

フロニカミド試験法（畜産物）

1. 分析対象化合物

フロニカミド

4-トリフルオロメチルニコチン酸（以下「TFNA」という。）

4-トリフルオロメチルニコチンアミド（以下「TFNA-AM」という。）

2. 装置

液体クロマトグラフ・質量分析計（LC/MS）

3. 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。

フロニカミド標準品 本品はフロニカミド96%以上を含み、融点は158℃である。

TFNA標準品 本品はTFNA 94%以上を含み、融点は140℃である。

TFNA-AM標準品 本品はTFNA-AM 97%以上を含み、融点は166℃である。

4. 試験溶液の調製

1) 抽出

筋肉、脂肪、肝臓、腎臓及びその他の食用部分の場合は、試料20.0 gを量り採る。卵の場合は、殻を除き十分均一化した後、試料20.0 gを量り採る。乳の場合は、試料20.0 gを量り採る。

これにアセトニトリル及び水（4：1）混液100 mL並びに*n*-ヘキサン50 mLを加え、ホモジナイズした後、毎分3,000回転で5分間遠心分離を行う。アセトニトリル及び水混液層を採り、*n*-ヘキサン層及び残留物にアセトニトリル及び水（4：1）混液50 mLを加え上記と同様に抽出する。得られたアセトニトリル及び水混液層を200 mLのメスフラスコに合わせ、アセトニトリル及び水（4：1）混液を加え正確に200 mLとする。この4 mLを分取し、10%塩化ナトリウム溶液30 mL及びリン酸0.3 mLを加え、酢酸エチル30 mLずつで2回振とう抽出する。抽出液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℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物に酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（1：1）混液5 mLを加えて溶かす。

2) 精製

シリカゲルミニカラム（690 mg）に酢酸エチル5 mL及び*n*-ヘキサン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。さらに、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（1：1）混液5 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで、アセトン、酢酸及び酢酸エチル（40：1：60）混液20 mLを注入し、溶出液を40℃以下で濃縮し、

溶媒を除去する。残留物をアセトニトリル及び水（1：9）混液に溶解し、正確に2 mLとしたものを試験溶液とする。

5. 検量線の作成

フロニカミド標準品、TFNA標準品及びTFNA-AM標準品のアセトニトリル溶液を調製し、それらを混合し、フロニカミドについては0.002～0.04 mg/L、TFNA及びTFNA-AMについては0.0016～0.032 mg/Lを含むアセトニトリル及び水（1：9）混液の混合標準溶液を数点調製し、それぞれ10 µLをLC/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。

6. 定量

試験溶液10 µLをLC/MSに注入し、5の検量線でフロニカミド、TFNA及びTFNA-AMの含量を求め、次式により、TFNA及びTFNA-AMを含むフロニカミドの含量を求める。

フロニカミド（TFNA及びTFNA-AMを含む。）の含量（ppm） = $A + B \times 1.20 + C \times 1.21$

A：フロニカミドの含量（ppm）

B：TFNAの含量（ppm）

C：TFNA-AMの含量（ppm）

7. 確認試験

LC/MSにより確認する。

8. 測定条件

LC/MS

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲル（粒径3～5 µm）、内径2.0～2.1 mm、長さ150 mm

カラム温度：40℃

移動相：A液及びB液について下の表の濃度勾配で送液する。

移動相流量：0.2 mL/分

A液：アセトニトリル

B液：0.1%酢酸溶液

時間（分）	A液（%）	B液（%）
0	10	90
4	10	90
10	60	40
13	60	40

時間 (分)	A液 (%)	B液 (%)
13	10	90

イオン化モード：ESI

主なイオン (m/z)：フロニカミド 負イオンモード228

TFNA 負イオンモード190

TFNA-AM 正イオンモード191

注入量：10 μ L

保持時間の目安：フロニカミド12分、TFNA6分、TFNA-AM7分

9. 定量限界

各化合物 0.01 mg/kg (TFNA及びTFNA-AMはフロニカミド換算)

10. 留意事項

1) 試験法の概要

フロニカミド、TFNA及びTFNA-AMを試料からアセトニトリル及び水 (4:1) 混液で抽出と同時に n -ヘキサン洗浄する。酢酸エチルに転溶し、水を除いた後、シリカゲルミニカラムにより精製し、LC/MSで測定及び確認する方法である。なお、フロニカミド及びその代謝物であるTFNA及びTFNA-AMのそれぞれについて定量を行い、TFNA及びTFNA-AMについてはそれぞれの含量に換算係数を乗じてフロニカミドの含量に変換し、これらの和を分析値とする。

2) 注意点

- (1) TFNAは、アセトニトリル溶液中低濃度ではガラス容器などに吸着する傾向がある。低濃度の溶液はアセトニトリル及び水 (1:9) 混液で調製する。
- (2) イオン化モードを分析途中で変更して同時に測定を行う場合、TFNA及びTFNA-AMの保持時間が近接しているため、各ピークの測定が適切に行われるよう留意する。

11. 参考文献

なし

12. 類型

C