

※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

アミノシクロピラクロル試験法（畜産物）

アミノシクロピラクロール試験法（畜産物）の検討結果

[緒言]

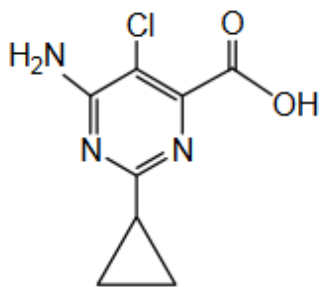
1. 目的及び試験法の検討方針

アミノシクロピラクロールは、米国デュポン社により開発されたピリミジンカルボン酸系の除草剤である。作用機構は、植物体内中にオーキシシンが過剰に存在する状態を引き起こし、細胞分裂を阻害して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おり、アミノ酸系除草剤に耐性の広葉雑草に対して殺草作用を有する。現在日本では農薬として登録されていない。

食品中の残留基準値は、アミノシクロピラクロールに対して設定されている。本検討では、畜産物中のアミノシクロピラクロールを測定する試験法を開発することを目的とした。

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. *1 : 858956-08-8

化 学 式*1 : $C_8H_8ClN_3O_2$

分 子 量*1 : 213.6

化 学 名 (IUPAC) *1 : 6-Amino-5-chloro-2-cyclopropylpyrimidine-4-carboxylic acid

外 観*1 : 白色、非晶質

融 点*1 : 140.5°C

蒸 気 圧*2 : 0.0049 mPa (20°C)

酸解離定数 (pKa) *1 : 4.65 (20~25°C)

溶 解 性 (20~25°C) *1 : 水 2810.0 mg/L (非緩衝液)、水 3130.0 mg/L (pH 4)、
水 4200.0 mg/L (pH 7)、水 3870.0 mg/L (pH 9)、アセトン 0.96 g/L、
アセトニトリル 0.651 g/L、ジクロロメタン 0.235 g/L、
酢酸エチル 2.008 g/L、メタノール 36.747 g/L、*n*-オクタノール 1.945 g/L、
o-キシレン 0.005 g/L

安 定 性*1 : 半減期 (25°C) 1年以上 (pH4、7、9)

オクタノール/水分配係数 ($\log K_{ow}$) *1 : -2.48 (pH 7)、-1.12 (非緩衝液)、-1.01 (pH 4)

(出典*1 : The Pesticide Manual 17th Edition)

(出展*2 : The Pesticide Manual 18th Edition)

2) 基準値（生食発0703第1号（平成30年7月3日））

食品名	基準値 (ppm)
牛の筋肉	0.01
豚の筋肉	0.01
その他陸棲哺乳類に属する動物の筋肉	0.01
牛の脂肪	0.03
豚の脂肪	0.03
その他陸棲哺乳類に属する動物の脂肪	0.03
牛の肝臓	0.3
豚の肝臓	0.3
その他陸棲哺乳類に属する動物の肝臓	0.3
牛の腎臓	0.3
豚の腎臓	0.3
その他陸棲哺乳類に属する動物の腎臓	0.3
牛の食用部分	0.3
豚の食用部分	0.3
その他陸棲哺乳類に属する動物の食用部分	0.3
乳	0.02

3) 家畜残留試験の方法（参照：<https://www.mhlw.go.jp/content/000573967.pdf>）

秤 取

| 試料5.0 g

アセトニトリル及び0.1 vol%ギ酸抽出

| アセトニトリル及び0.1 vol%ギ酸（9：1）混液40 mLを加えホモジナイズ
 | 遠心分離
 | 筋肉、肝臓、腎臓及び脂肪：
 | 残留物にアセトニトリル及び0.1 vol%ギ酸（7：3）混液を加えホモジナイズ
 | 遠心分離
 | 筋肉、肝臓、腎臓及び脂肪：
 | 残留物にアセトニトリル及び0.1 vol%ギ酸（1：1）混液を加えホモジナイズ
 | 遠心分離
 | 0.1 vol%ギ酸で100 mLに定容
 | 1 mL分取
 | 筋肉：40℃以下で0.25 mL以下に濃縮
 | 筋肉以外：40℃以下で0.5 mL以下に濃縮
 | 0.2 vol%ギ酸で6.0 mLに定容・・・①
 | 筋肉以外：①を試験溶液とする

Oasis MCX（筋肉のみ）

- | メタノール3 mL及び0.01 vol%ギ酸6 mL×2回を順次注入しコンディショニング
- | ①を注入（流出液は捨てる）
- | 0.2 vol%ギ酸2 mL×2回を通液し、この流出液を先のMCXミニカラムに通液する
- | メタノール5 mL×2回で洗浄
- | 75 mmol/L水酸化アンモニウム溶液5 mLを1 mL/分の流速で3回注入して溶出
- | 溶出液は、あらかじめ0.2 vol%ギ酸1 mLを加えた採集管に採る

窒素吹付け濃縮、溶媒除去（筋肉のみ）

- | 40℃以下で1～2 mLに濃縮
- | 0.01 vol%ギ酸で12.5 mLとする

LC-MS/MS定量

30 µL注入

[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

- ① 牛の筋肉は、可能な限り脂肪層を除き、細切均一化した。
- ② 牛の脂肪は、可能な限り筋肉層を除き、細切均一化した。
- ③ 牛の肝臓はそのまま、細切均一化した。
- ④ 牛乳は、よく混合して均一化した。

2. 試薬・試液等

1) 標準品

アミノシクロピラクロル標準品・・・純度97%、combi-blocks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 富士フイルム和光純薬製
- ② ケイソウ土・・・セライトNo.545 富士フイルム和光純薬製
- ③ 水
- ④ ギ酸・・・特級 富士フイルム和光純薬製
- ⑤ 酢酸・・・特級 関東化学製
- ⑥ 超純水、メタノール、アセトニトリル・・・LC/MS用 富士フイルム和光純薬製（移動相に用いた。）
- ⑦ 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

- ⑧ 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
- ⑨ 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・・・
InertSep PSA (500 mg) ジーエルサイエンス製
- ⑩ 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
- ⑪ トリメチルアンモニウム塩修飾メタクリレート重合体ミニカラム・・・
InertSep MA-1 (250 mg) ジーエルサイエンス製
- ⑫ ベンゼンスルホンプロピルシリル化シリカゲルミニカラム・・・
BondElut SCX (500 mg) Agilent製
- ⑬ 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 (225 mg) Waters製
- ⑭ スルホン酸塩修飾メタクリレート重合体ミニカラム・・・
InertSep MC-1 (250 mg) ジーエルサイエンス製
- ⑮ スルホン酸塩修飾スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラム・・・
BondElut PLEXA PCX (200 mg) Agilent製

3) 標準溶液の調製方法

- ① 1000 mg/Lアミノシクロピラクロール標準原液
アミノシクロピラクロール標準品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）
アミノシクロピラクロール標準原液をメタノールで希釈し、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：牛乳）
アミノシクロピラクロール標準原液をメタノールで希釈し、0.2 mg/Lの標準溶液を調製した。
- ④ 添加用標準溶液（基準値濃度：牛の脂肪）
アミノシクロピラクロール標準原液をメタノールで希釈し、0.3 mg/Lの標準溶液を調製した。
- ⑤ 添加用標準溶液（基準値濃度：牛の肝臓）
アミノシクロピラクロール標準原液をメタノールで希釈し、3 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 UV-3	メルクミリポア
フードプロセッサー	DLC-7 SUPER PRO	Cuisinart
ホモジナイザー	T-18	IKA
遠心分離機	7780 II	久保田商事

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（℃）	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><tr><td>時間（分）</td><td>A液（%）</td><td>B液（%）</td></tr><tr><td>0</td><td>90</td><td>10</td></tr><tr><td>10.0</td><td>90</td><td>10</td></tr><tr><td>10.1</td><td>10</td><td>90</td></tr><tr><td>15.0</td><td>10</td><td>90</td></tr><tr><td>15.1</td><td>90</td><td>10</td></tr><tr><td>20.0</td><td>90</td><td>10</td></tr></table>			時間（分）	A液（%）	B液（%）	0	90	10	10.0	90	10	10.1	10	90	15.0	10	90	15.1	90	10	20.0	90	10
時間（分）	A液（%）	B液（%）																						
0	90	10																						
10.0	90	10																						
10.1	10	90																						
15.0	10	90																						
15.1	90	10																						
20.0	90	10																						
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（+）																							
キャピラリー電圧（V）	5500																							
ソース温度（℃）	450																							
コリジョンガス	窒素																							
測定イオン	<table><tr><td></td><td>イオン （<i>m/z</i>）</td><td>DP*¹ （V）</td><td>CE*² （eV）</td></tr><tr><td>定量イオン</td><td>214.0>68.1</td><td>61</td><td>41</td></tr><tr><td>定性イオン</td><td>214.0>101.1</td><td>61</td><td>45</td></tr></table>				イオン （ <i>m/z</i> ）	DP* ¹ （V）	CE* ² （eV）	定量イオン	214.0>68.1	61	41	定性イオン	214.0>101.1	61	45									
	イオン （ <i>m/z</i> ）	DP* ¹ （V）	CE* ² （eV）																					
定量イオン	214.0>68.1	61	41																					
定性イオン	214.0>101.1	61	45																					
保持時間（分）	5.3																							

*¹ Declustering Potentialの略。カーテンプレートにかかる電圧。

*² Colision Energy (コリジョンエネルギー) の略。

5. 定量

アミノシクロピラクロル標準原液を0.1 vol%酢酸及びメタノール（9：1）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：0.000125、0.00025、0.000375、0.0005、0.000625及び0.00075 mg/L

基準値濃度（牛乳）：0.00025、0.0005、0.00075、0.001、0.00125及び0.0015 mg/L

基準値濃度（牛の脂肪）：0.000375、0.00075、0.001125、0.0015、0.001875及び0.00225 mg/L

基準値濃度（牛の肝臓）：0.00375、0.0075、0.01125、0.015、0.01875及び0.0225 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（牛の筋肉、牛の肝臓及び牛乳）

試料10.0 gに0.1 mg/Lアミノシクロピラクロル添加用標準溶液1 mLを添加してよく混合し、30分間放置した。

2) 定量限界濃度（牛の脂肪）

試料10.0 gを採り、約60℃で加温して融解させたものに0.1 mg/Lアミノシクロピラクロル添加用標準溶液1 mLを添加し、よく混合した後、室温で放置して再度凝固させた後、30分間放置した。

3) 基準値濃度（牛乳）

試料10.0 gに0.2 mg/Lアミノシクロピラクロル添加用標準溶液1 mLを添加してよく混合し、30分間放置した。

4) 基準値濃度（牛の脂肪）

試料10.0 gを採り、約60℃で加温して融解させたものに0.3 mg/Lアミノシクロピラクロル添加用標準溶液1 mLを添加し、よく混合した後、室温で放置して再度凝固させた後、30分間放置した。

5) 基準値濃度（牛の肝臓）

試料10.0 gに3 mg/Lアミノシクロピラクロル添加用標準溶液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

アミノシクロピラクロルを試料からメタノールで抽出し、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）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、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。

② 精製

Sep-pak Accell Plus QMA (360 mg) にメタノール10 mLを注入し、流出液は捨てた。このミニカラムに、①で得られた溶液を正確に10 mL注入した後、メタノール5 mLを注入し、流出液は捨てた。これに1 vol%ギ酸・メタノール溶液5 mLを注入し、溶出液を採った。この溶出液を40℃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 (9 : 1) 混液に溶解し、正確に10 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

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
| メタノールで200 mLに定容
| 10 mL分取 (試料0.5 g相当) …①

Sep-pak Accell Plus QMA (360mg)

| メタノール10 mLでコンディショニング
| ①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5 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 (9 : 1) 混液で正確に10 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%相当濃度のアミノシクロピラクロル標準溶液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アミノシクロピラクロール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1-1、図1-2に示した。アミノシクロピラクロール (モノアイソトピック質量 213.0305) は、ESI (+) モードでプロトン付加分子 (m/z 214.0 $[M+H]^+$) のイオン強度が最も高く検出された。ESI (-) モードで脱プロトン分子 (m/z 212.0 $[M-H]^-$) のイオン強度が最も高く検出された。しかし、ESI (-) モードで m/z 212.0をプリカーサーイオンとしてプロダクトイオンスキャン測定した場合、十分な強度のプロダクトイオンが得られなかった。

したがって、アミノシクロピラクロールは、ESI (+) モードで測定される m/z 214.0をプリカーサーイオンとした。

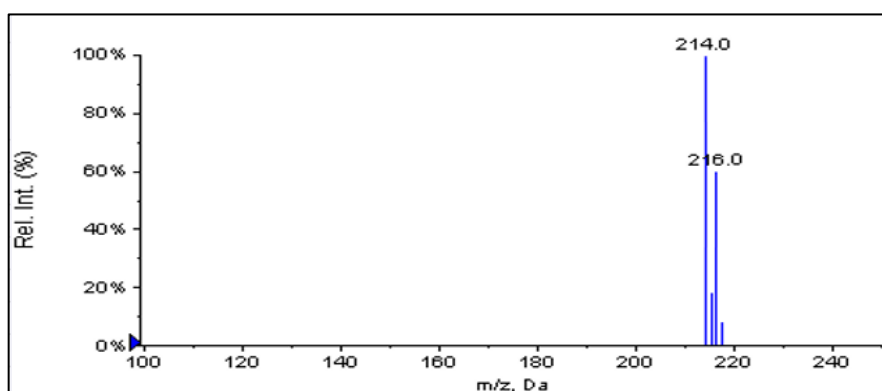


図1-1 アミノシクロピラクロールのマススペクトル

測定条件 : ESI (+)、DP=61

スキャン範囲 : m/z 100~250

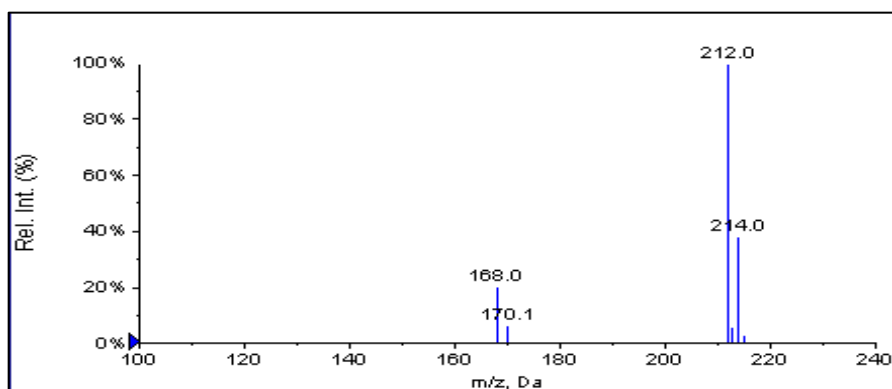


図1-2 アミノシクロピラクロールのマススペクトル

測定条件 : ESI (-)、DP=-55

スキャン範囲 : m/z 100~250

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)

メタノール及び水 (1 : 1) 混液で調製した0.1 mg/Lアミノシクロピラクロール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2-1、図2-2に示した。

アミノシクロピラクロールは、ESI (+) モードで m/z 214.0→68.1 (CE=41 eV) が最も高く検出された為、これを定量イオンとし、次いで高く検出された m/z 214.0→101.1 (CE=45 eV) を定性イオンとした。

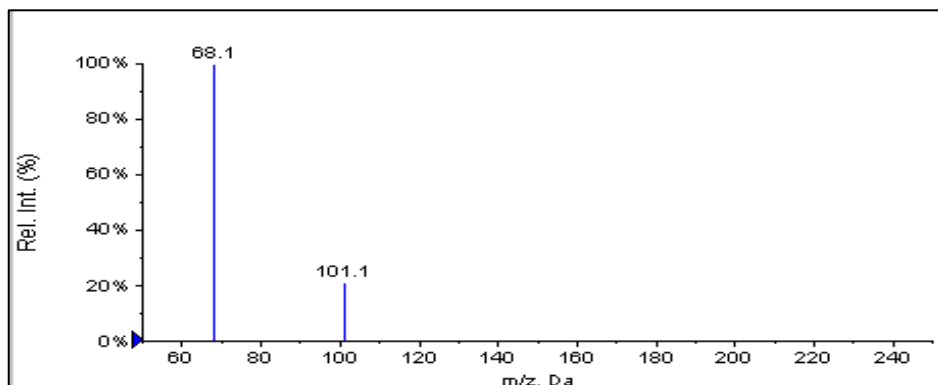


図2-1 アミノシクロピラクロールのプロダクトイオンスペクトル
プリカーサーイオン： m/z 214.0、スキャン範囲： m/z 50～250
測定条件：ESI (+)、DP = 61 V、CE=41 eV

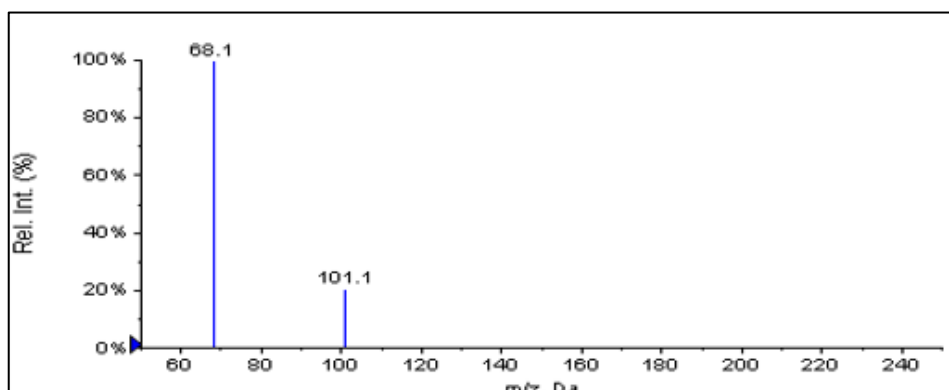


図2-2 アミノシクロピラクロールのプロダクトイオンスペクトル
プリカーサーイオン： m/z 214.0、スキャン範囲： m/z 50～250
測定条件：ESI (+)、DP = 61 V、CE=45 eV

3) MS条件の検討

0.1 mg/Lアミノシクロピラクロール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：5500 V、ソース温度：450℃、DP：61でアミノシクロピラクロール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)

アミノシクロピラクロールは、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かった (図3)。そこで、水系移動相に0.2 vol%酢酸 (約34.9 mmol/L) を使用した場合と、0.2 vol%ギ酸 (約53.0 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。

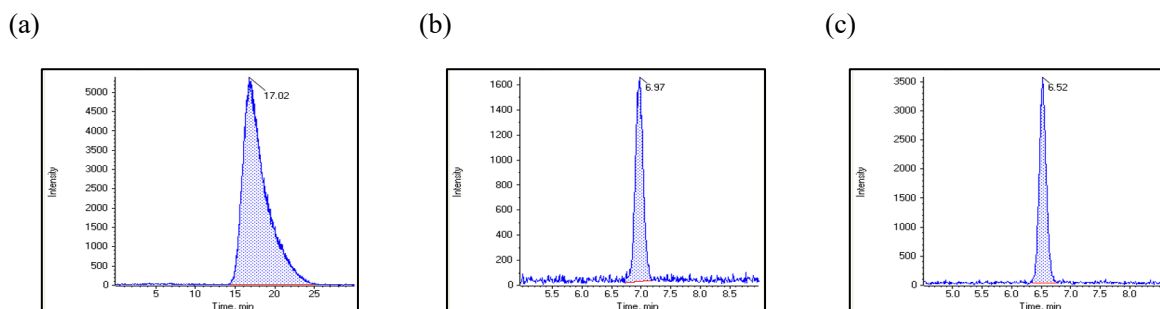


図3 アミノシクロピラクロルのクロマトグラム

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

(a) 水及びメタノール（2：3）混液、0.2mL/min

(b) 0.2 vol%ギ酸及びメタノール（2：3）混液、0.2mL/min

(c) 0.2 vol%酢酸及びメタノール（2：3）混液、0.2mL/min

表1 移動相添加剤のS/Nの状況

	0.2 vol%酢酸及びメタノール (9：1) 混液	0.2 vol%ギ酸及びメタノール (9：1) 混液
S/N	88.7	40.6

測定溶液：0.0005 mg/Lアミノシクロピラクロル標準液 5 μ L（0.0025 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、0.2 vol%酢酸及びメタノール（9：1）混液を使用した場合と、0.2 vol%酢酸及びアセトニトリル（9：1）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

	0.2 vol%酢酸及びメタノール (9：1) 混液	0.2 vol%酢酸及びアセトニトリル (9：1) 混液
S/N	88.7	21.7

測定溶液：0.0005 mg/Lアミノシクロピラクロル標準液 5 μ L（0.0025 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%、0.5 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%	0.5 vol%
S/N	98.7	88.7	69.9

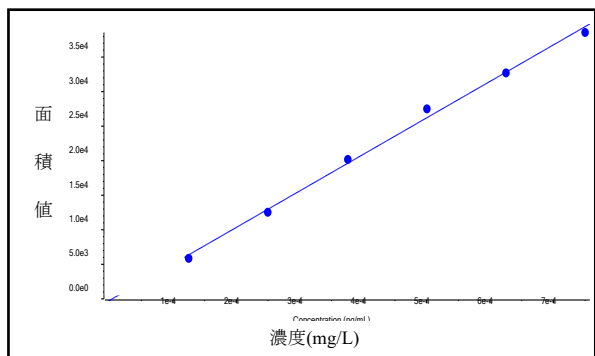
測定溶液：0.0005 mg/Lアミノシクロピラクロル標準液 5 μ L（0.0025 ng）

移動相：各酢酸溶液及びメタノール（9：1）混液

7) 検量線の直線性について

アミノシクロピラクロルの検量線の例を図4-1、図4-2に示した。

低濃度および高濃度ともに、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

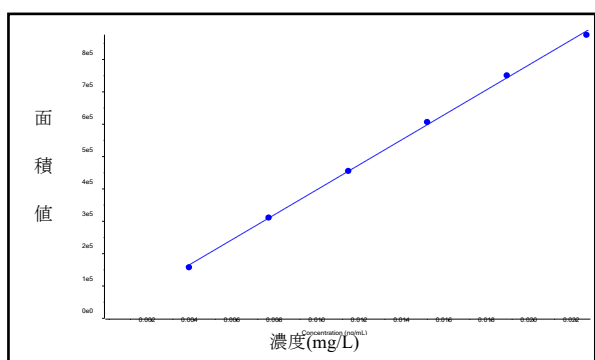
濃度範囲：0.000125～0.00075 mg/L

検量線傾き (a)：52810514

検量線切片 (b)：-216.2

寄与率 (r^2)：0.995844

図4-1 アミノシクロピラクロルの検量線（低濃度）の例



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：0.00375～0.0225 mg/L

検量線傾き (a)：38599771

検量線切片 (b)：19761

寄与率 (r^2)：0.999188

図4-2 アミノシクロピラクロルの検量線（高濃度）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。

$$0.01 \text{ mg/kg} \left[\frac{\text{試験溶液量} 10 \text{ (mL)}}{\text{試験溶液中の試料量} 0.5 \text{ (g)}^{*1}} \times \frac{\text{分析対象化合物の定量限界相当量} 0.0025 \text{ (ng)}}{\text{注入量} 5 \text{ (}\mu\text{L)}} \right]$$

*1 10.0 g × 10 mL / 200 mL

2. 試験溶液調製法の検討

1) 抽出方法の検討

家畜残留試験の分析法では、試料5.0 gにアセトニトリル及び0.1 vol%ギ酸（9：1）混液、アセトニトリル及び0.1 vol%ギ酸（7：3）混液、次いでアセトニトリル及び0.1 vol%ギ酸（1：1）混液で順次抽出を行っている。そこで、牛の筋肉10.0 gにアミノシクロピラクロルを添加して、家畜残留試験の抽出法と、抽出溶媒にアセトンやメタノールを用いる方法と回収率の比較を行うために、表4に示した条件で得られた抽出液を移動相で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メタノールを抽出溶媒とし、その抽出回数は2回とした。

また、牛の肝臓、牛の脂肪及び牛乳についてもメタノールを用いた抽出を行ったところ、97%～106%と良好な結果が得られた。

表4 牛の筋肉の抽出状況（回収率（%））

抽出溶媒 (1回目、2回目、3回目の抽出液量)	1回目	2回目	3回目	合計
アセトニトリル及び0.1 vol%ギ酸混液* (40 mL、40 mL、40 mL)	64	10	5	79
アセトン (100 mL、50 mL、50 mL)	43	0	0	43
メタノール (100 mL、50 mL、50 mL)	86	11	3	100

*アセトニトリル及び0.1 vol%ギ酸混液の比率は、抽出1回目は（9：1）、抽出2回目は（7：3）、抽出3回目は（1：1）を使用。

添加試料：牛の筋肉、供試量：アミノシクロピラクロル 50 µg、検量線：溶媒標準液

2) ミニカラムによる精製の検討①（陽イオン交換）

家畜残留試験の分析法では、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、Waters製）を用いて精製を行っている。そこで、表5に示したミニカラムに、メタノールで希釈した標準品を通液し、回収率を求めた。その結果を表5に示した。

今回検討を行ったいずれのミニカラムも、アミノシクロピラクロルを十分保持できなかった。

表5 ミニカラム（陽イオン交換）からの溶出状況（回収率（%））

固相カラム	試料負荷液	メタノール	合計
	(10mL)	0-5 mL	
Oasis MCX (225 mg)	84	11	95
BondElut SCX (500 mg)	93	10	103
BondElut PLEXA PCX (200 mg)	94	12	106
InertSep MC-1 (250 mg)	90	8	98

供試量：5 mg/L アミノシクロピラクロル標準液 10 mL (50 µg)

3) ミニカラムによる精製の検討②（陰イオン交換）

2) で検討したミニカラムでは、メタノール溶液中のアミノシクロピラクロルを十分に保持できなかった。そこで、表6-1に示したミニカラムに、メタノールで希釈した標準品を通液し、回収率を求めた。その結果を表6-1に示した。回収率、ミニカラムの通液性、及び溶出溶媒量の少なさから、Sep-pak Accell Plus QMA (360 mg) を選択した。

また、溶出溶媒に使用するギ酸の濃度を検討した結果を表6-2に示した。1 vol%ギ酸・メタノール溶液5 mLでも良好な回収率が得られたため、溶出溶媒のギ酸濃度は、1 vol%を選択した。

表6-1 ミニカラム（陰イオン交換）からの溶出状況（回収率（%））

固相カラム	試料負荷液	メタノール		2 vol%ギ酸・メタノール溶液		合計
	(10mL)	0-5 mL	0-5 mL	5-10 mL		
Oasis MAX (150 mg)	50	20	3	0		73
BondElut SAX (500 mg)	0	3	87	3		90
InertSep PSA (500 mg)	0	0	77	15		92
InertSep MA-1 (250 mg)	0	0	81	2		83
<u>Sep-pak Accell QMA (360 mg)</u>	0	0	92	0		92

供試量：5 mg/L アミノシクロピラクロル標準液 10 mL (50 µg)

表6-2 Sep-pak Accell QMA (360 mg) からの溶出状況（回収率（%））

溶出溶媒	試料負荷液	メタノール	溶出溶媒					合計
	(10mL)	0-5 mL	0-1 mL	1-2 mL	2-3 mL	3-4 mL	4-5 mL	
2 vol%ギ酸・メタノール溶液	0	0	11	73	8	0	0	92
<u>1 vol%ギ酸・メタノール溶液</u>	0	0	0	70	20	2	0	92

供試量：5 mg/L アミノシクロピラクロル標準液 10 mL (50 µg)

4) 陰イオン交換ミニカラムによる精製の検討③

マトリックス存在下における溶出状況を確認した。試料10.0 g（牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳）を7.試験溶液の調製 1) ①抽出に従って前処理し、ブランク液10 mLを得た。これに、100 mg/Lアミノシクロピラクロル標準液100 µL (10 µg) を添加した後、あらかじめメタノール10 mLを通液して予備洗浄したSep-pak Accell Plus QMA (360 mg) に負荷した。このミニカラムにメタノール5 mLを通液し、洗浄した。次いで、1 vol%ギ酸・メタノール溶液5 mLを通液し、溶出液を得た。このときの溶出状況を表7に示した。

この結果、マトリックス存在下（牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳）においても、十分な回収率が得られることが確認された。

表7 マトリックス存在下におけるSep-pak Accell QMAからの回収率 (%)

試料	試料負荷液	メタノール	1 vol% 酢酸・メタノール溶液	合計
	(10mL)	5 mL	5 mL	
牛の筋肉	0	0	102	102
牛の脂肪	0	0	97	97
牛の肝臓	0	0	96	96
牛乳	0	0	103	103

供試量：100 mg/L アミノシクロピラクロル標準液 100 μ L (10 μ g)、検量線：溶媒標準液

3. 添加回収試験

畜産物4種類（牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳）を用いて、試料にアミノシクロピラクロルを添加して、実験方法の「7. 試験溶液の調製」に従い、定量限界濃度（0.01 mg/kg）及び基準値濃度で5併行の添加回収試験を行った。添加回収試験における各食品のブランク試料、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及び図6に示した。また、各食品の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7に示した。

1) 選択性

検討結果を表8に示した。畜産物4種類（牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳）いずれの食品においても、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) 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	アミノシクロピラクロル	牛の筋肉	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0			#DIV/0!	#DIV/0!	○	
		牛の脂肪	0.01	0.03	基準値	0.03	< 0.100	面積	0	0	0			#DIV/0!	#DIV/0!	○	
		牛の肝臓	0.01	0.3	基準値	0.3	< 0.100	面積	0	0	0			#DIV/0!	#DIV/0!	○	
		牛乳	0.01	0.02	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9に示した。定量限界濃度では、真度88.6～96.1%、併行精度2.4～3.4%となり、基準値濃度では、真度89.1～97.9%、併行精度3.3～5.2%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148～178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 ^{*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.	Min.	平均値	
1	アミノシクロピラクロル	牛の筋肉	0.01	0.01	0.01	S/N	52810514	-216	0.9958	90.5	94.0	89.8	88.8	88.7	90.3	2.4	176	151	164	
		牛の脂肪	0.01	0.03	0.01	S/N	71079429	-3257	0.9925	86.6	87.4	91.3	90.6	87.1	88.6	2.5	190	166	178	
		牛の脂肪	0.01	0.03	0.03	—	60005714	128	0.9909	93.1	91.2	101.9	91.4	99.7	95.5	5.2	-	-	#DIV/0!	
		牛の肝臓	0.01	0.3	0.01	S/N	46951771	-214	0.9982	91.1	97.2	96.9	99.9	95.3	96.1	3.4	166	129	148	
		牛の肝臓	0.01	0.3	0.3	—	38599771	19761	0.9996	91.1	84.9	90.8	91.4	87.1	89.1	3.3	-	-	#DIV/0!	
		牛乳	0.01	0.02	0.01	S/N	52828229	40	0.9918	89.5	93.0	88.8	87.8	87.7	89.3	2.4	195	140	167	
		牛乳	0.01	0.02	0.02	—	49460571	569	0.9998	90.5	99.5	97.5	99.7	102.4	97.9	4.6	-	-	#DIV/0!	

*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0.91～1.08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 ¹ (mg/L)	ピーク面積(高さ) ²								備 考	
							面積又は 高さの別	ブランク ³	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	アミノシクロピラクロル	牛の筋肉	0.01	0.01	0.01	0.0005	面積	0	26209	24827	25518	27439	26403	26921	0.95	
		牛の脂肪	0.01	0.03	0.01	0.0005	面積	0	32905	33196	33051	29888	31316	30602	1.08	
		牛の脂肪	0.01	0.03	0.03	0.0015	面積	0	86965	86829	86897	93325	83829	88577	0.98	
		牛の肝臓	0.01	0.3	0.01	0.0005	面積	0	21908	21290	21599	23765	23718	23742	0.91	
		牛の肝臓	0.01	0.3	0.3	0.015	面積	0	550590	556230	553410	606220	613500	609860	0.91	
		牛乳	0.01	0.02	0.01	0.0005	面積	0	26209	24827	25518	28312	26741	27527	0.93	
		牛乳	0.01	0.02	0.02	0.001	面積	0	54554	49075	51815	49752	49471	49612	1.04	

*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]

低濃度群

(ESI (+)、青線 (定量イオン) : m/z 214.0>68.1、赤線 (定性イオン) : m/z 214.0>101.1)

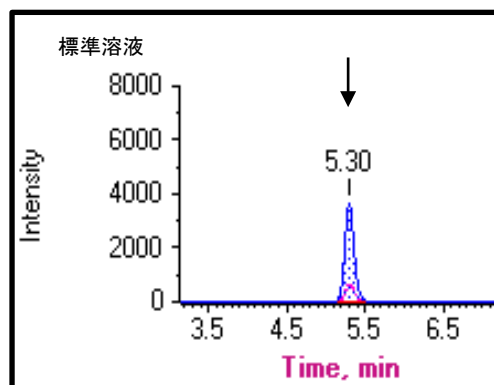
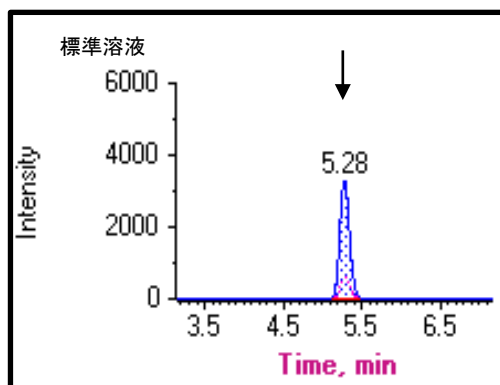
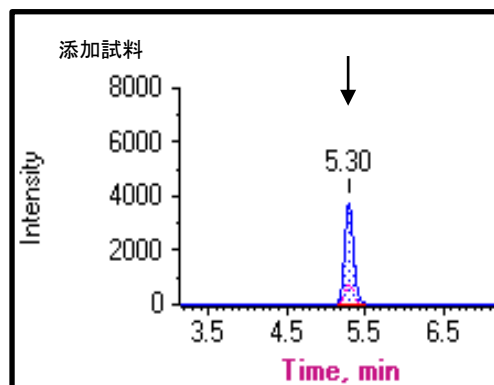
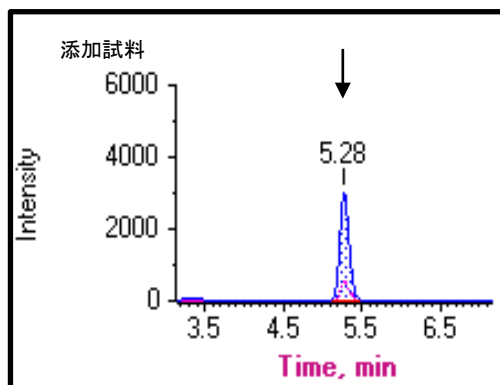
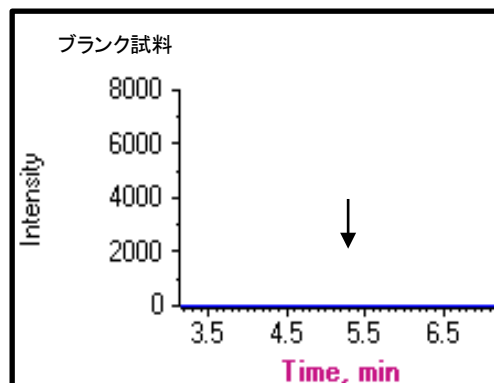
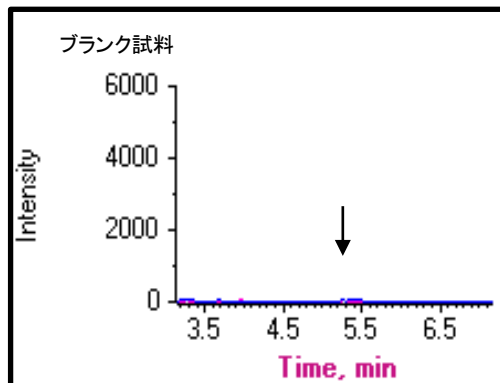


図5-1 牛の筋肉のSRMクロマトグラム
(添加濃度 0.01 ppm)

図5-2 牛の脂肪のSRMクロマトグラム
(添加濃度 0.01 ppm)

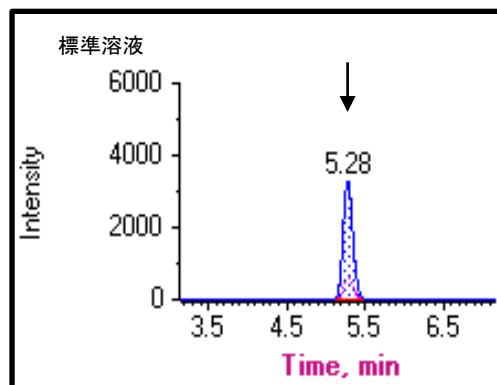
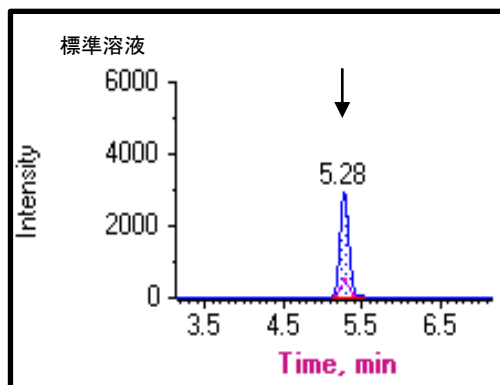
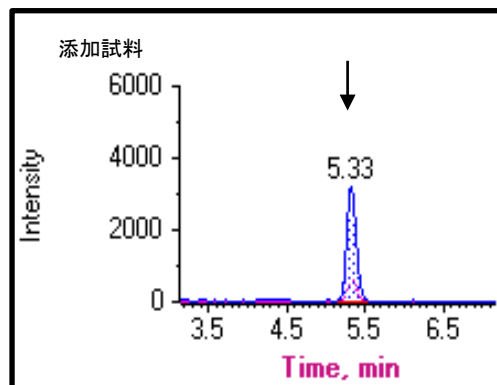
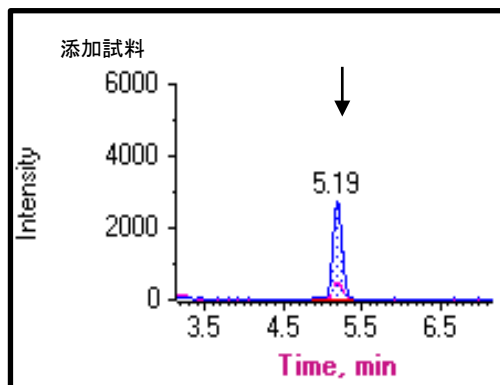
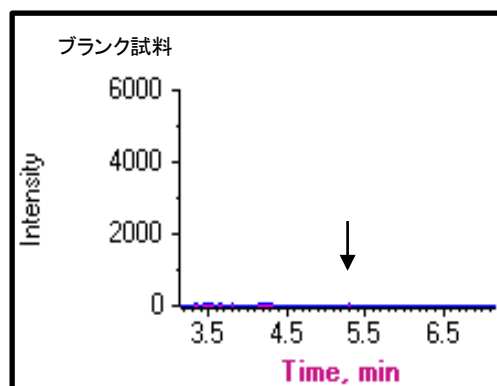
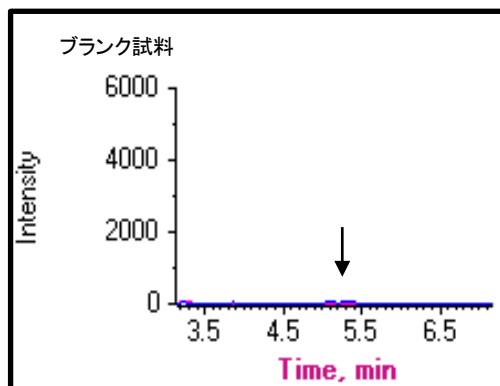


図5-3 牛の肝臓のSRMクロマトグラム
(添加濃度 0.01 ppm)

図5-4 牛乳のSRMクロマトグラム
(添加濃度 0.01 ppm)

高濃度群

(ESI (+)、青線 (定量イオン) : m/z 214.0>68.1、赤線 (定性イオン) : m/z 214.0>101.1)

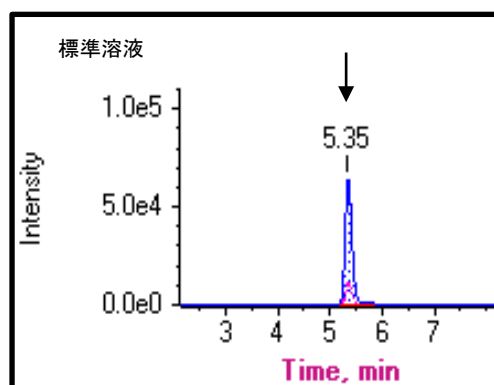
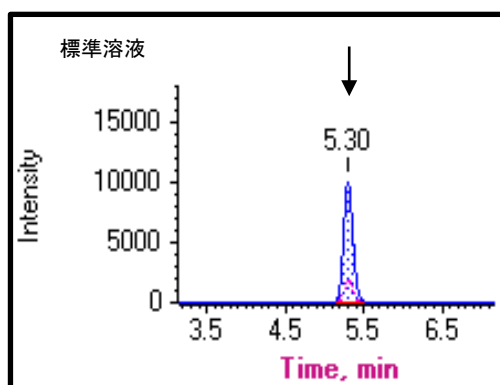
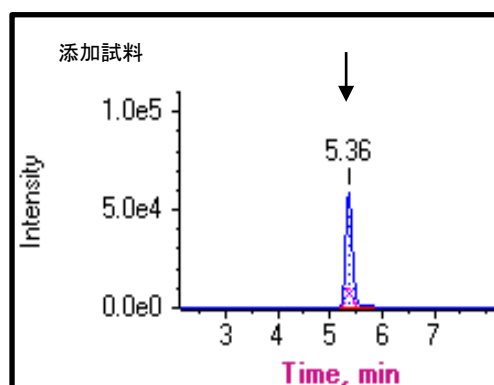
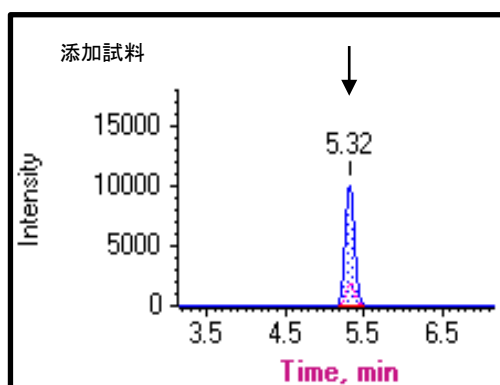
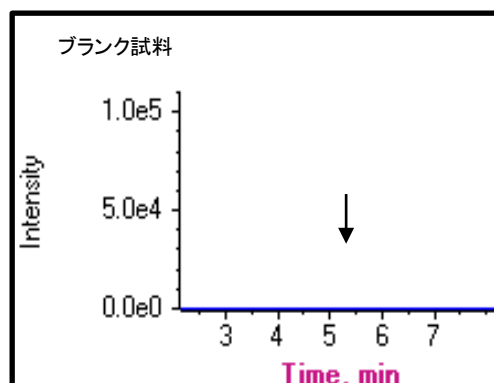
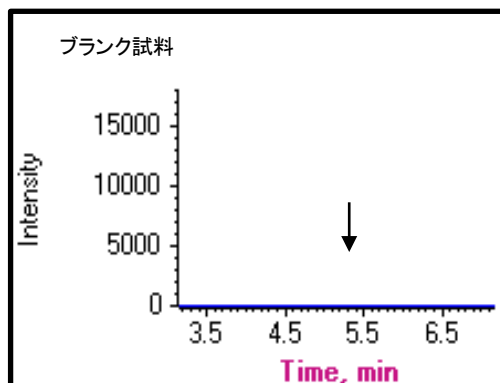


図6-1 牛の脂肪のSRMクロマトグラム
(添加濃度 0.03 ppm)

図6-2 牛の肝臓のSRMクロマトグラム
(添加濃度 0.3 ppm)

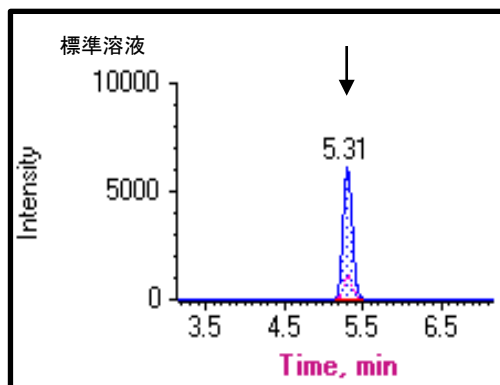
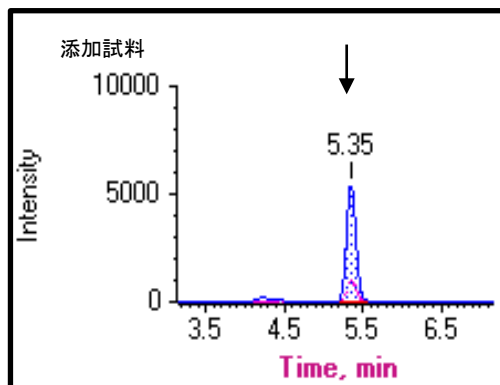
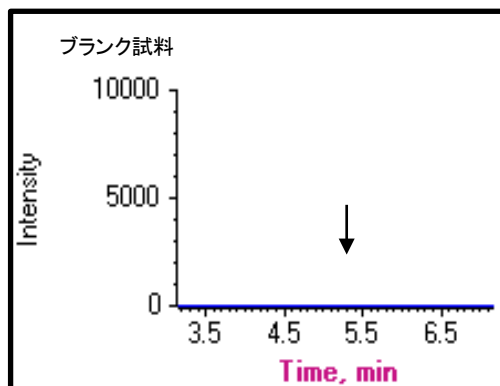
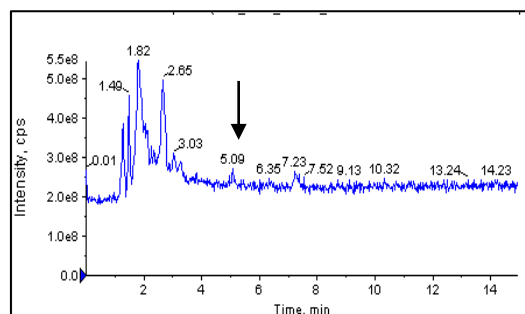
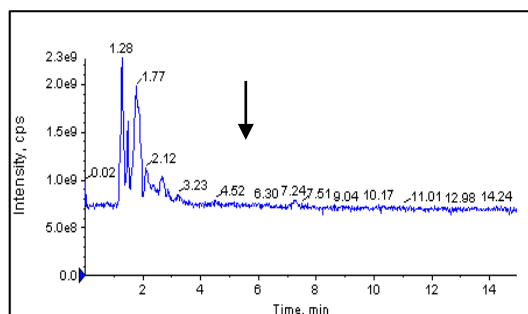


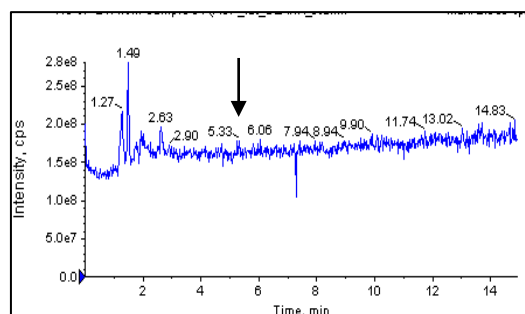
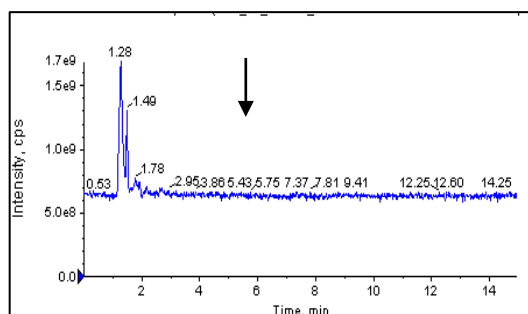
図6-3 牛乳のSRMクロマトグラム
(添加濃度 0.02 ppm)

[各食品のブランク試料のトータルイオンクロマトグラム]

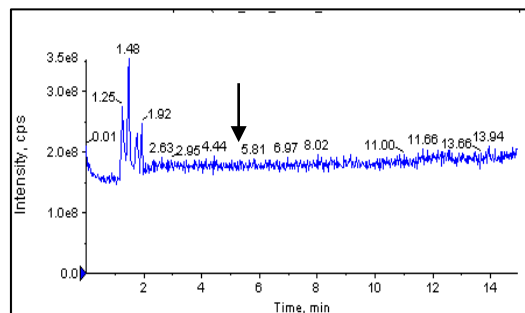
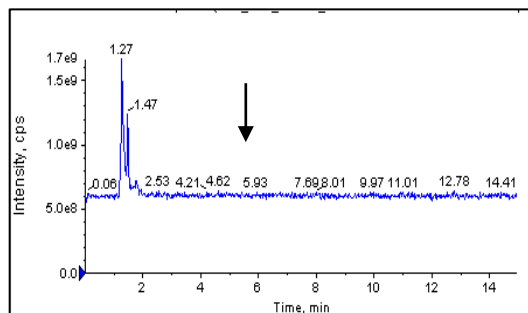
① 牛の筋肉



② 牛の脂肪



③ 牛の肝臓



④ 牛乳

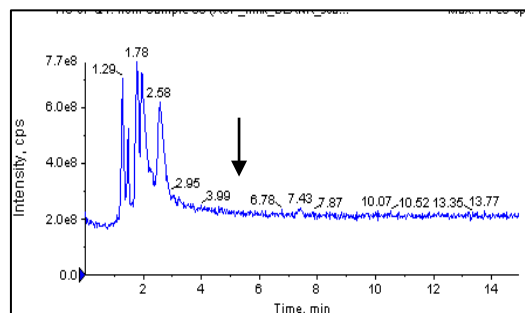
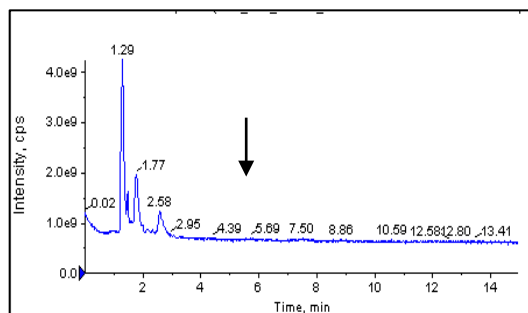


図7 各畜産物のトータルイオンクロマトグラム

左：スキャン範囲 (m/z) : 50~1000、ESI (-)、DP : -61

右：スキャン範囲 (m/z) : 50~1000、ESI (+)、DP : 61

[結論]

アミノシクロピラクロールを試料からメタノールで抽出し、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。本法を用いて畜産物4種類（牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳）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88.6～96.1%、併行精度2.4～3.4%となり、基準値濃度では、真度89.1～97.9%、併行精度3.3～5.2%と良好な結果が得られた。いずれの試料においても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0.91～1.08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、アミノシクロピラクロール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 mg/kgの定量が可能であると確認された。

[参考文献]

なし