

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 を加えて攪拌した後、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 を加えて攪拌した後、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°C 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°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、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°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 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 μ m

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 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ニプロピル	イソシンコメロン酸ニプロピル	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
エトバベート	エトバベート	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
ファミフル	ファミフル	0.97	+326→281	+326→217	+326→93			0.01*
ブラジクアンテル	ブラジクアンテル	0.91	+313→203	+313→83				0.01
フルニキシム	フルニキシム	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
フロルフエニコール	フロルフエニコール	0.68	-356→336	-356→185				0.01
メンプトン	メンプトン	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。