

クロメプロップ試験法（畜水産物）

1. 分析対象化合物

クロメプロップ

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）]

2. 装置

液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計（LC-MS/MS）

3. 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。

クロメプロップ標準品 本品はクロメプロップ 97%以上を含む。

クロメプロップ酸標準品 本品はクロメプロップ酸 99%以上を含む。

4. 試験溶液調製法

1) 抽出

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 を量り採る。

これに（はちみつを除く）、アセトン及び *n*-ヘキサン（1：2）混液 100 mL、1 mol/L 塩酸 6 mL 及び塩化ナトリウム 8 g の順に加える。はちみつの場合は、1 mol/L 塩酸 6 mL を加えて溶解した後、アセトン及び *n*-ヘキサン（1：2）混液 100 mL 及び塩化ナトリウム 8 g の順に加える。ホモジナイズした後、毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離し、有機層を採る。残留物及び水層にアセトン及び *n*-ヘキサン（1：2）混液 100 mL を加え、ホモジナイズした後、毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離する。得られた有機層を合わせ、アセトン及び *n*-ヘキサン（1：2）混液で正確に 200 mL とする。この 20 mL（脂肪では 40 mL）を採り、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 3 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（1：49）混液 3 mL を加えて溶かす。

2) 精製

トリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム（500 mg）の下部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（500 mg）を接続し、メタノール、アセトン及び *n*-ヘキサン各 10 mL を順次注入し、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（1：49）混液 10 mL を注入し、流出液は捨てる。次いで、アセトン及び *n*-ヘキサン（3：17）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水（1：1）混液に溶解し、正確に 2 mL としたものをクロメプロップ試験溶液とする。

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）を取り外し、トリ

メチルアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム (500 mg) にアセトン及びメタノール各 10 mL を順次注入し、流出液は捨てる。このカラムに 0.4 vol%ギ酸・メタノール溶液 10 mL を注入し、溶出液を 40℃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水 (1 : 1) 混液に溶解し、正確に 2 mL としたものをクロメプロップ酸試験溶液とする。

5. 検量線の作成

クロメプロップ標準品及びクロメプロップ酸標準品のアセトニトリル及び水 (1 : 1) 混液の溶液を数点調製し、それぞれ 10 µL を 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、定量限界に相当する試験溶液中濃度は 0.005 mg/L (クロメプロップとして) である。

6. 定量

試験溶液 10 µL を LC-MS/MS に注入し、5 の検量線でクロメプロップ及びクロメプロップ酸の含量を求める。ただし、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求める場合には、次式によりクロメプロップ酸を含むクロメプロップの含量を求める。

クロメプロップ (クロメプロップ酸を含む。) の含量 (ppm) = A + B × 1.302

A : クロメプロップの含量 (ppm)

B : クロメプロップ酸の含量 (ppm)

7. 確認試験

LC-MS/MS により確認する。

8. 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℃

移動相 : 0.01 vol%酢酸及び 0.01%酢酸・アセトニトリル溶液の混液 (1 : 1) で 0.5 分間保持した後、(1 : 9) までの濃度勾配を 5.5 分間で行い、2 分間保持する。

イオン化モード : クロメプロップ ESI (+)、クロメプロップ酸 ESI (-)

主なイオン (*m/z*) :

クロメプロップ プリカーサーイオン 326、324、プロダクトイオン 120

クロメプロップ酸 プリカーサーイオン 249、プロダクトイオン 177

プリカーサーイオン 247、プロダクトイオン 175

保持時間の目安 : クロメプロップ 7分、クロメプロップ酸 5分

9. 定量限界

クロメプロップ 0.01 mg/kg

クロメプロップ酸 0.01 mg/kg (クロメプロップとして)

10. 留意事項

1) 試験法の概要

クロメプロップ及び代謝物であるクロメプロップ酸を試料から塩酸酸性及び飽和食塩水存在下、アセトン及び *n*-ヘキサンの混液で抽出し、アセトニトリル/ヘキサン分配で脱脂する。トリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム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を連結した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クロメプロップ酸を分析対象化合物としない場合には、4. 試験溶液調製法の2) 精製において、クロメプロップ酸試験溶液の調製に関する操作は実施しなくても良い。

②クロメプロップ及びクロメプロップ酸の 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。

クロメプロップ

定量イオン (*m/z*) : プリカーサーイオン 324、プロダクトイオン 120

定性イオン (*m/z*) : プリカーサーイオン 326、プロダクトイオン 120

クロメプロップ酸

定量イオン (*m/z*) : プリカーサーイオン 247、プロダクトイオン 175

定性イオン (*m/z*) : プリカーサーイオン 249、プロダクトイオン 177

③鶏卵及び乳では、抽出時に最初に塩酸を添加するとゲル化することがあるので、アセトン及び *n*-ヘキサン (1 : 2) 混液、1 mol/L 塩酸及び塩化ナトリウムの順に試料に添加する。

④はちみつでは、最初に 1 mol/L 塩酸を添加して溶解してから、アセトン及び *n*-ヘキサン (1 : 2) 混液及び塩化ナトリウムの順に添加する。

11. 参考文献

なし

12. 類型

C