

メチオカルブ試験法（農産物）

1. 分析対象化合物

メチオカルブ

メチオカルブスルホキシド（以下「代謝物D」という。）

メチオカルブスルホン（以下「代謝物H」という。）

2. 適用食品

農産物

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。

メチオカルブ標準品 本品はメチオカルブ98%以上を含む。

代謝物D標準品 本品は代謝物D 98%以上を含む。

代謝物H標準品 本品は代謝物H 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に水20 mLを加え、30分間放置する。これにアセトン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ン50 mLを加えてホモジナイズした後、上記と同様にろ過する。得られたろ液を合わせて、アセトンで正確に200 mLとする。この溶液から正確に2 mLを分取し、ギ酸0.1 mL及び10 w/v%塩化ナトリウム溶液100 mLを加え、酢酸エチル100 mL及び50 mLで2回振とう抽出する。抽出液を合わせ、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、40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物にアセトニトリル10 mLを加えて溶かす。

② 果実及び野菜の場合

試料20.0 gにアセトン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ン50 mLを加えてホモジナイズした後、上記と同様にろ過する。得られたろ液を合わせて、アセトンで正確に200 mLとする。この溶液から正確に1 mLを分取し、ギ酸0.1 mL及び10 w/v%塩化ナトリウム溶液100 mLを加え、酢酸エチル100 mL及び50 mLで2回振とう抽出する。抽出液を合わせ、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、40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物にアセトニトリル10 mLを加えて溶かす。

③ 茶の場合

試料5.00 gに水20 mLを加え、30分間放置する。アセトン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ン50 mLを加えてホモジナイズした後、上記と同様にろ過する。得られたろ液を合わせて、アセトンで正確に200 mLとする。この溶液から正確に4 mLを分取し、ギ酸0.1 mL及び10 w/v%塩化ナトリウム溶液100 mLを加え、酢酸エチル100 mL及び50 mLで2回振とう抽出する。抽出液を合わせ、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、40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物にアセトニトリル10 mLを加えて溶かす。

2) 精製

グラファイトカーボンミニカラム (250 mg) 及びアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム (360 mg) にアセトニトリル各10 mLを注入し、流出液は捨てる。グラファイトカーボンミニカラムの下部にアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムを連結し、1) 抽出で得られた溶液を注入した後、アセトニトリル10 mLを注入し、全溶出液を40°C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及び0.1 vol%ギ酸 (1 : 1) 混液に溶かし、正確に2 mLとしたものを試験溶液とする。

6. 検量線の作成

メチオカルブ標準品、代謝物D標準品及び代謝物H標準品をそれぞれアセトンに溶解して標準原液とする。各標準原液を適宜混合してアセトニトリル及び0.1 vol%ギ酸 (1 : 1) 混液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0.01 mg/kgに相当する試験溶液中濃度は0.0005 mg/Lである。

7. 定量

試験溶液をLC-MS/MSに注入し、6. の検量線でメチオカルブ、代謝物D及び代謝物Hの含量を求める。

代謝物D及び代謝物Hを含むメチオカルブの含量を求める場合には、次式により求める。

メチオカルブ (代謝物D及び代謝物Hを含む。) の含量 (ppm) = $A + (B \times 0.9337) + (C \times 0.8756)$

A : メチオカルブの含量 (ppm)

B : 代謝物Dの含量 (ppm)

C : 代謝物H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2.0 mm、長さ150 mm、粒子径5 µm

カラム温度：40°C

移動相：アセトニトリル及び0.1 vol%ギ酸（1：9）から（7：3）までの濃度勾配を10分間で
で行い、（7：3）で3分間保持する。

イオン化モード：ESI（+）

主なイオン（ m/z ）

メチオカルブ：プリカーサーイオン 226、プロダクトイオン 169、121

代謝物D：プリカーサーイオン 242、プロダクトイオン 185、122

代謝物H：プリカーサーイオン 258、プロダクトイオン 201、122

注入量：4 µL

保持時間の目安

メチオカルブ：12分

代謝物D：7分

代謝物H：8分

10. 定量限界

各化合物0.01 mg/kg

11. 概要

メチオカルブ、代謝物D及び代謝物Hを試料からアセトン抽出し、ギ酸酸性下で酢酸エチルに転溶する。グラファイトカーボンミニカラムの下部にアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムを連結したカラムで精製し、LC-MS/MSで定量及び確認する方法である。なお、メチオカルブ、代謝物D及び代謝物Hのそれぞれについて定量を行い、代謝物D及び代謝物Hを含むメチオカルブの含量を求める場合には、代謝物D及び代謝物Hの含量に換算係数を乗じてそれぞれメチオカルブの含量に変換し、これらの和を分析値とする。

12. 注意点

1) メチオカルブ及び各代謝物は濃縮操作時に乾固させると損失することがあるため、約1 mLまで濃縮した後、穏やかな窒素気流により乾固させる。

2) グラファイトカーボン及びアミノプロピルシリル化シリカゲル連結ミニカラム精製時、途中でカラムを乾燥させると代謝物Hの溶出率が落ちることがあるため、途中カラムを乾燥させないようにする。

3) 代謝物Hの標準溶液は低濃度域では不安定である。この現象はギ酸を添加することで抑えられるため、検量線作成用標準溶液の調製時にはギ酸を添加する必要がある。

4) メチオカルブ、代謝物D及び代謝物H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。

メチオカルブ

定量イオン (m/z) : プリカーサーイオン 226、プロダクトイオン 169

定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン 226、プロダクトイオン 121

代謝物D

定量イオン (m/z) : プリカーサーイオン 242、プロダクトイオン 185

定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン 242、プロダクトイオン 122

代謝物H

定量イオン (m/z) : プリカーサーイオン 258、プロダクトイオン 201

定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン 258、プロダクトイオン 122

5) 試験法開発時に検討した食品: 玄米、大豆、らっかせい、ばれいしょ、ほうれんそう、キャベツ、オレンジ、りんご、茶及びぶどう

13. 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0124001号「メチオカルブ試験法（農産物）」（平成17年1月24日）

14. 類型

C