

## オキシシン銅試験法（農産物）

### 1. 分析対象化合物

オキシシン銅

### 2. 適用食品

農産物（穀類、果実、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。

スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラム（500 mg） 内径8～13 mm のポリエチレン製のカラム管に、スチレンジビニルベンゼン共重合体 500 mg を充填したもの又はこれと同等の分離特性を有するものを用いる。

エチレンジアミン四酢酸四ナトリウム四水和物 純度 98%以上の試薬を用いる。

オキシシン銅標準品 本品はオキシシン銅 98%以上を含む。

### 5. 試験溶液の調製

#### 1) 抽出

##### ① 穀類の場合

試料 10.0 g に 0.1 mol/L 塩酸 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、アセトンを加えて正確に 200 mL とする。この溶液から正確に 10 mL を分取し、30 mmol/L エチレンジアミン四酢酸四ナトリウム四水和物溶液 10 mL、酢酸エチル 10 mL 及び塩化ナトリウム 2 g を加えて振とうする。毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離し、有機層を採る。有機層を採った後の容器を酢酸エチル 2～3 mL で洗い、洗液を先の有機層に合わせる。合わせた有機層に 30 mmol/L エチレンジアミン四酢酸四ナトリウム四水和物溶液 10 mL、塩化ナトリウム 2 g 及び 2 mol/L 塩酸 3 mL を加えて振とうする。毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離し、有機層を捨てる。残った水層に 2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 3 mL 及び水 10 mL を加えて混合する。

##### ② 果実及び野菜の場合

試料を正確に量り、重量比で 1/10 量の 2 mol/L 塩酸を加え磨砕均一化した後、試料 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、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、アセトンを加えて正確に 200 mL とする。この溶液から正確に 10 mL を分取し、30 mmol/L エチレンジアミン四酢酸四ナトリウム四水和物溶液 10 mL、酢酸エチル 10 mL 及び塩化ナトリウム 2 g を加えて

振とうする。毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離し、有機層を採る。有機層を採った後の容器を酢酸エチル 2~3 mL で洗い、洗液を先の有機層に合わせる。合わせた有機層に 30 mmol/L エチレンジアミン四酢酸四ナトリウム四水和物溶液 10 mL、塩化ナトリウム 2 g 及び 2 mol/L 塩酸 3 mL を加えて振とうする。毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離し、有機層を捨てる。残った水層に 2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 3 mL 及び水 10 mL を加えて混合する。

## 2) 精製

スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラム (500 mg) にメタノール、水及び 30 mmol/L エチレンジアミン四酢酸四ナトリウム四水和物溶液各 10 mL を順次注入し、各流出液は捨てる。このカラムに 1) で得られた溶液を注入した後、水 10 mL、水及びメタノール (2 : 3) 混液 10 mL を順次注入し、流出液は捨てる。次いで、メタノール 10 mL を注入し、溶出液を水で正確に 20 mL としたものを試験溶液とする。また、穀類の場合は、溶出液を 40°C 以下で濃縮し、溶媒を除去した後、残留物を水及メタノール (1 : 1) 混液に溶かし、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

オキシシン銅標準品の水及びメタノール (1 : 1) 混液の溶液を数点調製し、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. の検量線でオキシシン銅の含量を求める。

## 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 100 mm、粒子径 3 µm

カラム温度 : 40°C

移動相 : 0.05 vol% 酢酸及び 0.05 vol% 酢酸・アセトニトリル溶液の混液 (19 : 1) で 0.5 分間保持した後、(1 : 9) までの濃度勾配を 4.5 分間で行い、(1 : 9) で 5 分間保持する。

イオン化モード : ESI (+)

主なイオン ( $m/z$ ) : プリカーサーイオン 146、プロダクトイオン 128、118

注入量 : 5 µL

保持時間の目安 : 5 分

## 10. 定量限界

0.01 mg/kg

## 11. 留意事項

### 1) 試験法の概要

オキシシン銅を試料から塩酸酸性下アセトンで抽出し、エチレンジアミン四酢酸四ナトリウム四水和物溶液、酢酸エチル及び塩化ナトリウムを加え、有機層に転溶する。塩酸酸性として水層に転溶し、水酸化ナトリウム溶液を添加して pH を調整した後、スチレンジビニルベンゼン共重合体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 スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラム（500 mg）は、内径 22 mm のカラムも使用可能である。
- ② オキシシン銅の 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。  
定量イオン ( $m/z$ ) : プリカーサーイオン 146、プロダクトイオン 118  
定性イオン ( $m/z$ ) : プリカーサーイオン 146、プロダクトイオン 128
- ③ オキシシン銅は、ばれいしょ等の中性の試料中では分解し易いことから、分解を防止するために試料調製時に塩酸を添加する。オレンジ等の試料では塩酸を添加しなくとも試験可能である。
- ④ オキシシン銅は弱酸性下で解離して水溶性になる。2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を添加した後、pH が 5 程度になっていることを確認する。
- ⑤ オキシシン銅は配位化合物であるため、カラム充填剤であるオクタデシルシリル化シリカゲル中の金属不純物に配位しテーリングを起こす場合がある。そのため、高純度シリカゲルベースの充填剤、かつ、エンドキャッピング処理が充分に行われている分析カラムを選択すること。
- ⑥ 配位化合物であるオキシシン銅の容器への吸着を防ぐため、ポリプロピレン製遠心管を使用すること。
- ⑦ 試験法開発時に検討した食品：小麦、パセリ、キャベツ、ばれいしょ、オレンジ、りんご

## 12. 参考文献

なし

## 13. 類型

C