

セトキシジム試験法（畜水産物）

1. 分析対象化合物

セトキシジム

2-[1-(エトキシイミノ)ブチル]-5-[2-(エチルスルフィニル)プロピル]-3-ヒドロキシシクロヘキサ-2-エン-1-オン（以下「代謝物B」という。）

2-[1-(エトキシイミノ)ブチル]-5-[2-(エチルスルフォニル)プロピル]-3-ヒドロキシシクロヘキサ-2-エン-1-オン（以下「代謝物C」という。）

6-[2-(エチルチオ)プロピル]-4-オキソ-2-プロピル-4,5,6,7-テトラヒドロベンゾオキサゾール（以下「代謝物G」という。）

6-[2-(エチルスルフィニル)プロピル]-4-オキソ-2-プロピル-4,5,6,7-テトラヒドロベンゾオキサゾール（以下「代謝物H」という。）

6-[2-(エチルスルフォニル)プロピル]-4-オキソ-2-プロピル-4,5,6,7-テトラヒドロベンゾオキサゾール（以下「代謝物I」という。）

2. 適用食品

畜水産物

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。

20 w/v%塩化ナトリウム含有5 w/v%チオ硫酸ナトリウム溶液 塩化ナトリウム200 g及びチオ硫酸ナトリウム五水和物78.6 gを量り、水に溶かし、1000 mLとする。

クエン酸 純度98%以上の試薬を用いる。

0.05 mol/L クエン酸緩衝液（pH 3.0） クエン酸9.6 gを量り、水を加えて溶かし、1000 mLとしたものを第1液とする。クエン酸三ナトリウム二水和物7.35 gを量り、水を加えて溶かし、500 mLとしたものを第2液とする。第1液と第2液を混和し、pHを3.0に調整する。

m-クロロ過安息香酸試液 *m*-クロロ過安息香酸100 mgを量り、酢酸エチル20 mLを加えて溶かす。用時調製とする。

多孔性ケイソウ土カラム（10 mL保持用） 内径25～30 mmのポリエチレン製のカラム管に、10 mLを保持することができる量のカラムクロマトグラフィー用に製造した顆粒状多孔性ケイソウ土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。

セトキシジム標準品 本品はセトキシジム95%以上を含む。

代謝物I標準品 本品は代謝物I 95%以上を含む。

5. 試験溶液の調製

1) 抽出

試料10.0 gにメタノール50 mL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、上澄液を採る。残留物にメタノール30 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、上澄液を採る。得られた上澄液を合わせ、メタノールを加えて正確に100 mLとする。

2) オキサゾール化及びスルホン化

① オキサゾール化及びスルホキシド化

1) で得られた溶液から正確に2 mLを分取し、0.05 mol/Lクエン酸緩衝液 (pH 3.0) 2 mL及び過酸化水素25 mLを加えて混合した後、密栓して50°Cで16時間加温する。冷後、全量を多孔性ケイソウ土カラム (10 mL保持用) に注入する。水4 mLをカラムに注入して10分間放置する。このカラムに*n*-ヘキサン50 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで、酢酸エチル80 mLを注入して、溶出液を採り、40°C以下で約30 mLに濃縮する。

② スルホン化

①で得られた溶液に、*m*-クロロ過安息香酸試液1 mLを加えて混合した後、密栓して30°Cで10分間加温する。この溶液を、予め20 w/v%塩化ナトリウム含有5 w/v%チオ硫酸ナトリウム溶液9 mLを注入して10分間放置した多孔性ケイソウ土カラム (10 mL保持用) に注入して、溶出液を採る。次いで、このカラムに酢酸エチル40 mLを注入して溶出液を採る。得られた溶出液を合わせて、40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物に酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (3 : 2) 混液2 mLを加えて溶かす。

3) 精製

シリカゲルミニカラム (500 mg) に、酢酸エチル5 mL並びに酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (3 : 2) 混液5 mLを順次注入し、各流出液は捨てる。このカラムに2) で得られた溶液を注入した後、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (3 : 2) 混液10 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン (9 : 1) 混液15 mLを注入し、溶出液を40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物をアセトニトリル及び2.5 mmol/Lギ酸アンモニウム溶液 (12 : 13) 混液に溶かし、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

代謝物I標準品をアセトニトリルに溶かして標準原液を調製する。標準原液をアセトニトリル及び2.5 mmol/Lギ酸アンモニウム溶液 (12 : 13) 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 (セトキシジム換算) に相当する試験溶液中濃度は0.001 mg/L (セトキシジム換算) である。

7. 定量

試験溶液をLC-MS/MSに注入し、6. の検量線で代謝物Iの含量を求め、次式により、セトキシジム (代謝物B、代謝物C、代謝物G、代謝物H及び代謝物Iを含む。) の含量を求める。

セトキシジム (代謝物B、代謝物C、代謝物G、代謝物H及び代謝物Iを含む。) の含量 (ppm) = 代謝物Iの含量 (ppm) × 1.045

8. 確認試験

LC-MS/MSにより確認する。

9. 測定条件

(例)

カラム：オクチルシリル化シリカゲル 内径3.0 mm、長さ150 mm、粒子径5 μm

カラム温度：40°C

移動相：アセトニトリル及び2.5 mmol/Lギ酸アンモニウム溶液（12：13）混液

イオン化モード：ESI（+）

主なイオン (m/z)：プリカーサーイオン314、プロダクトイオン220、178

注入量：5 μL

保持時間の目安：3分

10. 定量限界

0.01 mg/kg（セトキシジム換算）

11. 留意事項

1) 試験法の概要

セトキシジム及びその代謝物（代謝物B、代謝物C、代謝物G、代謝物H及び代謝物I）を試料からメタノールで抽出する。過酸化水素を加えて50°Cで16時間加温して、オキサゾール化及びスルホキシド化を行う。多孔性ケイソウ土カラムで精製した後、*m*-クロロ過安息香酸を加えてスルホン化を行い、セトキシジム及びその代謝物（代謝物B、代謝物C、代謝物G及び代謝物H）を代謝物Iに変換する。反応液を予め20 w/v%塩化ナトリウム含有5 w/v%チオ硫酸ナトリウム溶液を注入した多孔性ケイソウ土カラムに注入し、*m*-クロロ過安息香酸を還元するとともに精製する。更に、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。なお、代謝物Iについて定量を行い、代謝物Iの含量に換算係数を乗じてセトキシジム（代謝物B、代謝物C、代謝物G、代謝物H及び代謝物Iを含む。）の含量に換算したものを分析値とする。

2) 注意点

- ① オキサゾール化及びスルホン化は、セトキシジム標準品を用いて添加回収試験を実施し、代謝物Iへの変換が十分に行われていることを確認すること。
- 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1,930 $\times g$ である。
- ③ セトキシジムから変換された代謝物Iは、異性体の混合物であるためピーク形状がややブロードとなる。代謝物I標準品とはピーク形状が異なることがあるため、6. 検量線は、ピーク高法ではなく、ピーク面積法で作成する。
- ④ 代謝物I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 314、プロダクトイオン 220
定性イオン (m/z)：プリカーサーイオン 314、プロダクトイオン 178

また、参考としてセトキシジム、代謝物B、代謝物C、代謝物G、代謝物H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。

セトキシジム

定量イオン (m/z) : プリカーサーイオン 328、プロダクトイオン 178

定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン 328、プロダクトイオン 282

代謝物B

定量イオン (m/z) : プリカーサーイオン 344、プロダクトイオン 220

定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン 344、プロダクトイオン 178

代謝物C

定量イオン (m/z) : プリカーサーイオン 360、プロダクトイオン 314

定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン 360、プロダクトイオン 178

代謝物G

定量イオン (m/z) : プリカーサーイオン 282、プロダクトイオン 176

定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン 282、プロダクトイオン 220

代謝物H

定量イオン (m/z) : プリカーサーイオン 298、プロダクトイオン 220

定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン 298、プロダクトイオン 178

- ⑤ 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、うなぎ、しじみ

12. 参考文献

なし

13. 類型

C