

エチプロール試験法（畜水産物）

1. 分析対象化合物

エチプロール

2. 適用食品

畜水産物

3. 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）

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。

エチプロール標準品 本品はエチプロール 98%以上を含む。

5. 試験溶液の調製

1) 抽出

① はちみつ以外の場合

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。この溶液から正確に 40 mL を分取し、40°C以下で約 2 mL まで濃縮する。これに 10 w/v%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。この溶液から正確に 3 mL を分取し、さらに水 7 mL を加える。

② はちみつの場合

試料 10.0 g に水 10 mL を加え溶解する。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。得られたろ液を合わせ、アセトンを加えて正確に 200 mL とする。この溶液から正確に 40 mL を分取し、40°C以下で約 2 mL まで濃縮する。これに 10 w/v%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。この残留物にアセトニトリルを加えて溶かし、正確に 6 mL とする。この溶液から正確に 3 mL を分取し、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。

6. 検量線の作成

エチプロール標準品のアセトニトリル及び水（1：1）混液の溶液を数点調製し、それぞれ LC-MS 又は 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 に相当する試験溶液中濃度は 0.001 mg/L である。

7. 定量

試験溶液を LC-MS 又は LC-MS/MS に注入し、6 の検量線でエチプロールの含量を求める。

8. 確認試験

LC-MS 又は 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 2.0 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm

カラム温度：40℃

移動相：アセトニトリル及び 2 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液混液（3：7）から（9：1）までの濃度勾配を 22 分間で行い、（9：1）で 3 分間保持する。

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（-）、397（+）

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、250

注入量：5 μL

保持時間の目安：14 分

10. 定量限界

0.01 mg/kg

11. 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/ヘキサン分配により脱脂した後、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムで精製し、LC-MS 又は LC-MS/MS で定量及び確認する方法である。

2) 注意点

- ① エチプロールの LC-MS 又は 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。

LC-MS の場合

定量イオン (m/z)：395（-）

定性イオン (m/z)：397（+）

LC-MS/MS の場合

定量イオン (m/z)：プリカーサーイオン 395、プロダクトイオン 330

定性イオン (m/z)：プリカーサーイオン 395、プロダクトイオン 262、250

- ② LC-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。
- ③ 使用する機種によって ESI ポジティブモードでの感度が低い場合がある。その場合、以下の条件を用いるとエチプロールを感度良く測定できることがある。

測定条件

移動相：5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液及び 5 mmol/L 酢酸アンモニウム・メタノール溶液混液（7：3）から（1：99）までの濃度勾配を 15 分間で行い、（1：99）で 5 分間保持する。

イオン化モード：ESI（+）

主なイオン（ m/z ）

i) LC-MS の場合：399、397

ii) LC-MS/MS の場合：プリカーサーイオン 397、プロダクトイオン 351、255

注入量：5 μ L

保持時間の目安：14 分

- ④ 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、はちみつ、うなぎ、さけ及びしじみ

12. 参考文献

厚生労働省食安全部 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）

13. 類型

C