

## クレトジム試験法

### 1. 分析対象化合物

クレトジム、クレトジムスルホキシド、クレトジムスルホン

### 2. 装置

紫外分光光度型検出器付き高速液体クロマトグラフ及び液体クロマトグラフ・質量分析計を用いる。

### 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。

(±)-2-[ (E)-1-[ (E)-3-クロロアリルオキシイミノ]プロピル]-5-[2-(エチルスルフォニル)プロピル]-3-ヒドロキシシクロヘキサ-2-エノン (以下「クレトジムスルホン体」という。) クレトジムを5. 試験溶液の調製のb 酸化及びc 精製法と同様に操作して得る。

### 4. 標準品

クレトジム 本品はクレトジム98%以上を含む。

分解点 本品の分解点は120°Cである。

### 5. 試験溶液の調製

#### a 抽出法

豆類及び種実類の場合は、検体を420 µmの標準網ふるいを通るように粉碎した後、その10.0 gを量り採り、水20 mLを加え、2時間放置する。

野菜の場合は、検体約1 kgを精密に量り、必要に応じ適量の水を量って加え、細切均一した後、検体20.0 gに相当する量を量り採る。

これにアセトン100 mLを加え、3分間細砕した後、ケイソウ土を1 cmの厚さに敷いたろ紙を用いてすり合わせ減圧濃縮器中に吸引ろ過する。ろ紙上の残留物を採り、アセトン50 mLを加え、上記と同様に操作して、ろ液をその減圧濃縮器中に合わせ、40°C以下で約30 mLに濃縮する。

#### b 酸化

a 抽出法で得られた溶液に酢酸エチル30 mL、3 mol/L硫酸1 mL及びm-クロロ過安息香酸50 mgを加え、栓をして時々振り混ぜながら50°Cで1分間放置する。これに10%チオ硫酸ナトリウム溶液30 mLを加え、振とう機を用いて5分間振とうする。この溶液を300 mLの分液漏斗に移し、水70 mL、塩化ナトリウム20 g及び酢酸エチル70 mLを加え、振とう機

を用いて5分間振り混ぜた後、放置し、酢酸エチル層を300 mLの三角フラスコに移す。水層に酢酸エチル100 mLを加え、上記と同様に操作して酢酸エチル層を上記の三角フラスコに合わせる。これに適量の無水硫酸ナトリウムを加え、時々振り混ぜながら15分間放置した後、すり合わせ減圧濃縮器中へろ過する。次いで酢酸エチル20 mLを用いて三角フラスコを洗い、その洗液でろ紙上の残留物を洗う操作を2回繰り返す。両洗液を減圧濃縮器中に合わせ、40°C以下で酢酸エチルを除去する。この残留物にアセトン及び*n*-ヘキサンの混液（3：17）5 mLを加えて溶かす。

#### c 精製法

##### (1) プロピルスルホンシル化シリカゲルカラム及びトリメチルアミノ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

プロピルスルホンシル化シリカゲルミニカラム（1,000 mg）を下に連結した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*n*-ヘキサン10 mLを注入し、流出液は捨てる。このカラムにb 酸化で得られた溶液を注入し、流出液は捨てる。次いでアセトン及び*n*-ヘキサンの混液（3：17）20 mLを注入し、流出液は捨てる。次いでアセトン及び*n*-ヘキサンの混液（1：1）20 mLを注入し、流出液をすり合わせ減圧濃縮器中に採り、40°C以下でアセトン及び*n*-ヘキサンを除去する。この残留物に酢酸エチル10 mLを加えて溶かす。

##### (2) アルミナカラムクロマトグラフィー

中性アルミナミニカラム（1,710 mg）に酢酸エチル10 mLを注入し、流出液は捨てる。このカラムに(1) プロピルスルホンシル化シリカゲルカラム及びトリメチルアミノ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で得られた溶液を注入し、流出液は捨てる。次いで酢酸エチル10 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで酢酸エチル及びメタノールの混液（19：1）50 mLを注入し、流出液をすり合わせ減圧濃縮器中に採り、40°C以下で酢酸エチル及びメタノールを除去する。この残留物にアセトニトリルを加えて溶かし、正確に2 mLとして、これを試験溶液とする。

## 6. 操作法

### a 定性試験

次の操作条件で試験を行う。試験結果はクレトジムスルホン体と一致しなければならない。

#### 操作条件

カラム充てん剤 オクタデシルシリル化シリカゲル（粒径5 µm）を用いる。

クロマトグラフ管 内径4.6 mm、長さ250 mmのステンレス管を用いる。

カラム温度 40°C

検出器 波長254 nmで操作する。

移動相 アセトニトリル及び0.01%トリクロロ酢酸を用い、クレトジムスルホン体が約10分で流出する流速に調整する。

濃度勾配 アセトニトリル及び0.01%トリクロロ酢酸の混液（3：7）からアセトニトリルまで15分間の濃度勾配で送液する。次にアセトニトリルを5分間送液した後、アセトニトリル及び0.01%トリクロロ酢酸の混液（3：7）に1分間で戻し、そのまま7分間送液する。

b 定量試験

a 定性試験と同様の操作条件で得られた試験結果に基づき、ピーク高法又はピーク面積法により定量を行い、クレトジムスルホン体の含量を求める。さらに次式によりクレトジムの含量を求める。

$$\text{クレトジム（代謝物を含む。）} = \text{クレトジムスルホン体の含量（ppm）} \times 0.92$$

c 確認試験

a 定性試験と同様の操作条件で液体クロマトグラフィー・質量分析を行う。試験結果はクレトジムスルホン体と一致しなければならない。また、必要に応じ、ピーク高法又はピーク面積法により定量を行う。

7. 定量限界

0.01 mg/kg

8. 留意事項

クレトジムは、クレトジム及びクレトジムスルホキシドをスルホン体に変換した後、そのクレトジムスルホン体について定量を行い、その含量に係数を乗じてクレトジムの含量に換算し、これを分析値とすること。

9. 参考文献

なし

10. 類型

A