生食発０４１９第２号
平成30年４月１９日

各　検疫所長　　殿

大臣官房生活衛生・食品安全審議官
（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について」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）を下記のとおり改正することとした。

関係者へ周知するとともに、その運用に遺漏なきよう取り計られたい。

記

１．目次を別紙１のように改めること。以下に掲げる試験法について別紙２から別紙５までのとおり「第２章　一斉試験法」及び「第３章 個別試験法」に追加すること。

・LC/MS による農薬等の一斉試験法Ⅲ（畜水産物）
・イミダクロプリド試験法（畜水産物）
・フルチアニル試験法（農産物）
・ヘキサジノン試験法（畜産物）

２．「第３章　個別試験法」の「スピロメシフェン試験法（畜水産物）」を別紙６に差し替えること。

３．イミダクロプリドの残留の規制対象は、農産物にあってはイミダクロプリ

ドとし、畜産物にあってはイミダクロプリド及び 6-クロロピリジル基を有する代謝物をイミダクロプリドに換算したものの和としている。イミダクロプリドについては、飼料として給与された作物を通じて畜産物への残留が想定されるが、イミダクロプリド以外の農薬等からも 6-クロロピリジル基を有する代謝物が生成する可能性がある。そのため、畜産物におけるイミダクロプリドの残留基準への適否については、飼料に供される可能性のある農作物への農薬等の使用履歴や残留濃度等を考慮して判断すること。

（下線は改正部分）

別紙１

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Ⅰ（畜水産物）
・LC/MSによる農薬等の一斉試験法Ⅱ（畜水産物）
・LC/MSによる農薬等の一斉試験法Ⅲ（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、γ－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）
・２，４－Ｄ、２，４－ＤＢ及びクロプロップ試験法（畜水産物）
・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）
・Ｓｅｃ－ブチルアミン試験法（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）
・アザペロン試験法（畜水産物）
・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）
・アセキノシル試験法（畜水産物）
・アセタミプリド試験法（農産物）
・アセタミプリド試験法（畜水産物）
・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）
・アゾシクロチン及びシヘキサチン試験法（農産物）
・アゾシクロチン及びシヘキサチン試験法（畜水産物）
・アニラジン試験法（農産物）
・アビラマイシン試験法（畜産物）
・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）
・アルベンダゾール及びチア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、ピラゾスルフロンエチル、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ロン試験法（農産物）
・イソチアニル及びプロスルホカルブ試験法（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）
・イマザピック、イマザピル、イマザモックスアンモニウム塩及びイマゼタピルアンモニウム塩試験法（農産物）
・イマザリル試験法　（農産物）
・イマゾ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）
・イミダクロプリド試験法（畜水産物）
・イミドカルブ試験法（畜水産物）
・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、クロルプロファム、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）
・塩酸ホルメタネート試験法（農産物）
・エンロフロキサシン、オキソリニック酸、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）
・エンロフロキサシン、オキソリニック酸、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、フルメキン及びマルボフロキサシン試験法（はちみつ）
・オキサジアルギル試験法（農産物）
・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）
・オキスポコナゾールフマル酸塩試験法（農産物）
・オキソリニック酸試験法（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）
・カスガマイシン試験法（農産物）
・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、フルジオキソニル、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）
・カフェンストロール試験法（畜水産物）
・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、チオファネート、チオファネートメチル及びベノミル試験法（農産物及び畜水産物）
・カルボキシン試験法（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）
・キャプタン及びクロロタロニル試験法（畜水産物）
・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）
・グリホサート試験法（畜水産物）
・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）
・クロルスルフロン及びメトスルフロンメチル試験法　（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）
・酢酸イソ吉草酸タイロシン試験法（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）
・シクロスルファムロン試験法　（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（魚介類）
・ジクロベニル及びフルオピコリド試験法（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）
・ジチオカルバメート試験法（農産物及び畜水産物）
・ジチオピル及びチアゾピル試験法（農産物）
・ジニコナゾール試験法（農産物）
・ジニコナゾール試験法（畜水産物）
・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）
・ジフェニルアミン試験法（農産物）
・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）
・シラフルオフェン試験法（農産物）
・ジルパテロール試験法（畜産物）
・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）
・スピネトラム試験法（農産物）
・スピネトラム試験法（畜水産物）
・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）
・スピロテトラマト試験法（農産物）
・スピロテトラマト試験法（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ン、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ン及びスルフイソゾール試験法（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、セファレキシン、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）
・テクロフタラム試験法　（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）
・テフリルトリオン及びメソトリオン試験法（農産物）
・テレフタル酸銅試験法　（農産物）
・ドジン試験法（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）
・トリフロキシストロビン試験法（畜水産物）
・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）
・１－ナフタレン酢酸試験法（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）
・ノシヘプタイド試験法（畜水産物）
・ノバルロン試験法　（農産物）
・ノルフルラゾン試験法（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）
・ハロスルフロンメチル試験法（畜水産物）
・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）
・ピリフルキナゾン試験法（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）
・ピンドン試験法（農産物）
・ピンドン試験法（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）
・フェンチオン試験法（農産物）
・フェンチオン試験法（畜水産物）
・フェントラザミド試験法　（農産物）
・フェントラザミド試験法（畜水産物）
・フェンピラザミン試験法（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）
・フルアジホップブチル試験法　（農産物）
・フルオピコリド試験法（農産物）
・フルオピコリド試験法（畜水産物）
・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）
・フルシラゾール試験法（畜水産物）
・フルスルファミド試験法　（農産物）
・フルセトスルフロン試験法（農産物）
・フルチアニル試験法（農産物）
・フルトラニル試験法（畜水産物）
・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）
・フルメツラム試験法（畜水産物）
・プロクロラズ試験法　（農産物）

・プロシミドン試験法　（農産物）
・ブ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）
・プロパモカルブ試験法（畜水産物）
・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）
・ヘキサジノン試験法（畜産物）
・ヘキシチアゾクス試験法　（農産物）
・ベダプロフェン試験法（畜水産物）
・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）
・メタフルミゾン試験法（農産物）
・メタベン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）
・１－メチルシクロプロペン試験法（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）
・メベンダゾール試験法（畜水産物）
・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
・アルドリン、エンドリン及びディルドリン試験法
・α－トレンボロン及びβ－トレンボロン試験法
・イプロニダゾール、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
・オラキンドックス及びカルバドックス試験法
・カプタホール試験法
・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
・クロルスロン試験法
・クロルプロマジン試験法
・酢酸メレンゲステロール試験法
・ジエチルスチルベストロール試験法
・ダミノジッド試験法
・デキサメタゾン試験法
・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
・パラチオン試験法
・ブロチゾラム試験法
・プロファム試験法
・マラカイトグリーン試験法

別紙２

LC/MSによる農薬等の一斉試験法Ⅲ（畜水産物）

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。

20 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液（pH 4.5）　酢酸アンモニウム 1.54 g を量り採り水約 950 mL に溶解し、酢酸を用いて pH を 4.5 に調整した後、水を加えて 1 L とする。

各農薬等標準品　各農薬等の純度が明らかなもの。（各農薬等の個別試験法で、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

①　はちみつ以外の場合

試料を正確に量り、重量比で等量のエタノール及び水（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 100 mL 及び酢酸 1 mL を加え、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、上澄液を採る。残留物にエタノール及び水（1：1）混液 10 mL を加えて撹拌した後、アセトン 50 mL 及び酢酸 1 mL を加えてホモジナイズする。上記と同様に遠心分離した後、上澄液を採り、先の上澄液と合わせ、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、40℃以下で約 1 mL まで濃縮する。これに *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、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及び 20 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液（pH 4.5）（9：1）混液 2 mL を加えて溶かす。

②　はちみつの場合

試料を正確に量り、重量比で等量のエタノール及び水（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 100 mL 及び酢酸 1 mL を加え、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、上澄液を採る。残留物にエタノール及び水（1：1）混液 10 mL を加えて撹拌した後、アセトン 50 mL 及び酢酸 1 mL を加えてホモジナイズする。上記と同様に遠心分離した後、上澄液を採り、先の上澄液と合わせ、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、40℃以下で溶媒を除去する。この残留物にアセトニトリル及び 20 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液（pH 4.5）（9：1）混液 2 mL を加えて溶かす。

２）精製

①　オクタデシルシリル化シリカゲルカラムクロマトグラフィー

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム（1,000 mg）にアセトニトリル 5 mL、アセトニトリル及び 20 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液（pH 4.5）（9：1）混液 5 mL を順次注入し、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、さらにアセトニトリル及び 20 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液（pH 4.5）（9：1）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℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物に酢酸エチル、トルエン及びメタノール（2：1：2）混液 2 mL を加えて溶かす。

②　グラファイトカーボンカラム及びシリカゲルカラムクロマトグラフィー

グラファイトカーボンミニカラム（250 mg）に酢酸エチル、トルエン及びメタノール（2：1：2）混液 15 mL を注入し、流出液は捨てる。シリカゲルミニカラム（500 mg）に酢酸エチル、トリエチルアミン、トルエン及びメタノール（40：1：20：40）混液 10 mL、酢酸エチル、トルエン及びメタノール（2：1：2）混液 5 mL を順次注入し、流出液は捨てる。グラファイトカーボンミニカラムの下部にシリカゲルミニカラムを接続し、①で得られた溶液を注入した後、さらに酢酸エチル、トルエン及びメタノール（2：1：2）混液 15 mL を注入し、次いで、グラファイトカーボンミニカラムを取り外し、シリカゲルミニカラムに酢酸エチル、トルエン及びメタノール（2：1：2）混液 5 mL を注入し、負荷液を含む全溶出液を採る。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 20 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液（pH 4.5）（1：1）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

各農薬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農薬等を含むアセトニトリル及び 20 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液（pH 4.5）（1：1）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．の検量線で各農薬等の含量を求める。

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：20 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液（pH 4.5）

B 液：アセトニトリル

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 μL

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

各農薬等を試料から酢酸酸性下アセトンで抽出し、アセトニトリル/ヘキサン分配（はちみつの場合は省略）、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム、グラファイトカーボンミニカラム及び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 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 各農薬等標準品は、可能な限り高純度のものを使用すること。

⑤ 定容後のアセトン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農薬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。

12. 参考文献

なし

13. 類型

C

（別表）LC/MSによる農薬等の一斉試験法Ⅲ（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]
イソシンコメロン酸二プロピル	イソシンコメロン酸二プロピル	1.00	+252→210	+252→192	+252→164			0.004
イソプロチオラン	イソプロチオラン	1.05	+291→231	+291→189	+291→145			0.01
エトパベート	エトパベート	0.74	+238→206	+238→136	−236→192	−236→132		0.01
オルメトプリム	オルメトプリム	0.56	+275→259	+275→231	+275→123	+275→81		0.01
オレアンドマイシン	オレアンドマイシン	0.72	+689→544	+689→158	+688→544	+688→158		0.01
カルベタミド	カルベタミド	0.75	+237→192	+237→118				0.01
キシラジン	キシラジン	0.62	+221→164	+221→90				0.01
クロキサシリン	クロキサシリン	0.74	+436→220	+436→178	+436→150			0.01
ケトプロフェン	ケトプロフェン	0.83	+255→209	+255→105	+255→77			0.01
酢酸メレンゲステロール	酢酸メレンゲステロール	1.10	+397→337	+397→279				0.01
ジクロキサシリン	ジクロキサシリン	0.79	+470→254	+470→212	+470→184			0.01
スルファジアジン	スルファジアジン	0.51	+251→156	+251→92				0.01*
スルファニトラン	スルファニトラン	0.83	−334→136	−334→133				0.01
チアベンダゾール	チアベンダゾール	0.70	+202→175	+202→131				0.01*
チアムリン	チアムリン	0.83	+494→192	+494→119				0.01
チアンフェニコール	チアンフェニコール	0.56	−354→290	−354→185	−354→79			0.01
チルミコシン	チルミコシン	0.70	+870→174	+870→88				0.01
テメホス	テメホス	1.13	+467→419	+467→405	+467→125			0.01
トリクラベンダゾール	トリクラベンダゾール	1.10	+361→346	+361→274	+359→344	+359→274		0.01
トリペレナミン	トリペレナミン	0.72	+256→211	+256→119	+256→91			0.01
トリメトプリム	トリメトプリム	0.54	+291→275	+291→230	+291→123			0.01
トルフェナム酸	トルフェナム酸	0.99	+262→209	−260→216				0.01
ニトロキシニル	ニトロキシニル	0.66	−289→162	−289→127				0.01
ピリメタミン	ピリメタミン	0.69	+249→233	+249→198	+249→177			0.01
ファムフール	ファムフール	0.97	+326→281	+326→217	+326→93			0.01*
プラジクアンテル	プラジクアンテル	0.91	+313→203	+313→83				0.01
フルニキシン	フルニキシン	0.82	+297→279	+297→264	+297→109	−295→251	−295→231	0.01
フルベンダゾール	フルベンダゾール	0.84	+314→282	+314→123	+314→95			0.01
プロポキスル	プロポキスル	0.83	+210→168	+210→111				0.01
フロルフェニコール	フロルフェニコール	0.68	−356→336	−356→185				0.01
メンブトン	メンブトン	0.83	+259→241	+259→185	+259→159	+259→127		0.01
ラクトパミン	ラクトパミン	0.58	+302→164	+302→121	+302→107			0.01
レバミゾール	レバミゾール	0.51	+205→178	+205→91				0.01
ワルファリン	ワルファリン	0.91	+309→251	+309→163	+309→121			0.001

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（25～26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。

別紙３

イミダクロプリド試験法（畜水産物）

１．分析対象化合物

イミダクロプリド

6-クロロピリジル基を有する代謝物（酸化反応により6−クロロニコチン酸に変換される化合物を含む。）

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。

イミダクロプリド標準品　本品はイミダクロプリド 98%以上を含む。

6-クロロニコチン酸標準品　本品は6-クロロニコチン酸 98%以上を含む。

５．試験溶液の調製

１）抽出

試料10.0 g（脂肪の場合は5.00 g）に*n*-ヘキサン50 mL並びに水及びメタノール（1：3）混液100 mLを加え、ホモジナイズした後、毎分3,000回転で5分間遠心分離を行う。メタノール層を採り、*n*-ヘキサン層及び残留物に水及びメタノール（1：3）混液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、得られた水及びメタノール（1：3）混液層を合わせて、水及びメタノール（1：3）混液で正確に200 mLとする。この溶液から正確に5 mL（はちみつは2 mL、脂肪は10 mL）を分取し、40℃以下で約1 mLまで濃縮する。

２）酸化

１）で得られた溶液に32 w/v%水酸化ナトリウム溶液5 mL及び5 w/v%過マンガン酸カリウム溶液50 mLを加え、空冷管を付けて120℃の油浴中で15分間加熱し、イミダクロプリド及び6-クロロピリジル基を有する代謝物を6-クロロニコチン酸に酸化する。加熱還流操作後、冷水で冷やしながら水50 mL、10 v/v%硫酸50 mL及び亜硫酸水素ナトリウム5 gを加え酸化反応を終了させた後、酢酸エチル100 mL及び50 mLで2回振とう抽出する。抽出液を合わせ、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、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（9：1）混液に溶かし、正確に2.5 mL（はちみつの場合は1 mL）としたものを試験溶液とする。

６．検量線の作成

6-クロロニコチン酸標準品をアセトンに溶かして標準原液とする。標準原液を0.1 vol%酢酸及びメタノール（9：1）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（イミダクロプリド換算）に相当する試験溶液中濃度は0.001 mg/L（イミダクロプリド換算）である。

７．定量

試験溶液をLC-MS/MSに注入し、６．の検量線で6-クロロニコチン酸の含量を求め、次式によりイミダクロプリド（6-クロロピリジル基を有する代謝物を含む。）の含量を求める。

イミダクロプリド（6-クロロピリジル基を有する代謝物を含む。）の含量（ppm）
=A×1.623

A：6-クロロニコチン酸の含量（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250 mm、粒子径3 μm

カラム温度：40℃

移動相： アセトニトリル及び0.1 vol％酢酸混液（1：9）から（9：1）までの濃度勾配を10分間で行い（9：1）で5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 158、プロダクトイオン 122、78

注入量：10 μL

保持時間の目安：9分

10．定量限界

0.01 mg/kg（イミダクロプリド換算）

11．留意事項

１）試験法の概要

イミダクロプリド及び6-クロロピリジル基を有する代謝物を試料から*n*-ヘキサン存在下水及びメタノール （1：3）混液を用いて抽出する。塩基性条件下で過マンガン酸カリウム溶液を用いて加熱還流を行い、イミダクロプリド及び6-クロロピリジル基を有する代謝物を6-クロロニコチン酸に酸化し、酢酸エチルで抽出した後、LC-MS/MSで定量及び確認する方法である。なお、6-クロロニコチン酸について定量を行い、6-クロロニコチン酸の含量に換算係数を乗じてイミダクロプリド（6-クロロピリジル基を有する代謝物を含む。）含量に変換したものを分析値とする。

２）注意点

① 酸化反応については、イミダクロプリド標準品を用いて、酸化反応が十分に行われていることを確認すること。なお、加熱還流時間が長いと6-クロロニコ

チン酸が減少するため、反応時間に留意する。

② 6-クロロニコチン酸の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 158、プロダクトイオン 122

定性イオン（*m/z*）：プリカーサーイオン 158、プロダクトイオン 78

③ 試験法開発に検討した食品：牛の筋肉・脂肪・肝臓・乳、鶏の筋肉・卵、はちみつ、うなぎ、さけ及びしじみ

12. 参考文献

なし

13. 類型

C

別紙４

フルチアニル試験法（農産物）

１．分析対象化合物
フルチアニル

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。
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　内径12～13 mmのポリエチ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。
0.5 mol/L リン酸緩衝液（pH 7.0）リン酸水素二カリウム（K_2HPO_4）52.7 g 及びリン酸二水素カリウム（KH_2PO_4）30.2 g を量り採り、水約 500 mL に溶解し、1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液又は 1 mol/L 塩酸を用いて pH を 7.0 に調整した後、水を加えて 1 L とする。
フルチアニル標準品　本品はフルチアニル98％以上を含む。

５．試験溶液の調製
１）抽出
①　穀類、豆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。これにアセトニトリル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ニトリル20 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20 mLを分取し、塩化ナトリウム10 g及び0.5 mol/Lリン酸緩衝液（pH 7.0）20 mLを加え、10分間振とうする。静置した後、分離した水層を捨てる。
オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム（1,000 mg）にアセトニトリル10 mLを注入し、流出液は捨てる。このカラムに上記のアセトニトリル層を注入し、さらに、アセトニトリル2 mLを注入して、全溶出液を採り、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、野菜及びハーブの場合
試料20.0 gにアセトニトリル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ニトリル20 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20 mLを分取し、塩化ナトリウム10 g及び0.5 mol/Lリン酸緩衝液（pH 7.0）20 mLを加え、10分間振とうする。静置した後、分離した水層を捨てる。アセトニトリル層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、ろ液を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及びトルエン（3：1）混液2 mLを加えて溶かす。

③　茶及びホップの場合

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ニトリル20 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、アセトニトリル15 mL、塩化ナトリウム10 g及び0.5 mol/Lリン酸緩衝液（pH 7.0）20 mLを加え、10分間振とうする。静置した後、分離した水層を捨てる。

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム（1,000 mg）にアセトニトリル10 mLを注入し、流出液は捨てる。このカラムに上記のアセトニトリル層を注入し、さらに、アセトニトリル2 mLを注入して、全溶出液を採り、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

①　穀類、豆類、種実類、果実、野菜及びハーブの場合

グラファイトカーボン/アミノ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、さらにアセトニトリル及びトルエン（3：1）混液20 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て、穀類、豆類及び種実類の場合は正確に4 mL、果実、野菜及びハーブの場合は正確に8 mLとしたものを試験溶液とする。

②　茶及びホップの場合

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、さらにアセトニトリル及びトルエン（3：1）混液20 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て、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

フルチアニル標準品のメタノー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に相当する試験溶液中濃度は、穀類、豆類、種実類、果実、野菜及びハーブでは0.005 mg/Lであり、茶及びホップでは0.0025 mg/Lである。

７．定量

試験溶液をLC-MS/MSに注入し、６．の検量線でフルチアニルの含量を求める。

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：A液及びB液について下表の濃度勾配で送液する。

A液：5 mmol/L酢酸アンモニウム溶液

B液：5 mmol/L酢酸アンモニウム・メタノール溶液

時間（分）	A液（%）	B液（%）
0	85	15
1	60	40
3.5	60	40
6	50	50
8	45	55
17.5	5	95
30	5	95
30	85	15

イオン化モード：ESI（＋）

主なイオン（*m/z*）：プリカーサーイオン427、プロダクトイオン411、201、192、132

注入量：5 μL

保持時間の目安：17分

10．定量限界

0.01 mg/kg

11．留意事項

１）試験法の概要

フルチアニルを試料からアセトニトリルで抽出し、塩析で水を除いた後、果実、野菜及びハーブについてはそのまま、穀類、豆類、種実類、茶及びホップについてはオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムで精製後、穀類、豆類、種実類、果実、野菜及びハーブについてはグラファイトカーボン/アミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラムで精製し、茶及びホップについては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た後、LC-MS/MSで定量及び確認する方法である。

２）注意点

①　本法は「LC/MSによる農薬等の一斉試験法I（農産物）」に準拠したものである。

② フルチアニルの 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。
定量イオン（*m/z*）：プリカーサーイオン 427、プロダクトイオン 411
定性イオン（*m/z*）：プリカーサーイオン 427、プロダクトイオン 192
③ 本法における測定条件下では、フルチアニルのピーク形状にリーディングが生じるが、定量性に問題はない。また、移動相にアセトニトリルを用いることによりピーク形状が改善することが報告されている。
④ 試験法開発時に検討した食品：玄米、大豆、かぼちゃ、ほうれんそう、なす、ばれいしょ、オレンジ、いちご、茶

12. 参考文献

厚生労働省通知食安発第1129002号「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（一部改正）」（平成17年11月29日）、「LC/MSによる農薬等の一斉試験法I（農産物）」

13. 類型

C

別紙５

ヘキサジノン試験法（畜産物）

１．分析対象化合物

ヘキサジノン

3-シクロヘキシル-6-(メチルアミノ)-1-メチル-1,3,5-トリアジン-2,4-(1*H*,3*H*)-ジオン（以下「代謝物B」という。）

3-(4-ヒドロキシシクロヘキシル)-6-(メチルアミノ)-1-メチル-1,3,5-トリアジン-2,4-(1*H*,3*H*)−ジオン（以下「代謝物C」という。）

3-シクロヘキシル-6-アミノ-1-メチル-1,3,5-トリアジン-2,4-(1*H*,3*H*)-ジオン(以下「代謝物F」という。)

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。

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）　内径12～13 mmのポリエチレン製のカラム管に、上層にトリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲルを、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充填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。

ヘキサジノン標準品　本品はヘキサジノン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。

代謝物C標準品　本品は代謝物C 98%以上を含む。

代謝物F標準品　本品は代謝物F 98%以上を含む。

５．試験溶液の調製

１）抽出

試料10.0 g（脂肪の場合は5.00 g）に*n*-ヘキサン50 mL及び*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル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、アセトニトリル層を採る。残留物と*n*-ヘキサン層に*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル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する。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。

２）精製

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）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）で得られた溶液を正確に4 mL注入した後、アセトニトリル20 mLを注入し、全溶出液を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かし、正確に4 mL（脂肪の場合は2 mL）としたものを

試験溶液とする。

６．検量線の作成

ヘキサジノン標準品、代謝物B標準品、代謝物C標準品及び代謝物F標準品をそれぞれメタノールに溶解して、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、試料中0.0025 mg/kg（ヘキサジノン換算）に相当する試験溶液中濃度は各化合物とも0.00025 mg/L（ヘキサジノン換算）である。

７．定量

１）乳を除く畜産物

試験溶液を LC-MS/MS に注入し、６．の検量線でヘキサジノン、代謝物 B 及び代謝物 F の各含量を求める。代謝物 B 及び代謝物 F を含むヘキサジノンの含量を求める場合には、次式により求める。

ヘキサジノン（代謝物B及び代謝物Fを含む。）の含量（ppm）
＝A＋B×1.059＋C×1.125

A：ヘキサジノンの含量（ppm）
B：代謝物Bの含量（ppm）
C：代謝物Fの含量（ppm）

２）乳

試験溶液を LC-MS/MS に注入し、６の検量線でヘキサジノン、代謝物 B、代謝物 C 及び代謝物 F の各含量を求める。代謝物 B、代謝物 C 及び代謝物 F を含むヘキサジノンの含量を求める場合には、次式により求める。

ヘキサジノン（代謝物B、代謝物C及び代謝物Fを含む。）の含量（ppm）
＝A＋B×1.059＋C×0.9922＋D×1.125

A：ヘキサジノンの含量（ppm）
B：代謝物Bの含量（ppm）
C：代謝物Cの含量（ppm）
D：代謝物F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：A液及びB液について下表の濃度勾配で送液する。
A液：5 mmol/L酢酸アンモニウム溶液

B液：5 mmol/L酢酸アンモニウム・メタノール溶液

時間（分）	A液（%）	B液（%）
0	85	15
1	60	40
3.5	60	40
6	50	50
8	45	55
17.5	5	95

イオン化モード：ESI（＋）

主なイオン（*m/z*）

ヘキサジノン：プリカーサーイオン253、プロダクトイオン171、71

代謝物B：プリカーサーイオン239、プロダクトイオン157、71

代謝物C：プリカーサーイオン255、プロダクトイオン157、71

代謝物F：プリカーサーイオン225、プロダクトイオン143、101

注入量：5 μL

保持時間の目安

ヘキサジノン：15分

代謝物B：14分

代謝物C：6分及び7分

代謝物F：13分

10. 定量限界

各化合物 0.0025 mg/kg（ヘキサジノン換算）

11. 留意事項

１）試験法の概要

ヘキサジノン、代謝物B、代謝物C及び代謝物Fを試料から*n*-ヘキサン存在下アセトニトリルで抽出し、トリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲル/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た後、LC-MS/MSで定量及び確認する方法である。なお、畜産物（乳を除く）においては、ヘキサジノン、代謝物B及び代謝物Fのそれぞれについて定量を行い、ヘキサジノン並びに代謝物B及び代謝物Fをヘキサジノンに換算したものの和を分析値とし、乳においては、ヘキサジノン、代謝物B、代謝物C及び代謝物Fのそれぞれについて定量を行い、ヘキサジノン並びに代謝物B、代謝物C及び代謝物Fをヘキサジノンに換算したものの和を分析値とする。

２）注意点

① 代謝物 C は異性体の混合物であり、各異性体の和について定量する。

② ヘキサジノン、代謝物 B、代謝物 C 及び代謝物 F 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。

ヘキサジノン

定量イオン（*m/z*）：プリカーサーイオン 253、プロダクトイオン 171

定性イオン（*m/z*）：プリカーサーイオン 253、プロダクトイオン 71

代謝物 B

定量イオン（*m/z*）：プリカーサーイオン 239、プロダクトイオン 157
定性イオン（*m/z*）：プリカーサーイオン 239、プロダクトイオン 71
代謝物 C
定量イオン（*m/z*）：プリカーサーイオン 255、プロダクトイオン 157
定性イオン（*m/z*）：プリカーサーイオン 255、プロダクトイオン 71
代謝物 F
定量イオン（*m/z*）：プリカーサーイオン 225、プロダクトイオン 143
定性イオン（*m/z*）：プリカーサーイオン 225、プロダクトイオン 101

③　抽出操作において、遠心分離後のアセトニトリル層に試料残留物の混入が認められた場合には、アセトニトリル層をろ紙でろ過すると良い。

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

別紙６

スピロメシフェン試験法（畜水産物）

１．分析対象化合物

スピロメシフェン

4-ヒドロキシ-3-メシチル-1-オキサスピロ[4.4]ノナ-3-エン-2-オン（以下、「代謝物M1」という。）

4-ヒドロキシ-3-（4-ヒドロキシメチル-2、6-ジメチル-フェニル）-1-オキサスピロ[4.4]ノナ-3-エン-2-オン（以下、「代謝物M2」という。抱合体を含む。）

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。

スピロメシフェン標準品　本品はスピロメシフェン 98%以上を含む。

代謝物M1標準品　本品は代謝物M1 98%以上を含む。

代謝物M2標準品　本品は代謝物M2 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3/10量のエタノール、ギ酸及び水（9：2：9）混液を加え磨砕均一化した後、試料10.0 g（脂肪の場合は5.00 g）に相当する量を量り採る。アセトニトリル、ギ酸及び水（80：1：20）混液100 mL並びに*n*-ヘキサン20 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、アセトニトリル及び水混液層を採る。*n*-ヘキサン層及び残留物にアセトニトリル、ギ酸及び水（80：1：20）混液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及び水混液層を合わせ、アセトニトリル、ギ酸及び水（80 : 1 : 20）混液で正確に200 mLとする。この溶液から正確に5 mL（脂肪は10 mL）を分取し、40℃以下で約1 mLに濃縮する。これに0.1 vol%ギ酸0.1 mL及び10 w/v%塩化ナトリウム溶液40 mLを加え、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（1：19）混液50 mLずつで2回振とう抽出する。抽出液を合わせ、スピロメシフェン及び代謝物M1画分（画分Ⅰ）とする。残りの水層を採り、代謝物M2及び代謝物M2抱合体画分（画分Ⅱ）とする。画分Ⅰ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、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0.01 vol%ギ酸（1：1）混液に溶かし、正確に10 mLとしたものをスピロメシフェン及び代謝物M1の試験溶液とする。

２）加水分解（畜産物のみ）

１）で得られた画分Ⅱに水を加えて正確に50 mLとする。この溶液から正確に10 mLを分取し、塩酸6 mLを加え、密栓して90℃の油浴中で3時間加熱し代謝物M2

抱合体を加水分解する。放冷後、10 w/v％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、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及び酢酸（99：1）混液10 mLを加えて溶かす。

３）精製

エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲル（500 mg）にアセトニトリル及び酢酸（99：:1）混液10 mLを注入し、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流出液を捨てる。次いでアセトニトリル及び酢酸（19：1）20 mLを注入し溶出液を40 ℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物をアセトニトリル及び0.1 vol％ギ酸（1：1）混液に溶かし、正確に2 mLとしたものを代謝物M2の試験溶液とする。

６．検量線の作成

スピロメシフェン標準品、代謝物M1標準品及び代謝物M2標準品をそれぞれアセトニトリルに溶かして標準原液とする。各標準原液を適宜混合してアセトニトリル及び0.1 vol％ギ酸（1：1）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（スピロメシフェン換算）に相当する試験溶液中濃度は各化合物とも0.00025 mg/L（スピロメシフェン換算）である。

７．定量

試験溶液をLC-MS/MSに注入し、６．の検量線でスピロメシフェン、代謝物M1及び代謝物M2の各含量を求める。代謝物M1及び代謝物M2を含むスピロメシフェンの含量を求める場合には、次式により求める。

スピロメシフェン（代謝物M1及び代謝物M2を含む。）の含量（ppm）

=A＋B×1.360＋C×1.285

A：スピロメシフェンの含量（ppm）

B：代謝物M1の含量（ppm）

C：代謝物M2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％ギ酸混液（1：4）から（9：1）までの濃度勾配を10分間で行い（9：1）で6分間保持する。

イオン化モード：ESI（＋）
主なイオン（*m/z*）
スピロメシフェン：プリカーサーイオン 273、プロダクトイオン 255、187
代謝物M1：プリカーサーイオン 273、プロダクトイオン 255、187
代謝物M2：プリカーサーイオン 289、プロダクトイオン 271、241
注入量：10 μL
保持時間の目安
スピロメシフェン：15分
代謝物M1：11分
代謝物M2：9分

10．定量限界

各化合物0.01 mg/kg（スピロメシフェン換算）

11．留意事項

１）試験法の概要

スピロメシフェン、代謝物M1及び代謝物M2（抱合体を含む。）をエタノール、ギ酸及び水（9：2：9）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、ギ酸及び水（80：1：20）混液で抽出する。酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（1:19）混液を用いた液液分配によりスピロメシフェン及び代謝物M1を有機層に、代謝物M2及びその抱合体を水層に分画する。有機層についてはそのまま、水層については代謝物M2の抱合体を塩酸で加水分解して代謝物M2とし、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（1：1）混液で抽出した後、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。

なお、スピロメシフェン、代謝物M1及び代謝物M2（抱合体を含む）のそれぞれについて定量を行い、代謝物M1及び代謝物M2（抱合体を含む）を含むスピロメシフェンの含量を求める場合には、代謝物M1及び代謝物M2の含量に換算係数を乗じてスピロメシフェンの含量に変換し、これらの和を分析値とする。ただし、分析値を求める際には、各食品の規制対象化合物に留意すること。

２）注意点

① 調製時及び試験操作時のスピロメシフェンの分解を防ぐためにエタノール、ギ酸及び水混液を加えて調製を行い、以降の試験操作もギ酸酸性下で行う必要がある。

② スピロメシフェン、代謝物M1及び代謝物M2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。

スピロメシフェン
定量イオン（*m/z*）：プリカーサーイオン 273、プロダクトイオン 187
定性イオン（*m/z*）：プリカーサーイオン 273、プロダクトイオン 255
代謝物M1
定量イオン（*m/z*）：プリカーサーイオン 273、プロダクトイオン 187
定性イオン（*m/z*）：プリカーサーイオン 273、プロダクトイオン 255
代謝物M2
定量イオン（*m/z*）：プリカーサーイオン 289、プロダクトイオン241
定性イオン（*m/z*）：プリカーサーイオン 289、プロダクトイオン271

③ 試験法開発に検討した食品：牛の筋肉・脂肪・肝臓・乳、鶏の筋肉・卵、はちみつ、うなぎ、さけ及びしじみ

12. 参考文献

なし

13. 類型

C