

## チオキサザフェン分析法（畜産物）

### 1. 分析対象化合物

- ・チオキサザフェン及び代謝物 TX2（ベンズアミジン）

### 2. 装置

チオキサザフェン：ガスクロマトグラフ・タンデム型質量分析計（GC-MS/MS）  
代謝物 TX2（ベンズアミジン）：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

トルエン	: ACS
アセトニトリル、メタノール、水	: HPLC 用
n-ヘキサン	: 分析用
酢酸アンモニウム	: 100%
チオキサザフェン及び代謝物 TX2 （ベンズアミジン）	: 分析用標準品
ポリプロピレン製遠沈管	: 50 mL
96-ウェルプレート用ポリプロピ レン製遠沈管	: 1.4 mL
96-ウェルプレート	: 1 mL、丸型ウェル、U底、ポリプ ロピレン

### 4. 試験溶液の調製

#### (1) 抽出

##### 1) 筋肉、肝臓、腎臓、乳及び卵

均質化した試料 4.00 g を 50 mL 用ポリプロピレン製遠沈管に秤り取り、アセトニトリル 0.4 mL を添加した後、粉碎用ステンレスボール 4 個を遠沈管に入れる。安定同位体標識標準物質のアセトニトリル溶液 0.6 mL を加えた後、抽出溶媒（筋肉、肝臓、腎臓及び卵は 80%アセトニトリル、乳はアセトニトリル）を 39 mL 加えた後、遠沈管に蓋をし、20 分間高速振とう抽出し、遠心分離後、上清の抽出液を得る。

##### 2) 脂肪

均質化した試料 4.00 g を 50 mL 用ポリプロピレン製遠沈管に秤り取り、アセトニトリル 0.4 mL を添加した後、粉碎用ステンレスボール 4 個を遠沈管に入れる。安定同位体標識標準物質のアセトニトリル溶液 0.6 mL を加えた後、アセトニトリル及び n-ヘキサンをそれぞれ 19.5 mL 加えた後、遠沈管に蓋をし、20 分間高速振とう抽出し、遠心分離後、上清の n-ヘキサンとアセトニトリルからアセトニトリル層を分液する。アセトニトリル層から 0.3 mL を GC 分析用 96-ウェルプレートに分取する。残りのアセトニトリル層は全量を遠沈管に戻し、水 4 mL を加えた後、遠沈管に蓋をし、20 分間高

速振とう抽出し、遠心分離後、上清の抽出液を得る。

## (2) 精製

### 1) 筋肉、肝臓、腎臓、乳及び卵

#### ① チオキサザフェン

抽出液の一部を GC 分析用 96-ウェルプレートまたは GC バイアルに分取する。等量のトルエンを加えた後に攪拌し、上層の有機層を得る。

#### ② 代謝物 TX2 (ベンズアミジン)

抽出液の一部を LC 分析用 96-ウェルプレートまたは LC バイアルに分取する。筋肉、肝臓、腎臓及び卵は抽出液に等量のアセトニトリルで希釈する。

### 2) 脂肪

#### ① チオキサザフェン

GC 分析用 96-ウェルプレートに分取した抽出液をそのまま分析する。

#### ② 代謝物 TX2 (ベンズアミジン)

抽出液の一部を LC 分析用 96-ウェルプレートまたは LC バイアルに分取し、等量のアセトニトリルで希釈する。

## 5. 検量線の作成

### (1) チオキサザフェン

チオキサザフェン標準品をアセトニトリルに溶解し、0.50 mg/mL の標準溶液を調製する。調製した標準液をアセトニトリルで段階的に希釈して、検量線用の標準液を数点調製し、それぞれ GC-MS/MS に注入して、ピーク面積を測定し、横軸に重量、縦軸にピーク面積をとって、検量線を作成する。

### (2) 代謝物 TX2 (ベンズアミジン)

代謝物 TX2 (ベンズアミジン) 標準品を 65%アセトニトリルに溶解し、0.526 mg/mL の標準溶液を調製する。調製した標準液をアセトニトリルで段階的に希釈して、検量線用の標準液を数点調製し、それぞれ LC-MS/MS に注入して、ピーク面積を測定し、横軸に重量、縦軸にピーク面積をとって、検量線を作成する。

## 6. 定量

### (1) チオキサザフェン

試験溶液を GC-MS/MS に注入し、5 の検量線を用いて定量する。

### (2) 代謝物 TX2 (ベンズアミジン)

試験溶液を LC-MS/MS に注入し、5 の検量線を用いて定量する。

## 7. 測定条件

### (1) チオキサザフェン

カラム : Rxi-17Sil MS (30 m、内径 0.25 mm、膜厚 0.25  $\mu$ m、Restek 製)  
 温度 : 注入口 : 250 $^{\circ}$ C  
 MS トランスファーライン : 275 $^{\circ}$ C  
 オーブン :

時間 (min)	昇温速度 ( $^{\circ}$ C/min)	初期温度 ( $^{\circ}$ C)	最終温度 ( $^{\circ}$ C)
0-1.0	0	50	50
1.0-4.75	40	50	200
4.75-8.58	30	200	315
8.58-13.58	0	315	315

キャリアーガス : ヘリウム、1.0 mL/min  
 及び流量

注入量 : 0.50  $\mu$ L

保持時間の目安 : チオキサザフェン : 7.5 分

イオン化モード : EI

モニタリング  
 イオン

	プレカーサー イオン ( $m/z$ )	プロダクト イオン ( $m/z$ )
チオキサザフェン	228	119
安定同位体標識	234	125

### (2) 代謝物 TX2(ベンズアミジン)

カラム : Halo Penta-HILIC Column (50 mm、内径 2.1 mm、2.7  $\mu$ m、AMT 製)

カラム温度 : 40  $^{\circ}$ C

移動相及び流量 : 移動相A: 50 mM酢酸アンモニウムの50%メタノール  
 溶液

移動相 B: 10 mM 酢酸アンモニウムの 92% アセトニ  
 トリル溶液

時間 (min)	移動相 B 溶 液 (%)	流量 (mL/min)
0~1.2	100	0.4
5	100	0.4
6	グラジエント 56	1
11	グラジエント 56	1
11.5	100	0.4
12.9	100	0.4

注入量 : 6  $\mu$ L  
保持時間の目安 : 代謝物 TX2 (ベンズアミジン) : 1.4 分  
イオン化モード : ESI (+)  
モニタリング :  
イオン :

	プレカーサー イオン ( <i>m/z</i> )	プロダクト イオン ( <i>m/z</i> )
代謝物 TX2 (ベンズアミジン)	121.1	104.0
安定同位体標識	127.1	110.0

#### 8. 定量限界

チオキサザフェン : 0.01 mg/kg

代謝物 TX2 (ベンズアミジン) : 0.01 mg/kg (チオキサザフェン換算)

#### 9. 留意事項

なし

※ 本分析法は、畜産物における残留試験等において用いられた残留農薬等分析法であり、新たな試験法の開発等に際して参考として下さい。なお、当該分析法をもとに開発した試験法を食品規格への適合判定のために使用する場合には、「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインの一部改正について（平成 22 年 12 月 24 日薬食発 1224 第 1 号）」に従って使用する試験法の妥当性を評価する必要があります。