

別紙 3

アゾシクロチン及びシヘキサチン試験法（農産物）

1. 分析対象化合物

アゾシクロチン
シヘキサチン

2. 装置

蛍光光度型検出器（スズ用干渉フィルター、波長610nm）付きガスクロマトグラフ（GC-FPD（Sn））

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。

L-アスコルビン酸ナトリウム（特級）

シヘキサチン標準品 本品はシヘキサチン98%以上を含む。

4. 試験溶液の調製

1) 抽出

① 穀類、果実及び野菜の場合

穀類の場合は、試料10.0 gにL-アスコルビン酸ナトリウム約0.5 g及び水20 mLを加え、30分間放置する。果実及び野菜の場合は、試料20.0 gにL-アスコルビン酸ナトリウム約0.5 g加える。

これにアセトン及び酢酸（99：1）混液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及び酢酸（99：1）混液50 mLを加えてホモジナイズし、上記と同様にろ過する。得られたろ液を合わせ、アセトンを加えて正確に200 mLとする。

この40 mLを分取し、10%塩化ナトリウム溶液200 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、40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。穀類の場合は、この残留物に*n*-ヘキサン1 mLを加えて溶かす。果実及び野菜の場合は、この残留物を*n*-ヘキサンに溶かし、正確に2 mLとし、1 mLを分取する。

② 豆類及び種実類の場合

試料10.0 gにL-アスコルビン酸ナトリウム約0.5 g及び水20 mLを加え、30分間放置する。これにアセトン及び酢酸（99：1）混液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、アセトン及び酢酸（99：1）混液50 mLを加えてホモジナイズし、上記と同様にろ過する。得られたろ液を合わせ、アセトンを加えて正確に200 mLとする。この40 mLを分取し、40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。

残留物にエタノール50 mL及び10 mol/L水酸化カリウム溶液10 mLを加え、30分間激しく振とうした後、10%塩化ナトリウム溶液50 mLを加え*n*-ヘキサン50 mLで2回振とう抽出する。抽出液を合わせ、10%塩化ナトリウム溶液100 mLで2回洗浄した後、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、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1 mLを加えて溶かす。

③ 茶の場合

試料5.00 gにL-アスコルビン酸ナトリウム約0.5 g及び水20 mLを加え、30分間放置する。これにアセトン及び酢酸（99：1）混液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及び酢酸（99：1）混液50 mLを加えてホモジナイズし、上記と同様にろ過する。得られたろ液を合わせ、アセトンを加えて正確に200 mLとする。この80 mLを分取し、40℃以下で約40 mLまで濃縮する。

これに10%塩化ナトリウム溶液200 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、40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物にアセトニトリル及びトルエン（3：1）混液5 mLを加えて溶かす。

2) 精製（茶の場合のみ実施する。）

グラファイトカーボンミニカラム（500 mg）にアセトニトリル及びトルエン（3：1）混液10 mLを注入し、流出液は捨てる。このカラムに1)の③で得られた溶液を注入した後、アセトニトリル及びトルエン（3：1）混液15 mLを注入し、全溶出液を採り、40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。残留物に*n*-ヘキサン1 mLを加えて溶かす。

3) エチル化

1)又は2)で得られた溶液に3 mol/Lエチルマグネシウムブロミド・エーテル溶液1 mLを加え、室温で20分間放置する。これに0.5 mol/L硫酸10 mLを徐々に加え、次いで水10 mLを加えた後、*n*-ヘキサン10 mL及び5 mLで2回振とう抽出する。抽出液を合わせ、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、40℃以下で約1 mLまで濃縮する。

4) 精製

合成ケイ酸マグネシウムミニカラム（910 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、3)で得られた溶液を注入した後、*n*-ヘキサン15 mLを注入し、全溶出液を採り、40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物を*n*-ヘキサンに溶解し、正確に1 mLとしたものを試験溶液とする。

5. 検量線の作成

シヘキサチン標準品の20 mg/Lアセトン溶液を調製する。この1 mLを採り、窒素を吹き付けて溶媒を除去して*n*-ヘキサン1 mLに再溶解した後、4. 試験溶液の調製の3) エチル化と同様に操作して得られた溶液を*n*-ヘキサンで定容及び希釈して検量線用の標準溶液を数点調製し、それぞれGC-FPD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。なお、本法に従って試験溶液を調製した場合、試料中0.01 mg/kgに相当する試験溶液中濃度は0.02 mg/Lである。

6. 定量

試験溶液をGC-FPDに注入し、5の検量線でアゾシクロチン及びシヘキサチンの含量を求める。

7. 確認試験

GC-FPDにより確認する。

8. 測定条件

(例)

1) GC-FPD (定量用)

検出器：FPD (Sn)

カラム：5%フェニル-メチルシリコン 内径0.25 mm、長さ30 m、膜厚0.25 μm

カラム温度：100℃ (1分) - 30℃/分 - 280℃ (10分)

注入口温度：250℃

検出器温度：250℃

キャリアーガス：ヘリウム

注入量：2 μL

保持時間の目安：8分

2) GC-FPD (確認用)

検出器：FPD (Sn)

カラム：(14%シアノプロピル-フェニル)メチルシリコン 内径0.25 mm、長さ30 m、膜厚0.25 μm

カラム温度：50℃ (1分) - 30℃/分 - 280℃ (5分)

注入口温度：250℃

検出器温度：250℃

キャリアーガス：ヘリウム

注入量：2 μL

保持時間の目安：10分

9. 定量限界

0.01 mg/kg

10. 留意事項

1) 試験法の概要

アゾシクロチン及びシヘキサチンを試料から酢酸酸性アセトンで抽出し、豆類及び種実類等の脂質の多い食品についてはアルカリ分解で脂質を除去した後、*n*-ヘキサンに転溶する。必要に応じ、グラファイトカーボンミニカラムで精製し、エチル化を行う。合成ケイ酸マグネシウムミニカラムで精製した後、GC-FPDで定量及び確認する方法である。

2) 注意点

① アゾシクロチンは、エチル化によりシヘキサチンと同一物質に変化する。

- ② グラファイトカーボンミニカラムでの精製時に残留物が溶けきらず、カラム負荷が困難なときは、遠心分離を行うことが有効である。
- ③ エチル化の操作時、0.5 mol/L硫酸を加えると激しく反応するため徐々に加える。
- ④ 果実及び野菜の場合でも、アボカド等の脂質の多い食品については、豆類及び種実類の場合と同様にアルカリ分解を実施する必要がある。
- ⑤ L-アスコルビン酸ナトリウムは、抽出時の酸化分解を抑えるために添加する。

11. 参考文献

なし

12. 類型

C