

※本報告書は、試験法開発における検討結果をまとめたものであり、試験法の実施に際して参考として下さい。なお、報告書の内容と通知または告示試験法との間に齟齬がある場合には、通知または告示試験法が優先することをご留意ください。

## 食品に残留する農薬等の成分である物質の 試験法開発事業報告書

フルチアニル試験法（農産物）

## フルチアニル試験法（農産物）の検討結果

### 〔緒言〕

#### 1. 目的及び試験法の検討方針等

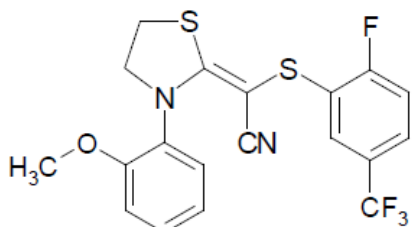
フルチアニルの農産物中の分析法の開発を行った。フルチアニルは大塚アグリテクノ（株）で開発されたチアゾリジン環にシアノメチレン基を有し、うどんこ病に効果を有する殺菌剤である。本剤は既存剤に対する耐性菌株又は低感受性菌株に対して有効であり、また形態学的観察において菌の感染プロセスへの影響が既存剤とは異なることから、新規の作用機構を有すると考えられている。

本検討においては、通知一斉試験法「LC/MSによる農薬等の一斉試験法Ⅰ（農産物）」<sup>1)</sup>の適用を試みたところ、良好な結果が得られたことから、既存の通知一斉試験法を適用して検討を行った。なお、茶については「LC-MSによる一斉試験法Ⅰ（茶：有機溶媒抽出法）」<sup>2)</sup>を適用して検討を行った。

#### 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：フルチアニル

構造式：



分子式：C<sub>19</sub>H<sub>14</sub>F<sub>4</sub>N<sub>2</sub>OS<sub>2</sub>

分子量：426.5

化学名：

IUPAC名：(Z)-2-[2-fluoro-5-(trifluoromethyl)phenylthio]-2-[3-(2-methoxyphenyl)-1,3-thiazolidin-2-ylidene]acetonitrile

CAS名：(2Z)-2-[[2-fluoro-5-(trifluoromethyl)phenyl]thio]-2-[3-(2-methoxyphenyl)-2-thiazolidinylidene]acetonitrile

外観：白色結晶性粉末

密度：1.45 g/cm<sup>3</sup> (20±1.0℃)

融点：178～179℃

蒸気圧：<1.7×10<sup>-5</sup> Pa (30℃)

熱安定性：280℃までは安定

溶解性：水 0.0079 mg/L (20℃)、*n*-ヘキサン <0.01 g/L、トルエン 11.2 g/L (20℃)、ジクロロメタン 169 g/L (20℃)、酢酸エチル 22.8 g/L (20℃)、アセトン 66.4 g/L (20℃)、メタノール 5.62 g/L (20℃)

1-オクタノール/水分配係数 (log Pow)：2.9 (25℃)

安定性：加水分解性：加水分解に対して安定 (pH 4、pH 7、pH 9)、

水中光分解性：緩衝液 (pH 7) 半減期 約 1.0 日 (25℃、25.3 W/m<sup>2</sup>、300～400 nm)

自然水 (pH 7.4) 半減期 約 1.2 日 (25℃、25.3 W/m<sup>2</sup>、300～400 nm)

〔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「審査報告書 フルチアニル」(平成25年5月17日)〕<sup>3)</sup>

#### 3. 基準値

なす 0.2 ppm、きゅうり（ガーキンを含む。） 0.2 ppm、かぼちゃ（スカッシュを含む。） 0.05 ppm、すいか 0.05 ppm、メロン類果実 0.05ppm、いちご 0.5 ppm

## [実験方法]

### 1. 試料

玄米、大豆、かぼちゃ、ほうれんそう、なす、ばれいしょ、オレンジ、いちご及び茶（煎茶）を検討に用いた。

検討に用いた試料はいずれも三重県内の小売店で購入した。また、試料の採取方法を以下に記載した。

#### (1) 玄米

試料をアブソリュートミルを用いて 425  $\mu\text{m}$  の標準網ふるいを通して均一化した。

#### (2) 大豆

試料をアブソリュートミルを用いて 425  $\mu\text{m}$  の標準網ふるいを通して均一化した。

#### (3) かぼちゃ（つるを除去したもの）

試料を細切したのちフードプロセッサを用いて磨砕均一化した。

#### (4) ほうれんそう（ひげ根及び変質葉を除去したもの）

試料を細切したのちフードプロセッサを用いて磨砕均一化した。

#### (5) なす（へたを除去したもの）

試料を細切したのちフードプロセッサを用いて磨砕均一化した。

#### (6) ばれいしょ（泥を水で軽く洗い落としたもの）

試料を細切したのちフードプロセッサを用いて磨砕均一化した。

#### (7) オレンジ

試料を細切したのちフードプロセッサを用いて磨砕均一化した。

#### (8) いちご（へたを除去したもの）

試料を細切したのちフードプロセッサを用いて磨砕均一化した。

#### (9) 茶

試料をアブソリュートミルを用いて 425  $\mu\text{m}$  の標準網ふるいを通して均一化した。

### 2. 試薬・試液

フルチアニル標準品：純度 99.9%（林純薬工業製）

アセトン：残留農薬試験用（関東化学製）

アセトニトリル：残留農薬試験用（和光純薬製）

アセトニトリル：高速液体クロマトグラフ用（和光純薬製）

トルエン：残留農薬試験用（和光純薬製）

メタノール：高速液体クロマトグラフ用（和光純薬製）

ケイソウ土：セライト 545（キシダ化学製）

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム：Mega Bond Elute-C18（1000 mg/6 mL、Agilent Technologies 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：ENVI-Carb/LC-NH<sub>2</sub>（500 mg/500 mg/6 mL、SPELCO 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/6 mL、GL science 製）

リン酸水素二カリウム：特級（ナカライテスク製）

リン酸二水素カリウム：特級（関東化学製）

水酸化ナトリウム：特級（キシダ化学製）

塩酸：特級（関東化学製）

0.5 mol/L リン酸緩衝液（pH 7.0）：リン酸水素二カリウム 52.7 g 及びリン酸二水素カリウム 30.2 g を量り採り、水約 500 mL に溶解し、1 mol/L 水酸化ナトリウム又は 1 mol/L 塩酸を用いて pH を 7.0 に調

整した後、水を加えて 1 L としたもの。

アセトニトリル及びトルエン (3:1) 混液: アセトニトリル 750 mL にトルエン 250 mL を加えたもの。

1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液: 水酸化ナトリウム 40.0 g を量り採り、水に溶解して 1 L としたもの。

1 mol/L 塩酸: 塩酸 88.5 mL に水を加えて 1 L としたもの。

標準原液: フルチアニル標準品 20 mg を精秤し、アセトニトリルで溶解して 1000 mg/L 溶液を調製した。

検量線用標準溶液: 標準原液をメタノールで希釈し、各食品の評価濃度に合わせて回収率 25、50、75、100、125、150%相当濃度となるように標準溶液を調製した。

添加用標準溶液: 標準原液をアセトンで希釈し、各食品の添加濃度に合わせて 0.1~10 mg/L 溶液を調製した。

### 3. 装置

ホモジナイザー: ヒスコトロン NS-51 (マイクロテック・ユニオン製)

粉砕器: フードプロセッサ MK-48P (パナソニック製)

アブソリュートミル (大阪ケミカル製)

濃縮装置: REN1000 (イワキ製)

遠心分離器: 高速遠心機 8920 (クボタ製)

### LC-MS/MS

装置	型式	製造者
LC	Prominence	島津製作所製
MS	API 3200 Q TRAP	AB SCIEX 製
データ処理	Analyst	AB SCIEX 製

### 4. 測定条件

#### LC-MS/MS

LC 条件																											
カラム	X Terra 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: 5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 B 液: 5 mmol/L 酢酸アンモニウム・メタノール溶液																										
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>85</td> <td>15</td> </tr> <tr> <td>1.0</td> <td>60</td> <td>40</td> </tr> <tr> <td>3.5</td> <td>60</td> <td>40</td> </tr> <tr> <td>6.0</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>8.0</td> <td>45</td> <td>55</td> </tr> <tr> <td>17.5</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>30.0</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> </tbody> </table>			時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)	0.0	85	15	1.0	60	40	3.5	60	40	6.0	50	50	8.0	45	55	17.5	5	95	30.0	5	95
時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)																									
0.0	85	15																									
1.0	60	40																									
3.5	60	40																									
6.0	50	50																									
8.0	45	55																									
17.5	5	95																									
30.0	5	95																									
MS 条件																											
測定モード	MS/MS、選択イオン検出																										
イオン化モード	ESI (+)																										
キャピラリー電圧 (V)	4500																										
脱溶媒温度 (°C)	500																										

コーンガス	窒素、10 psi
脱溶媒ガス	窒素、80 psi
コリジョンガス	窒素
定量イオン ( $m/z$ )	MS/MS: +427.1→411.2 [コーン電圧 (V) 71、コリジョンエネルギー (V) 49]
定性イオン ( $m/z$ )	MS/MS: +427.1→192.2 [コーン電圧 (V) 71、コリジョンエネルギー (V) 37]
保持時間 (min)	17.4

## 5. 定量

フルチアニル標準品 20 mg を精秤し、アセトニトリルに溶解して 1000 mg/L 溶液を調製した。この溶液をメタノールで希釈して各食品の評価濃度に合わせて回収率 25、50、75、100、125、150%相当濃度となるように標準溶液を調製した。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ルチアニルの含量を算出した。

## 6. 添加試料の調製

添加用標準溶液は標準原液をアセトンで希釈して調製した。

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

かぼちゃ (添加濃度 : 0.05 ppm) : 試料 20.0 g に添加用標準溶液 (調製濃度 : 1 mg/L) 1 mL を添加しよく混合した後、30 分間放置した。

ほうれんそう (添加濃度 : 0.01 ppm) : 試料 20.0 g に添加用標準溶液 (調製濃度 : 0.2 mg/L) 1 mL を添加しよく混合した後、30 分間放置した。

なす (添加濃度 : 0.2 ppm) : 試料 20.0 g に添加用標準溶液 (調製濃度 : 10 mg/L) 0.4 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) : 試料 20.0 g に添加用標準溶液 (調製濃度 : 0.2 mg/L) 1 mL を添加しよく混合した後、30 分間放置した。

オレンジ (添加濃度 : 0.01 ppm) : 試料 20.0 g に添加用標準溶液 (調製濃度 : 0.2 mg/L) 1 mL を添加しよく混合した後、30 分間放置した。

いちご (添加濃度 : 0.5 ppm) : 試料 20.0 g に添加用標準溶液 (調製濃度 : 10 mg/L) 1 mL を添加しよく混合した後、30 分間放置した。

茶 (添加濃度 : 0.01 ppm) : 試料 5.00 g に添加用標準溶液 (調製濃度 : 0.1 mg/L) 0.5 mL を添加しよく混合した後、30 分間放置した。

## 7. 試験溶液の調製

### 概要

フルチアニルを試料からアセトニトリルで抽出し、塩析で水を除いた後、かぼちゃ、ほうれんそう、なす、ばれいしょ、オレンジ及びいちごについてはそのまま、玄米、大豆及び茶についてはオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムで精製後、玄米、大豆、かぼちゃ、ほうれんそう、なす、ばれいしょ、オレンジ及びいちごについては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で精製し、茶については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で精製した後、LC-MS/MSで定量及び確認した。

## 1) 抽出

### ①玄米、大豆の場合

試料10.0 gをガラス製遠心管に量り採り、水20 mLを加え、30分間放置した。これにアセトニトリル50 mLを加えて2分間ホモジナイズした後、ケイソウ土を約1 cmの厚さに敷いたろ紙（直径60 mm、No.5A、桐山製作所製）を用いて吸引ろ過した。ろ紙上の残留物にアセトニトリル20 mLを加えて2分間ホモジナイズし、上記と同様に吸引ろ過した。得られたろ液を合わせ、アセトニトリルを加えて正確に100 mLとした。

抽出液20 mLを採り、塩化ナトリウム10 g及び0.5 mol/Lリン酸緩衝液（pH 7.0）20 mLを加え、10分間振とうした。静置した後、分離した水層を捨てた。

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム [Mega Bond Elute-C18 (1000 mg/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) で得られたアセトニトリル層を注入し、さらにアセトニトリル 2 mLを注入して、全溶出液を採った。溶出液に無水硫酸ナトリウム5 gを加えて1分間振とうし、15分間放置した。無水硫酸ナトリウムをろ別した後、アセトニトリル20 mLで容器及び無水硫酸ナトリウムを2回洗浄し、洗浄液と合わせた溶液をロータリーエバポレーターを用いて40℃以下で約1 mLまで濃縮した後、窒素気流により溶媒を除去した。残留物にアセトニトリル及びトルエン（3 : 1）混液2 mLを加えて溶解した。

### ②かぼちゃ、ほうれんそう、なす、ばれいしょ、オレンジ、いちごの場合

試料20.0 gをガラス製遠心管に量り採った。これにアセトニトリル50 mLを加えて2分間ホモジナイズした後、ケイソウ土を約1 cmの厚さに敷いたろ紙（直径60 mm、No.5A、桐山製作所製）を用いて吸引ろ過した。ろ紙上の残留物にアセトニトリル20 mLを加えて2分間ホモジナイズし、上記と同様にろ過した。得られたろ液を合わせ、アセトニトリルを加えて正確に100 mLとした。

抽出液 20 mL を採り、塩化ナトリウム 10 g 及び 0.5 mol/L リン酸緩衝液（pH 7.0）20 mL を加え、10分間振とうした。静置した後、分離した水層を捨てた。アセトニトリル層に無水硫酸ナトリウム 5 g を加えて 1 分間振とうし、15 分間放置した。無水硫酸ナトリウムをろ別した後、アセトニトリル 20 mL で容器及び無水硫酸ナトリウムを 2 回洗浄し、洗浄液と合わせた溶液をロータリーエバポレーターを用いて 40℃以下で約 1 mL まで濃縮した後、窒素気流により溶媒を除去した。残留物にアセトニトリル及びトルエン（3 : 1）混液 2 mL を加えて溶解した。

### ③茶の場合

試料5.00 gをガラス製遠心管に量り採り、水20 mLを加え、30分間放置した。これにアセトニトリル50 mLを加えて2分間ホモジナイズした後、ケイソウ土を約1 cmの厚さに敷いたろ紙（直径60 mm、No.5A、桐山製作所製）を用いて吸引ろ過した。ろ紙上の残留物にアセトニトリル20 mLを加えて2分間ホモジナイズし、上記と同様にろ過した。得られたろ液を合わせ、アセトニトリルを加えて正確に100 mLとした。

抽出液5 mLを採り、アセトニトリル15 mL、塩化ナトリウム10 g及び0.5 mol/Lリン酸緩衝液（pH 7.0）20 mLを加え、10分間振とうした。静置した後、分離した水層を捨てた。

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム [Mega Bond Elute-C18 (1000 mg/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) で得られたアセトニトリル層を注入し、さらにアセトニトリル 2 mLを注入して全溶出液を採った。溶出液に無水硫酸ナトリウム5 gを加えて1分間振とうし、15分間放置した。無水硫酸ナトリウムをろ別した後、アセトニトリル20 mLで容器及び無水硫酸ナトリウムを2回洗浄し、洗浄液と合わせた溶液をロータリーエバポレーターを用いて40℃以下で約1 mLまで濃縮した後、窒素気流により溶媒を除去した。残留物にアセトニトリル及びトルエン（3 : 1）混液2 mLを加えて溶解した。

## 2) 精製

### ①玄米、大豆の場合

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クロマトグラフィー

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 [ENVI-Carb/LC-NH<sub>2</sub> (500 mg/500 mg/6 mL)] にアセトニトリル及びトルエン (3 : 1) 混液 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、アセトニトリル及びトルエン (3 : 1) 混液 20 mL (うち 2 mL で 3 回容器を洗浄する) を注入する。全溶出液を採り、ロータリーエバポレーターを用いて 40°C 以下で約 1 mL まで濃縮した後、窒素気流により溶媒を除去した。残留物をメタノールに溶解し、正確に 4 mL としたものを試験溶液とした。

### ②かぼちゃ、ほうれんそう、なす、ばれいしょ、オレンジ、いちごの場合

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クロマトグラフィー

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 [ENVI-Carb/LC-NH<sub>2</sub> (500 mg/500 mg/6 mL)] にアセトニトリル及びトルエン (3 : 1) 混液 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、アセトニトリル及びトルエン (3 : 1) 混液 20 mL (うち 2 mL で 3 回容器を洗浄する) を注入する。全溶出液を採り、ロータリーエバポレーターを用いて 40°C 以下で約 1 mL まで濃縮した後、窒素気流により溶媒を除去した。残留物をメタノールに溶解し、正確に 8 mL としたものを試験溶液とした。

### ③茶の場合

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クロマトグラフィー

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)] にアセトニトリル及びトルエン (3 : 1) 混液 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、アセトニトリル及びトルエン (3 : 1) 混液 20 mL (うち 2 mL で 3 回容器を洗浄する) を注入する。全溶出液を採り、ロータリーエバポレーターを用いて 40°C 以下で約 1 mL まで濃縮した後、窒素気流により溶媒を除去した。残留物をメタノールに溶解し、正確に 1 mL としたものを試験溶液とした。

[分析法フローチャート]

①玄米、大豆の場合

秤 取

↓ 試料 10.0 g に水 20 mL を加え、30 分間放置

アセトニトリル抽出

- ↓ アセトニトリル 50 mL を加えホモジナイズ
- ↓ 吸引ろ過
- ↓ 残留物はアセトニトリル 20 mL を加えホモジナイズ
- ↓ 吸引ろ過
- ↓ ろ液を合わせ、アセトニトリルを加えて 100 mL に定容
- ↓ 抽出液 20 mL (試料 2 g 相当) を採る

↓

塩析

- ↓ 塩化ナトリウム 10 g 及びリン酸緩衝液 20 mL を加え、10 分間振とう
- ↓ 静置した後、アセトニトリル層を採る

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム [Mega Bond Elute-C18 (1000 mg/6 mL)]

- ↓ アセトニトリル 10 mL でコンディショニング
- ↓ アセトニトリル層を注入
- ↓ アセトニトリル 2 mL で溶出 (全溶出液を採取)

脱水

- ↓ 無水硫酸ナトリウム 5 g を加え、1 分間振とう後、15 分間放置

濃縮 (溶媒除去)

- ↓ アセトニトリル及びトルエン (3 : 1) 混液 2 mL に溶解

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ミニカラム  
[ENVI-Carb/LC-NH<sub>2</sub> (500 mg/500 mg/6 mL)]

- ↓ アセトニトリル及びトルエン (3 : 1) 混液 10 mL でコンディショニング
- ↓ 抽出溶液を注入
- ↓ アセトニトリル及びトルエン (3 : 1) 混液 20 mL で溶出 (全溶出液を採取)

濃縮 (溶媒除去)

- ↓ 残留物にメタノールを加えて正確に 4 mL とする (0.5 g 試料/mL)

試験溶液

↓

LC-MS/MS



②かぼちゃ、ほうれんそう、なす、ばれいしょ、オレンジ、いちごの場合

**秤 取**

↓ 試料 20.0 g

**アセトニトリル抽出**

- ↓ アセトニトリル 50 mL を加えホモジナイズ
- ↓ 吸引ろ過
- ↓ 残留物はアセトニトリル 20 mL を加えホモジナイズ
- ↓ 吸引ろ過
- ↓ ろ液を合わせ、アセトニトリルを加えて 100 mL に定容
- ↓ 抽出液 20 mL (試料 4 g 相当) を採る

**塩析**

- ↓ 塩化ナトリウム 10 g 及びリン酸緩衝液 20 mL を加え、10 分間振とう
- ↓ 静置した後、アセトニトリル層を採る

**脱水**

- ↓ 無水硫酸ナトリウム 5 g を加え、1 分間振とう後、15 分間放置

**濃縮 (溶媒除去)**

- ↓ アセトニトリル及びトルエン (3 : 1) 混液 2 mL に溶解

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ミニカラム  
[ENVI-Carb/LC-NH<sub>2</sub> (500 mg/500 mg/6 mL)]

- ↓ アセトニトリル及びトルエン (3 : 1) 混液 10 mL でコンディショニング
- ↓ 抽出溶液を注入
- ↓ アセトニトリル及びトルエン (3 : 1) 混液 20 mL で溶出 (全溶出液を採取)

**濃縮 (溶媒除去)**

- ↓ 残留物にメタノールを加えて正確に 8 mL とする (0.5 g 試料/mL)

**試験溶液**

↓

**LC-MS/MS**

③茶の場合

秤 取

↓ 試料 5.00 g に水 20 mL を加え、30 分間放置

アセトニトリル抽出

↓ アセトニトリル 50 mL を加えホモジナイズ

↓ 吸引ろ過

↓ 残留物はアセトニトリル 20 mL を加えホモジナイズ

↓ 吸引ろ過

↓ ろ液を合わせ、アセトニトリルを加えて 100 mL に定容

↓ 抽出液 5 mL (試料 0.25 g 相当) を採る

↓

塩析

↓ アセトニトリル 15 mL、塩化ナトリウム 10 g 及びリン酸緩衝液 20 mL を加え、10 分間振とう

↓ 静置した後、アセトニトリル層を採る

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム [Mega Bond Elute-C18 (1000 mg/6 mL)]

↓ アセトニトリル 10 mL でコンディショニング

↓ アセトニトリル層を注入

↓ アセトニトリル 2 mL で溶出

脱水

↓ 無水硫酸ナトリウム 5 g を加え、1 分間振とう後、15 分間放置

濃縮 (溶媒除去)

↓ アセトニトリル及びトルエン (3 : 1) 混液 2 mL に溶解

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ミニカラム  
[InertSep GC/PSA (500 mg/500 mg/6 mL)]

↓ アセトニトリル及びトルエン (3 : 1) 混液 10 mL でコンディショニング

↓ 抽出溶液を注入

↓ アセトニトリル及びトルエン (3 : 1) 混液 20 mL で溶出 (全溶出液を採取)

濃縮 (溶媒除去)

↓ 残留物にメタノールを加えて正確に 1 mL とする (0.25 g 試料/mL)

試験溶液

↓

LC-MS/MS

## 8. マトリックス添加標準溶液の調製

ブランク試験溶液 1 mL を採り、窒素気流下にて溶媒を除去した後、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、又は定量下限相当濃度の溶媒標準溶液 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。

### [結果及び考察]

#### 1. 測定条件の検討

##### (1) MS条件の検討

フルチアニルのマススペクトルを確認したところ、ESI (+) モードではプロトン付加イオンがベースピークとして確認されたが、ESI (-) モードでは脱プロトンイオンを含め感度の良いピークが確認できなかったため、測定にはESI (+) モードを用いることにした。

フルチアニルのESI (+) モード測定時のマススペクトルを図1に示した。その結果から、フルチアニルのプロトン付加分子 ( $m/z$  427.1  $[M+H]^+$ ) が最も感度が高いため、フルチアニルのプロトン付加分子をプリカーサーイオンとした。 $m/z$  427.1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に示した。高感度が得られ、かつ質量数の高い $m/z$  411.2を定量用イオンに、また $m/z$  192.2を定性用イオンとした。

以上のことから、ESI (+) モードで測定し、 $m/z$  +427.1→411.2を定量用、 $m/z$  +427.1→192.2を定性用の測定イオンとした。

マススペクトル (スキャン測定) の例

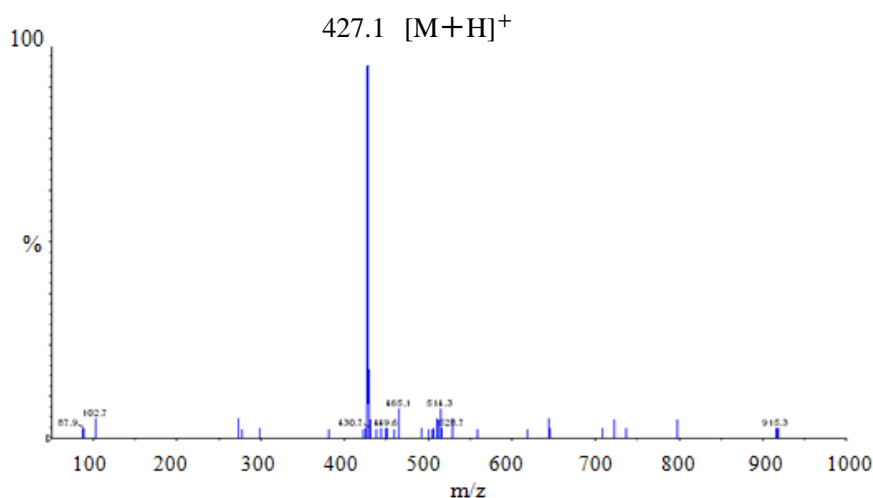


図1 フルチアニルのマススペクトル  
スキャン範囲： 50~1000 amu  
測定条件：ESI (+) , CV=71 V (CV : corn voltage)  
フルチアニル： 0.1 mg/L

プロダクトイオンスペクトル（プロダクトイオンキャン測定）の例

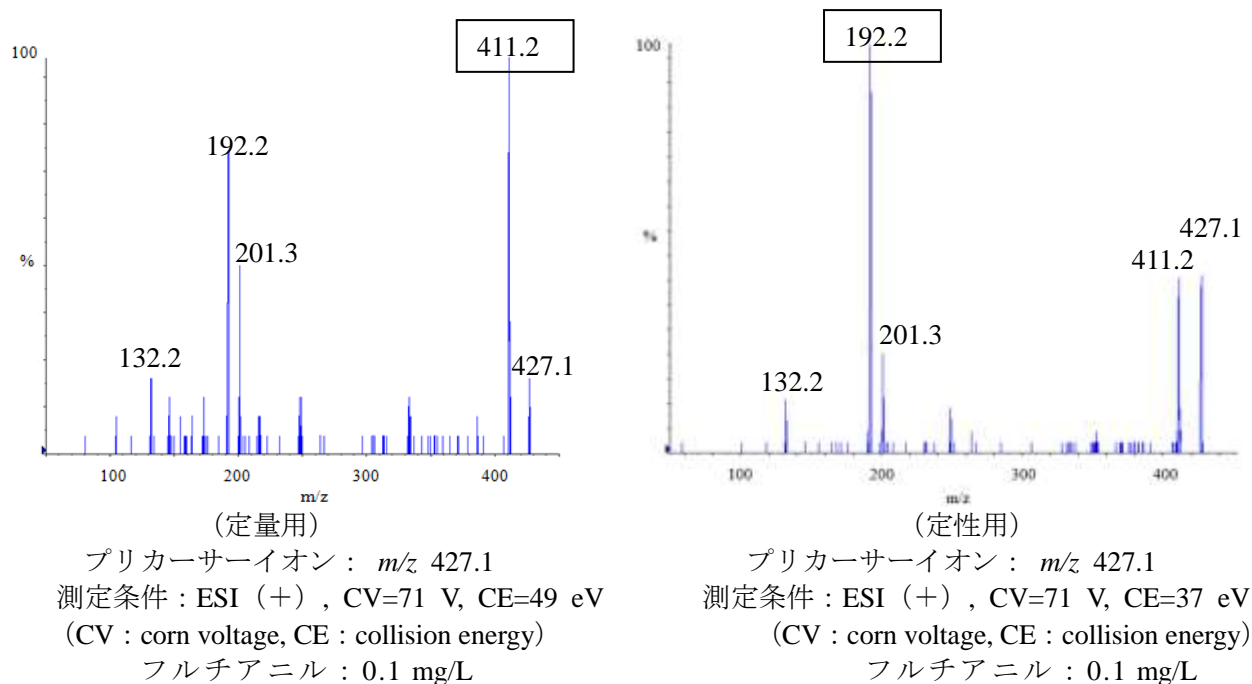


図2 フルチアニルのプロダクトイオンスペクトル

## (2) LC条件の検討

「LC/MSによる農薬等の一斉試験法I（農産物）」の条件に従い、フルチアニルの標準溶液をLC-MS/MSに注入したところ、ピーク形状にリーディングが観察された。クロマトグラムの例を図3に示した。

ピーク形状の改善を目的としてLC条件の検討を行った。

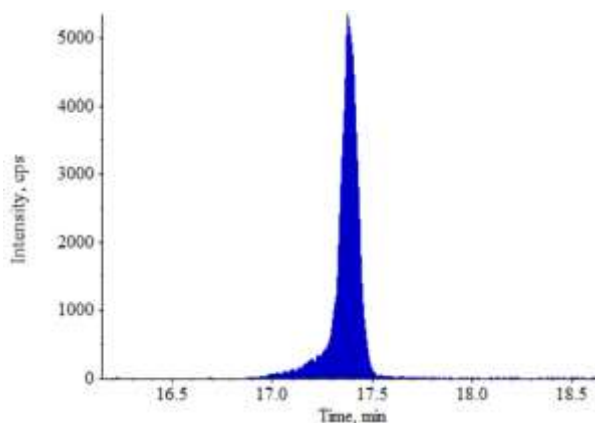
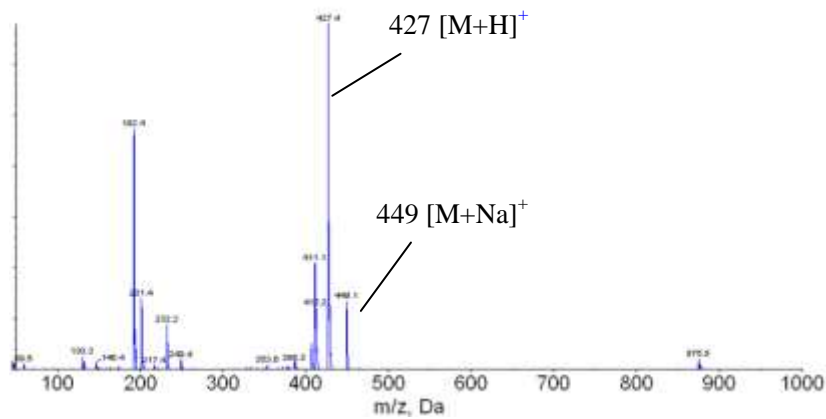
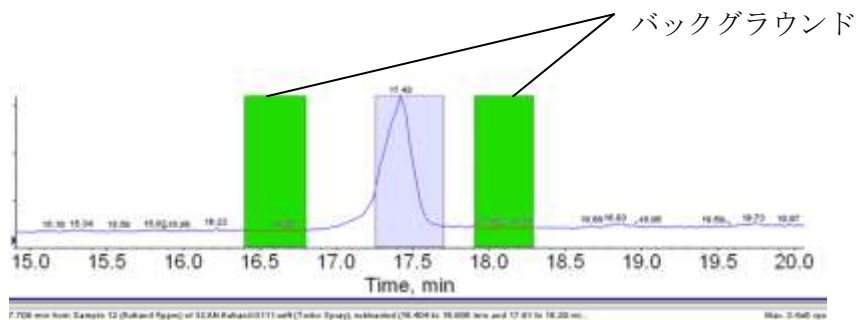


図3 フルチアニル標準溶液(0.005 mg/L)  
 ( $m/z$  +427.1→411.2)

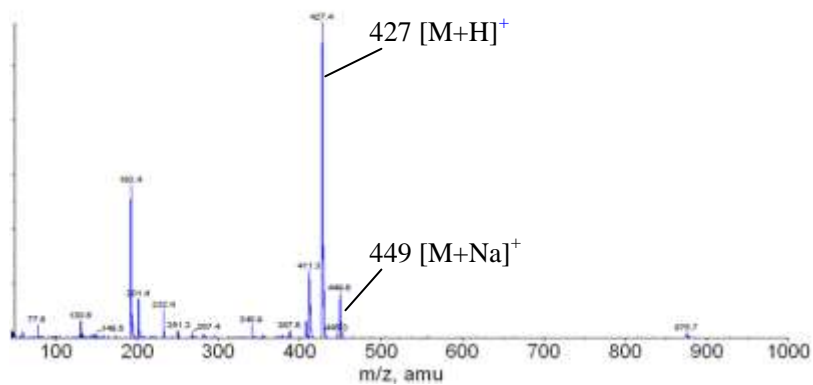
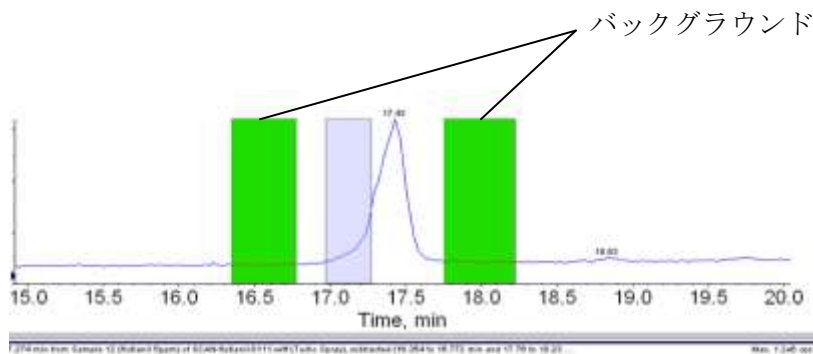
### ①標準品の確認

リーディングが生じる要因はフルチアニル異性体の存在によるものではないかと考え、検討を行った。「LC/MSによる農薬等の一斉試験法I（農産物）」の条件に従いフルチアニル標準溶液のスクリーン測定を実施した。その結果を図4に示した。得られたトータルイオンクロマトグラムのリーディング部分、及びピーク主要部分のマススペクトルを比較したところ、両者のマススペクトルに大きな差は確認されなかった。

この結果から、リーディングはフルチアニル異性体の存在によるものではないと判断した。



ピーク主要部分のマスペクトル



リーディング部分のマスペクトル

図4 フルチアニルのマスペクトル

スキャン範囲： 50~1000 amu

測定条件： ESI (+), CV=71 V (CV: core voltage)

フルチアニル： 10 mg/L

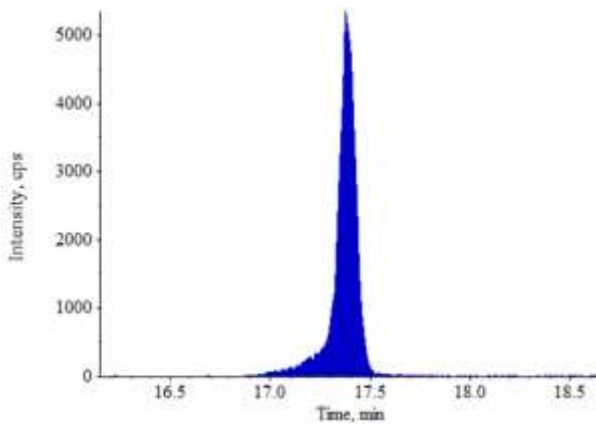
(バックグラウンドを差し引いたマスペクトル)

②分析カラムの検討

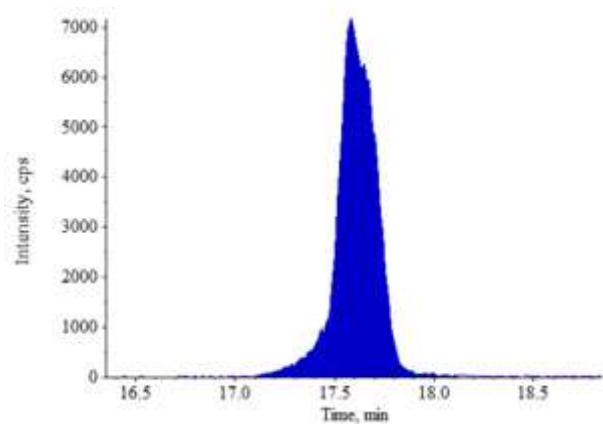
検討に用いたカラムを表1に示した。4. 測定条件に従い、各カラムでフルチアニル標準溶液 (0.005 mg/L) を測定したクロマトグラムの例を図5に示した。いずれのカラムにおいてもピークにリーディング傾向が観察された。また、検討に用いたカラムのうち、標準溶液のピーク強度が最も低いカラムはX Terra MS C18、ピーク強度が高いカラムはZORBAX Eclipse XDB-C18であり、両者のピーク強度差は約2倍であった。分析カラムの変更ではリーディングを抑えることができなかつたが、検討した分析カラムの中でリーディングが最も小さいX Terra MS C18 (Waters 製) を採用し、以降の検討はこれを使用した。

表1 検討に用いたカラム

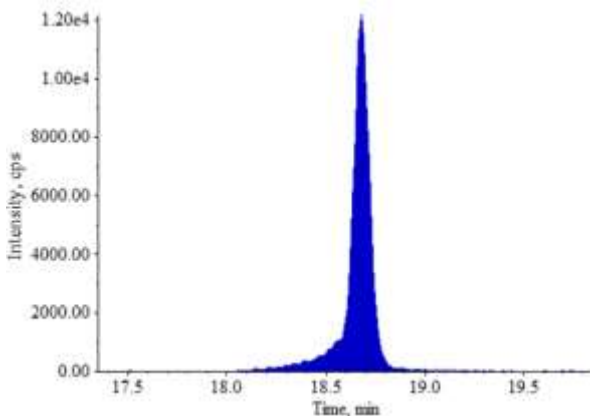
カラム名称	仕様	製造者
X Terra MS C18	3.5 $\mu$ m, 2.1 $\times$ 150 mm	Waters
Atrantis dC18	3 $\mu$ m, 2.1 $\times$ 150 mm	Waters
Inertsil ODS-4	3 $\mu$ m, 2.1 $\times$ 150 mm	GL science
Inertsustain C18	3 $\mu$ m, 2.1 $\times$ 150 mm	GL science
Mightysil RP-18GP	3 $\mu$ m, 3.0 $\times$ 150 mm	関東化学
ZORBAX Eclipse XDB-C18	3.5 $\mu$ m, 2.1 $\times$ 150 mm	Agilent Technology



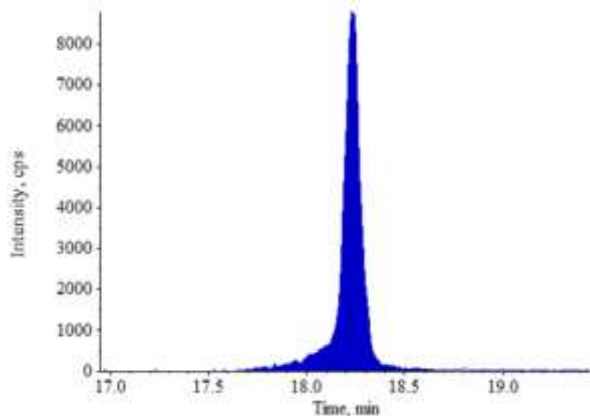
カラム : X Terra MS C18  
保持時間 : 17.4分



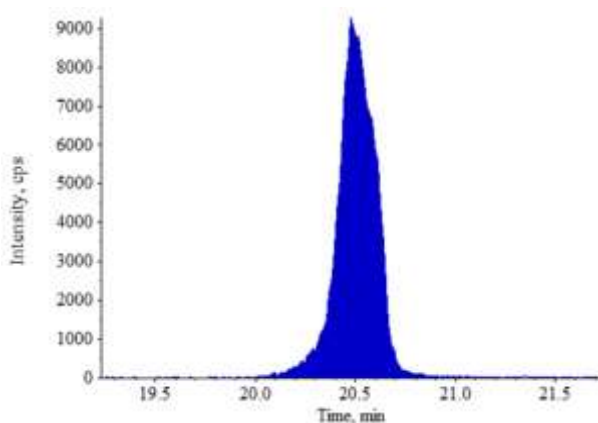
カラム : Atrantis dC18  
保持時間 : 17.9分



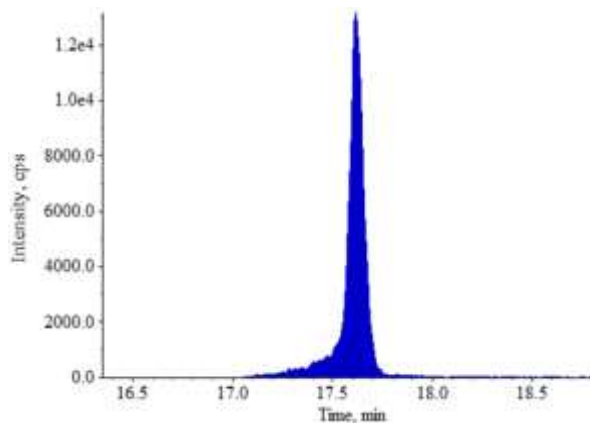
カラム : Inertsil ODS-4  
保持時間 : 18.7分



カラム : Inertsustain C18  
保持時間 : 18.2分



カラム : Mightysil RP-18GP  
保持時間 : 20.5分



カラム : ZORBAX Eclipse XDB-C18  
保持時間 : 17.6分

図5 フルチアニル標準溶液 (0.005 mg/L)  
( $m/z$  + 427.1→411.2)

### ③グラジエント条件の検討

検討したグラジエント条件を表2に示した。その他の測定条件は4. 測定条件に従った。有機溶媒の初期濃度、及び濃度勾配について検討を行ったところ、リーディングが最も抑えられたグラジエント条件は⑤であった。クロマトグラムの例を図6に示した。図3と比較して、若干リーディングが抑えられたが、濃度勾配を上げ、溶出速度を早めた条件設定であるため、試験溶液中の夾雑成分の影響を受けやすくなることが懸念された。よって、グラジエント条件の変更では根本的な解決に至らないと判断した。

表2 グラジエント条件

移動相	A液 : 5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 B液 : 5 mmol/L 酢酸アンモニウム・メタノール溶液
グラジエント条件 B液(%)	① 0分 (5%) → 15分 (95%) → 25分 (95%)
	② 0分 (10%) → 15分 (95%) → 25分 (95%)
	③ 0分 (15%) → 15分 (95%) → 25分 (95%)
	④ 0分 (20%) → 15分 (95%) → 25分 (95%)
	⑤ 0分 (15%) → 10分 (95%) → 20分 (95%)

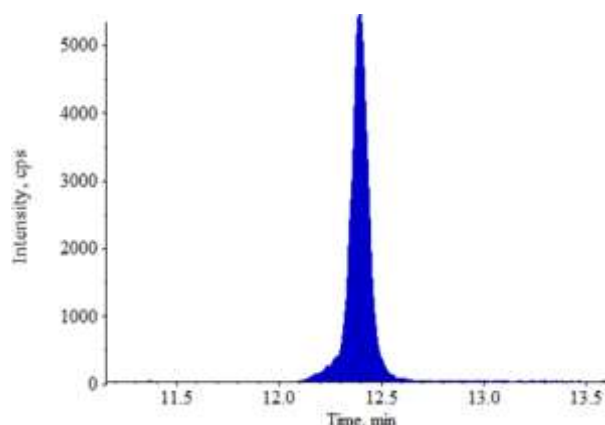
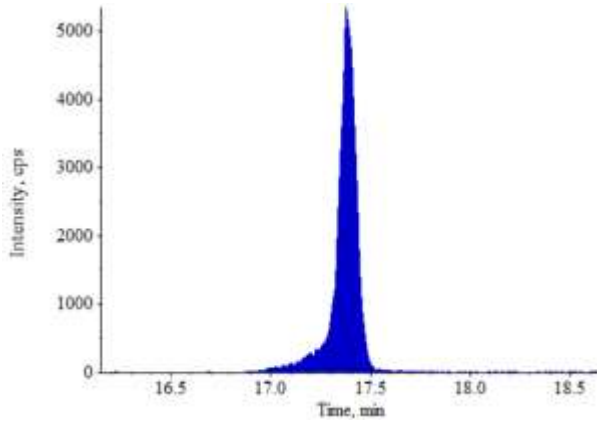


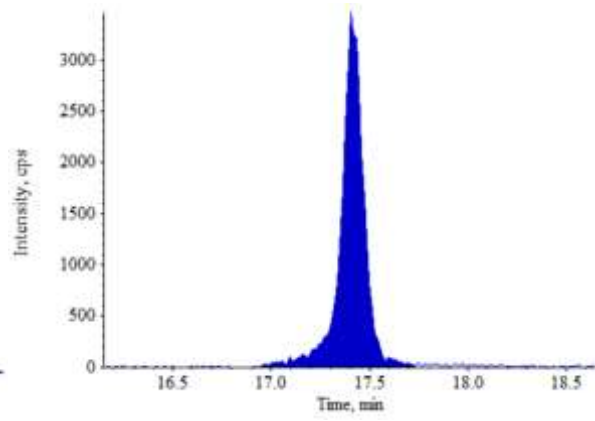
図6 フルチアニル標準溶液 (0.005 mg/L)  
保持時間 : 12.4分  
( $m/z$  + 427.1→411.2)

④移動相添加剤及び移動相溶媒の検討

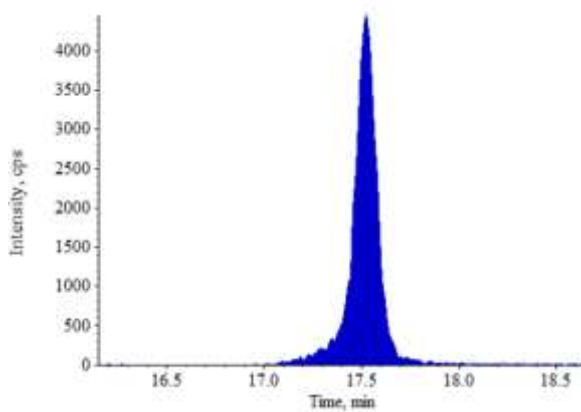
移動相に添加する試薬を酢酸アンモニウム、ギ酸アンモニウム、ギ酸、酢酸、それぞれの場合について検討した。メタノール系の移動相を用いた場合のクロマトグラムを例を図7に示した。いずれの条件でもピークにリーディング傾向が観察された。次に、有機溶媒をアセトニトリルへ変更して同様の検討を行った。(標準溶液はアセトニトリルで希釈したものを用いた。)アセトニトリル系の移動相で測定した場合のクロマトグラムを例を図8に示した。移動相溶媒にアセトニトリルを用いた場合、添加試薬によらずリーディングが抑えられ、良好なピーク形状を得ることができた。



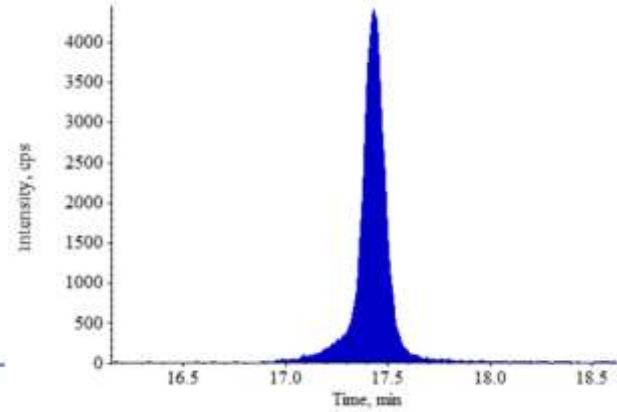
A 液 : 5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液  
B 液 : 5 mmol/L 酢酸アンモニウム・メタノール溶液



A 液 : 0.1%ギ酸  
B 液 : 0.1%ギ酸・メタノール溶液



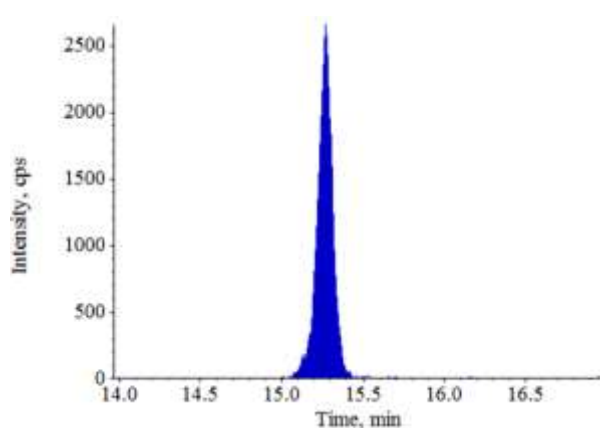
A 液 : 5 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液  
B 液 : 5 mmol/L ギ酸アンモニウム・メタノール溶液



A 液 : 0.1%酢酸  
B 液 : 0.1%酢酸・メタノール溶液

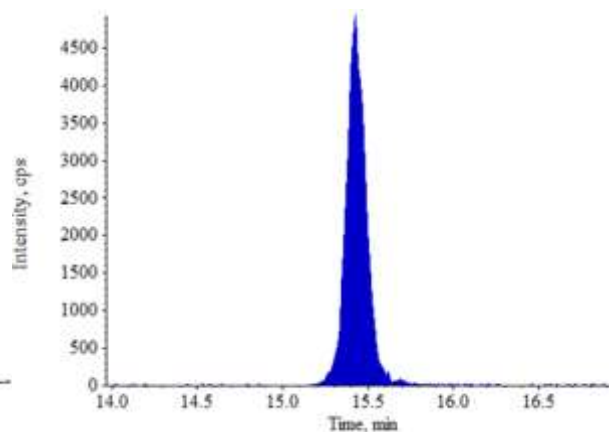
図7 メタノール系移動相による測定  
フルチアニル標準溶液(0.005 mg/L)  
( $m/z$  + 427.1→411.2)





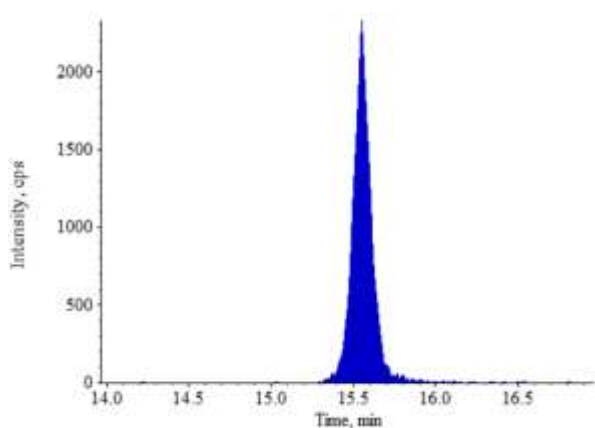
A 液 : 5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液

B 液 : 5 mmol/L 酢酸アンモニウム・アセトニトリル溶液



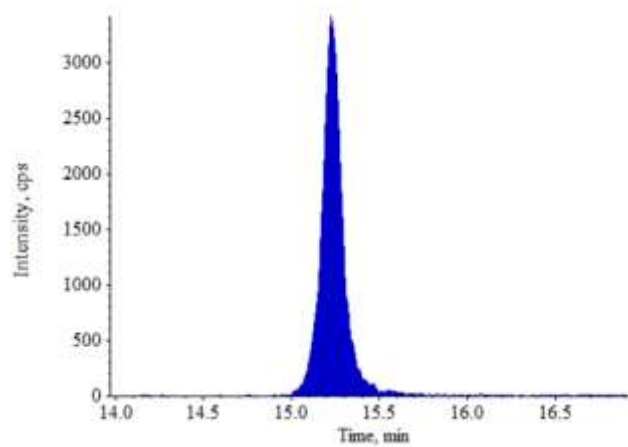
A 液 : 0.1%ギ酸

B 液 : 0.1%ギ酸・アセトニトリル溶液



A 液 : 5 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液

B 液 : 5 mmol/L ギ酸アンモニウム・アセトニトリル溶液



A 液 : 0.1%酢酸

B 液 : 0.1%酢酸・アセトニトリル溶液

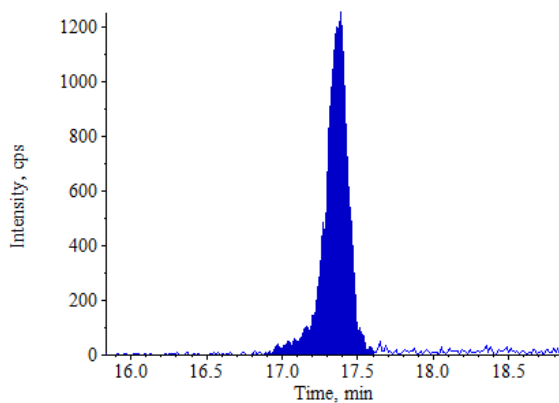
図8 アセトニトリル系移動相による測定

フルチアニル標準溶液(0.005 mg/L)

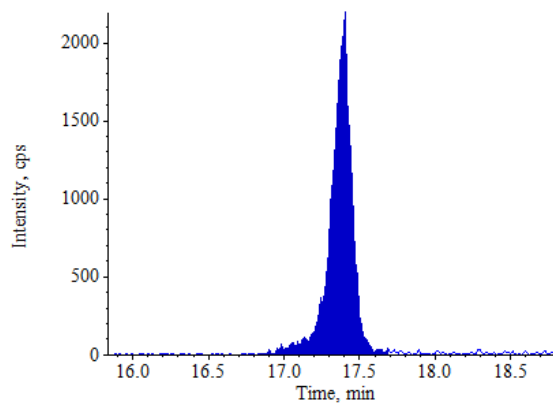
( $m/z$  +427.1→411.2)

⑤注入量の検討

LC-MS/MS への注入量を減らすことによりリーディングが抑えられるかを確認する検討を行った。注入量以外の測定条件は4. 測定条件に従った。クロマトグラムの例を図9に示した。注入量を減らした測定においてもピークにリーディング傾向が観察され、注入量の変更ではリーディングを抑えることができなかった。



注入量 : 2  $\mu$ L



注入量 : 3  $\mu$ L

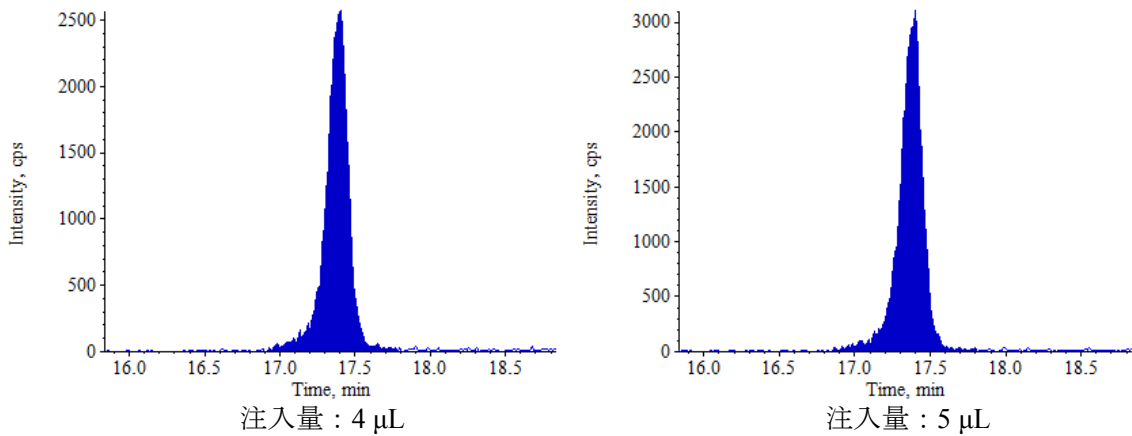


図9 フルチアニル標準溶液(0.005 mg/L)  
(m/z +427.1→411.2)

⑥ 試験溶液に用いる溶媒の検討

試験溶液の極性がピーク形状に与える影響を検討した。検討に用いた溶媒を表3に示した。各溶媒を用いて調製したフルチアニル標準溶液(0.005 mg/L)を測定したクロマトグラムを図10に示した。いずれの溶媒においてもピークにリーディング傾向が観察され、試験溶液の極性の変更ではリーディングを抑えることができなかった。

表3 試験溶液に用いた溶媒

溶媒	水及びメタノール (1 : 9) 混液
	水及びメタノール (1 : 3) 混液
	水及びメタノール (1 : 1) 混液
	水及びメタノール (4 : 1) 混液

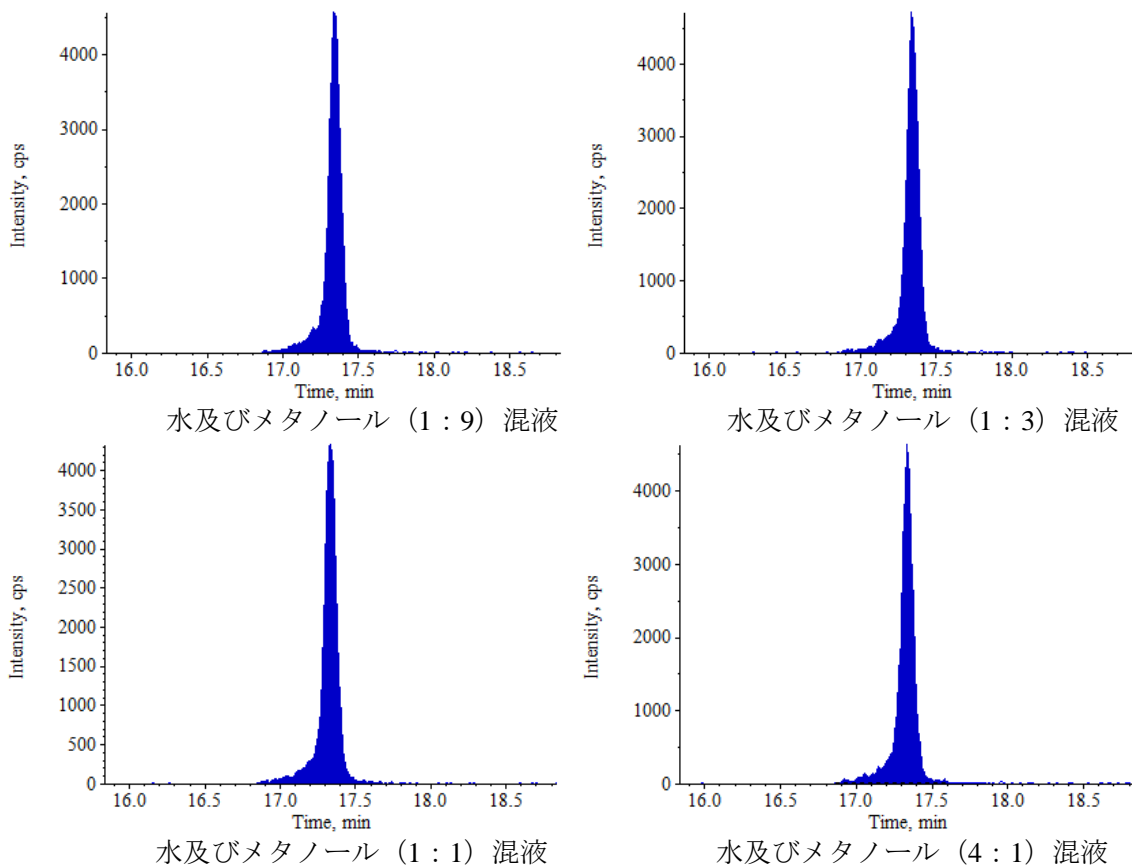


図10 フルチアニル標準溶液(0.005 mg/L)  
(m/z +427.1→411.2)

## ⑦ 考察

「LC/MS による農薬等の一斉試験法 I (農産物)」の測定条件において、分析カラム、グラジエント条件、移動相添加剤、移動相溶媒、注入量及び試験溶液に用いる溶媒の検討を行ったところ、移動相溶媒にアセトニトリルを用いることでピークのリーディングが抑えられ、形状の改善が確認できた。しかし、メタノールで見られたリーディング傾向はアセトニトリルでのピーク形状と比較し、著しく悪いものではなく、1. 測定条件の検討 (3) で示すように検量線の直線性は良好であり、選択性、真度、併行精度において良好な結果が得られたため、LC 条件には「LC/MS による農薬等の一斉試験法 I (農産物)」の条件を適用した。

### (3) 検量線

図 11 にフルチアニル検量線の例を示した。0.0025~0.10 mg/mL の濃度範囲で作成した検量線の相関係数 ( $r^2$ ) は、いずれも 0.999 以上であり良好な直線性を示した。

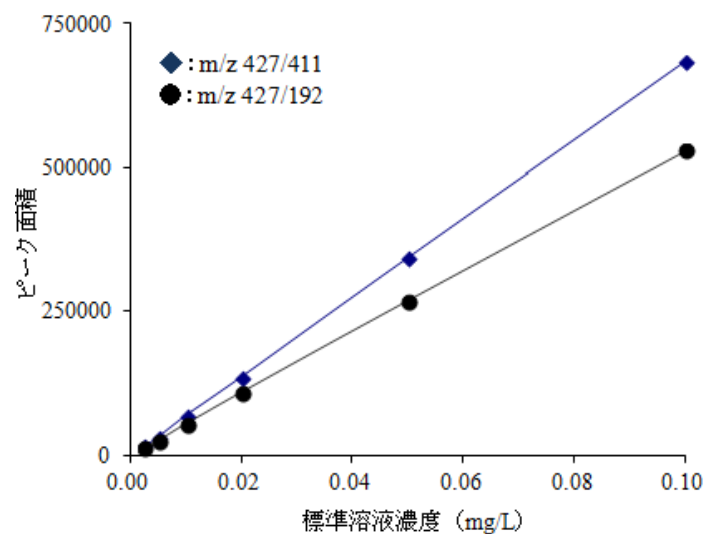


図 11 フルチアニル検量線の例  
定量イオン ( $m/z$  427/411)      定性イオン ( $m/z$  427/192)  
 $y = 6862780x - 1229$                        $y = 5311111x - 389$   
 $r^2 = 0.99997$                                        $r^2 = 0.99989$

### (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 【[試験用量 8 (mL) / 試験溶液中の試料量 4 (g)]

× [分析対象化合物の定量限界相当量 0.025 (ng) / 5 (μL)】

穀類・豆類： 0.01 mg/kg 【[試験用量 4 (mL) / 試験溶液中の試料量 2 (g)]

× [分析対象化合物の定量限界相当量 0.025 (ng) / 注入量 5 (μL)】

茶： 0.01 mg/kg 【[試験用量 1 (mL) / 試験溶液中の試料量 0.25 (g)]

× [分析対象化合物の定量限界相当量 0.0125 (ng) / 注入量 5 (μL)】

## 2. 試験溶液調製法の検討

玄米、大豆、かぼちゃ、ほうれんそう、なす、ばれいしょ、オレンジ、及びいちごにおいては通知一斉試験法「LC/MS による農薬等の一斉試験法 I (農産物)」の適用を試みた。また、茶においては「LC-MS による一斉試験法 I (茶：有機溶媒抽出法)」の適用を試みた。

### (1) 抽出方法の検討

作物残留試験で採用されている試験法では塩酸含有メタノール・水混液による酸性条件での抽出、もしくはアセトニトリルを用いた抽出であった。前者の試験法はフルチアニルの代謝物「2-フルオロ-5-(トリフルオロメチル)ベンゼンスルホン酸」がスルホ基を有する酸性物質であるため、フルチアニルとの同時抽出を目的として酸性条件下での抽出を行っていると考えられる。作物残留試験における両者の試験結果において、いずれもフルチアニル（親化合物）の回収率は良好であったことから、フルチアニル（親化合物）のみを分析対象とした場合は抽出溶媒にアセトニトリルを採用して問題ないと判断した。

### (2) カラム精製の検討

通知一斉試験法「LC/MSによる農薬等の一斉試験法 I（農産物）」、及び「LC-MSによる一斉試験法 I（茶：有機溶媒抽出法）」で使用するミニカラムの溶出試験を行った。

#### ① オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムによる精製 [Mega Bond Elute-C18 (1000 mg/6 mL)]

カラムをアセトニトリル10 mLで予備洗浄した後、フルチアニル標準溶液を負荷し、アセトニトリルで溶出したときの溶出状況を表4に示した。フルチアニルは、溶出量2 mLで101%溶出されたことから、試験溶液を負荷後の溶出量は2 mLとした。

表4 オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムからの溶出状況

	20 mL (負荷)	アセトニトリル			合計
		20~22 mL	22~24 mL	24~26 mL	
回収率 (%)	92	9	0	0	101

負荷量：0.0025 µg (0.000125 mg/L溶液20 mL分取)

#### ② 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 [ENVI-Carb/LC-NH<sub>2</sub> (500mg/500mg/6 mL)]

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、フルチアニル標準溶液を負荷し、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5に示した。フルチアニルは、アセトニトリル及びトルエン（3：1）混液 10 mLで103%溶出されたことから「LC/MSによる農薬等の一斉試験法I（農産物）」と同様に溶出量20 mLを採用した。

表5 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溶出状況

	5 mL (負荷)	アセトニトリル及びトルエン（3：1） 混液			合計
		5~10 mL	10~15 mL	15~20 mL	
回収率 (%)	51	52	0	0	103

負荷量：0.0025 µg (0.0005 mg/L溶液 5 mLを分取)

#### ③ 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、フルチアニル標準溶液を負荷し、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6に示した。フルチアニルは、アセトニトリル及びトルエン（3：1）混液 10 mLで99%溶出されたことから「LC/MSによる一斉試験法 I（茶：有機溶媒抽出法）」と同様に溶出量20 mLを採用した。

表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からの溶出状況

	5 mL (負荷)	アセトニトリル及びトルエン (3:1) 混液			合計
		5~10 mL	10~15 mL	15~20 mL	
回収率 (%)	45	54	0	0	99

負荷量：0.0025 µg (0.0005 mg/L溶液 5 mLを分取)

### 3. 添加回収試験

玄米、大豆、かぼちゃ、ほうれんそう、なす、ばれいしょ、オレンジ、いちご及び茶の9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。

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の例を図12~20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25~33に示した。

#### (1) 選択性

選択性の検討結果を表7に示した。検討したいずれの試料においても、フルチアニルの定量を妨害するピークは認められず、選択性は良好であった。

表7 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 <sup>1</sup> (ppm)	添加濃度 <sup>2</sup> (ppm)	妨害ピークの許容範囲		ピーク面積(高さ) <sup>3</sup>				選択性 の評価 <sup>5</sup>	
						評価対象濃度 (ppm)	判定基準	面積又は 高さの別	ブランク試料 (a)	標準溶液 <sup>4</sup> (b)	面積(高さ) 比(a)/(b)		
1	フルチアニル	玄米	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	36903	0.000	○
		大豆	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	46872	0.000	○
		かぼちゃ	0.01	0.05	0.05	基準値	0.05	< 0.100	面積	0	141890	0.000	○
		ほうれんそう	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	32157	0.000	○
		なす	0.01	0.2	0.2	基準値	0.2	< 0.100	面積	0	669168	0.000	○
		ばれいしょ	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	31713	0.000	○
		オレンジ	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	27277	0.000	○
		いちご	0.01	0.5	0.5	基準値	0.5	< 0.100	面積	0	1660204	0.000	○
		茶	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	18031	0.000	○

#### (2) 真度、精度及び定量限界

真度及び併行精度の検討結果を表8に示した。真度は89.9~104.7%、併行精度は0.9~2.9%であり、全ての食品で真度の目標値(70~120%)、併行精度の目標値(15%>又は10%>)を満たしていた。また、定量限界と添加濃度が同じである、玄米、大豆、ほうれんそう、ばれいしょ、オレンジ及び茶については、S/N比の平均値は185~573であり、目標とするS/N比 $\geq 10$ を満たしているため、定量限界は0.01 ppmに設定できると考えられた。

添加濃度が定量限界濃度と異なる、かぼちゃ、なす及びいちごについては、定量限界の推定結果を表9に示した。また、定量限界の推定における代表的なクロマトグラムの例を図22~24に示した。S/N比の平均値は567~572であり、目標とするS/N比 $\geq 10$ を満たしているため、定量限界は0.01 ppmに設定できると考えられた。

表8 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 <sup>1</sup> (ppm)	添加濃度 (ppm)	定量限界 の評価 <sup>2</sup>	検量線			回収率(%)					真度 (%)	併行精度 (RSD%)	S/N比 <sup>3</sup>		
							傾き	切片	r <sup>2</sup>	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5			Max	Min	平均値
1	フルチアニル	玄米	0.01	0.01	0.01		0.00017	-0.21	0.9991	108.8	105.5	102.8	103.3	103.0	104.7	2.5	573.3	573.3	573.3
		大豆	0.01	0.01	0.01		0.000731	-179	0.9998	97.6	95.5	94.9	94.2	94.7	95.4	1.4	563.3	560.8	562.0
		かぼちゃ	0.01	0.05	0.05	*	0.000205	-1544	0.9997	93.0	93.8	95.0	92.3	93.6	93.5	1.1	-	-	#DIV/0!
		ほうれんそう	0.01	0.01	0.01		0.000874	-842	0.9996	96.0	97.0	95.2	99.7	97.5	97.1	1.6	280.8	280.8	280.8
		なす	0.01	0.2	0.2	*	0.000219	-14358	0.9998	97.8	97.2	95.5	99.6	99.6	98.1	1.4	-	-	#DIV/0!
		ばれいしょ	0.01	0.01	0.01		0.000000	-413	0.9996	100.5	99.9	100.9	98.6	96.1	99.2	2.0	280.8	278.3	279.5
		オレンジ	0.01	0.01	0.01		0.001188	-591	0.9990	94.7	97.1	95.6	93.0	97.2	95.5	1.8	279.5	278.3	278.9
		いちご	0.01	0.5	0.5	*	0.000150	-34954	0.9994	102.1	101.1	99.6	101.5	101.6	101.2	0.9	-	-	#DIV/0!
		茶	0.01	0.01	0.01		0.000348	128	0.9995	91.2	91.5	90.1	91.1	85.2	89.9	2.9	184.9	184.9	184.9

表9 定量限界の推定

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (mg/kg)	検出限界 <sup>1)</sup> (ppm)	添加濃度 (ppm)	補正真度 <sup>2)</sup> (%)	ピーク面積(高さ) <sup>3)</sup>						S/N比		平均値							
							面積又は 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			n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均	面積(高さ) 比(%) <sup>6)</sup>	S/N比
									n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均								
1	フルチアニル	かぼちゃ	0.01	0.05	0.05	*	0.005	面積	0	35080	34711	35196.5	34188	33809	33898.0	573.0	570.8	103.5	572.0			
		なす	0.01	0.2	0.2	*	0.005	面積	0	34106	33380	33743.0	34337	35292	34814.5	570.8	573.3	98.9	572.0			
		いちご	0.01	0.5	0.5	*	0.005	面積	0	35033	35000	35049.5	33907	33894	33945.5	565.8	568.3	105.6	567.0			

(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 10 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 0.91~1.05 であり、おおむね良好な結果が得られた。なお、茶の試験溶液は無色透明であったが、わずかにイオン化抑制が認められた。

添加回収試験における真度を表 10 で求めたピーク面積比で除して補正真度を求め、表 11 に示した。補正真度は 91.7~100.7%であり、全ての食品で真度の目標値 (70~120%) を満たしていた。全ての食品において真度及び補正真度の結果はいずれも目標値 (70~120%) の範囲内であったため、試験溶液に含まれる食品成分がフルチアニルのイオン化に与える影響は少ないと考えられた。

表 10 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 <sup>1)</sup> (ppm)	添加濃度 (ppm)	標準真度 <sup>2)</sup> (%)	ピーク面積(高さ) <sup>3)</sup>						ピーク面積 (高さ)比 <sup>4)</sup>		
							面積又は 高さの別	ブランク <sup>5)</sup>	マトリックス添加標準溶液 <sup>6)</sup>			溶媒標準溶液			
									n=1	n=2	平均	n=1		n=2	平均
1	フルチアニル	玄米	0.01	0.01	0.01	0.005	面積	0	36903	37013	36958.0	34749	36143	35446.0	1.04
		大豆	0.01	0.01	0.01	0.005	面積	0	46872	47302	47087.0	46901	47331	47116.0	1.00
		かぼちゃ	0.01	0.05	0.05	0.025	面積	0	141890	139955	140927.5	139522	137899	138710.5	1.02
		ほうれんそう	0.01	0.01	0.01	0.005	面積	0	32157	31755	31956.0	30654	30098	30476.0	1.05
		なす	0.01	0.2	0.2	0.1	面積	0	27277	26948	27112.5	27126	27606	27366.0	0.99
		ばれいしょ	0.01	0.01	0.01	0.005	面積	0	31713	31110	31411.5	29889	31620	30759.5	1.02
		オレンジ	0.01	0.01	0.01	0.005	面積	0	27277	26948	27112.5	27126	27606	27366.0	0.99
		いちご	0.01	0.5	0.5	0.25	面積	0	1660204	1669631	1663417.5	1603400	1599861	1501630.5	1.04
		茶	0.01	0.01	0.01	0.0025	面積	0	15873	15940	15911.0	17074	17118	17546.0	0.91

表 11 補正真度

食品名	真度 (%)	ピーク面積比	補正真度 (%)
玄米	104.7	1.04	100.7
大豆	95.4	1.00	95.4
かぼちゃ	93.5	1.02	91.7
ほうれんそう	97.1	1.05	92.5
なす	98.1	0.99	99.1
ばれいしょ	99.2	1.02	97.3
オレンジ	95.5	0.99	96.5
いちご	101.2	1.04	97.3
茶	89.9	0.91	98.8

4. その他の試験法検討に関連する事項

茶について「LC/MS による農薬等の一斉試験法 I (農産物)」を適用した検討を行った。試料の採取方法、試薬・試液、測定条件等は [実験方法] 1. ~ 6. に従い、試験溶液は試料中 0.01 mg/kg に相当する試験溶液中濃度が 0.005 mg/L となるように調製した。

試験法の適用を検討した結果、フルチアニルの定量を妨害するピークは認められず、選択性は良好であった。真度は 88.1%、併行精度は 3.3%であり、真度の目標値 (70~120%)、併行精度の目標値 (15% >) を満たしていた。また S/N 比の平均値は 280 であり、目標とする S/N 比 ≥ 10 を満たしているため、

定量限界は 0.01 ppm に設定できると考えられた。試料マトリックスの測定への影響について検討したところ、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は 0.90 であった。わずかにイオン化抑制が認められたが、真度、及び補正真度の結果は目標値（70～120%）を満たしており、フルチアニルのイオン化に与える影響は少なく、結果は良好であった。しかし、試験溶液は薄黄色を呈しており、機器への負荷が懸念された。

各検討結果を表 12～15 に示した。また、代表的なクロマトグラムの例を図 21、トータルイオンクロマトグラムを図 34 に示した。

表12 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 <sup>1)</sup> (ppm)	添加濃度 <sup>2)</sup> (ppm)	妨害ピークの許容範囲		ピーク面積(高さ) <sup>3)</sup>				選択性の評価 <sup>4)</sup>	
						評価対象濃度 (ppm)	判定基準	面積又は高さの別	ブランク試料 (a)	標準溶液 <sup>1)</sup> (b)	面積(高さ)比 (a/b)		
1	フルチアニル	茶	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	31957	0.000	○

表13 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 <sup>1)</sup> (ppm)	添加濃度 (ppm)	定量限界の評価 <sup>2)</sup>	検査額			回収率(%)					真度 (%)	併行精度 (RSD%)	S <sub>rel</sub> <sup>3)</sup>		
							検定	切片	片道	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5			Max	Min	平均値
1	フルチアニル	茶	0.01	0.01	0.01		88.1	279	0.9990	88.4	83.3	90.0	90.6	88.0	88.1	3.3	279.5	279.5	279.5

表 14 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 <sup>1)</sup> (ppm)	添加濃度 (ppm)	標準溶液濃度 <sup>2)</sup> (mg/L)	ピーク面積(高さ) <sup>3)</sup>									
							面積又は高さの別	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(高さ)比 <sup>6)</sup>	
									n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均		
1	フルチアニル	茶	0.01	0.01	0.01	0.005	面積	0	32601	32167	32384.0	35772	36245	36008.5	0.90	

表 15 補正真度

食品名	真度 (%)	ピーク面積比	補正真度 (%)
茶	88.1	0.90	97.9

## 5. 考察

「LC/MSによる農薬等の一斉試験法I（農産物）」の測定条件に従いフルチアニルを測定したところ、ピーク形状にリーディングが観察された。リーディングを抑える測定条件を設定するため、分析カラム、グラジエント条件、移動相添加物、移動相溶媒、注入量、及び試験溶液に用いる溶媒の検討を実施したところ、移動相溶媒にアセトニトリルを用いることでリーディングが抑えられ、良好なピーク形状を得ることができた。しかし、検討した全ての食品において「LC/MSによる農薬等の一斉試験法I（農産物）」を適用した検討結果は良好であったため、試験法の適用は可能であると判断した。よって、測定条件は「LC/MSによる農薬等の一斉試験法I（農産物）」を採用した。

茶は「LC/MSによる農薬等の一斉試験法I（農産物）」の適用も可能であると考えられたが、塩析後のアセトニトリル層にエマルジョンが観察されたため、遠心分離による液層の分離が必要であった。また、試験溶液は薄黄色を呈しており、精製不足による測定機器への負荷が増加することが懸念された。これらの操作上の不具合、及び精製不足の解消を目的として、茶は「LC-MSによる一斉試験法I（茶：有機溶媒抽出法）」を適用した検討を行い、良好な結果が得られた。

「LC-MSによる一斉試験法I（茶：有機溶媒抽出法）」において、既存の通知一斉試験法と異なる操作手順については試験操作の統一性を鑑み、「LC/MSによる農薬等の一斉試験法I（農産物）」に準拠した。変更した手順は以下の通りである。塩析後、静置することでアセトニトリル層はエマルジョンを形成することなく水層と分離したため、遠心分離の操作を省略した。オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム精製の溶出量は、溶出試験の結果より2 mLを採用して問題ないと判断した。また、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム精製後の溶出液を濃縮しても水は残らなかったが、濃縮前に無水硫酸ナトリウムによる脱水操作を追加した。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

ラム精製後の溶出液の濃縮操作は、濃縮過程でアセトンを加える手順を採用した。

#### 【結論】

農産物中のフルチアニル試験法として、「LC/MS による農薬等の一斉試験法 I (農産物)」の適用を検討した。なお、茶については「LC-MS による一斉試験法 I (茶：有機溶媒抽出法)」の適用を検討した。試験法を玄米、大豆、かぼちゃ、ほうれんそう、なす、ばれいしょ、オレンジ、いちご及び茶（煎茶）の 9 食品に適用した結果、真度 89.9～104.7、併行精度 0.9～2.9%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。

茶は「LC/MS による農薬等の一斉試験法 I (農産物)」の適用を検討した結果、真度 88.1%、併行精度 3.3%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。

#### 【参考文献】

- 1) 厚生労働省通知食安発第 1129002 号「食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について（一部改正）」（平成 17 年 11 月 29 日）、「LC/MS による農薬等の一斉試験法 I (農産物)」
- 2) 「LC-MS による一斉試験法 I (茶：有機溶媒抽出法)」実施要領（平成 25 年度版）
- 3) 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「審査報告書 フルチアニル」（平成 25 年 5 月 17 日）



①添加回収試験における代表的なクロマトグラム

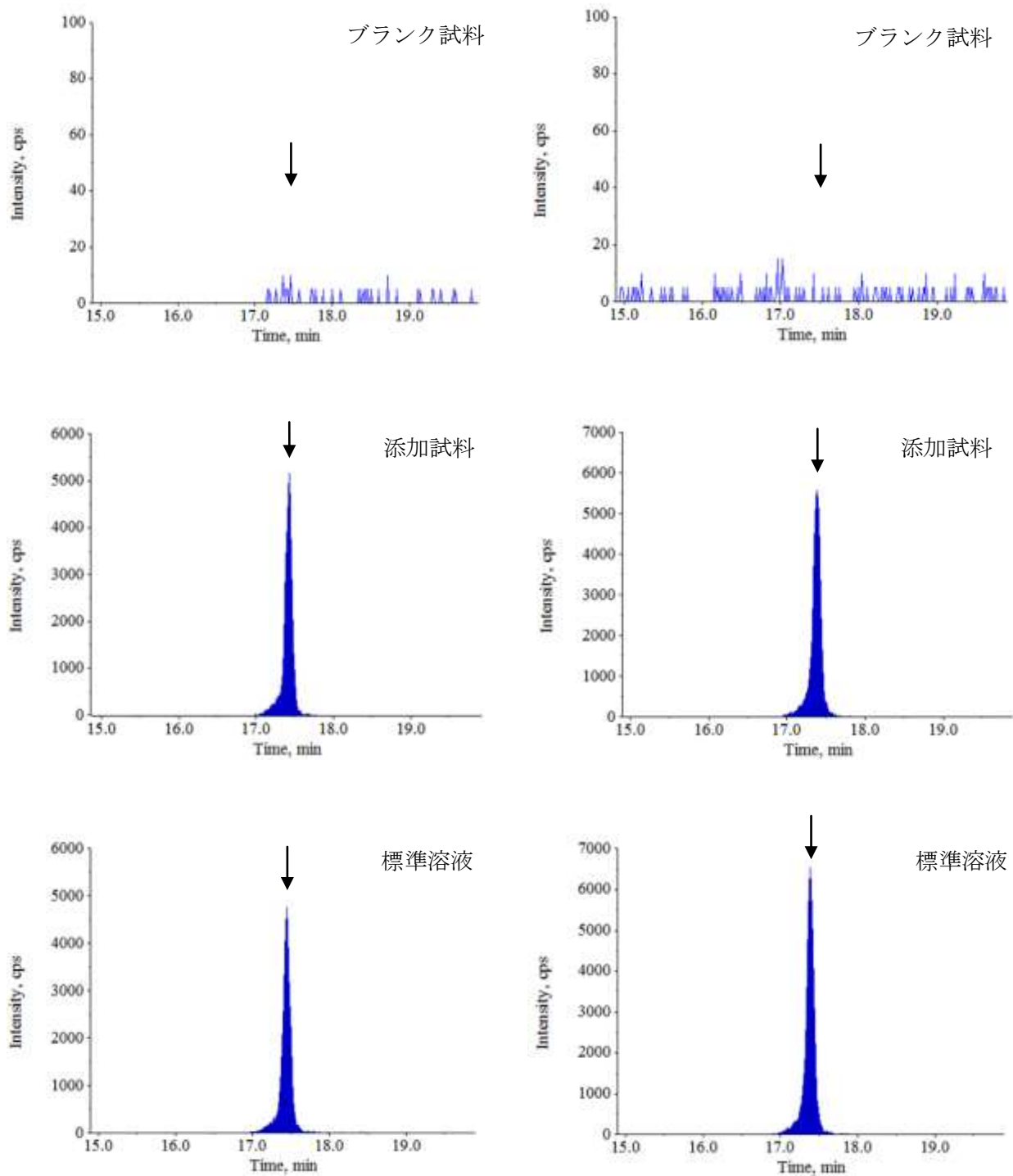


図 12 玄米の SRM クロマトグラム  
 ( $m/z$  + 427.1→411.2)  
 添加濃度 : 0.01 ppm

図 13 大豆の SRM クロマトグラム  
 ( $m/z$  + 427.1→411.2)  
 添加濃度 : 0.01 ppm

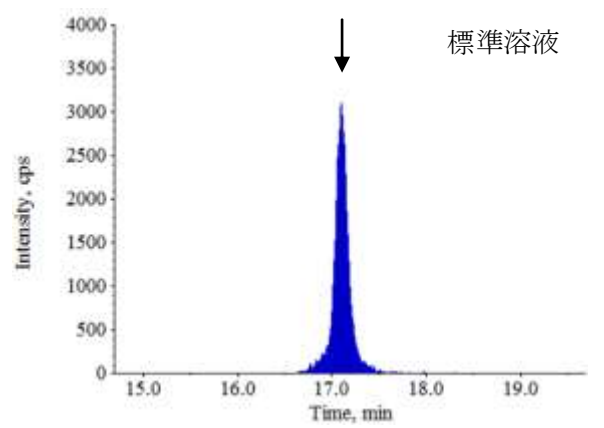
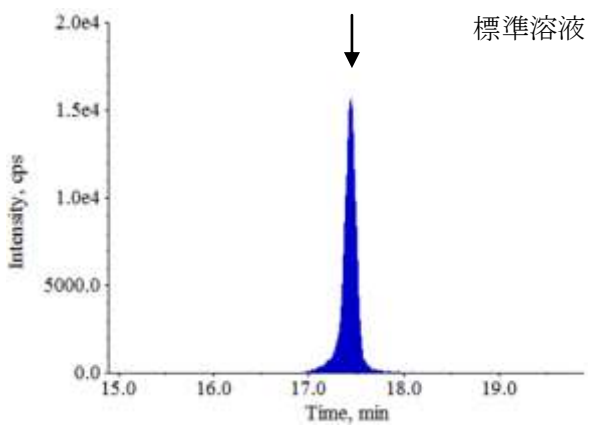
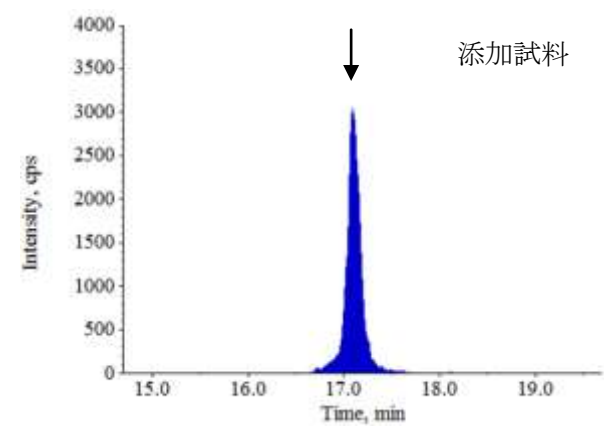
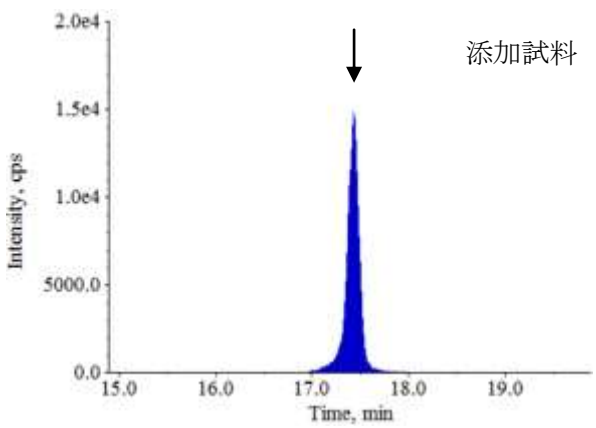
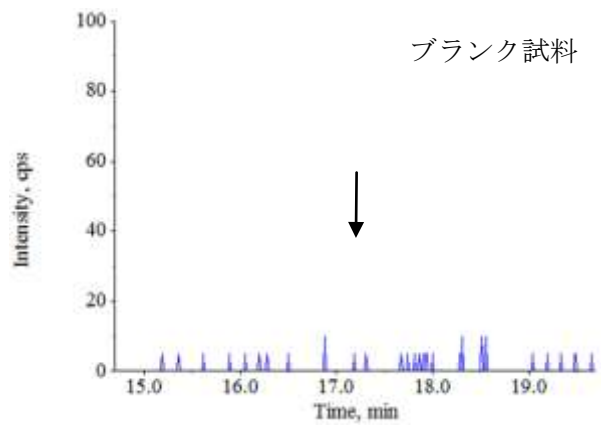
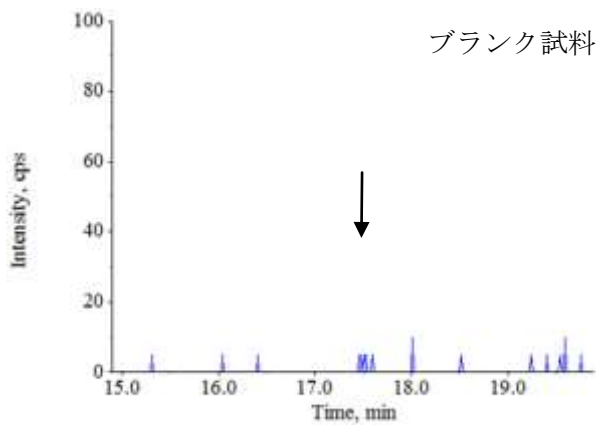


図 14 かぼちゃの SRM クロマトグラム  
( $m/z + 427.1 \rightarrow 411.2$ )  
添加濃度 : 0.05 ppm

図 15 ほうれんそうの SRM クロマトグラム  
( $m/z + 427.1 \rightarrow 411.2$ )  
添加濃度 : 0.01 ppm

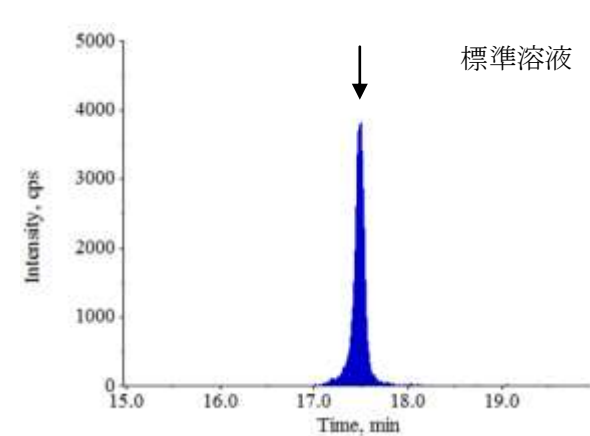
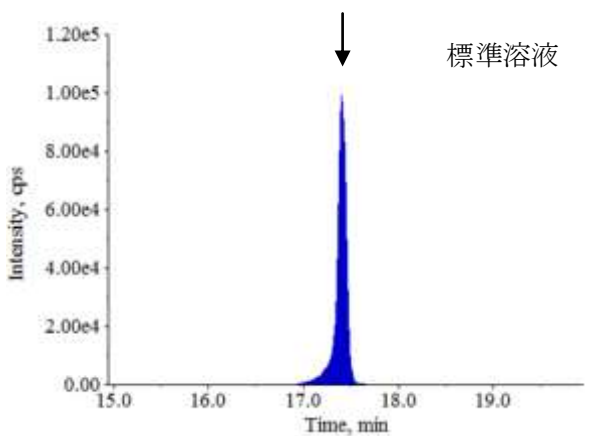
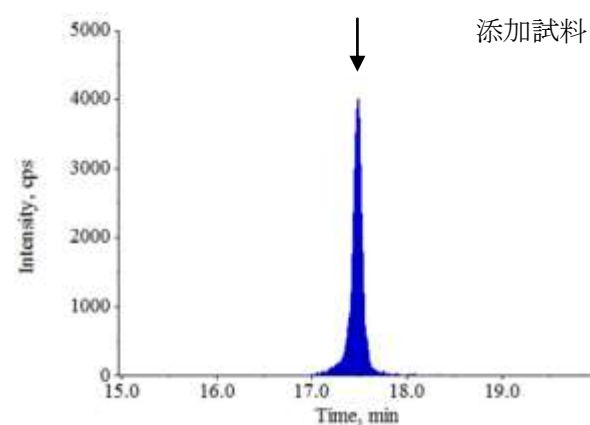
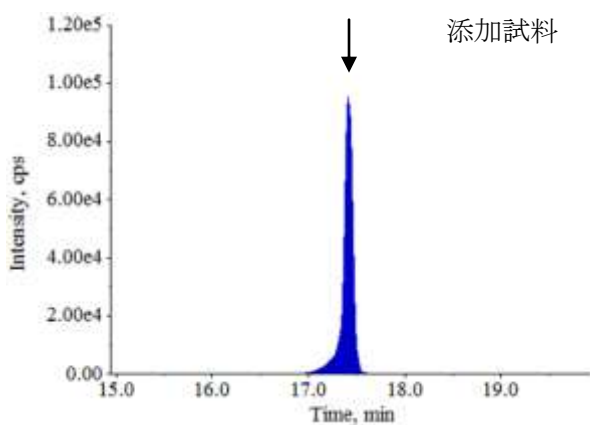
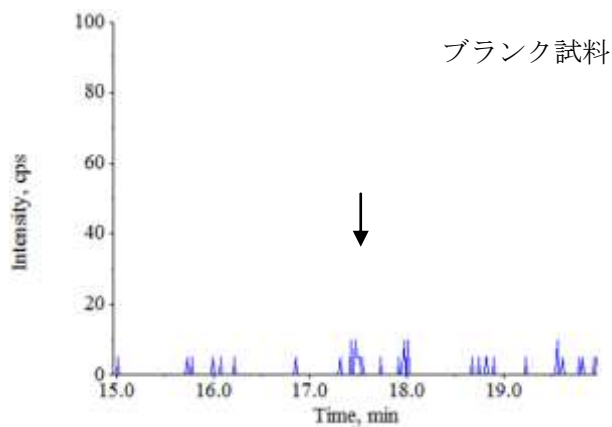
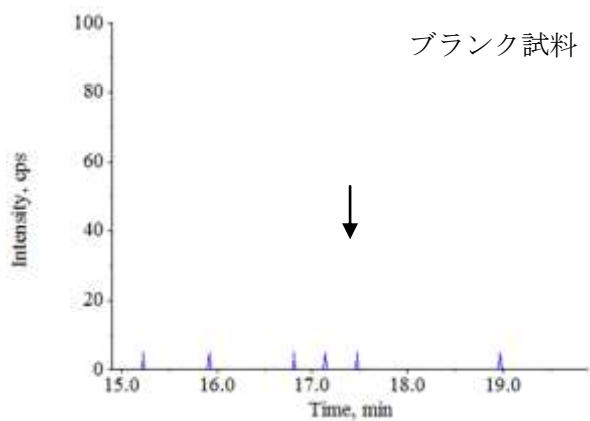


図 16 ナスの SRM クロマトグラム  
( $m/z + 427.1 \rightarrow 411.2$ )  
添加濃度 : 0.2 ppm

図 17 ばれいしょの SRM クロマトグラム  
( $m/z + 427.1 \rightarrow 411.2$ )  
添加濃度 : 0.01 ppm

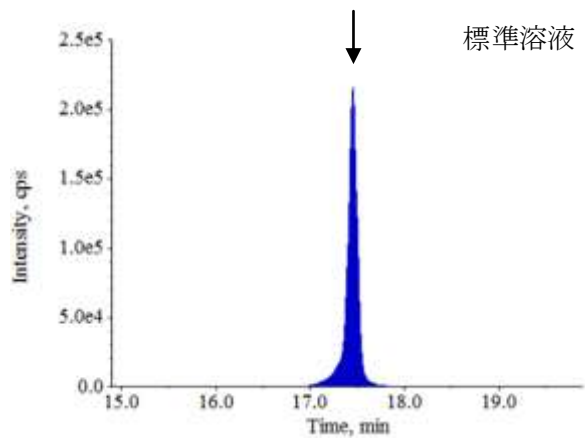
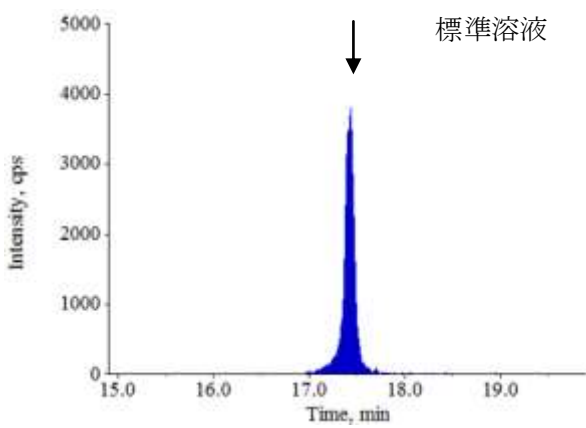
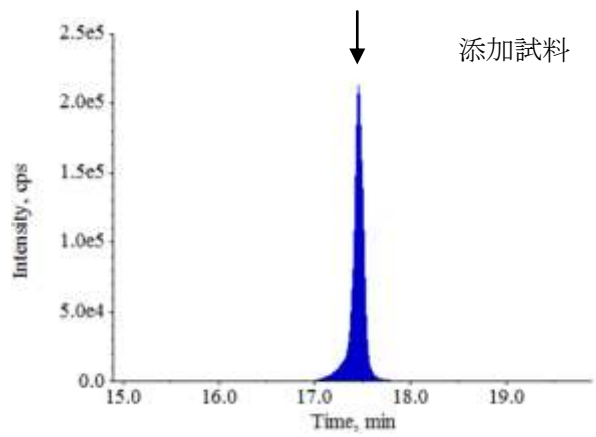
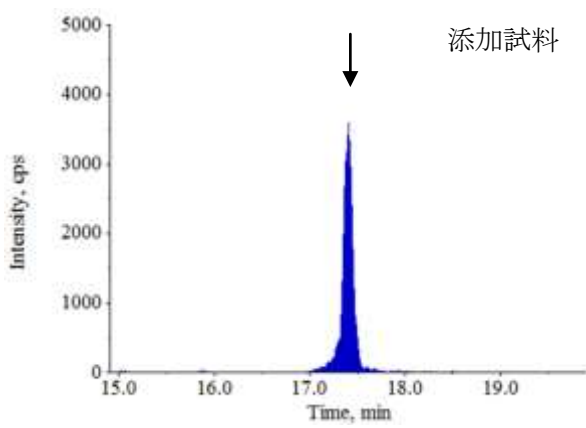
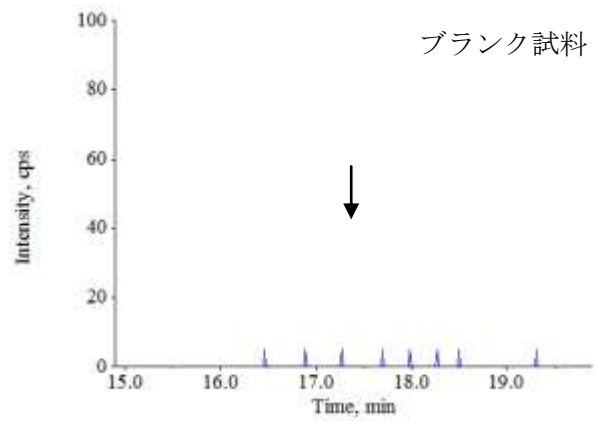
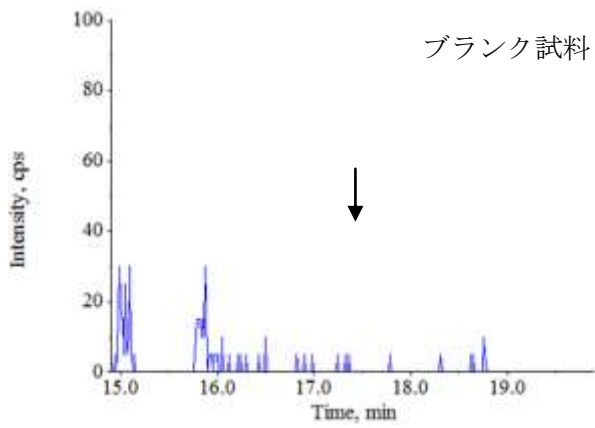


図 18 オレンジの SRM クロマトグラム  
( $m/z + 427.1 \rightarrow 411.2$ )  
添加濃度 : 0.01 ppm

図 19 いちごの SRM クロマトグラム  
( $m/z + 427.1 \rightarrow 411.2$ )  
添加濃度 : 0.5 ppm

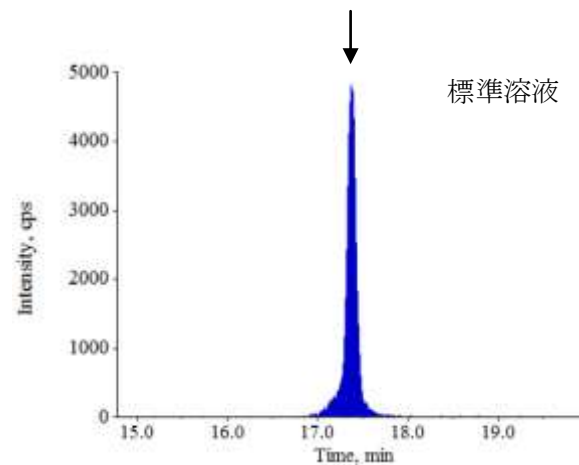
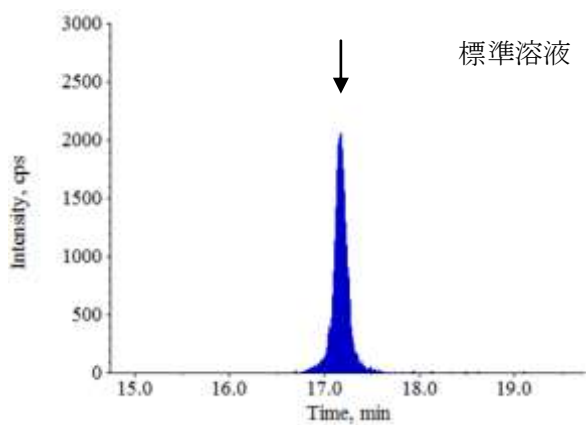
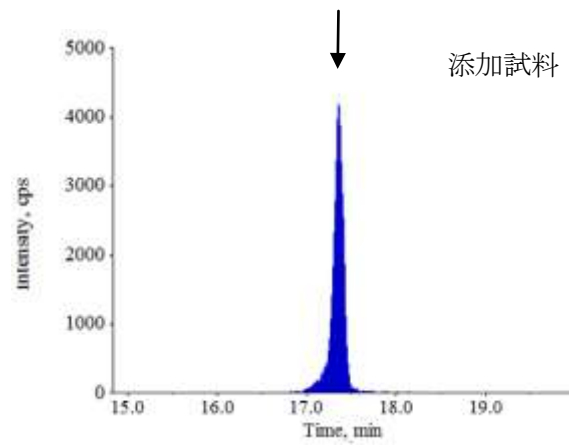
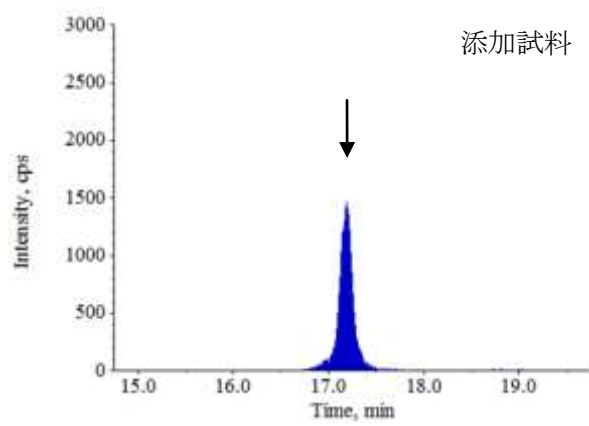
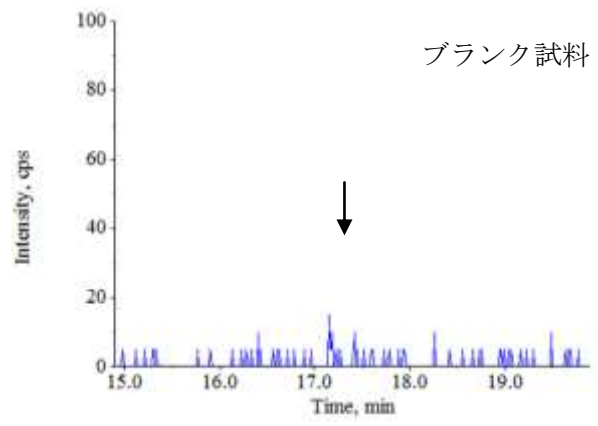
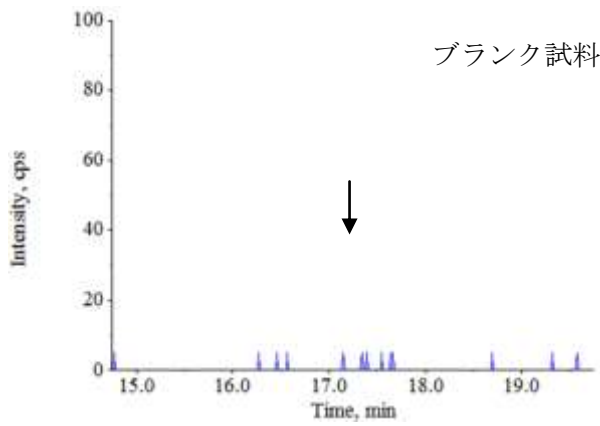


図 20 茶の SRM クロマトグラム  
( $m/z + 427.1 \rightarrow 411.2$ )  
添加濃度 : 0.01 ppm

図 21 茶の SRM クロマトグラム  
( $m/z + 427.1 \rightarrow 411.2$ )  
添加濃度 : 0.01 ppm

②定量限界の推定における代表的なクロマトグラム（定量限界相当濃度）

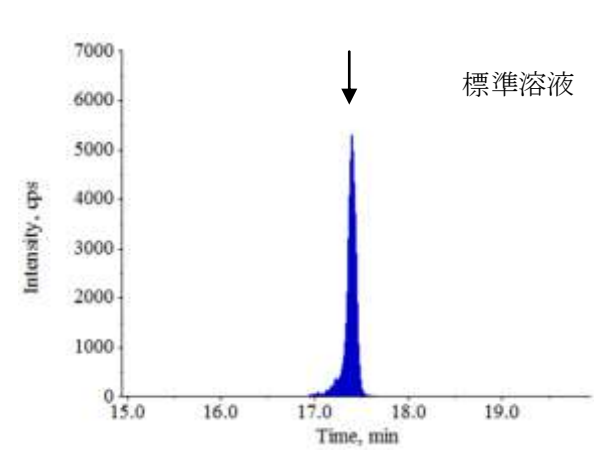
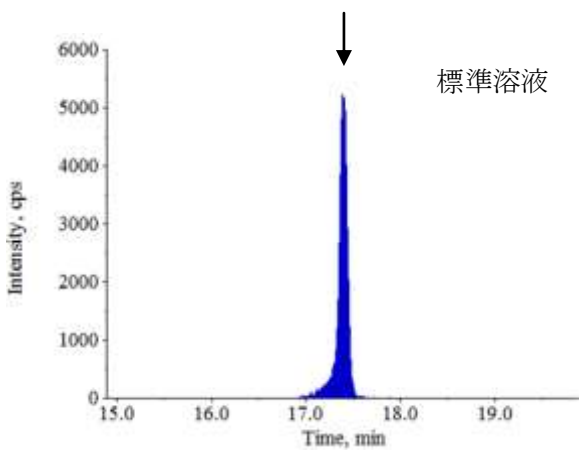
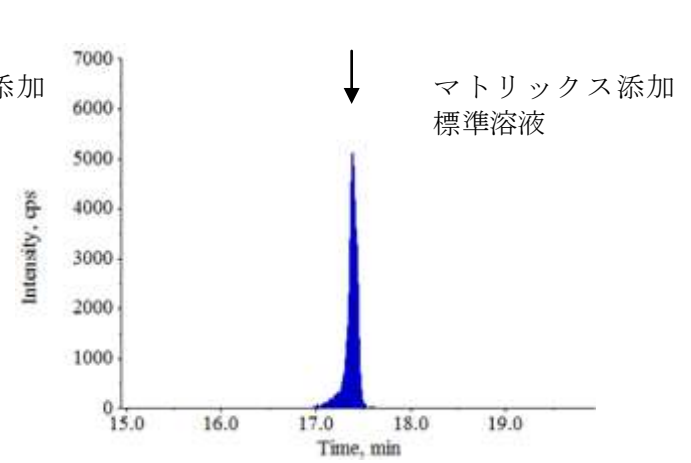
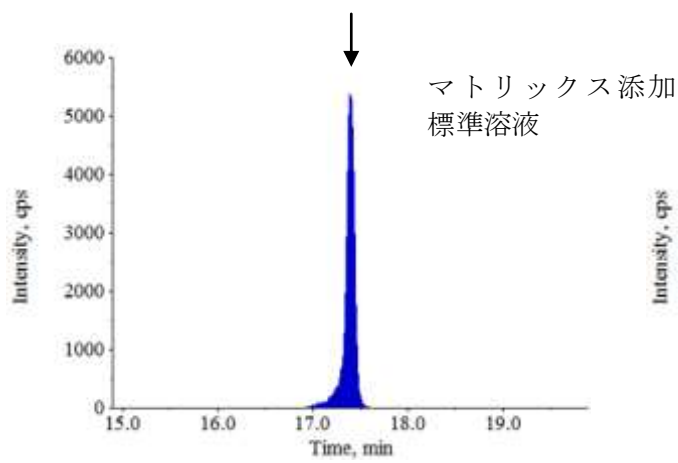
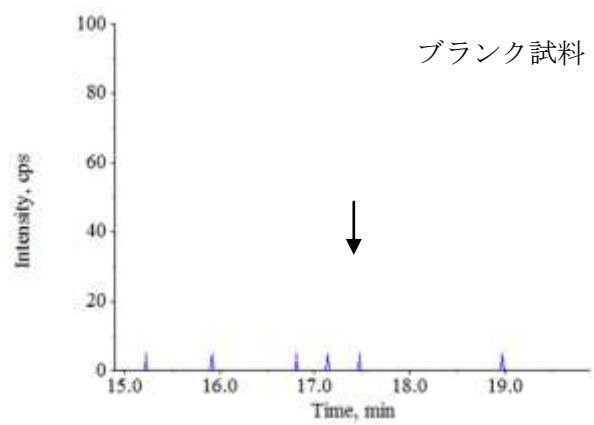
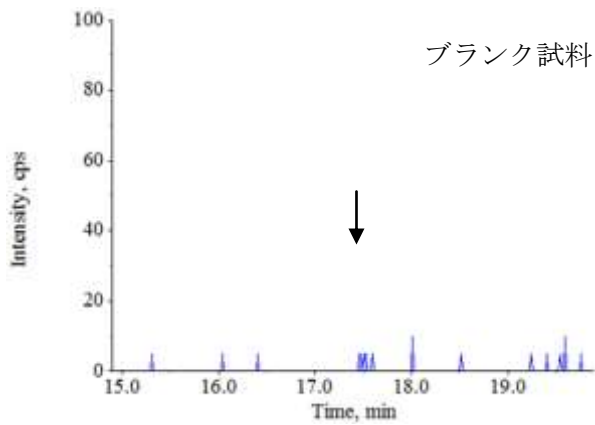


図 22 かぼちゃの SRM クロマトグラム  
( $m/z$  +427.1→411.2)  
試料中0.01 ppm相当

図 23 なすの SRM クロマトグラム  
( $m/z$  +427.1→411.2)  
試料中0.01 ppm相当

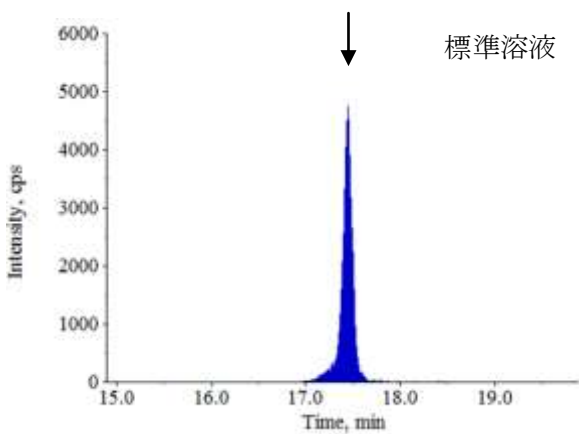
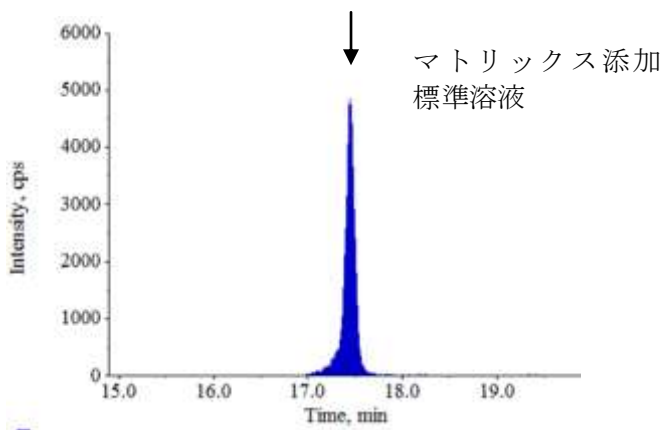
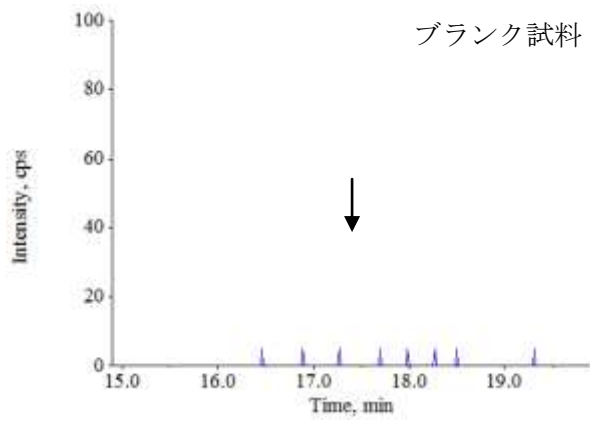


図 24 いちごの SRM クロマトグラム  
 ( $m/z + 427.1 \rightarrow 411.2$ )  
 試料中 0.01 ppm 相当

③空白試料の代表的なトータルイオンクロマトグラム

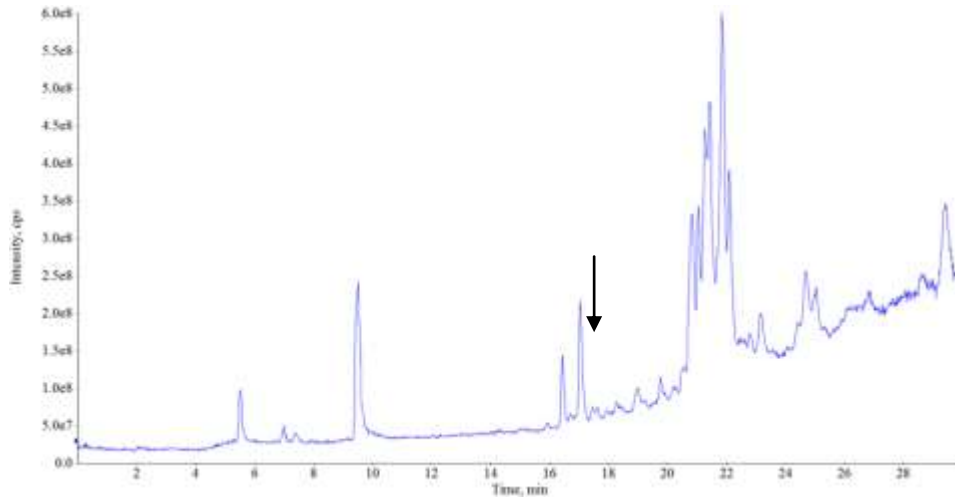


図 25 玄米の空白試料のトータルイオンクロマトグラム  
(スキャン範囲：50～1000 amu)

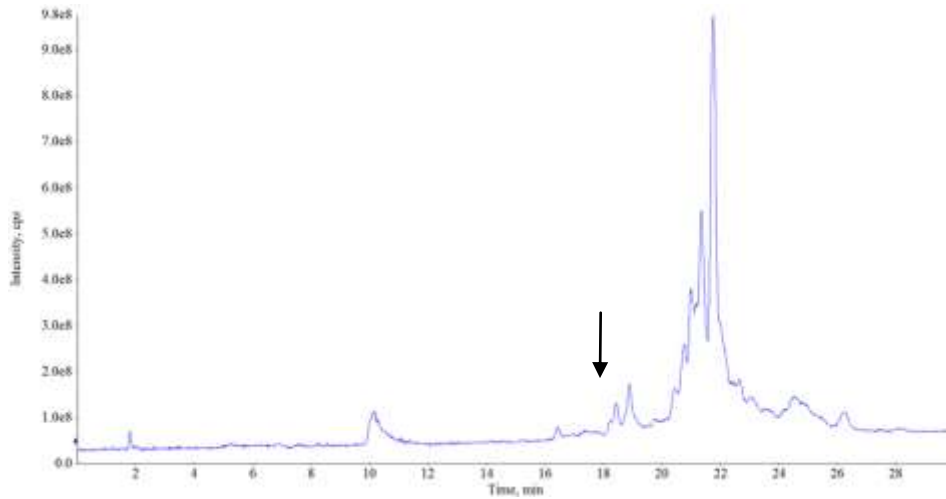


図 26 大豆の空白試料のトータルイオンクロマトグラム  
(スキャン範囲：50～1000 amu)

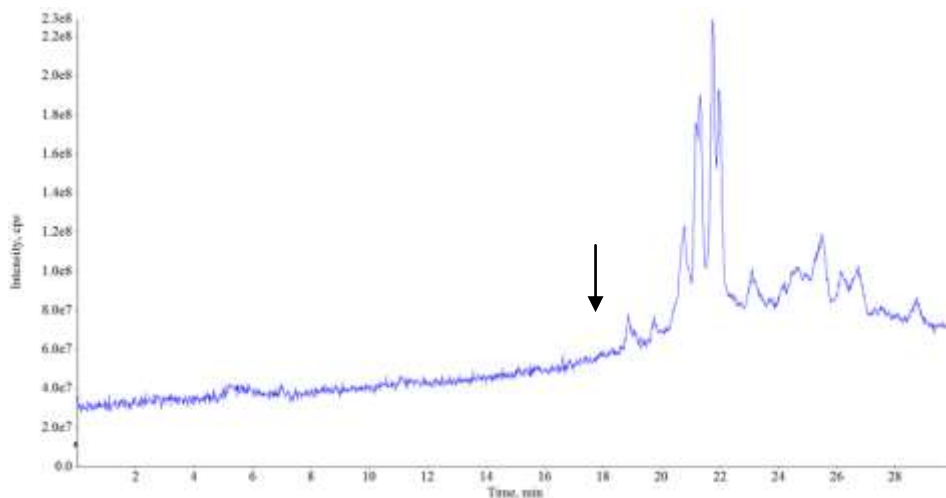


図 27 かぼちゃの空白試料のトータルイオンクロマトグラム  
(スキャン範囲：50～1000 amu)



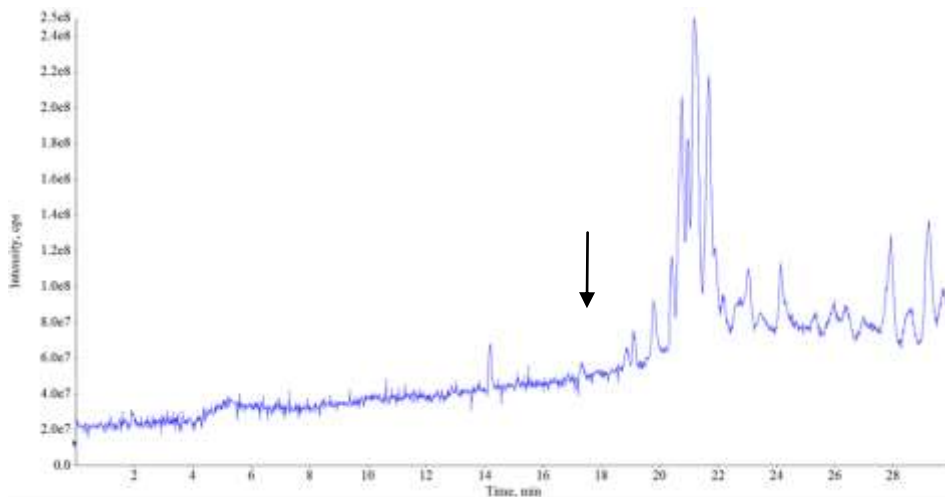


図 28 ほうれんそうの空白試料のトータルイオンクロマトグラム  
(スキャン範囲：50～1000 amu)

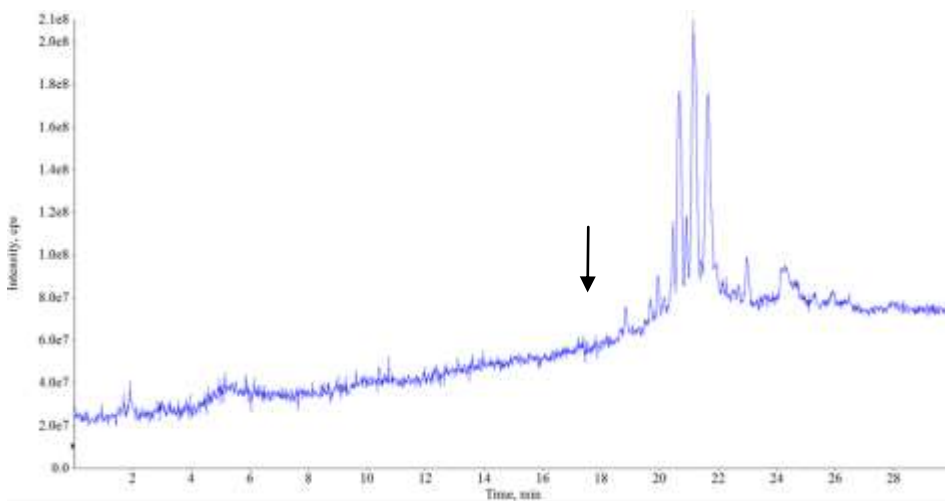


図 29 なすの空白試料のトータルイオンクロマトグラム  
(スキャン範囲：50～1000 amu)

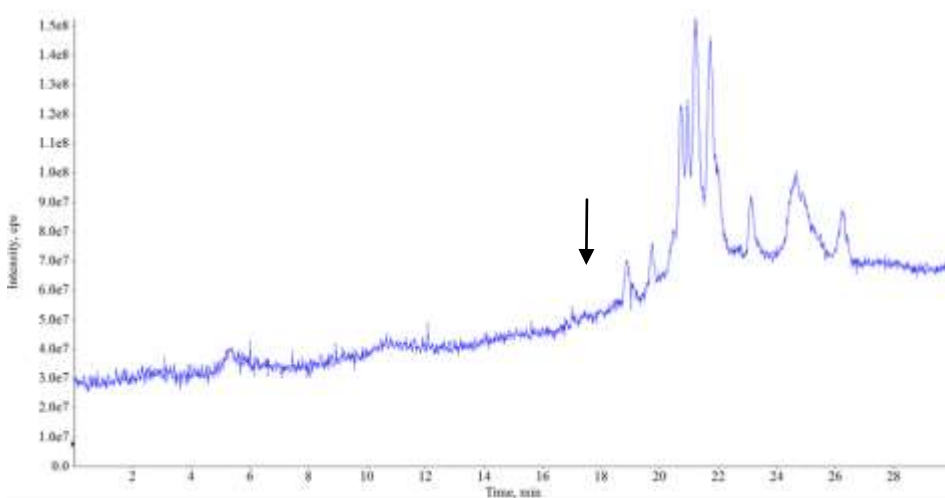


図 30 ばれいしょの空白試料のトータルイオンクロマトグラム  
(スキャン範囲：50～1000 amu)

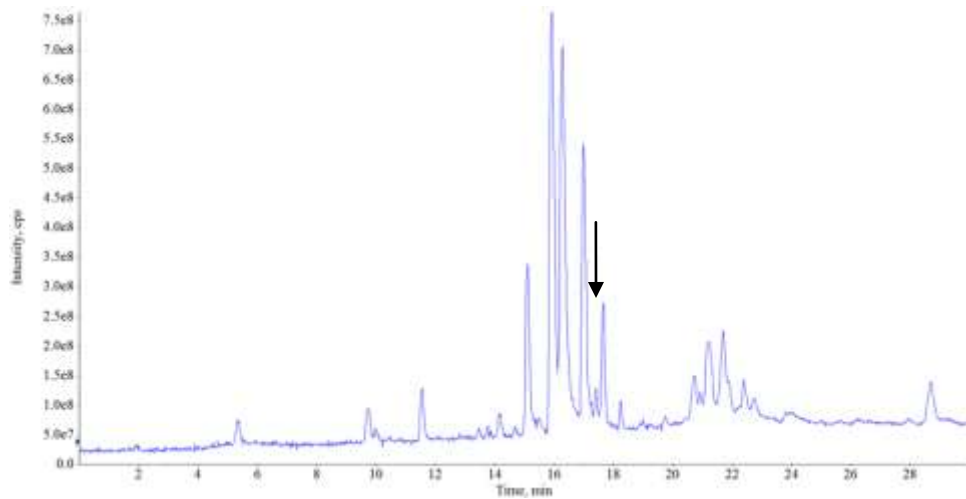


図 31 オレンジのブランク試料のトータルイオンクロマトグラム  
(スキャン範囲：50～1000 amu)

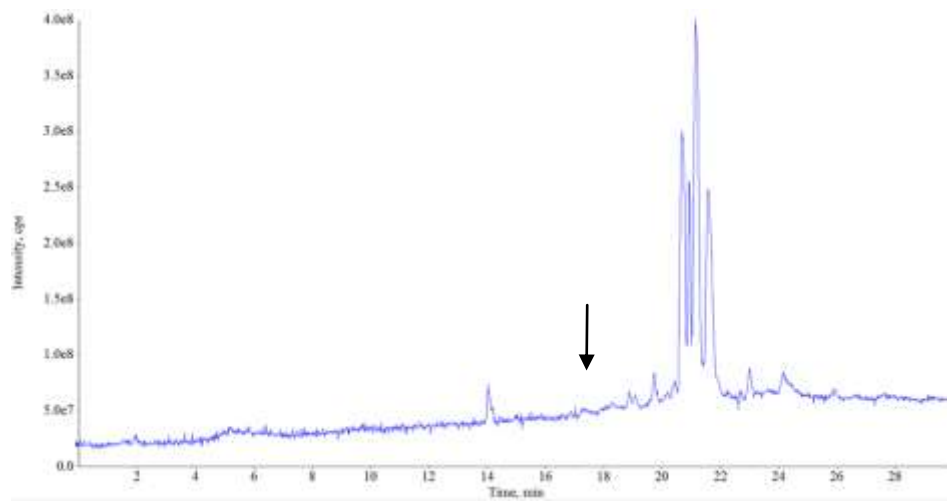


図 32 いちごのブランク試料のトータルイオンクロマトグラム  
(スキャン範囲：50～1000 amu)

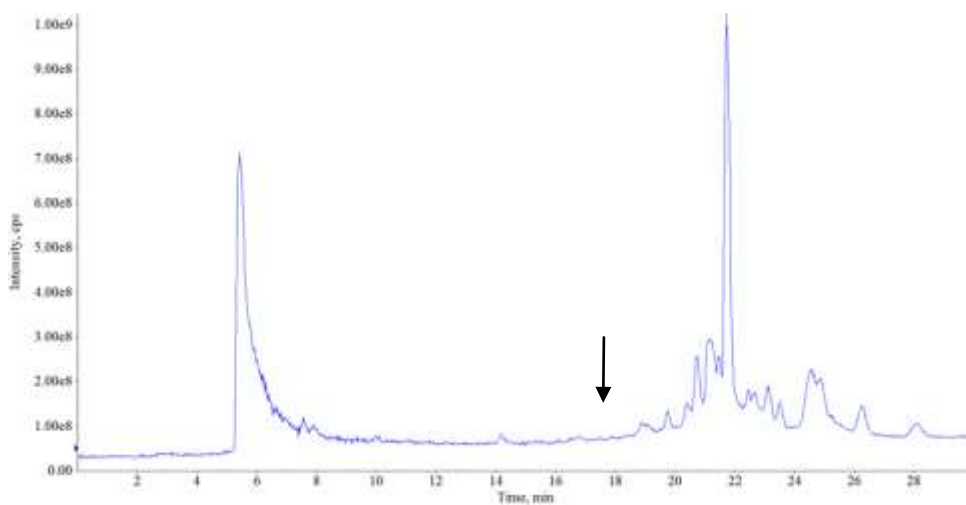


図 33 茶のブランク試料のトータルイオンクロマトグラム  
(スキャン範囲：50～1000 amu)

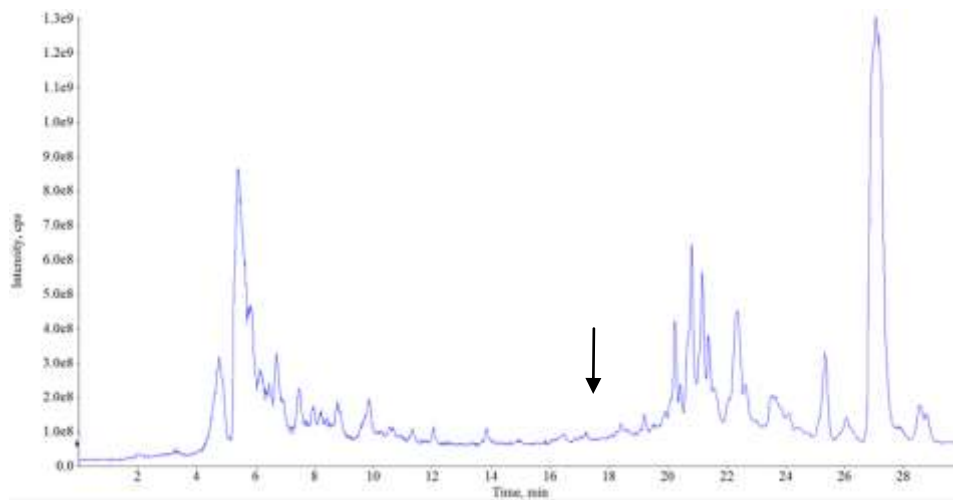


図 34 茶の空白試料のトータルイオンクロマトグラム  
(スキャン範囲：50～1000 amu)