

イソウロン、ジウロン、テブチウロン、トリフルムロン、フルオメツロン及びリニュロン 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
イソウロン	イソウロン
ジウロン	ジウロン
テブチウロン	テブチウロン
トリフルムロン	トリフルムロン
フルオメツロン	フルオメツロン
リニュロン	リニュロン

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

次に示すもの以外は、総則の3に示すものを用いる。

グラファイトカーボンミニカラム（500 mg） 内径12～13 mmのポリエチレン製のカラム管に、グラファイトカーボン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

メタノール 高速液体クロマトグラフ用に製造されたもの

イソウロン標準品 本品はイソウロン99%以上を含み、融点は119～120℃である。

ジウロン標準品 本品はジウロン99%以上を含み、融点は158～159℃である。

テブチウロン標準品 本品はテブチウロン98%以上を含み、融点は163℃である。

トリフルムロン標準品 本品はトリフルムロン98%以上を含み、融点は195℃である。

フルオメツロン標準品 本品はフルオメツロン98%以上を含み、融点は163～165℃である。

リニュロン標準品 本品はリニュロン99%以上を含み、融点は93～94℃である。

4. 試験溶液の調製

1) 抽出

(1) 穀類、豆類及び種実類の場合

試料10.0 gを量り採り、水20 mLを加え、2時間放置する。

これにアセトン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、アセトン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ンを加えて正確に200 mLとする。この100 mLを採り、40°C以下で約15 mLに濃縮する。

これに10%塩化ナトリウム溶液100 mLを加え、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (1 : 1) 混液100 mL及び50 mLで2回振とう抽出する。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°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。

この残留物に*n*-ヘキサン50 mLを加え、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル50 mLずつで2回振とう抽出する。抽出液を合わせ、40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物に酢酸エチル5 mLを加えて溶かす。

(2) 果実、野菜、ハーブ、茶及びホップの場合

果実、野菜及びハーブの場合は、試料20.0 gを量り採る。

茶(ジウロンを分析対象とする場合は抹茶)及びホップの場合は試料5.00 gを量り採り、水20 mLを加え、2時間放置する。

これにアセトン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、アセトン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ンを加えて正確に200 mLとする。この100 mLを採り、40°C以下で約15 mLに濃縮する。

これに10%塩化ナトリウム溶液100 mLを加え、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (1 : 1) 混液100 mL及び50 mLで2回振とう抽出する。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°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物に酢酸エチル5 mLを加えて溶かす。

(3) 抹茶以外の茶 (ジウロンを分析対象とする場合)

試料9.00 gに100°Cの水540 mLを加え、室温で5分間放置した後、ろ過する。冷後、ろ液300 mLを採り、飽和酢酸鉛溶液2 mLを加え、振り混ぜた後、吸引ろ過する。ろ紙上の残留物をアセトン及び水 (1 : 1) 混液50 mLで洗い、ろ液をエーテル及び*n*-ヘキサン (1 : 1) 混液100 mLずつで2回振とう抽出する。抽出液を合わせ、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°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物に酢酸エチル5 mLを加えて溶かす。

2) 精製

(1) 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) に酢酸エチル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、さらに、酢酸エチル15 mLを注入し、全溶出液を40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物に酢酸エチル及び*n*-ヘキサン

(1 : 19) 混液5 mLを加えて溶かす。

(2) アミノプロピルシリル化シルカゲルカラムクロマトグラフィー

アミノプロピルシリル化シルカゲルミニカラム (360 mg) に酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (1 : 19) 混液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、流出液は捨てる。さらに、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (1 : 19) 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。この残留物を水及びメタノール (3 : 7) 混液に溶解し、正確に2 mL (穀類、豆類、種実類及び抹茶以外の茶の場合は1 mL、茶及びホップの場合は0.5 mL) としたものを試験溶液とする。

5. 検量線の作成

イソウロン、ジウロン、テブチウロン、トリフルムロン、フルオメツロン及びリニュロン標準品のメタノール溶液を別々に調製し、それらを同一の割合で混合した後、0.1~2 mg/L 水及びメタノール (3 : 7) 混液溶液を数点調製し、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の検量線でイソウロン、ジウロン、テブチウロン、トリフルムロン、フルオメツロン及びリニュ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

1) HPLC

検出器 : UV (ジウロン、テブチウロン、トリフルムロン、フルオメツロン及びリニュロンは波長250 nm、イソウロンは波長220 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 : 水及びメタノール混液 (3 : 2) から (0 : 1) までの濃度勾配を40分間で行う。

保持時間の目安 : テブチウロン16.5分、イソウロン17分、フルオメツロン19分、ジウロン21.5分、リニュロン25分、トリフルムロン32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：水及びメタノール（1：1）混液を8分間送液した後、（1：1）から（0：1）までの濃度勾配を12分間で行い、そのまま5分間送液する。

イオン化モード：ESI

主なイオン（ m/z ）：正イオンモードでは、テブチウロン251又は229、イソウロン234又は212、フルオメツロン255又は233、ジウロン255又は233、リニュロン271又は249、トリフルムロン381又は359。負イオンモードでは、フルオメツロン231、ジウロン231、リニュロン247、トリフルムロン357

注入量：5 μL

保持時間の目安：テブチウロン7.3分、イソウロン7.5分、フルオメツロン9.5分、ジウロン13分、リニュロン17分、トリフルムロン22分

9. 定量限界

何れの農薬も0.02 mg/kg

10. 留意事項

1) 試験法の概要

本法はイソウロン等6農薬（イソウロン、ジウロン、テブチウロン、トリフルムロン、フルオメツロン及びリニュロン）の同時分析法である。これらの農薬を試料からアセトンで抽出し、酢酸エチル及び n -ヘキサン（1：1）混液に転溶する。果実、野菜、ハーブ、茶及びホップはそのまま、穀類、豆類及び種実類はアセトニトリル/ヘキサン分配で脱脂する。グラファイトカーボンミニカラム及びアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムにより精製した後、HPLC-UVで測定し、LC/MSで確認する方法である。

2) 注意点

(1) イソウロンは他の5農薬と測定波長が異なるため、測定は2回に分けて行う。

(2) 精製が不十分な場合は、シリカゲルミニカラム（690 mg）〔試料溶液を負荷した後、 n -ヘキサン10 mLで洗浄し、アセトン及び n -ヘキサン（3：7）混液10 mLで溶出〕やオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム（1,000 mg）〔試料溶液を負荷した後、アセトニトリル及び水（1：4）混液10 mLで洗浄し、アセトニトリル10 mLで溶出〕による精製を追加するとよい。

11. 参考文献

- 1) 厚生省告示第245号「クロルフルアズロン等7農薬の試験法」（平成10年10月12日）
- 2) 厚生労働省・残留農薬等試験法「ノバルロン試験法」（平成16年6月4日）
- 3) 環境庁告示第37号「ジウロン試験法」（昭和59年6月20日）
- 4) 環境庁告示第56号「リニュロン試験法」（昭和57年4月21日）

5) 環境庁告示第21号「イソウロン試験法」(昭和60年3月27日)

12. 類型

C