

アゾキシストロビン試験法（農産物）

1. 分析対象化合物

アゾキシストロビン

2. 装置

紫外分光光度型検出器付き高速液体クロマトグラフ及び液体クロマトグラフ・質量分析計を用いる。

3. 試薬、試液

総則の3に示すものを用いる。

4. 標準品

アゾキシストロビン 本品はアゾキシストロビン 99%以上を含む。

融点 本品の融点は 116～118° である。

5. 試験溶液の調製

a 抽出法

(1) 穀類、豆類、果実、野菜及び種実類の場合

穀類、豆類及び種実類の場合は、検体を 420 μ m の標準網ふるいを通るように粉碎した後、その 10.0g を量り採り、水 20ml を加え、2 時間放置する。

果実及び野菜(たまねぎ、にんにく、ねぎ及びわけぎを除く。)の場合は、検体約 1kg を精密に量り、3%リン酸溶液 500ml を加え、細切均一化した後、検体 20.0g に相当する量を量り採る。

たまねぎ、にんにく、ねぎ及びわけぎの場合は、検体約 1kg を精密に量り、3%リン酸 2,000ml を加え、細切均一化した後、検体 20.0g に相当する量を量り採る。

これにアセトン 100ml を加え、3 分間細砕した後、ろ紙を用いてすり合わせ減圧濃縮器中に吸引ろ過する。ろ紙上の残留物を採り、アセトン 50ml を加え、3 分間細砕した後、上記と同様に操作して、ろ液をその減圧濃縮器中に合わせ、40° 以下で穀類、豆類及び種実類の場合は約 50ml に、果実及び野菜(たまねぎ、にんにく、ねぎ及びわけぎを除く。)の場合は約 75ml に、たまねぎ、にんにく、ねぎ及びわけぎの場合は約 120ml に濃縮する。

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム(5,000mg)にアセトン 30ml を注入し、流出液は捨てる。水 10ml を注入し、流出液は捨てる。このカラムに上記の減圧濃縮器中の溶液を注入し、流出液を 300ml の三角フラスコに採る。次いで上記の減圧濃縮器のナス型フラスコにアセトン 9ml を加え、残留物を溶かした後、水 6ml を加えて混和し、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムに注入する操作を 2 回繰り返す、両流出液を上記の三角フラスコに合わせる。

これをあらかじめ 10%塩化ナトリウム溶液 100ml を入れた 500ml の分液漏斗に移

す。酢酸エチル及び n-ヘキサン の混液 (1 : 1) 100ml を用いて上記の三角フラスコを洗い、洗液を上記の分液漏斗に合わせる。振とう機を用いて 5 分間激しく振り混ぜた後、静置し、酢酸エチル及び n-ヘキサンの層を 300ml の三角フラスコに移す。水層に酢酸エチル及び n-ヘキサンの混液 (1 : 1) 50ml を加え、上記と同様に操作して、酢酸エチル及び n-ヘキサンの層を上記の三角フラスコに合わせる。これに適量の無水硫酸ナトリウムを加え、時々振り混ぜながら 15 分間放置した後、すり合わせ減圧濃縮器中にろ過する。次いで酢酸エチル及び n-ヘキサンの混液 (1 : 1) 20ml を用いて三角フラスコを洗い、その洗液でろ紙上の残留物を洗う操作を 2 回繰り返す。両洗液をその減圧濃縮器中に合わせ、40° 以下で酢酸エチル及び n-ヘキサンを除去する。この残留物にアセトン 3ml を加えて溶かし、n-ヘキサン 7ml を加える。

(2) 茶の場合

検体を粉砕した後、その 5.00g を量り採り、水 20ml を加え、2 時間放置する。

これにアセトン 100ml を加え、3 分間細砕した後、ろ紙を用いて三角フラスコ中に吸引ろ過する。ろ紙上の残留物を採り、アセトン 50ml を加え、3 分間細砕した後、上記と同様に操作してろ液をその三角フラスコ中に合わせる。このろ液にアセトンを加えて 200ml とする。

グラスウールをつめ、カラムクロマトグラフィー用アルミナ(塩基性)10g を充てんした直系 9cm の漏斗に上記のろ液 100ml を注入し、流出液をすり合わせ減圧濃縮器中に採る。次いで上記の漏斗にアセトン 30ml を注入し、流出液を上記の減圧濃縮器中に合わせる。これにリン酸 1ml を加え、40° 以下で約 25ml に濃縮する。

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム(5,000mg)にアセトン 30ml を注入し、流出液は捨てる。次いで水 10ml を注入し、流出液は捨てる。このカラムに上記の減圧濃縮器中の溶液を注入し、流出液を 100ml の三角フラスコに採る。次いで、上記の減圧濃縮器のナス型フラスコにアセトン 9ml を加え、残留物を溶かした後、水 6ml を加えて混和し、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムに注入する操作を 2 回繰り返す。両流出液を上記の三角フラスコに合わせる。

これをあらかじめ 10% 塩化ナトリウム溶液 100ml を入れた 500ml の分液漏斗に移す。酢酸エチル及び n-ヘキサンの混液 (1 : 1) 100ml を用いて上記の三角フラスコを洗い、洗液を上記の分液漏斗に合わせる。振とう機を用いて 5 分間激しく振り混ぜた後、静置し、酢酸エチル及び n-ヘキサンの層を 300ml の三角フラスコに移す。水層に酢酸エチル及び n-ヘキサンの混液 (1 : 1) 50ml を加え、上記と同様に操作して、酢酸エチル及び n-ヘキサンの層を上記の三角フラスコに合わせる。これに適量の無水硫酸ナトリウムを加え、時々振り混ぜながら 15 分間放置した後、すり合わせ減圧濃縮器中にろ過する。次いで酢酸エチル及び n-ヘキサンの混液 (1 : 1) 20ml を用いて三角フラスコを洗い、その洗液でろ紙上の残留物を洗う操作を 2 回繰り返す。両洗液をその減圧濃縮器中に合わせ、40° 以下で酢酸エチル及び n-ヘキサンを除去する。この残留物にアセトン 3ml を加えて溶かし、n-ヘキサン 7ml を加える。

b 精製法

(1) 合成ケイ酸マグネシウムカラムクロマトグラフィー

内径 15mm、長さ 300mm のクロマトグラフ管にカラムクロマトグラフィー用合成ケイ酸マグネシウム 5g を n-ヘキサンに懸濁したもの、次いでその上に無水硫酸ナトリ

ウム約 5g を入れ、カラムの上端に少量の n-ヘキサンが残る程度まで n-ヘキサンを流出させる。このカラムに a 抽出法で得られた溶液を注入した後、アセトン及び n-ヘキサンの混液(3 : 7) 100ml を注入し、流出液をすり合わせ減圧濃縮器中に採り、40° 以下でアセトン及び n-ヘキサンを除去する。この残留物に酢酸エチル 3ml を加えて溶かし、n-ヘキサン 7ml を加える。

(2) シリカゲルカラムクロマトグラフィー

内径 15mm、長さ 300mm のクロマトグラフ管にカラムクロマトグラフィー用シリカゲル(粒径 63~200 μ m) 5g を n-ヘキサンに懸濁したもの、次いでその上に無水硫酸ナトリウム約 5g を入れ、カラムの上端に少量の n-ヘキサンが残る程度まで n-ヘキサンを流出させる。このカラムに(1) 合成ケイ酸マグネシウムカラムクロマトグラフィーで得られた溶液を注入した後、酢酸エチル及び n-ヘキサンの混液(3 : 7) 100ml を注入し、流出液は捨てる。次いで酢酸エチル及び n-ヘキサンの混液(1 : 1) 100ml を注入し、流出液をすり合わせ減圧濃縮器中に採り、40° 以下で酢酸エチル及び n-ヘキサンを除去する。この残留物にアセトニトリル及び水の混液(9 : 11)を加えて溶かし、正確に 2ml として、これを試験溶液とする。

6. 操作法

a 定性試験

次の操作条件で試験を行う。試験結果は標準品と一致しなければならない。

操作条件

カラム充てん剤 オクタデシルシリル化シリカゲル(粒径 5 μ m)を用いる。

クロマトグラフ管 内径 4.6mm、長さ 150mm のステンレス管を用いる。

カラム温度 40°

検出器 波長 260nm で操作する。

移動相 アセトニトリル及び水の混液(9 : 11)を用いる。アゾキシストロビンが約 16 分で流出する流速に調整する。

b 定量試験

a 定性試験と同様の操作条件で得られた試験結果に基づき、ピーク高法又はピーク面積法により定量を行う。

c 確認試験

a 定性試験と同様の操作条件で液体クロマトグラフィー・質量分析を行う。試験結果は標準品と一致しなければならない。また、必要に応じ、ピーク高法及びピーク面積法により定量を行う。

7. 定量限界

0.02 mg/kg (穀類にあつては 0.04 mg/kg、らっかせいにあつては 0.01 mg/kg、茶にあつては 0.2 mg/kg)

8. 留意事項

なし

9. 参考文献
なし

10. 類型
A