

エチプロール試験法（水産物）

1. 分析対象化合物

エチプロール

2. 装置

液体クロマトグラフ・質量分析計（LC-MS）又は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。

エチプロール標準品 本品はエチプロール98%以上を含む。

4. 試験溶液の調製

1) 抽出

試料 10.0 g にアセトン 100 mL を加え、ホモジナイズした後、吸引ろ過する。ろ紙上の残留物にアセトン 50 mL を加えてホモジナイズし、上記と同様にろ過する。得られたろ液を合わせ、アセトンを加えて正確に 200 mL とする。この 40 mL を採り、40°C以下で約 2 mL まで濃縮する。これに 10%塩化ナトリウム溶液 100 mL を加え、酢酸エチル及び *n*-ヘキサン（1：1）混液 100 mL 及び 50 mL 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 30 mL を加え、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL ずつで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ニトリルを加えて溶かし、正確に 6 mL とする。この 3 mL を採り、さらに水 7 mL を加える。

2) 精製

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム（500 mg）にアセトニトリル及び水各 5 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、流出液は捨てる。次いでアセトニトリル及び水（1：1）混液 10 mL を注入し、溶出液にアセトニトリル及び水（1：1）混液を加えて正確に 10 mL としたものを試験溶液とする。

5. 検量線の作成

エチプロール標準品の 0.001～0.02 mg/L 溶液（アセトニトリル及び水（1：1）混液）を数点調製し、それぞれ 5 µL を LC-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。

6. 定量

試験溶液 5 μL を LC-MS に注入し、5 の検量線でエチプロールの含量を求める。

7. 確認試験

LC-MS 又は LC-MS/MS により確認する。

8. 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 mm、長さ 150 mm、粒子径 5 μm

カラム温度：40 $^{\circ}\text{C}$

移動相：A 液及び B 液について下表の濃度勾配で送液する。

A 液：2 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液

B 液：アセトニトリル

時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)
0	70	30
22	10	90
25	10	90
25	70	30

イオン化モード：

1) LC-MS の場合 ESI (-)、ESI (+)

2) LC-MS/MS の場合 ESI (-)

主なイオン (m/z)：

1) LC-MS の場合 395 (-) (定量用)

397 (+) (確認用)

2) LC-MS/MS の場合 プリカーサーイオン 395、プロダクトイオン 330、262

保持時間の目安：14 分

9. 定量限界

0.01 mg/kg

10. 留意事項

1) 試験法の概要

エチプロールを試料からアセトンで抽出、酢酸エチル及び *n*-ヘキサン (1 : 1) 混液に転溶する。アセトニトリル/ヘキサン分配及びオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムで精製した後、LC-MS で定量し、LC-MS 又は LC-MS/MS で確認する方法である。

2) 注意点

①本試験法は、水産物（魚介類）に適用できる。なお、畜産物（牛、豚及び鶏等）に対

する検討は実施していない。

②LC-MS の場合、主なイオンの他に確認できるイオンとして、ESI(−)においては m/z 397 が、ESI (+) においては m/z 399 がある。

1 1. 参考文献

厚生労働省食安全部長通知 食安発第 0124004 号「食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について」(エチプロール試験法) (平成 17 年 1 月 24 日)

1 2. 類型

C

エチプロール試験法（農産物）

1. 分析対象化合物

エチプロール

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（HPLC（UV））

液体クロマトグラフ・質量分析計（LC/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。

ベンゼンスルホニルプロピルシリル化シリカゲルミニカラム（1,000 mg）内径12～13 mmのポリエチレン製のカラム管に、ベンゼンスルホニルプロピルシリル化シリカゲル1,000 mgを充てん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。

アセトニトリル 高速液体クロマトグラフ用に製造されたもの
エチプロール標準品 本品はエチプロール98%以上を含む。

4. 試験溶液の調製

1) 抽出

穀類の場合は、試料10.0 gを量り採り、これに水20 mLを加え、2時間放置する。茶の場合は、試料5.0 gを量り採り、上記と同様に処理する。果実の場合は、試料20.0 gを量り採る。

これにアセトン100 mLを加え、ホモジナイズした後、吸引ろ過する。ろ紙上の残留物に、アセトン50 mLを加えてホモジナイズし、上記と同様にろ過する。得られたろ液にアセトンを加えて正確に200 mLとする。穀類及び果実の場合は、この100 mLを採り、40℃以下で約15 mLまで濃縮する。茶の場合は、この40 mLを採り、40℃以下で約5 mLまで濃縮する。これに10%塩化ナトリウム溶液100 mLを加え、酢酸エチル・*n*-ヘキサン混液（1：1）100 mL及び50 mLで2回振とう抽出する。抽出液を液相分離ろ紙を用いてろ過した後、ろ液を40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物に酢酸エチル・*n*-ヘキサン混液（1：1）5 mLを加えて溶かす。

2) 精製

(1) 活性炭カラムクロマトグラフィー

活性炭ミニカラム（500 mg）に酢酸エチル・*n*-ヘキサン混液（1：1）10 mLを注入し、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、

酢酸エチル・*n*-ヘキサン混液（1：1） 10 mL を注入する。全溶出液を 40℃ 以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物にアセトン・*n*-ヘキサン混液（1：9） 5 mL を加えて溶かす。

(2) 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

アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム（360 mg） にアセトン・*n*-ヘキサン混液（1：9） 10 mL を注入し、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、流出液は捨てる。さらに、アセトン・*n*-ヘキサン混液（1：9） 5 mL を注入し、流出液は捨てる。次いで、アセトン・*n*-ヘキサン混液（1：4） 10 mL を注入し、溶出液を 40℃ 以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物に酢酸エチル 5 mL を加えて溶かす。

(3) ベンゼンスルホン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

ベンゼンスルホンプロピルシリル化シリカゲルミニカラム（1,000 mg） にアセトン 10 mL 及び酢酸エチル 10 mL を順次注入し、各流出液は捨てる。このカラムに（2）で得られた溶液を注入し、流出液は捨てる。さらに、酢酸エチル 5 mL を注入し、流出液は捨てる。次いで、アセトン 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・水混液（1：1）に溶解し、正確に 4 mL（穀類の場合は 2 mL、茶の場合は 1 mL）としたものを試験溶液とする。

5. 検量線の作成

エチプロール標準品の 0.05～1 mg/L アセトニトリル・水混液（1：1） 溶液を数点調製し、それぞれ 40 μL を HPLC 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。

6. 定量

試験溶液 40 μL を HPLC に注入し、5 の検量線でエチプロールの含量を求めらる。

7. 測定条件

1) HPLC

検出器： UV（波長 275 nm）

カラム： オクタデシルシリル化シリカゲル（粒径 5 μm）、内径 4～4.6 mm、長さ 250 mm

カラム温度： 40℃

移動相： アセトニトリル・水混液（1：1）

保持時間の目安： 9 分

2) LC/MS

カラム： オクタデシルシリル化シリカゲル（粒径 5 μm ）、内径 2 mm、長さ 150 mm

移動相： 水・アセトニトリル混液（1：1）

イオン化モード： ESI

主なイオン (m/z)： 正イオンモード 397、399、 負イオンモード 395、397

注入量： 4 μL

保持時間の目安： 7分

8. 定量限界

0.02 mg/kg（茶にあつては 0.05 mg/kg）

9. 留意事項

1) 試験法の概要

エチプロールを試料からアセトンで抽出し、酢酸エチル・*n*-ヘキサン混液（1：1）に転溶する。活性炭ミニカラム、アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム及びベンゼンスルホニルプロピルシリル化シリカゲルミニカラムにより精製した後、HPLC(UV)で測定し、LC/MSで確認する方法である。

2) 注意点

(1) 転溶溶媒を脱水するために、液相分離ろ紙の代わりに無水硫酸ナトリウムを使用した場合は、回収率の大幅な低下を招く。

(2) 転溶操作時にエマルジョンが生成する場合がある。代替法としては、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム（1,000 mg）を利用する方法がある。[操作概要： 試料抽出液（できるだけ溶媒を除去した状態）をカラム（アセトニトリル 5mL 及び水 5mL で順次洗浄したもの）に負荷した後、アセトニトリル・水混液（7：13） 10 mL で洗浄、アセトニトリル・水混液（3：2） 10 mL 又はアセトニトリル 10 mL で溶出する。]

(3) ベンゼンスルホニル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は、夾雑物の少ない試料では、省略することも可能である。

10. 参考文献

なし

11. 類型

C