

※ 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の参考としてください。なお、報告書の内容と通知又は告示試験法との間に齟齬がある場合には、通知又は告示試験法が優先することに御留意ください。

# 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

## アミノピラリド試験法 (農産物)

## アミノピラリド試験法（農産物）の検討結果

### [緒言]

#### 1. 目的及び試験法の検討方針

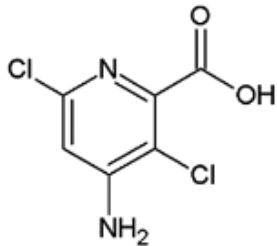
アミノピラリドは、ダウ・アグロサイエンス社（現コルテバ・アグリサイエンス社）により開発されたピリジンカルボン酸系の除草剤である。作用機構は、植物のオーキシシン受容体に作用し、正常な生育を抑制することにより、成長を阻害するものと考えられている。

現在日本では農薬として登録されておらず、ポジティブリスト制導入に伴う暫定基準値が設定されている。

農産物を対象としたアミノピラリドの試験法は報告されていないため、本検討では、小麦を対象として定量限界0.01 ppmが測定可能な個別試験法の検討を行った。

#### 2. 分析対象物質の構造式、物理化学的性質、基準値等に関する情報

##### 1) 構造式及び物理化学的性質



CAS No. : 150114-71-9

化学式 : C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

分子量 : 207.0

化学名 (IUPAC) : 4-Amino-3,6-dichloropyridine-2-carboxylic acid

外 観 : 白色粉末

融 点 : 163.5°C

蒸気圧 : 9.52 × 10<sup>-6</sup> mPa (20°C)

酸解離定数 (pKa) : 2.56 (20~25°C)

溶解性 (20~25°C) : 水 2,480.0 mg/L (非緩衝液、18°C)、水 2.59 × 10<sup>5</sup> mg/L (pH 7)

アセトン 29.2 g/L、1,2-ジクロロエタン 0.189 g/L、酢酸エチル 4 g/L、

メタノール 52.2 g/L、キシレン 0.043 g/L、*n*-ヘプタン <0.010 g/L

安定性 : 安定 (pH5、7、9、31日間)

オクタノール/水分配係数 (log K<sub>ow</sub>) : -2.96 (pH 9)、-1.75 (pH 5)、0.201 (非緩衝液)

(出展 : The Pesticide Manual 17th Edition)

##### 2) 基準値（農産物のみ抜粋）

食品名	基準値(ppm)
小麦	0.04

## [実験方法]

### 1. 試料

#### 1) 購入先

試料は国産のものを愛知県内の小売店にて購入した。

#### 2) 試料の採取方法

小麦（玄麦）は、超遠心粉碎機を用いて425  $\mu\text{m}$ の標準網ふるいを通して均一化した。

### 2. 試薬・試液等

#### 1) 標準品

アミノピラリド標準品・・・純度99.8%、林純薬工業製

#### 2) 試薬

① アセトニトリル、メタノール・・・残留農薬試験用300倍 富士フィルム和光純薬製

② ケイソウ土・・・セライトNo.545 富士フィルム和光純薬製

③ 水

④ ギ酸・・・特級 富士フィルム和光純薬製

⑤ 酢酸・・・特級 関東化学製

⑥ 塩酸・・・特級 関東化学製

⑦ 超純水、メタノール、アセトニトリル・・・LC/MS用 富士フィルム和光純薬製（移動相に用いた。）

⑧ アクリルアミド共重合体結合グリセリルプロピルシリル化シリカゲルミニカラム・・・  
Sep-Pak Accell Plus QMA (360 mg) Waters製

⑨ トリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム・・・  
BondElut SAX (500 mg) Agilent製

⑩ エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラム・・・  
BondElut PSA (500 mg) Agilent製

⑪ 4級アンモニウム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 MAX (150 mg) Waters製

⑫ オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム・・・  
Sep-Pak C18 (360 mg) Waters製

⑬ 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 HLB (225 mg) Waters製

⑭ スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラム・・・  
Sep-Pak PS-2 (265 mg) Waters製

⑮ 窒素含有極性基修飾メタクリレート-スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラム・・・  
InertSep PLS-3 (230 mg) ジーエルサイエンス製

#### 3) 標準溶液の調製方法

① 1,000 mg/Lアミノピラリド標準原液

アミノピラリド標準品10 mgを精密に量り採り、メタノールを加えて溶解し、10 mLとした。

② 添加用標準溶液（定量限界濃度）

アミノピラリド標準原液をメタノールで100倍に希釈した標準液を、さらにメタノールで100倍に希釈し、0.1 mg/Lの標準溶液を調製した。

③ 添加用標準溶液（基準値濃度）

アミノピラリド標準原液をメタノールで100倍に希釈した標準液を、さらにメタノールで25倍に希釈し、0.4 mg/Lの標準溶液を調製した。

3. 装置

前処理装置	型式	メーカー
純水製造装置	Elix Essential UV3	メルクミリポア
超遠心粉碎機	ZM300	Retsch
ホモジナイザー	T-18	IKA

測定装置	型式	メーカー
LC	Nexera X2	島津製作所
MS	4000 QTRAP	Sciex

4. 測定条件

LC条件																								
カラム	InertSustain C18 HP サイズ：内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm メーカー：ジーエルサイエンス																							
移動相流速 (mL/分)	0.20																							
注入量 (μL)	5																							
カラム温度 (°C)	40																							
移動相	A液：0.1 vol%酢酸 B液：メタノール																							
グラジエント条件	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間 (分)</th> <th>A液 (%)</th> <th>B液 (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>10.0</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>12.0</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>15.0</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>15.1</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>20.0</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> </tbody> </table>			時間 (分)	A液 (%)	B液 (%)	0	95	5	10.0	95	5	12.0	0	100	15.0	0	100	15.1	95	5	20.0	95	5
時間 (分)	A液 (%)	B液 (%)																						
0	95	5																						
10.0	95	5																						
12.0	0	100																						
15.0	0	100																						
15.1	95	5																						
20.0	95	5																						
MS条件																								
測定モード	選択反応モニタリング (SRM)																							
イオン化モード	ESI (+)																							

キャピラリ電圧 (V)	4,500			
ソース温度 (°C)	600			
コリジョンガス	窒素			
測定イオン		イオン ( <i>m/z</i> )	DP* <sup>1</sup> (V)	CE* <sup>2</sup> (eV)
	定量イオン	207.1>161.0	56	31
	定性イオン	209.1>163.0	56	31
保持時間 (分)	6.0			

\*<sup>1</sup> Declustering Potentialの略。カーテンプレートにかかる電圧。

\*<sup>2</sup> Collision Energy (コリジョンエネルギー) の略。

## 5. 定量

アミノピラリド標準原液を0.1 vol%酢酸及びメタノール (19 : 1) 混液で希釈し、以下の濃度の標準溶液を調製した。

定量限界濃度 : 0.00025、0.0005、0.00075、0.001、0.00125及び0.0015 mg/L

基準値濃度 : 0.001、0.002、0.003、0.004、0.005及び0.006 mg/L

これらの標準溶液5 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。検量線の作成例は図4に示した。

## 6. 添加試料の調製

### 1) 定量限界濃度

試料10.0 gに0.1 mg/Lアミノピラリド添加用標準溶液1 mLを添加してよく混合し、30分間放置した。

### 2) 基準値濃度

試料10.0 gに0.4 mg/Lアミノピラリド添加用標準溶液1 mLを添加してよく混合し、30分間放置した。

## 7. 試験溶液の調製

### 1) 試験法の分析操作

アミノピラリドを塩酸酸性下で試料からメタノールで抽出し、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 HLB) 及び4級アンモニウム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 MAX) で精製した後、LC-MS/MSで定量及び確認した。

#### ① 抽出

試料10.0 gを量り採り、水20 mLを加え、30分間放置した。これに20 vol%塩酸10 mL及びメタノール100 mLを加え、3分間ホモジナイズした後、ケイソウ土を1 cmの厚さに敷いたろ紙 (直径40 mm、No.5A、桐山製作所製) を用いて200 mLメスフラスコ中に吸引ろ過した。ろ紙上の残留物を採り、メタノール50 mLを加えて3分間ホモジナイズし、上記と同様に操作した。得られたろ液を合わせ、メタノールで正確に200 mLとした。この溶液から正確に2 mLを分取し、0.1 vol%ギ酸18 mLを加えた。

② 精製 (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)

Oasis HLB (225 mg) にメタノール5 mL及び0.1 vol%ギ酸5 mLを順次注入し、流出液は捨てた。このミニカラムに、①で得られた溶液を注入した後、0.1 vol%ギ酸及びメタノール (9 : 1) 混液5 mLを注入し、流出液を捨てた。次いで、水及びメタノール (1 : 4) 混液5 mLを注入し、溶出液を採った。

③ 精製 (4級アンモニウム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)

Oasis MAX (150 mg) に水及びメタノール (1 : 4) 混液5 mLを注入し、流出液は捨てた。このミニカラムに、②で得られた溶液を注入した後、メタノール5 mLを注入し、流出液を捨てた。次いで、1 vol%ギ酸・メタノール溶液8 mLを注入し、溶出液を採った。この溶出液を40°C以下で窒素気流により溶媒を除去した。この残留物を0.1 vol%酢酸及びメタノール (19 : 1) 混液に溶解し、正確に1 mLとしたものを試験溶液とした。

2) フローチャート

秤 取

- | 試料10.0 g
- | 水20 mLを加えて30分間放置

メタノール抽出

- | 20 vol%塩酸10 mL及びメタノール100 mLを加え3分間ホモジナイズ
- | 吸引ろ過
- | 残留物にメタノール50 mLを加え3分間ホモジナイズ
- | 吸引ろ過
- | メタノールで200 mLに定容
- | 正確に2 mL分取し、0.1 vol%ギ酸18 mLを加える (試料0.1 g相当) …①

Oasis HLB (225 mg)

- | メタノール5 mL及び0.1 vol%ギ酸5 mLでコンディショニング
- | ①を注入 (流出液は捨てる)
- | 0.1 vol%ギ酸及びメタノール (9 : 1) 混液5 mLで洗浄
- | 水及びメタノール (1 : 4) 混液5 mLで溶出 (試料0.1 g相当) …②

Oasis MAX (150mg)

- | 水及びメタノール (1 : 4) 混液5 mLでコンディショニング
- | ②を注入 (流出液は捨てる)
- | メタノール5 mLで洗浄
- | 1 vol%ギ酸・メタノール溶液8 mLで溶出

窒素吹付け濃縮、溶媒除去

- | 残留物を0.1 vol%酢酸及びメタノール (19 : 1) 混液で正確に1 mLとする

LC-MS/MS定量

5 µL注入

## 8. マトリックス添加標準溶液の調製

ブランク試験溶液から1 mL分取し、溶媒を除去した後、添加回収試験における回収率100%相当濃度のアミノピラリド標準溶液1 mLを加えて溶解したものをマトリックス添加標準溶液とした。

### [検討結果及び考察]

#### 1. 測定条件の検討

##### 1) プリカーサーイオンの検討 (スキャン測定)

水及びメタノール (1:1) 混液で調製した0.1 mg/Lアミノピラリド標準液をインフュージョンでESI法によるスキャン測定を行った。その結果を図1に示した。アミノピラリド (モノアイソトピック質量 206.0006) は、ESI (+) モードでプロトン付加分子 ( $m/z$  207.1 [M+H]<sup>+</sup>) のイオン強度が最も感度良く検出された。次いで塩素原子同位体由来のイオン ( $m/z$  209.1 [M+H]<sup>+</sup>) が感度良く検出された。ESI (-) モードで脱プロトン分子 ( $m/z$  204.8 [M-H]<sup>-</sup>) のイオン強度が最も感度良く検出された。次いで塩素原子同位体由来のイオン ( $m/z$  206.8 [M-H]<sup>-</sup>) が感度良く検出された。

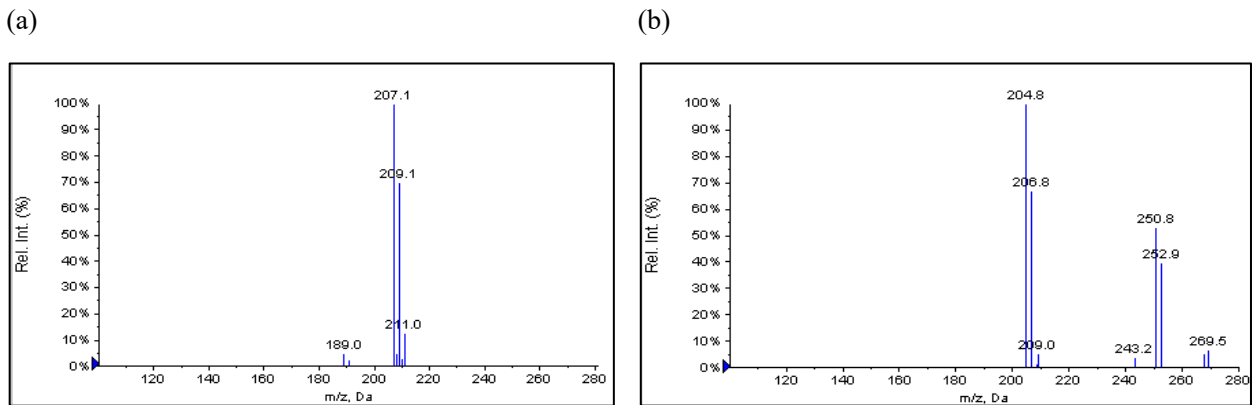


図1 アミノピラリドのマスペクトル

(a) 測定条件：ESI (+)、DP=56、 $m/z$  100~280

(b) 測定条件：ESI (-)、DP=-45、 $m/z$  100~280

##### 2) プロダクトイオンの検討 (プロダクトイオンスキャン測定)

水及びメタノール (1:1) 混液で調製した0.1 mg/Lアミノピラリド標準液をインフュージョンでESI法によるプロダクトイオンスキャン測定を行った。その結果を図2に示した。

アミノピラリドは、ESI (-) モードよりもESI (+) モードの方が感度が良かった。また、ESI (+) モードで $m/z$ 207.1→161.0 (CE=31 eV) が最も感度良く検出された為、これを定量イオンとし、次いで高く検出された $m/z$  209.1→163.0 (CE=31 eV) を定性イオンとした。

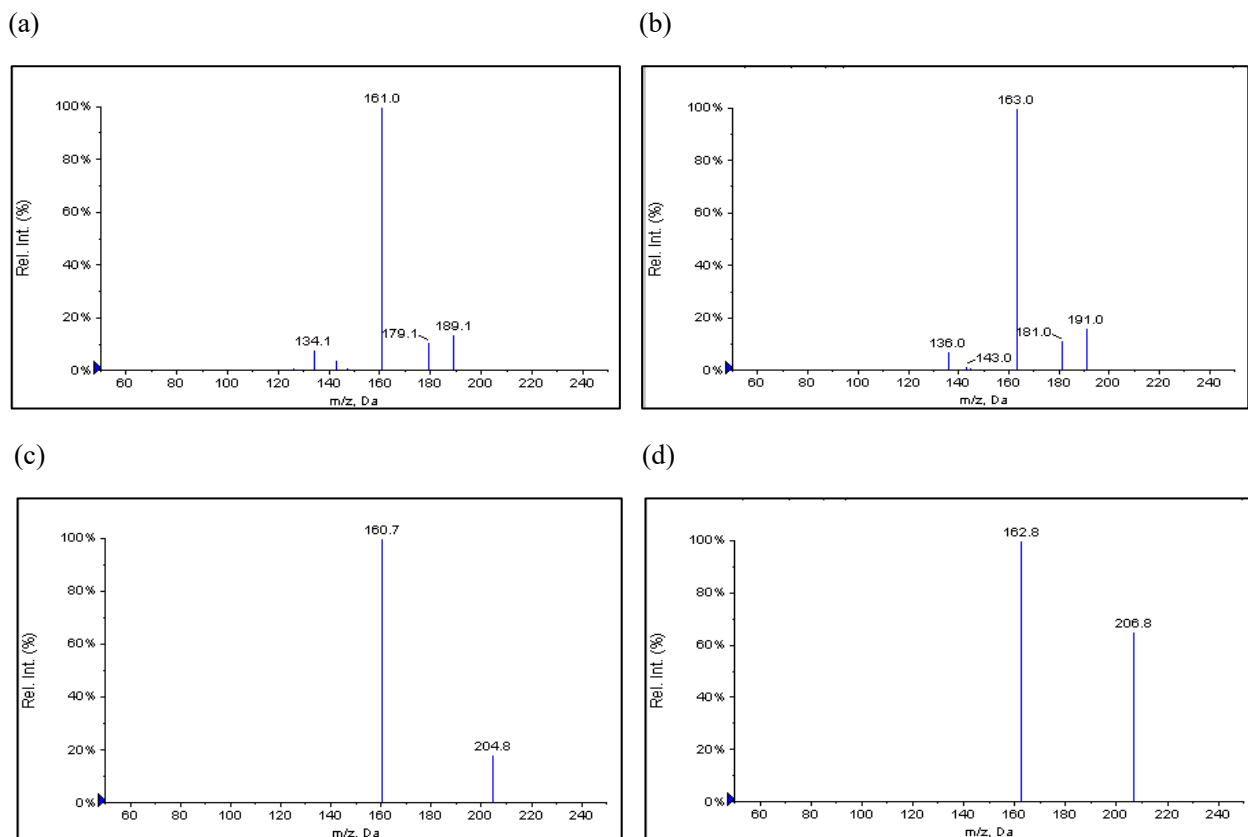


図2 アミノピラリドのプロダクトイオンスペクトル

- (a) プリカーサーイオン： $m/z$  207.1、測定条件： $m/z$  50～250、ESI (+)、DP = 56 V、CE=31 eV  
 (b) プリカーサーイオン： $m/z$  209.1、測定条件： $m/z$  50～250、ESI (+)、DP = 56 V、CE=31 eV  
 (c) プリカーサーイオン： $m/z$  204.8、測定条件： $m/z$  50～250、ESI (-)、DP = -45 V、CE=-12 eV  
 (d) プリカーサーイオン： $m/z$  206.8、測定条件： $m/z$  50～250、ESI (-)、DP = -45 V、CE=-12 eV

### 3) MS条件の検討

0.1 mg/Lアミノピラリド標準液をフローインジェクションでMS条件の最適化を行ったところ、キャピラリー電圧：4,500 V、ソース温度：600°C、DP：56 Vでアミノピラリド定量イオンの強度が最も高くなったため、この条件を採用した。

### 4) LC条件の検討①（移動相に使用する添加剤）

アミノピラリドは、移動相のpHを十分に下げなければ、良好なピーク形状が得られない場合があった（図3）。そこで、水系移動相に0.1 vol%酢酸（約17.5 mmol/L）を使用した場合と、0.1 vol%ギ酸（約26.5 mmol/L）を使用した場合のS/Nを比較した。その結果を表1に示した。酢酸を用いた方がS/Nが高かったため、酢酸を移動相に用いる添加剤として採用した。

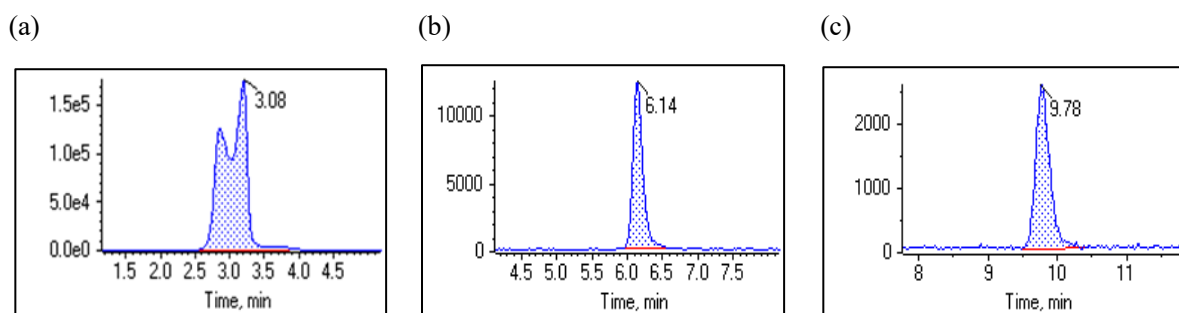


図3 アミノピラリドのクロマトグラム

分析カラム：InertSustain C18 HP（内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm）

(a) 20 mmol/L酢酸アンモニウム溶液及びメタノール（19：1）混液、0.2mL/min

(b) 0.1 vol%酢酸及びメタノール（19：1）混液、0.2mL/min

(c) 0.1 vol%ギ酸及びメタノール（19：1）混液、0.2mL/min

表1 移動相添加剤のS/Nの状況

	0.1 vol%酢酸及びメタノール (19：1) 混液	0.1 vol%ギ酸及びメタノール (19：1) 混液
S/N	201.4	81.1

測定溶液：0.01 mg/Lアミノピラリド標準液 5 μL（0.05 ng）

5) LC条件の検討②（移動相に使用する有機溶媒）

移動相に使用する有機溶媒を決めるため、0.1 vol%酢酸及びメタノール（19：1）混液を使用した場合と、0.1 vol%酢酸及びアセトニトリル（19：1）混液を使用した場合のS/Nを比較した。その結果を表2に示した。メタノールを使用した場合の方がS/Nが高かったため、移動相の有機溶媒にはメタノールを採用することとした。

表2 移動相に使用する有機溶媒のS/Nの状況

	0.1 vol%酢酸及びメタノール (19：1) 混液	0.1 vol%酢酸及びアセトニトリル (19：1) 混液
S/N	201.4	144.5

測定溶液：0.01 mg/Lアミノピラリド標準液 5 μL（0.05 ng）

6) LC条件の検討③（移動相に使用する添加剤濃度）

移動相に添加する酢酸濃度を0.1 vol%、0.2 vol%、0.4 vol%と変えた場合のS/Nを比較した。その結果を表3に示した。最もS/Nが高かった条件は0.1 vol%酢酸の場合であったため、これを採用した。

表3 各酢酸濃度におけるS/Nの状況

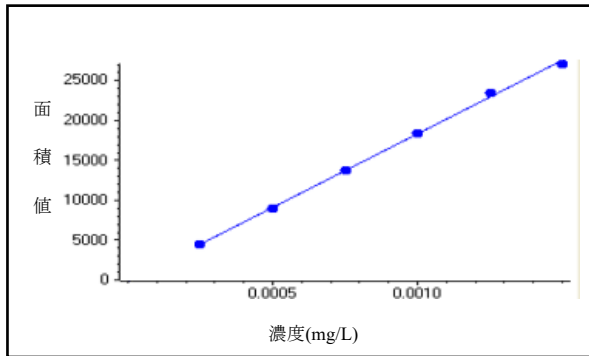
	0.1 vol%	0.2 vol%	0.4 vol%
S/N	201.4	124.3	120.4

測定溶液：0.01 mg/Lアミノピラリド標準液 5 μL（0.05 ng）

移動相：各濃度の酢酸及びメタノール（19：1）混液

7) 検量線の直線性について

アミノピラリドの検量線の例を図4に示した。直線性に問題はなかった。



データ処理装置設定条件の一例

データ処理ソフトウェア：MultiQuant2.1.1 (Sciex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

濃度範囲：0.00025～0.0015 mg/L

検量線傾き (a)：18450217

検量線切片 (b)：-106

寄与率 (r<sup>2</sup>)：0.9984

図4 アミノピラリドの検量線の例

8) 定量限界について

定量限界の算出結果を以下に示した。

$$0.01 \text{ ppm} \left[ \frac{\text{試験溶液量}1 \text{ (mL)}}{\text{試験溶液中の試料量}0.1 \text{ (g)} *1} \times \frac{\text{分析対象化合物の定量限界相当量}0.005 \text{ (ng)}}{\text{注入量}5 \text{ (}\mu\text{L)}} \right]$$

$$*1 \quad 10.0 \text{ g} \times 2 \text{ mL} / 200 \text{ mL}$$

2. 試験溶液調製法の検討

1) 抽出方法の検討①

アミノピラリドと同じピリジんカルボン酸系の除草剤であるクロピラリド試験法(農産物)では、試料10.0 gに20 vol%塩酸10 mLを加えた後、アセトン抽出を行っている。そこで、アセトン又はメタノールを抽出溶媒に用いる方法の比較と、20 vol%塩酸添加の有無による抽出状況の比較検討を行った。

小麦10.0 gを量り採り、100 mg/Lアミノピラリド標準液1 mL (アミノピラリド100 μg) を添加し、30分間放置した。さらに水20 mLを加えて30分間放置した。これに表4に示した抽出条件で得られた抽出液を0.1 vol%酢酸及びメタノール (19 : 1) 混液で100倍に希釈した後、測定した。その結果を表4に示した。

最も回収率が良好であったのは、20 vol%塩酸を加えた後、メタノール抽出を行った場合であった。その抽出回数は2回とした。

表4 小麦の抽出状況 (回収率 (%))

抽出溶媒	20 vol%塩酸	1回目 (100 mL)	2回目 (50 mL)	3回目 (50 mL)	合計
アセトン	10 mL	74	8	tr	82
メタノール	<u>10 mL</u>	<u>87</u>	<u>13</u>	tr	<u>100</u>
アセトン	なし	34	2	tr	36
メタノール	なし	62	15	5	82

添加試料：小麦、供試量：100 mg/Lアミノピラリド標準液1 mL (100 μg、メタノール溶液)

検量線：溶媒標準液、tr<1

2) ミニカラムによる精製の検討① (逆相)

小麦10.0gを「7. 試験溶液の調製 1) 試験法の分析操作 ①抽出」にしたがって抽出操作を行った。得られたブランク溶液約20 mLに4 mg/Lアミノピラリド標準液0.1 mL (アミノピラリド0.4 µg)を加えた。これを、あらかじめメタノール及び0.1 vol%ギ酸5 mLを順次注入してコンディショニングした下記に示す4種のミニカラムにそれぞれ注入した後、0.1 vol%ギ酸及びメタノールの混液 (9 : 1)、(4 : 1)、(3 : 2)、(2 : 3)、(1 : 4)、(0 : 10) 各5 mLを順次注入し、各溶出液を得た。得られた各溶出液を0.1 vol%酢酸及びメタノール (19 : 1) 混液で10倍希釈し、回収率を求めた。その結果を表5に示した。

今回比較検討したミニカラムの中で最もアミノピラリドの保持能力が高かったのは、Oasis HLB (225 mg)であったため、本試験法では、Oasis HLB (225 mg) を使用し、試料液負荷後の洗浄溶媒には、成分の溶出が認められなかった0.1 vol%ギ酸及びメタノール (9 : 1) 混液5 mLを使用することとした。

表5 ミニカラムからの溶出状況 (回収率 (%))

ミニカラム	試料 負荷液	0.1 vol%ギ酸及びメタノール混液の比率						合計
		(9 : 1)	(4 : 1)	(3 : 2)	(2 : 3)	(1 : 4)	(0 : 10)	
<u>Oasis HLB(225 mg)</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>1</u>	<u>36</u>	<u>61</u>	<u>1</u>	<u>0</u>	<u>99</u>
InertSep PLS-3(230 mg)	6	6	18	65	9	0	0	104
Sep-pak PS-2(265 mg)	36	10	11	21	13	0	0	91
Sep-pak C18(500 mg)	80	20	1	0	0	0	0	101

添加試料：小麦、供試量：10 mg/Lアミノピラリド標準液0.1 mL (1 µg、メタノール溶液)

検量線：溶媒標準液

3) ミニカラムによる精製の検討② (逆相)

小麦10.0gを「7. 試験溶液の調製 1) 試験法の分析操作 ①抽出」にしたがって抽出操作を行った。得られたブランク溶液約20 mLに10 mg/Lアミノピラリド標準液0.1 mL (アミノピラリド1 µg)を加えた。これを、あらかじめメタノール及び0.1 vol%ギ酸5 mLを順次注入してコンディショニングしたOasis HLB (225 mg) に注入した後、0.1 vol%ギ酸及びメタノールの混液 (9 : 1) 5 mLを注入し、流出液を得た。このミニカラムに水及びメタノールの混液 (9 : 1)、(4 : 1)、(3 : 2)、(2 : 3)、(1 : 4) 各5 mLを順次注入し、各溶出液を得た。得られた各溶出液を0.1 vol%酢酸及びメタノール (19 : 1) 混液で10倍希釈し、回収率を求めた。その結果を表6に示した。

水及びメタノール (2 : 3) 混液5 mLまで微量ながら成分の溶出が認められたため、溶出溶媒には、水及びメタノール (1 : 4) 混液5 mLを使用することとした。

表6 ミニカラムからの溶出状況 (回収率 (%))

ミニカラム	試料 負荷液	洗浄 溶媒	水及びメタノール混液の比率					合計
			(9 : 1)	(4 : 1)	(3 : 2)	(2 : 3)	(1 : 4)	
Oasis HLB(225 mg)	0	0	31	61	4	1	0	98

添加試料：小麦、供試量：10 mg/Lアミノピラリド標準液0.1 mL (1 µg、メタノール溶液)

洗浄溶媒：0.1 vol%ギ酸及びメタノールの混液（9：1）5 mL、検量線：溶媒標準液

#### 4) ミニカラムによる精製の検討③（陰イオン交換）

Oasis HLB（225 mg）による精製後の溶液は、濁りや着色がある程度除去できたものの、濁りがわずかに残った。そこで、陰イオン交換ミニカラムによる精製の検討を行った。

小麦10.0 gを「7. 試験溶液の調製 1）試験法の分析操作 ①抽出及び②精製（HLB）」にしたがって操作を行った。得られたブランク溶液5 mLに10 mg/Lアミノピラリド標準液0.1 mL（アミノピラリド1 µg）を加えた。表7に示したミニカラムに、水及びメタノール（1：4）混液5 mLを注入してコンディショニングした後、先の標準添加したブランク溶液を注入し、流出液を得た。さらに、メタノール5 mL及び1 vol%ギ酸・メタノール溶液2 mL×4回、順次注入し各溶出液を得た。得られた各溶出液を0.1 vol%酢酸及びメタノール（19：1）混液で10倍希釈し、回収率を求めた。その結果を表7に示した。

回収率はBondElut PSAを除きいずれのミニカラムも良好であったため、ミニカラムの通液性が最も良好であったOasis MAX（150 mg）を選択した。また、1 vol%ギ酸・メタノール溶液量6 mLまで微量ながら成分の溶出が認められたため、溶出溶媒の1 vol%ギ酸・メタノール溶液量は、8 mLとした。

表7 ミニカラム（陰イオン交換）からの溶出状況（回収率（%））

ミニカラム	試料 負荷液 (5 mL)	洗浄 溶媒 (5 mL)	1 vol%ギ酸・メタノール溶液				合計
			0-2	2-4	4-6	6-8	
			mL	mL	mL	mL	
Oasis MAX(150 mg)	0	0	59	39	1	0	102
BondElut SAX(500 mg)	0	0	76	22	0	0	98
Sep-Pak Accell QMA(360 mg)	0	0	32	67	1	0	100
BondElut PSA(500 mg)	0	0	0	0	0	0	0

供試量：10 mg/L アミノピラリド標準液 0.1 mL（1 µg、メタノール溶液）、検量線：溶媒標準液

#### 5) ミニカラムによる精製の検討④（逆相及び陰イオン交換）

小麦10.0 gを「7. 試験溶液の調製 1）試験法の分析操作 ①抽出」にしたがって抽出操作を行った。得られたブランク溶液約20 mLに1 mg/Lアミノピラリド標準液0.1 mL（アミノピラリド0.1 µg、メタノール溶液）を加えた。これを、「7. 試験溶液の調製 1）試験法の分析操作 ②精製（Oasis HLB）及び③精製（Oasis MAX）」にしたがって操作を行い、得られた試験溶液を0.1 vol%酢酸及びメタノール（19：1）混液で10倍希釈し、回収率を求めた。

その結果、回収率92%と良好な結果が得られた。また、得られた試験溶液は、濁りや着色が認められず、Oasis HLB（225 mg）及びOasis MAX（150 mg）を用いることで十分な精製ができていると考えられた。

### 3. 添加回収試験

小麦にアミノピラリドを添加して、実験方法の「7. 試験溶液の調製」に従い、定量限界濃度（0.01 ppm）及び基準値濃度（0.04 ppm）で5併行の添加回収試験を行った。添加回収試験における小麦のブランク試

料、添加試料、回収率100%相当の溶媒標準溶液の代表的なクロマトグラムを図5-1、図5-2に示した。また、小麦ブランク試料の代表的なトータルイオンクロマトグラムを図6に示した。

### 1) 選択性

検討結果を表8に示した。定量を妨害するピークは認められず、良好な選択性が得られた。

表8 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) <sup>1)</sup>						選択性 の評価 <sup>3)</sup>	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 <sup>2)</sup>				面積(高さ) 比(a)/(b)		
								n=1	n=2	平均(a)	n=1	n=2				平均(b)	
1	アミノピラリド	小麦	0.01	0.04	基準値	0.04	< 0.100	面積	0	0	0	73314	73981	73648	0.000	○	

\*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9に示した。定量限界濃度では、真度89.0~94.5%、併行精度2.3%となり、基準値濃度では、真度86.8~89.8%、併行精度1.3%と良好な結果が得られ、妥当性評価ガイドラインの真度及び精度の目標値を満足した。また、定量限界濃度の添加試料から得られたピークのS/Nは28~36であり、S/N $\geq$ 10であった。

表9 真度、併行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 <sup>1)</sup>	検量線		回収率(%)					真度 (%)	併行精度 (RSD%)	S/N <sup>2)</sup>			備考	
							傾き	切片	r <sup>2</sup> 値	n=1	n=2	n=3	n=4			n=5	Max.	Min.		平均値
1	アミノピラリド	小麦	0.01	0.01	0.01	—	18450217	-106	0.9984	91.7	89.0	91.1	94.5	93.1	91.9	2.3	36	28	32	
		小麦	0.01	0.04	0.04	—	19014057	-2625	0.9998	87.3	87.9	89.8	86.8	88.6	88.1	1.3	168	99	133	

\*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(Min.)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10に示した。添加回収試験における回収率100%相当濃度に調製したマトリックス添加標準溶液のピーク面積と、溶媒で回収率100%相当濃度に調製した溶媒標準溶液とのピーク面積の比を求めて評価した。面積比は0.99であり、試料マトリックスの測定への影響は小さいと考えられた。

表10 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 <sup>1)</sup> (mg/L)	ピーク面積(高さ) <sup>2)</sup>								備考	
							面積又は 高さの別	ブランク <sup>3)</sup>	マトリックス添加標準溶液 <sup>4)</sup>			溶媒標準溶液				ピーク面積 (高さ)比 <sup>5)</sup>
									n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均		
1	アミノピラリド	小麦	0.01	0.01	0.01	0.001	面積	0	17925	17705	17815	17954	18005	17980	0.99	
		小麦	0.01	0.04	0.04	0.004	面積	0	73314	73981	73648	74811	74627	74719	0.99	

\*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。

[添加回収試験における代表的なクロマトグラム]

(ESI (+)、青線 (定量イオン) :  $m/z$  207.1>161.0、赤線 (定性イオン) :  $m/z$  209.1>163.0)

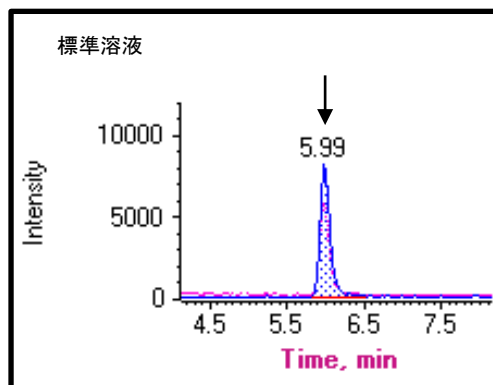
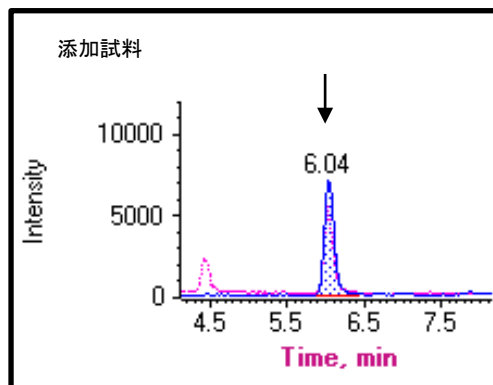
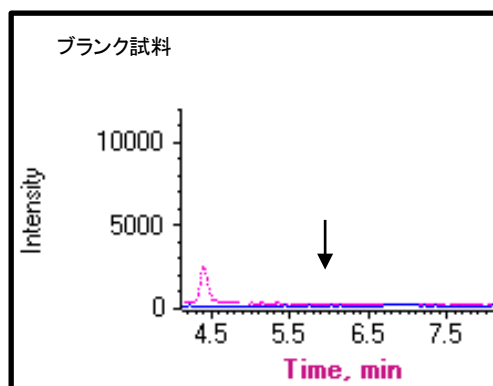
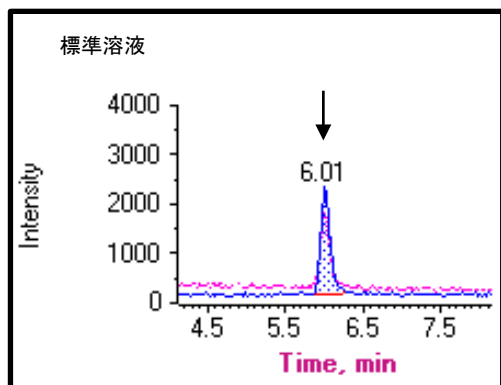
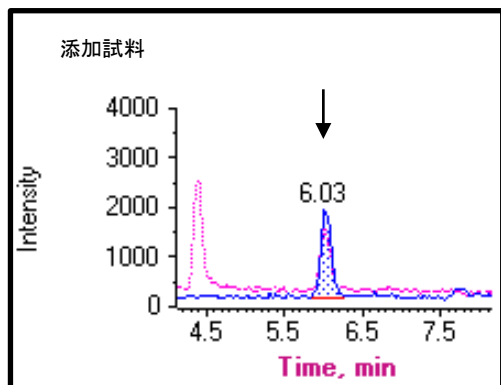
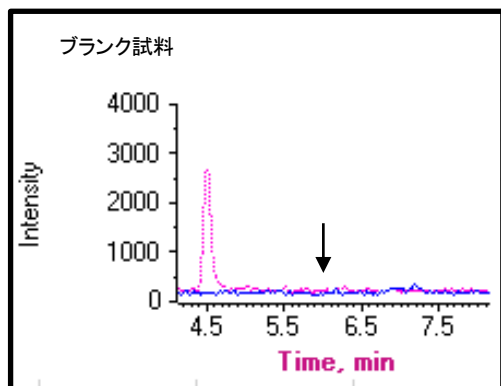


図5-1 小麦のSRMクロマトグラム  
(定量下限値 : 添加濃度 0.01 ppm)

図5-2 小麦のSRMクロマトグラム  
(基準値 : 添加濃度 0.04 ppm)

[ブランク試料のトータルイオンクロマトグラム]

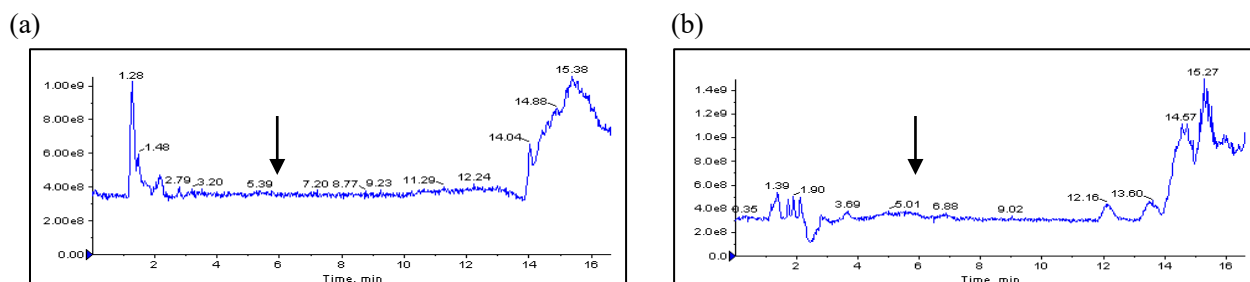


図6 小麦のトータルイオンクロマトグラム

(a) スキャン範囲 ( $m/z$ ): 50~1000、ESI (+)、DP : 56

(b) スキャン範囲 ( $m/z$ ): 50~1000、ESI (-)、DP : -45

[結論]

アミノピラリドを試料から塩酸酸性下メタノールで抽出し、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4級アンモニウム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後、LC-MS/MSで定量及び確認する方法を開発した。本法を用いて農産物1種類(小麦)を対象に添加回収試験を行った結果、定量限界濃度では、真度89.0~94.5%、併行精度2.3%となり、基準値濃度では、真度86.8~89.8%、併行精度1.3%と良好な結果が得られた。妨害ピークは認められず選択性は良好であった。また、溶媒標準溶液に対するマトリックス標準溶液のピーク面積比は0.99となり、試料由来のマトリックスの影響をほとんど受けずに測定することができた。これらの結果から、本法は、アミノピラリドを精確に分析可能な方法と考えられる。また、定量限界として0.01 ppmの定量が可能であると確認された。

[参考文献]

なし