

## クロルフルアズロン、ジフルベンズロン、テブフェノジド、テフルベンズロン、フルフェノクスロン、ヘキサフルムロン及びルフェヌロン試験法

### 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
クロルフルアズロン	クロルフルアズロン
ジフルベンズロン	ジフルベンズロン
テブフェノジド	テブフェノジド
テフルベンズロン	テフルベンズロン
フルフェノクスロン	フルフェノクスロン
ヘキサフルムロン	ヘキサフルムロン
ルフェヌロン	ルフェヌロン

### 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。

カラムクロマトグラフィー用シリカゲル カラムクロマトグラフィー用に製造したシリカゲル（粒径63～200 μm）を130℃で12時間以上加熱した後、デシケーター中で放冷する。これに対して水5%を加える。

凝固液 塩化アンモニウム2 g及びリン酸4 mLに水を加えて400 mLとする。

### 4. 標準品

クロルフルアズロン 本品はクロルフルアズロン99%以上を含む。

融点 本品の融点は228℃である。

ジフルベンズロン 本品はジフルベンズロン99%以上を含む。

融点 本品の融点は230～232℃である。

テブフェノジド 本品はテブフェノジド99%以上を含む。

融点 本品の融点は191℃である。

テフルベンズロン 本品はテフルベンズロン98%以上を含む。

融点 本品の融点は219～222℃である。

フルフェノクスロン 本品はフルフェノクスロン99%以上を含む。

融点 本品の融点は169～172℃である。

ヘキサフルムロン 本品はヘキサフルムロン97%以上を含む。

融点 本品の融点は202～205℃である。

ルフェヌロン 本品はルフェヌロン99%以上を含む。

融点 本品の融点は165～168℃である。

## 5. 試験溶液の調製

### a 抽出法

#### (1) 穀類、豆類及び種実類の場合

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、3分間細砕した後、ケイソウ土を1 cmの厚さに敷いたろ紙を用いてすり合わせ減圧濃縮器中に吸引ろ過する。ろ紙上の残留物を採り、アセトン50 mLを加え、3分間細砕した後、上記と同様に操作して、ろ液をその減圧濃縮器中に合わせ、40℃以下で約30 mLに濃縮する。

これをあらかじめ10%塩化ナトリウム溶液100 mLを入れた300 mLの分液漏斗に移す。*n*-ヘキサン100 mLを用いて上記の減圧濃縮器のナス型フラスコを洗い、洗液を上記の分液漏斗に合わせる。振とう機を用いて5分間激しく振り混ぜた後、静置し、*n*-ヘキサン層を300 mLの三角フラスコに移す。水層に*n*-ヘキサン50 mLを加え、上記と同様に操作して、*n*-ヘキサン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*n*-ヘキサン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、40℃以下で*n*-ヘキサンを除去する。

この残留物に*n*-ヘキサン30 mLを加え、100 mLの分液漏斗に移す。これに*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル30 mLを加え、振とう機を用いて5分間激しく振り混ぜた後、静置し、アセトニトリル層をすり合わせ減圧濃縮器中に移す。*n*-ヘキサン層に*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル30 mLを加え、上記と同様の操作を2回繰り返す。アセトニトリル層をその減圧濃縮器中に合わせ、40℃以下でアセトニトリルを除去する。この残留物に酢酸エチル及び*n*-ヘキサンの混液(1:9) 5 mLを加えて溶かす。

#### (2) 果実及び野菜の場合

検体約1 kgを精密に量り、必要に応じ適量の水を量つて加え、細切均一化した後、検体20.0 gに相当する量を量り採る。

これにアセトン100 mLを加え、3分間細砕した後、ケイソウ土を1 cmの厚さに敷いたろ紙を用いてすり合わせ減圧濃縮器中に吸引ろ過する。ろ紙上の残留物を採り、アセトン50

mLを加え、3分間細砕した後、上記と同様に操作して、ろ液をその減圧濃縮器中に合わせ、40℃以下で約30 mLに濃縮する。

これをあらかじめ10%塩化ナトリウム溶液100 mLを入れた300 mLの分液漏斗に移す。*n*-ヘキサン100 mLを用いて上記の減圧濃縮器のナス型フラスコを洗い、洗液を上記の分液漏斗に合わせる。振とう機を用いて5分間激しく振り混ぜた後、静置し、*n*-ヘキサン層を300 mLの三角フラスコに移す。水層に*n*-ヘキサン50 mLを加え、上記と同様に操作して、*n*-ヘキサン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*n*-ヘキサン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、40℃以下で*n*-ヘキサンを除去する。この残留物に酢酸エチル及び*n*-ヘキサンの混液（1：9）5 mLを加えて溶かす。

### (3) 抹茶の場合

検体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、3分間細砕した後、ケイソウ土を1 cmの厚さに敷いたろ紙を用いてすり合わせ減圧濃縮器中に吸引ろ過する。ろ紙上の残留物を採り、アセトン50 mLを加え、3分間細砕した後、上記と同様に操作して、ろ液をその減圧濃縮器中に合わせ、40℃以下で約30 mLに濃縮する。

これをあらかじめ10%塩化ナトリウム溶液100 mLを入れた300 mLの分液漏斗に移す。*n*-ヘキサン100 mLを用いて上記の減圧濃縮器のナス型フラスコを洗い、洗液を上記の分液漏斗に合わせる。振とう機を用いて5分間激しく振り混ぜた後、静置し、*n*-ヘキサン層を300 mLの三角フラスコに移す。水層に*n*-ヘキサン50 mLを加え、上記と同様に操作して、*n*-ヘキサン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*n*-ヘキサン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、40℃以下で*n*-ヘキサンを除去する。

この残留物にアセトン50 mLを加えて溶かし、凝固液50 mL及びケイソウ土2 gを加え、時々振り混ぜながら5分間放置し、ケイソウ土を1 cmの厚さに敷いたろ紙を用いて吸引ろ過し、ろ液を300 mLの分液漏斗に移す。アセトン及び凝固液の混液（1：1）25 mLを用いて上記の減圧濃縮器のナス型フラスコを洗い、その洗液でろ紙上の残留物を洗う操作を2回繰り返す。両洗液を上記の分液漏斗に合わせる。これに塩化ナトリウム10 g及び*n*-ヘキサン50 mLを加え、振とう機を用いて5分間激しく振り混ぜた後、静置し、*n*-ヘキサン層を200 mLの三角フラスコに移す。水層に*n*-ヘキサン50 mLを加え、上記と同様に操作して、*n*-ヘキサン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*n*-ヘキサン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、40℃以下で*n*-ヘキサンを除去する。この残留物に酢酸エチル及び*n*-ヘキサンの混液（1：9）5 mLを加えて溶かす。

#### (4) 抹茶以外の茶の場合

検体9.00 gを100℃の水540 mLに浸し、室温で5分間放置した後、ろ過し、冷後ろ液360 mLを1,000 mLの三角フラスコに移す。これにアセトン100 mL及び飽和酢酸鉛溶液2 mLを加え、室温で1時間放置した後、ケイソウ土を1 cmの厚さに敷いたろ紙を用いて吸引ろ過し、ろ液を1,000 mLの分液漏斗に移す。次いでアセトン及び水の混液（1：1）25 mLを用いて上記の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。洗液を上記の分液漏斗に合わせる。

これに塩化ナトリウム30 g及び*n*-ヘキサン100 mLを加え、振とう機を用いて5分間激しく振り混ぜた後、静置し、*n*-ヘキサン層を300 mLの三角フラスコに移す。水層に*n*-ヘキサン100 mLを加え、上記と同様に操作して、*n*-ヘキサン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*n*-ヘキサン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、40℃以下で*n*-ヘキサンを除去する。この残留物に酢酸エチル及び*n*-ヘキサンの混液（1：9）5 mLを加えて溶かす。

#### b 精製法

##### (1) シリカゲルカラムクロマトグラフィー

内径15 mm、長さ300 mmのクロマトグラフ管に、カラムクロマトグラフィー用シリカゲル5 gを*n*-ヘキサンに懸濁したもの、次いでその上に無水硫酸ナトリウム約5 gを入れ、カラムの上端に少量の*n*-ヘキサンが残る程度まで*n*-ヘキサンを流出させる。このカラムに a 抽出法で得られた溶液を注入した後、酢酸エチル及び*n*-ヘキサンの混液（1：9）50 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで酢酸エチル及び*n*-ヘキサンの混液（3：17）125 mLを注入し、流出液をすり合わせ減圧濃縮器中に採り、40℃以下で酢酸エチル及び*n*-ヘキサンを除去する。この残留物にエーテル及び*n*-ヘキサンの混液（3：7）を加えて溶かし、正確に8 mLとする。

##### (2) 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

アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム（500 mg）にエーテル及び*n*-ヘキサンの混液（3：7）10 mLを注入し、流出液は捨てる。このカラムに(1) シリカゲルカラムクロマトグラフィーで得られた溶液2 mLを注入した後、エーテル及び*n*-ヘキサンの混液（3：7）10 mLを注入し、流出液は捨てる。次いでアセトン及び*n*-ヘキサンの混液（3：17）12 mLを注入し、流出液をすり合わせ減圧濃縮器中に採り、40℃以下でアセトン及び*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1 mLとして、これを試験溶液とする。

## 6. 操作法

### a 定性試験

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4~4.6 mm, 長さ250 mmのステンレス管を用いる。

カラム温度 40℃

検出器 波長250 nmで操作する。

移動相 アセトニトリル及び水の混液（7：3）を用いる。ジフルベンズロンが約7分で流出する流速に調整する。

### 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、ピーク高法又はピーク面積法により定量を行う。

### c 確認試験

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。

## 7. 定量限界

クロルフルアズロン 0.05 mg/kg（茶にあっては0.1 mg/kg）

ジフルベンズロン 0.05 mg/kg（茶にあっては0.1 mg/kg）

テブフェノジド 0.05 mg/kg（茶にあっては0.1 mg/kg）

テフルベンズロン 0.02 mg/kg（綿実にあっては0.05 mg/kg、茶にあっては0.1 mg/kg）

フルフェノクスロン 0.02 mg/kg（茶にあっては0.1 mg/kg）

ヘキサフルムロン 0.02 mg/kg（茶にあっては0.1 mg/kg）

ルフェヌロン 0.02 mg/kg（茶にあっては0.1 mg/kg）

## 8. 留意事項

なし

## 9. 参考文献

なし

## 10. 類型

A