

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 µmの標準網ふるいを通るように粉碎した後、その10.0 gを量り採り、水20 mL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1 kgを精密に量り、3%リン酸溶液500 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。

たまねぎ、にんにく、ねぎ及びわけぎの場合は、検体約1 kgを精密に量り、3%リン酸2,000 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。

これにアセトン100 mL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50 mL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50 mL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75 mLに、たまねぎ、にんにく、ねぎ及びわけぎの場合は約120 mL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（5,000 mg）にアセトン30 mLを注入し、流出液は捨てる。水10 mL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300 mL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9 mLを加え、残留物を溶かした後、水6 mL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回繰り返し、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100 mLを入れた500 mL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）100 mL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300 mL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）50 mL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入ろ過する。次いで酢酸エチル及び*n*-ヘキサンの混液（1：1）20 mL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°C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3 mLを加えて溶かし、*n*-ヘキサン7 mLを加える。

(2) 茶の場合

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

これにアセトン100 mL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ろ過する。ろ紙上の残留物を採り、アセトン50 mL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200 mL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）10 gを充てんした直系9 cmの漏斗に上記のろ液100 mL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30 mL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1 mLを加え、40°C以下で約25 mL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（5,000 mg）にアセトン30 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで水10 mL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100 mL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9 mLを加え、残留物を溶かした後、水6 mL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回繰り返し、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100 mLを入れた500 mL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）100 mL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300 mL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）50 mL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入ろ過する。次

いで酢酸エチル及び*n*-ヘキサンの混液（1：1）20 mL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3 mLを加えて溶かし、*n*-ヘキサン7 mL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15 mm、長さ300 mm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5 g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5 g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）100 mL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3 mLを加えて溶かし、*n*-ヘキサン7 mLを加える。

(2) シリカゲルカラムクロマトグラフィー

内径15 mm、長さ300 mm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 μm）5 g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5 g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）100 mL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）100 mL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2 mL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5μm）を用いる。

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

カラム温度 40℃

検出器 波長260 nm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。アズ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