

※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 法開発業務報告書

フルトラニル試験法（畜産物）

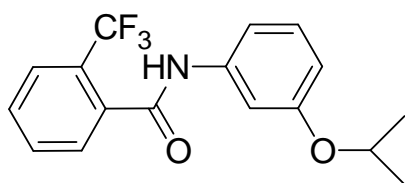
フルトラニル試験法（畜水産物）

[緒言]

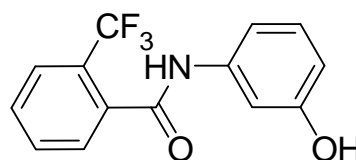
1. 目的及び試験法の検討方針

フルトラニルは、担子菌類に選択的に殺菌活性をもつアミド系殺菌剤である。農薬・動物用医薬品部会（平成20年4月7日）において、暫定基準値の見直しが行われるとともに、新たに魚介類に基準値を設定することとされた。また、畜産物の規制対象は、これまでの「フルトラニル」から、「フルトラニル及びその代謝物である α, α, α -トリフルオロ-3'-ヒドロキシ-*o*-トルアニリド（代謝物M4）（遊離体、グルクロン酸抱合体及び硫酸抱合体を含む）」に変更された（食安発第0604002号、平成21年6月4日）。通知一斉試験法の「GC/MSによる農薬等の一斉試験法（畜水産物）」では、親化合物のフルトラニルのみを分析対象としており、代謝物M4を分析することはできない。このため、新たにフルトラニルと代謝物M4を分析可能な畜水産物を対象とした残留分析法を検討した。

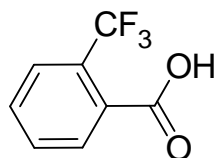
2. 分析対象化合物及びアルカリ加水分解物の構造式及び物理化学的性質



フルトラニル



α, α, α -トリフルオロ-3'-ヒドロキシ-*o*-トルアニリド
(代謝物M4)



α, α, α -トリフルオロ-*o*-トルイル酸

フルトラニル

分子式：C₁₇H₁₆F₃NO₂

化学名（IUPAC）： α, α, α -trifluoro-3'-isopropoxy-*o*-toluanilide

分子量：323.31

外観：無色結晶

融点：104.7-106.8℃

蒸気圧：4.1 x 10⁻⁴ mPa（20℃）

溶解性：水1Lに8.01 mg溶解する（20℃）

1-オクタノール/水分配係数（log Pow）：3.17

[出典] The Pesticide Manual（Fifteenth Edition）

α, α, α -トリフルオロ-3'-ヒドロキシ-*o*-トルアニリド（代謝物M4）

分子式：C₁₄H₁₀F₃NO₂

化学名（IUPAC）： α, α, α -trifluoro-3'-hydroxy-*o*-toluanilide

分子量：281.23

外観：白色の結晶性粉末

溶解性：アセトン及びエタノールに溶解する。水にはほとんど溶解しない。

融点：156.4℃

[出典] 和光純薬工業株式会社 安全データシート

α, α, α -トリフルオロ-*o*-トルイル酸

分子式： $C_8H_5F_3O_2$

化学名（IUPAC）： α, α, α -trifluoro-*o*-toluic acid

分子量：190.12

外観：結晶性粉末～粉末

融点：109.6℃

[出典] 和光純薬工業株式会社 安全データシート

3. 基準値

畜産物にあつては、フルトラニル及び α, α, α -トリフルオロ-3'-ヒドロキシ-*o*-トルアニリドをフルトラニル含量に換算したものの和をいい、その他の食品にあつてはフルトラニルのみをいうこと。なお、 α, α, α -トリフルオロ-3'-ヒドロキシ-*o*-トルアニリドには、遊離体、グルクロン酸抱合体及び硫酸抱合体が含まれること。

牛の筋肉、乳、鶏の卵：0.05 ppm

牛の脂肪：0.1 ppm

牛の肝臓：0.2 ppm

魚介類：2 ppm

[実験方法]

1. 試料

1) 購入先

牛の筋肉・脂肪・乳、鶏卵、しじみは、東京都内のスーパーマーケットで購入したものを用いた。牛の肝臓、うなぎ（国産）は、インターネットを介して購入したものを用いた。

2) 試料の採取方法

- ① 牛の筋肉は、可能な限り脂肪層を除き細切均一化した。
- ② 牛の脂肪は、可能な限り筋肉部を除き細切均一化した。
- ③ 牛の肝臓は、全体を細切均一化した。
- ④ 牛の乳は、全体を混合し均一化した。
- ⑤ 鶏卵は、殻を除去し卵黄と卵白をよく混合し均一化した。
- ⑥ うなぎは、頭部を除き、内臓、骨及び皮を含む可食部を細切均一化した。
- ⑦ しじみは、殻を除去し、得られたむき身を目の細かい金網にのせ、約5分間水切りを行ったものを細切均一化した。

2. 試薬・試液

1) 標準品

フルトラニル標準品：純度99.7%（和光純薬工業製）

フルトラニル代謝産物M4標準品：純度98.8%（和光純薬工業製）

α, α, α -トリフルオロ-*o*-トルイル酸標準品：純度99.4%（和光純薬工業製）

2) 試薬

アセトニトリル、アセトン、*n*-ヘキサン：残留農薬試験用（関東化学製）

アセトニトリル、蒸留水：LC-MS用（関東化学製）

アンモニア水：特級（関東化学製）

酢酸エチル、メタノール、硫酸ナトリウム：残留農薬試験用（和光純薬工業製）

ジエチレングリコール、水酸化ナトリウム、硫酸：試薬特級（和光純薬工業製）

トリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム：InertSep SAX（500 mg/6 mL）
（ジーエルサイエンス製）

3) 標準溶液、試液の調製方法

① 標準溶液の調製方法

フルトラニル標準原液：フルトラニル標準品を精秤し、アセトニトリルに溶解して1 mg/mL溶液を調製した。

フルトラニル添加用標準溶液：フルトラニル標準原液をアセトンで希釈し、0.2、1、2、4、40 μ g/mLの濃度の溶液を調製した。

代謝物M4標準原液：フルトラニル代謝物M4標準品を精秤し、アセトニトリルに溶解し、フルトラニルとして、1 mg/mL溶液を調製した。なお、換算係数は、0.8698（代謝物M4の分子量をフルトラニルの分子量で除した値：281.23/323.31）とした。

代謝物M4添加用標準溶液：フルトラニル代謝物M4標準原液をアセトンで希釈し、0.2、1、2、4、40 μ g/mLの濃度（フルトラニルとして）の溶液を調製した。

α, α, α -トリフルオロ-*o*-トルイル酸標準原液： α, α, α -トリフルオロ-*o*-トルイル酸標準品を精秤し、メタノールに溶解し1 mg/mL溶液（フルトラニルとして）を調製した。なお、換算係数は、0.5880（ α, α, α -トリフルオロ-*o*-トルイル酸の分子量をフルトラニルの分子量で除した値：190.12/323.31）とした。

② 試液の調製方法

アセトニトリル及び水（1：19）混液：アセトニトリル50 mL及び水950 mLを混合した。

アンモニア水及びメタノール（1：99）混液：アンモニア水1 mL及びメタノール99 mLを混合した。

酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（1：9）混液：酢酸エチル100 mL及びヘキサン900 mLを混合した。

50 w/w%水酸化ナトリウム溶液：水100 gに水酸化ナトリウム100 gを加えて溶解した。

30 vol%硫酸：水に硫酸300 mLを加えて混合し、1 Lとした。

2 mmol/L酢酸アンモニウム溶液：酢酸アンモニウム154.2 mgに水を加えて溶解し、1 Lとした。

2 vol%ジエチレングリコール・アセトン溶液：ジエチレングリコール2 mLをアセトンに加えて、100 mLとした。

3. 装置

ホモジナイザー：PT 10-35 GT（キネマティカ製）

ヒートブロック：MetaPREP AT-1（ジーエルサイエンス製）

PTFE製容器（75 mL容）：MetaTUBE PTFE L183（GLサイエンス製）

遠心分離機：8100（久保田商事製）

マグネチックスターラー：KSI-12（アズワン製）

振とう機：SR-2w（タイテック製）

LC-MS/MS

	型式	会社
LC 装置	Nexera X2	島津製作所
MS 装置	API 4000	SCIEX
データ処理	Analyst	SCIEX

4. 測定条件

LC 条件																								
カラム	InertSustain AQ-C18 サイズ:内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm 会社：ジューエルサイエンス株式会社																							
流速 (mL/min)	0.3																							
注入量(μL)	5																							
カラム温度 (°C)	40																							
移動相	A 液：2 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 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>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>6.0</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>6.1</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>11.0</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>11.1</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>20.0</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> </tbody> </table>			時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)	0.0	95	5	6.0	95	5	6.1	5	95	11.0	5	95	11.1	95	5	20.0	95	5
時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)																						
0.0	95	5																						
6.0	95	5																						
6.1	5	95																						
11.0	5	95																						
11.1	95	5																						
20.0	95	5																						
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	フルトラニル：ESI (+) 代謝物 M4、α, α, α-トリフルオロ- <i>o</i> -トルイル酸：ESI (-)																							
イオンスプレー電圧 (V)	フルトラニル：4,500 代謝物 M4、α, α, α-トリフルオロ- <i>o</i> -トルイル酸：-4,500																							
ヒーター温度 (°C)	700																							
エントランス電位 (V)	フルトラニル：10 代謝物 M4、α, α, α-トリフルオロ- <i>o</i> -トルイル酸：-10																							
カーテングス (psi)	40																							
ネブライザーガス (psi)	80																							
ターボガス (psi)	70																							
コリジョンガス	10 (窒素)																							
コリジョンセルイグジット電位 (V)	フルトラニル：8 (定量イオン)、24 (定性イオン) 代謝物 M4：-7 (定量イオン)、-23 (定性イオン) α, α, α-トリフルオロ- <i>o</i> -トルイル酸：-25 (定量イオン)、-1 (定性イオン)																							
定量イオン (m/z)	フルトラニル：m/z 324→262 [デクラスタリング電位：76 V、コリジョンエネルギー：27 eV] 代謝物 M4：m/z 280→134 [デクラスタリング電位：-70 V、コリジョンエネルギー：-26 eV] α, α, α-トリフルオロ- <i>o</i> -トルイル酸：m/z 189→145 [デクラスタリング電位：-35 V、コリジョンエネルギー：-22 eV]																							
定性イオン (m/z)	フルトラニル：m/z 324→242 [デクラスタリング電位：76 V、コリジョンエネルギー：37 eV] 代謝物 M4：m/z 280→145 [デクラスタリング電位：-70 V、コリジョンエネルギー：-34 eV] α, α, α-トリフルオロ- <i>o</i> -トルイル酸：m/z 189→69 [デクラスタリング電位：-35 V、コリジョンエネルギー：-52 eV]																							
保持時間 (分)	5																							

5. 定量

α, α, α -トリフルオロ-*o*-トルイル酸標準原液をアセトニトリル及び水（1：19）混液で希釈して、各食品の添加濃度に対して、25、50、75、100、125、150%の回収率に相当する濃度の検量溶液を調製した。なお、 α, α, α -トリフルオロ-*o*-トルイル酸の検量溶液は、フルトラニルとしての濃度で調製した。各濃度に調製した検量溶液5 μL をLC-MS/MSに注入して、得られたピーク面積値を用いて検量線を作成した。なお、本法に従って試験溶液を調製した場合には、試料中0.01 mg/kgのフルトラニルの相当する試験溶液の濃度は、0.005 mg/Lである。試験溶液は5 μL をLC-MS/MSに注入して、検量線から絶対検量線法によりフルトラニルの含量を求めた。

6. 添加試料の調製

添加濃度はフルトラニルとしての濃度で示した。

1) 基準値濃度の添加試料の作成

牛の筋肉・乳、鶏卵（添加濃度：0.05 mg/kg）：試料10.0 gに、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 添加用標準溶液0.5 mLを添加し混合後、30分放置した。

牛の脂肪（添加濃度：0.1 mg/kg）：試料10.0 gを採り、約40°Cの湯浴で融解し、2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 添加用標準溶液0.5 mLを添加し混合後、-30°Cで30分間放置して固化した。

牛の肝臓（添加濃度：0.2 mg/kg）：試料10.0 gに、4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 添加用標準溶液0.5 mLを添加し混合後、30分放置した。

うなぎ、しじみ（添加濃度：2 mg/kg）：試料10.0 gに、40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 添加用標準溶液0.5 mLを添加し混合後、30分放置した。

2) 定量限界濃度の添加試料の作成

牛の筋肉・肝臓・乳、鶏卵、うなぎ、しじみ（添加濃度：0.01 mg/kg）：試料10.0 gに、0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 添加用標準溶液0.5 mLを添加し混合後、30分放置した。

牛の脂肪（添加濃度：0.01 mg/kg）：試料10.0 gを採り、約40°Cの湯浴で融解し、0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 添加用標準溶液0.5 mLを添加し混合後、-30°Cで30分間放置して固化した。

7. 試験溶液の調製

概要

脂肪の場合は、フルトラニル及び代謝物M4を試料から*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル及び*n*-ヘキサン混液によりホモジナイズ抽出して、遠心分離後に*n*-ヘキサン層を捨て、アセトニトリル層を採取した。残留物に*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル及び*n*-ヘキサン混液を加えて、上記と同様に操作した。得られたアセトニトリル層を濃縮して溶媒を除去した。牛の筋肉・肝臓・乳、鶏卵、うなぎ及びしじみ並びに上記により得られた脂肪の濃縮物に、水酸化ナトリウム溶液または固体の水酸化ナトリウムを加えて、200°Cで6時間加熱して、フルトラニル及び代謝物M4を α, α, α -トリフルオロ-*o*-トルイル酸に加水分解した。容器を放冷して室温に戻した後、加水分解物に硫酸を加えて酸性にし、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン混液に転溶した。トリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲル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

脂肪の場合

脂肪を細切均一化した後、試料 10.0 g を量り採る。これに *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 50

mL、*n*-ヘキサン 50 mL、無水硫酸ナトリウム 20 g を加えて、ホモジナイズした。毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離した後、アセトニトリル層を分取し、*n*-ヘキサン層は捨てた。残留物に *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 50 mL、*n*-ヘキサン 50 mL を加えホモジナイズした後、上記と同様に遠心分離した。アセトニトリル層を採り、先に採取したアセトニトリル層と合わせた。

2) 加水分解

① 筋肉、肝臓、乳、鶏卵、うなぎ、しじみの場合

筋肉、肝臓、乳、鶏卵及び魚介類の場合は、検体を細切均一化した後、試料 10.0 g を PTFE 製容器に量り採った。これに、乳以外には、50 w/w% 水酸化ナトリウム溶液 10 mL を加え、乳の場合は、固体の水酸化ナトリウム 7 g を加えて、10 分間放置した後、密栓して 200°C で 6 時間加熱した。反応容器を放冷して室温に戻した後、加水分解物をビーカーに採りマグネチックスターラーで攪拌した。容器を水 10 mL で 4 回、30 vol% 硫酸 20 mL、水 10 mL、アセトン 5 mL で順次洗浄し、加水分解物を攪拌しているビーカーに洗液を合わせた。これに、酢酸エチル及び *n*-ヘキサン (1 : 9) 混液 50 mL を加え振とう抽出し、酢酸エチル及び *n*-ヘキサン混液層を採った。水層に酢酸エチル及び *n*-ヘキサン (1 : 9) 混液 40 mL を加えて振とう抽出した後、有機層を合わせて、同溶媒で正確に 100 mL とした。

② 脂肪の場合

1) 抽出で得られた溶液を、40°C 以下で濃縮し溶媒を除去した。この残留物にアセトン 5 mL を加えて溶解し、PTFE 製容器に移した後、窒素ガスを吹き付けて溶媒を除去した。これに、50 w/w% 水酸化ナトリウム溶液 10 mL を加えて、10 分間放置した後、密栓して 200°C で 6 時間加熱した。反応容器を放冷して室温に戻した後、加水分解物をビーカーに採りマグネチックスターラーで攪拌した。容器を水 10 mL で 4 回、30 vol% 硫酸 20 mL、水 10 mL、アセトン 5 mL で順次洗浄し、加水分解物を攪拌しているビーカーに洗液を合わせた。これに、酢酸エチル及び *n*-ヘキサン (1 : 9) 混液 50 mL を加え振とう抽出し、酢酸エチル及び *n*-ヘキサン混液層を採った。水層に酢酸エチル及び *n*-ヘキサン (1 : 9) 混液 40 mL を加えて振とう抽出した後、有機層を合わせて、同溶媒で正確に 100 mL とした。

3) 精製

トリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム (500 mg) に、酢酸エチル及び *n*-ヘキサン (1 : 9) 混液 5 mL を注入し、流出液は捨てた。このカラムに 2) で得られた溶液 10 mL を正確に分取して負荷した後、アセトン 5 mL、メタノール 10 mL を順次注入し、流出液は捨てた。次いで、アンモニア水及びメタノール (1 : 99) 混液 10 mL を注入し、溶出液を採った。これに 2 vol% ジエチレングリコール・アセトン溶液 0.5 mL を加えて、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及び水 (1 : 19) 混液に溶解し、正確に 2 mL としたものを試験溶液とした。

[分析法フローチャート]

脂肪の場合

試料

- ↓ 10.0 g を 350 mL 容ガラス製遠沈管に量り採る
- ↓ 約 40°C の湯浴で融解し、添加用標準溶液 0.5 mL を添加し混合後、-30°C で 30 分間放置して固化する

抽出

- ↓ *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 50 mL、*n*-ヘキサン 50 mL 及び無水硫酸ナトリウム 20 g を加え、ホモジナイズ後に遠心分離（3,000回転、5分間）する
- ↓ *n*-ヘキサン層を捨て、アセトニトリル層を採取する

残留物

- ↓ *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 50 mL、*n*-ヘキサン 50 mL を加え、ホモジナイズ後に遠心分離（3,000 回転、5 分間）する
- ↓ アセトニトリル層を採取し、先に得られたアセトニトリル層と合わせる

抽出液

- ↓ 抽出液を 40°C 以下で濃縮し、溶媒を除去する
- ↓ 残留物にアセトン 5 mL を加えて溶解し、PTFE 製容器に移し、窒素ガスにより濃縮する

加水分解

- ↓ 50 w/w% 水酸化ナトリウム 10 mL を加え、混合後に室温で 10 分間放置
- ↓ 密栓して、200°C で 6 時間加熱する

酢酸エチル及び *n*-ヘキサン混液転溶

- ↓ 放冷して室温に戻した後、PTFE 製容器の内容物をビーカーに移し、マグネチックスターラーで攪拌する
- ↓ PTFE 製容器を水 10 mL で 4 回、30 vol% 硫酸 20 mL、水 10 mL、アセトン 5 mL で順次洗い、攪拌しながら各洗液を先のビーカーに合わせる
- ↓ 分液ロートに移し、酢酸エチル及び *n*-ヘキサン（1：9）混液 50 mL を加え、5 分間振とうし、有機層を 100 mL メスフラスコに採取する
- ↓ 水層に酢酸エチル及び *n*-ヘキサン（1：9）混液 40 mL を加え、5 分間振とうし、有機層を合わせて、正確に 100 mL とする

トリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム精製（InertSep SAX、500 mg）

- ↓ 予め酢酸エチル及び *n*-ヘキサン（1：9）混液 5 mL を注入し、流出液は捨てる
- ↓ 上記で得られた溶液 10 mL を正確に分取し、カラムに注入する
- ↓ アセトン 5 mL、メタノール 10 mL を順次注入し、各流出液は捨てる
- ↓ アンモニア水及びメタノール（1:99）混液 10 mL を注入し、溶出液を採る
- ↓ 溶出液に 2 vol% ジエチレングリコール・アセトン溶液 0.5 mL を加え、40°C 以下で濃縮し、溶媒を除去する
- ↓ 残留物をアセトニトリル及び水（1：19）混液に溶かし、正確に 2 mL に溶解する

試験溶液

↓

LC-MS/MS測定（0.5 g 試料/mL）試験溶液 5 μL を注入

筋肉、肝臓、乳、鶏卵、うなぎ、しじみの場合

試料

↓ 試料 10.0 g を PTFE 製容器 (75 mL 容) に量り採る

加水分解

↓ 標準溶液を添加し、混合後に 30 分間放置

↓ 牛の筋肉・肝臓、鶏卵、魚介類の場合は 50 w/w% 水酸化ナトリウム 10 mL を、牛の乳の場合は、水酸化ナトリウム 7 g を加えて、混合後に室温で 10 分間放置

↓ 密栓して、200℃で 6 時間加熱する

酢酸エチル及び *n*-ヘキサン混液転溶

↓ 放冷して室温に戻した後、PTFE 製容器の内容物をビーカーに移し、マグネチックスターラーで攪拌する

↓ PTFE 製容器を水 10 mL で 4 回、30 vol% 硫酸 20 mL、水 10 mL、アセトン 5 mL で順次洗い、攪拌しながら各洗液を先のビーカーに合わせる

↓ 分液ロートに移し、酢酸エチル及び *n*-ヘキサン (1 : 9) 混液 50 mL を加え、5 分間振とうし、有機層を 100 mL メスフラスコに採取する

↓ 水層に酢酸エチル及び *n*-ヘキサン (1 : 9) 混液 40 mL を加え、5 分間振とうし、有機層を合わせて、正確に 100 mL とする

トリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム精製 (InertSep SAX、500 mg)

↓ 予め酢酸エチル及び *n*-ヘキサン (1 : 9) 混液 5 mL を注入し、流出液は捨てる

↓ 上記で得られた溶液 10 mL を正確に分取し、カラムに注入する

↓ アセトン 5 mL、メタノール 10 mL を順次注入し、各流出液は捨てる

↓ アンモニア水及びメタノール (1:99) 混液 10 mL を注入し、溶出液を採る

↓ 溶出液に 2 vol% ジエチレングリコール・アセトン溶液 0.5 mL を加え、40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する

↓ 残留物をアセトニトリル及び水 (1 : 19) 混液に溶かし、正確に 2 mL に溶解する

試験溶液

↓

LC-MS/MS測定 (0.5 g試料/mL) 試験溶液5 μLを注入

8. マトリックス添加標準溶液の調製

各検討食品の添加回収試験における回収率100%相当濃度、または定量限界相当濃度（0.01 mg/kg）（フルトラニルとして）となりように、 α, α, α -トリフルオロ-*o*-トルイル酸標準溶液（メタノール溶液）を2 mLバイアルに採った。室温で窒素ガスを吹き付け乾固し、ブランク試験溶液0.5 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

① フルトラニルのMS条件の検討

フルトラニル標準溶液をESIのポジティブモード及びネガティブモードでスキャン測定した。ポジティブモードにおいて、より高感度に測定することが可能であったため、測定モードはESIのポジティブモードとした。フルトラニルのスキャン測定におけるマススペクトル（デクラスタリング電位（DP）：76 V）を図1に示した。フルトラニルのプロトン付加分子（ m/z 324 [M+H]⁺）が強く観察されたため、本イオンをプリカーサーイオンとした。図2及び3には、本イオン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示した。最も高感度に測定できた m/z 324→262（DP：76 V、CE：27 eV）を定量イオンとし、 m/z 324→242（DP：76 V、CE：37 eV）を定性イオンとした。

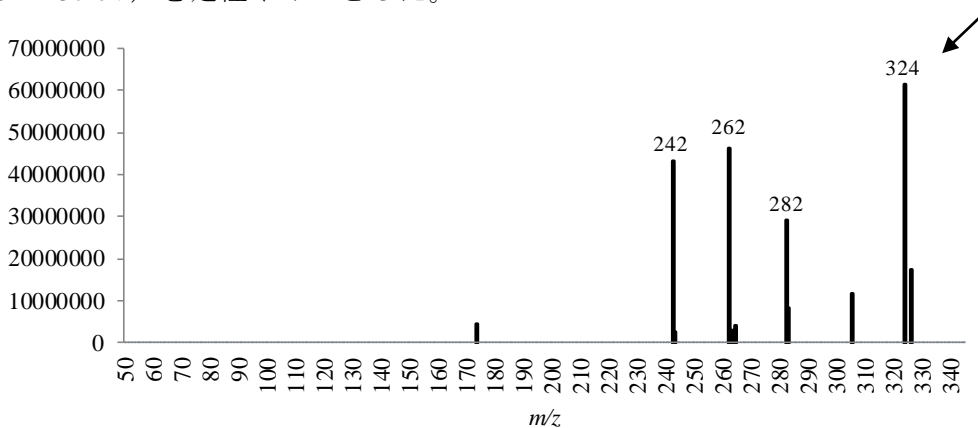


図1 フルトラニルのマススペクトル

スキャン範囲：50～350 m/z 、測定条件：ESI (+)、DP = 76 V

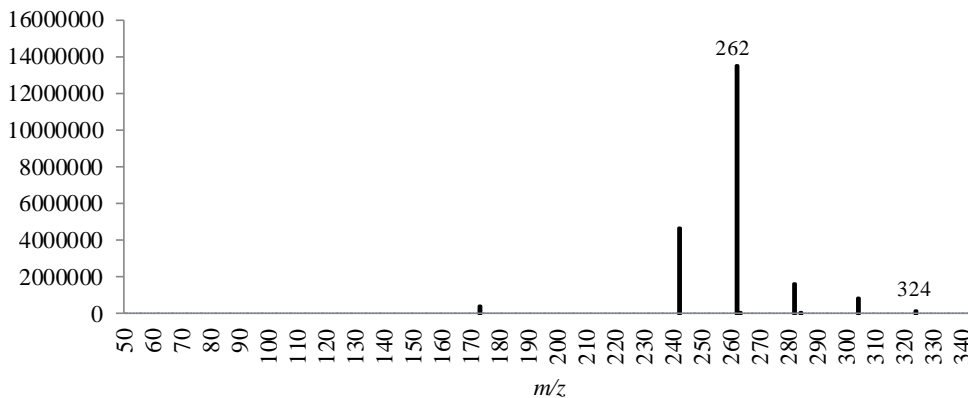


図2 フルトラニルのプロダクトイオンスペクトル（定量用）

プリカーサーイオン： m/z 324、測定条件：ESI (+)、DP = 76 V、CE = 27 eV

（DP：デクラスタリング電位、CE：コリジョンエネルギー）

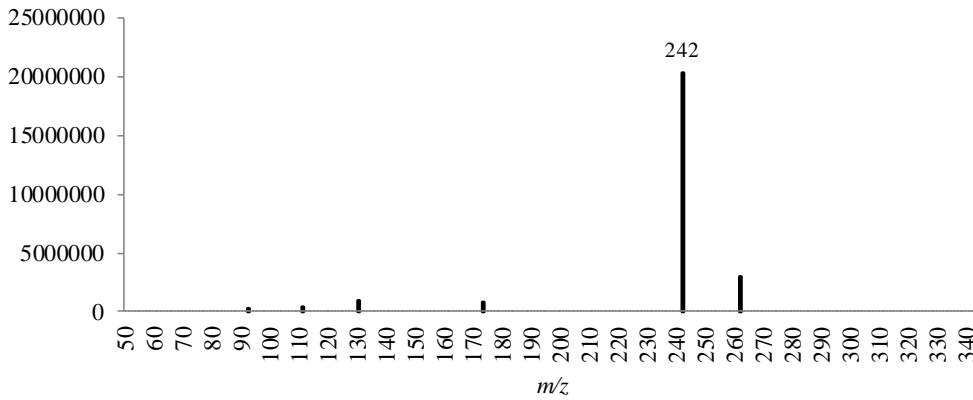


図3フルトラニルのプロダクトイオンスペクトル（定性用）

プリカーサーイオン： m/z 324、測定条件：ESI（+）、DP = 76 V、CE = 37 eV

② 代謝物M4のMS条件の検討

代謝物M4標準溶液をESIのポジティブモード及びネガティブモードでスキャン測定したところ、ネガティブモードにおいて、より高感度に測定することが可能であった。このため、測定モードはESIのネガティブモードとした。代謝物M4のスキャン測定におけるマススペクトル（DP：-70 V）を図4に示した。代謝物M4の脱プロトン化分子（ m/z 280 [M-H]⁻）が強く観察されたため、本イオンをプリカーサーイオンとした。図5及び6には、本イオン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示した。最も高感度に測定できた m/z 280→134（DP：-70 V、CE：-34 eV）を定量イオンとし、 m/z 280→145（DP：-70 V、CE：-26 eV）を定性イオンとした。

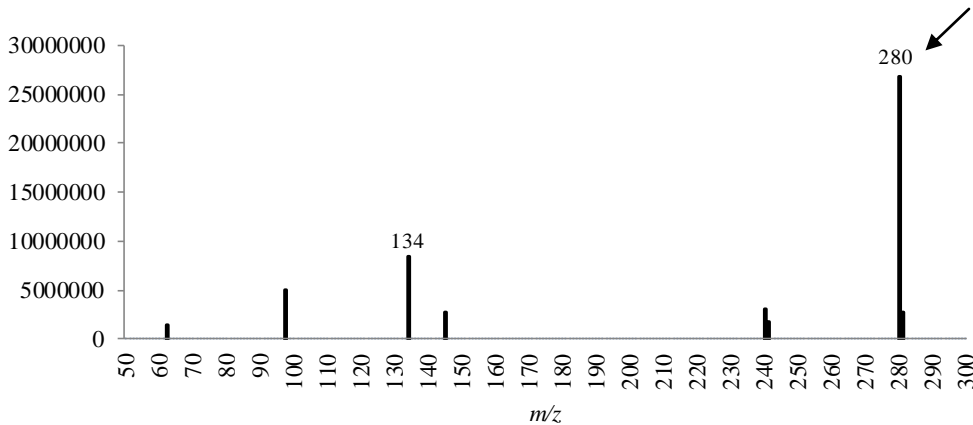


図4 代謝物M4のマススペクトル

スキャン範囲：50～300 m/z 、測定条件：ESI（-）、DP = -70 V

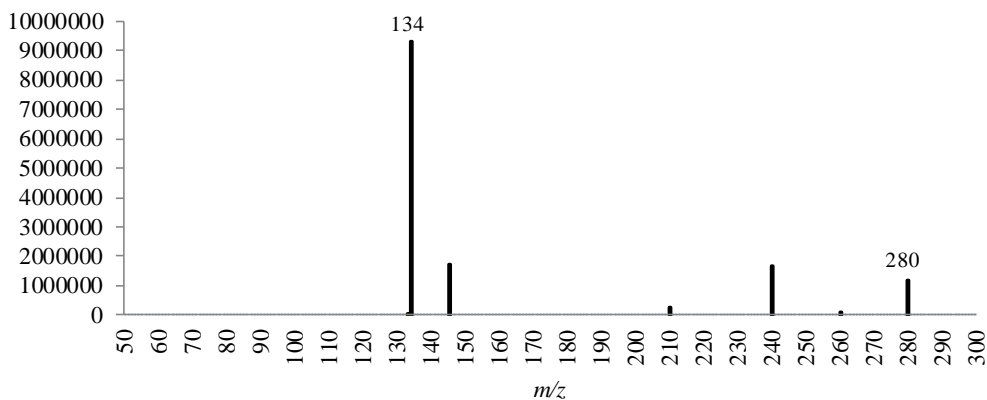


図5 代謝物M4のプロダクトイオンスペクトル（定量用）

プリカーサーイオン： m/z 280、測定条件：ESI（-）、DP = -70 V、CE = -26 eV

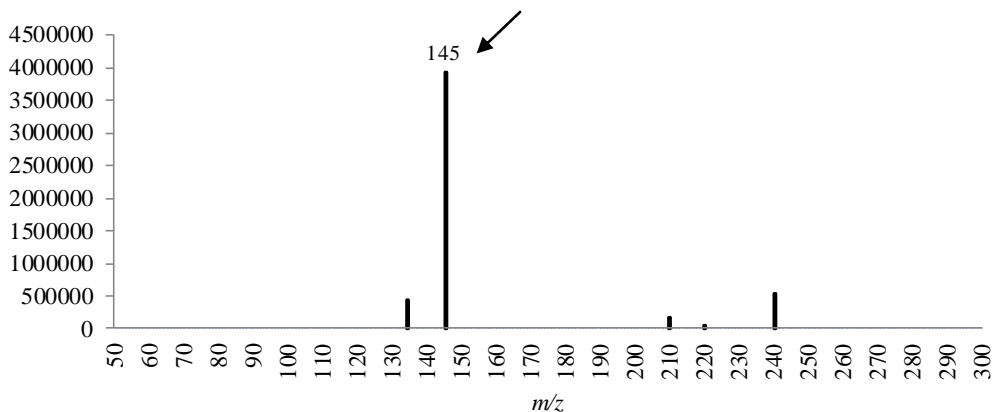


図6 代謝物M4のプロダクトイオンスペクトル（定性用）

プリカーサーイオン： m/z 280、測定条件：ESI（－）、DP = -70 V、CE = -34 eV

③ α, α, α -トリフルオロ-*o*-トルイル酸のMS条件の検討

ESIのポジティブ及びネガティブモードにおいて、 α, α, α -トリフルオロ-*o*-トルイル酸標準溶液をスキャン測定したところ、ポジティブモードではシグナルが検出されなかった。このため、測定モードはESIのネガティブモードとした。 α, α, α -トリフルオロ-*o*-トルイル酸のスキャン測定におけるマススペクトル（DP：-35 V）を図7に示した。 α, α, α -トリフルオロ-*o*-トルイル酸の脱プロトン化分子（ m/z 189 $[M-H]^-$ ）が強く観察されたため、本イオンをプリカーサーイオンとした。図8及び9には、本イオン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示した。最も高感度に測定できた m/z 189→145（DP：-35 V、CE：-22 eV）を定量イオンとし、 m/z 189→69（DP：-35V、CE：-52 eV）を定性イオンとした。

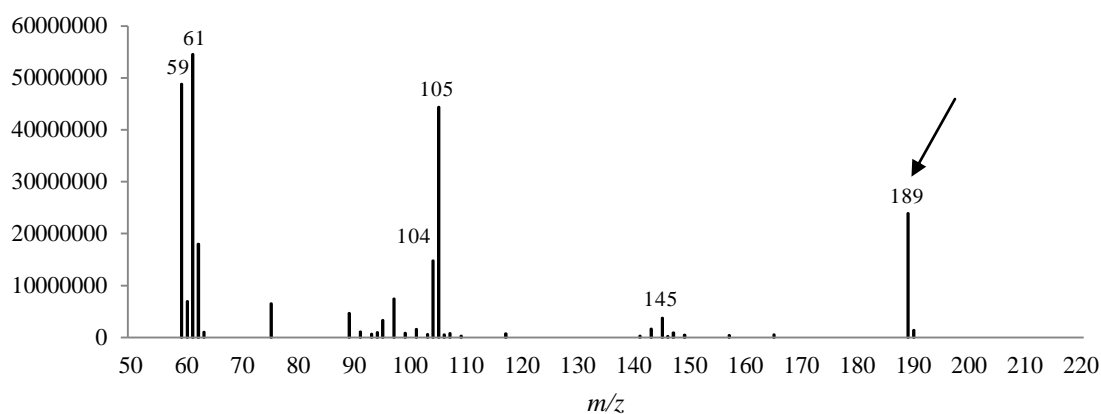


図7 α, α, α -トリフルオロ-*o*-トルイル酸のマススペクトル

スキャン範囲：50～220 m/z 、測定条件：ESI（－）、DP = -35 V

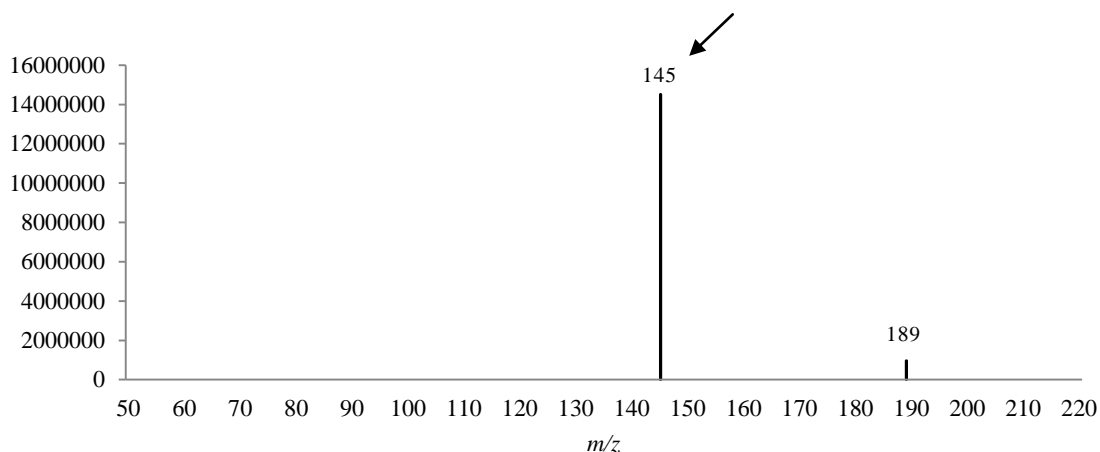


図8 α, α, α -トリフルオロ-*o*-トルイル酸のプロダクトイオンスペクトル（定量用）

プリカーサーイオン： m/z 189、測定条件：ESI（-）、DP = -35 V、CE = -22 eV

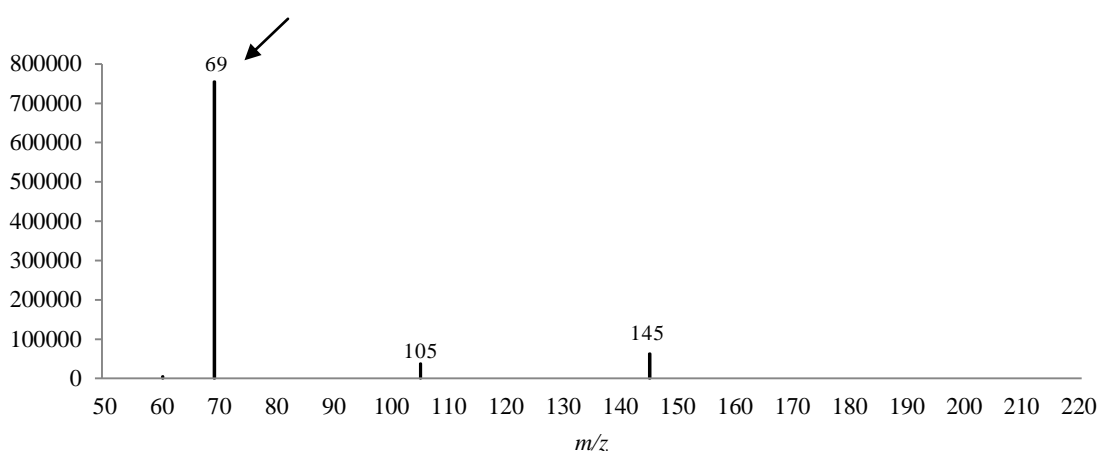


図9 α, α, α -トリフルオロ-*o*-トルイル酸のプロダクトイオンスペクトル（定性用）

プリカーサーイオン： m/z 189、測定条件：ESI（-）、DP = -35 V、CE = -52 eV

2) LC条件の検討

① 移動相条件の検討

移動相に5 mmol/L酢酸アンモニウム溶液と、メタノール、またはアセトニトリルを用いて、アイソクラティックモードで α, α, α -トリフルオロ-*o*-トルイル酸標準溶液を測定し、ピーク形状を比較した。その結果、メタノールを選択した場合には、アセトニトリルの場合に比べてピーク形状が悪かったため、移動相にはアセトニトリルを選択することにした。

次に、水に加える添加剤の種類について検討した。5 mmol/L酢酸アンモニウム溶液、5 mmol/Lギ酸アンモニウム溶液を用いて、 α, α, α -トリフルオロ-*o*-トルイル酸標準溶液を測定し、ピークのS/Nを比較した。表1に示す通り、酢酸アンモニウム溶液を用いた場合にS/Nが約300となり、ギ酸アンモニウム溶液の場合に比べ大きなS/Nが得られた。更に、最適な酢酸アンモニウム溶液の濃度を検討するために、2、5 mmol/Lの酢酸アンモニウム溶液を用いて同様に検討した。その結果、酢酸アンモニウム濃度が2 mmol/Lを用いた方が、ピークのS/Nが大きくなった。以上のことから、添加剤には2 mmol/Lの酢酸アンモニウム溶液を用いることにした。（表2）

表1 各移動相条件における α, α, α -トリフルオロ-*o*-トルイル酸のS/N

移動相	保持時間 (分)	ピークの S/N
アセトニトリル及び 5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 (1:19)混液	4.2	300±24
アセトニトリル及び 5 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液 (1:19)混液	4.2	247±17

10 ng/mL α, α, α -トリフルオロ-*o*-トルイル酸標準溶液（フルトラニルとして）5 μ Lを注入
カラム：InertSustain C18（2.1 x 150 mm, 3 μ m）、流速：0.3 mL/min、 $n = 5$

表2 各移動相条件における α, α, α -トリフルオロ-*o*-トルイル酸のS/N

移動相	保持時間 (分)	ピークの S/N
アセトニトリル及び 2 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 (1:19)混液	4.2	491±32
アセトニトリル及び 5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 (1:19)混液	4.2	289±30

10 ng/mL α, α, α -トリフルオロ-*o*-トルイル酸標準溶液（フルトラニルとして）5 μ Lを注入
カラム：InertSustain C18（2.1 x 150 mm, 3 μ m）、流速：0.3 mL/min、 $n = 5$

② 分析カラムの選定

3種のODSカラムを用いて α, α, α -トリフルオロ-*o*-トルイル酸標準溶液を測定し、ピークのS/Nを指標として分析カラムを選択した。表3に示すように、InertSustain AQ-C18カラムを用いることで、 α, α, α -トリフルオロ-*o*-トルイル酸のピークのS/Nが検討したカラムの中では最大となった。以上のことから、分析カラムは、InertSustain AQ-C18を用いることにした。なお、フルトラニル及び代謝物M4の分析は、測定対象化合物である α, α, α -トリフルオロ-*o*-トルイル酸が最も高感度に測定できた条件で測定することにした。

表3 各分析カラムを用いたときの、 α, α, α -トリフルオロ-*o*-トルイル酸のピークのS/N

カラム	移動相	保持時間 (分)	ピークの S/N
InertSustain AQ-C18 内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μ m (ジーエルサイエンス製)	アセトニトリル及び 2 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液(7:93)混液	4.3	516±39
InertSustain Swift C18 内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μ m (ジーエルサイエンス製)	アセトニトリル及び 2 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液(3:97)混液	4.2	383±31
InertSustain C18 内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μ m (ジーエルサイエンス製)	アセトニトリル及び 2 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液(1:19)混液	4.2	412±20

10 ng/mL α, α, α -トリフルオロ-*o*-トルイル酸標準溶液（フルトラニルとして）5 μ Lを注入
流速：0.3 mL/min、 $n = 5$

3) 検量線

各添加濃度に対する回収率25%、50%、75%、100%、125%、150%に相当する濃度の検量溶液をアセトニトリル及び水（5：95）混液で調製し、5 µLをLC-MS/MSに注入して検量線を作成した。図10には、定量限界濃度（0.01 mg/kg）に対する回収率25%～150%（0.00125～0.0075 mg/L）（フルトラニルとして）に相当する濃度範囲の検量線の例を示した。本濃度範囲で作成した検量線の決定係数 R^2 は0.998以上と良好な直線性が認められた。

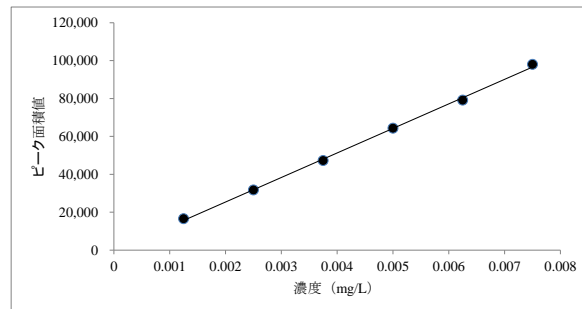


図10 α, α, α -トリフルオロ-*o*-トルイル酸の検量線（フルトラニルとして）の例

$$y = 12,955 x - 547$$

$$R^2 = 0.9989$$

2. 試験溶液調製方法の検討

1) 抽出方法の検討（牛の脂肪の場合のみ）

牛の脂肪からの抽出溶媒には、申請企業の残留分析法¹⁾に準拠して、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリルと*n*-ヘキサンの混合溶媒を用いることにした。はじめに、フルトラニルと代謝物M4標準溶液を用いて、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリルと*n*-ヘキサンの混合溶媒による抽出を行い化合物の各溶媒への移行の挙動を確認した。フルトラニル、代謝物M4 1µgを*n*-ヘキサン50 mLに溶解して、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル50 mLで3回抽出した。得られた*n*-ヘキサン層及びアセトニトリル層を濃縮し、アセトニトリル及び水（1：19）混液10 mLに溶解したものをLC-MS/MSに注入し、回収率を求めた。表4に示すように、フルトラニル及び代謝物M4は、1回の抽出でほぼ100%がアセトニトリル層に抽出されたが、2回目の抽出においてもアセトニトリル層に数%が検出された。このため、抽出は2回行うこととした。

次に、牛の脂肪に0.1 mg/kgとなるように、フルトラニルまたは代謝物M4を添加した試料を調製して、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリルと*n*-ヘキサンにより、2回抽出して回収率を求めた。なお、牛の脂肪は、約40°Cの湯浴で融解し添加用標準溶液を添加し混合後、-30°Cで30分間放置して固化して調製した。試料を*n*-ヘキサン50 mLに溶解し、無水硫酸ナトリウム20 gを添加後に、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル50 mL及び40 mLで2回ホモジナイズ抽出し、遠心分離（3,000 rpm、5分間）した。得られたアセトニトリルを合わせて濃縮した後に、アセトニトリル及び水（1：19）混液10 mLに溶解したものをLC-MS/MSで測定した。なお、回収率は、マトリックス添加標準溶液から得られたピーク面積値に対する添加試料から得られたピーク面積値の比を求め回収率とした。表5に示すように、上記の方法において、フルトラニル、代謝物M4共に、約100%と良好な回収率が得られた。

表4 アセトニトリル/*n*-ヘキサン分配の検討結果

	回収率 (%)				合計
	<i>n</i> -ヘキサン層	アセトニトリル層			
	50 mL	50 mL (1回目)	50 mL (2回目)	50 mL (3回目)	
フルトラニル	0	99	2	0	101
代謝物 M4	0	99	1	0	100

添加量：1 µg (フルトラニルとして)

表5 脂肪からの抽出結果

	フルトラニル	代謝物 M4
回収率* (%)	99	98

*添加試料から得られたピーク面積値/マトリックス添加標準溶液のピーク面積値 x 100
 添加濃度：0.01 mg/kg (フルトラニルとして)

2) アルカリ加水分解条件の検討

申請企業の残留分析法により示されている脂肪以外の食品を対象としたフルトラニル分析法¹⁾では、試料に50 w/w%水酸化ナトリウム溶液を添加してアルカリ加水分解し、フルトラニル及びその複数の代謝物を共通の加水分解物である α , α , α -トリフルオロ-*o*-トルイル酸に変換して、本化合物を測定している。そこで、本検討においても、申請企業の残留分析法に準拠し、上記と同様に試料を直接アルカリ加水分解して、その加水分解物を測定する方法を検討した。

申請企業の残留分析法では、筋肉、乳、鶏卵の場合、200°Cの加熱条件で3~4時間を加水分解条件としている。はじめに、市販されている50 mL容PTFE製容器を用いて、牛の筋肉10.0 gに、50 w/w%水酸化ナトリウム溶液10 mLを加えて加熱し、加水分解条件の検討を行なったところ、200°Cまで加熱すると、10分程度で試料が漏出した。加水分解時には容器内の圧力を下げるために、反応容器の上部に冷却剤を載せて反応を行ったが、一部の容器からは試料が漏出した。このため、200°Cの加熱条件でも試料がリークしない耐圧性に優れたPTFE製容器(75 mL容)を容器メーカーの協力を得て開発して、本容器を用いて検討した。なお、本PTFE製容器は、現在市販品として販売されている。本反応容器を用いる際にも、容器内の圧力を下げて容器からの試料の漏出を防ぐために、上部に冷却剤を載せて反応を行った。冷却剤は、一般に食品の保存に使用される保冷剤を用いた。牛の筋肉10.0 gに50 w/w%水酸化ナトリウム溶液10 mLを加えて、200°Cの加熱条件で2~7時間のアルカリ加水分解を行い、得られる α , α , α -トリフルオロ-*o*-トルイル酸の回収率から適切な加熱時間を検討した。なお、フルトラニルの添加濃度は0.1 mg/kgとし、回収率は各時間のマトリックス添加標準溶液と添加試料のピーク面積の比から求めた。図11に示したように、加熱時間に依存して、回収率が上昇し、5時間以上で100%程度となった。多様な形態の食品試料にも十分に適用が可能となるように、余裕を見て、反応時間を6時間に設定した。なお、牛の乳の場合は、申請企業の残留分析法に準拠して、固体の水酸化ナトリウムを加えて加水分解することにした。また、反応後の容器を放冷すると、筋肉、肝臓、うなぎの場合には、試料がゲル化することがあったが、硫酸の添加により溶解した。

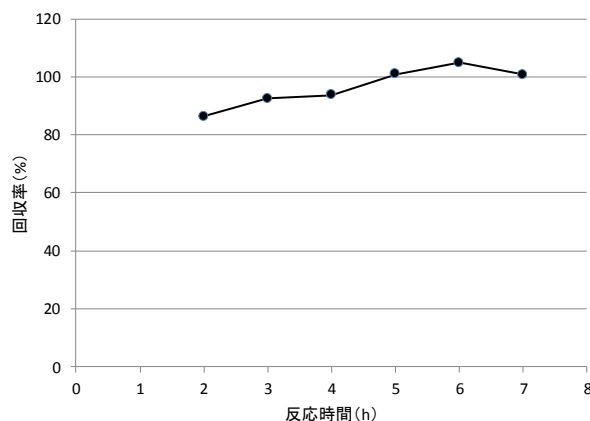


図11 各反応時間における α, α, α -トリフルオロ-*o*-トルイル酸の回収率*

フルトラニルの添加濃度：0.1 mg/kg

*添加試料から得られたピーク面積値/マトリックス添加標準溶液のピーク面積値 x 100

3) α, α, α -トリフルオロ-*o*-トルイル酸の濃縮方法の検討

α, α, α -トリフルオロ-*o*-トルイル酸の蒸気圧に関する物性値は文献等には示されていないが、比較的、低分子であることから、濃縮操作により揮散することが危惧された。本化合物の位置異性体である α, α, α -トリフルオロ-*m*-トルイル酸の蒸気圧を調査したところ、 9.9×10^{-3} mmHgと非常に高い蒸気圧をもつことが分かった。このため、通常の濃縮操作により α, α, α -トリフルオロ-*o*-トルイル酸の揮散が見られるかを確認した。1 $\mu\text{g/mL}$ α, α, α -トリフルオロ-*o*-トルイル酸0.1 mL (100 ng相当) に酢酸エチル及び*n*-ヘキサン混液40 mL加えて、40°Cで1 mL程度になるまで濃縮して、窒素ガスにより乾固した場合と、上記の溶液にキーパーとして2 vol%ジエチレングリコール・アセトン溶液0.5 mLを加えて同様に濃縮操作した場合とで、回収率を比較した。表6に示すように、キーパーとして2 vol%ジエチレングリコールを添加しないと、回収率が10%程度低下することが分かった。このため、濃縮操作の際には、揮散を防止するために2 vol%ジエチレングリコール0.5 mLを加えてから、濃縮することにした。

表6 α, α, α -トリフルオロ-*o*-トルイル酸の濃縮結果

濃縮溶媒	ピーク面積値	回収率 (%)
酢酸エチル及び <i>n</i> -ヘキサン(1:1)混液 40 mL	46,400	86
酢酸エチル及び <i>n</i> -ヘキサン(1:1)混液 40 mL + 2 vol%ジエチレングリコール 0.5 mL	51,800	96
酢酸エチル及び <i>n</i> -ヘキサン(1:9)混液 40 mL	47,500	88
酢酸エチル及び <i>n</i> -ヘキサン(1:9)混液 40 mL + 2 vol%ジエチレングリコール 0.5 mL	52,800	98

α, α, α -トリフルオロ-*o*-トルイル酸の添加量：100 ng (フルトラニルとして)

4) 転溶方法の検討

加水分解後に行う転溶操作について検討した。申請企業の残留分析法では、加水分解後の加水分解物に硫酸を加えてpH 1以下の酸性条件とした後、ジクロロメタンに転溶する方法を採用している。本検討では、ジクロロメタンの代わりに酢酸エチル及び*n*-ヘキサン混液を用いて転溶する方法を検討した。50 w/w%水酸化ナトリウム溶液10 mLに、 α, α, α -トリフルオロ-*o*-トルイル酸 0.1 μg を添加した。この溶液に、水50 mL、30 vol%硫酸20 mL、アセトン 5 mLを攪拌しながら加えた後、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (1 : 9) 混液で50、40、40 mLずつで3回抽出した。得られた有機層に2 vol%ジエチレングリコール・アセトン溶液0.5 mLを加えて濃縮した後、アセトニトリル及び水 (5 : 95) 混液を加えて、正確に10 mLとした。表6に、各抽出回における回収率 (%)を示した。 α, α, α -トリフルオロ-*o*-トルイル酸は1回目、2回目の抽出で、それぞれ、87%、11%が回収されたが、3回目の抽出では検出されなかった。以上のことから、転溶操作は酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (1 : 9) 混液50 mL、40 mLで2回行うことにした。

表7 酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (1 : 9) 混液への転溶の検討

	回収率 (%)			
	酢酸エチル及び <i>n</i> -ヘキサン (1 : 9) 混液			合計
	50 mL (1回目)	40 mL (2回目)	40 mL (3回目)	
α, α, α -トリフルオロ- <i>o</i> -トルイル酸	87	11	0	98

添加量 : 0.1 μg (フルトラニルとして)

5) カラム精製方法の検討

申請企業の残留分析法¹⁾では、加水分解後の反応溶液からジクロロメタンで抽出した α, α, α -トリフルオロ-*o*-トルイル酸をヨードメタンでメチル化して、アルミナカラムで精製する方法を用いている。本検討では、LC-MS/MSを用いて、 α, α, α -トリフルオロ-*o*-トルイル酸を直接測定するため、煩雑な誘導体化の操作の必要はない。はじめに、トリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムによる精製方法を検討した。予め、ミニカラムに酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (1 : 9) 混液5 mLを注入し、流出液は捨てた。このカラムに、10 ng/mL α, α, α -トリフルオロ-*o*-トルイル酸溶液 (酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (1 : 9) 混液) 10 mLを負荷し、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (1 : 9) 混液、アセトン、メタノール、アンモニア水及びメタノール (1 : 99) 混液で溶出したときの溶出状況を表8に示した。 α, α, α -トリフルオロ-*o*-トルイル酸は、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (1 : 9) 混液、アセトン、メタノールでは溶出されず、アンモニア水及びメタノール (1 : 99) 混液5 mLで溶出された。以上のことから、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (1 : 9) 混液10 mLで負荷した後、アセトン5 mL、メタノール10 mLでカラムを洗浄し、アンモニア水及びメタノール (1 : 99) 混液10 mLで溶出することにした。

表8 トリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムからの溶出状況

	回収率 (%)									合計 (%)
	酢酸エチル及びヘキサン (1:9) 混液		アセトン	メタノール			アンモニア水及びメタノール (1:99) 混液			
	10 mL (負荷)	5 mL	5 mL	0-5 mL	5-10 mL	10-15 mL	0-5 mL	5-10 mL	10-15 mL	
α, α, α-トリフルオロ- <i>o</i> -トルイル酸	0	0	0	0	0	0	97	0	0	97

InertSep SAX (6 mL、500 mg、GLサイエンス製)

添加量：1 ng (フルトラニルとして)

3. 添加回収試験

畜水産物7食品 (牛の筋肉・脂肪・肝臓・乳、鶏卵、うなぎ、しじみ) を用いて、[実験方法] 7. 試験溶液の調製に示す方法に従い、基準値濃度及び定量限界濃度 (0.01 mg/kg) (フルトラニルとして) の2濃度でフルトラニル及び代謝物M4の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11~24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に示した。

1) 選択性の評価

選択性の評価結果を表9、10に示した。牛の乳、鶏卵、しじみのブランク試料から、α, α, α-トリフルオロ-*o*-トルイル酸と同じ保持時間にピークが観察されたが、基準値濃度に対するピーク面積の1/10以下であったことから選択性は問題がないと判断した。なお、これらのブランク試料から検出されたピークは定性イオン (m/z 189→69) では検出されなかった。その他の食品では、α, α, α-トリフルオロ-*o*-トルイル酸の定量を妨害するピークは検出されなかった。

表9 選択性の評価 (基準値濃度)

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 [検出限界] (mg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 (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	フルトラニル	牛の筋肉	0.01	0.05	0.05	基準値 0.05	< 0.100	面積	0	0	0	334190	321540	327865	0.000	○	
		牛の脂肪	0.01	0.1	0.1	基準値 0.1	< 0.100	面積	0	0	0	411630	413850	412740	0.000	○	
		牛の肝臓	0.01	0.2	0.2	基準値 0.2	< 0.100	面積	0	0	0	860990	829350	845170	0.000	○	
		牛の乳	0.01	0.05	0.05	基準値 0.05	< 0.100	面積	4302	3788	4045	211070	213090	212080	0.019	○	
		鶏卵	0.01	0.05	0.05	基準値 0.05	< 0.100	面積	2620	2400	2510	200640	199280	199960	0.013	○	
		うなぎ	0.01	2.	2.	基準値 2.	< 0.100	面積	0	0	0	6876600	6713100	6794850	0.000	○	
		しじみ	0.01	2.	2.	基準値 2.	< 0.100	面積	1940	1900	1920	8985700	8989000	8987350	0.000	○	
2	代謝物M4	牛の筋肉	0.01	0.05	0.05	基準値 0.05	< 0.100	面積	0	0	0	334190	321540	327865	0.000	○	
		牛の脂肪	0.01	0.1	0.1	基準値 0.1	< 0.100	面積	0	0	0	411630	413850	412740	0.000	○	
		牛の肝臓	0.01	0.2	0.2	基準値 0.2	< 0.100	面積	0	0	0	860990	829350	845170	0.000	○	
		牛の乳	0.01	0.05	0.05	基準値 0.05	< 0.100	面積	4302	3788	4045	211070	213090	212080	0.019	○	
		鶏卵	0.01	0.05	0.05	基準値 0.05	< 0.100	面積	2620	2400	2510	200640	199280	199960	0.013	○	
		うなぎ	0.01	2.	2.	基準値 2.	< 0.100	面積	0	0	0	6876600	6713100	6794850	0.000	○	
		しじみ	0.01	2.	2.	基準値 2.	< 0.100	面積	1940	1900	1920	8985700	8989000	8987350	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。

表10 選択性の評価（定量限界濃度）

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 [検出限界] (mg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 (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	フルトラニル	牛の筋肉	0.01	0.05	0.01	基準値	0.05	< 0.100	面積	0	0	0	39047	37664	38356	0.000	○	
		牛の脂肪	0.01	0.1	0.01	基準値	0.1	< 0.100	面積	0	0	0	37264	35732	36498	0.000	○	
		牛の肝臓	0.01	0.2	0.01	基準値	0.2	< 0.100	面積	0	0	0	38611	39190	38901	0.000	○	
		牛の乳	0.01	0.05	0.01	基準値	0.05	< 0.100	面積	3185	3292	3239	42146	43285	42716	0.082	○	
		鶏卵	0.01	0.05	0.01	基準値	0.05	< 0.100	面積	2174	1961	2068	38729	38381	38555	0.057	○	
		うなぎ	0.01	2.	0.01	基準値	2.	< 0.100	面積	0	0	0	32963	31942	32453	0.000	○	
		しじみ	0.01	2.	0.01	基準値	2.	< 0.100	面積	1540	1860	1700	37138	37537	37338	0.048	○	
2	代謝物M4	牛の筋肉	0.01	0.05	0.01	基準値	0.05	< 0.100	面積	0	0	0	39047	37664	38356	0.000	○	
		牛の脂肪	0.01	0.1	0.01	基準値	0.1	< 0.100	面積	0	0	0	37264	35732	36498	0.000	○	
		牛の肝臓	0.01	0.2	0.01	基準値	0.2	< 0.100	面積	0	0	0	38611	39190	38901	0.000	○	
		牛の乳	0.01	0.05	0.01	基準値	0.05	< 0.100	面積	3185	3292	3239	42146	43285	42716	0.082	○	
		鶏卵	0.01	0.05	0.01	基準値	0.05	< 0.100	面積	2174	1961	2068	38729	38381	38555	0.057	○	
		うなぎ	0.01	2.	0.01	基準値	2.	< 0.100	面積	0	0	0	32963	31942	32453	0.000	○	
		しじみ	0.01	2.	0.01	基準値	2.	< 0.100	面積	1540	1860	1700	37138	37537	37338	0.048	○	

*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

基準値濃度及び定量限界濃度（0.01 mg/kg）における真度、精度の検討結果を表11、12に示した。基準値濃度での真度及び併行精度は、フルトラニルでそれぞれ90～104%及び2.3～4.8%、代謝物M4でそれぞれ90～103%及び1.2～6.0%であった。また、定量限界濃度での真度及び併行精度は、フルトラニルでそれぞれ90～107%及び1.5～6.6%、代謝物M4でそれぞれ88～105%及び1.1～8.9%であった。検討した両添加濃度ともに、ガイドラインの目標値を十分に満たした。また、定量限界濃度における添加試料のピークのS/Nの平均値は、フルトラニルで143～334、代謝物M4で132～253であり、S/N≥10以上を十分に満たした。なお、代謝物M4の加水分解条件の検討は実施していないが、添加回収試験の結果、検討したすべての食品で良好な真度及び精度が得られた。このため、フルトラニルと同様の加水分解条件で十分に、 α 、 α -トリフルオロ-*o*-トルイル酸に変換されたものと考えられた。

表11 真度、精度の評価（基準値濃度）

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 [検出限界] (mg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	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	フルトラニル	牛の筋肉	0.01	0.05	0.05	12407	5625	0.9972	99.3	99.1	101.3	97.8	
牛の脂肪	0.01	0.1	0.1	8253	3763			0.9997	90.0	86.5	90.8	90.9	91.7	90.0	2.3	1420.0	1192.0	1306.0	
牛の肝臓	0.01	0.2	0.2	8034	27965			0.9983	101.1	108.9	110.4	99.0	102.1	104.3	4.8	2869.0	2718.0	2793.5	
牛の乳	0.01	0.05	0.05	8117	2141			0.9986	97.8	104.6	101.9	109.3	103.6	103.5	4.0	1259.0	1077.0	1168.0	
鶏卵	0.01	0.05	0.05	7660	-465			0.9995	105.2	98.8	97.9	107.2	103.1	102.4	3.9	1435.0	1130.0	1282.5	
うなぎ	0.01	2.	2.	6318	235613			0.9963	99.9	101.2	93.0	96.7	99.1	98.0	3.3	13884.0	9450.0	11667.0	
しじみ	0.01	2.	2.	8597	212780			0.9980	97.8	102.4	104.4	106.5	101.1	102.4	3.2	20133.0	16108.0	18120.5	
2	代謝物M4	牛の筋肉	0.01	0.05	0.05	12407	5625	0.9972	102.1	101.1	101.7	99.2	100.3	100.9	1.2	2344.0	1636.0	1990.0	
		牛の脂肪	0.01	0.1	0.1	8253	3763	0.9997	88.8	90.7	88.7	88.5	90.8	89.5	1.3	1416.0	1023.0	1219.5	
		牛の肝臓	0.01	0.2	0.2	8034	27965	0.9983	98.6	98.6	97.9	98.8	101.9	99.1	1.6	2055.0	1650.0	1852.5	
		牛の乳	0.01	0.05	0.05	8117	2141	0.9986	100.4	98.4	104.7	99.7	104.6	101.6	2.9	1241.0	1094.0	1167.5	
		鶏卵	0.01	0.05	0.05	7660	-465	0.9995	96.4	104.6	101.7	89.2	98.6	98.1	6.0	895.0	845.0	870.0	
		うなぎ	0.01	2.	2.	6318	235613	0.9963	98.4	98.4	97.3	98.7	90.0	96.6	3.8	22423.0	12767.0	17595.0	
		しじみ	0.01	2.	2.	8597	212780	0.9980	104.3	104.2	106.4	103.0	97.5	103.1	3.3	38026.0	24916.0	31471.0	

*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（Min.）のそれぞれのS/Nを求める。

表12 真度、精度の評価（定量限界濃度）

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 [検出限界] (mg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	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	フルトラニル	牛の筋肉	0.01	0.05	0.01	7449	157	0.9995	102.1	107.4	100.5	100.3	102.5	102.6	2.8	444.0	224.0	334.0	
		牛の脂肪	0.01	0.1	0.01	7302	107	0.9967	92.1	90.8	80.3	90.6	96.3	90.0	6.6	187.0	137.0	162.0	
		牛の肝臓	0.01	0.2	0.01	7504	-212	0.9996	107.1	99.0	99.3	96.5	97.5	99.9	4.2	169.0	138.0	153.5	
		牛の乳	0.01	0.05	0.01	8425	-227	0.9994	103.0	108.7	101.3	109.3	108.7	106.2	3.5	173.0	171.0	172.0	
		鶏卵	0.01	0.05	0.01	7333	-327	0.9993	108.7	104.6	109.1	107.0	103.7	106.6	2.3	285.0	223.0	254.0	
		うなぎ	0.01	2.	0.01	6460	-192	0.9985	104.0	106.5	93.7	106.6	106.8	103.5	5.4	212.0	82.0	147.0	
		しじみ	0.01	2.	0.01	7639	-977	0.9982	105.9	105.7	109.3	108.8	107.5	107.4	1.5	183.0	103.0	143.0	
2	代謝物M4	牛の筋肉	0.01	0.05	0.01	7449	157	0.9995	95.5	96.7	102.2	99.8	98.3	98.5	2.7	291.0	138.0	214.5	
		牛の脂肪	0.01	0.1	0.01	7302	107	0.9967	75.2	93.3	91.1	94.5	86.6	88.1	8.9	173.0	156.0	164.5	
		牛の肝臓	0.01	0.2	0.01	7504	-212	0.9996	87.6	87.4	88.6	86.8	90.0	88.1	1.4	151.0	148.0	149.5	
		牛の乳	0.01	0.05	0.01	8425	-227	0.9994	107.1	102.2	104.1	105.2	105.4	104.8	1.7	297.0	209.0	253.0	
		鶏卵	0.01	0.05	0.01	7333	-327	0.9993	102.4	102.1	100.8	103.4	103.6	102.5	1.1	217.0	174.0	195.5	
		うなぎ	0.01	2.	0.01	6460	-192	0.9985	102.9	100.5	105.6	90.6	101.0	100.1	5.7	176.0	92.0	134.0	
		しじみ	0.01	2.	0.01	7639	-977	0.9982	101.5	98.9	98.6	103.7	103.2	101.2	2.3	143.0	120.0	131.5	

*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 (Min.) 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13、14に示した。添加回収試験における回収率100%相当濃度と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。その結果、ピーク面積比は基準値濃度では、0.99~1.03であり、定量限界濃度では、0.99~1.05であったことから、本法は試料由来のマトリックスの影響をほとんど受けずに測定することが可能と考えられた。

表13 試料マトリックスの測定への影響（基準値濃度）

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 [検出限界] (mg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	標準溶液 濃度 ¹ (mg/L)	ピーク面積(高さ) ²							備考		
							面積又は 高さの別	ブランク ³	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	フルトラニル	牛の筋肉	0.01	0.05	0.05	0.025	面積	0	334190	321540	327865	322240	325860	324050	1.01	
		牛の脂肪	0.01	0.1	0.1	0.05	面積	0	411630	413850	412740	416690	407480	412085	1.00	
		牛の肝臓	0.01	0.2	0.2	0.1	面積	0	860990	829350	845170	850140	851990	851065	0.99	
		牛の乳	0.01	0.05	0.05	0.025	面積	4054	211070	213090	208026	209420	208360	208890	1.00	
		鶏卵	0.01	0.05	0.05	0.025	面積	2510	200640	199280	197450	192480	190720	191600	1.03	
		うなぎ	0.01	2.	2.	1	面積	0	6876600	6713100	6794850	6837800	6657600	6747700	1.01	
		しじみ	0.01	2.	2.	1	面積	1920	8985700	8989000	8985430	8993400	9028500	9010950	1.00	
2	代謝物M4	牛の筋肉	0.01	0.05	0.05	0.025	面積	0	334190	321540	327865	322240	325860	324050	1.01	
		牛の脂肪	0.01	0.1	0.1	0.05	面積	0	411630	413850	412740	416690	407480	412085	1.00	
		牛の肝臓	0.01	0.2	0.2	0.1	面積	0	860990	829350	845170	850140	851990	851065	0.99	
		牛の乳	0.01	0.05	0.05	0.025	面積	4054	211070	213090	208026	209420	208360	208890	1.00	
		鶏卵	0.01	0.05	0.05	0.025	面積	2510	200640	199280	197450	192480	190720	191600	1.03	
		うなぎ	0.01	2.	2.	1	面積	0	6876600	6713100	6794850	6837800	6657600	6747700	1.01	
		しじみ	0.01	2.	2.	1	面積	1920	8985700	8989000	8985430	8993400	9028500	9010950	1.00	

*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14 試料マトリックスの測定への影響（定量限界濃度）

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 [検出限界] (mg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	標準溶液 濃度 ¹ (mg/L)	ピーク面積(高さ) ²							備考		
							面積又は 高さの別	ブランク ³	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	フルトラニル	牛の筋肉	0.01	0.05	0.01	0.005	面積	0	39047	37664	38356	36663	37422	37043	1.04	
		牛の脂肪	0.01	0.1	0.01	0.005	面積	0	37264	35732	36498	35650	33923	34787	1.05	
		牛の肝臓	0.01	0.2	0.01	0.005	面積	0	38611	39190	38901	37376	37211	37294	1.04	
		牛の乳	0.01	0.05	0.01	0.005	面積	3239	42146	43285	39477	41998	41253	41626	0.95	
		鶏卵	0.01	0.05	0.01	0.005	面積	2068	38729	38381	36487	37094	35833	36464	1.00	
		うなぎ	0.01	2.	0.01	0.005	面積	0	32963	31942	32453	30755	31386	31071	1.04	
		しじみ	0.01	2.	0.01	0.005	面積	1700	37138	37537	35638	36147	35528	35838	0.99	
2	代謝物M4	牛の筋肉	0.01	0.05	0.01	0.005	面積	0	39047	37664	38356	36663	37422	37043	1.04	
		牛の脂肪	0.01	0.1	0.01	0.005	面積	0	37264	35732	36498	35650	33923	34787	1.05	
		牛の肝臓	0.01	0.2	0.01	0.005	面積	0	38611	39190	38901	37376	37211	37294	1.04	
		牛の乳	0.01	0.05	0.01	0.005	面積	3239	42146	43285	39477	41998	41253	41626	0.95	
		鶏卵	0.01	0.05	0.01	0.005	面積	2068	38729	38381	36487	37094	35833	36464	1.00	
		うなぎ	0.01	2.	0.01	0.005	面積	0	32963	31942	32453	30755	31386	31071	1.04	
		しじみ	0.01	2.	0.01	0.005	面積	1700	37138	37537	35638	36147	35528	35838	0.99	

*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。

[結論]

牛の脂肪の場合は、フルトラニル及び代謝物M4を試料から*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル及び*n*-ヘキサン混液によりホモジナイズして、アセトニトリル層に2回抽出して、アセトニトリル層を濃縮する。筋肉、肝臓、腎臓、乳、卵、魚介類及び上記の脂肪の抽出物に、水酸化ナトリウム溶液、または固体の水酸化ナトリウムを直接加えて、200℃で6時間加熱し、フルトラニル及び代謝物M4を α, α, α -トリフルオロ-*o*-トルイル酸に加水分解する。反応容器を放冷し室温に戻した後、加水分解物に硫酸を加えて酸性にして、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン混液に転溶する。トリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲル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開発した。

開発した分析法を、基準値濃度及び定量限界濃度の2濃度で、牛の筋肉・脂肪・肝臓・乳、鶏卵、うなぎ、しじみの7食品に適用した。真度及び併行精度（RSD%）は、基準値濃度では、フルトラニルでそれぞれ90～104%及び2.3～4.8%、代謝物M4でそれぞれ90～103%及び1.2～6.0%であった。また、定量限界濃度での真度及び併行精度は、フルトラニルでそれぞれ90～107%及び1.5～6.6%、代謝物M4でそれぞれ88～105%及び1.1～8.9%と良好な結果が得られた。

一部の検討試料から、 α, α, α -トリフルオロ-*o*-トルイル酸と同じ保持時間にピークが検出されたが、ピーク面積がマトリックス添加標準溶液の1/10を大きく下回ることから、選択性は問題ないと判断した。また、各食品におけるマトリックス添加標準溶液に対する溶媒標準溶液のピーク面積比は、基準値濃度では0.99～1.03であり、定量限界濃度では0.99～1.05であったことから、本法は試料由来のマトリックスの影響をほとんど受けずに測定することが可能と考えられた。

以上のことから、開発した分析法は、畜水産物中のフルトラニル及び代謝物M4を添加濃度及び定量限界濃度（0.01 mg/kg）で精度良く定量することが可能であると考えられた。

[参考文献]

1) Independent laboratory validation of an analytical method for residues of flutolanil in milk, eggs, beef muscle and fat, rice grain, and peanut meat and hay, Report AU95R005, Analytical Development Corp, USA, 1998.

添加回収試験における代表的なクロマトグラム（添加濃度：基準値濃度）

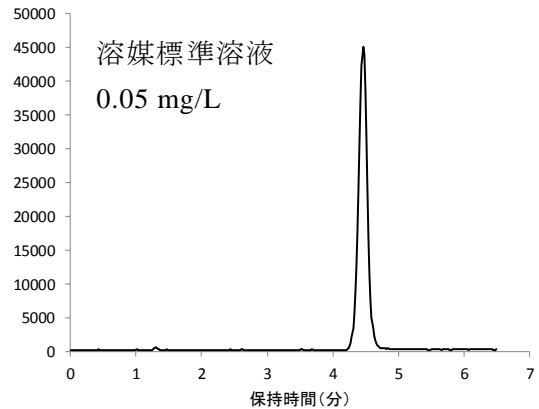
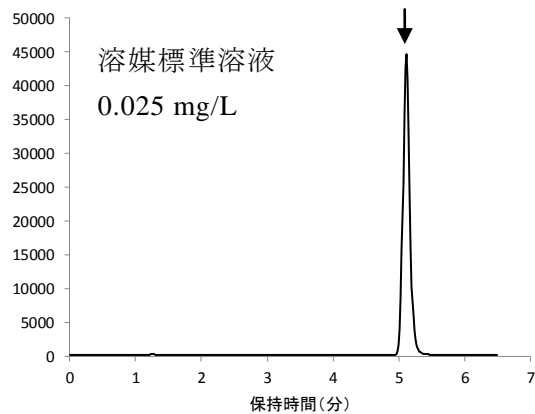
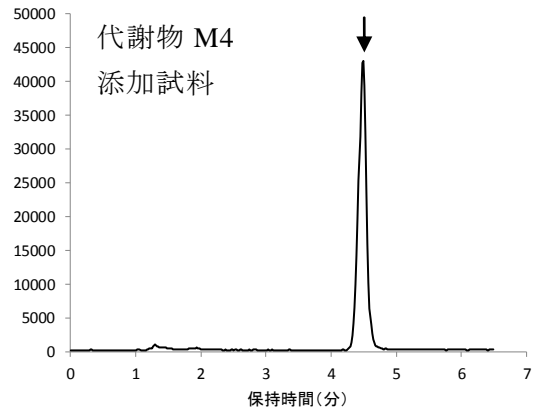
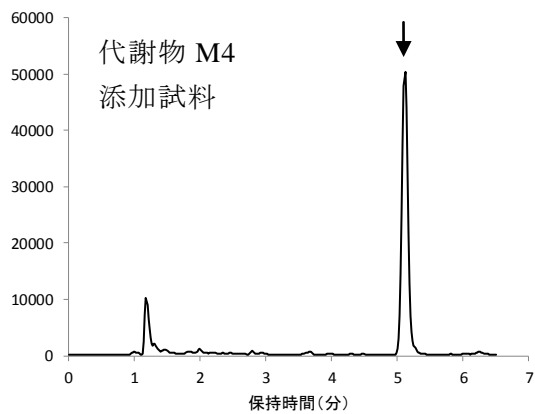
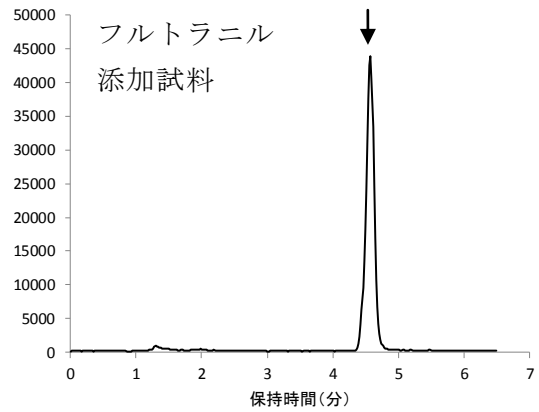
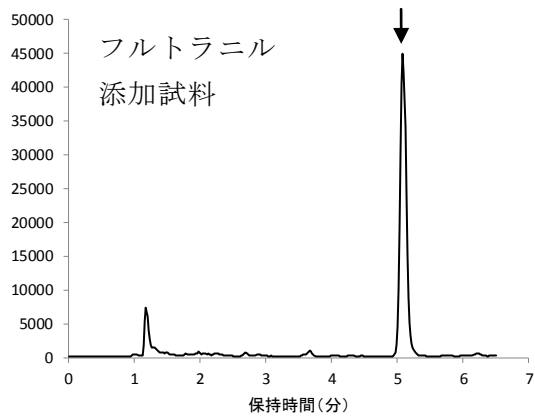
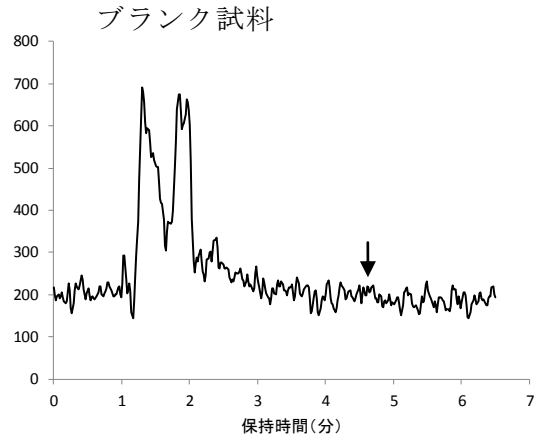
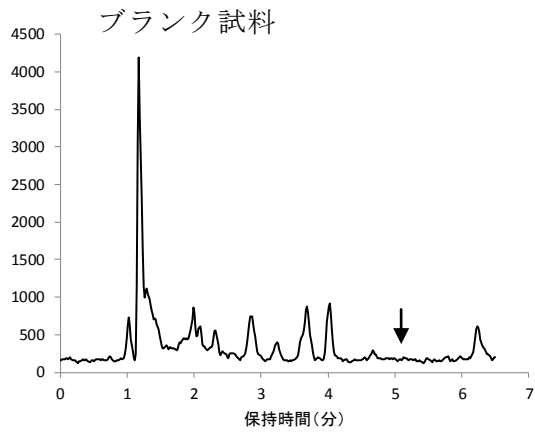


図11 牛の筋肉のSRMクロマトグラム

α, α, α -トリフルオロ-*o*-トルイル酸 (m/z 189→145) 添加濃度：0.05 mg/kg

図12 牛の脂肪のSRMクロマトグラム

α, α, α -トリフルオロ-*o*-トルイル酸 (m/z 189→145) 添加濃度：0.2 mg/kg

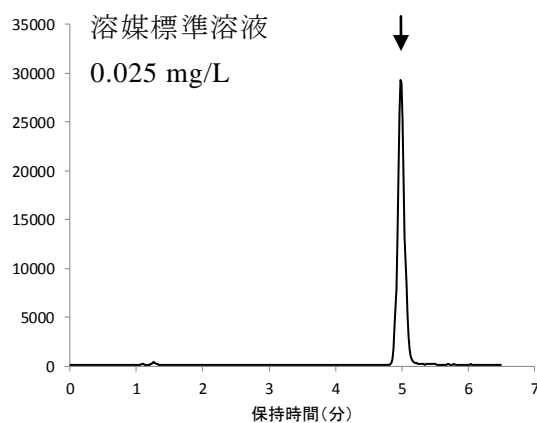
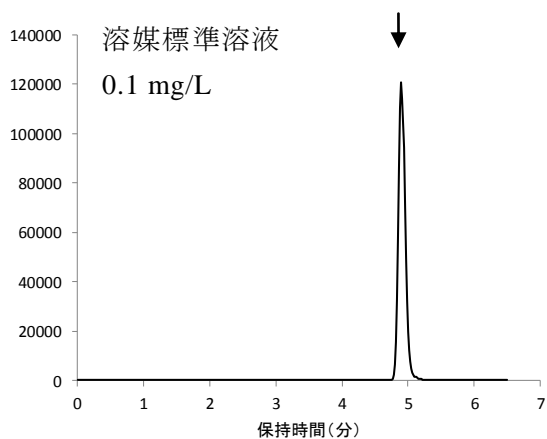
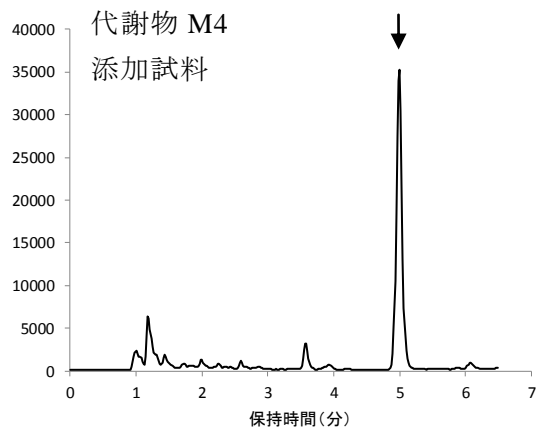
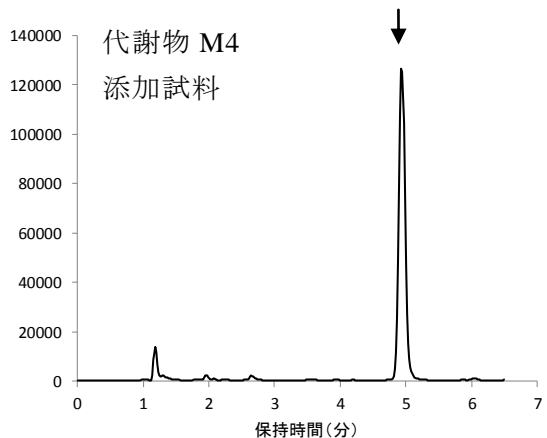
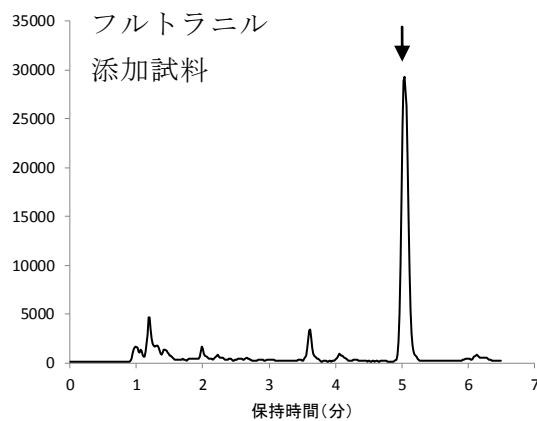
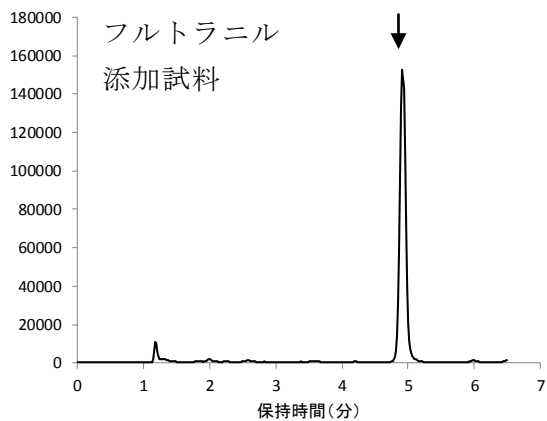
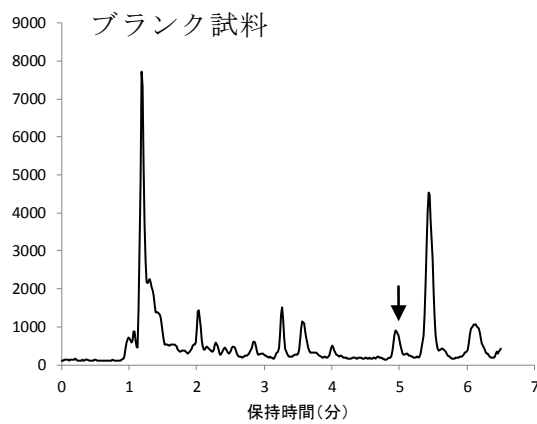
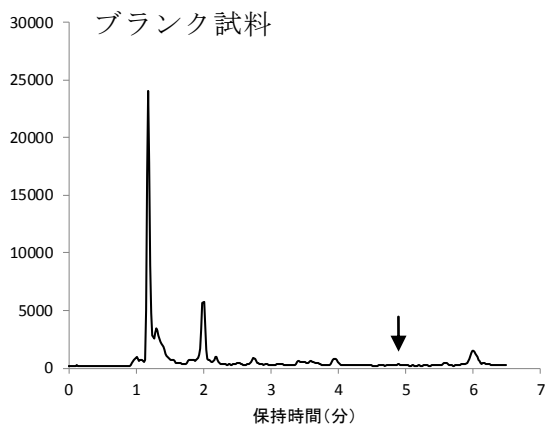


図13 牛の肝臓のSRMクロマトグラム
 α, α, α -トリフルオロ-*o*-トルイル酸 (m/z 189→145) 添加濃度：0.2 mg/kg

図14 牛の乳のSRMクロマトグラム
 α, α, α -トリフルオロ-*o*-トルイル酸 (m/z 189→145) 添加濃度：0.05 mg/kg

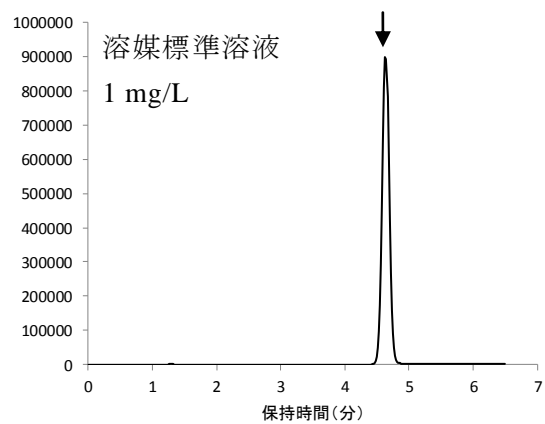
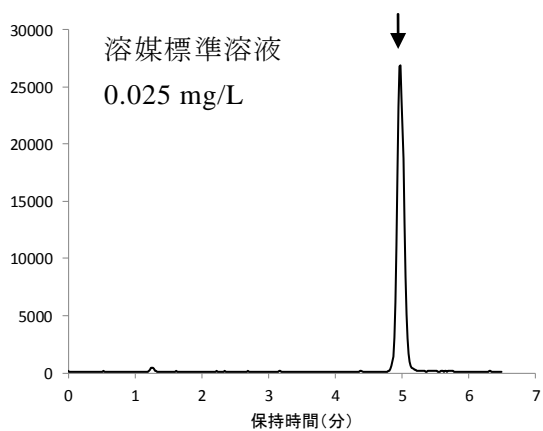
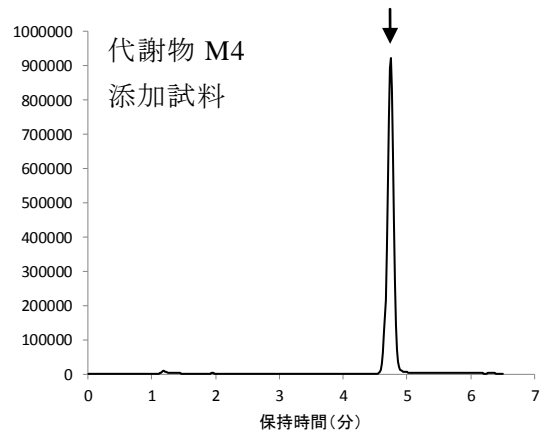
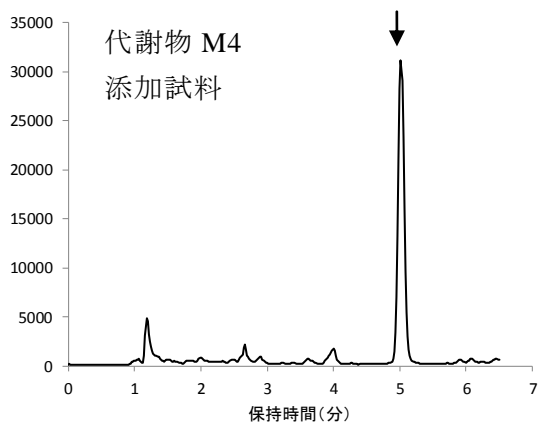
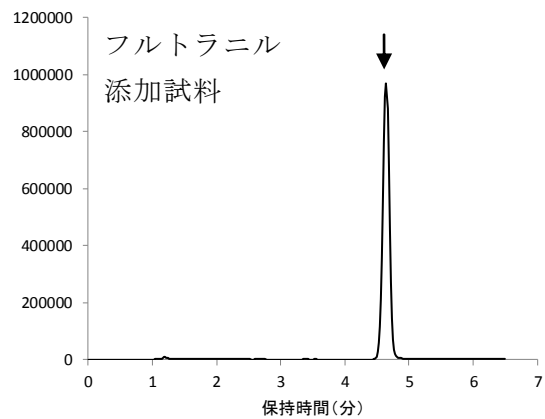
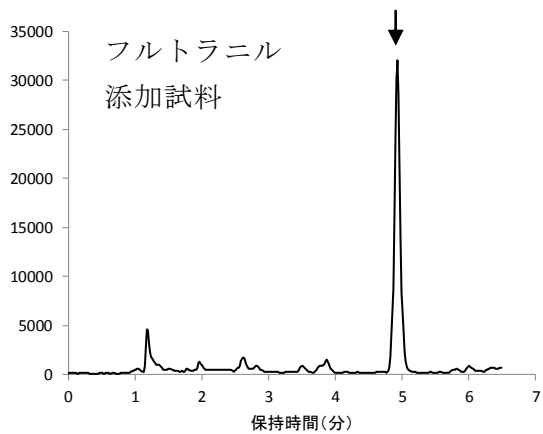
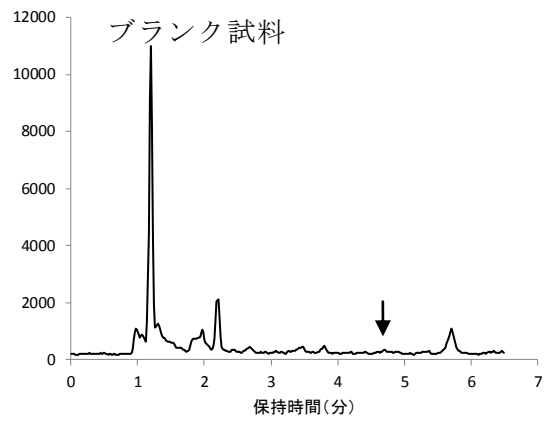
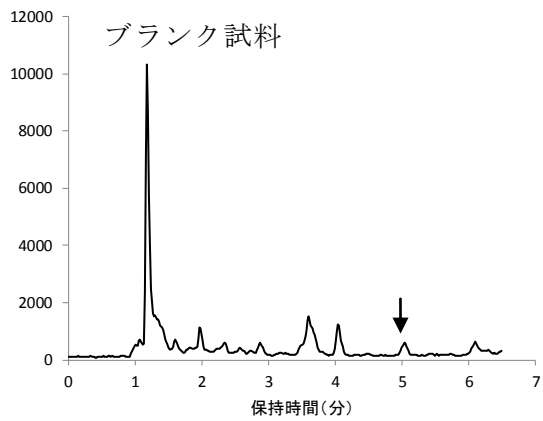


図15 鶏卵のSRMクロマトグラム

α, α, α -トリフルオロ-*o*-トルイル酸 (m/z 189→145) 添加濃度：0.05 mg/kg

図16 うなぎのSRMクロマトグラム

α, α, α -トリフルオロ-*o*-トルイル酸 (m/z 189→145) 添加濃度：2 mg/kg

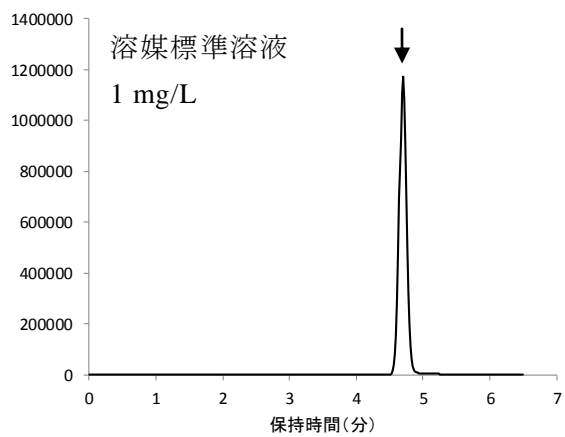
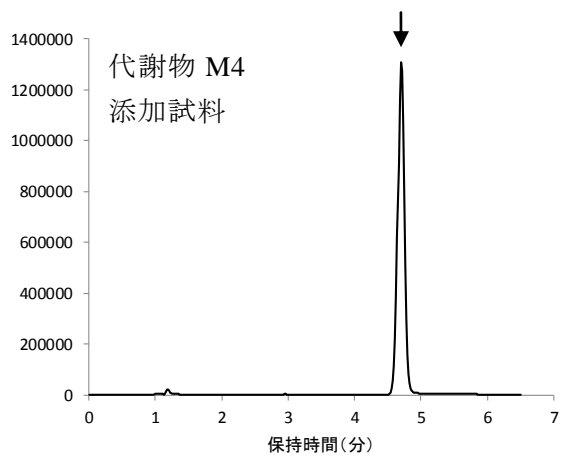
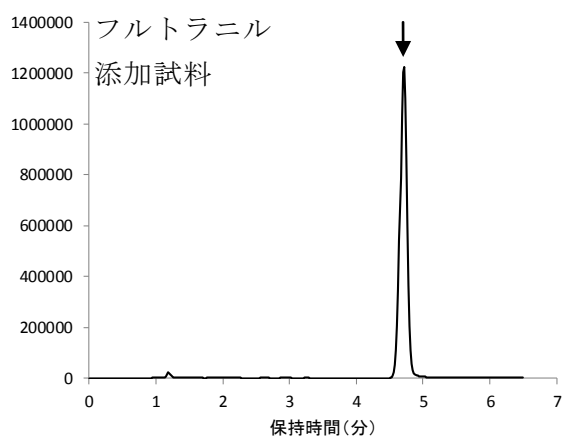
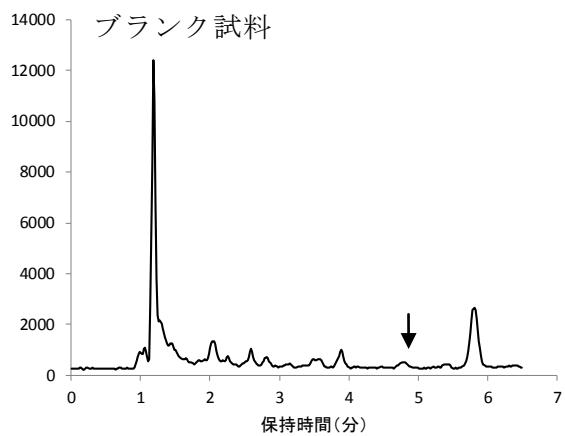


図17 しじみのSRMクロマトグラム

α, α, α -トリフルオロ-*o*-トルイル酸 (m/z 189→145) 添加濃度：2 mg/kg

添加回収試験における代表的なクロマトグラム（添加濃度：定量限界濃度）

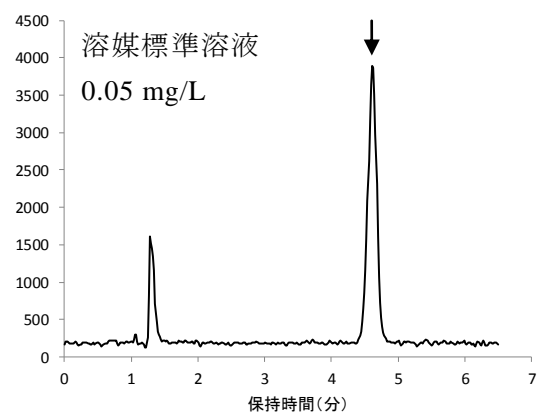
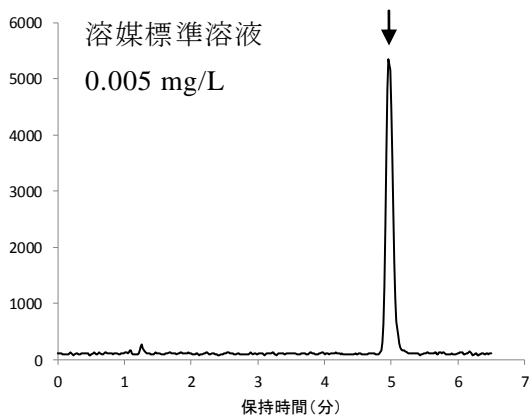
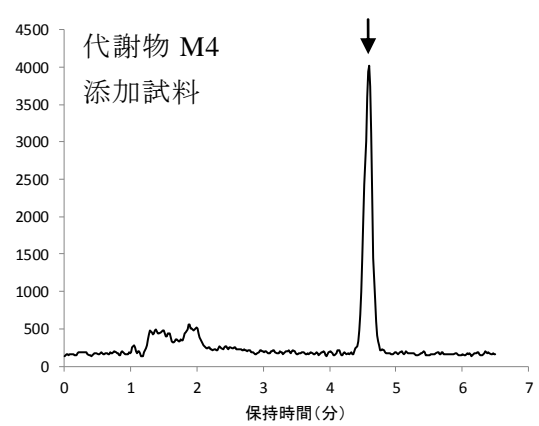
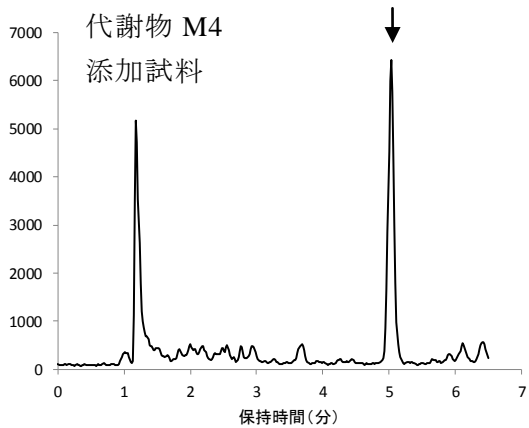
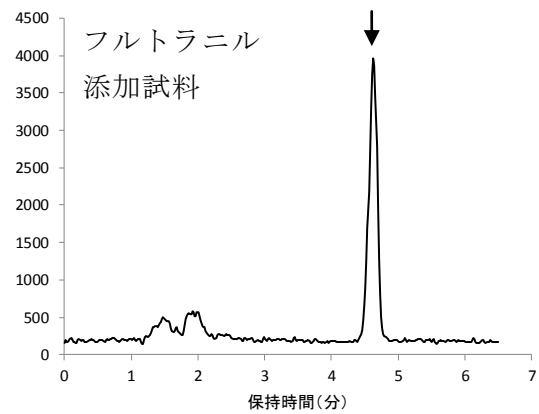
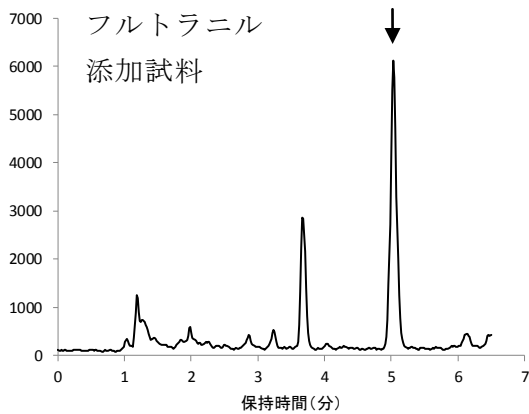
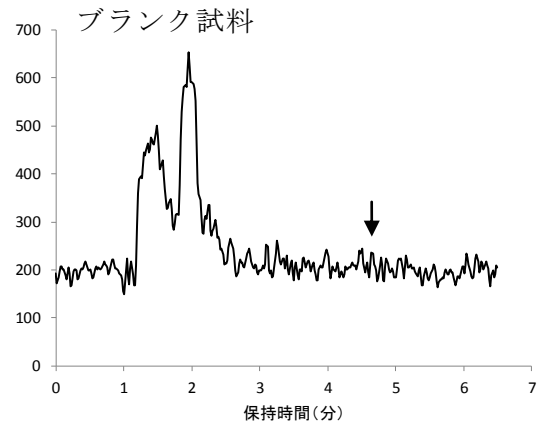
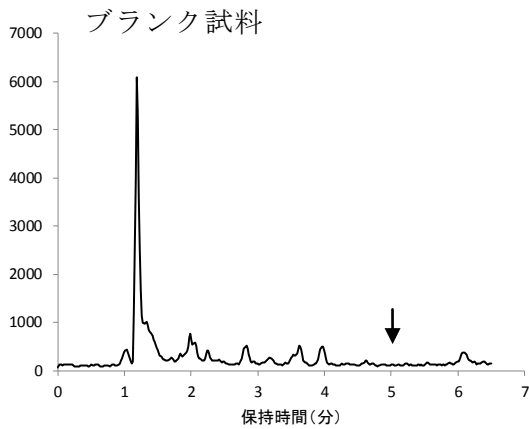


図18 牛の筋肉のSRMクロマトグラム

α, α, α -トリフルオロ-*o*-トルイル酸 (m/z 189→145) 添加濃度：0.01 mg/kg

図19 牛の脂肪のSRMクロマトグラム

α, α, α -トリフルオロ-*o*-トルイル酸 (m/z 189→145) 添加濃度：0.01 mg/kg

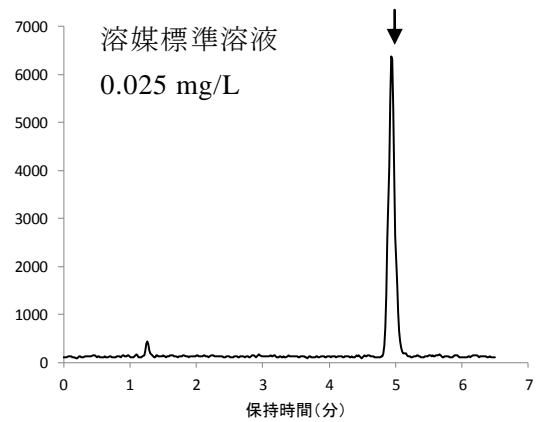
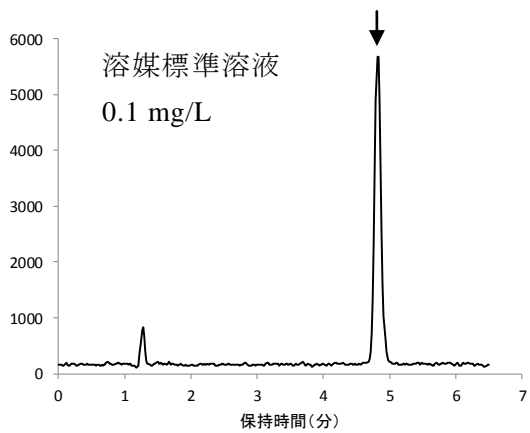
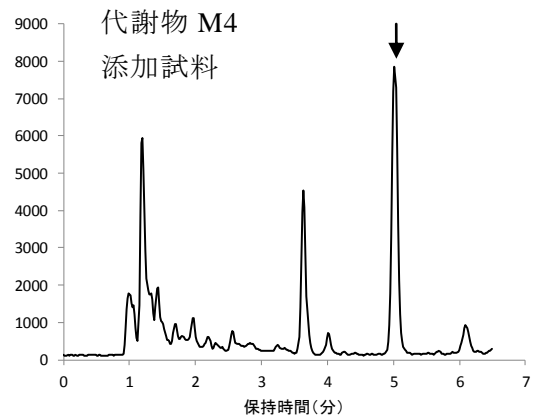
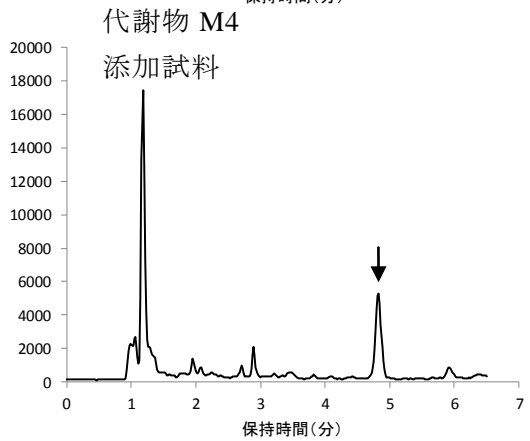
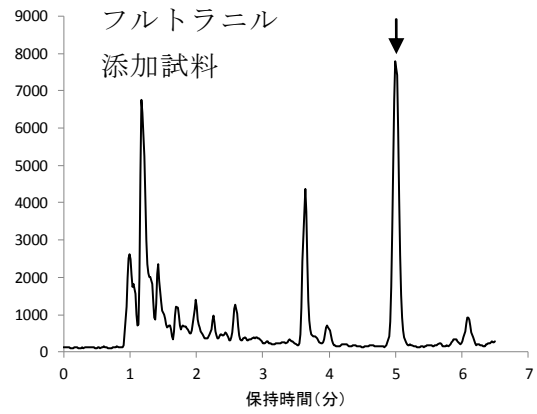
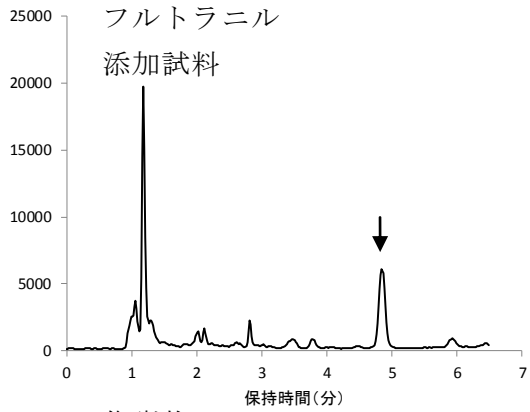
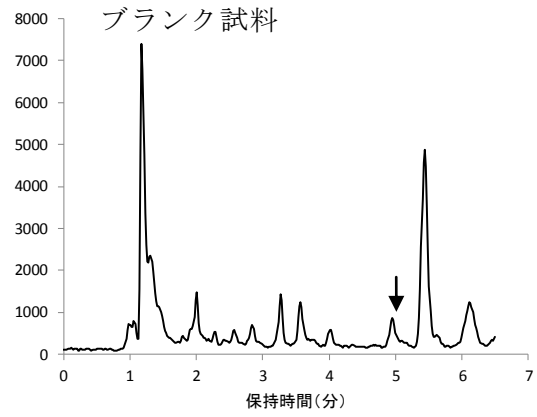
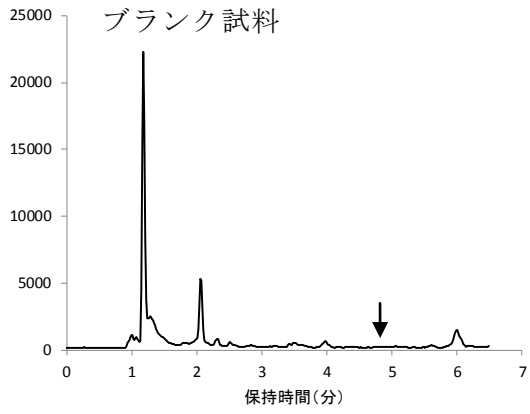


図20 牛の肝臓のSRMクロマトグラム

α, α, α -トリフルオロ-*o*-トルイル酸 (m/z 189→145) 添加濃度：0.01 mg/kg

図21 牛の乳のSRMクロマトグラム

α, α, α -トリフルオロ-*o*-トルイル酸 (m/z 189→145) 添加濃度：0.01 mg/kg

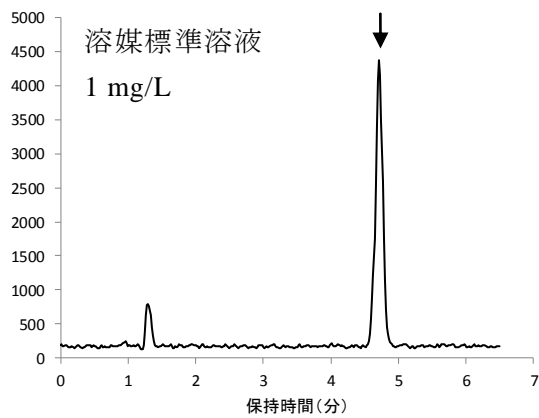
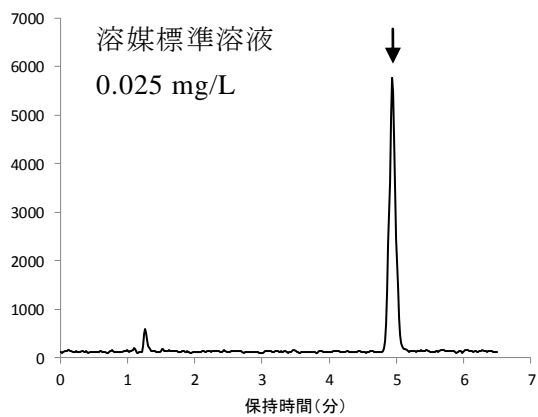
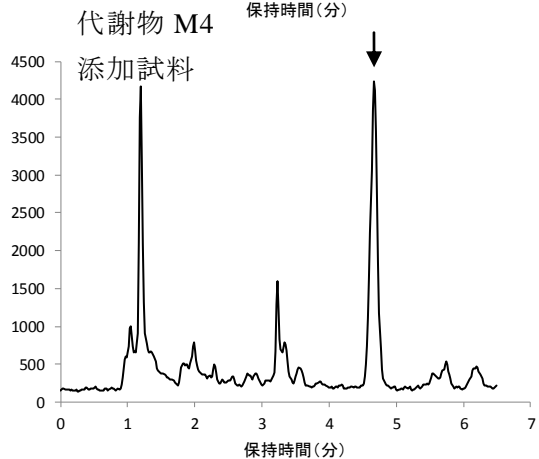
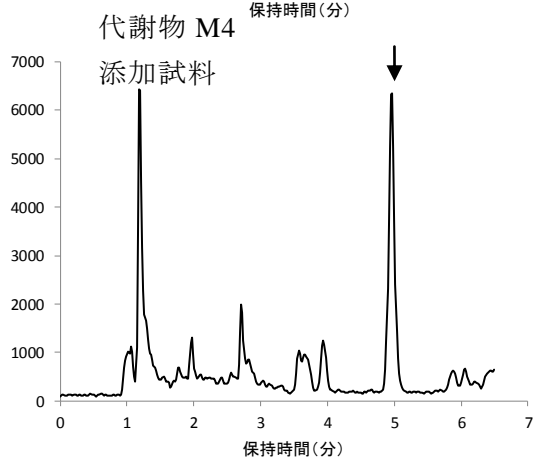
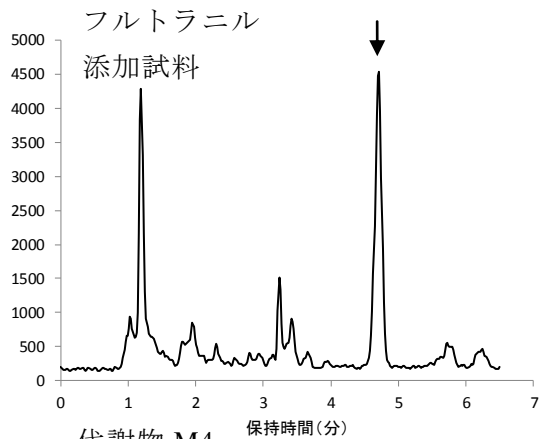
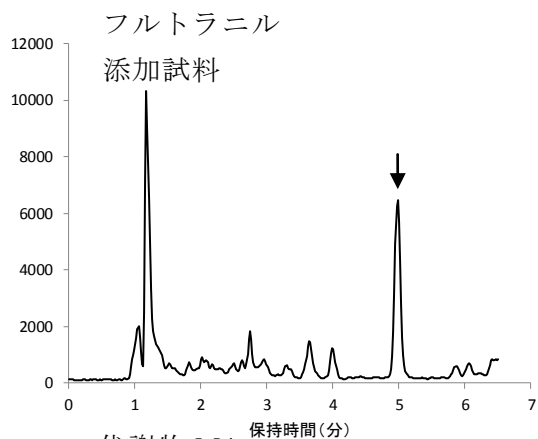
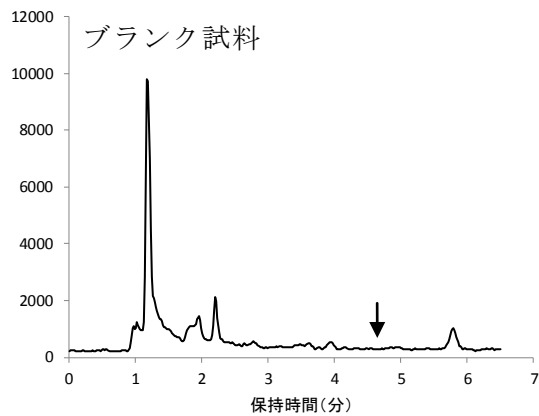
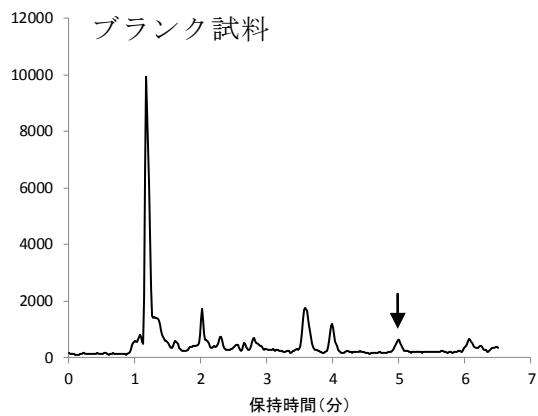


図22 鶏卵のSRMクロマトグラム

α, α, α -トリフルオロ-*o*-トルイル酸 (m/z 189→145) 添加濃度：0.01 mg/kg

図23 うなぎのSRMクロマトグラム

α, α, α -トリフルオロ-*o*-トルイル酸 (m/z 189→145) 添加濃度：0.01 mg/kg

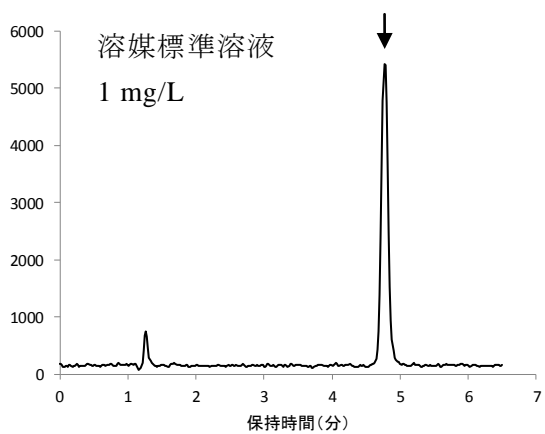
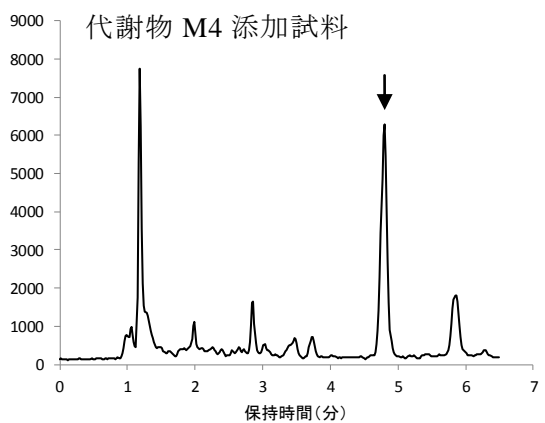
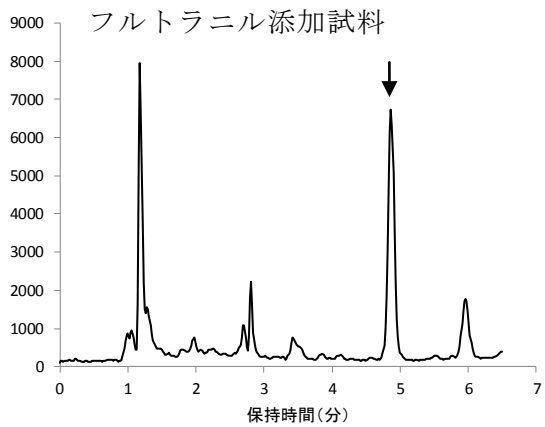
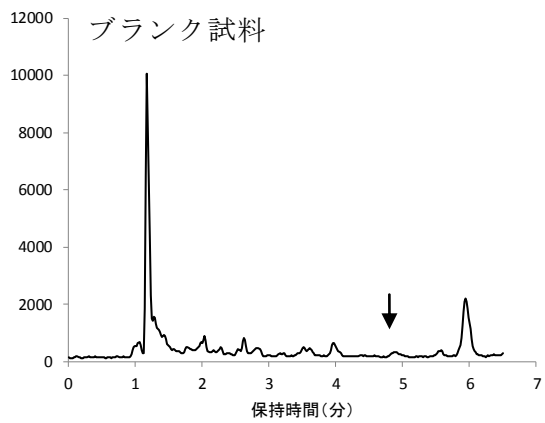


図24 しじみのSRMクロマトグラム

α, α, α -トリフルオロ-*o*-トルイル酸 (m/z 189→145) 添加濃度 : 0.01 mg/kg

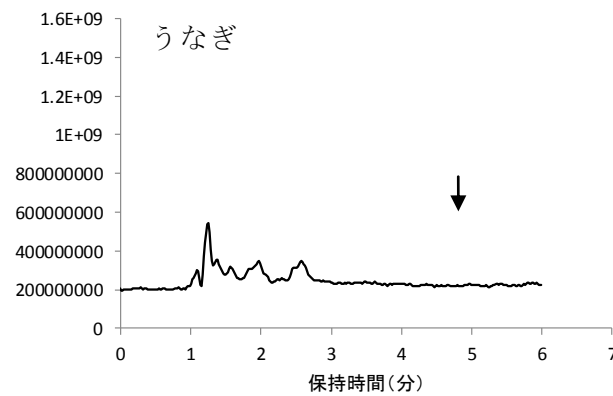
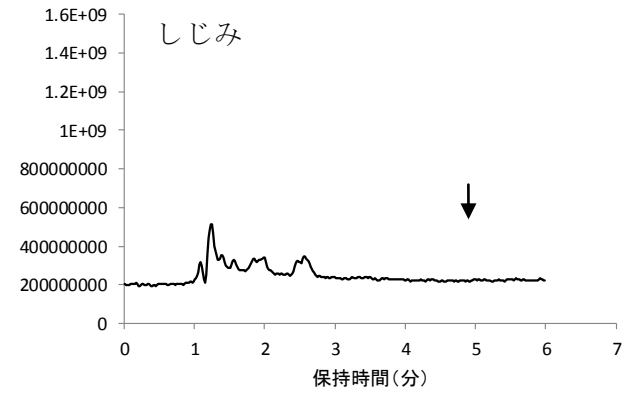
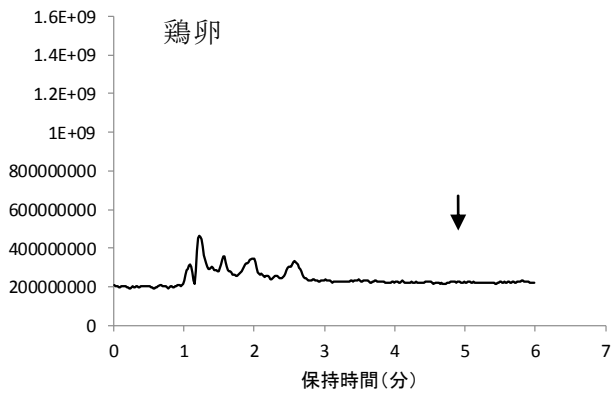
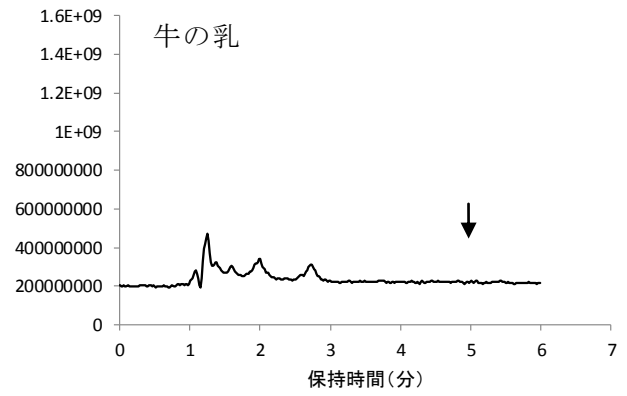
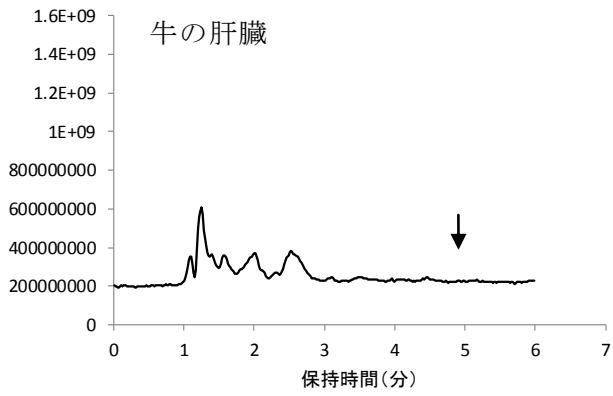
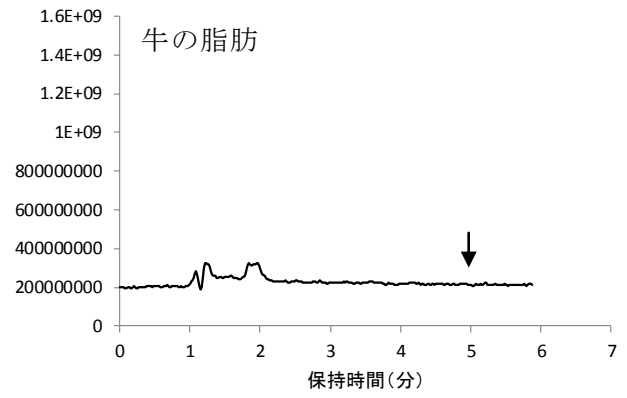
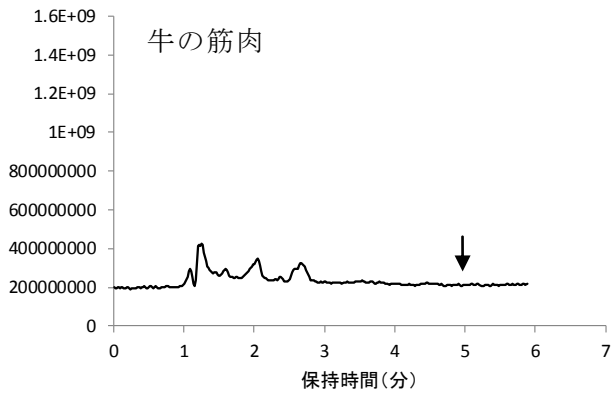


図 25 ブランク試料の代表的なトータルイオンクロマトグラム (スキャン範囲 : 50~500 m/z)