

クロロフルアズロンの測定方法

(1) 装置

質量分析計付き液体クロマトグラフを用いる。

(2) 試験試薬

ヘキサン、ジエチルエーテル、酢酸、硝酸アンモニウム、無水硫酸ナトリウム；特級試薬メタノール；高速液体クロマトグラフ用

(3) 試験溶液の調製

ヘキサン抽出；

試料 1 L を 1.3 L 容分液ロートに量りとり、硫酸アンモニウム 25 g を加え溶解後、ヘキサン 100 mL を加えて 5 分間振とう抽出する。静置分離後、ヘキサン層は無水硫酸ナトリウムをのせたろ紙 (No.5A) を通過させ、脱水しながら 300 mL 容ナス型フラスコに受ける。水層には新たにヘキサン 100 mL を加えて同様の操作を繰り返す。ヘキサン層を合わせロータリーエバポレーター (水浴 40°C 以下) を用いて約 5 mL まで減圧濃縮する。

固相抽出；

あらかじめヘキサン 10 mL を流下させ洗浄した Sep Pak NH₂ カートリッジカラム (Waters 社製、以下 NH₂ カラム) をミニカラム吸引装置に取り付け、先の濃縮液をヘキサン 10 mL を用いてナス型フラスコを洗いながらカラムに移し入れ、流速 10~15 mL/分で流下させる。次いでヘキサン 20 mL を同様に流下させ流出液は棄てる。次いであらかじめヘキサン 10 mL を流下させて洗浄した Sep Pak Diol カートリッジカラム (Waters 社製) を NH₂ カラムの下に連結して、ジエチルエーテル/ヘキサン (30:70, v/v) 40 mL を同様に流下させ、クロロフルアズロンを溶出する。溶出液は 100 mL 容ナス型フラスコに受け、ロータリーエバポレーター (水浴 40°C 以下) を用いて約 2 mL まで減圧濃縮後、通風で乾固する。残留物をメタノール 2 mL に溶解し、LC/MS 分析に供する。

(4) 測定機器の操作条件

カラム： ZORBAX Eclipse XDB-C8 (2.1 mm×100 mm, 3.5 μm) (Agilent 社製)

移動相： メタノール/0.2%酢酸水 (85/15, v/v)

流速： 0.2 mL/分

注入量： 1 μL

イオン化法： API-ES (Negative)

選択イオン： *m/z* 538

キャピラリー電圧： 3500 V

フラグメンター電圧： 100 V

感度：クロロフルアズロンの 0.005 ng が十分確認できる (定量限界：0.01 μg/L) ように感度を調節する。

(5) 検量線の作成

クロロフルアズロン標準品 100 mg を量りとり、メタノールに溶解し、100 mL に定容して 1000 mg/L の標準溶液を調製する。標準原液をメタノールで順次希釈し、0.005、0.025、0.05、0.075、および 0.1 μg/mL の検量線用標準液を調製する。検量線用標準液を LC/MS に注入し、得られたクロマトグラムよりピーク面積を求め、縦軸にピーク面積、横軸に重量をとり、検量線を作成する。

(6) 定量試験

測定溶液 1 μL を LC/MS に注入して、ピーク面積を測定し、(5)で作成した検量線よりクロロフルアズロンの量を求めて濃度を算出する。