

LC-MS/MSによる農産物中フリラゾール分析法

小林 麻紀^a, 大町 勇貴^a, 森田 有香^a, 平石 勇樹^a, 田口 貴章^b, 田原 正一^a

農産物中のフリラゾール分析法について検討を行った。試料からアセトニトリルで抽出し、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（GC/PSA）ミニカラムで精製後、LC-MS/MSで測定を行い、絶対検量線法で定量した。3品目の農産物（とうもろこし、未成熟とうもろこし及びデオシント）を対象に残留基準値濃度（0.01 ppm）または定量下限濃度（0.005 ppm）における添加回収試験を行った結果、真度（ $n=5$ ）は76.5～96.4%，併行精度は5.3～8.5%，定量限界は0.005 mg/kgであった。

キーワード：フリラゾール，薬害軽減，農産物，とうもろこし，液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析計

はじめに

フリラゾールは，とうもろこし等に利用される薬害軽減剤（セーフナー：safener）である。セーフナーは除草剤の悪影響から作物を守りつつ，雑草の効果的な防除を可能とする化合物である。作物の除草剤代謝能力を向上させることで，除草剤の植物に対する毒性を低減する。フリラゾールの作用機序は，植物体内のグルタチオン *S*-トランスフェラーゼ（GST）活性やグルタチオン（GSH）含量を高めることにより除草剤解毒における GSH 抱合を中心とする除草剤の解毒代謝を促進することによると考えられている¹⁾。

フリラゾールはアメリカで登録されており，2002 年4月にアメリカにおける許容一日摂取量（ADI）が0.0009 mg/kg体重/日と設定されている。我が国で農薬登録はされていないが，ポジティブリスト制度導入に伴う残留基準値がとうもろこしに0.01 ppm設定されている。食品安全委員会はフリラゾールのADIを0.00086 mg/kg体重/日と設定している^{1,2)}。

フリラゾールは，とうもろこしを中心とした農産物に使用されているが，とうもろこしを対象としたフリラゾールの試験法はほとんど報告されていない。そこで，とうもろこしを中心とした農産物を対象として，高感度で選択性の高い LC-MS/MS による一律基準値（0.01 mg/kg）に適用できる試験法を検討したので報告する。

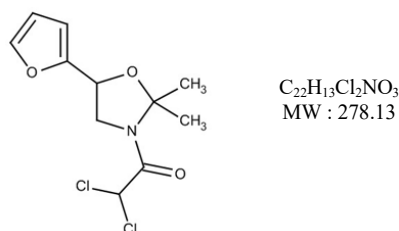


Fig.1. Structure of furilazol.

実験方法

1. 試料

市販のとうもろこし（乾燥子実），未成熟とうもろこし及びデオシント（乾燥子実）を用いた。

2. 試薬

1) 標準溶液

フリラゾール標準品は富士フィルム和光純薬（株）製の残留農薬試験用標準品を用いた。この10.0 mgをアセトンに溶解して1,000 µg/mLの標準原液を調製した。この標準原液をアセトンで希釈したものを添加回収用標準溶液とし，アセトニトリルで適宜希釈したものを検量線用標準溶液とした。

2) ミニカラム

InertSep C₁₈ 500 mg/6 mL（オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム），InertSep FL 500 mg/6 mL（合成ケイ酸マグネシウムミニカラム），InertSep GC 500 mg/6 mL（グラファイトカーボンミニカラム），InertSep NH₂（アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム），InertSep PSA500 mg/6 mL（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/NH₂ 500 mg/500 mg/6 mL（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）及びInertSep GC/PSA 500 mg/500 mg/6 mL（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）はジーエルサイエンス（株）製を用いた。

3) その他の試薬

有機溶媒は関東化学（株）製及び富士フィルム和光純薬（株）製の残留農薬試験用及びLC/MS用を用いた。

酢酸アンモニウムは富士フィルム和光純薬（株）製の高速液体クロマトグラフ用を，ギ酸はLC/MS用を用いた。

^a 東京都健康安全研究センター食品化学部残留物質研究科
169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

^b 国立医薬品食品衛生研究所
210-9501 神奈川県川崎市川崎区殿町3-25-26

3. 装置

1) 液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析計

LC部：Waters社製 ACQUITY UPLC I-Class PLUS

MS部：Waters社製 XevoTQ-Smicro

4 測定条件

1) LC条件

分析カラム：Waters社製 Xselect HSS T3（粒子径 2.5 μm , 2.1 mm i.d. $\times$ 100 mm), 移動相：A 液 水, B 液 メタノール, グラジエント条件：0分 A:B=70:30 $\rightarrow$ 3分 A:B=2:98 $\rightarrow$ 8分, 流量：0.2 mL/min, カラム温度：40°C

2) MS/MS条件

イオン化法：ESI(+), キャピラリー電圧：2.5 kV, ソース温度：130°C, デソルベーション温度：500°C, コーンガス流量：N₂, 50 L/hr, デソルベーションガス流量：N₂, 1,000 L/h, 定量イオン (m/z)：220.0 $\rightarrow$ 83.0 [コーン電圧 42 V, コリジョンエネルギー14 eV], 定性イオン (m/z)：220.0 $\rightarrow$ 93.0 [コーン電圧42 V, コリジョンエネルギー14 eV].

上記, LC-MS/MS 条件下でのフリラゾールのクロマトグラムを Fig.2に示す.

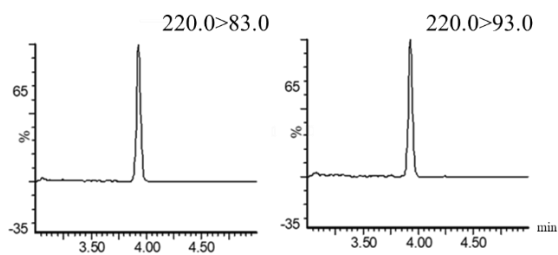


Fig.2. LC-MS/MS chromatograms obtained SRM mode for furilazole 0.5 ng/mL

5. 分析方法

1) 抽出法

試料20.0 g (乾燥品であるとうもろこし (乾燥子実) 及びテオシント (乾燥子実) は試料10.0 gに水20 mLを加えて30分間放置) にアセトニトリル100 mLを加え, ホモジナイズした後, 毎分3,000回転で5分間遠心分離し, その上澄液を分取した. 残さにアセトニトリル50 mLを加え, 1回目と同様に細砕した後, 遠心分離した. 上澄液を合わせ, アセトニトリルを加えて200 mLに定容し, 試料抽出溶液とした. この試料抽出溶液10 mLを (とうもろこし及びテオシントは20 mL) 分取し, 窒素吹付濃縮装置を用いて40°C以下で溶媒を除去した. 残さにアセトニトリル2 mLを加えて溶解した.

2) 精製法

GC/PSAミニカラムをアセトニトリル20 mLでコンディショニングし, 1)で得られた溶液を注入した後, 容器をアセトニトリル2 mLで洗い, 洗液をカラムに注入した. アセトニトリル6 mLを注入して, 負荷液及び洗液を含む全溶出液を採り, アセトニトリルを用いて正確に10 mLとし

たものを試験溶液とした.

結果及び考察

1. LC及びMS条件の検討

1) MS条件の検討

スキャン測定におけるフリラゾールのESI (+) モード測定時のマスペクトルをFig.3に示す. ESI (+) でプロトン付加分子 (m/z 278.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$) を観測したが, m/z 278.0は不安定で m/z 220のプロダクトイオンを生じやすい傾向がみられた^{3,4)}. GC-MS/MSの測定においてもプリカーサーイオンとして m/z 220を用いた報告^{5,6)}がある. m/z 220.0をプリカーサーイオンとした場合のプロダクトイオンとして m/z 65.0, 83.0及び93.0が観測され (Fig.4), LC-MS/MSを用いた既報⁷⁾における定量イオンの m/z 83.0と一致した.

SRM測定を行った結果, m/z 278.0をプリカーサーイオンとして m/z 220をプロダクトイオンとした場合よりも, m/z 220.0をプリカーサーイオンとして m/z 83.0をプロダクトイオンとした場合のほうが安定して感度が良く測定できたため, 高いS/N比が得られた m/z 83.0を定量用イオンに, m/z 93.0を定性用イオンとすることとした.

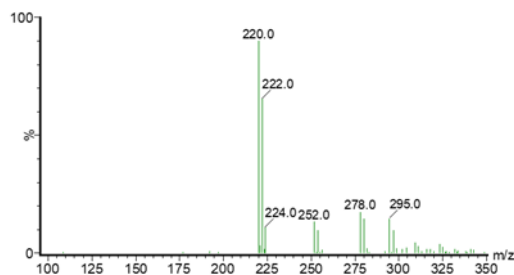


Fig.3. LC-MS/MS mass spectrum obtained scan mode for furilazole 1 $\mu\text{g/mL}$
ESI positive, cone voltage:4 V

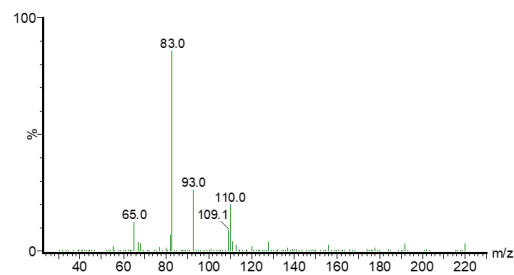


Fig.4. LC-MS/MS mass spectrum obtained scan mode for furilazole 1 $\mu\text{g/mL}$
ESI positive, cone voltage:42 V, collision energy:14 eV

2) LC条件の検討

分析カラムに, 汎用されているオクタデシルシリル化シリカゲル (ODS) 充填カラムCAPCELL PAK C₁₈ MGII及びMGIII (内径 2.1 mm, 長さ100 mm, 粒子径5 μm : (株) 大阪ソーダ製), InertSustain C₁₈及びODS3 (内径 2.1 mm, 長さ100 mm, 粒子径3 μm : ジーエルサイエンス (株))

製), L-column2 ODS (内径 2.0 mm, 長さ100 mm, 粒子径3 μm : 化学物質評価研究機構製), Mightysil RP-18 (内径 2.1 mm, 長さ100 mm, 粒子径3 μm : 関東化学(株)製) 及びXselect HSS T3 (内径 2.1 mm, 長さ100 mm, 粒子径 2.5 μm : Waters製)を比較検討した結果, Xselect HSS T3を使用することで, フリラゾールの保持, ピーク強度及び再現性について良好な結果が得られた。

移動相の水系溶媒についてはギ酸, 酢酸アンモニウム溶液及び水について検討した。B 液にはアセトニトリル及びメタノールを用い, A:B (7:3) から3分までに (1:49) のグラジエント条件で送液したうえで, ギ酸では 0.05~0.5%濃度を, 酢酸アンモニウムについては 0.1~5 mmol/L について比較した。その結果, 水を用いたところ, 保持, ピーク強度及びピーク形状が良好となった。また, アセトニトリルとの混液よりもメタノールとの混液のほうがピーク強度及び形状が良好であったため, 水及びメタノール混液の組成について検討した。フリラゾールのピーク形状及び強度を確保するためグラジエント測定条件を検討した。水及びメタノール (7:3) から 3 分までに (1:49) のグラジエント条件で分析カラムからの試料成分流出のため, (1:49) で 5 分間保持した場合, フリラゾールの保持時間は3.9分であった。

2. 抽出法の検討

抽出溶媒としてアセトニトリル, アセトン, アセトン・*n*-ヘキサン混液 (1:1), 酢酸エチル及びメタノールについて検討した。水10 mL にフリラゾール標準溶液5 mg/L (アセトン溶液) 0.1 mL を添加し, 各溶媒100 mL, 50 mL でホモジナイズ後, 毎分3,000回転で5分間遠心分離した。得られた上層を200 mL に定容後, 5 mL 分取し, アセトニトリルに置換後, LC-MS/MS (SRMモード) で測定した。その結果, アセトン・*n*-ヘキサン混液 (1:1) 以外では99%以上の回収が得られた。

次に, 未成熟とうもろこしを試料として, アセトニトリル, アセトン, 酢酸エチル及びメタノールを用いて抽出した溶液をGC/PSA ミニカラムで精製し, LC-MS/MSで測定した。その結果, アセトニトリル及びアセトン抽出液で試料由来の夾雑成分の影響が少なかった。アセトニトリルは色素及び濃縮後に残る水分量がアセトンよりも少なく, 乾固しやすいことから, アセトニトリルを抽出溶媒に用いることとした。

3. 精製法の検討

1) ミニカラム精製の検討

脂質, 脂肪酸及び低極性化合物を除去する目的で C₁₈ 及び PSA ミニカラムを, 色素除去のために GC ミニカラムについて, 精製に汎用される FL, NH₂及び SI ミニカラムを用いて検討を行った。

各ミニカラムを用い, アセトニトリル10 mL でコンディ

ショニングした後, フリラゾール標準溶液0.05 mg/L (メタノール溶液) 0.5 mL を負荷し, アセトニトリルで溶出した。フリラゾールはいずれのミニカラムにおいても10 mL で溶出された。

次に, とうもろこし, 未成熟とうもろこし及びテオシントを試料として, アセトニトリル抽出した溶液を各ミニカラムに負荷し, それぞれアセトニトリル10 mL で溶出して精製した。各ミニカラムについて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 (Table 1)。

いずれのカラムにおいてもイオン化抑制 (ピーク面積比<0.9) またはイオン化促進 (1.1<ピーク面積比) がみられた。

Table 1. Effect of sample matrix on the ionization of analyte

Sample	C ₁₈	FL	GC	NH ₂	PSA	SI
Maize	0.86	0.87	0.83	0.94	0.95	0.93
Sweet corn	1.05	1.05	1.18	1.01	1.07	1.08
Teosinte	1.12	0.92	1.13	0.79	0.86	0.83

a) Concentration : 0.00025 mg/L

b) Matrix standard / standard in solvent (*n*=2)

2) GCとの組合せ検討

GC ミニカラム以外のミニカラムでは色素の除去ができなかった。また, いずれのミニカラムにおいてもマトリックスの影響を除去できなかったことから, GC ミニカラムと組み合わせることで精製効果を高めることを検討した。NH₂及び PSA については GC との積層カラムを用いて検討した。

C₁₈, FL, GC 及び SI ミニカラムをそれぞれアセトニトリル10 mL でコンディショニングした後, C₁₈, FL 及び SI カラムをそれぞれ GC ミニカラムと連結した。GC/NH₂ミニカラム及び GC/PSA ミニカラムをそれぞれアセトニトリル20 mL でコンディショニングした。各ミニカラムにフリラゾール標準溶液0.05 mg/L (メタノール溶液) 0.5 mL を負荷し, アセトニトリルで溶出したところ, いずれの組合せにおいても10 mL の溶出で100%の回収が得られた。

次に, マトリックスの影響を確認するため, とうもろこし, 未成熟とうもろこし及びテオシントにおける0.01 mg/kg 添加相当濃度 (溶液中濃度0.00025 mg/L) での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 (Table 2)。その結果, FL ミニカラム (0.96及び0.97) との組み合わせ及び GC/PSA ミニカラム以外では, C₁₈ ミニカラムとの組み合わせではとうもろこしで (0.87), GC/NH₂ミニカラムではとうもろこし及びテオシントで (0.73), SI ミニカラムとの組合せで未成熟とうもろこし

Table 2. Effect of sample matrix on the ionization of analyte

Sample	Peak area ratio ^{a,b)}				
	GC+C ₁₈	GC+FL	GC/NH ₂	GC/PSA	GC+SI
Maize	0.87	0.96	0.73	0.97	0.96
Sweet corn	0.97	0.97	0.97	0.99	0.79
Teosinte	0.93	0.96	0.73	1.05	0.96

a) Concentration : 0.00025 mg/L

b) Peak area of matrix standard / peak area of solvent standard (*n*=2)

Table 3. Total weight of after solvent removal

Sample	Weight of residue (mg) ^{a)}				
	GC+C ₁₈	GC+FL	GC/NH ₂	GC/PSA	GC+SI
Maize	3.2	3.8	4.0	3.1	4.0
Sweet corn	2.9	3.2	3.5	2.7	3.2
Teosinte	2.7	2.8	2.3	2.8	2.6

a) $n=1$

(0.79) でイオン化抑制が見られた。次に、GC ミニカラムと組合せて精製した試料精製溶液を濃縮後、残留物の重量を測定した (Table 3)。

その結果、残留物重量は GC ミニカラム及び FL ミニカラムとの組合せ及び GC/PSA ミニカラムで少なかった。

面積比からも GC 及び FL ミニカラムの組合せと GC/PSA ミニカラムが最も精製効果が高い結果であった。効率性及び経済性から、GC/PSA ミニカラムを用いることとした。

4. 検量線

標準品の0.0625～0.375 ng/mL及び0.125～0.75 ng/mLアセトニトリル溶液を各濃度範囲で6点調製し、2 μ LをLC-MS/MSに注入し、ピーク面積で検量線を作成した。相関係数 (r^2) は0.999以上で良好な直線性が得られた。

5. 添加回収試験

とうもろこし、未成熟とうもろこし及びテオシントに試料中濃度が0.01及び0.005 mg/kgとなるよう各標準溶液を添加し、30分放置後、本法を用いて添加回収試験を行った。5回試行時における回収率の平均は0.01 mg/kgで86.5～96.4%，0.005 mg/kgで76.5～89.3%，併行精度は0.01 mg/kgで5.3～8.0%，0.005 mg/kgで5.9～8.5%であった。(Table 4)。いずれも真度70～120%，併行精度25%未満の目標値（非公開：国立医薬品食品衛生研究所食品部：残留農薬等試験法開発事業実施要領 令和6年度，10-13，2024年1月）を満たした。

Table 4. Recovery of furilazole from agricultural products

Sample	Spiked conc. (mg/kg)	Recovery ^{a)} (%)		Peak area ratio ^{b)}
		Average	RSD	
Maize	0.01	86.5	8.0	0.97
	0.005	76.5	5.9	1.05
Sweet corn	0.01	96.4	5.3	0.99
	0.005	85.9	8.5	1.05
Teosinte	0.01	92.0	7.7	1.05
	0.005	89.3	7.6	1.07

a) $n=5$ b) Peak area of matrix standard / peak area of solvent standard ($n=2$)

試料マトリックスの測定への影響について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0.97～1.07であり、いずれの試料においても、マトリックスによる測定への顕著な影響は認めら

れなかった。0.005 mg/kg添加相当になるように調製したマトリックス添加標準溶液でのS/N比を求めたところ、21.2～28.5と全ての農産物でS/N $\geq$ 10を満たしており、本法による定量限界を0.005 mg/kgに設定した。

ま と め

LC-MS/MSを用いた農産物中のフリラゾール試験法を検討した。試料からはアセトニトリルで抽出し、GC/PSA ミニカラムで精製した後、LC-MS/MSで測定した。3品目の農産物（とうもろこし、未成熟とうもろこし及びテオシント）を対象に添加回収試験を行った。残留基準値濃度または定量限界濃度となるように添加したときの本法の真度は76.5～96.4%，併行精度は5.3～8.5%であり、良好な結果が得られた。定量限界は、検討したいずれの農産物においても0.005 mg/kgであり、フリラゾールの分析法として有用と思われる。

謝 辞

本研究は、消費者庁食品衛生基準審査課残留農薬等基準審査室「令和6年度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」により実施したものである。関係各位に深謝いたします。

文 献

- 1) 内閣府食品安全委員会農薬専門調査会：動物用医薬品評価書（案）フリラゾール，2007年6月6日。
- 2) 内閣府食品安全委員会農薬専門調査会幹事会：第19回 会 合 議 事 録 ， 平 成 19 年 6 月 6 日 。
<https://www.fsc.go.jp/fsciis/meetingMaterial/show/kai20070606no1>（2025年7月7日現在。なお本URLは変更または抹消の可能性はある）
- 3) 厚生労働省医薬食品局：農作物対象のGC/MS一斉分析法及びLC/MS一斉分析法，並びに畜水産物対象のGC/MS一斉分析法の検討結果，平成17年8月19日。
https://www.caa.go.jp/policies/policy/standards_evaluation/pesticide_residues/test_method/assets/040806-111.pdf（2025年7月7日現在。なお本URLは変更または抹消の可能性はある）
- 4) 小澤祐子，竹田正美，萩原明香，他：石川保健環境センター研報，**54**，21–37，2017。
- 5) 内山賢二，中村正規：福岡保健環境研報，**34**，99–104，2009。
- 6) 内山賢二，中村正規：福岡保健環境研報，**35**，97–03，2010。
- 7) 並河幹夫，柴田さよ，塩見哲生，他：食衛誌，**55**，279–289，2014。

Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Determination of Furilazole in Agricultural Products

Maki KOBAYASHI^a, Yuki OMACHI^a, Yuka MORITA^a, Yuki HIRAISHI^a,
Takaaki TAGUCHI^b and Shyoichi TAHARA^a

An analytical method based on liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) was developed for Furilazole determination in agricultural products. Samples were extracted with acetonitrile, and the extracts were cleaned on a graphite carbon–ethylene-diamine-*N*-propyl silylation silica gel cartridge column. The sample solution was analyzed using LC–MS/MS and an external solvent calibration curve. The average Furilazole recoveries ($n = 5$) from three agricultural products (maize, sweet corn, and teosinte) spiked at their maximum residue limits or at a uniform limit of 0.005 mg/kg were 76.5%–96.4% (relative standard deviation: 5.3%–8.5%). The calculated limit of quantitation of the developed method was 0.005 mg/kg.

Keywords: furilazole, safener, agricultural products, maize, LC-/MS/MS

^a Tokyo Metropolitan Institute of Public Health
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan

^b National Institute of Health Sciences
3-25-26, Tonomachi, Kawasaki-ku, Kawasaki City, Kanagawa, 210-9501, Japan