



食安発第1012001号  
平成17年10月12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

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

食品、添加物等の規格基準の一部を改正する件（平成17年厚生労働省告示第423号）が平成17年9月16日に公布され、その内容については、同日付け食安発第0916001号当職通知をもって通知したところである。

これに関連して、今般、農薬ビフェナゼート、農薬フェンアミドン及び農薬プロヒドロジャスモンに係る試験法について別添のとおり定めたので、関係者への周知方よろしく願います。

なお、上記試験法を実施するに際しては、「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）別添の第1章総則部分を参考とされたい。

(別添)

# 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

厚生労働省医薬食品局食品安全部

平成 1 7 年 1 0 月

# 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

食品、添加物等の規格基準（昭和34年厚生省告示第370号）の第1食品の部A食品一般の成分規格の6の(1)の表の第1欄に掲げる農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質（その物質が化学的に変化して生成した物質を含む。）の試験法（同表第3欄に「不検出」と定めているものに係るものを除く。）について、次のとおり定める。

## 第1章 総則

## 第2章 試験法

※ 「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10月12日付け食安発第1012001号厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知) 別添

# 目次

## 第1章 総則 (略)

## 第2章 試験法 (追加するもの以外略)

- BHC、DDT、アルドリン、ジコホール、ディルドリン、テフルトリン、トリフルラリン、ハルフェンプロックス及びフェンプロパトリン試験法
- 2,4-D 試験法
- DCIP 試験法
- EPN、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、クロルフェンビンホス、ジメチルビンホス、ジメトエート、ダイアジノン、チオメトン、テルブホス、トリアゾホス、トルクロホスメチル、パラチオン、パラチオンメチル、ピラクロホス、ピリミホスメチル、フェントロチオン、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、ホキシム、ホサロン、ホスチアゼート及びマラチオン試験法
- EPTC 試験法
- MCPA 及びジカンバ試験法
- 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、トラロメトリン、ピフェントリン、ピレトリン、フェンバレレート、フルシトリネート、フルバリネート及びペルメトリン試験法
- アシベンゾラル S メチル試験法
- 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
- アセキノシル試験法
- アセタミプリド試験法
- アセフェート及びメタミドホス試験法
- アゾキシストロビン試験法
- アミトラズ試験法
- 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
- アルジカルブ、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、フェノブカルブ及びベンダイオカルブ試験法
- イソフェンホス試験法
- イソメタミジウム試験法
- イナベンフィド試験法
- イプロジオン試験法
- イベルメクチン、エプリノメクチン及びモキシデクチン試験法
- イマザモックスアンモニウム塩試験法
- イマザリル試験法
- イマズスルフロン及びベンスルフロンメチル試験法
- イミノクタジン試験法
- イミベンコナゾール試験法

- ・ インダノファン試験法
- ・ ウニコナゾール P 試験法
- ・ エスプロカルブ、クロルプロファミン、チオベンカルブ、ピリブチカルブ及びペンデ  
イメタリン試験法
- ・ エチクロゼート試験法
- ・ エチプロール試験法
- ・ エトキサゾール試験法
- ・ エトキシキン試験法
- ・ エトフェンプロックス試験法
- ・ エトベンザニド試験法
- ・ エマメクチン安息香酸塩試験法
- ・ オキサジクロメホン及びフェノキサニル試験法
- ・ 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
- ・ オクスフェンダゾール、フェバンテル及びフェンペンダゾール試験法
- ・ 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、フルジオキシ  
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
- ・ カルプロパミド試験法
- ・ カンタキサンチン試験法
- ・ キザロホップエチル試験法
- ・ キノメチオネート試験法
- ・ 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
- ・ キンクロラック試験法
- ・ クミルロン試験法
- ・ グリホサート試験法
- ・ グルホシネート試験法
- ・ クレトジム試験法
- ・ クロサンテル試験法
- ・ クロフェンテジン試験法
- ・ クロリムロンエチル及びトリベヌロンメチル試験法
- ・ 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
- ・ クロルフェナピル及びビフェノックス試験法
- ・ 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
- ・ クロルメコート試験法
- ・ ゲンタマイシン試験法
- ・ サラフロキサシン及びダノフロキサシン試験法
- ・ 酸化フェンブタズ試験法
- ・ シアゾファミド試験法
- ・ シアナジン試験法
- ・ ジアフェンチウロン試験法
- ・ ジクラズリル及びナイカルバジン試験法
- ・ シクロキシジム試験法
- ・ ジクロシメット試験法

- ・ シクロスルファムロン試験法
- ・ ジクロフルアニド試験法
- ・ ジクロメジン試験法
- ・ ジクロルボス及びトリクロルホン試験法
- ・ シハロホップブチル及びジメテナミド試験法
- ・ 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
- ・ ジフェンゾコート試験法
- ・ ジフルフェニカン試験法
- ・ シプロジニル試験法
- ・ ジメチピン試験法
- ・ ジメトモルフ試験法
- ・ シモキサニル試験法
- ・ 臭素試験法
- ・ シラフルオフエン試験法
- ・ 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
- ・ スピノサド試験法
- ・ スピラマイシン試験法
- ・ スルファジミジン試験法
- ・ セトキシジム試験法
- ・ セフチオフル試験法
- ・ ゼラノール、 $\alpha$ -トレンボロン及び $\beta$ -トレンボロン試験法
- ・ ダイムロン試験法
- ・ ターバシル試験法
- ・ 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
- ・ チルミコシン試験法
- ・ テクロフタラム試験法
- ・ デスメディファム試験法
- ・ テブラロキシジム試験法
- ・ テレフタル酸銅試験法
- ・ トリクラベンダゾール試験法
- ・ トリクラミド試験法
- ・ トリシクラゾール試験法
- ・ トリネキサパックエチル試験法
- ・ トリフルミゾール試験法
- ・ トルフェンピラド試験法
- ・ 鉛試験法
- ・ ニテンピラム試験法
- ・ ノバルロン試験法
- ・ バミドチオン試験法
- ・ ビオレスメトリン試験法

- ・ ピクロラム試験法
- ・ ビスピリバックナトリウム塩試験法
- ・ ヒ素試験法
- ・ ビフェナゼート試験法（追加）
- ・ ピメトロジン試験法
- ・ ピラゾキシフェン試験法
- ・ ピラフルフェンエチル試験法
- ・ ピリダベン試験法
- ・ ピリダリル試験法
- ・ ピリデート試験法
- ・ ピリフェノックス試験法
- ・ ピリミジフェン試験法
- ・ ピリメタニル試験法
- ・ ピルリマイシン試験法
- ・ ファモキサドン試験法
- ・ フィプロニル試験法
- ・ フェノキサプロップエチル試験法
- ・ フェンアミドン試験法（追加）
- ・ フェントラザミド試験法
- ・ フェンピロキシメート試験法
- ・ フェンヘキサミド試験法
- ・ ブチレート試験法
- ・ フラメトピル試験法
- ・ フルアジナム試験法
- ・ フルアジホップ試験法
- ・ フルオルイミド試験法
- ・ フルシラゾール試験法
- ・ フルスルファミド試験法
- ・ フルベンダゾール試験法
- ・ フルミオキサジン試験法
- ・ プロクロラズ試験法
- ・ プロシミドン試験法
- ・ プロパモカルブ試験法
- ・ プロヒドロジャスモン試験法（追加）
- ・ プロヘキサジオンカルシウム塩試験法
- ・ ヘキシチアゾクス試験法
- ・ ペンシクロン試験法
- ・ ベンジルペニシリン試験法
- ・ ペンタゾン試験法
- ・ ペントキサゾン試験法
- ・ ベンフレセート試験法
- ・ 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

- ・ マレイン酸ヒドラジド試験法
- ・ ミクロブタニル試験法
- ・ メタベンズチアズロン試験法
- ・ メチオカルブ試験法
- ・ メトプレレン試験法
- ・ メトリブジン試験法
- ・ メパニピリム試験法
- ・ モリネート試験法
- ・ レバミゾール試験法

(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
- ・ アミトロール試験法
- ・ 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
- ・ キノキサリン-2-カルボン酸試験法
- ・ シヘキサチン試験法
- ・ ダミノジッド試験法
- ・ トリアゾホス及びパラチオン試験法

## 第2章 試験法

(追加：ビフェナゼート試験法、フェンアミドン試験法、プロヒドロジャスモン試験法)

## ビフェナゼート試験法（農産物）

### 1. 分析対象化合物

ビフェナゼート

イソプロピル=2-(4-メトキシビフェニル-3-イル)ジアゼニルホルマート（以下「ビフェナゼート酸化体」という。）

### 2. 装置

蛍光検出器付き高速液体クロマトグラフ（HPLC(FL)）

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2に示すものを用いる。

1,5-ジフェニルカルボノヒドラジド(以下「DPH」という。)

ビフェナゼート標準品 本品はビフェナゼート 99%以上を含む。

### 4. 試験溶液の調製

#### 1) 抽出

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 4.0 gを量り採り、これに水 20 mLを加え、2 時間放置する。

これに 0.5%DPH含有アセトニトリル 10 mL及びアセトニトリル・水混液(3:2) 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・水混液(3:2) 50 mLを加えてホモジナイズし、上記と同様にろ過する。得られたろ液にアセトニトリルを加えて正確に 200 mLとし、この 50 mLを採り、40℃以下で約 20 mLまで濃縮する。これに 10%塩化ナトリウム溶液 100 mLを加え、酢酸エチル・*n*-ヘキサン混液(1:9) 100 mL及び 50 mLで 2 回振とう抽出する。抽出液を液相分離ろ紙でろ過した後、40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物に2%アスコルビン酸・アセトニトリル混液(2:3) 10 mLを加えて溶かし、50℃で30分間加温する。放冷後、0.1% DPH含有アセトニトリル 0.5 mLを加える。

#### 2) 精製

活性炭ミニカラム(500 mg)に 0.01%DPH含有アセトニトリル 10 mL及び水 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、0.01%DPH含有アセトニトリル・水混液(3:2) 5 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで、0.01%DPH含有アセトニトリル 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0.02%アスコルビン酸・アセトニトリル混液(2:3)に溶解し、正確に 2 mLとしたものを試験溶液とする。

### 5. 検量線の作成

ビフェナゼート標準品の 0.05～1 mg/L 0.02%アスコルビン酸・アセトニトリル混液(2:3)溶液を数点調製し、それぞれ 50  $\mu$ LをHPLC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。

## 6. 定量

試験溶液 50  $\mu$ LをHPLCに注入し、5の検量線でビフェナゼートの含量を求める。

## 7. 測定条件

### 1) HPLC

検出器: FL (励起波長 266 nm、蛍光波長 427 nm )

カラム: オクタデシルシリル化シリカゲル (粒径 5  $\mu$ m)、内径 4~4.6 mm、長さ 250 mm

カラム温度: 40°C

移動相: アセトニトリル・水混液 (1:1)

保持時間の目安: 約18分

### 2) LC/MS

カラム: オクタデシルシリル化シリカゲル (粒径 5  $\mu$ m)、内径 2 mm、長さ 150 mm

移動相: アセトニトリル・水混液 (1:1)

イオン化モード: ESI

主なイオン ( $m/z$ ): 正イオンモード 301

注入量: 5  $\mu$ L

保持時間の目安: 約10分

## 8. 定量限界

0.02 mg/kg (茶の場合は 0.1 mg/kg)

## 9. 留意事項

### 1) 試験法の概要

ビフェナゼート及びビフェナゼート酸化体を試料からDPH共存下でアセトニトリル・水混液(3:2)で抽出し、酢酸エチル・*n*-ヘキサン混液 (1:9)に転溶する。還元処理(2%アスコルビン酸・アセトニトリル混液中、50°Cで30分間反応)によりビフェナゼート酸化体をビフェナゼートに変換し、さらに、活性炭ミニカラムにより精製した後、HPLC(FL)で測定し、LC/MSで確認する方法である。

### 2) 注意点

① 回収が不良の場合は、以下の方法に変更することにより改善される場合がある。抽出液を濃縮せずに水で 500 mL定容とし、その 125 mLを取り、これをオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム(500 mg: アセトニトリル及び水の各 5 mLで順次洗浄したもの)に負荷した後、2%アスコルビン酸・アセトニトリル混液(2:3) 10 mLで溶出し、これを 50°Cで 30分間加温し、放冷後、0.1%DPH含有アセトニトリル 0.5 mLを加え、以下、4. 試験溶液の調製の 2)の精製と同様の操作を行う。(操作内容の詳細は参考文献を参照)

② 精製が不十分な場合は、アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム (360 mg)による精製を追加するとよい。操作概要を以下に記す。活性炭ミニカラム精製後の残留物を 0.01%DPH含有酢酸エチル・*n*-ヘキサン混液 (1:4) 5 mLに溶解し、これをミニカラム(*n*-ヘキサン 5 mLで洗浄したもの)に負荷し、さらに同混液 20mLを流下し、全溶出液を採る。なお、追加精製を実施しても改善が見られない場合は、①の方法に変更することも有効である。

③ 転溶溶媒を脱水するために、液相分離ろ紙の代わりに無水硫酸ナトリウムを使用した場合は、

回収率の低下を招く。

10. 参考文献

環境省告示第53号ビフェナゼート試験法（平成12年8月17日）

11. 類型

C

## ビフェナゼート試験法(畜産物)

### 1. 分析対象化合物

ビフェナゼート

イソプロピル=2-(4-メトキシビフェニル-3-イル)ジアゼニルホルマート(以下「ビフェナゼート酸化体」という。)

4-ヒドロキシビフェニル(以下「HBP」という。)

4-スルファトビフェニル(以下「HBP硫酸抱合体」という。)

### 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2に示すものを用いる。

L(+)-アスコルビン酸(特級)

1,5-ジフェニルカルボノヒドラジド(以下「DPH」という。)(特級)

ビフェナゼート標準品 本品はビフェナゼート99%以上を含み、融点は120~121℃である。

HBP標準品 本品はHBP99%以上を含む。

### 4. 試験溶液の調製

#### 1) 抽出

筋肉、脂肪、肝臓、腎臓及びその他の食用部分の場合は、細切均一化した後、その20.0 gを量り採る。

乳の場合は、20.0 gを量り採る。

これに0.25%酢酸含有アセトニトリル・水混液(7:3)100 mLを加え、3分間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。上澄液をガラス繊維ろ紙で吸引ろ過後、遠心管内の残留物に0.25%酢酸含有アセトニトリル・水混液(7:3)50 mLを加えホモジナイズした後、上澄液を上記と同様にろ過する。得られたろ液を200 mLのメスフラスコに合わせ、0.25%酢酸含有アセトニトリル・水混液(7:3)を加えて200 mLに定容する。

#### 2) 精製

##### a ビフェナゼート及びビフェナゼート酸化体試験溶液

##### 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(500 mg)にアセトニトリル及び水各10 mLを注入し、流出液は捨てる。このカラムに1)で得られた抽出溶液の20 mL(試料2 g相当)に水40 mLを加えたものを注入した後、容器をアセトニトリル・水混液(3:7)10 mLで洗い、洗液をカラムに注入し、流出液は捨てる。次いで、2%アスコルビン酸溶液・アセトニトリル混液(2:3)20 mLを注入し、溶出液を50 mLのナス型フラスコにとる。

##### ② 還元処理

①の溶出液を50℃で30分間密栓加温する。放冷後、0.1%DPH含有アセトニトリル溶液1 mLを加える。

##### ③ 活性炭カラムクロマトグラフィー

活性炭ミニカラム(500 mg)に0.01%DPH含有アセトニトリル溶液及び水各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た後、容器を0.01%DPH含有アセトニトリル溶液・水混液(3:2)5 mLで洗い、洗液を先のカラムに注入し、流出液は捨てる。次いで、0.01%DPH含有アセトニトリル溶液25 mLを注入し、溶出液を40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物に0.05%DPH含有酢酸エチル溶液2 mLを加え、残留物を完全に溶かした後、*n*-ヘキサン8 mLを加える。

④ 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

アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム(360 mg)に0.05%DPH含有酢酸エチル溶液・*n*-ヘキサン混液(1:4)10 mLを注入し、流出液は捨てる。このカラムに③で得られた溶液を注入した後、容器を0.05%DPH含有酢酸エチル溶液・*n*-ヘキサン混液(1:4)5 mLで洗い、洗液を先のカラムに注入する操作を2回繰り返す。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0.02%アスコルビン酸溶液・アセトニトリル混液(2:3)に溶解し、正確に4 mLとしたものを試験溶液とする。

b HBP及びHBP硫酸抱合体試験溶液(脂肪以外)

① HBPへの変換

1)で得られた抽出溶液の20 mL(試料2 g相当)を100 mLのナス型フラスコに取り、塩酸2 mLを加えた後、50℃で2時間密栓加温する。

② 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、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及びジビニルベンゼン-*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

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム(500 mg)、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)及びジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム(200 mg)にそれぞれアセトニトリル及び水各10 mLを注入し、流出液は捨てる。

①で得られた溶液に水40 mLを加えたものをオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムに注入した後、容器をアセトニトリル・水混液(1:3)10 mLで洗い、洗液をカラムに注入し、流出液は捨てる。次いで、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム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及びジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムを接続し、アセトニトリル・水混液(1:1)10 mLを注入し、流出液は捨てる。オクタデシルシリル化シリカゲルミニ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ミニカラムを除去した後、アセトニトリル25 mL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に注入し、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・水混液(1:1)に溶解し、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

ビフェナゼート標準品の0.004~0.08 mg/L 0.02%アスコルビン酸溶液・アセトニトリル混液(2:3)溶液及びHBPの0.002~0.04 mg/Lアセトニトリル・水混液(1:1)溶液を数点調製し、それぞれ10 µLを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。

6. 定量

試験溶液10 µLをLC/MSに注入し、5の検量線でビフェナゼート及びHBPの含量を求める。次式により、HBPを含むビフェナゼートの含量を求める。

ビフェナゼート(HBPを含む。)の含量(ppm) =  $A + B \times 1.76$

A : ビフェナゼートの含量(ppm)

B : HBPの含量(ppm)

7. 測定条件

検出器 : LC/MS

カラム : オクタデシルシリル化シリカゲル(粒径3 µm)、内径2 mm、長さ150 mm

カラム温度 : 40℃

移動相 : ビフェナゼート アセトニトリル・0.1%酢酸溶液混液(1:1)から(9:1)までの濃度勾配を5分間で行い、(9:1)で10分間保持する。

HBP アセトニトリル・0.1%酢酸溶液混液(4:6)から(9:1)までの濃度勾配を5分間で行い、(9:1)で10分間保持する。

イオン化モード : ESI

主なイオン(*m/z*) : ビフェナゼート 正イオンモード 301.6  
HB P 負イオンモード 169.0

注入量 : 10  $\mu$ L

保持時間 : ビフェナゼート 約7.6 分、HB P 約7.7 分

## 8. 定量限界

ビフェナゼート 0.008 mg/kg、HB P 0.004 mg/kg

## 9. 留意事項

分析対象は検体の種類によって異なる。脂肪ではビフェナゼート及びビフェナゼート酸化体を、脂肪以外ではビフェナゼート、ビフェナゼート酸化体、HB P及びHB P硫酸抱合体を分析対象とする。

### 1) 分析値

ビフェナゼート及びその代謝物であるHB Pのそれぞれについて定量を行い、HB Pについてはその含量に係数を乗じてビフェナゼートの含量に変換し、これらの和を分析値とすること。

### 2) 試験法の概要

脂肪以外は①、②の分析対象化合物を測定、脂肪は①の分析対象化合物のみ測定。

#### ① ビフェナゼート及びビフェナゼート酸化体

試料から0.25%酢酸含有アセトニトリル・水混液(7:3)で抽出する。オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムにより精製した後、還元処理によりビフェナゼート酸化体をビフェナゼートに一括変換し、さらに活性炭ミニカラム及びアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムにより精製した後、LC/MSで測定する方法である。

#### ② HB P及びHB P硫酸抱合体

試料から0.25%酢酸含有アセトニトリル・水混液(7:3)で抽出する。HB P硫酸抱合体をHB Pに一括変換した後、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム、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及びジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムにより精製した後、LC/MSで測定する方法である。

### 3) 注意点

- 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における精製時にミニカラムが目詰まりする場合は、ミニカラム上部に脱脂綿を詰めると効果的である。
- ② ビフェナゼート精製に用いる2%アスコルビン酸溶液、0.02%アスコルビン酸溶液、0.1%DPH含有アセトニトリル溶液、0.01%DPH含有アセトニトリル溶液及び0.05%DPH含有酢酸エチル溶液は用時調製する。特にDPHを含有する溶液については調製後直ちに用いること。
- ③ ビフェナゼートの精製において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を行う際、ミニカラム注入前の残留物はヘキサンに難溶である。0.05%DPH含有酢酸エチル溶液に完全に溶解した後に、ヘキサンを加える必要がある。

## 10. 参考文献

平成12年8月17日 環境省告示第53号「ビフェナゼート試験法」

### 11. 類型

C

### 12. その他

平成17年1月24日付け厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課事務連絡「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係る分析上の留意事項について」の別添を参考にすること。

## フェンアミドン試験法（農産物）

### 1. 分析対象化合物

フェンアミドン

### 2. 装置

アルカリ熱イオン化検出器付きガスクロマトグラフ (GC (FTD)) 又は高感度窒素・リン検出器付きガスクロマトグラフ (GC (NPD))

ガスクロマトグラフ・質量分析計 (GC/MS)

### 3. 試薬、試液

次に示すもの以外は、総則2に示すものを用いる。

フェンアミドン標準品 本品はフェンアミドン 99%以上を含み、融点は 137°Cである。

### 4. 試験溶液の調製

#### 1) 抽出

試料 20.0 g にアセトン 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°C以下で約 30 mLまで濃縮する。これに 10%塩化ナトリウム溶液 100 mLを加え、*n*-ヘキサン 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、ろ液を 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・*n*-ヘキサン混液 (1:1) 5 mLを加えて溶かす。

#### 2) 精製

##### ① 活性炭カラムクロマトグラフィー

活性炭ミニカラム (500 mg) に酢酸エチル・*n*-ヘキサン混液 (1:1) 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、酢酸エチル・*n*-ヘキサン混液 (1:1) 15 mLを注入する。全溶出液を 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・*n*-ヘキサン混液 (1:19) 5 mLを加えて溶かす。

##### ② 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

アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム (360 mg) に酢酸エチル・*n*-ヘキサン混液 (1:19) 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、流出液は捨てる。さらに、酢酸エチル・*n*-ヘキサン混液 (1:19) 10 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで、酢酸エチル・*n*-ヘキサン混液 (3:7) 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。この残留物をアセトンに溶解し、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

フェンアミドン標準品の 0.05~1 mg/Lアセトン溶液を数点調製し、それぞれ 2  $\mu$ LをGC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。

### 6. 定量

試験溶液 2  $\mu$ LをGCに注入し、5の検量線でフェンアミドンの含量を求める。

## 7. 測定条件

### 1) GC

検出器：FTD又はNPD

カラム：50%フェニルメチルシリコン、内径 0.53 mm、長さ 15 m、膜厚 1  $\mu$ m

カラム温度：255 $^{\circ}$ C

注入口温度：280 $^{\circ}$ C

検出器温度：280 $^{\circ}$ C

キャリアーガス：ヘリウム

保持時間の目安：約4分

### 2) GC/MS

カラム：5%フェニルメチルシリコン、内径 0.25 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25  $\mu$ m

カラム温度：200 $^{\circ}$ C(1分)－10 $^{\circ}$ C/分－280 $^{\circ}$ C(5分)

注入口温度：250 $^{\circ}$ C

キャリアーガス：ヘリウム

イオン化モード(電圧)：EI (70 eV)

主なイオン ( $m/z$ ): 311、268、238

注入量：1  $\mu$ L

保持時間の目安：約8分

## 8. 定量限界

0.01 mg/kg

## 9. 留意事項

### 1) 試験法の概要

フェンアミドンを試料からアセトンで抽出し、*n*-ヘキサンに転溶する。活性炭ミニカラム及びアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムにより精製した後、GC (FTD又はNPD)で測定し、GC/MSで確認する方法である。

### 2) 注意点

① 精製が不十分な場合は、シリカゲルミニカラム (690 mg) による精製を追加するとよい。操作概要を以下に記す。試料溶液をカラム(*n*-ヘキサン 10 mLで予備洗浄)に負荷した後、酢酸エチル・*n*-ヘキサン混液 (1:9) 10 mLで洗浄、酢酸エチル・*n*-ヘキサン混液 (2:3) 10 mLで溶出する。

② GC/MS測定では、フェンアミドンの感度が食品の品目によってはやや高まる場合がある。対策としては、追加精製やマトリックス含有標準溶液の使用等がある。

## 10. 参考文献

なし

## 11. 類型

C

## 12. その他

カラムについては、平成17年1月24日付け厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課事務連絡「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係る分析上の留意事項について」の別添を参考にすること。

## フェンアミドン試験法（畜産物）

### 1. 分析対象化合物

フェンアミドン

5-メチル-5-フェニルイミダゾリジン-2,4-ジオン(以下「MPID」という。)

### 2. 装置

ガスクロマトグラフ・質量分析計(GC/MS)を用いる。

### 3. 試薬、試液

次に示すもの以外は、総則2に示すものを用いる。

フェンアミドン標準品 本品はフェンアミドン 99%以上を含み、融点は137℃である。

MPID標準品 本品はMPID 99%以上を含む。

スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラム(500mg) 内径8~9mmのポリエチレン製のカラム管に、スチレンジビニルベンゼン共重合体500mg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. 試験溶液の調製

#### 1) 抽出

筋肉、脂肪、肝臓、腎臓及びその他の食用部分の場合は、細切均一化した後、その5.0 gを量り採る。

乳の場合は、20.0 gを量り採る。

これにアセトニトリル50 mL、アセトニトリル飽和 *n*-ヘキサン50 mL及び無水硫酸ナトリウム10 g(乳の場合は40 g)を加え、3分間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。アセトニトリル層を採り、*n*-ヘキサン層及び残留物にアセトニトリル50 mLを加え上記と同様にホモジナイズ及び遠心分離を行う。得られたアセトニトリル層を先のアセトニトリル層に合わせ、40℃以下で濃縮し溶媒を除去する。この残留物に水・メタノール混液(3:2)10 mLを加えて溶かす。

#### 2) 精製

##### ① スチレンジビニルベンゼン共重合体カラムクロマトグラフィー及び活性炭カラムクロマトグラフィー

スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラム(500 mg)にメタノール及び水各5 mLを注入し、流出液は捨てる。活性炭ミニカラム(500 mg)にメタノール5 mLを注入し、流出液は捨てる。スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラムに、1)で得られた溶液を注入した後、容器を水・メタノール混液(3:2)10 mLで洗い、洗液を先のカラムに注入し、流出液は捨てる。次いで、スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラムの下部に活性炭ミニカラムを接続し、メタノール20 mLを注入する。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・*n*-ヘキサン混液(1:19)5 mLを加えて溶かす。

##### ② 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

アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム(1,000 mg)に酢酸エチル・*n*-ヘキサン混

液(1:19)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、容器を酢酸エチル・*n*-ヘキサン混液(1:19)5 mLで洗い、洗液を先のカラムに注入する操作を3回繰り返し、流出液は捨てる。次いで、酢酸エチル・*n*-ヘキサン混液(3:7)20 mLを注入し、溶出液を分取する(溶出液Ⅰ)。さらにアセトン・*n*-ヘキサン混液(3:7)10 mLを注入し、流出液を捨てた後、アセトン・*n*-ヘキサン混液(3:7)20 mLを注入し、溶出液を分取する(溶出液Ⅱ)。溶出液Ⅰ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に溶解し、正確に1 mLとしたものをフェンアミドン用試験溶液とする。溶出液Ⅱを同様に濃縮し、溶媒を除去する。この残留物をアセトンに溶解し、正確に1mLとしたものをMP I D用試験溶液とする。

## 5. 検量線の作成

フェンアミドン標準品の0.1~2 mg/Lアセトン溶液及びMP I D標準品の0.05~0.5 mg/Lアセトン溶液を数点調製し、それぞれ2 μLをGC/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。

## 6. 定量

試験溶液2 μLをGC/MSに注入し、5の検量線でフェンアミドン及びMP I Dの含量を求める。次式により、MP I Dを含むフェンアミドンの含量を求める。

フェンアミドン(MP I Dを含む。)の含量(ppm) =  $A + B \times 1.64$

A : フェンアミドンの含量(ppm)

B : MP I Dの含量(ppm)

## 7. 測定条件

検出器 : GC/MS

カラム : 50%トリフルオロプロピルメチルシリコン、  
内径0.25 mm、長さ30 m、膜厚0.25 μm

カラム温度 : 100℃(1分) - 20℃/分 - 260℃(10分)

注入口温度 : 250℃

キャリアーガス : ヘリウム

イオン化モード(電圧) : EI (70 eV)

主なイオン(*m/z*) : フェンアミドン ; 311、268、238      MP I D ; 175、104

保持時間の目安 : フェンアミドン 約8.4分、MP I D 約7.4分

## 8. 定量限界

筋肉、脂肪、肝臓、腎臓及びその他の食用部分 :

フェンアミドン 0.02 mg/kg、MP I D 0.01 mg/kg

乳 : フェンアミドン 0.005 mg/kg、MP I D 0.003 mg/kg

## 9. 留意事項

### 1) 分析値

フェンアミドン及びその代謝物であるMP I Dのそれぞれについて定量を行い、MP I Dについてはその含量に係数を乗じてフェンアミドンの含量に変換し、これらの和を分析値とすること。

## 2) 試験法の概要

フェンアミドン及びMP I Dを試料からアセトニトリルで抽出し、アセトニトリル飽和 *n*-ヘキサンで洗浄する。スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラム、活性炭ミニカラム及びアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムにより精製した後、GC/MSで測定、確認する方法である。

## 3) 注意点

- ① MP I D試験溶液の精製が不十分な場合は、シリカゲルミニカラム(1,000 mg)による精製を追加するとよい。操作概要を以下に記す。アセトン・*n*-ヘキサン混液(3:17) 5mLでコンディショニングしたカラムに、MP I D画分を同混液(3:17)5 mLで負荷、同混液15 mLで洗浄、アセトン・*n*-ヘキサン混液(1:1)10 mLで溶出する。
- ② フェンアミドン及びMP I Dの感度が試験溶液の注入前後で大幅に変動する可能性がある為、あらかじめ試験溶液を数回注入して、感度を十分に安定させた後、測定を行う等の措置が必要である。
- ③ MP I DのGC/MS測定においてマイクロシリンジ及び注入口部でキャリーオーバー(メモリー効果)が起こる。特に高濃度のMP I Dを注入した後は注入口を洗浄するためにアセトンを3、4回注入し、MP I Dのピークが検出しないことを確認してから次の試験溶液の測定を行う必要がある。

## 10. 参考文献

なし

## 11. 類型

C(未確認)

## 12. その他

ミニカラムについては、平成17年1月24日付け厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課事務連絡「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係る分析上の留意事項について」の別添を参考にすること。

## プロヒドロジャスモン試験法

### 1. 分析対象化合物

プロヒドロジャスモン[*n*-プロピルジヒドロジャスモネート(以下「PDJ」という。)]

### 2. 装置

ガスクロマトグラフ・質量分析計(GC/MS)

### 3. 試薬、試液

次に示すもの以外は、総則の2に示すものを用いる。

PDJ標準品 本品は、PDJ 97%以上を含み、沸点は318℃である。

### 4. 試験溶液の調製

#### 1) 抽出

試料20.0 gを量り採り、アセトン100 mLを加え、3分間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20 mLに濃縮する。これに10%塩化ナトリウム溶液50 mLを加え、*n*-ヘキサン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、ろ液を40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。残留物に*n*-ヘキサン20 mLを加えて溶解した後、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル40 mLずつで2回振とう抽出する。アセトニトリル層を合わせて40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物に*n*-ヘキサンを加えて溶解し、正確に20 mLとする。

#### 2) 精製

クロマトグラフ管(内径15 mm)に、カラムクロマトグラフィー用合成ケイ酸マグネシウム10 gを*n*-ヘキサンに懸濁させて充てんし、無水硫酸ナトリウム5 gを積層する。このカラムに、1)で得られた溶液4 mLを注入した後、*n*-ヘキサン100 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで、酢酸エチル・*n*-ヘキサン混液(1:19)200 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*n*-ヘキサンに溶解し、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

PDJ標準品をアセトンで溶解後、0.005~0.1 mg/L *n*-ヘキサン溶液を数点調製し、それぞれ2  $\mu$ LをGC/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。

### 6. 定量

試験溶液2  $\mu$ LをGC/MSに注入し、5の検量線でPDJの含量を求める。

### 7. 測定条件

## GC/MS

カラム：5%フェニルメチルシリコン、内径0.25 mm、長さ30 m、膜厚0.25  $\mu$ m

カラム温度：80°C(1分)–15°C/分–280°C(10分)

注入口温度：250°C

キャリアーガス：ヘリウム

イオン化モード(電圧)：EI (70 eV)

主なイオン( $m/z$ )：184、153

保持時間の目安：約10.4分および約10.6分

## 8. 定量限界

0.005 mg/kg

## 9. 留意事項

### 1) 試験法の概要

PDJを試料からアセトンで抽出し、*n*-ヘキサンに転溶する。アセトニトリル/*n*-ヘキサン分配及び合成ケイ酸マグネシウムカラムクロマトグラフィーで精製した後、GC/MSで測定する方法である。

### 2) 注意点

- ① PDJ標準品は、ヘキサンよりもアセトンに溶解性が高いため、標準原液をアセトンで調製した後、測定用標準溶液をヘキサンで調製する。なお、PDJ標準品は *trans*体87%以上及び *epi*体12%以下の混合物であり、クロマトグラム上は *trans*体および *epi*体の順に溶出する。PDJは *trans*体と *epi*体の和を分析値とする。GC/MSの測定において、PDJの感度が試験溶液の注入前後で大幅に変動する可能性があるため、あらかじめ試験溶液を数回注入して、感度を十分に安定させた後、測定を行う等の措置が必要である。また、試験溶液の夾雑物が次のクロマトグラムに影響を及ぼす可能性があるため、測定終了後カラムの焼き出しを十分に行う必要がある。
- ② 精製が不十分な場合は、以下のカラムを用いて精製を追加することができる。
  - a) シリカゲルミニカラム(690 mg)  
エーテル及び *n*-ヘキサン各10 mLで予備洗浄を行う。試料液をエーテル・*n*-ヘキサン混液(1:19)10 mLで負荷洗浄し、流出液を捨てた後、エーテル・*n*-ヘキサン混液(3:17)20 mLで溶出させる。
  - b) 活性炭ミニカラム(500 mg)  
*n*-ヘキサン10 mLで予備洗浄を行う。試料液を *n*-ヘキサン10 mLで負荷し、*n*-ヘキサン10 mLで溶出させる。全量を採取する。

## 10. 参考文献

環境省告示第60号 「プロヒドロジャスモン試験法」 (平成15年4月10日)

## 11. 類型

C