

フルベンジアミド試験法（農産物）

1. 分析対象化合物

フルベンジアミド

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。

フルベンジアミド標準品 本品はフルベンジアミド98%以上を含み、融点は217～221℃である。

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。豆類の場合は試料10.0 g、茶の場合は試料5.00 gにそれぞれ水20 mLを加え、2時間放置する。

これにアセトニトリル及び水（4：1）混液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、アセトニトリル及び水（4：1）混液50 mLを加えてホモジナイズし、上記と同様にろ過する。得られたろ液を合わせて40℃以下で約18 mLまで濃縮する。

2) 精製

(1) 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) で得られた溶液を注入し、5分間放置する。次いで、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（1：4）混液100 mLを注入し、溶出液を40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物にアセトニトリル1 mLを加えて溶かし、さらに、水4 mLを加え混合する。

(2) オクタデシルシリル化シリカゲルカラムクロマトグラフィー

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム（1,000 mg）にアセトニトリル及び水各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、溶出液を40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物に酢酸エチル1 mLを加えて溶かし、さらに、*n*-ヘキサン4 mLを加え混合する。

(3) グラファイトカーボン/アミノプロピルシリル化シリカゲル積層カラムクロマトグラフィー

グラファイトカーボン/アミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム (500 mg/500 mg) にアセトン及び*n*-ヘキサン各10 mLを順次注入し、各流出液は捨てる。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、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (3 : 7) 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15 mLを注入し、溶出液を40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物にアセトン及び*n*-ヘキサン (1 : 19) 混液5 mLを加えて溶かす。

(4) 合成ケイ酸マグネシウムカラムクロマトグラフィー

合成ケイ酸マグネシウムミニカラム (900 mg) にアセトン5 mL及び*n*-ヘキサン10 mLを順次注入し、各流出液は捨てる。このカラムに (3) で得られた溶液を注入し、流出液は捨てる。さらに、アセトン及び*n*-ヘキサン (3 : 17) 混液10 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで、アセトン及び*n*-ヘキサン (2 : 3) 混液10 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及び水 (7 : 3) 混液に溶解し、正確に4 mL (豆類の場合は2 mL、茶の場合は5 mL) としたものを試験溶液とする。

5. 検量線の作成

フルベンジアミド標準品の0.05~1.0 mg/Lを含むアセトニトリル及び水 (7 : 3) 混液の標準溶液を数点調製し、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の検量線でフルベンジアミドの含量を求める。

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 (波長256 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°C

移動相 : アセトニトリル及び水 (13 : 7) 混液

注入量 : 40 µL

保持時間の目安 : 8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 2.1 mm、長さ 150 mm

移動相：アセトニトリル、酢酸及び水（65 : 0.1 : 35）混液

イオン化モード：ESI（－）

主なイオン（ m/z ）：681 注入量：5 μL

保持時間の目安：6分

9. 定量限界

0.01 mg/kg（茶の場合は0.05 mg/kg）

10. 留意事項

1) 試験法の概要

フルベンジアミドを試料からアセトニトリル及び水（4 : 1）混液で抽出し、多孔性ケイソウ土カラム、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム、グラファイトカーボン/アミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム及び合成ケイ酸マグネシウムミニカラムで精製した後、HPLC-UVで定量し、LC/MSで確認する方法である。

2) 注意点

- (1) 精製が不十分な場合は、シリカゲルミニカラム（690 mg）による精製を追加するとよい。操作概要： 残留物を酢酸エチル及び n -ヘキサン（1 : 9）混液5 mLに溶解し、カラムに負荷した後、酢酸エチル及び n -ヘキサン（3 : 7）混液5 mLで洗浄、酢酸エチル及び n -ヘキサン（2 : 3）混液10 mLで溶出する。
- (2) 夾雑成分の多い試料では、HPLC分析においてフルベンジアミド溶出後に移動相を十分に流しカラム内に残存する夾雑物を溶出させた後に、次の分析を行う。

11. 参考文献

なし

12. 類型

C