

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
アミトロール試験法（農産物） P3～	・アミトロール	アミトロールを試料からメタノールで抽出し、スルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン- <i>N</i> -ビニルピロリドン共重合体ミニカラムで精製する。穀類、豆類及び種実類は、さらに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、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方法である。
フィプロニル試験法（畜産物） P6～	・フィプロニル ・(±)-5-アミノ-1-(2,6-ジクロロ- α , α , α -トリフルオロ- <i>p</i> -トリル)-4-トリフルオロメチルスルホンピラゾール-3-カルボニトリル（代謝物 B）	フィプロニル及び代謝物 B を試料から、酢酸酸性下、 <i>n</i> -ヘキサン及び無水硫酸ナトリウム存在下、アセトニトリルで抽出する。アルミナ（中性）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。 なお、フィプロニル及び代謝物 B のそれぞれについて定量を行い、代謝物 B を含むフィプロニルの含量を求める場合には、代謝物 B の含量に換算係数を乗じてフィプロニル含量に変換し、これらの和を分析値とする。
フルフェナセット試験法（農産物） P9～	・フルフェナセット ・[(4-フルオロフェニル)(1-メチルエチル)アミノ]オキソ酢酸（代謝物 W） ・[<i>N</i> -(4-フルオロフェニル)- <i>N</i> -(1-メチルエチル)アセトアミド]-2-スルフィニル酢酸（代謝物 P1）	フルフェナセット、代謝物 W 及び代謝物 P1 を試料からメタノールで抽出し、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム（ODS）及びグラファイトカーボン/エチレンジアミン- <i>N</i> -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。 なお、フルフェナセット、代謝物 W 及び代謝物 P1 のそれぞれについて定量を行い、代謝物 W 及び代謝物 P1 を含むフルフェナセットの含量を求める場合には、代謝物 W 及び代謝物 P1 の含量にそれぞれ換算係数を乗じてフルフェナセットの含量に変換し、これらの和を分析値とする。
フルメトリン試験法（畜産物） P13～	・フルメトリン	フルメトリン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（はちみつの場合は省略）した後、ODS 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。

<p>ヘキシチアゾクス試験 法（畜産物） P16～</p>	<ul style="list-style-type: none"> ・ヘキシチアゾクス ・塩基性条件下の加水分解により <i>trans</i>-5-(4-クロロフェニル)-4-メチルチアゾリジン-2-オン (PT-1-3) に変換される代謝物 	<p>ヘキシチアゾクス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／ヘキサン分配による脱脂及びエチレンジアミン-<i>N</i>-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムによる精製を行い、水酸化ナトリウム溶液を加えてヘキシチアゾクス及び代謝物を PT-1-3 へ変換した後、ジビニルベンゼン-<i>N</i>-ビニルピロリドン共重合体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。</p>
---------------------------------------	---	---

アミトロール試験法（農産物）

1. 分析対象化合物

アミトロール

2. 適用食品

穀類、豆類、種実類及び果実

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。

スルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム（150 mg）

内径12～13 mmのポリエチレン製のカラム管に、スルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体150 mg を充てんしたもの又はこれと同等の分離特性を有するものを用いる。

アミトロール標準品 本品はアミトロール 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（茶は5.00 g）に水20 mLを加え、30分間放置する。これにメタノール100 mLを加え、ホモジナイズした後、吸引ろ過する。ろ紙上の残留物にメタノール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、メタノールを加え正確に200 mLとする。この溶液から正確に8 mLを分取し、2 vol%ギ酸10 mLを加える。

② 果実及び野菜の場合

試料20.0 gにメタノール100 mLを加え、ホモジナイズした後、吸引ろ過する。ろ紙上の残留物にメタノール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、メタノールを加えて正確に200 mLとする。この溶液から正確に8 mLを分取し、2 vol%ギ酸10 mLを加える。

2) 精製

① 穀類、豆類及び種実類の場合

a) スルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体カラムクロマ

トグラフィー

スルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム (150 mg) に、メタノール及び2 vol%ギ酸各5 mLを順次注入し、各流出液は捨てる。このカラムに1) で得られた溶液を注入した後、水5 mL及びメタノール10 mLを注入し、各流出液を捨てる。次いで、アンモニア水及びメタノール (1 : 99) 混液5 mLを注入し、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1 mLに溶かした後、酢酸エチル4 mLを加える。

b) アミノプロピルシリル化シリカゲルカラムクロマトグラフィー

アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム (360 mg) に、酢酸エチル及びメタノール (4 : 1) 混液5 mLを注入し、流出液は捨てる。このカラムにa) で得られた溶液を注入した後、酢酸エチル及びメタノール (4 : 1) 混液10 mLを注入し、溶出液を40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物をアセトニトリル及びメタノール (3 : 1) 混液に溶かし、正確に2 mLとしたものを試験溶液とする。

② 果実及び野菜の場合

スルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム (150 mg) に、メタノール及び2 vol%ギ酸各5 mLを順次注入し、各流出液は捨てる。このカラムに1) で得られた溶液を注入した後、水5 mL及びメタノール10 mLを注入し、各流出液を捨てる。次いで、アンモニア水及びメタノール (1 : 99) 混液5 mLを注入し、溶出液を40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物をアセトニトリル及びメタノール (3 : 1) 混液に溶かし、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

アミトロール標準品のアセトニトリル及びメタノール (3 : 1) 混液の溶液を数点調製し、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0.002 mg/Lである。

7. 定量

試験溶液をLC-MS/MSに注入し、6の検量線でアミトロールの含量を求める。

8. 確認試験

LC-MS/MSにより確認する。

9. 測定条件

(例)

カラム：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：10 mmol/L酢酸アンモニウム含有アセトニトリル及び水（19：1）混液

イオン化モード：ESI（+）

主なイオン（*m/z*）：プリカーサーイオン 85、プロダクトイオン 57、43

注入量：10 μL

保持時間の目安：4分

10. 定量限界

0.01 mg/kg

11. 留意事項

1) 試験法の概要

アミトロールを試料からメタノールで抽出し、スルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムで精製する。穀類、豆類及び種実類は、さらに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である。

2) 注意点

① アミトロールの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 85、プロダクトイオン 57

定性イオン（*m/z*）：プリカーサーイオン 85、プロダクトイオン 43

② 試験法開発に検討した食品：りんご、うめ、ぶどう、小麦、なたね

12. 参考文献

なし

13. 類型

C

フィプロニル試験法（畜産物）

1. 分析対象化合物

フィプロニル

(±) -5-アミノ-1- (2, 6-ジクロロ- α , α , α -トリフルオロ-*p*-トリル) -4-トリフルオロメチル
スルホニルピラゾロール-3-カルボニトリル（以下「代謝物 B」という。）

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。

アルミナ（中性）ミニカラム（1,000 mg） 内径 12～13 mm のポリエチレン製のカラム
管に、アルミナ（中性）1,000 mg を充填したもの又はこれと同等の分離特性を有するも
のを用いる。

10 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液（pH 9） ギ酸アンモニウム 0.63 g を量り採り水約 950
mL に溶解し、アンモニア水を用いて pH を 9 に調整した後、水を加えて 1 L とする。

フィプロニル標準品 本品はフィプロニル 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

試料 10.0 g に *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 50 mL、*n*-ヘキサン 50 mL 及び酢酸 1 mL
を加えてホモジナイズした後、無水硫酸ナトリウム 20 g を加えてさらにホモジナイズする。
毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離した後、*n*-ヘキサン層を捨て、アセトニトリル層を採る。
残留物にアセトニトリル 50 mL を加えてホモジナイズした後、上記と同様に遠心分離する。
アセトニトリル層を採り、先のアセトニトリル層と合わせ、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 5 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 *n*-ヘキサン 2 mL を加えて溶かす。

2) 精製

アルミナ（中性）ミニカラム（1,000 mg）に *n*-ヘキサン 5 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 *n*-ヘキサン 5 mL を注入し、

流出液は捨てる。次いで、エタノール及び *n*-ヘキサン (1 : 19) 混液 15 mL を注入し、流出液を採り、40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物をアセトニトリル及び 10 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液 (pH 9) (4 : 1) 混液に溶解し、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

フィプロニル標準品及び代謝物 B 標準品をそれぞれアセトニトリルに溶かして標準原液を調製する。各標準原液を適宜混合してアセトニトリル及び 10 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液 (pH 9) (4 : 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 0.001 mg/kg に相当する試験溶液中の濃度は 0.0005 mg/L である。

7. 定量

試験溶液を LC-MS/MS に注入し、6 の検量線でフィプロニル及び代謝物 B の含量を求める。代謝物 B を含むフィプロニルの含量を求める場合には、次式により求める。

フィプロニル (代謝物 B を含む。) の含量 (ppm) = $A + B \times 0.9647$

A : フィプロニルの含量 (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 3 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 10 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液 (pH 9) (4 : 1) 混液

イオン化モード : ESI (-)

主なイオン (*m/z*)

フィプロニル : プリカーサーイオン 435、プロダクトイオン 330

プリカーサーイオン 437、プロダクトイオン 332, 330

代謝物 B : プリカーサーイオン 451、プロダクトイオン 282

プリカーサーイオン 453、プロダクトイオン 284, 282

注入量 : 5 μL

保持時間の目安

フィプロニル : 3分

代謝物 B : 3分

10. 定量限界

各 0.001 mg/kg (代謝物 B はフィプロニル換算)

11. 留意事項

1) 試験法の概要

フィプロニル及び代謝物 B を試料から、酢酸酸性下、*n*-ヘキサン及び無水硫酸ナトリウム存在下、アセトニトリルで抽出する。アルミナ (中性) 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。なお、フィプロニル及び代謝物 B のそれぞれについて定量を行い、代謝物 B を含むフィプロニルの含量を求める場合には、代謝物 B の含量に換算係数を乗じてフィプロニル含量に変換し、これらの和を分析値とする。

2) 注意点

- ① フィプロニル及び代謝物 B 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。

フィプロニル

定量イオン (*m/z*) : プリカーサーイオン 435、プロダクトイオン 330

定性イオン (*m/z*) : プリカーサーイオン 437、プロダクトイオン 332

代謝物 B

定量イオン (*m/z*) : プリカーサーイオン 451、プロダクトイオン 282

定性イオン (*m/z*) : プリカーサーイオン 453、プロダクトイオン 284

- ② 試験法開発時に検討した食品 : 牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳、鶏の筋肉、鶏卵

12. 参考文献

なし

13. 類型

C

フルフェナセット試験法（農産物）

1. 分析対象化合物

フルフェナセット

[(4-フルオロフェニル) (1-メチルエチル) アミノ] オキシ酢酸（以下「代謝物W」という。）

[*N*- (4-フルオロフェニル) -*N*- (1-メチルエチル) アセトアミド] -2-スルフィニル酢酸（以下「代謝物P1」という。）

2. 適用食品

穀類、豆類、種実類及び野菜

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。

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） 内径12~13 mmのポリエチレン製のカラム管に、上層にグラファイトカーボンを、下層にエチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルを各500 mg 充てんしたもの又はこれと同等の分離特性を有するものを用いる。

フルフェナセット標準品 本品はフルフェナセット 98%以上を含む。

代謝物W標準品 本品は代謝物W 98%以上を含む。

代謝物P1標準品 本品は代謝物P1 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分放置する。これにメタノール100 mLを加え、ホモジナイズした後、吸引ろ過する。ろ紙上の残留物にメタノール50 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、メタノールを加えて正確に200 mLとする。この溶液から正確に20 mLを分取し、40 °C以下で約1 mLまで濃縮する。残留物に0.1 vol%ギ酸4 mLを加える。

② 果実及び野菜の場合

試料20.0 gにメタノール100 mLを加えてホモジナイズした後、吸引ろ過する。ろ紙上

の残留物にメタノール50 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、メタノールを加えて正確に200 mLとする。この溶液から正確に20 mLを分取し、40 °C以下で約1 mLまで濃縮する。残留物に0.1 vol%ギ酸4 mLを加える

2) 精製

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム(1,000 mg)にメタノール5 mL及び0.1 vol%ギ酸5 mLを順次注入し、各流出液は捨てる。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5 mLを注入し、流出液は捨てる。オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムに1)で得られた溶液を注入した後、0.1 vol%ギ酸及びメタノール(4:1)混液5 mLを注入し、流出液は捨てる。オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムの下に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接続し、メタノール5 mLを注入し、溶出液を採る。次いで、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムを取り外し、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積層ミニカラムにアンモニア水及びメタノール(1:99)混液7 mLを注入し、溶出液を先の溶出液と合わせ、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、豆類及び種実類の場合は正確に2 mL、野菜の場合は正確に4 mLとしたものを試験溶液とする。

6. 検量線の作成

フルフェナセット標準品、代謝物W標準品及び代謝物P1標準品の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0.01 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の検量線でフルフェナセット、代謝物W及び代謝物P1の各含量を求める。代謝物W及び代謝物P1を含むフルフェナセットの含量を求める場合には、次式により求める。

フルフェナセット(代謝物W及び代謝物P1を含む。)の含量(ppm) = $A + B \times 1.613 + C \times 1.206$

A: フルフェナセットの含量(ppm)

B: 代謝物Wの含量(ppm)

C: 代謝物P1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3.5 μ m

カラム温度：40°C

移動相：5 mmol/L酢酸アンモニウム溶液及び5 mmol/L酢酸アンモニウム・メタノール溶液の混液（9：1）から（1：9）までの濃度勾配を14分間で行い、（1：9）で2分間保持する。

イオン化モード：ESI（+）

主なイオン（*m/z*）

フルフェナセット：プリカーサーイオン364、プロダクトイオン194、152

代謝物W：プリカーサーイオン226、プロダクトイオン138、110

代謝物P1：プリカーサーイオン302、プロダクトイオン284、111

注入量：2 μ L

保持時間の目安

フルフェナセット：14分

代謝物W：8分

代謝物P1：8分

10. 定量限界

各化合物0.01 mg/kg（代謝物W及び代謝物P1はフルフェナセット換算）

11. 留意事項

1) 試験法の概要

フルフェナセット、代謝物W及び代謝物P1を試料からメタノールで抽出し、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/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、LC-MS/MSで定量及び確認する方法である。なお、フルフェナセット、代謝物W及び代謝物P1のそれぞれについて定量を行い、代謝物W及び代謝物P1を含むフルフェナセットの含量を求める場合には、代謝物W及び代謝物P1の含量にそれぞれ換算係数を乗じてフルフェナセットの含量に変換し、これらの和を分析値とする。

2) 注意点

- ① 抽出操作において、吸引る過が困難な場合は、遠心分離を行う。試験法開発時、大豆は吸引る過時に目詰りしたため、3,000 rpmで5分間遠心分離を行った。
- ② 抽出液を濃縮する際に不溶物が析出して濃縮容器に付着した場合は、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/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連結してメタノールを注入する際に、メタノール5 mLの内1 mLずつを用いて2回濃縮容器を洗い込むとよい。

- ③ 精製操作後の濃縮操作の際、水分が残るため、アンモニア臭がなくなる程度(約1 mL以下)まで濃縮した後、メスフラスコを用いて規定の量とする。
- ④ 各化合物の測定で、試験法開発時に使用したイオンを以下に示す。

フルフェナセット

定量イオン (m/z) : プリカーサーイオン364、プロダクトイオン194

定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン364、プロダクトイオン152

代謝物W

定量イオン (m/z) : プリカーサーイオン226、プロダクトイオン138

定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン226、プロダクトイオン110

代謝物P1

定量イオン (m/z) : プリカーサーイオン302、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302、プロダクトイオン111

- ⑤ 試験法開発時に検討した食品：小麦、大豆、ばれいしょ、トマト

12. 参考文献

なし

13. 類型

C

フルメトリン試験法（畜産物）

1. 分析対象化合物

フルメトリン

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。

フルメトリン標準品 本品はフルメトリン 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、アセトンを加えて正確に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。抽出液を合わせ、40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物をアセトニトリル及び水（7：3）混液10 mLに溶かす。

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、アセトンを加えて正確に200 mLとする。この溶液から正確に4 mLを分取し、40℃以下で約0.5 mLまで濃縮した後アセトニトリル及び水（7：3）混液10 mLを加える

2) 精製

オクタデシルシリル化シリカゲルカラムミニカラム（500 mg）に、アセトニトリル及び水各5 mLを順次注入し、各流出液は捨てる。このカラムに1) で得られた溶液を注入し流出液は捨てる。次いで、アセトニトリル及び水（9：1）混液5 mLを注入し、溶出液を採り、

アセトニトリル及び水（9：1）混液を加えて正確に5 mLとしたものを試験溶液とする。

6. 検量線の作成

フルメトリン標準品のアセトニトリル及び水（9：1）混液の溶液を数点調製し、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（はちみつの場合は0.005 mg/kg）に相当する試験溶液中濃度は0.0002 mg/Lである。

7. 定量

試験溶液をLC-MS/MSに注入し、6の検量線でフルメトリンの含量を求める。

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2.0 mm、長さ150 mm、粒子径5 µm

カラム温度：40℃

移動相：4 mmol/L酢酸アンモニウム溶液及びメタノール混液（3：7）から（0：10）までの濃度勾配を5分間で行い、（0：10）で10分間保持する。

イオン化モード：ESI（+）

主なイオン（*m/z*）：プリカーサーイオン 527、プロダクトイオン 267、239

注入量：10 µL

保持時間の目安：8分

10. 定量限界

0.01 mg/kg（はちみつの場合は0.005 mg/kg）

11. 留意事項

1) 試験法の概要

フルメトリン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（はちみつの場合は省略）した後、オクタデシルシリル化シリカゲル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 フルメトリンの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 527、プロダクトイオン 267

定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン 527、プロダクトイオン 239

- ② 試験法開発に検討した食品：牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳、鶏の筋肉、
鶏卵、はちみつ（そばみつ）

12. 参考文献

なし

13. 類型

C

ヘキシチアゾクス試験法（畜産物）

1. 分析対象化合物

ヘキシチアゾクス

塩基性条件下の加水分解により *trans*-5-(4-クロロフェニル)-4-メチルチアゾリジン-2-オン（以下、「PT-1-3」という）に変換される代謝物

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。

ヘキシチアゾクス標準品 本品はヘキシチアゾクス98%以上を含む。

PT-1-3標準品 本品はPT-1-3 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100 mLを加え、ホモジナイズした後、毎分3,000回転で10分間遠心分離し、上澄液を採る。残留物にアセトン50 mLを加えてホモジナイズした後、上記と同様に遠心分離し、得られた上澄液を合わせ、アセトンを加えて正確に200 mLとする。この溶液から正確に2 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 *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3回振とう抽出する。抽出液を合わせ、40℃以下で約2 mLまで濃縮する。

2) 精製・加水分解

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（500 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1) で得られた濃縮液を注入した後、アセトニトリル10 mLを注入し、負荷液を含む全溶出液を採り、40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物にメタノール2 mLを加えて溶かした後、0.1 mol/L水酸化ナトリウム溶液20 mLを加えて混合し、密栓して60℃で80分間加熱する。加熱後の溶液を放冷し、室温まで戻す。

3) 精製

ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム (500 mg) にメタノール及び水各10 mLを順次注入し、各流出液は捨てる。このカラムに2) で得られた加水分解溶液を注入した後、水10 mLを注入し、流出液を捨てる。次いで、メタノール10 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5 mLとしたものを試験溶液とする。

6. 検量線の作成

PT-1-3 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の濃度は 0.0002 mg/L (ヘキシチアゾクス換算) である。

7. 定量

試験溶液を LC-MS/MS に注入し、6 の検量線で PT-1-3 の含量を求め、次式によりヘキシチアゾクスの含量を求める。

ヘキシチアゾクス (塩基性条件下の加水分解で PT-1-3 に変換される代謝物を含む) の含量 (ppm) = PT-1-3 の含量 (ppm) × 1.550

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：0.1 vol%ギ酸及びメタノールの混液 (9 : 1) から (1 : 99) までの濃度勾配を 10 分間で行い、10 分間保持する。

イオン化モード：ESI (+)

主なイオン (*m/z*)：プリカーサーイオン 228、プロダクトイオン 168、116

注入量：10 μL

保持時間の目安：12分

10. 定量限界

0.01 mg/kg (ヘキシチアゾクス換算)

11. 留意事項

1) 試験法の概要

ヘキシチアゾクス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/ヘキサン分配による脱脂及びエチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムによる精製を行い、水酸化ナトリウム溶液を加えてヘキシチアゾクス及び代謝物をPT-1-3へ変換した後、ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体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 ヘキシチアゾクス及びPT-1-3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。

ヘキシチアゾクス

定量イオン (m/z) : プリカーサーイオン353、プロダクトイオン228

定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン353、プロダクトイオン168

PT-1-3

定量イオン (m/z) : プリカーサーイオン228、プロダクトイオン168

定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン228、プロダクトイオン116

- ② 加水分解において、長時間加熱すると回収率が低下する可能性があるため、必ず試験前にヘキシチアゾクス標準品を用いてヘキシチアゾクスがPT-1-3へ変換することを確認し、最適な加熱時間で試験を行う。
- ③ 試験法開発時に検討した食品：牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳、鶏卵

12. 参考文献

なし

13. 類型

C