

## ベンゾビシクロン試験法（農産物）

### 1. 分析対象化合物

ベンゾビシクロン

### 2. 装置

紫外分光光度型検出器付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

次に示すもの以外は、総則の3に示すものを用いる。

スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラム（500 mg） 内径8～9 mmのポリエチレン製のカラム管に、スチレンジビニルベンゼン共重合体500 mg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。

ベンゾビシクロン標準品 本品はベンゾビシクロン99%以上を含み、融点は188～189℃である。

### 4. 試験溶液の調製

#### 1) 抽出

試料10.0 gに0.15 mol/Lリン酸溶液20 mLを加え、2時間放置する。これにアセトニトリル100 mLを加え、30分間振とう抽出した後、ガラス繊維ろ紙を用いて吸引ろ過する。ろ紙上の残留物にアセトニトリル50 mLを加え、振とう及びろ過の操作を繰り返す。得られたろ液を合わせて、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）にアセトニトリル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、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、溶出液に水10 mLを加える。

##### (2) 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)で得られた溶出液を注入し、次いで、酢酸エチル120 mLを注入する。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ン、酢酸及び*n*-ヘキサン（1：0.2：19）混液5 mLに溶かす。

##### (3) シリカゲルカラムクロマトグラフィー

シリカゲルミニカラム (690 mg) にアセトン、酢酸及び*n*-ヘキサン (1 : 0.2 : 19) 混液 5 mLを注入し、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。さらに同混液10 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで、アセトン、酢酸及び*n*-ヘキサン (2 : 0.05 : 3) 混液20 mLを注入し、溶出液を40°C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5 mLに溶かす。

(4) トリメチルアミノ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

トリメチルアミノプロピ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5 mLを注入し、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、アセトニトリル10 mLを注入する。溶出液を40°C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 (1 : 1) 混液に溶かし、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

ベンゾビシクロン標準品の500 mg/Lアセトニトリル溶液を調製し、アセトニトリル及び水 (1 : 1) 混液で希釈し、0.05~1 mg/L溶液を数点調製する。それぞれ20 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20 µLをHPLCに注入し、5の検量線でベンゾビシクロンの含量を求める。

7. 確認試験

LC/MSにより確認する。

8. 測定条件

HPLC

検出器：波長320 nm

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲル、内径 2~6 mm、長さ150~300 mm

カラム温度：40°C

移動相：アセトニトリル、水及びリン酸 (3 : 2 : 0.005) 混液

流量：1 mL/min

保持時間の目安：10~15分

9. 定量限界

0.01mg/kg

10. 留意事項

## 1) 試験法の概要

ベンゾビシクロンを試料から酸性下でアセトニトリル抽出し、スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラム、多孔性ケイソウ土カラム、シリカゲルミニカラム及びトリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムで精製する。HPLC-UVで測定し、LC/MSで確認する方法である。

## 2) 注意点

- (1) 本法は玄米を対象とした試験法である。
- (2) ベンゾビシクロンは加水分解されやすいので、試料は出来るだけ保存しないで直ちに分析すること。

## 11. 参考文献

なし

## 12. 類型

A (環境省告示第31号「ベンゾビシクロン試験法」平成13年4月26日)