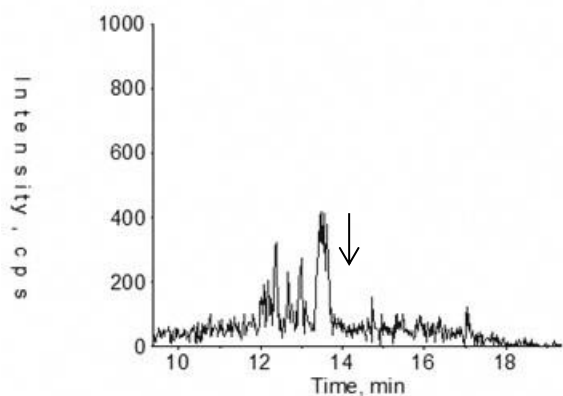
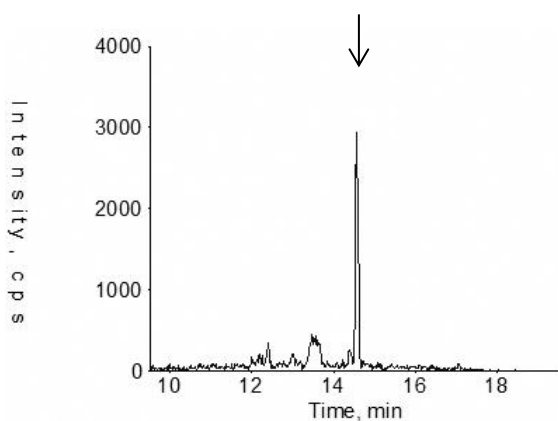


図 13 フルエンスルホンの SRM クロマトグラム (m/z 292.1→166.1)
試料：キャベツ

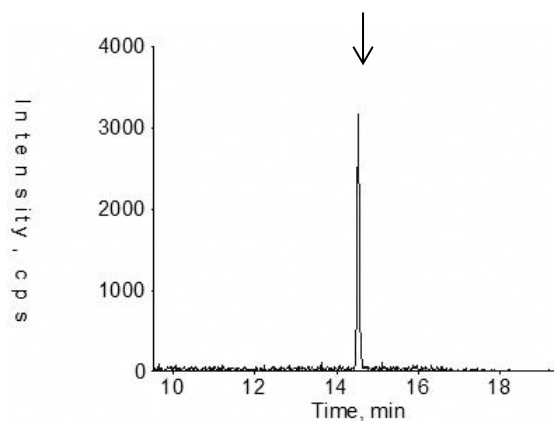
ブランク試料



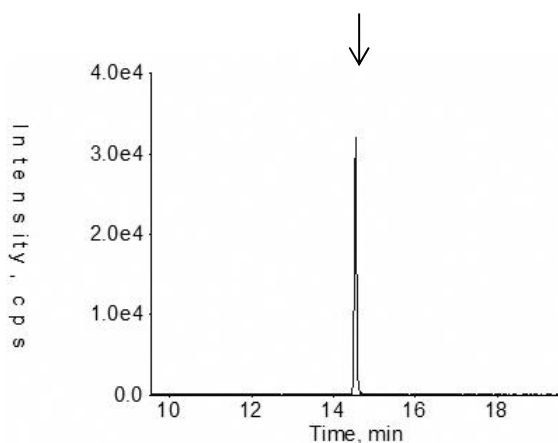
添加試料 (試料中 0.005 ppm 相当)



標準溶液 (0.0005 mg/L)



添加試料 (試料中 5 ppm 相当、100 倍希釈)



標準溶液 (0.005 mg/L)

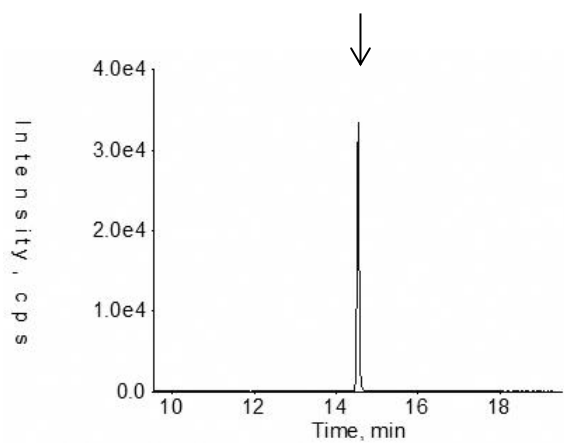
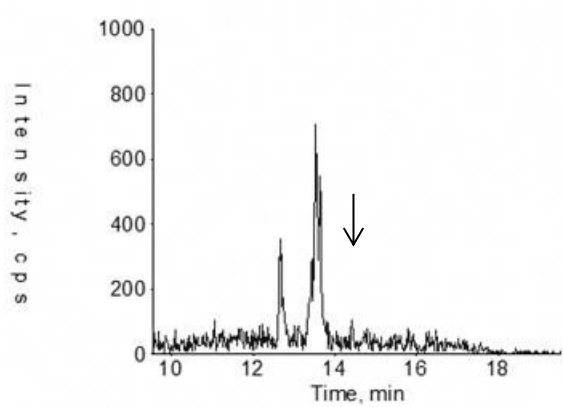
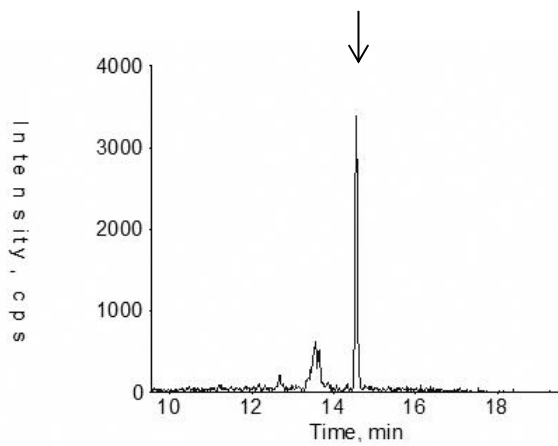


図 14 フルエンスルホンの SRM クロマトグラム (m/z 292.1→166.1)
試料：かんしょ

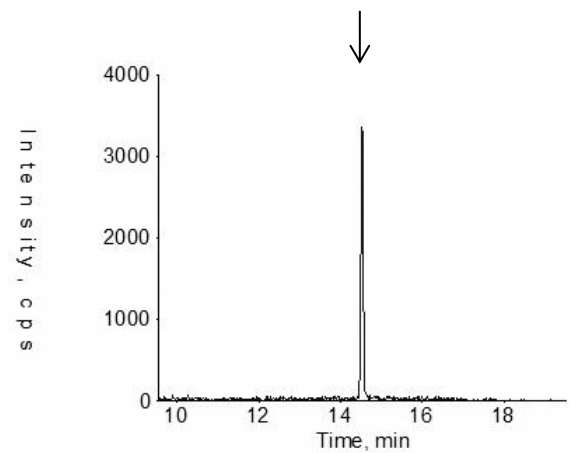
ブランク試料



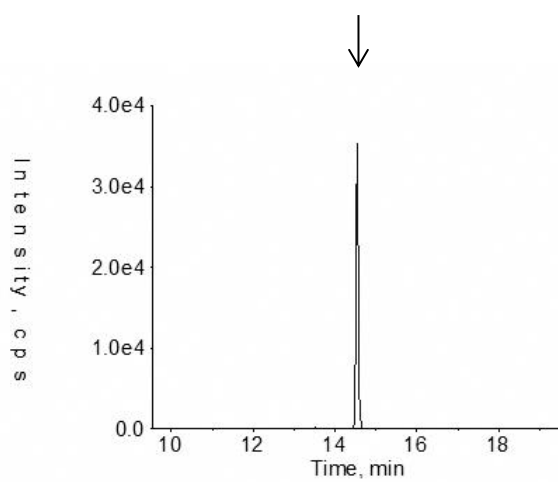
添加試料 (試料中 0.005 ppm 相当)



標準溶液 (0.0005 mg/L)



添加試料 (試料中 0.2 ppm 相当、4 倍希釈)



標準溶液 (0.005 mg/L)

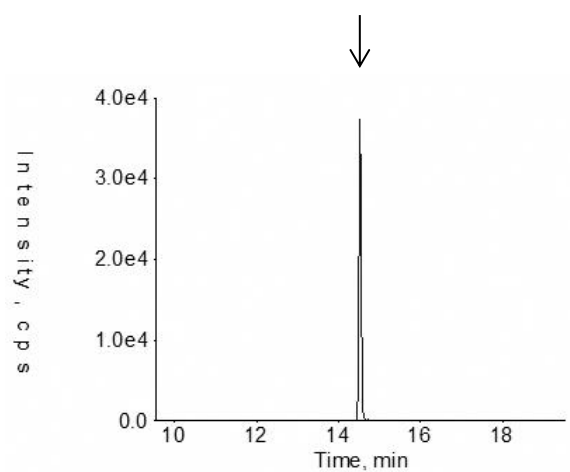
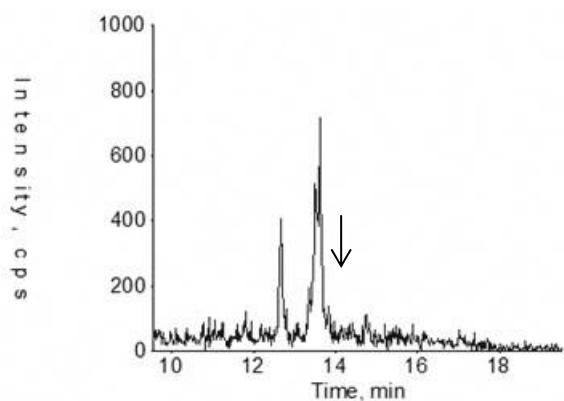
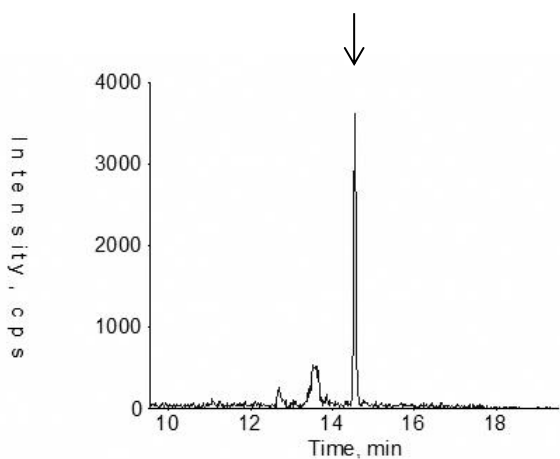


図 15 フルエンズルホンの SRM クロマトグラム (m/z 292.1→166.1)
試料: すいか (果肉部のみ)

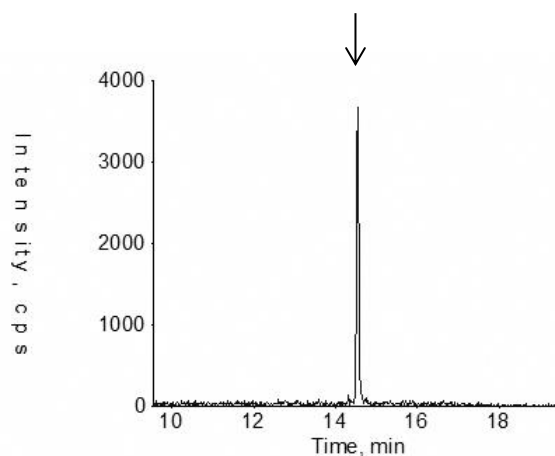
ブランク試料



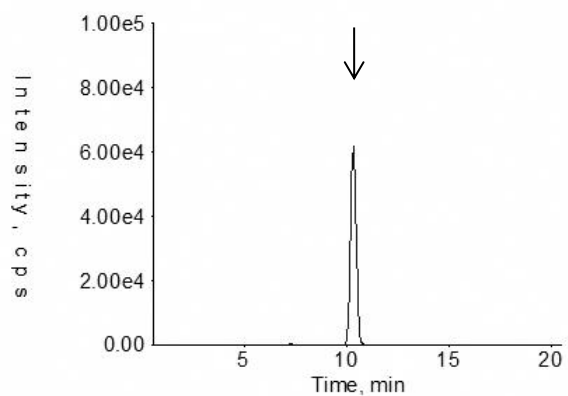
添加試料 (試料中 0.005 ppm 相当)



標準溶液 (0.0005 mg/L)



添加試料 (試料中 0.2 ppm 相当、4 倍希釈)



標準溶液 (0.005 mg/L)

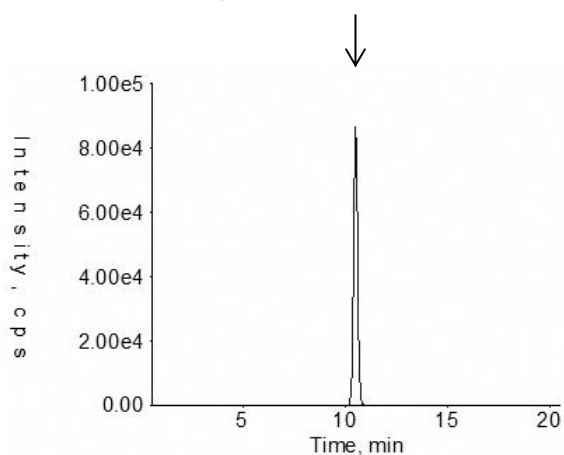
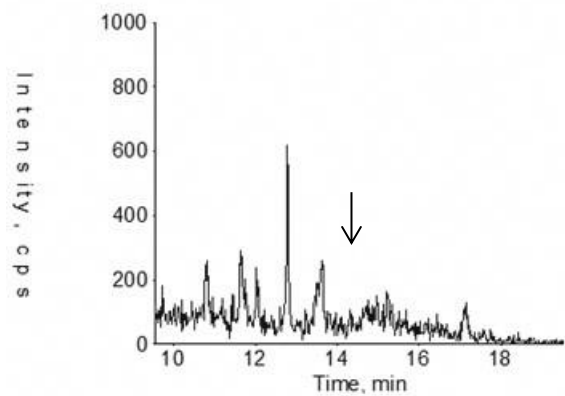
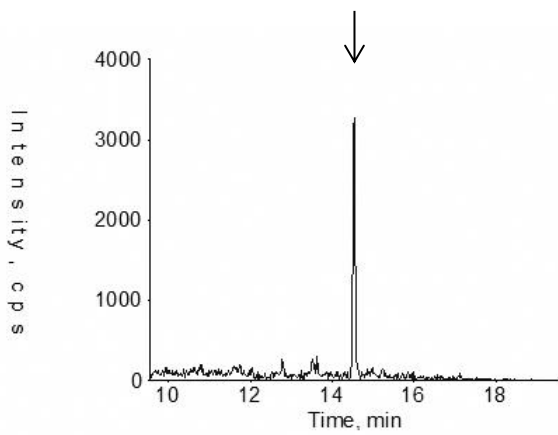


図 16 フルエンズルホンの SRM クロマトグラム (m/z 292.1→166.1)
試料：すいか (果実全体)

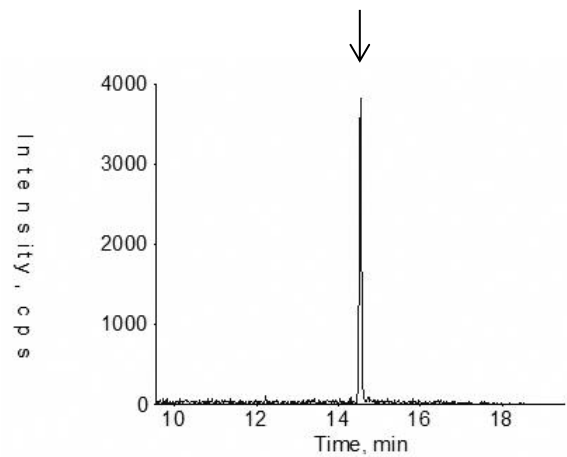
ブランク試料



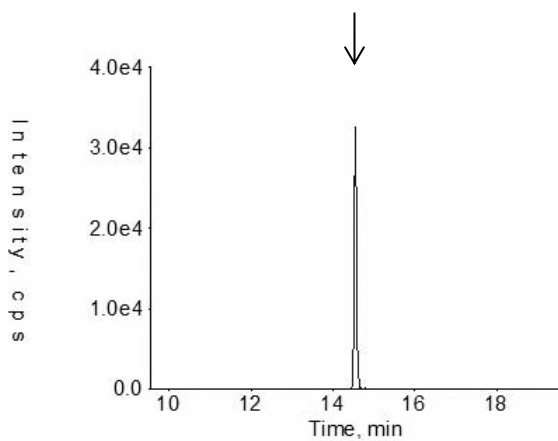
添加試料 (試料中 0.005 ppm 相当)



標準溶液 (0.0005 mg/L)



添加試料 (試料中 0.5 ppm 相当、10 倍希釈)



標準溶液 (0.005 mg/L)

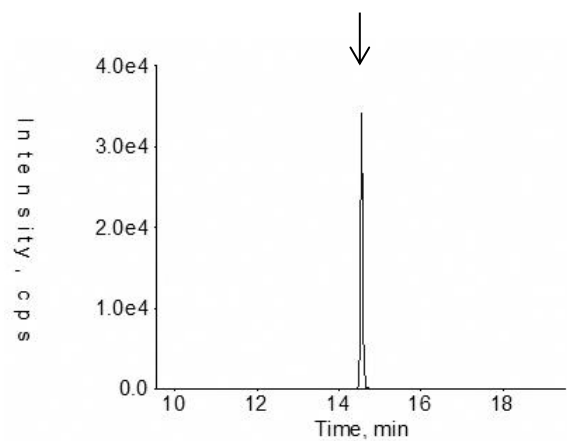
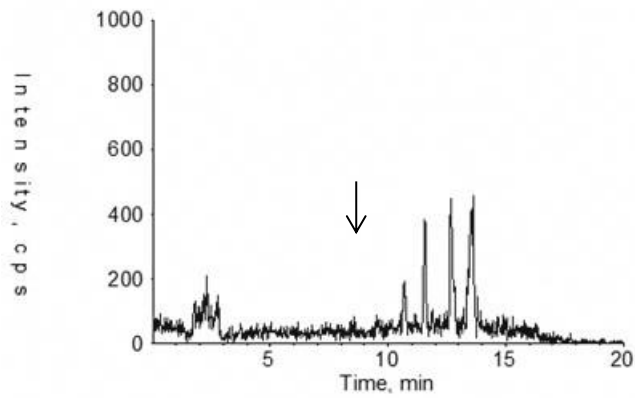
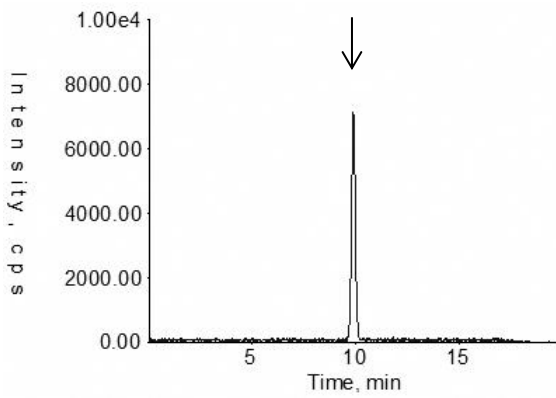


図 17 フルエンズルホンの SRM クロマトグラム (m/z 292.1→166.1)
試料：いちご

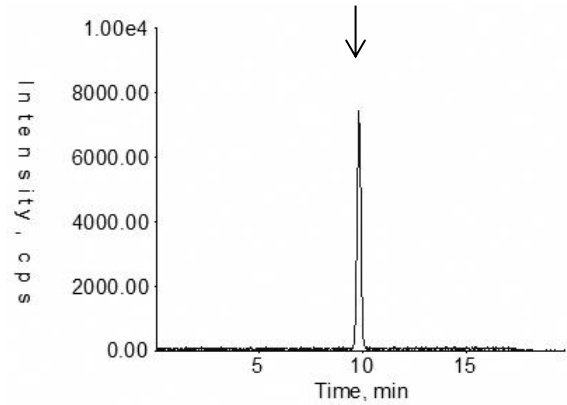
ブランク試料



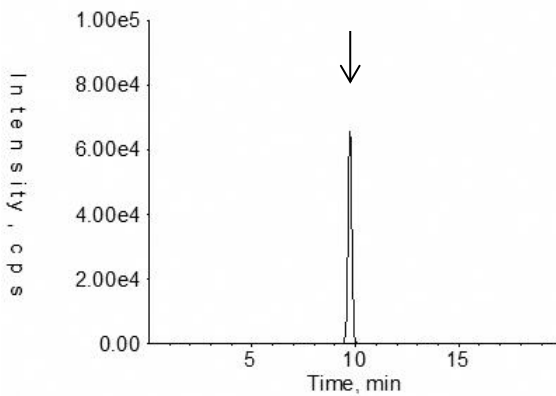
添加試料 (試料中 0.005 ppm 相当)



標準溶液 (0.0005 mg/L)



添加試料 (試料中 4 ppm 相当、80 倍希釈)



標準溶液 (0.005 mg/L)

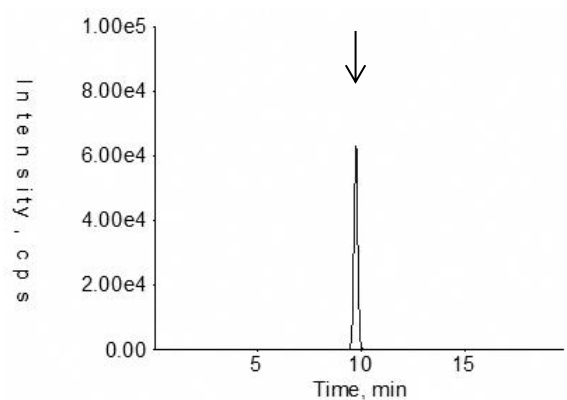
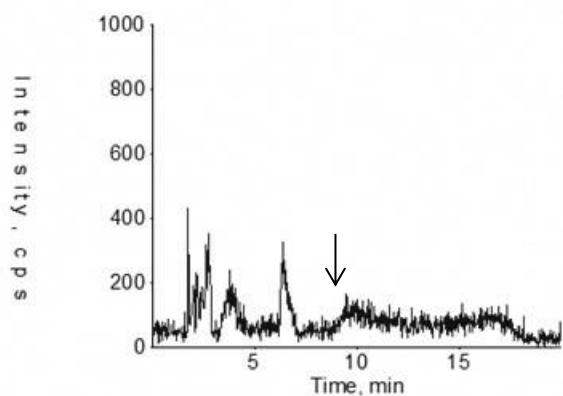
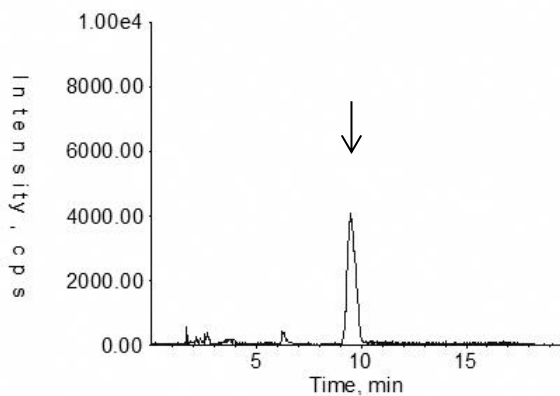


図 18 代謝物 BSA の SRM クロマトグラム (m/z 188.8→80.9)
試料：ほうれんそう

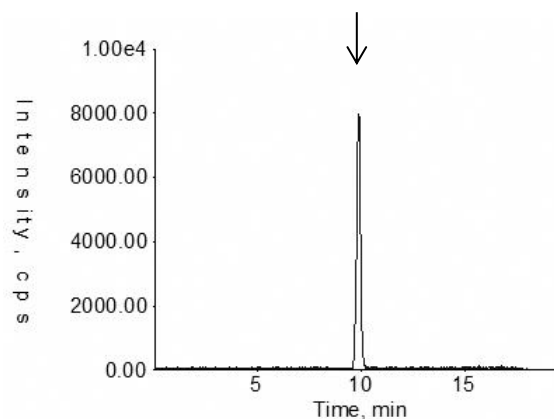
ブランク試料



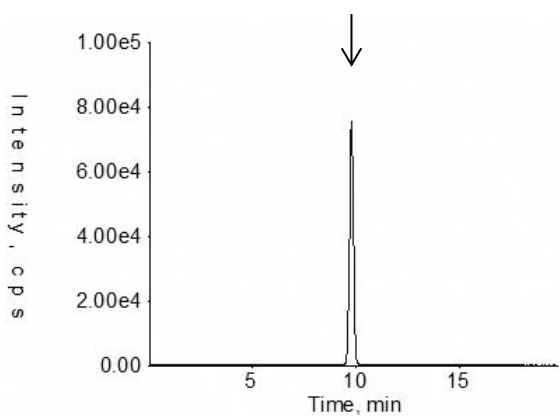
添加試料 (試料中 0.005 ppm 相当)



標準溶液 (0.0005 mg/L)



添加試料 (試料中 2 ppm 相当、40 倍希釈)



標準溶液 (0.005 mg/L)

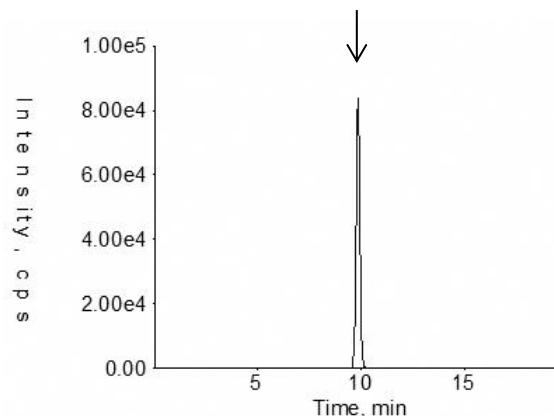
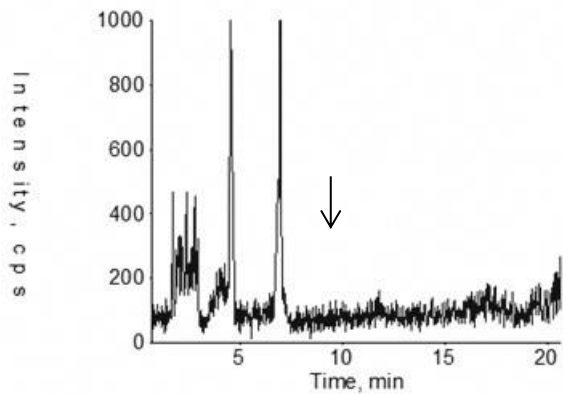
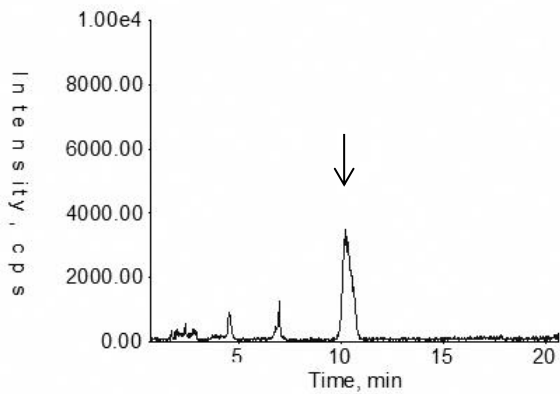


図 19 代謝物 BSA の SRM クロマトグラム (m/z 188.8→80.9)
試料：キャベツ

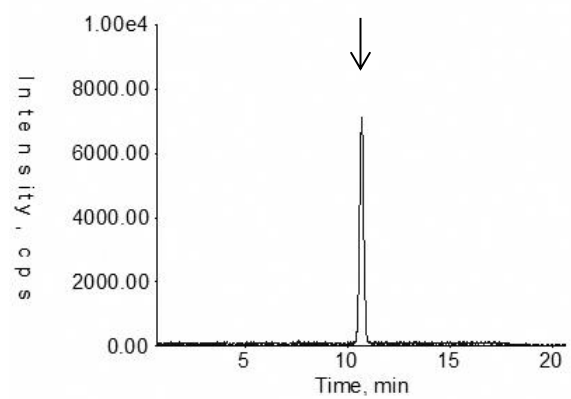
ブランク試料



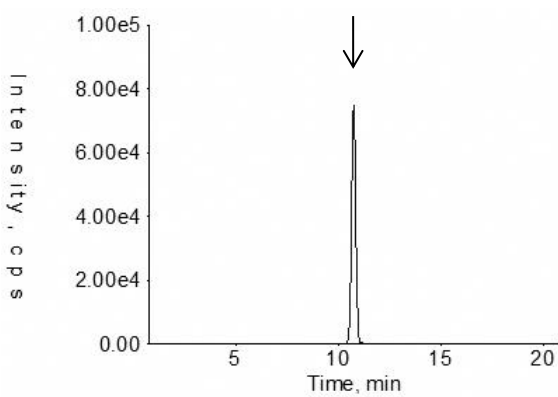
添加試料 (試料中 0.005 ppm 相当)



標準溶液 (0.0005 mg/L)



添加試料 (試料中 5 ppm 相当、100 倍希釈)



標準溶液 (0.005 mg/L)

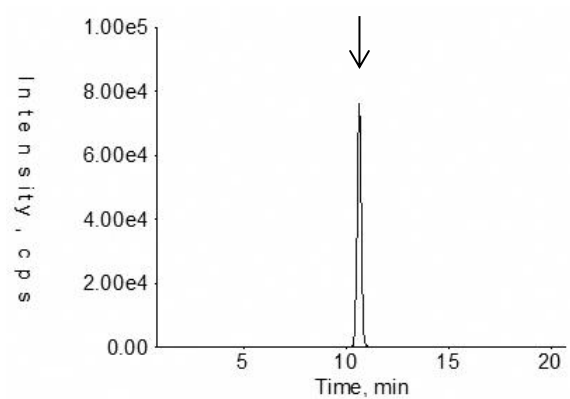
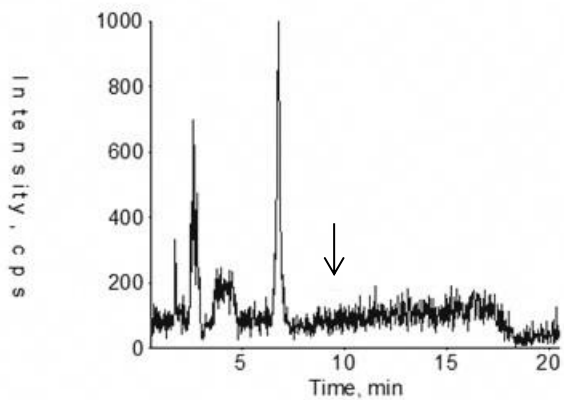


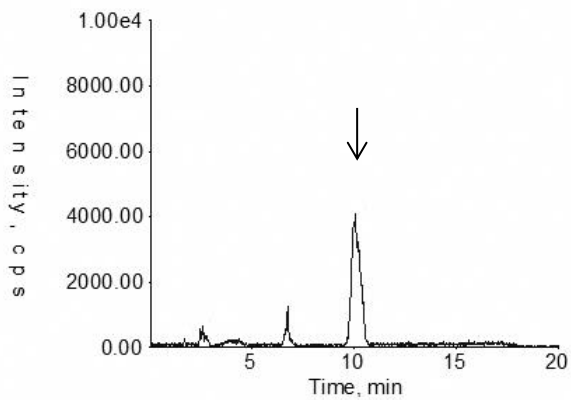
図 20 代謝物 BSA の SRM クロマトグラム (m/z 188.8→80.9)

試料：かんしょ

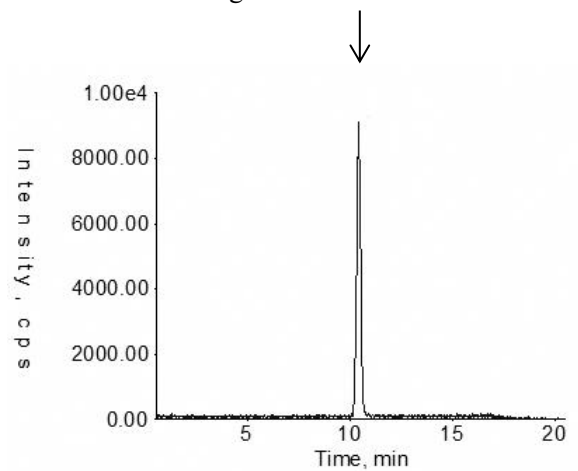
ブランク試料



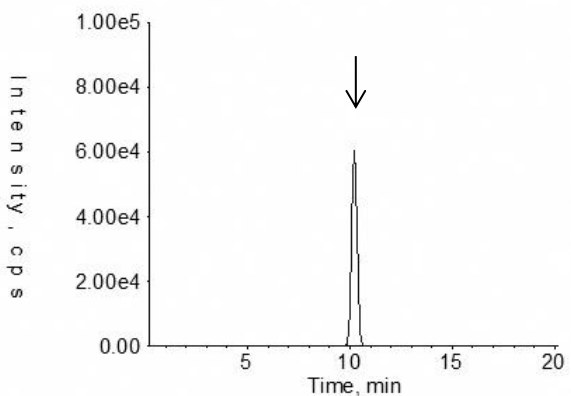
添加試料 (試料中 0.005 ppm 相当)



標準溶液 (0.0005 mg/L)



添加試料 (試料中 0.2 ppm 相当、4 倍希釈)



標準溶液 (0.005 mg/L)

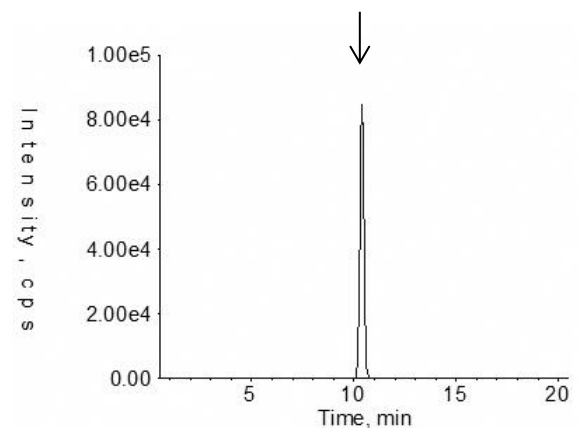
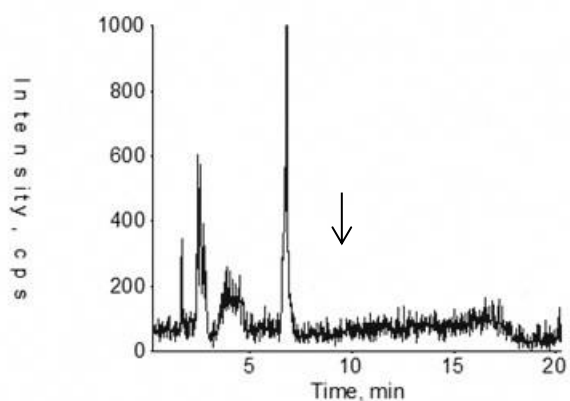
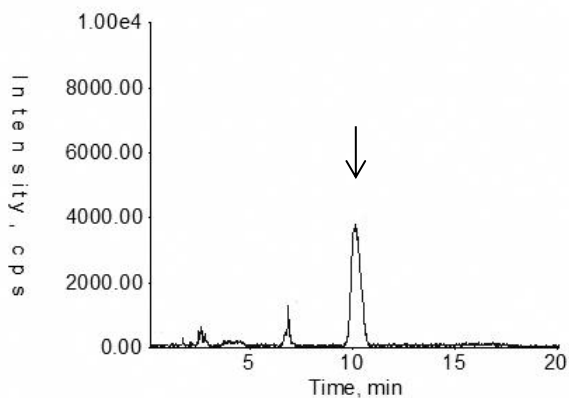


図 21 代謝物 BSA の SRM クロマトグラム (m/z 188.8→80.9)
試料：すいか (果肉部のみ)

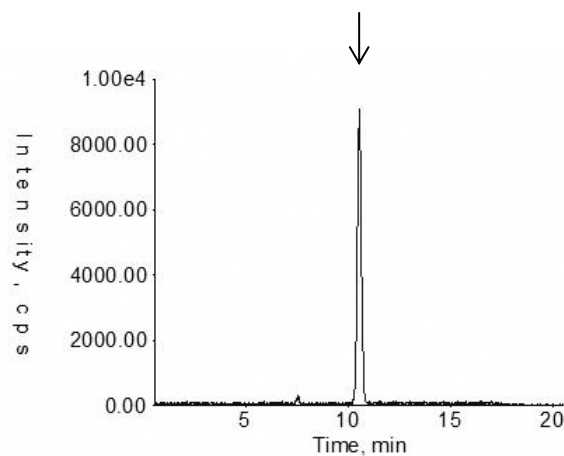
ブランク試料



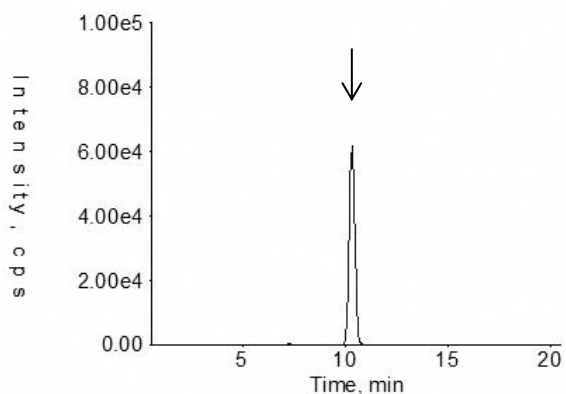
添加試料 (試料中 0.005 ppm 相当)



標準溶液 (0.0005 mg/L)



添加試料 (試料中 0.2 ppm 相当、4 倍希釈)



標準溶液 (0.005 mg/L)

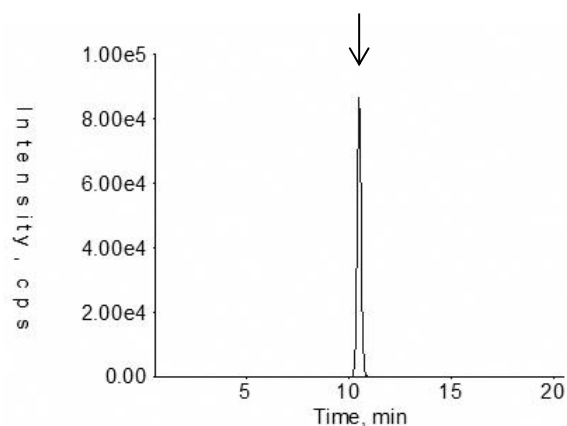
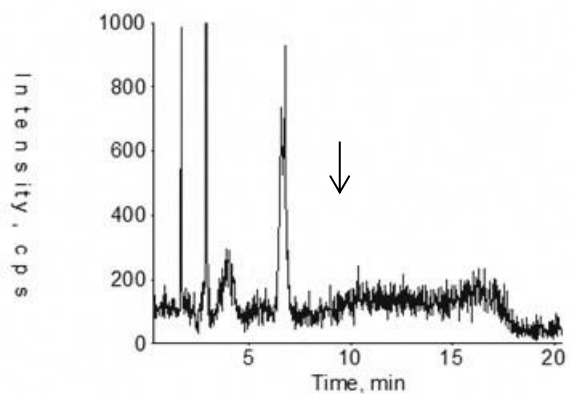
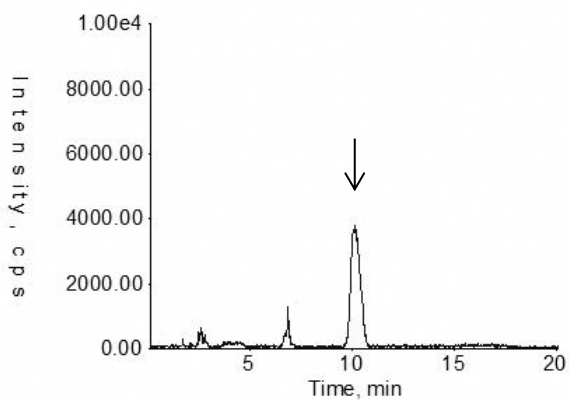


図 22 代謝物 BSA の SRM クロマトグラム (m/z 188.8→80.9)
試料：すいか (果実全体)

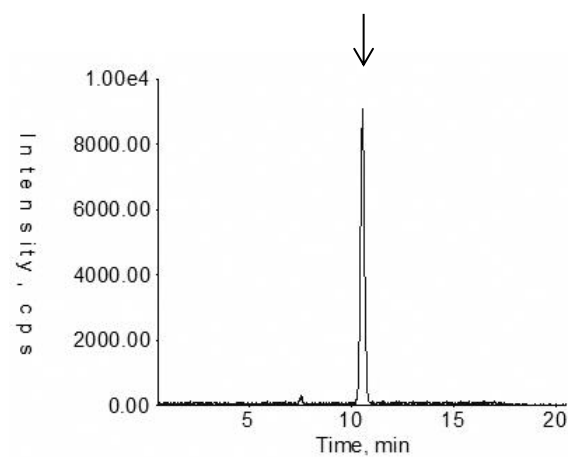
ブランク試料



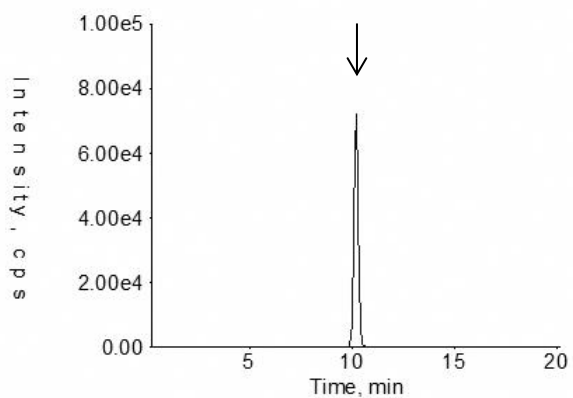
添加試料 (試料中 0.005 ppm 相当)



標準溶液 (0.0005 mg/L)



添加試料 (試料中 0.5 ppm 相当、10 倍希釈)



標準溶液 (0.005 mg/L)

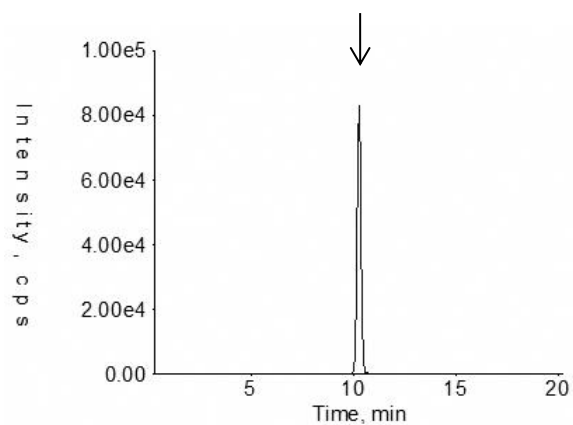
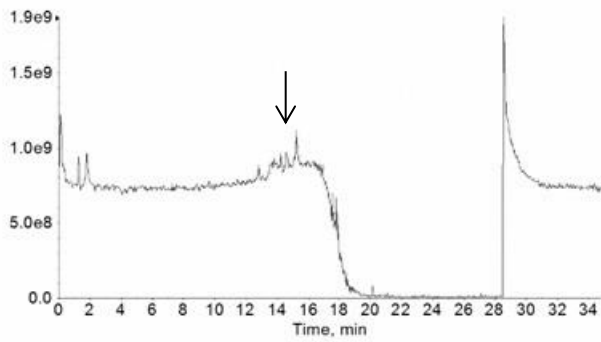
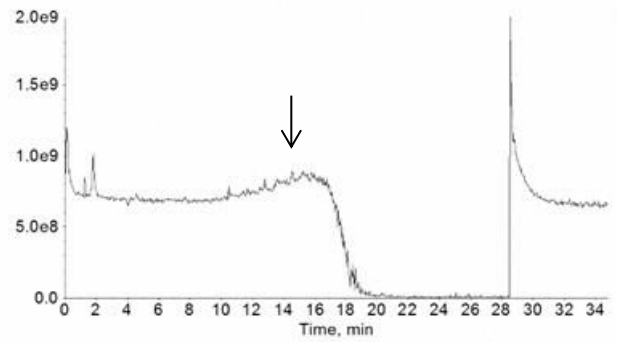


図 23 代謝物 BSA の SRM クロマトグラム (m/z 188.8→80.9)
試料：いちご

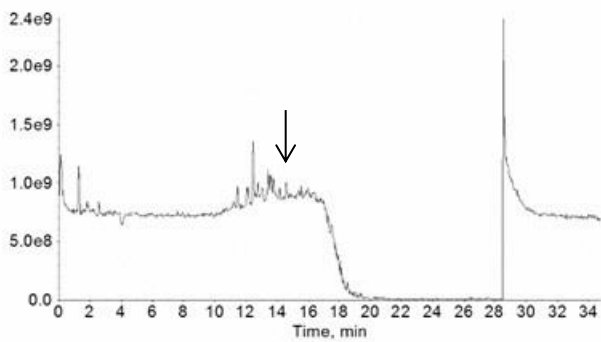
ほうれんそう



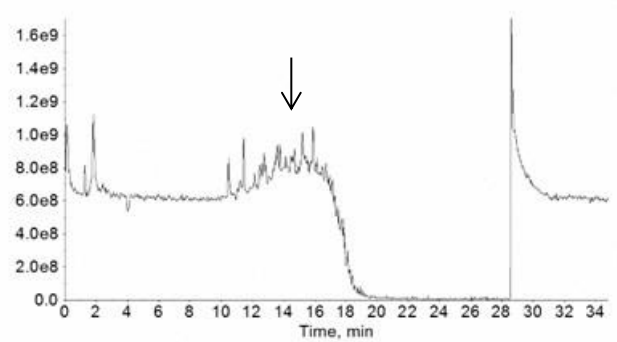
キャベツ



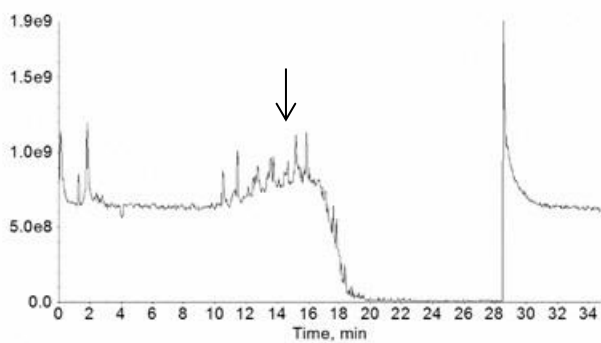
かんしょ



すいか (果肉部のみ)



すいか (果実全体)



いちご

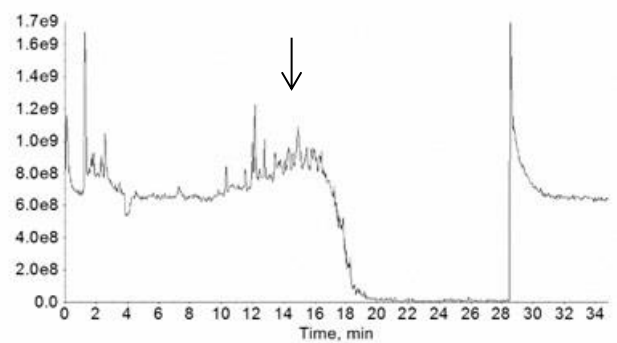
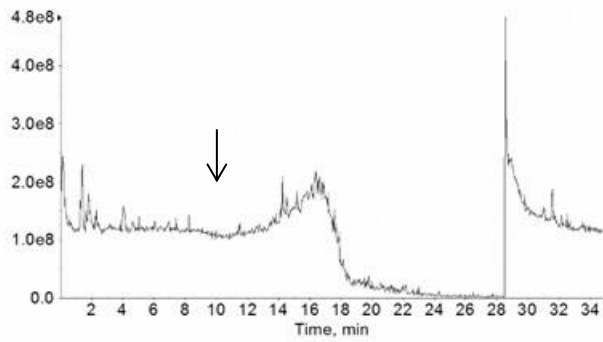
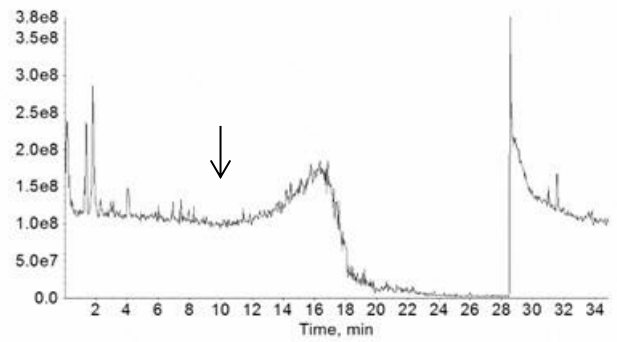


図 24 ブランク試料のフルスキャン測定におけるトータルイオンクロマトグラム
(ポジティブイオンモード、スキャン範囲：50~550 amu)

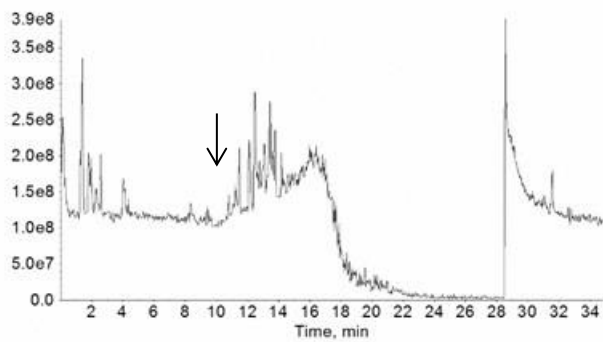
ほうれんそう



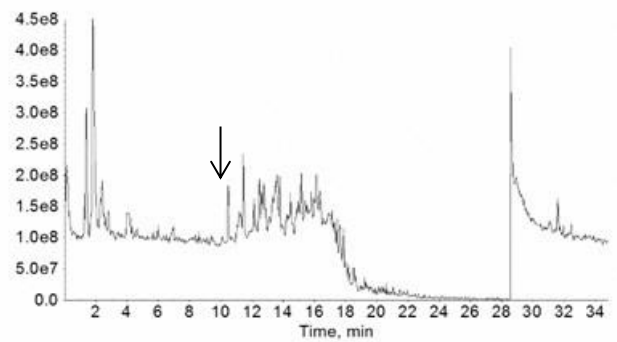
キャベツ



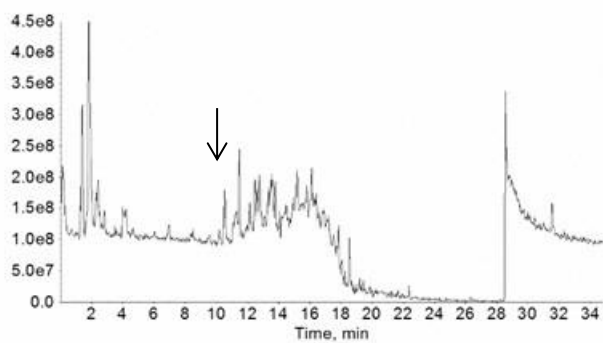
かんしょ



すいか (果肉部のみ)



すいか (果実全体)



いちご

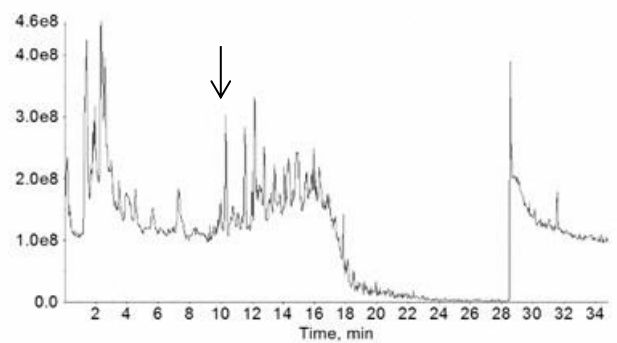


図 25 ブランク試料のフルスキャン測定におけるトータルイオンクロマトグラム
(ネガティブイオンモード、スキャン範囲：50~550 amu)

別紙

代謝物 BSA 標準品の純度について

試薬製造メーカーから純度に関する疑義の照会が当院にあったため、代謝物 BSA の純度確認を行った。

使用した 4 種類の標準品を表 1 に示した。これらの標準品 A~D を用いて 5 種類の標準原液①~⑤を調製した。

表 1 使用した標準品

標準品	製造メーカー	ロット番号	表記の純度
A	林純薬工業 (株)	180250	51% ^{※1}
B ^{※2}	林純薬工業 (株)	190178	91.3% ^{※1}
C	残留農薬研究所より提供	215PAL44	99.5%
D	ADAMA MAKHTESHIM Ltd.	499-147-01	97.8%

※1 標準品 A 及び B の純度は林純薬工業 (株) が定量 NMR にて測定した結果から求めた値

※2 標準品 B は標準品 A を林純薬工業 (株) にて精製したもの

標準溶液の調製法

標準原液①：標準品 A の純度を考慮し、50 mg/L となるように換算して調製

標準品 A 5.5 mg を精秤し、アセトニトリル 50 mL に溶解した

標準原液②：標準品 A を用いて 50 mg/L となるように調製

標準品 A 5.6 mg を精秤し、アセトニトリル 100 mL に溶解した

標準原液③：標準品 B を用いて 10 mg/L となるように調製

標準品 B 0.6 mg を精秤し、アセトニトリル 50 mL に溶解した

標準原液④：標準品 C を用いて 50 mg/L となるように調製

標準品 C 5.6 mg を精秤し、アセトニトリル 100 mL に溶解した

標準原液⑤：標準品 D を用いて 50 mg/L となるように調製

標準品 D 5.6 mg を精秤し、アセトニトリル 100 mL に溶解した

それぞれの標準原液をアセトニトリルで希釈して 0.1 mg/L の標準溶液①~⑤を調製した。LC-MS/MS にて測定を行い、面積値を比較した結果を表 2 に示した。

表 2 標準品の純度比較

試行	標準溶液				
	①	②	③	④	⑤
n=1	7406076	3958560	8735530	3951579	4167342
n=2	7224905	4019037	9055474	4054015	4093430
n=3	7330655	4038266	9031398	3996727	4273153
n=4	7589285	4048784	8888437	4053842	4306920
n=5	7464106	4200277	9688437	4120471	4406544
平均値	7403005	4052985	9079855	4035327	4249478
面積値／①の面積値		0.547	1.227	0.545	0.574

NMRにより、純度が明確である標準品 A を用いて、標準品の純度を考慮して調製した標準溶液①の面積値を 1 としてそれぞれの標準溶液の面積値を比較したところ、表 2 示す通り標準溶液④及び⑤はそれぞれ 0.55、0.57 であり、表記されている純度より低いと考えられた。また、林純薬工業(株)で精製を行い、純度を高めた標準品 B は、標準溶液①と比較して 1.2 とほぼ一致した。

そこで、今回の試験法開発事業においては、NMR で純度換算されている標準品 A (純度 51%) を純度補正して調製した標準原液を用いて添加回収試験を行った。