

ブロチゾラム試験法

1. 装置

液体クロマトグラフ・タンデム質量分析計を用いる。

2. 試薬・試液

次に示すもの以外は、第2 添加物の部C 試薬・試液等の項に示すものを用いる。
アセトニトリル 当該農薬等の成分である物質の分析の妨害物質を含まないものを用いる。

アセトン 当該農薬等の成分である物質の分析の妨害物質を含まないものを用いる。

塩化ナトリウム 当該農薬等の成分である物質の分析の妨害物質を含まないものを用いる。

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム (1,000mg) 内径12~13mmのポリエチレン製のカラム管に、オクタデシルシリル化シリカゲル1,000mg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。

トリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲル及びエチレンジアミン-N-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム (500mg/500mg) 内径12~13mmのポリエチレン製のカラム管に、上層にトリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲル500mg及び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500mg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。

n-ヘキサン 当該農薬等の成分である物質の分析の妨害物質を含まないものを用いる。

水 蒸留水，精製水，純水等の化学分析に適したものを用いる。当該農薬等の成分である物質の分析の妨害物質を含む場合には，n-ヘキサン等の溶媒で洗浄したものを用いる。

無水硫酸ナトリウム 当該農薬等の成分である物質の分析の妨害物質を含まないものを用いる。

3. 標準品

ブロチゾラム 本品はブロチゾラム98%以上を含む。

4. 試験溶液の調製

a 抽出法

① 筋肉，脂肪，肝臓及び腎臓並びに魚介類の場合

脂肪の場合は，検体を細切均一化した後，その5.00gを量り採る。

脂肪以外の場合は，検体を細切均一化した後，その10.0gを量り採る。

これにアセトン及びn-ヘキサンの混液（1：1）50mlを加えて細砕した後，吸引ろ過する。ろ紙上の残留物を採り，アセトン及びn-ヘキサンの混液（1：

1) 25mlを加えて細砕した後、上記と同様に操作する。得られたろ液を合わせ、40℃以下で約15mlに濃縮する。これに飽和塩化ナトリウム溶液100mlを加え、酢酸エチル100ml及び50mlで2回振とう抽出する。抽出液を合わせ、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n-ヘキサン30mlを加え、n-ヘキサン飽和アセトニトリル30mlで2回振とう抽出する。抽出液を合わせ、40℃以下で約5mlに濃縮する。

② 乳、卵及びはちみつの場合

乳及び卵の場合は、検体を均一化した後、その5.00gを量り採る。

はちみつの場合は、検体を均一化した後、その5.00gを量り採り、水5mlを加えて溶かす。

これにアセトニトリル30mlを加えて細砕した後、毎分2,500回転で5分間遠心分離し、アセトニトリル層を採る。残留物（はちみつの場合は残留物及び水層）にアセトニトリル20mlを加えて細砕した後、上記と同様に遠心分離する。得られたアセトニトリル層を合わせ、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℃以下で約5mlに濃縮する。

b 精製法

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム（1,000mg）の下部にトリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲル及びエチレンジアミン-N-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム（500mg/500mg）を連結し、これにアセトニトリル10mlを注入し、流出液は捨てる。この連結カラムにa 抽出法で得られた溶液を注入した後、アセトニトリル10ml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ニトリル及び水の混液（1：1）を加えて溶かし、正確に5ml（脂肪、乳、卵及びはちみつの場合は2.5ml）として、これを試験溶液とする。

5. 操作法

a 検量線の作成

ブロチゾラム標準品のアセトニトリル及び水の混液（1：1）の溶液を数点調製し、それぞれを液体クロマトグラフ・タンデム質量分析計に注入し、ピーク高法又はピーク面積法により検量線を作成する。なお、本法に従って試験溶液を調製した場合、試料中0.0005mg/kgに相当する試験溶液中濃度は0.001mg/lである。

b 定量試験

試験溶液を液体クロマトグラフ・タンデム質量分析計に注入し、a 検量線の作成によりブロチゾラムの定量を行う。

c 確認試験

液体クロマトグラフ・タンデム質量分析計により確認する。

d 測定条件

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲル 内径2.1mm, 長さ150mm, 粒子径 3 μ m

カラム温度：40℃

移動相：アセトニトリル及び0.1vol%ギ酸の混液（3：7）から（7：3）までの濃度勾配を15分間で行う。

イオン化モード：エレクトロスプレーイオン化法 ポジティブイオンモード

主なイオン（m/z）：プリカーサーイオン 395, プロダクトイオン 316, 314

注入量：5 μ l

保持時間の目安：13分