

## フルトラニル試験法（畜産物）

### 1. 分析対象化合物

フルトラニル

$\alpha, \alpha, \alpha$ -トリフルオロ-3'-ヒドロキシ-*o*-トルアニリド（以下「代謝物M4」という。遊離体、グルクロン酸抱合体及び硫酸抱合体を含む。）

### 2. 対象食品

畜産物（はちみつを除く）

### 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。

フルトラニル標準品 本品はフルトラニル98%以上を含む。

代謝物M4標準品 本品は代謝物M4 98%以上を含む。

$\alpha, \alpha, \alpha$ -トリフルオロ-*o*-トルイル酸標準品 本品は $\alpha, \alpha, \alpha$ -トリフルオロ-*o*-トルイル酸95%以上を含む。

### 5. 試験溶液の調製

#### 1) 抽出

① 筋肉、肝臓、腎臓、乳及び卵の場合

2) 加水分解から実施する。

② 脂肪の場合

試料 10.0 g に *n*-ヘキサン 50 mL、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 50 mL 及び無水硫酸ナトリウム 20 g を加えて、ホモジナイズした後、毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離し、アセトニトリル層を採り、*n*-ヘキサン層は捨てる。残留物に *n*-ヘキサン 50 mL 及び *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 50 mL を加え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、40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。

#### 2) 加水分解

① 筋肉、肝臓、腎臓、乳及び卵の場合

試料10.0 gをポリテトラフルオロエチレン（polytetrafluoroethylene: PTFE）製容器に採り、50 w/w%水酸化ナトリウム溶液10 mL（乳の場合は水酸化ナトリウム7

g) を加えて混合し、10分間放置した後、密栓して200°Cで6時間加熱する。反応後の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攪拌する。先の容器を水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、試料を確実に溶解する。この溶液を酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（1：9）混液50 mL、次いで40 mLで2回振とう抽出する。抽出液を合わせ、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（1：9）混液で正確に100 mLとする。

## ② 脂肪の場合

1) 抽出で得られた残留物にアセトン5 mLを加えて溶解して、PTFE製容器に移した後、窒素ガスを吹き付けて溶媒を除去する。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時間加熱する。反応後の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攪拌する。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る。この溶液を酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（1：9）混液50 mL及び40 mLで2回振とう抽出する。抽出液を合わせ、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（1：9）混液で正確に100 mLとする。

## 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、流出液は捨てる。このカラムに2) で得られた溶液から正確に10 mLを分取して注入した後、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。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、溶出液を採り、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、溶媒を除去する。この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としたものを試験溶液とする。

## 6. 検量線の作成

$\alpha, \alpha, \alpha$ -トリフルオロ-*o*-トルイル酸標準品のアセトニトリル及び水（1：19）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（フルトラニル換算）に相当する試験溶液の濃度は、0.005 mg/L（フルトラニル換算）である。

## 7. 定量

試験溶液をLC-MS/MSに注入し、6. の検量線で $\alpha, \alpha, \alpha$ -トリフルオロ-*o*-トルイル酸の含量を求め、次式により、フルトラニル（代謝物M4を含む）の含量を求め

る。

フルトラニル（代謝物M4を含む）の含量（ppm）＝ $\alpha, \alpha, \alpha$ -トリフルオロ-*o*-トルイル酸の含量（ppm）×1.701

## 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  $\mu\text{m}$

カラム温度：40℃

移動相：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

イオン化モード：ESI（－）

主なイオン（*m/z*）：プリカーサーイオン189、プロダクトイオン145、69

注入量：5  $\mu\text{L}$

保持時間の目安：5分

## 10. 定量限界

0.01 mg/kg（フルトラニル換算）

## 11. 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*-ヘキサン存在下*n*-ヘキサン飽和アセトニトリルで抽出し抽出液を濃縮して乾固した後、筋肉、肝臓、腎臓、乳及び卵の場合はそのまま試料に水酸化ナトリウムを加えて、フルトラニル及び代謝物M4を、 $\alpha, \alpha, \alpha$ -トリフルオロ-*o*-トルイル酸に加水分解する。酢酸エチル及び*n*-ヘキサン混液に転溶し、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である。なお、 $\alpha, \alpha, \alpha$ -トリフルオロ-*o*-トルイル酸について定量を行い、 $\alpha, \alpha, \alpha$ -トリフルオロ-*o*-トルイル酸の含量に換算係数を乗じてフルトラニル（代謝物M4を含む）含量に変換したものを分析値とする。

## 12. 注意点

1）本法（筋肉等の方法）は、魚介類にも適用可能であるが、適用に当たっては規制対象化合物に留意すること。

2）加水分解操作については、フルトラニル標準品を用いて、加水分解が十分に行われていることを確認すること。

3) 5. 試験溶液の調製の2) 加水分解では、密閉された容器内で高濃度の水酸化ナトリウム溶液を高温条件で加熱する。加熱時に容器内の圧力が上昇して、内容物の漏出、容器の破損等により、分析者に危険が生じる可能性があるため、本操作はドラフト内等で行うことが望ましい。また、加熱時に内容物の漏出がある場合には、加水分解に使用する反応容器に75 mL程度以上の容量のものを使用すると良い。また、反応時には、容器の内部圧力の急激な上昇を避けるために、容器上部に冷却剤を載せると良い。

4) 5. 試験溶液の調製の2) 加水分解において、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る。また、加水分解後の加水分解物に30 vol%硫酸を加える際には、強アルカリと強酸の反応となり激しく発熱するため、溶液の温度には十分に注意する。このため、ゲル化した試料を確実に溶解するとともに、30 vol%硫酸を加える際の急激な温度上昇を避けるために、マグネチックスターラーを用いて加水分解物を攪拌しながら慎重に加える。

5)  $\alpha, \alpha, \alpha$ -トリフルオロ-*o*-トルイル酸は揮散しやすいため、濃縮操作の際には、キーパーとして2 vol%ジエチレングリコール・アセトン溶液を加えてから、濃縮操作を行う。

6)  $\alpha, \alpha, \alpha$ -トリフルオロ-*o*-トルイル酸の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189、プロダクトイオン145

定性イオン ( $m/z$ ) : プリカーサーイオン189、プロダクトイオン69

7) 試験法開発時に検討した食品：牛の筋肉・脂肪・肝臓・乳、卵、うなぎ、しじみ

### 13. 参考文献

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.

### 14. 類型

C