

## クロチアニジン試験法（農産物）

### 1. 分析対象化合物

クロチアニジン

### 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（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。

クロチアニジン標準品 本品はクロチアニジン99%以上を含み、融点は176.8℃である。

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8～9 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。

### 4. 試験溶液の調製

#### 1) 抽出

##### (1) 穀類、豆類及び種実類の場合

試料10.0 gを量り採り、水20 mLを加え、2時間放置する。これにアセトン100 mLを加え、3分間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て、40℃以下で約30 mLに濃縮する。これに10%塩化ナトリウム溶液100 mLを加え、*n*-ヘキサン100 mLで洗浄した後、酢酸エチル100 mLずつで2回振とう抽出する。抽出液に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、ろ液を40℃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3回振とう抽出する。アセトニトリル層を40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物にアセトン3 mLを加え、完全に溶かした後、*n*-ヘキサン7 mLを加えて混合する。

##### (2) 果実及び野菜の場合

試料20.0 gを量り採り、アセトン100 mLを加え、3分間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て、40℃以下で約30 mLに濃縮する。これに10%塩化ナトリウム溶液100 mLを加え、*n*-ヘキサン100 mLで洗浄した後、酢酸エチル100 mLずつで2回振とう抽出する。抽出液に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、ろ液を40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物にアセトン3 mLを加え、完全に溶かした後、*n*-ヘキサン7 mLを加えて混合する。

### (3) 茶の場合

試料5.00 gを量り採り、水20 mLを加え、2時間放置する。これにアセトン100 mLを加え、3分間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て、40°C以下で約30 mLに濃縮する。これに10%塩化ナトリウム溶液100 mLを加え、*n*-ヘキサン100 mLで洗浄した後、酢酸エチル100 mLずつで2回振とう抽出する。抽出液に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、ろ液に酢酸エチルを加えて正確に250 mLとする。この50 mLを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3 mLを加え、完全に溶かした後、*n*-ヘキサン7 mLを加えて混合する。

### 2) 精製

#### (1) シリカゲルカラムクロマトグラフィー

クロマトグラフ管 (内径15 mm) に、カラムクロマトグラフィー用シリカゲル (粒径63 ~200  $\mu\text{m}$ ) 10 gを*n*-ヘキサンに懸濁させて充てんし、無水硫酸ナトリウム5 gを積層する。このカラムに、1) で得られた溶液を注入した後、アセトン・*n*-ヘキサン混液 (3 : 7) 50 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 : 1) 100 mLを注入し、溶出液を40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物に酢酸エチル5 mLを加えて溶かす。

#### (2) ベンゼンスルホンプロピルシリル化シリカゲル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) にメタノール及び酢酸エチル各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た後、さらにアセトン5 mLを注入し、流出液は捨てる。次いでメタノール10 mLを注入し、溶出液を40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物に酢酸エチル5 mLを加えて溶かす。

#### (3) 中性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5 mLを注入し、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た後、酢酸エチル10 mLを注入し、流出液は捨てる。次いでアセトン20 mLを注入し、溶出液を40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物を水・メタノール混液 (7 : 3) に溶解し、穀類、豆類及び種実類の場合は正確に2 mL、果実及び野菜の場合は正確に4 mL、茶の場合は正確に2 mLとしたものを試験溶液とする。

## 5. 検量線の作成

クロチアニジン標準品の0.025~0.5 mg/L水・メタノール混液 (7 : 3) 溶液を数点調製し、それぞれ20  $\mu\text{L}$ 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20  $\mu\text{L}$ をHPLCに注入し、5の検量線でクロチアニジンの含量を求める。

## 7. 測定条件

### 1) HPLC

検出器：UV（波長265 nm）

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲル（粒径5  $\mu\text{m}$ ）、内径4.6 mm、長さ250 mm

カラム温度：40 $^{\circ}\text{C}$

移動相：水・メタノール混液（7：3）

保持時間の目安：約15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  $\mu\text{m}$ ）、内径2.1 mm、長さ150 mm

カラム温度：40 $^{\circ}\text{C}$

移動相：アセトニトリル・0.01%ギ酸溶液混液（1：9）から（1：1）までの濃度勾配を5分間で行い、（1：1）で5分間保持した後、さらに（9：1）で5分間保持する。

イオン化モード：ESI

主なイオン ( $m/z$ )：正イオンモード250

注入量：4  $\mu\text{L}$

保持時間の目安：約11分

## 8. 定量限界

0.005 mg/kg（茶：0.05 mg/kg）

## 9. 留意事項

### 1) 試験法の概要

クロチアニジンを試料からアセトンで抽出し、*n*-ヘキサンで洗浄後、酢酸エチルに転溶する。果実、野菜、茶はそのまま、穀類、豆類、種実類はアセトニトリル/*n*-ヘキサン分配で脱脂した後、シリカゲルカラム、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及び中性アルミナミニカラムにより精製し、HPLC（UV）で定量、LC/MSで確認する方法である。

### 2) 注意点

- (1) 豆類等は*n*-ヘキサンでの洗浄時、酢酸エチルへの転溶時及びアセトニトリル/*n*-ヘキサン分配時にエマルジョンを形成しやすく、回収率の低下を招くので激しい振とうは避ける。
- (2) シリカゲルカラムクロマトグラフィーを行う際、試料によってはミニカラム注入前の残留物がアセトン・*n*-ヘキサン混液（3：7）に溶解しないことがあるので、アセトンに完全に溶解した後に、*n*-ヘキサンを加える必要がある。

- (3) 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可能である。
- (4) LC/MS分析では、クロチアニジン溶出後に移動相のアセトニトリルの比率を上げてカラム内に残存する夾雑物を溶出させることで、イオン化阻害を回避できる。

#### 10. 参考文献

平成14年環境省告示第35号「クロチアニジン試験法」

#### 11. 類型

C