

EPTC 試験法(畜水産物)

1. 分析対象化合物

EPTC

2. 適用食品

畜水産物

3. 装置

アルカリ熱イオン化検出器付きガスクロマトグラフ (GC-FTD) 又は高感度窒素・リン検出器付きガスクロマトグラフ (GC-NPD)

ガスクロマトグラフ・質量分析計 (GC-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。

合成ケイ酸マグネシウムミニカラム (1,000 mg) 内径 12~13 mm のポリエチレン製の
カラム管に、合成ケイ酸マグネシウム 1,000 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を用いる。

EPTC 標準品 本品は EPTC を 98%以上含む。

5. 試験溶液の調製

1) 抽出

① 筋肉、脂肪、肝臓、腎臓及び魚介類の場合

脂肪以外の場合は試料 20.0 g を量り採る。脂肪の場合は、5.00 g を量り採る。

これに水 20 mL を加え、ホモジナイズした後、アセトン及び *n*-ヘキサン (1 : 2) 混液 100 mL を加え、さらにホモジナイズした後、毎分 2,500 回転で 5 分間遠心分離し、有機層を採る。残留物に *n*-ヘキサン 50 mL を加え、ホモジナイズした後、上記と同様に遠心分離する。得られた有機層を合わせ、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する。ろ液に 2 vol% ジエチレングリコール・アセトン溶液 2 mL を加え、40°C以下で約 2 mL まで濃縮する。窒素気流下で溶媒を除去した後、残留物の重量を測定し、これを抽出脂肪重量とする。

脂肪以外の場合は残留物をアセトン及びシクロヘキサン (1 : 4) 混液に溶かし、正確に 20 mL とする。(抽出脂肪重量が 2.0 g を超える場合は、溶液の抽出脂肪濃度が 0.10 g/mL 以下となるように液量を増やす。) 脂肪の場合は、残留物に溶液の抽出脂肪濃度が 0.10 g/mL 以下となるようにアセトン及びシクロヘキサン (1 : 4) 混液を加えて溶かす。

② 乳及び卵の場合

試料 20.0 g にアセトン及び *n*-ヘキサン (1 : 2) 混液 100 mL を加え、ホモジナイズした後、毎分 2,500 回転で 5 分間遠心分離し、有機層を採る。残留物に、卵は *n*-ヘキサン 50 mL、乳の場合はアセトン及び *n*-ヘキサン (1 : 4) 混液 50 mL を加え、ホモジナイズした後、上記と同様に遠心分離する。得られた有機層を合わせ、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する。ろ液に 2 vol% ジエチレングリコール・アセトン溶液 2 mL を加え、40°C 以下で約 2 mL まで濃縮する。窒素気流下で溶媒を除去した後、残留物の重量を測定し、これを抽出脂肪重量とする。残留物をアセトン及びシクロヘキサン (1 : 4) 混液に溶かし、正確に 20 mL とする。(抽出脂肪重量が 2.0 g を超える場合は、溶液の抽出脂肪濃度が 0.10 g/mL 以下となるように液量を増やす。)

③ はちみつの場合

試料 20.0 g に水 20 mL を加えて溶かす。これにアセトン及び *n*-ヘキサン (1 : 2) 混液 100 mL を加え、ホモジナイズした後、毎分 2,500 回転で 5 分間遠心分離し、有機層を採る。残留物に *n*-ヘキサン 50 mL を加え、ホモジナイズした後、上記と同様に遠心分離する。得られた有機層を合わせ、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する。ろ液を 40°C 以下で約 2 mL まで濃縮し、*n*-ヘキサンで正確に 20 mL とする。

2) 精製

① 筋肉、脂肪、肝臓、腎臓、魚介類、乳及び卵の場合

a ゲル浸透クロマトグラフィー

1) で得られた溶液を毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離し、その上澄液 5.0 mL をゲル浸透クロマトグラフィー用カラム (スチレンジビニルベンゼン共重合体カラム) に注入し、アセトン及びシクロヘキサン (1 : 4) 混液で溶出する。アクリナトリンの保持時間からトリシクラゾールの溶出終了までの溶出液を採り、40°C 以下で約 2 mL まで濃縮し、*n*-ヘキサン 5 mL を加えて混和する。

b 合成ケイ酸マグネシウムカラムクロマトグラフィー

合成ケイ酸マグネシウムミニカラム (1,000 mg) にエーテル 5 mL 及び *n*-ヘキサン 15 mL を順次注入し、各流出液は捨てる。このカラムに a で得られた溶液を注入した後、さらにエーテル及び *n*-ヘキサン (3 : 7) 混液 5 mL を注入し、全溶出液を 40°C 以下で約 1 mL まで濃縮し、アセトンで正確に 5 mL としたものを試験溶液とする。

② はちみつの場合

合成ケイ酸マグネシウムミニカラム (1,000 mg) にエーテル 5 mL 及び *n*-ヘキサン 15 mL を順次注入し、各流出液は捨てる。このカラムに 1) で得られた溶液から正確に 5 mL を分取して注入した後、さらにエーテル及び *n*-ヘキサン (3 : 7) 混液 5 mL を注入し、全溶出液を 40°C 以下で約 1 mL まで濃縮し、アセトンで正確に 5 mL としたものを試験溶液とする。

6. 検量線の作成

EPTC 標準品のアセトン溶液を数点調製し、それぞれ GC-FTD 又は GC-NPD 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 (脂肪等を除く) 0.01 mg/kg に相当する試験溶液中濃度は 0.01 mg/L である。

7. 定量

試験溶液を GC-FTD 又は GC-NPD に注入し、6 の検量線で EPTC の含量を求める。

8. 確認試験

GC-MS により確認する。

9. 測定条件

(例)

GC

検出器 : NPD

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

カラム温度 : 60°C (2分) -15°C/分-200°C (2分) -5°C/分-280°C (10分)

注入口温度 : 250°C

検出器温度 : 300°C

キャリアーガス : ヘリウム

注入量 : 1 µL

保持時間の目安 : 10分

GC-MS

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 : 50°C (1分) -25°C/分-125°C (0分) -10°C/分-300°C (10分)

注入口温度 : 250°C

キャリアーガス : ヘリウム

イオン化モード (イオン化エネルギー) : EI (70 eV)

主なイオン (*m/z*) : 189、160、132、128

注入量：1 μ L

保持時間の目安：8分

10. 定量限界

0.01 mg/kg（脂肪の場合は 0.02 mg/kg）

11. 留意事項

1) 試験法の概要

EPTC を試料からアセトン及び *n*-ヘキサン（1：2）混液で抽出し、ゲル浸透クロマトグラフィー及び合成ケイ酸マグネシウムカラム（はちみつの場合はゲル浸透クロマトグラフィーを省略する）で精製した後、GC-FTD 又は GC-NPD で定量し、GC-MS で確認する方法である。

2) 注意点

- ① EPTC は蒸気圧が高いので濃縮時に揮散しやすい。抽出後の減圧濃縮ではキーパーとしてジエチレングリコールを加え、溶媒を約 2 mL 残し、窒素気流を用いて穏やかに溶媒を除去する。精製操作後の減圧濃縮では乾固をしないよう十分注意する。
- ② 5. 2) ① b で、a で得られた溶液をカラムに注入するときは、a の容器を *n*-ヘキサン 1 mL で 2 回洗い込む。
- ③ ゲル浸透クロマトグラフィー条件の例を以下に示す。

カラム：スチレンジビニルベンゼン共重合体カラム（内径 20 mm、長さ 300 mm）に
ガードカラムとしてスチレンジビニルベンゼン共重合体カラム（内径 20 mm、
長さ 100 mm）を接続したもの、又は同等品

移動相：アセトン及びシクロヘキサン（1：4）混液

流速：5 mL/min

カラム温度：40°C

注入量：5.0 mL

モニター波長：254 nm

分取範囲：次の方法によりあらかじめ決定しておく。

アクリナトリン及びトリシクラゾールの 5 mg/L 混合溶液を移動相で調製し、その 5.0 mL をゲル浸透クロマトグラフィー用カラムに注入して 254 nm でモニターし、溶出位置を確認する。溶出液を適当な間隔で分取して GC 又は GC-MS で測定するなど他の適切な方法を用いてもよい。

分取範囲（アクリナトリンの保持時間からトリシクラゾールの溶出が終了するまで）の例を図 1 に示した。

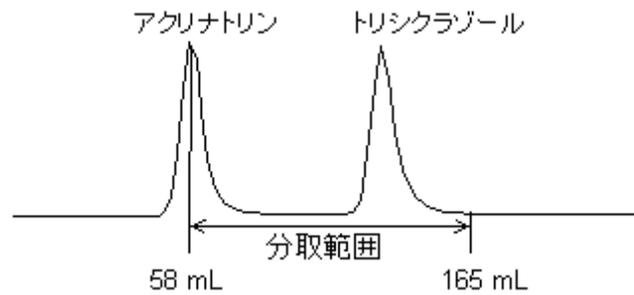


図1 分取範囲の例
(例) 58～165 mL (合計 107 mL)

- ④ 脂肪含有量が高い試料では、試験溶液の濃縮倍率が低くなる。その際、目標の測定感度が得られない場合には、抽出脂肪を用いてゲル浸透クロマトグラフィー以降の操作を複数回繰り返し、合成ケイ酸マグネシウムミニカラム精製後の溶出液を合わせて試験溶液とする。また必要に応じて、適宜、試験溶液の濃縮倍率を調整する。例えば、脂肪の場合は抽出脂肪重量が 4 g を超えるので、重量測定後、残留物をアセトン及びシクロヘキサン (1 : 4) 混液に溶かし、正確に 50 mL とする。この溶液についてゲル浸透クロマトグラフィー以降の操作を 2 回繰り返し、合成ケイ酸マグネシウムミニカラム精製後の溶出液を合わせる。
- ⑤ 試験法開発時に検討した食品：牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、豚の筋肉、さけ、うなぎ、しじみ、牛乳、鶏卵及びはちみつ

12. 参考文献

なし

13. 類型

C