

※本報告書は、試験法開発における検討結果を取り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下さい。

食品に残留する農薬等の成分である物質の 試験法開発事業報告書

クロルメコート試験法（畜産物）

クロルメコート試験法（畜水産物）の検討結果

〔緒言〕

1. 目的

クロルメコートは、1959年にミシガン大学と共同でアメリカン・サイアナミッド社（現 BASF コーポレーション）により開発された植物成長調整剤であり、植物体内においてジベレリン生合成過程の初期の段階にあるゲラニルゲラニルニリン酸から *ent*-カウレンへの生合成を抑え、ジベレリンの生合成を阻害することにより成長を抑制すると考えられている。

クロルメコートは、国内では1984年に農薬登録された。海外ではオーストラリア、カナダ、米国、EU等において登録されている。

食品安全委員会ではクロルメコートの日摂取許容量を 0.05 mg/kg 体重/日、急性参照用量を 0.05 mg/kg 体重と設定している。

ポジティブリスト制度が導入されたことに伴い、基準値が牛の筋肉、牛の脂肪及び乳等に 0.05～1 ppm 設定された。LC/MS による農薬等の一斉試験法（畜水産物）の適用検討²⁾において、極性が極めて高いことから十分な回収率が得られなかった。そこで、定量限界が一律基準 0.01 ppm を満たすクロルメコート個別試験法の検討を行った。

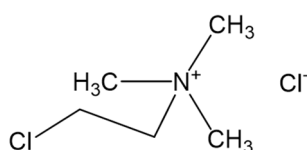
2. 分析対象化合物の構造式及び物理化学的性質

分析対象化合物

和名：クロルメコートクロリド

英名：chlormequat chloride

構造式



分子式：C₅H₁₃Cl₂N

分子量：158.07

CAS NO.：999-81-5

化学名（IUPAC）：2-Chloroethyltrimethylammonium chloride

外観：白色～わずかにうすい黄色、結晶～結晶性粉末または塊

密度：1.241 g/cm³（室温）

融点：236℃（褐色化を伴う）

沸点：測定不能（240℃で分解）

解離定数：完全に解離

蒸気圧：<1×10⁻⁶ Pa（20℃）

水溶解度：>500 g/L（20℃）

有機溶媒溶解度

アセトン 0.13 g/L（20℃）、アセトニトリル 2.95 g/L（20℃）、*n*-オクタノール 9.67 g/L（20℃）、酢酸エチル<0.01 g/L（20℃）、ジクロロエタン 0.07 g/L（20℃）、トルエン <0.01 g/L（20℃）、*n*-へプタン<0.01 g/L（20℃）、メタノール 365 g/L（20℃）

1-オクタノール/水分係数（Log Pow）：log Pow = -3.39（20℃）

土壌吸着係数：K_F^{ads}_{23±2℃}：1.89～4.95、K_F^{ads}_{oc23±2℃}：80～626

[出典]

- ① 独立行政法人農林水産消費安全技術センター（FAMIC），農薬抄録及び評価書，農薬抄録，一般名
クロルメコート（植物成長調整剤）<http://www.acis.famic.go.jp/syouroku/chlormequat%20chloride/index.htm>
- ② 富士フイルム和光純薬 クロルメコート標準品 製品規格書

3. 基準値

クロルメコートとは、クロルメコートクロリドのみとする。

食品名	基準値(ppm)
牛の筋肉	0.3
豚の筋肉	0.3
その他の陸棲哺乳類に属する動物の筋肉	0.3
牛の脂肪	0.1
豚の脂肪	0.1
その他の陸棲哺乳類に属する動物の脂肪	0.1
牛の肝臓	1
豚の肝臓	1
その他の陸棲哺乳類に属する動物の肝臓	1
牛の腎臓	1
豚の腎臓	1
その他の陸棲哺乳類に属する動物の腎臓	1
牛の食用部分	1
豚の食用部分	1
その他の陸棲哺乳類に属する動物の食用部分	1
乳	0.4
鶏の筋肉	0.05
その他の家きんの筋肉	0.05
鶏の脂肪	0.05
その他の家きんの脂肪	0.05
鶏の肝臓	0.1
その他の家きんの肝臓	0.1
鶏の腎臓	0.1
その他の家きんの腎臓	0.1
鶏の食用部分	0.1
その他の家きんの食用部分	0.1
鶏の卵	0.1
その他の家きんの卵	0.1

[実験方法]

1. 試料

検討には、牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳及び鶏の卵を試料として用いた。いずれも東京都内で流通していたものを購入した。

試料及び産地を以下に記載した。

試料名	産地
牛の筋肉	国産
牛の脂肪	国産
牛の肝臓	国産
牛乳	国産
鶏の卵	国産

各試料の採取方法を以下に記載した。

(1) 牛の筋肉

可能な限り脂肪層を除き、試料を細切した後、フードプロセッサーを用いて均一化した。

(2) 牛の脂肪

可能な限り筋肉層を除き、試料を細切した後、フードプロセッサーを用いて均一化した。

(3) 牛の肝臓

試料を細切した後、フードプロセッサーを用いて均一化した。

(4) 牛乳

振とう混和して均一化した。

(5) 鶏の卵

フードプロセッサーを用いて均一化した。

2. 試薬・試液

クロルメコートクロリド標準品：純度 98% (富士フィルム和光純薬製)

アセトン：残留農薬試験用 (富士フィルム和光純薬製)

アセトニトリル：残留農薬試験用 (富士フィルム和光純薬製) 及び LC-MS 用 (富士フィルム和光純薬製)

アルミナ (酸性) ミニカラム (500 mg) : InertSep AL-A (ジーエルサイエンス製)

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) : InertSep PSA (ジーエルサイエンス製)

塩化ナトリウム：残留農薬試験用 (富士フィルム和光純薬製)

塩酸：5 mol/L 塩酸 特級 (富士フィルム和光純薬製)

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム (1 g) : InertSep C₁₈ (ジーエルサイエンス製)

ギ酸：LC-MS 用 (富士フィルム和光純薬製)

強酸性陽イオン交換体ミニカラム (500 mg) : InertSep SCX (ジーエルサイエンス製)

グラファイトカーボンミニカラム (500 mg) : InertSep GC (ジーエルサイエンス製)

グラファイトカーボン/エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム (500 mg/500 mg) : InertSep GC/PSA (ジーエルサイエンス製)

ケイソウ土カラム (5 mL 保持用) : InertSep K-solute (ジーエルサイエンス製)

酢酸：LC-MS 用 (富士フィルム和光純薬製)

酢酸アンモニウム：高速液体クロマトグラフ用 (富士フィルム和光純薬製)

酢酸エチル：残留農薬試験用 (富士フィルム和光純薬製)

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 (200 mg) : Oasis HLB (ウォーターズ製)

n-ヘキサン：残留農薬試験用（富士フィルム和光純薬製）

メタノール：残留農薬試験用（富士フィルム和光純薬製）及び LC-MS 用（富士フィルム和光純薬製）

標準原液：クロルメコトクロリド標準品 10 mg を精秤し、メタノールで溶解して 1,000 mg/L 溶液を調製した。

検量線用標準溶液：標準原液をアセトニトリルで適宜希釈し、0.000125～0.075 mg/L の各溶液を調製した。

添加用標準溶液①：標準原液をメタノールで希釈して 1 mg/L 溶液を調製した。

添加用標準溶液②：標準原液をメタノールで希釈して 10 mg/L 溶液を調製した。

添加用標準溶液③：標準原液をメタノールで希釈して 30 mg/L 溶液を調製した。

添加用標準溶液④：標準原液をメタノールで希釈して 40 mg/L 溶液を調製した。

添加用標準溶液⑤：標準原液をメタノールで希釈して 100 mg/L 溶液を調製した。

ポリプロピレン製遠心管：100 mL（AGC テクノグラス製）、15 mL（コーニング製）

3. 装置

ホモジナイザー：ヒスコトロン NS-52（マイクロテック・ニチオン製）

フードプロセッサ：MK-K81（パナソニック製）

濃縮装置：TurboVap® LV（バイオタージ製）

振とう機：SR-2WD（タイテック製）

遠心分離器：AX-321（トミー精工製）

アスピレーター：MDA-015（アルバック機工製）

吸引マニホールド：GL-SPE吸引マニホールド（ジーエルサイエンス製）

LC-MS/MS

装置	型式	会社
MS	Xevo TQD	Waters
LC	ACQUITY H-CLASS	Waters
データ処理	MassLynx V.4.1 SCN962	Waters

4. 測定条件

LC-MS

LC 条件				
カラム	Scherzo SW-C18（内径 2.0 mm、長さ 100 mm、粒子径 3 μm：インタクト社製）			
移動相流速（mL/min）	0.20			
注入量（μL）	5			
カラム温度（℃）	40			
移動相	A 液：2 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 B 液：メタノール			
グラジエント条件	時間（分）	A 液（%）	B 液（%）	
	0	80	20	
	1	80	20	
	3	50	50	
	5	2	98	
	8	2	98	
	8.1	80	20	
	13	80	20	

MS 条件	
測定モード	SRM、選択反応モニタリング
イオン化モード	ESI (+)
キャピラリ電圧 (kV)	3.0
ソース温度 (°C)	150
脱溶媒温度 (°C)	450
コーンガス	窒素、50 L/hr
脱溶媒ガス	窒素、800 L/hr
コリジョンガス	アルゴン
定量イオン (m/z)	MS/MS: +122.2→58.1 [コーン電圧 46 (V)、コリジョンエネルギー 24 (eV)]
定性イオン (m/z)	MS/MS: +122.2→59.1 [コーン電圧 46 (V)、コリジョンエネルギー 18 (eV)]
保持時間 (min)	3.2

5. 定量

標準原液をアセトニトリルで希釈して、0.000125、0.00025、0.000375、0.0005、0.000625、0.00075、0.00125、0.0025、0.00375、0.005、0.00625、0.0075、0.01、0.0125、0.015、0.0185、0.02、0.0225、0.025、0.03、0.0375、0.05、0.0625 及び 0.075 mg/L の標準溶液を調製した。この溶液 5 µL を LC-MS/MS に注入して、得られたピーク面積を用いた絶対検量線法で定量した。

6. 添加試料の調製

(1) 牛の筋肉 (添加濃度 : 0.3 mg/kg)

試料 10.0 g に添加用標準溶液③0.1 mL (メタノール溶液) を添加しよく混合した後、30 分間放置した。

牛の筋肉 (添加濃度 : 0.01 mg/kg)

試料 10.0 g に添加用標準溶液①0.1 mL (メタノール溶液) を添加しよく混合した後、30 分間放置した。

(2) 牛の脂肪 (添加濃度 : 0.1 mg/kg)

試料 10.0 g を採り、約 40°C で加温して融解させたものに添加用標準溶液②0.1 mL (メタノール溶液) を添加してよく混合した後、放置 (室温) して再度凝固させた後、30 分間放置した。

牛の脂肪 (添加濃度 : 0.01 mg/kg)

試料 10.0 g を採り、約 40°C で加温して融解させたものに添加用標準溶液①0.1 mL (メタノール溶液) を添加してよく混合した後、放置 (室温) して再度凝固させた後、30 分間放置した。

(3) 牛の肝臓 (添加濃度 : 1 mg/kg)

試料 10.0 g に添加用標準溶液⑤0.1 mL (メタノール溶液) を添加しよく混合した後、30 分間放置した。

牛の肝臓 (添加濃度 : 0.01 mg/kg)

試料 10.0 g に添加用標準溶液①0.1 mL (メタノール溶液) を添加しよく混合した後、30 分間放置した。

(4) 牛乳 (添加濃度 : 0.4 mg/kg)

試料 10.0 g に添加用標準溶液④0.1 mL (メタノール溶液) を添加しよく混合した後、30 分間放置した。

牛乳 (添加濃度 : 0.01 mg/kg)

試料 10.0 g に添加用標準溶液①0.1 mL (メタノール溶液) を添加しよく混合した後、30 分間放置した。

(5) 鶏の卵 (添加濃度 : 0.1 mg/kg)

試料 10.0 g に添加用標準溶液②0.1 mL (メタノール溶液) を添加しよく混合した後、30 分間放置した。

鶏の卵 (添加濃度 : 0.01 mg/kg)

試料 10.0 g に添加用標準溶液①0.1 mL (メタノール溶液) を添加しよく混合した後、30 分間放置した。

7. 試験溶液の調製

概要

クロルメコートクロリドを試料から塩化ナトリウム及びギ酸酸性下メタノールで抽出し、アセトニトリル/ヘキサン分配で脱脂後、グラファイトカーボン/エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラムで精製し、LC-MS/MSで定量及び確認した。

(1) 抽出

試料10.0 gを100 mLポリプロピレン製遠心管に採り、塩化ナトリウム1 g、1 vol%ギ酸10 mLを加え、ホモジナイズした後、メタノール50 mLを加え、さらにホモジナイズした。毎分3,000回転で5分間遠心分離し、上澄液を採取した。残留物にメタノール25 mLを加え、ホモジナイズした後、毎分3,000回転で5分間遠心分離した。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とした。

抽出液5 mLを15 mLポリプロピレン製遠心管に採り、40 °C以下で窒素吹き付け濃縮装置を用いて溶媒を除去した。残留物に*n*-ヘキサン5 mLおよび*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル5 mLを加え、超音波処理により溶解し、5分間振とうした。静置した後、アセトニトリル層を分取した。*n*-ヘキサン層に*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル5 mLを加え、上記と同様の操作を繰り返し、アセトニトリル層を合わせ、40 °C以下で窒素吹き付け濃縮装置を用いて1 mL程度まで濃縮した。

(2) 精製

グラファイトカーボン/エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム [InertSep GC/PSA (500 mg/500 mg/6 mL)] に 0.1 mol/L 塩酸 10 mL 及びアセトニトリル 20 mL を注入し、流出液は捨てた。このカラムに (1) で得られた溶液を注入した後、容器をアセトニトリル 2 mL で洗い、カラムに注入し、さらにアセトニトリル 6 mL をカラムに注入し、溶出液を採り、アセトニトリルを加え、正確に 10 mL としたものを試験溶液とした。

[分析法フローチャート]

秤 取

↓ 試料 10.0 g

メタノール抽出

↓ 塩化ナトリウム 1 g 及び 1 vol%ギ酸 10 mL を加えホモジナイズ

↓ メタノール 50 mL を加えホモジナイズ

↓ 遠心分離 (毎分 3,000 回転、5 分間)

↓ 残留物にメタノール 25 mL を加えホモジナイズ

↓ 遠心分離 (毎分 3,000 回転、5 分間)

↓ 上澄液を合わせる

↓ メタノール 100 mL 定容

↓ 抽出液 5 mL を分取し、濃縮

濃縮 (溶媒除去)

↓

アセトニトリル／ヘキサン分配（脱脂）

- ↓ *n*-ヘキサン 5 mL 及び *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 5 mL を加え振とう
- ↓ アセトニトリル層を分取
- ↓ *n* ヘキサン飽和アセトニトリル 5 mL を加え振とう
- ↓ アセトニトリル層を分取し、先のアセトニトリルと合わせ、濃縮

濃縮（1 mL 程度まで）

↓

グラファイトカーボン/エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲル積層ニカラム [InertSep

GC/PSA（500 mg/500 mg/6 mL）]

- ↓ 0.1 mol/L 塩酸 10 mL 及びアセトニトリル 20 mL でコンディショニング
- ↓ 1 mL まで濃縮した溶液を注入
- ↓ 容器をアセトニトリル 2 mL で洗いこむ
- ↓ アセトニトリル溶液 6 mL で溶出（全溶出液を採取）
- ↓ アセトニトリルで正確に 10 mL に定容

試験溶液

↓

LC-MS/MS

8. マトリックス添加標準溶液の調製

ブランク試験溶液 0.5 mL を採り、窒素気流下で溶媒を除去した後、各検討対象食品の添加回収試験における回収率 100%相当濃度の溶媒標準溶液 0.5 mL を加えて溶解したものをマトリックス添加標準溶液とした。

[結果及び考察]

1. 測定条件の検討

(1) MS条件の検討

スキャン測定において、クロルメコートクロリドは ESI (+) モードでイオン化した。測定時のマススペクトルを図 1 に示した。クロルメコート (カチオン) (m/z 122.2 [M]⁺) のスペクトルが得られた。既報²⁾⁷⁾における検出イオンと一致した。

クロルメコート (カチオン) のうち最も強度の高い m/z 122.2 をプリカーサーイオンとした場合のプロダクトイオンスペクトルを図 2 及び図 3 に示した。 m/z 122.2 をプリカーサーイオンとした場合のプロダクトイオンとして、 m/z 58.1、59.1 及び 63.1 が観測された。SRM 測定を行った結果、高い S/N が得られた m/z 58.1 を定量用イオンに、 m/z 59.1 を定性用イオンとすることとした。

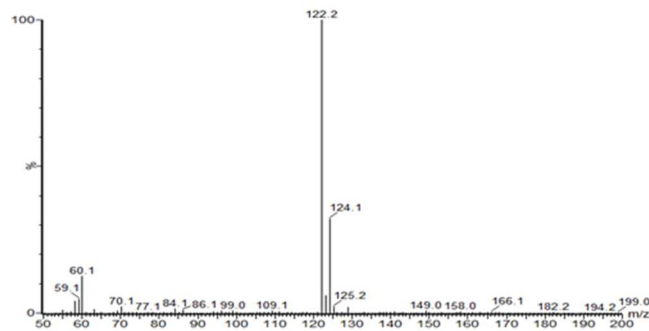


図 1 クロルメコートクロリドのマススペクトル
スキャン範囲： 50～1,000 m/z
測定条件： ESI (+)
CV=46 V (CV : cone voltage)
クロルメコートクロリド： 10 mg/L

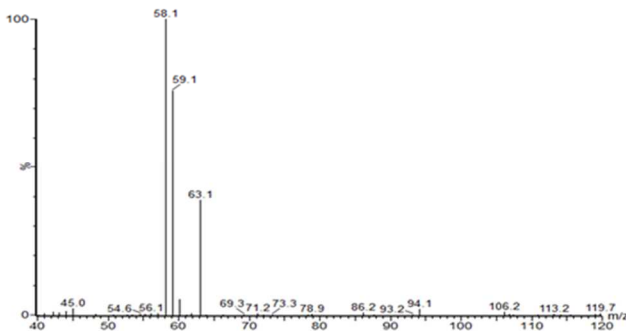


図 2 クロルメコートクロリド
のプロダクトイオン
スペクトル
プリカーサーイオン： m/z 122.2
測定条件： ESI (+)
CV=46 V, CE=24 eV (定量用)
(CV : cone voltage, CE : collision energy)
クロルメコートクロリド： 0.1 mg/L

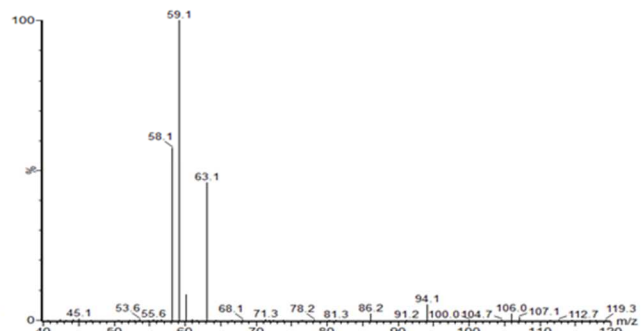


図 3 クロルメコートクロリド
のプロダクトイオン
スペクトル
プリカーサーイオン： m/z 122.2
測定条件： ESI (+)
CV=46 V, CE=18eV (定性用)
(CV : cone voltage, CE : collision energy)
クロルメコートクロリド： 0.1 mg/L

(2) LC条件の検討

分析カラムは、汎用されているオクタデシルシリル化シリカゲル (ODS) 充填カラム Accucore aQ (内径 2.1 mm、長さ 100 mm、粒子径 2.6 μm : サーモフィッシャーサイエンティフィック製)、InertSustain AQ-C18 (内径 2.1 mm、長さ 100 mm、粒子径 5 μm : ジーエルサイエンス製)、InertSustain C18 (内径 2.1 mm、長さ 100 mm、粒子径 5 μm : ジーエルサイエンス製)、Mightysil RP-18 (内径 2.1 mm、長さ 100 mm、粒子径 3 μm : 関東化学製) 及びオクタデシル基の他に陰陽の両イオン官能基を個別に導入した全多孔性シリカゲル充填カラム Scherzo SW-C18 (内径 2.0 mm、長さ 100 mm、粒子径 3 μm : インタクト製) を比較検討した結果、Scherzo SW-C18 以外のカラムではクロルメコートクロリドの保持時間が 1~1.5 分と早く、保持が不十分であった。Scherzo SW-C18 を使用することで、クロルメコートクロリドの保持及び再現性について良好な結果が得られた。

移動相条件については、ギ酸及び酢酸アンモニウム溶液について検討したところ、ギ酸溶液ではクロルメコートクロリドの保持が不十分となった。また、アセトニトリル混液よりもメタノール混液のほうが良好なピーク形状であったため、酢酸アンモニウム溶液及びメタノールとの混液について検討した。酢酸アンモニウムの添加濃度については、1~10 mmol/L を比較したところ、4 mmol/L 以上でクロルメコートクロリドの保持が不十分となった。2 mmol/L で保持及びピーク形状が良好となったことから、移動相は 2 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液及びメタノールを用いることとした。

アイソクラティックの条件を検討したが、クロルメコートクロリドのピーク強度を確保するためには酢酸アンモニウム溶液及びメタノール (1 : 9) 混液程度が必要であったが、保持時間が 1 分と早かった。ピーク形状及び強度を確保するためグラジエント測定条件を検討した。

2 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液及びメタノール溶液 (4 : 1) を 1 分保持し、3 分まで (1 : 1)、5 分までに (1 : 49) のグラジエント条件で分析カラムからの試料成分流出のため、(1 : 49) で 3 分間保持した場合、クロルメコートクロリドの保持時間は 3.2 分であった。

(3) 検量線

図 4-1 に 0.000125~0.00075 mg/L 及び図 4-2 に 0.0125~0.075 mg/L の濃度範囲で作成した検量線を示した。検量線の決定係数は、0.999 以上であり良好な直線性を示した。

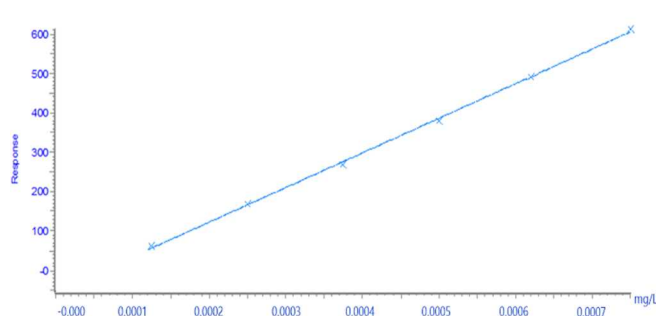


図 4-1 クロルメコートクロリド検量線の例

$$y = 878.0182x - 28871$$
$$r^2 = 0.99985$$

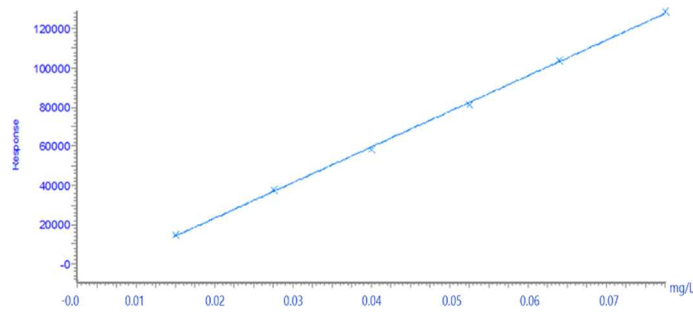


図 4-2 クロルメコートクロリド検量線の例

$$y = 1874.22x - 12743.5$$
$$r^2 = 0.99983$$

(4) 定量限界

定量限界の算出結果を以下に示した。

クロルメコートクロリド : $\left[\frac{10(\text{mL})}{0.5(\text{g})} \times \frac{0.0025(\text{ng})}{5(\mu\text{L})} \right] = 0.01 \text{ mg/kg}$

2. 試験溶液調製法の検討

(1) 抽出溶媒の検討

抽出溶媒としてアセトニトリル、アセトン、アセトン及び *n*-ヘキサン (1:1) 混液、酢酸エチル及びメタノールについて検討した。水 10 mL にクロルメコートクロリド 5 mg/L (メタノール溶液) 0.1 mL を添加し、各溶媒 50 mL、25 mL で 1 分間ホモジナイズ後、毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離した。得られた上層を 100 mL に定容後、5 mL 分取し、アセトニトリルに置換後、LC-MS/MS で測定した。表 1 に添加したクロルメコートクロリドの回収結果を示した。

アセトニトリル、アセトン及びメタノールで 100% の回収率が得られたが、脂肪を十分に分散可能なアセトン及びメタノールを用いて検討を行うこととした。

表 1 各溶媒からのクロルメコートクロリドの回収結果

化合物	回収率(%)		
	50 mL (1回目)	25 mL (2回目)	合計
アセトニトリル	96	4	100
アセトン	96	4	100
アセトン・ <i>n</i> -ヘキサン(1:1)	4	4	8
酢酸エチル	6	5	11
メタノール	95	5	100

添加量 : 0.5 µg (n=1)

(2) 抽出時分解の有無の確認

牛の肝臓に標準品を添加後、放置中に分解が起きるか確認した。

牛の肝臓 10.0 g にクロルメコートクロリド 5 mg/L (メタノール溶液) 0.1 mL を添加し、各時間放置後、水 10 mL を加え、アセトンまたはメタノール抽出後、アセトニトリル/ヘキサン分配で脱脂し、グラファイトカーボン/エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラムで精製を行った後、試験溶液とした。表 2 に添加したクロルメコートクロリドの回収結果を示した。

いずれも 58~84 % と十分な回収が得られなかった。

表 2 抽出時放置時間による分解の確認

放置時間 (分)	回収率(%)	
	アセトン	メタノール
0	71	84
10	60	78
20	58	71
30	58	70

添加量 : 0.5 µg (n=1)

次にアルカリ及び報告例⁴⁾⁶⁾のある酸の添加による回収率の向上を検討した。

牛の肝臓 10.0 g にクロルメコートクロリド 5 mg/L (メタノール溶液) 0.1 mL を添加し、各溶液 10 mL を加え、30 分放置し、アセトンまたはメタノール抽出後、アセトニトリル/ヘキサン分配で脱脂し、グラファイトカーボン/エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラムで精製を行った後、試験溶液とした。表 3 に添加したクロルメコートクロリドの回収結果を示した。

いずれの溶液を加えた場合もアセトンはメタノールよりもクロルメコートクロリドの回収率が低かった。そこで、抽出にはクロルメコートクロリドの安定性が高いメタノールを用い、また、分解抑

制のため回収率が 92%と良好であったギ酸を加えることとした。

表 3 アルカリ及び酸溶液添加による回収率への影響

放置時間 (分)	回収率(%)	
	アセトン	メタノール
1 vol%アンモニア	47	86
0.1 mol/L 塩酸	87	90
1 vol%ギ酸	80	92
1 vol%酢酸	78	89
1 vol%リン酸	74	90

添加量 : 0.5 µg (n=1)

塩析効果による回収率の向上を検討した。

牛の肝臓 10.0 g に、クロルメコートクロリド 5 mg/L (メタノール溶液) 0.1 mL を添加後、1 vol%ギ酸溶液 10 mL を加え、30 分放置し、塩化ナトリウムを 0.1~3 g 加えメタノール抽出後、アセトニトリル/ヘキサン分配で脱脂し、グラファイトカーボン/エチレンジアミン-N-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラムで精製を行った後、試験溶液とした。回収結果を表 4 に示した。

その結果、回収率は 1 及び 2 g 加えた場合に良好であった。秤量しやすく量の少ない 1 g を加えることとした。

表 4. 塩化ナトリウム添加による回収率への影響

塩化ナトリウム(g)	0.1	0.5	1	2	3
回収率(%)	94	94	99	99	98

添加量 : 0.5 µg (n=1)

(3) 脱脂操作の検討

① アセトニトリル/ヘキサン分配

クロルメコートクロリドの 0.05 mg/L (アセトニトリル溶液) 0.5 mL を n-ヘキサン 30 mL に加え、n-ヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL で分液ロートを用いて 3 回抽出を行った場合と、15 mL ポリプロピレン製遠心管にクロルメコートクロリドの 0.05 mg/L (アセトニトリル溶液) 0.5 mL を加え、溶媒を除去後、n-ヘキサン 5 mL を加え、n-ヘキサン飽和アセトニトリル 5 mL で 3 回抽出を行った場合の結果を表 5 に示した。

ポリプロピレン製遠心管では 2 回の抽出で 100%の回収が得られたが、分液ロートでは 3 回抽出が必要であった。ガラス製分液ロートであったことから、クロルメコートクロリドの器壁への吸着が考えられた。簡易・迅速化のため、溶媒量が少なく、器壁への吸着の恐れのないポリプロピレン製遠心管でアセトニトリル/ヘキサン分配を行うこととした。

牛の脂肪 10.0 g をメタノールで抽出し、100 mL に定容後、その 5 mL を分取し、溶媒を除去後、同様に操作し、溶媒を除去したところ、顕著な脂肪の残留は見られず、脱脂効果が十分であることを確認した。

表5 アセトニトリル/ヘキサン分配の検討

器具	転溶回数			回収率(%)
	1回	2回	3回	
ガラス製分液ロート (100 mL)	43	41	16	100
ポリプロピレン製遠心管 (15 mL)	97	3	0	100

添加量 : 0.025 µg (n=1)

(4) 精製法検討

① グラファイトカーボンミニカラムによる精製 [InertSep GC (500 mg/6 mL)]

色素除去のためグラファイトカーボンミニカラムについて検討した。

カラムをアセトニトリル 20 mL で予備洗浄した後、クロルメコートクロリド 0.05 mg/L (アセトニトリル溶液) 0.5 mL を負荷し、アセトニトリルで溶出したときの溶出状況を表 6 に示した。クロルメコートクロリドは 10 mL で 100%回収された。

表6 グラファイトカーボンミニカラムからの溶出状況。

ミニカラム	アセトニトリル溶出液量(mL)							回収率(%)
	0-5	5-10	10-15	15-20	20-25	25-30	30-35	
InertSep GC (500 mg/6 mL)	96	4	0	0	0	0	0	100

添加量 : 0.025 µg (n=1)

② 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 [InertSep PSA (500 mg/6 mL)]

色素及び脂肪酸の除去のためにエチレンジアミン-N-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムについて検討した。

カラムをアセトニトリル 20 mL で予備洗浄した後、クロルメコートクロリド 0.05 mg/L (アセトニトリル溶液) 0.5 mL を負荷し、アセトニトリルで溶出したときの溶出状況を表 7 に示した。クロルメコートクロリドは 100%回収されたが、溶出液量は 15 mL 必要であった。

表7 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からの溶出状況

ミニカラム	アセトニトリル溶出液量(mL)							回収率(%)
	0-5	5-10	10-15	15-20	20-25	25-30	30-35	
InertSep PSA (500 mg/6 mL)	95	4	1	0	0	0	0	100

添加量 : 0.025 µg (n=1)

次に、鶏の卵における色素除去効果及びクロルメコートクロリドの回収率を確認した。

鶏の卵における 0.1 mg/kg 添加相当濃度のマトリックス添加標準溶液を作成し、カラムをアセトニトリル 20 mL で予備洗浄した後、1 mL を負荷し、アセトニトリル 15 mL で溶出した。40°C以下で窒素を吹き付けて 10 mL 程度まで濃縮し、アセトニトリルで 10 mL に定容後、LC-MS/MS で測定した。n=3 で実施した結果を表 8 に示した。その結果、38、71 及び 85%と回収率にバラつきが生じた。

表8 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からの回収率

試料	回収率(%)		
	1	2	3
鶏の卵	38	71	85

試料マトリックス及び固相に残留している金属等がクロルメコートクロリドの溶出挙動に影響を与えていると考えられた。固相を酸で洗浄することによる回収率の安定を検討した。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に各濃度の塩酸溶液 10 mL 及びアセトニトリル 20 mL で予備洗浄した後、クロルメコートクロリド 0.05 mg/L (アセトニトリル溶液) 0.5 mL を負荷し、アセトニトリル溶液で溶出したときの溶出状況を表 9 に示した。

塩酸濃度 1 mol/L で洗浄した場合以外では、アセトニトリル 10 mL までで 100%溶出した。そこで、塩酸濃度が低く、調製しやすい 0.1 mol/L 塩酸 10 mL でカラムを洗浄することとした。

表9 塩酸洗浄を行った場合のエチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムからの溶出状況

塩酸濃度 (mol/L)	アセトニトリル溶出液量(mL)							回収率(%)
	0-5	5-10	10-15	15-20	20-25	25-30	30-35	
0.05	94	6	0	0	0	0	0	100
0.1	98	2	0	0	0	0	0	100
0.5	98	2	0	0	0	0	0	100
1	96	3	1	0	0	0	0	100

添加量 : 0.025 µg (*n*=1)

鶏の卵における 0.1 mg/kg 添加相当濃度のマトリックス添加標準溶液を作成し、カラムを 0.1 mol/L 塩酸 10 mL 及びアセトニトリル 20 mL で予備洗浄した後、1 mL を負荷し、アセトニトリル 10 mL で溶出した。40°C以下で窒素を吹き付けて 10 mL 程度まで濃縮し、アセトニトリルで 10 mL に定容後、LC-MS/MS で測定した。*n*=3 で実施した結果を表 10 に示した。その結果、回収率にばらつきは見られなかった。

表 10 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からの回収率

試料	回収率(%)		
	1	2	3
鶏の卵	98	99	99

③ グラファイトカーボン及びエチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムを組合せての検討

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では、鶏の卵の色素を除去することは困難であった。そこでグラファイトカーボンミニカラムと組合せて検討した。

操作の簡易化のため、グラファイトカーボン/エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム InertSep GC/PSA (500 mg/500 mg/6 mL) を用いた。

グラファイトカーボン/エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラムを 0.1 mol/L 塩酸 10 mL 及びアセトニトリル 20 mL で予備洗浄した後、クロルメコートクロリド 0.05 mg/L (アセトニトリル溶液) 0.5 mL を負荷し、アセトニトリル 5 mL ずつで溶出したときの溶出状況を表 11 に示した。その結果、アセトニトリル 5 mL で溶出が可能であった。

表 11 グラファイトカーボン/エチレンジアミン-N-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラムからの溶出状況

ミニカラム	アセトニトリル溶出液量(mL)							回収率(%)
	0-5	5-10	10-15	15-20	20-25	25-30	30-35	
InertSepGC/PSA (500 mg/500 mg)	100	0	0	0	0	0	0	100

添加量：0.025 µg (n=1)

次にグラファイトカーボン/エチレンジアミン-N-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラムを用いて、マトリックスの影響を確認するため、牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳及び鶏の卵における 0.01 mg/kg 添加相当濃度（溶液中濃度 0.0005 mg/L）でのマトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対する面積比を求め、表 12 に示した。

その結果、面積比は 0.93~1.06 とマトリックスの影響を十分に軽減可能であることを確認した。

表 12 試料マトリックスの影響

試料	ピーク面積比 ¹⁾
	GC/PSA 500 mg/500 mg
牛の筋肉	1.04
牛の脂肪	0.96
牛の肝臓	1.06
牛乳	0.93
鶏の卵	1.06

1) マトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積の比 (n=2)

3. 添加回収試験

牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳及び鶏の卵の5食品を試料に用いて、実験方法の7. 試験溶液の調製に従って添加回収試験を実施した。

添加回収試験における回収率 100%相当の溶媒標準溶液、各食品のブランク試料及び添加試料のクロマトグラムを図 5~14 に示した。また、各食品のブランク試料のスキャン測定によるトータルイオンクロマトグラムを図 15 に示した。

(1) 選択性

選択性の検討結果を表13に示した。検討したいずれの試料においても、クロルメコートクロリドの定量を妨害するピークは認められず、選択性は良好であった。

表13 選択性の評価

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 [検出限界] (mg/kg)	基準値 (ppm)	妨害ピークの許容範囲の評価			ピーク面積(高さ) ^{*1}						選択性 の評価 ^{*3}		
					評価濃度 (ppm)	評価基準	面積又は 高さの別	ブランク			マトリックス添加標準溶液 ^{*2}				面積(高さ) 比(a)/(b)	
								n=1	n=2	平均(a)	n=1	n=2	平均(b)			
1	クロルメコートクロリド	牛の筋肉	0.01	0.3	基準値	0.3	< 0.100	面積	2	5	4	27664	27864	27764	0.000	○
		牛の脂肪	0.01	0.1	基準値	0.1	< 0.100	面積	0	0	0	8254	8266	8260	0.000	○
		牛の肝臓	0.01	1.	基準値	1.	< 0.100	面積	5	3	4	84179	83924	84052	0.000	○
		牛乳	0.01	0.4	基準値	0.4	< 0.100	面積	1	3	2	34133	34158	34146	0.000	○
		鶏の卵	0.01	0.1	基準値	0.1	< 0.100	面積	0	0	0	8266	8245	8256	0.000	○

*1 ブランク試料、標準溶液の順に注入して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。)

*2 試料中の濃度が「評価濃度」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(マトリックス添加標準溶液)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。

*3 面積(高さ)比が、妨害ピークの許容範囲の評価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。

(2) 真度、精度及び定量限界

基準値及び定量限界濃度である0.01 mg/kgでの添加回収を行った。

真度及び併行精度の検討結果を表14に示した。0.01 mg/kgでは真度89~109%、併行精度は4~8%（目標値：真度70~120%及び併行精度25>）、0.1 mg/kgでは真度106~107%、併行精度は1~4%（目標値：真度70~120%、併行精度15>）、0.3、0.4及び1 mg/kgでは真度86~93%、併行精度は2~6%（目標値：真度70~120%、併行精度10>）といずれも目標値に適合する結果であった。

0.01 mg/kg添加試料溶液でのS/N比の平均値は17~20であり、全ての食品でS/N \geq 10を満たした。

表14 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 [検出限界] (mg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	定量限界 の評価 ¹	検量線			回収率 (%)					真度 (%)	併行精度 (RSD%)	S/N ²		
							傾き	切片	r ² 値	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5			Max.	Min.	平均値
1	クロルメコトクロリド	牛の筋肉	0.01	0.3	0.3	—	1969	-3216	0.9988	97	95	88	95	92	93.2	3.6	—	—	
		牛の筋肉	0.01	0.3	0.01	S/N	1020	-58	0.9989	88	92	95	90	82	89.3	5.4	18	15	17
		牛の脂肪	0.01	0.1	0.1	—	1597	-765	0.9999	101	111	111	103	109	107.0	4.4	—	—	
		牛の脂肪	0.01	0.1	0.01	S/N	978	-71	0.9990	102	101	119	105	117	108.6	8.0	19	22	20
		牛の肝臓	0.01	1.	1.	—	1874	-12744	0.9998	83	86	85	87	86	85.5	1.6	—	—	
		牛の肝臓	0.01	1.	0.01	S/N	794	-26	0.9978	97	101	94	90	83	92.8	7.3	16	18	17
		牛乳	0.01	0.4	0.4	—	1919	-2127	0.9956	84	97	95	93	97	93.2	5.6	—	—	
		牛乳	0.01	0.4	0.01	S/N	903	-44	0.9996	106	95	101	116	98	103.3	7.9	18	17	18
		鶏の卵	0.01	0.1	0.1	—	1631	-2926	0.9998	106	104	106	105	107	105.6	1.1	—	—	
		鶏の卵	0.01	0.1	0.01	S/N	918	-56	0.9995	95	91	97	98	89	93.9	4.2	20	16	18

*1 S/Nを求める必要がある場合には「S/N」と表示される。

*2 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を求める。

(3) 試料マトリックスの測定への影響

試料マトリックスの測定への影響について検討した結果を表15に示した。添加回収試験における回収率100%相当濃度になるように調製したマトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積比を求めた。面積比は0.90~1.06あり、いずれの試料においても、顕著なマトリックスの測定への影響は認められなかった。

添加回収試験における真度を表15で求めたピーク面積比で除して補正真度を求め、表16に示した。補正真度は86~114%であり、目標値（真度70~120%）に適合する結果であった。

表15 試料マトリックスの測定への影響

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 [検出限界] (mg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	標準溶液 濃度 ¹ (mg/L)	ピーク面積(高さ) ²								
							面積又は 高さの別	ブランク ³	マトリックス添加標準溶液 ⁴			溶媒標準溶液			ピーク面積 (高さ)比 ⁵
							n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均			
1	クロルメコトクロリド	牛の筋肉	0.01	0.3	0.3	0.015	面積	2	27882	27684	27781	27823	27895	27859	1.00
		牛の筋肉	0.01	0.3	0.01	0.0005	面積	1	744	805	774	668	817	743	1.04
		牛の脂肪	0.01	0.1	0.1	0.005	面積	4	8252	8275	8260	8227	8648	8438	0.98
		牛の脂肪	0.01	0.1	0.01	0.0005	面積	0	774	761	768	808	795	802	0.96
		牛の肝臓	0.01	1.	1.	0.05	面積	3	85173	83692	84430	89496	93737	91617	0.92
		牛の肝臓	0.01	1.	0.01	0.0005	面積	1	778	636	706	625	713	669	1.06
		牛乳	0.01	0.4	0.4	0.02	面積	1	34033	34903	34467	38139	38202	38171	0.90
		牛乳	0.01	0.4	0.01	0.0005	面積	1	757	765	760	777	852	815	0.93
		鶏の卵	0.01	0.1	0.1	0.005	面積	0	8287	8223	8255	8343	8122	8233	1.00
		鶏の卵	0.01	0.1	0.01	0.0005	面積	0	746	779	763	756	774	765	1.00

*1 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(マトリックス添加標準溶液)及び溶媒で調製した標準溶液(溶媒標準溶液)を作成する。

*2 マトリッ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。)

*3 ブランクにピークが認められた場合には、マトリッ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。

*4 マトリッ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。

*5 マトリッ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。

表 16 補正真度

化合物名	食品名	添加濃度 (mg/kg)	真度 (%)	ピーク面積比	補正真度 (%)
クロルメコート クロリド	牛の筋肉	0.3	93	1.00	93
		0.01	89	1.04	86
	牛の脂肪	0.1	107	0.98	109
		0.01	109	0.96	114
	牛の肝臓	1	86	0.92	93
		0.01	93	1.06	88
	牛乳	0.4	93	0.90	103
		0.01	103	0.93	111
	鶏の卵	0.1	106	1.00	106
		0.01	94	1.00	94

4. その他の試験法検討に関連する事項

採用しなかった検討事項について以下に示す。

(1) 脱脂方法の検討

① ケイソウ土カラム [InertSep K-solute (5 mL 保持用)]

操作の簡便性向上及びエマルジョンによる回収率低下を考慮し、ケイソウ土カラムクロマトグラフィーによる脱脂を検討した。

5 mL 保持用カラムに、0.05 mg/L (メタノール溶液) 1 mL 及びメタノール 4 mL を負荷し、室温条件下-0.02 Mpa で 5 分間吸引乾燥後、アセトニトリル 15 mL 1 分画及び 10 mL 9 分画で溶出し、濃縮後、アセトニトリルを加え 10 mL に定容後 LC-MS/MS で測定したときの結果を 17 に示した。クロルメコートクロリドは 105 mL で溶出したが、濃縮液量が多くなることから迅速性を高めるため採用しなかった。

表 17 多孔性ケイソウ土カラムからの溶出状況

溶出液量 (mL)	回収率(%)
1 - 15	1
15- 25	14
25-35	18
35- 45	13
45- 55	9
55- 65	10
65- 75	11
75- 85	9
85- 95	8
95-105	7
合計	100

添加量 : 0.05 µg (n=1)

(2) 精製法の検討

グラファイトカーボンミニカラムのみでは精製が不十分であったことから、組み合わせて精製を行うため、クロルメコート試験法（農産物）で使用されているアルミナミニカラム及び強酸性陽イオン交換体ミニカラム、報告例⁵⁻⁷⁾のあるオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム及びジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムについて検討を加えた。

① アルミナ（酸性）ミニカラム [InertSep AL-A (500 mg/6 mL)]

カラムをアセトニトリル20 mLで予備洗浄した後、クロルメコートクロリド0.05 mg/L（アセトニトリル溶液）0.5 mLを負荷し、アセトニトリルで溶出したときの溶出状況を表18に示した。クロルメコートクロリドは5 mLで100%溶出された。

表 18 アルミナ（酸性）ミニカラムの溶出状況

ミニカラム	充てん量	アセトニトリル溶出液量(mL)						回収率 (%)
		1-5	5-10	10-15	15-20	20-25	25-30	
InertSep AL-A	500 mg	100	0	0	0	0	0	100

添加量：0.025 µg (n=1)

② オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム精製 [InertSepC18 (1 g/6 mL)]

脂質の除去のため、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムについて検討した。

カラムをアセトニトリル 20 mL で予備洗浄した後、クロルメコートクロリド 0.05 mg/L（アセトニトリル溶液）0.5 mL を負荷し、アセトニトリルで溶出したときの溶出状況を表 19 に示した。クロルメコートクロリドは 5 mL で 100%回収された。

表 19 オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムからの溶出状況

ミニカラム	アセトニトリル溶出液量(mL)							回収率(%)
	0-5	5-10	10-15	15-20	20-25	25-30	30-35	
InertSep C ₁₈ (1 g/6 mL)	100	0	0	0	0	0	0	100

添加量：0.025 µg (n=1)

③ 強酸性陽イオン交換体ミニカラム [InertSep SCX (500 mg/6 mL)]

カラムをアセトニトリル20 mLで予備洗浄した後、クロルメコートクロリド0.05 mg/L（アセトニトリル溶液）0.5 mLを負荷し、アセトニトリルで溶出した。クロルメコートクロリドは溶出されなかった。

④ 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 [Oasis HLB (200 mg/6 mL)]

カラムをアセトニトリル20 mLで予備洗浄した後、クロルメコートクロリド0.05 mg/L（アセトニトリル溶液）0.5 mLを負荷し、アセトニトリルで溶出したときの溶出状況を表20に示した。クロルメコートクロリドは5 mLで100%溶出された。

表20 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からの溶出状況

ミニカラム	アセトニトリル溶出液量(mL)						回収率 (%)
	0-5	5-10	10-15	15-20	20-25	25-30	
Oasis HLB (200 mg/6 mL)	100	0	0	0	0	0	100

添加量：0.025 µg (n=1)

④ 各ミニカラムの試料マトリックスの影響確認

いずれのミニカラムにおいても鶏の卵の色素を除去できなかったことから、グラファイトカーボンミニカラムと組合せて検討を行った。グラファイトカーボンミニカラムにアルミナ（酸性）ミニカラム、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムまたはジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムを組合せ、牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳及び鶏の卵の5食品におけるマトリックス添加標準溶液を作成し、溶媒標準溶液に対する面積比を求め、表21に示した。

面積比は牛の脂肪で0.71~0.81であり、マトリックスの測定への影響が認められた。

表21 試料マトリックスの影響

試料	ピーク面積比 ¹⁾		
	GC 500 mg+AL-A500 mg	GC 500 mg+C ₁₈ 1 g	GC 500 mg +HLB 200 mg
牛の筋肉	0.96	0.93	0.92
牛の脂肪	0.81	0.79	0.71
牛の肝臓	0.97	0.95	0.96
牛乳	1.05	1.00	0.94
鶏の卵	0.83	0.94	0.88

1) マトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積の比 (n=2)

5. 考察

クロルメコートクロリドを脂肪とともに抽出するため、メタノールを抽出溶媒に用いた。

牛の肝臓での検討結果により、抽出の際に塩化ナトリウム及びギ酸を加えて抽出することとした。

カラムによる精製では、充てん剤が一種類のカラムのみでは精製が不十分であったことから、試料溶液中の色素及び脂肪酸等を除去するため、グラファイトカーボン及びエチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルが積層されているグラファイトカーボン/エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラムを用いた。

検討した試験法を用いて、牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳及び鶏の卵の5食品を試料として、添加回収試験を実施した。その結果、選択性は良好でいずれの試料においても測定を妨害するようなピークは認められなかった。0.01 mg/kgでは真度89~109%、併行精度は4~8%、0.1 mg/kgでは真度106~107%、併行精度は1~4%、0.3、0.4及び1 mg/kgでは真度86~93%、併行精度は2~6%の良好な結果が得られたことから、本試験法は、畜産物に適用可能であると判断された。

【結論】

畜産物中のクロルメコート試験法を検討した。クロルメコートクロリドを試料から塩化ナトリウム及びギ酸酸性下メタノールで抽出し、アセトニトリル/ヘキサン分配で脱脂した。グラファイトカーボン/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で精製した後、LC-MS/MSで定量及び確認した。

牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳及び鶏の卵の5食品に適用した結果、0.01 mg/kgでは真度89~109%、併行精度は4~8%、0.1 mg/kgでは真度106~107%、併行精度は1~4%、0.3、0.4及び1 mg/kgでは真度86~93%、併行精度は2~6%の良好な結果が得られた。また、定量限界として、0.01 mg/kgを設定可能であることが確認された。

【参考文献】

- 1) 農薬評価書 クロルメコート, 2017年12月食品安全委員会農薬専門調査会.
- 2) 農産物対象のGC/MS一斉分析法及びLC/MS一斉分析法, 並びに畜産物対象のGC/MS一斉分析

法及び LC/MS 一斉分析法の平成 17 年度検討結果, 詳細 3, <https://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/>

syoku-anzen/zanryu3/dl/061227-4.pdf.

- 3) J. Hau, et al, Determination of the plant growth regulator chlormequat in food by liquid chromatography-electrospray ionisation tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, 878, 77-86 (2000).
- 4) M. E. Poulsen, et al, Determination of chlormequat in pig serum and sow milk by LC-MS/MS, *Anal. Bioanal. Chem.*, 389, 1799-1804(2007).
- 5) N. Tiziana, et al., Fast analysis of quaternary ammonium pesticides in food and beverages using cation-exchange chromatography coupled with isotope-dilution high-resolution mass spectrometry, *J. Sep. Sci.*, 40, 3928-3937(2017)
- 6) Z. Luo, et al, Multi-residue analysis of plant growth regulators and pesticides in traditional Chinese medicines by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry, *Anal. Bio. Chem.*, 411, 2447-2460 (2019).
- 7) R. Castro, Determination of Chlormequat in Fruit Samples by Liquid Chromatography-Electrospray-Mass Spectrometry/Mass Spectrometry, *J. AOAC Int*, 84, 1903-1908(2001).

① 添加回収試験における代表的なクロマトグラム

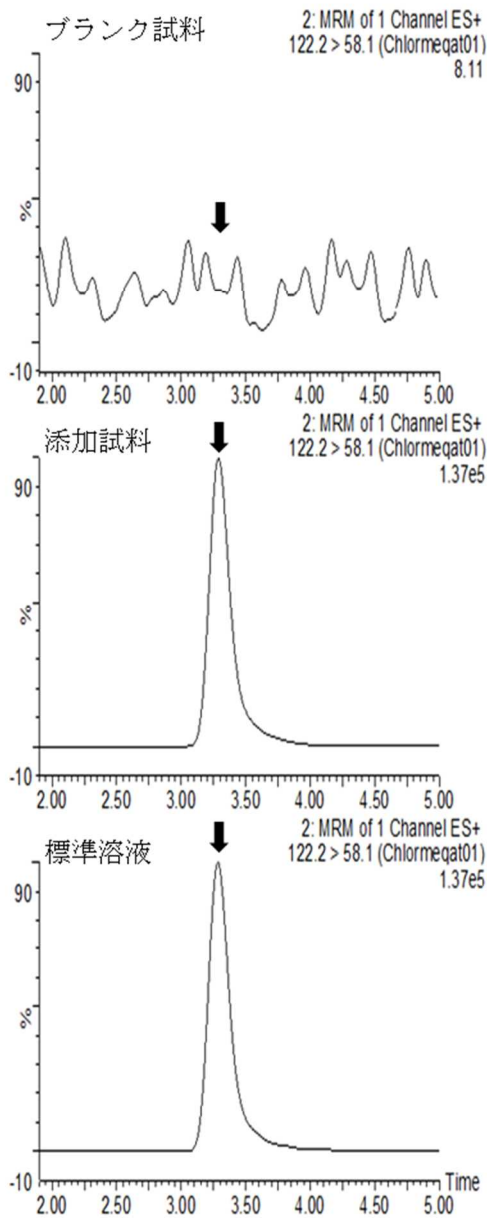


図 5 牛の筋肉の SRM クロマトグラム
 (クロルメコートクロリド : m/z +122.2→58.1)
 添加濃度 : 0.3 mg/kg

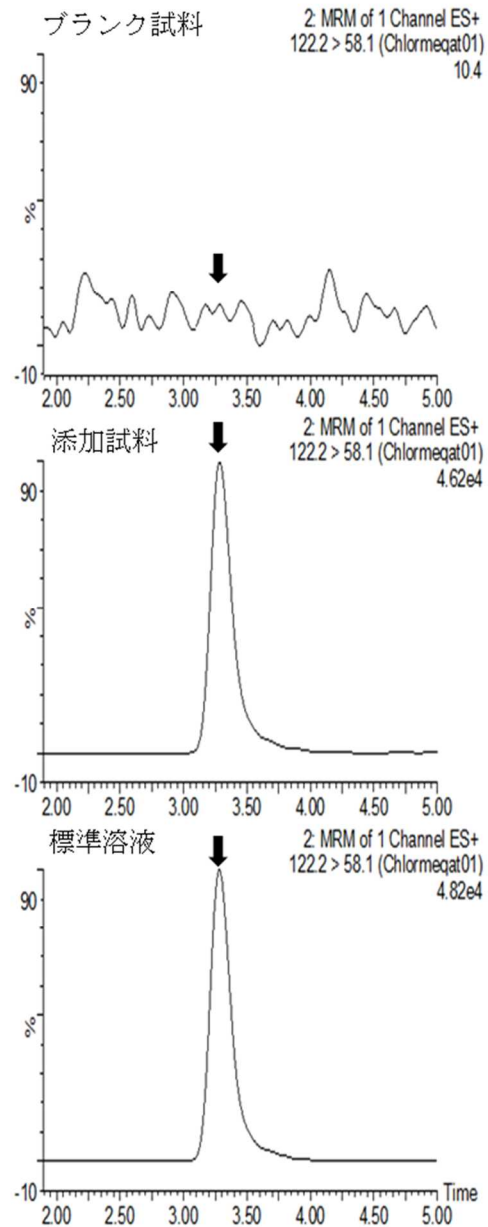


図 6 牛の脂肪の SRM クロマトグラム
 (クロルメコートクロリド : m/z +122.2→58.1)
 添加濃度 : 0.1 mg/kg

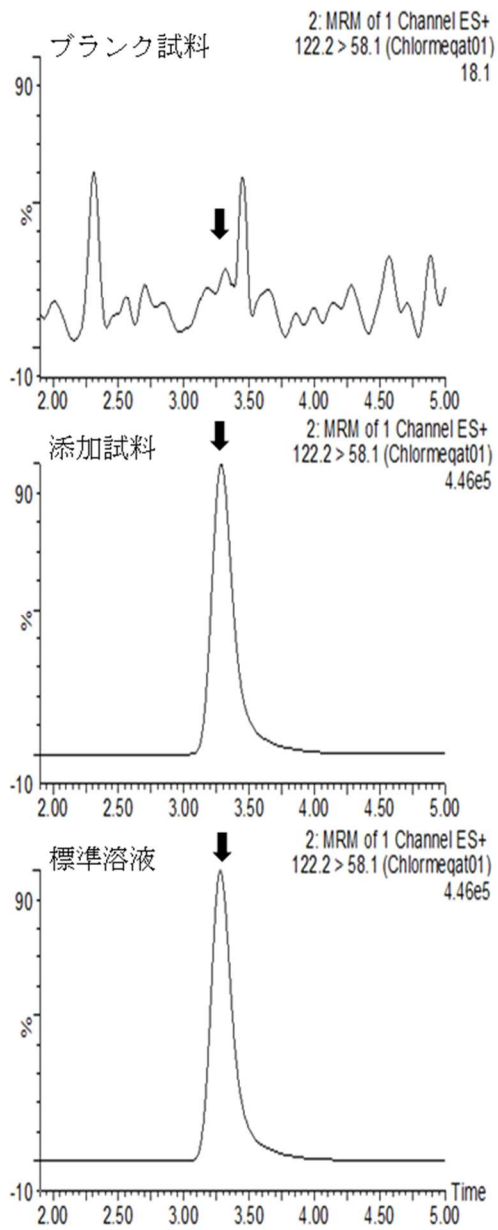


図 7 牛の肝臓の SRM クロマトグラム
 (クロルメコートクロリド: m/z +122.2→58.1)
 添加濃度: 1 mg/kg

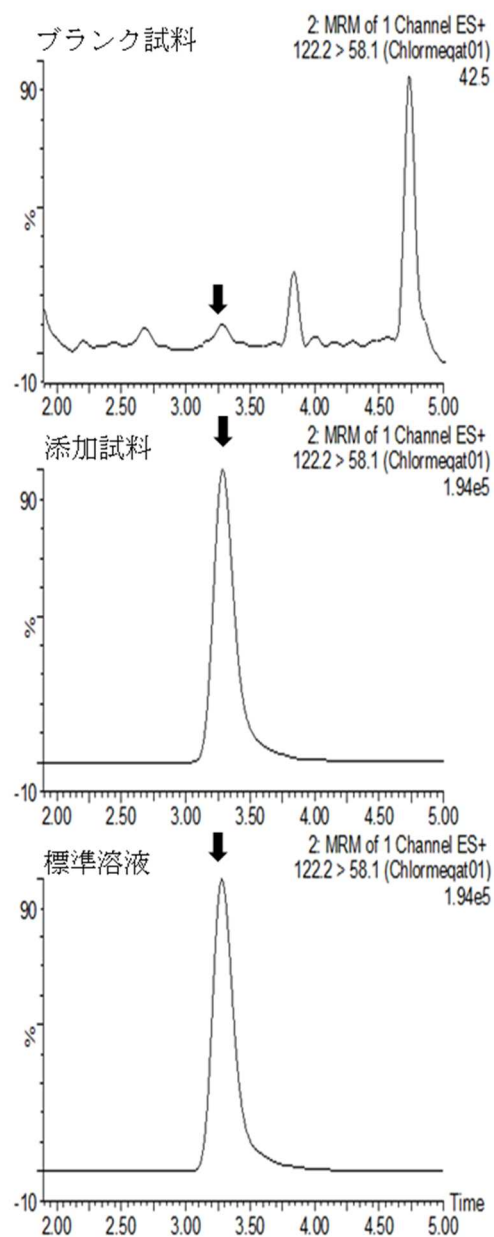


図 8 牛乳の SRM クロマトグラム
 (クロルメコートクロリド: m/z +122.2→58.1)
 添加濃度: 0.4 mg/kg

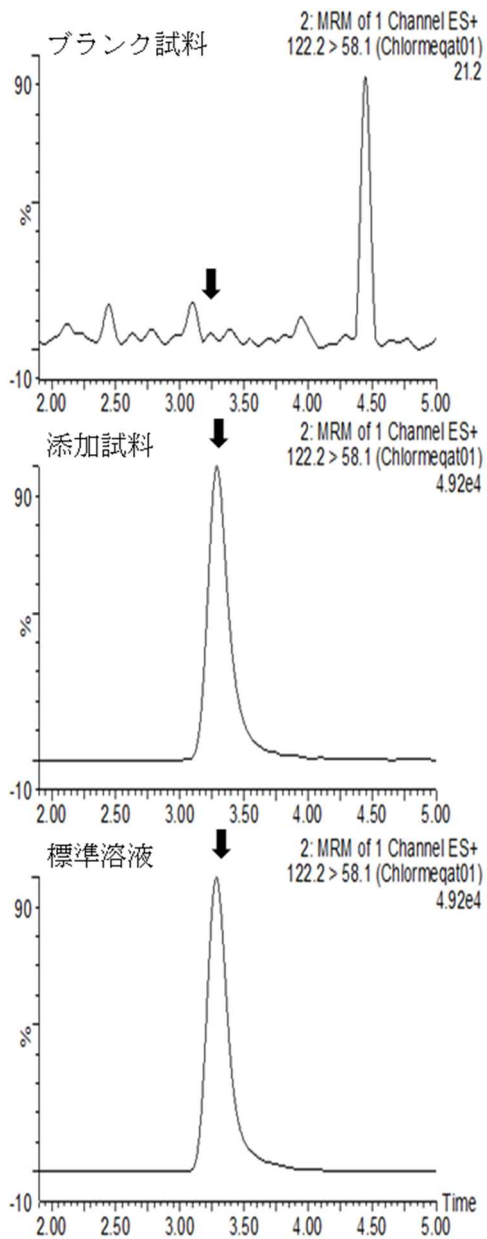


図 9 鶏の卵の SRM クロマトグラム
 (クロルメコートクロリド : m/z +122.2→58.1)
 添加濃度 : 0.1 mg/kg

② 定量限界における代表的なクロマトグラム (定量限界濃度)

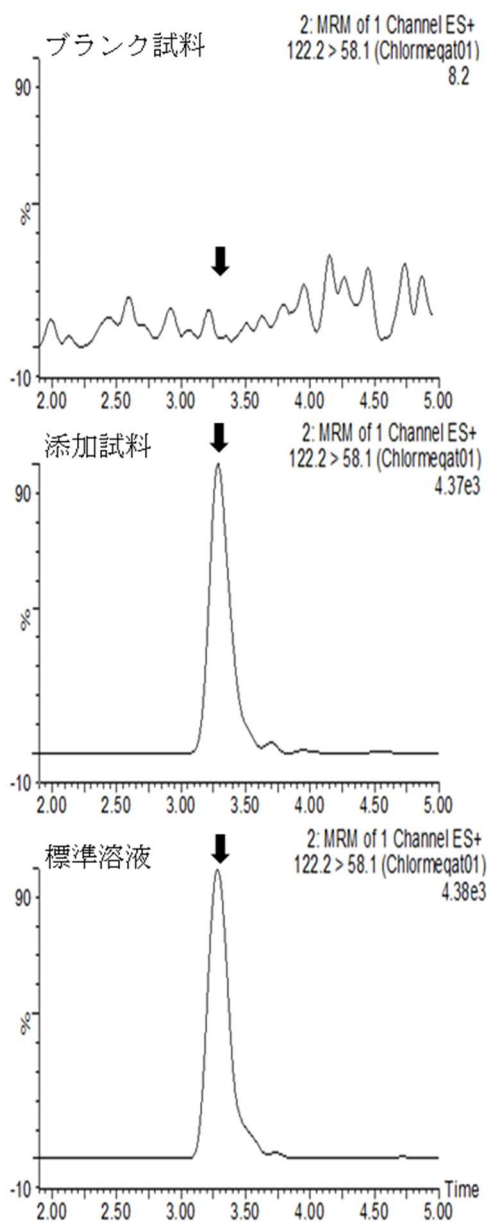


図 10 牛の筋肉の SRM クロマトグラム
 (クロルメコートクロリド : m/z +122.2→58.1)
 添加濃度 : 0.01 mg/kg

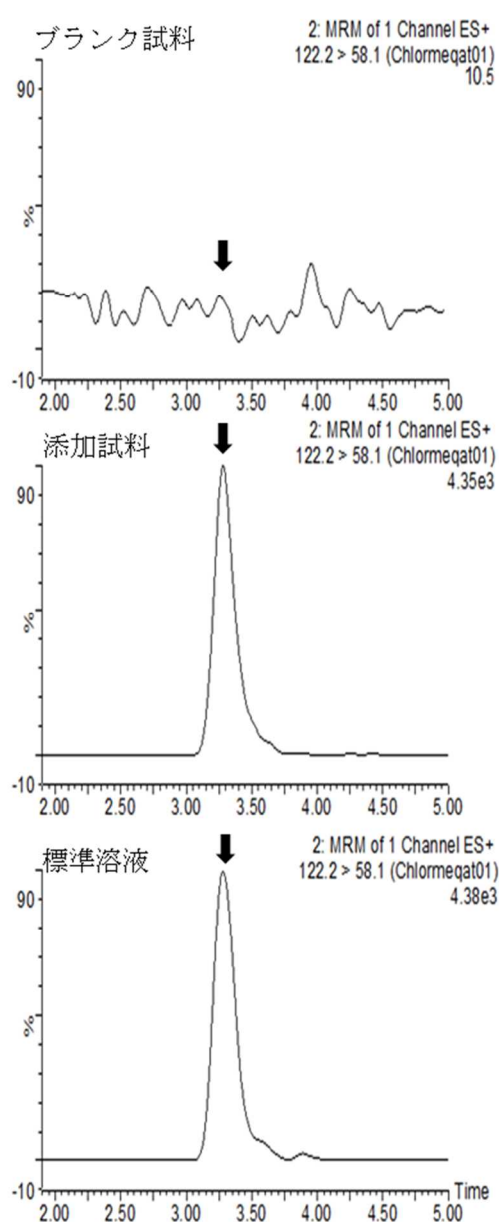


図 11 牛の脂肪の SRM クロマトグラム
 (クロルメコートクロリド : m/z +122.2→58.1)
 添加濃度 : 0.01 mg/kg

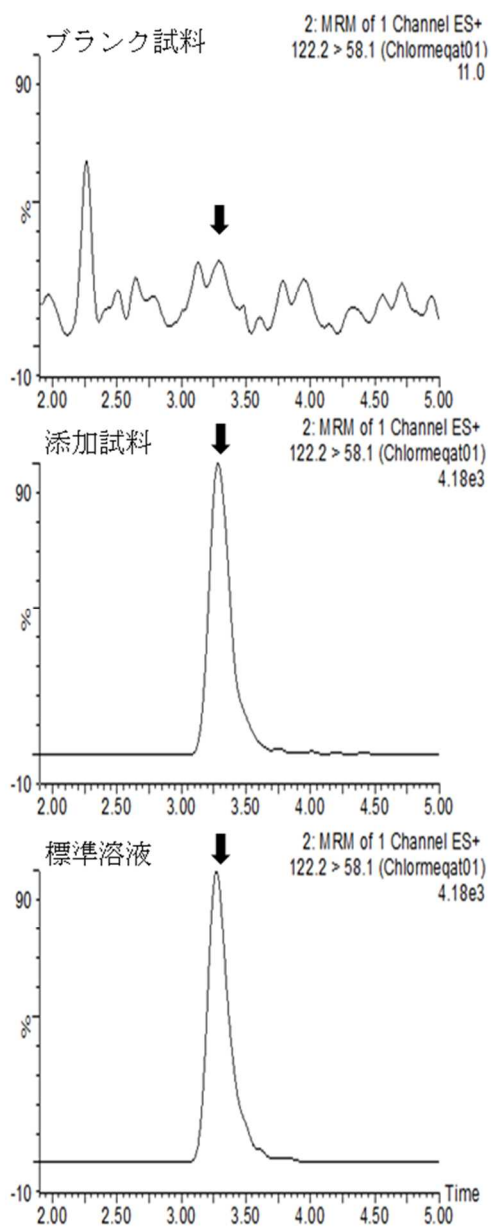


図 12 牛の肝臓の SRM クロマトグラム
 (クロルメコートクロリド: m/z +122.2→58.1)
 添加濃度: 0.01 mg/kg

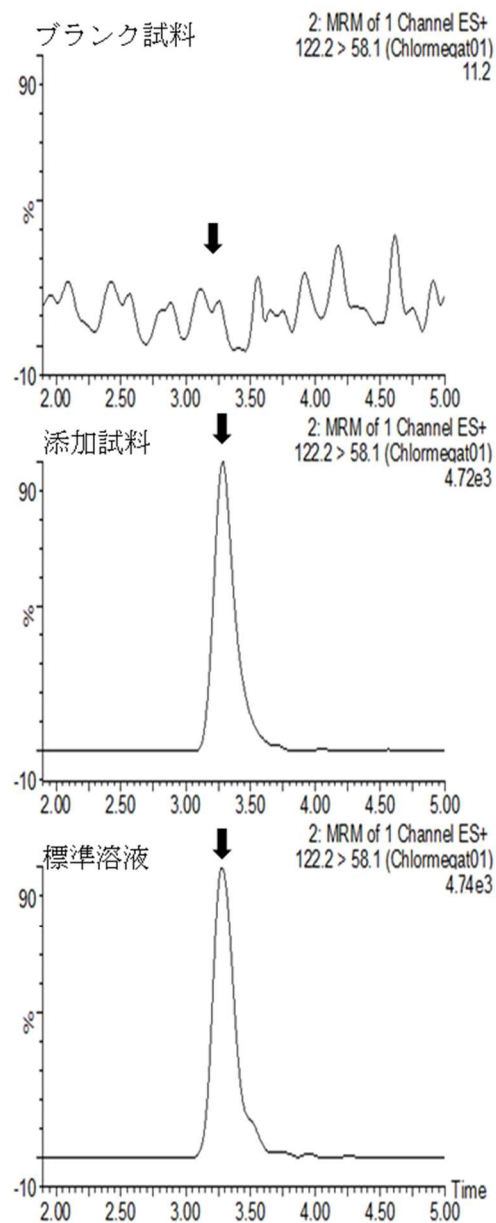


図 13 牛乳の SRM クロマトグラム
 (クロルメコートクロリド: m/z +122.2→58.1)
 添加濃度: 0.01 mg/kg

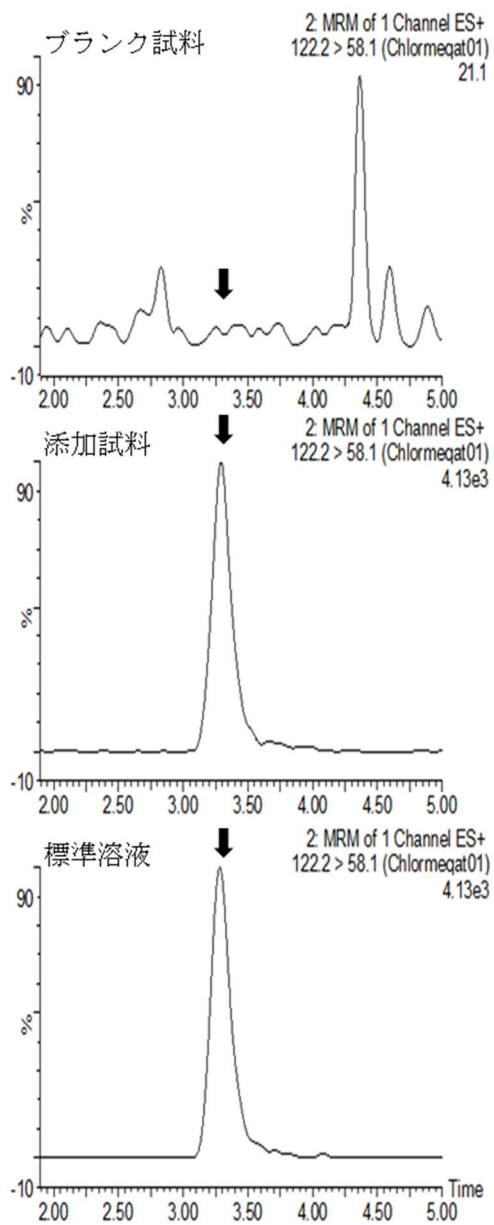


図 14 鶏の卵の SRM クロマトグラム
(クロルメコートクロリド : m/z +122.2→58.1)
添加濃度 : 0.01 mg/kg

③ ブランク試料の代表的なトータルイオンクロマトグラム

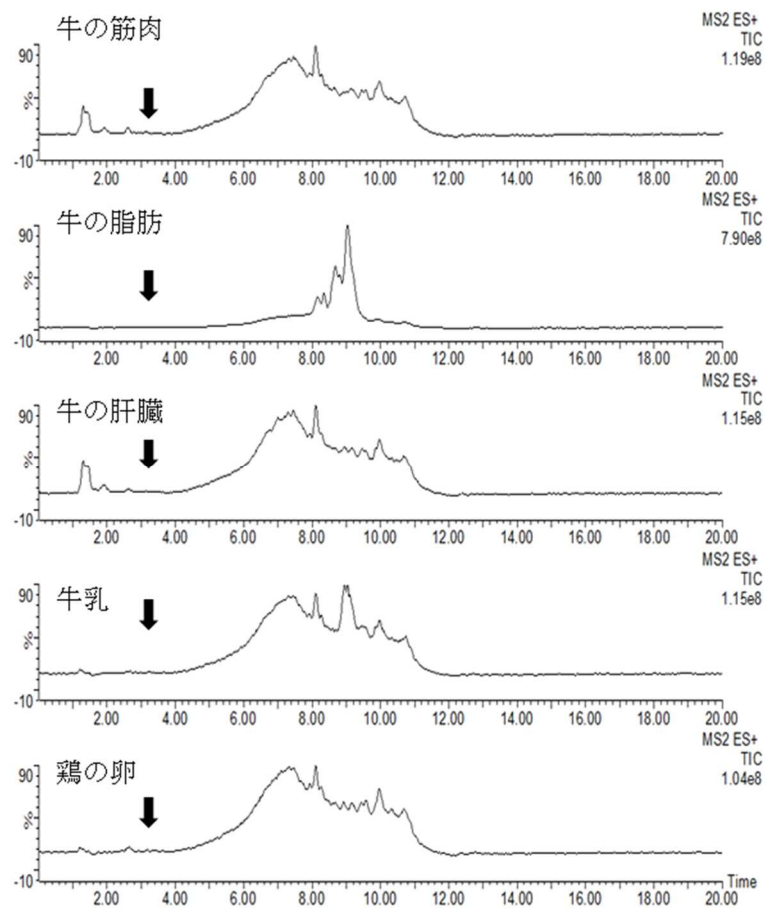


図 15 ブランク試料のトータルイオンクロマトグラム
測定条件： CV=46 V (CV : corn voltage)
(スキャン範囲： 50~1,000 m/z)