

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
オキシリニック酸試験法（農産物） P3～	・オキシリニック酸	オキシリニック酸を試料からアセトニトリル及び1 mol/L塩酸（9：1）混液で抽出した後、グラファイトカーボン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。
シフルメトフェン試験法（畜産物） P5～	・シフルメトフェン ・ α, α, α -トリフルオロ- <i>o</i> -トルイル酸（代謝物B-1）	シフルメトフェン及び代謝物B-1を試料から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、シフルメトフェン及び代謝物B-1のそれぞれについて定量を行い、代謝物B-1を含むシフルメトフェンの含量を求める場合には、代謝物B-1の含量に換算係数を乗じてシフルメトフェンの含量に換算し、これらの和を分析値とする。
タイロシン試験法（畜産物） P8～	・タイロシンA ・タイロシンB	タイロシンA及びタイロシンBを、エタノール及び20 vol%酢酸（1：1）混液で磨砕均一化した試料からアセトンで抽出し、 <i>n</i> -ヘキサンで脱脂（はちみつの場合は省略）した後、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。なお、タイロシンA及びタイロシンBのそれぞれについて定量を行い、タイロシンBを含むタイロシンAの含量を求める場合には、タイロシンBの含量に換算係数を乗じてタイロシンAの含量に換算し、これらの和を分析値とする。
フラボフォスフォリポール試験法（畜産物） P12～	・モエノマイシンA	モエノマイシンAを試料から50°Cに加温したアンモニア水及びメタノール（1：9）混液で抽出し、酢酸エチルで洗浄した後、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、LC-MS/MSで定量及び確認する方法である。
ラサロシド試験法（畜産物） P15～	・ラサロシドA	ラサロシドAを試料からメタノールで抽出し、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で精製した後、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、今回新たに通知予定の「シフルメトフェン試験法（畜産物）」の分析対象化合物であるシフルメトフェン及び α, α, α -トリフルオロ-*o*-トルイル酸は、通知済みの「シフルメトフェン試験法（農産物）」の分析対象化合物と共通している。また、 α, α, α -トリフルオロ-*o*-トルイル酸は、通知済みの「フルトラニル試験法（畜産物）」の測定対象化合物と同じである。今回、シフルメトフェン試験法（畜産物）の通知発出にあたり、これらの標準品について最新の市販状況を調べたところ、過去に通知済みの標準品純度が現在の市販状況と異なっていることから、最新の情報に従い過去の通知を以下の通り改める。また、標準品の融点の記載について、現在は通知に記載していないため、併せて削除する。

(下線部は変更箇所)

改正後	改正前
<p>シフルメトフェン試験法（農産物）</p> <p>1. ～2. (略)</p> <p>3. 試薬、試液</p> <p>次に示すもの以外は、総則の3に示すものを用いる。</p> <p>シフルメトフェン標準品 本品はシフルメトフェン<u>95%</u>以上を含む。</p> <p>代謝物標準品 本品はα, α, α-トリフルオロ-<i>o</i>-トルイル酸<u>95%</u>以上を含む。</p> <p>4. ～12. (略)</p>	<p>シフルメトフェン試験法（農産物）</p> <p>1. ～2. (略)</p> <p>3. 試薬、試液</p> <p>次に示すもの以外は、総則の3に示すものを用いる。</p> <p>シフルメトフェン標準品 本品はシフルメトフェン<u>96%</u>以上を含み、<u>融点は77～82℃</u>である。</p> <p>代謝物標準品 本品はα, α, α-トリフルオロ-<i>o</i>-トルイル酸<u>99%</u>以上を含み、<u>融点は109～113℃</u>である。</p> <p>4. ～12. (略)</p>
<p>フルトラニル試験法（畜産物）</p> <p>1. ～3. (略)</p> <p>4. 試薬、試液</p> <p>次に示すもの以外は、総則の3に示すものを用いる。</p> <p>フルトラニル標準品 本品はフルトラニル<u>98%</u>以上を含む。</p> <p>代謝物M4標準品 本品は代謝物M4 <u>98%</u>以上を含む。</p> <p>α, α, α-トリフルオロ-<i>o</i>-トルイル酸標準品 本品はα, α, α-トリフルオロ-<i>o</i>-トルイル酸<u>95%</u>以上を含む。</p> <p>5. ～14. (略)</p>	<p>フルトラニル試験法（畜産物）</p> <p>1. ～3. (略)</p> <p>4. 試薬、試液</p> <p>次に示すもの以外は、総則の3に示すものを用いる。</p> <p>フルトラニル標準品 本品はフルトラニル<u>98%</u>以上を含む。</p> <p>代謝物M4標準品 本品は代謝物M4 <u>98%</u>以上を含む。</p> <p>α, α, α-トリフルオロ-<i>o</i>-トルイル酸標準品 本品はα, α, α-トリフルオロ-<i>o</i>-トルイル酸<u>98%</u>以上を含む。</p> <p>5. ～14. (略)</p>

オキシリニック酸試験法（農産物）（案）

1. 分析対象化合物

オキシリニック酸

2. 適用食品

穀類、果実、野菜及び茶

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。

オキシリニック酸標準品 本品はオキシリニック酸95%以上を含む。

5. 試験溶液の調製

1) 抽出

穀類の場合は、試料10.0 gに水20 mLを加え、30分間放置する。果実及び野菜の場合は、試料20.0 gを量り採る。茶の場合は、試料5.00 gに水20 mLを加え、30分間放置する。これにアセトニトリル及び1 mol/L塩酸（9：1）混液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、アセトニトリル及び1 mol/L塩酸（9：1）混液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、アセトニトリル及び1 mol/L塩酸（9：1）混液を加えて正確に200 mLとする。

2) 精製

グラファイトカーボンミニカラム（250 mg）にアセトニトリル10 mLを注入し、流出液は捨てる。このカラムに1) で得られた溶液から正確に5 mLを分取して注入した後、メタノール10 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで、トルエン及びメタノール（1：3）混液25 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（7：3）混液に溶かし、穀類の場合は正確に5 mL、果実、野菜及び茶の場合は正確に10 mLとしたものを試験溶液とする。

6. 検量線の作成

オキシリニック酸標準品のアセトニトリル及び水（7：3）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、穀類、果実及び野菜にあつては、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。茶にあつては、試料中0.04 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. の検量線でオキシリニック酸の含量を求める。

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%ギ酸含有5 mmol/Lギ酸アンモニウム溶液（7：13）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262、プロダクトイオン244、216

注入量：5 μL

保持時間の目安：6分

10. 定量限界

0.01 mg/kg（茶の場合は0.04 mg/kg）

11. 留意事項

1) 試験法の概要

オキシリニック酸を試料からアセトニトリル及び1 mol/L塩酸（9：1）混液で抽出した後、グラファイトカーボン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 グラファイトカーボンミニカラム（250 mg）は内径12~13 mmのカラムも使用可能である。
- ② オキシリニック酸の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262、プロダクトイオン244
定性イオン (m/z)：プリカーサーイオン262、プロダクトイオン216
- ③ グラファイトカーボンミニカラムによる精製では、メーカーにより溶出状況が異なることから、確認の上、使用する。
- ④ グラファイトカーボンミニカラムの溶出液から溶媒を除去した後、残留物がアセトニトリル及び水（7：3）混液に溶解しにくい場合は、超音波処理を行い溶解するとよい。
- ⑤ 試験法開発時に検討した食品：玄米、ばれいしょ、チンゲンサイ、たまねぎ、日本なし、すもも、茶

12. 参考文献

なし

13. 類型

C

シフルメトフェン試験法（畜産物）（案）

1. 分析対象化合物

シフルメトフェン

α, α, α -トリフルオロ-*o*-トルイル酸（以下「代謝物B-1」という。）

2. 適用食品

畜産物（はちみつを除く）

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。

シフルメトフェン標準品 本品はシフルメトフェン95%以上を含む。

代謝物B-1標準品 本品は代謝物B-1 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、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、メタノールを加えて正確に100 mLとする。この溶液から正確に25 mLを分取し、40℃以下で約1 mLに濃縮する。この溶液に0.1 vol%酢酸を加え、10 mLとする。

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）にメタノール及び0.1 vol%酢酸各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、水5 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで、メタノール10 mLを注入し、溶出液を40℃以下で約1 mLに濃縮する。この溶液に水及びメタノール（2：3）混液を加え、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

シフルメトフェン標準品及び代謝物B-1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（2：3）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（代謝物B-1はシフルメトフェン換算）に相当する試験溶液中濃度は0.0025 mg/L（代謝物B-1はシフルメトフェン換算）である。

7. 定量

試験溶液をLC-MS/MSに注入し、6. の検量線でシフルメトフェン及び代謝物B-1の各含量を求める。
なお、代謝物B-1を含むシフルメトフェンの含量を求める場合には、次式により求める。

シフルメトフェン（代謝物B-1を含む。）の含量（ppm）＝A + B × 2.354

A：シフルメトフェンの含量（ppm）

B：代謝物B-1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℃

移動相：0.05 vol%酢酸及び0.05 vol%酢酸・メタノール溶液の混液（2：3）で1分間保持した後、
（1：19）までの濃度勾配を14分間で行う。

イオン化モード

シフルメトフェン：ESI（+）

代謝物B-1：ESI（-）

主なイオン（*m/z*）

シフルメトフェン：プリカーサーイオン448、プロダクトイオン249、173

代謝物B-1：プリカーサーイオン189、プロダクトイオン145、69

注入量：10 μL

保持時間の目安

シフルメトフェン：14分

代謝物B-1：4分

10. 定量限界

各化合物：0.005 mg/kg（代謝物B-1はシフルメトフェン換算）

11. 留意事項

1) 試験法の概要

シフルメトフェン及び代謝物B-1を試料から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、シフルメトフェン及び代謝物B-1のそれぞれについて定量を行い、代謝物B-1を含むシフルメトフェンの含量を求める場合には、代謝物B-1の含量に換算係数を乗じてシフルメトフェンの含量に換算し、これらの和を分析値とする。

2) 注意点

① 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、シフル

メトフェン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よい。

- ② シフルメトフェン及び代謝物B-1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。

シフルメトフェン

定量イオン (m/z) : プリカーサーイオン448、プロダクトイオン249

定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン448、プロダクトイオン173

代謝物B-1

定量イオン (m/z) : プリカーサーイオン189、プロダクトイオン145

定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン189、プロダクトイオン69

- ③ 代謝物B-1は他の農薬の規制対象にも含まれている。
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

12. 参考文献

なし

13. 類型

C

タイロシン試験法(畜産物)(案)

1. 分析対象化合物

タイロシンA

タイロシンB

2. 適用食品

タイロシンA：畜産物、はちみつ

タイロシンB：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。

タイロシンA標準品 本品はタイロシンA 97%以上を含む。

タイロシンB標準品 純度が明らかなもの。

5. 試験溶液の調製

1) 抽出

① 筋肉、脂肪、肝臓及び腎臓の場合

試料を冷凍し、約5 mm角以下に細切した後、正確に量り、重量比で等量のエタノール及び20 vol% 酢酸 (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。これにアセトン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、上記と同様に遠心分離し、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2 mLを分取し、窒素気流下で約1 mLに濃縮した後、水10 mLを加える。これに*n*-ヘキサン10 mLを加えて振とうした後、毎分3,000回転で5分間遠心分離し、*n*-ヘキサン層を捨てる操作を2回繰り返す。

② 乳及び卵の場合

氷冷した試料を正確に量り、重量比で等量のエタノール及び20 vol% 酢酸 (1 : 1) 混液を加え、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、上記と同様に遠心分離し、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2 mLを分取し、窒素気流下で約1 mLに濃縮した後、水10 mLを加える。これに*n*-ヘキサン10 mLを加えて振とうした後、毎分3,000回転で5分間遠心分離し、*n*-ヘキサン層を捨てる操作を2回繰り返す。

③ はちみつの場合

氷冷した試料を正確に量り、重量比で等量のエタノール及び20 vol% 酢酸 (1 : 1) 混液を加え、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。残留物に水5 mLを加えて溶かし、アセトン25 mLを加えてホモジナイズした後、上記と同様に遠心分離し、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2 mLを分取し、窒素気流下で約1 mLに濃縮した後、水10 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 (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。このカラムに1) で得られた溶液を注入した後、水5 mL、水及びメタノール (1 : 1) 混液5 mLを順次注入し、各流出液は捨てる。次いで、酢酸、水及びメタノール (1 : 29 : 70) 混液10 mLを注入し、溶出液を採り、酢酸、水及びメタノール (1 : 29 : 70) 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

タイロシンA標準品及びタイロシンB標準品を用いてそれぞれ標準原液を調製する。各標準原液を酢酸、水及びメタノール (1 : 29 : 70) 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 (タイロシンA換算) に相当する試験溶液中濃度は各化合物とも0.0001 mg/L (タイロシンA換算) である。

7. 定量

1) はちみつ以外の場合

試験溶液をLC-MS/MSに注入し、6. の検量線でタイロシンAの含量を求める。

2) はちみつの場合

試験溶液をLC-MS/MSに注入し、6. の検量線でタイロシンA及びタイロシンBの各含量を求める。タイロシンBを含むタイロシンAの含量を求める場合には、次式により求める。

タイロシンA (タイロシンBを含む。) の含量 (ppm) = $A + B \times 1.187$

A : タイロシンAの含量 (ppm)

B : タイロシン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 : 0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液及び0.1 vol%ギ酸含有5 mmol/Lギ酸アンモニウム溶液

(1 : 4) 混液で5分間保持した後、(1 : 4) から (19 : 1) 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)

タイロシンA：プリカーサーイオン916、プロダクトイオン772、174

タイロシンB：プリカーサーイオン772、プロダクトイオン174、88

注入量：5 μ L

保持時間の目安

タイロシンA：12分

タイロシンB：12分

10. 定量限界

各化合物0.005 mg/kg (タイロシンA換算)

11. 留意事項

1) 試験法の概要

タイロシンA及びタイロシンBを、エタノール及び20 vol%酢酸 (1 : 1) 混液で磨砕均一化した試料からアセトンで抽出し、*n*-ヘキサンで脱脂 (はちみつの場合は省略) した後、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。なお、タイロシンA及びタイロシンBのそれぞれについて定量を行い、タイロシンBを含むタイロシンAの含量を求める場合には、タイロシンBの含量に換算係数を乗じてタイロシンAの含量に換算し、これらの和を分析値とする。

2) 注意点

- ① タイロシンA及びタイロシン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。

タイロシンA

定量イオン (m/z) : プリカーサーイオン917、プロダクトイオン174

定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン917、プロダクトイオン772

タイロシンB

定量イオン (m/z) : プリカーサーイオン772、プロダクトイオン174

定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン772、プロダクトイオン88

- ② タイロシンAは常温の試料 (特に肝臓) 中で分解する可能性があるため、筋肉、脂肪及び内臓などの固形試料は冷凍し、包丁等を用いて細切可能な状態 (半解凍状態) になるまで氷冷下で解凍した後、細切する。細切した試料には、速やかに重量比で等量のエタノール及び20 vol%酢酸 (1 : 1) 混液を加え、磨砕均一化する。
- ③ 乳、卵及びはちみつなどの液体試料は氷冷し、速やかに重量比で等量のエタノール及び20 vol%酢酸 (1 : 1) 混液を加え、均一化する。
- ④ 加えるエタノール及び20 vol%酢酸 (1 : 1) 混液は、氷冷下で冷やしたものを用いる。
- ⑤ 均一化した試料は、抽出開始まで0°C以下の温度を保つ。
- ⑥ 遠心分離後の*n*-ヘキサン層を捨てる操作を2回繰り返したときに、*n*-ヘキサンが残る場合には、窒素気流下で完全に除去する。
- ⑦ 試験法開発時には、タイロシンB標準品は高純度の標準品が入手できなかったため、4. 試薬、試液では「タイロシンB標準品 純度が明らかなもの。」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ことが望ましい。

- ⑧ タイロシンAは、標準溶液中でもタイロシンBに変換される可能性があることから、タイロシンA及びタイロシンBの標準溶液はそれぞれ単品で調製する。
- ⑨ 試験法開発時に検討した食品
タイロシンA：牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳、鶏卵、はちみつ
タイロシンB：はちみつ

12. 参考文献

なし

13. 類型

C

フラボフォスフォリポール試験法（畜産物）（案）

1. 分析対象化合物

モエノマイシンA

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。

モエノマイシンA標準品 本品はモエノマイシンA 95%以上を含む。

5. 試験溶液の調製

1) 抽出

試料10.0 gに50℃に加温したアンモニア水及びメタノール（1：9）混液100 mLを加え、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50℃に加温したアンモニア水及びメタノール（1：9）混液80 mLを加えてホモジナイズし、上記と同様に遠心分離する。上澄液を採り、先の上澄液に合わせ、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℃以下で濃縮乾固する。この残留物にアンモニア水、水及びメタノール（1：60：40）混液20 mLを加えて溶かす。これに酢酸エチル20 mLを加えて振とうし、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る操作を2回繰り返す。アンモニア水、水及びメタノール混液層を40℃以下で濃縮乾固する。この残留物にギ酸、水及びメタノール（1：20：80）混液2 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5 mL、ギ酸、水及びメタノール（1：20：80）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、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（1：9）混液5 mLで1)で得られた溶液が入っていた容器を洗い、この洗液を先のカラムに注入する操作を2回繰り返す、溶出液を採る。さらにアンモニア水及びメタノール（1：9）混液10 mLを注入し、溶出液を先の溶出液に合わせる。40℃以下で約1 mLに濃縮し、0.3 vol%ギ酸及び0.3 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液（3：2）混液で正確に5 mLとしたものを試験溶液とする。

6. 検量線の作成

モエノマイシンA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0.3 vol%ギ酸及び0.3 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液（3：2）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0.002 mg/Lである。

7. 定量

試験溶液をLC-MS/MSに注入し、6. の検量線でモエノマイシンA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：オクチ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：0.3 vol%ギ酸及び0.3 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液（3：2）混液で1分間保持した後、（3：2）から（1：3）までの濃度勾配を9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790、プロダクトイオン576、554

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

モエノマイシンAを試料から50℃に加温したアンモニア水及びメタノール（1：9）混液で抽出し、酢酸エチルで洗浄した後、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、LC-MS/MSで定量及び確認する方法である。

2) 注意点

- ① 試料をホモジナイズ抽出する際にガラス製の遠心管を用いると、抽出液の温度が低下して、十分な回収が得られないことがある。このため、ホモジナイズ抽出時にはポリプロピレン製の容器を用いることが望ましい。
- ② モエノマイシンAは、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精製における負荷溶媒であるギ酸、水及びメタノール（1：20：80）混液への溶解が、試料によっては不十分となり容器内に残留する場合がある。このため、溶出溶媒であるアンモニア水及びメタノール（1：9）混液で容器を十分に洗い、洗液をカラムに注入し、この溶出液を採る。
- ③ モエノマイシン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。
定量イオン（*m/z*）：プリカーサーイオン 790、プロダクトイオン 576

定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン 790、プロダクトイオン 554

④ 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、鶏卵

12. 参考文献

なし

13. 類型

C

ラサロシド試験法（畜産物）（案）

1. 分析対象化合物

ラサロシドA

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。

ギ酸・メタノール試液 ギ酸5 mLに水及びメタノール（1：99）混液を加えて1,000 mLとする。

ラサロシドAナトリウム標準品 本品はラサロシドAナトリウム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100 mLを加え、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、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200 mLとする。この溶液から正確に2 mLを分取する。

2) 精製

① トリメチルアミノ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

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、メタノール10 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで、ギ酸・メタノール試液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。この残留物に水及びメタノール（9：1）混液5 mLを加えて溶かす。

② 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（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、水10 mL、水及びメタノール（1：1）混液10 mLを順次注入し、各流出液は捨てる。次いで、メタノール20 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5 mLとしたものを試験溶液とする。

6. 検量線の作成

ラサロシドAナトリウム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0.01 mg/kg(ラサロシドAとして)に相当する試験溶液中の濃度は0.0002 mg/L(ラサロシドAとして)である。

7. 定量

試験溶液をLC-MS/MSに注入し、6.の検量線でラサロシドA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：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)から(1:99)までの濃度勾配を10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589、プロダクトイオン235、121

注入量：10 µL

保持時間の目安：14分

10. 定量限界

0.01 mg/kg

11. 留意事項

1) 試験法の概要

ラサロシドAを試料からメタノールで抽出し、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で精製した後、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。

2) 注意点

① ラサロシド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。

定量イオン(m/z)：プリカーサーイオン589、プロダクトイオン235

定性イオン(m/z)：プリカーサーイオン589、プロダクトイオン121

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

12. 参考文献

なし

13. 類型

C