

(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について

(傍線部分は改正部分)

改正後	現行
<p>(略)</p> <p>目次</p> <p>(略)</p> <p>第3章 個別試験法</p> <p>(略)</p> <p>・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)</p> <p>・<u>ジフェニルアミン試験法 (農産物)</u></p> <p>・<u>ジフェンゾコート試験法 (農産物)</u></p> <p>(略)</p> <p>・フルオピコリド試験法 (農産物)</p> <p>・<u>フルオピコリド試験法 (畜水産物)</u></p> <p>・フルオルイミド試験法 (農産物)</p> <p>(略)</p> <p>・プロパモカルブ試験法 (農産物)</p> <p>・<u>プロパモカルブ試験法 (畜水産物)</u></p> <p>・<u>プロヒドロジャスモン試験法 (農産物)</u></p> <p>(略)</p> <p>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)</p> <p>(略)</p> <p><u>ジフェニルアミン試験法 (農産物)</u></p> <p>1. <u>分析対象化合物</u> <u>ジフェニルアミン</u></p> <p>2. <u>適用食品</u> <u>農産物</u></p> <p>3. <u>装置</u> <u>蛍光光度型検出器付き高速液体クロマトグラフ (HPLC-FL)</u></p>	<p>(略)</p> <p>目次</p> <p>(略)</p> <p>第3章 個別試験法</p> <p>(略)</p> <p>・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)</p> <p>(新設)</p> <p>・ジフェンゾコート試験法 (農産物)</p> <p>(略)</p> <p>・フルオピコリド試験法 (農産物)</p> <p>(新設)</p> <p>・フルオルイミド試験法 (農産物)</p> <p>(略)</p> <p>・プロパモカルブ試験法 (農産物)</p> <p>(新設)</p> <p>(略)</p> <p>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)</p> <p>(略)</p> <p>(新規)</p>

## 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。

ジフェニルアミン標準品 本品はジフェニルアミン 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 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 50 mL を加えてホモジナイズし、上記と同様にろ過する。得られたろ液同士を合わせ、アセトニトリルを加えて正確に 200 mL とする

。

##### ② 果実及び野菜類の場合

試料を精密に量り、重量比で 1/2 量の 5 vol % リン酸を加え磨砕均一化した後、試料 20.0 g に相当する量を量り採る。これにアセトニトリル 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 50 mL を加えてホモジナイズし、上記と同様にろ過する。得られたろ液同士を合わせ、アセトニトリルを加えて正確に 200 mL とする。

##### ③ 茶の場合

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 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 50 mL を加えてホモジナイズし、上記と同様にろ過する。得られたろ液同士を合わせ、アセトニトリルを加えて正確に 200 mL とする

。

#### 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 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 20 mL を分取して注入し、さらにアセトニトリル 5 mL を注入して全溶出液を採り、40 °C 以下で約 5 mL に濃縮する。これに 10 w/v % 塩化ナトリウム溶液 30 mL を加え、*n*-ヘキサン 30 mL 及び 15 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 °C 以下で約 2 mL に濃縮する。

② 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  
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) にエーテル及び n-ヘキサン (3 : 17) 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、さらにエーテル及び n-ヘキサン (3 : 17) 混液 10 mL を注入して全溶出液を採り、40 °C 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、穀類、豆類及び種実 類の場合は正確に 2 mL、果実及び野菜の場合は正確に 4 mL、茶の場合は正 確に 1 mL としたものを試験溶液とする。

#### 6. 検量線の作成

ジフェニルアミン標準品のメタノール溶液を数点調製し、それぞれ HPLC-FL 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、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。

#### 7. 定量

試験溶液を HPLC-FL に注入し、6 の検量線でジフェニルアミンの含量を求める。

#### 8. 確認試験

LC-MS/MS により確認する。

#### 9. 測定条件

(例)

##### 1) HPLC

検出器：FL (励起波長 285 nm、蛍光波長 360 nm)

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲル 内径 4.6 mm、長さ 250 mm、  
粒子径 5 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 (3 : 7) 混液

注入量：10 µL

保持時間の目安：10 分

##### 2) LC-MS/MS

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：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

イオン化モード : ESI (+)

主なイオン ( $m/z$ ) : プリカーサーイオン 170、  
プロダクトイオン 93、92、66

注入量 : 5  $\mu$ L

保持時間の目安 : 18 分

#### 10. 定量限界

0.01 mg/kg

#### 11. 留意事項

##### 1) 試験法の概要

ジフェニルアミンを試料からリン酸酸性下アセトニトリルで抽出し、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムで精製した後、*n*-ヘキサンに転溶する。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、HPLC-FL で定量し、LC-MS/MS で確認する方法である。

##### 2) 注意点

- ① ばれいしよの試料採取中にジフェニルアミンの分解がみられたことから、果実及び野菜では分解を防止するために検体をリン酸酸性下で磨砕均一化する操作とした。一方、試験法開発時に検討した玄米、とうもろこし、大豆及び茶では、試料採取中のジフェニルアミンの分解はみられなかったことから、穀類、豆類、種実類及び茶ではリン酸添加をしない操作とした。しかし、検討した食品に限られていることから、穀類、豆

類、種実類及び茶において分解が認められた場合には、5. 試験溶液の調製の1) 抽出において次のように操作する。

試料 10.0 g (茶は 5.00 g) に 5 vol %リン酸 10 mL を加え、さらに水 20mL を加え 30 分間放置する。これにアセトニトリル 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 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、アセトニトリルを加えて正確に 200 mL とする。

- ② ジフェニルアミンは揮発性が比較的高いので、窒素気流下における溶媒除去時には穏やかに窒素を吹きつけ、乾固したら直ちに窒素の吹き付けを終了する。
- ③ HPLC-FL での測定終了後、そのまま続けて次の試験溶液を測定すると、直前に測定した試料の夾雑物のピークが妨害となる場合がある。その場合は、ジフェニルアミン溶出後に移動相の 5 mmol/L 酢酸アンモニウム・メタノール溶液の比率をさらに上げて洗浄するとよい。
- ④ ジフェニルアミンは、ポリエチレン容器等から食品に移染の可能性があるため、ポリエチレン製以外の容器等を用いて検体を採取する。
- ⑤ 試験法開発時に検討した食品：玄米、とうもろこし、大豆、ばれいしよ、キャベツ、なす、ほうれんそう、オレンジ、りんご及び茶

12. 参考文献

なし

13. 類型

C

(略) ジフェンゾコート試験法 (農産物)  
(略) (略)  
(略) フルオピコリド試験法 (農産物)  
(略) フルオピコリド試験法 (畜水産物)

(略) ジフェンゾコート試験法 (農産物)  
(略) (略)  
(略) フルオピコリド試験法 (農産物)  
(新規)

1. 分析対象化合物

フルオピコリド

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。

多孔性ケイソウ土カラム (10 mL 保持用) 内径 20 ~ 30 mm のポリエチレン製のカラム管に、10 mL を保持することができる量のカラムクロマトグラフィー用に製造した顆粒状多孔性ケイソウ土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。

フルオピコリド標準品 本品はフルオピコリド 98 %以上を含む。

### 5. 試験溶液の調製

#### 1) 抽出

試料 10.0 g に塩化ナトリウム 1 g、1 vol %ギ酸 10 mL 及びアセトン 50 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。残留物にアセトン 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。得られた上澄液同士を合わせ、アセトンを加え正確に 100 mL とする。

#### 2) 精製

##### ① 多孔性ケイソウ土カラムクロマトグラフィー

1) で得られた溶液から正確に 10 mL を分取し、多孔性ケイソウ土カラム (10 mL 保持用) に注入した後、吸引乾燥する。このカラムにアセトニトリル 100 mL を注入し、溶出液を 40 °C 以下で約 3 mL まで濃縮する。

##### ② グラファイトカーボン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

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。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) にアセトニトリル 10 mL を注入し、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接続する。このカラムに①で得られた溶液を注入し、さらにアセトニトリル 16 mL を注入して、全溶出液を採り、アセトニトリルを加えて正確に 20 mL としたものを試験溶液とする。

### 6. 検量線の作成

フルオピコリド標準品のアセトニトリル溶液を数点調製する。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、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。

## 7. 定量

試験溶液を LC-MS/MS に注入し、6 の検量線でフルオピコリドの含量を求める。

## 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 100 mm、粒子径 5  $\mu\text{m}$

カラム温度：40  $^{\circ}\text{C}$

移動相：アセトニトリル及び 2 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液の混液 (1 : 9) から (9 : 1) までの濃度勾配を 8 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 383、  
プロダクトイオン 173、109

注入量：5  $\mu\text{L}$

保持時間の目安：6 分

## 10. 定量限界

0.01 mg/kg

## 11. 留意事項

### 1) 試験法の概要

フルオピコリドを試料から塩化ナトリウム及びギ酸存在下アセトンで抽出し、多孔性ケイソウ土カラムで脱脂する。グラファイトカーボン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 多孔性ケイソウ土カラムの吸引乾燥では、アセトンの除去が不十分な場合は十分な脱脂効果が得られない。
- ② フルオピコリドの 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 383、プロダクトイオン 173  
定性イオン ( $m/z$ )：プリカーサーイオン 383、プロダクトイオン 109
- ③ 試験法開発時に検討した食品：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

厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知 食安発第 0218001 号の第 3 章個別試験法「フルオピコリド試験法（農産物）」（平成 20 年 2 月 18 日）

13. 類型

C

(略) フルオルイミド試験法（農産物）  
(略)

(略) 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）

1. 分析対象化合物

プロパモカルブ

2. 適用食品

畜水産物

3. 装置

液体クロマトグラフ・質量分析計（LC-MS）又は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。

プロパモカルブ標準品 本品はプロパモカルブ 98 % 以上を含む。

5. 試験溶液の調製

1) 筋肉、脂肪、肝臓、腎臓、魚介類、乳及び鶏卵の場合

試料 10.0 g（脂肪の場合は 5.00 g）にアセトン 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。得られたろ液同士を合わせ、1 mol/L 塩酸 5 mL 及び飽和塩化ナトリウム溶液 50 mL を加えた後、*n*-ヘキサン 50 mL で 2 回洗浄する。次いで、10 w/v % 水酸化ナトリウム溶液 5 mL を加え、酢酸エチル 50 mL ずつで 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、ろ液を 40℃ 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

(略) フルオルイミド試験法（農産物）  
(略)

(略) プロパモカルブ試験法（農産物）

(新規)



を加えて正確に 10 mL (脂肪の場合は 5 mL) としたものを試験溶液とする。

## 2) はちみつの場合

試料 10.0 g に飽和塩化ナトリウム溶液 50 mL を加えて溶解する。これにアセトン 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。得られた液同士を合わせ、1 mol/L 塩酸 5 mL を加えた後、*n*-ヘキサン 50 mL で 2 回洗浄する。次いで、10 w/v % 水酸化ナトリウム溶液 5 mL を加え、酢酸エチル 50 mL ずつで 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、ろ液を 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

プロパモカルブ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 又は 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、試料中 0.01 mg/kg に相当する試験溶液中濃度は 0.01 mg/L である。

## 7. 定量

試験溶液を LC-MS 又は LC-MS/MS に注入し、6 の検量線でプロパモカルブの含量を求める。

## 8. 確認試験

LC-MS 又は 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：0.2 mol/L 酢酸アンモニウム溶液、水及びメタノール混液 (1 : 17 : 2) から (1 : 0 : 19) までの濃度勾配を 2 分間で行い、(1 : 0 : 19) で 4 分間保持する。

イオン化モード：ESI (+)

主なイオン (*m/z*)

LC-MS の場合：189、102

LC-MS/MS の場合：プリカーサーイオン 189、  
プロダクトイオン 144、102

注入量：5 µL

保持時間の目安：6分

10. 定量限界

0.01 mg/kg

11. 留意事項

1) 試験法の概要

プロパモカルブを試料からアセトンで抽出し、塩酸及び飽和塩化ナトリウム溶液を加えて、*n*-ヘキサンで洗浄する。次いで、水酸化ナトリウム溶液を添加して塩基性として酢酸エチルに転溶した後、LC-MS 又は LC-MS/MS で定量及び確認する方法である。

2) 注意点

① プロパモカルブの LC-MS 及び 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。

LC-MS の場合

定量イオン (*m/z*) : 102

定性イオン (*m/z*) : 189

LC-MS/MS の場合

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 102

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 144

② 鶏卵の場合は、振とう操作でエマルジョンを生じ、遠心分離を行っても消失しないことがある。その場合には、振とうは緩やかに行うとよい。

③ 試験法開発時に、牛の脂肪において *m/z* 189 の強度が小さくなる場合があった。その場合には、LC-MS 測定の定性イオンは *m/z* 144 を用いるとよい。加えて、LC-MS/MS 測定では、プリカーサーイオンに *m/z* 189 を用いた場合は定量値が小さくなるので注意すること。

④ 試験溶液用バイアルについては、プロパモカルブはガラス製バイアルに吸着することがあるので、ポリプロピレン等のガラス製以外のものを使用すると良い。

⑤ 試験法開発時に検討した食品：牛の筋肉・脂肪・肝臓・乳、鶏の筋肉・卵、さけ、うなぎ、しじみ及びはちみつ

12. 参考文献

厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知 食安発第 0124001 号の第 3 章個別試験法の「プロパモカルブ試験法（農産物）（平成 17 年 1 月 24 日）

13. 類型

C

(略)

プロヒドロジャスモン試験法（農産物）

(略)

プロヒドロジャスモン試験法（農産物）