

## 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
アラクロール試験法 （畜産物） P3～	<ul style="list-style-type: none"> <li>アラクロール</li> <li>加水分解によりDEA【2,6-ジエチルアニリン】へ変換される代謝物</li> <li>加水分解によりHEEA【2-エチル-6-(1-ヒドロキシエチル)アニリン】へ変換される代謝物</li> </ul>	アラ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、水酸化ナトリウム溶液中で加熱してDEA及びHEEAに加水分解した後、水蒸気蒸留によりDEA及びHEEAを捕集する。窒素含有極性基修飾メタクリレート-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、DEA及びHEEAのそれぞれについて定量を行い、水酸化ナトリウム溶液中でDEA及びHEEAに加水分解される代謝物を含むアラクロールの含量を求める場合には、DEA及びHEEAの含量にそれぞれ換算係数を乗じてアラクロールの含量に換算し、これらの和を分析値とする。DEAの含量には、アラクロール及び加水分解によりDEAへ変換される代謝物が含まれる。
イソキサフトール試験法（農産物） P8～	<ul style="list-style-type: none"> <li>イソキサフトール</li> <li>2-シアノ-3-シクロプロピル-4-(2-メチルスルホニル-4-トリフルオロメチルフェニル)プロパン-1,3-ジオン（代謝物B）</li> </ul>	イソキサフトール及び代謝物Bを2 mol/L塩酸で磨砕均一化した試料から、アセトニトリルで抽出し、酢酸エチル及び <i>n</i> -ヘキサン（3:7）混液に転溶した後、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、LC-MS/MSで定量及び確認する方法である。なお、イソキサフトール及び代謝物Bのそれぞれについて定量を行い、代謝物Bを含むイソキサフトールの含量を求める場合には、代謝物Bの含量に換算係数を乗じてイソキサフトールの含量に換算し、これらの和を分析値とする。
ガミスロマイシン試験法（畜産物） P11～	<ul style="list-style-type: none"> <li>ガミスロマイシン</li> </ul>	ガミスロマイシンを試料からアセトンで抽出し、スルホン酸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。
キザロホップエチル及びキザロホップPテフリル試験法（農産物） P14～	<ul style="list-style-type: none"> <li>キザロホップエチル（キザロホップPエチルを含む。）</li> <li>キザロホップPテフリル</li> <li>代謝物B【2-[4-(6-クロロキノキサリン-2-イルオキシ)フェノキシ]プロピオン酸】（キザロホップPを含む。）</li> <li>加水分解により代謝物Bに変換される代謝物</li> </ul>	試料に水酸化カリウム・メタノール試液を加えて加熱し、キザロホップエチル、キザロホップPテフリル及びそれらの代謝物（代謝物B及び加水分解により代謝物Bに変換される代謝物を含む。）を6-クロロ-2-メトキシキノキサリンに変換した後、 <i>n</i> -ヘキサンに転溶し、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及びシリカゲルミニカラムで精製した後、GC-MS/MSで定量及び確認する方法である。なお、6-クロロ-2-メトキシキノキサリンの含量に換算係数を乗じて代謝物Bの含量に換算し、これを分析値とする。代謝物Bの含量には、キザロホップエチル（キザロホップPエチルを含む。）、キザロホップPテフリル、代謝物B（キザロホップPを含む。）及び加水分解により代謝物Bに変換される代謝物が含まれる。

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	概要
プロピリスルフロ ン 試験法（水産物） P18～	・プロピリスルフロ ン	プロピリスルフロ ンを試料から塩酸酸性下、飽和量 の塩化ナトリウムを添加してアセトン及び <i>n</i> -ヘキサ ン（1：2）混液で抽出し、アセトニトリル/ヘキサン 分配で脱脂する。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及び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。
プロピリスルフロ ン 試験法（農産物） P21～	・プロピリスルフロ ン	プロピリスルフロ ンを試料から塩酸酸性下アセトン で抽出し、酢酸エチルに転溶した後、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及び オクタデシ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。

上記のうち、「キザロホップエチル及びキザロホップPテフリル試験法」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
キザロホップエチル試験法（農産物） 食安発第 0124001 号（平成 17 年 1 月 24 日）	農薬	農産物

## アラクロール試験法（畜産物）（案）

### 1. 分析対象化合物

アラクロール

加水分解によりDEA【2,6-ジエチルアニリン】へ変換される代謝物

加水分解によりHEEA【2-エチル-6-(1-ヒドロキシエチル)アニリン】へ変換される代謝物

### 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）

水蒸気蒸留装置（本装置はガラス製であり、その概略は次の図による。）

A：1,000 mLの丸底フラスコ（水蒸気発生用）

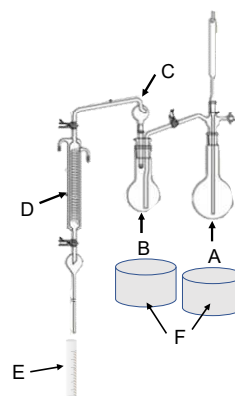
B：500 mLの丸底フラスコ（蒸留用）

C：蒸留トラップ

D：冷却管

E：100 mLのメスシリンダー

F：マントルヒーター



### 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。

窒素含有極性基修飾メタクリレート-スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラム（200 mg） 内径12~13 mmポリプロピレン製のカラム管に、窒素含有極性基修飾メタクリレート-スチレンジビニルベンゼン共重合体200 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。

アラクロール標準品 本品はアラクロール95%以上を含む。

DEA標準品 本品はDEA95%以上を含む。

HEEA標準品 本品はHEEA95%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、メタノールで正確に100 mLとする。この溶液から正確に50 mLを丸底フラスコ（蒸留用）に分取し、40℃以下で約3 mLに濃縮する。

## 2) 加水分解

1) で得られた濃縮液に50 w/v%水酸化ナトリウム溶液50 mLを加える。これに消泡用シリコン1~2滴及び沸騰石を加えた後、丸底フラスコ（蒸留用）を直ちに蒸留装置に取り付ける。別に、冷却管を10°C以下に冷却し、流止め連結管の下端を水（捕集液）10 mLを入れた100 mLのメスシリンダー（氷冷）の液中に浸す。また、丸底フラスコ（水蒸気発生用）に水1,000 mLを入れ、沸騰石を加えた後、水蒸気蒸留装置に取り付けて100°Cに加熱しておく。丸底フラスコ（蒸留用）を100°Cに加熱し、30分間加水分解を行った後に水蒸気蒸留を開始する。留液が75 mL（捕集液と合わせた液量）になるまで水蒸気蒸留し、留液が中性であることをpH試験紙で確認する。捕集した留液に2 vol%トリエチルアミンを加え、100 mLとする。

## 3) 精製

窒素含有極性基修飾メタクリレート-スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラム（200 mg）にアセトニトリル及び水各5 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5 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで、アセトニトリル10 mLを注入し、溶出液を40°C以下で約1 mLに濃縮し、水及びメタノール（3：2）混液で正確に10 mLとしたものを試験溶液とする。

## 6. 検量線の作成

DEA標準品及びHEEA標準品をそれぞれメタノー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水及びメタノール（3：2）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0.002 mg/kg（アラクロール換算）に相当する試験溶液中の濃度は0.001 mg/L（アラクロール換算）である。

## 7. 定量

試験溶液をLC-MS/MSに注入し、6. の検量線でDEA及びHEEAの含量を求める。加水分解によりDEA及びHEEAに変換される代謝物を含むアラクロールの含量を求める場合には、次式により求める。

アラクロール（加水分解によりDEA及びHEEAに変換される代謝物を含む。）の含量（ppm） $= A \times 1.808 + B \times 1.633$

A：DEAの含量（ppm）

B：HEEA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・メタノール溶液の混液（11：9）で1分間保持した後、（1：49）

までの濃度勾配を13分間で行う。

イオン化モード：ESI (+)

主なイオン ( $m/z$ )

DEA：プリカーサーイオン 150、プロダクトイオン105、77

HEEA：プリカーサーイオン 166、プロダクトイオン148、118

注入量：5  $\mu$ L

保持時間の目安：

DEA：8分

HEEA：4分

## 10. 定量限界

アラクロール（加水分解によりDEAへ変換。）：0.002 mg/kg（アラクロール換算）

DEA（加水分解によりDEAへ変換される代謝物を含む。）：0.002 mg/kg（アラクロール換算）

HEEA（加水分解によりHEEAへ変換される代謝物を含む。）：0.002 mg/kg（アラクロール換算）

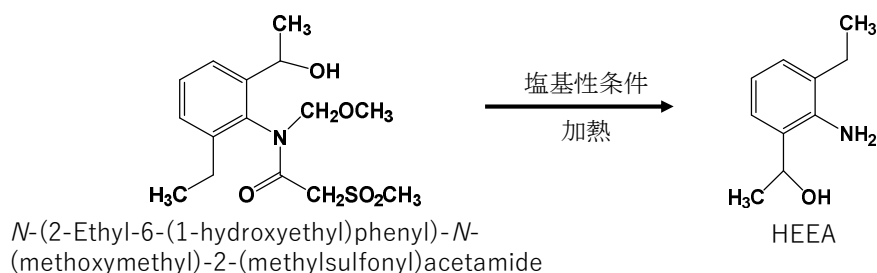
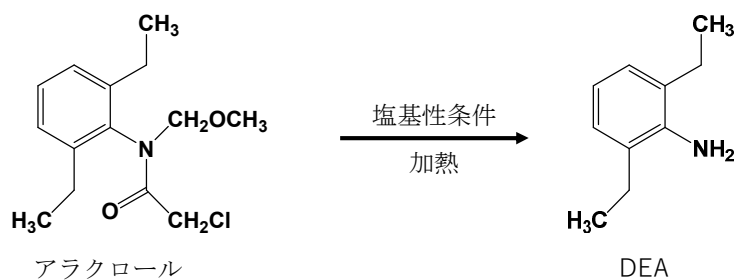
## 11. 留意事項

### 1) 試験法の概要

アラ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、水酸化ナトリウム溶液中で加熱してDEA及びHEEAに加水分解した後、水蒸気蒸留によりDEA及びHEEAを捕集する。窒素含有極性基修飾メタクリレート-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、DEA及びHEEAのそれぞれについて定量を行い、水酸化ナトリウム溶液中でDEA及びHEEAに加水分解される代謝物を含むアラクロールの含量を求める場合には、DEA及びHEEAの含量にそれぞれ換算係数を乗じてアラクロールの含量に換算し、これらの和を分析値とする。DEAの含量には、アラクロール及び加水分解によりDEAへ変換される代謝物が含まれる。

### 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 $2,130 \times g$ である。
- ② アラクロール標準品を用いて添加回収試験を実施し、DEAへの変換が十分に行われていることを確認すること。アラクロールからDEAへ十分に変換すれば、HEEAへの変換も行われると考えられる。



#### DEA 及び HEEA への変換

*N*-(2-Ethyl-6-(1-hydroxyethyl)phenyl)-*N*-(methoxymethyl)-2-(methylsulfonyl)acetamide は、HEEA に変換される代謝物の一例として示した。

- ③ 捕集液に流止め連結管の先端（流止め連絡管の先端が破損しないように先端にシリコンチューブを付け、その先にガラス管を接続する）が浸るようにする。蒸留速度は約5～10 mL/分とする。
- ④ 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、DEAが溶出した後に移動相のメタノール濃度を上げてカラムを洗浄すると良い。
- ⑤ 蒸留に用いる丸底フラスコ（蒸留用）は、50 w/v%水酸化ナトリウム溶液を用いるため、使用前にヒビや破損がないか確認する。また、繰り返し使用することによりガラスが劣化するため、ヒビや破損が無くても10回程度で必要に応じて新しいものに交換する。
- ⑥ 留液が中性であることをpH試験紙で確認するが、塩基性になった場合、分析対象化合物の捕集が不十分になる可能性があるため、再試験する必要がある。
- ⑦ DEAは揮発しやすいため、5. 試験溶液の調製の「2）加水分解」における加水分解操作及び水蒸気蒸留操作では、操作中の揮散に注意する。また、実験器具の汚染にも注意する。
- ⑧ DEA及びHEEA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。

#### DEA

定量イオン ( $m/z$ ) : プリカーサーイオン 150、プロダクトイオン 105

定性イオン ( $m/z$ ) : プリカーサーイオン 150、プロダクトイオン 77

#### HEEA

定量イオン ( $m/z$ ) : プリカーサーイオン 166、プロダクトイオン 148

定性イオン ( $m/z$ ) : プリカーサーイオン 166、プロダクトイオン 118

- ⑨ 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

## イソキサフルトール試験法（農産物）（案）

### 1. 分析対象化合物

イソキサフルトール

2-シアノ-3-シクロプロピル-4-(2-メチルスルホニル-4-トリフルオロメチルフェニル)プロパン-1,3-ジオン（以下「代謝物B」という。）

### 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。

イソキサフルトール標準品 本品はイソキサフルトール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 穀類及び豆類の場合

試料10.0 gに2 mol/L塩酸20 gを加えて、30分間放置する。これにアセトニトリル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4 mLを分取し、0.1 mol/L塩酸16 mL及び塩化ナトリウム2 gを加え、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（3：7）混液20 mLを加えて振とう抽出した後、毎分3,000回転で5分間遠心分離し、有機層を採る。水層に酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（3：7）混液20 mLを加えて振とう抽出した後、上記と同様に遠心分離し、得られた有機層を合わせ、40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物に酢酸、水及びメタノール（1：20：30）混液2 mLを加えて溶かす。

##### ② とうもろこし（未成熟）及びさとうきびの場合

試料を正確に量り、重量比で1/2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。これにアセトニトリル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4 mLを分取し、0.1 mol/L塩酸16 mL及び塩化ナトリウム2 gを加え、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（3：7）混液20 mLを加えて振とう抽出した後、毎分3,000回転で5分間遠心分離し、有機層を採る。水層に酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（3：7）混液20 mLを加えて振とう抽出した後、上記と同様に遠心分離し、得られた有機層を合わせ、40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。こ



の残留物に酢酸、水及びメタノール（1：20：30）混液2 mLを加えて溶かす。

## 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（500 mg）に、メタノール5 mL、次いで酢酸、水及びメタノール（1：20：30）混液5 mLを注入し、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、酢酸、水及びメタノール（1：20：30）混液10 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで、酢酸、水及びメタノール（1：5：45）混液20 mLを注入し、溶出液を40°C以下で約1 mLに濃縮し、0.05 vol%酢酸及び0.05 vol%酢酸・アセトニトリル溶液（7：3）混液で正確に4 mLとしたものを試験溶液とする。

## 6. 検量線の作成

イソキサフルトール標準品は1 vol%酢酸・アセトニトリル溶液に、代謝物B標準品は、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0.05 vol%酢酸及び0.05 vol%酢酸・アセトニトリル溶液（7：3）混液で適宜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、穀類及び豆類の場合は各化合物0.001 mg/L、とうもろこし（未成熟）及びさとうきびの場合には0.002 mg/Lである。

## 7. 定量

試験溶液をLC-MS/MSに注入し、6. の検量線でイソキサフルトール及び代謝物Bの含量を求める。代謝物Bを含むイソキサフルトールの含量を求める場合には、次式により求める。

イソキサフルトール（代謝物Bを含む）の含量（ppm） =  $A + B \times 1.000$

A：イソキサフルトールの含量（ppm）

B：代謝物B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：0.05 vol%酢酸及び0.05 vol%酢酸・アセトニトリル溶液（7：3）混液で5分間保持した後、（7：3）から（9：11）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*）

イソキサフルトール：プリカーサーイオン358、プロダクトイオン278、79

代謝物B：プリカーサーイオン358、プロダクトイオン278、79

注入量：5 μL

## 保持時間の目安

イソキサフルトール：19分

代謝物B：5分

## 10. 定量限界

各化合物0.01 mg/kg

## 11. 留意事項

### 1) 試験法の概要

イソキサフルトール及び代謝物Bを2 mol/L塩酸で磨砕均一化した試料から、アセトニトリルで抽出し、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（3：7）混液に転溶した後、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、LC-MS/MSで定量及び確認する方法である。なお、イソキサフルトール及び代謝物Bのそれぞれについて定量を行い、代謝物Bを含むイソキサフルトールの含量を求める場合には、代謝物Bの含量に換算係数を乗じてイソキサフルトールの含量に換算し、これらの和を分析値とする。

### 2) 注意点

- ① イソキサフルトール及び代謝物Bは光に対して不安定なため、褐色のガラス器具を使用するなど、可能な限り遮光下で操作する。
- 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×gである。
- ③ カラムからの溶出液を、減圧濃縮後に窒素ガスを吹き付けて溶媒を完全に除去すると、代謝物Bが損失することがある。このため、溶出液の濃縮操作においては1 mL程度残すこと。
- ④ イソキサフルトール及び代謝物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。

イソキサフルトール

定量イオン (*m/z*) : プリカーサーイオン 358、プロダクトイオン 79

定性イオン (*m/z*) : プリカーサーイオン 358、プロダクトイオン 278

代謝物B

定量イオン (*m/z*) : プリカーサーイオン 358、プロダクトイオン 79

定性イオン (*m/z*) : プリカーサーイオン 358、プロダクトイオン 278

- ⑤ 試験法開発時に検討した食品：大豆、ひよこ豆、とうもろこし（乾燥子実、未成熟）、さとうきび

## 12. 参考文献

なし

## 13. 類型

C

## ガミスロマイシン試験法（畜産物）（案）

### 1. 分析対象化合物

ガミスロマイシン

### 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。

スルホン酸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、スルホン酸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。

5 mmol/L酢酸アンモニウム溶液（pH 4.0） 酢酸アンモニウム0.39 gを量り採り水約950 mLに溶解し、酢酸を用いてpH 4.0に調整した後、水を加えて1 Lとする。

ガミスロマイシン標準品 本品はガミスロマイシン95%以上を含む。

### 5. 試験溶液の調製

#### 1) 抽出

試料10.0 g（脂肪の場合は5.00 g）にアセトン50 mLを加え、ホモジナイズする。毎分4,000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、酢酸12.5  $\mu$ L、1 mol/L酢酸アンモニウム溶液25  $\mu$ Lを加えてよく混合する。

#### 2) 精製

スルホン酸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）にメタノール10 mL及びアセトン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、メタノール10 mL及びアセトニトリル10 mLを順次注入し、各流出液は捨てる。次いで、アセトニトリル及びアンモニア水（20 : 1）混液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。この残留物を5 mmol/L 酢酸アンモニウム・メタノール溶液に溶かし、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

ガミスロマイシン標準品の5 mmol/L酢酸アンモニウム・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筋肉及び肝臓にあつては0.005 mg/L、脂肪にあつては0.0025 mg/Lである。

## 7. 定量

試験溶液をLC-MS/MSに注入し、6. の検量線でガミスロ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：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：5 mmol/L酢酸アンモニウム溶液 (pH 4.0) 及び5 mmol/L酢酸アンモニウム・メタノール溶液 (9 : 1) で1分間保持した後、(1 : 19) 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 ( $m/z$ )：プリカーサーイオン778、プロダクトイオン620、158、116、83

注入量：5 µL

保持時間の目安：7分

## 10. 定量限界

0.01 mg/kg

## 11. 留意事項

### 1) 試験法の概要

ガミスロマイシンを試料からアセトンで抽出し、スルホン酸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。

### 2) 注意点

① ガミスロマイシンの測定で、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 778、プロダクトイオン 620

定性イオン ( $m/z$ )：プリカーサーイオン 778、プロダクトイオン 158、116、83

② ガミスロマイシンは、溶解する溶媒によってはガラス容器に吸着する。このため、可能な限りポリプロピレン製やポリテトラフルオロエチレン製などプラスチック製の容器を用いるのが望ましい。

③ 開発時に用いた遠心分離機における毎分4,000回転は、約3,430×gである。

④ 試験法開発時に検討した食品：牛の筋肉、豚の肝臓、牛の脂肪

12. 参考文献

なし

13. 類型

C

## キザロホップエチル及びキザロホップPテフリル試験法（農産物）（案）

### 1. 分析対象化合物

キザロホップエチル（キザロホップPエチルを含む。）

キザロホップPテフリル

代謝物B【2-[4-(6-クロロキノキサリン-2-イルオキシ)フェノキシ]プロピオン酸】（キザロホップPを含む。）

加水分解により代謝物Bに変換される代謝物

### 2. 適用食品

豆類、種実類、果実及び野菜

### 3. 装置

ガスクロマトグラフ・タンデム型質量分析計（GC-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。

水酸化カリウム・メタノール試液 水酸化カリウム（特級）56 gをメタノール1 Lに溶解する。

キザロホップエチル標準品 本品はキザロホップエチル95%以上を含む。

キザロホップPテフリル標準品 本品はキザロホップPテフリル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。

6-クロロ-2-メトキシキノキサリン標準品 本品は6-クロロ-2-メトキシキノキサリン95%以上を含む。

### 5. 試験溶液の調製

#### 1) 6-クロロ-2-メトキシキノキサリンへの変換

豆類及び種実類の場合は、試料10.0 gを量り採る。果実及び野菜の場合は、試料20.0 gを量り採る。これに水酸化カリウム・メタノール試液200 mL及び沸騰石を加え、還流冷却器を取り付けて、90分間加熱還流した後、氷冷する。反応液を吸引ろ過し、得られたろ液にメタノールを加えて正確に250 mLとする。

#### 2) 転溶

##### ① 豆類及び種実類の場合

1) で得られた溶液から正確に20 mLを分取し、1 mol/L塩酸30 mLを加え、*n*-ヘキサン40 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以下で約2 mLに濃縮する。

##### ② 果実及び野菜の場合

1) で得られた溶液から正確に10 mLを分取し、1 mol/L塩酸15 mLを加え、*n*-ヘキサン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以下で約2 mLに濃縮する。

### 3) 精製

#### ① 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*n*-ヘキサン10 mLを注入し、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、*n*-ヘキサン10 mLを注入し、溶出液を40°C以下で約2 mLに濃縮する。

#### ② シリカゲルカラムクロマトグラフィー

シリカゲルミニカラム (1,000 mg) に*n*-ヘキサン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、*n*-ヘキサン5 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (1 : 19) 混液10 mLを注入し、溶出液を40°C以下で約2 mLに濃縮する。この溶液に酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (1 : 19) 混液を加えて、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

6-クロロ-2-メトキシキノキサリン標準品の酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (1 : 19) 混液の溶液を数点調製し、それぞれGC-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 (代謝物B換算) に相当する試験溶液中濃度は0.002 mg/L (代謝物B換算) である。

### 7. 定量

試験溶液をGC-MS/MSに注入し、6. の検量線で6-クロロ-2-メトキシキノキサリンの含量を求め、次式により代謝物Bの含量を求める。

$$\text{代謝物Bの含量 (ppm)} = \text{6-クロロ-2-メトキシキノキサリンの含量 (ppm)} \times 1.771$$

### 8. 確認試験

GC-MS/MSにより確認する。

### 9. 測定条件

(例)

カラム : 5%フェニル-メチルシリコン 内径0.25 mm、長さ30 m、膜厚0.25 μm

カラム温度 : 50°C (1分) - 25°C/分 - 175°C - 10°C/分 - 225°C - 25°C/分 - 300°C (10分)

注入口温度 : 280°C

キャリアーガス : ヘリウム

イオン化モード (イオン化エネルギー) : EI (70 eV)

主なイオン ( $m/z$ ) :

プリカーサーイオン194、プロダクトイオン165

プリカーサーイオン196、プロダクトイオン167

注入量 : 2  $\mu$ L

保持時間の目安 : 8分

## 10. 定量限界

キザロホップエチル : 0.01 mg/kg (代謝物B換算)

キザロホップPテフリル : 0.01 mg/kg (代謝物B換算)

代謝物B : 0.01 mg/kg

加水分解により代謝物Bに変換される代謝物 : 0.01 mg/kg (代謝物B換算)

## 11. 留意事項

### 1) 試験法の概要

試料に水酸化カリウム・メタノール試液を加えて加熱し、キザロホップエチル、キザロホップPテフリル及びそれらの代謝物(代謝物B及び加水分解により代謝物Bに変換される代謝物を含む。)を6-クロロ-2-メトキシキノキサリンに変換した後、*n*-ヘキサンに転溶し、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及びシリカゲルミニカラムで精製した後、GC-MS/MSで定量及び確認する方法である。なお、6-クロロ-2-メトキシキノキサリンの含量に換算係数を乗じて代謝物Bの含量に換算し、これを分析値とする。代謝物Bの含量には、キザロホップエチル(キザロホップPエチルを含む。)、キザロホップPテフリル、代謝物B(キザロホップPを含む。)及び加水分解により代謝物Bに変換される代謝物が含まれる。

### 2) 注意点

- ① キザロホップエチル標準品、キザロホップPテフリル標準品及び代謝物B標準品を用いて添加回収試験を実施し、6-クロロ-2-メトキシキノキサリンへの変換が十分に行われていることを確認すること。
- ② 6-クロロ-2-メトキシキノキサリンは揮散しやすいため、加熱還流後は反応容器を氷冷し、1~30℃に冷却した後、還流冷却器を取り外すこと。
- ③ 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分間遠心分離するとよい。
- ④ 6-クロロ-2-メトキシキノキサリンは揮散しやすいため、濃縮操作の際は2 mL程度まで濃縮し、乾固しないこと。
- ⑤ 6-クロロ-2-メトキシキノキサリンのGC-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194、プロダクトイオン165  
定性イオン ( $m/z$ ) : プリカーサーイオン196、プロダクトイオン167
- ⑥ 6-クロロ-2-メトキシキノキサリンのGC-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165、プロダクトイオン111

定性イオン ( $m/z$ ) : プリカーサーイオン165、プロダクトイオン138

- ⑦ 試験法開発時に検討した食品：大豆、ほうれんそう、キャベツ、ばれいしょ、りんご、いちご

12. 参考文献

なし

13. 類型

C

## プロピリスルフロン試験法（水産物）（案）

### 1. 分析対象化合物

プロピリスルフロン

### 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

次に示すもの以外は、総則の3に示すものを用いる。

プロピリスルフロン標準品 本品はプロピリスルフロン95%以上を含む。

### 5. 試験溶液の調製

#### 1) 抽出

試料10.0 gにアセトン及び*n*-ヘキサン（1：2）混液70 mL、1 mol/L塩酸6 mL及び塩化ナトリウム8 gを加え、ホモジナイズする。毎分3,000回転で5分間遠心分離し、有機層を採る。残留物及び水層に、アセトン及び*n*-ヘキサン（1：2）混液30 mLを加えてホモジナイズし、上記と同様に遠心分離し、有機層を採る。得られた有機層を合わせ、アセトン及び*n*-ヘキサン（1：2）混液を加えて正確に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、溶媒を除去する。この残留物に*n*-ヘキサン20 mLを加え、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル20 mLずつで2回振とう抽出し、抽出液を合わせる。

#### 2) 精製

##### ① 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）にアセトン及びアセトニトリル各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、アセトニトリル5 mLを注入し、さらにアセトン10 mLを注入し、各流出液は捨てる。次いで、1 vol%ギ酸・アセトン溶液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。この残留物にアセトニトリル及び水（3：7）混液10 mLを加えて溶かす。

##### ② 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、流出液は捨てる。次いで、アセトニトリル及び水（3：2）混液10 mLを注入し、溶出液を採り、アセトニトリル及び水（3：2）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

プロピリスルフロンの標準品をアセトンに溶解して標準原液とする。標準原液をアセトニトリル及び水（3：2）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である。

## 7. 定量

試験溶液をLC-MS/MSに注入し、6.の検量線でプロピリスルフロンの含量を求める。

## 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100 mm、粒子径3 µm

カラム温度：40℃

移動相：0.01 vol%酢酸及び0.01 vol%酢酸・アセトニトリル溶液（7：3）混液で0.5分間保持した後、（1：

4）までの濃度勾配を2.5分間で行い、（1：4）で6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 456、プロダクトイオン 261、196

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

プロピリスルフロンを試料から塩酸性下、飽和量の塩化ナトリウムを添加してアセトン及び*n*-ヘキサン（1：2）混液で抽出し、アセトニトリル/ヘキサン分配で脱脂する。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及び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。

### 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1,710×*g*である。
- ② 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）及びオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム（500 mg）は、内径12~13 mmのカラムも使用可能である。
- ③ マトリックスの影響によりオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム溶出状況が変動する可

能性がある。

- ④ プロピリスルフロンの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 456、プロダクトイオン 261  
定性イオン ( $m/z$ ) : プリカーサーイオン 456、プロダクトイオン 196
- ⑤ 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

## プロピリスルフロンの試験法（農産物）（案）

### 1. 分析対象化合物

プロピリスルフィン

### 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

次に示すもの以外は、総則の3に示すものを用いる。

プロピリスルフィン標準品 本品はプロピリスルフィン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。これにアセトン100 mL及び1 mol/L塩酸2 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、溶媒を除去する。残留物に飽和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、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10 mLを加えて溶かす。

#### 2) 精製

##### ① 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）にアセトン及びアセトニトリル各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、アセトニトリル5 mL及びアセトン10 mLを順次注入し、各流出液は捨てる。次いで、1 vol %ギ酸・アセトン溶液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。この残留物にアセトニトリル及び水（1：4）混液10 mLを加えて溶かす。

##### ② 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、流出液は捨てる。次いで、アセトニトリル及び水（3：2）混液10 mLを注入し、溶出液を採り、アセトニトリル及び水（3：2）混液で正確に10 mLとしたものを試験溶液とする。

### 6. 検量線の作成

プロピリスルフィン標準品をアセトンに溶解して標準原液とする。標準原液をアセトニトリル及び水（3：2）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. の検量線でプロピリスルフロンの含量を求める。

## 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100 mm、粒子径3 μm

カラム温度：40℃

移動相：0.01 vol %酢酸及び0.01 vol %酢酸・アセトニトリル溶液（7：3）混液で0.5分間保持した後、（1：4）までの濃度勾配を2.5分間で行い、（1：4）で6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 456、プロダクトイオン 261、196

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

プロピリスルフロンを試料から塩酸酸性下アセトンで抽出し、酢酸エチルに転溶した後、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及びオクタデシ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 開発時に用いた遠心分離機における毎分3,000回転は、約1,710×*g*である。
- ② 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）及びオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム（500 mg）は、内径12~13 mmのカラムも使用可能である。
- ③ 酢酸エチルに転溶する際、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。
- ④ マトリックスの影響によりオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム溶出状況が変動する可能性がある。
- ⑤ プロピリスルフロンの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456、プロダクトイオン261  
定性イオン（*m/z*）：プリカーサーイオン456、プロダクトイオン196
- ⑥ 試験法開発時に検討した食品：玄米

12. 参考文献

なし

13. 類型

C