

ジノカップ試験法（農産物）

1. 分析対象化合物

ジノカップ、ジノカップ分解物（2,4-ジニトロ-6-オクチルフェノール（以下、「2,4-DNOP」という。）及び2,6-ジニトロ-4-オクチルフェノール（以下、「2,6-DNOP」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3に示すものを用いる。

1 mol/Lリン酸緩衝液（pH 6.9） リン酸一カリウム68.0 g及びリン酸二ナトリウム71.0 gに水を加えて溶かし、1,000 mLとする。

ジノカップ標準品 本品はジノカップ92%以上を含み、融点は138～140℃である。

4. 試験溶液の調製

1) 抽出

穀類の場合は、試料10.0 gに水20 mLを加え、2時間放置する。果実及び野菜の場合は、試料10.0 gを量り採る。

これにアセトニトリル50 mLを加え、ホモジナイズした後、吸引ろ過する。ろ紙上の残留物をアセトニトリル20 mLで洗浄、ろ過し、ろ液を合わせ、アセトニトリルを加えて正確に100 mLとする。この20 mLを採り、塩化ナトリウム10 g及び1 mol/Lリン酸緩衝液（pH 6.9）20 mLを加え、10分間振とうする。静置した後、分離した水層を捨てる。

2) 精製

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10 mLを注入し、流出液は捨てる。これに1) で得られたアセトニトリル溶液を注入し、さらに、アセトニトリル4 mLを注入して、全溶出液を採り、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。

3) 加水分解

2) で得られた残留物をメタノール2 mLに溶解し、1 mol/L水酸化ナトリウム溶液10 mLを加え、1分間振とうし、30分間放置する。反応液に1.2 mol/L塩酸10 mLを加え、*n*-ヘキサン20 mLずつで2回振とう抽出する。この抽出液に、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。この残留物をメタノールに溶解し、正確に10 mLとしたものを試験溶液とする。

5. 検量線の作成

ジノカップ標準品の100 mg/Lメタノール溶液を調製し、この2 mLを採り、4. 3)と同様の操作を行い、その残留物にメタノールを加えて溶かし、10 mLとし、ジノカップ分解物(2,4-DNOP及び2,6-DNOP)のメタノール溶液とする。これをメタノールで希釈し、ジノカップとして0.002~0.2 mg/Lの標準溶液を数点調製し、それぞれ10 µLをLC/MSに注入する。各異性体の濃度(ジノカップとしての値)を横軸にとり、ピーク高法又はピーク面積法で各異性体毎に検量線を作成する。

各異性体の濃度は、フラグメントイオンが生じない m/z 295の条件で測定して得られた4本の異性体ピークの高さ比又は面積比を各異性体の存在比として算出する。

6. 定量

試験溶液10 µLをLC/MSに注入し、各異性体ピークの高さ又は面積を用いて、5の検量線でジノカップ分解物の各異性体の含量を求め、合算してジノカップの含量を求める。

7. 確認試験

LC/MSにより確認する。

8. 測定条件

LC/MS

カラム：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

カラム温度：40℃

移動相：0.1%ギ酸及びメタノール混液(2:8)を1分間送液した後、(2:8)から(1:9)までの濃度勾配を2分間で行い、(1:9)で17分間送液する。次いで、(1:9)から(2:8)までの濃度勾配を2分間で行い、(2:8)で13分間送液する。

イオン化モード：ESI(-)

主なイオン(m/z)：209、295

保持時間の目安：4本の異性体ピーク9~11分

9. 定量限界

0.01 mg/kg

10. 留意事項

1) 試験法の概要

ジノカップ及びジノカップ分解物(2,4-DNOP及び2,6-DNOP)を試料からアセトニトリルで抽出し、塩析で水を除いた後、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムで精製後、

アルカリで加水分解し、ジノカップをジノカップ分解物に変換する。酸性下でジノカップ分解物を*n*-ヘキサンで抽出し、LC/MSで測定及び確認する方法である。

2) 注意点

- (1) 通常、室温30分間放置の条件で、アルカリ加水分解の反応が完結するが、標準溶液等は、HPLC-UV又はGC/MSを用いて、ジノカップの未反応物が存在していないことを確認する。ジノカップはHPLC-UVで測定可能であり、ジノカップ及びジノカップ分解物はGC/MSでも測定可能であるが、いずれも感度が低いため、残留分析には使用できない。
- (2) ジノカップ分解物の*m/z* 295での測定は、農産物の種類によっては夾雑物ピークのために定量が困難であることから、夾雑物ピークが少ない*m/z* 209 (フラグメントイオン) で測定及び定量を行う。
- (3) ジノカップは異性体 (6種) の混合物である。本測定条件でジノカップ分解物として4本のピークが検出される。ジノカップ分解物の分子量は296.3であり、LC/MS (*m/z* 295) による測定時の異性体ピークの面積比はHPLC-UV (260 nm) による測定時とほぼ等しいが、フラグメントイオンである*m/z* 209で測定した場合は、HPLC-UV (260 nm) 測定による面積比とは異なる。そこで、LC/MS (*m/z* 209) で測定し、異性体ピーク高さ又は面積の総和で定量すると、標準品と残留物の異性体組成比が異なる場合、誤差を生じるおそれがあるため、各異性体毎に定量した値を合計して分析値とする。
- (4) 夾雑物ピークによる妨害が認められた場合は、試験溶液を適宜希釈して測定を行う。

11. 参考文献

- 1) 環境省告示第20号「ジノカップ試験法」 (平成9年4月30日)
- 2) 農薬残留分析法研究班編「最新農薬の残留分析法」p.228-229、中央法規出版 (1995)

12. 類型

C