

※本報告書は、試験法開発における検討結果を取りまとめたものであり、試験法の実施に際して参考として下さい。なお、報告書の内容と通知または告示試験法との間に齟齬がある場合には、通知または告示試験法が優先することをご留意下さい。

食品に残留する農薬等の成分である物質の 試験法開発事業報告書

アミトロール試験法（農産物）

アミトロール試験法の検討結果

1. 目的及び試験法の検討方針

アミトロールは、食品において「不検出」とされる農薬であったが、平成24年4月に「不検出」とされる農薬等の成分である物質から削除され、基準値が設けられた。平成19年度食品に残留する農薬等の成分である物質の試験法開発事業において、開発が行われているが定量限界が0.025 mg/kgに設定されている。

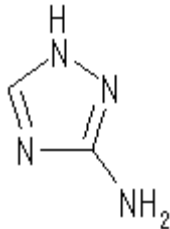
「薬事食品衛生審議会 食品衛生分科会報告書」に記載されている規制対象物質及び残留基準値案を踏まえ、定量限界0.01 mg/kgが設定可能な試験法の検討を行った。

1) 規制対象物質

アミトロール

2. 分析対象化合物の構造式、物理化学的性質及び基準値等に関する情報

1) 構造式及び物理化学的性質



化学式：C₂H₄N₄

分子量：84.1

化学名 (IUPAC)：1-*H*-1,2,4-triazol-3-ylamine

外 観：無色結晶

融 点：157～159℃

蒸気圧：3.3×10⁻⁵ mPa (20℃)

溶解性：水 >1384 g/L (pH 4)、264 g/L (pH 7)、261 g/L (pH 10) (20℃)

ジクロロメタン0.1、2-プロペン20～50、トルエン0.02、イソプロパノール27、
メタノール133～160、アセトン2.9～3.3、酢酸エチル1、*n*-ヘキサン<0.01、
n-ヘプタン及び*p*-キシレン<0.1 (以上 g/L、20℃)

オクタノール/水分配係数：Log P_{ow}=-0.969

安定性：酸性、中性及びアルカリ性で安定

(出典：The e-Pesticide Manual 15th ed.,ver.5.2)

2) 基準値の一例

りんご、日本なし、西洋なし、マルメロ、ネクタリン、あんず (アプリコットを含む)、すもも (プルーンを含む)、うめ、おうとう (チェリーを含む) 及びぶどう 0.05 ppm

[実験方法]

1. 試料

1) 購入先

都内のスーパーにて購入した。

2) 試料の採取方法

- ①りんごは花おち、しん及び果梗の基部を除き、細切均一化した。
- ②うめは果梗及び種子を除き、細切均一化した。
- ③ぶどうは果梗を除き、細切均一化した。
- ④小麦は425 μm の標準網ふるいを通るように粉碎し均一化した。
- ⑤なたねは2 mmのふるいを通るように粉碎し均一化した。

2. 試薬・試液

1) 標準品

アミトロール標準品：純度99.9%（富士フィルム和光純薬製）

2) 試薬

酢酸エチル、メタノール：残留農薬試験用（関東化学製）

アセトニトリル、メタノール：高速液体クロマトグラフ用（関東化学製）

ギ酸、酢酸アンモニウム：試薬特級（関東化学製）

アンモニア水（28%）：試薬特級（小宗化学製）

スルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム
：Oasis MCX（充てん量150 mg、Waters製）

アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム：Sep-Pak plus NH2（充てん量360 mg、Waters製）

3) 標準溶液、試液の調製方法

①標準溶液の調製方法

標準原液：アミトロール標準品25 mgを精秤し、メタノールに溶かして50 mLに定容し、500 mg/L溶液を調製した。

検量線用標準溶液：アミトロール標準原液をアセトニトリル及びメタノール（3：1）混液で希釈し、0.001～0.015 mg/Lの濃度の標準溶液を調製した。

添加用標準溶液：アミトロール標準原液をメタノールで希釈して0.2及び1 mg/Lの濃度の標準溶液を調製した。

②試液の調製方法

2 vol%ギ酸

ギ酸10 mLに水を加えて混合し、500 mLとした。

アンモニア水及びメタノール（1：99）混液

アンモニア水1 mL及びメタノール99 mLを混合した。

酢酸エチル及びメタノール（4：1）混液

酢酸エチル80 mL及びメタノール20 mLを混合した。

1 mol/L酢酸アンモニウム溶液

酢酸アンモニウム15.43 gを水に溶解し200 mLとした。

10 mmol/L酢酸アンモニウム含有アセトニトリル及び水（19：1）混液

アセトニトリル950 mL、水40 mL及び1 mol/L酢酸アンモニウム溶液10 mLを混合した。

3. 装置

ホモジナイザー：ウルトラタラックスT-25ベーシック（イカ・ジャパン製）

ロータリーエバポレーター：R-200（BÜCHI製）等

LC-MS/MS

	型式	会社
MS 装置	LC/MS-8050	島津製作所
LC 装置	Nexera X2 (LC30AD)	島津製作所
解析ソフト	LabSolutions LCMS	島津製作所

4. 測定条件

LC 条件	
カラム	Atlantis Silica HILIC サイズ：内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 5 μm 会社：Waters
移動相流速 (mL/min)	0.3
注入量 (μL)	10
カラム温度 (°C)	40
移動相	10 mmol/L酢酸アンモニウム含有アセトニトリル及び水 (19 : 1) 混液
MS 条件	
測定モード	MS/MS、SRM (選択反応モニタリング)
イオン化モード	ESI (+)
キャピラリ電圧 (kV)	4.0
コーン電圧 (V)	16
イオン化室温度 (°C)	300
脱溶媒ガス	窒素 10 L/min
コリジョンガス	アルゴン
定量イオン (m/z)	85→57 [コリジョンエネルギー：22(eV)]
定性イオン (m/z)	85→43 [コリジョンエネルギー：25(eV)]
保持時間 (min)	4.3

5. 定量

[実験方法] 2. 3) ①に従い調製した標準溶液10 μLをLC-MS/MSに注入し、得られたピーク面積から絶対検量線法で検量線を作成した。試験溶液10 μLをLC-MS/MSに注入し、得られたピーク面積と作成した検量線からアミトロールの量を算出した。

6. 添加試料の調製

2. 3) で調製した添加用標準溶液を使用した。

りんご、うめ及びぶどう（添加濃度：0.05 ppm相当）：1. 2) の試料20.0 gに添加用標準溶液1 mg/Lを1 mL添加しよく混合した後、30分間放置した。

りんご、うめ及びぶどう（添加濃度：0.01 ppm相当）：1. 2) の試料20.0 gに添加用標準溶液0.2 mg/Lを1 mL添加しよく混合した後、30分間放置した。

小麦及びなたね（添加濃度：0.01 ppm相当）：1. 2) の試料10.0 gに添加用標準溶液0.2 mg/Lを0.5 mL添加しよく混合した後、30分間放置した。

7. 試験溶液の調製

アミトロールを試料からメタノールを用いて抽出し、スルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムで精製した。小麦及びなたねは、さらにアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムで精製した後、LC-MS/MSで定量及び確認した。

1) 抽出

①小麦及びなたねの場合

1. 2) の試料10.0 gを200 mL遠心管に量り採り、水20 mLを加え30分間放置した。メタノール100 mLを加え、ホモジナイズした後、ケイソウ土を厚さ約1 cmに敷いたろ紙（直径60 mm、No. 4、桐山製作所製）を用いて吸引ろ過した。ろ紙上の残留物にメタノール50 mLを加えてホモジナイズした後、上記と同様にろ過した。得られたろ液を合わせて、メタノールで正確に200 mLとした。この溶液から正確に8 mLを分取し、50 mL遠心管に採り、2 vol%ギ酸10 mLを加えた。

②りんご、うめ及びぶどうの場合

1. 2) の試料20.0 gを200 mL遠心管に量り採り、メタノール100 mLを加え、ホモジナイズした後、ケイソウ土を厚さ約1 cmに敷いたろ紙（直径60 mm、No. 4、桐山製作所製）を用いて吸引ろ過した。ろ紙上の残留物にメタノール50 mLを加えてホモジナイズした後、上記と同様にろ過した。得られたろ液を合わせて、メタノールで正確に200 mLとした。この溶液から正確に8 mLを分取し、50 mL遠心管に採り、2 vol%ギ酸10 mLを加えた。

2) 精製

①小麦及びなたねの場合

a) スルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体カラムクロマトグラフィー

スルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム (150 mg) に、メタノール及び2 vol%ギ酸各5 mLを順次注入し、各流出液は捨てた。このカラムに1) で得られた溶液を注入した後、水5 mL及びメタノール10 mLを注入し、各流出液を捨てた。次いで、アンモニア水及びメタノール (1 : 99) 混液5 mLを注入し、溶出液を40°C以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物をメタノール1 mLに溶かした後、酢酸エチル4 mLを加えた。

b) アミノプロピルシリル化シリカゲルカラムクロマトグラフィー

アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム (360 mg) に、酢酸エチル及びメタノール (4 : 1) 混液5 mLを注入し、流出液は捨てた。このカラムにa) で得られた溶液を注入した後、酢酸エチル及びメタノール (4 : 1) 混液10 mLを注入し、溶出液を40°C以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物をアセトニトリル及びメタノール (3 : 1) 混液に溶かし、正確に2 mLとしたものを試験溶液とした。

②りんご、うめ及びぶどうの場合

スルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム (150 mg) に、メタノール及び2 vol%ギ酸各5 mLを順次注入し、各流出液は捨てた。このカラムに1) で得られた溶液を注入した後、水5 mL及びメタノール10 mLを注入し、各流出液を捨てた。次いでアンモニア水及びメタノール (1 : 99) 混液5 mLを注入し、溶出液を40°C以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物をアセトニトリル及びメタノール (3 : 1) 混液に溶かし、正確に4 mLとしたものを試験溶液とした。

[分析法フローチャート]

秤 取

- | 小麦及びなたね：試料10.0 gに水20 mLを加え30分間放置
- ↓ りんご、うめ及びぶどう：試料20.0 g

メタノール抽出

- | メタノール100 mLを加え、ホモジナイズ
- | 吸引ろ過
- | 残留物にメタノール50 mLを加え、ホモジナイズ
- | 吸引ろ過
- | ろ液を合わせ、メタノールで正確に200 mLとする
- ↓ 正確に8 mL分取し、2 vol%ギ酸10 mLを加える

スルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム (150 mg) 精製

- | メタノール及び2 vol%ギ酸5 mLでコンディショニング
- | 全量注入
- | 水5 mL及びメタノール10 mLで洗浄
- ↓ アンモニア水及びメタノール (1 : 99) 混液5 mLで溶出

濃縮 (溶媒除去)

- | 小麦及びなたね：残留物をメタノール1 mLに溶解後、酢酸エチル4 mLを加える
- | りんご、うめ及びぶどう：残留物をアセトニトリル及びメタノール (3 : 1) 混液に溶かし、
- ↓ 正確に4 mLとしたものを試験溶液とする。

アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム (360 mg) 精製 (小麦及びなたねのみ実施)

- | 酢酸エチル及びメタノール (4 : 1) 混液5 mLでコンディショニング
- | 全量注入、溶出
- ↓ 酢酸エチル及びメタノール (4 : 1) 混液10 mLで溶出

濃縮 (溶媒除去) (小麦及びなたねのみ実施)

- | 残留物をアセトニトリル及びメタノール (3 : 1) 混液に溶かし、正確に2 mLとしたものを試
- ↓ 験溶液とする。

LC-MS/MS定量

10 µL注入

8. マトリックス添加標準溶液の調製

りんご、うめ、ぶどう、小麦及びなたねはブランク試験溶液から1 mL分取し溶媒を除去した後、0.002 mg/Lの標準溶液1 mLに溶解したものを、マトリックス添加標準溶液とした。

りんご、うめ及びぶどうは、ブランク試験溶液から1 mL分取し溶媒を除去した後、0.01 mg/Lの標準溶液1 mLに溶解したものを、マトリックス添加標準溶液とした。

[結果及び考察]

1. 測定条件の検討

1) MS条件の検討

アミトロールのESI (+) モード測定時のマススペクトルを図1に示した。その結果から、基準ピークとして85が得られたので、アミトロールのプロトン付加分子 (m/z 85 $[M+H]^+$) をプリカーサーイオンとした。また、 m/z 85をプリカーサーイオンとした場合のプロダクトイオンスペクトルを図2に示した。強度として m/z 43のプロダクトイオンが強く、次いで m/z 57であったが、 m/z 43はノイズが大きくS/N比は m/z 57の方が大きかったため、 m/z 57を定量用イオン、 m/z 43を定性用イオンとした。

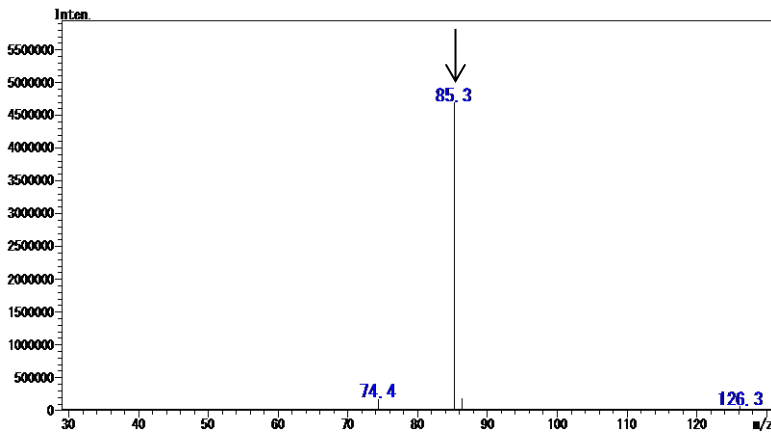


図 1 アミトロールのマススペクトル

スキャン範囲：30~130 m/z

測定条件：ESI (+)、CV=41 (CV：コーン電圧)

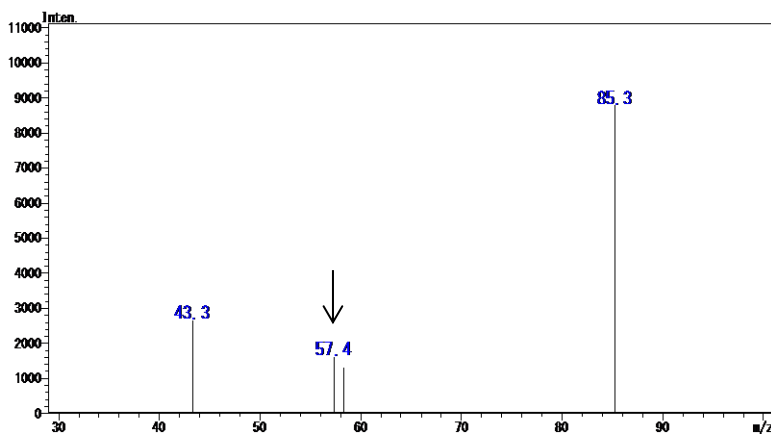


図 2-1 アミトロールのプリカーサーイオン m/z 85 のプロダクトイオンスペクトル (定量用)

スキャン範囲：30~100 m/z

測定条件：ESI (+)、CV=16、CE=22 (CV：コーン電圧、CE：コリジョンエネルギー)

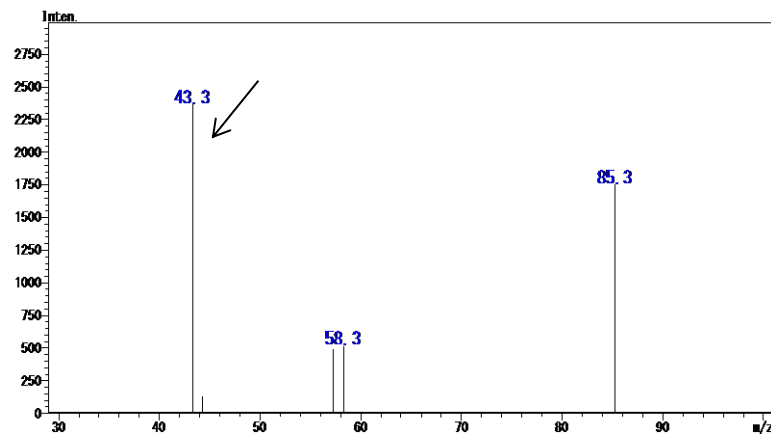


図 2-2 アミトロールのプリカーサーイオン m/z 85 のプロダクトイオンスペクトル (定性用)

スキャン範囲：30~100 m/z

測定条件：ESI (+)、CV=16、CE=25 (CV：コーン電圧、CE：コリジョンエネルギー)

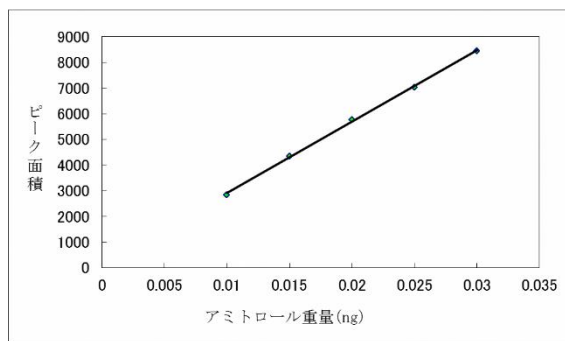
2) LC 条件の検討

分離カラムについて、アミトロールは高極性物質であるため、ODSカラムにはイオンペア剤を使用しないと保持が困難である。イオンペア剤を使用せず、測定を行うためにHILICカラムを検討した。カラムにAtlantis Silica HILIC (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 5 μm) を、移動相に、アセトニトリル及び酢酸アンモニウム溶液の混液を用いて検討を行ったところ、ピーク形状、分離、再現性及び感度のい

いずれも良好な結果が得られたので、分離カラムについて、Atlantis Silica HILIC（内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 5 μm）を、移動相については、アセトニトリル及び10 mmol/L酢酸アンモニウム溶液（19：1）混液とした。

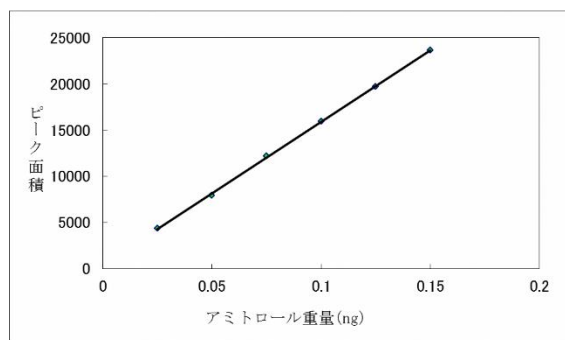
3) 検量線

図3にアミトロールの検量線の例を示した。0.001 mg/L (0.01 ng) ~0.003 mg/L (0.03 ng) 及び 0.0025 mg/L (0.025 ng) ~0.015 mg/L (0.15 ng) の濃度範囲で作成した検量線の相関係数は、いずれも 0.999以上であり良好な直線性を示した。



データ処理装置設定条件の一例
 データ処理ソフト（メーカー）：LabSolutions LCMS
 （島津製作所製）
 ピークの定量方法：ピーク面積法
 検量線の種類：最小二乗法
 検量線基準ピークの重量：0.01 ng~0.03 ng
 傾き (a) : a=278115.5
 切片 (b) : b=128.3
 R : 0.999

図 3-1 アミトロール検量線例 (m/z 85→43)



データ処理装置設定条件の一例
 データ処理ソフト（メーカー）：LabSolutions LCMS
 （島津製作所製）
 ピークの定量方法：ピーク面積法
 検量線の種類：最小二乗法
 検量線基準ピークの重量：0.025 ng~0.15 ng
 傾き (a) : a=154855.7
 切片 (b) : b=414.2
 R : 0.999

図 3-2 アミトロール検量線例 (m/z 85→43)

4) 定量限界

定量限界の算出結果を以下に示した。

①小麦及びなたねの場合

$$0.01 \text{ mg/kg} [(2 \text{ mL}/0.4 \text{ g}^{*1}) \times (0.02 \text{ ng}/10 \mu\text{L})]$$

$$*1 \quad 10.0 \text{ g} \times 8 \text{ mL}/200 \text{ mL}$$

②りんご、うめ及びぶどうの場合

$$0.01 \text{ mg/kg} [(4 \text{ mL}/0.8 \text{ g}^{*2}) \times (0.02 \text{ ng}/10 \mu\text{L})]$$

$$*2 \quad 20.0 \text{ g} \times 8 \text{ mL}/200 \text{ mL}$$

2. 試験溶液調製法の検討

1) 抽出方法の検討

①抽出溶媒について

通知法では1回目の抽出溶媒にエタノール、2回目の抽出溶媒に60 vol%エタノールを用いている。2回目の抽出溶媒を含水にする必要があるのか検討した。また、アミトロールの溶解性が高く、農薬の抽出

で多く用いられているメタノールについてもエタノールと同様に検討した。

アミトロール4 µgを添加し、30分間放置した小麦10 gに、水20 mLを加え30分間放置した後、表1の抽出条件でホモジナイズ抽出を行い回収率を調べ、結果を表1に示した。アミトロールは1回目の抽出で9割以上が抽出され、いずれの条件でも2回目の抽出まででほぼ100%が抽出された。本検討では抽出溶媒に1回目、2回目ともにメタノールを用いることとした。

表1 回収率 (%)

抽出条件	回収率	合計
1回目 エタノール 100 mL	89	97
2回目 エタノール 50 mL	8	
3回目 エタノール 50 mL	0	
1回目 エタノール 100 mL	90	103
2回目 60 vol%エタノール 50 mL	13	
3回目 60 vol%エタノール 50 mL	0	
1回目 メタノール 100 mL	91	99
2回目 メタノール 50 mL	8	
3回目 メタノール 50 mL	0	
1回目 メタノール 100 mL	97	106
2回目 60 vol%メタノール 50 mL	9	
3回目 60 vol%メタノール 50 mL	0	

②加熱還流について

通知試験法及び平成19年度食品に残留する農薬等の成分である物質の試験法開発事業では過酸化水素水を加え加熱還流を行っている。この操作の目的は精製、あるいは抱合体や配糖体の分解が考えられるが、アミトロールに抱合体あるいは配糖体化合物に関する情報はなく、規制の対象ともなっていない。精製が目的であれば、還流操作を行わずともカラム等での精製で十分に測定が可能であったため、過熱還流操作は不採用とした。

2) 精製カラムの検討

①スルホンジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムの溶出状況

スルホンジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム (MCX) をメタノール及び2 vol%ギ酸各5 mLで予備洗浄した後、アミトロール0.1 µgを2 vol%ギ酸10 mLで負荷した。溶出状況を表2に示した。アミトロールは負荷液、水5 mL及びメタノール10 mLでは溶出せず、アンモニア水及びメタノール (1 : 99) 混液5 mLで溶出することが可能であった。また、なたね及び小麦0.4 g相当共存下での溶出状況も確認し、溶出状況に違いがないことを確認した。なお、溶出に問題はなかったが、MCXのみの精製により調製した試験溶液では測定時にマトリックスの影響によるイオン化阻害が確認されたため、追加精製が必要と考えられた。

表2 スルホンジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムからの溶出状況 (%)

	2vol%ギ酸 0-10 mL	水 0-5 mL	メタノール 0-10 mL	アンモニア水及びメタノール (1 : 99) 混液			合計
				0-5 mL	5-10 mL	10-15 mL	
試薬回収	0	0	0	96	tr	0	96
なたね	0	0	0	95	0	0	95
小麦	0	0	0	97	0	0	97

Oasis MCX、充てん量 150 mg、Waters 製

添加量 : 0.1 µg なたね及び小麦共存下は0.5 µg

②アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムの溶出状況

アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムを酢酸エチル及びメタノール（4：1）混液10 mLで予備洗浄した後、アミトロール0.1 µgを酢酸エチル及びメタノール（4：1）混液5 mLで負荷、溶出したときの溶出状況を表3に示した。アミトロール負荷後、酢酸エチル及びメタノール（4：1）混液10 mLで溶出することが可能であった。また、なたね及び小麦0.4 g相当共存下での溶出状況も確認し、溶出状況に違いがないことを確認した。本精製を実施することで、MCXのみの精製ではマトリックスの影響によるイオン化阻害が確認されたなたね及び小麦試料について、試料マトリックスの影響は改善できた。なお、添加回収試験実施予定検体のうち、りんご、うめ及びぶどうではアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムを省略しても測定が可能であった。

表3 アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムからの溶出状況（%）

	酢酸エチル及びメタノール（4：1）混液				合計
	0-5 mL	5-10 mL	10-15 mL	15-20 mL	
試薬回収	45	43	5	0	93
なたね	48	56	8	0	112
小麦	52	55	5	0	112

Sep-Pak plus NH₂、充てん量360 mg、Waters製
添加量：0.1 µg

3. 添加回収試験

りんご、うめ、ぶどう、小麦及びなたねの5食品を用いて、[実験方法] 7. 試験溶液の調製に従って添加回収試験を実施した。

添加回収試験における回収率100%相当の溶媒標準溶液、各食品のブランク試料及び添加試料の代表的なクロマトグラムを図4に示した。また、各食品のブランク試料のスキャン測定による代表的なトータルイオンクロマトグラムを図5に示した。

1) 選択性

選択性の結果を表4に示した。検討した何れの試料においてもアミトロールの定量を妨害するようなピークは認められず、選択性は良好であった。

表4 選択性の評価

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 [検出限界] (mg/kg)	基準値 (ppm)	妨害ピークの許容範囲の評価			ピーク面積(高さ) ^{*1}							選択性 の評価 ³	備考	
					評価濃度 (ppm)	評価基準	面積又は 高さの別	ブランク			マトリックス添加標準溶液 ^{*2}		面積(高さ) 比(a)/(b)				
								n=1	n=2	平均(a)	n=1	n=2		平均(b)			
1	アミトロール	りんご	0.01	0.05	基準値	0.05	< 0.100	面積	0	0	0			#DIV/0!	#DIV/0!	○	
		うめ	0.01	0.05	基準値	0.05	< 0.100	面積	0	0	0			#DIV/0!	#DIV/0!	○	
		ぶどう	0.01	0.05	基準値	0.05	< 0.100	面積	0	0	0			#DIV/0!	#DIV/0!	○	
		小麦	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0			#DIV/0!	#DIV/0!	○	
		なたね	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0			#DIV/0!	#DIV/0!	○	

*1 ブランク試料、標準溶液の順に注入して測定した結果から評価する。(必要に応じて起爆注入を行う。)

*2 試料中の濃度が「評価濃度」相当になるように、ブランク試料の試験溶液で調製した標準溶液(マトリックス添加標準溶液)を用いる。ブランク試料に妨害ピークが観察されなかった場合には、標準溶液のピーク面積(高さ)は求めなくても良い。

*3 面積(高さ)比が、妨害ピークの許容範囲の評価基準に適合する場合には「○」、適合しない場合には「×」を記載する。

2) 真度、精度及び定量限界

真度及び併行精度の検討結果を表5に示した。アミトロールの真度は94.4~106.8%、併行精度は2.7~11.3%であり、目標値を十分に満たした。アミトロールのS/N比の平均値は34.8~49.0でありS/N≥10を十分に満たした。

表5 真度、精度及び定量限界の評価

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 [検出限界] (mg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	定量限界 の評価 ^{*1}	検量線			回収率(%)					真度 (%)	併行精度 (RSD%)	S/N ^{*2}			備考
							傾き	切片	r ² 値	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5			Max.	Mn.	平均値	
1	アミトロール	りんご	0.01	0.05	0.01	S/N	162799	207	0.9960	115.3	93.0	109.2	98.8	106.3	104.5	8.4	46.3	39.3	42.8	
		りんご	0.01	0.05	0.05	-	154855	414	0.9997	97.8	108.0	105.2	100.6	86.7	99.7	8.3	-	-	#DIV/0!	
		うめ	0.01	0.05	0.01	S/N	162799	207	0.9960	102.5	107.8	107.6	108.4	103.1	105.9	2.7	47.3	40.8	44.0	
		うめ	0.01	0.05	0.05	-	154855	414	0.9997	95.5	108.1	97.5	95.3	104.2	100.1	5.7	-	-	#DIV/0!	
		ぶどう	0.01	0.05	0.01	S/N	278115	128	0.9992	94.6	104.8	106.4	108.9	96.9	102.3	6.1	59.1	38.9	49.0	
		ぶどう	0.01	0.05	0.05	-	154855	414	0.9997	87.1	112.5	108.3	106.6	119.4	106.8	11.3	-	-	#DIV/0!	
		小麦	0.01	0.01	0.01	S/N	226064	282	0.9993	97.7	90.5	108.4	102.2	100.7	99.9	6.6	37.0	32.6	34.8	
		なたね	0.01	0.01	0.01	S/N	226064	282	0.9993	94.2	89.4	98.5	102.3	87.8	94.4	6.4	44.1	29.5	36.8	

*1 S/Nを求める必要がある場合には「S/N」と表示される。

*2 得られた回収率の中で最大値を与えるピーク(Max.)及び最小値を与えるピーク(Mn.)のそれぞれのS/Nを求める。

3) 試料マトリックスの測定への影響

試料マトリックスの測定への影響について検討した結果を表6に示した。添加回収試験における回収率100%相当濃度になるように調製したマトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積比を求めた。アミトロールの面積比は0.97~1.08であり、測定への影響は少ないものと考えられた。

添加回収試験における真度を表6で求めたピーク面積比で除して補正真度を求め、表7に示した。補正真度は92.7~108.3%であり、試料マトリックスの測定への影響と真度との間に矛盾は見られなかった。

表6 試料マトリックスの測定への影響

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 [検出限界] (mg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	標準溶液 濃度 ^{*1} (mg/L)	面積又は 高さの別	ブランク ^{*3}	ピーク面積(高さ) ^{*2}							備考
									マトリックス添加標準溶液 ^{*4}			溶媒標準溶液			ピーク面積 (高さ)比 ^{*5}	
									n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均		
1	アミトロール	りんご	0.01	0.05	0.01	0.002	面積	0	5471	5410	5441	5261	5120	5191	1.05	
		りんご	0.01	0.05	0.05	0.01	面積	0	28453	28881	28667	26783	29480	28132	1.02	
		うめ	0.01	0.05	0.01	0.002	面積	0	5758	5570	5664	5238	5299	5269	1.08	
		うめ	0.01	0.05	0.05	0.01	面積	0	27678	29091	28385	28385	29813	29099	0.98	
		ぶどう	0.01	0.05	0.01	0.002	面積	0	5161	5304	5233	5174	5038	5106	1.02	
		ぶどう	0.01	0.05	0.05	0.01	面積	0	29084	28828	28956	29103	29631	29367	0.99	
		小麦	0.01	0.01	0.01	0.002	面積	0	4165	4777	4471	4229	4065	4147	1.08	
		なたね	0.01	0.01	0.01	0.002	面積	0	5170	4941	5056	5004	5393	5199	0.97	

*1 添加回収試験における回収率100%相当濃度になるように、ブランク試料の試験溶液で調製した標準溶液(マトリックス添加標準溶液)及び溶媒で調製した標準溶液(溶媒標準溶液)を作成する。

*2 マトリックス添加標準溶液及び溶媒標準溶液の順に交互に2回以上測定した結果から評価する。(必要に応じて起爆注入を行う。)

*3 ブランクにピークが認められた場合には、マトリックス添加標準溶液の値はブランク値を差し引いた値を用いる。

*4 マトリックス添加標準溶液は試験当日のブランク試料の試験溶液を用いて調製する。

*5 マトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積(又は高さ)の比を求める。

表7 補正真度

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	基準値 ^{*1} (ppm)	添加濃度 (ppm)	真度 (%)	ピーク面積 比 (%)	補正真度 (%)	備考
1	アミトロール	りんご	0.01	0.05	0.01	104.5	1.05	99.5	
		りんご	0.01	0.05	0.05	99.7	1.02	97.8	
		うめ	0.01	0.05	0.01	105.9	1.08	98.5	
		うめ	0.01	0.05	0.05	100.1	0.98	102.6	
		ぶどう	0.01	0.05	0.01	102.3	1.02	99.8	
		ぶどう	0.01	0.05	0.05	106.8	0.99	108.3	
		小麦	0.01	0.01	0.01	99.9	1.08	92.7	
		なたね	0.01	0.01	0.01	94.4	0.97	97.1	

*1 基準値は、基準値未設定の場合には一律基準(0.01 ppm)を用いる。

4. 考察

抽出はアミトロールの溶解性を考慮しメタノールを用いた。精製カラムについては、スルホンジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム及びアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムについて検討したところ、良好な結果が得られた。なお、りんご、うめ及びぶどうはスルホンジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムのみでの精製で良好な結果が得られた。

開発した方法を用いて、りんご等5食品の添加回収試験を行った結果、選択性は良好で何れの試料においても妨害ピークは認められず、アミトロールの真度は94.4～106.8%、併行精度は2.7～11.3%の良好な結果が得られたことから、本試験法は、穀類、種実類及び果実等の農産物に適応可能であると考えられた。

[結論]

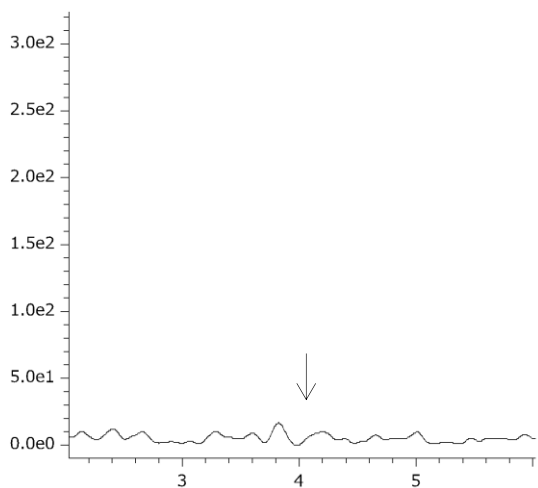
農産物中のアミトロールの試験法として、試料からメタノールを用いて抽出し、スルホンジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムで精製した。小麦及びなたねは、さらにアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラムで精製した後、LC-MS/MSで定量及び確認する方法を開発した。

開発した試験法をりんご、うめ、ぶどう、小麦及びなたねに適用した結果、選択性は良好で何れの試料においても妨害ピークは認められず、アミトロールの真度は94.4～106.8%、併行精度は2.7～11.3%、定量限界は0.01 mg/kgが可能であることが確認できた。

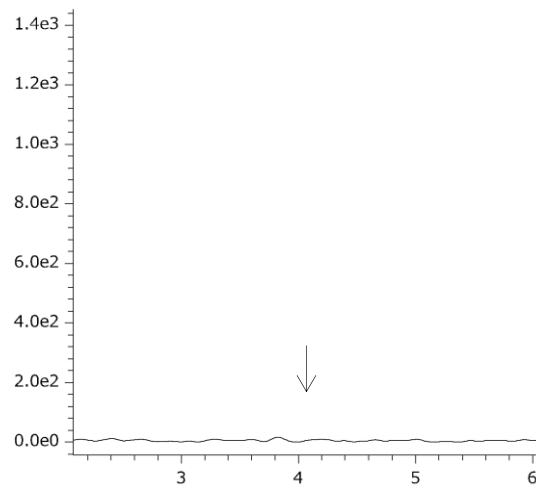
[参考文献]

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 アミトロール試験法 (農産物)

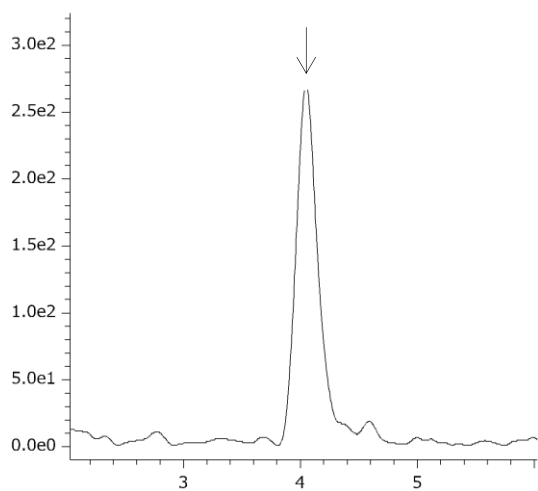
アミトロールの添加回収試験におけるクロマトグラム
 ブランク



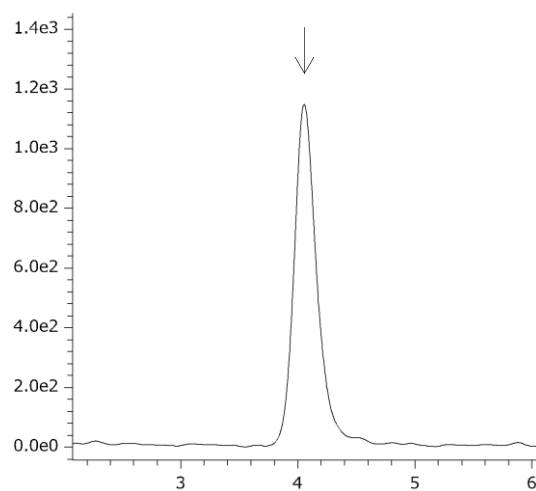
ブランク



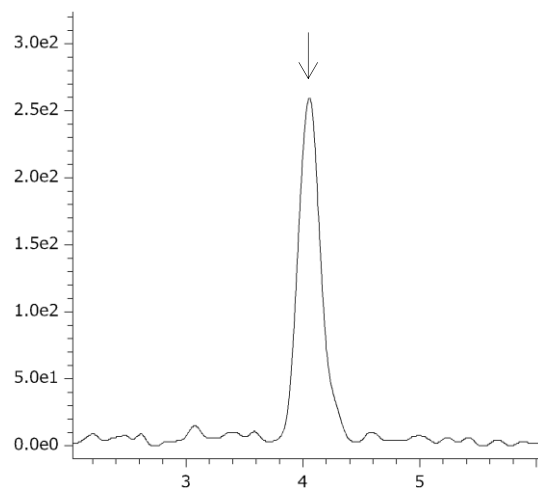
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

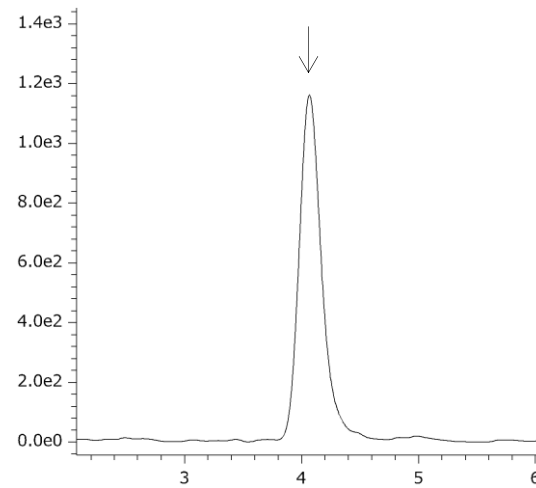
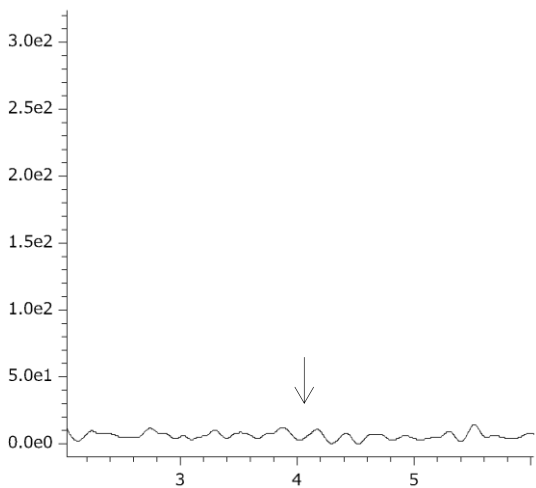


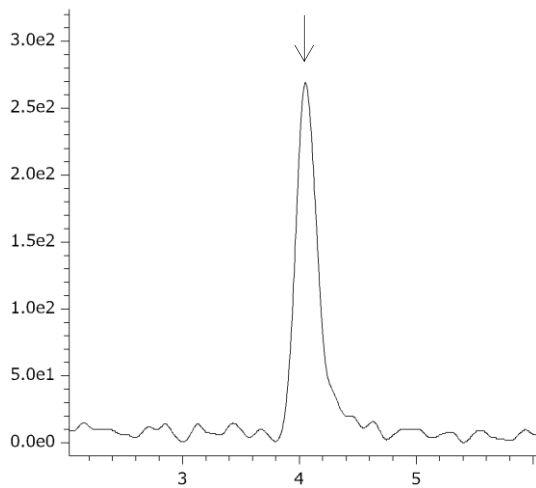
図 4-1 りんごの SRM クロマトグラム
 アミトロール
 ($m/z +85 \rightarrow 57$)
 添加濃度 : 0.01 ppm

図 4-2 りんごの SRM クロマトグラム
 アミトロール
 ($m/z +85 \rightarrow 57$)
 添加濃度 : 0.05 ppm

ブランク



添加試料



標準溶液

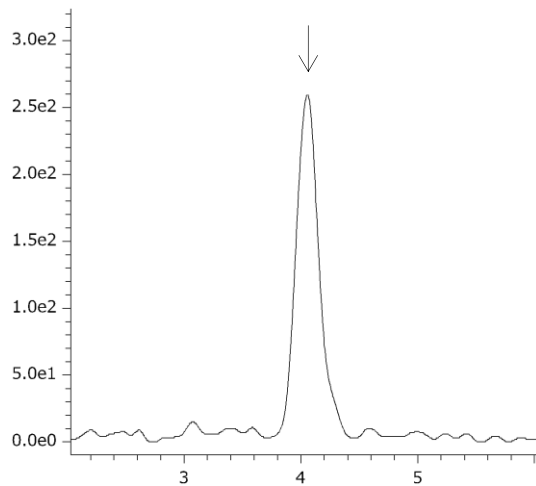
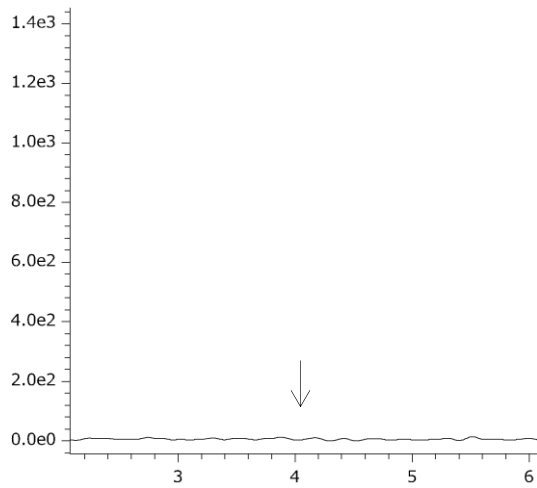
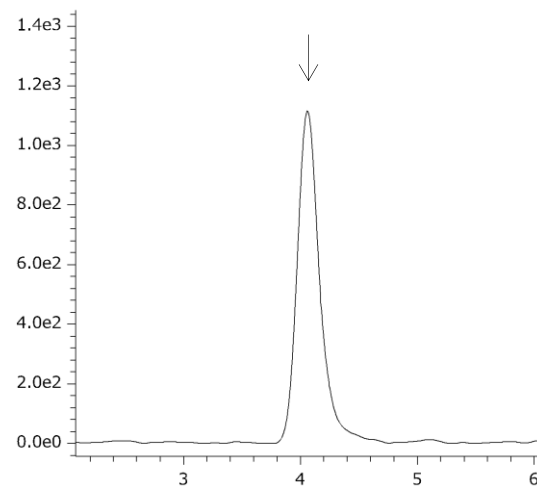


図 4-3 うめの SRM クロマトグラム
アミトロール
($m/z + 85 \rightarrow 57$)
添加濃度 : 0.01 ppm

ブランク



添加試料



標準溶液

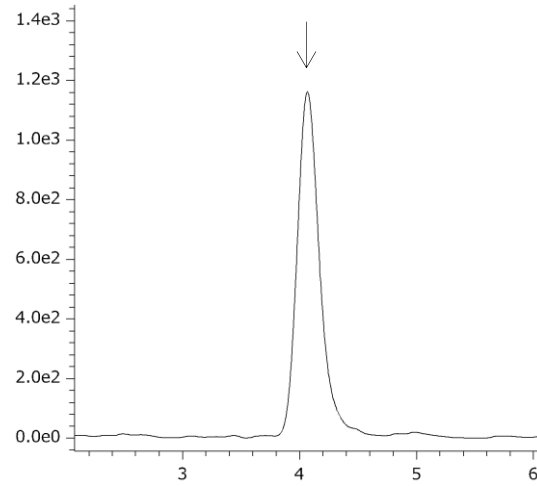
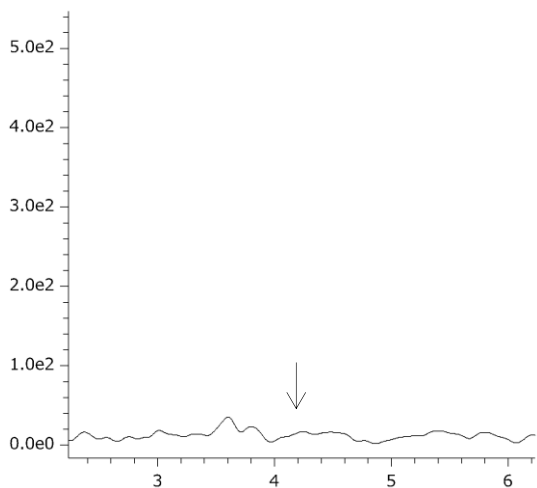
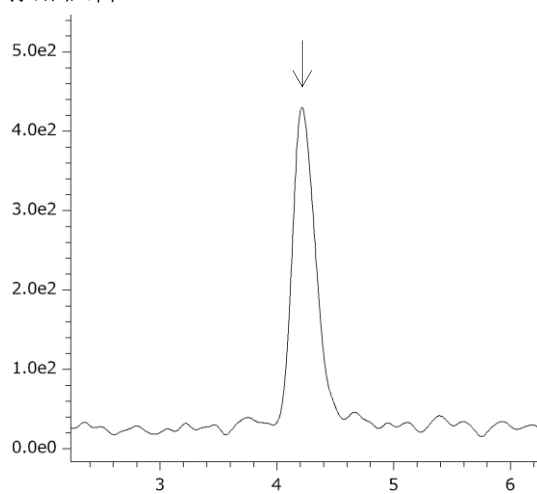


図 4-4 うめの SRM クロマトグラム
アミトロール
($m/z + 85 \rightarrow 57$)
添加濃度 : 0.05 ppm

ブランク



添加試料



標準溶液

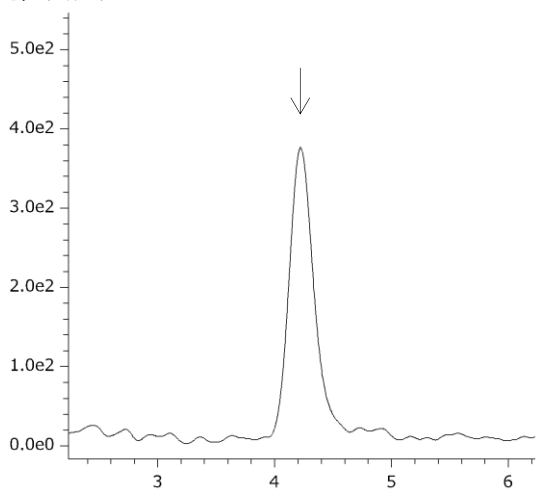


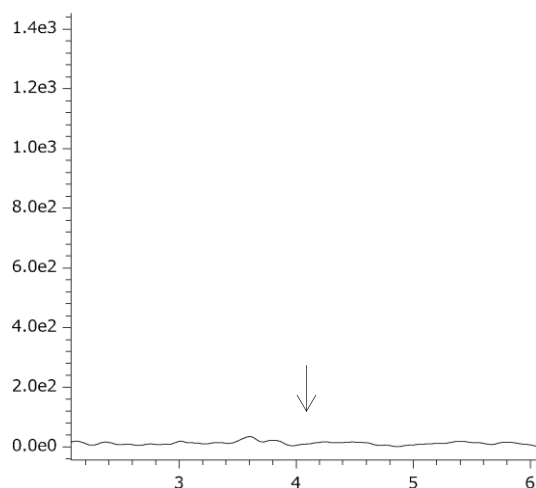
図 4-5 ぶどう SRM クロマトグラム

アミトロール

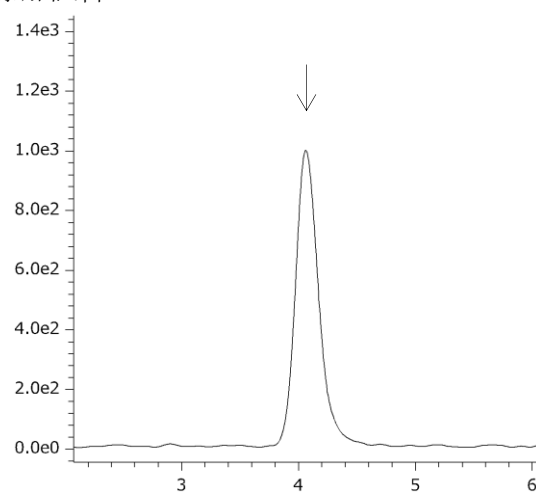
(m/z +85→57)

添加濃度 : 0.01 ppm

ブランク



添加試料



標準溶液

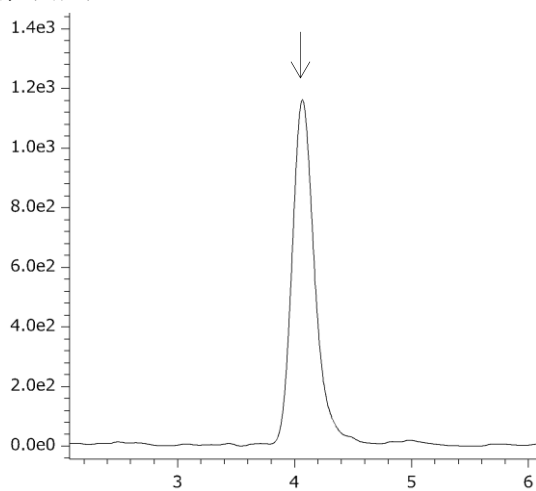


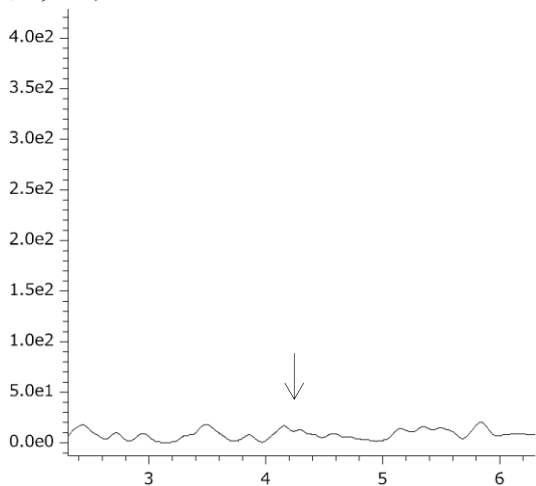
図 4-6 ぶどうの SRM クロマトグラム

アミトロール

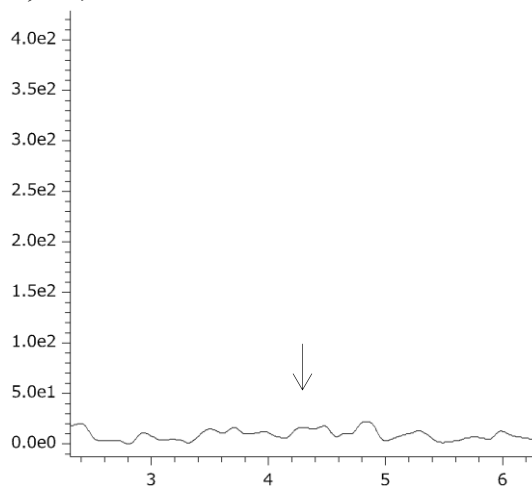
(m/z +85→57)

添加濃度 : 0.05 ppm

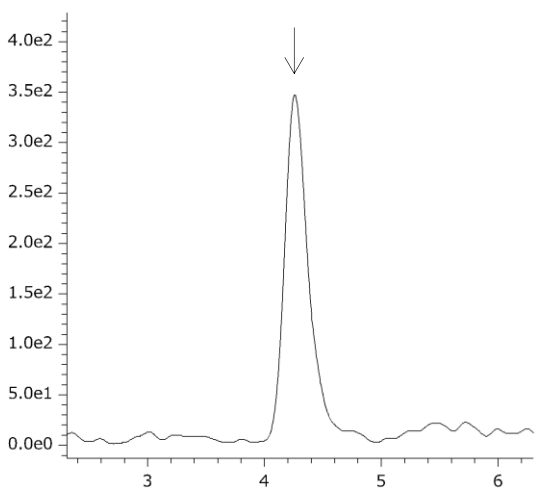
ブランク



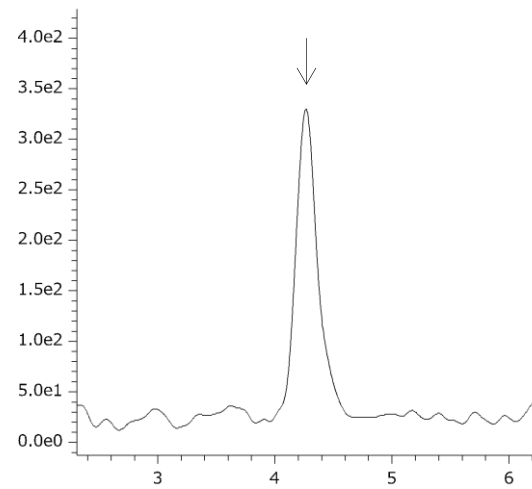
ブランク



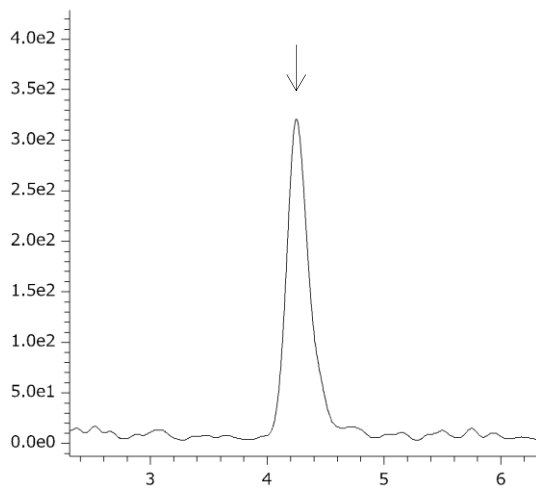
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

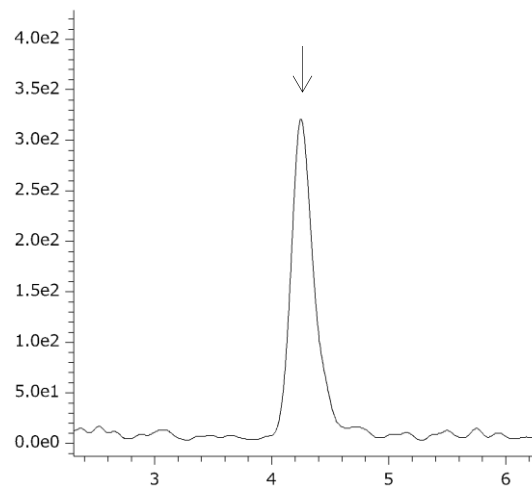
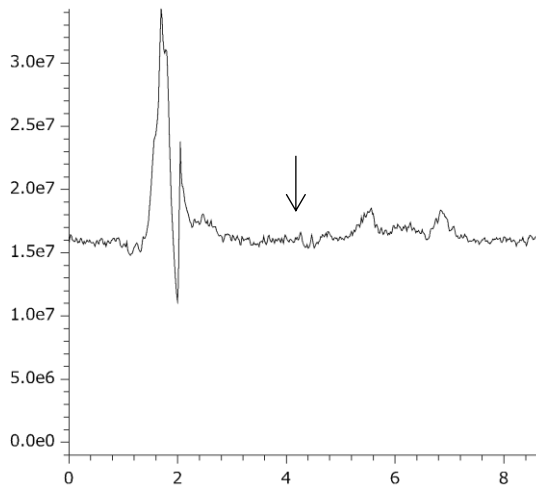


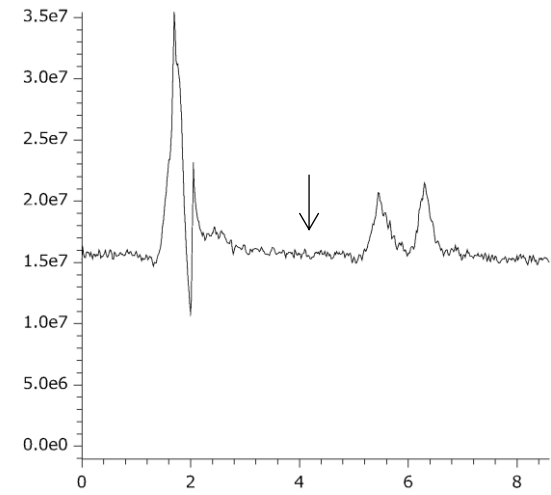
図 4-7 小麦の SRM クロマトグラム
アミトロール
($m/z + 85 \rightarrow 57$)
添加濃度 : 0.01 ppm

図 4-8 なたねの SRM クロマトグラム
アミトロール
($m/z + 85 \rightarrow 57$)
添加濃度 : 0.01 ppm

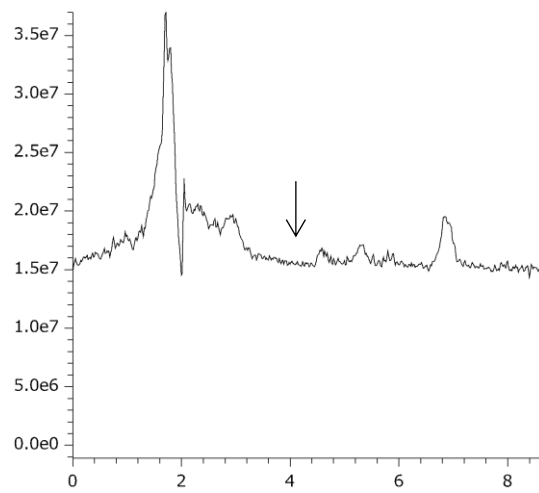
りんご



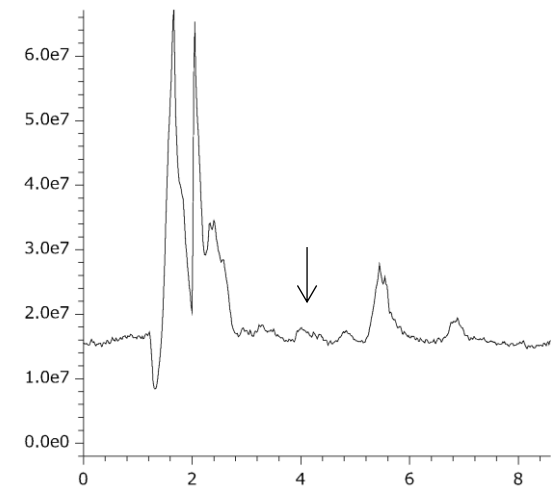
うめ



ぶどう



小麦



なたね

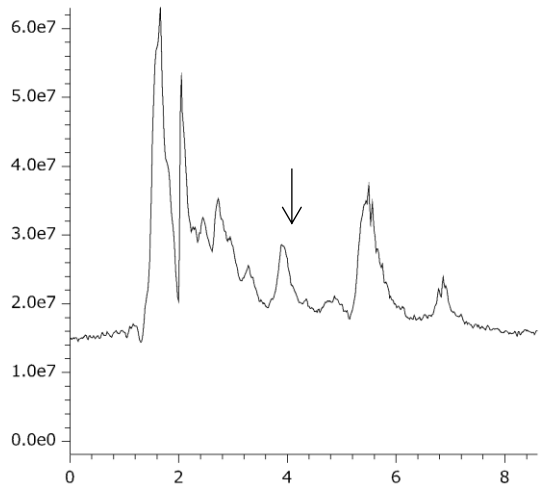


図5 ブランク試料のトータルイオンクロマトグラム
(スキャン範囲：30～500 m/z)