

## フルジオキシニル試験法（畜産物）

### 1. 分析対象化合物

フルジオキシニル

酸化反応により2,2-ジフルオロ-1,3-ベンゾジオキソール-4-カルボン酸（以下「代謝物K」という。）に変換される代謝物

### 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。

3級アミン修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン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、3級アミン修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体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。

ピロ亜硫酸ナトリウム 純度95%以上の試薬を用いる。

代謝物K標準品 本品は代謝物K 95%以上を含む。

フルジオキシニル標準品 本品はフルジオキシニル95%以上を含む。

### 5. 試験溶液の調製

#### 1) 抽出

##### ① 筋肉、肝臓、腎臓、乳及び卵の場合

試料10.0 gにアセトニトリル160 mLを加えてホモジナイズする。アセトニトリル10 mL及びアンモニア水40 mLを加え、還流冷却器を付けて1時間加熱還流する。室温まで放冷後、ケイソウ土10 gを加えて吸引ろ過し、ろ紙上の残留物を水25 mL、次いで、アセトニトリル25 mLで洗浄し、得られたろ液を合わせる。これに塩酸2 mL、トルエン25 mL及び飽和塩化ナトリウム溶液25 mLを加えて振とうした後、上層を採り、アセトニトリル及びトルエン（17：3）混液を加えて正確に250 mLとする。

##### ② 脂肪の場合

試料10.0 gにアセトニトリル170 mL、アンモニア水40 mLを加え、還流冷却器を付けて1時間加熱還流する。室温まで放冷後、ケイソウ土10 gを加えて吸引ろ過し、ろ紙上の残留物を水25 mL、次いで、アセトニトリル25 mLで洗浄し、得られたろ液を合わせる。これに塩酸2 mL、トルエン25 mL及び飽和塩化ナトリウム溶液25 mLを加えて振とうした後、上層を採り、アセトニトリル及びトルエン（17：3）混液を加えて正確に250 mLとする。

## 2) 酸化

1) で得られた溶液から正確に25 mLを分取した後、40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物に過マンガン酸カリウム1 g及び1 mol/L水酸化ナトリウム溶液30 mLを加え、60°Cで15分間加熱した後、氷冷する。反応液が十分に冷えた後、氷冷下でピロ亜硫酸ナトリウム6 gを加え、適宜振り混ぜながら氷冷下で放置する。反応液が乳白色となった後、不溶物をろ別し、水を加えて正確に50 mLとする。この溶液から正確に10 mLを分取し、塩酸800 µLを加えて混合する。

## 3) 精製

ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム (500 mg) にアセトニトリル及び水各5 mLを順次注入し、各流出液は捨てる。3級アミン修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム (500 mg) にメタノール及び水各5 mLを順次注入し、各流出液は捨てる。ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムに2) で得られた溶液を注入した後、水12 mLを注入し、流出液は捨てる。このカラムの下部に3級アミン修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムを接続した後、アセトニトリル及び水 (1 : 1) 混液20 mLを注入し、流出液は捨てる。ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムを取り外した後、3級アミン修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムに酢酸及びメタノール (1 : 199) 混液10 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで、ギ酸及びメタノール (1 : 99) 混液12 mLを注入し、溶出液を40°C以下で約1 mLまで濃縮し、0.2 vol%酢酸及び0.2 vol%酢酸・アセトニトリル溶液 (1 : 1) 混液で正確に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K標準品の0.2 vol%酢酸及び0.2 vol%酢酸・アセトニトリル溶液 (1 : 1) 混液の溶液を数点調製し、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 (フルジオキシソニル換算) に相当する試験溶液中濃度は0.001 mg/L (フルジオキシソニル換算) 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Kの含量を求め、次式によりフルジオキシソニル (酸化反応により代謝物Kに変換される代謝物を含む。) の含量を求める。

フルジオキシソニル (酸化反応により代謝物Kに変換される代謝物を含む) の含量 (ppm) = 代謝物Kの含量 (ppm) × 1.228

## 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2.1 mm、長さ150 mm、粒子径3 µm

カラム温度 : 40°C

移動相：0.2 vol%酢酸及び0.2 vol%酢酸・アセトニトリル溶液（49：1）混液で1分間保持した後、（49：1）から（3：2）までの濃度勾配を6分間で行い、（3：2）で8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201、プロダクトイオン91、65

注入量：5 µL

保持時間の目安：14分

## 10. 定量限界

0.01 mg/kg（フルジオキソニル換算）

## 11. 留意事項

### 1) 試験法の概要

フルジオキソニル及び酸化反応により代謝物Kに変換される代謝物を、筋肉、肝臓、腎臓、乳及び卵の場合は、試料をアセトニトリルでホモジナイズした後、脂肪の場合はそのまま試料に、アセトニトリル及びアンモニア水を（17：4）になるように加え、加熱還流して抽出し、酸性下でトルエンに転溶する。抽出液を過マンガン酸カリウム・水酸化ナトリウム溶液に置換して加熱し、フルジオキソニル及びその代謝物を代謝物Kに酸化する。酸化生成物をジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム及び3級アミン修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン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、代謝物Kについて定量を行い、代謝物Kの含量に換算係数を乗じてフルジオキソニル（酸化反応により代謝物Kに変換される代謝物を含む。）の含量に換算したものを分析値とする。

### 2) 注意点

- ① 5. 1) 抽出の「① 筋肉、肝臓、腎臓、乳及び卵の場合」においては、ホモジナイズ後に加えるアセトニトリル10 mLでホモジナイザーのシャフトを洗浄し、その洗液を合わせる。
- ② 5. 1) 抽出において、塩酸を加えたときに pH が 3 以下であることを確認する。
- ③ フルジオキソニル標準品を用いて添加回収試験を実施し、代謝物 K への変換が十分に行われていることを確認すること。
- ④ 過マンガン酸カリウム及び水酸化ナトリウム溶液を加えて混合したとき、反応液が赤紫色であることを確認する。反応液が茶色や緑色である場合、代謝物 K への変換が十分に行われない可能性がある。この原因として、酸化試薬添加前の溶媒除去が不十分であることが考えられるので、溶媒を完全に除去するよう留意する。
- ⑤ ピロ亜硫酸ナトリウムを加えると反応液が発熱するため、本操作は氷冷中で行う。
- ⑥ 過マンガン酸カリウムとピロ亜硫酸ナトリウムの反応により不溶物が生じて反応液が乳白色となる。
- ⑦ 5. 2) 酸化において、塩酸を加えたとき pH が 1 程度であることを確認する。
- ⑧ 5. 3) 精製において、ギ酸及びメタノール（1：99）混液の溶出液を濃縮乾固すると代謝物 K が損失する可能性があるため、溶出液を濃縮する際には乾固させないように注意する。
- ⑨ 代謝物 K 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 201、プロダクトイオン 91

定性イオン ( $m/z$ ) : プリカーサーイオン 201、プロダクトイオン 65

⑩ 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