

※ 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 22 年度

## 残留農薬等試験法の開発

フルメツラム試験法（畜水産物）

## フルメツラム試験法（畜水産物）の検討結果

### [緒言]

#### 1. 目的及び試験法の検討方針

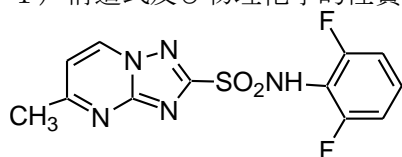
「薬事食品衛生審議会 食品衛生分科会報告書」に記載されている規制対象物質及び残留基準値案を踏まえ、試験法の開発を行った。

#### 1) 規制対象物質

フルメツラム

#### 2. 分析対象化合物の構造式、物理化学的性質、基準値等に関する情報

##### 1) 構造式及び物理化学的性質



化学式：C<sub>12</sub>H<sub>9</sub>F<sub>2</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>S

分子量：325.3

化学名（IUPAC）：2',6'-difluoro-5-methyl[1,2,4]triazolo[1,5-a]pyrimidine-2-sulfonamide

外 観：白色結晶

融 点：251～253℃

蒸気圧：3.7×10<sup>-7</sup> mPa (25℃)

溶解性：水 49 mg/L (pH 2.5) pHが高くなるに従って溶解度は増加

アセトン及びメタノールにごくわずかに溶解、ヘキサン及びキシレンに不溶

オクタノール/水分配係数：log Pow (25℃) = -0.68

酸解離定数(pKa)：4.6

安定性：水中光分解半減期6～12ヶ月、土壤中光分解半減期3ヶ月

(出典：The e-Pesticide Manual 15th ed.,ver.5.0)

#### 2) 基準値

牛の筋肉、脂肪、鶏の筋肉、卵、乳 0.1 ppm

牛の肝臓 0.2 ppm

### [実験方法]

#### 1. 試料

うなぎは愛知県の業者にて、その他の試料については都内のスーパーにて購入した。

#### 2. 試薬・試液

アセトン、酢酸エチル、*n*-ヘキサン、メタノール（以上、残留農薬試験用）

メタノール（高速液体クロマトグラフィー用）

塩酸、ギ酸（試薬特級）

ケイソウ土（セライト545）

多孔性ケイソウ土カラム（5 mL保持用）（InertSep K-solute 5 mL、ジーエルサイエンス製）

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、充てん量500 mg/500 mg、ジーエルサイエンス製）

フルメツラム標準品（純度98.5%、Dr.Ehrestorfer製）

### 3. 装置

	型式	会社
MS 装置	API-3200Q トラップ	AB SCIEX
LC 装置	Agilent1200	Agilent Technologies

### 4. 測定条件

LC 条件																		
カラム	Mightysil RP-18 GP サイズ：内径 2.0 mm、長さ 150 mm、粒子径 5 μm 会社：関東化学製																	
移動相流速 (mL/min)	0.2																	
注入量 (μL)	4																	
カラム温度 (°C)	40																	
移動相	A液：0.1%ギ酸 B液：メタノール																	
グラジエント条件	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間(分)</th> <th>A液 (%)</th> <th>B液 (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.0</td> <td>80</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>13.0</td> <td>40</td> <td>60</td> </tr> <tr> <td>15.0</td> <td>40</td> <td>60</td> </tr> <tr> <td>15.1</td> <td>80</td> <td>20</td> </tr> </tbody> </table>			時間(分)	A液 (%)	B液 (%)	0.0	80	20	13.0	40	60	15.0	40	60	15.1	80	20
時間(分)	A液 (%)	B液 (%)																
0.0	80	20																
13.0	40	60																
15.0	40	60																
15.1	80	20																
MS 条件																		
測定モード	MS/MS、SRM（選択反応モニタリング）																	
イオン化モード	ESI（+）																	
キャピラリ電圧 (V)	4500																	
ソース温度 (°C)	500																	
コーンガス	窒素																	
脱溶媒ガス	窒素 70 psi																	
コリジョンガス	窒素																	
定量イオン (m/z)	+326→129 [コーン電圧：51 (V)、コリジョンエネルギー：33 (eV)]																	
定性イオン (m/z)	+326→109 [コーン電圧：51 (V)、コリジョンエネルギー：71 (eV)]																	
保持時間の目安	9分																	

### 5. 定量

フルメツラム標準溶液を0.1%ギ酸及びメタノール（1：1）混液で希釈し、0.00025、0.0005、0.001、0.0025、0.005、0.01 mg/Lの濃度の標準溶液を調製した。標準溶液4 μLをLC-MS/MSに注入し、得られたピーク面積から絶対検量線法で検量線を作成した。試験溶液4 μLをLC-MS/MSに注入し、得られたピーク面積と作成した検量線からフルメツラムの含量を算出した。

#### 1) 検量線の直線性（図3）

4. の測定条件において、濃度0.00025 mg/L（0.001 ng）～0.01 mg/L（0.04 ng）の範囲で良好な直線性を示した。

#### 2) 標準溶液の検出感度（図4）

定量限界相当の検出量：0.002 ng（0.0005 mg/L×4 μL）のピークのS/N比は10以上であった。

## 6. 試験溶液の調製

### 1) 試験法の分析操作

フルメツラムを試料からアセトン及び0.1 mol/L塩酸 (9 : 1) 混液で抽出し、多孔性ケイソウ土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た後、LC-MS/MSで定量及び確認した。

#### ① 抽出

##### a 筋肉、肝臓、腎臓、乳、卵、魚介類及びはちみつの場合

試料10.0 gを200 mL遠心管に量り採り、アセトン及び0.1 mol/L塩酸 (9 : 1) 混液100 mLを加え、ホモジナイズした後、ケイソウ土を厚さ約1 cmに敷いたろ紙を用いて吸引ろ過し、200 mL容メスフラスコに採取した。ろ紙上の残留物にアセトン及び0.1 mol/L塩酸 (9 : 1) 混液50 mLを加えてホモジナイズした後、上記と同様にろ過した。得られたろ液を合わせて、アセトンで正確に200 mLとした。抽出液2 mLを50 mL遠心管に採り、40°C以下で濃縮し、アセトンを除去した。

##### b 脂肪の場合

試料5.00 gを200 mL遠心管に量り採り、アセトン及び0.1 mol/L塩酸 (9 : 1) 混液100 mLを加え、ホモジナイズした後、ケイソウ土を厚さ約1 cmに敷いたろ紙を用いて吸引ろ過し、200 mL容メスフラスコに採取した。ろ紙上の残留物にアセトン及び0.1 mol/L塩酸 (9 : 1) 混液50 mLを加えてホモジナイズした後、上記と同様にろ過した。得られたろ液を合わせて、アセトンで正確に200 mLとした。抽出液4 mLを50 mL遠心管に採り、40°C以下で濃縮し、アセトンを除去した。

#### ② 精製

##### a 多孔性ケイソウ土カラムクロマトグラフィー

①で得られた残留物に0.1 mol/L塩酸3 mLを加え超音波処理後、多孔性ケイソウ土カラム (5 mL保持用) に流し入れ、5分間放置した。*n*-ヘキサン20 mLで容器を洗い込み注入し、流出液は捨て、さらに*n*-ヘキサン 20 mLを注入し流出液は捨てた。次いで酢酸エチル10 mLで容器を洗い込み注入し、さらに酢酸エチル30 mLを注入し、溶出液を200 mLなす形フラスコに採り、40°C以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物をアセトン5 mLを加えて溶かした。

##### b 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カラム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 (500 mg/500 mg) にメタノール及びアセトン各5 mLを順次注入し、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、さらにアセトン5 mLで容器を洗い込み注入し、流出液は捨てた。次いでギ酸及びメタノール (1 : 49) 混液10 mLで容器を洗い込み注入し、さらにギ酸及びメタノール (1 : 49) 混液10 mLを注入し、溶出液を50 mL遠心管に採り、溶出液を40°C以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物を0.1%ギ酸及びメタノール (1 : 1) 混液に溶解し、正確に2 mLとしたものを試験溶液とした。

## 秤 取

| 脂肪以外：試料10.0 g

↓ 脂肪：試料5.00 g

### アセトン及び0.1 mol/L塩酸（9：1）混液抽出

| アセトン及び0.1 mol/L塩酸（9：1）混液100 mLを加え、ホモジナイズ

| 吸引ろ過、ろ紙上の残留物を採る

| 残留物にアセトン及び0.1 mol/L塩酸（9：1）混液50 mLを加え、ホモジナイズ

| 吸引ろ過、ろ液を合わせ、アセトンで正確に200 mLとする

| 脂肪以外：抽出液2 mL分取、減圧濃縮、アセトンを除去

↓ 脂肪：抽出液4 mL分取、減圧濃縮、アセトンを除去

### 多孔性ケイソウ土カラム

| 0.1 mol/L塩酸3 mLを加え全量負荷、5分間放置

| *n*-ヘキサン40 mLで洗浄

| 酢酸エチル40 mLで溶出

↓ 溶出液を減圧濃縮、窒素乾固

### 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

| メタノール及びアセトン各5 mLで予備洗浄

| アセトン10 mLで負荷、洗浄

| ギ酸及びメタノール（1：49）混液20 mLで溶出

| 溶出液を減圧濃縮、窒素乾固

↓ 0.1%ギ酸及びメタノール（1：1）混液で正確に2 mLとし、試験溶液とする

### LC-MS/MS定量

4 μL注入

## 2) 定量限界

0.01 mg/kg [ (2 mL/0.1 g<sup>\*1</sup>) × (0.002 ng/4 μL) ]

\*<sup>1</sup> 5.00 g × 4 mL/200 mL (脂肪の場合)

10.0 g × 2 mL/200 mL (脂肪以外の場合)

## 7. マトリックス添加標準溶液の調製

### 1) 定量限界相当濃度（定量限界の推定用）

牛の筋肉、牛の脂肪、牛肝臓、牛乳、鶏卵及び鶏の筋肉はブランク試験溶液から0.5 mL分取し溶媒を除去した後、0.0005 mg/Lの標準溶液0.5 mLに溶解したものを、マトリックス添加標準溶液とした。

### 2) 添加回収試験における回収率 100%相当濃度（試料マトリックスの測定への影響用）

牛の筋肉、牛の脂肪、牛乳、鶏卵及び鶏の筋肉はブランク試験溶液から0.5 mL分取し溶媒を除去した後、0.005 mg/Lの標準溶液0.5 mLに溶解したものを、牛肝臓はブランク試験溶液から0.5 mL分取し溶媒を除去した後、0.005 mg/Lの標準溶液1 mLに溶解したものを、さけ、うなぎ、しじみ及びはちみつはブランク試験溶液から0.5 mL分取し溶媒を除去した後、0.0005 mg/Lの標準溶液0.5 mLに溶解したものを、マトリックス添加標準溶液とした。

## [結果及び考察]

### 1. 測定条件の検討

MS条件について検討した。フルメツラムはポジティブモード、ネガティブモードのいずれでも測定が可能であったが、より感度の良いポジティブモードを選択した。モニターイオンは4. の主なイ

オン ( $m/z$ ) に示した。ポジティブモードのマススペクトルを図1に、プロダクトイオンスペクトルを図2に示した。なお、ネガティブモードでは、プリカーサーイオン324、プロダクトイオン133、66で測定可能であった。ネガティブモードのマススペクトルを図3に、プロダクトイオンスペクトルを図4に示した。フルメツラムの標準溶液 (0.0005 mg/L) におけるS/N比をTable1に示した。

Table1 フルメツラムのS/N比 (0.0005 mg/L)

プリカーサーイオン	プロダクトイオン	イオン化モード	S/N 比	Area (counts)
326	129	ESI (+)	86	2814
326	109	ESI (+)	15	343
324	133	ESI (-)	69	1161
324	66	ESI (-)	21	360

## 2. 試験溶液調製法の検討

### 1) 抽出方法の検討

米国EPAの情報を参考に、アセトン及び0.1 mol/L塩酸 (9 : 1) 混液を用いて抽出した。

### 2) 精製方法の検討

#### ①多孔性ケイソウ土カラムによる精製

多孔性ケイソウ土カラムに0.1 mol/L塩酸3 mLで負荷し、5分間放置した。溶出状況をTable2に示した。 $n$ -ヘキサン40 mLでは溶出せず、酢酸エチル0-40 mLで良好な回収率が得られた。

Table2 多孔性ケイソウ土カラム (5 mL 保持用) からの溶出状況 (%)

	$n$ -ヘキサン		酢酸エチル		合計
	0-40 mL	0-30 mL	30-40 mL	40-50 mL	
フルメツラム	0	98	tr	0	98

Inert Sep K-solute 5 mL(5 mL保持用、ジーエルサイエンス製)

供試量 : 1  $\mu$ g

#### ②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

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メタノール及びアセトン各5 mLで予備洗浄した後、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セトン5 mLで負荷した。溶出状況をTable3に示した。アセトン10 mLでは溶出せず、ギ酸及びメタノール (1 : 49) 混液0-20 mLで良好な回収率が得られた。

Table3 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 (%)

	アセトン		ギ酸-メタノール (1 : 49)			合計
	5 mL (負荷) +5 mL	0-10 mL	10-20 mL	20-30 mL		
フルメツラム	0	93	4	0	97	

Inert Sep GC/PSA (充てん量 500 mg/500 mg、ジーエルサイエンス製)

供試量 : 1  $\mu$ g

③塩基性アルミナミニカラムによる精製

塩基性アルミナミニカラムをメタノール及びアセトン各5 mLで予備洗浄した後、塩基性アルミナミニカラムにアセトン5 mLで負荷した。溶出状況をTable4に示した。アセトン、アセトニトリル、メタノールでは溶出せず、水及びメタノール（1：4）混液0-10 mLで良好な回収率が得られた。

Table4 塩基性アルミナミニカラムからの溶出状況（%）

	アセトン	アセトニトリル	メタノール	水-メタノール (1:4)	合計
	5 mL (負荷) +5mL	0-10 mL	0-10 mL	0-10 mL	
フルメツラム	0	0	0	110	110

Sep-Pak AL-B(充てん量1,710 mg、Waters製)

供試量：1 µg

カラムによる精製の検討では、多孔性ケイソウ土カラム、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及び塩基性アルミナミニカラムで良好な回収率が得られた。

多孔性ケイソウ土カラムは脂質の除去に非常に有効であった。塩基性アルミナミニカラムは溶出液に水及びメタノール（1：4）混液を用いなければならず、濃縮操作に時間がかかること、多孔性ケイソウ土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のみの精製で試料共存下でも良好なクロマトグラムが得られたことから、精製には多孔性ケイソウ土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用いることとした。

3. 添加回収試験

牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、さけ、うなぎ、しじみ、牛乳、鶏卵及びはちみつの9品目に鶏の筋肉を加えた10品目を試料とした。

フルメツラムを牛の筋肉、牛の脂肪、牛乳、鶏卵及び鶏の筋肉は0.1 ppm相当、牛の肝臓は0.2 ppm相当、さけ、うなぎ、しじみ及びはちみつは0.01 ppm相当添加し、[実験方法] 6 の分析法に従って添加回収試験を行った。

1) 選択性の評価

表1 選択性の評価

担当機関: (財) 日本食品分析センター

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	基準値 <sup>*1</sup> (ppm)	添加濃度 <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>	備考	
						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)
フルメツラム		牛の筋肉	0.01	0.1	0.1	基準値	0.1	< 0.100	面積	0		#DIV/0!	○
		牛の脂肪	0.01	0.1	0.1	基準値	0.1	< 0.100	面積	0		#DIV/0!	○
		牛の肝臓	0.01	0.2	0.2	基準値	0.2	< 0.100	面積	0		#DIV/0!	○
		さけ	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○
		うなぎ	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○
		しじみ	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○
		牛乳	0.01	0.1	0.1	基準値	0.1	< 0.100	面積	0		#DIV/0!	○
		鶏卵	0.01	0.1	0.1	基準値	0.1	< 0.100	面積	0		#DIV/0!	○
		はちみつ	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○
		鶏の筋肉	0.01	0.1	0.1	基準値	0.1	< 0.100	面積	0		#DIV/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、別注、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。(必要に応じて乾燥注入を行う。)

\*4 試料中の濃度が「評価対象濃度(基準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。

10品目何れの試料においても妨害ピークは認められず、選択性は良好であった。

## 2) 真度、精度及び定量限界の評価

表2 真度、精度及び定量限界の評価

担当機関:(財)日本食品分析センター

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	基準値 <sup>1)</sup> (ppm)	添加濃度 (ppm)	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>			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			
	フルメツラム	牛の筋肉	0.01	0.1	0.1	*	132000	-101	1.008	92	90	97	94	91	92	3	/	/	#DIV/0!			
		牛の脂肪	0.01	0.1	0.1	*	1320000	-191	1.008	83	87	96	98	101	95	7	/	/	#DIV/0!			
		牛の肝臓	0.01	0.2	0.2	*	992000	113	0.999	100	98	93	93	94	95	3	/	/	#DIV/0!			
		さけ	0.01	0.01	0.01		992000	113	0.999	95	97	98	96	94	92	7	63	56	60			
		うなぎ	0.01	0.01	0.01		161000	-482	0.999	77	94	95	95	97	92	9	80	54	67			
		しじみ	0.01	0.01	0.01		1610000	-482	0.999	94	94	102	90	91	94	5	77	71	74			
		牛乳	0.01	0.1	0.1	*	1210000	-412	0.999	88	91	88	92	94	91	3	/	/	#DIV/0!			
		鶏卵	0.01	0.1	0.1	*	1310000	-412	0.999	83	80	93	92	94	90	5	/	/	#DIV/0!			
		はちみつ	0.01	0.01	0.01		1250000	-422	1.009	93	82	98	103	104	98	8	76	48	82			
		鶏の筋肉	0.01	0.1	0.1	*	1290000	-921	0.999	86	89	82	93	90	86	4	/	/	#DIV/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、F\*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えるピーク(Max)及び最小値をえるピーク(Min)のそれぞれのS/N比を求める。

真度は86~98%、併行精度は3~9%で良好な結果が得られた。また定量限界濃度の添加回収試験を行った、さけ、うなぎ、しじみ及びはちみつの添加回収試験におけるS/N比の平均値は62~74であった。

## 3) 定量限界の推定

表3 定量限界の推定

担当機関:(財)日本食品分析センター

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	基準値 <sup>1)</sup> (ppm)	添加濃度 (ppm)	定量限界の評価 <sup>2)</sup>	標準溶液濃度 <sup>3)</sup> (mg/L)	面積又は高さの別	ブランク <sup>4)</sup>	ピーク面積(高さ) <sup>5)</sup>			溶媒標準溶液			S/N比		平均値		備考
										マトリックス添加標準溶液	溶媒標準溶液	平均	n=1	n=2	平均	n=1	n=2	面積(高さ)比(%) <sup>6)</sup>	S/N比	
	フルメツラム	牛の筋肉	0.01	0.1	0.1	*	0.0005	面積	0	2665	2628	2747	2742	2706	2734	61	77	101	89	
		牛の脂肪	0.01	0.1	0.1	*	0.0005	面積	0	2637	2701	2689	2629	2727	2779	61	85	95	83	
		牛の肝臓	0.01	0.2	0.2	*	0.0005	面積	0	2687	2845	2686	2586	2702	2644	88	70	101	88	
		さけ	0.01	0.01	0.01			面積				0			0			#DIV/0!	#DIV/0!	
		うなぎ	0.01	0.01	0.01			面積				0			0			#DIV/0!	#DIV/0!	
		しじみ	0.01	0.01	0.01			面積				0			0			#DIV/0!	#DIV/0!	
		牛乳	0.01	0.1	0.1	*	0.0005	面積	0	2622	2526	2579	2574	2688	2631	85	58	88	82	
		鶏卵	0.01	0.1	0.1	*	0.0005	面積	0	2687	2598	2648	2551	2513	2532	87	89	105	88	
		はちみつ	0.01	0.01	0.01			面積				0			0			#DIV/0!	#DIV/0!	
		鶏の筋肉	0.01	0.1	0.1	*	0.0005	面積	0	2552	2455	2504	2355	2422	2389	86	80	105	83	

\*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 定量限界の推定を行う対象(添加濃度と定量限界濃度と異なる場合には、F\*が表示される。

\*3 試料中の濃度が定量限界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。

\*4 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。)

\*5 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。

\*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。

基準値濃度の添加回収試験を行った、牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳、鶏卵及び鶏の筋肉のブランク試料の試験溶液で調製した定量限界相当濃度のマトリックス添加標準溶液と溶媒で調製した標準溶液の面積比の平均値は96~105%であった。また、マトリックス添加標準溶液のS/N比の平均値は62~69であった。

## 4) 試料マトリックスの影響

表4 試料マトリックスの測定への影響

担当機関:(財)日本食品分析センター

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	基準値 <sup>1)</sup> (ppm)	添加濃度 (ppm)	標準溶液濃度 <sup>2)</sup> (mg/L)	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>	備考
									n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均		
	フルメツラム	牛の筋肉	0.01	0.1	0.1	0.005	面積	0	26220	26300	26266	27210	27500	27356	0.98	
		牛の脂肪	0.01	0.1	0.1	0.005	面積	0	26640	26850	26745	28670	28750	28210	0.95	
		牛の肝臓	0.01	0.2	0.2	0.005	面積	0	26810	27170	26990	28130	27000	27566	0.98	
		さけ	0.01	0.01	0.01	0.0005	面積	0	2443	2581	2517	2525	2554	2540	0.99	
		うなぎ	0.01	0.01	0.01	0.0005	面積	0	2248	2226	2238	2369	2267	2318	0.97	
		しじみ	0.01	0.01	0.01	0.0005	面積	0	2359	2480	2410	2593	2740	2687	0.90	
		牛乳	0.01	0.1	0.1	0.005	面積	0	27440	26890	27165	27990	29530	28760	0.94	
		鶏卵	0.01	0.1	0.1	0.005	面積	0	28360	28660	27510	28520	27860	28090	0.98	
		はちみつ	0.01	0.01	0.01	0.0005	面積	0	2496	2589	2548	2589	2853	2721	0.94	
		鶏の筋肉	0.01	0.1	0.1	0.005	面積	0	30850	29590	30270	31410	28760	30085	1.01	

\*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。

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マトリックス添加標準溶液と溶媒で調製した標準溶液の面積比の平均値は0.90~1.01であった。



#### 4. 試験法の妥当性評価

試験法の妥当性評価(真度及び精度)

担当機関:(財)日本食品分析センター

No.	分析対象化合物	食品名	基準値*1 (ppm)	添加濃度 (ppm)		測定値(ppm)					真度(%)		精度(RSD%)	
						1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	全平均の 回収率	併行精度	室内精度	
	フルメツラム	牛の筋肉	0.1	0.1	1回目	0.0936	0.0942	0.0916	0.0778	0.0957	89	3.4	7.1	
					2回目	0.0910	0.0913	0.0922	0.0799	0.0872				
		牛の脂肪	0.1	0.1	1回目	0.0978	0.0832	0.0876	0.0791	0.0887	87	2.1	9.4	
					2回目	0.1013	0.0851	0.0871	0.0754	0.0871				
		牛の肝臓	0.2	0.2	1回目	0.1861	0.1593	0.1658	0.1699	0.1935	89	3.4	8.0	
					2回目	0.1882	0.1655	0.1767	0.1767	0.2014				
		しじみ	0.01	0.01	1回目	0.0089	0.0084	0.0103	0.0083	0.0093	95	5.2	9.2	
					2回目	0.0091	0.0084	0.0114	0.0094	0.0092				
		はちみつ	0.01	0.01	1回目	0.0092	0.0103	0.0096	0.0097	0.0105	99	2.2	4.5	
					2回目	0.0096	0.0104	0.0096	0.0101	0.0101				

\*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。

牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、しじみ及びはちみつを用いて試験法の妥当性評価を行った。真度は87~99%、併行精度は2.1~5.2%、室内精度は4.5~9.4%であり、試験法の妥当性評価ガイドラインの基準内であった。

#### [結論]

フルメツラムを試料からアセトン及び0.1 mol/L塩酸(9:1)混液で抽出し、多孔性ケイソウ土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た後、LC-MS/MSで定量及び確認する方法を提案する。

この試験法を牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、さけ、うなぎ、しじみ、牛乳、鶏卵、はちみつ及び鶏の筋肉に適用した場合、選択性は良好で何れの試料においても妨害ピークは認められず、真度は86~98%、定量限界は0.01 mg/kgが可能であることが確認できた。

#### [参考文献]

Flumetsulam.Summary of Analytical Chemistry and Residue Data for the Tolerance Reassessment Eligibility Decision (TRED) Document. 一部抜粋:EPA

図1 フルメツラムのポジティブモードでのマススペクトル

スキャン範囲：50~350  $m/z$

測定条件：ESI (+)、CV=51 (CV：コーン電圧)

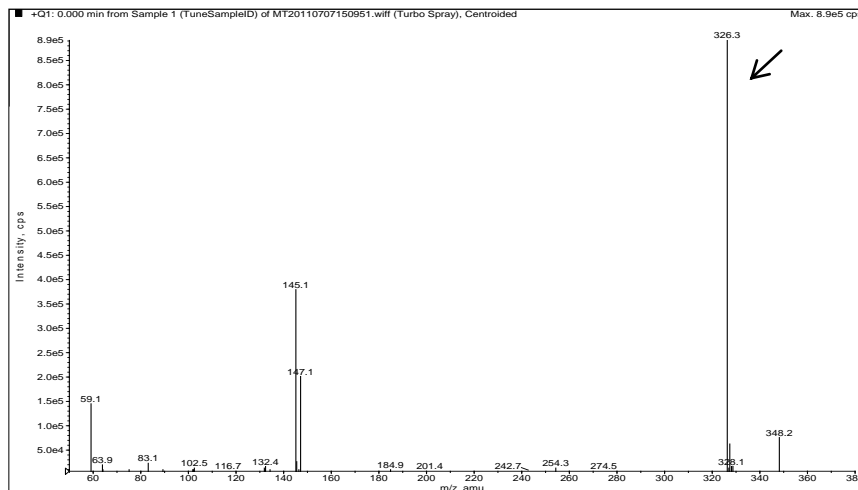


図2 フルメツラムのプリカーサーイオン  $m/z$  326 のプロダクトイオンスペクトル

スキャン範囲：50~350  $m/z$

測定条件：ESI (+)、CV=51、CE=33 (CV：コーン電圧、CE：コリジョンエネルギー)

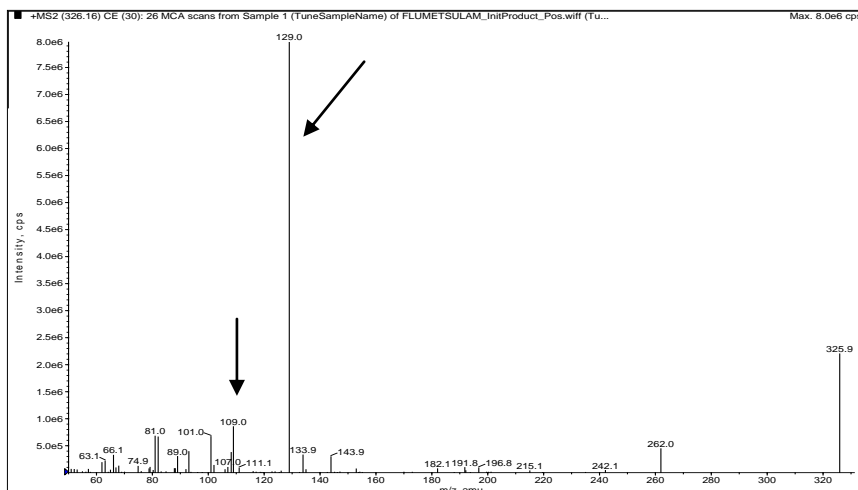


図3 フルメツラムのネガティブモードでのマススペクトル

スキャン範囲：50~350  $m/z$

測定条件：ESI (-)、CV=55 (CV：コーン電圧)

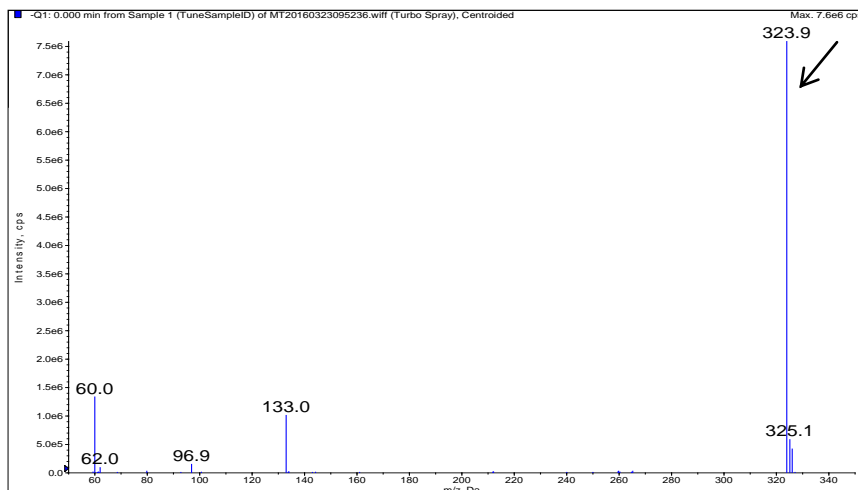


図 4-1 フルメツラムのプリカーサーイオン  $m/z$  324 のプロダクトイオンスペクトル  
 スキャン範囲：50~350  $m/z$

測定条件：ESI（-）、CV=51、CE=30（CV：コーン電圧、CE：コリジョンエネルギー）

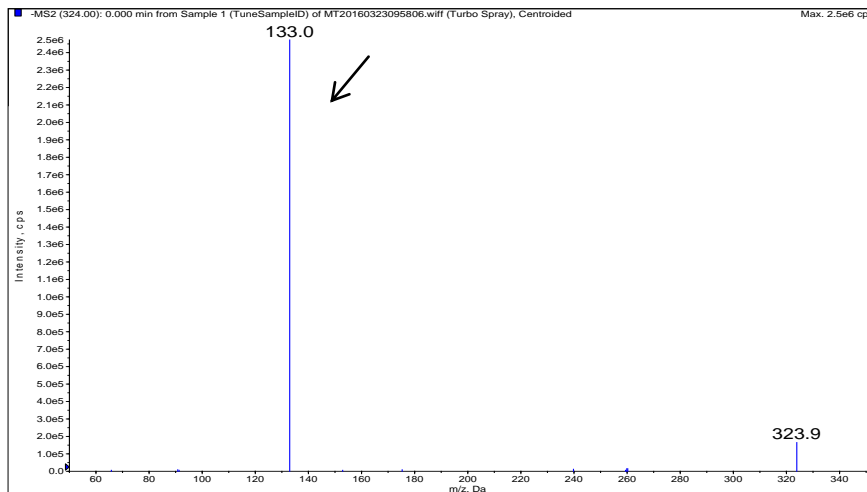


図 4-2 フルメツラムのプリカーサーイオン  $m/z$  324 のプロダクトイオンスペクトル  
 スキャン範囲：50~350  $m/z$

測定条件：ESI（-）、CV=51、CE=78（CV：コーン電圧、CE：コリジョンエネルギー）

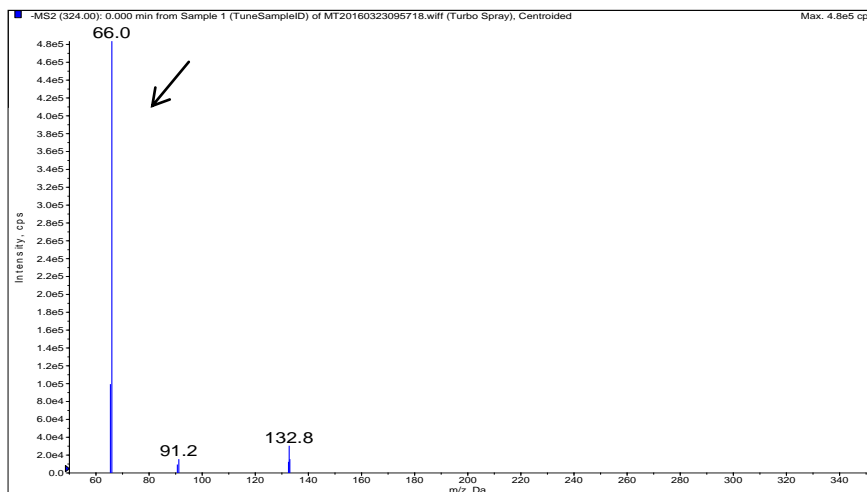
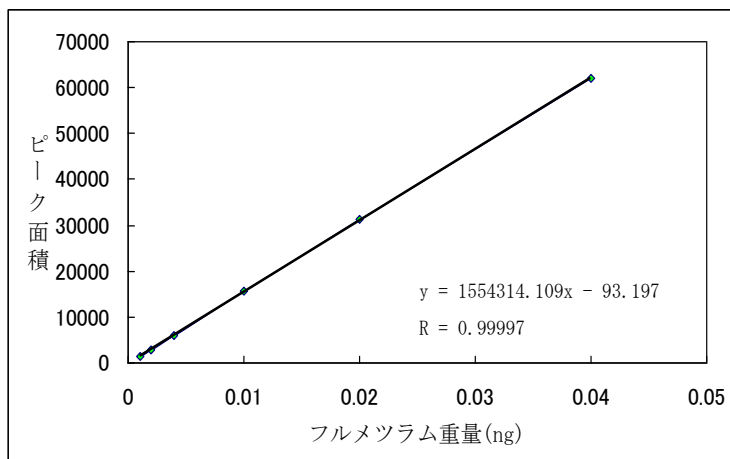


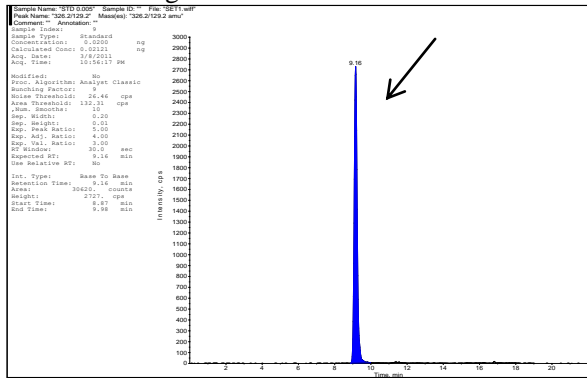
図5 フルメツラム検量線（一例）



データ処理装置設定条件の一例  
 機種（メーカー）：Analyst（AB SCIEX製）  
 ピークの定量方法：ピーク面積法  
 検量線の種類：最小二乗法  
 検量線基準ピークの重量：0.001 ng~0.04 ng  
 検量線傾き（a）：a=1554314.109  
 検量線切片（b）：b=-93.197

図6 標準溶液のクロマトグラム (一例)

標準品0.02 ng



標準品0.002 ng (定量限界相当)

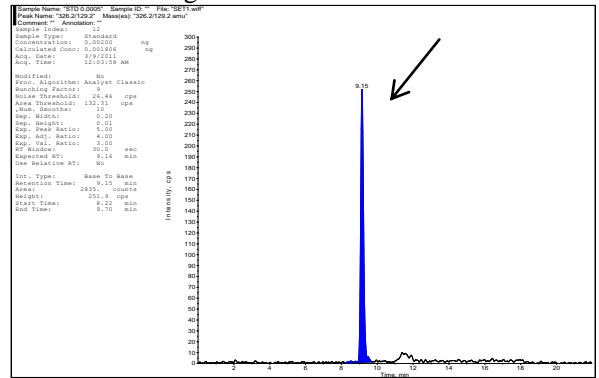
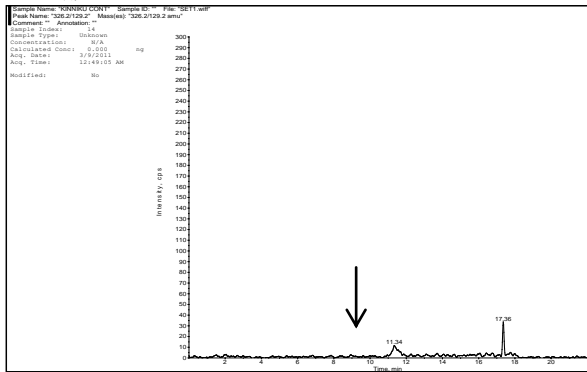
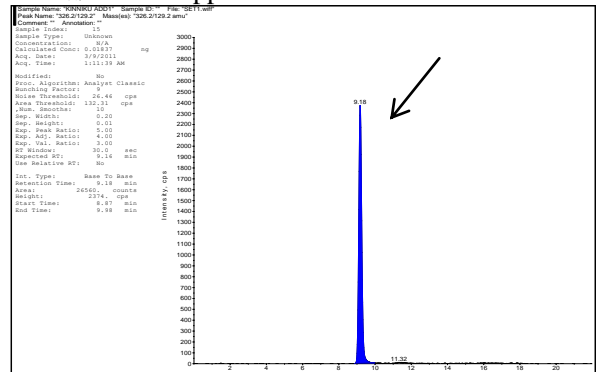


図 7-1 試料のクロマトグラム

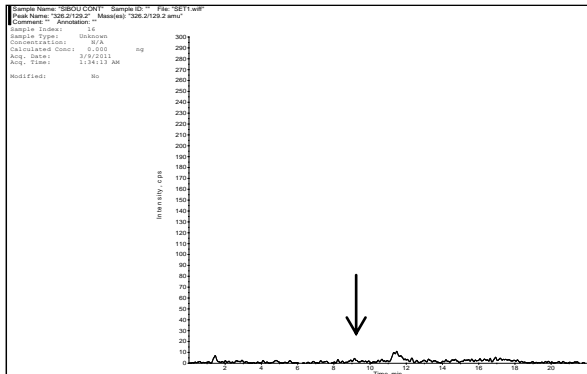
牛の筋肉 無添加



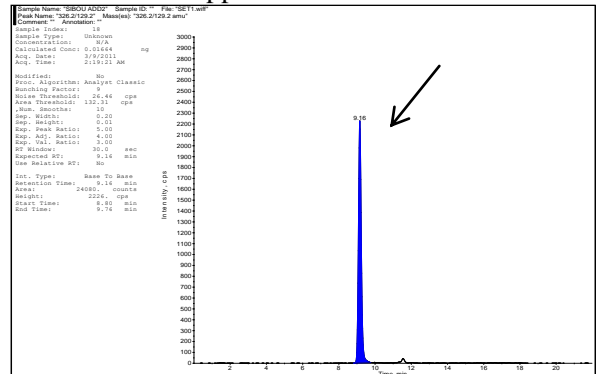
牛の筋肉 0.1 ppm 添加



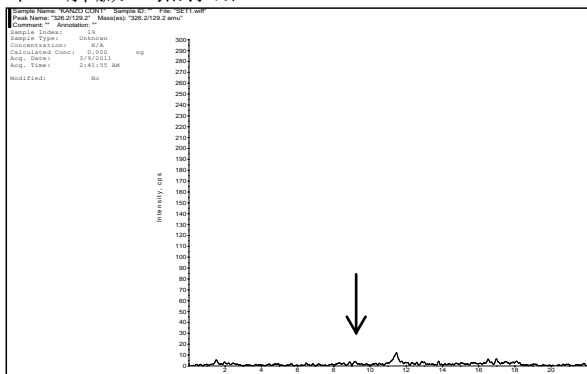
牛の脂肪 無添加



牛の脂肪 0.1 ppm 添加



牛の肝臓 無添加



牛の肝臓 0.2 ppm 添加 2 倍希釈

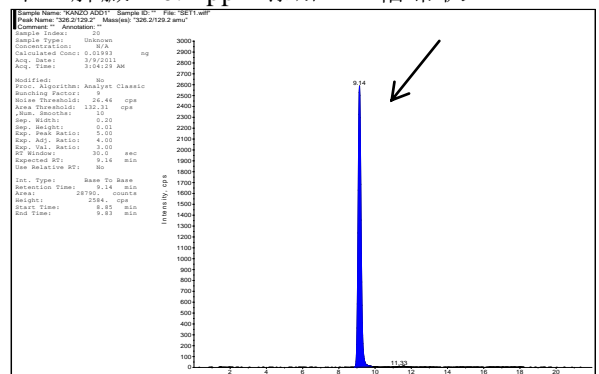
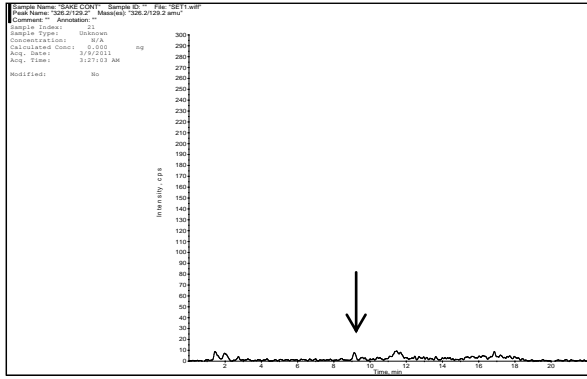
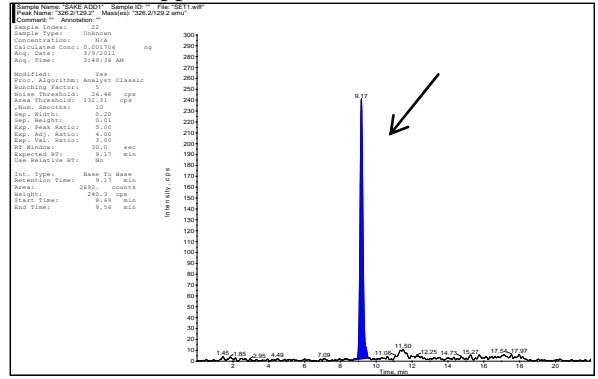


図 7-2 試料のクロマトグラム

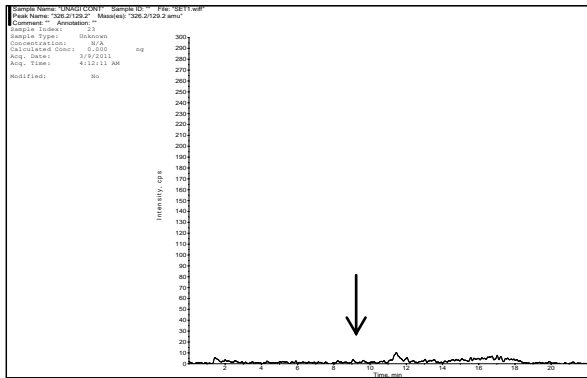
さけ 無添加



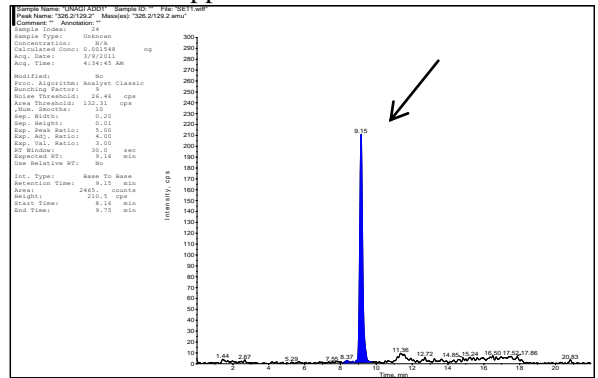
さけ 0.01 ppm 添加



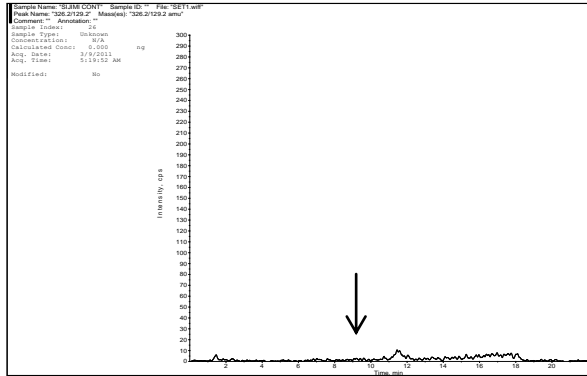
うなぎ 無添加



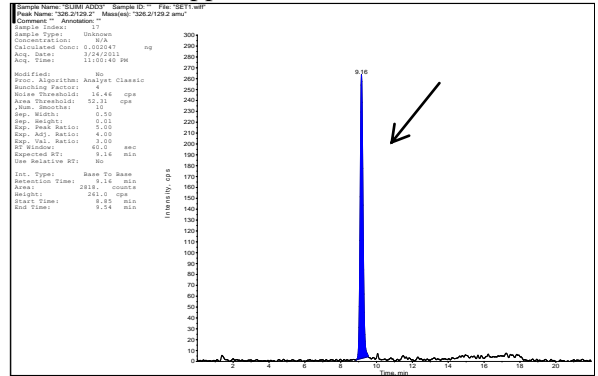
うなぎ 0.01 ppm 添加



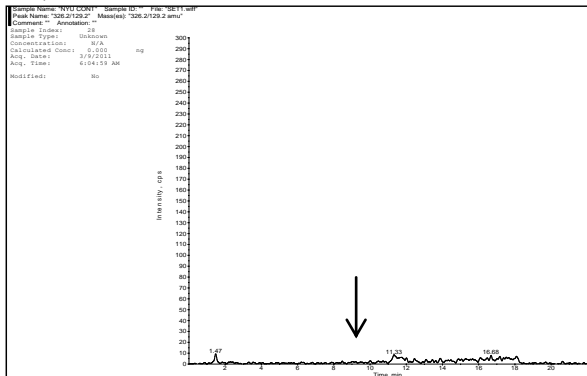
しじみ 無添加



しじみ 0.01 ppm 添加



牛乳 無添加



牛乳 0.1 ppm 添加

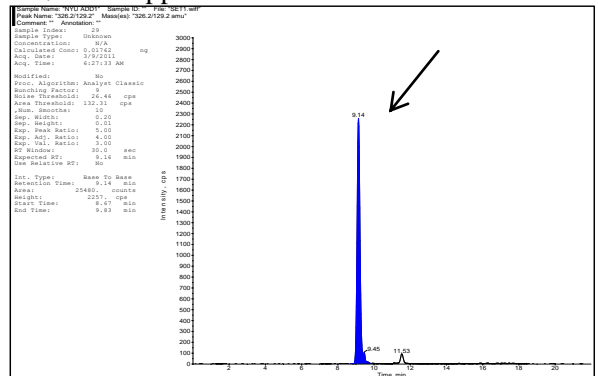
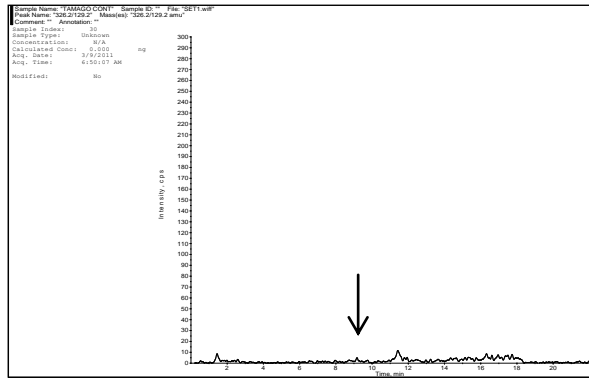
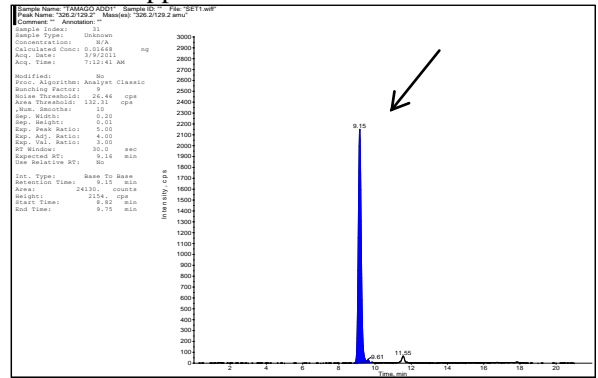


図 7-3 試料のクロマトグラム

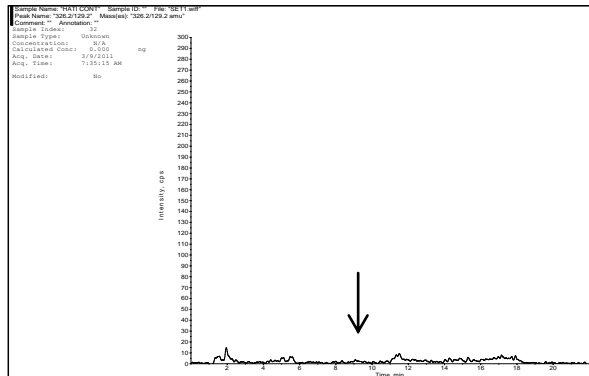
鶏卵 無添加



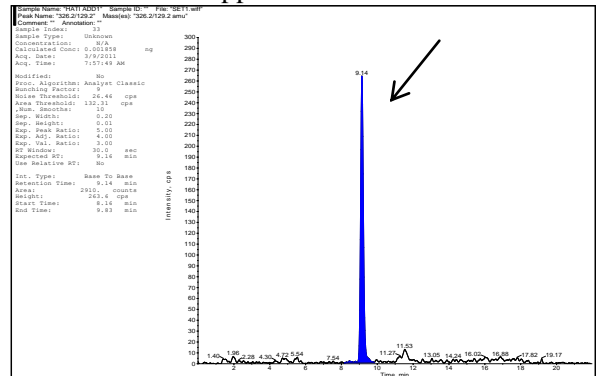
鶏卵 0.1 ppm 添加



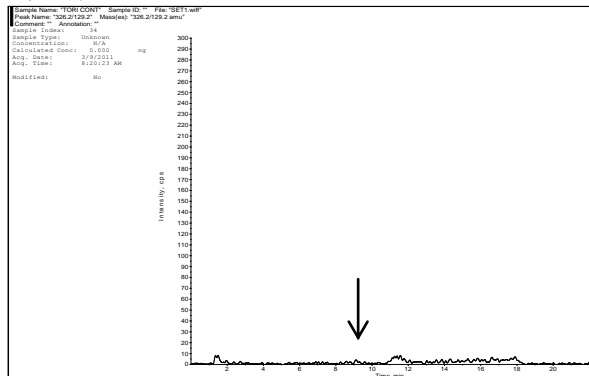
はちみつ 無添加



はちみつ 0.01 ppm 添加



鶏の筋肉 無添加



鶏の筋肉 0.1 ppm 添加

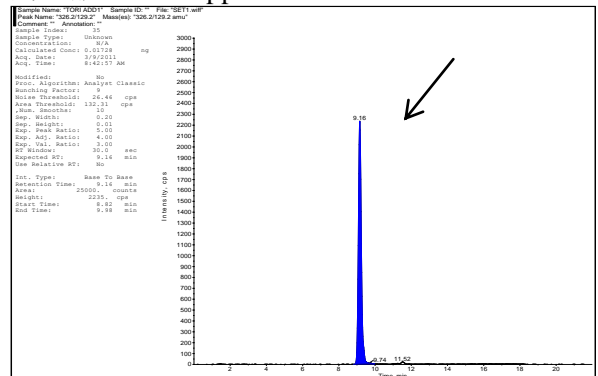
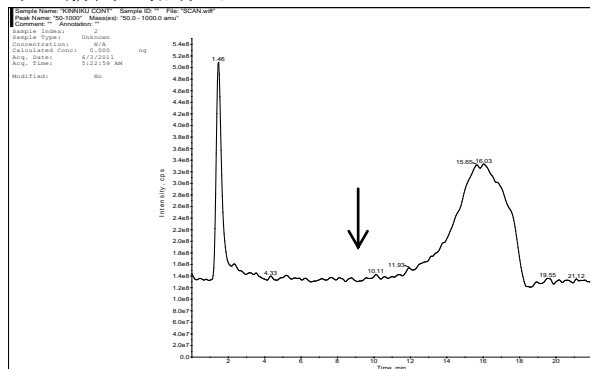
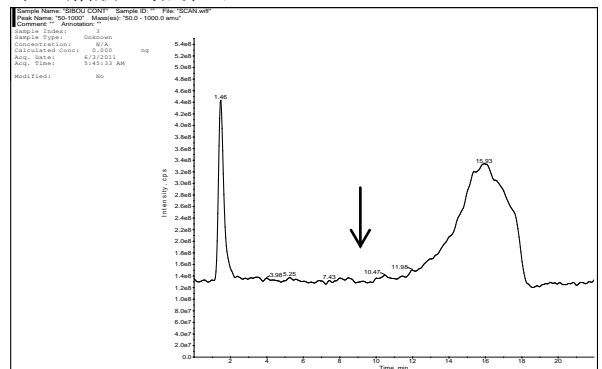


図 8-1 ブランク試料のトータルイオンクロマトグラム  
 (スキャン範囲：50~1000 amu、コーン電圧：51 (V))

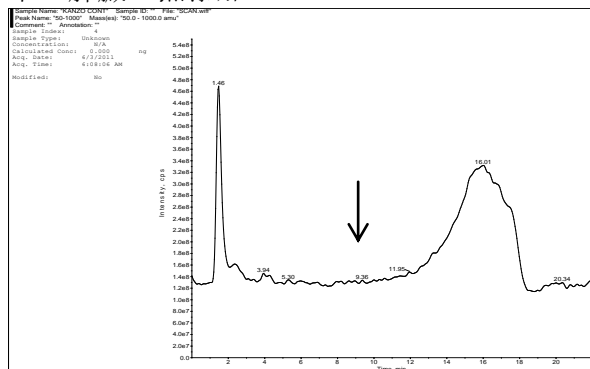
牛の筋肉 無添加



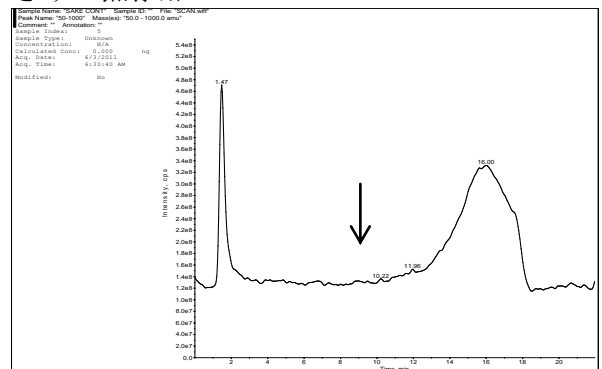
牛の脂肪 無添加



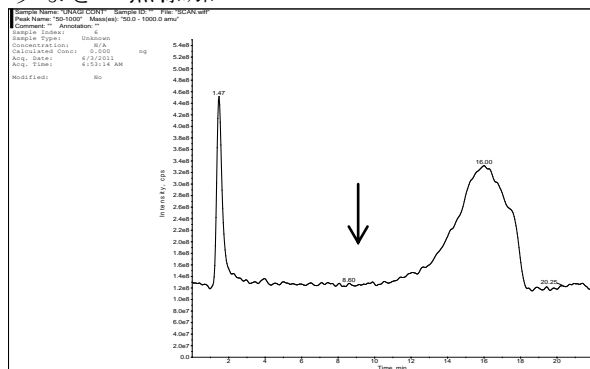
牛の肝臓 無添加



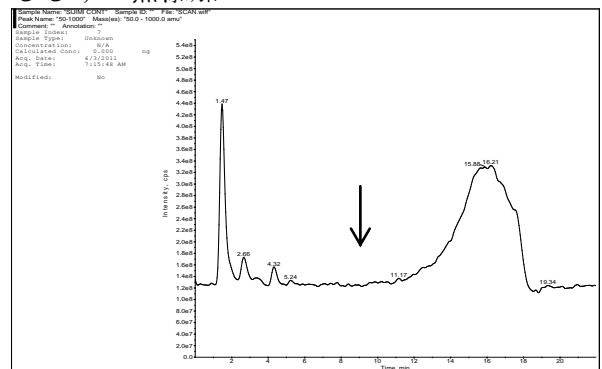
さけ 無添加



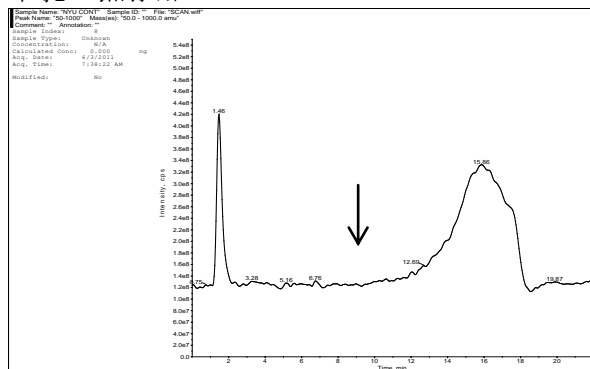
うなぎ 無添加



しじみ 無添加



牛乳 無添加



鶏卵 無添加

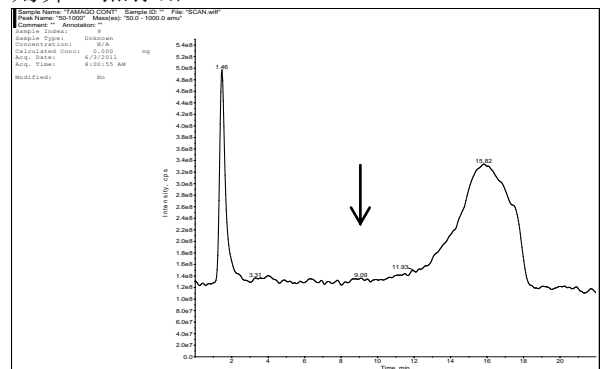
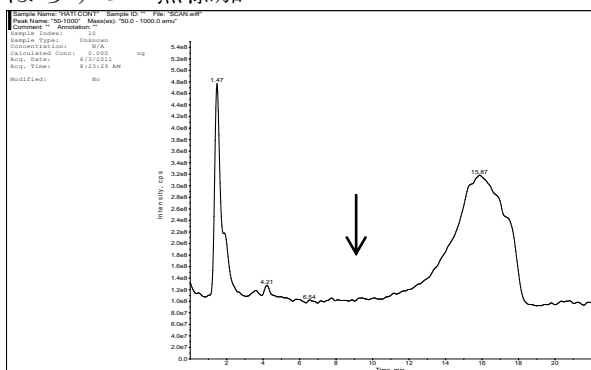


図 8-2 ブランク試料のトータルイオンクロマトグラム  
 (スキャン範囲 : 50~1000 amu、コーン電圧 : 51 (V))  
 はちみつ 無添加



鶏の筋肉 無添加

