

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 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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