

## ノバルロン試験法

### 1. 分析対象化合物

ノバルロン

### 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。

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

ノバルロン標準品 本品はノバルロン99%以上を含み、融点は176~178℃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℃以下で約15 mLまで濃縮する。これに10%塩化ナトリウム溶液100 mLを加え、*n*-ヘキサン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℃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℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物に*n*-ヘキサン5 mLを加えて溶かす。

##### (2) 果実及び野菜の場合

試料20.0 g 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℃以下で約15 mLまで濃縮する。これに10%塩化ナトリウム溶液100 mLを加え、*n*-ヘキサン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℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物に*n*-ヘキサン5 mLを加えて溶かす。

## 2) 精製

### (1) 活性炭カラムクロマトグラフィー

活性炭ミニカラム (500 mg) に $n$ -ヘキサン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、 $n$ -ヘキサン5 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで、酢酸エチル・ $n$ -ヘキサン混液 (1 : 1) 20 mLを注入し、溶出液を40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物に酢酸エチル・ $n$ -ヘキサン混液 (1 : 19) 5 mLを加えて溶かす。

### (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 (360 mg) に酢酸エチル・ $n$ -ヘキサン混液 (1 : 19) 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・ $n$ -ヘキサン混液 (1 : 19) 10 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで、酢酸エチル・ $n$ -ヘキサン混液 (1 : 1) 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。この残留物を水・メタノール混液 (1 : 4) に溶解し、正確に2 mL (穀類、豆類及び種実類の場合は、1 mL) としたものを試験溶液とする。

## 5. 検量線の作成

ノバルロン標準品の0.1~2 mg/L水・メタノール混液 (1 : 4) 溶液を数点調製し、それぞれ40  $\mu$ L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  $\mu$ LをHPLCに注入し、5の検量線でノバルロンの含量を求める。

## 7. 測定条件

### 1) HPLC

検出器 : UV (波長252 nm)

カラム : オクタデシルシリル化シリカゲル (粒径5  $\mu$ m) 、内径4~4.6 mm、長さ250 mm

カラム温度 : 40°C

移動相 : 水・メタノール混液 (1 : 4)

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  $\mu$ m) 、内径2 mm、長さ150 mm

移動相 : 水・メタノール混液 (1 : 4)

イオン化モード : ESI

主なイオン ( $m/z$ ) : 正イオンモード493、515、負イオンモード491

注入量 : 2  $\mu$ L

保持時間の目安：5分

## 8. 定量限界

0.02 mg/kg

## 9. 留意事項

### 1) 試験法の概要

ノバルロンを試料からアセトンで抽出し、*n*-ヘキサンに転溶する。果実、野菜はそのまま、穀類、豆類、種実類はアセトニトリル/ヘキサン分配で脱脂した後、活性炭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) 活性炭ミニカラムにおける溶出挙動は、試料の種類や試料負荷量によって影響を受けやすいので注意を要する。当該カラムは精製の初期段階で使用しているため、保持力の低下を起こしやすく、洗浄画分にノバルロンが溶出される可能性がある。その場合は、*n*-ヘキサン洗浄を省略して、酢酸エチル・*n*-ヘキサン混液（1：1）のみで負荷及び溶出を行う必要がある。
- (2) 精製が不十分な場合は、シリカゲルミニカラム（690 mg） [アセトン・*n*-ヘキサン混液（1：19） 10 mLで洗浄、アセトン・*n*-ヘキサン混液（3：7） 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（1000 mg） [アセトニトリル・水混液（1：1） 10 mLで洗浄、アセトニトリル・水混液（4：1） 10 mL又はアセトニトリル10 mLで溶出]などによる精製を追加するとよい。

## 10. 参考文献

平成13年厚生労働省告示第56号「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」

## 11. 類型

C