

食安発0328第7号  
平成26年3月28日

各 

都道府県知事
保健所設置市長
特別区長

 殿

厚生労働省医薬食品局食品安全部長  
(公 印 省 略)

食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法の一部改正について

今般、農薬、飼料添加物及び動物用医薬品に関する試験法に係る知見の集積等を踏まえ、「食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について」（平成17年1月24日付け食安発第0124001号当職通知。以下「試験法通知」という。）の別添の一部を下記のとおり改正することとしたので、関係者への周知方よろしく願います。

なお、改正後の試験法を実施するに際しては、試験法通知別添の第1章総則部分を参考とされたい。

#### 記

1. 目次を別紙1のとおり改める。なお、改正部分を下線で示す。
2. 第3章個別試験法中「スピノサド試験法（農産物）」に係る部分の次に別紙2の「スピノサド試験法（畜水産物）」を、「プロシミドン試験法（農産物）」に係る部分の次に別紙3の「ブロディファコウム及びワルファリン試験法（畜水産物）」を加える。

なお、各試験法の開発に当たっては、1機関の結果ではあるが、「スピノサド試験法（畜水産物）」にあつては、牛の筋肉・脂肪・肝臓、鶏の筋肉、鶏卵、牛乳、はちみつ、うなぎ、さけ、えび及びあさりについて、「ブロディファコウム及びワルファリン試験法（畜水産物）」にあつては、牛の筋肉・

脂肪・肝臓、豚の筋肉、鶏卵、牛乳、そばみつ、はちみつ、うなぎ、さけ及びしじみについて、各試験法が適用可能であることが確認されており、各試験の実施に際しては参考とされたい。

## 目次

## 第1章 総則

## 第2章 一斉試験法

- ・GC/MSによる農薬等の一斉試験法（農産物）
- ・LC/MSによる農薬等の一斉試験法Ⅰ（農産物）
- ・LC/MSによる農薬等の一斉試験法Ⅱ（農産物）
- ・GC/MSによる農薬等の一斉試験法（畜水産物）
- ・LC/MSによる農薬等の一斉試験法（畜水産物）
- ・HPLCによる動物用医薬品等の一斉試験法Ⅰ（畜水産物）
- ・HPLCによる動物用医薬品等の一斉試験法Ⅱ（畜水産物）
- ・HPLCによる動物用医薬品等の一斉試験法Ⅲ（畜水産物）

## 第3章 個別試験法

- ・BHC、 $\gamma$ -BHC、DDT、アルドリン及びディルドリン、エタルフルラリン、エトリジアゾール、エンドリン、キントゼン、クロルデン、ジコホール、テクナゼン、テトラジホン、テフルトリン、トリフルラリン、ハルフェンプロックス、フェンプロパトリン、ヘキサクロロベンゼン、ヘプタクロル、ベンフルラリン並びにメトキシクロール試験法（農産物）
- ・2,4-D、2,4-DB及びクロプロップ試験法（農産物）
- ・2,2-DPA試験法（農産物）
- ・DCIP試験法（農産物）
- ・DBEDC試験法（農産物）
- ・EPN、アニロホス、イサゾホス、イプロベンホス、エチオン、エディフェンホス、エトプロホス、エトリムホス、カズサホス、キナルホス、クロルピリホス、クロルピリホスメチル、クロルフェンビンホス、シアノホス、ジスルホトン、ジメチルビンホス、ジメトエート、スルプロホス、ダイアジノン、チオメトン、テトラクロルビンホス、テルブホス、トリアゾホス、トリブホス、トルクロホスメチル、パラチオン、パラチオンメチル、ピペロホス、ピラクロホス、ピラゾホス、ピリダフェンチオン、ピリミホスメチル、フェナミホス、フェニトロチオン、フェンスルホチオン、フェンチオン、フェントエート、ブタミホス、プロチオホス、プロパホス、プロフェノホス、ブロモホス、ベンスリド、ホキシム、ホサロン、ホスチアゼート、ホスファミドン、ホスメット、ホレート、マラチオン、メカルバム、メタクリホス、メチダチオン及びメビンホス試験法（農産物）
- ・EPTC試験法（農産物）
- ・MCPA及びジカンバ試験法（農産物）
- ・Seebachアミン試験法（農産物）
- ・アクリナトリン、シハロトリン、シフルトリン、シペルメトリン、デルタメトリン及びト

- ラロメトリン、ビフェントリン、ピレトリン、フェンバレレート、フルシトリネート、フルバリネート並びにペルメトリン試験法（農産物）
- ・アシベンゾラルSメチル試験法（農産物）
  - ・アジムスルフロン、ハロスルフロンメチル及びフラザスルフロン試験法（農産物）
  - ・アシュラム試験法（農産物）
  - ・アセキノシル試験法（農産物）
  - ・アセタミプリド試験法（農産物）
  - ・アセフェート、オメトエート及びメタミドホス試験法（農産物）
  - ・アゾキシストロビン試験法（農産物）
  - ・アゾキシストロビン、クミルロン及びシメコナゾール試験法（畜水産物）
  - ・アニラジン試験法（農産物）
  - ・アミスルブロム試験法（農産物）
  - ・アミトラズ試験法（農産物）
  - ・アミトロール試験法（農産物）
  - ・アラクロール、イソプロカルブ、クレソキシムメチル、ジエトフェンカルブ、テニルクロール、テブフェンピラド、パクロブトラゾール、ビテルタノール、ピリプロキシフェン、ピリミノバックメチル、フェナリモル、ブタクロール、フルトラニル、プレチラクロール、メトラクロール、メフェナセット、メプロニル及びレナシル試験法（農産物）
  - ・アラニカルブ試験法（農産物）
  - ・アルジカルブ及びアルドキシカルブ、エチオフェンカルブ、オキサミル、カルバリル、ピリミカーブ、フェノブカルブ並びにベンダイオカルブ試験法（農産物）
  - ・アルベンダゾール、オキシベンダゾール、チアベンダゾール、フルベンダゾール及びメベンダゾール試験法（畜水産物）
  - ・アンプロリウム及びデコキネート試験法（畜水産物）
  - ・イオドスルフロンメチル、エタメツルフロンメチル、エトキシスルフロン、シノスルフロン、スルホスルフロン、トリアスルフロン、ニコスルフロン、ピラズスルフロンエチル、プリミスルフロンメチル、プロスルフロン及びリムスルフロン試験法（農産物）
  - ・イソウロン、ジウロン、テブチウロン、トリフルムロン、フルオメツロン及びリニューロン試験法（農産物）
  - ・イソフェンホス試験法（農産物）
  - ・イソメタミジウム試験法（畜水産物）
  - ・イナベンフィド試験法（農産物）
  - ・イプロジオン試験法（農産物）
  - ・イベルメクチン、エプリノメクチン、ドラメクチン及びモキシデクチン試験法（畜水産物）
  - ・イマザモックスアンモニウム塩試験法（農産物）
  - ・イマザリル試験法（農産物）
  - ・イマズスルフロン及びベンスルフロンメチル試験法（農産物）
  - ・イミシアホス試験法（農産物）
  - ・イミノクタジン試験法（農産物）
  - ・イミベンコナゾール試験法（農産物）

- ・インダノファン試験法（農産物）
- ・ウニコナゾールP試験法（農産物）
- ・エスプロカルブ、クロルプロファミ、チオベンカルブ、ピリブチカルブ及びペンディメタリン試験法（農産物）
- ・エチクロゼート試験法（農産物）
- ・エチプロール試験法（農産物）
- ・エチプロール試験法（水産物）
- ・エテホン試験法（農産物）
- ・エトキサゾール試験法（農産物）
- ・エトキシキン試験法（農産物）
- ・エトキシキン試験法（畜水産物）
- ・エトフェンプロックス試験法（農産物）
- ・エトベンザニド試験法（農産物）
- ・エマメクチン安息香酸塩試験法（農産物）
- ・エンロフロキサシン、オキシリニック酸、オフロキサシン、オルビフロキサシン、サラフロキサシン、ジフロキサシン、ダノフロキサシン、ナリジクス酸、ノルフロキサシン及びフルメキン試験法（畜水産物）
- ・オキサジクロメホン及びフェノキサニル試験法（農産物）
- ・オキシテトラサイクリン試験法（農産物）
- ・オキシテトラサイクリン、クロルテトラサイクリン及びテトラサイクリン試験法（畜水産物）
- ・オキシポコナゾールフマル酸塩試験法（農産物）
- ・オキシリニック酸試験法（農産物）
- ・オクスフェンダゾール、フェバンテル及びフェンベンダゾール試験法（畜水産物）
- ・オリサストロビン試験法（農産物）
- ・オルトフェニルフェノール及びジフェニル試験法（農産物）
- ・オルメトプリム、ジアベリジン、トリメトプリム及びピリメタミン試験法（畜水産物）
- ・カフェンストロール、ジフェノコナゾール、シプロコナゾール、シメトリン、チフルザミド、テトラコナゾール、テブコナゾール、トリアジメノール、フルジオキサニル、プロピコナゾール、ヘキサコナゾール及びペンコナゾール試験法（農産物）
- ・カルタップ、ベンスルタップ及びチオシクラム試験法（農産物）
- ・カルプロパミド試験法（農産物）
- ・カルベンダジム、チオフアネート、チオフアネートメチル及びベノミル試験法（農産物）
- ・カルボスルファン、カルボフラン、フラチオカルブ及びベンフラカルブ試験法（農産物）
- ・カンタキサンチン試験法（畜水産物）
- ・キザロホップエチル試験法（農産物）
- ・キノメチオネート試験法（農産物）
- ・キャプタン、クロルベンジレート、クロロタロニル及びホルペット試験法（農産物）
- ・キンクロラック試験法（農産物）
- ・クミルロン試験法（農産物）

- ・クリスタルバイオレット、ブリリアントグリーン及びメチレンブルー試験法（畜水産物）
- ・グリチルリチン酸試験法（畜水産物）
- ・グリホサート試験法（農産物）
- ・グルホシネート試験法（農産物）
- ・クレトジム試験法（農産物）
- ・クロサンテル試験法（畜水産物）
- ・クロジナホッププロパルギル試験法（農産物）
- ・クロチアニジン試験法（農産物）
- ・クロチアニジン試験法（畜産物）
- ・クロピラリド試験法（農産物）
- ・クロフェンテジン試験法（農産物）
- ・クロメプロップ試験法（畜水産物）
- ・クロラントラニリプロール試験法（農産物）
- ・クロリムロンエチル及びトリベヌロンメチル試験法（農産物）
- ・クロルスルフロロン及びメトスルフロロンメチル試験法（農産物）
- ・クロルフェナピル及びビフェノックス試験法（農産物）
- ・クロルフルアズロン、ジフルベンズロン、テブフェノジド、テフルベンズロン、フルフェノクスロン、ヘキサフルムロン及びルフェヌロン試験法（農産物）
- ・クロルメコート試験法（農産物）
- ・ゲンタマイシン試験法（畜水産物）
- ・酸化フェンブタスズ試験法（農産物）
- ・酸化プロピレン試験法（農産物）
- ・シアゾファミド試験法（農産物）
- ・シアナジン試験法（農産物）
- ・ジアフェンチウロン試験法（農産物）
- ・シアン化水素試験法（農産物）
- ・シエノピラフェン試験法（農産物）
- ・ジクラズリル及びナイカルバジン試験法（畜水産物）
- ・シクロキシジム試験法（農産物）
- ・ジクロシメット試験法（農産物）
- ・シクロスルファミロン試験法（農産物）
- ・ジクロフルアニド及びトリルフルアニド試験法（農産物）
- ・ジクロベニル試験法（農産物）
- ・ジクロメジン試験法（農産物）
- ・ジクロルボス及びトリクロルホン試験法（農産物）
- ・ジクワット、パラコート及びメピコートクロリド試験法（農産物）
- ・ジチアノン試験法（農産物）
- ・ジチオピル及びチアゾピル試験法（農産物）
- ・ジノカップ試験法（農産物）
- ・ジノテフラン試験法（農産物）

- ・ジノテフラン試験法（畜産物）
- ・シハロホップブチル及びジメテナミド試験法（農産物）
- ・ジヒドロストレプトマイシン及びストレプトマイシン試験法（農産物）
- ・ジヒドロストレプトマイシン、ストレプトマイシン、スペクチノマイシン及びネオマイシン試験法（畜水産物）
- ・ジフェンゾコート試験法（農産物）
- ・ジフルフェニカン試験法（農産物）
- ・シフルメトフェン試験法（農産物）
- ・シプロジニル試験法（農産物）
- ・ジメチピン試験法（農産物）
- ・ジメトモルフ試験法（農産物）
- ・ジメトモルフ試験法（畜水産物）
- ・シモキサニル試験法（農産物）
- ・臭素試験法（農産物）
- ・シラフルオフエン試験法（農産物）
- ・シロマジン試験法（農産物）
- ・シロマジン試験法（畜産物）
- ・シンメチリン試験法（農産物）
- ・スピノサド試験法（農産物）
- ・**スピノサド試験法（畜水産物）**
- ・スピラマイシン試験法（畜水産物）
- ・スピロメシフェン試験法（農産物）
- ・スピロメシフェン試験法（畜水産物）
- ・スルファキノキサリン、スルファジアジン、スルファジミジン、スルファジメトキシム、スルファメトキサゾール、スルファメトキシピリダジン、スルファメラジン、スルファモノメトキシム及びスルフィソゾール試験法（畜水産物）
- ・スルファジミジン試験法（畜水産物）
- ・セトキシジム試験法（農産物）
- ・セファゾリン、セファピリン、セファレキシム、セファロニウム、セフォペラゾン及びセフロキシム試験法（畜水産物）
- ・セフキノム試験法（畜水産物）
- ・セフチオフル試験法（畜水産物）
- ・ゼラノール試験法（畜水産物）
- ・ダイムロン試験法（農産物）
- ・ダゾメット、メタム及びメチルイソチオシアネート試験法（農産物）
- ・ターバシル試験法（農産物）
- ・チアジニル試験法（農産物）
- ・チアベンダゾール及び5-プロピルスルホニル-1H-ベンズイミダゾール-2-アミン試験法（畜水産物）
- ・チオジカルブ及びメソミル試験法（農産物）

- ・チルミコシン試験法（畜水産物）
- ・ツラスロマイシン試験法（畜水産物）
- ・テクロフトラム試験法（農産物）
- ・デスメディファム試験法（農産物）
- ・テプラロキシジム試験法（農産物）
- ・テレフタル酸銅試験法（農産物）
- ・トリクラベンダゾール試験法（畜水産物）
- ・トリクラミド試験法（農産物）
- ・トリクロロ酢酸ナトリウム塩試験法（農産物）
- ・トリシクラゾール試験法（農産物）
- ・トリネキサパックエチル試験法（農産物）
- ・トリフルミゾール試験法（農産物）
- ・トリブロムサラン及びビチオノール試験法（畜水産物）
- ・トルトラズリル試験法（畜水産物）
- ・トルフェンピラド試験法（農産物）
- ・鉛試験法（農産物）
- ・ニコチン試験法（農産物）
- ・ニテンピラム試験法（農産物）
- ・ノバルロン試験法（農産物）
- ・バミドチオン試験法（農産物）
- ・バリダマイシン試験法（農産物）
- ・ビオレスメトリン試験法（農産物）
- ・ピクロラム試験法（農産物）
- ・ビスピリバックナトリウム塩試験法（農産物）
- ・ヒ素試験法（農産物）
- ・ビフェナゼート試験法（農産物）
- ・ビフェナゼート試験法（畜産物）
- ・ヒメキサゾール試験法（農産物）
- ・ピメトロジン試験法（農産物）
- ・ピラクロストロビン試験法（農産物）
- ・ピラクロストロビン試験法（畜産物）
- ・ピラクロニル試験法（農産物）
- ・ピラゾキシフェン試験法（農産物）
- ・ピラフルフェンエチル試験法（農産物）
- ・ピリダベン試験法（農産物）
- ・ピリダリル試験法（農産物）
- ・ピリチオバックナトリウム塩試験法（農産物）
- ・ピリデート試験法（農産物）
- ・ピリフェノックス試験法（農産物）
- ・ピリミジフェン試験法（農産物）



- ・ピリミスルファン試験法（農産物）
- ・ピリメタニル試験法（農産物）
- ・ピルリマイシン試験法（畜水産物）
- ・ファモキサドン試験法（農産物）
- ・フィプロニル試験法（農産物）
- ・フェノキサプロップエチル試験法（農産物）
- ・フェリムゾン試験法（水産物）
- ・フェンアミドン試験法（農産物）
- ・フェンアミドン試験法（畜産物）
- ・フェントラザミド試験法（農産物）
- ・フェンピロキシメート試験法（農産物）
- ・フェンヘキサミド試験法（農産物）
- ・フェンヘキサミド試験法（畜水産物）
- ・フェンチン試験法（農産物）
- ・ブチレート試験法（農産物）
- ・プラジクアンテル試験法（畜水産物）
- ・フラメトピル試験法（農産物）
- ・フルアジナム試験法（農産物）
- ・フルアジホップ試験法（農産物）
- ・フルオピコリド試験法（農産物）
- ・フルオルイミド試験法（農産物）
- ・フルカルバゾンナトリウム塩試験法（農産物）
- ・フルシラゾール試験法（農産物）
- ・フルスルファミド試験法（農産物）
- ・フルセトスルフロニ試験法（農産物）
- ・フルベンジアミド試験法（農産物）
- ・フルベンダゾール試験法（畜水産物）
- ・フルミオキサジン試験法（農産物）
- ・プロクロラズ試験法（農産物）
- ・プロシミドン試験法（農産物）
- ・プロディファコウム及びワルファリン試験法（畜水産物）
- ・フロニカミド試験法（農産物）
- ・フロニカミド試験法（畜産物）
- ・プロパモカルブ試験法（農産物）
- ・プロヒドロジャスモン試験法（農産物）
- ・プロヘキサジオンカルシウム塩試験法（農産物）
- ・ヘキシチアゾクス試験法（農産物）
- ・ペンシクロン試験法（農産物）
- ・ベンジルペニシリン試験法（畜水産物）
- ・ベンゾビシクロン試験法（農産物）

- ・ベンタゾン試験法（農産物）
- ・ベンチアバリカルブイソプロピル試験法（農産物）
- ・ペンチオピラド試験法（農産物）
- ・ペントキサゾン試験法（農産物）
- ・ベンフレセート試験法（農産物）
- ・ボスカリド試験法（農産物）
- ・ボスカリド試験法（畜産物）
- ・ホセチル試験法（農産物）
- ・マレイン酸ヒドラジド試験法（農産物）
- ・マンジプロパミド試験法（農産物）
- ・ミクロブタニル試験法（農産物）
- ・ミルベメクチン及びレピメクチン試験法（農産物）
- ・ミロサマイシン試験法（畜水産物）
- ・メタアルデヒド試験法（農産物）
- ・メタバズチアズロン試験法（農産物）
- ・メタミトロン試験法（農産物）
- ・メチオカルブ試験法（農産物）
- ・メトコナゾール試験法（農産物）
- ・メトプレン試験法（農産物）
- ・メトリブジン試験法（農産物）
- ・メパニピリム試験法（農産物）
- ・モリネート試験法（農産物）
- ・ヨウ化メチル試験法（農産物）
- ・ラクトパミン試験法（畜水産物）
- ・ラフォキサニド試験法（畜水産物）
- ・リン化水素試験法（農産物）
- ・レバミゾール試験法（畜水産物）

(参考) 食品、添加物等の規格基準 (昭和34年厚生省告示第370号) に規定する試験法

- ・ 2, 4, 5-T 試験法
- ・ アゾシクロチン及びシヘキサチン試験法
- ・ アルドリン、エンドリン及びディルドリン試験法
- ・ カプタホール試験法
- ・ カルバドックス試験法
- ・ クマホス試験法
- ・ クレンブテロール試験法
- ・ クロラムフェニコール試験法
- ・ クロルプロマジン試験法
- ・ ジエチルスチルベストロール試験法
- ・ ジメトリダゾール、メトロニダゾール及びロニダゾール試験法
- ・ ダミノジッド試験法
- ・ デキサメタゾン試験法
- ・ トリアゾホス及びパラチオン試験法
- ・  $\alpha$ -トレンボロン及び $\beta$ -トレンボロン試験法
- ・ 二臭化エチレン試験法
- ・ ニトロフラゾン試験法
- ・ ニトロフラントイン、フラゾリドン及びフラルタドン試験法
- ・ プロファム試験法
- ・ マラカイトグリーン試験法

## スピノサド試験法（畜水産物）

## 1. 分析対象化合物

スピノシンA

スピノシンD

## 2. 装置

液体クロマトグラフ・質量分析計（LC-MS）

## 3. 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。

スピノシンA標準品 本品はスピノシンA90%以上を含む。

スピノシンD標準品 本品はスピノシンD90%以上を含む。

## 4. 試験溶液の調製

## 1) 抽出

## ①筋肉、脂肪、肝臓、腎臓及び魚介類の場合

筋肉、肝臓、腎臓及び魚介類の場合は、試料20.0 gを量り採る。脂肪の場合は、試料5.00 gを量り採る。

これに1 mol/Lリン酸水素二カリウム溶液20 mLを加えてホモジナイズし、アセトン及び*n*-ヘキサン（1：2）混液100 mLを加えて、さらに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する。得られた有機層を合わせ、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する。ろ液を40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物を*n*-ヘキサンに溶かし、正確に20 mLとする。

## ②乳、卵及びはちみつの場合

試料10.0 gを量り採る。

これに1 mol/Lリン酸水素二カリウム溶液10 mLを加えてホモジナイズし、アセトン及び*n*-ヘキサン（1：2）混液100 mLを加えて、さらに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する。得られた有機層を合わせ、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する。ろ液を40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。乳及び卵の場合は、この残留物に*n*-ヘキサン10 mLを加えて溶かす。はちみつの場合は、この残留物をアセトン及び*n*-ヘキサン（1：1）混液に溶かし、正確に10 mLとする。

## 2) 精製

### ①筋肉、脂肪、肝臓、腎臓、魚介類、乳及び卵の場合

#### a 多孔性ケイソウ土カラムクロマトグラフィー

多孔性ケイソウ土カラム（20 mL保持用）に1）で得られた溶液10 mL（乳及び卵の場合は、全量）を注入する。このカラムを10分間放置した後、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル80 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ン及び*n*-ヘキサン（1：1）混液に溶かし、正確に10 mLとする。

#### b トリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲル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）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（500 mg）を接続し、アセトン及び*n*-ヘキサン（1：1）混液10 mLを注入し、流出液は捨てる。このカラムにa）で得られた溶液2 mLを注入し、さらにアセトン及び*n*-ヘキサン（1：1）混液10 mLを注入して、全溶出液を採り、40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物をメタノールに溶かし、正確に4 mL（脂肪の場合は1 mL）としたものを試験溶液とする。

### ②はちみつの場合

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）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（500 mg）を接続し、アセトン及び*n*-ヘキサン（1：1）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2 mLを注入し、さらにアセトン及び*n*-ヘキサン（1：1）混液10 mLを注入して、全溶出液を採り、40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物をメタノールに溶かし、正確に4 mLとしたものを試験溶液とする。

## 5. 検量線の作成

スピノシンA標準品及びスピノシンD標準品のメタノール溶液を数点調製し、それぞれLC-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。

## 6. 定量

試験溶液をLC-MSに注入し、5の検量線でスピノシンA及びスピノシンDの含量を求め、その和をスピノサドの含量とする。

## 7. 確認試験

LC-MS又はLC-MS/MSにより確認する。

## 8. 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100 mm、粒子径3  $\mu\text{m}$

カラム温度：40°C

移動相：アセトニトリル及び10 mmol/L酢酸アンモニウム溶液（3：1）混液

イオン化モード：ESI（+）

主なイオン（ $m/z$ ）：スピノシンA 733、732、142

スピノシンD 747、746、142

注入量：5  $\mu\text{L}$

保持時間の目安：スピノシンA 8分、スピノシンD 10分

## 9. 定量限界

スピノシンA 0.01 mg/kg

スピノシンD 0.01 mg/kg

## 10. 留意事項

### 1) 試験法の概要

スピノシンA及びスピノシンDを試料から弱塩基性条件下でアセトン及び $n$ -ヘキサン（1：2）混液で抽出する。多孔性ケイソウ土カラムにより脱脂し（はちみつの場合は省略する）、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連結したカラムで精製した後、LC-MSで定量及び確認する方法である。

### 2) 注意点

- ①スピノサドは、スピノシンA及びスピノシンDのそれぞれについて定量を行い、その含量の和を分析値とする。
- ②試料によってはスピノシンA及びスピノシンDが有機層に分配されないことがあるので、中性～弱塩基性条件下で抽出する。
- ③乳では2回目の抽出時にヘキサン層が固まることもある。その場合は、ホモジナイズしないでスパーテルでよくかき混ぜた後、遠心分離するとよい。なお、スピノシンA及びスピノシンDは1回目の抽出でほとんどが抽出される。
- ④脱水操作では、無水硫酸ナトリウムをアセトン及び $n$ -ヘキサン（1：2）混液20 mLで2回洗い込む。
- ⑤多孔性ケイソウ土カラムからの溶出の際に、流速が速いとスピノシンA及びスピノシンDの一部が溶出しないことがあるので、流速を4 mL/分以下に調整する。

⑥トリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲル/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) を用いてもよい。

⑦スピノシンA及びスピノシンDのLC-MS測定で、試験法開発時に使用したイオンを以下に示す。

スピノシンA

定量イオン ( $m/z$ ) : 732

定性イオン ( $m/z$ ) : 142

スピノシンD

定量イオン ( $m/z$ ) : 746

定性イオン ( $m/z$ ) : 142

また、LC-MS/MS測定の例を以下に示す。

スピノシンA

定量イオン ( $m/z$ ) : プリカーサーイオン732、プロダクトイオン142

定性イオン ( $m/z$ ) : プリカーサーイオン732、プロダクトイオン98

スピノシンD

定量イオン ( $m/z$ ) : プリカーサーイオン746、プロダクトイオン142

定性イオン ( $m/z$ ) : プリカーサーイオン746、プロダクトイオン98

## 1 1. 参考文献

なし

## 1 2. 類型

C

## ブロディファコウム及びワルファリン試験法（畜水産物）

## 1. 分析対象化合物

ブロディファコウム

ワルファリン

## 2. 装置

液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計（LC-MS/MS）

## 3. 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。

ブロディファコウム標準品 本品はブロディファコウム96%以上を含む。

ワルファリン標準品 本品はワルファリン98%以上を含む。

## 4. 試験溶液の調製

## 1) 抽出

筋肉、肝臓、腎臓、魚介類、乳及び卵の場合は、試料10.0 gを量り採る。脂肪の場合は、試料5.00 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20 mLを加えて溶解する。

これに酢酸1 mL及びアセトン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て40℃以下で約10 mL（はちみつの場合は約30 mL）に濃縮する。これに10%塩化ナトリウム溶液100 mLを加え、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（1：1）混液100 mL及び50 mLで2回振とう抽出する。抽出液に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、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（1：1）混液で正確に200 mLとする。

抽出液20 mL（脂肪の場合は40 mL）を採り、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30 mLを加え、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル30 mLずつで3回振とう抽出する。抽出液を合わせて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（1：1）混液2 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）にアセトン及び*n*-ヘキサン（1：1）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、さらにアセトン及び*n*-ヘキサン（1：1）混液8 mLを注入し、流出液は捨てる。次いでアセトン、ギ酸及び*n*-ヘキサン（25：1：25）混液20 mLを注入し、溶出液を40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物をメタノールに



溶解し、正確に1 mLとしたものを試験溶液とする。

## 5. 検量線の作成

プロディオファコウム標準品及びワルファリン標準品をそれぞれアセトニトリルに溶解して1 mg/Lとし標準原液とする。各標準原液を適宜混合してメタノール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、プロディオファコウムでは試料中0.0005 mg/kgに相当する試験溶液中濃度は0.0005 mg/Lであり、ワルファリンでは試料中0.001 mg/kgに相当する試験溶液中濃度は0.001 mg/Lである。

## 6. 定量

試験溶液5 µLをLC-MS/MSに注入し、5の検量線でプロディオファコウム及びワルファリンの含量を求める。

## 7. 確認試験

LC-MS/MSにより確認する。

## 8. 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：10 mmol/L酢酸アンモニウム溶液及び10 mmol/L酢酸アンモニウム・メタノール溶液混液（4：1）から（1：19）までの濃度勾配を15分間で行い、（1：19）で10分間保持する。

イオン化モード：ESI（－）

主なイオン（*m/z*）：

プロディオファコウム プリカーサーイオン523、プロダクトイオン135、81

ワルファリン プリカーサーイオン307、プロダクトイオン250、161

保持時間の目安：プロディオファコウム20分、ワルファリン14分

## 9. 定量限界

プロディオファコウム 0.0005 mg/kg

ワルファリン 0.001 mg/kg

## 10. 留意事項

### 1) 試験法の概要

プロディオファコウム及びワルファリンを試料から酢酸酸性アセトンで抽出し、酢酸

エチル及び*n*-ヘキサンの混液に転溶する。アセトニトリル/ヘキサン分配で脱脂し、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プロディファコウムの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523、プロダクトイオン135

定性イオン (*m/z*) : プリカーサーイオン523、プロダクトイオン81

②ワルファリンの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307、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307、プロダクトイオン250

③LC-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、プロディファコウム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良い。

④脂肪の少ない食品では、アセトニトリル/ヘキサン分配による脱脂操作を省略しても良い。

⑤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。

⑥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からの溶出条件では、脂肪酸などの夾雑成分も溶出されるので、装置の感度によっては試験溶液をメタノールで希釈するとよい。

## 1 1. 参考文献

なし

## 1 2. 類型

C