

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
アミトラズ試験法（畜産物） P3～	・アミトラズ ・N-2,4-ジメチルフェニル-N-メチルホルムアミジン（代謝物 B）	アミトラズ及び代謝物 B を試料から塩基性条件下メタノールで抽出し、多孔性ケイソウ土カラム及びアセトニトリル／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（ODS）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を行い、液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計（LC-MS/MS）で定量及び確認する方法である。 なお、アミトラズ及び代謝物 B のそれぞれについて定量を行い、代謝物 B を含むアミトラズ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アミトラズの含量に変換し、これらの和を分析値とする。
イプフェンカルバゾン試験法（農産物） P6～	・イプフェンカルバゾン	イプフェンカルバゾンを試料からアセトンで抽出し、n-ヘキサンに転溶した後、グラフアイトカーボン／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及び ODS 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。
プロチオコナゾール試験法（畜産物） P10～	・[2-(1-クロロシクロプロピル)-1-(2-クロロフェニル)-3-(1 <i>H</i> -1,2,4-トリアゾール-1-イル)-2-プロパノール]（代謝物 M17）（抱合体を含む。）	代謝物 M17 及びその抱合体を試料から n-ヘキサン存在下アセトニトリル及び水（4：1）混液で抽出する。代謝物 M17 の抱合体を塩酸で加水分解して代謝物 M17 とし、ODS 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、代謝物 M17 の含量に換算係数を乗じてプロチオコナゾールの含量に変換し分析値とする。
プロポキシカルバゾン試験法（農産物） P13～	・プロポキシカルバゾン ・メチル 2-[[[[[4,5-ジヒドロ-3-(2-ヒドロキシプロポキシ)-4-メチル-5-オキソ-1 <i>H</i> -1,2,4-トリアゾール-1-イル]カルボニル]アミノ]スルホニル]ベンゾエート（代謝物 A）	プロポキシカルバゾン及び代謝物 A を試料からメタノールで抽出し、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。
プロポキシカルバゾン試験法（畜産物） P16～	・プロポキシカルバゾン	プロポキシカルバゾンを試料から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で精製し、LC-

		MS/MS で定量及び確認する方法である。
フロルフェニコール試験法（畜水産物） P19～	<ul style="list-style-type: none"> ・フロルフェニコール ・ [(1R,2S)-1-(4-メチルスルホニルフェニル)-2-アミノ-3-フルオロ-1-プロパノール]（代謝物 FFNH₂） （「フロルフェニコールアミン」という。加水分解によりフロルフェニコールアミンに変換される化合物を含む。） 	試料に酸を加えて加熱し、フロルフェニコール及びその代謝物をフロルフェニコールアミンに加水分解後、 <i>n</i> -ヘキサンで洗浄し、多孔性ケイソウ土カラム及び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。

アミトラズ試験法（畜産物）

1. 分析対象化合物

アミトラズ

N-2,4-ジメチルフェニル-*N*-メチルホルムアミジン（以下「代謝物 B」という。）

2. 適用食品

畜産物、乳、はちみつ

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。

アミトラズ標準品 本品はアミトラズ 98%以上を含む。

代謝物 B 塩酸塩標準品 本品は代謝物 B 塩酸塩 98%以上を含む。

5. 試験溶液の調製

1) 抽出

筋肉、脂肪及び内臓の場合は、試料を正確に量り、重量比で 1/2 量のエタノール及び 8 mol/L 水酸化ナトリウム溶液（1 : 1）混液を加え磨砕均一化した後、試料 10.0 g に相当する量を量り採る。乳及びはちみつの場合は、試料 10.0 g に、8 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 2.5 mL を加える。これにメタノール 100 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、上澄液を採る。残留物にメタノール 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、得られた上澄液を合わせ、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 2 mL を分取して多孔性ケイソウ土カラム（5 mL 保持用）に注入し、10 分間放置した後、アセトニトリル 30 mL を注入し溶出液を採る。この溶出液に *n*-ヘキサン 30 mL を加えて 5 分間振とうした後、アセトニトリル層を採る。*n*-ヘキサン層は、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL ずつで 2 回振とう抽出し、抽出液を先のアセトニトリル層に合わせる。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 2 mL 加えて溶かした後、アセトニトリル 2 mL を加えて軽く振り混ぜる。

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）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（500 mg）にそれぞれアセトニトリル 10 mL を注

入し、流出液は捨てる。オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムの下部にエチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムを接続し、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る。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メタノール (1 : 1) 混液に溶かし、正確に 2 mL としたものを代謝物 B 試験溶液とする。また、代謝物 B 試験溶液から正確に 1 mL を分取し、アセトニトリル及びメタノール (1 : 1) 混液を加えて正確に 10 mL としたものをアミトラズ試験溶液とする。

6. 検量線の作成

アミトラズ標準品及び代謝物 B 塩酸塩標準品のアセトニトリル及びメタノール (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の濃度は、アミトラズにあっては 0.00005 mg/L、代謝物 B にあっては 0.0005 mg/L (アミトラズ換算) である。

7. 定量

試験溶液を LC-MS/MS に注入し、6 の検量線でアミトラズ及び代謝物 B の各含量を求める。代謝物 B を含むアミトラズの含量を求める場合には、次式により求める。

アミトラズ (代謝物 B を含む) の含量 (ppm) = $A + B \times 1.807$

A : アミトラズの含量 (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 μ m

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) で 5 分間保持し、(9 : 1) から (0 : 100) までの濃度勾配を 10 分間で行い、(0 : 100) で 10 分間保持する。

イオン化モード : ESI (+)

主なイオン (m/z)

アミトラズ : プリカーサーイオン 294、プロダクトイオン 163、122

代謝物 B : プリカーサーイオン 163、プロダクトイオン 122、107

注入量：10 μ L

保持時間の目安

アミトラズ：18 分

代謝物 B：14 分

10. 定量限界

各化合物 0.01 mg/kg（代謝物 B はアミトラズ換算）

11. 留意事項

1) 試験法の概要

アミトラズ及び代謝物 B を試料から塩基性条件下メタノールで抽出し、多孔性ケイソウ土カラム及びアセトニトリル／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を行い、LC-MS/MS で定量及び確認する方法である。なお、アミトラズ及び代謝物 B のそれぞれについて定量を行い、代謝物 B を含むアミトラズ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アミトラズの含量に変換し、これらの和を分析値とする。

2) 注意点

- ① アミトラズ及び代謝物 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。

アミトラズ

定量イオン (m/z)：プリカーサーイオン 294、プロダクトイオン 163

定性イオン (m/z)：プリカーサーイオン 294、プロダクトイオン 122

代謝物 B

定量イオン (m/z)：プリカーサーイオン 163、プロダクトイオン 122

定性イオン (m/z)：プリカーサーイオン 163、プロダクトイオン 107

- 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、はちみつ

12. 参考文献

なし

13. 類型

C

イプフェンカルバゾン試験法（農産物）

1. 分析対象化合物

イプフェンカルバゾン

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。

イプフェンカルバゾン標準品 本品はイプフェンカルバゾン 98 %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、飽和塩化ナトリウム溶液 20 mL を加え、*n*-ヘキサン 20 mL で振とう抽出した後、毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離し、上澄液を採る。水層に *n*-ヘキサン 20 mL を加えて振とう抽出し、上記と同様に遠心分離し、上澄液を採る。得られた上澄液を先の上澄液に合わせ、40℃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（1：9）混液 5 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、飽和塩化ナトリウム溶液 10 mL を加え、*n*-ヘキサン 10 mL で振とう抽出した後、毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離し、上澄液を採る。水層に *n*-ヘキサン 10 mL を加えて振とう抽出し、上記と同様に遠心分離し、上澄液を採る。得られた上澄液を先の上澄液に合わせ、40℃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（1：9）混液 5 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 40 mL を分取し、飽和塩化ナトリウム溶液 40 mL を加え、*n*-ヘキサン 40 mL で振とう抽出した後、毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離し、上澄液を採る。水層に *n*-ヘキサン 40 mL を加えて振とう抽出し、上記と同様に遠心分離し、上澄液を採る。得られた上澄液を先の上澄液に合わせ、40°C 以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物にアセトン及び *n*-ヘキサン (1 : 9) 混液 5 mL を加えて溶かす。

2) 精製

① 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カラムクロマトグラフィー

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) にアセトン及び *n*-ヘキサン各 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、アセトン及び *n*-ヘキサン (1 : 9) 混液 5 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水 (3 : 7) 混液 5 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た後、アセトニトリル及び水 (3 : 7) 混液 5 mL を注入し、流出液は捨てる。アセトニトリル及び水 (3 : 2) 混液 10 mL を注入し、溶出液を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

イプフェンカルバゾン標準品のアセトニトリル及び水 (3 : 2) 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 0.001 mg/L である。

7. 定量

試験溶液を LC-MS/MS に注入し、6 の検量線でイプフェンカルバゾンの含量を求める。

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 3.5 μm

カラム温度：40°C

移動相：0.01 vol%酢酸・アセトニトリル溶液及び 0.01 vol%酢酸の混液（1：1）で 0.5 分間保持した後、（4：1）までの濃度勾配を 7.5 分間で行い 4 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 427、プロダクトイオン 198

プリカーサーイオン 429、プロダクトイオン 198

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

イプフェンカルバゾンを試料からアセトンで抽出し、*n*-ヘキサンに転溶した後、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 イプフェンカルバゾンの 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 427、プロダクトイオン 198

定性イオン (m/z)：プリカーサーイオン 429、プロダクトイオン 198

- ② 試験法開発時に検討した食品：玄米、大豆、ほうれんそう、キャベツ、ばれいしょ、オレンジ、りんご、及び緑茶

12. 参考文献

なし

13. 類型

C

プロチオコナゾール試験法（畜産物）

1. 分析対象化合物

代謝物M17 [2- (1-クロロシクロプロピル) -1- (2-クロロフェニル) -3- (1*H*-1,2,4-トリアゾール-1-イル) -2-プロパノール]（抱合体を含む。）

2. 適用食品

畜産物、乳

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。

代謝物M17標準品 本品は代謝物M17 98%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）を量り採る。アセトニトリル及び水（4：1）混液40 mL及び*n*-ヘキサン20 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。残留物にアセトニトリル及び水（4：1）混液40 mL及び*n*-ヘキサン20 mLを加え、ホモジナイズし、上記と同様に遠心分離し、得られた上澄液を合わせる。アセトニトリル及び水混液層を採り、消泡用シリコン3滴を加え、40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。

2) 加水分解

1) で得られた残留物に水10 mL及び5 mol/L塩酸20 mLを加え、還流装置に接続し、2時間加熱還流を行い、代謝物M17の抱合体を加水分解する。放冷後、反応液に水を加えて正確に100 mLとする。

3) 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水各5 mLを順次注入し、各流出液は捨てる。2) で得られた溶液から正確に10 mL（脂肪の場合は20 mL）を分取し、このカラムに注入した後、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（4：1）混液10 mLを注入し、溶出液をアセトニトリル及び水（4：1）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

代謝物M17標準品のアセトニトリル及び水（4：1）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、筋肉、脂肪及び内臓にあつては、試料中0.01 mg/kg（プロチオコナゾール換算）に相当する試験溶液中濃度は0.001 mg/L（プロチオコナゾール換算）である。乳にあつては、試料中0.004 mg/kg（プロチオコナゾール換算）に相当する試験溶液中濃度は0.0004 mg/L（プロチオコナゾール換算）である。

7. 定量

試験溶液をLC-MS/MSに注入し、6の検量線で代謝物M17の含量を求め、次式により、プロチオコナゾール（代謝物M17及びその抱合体を含む）の含量を求める。

プロチオコナゾール（代謝物M17及びその抱合体を含む）の含量（ppm）=代謝物M17の含量（ppm）×1.103

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：5 mmol/L酢酸アンモニウム溶液及びアセトニトリルの混液（1：1）から（1：9）

までの濃度勾配を10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 312、プロダクトイオン 125、70

注入量：4 µL

保持時間の目安：6分

10. 定量限界

筋肉、脂肪及び内臓：0.01 mg/kg（プロチオコナゾール換算）

乳：0.004 mg/kg（プロチオコナゾール換算）

11. 留意事項

1) 試験法の概要

代謝物M17及びその抱合体を試料から n -ヘキサン存在下アセトニトリル及び水（4：1）

混液で抽出する。代謝物M17の抱合体を塩酸で加水分解して代謝物M17とし、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。

なお、代謝物M17の含量に換算係数を乗じてプロチオコナゾールの含量に変換し分析値とする。

2) 注意点

- ① 代謝物M17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 312、プロダクトイオン 70
定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン 312、プロダクトイオン 125
- 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

- ・ JAU6476 Independent Method Validation (Battelle Study Number A4-14-01-01)
- ・ [Phenyl-UL-¹⁴C]JAU6476-desthio Absorption, Distribution, Excretion, and Metabolism in the Lactating Goat

13. 類型

C

プロポキシカルバゾン試験法（農産物）

1. 分析対象化合物

プロポキシカルバゾン

メチル 2-[[[4,5-ジヒドロ-3-(2-ヒドロキシプロポキシ)-4-メチル-5-オキソ-1*H*-1,2,4-トリアゾール-1-イル]カルボニル]アミノ]スルホニル]ベンゾエート（以下「代謝物A」という。）

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。

プロポキシカルバゾンナトリウム塩標準品 本品はプロポキシカルバゾンナトリウム塩98%以上を含む。

代謝物A標準品 本品は代謝物A 97%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。この残留物にアセトニトリル5 mLを加えて溶かす。

2) 精製

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、水及びアセトニトリル各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、アセトニトリル5 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10 mLを注入し、溶出液を採り、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

プロポキシカルバゾンナトリウム塩標準品をメタノールに溶かして200 mg/L (プロポキシカルバゾン換算) とし標準原液とする。同様に代謝物A標準品をメタノールに溶かして200 mg/Lの標準原液とする。各標準原液を適宜混合してアセトニトリル及び水 (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 (代謝物Aはプロポキシカルバゾン換算) に相当する試験溶液中濃度は0.001 mg/L (代謝物Aはプロポキシカルバゾン換算) である。

7. 定量

試験溶液をLC-MS/MSに注入し、6の検量線でプロポキシカルバゾン及び代謝物Aの各含量を求める。

代謝物Aを含むプロポキシカルバゾンの含量を求める場合には、次式により求める。

プロポキシカルバゾン (代謝物Aを含む。) の含量 (ppm) = A + B × 0.9614

A : プロポキシカルバゾンの含量 (ppm)

B : 代謝物A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5 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 (3 : 7) から (7 : 3) までの濃度勾配を10分間で行った後、(9 : 1) で5分間保持する。

イオン化モード : ESI (-)

主なイオン (*m/z*)

プロポキシカルバゾン : プリカーサーイオン 397、プロダクトイオン 156、113

代謝物A : プリカーサーイオン 413、プロダクトイオン 172、113

注入量 : 4 µL

保持時間の目安

プロポキシカルバゾン : 9分

代謝物A : 5分

10. 定量限界

各化合物0.01 mg/kg (代謝物Aはプロポキシカルバゾン換算)

11. 留意事項

1) 試験法の概要

プロポキシカルバゾン及び代謝物Aを試料からメタノールで抽出し、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 プロポキシカルバゾン及び代謝物A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。

プロポキシカルバゾン

定量イオン (m/z) : プリカーサーイオン 397、プロダクトイオン 156

定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン 397、プロダクトイオン 113

代謝物A

定量イオン (m/z) : プリカーサーイオン 413、プロダクトイオン 172

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 113

- ② プロポキシカルバゾンはアセトニトリルに溶けにくいため、標準原液調製時には作成する濃度によっては注意すること。
- ③ 試験法開発時に検討した食品：小麦

12. 参考文献

なし

13. 類型

C

プロポキシカルバゾン試験法（畜産物）

1. 分析対象化合物

プロポキシカルバゾン

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。

プロポキシカルバゾンナトリウム塩標準品 本品はプロポキシカルバゾンナトリウム塩98%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。この溶液から正確に20 mLを分取し、40℃以下で約1 mLに濃縮する。これに*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で2回振とう抽出する。抽出液を合わせ、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5 mLを加えて溶かす。

2) 精製

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、水及びアセトニトリル各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、アセトニトリル5 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10 mLを注入し、溶出液を採り、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

プロポキシカルバゾンナトリウム塩標準品をメタノールに溶かして200 mg/L（プロポキシカルバゾン換算）とし標準原液とする。標準原液をアセトニトリル及び水（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の検量線でプロポキシカルバゾンの含量を求める。

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5 μm

カラム温度：40℃

移動相：アセトニトリル及び0.1 vol%ギ酸の混液（3：7）から（7：3）までの濃度勾配を10分間で行った後、（9：1）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 397、プロダクトイオン 156、113

注入量：4 μL

保持時間の目安：9分

10. 定量限界

0.01 mg/kg

11. 留意事項

1) 試験法の概要

プロポキシカルバゾンを試料から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 プロポキシカルバゾンの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 397、プロダクトイオン 156

定性イオン（*m/z*）：プリカーサーイオン 397、プロダクトイオン 113

- ② プロポキシカルバゾンはアセトニトリルに溶けにくいいため、標準原液調製時には作成する濃度によっては注意すること。

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

フロルフェニコール試験法（畜水産物）

1. 分析対象化合物

フロルフェニコール

代謝物FFNH₂ [(1*R*,2*S*)-1-(4-メチルスルホニルフェニル)-2-アミノ-3-フルオロ-1-プロパノール]（以下「フロルフェニコールアミン」という。加水分解によりフロルフェニコールアミンに変換される化合物を含む。）

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。

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。

フロルフェニコール標準品 本品はフロルフェニコール98%以上を含む。

フロルフェニコールアミン標準品 本品はフロルフェニコールアミン97%以上を含む。

5. 試験溶液の調製

1) 加水分解及び抽出

試料10.0 gに6 mol/L塩酸20 mLを加え、密栓して100℃で3時間加熱する。放冷後、水10 mL及び*n*-ヘキサン40 mLを加え、振とう後、毎分3,000回転で5分間遠心分離する。*n*-ヘキサン層を捨て、水層にケイソウ土2 gを加えて混合した後、吸引ろ過する。容器及びろ紙上の残留物をアセトン及び水（1：1）混液10 mLで2回洗い、洗液を吸引ろ過する。ろ液を合わせ、水を加えて正確に100 mLとする。

2) 精製

① 多孔性ケイソウ土カラムクロマトグラフィー

1) で得られた溶液から正確に2.5 mLを分取し、7.5 mol/L水酸化ナトリウム溶液1 mL及び塩化ナトリウム1 gを加えよく混合した後、多孔性ケイソウ土カラム（5

mL保持用) に注入する。このカラムを30分間放置した後、酢酸エチル30 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0.1 vol%酢酸及びメタノール (1 : 1) 混液1 mLを加えて溶かす。

② 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カラムクロマトグラフィー

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2 mL及び0.1 vol%酢酸及びメタノール (1 : 1) 混液3 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%酢酸及びメタノール (1 : 1) 混液3 mL及びメタノール2 mLを順次注入し、各流出液は捨てる。次いで、アンモニア水及びメタノール (1 : 99) 混液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1 mLとしたものを試験溶液とする。

6. 検量線の作成

フロルフェニコールアミン標準品の0.1 vol%酢酸及びメタノール (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濃度は0.0025 mg/Lである。

7. 定量

試験溶液をLC-MS/MSに注入し、6の検量線でフロルフェニコールアミンの含量を求める。

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 µm

カラム温度 : 40°C

移動相 : アセトニトリル及び0.1 vol%酢酸 (1 : 99) 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248、プロダクトイオン230、130

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

試料に塩酸を加えて加熱し、フロルフェニコール及びその代謝物をフロルフェニコールアミンに加水分解後、*n*-ヘキサンで洗浄し、多孔性ケイソウ土カラム及び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 加水分解操作については、フロルフェニコール標準品を用いて、加水分解が十分に行われていることを確認すること。
- ② 加水分解においては、試料の塊がなくなり、暗褐色～黒色の溶液状態となるまで加熱すること。
- ③ 吸引ろ過の際、ろ過速度が遅い場合は、ガラス繊維ろ紙を用いると良い。
- ④ 吸引ろ過の際、気泡が発生し、定容が困難な場合は毎分3,000回転で5分間遠心分離すると良い。
- ⑤ *n*-ヘキサンで洗浄した後、浮遊物が認められない場合は、吸引ろ過を行う必要はない。吸引ろ過を行わない場合の操作を以下に示す。
n-ヘキサン層を捨て、水層にアセトン10 mLを加えた後、水を加えて正確に100 mLとする。
- ⑥ 定容の際、激しく振とうすると、試料によっては泡立つ場合があるため、穏やかに転倒混和する。
- ⑦ 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カラムクロマトグラフィーにおいて、濃縮の際に水が残る場合は、40℃以下で約0.5 mLまで濃縮した後、エタノールを2 mL程度加えて再度濃縮すると良い。
- ⑧ 多孔性ケイソウ土カラムクロマトグラフィーのみで精製が十分である場合は、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カラムクロマトグラフィーを省略してもよい。
- ⑨ 試験法開発時の基準値濃度での添加回収試験においては、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カラムクロマトグラフィーを省略した。
- ⑩ フロルフェニコールアミンの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248、プロダクトイオン230

定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン248、プロダクトイオン130

- ⑪ 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、フロルフェニコールアミン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。
- ⑫ 試験法開発時に使用したフロルフェニコールのLC-MS/MS測定条件を以下に示す。

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%酢酸 (1 : 99) 混液で6分間保持した後、(1 : 99) から (19 : 1) までの濃度勾配を6分間で行い、(19 : 1) で5分間保持する。

イオン化モード : ESI (-)

主なイオン

定量イオン (m/z) : プリカーサーイオン356、プロダクトイオン336

定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン356、プロダクトイオン185

注入量 : 5 μL

保持時間の目安 : 11分

- ⑬ 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、うなぎ

12. 参考文献

Determination and Confirmation of Florfenicol. CLG-FLOR 1.04. Revision 04. United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service, Office of Public Health Science, 2010.

13. 類型

C