

## 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
キンクロラク試験法 （農産物） P2～	<ul style="list-style-type: none"> <li>・キンクロラク</li> <li>・メチル 3,7-ジクロロ-8-キノリンカルボキシレート（代謝物 C）</li> </ul>	<p>キンクロラク及び代謝物 C を試料から塩酸酸性下、アセトンで抽出し、ODS カラムで精製した後、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、キンクロラクと代謝物 C のそれぞれについて定量を行い、代謝物 C を含むキンクロラクの含量を求める場合には、代謝物 C の含量に換算係数を乗じてキンクロラクの含量に換算し、これらの和を分析値とする。</p>
シラフルオフエン試験法 （畜水産物） P5～	<ul style="list-style-type: none"> <li>・シラフルオフエン</li> </ul>	<p>シラフルオフエンを試料からアセトン及び <i>n</i>-ヘキサン（1：2）混液で抽出し、さらに <i>n</i>-ヘキサンで抽出する。アセトニトリル/ヘキサン分配により脱脂した後、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で精製し、LC-MS/MS で定量及び確認する方法である。</p>
プレドニゾン試験法 （畜産物） P7～	<ul style="list-style-type: none"> <li>・プレドニゾン</li> </ul>	<p>プレドニゾンを試料から <i>n</i>-ヘキサン存在下、アセトニトリルで抽出し、ODS 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>

## キンクロラック試験法（農産物）（案）

### 1. 分析対象化合物

キンクロラック

メチル3,7-ジクロロ-8-キノリンカルボキシレート（以下「代謝物C」という。）

### 2. 適用食品

穀類、種実類、果実及びその他のハーブ

### 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。

代謝物C標準品 本品は代謝物C 98%以上を含む。

### 5. 試験溶液の調製

#### 1) 抽出

##### ① 穀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1 vol%塩酸・アセトン溶液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1 vol%塩酸・アセトン溶液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、1 vol%塩酸・アセトン溶液で正確に200 mLとする。この溶液から正確に2 mLを分取し、0.1 vol%塩酸20 mLを加える。

##### ② 果実及び野菜の場合

試料20.0 gに1 vol%塩酸・アセトン溶液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1 vol%塩酸・アセトン溶液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、1 vol%塩酸・アセトン溶液で正確に200 mLとする。この溶液から正確に1 mLを分取し、0.1 vol%塩酸20 mLを加える。

#### 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）に、メタノール及び0.1 vol%塩酸各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、0.1 vol%塩酸及びメタノール（4：1）混液10 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで、0.1 vol%塩酸及びメタノール（1：4）混液10 mLを注入し、溶出液を採り、0.1 vol%塩酸及びメタノール（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

キンクロラック標準品及び代謝物C標準品の標準原液を調製する。各標準原液を適宜混合して0.1 vol%塩酸及びメタノール（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(代謝物Cはキンクロラック換算)に相当する試験溶液中濃度は0.0001 mg/L(代謝物Cはキンクロラック換算)である。

## 7. 定量

試験溶液をLC-MS/MSに注入し、6の検量線でキンクロラック及び代謝物Cの含量を求め、次式により、代謝物Cを含むキンクロラックの含量を求める。

キンクロラック（代謝物Cを含む。）の含量（ppm）=A+B×0.9452

A：キンクロラックの含量（ppm）

B：代謝物C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℃

移動相：アセトニトリル及び0.1 vol%ギ酸（2：3）混液で6分間保持し、（4：1）までの濃度勾配を4分間で行った後、（4：1）で5分間保持する。

イオン化モード：ESI（+）

主なイオン（*m/z*）

キンクロラック：プリカーサーイオン 242、プロダクトイオン 224、161

代謝物C：プリカーサーイオン 256、プロダクトイオン 196、161

注入量：10 μL

保持時間の目安：キンクロラック：5分

代謝物C：11分

## 10. 定量限界

各化合物0.01 mg/kg（代謝物Cはキンクロラック換算）

## 11. 留意事項

### 1) 試験法の概要

キンクロラック及び代謝物Cを試料から塩酸酸性下、アセトンで抽出し、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、キンクロラックと代謝物Cのそれぞれについて定量を行い、代謝物Cを含むキンクロラックの含量を求める場合には、代謝物Cの含量に換算係数を乗じてキンクロラックの含

量に換算し、これらの和を分析値とする。

## 2) 注意点

① キンクロラック及び代謝物C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。

### ・キンクロラック

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 224

### ・代謝物C

定量イオン ( $m/z$ ) : プリカーサーイオン 256、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 256、プロダクトイオン 196

② 試験法開発に検討した食品：玄米、ブルーベリー、バジル及びなたね

## 12. 参考文献

なし

## 13. 類型

C

## シラフルオフェン試験法（畜水産物）（案）

### 1. 分析対象化合物

シラフルオフェン

### 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。

シラフルオフェン標準品 本品はシラフルオフェン98%以上を含む

### 5. 試験溶液の調製

#### 1) 抽出

筋肉、脂肪、内臓及び魚介類の場合は、試料10.0 gに水10 mLを加え、ホモジナイズする。

乳及び卵の場合は、試料10.0 gを量り採る。

これにアセトン及び*n*-ヘキサン（1：2）混液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、有機層を採る。残留物に*n*-ヘキサン30 mLを加え、ホモジナイズした後、上記と同様に遠心分離する。得られた有機層を合わせ、*n*-ヘキサンを加えて正確に100 mLとする。この溶液から正確に10 mLを分取し、40℃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20 mLずつで2回振とう抽出した後、さらに、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル10 mLで振とう抽出する。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*n*-ヘキサン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*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10 mLを注入し、負荷液を含む全溶出液を採り、40℃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5 mLとしたものを試験溶液とする。

### 6. 検量線の作成

シラフルオフェン標準品のアセトニトリル溶液を数点調製し、それぞれを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0.002 mg/Lである。

### 7. 定量

試験溶液をLC-MS/MSに注入し、6の検量線でシラフルオフェンの含量を求める。

## 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℃

移動相：20 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液及び20 mmol/L 酢酸アンモニウム・メタノール溶液の混液（2：3）で2分間保持した後、（1：49）までの濃度勾配を3分間で行い、（1：49）で9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 426、プロダクトイオン 287、181、168

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

シラフルオフェンを試料からアセトン及び*n*-ヘキサン（1：2）混液で抽出し、さらに*n*-ヘキサンで抽出する。アセトニトリル/ヘキサン分配により脱脂した後、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 シラフルオフェンの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 426、プロダクトイオン 287

定性イオン（*m/z*）：プリカーサーイオン 426、プロダクトイオン 181、168

- 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、鶏卵、しじみ、うなぎ

## 12. 類型

C

## プレドニゾン試験法（畜産物）（案）

### 1. 分析対象化合物

プレドニゾン

### 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。

プレドニゾン標準品 本品はプレドニゾン 98%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*-ヘキサン層にアセトニトリル 25 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 10 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ニトリル及び水 (1 : 9) 混液 5 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 10 mL 及びアセトニトリル及び水 (1 : 9) 混液 10 mL を順次注入し、各流出液は捨てる。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 (500 mg) にアセトニトリル 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 : 9) 混液 10 mL を注入し、流出液は捨てる。この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た後、アセトニトリル 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。この残留物を水及びメタノール (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

プレドニゾン標準品の水及びメタノール (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 0.0005 mg/kg に相当する試験溶液中の濃度は 0.0005 mg/L である。

### 7. 定量

試験溶液を LC-MS/MS に注入し、6 の検量線でプレドニ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 3  $\mu$ m

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 (3 : 2) から (2 : 3) までの濃度勾配を 20 分間で行い、その後 (1 : 9) までの濃度勾配を 2 分間で行い、8 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 405、プロダクトイオン 329、295

注入量：10  $\mu$ L

保持時間の目安：17 分

#### 10. 定量限界

0.0005 mg/kg

#### 11. 留意事項

##### 1) 試験法の概要

プレドニゾロンを試料から *n*-ヘキサン存在下、アセトニトリルで抽出し、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 プレドニゾロンの 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 405、プロダクトイオン 329

定性イオン ( $m/z$ )：プリカーサーイオン 405、プロダクトイオン 295

- ② 試験法開発時に検討した食品：豚の筋肉、豚の脂肪、豚の肝臓、牛乳

#### 12. 参考文献

なし

#### 13. 類型

C