

カルボキシシン試験法（農産物）

1. 分析対象化合物

カルボキシシン

5,6-ジヒドロ-3-カルボキシアニリド-2-メチル-1,4-オキサシン-4-オキシド（以下「カルボキシンスルホキシド」という。）

2. 適用食品

穀類、豆類、種実類、野菜

3. 装置

液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計（LC-MS/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。

0.5 mol/Lリン酸緩衝液（pH 7.0） リン酸水素二カリウム（ K_2HPO_4 ）52.7 g及びリン酸二水素カリウム（ KH_2PO_4 ）30.2 gを量り採り、水約500 mLに溶解し、1 mol/L水酸化ナトリウム又は1 mol/L塩酸を用いてpHを7.0に調整した後、水を加えて1 Lとする。

チオ尿素 チオ尿素（特級）

カルボキシシン標準品 本品はカルボキシシン98%以上を含む。

カルボキシンスルホキシド標準品 本品はカルボキシンスルホキシド98%以上を含む。

5. 試験溶液の調製

1) 抽出

① 穀類、豆類及び種実類の場合

試料10.0 gに5 w/v%チオ尿素溶液20 mLを加え、30分間放置する。

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、ホモジナイズした後、吸引ろ過する。得られたろ液を合わせ、アセトニトリルを加えて正確に200 mLとする。

この溶液から正確に20 mLを分取し、塩化ナトリウム10 g及び0.5 mol/Lリン酸緩衝液（pH 7.0）20 mLを加え、10分間振とうする。静置した後、分離した水層を捨てる。

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム（1,000 mg）にアセトニトリル10 mLを注入し、流出液は捨てる。このカラムに上記のアセトニトリル層を注入し、更に、アセトニトリル6 mLを注入して、全溶出液を採り40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。残留物にアセトニトリル及びトルエン（3：1）混液2 mLを加えて溶かす。

② 野菜の場合

試料を正確に量り、重量比で等量の5 w/v%チオ尿素溶液を加えホモジナイズした後、試料20.0 gに相当する量を量り採る。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、ホモジナイズした後、吸引ろ過する。得られたろ液を合わせ、アセトニトリルを加えて正確に200 mLとする。

この溶液から正確に20 mLを分取し、塩化ナトリウム10 g及び0.5 mol/Lリン酸緩衝液 (pH7.0) 20 mLを加え、10分間振とうする。静置した後、分離した水層を捨てる。

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム (1,000 mg) にアセトニトリル10 mLを注入し、流出液は捨てる。このカラムに上記のアセトニトリル層を注入し、さらに、アセトニトリル6 mLを注入して、全溶出液を採り40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。残留物にアセトニトリル及びトルエン (3 : 1) 混液2 mLを加えて溶かす。

2) 精製

グラファイトカーボン/アミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム (500 mg/500 mg) に、アセトニトリル及びトルエン (3 : 1) 混液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、更にアセトニトリル及びトルエン (3 : 1) 混液15 mLを注入し、全溶出液を40 °C以下で溶媒を除去する。残留物にメタノールを加えて溶かし、穀類、豆類及び種実類の場合は正確に5 mL、野菜の場合は正確に10 mLとしたものを試験溶液とする。

6. 検量線の作成

カルボキシン標準品及びカルボキシンスルホキシド標準品をそれぞれアセトンに溶解して標準原液を調製する。各標準原液を適宜混合してメタノールで希釈した溶液を数点調製し、それぞれLC-MS/MS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0.005 mg/kg (カルボキシンスルホキシドはカルボキシン換算) に相当する試験溶液中濃度は0.001 mg/L (カルボキシンスルホキシドはカルボキシン換算) である。

7. 定量

試験溶液をLC-MS/MSに注入し、6. の検量線でカルボキシン及びカルボキシンスルホキシドの各含量を求める。カルボキシンスルホキシドを含むカルボキシンの含量を求める場合には、次式により求める。

カルボキシン (カルボキシンスルホキシドを含む。) の含量 (ppm) = $A + B \times 0.9363$

A : カルボキシンの含量 (ppm)

B : カルボキシンスルホキシドの含量 (ppm)

8. 確認試験

LC-MS/MSにより確認する。

9. 測定条件

(例)

カラム : オクタデシルシリル化シリカゲル 内径2.1 mm、長さ150 mm、粒子径5 μm

カラム温度 : 40°C

移動相 : 2 mmol/Lギ酸アンモニウム溶液及び2 mmol/Lギ酸アンモニウム・メタノール溶液の混液 (7 : 3) から (1 : 4) までの濃度勾配を20 分間で行う。

イオン化モード : ESI (+)

主なイオン (m/z)

カルボキシン : プリカーサーイオン 236、プロダクトイオン 143、87

カルボキシンスルホキシド：プリカーサーイオン 252、プロダクトイオン 159、131
注入量：2 μ L
保持時間の目安
カルボキシシン：17 分
カルボキシンスルホキシド：10 分

10. 定量限界

カルボキシシン：0.005 mg/kg
カルボキシンスルホキシド：0.005 mg/kg（カルボキシシン換算）

11. 留意事項

1) 試験法の概要

カルボキシシン及びカルボキシンスルホキシドを試料からチオ尿素存在下アセトニトリルで抽出し、塩析で水を除いた後、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム及びグラファイトカーボン/アミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラムで精製し、LC-MS/MSで定量及び確認する方法である。

2) 注意点

- ① カルボキシシン及びカルボキシンスルホキシドのLC-MS/MS測定で、試験法開発時に使用したイオンを以下に示す。

カルボキシシン

定量イオン (m/z)：プリカーサーイオン 236、プロダクトイオン 143

定性イオン (m/z)：プリカーサーイオン 236、プロダクトイオン 87

カルボキシンスルホキシド

定量イオン (m/z)：プリカーサーイオン 252、プロダクトイオン 159

定性イオン (m/z)：プリカーサーイオン 252、プロダクトイオン 131

- ② 試験法開発時には、分析操作中にカルボキシシン及びカルボキシンスルホキシドのカルボキシンスルホン（オキシカルボキシシン）への変換は見られなかったが、必要に応じてカルボキシンスルホンへの変換がないことを確認すること。
- ③ 試験法開発時に検討した食品：小麦、えだまめ、小豆、たまねぎ、未成熟いんげん

12. 参考文献

厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知 食安発第1003001号「GC/MSによる農薬等の一斉試験法（農産物）」及び「LC/MSによる農薬等の一斉試験法 I（農産物）」（平成18年10月3日）

佐々木久美子ら、果実中のエトキシキン分析法の評価、食衛誌、**43**、366-370（2002）

13. 類型

C