

## 発出予定の試験法（案）の概要

試験法（案）	分析対象化合物	概要
アピラマイシン試験法 （畜産物） P2～	<ul style="list-style-type: none"> <li>・アピラマイシン</li> <li>・ジクロロイソエバニニック酸</li> </ul>	アセトンで抽出し、塩基性条件下で加水分解してジクロロイソエバニニック酸に変換する。酢酸エチルで洗浄後、リン酸酸性下酢酸エチルに転溶し、シリカゲルミニカラムで精製した後、液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計（LC-MS/MS）で定量及び確認する。
カルボキシシン試験法 （農産物） P4～	<ul style="list-style-type: none"> <li>・カルボキシシン</li> <li>・カルボキシンスルホキシド</li> </ul>	チオ尿素存在下アセトニトリルで抽出し、塩析で水を除いた後、ODS ミニカラム及び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積層ミニカラムで精製し、LC-MS/MS で定量及び確認する。
ノルフルラゾン試験法 （農産物） P7～	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ノルフルラゾン</li> <li>・B4-クロロ-5-(アミノ)-2-(<math>\alpha</math>, <math>\alpha</math>, <math>\alpha</math>-トリフルオロ-<i>m</i>-トリル)-3-(2<i>H</i>)-ピリダジノン（代謝物 B）</li> </ul>	アセトニトリルで抽出し、塩析で水を除いた後、果実、野菜についてはそのまま、穀類、豆類及び種実類についてはオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムで精製後、いずれも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積層ミニカラムで精製し、LC-MS/MS で定量及び確認する。
ヒ素試験法 （農産物） P10～	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ヒ素</li> </ul>	湿式灰化法にて分解し、塩酸存在下でヨウ化カリウムにより予備還元し、水素化物発生装置によって発生したヒ化水素を原子吸光光度計にてヒ素を定量する。
フェンチオン試験法 （農産物及び畜水産物） P13～	<ul style="list-style-type: none"> <li>・フェンチオン</li> <li>・フェンチونسルホキシド（代謝物 B）</li> <li>・フェンチونسルホン（代謝物 C）</li> <li>・フェンチオンオキソン（代謝物 D）</li> <li>・フェンチオンオキシンスルホキシド（代謝物 E）</li> <li>・フェンチオンオキシンスルホン（代謝物 F）</li> </ul>	アセトンで抽出し、アセトニトリル/ヘキサン分配で脱脂した後、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積層ミニカラムで酸化して代謝物 C 又は代謝物 F に変換した後、多孔性ケイソウ土カラムで精製し、LC-MS/MS で定量及び確認する。

## アピラマイシン試験法（畜産物）（案）

### 1. 分析対象化合物

アピラマイシン

ジクロロイソエバニニック酸(加水分解によりジクロロイソエバニニック酸に変換される化合物を含む。)

### 2. 適用食品

畜産物

### 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。

アピラマイシン標準品 本品はアピラマイシン98%以上を含む。

ジクロロイソエバニニック酸標準品 本品はジクロロイソエバニニック酸98%以上を含む。

### 5. 試験溶液の調製

#### 1) 抽出

試料10.0 gにアセトン50 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、上澄液を採る。残留物にアセトン25 mLを加えてホモジナイズし、上記と同様に遠心分離する。得られた上澄液を合わせ、アセトンを加えて正確に100 mLとする。

#### 2) 加水分解

1) で得られた溶液から正確に10 mLを分取し、40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物に1 mol/L水酸化ナトリウム溶液4 mLを加え、70℃で2時間加熱する。放冷後、水10 mL及び酢酸エチル10 mLを加え振とうする。酢酸エチル層を捨て、水層にリン酸2 mLを加えた後、酢酸エチル15 mLで2回振とう抽出する。抽出液を合わせ、40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物にギ酸、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（1：100：900）混液2 mLを加えて溶かす。

#### 3) 精製

シリカゲルミニカラム（1,000 mg）にギ酸、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（1：100：900）混液10 mLを注入し、流出液は捨てる。このカラムに2) で得られた溶液を注入した後、ギ酸、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（1：100：900）混液8 mLを注入し、流出液は捨てる。次いでギ酸、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（1：300：700）混液15 mLを注入し、溶出液を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、正確に1 mLとしたものを試験溶液とする。

### 6. 検量線の作成

ジクロロイソエバニニック酸標準品のメタノール溶液を数点調製し、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0.01 mg/kgに相当する試験溶液中濃度は0.01 mg/Lである。

### 7. 定量

試験溶液をLC-MS/MSに注入し、6の検量線でジクロロイソエバニニック酸の含量を求める。

### 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2.1 mm、長さ150 mm、粒子径3 μm

カラム温度：40℃

移動相：アセトニトリル及び0.01 vol%ギ酸混液（1：9）から（7：3）までの濃度勾配を8分間で行う。

イオン化モード：ESI（－）

主なイオン（*m/z*）

プリカーサーイオン249、プロダクトイオン190

プリカーサーイオン251、プロダクトイオン192

注入量：5 μL

保持時間の目安：5分

## 10. 定量限界

0.01 mg/kg

## 11. 留意事項

### 1) 試験法の概要

アピラマイシン及びその代謝物を試料からアセトンで抽出し、塩基性条件下で加水分解してジクロロイソエバニニック酸に変換する。酢酸エチルで洗浄後、リン酸酸性下酢酸エチルに転溶し、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である。

### 2) 注意点

- ① 加水分解操作については、アピラマイシン標準品を用いて、加水分解が十分に行われていることを確認すること。
- ② 加水分解後の酢酸エチルでの洗浄及び酸性条件下での酢酸エチルへの転溶の際、エマルジョンが生成した場合は、毎分3,000回転で5分間遠心分離を行うと良い。
- ③ ジクロロイソエバニニック酸のLC-MS/MS測定で、試験法開発時に使用したイオンを以下に示す。  
定量イオン（*m/z*）：プリカーサーイオン249、プロダクトイオン190  
定性イオン（*m/z*）：プリカーサーイオン251、プロダクトイオン192
- ④ LC-MS/MS測定では、試料中の夾雑成分のキャリーオーバーの影響を軽減させるため、ジクロロイソエバニニック酸が溶出した後に移動相のアセトニトリル濃度を上げてカラムを洗浄すると良い。
- ⑤ 試験法開発時に検討した食品：豚の筋肉、豚の脂肪、豚の肝臓

## 12. 参考文献

なし

## 13. 類型

C

## カルボキシシン試験法（農産物）（案）

### 1. 分析対象化合物

カルボキシシン

5,6-ジヒドロ-3-カルボキシアニリド-2-メチル-1,4-オキサシン-4-オキシド（以下「カルボキシシンスルホキシド」という。）

### 2. 適用食品

穀類、豆類、種実類、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。

0.5 mol/Lリン酸緩衝液（pH 7.0） リン酸水素二カリウム（ $K_2HPO_4$ ）52.7 g及びリン酸二水素カリウム（ $KH_2PO_4$ ）30.2 gを量り採り、水約500 mLに溶解し、1 mol/L水酸化ナトリウム又は1 mol/L塩酸を用いてpHを7.0に調整した後、水を加えて1 Lとする。

チオ尿素 チオ尿素（特級）

カルボキシシン標準品 本品はカルボキシシン98%以上を含む。

カルボキシシンスルホキシド標準品 本品はカルボキシシンスルホキシド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10.0 gに5 w/v%チオ尿素溶液20 mLを加え、30分間放置する。

これにアセトニトリル100 mLを加え、ホモジナイズした後、吸引ろ過する。ろ紙上の残留物にアセトニトリル50 mLを加え、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、アセトニトリルを加えて正確に200 mLとする。

この溶液から正確に20 mLを分取し、塩化ナトリウム10 g及び0.5 mol/Lリン酸緩衝液（pH 7.0）20 mLを加え、10分間振とうする。静置した後、分離した水層を捨てる。

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム（1,000 mg）にアセトニトリル10 mLを注入し、流出液は捨てる。このカラムに上記のアセトニトリル層を注入し、さらに、アセトニトリル6 mLを注入して、全溶出液を採り40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。残留物にアセトニトリル及びトルエン（3：1）混液2 mLを加えて溶かす。

##### ② 野菜の場合

試料を正確に量り、重量比で等量の5 w/v%チオ尿素溶液を加え磨砕均一化した後、試料20.0 gに相当する量を量り採る。アセトニトリル100 mLを加え、ホモジナイズした後、吸引ろ過する。ろ紙上の残留物にアセトニトリル50 mLを加え、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、アセトニトリルを加えて正確に200 mLとする。

この溶液から正確に20 mLを分取し、塩化ナトリウム10 g及び0.5 mol/Lリン酸緩衝液（pH7.0）20 mLを加え、10分間振とうする。静置した後、分離した水層を捨てる。

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム（1,000 mg）にアセトニトリル10 mLを注入し、流出液は捨てる。このカラムに上記のアセトニトリル層を注入し、さらに、アセトニトリル6 mLを注入し

て、全溶出液を採り40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。残留物にアセトニトリル及びトルエン（3：1）混液2 mLを加えて溶かす。

## 2) 精製

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積層ミニカラム（500 mg/500 mg）に、アセトニトリル及びトルエン（3：1）混液10 mLを注入し、流出液は捨てる。このカラムに1）で得られた溶液を注入した後、さらにアセトニトリル及びトルエン（3：1）混液15 mLを注入し、全溶出液を40℃以下で溶媒を除去する。残留物にメタノールを加えて溶かし、穀類、豆類及び種実類の場合は正確に5 mL、野菜の場合は正確に10 mLとしたものを試験溶液とする。

## 6. 検量線の作成

カルボキシシン標準品及びカルボキシンスルホキシド標準品をそれぞれアセトンに溶解して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0.005 mg/kg（カルボキシンスルホキシドはカルボキシシン換算）に相当する試験溶液中濃度は0.001 mg/L（カルボキシンスルホキシドはカルボキシシン換算）である。

## 7. 定量

試験溶液をLC-MS/MSに注入し、6. の検量線でカルボキシシン及びカルボキシンスルホキシドの各含量を求める。カルボキシンスルホキシドを含むカルボキシシンの含量を求める場合には、次式により求める。

カルボキシシン（カルボキシンスルホキシドを含む。）の含量（ppm）＝ $A+B \times 0.9363$

A：カルボキシシンの含量（ppm）

B：カルボキシンスルホキシドの含量（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2.1 mm、長さ150 mm、粒子径5 μm

カラム温度：40℃

移動相：2 mmol/Lギ酸アンモニウム溶液及び2 mmol/Lギ酸アンモニウム・メタノール溶液の混液（7：3）から（1：4）までの濃度勾配を20分間で行う。

イオン化モード：ESI（+）

主なイオン（ $m/z$ ）

カルボキシシン：プリカーサーイオン 236、プロダクトイオン 143、87

カルボキシンスルホキシド：プリカーサーイオン 252、プロダクトイオン 159、131

注入量：2 μL

保持時間の目安

カルボキシシン：17分

カルボキシンスルホキシド：10分

## 10. 定量限界

カルボキシシン：0.005 mg/kg

カルボキシンスルホキシド：0.005 mg/kg（カルボキシシン換算）

## 11. 留意事項

### 1) 試験法の概要

カルボキシシン及びカルボキシンスルホキシドを試料からチオ尿素存在下アセトニトリルで抽出し、塩析で水を除いた後、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/アミノ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。

### 2) 注意点

- ① カルボキシシン及びカルボキシンスルホキシドのLC-MS/MS測定で、試験法開発時に使用したイオンを以下に示す。

カルボキシシン

定量イオン ( $m/z$ ) : プリカーサーイオン 236、プロダクトイオン 143

定性イオン ( $m/z$ ) : プリカーサーイオン 236、プロダクトイオン 87

カルボキシンスルホキシド

定量イオン ( $m/z$ ) : プリカーサーイオン 252、プロダクトイオン 159

定性イオン ( $m/z$ ) : プリカーサーイオン 252、プロダクトイオン 131

- ② 試験法開発時には、分析操作中にカルボキシシン及びカルボキシンスルホキシドのカルボキシンスルホン（オキシカルボキシシン）への変換は見られなかったが、必要に応じてカルボキシンスルホンへの変換がないことを確認することが望ましい。
- ③ 試験法開発時に検討した食品：小麦、えだまめ、小豆、たまねぎ、未成熟いんげん

## 12. 参考文献

厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知 食安発第1003001号「GC/MSによる農薬等の一斉試験法（農産物）」及び「LC/MSによる農薬等の一斉試験法Ⅰ（農産物）」（平成18年10月3日）

佐々木久美子ら、果実中のエトキシキン分析法の評価、食衛誌、**43**、366-370（2002）

## 13. 類型

C

## ノルフルラゾン試験法（農産物）（案）

### 1. 分析対象化合物

ノルフルラゾン

4-クロロ-5-(アミノ)-2-( $\alpha,\alpha,\alpha$ -トリフルオロ-*m*-トリル)-3-(2*H*)-ピリダジノン（以下「代謝物B」という。）

### 2. 適用食品

穀類、豆類、種実類、果実及び野菜

### 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。

0.5 mol/Lリン酸緩衝液（pH 7.0） リン酸水素二カリウム（ $K_2HPO_4$ ）52.7 g及びリン酸二水素カリウム（ $KH_2PO_4$ ）30.2 gを量り採り、水約500 mLに溶解し、1 mol/L水酸化ナトリウム又は1 mol/L塩酸を用いてpHを7.0に調整した後、水を加えて1 Lとする。

ノルフルラゾン標準品 本品はノルフルラゾン98%以上を含む。

代謝物B標準品 本品は代謝物B 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10.0 gに水20 mLを加え、30分間放置する。これにアセトニトリル50 mLを加え、ホモジナイズした後、吸引ろ過する。ろ紙上の残留物にアセトニトリル20 mL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、アセトニトリルを加えて正確に100 mLとする。この溶液から正確に20 mLを分取し、塩化ナトリウム10 g及び0.5 mol/Lリン酸緩衝液（pH 7.0）20 mLを加え、10分間振とうする。静置した後、分離した水層を捨てる。

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム（1,000 mg）にアセトニトリル10 mLを注入し、流出液は捨てる。このカラムに上記のアセトニトリル層を注入し、さらに、アセトニトリル3 mLを注入して、全溶出液を採り、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以下で濃縮し、溶媒を除去する。残留物にアセトニトリル及びトルエン（3：1）混液2 mLを加えて溶かす。

##### ② 果実及び野菜の場合

試料20.0 gにアセトニトリル50 mLを加え、ホモジナイズした後、吸引ろ過する。ろ紙上の残留物にアセトニトリル20 mL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、アセトニトリルを加えて正確に100 mLとする。この溶液から正確に20 mLを分取し、塩化ナトリウム10 g及び0.5 mol/Lリン酸緩衝液（pH 7.0）20 mLを加え、10分間振とうする。静置した後、分離した水層を捨てる。アセトニトリル層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以下で濃縮し、溶媒を除去する。残留物にアセトニトリル及びトルエン（3：1）混液2 mLを加えて溶かす。

## 2) 精製

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積層ミニカラム (500 mg/500 mg) に、アセトニトリル及びトルエン (3 : 1) 混液10 mLを注入し、流出液は捨てる。このカラムに1) で得られた溶液を注入した後、さらにアセトニトリル及びトルエン (3 : 1) 混液20 mLを注入し、全溶出液を40°C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、豆類及び種実類については正確に2 mL、果実、野菜等については正確に4 mLとしたものを試験溶液とする。

## 6. 検量線の作成

ノルフルラゾン標準品及び代謝物 B 標準品をそれぞれメタノールに溶解して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 0.005 mg/kg に相当する試験溶液中濃度は 0.005 mg/L である。

## 7. 定量

試験溶液を LC-MS/MS に注入し、6 の検量線でノルフルラゾン及び代謝物 B の含量を求める。代謝物 B を含むノルフルラゾンの含量を求める場合には、次式により求める。

ノルフルラゾン (代謝物 B を含む) の含量 (ppm) = A+B×1.048

A : ノルフルラゾンの含量 (ppm)

B : 代謝物 B 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2.1 mm、長さ100 mm、粒子径5 µm

カラム温度 : 40°C

移動相 : A液及びB液について下表の濃度勾配で送液する。

A液 : 5 mmol/L酢酸アンモニウム溶液

B液 : 5 mmol/L酢酸アンモニウム・メタノール溶液

時間 (分)	A液 (%)	B液 (%)
0	85	15
1	60	40
3.5	60	40
6	50	50
8	45	55
17.5	5	95

イオン化モード : ESI (+)

主なイオン (m/z)

ノルフルラゾン : プリカーサーイオン304、プロダクトイオン284、102

代謝物B : プリカーサーイオン290、プロダクトイオン270、160

注入量 : 5 µL

保持時間の目安

ノルフルラゾン : 11分

代謝物B : 9分

## 10. 定量限界

各化合物 0.005 mg/kg (代謝物 B はノルフルラゾン換算)

## 11. 留意事項

### 1) 試験法の概要

ノルフルラゾンを試料からアセトニトリルで抽出し、塩析で水を除いた後、果実、野菜についてはそのまま、穀類、豆類及び種実類についてはオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムで精製後、いずれも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。

### 2) 注意点

- ① LC-MS/MS測定で、試験法開発時に使用したイオンを以下に示す。

ノルフルラゾン

定量イオン ( $m/z$ ) : プリカーサーイオン 304、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 304、プロダクトイオン 102

代謝物B

定量イオン ( $m/z$ ) : プリカーサーイオン 290、プロダクトイオン 270

定性イオン ( $m/z$ ) : プリカーサーイオン 290、プロダクトイオン 160

- ② 試験法開発時に検討した食品：らっかせい、アスパラガス、オレンジ及びりんご

## 12. 参考文献

厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知 食安発第号0526001号の第2章一斉試験法「LC/MSによる農薬等の一斉試験法I（農産物）」（平成18年5月26日）

## 13. 類型

C

## ヒ素試験法（農産物）（案）

### 1. 分析対象化合物

ヒ素

### 2. 適用食品

果実及び野菜

### 3. 装置

原子吸光光度計

水素化物発生装置 告示第2 添加物の部B 一般試験法の項の36.ヒ素試験法の装置Cを用いる。

### 4. 試薬、試液

告示第2 添加物の部C 試薬・試液等の項に示すものを用いる。

飽和シュウ酸アンモニウム溶液 シュウ酸アンモニウム1水和物5gを水に溶かし、100mLとする。

ヒ素標準原液：三酸化二ヒ素1.32gに水酸化ナトリウム溶液（1→10）6mLを加えて溶解する。水500mL及び塩酸（1→4）で、pH3～5に調節し、水を加えて正確に1000mLとする。この液10mLを正確に量り、水を加えて正確に100mLとする。本液1mLは、ヒ素（As）0.1mgを含む。（100μg/mL）

ヒ素標準液：ヒ素標準原液5mLを正確に量り、硫酸（1→20）10mLを加え、新たに煮沸し冷却した水を加えて正確に1000mLとする。本液1mLは、ヒ素（As）0.5μgを含む。用時調製し、共栓瓶に保存する。

0.5%NaOH-0.4%テトラヒドロホウ酸ナトリウム溶液：水酸化ナトリウム2.5gを適量の水に溶解させた後、テトラヒドロホウ酸ナトリウム2.0gを量り入れ、水を加えて500mLに定容する。

### 5. 試験溶液の調製

試料20.0gを量り採り、500mLの分解瓶に入れ、硝酸30mLと水20mLを加え、よく混和した後、穏やかに加熱し、激しい反応が終わった後、一晩放置する。次いで硫酸10mLを加え、再び加熱し、時々硝酸を少量ずつ加え、内容物が暗色にならないようにする。硫酸の白煙が発生するまで加熱し、内容物が淡黄～無色になったとき分解は完了する。以上の操作で分解が長引くときは、更に過塩素酸1mLを加え、加熱分解し、残存する過量の過塩素酸が無くなるまで加熱を続ける。冷後分解溶液に飽和シュウ酸アンモニウム溶液25mL及び水75mLを加え、硫酸の白煙が発生するまで加熱する。冷後水を加えて正確に100mLとし、さらに水を用いて10倍希釈した溶液を試験溶液とする。

### 6. 操作方法

試験溶液を正確に4mL（なつみかんの外果皮、日本なし及びりんごの場合は1mL）を分取し、これに塩酸1mL及びヨウ化カリウム溶液（1→10）1mLを加え、70℃の水浴上で4分間加温した後、冷後水を加えて正確に20mLとし、検液とする。水素化物発生装置にアルゴンを流しながら、この検液及び適当な濃度の塩酸（1～6mol/L）、テトラヒドロホウ酸ナトリウム試液を、定量ポンプAを用いてそれぞれ1

～10 mL/分の適当な流量で連続的に水素化物発生装置内に導入して順々に混合させ、ヒ化水素を発生させる。なお、ヨウ化カリウム溶液（1→10）を定量ポンプで連続的に水素化物発生装置内に導入する方式にあつては、試験溶液を直接又は水で適当な濃度に希釈後、この溶液及び適当な濃度の塩酸（1～6 mol/L）、ヨウ化カリウム溶液（1→10）、テトラヒドロホウ酸ナトリウム試液を、上記と同様な操作で導入して順々に混合させ、ヒ化水素を発生させる。発生したヒ化水素と廃液を気液セパレータ F で分離した後、ヒ化水素を含む気体を加熱吸収セルを取り付けた原子吸光光度計に導入し、波長 193.7 nm の吸光度を測定する。

## 7. 検量線の作成

ヒ素標準液を水で適宜希釈し異なる濃度を数点調製した。調製後の液はそれぞれ正確に 4 mL を分取し、これに塩酸 1 mL 及びヨウ化カリウム溶液（1→10）1 mL を加え、70°C の水浴上で 4 分間加温した後、水を加えて正確に 20 mL とし、以下 6. 操作方法と同様に操作し、得られた吸光度から検量線を作成する。

## 8. 定量

試験溶液を 6. 操作方法に従って測定し、6. の検量線で  $\text{As}_2\text{O}_3$  としての含量を求める。

## 9. 定量限界

1.0 mg/kg ( $\text{As}_2\text{O}_3$  として)

## 10. 留意事項

### 1) 試験法の概要

残留農薬のヒ素の試験法には臭化第二水銀を用いたグットツァイト法に基づく方法が通知されていたが、平成 29 年の食品添加物規格基準の改正により、グットツァイト法（装置 A）については告示の第 2 添加物の部 B 一般試験法の項の 36. ヒ素試験法から削除されることから、グットツァイト法（装置 A）から同告示の水素化物発生装置を用いた原子吸光光度法（装置 C）を用いた方法に変更した。試料を湿式灰化法にて分解し、塩酸存在下でヨウ化カリウムによる予備還元し、水素化物発生装置によって発生したヒ化水素を原子吸光度計を用いてヒ素を定量する試験法である。

### 2) 注意点

- ① 灰化中にヒ素の揮散が起こらない方法を用いて試料を灰化し、ヒ素を原子化されやすいヒ化水素に変換して、原子吸光光度計に導入する方法である。ヒ素（V）の場合、そのまま原子吸光度を測定すると、ヒ素（III）よりも低い値しか得られない。試験溶液中のヒ素はヒ素（V）が多いと考えられるので、あらかじめ塩酸酸性下でヨウ化カリウムを用いて、ヒ素（III）に還元しておく必要がある。
- ② 試験に用いる器具・試薬及び試液は、ヒ素を含まないか、又はほとんど含まないものを用い、必要があれば空試験を行う。
- ③ 水素化物発生装置は、装置により試料、塩酸、テトラヒドロホウ酸ナトリウム試液、ヨウ化カリウム溶液の流量や、塩酸及びヨウ化カリウム溶液の濃度は異なり、更にテトラヒドロホウ酸ナ

トリウム試液とは異なる濃度のテトラヒドロホウ酸ナトリウム試液を使用する場合もある。

- ④ 告示第2 添加物の部C 試薬・試液等の項に示されるヒ素標準液は1 mLにAsとして0.5 µgを含有し、As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>として0.66 µg/mLの濃度に相当する。
- ⑤ 検量線濃度範囲は、概ね1.3~13 ng/mL (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>として)である。これはAsとしては1~10 ng/mLに相当する。なお、本法に従って検液を調製した場合、試料中1.0 mg/kg (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>として)に相当する検液中濃度は4 ng/mL (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>として)であり、なつみかんの外果皮、日本なし及びりんごの場合、試料中3.5 mg/kg (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>として)に相当する検液中濃度は3.5 ng/ml (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>として)である。
- ⑥ 塩酸酸性化でヨウ化カリウムを用いて還元操作を行うと還元されたヒ素(Ⅲ)が揮散するため、予備還元操作後は30分以内に測定を終了する必要がある。

## 11. 参考文献

- 1 片岡 洋平 渡邊 敬浩 林 智子 手島 玲子 松田 りえ子：清涼飲料水中の鉛，総ヒ素，カドミウムの一斉定量を目的としたICP-OES法，ICP-MS法，電気加熱式原子吸光法の開発 食衛誌 56, 88-95, (2015) .

## 12. 類型

C

## フェンチオン試験法（農産物）（案）

### 1. 分析対象化合物

フェンチオン

フェンチオンスルホキシド（以下「代謝物B」という。）

フェンチオンスルホン（以下「代謝物C」という。）

フェンチオンオキソン（以下「代謝物D」という。）

フェンチオンオキシソンスルホキシド（以下「代謝物E」という。）

フェンチオンオキシソンスルホン（以下「代謝物F」という。）

### 2. 適用食品

農産物

### 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。

フェンチオン標準品 本品はフェンチオン97%以上を含む。

代謝物B標準品 本品は代謝物B 98%以上を含む。

代謝物C標準品 本品は代謝物C 98%以上を含む。

代謝物D標準品 本品は代謝物D 98%以上を含む。

代謝物E標準品 本品は代謝物E 98%以上を含む。

代謝物F標準品 本品は代謝物F 98%以上を含む。

### 5. 試験溶液の調製

#### 1) 抽出

##### ① 穀類、豆類、種実類及び茶の場合

試料10.0 g（茶は5.00 g）に2 vol%ギ酸20 mLを加え、30分間放置する。これにアセトン100 mLを加え、ホモジナイズした後、吸引ろ過する。ろ紙上の残留物にアセトン50 mLを加えてホモジナイズし、上記と同様にろ過する。得られたろ液を合わせ、アセトンで正確に200 mLとする。この溶液から正確に2 mLを分取し、*n*-ヘキサン30 mLを加え、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル30 mLずつで2回振とう抽出する。

##### ② 果実及び野菜の場合

試料20.0 gにアセトン100 mLを加え、ホモジナイズした後、吸引ろ過する。ろ紙上の残留物にアセトン50 mLを加えてホモジナイズし、上記と同様にろ過する。得られたろ液を合わせ、アセトンで正確に200 mLとする。この溶液から正確に2 mLを分取し、*n*-ヘキサン30 mLを加え、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル30 mLずつで2回振とう抽出する。

#### 2) 精製

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積層ミニカラム (500 mg/500 mg) に*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル10 mLを注入し流出液は捨てる。このカラムに1) で得られたアセトニトリル層を注入し、溶出液を40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物にアセトン2 mLを加えて溶かす。

### 3) 酸化反応

2) で得られた溶液に5 w/v%過マンガン酸カリウム溶液1 mLを加え、軽く振り混ぜ室温で10分間放置した後、40℃以下で約1 mLまで濃縮し水3 mLを加える。

### 4) 精製

多孔性ケイソウ土カラム (5 mL保持用) に3) で得られた溶液を注入し、室温で5分間放置した後、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (1:1) 混液40 mLを注入し、溶出液を40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物を水及びメタノール (1:1) 混液に溶かし、穀類、豆類及び種実類の場合は正確に2 mL、果実及び野菜の場合は正確に4 mL、茶の場合は正確に1 mLとしたものを試験溶液とする。

## 6. 検量線の作成

代謝物C標準品及び代謝物F標準品をそれぞれアセトンに溶かして500 mg/Lとし標準原液とする。各標準原液を適宜混合して水及びメタノール (1:1) 混液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0.01 mg/kgに相当する試験溶液中濃度は0.0005 mg/Lである。

## 7. 定量

試験溶液をLC-MS/MSに注入し、6の検量線で代謝物C及び代謝物Fの各含量を求める。

代謝物を含むフェンチオンの含量を求める場合には、次式により求める。

フェンチオン (代謝物を含む。) の含量 (ppm) =  $A \times 0.8969 + B \times 0.9459$

A : 代謝物Cの含量 (ppm)

B : 代謝物F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2.1 mm、長さ150 mm、粒子径5 µm

カラム温度 : 40℃

移動相 : 2 mmol/L酢酸アンモニウム溶液及びメタノールの混液 (7:3) から (3:7) までの濃度勾配を10分間で行った後、(3:7) で5分間保持する。

イオン化モード : ESI (+)

主なイオン (*m/z*) :

代謝物C : プリカーサーイオン 311、プロダクトイオン 125、109

代謝物F : プリカーサーイオン 295、プロダクトイオン 217、104

注入量：5  $\mu$ L

保持時間の目安

代謝物C：11分

代謝物F：6分

## 10. 定量限界

各化合物0.01 mg/kg

## 11. 留意事項

### 1) 試験法の概要

フェンチオン及び代謝物を試料からアセトンで抽出し、アセトニトリル/ヘキサン分配で脱脂した後、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積層ミニカラムで精製する。過マンガン酸カリウムで酸化して代謝物C又は代謝物Fに変換した後、多孔性ケイソウ土カラムで精製し、LC-MS/MSで定量及び確認する方法である。

### 2) 注意点

- ① 豆類の一部において、抽出時に水を加えて30分間放置した際に代謝物Fの減少が見られたため、穀類、豆類、種実類及び茶の場合にあっては、減少防止のために水の代わりに2 vol%ギ酸を用いる。
- ② 多孔性ケイソウ土カラムによる精製時にアセトンが残っていると過マンガン酸カリウムの除去が不十分となり、紫色を呈する液が溶出するため、濃縮時には十分にアセトンを除去する。
- ③ 代謝物C及び代謝物FのLC-MS/MS測定で、試験法開発時に使用したイオンを以下に示す。

代謝物C

定量イオン ( $m/z$ ) : プリカーサーイオン 311、プロダクトイオン 125

定性イオン ( $m/z$ ) : プリカーサーイオン 311、プロダクトイオン 109

代謝物F

定量イオン ( $m/z$ ) : プリカーサーイオン 295、プロダクトイオン 217

定性イオン ( $m/z$ ) : プリカーサーイオン 295、プロダクトイオン 104

- ④ 試験法開発に検討した食品：玄米、大豆、らっかせい、ほうれんそう、キャベツ、ばれいしょ、オレンジ、りんご、茶及びぶどう

## 12. 参考文献

なし

## 13. 類型

C

## フェンチオン試験法（畜水産物）（案）

### 1. 分析対象化合物

フェンチオン

フェンチオンスルホキシド（以下「代謝物B」という。）

フェンチオンスルホン（以下「代謝物C」という。）

フェンチオンオキソン（以下「代謝物D」という。）

フェンチオンオキシソンスルホキシド（以下「代謝物E」という。）

フェンチオンオキシソンスルホン（以下「代謝物F」という。）

### 2. 適用食品

畜水産物

### 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。

フェンチオン標準品 本品はフェンチオン97%以上を含む。

代謝物B標準品 本品は代謝物B 98%以上を含む。

代謝物C標準品 本品は代謝物C 98%以上を含む。

代謝物D標準品 本品は代謝物D 98%以上を含む。

代謝物E標準品 本品は代謝物E 98%以上を含む。

代謝物F標準品 本品は代謝物F 98%以上を含む。

### 5. 試験溶液の調製

#### 1) 抽出

##### ① はちみつ以外の場合

試料10.0 gにアセトン100 mLを加え、ホモジナイズした後、吸引ろ過する。ろ紙上の残留物にアセトン50 mLを加えてホモジナイズし、上記と同様にろ過する。得られたろ液を合わせ、アセトンで正確に200 mLとする。この溶液から正確に2 mLを分取し、*n*-ヘキサン30 mLを加え、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル30 mLずつで2回振とう抽出する。

##### ② はちみつの場合

試料10.0 gに水20 mLを加え溶解する。これにアセトン100 mLを加え、ホモジナイズした後、吸引ろ過する。ろ紙上の残留物に水10 mL及びアセトン50 mLを加えてホモジナイズし、上記と同様にろ過する。得られたろ液を合わせ、アセトンで正確に200 mLとする。この溶液から正確に2 mLを分取し、*n*-ヘキサン30 mLを加え、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル30 mLずつで2回振とう抽出する。

#### 2) 精製

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積層ミニカラム（500 mg/500 mg）に*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル10 mLを注入し流出液は捨てる。このカラムに1) で得られたアセトニト

リル層を注入し、溶出液を40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物にアセトン2 mLを加えて溶かす。

### 3) 酸化反応

2) で得られた溶液に5 w/v%過マンガン酸カリウム溶液1 mLを加え、軽く振り混ぜ室温で10分間放置した後、40℃以下で約1 mLまで濃縮し水3 mLを加える。

### 4) 精製

多孔性ケイソウ土カラム (5 mL保持用) に3) で得られた溶液を注入し、室温で5分間放置した後、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (1:1) 混液40 mLを注入し、溶出液を40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物を水及びメタノール (1:1) 混液2 mLに溶解し、試験溶液とする。

## 6. 検量線の作成

代謝物C標準品及び代謝物F標準品をそれぞれアセトンに溶かして500 mg/Lとし標準原液とする。各標準原液を適宜混合して水及びメタノール (1:1) 混液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0.01 mg/kgに相当する試験溶液中濃度は0.0005 mg/Lである。

## 7. 定量

試験溶液をLC-MS/MSに注入し、6の検量線で代謝物C及び代謝物Fの各含量を求める。

代謝物を含むフェンチオンの含量を求める場合には、次式により求める。

フェンチオン (代謝物を含む。) の含量 (ppm) =  $A \times 0.8969 + B \times 0.9459$

A : 代謝物Cの含量 (ppm)

B : 代謝物F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2.1 mm、長さ150 mm、粒子径5 μm

カラム温度 : 40℃

移動相 : 2 mmol/L酢酸アンモニウム溶液及びメタノール混液 (7:3) から (3:7) までの濃度勾配を10分間で行った後、(3:7) で5分間保持する。

イオン化モード : ESI (+)

主なイオン (*m/z*)

代謝物C : プリカーサーイオン 311、プロダクトイオン 125、109

代謝物F : プリカーサーイオン 295、プロダクトイオン 217、104

注入量 : 5 μL

保持時間の目安

代謝物C : 11分

代謝物F：6分

## 10. 定量限界

各化合物0.01 mg/kg

## 11. 留意事項

### 1) 試験法の概要

フェンチオン及び代謝物を試料からアセトンで抽出し、アセトニトリル/ヘキサン分配で脱脂した後、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積層ミニカラムで精製する。過マンガン酸カリウムで酸化して代謝物C又は代謝物Fに変換した後、多孔性ケイソウ土カラムで精製し、LC-MS/MSで定量及び確認する方法である。

### 2) 注意点

- ① 多孔性ケイソウ土カラムによる精製時にアセトンが残っていると過マンガン酸カリウムの除去が不十分となり、紫色を呈する液が溶出するため、濃縮時には十分にアセトンを除去する。
- ② 代謝物C及び代謝物FのLC-MS/MS測定で、試験法開発時に使用したイオンを以下に示す。

代謝物C

定量イオン ( $m/z$ ) : プリカーサーイオン 311、プロダクトイオン 125

定性イオン ( $m/z$ ) : プリカーサーイオン 311、プロダクトイオン 109

代謝物F

定量イオン ( $m/z$ ) : プリカーサーイオン 295、プロダクトイオン 217

定性イオン ( $m/z$ ) : プリカーサーイオン 295、プロダクトイオン 104

- ③ 試験法開発に検討した食品：牛の筋肉・脂肪・肝臓・乳、鶏の筋肉・卵、はちみつ、うなぎ、さけ及びしじみ

## 12. 参考文献

なし

## 13. 類型

C