

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、総則の3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/L0.02%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 μL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 μL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 μm）、内径4～4.6 mm、長さ250 mm

カラム温度：40℃

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 μm）、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 μL

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℃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を採り、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20 mL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