

イミベンコナゾール試験法

1. 分析対象化合物

イミベンコナゾール、イミベンコナゾール脱ベンジル体 [2, 4-ジクロロ-2-(1, 2, 4-トリアゾール-1-イル) アセトアニリド]、2, 4-ジクロロアニリン

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及びガスクロマトグラフ・質量分析計を用いる。

3. 試薬、試液

総則の3に示すものを用いる。

4. 標準品

イミベンコナゾール 本品はイミベンコナゾール99%以上を含む。

融点 本品の融点は89.5～90℃である。

2, 4-ジクロロアニリン 本品は2, 4-ジクロロアニリン99%以上を含む。

融点 本品の融点は63℃である。

2, 4-ジクロロ-2-(1, 2, 4-トリアゾール-1-イル) アセトアニリド (以下「イミベンコナゾール脱ベンジル体」という。) 本品はイミベンコナゾール脱ベンジル体99%以上を含む。

融点 本品の融点は178～180℃である。

5. 試験溶液の調製

a 抽出法

(1) 豆類の場合

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及び2～10%炭酸水素ナトリウム溶液8 mLを加えてpH 8に調整し、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。酢酸エチル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、酢酸エチル層を500 mLの三角フラスコに移す。水層に酢酸エチル50 mLを加え、上記と同様に操作して、酢酸エチル層を上記の三角フラスコに合わせる。水層に6 mol/L塩酸1～3 mLを加え、pH 1

に調整した後、室温で1時間放置する。これに1 mol/L水酸化ナトリウム溶液5~20 mLを加えてpH 8に調整する。酢酸エチル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、酢酸エチル層を上記の三角フラスコに合わせる。水層に酢酸エチル30 mLを加え、上記と同様に操作して酢酸エチル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、1%ジエチレングリコールアセトン溶液1 mLを加え、40℃以下で酢酸エチルを除去する。

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*n*-ヘキサン5 mLを加えて溶かす。

(2) 果実の場合

検体約1 kgを精密に量り、2~10%炭酸水素ナトリウム溶液400 mLを加え、細切均一化した後、pH 8に調整する。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。酢酸エチル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、酢酸エチル層を500 mLの三角フラスコに移す。水層に酢酸エチル50 mLを加え、上記と同様に操作して、酢酸エチル層を上記の三角フラスコに合わせる。水層に6 mol/L塩酸1~3 mLを加え、pH 1に調整した後、室温で1時間放置する。これに1 mol/L水酸化ナトリウム溶液5~20 mLを加えてpH 8に調整する。酢酸エチル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、酢酸エチル層を上記の三角フラスコに合わせる。水層に酢酸エチル30 mLを加え、上記と同様の操作を繰り返す、酢酸エチル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℃以下で酢酸エチルを除去する。この残留物に*n*-ヘキサン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、2～10%炭酸水素ナトリウム溶液20 mLを加えてpH 8に調整した後、2時間放置する。これにメタノール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500 mLの三角フラスコ中に吸引ろ過する。ろ紙上の残留物を採り、メタノール50 mLを加え、3分間細砕した後、上記と同様に操作して、ろ液をその三角フラスコ中に合わせる。

これを500 mLの分液漏斗に移す。水150 mL及びジクロロメタン100 mLを用いて上記の三角フラスコを洗い、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、ジクロロメタン層を500 mLの三角フラスコに移す。水層にジクロロメタン50 mLを加え、上記と同様に操作して、ジクロロメタン層を上記の三角フラスコに合わせる。水層に6 mol/L塩酸1～3 mLを加え、pH 1に調整した後、室温で1時間放置する。これに1 mol/L水酸化ナトリウム溶液5～20 mLを加え、pH 8に調整する。次いでジクロロメタン60 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、ジクロロメタン層を上記三角フラスコに合わせる。水層にジクロロメタン30 mLを加え、上記と同様の操作を繰り返し、ジクロロメタ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。次いでジクロロメタン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、1%ジエチレングリコールアセトン溶液1 mLを加え、40℃以下でジクロロメタンを除去する。この残留物にアセトン及び*n*-ヘキサンの混液(1:19) 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500 mLの分液漏斗に移す。これに塩化ナトリウム12 g、アセトン6 mL及び酢酸エチル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、酢酸エチル層を300 mLの三角フラスコに移す。水層に酢酸エチル50 mLを加え、上記と同様に操作して、酢酸エチル層を上記の三角フラスコに合わせる。水層に6 mol/L塩酸1～3 mLを加え、pH 1に調整した後、室温で1時間放置する。これに1 mol/L水酸化ナトリウム溶液5～20 mLを加え、pH 8に調整する。次いで酢酸エチル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、酢酸エチル層を上記の三角フラスコに合わせる。水層に酢酸エチル30 mLを加え、上記と同様の操作を繰り返し、酢酸エチル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、1%ジエチレングリコールアセトン溶液1 mLを加え、40℃以下で酢酸エチルを除去する。この残留物に*n*-ヘキサン5 mLを加えて溶かす。

b 精製法

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合成ケイ酸マグネシウム10 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、アセトン及び*n*-ヘキサンの混液(1:19) 100 mLを注入し、流出液をすり合わせ減圧濃縮器 (I) 中に採り、1%ジエチレングリコールアセトン溶液1 mLを加える。次いでアセトン及び*n*-ヘキサンの混液(1:1) 120 mLを注入し、流出液をすり合わせ減圧濃縮器 (II) 中に採り、それぞれ40°C以下でアセトン及び*n*-ヘキサンを除去する。すり合わせ減圧濃縮器 (I) 中に採った流出液の残留物にアセトンを加えて溶かし、正確に4 mLとして、これを2, 4-ジクロロアニリンの試験溶液とする。すり合わせ減圧濃縮器 (II) 中に採った流出液の残留物について上記と同様に操作し、これをイミベンコナゾール及びイミベンコナゾール脱ベンジル体試験の試験溶液とする。

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 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ー用50%トリフルオロプロピル-メチルシリコンを0.25 μmの厚さでコーティングしたもの。

カラム温度 80°Cで1分間保持し、その後毎分20°Cで昇温し、250°Cに到達後毎分10°Cで昇温し、300°Cに到達後4分間保持する。

試験溶液注入口温度 250°C

注入方式 スプリットレス

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。イミベンコナゾールが約16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、イミベンコナゾール、イミベンコナゾール脱ベンジル体及び2, 4-ジクロロアニリンのそれぞれ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、イミベンコナゾール、イミベンコナゾール脱ベンジル体及び2, 4-ジクロロアニリンの含量を求め、次式により、イミベンコナゾール脱ベンジル体及び2, 4-ジクロロアニリンを含むイミベンコナゾールの含量を求める。

イミベンコナゾール (イミベンコナゾール脱ベンジル体及び2, 4-ジクロロアニリンを含む。) の含量 (ppm) = A + B × 1.52 + C × 2.54

A : イミベンコナゾールの含量 (ppm)

B : イミベンコナゾール脱ベンジル体の含量 (ppm)

C : 2, 4-ジクロロアニリンの含量 (ppm)

c 確認試験

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

0.01 mg/kg (抹茶にあっては0.05 mg/kg)

8. 留意事項

イミベンコナゾールは、イミベンコナゾール、イミベンコナゾール脱ベンジル体及び2,4-ジクロロアニリンのそれぞれについて定量を行い、イミベンコナゾール脱ベンジル体及び2,4-ジクロロアニリンについてはそれぞれの含量に係数を乗じてイミベンコナゾールの含量に換算し、これらの和を分析値とすること。

9. 参考文献

なし

10. 類型

A