

フェナザキン分析法（農産物）

1. 分析対象化合物

フェナザキン

2. 装置

茶：ガスクロマトグラフィー質量分析（GC-MS）

果実、種実類：高速液体クロマトグラフ・質量分析計（LC-MS/MS）

3. 試薬、試液

アセトニトリル	:	残留農薬試験用
<i>n</i> -ヘキサン	:	分析用
酢酸エチル	:	分析用
水	:	脱イオン水をMilli-Q System（Millipore製） で精製したもの
フェナザキン分析用標準品	:	分析用標準品 純度99.5%

1) 茶

炭酸水素ナトリウム	:	分析用
無水硫酸ナトリウム	:	分析用
ジクロロメタン	:	分析用
2,2,4-トリメチルペンタン	:	分析用
アセトン	:	分析用
1,4-ジブロモナフタレン	:	内部標準物質
ヘリウム	:	GC-MS用キャリアガス
フロリジル ミニカラム	:	Sep-Pak Florisil（Waters製）
アミノプロピル ミニカラム	:	Bond Elut NH ₂ 500 mg（Varian製）

2) 果実、種実類

塩化メチレン	:	分析用
--------	---	-----

3) 内部標準液の調製

1,4-ジブロモナフタレン 100 mg を 2,2,4-トリメチルペンタン 100 mL に溶解し、1000 mg/L の内部標準溶液を調製する。調製した内部標準液を 2,2,4-トリメチルペンタンで希釈して 1 mg/L と 10 mg/L の内部標準溶液とする。

4. 試験溶液の調製

1) 抽出

① 茶の場合

試料 10.0 g に水 100 mL を加える。これにアセトニトリル及び水 (9:1) 混液 100 mL を加え、2 分間ホモジナイズし、抽出用フラスコへ移す。60±5°C のホットプレート上で 1 時間加熱し、室温下に置いた。5%炭酸水素ナトリウム溶液 75 mL と *n*-ヘキサン 75 mL を加え 30 分間振とう抽出する。抽出液に無水硫酸ナトリウムを加えて脱水し、無水硫酸ナトリウムをろ別した後、ろ液を 40°C 以下で 2 mL まで濃縮する。この残留物にジクロロメタン 5 mL を加えて溶かし、-20±1°C で一晩冷凍保存する。

② アーモンド・桜桃の場合

試料を凍結保存し、ドライアイス存在下で試料を粉碎する。ドライアイスが昇華した後、試料 20.0 g にアセトニトリルを加えてホモジナイズし抽出する。この抽出液に水/塩化メチレンを加えて分配し、有機層を分取する。有機層を濃縮し、溶媒を除去する。この残留物にアセトニトリルを加えて溶かし、試験溶液とした。

2) 精製 (茶)

① フロリジルカラムによる精製

フロリジルカラムにジクロロメタン 10 mL を注入し、流出液は捨てる。このカラムに、室温にもどした抽出溶液を負荷する。容器をジクロロメタン 5 mL で洗浄してフロリジルカラムに注入し、流出液は捨てる。さらにジクロロメタン 15 mL で洗浄し、再度流出液を捨てる。次いで、ジクロロメタン及び酢酸エチル (99 : 1) 混液約 8 mL で洗浄した後、酢酸エチル及びジクロロメタン (9 : 1) 混液 12 mL で溶出する。溶出液を 40°C 以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物に *n*-ヘキサン 3 mL を加えて溶かす。

② アミノプロピルカラムによる精製

アミノプロピルカラムに *n*-ヘキサン 6 mL を注入し、流出液は捨てる。2) ①で得られた溶液を注入した後、容器を *n*-ヘキサン 3 mL で洗浄してカラムに注し、流出液は捨てる。次いで、アセトン及び *n*-ヘキサン (1 : 49) 混液 9 mL で溶出し、溶出液を 40°C の以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物を 1 mg/L の 1,4-ジブromonaフタレンに溶かし、正確に 10 mL および 5 mL としたものを試験溶液とする。

5. 検量線の作成

1) 茶

フェナザキン標準品を 2,2,4-トリメチルペンタンに溶解し、1000 mg/L の標準溶液を調製する。調製した標準溶液を、2,2,4-トリメチルペンタンで希釈して数点 (0.003~5.0 mg/L) の溶液を調製し、それぞれ GC-MS に注入し、ピーク面積法で検量線を作成する。なお、各溶液は 1 mg/L の 1,4-ジブromonaフタレン (内部標準物質) を含む。

2) アーモンド・桜桃

フェナザキン標準品 10 mg をアセトニトリル 10 mL に溶解し、1000 mg/L の標準溶液を調製する。調製した標準溶液をアセトニトリルで希釈して数点 (1~100 ng/mL) の溶液を調製し、それぞれ LC-MS/MS に注入し、ピーク面積法で検量線を作成する。

6. 定量

1) 茶

試験溶液を GC-MS に注入し、5. 1) の検量線を用いて含量を定量する。

2) アーモンド・桜桃

試験溶液を LC-MS/MS に注入し、5. 2) の検量線を用いて含量を定量する。

7. 測定条件

1) 茶

(例)

機器 : Shimadzu Gas chromatograph GC 17A series
Shimadzu GC-MS QP5050A

カラム : DB-5カラム、0.25 μ film、0.32 mm i.d. \times 30m、 (Agilent製)

キャリアガス : ヘリウム (2 mL/min)

流量 : 3 mL/min

モニタリングイオン	定量イオン (m/z)	確認イオン (m/z)
フェナザキン	145.10	169.10

1,4-ジブロモナフタレン (内部標準) : 285.9 m/z

トランスファーライン温度 : 280°C

機器温度

平衡化時間 : 3 min

初期温度 : 40°C

初期時間 : 1 min

プログラムレート : 20°C/min

最終温度 : 300°C

最終時間 : 12 min

注入量 : 5.0 μ L

保持時間の目安 : 1,4-ジブロモナフタレン : 10.3分
フェナザキン : 14.3分

2) アーモンド・桜桃

(例)

機器 : Sciex API 3000 もしくは API 4000 (LC-MS/MS)

カラム : Phenomenex Luna Phenylhexyl、5 μ m、2.0 i.d. \times 150 mm
(Phenomenex製)

移動相 : A) 0.1%ギ酸水溶液
B) 0.1%ギ酸含有アセトニトリル

グラジエント	時間 (分)	0.0	0.5	0.6	4.5	4.6	8.0
移動相A		30	30	5	5	30	30
移動相B		70	70	95	95	70	Stop

流量 : 0.3 mL/min

注入量 : 2~5 μ L (アーモンド)
2~10 μ L (桜桃)

イオン化モード : ESI (positive)

イオン検出法 : MRM法

保持時間の目安 : フェナザキン 3.8 min

モニタリング
イオン

	プリカーサーイオン (<i>m/z</i>)	プロダクトイオン (<i>m/z</i>)
フェナザキン	307.2	161.0
フェナザキン ダイマー	613.3	307.2

8. 定量限界
0.01 ppm

9. 添加回収を実施した食品
茶、アーモンド及び桜桃

10. 留意事項
特になし

※ 本分析法は、農産物における作物残留試験等において用いられた残留農薬分析法であり、新たな試験法の開発等に際して参考として下さい。なお、当該分析法をもとに開発した試験法を食品規格への適合判定のために使用する場合には、「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインの一部改正について（平成 22 年 12 月 24 日薬食発 1224 第 1 号）」に従って使用する試験法の妥当性を評価する必要があります。