

イプフェンカルバゾン試験法（畜水産物）

1. 分析対象化合物

イプフェンカルバゾン

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。

イプフェンカルバゾン標準品 本品はイプフェンカルバゾン 98 %以上を含む。

5. 試験溶液の調製

1) 抽出

① 筋肉、脂肪、内臓、卵、乳及び魚介類の場合

脂肪以外の場合は試料 10.0 g を、脂肪の場合は試料 5.00 g を量り採り、アセトン及び *n*-ヘキサン（1：2）混液 70 mL を加え、ホモジナイズする。毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離し、有機層を採る。残留物にアセトン及び *n*-ヘキサン（1：2）混液 30 mL を加え、ホモジナイズした後、同様に遠心分離する。有機層を先の有機層に合わせ、アセトン及び *n*-ヘキサン（1：2）混液を加えて正確に 100 mL とする。この溶液から、脂肪以外の場合は正確に 10 mL を、脂肪の場合は正確に 20 mL を分取し、40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物に *n*-ヘキサン 20 mL を加え、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 20 mL ずつで 2 回振とう抽出する。抽出液を合わせ、40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物にアセトン及び *n*-ヘキサン（1：9）混液 5 mL を加えて溶かす。

② はちみつの場合

試料 10.0 g に水 6 mL を加えて溶かした後、アセトン及び *n*-ヘキサン（1：2）混液 70 mL を加え、ホモジナイズする。毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離し、有機層を採る。残留物にアセトン及び *n*-ヘキサン（1：2）混液 30 mL を加え、ホモジナイズした後、同様に遠心分離する。有機層を先の有機層に合わせ、アセトン及び *n*-ヘキサン（1：2）混液を加えて正確に 100 mL とする。この溶液から正確に 10 mL を分取し、40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物にアセトン及び *n*-ヘキサン（1：9）混液 5 mL を

加えて溶かす。

2) 精製

① 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 (500 mg) に、アセトン及び *n*-ヘキサン各 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、アセトン及び *n*-ヘキサン (1 : 9) 混液 5 mL を注入し、負荷液を含む全溶出液を採り、40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物にアセトニトリル及び水 (3 : 7) 混液 5 mL を加えて溶かす。

② 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、アセトニトリル及び水各 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、アセトニトリル及び水 (3 : 7) 混液 5 mL を注入し、流出液は捨てる。次いで、アセトニトリル及び水 (3 : 2) 混液 10 mL を注入し、溶出液をアセトニトリル及び水 (3 : 21) 混液で正確に 10 mL としたものを試験溶液とする。

6. 検量線の作成

イプフェンカルバゾン標準品のアセトニトリル及び水 (3 : 2) 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 0.001 mg/L である。

7. 定量

試験溶液を LC-MS/MS に注入し、6の検量線でイプフェンカルバゾンの含量を求める。

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 2.1 mm、長さ 100 mm、粒子径 3.5 μm

カラム温度 : 40°C

移動相 : 0.01 vol% 酢酸・アセトニトリル溶液及び 0.01 vol% 酢酸の混液 (1 : 1) で 0.5 分間保持した後、(4 : 1) までの濃度勾配を 7.5 分間で行い 4 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 427、プロダクトイオン 198
プリカーサーイオン 429、プロダクトイオン 198

注入量 : 5 μ L

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

イプフェンカルバゾンを試料からアセトン及び *n*-ヘキサン (1 : 2) 混液で抽出し、アセトニトリル/ヘキサン分配で脱脂し、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及びオクタデシ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 イプフェンカルバゾンの 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 427、プロダクトイオン 198

定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン 429、プロダクトイオン 198

- ② 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、はち

みつ、うなぎ及びしじみ

12. 参考文献

なし

13. 類型

C