

アミトロール試験法（農産物）

1. 分析対象化合物

アミトロール

2. 装置

蛍光光度型検出器付き高速液体クロマトグラフ（HPLC-FL）

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。

酢酸緩衝液 0.05 mol/L酢酸800 mLに0.05 mol/L酢酸ナトリウム溶液を加えて1,000 mLとする。

弱酸性陽イオン交換樹脂 カラムクロマトグラフィー用に製造した弱酸性陽イオン交換樹脂を1 mol/L塩酸を用いて洗い、次いで2.8%アンモニア水を用いて洗う。さらに1 mol/L塩酸を用いて洗い、次いで水を用いて洗液が中性になるまで洗う。

リン酸緩衝液 0.05 mol/Lリン酸一ナトリウム溶液に10%リン酸を加えてpH 3.0に調整する。

アミトロール標準品 本品はアミトロール98%以上を含む。

4. 試験溶液の調製

1) 抽出

①穀類、豆類、種実類、果実、野菜、抹茶及びホップの場合

試料30.0 gにエタノール80 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60 vol%エタノール40 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、ろ液の容量を量る。この10 mLを採り、過酸化水素水1 mLを加える。これに還流冷却器を取り付けて75°Cの水浴中で30分間加熱した後、放冷する。

②抹茶以外の茶の場合

試料10.0 gを100°Cの水600 mLに浸し、室温で5分間放置した後、ろ過し、冷後ろ液12 mLを採り、過酸化水素1 mLを加える。これに還流冷却器を取り付けて75°Cの水浴中で30分間加熱した後、放冷する。

2) 精製

①強酸性陽イオン交換樹脂カラムクロマトグラフィー

クロマトグラフ管（内径10 mm）に強酸性陽イオン交換樹脂（粒径0.063～0.156 mm）1 mLを水に懸濁させて充てんし、カラムの上端に少量の水が残る程度まで水を流出させる。このカラムに水5 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで1) で得られた溶液を注入した後、水10 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで2.8%アンモニア水12 mLを注入し、溶出液に1-プロパノール

ル30 mLを加え、45°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物に水5 mLを加えて溶かす。

②弱酸性陽イオン交換樹脂カラムクロマトグラフィー

クロマトグラフ管（内径10 mm）に、弱酸性陽イオン交換樹脂（粒径0.33～0.50 mm）5 mLを水に懸濁させて充てんし、カラムの上端に少量の水が残る程度まで水を流出させる。このカラムに水10 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで2)の①で得られた溶液を注入した後、水50 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで2.8%アンモニア水35 mLを注入し、溶出液に1-プロパノール100 mLを加え、45°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物を酢酸緩衝液に溶解し正確に2 mLとする。

3) 蛍光化

2)の②で得られた溶液1 mLに0.25 w/v%フルオレスカミン・アセトン溶液100 µLを加え、よく振り混ぜた後、1時間放置する。これに0.05 mol/Lホウ酸ナトリウム溶液0.5 mLを加えて混合し、これを試験溶液とする。

5. 検量線の作成

アミトロール標準品の0.02～2 mg/L溶液（酢酸緩衝液）を数点調製し、4. 試験溶液の調製の3) 蛍光化と同様に操作して得られたものについて、それぞれ10 µL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10 µLをHPLCに注入し、5の検量線でアミトロールの含量を求める。

7. 確認試験

LC-MSにより確認する。

8. 測定条件

(例)

HPLC

検出器：FL（励起波長380 nm、蛍光波長484 nm）

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲル 内径4.6 mm、長さ150 mm、粒子径5 µm

カラム温度：40°C

移動相：アセトニトリル及びリン酸緩衝液（3：7）混液

保持時間の目安：15分

9. 定量限界

0.025 mg/kg（茶の場合は0.1 mg/kg）

10. 留意事項

1) 試験法の概要

アミトロールを試料からエタノール及び60 vol%エタノールで抽出し、過酸化水素を加え、加熱還流後、強酸性陽イオン交換樹脂及び弱酸性陽イオン交換樹脂で精製する。次いでフルオレスカミンで蛍光誘導体化した後、HPLC-FLで定量し、LC-MSで確認する方法である。

2) 注意点

- ①強酸性陽イオン交換樹脂及び弱酸性陽イオン交換樹脂は、樹脂により溶出量が変わるので、標準品を用いて事前に溶出量を確認する。
- ②蛍光誘導体化の至適pHは4.1～4.4である。
- ③試験溶液中の蛍光誘導体は徐々に分解するため、速やかに測定する。

1 1. 参考文献

なし

1 2. 類型

A