

イソキサフルトール試験法（畜産物）

1. 分析対象化合物

イソキサフルトール

2-シアノ-3-シクロプロピル-4-(2-メチルスルホニル-4-トリフルオロメチルフェニル)プロパン-1,3-ジオン（以下「代謝物B」という。）

2. 対象食品

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。

イソキサフルトール標準品 本品はイソキサフルトール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。

5. 試験溶液の調製

1) 抽出

試料を正確に量り、重量比で1/2量の4 mol/L塩酸及びエタノール（1：1）混液を加え磨砕均一化した後、試料10.0 gに相当する量を量り採る。これに*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル50 mL、*n*-ヘキサン50 mL及び無水硫酸ナトリウム20 gを加えてホモジナイズした後、毎分3,000回転で5分間遠心分離し、*n*-ヘキサン層を捨て、アセトニトリル層を採る。残留物に*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル50 mL及び*n*-ヘキサン50 mLを加えてホモジナイズした後、上記と同様に遠心分離し、得られた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。この溶液から正確に4 mLを分取し、0.1 mol/L塩酸16 mL及び塩化ナトリウム2 gを加え、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（3：7）混液20 mLを加えて振とう抽出した後、毎分3,000回転で5分間遠心分離し、有機層を採る。水層に酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（3：7）混液20 mLを加えて振とう抽出した後、上記と同様に遠心分離し、得られた有機層を合わせ、40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物に酢酸、水及びメタノール（1：20：30）混液2 mLを加えて溶かす。

2) 精製

ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム（500 mg）に、メタノール5 mL、次いで酢酸、水及びメタノール（1：20：30）混液5 mLを注入し、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、酢酸、水及びメタノール（1：20：30）混液10 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで、酢酸、水及びメタノール（1：5：45）混液20 mLを注入し、溶出液を採り、溶出液を40℃以下で約1 mLまで濃縮し、0.05 vol%酢酸及び0.05 vol%酢酸・アセトニトリル溶液（7：3）混液で正確に2 mLとしたものを試験溶液とする。

6. 検量線の作成

イソキサフルトール標準品は1 vol%酢酸・アセトニトリル溶液で、代謝物B標準品は、アセトニトリルで溶かして標準原液を調製する。各標準原液を適宜混合して0.05 vol%酢酸及び0.05 vol%酢酸・アセトニトリル溶液（7：3）混液で適宜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各化合物0.002 mg/Lである。

7. 定量

試験溶液をLC-MS/MSに注入し、6. の検量線でイソキサフルトール及び代謝物Bの含量を求める。代謝物Bを含むイソキサフルトールの含量を求める場合には、次式により求める。

イソキサフルトール（代謝物Bを含む）の含量（ppm） = $A + B \times 1.000$

A：イソキサフルトールの含量（ppm）

B：代謝物B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：0.05 vol%酢酸及び0.05 vol%酢酸・アセトニトリル溶液（7：3）混液で5分間保持した後、（7：3）から（9：11）までの濃度勾配を15分間で行う。

イオン化モード：ESI（－）

主なイオン（*m/z*）：

イソキサフルトール：プリカーサーイオン 358、プロダクトイオン 278、79

代謝物B：プリカーサーイオン 358、プロダクトイオン 278、79

注入量：5 μL

保持時間の目安：イソキサフルトール：19分

代謝物B：5分

10. 定量限界

各化合物0.01 mg/kg

11. 留意事項

1) 試験法の概要

イソキサフルトール及び代謝物Bを4 mol/L塩酸及びエタノール（1：1）混液で磨砕均一化した試料から、*n*-ヘキサン存在下アセトニトリルで抽出し、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（3：7）混液に転溶した後、ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリド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。なお、イソキサフルトール及び代謝物Bのそれぞれについて定量を行い、代謝物Bを含むイソキサフルトールの含量を求める場合には、代謝物Bの含量に換算係数を乗じてイソキサフルトールに換算し、これらの和を分析値とする。

2) 注意点

- ① イソキサフルトール及び代謝物Bは光に対して不安定なため、褐色のガラス器具を使用するなど、可能な限り遮光下で操作する。
- ② カラムからの溶出液を、減圧濃縮後に窒素ガスを吹き付けて溶媒を完全に除去すると、代謝物Bが損失するため、溶出液の濃縮操作においては1 mL程度残すこと。
- ③ イソキサフルトール及び代謝物B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。
 - ・イソキサフルトール
 - 定量イオン（*m/z*）：プリカーサーイオン 358、プロダクトイオン 79
 - 定性イオン（*m/z*）：プリカーサーイオン 358、プロダクトイオン 278
 - ・代謝物B
 - 定量イオン（*m/z*）：プリカーサーイオン 358、プロダクトイオン 79

定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン 358、プロダクトイオン 278

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、鶏卵

12. 参考文献

なし

13. 類型

C