

※本報告書は、試験法開発における検討結果をまとめたものであり、試験法の実施に際して参考として下さい。なお、報告書の内容と通知または告示試験法との間に齟齬がある場合には、通知または告示試験法が優先することをご留意ください。

平成 19 年度

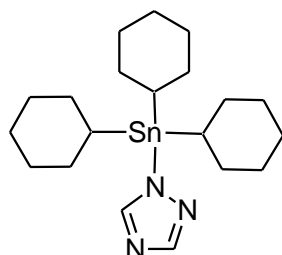
残留農薬等に関するポジティブリスト制度
導入に係る分析法開発
(残留農薬個別試験法開発 アゾシクロチン他 1 品目)

(報告書)

アゾシクロチン及びシヘキサチンに関する試験法（検討内容）

1. 構造式等

アゾシクロチン



化学式：C₂₀H₃₅N₃Sn

分子量：436.2

化学名（IUPAC）：tri (cyclohexyl) -1*H*-1,2,4-triazol-1-yltin

外 観：無色結晶

融 点：210℃

蒸気圧：2×10⁻⁸ mPa (20℃)

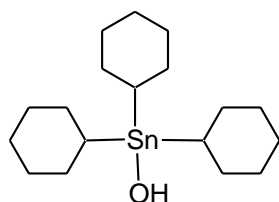
溶解性：水 0.12 mg/L (20℃)、ジクロロメタン 20-50 g/L、イソプロパノール 10-50 g/L、*n*-ヘキサン 0.1-1 g/L、トルエン 2-5 g/L (以上 20℃)

オクタノール/水分配係数：log Pow=5.3 (20℃)

安定性：DT₉₀ (20℃) < 10分 (pH4、7及び9)

(出典：The e-Pesticide Manual 14th Edition)

シヘキサチン



化学式：C₁₈H₃₄OSn

分子量：385.2

化学名（IUPAC）：tricyclohexyltin hydroxide

外 観：無色結晶

溶解性：水 < 1 mg/L (25℃)、クロロホルム 216 g/kg、メタノール 37 g/kg、ジクロロメタン 34 g/kg、四塩化炭素 28 g/kg、ベンゼン 16 g/kg、トルエン 10 g/kg、キシレン 3.6 g/kg、アセトン 1.3 g/kg (以上 25℃)

オクタノール/水分配係数：log Pow=4.86

安定性：弱酸性 (pH6) ~ アルカリの水懸濁液で100℃で安定。紫外線で分解。

(出典：The e-Pesticide Manual 14th Edition)

2. 基準値

不検出（全食品対象）

3. 分析対象化合物

アゾシクロチン

シヘキサチン

4. 試験法の検討内容

既存の「アゾシクロチン及びシヘキサチン試験法」を参考に検討を行った。現行の試験法は脂質等の夾雑物質の除去にアセトニトリル/ヘキサン分配を用いているが、回収率が十分ではない。しかし、脂質等がエチル化反応を阻害するため、脱脂操作は必要である。

アゾシクロチン及びシヘキサチン試験法の作成に際して種々の脱脂方法の検討を行い、アルカリ分解を用いた精製により脂質等の夾雑物質を除去したのちエチルマグネシウムブロミドでエチル化を行った。その結果、脂質等の除去が可能であり、良好な回収率が得られた。

また、脱脂方法以外の各操作について再確認を行い、畜水産物についても試験法適用確認を行った。

なお、検討時は不検出基準が適用されているが、平成25年11月29日の農薬・動物用医薬品部会で、基準値案が示され、基準値の設定されていない食品については一律基準が適用されることになる。それに伴い茶の試験法は抹茶の方法（溶媒抽出法）を採用し、熱湯抽出法は用いないこととなる。

1. 試料

1) 購入先

うなぎは愛知県の業者から、しじみは熊本県の業者から、その他の試料については都内のスーパーにて購入した。

2) 試料の採取方法

（農産物）

- ①玄米は425 μm の標準網ふるいを通るように粉砕し均一化した。
- ②大豆は425 μm の標準網ふるいを通るように粉砕し均一化した。
- ③ばれいしょは泥を水で軽く洗い落とし、細切均一化した。
- ④ほうれんそうはひげ根及び変質葉を除き、細切均一化した。
- ⑤キャベツは外側変質葉及びしんを除き、細切均一化した。
- ⑥りんごは花おち、しん及び果梗の基部を除き細切均一化した。
- ⑦オレンジは細切均一化した。
- ⑧抹茶は425 μm の標準網ふるいを通し均一化した。
- ⑨コーヒー豆は、2 mmのふるいを通るように粉砕し均一化した。
- ⑩抹茶以外の茶はよく振り混ぜ均一化した。

（畜水産物）

- ①牛の筋肉は脂肪層を除き、細切均一化した。

- ②牛の脂肪は筋肉部を除き、細切均一化した。
- ③牛の肝臓は、全体を細切均一化した。
- ④牛乳は全体をよく混合して均一化した。
- ⑤鶏卵は、殻を除き卵白と卵黄を合わせてよく混合し均一化した。
- ⑥さけは可食部（皮を含む）を細切均一化した。
- ⑦うなぎは、活鰻を使用し、頭部を除いた可食部（内臓、骨及び皮を含む）を細切均一化した。
- ⑧しじみは、貝殻を除き細切均一化した。
- ⑨えびは、頭部、殻及び尾部を除き、細切均一化した。
- ⑩はちみつは百花蜜を使用し、加温（40℃以下）してから、よく混合して均一化した。

2. 試薬・試液

1) 標準品

- シヘキサチン標準品：純度100.4 %（和光純薬工業製）
- アゾシクロチン標準品：純度100.0 %（和光純薬工業製）

2) 試薬

- アセトニトリル、アセトン、エタノール、*n*-ヘキサン：残留農薬試験用（関東化学製）
- L-アスコルビン酸ナトリウム、塩化ナトリウム、酢酸、水酸化カリウム、トルエン、硫酸：試薬特級（関東化学製）
- 無水硫酸ナトリウム：PCB分析用（関東化学製）
- ケイソウ土：セライト545（関東化学製）
- エチルマグネシウムブロミド・エーテル溶液：3 mol/L（東京化成製）
- グラファイトカーボンミニカラム：Supelclean ENVI-Carb SPE Tubes（充てん量500 mg、SUPELCO製）
- 合成ケイ酸マグネシウムミニカラム：Sep-Pak plus Florisil（充てん量910 mg、Waters製）

3) 標準溶液の調製方法

標準原液：シヘキサチン標準品及びアゾシクロチン標準品各10 mgを精秤し、アセトンでそれぞれ溶解して200 mg/L溶液を調製した。

検量線用標準溶液：シヘキサチン標準原液をアセトンで希釈し、20 mg/Lアセトン溶液を調製した。この1 mLを窒素乾固し、5. 試験法の分析操作の試験溶液の調製の1) 分析法フローシート、①農産物、a 穀類、果実及び野菜、抹茶及びホップのエチル化（穀類、抹茶及びホップ）と同様に操作したものを*n*-ヘキサンで希釈し、0.01～0.2 mg/Lを含む*n*-ヘキサン標準溶液を数点調製した。

添加用標準溶液：シヘキサチン標準原液及びアゾシクロチン標準原液をそれぞれアセトンで希釈し、0.1及び0.2 mg/L溶液を調製した。

3. 装置

- ホモジナイザー：ウルトラタラックスT-25ベーシック（イカ・ジャパン製）
- 振とう器：エルビスEL型（杉山元医理器製）
- ロータリーエバポレーター：R-200（柴田科学製）等

GC

	型式	会社
GC 装置	6890	Agilent Technologies

4. 測定条件

1) 定量条件

GC 条件	
検出器	FPD-Sn
カラム	DB-5 : 内径 0.25 mm, 長さ 30 m, 膜厚 0.25 μm
カラム温度(°C)	100°C (1分) -30°C/分-280°C (10分)
注入口温度(°C)	250°C
検出器温度(°C)	250°C
キャリアーガス	ヘリウム 2.0 mL/min
燃焼ガス	水素 75 mL/min
助燃ガス	空気 100 mL/min
注入量(μL)	2
保持時間の目安	8分

2) 確認条件

GC 条件	
検出器	FPD-Sn
カラム	DB-1701 : 内径 0.25 mm, 長さ 30 m, 膜厚 0.25 μm
カラム温度(°C)	50°C (1分) -30°C/分-280°C (5分)
注入口温度(°C)	250°C
検出器温度(°C)	250°C
キャリアーガス	ヘリウム 2.0 mL/min
燃焼ガス	水素 75 mL/min
助燃ガス	空気 100 mL/min
注入量(μL)	2
保持時間の目安	9.5分

5. 試験法の分析操作

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、*n*-ヘキサン転溶、エチル化及び合成ケイ酸マグネシウムミニカラムで精製した後、GC-FPDで測定する。

必要に応じ、エチル化前にアルカリ分解又はグラファイトカーボンミニカラムで精製を行う。

1) 分析法フローシート

①農産物

a 穀類、果実及び野菜、抹茶及びホップ

秤 取

- | 穀類：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
- | 果実及び野菜：試料20.0 gにL-アスコルビン酸ナトリウム約0.5 gを加える
- | 抹茶及びホップ：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

アセトン抽出

- | アセトン及び酢酸（99：1）混液100 mLを加え、ホモジナイズ
- | ケイソウ土を厚さ約1 cmに敷いたろ紙を用いて吸引ろ過
- | 残留物にアセトン及び酢酸（99：1）混液50 mLを加え、ホモジナイズ
- | ケイソウ土を厚さ約1 cmに敷いたろ紙を用いて吸引ろ過
- ↓ ろ液を合わせ、アセトンで正確に200 mLとする

n-ヘキサン転溶

- | 抹茶及びホップ以外は抽出液40 mL分取
- | （穀類：2.00 g相当、果実及び野菜：4.00 g相当）
- | 抹茶及びホップは抽出液80 mL分取（2.00 g相当）約40 mLまで減圧濃縮
- | 10 w/v%塩化ナトリウム溶液200 mLで分液漏斗に移す
- | *n*-ヘキサン100 mLを加え、5分間振とう
- | *n*-ヘキサン層を採る
- | *n*-ヘキサン 50 mL を加え、5分間振とう
- | *n*-ヘキサン層を合わせ、無水硫酸ナトリウムで脱水
- ↓ 減圧濃縮、窒素乾固

グラファイトカーボンミニカラム(500 mg)精製（抹茶及びホップのみ実施）

- | 残留物をアセトニトリル及びトルエン（3：1）混液5 mLに溶解
- | カラム（アセトニトリル及びトルエン（3：1）混液10 mLで洗浄済）
- | に注入
- | アセトニトリル及びトルエン（3：1）混液15 mLで溶出
- ↓ 溶出液を減圧濃縮、窒素乾固

エチル化

- | 穀類、抹茶及びホップは残留物を*n*-ヘキサン1 mLに溶解
- | 果実及び野菜は残留物を*n*-ヘキサんに溶解し、正確に2 mLとし、1 mL（2.00 g相当）
- | 分取
- | 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
- | 0.5 mol/L硫酸10 mLを徐々に加える
- | 水10 mLを加え、*n*-ヘキサン10 mL及び5 mLで2回（計3回）抽出
- | 抽出液を合わせ、無水硫酸ナトリウムで脱水し、
- ↓ 約1 mLまで減圧濃縮

合成ケイ酸マグネシウムミニカラム(910 mg)精製

- | 試料溶液をカラム（*n*-ヘキサン10 mLで洗浄済）に注入
- | *n*-ヘキサン5 mLで洗いこむ
- | *n*-ヘキサン10 mLで溶出
- ↓ 負荷液及び溶出液を合わせ、減圧濃縮、窒素乾固

GC-FPD定量

n-ヘキサンで正確に1 mLとし、試験溶液とする

b 豆類及び種実類

秤 取

- | 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

アセトン抽出

- | アセトン及び酢酸（99：1）混液100 mLを加え、ホモジナイズ
- | ケイソウ土を厚さ約1 cmに敷いたろ紙を用いて吸引ろ過
- | 残留物にアセトン及び酢酸（99：1）混液50 mLを加え、ホモジナイズ
- | ケイソウ土を厚さ約1 cmに敷いたろ紙を用いて吸引ろ過
- | ろ液を合わせ、アセトンで正確に200 mLとする
- ↓ 抽出液40 mL分取（2.00 g相当）、減圧濃縮

アルカリ分解

- | 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分間振とう
- | 10 w/v%塩化ナトリウム溶液50 mLを加え、
- | *n*-ヘキサン50 mLで2回抽出
- | 抽出液を合わせ、10 w/v%塩化ナトリウム溶液100 mLで2回洗浄
- ↓ 無水硫酸ナトリウムで脱水し、減圧濃縮、窒素乾固

エチル化

- | 残留物を*n*-ヘキサン1 mLに溶解
- | 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
- | 0.5 mol/L硫酸10 mLを徐々に加える
- | 水10 mLを加え、*n*-ヘキサン10 mL及び5 mLで2回（計3回）抽出
- | 抽出液を合わせ、無水硫酸ナトリウムで脱水し、
- ↓ 約1 mLまで減圧濃縮

合成ケイ酸マグネシウムミニカラム(910 mg)精製

- | 試料溶液をカラム（*n*-ヘキサン10 mLで洗浄済）に注入
- | *n*-ヘキサン5 mLで洗いこむ
- | *n*-ヘキサン10 mLで溶出
- ↓ 負荷液及び溶出液を合わせ、減圧濃縮、窒素乾固

GC-FPD定量

n-ヘキサンで正確に1 mLとし、試験溶液とする

c 抹茶以外の茶

秤 取

- (検体9.00 gを100°Cの水540 mLに浸し、室温で5分間放置した後、ろ過)
- ↓ 試料180 mL（3.00 g相当）にL-アスコルビン酸ナトリウム約0.5 gを加える

n-ヘキサン転溶

- | 塩化ナトリウム20 g、2 w/v%ドデシル硫酸ナトリウム溶液2 mL及び

- | *n*-ヘキサン100 mLを加え、5分間振とう
- | *n*-ヘキサン層を採る
- | *n*-ヘキサン 50 mL を加え、5分間振とう
- | *n*-ヘキサン層を合わせ、無水硫酸ナトリウムで脱水し、
- | 減圧濃縮、窒素乾固
- ↓ 残留物を*n*-ヘキサンに溶解し、正確に3 mLとする

エチル化

- | 試料溶液2 mL (2.00 g相当) 分取
- | 3 mol/Lエチルマグネシウムブロミド・エーテル溶液2 mLを加え、
- | 室温で20分間放置
- | 0.5 mol/L硫酸10 mLを徐々に加える
- | 水10 mLを加え、*n*-ヘキサン10 mL及び5 mLで2回 (計3回) 抽出
- | 抽出液を合わせ、無水硫酸ナトリウムで脱水し、
- ↓ 約1 mLまで減圧濃縮

合成ケイ酸マグネシウムミニカラム(910 mg)精製

- | 試料溶液をカラム (*n*-ヘキサン10 mLで洗浄済) に注入
- | *n*-ヘキサン5 mLで洗いこむ
- | *n*-ヘキサン10 mLで溶出
- ↓ 負荷液及び溶出液を合わせ、減圧濃縮、窒素乾固

GC-FPD定量

n-ヘキサンで正確に1 mLとし、試験溶液とする

②畜水産物

a はちみつ以外

秤 取

- | 脂肪以外：試料10.0 g
- ↓ 脂肪：試料5.00 g

アセトン抽出

- | アセトン及び酢酸 (99 : 1) 混液100 mLを加え、ホモジナイズ
- | ケイソウ土を厚さ約1 cmに敷いたろ紙を用いて吸引ろ過
- | 残留物にアセトン及び酢酸 (99 : 1) 混液50 mLを加え、ホモジナイズ
- | ケイソウ土を厚さ約1 cmに敷いたろ紙を用いて吸引ろ過
- ↓ ろ液を合わせ、減圧濃縮

アルカリ分解

- | 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分間振とう
- | 10 w/v%塩化ナトリウム溶液50 mLを加え、
- | *n*-ヘキサン50 mLで2回抽出
- | 抽出液を合わせ、10 w/v%塩化ナトリウム溶液100 mLで2回洗浄
- | 無水硫酸ナトリウムで脱水し、減圧濃縮、窒素乾固
- ↓ 残留物を*n*-ヘキサンに溶解し、正確に5 mL (脂肪は2.5 mL) とする

エチル化

- | 試料溶液1 mL (2.00 g相当) 分取
- | 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
- | 0.5 mol/L硫酸10 mLを徐々に加える
- | 水10 mLを加え、*n*-ヘキサン10 mL及び5 mLで2回 (計3回) 抽出
- | 抽出液を合わせ、無水硫酸ナトリウムで脱水し、
- ↓ 約1 mLまで減圧濃縮

合成ケイ酸マグネシウムミニカラム(910 mg)精製

- | 試料溶液をカラム (*n*-ヘキサン10 mLで洗浄済) に注入
- | *n*-ヘキサン5 mLで洗いこむ
- | *n*-ヘキサン10 mLで溶出
- ↓ 負荷液及び溶出液を合わせ、減圧濃縮、窒素乾固

GC-FPD定量

n-ヘキサンで正確に1 mLとし、試験溶液とする

b はちみつ

秤 取

- ↓ 試料10.0 g

アセトン抽出

- | 水20 mL及びアセトン及び酢酸 (99 : 1) 混液100 mLを加え、
- | ホモジナイズ後、ケイソウ土を厚さ約1 cmに敷いたろ紙を用いて吸引ろ過
- | 残留物にアセトン及び酢酸 (99 : 1) 混液50 mLを加え、ホモジナイズ
- | ケイソウ土を厚さ約1 cmに敷いたろ紙を用いて吸引ろ過
- ↓ ろ液を合わせ、減圧濃縮

n-ヘキサン転溶

- | 10 w/v%塩化ナトリウム溶液100 mLで分液漏斗に移す
- | *n*-ヘキサン50 mLを加え、5分間振とう
- | *n*-ヘキサン層を採る
- | *n*-ヘキサン 50 mL を加え、5分間振とう
- | *n*-ヘキサン層を合わせ、無水硫酸ナトリウムで脱水し、
- | 減圧濃縮、窒素乾固
- ↓ 残留物を*n*-ヘキサんに溶解し、正確に5 mLとする

エチル化

- | 試料溶液1 mL (2.00 g相当) 分取
- | 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
- | 0.5 mol/L硫酸10 mLを徐々に加える
- | 水10 mLを加え、*n*-ヘキサン10 mL及び5 mLで2回 (計3回) 抽出
- | 抽出液を合わせ、無水硫酸ナトリウムで脱水し、
- ↓ 約1 mLまで減圧濃縮

合成ケイ酸マグネシウムミニカラム(910 mg)精製

- | 試料溶液をカラム (*n*-ヘキサン10 mLで洗浄済) に注入
- | *n*-ヘキサン5 mLで洗いこむ
- | *n*-ヘキサン10 mLで溶出
- ↓ 負荷液及び溶出液を合わせ、減圧濃縮、窒素乾固

GC-FPD定量

n-ヘキサンで正確に 1 mL とし、試験溶液とする

2) ガスクロマトグラフ (GC-FPD) 操作条件

①GC-FPD (定量用)

カラム：DB-5 (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 μ m
カラム温度：100°C (1分) -30°C/分-280°C (10分)
注入口温度：250°C
検出器温度：250°C
キャリアーガス：ヘリウム
保持時間の目安：8分

②GC-FPD (確認用)

カラム：DB-1701 [(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 μ m
カラム温度：50°C (1分) -30°C/分-280°C (5分)
注入口温度：250°C
検出器温度：250°C
キャリアーガス：ヘリウム
保持時間の目安：10分

3) 検出限界

0.01 mg/kg [残留基準値 不検出]

[(1 mL/2.00 g^{*1}) \times (0.04 ng^{*2}/2 μ L)]

- *1 10.0 g \times 40 mL/200 mL (穀類、豆類及び種実類の場合)
20.0 g \times 40 mL/200 mL \times 1 mL/2 mL (果実及び野菜類の場合)
5.00 g \times 80 mL/200 mL (抹茶及びホップの場合)
9.00 g \times 180 mL/540 mL \times 2 mL/3 mL (抹茶以外の茶の場合)
10.0 g \times 1 mL/5 mL (脂肪以外の畜水産物の場合)
5.00 g \times 1 mL/2.5 mL (脂肪の場合)
- *2 最小検出量

6. 検討結果

1) 抽出法

①L-アスコルビン酸ナトリウムの添加

現行の告示試験法の抽出法ではコーヒー豆においてアヅシクロチンの回収率が 54%、シヘキサチンの回収率が 34%であった。

抽出時の酸化分解が疑われたため、L-アスコルビン酸ナトリウムを加えて抽出を行うこととした。

②抽出溶媒の検討

他の有機スズ化合物で用いる抽出溶媒の適用確認を行った。

フェンチンの通知試験法の抽出溶媒であるアセトン 100 mL に 6 mol/L 塩酸 1 mL を加えたものを用い、玄米、コーヒー豆及びキャベツで添加回収試験を行った。結果を Table1 に示した。

玄米及びコーヒー豆のシヘキサチンの回収率が平均 53%と低かったため、現行どおり抽出溶媒はアセトン及び酢酸（99：1）混液を用いることとした。

Table1 添加回収結果（添加濃度：0.01 ppm）

		回収率 (%)					平均	RSD (%)
		1	2	3	4	5		
玄米	アヅシクロチン	74	92	86	71	65	78	14.2
	シヘキサチン	53	55	55	49	52	53	5.0
コーヒー豆	アヅシクロチン	85	81	89	94	97	89	7.7
	シヘキサチン	51	51	55	60	48	53	9.4
キャベツ	アヅシクロチン	83	99	112	124	122	108	15.8
	シヘキサチン	73	100	79	81	80	83	12.6

2) 転溶

n-ヘキサンへの転溶率を Table2 及び 3 に示した。

Table2 *n*-ヘキサンへの転溶率 (%)

	1回目 (100 mL)	2回目 (50 mL)	3回目 (50 mL)	合計
アヅシクロチン	110	0	0	110
シヘキサチン	93	2	0	95

10 w/v%塩化ナトリウム溶液200 mLおよびアセトン40 mLから、

1回目100 mL、2回目は50 mL、3回目は50 mLで連続的に抽出

添加量：各0.1 μg

Table3 *n*-ヘキサンへの転溶率 (%)

	1回目 (50 mL)	2回目 (50 mL)	3回目 (50 mL)	合計
アゾシクロチン	106	3	0	109
シヘキサチン	93	0	0	93

10 w/v%塩化ナトリウム溶液100 mLから50 mLで連続的に抽出

添加量：各0.1 μ g

3) 脱脂方法

現行の告示試験法で用いられているアセトニトリル/ヘキサン分配では十分な回収率が得られないことが知られているため、以下の方法を検討した。

検討した結果、脱脂方法としてアルカリ分解を採用した。

①ゲル浸透クロマトグラフィー (GPC)

溶出状況をTable4に示した。

大豆油0.5 gを負荷、溶出させたところアゾシクロチン及びシヘキサチンの溶出区にほぼ全ての大豆油が溶出してしまい、脱脂効果は得られなかった。

Table4 ゲル浸透クロマトグラフ (GPC) からの溶出状況 (%)

	アセトン及びシクロヘキサン (1 : 4) 混液					合計
	50-60 mL	60-70 mL	70-80 mL	80-90 mL	90-100 mL	
アゾシクロチン	0	32	82	tr	0	114
シヘキサチン	0	29	75	tr	0	104

Shodex CLNpak EV-G (ϕ 20 mm \times 100 mm)

+ Shodex CLNpak EV-2000 (ϕ 20 mm \times 300 mm)

展開溶媒は連続して流下

添加量：各1 μ g

②陽イオン交換カラムクロマトグラフィー

強酸性カチオン交換ミニカラムを用いた。カラムからの溶出状況をTable5に示した。大豆油1 gにシヘキサチン0.01 μ gを添加し、エタノール30 mLで洗浄後、メタノール及び12 mol/L塩酸(99 : 1)混液10 mLで溶出させたものの回収率は101%であった。

そこで、現行の告示試験法のアセトニトリル/ヘキサン分配を陽イオン交換カラムクロマトグラフィーに変更して大豆及び牛の脂肪を用い添加回収試験を行った。結果をTable6に示した。牛の脂肪では良好な回収が得られたが、大豆では回収が得られなかった。

Table5 強酸性カチオン交換ミニカラムからの溶出状況 (%)

	エタノール 30 mL	メタノール及び12 mol/L塩酸 (99 : 1) 混液		合計
		0-10 mL	10-20 mL	
		アゾシクロチン	0	
シヘキサチン	0	95	0	95

InertSep SCX 2 g 水及びエタノール各10 mL予備洗浄

展開溶媒は連続して流下

添加量：各0.2 μg

Table6 添加回収結果 (添加濃度：0.01 ppm)

		回収率 (%)					平均	RSD (%)
		1	2	3	4	5		
大豆	アゾシクロチン	tr	tr	tr	tr	tr	-	-
	シヘキサチン	tr	tr	tr	tr	tr	-	-
牛の脂肪	アゾシクロチン	107	103	99	93	108	102	6.0
	シヘキサチン	77	76	77	73	72	75	3.0

③アルカリ分解

大豆油2 gを用いアルカリ分解の条件を検討した。分解時間は30分間、水酸化カリウム溶液の濃度は10 mol/Lとし、分解操作及び水酸化カリウム溶液量を変え検討した結果をTable7に示した。

分解操作は振とうとし、水酸化カリウム溶液量は10 mLとした。

アルカリ分解後の*n*-ヘキサンへの抽出率をTable8に示した。

Table7 アルカリ分解における脱脂状況

分解操作	水酸化カリウム溶液量 (mL)	脱脂状況
振とう	5	×
	10	○
	20	○
インキュベーターで 60°Cに加熱	5	×
	10	×
	20	○

エタノール50 mLに水酸化カリウム溶液を加えそれぞれの条件で分解後、*n*-ヘキサンで抽出。脱脂状況は目視で判断した。

Table8 アルカリ分解後の*n*-ヘキサンへの抽出率 (%)

	1回目 (50 mL)	2回目 (50 mL)	3回目 (50 mL)	合計
アゾシクロチン	98	3	0	101
シヘキサチン	92	5	0	97

エタノール50 mLおよび10 mol/L水酸化カリウム溶液10 mLに添加後、30分間振とうし10 w/v%塩化ナトリウム溶液50 mLを加えた後、50 mLで連続的に抽出
添加量：各0.1 μ g

4) グラファイトカーボンミニカラムによる精製

抹茶において現行の告示試験法ではエチル化前で多くの残留物が生じ、エチル化が阻害される。またエチル化後の*n*-ヘキサン転溶でもエマルジョンが生じ操作が困難であったためグラファイトカーボンミニカラムによる精製を検討した。

グラファイトカーボンミニカラムからの溶出状況をTable9及びTable10に示した。

Table9の溶出条件では抹茶共存下では*n*-ヘキサン区に溶出がずれてしまったため、Table10の溶出条件を採用した。

Table9 グラファイトカーボンミニカラムからの溶出状況 (%)

	<i>n</i> -ヘキサン 10 mL	アセトン		合計
		0-10 mL	10-20 mL	
アゾシクロチン	0	99	0	99
シヘキサチン	0	90	0	90

Supelclean ENVI-Carb SPE Tubes 0.5 g アセトン及び*n*-ヘキサン各5 mL予備洗浄
展開溶媒は連続して流下
添加量：各0.1 μ g

Table10 グラファイトカーボンミニカラムからの溶出状況 (%)

	アセトニトリル及びトルエン (3 : 1) 混液		合計
	0-20 mL	20-25 mL	
アゾシクロチン	107	0	107
シヘキサチン	92	0	92

Supelclean ENVI-Carb SPE Tubes 0.5 g
アセトニトリル及びトルエン (3 : 1) 混液10 mL予備洗浄
展開溶媒は連続して流下
添加量：各0.1 μ g

5) 合成ケイ酸マグネシウムミニカラムによる精製

合成ケイ酸マグネシウムミニカラムからの溶出状況をTable11に示した。

ミニカラムでも十分な精製効果が得られた。

Table11 合成ケイ酸マグネシウムミニカラムからの溶出状況 (%)

	<i>n</i> -ヘキサン 10 mL	<i>n</i> -ヘキサン及び エーテル (99 : 1) 混液		合計
		0-10 mL	10-20 mL	
シヘキサチン	102	0	0	102

Sep-Pak Plus Florisil (910 mg) *n*-ヘキサン10 mL予備洗浄

展開溶媒は連続して流下

添加量 : 0.2 μ g (シヘキサチンエチル体)

6) 測定機器

測定機器としてガスクロマトグラフ・質量分析計 (GC-MS) について検討した。

検討した結果、5 試験法の分析操作の1) 分析法フローシートに従い調製した試験溶液では一部の作物において試料由来の妨害物質のため測定が出来ず、また定量性も悪かったため、測定機器には適さなかった。

① ガスクロマトグラフ・質量分析計 (GC-MS) 操作条件

カラム : DB-5 (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 μ m

カラム温度 : 100°C (1分) -20°C/分-300°C (10分)

注入口温度 : 250°C

インターフェイス温度 : 280°C

キャリアーガス : ヘリウム

イオン化モード (電圧) : EI (70 eV)

主なイオン (*m/z*) : 315、233

注入量 : 2 μ L

保持時間の目安 : 10分

② 検量線の直線性及び検出感度

6) 測定機器の①の測定条件において濃度0.002 mg/L (0.004 ng) ~0.1 mg/L (0.2 ng) の範囲で良好な直線性を示した。マススペクトルを図1-1に、検量線を図1-2に、標準溶液のクロマトグラムを図1-3に示した。

GC-FPDの約4倍の検出感度があり、0.01 ng (0.005 mg/L \times 2 μ L) のピークのS/N比は10以上であった。

③ エチルマグネシウムブロミド・エーテル溶液について

東京化成工業株式会社製とStrem Chemicals Inc.製の3 mol/Lエチルマグネシウムブロミド・エーテル溶液を用いエチル化のブランク試験を行った。それぞれの試薬でエチル化及び*n*-ヘキサン転溶した後、*n*-ヘキサンで1 mLとしたものをブランク試験溶液とした。クロマトグラムを図1-4に示した。

東京化成工業株式会社製では試薬由来と思われる妨害ピークが見られた。

なお、GC-FPDでの測定においては、試薬由来の妨害ピークは見られなかった。

④ 添加回収試験

ほうれんそう及び茶の浸出液にアゾシクロチン及びシヘキサチンを0.01 ppm相当添加し、5試験法の分析操作の1) 分析法フローシートに従って試験溶液を調製し、GC-MSに注入した。ただしGC-FPDよりも感度が良いため検出限界相当の検出量は0.01 ng (0.005 mg/L×2 μL) とし、エチル化前にほうれんそうは0.50 g相当 (茶は1.00 g) になるよう分取し、茶は最終定容量を2 mLに変更した。結果をTable12に、クロマトグラムを図1-5、6に示した。

ほうれんそうは妨害ピークの影響により回収率が算出できなかった。また、茶はマトリックスの影響で回収率が高くなった。

Table12 添加回収結果 (添加濃度 : 0.01 ppm)

		回収率 (%)					平均	RSD (%)
		1	2	3	4	5		
ほうれんそう	アゾシクロチン	-	-	-	-	-	-	-
	シヘキサチン	-	-	-	-	-	-	-
茶 (浸出液)	アゾシクロチン	187	262	244	276	211	236	15.6
	シヘキサチン	110	143	122	180	116	134	21.1

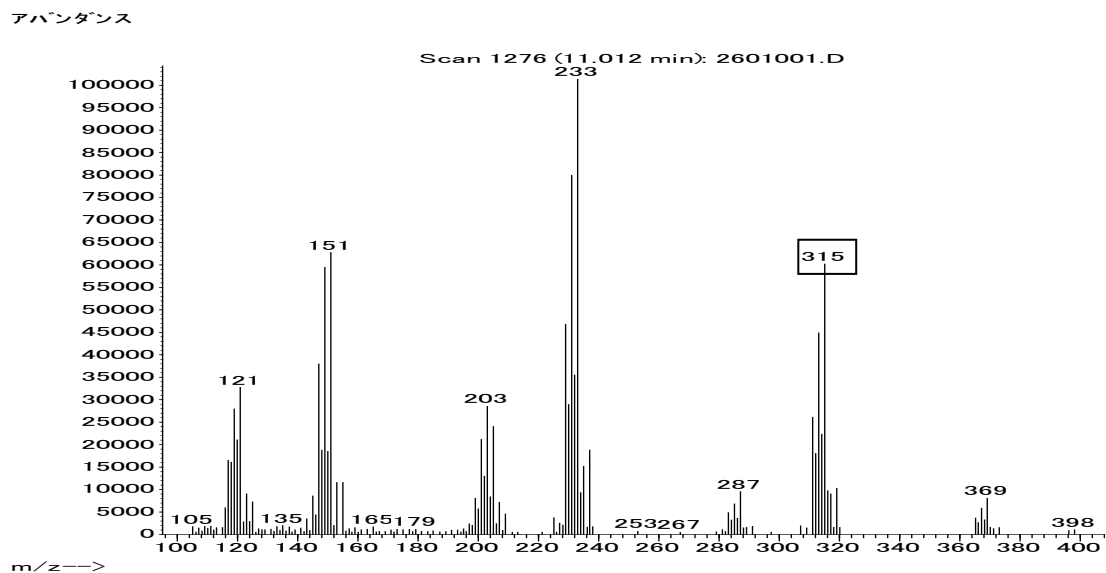
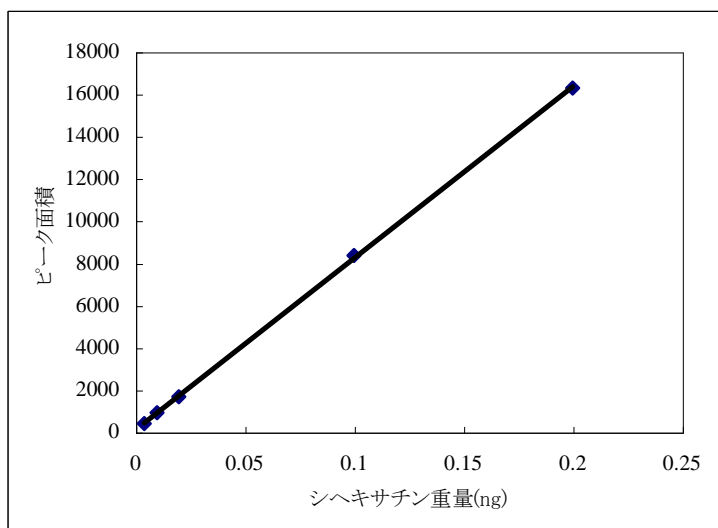


図1-1 シヘキサチンエチル体マススペクトル



データ処理装置設定条件の一例

機種 [メーカー] :

Chemstation [Agilent technologies製]

ピークの定量方法: ピーク面積法

検量線の種類: 最小二乗法

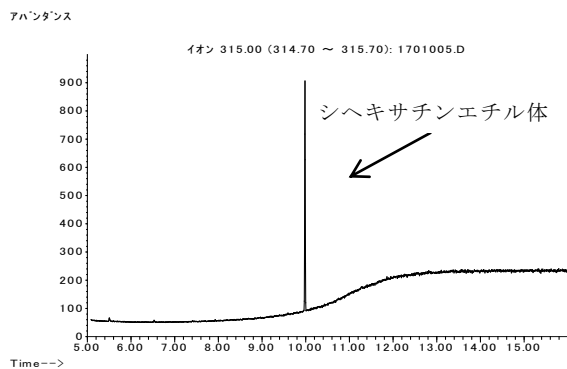
検量線基準ピークの重量: 0.004 ng~0.2 ng

r=検量線傾き (a) : a=81225.6

検量線切片 (b) : b=99.9

図1-2 検量線の一例 (GC-MS)

標準溶液 0.1 ng



標準溶液 0.01 ng

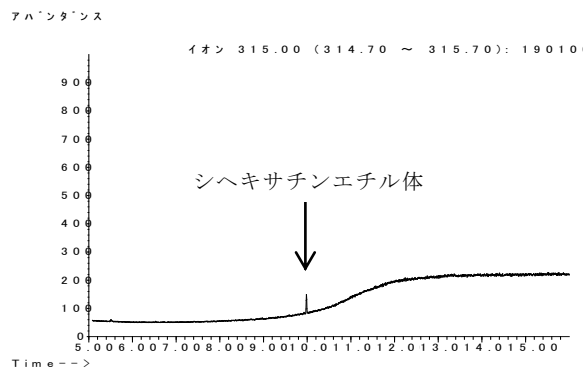
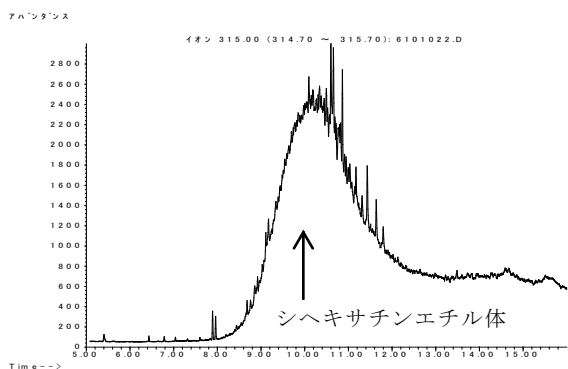


図1-3 標準溶液のクロマトグラム (GC-MS : 一例)

東京化成工業株式会社製



Strem Chemicals Inc.製

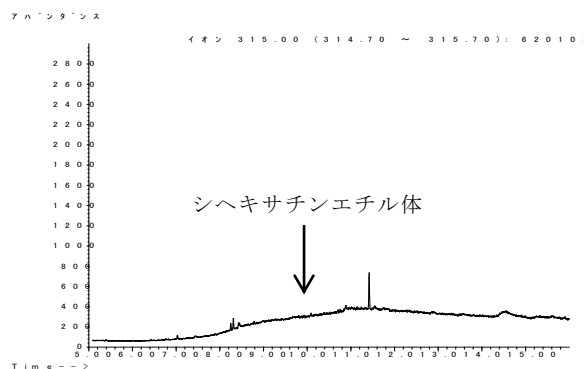
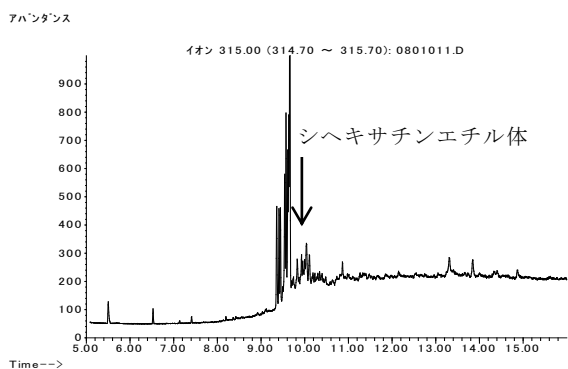
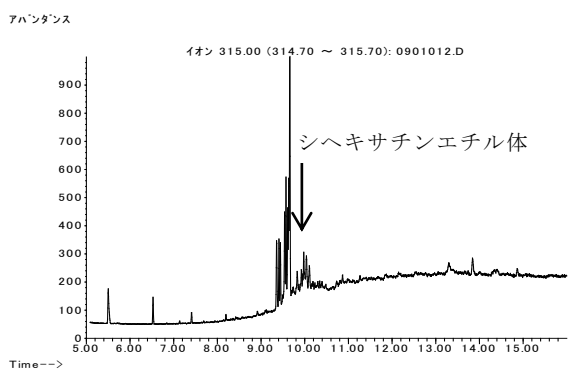


図1-4 エチル化ブランク試験クロマトグラム

ほうれんそう 無添加



ほうれんそう アズシクロチン0.01 ppm相当添加



ほうれんそう シヘキサチン0.01 ppm相当添加

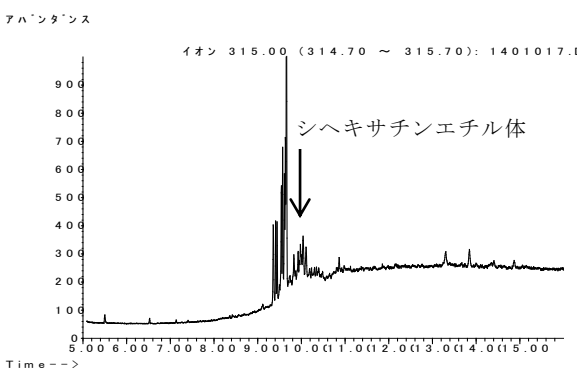
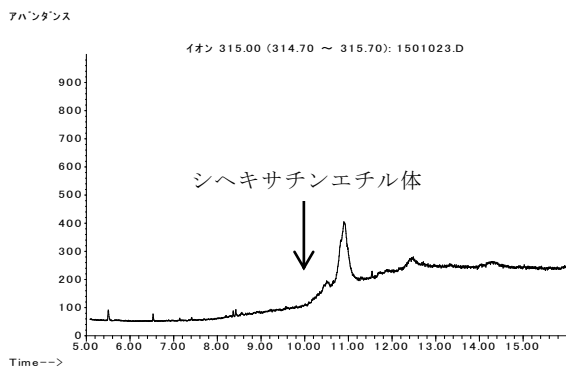
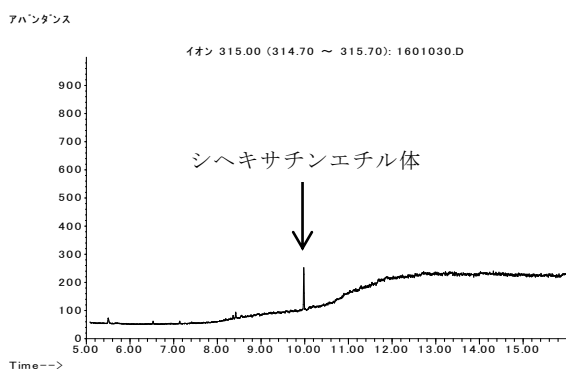


図1-5 試料のクロマトグラム (GC-MS)

茶（浸出液） 無添加



茶（浸出液） アゾシクロチン0.01 ppm相当添加



茶（浸出液） シヘキサチン0.01 ppm相当添加

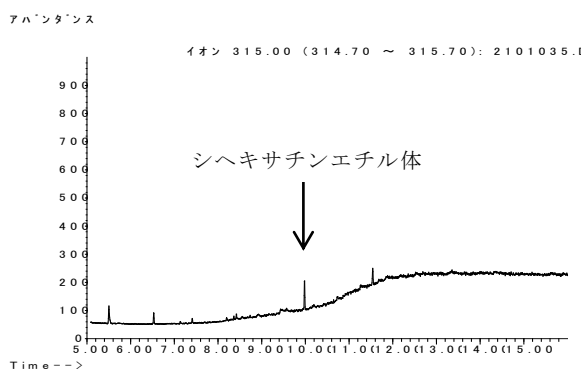


図1-6 試料のクロマトグラム (GC-MS)

7. 添加試料の調製

1) 農産物

玄米、大豆及びコーヒー豆（添加濃度：0.01 ppm相当）：試料10.0 gに添加用標準溶液0.2 mg/Lを0.5 mL添加しよく混合した後、30分間放置した。

ばれいしょ、ほうれんそう、キャベツ、りんご及びオレンジ（添加濃度：0.01 ppm相当）：試料20.0 gに添加用標準溶液0.2 mg/Lを1 mL添加しよく混合した後、30分間放置した。

茶（添加濃度：0.01 ppm）：試料5.00 gに添加用標準溶液0.1 mg/Lを0.5 mL添加しよく混合した後、30分間放置した。

2) 畜水産物

牛の筋肉、牛の肝臓、牛乳、鶏卵、サケ、うなぎ、しじみ、えび及びはちみつ（添加濃度：0.01 ppm相当）：試料10.0 gに添加用標準溶液0.2 mg/Lを0.5 mL添加しよく混合した後、30分間放置した。

牛の脂肪（添加濃度：0.01 ppm）：試料5.00 gに添加用標準溶液0.1 mg/Lを0.5 mL添加しよく混合した後、30分間放置した。

8. 添加回収試験

試料にアゾシクロチン又はシヘキサチンを0.01 ppm相当添加し、5 試験法の分析操作の1) 分析法フローシートに従って試験溶液を調製し、GC-FPDに注入した。

農産物については玄米、大豆、ばれいしょ、ほうれんそう、キャベツ、りんご、オレンジ、抹茶、コーヒー豆及び茶（浸出液）を試料とした。

畜水産物については、牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳、鶏卵、サケ、うなぎ、しじみ、えび及びはちみつとした。

GC-FPD（定量用）の検量線を図2-1に、標準溶液のクロマトグラムを図2-2に、試料のクロマトグラムを図2-3-1～図2-3-10に示した。GC-FPD（確認用）の検量線を図3-1に、標準溶液のクロマトグラムを図3-2に、試料のクロマトグラムを図3-3-1～図3-3-10に示した。結果をTable 13～16に示した。

Table 13 アゾシクロチン（農産物）添加回収結果（0.01 ppm相当添加）

	真度 (%)					平均	併行精度 (RSD%)
	1	2	3	4	5		
玄米	90	89	90	84	93	89	3.7
大豆	72	63	79	69	69	70	8.3
ばれいしょ	100	107	99	117	97	104	7.9
ほうれんそう	126	105	99	100	129	112	12.7
キャベツ	114	115	114	115	115	115	0.6
りんご	108	102	97	82	115	101	12.4
オレンジ	78	76	72	83	86	79	7.2
抹茶	85	72	78	74	84	79	7.4
コーヒー豆	66	73	75	72	72	72	4.5
茶（浸出液）	87	103	97	118	107	102	11.5

Table 14 シヘキサチン（農産物）添加回収結果（0.01 ppm相当添加）

	真度 (%)					平均	併行精度 (RSD%)
	1	2	3	4	5		
玄米	92	108	91	100	92	97	7.7
大豆	73	73	67	69	72	71	4.0
ばれいしょ	79	92	72	72	97	82	14.0
ほうれんそう	122	119	117	103	111	114	6.5
キャベツ	105	116	111	104	102	108	5.7
りんご	103	94	101	117	106	104	8.2
オレンジ	73	79	70	84	71	75	7.8
抹茶	84	78	104	75	86	85	13.5
コーヒー豆	82	85	81	74	70	78	7.5
茶（浸出液）	93	89	95	96	111	97	8.7

Table 15 アゾシクロチン（畜水産物）添加回収結果（0.01 ppm相当添加）

	真度 (%)					平均	併行精度 (RSD%)
	1	2	3	4	5		
牛の筋肉	115	94	113	107	103	106	8.1
牛の脂肪	79	105	84	99	102	94	12.3
牛の肝臓	86	73	93	75	76	81	10.5
牛乳	95	93	73	80	72	83	12.8
鶏卵	86	73	88	98	93	88	10.8
サケ	71	88	87	85	96	85	10.7
うなぎ	80	100	102	80	92	91	11.6
しじみ	100	93	89	94	85	92	6.2
えび	108	92	92	90	95	95	7.8
はちみつ	98	86	80	75	78	83	11.0

Table 16 シヘキサチン（畜水産物）添加回収結果（0.01 ppm相当添加）

	真度 (%)					平均	併行精度 (RSD%)
	1	2	3	4	5		
牛の筋肉	122	109	105	118	118	114	6.1
牛の脂肪	92	99	110	99	99	100	6.6
牛の肝臓	82	81	85	82	97	85	7.6
牛乳	75	73	78	98	74	80	12.9
鶏卵	110	86	88	92	106	96	11.2
サケ	76	85	98	104	96	92	12.4
うなぎ	101	112	87	107	109	103	9.8
しじみ	94	89	102	99	116	100	10.3
えび	77	98	101	83	97	91	11.6
はちみつ	87	76	78	90	78	82	7.7

9. ブランク試料の妨害状況

測定条件は5 試験法の分析操作の2) ガスクロマトグラフ (GC-FPD) 操作条件の① GC-FPD (定量用) とし、②GC-FPD (確認用) で確認を行った。どちらの条件でも農産物及び畜水産物の何れの試料においても妨害ピークは検出されなかった。

10. 試料マトリックスの測定への影響

平成21年度 残留農薬等試験法の妥当性評価試験 アゾシクロチン及びシヘキサチン試験法（農産物及び畜水産物）において試料マトリックスの測定への影響について検討した結果をTable 17に示した。添加回収試験における回収率100%相当濃度になるように調製したマトリックス添加標準溶液の溶媒混合標準溶液に対するピーク高さ比を求めた。高さ比の平均は0.96~1.18であり、測定への影響はないものと考えられた。

Table 17 試料マトリックスの測定への影響

担当機関: 日本食品分析センター

No.	分析対象化合物	食品名	標準溶液濃度 ^{*1} (mg/L)	面積又は高さの別	ピーク面積(高さ) ^{*2}																		ピーク面積(高さ)比 (マトリックス/溶媒) ^{*3}			備考
					1日									2日									1日	2日	平均	
					ブランク	マトリックス ^{*4}			溶媒			ブランク	マトリックス ^{*4}			溶媒										
						n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均		n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均								
シヘキサチン	玄米	0.02	高さ	0	81610	81318	81464	73256	74011	73634	0	52051	51983	52017	50446	50850	50648	1.11	1.03	1.07						
シヘキサチン	大豆	0.02	高さ	0	65287	64664	64976	72042	72054	72048	0	82504	83084	82794	76758	77198	76978	0.90	1.08	0.99						
シヘキサチン	らっかせい	0.02	高さ	0	68463	69395	68929	60288	60372	60330	0	68762	69252	69007	70603	71447	71025	1.14	0.97	1.06						
シヘキサチン	ほうれんそう	0.02	高さ	0	79201	82113	80657	74892	73893	74393	0	61338	60576	60957	56922	54948	55935	1.08	1.09	1.09						
シヘキサチン	キャベツ	0.02	高さ	0	64255	64096	64176	58394	60348	59371	0	66264	67434	66849	79191	79037	79114	1.08	0.84	0.96						
シヘキサチン	ばれいしょ	0.02	高さ	0	59466	60686	60076	58123	57911	58017	0	55538	55310	55424	52211	53617	52914	1.04	1.05	1.04						
シヘキサチン	なす	0.02	高さ	0	56838	56186	56512	53797	54531	54164	0	79713	78760	79237	72474	74437	73456	1.04	1.08	1.06						
シヘキサチン	オレンジ	0.02	高さ	0	65859	64467	65163	59947	59166	59557	0	55702	56065	55884	54128	53088	53608	1.09	1.04	1.07						
シヘキサチン	りんご	0.02	高さ	0	66765	66361	66563	56826	56071	56449	0	78136	78925	78531	72933	73311	73122	1.18	1.07	1.13						
シヘキサチン	茶	0.02	高さ	0	60025	58341	59183	50451	52158	51305	0	62164	63194	62679	51601	52634	52118	1.15	1.20	1.18						
シヘキサチン	牛の筋肉	0.02	高さ	0	56890	58241	57586	55877	54565	55221	0	58729	57874	58302	53810	55687	54749	1.04	1.06	1.05						
シヘキサチン	牛の脂肪	0.02	高さ	0	92276	91751	92014	82037	82603	82320	0	62364	60436	61400	56140	56213	56177	1.12	1.09	1.11						
シヘキサチン	牛の肝臓	0.02	高さ	0	68519	69015	68767	74311	74831	74571	0	58478	58365	58422	55284	55782	55533	0.92	1.05	0.99						
シヘキサチン	鶏の筋肉	0.02	高さ	0	74197	74527	74362	73058	73314	73186	0	57230	60451	58841	51765	52638	52202	1.02	1.13	1.07						
シヘキサチン	さけ	0.02	高さ	0	79932	80673	80303	80704	74760	77732	0	56879	57649	57264	54553	53788	54171	1.03	1.06	1.05						
シヘキサチン	うなぎ	0.02	高さ	0	75087	74696	74892	74202	75478	74840	0	57511	58683	58097	55877	56056	55967	1.00	1.04	1.02						
シヘキサチン	しじみ	0.02	高さ	0	79799	79377	79588	74235	74503	74369	0	57215	57266	57241	55887	56431	56159	1.07	1.02	1.04						
シヘキサチン	鶏卵	0.02	高さ	0	85742	86340	86041	66917	68011	67464	0	60151	59886	60019	55416	55936	55676	1.28	1.08	1.18						
シヘキサチン	牛乳	0.02	高さ	0	85381	87193	86287	72175	73800	72988	0	58783	57658	58221	52841	54408	53625	1.18	1.09	1.13						
シヘキサチン	はちみつ	0.02	高さ	0	70547	68480	69514	66245	62943	64594	0	53522	54310	53916	51739	56298	54019	1.08	1.00	1.04						

*1 添加回収試験における回収率100%相当濃度の標準溶液をブランク試料(マトリックス添加標準溶液)及び溶媒(溶媒標準溶液)で調製する。

*2 マトリックス添加標準溶液(マトリックス)及び溶媒標準溶液(溶媒)の順に測定し、2日間の結果から評価する。

*3 ブランクにピークが認められた場合には、マトリックス添加標準溶液の値はブランク値を差し引いた値を用いる。

*4 マトリックス添加標準溶液は試験当日のブランク試料を用いて測定日ごとに調製する。

11. 結論

アゾシクロチン及びシヘキサチンについて告示試験法の見直しを行った。その結果、酢酸酸性アセトン抽出、*n*-ヘキササン転溶、エチル化及び合成ケイ酸マグネシウムカラムクロマトグラフィーで精製し、必要に応じてアルカリ分解及びグラフアイトカーボンカラムクロマトグラフィーによる精製を加え、GC-FPDで定量、確認するという方法を提案する。

農産物の試験法について玄米、大豆、ばれいしょ、ほうれんそう、キャベツ、りんご、オレンジ、抹茶、コーヒー豆及び茶（浸出液）の10品目の試料に適用した場合の真度はアゾシクロチン70~115%及びシヘキサチン71~114%、併行精度はアゾシクロチン0.6~15%及びシヘキサチンは4~14%であり、定量限界は全ての試料において0.01 ppmが可能であることが確認された。

畜水産物の試験法について牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳、鶏卵、さけ、うなぎ、しじみ、えび及びはちみつの10品目の試料に適用した場合の真度はアゾシクロチン81~106%及びシヘキサチン80~106%、併行精度はアゾシクロチン6~12%及びシヘキサチンは6~13%であり、定量限界は全ての試料において0.01 ppmが可能であることが確認された。

12. 文献

厚生労働省告示第370号 「アゾシクロチン及びシヘキサチン試験法」