

発出予定の試験法（案）の概要

試験法（案）	分析対象化合物	開発の経緯及び試験法の概要
MCPA試験法（畜水産物） P 5～7	・ MCPA（MCPAの塩、MCPAのエステル体及び加水分解によりMCPAに変換される代謝物を含む。）	【開発の経緯】 畜水産物における規制対象を分析可能な公示試験法が存在しないため、新規開発した。 【試験法の概要】 MCPA（MCPAの塩、MCPAのエステル体及び加水分解によりMCPAに変換される代謝物を含む。）を、試料にアセトンを加えてホモジナイズした後、酸性条件及び塩基性条件での加水分解により抽出及びMCPAへの変換を行う。加水分解後の溶液をpH 7～8として<i>n</i>-ヘキサンで洗浄した後、酸性条件として酢酸エチル及び<i>n</i>-ヘキサン（1：4）混液に転溶する。トリメチルアミノ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。なお、MCPAの分析値には、MCPA、MCPAの塩、MCPAのエステル体及び加水分解によりMCPAに変換される代謝物が含まれる。
アミノピラリド試験法（農産物） P 8～10	・ アミノピラリド	【開発の経緯】 農産物における規制対象を分析可能な公示試験法が存在しないため、新規開発した。 【試験法の概要】 アミノピラリドを試料から塩酸酸性下メタノールで抽出し、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及び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。

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	開発の経緯及び試験法の概要
クロフェンテジン試験法（畜産物） P 11～13	・クロフェンテジン ・臭化水素酸によって2-クロロ安息香酸に変換される代謝物	【開発の経緯】 畜産物における規制対象を分析可能な公示試験法が存在しないため、新規開発した。 【試験法の概要】 試料に臭化水素酸を加えて加熱還流し、クロフェンテジン及び臭化水素酸によって 2-クロロ安息香酸に変換される代謝物を 2-クロロ安息香酸に加水分解する。ジエチルエーテル及び <i>n</i>-ヘキサン（3：1）混液で抽出した後、0.1 mol/L 炭酸水素ナトリウム溶液に抽出する。塩酸で酸性として再度ジエチルエーテル及び <i>n</i>-ヘキサン（3：1）混液に転溶し、トリメチルアミノ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、LC-MS/MS で定量及び確認する方法である。なお、2-クロロ安息香酸について定量を行い、2-クロロ安息香酸の含量に換算係数を乗じてクロフェンテジン（臭化水素酸によって 2-クロロ安息香酸に変換される代謝物を含む。）の含量に換算したものを分析値とする。
ジカンバ試験法（畜産物） P 14～16	・ジカンバ ・3, 6-ジクロロ-2-ヒドロキシ安息香酸（以下「代謝物 B」という。抱合体を含む。）	【開発の経緯】 畜産物における規制対象を分析可能な公示試験法が存在しないため、新規開発した。 【試験法の概要】 ジカンバ及び代謝物B（抱合体を含む。）を、試料にエタノール及び2 mol/L塩酸（1：1）混液を加えて加水分解して抽出した後、<i>n</i>-ヘキサンで洗浄する。酢酸エチル及び<i>n</i>-ヘキサン（1：4）混液に転溶し、スチレンジビニルベンゼン-N含有ビニル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、ジカンバ及び代謝物B（抱合体を含む。）のそれぞれについて定量を行い、代謝物B（抱合体を含む。）を含むジカンバの含量を求める場合には、代謝物B（抱合体を含む。）の含量に換算係数を乗じてジカンバの含量に換算し、これらの和を分析値とする。

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	開発の経緯及び試験法の概要
ジチアノン試験法 （畜産物） P 17～18	・ジチアノン	【開発の経緯】 畜産物における規制対象を分析可能な公示試験法が存在しないため、新規開発した。 【試験法の概要】 ジチアノンを、重量比で3/10量のエタノール及び重量比で3/10量の6 mol/L塩酸を加えて磨砕均一化した試料からアセトンで抽出し、アセトニトリル/ヘキサン分配で脱脂する。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。
セトキシジム試験法（畜水産物） P 19～22	・セトキシジム ・2-[1-(エトキシイミノ)ブチル]-5-[2-(エチルスルフィニル)プロピル]-3-ヒドロキシシクロヘキサ-2-エン-1-オン（以下「代謝物B」という。） ・2-[1-(エトキシイミノ)ブチル]-5-[2-(エチルスルフォニル)プロピル]-3-ヒドロキシシクロヘキサ-2-エン-1-オン（以下「代謝物C」という。） ・6-[2-(エチルチオ)プロピル]-4-オキソ-2-プロピル-4,5,6,7-テトラヒドロベンゾオキサゾール（以下「代謝物G」という。） ・6-[2-(エチルスルフィニル)プロピル]-4-オキソ-2-プロピル-4,5,6,7-テトラヒドロベンゾオキサゾール（以下「代謝物H」という。） ・6-[2-(エチルスルフィニル)プロピル]-4-オキソ-2-プロピル-4,5,6,7-テトラヒドロベンゾオキサゾール（以下「代謝物I」という。）	【開発の経緯】 畜水産物における規制対象を分析可能な公示試験法が存在しないため、新規開発した。 【試験法の概要】 セトキシジム及びその代謝物（代謝物B、代謝物C、代謝物G、代謝物H及び代謝物I）を試料からメタノールで抽出する。過酸化水素を加えて50℃で16時間加温して、オキサゾール化及びスルホキシド化を行う。多孔性ケイソウ土カラムで精製した後、<i>m</i>-クロロ過安息香酸を加えてスルホン化を行い、セトキシジム及びその代謝物（代謝物B、代謝物C、代謝物G及び代謝物H）を代謝物Iに変換する。反応液を予め20 w/v%塩化ナトリウム含有5 w/v%チオ硫酸ナトリウム溶液を注入した多孔性ケイソウ土カラムに注入し、<i>m</i>-クロロ過安息香酸を還元するとともに精製する。更に、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Iについて定量を行い、代謝物Iの含量に換算係数を乗じてセトキシジム（代謝物B、代謝物C、代謝物G、代謝物H及び代謝物Iを含む。）の含量に換算したものを分析値とする。

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	開発の経緯及び試験法の概要
フルジオキシソニル試験法（畜産物） P 23～26	・フルジオキシソニル ・酸化反応により2,2-ジフルオロ-1,3-ベンゾジオキソニル-4-カルボン酸（以下「代謝物K」という。）に変換される代謝物	【開発の経緯】 畜産物における規制対象を分析可能な公示試験法が存在しないため、新規開発した。 【分析法の概要】 フルジオキシソニル及び酸化反応により代謝物Kに変換される代謝物を、筋肉、肝臓、腎臓、乳及び卵の場合は、試料をアセトニトリルでホモジナイズした後、脂肪の場合はそのまま試料に、アセトニトリル及びアンモニア水を（17：4）になるように加え、加熱還流して抽出し、酸性下でトルエンに転溶する。抽出液を過マンガン酸カリウム・水酸化ナトリウム溶液に置換して加熱し、フルジオキシソニル及びその代謝物を代謝物Kに酸化する。酸化生成物をジビニルベンゼン-<i>N</i>-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム及び3級アミン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Kについて定量を行い、代謝物Kの含量に換算係数を乗じてフルジオキシソニル（酸化反応により代謝物Kに変換される代謝物を含む。）の含量に換算したものを分析値とする。

MCPA 試験法（畜水産物）（案）

1. 分析対象化合物

MCPA（MCPAの塩、MCPAのエステル体及び加水分解によりMCPAに変換される代謝物を含む。）

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。

MCPA標準品 本品はMCPA 95%以上を含む。

MCPA 2-エチルヘキシルエステル標準品 本品はMCPA 2-エチルヘキシルエステル 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、ホモジナイズした後、エタノール及び 4 mol/L 塩酸（1 : 1）混液 75 mL を加え、還流冷却器を付けて 95℃ で 1 時間加熱する。放冷した後、5 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 50 mL を加え、還流冷却器を付けて 80℃ で 1 時間加熱する。放冷した後、6 mol/L 塩酸を加え pH を 7~8 に調整し、吸引ろ過する。この溶液に *n*-ヘキサン 100 mL を加え、振とうし、*n*-ヘキサン層を除去する操作を 2 回繰り返した後、6 mol/L 塩酸 5 mL 及び水を加えて正確に 200 mL とする。この溶液から正確に 2 mL を分取し、酢酸エチル及び *n*-ヘキサン（1 : 4）混液 2 mL ずつで 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。この残留物に水 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ミニカラム（500 mg）にメタノール及び水各 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、水及びメタノール各 10 mL を順次注入し、各流出液は捨てる。次いで、1 vol% ギ酸・メタノール溶液 10 mL を注入し、溶出液を 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及び水（1 : 4）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

MCPA 標準品のアセトニトリル及び水（1 : 4）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 MCPA (MCPA の塩、MCPA のエステル体及び加水分解により MCPA に変換される代謝物を含む。) 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 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 (1 : 4) から (4 : 1) までの濃度勾配を 15 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 199、プロダクトイオン 141

プリカーサーイオン 201、プロダクトイオン 143

注入量：5 μ L

保持時間の目安：12 分

10. 定量限界

0.01 mg/kg

11. 留意事項

1) 試験法の概要

MCPA (MCPA の塩、MCPA のエステル体及び加水分解により MCPA に変換される代謝物を含む。) を、試料にアセトンを加えてホモジナイズした後、酸性条件及び塩基性条件での加水分解により抽出及び MCPA への変換を行う。加水分解後の溶液を pH 7~8 として *n*-ヘキサンで洗浄した後、酸性条件として酢酸エチル及び *n*-ヘキサン (1 : 4) 混液に転溶する。トリメチルアミノ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。なお、MCPA の分析値には、MCPA、MCPA の塩、MCPA のエステル体及び加水分解により MCPA に変換される代謝物が含まれる。

2) 注意点

- ① MCPA 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 199、プロダクトイオン 141

定性イオン (m/z)：プリカーサーイオン 201、プロダクトイオン 143

また、参考に MCPA エチル及び MCPA 2-エチルヘキシルエステルの 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。

MCPA エチル

定量イオン (m/z) : プリカーサーイオン 246、プロダクトイオン 125

定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン 246、プロダクトイオン 155

MCPA 2-エチルヘキシルエステル

定量イオン (m/z) : プリカーサーイオン 330、プロダクトイオン 155

定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン 330、プロダクトイオン 201

- ② MCPA 2-エチルヘキシルエステル標準品を用いて添加回収試験を実施し、MCPA への変換が十分に行われていることを確認すること。
- ③ 分析対象化合物は、MCPA、MCPA ナトリウム塩、MCPA エチル、MCPA ジメチルアミン塩、MCPA 2-エチルヘキシルエステル及び加水分解により MCPA に変換される代謝物を含む。
- ④ 加水分解後、水酸化ナトリウム溶液又は塩酸を加える際は発熱するので、氷冷しながら行う。
- ⑤ 酢酸エチル及び n -ヘキサン (1 : 4) 混液への転溶の際、エマルジョンが生成した場合は、毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離を行うと良い。なお、開発時に用いた遠心分離機における毎分 3,000 回転は、約 $1,690 \times g$ である。
- ⑥ 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、うなぎ、しじみ

12. 参考文献

なし

13. 類型

C

アミノピラリド試験法（農産物）（案）

1. 分析対象化合物

アミノピラリド

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。

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（225 mg） 内径12～13 mmのポリエチレン製のカラム管に、ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体225 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。

4級アミン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級アミン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。

アミノピラリド標準品 本品はアミノピラリド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20 vol%塩酸10 mL及びメタノール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2 mLを分取し、0.1 vol%ギ酸18 mLを加える。

2) 精製

① 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

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（225 mg）に、メタノール及び0.1 vol%ギ酸各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%ギ酸及びメタノール（9：1）混液5 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで、水及びメタノール（1：4）混液5 mLを注入し、溶出液を採る。

② 4級アミン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

4級アミン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、水及びメタノール（1：4）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、メタノール5 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで、1 vol%ギ酸・メタノール溶液8 mLを注

入し、溶出液を40℃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（19：1）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

アミノピラリド標準品をメタノールに溶かして標準原液を調製する。標準原液を0.1 vol%酢酸及びメタノール（19：1）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0.001 mg/Lである。

7. 定量

試験溶液をLC-MS/MSに注入し、6. の検量線でアミノピラ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：0.1 vol%酢酸及びメタノール（19：1）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207、プロダクトイオン161

プリカーサーイオン209、プロダクトイオン163

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

アミノピラリドを試料から塩酸酸性下メタノールで抽出し、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及び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。

2) 注意点

① アミノピラリドの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207、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209、プロダクトイオン163

② 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

クロフェンテジン試験法（畜産物）（案）

1. 分析対象化合物

クロフェンテジン

臭化水素酸によって 2-クロロ安息香酸に変換される代謝物

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）

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。

臭化水素酸 臭化水素酸（特級）

クロフェンテジン標準品 本品はクロフェンテジン95%以上を含む。

2-クロロ安息香酸標準品 本品は2-クロロ安息香酸95%以上を含む。

5. 試験溶液の調製

1) 抽出

試料10.0 gに臭化水素酸50 mL及び沸騰石を加え、還流冷却器を取り付けて、沸騰水浴中で2時間加熱還流する。放冷後、吸引ろ過し、ろ液を採る。ろ紙上の残留物に水30 mLを加え、攪拌した後、吸引ろ過する操作を3回繰り返し、ろ液を先のろ液に合わせる。更に、ろ紙上の残留物にジエチルエーテル及び*n*-ヘキサン（3：1）混液30 mLを加え、攪拌した後、吸引ろ過する操作を3回繰り返し、ろ液を先のろ液に合わせる。得られたろ液に水200 mLを加え、ジエチルエーテル及び*n*-ヘキサン（3：1）混液100 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℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物にジエチルエーテル及び*n*-ヘキサン（3：1）混液を加えて溶かし、正確に50 mLとする。

この溶液から正確に5 mLを分取し、0.1 mol/L炭酸水素ナトリウム溶液5 mLずつで2回振とう抽出する。抽出液を合わせ、5 mol/L塩酸0.3 mLを加え、pH 3以下であることを確認した後、ジエチルエーテル及び*n*-ヘキサン（3：1）混液10 mLずつで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。残留物にジエチルエーテルを加えて溶かし、2 mLに定容する。

2) 精製

トリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム（500 mg）及び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。トリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムに1）で得られた溶液を正確に1 mL注入した後、アセトニトリル10 mLを注入し、流出液は捨てる。トリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムの下部にシリカゲル

ミニカラムを接続し、1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液10 mLを注入し、溶出液を採り、1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液を加えて正確に10 mLとしたものを試験溶液とする。

6. 検量線の作成

2-クロロ安息香酸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 (クロフェンテジン換算) に相当する試験溶液中濃度は 0.0005 mg/L (クロフェンテジン換算) である。

7. 定量

試験溶液を LC-MS/MS に注入し、6. の検量線で 2-クロロ安息香酸の含量を求め、次式によりクロフェンテジン (臭化水素酸によって 2-クロロ安息香酸に変換される代謝物を含む。) の含量を求める。

クロフェンテジン (臭化水素酸によって 2-クロロ安息香酸に変換される代謝物を含む。) の含量 (ppm)
= 2-クロロ安息香酸の含量 (ppm) × 1.936

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2.5 μm

カラム温度：40℃

移動相：アセトニトリル及び0.05 vol%酢酸の混液 (1 : 49) から (3 : 7) までの濃度勾配を1分間で行い、(3 : 7) から (49 : 1) までの濃度勾配を4分間で行い、(49 : 1) 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155、プロダクトイオン111、35

注入量：2 μL

保持時間の目安：4分

10. 定量限界

0.01 mg/kg (クロフェンテジン換算)

11. 留意事項

1) 試験法の概要

試料に臭化水素酸を加えて加熱還流し、クロフェンテジン及び臭化水素酸によって 2-クロロ安息香酸に変換される代謝物を 2-クロロ安息香酸に加水分解する。ジエチルエーテル及び *n*-ヘキサン

(3 : 1) 混液で抽出した後、0.1 mol/L 炭酸水素ナトリウム溶液に抽出する。塩酸で酸性として再度ジエチルエーテル及び *n*-ヘキサン (3 : 1) 混液に転溶し、トリメチルアミノ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、LC-MS/MS で定量及び確認する方法である。

なお、2-クロロ安息香酸について定量を行い、2-クロロ安息香酸の含量に換算係数を乗じてクロフェンテジン（臭化水素酸によって 2-クロロ安息香酸に変換される代謝物を含む。）の含量に換算したものを分析値とする。

2) 注意点

- ① 臭化水素酸はドラフト内等で使用する。また、必要に応じて保護具を着用する。
- ② 試料を加熱還流した後の溶液は強酸のため、吸引ろ過にはガラス繊維ろ紙を用いる。
- ③ 加水分解後の放冷は、ジエチルエーテルの沸点（35℃）以下まで放冷すると振とう操作がしやすい。脂肪は加水分解後、脂肪が析出しない40℃程度まで放冷し、ジエチルエーテル及び n -ヘキサン（3：1）混液で抽出する。脂肪が析出するとジエチルエーテル及び n -ヘキサン（3：1）混液に溶解しにくい。析出した場合は、脂肪が溶解する40℃程度まで加温するとよい。
- ④ 炭酸水素ナトリウム溶液に5 mol/L塩酸0.3 mLを加えてpH 3以下にならない場合は、pH 3以下となるまで5 mol/L塩酸を加える。
- ⑤ 抽出液を濃縮、溶媒除去して得られた残留物は、試料によっては溶解しにくい場合があるため、十分に超音波処理を行い溶解すること。
- ⑥ 2-クロロ安息香酸の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 155、プロダクトイオン 35
定性イオン（ m/z ）：プリカーサーイオン 155、プロダクトイオン 111
- ⑦ クロフェンテジン標準品を用いて添加回収試験を実施し、2-クロロ安息香酸への変換が十分に行われていることを確認すること。
- ⑧ 回収率が不十分な場合や、回収率のばらつきが大きい場合には、加水分解時間を長くすると良い。
- 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

ジカンバ試験法（畜産物）（案）

1. 分析対象化合物

ジカンバ

3,6-ジクロロ-2-ヒドロキシ安息香酸（以下「代謝物 B」という。抱合体を含む。）

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。

アンモニア水 25%アンモニア水（特級）

スチレンジビニルベンゼン-N 含有ビニル共重合体ミニカラム（500 mg） 内径 12~13 mm のポリプロピレン製のカラム管に、スチレンジビニルベンゼン-N 含有ビニル共重合体 500 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。

ジカンバ標準品 本品はジカンバ 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) 加水分解

試料 10.0 g にエタノール及び 2 mol/L 塩酸（1 : 1）混液 150 mL を加え混合し、還流冷却器をつけて 95°C で 1.5 時間加熱する。放冷後、5 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を加え、pH を 7~8 に調整した後、毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離する。上澄液を採り、*n*-ヘキサン 100 mL を加えて緩やかに振とうした後、水層を採り、2 mol/L 塩酸 5 mL 及び水を加えて正確に 200 mL とする。この溶液から正確に 20 mL を分取し、酢酸エチル及び *n*-ヘキサン（1 : 4）混液 20 mL ずつで 3 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。この残留物にギ酸、水及びメタノール（1 : 600 : 400）混液 5 mL を加えて溶かす。

2) 精製

スチレンジビニルベンゼン-N 含有ビニル共重合体ミニカラム（500 mg）にメタノール 10 mL、ギ酸、水及びメタノール（1 : 600 : 400）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、ギ酸、水及びメタノール（1 : 600 : 400）混液 10 mL、水 10 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（2 : 5 : 95）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（19 : 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

ジカンバ標準品及び代謝物 B 標準品を用いてそれぞれ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（19：1）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 0.005 mg/kg に相当する試験溶液中の濃度は 0.005 mg/L である。

7. 定量

試験溶液を LC-MS/MS に注入し、6. の検量線でジカンバ及び代謝物 B（抱合体を含む。）の各含量を求める。代謝物 B（抱合体を含む。）を含むジカンバの含量を求める場合には、次式により求める。

ジカンバ（代謝物 B（抱合体を含む。）を含む。）の含量（ppm）＝ $A + B \times 1.068$

A：ジカンバの含量（ppm）

B：代謝物 B（抱合体を含む。）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：フェニ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：0.1 vol% 酢酸・5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液及びメタノールの混液（19：1）から（7：3）までの濃度勾配を 2 分間で行い、13 分間保持する。

イオン化モード：ESI（－）

主なイオン（*m/z*）

ジカンバ：プリカーサーイオン 219、プロダクトイオン 175

プリカーサーイオン 221、プロダクトイオン 177

代謝物 B：プリカーサーイオン 205、プロダクトイオン 161

プリカーサーイオン 207、プロダクトイオン 163

注入量：10 μL

保持時間の目安

ジカンバ：8 分

代謝物 B：11 分

10. 定量限界

各化合物 0.005 mg/kg（代謝物 B はジカンバ換算）

11. 留意事項

1) 試験法の概要

ジカンバ及び代謝物 B（抱合体を含む。）を、試料にエタノール及び 2 mol/L 塩酸（1：1）混液を加

えて加水分解して抽出した後、*n*-ヘキサンで洗浄する。酢酸エチル及び *n*-ヘキサン（1：4）混液に転溶し、スチレンジビニルベンゼン-N 含有ビニル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、ジカンバ及び代謝物 B（抱合体を含む。）のそれぞれについて定量を行い、代謝物 B（抱合体を含む。）を含むジカンバの含量を求める場合には、代謝物 B（抱合体を含む。）の含量に換算係数を乗じてジカンバの含量に換算し、これらの和を分析値とする。

2) 注意点

- ① ジカンバ及び代謝物 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。

ジカンバ

定量イオン (*m/z*) : プリカーサーイオン 219、プロダクトイオン 175

定性イオン (*m/z*) : プリカーサーイオン 221、プロダクトイオン 177

代謝物 B

定量イオン (*m/z*) : プリカーサーイオン 205、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 207、プロダクトイオン 163

- 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 1,490×g である。
- ③ LC-MS/MS 測定においてマトリックスの影響がある場合は、試験溶液を希釈して測定すると良い。なお、試験法開発時には、代謝物 B はマトリックスの影響を受けたため、試験溶液を希釈して測定した。
- 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

ジチアノン試験法（畜産物）（案）

1. 分析対象化合物

ジチアノン

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。

ジチアノン標準品 本品はジチアノン 95%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 3/10 量のエタノール及び重量比で 3/10 量の 6 mol/L 塩酸を加えて磨砕均一化した後、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た後、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℃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、酢酸及び水（6：1：13）混液 10 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（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 1) で得られた溶液を注入した後、アセトニトリル、酢酸及び水（6：1：13）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酢酸（19：1）混液 10 mL を注入し、溶出液に水を加えて正確に 20 mL としたものを試験溶液とする。

6. 検量線の作成

ジチアノ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、酢酸及び水（19：1：20）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. の検量線でジチアノンの含量を求める。

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%ギ酸及び 0.01 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液（7：3）混液で 1 分間保持した後、（2：3）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 296、プロダクトイオン 264、238

注入量：5 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

ジチアノンを、重量比で 3/10 量のエタノール及び重量比で 3/10 量の 6 mol/L 塩酸を加えて磨砕均一化した試料からアセトンで抽出し、アセトニトリル/ヘキサン分配で脱脂する。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 ジチアノンの 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 296、プロダクトイオン 264

定性イオン（ m/z ）：プリカーサーイオン 296、プロダクトイオン 238

② ジチアノンは溶液状態では不安定であるため、試験溶液の調製から測定までを当日中に終わらせることが望ましい。また、検量線用標準溶液は用時調製する。なお、アセトンで調製した標準原液（1,000 mg/L）は、4°C以下で 6 か月間安定である。

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、鶏卵

12. 参考文献

なし

13. 類型

C

セトキシジム試験法（畜水産物）（案）

1. 分析対象化合物

セトキシジム

2-[1-(エトキシイミノ)ブチル]-5-[2-(エチルスルフィニル)プロピル]-3-ヒドロキシシクロヘキサ-2-エン-1-オン（以下「代謝物B」という。）

2-[1-(エトキシイミノ)ブチル]-5-[2-(エチルスルフォニル)プロピル]-3-ヒドロキシシクロヘキサ-2-エン-1-オン（以下「代謝物C」という。）

6-[2-(エチルチオ)プロピル]-4-オキソ-2-プロピル-4,5,6,7-テトラヒドロベンゾオキサゾール（以下「代謝物G」という。）

6-[2-(エチルスルフィニル)プロピル]-4-オキソ-2-プロピル-4,5,6,7-テトラヒドロベンゾオキサゾール（以下「代謝物H」という。）

6-[2-(エチルスルフォニル)プロピル]-4-オキソ-2-プロピル-4,5,6,7-テトラヒドロベンゾオキサゾール（以下「代謝物I」という。）

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。

20 w/v%塩化ナトリウム含有5 w/v%チオ硫酸ナトリウム溶液 塩化ナトリウム200 g及びチオ硫酸ナトリウム五水和物78.6 gを量り、水に溶かし、1000 mLとする。

クエン酸 純度98%以上の試薬を用いる。

0.05 mol/L クエン酸緩衝液（pH 3.0） クエン酸9.6 gを量り、水を加えて溶かし、1000 mLとしたものを第1液とする。クエン酸三ナトリウム二水和物7.35 gを量り、水を加えて溶かし、500 mLとしたものを第2液とする。第1液と第2液を混和し、pHを3.0に調整する。

m-クロロ過安息香酸試液 *m*-クロロ過安息香酸100 mgを量り、酢酸エチル20 mLを加えて溶かす。用時調製とする。

多孔性ケイソウ土カラム（10 mL保持用） 内径25～30 mmのポリエチレン製のカラム管に、10 mLを保持することができる量のカラムクロマトグラフィー用に製造した顆粒状多孔性ケイソウ土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。

セトキシジム標準品 本品はセトキシジム95%以上を含む。

代謝物I標準品 本品は代謝物I 95%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、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。

2) オキサゾール化及びスルホン化

① オキサゾール化及びスルホキシド化

1) で得られた溶液から正確に2 mLを分取し、0.05 mol/Lクエン酸緩衝液 (pH 3.0) 2 mL及び過酸化水素25 mLを加えて混合した後、密栓して50°Cで16時間加温する。冷後、全量を多孔性ケイソウ土カラム (10 mL保持用) に注入する。水4 mLをカラムに注入して10分間放置する。このカラムに*n*-ヘキサン50 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで、酢酸エチル80 mLを注入して、溶出液を採り、40°C以下で約30 mLに濃縮する。

② スルホン化

① で得られた溶液に、*m*-クロロ過安息香酸試液1 mLを加えて混合した後、密栓して30°Cで10分間加温する。この溶液を、予め20 w/v%塩化ナトリウム含有5 w/v%チオ硫酸ナトリウム溶液9 mLを注入して10分間放置した多孔性ケイソウ土カラム (10 mL保持用) に注入して、溶出液を採る。次いで、このカラムに酢酸エチル40 mLを注入して溶出液を採る。得られた溶出液を合わせて、40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物に酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (3 : 2) 混液2 mLを加えて溶かす。

3) 精製

シリカゲルミニカラム (500 mg) に、酢酸エチル5 mL並びに酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (3 : 2) 混液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、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (3 : 2) 混液10 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 (9 : 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2.5 mmol/Lギ酸アンモニウム溶液 (12 : 13) 混液に溶かし、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

代謝物I標準品をアセトニトリルに溶かして標準原液を調製する。標準原液をアセトニトリル及び2.5 mmol/Lギ酸アンモニウム溶液 (12 : 13) 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 (セトキシジム換算) に相当する試験溶液中濃度は0.001 mg/L (セトキシジム換算) 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Iの含量を求め、次式により、セトキシジム (代謝物B、代謝物C、代謝物G、代謝物H及び代謝物Iを含む。) の含量を求める。

セトキシジム (代謝物B、代謝物C、代謝物G、代謝物H及び代謝物Iを含む。) の含量 (ppm) = 代謝物Iの含量 (ppm) × 1.045

8. 確認試験

LC-MS/MSにより確認する。

9. 測定条件

(例)

カラム：オクチルシリル化シリカゲル 内径3.0 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2.5 mmol/Lギ酸アンモニウム溶液（12：13）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314、プロダクトイオン220、178

注入量：5 µL

保持時間の目安：3分

10. 定量限界

0.01 mg/kg（セトキシジム換算）

11. 留意事項

1) 試験法の概要

セトキシジム及びその代謝物（代謝物B、代謝物C、代謝物G、代謝物H及び代謝物I）を試料からメタノールで抽出する。過酸化水素を加えて50℃で16時間加温して、オキサゾール化及びスルホキシド化を行う。多孔性ケイソウ土カラムで精製した後、*m*-クロロ過安息香酸を加えてスルホン化を行い、セトキシジム及びその代謝物（代謝物B、代謝物C、代謝物G及び代謝物H）を代謝物Iに変換する。反応液を予め20 w/v%塩化ナトリウム含有5 w/v%チオ硫酸ナトリウム溶液を注入した多孔性ケイソウ土カラムに注入し、*m*-クロロ過安息香酸を還元するとともに精製する。更に、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Iについて定量を行い、代謝物Iの含量に換算係数を乗じてセトキシジム（代謝物B、代謝物C、代謝物G、代謝物H及び代謝物Iを含む。）の含量に換算したものを分析値とする。

2) 注意点

- ① オキサゾール化及びスルホン化は、セトキシジム標準品を用いて添加回収試験を実施し、代謝物Iへの変換が十分に行われていることを確認すること。
- 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 セトキシジムから変換された代謝物Iは、異性体の混合物であるためピーク形状がややブロードとなる。代謝物I標準品とはピーク形状が異なることがあるため、6. 検量線は、ピーク高法ではなく、ピーク面積法で作成する。
- ④ 代謝物I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 314、プロダクトイオン 220
定性イオン（ m/z ）：プリカーサーイオン 314、プロダクトイオン 178

また、参考としてセトキシジム、代謝物B、代謝物C、代謝物G、代謝物H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。

セトキシジム

定量イオン (m/z) : プリカーサーイオン 328、プロダクトイオン 178

定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン 328、プロダクトイオン 282

代謝物B

定量イオン (m/z) : プリカーサーイオン 344、プロダクトイオン 220

定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン 344、プロダクトイオン 178

代謝物C

定量イオン (m/z) : プリカーサーイオン 360、プロダクトイオン 314

定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン 360、プロダクトイオン 178

代謝物G

定量イオン (m/z) : プリカーサーイオン 282、プロダクトイオン 176

定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン 282、プロダクトイオン 220

代謝物H

定量イオン (m/z) : プリカーサーイオン 298、プロダクトイオン 220

定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン 298、プロダクトイオン 178

- ⑤ 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、うなぎ、しじみ

12. 参考文献

なし

13. 類型

C

フルジオキシソニル試験法（畜産物）（案）

1. 分析対象化合物

フルジオキシソニル

酸化反応により2,2-ジフルオロ-1,3-ベンゾジオキソール-4-カルボン酸（以下「代謝物K」という。）に変換される代謝物

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）

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。

3級アミン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（500 mg） 内径12～13 mmのポリプロピレン製のカラム管に、3級アミン修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体500 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。

ピロ亜硫酸ナトリウム 純度95%以上の試薬を用いる。

代謝物K標準品 本品は代謝物K 95%以上を含む。

フルジオキシソニル標準品 本品はフルジオキシソニル95%以上を含む。

5. 試験溶液の調製

1) 抽出

① 筋肉、肝臓、腎臓、乳及び卵の場合

試料10.0 gにアセトニトリル160 mLを加えてホモジナイズする。アセトニトリル10 mL及びアンモニア水40 mLを加え、還流冷却器を付けて1時間加熱還流する。室温まで放冷後、ケイソウ土10 gを加えて吸引ろ過し、ろ紙上の残留物を水25 mL、次いで、アセトニトリル25 mLで洗浄し、得られたろ液を合わせる。これに塩酸2 mL、トルエン25 mL及び飽和塩化ナトリウム溶液25 mLを加えて振とうした後、上層を採り、アセトニトリル及びトルエン（17：3）混液を加えて正確に250 mLとする。

② 脂肪の場合

試料10.0 gにアセトニトリル170 mL、アンモニア水40 mLを加え、還流冷却器を付けて1時間加熱還流する。室温まで放冷後、ケイソウ土10 gを加えて吸引ろ過し、ろ紙上の残留物を水25 mL、次いで、アセトニトリル25 mLで洗浄し、得られたろ液を合わせる。これに塩酸2 mL、トルエン25 mL及び飽和塩化ナトリウム溶液25 mLを加えて振とうした後、上層を採り、アセトニトリル及びトルエン（17：3）混液を加えて正確に250 mLとする。

2) 酸化

1) で得られた溶液から正確に25 mLを分取した後、40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物に過マンガン酸カリウム1 g及び1 mol/L水酸化ナトリウム溶液30 mLを加え、60℃で15分間加熱した後、氷冷する。反応液が十分に冷えた後、氷冷下でピロ亜硫酸ナトリウム6 gを加え、適宜振り混ぜながら氷冷下で放置する。反応液が乳白色となった後、不溶物をろ別し、水を加えて正確に50 mLとする。この溶液から正確に10 mLを分取し、塩酸800 µLを加えて混合する。

3) 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。3級アミン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 (500 mg) にメタノール及び水各5 mLを順次注入し、各流出液は捨てる。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に2) で得られた溶液を注入した後、水12 mLを注入し、流出液は捨てる。このカラムの下部に3級アミン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を接続した後、アセトニトリル及び水 (1 : 1) 混液20 mLを注入し、流出液は捨てる。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を取り外した後、3級アミン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に酢酸及びメタノール (1 : 199) 混液10 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで、ギ酸及びメタノール (1 : 99) 混液12 mLを注入し、溶出液を40℃以下で約1 mLまで濃縮し、0.2 vol%酢酸及び0.2 vol%酢酸・アセトニトリル溶液 (1 : 1) 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

代謝物K標準品の0.2 vol%酢酸及び0.2 vol%酢酸・アセトニトリル溶液 (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 (フルジオキシソニル換算) に相当する試験溶液中濃度は0.001 mg/L (フルジオキシソニル換算) 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Kの含量を求め、次式によりフルジオキシソニル (酸化反応により代謝物Kに変換される代謝物を含む。) の含量を求める。

フルジオキシソニル (酸化反応により代謝物Kに変換される代謝物を含む) の含量 (ppm) = 代謝物Kの含量 (ppm) × 1.228

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：0.2 vol%酢酸及び0.2 vol%酢酸・アセトニトリル溶液（49：1）混液で1分間保持した後、（49：1）から（3：2）までの濃度勾配を6分間で行い、（3：2）で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201、プロダクトイオン91、65

注入量：5 μ L

保持時間の目安：14分

10. 定量限界

0.01 mg/kg（フルジオキシソニル換算）

11. 留意事項

1）試験法の概要

フルジオキシソニル及び酸化反応により代謝物Kに変換される代謝物を、筋肉、肝臓、腎臓、乳及び卵の場合は、試料をアセトニトリルでホモジナイズした後、脂肪の場合はそのまま試料に、アセトニトリル及びアンモニア水を（17：4）になるように加え、加熱還流して抽出し、酸性下でトルエンに転溶する。抽出液を過マンガン酸カリウム・水酸化ナトリウム溶液に置換して加熱し、フルジオキシソニル及びその代謝物を代謝物Kに酸化する。酸化生成物をジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム及び3級アミン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Kについて定量を行い、代謝物Kの含量に換算係数を乗じてフルジオキシソニル（酸化反応により代謝物Kに変換される代謝物を含む。）の含量に換算したものを分析値とする。

2）注意点

- ① 5. 1）抽出の「① 筋肉、肝臓、腎臓、乳及び卵の場合」においては、ホモジナイズ後に加えるアセトニトリル10 mLでホモジナイザーのシャフトを洗浄し、その洗液を合わせる。
- ② 5. 1）抽出において、塩酸を加えたときに pH が 3 以下であることを確認する。
- ③ フルジオキシソニル標準品を用いて添加回収試験を実施し、代謝物 K への変換が十分に行われていることを確認すること。
- ④ 過マンガン酸カリウム及び水酸化ナトリウム溶液を加えて混合したとき、反応液が赤紫色であることを確認する。反応液が茶色や緑色である場合、代謝物 K への変換が十分に行われない可能性がある。この原因として、酸化試薬添加前の溶媒除去が不十分であることが考えられるので、溶媒を完全に除去するよう留意する。
- ⑤ ピロ亜硫酸ナトリウムを加えると反応液が発熱するため、本操作は氷冷中で行う。
- ⑥ 過マンガン酸カリウムとピロ亜硫酸ナトリウムの反応により不溶物が生じて反応液が乳白色となる。
- ⑦ 5. 2）酸化において、塩酸を加えたとき pH が 1 程度であることを確認する。
- ⑧ 5. 3）精製において、ギ酸及びメタノール（1：99）混液の溶出液を濃縮乾固すると代謝物 K が損失する可能性があるため、溶出液を濃縮する際には乾固させないように注意する。
- ⑨ 代謝物 K 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 201、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 201、プロダクトイオン 65

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、牛乳、鶏卵

12. 参考文献

なし

13. 類型

C