

シクロプロトリン試験法（農産物）

1. 分析対象化合物

シクロプロトリン

2. 適用食品

穀類

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

以下に示すもの以外は、総則の3に示すものを用いる。

0.5 mol/L リン酸緩衝液（pH 7.0） リン酸水素二カリウム（ K_2HPO_4 ） 52.7 g 及びリン酸二水素カリウム（ KH_2PO_4 ） 30.2 g を量り採り、水約 500 mL に溶解し、1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液又は 1 mol/L 塩酸を用いて pH を 7.0 に調整した後、水を加えて 1 L とする。

シクロプロトリン標準品 本品はシクロプロトリン 95%以上を含む。

5. 試験溶液の調製

1) 抽出

試料 10.0 g に水 20 mL を加え、30 分間放置する。これにアセトニトリル 50 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ニトリル 20 mL を加え、ホモジナイズした後、上記と同様に吸引ろ過する。得られたろ液を合わせ、アセトニトリルを加えて正確に 100 mL とする。この溶液から正確に 20 mL を分取し、塩化ナトリウム 10 g 及び 0.5 mol/L リン酸緩衝液（pH 7.0） 20 mL を加え、5 分間振とうする。静置した後、分離した水層を捨てる。

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム（1,000 mg）にアセトニトリル 5 mL を注入し、流出液は捨てる。このカラムに上記のアセトニトリル層を注入した後、アセトニトリル 5 mL を注入し、負荷液を含む全溶出液を 40°C 以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物にアセトニトリル及びトルエン（3 : 1）混液 2 mL を加えて溶かす。

2) 精製

グラファイトカーボン/アミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム（500 mg/500 mg）に、アセトニトリル及びトルエン（3 : 1）混液 5 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、アセトニトリル及びトルエン（3 : 1）混液 20 mL を注入し、負荷液を含む全溶出液を 40°C 以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物をメタノールに溶かし、正確に 1 mL としたものを試験溶液とする。

6. 検量線の作成

シクロプロトリン標準品のメタノール溶液を数点調製し、LC-MS/MS に注入して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 に相当する試験溶液中濃度は 0.02 mg/L である。

7. 定量

試験溶液を LC-MS/MS に注入し、6. の検量線でシクロプロトリンの含量を求める。

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 150 mm、粒子径 3.5 μ m

カラム温度：40°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：5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液

B 液：5 mmol/L 酢酸アンモニウム・メタノール溶液

時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)
0	90	10
3	30	70
13	10	90
15	10	90

イオン化モード：ESI (+)

主なイオン (m/z)：プリカーサーイオン 499、プロダクトイオン 257、181

注入量：2 μ L

保持時間の目安：13 分

10. 定量限界

0.01 mg/kg

11. 留意事項

1) 試験法の概要

シクロプロトリンを試料からアセトニトリルで抽出し、塩析で水を除いた後、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム及びグラファイトカーボン/アミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラムで精製し、LC-MS/MS で定量及び確認する方法である。

本法の「5. 試験溶液の調製」は、試料の濃縮率を除き「LC/MS による農薬等の一斉試験法 I (農産物)」に準拠したものである。

2) 注意点

- ① 他の農薬と同時に分析する可能性を考慮し、グラファイトカーボン/アミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム (500 mg/500 mg) からのシクロプロトリンの溶出には、「LC/MS による農薬等の一斉試験法 I (農産物)」に準拠して、アセトニトリル及びトルエン (3 : 1) 混液 20 mL を用いている。シクロプロトリンのみを分析対象とする場合には、アセトニトリル及びトルエン (3 : 1) 混液の液量を減らすことができる。標準液のみでの検討であるが、アセトニトリル及びトルエン

ン（3：1）混液 5 mL でグラファイトカーボン/アミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム（500 mg/500 mg）からシクロプロトリンを溶出できることを確認している。

② シクロプロトリンの 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 499、プロダクトイオン 181

定性イオン（ m/z ）：プリカーサーイオン 499、プロダクトイオン 257

③ 試験法開発時に検討した食品：玄米

12. 参考文献

厚生労働省医薬・生活衛生局生活衛生・食品安全部長通知 生食発第 0620 第 1 号「LC/MS による農薬等の一斉試験法 I（農産物）」（平成 29 年 6 月 20 日）

13. 類型

C