

ビキサフェン分析法（畜産物）

1. 分析対象化合物

ビキサフェン、代謝物[M21]

2. 装置

高速液体クロマトグラフ・質量分析計（LC-MS/MS）

3. 試薬、試液

ビキサフェン分析標準品	: 純度検定済みの標準物質
代謝物 M21 分析標準品	: 純度検定済みの標準物質
ビキサフェン安定同位体分析標準品	: フェニル環を ^{13}C で標識
代謝物[M21]安定同位体分析標準品	: フェニル環を ^{13}C で標識
アセトニトリル	: LCMS 用
メタノール	: LCMS 用
ギ酸アンモニウム	: 試薬特級
ギ酸	: 試薬特級
水	: Milli-Q 精製装置(ミリポア製)で精製
C18 ミニカラム	: BondElut C18 (500 mg)

4. 試験溶液の調製

1) 内部標準溶液の調製

ビキサフェン及び代謝物[M21]の安定同位体標識標準品をアセトニトリルに溶解し、それぞれ 250 mg/L 及び 500 mg/L(ビキサフェン換算)の安定同位体の一次標準溶液を調製する。次いで、一次標準溶液をメタノール/水(1/4, v/v)に希釈し、ビキサフェン及び代謝物[M21]各 1.0、0.1 及び 0.001 mg/L の内部標準溶液を調製する。

2) 抽出及び精製

① 乳汁、筋肉、腎臓及び卵

均質化した試料(5 g)を 150 mL 容ビーカーに秤量後、30 mL のアセトニトリル/水混液(4/1, v/v)を加え、磨砕抽出する(2分)。ろ過後、抽出液全量を C18 ミニカラムに供試し、流下液を 100 mL 容メスフラスコに回収する。これに内部標準溶液(1.0 mg/L)を 0.5 mL 添加後、アセトニトリル/水混液(4/1, v/v)で 100 mL に定容する。この溶液をメタノール/水(2/8, v/v)で 5 倍量に希釈し、その一部を試験溶液とする。

② 脂肪

均質化した試料(5 g)を 150 mL 容ビーカーに秤量後、アセトニトリル飽和 *n*-ヘキサン 30 mL を加え、磨砕抽出する。ろ過後、残留物に *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL を加え、磨砕抽出する。再び濾過し、先の *n*-ヘキサン抽出液と合わせた後、分液漏斗に移し、激しく振とう後アセトニトリル層を分取する。*n*-ヘキサン層にアセトニトリルを加え、振とう後、アセトニトリル層を分取する。アセトニトリル層を混合し、100 mL 容メスフラスコに移し、更に内部標準溶液(1.0 mg/L)を 0.5 mL 添加後、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリルで 100 mL に定容する。この溶液をメタノール/水(1/4, v/v)で 5 倍量に希釈し、その一部を試験溶液とする。

③ 肝臓

均質化した試料(5 g)を 100 mL 容ビーカーに秤量後、30 mL (牛及び家きんは 25 mL) のアセトニトリル/水混液(4/1, v/v)を加え (家きんは 1 : 1 で 25mL)、静置後マイクロウェーブで加熱抽出する(120°C)。ろ過後、30 mL のアセトニトリル/水混液(4/1, v/v)を加え、再度加熱抽出する。ろ過後、抽出液全量を C18 ミニカラムに供試し、流下液を 100 mL 容メスフラスコに採取する。これに内部標準溶液(1.0 mg/L)を 0.5 mL 添加後、アセトニトリル/水混液(8/2, v/v)で 100 mL に定容する。この溶液をメタノール/水(1/4, v/v)で 5 倍量に希釈し(豚は 2.5 倍量)、その一部を試験溶液とする。

5. 検量線の作成

ビキサフェン標準品及び代謝物[M21]標準品をアセトニトリルに溶解し、それぞれ 500 mg/L(代謝物[M21]はビキサフェン換算)の一次標準溶液を調製する。

この一次標準溶液を希釈し、ビキサフェン及び代謝物[M21]の濃度 1.0 及び 0.10 mg/L の混合標準溶液を調製した。

混合標準溶液と混合内部標準溶液を下表に示す割合で混合後、100 mL に定容し、以下の濃度比の検量線用標準溶液を調製する。

濃度比	標準品濃度	内部標準濃度
50	0.05 mg/L	0.001 mg/L
10	0.01 mg/L	0.001 mg/L
1	0.001 mg/L	0.001 mg/L
0.1	0.0001 mg/L	0.001 mg/L
0.05	0.00005 mg/L	0.001 mg/L

これらの溶液を LC-MS/MS に注入し、標準品ピーク及び内部標準ピークの面積比と濃度比から検量線を作成する。

6. 定量

試験溶液を LC-MS/MS に注入し、5 の検量線を用いて濃度比を求める。得られた濃度比を用いて、下式より残留濃度を求める。

$$\text{残留濃度 (ppm)} = \text{濃度比} \times 0.001 \text{ mg/L (内部標準溶液濃度)} \times \frac{\text{最終液量 (500 mL)}}{\text{試料採取量(5.0 g)}}$$

7. 測定条件

(例)

カラム : Synergy Polar-PR80A (Phenomenex製)
粒径4 μm、内径4.6 mm、長さ150 mm)
移動相 : A 液 : 水/ギ酸アンモニウム水溶液 (10 mmol/L)
B 液 : メタノール

分	%A 液	%B 液
0.0	35	65
1.0	35	65
7.0	15	85
9.0	15	85
9.1	35	65
12.0	35	65
12.0	Stop time	Stop time

流量 : 1.0 mL/分

注入量 : 50 μL

保持時間の目安 : ビキサフェン: 約 7.7 分
代謝物[M21]: 約 6.8 分
イオン化法 : ビキサフェン: ESI (+)
代謝物[M21]: ESI (-)

モニタリングイオン :

	親イオン	娘イオン
ビキサフェン	<i>m/z</i> 414	<i>m/z</i> 394
ビキサフェン内部標準	<i>m/z</i> 421	<i>m/z</i> 401
代謝物[M21]	<i>m/z</i> 398	<i>m/z</i> 378
代謝物[M21] 内部標準	<i>m/z</i> 405	<i>m/z</i> 385

8. 定量限界
各 0.01 ppm

9. 添加回収を実施した食品
鶏卵、牛乳、筋肉、腎臓、家きん及び牛の肝臓・脂肪

10. 留意事項
なし

※ 本分析法は、畜産物における残留試験において用いられた分析法であり、新たな試験法の開発等に際して参考とされたい。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。