

## カフェンストロール試験法（畜水産物）

### 1. 分析対象化合物

カフェンストロール

3- (2,4,6-トリメチルフェニルスルホニル) -1,2,4-トリアゾール（以下「代謝物」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

次に示すもの以外は、総則の3に示すものを用いる。

カフェンストロール標準品 本品はカフェンストロール95%以上を含む。

代謝物標準品 本品は代謝物95%以上を含む。

### 4. 試験溶液の調製

#### 1) 抽出

##### ① 筋肉、肝臓、腎臓、乳、卵及び魚介類の場合

試料10.0 gに0.1 mol/L塩酸20 mLを加える。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、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4 mLを採り、水16 mLを加える。

##### ② はちみつの場合

試料10.0 gに0.1 mol/L塩酸20 mLを加え溶解する。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、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4 mLを採り、水16 mLを加える。

##### ③ 脂肪の場合

試料5.00 gに0.1 mol/L塩酸20 mLを加える。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、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8 mLを採り、40°C以下で濃縮し、アセトンを除去する。この残留物に*n*-ヘキサン30 mLを加え、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル30 mLずつで2回振とう抽出する。抽出液を合わせ、40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物にアセトン4 mLを加えて溶かし、水16 mLを加える。

#### 2) 精製

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム（1,000 mg）にアセトニトリル及び水各5 mLを順次注入し、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、アセトニトリル及び水（1：4）混液10 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで、アセトニトリル及び水（3：2）混液10 mLを注入し、流出液をアセトニトリル及び水（3：2）混液で正確に10 mLとしたものを試験溶液とする。

### 5. 検量線の作成

カフェンストロール標準品及び代謝物標準品のアセトニトリル及び水（3：2）混合の溶液を数点調製し、それぞれを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。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各化合物とも0.0002 mg/Lである。なお、代謝物については、カフェンストロールに換算した値である。

## 6. 定量

試験溶液をLC-MS/MSに注入し、5の検量線でカフェンストロール及び代謝物の含量を求める。代謝物を含むカフェンストロールの含量を求める場合には、次式により求める。

カフェンストロール（代謝物を含む。）の含量（ppm）＝A+B×1.395

A：カフェンストロールの含量（ppm）

B：代謝物の含量（ppm）

## 7. 確認試験

LC-MS/MSにより確認する。

## 8. 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℃

移動相：アセトニトリル及び5 mmol/L酢酸アンモニウムの混液（1：4）から（19：1）までの濃度勾配を15分間で行い、（19：1）で5分間保持する。

イオン化モード

カフェンストロール：ESI（+）

代謝物：ESI（-）

主なイオン（*m/z*）

カフェンストロール：プリカーサーイオン 351、プロダクトイオン 100、72

代謝物：プリカーサーイオン 250、プロダクトイオン 186、131

注入量：5 μL

保持時間の目安

カフェンストロール：17分

代謝物：10分

## 9. 定量限界

各化合物 0.01 mg/kg（代謝物はカフェンストロール換算）

## 10. 留意事項

### 1) 試験法の概要

カフェンストロール及び代謝物を試料から塩酸酸性下でアセトンで抽出し、アセトニトリル/ヘキサン分配で脱脂（脂肪の場合のみ）する。オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムで精製した後、LC-MS/MSで定量及び確認する方法である。

### 2) 注意点

① 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知 食安発第0604002号（平成21年6月4日）により、今回残留基準を設定するカフェンストロールとは、魚介類においては、カフェンストロール及び3-（2,4,6-トリメチルフェニル）スルホニル）-1,2,4-トリアゾールをカフェンストロール含量に換算したものの和をいい、

その他の食品については、カフェンストロールのみをいうこととされたため、魚介類についてはカフェンストロール及び代謝物について、その他の食品についてはカフェンストロールについて定量する。

- ② 代謝物は減圧濃縮時に損失しやすいため、約1 mLまで減圧濃縮した後、窒素ガスを緩やかに送って溶媒を除去する。
- ③ カフェンストロールは、メタノール又は水を含む溶媒中で室温放置すると減少する傾向がある。標準原液の調製にはこれらを含まない溶媒（アセトニトリル等）を用いる。なお、検量線用標準溶液は用時調製が望ましいが、保存する場合は冷蔵すること。また、試験溶液を保存する場合も冷蔵すること。
- ④ カフェンストロール及び代謝物の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。

カフェンストロール

定量イオン ( $m/z$ ) : プリカーサーイオン 351、プロダクトイオン 100

定性イオン ( $m/z$ ) : プリカーサーイオン 351、プロダクトイオン 72

代謝物

定量イオン ( $m/z$ ) : プリカーサーイオン 250、プロダクトイオン 186

定性イオン ( $m/z$ ) : プリカーサーイオン 250、プロダクトイオン 131

## 1 1. 参考文献

なし

## 1 2. 類型

C