

イミノクタジン試験法（農産物）

1. 分析対象化合物

イミノクタジン
イミノクタジン三酢酸塩
イミノクタジンアルベシル酸塩

2. 装置

ポストカラム反応蛍光光度型検出器付き高速液体クロマトグラフ (HPLC-FL (ポストカラム))

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。

0.1 mol/L 塩酸・メタノール溶液 塩酸 10 mL にメタノールを加えて 1,000 mL とする。

トリエチルアミン溶液 水酸化ナトリウム 40.0 g 及びトリエチルアミン 0.75 mL に水を加えて 1,000 mL とする。

発蛍光液 ニンヒドリン 3 g に水を加えて 1,000 mL とする。

リン酸緩衝液 (pH 6) 第1液：リン酸一カリウム 2.713 g を量り、水を加えて溶かして 1,000 mL とする。第2液：0.1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を用いる。第1液 400 mL と第2液 7 mL を混和し、両液を用いて pH を 6 に調整する。

イミノクタジン三酢酸塩標準品 本品はイミノクタジン三酢酸塩 98%以上を含む。

4. 試験溶液の調製

1) 抽出

① 穀類、豆類、種実類、果実、野菜及び抹茶の場合

穀類、豆類及び種実類の場合は、試料 20.0 g に塩酸グアニジン 5 g、トリエチルアミン溶液 20 mL 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、検体約 100 g を精密に量り、塩酸グアニジン 25 g 及びトリエチルアミン溶液 100 mL を加え、細切均一化した後、検体 20.0 g に相当する量を量り採る。

抹茶の場合は、試料 2.00 g に塩酸グアニジン 5 g、トリエチルアミン溶液 20 mL 及び水 20 mL を加え 30 分間放置する。

これに塩化ナトリウム 5 g 並びに *n*-ブタノール及び *n*-ヘキサン (1:1) 混液 100 mL を加えてホモジナイズした後、毎分 3,000 回転で 10 分間遠心分離し、上澄液をあらかじめトリエチルアミン溶液 50 mL を入れた分液漏斗に移す。残留物に *n*-ブタノール及び *n*-ヘキサン (1:1) 混液 50 mL を加えてホモジナイズした後、上記と同様に遠心分離する。得られた上澄液を合わせ、軽く振り混ぜた後、静置し、水層を捨てる。

これに水 30 mL 及び 1 mol/L 硫酸 2 mL を加え、振とうした後、静置し、水層をとる。*n*-ブ

タノール及び *n*-ヘキサン混液層に水 20 mL 及び 1 mol/L 硫酸 0.5 mL を加え、上記と同様に操作する。得られた水層を合わせ、50°C以下で約 2 mL に濃縮する。これにリン酸緩衝液 (pH 6) 5 mL を加えた後、0.1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を加えて pH 6 に調整する。

② 抹茶以外の茶の場合

試料 9.00 g を 100°Cの水 540 mL に浸し、室温で 5 分間放置した後、ろ過し、冷後ろ液 120 mL をあらかじめトリエチルアミン溶液 100 mL を入れた分液漏斗に移す。これに塩化ナトリウム 20 g、塩酸グアニジン 1 g 並びに *n*-ブタノール及び *n*-ヘキサン (1 : 1) 混液 100 mL を加え、振とうした後、静置し、*n*-ブタノール及び *n*-ヘキサン混液層をあらかじめトリエチルアミン溶液 50 mL を入れた分液漏斗に移す。水層に *n*-ブタノール及び *n*-ヘキサン (1 : 1) 混液 50 mL を加え、上記と同様に操作する。*n*-ブタノール及び *n*-ヘキサン混液層を合わせ、軽く振り混ぜた後、静置し、水層を捨てる。

これに水 30 mL 及び 1 mol/L 硫酸 2 mL を加え、振とうした後、静置し、水層をとる。*n*-ブタノール及び *n*-ヘキサン混液層に水 20 mL 及び 1 mol/L 硫酸 0.5 mL を加え、上記と同様に操作する。得られた水層を合わせ、50°C以下で約 2 mL に濃縮する。これにリン酸緩衝液 (pH 6) 5 mL を加えた後、0.1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を加えて pH 6 に調整する。

2) 精製

カルボキシエチルシリル化シリカゲルミニカラム (1,000 mg) に、メタノール及び水各 10 mL を順次注入し、流出液は捨てる。このカラムに 1) で得られた溶液を注入し、流出液は捨てる。次いで、リン酸緩衝液 (pH 6) 5 mL を注入し、流出液は捨てる。0.1 mol/L 塩酸・メタノール溶液 10 mL を注入し、溶出液を 40°C以下で濃縮し、塩酸及びメタノールを除去する。この残留物を 8. 測定条件の移動相に溶解し、正確に 5 mL としたものを試験溶液とする。

5. 検量線の作成

イミノクタジン三酢酸塩標準品を 8. 測定条件の移動相で調製した溶液を数点調製し、それぞれ HPLC-FL (ポストカラム) 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、穀類、豆類、種実類、果実及び野菜では試料中 0.02 mg/kg に相当する試験溶液中濃度は 0.08 mg/L であり、茶では試料中 0.2 mg/kg に相当する試験溶液中濃度は 0.08 mg/L である。

6. 定量

試験溶液を HPLC-FL (ポストカラム) に注入し、5. の検量線でイミノクタジン三酢酸塩の含量を求め、次式により、イミノクタジンの含量を求める。

$$\text{イミノクタジンの含量 (ppm)} = \text{イミノクタジン三酢酸塩の含量 (ppm)} \times 0.6637$$

7. 確認試験

HPLC-FL (ポストカラム) により確認する。

8. 測定条件

(例)

検出器：FL (励起波長 395 nm、蛍光波長 500 nm)

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲル 内径 4.6 mm、長さ 150 mm、粒子径 5 μm

カラム温度：50°C

移動相：過塩素酸ナトリウム 14.1 g、水酸化ナトリウム 400 mg 及び乳酸 1.8 mL に水を加えて 1,000 mL とする。この溶液 850 mL にアセトニトリル 250 mL を加える。

蛍光反応槽：移動相に対し 0.5 mol/L 水酸化ナトリウム溶液及び発蛍光液を注入する。注入量を一定に保つ。

蛍光反応槽温度：60°C

注入量：20 μL

保持時間の目安：約 11 分

9. 定量限界

0.02 mg/kg (茶の場合は 0.2 mg/kg)

10. 留意事項

1) 試験法の概要

イミノクタジンを試料からトリエチルアミン塩基性下で *n*-ブタノール及び *n*-ヘキサン (1 : 1) 混液で抽出し、カルボキシエチルシリル化シリカゲルミニカラムで精製した後、HPLC-FL (ポストカラム) で定量及び確認する方法である。

2) 注意点

- ① イミノクタジンは、イミノクタジン三酢酸塩の定量を行い、これに係数を乗じてイミノクタジンの含量に換算した値を分析値とする。イミノクタジンの分析値には、イミノクタジン、イミノクタジン三酢酸塩及びイミノクタジンアルベシル酸塩が含まれる。
- ② イミノクタジンは塩基性状態でガラスに吸着されやすいため、抽出及び洗浄の操作時に、あらかじめトリエチルアミン溶液を添加してガラス器具のシラノール基を隠蔽しておく必要がある。また、植物成分への吸着を防止するため、検体の細切均一化時に塩酸グアニジンを追加する。
- ③ *n*-ブタノール及び *n*-ヘキサン (1 : 1) 混液は比較的粘度が高いため、ホモジナイザーを用いて 3 分以上ホモジナイズする。特に果実試料の場合は混ざりにくいので注意する。
- ④ 蛍光強度は発蛍光液の流速によって変動するので、最適な流速を選択し一定に保つ。

1 1. 参考文献

なし

1 2. 類型

A