

ジカンバ試験法（畜産物）

1. 分析対象化合物

ジカンバ

3,6-ジクロロ-2-ヒドロキシ安息香酸（以下「代謝物 B」という。抱合体を含む。）

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。

アンモニア水 25%アンモニア水（特級）

スチレンジビニルベンゼン-N 含有ビニル共重合体ミニカラム（500 mg） 内径 12~13 mm のポリプロピレン製のカラム管に、スチレンジビニルベンゼン-N 含有ビニル共重合体 500 mg を充てん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。

ジカンバ標準品 本品はジカンバ 95%以上を含む。

代謝物 B 標準品 本品は代謝物 B 95%以上を含む。

5. 試験溶液の調製

1) 加水分解

試料 10.0 g にエタノール及び 2 mol/L 塩酸（1 : 1）混液 150 mL を加え混合し、還流冷却器をつけて 95°C で 1.5 時間加熱する。放冷後、5 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を加え、pH を 7~8 に調整した後、毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離する。上澄液を採り、*n*-ヘキサン 100 mL を加えて緩やかに振とうした後、水層を採り、2 mol/L 塩酸 5 mL 及び水を加えて正確に 200 mL とする。この溶液から正確に 20 mL を分取し、酢酸エチル及び *n*-ヘキサン（1 : 4）混液 20 mL ずつで 3 回振とう抽出する。抽出液を合わせ、無水硫酸ナトリウムを加えて脱水し、無水硫酸ナトリウムをろ別した後、ろ液を 40°C 以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物にギ酸、水及びメタノール（1 : 600 : 400）混液 5 mL を加えて溶かす。

2) 精製

スチレンジビニルベンゼン-N 含有ビニル共重合体ミニカラム（500 mg）にメタノール 10 mL、ギ酸、水及びメタノール（1 : 600 : 400）混液 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、ギ酸、水及びメタノール（1 : 600 : 400）混液 10 mL、水 10 mL を順次注入し、各流出液は捨てる。次いで、アンモニア水、水及びメタノール（2 : 5 : 95）10 mL を注入し、溶出液を 40°C 以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物を水及びメタノール（19 : 1）混液に溶かし、正確に 1 mL としたものを試験溶液とする。

6. 検量線の作成

ジカンバ標準品及び代謝物 B 標準品を用いてそれぞれ標準原液を調製する。各標準原液を適宜混合して水及びメタノール（19：1）混液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 0.005 mg/kg に相当する試験溶液中の濃度は 0.005 mg/L である。

7. 定量

試験溶液を LC-MS/MS に注入し、6. の検量線でジカンバ及び代謝物 B（抱合体を含む。）の各含量を求める。代謝物 B（抱合体を含む。）を含むジカンバの含量を求める場合には、次式により求める。

$$\text{ジカンバ（代謝物 B（抱合体を含む。）を含む。）の含量（ppm）} = A + B \times 1.068$$

A：ジカンバの含量（ppm）

B：代謝物 B（抱合体を含む。）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：フェニルシリル化シリカゲル内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 5 μm

カラム温度：40°C

移動相：0.1 vol% 酢酸・5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液及びメタノールの混液（19：1）から（7：3）までの濃度勾配を 2 分間で行い、13 分間保持する。

イオン化モード：ESI（－）

主なイオン（*m/z*）

ジカンバ：プリカーサーイオン 219、プロダクトイオン 175

プリカーサーイオン 221、プロダクトイオン 177

代謝物 B：プリカーサーイオン 205、プロダクトイオン 161

プリカーサーイオン 207、プロダクトイオン 163

注入量：10 μL

保持時間の目安

ジカンバ：8 分

代謝物 B：11 分

10. 定量限界

各化合物 0.005 mg/kg（代謝物 B はジカンバ換算）

11. 留意事項

1) 試験法の概要

ジカンバ及び代謝物 B（抱合体を含む。）を、試料にエタノール及び 2 mol/L 塩酸（1：1）混液を加

えて加水分解して抽出した後、*n*-ヘキサンで洗浄する。酢酸エチル及び *n*-ヘキサン（1：4）混液に転溶し、スチレンジビニルベンゼン-N 含有ビニル共重合体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、ジカンバ及び代謝物 B（抱合体を含む。）のそれぞれについて定量を行い、代謝物 B（抱合体を含む。）を含むジカンバの含量を求める場合には、代謝物 B（抱合体を含む。）の含量に換算係数を乗じてジカンバの含量に換算し、これらの和を分析値とする。

2) 注意点

- ① ジカンバ及び代謝物 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。

ジカンバ

定量イオン (*m/z*) : プリカーサーイオン 219、プロダクトイオン 175

定性イオン (*m/z*) : プリカーサーイオン 221、プロダクトイオン 177

代謝物 B

定量イオン (*m/z*) : プリカーサーイオン 205、プロダクトイオン 161

定性イオン (*m/z*) : プリカーサーイオン 207、プロダクトイオン 163

- 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 1,490×g である。
- ③ LC-MS/MS 測定においてマトリックスの影響がある場合は、試験溶液を希釈して測定すると良い。なお、試験法開発時には、代謝物 B はマトリックスの影響を受けたため、試験溶液を希釈して測定した。
- 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