

ノルフルラゾン試験法（農産物）

1. 分析対象化合物

ノルフルラゾン

4-クロロ-5-（アミノ）-2-（ α,α,α -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℃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、果実、野菜等の場合は正確に4 mLとしたものを試験溶液とする。

6. 検量線の作成

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℃

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 μ L

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