

フルフェナセット試験法（農産物）

1. 分析対象化合物

フルフェナセット

〔（4-フルオロフェニル）（1-メチルエチル）アミノ〕オキソ酢酸（以下「代謝物W」という。）

〔*N*-（4-フルオロフェニル）-*N*-（1-メチルエチル）アセトアミド〕-2-スルフィニル酢酸（以下「代謝物P 1」という。）

2. 適用食品

穀類、豆類、種実類及び野菜

3. 装置

液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計（LC-MS/MS）

4. 試薬、試液

次に示すもの以外は、総則の3に示すものを用いる。

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（500mg/500mg） 内径12~13mmのポリエチレン製のカラム管に、上層にグラファイトカーボンを、下層にエチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルを各500mg充填したもの又はこれと同等の分離特性を有するものを用いる。

フルフェナセット標準品 本品はフルフェナセット 98%以上を含む。

代謝物W標準品 本品は代謝物W 98%以上を含む。

代謝物P 1標準品 本品は代謝物P 1 98%以上を含む。

5. 試験溶液の調製

1) 抽出

① 穀類、豆類及び種実類の場合

試料10.0gに水20mLを加え、30分放置する。これにメタノール100mLを加え、ホモジナイズした後、吸引ろ過する。ろ紙上の残留物にメタノール50mLを加えてホモジナイズした後、吸引ろ過する。得られたろ液を合わせ、メタノールを加えて正確に200mLとする。この溶液から正確に20mLを分取し、40℃以下で約1mLまで濃縮する。残留物に0.1vol%ギ酸4mLを加える。

② 果実及び野菜の場合

試料20.0gにメタノール100mLを加えてホモジナイズした後、吸引ろ過する。ろ紙上の

残留物にメタノール50mLを加えてホモジナイズした後、吸引ろ過する。得られたろ液を合わせ、メタノールを加えて正確に200mLとする。この溶液から正確に20mLを分取し、40℃以下で約1mLまで濃縮する。残留物に0.1vol%ギ酸4mLを加える

2) 精製

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム (1,000mg) にメタノール 5 mL 及び 0.1 vol% ギ酸 5 mL を順次注入し、各流出液は捨てる。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 (500mg/500mg) にメタノール 5 mL を注入し、流出液は捨てる。オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムに 1) で得られた溶液を注入した後、0.1 vol% ギ酸及びメタノール (4 : 1) 混液 5 mL を注入し、流出液は捨てる。オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムの下に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を接続し、メタノール 5 mL を注入し、溶出液を採る。次いで、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムを取り外し、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アンモニア水及びメタノール (1 : 99) 混液 7 mL を注入し、溶出液を先の溶出液と合わせ、40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物をメタノールに溶かし、穀類、豆類及び種実類の場合は正確に 2 mL、野菜の場合は正確に 4 mL としたものを試験溶液とする。

6. 検量線の作成

フルフェナセット標準品、代謝物W標準品及び代謝物P1標準品の標準原液を調製する。各標準原液を適宜混合してメタノールで希釈した溶液を数点調製し、それぞれLC-MS/MSに注入し、ピーク高法又はピーク面積法で検量線を作成する。なお、本法に従って試験溶液を調製した場合、試料中0.01mg/kgに相当する試験溶液中濃度は0.005mg/Lである。

7. 定量

試験溶液をLC-MS/MSに注入し、6. の検量線でフルフェナセット、代謝物W及び代謝物P1の各含量を求める。代謝物W及び代謝物P1を含むフルフェナセットの含量を求める場合には、次式により求める。

フルフェナセット (代謝物W及び代謝物P1を含む。) の含量 (ppm)

$$= A + B \times 1.613 + C \times 1.206$$

A : フルフェナセットの含量 (ppm)

B : 代謝物Wの含量 (ppm)

C : 代謝物P1の含量 (ppm)

8. 確認試験

LC-MS/MSにより確認する。

9. 測定条件

(例)

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲル 内径2.1mm、長さ150mm、粒子径3.5 μ m

カラム温度：40℃

移動相：5 mmol/L酢酸アンモニウム溶液及び5 mmol/L酢酸アンモニウム・メタノール溶液の混液（9：1）から（1：9）までの濃度勾配を14分間で行い、（1：9）で2分間保持する。

イオン化モード：ESI（+）

主なイオン (m/z)

フルフェナセット：プリカーサーイオン364、プロダクトイオン194、152

代謝物W：プリカーサーイオン226、プロダクトイオン138、110

代謝物P1：プリカーサーイオン302、プロダクトイオン284、1

注入量：2 μ L

保持時間の目安

フルフェナセット：14分

代謝物W：8分

代謝物P1：8分

10. 定量限界

各化合物0.01mg/kg（代謝物W及び代謝物P1はフルフェナセット換算）

11. 留意事項

1) 試験法の概要

フルフェナセット、代謝物W及び代謝物P1を試料からメタノールで抽出し、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム及び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、LC-MS/MSで定量及び確認する方法である。なお、フルフェナセット、代謝物W及び代謝物P1のそれぞれについて定量を行い、代謝物W及び代謝物P1を含むフルフェナセットの含量を求める場合には、代謝物W及び代謝物P1の含量にそれぞれ換算係数を乗じてフルフェナセットの含量に変換し、これらの和を分析値とする。

2) 注意点

- ① 抽出操作において、吸引ろ過が困難な場合は、遠心分離を行う。試験法開発時、大豆は吸引ろ過時に目詰りしたため、3,000rpmで5分間遠心分離を行った。

- ② 抽出液を濃縮する際に不溶物が析出して濃縮容器に付着した場合は、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム及び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を連結してメタノールを注入する際に、メタノール5 mLの内1 mLずつを用いて2回濃縮容器を洗い込むとよい。
- ③ 精製操作後の濃縮操作の際、水分が残るため、アンモニア臭がなくなる程度(約1 mL以下)まで濃縮した後、メスフラスコを用いて規定の量とする。
- ④ 各化合物の測定で、試験法開発時に使用したイオンを以下に示す。

フルフェナセット

定量イオン (m/z) : プリカーサーイオン364、プロダクトイオン194

定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン364、プロダクトイオン152

代謝物W

定量イオン (m/z) : プリカーサーイオン226、プロダクトイオン138

定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン226、プロダクトイオン110

代謝物P 1

定量イオン (m/z) : プリカーサーイオン302、プロダクトイオン284

定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン302、プロダクトイオン111

- ⑤ 試験法開発時に検討した食品：小麦、大豆、ばれいしょ及びトマト

12. 参考文献

なし

13. 類型

C