

セトキシジム分析法（農産物）

1. 分析対象化合物

- ・セトキシジム
- ・2-[1-(エトキシイミノ)ブチル]-5-[2-(エチルスルフィニル)プロピル]-3-ヒドロキシシクロヘキサ-2-エン-1-オン（以下、代謝物 B という）
- ・2-[1-(エトキシイミノ)ブチル]-5-[2-(エチルスルフォニル)プロピル]-3-ヒドロキシシクロヘキサ-2-エン-1-オン（以下、代謝物 C という）
- ・6-[2-(エチルチオ)プロピル]-4-オキソ-2-プロピル-4,5,6,7-テトラヒドロベンゾオキサゾール（以下、代謝物 G という）
- ・6-[2-(エチルスルフィニル)プロピル]-4-オキソ-2-プロピル-4,5,6,7-テトラヒドロベンゾオキサゾール（以下、代謝物 H という）
- ・6-[2-(エチルスルフォニル)プロピル]-4-オキソ-2-プロピル-4,5,6,7-テトラヒドロベンゾオキサゾール（以下、代謝物 I という）
- ・2-[1-(エトキシイミノ)ブチル]-5-[2-(エチルスルフィニル)プロピル]-3,5-ジヒドロキシシクロヘキサ-2-エン-1-オン（以下、代謝物 J という）
- ・2-[1-(エトキシイミノ)ブチル]-5-[2-(エチルスルフォニル)プロピル]-3,5-ジヒドロキシシクロヘキサ-2-エン-1-オン（以下、代謝物 K という）
- ・6-[2-(エチルスルフィニル)プロピル]-4-オキソ-6-ヒドロキシ-2-プロピル-4,5,6,7-テトラヒドロベンゾオキサゾール（以下、代謝物 M という）

2. 装置

液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計（LC-MS/MS）

3. 試薬、試液

アセトニトリル、アセトン、 酢酸エチル、ヘキサン	:	残留農薬試験用
メタノール	:	LC/MS 用
水	:	活性炭フィルター、逆浸透膜及びイオン交換樹脂で精製したもの
酢酸	:	高速液体クロマトグラフィー用
塩化ナトリウム、塩酸、酢酸、過酸化水素、チオ硫酸ナトリウム五水和物	:	特級
3-クロロ過安息香酸、セライト 545	:	
グラファイトカーボンミニカラム	:	InterSep GC 500 mg/6 mL（ジーエルサイエンス製）
シリカゲルミニカラム	:	Pressep-C 800 mg（和光純薬工業製）
多孔性ケイソウ土カラム	:	InertSep K-solute 20 mL

4. 試験溶液の調製

1) 抽出

① 穀類及び豆類の場合

均一化試料 10.0 g に水 20 mL を加えて 2 時間放置し、メタノール 100 mL を加え破碎した。20 mL 加え 30 分間振とうした後、セライトを敷いて吸引ろ過する。残渣を同混液 50 mL で洗い、同様にろ過する。全てのろ液を合わせてメタノールで 200 mL に定容する。

② 果実及び野菜類の場合

均一化試料 20.0 g にメタノール 100 mL を加え破碎した。20 mL 加え 30 分間振とうした後、セライトを敷いて吸引ろ過する。残渣を同混液 50 mL で洗い、同様にろ過する。全てのろ液を合わせてメタノールで 200 mL に定容する。

2) オキサゾール化及びスルホキシド化

① 穀類及び豆類の場合

抽出液 2 mL にメタノール 3 mL 及び水 4 mL を加えた後、0.1 mol/L 塩酸を用いて pH3~4 に調整する。これに過酸化水素 30 μ L を加えて密栓し、50°C で 16 時間放置してオキサゾール化及びスルホキシド化を行う。

② 果実及び野菜の場合

抽出液 5 mL に水 4 mL を加えた後、0.1 mol/L 塩酸を用いて pH3~4 に調整する。これに過酸化水素 30 μ L を加えて密栓し、50°C で 16 時間放置してオキサゾール化及びスルホキシド化を行う。

3) 精製 1

① 穀類及び豆類の場合

反応液を多孔性ケイソウ土カラムに移し、10 分間放置する。ヘキサンで容器を 10 mL で洗い、洗液をカラムに移す操作を 3 回繰り返す。さらにヘキサン 30 mL を流下して流出液を捨てる。次いで、酢酸エチル 30 mL で容器を洗い、洗液を流下し溶出液をとり、さらに、酢酸エチル 50 mL を流下し、溶出液をとる。40°C 以下で約 30 mL まで減圧濃縮する。

② 果実及び野菜の場合

反応液を多孔性ケイソウ土カラムに移し、10 分間放置する。ヘキサンで容器を 10 mL で洗い、洗液をカラムに移す操作を 3 回繰り返す。さらにヘキサン 30 mL を流下して流出液を捨てる。次いで、酢酸エチル 15 mL で容器を洗い、洗液をカラムに移す操作を 2 回繰り返す、さらに、酢酸エチル 80 mL を流下し、溶出液をとる。40°C 以下で約 30 mL まで減圧濃縮する。

4) スルホン化

濃縮液に 3-クロロ過安息香酸約 20 mg を加えて密栓し、30°C に 10 分間放置し、スルホン化を行う。

5) 精製 2

① 穀類及び豆類の場合

多孔性ケイソウ土カラム (10%塩化ナトリウム含有 5%チオ硫酸ナトリウム溶液 9.5 mL を負荷し、10 分間放置させたもの) の下部にグラファイトカーボンミニカラム (酢酸エチル 5 mL を流下させ洗浄したもの) を連結する。(以下「連結カラム」という。) 反応液を直ちに連結カラムに移し、酢酸エチルで容器を 5 mL で洗い、洗液を連結カラムに移し流下させる操作を 2 回繰り返す、さらに、酢酸エチル 10 mL で洗い、溶出液をとる。40°C以下の水浴中で約 1 mL まで減圧濃縮し、室温で窒素ガスで溶媒を除去する。

残留物をヘキサン及びアセトン (17:3) 混液 5 mL に溶解し、アセトン及びヘキサン各 5 mL で洗浄したシリカゲルミニカラムに移す。容器を同混液 5 mL で洗い、洗液をカラムに移す操作を 2 回繰り返す、流出液は捨てる。次いで、ヘキサン及びアセトン (7:3) 混液 30 mL を流下し溶出液をとる。40°C以下の水浴中で約 1 mL まで減圧濃縮し、室温で窒素ガスで溶媒を除去する。

残留物をメタノール及び水 (1 : 1) 混液 4 mL に溶解する。検量線の濃度範囲を超過する場合は、同混液で希釈する。

② 果実及び野菜の場合

多孔性ケイソウ土カラム (10%塩化ナトリウム含有 5%チオ硫酸ナトリウム溶液 9.5 mL を負荷し、10 分間放置させたもの) の下部にグラファイトカーボンミニカラム (酢酸エチル 5 mL を流下させ洗浄したもの) を連結する。(以下「連結カラム」という。) 反応液を直ちに連結カラムに移し、酢酸エチルで容器を 5 mL で洗い、洗液を連結カラムに移し流下させる操作を 2 回繰り返す、さらに、酢酸エチル 15 mL で洗い、溶出液をとる。40°C以下の水浴中で約 1 mL まで減圧濃縮し、室温で窒素ガスで溶媒を除去する。

残留物をメタノール及び水 (1 : 1) 混液 10 mL に溶解する。検量線の濃度範囲を超過する場合は、同混液で希釈する。

5. 検量線の作成

代謝物 I 及び代謝物 M 標準品を別々にメタノールに溶解し、500 mg/L の標準溶液を調製する。調製した標準液をメタノール及び水 (1 : 1) 混液で段階的に希釈して、検量線用の標準液を数点調製し、それぞれ LC-MS/MS に注入して、ピーク面積を測定し、横軸に重量、縦軸にピーク面積をとって、検量線を作成する。

6. 定量

前処理用フィルターでろ過した試験溶液を LC-MS/MS に注入し、5 の検量線を用いて定量する。なお、代謝物 I の分析値は、換算係数*1 を用いてセトキシジム濃度に換算する。また、代謝物 M の分析値は、換算係数*2 を用いて代謝物 K 濃度に換算し、さらに、換算係数*3 を用いてセトキシジム濃度に換算する。

- *1 換算係数 = セトキシジム分子量/代謝物 I 分子量
- *2 換算係数 = 代謝物 K 分子量/ 代謝物 M 分子量
- *3 換算係数 = セトキシジム分子量/代謝物 K 分子量

7. 測定条件

カラム : Inertsil ODS-SP (ジーエルサイエンス製)
(内径 2.1 mm 長さ 150 mm 粒径 5 μm)

カラム温度 : 40°C

移動相 : ①A 液 水及び酢酸 (100:0.1) 混液
B 液 アセトニトリル
B 液濃度 (%) 10→ (8 分) →95 (5 分保持)

②A 液 水及び酢酸 (100:0.1) 混液
B 液 アセトニトリル
B 液濃度 (%) 20→ (7 分) →95 (3 分保持)

流量 : 0.2 mL/min

注入量 : 5 μL

保持時間の目安 : 代謝物 I ①10.3~10.4 分、②5.5~5.6 分
代謝物 M ①9.5~9.6 分、②4.9~5.0 分

イオン化モード : ESI (+)

モニタリング
イオン :

	プレカーサー イオン (<i>m/z</i>)	プロダクト イオン (<i>m/z</i>)
代謝物 I (セトキシジム、 代謝物 B、代謝 物 C、代謝物 G、 代謝物 H をオキ サゾール化、ス ルホキシド化、 スルホン化)	314.0	220.0
代謝物 M (代謝物 K、代 謝物 J をオキサ ゾール化)	330.0	235.7

8. 定量限界

代謝物 I 0.02～0.05 ppm

代謝物 M 0.02～0.05 ppm

9. 作物残留試験を実施した食品

だいず、そば、セルリー、はっか等

10. 留意事項

※ 本分析法は、農作物における残留試験等において用いられた残留農薬等分析法であり、新たな試験法の開発等に際して参考として下さい。なお、当該分析法をもとに開発した試験法を食品規格への適合判定のために使用する場合には、「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインの一部改正について（平成 22 年 12 月 24 日薬食発 1224 第 1 号）」に従って使用する試験法の妥当性を評価する必要があります。