

クレブテロール試験法

1. 装置

液体クロマトグラフ・タンデム質量分析計を用いる。

2. 試薬・試液

次に示すもの以外は、第2 添加物の部C 試薬・試液等の項に示すものを用いる。

なお、「(特級)」と記載したものは、日本産業規格試薬の特級の規格に適合するものであることを示す。

アセトン 当該農薬等の成分である物質の分析の妨害物質を含まないものを用いる。

アセトニトリル 当該農薬等の成分である物質の分析の妨害物質を含まないものを用いる。

塩化ナトリウム 当該農薬等の成分である物質の分析の妨害物質を含まないものを用いる。

強酸性陽イオン交換体ミニカラム (500mg) 内径8～9mmのポリエチレン製のカラム管に、ベンゼンスルホンプロピルシリル化シリカゲル500mgを充填したもの又はこれと同等の分離特性を有するものを用いる。

酢酸エチル 当該農薬等の成分である物質の分析の妨害物質を含まないものを用いる。

シリカゲルミニカラム (1,000mg) 内径8～9mmのポリエチレン製のカラム管に、シリカゲル1,000mgを充填したもの又はこれと同等の分離特性を有するものを用いる。

トリエチルアミン トリエチルアミン (特級)

n-ヘキサン 当該農薬等の成分である物質の分析の妨害物質を含まないものを用いる。

水 蒸留水、精製水、純水等の化学分析に適したものを用いる。当該農薬等の成分である物質の分析の妨害物質を含む場合には、*n*-ヘキサン等の溶媒で洗浄したものを用いる。

無水硫酸ナトリウム 当該農薬等の成分である物質の分析の妨害物質を含まないものを用いる。

メタノール 当該農薬等の成分である物質の分析の妨害物質を含まないものを用いる。

3. 標準品

クレブテロール標準品 本品は、塩酸クレブテロール98%以上を含む。

4. 試験溶液の調製

a 抽出法

筋肉、肝臓、腎臓、魚介類、乳及び卵の場合は、検体を細切均一化した後、その10.0 gを量り採る。

脂肪の場合は、検体を細切均一化した後、その5.00 gを量り採る。

はちみつの場合は、検体を均一化した後、その10.0 gを量り採る。これに水20mLを加えて溶かす。

これにアセトン100mLを加え、細切均一化した後、毎分3,000回転で5分間遠心分離し、上澄液を採る。残留物にアセトン50mLを加え、細切均一化し、上記と同様に遠心分離する。得られた上澄液を合わせ40°C以下で約30mLまで濃縮する。これに10w/v%塩化ナトリウム溶液100mL及び2mol/L水酸化ナトリウム5mLを加え、酢酸エチル100mL及び50mLで2回振とう抽出する。抽出液を合わせ、無水硫酸ナトリウムを加えて脱水し、無水硫酸ナトリウムをろ別した後、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30mLを加え、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル30mL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、トリエチルアミン及び*n*-ヘキサン(30:1:170)混液5mLを加えて溶かす。

b 精製法

(1) シリカゲルカラムクロマトグラフィー

シリカゲルミニカラム(1,000mg)にアセトン10mL及び*n*-ヘキサン10mLを順次注入し、流出液は捨てる。このカラムにa 抽出法で得られた溶液を注入した後、更にアセトン、トリエチルアミン及び*n*-ヘキサン(30:1:170)混液10mLを注入し、流出液は捨てる。次いでアセトン15mLを注入し、溶出液を40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物に水及びメタノール(1:1)混液5mLを加えて溶かす。

(2) 強酸性陽イオン交換体カラムクロマトグラフィー

強酸性陽イオン交換体ミニカラム(500mg)にメタノール5mL及び水5mLを順次注入し、流出液は捨てる。このカラムに(1) 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た後、メタノール10mLを注入し、流出液は捨てる。次いでアンモニア水及びメタノール(1:49)混液10mL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、ギ酸及び水(300:1:700)混液に溶かし、正確に2mL(脂肪の場合は1mL)としたものを試験溶液とする。

5. 操作法

a 検量線の作成

クレンブテロール標準品のアセトニトリル、ギ酸及び水(300:1:700)混液の溶液を数点調製し、それぞれを液体クロマトグラフ・タンデム質量分析計に注入し、ピーク高法又はピーク面積法により検量線を作成する。なお、本法に従って試験溶液を調製した場合、試料中0.00005mg/kgに相当する試験溶液中濃度は0.00025mg/Lである。

b 定量試験

試験溶液を液体クロマトグラフ・タンデム質量分析計に注入し、a 検量線の作成によりクレンプテロールの定量を行う。

c 確認試験

液体クロマトグラフ・タンデム質量分析計により確認する。

d 測定条件

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲル 内径2.1mm, 長さ150mm, 粒子径3.5 μ m

カラム温度：40°C

移動相：0.1vol%ギ酸・アセトニトリル溶液及び0.1vol%ギ酸の混液（1：19）で1分間保持した後，（1：19）から（3：7）までの濃度勾配を13分間で行う。

イオン化モード：エレクトロスプレーイオン化法 ポジティブイオンモード

主なイオン（m/z）：プリカーサーイオン 277, プロダクトイオン 203, 132

注入量：10 μ L

保持時間の目安：10分