

シクラニリド試験法（畜産物）

1. 分析対象化合物

シクラニリド

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。

シクラニリド標準品 本品はシクラニリド95%以上を含む。

5. 試験溶液の調製

1) 抽出

試料10.0 gに水10 mLを加え、ホモジナイズした後、アセトン50 mLを加え、さらにホモジナイズする。毎分3,000回転で5分間遠心分離し、上澄液を採る。残留物にアセトン25 mLを加えてホモジナイズし、上記と同様に遠心分離し、上澄液を採る。得られた上澄液を合わせ、アセトンを加えて正確に100 mLとする。この溶液から正確に5 mLを分取し、40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物に*n*-ヘキサン5 mLを加え、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル5 mLずつで2回振とう抽出する。抽出液を合わせ、40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物に水及びメタノール（9：1）混液1 mLを加えて溶かす。

2) 精製

① オクタデシルシリル化シリカゲルカラムクロマトグラフィー

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム（500 mg）に0.1 mol/L塩酸10 mL、メタノール5 mL及び水10 mLを順次注入し、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、水及びメタノール（9：1）混液10 mL、水及びメタノール（1：1）混液10 mLを順次注入し、各流出液は捨てる。次いで0.5 vol%ギ酸・メタノール溶液10 mLを注入し、溶出液を40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物にメタノール1 mLを加えて溶かす。

② エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルカラムクロマトグラフィー

エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラム（1,000 mg）に0.1 mol/L塩酸及びメタノール各10 mLを順次注入し、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、0.5 vol%ギ酸・メタノール溶液15 mLを注入し、負荷液を含む全溶出液を採り、溶出液に0.5 vol%ギ酸・メタノール溶液を加えて正確に20 mLにしたものを試験溶液とする。

6. 検量線の作成

シクラニリド標準品のメタノール溶液を数点調製し、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0.00025 mg/Lである。

7. 定量

試験溶液をLC-MS/MS に注入し、6. の検量線でシクラニリドの含量を求める。

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2.0 mm、長さ100 mm、粒子径3 µm

カラム温度：40℃

移動相：0.1 vol%ギ酸・1 mmol/L酢酸アンモニウム溶液及びメタノールの混液（1：1）から（1：9）までの濃度勾配を3分間で行い、さらに（1：49）までの濃度勾配を2分間で行い、（1：49）で3分間保持する。

イオン化モード：ESI（－）

主なイオン（ m/z ）：プリカーサーイオン272、プロダクトイオン228、160

注入量：5 µL

保持時間の目安：6分

10. 定量限界

0.01 mg/kg

11. 留意事項

1) 試験法の概要

シクラニリドを試料からアセトンで抽出し、アセトニリル/ヘキサン分配で脱脂する。オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム及びエチレンジアミン-*N*-プロピ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 シクラニリドの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。

定量イオン（ m/z ）：プリカーサーイオン 272、プロダクトイオン 160

定性イオン（ m/z ）：プリカーサーイオン 272、プロダクトイオン 228

② 開発時に用いた遠心分離機における毎分3,000回転は、約1,820×gである。

③ 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