

※ 本報告書は、試験法開発における検討結果をまとめたものであり、試験法の実施に際して参考として下さい。なお、報告書の内容と通知または告示試験法との間に齟齬がある場合には、通知または告示試験法が優先することをご留意ください。

平成23年度

食品に残留する農薬等の成分である物質の  
試験法開発・検証業務の結果報告

(農薬：クロメプロップ)

## クロメプロップ試験法（畜水産物）の検討結果

### [緒言]

クロメプロップはフェノキシ酸系除草剤であり、水田において水稻に高い選択性を示し、一年生広葉雑草及び多年生雑草のウリカワ、ホタルイ、マツバイに効果を示す。本剤はホルモン作用を持つ吸収移行型の除草剤であり、作用機構として根部、茎葉基部及び茎葉部から吸収された後、植物体内を移行してオーキシシン作用を攪乱し、その結果、正常な生体制御機構を破壊し枯死させると考えられている。また、スルホニルウレア系除草剤とは殺草機構が異なるため、スルホニルウレア抵抗性雑草の防除及び発生防止に有効である。わが国においては、1988年3月に初回農薬登録されている。JMPRにおける毒性評価はなされておらず、国際基準も設定されていない。また、米国、カナダ、欧州連合（EU）、オーストラリア及びニュージーランドにおいても基準値は設定されていない。わが国ではクロメプロップは食品衛生法の規格基準で米（玄米）に0.02ppm、魚介類に0.3ppmの基準値が設定されている。食品安全委員会の食品健康影響評価結果から、クロメプロップ及び代謝物B（2-(2,4-ジクロロ-*m*-トリルオキシ)プロピオン酸。別名クロメプロップ酸）を分析対象化合物とした作物残留試験の結果、玄米及び稲わらにおいては、いずれの化合物も定量限界未満であり、魚介類においてはクロメプロップ及び代謝物の最大推定残留値は、それぞれ0.002及び0.239 mg/kgであった。そこで、農産物にあつては、クロメプロップのみを規制対象としている。また、本試験法の対象である畜水産物のうち、水産物にあつてはクロメプロップ及びクロメプロップ酸をクロメプロップに換算したものの和を規制対象とし、水産物以外の食品（畜産物、はちみつなど）にあつてはクロメプロップを規制対象としている。

クロメプロップの物理化学的性状<sup>1)</sup>は、白色固体、わずかなフェノール臭があり、融点 147～148℃、沸点 302～309℃、蒸気圧  $4.31 \times 10^{-6}$  Pa 未満、解離定数（pKa）は水に極めて難溶性のため測定不能、オクタノール/水分配係数（log Pow）4.8（25℃）である。各溶媒等への溶解度は水： $3.5 \times 10^{-5}$  g/L、*n*-ヘキサン：0.54 g/L、トルエン：23.9 g/L、メタノール：3.6 g/L、アセトン：27.5 g/L、ジクロロメタン：124 g/L、酢酸エチル：24.1 g/L である。

クロメプロップ及びクロメプロップ酸の構造を図1に示す。

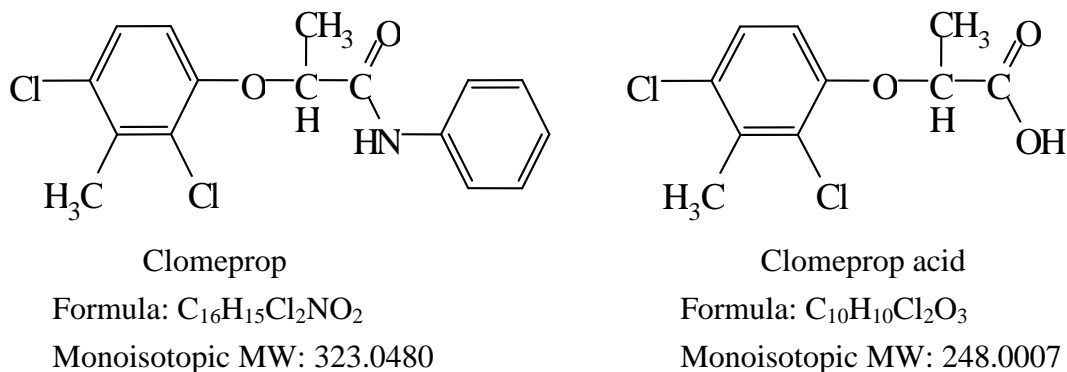


図 1. Structure of clomeprop and clomeprop acid

クロメプロップの分析法は、通知一斉試験法「LC/MSによる農薬等の一斉分析法Ⅰ（農産物）」で対象農薬となっているが、畜水産物を対象としておらず、また、代謝物についても測定対象としていない。そのほかの報告でも同様に、畜水産物や代謝物を対象とした分析法の報告はない。

## 【実験方法】

### 1. 試料

試料は埼玉県内で市販されていた 1)牛筋肉, 2)牛脂, 3)牛肝臓, 4)牛乳, 5)さけ, 6)うなぎ, 7)しじみ, 8)鶏卵, 9)はちみつ（そば蜜）及び 10)ブリを用いた。

各食品の試料採取の方法を以下に示した。

- 1) 牛筋肉：可能な限り脂肪層を除き，細切均一化した。
- 2) 牛脂：可能な限り筋肉層を除き，細切均一化した。
- 3) 牛肝臓：全体を細切均一化した。
- 4) 牛乳：全体をよく混合して均一化した。
- 5) さけ：可食部（皮を含む）を細切均一化した。
- 6) うなぎ：活鰻を使用し，頭を除いた可食部（内臓、骨及び皮を含む）を細切均一化した。
- 7) しじみ：殻を除去し，細切均一化した。
- 8) 鶏卵：殻を除去し，卵白と卵黄を合わせてよく混合し均一化した。
- 9) はちみつ：そば蜜を使用し，よく混合して均一化した。
- 10) ブリ：可食部（皮を含む）を細切均一化した。

### 2. 試薬

標準品：クロメプロップは和光純薬工業（株）製，純度 99.8%のものを，クロメプロップ酸は林純薬工業（株）製，純度 99.9%のものを使用した。

標準原液：各標準品 50 mg を精秤し，アセトンに溶解して 50mL としたものを標準原液とした。

アセトニトリル，メタノール及び蒸留水は高速液体クロマトグラフィー用を，*n*-ヘキサン及びアセトンは残留農薬試験用を，その他の試薬はすべて特級品を用いた。精製用固相抽出カートリッジには InertSep SAX（500mg）及び InertSep Slim-J PSA（500mg）（GL Sciences 社製）を用いた。あらかじめメタノール，アセトン及び *n*-ヘキサン各 10mL で順次，コンディショニングして使用した。

### 3. 装置

高速液体クロマトグラフは Waters 社製 Acquity，質量分析装置は Waters 社製 Xevo TQ，フォトダイオードアレイ検出器は Waters 社製 2996 を用いた。ロータリーエバポレーターは Buchi 社の R-210 を用いた。

#### 4. 測定条件

分析カラムに X-bridge C<sub>18</sub> (2.1×100mm, 粒子径 3.5 μm) (Waters 社製) を, 検出には MS 検出器を用い, MRM (Multiple Reaction Monitoring) モードで測定した.

LC-MS/MS の測定条件を表 1 及び 2 に示す.

表 1. LC-MS/MS operating conditions

parameter	Settings																		
LC parameters																			
Mobile phase	A = 0.01% acetic acid B = 0.01% acetic acid in acetonitrile																		
Linear gradient elution	<table border="1"> <thead> <tr> <th>time (min)</th> <th>A (%)</th> <th>B (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>0.5</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>6</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>8</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>8.1</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> </tbody> </table>	time (min)	A (%)	B (%)	0	50	50	0.5	50	50	6	10	90	8	10	90	8.1	50	50
time (min)	A (%)	B (%)																	
0	50	50																	
0.5	50	50																	
6	10	90																	
8	10	90																	
8.1	50	50																	
Flow rate	0.2 ml/min																		
Column temperature	40 °C																		
Injection volume	10 μl																		
Run time	20 min																		
AP interface parameters <sup>a</sup>																			
clomeprop																			
Ionization mode	Electrospray ionization (positive mode)																		
Capillary voltage	3.20kV																		
clomeprop acid																			
Ionization mode	Electrospray ionization (negative mode)																		
Capillary voltage	3.00kV																		
Source temperature	150°C																		
Desolvation temperature	450°C																		
Cone gas flow	50 L/hr																		
Desolvation gas flow	1000 L/hr																		

<sup>a</sup>AP= Atmospheric pressure

表 2. MRM parameter

analyte	Monitored Reactions	Dwell	Cone	Collision
	Precursor m/z >product m/z	Time (s)	Voltage (V)	Energy (eV)
clomeprop	324 > 120 <sup>a,c</sup>	0.4	39	25
	326 > 120 <sup>b,c</sup>	0.4	39	25
clomeprop acid	247 > 175 <sup>a,d</sup>	0.4	29	10
	249 > 177 <sup>b,d</sup>	0.4	29	15

<sup>a</sup> used for quantitation

<sup>b</sup> used for confirmation.

<sup>c</sup> positive mode

<sup>d</sup> negative mode

## 5. 定量

クロメプロップ及びクロメプロップ酸標準原液をアセトニトリル及び水 (1:1) 混液で希釈し、クロメプロップは 0.001~0.045 µg/mL 濃度範囲の、クロメプロップ酸は 0.00077~0.03465 µg/mL 濃度範囲の標準溶液を調製し、10 µL を LC-MS/MS に注入した。それぞれ得られたクロマトグラムからクロメプロップ及びクロメプロップ酸のピーク面積を求め、絶対検量線法で検量線を作成した。

## 6. 試験溶液の調製

### 1) 抽出

脂肪以外の試料は 10.0g を、脂肪試料は 5.00g を量り採った。はちみつ以外の試料はアセトン及び *n*-ヘキサン (1:2) 混液 100mL、1mol/L 塩酸 6mL 及び塩化ナトリウム 8g の順に加え、1 分間ホモジナイズし、3 分間振とう<sup>注1)</sup> した。はちみつ試料は 1mol/L 塩酸 6mL を加え、溶解した後、アセトン及び *n*-ヘキサン (1:2) 混液 100mL 及び塩化ナトリウム 8g を加え、1 分間ホモジナイズした後、3 分間振とう<sup>注1)</sup> した。毎分 3,500 回転で 5 分間遠心分離し、上層のアセトン及びヘキサン層を採取した。下層のアセトン-水層及び残留物にアセトン及びヘキサン (1:2) 混液 100mL を加え、3 分間振とう<sup>注2)</sup> した後、毎分 3,500 回転で 5 分間遠心分離した。上層を先のアセトン-ヘキサン層に合わせ、アセトン及びヘキサン (1:2) 混液で 200mL に定容した。

注 1) 試験法開発時には、塩化ナトリウムの溶解を助けるためにホモジナイズ後に 3

分間振とうしたが、ホモジナイズのみでも溶解は十分と考えられたことから通知法(案)では振とう操作を削除した。

注2) 試験法開発時には2回目の抽出には振とう抽出を用いたが、ホモジナイズに変更しても残留物等の状況から夾雑成分の増加等の影響は少ないと思われたことから、通知法(案)ではホモジナイズ抽出とした。

## 2) 脱脂

脂肪以外の試料についてはその液の20mL(試料1g相当)を、脂肪試料は40mL(1g分)を採取し、40℃以下で減圧濃縮し、溶媒を留去した。残留物に*n*-ヘキサン20mLを加え、50mL容のポリプロピレンチューブに移した。*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル20mLを加え、3分間、振とう抽出した。3,000回転で5分間遠心分離し、アセトニトリル層を採取した後、ヘキサン層に*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル20mLを加え、同様に操作した。この操作をもう一度繰り返す、アセトニトリル層を併せた。アセトニトリル層を40℃以下で減圧濃縮し、溶媒を除去した。残留物にアセトン及び*n*-ヘキサン(1:49)混液3mLを加えて超音波溶解した。なお、ハチミツ試料については、アセトニトリルヘキサン分配の脱脂行程を省略することが可能であった。

## 3) 精製

あらかじめコンディショニングしたInertSep SAX(500mg)の下部にInertSep Slim-J PSA(500mg)を連結したものに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(1:49)混液10mLを注入し、流出液を除去した。次いでアセトン及び*n*-ヘキサン(3:17)混液15mLを注入し、溶出液を40℃以下で濃縮し、溶媒を除去した。残留物をアセトニトリル及び水(1:1)混液に溶解し、正確に2mLとしたものをクロメプロップ試験溶液とした。なお、基準値の高い水産物の添加回収試験では、10mLとしたものを試験溶液とした。InertSep Slim-J PSA(500mg)を取り外し、InertSep SAX(500mg)にアセトン及びメタノール各10mLを順次注入し、流出液を除去した。このカラムに0.4 vol%ギ酸・メタノール溶液10mLを注入し、溶出液を40℃以下で濃縮し、溶媒を除去した。残留物をアセトニトリル及び水(1:1)混液に溶解し、正確に2mLとしたものをクロメプロップ酸試験溶液とした。なお、基準値の高い水産物の添加回収試験では、クロメプロップ試験溶液の作成と同様に10mLとした。

試験溶液調製法の概略を図2に示す。

なお、添加回収試験では、基準値の10倍濃度の標準溶液(アセトン溶液)を作製し、試料10g(脂肪試料では5g)に対し1mL(脂肪試料では0.5mL)添加して良く混合してから30分間放置した後、上記、試験溶液の調製法に従って操作した。

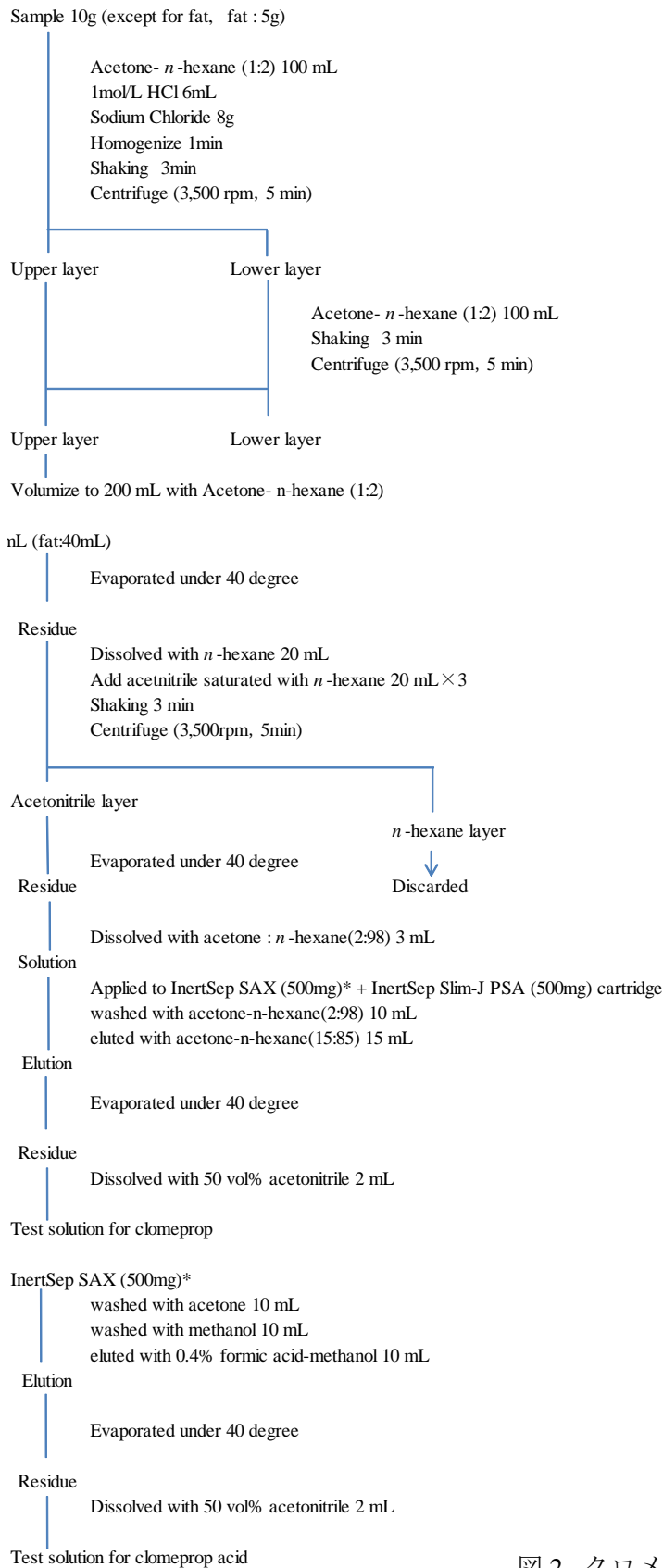


図 2. クロメプロップの試験溶液調製方法

## 7. マトリクスの測定値への影響及び定量下限値の S/N 比の検討

### 1) ブランク溶液の調製

クロメプロップ及びクロメプロップ酸が含有されていないことを確認した試料を 6 に示した「試験溶液の調製法」に従って作製した。精製行程の残留物は、メスピペットでアセトニトリル及び水 (1:1) 混液 1.8mL に溶解した。

### 2) マトリクスの測定値への影響の検討

添加回収試験で添加した濃度の 10 倍濃度に相当する標準液 0.2mL をメスピペットで調製したブランク溶液に添加し、マトリクス添加標準溶液を作製した (添加回収試験での 100% 回収率に相当する濃度)。溶媒標準溶液とのピーク面積値と比較し、試料マトリクスの測定値への影響を検討した。

### 3) 定量下限値の S/N 比の検討

定量下限値 (MRM 測定では試料中濃度としてクロメプロップは 0.002mg/kg, クロメプロップ酸は 0.00154mg/kg) に相当する濃度の 10 倍濃度の標準溶液 0.2mL を調製したブランク溶液に添加した (定量下限値に相当する濃度)。試料マトリクス存在下における定量下限値の S/N 比を検討した。

## [結果及び考察]

### 1. 測定条件の検討

#### 1) LC, UV, MS(/MS)条件の検討

##### 1-1) LC 条件の検討

これまでに報告されているクロメプロップの分析法の LC 条件<sup>2-6)</sup> はいずれもシリカベースの逆相系のカラム (C<sub>18</sub>) を用いている。これらの報告で良好な結果が得られているので、本検討でもシリカベースの逆相系カラムについて、ピーク形状や MS 検出で感度が良好なカラムを検討した。L-column ODS ((財) 化学物質評価研究機構製), CadenzaCD-C18 (Imtakt 社製), Atlantis T3, Symmetry C18 及び Xbridge C18 (Waters 社製), Mightysil RP-18 GP Aqua (関東化学 (株) 製) の内径 2~2.1mm, 長さ 100mm のカラムについて検討したところ、すべてのカラムで概ね良好な結果が得られたが、最も MS の感度が高く、また、保持時間やクロメプロップ及びクロメプロップ酸の相互分離を考慮し、X bridge C18 を採用した。

移動相については、添加剤を含まない水-有機溶媒系ではクロメプロップの感度が著しく低下し、また、クロメプロップ酸のピーク形状がブロードとなったことから、添加剤の移動相への添加によるカラムからの溶出及びイオン化の促進について検討した。ギ酸と酢酸について検討したところ、酢酸の方が MS 検出で良好な感度が得られ、その至適濃度は 0.01% であった。5mM 酢酸アンモニウムを添加して検討したところ、カラムへの保持力が低下し、ネガティブモード測定のカロメプロップ酸の感度が 1/5 に低下した。メタノールとアセトニトリルを比較したところ、感度では顕著な差は認められなか



ったが、アセトニトリルの方がよりカラム圧が低かったことからアセトニトリルを採用した。以上の検討結果から、表 1 及び 2 の LC 測定条件とした。

## 1-2) 検出条件の検討

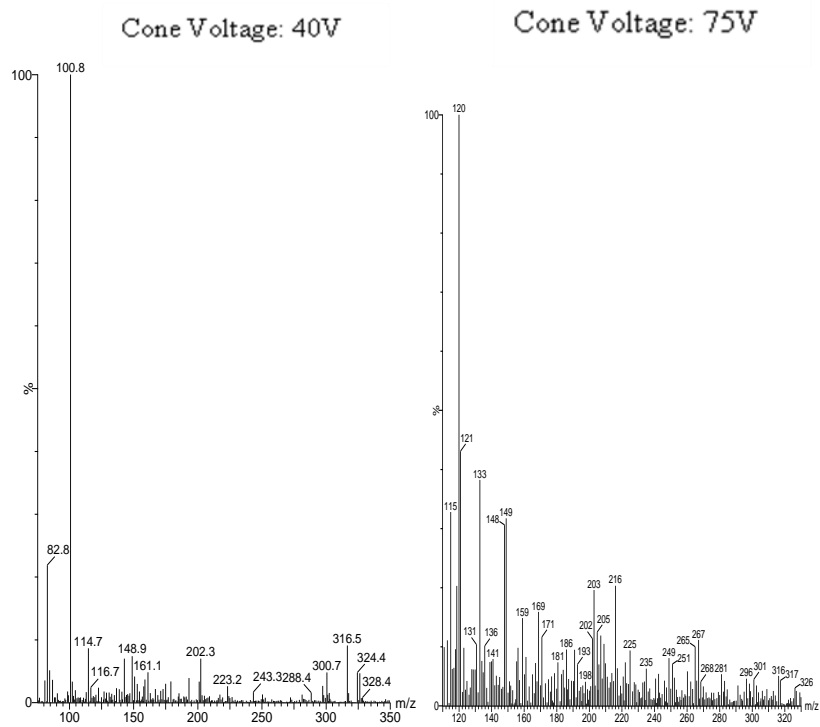
### 1-2-1) UV 条件

フォトダイオードアレイ検出器を用いて、クロメプロップ及びクロメプロップ酸の測定を試みたが、標準溶液 (0.1 $\mu$ g/mL) で有効な UV スペクトルが得られなかったことから、UV 検出では一律基準値 (0.01 $\mu$ g/g) を定量するのに十分な感度は得られないと考え、以降の検討は MS 検出器により行うこととした。

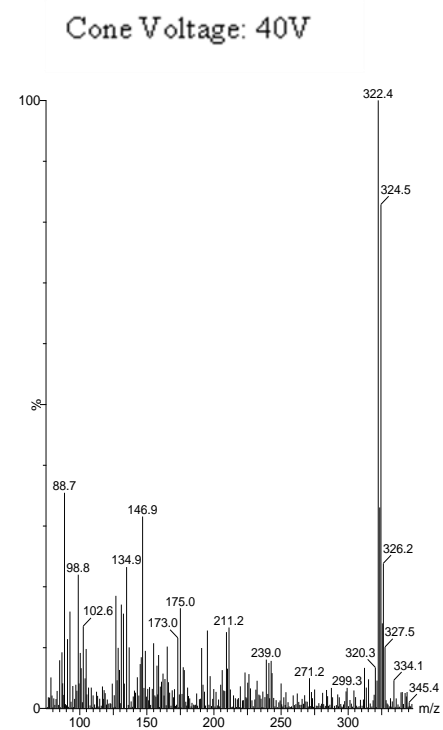
### 1-2-2) MS 条件

各標準溶液 (濃度 : 1mg/L) を 5  $\mu$ L/min で MS 部に導入し、最適な MS 条件を検討した。クロメプロップはポジティブモード及びネガティブモード両方のモードで測定が可能であった。それぞれのモードで測定したマススペクトルを図 3 及び 4 に示す。クロメプロップはポジティブモードではプロトン化分子の  $[M+H]^+$  の  $m/z$  324 及び塩素原子同位体由来のイオン  $m/z$  326 が感度良く検出された。ネガティブモードでは脱プロトン化分子の  $[M-H]$  である  $m/z$  322 及び塩素原子同位体由来のイオン  $m/z$  324 が感度良く検出された。ポジティブモードとネガティブモードでの感度を比較するとポジティブモードの方が良好であったことから、本検討ではポジティブモードを採用した。

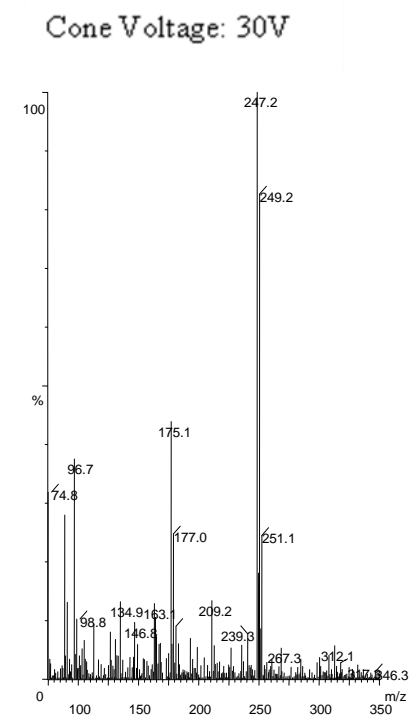
クロメプロップ酸はネガティブモードのみ測定が可能であった。マススペクトルを図 5 に示す。脱プロトン化分子の  $[M-H]$  である  $m/z$  247 及び塩素原子同位体由来のイオン  $m/z$  249 が感度良く検出され、そのほか  $m/z$  175 及び 177 がフラグメントイオンとして検出された。



☒ 3. MS spectrum of clomeprop in positive mode



☒ 4. MS spectrum of clomeprop in negative mode



☒ 5. MS spectrum of clomeprop acid in negative mode

LC-MS を用いて、クロメプロップのモニターイオン  $m/z$ 120, 326, 324, クロメプロップ酸のモニターイオン  $m/z$ 175, 177, 247 を選択し、それぞれのフラグメントイオンに最適なコーン電圧を設定し、標準溶液 (0.025 $\mu$ g/mL) を測定した。クロメプロップでは  $m/z$  326 が、クロメプロップ酸では  $m/z$  177 及び 247 が十分な感度が得られなかった (図 6)。SIM 測定では一律基準値 (0.01 $\mu$ g/g) を検出するのに十分な感度は得られないと考え、以降の検討は MRM 測定により行うこととした。

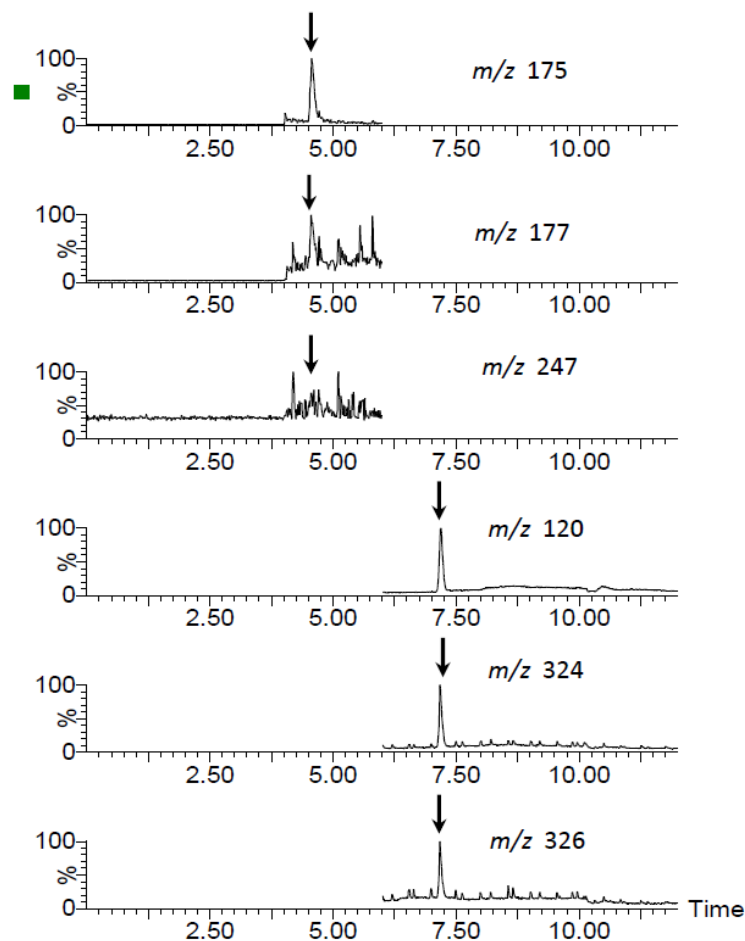


図.6 Chromatograms of clomeprop and clomeprop acid in SIM mode

### 1-2-3) MS/MS 条件

MRM (Multiple Reaction Monitoring) モード測定条件についてクロメプロップはプロトン付加分子の  $[M+H]^+$  をプリカーサーイオンとして、衝突誘起解離によって得られる  $m/z$  324 $\rightarrow$ 120 を定量イオンに、塩素原子由来の同位体イオン  $m/z$  326 $\rightarrow$ 120 を定性イオンに採用した。クロメプロップ酸は脱プロトン化分子  $[M-H]^-$  をプリカーサーイオンとして、 $m/z$  247 $\rightarrow$ 175 を定量イオンに、塩素原子由来の同位体イオン  $m/z$  249 $\rightarrow$ 177 を定性イオンに採用した。それぞれのモニターイオンに最適な条件を表 2 のとおり設定した。図 7 にクロメプロップの  $m/z$  324 及び 326 のプロダクトイオンスキャンの結果を、図 8 にクロメプロップ酸の  $m/z$  247 及び 249 のプロダクトイオンスキャンの結果を示す。

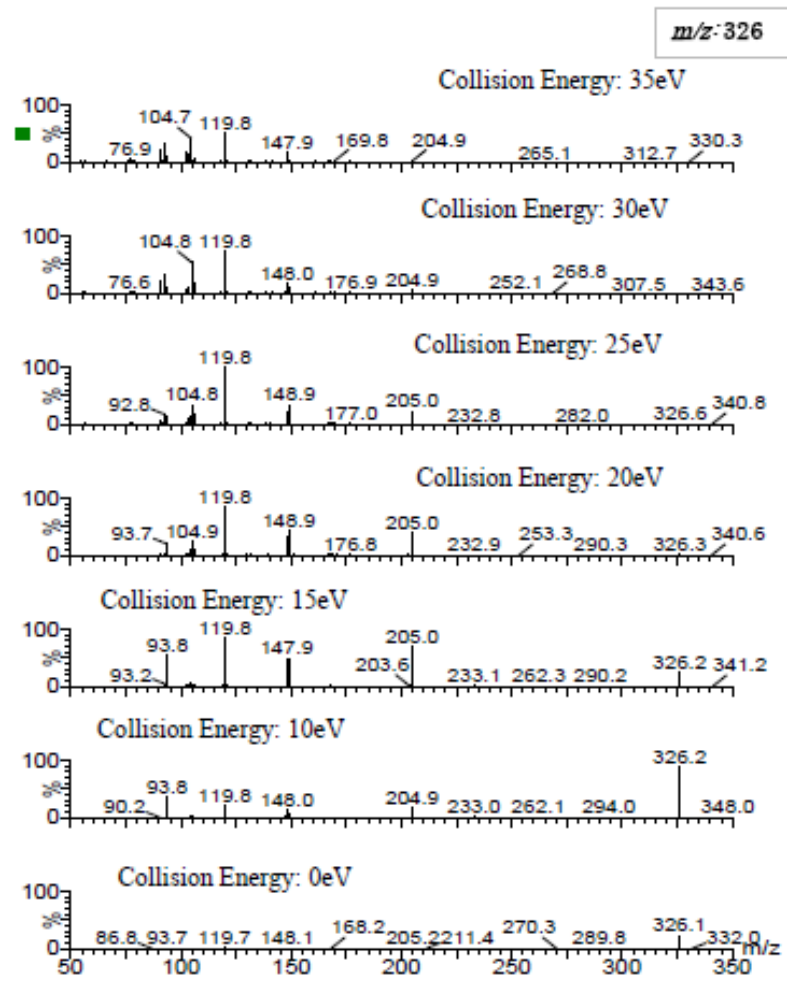
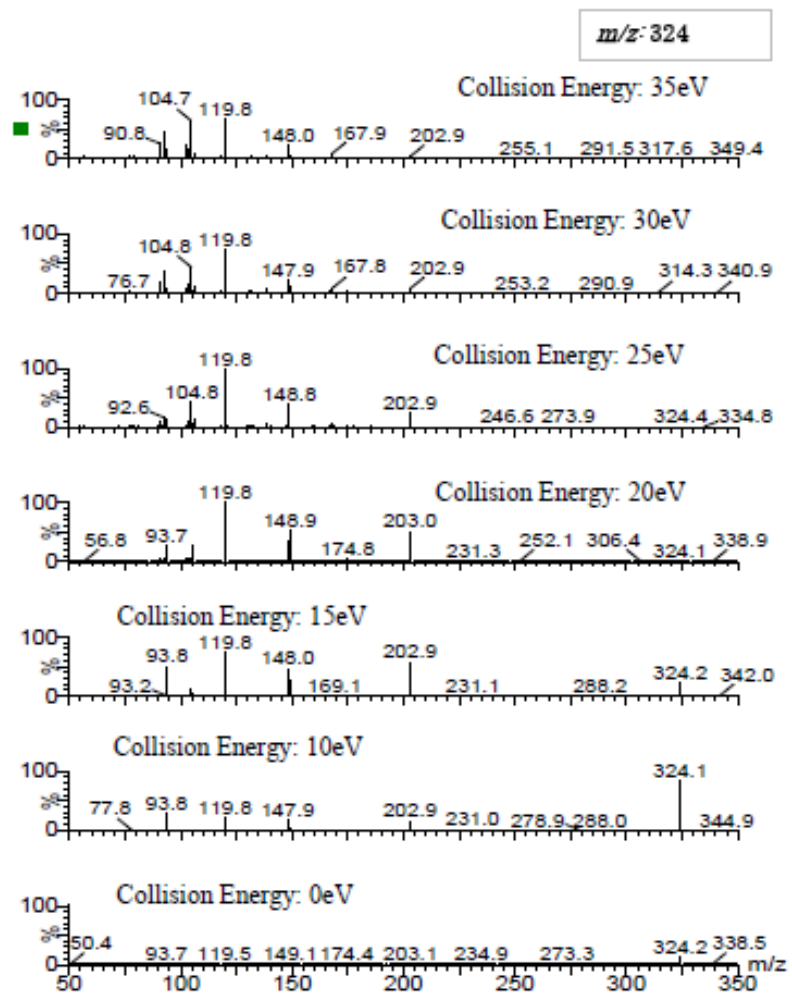


图.7 MS spectrums obtained by product ion scan of  $m/z$  324 or 326

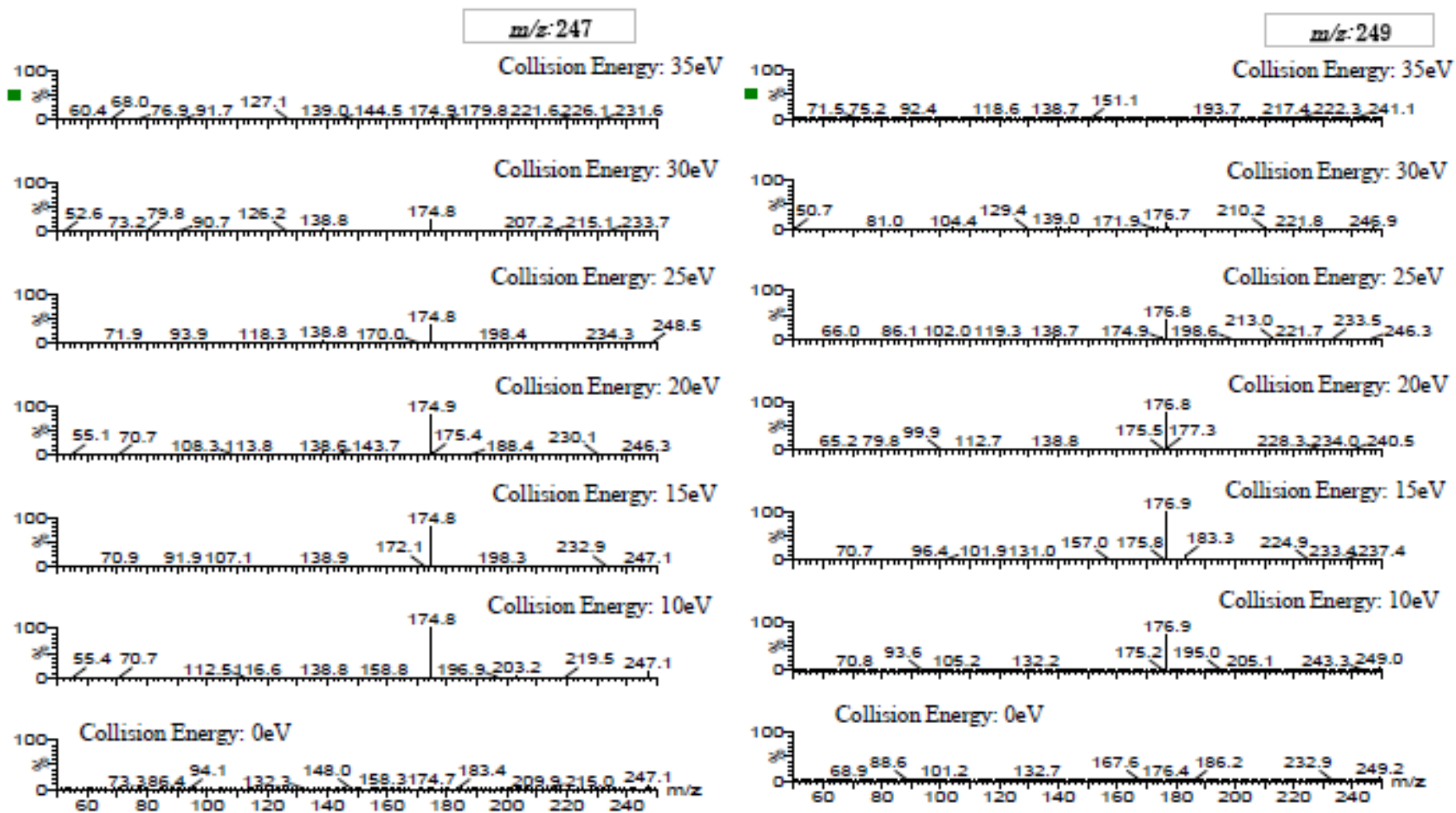


图.8 MS spectra obtained by product ion scan of  $m/z$  247 or 249

## 2) 検量線

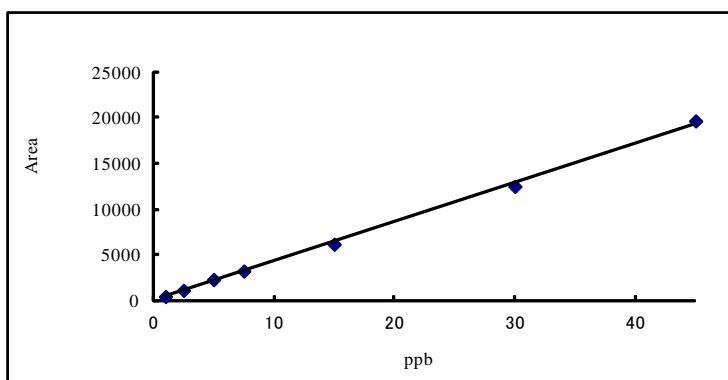
各定量用イオンのピーク面積値を用いて、絶対検量線を作成した。クロメプロップは0.001~0.045 $\mu\text{g/mL}$ の範囲で、クロメプロップ酸はZERO, 0.00077~0.03465 $\mu\text{g/mL}$ の範囲でそれぞれ8点の濃度で検量線を作成した。異なる10日間で作成した検量線は良好な直線性が得られた (MRM 測定 :  $r^2=0.995\sim 1.000$ )。代表的な検量線を図9に示す。

### clomeprop

Concentration (ppb)	1	2.5	5	7.5	15	30	45
Area	454	1130	2308	3240	6175	12514	19685

Slope 431.0  
Intercept -25.0

Correlation Coefficient (r): 0.9994



### clomeprop acid

Concentration (ppb)	0.77	1.925	3.85	5.775	11.55	23.1	34.65
Area	122	279	578	886	1969	3805	5824

Slope 168.8  
Intercept -44.5

Correlation Coefficient (r): 0.9998

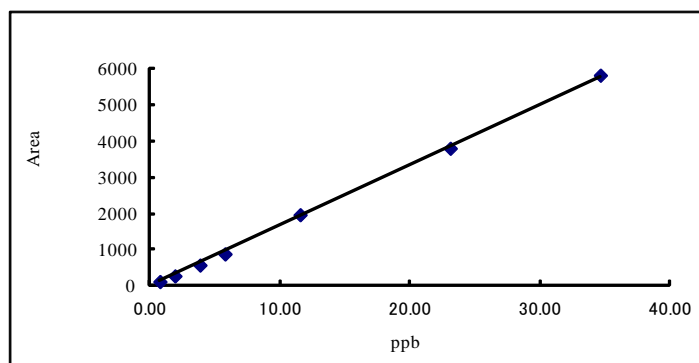


図.9 Typical calibration curves of clomeprop and clomeprop acid

## 3) 定量限界

本法による定量下限値は、クロメプロップは0.002mg/kg、クロメプロップ酸は0.00154mg/kgであった。クロメプロップ酸はクロメプロップに換算すると0.002mg/kgとなる。(換算係数 : クロメプロップの分子量 / クロメプロップ酸の分子量 =

## 2. 前処理法の検討

抽出溶媒は脂質と、分析対象としているクロメプロップ及びクロメプロップ酸を同時に抽出できる溶媒を検討した。昨年度に報告したハロスルフロンメチル分析法（畜水産物）で採用した抽出溶媒で、「LC/MSによる農薬等の一斉分析法（畜水産物）」でも採用されているアセトン及びヘキサン（1:2）混液について検討した。ホモジナイズ抽出、遠心分離により上層の抽出液を得た。ブリを用いて検討したところ、この条件ではクロメプロップ酸の回収率は約10%程度であった。クロメプロップ酸は下層のアセトン-水層に分配しているか、あるいは試料に吸着していることが考えられたことから、塩析効果によるヘキサン-アセトン層への抽出効率の改善を試みた。すなわち、抽出時に添加する水の量を6mLとし、過剰量の塩化ナトリウム8gを添加したところ、回収率は50%程度に回収率が向上した。クロメプロップ酸はカルボキシル基を有することから、水に替えて、1mol/L塩酸6mLを添加することによって、有機層への効率的な抽出を図った。その結果、回収率は100%近くに改善できた。また、塩化ナトリウムの添加せず、1mol/L塩酸6mLのみを添加したところ回収率は60%程度であり、塩化ナトリウムの添加が必要であった。至適な塩酸濃度について検討した。対象食品の中で最もアルカリ性を示した鶏卵を用いて検討した。塩酸を添加しない場合の水層のpHは約8~9程度であり、0.1mol/L HCl 6mLの添加では約pH 6、1 mol/L HCl 6mLの添加では約pH 2~3を示した。0.1mol/L HCl 添加では回収率は約65%、1N HClの添加では約98%に改善された。

次に脱脂方法についてアセトニトリル/ヘキサン分配の溶媒量を検討した。実施要領では*n*-ヘキサン30mLに対して*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル30mLで3回抽出することになっている。先の抽出液を一定量に定容し、その一部（試料1g分）についてのみ精製操作を行い、使用する溶媒量の低減を図った。すなわちそれぞれ20mLを用いて脱脂操作を行った。クロメプロップはオクタノール/水分配係数が4.8と脂溶性であることから、アセトニトリル層に十分に回収されるためには3回の分配操作が必要であった。試料にサケを用いて、分配前の抽出溶液に基準値濃度となるように標準溶液を添加し、分配の回数ごとの回収率を検討した（表3）。なお、はちみつ試料では脂質をほとんど含有しないことから、アセトニトリル/ヘキサン分配を省略し、抽出溶媒20mLを採取し、溶媒留去後、固相カートリッジによる精製操作を行ったが、妨害となるピークはなく、良好な回収率が得られた。

表 3. アセトニトリル/ヘキサン分配での回収率

analyte	1回目(%)	2回目(%)	3回目(%)
clomeprop	82	14	3
clomeprop acid	99	0	0

n=3

畜水産食品では、脂質以外にも分析妨害物質として高級脂肪酸、高級脂肪酸エステル及び色素成分等が考えられる。これらを除去することを目的として、Bond Elut C18 (500mg) (Varian 社製) や陰イオン交換作用を持つ InertSep SAX (500mg), InertSep SAX/PSA (500mg/500mg) 及び InertSep PSA (500mg) (ジーエルサイエンス社製) による精製効果を検証した。最も脂肪酸等が多く、分析が困難と考えられた牛肝臓を用いて検討した。アセトニトリル/ヘキサン分配後の残留物をアセトニトリル及び水 (4:1) 混液に溶解し、C18 カートリッジを通過させ、通過液について検討したところ、クロメプロップで 60% 程度のイオン化抑制作用が認められ、精製が不十分であると考えられた。次に SAX での精製について検討した。アセトニトリル/ヘキサン分配後の抽出残留物を 2% アセトンヘキサンに溶解し、SAX に負荷し、順次、2% アセトンヘキサン、15% アセトンヘキサン、アセトン、メタノール、0.4% ギ酸含有メタノールそれぞれ 10mL で溶出したところ、クロメプロップは 15% アセトンヘキサン画分に溶出し、クロメプロップ酸は 0.4% ギ酸メタノール画分に溶出した。しかし、クロメプロップ溶出画分で 30% 程度のイオン化抑制作用が認められた。SAX からの共雑物の溶出状況について GC-MS を用いて検討したところ、アセトニトリル/ヘキサン分配後の抽出残留物にはラウリル酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、オレイン酸及びステアリン酸等の高級脂肪酸やコレステロール、色素成分が含まれていた。SAX にこれら共雑物を負荷し、各溶出画分について測定したところ、15% アセトンヘキサン画分には全高級脂肪酸類の約 50% 程度が溶出し、アセトン画分で残りのほとんどが、また、メタノール画分には色素成分等が溶出した。クロメプロップ溶出画分の 15% アセトンヘキサンでは、高級脂肪酸等の除去が不十分であることが考えられ、これら共雑物に対し除去効果の高い、同じ陰イオン交換樹脂の PSA が積層している SAX/PSA (500mg/500mg) について検討した。クロメプロップは 15% アセトンヘキサン画分に溶出し、共雑物の高級脂肪酸は PSA に保持され、良好な精製効果を示した。しかし、アセトン、メタノールで洗浄した際、色素等の共雑物が PSA 部分に保持され、クロメプロップ酸の溶出画分の 0.4% ギ酸メタノールに同時に溶出され、20% 程度のイオン化増強作用を示した。そこで、それぞれ別のカートリッジを使用し、SAX の下部に PSA を連結させ、クロメプロップ溶出後、PSA を取り外し、SAX



をアセトン、メタノールで洗浄し、0.4%ギ酸メタノールで溶出した。その結果、良好な回収率を示し、イオン化抑制・増強作用も認められなかった。以上の検討結果から、図2に示す方法を前処理方法とした。

表 4. 固相カートリッジからの溶出挙動  
<C18 カートリッジ\*1>

溶出画分	溶出率 (%)	
	クロメプロップ	クロメプロップ酸
負荷液*2	74	83
アセトニトリル及び水 (4:1) 混液 10 mL	26	17

\*1 Bond Elut C18 (500 mg) (Varian 社製 (現 Agilent 社製)) をあらかじめアセトニトリル 5mL, 水 5mL で洗浄して使用した。

\*2 負荷液: 牛肝臓抽出液のアセトニトリル/ヘキサン分配後の残留物に、クロメプロップ及びクロメプロップ酸の各 0.25 µg を添加し、アセトニトリル及び水 (4:1) 混液 3 mL で溶解した。

<SAX, SAX/PSA 積層, SAX と PSA の連結カートリッジ\*1>

溶出画分	溶出率 (%)	
	クロメプロップ	クロメプロップ酸
負荷液*2	0	0
アセトン及び <i>n</i> -ヘキサン (1:49) 混液 10 mL	0	0
アセトン及び <i>n</i> -ヘキサン (3:17) 混液 2 mL	0	0
アセトン及び <i>n</i> -ヘキサン (3:17) 混液 5 mL	90	0
アセトン及び <i>n</i> -ヘキサン (3:17) 混液 5 mL	9	0
アセトン及び <i>n</i> -ヘキサン (3:17) 混液 5 mL	1	0
アセトン及び <i>n</i> -ヘキサン (3:7) 混液 10 mL	0	0
アセトン 10 mL *3	0	0
メタノール 10 mL	0	0
0.4 vol%ギ酸・メタノール溶液 10 mL	0	100

\*1 InertSep SAX (500mg, GL サイエンス社製), InertSep SAX/PSA (500mg/PSA, GL サイエンス社製), InertSep SAX (500mg, GL サイエンス社製) の下部に InertSep Slim-J PSA (500mg, GL Sciences 社製) を接続したカートリッジを用いた。それぞれあらかじめメタノール 5 mL, アセトン 5mL, アセトン及び *n*-ヘキサン (1:49) 混液 5mL で洗浄して使用した。

\*2 負荷液: 牛肝臓抽出液のアセトニトリル/ヘキサン分配後の残留物に、クロメプロップ及びクロメプロップ酸の各 0.25 µg を添加し、アセトン及び *n*-ヘキサン (1:

49) 混液 3 mL に溶解した.

\*3 SAX と PSA の連結カラムについては, PSA カラムを取り外し、以降は SAX カラムからの溶出を確認した。

また, SAX 及び PSA については牛肝臓を用いて Varian 社製の Bond Elut SAX 及び PSA についても検討したが, InertSep SAX 及び PSA (GL sciences 社製) と同様の回収率が得られた。

### 3. 選択性

いずれの試料においても定量イオン及び確認イオンともに妨害となるピークは認められなかった。

表 1 選択性の評価

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	基準値 <sup>*1</sup> (ppm)	添加濃度 <sup>*2</sup> (ppm)	妨害ピークの許容範囲			ピーク面積 (高さ) <sup>*3</sup>				選択性の評価 <sup>*5</sup>	備考
						評価対象濃度 (ppm)	判定基準	面積又は高さの別	ブランク試料 (a)	標準溶液 <sup>*4</sup> (b)	面積比 (a)/(b)			
1	クロメプロップ	牛の筋肉	0.002	0.01	0.01	基準値	0.01	< 0.100	面積	0	1572	0.000	○	
2	クロメプロップ	牛の肝臓	0.002	0.01	0.01	基準値	0.01	< 0.100	面積	0	1572	0.000	○	
3	クロメプロップ	牛の脂肪	0.002	0.01	0.01	基準値	0.01	< 0.100	面積	0	2323	0.000	○	
4	クロメプロップ	牛乳	0.002	0.01	0.01	基準値	0.01	< 0.100	面積	0	3397	0.000	○	
5	クロメプロップ	鶏卵	0.002	0.01	0.01	基準値	0.01	< 0.100	面積	0	3397	0.000	○	
6	クロメプロップ	はちみつ	0.002	0.01	0.01	基準値	0.01	< 0.100	面積	130	2802	0.049	○	
7	クロメプロップ	さけ	0.002	0.3	0.3	基準値	0.3	< 0.100	面積	0	11415	0.000	○	
8	クロメプロップ	うなぎ	0.002	0.3	0.3	基準値	0.3	< 0.100	面積	0	11415	0.000	○	
9	クロメプロップ	しじみ	0.002	0.3	0.3	基準値	0.3	< 0.100	面積	0	11415	0.000	○	
10	クロメプロップ	ブリ	0.002	0.3	0.3	基準値	0.3	< 0.100	面積	0	7619	0.000	○	
11	クロメプロップ酸	牛の筋肉	0.00154	0.0077	0.0077	基準値	0.0077	< 0.100	面積	0	2890	0.000	○	
12	クロメプロップ酸	牛の肝臓	0.00154	0.0077	0.0077	基準値	0.0077	< 0.100	面積	0	2890	0.000	○	
13	クロメプロップ酸	牛の脂肪	0.00154	0.0077	0.0077	基準値	0.0077	< 0.100	面積	0	2876	0.000	○	
14	クロメプロップ酸	牛乳	0.00154	0.0077	0.0077	基準値	0.0077	< 0.100	面積	0	2890	0.000	○	
15	クロメプロップ酸	鶏卵	0.00154	0.0077	0.0077	基準値	0.0077	< 0.100	面積	0	2876	0.000	○	
16	クロメプロップ酸	はちみつ	0.00154	0.0077	0.0077	基準値	0.0077	< 0.100	面積	0	2876	0.000	○	
17	クロメプロップ酸	さけ	0.00154	0.231	0.231	基準値	0.231	< 0.100	面積	0	3265	0.000	○	

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	基準値 <sup>*1</sup> (ppm)	添加濃度 <sup>*2</sup> (ppm)	妨害ピークの許容範囲			ピーク面積(高さ) <sup>*3</sup>				選択性の評価 <sup>*5</sup>	備考
						評価対象濃度 (ppm)	判定基準	面積又は高さの別	ブランク試料 (a)	標準溶液 <sup>*4</sup> (b)	面積(高さ)比 (a)/(b)			
18	クロメプロップ酸	うなぎ	0.00154	0.231	0.231	基準値	0.231	< 0.100	面積	0	3265	0.000	○	
19	クロメプロップ酸	しじみ	0.00154	0.231	0.231	基準値	0.231	< 0.100	面積	0	3265	0.000	○	
20	クロメプロップ酸	ブリ	0.00154	0.231	0.231	基準値	0.231	< 0.100	面積	0	4176	0.000	○	

\*1 基準値は、基準値未設定の場合には一律基準(0.01 ppm)を用いる。

\*2 添加濃度と評価対象濃度が異なる場合(定量限界と基準値との関係が、『定量限界<基準値<定量限界×3』となる場合)には、『\*』が表示される。『\*』が表示された分析対象化合物は、添加濃度と評価対象濃度が異なるため、別途、定量限界濃度相当のマトリクス添加標準溶液を調製して評価する。

\*3 ブランク試料及び標準溶液の順に測定した結果から評価する。(必要に応じて起爆注入を行う。)

\*4 試料中の濃度が「評価対象濃度(基準値濃度又は定量限界濃度)」相当になるように、ブランク試料の試験溶液で調製した標準溶液(マトリクス添加標準溶液)を用いる。

ブランク試料に妨害ピークが観察されなかった場合には、標準溶液のピーク面積(高さ)は求めなくても良い。

\*5 面積(高さ)比が、妨害ピークの許容範囲の判定基準に適合する場合には「○」、適合しない場合には「×」を記載する。

#### 4. 真度及び精度

わが国の食品衛生法では現在のところ、クロメプロップの残留基準値は米(玄米)に0.02ppm、魚介類に0.3ppmの基準値が設定されている。農産物にあつては、クロメプロップのみをいい、水産物にあつては、クロメプロップ及び代謝物(2-(2,4-ジクロロ-m-トリルオキシ)プロピオン酸。別名クロメプロップ酸)をクロメプロップに換算したものの和となっている。その他の食品には一律基準値が適用される。そこで、添加回収試験は残留基準値の設定されている試料には基準値濃度を、残留基準値の設定されていない試料には一律基準値濃度を添加し、回収率を検討した。

表2 真度、精度及び定量限界の評価

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	基準値*1 (ppm)	添加濃度 (ppm)	定量限界の評価*2	検量線			回収率(%)					真度 (%)	併行精度 (RSD %)	S/N比*3			備考
							傾き	切片	r <sup>2</sup> 値	r <sub>11</sub>	r <sub>12</sub>	r <sub>13</sub>	r <sub>14</sub>	r <sub>15</sub>			Max.	Min.	平均値	
1	クロメプ ロップ	牛の筋肉	0.01	0.01	0.01		489	2	0.997	90.8	88.5	94.3	74.9	80.5	85.8	9.2	140	123	129	
2	クロメプ ロップ	牛の肝臓	0.01	0.01	0.01		429	18	0.995	94.5	89.7	93.1	90.1	89.8	91.4	2.4	89	104	96	
3	クロメプ ロップ	牛の脂肪	0.01	0.01	0.01		571	20	0.999	72.8	76.8	101.9	75.8	82.2	81.9	14.3	158	125	141	
4	クロメプ ロップ	牛乳	0.01	0.01	0.01		487	22	0.998	86.9	72.0	85.7	80.1	84.0	81.7	7.4	267	201	247	
5	クロメプ ロップ	鶏卵	0.01	0.01	0.01		638	0.4	0.999	79.0	79.5	82.7	82.6	81.3	81.0	2.1	290	267	287	
6	クロメプ ロップ	はちみつ	0.01	0.01	0.01		535	52	0.995	92.9	93.1	80.5	102.2	86.6	91.1	8.9	598	513	582	
7	クロメプ ロップ	さけ	0.01	0.3	0.3	*	476	160	0.995	87.3	112.2	93.5	98.4	92.1	96.7	9.9				
8	クロメプ ロップ	うなぎ	0.01	0.3	0.3	*	476	160	0.995	96.7	86.1	87.6	95.3	87.0	90.5	5.6				
9	クロメプ ロップ	しじみ	0.01	0.3	0.3	*	476	160	0.995	94.7	81.6	97.7	97.7	110.8	96.5	10.8				

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	基準値*1 (ppm)	添加濃度 (ppm)	定量限界の評価*2	検量線			回収率(%)					真度 (%)	併行精度 (RSD %)	S/N比*3			備考
							傾き	切片	r <sup>2</sup> 値	r <sub>11</sub>	r <sub>12</sub>	r <sub>13</sub>	r <sub>14</sub>	r <sub>15</sub>			Max.	Min.	平均値	
10	クロメプ ロップ	ブリ	0.01	0.3	0.3	*	519	390	0.996	89.4	89.6	81.4	77.5	79.0	83.4	6.9				
11	クロメプ ロップ酸	牛の筋肉	0.0077	0.0077	0.0077		133	-7	0.998	104.4	97.0	102.4	95.2	105.8	101.0	4.6	90	78	82	
12	クロメプ ロップ酸	牛の肝臓	0.0077	0.0077	0.0077		119	5	0.996	93.4	87.9	99.6	98.2	91.9	94.2	5.1	88	61	70	
13	クロメプ ロップ酸	牛の脂肪	0.0077	0.0077	0.0077		121	-56	0.997	90.1	82.8	98.0	95.3	99.0	93.0	7.2	90	72	80	
14	クロメプ ロップ酸	牛乳	0.0077	0.0077	0.0077		133	-34	0.995	98.3	87.5	101.0	93.0	96.9	95.3	5.5	114	98	103	
15	クロメプ ロップ酸	鶏卵	0.0077	0.0077	0.0077		133	-34	0.995	99.5	98.0	94.0	99.2	99.9	98.1	2.5	164	132	144	
16	クロメプ ロップ酸	はちみつ	0.0077	0.0077	0.0077		121	-56	0.997	87.4	92.5	99.7	103.9	99.4	96.6	6.8	114	95	101	
17	クロメプ ロップ酸	さけ	0.0077	0.231	0.231	*	142	-92	0.997	96.7	94.7	98.1	92.8	96.3	95.7	2.1				
18	クロメプ ロップ酸	うなぎ	0.0077	0.231	0.231	*	142	-92	0.997	101.4	101.1	95.5	98.3	104.9	100.2	3.5				

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	基準値*1 (ppm)	添加濃度 (ppm)	定量限界の評価*2	検量線			回収率 (%)					真度 (%)	併行精度 (RSD%)	S/N比*3			備考
							傾き	切片	r <sup>2</sup> 値	r <sub>1</sub>	r <sub>2</sub>	r <sub>3</sub>	r <sub>4</sub>	r <sub>5</sub>			Max.	Min.	平均値	
19	クロメプロップ酸	しじみ	0.0077	0.231	0.231	*	142	-92	0.997	97.1	99.9	99.5	99.2	100.4	99.2	1.3				
20	クロメプロップ酸	ブリ	0.0077	0.231	0.231	*	125	-111	0.995	95.9	99.5	92.3	97.3	102.6	97.5	4.0				

\*1 基準値は、基準値未設定の場合には一律基準(0.01 ppm)を用いる。

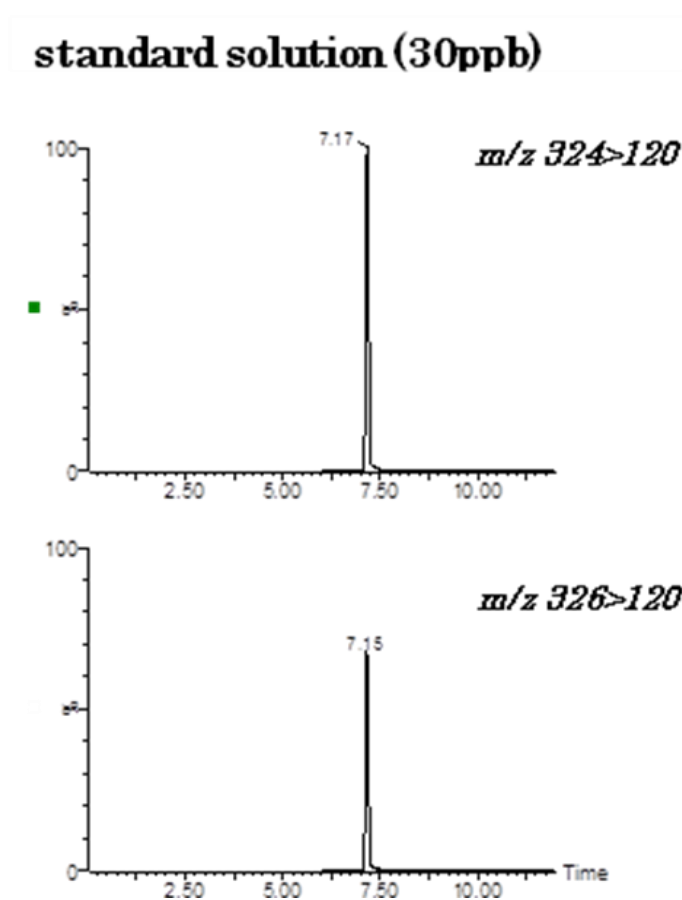
\*2 添加濃度が定量限界濃度と異なる場合には、『\*』が表示される。その場合には、S/N比の算出は不要であるが、別途、定量限界の推定を行う。

\*3 得られた回収率の中で最大値を与えるピーク(Max.)及び最小値を与えるピーク(Min.)のそれぞれのS/N比を求める。

これら畜水産食品に対する真度は、クロメプロップでは 81.0~96.7%，クロメプロップ酸では 93.0~101.0%であった。また、併行精度はクロメプロップでは 2.1~14.3%，クロメプロップ酸では 1.3~7.2%であった。回収率及び併行精度の相対標準偏差は厚生労働省から通知されている「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインについて」（平成 19 年 11 月 15 日，平成 22 年 12 月 24 日改正）で示されている目標値を満足するものであった。

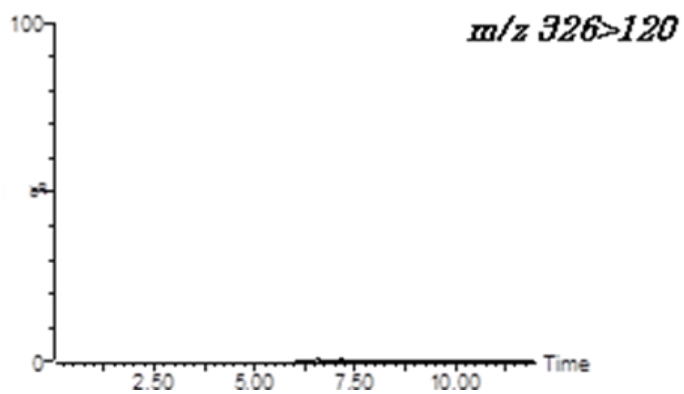
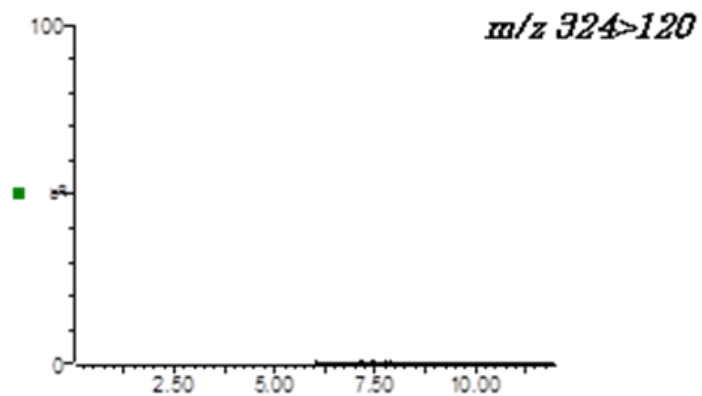
代表的な各ブランク試料，添加回収試験，添加回収試験で 100%回収率に相当する溶媒標準溶液のクロマトグラムを図 10-1~10-4 に，ブランク試料の SCAN 測定によるクロマトグラムを図 11-1 及び 11-2 に示す。特に顕著な夾雑ピークは認められなかった。

図 10-1. Typical MRM chromatograms ( $m/z$  324→120, 326→120) of blank sample, sample spiked with clomeprop and standard Scales were equal in each chromatogram in the sample

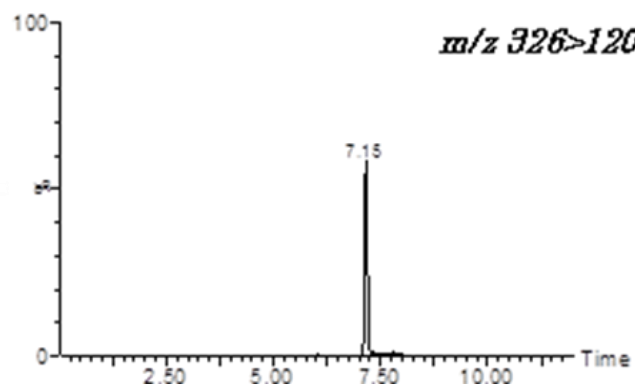
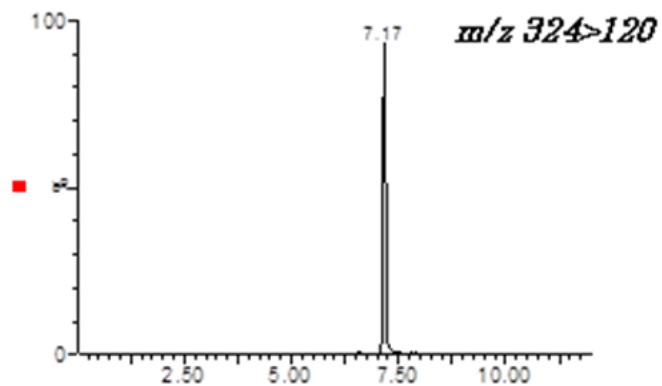




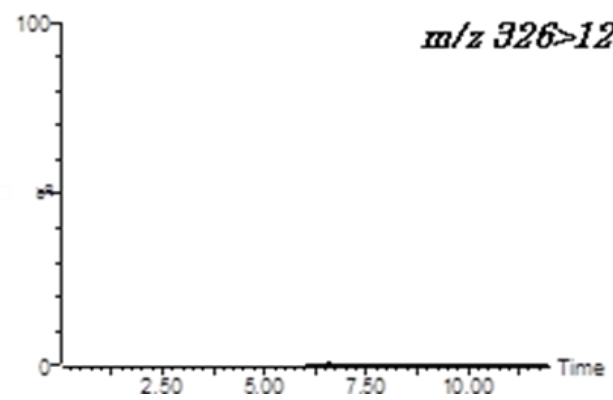
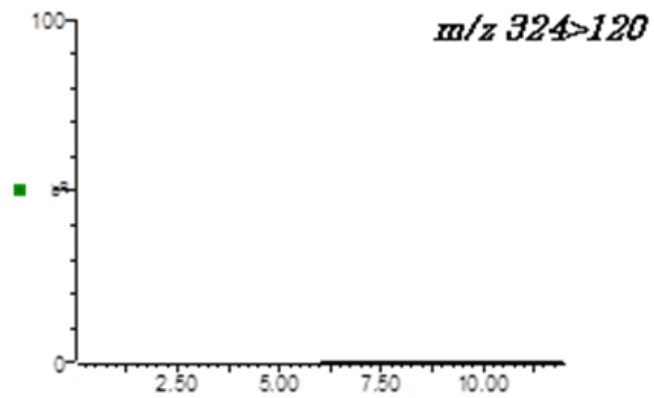
### Fresh water clam blank sample



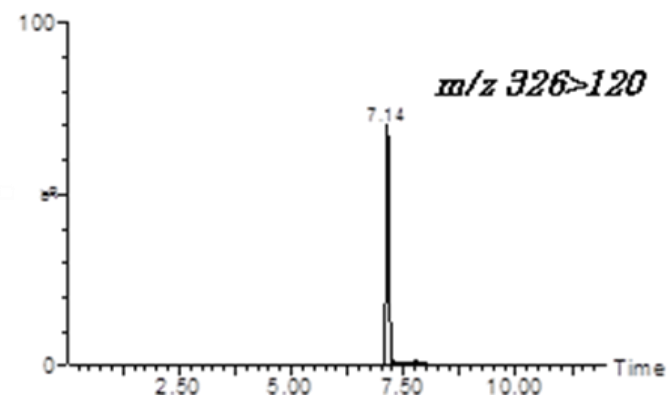
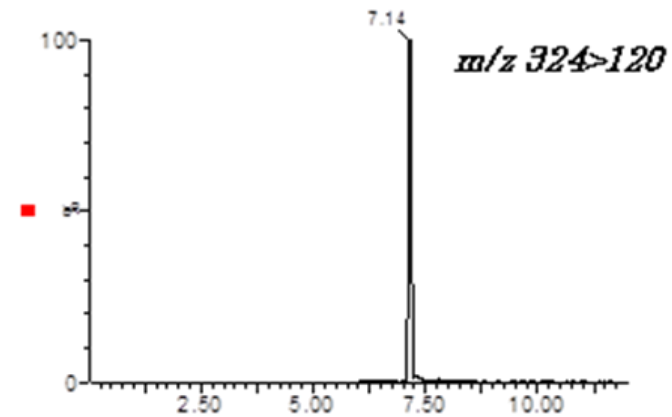
### Fresh water clam spiked at 300ppb



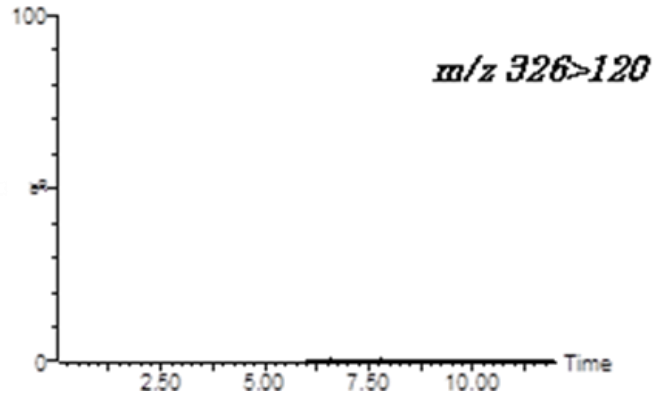
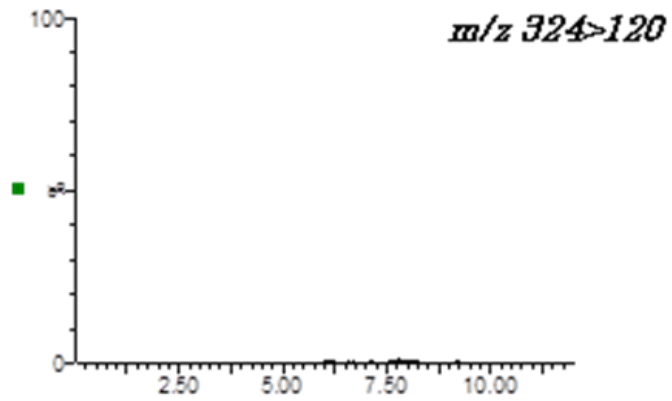
### Salmon blank sample



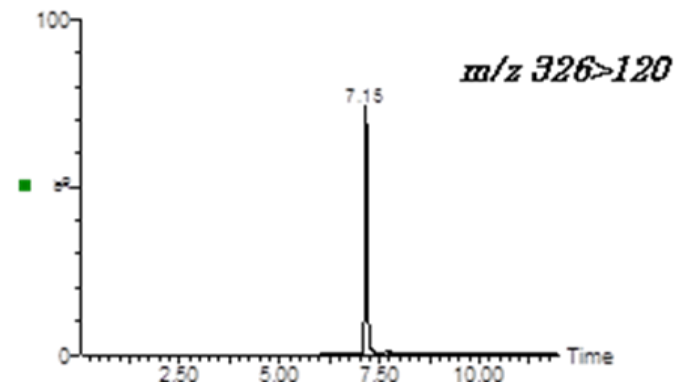
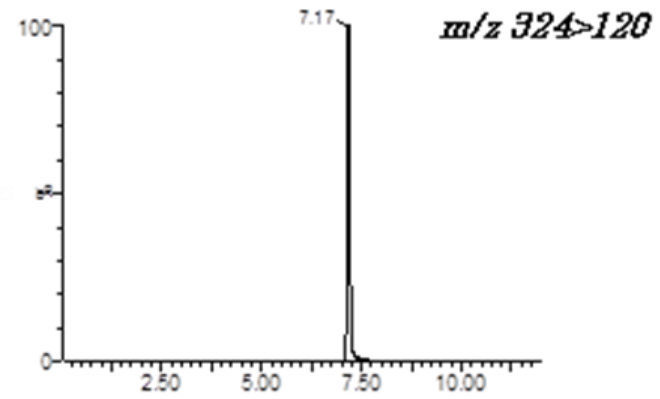
### Salmon spiked at 300ppb



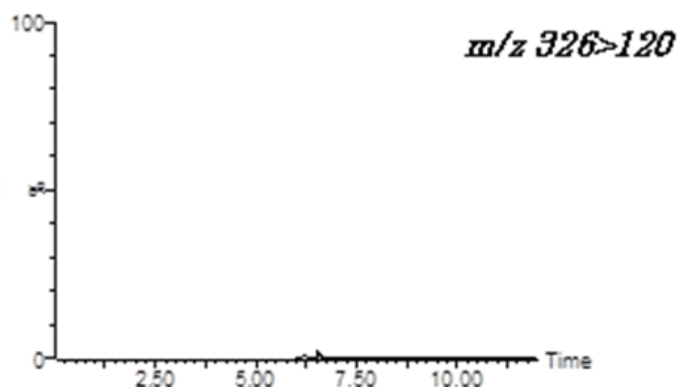
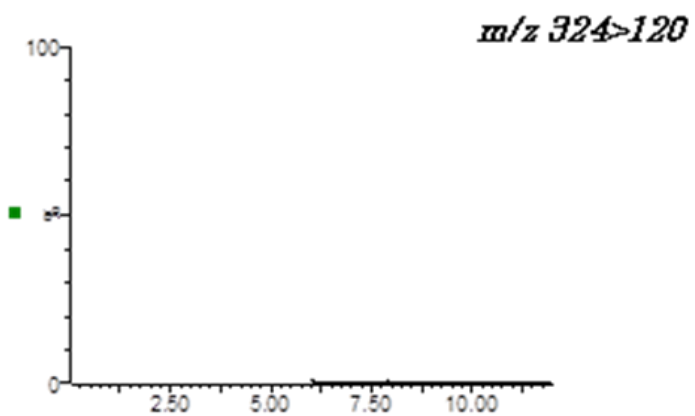
### Eel blank sample



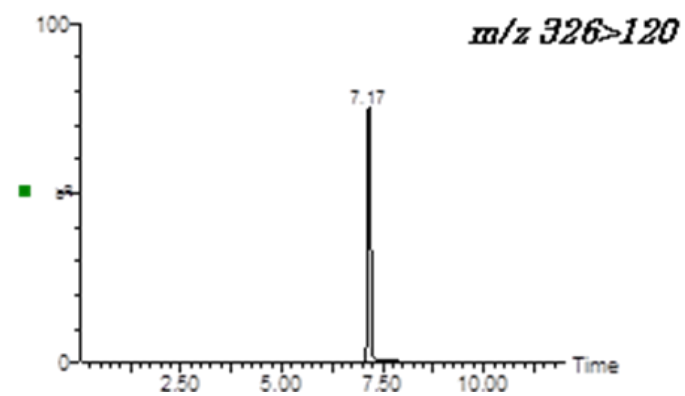
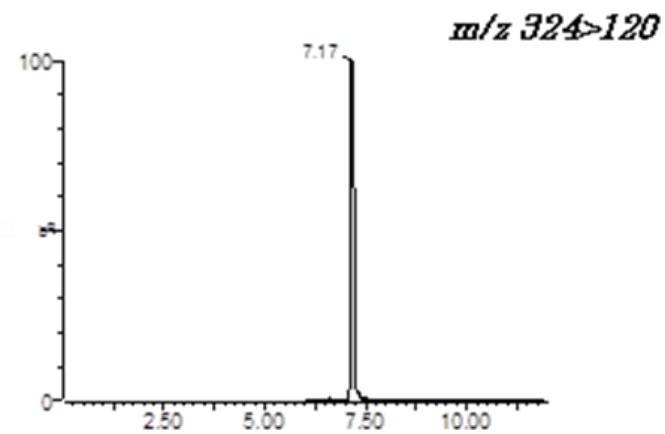
### Eel spiked at 300ppb



### Yellowtail blank sample

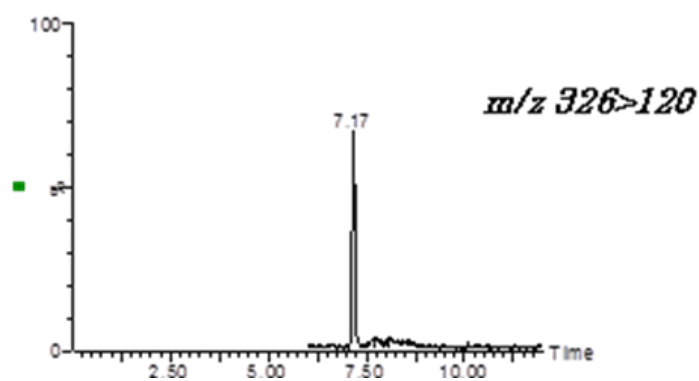
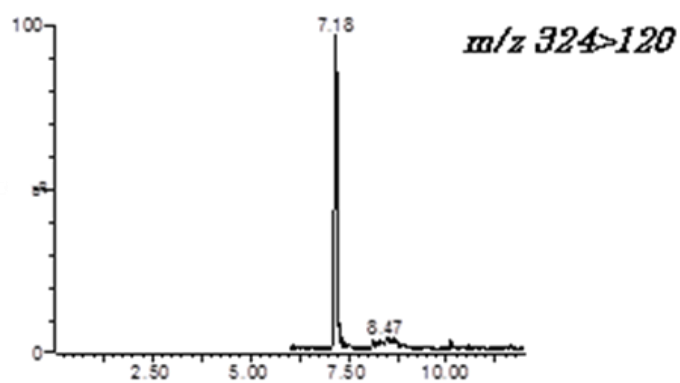


### Yellowtail spiked at 300ppb

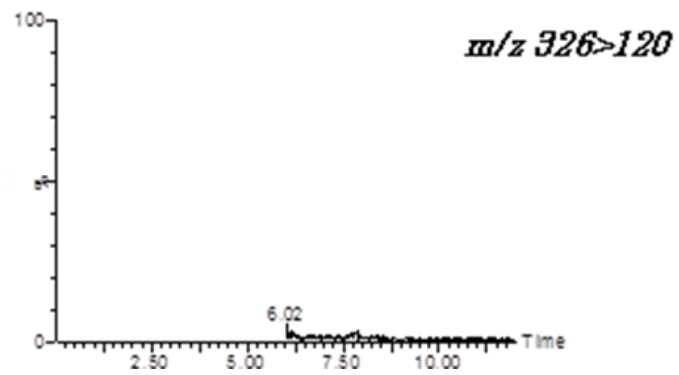
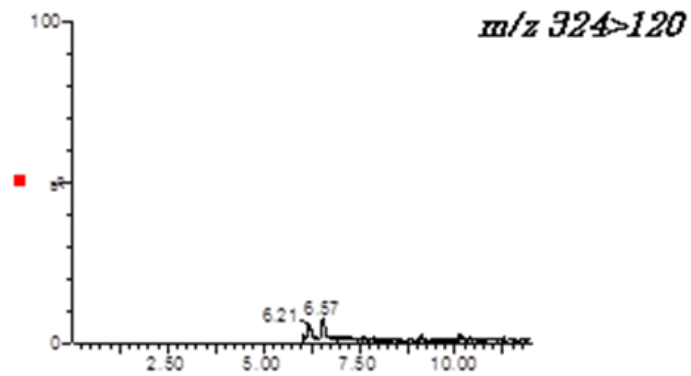


☒ 10-2 Typical MRM chromatograms ( $m/z$  324 $\rightarrow$ 120, 326 $\rightarrow$ 120) of blank sample, sample spiked with clomeprop and standard Scales were equal in each chromatogram in the sample

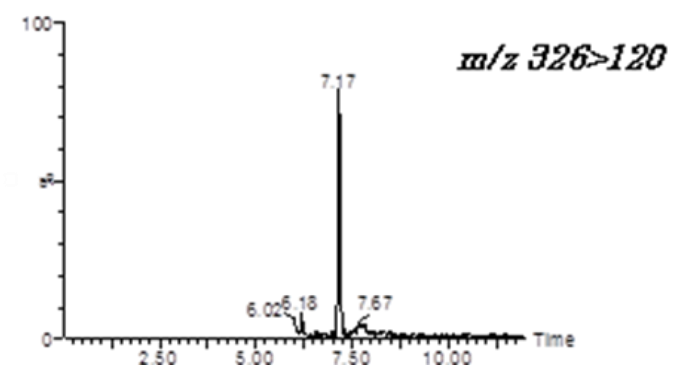
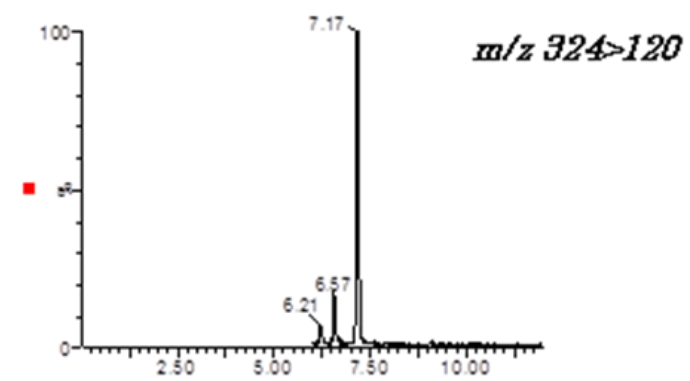
### standard solution (5ppb)



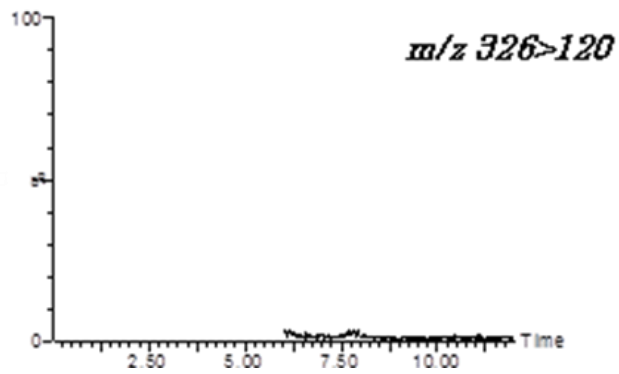
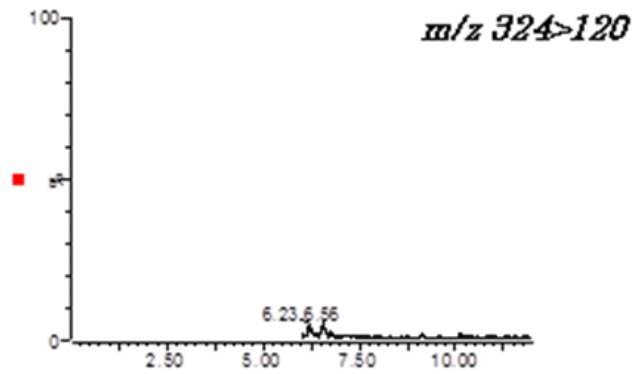
### Bovine muscle blank sample



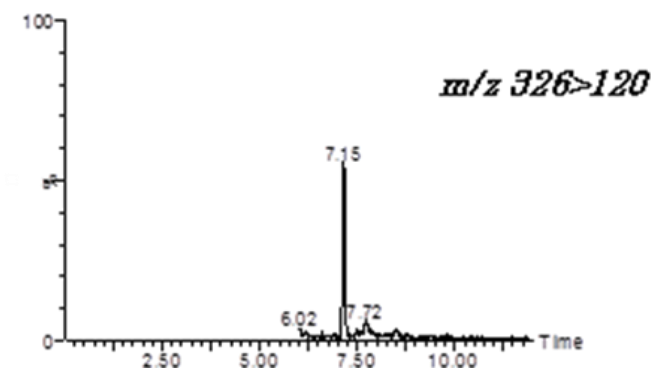
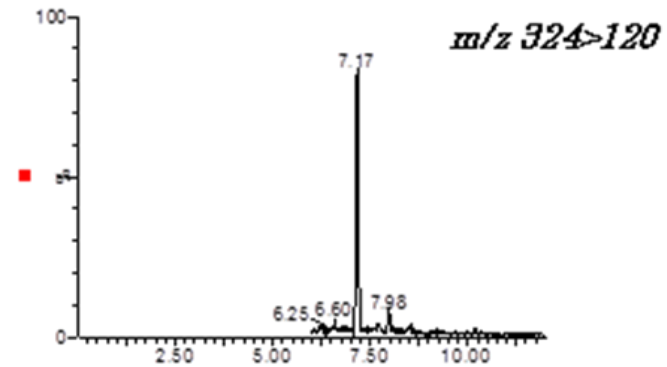
### Bovine muscle spiked at 10ppb



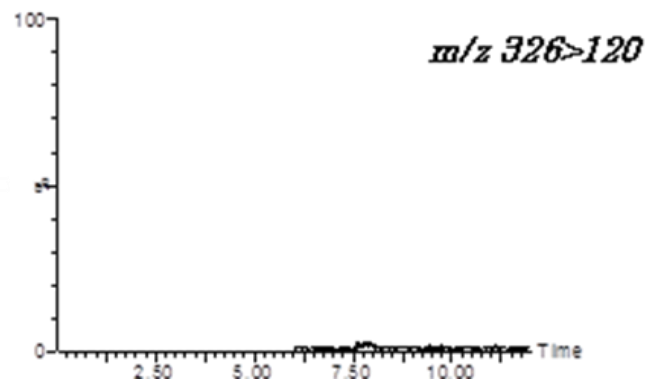
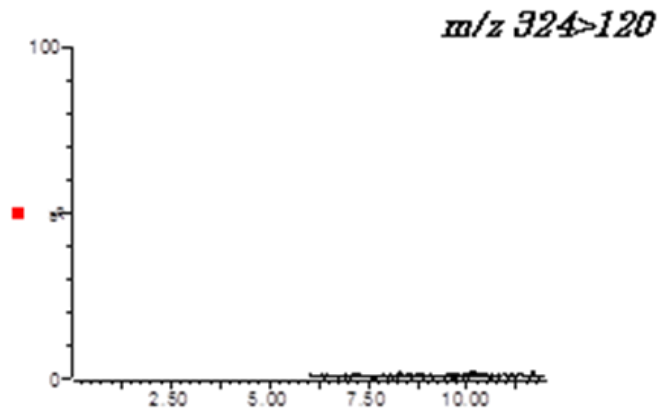
### Bovine liver blank sample



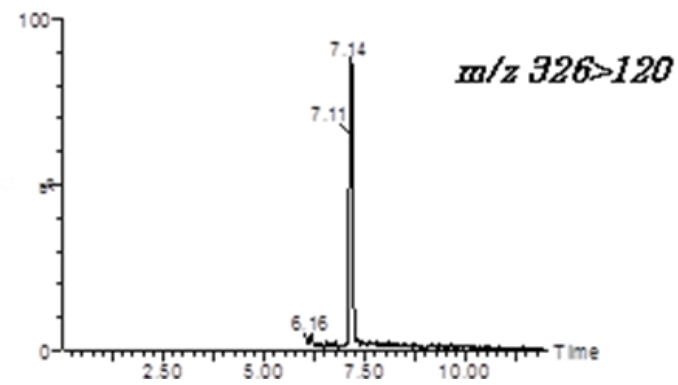
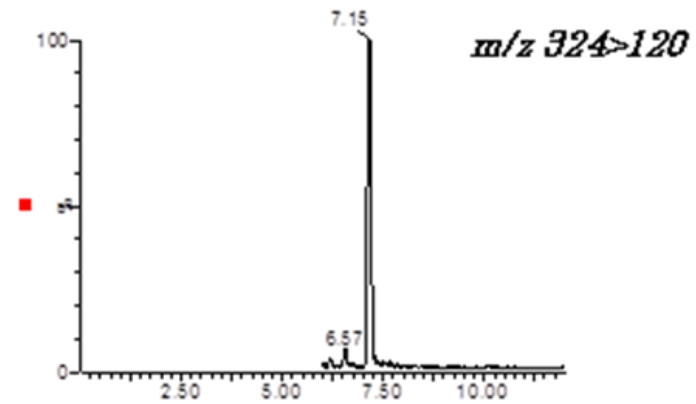
### Bovine liver spiked at 10ppb



### Bovine fat blank sample

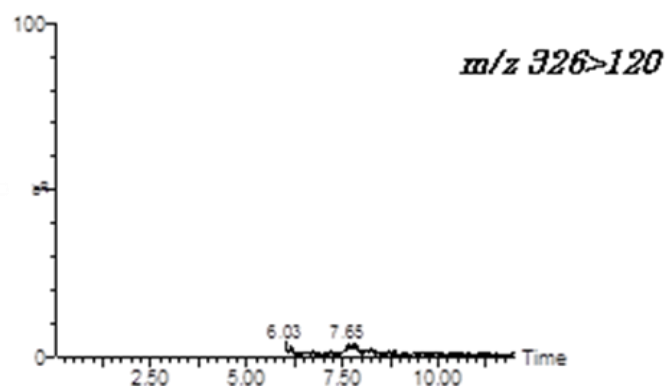
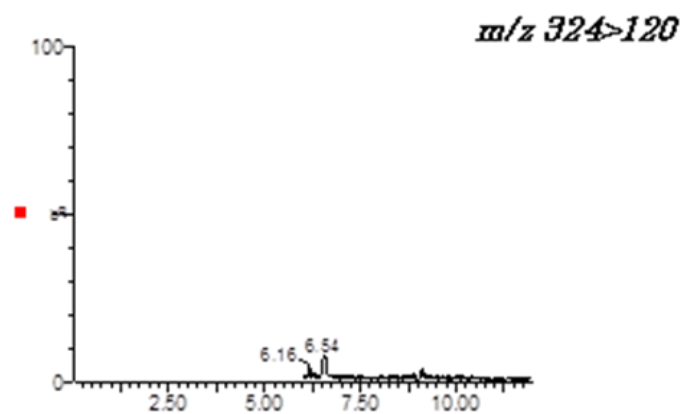


### Bovine fat spiked at 10ppb

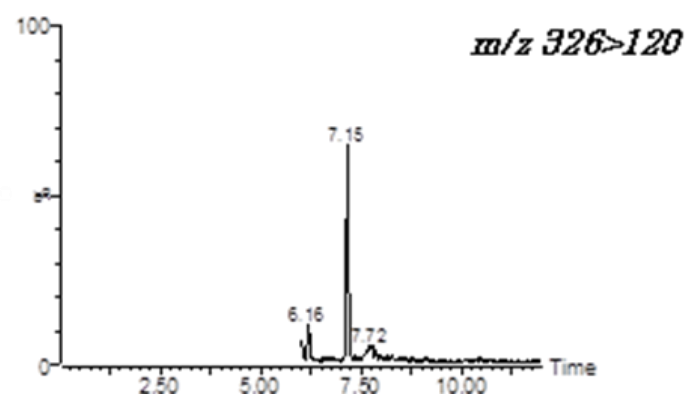
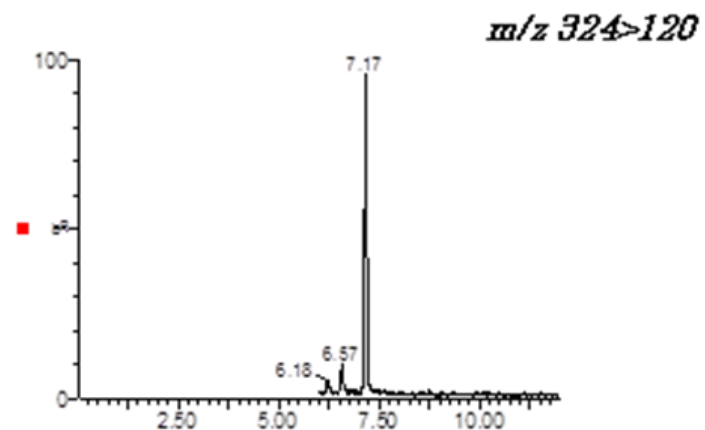




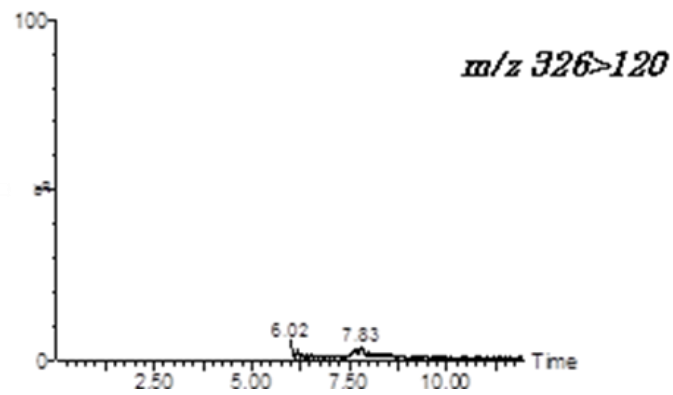
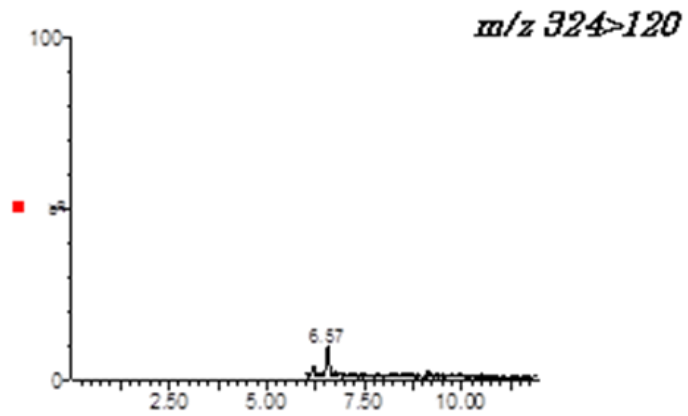
### Egg blank sample



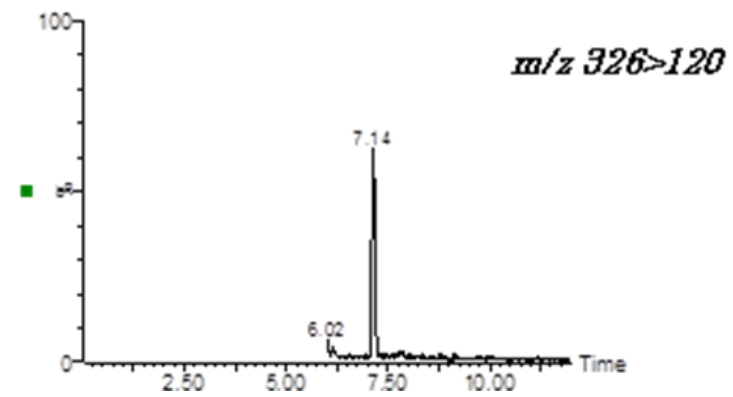
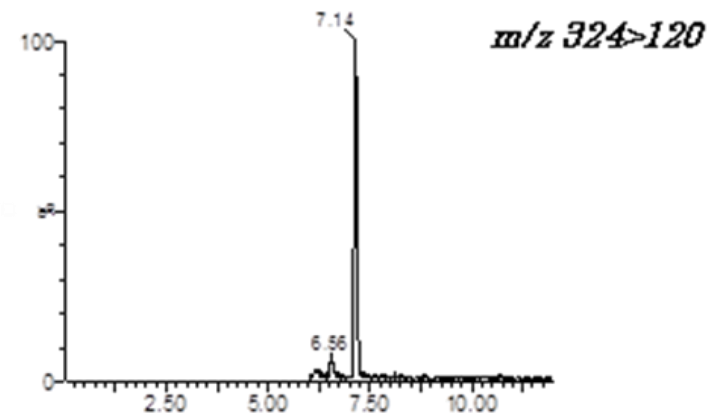
### Egg spiked at 10ppb



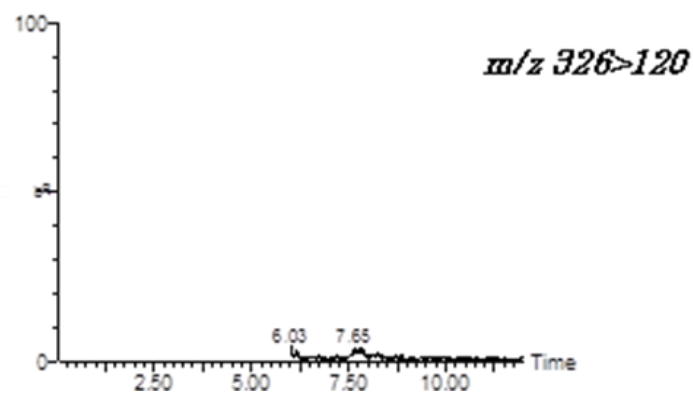
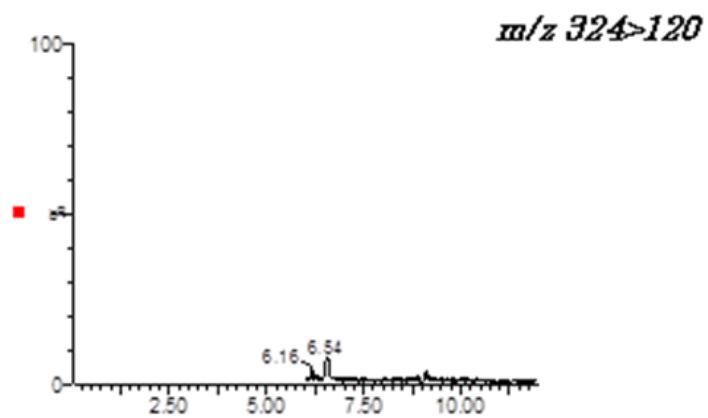
### Milk blank sample



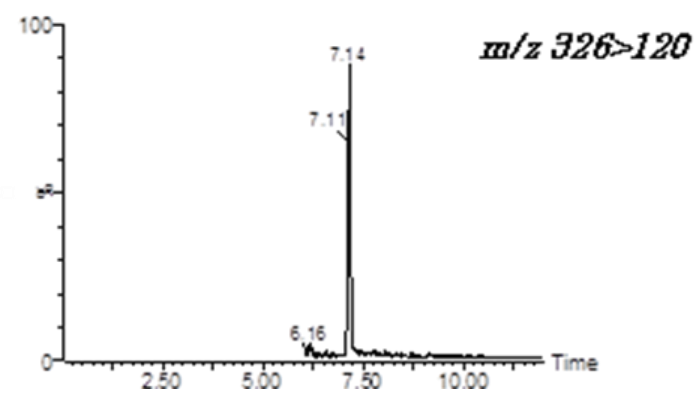
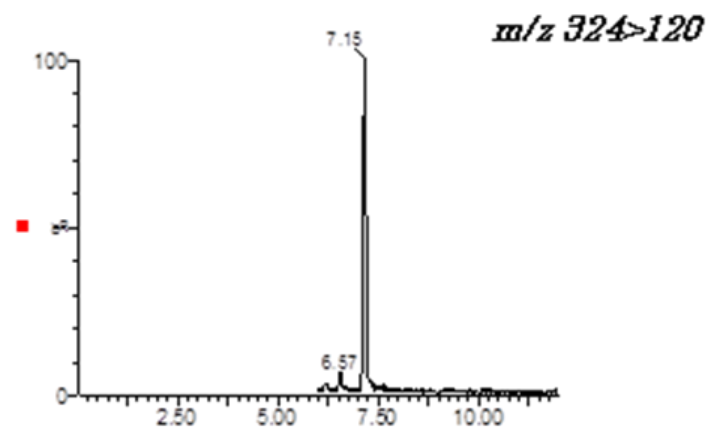
### Milk spiked at 10ppb



### Honey blank sample

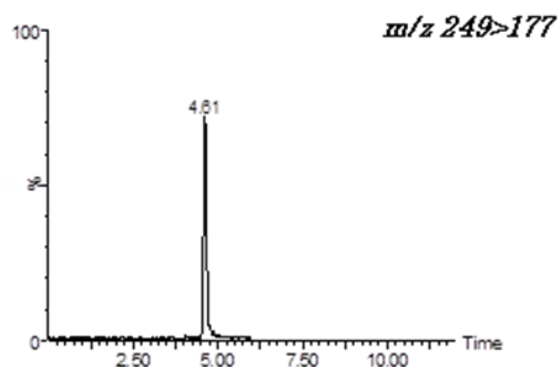
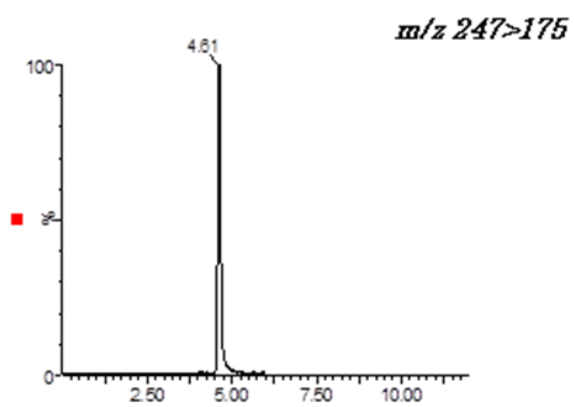


### Honey spiked at 10ppb

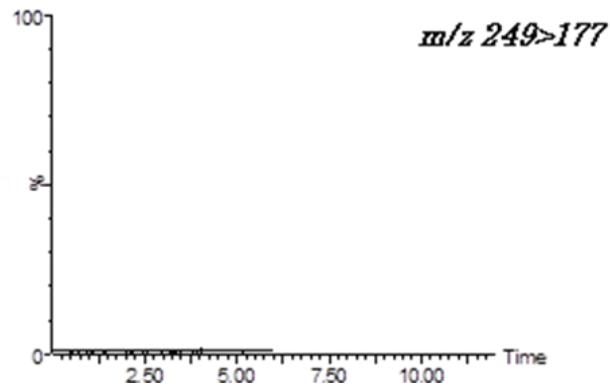
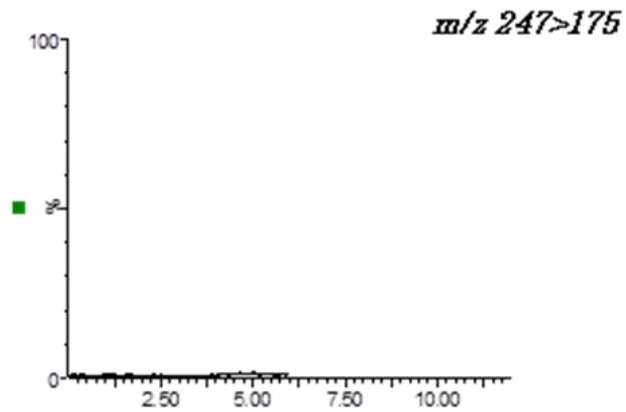


☒ 10-3. Typical MRM chromatograms ( $m/z$  247 $\rightarrow$ 175, 249 $\rightarrow$ 177) of blank sample, sample spiked with clomeprop acid and standard Scales were equal in each chromatogram in the sample

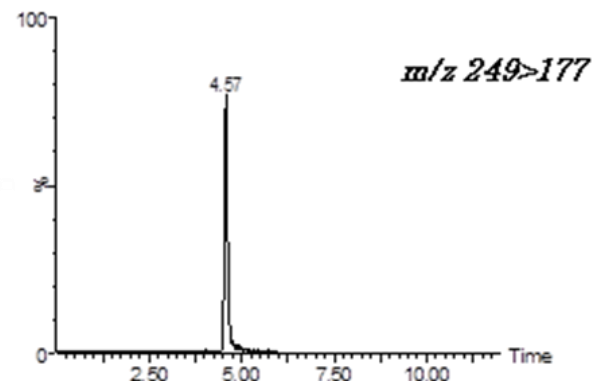
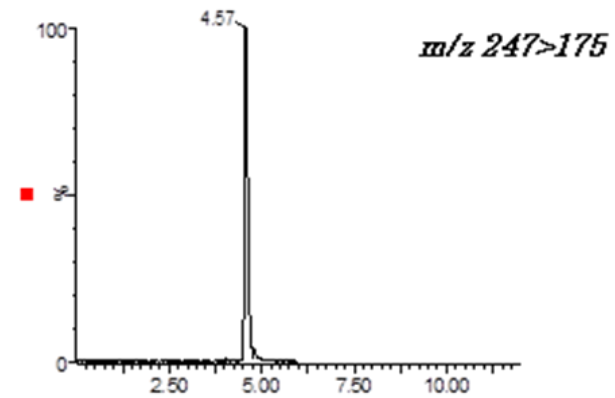
**standard solution (23.1ppb)**



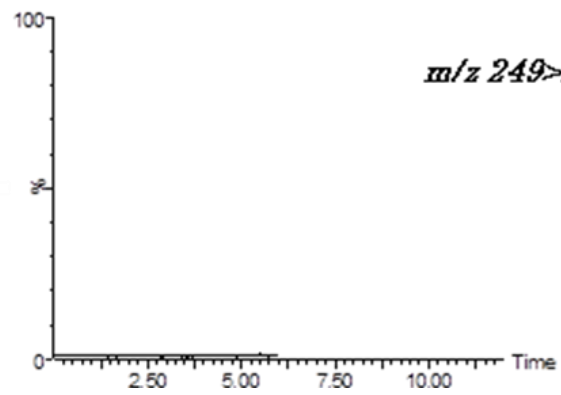
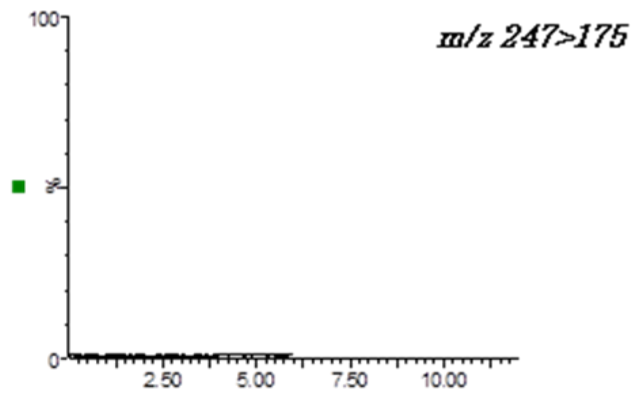
### Fresh water clam blank sample



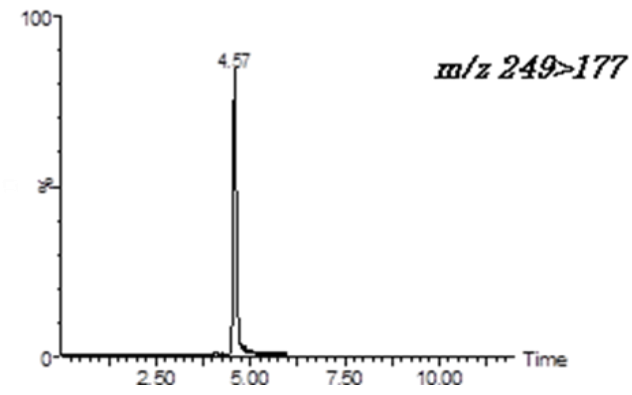
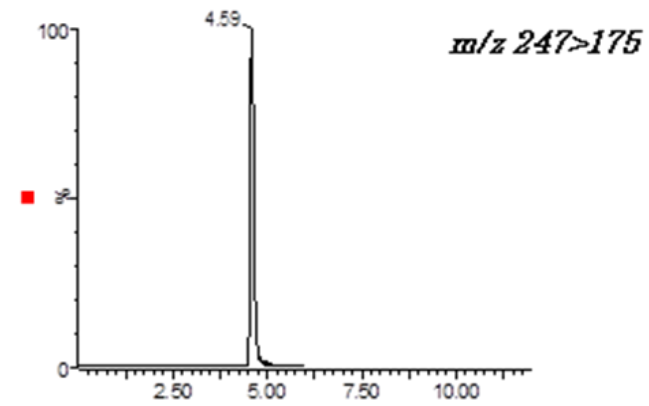
### Fresh water clam spiked at 231pb



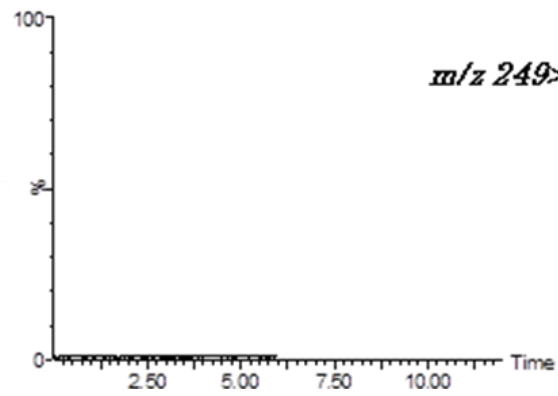
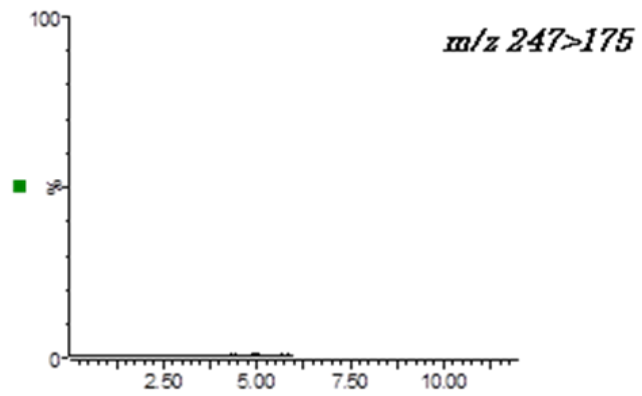
### Salmon blank sample



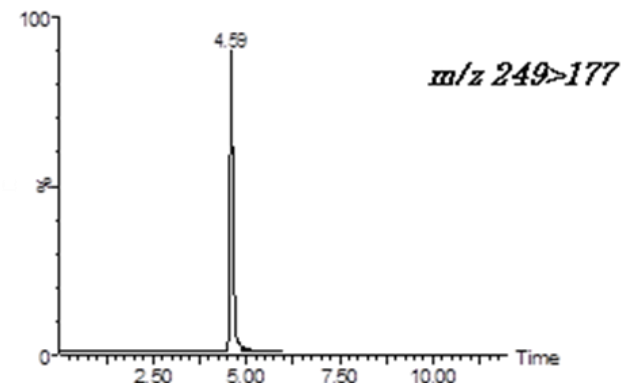
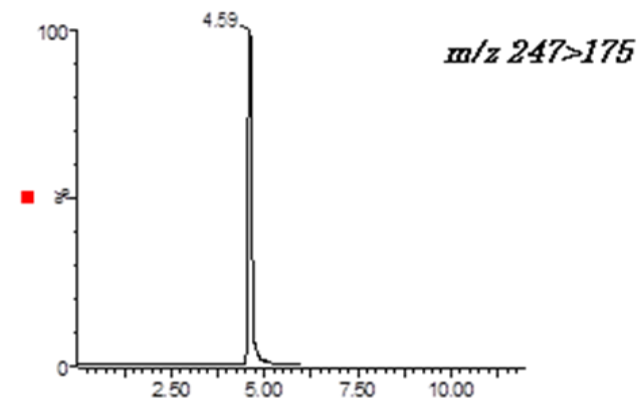
### Salmon spiked at 231pb



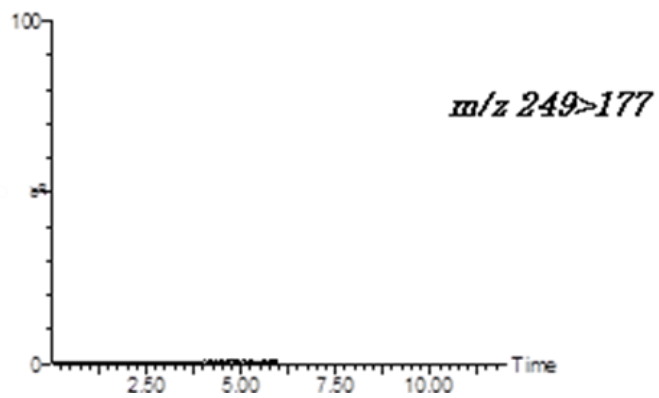
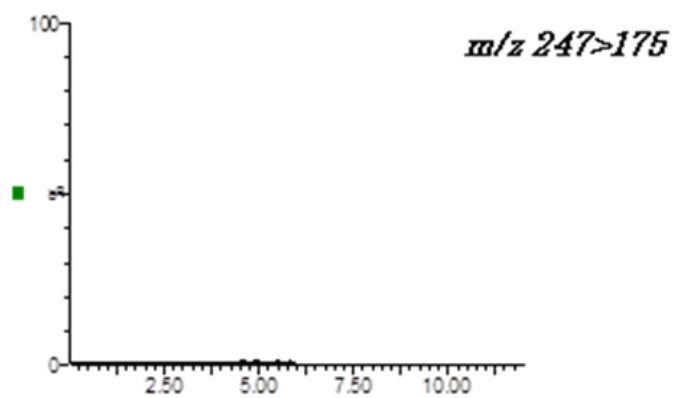
### Eel blank sample



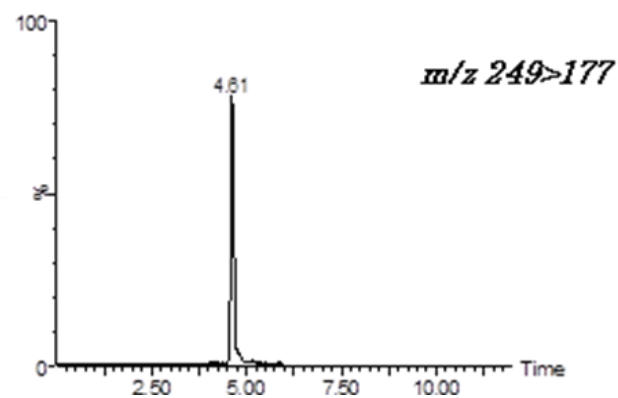
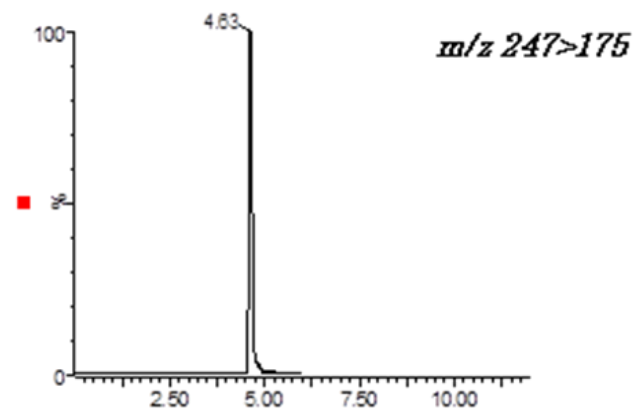
### Eel spiked at 231ppb



### Yellowtail blank sample



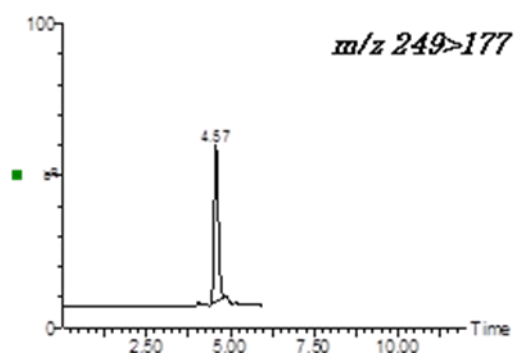
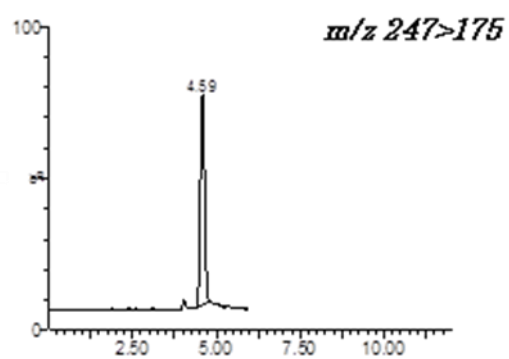
### Yellowtail spiked at 231pb



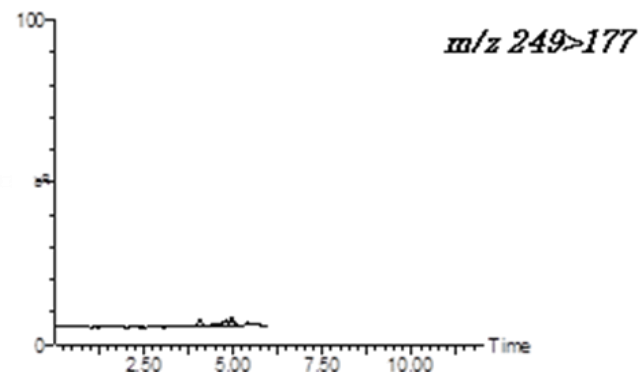
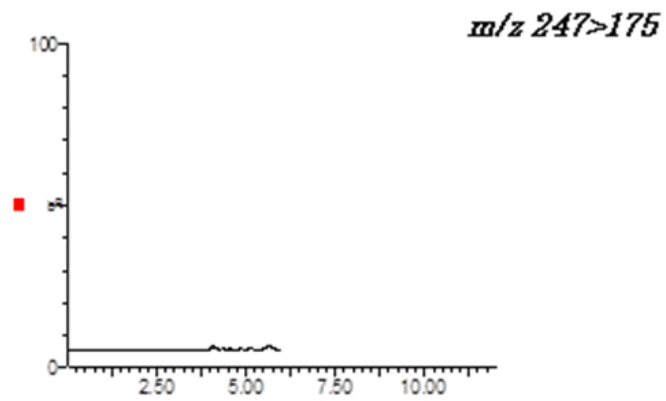


☒ 10-4. Typical MRM chromatograms ( $m/z$  247→175, 249→177) of blank sample, sample spiked with clomeprop acid and standard Scales were equal in each chromatogram in the sample

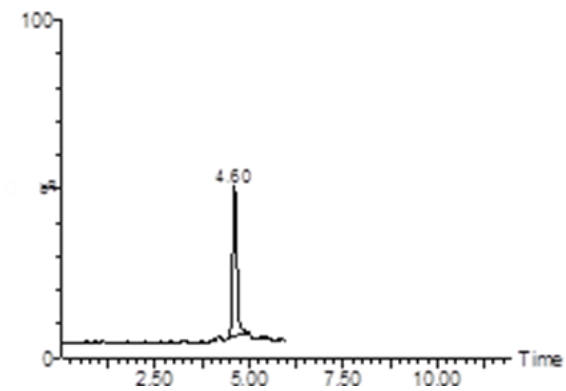
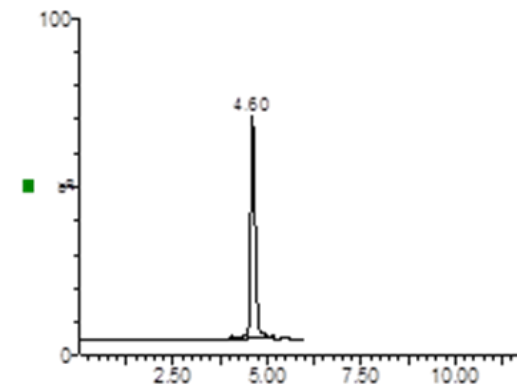
**standard solution (3.85ppb)**



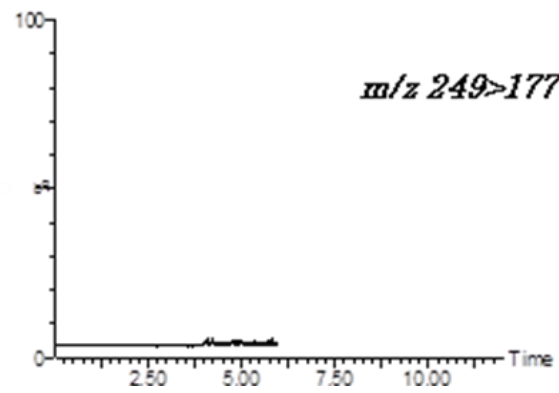
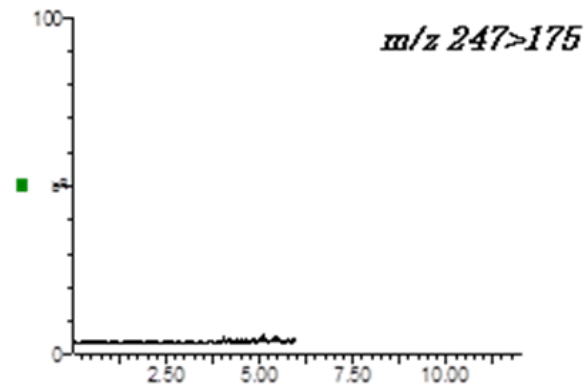
### Bovine muscle blank sample



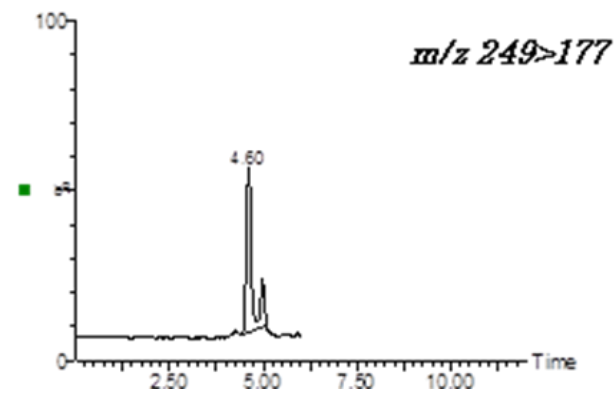
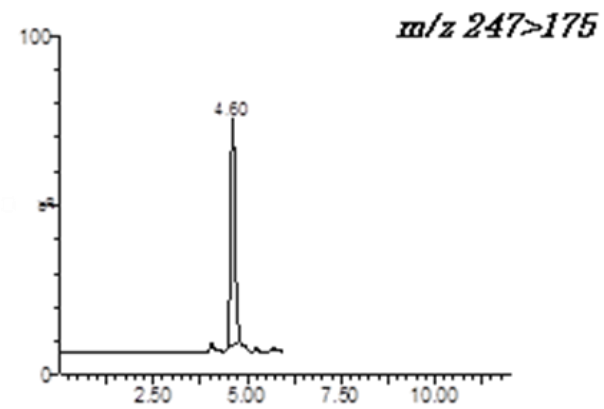
### Bovine muscle spiked at 7.7ppb



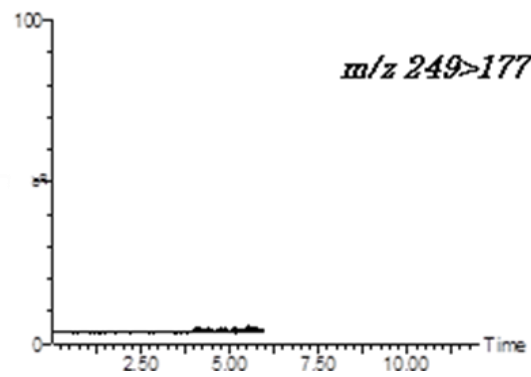
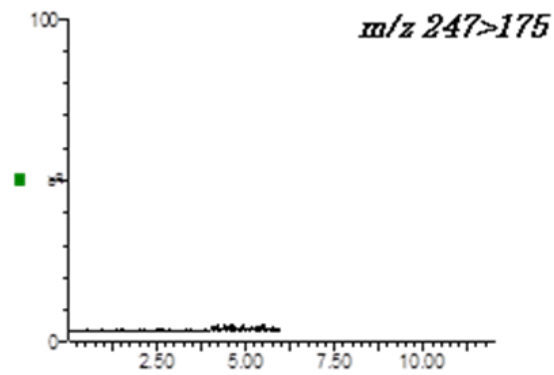
### Bovine liver blank sample



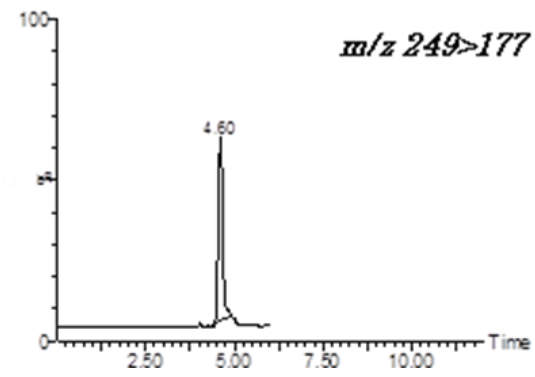
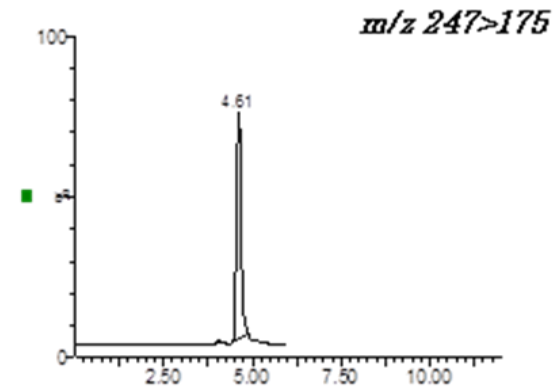
### Bovine liver spiked at 7.7ppb



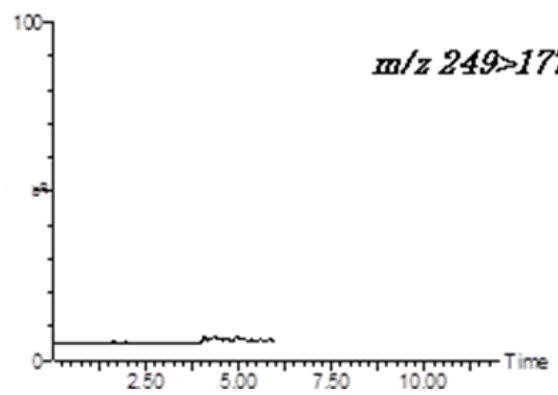
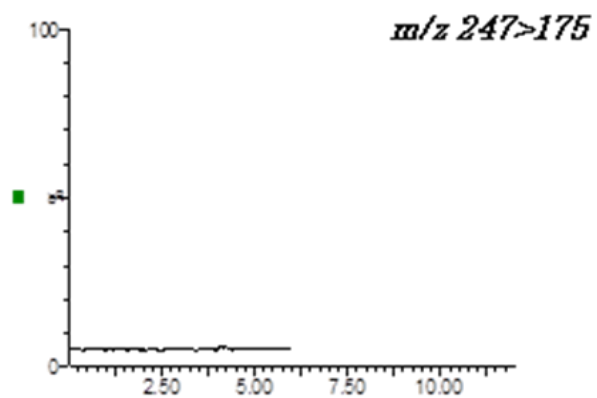
### Bovine fat blank sample



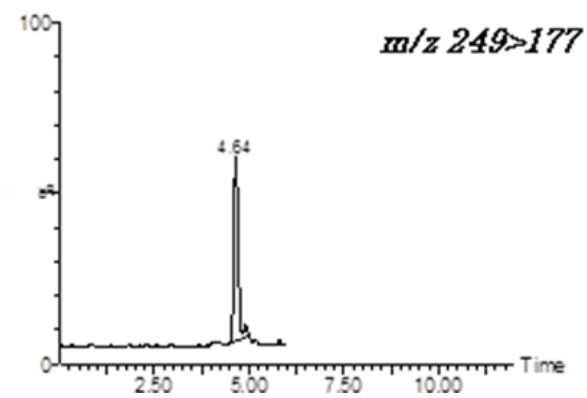
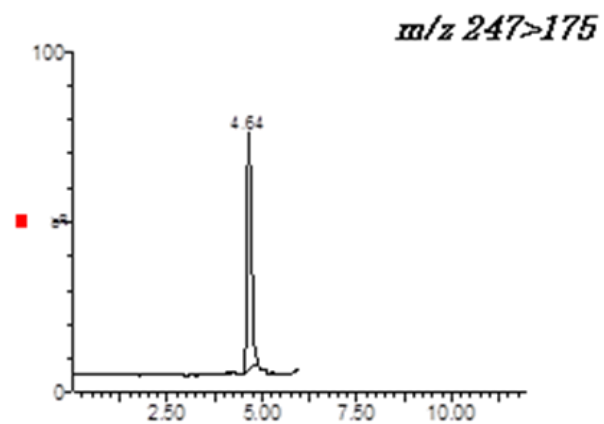
### Bovine fat spiked at 7.7ppb



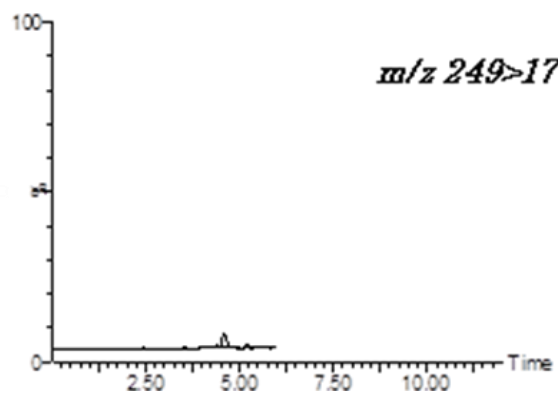
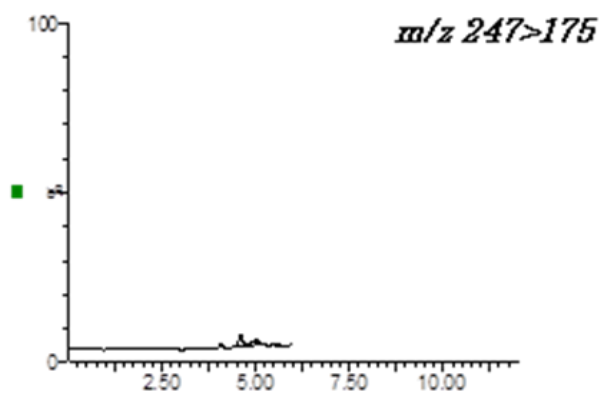
### Egg blank sample



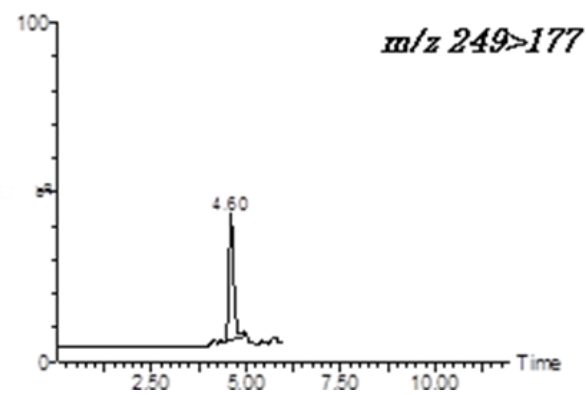
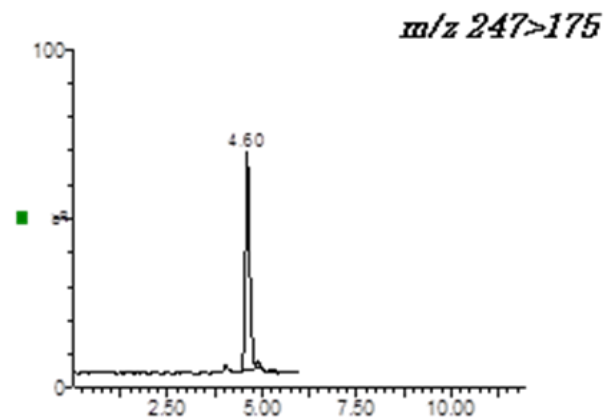
### Egg spiked at 7.7ppb



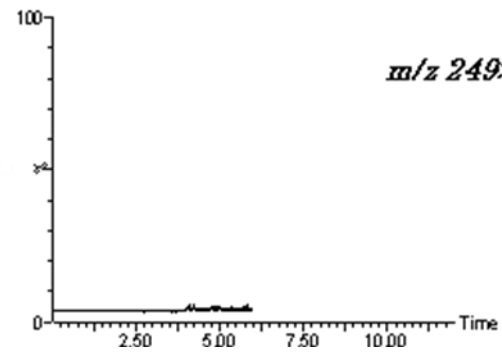
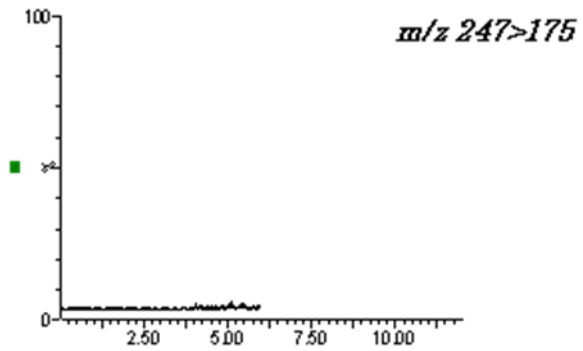
### Milk blank sample



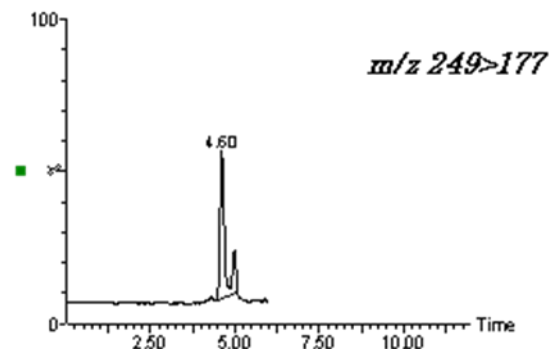
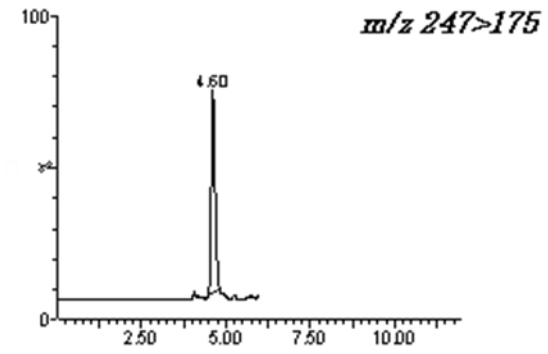
### Milk spiked at 7.7ppb

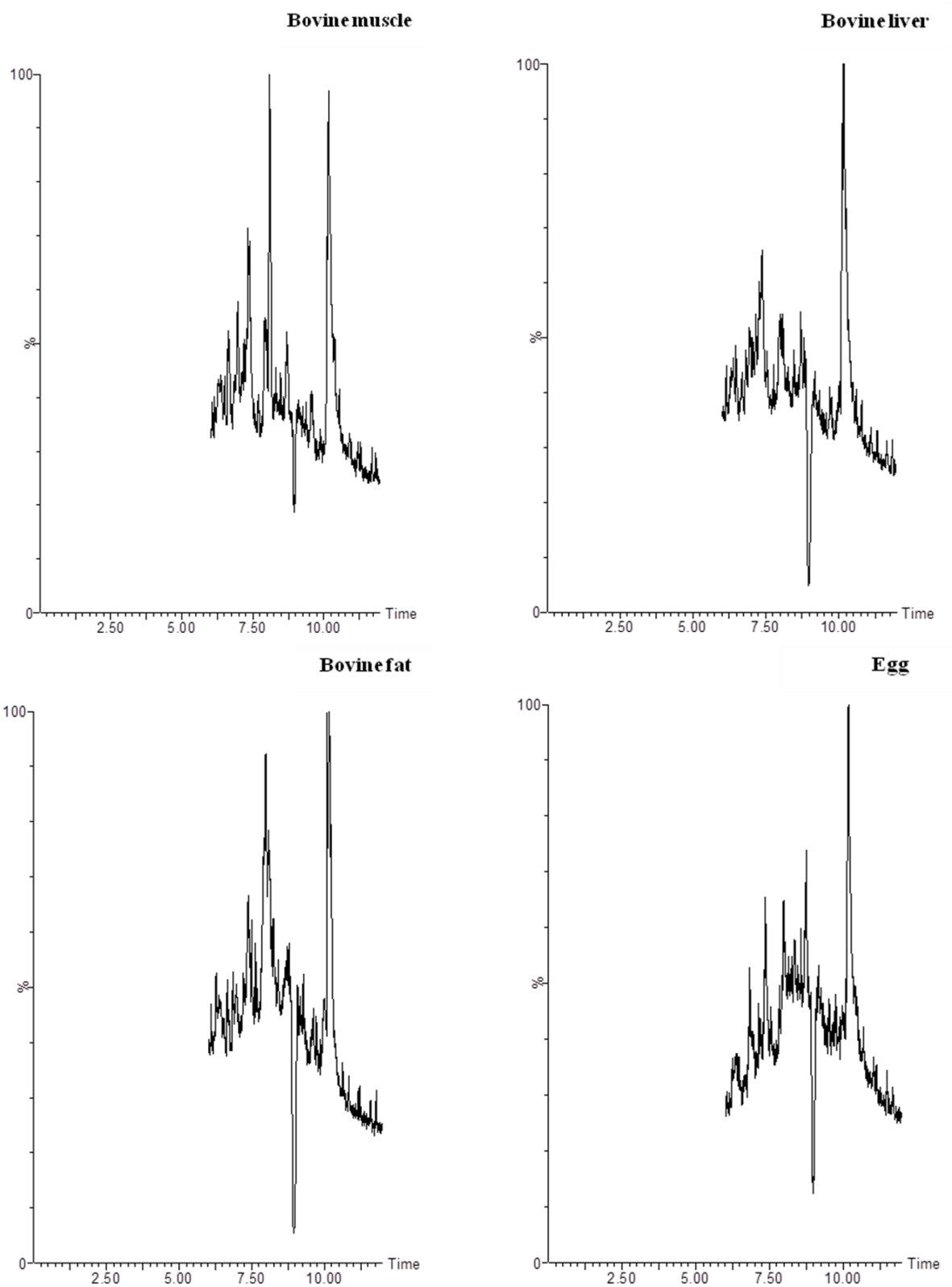


### Honey blank sample



### Honey spiked at 7.7ppb

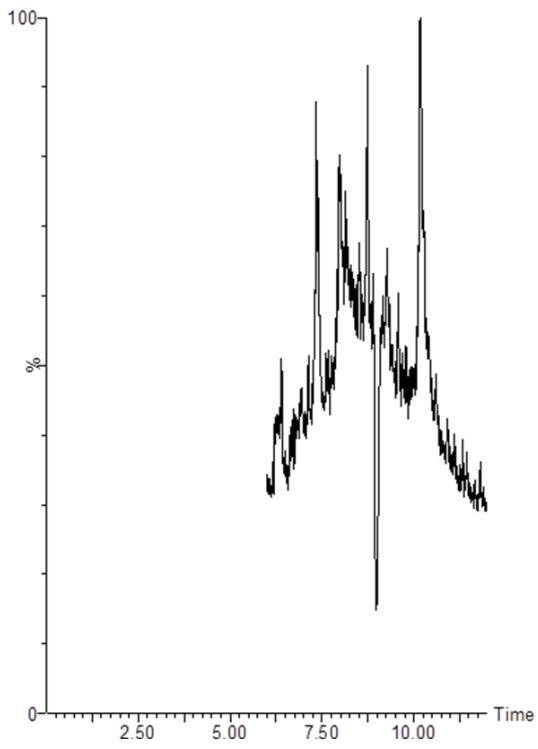




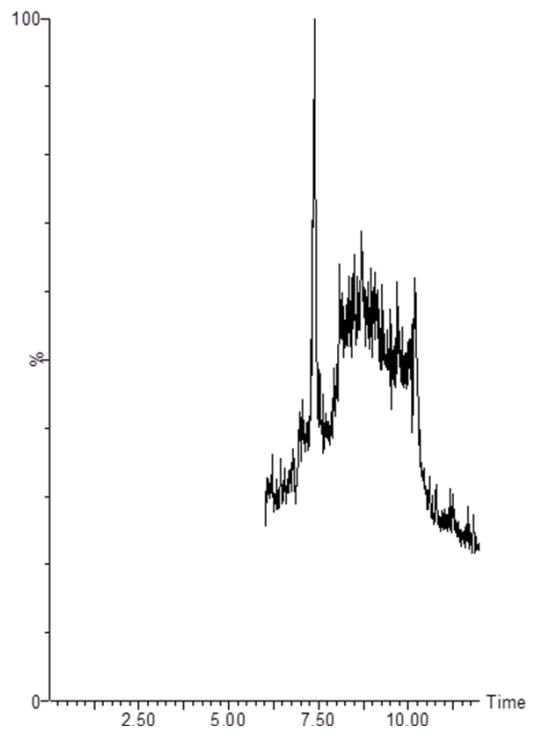
☒ 11-1. Typical total ion chromatograms (scan:  $m/z$  50-600 in ESI positive mode) of blank sample on LC condition in Table 1 Scales were taken from the intensities of largest peak in each chromatogram



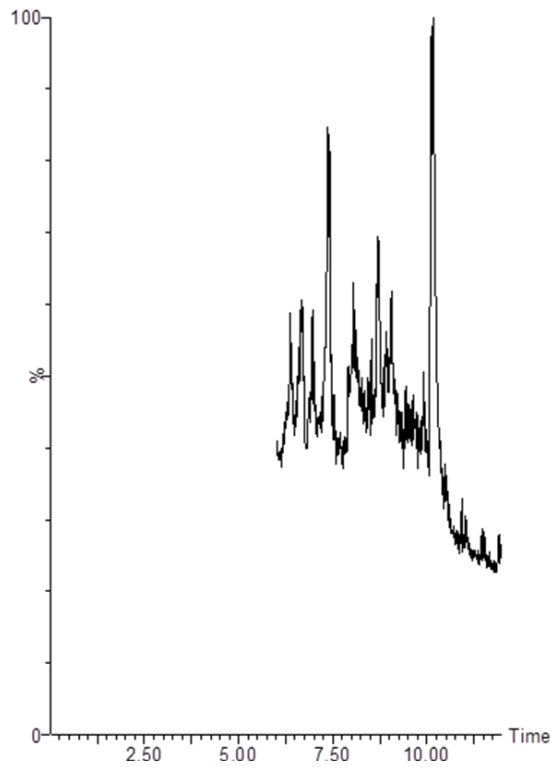
**Milk**



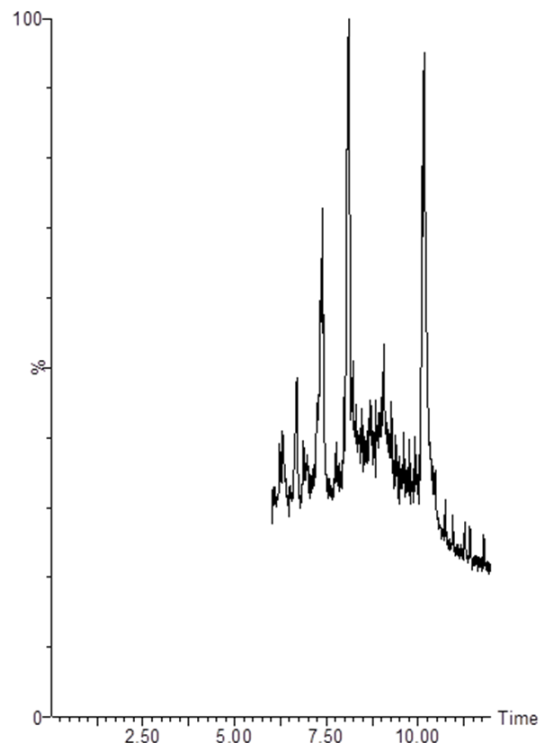
**Honey**

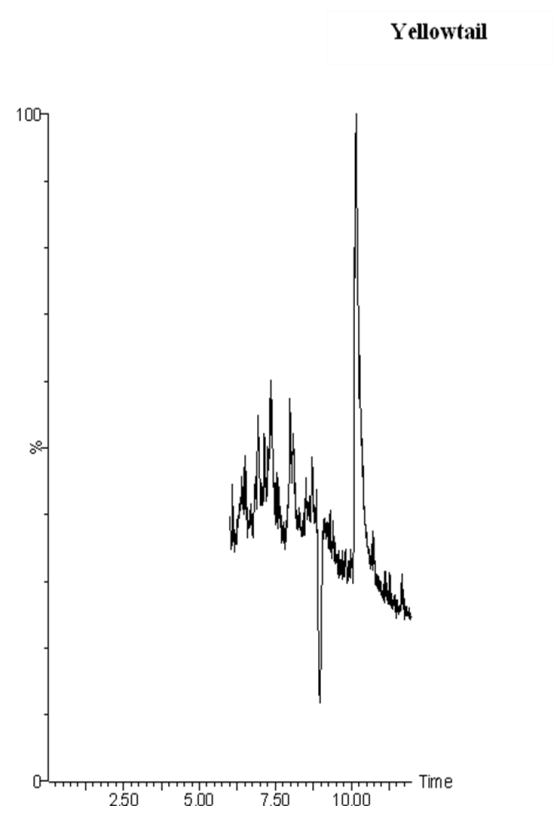
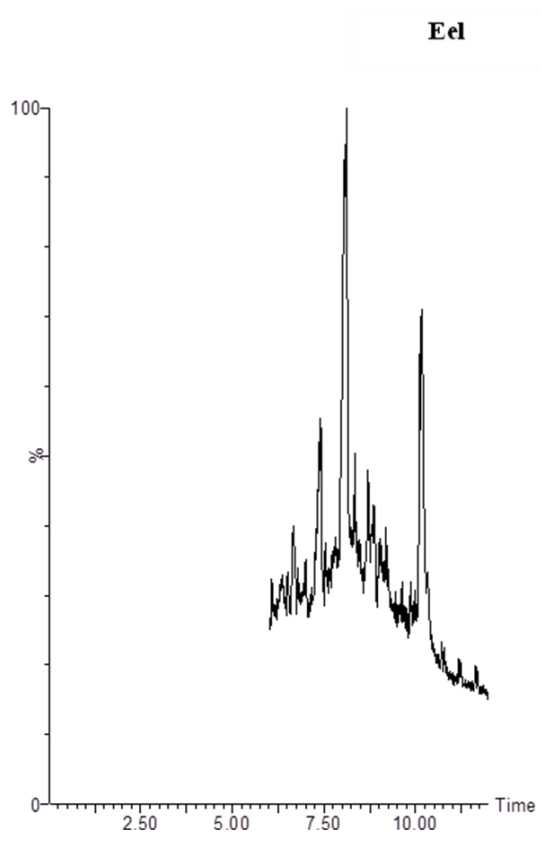


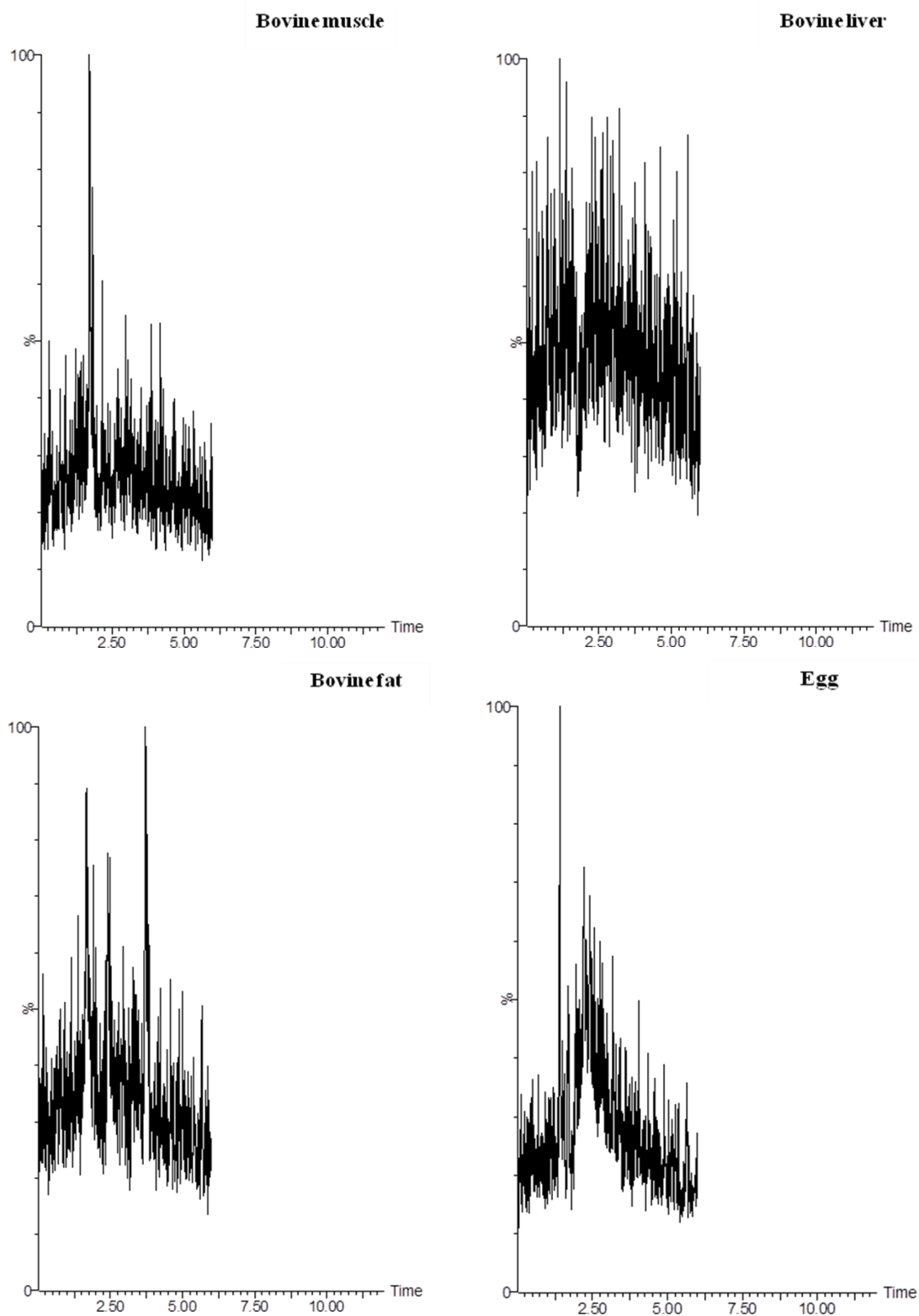
**Fresh water clam**



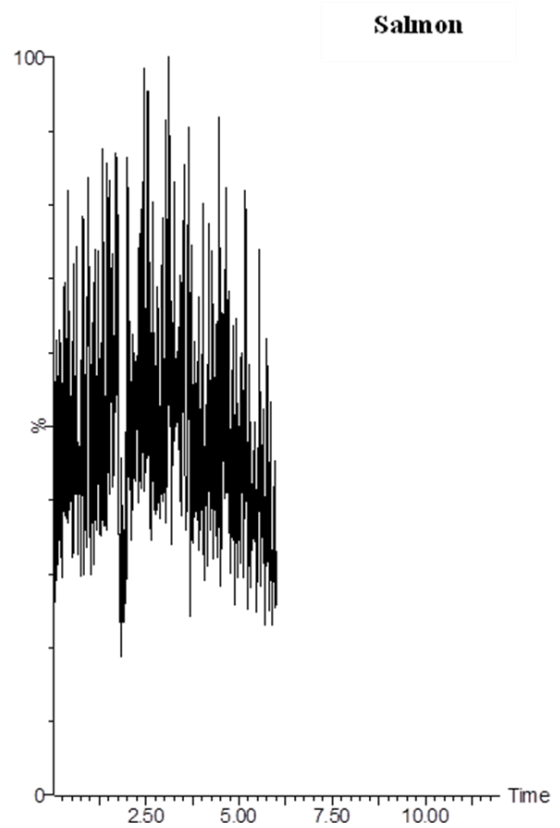
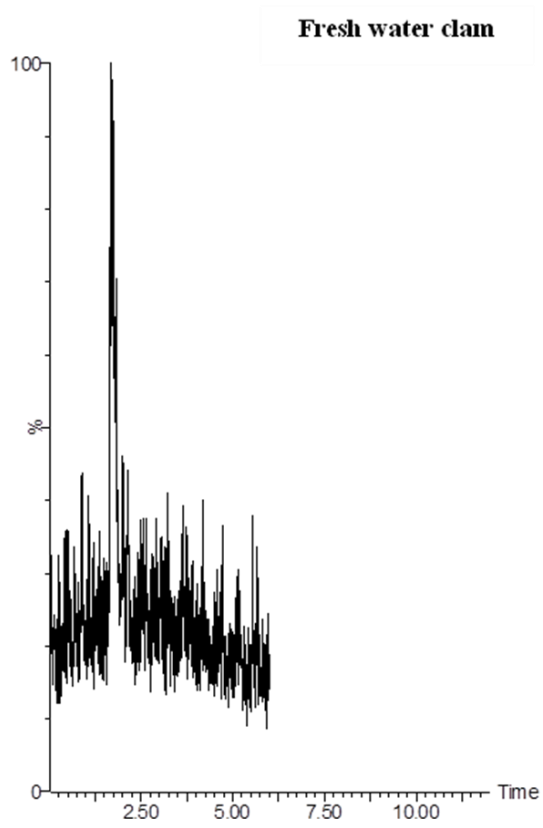
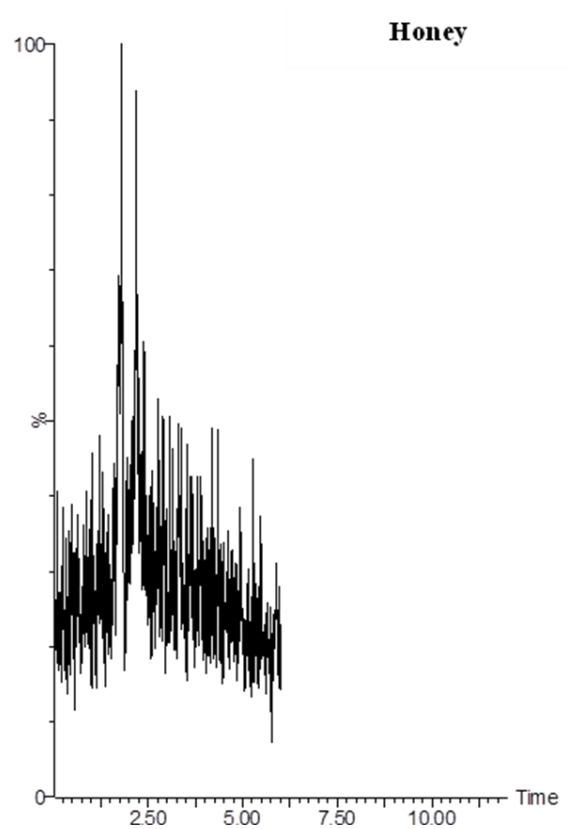
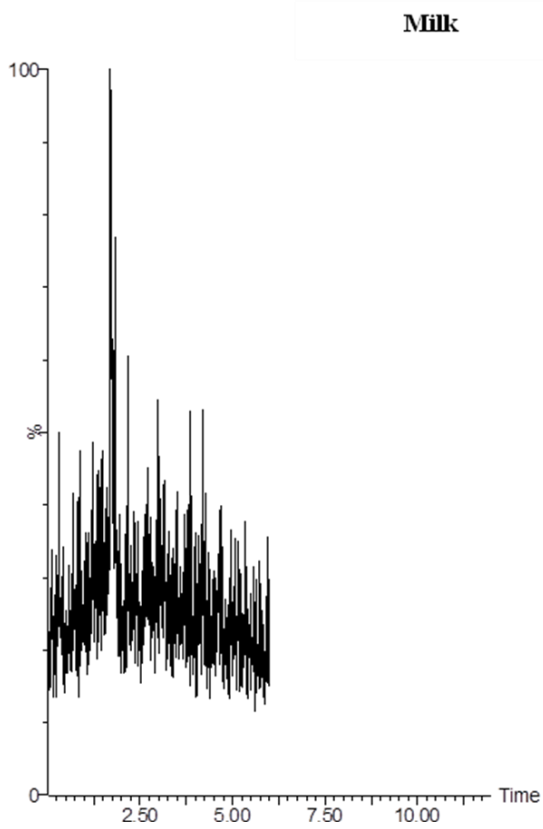
**Salmon**

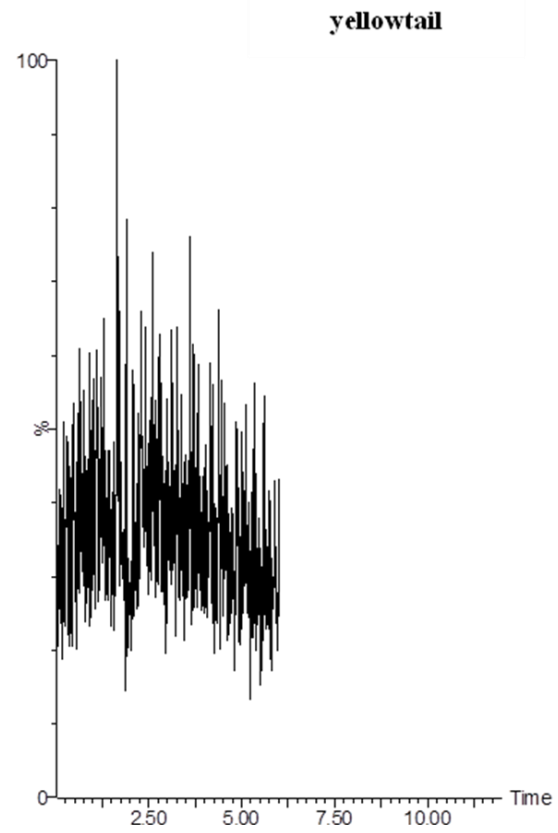
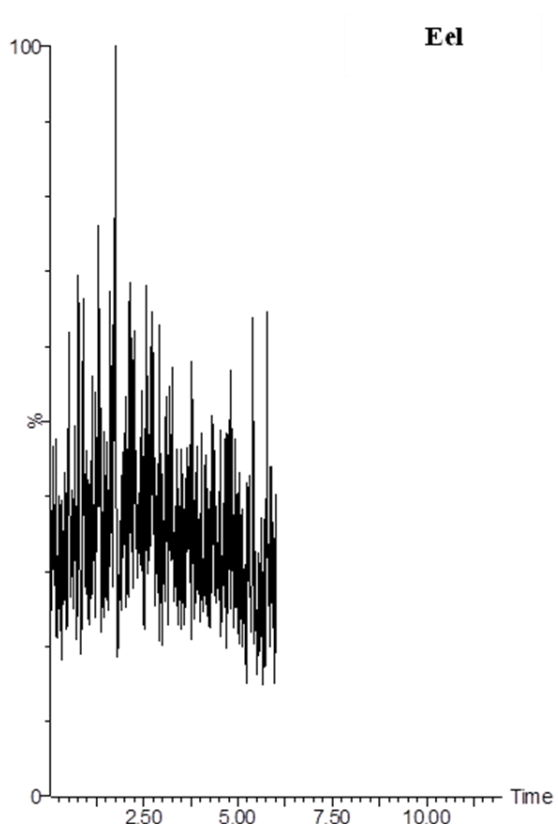






☒ 11-2. Typical total ion chromatograms (scan:  $m/z$  50-600 in ESI negative mode) of blank sample on LC condition in Table 1 Scales were taken from the intensities of largest peak in each chromatogram





5. 定量限界（定量限界の推定を含む）

各試料のブランク試験溶液に S/N 比 10 を与えると考えられた濃度（クロメプロップは 0.002 $\mu\text{g/g}$ , クロメプロップ酸は 0.00154 $\mu\text{g/g}$  試料中相当濃度）となるように標準溶液を添加し, S/N 比を検討した. クロマトグラムを図 12-1 及び 12-2 に示す. いずれの試料においても S/N 比の平均は 10 以上であった.

表 3 定量限界の推定

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	基準値* <sup>1</sup> (ppm)	添加濃度 (ppm)	定量限界の評価* <sup>2</sup>	標準溶液濃度* <sup>3</sup> (mg/L)	ピーク面積(高さ)* <sup>4</sup>						S/N 比		平均値		備考		
								面積又は高さの別	ブランク* <sup>5</sup>	マトリクス添加標準溶液			溶媒標準溶液			U <sub>1</sub>	U <sub>2</sub>		面積(高さ)比(%)* <sup>6</sup>	S/N 比
										U <sub>1</sub>	U <sub>2</sub>	平均	U <sub>1</sub>	U <sub>2</sub>	平均					
1	クロメプロップ	牛の筋肉	0.002	0.01	0.01	*	0.001	面積	0	338	298	318	290	374	332	26	26	96	26	
2	クロメプロップ	牛の肝臓	0.002	0.01	0.01	*	0.001	面積	0	293	296	295	290	374	332	20	17	89	19	
3	クロメプロップ	牛の脂肪	0.002	0.01	0.01	*	0.001	面積	0	430	497	464	440	377	409	36	21	113	28	
4	クロメプロップ	牛乳	0.002	0.01	0.01	*	0.001	面積	0	635	619	627	658	604	631	56	44	99	50	
5	クロメプロップ	鶏卵	0.002	0.01	0.01	*	0.001	面積	0	680	591	636	658	604	631	56	56	101	56	
6	クロメプロップ	はちみつ	0.002	0.01	0.01	*	0.001	面積	130	778	752	635	707	650	679	116	116	94	116	
7	クロメプロップ	さけ	0.002	0.3	0.3	*	0.001	面積	0	456	449	453	481	456	469	38	17	97	27	
8	クロメプロップ	うなぎ	0.002	0.3	0.3	*	0.001	面積	0	427	425	426	481	456	469	17	7	91	12	
9	クロメプロップ	しじみ	0.002	0.3	0.3	*	0.001	面積	0	488	467	478	481	456	469	36	26	102	31	
10	クロメプロップ	ブリ	0.002	0.3	0.3	*	0.001	面積	0	303	350	327	290	374	332	26	20	98	23	
11	クロメプロップ酸	牛の筋肉	0.00154	0.0077	0.0077	*	0.00077	面積	0	92	86	89	94	84	89	21	14	100	17	

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	基準値*1 (ppm)	添加濃度 (ppm)	定量限界の評価*2	標準溶液濃度*3 (mg/L)	ピーク面積(高さ)*4						S/N比		平均値		備考		
								面積又は高さの別	ブランク*5	マトリクス添加標準溶液			溶媒標準溶液			n=1	n=2		面積(高さ)比(%) <sub>9*</sub>	S/N比
										n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均					
12	クロメプロップ酸	牛の肝臓	0.00154	0.0077	0.0077	*	0.00077	面積	0	102	96	99	120	97	109	17	11	91	14	
13	クロメプロップ酸	牛の脂肪	0.00154	0.0077	0.0077	*	0.00077	面積	0	96	102	99	93	85	89	20	12	111	16	
14	クロメプロップ酸	牛乳	0.00154	0.0077	0.0077	*	0.00077	面積	0	102	94	98	93	85	89	27	15	110	21	
15	クロメプロップ酸	鶏卵	0.00154	0.0077	0.0077	*	0.00077	面積	0	108	93	101	120	97	109	41	17	93	29	
16	クロメプロップ酸	はちみつ	0.00154	0.0077	0.0077	*	0.00077	面積	0	102	94	98	101	84	93	20	20	106	20	
17	クロメプロップ酸	さけ	0.00154	0.231	0.231	*	0.00077	面積	0	101	100	101	103	94	99	21	21	102	21	
18	クロメプロップ酸	うなぎ	0.00154	0.231	0.231	*	0.00077	面積	0	80	120	100	103	94	99	21	11	102	16	
19	クロメプロップ酸	しじみ	0.00154	0.231	0.231	*	0.00077	面積	0	105	104	105	103	94	99	16	12	106	14	
20	クロメプロップ酸	ブリ	0.00154	0.231	0.231	*	0.00077	面積	0	99	83	91	102	85	94	20	15	97	18	

\*1 基準値は、基準値未設定の場合には一律基準(0.01 ppm)を用いる。

\*2 定量限界の推定を行う対象(添加濃度と定量限界濃度とが異なる場合)には、『\*』が表示される。

\*3 試料中の濃度が定量限界相当濃度になるように、ブランク試料の試験溶液で調製した標準溶液(マトリクス添加標準溶液)及び溶媒で調製した標準溶液(溶媒標準溶液)を作成する。

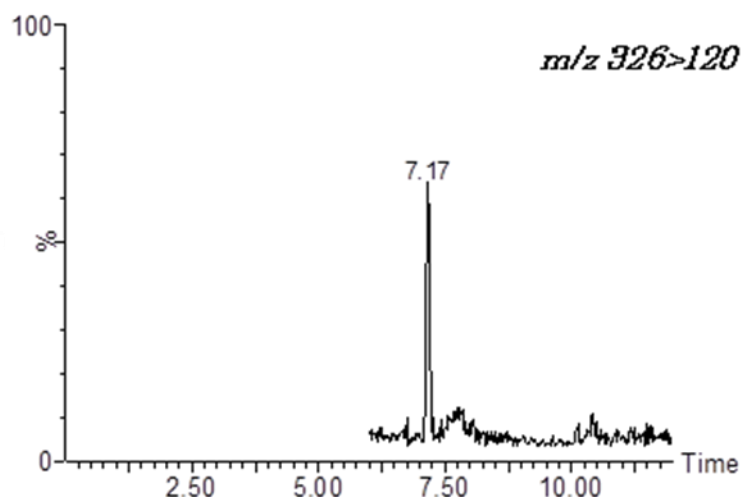
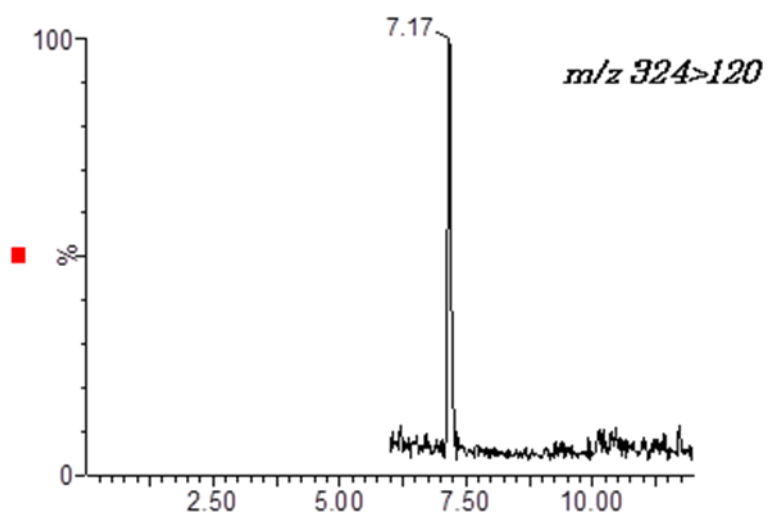
\*4 マトリクス添加標準溶液及び溶媒標準溶液の順に交互に2回以上測定する。(必要に応じて起爆注入を行う。)

\*5 ブランクにピークが認められた場合には、マトリクス添加標準溶液の値はブランク値を差し引いた値を用いる。

\*6 マトリクス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積(又は高さ)の比(%)を求める。

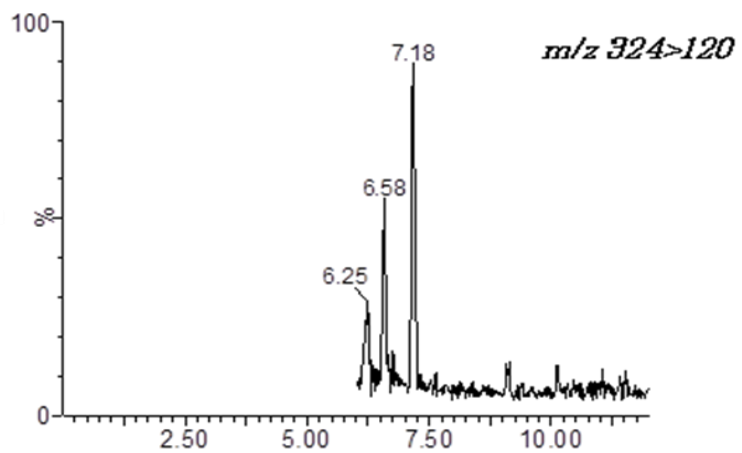
☒ 12-1. Typical MRM chromatograms of clomeprop standard solution (1ppb) fortified with sample matrix and clomeprop standard Scales were equal in each chromatogram in the sample

**standard solution (1ppb)**

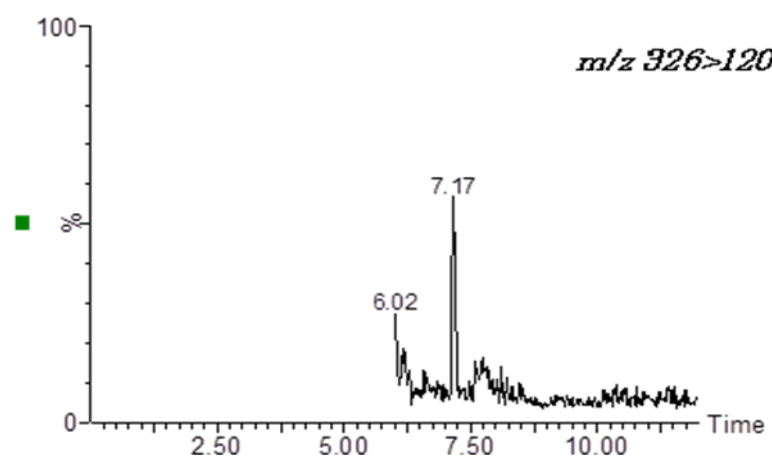
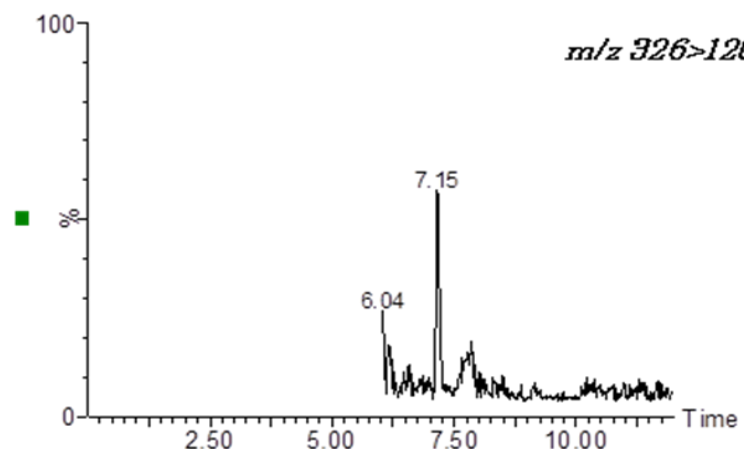
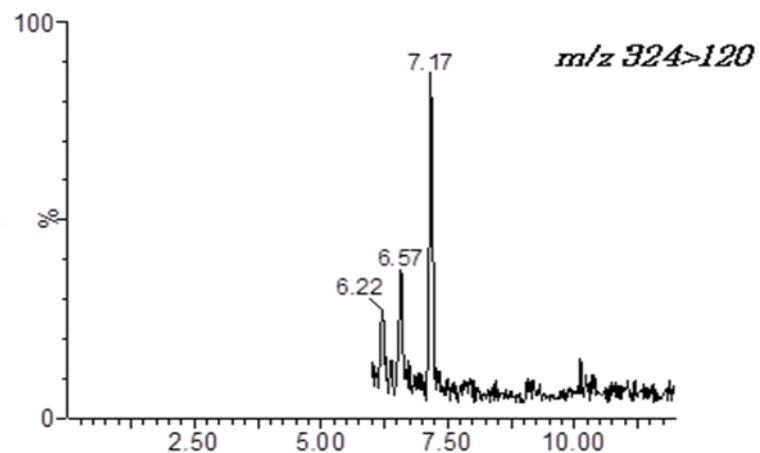




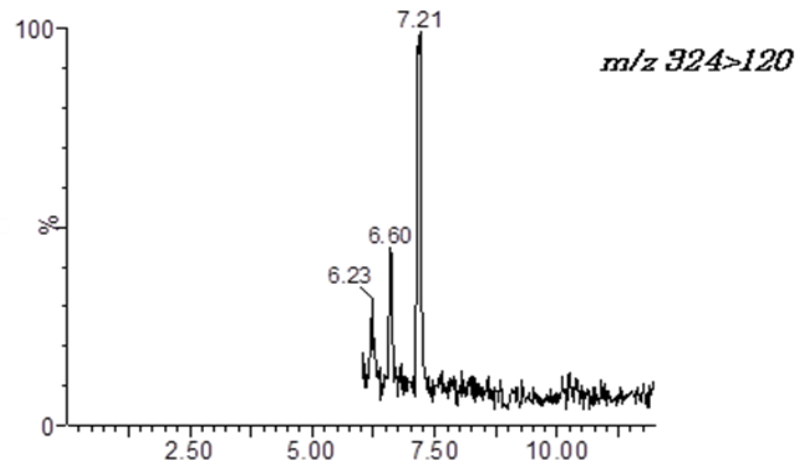
### Bovine muscle



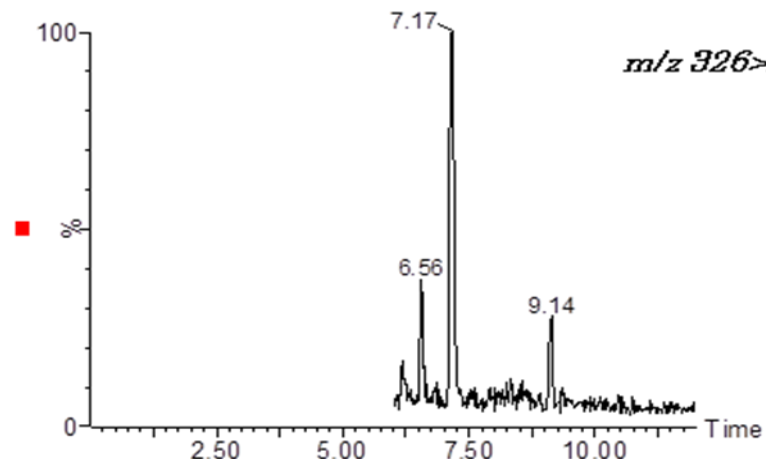
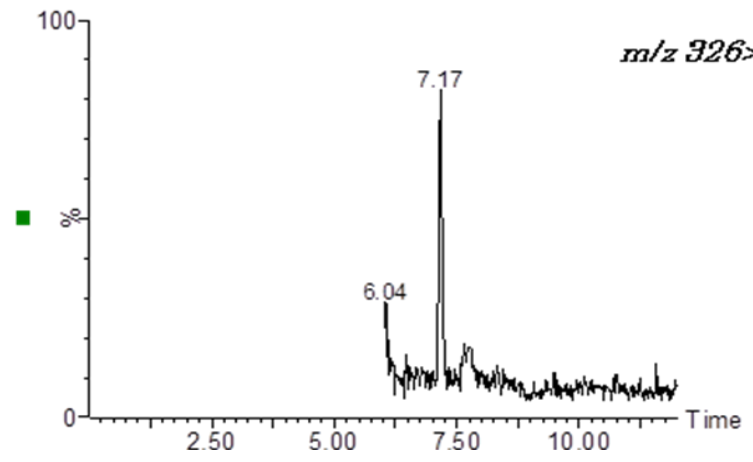
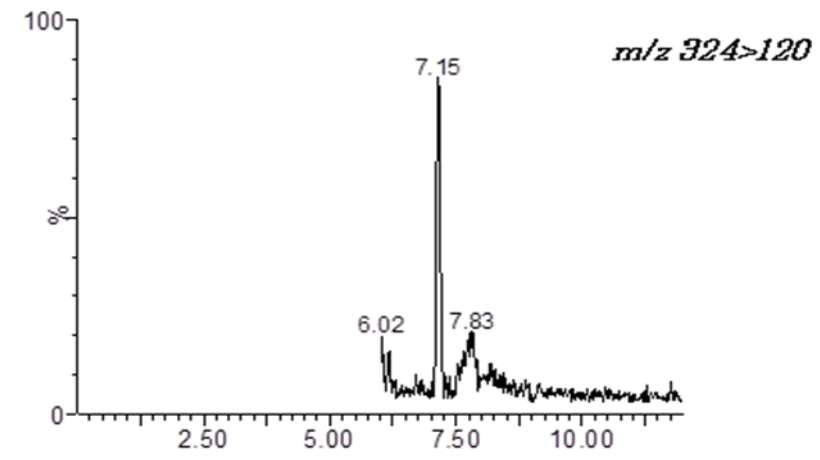
### Bovine liver

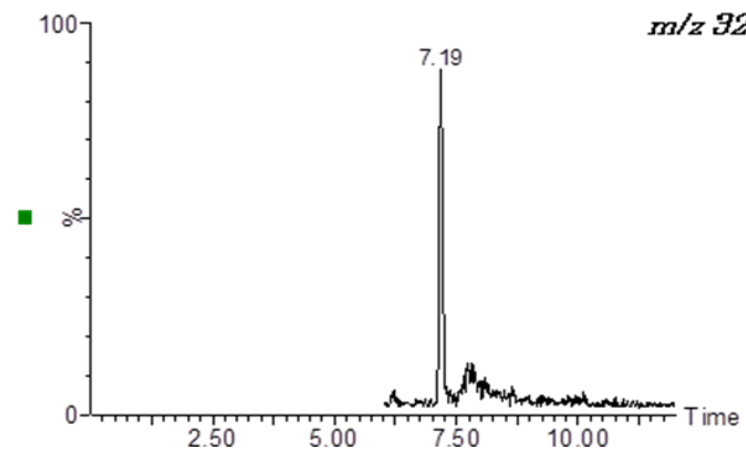
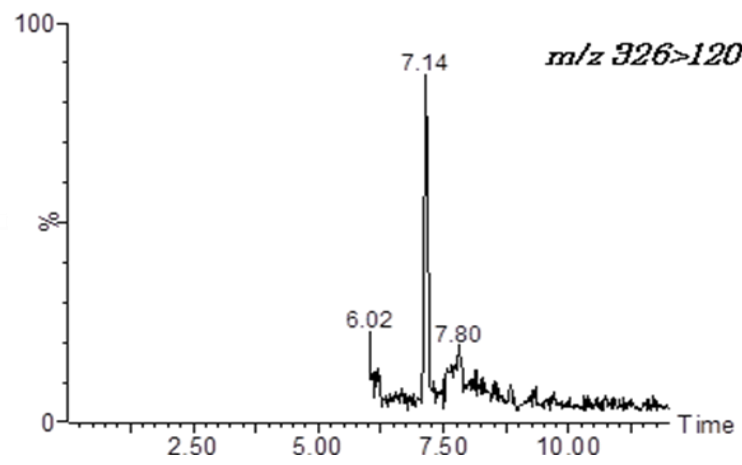
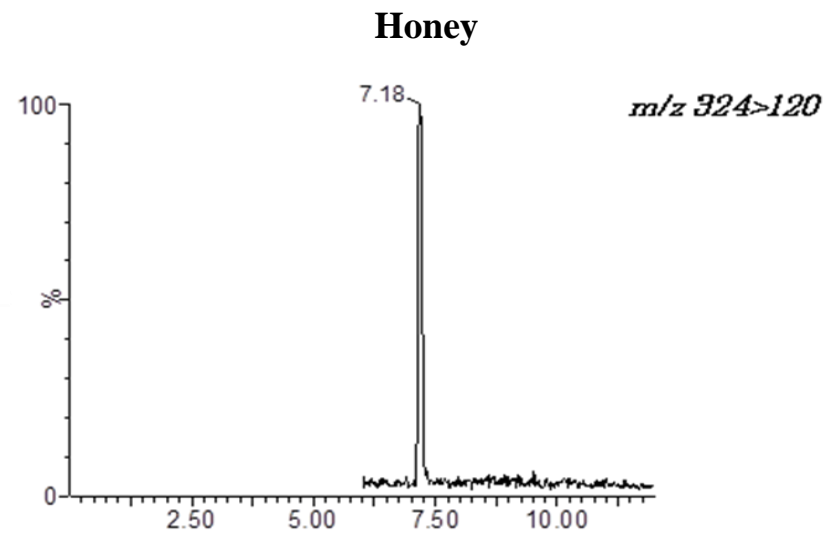
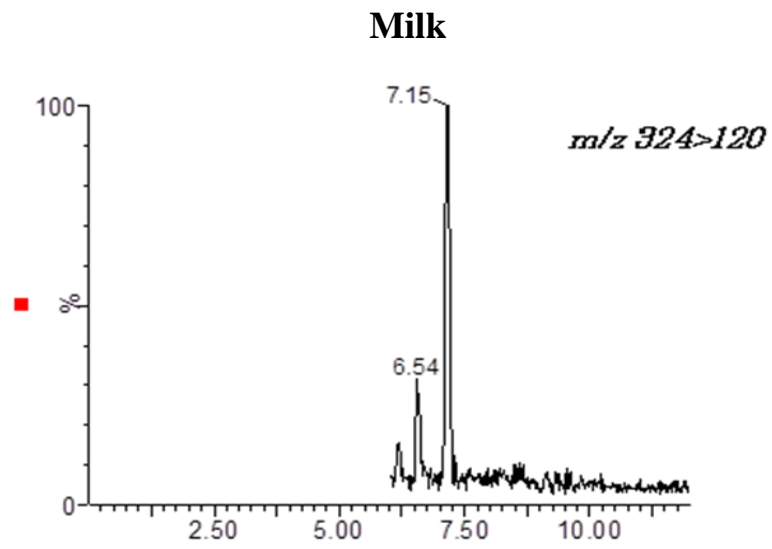


### Bovine fat

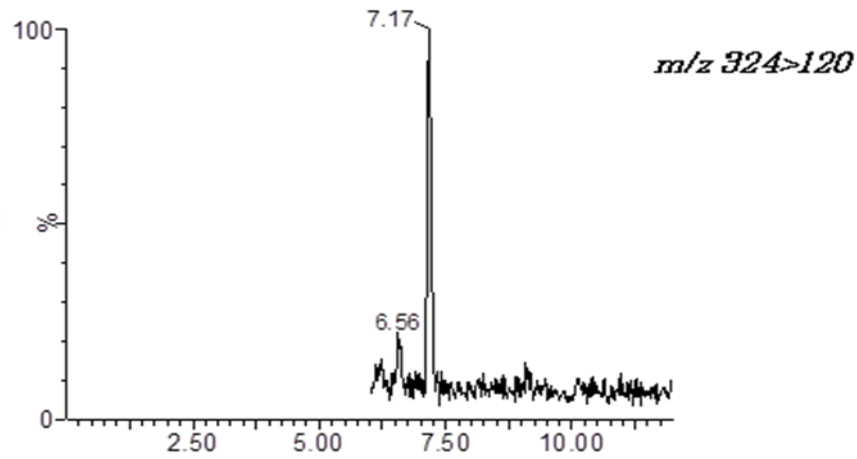


### Egg

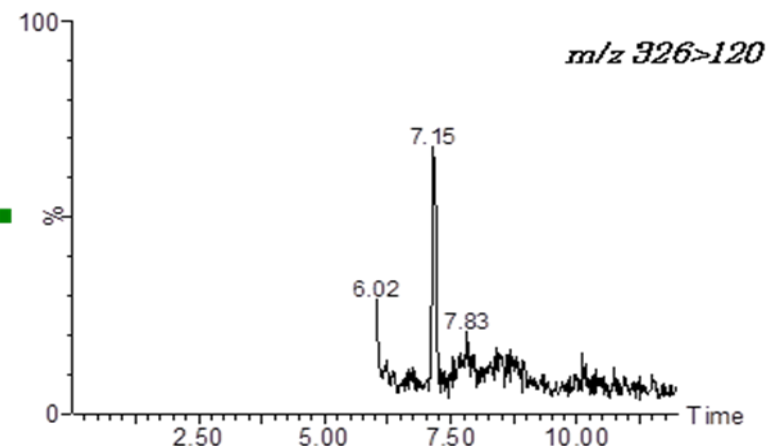
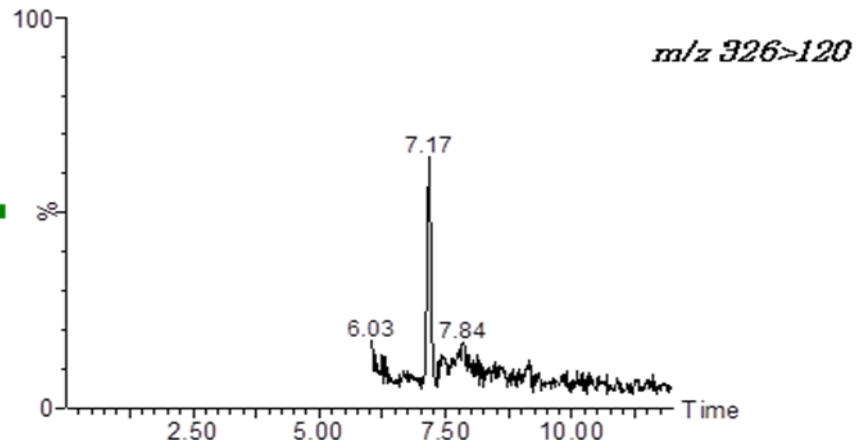
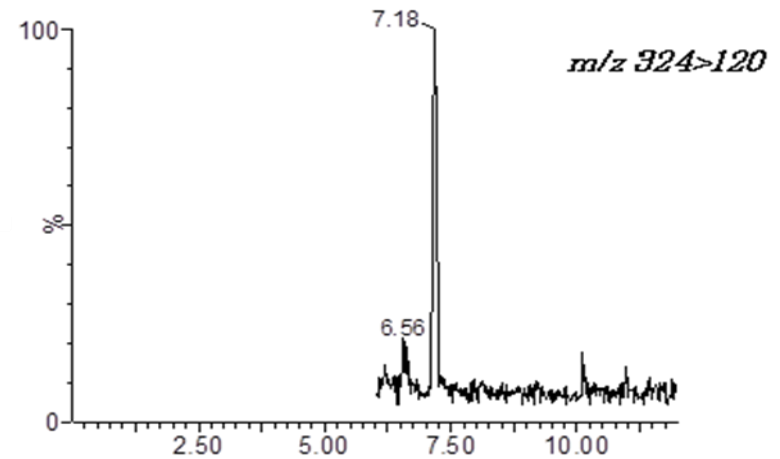




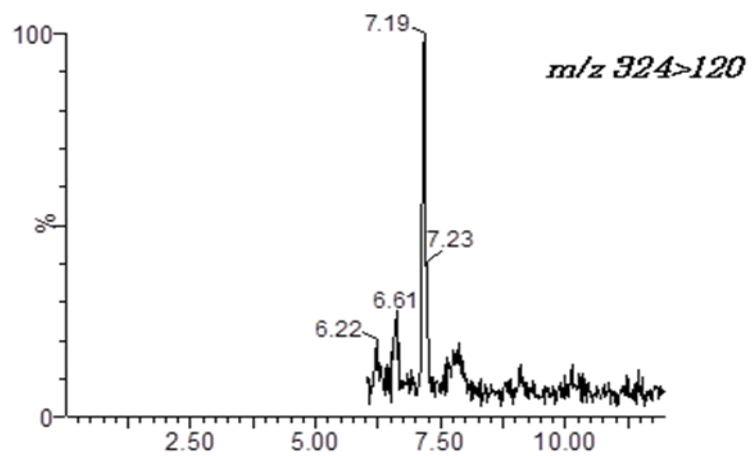
**Fresh water clam**



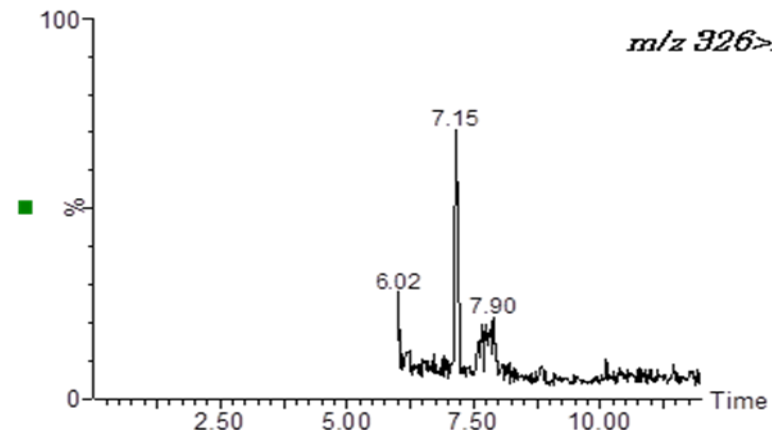
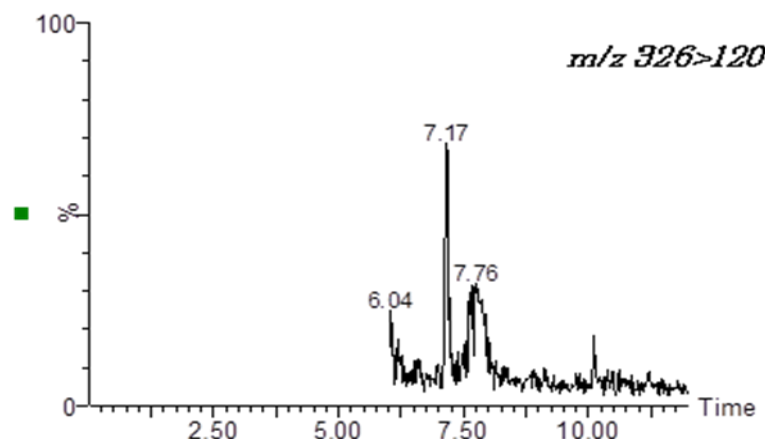
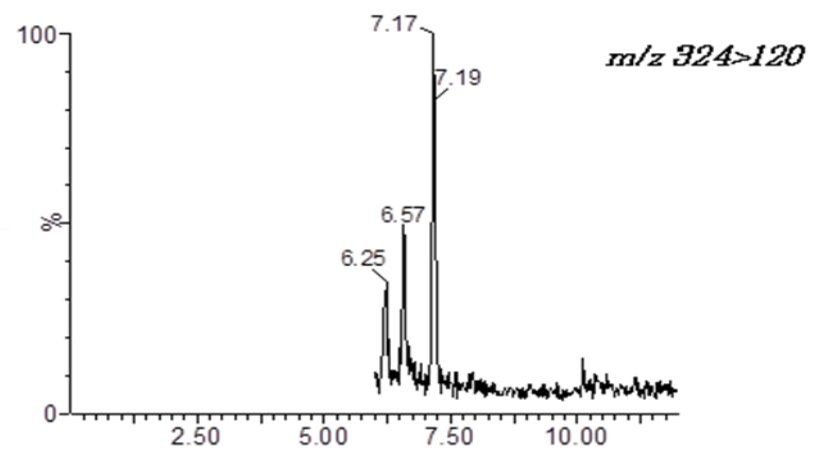
**Salmon**



### Eel

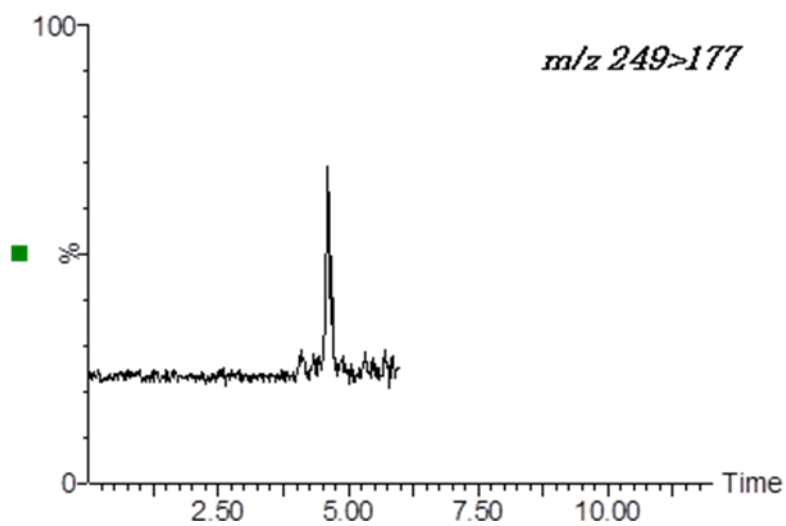
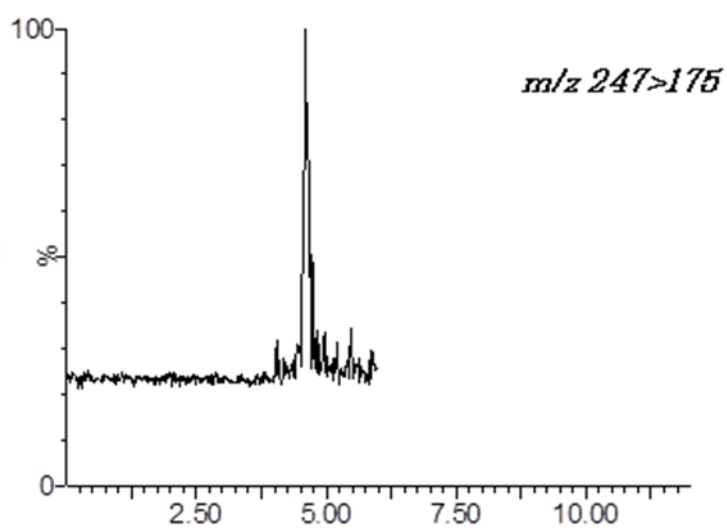


### Yellowtail

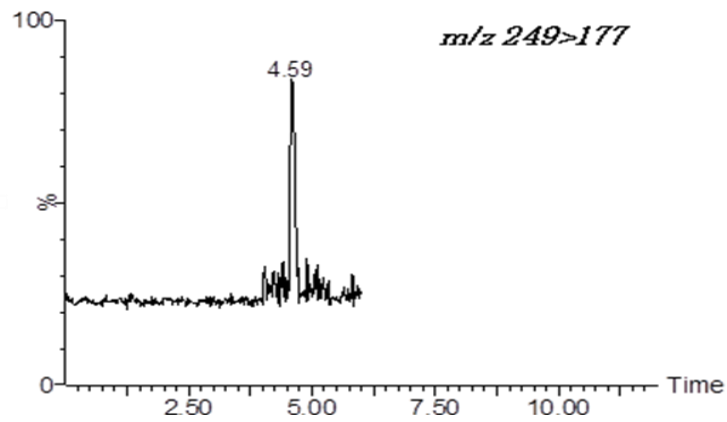
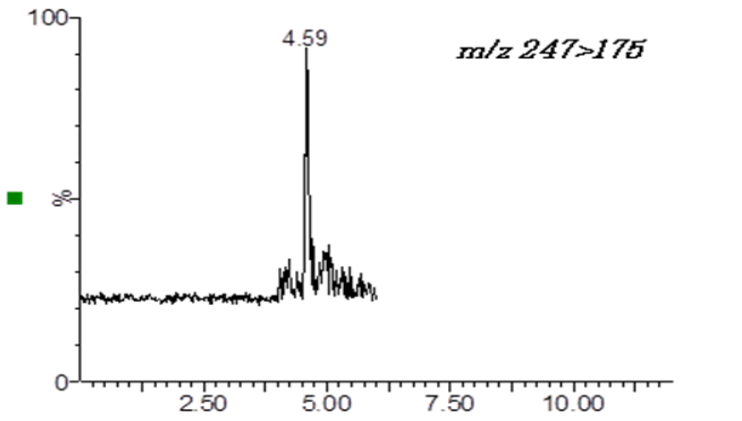


☒ 12-2. Typical MRM chromatograms of clomeprop acid standard solution (0.77ppb) fortified with sample matrix and clomeprop acid standard

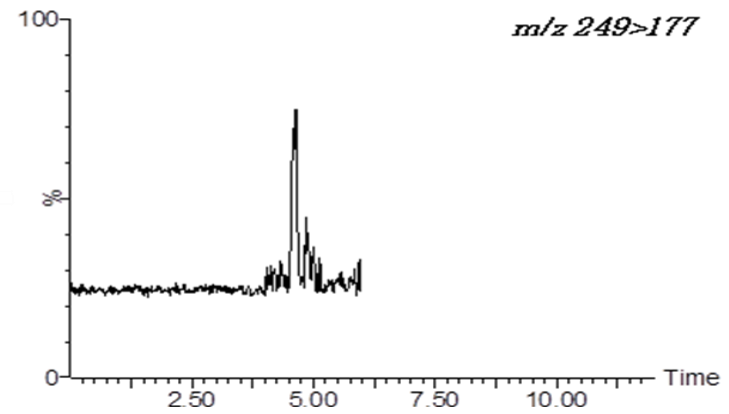
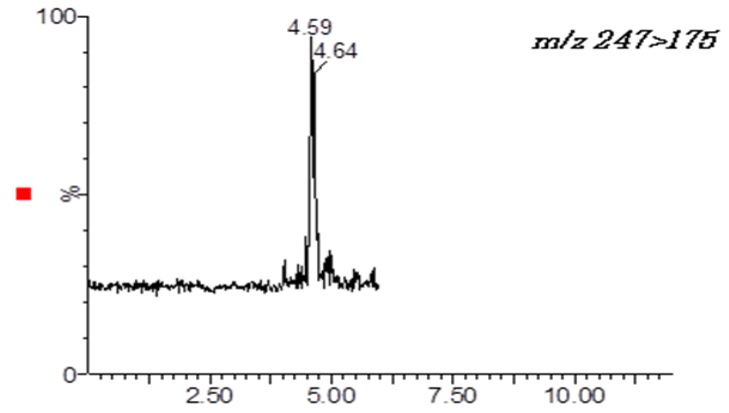
**standard solution (0.77ppb)**



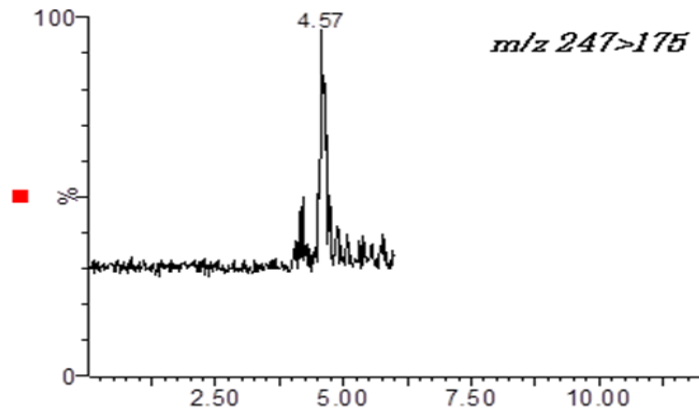
### Bovine muscle



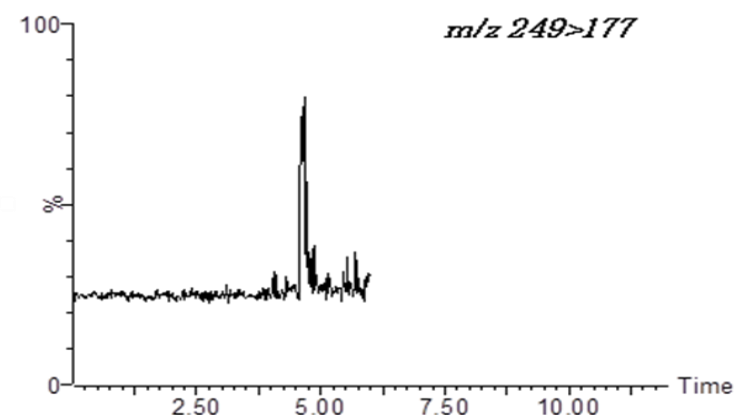
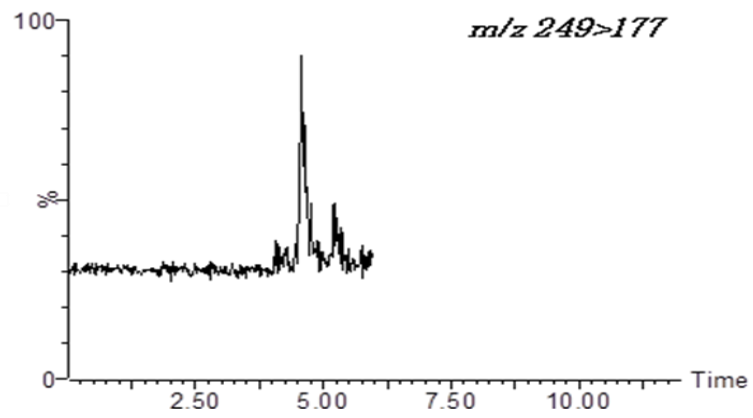
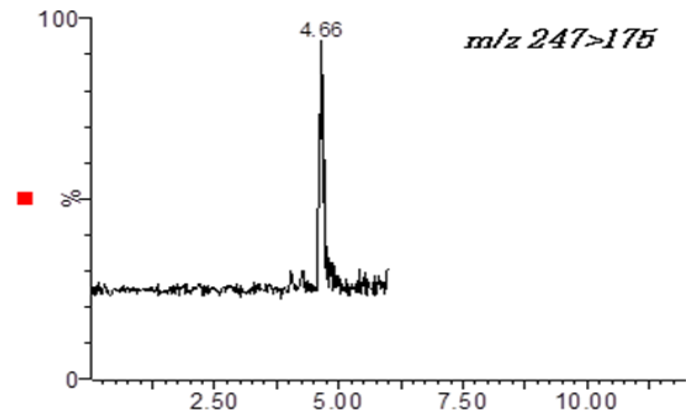
### Bovine liver



### Bovine fat

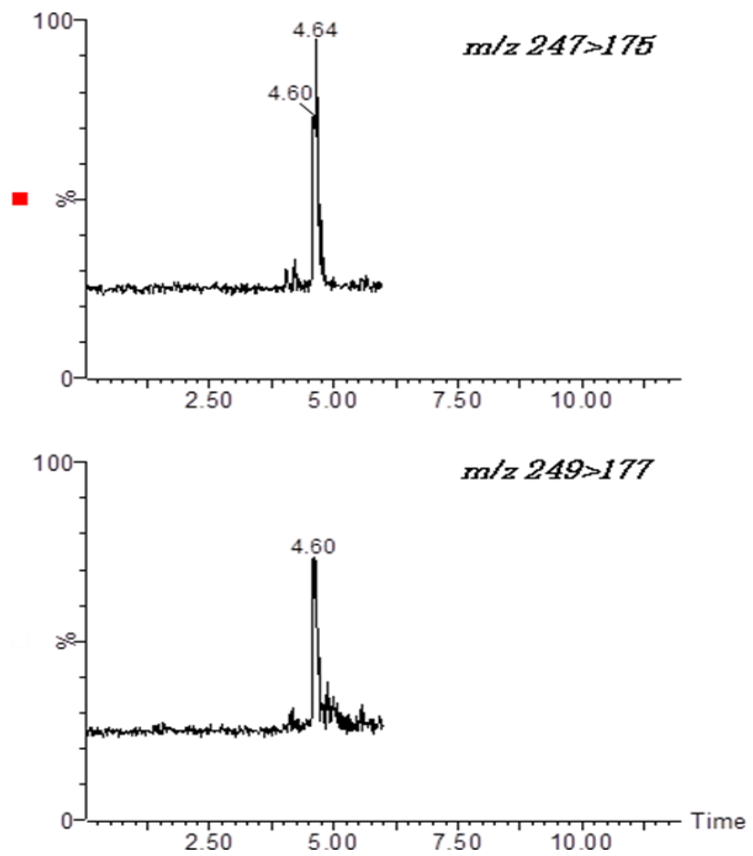


### Egg

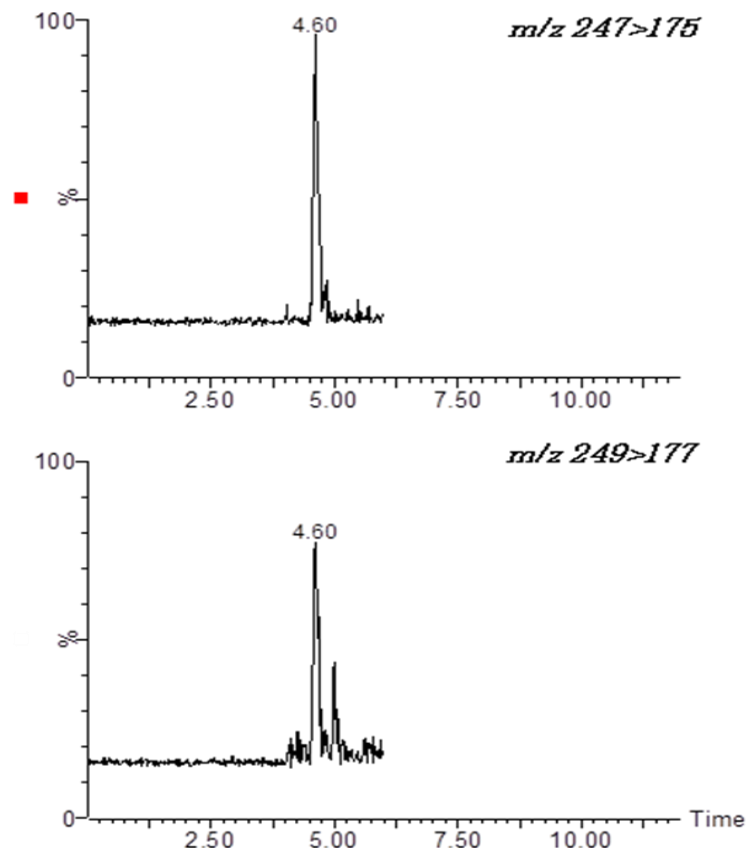




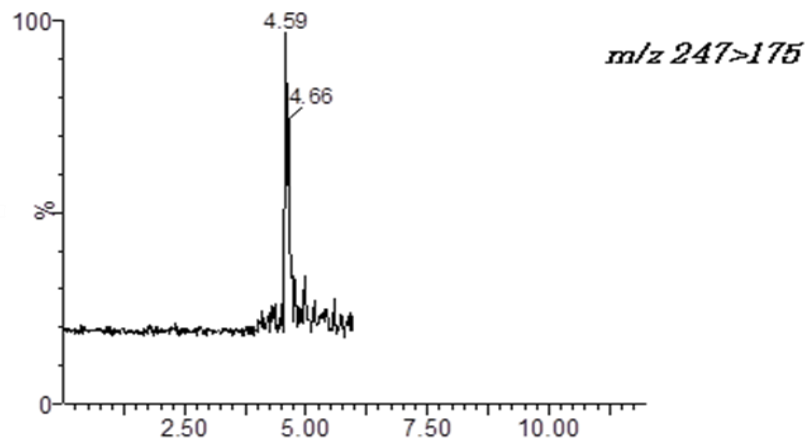
### Milk



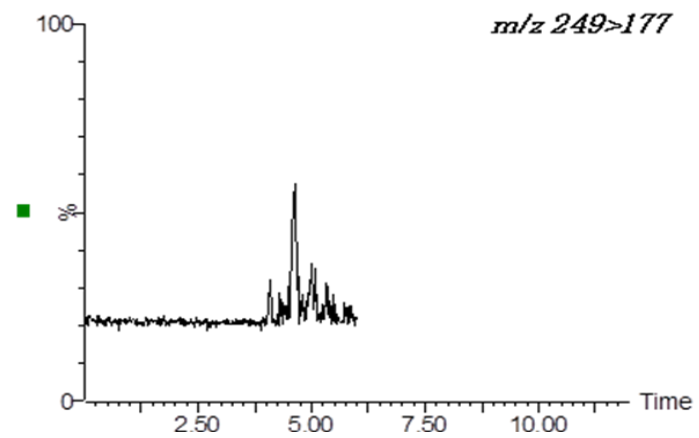
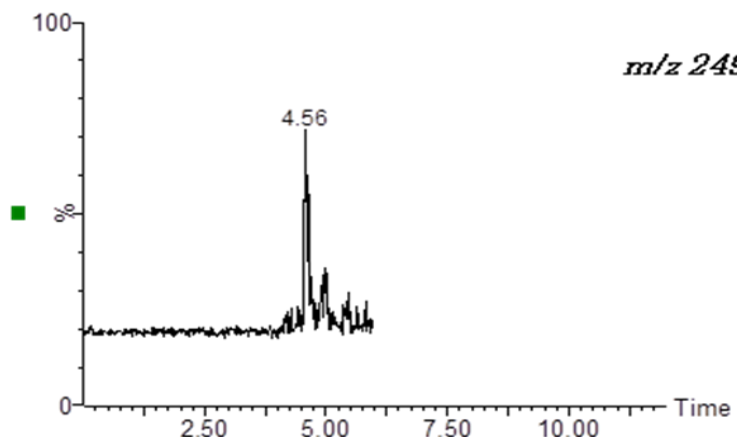
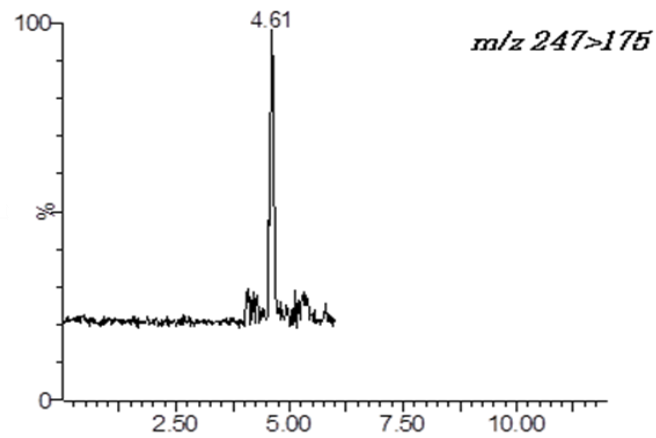
### Honey



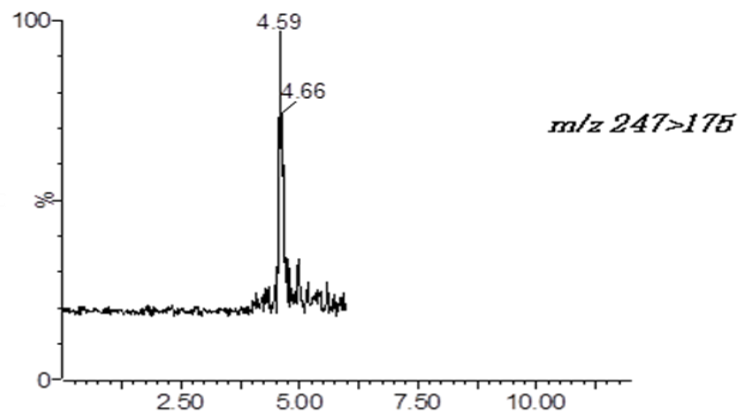
### Fresh water clam



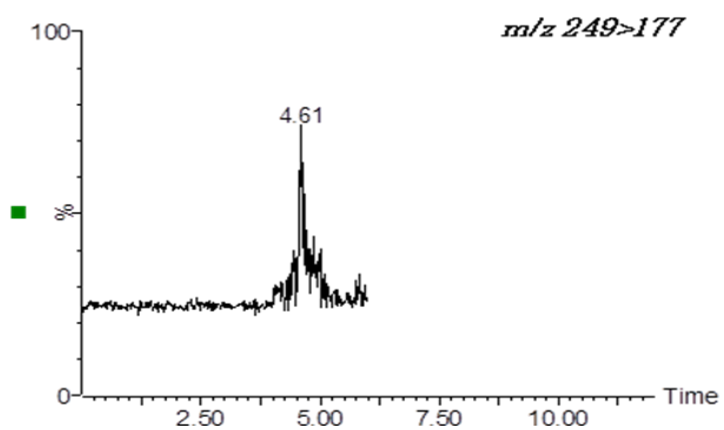
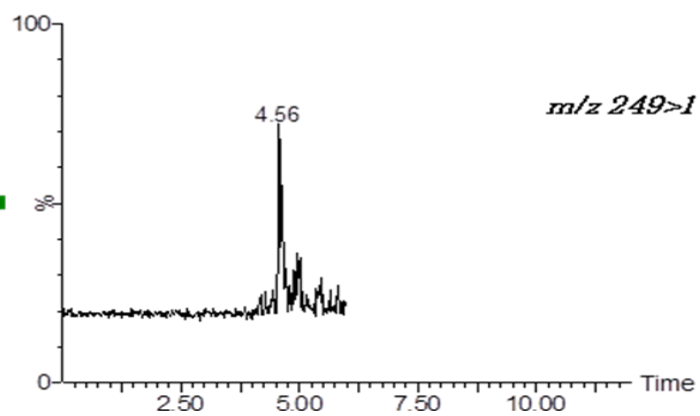
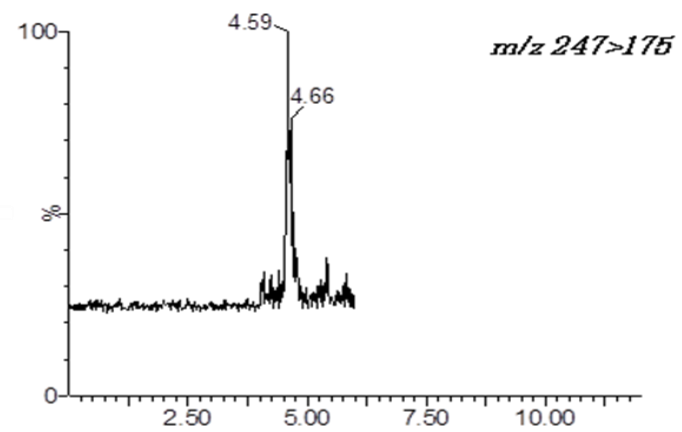
### Salmon



### Eel



### Yellowtail



6. 試料マトリクスの測定値への影響

添加回収濃度（基準値相当）レベルで溶媒標準溶液に対するマトリクス添加標準溶液のピーク面積の比を比較し、試料マトリクスの測定値への影響について検討した。クロメプロップにおいては89～100%、クロメプロップ酸においては99～104%の範囲であり、顕著なイオン化抑制及び増強効果は低く、許容できる範囲であると考えられた。

表4 試料マトリクスの測定への影響

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	基準値*1 (ppm)	添加濃度 (ppm)	標準溶液濃度*2 (mg/L)	ピーク面積(高さ)*3									備考
							面積又は高さの別	ブランク*4	マトリクス添加標準溶液*5			溶媒標準溶液			ピーク面積(高さ)比*6	
									n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均		
1	クロメプロップ	牛の筋肉	0.002	0.01	0.01	0.005	面積	0	1496	1685	1591	1501	1697	1599	0.99	
2	クロメプロップ	牛の肝臓	0.002	0.01	0.01	0.005	面積	0	1505	1509	1507	1501	1697	1599	0.94	
3	クロメプロップ	牛の脂肪	0.002	0.01	0.01	0.005	面積	0	1976	2023	2000	2216	2024	2120	0.94	
4	クロメプロップ	牛乳	0.002	0.01	0.01	0.005	面積	0	2958	2748	2853	3451	2964	3208	0.89	
5	クロメプロップ	鶏卵	0.002	0.01	0.01	0.005	面積	0	3062	3030	3046	3451	2964	3208	0.95	
6	クロメプロップ	はちみつ	0.002	0.01	0.01	0.005	面積	130	3121	3122	2992	3212	3193	3203	0.93	
7	クロメプロップ	さけ	0.002	0.3	0.3	0.03	面積	0	10554	10792	10673	11800	11327	11564	0.92	
8	クロメプロップ	うなぎ	0.002	0.3	0.3	0.03	面積	0	11196	11961	11579	11800	11327	11564	1.00	
9	クロメプロップ	しじみ	0.002	0.3	0.3	0.03	面積	0	9821	11066	10444	11800	11327	11564	0.90	
10	クロメプロップ	ブリ	0.002	0.3	0.3	0.03	面積	0	7392	7982	7687	8308	7981	8145	0.94	
11	クロメプロップ酸	牛の筋肉	0.00154	0.0077	0.0077	0.00385	面積	0	675	621	648	652	632	642	1.01	
12	クロメプロップ酸	牛の肝臓	0.00154	0.0077	0.0077	0.00385	面積	0	703	694	699	652	632	642	1.09	
13	クロメプロップ酸	牛の脂肪	0.00154	0.0077	0.0077	0.00385	面積	0	592	615	604	583	603	593	1.02	

No.	分析対象 化合物	食品名	定量 限界 (ppm)	基準 値*1 (ppm)	添加 濃度 (ppm)	標準 溶液 濃度*2 (mg/L)	ピーク面積(高さ)*3									備考
							面積 又は 高さ の別	ブ ラ ン ク *4	マトリクス添加 標準溶液*5			溶媒標準溶液			ピーク 面積 (高さ) 比*6	
									n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均		
14	クロメプロップ酸	牛乳	0.00154	0.0077	0.0077	0.00385	面積	0	673	635	654	652	632	642	1.02	
15	クロメプロップ酸	鶏卵	0.00154	0.0077	0.0077	0.00385	面積	0	623	572	598	583	603	593	1.01	
16	クロメプロップ酸	はちみつ	0.00154	0.0077	0.0077	0.00385	面積	0	642	615	629	583	603	593	1.06	
17	クロメプロップ酸	さけ	0.00154	0.231	0.231	0.0231	面積	0	3861	3752	3807	4079	3436	3758	1.01	
18	クロメプロップ酸	うなぎ	0.00154	0.231	0.231	0.0231	面積	0	3814	3602	3708	4079	3436	3758	0.99	
19	クロメプロップ酸	しじみ	0.00154	0.231	0.231	0.0231	面積	0	3875	3671	3773	4079	3436	3758	1.00	
20	クロメプロップ酸	ブリ	0.00154	0.231	0.231	0.0231	面積	0	4251	4155	4203	4164	3939	4052	1.04	

\*1 基準値は、基準値未設定の場合には一律基準(0.01 ppm)を用いる。

\*2 添加回収試験における回収率 100%相当濃度になるように、ブランク試料の試験溶液で調製した標準溶液(マトリクス添加標準溶液)及び溶媒で調製した標準溶液(溶媒標準溶液)を作成する。

\*3 マトリクス添加標準溶液及び溶媒標準溶液の順に交互に2回以上測定した結果から評価する。(必要に応じて起爆注入を行う。)

\*4 ブランクにピークが認められた場合には、マトリクス添加標準溶液の値はブランク値を差し引いた値を用いる。

\*5 マトリクス添加標準溶液は試験当日のブランク試料の試験溶液を用いて調製する。

\*6 マトリクス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積(又は高さ)の比を求める。

## 7. その他の試験法検討に関連する事項

標準品の安定性については、アセトンで作製した標準原液は4℃下で6ヶ月は安定であった。

## 8. 結論

塩酸酸性条件下、アセトン及びヘキサン混液で抽出後、アセトニトリル/ヘキサン分配により脱脂し、SAX及びPSAの固相カラムで精製する方法を検討した。測定にはLC-MS/MSのESI法を用い、クロメプロップはポジティブモードを、クロメプロップ酸はネガティブモードを採用した。移動相には酢酸含有の水-アセトニトリル系を、カラムにはXbridge C18を用いた。残留基準値濃度あるいは基準値が設定されていない食品種にあつては一律基準濃度の添加回収試験の真度はクロメプロップが81.0～96.7%、クロメプロップ酸が93.0～101.0%であった。また、併行精度はクロメプロップが2.1～14.3%、クロメプロップ酸では1.3～7.2%であった。

## 参考文献

- 1) 農薬抄録「クロメプロップ」：<http://www.acis.famic.go.jp/syouroku/clomeprop/index.htm>
- 2) Ishii R., Takahashi K., Horie M., Simultaneous determination of pesticides residues in crops by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Food Hygiene and Safety Science*, **47**, 201-212 (2006).
- 3) Akiyama Y., Matsuoka T., Mitsuhashi T., Multi-residue screening method of acidic pesticides in agricultural products by liquid chromatography / time of flight mass spectrometry. *J. Pestic. Sci.*, **34**, 265-272 (2009).
- 4) Matsumoto N., Yoshikawa M., Eda K., Kobayashi A., Yokoshima M., Murakami M., Kanekita H., Simple preprocessing method for multi-determination of 235 pesticides residues in cooked ingredients of foods by GC/MS and LC/MS/MS. *Food Hygiene and Safety Science*, **49**, 211-222 (2008).
- 5) Takatori S., Okihashi M., Okamoto Y., Kitagawa Y., Kakimoto S., Murata H., Sumimoto T., Tanama Y., A rapid and easy multiresidue method for the determination of pesticide residues in vegetables, fruits and cereals using liquid chromatography / tandem mass spectrometry. *J. AOAC Int.*, **91**, 871-883 (2008).
- 6) Okamoto Y., Takatori S., Kitagawa Y., Okihashi M., Fukui N., Murata H., Sumimoto T., Tanama Y., Obana H., Determination of pesticides in Chinese dumplings using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Hygiene and Safety Science*, **50**, 10-15 (2009).