

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 |
|--------------------------------------|--|--|
| LC/MSによる動物用医薬品等の一斉試験法 I（畜水産物） P3～ | ・2-アセチルアミノ-5-ニトロチアゾール含む48物質 | <p>各動物用医薬品等を試料から、酢酸酸性下、<i>n</i>-ヘキサン及び無水硫酸ナトリウム存在下、アセトニトリルで抽出する。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。</p> <p>開発した一斉試験法の妥当性について3機関で実施した結果から評価を行い、10食品中7食品以上で選択性、真度、併行精度、室間精度の目標値を満たした48物質を別表とした。</p> |
| イソキサフルトール試験法（畜産物） P7～ | <ul style="list-style-type: none"> ・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（代謝物B） | <p>イソキサフルトール及び代謝物Bを4 mol/L塩酸及びエタノール（1:1）混液で磨砕均一化した試料から、<i>n</i>-ヘキサン存在下アセトニトリルで抽出し、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。</p> <p>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に換算し、これらの和を分析値とする。</p> |
| ツラスロマイシン試験法（畜産物） P10～ | <ul style="list-style-type: none"> ・ツラスロマイシンA ・ツラスロマイシンB ・【(2<i>R</i>,3<i>S</i>,4<i>R</i>,5<i>R</i>,8<i>R</i>,10<i>R</i>,11<i>R</i>,12<i>S</i>,13<i>S</i>,14<i>R</i>)-2-エチル-3,4,10,13-テトラヒドロキシ-3,5,8,10,12,14-ヘキサメチル-11-[[3,4,6-トリデオキシ-3-(ジメチルアミノ)-β-D-キシロ-ヘキソピラノシル]オキシ]-1-オキサ-6-アザシクロペンタデカン-15-オン】（代謝物M1）（加水分解により代謝物M1に変換される代謝物を含む。） ・【(2<i>R</i>,3<i>R</i>,6<i>R</i>,8<i>R</i>,9<i>R</i>,10<i>S</i>,11<i>S</i>,12<i>R</i>)-2-[(1<i>R</i>,2<i>R</i>)-1,2-ジヒドロキシ-1-メチルブチル]-8,11-ジヒドロキシ-3,6,8,10,12-ペンタメチル-9-[[3,4,6-トリデオキシ-3-(ジメチルアミノ)-β-D-キシロ-ヘキソピラノシル] | <p>ツラスロマイシン及びその代謝物を試料から酢酸エチル存在下2 mol/L塩酸で抽出する。塩酸酸性条件下で加熱して代謝物M1及び代謝物M1の異性体に変換し、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。なお、代謝物M1及び代謝物M1の異性体について定量を行い、代謝物M1及び代謝物M1の異性体の含量の和に換算係数を乗じてツラスロマイシン（代謝物M1、代謝物M1の異性体及び加水分解により代謝物M1又は代謝物M1の異性体に変換される代謝物を含む）含量に変換したものを分析値とする。</p> |

| | | |
|---|---|---|
| | オキシ]-1-オキサ-4-アザシクロトリデカン-13-オン】（代謝物M1の異性体）（加水分解により代謝物M1の異性体に変換される代謝物を含む。） | |
| デメトン- <i>S</i> -メチル及びオキシデメトンメチル試験法（農産物） P13～ | <ul style="list-style-type: none"> ・デメトン-<i>S</i>-メチル ・オキシデメトンメチル（別名：デメトン-<i>S</i>-メチルスルホキシド） | デメトン- <i>S</i> -メチル及びオキシデメトンメチルを試料からチオ尿素存在下アセトンで抽出し、多孔性ケイソウ土カラムで酢酸エチルに転溶する。アセトニトリル/ヘキサン分配により脱脂した後、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。 |
| ベンジルアデニン試験法（農産物） P16～ | <ul style="list-style-type: none"> ・ベンジルアデニン（ベンジルアミノプリンをいう。） | ベンジルアデニンを試料からアセトンで抽出し、中性条件下で酢酸エチルに転溶する。ベンゼンスルホン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。 |

LC/MSによる動物用医薬品等の一斉試験法 I (畜水産物) (案)

1. 分析対象化合物

別表参照

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。

各動物用医薬品等標準品 各動物用医薬品等の純度が明らかなもの。(各動物用医薬品等の個別試験法で、標準品の純度が示されている場合にはそれに従う。示されていない場合には、純度95%以上のものを使用することが望ましい。)

5. 試験溶液の調製

1) 抽出

試料10.0 gを量り採る。はちみつの場合は、試料10.0 gを量り採り、水10 mLを加えて溶かす。これに、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル50 mL、*n*-ヘキサン50 mL及び酢酸1 mLを加えてホモジナイズした後、無水硫酸ナトリウム20 gを加えてさらにホモジナイズする。毎分3,000回転で5分間遠心分離した後、*n*-ヘキサン層を捨て、アセトニトリル層を採る。残留物にアセトニトリル50 mLを加えてホモジナイズし、上記と同様に遠心分離する。アセトニトリル層を採り、先のアセトニトリル層と合わせ、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0.1 vol%ギ酸及びメタノール (1:4) 混液1 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) にメタノール5 mL、0.1 vol%ギ酸及びメタノール (1:4) 混液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、さらに0.1 vol%ギ酸及びメタノール (1:4) 混液15 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0.1 vol%ギ酸 (1:3) 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

各動物用医薬品等の標準品を適切な溶媒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、適切な濃度範囲の各動物用医薬品等を含むアセトニトリル及び0.1 vol%ギ酸 (1:3) 混液の溶液を数点調製し、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。

7. 定量

試験溶液をLC-MS/MSに注入し、6. の検量線で各動物用医薬品等の含量を求める。

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3.0 mm、長さ150 mm、粒子径3 μm

カラム温度：40℃

移動相：A液及びB液について下表の条件で送液する。

A液：0.1 vol%ギ酸

B液：0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液

| 時間 (分) | A液 (%) | B液 (%) |
|--------|--------|--------|
| 0.0 | 99 | 1 |
| 5.0 | 99 | 1 |
| 35.0 | 0 | 100 |
| 40.0 | 0 | 100 |

イオン化モード：ESI (+) 及びESI (-)

主なイオン (m/z)：別表参照

注入量：5 μ L

保持時間の目安：別表参照

10. 定量限界

別表参照

11. 留意事項

1) 試験法の概要

各動物用医薬品等を試料から、酢酸酸性下、*n*-ヘキサン及び無水硫酸ナトリウム存在下、アセトニトリルで抽出する。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 別表は本法を適用できる化合物を五十音順に示したものであるが、規制対象となる品目には本法を適用できない代謝物等の化合物が含まれる場合があるので留意すること。また、保持時間の異なる異性体は、化合物名欄に個別に示した。
- ② 本試験法は別表に示した全ての化合物の同時分析を保証したものではない。化合物同士の相互作用による分解等及び測定への干渉等のおそれがあるため、分析対象とする化合物の組み合わせにおいてあらかじめこれらの点を検証する必要がある。
- ③ 別表に示した化合物の中には、分析操作中に経時的に減少するものがあるので、全操作は迅速に行う。
- ④ 各動物用医薬品等標準品は、可能な限り高純度のものを使用すること。
- ⑤ 定容後のアセトニトリル抽出液中に浮遊物が認められる場合には、遠心分離を行い上澄液を以降の操作に用いても良い。
- ⑥ 濃縮し、溶媒を完全に除去する操作は、窒素気流を用いて穏やかに行う。
- ⑦ ミニカラムは使用条件で各動物用医薬品等の溶出調査を事前に行い、溶出位置を確認してから使用する。
- ⑧ 精確な測定値を得るためには、試験溶液の希釈やマトリックス添加標準溶液又は標準添加法を用いることが必要な場合がある。
- ⑨ 定量限界は使用する装置や測定条件により異なるので、必要に応じて最適条件を検討する。
- ⑩ LC-MS/MSの感度によっては、試験溶液を更にアセトニトリル及び0.1 vol%ギ酸 (1 : 3) 混液で希釈する。
- ⑪ 試験法開発時に検討した食品：牛の筋肉、鶏の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳、鶏卵、はちみつ、うなぎ、さけ、しじみ

12. 参考文献

なし

13. 類型
C

(別表)LC/MSIによる動物用医薬品等の一斉試験法 I (畜水産物)

| 品目 | 分析対象化合物 ¹⁾ | 相対保持時間 ²⁾ | 主なイオン(m/z) ³⁾ | | | | | | 定量限界(mg/kg) ⁴⁾ |
|----------------------|---|----------------------|--------------------------|------------|------------|------------|------------|-----------|---------------------------|
| | | | | | | | | | |
| 2-アセチルアミノ-5-ニトロチアゾール | 2-アセチルアミノ-5-ニトロチアゾール | 0.68 | -186 → 139 | -186 → 96 | | | | | 0.01 |
| アザペロン | アザペロール | 0.55 | +330 → 312 | +330 → 121 | +330 → 109 | +330 → 78 | | | 0.01 |
| アルベンダゾール | 5-プロピルスルホニル-1H-ベンズイミダゾール-2-アミン(アルベンダゾール代謝物 I) | 0.52 | +240 → 198 | +240 → 133 | +240 → 91 | | | | 0.01 |
| エトバベート | エトバベート | 0.75 | +238 → 206 | +238 → 136 | +238 → 80 | | | | 0.01 |
| オキシベンダゾール | オキシベンダゾール | 0.68 | +250 → 218 | +250 → 176 | +250 → 80 | | | | 0.01 |
| オルビフロキサシン | オルビフロキサシン | 0.60 | +396 → 352 | +396 → 295 | +396 → 267 | +396 → 226 | | | 0.01 |
| オルメトプリム | オルメトプリム | 0.57 | +275 → 259 | +275 → 123 | +275 → 81 | | | | 0.01 |
| カラゾロール | カラゾロール | 0.68 | +299 → 222 | +299 → 194 | +299 → 116 | | | | 0.001 |
| キシラジン | キシラジン | 0.61 | +221 → 164 | +221 → 90 | | | | | 0.01 |
| クロピドール | クロピドール | 0.51 | +194 → 101 | +192 → 101 | +192 → 87 | | | | 0.01 |
| ケトプロフェン | ケトプロフェン | 0.91 | +255 → 209 | +255 → 194 | +255 → 105 | +255 → 77 | | | 0.01 |
| ジアベリジン | ジアベリジン | 0.52 | +261 → 245 | +261 → 123 | +261 → 107 | +261 → 81 | | | 0.01 |
| ジシクラニル | ジシクラニル | 0.43 | +191 → 163 | +191 → 150 | +191 → 109 | +191 → 92 | +191 → 41 | | 0.01 |
| ジニトルミド | ジニトルミド | 0.67 | -224 → 181 | -224 → 77 | -224 → 42 | | | | 0.01 |
| ジフルベンズロン | ジフルベンズロン | 1.04 | +311 → 158 | +311 → 141 | | | | | 0.01 |
| ジフロキサシン | ジフロキサシン | 0.63 | +400 → 356 | +400 → 306 | +400 → 299 | +400 → 256 | | | 0.01 |
| ジョサマイシン | ジョサマイシン | 0.84 | +828 → 174 | +828 → 109 | | | | | 0.01 |
| スルファトロキサゾール | スルファトロキサゾール | 0.69 | +268 → 156 | +268 → 108 | +268 → 92 | | | | 0.01 |
| スルファニトラン | スルファニトラン | 0.84 | +336 → 156 | +336 → 134 | +336 → 65 | -334 → 136 | -334 → 133 | | 0.01 |
| スルファメラジン | スルファメラジン | 0.57 | +265 → 156 | +265 → 108 | +265 → 92 | | | | 0.01 |
| チアベンダゾール | チアベンダゾール | 0.53 | +202 → 175 | +202 → 131 | +202 → 104 | | | | 0.01* |
| チアムリン | チアムリン | 0.80 | +495 → 91 | +495 → 73 | +494 → 192 | +494 → 119 | | | 0.01 |
| チアンフェニコール | チアンフェニコール | 0.57 | -354 → 290 | -354 → 185 | | | | | 0.01 |
| トリクロロホン | トリクロロホン | 0.61 | +257 → 127 | +257 → 109 | +257 → 79 | | | | 0.004 |
| トリメトプリム | トリメトプリム | 0.54 | +291 → 261 | +291 → 230 | +291 → 123 | | | | 0.01* |
| ナイカルバジン | N, N'-ビス-(4-ニトロフェニル)ウレア | 0.99 | -301 → 137 | -301 → 107 | | | | | 0.01 |
| ナリジクス酸 | ナリジクス酸 | 0.82 | +233 → 215 | +233 → 187 | +233 → 159 | +233 → 104 | | | 0.01 |
| ニトロキシニル | ニトロキシニル | 0.87 | -289 → 162 | -289 → 127 | | | | | 0.01 |
| バルネムリン | バルネムリン | 0.81 | +565 → 263 | +565 → 164 | | | | | 0.01 |
| ハロフゾン | ハロフゾン | 0.66 | +416 → 120 | +416 → 100 | | | | | 0.01 |
| ピランテル | ピランテル-1 | 0.52 | +207 → 150 | +207 → 136 | +207 → 109 | +207 → 97 | | | 0.01 |
| | ピランテル-2 | 0.57 | +207 → 150 | +207 → 136 | +207 → 109 | +207 → 97 | | | 0.01 |
| ピリメタミン | ピリメタミン | 0.67 | +249 → 233 | +249 → 198 | +249 → 177 | +249 → 128 | | | 0.01 |
| ファミール | ファミール | 0.98 | +326 → 281 | +326 → 217 | +326 → 109 | +326 → 93 | | | 0.01* |
| フェノキシメチルペニシリン | フェノキシメチルペニシリン | 0.82 | +351 → 229 | +351 → 160 | +351 → 137 | +351 → 114 | -349 → 208 | -349 → 93 | 0.01 |
| ブラジクアンテル | ブラジクアンテル | 0.92 | +313 → 203 | +313 → 174 | +313 → 83 | | | | 0.01 |
| ブリフィニウム | ブリフィニウム | 0.82 | +307 → 87 | +307 → 86 | +306 → 91 | +306 → 86 | | | 0.01 |
| フルニキシン | フルニキシン | 0.94 | +297 → 279 | +297 → 264 | +297 → 109 | | | | 0.01 |
| フルベンダゾール | フルベンダゾール | 0.81 | +314 → 282 | +314 → 123 | +314 → 95 | | | | 0.01 |
| フルメキン | フルメキン | 0.83 | +262 → 244 | +262 → 202 | +262 → 126 | | | | 0.01 |
| プロチゾラム | プロチゾラム | 0.89 | +395 → 316 | +395 → 314 | +393 → 314 | +393 → 279 | | | 0.0005 |
| プロマシル | プロマシル | 0.77 | +261 → 205 | +261 → 188 | | | | | 0.01 |
| フロルフェニコール | フロルフェニコール | 0.69 | -356 → 336 | -356 → 185 | | | | | 0.01 |
| マホブラジン | マホブラジン | 0.68 | +402 → 193 | +402 → 122 | +402 → 70 | | | | 0.01 |
| メチルプレドニゾロン | メチルプレドニゾロン | 0.80 | +375 → 339 | +375 → 185 | +375 → 161 | +375 → 135 | | | 0.01 |
| メベンダゾール | メベンダゾール | 0.78 | +296 → 264 | +296 → 131 | +296 → 105 | +296 → 77 | | | 0.01 |
| メロキシカム | メロキシカム | 0.94 | +352 → 141 | +352 → 115 | +352 → 73 | | | | 0.01 |
| メンプトン | メンプトン | 0.89 | +259 → 241 | +259 → 185 | +259 → 159 | +259 → 114 | | | 0.01 |
| レバミゾール | レバミゾール | 0.51 | +205 → 178 | +205 → 91 | | | | | 0.01 |

1) 試験法を適用できる分析対象化合物を品目の五十音順に示したものであるが、規制対象となる品目には本法を適用できない代謝物等の化合物が含まれる場合があるので留意すること。また、保持時間の異なる異性体は、分析対象化合物欄に個別に示した。

2) 相対保持時間はイソキサフルトールの保持時間(22~27分)に対する相対値であり、検討機関の平均値で示した。

3) 主なイオンは、LC-MS/MS測定における[プリカーサーイオン→プロダクトイオン]を示し、数字の前の符号(+又は-)は、ESI測定におけるイオン化モード(ESI(+))又はESI(-))を示す。各イオンは、数字の大きい順に示した。

4) 定量限界は、添加濃度0.01 ppm(又は最小添加濃度)での添加回収試験における添加試料中の分析対象化合物のピークのS/Nが、1食品でも10以上の値が得られた場合には0.01 mg/kg(又は最小添加濃度)とした。添加濃度0.01 ppmでの添加回収試験の結果がない場合には、マトリックス添加標準溶液を用いて試料中0.01 ppmに相当する分析対象化合物のピークのS/Nが、1食品でも10以上の値が得られた場合には、定量限界の推定値を0.01 mg/kgとし「*」をつけて示した。

イソキサフルトール試験法（畜産物）（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. 対象食品

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。

イソキサフルトール標準品 本品はイソキサフルトール98%以上を含む。

代謝物B標準品 本品は代謝物B 98%以上を含む。

5. 試験溶液の調製

1) 抽出

試料を正確に量り、重量比で1/2量の4 mol/L塩酸及びエタノール（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。これに*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル50 mL、*n*-ヘキサン50 mL及び無水硫酸ナトリウム20 g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、*n*-ヘキサン層を捨て、アセトニトリル層を採る。残留物に*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル50 mL及び*n*-ヘキサン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、得られたアセトニトリル層を先のアセトニトリル層に合わせ、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℃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、溶出液を採り、溶出液を40℃以下で約1 mLまで濃縮し、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2 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で、代謝物B標準品は、アセトニトリルで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各化合物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 × 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℃

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4 mol/L塩酸及びエタノール（1：1）混液で磨砕均一化した試料から、*n*-ヘキサン存在下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 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が損失するため、溶出液の濃縮操作においては1 mL程度残すこと。
- ③ 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
- 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

12. 参考文献

なし

13. 類型
C

ツラスロマイシン試験法（畜産物）（案）

1. 分析対象化合物

ツラスロマイシンA

ツラスロマイシンB

代謝物M1 【(2R,3S,4R,5R,8R,10R,11R,12S,13S,14R)-2-エチル-3,4,10,13-テトラヒドロキシ-3,5,8,10,12,14-ヘキサメチル-11-[[3,4,6-トリデオキシ-3-(ジメチルアミノ)-β-D-キシロ-ヘキソピラノシル]オキシ]-1-オキサ-6-アザシクロペンタデカン-15-オン】（加水分解により代謝物M1に変換される代謝物を含む。）

代謝物M1の異性体 【(2R,3R,6R,8R,9R,10S,11S,12R)-2-[(1R,2R)-1,2-ジヒドロキシ-1-メチルブチル]-8,11-ジヒドロキシ-3,6,8,10,12-ペンタメチル-9-[[3,4,6-トリデオキシ-3-(ジメチルアミノ)-β-D-キシロ-ヘキソピラノシル]オキシ]-1-オキサ-4-アザシクロトリデカン-13-オン】（加水分解により代謝物M1の異性体に変換される代謝物を含む。）

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。

20 mmol/L酢酸緩衝液（pH 4.7）

第1液：酢酸アンモニウム1.54 gを量り、水を加えて溶かし、1 Lとする。

第2液：酢酸1.20 gを量り、水を加えて1 Lとする。

第1液と第2液を混和し、pHを4.7に調整する。

ツラスロマイシンA標準品 本品はツラスロマイシンA 90%以上を含む。

代謝物M1標準品 本品は代謝物M1 97%以上を含む。

5. 試験溶液の調製

1) 抽出及び加水分解

試料10.0 gに酢酸エチル25 mLを加え、ホモジナイズした後、2 mol/L塩酸25 mLを加え、さらにホモジナイズする。毎分3,000回転で5分間遠心分離した後、酢酸エチル層を捨て、水層を採る。残留物に酢酸エチル10 mL及び2 mol/L塩酸10 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、酢酸エチル層を捨てる。水層及び残留物に、先の水層を合わせ、2 mol/L塩酸5 mLで先の水層を採った容器を洗い、洗液を合わせる。得られた溶液及び残留物を60℃で30分間加熱する。放冷後、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2 mol/L塩酸5 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

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及び水5 mLを順次注入し、各流出液は捨てる。このカラムに1) で得られた溶液から正確に5 mLを分取して注入した後、メタノール5 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで、アンモニア水及びメタノール（1：49）混液4 mLを注入し、溶出液にアンモニア水及びメタノール（1：49）混液を加えて正確に5 mLとしたものを試験溶液とする。

6. 検量線の作成

代謝物M1標準品を20 mmol/L酢酸緩衝液 (pH 4.7) 及びメタノール (1 : 1) 混液に溶かして標準原液を調製する。これをアンモニア水及びメタノール (1 : 49) 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、代謝物M1及び代謝物M1の異性体の各ピーク高又はピーク面積の和を用いて、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 (ツラスロマイシン換算) に相当する試験溶液中濃度は0.001 mg/L (ツラスロマイシン換算) である。

7. 定量

試験溶液をLC-MS/MSに注入し、6. の検量線で代謝物M1及び代謝物M1の異性体の含量の和を求め、次式により、ツラスロマイシン (代謝物M1、代謝物M1の異性体及び加水分解により代謝物M1又は代謝物M1の異性体に変換される代謝物を含む。) の含量を求める。

ツラスロマイシン (代謝物M1、代謝物M1の異性体及び加水分解により代謝物M1又は代謝物M1の異性体に変換される代謝物を含む。) の含量 (ppm) = 代謝物M1及び代謝物M1の異性体の含量の和 (ppm) × 1.398

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酢酸緩衝液 (pH 4.7) 及びメタノール (9 : 1) から (0 : 10) までの濃度勾配を10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 577、プロダクトイオン 158、116

注入量：3 µL

保持時間の目安：代謝物M1：6分

代謝物M1の異性体：5分

10. 定量限界

0.01 mg/kg (ツラスロマイシン換算)

11. 留意事項

1) 試験法の概要

ツラスロマイシン及びその代謝物を試料から酢酸エチル存在下2 mol/L塩酸で抽出する。塩酸性条件下で加熱して代謝物M1及び代謝物M1の異性体に変換し、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。なお、代謝物M1及び代謝物M1の異性体について定量を行い、代謝物M1及び代謝物M1の異性体の含量の和に換算係数を乗じてツラスロマイシン (代謝物M1、代謝物M1の異性体及び加水分解により代謝物M1又は代謝物M1の異性体に変換される代謝物を含む。) 含量に変換したものを分析値とする。

2) 注意点

- ① ツラスロマイシンA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90%以上であったため、4. では「ツラスロマイシンA標準品 本品はツラスロマイシンA 90%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。
- ② ツラスロマイシンは水溶液中でツラスロマイシンA及びツラスロマイシンBの平衡混合物となる。ツラスロマイシンA標準品を用いて添加回収試験を行った場合、代謝物M1及び代謝物M1の異性体の2本のピークとして検出される。
- ③ ツラスロマイシンA及び代謝物M1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、ツラスロマイシンAの標準原液は、標準品を20 mmol/L酢酸緩衝液 (pH 4.7) 及びメタノール (1 : 1) 混液に溶かして調製すると良い。

- ④ ツラスロマイシンA標準品を用いて添加回収試験を実施し、加水分解が十分に行われていることを確認すること。
- ⑤ 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。
- ⑥ 加水分解後、遠心分離を行うことにより浮遊物を除くことができる場合は、吸引ろ過を行う必要はない。
- ⑦ 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。
- ⑧ 代謝物M1及び代謝物M1の異性体の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577、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577、プロダクトイオン116
- ⑨ 代謝物M1に対する代謝物M1の異性体の相対保持時間は約0.8である。
- ⑩ 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

12. 参考文献

なし

13. 類型

C

デメトン-S-メチル及びオキシデメトンメチル試験法（農産物）（案）

1. 分析対象化合物

デメトン-S-メチル

オキシデメトンメチル（別名：デメトン-S-メチルスルホキシド）

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。

チオ尿素 チオ尿素（特級）

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のポリプロピ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。

デメトン-S-メチル標準品 本品はデメトン-S-メチル98%以上を含む。

オキシデメトンメチル標準品 本品はオキシデメトンメチル98%以上を含む。

5. 試験溶液の調製法

1) 抽出

① 穀類、豆類及び茶の場合

穀類及び豆類の場合は試料10.0 g、茶の場合は試料5.00 gを量り採り、0.2 w/v%チオ尿素溶液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、ホモジナイズした後、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5 mL以下に濃縮する。これに塩化ナトリウム1 gを加えて溶解した後、多孔性ケイソウ土カラム（5 mL保持用）に注入する。このカラムを約10分間放置した後、酢酸エチル40 mLを注入し、溶出液を40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。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

試料を正確に量り、重量比で等量の0.2 w/v%チオ尿素溶液を加えホモジナイズした後、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、ホモジナイズした後、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5 mL以下に濃縮する。これに塩化ナトリウム1 gを加えて溶解した後、多孔性ケイソウ土カラム（5 mL保持用）に注入する。このカラムを約10分間放置した後、酢酸エチル40 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/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12 mLを注入して負荷液を含む全溶出液を採り、40℃以下で濃縮して溶媒を除去する。
この残留物に水及びメタノール（4：1）混液を加えて溶かし、穀類及び豆類の場合は正確に2 mL、茶の場合は正確に1 mL、果実及び野菜の場合は正確に4 mLとしたものを試験溶液とする。

6. 検量線の作成

デメトン-*S*-メチル標準品及びオキシデメトンメチル標準品をそれぞれメタノールに溶解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（4：1）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0.01 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. の検量線でデメトン-*S*-メチル及びオキシデメトンメチルの各含量を求める。

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2.0 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5 mmol/L酢酸アンモニウム・メタノール溶液の混液（4：1）から（1：99）までの濃度勾配を10分間で行い、（1：99）で10分間保持する。

イオン化モード：ESI（+）

主なイオン（*m/z*）：

デメトン-*S*-メチル：プリカーサーイオン 231、プロダクトイオン 89、61

オキシデメトンメチル：プリカーサーイオン 247、プロダクトイオン 169、109

注入量：3 μL

保持時間の目安：デメトン-*S*-メチル：8分

オキシデメトンメチル：5分

10. 定量限界

デメトン-*S*-メチル：0.01 mg/kg

オキシデメトンメチル：0.01 mg/kg

11. 留意事項

1) 試験法の概要

デメトン-*S*-メチル及びオキシデメトンメチルを試料からチオ尿素存在下アセトンで抽出し、多孔性ケイソウ土カラムで酢酸エチルに転溶する。アセトニトリル/ヘキサン分配により脱脂した後、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 濃縮後の抽出液に塩化ナトリウム1 gを加えて溶解する際には、超音波洗浄機にかけながら行うなど、十分に飽和させる必要がある。添加する塩化ナトリウムが多すぎる場合は減らしてもよいが、十分に飽和する量を加える。
- ② 多孔性ケイソウ土カラムによる転溶操作は、溶出液の流速が速いと水分が溶出することがあることから、流速を5 mL/分以下に調整する。カラムの出口にストップバルブ（テフロン製など汚染の可能性の少ない材質のものを使用する）をつけて調節すると良い。
- ③ 果実・野菜の場合についても、必要に応じてアセトニトリル/ヘキサン分配を追加するとよい。

- ④ 多孔性ケイソウ土カラムに負荷した後の容器を酢酸エチル5 mLで2回洗い込み、さらに30 mLで洗い込むと良い。洗い込む際に付着物があれば、必要に応じて適量の無水硫酸ナトリウムを加えて超音波洗浄機にかけながら洗い込むと良い。試料によっては濃縮の際に容器の内側に強固な付着物が認められることがあり、無水硫酸ナトリウムはこれを分散させるために使用する。
- ⑤ 分析操作中にデメトン-S-メチルのオキシデメトンメチル、更に、デメトン-S-メチルスルホンに変換する場合があるので、必要に応じてデメトン-S-メチル標準品を用いて添加回収試験を実施し、これらへの変換がないことを確認すること。
- ⑥ デメトン-S-メチル、オキシデメトンメチル及びデメトン-S-メチルスルホンの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。
- ・デメトン-S-メチル
 - 定量イオン (m/z) : プリカーサーイオン 231、プロダクトイオン 89
 - 定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン 231、プロダクトイオン 61
 - ・オキシデメトンメチル
 - 定量イオン (m/z) : プリカーサーイオン 247、プロダクトイオン 169
 - 定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン 247、プロダクトイオン 109
 - ・デメトン-S-メチルスルホン
 - 定量イオン (m/z) : プリカーサーイオン 263、プロダクトイオン 169
 - 定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン 263、プロダクトイオン 109
- ⑦ 試験法開発時に検討した食品：玄米、大豆、ばれいしょ、ほうれんそう、キャベツ、りんご、オレンジ、茶

12. 参考文献

上野英二ら、LC-MSによる農産物中デメトン-S-メチル、オキシデメトンメチルおよびデメトン-S-メチルスルホンの分析、食衛誌、**50**、64-69 (2009)

13. 類型

C

ベンジルアデニン試験法（農産物）（案）

1. 分析対象化合物

ベンジルアデニン（ベンジルアミノプリンをいう。）

2. 適用食品

野菜及び果実

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）

第1液：リン酸二水素カリウム68.0 gを量り、水を加えて溶かし、1,000 mLとする。

第2液：リン酸水素二カリウム87.1 gを量り、水を加えて溶かし、1,000 mLとする。

第1液1容量と第2液2容量を混和し、両液を用いてpH 7.0に調整する。

ベンジルアデニン標準品 本品はベンジルアデニン98%以上を含む。

5. 試験溶液の調製

1) 抽出

試料20.0 gにアセトン100 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50 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200 mLとする。この溶液から正確に10 mLを分取し、0.5 mol/Lリン酸緩衝液（pH 7.0）40 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℃以下で約2 mLまで濃縮する。

2) 精製

ベンゼンスルホンプロピルシリル化シリカゲルミニカラム（500 mg）にメタノール及び酢酸エチル各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、酢酸エチル及びメタノール各5 mLを順次注入し、各流出液は捨てる。次いで、アンモニア水、水及びメタノール（1：30：20）混液5 mLを注入して溶出液を採り、メタノールを加えて正確に5 mLとしたものを試験溶液とする。

6. 検量線の作成

ベンジルアデニ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0.005 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. の検量線でベンジルアデニンの含量を求める。

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：5 mmol/L酢酸アンモニウム溶液及びメタノールの混液（4：1）から（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 ）：プリカーサーイオン 226、プロダクトイオン 91、65

注入量：2 μ L

保持時間の目安：9分

10. 定量限界

0.005 mg/kg

11. 留意事項

1) 試験法の概要

ベンジルアデニンを試料からアセトンで抽出し、中性条件下で酢酸エチルに転溶する。ベンゼンスルホン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 アセトンを用いてベンジルアデニンの標準原液を調製する場合は、溶解度に注意する。ベンジルアデニンの1,000 mg/Lアセトン溶液を4°Cで保存した場合、析出が見られる。メタノールを用いれば1,000 mg/L溶液を調製可能である。
- ② ベンジルアデニンの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 226、プロダクトイオン 91
定性イオン（ m/z ）：プリカーサーイオン 226、プロダクトイオン 65
- ③ 試験法開発時に検討した食品：アスパラガス、かぼちゃ、すいか、りんご、ぶどう

12. 参考文献

多田 裕之ら、農産物中ベンジルアミノプリン分析法、食衛誌、**49**、136-140（2008）

13. 類型

C