

発出予定の試験法（案）の概要

試験法（案）	分析対象化合物	概要
エマメクチン安息香酸塩試験法（畜水産物） P2～	<ul style="list-style-type: none"> エマメクチン B_{1a} 8,9-Z-エマメクチン B_{1a} 	エマメクチン B _{1a} 及び 8,9-Z-エマメクチン B _{1a} を試料からアセトンで抽出し、アンモニア塩基性条件下で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（はちみつでは省略）する。スチレンジビニルベンゼ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、エマメクチン B _{1a} 及び 8,9-Z-エマメクチン B _{1a} のそれぞれについて定量を行い、エマメクチン B _{1a} 及び 8,9-Z-エマメクチン B _{1a} の含量にそれぞれ換算係数を乗じてエマメクチン安息香酸塩含量に換算し、これらの和を分析値とする。
オキシシン銅試験法（農産物） P5～	<ul style="list-style-type: none"> オキシシン銅 	オキシシン銅を試料から塩酸酸性下アセトンで抽出し、エチレンジアミン四酢酸四ナトリウム四水和物溶液、酢酸エチル及び塩化ナトリウムを加え、有機層に転溶する。塩酸酸性として水層に転溶し、水酸化ナトリウム溶液を添加して pH を調整した後、スチレンジビニルベンゼン共重合体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。
キンクロラック試験法（畜産物） P8～	<ul style="list-style-type: none"> キンクロラック 	キンクロラックを試料から塩酸酸性条件下アセトンで抽出し、塩基性条件下酢酸エチルで洗浄する。酸性条件下酢酸エチルに転溶し、LC-MS/MS で定量及び確認する方法である。
フルエンズルホン試験法（農産物） P10～	<ul style="list-style-type: none"> フルエンズルホン 3,4,4-トリフルオロプロパ-3-エン-1-イルズルホン酸（代謝物 BSA） 	フルエンズルホン及び代謝物 BSA を試料からアセトニトリルで抽出し、葉緑素を多く含む野菜についてはグラファイトカーボンミニカラムで精製した後、トリメチルアンモニウム塩修飾メタクリレート重合体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。

エマメクチン安息香酸塩試験法（畜水産物）（案）

1. 分析対象化合物

エマメクチン B1a

8,9-Z-エマメクチン B1a

2. 適用食品

畜水産物

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。

エマメクチン B1a 安息香酸塩標準品 本品はエマメクチン B1a 安息香酸塩 92%以上を含む。

8,9-Z-エマメクチン B1a 安息香酸塩標準品 本品は 8,9-Z-エマメクチン B1a 安息香酸塩 80%以上を含む。

5. 試験溶液の調製

1) 抽出

① 筋肉、脂肪、肝臓、乳、卵及び魚介類の場合

試料 10.0 g にアセトン 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ン 25 mL を加えてホモジナイズした後、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 20 w/v% 塩化ナトリウム溶液 10 mL 及びアンモニア水 1 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、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 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。この残留物にアセトニトリル及び水（1：1）混液 10 mL 及びアンモニア水 0.5 mL を加えて溶かす。

② はちみつの場合

試料 10.0 g に水 5 mL を加えて溶かす。これにアセトン 50 mL を加え、ホモジナイズした後、吸引ろ過する。ろ紙上の残留物に水 5 mL を加えて溶かし、アセトン 25 mL を加えてホモジナイズした後、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 20 w/v% 塩化ナトリウム溶液 10 mL 及びアンモニア水 1 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、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水（1：1）混液 10 mL 及びアンモニア水 0.5 mL を加えて溶かす。

2) 精製

スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラム (500 mg) にアセトニトリル及び水各 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、アセトニトリル及び水 (1 : 1) 混液 10 mL を注入し、流出液は捨てる。次いで、2 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液 5 mL を注入し、溶出液を採り、水で正確に 10 mL としたものを試験溶液とする。

6. 検量線の作成

エマメクチン B1a 安息香酸塩標準品及び 8,9-Z-エマメクチン B1a 安息香酸塩標準品をそれぞれアセトンに溶かして標準原液を調製する。各標準原液を適宜混合して 1 vol%ギ酸含有アセトニトリル及び水 (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 0.0005 mg/kg (エマメクチン安息香酸塩換算) に相当する試験溶液中濃度は各化合物 0.00005 mg/L (エマメクチン安息香酸塩換算) である。

7. 定量

試験溶液を LC-MS/MS に注入し、6. の検量線でエマメクチン B1a 及び 8,9-Z-エマメクチン B1a の各含量を求め、次式によりエマメクチン安息香酸塩の含量を求める。

$$\text{エマメクチン安息香酸塩の含量 (ppm)} = A \times 1.138 + B \times 1.138$$

A : エマメクチン B1a の含量 (ppm)

B : 8,9-Z-エマメクチン B1a 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 3.5 μ m

カラム温度 : 40 $^{\circ}$ C

移動相 : 0.02 vol%ギ酸及び 0.02 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液 (1 : 1) 混液で 0.5 分間保持した後、(1 : 9) までの濃度勾配を 9.5 分間で行い、(1 : 9) で 5 分間保持する。

イオン化モード : ESI (+)

主なイオン (m/z) :

エマメクチン B1a プリカーサーイオン 887、プロダクトイオン 158、82

8,9-Z-エマメクチン B1a プリカーサーイオン 887、プロダクトイオン 158、82

注入量 : 5 μ L

保持時間の目安 : エマメクチン B1a 5 分

8,9-Z-エマメクチン B1a 6 分

10. 定量限界

各化合物 0.0005 mg/kg (エマメクチン安息香酸塩換算)

11. 留意事項

1) 試験法の概要

エマメクチン B1a 及び 8,9-Z-エマメクチン B1a を試料からアセトンで抽出し、アンモニア塩基性条件下で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（はちみつでは省略）する。スチレンジビニルベンゼ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、エマメクチン B1a 及び 8,9-Z-エマメクチン B1a のそれぞれについて定量を行い、エマメクチン B1a 及び 8,9-Z-エマメクチン B1a の含量にそれぞれ換算係数を乗じてエマメクチン安息香酸塩含量に換算し、これらの和を分析値とする。

2) 注意点

- ① エマメクチン B1a 及び 8,9-Z-エマメクチン B1a 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。

エマメクチン B1a

定量イオン (m/z) : プリカーサーイオン 887、プロダクトイオン 158

定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン 887、プロダクトイオン 82

8,9-Z-エマメクチン B1a

定量イオン (m/z) : プリカーサーイオン 887、プロダクトイオン 158

定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン 887、プロダクトイオン 82

- ② エマメクチン B1a 及び 8,9-Z-エマメクチン B1a はガラスに吸着する場合がありますので、傷がついたものや表面が劣化したガラス器具を使用しないこと。
- ③ エマメクチン B1a 安息香酸塩標準品については、試験法開発時に入手可能であった標準品の純度規格が 92%以上であったため、4. 試薬、試液では、「エマメクチン B1a 安息香酸塩標準品 本品はエマメクチン B1a 安息香酸塩 92%以上を含む」とされたが、入手可能な場合には純度 95%以上の標準品を試験に用いるのが望ましい。また、8,9-Z-エマメクチン B1a 安息香酸塩標準品については、試験法開発時に入手可能であった標準品の純度規格が 80%以上であったため、4. 試薬、試液では、「8,9-Z-エマメクチン B1a 安息香酸塩標準品 本品は 8,9-Z-エマメクチン B1a 安息香酸塩 80%以上を含む」とされたが、入手可能な場合には純度 95%以上の標準品を試験に用いるのが望ましい。
- 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、鶏卵、はちみつ（そば蜜）、うなぎ、しじみ

12. 参考文献

なし

13. 類型

C

オキシシン銅試験法（農産物）（案）

1. 分析対象化合物

オキシシン銅

2. 適用食品

農産物（穀類、果実、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。

スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラム（500 mg） 内径 8～13 mm のポリエチレン製のカラム管に、スチレンジビニルベンゼン共重合体 500 mg 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。

エチレンジアミン四酢酸四ナトリウム四水和物 純度 98%以上の試薬を用いる。

オキシシン銅標準品 本品はオキシシン銅 98%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 塩酸 20 mL を加え 30 分間放置する。これにアセトン 100 mL を加え、ホモジナイズした後、吸引ろ過する。ろ紙上の残留物にアセトン 50 mL を加えてホモジナイズした後、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 200 mL とする。この溶液から正確に 10 mL を分取し、30 mmol/L エチレンジアミン四酢酸四ナトリウム四水和物溶液 10 mL、酢酸エチル 10 mL 及び塩化ナトリウム 2 g を加えて振とうする。毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離し、有機層を採る。有機層を採った後の容器を酢酸エチル 2～3 mL で洗い、洗液を先の有機層に合わせる。合わせた有機層に 30 mmol/L エチレンジアミン四酢酸四ナトリウム四水和物溶液 10 mL、塩化ナトリウム 2 g 及び 2 mol/L 塩酸 3 mL を加えて振とうする。毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離し、有機層を捨てる。残った水層に 2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 3 mL 及び水 10 mL を加えて混合する。

② 果実及び野菜の場合

試料を正確に量り、重量比で 1/10 量の 2 mol/L 塩酸を加え磨砕均一化した後、試料 20.0 g に相当する量を量り採る。これにアセトン 100 mL を加え、ホモジナイズした後、吸引ろ過する。ろ紙上の残留物にアセトン 50 mL を加えてホモジナイズした後、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 200 mL とする。この溶液から正確に 10 mL を分取し、30 mmol/L エチレンジアミン四酢酸四ナトリウム四水和物溶液 10 mL、酢酸エチル 10 mL 及び塩化ナトリウム 2 g を加えて

振とうする。毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離し、有機層を採る。有機層を採った後の容器を酢酸エチル 2~3 mL で洗い、洗液を先の有機層に合わせる。合わせた有機層に 30 mmol/L エチレンジアミン四酢酸四ナトリウム四水和物溶液 10 mL、塩化ナトリウム 2 g 及び 2 mol/L 塩酸 3 mL を加えて振とうする。毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離し、有機層を捨てる。残った水層に 2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 3 mL 及び水 10 mL を加えて混合する。

2) 精製

スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラム (500 mg) にメタノール、水及び 30 mmol/L エチレンジアミン四酢酸四ナトリウム四水和物溶液各 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、水 10 mL、水及びメタノール (2 : 3) 混液 10 mL を順次注入し、流出液は捨てる。次いで、メタノール 10 mL を注入し、溶出液を水で正確に 20 mL としたものを試験溶液とする。また、穀類の場合は、溶出液を 40°C 以下で濃縮し、溶媒を除去した後、残留物を水及メタノール (1 : 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

オキシシン銅標準品の水及びメタノール (1 : 1) 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 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. の検量線でオキシシン銅の含量を求める。

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 100 mm、粒子径 3 µm

カラム温度 : 40°C

移動相 : 0.05 vol% 酢酸及び 0.05 vol% 酢酸・アセトニトリル溶液の混液 (19 : 1) で 0.5 分間保持した後、(1 : 9) までの濃度勾配を 4.5 分間で行い、(1 : 9) で 5 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 146、プロダクトイオン 128、118

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

オキシシン銅を試料から塩酸酸性下アセトンで抽出し、エチレンジアミン四酢酸四ナトリウム四水和物溶液、酢酸エチル及び塩化ナトリウムを加え、有機層に転溶する。塩酸酸性として水層に転溶し、水酸化ナトリウム溶液を添加して pH を調整した後、スチレンジビニルベンゼン共重合体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 スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラム (500 mg) は、内径 22 mm のカラムも使用可能である。
- ② オキシシン銅の 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 146、プロダクトイオン 118
定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン 146、プロダクトイオン 128
- ③ オキシシン銅は、ばれいしょ等の中性の試料中では分解し易いことから、分解を防止するために試料調製時に塩酸を添加する。オレンジ等の試料では塩酸を添加しなくとも試験可能である。
- ④ オキシシン銅は弱酸性下で解離して水溶性になる。2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を添加した後、pH が 5 程度になっていることを確認する。
- ⑤ オキシシン銅は配位化合物であるため、カラム充填剤であるオクタデシルシリル化シリカゲル中の金属不純物に配位しテーリングを起こす場合がある。そのため、高純度シリカゲルベースの充填剤、かつ、エンドキャッピング処理が充分に行われている分析カラムを選択すること。
- ⑥ 配位化合物であるオキシシン銅の容器への吸着を防ぐため、ポリプロピレン製遠心管を使用すること。
- ⑦ 試験法開発時に検討した食品：小麦、パセリ、キャベツ、ばれいしょ、オレンジ、りんご

12. 参考文献

なし

13. 類型

C

キンクロラック試験法（畜産物）（案）

1. 分析対象化合物

キンクロラック

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。

キンクロラック標準品 本品はキンクロラック 98%以上を含む。

5. 試験溶液の調製

試料 10.0 g にアセトン及び塩酸（99：1）混液 100 mL を加え、ホモジナイズした後、吸引ろ過する。ろ紙上の残留物にアセトン及び塩酸（99：1）混液 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、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 4 mL を分取し、2 w/v%炭酸水素ナトリウム含有 10 w/v%塩化ナトリウム溶液 40 mL を加える。酢酸エチル 40 mL を加え、振とうし、酢酸エチル層を除去する操作を 2 回繰り返す。水層に塩酸 1 mL を加え、酢酸エチル 40 mL 及び 20 mL 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。この残留物にメタノールを加えて溶かし、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

キンクロラック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. の検量線でキンクロラックの含量を求める。

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：5 mmol/L酢酸アンモニウム溶液及び5 mmol/L酢酸アンモニウム・メタノール溶液の混液（9：1）から（1：19）までの濃度勾配を20分間で行う。

イオン化モード：ESI（+）

主なイオン（ m/z ）：プリカーサーイオン 242、プロダクトイオン 196、161

注入量：2 μL

保持時間の目安：11分

10. 定量限界

0.01 mg/kg

11. 留意事項

1) 試験法の概要

キンクロラックを試料から塩酸酸性条件下アセトンで抽出し、塩基性条件下酢酸エチルで洗浄する。酸性条件下酢酸エチルに転溶し、LC-MS/MS で定量及び確認する方法である。

2) 注意点

① キンクロラックの 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 242、プロダクトイオン 161

定性イオン（ m/z ）：プリカーサーイオン 242、プロダクトイオン 196

② 水層に塩酸を加えると激しく発泡するので、発泡が収まってから振とうする。

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、鶏卵

12. 参考文献

なし

13. 類型

C

フルエンズルホン試験法（農産物）（案）

1. 分析対象化合物

フルエンズルホン

3,4,4-トリフルオロブタ-3-エン-1-イルズルホン酸（以下「代謝物 BSA」という。）

2. 適用食品

野菜、果実（酸性を示す食品）

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。

トリメチルアンモニウム塩修飾メタクリレート重合体ミニカラム（500 mg） 内径 12~13 mm のポリエチレン製のカラム管に、トリメチルアンモニウム塩修飾メタクリレート重合体 500 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。

フルエンズルホン標準品 本品はフルエンズルホン 95%以上を含む。

代謝物 BSA ナトリウム塩標準品 純度が明らかなもの。

5. 試験溶液の調製

1) 抽出

①葉緑素を多く含む野菜の場合

試料 20.0 g にアセトニトリル 100 mL を加え、ホモジナイズした後、毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離し、上澄液を採る。残留物にアセトニトリル 50 mL 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、得られた上澄液を合わせ、アセトニトリルを加えて正確に 200 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 5 mL に濃縮する。

②その他の野菜及び果実の場合

試料 20.0 g にアセトニトリル 100 mL を加え、ホモジナイズした後、毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離し、上澄液を採る。残留物にアセトニトリル 50 mL 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、得られた上澄液を合わせ、アセトニトリルを加えて正確に 200 mL とする。この溶液から正確に 20 mL を分取し、水 5 mL を加え、40°C以下で約 2 mL に濃縮する。

2) 精製

①葉緑素を多く含む野菜の場合

a グラファイトカーボンカラムクロマトグラフィー

グラファイトカーボンミニカラム（500 mg）にアセトニトリル 10 mL、アセトニトリル及び水（9：

1) 混液10 mLを順次注入し、各流出液は捨てる。このカラムに1) ①で得られた溶液を注入し、さらにアセトニトリル及び水 (9 : 1) 混液20 mLを注入して、負荷液を含む全溶出液を採り、これに水5 mLを加え、40°C以下で約2 mLに濃縮する。

b トリメチルアンモニウム塩修飾メタクリレート重合体カラムクロマトグラフィー

トリメチルアンモニウム塩修飾メタクリレート重合体ミニカラム (500 mg) にアセトニトリル10 mL、アセトニトリル及び水 (1 : 4) 混液10 mLを順次注入し、各流出液は捨てる。このカラムにaで得られた溶液を注入した後、アセトニトリル及び水 (1 : 4) 混液10 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで、アセトニトリル及び水 (2 : 3) 混液10 mLを注入し、溶出液を採り、水を加えて正確に20 mLとしたものをフルエンシルホン試験溶液とする。このカラムにアセトニトリル10 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで、アセトニトリル及び0.2 mol/L塩酸 (9 : 1) 混液20 mLを注入し、溶出液を採り、アセトニトリル及び25%アンモニア水 (9 : 1) 混液5 mLを加えて振り混ぜる。この溶液を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水 (1 : 4) 混液に溶解し、正確に20 mLとしたものを代謝物BSA試験溶液とする。

②その他の野菜及び果実の場合

トリメチルアンモニウム塩修飾メタクリレート重合体ミニカラム (500 mg) にアセトニトリル10 mL、アセトニトリル及び水 (1 : 4) 混液 10 mL を順次注入し、各流出液は捨てる。このカラムに1) ②で得られた溶液を注入した後、アセトニトリル及び水 (1 : 4) 混液 10 mL を注入し、流出液は捨てる。次いで、アセトニトリル及び水 (2 : 3) 混液 10 mL を注入し、溶出液を採り、水を加えて正確に 20 mL としたものをフルエンシルホン試験溶液とする。このカラムにアセトニトリル 10 mL を注入し、流出液は捨てる。次いで、アセトニトリル及び 0.2 mol/L 塩酸 (9 : 1) 混液 20 mL を注入し、溶出液を採り、アセトニトリル及び 25%アンモニア水 (9 : 1) 混液 5 mL を加えて振り混ぜる。この溶液を 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水 (1 : 4) 混液に溶解し、正確に 20 mL としたものを代謝物 BSA 試験溶液とする。

6. 検量線の作成

フルエンシルホン標準品及び代謝物 BSA ナトリウム塩標準品のアセトニトリル及び水 (1 : 4) 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 0.005 mg/kg (代謝物 BSA はフルエンシルホン換算) に相当する試験溶液中の濃度は 0.0005 mg/L (代謝物 BSA はフルエンシルホン換算) である。

7. 定量

試験溶液を LC-MS/MS に注入し、6. の検量線でフルエンシルホン及び代謝物 BSA の含量を求める。代謝物 BSA を含むフルエンシルホンの含量を求める場合には、次式により求める。

フルエンシルホン (代謝物 BSA を含む) の含量 (ppm) = A + B × 1.534

A : フルエンシルホンの含量 (ppm)

B : 代謝物 BSA 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：極性基導入型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 4 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 : 4) で 5 分間保持し、(1 : 4) から (99 : 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

フルエンズルホン：ESI (+)

代謝物 BSA：ESI (-)

主なイオン (*m/z*)

フルエンズルホン：プリカーサーイオン 292、プロダクトイオン 166、109

代謝物 BSA：プリカーサーイオン 189、プロダクトイオン 81、80

注入量：10 μL

保持時間の目安

フルエンズルホン：15 分

代謝物 BSA：10 分

10. 定量限界

各化合物 0.005 mg/kg (代謝物 BSA はフルエンズルホン換算)

11. 留意事項

1) 試験法の概要

フルエンズルホン及び代謝物 BSA を試料からアセトニトリルで抽出し、葉緑素を多く含む野菜についてはグラファイトカーボンミニカラムで精製した後、トリメチルアンモニウム塩修飾メタクリレート重合体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トリメチルアンモニウム塩修飾メタクリレート重合体ミニカラムにフルエンズルホンを保持させるため、負荷する際には極力アセトニトリルを除去する必要がある。ただし、乾固をさせるとフルエンズルホンが損失するため、カラムへの負荷液の調製にあたっては、水 5 mL を加え、乾固させないように注意して 40°C以下で約 2 mL に濃縮すること。
- ②代謝物 BSA は、グラファイトカーボンミニカラムのロットにより溶出状況が変わる場合があるため注意すること。
- ③フルエンズルホン及び代謝物 BSA 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。

フルエンシルホン

定量イオン (m/z) : プリカーサーイオン 292、プロダクトイオン 166

定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン 292、プロダクトイオン 109

代謝物 BSA

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 81

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 80

- ④試験法開発時には、代謝物 BSA ナトリウム塩標準品は高純度の標準品が入手できなかったため、
4. 試薬、試液では「代謝物 BSA ナトリウム塩標準品 純度が明らかなもの。」とされたが、入手可能な場合には純度 95%以上の標準品を試験に用いることが望ましい。
- ⑤試験法開発時に検討した食品：ほうれんそう、キャベツ、かんしょ、すいか、いちご

12. 参考文献

なし

13. 類型

C