

ジアフェンチウロン試験法

1. 分析対象化合物

ジアフェンチウロン, ジアフェンチウロン尿素体 [1-*tert*-ブチル-3-(2,6-ジイソプロピル-4-フェノキシフェニル)尿素], ジアフェンチウロンメタンイミドアミド体[1-*tert*-ブチル-3-(2,6-ジイソプロピル-4-フェノキシフェニル)メタンイミドアミド]

2. 装置

アルカリ熱イオン化検出器又は高感度窒素・リン検出器付きガスクロマトグラフ、紫外分光光度型検出器付き高速液体クロマトグラフ、ガスクロマトグラフ・質量分析計及び液体クロマトグラフ・質量分析計を用いる。

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。

0.1 mol/L酢酸緩衝液 (pH 5.0) 0.1 mol/L酢酸ナトリウム溶液に0.1 mol/L酢酸を加えてpH 5.0に調整したもの。

ジアフェンチウロン標準溶液 ジアフェンチウロン10.0 mgにアセトニトリルを加えて200 mLとし、この10 mLを採り、アセトニトリル及び水の混液 (9 : 1) を加えて100 mLとする。

4. 標準品

ジアフェンチウロン標準品 本品はジアフェンチウロン99%以上を含む。

融点 本品の融点は145～148℃である。

1-*tert*-ブチル-3-(2, 6-ジイソプロピル-4-フェノキシフェニル)尿素(以下「尿素体」という。)

標準品 本品は尿素体97%以上を含む。

融点 本品の融点は180～181℃である。

1-*tert*-ブチル-3-(2, 6-ジイソプロピル-4-フェノキシフェニル)メタンイミドアミド(以下「メタンイミドアミド体」という。) 標準品 本品はメタンイミドアミド体97%以上を含む。

融点 本品の融点は126～127℃である。

5. 試験溶液の調製

a ジアフェンチウロン試験溶液

(1) 抽出法

イ 種実類の場合

検体を420 µmの標準網ふるいを通るように粉碎した後、その8.00 gを300 mLの共栓付き褐色三角フラスコに量り採り、30%L-システイン塩酸塩溶液15 mL及び1 mol/L炭酸カリウム溶液15 mLを加え、2時間放置する。

これにアセトニトリル80 mLを加え、30分間振とうした後、ガラス繊維ろ紙を用いて200 mLの褐色三角フラスコ中に吸引ろ過する。ろ紙上の残留物をアセトニトリル30 mLで洗い、洗液をその褐色三角フラスコ中に合わせ、200 mLの共栓付き褐色メスシリンダーに移し、水を加えて200 mLとする。この100 mLを採り、水40 mLを加える。

ロ 果実及び野菜の場合

検体を細切した後、その20.0 gを300 mLの共栓付き褐色三角フラスコに量り採り、30%L-システイン塩酸塩溶液10 mL、1 mol/L炭酸カリウム溶液10 mL及びアセトニトリル80 mLを加え、1分間細砕した後、30分間振とうし、ガラス繊維ろ紙を用いて褐色三角フラスコ中に吸引ろ過する。ろ紙上の残留物をアセトニトリル30 mLで洗い、洗液をその褐色三角フラスコ中に合わせ、200 mLの共栓付き褐色メスシリンダーに移し、水を加えて200 mLとする。この100 mLを採り、水40 mLを加える。

ハ 茶の場合

検体を粉碎した後、その5.00 gを300 mLの共栓付き褐色三角フラスコに量り採り、30%L-システイン塩酸塩溶液10 mL及び1 mol/L炭酸カリウム溶液10 mLを加え、2時間放置する。

これにアセトニトリル80 mLを加え、30分間振とうした後、ガラス繊維ろ紙を用いて褐色三角フラスコ中に吸引ろ過する。ろ紙上の残留物をアセトニトリル30 mLで洗い、洗液をその褐色三角フラスコ中に合わせ、200 mLの共栓付き褐色メスシリンダーに移し、水を加えて200 mLとする。この80 mLを採り、水30 mLを加える。

(2) 精製法

イ 種実類、果実及び野菜の場合

シクロヘキシルシリル化シリカゲルミニカラム (1,000 mg) をアルミホイルで包み遮光したものに、アセトニトリル10 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで水10 mLを注入し、流出液は捨てる。このカラムに(1) 抽出法で得られた溶液を注入し、流出液は捨てる。アセトニトリル及び水の混液 (2 : 3) 10 mLを注入し、流出液は捨てる。次いでアセトニトリル4 mLを注入し、流出液を目盛り付き褐色試験管中に採る。これにアセトニトリルを加え、正確に4 mLとして、これを試験溶液とする。

ロ 茶の場合

シクロヘキシルシリル化シリカゲルミニカラム (2,000 mg) をアルミホイルで包み遮光したものに、アセトニトリル10 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで水10 mLを注入し、流出液は捨てる。このカラムに(1) 抽出法で得られた溶液を注入し、流出液は捨てる。アセトニトリル及び水の混液 (2 : 3) 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の混液（4：1）15 mLを注入し、流出液を採る。これに水15 mLを加える。

アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム（1,000 mg）の下にシクロヘキシルシリル化シリカゲルミニカラム（1,000 mg）を連結する。これにアセトニトリル10 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで水10 mLを注入し、流出液は捨てる。このカラムに上記溶液を注入し、流出液は捨てる。アセトニトリル及び水の混液（2：3）10 mLを注入し、流出液を捨てた後、アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムを分離して捨てる。シクロヘキシルシリル化シリカゲルミニカラムにアセトニトリル及び水の混液（1：1）10 mLを注入し、流出液は捨てる。次いでアセトニトリル4 mLを注入し、流出液は目盛り付き褐色試験管中に採る。これにアセトニトリルを加え、正確に4 mLとして、これを試験溶液とする。

b 尿素体試験溶液

(1) 抽出法

イ 種実類の場合

検体を420 µmの標準網ふるいを通るように粉碎した後、その8.00 gを300 mLの共栓付き褐色三角フラスコに量り採り、30%L-システイン塩酸塩溶液15 mL及び1 mol/L炭酸カリウム溶液15 mLを加え、2時間放置する。

これにアセトニトリル80 mLを加え、30分間振とうした後、ガラス繊維ろ紙を用いて褐色三角フラスコ中に吸引ろ過する。ろ紙上の残留物をアセトニトリル30 mLで洗い、洗液をその褐色三角フラスコ中に合わせ、200 mLの共栓付き褐色メスシリンダーに移し、水を加えて200 mLとする。この100 mLを採り、水40 mLを加える。

ロ 果実及び野菜の場合

検体を細切した後、その20.0 gを300 mLの共栓付き褐色三角フラスコに量り採り、30%L-システイン塩酸塩溶液10 mL、1 mol/L炭酸カリウム溶液10 mL及びアセトニトリル80 mLを加え、1分間細砕した後、30分間振とうし、ガラス繊維ろ紙を用いて褐色三角フラスコ中に吸引ろ過する。ろ紙上の残留物をアセトニトリル30 mLで洗い、洗液をその褐色三角フラスコ中に合わせ、200 mLの共栓付き褐色メスシリンダーに移し、水を加えて200 mLとする。この100 mLを採り、水40 mLを加える。

ハ 茶の場合

検体を粉碎した後、その5.00 gを300 mLの共栓付き褐色三角フラスコに量り採り、30%L-システイン塩酸塩溶液10 mL及び1 mol/L炭酸カリウム溶液10 mLを加え、2時間放置する。

これにアセトニトリル80 mLを加え、30分間振とうした後、ガラス繊維ろ紙を用いて褐色三角フラスコ中に吸引ろ過する。ろ紙上の残留物をアセトニトリル30 mLで洗い、洗液をその褐色三角フラスコ中に合わせ、200 mLの共栓付き褐色メスシリンダーに移し、水を加えて200 mLとする。この80 mLを採り、水30 mLを加える。

(2) 精製法

イ 種実類の場合

シクロヘキシルシリル化シリカゲルミニカラム (1,000 mg) をアルミホイルで包み遮光したものに、アセトニトリル10 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで水10 mLを注入し、流出液は捨てる。このカラムに(1) 抽出法で得られた溶液を注入し、流出液は捨てる。アセトニトリル及び水の混液 (2 : 3) 10 mLを注入し、流出液は捨てる。次いでアセトニトリル4 mLを注入し、流出液を目盛り付き褐色試験管中に採る。これにアセトニトリルを加え、4 mLとする。この溶液の3 mLを褐色すり合わせ減圧濃縮器中に採り、2%ジエチレングリコールのアセトン溶液0.5 mLを加え、40°C以下でアセトニトリルを除去する。この残留物にエーテル及び*n*-ヘキサンの混液 (3 : 17) 2 mLを加えて溶かす。

シリカゲルミニカラム (遮光、690 mg) に、*n*-ヘキサン5 mLを注入し、流出液は捨てる。このカラムに上記溶液を注入し、流出液は捨てる。エーテル及び*n*-ヘキサンの混液 (3 : 17) 8 mLを注入し、流出液は捨てる。このカラムの下にあらかじめ*n*-ヘキサン5 mLを注入し、流出液を捨てたアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム (360 mg) を連結する。次いでエーテル及び*n*-ヘキサンの混液 (2 : 3) 20 mLをシリカゲルミニカラムに注入し、流出液をすり合わせ減圧濃縮器中に採り、40°C以下でエーテル及び*n*-ヘキサンを除去する。この残留物にアセトニトリルを加えて溶かし、正確に2 mLとして、試験溶液とする。試験溶液調製後は速やかに測定する。

ロ 果実及び野菜の場合

シクロヘキシルシリル化シリカゲルミニカラム (遮光、1,000 mg) にアセトニトリル10 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで水10 mLを注入し、流出液は捨てる。このカラムに(1) 抽出法で得られた溶液を注入し、流出液は捨てる。アセトニトリル及び水の混液 (2 : 3) 10 mLを注入し、流出液は捨てる。次いでアセトニトリル4 mLを注入し、流出液を目盛り付き褐色試験管中に採る。これにアセトニトリルを加え、4 mLとする。この溶液の2 mLを褐色すり合わせ減圧濃縮器中に採り、2%ジエチレングリコールのアセトン溶液0.5 mLを加え、40°C以下でアセトニトリルを除去する。この残留物にエーテル及び*n*-ヘキサンの混液 (3 : 17) 2 mLを加えて溶かす。

シリカゲルミニカラム (遮光、690 mg) に、*n*-ヘキサン5 mLを注入し、流出液は捨てる。このカラムに上記溶液を注入し、流出液は捨てる。エーテル及び*n*-ヘキサンの混液 (3 : 17) 8 mLを注入し、流出液は捨てる。このカラムの下に、あらかじめ*n*-ヘキサン5 mLを注入し、流出液を捨てたアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム (360 mg) を連結する。次いでエーテル及び*n*-ヘキサンの混液 (2 : 3) 20 mLをシリカゲルミニカラムに注入し、流出液を褐色すり合わせ減圧濃縮器中に採り、40°C以下でエーテル及び*n*-ヘキサンを除去する。この残留物にアセトニトリルを加えて溶かし、正確に2 mLとして、試験溶液とする。試験溶液調製後は速やかに測定する。

ハ 茶の場合

シクロヘキシルシリル化シリカゲルミニカラム（遮光、2,000 mg）にアセトニトリル10 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで水10 mLを注入し、流出液は捨てる。このカラムに(1) 抽出法で得られた溶液を注入し、流出液は捨てる。アセトニトリル及び水の混液（2：3）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の混液（4：1）15 mLを注入し、流出液を採る。これに水15 mLを加える。

アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム（遮光、1,000 mg）の下にシクロヘキシルシリル化シリカゲルミニカラム（遮光、1,000 mg）を連結する。これにアセトニトリル10 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで水10 mLを注入し、流出液は捨てる。このカラムに上記溶液を注入し、流出液は捨てる。アセトニトリル及び水の混液（2：3）10 mLを注入し、流出液を捨てた後、アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムを分離して捨てる。シクロヘキシルシリル化シリカゲルミニカラムにアセトニトリル及び水の混液（1：1）10 mLを注入し、流出液は捨てる。次いでアセトニトリル4 mLを注入し、流出液を目盛り付き褐色試験管中に採る。これにアセトニトリルを加え、正確に4 mLとする。この溶液の2 mLを褐色すり合わせ減圧濃縮器中に採り、2%ジエチレングリコールのアセトン溶液0.5 mLを加え、40°C以下でアセトニトリルを除去する。この残留物にエーテル及び*n*-ヘキサンの混液（3：17）2 mLを加えて溶かす。

シリカゲルミニカラム（遮光、690 mg）に、*n*-ヘキサン5 mLを注入し、流出液は捨てる。このカラムに上記溶液を注入し、流出液は捨てる。エーテル及び*n*-ヘキサンの混液（3：17）8 mLを注入し、流出液は捨てる。このカラムの下に、あらかじめ*n*-ヘキサン5 mLを注入し、流出液を捨てたアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム（360 mg）を連結する。次いでエーテル及び*n*-ヘキサンの混液（2：3）20 mLをシリカゲルミニカラムに注入し、流出液をすり合わせ減圧濃縮器中に採り、40°C以下でエーテル及び*n*-ヘキサンを除去する。この残留物にアセトニトリルを加えて溶かし、正確に2 mLとして、試験溶液とする。試験溶液調製後は速やかに測定する。

c メタンイミドアミド体試験溶液

(1) 抽出法

イ 種実類の場合

検体を420 µmの標準網ふるいを通るように粉碎した後、その8.00 gを300 mLの共栓付き褐色三角フラスコに量り採り、30%L-システイン塩酸塩溶液15 mL及び1 mol/L炭酸カリウム溶液15 mLを加え、2時間放置する。

これにアセトニトリル80 mLを加え、30分間振とうした後、ガラス繊維ろ紙を用いて褐色三角フラスコ中に吸引ろ過する。ろ紙上の残留物をアセトニトリル30 mLで洗い、洗液をその褐色三角フラスコ中に合わせ、200 mLの共栓付き褐色メスシリンダーに移し、水を加えて200 mLとする。この100 mLを採り、水40 mLを加える。

ロ 果実及び野菜の場合

検体を細切した後、その20.0 gを300 mLの共栓付き褐色三角フラスコに量り採り、30%L-システイン塩酸塩溶液10 mL、1 mol/L炭酸カリウム溶液10 mL及びアセトニトリル80 mLを加え、1分間細砕した後、30分間振とうし、ガラス繊維ろ紙を用いて褐色三角フラスコ中に吸引ろ過する。ろ紙上の残留物をアセトニトリル30 mLで洗い、ろ液をその褐色三角フラスコ中に合わせ、200 mLの共栓付き褐色メスシリンダーに移し、水を加えて200 mLとする。この100 mLを採り、水40 mLを加える。

ハ 茶の場合

検体を粉碎した後、その5.00 gを300 mLの共栓付き褐色三角フラスコに量り採り、30%L-システイン塩酸塩溶液10 mL及び1 mol/L炭酸カリウム溶液10 mLを加え、2時間放置する。

これにアセトニトリル80 mLを加え、30分間振とうした後、ガラス繊維ろ紙を用いて褐色三角フラスコ中に吸引ろ過する。ろ紙上の残留物をアセトニトリル30 mLで洗い、洗液をその褐色三角フラスコ中に合わせ、200 mLの共栓付き褐色メスシリンダーに移し、水を加えて200 mLとする。この80 mLを採り、水30 mLを加える。

(2) 精製法

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム（遮光、1,000 mg）に、アセトニトリル10 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで水10 mLを注入し、流出液は捨てる。このカラムに(1) 抽出法で得られた溶液を注入し、流出液は捨てる。水30 mLを注入し、流出液は捨てる。アセトニトリル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0.1 mol/L酢酸緩衝液（pH 5.0）の混液（4 : 1）20 mLを注入し、流出液を100 mLの三角フラスコに採る。

この流出液を5%塩化ナトリウム溶液100 mL、次いで酢酸エチル及び*n*-ヘキサンの混液（1 : 1）50 mLで300 mLの分液漏斗に移し、振とう機を用いて5分間激しく振り混ぜた後、静置し、酢酸エチル及び*n*-ヘキサンの層を200 mLの三角フラスコに移す。水層に酢酸エチル及び*n*-ヘキサンの混液（1 : 1）50 mLを加え、上記と同様に操作して、酢酸エチル及び*n*-ヘキサンの層を上記の三角フラスコに合わせる。これに適量の無水硫酸ナトリウムを加え、時々振り混ぜながら15分間放置した後、すり合わせ減圧濃縮器中にろ過する。次いで酢酸エチル及び*n*-ヘキサンの混液（1 : 1）20 mLを用いて三角フラスコを洗い、その洗液でろ紙上の残留物を洗う操作を2回繰り返す。両洗液をその減圧濃縮器中に合わせ、2%ジエチレングリコールのアセトン溶液0.5 mLを加え、40℃以下で酢酸エチル及び*n*-ヘキサンを除去する。この残留物にアセトンを加えて溶かし、正確に3 mLとする。

6. 操作法

a 定性試験

(1) ジアフェンチウロンの試験を行う場合

紫外分光光度型検出器付き高速液体クロマトグラフを用いて、次の操作条件で試験を行う。試験結果はジアフェンチウロン標準溶液と一致しなければならない。

操作条件

カラム充てん剤 オクタデシルシリル化シリカゲル（粒径5 µm、細孔径30 nm）を用いる。

クロマトグラフ管 内径6 mm、長さ150 mmのステンレス管を用いる。

カラム温度 40°C

検出器 波長256 nmで操作する。

移動相 アセトニトリル、水及びメタノールの混液（2：2：1）を用いる。ジアフェンチウロンが約32分で流出する流速に調整する。

(2) 尿素体の試験を行う場合

紫外分光光度型検出器付き高速液体クロマトグラフを用いて、次の操作条件で試験を行う。試験結果は標準品と一致しなければならない。

操作条件

カラム充てん剤 オクタデシルシリル化シリカゲル（粒径5 µm）を用いる。

クロマトグラフ管 内径6 mm、長さ150 mmのステンレス管を用いる。

カラム温度 40°C

検出器 波長235 nmで操作する。

移動相 アセトニトリル、水及びメタノールの混液（2：2：1）を用いる。尿素体が約20分で流出する流速に調整する。

(3) メタンイミドアミド体の試験を行う場合

アルカリ熱イオン化検出器又は高感度窒素・リン検出器付きガスクロマトグラフを用いて、次の操作条件で試験を行う。試験結果は標準品と一致しなければならない。

操作条件

カラム 内径0.25 mm、長さ30 mのケイ酸ガラス製の細管に、ガスクロマトグラフィ用50%フェニル-メチルシリコンを0.25 mmの厚さでコーティングしたもの。

カラム温度 100°Cで1分間保持し、その後毎分30°Cで昇温し、280°Cに到達後4分間保持する。

試験溶液注入口温度 250°C

検出器 280°Cで操作する。

ガス流量 キャリヤーガスとしてヘリウムを用いる。メタンイミドアミド体が約10分で流出する流速に調整する。空気及び水素の流量を至適条件に調整する。

b 定量試験

a 定性試験と同様の操作条件で得られた試験結果に基づき、ジアフェンチウロン、尿素体及びメタンイミドアミド体についてピーク高法又はピーク面積法により

定量を行い、それぞれの含量を求め、次式により尿素体及びメタンイミドアミド体を含むジアフェンチウロンの含量を求める。

ジアフェンチウロンの含量（尿素体及びメタンイミドアミド体を含む。）=A+B×1.04+C×1.09

A：ジアフェンチウロンの含量（ppm）

B：尿素体の含量（ppm）

C：メタンイミドアミド体の含量（ppm）

c 確認試験

ジアフェンチウロン及び尿素体の試験溶液について、a 定性試験と同様の操作条件で液体クロマトグラフィー・質量分析を行う。試験結果は標準品と一致しなければならない。また、必要に応じ、ピーク高法又はピーク面積法により定量を行う。

メタンイミドアミド体の試験溶液について、a 定性試験と同様の操作条件でガスクロマトグラフィー・質量分析を行う。試験結果は標準品と一致しなければならない。また、必要に応じ、ピーク高法又はピーク面積法により定量を行う。

7. 定量限界

野菜・果実0.02 mg/kg、種実0.04 mg/kg、茶0.2 mg/kg

8. 留意事項

1) 分析値

ジアフェンチウロンは、ジアフェンチウロン並びに尿素体及びメタンイミドアミド体のそれぞれについて定量を行い、尿素体及びメタンイミドアミド体についてはその含量に係数を乗じてジアフェンチウロンの含量に換算し、これらの和を分析値とすること。

2) ジアフェンチウロンは光及び水中で非常に不安定であり、試験は一部遮光条件下で行うとともに、ロータリーエバポレーターの使用は厳禁であること。また磨砕、細切に関わらず冷凍保存した試料を解凍した後は、再度試験試料に供することはできないこと。磨砕試料中の本薬は経時的に分解が進むため、抽出直前にホモジナイズを行うこと。尿素体及びメタンイミドアミド体の試験溶液は安定であるが、作物によっては本薬の試験溶液は不安定であり、調製後は冷蔵庫に保存し、速やかに測定することが望ましいこと。

9. 参考文献

なし

10. 類型

A