

発出予定の試験法（案）の概要

試験法（案）	分析対象化合物	開発の経緯及び試験法の概要
アシベンゾラルS-メチル試験法 (農産物) P4～	・アシベンゾラルS-メチル ・代謝物B 【ベンゾ[1,2,3]チアジアゾール-7-カルボン酸】(加水分解により代謝物Bに変換される代謝物を含む。)	<p>【開発の経緯】 規制対象に設定されている「加水分解により代謝物Bに変換される代謝物」を分析対象とする公示試験法が存在しないため、新規開発した。</p> <p>【試験法の概要】 試料を塩基性条件下で加熱して、アシベンゾラルS-メチル及び加水分解により代謝物Bに変換される代謝物を代謝物Bに加水分解した後、メタノールで抽出し、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及びアクリルアミド共重合体結合グリセリルプロピ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。なお、代謝物Bについて定量を行い、代謝物Bの含量に換算係数を乗じてアシベンゾラルS-メチル〔代謝物B（加水分解により代謝物Bに変換される代謝物を含む。）を含む。〕の含量に換算し、これを分析値とする。</p>
アミノシクロピラクロル試験法 (畜産物) P7～	・アミノシクロピラクロル	<p>【開発の経緯】 畜産物における規制対象を分析可能な公示試験法が存在しないため、新規開発した。</p> <p>【試験法の概要】 アミノシクロピラクロルを試料からメタノールで抽出し、アクリルアミド共重合体結合グリセリル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。</p>
グリホサート試験法 (農産物) P9～	・グリホサート ・N-アセチルグリホサート	<p>【開発の経緯】 グリホサート及びN-アセチルグリホサートの両方が規制対象となる大豆、とうもろこし及びなたねにおいて、公示試験法が存在しないため、新規開発した。</p> <p>【試験法の概要】 グリホサート及びN-アセチルグリホサートを試料から、エタノール及び水混液で抽出する。酢酸及びオルト酢酸トリメチルで誘導体化した後、グラファイトカーボンミニカラム及び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。</p>

発出予定の試験法（案）の概要（続き）

試験法（案）	分析対象化合物	開発の経緯及び試験法の概要
シクラニリド試験法 (畜産物) P13～	・シクラニリド	<p>【開発の経緯】 畜産物における規制対象を分析可能な公示試験法が存在しないため、新規開発した。</p> <p>【試験法の概要】 シクラニリドを試料からアセトンで抽出し、アセトニル/ヘキサン分配で脱脂する。オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム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で精製した後、LC-MS/MSで定量及び確認する方法である。</p>
スピラマイシン試験法 (畜水産物) P16～	・スピラマイシン I ・ネオスピラマイシン I	<p>【開発の経緯】 選択性及び測定感度を向上させた公示試験法を新規開発した。</p> <p>【分析法の概要】 スピラマイシン I 及びネオスピラマイシン I を試料からメタノール（脂肪の場合は、メタノール及び0.4 w/v%メタリン酸溶液（1:1）混液）で抽出し、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た後、LC-MS/MSで定量及び確認する方法である。なお、スピラマイシン I 及びネオスピラマイシン I のそれぞれについて定量を行い、ネオスピラマイシン I を含むスピラマイシン I の含量を求める場合には、ネオスピラマイシン I の含量に換算係数を乗じてスピラマイシン I の含量に換算し、これらの和を分析値とする。</p>
スピロジクロフェン試験法（畜産物） P19～	・スピロジクロフェン ・3-(2,4-ジクロロフェニル)-4-ヒドロキシ-1-オキサスピロ[4.5]デカ-3-エン-2-オン（代謝物 M1）	<p>【開発の経緯】 畜産物における規制対象を分析可能な公示試験法が存在しないため、新規開発した。</p> <p>【試験法の概要】 スピロジクロフェン及び代謝物M1を試料からギ酸酸性下アセトンで抽出し、酢酸エチルに転溶した後、アセトニトリル/ヘキサン分配で脱脂する。オクタデシ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、スピロジクロフェン及び代謝物M1のそれぞれについて定量を行い、代謝物M1を含むスピロジクロフェン含量を求める場合には、代謝物M1の含量に換算係数を乗じてスピロジクロフェンの含量に換算し、これらの和を分析値とする。</p>

発出予定の試験法（案）の概要（続き）

試験法（案）	分析対象化合物	開発の経緯及び試験法の概要
フェンピロキシメート試験法（畜産物） P22～	・フェンピロキシメート ・(E)-4-[(1,3-ジメチル-5-フェノキシピラゾール-4-イル)メチレンアミノオキシメチル]安息香酸（代謝物D）	<p>【開発の経緯】 畜産物における規制対象を分析可能な公示試験法が存在しないため、新規開発した。</p> <p>【試験法の概要】 フェンピロキシメート及び代謝物D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した後、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、LC-MS/MSで定量及び確認する方法である。</p>

上記のうち、「アシベンゾラルSメチル試験法」の開発に伴い、以下の既存の試験法を廃止する。

試験法	用途	分析対象食品
アシベンゾラルSメチル試験法（農産物） 食安発第0124001号（平成17年1月24日）	農薬	農産物

アシベンゾラルS-メチル試験法（農産物）（案）

1. 分析対象化合物

アシベンゾラルS-メチル

代謝物B【ベンゾ[1,2,3]チアジアゾール-7-カルボン酸】（加水分解により代謝物Bに変換される代謝物を含む。）

2. 適用食品

穀類、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。

塩化カルシウム 塩化カルシウム（特級）

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、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。

アシベンゾラルS-メチル標準品 本品はアシベンゾラルS-メチル95%以上を含む。

代謝物B標準品 本品は代謝物B 95%以上を含む。

5. 試験溶液の調製

1) 抽出

① 穀類の場合

試料10.0 gに0.1 mol/L水酸化ナトリウム溶液40 mLを加え、密栓して60°Cの水浴中で時々振り混ぜながら30分間加熱する。放冷後、メタノール100 mL及び塩化カルシウム4 g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5 mLを分取し、水15 mL及び1 mol/L塩酸0.2 mLを加える。

② 果実及び野菜の場合

試料20.0 gに0.1 mol/L水酸化ナトリウム溶液40 mLを加え、密栓して60°Cの水浴中で時々振り混ぜながら30分間加熱する。放冷後、メタノール100 mL及び塩化カルシウム4 g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5 mLを分取し、水15 mL及び1 mol/L塩酸0.2 mLを加える。

2) 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 (150 mg) にメタノール及び水各5 mLを順次注入し、各流出液は捨てる。アクリルアミド共重合体結合グリセリルプロピルシリル化シリカゲルミニカラム (360 mg) にメタノール10 mLを注入し、流出液は捨てる。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に1) で得られた溶液を注入した後、0.1 vol%酢酸及びメタノール (4:1) 混液10 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで、このカラムの下部にアクリルアミド共重合体結合グリセリルプロピルシリル化シリカゲルミニカラムを接続し、メタノール10 mLを注入し、流出液は捨てる。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を取り外し、アクリルアミド共重合体結合グリセリルプロピルシリル化シリカゲルミニカラムに0.5 vol%ギ酸・メタノール溶液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0.1 vol%酢酸及びメタノール (3:1) 混液に溶かして、穀類の場合は正確に5 mL、果実及び野菜の場合は正確に10 mLとしたものを試験溶液とする。

6. 検量線の作成

代謝物B標準品をメタノールに溶かして1,000 mg/Lとし標準原液とする。標準原液を0.1 vol%酢酸及びメタノール (3:1) 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0.01 mg/kg (アシベンゾラル*S*-メチル換算) に相当する試験溶液中濃度は0.0005 mg/L (アシベンゾラル*S*-メチル換算) である。

7. 定量

試験溶液をLC-MS/MSに注入し、6. の検量線で代謝物Bの含量を求め、次式によりアシベンゾラル*S*-メチル [代謝物B (加水分解により代謝物Bに変換される代謝物を含む。) を含む。] の含量を求める。

アシベンゾラル*S*-メチル[代謝物B (加水分解により代謝物Bに変換される代謝物を含む。) を含む。] の含量 (ppm) = 代謝物Bの含量 (ppm) × 1.167

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°C

移動相：0.1 vol%酢酸及びメタノール (3:1) 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179、プロダクトイオン135、107

注入量：5 μL

保持時間の目安：19分

10. 定量限界

0.01 mg/kg (アシベンゾラルS-メチル換算)

11. 留意事項

1) 試験法の概要

試料を塩基性条件下で加熱して、アシベンゾラルS-メチル及び加水分解により代謝物Bに変換される代謝物を代謝物Bに加水分解した後、メタノールで抽出し、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及びアクリルアミド共重合体結合グリセリルプロピ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。なお、代謝物Bについて定量を行い、代謝物Bの含量に換算係数を乗じてアシベンゾラルS-メチル〔代謝物B（加水分解により代謝物Bに変換される代謝物を含む。）を含む。〕の含量に換算し、これを分析値とする。

2) 注意点

① 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。

定量イオン (m/z) : プリカーサーイオン179、プロダクトイオン107

定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン179、プロダクトイオン135

② アシベンゾラルS-メチル標準品を用いて添加回収試験を実施し、代謝物Bへの変換が十分に行われていることを確認すること。

③ 試料のpHが概ね4以下のは場合は、試料20.0 gに1 mol/L水酸化ナトリウム溶液を加えてpH 6.5～7.5に調整し、先に加えた1 mol/L水酸化ナトリウム溶液の量と合わせて40 mLとなるように0.1 mol/L水酸化ナトリウム溶液を加えて加水分解を行うこと。

④ 試験溶液の調製における1)の操作では、抽出液を塩基性から酸性に調整するために1 mol/L 塩酸0.2 mLを加える。pH試験紙等を用いて溶液のpHが2以下であることを確認し、必要に応じて添加量を調節する。

⑤ 試験法開発時に検討した食品：玄米、小麦、ほうれんそう、キャベツ、なす、いちご、バナナ、オレンジ

12. 参考文献

なし

13. 類型

C

アミノシクロピラクロル試験法（畜産物）（案）

1. 分析対象化合物

アミノシクロピラクロル

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。

アミノシクロピラクロル標準品 本品はアミノシクロピラクロル95%以上を含む。

5. 試験溶液の調製

1) 抽出

試料10.0 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。

2) 精製

アクリルアミド共重合体結合グリセリルプロピルシリル化シリカゲルミニカラム（360 mg）にメタノール10 mLを注入し、流出液は捨てる。このカラムに1)で得られた溶液を正確に10 mL注入した後、メタノール5 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで1 vol% ギ酸・メタノール溶液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0.1 vol% 酢酸及びメタノール（9:1）混液に溶かし、正確に10 mLとしたものを試験溶液とする。

6. 検量線の作成

アミノシクロピラクロル標準品をメタノールに溶かして1,000 mg/Lとし標準原液とする。標準原液を0.1 vol% 酢酸及びメタノール（9:1）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 0.01 mg/kgに相当する試験溶液中濃度は0.0005 mg/Lである。

7. 定量

試験溶液をLC-MS/MSに注入し、6. の検量線でアミノシクロピラクロルの含量を求める。

8. 確認試験

LC-MS/MSにより確認する。

9. 測定条件

(例)

カラム：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°C

移動相：0.1 vol%酢酸及びメタノール (9 : 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214、プロダクトイオン101、68

注入量：5 μL

保持時間の目安：5分

10. 定量限界

0.01 mg/kg

11. 留意事項

1) 試験法の概要

アミノシクロピラクロルを試料からメタノールで抽出し、アクリルアミド共重合体結合グリセリル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 アミノシクロピラクロルの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214、プロダクトイオン68

定性イオン (m/z)：プリカーサーイオン214、プロダクトイオン101

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

12. 参考文献

なし

13. 類型

C

グリホサート試験法（農産物）（案）

1. 分析対象化合物

グリホサート

N-アセチルグリホサート

2. 適用食品

大豆、とうもろこし（未成熟）及びなたね

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。

グリホサート標準品 本品はグリホサート95%以上を含む。

N-アセチルグリホサート標準品 本品は*N*-アセチルグリホサート95%以上を含む。

5. 試験溶液の調製

1) 抽出

① 大豆の場合

試料10.0 gに水20 mLを加え30分間放置する。これにエタノール及び水（3:2）混液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。残留物にエタノール及び水（3:2）混液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、上澄液を採る。得られた上澄液を合わせ、エタノール及び水（3:2）混液を加えて正確に200 mLとする。この溶液から正確に2 mLを分取し、エタノールを加えて正確に10 mLとする。この溶液から正確に1 mLを分取し、40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。

② とうもろこし（未成熟）の場合

試料20.0 gにエタノール及び水（3:2）混液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。残留物にエタノール及び水（3:2）混液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、上澄液を採る。得られた上澄液を合わせ、エタノール及び水（3:2）混液を加えて正確に200 mLとする。この溶液から正確に1 mLを分取し、エタノールを加えて正確に10 mLとする。この溶液から正確に1 mLを分取し、40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。

③ なたねの場合

試料10.0 gに水20 mLを加え30分間放置する。これにエタノール及び水（3:7）混液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。残留物にエタノール及び水（3:7）混液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、上澄液を採る。得られた上澄液を合わせ、エタノール及び水（3:7）混液を加えて正確に200 mLとする。こ

の溶液から正確に2 mLを分取し、エタノールを加えて正確に10 mLとする。次いで、この溶液から正確に1 mLを分取し、40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。

2) 誘導体化

1) で得られた残留物にメタノール100 μ Lを加えた後、酢酸2 mL及びオルト酢酸トリメチル2 mLを加え、密栓して100°Cで90分間加熱する。放冷後、40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物に酢酸エチル2 mLを加えて溶かす。

3) 精製

グラファイトカーボンミニカラム (250 mg) に酢酸エチル10 mLを注入し、流出液は捨てる。シリカゲルミニカラム (500 mg) に酢酸エチル及びトリエチルアミン (99 : 1) 混液10 mL、酢酸エチル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ミニカラムの下部にシリカゲルミニカラムを連結し、2) で得られた溶液を注入した後、酢酸エチル13 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで、グラファイトカーボンミニカラムを取り外し、シリカゲルミニカラムに酢酸エチル5 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで、酢酸エチル及びメタノール (7 : 3) 混液20 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10 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液 (1 : 9) 混液に溶かし、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

グリホサート標準品を水に溶かして1,000 mg/Lの標準原液を調製する。標準原液をメタノールで適宜希釈した溶液を正確に100 μ L分取し、酢酸2 mL及びオルト酢酸トリメチル2 mLを加え、密栓して100°Cで90分間加熱する。放冷後、40°C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10 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液 (1 : 9) 混液を加えて溶かし検量線用標準原液を調製する。この検量線用標準原液をアセトニトリル及び10 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液 (1 : 9) 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0.01 mg/kgに相当する試験溶液中濃度は0.0001 mg/Lである。

7. 定量

試験溶液をLC-MS/MSに注入し、6. の検量線でグリホサート (N-アセチルグリホサートを含む。) 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 3.0 mm、長さ150 mm、粒子径3 μm

カラム温度：40°C

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 (1 : 9) 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 254、プロダクトイオン 102、74

注入量：5 μL

保持時間の目安：7分

10. 定量限界

0.01 mg/kg (グリホサート換算)

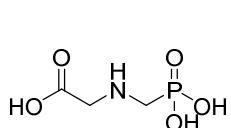
11. 留意事項

1) 試験法の概要

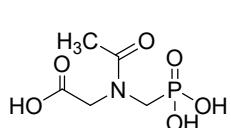
グリホサート及びN-アセチルグリホサートを試料から、エタノール及び水混液で抽出する。酢酸及びオルト酢酸トリメチルで誘導体化した後、グラファイトカーボンミニカラム及びシリカゲルミニカラムで精製し、LC-MS/MSで定量及び確認する方法である。

2) 注意点

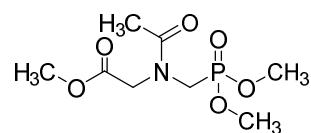
- ① 分析対象化合物は非常に極性が高い化合物であることから、抽出溶媒には水とエタノールの混液を選択した。遠心分離後の上澄液の採取の容易さと回収率を考慮し、大豆及びとうもろこし(未成熟)の場合はエタノール及び水(3:2)混液を、なたねの場合はエタノール及び水(3:7)混液を用いた。
- ② 開発時に用いた遠心分離機における毎分3,000回転は、約1,930 $\times g$ である。
- ③ 誘導体化反応は密栓条件で実施するため、反応中の危険を回避するため、栓が飛ばないようクリップ等で固定し、栓の上にタオルを掛け、さらにその上から平板状の重りを載せるなどの対処をすることが望ましい。
- ④ 本試験法の誘導体化で得られるグリホサート及びN-アセチルグリホサートの誘導体化物は、同一の化合物である(下図)。グリホサート標準品を用いて、誘導体化物に変換されることを確認すること。なお、誘導体化の際の100°Cでの加熱は、試験法開発時はブロックヒーターを用いて実施した。



グリホサート



N-アセチルグリホサート



誘導体化物

- ⑤ LC-MS/MS測定では、試料中の夾雑成分のキャリーオーバーの影響を軽減させるため、誘導体化物が溶出した後に移動相のアセトニトリル濃度を上げてカラムを洗浄すると良い。

- ⑥ グリホサートのLC-MS/MS測定で、試験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254、プロダクトイオン102
定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン254、プロダクトイオン74
- ⑦ グリホサートの検量線用標準溶液は、200 mg/L以上ではメタノールに溶けないため水で希釈する。
- ⑧ グリホサートはガラス器具への吸着が懸念されるため、誘導体化前の操作ではポリプロピレン製の器具を用いることが望ましい。
- ⑨ とうもろこしの乾燥子実に適用する場合には大豆を参照する。
- ⑩ 試験法開発時に検討した食品：大豆、とうもろこし（未成熟）、なたね

12. 参考文献

厚生労働省医薬・生活衛生局生活衛生・食品安全部長通知 生食発0404第5号「グリホサート試験法（畜水産物）」（平成28年4月4日）

厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知 食安発第0124001号「グリホサート試験法（農産物）」（平成17年1月24日）

13. 類型

C

シクラニリド試験法（畜産物）（案）

1. 分析対象化合物

シクラニリド

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。

シクラニリド標準品 本品はシクラニリド95%以上を含む。

5. 試験溶液の調製

1) 抽出

試料10.0 gに水10 mLを加え、ホモジナイズした後、アセトン50 mLを加え、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、上澄液を採る。残留物にアセトン25 mLを加えてホモジナイズし、上記と同様に遠心分離し、上澄液を採る。得られた上澄液を合わせ、アセトンを加えて正確に100 mLとする。この溶液から正確に5 mLを分取し、40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物にn-ヘキサン5 mLを加え、n-ヘキサン飽和アセトニトリル5 mLずつで2回振とう抽出する。抽出液を合わせ、40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物に水及びメタノール（9:1）混液1 mLを加えて溶かす。

2) 精製

① オクタデシルシリル化シリカゲルカラムクロマトグラフィー

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム（500 mg）に0.1 mol/L塩酸10 mL、メタノール5 mL及び水10 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、水及びメタノール（9:1）混液10 mL、水及びメタノール（1:1）混液10 mLを順次注入し、各流出液は捨てる。次いで0.5 vol%ギ酸・メタノール溶液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。この残留物にメタノール1 mLを加えて溶かす。

② エチレンジアミン-N-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

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（1,000 mg）に0.1 mol/L塩酸及びメタノール各10 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、0.5 vol%ギ酸・メタノール溶液15 mLを注入し、負荷液を含む全溶出液を採り、溶出液に0.5 vol%ギ酸・メタノール溶液を加えて正確に20 mLにしたものを試験溶液とする。

6. 検量線の作成

シクラニリド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、ピーク高法又はビ

一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0.00025 mg/Lである。

7. 定量

試験溶液をLC-MS/MS に注入し、6. の検量線でシクラニリドの含量を求める。

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100 mm、粒子径3 μm

カラム温度：40°C

移動相：0.1 vol%ギ酸・1 mmol/L酢酸アンモニウム溶液及びメタノールの混液（1：1）から（1：9）までの濃度勾配を3分間で行い、さらに（1：49）までの濃度勾配を2分間で行い、（1：49）で3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272、プロダクトイオン228、160

注入量：5 μL

保持時間の目安：6分

10. 定量限界

0.01 mg/kg

11. 留意事項

1) 試験法の概要

シクラニリドを試料からアセトンで抽出し、アセトニル/ヘキサン分配で脱脂する。オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム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 シクラニリドの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 272、プロダクトイオン 160

定性イオン（ m/z ）：プリカーサーイオン 272、プロダクトイオン 228

② 開発時に用いた遠心分離機における毎分3,000回転は、約1,820×gである。

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

12. 参考文献

なし

13. 類型

C

スピラマイシン試験法（畜水産物）（案）

1. 分析対象化合物

スピラマイシン I

ネオスピラマイシン I

2. 適用食品

畜産物、水産物（魚類）

ただし、畜産物の「肝臓」は適用対象外とする。

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。

スピラマイシン I 標準品 本品はスピラマイシン I 95%以上を含む。

ネオスピラマイシン I 標準品 本品はネオスピラマイシン I 95%以上を含む。

5. 試験溶液の調製

1) 抽出

① 筋肉、乳及び魚類の場合

試料10.0 gにメタノール50 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。残留物にメタノール25 mLを加えてホモジナイズし、上記と同様に遠心分離し、上澄液を採る。得られた上澄液を合わせ、メタノールを加えて正確に100 mLとする。この溶液から正確に10 mLを分取し、40°C以下で約1 mLに濃縮する。この溶液に0.5 vol%トリフルオロ酢酸9 mLを加える。

② 脂肪の場合

試料5.00 gにメタノール及び0.4 w/v%メタリン酸溶液（1:1）混液 50 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。残留物にメタノール及び0.4 w/v%メタリン酸溶液（1:1）混液 25 mLを加えてホモジナイズし、上記と同様に遠心分離し、上澄液を採る。得られた上澄液を合わせ、メタノールを加えて正確に100 mLとする。この溶液から正確に20 mLを分取し、40°C以下で約1 mLに濃縮する。この溶液に0.5 vol%トリフルオロ酢酸を加え、10 mLにする。

2) 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（200 mg）にメタノール及び0.5 vol%トリフルオロ酢酸各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、水及び1 vol%トリエチルアミン各5 mLを順次注入し、各流出液は捨てる。次いで、1 vol%トリエチルアミン・メタノール溶液 5 mLを注入し、溶出液に水を加えて正確に10 mLとしたものを試験溶

液とする。

6. 検量線の作成

スピラマイシン I 標準品及びネオスピラマイシン I 標準品をメタノールに溶かしてそれぞれ1,000 mg/Lとし、標準原液とする。各標準原液を適宜混合して1 vol%トリエチルアミン・メタノール溶液及び水（1:1）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0.01 mg/kgに相当する試験溶液中の濃度は0.001 mg/L（ネオスピラマイシン I はスピラマイシン I 換算）である。

7. 定量

試験溶液をLC-MS/MSに注入し、6. の検量線でスピラマイシン I 及びネオスピラマイシン I の各含量を求める。ネオスピラマイシン I を含むスピラマイシン I の含量を求める場合には、次式により求め る。

$$\text{スピラマイシン I (ネオスピラマイシン I を含む。) の含量 (ppm)} = A + B \times 1.206$$

A : スピラマイシン I の含量 (ppm)

B : ネオスピラマイシン I 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2.0 mm、長さ150 mm、粒子径3 μm

カラム温度：40°C

移動相：0.1 vol%ギ酸及び0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液の混液（17:3）で1分間保持した後、(3:2)までの濃度勾配を8分間で行う。

イオン化モード：ESI (+)

主なイオン (m/z)

スピラマイシン I : プリカーサーイオン422、プロダクトイオン174、101

ネオスピラマイシン I : プリカーサーイオン350、プロダクトイオン174、160

注入量：10 μL

保持時間の目安

スピラマイシン I : 8分

ネオスピラマイシン I : 7分

10. 定量限界

各化合物0.01 mg/kg（ネオスピラマイシン I はスピラマイシン I 換算）

11. 留意事項

1) 試験法の概要

スピラマイシン I 及びネオスピラマイシン I を試料からメタノール（脂肪の場合は、メタノール及び0.4 w/v%メタリン酸溶液（1:1）混液）で抽出し、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た後、LC-MS/MSで定量及び確認する方法である。なお、スピラマイシン I 及びネオスピラマイシン I のそれぞれについて定量を行い、ネオスピラマイシン I を含むスピラマイシン I の含量を求める場合には、ネオスピラマイシン I の含量に換算係数を乗じてスピラマイシン I の含量に換算し、これらの和を分析値とする。

2) 注意点

- ① 開発時に用いた遠心分離機における毎分3,000回転は、約2,130×gである。
- ② LC-MS/MS測定では、試料中の夾雜成分のキャリーオーバーの影響を軽減させるため、スピラマイシン I が溶出した後に移動相のアセトニトリル濃度を上げてカラムを洗浄すると良い。
- ③ LC-MS/MS測定を用いて、肝臓のスピラマイシン I 及びネオスピラマイシン I を測定する場合、いずれも速やかにチアゾリジン誘導体へ変換してしまい、設定した定量イオン及び定性イオンでは測定することができない。そのため、肝臓を試験する場合、バイオアッセイによる方法を用いる。
- ④ スピラマイシン I 及びネオスピラマイシン I 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。

スピラマイシン I

定量イオン (m/z) : プリカーサーイオン422、プロダクトイオン174
定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン422、プロダクトイオン101

ネオスピラマイシン I

定量イオン (m/z) : プリカーサーイオン350、プロダクトイオン174
定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン350、プロダクトイオン160

- ⑤ 試験法開発時に検討した食品：豚の筋肉、豚の脂肪、牛乳、ぶり

12. 参考文献

なし

13. 類型

C

スピロジクロフェン試験法（畜産物）（案）

1. 分析対象化合物

スピロジクロフェン

3-(2,4-ジクロロフェニル)-4-ヒドロキシ-1-オキサスピロ[4.5]デカ-3-エン-2-オン（以下「代謝物M1」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。

スピロジクロフェン標準品 本品はスピロジクロフェン95%以上を含む。

代謝物M1標準品 本品は代謝物M1 95%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50 mL及びギ酸0.1 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25 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100 mLとする。この溶液から正確に10 mLを分取し、40°C以下で約1 mLに濃縮する。これに10 w/v%塩化ナトリウム溶液10 mLを加え、酢酸エチル10 mLずつで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°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物にn-ヘキサン10 mLを加え、n-ヘキサン飽和アセトニトリル10 mLずつで3回振とう抽出する。抽出液を合わせ、40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物に0.1 vol%ギ酸及び0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液（7:3）混液10 mLを加えて溶かす。

2) 精製

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム（500 mg）に、アセトニトリル及び0.1 vol%ギ酸各10 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、0.1 vol%ギ酸及び0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液（7:3）混液10 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで、0.1 vol%ギ酸及び0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液（1:4）混液10 mLを注入し、流出液に0.1 vol%ギ酸及び0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液（1:4）混液を加えて正確に10 mLとしたものを試験溶液とする。

6. 検量線の作成

スピロジクロフェン標準品及び代謝物M1標準品をそれぞれアセトンに溶かして標準原液とする。各標準原液を適宜混合して0.1 vol%ギ酸及び0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液(1:4)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0.01 mg/kgに相当する試験溶液中濃度は0.001 mg/L(代謝物M1はスピロジクロフェン換算)である。

7. 定量

試験溶液をLC-MS/MSに注入し、6.の検量線でスピロジクロフェン及び代謝物M1の含量を求める。代謝物M1を含むスピロジクロフェンの含量を求める場合には、次式により求める。

$$\text{スピロジクロフェン (代謝物M1を含む。) の含量 (ppm)} = A + B \times 1.313$$

A : スピロジクロフェンの含量 (ppm)

B : 代謝物M1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3 μm

カラム温度：40 °C

移動相：2 mmol/Lギ酸アンモニウム溶液及び2 mmol/Lギ酸アンモニウム・メタノール溶液(1:1)混液で5分間保持した後、(1:4)で8分間保持する。

イオン化モード：ESI (+)

主なイオン (m/z)

スピロジクロフェン：プリカーサーイオン 411、プロダクトイオン 313

 プリカーサーイオン 413、プロダクトイオン 315

代謝物M1：プリカーサーイオン 313、プロダクトイオン 213

 プリカーサーイオン 315、プロダクトイオン 215

注入量：5 μL

保持時間の目安

スピロジクロフェン：13分

代謝物M1：3分

10. 定量限界

各化合物0.01 mg/kg(代謝物M1はスピロジクロフェン換算)

11. 留意事項

1) 試験法の概要

スピロジクロフェン及び代謝物M1を試料からギ酸酸性下アセトンで抽出し、酢酸エチルに転溶し

た後、アセトニトリル/ヘキサン分配で脱脂する。オクタデシ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、スピロジクロフェン及び代謝物M1のそれぞれについて定量を行い、代謝物M1を含むスピロジクロフェン含量を求める場合には、代謝物M1の含量に換算係数を乗じてスピロジクロフェンの含量に換算し、これらの和を分析値とする。

2) 注意点

- ① スピロジクロフェンから代謝物M1への変換を抑えるためにギ酸酸性下にて抽出を行う。
- ② 酢酸エチル転溶の際、エマルジョンが生成した場合は、毎分3,000回転で5分間遠心分離を行うと良い。
- ③ スピロジクロフェン及び代謝物M1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。

スピロジクロフェン

定量イオン (m/z) : プリカーサーイオン 411、プロダクトイオン 313

定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン 413、プロダクトイオン 315

代謝物M1

定量イオン (m/z) : プリカーサーイオン 313、プロダクトイオン 213

定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン 315、プロダクトイオン 215

- ④ 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

12. 参考文献

なし

13. 類型

C

フェンピロキシメート試験法（畜産物）（案）

1. 分析対象化合物

フェンピロキシメート

(E)-4-[(1,3-ジメチル-5-フェノキシピラゾール-4-イル)メチレンアミノオキシメチル]安息香酸(以下「代謝物D」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。

フェンピロキシメート標準品 本品はフェンピロキシメート95%以上を含む。

代謝物D標準品 本品は代謝物D 95%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、上記と同様に遠心分離し、上澄液を採る。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°C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°C以下で約2 mLに濃縮する。

2) 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)で得られた溶液を注入した後、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、フェンピロキシメート画分(溶出液I)とする。次いで、0.5 vol%酢酸・アセトニトリル溶液10 mLを注入し、溶出液を採り、代謝物D画分(溶出液II)とする。溶出液I及び溶出液IIをそれぞれ40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。各残留物をアセトニトリルに溶かし、それぞれ正確に5 mLとしたものを試験溶液とする。

6. 検量線の作成

フェンピロキシメート標準品及び代謝物D標準品のアセトニトリ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0.005 mg/kgに相当する試験溶液中の濃度は0.0001 mg/L(フェンピロキシメート換算)である。

7. 定量

試験溶液をLC-MS/MSに注入し、6. の検量線でフェンピロキシメート及び代謝物Dの含量を求める。代謝物Dを含むフェンピロキシメートの含量を求める場合には、次式により求める。

$$\text{フェンピロキシメート (代謝物Dを含む) の含量 (ppm)} = A + B \times 1.154$$

A : フェンピロキシメートの含量 (ppm)

B : 代謝物D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 μm

カラム温度：40°C

移動相：アセトニトリル及び0.1 vol%ギ酸の混液 (1:9) から (9:1) 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)

フェンピロキシメート：プリカーサーイオン422、プロダクトイオン366、138

代謝物D：プリカーサーイオン366、プロダクトイオン138、77

注入量：5 μL

保持時間の目安

フェンピロキシメート：13分

代謝物D：10分

10. 定量限界

各化合物0.005 mg/kg (代謝物Dはフェンピロキシメート換算)

11. 留意事項

1) 試験法の概要

フェンピロキシメート及び代謝物D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した後、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、LC-MS/MSで定量及び確認する方法である。

2) 注意点

① 精製において、フェンピロキシメート画分と代謝物D画分を合わせて測定を行うと、代謝物Dの測定において夾雑物の影響を受けることがあるため別々に測定する。夾雑物の影響が無い場合には、両画分を合わせて測定することも可能である。なお、検量線の作成に用いる標準溶液は混合

して調製しても良い。

- ② 開発時に用いた遠心分離機における毎分3,000回転は、約 $1,490 \times g$ である。
- ③ フェンピロキシメート及び代謝物D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。

フェンピロキシメート

定量イオン (m/z) : プリカーサーイオン422、プロダクトイオン366

定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン422、プロダクトイオン138

代謝物D

定量イオン (m/z) : プリカーサーイオン366、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366、プロダクトイオン77

- ④ 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

12. 参考文献

なし

13. 類型

C