

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
アセトクロール試験法（農産物） P3～	<ul style="list-style-type: none"> アセトクロール 塩基性条件下で EMA 【2-エチル-6-メチルアニリン】に変換される代謝物 塩基性条件下で HEMA 【2-(1-ヒドロキシエチル)-6-メチルアニリン】に変換される代謝物 	アセトクロール及びその代謝物を試料からメタノールで抽出した後、塩基性条件下で加熱して EMA 及び HEMA に変換し、4 級アンモニウム塩修飾ジビニルベンゼン- <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、EMA 及び HEMA のそれぞれについて定量を行い、塩基性条件下で EMA 及び HEMA に変換される代謝物を含むアセトクロールの含量を求める場合には、EMA 及び HEMA の含量にそれぞれ換算係数を乗じてアセトクロールの含量に変換し、これらの和を分析値とする。
アバメクチン試験法（農産物） P7～	<ul style="list-style-type: none"> アベルメクチン B_{1a} アベルメクチン B_{1b} 8,9-<i>Z</i>-アベルメクチン B_{1a} 	アベルメクチン B _{1a} 、アベルメクチン B _{1b} 及び 8,9- <i>Z</i> -アベルメクチン B _{1a} を試料からアセトンで抽出し、酢酸エチルに転溶する。穀類、豆類及び種実類の場合は、アセトニトリル/ヘキサン分配で脱脂した後、茶の場合は、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、グラファイトカーボン/アミノプロピルシリル化シリカゲル積層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。アベルメクチン B _{1a} 、アベルメクチン B _{1b} 及び 8,9- <i>Z</i> -アベルメクチン B _{1a} のそれぞれについて定量を行い、これらの含量の和を分析値とする。
アバメクチン試験法（畜産物） P11～	<ul style="list-style-type: none"> アベルメクチン B_{1a} アベルメクチン B_{1b} 8,9-<i>Z</i>-アベルメクチン B_{1a} 	アベルメクチン B _{1a} 、アベルメクチン B _{1b} 及び 8,9- <i>Z</i> -アベルメクチン B _{1a} を試料からアセトンで抽出し、酢酸エチルに転溶する。アセトニトリル/ヘキサン分配で脱脂し、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。アベルメクチン B _{1a} 、アベルメクチン B _{1b} 及び 8,9- <i>Z</i> -アベルメクチン B _{1a} のそれぞれについて定量を行い、これらの含量の和を分析値とする。
クロルメコート試験法（畜産物） P14～	・クロルメコートクロリド	クロルメコートクロリドを試料から塩化ナトリウム及びギ酸存在下メタノールで抽出し、アセトニトリル/ヘキサン分配で脱脂する。グラファイトカーボン/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。

		ル積層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、有効成分の一般名はクロルメコートクロリドであるが、農薬の品目名としてはクロルメコートが使用されている。
シクロプロトリン試験法（農産物） P16～	・シクロプロトリン	シクロプロトリンを試料からアセトニトリルで抽出し、塩析で水を除いた後、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム及びグラファイトカーボン/アミノプロピルシリル化シリカゲル積層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。本法の「5. 試験溶液の調製」は、試料の濃縮率を除き「LC/MS による農薬等の一斉試験法 I（農産物）」に準拠したものである。
シクロプロトリン試験法（水産物） P19～	・シクロプロトリン	シクロプロトリンを試料からアセトンで抽出し、 <i>n</i> -ヘキサンに転溶する。アセトニトリル/ヘキサン分配で脱脂した後、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、LC-MS/MS で定量及び確認する方法である。
ビコザマイシン試験法（畜水産物） P21～	・ビコザマイシン	ビコザマイシンを試料から <i>n</i> -ヘキサン存在下アセトニトリルで抽出し、トリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲル/エチレンジアミン- <i>N</i> -プロピルシリル化シリカゲル積層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。

アセトクロール試験法（農産物）（案）

1. 分析対象化合物

アセトクロール

塩基性条件下でEMA【2-エチル-6-メチルアニリン】に変換される代謝物

塩基性条件下でHEMA【2-(1-ヒドロキシエチル)-6-メチルアニリン】に変換される代謝物

2. 適用食品

穀類、豆類、種実類、とうもろこし（未成熟）

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。

4級アンモニウム塩修飾ジビニルベンゼン-*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、4級アンモニウム塩修飾ジビニルベンゼン-*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。

アセトクロール標準品 本品はアセトクロール95%以上を含む。

EMA標準品 本品はEMA97%以上を含む。

HEMA標準品 本品はHEMA95%以上を含む。

5. 試験溶液の調製

1) 抽出

穀類、豆類及び種実類の場合は、試料10.0 gに水20 mLを加え、30分間放置する。とうもろこし（未成熟）の場合は、試料20.0 gを量り採る。

これにメタノール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。この溶液から正確に20 mL（とうもろこし（未成熟）の場合は10 mL）を分取し、40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。

2) EMA及びHEMAへの変換

1) で得られた残留物にメタノール4 mLを加えて溶かし、反応容器に移す。反応容器を氷冷しながら50%水酸化ナトリウム溶液4 mLを加え、密栓した後、120℃で4時間加熱する。反応容器を室温程度まで放冷した後、氷冷する。反応容器を開栓し、氷冷した反応液を、予め氷冷した水30 mLに滴下する。反応容器を水10 mLで洗い、洗液を合わせる。

3) 精製

4級アンモニウム塩修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム（150 mg）にアセトニトリル2 mL及び水3 mLを順次注入し、各流出液は捨てる。このカラムに2) で得られた溶液を注入した後、水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（7：3）混液4 mLを注入し、溶出液にアセトニトリル及び水（7：3）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

EMA標準品及びHEMA標準品のアセトニトリル及び水（7：3）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（アセトクロール換算）に相当する試験溶液中濃度は0.001 mg/L（アセトクロール換算）である。

7. 定量

試験溶液をLC-MS/MSに注入し、6. の検量線でEMA及びHEMAの含量を求める。塩基性条件下でEMA及びHEMAに変換される代謝物を含むアセトクロールの含量を求める場合には、次式により求める。

アセトクロール（塩基性条件下でEMA及びHEMAに変換される代謝物を含む。）の含量
(ppm) = $A \times 1.995 + B \times 1.784$

A : EMAの含量 (ppm)

B : HEMA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℃

移動相：0.01 vol%ギ酸及び0.01 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液の混液（9：1）で5分間保持した後、（1：19）までの濃度勾配を15分間で行う。

イオン化モード：ESI (+)

主なイオン (m/z)

EMA：プリカーサーイオン136、プロダクトイオン119、117

HEMA：プリカーサーイオン152、プロダクトイオン119、91

注入量：3 μL

保持時間の目安：

EMA 15分

HEMA 9分

10. 定量限界

アセトクロール：0.01 mg/kg

塩基性条件下でEMAに変換される代謝物：0.01 mg/kg（アセトクロール換算）

塩基性条件下でHEMAに変換される代謝物：0.01 mg/kg（アセトクロール換算）

11. 留意事項

1) 試験法の概要

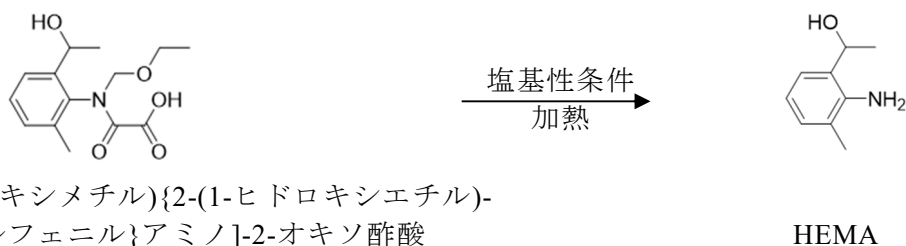
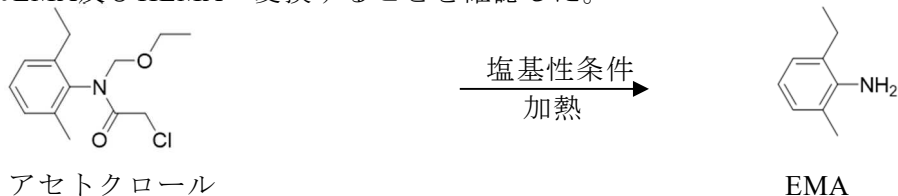
アセトクロール及びその代謝物を試料からメタノールで抽出した後、塩基性条件下で加熱してEMA及びHEMAに変換し、4級アンモニウム塩修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムで精製した後、LC-MS/MSで定量及び確認する方法である。なお、EMA及びHEMAのそれぞれについて定量を行い、塩基性条件下でEMA及びHEMAに変換される代謝物を含むアセトクロールの含量を求める場合には、EMA及びHEMAの含量にそれぞれ換算係数を乗じてアセトクロールの含量に変換し、これらの和を分析値とする。

2) 注意点

① 抽出液の溶媒を除去する際、水が残る場合はエタノールを10 mL程度（約5 mLずつ、2回

程度) 加えて濃縮するとよい。

- ② アセトクロール標準品を用いて添加回収試験を実施し、EMAへの変換が十分に行われていることを確認すること。アセトクロールからEMAへ十分に変換すれば、HEMAへの変換も行われると考えられる。なお、試験法開発時はアセトクロール標準品及び2-[(エトキシメチル){2-(1-ヒドロキシエチル)-6-メチルフェニル}アミノ]-2-オキシ酢酸標準品を用いてそれぞれEMA及びHEMAへ変換することを確認した。



EMA及びHEMAへの変換

- ③ 抽出で得られた残留物をメタノールに再溶解した後、50%水酸化ナトリウム溶液を加えて混合するとやや発熱するため、EMA及びHEMAが揮散するおそれがある。このため、反応容器を氷冷しながら、50%水酸化ナトリウム溶液を加える。
- ④ 変換反応ではアルミシールバイアル等の気密性の高い容器を用いる。
- ⑤ 変換反応後、反応液に水を加えると激しく発熱し、EMA及びHEMAが揮散するおそれがある。このため、反応液を水で希釈する際は、氷冷した反応液を、予め氷冷した水に滴下する。
- ⑥ 変換反応後、反応液を水で希釈すると浮遊物が生成する可能性がある。ミニカラム精製においては浮遊物も含めてミニカラムに注入する。ミニカラムに注入する際、浮遊物をはじめに注入すると流速が遅くなる場合があるため、浮遊物をなるべく採らずに溶液を注入した後、少量残った浮遊物を洗浄操作で用いる水(約2 mLずつ、3回程度)に懸濁してミニカラムに注入するとよい。浮遊物は、この水に懸濁してミニカラムに注入する操作中に溶解する。なお、流速が遅い場合は必要に応じて吸引するとよい。
- ⑦ EMA及びHEMA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。

EMA

定量イオン (m/z) : プリカーサーイオン136、プロダクトイオン119

定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン136、プロダクトイオン117

HEMA

定量イオン (m/z) : プリカーサーイオン152、プロダクトイオン119

定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン152、プロダクトイオン91

- ⑧ HEMAのLC-MS/MS測定で、感度が不足する場合は以下のイオンを使用するとよい。

定量イオン (m/z) : プリカーサーイオン134、プロダクトイオン115

定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン134、プロダクトイオン119

- ⑨ 試験法開発時に検討した食品：大豆、とうもろこし(未成熟)

12. 参考文献
なし

13. 類型
C

アバメクチン試験法（農産物）（案）

1. 分析対象化合物

アベルメクチンB_{1a}

アベルメクチンB_{1b}

8,9-Z-アベルメクチンB_{1a}

2. 適用食品

農産物

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。

アベルメクチン B_{1a} 標準品 本品はアベルメクチン B_{1a} 95%以上を含む。

アベルメクチン B_{1b} 標準品 本品はアベルメクチン B_{1b} 95%以上を含む。

8,9-Z-アベルメクチン B_{1a} 標準品 本品は 8,9-Z-アベルメクチン B_{1a} 95%以上を含む。

5. 試験溶液の調製

1) 抽出

① 穀類、豆類及び種実類の場合

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、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 20 mL を分取し、40°C以下で濃縮して、アセトンを除去する。これに 10 w/v%塩化ナトリウム溶液 50 mL を加え、酢酸エチル 50 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 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トルエン（3：1）混液 2 mL を加えて溶かす。

② 果実及び野菜の場合

試料 20.0 g 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、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、40°C以下で濃縮して、アセトンを除去する。これに 10 w/v%塩化ナトリウム溶液 50 mL を加え、酢酸エチル 50 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。この残留物にアセトニトリル及びトルエン（3：1）混液 2 mL を加えて溶かす。

③ 茶の場合

試料 5.00 g に水 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、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、40°C以下で濃縮して、アセトンを除去する。これに 10 w/v%塩化ナトリウム溶液 50 mL を加え、酢酸エチル 50 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。この残留物にアセトニトリル 2 mL を加えて溶かす。

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム (1,000 mg) にアセトニトリル 10 mL を注入し、流出液は捨てる。このカラムに上記のアセトニトリル溶液を注入した後、さらにアセトニトリル 20 mL を注入し、負荷液を含む全溶出液を採り、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トルエン (3 : 1) 混液 2 mL を加えて溶かす。

2) 精製

グラファイトカーボン/アミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム (500 mg/500 mg) にアセトニトリル及びトルエン (3 : 1) 混液 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、アセトニトリル及びトルエン (3 : 1) 混液 25 mL を注入し、負荷液を含む全溶出液を採り、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

各標準品をそれぞれアセトニトリル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アセトニトリル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、穀類、豆類、種実類、果実及び野菜にあつては、試料中 0.005 mg/kg に相当する試験溶液中濃度は各化合物 0.005 mg/L である。茶にあつては、試料中 0.02 mg/kg に相当する試験溶液中濃度は各化合物 0.005 mg/L である。

7. 定量

試験溶液を LC-MS/MS に注入し、6. の検量線でアベルメクチン B_{1a}、アベルメクチン B_{1b} 及び 8,9-Z-アベルメクチン B_{1a} 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・アセトニトリル溶液の混液 (1 : 9) で 1 分間保持した後、(1 : 19) までの濃度勾配を 7 分間で行い、(1 : 19) で 2 分間保持す

る。

イオン化モード：ESI (+)

主なイオン (m/z)

アベルメクチン B_{1a}：プリカーサーイオン 891、プロダクトイオン 567、305、145

アベルメクチン B_{1b}：プリカーサーイオン 877、プロダクトイオン 553、291、145

8,9-Z-アベルメクチン B_{1a}：プリカーサーイオン 891、プロダクトイオン 567、305、145

注入量：5 μ L

保持時間の目安

アベルメクチン B_{1a}：5分

アベルメクチン B_{1b}：4分

8,9-Z-アベルメクチン B_{1a}：6分

10. 定量限界

穀類、豆類、種実類、果実及び野菜：各化合物 0.005 mg/kg

茶：各化合物 0.02 mg/kg

11. 留意事項

1) 試験法の概要

アベルメクチン B_{1a}、アベルメクチン B_{1b}及び8,9-Z-アベルメクチン B_{1a}を試料からアセトンで抽出し、酢酸エチルに転溶する。穀類、豆類及び種実類の場合は、アセトニトリル/ヘキサン分配で脱脂した後、茶の場合は、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、グラファイトカーボン/アミノプロピルシリル化シリカゲル積層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。アベルメクチン B_{1a}、アベルメクチン B_{1b}及び8,9-Z-アベルメクチン B_{1a}のそれぞれについて定量を行い、これらの含量の和を分析値とする。

2) 注意点

- ① 市販の標準品には、それぞれ互いの分析対象化合物を含有していることがあることから、混合標準溶液を調製する場合には単一物質として精製された標準品を用いること。
- ② 測定に際して食品マトリックスの影響がある場合には、試験溶液の希釈や測定条件の検討を行うことが望ましい。
- ③ アベルメクチン B_{1a}、アベルメクチン B_{1b}及び8,9-Z-アベルメクチン B_{1a}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。

アベルメクチン B_{1a}
定量イオン (m/z)：プリカーサーイオン891、プロダクトイオン567
定性イオン (m/z)：プリカーサーイオン891、プロダクトイオン305

アベルメクチン B_{1b}
定量イオン (m/z)：プリカーサーイオン877、プロダクトイオン553
定性イオン (m/z)：プリカーサーイオン877、プロダクトイオン291

8,9-Z-アベルメクチン B_{1a}
定量イオン (m/z)：プリカーサーイオン891、プロダクトイオン567
定性イオン (m/z)：プリカーサーイオン891、プロダクトイオン305
- ④ 試験法開発時に検討した食品：玄米、大豆、ほうれんそう、ねぎ、ばれいしょ、オレンジ、りん

ご、茶

12. 参考文献
なし

13. 類型
C

アバメクチン試験法（畜産物）（案）

1. 分析対象化合物

アベルメクチンB_{1a}

アベルメクチンB_{1b}

8,9-Z-アベルメクチンB_{1a}

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。

アベルメクチン B_{1a} 標準品 本品はアベルメクチン B_{1a} 95%以上を含む。

アベルメクチン B_{1b} 標準品 本品はアベルメクチン B_{1b} 95%以上を含む。

8,9-Z-アベルメクチン B_{1a} 標準品 本品は 8,9-Z-アベルメクチン B_{1a} 95%以上を含む。

5. 試験溶液の調製

1) 抽出

① 筋肉、肝臓及び腎臓の場合

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、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以下で濃縮して、アセトンを除去する。これに 10 w/v%塩化ナトリウム溶液 50 mL を加え、酢酸エチル 50 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 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以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物にアセトニトリル 2 mL を加えて溶かす。

② 脂肪及び乳の場合

試料 5.00 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、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 20 mL を分取し、40°C以下で濃縮して、アセトンを除去する。これに 10 w/v%塩化ナトリウム溶液 50 mL を加え、酢酸エチル 50 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 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以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物にアセトニトリル 2 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 (1,000 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 20 mL を注入し、負荷液を含む全溶出液を採り、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

各標準品をそれぞれアセトニトリル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アセトニトリル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 0.005 mg/kg に相当する試験溶液中濃度は 0.005 mg/L である。

7. 定量

試験溶液を LC-MS/MS に注入し、6. の検量線でアベルメクチン B_{1a}、アベルメクチン B_{1b} 及び 8,9-Z-アベルメクチン B_{1a} 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・アセトニトリル溶液の混液 (1 : 9) で 1 分間保持した後、(1 : 19) までの濃度勾配を 7 分間で行い、(1 : 19) で 2 分間保持する。

イオン化モード：ESI (+)

主なイオン (*m/z*)

アベルメクチン B_{1a}：プリカーサーイオン 891、プロダクトイオン 567、305、145

アベルメクチン B_{1b}：プリカーサーイオン 877、プロダクトイオン 553、291、145

8,9-Z-アベルメクチン B_{1a}：プリカーサーイオン 891、プロダクトイオン 567、305、145

注入量：5 µL

保持時間の目安

アベルメクチン B_{1a}：5 分

アベルメクチン B_{1b}：4 分

8,9-Z-アベルメクチン B_{1a}：6 分

10. 定量限界

各化合物 0.005 mg/kg

11. 留意事項

1) 試験法の概要

アベルメクチン B_{1a}、アベルメクチン B_{1b} 及び 8,9-Z-アベルメクチン B_{1a} を試料からアセトンで抽出し、酢酸エチルに転溶する。アセトニトリル/ヘキサン分配で脱脂し、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。アベルメクチン B_{1a}、アベルメクチン B_{1b} 及び 8,9-Z-アベルメクチン B_{1a} のそれぞれについて定量を行い、これらの含量の和を分析値とする。

2) 注意点

- ① 市販の標準品には、それぞれ互いの分析対象化合物を含有していることがあることから、混合標準溶液を調製する場合には単一物質として精製された標準品を用いること。
- ② アベルメクチン B_{1a}、アベルメクチン B_{1b} 及び 8,9-Z-アベルメクチン B_{1a} 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。

アベルメクチン B_{1a}

定量イオン (m/z) : プリカーサーイオン 891、プロダクトイオン 567

定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン 891、プロダクトイオン 305

アベルメクチン B_{1b}

定量イオン (m/z) : プリカーサーイオン 877、プロダクトイオン 553

定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン 877、プロダクトイオン 291

8,9-Z-アベルメクチン B_{1a}

定量イオン (m/z) : プリカーサーイオン 891、プロダクトイオン 567

定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン 891、プロダクトイオン 305

- 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

クロルメコート試験法（畜産物）（案）

1. 分析対象化合物

クロルメコートクロリド

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。

グラファイトカーボン/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（500 mg/500 mg） 内径12~13 mmのポリエチレン製のカラム管に、上層にグラファイトカーボンを、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を各500 mg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。

クロルメコートクロリド標準品 本品はクロルメコートクロリド98%以上を含む。

5. 試験溶液の調製

1) 抽出

試料10.0 gに塩化ナトリウム1 g及び1 vol%ギ酸10 mLを加え、ホモジナイズした後、メタノール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以下で約1 mLに濃縮する。

2) 精製

グラファイトカーボン/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（500 mg/500 mg）に0.1 mol/L塩酸10 mL及びアセトニトリル20 mLを順次注入し、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、さらにアセトニトリル8 mLを注入し、負荷液を含む全溶出液を採り、溶出液をアセトニトリルで正確に10 mLにしたものを試験溶液とする。

6. 検量線の作成

クロルメコートクロリド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 0.01 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. の検量線でクロルメコートクロ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基、陽イオン交換基及び陰イオン交換基を修飾したシリカゲル 内径2.0 mm、長さ100 mm、粒子径3 µm

カラム温度：40°C

移動相：2 mmol/L酢酸アンモニウム溶液及びメタノール（4：1）混液で1分間保持した後、（1：1）までの濃度勾配を2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122、プロダクトイオン58、59

注入量：5 µL

保持時間の目安：3分

10. 定量限界

0.01 mg/kg

11. 留意事項

1) 試験法の概要

クロルメコートクロリドを試料から塩化ナトリウム及びギ酸存在下メタノールで抽出し、アセトニリル/ヘキサン分配で脱脂する。グラファイトカーボン/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、有効成分の一般名はクロルメコートクロリドであるが、農薬の品目名としてはクロルメコートが使用されている。

2) 注意点

- ① クロルメコートクロリドはガラス壁に吸着しやすいため、使用する器具類はポリプロピレン製を用いると良い。
- ② クロルメコートクロリドの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 122、プロダクトイオン 58
定性イオン（ m/z ）：プリカーサーイオン 122、プロダクトイオン 59
- 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、鶏の卵

12. 参考文献

なし

13. 類型

C

シクロプロトリン試験法（農産物）（案）

1. 分析対象化合物

シクロプロトリン

2. 適用食品

穀類

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

以下に示すもの以外は、総則の3に示すものを用いる。

0.5 mol/Lリン酸緩衝液（pH 7.0）リン酸水素二カリウム（ K_2HPO_4 ）52.7 g及びリン酸二水素カリウム（ KH_2PO_4 ）30.2 gを量り採り、水約500 mLに溶解し、1 mol/L水酸化ナトリウム溶液又は1 mol/L塩酸を用いてpHを7.0に調整した後、水を加えて1 Lとする。

シクロプロトリン標準品 本品はシクロプロトリン95%以上を含む。

5. 試験溶液の調製

1) 抽出

試料 10.0 g に水 20 mL を加え、30 分間放置する。これにアセトニトリル 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ニトリル 20 mL を加え、ホモジナイズした後、上記と同様に吸引ろ過する。得られたろ液を合わせ、アセトニトリルを加えて正確に 100 mL とする。この溶液から正確に 20 mL を分取し、塩化ナトリウム 10 g 及び 0.5 mol/L リン酸緩衝液（pH 7.0）20 mL を加え、5 分間振とうする。静置した後、分離した水層を捨てる。

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム（1,000 mg）にアセトニトリル 5 mL を注入し、流出液は捨てる。このカラムに上記のアセトニトリル層を注入した後、アセトニトリル 5 mL を注入し、負荷液を含む全溶出液を 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トルエン（3：1）混液 2 mL を加えて溶かす。

2) 精製

グラファイトカーボン/アミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム（500 mg/500 mg）に、アセトニトリル及びトルエン（3：1）混液 5 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、アセトニトリル及びトルエン（3：1）混液 20 mL を注入し、負荷液を含む全溶出液を 40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物をメタノールに溶かし、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

シクロプロトリン標準品のメタノール溶液を数点調製し、LC-MS/MS に注入して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 0.02 mg/L である。

7. 定量

試験溶液を LC-MS/MS に注入し、6. の検量線でシクロプロトリンの含量を求める。

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 3.5 μm

カラム温度：40℃

移動相：A 液及び B 液について下表の濃度勾配で送液する。

A 液：5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液

B 液：5 mmol/L 酢酸アンモニウム・メタノール溶液

時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)
0	90	10
3	30	70
13	10	90
15	10	90

イオン化モード：ESI (+)

主なイオン (m/z)：プリカーサーイオン 499、プロダクトイオン 257、181

注入量：2 μL

保持時間の目安：13 分

10. 定量限界

0.01 mg/kg

11. 留意事項

1) 試験法の概要

シクロプロトリンを試料からアセトニトリルで抽出し、塩析で水を除いた後、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム及びグラファイトカーボン/アミノプロピルシリル化シリカゲル積層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。

本法の「5. 試験溶液の調製」は、試料の濃縮率を除き「LC/MS による農薬等の一斉試験法 I (農産物)」に準拠したものである。

2) 注意点

- ① 他の農薬と同時に分析する可能性を考慮し、グラファイトカーボン/アミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム (500 mg/500 mg) からのシクロプロトリンの溶出には、「LC/MS による農薬等の一斉試験法 I (農産物)」に準拠して、アセトニトリル及びトルエン (3 : 1) 混液 20 mL を用いている。シクロプロトリンのみを分析対象とする場合には、アセトニトリル及びトルエン (3 : 1) 混液の液量を減らすことができる。標準液のみでの検討であるが、アセトニトリル及びトルエン (3 : 1) 混液 5 mL でグラファイトカーボン/アミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム (500 mg/500 mg) からシクロプロトリンを溶出できることを確認している。

- ② シクロプロトリンの 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 499、プロダクトイオン 181

定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン 499、プロダクトイオン 257

③ 試験法開発時に検討した食品：玄米

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 生食発第 0620 第 1 号「LC/MS による農薬等の一斉試験法 I (農産物)」(平成 29 年 6 月 20 日)

13. 類型

C

シクロプロトリン試験法（水産物）（案）

1. 分析対象化合物

シクロプロトリン

2. 適用食品

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

以下に示すもの以外は、総則の3に示すものを用いる。

シクロプロトリン標準品 本品はシクロプロトリン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 を加えて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、上記と同様に吸引ろ過する。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 20 mL を分取し、10 w/v% 塩化ナトリウム溶液 100 mL を加え、*n*-ヘキサン 50 mL 及び 25 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 *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 2 回振とう抽出する。抽出液を合わせ、40°C 以下で 1 mL 以下に濃縮する。

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 (2,000 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 5 mL を注入し、負荷液を含む全溶出液を 40°C 以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物にアセトン及び *n*-ヘキサン (1 : 19) 混液 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 (500 mg) にアセトン及び *n*-ヘキサン (1 : 19) 混液 5 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、アセトン及び *n*-ヘキサン (1 : 19) 混液 10 mL を注入し、負荷液を含む全溶出液を 40°C 以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物をメタノールに溶かし、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

シクロプロトリン標準品のメタノール溶液を数点調製し、LC-MS/MS に注入して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 0.02 mg/L である。

7. 定量

試験溶液を LC-MS/MS に注入し、6. の検量線でシクロプロトリンの含量を求める。

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 3.5 μm

カラム温度：40°C

移動相：A 液及び B 液について下表の濃度勾配で送液する。

A 液：5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液

B 液：5 mmol/L 酢酸アンモニウム・メタノール溶液

時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)
0	90	10
3	30	70
13	10	90
15	10	90

イオン化モード：ESI (+)

主なイオン (m/z)：プリカーサーイオン 499、プロダクトイオン 257、181

注入量：2 μL

保持時間の目安：13 分

10. 定量限界

0.01 mg/kg

11. 留意事項

1) 試験法の概要

シクロプロトリンを試料からアセトンで抽出し、*n*-ヘキサンに転溶する。アセトニトリル/ヘキサン分配で脱脂した後、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、LC-MS/MS で定量及び確認する方法である。

2) 注意点

① シクロプロトリンの 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 499、プロダクトイオン 181

定性イオン (m/z)：プリカーサーイオン 499、プロダクトイオン 257

② 試験法開発時に検討した食品：うなぎ、しじみ

12. 参考文献

なし

13. 類型

C

ビコザマイシン試験法（畜水産物）（案）

1. 分析対象化合物

ビコザマイシン

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。

トリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲル/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（500 mg/500 mg） 内径 12~13 mm 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を、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を各 500 mg 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。

ビコザマイシン標準品 本品はビコザマイシン 95%以上を含む。

5. 試験溶液の調製

1) 抽出

試料 10.0 g に *n*-ヘキサン 50 mL を加え、ホモジナイズした後、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 50 mL を加え、さらにホモジナイズした後、毎分 3,000 回転で 10 分間遠心分離し、アセトニトリル層を採る。残留物及び *n*-ヘキサン層に *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 30 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、得られたアセトニトリル層を合わせ、アセトニトリルを加えて正確に 100 mL とする。この溶液から正確に 1 mL を分取して 40°C 以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物にアセトン及び *n*-ヘキサン（4 : 1）混液 5 mL を加えて溶かす。

2) 精製

トリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲル/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（500 mg/500 mg）にアセトン 10 mL、アセトン及び *n*-ヘキサン（4 : 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) で得られた溶液を注入した後、アセトン及び *n*-ヘキサン（4 : 1）混液 10 mL を注入し、流出液は捨てる。次いで、アセトン及び水（19 : 1）混液 15 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水（9 : 1）混液に溶かし、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

ビコザマイシン標準品のアセトニトリル及び水（9 : 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の濃度は 0.0002 mg/L である。

7. 定量

試験溶液を LC-MS/MS に注入し、6. の検量線でビコザマイシンの含量を求める。

8. 確認試験

LC-MS/MS により確認する。

9. 測定条件

(例)

カラム：スルホベタイン基結合型シリカゲル 内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3.5 μ m

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 (9 : 1) から (1 : 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)：プリカーサーイオン 301、プロダクトイオン 209、184

注入量：10 μ L

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

ビコザマイシンを試料から *n*-ヘキサン存在下アセトニトリルで抽出し、トリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲル/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 ビコザマイシンの 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 301、プロダクトイオン 184

定性イオン (m/z)：プリカーサーイオン 301、プロダクトイオン 209

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、ブリ

12. 参考文献

なし

13. 類型

C