

## シアゾファミド試験法（農産物）

### 1. 分析対象化合物

シアゾファミド

### 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（HPLC-UV）  
液体クロマトグラフ・質量分析計（LC/MS）

### 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。

シアゾファミド標準品 本品はシアゾファミド99%以上を含み、融点は152～153℃である。

### 4. 試験溶液の調製

#### 1) 抽出

穀類及び豆類の場合は、試料10.0 gに水20 mLを加え、2時間放置する。種実類及び茶の場合は、試料5.00 gに水20 mLを加え、2時間放置する。果実及び野菜の場合は、試料20.0 gを量り採る。その他のハーブの場合は、試料5.00 gを量り採る。

これにアセトニトリル100 mLを加え、ホモジナイズした後、吸引ろ過する。ろ紙上の残留物に、アセトニトリル50 mLを加えてホモジナイズし、上記と同様にろ過する。得られたろ液を合わせて、40℃以下で約30 mLまで濃縮する。これに10%塩化ナトリウム溶液100 mLを加え、*n*-ヘキサン100 mL及び50 mLで2回振とう抽出する。抽出液に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した後、ろ液を40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物に*n*-ヘキサン5 mLを加えて溶かす。

#### 2) 精製

##### (1) 合成ケイ酸マグネシウムカラムクロマトグラフィー

クロマトグラフ管（内径15 mm）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*-ヘキサンに懸濁させて充てんし、無水硫酸ナトリウム約5 gを積層する。このカラムに1) で得られた溶液を注入した後、アセトン及び*n*-ヘキサン（1：19）混液50 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで、アセトン及び*n*-ヘキサン（3：17）混液50 mLを注入し、溶出液を40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物にアセトン5 mLを加えて溶かす。

##### (2) グラファイトカーボンカラムクロマトグラフィー

グラファイトカーボンミニカラム (500 mg) にアセトン10 mLを注入し、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た後、アセトン5 mLを注入する。全溶出液を40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物にエーテル及び*n*-ヘキサン (3 : 17) 混液5 mLを加えて溶かす。

### (3) シリカゲルカラムクロマトグラフィー

シリカゲルミニカラム (690 mg) にエーテル及び*n*-ヘキサン (3 : 17) 混液10 mLを注入し、流出液は捨てる。このカラムに(2)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 : 17) 混液10 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで、エーテル及び*n*-ヘキサン (3 : 7) 混液20 mLを注入し、溶出液を40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物をアセトニトリルに溶解し、種実類、茶及びその他のハーブの場合は正確に1 mL、穀類及び豆類の場合は正確に2 mL、果実及び野菜の場合は正確に4 mLとしたものを試験溶液とする。

## 5. 検量線の作成

シアゾファミド標準品の0.05~1 mg/Lアセトニトリル溶液を数点調製し、それぞれ20 µLをHPLC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。

## 6. 定量

試験溶液20 µLをHPLCに注入し、5の検量線でシアゾファミドの含量を求める。

## 7. 確認試験

LC/MSにより確認する。

## 8. 測定条件

### 1) HPLC

検出器 : UV (波長280 nm)

カラム : オクタデシルシリル化シリカゲル (粒径5 µm) 、内径4.6 mm、長さ250 mm

カラム温度 : 40℃

移動相 : アセトニトリル及び水 (3 : 2) 混液

保持時間の目安 : 12分

### 2) LC/MS

カラム : オクタデシルシリル化シリカゲル (粒径5 µm) 、内径2~2.1 mm、長さ150 mm

カラム温度 : 40℃

移動相：0.002 mol/L酢酸アンモニウム溶液及びメタノール混液（7：3）から（1：9）までの濃度勾配を8分間で行い、（1：9）で6分間保持する。

イオン化モード：ESI

主なイオン（ $m/z$ ）：正イオンモード325、負イオンモード216

注入量：1  $\mu$ L

保持時間の目安：14分

## 9. 定量限界

0.01 mg/kg

## 10. 留意事項

### 1) 試験法の概要

シアゾファミドを試料からアセトニトリルで抽出し、*n*-ヘキサンに転溶する。合成ケイ酸マグネシウムカラム、グラファイトカーボンミニカラム及びシリカゲルミニカラムにより精製し、HPLC-UVで測定し、LC/MSで確認する方法である。

### 2) 注意点

(1) 標準溶液及び試料溶液中のシアゾファミドは、室温で徐々に分解するため、冷蔵で保存する。

(2) HPLC測定時において試料由来の夾雑成分のピークが、シアゾファミドの溶出位置に認められた場合、HPLCのカラムを変更することにより、シアゾファミドを試料由来の夾雑成分のピークから分離することができる。通常用いているオクタデシルシリル化シリカゲルからトリアコンチルシリル化シリカゲル（C<sub>30</sub>）あるいはフェニルシリル化シリカゲル（Ph）などの充てん剤を用いたカラムに変更することが有効である。

(3) グラファイトカーボンミニカラムクロマトグラフィーは、夾雑物の少ない試料では、省略することもできる。

(4) 精製が不十分な場合、アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム（360 mg）による追加精製が可能である。

酢酸及び*n*-ヘキサン（0.1：100）混液10 mLで予備洗浄を行う。試料溶液を酢酸及び*n*-ヘキサン混液（0.1：100）10 mLで負荷し、流出液を捨てた後、エーテル、酢酸及び*n*-ヘキサン（10：0.1：90）混液30 mLで溶出させる。

(5) シアゾファミドはLC/MSでの測定において正イオン $m/z$ ：325[M+H]<sup>+</sup>または負イオン  $m/z$ ：216[M-SO<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]<sup>-</sup>で測定が可能であるが、後者の方が感度も良く、選択性に優れている。

(6) HPLC分析において、試料由来の妨害成分の影響等で定量が困難な場合はLC/MSを用いて測定を行う。

11. 参考文献

平成13年環境省告示第31号「シアゾファミド試験法」

12. 類型

A