

クロフェンテジン試験法（畜産物）

1. 分析対象化合物

クロフェンテジン

臭化水素酸によって2-クロロ安息香酸に変換される代謝物

2. 適用食品

畜産物

3. 装置

液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計（LC-MS/MS）

4. 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。

臭化水素酸 臭化水素酸（特級）

クロフェンテジン標準品 本品はクロフェンテジン95%以上を含む。

2-クロロ安息香酸標準品 本品は2-クロロ安息香酸95%以上を含む。

5. 試験溶液の調製

1) 抽出

試料10.0 gに臭化水素酸50 mL及び沸騰石を加え、還流冷却器を取り付けて、沸騰水浴中で2時間加熱還流する。放冷後、吸引ろ過し、ろ液を採る。ろ紙上の残留物に水30 mLを加え、攪拌した後、吸引ろ過する操作を3回繰り返し、ろ液を先のろ液に合わせる。更に、ろ紙上の残留物にジエチルエーテル及び*n*-ヘキサン（3：1）混液30 mLを加え、攪拌した後、吸引ろ過する操作を3回繰り返し、ろ液を先のろ液に合わせる。得られたろ液に水200 mLを加え、ジエチルエーテル及び*n*-ヘキサン（3：1）混液100 mLずつで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、ろ液を40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物にジエチルエーテル及び*n*-ヘキサン（3：1）混液を加えて溶かし、正確に50 mLとする。

この溶液から正確に5 mLを分取し、0.1 mol/L炭酸水素ナトリウム溶液5 mLずつで2回振とう抽出する。抽出液を合わせ、5 mol/L塩酸0.3 mLを加え、pH 3以下であることを確認した後、ジエチルエーテル及び*n*-ヘキサン（3：1）混液10 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。残留物にジエチルエーテルを加えて溶かし、2 mLに定容する。

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）及びシリカゲルミニカラム（500 mg）にそれぞれアセトニトリル10 mLを注入し、流出液は捨てる。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1) で得られた溶液を正確に1 mL注入した後、アセトニトリル10 mLを注入し、流出液は捨てる。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の下部にシリカゲル

ミニカラムを接続し、1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液10 mLを注入し、溶出液を採り、1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液を加えて正確に10 mLとしたものを試験溶液とする。

6. 検量線の作成

2-クロロ安息香酸標準品のアセトニトリル溶液を数点調製し、それぞれ 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、試料中 0.01 mg/kg (クロフェンテジン換算) に相当する試験溶液中濃度は 0.0005 mg/L (クロフェンテジン換算) である。

7. 定量

試験溶液を LC-MS/MS に注入し、6. の検量線で 2-クロロ安息香酸の含量を求め、次式によりクロフェンテジン (臭化水素酸によって 2-クロロ安息香酸に変換される代謝物を含む。) の含量を求める。

クロフェンテジン (臭化水素酸によって 2-クロロ安息香酸に変換される代謝物を含む。) の含量 (ppm)
=2-クロロ安息香酸の含量 (ppm) ×1.936

8. 確認試験

LC-MS/MSにより確認する。

9. 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2.5 μm

カラム温度：40℃

移動相：アセトニトリル及び0.05 vol%酢酸の混液 (1 : 49) から (3 : 7) までの濃度勾配を1分間で行い、(3 : 7) から (49 : 1) までの濃度勾配を4分間で行い、(49 : 1) で3分間保持する。

イオン化モード：ESI (-)

主なイオン (*m/z*)：プリカーサーイオン155、プロダクトイオン111、35

注入量：2 μL

保持時間の目安：4分

10. 定量限界

0.01 mg/kg (クロフェンテジン換算)

11. 留意事項

1) 試験法の概要

試料に臭化水素酸を加えて加熱還流し、クロフェンテジン及び臭化水素酸によって 2-クロロ安息香酸に変換される代謝物を 2-クロロ安息香酸に加水分解する。ジエチルエーテル及び *n*-ヘキサン

(3 : 1) 混液で抽出した後、0.1 mol/L 炭酸水素ナトリウム溶液に抽出する。塩酸で酸性として再度ジエチルエーテル及び *n*-ヘキサン (3 : 1) 混液に転溶し、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及びシリカゲルミニ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。

なお、2-クロロ安息香酸について定量を行い、2-クロロ安息香酸の含量に換算係数を乗じてクロフェンテジン（臭化水素酸によって 2-クロロ安息香酸に変換される代謝物を含む。）の含量に換算したものを分析値とする。

2) 注意点

- ① 臭化水素酸はドラフト内等で使用する。また、必要に応じて保護具を着用する。
- ② 試料を加熱還流した後の溶液は強酸のため、吸引ろ過にはガラス繊維ろ紙を用いる。
- ③ 加水分解後の放冷は、ジエチルエーテルの沸点 (35°C) 以下まで放冷すると振とう操作がしやすい。脂肪は加水分解後、脂肪が析出しない40°C程度まで放冷し、ジエチルエーテル及び*n*-ヘキサン (3 : 1) 混液で抽出する。脂肪が析出するとジエチルエーテル及び*n*-ヘキサン (3 : 1) 混液に溶解しにくい。析出した場合は、脂肪が溶解する40°C程度まで加温するとよい。
- ④ 炭酸水素ナトリウム溶液に5 mol/L塩酸0.3 mLを加えてpH 3以下にならない場合は、pH 3以下となるまで5 mol/L塩酸を加える。
- ⑤ 抽出液を濃縮、溶媒除去して得られた残留物は、試料によっては溶解しにくい場合があるため、十分に超音波処理を行い溶解すること。
- ⑥ 2-クロロ安息香酸の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。
定量イオン (*m/z*) : プリカーサーイオン 155、プロダクトイオン 35
定性イオン (*m/z*) : プリカーサーイオン 155、プロダクトイオン 111
- ⑦ クロフェンテジン標準品を用いて添加回収試験を実施し、2-クロロ安息香酸への変換が十分に行われていることを確認すること。
- ⑧ 回収率が不十分な場合や、回収率のばらつきが大きい場合には、加水分解時間を長くすると良い。
- ⑨ 試験法開発時に検討した食品：牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳、鶏卵

12. 参考文献

なし

13. 類型

C