

1. 装置

蛍光光度型検出器付き高速液体クロマトグラフを用いる

2. 試薬試液

無水トリフルオロ酢酸、：試薬特級

トリエチルアミン：試薬鹿特級

メタノール：高速液体クロマトグラフィー用

ベンゼン：残留農薬試験用

水：純水製造装置で製造した水

M.A₃ 標準品

M.A₄ 標準品

シクロヘキシルシリル化シリカゲルミニカラム 1g/6mL

エチレンジアミン-N-プロピルシリル化シリカゲルミニカラム 1000mg

0.5mol/L トリエチルアミン含有ベンゼン溶液： トリエチルアミン 5.06g をベンゼンに溶解し、100mL に定容したもの。

3. 試験溶液の調製

固相抽出

CH ミニカラム及び PSA ミニカラムをミニカラム吸引装置に取り付け、CH ミニカラムはメタノール 5mL 及び水 5mL を、PSA ミニカラムはメタノール 10mL をそれぞれ流下させてカラムを洗浄した。CH ミニカラムに試料 200mL を 5~10mL/分の流速で流下させて流出液は捨てた。次にメタノール/水 (50 : 50 v/v) 混液 10mL を流下させて流出液を捨てた後、受器を 50mL 容ナス型フラスコに替え、CH ミニカラムの下部に PSA ミニカラムを連結しメタノール 15mL を流下させて M.A₃ 及び M.A₄ を溶出した。溶出液は減圧濃縮器を用いて 40°C以下で濃縮した後、通風で乾固した。

蛍光ラベル化

残留物は直ちに 0.5mol/L トリエチルアミン含有ベンゼン溶液 1mL 及び無水トリフルオロ酢酸 0.5mL を加えて密栓後 40°Cに設定した定温乾燥器に 30 分間放置して蛍光ラベル化した。

試験溶液調製

反応液を室温で放冷後、トリエチルアミン 50μL を加え窒素気流下で乾固直前まで濃縮した。濃縮液はメタノールを用いて 5mL に定容して試験溶液とした。

4. 測定機器の操作条件

液体クロマトグラフ・蛍光分光光度計(HPLC-FL)の操作条件

充填剤：WAKOUPACK navi C30、粒径 5 μ m

カラム：内径 4.6mm、長さ 25cm、ステンレス製

カラム温度：40 $^{\circ}$ C

移動相：メタノール/水 (92 : 8v/v)

流量：1.6mL/min

波長：励起 360nm、蛍光 460nm

感度：Rengel Mid ゲイン \times 4

保持時間：M.A₃ 約 14.4 分

M.A₄ 約 17.6 分

5. 検量線の作成

M.A₃ 及び M.A₄ の標準品各々 10.0mg(純度換算相当量)を正確に量りとり、メタノールで溶解し、各々 100mL に定容して 100mg/L 標準原液を調製した。この原液を等量ずつ分取し、メタノールで希釈して 10mg/L 混合標準溶液を調製した。この混合標準溶液 5mL を 50mL 容ナス型フラスコに分取し、ロータリーエバポレーター (水浴 40 $^{\circ}$ C以下) を用いて約 1mL まで減圧濃縮後、通風で乾固した。残留物は直ちに 0.5mol/L トリエチルアミン含有ベンゼン溶液 1mL 及び無水トリフルオロ酢酸 0.5mL を加えて密栓後 40 $^{\circ}$ Cに設定した定温乾燥器に 30 分間放置して蛍光ラベル化した。放冷後トリエチルアミン 50 μ L を加え窒素気流下で乾固直前まで濃縮した。濃縮液はメタノールを用いて 50mL に定容して 1mg/L 混合標準溶液を調製した。これをメタノールで希釈して 0.0005, 0.001, 0.005, 0.01, 0.015, 0.02 mg/L 混合標準溶液を調製し、この各 10 μ L を前記測定条件に設定した高速液体クロマトグラフに注入し、データ処理装置を用いてピーク高さを測定して各検量線を作成した。

6. 定量限界

本分析法は最終供試量 0.2L、測定液量 5mL、注入量 10 μ l で実施した。また、定量限界相当量は 0.01ng であり、M.A₃ 及び M.A₄ の定量限界はそれぞれ 0.025 μ g/L、ミルベメクチンとして 0.05 μ g/L となる。

各定量限界

定量限界相当量 (ng)	試料採取量 (L)	最終溶液 (mL)	注入量 (μ L)	各定量限界 (μ g/L)
0.01	0.2	5	10	0.025