

DBEDC 試験法（農産物）

1. 分析対象化合物

DBEDC

2. 装置

蛍光検出器付き高速液体クロマトグラフ（HPLC-FL）

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。

グラファイトカーボンミニカラム（1,000 mg） 内径12～13 mmのポリエチレン製のカラム管に、グラファイトカーボン1,000 mgを充てんしたもの又はこれと同等の分離特性を有するもの。

メチレンブルー溶液 メチレンブルー（三水和物）0.29 g及びリン酸一ナトリウム（二水和物）65 gを水に溶かし、硫酸6.8 mLを加え、水で全量を1 Lとし、ジクロロメタン200 mLずつで3回洗浄したもの。

DBEDC標準品 本品はDBEDC99%以上を含む。

4. 試験溶液の調製

1) 抽出

穀類、豆類及び種実類の場合は、試料10.0 gを量り採り、0.6 mol/L水酸化ナトリウム溶液20 mLを加え、2時間放置する。

茶及びホップの場合は、試料5.00 gを量り採り、0.6 mol/L水酸化ナトリウム溶液20 mLを加え、2時間放置する。

果実、野菜及びハーブの場合は、試料20.0 gを量り採り、2 mol/L水酸化ナトリウム溶液20 mLを加える。

これにメタノール150 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、メタノール50 mLを加えてホモジナイズし、上記と同様にろ過を行う。得られたろ液を合わせ、40°C以下で約20 mLに減圧濃縮する。これに0.5 mol/L硫酸を加え、pH 7に調整した後、水を加えて100 mLとする。

抽出液の20 mLを正確に量り採り、メチレンブルー溶液40 mLを加え、ジクロロメタン50 mLずつで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°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物に水5 mLを加えて溶かす。

2) 精製

グラファイトカーボンミニカラム (1,000 mg) にジクロロメタン、メタノール及び水各 10 mL を順次注入し、各流出液は捨てる。このカラムに 1) で得られた抽出溶液を注入し、流出液は捨てる。さらに、抽出溶液が入っていた容器を水 5 mL 及びメタノール 2 mL で順次洗い、各洗液をカラムに注入し、流出液は捨てる。次いで、ジクロロメタン及びメタノール (7 : 3) 混液 7 mL を注入し、流出液は捨てる。次いで、25 mmol/L ギ酸含有ジクロロメタン及びメタノール (9 : 1) 混液 7 mL を注入し、流出液は捨てる。次いで、10 mmol/L 水酸化テトラメチルアンモニウム含有ジクロロメタン及びメタノール (9 : 1) 混液 7 mL を注入し、溶出液を 40°C 以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物に水及びメタノール (1 : 4) 混液を加えて溶かし、穀類、豆類及び種実類の場合は正確に 2 mL、茶及びホップの場合は正確に 1 mL、果実、野菜及びハーブの場合は正確に 4 mL とする。

5. 検量線の作成

DBEDC 標準品について、標準原液をメタノールで調製し、水及びメタノール (1 : 4) 混液で希釈して 0.5~4 mg/L の標準溶液を数点調製し、100 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 100 µL を HPLC に注入し、5 の検量線で DBEDC 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 : FL (励起波長 225 nm, 蛍光波長 295 nm)

カラム : オクタデシルシリル化シリカゲル (粒径 3 µm)、内径 4.6 mm、長さ 150 mm

カラム温度 : 40°C

移動相 : 酢酸、10 mmol/L 酢酸アンモニウム及びメタノール (0.1 : 20 : 80) 混液

注入量 : 100 µL

保持時間の目安 : 6分

2) LC/MS

カラム : オクチルシリル化シリカゲル (粒径 3 µm)、内径 2.0 mm、長さ 150 mm

カラム温度 : 40°C

移動相 : 10 mmol/L 酢酸アンモニウム及びメタノール (1 : 3) 混液

イオン化モード：ESI（－）

主なイオン（*m/z*）：325

注入量：2 μ L

保持時間の目安：7分

9. 定量限界

0.5 mg/kg

10. 留意事項

1) 試験法の概要

DBEDC を塩基性下で試料からメタノールで抽出し、中性下でジクロロメタンに転溶する。グラファイトカーボンミニカラムで精製した後、HPLC-FL で測定し、LC/MS で確認する方法である。

2) 注意点

(1) 精製が不足する場合は、精製を追加する。

グラファイトカーボンミニカラムからの溶出液を濃縮し、水10 mLに溶かす。ジエチルアミノプロピルシリカゲルミニカラム（500 mg）をメタノール5 mL及び水5 mLで順次洗浄したものに溶液を注入し、次いでメタノール1 mLを注入し、流出液は捨てる。アンモニア水及びメタノール（1：49）混液10 mLを注入し、溶出液を濃縮して溶媒を除去し、残留物を酢酸エチルに溶かして試験溶液とする。

(2) HPLCのカラムはオクタデシルシリル化シリカゲルよりオクチルシリル化シリカゲルの方がピークの形状は良好だが、妨害ピークとの分離はオクタデシルシリル化シリカゲルが優れている。

(3) LC/MSの移動相はメタノールの組成比を上げて（1：4）混液とした方がピーク形状は良好であるが、試料成分によるイオン化阻害が起きやすい。

(4) LC/MSではHPLCより高感度分析が可能である。

11. 参考文献

1) 環境省告示第21号「DBEDC 試験法」（昭和60年3月27日）

12. 類型

C