

第 3 章 個別試験法

(追加：オルトフェニルフェノール及びジフェニル試験法、酸化プロピレン試験法、バリタマイシン試験法、フルベンジアミド試験法)

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）

1. 分析対象化合物

農薬等の成分である物質	分析対象化合物
オルトフェニルフェノール	オルトフェニルフェノール オルトフェニルフェノールナトリウム塩
ジフェニル	ジフェニル

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

次に示すものの以外は、総則の2に示すものを用いる。

オルトフェニルフェノール標準品 本品はオルトフェニルフェノール 99%以上を含む。

ジフェニル標準品 本品はジフェニル 99%以上を含む。

4. 試験溶液の調製

穀類の場合は、試料10.0 gを量り採り、水20 mLを加えて2時間放置する。

果実、野菜及びハーブの場合は、試料20.0 gを量り採る。

これに無水酢酸ナトリウム2 g及び無水硫酸ナトリウム30 gを加えてよく混和した後、酢酸エチル80 mLを加え、ホモジナイズする。これを遠心分離し、酢酸エチル層を採り、残留物に酢酸エチル80 mLを加えて、同様に操作する。得られた酢酸エチル層を合わせ、*n*-ブタノール5 mLを加えて、40℃以下で濃縮し、酢酸エチルを除去する。残留物をHPLC用移動相に溶かし、正確に20 mLとし、0.45 μ mのメンブランフィルターでろ過したものを試験溶液とする。

5. 検量線の作成

オルトフェニルフェノール標準品及びジフェニル標準品各100 mgを量り、それぞれメタノール50 mLに溶解した後、HPLC用移動相を加えて100 mLとしたものを標準溶液とする。各標準溶液10 mLを採り、*n*-ブタノール25 mLを加え、HPLC用移動相を加えて100 mLとしたものを混合標準溶液とする。混合標準溶液をHPLC用移動相で希釈し、オルトフェニルフェノール及びジフェニルの0.1～8 μ g/mL溶液を数点調製する。それぞれ10 μ 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 10 μ LをHPLCに注入し、5の検量線でオルトフェニルフェノール及びジフェニルの含量を求める。

7. 確認試験

LC/MS により確認する。

8. 測定条件

HPLC

検出器：FL（励起波長285 nm、蛍光波長325 nm）

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲル（粒径 5 μ m） 内径4.6～6.0 mm、長さ150～250 mm

カラム温度：40℃

移動相：アセトニトリル、水及びメタノール（1：7：12）混液に10 mmol/Lになるようにドデシル硫酸ナトリウムを加えた後、リン酸でpHを2.3～2.5とする。

注入量：10 μ L

保持時間の目安：オルトフェニルフェノール、ジフェニルの順に溶出する。

LC/MS

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲル（粒径 5 μ m） 内径3.0 mm、長さ150 mm

カラム温度：40℃

移動相：水及びメタノール混液（2：3）から（0：1）までの濃度勾配を10分間で行った後、2分間保持する。

イオン化モード：オルトフェニルフェノール APPI（－）、ジフェニル APPI（＋）

主なイオン（ m/z ）：オルトフェニルフェノール 169、141、ジフェニル 154、153

保持時間の目安：オルトフェニルフェノール 7分、ジフェニル 10分

9. 定量限界

オルトフェニルフェノール：0.1 mg/kg

ジフェニル：0.2 mg/kg

10. 留意事項

1) 試験法の概要

オルトフェニルフェノール及びジフェニルを試料から酢酸エチルで抽出し、HPLC-FLで測定し、LC/MSで確認する方法である。

2) 注意点

- ① 無水酢酸ナトリウムはpHを調整するために加える。グレープフルーツ、オレンジなどでは1 gの添加でpH調整できる。
- ② 無水硫酸ナトリウムの量は試料により、適宜増量する。
- ③ *n*-ブタノールは、減圧濃縮中にジフェニルが損失するのを防ぐために加える。
- ④ 妨害が多く測定が困難な場合は、酢酸エチル層をろ紙でろ過すること、酢酸エチル層を水及び0.025 mol/L硫酸各50 mLで洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで脱水して濃縮すること、HPLCの移動相の混合比を変えることなどにより改善できる。

- ⑤ オルトフェニルフェノール及びジフェニルの励起極大波長は、それぞれ290、254 nmであり、蛍光極大波長はそれぞれ315、345 nmである。

1 1. 参考文献

日本薬学会編「衛生試験法・注解2005」p.307-309、金原出版株式会社

1 2. 類型

D (厚生労働省監修「食品衛生検査指針 食品添加物編」p.117-122、p.123-124 (2003) 日本食品衛生協会。LC/MS測定条件については、N. Yoshioka, et.al., Rapid simultaneous determination of *o*-phenylphenol, diphenyl, thiabendazole, imazalil and its major metabolite in citrus fruits by liquid chromatography-mass spectrometry using atmospheric pressure photoionization, Journal of Chromatography A, 1022, 145-150, 2004)

酸化プロピレン試験法（農産物）

1. 分析対象化合物

酸化プロピレン

2. 装置

ページ・トラップ装置付きガスクロマトグラフ・質量分析計（ページ・トラップ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。

サロゲート溶液 メタノールを50～90 mL入れた100 mL容のメスフラスコに、酸化プロピレン- d_6 10 mgを量り採り、メタノールを加えて100 mLとしたものをサロゲート原液とする。メタノールを50～80 mL入れた100 mL容のメスフラスコにサロゲート原液 1 mLを入れ、メタノールを加えて100 mLとしたものをサロゲート溶液（1 μ g/mL）とする。

酸化プロピレン標準品 本品は酸化プロピレン99%以上を含む。

4. 試験溶液の調製

検体を包丁で細切した後、その20.0 gを量り採り、サロゲート溶液及び冷却メタノール20 mLを加え、容器を氷冷しながらホモジナイズする。毎分3,000回転で10分間遠心分離し、上澄液を50 mL容のメスフラスコに採る。沈殿に冷却メタノール20 mLを加え、5分間振とうした後、同様に遠心分離し、上澄液を上記のメスフラスコに合わせる。これにメタノールを加えて50 mLとする。

ページ容器に水9.8 mLに対して抽出液0.2 mLの割合になるように、水4.9～49 mL及び抽出液0.1～1.0 mLを静かに泡立てないように入れ、試験溶液とする。

5. 検量線の作成

メタノール30～50 mLを入れた100 mL容のメスフラスコに、標準品100 mgを量り採り、メタノールを加えて100 mLとしたものを標準原液とする。標準原液を適宜メタノールで希釈し、試料に添加した量と同量のサロゲート溶液を加えて50 mLとしたものを検量線溶液とする。ページ容器に水9.8 mLに対して検量線溶液0.2 mLの割合になるように水4.9～49 mL及び検量線溶液0.1～1.0 mLを静かに泡立てないように入れる。ページ容器をページ・トラップ装置のトラップ部に接続する。ページガスを一定量通気して対象物質を気相中に移動させてトラップ管に捕集する。次にトラップ管を加熱し、対象物質を脱着して冷却凝縮装置で再凝縮させ、GC/MSに導入する。GC/MSによりサロゲート物質と酸化プロピレンの面積比を求め、検量線を作成する。

6. 定量

試験溶液（パージ容器）をパージ・トラップ装置のトラップ部に接続する。パージガスを一定量通気して対象物質を気相中に移動させてトラップ管に捕集する。次にトラップ管を加熱し、対象物質を脱着して冷却凝縮装置で再凝縮させ、GC/MSに導入する。GC/MSによりサロゲート物質と酸化プロピレンの面積比を求め、5の検量線で酸化プロピレンの含量を求める。

7. 確認試験

GC/MSにより確認する。

8. 測定条件

1) パージ・トラップ装置

パージ時間：4分

パージ温度：室温

ドライパージ時間：3分

トラップ温度：-150℃

トラップ管加熱時間：2分

注入時間：3分

注入温度：180℃

トラップ管焼きだし時間：20分

トラップ管焼きだし温度：200℃

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30m、膜厚0.25 μm

カラム温度：40℃（1分）－3℃/分－80℃－10℃/分－200℃（15分）

注入口温度：120℃

キャリアーガス：ヘリウム

キャリアーガス流速：約10分で流出するように流速を調整する。

イオン化モード（電圧）：EI（70 eV）

イオン源温度：210℃

主なイオン（*m/z*）：酸化プロピレン 57、58

酸化プロピレン-*d*₆ 64

保持時間の目安：10分

9. 定量限界

0.02 mg/kg

10. 留意事項

1) 試験法の概要

細切した試料にサロゲート物質を加え、メタノールで抽出する。抽出液の一部を採り、ページ・トラップGC/MSで測定及び確認する方法である。定量にはサロゲート物質と酸化プロピレンの面積比を用いる。

2) 注意点

- ① 標準溶液は使用時に調製する。ただし、液体窒素あるいはメタノール・ドライアイス等の冷媒で冷却しながらアンプルに移し、冷暗所に保存すれば1～3ヶ月間使用できる。
- ② 抽出時に用いるメタノールはあらかじめ冷蔵しておく。
- ③ ページ・トラップ装置の取扱い説明書に従って操作する。
- ④ 冷却凝縮装置で再凝縮を行わない場合は、酸化プロピレンをトラップ管に捕集後、トラップ管を加熱してそのままGC/MSに導入する。
- ⑤ ページ・トラップの最適条件は使用する吸着剤の種類、量などによって異なるため、あらかじめ充分な回収結果が得られるか確認しておく。また、ページ条件はトラップ管の破過容量を超えないように注意する。

1 1.参考文献

なし

1 2.類型

- D〔要調査項目等調査マニュアル（平成12年12月 環境庁水質保全局水質管理課）
 - ii. 揮発性有機物質の分析法 p.35～46〕

バリダマイシン試験法（農産物）

1. 分析対象化合物

バリダマイシン

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。

バリダマイシン標準品 本品はバリダマイシン90%以上を含む。

4. 試験溶液の調製

1) 抽出

穀類及び豆類の場合は、試料10.0 gを量り採り、水20 mLを加えて2時間放置する。

果実、野菜及びハーブの場合は、試料20.0 gを量り採る。

これに水及びメタノール（1：9）混液100 mLを加え、ホモジナイズした後、吸引ろ過する。ろ紙上の残留物に水及びメタノール（1：9）混液50 mLを加えてホモジナイズし、上記と同様にろ過する。ろ液を合わせ、40℃以下で約20 mLに濃縮する。

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

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5 mL及び水5 mLを順次注入し、各流出液は捨てる。このカラムに1)で得られた溶液を注入し、さらに水10 mLを注入し、溶出液を合わせ、水を加えて正確に200 mLとする。

② グラファイトカーボン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（500 mg）にメタノール10 mL及び水10 mLを順次注入し、各流出液は捨てる。このカラムに①で得られた溶液5 mLを注入し、流出液は捨てる。さらに、水10 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで、メタノール20 mLを注入し、溶出液を40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物を水に溶解し、正確に5 mL（穀類及び豆類の場合は、2.5 mL）としたものを試験溶液とする。

5. 検量線の作成

バリダマイシン標準品の0.005～0.1 mg/L水溶液を数点調製し、それぞれ5 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5 µLをLC/MSに注入し、5の検量線でバリダマイシンの含量を求める。

7. 確認試験

LC/MSにより確認する。

8. 測定条件

LC/MS

カラム：トリアコンチルシリル化シリカゲル（粒径 5 μ m）、内径2.0 mm、長さ150 mm

カラム温度：40℃

移動相：アセトニトリル及び0.01 mol/L酢酸アンモニウム溶液（1：99）混液

移動相流速：0.2 mL/分

イオン化モード：ESI（+）

主なイオン（ m/z ）：498

保持時間の目安：8分

9. 定量限界

0.05 mg/kg

10. 留意事項

1) 試験法の概要

バリダマイシンを試料から含水メタノールで抽出し、スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラム及びグラファイトカーボンミニカラムで精製した後、LC/MSで測定及び確認する方法である。

2) 注意点

- 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の代わりに n -ヘキサンで洗浄する方法がある。その場合は、濃縮液に水を加えて80 mLとし、これに n -ヘキサン50 mLを加えて、振とう洗浄する。精製効果はカラムクロマトグラフィーと大きな差はない。
- ② グラファイトカーボンカラムクロマトグラフィーでは、試料負荷量を大幅に増やすと、バリダマイシンの溶出率が低下するので、注意が必要である。
- ③ バリダマイシンは糖鎖構造を持つ高極性化合物であるため、LCの分離カラムとしてはC₁₈（オクタデシルシリル化シリカゲル）カラムよりもC₃₀（トリアコンチルシリル化シリカゲル）カラムが適している。
- ④ LC/MS測定において、バリダマイシン溶出後に妨害成分が溶出されることがある。このような場合は、アセトニトリル及び0.01 mol/L酢酸アンモニウム溶液（1：1）混液を通液して洗浄すると良い。

11. 参考文献

なし

12. 類型

D（未発表資料）

フルベンジアミド試験法（農産物）

1. 分析対象化合物

フルベンジアミド

2. 装置

紫外分光光度型検出器付き高速液体クロマトグラフ（HPLC-UV）

液体クロマトグラフ・質量分析計（LC/MS）

3. 試薬、試液

次に示すものの以外は、総則の2に示すものを用いる。

フルベンジアミド標準品 本品はフルベンジアミド98%以上を含み、融点は217～ 221℃である。

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。豆類の場合は試料10.0 g、茶の場合は試料5.00 gにそれぞれ水20 mLを加え、2時間放置する。

これにアセトニトリル及び水（4：1）混液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、アセトニトリル及び水（4：1）混液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18 mLまで濃縮する。

2) 精製

① 多孔性ケイソウ土カラムクロマトグラフィー

多孔性ケイソウ土カラム（20 mL 保持用）に1）で得られた溶液を注入し、5分間放置する。次いで、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（1：4）混液100 mLを注入し、溶出液を40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物にアセトニトリル1 mLを加えて溶かし、さらに、水4 mLを加え混合する。

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

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム（1,000 mg）にアセトニトリル及び水各5 mLを順次注入し、各流出液は捨てる。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、アセトニトリル及び水（2：3）混液10 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで、アセトニトリル及び水（4：1）混液10 mLを注入し、溶出液を40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物に酢酸エチル1 mLを加えて溶かし、さらに、*n*-ヘキサン4 mLを加え混合する。

③ 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カラムクロマトグラフィー

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）にアセトン及び*n*-ヘキサン各10 mLを順次注入し、各流出液は捨てる。このカラムに②で得られた溶液を注入し、流出液は捨てる。さらに、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（3：

7) 混液10 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで、酢酸エチル及び *n* -ヘキサン (1 : 1) 混液15 mLを注入し、溶出液を40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物にアセトン及び *n* -ヘキサン (1 : 19) 混液 5 mLを加えて溶かす。

④ 合成ケイ酸マグネシウムカラムクロマトグラフィー

合成ケイ酸マグネシウムミニカラム (900 mg) にアセトン 5 mL及び *n* -ヘキサン10 mLを順次注入し、各流出液は捨てる。このカラムに ③で得られた溶液を注入し、流出液は捨てる。さらに、アセトン及び *n* -ヘキサン (3 : 17) 混液10 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで、アセトン及び *n* -ヘキサン (2 : 3) 混液10 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水 (7 : 3) 混液に溶解し、正確に 4 mL (豆類の場合は 2 mL、茶の場合は 5 mL) としたものを試験溶液とする。

5. 検量線の作成

フルベンジアミド標準品の0.05～1.0 mg/Lを含むアセトニトリル及び水 (7 : 3) 混液の標準溶液を数点調製し、それぞれ40 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40 µLをHPLCに注入し、5の検量線でフルベンジアミドの含量を求める。

7. 確認試験

LC/MSにより確認する。

8. 測定条件

1) HPLC

検出器 : UV (波長256 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4.6 mm、長さ250 mm

カラム温度 : 40℃

移動相 : アセトニトリル及び水 (13 : 7) 混液

注入量 : 40 µL

保持時間の目安 : 8 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2.1 mm、長さ 150 mm

移動相 : アセトニトリル、酢酸及び水 (65 : 0.1 : 35) 混液

イオン化モード : ESI (－)

主なイオン (*m/z*) : 681

注入量 : 5 µL

保持時間の目安 : 6 分

9. 定量限界

0.01 mg/kg（茶の場合は0.05 mg/kg）

1 0．留意事項

1) 試験法の概要

フルベンジアミドを試料からアセトニトリル及び水（4：1）混液で抽出し、多孔性ケイソウ土カラム、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／アミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム及び合成ケイ酸マグネシウムミニカラムで精製した後、HPLC-UVで定量し、LC/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： 残留物を酢酸エチル及び *n*-ヘキサン（1：9）混液 5 mL に溶解し、カラムに負荷した後、酢酸エチル及び *n*-ヘキサン（3：7）混液 5 mL で洗浄、酢酸エチル及び *n*-ヘキサン（2：3）混液 10 mL で溶出する。
- ② 夾雑成分の多い試料では、HPLC 分析においてフルベンジアミド溶出後に移動相を十分に流しカラム内に残存する夾雑物を溶出させた後に、次の分析を行う。

1 1．参考文献

なし

1 2．類型

C