

ジクワット、パラコート及びメピコートクロリド試験法（農産物）

1. 分析対象化合物

ジクワット

パラコート

メピコートクロリド

2. 適用食品

農産物

3. 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）

4. 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。

ジピクリルアミンナトリウム 純度98.0%以上（乾燥後）の試薬を用いる。

プロピルスルホニルシリル化シリカゲルミニカラム（500 mg） 内径12～13 mmのポリエチレン製のカラム管に、プロピルスルホニルシリル化シリカゲル500 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。

ヘプタフルオロ-n-酪酸 純度99.0%以上の試薬を用いる。

ジクワット標準品 本品はジクワット95%以上を含む。

パラコート標準品 本品はパラコート95%以上を含む。

メピコートクロリド標準品 本品はメピコートクロリド95%以上を含む。

5. 試験溶液の調製

1) 抽出

① 穀類、豆類、種実類、果実、野菜、ハーブ、抹茶及びホップの場合

穀類、豆類及び種実類の場合は試料10.0 gを量り採る。抹茶及びホップの場合は試料5.00 gを量り採る。果実、野菜及びハーブの場合は試料20.0 gを量り採る。これに水60 mL及び硫酸30 mLを加え、混合する。沸騰石2～3粒及び消泡剤約1 mLを加え、還流冷却器を付けて5時間加熱還流する。放冷後、ガラス繊維ろ紙を用いて吸引ろ過し、ろ紙上の残留物に水50 mLを加えて、上記と同様にろ過する。得られたろ液を合わせ、水を加えて正確に200 mLとする。その20 mL（試料1 g相当、抹茶及びホップの場合は40 mL、果実、野菜及びハーブの場合は10 mL）を正確に採り、12 mol/L水酸化ナトリウム溶液を加えてpH 7に調整する。

② 抹茶以外の茶の場合

試料9.00 gを100℃の水540 mLに浸し、室温で5分間放置した後、ろ過する。冷後、ろ液60 mLを採り、硫酸30 mLを加え、混合する。沸騰石2～3粒及び消泡剤約1 mLを加え、還流冷却器を付けて5時間加熱還流する。放冷後、ガラス繊維ろ紙を用いて吸引ろ過し、ろ紙上の残留物に水50 mLを加えて、上記と同様にろ過する。得られたろ液を合わせ、水を加えて正確に200 mLとする。その20 mL（試料0.1 g相当）を正確に採り、12 mol/L水酸化ナトリウム溶液を加えてpH 7に調整する。

2) 精製

プロピルスルホニルシリル化シリカゲルミニカラム（500 mg）にメタノール10 mL及び水10 mLを順次注入し、各流出液は捨てる。このカラムに1) で得られた溶液を注入した後、流出液は捨てる。さらに水10 mL及びメタノール10 mLを順次注入し、各流出液は捨てる。次いで、飽和塩化アンモニウム・メタノール溶液20 mLを注入し、溶出液を40℃以下で濃縮し、窒素ガスを送って乾固する（I、メピコートクロリド画分）。さらに、ミニカラムに5 mol/L塩化アンモニウム溶液20 mLを注入し、溶出液に5 mol/L塩化アンモニウム溶液を加えて正確に20 mLとする（II、ジクワット及びパラコート画分）。

3) ジクロロメタン転溶及びジクロロメタン洗浄（メピコートクロリド画分）

(I) の残留物に0.05%ジピクリルアミンナトリウム溶液20 mLを加えて溶かし、12 mol/L水酸化ナトリウム溶液1 mLを加え、pH 13とする。これをジクロロメタン30 mLずつで3回振とう抽出する。ジクロロメタン層を合わせて綿栓ろ過後、40℃以下で濃縮し、窒素ガスを送って乾固する。残留物に2 mol/L塩酸50 mLを加えて溶かす。これを、ジクロロメタン10 mLずつで2回洗浄した後、60℃以下で濃縮し、窒素ガスを送って乾固する。この残留物を5 mmol/Lヘプタフルオロ-n-酪酸溶液に溶かし、正確に2 mLとしたものをメピコートクロリド試験溶液とする。

4) 蛍光誘導体化（酸化）（ジクワット及びパラコート画分）

① ジクワット

(II) の溶液5 mLを正確に採り、12 mol/L水酸化ナトリウム溶液25 mL及び1%フェリシアン化カリウム溶液1 mLを加え、均一になるように振り混ぜた後、エーテル20 mLずつで2回振とう抽出する。エーテル層を合わせて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、窒素ガスを送って乾固する。この残留物をアセトニトリル及び水（1 : 9）混液に溶かし、正確に2 mLとしたものをジクワット試験溶液とする。

② パラコート

(II) の溶液10 mLを正確に採り、12 mol/L水酸化ナトリウム溶液10 mL及び1%フェリシアン化カリウム溶液1 mLを加え、均一になるように振り混ぜた後、ジクロロメタン20 mLずつで2回振とう抽出する。ジクロロメタン層を合わせ、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℃以下で減圧濃縮し、窒素ガスを送って乾固する。この残留物をアセトニトリル及び水(1:9)混液に溶かし、正確に2 mLとしたものをパラコート試験溶液とする。

6. 検量線の作成

1) ジクワット

ジクワット標準品の4 mg/L 0.01 mol/L塩酸溶液を調製し、その0.5 mLに5 mol/L塩化アンモニウム溶液5 mLを加え、以下5の4)「蛍光誘導体化(酸化)」①に従って操作する。濃縮残留物をアセトニトリル及び水(1:9)混液に溶かし、正確に20 mLとする(0.1 mg/L)。これを適宜希釈して、0.00125~0.05 mg/Lの溶液を調製し、それぞれ40 µLをHPLC-FL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。

2) パラコート

パラコート標準品の4 mg/L 0.01 mol/L塩酸溶液を調製し、その0.5 mLに5 mol/L塩化アンモニウム溶液10 mLを加え、以下5の4)「蛍光誘導体化(酸化)」②に従って操作する。濃縮残留物をアセトニトリル及び水(1:9)混液に溶かし、正確に20 mLとする(0.1 mg/L)。これを適宜希釈して、0.0025~0.1 mg/Lの溶液を調製し、それぞれ20 µLをHPLC-FL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。

3) メピコートクロリド

メピコートクロリド標準品の0.005~0.2 mg/L 5 mmol/Lヘプタフルオロ-n-酪酸溶液を数点調製し、それぞれ10 µLをLC-MS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。

7. 定量

1) ジクワット

試験溶液40 µLをHPLC-FLに注入し、6. 1) の検量線でジクワットの含量を求める。なお、ジクワットの含量を求める場合にはイオン換算とし、次式により求める。

$$\text{ジクワットイオンの含量 (ppm)} = A \times 0.5355$$

A : ジクワットの含量 (ppm)

2) パラコート

試験溶液20 μL をHPLCに注入し、6. 2)の検量線でパラコートの含量を求める。なお、パラコートの含量を求める場合にはイオン換算とし、次式により求める。

$$\text{パラコートイオンの含量 (ppm)} = A \times 0.7243$$

A : パラコートの含量 (ppm)

3) メピコートクロリド

試験溶液10 μL をLC-MSに注入し、6. 3)の検量線でメピコートクロリドの含量を求める。

8. 確認試験

LC-MSにより確認する。

9. 測定条件

(例)

1) HPLC-FL (ジクワット及びパラコートの場合)

カラム : トリアコンチルシリル化シリカゲル 内径4.6 mm、長さ250 mm、粒子径5 μm

カラム温度 : 40°C

移動相 : アセトニトリル及び水 (2 : 23) 混液

測定波長

ジクワット : 励起波長368 nm、蛍光波長430 nm

パラコート : 励起波長330 nm、蛍光波長436 nm

保持時間の目安

ジクワット : 18.5分

パラコート : 20分

2) LC-MS (メピコートクロリドの場合)

カラム : オクタデシルシリル化シリカゲル 内径2~3 mm、長さ150 mm、粒子径5 μm

カラム温度 : 40°C

移動相 : 5 mmol/Lヘプタフルオロ-n-酪酸及びメタノール混液 (19 : 1) から (1 : 1) までの濃度勾配を5分間で行う。

イオン化モード : ESI (+)

主なイオン (m/z) : 114

保持時間の目安 : 9分

3) LC-MS (ジクワット及びパラコートの場合)

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲル 内径2～3 mm、長さ150 mm、粒子径5 μm

カラム温度：40℃

移動相：アセトニトリル及び0.1%酢酸（1：9）混液

イオン化モード：ESI（+）

主なイオン（*m/z*）

ジクワット：215

パラコート：217

注入量

ジクワット：10 μL

パラコート：5 μL

保持時間の目安

ジクワット：5.7分

パラコート：5.4～5.6分

10. 定量限界

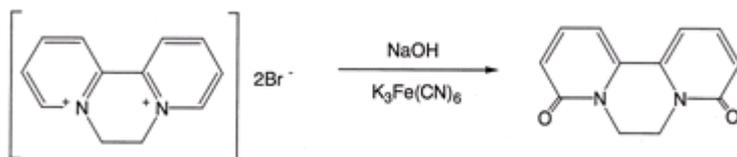
各化合物 0.01 mg/kg（抹茶以外の茶の場合は0.1 mg/kg）

11. 留意事項

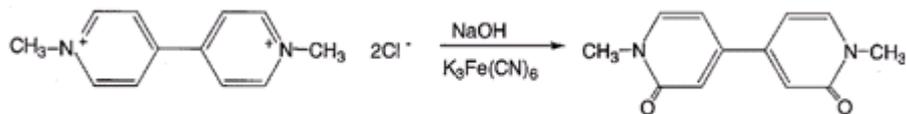
1) 試験法の概要

ジクワット、パラコート及びメピコートクロリドを試料から6 mol/L硫酸で加熱還流抽出し、プロピルスルホンシリル化シリカゲルミニカラムによる精製でメピコートクロリド画分（I）とジクワット及びパラコート画分（II）に分ける。メピコートクロリド画分（I）についてはジクロロメタン転溶、次いで塩酸酸性下ジクロロメタン洗浄を行った後、LC-MSで定量及び確認する方法である。ジクワット及びパラコート画分（II）については蛍光誘導体化（酸化）後、HPLC-FLで定量し、LC-MSで確認する方法である。

ジクワットの蛍光誘導体化



パラコートの蛍光誘導体化



2) 注意点

- ① 本試験法において、ジクワットはジクワット二臭化物 [C₁₂H₁₂Br₂N₂] のことを、またパラコートはパラコート二塩化物 [C₁₂H₁₄Cl₂N₂] のことをいう。
- ② 0.05%ジピクリルアミンナトリウム溶液は、調製後時間が経過したものを使用すると、メピコートクロリドの転溶率が低下する。
- ③ ジクワット及びパラコートの蛍光誘導体のLC/MSにおける感度は、HPLC-FL法の1/4である。基準値と比較して定量限界が高い場合は、蛍光誘導化に供する溶液量を適宜増加して定量限界を下げる。

12. 参考文献

- 1) 環境省告示第20号「ジクアトジプロミド試験法」(昭和61年4月14日)
- 2) 環境省告示第40号「パラクアトジクロリド試験法」(昭和51年6月11日)
- 3) 環境省告示第21号「メピコートクロリド試験法」(平成3年4月1日)
- 4) 飼料分析基準研究会編著「飼料分析法・解説」p.6-148～6-152(社)日本科学飼料協会
- 5) 赤木浩一、食品衛生学雑誌、45、197-200、2004
- 6) 大倉ら、平成元年度愛媛衛研年報、51、27-32、1990

13. 類型

C