

ヘキサジノン試験法（畜産物）

1. 分析対象化合物

ヘキサジノン

3-シクロヘキシル-6-(メチルアミノ)-1-メチル-1,3,5-トリアジン-2,4-(1*H*,3*H*)-ジオン（以下「代謝物B」という。）

3-(4-ヒドロキシシクロヘキシル)-6-(メチルアミノ)-1-メチル-1,3,5-トリアジン-2,4-(1*H*,3*H*)-ジオン（以下「代謝物C」という。）

3-シクロヘキシル-6-アミノ-1-メチル-1,3,5-トリアジン-2,4-(1*H*,3*H*)-ジオン（以下「代謝物F」という。）

2. 適用食品

畜産物

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。

トリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲル/エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム（500 mg/500 mg） 内径12~13 mmのポリエチレン製のカラム管に、上層にトリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲルを、下層にエチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルを各500 mg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。

ヘキサジノン標準品 本品はヘキサジノン98%以上を含む。

代謝物B標準品 本品は代謝物B 98%以上を含む。

代謝物C標準品 本品は代謝物C 98%以上を含む。

代謝物F標準品 本品は代謝物F 98%以上を含む。

5. 試験溶液の調製

1) 抽出

試料10.0 g（脂肪の場合は5.00 g）に*n*-ヘキサン50 mL及び*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル50 mLを加え、ホモジナイズした後、毎分3,000回転で10分間遠心分離し、アセトニトリル層を採る。残留物と*n*-ヘキサン層に*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル25 mLを加えてホモジナイズした後、上記と同様に遠心分離する。アセトニトリル層を先のアセトニトリル層に合わせ、アセトニトリルを加えて正確に100 mLとする。

2) 精製

トリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲル/エチレンジアミン-*N*-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) で得られた溶液を正確に4 mL注入した後、アセトニトリル20 mLを注入し、全溶出液を40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物をメタノールに溶かし、正確に4 mL（脂肪の場合は2 mL）としたものを

試験溶液とする。

6. 検量線の作成

ヘキサジノン標準品、代謝物B標準品、代謝物C標準品及び代謝物F標準品をそれぞれメタノールに溶解して、標準原液とする。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0.0025 mg/kg（ヘキサジノン換算）に相当する試験溶液中濃度は各化合物とも0.00025 mg/L（ヘキサジノン換算）である。

7. 定量

1) 乳を除く畜産物

試験溶液をLC-MS/MSに注入し、6.の検量線でヘキサジノン、代謝物B及び代謝物Fの各含量を求める。代謝物B及び代謝物Fを含むヘキサジノンの含量を求める場合には、次式により求める。

$$\begin{aligned} & \text{ヘキサジノン（代謝物B及び代謝物Fを含む。）の含量（ppm）} \\ & = A + B \times 1.059 + C \times 1.125 \end{aligned}$$

A：ヘキサジノンの含量（ppm）

B：代謝物Bの含量（ppm）

C：代謝物Fの含量（ppm）

2) 乳

試験溶液をLC-MS/MSに注入し、6の検量線でヘキサジノン、代謝物B、代謝物C及び代謝物Fの各含量を求める。代謝物B、代謝物C及び代謝物Fを含むヘキサジノンの含量を求める場合には、次式により求める。

$$\begin{aligned} & \text{ヘキサジノン（代謝物B、代謝物C及び代謝物Fを含む。）の含量（ppm）} \\ & = A + B \times 1.059 + C \times 0.9922 + D \times 1.125 \end{aligned}$$

A：ヘキサジノンの含量（ppm）

B：代謝物Bの含量（ppm）

C：代謝物Cの含量（ppm）

D：代謝物F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3 μm

カラム温度：40℃

移動相：A液及びB液について下表の濃度勾配で送液する。

A液：5 mmol/L酢酸アンモニウム溶液

B液：5 mmol/L酢酸アンモニウム・メタノール溶液

時間 (分)	A液 (%)	B液 (%)
0	85	15
1	60	40
3.5	60	40
6	50	50
8	45	55
17.5	5	95

イオン化モード：ESI (+)

主なイオン (m/z)

ヘキサジノン：プリカーサーイオン253、プロダクトイオン171、71

代謝物B：プリカーサーイオン239、プロダクトイオン157、71

代謝物C：プリカーサーイオン255、プロダクトイオン157、71

代謝物F：プリカーサーイオン225、プロダクトイオン143、101

注入量：5 μ L

保持時間の目安

ヘキサジノン：15分

代謝物B：14分

代謝物C：6分及び7分

代謝物F：13分

10. 定量限界

各化合物 0.0025 mg/kg (ヘキサジノン換算)

11. 留意事項

1) 試験法の概要

ヘキサジノン、代謝物B、代謝物C及び代謝物Fを試料からn-ヘキサン存在下アセトニトリルで抽出し、トリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲル/エチレンジアミン-N-プロピルシリル化シリカゲル積層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。なお、畜産物（乳を除く）においては、ヘキサジノン、代謝物B及び代謝物Fのそれぞれについて定量を行い、ヘキサジノン並びに代謝物B及び代謝物Fをヘキサジノンに換算したものの和を分析値とし、乳においては、ヘキサジノン、代謝物B、代謝物C及び代謝物Fのそれぞれについて定量を行い、ヘキサジノン並びに代謝物B、代謝物C及び代謝物Fをヘキサジノンに換算したものの和を分析値とする。

2) 注意点

- ① 代謝物Cは異性体の混合物であり、各異性体の和について定量する。
- ② ヘキサジノン、代謝物B、代謝物C及び代謝物F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。

ヘキサジノン

定量イオン (m/z)：プリカーサーイオン 253、プロダクトイオン 171

定性イオン (m/z)：プリカーサーイオン 253、プロダクトイオン 71

代謝物B

定量イオン (m/z) : プリカーサーイオン 239、プロダクトイオン 157

定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン 239、プロダクトイオン 71

代謝物 C

定量イオン (m/z) : プリカーサーイオン 255、プロダクトイオン 157

定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン 255、プロダクトイオン 71

代謝物 F

定量イオン (m/z) : プリカーサーイオン 225、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 225、プロダクトイオン 101

③ 抽出操作において、遠心分離後のアセトニトリル層に試料残留物の混入が認められた場合には、アセトニトリル層をろ紙でろ過すると良い。

④ 試験法開発時に検討した食品：牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳

12. 参考文献

なし

13. 類型

C