

※ 本報告書は、試験法開発における検討結果を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ください。

平成27年度

食品に残留する農薬等の成分である物質の
試験法開発事業報告書

塩酸ホルメタネート試験法（農産物）

塩酸ホルメタネート試験法（農産物）の検討結果

〔緒言〕

1. 目的

塩酸ホルメタネートは、カルバマート系の殺虫・殺ダニ剤である。コリンエステラーゼ性阻害作用により、殺虫効果を示すものと考えられている。

害虫及びダニ防除用にかんきつ類及びりんご等に茎葉処理して使用される。我が国では農薬として登録されていないが、ポジティブリスト制度が導入されたことに伴い、基準値がレモン、オレンジ等の果実に0.03～2 ppm設定された。農薬評価書では塩酸ホルメタネートの一日摂取許容量を0.001 mg/kg体重/日と設定している¹⁾。

分析法として通知一斉試験法[LC/MSによる農薬等の一斉試験法I(農産物)]の適用が検討されたが、平均回収率の中央値が50%未満と良好な結果が得られなかった*。また、果実以外の農産物に対する報告がほとんどないことから²⁻⁷⁾、一律基準0.01 ppmに適用できる塩酸ホルメタネートの農産物中の分析法の検討を行った。

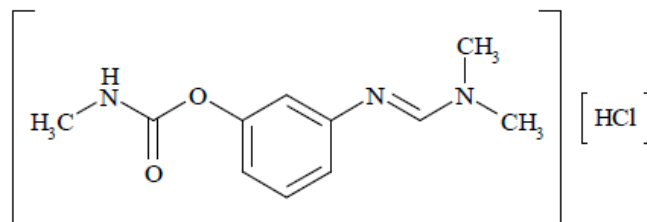
2. 分析対象化合物の構造式及び物理化学的性質

(1) 分析対象化合物

和名 塩酸ホルメタネート

英名 Formetanate hydrochloride

(2) 構造式



(3) 分子式 $C_{11}H_{16}ClN_3O_2$

(4) 分子量 257.8

(5) CAS NO. 23422-53-9

(6) 化学名

IUPAC 名

和名：3-[(*EZ*)-ジメチルアミノメチレンアミノ]フェニル メチルカルバマート塩酸塩

英名：3-[(*EZ*)-dimethylaminomethyleneamino]phenyl methylcarbamate hydrochloride

CAS 名

和名：*N,N*-ジメチル-*N'*-[3-[[メチルアミノ]カルボニル]オキシ]フェニル]メタンイミドアミド 一塩酸塩

英名：*N,N*-dimethyl-*N'*-[3-[(methylamino)carbonyl]oxy]phenyl] methanimidamide monohydrochloride

(7) 外観 無色粉末結晶

(8) 融点 200-202°C

(9) 蒸気圧

0.0016mPa (25°C)

(10) 解離定数 (pKa)

8.0

(11) 水溶解 882 g/L(25°C)

(12) 有機溶媒溶解度

n-ヘキサン <0.0005 g/L (20°C)

トルエン 0.01 g/L (20°C)

ジクロロメタン 0.303 g/L (20°C)

酢酸エチル 0.001 g/L (20°C)

アセトン 0.074 g/L (20°C)

メタノール 283 g/L (20°C)

(13) 1-オクタノール/水分配係数 (log Pow)

LogPow \leq -2.7(pH7-9)

(14) ヘンリー定数

$5.0 \times 10^{-10} \text{Pa m}^3 \text{mol}^{-1}$ (22°C)

(15) 加水分解性

半減期 (22°C)	pH 5	62.5 日
	pH 7	23 時間
	pH 9	2 時間

(16) 水中光分解性

半減期 (暗所)	pH 5	1333 時間
	pH 7	17 時間
	pH 9	2.9 時間

(17) 熱安定性

室温で8年間安定

200°Cで分解

[出典]

①農薬評価書 塩酸ホルメタネート, 2010年1月食品安全委員会農薬専門調査会.

②The Pesticide Manual (16th edition) (British Crop Protection Council): 440 Formetanete 568-570, 2012.

③T. Roberts and D. Hutson(ED in Chief), Metabolic Pathway of Agrochemicals, PART 2, Insecticides and Fungicides, The Royal Society of Chemistry, UK, 1999, p43-48(ISBN0-85404-499X).

3. 基準値

食品名	基準値(ppm)
レモン	0.6
オレンジ (ネーブルオレンジを含む)	2
グレープフルーツ	2
ライム	0.03
その他のかんきつ類果実	0.03
りんご	0.5
日本なし	0.5
西洋なし	0.5
ネクタリン	0.4

[実験方法]

1. 試料

検討には、玄米、大豆、ほうれんそう、キャベツ、ばれいしょ、オレンジ、ライム、りんご、ネクタリン及び緑茶を試料として用いた。いずれも東京都内で流通していたものを購入した。

試料、産地及び購入場所を以下に記載した。

試料名	産地
玄米	福島県
大豆	北海道
ほうれんそう	茨城県
キャベツ	千葉県
ばれいしょ	長崎県
オレンジ	アメリカ産
ライム	メキシコ産
りんご	青森県
ネクタリン	長野県
緑茶	鹿児島県

各試料の採取方法を以下に記載した。

(1) 玄米

試料をミルを用いて粉砕した後、標準網ふるい（425 μm）を通して均一化した。

(2) 大豆

試料をミルを用いて粉砕した後、標準網ふるい（425 μm）を通して均一化した。

(3) ほうれんそう

赤色根部を含み、ひげ根及び変質葉を除去したものを細切したのちフードプロセッサーを用いて均一化した。

(4) キャベツ

外側変質葉及びしんを除去したものを4個をそれぞれ4等分し、各々から1等分を集めたものを細切したのちフードプロセッサーを用いて均一化した。

(5) ばれいしょ

試料を細切した後、フードプロセッサーを用いて均一化した。

(6) オレンジ（全果）

試料を細切した後、フードプロセッサーを用いて均一化した。

(7) ライム（全果）

試料を細切した後、フードプロセッサーを用いて均一化した。

(8) りんご（全果）

試料のしん及び果梗の基部を除去したものを細切した後、フードプロセッサーを用いて均一化した。

(9) ネクタリン

試料の種子及び果梗の基部を除去したものを細切した後、フードプロセッサーを用いて均一化した。

(10) 緑茶

試料をミルを用いて粉砕した後、標準網ふるい（425 μm）を通して均一化した。

2. 試薬・試液

塩酸ホルメタネート標準品：純度99.9%（関東化学製）

アセトニトリル：残留農薬試験用（和光純薬工業製）、LC-MS用（和光純薬工業製）

1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液：高速液体クロマトグラフ用（和光純薬工業製）

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム：InertSep C₁₈（1 mg/6mL、ジーエルサイエンス製）

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(500 mg) : InertSep PSA (ジーエルサイエンス製)

グラファイトカーボンミニカラム(250mg 及び 500 mg) : InertSep GC (ジーエルサイエンス製)

標準原液： 塩酸ホルメタネート標準品 20mg を精秤し、アセトニトリルで溶解して 1000 mg/L 溶液を調製した。

検量線用標準溶液： 標準原液をアセトニトリル及び水 (1:1) 混液で適宜希釈し、0.000125~0.15 mg/L の各溶液を調製した。

添加用標準溶液①： 標準原液をアセトニトリルで希釈して 1 mg/L 溶液を調製した。

添加用標準溶液②： 標準原液をアセトニトリルで希釈して 200 mg/L 溶液を調製した。

添加用標準溶液③： 標準原液をアセトニトリルで希釈して 3 mg/L 溶液を調製した。

添加用標準溶液④： 標準原液をアセトニトリルで希釈して 50 mg/L 溶液を調製した。

添加用標準溶液⑤： 標準原液をアセトニトリルで希釈して 40 mg/L 溶液を調製した。

添加用標準溶液⑥： 標準原液をアセトニトリルで希釈して 0.5 mg/L 溶液を調製した。

3. 装置

ホモジナイザー： ヒスコトロン NS-52 (マイクロテック・ニチオン製)

ミル： .MA-X10GM (TOSHIBA 製)

フードプロセッサ： MK-K81 (パナソニック製)

濃縮装置： R-215 (ビュッヒ製)

遠心分離器： AX-321 (トミー精工製)

LC-MS/MS

装置	型式	会社
MS	Quattro Premier XE	Waters
LC	ACQUITY UPLC	Waters
データ処理	MassLynx V.4.1 SCN805	Waters

4. 測定条件

LC-MS(/MS)

LC 条件				
カラム	L-column2 ODS (内径 2.1 mm、長さ 100 mm、粒子径 5 μ m : 化学物質評価研究機構製)			
移動相流速 (mL/min)	0.30			
注入量 (μ L)	5			
カラム温度 (°C)	40			
移動相	A 液 : 5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 B 液 : アセトニトリル			
グラジエント条件	時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)	
	0.0	95	5	
	1.0	95	5	
	8.0	5	95	
	11.0	5	95	
	11.1	95	5	
15.0	95	5		
MS 条件				
測定モード	SRM			
イオン化モード	ESI (+)			

キャピラリ電圧 (kV)	3.00
ソース温度 (°C)	100
脱溶媒温度 (°C)	400
コーンガス	窒素、50 L/hr
脱溶媒ガス	窒素、850 L/hr
コリジョンガス	アルゴン
定量イオン (m/z)	MS/MS: +222→165 [コーン電圧 25 (V)、コリジョンエネルギー15 (eV)]
定性イオン (m/z)	MS/MS: +222→93 [コーン電圧 25 (V)、コリジョンエネルギー35 (eV)]
保持時間 (min)	3.2

5. 定量

塩酸ホルメタネート標準品 20 mg を精秤し、アセトニトリルに溶解して 1000 mg/L 溶液を調製した。この溶液をアセトニトリル及び水 (1:1) 混液で希釈して 0.000125、0.00025、0.000375、0.0005、0.000625、0.00075、0.001125、0.0015、0.001875、0.00225、0.0025、0.005、0.00625、0.0075、0.01、0.0125、0.015、0.0188、0.025、0.0313、0.0375、0.05、0.075、0.1、0.125 及び 0.15 mg/mL の標準溶液を調製した。この溶液 5 µL を LC-MS/MS に注入して、得られたピーク面積を用いた絶対検量線法で定量した。

6. 添加試料の調製

(1) 玄米 (添加濃度 : 0.01 mg/kg)

試料 10.0 g に添加用標準溶液①0.1 mL (アセトニトリル溶液) を添加しよく混合した後、30 分間放置した。

(2) 大豆 (添加濃度 : 0.01 mg/kg)

試料 10.0 g に添加用標準溶液①0.1 mL (アセトニトリル溶液) を添加しよく混合した後、30 分間放置した。

(3) ほうれんそう (添加濃度 : 0.01 mg/kg)

試料 20.0 g に添加用標準溶液①0.2 mL (アセトニトリル溶液) を添加しよく混合した後、30 分間放置した。

(4) キャベツ (添加濃度 : 0.01 mg/kg)

試料 20.0 g に添加用標準溶液①0.2 mL (アセトニトリル溶液) を添加しよく混合した後、30 分間放置した。

(5) ばれいしょ (添加濃度 : 0.01 mg/kg)

試料 20.0 g に添加用標準溶液①0.2 mL (アセトニトリル溶液) を添加しよく混合した後、30 分間放置した。

(6) オレンジ (添加濃度 : 2 mg/kg)

試料 20.0 g に添加用標準溶液②0.2 mL (アセトニトリル溶液) を添加しよく混合した後、30 分間放置した。

オレンジ (添加濃度 : 0.01 mg/kg)

試料 20.0 g に添加用標準溶液①0.2 mL (アセトニトリル溶液) を添加しよく混合した後、30 分間放置した。

(7) ライム (添加濃度 : 0.03 mg/kg)

試料 20.0 g に添加用標準溶液③0.2 mL (アセトニトリル溶液) を添加しよく混合した後、30 分間放置した。

ライム (添加濃度 : 0.01 mg/kg)

試料 20.0 g に添加用標準溶液①0.2mL (アセトニトリル溶液) を添加しよく混合した後、30 分間放置した。

(8) りんご (添加濃度 : 0.5 mg/kg)

試料 20.0 g に添加用標準溶液④0.2 mL (アセトニトリル溶液) を添加しよく混合した後、30 分間放置した。

りんご (添加濃度 : 0.01 mg/kg)

試料 20.0 g に添加用標準溶液①0.2 mL (アセトニトリル溶液) を添加しよく混合した後、30 分間放置した。

(9) ネクタリン (添加濃度 : 0.4 mg/kg)

試料 20.0 g に添加用標準溶液⑤0.2 mL (アセトニトリル溶液) を添加しよく混合した後、30 分間放置した。

ネクタリン (添加濃度 : 0.01 mg/kg)

試料 20.0 g に添加用標準溶液①0.2 mL (アセトニトリル溶液) を添加しよく混合した後、30 分間放置した。

(10) 緑茶 (添加濃度 : 0.01 mg/kg)

試料 5.0 g に添加用標準溶液⑥0.1 mL (アセトニトリル溶液) を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

概要

塩酸ホルメタネートを試料からアセトニトリルで抽出し、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及びグラファイトカーボン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

試料20.0 gを250 mL遠心管に採る。玄米及び大豆は試料10.0 gに水20 mLを加え、30分間放置する。茶の場合は、試料5.00 gに水20 mLを加え、30分間放置する。これにアセトニトリル100 mLを加えてホモジナイズした後、毎分3,000回転で5分間遠心分離し、上澄液を200 mL容メスフラスコに採取した。残留物にアセトニトリル50 mLを加え、ホモジナイズした後、毎分3,000回転で5分間遠心分離する。得られた上澄液を合わせ、アセトニトリルを加えて正確に200 mLとした。

(2) 精製

①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及びグラファイトカーボンミニカラムクロマトグラフィー

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/3 mL)] にアセトニトリル 20 mL を注入し、流出液は捨てた。グラファイトカーボンミニカラム [InertSep GC (500 mg/6 mL)] にアセトニトリル 20 mL を注入し、流出液は捨てた。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の下にグラファイトカーボンミニカラムを接続し、1) で得られた溶液を穀類、豆類及び種実類の場合 5 mL、果実及び野菜の場合は 2.5 mL、茶の場合は 10 mL 注入した。次いでアセトニトリル 20 mL 注入し、全溶出液を採り、減圧濃縮装置を用いて 40°C 以下でアセトニトリルを除去した。この残留物にアセトニトリル及び水 (1 : 1) 混液を加えて正確に 5 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

↓ 野菜及び果実 : 試料 20.0 g

↓ 玄米及び大豆 : 試料 10.0 g に水 20 mL を加え 30 分間放置

↓ 茶 : 試料 5.00 g に水 20 mL を加え 30 分間放置

アセトニトリル抽出

↓ アセトニトリル 100 mL を加えホモジナイズ

- ↓ 遠心分離
- ↓ 残留物にアセトニトリル 50 mL を加えホモジナイズ
- ↓ 遠心分離
- ↓ 上澄液を合わせる
- ↓ アセトニトリル 200 mL 定溶

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/3 mL)]

グラファイトカーボンミニカラム [InertSep GC (500 mg/6 mL)]

- ↓ アセトニトリル 20 mL でコンディショニング
- ↓ 野菜及び果実：抽出液 2.5 mL を注入
- ↓ 玄米及び大豆：抽出液 5 mL を注入
- ↓ 茶：抽出液 10 mL を注入
- ↓ アセトニトリル 20 mL で溶出（全溶出液を採取）

濃縮（溶媒除去）

- ↓ 残留物をアセトニトリル：水混液（1:1）5 mL に溶解

試験溶液

↓

LC-MS/MS

8. マトリックス添加標準溶液の調製

ブランク試験溶液 0.5 mL を採り、窒素気流下で溶媒を除去した後、各検討対象食品の添加回収試験における回収率 100% 相当濃度の溶媒標準溶液 0.5 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。

[結果及び考察]

1. 測定条件の検討

(1) MS条件の検討

スキャン測定においては、ESIのESI(-)モードでは塩酸ホルメタネートは検出されなかった。このため、測定モードは十分な感度の得られたESI(+)モードとした。

塩酸ホルメタネートのESI(+)モード測定時のマススペクトルを図1に示した。ESI(+)モードではホルメタネート (m/z 221.12) のプロトン付加分子 (m/z 222 $[M+H]^+$) のスペクトルが得られた。

ホルメタネートのプロトン付加分子 (m/z 222 $[M+H]^+$) 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及び図3に示した。 m/z 222をプリカーサーイオンとした場合のプロダクトイオンのうち、イオン強度の最も強い m/z 165を定量用イオンに、次にイオン強度の強い m/z 93を定性用イオンとした。

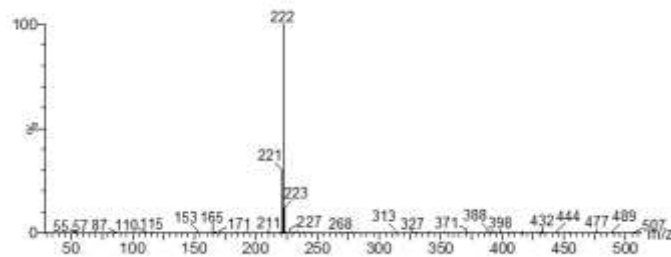


図1 塩酸ホルメタネートのマススペクトル
スキャン範囲： 50～550 m/z
測定条件：ESI(+) , CV=25 V
(CV : corn voltage) ,塩酸ホルメタネート： 0.1 mg/L

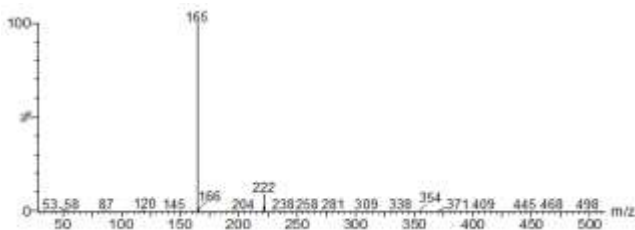


図2 塩酸ホルメタネートのプロダクトイオンスペクトル (定量用)
プリカーサーイオン： m/z 222
測定条件：ESI(+) , CV=25 V, CE=15 eV
(CV : corn voltage, CE : collision energy)
塩酸ホルメタネート： 0.1 mg/L

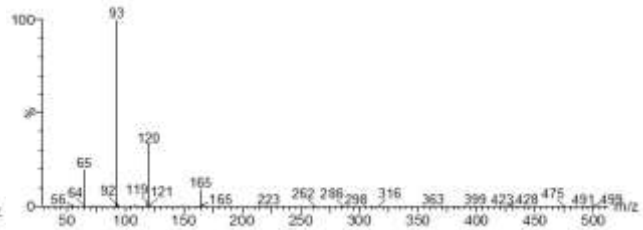


図3 塩酸ホルメタネートのプロダクトイオンスペクトル (定性用)
プリカーサーイオン： m/z 222
測定条件：ESI(+) , CV=25 V, CE=35 eV
(CV : corn voltage, CE : collision energy)
塩酸ホルメタネート： 0.1 mg/L

(2) LC条件の検討

分析カラムは、汎用されているオクタデシルシリル化シリカゲル (ODS) 充填カラムを比較検討した結果、化学物質評価研究機構製 L-column2 ODS (内径 2.1 mm、長さ 100 mm、粒子径 5 μ m :) を使用することで、塩酸ホルメタネートのピーク形状、分離及び再現性について良好な結果が得られたため、本カラムを用いて検討を実施した。

移動相条件については、後述のように塩酸ホルメタネートはメタノール中で不安定となるため、移動相溶媒にはアセトニトリルを選択し、アセトニトリル及びギ酸混液、アセトニトリル及び酢酸アンモニウム混液、アセトニトリル及び水混液について検討した。その結果、アセトニトリル及び酢酸アンモニウム混液で面積値が高かった。そこで、酢酸アンモニウム濃度について検討したところ、面積値は、5、

6及び7 mmol/Lで同様な値が得られ、それ以上では減少したことから、イオン化効率の安定する5 mmol/Lを用いることとした。

LC-MS/MS 測定では、分析対象化合物溶出後に移動相を十分に流し、分析カラム内に残存する夾雑物を溶出させる必要がある。塩酸ホルメタネートの保持時間は、アセトニトリル及び5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 1 : 9 混液で 2.9 分、1 : 4 混液では 1.4 分と早く、また、アイソクラティックの条件では、次の測定までにカラム内に残存する夾雑成分を十分に流出させることが困難であった。カラム内に残存する夾雑成分が影響しないようアセトニトリル及び5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液のグラジエント測定を検討した。アセトニトリル及び5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 (1 : 19) を 1 分保持した後、アセトニトリル及び5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 (19 : 1) までの 7 分間のグラジエント条件とした場合に、塩酸ホルメタネートの保持時間は 3.2 分であった。緑茶の測定後、カラム内に残存した夾雑成分によると思われるピークが次の測定に影響したため、分析カラムからの試料成分流出のため、アセトニトリル及び5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 (19 : 1) を 3 分間保持した。

(3) 検量線

図 5 に 0.000125~0.00075 mg/L の濃度範囲で作成した塩酸ホルメタネート検量線を示した。検量線の決定係数は、0.999 以上であり良好な直線性を示した。

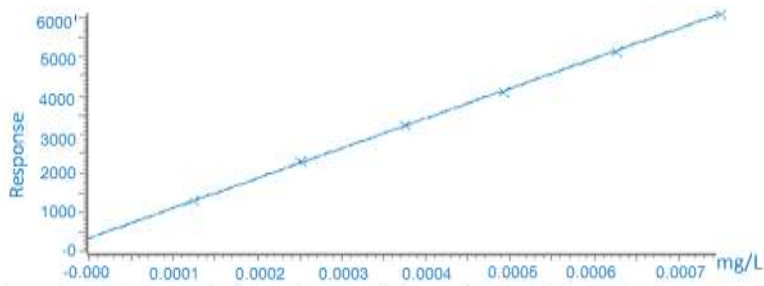


図 4. 塩酸ホルメタネート検量線の例
 $y = 7673.61x + 348.523$
 $r^2 = 0.999615$

(4) 定量限界

定量限界の算出結果を以下に示した。

塩酸ホルメタネート： 0.01 mg/kg $【5(\text{mL})/0.25(\text{g})】 \times 【0.0025(\text{ng})/5(\mu\text{L})】$

2. 試験溶液調製法の検討

(1) 抽出溶媒の検討

塩酸ホルメタネートは、水溶性が高く (882 g/L (25°C))^{8,9)}、LC での分析に適している。標準溶液の調製時に使用する有機溶媒により安定性に違いが見られたため、溶媒中での安定性の確認を行った。

LC 分析で移動相として使用されるアセトニトリル及びメタノールを用いて塩酸ホルメタネート 10 mg/L 標準溶液を作成し、-20、4、8 及び 20°C で保管し、塩酸ホルメタネートの最大吸光波長 252nm を (吸収波長を図 5 に示す) 測定して経日変化を確認した。吸光度の経日変化を図 6 に示した。

メタノールでは-20°C 保管以外は 5 日、-20°C も 12 日以降吸光度が低下した。アセトニトリルでは 190 日以降も安定して検出されたことから、抽出及び精製に使用する溶媒はアセトニトリルを用いて、標準溶液の保管は-20°C で行うこととした。

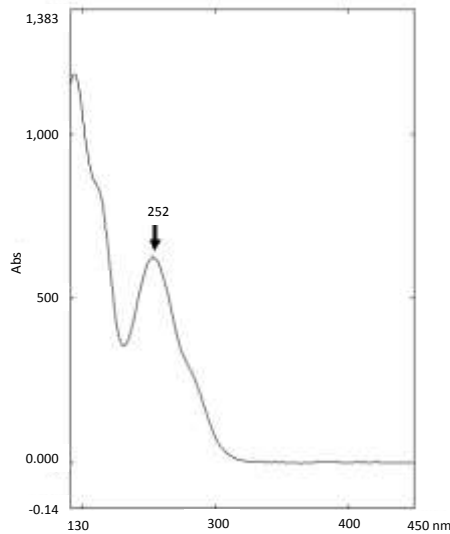


図5 塩酸ホルメタネート UV 吸収曲線

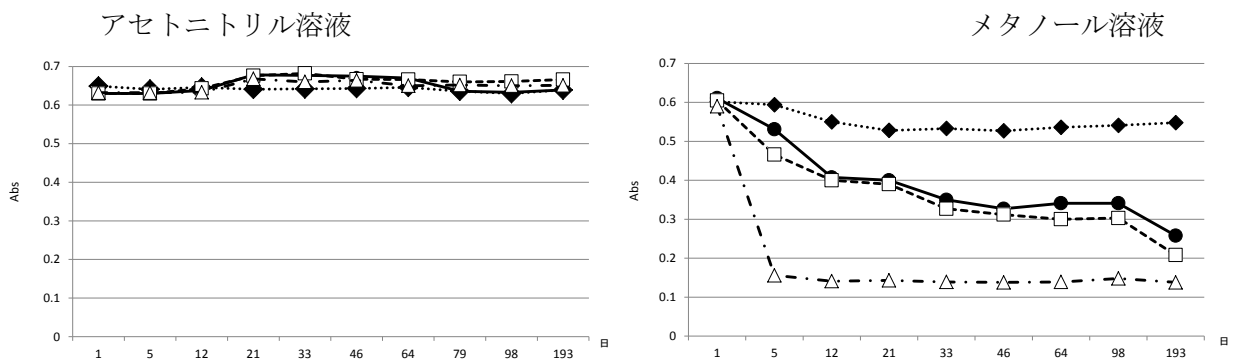


図6 塩酸ホルメタネート標準溶液吸光度の経日変化

●●●● : -20°C, ●●●● : 4°C, -□- : 8°C, -△- : 20°C

(2) 抽出時分解の有無の確認

塩酸ホルメタネートは弱酸性では比較的安定（半減期：pH 5 62.5 日）しているが、中性では加水分解されやすい（半減期：pH 7 23 時間）^{8,9)}。

試料に標準品を添加後、放置中に分解が起きるか確認した。玄米、大豆、ほうれんそう、キャベツ、ばれいしょ、オレンジ、ライム、りんご、ネクタリン及び緑茶を試料として、0.1 mg/kg になるようにアセトニトリル標準溶液を添加し良く混合した後、放置の経時変化について試行数 2 で添加回収試験を行った。

塩酸ホルメタネート 10 mg/L（アセトニトリル溶液）標準溶液 0.2 mL（玄米及び大豆は 0.1 mL、緑茶は 0.05 mL）を添加し、10 分、20 分及び 30 分放置後、アセトニトリル抽出、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム、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及びグラファイトカーボンミニカラムで精製を行った後、試験溶液とした。回収結果を表 1 に示した。

いずれの場合も 92.7%以上の回収が得られ、顕著な分解は見られなかった。アセトニトリルによる抽出で安定した回収が得られることを確認した。

表1 抽出時放置時間による分解の確認

食品名	回収率 (%)					
	10分放置		20分放置		30分放置	
	1	2	1	2	1	2
玄米	99.6	99.7	101.0	101.2	103.3	97.9
大豆	92.7	98.5	96.5	96.8	94.9	98.8
ほうれんそう	93.7	104.8	106.7	98.4	105.1	101.1
キャベツ	118.9	112.5	113.5	113.7	116.8	107.2
ばれいしょ	108.4	103.9	101.2	99.1	96.5	93.6
オレンジ	107.7	100.9	102.2	108.8	105.3	105.8
ライム	106.7	102.2	103.4	105.8	101.1	108.5
りんご	106.9	110.6	106.3	110.0	110.3	104.5
ネクタリン	98.6	98.8	97.3	97.0	98.1	99.2
緑茶	96.7	96.1	94.1	91.6	101.0	96.9

添加濃度：0.1 mg/kg

(3) 精製法検討

① オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムによる精製 [InertSep C₁₈ (1 g/6 mL)]

カラムをアセトニトリル20 mLで予備洗浄した後、塩酸ホルメタネート0.01 mg/kg (アセトニトリル溶液) 0.5 mLを負荷し、アセトニトリルで溶出したときの溶出状況を表2に示した。塩酸ホルメタネートは、10 mLで溶出された。

表2 オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムからの溶出状況

ミニカラム	充てん量	アセトニトリル量(mL)						回収率 (%)
		0-5	5-10	10-15	15-20	20-25	25-30	合計
InertSep C ₁₈	1 g	98.8	tr	nd	nd	nd.	nd.	98.8

添加濃度：0.01mg/kg (n=1), tr：痕跡量(0.00001 mg/kg未満), nd：不検出

② グラファイトカーボンミニカラムによる精製 [InertSep GC (250 mg/3 mL 及び 500 mg/6 mL)]

カラムをアセトニトリル20 mLで予備洗浄した後、塩酸ホルメタネート0.01 mg/kg (アセトニトリル溶液) 0.5 mLを負荷し、アセトニトリルで溶出したときの溶出状況を表3に示した。塩酸ホルメタネートは、20 mLで溶出された。

表3 グラファイトカーボンミニカラムからの溶出状況

ミニカラム	充てん量	アセトニトリル量(mL)						回収率 (%)
		0-5	5-10	10-15	15-20	20-25	25-30	合計
InertSep GC	250 mg	96.7	1.7	0.2	tr	nd.	nd.	98.6
	500 mg	96.7	2.1	0.7	tr	nd	nd	99.5

添加濃度：0.01mg/kg (n=1), tr：痕跡量(0.00001 mg/kg未満), nd：不検出

③ 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/3 mL)]

カラムをアセトニトリル20 mLで予備洗浄した後、塩酸ホルメタネート0.01 mg/kg (アセトニトリル

溶液) 0.5 mLを負荷し、アセトニトリルで溶出したときの溶出状況を表4に示した。塩酸ホルメタネートは、10 mLで溶出された。

表4 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からの溶出状況

ミニカラム	充てん量	アセトニトリル量(mL)						回収率 (%)
		0-5	5-10	10-15	15-20	20-25	25-30	合計
InertSep PSA	500 mg	97.7	0.5	nd	nd	nd	nd	98.2

添加濃度：0.01mg/kg (n=1) , nd：不検出

④ カラムの組合せの検討

それぞれ単独での精製を行った場合、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム及びエチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムでは試料溶液の色素除去が不十分であり、また、グラファイトカーボンミニカラムにおいても、溶媒標準溶液とマトリックス添加標準溶液のピーク面積比に試料マトリックスによる影響がみられた。

そこで、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム及びグラファイトカーボンミニカラム、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム及びエチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラム、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及びグラファイトカーボンミニカラムの組合せについて検討した。

カラムをアセトニトリル20 mLで予備洗浄した後、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム及びグラファイトカーボンミニカラム、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及びグラファイトカーボンミニカラムの組合せでは、グラファイトカーボンミニカラムを下にしてカラムを接続した。オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム及びエチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムでは、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を下にしてカラムを接続した。塩酸ホルメタネート0.01 mg/kg (アセトニトリル溶液) 0.5 mLを負荷し、アセトニトリルで溶出したときの溶出状況を表5に示した。

表5 接続カラムからの溶出状況

ミニカラム	充てん量	アセトニトリル量(mL)					回収率 (%)
		0-5	5-10	10-15	15-20	20-25	合計
InertSep C ₁₈ +GC	1g /250 mg	93.2	2.8	1.8	1.1	nd	98.9
	1g /500 mg	86.5	10.3	2.0	tr	nd	99.8
InertSep C ₁₈ +PSA	1g /500 mg	96.4	1.2	nd	nd	nd	97.6
InertSep PSA+GC	500 mg/250 mg	96.5	1.3	tr	tr	nd	97.8
	500 mg/500 mg	95.2	1.7	tr	tr	nd	96.9

添加濃度：0.01 mg/kg (n=1) , tr：痕跡量(0.00001 mg/kg未満), nd：不検出

次に、玄米、大豆、ほうれんそう、キャベツ、ばれいしょ、オレンジ、ライム、りんご、ネクタリン及び緑茶を試料として、抽出した溶液を表5の組合せで精製し、減圧濃縮後、残留物の重量を測定した結果を表6に示した。オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム及びグラファイトカーボンミニカラム、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及びグラファイトカーボンミニ

カラムの組合せは20 mLで、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム及びエチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムの組合せは10 mLで溶出した。

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム及びエチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムの組み合わせでは、ほうれんそう及び緑茶において色素の除去が不十分であった。オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム及びグラファイトカーボンミニカラム、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及びグラファイトカーボンミニカラムの組合せでは、いずれも試料の色素は十分に除去することは可能であったが、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及びグラファイトカーボンミニカラム 500mgの残留物重量が0.1~2.5 mgと最も少なく、他の組合せよりも試料マトリックスの影響を受けにくいと考えられた。

そこで、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500 mg及びグラファイトカーボンミニカラム500mgの組合せを用い、アセトニトリル20mLで溶出する条件を採用した。

表6 試料溶液精製後の残留物重量(mg)

食品名	InertSep C18 1 g			InertSep PSA 500 mg	
	GC 250 mg	GC 500 mg	PSA 500mg	GC 250 mg	GC 500 mg
玄米	5.7	2.1	3.3	0.5	0.1
大豆	2.5	0.9	3.8	1.5	0.1
ほうれんそう	4.1	1.2	3.5	1.8	0.8
キャベツ	2.5	1.5	4.3	0.1	0.9
ばれいしょ	2.7	0.8	4.1	0.3	0.1
オレンジ	1.1	1.0	3.7	0.8	0.6
ライム	2.5	2.2	4.3	0.5	0.1
りんご	4.2	2.8	2.5	0.7	0.1
ネクタリン	1.8	1.2	1.5	0.9	0.2
緑茶	5.6	2.6	5.8	4.8	2.5

n=1

⑤試験溶液調製溶媒についての検討

塩酸ホルメタネートは、アセトニトリル中では安定しているが、クロマトグラムのピーク形状が悪かった。水の比率が高くなるほどピーク形状は良くなったが（クロマトグラムを図7に示す）、水が多すぎると溶媒を除去したあとの残留物が溶解しない傾向が認められたことから、アセトニトリルと水の混合比について検討をした。

精製後の溶解溶媒の違いによるマトリックスの影響を確認するため、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 500 mg 及びグラファイトカーボンミニカラム 500mg の組合せで精製した玄米、大豆、ほうれんそう、キャベツ、ばれいしょ、オレンジ、ライム、りんご、ネクタリン及び緑茶の試料精製溶液を0.5 mLを採り、窒素気流下で溶媒を除去した後、0.01 mg/kg 添加時における回収率 100%相当濃度のアセトニトリル、アセトニトリル及び水（1：1）混液、移動相の初期条件であるアセトニトリル及び水（1：19）混液及び水標準溶液0.5 mLを加えて溶解し、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、表7に示した。

アセトニトリルでは0.76~1.03と緑茶でイオン化抑制が見られた。アセトニトリル及び水（1：1）混液では0.93~1.18、アセトニトリル及び水（1：19）混液では0.87~1.23、水では0.94~1.04であった。塩酸ホルメタネートとともに食品成分も十分に溶解でき、顕著なマトリックスの測定への影響が見られなかったアセトニトリル及び水（1：1）混液を用いることとした。

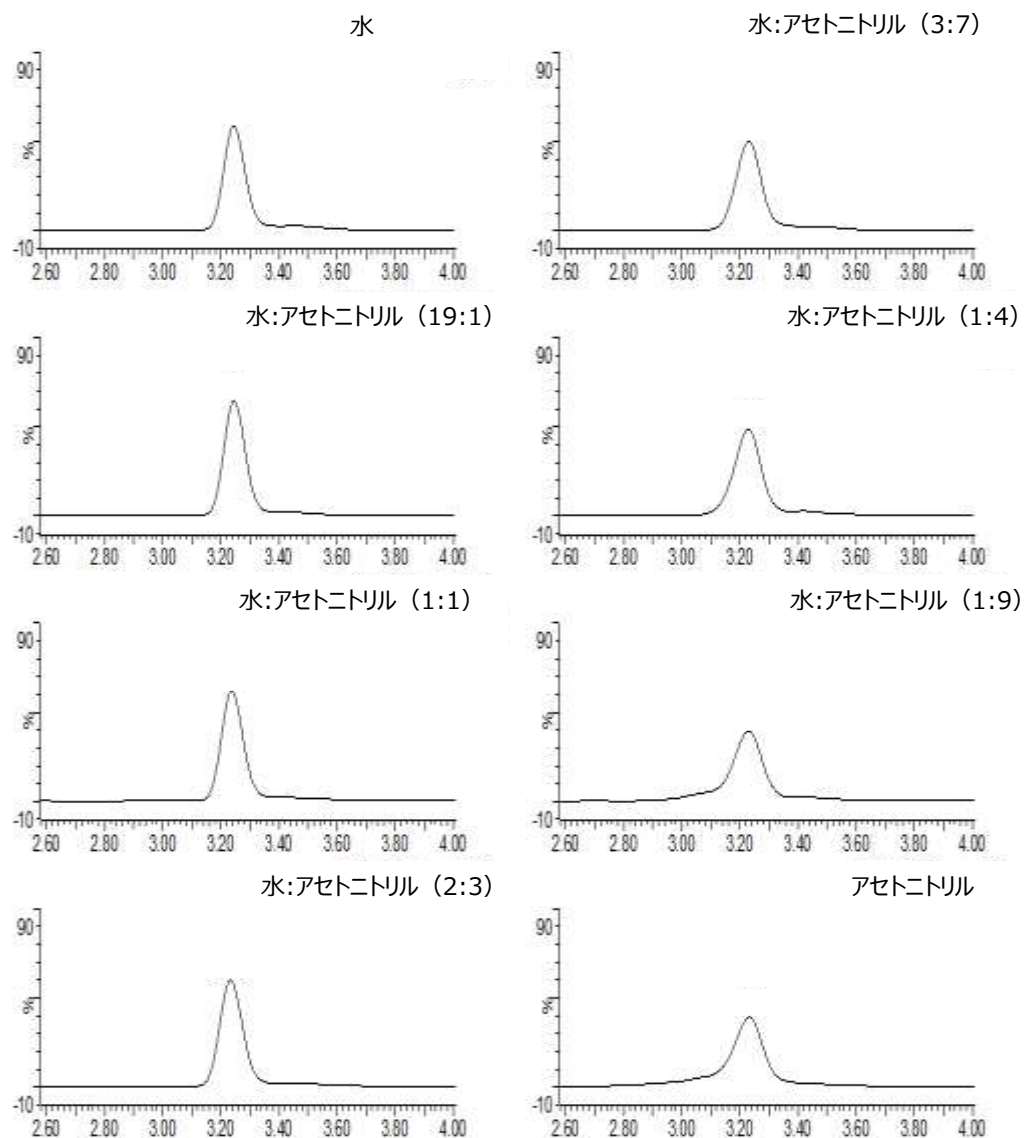


図7 標準溶液のピーク形状

表7 溶解溶液による試料マトリックスの影響

食品名	ピーク面積比 ^{*1}			
	アセトニトリル	水：アセトニトリル 1:1	水：アセトニトリル 19:1	水
玄米	0.91	0.93	1.02	1.00
大豆	0.82	1.18	1.23	0.95
ほうれんそう	0.90	1.01	1.00	0.94
キャベツ	1.01	1.12	0.91	1.01
ばれいしょ	1.03	0.98	0.99	0.99
オレンジ	0.99	0.99	1.01	1.04
ライム	1.02	1.00	0.93	1.04
りんご	0.98	1.00	0.96	0.99
ネクタリン	0.95	0.97	1.00	0.97
緑茶	0.76	0.97	0.87	0.97

*1 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の比

次にアセトニトリル及び水（1：1）混液での塩酸ホルメタネートの安定性を確認した。

アセトニトリル及び水（1：1）混液を用いて塩酸ホルメタネート 10 mg/L 標準溶液を作成し、4、8 及び 20℃で保管し、塩酸ホルメタネートの最大吸光波長を測定して経日変化を確認した。吸光度の経日変化を図 7 に示した。

20℃では 1 日以降吸光度が低下した。4 及び 8℃では 10 日以降も安定して検出されたことから、試験溶液調製後、測定は速やかに行い、また、測定時にはオートサンプラー内を 8℃に設定した。

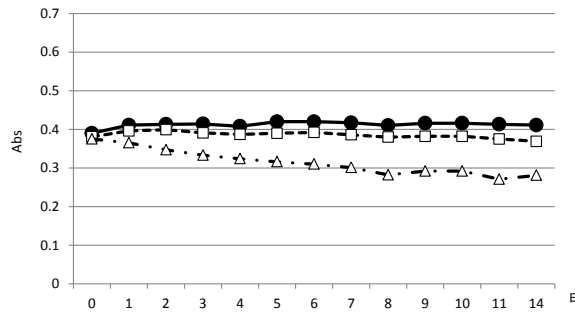


図 8 塩酸ホルメタネート標準溶液吸光度の経日変化

●:4℃, □:8℃, △:20℃

3. 添加回収試験

米、大豆、ほうれんそう、キャベツ、ばれいしょ、オレンジ、ライム、りんご、ネクタリン及び緑茶の10食品を試料に用いて、実験方法の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クロマトグラムを図 10～23 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トータルイオンクロマトグラムを図 24 に示した。

(1) 選択性

選択性の検討結果を表8に示した。検討したいずれの試料においても、塩酸ホルメタネートの定量を妨害するピークは認められず、選択性は良好であった。

表8 選択性の評価

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (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)				
	塩酸ホルメタネート	玄米	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	7	0	4	4628	4743	4685	0.001	○	
		大豆	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	36	16	26	5761	5793	5777	0.005	○	
		ほうれんそう	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	21	14	17	4619	4623	4621	0.004	○	
		キャベツ	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	8	10	9	5631	5329	5480	0.002	○	
		ばれいしょ	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	25	13	19	4448	4445	4447	0.004	○	
		オレンジ	0.01	2.	基準値	2.	< 0.100	面積	181	135	158	798365	800791	799578	0.000	○	
		ライム	0.01	0.03	基準値	0.03	< 0.100	面積	1	1	1	14274	14260	14267	0.000	○	
		りんご	0.01	0.5	基準値	0.5	< 0.100	面積	156	112	134	231747	231015	231381	0.001	○	
		ネクタリン	0.01	0.4	基準値	0.4	< 0.100	面積	1	1	1	94123	93539	93831	0.000	○	
		緑茶	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	46	35	41	4642	4835	4738	0.009	○	

*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。0.01~0.03 mg/kgでは真度92~103%、併行精度は2~5%（目標値：真度70~120%及び併行精度15>）、0.4~2 mg/kgでは真度98~99%、併行精度は1~3%（目標値：真度70~120%及び併行精度10>）といずれも目標値に適合する結果であった。

オレンジ、ライム、りんご及びネクタリンでは基準値及び定量限界濃度である0.01 mg/kgでの添加回収を行った。

0.01 mg/kg添加試料溶液でのS/N比の平均値は18~26であり、全ての食品でS/N≥10を満たした。

表9 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 (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	
塩酸ホルメタネート	玄米	大豆	0.01	0.01	0.01	S/N	7571	148	0.9989	91.2	97.8	97.7	100.1	93.2	96.0	3.8	23.5	24.3	23.9	
		ほうれんそう	0.01	0.01	0.01	S/N	8003	186	0.9998	101.0	104.6	105.5	103.8	100.3	103.0	2.2	21.0	17.5	19.2	
		キャベツ	0.01	0.01	0.01	S/N	8015	130	0.9999	100.9	95.8	96.0	101.2	96.2	98.4	2.6	18.9	17.8	18.3	
		ばれいしょ	0.01	0.01	0.01	S/N	8885	-356	1.0000	94.8	97.8	104.0	95.5	94.0	97.2	4.2	19.9	20.4	20.2	
		オレンジ	0.01	2	2	-	7735	277	0.9999	98.4	99.1	100.9	99.1	103.9	100.3	2.2	23.7	20.3	22.0	
		オレンジ	0.01	2	0.01	S/N	8786	29371	0.9998	99.2	96.8	100.2	99.6	99.0	99.0	1.3	-	-	-	
		ライム	0.01	0.03	0.03	-	8462	-216	0.9998	106.0	98.7	105.7	98.3	101.0	101.9	3.7	21.6	21.2	21.4	
		ライム	0.01	0.03	0.01	S/N	9146	468	0.9998	101.4	96.3	100.1	96.7	98.4	98.6	2.2	-	-	-	
		りんご	0.01	0.5	0.5	-	8462	-216	0.9982	101.3	96.7	102.8	100.1	100.7	100.3	2.2	21.2	20.1	20.6	
		りんご	0.01	0.5	0.01	S/N	8974	11021	0.9994	102.1	99.0	96.9	98.0	97.0	98.6	2.2	-	-	-	
ネクタリン	りんご	0.01	0.5	0.01	S/N	9939	525	0.9997	98.7	94.7	101.6	96.0	98.2	97.8	2.7	26.5	25.0	25.8		
	ネクタリン	0.01	0.4	0.4	-	9939	525	0.9997	98.7	94.7	101.6	96.0	98.2	97.8	2.7	-	-	-		
	ネクタリン	0.01	0.4	0.01	S/N	8547	-98	0.9996	101.4	102.6	97.9	99.0	97.8	99.7	2.2	23.7	19.4	21.5		
	緑茶	0.01	0.01	0.01	S/N	9034	-125	0.9996	97.5	88.1	90.4	97.7	87.8	92.3	5.4	20.0	32.6	26.3		

*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。面積比は0.90~1.18であり、いずれの試料においても、顕著なマトリックスの測定への影響は認められなかった。

添加回収試験における真度を表10で求めたピーク面積比で除して補正真度を求め、表12に示した。補正真度は87~104%であり、目標値（真度70~120%）に適合する結果であった。

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 (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				
塩酸ホルメタネート	玄米	大豆	0.01	0.01	0.01	0.0005	面積	6	4547	4353	4444	4743	4781	4762	0.93		
		ほうれんそう	0.01	0.01	0.01	0.0005	面積	14	5748	5761	5740	4952	4793	4873	1.18		
		キャベツ	0.01	0.01	0.01	0.0005	面積	14	4691	4619	4641	4466	4793	4629	1.00		
		ばれいしょ	0.01	0.01	0.01	0.0005	面積	13	5329	5368	5335	4728	4835	4781	1.12		
		オレンジ	0.01	2	2	0.1	面積	3	4591	4448	4517	4466	4793	4629	0.98		
		オレンジ	0.01	2	0.01	0.0005	面積	0	800160	806437	803298	812154	794754	803454	1.00		
		ライム	0.01	0.03	0.03	0.0015	面積	0	4782	4518	4650	4669	4650	4659	1.00		
		ライム	0.01	0.03	0.01	0.0005	面積	0	14580	14059	14320	14335	14000	14167	1.01		
		りんご	0.01	0.5	0.5	0.025	面積	16	4782	4518	4634	4650	4761	4705	0.98		
		りんご	0.01	0.5	0.01	0.0005	面積	0	223840	233875	228858	227517	231601	229559	1.00		
ネクタリン	りんご	0.01	0.5	0.01	0.0005	面積	13	4751	4620	4673	4761	4941	4851	0.96			
	ネクタリン	0.01	0.4	0.4	0.02	面積	0	184930	184351	184640	183799	184633	184216	1.00			
	ネクタリン	0.01	0.4	0.01	0.0005	面積	2	4725	4663	4692	4777	5034	4905	0.96			
	緑茶	0.01	0.01	0.01	0.0005	面積	39	4842	4835	4799	5318	5342	5330	0.90			

*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 11 補正真度

食品名	添加濃度 (mg/kg)	真度 (%)	ピーク面積比	補正真度 (%)
玄米	0.01	96	0.93	103
大豆	0.01	103	1.18	87
ほうれんそう	0.01	98	1.00	98
キャベツ	0.01	97	1.12	87
ばれいしょ	0.01	100	0.98	102
オレンジ	2	99	1.00	99
	0.01	102	1.00	102
ライム	0.03	99	1.01	98
	0.01	100	0.98	102
りんご	0.5	99	1.00	99
	0.01	98	0.96	102
ネクタリン	0.4	98	0.96	102
	0.01	100	0.96	104
緑茶	0.01	92	0.90	103

4. その他の試験法検討に関連する事項

採用しなかった検討事項について以下に示す。

(1) 抽出溶媒の検討

塩酸ホルメタネートのメタノールへの溶解度 (283 g/L (20°C))^{8,9)}が高いことから、塩酸ホルメタネートの回収を確認した。

玄米、大豆、ほうれんそう、キャベツ、ばれいしょ、オレンジ、ライム、りんご、ネクタリン及び緑茶を試料として、0.1 mg/kg になるようにアセトニトリル標準溶液を添加し、30分放置後、メタノール抽出、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム、グラファイトカーボンミニカラム及びエチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムで精製を行った後、試験溶液とした。回収結果を表 12 に示した。アセトニトリルを用いた回収結果よりも低い傾向であり、緑茶では 70%未満であった。アセトニトリルよりも試料由来の食品成分を同時に抽出するため、測定時に試料マトリックスの影響を受けやすいと推察した。

表 12 メタノールによる回収率

食品名	メタノール
玄米	102.9
大豆	81.8
ほうれんそう	87.0
キャベツ	112.6
ばれいしょ	89.8
オレンジ	89.7
ライム	86.2
りんご	97.5
ネクタリン	94.1
緑茶	63.7

添加濃度 : 0.1 mg/kg (n=1)

(2) 精製法の検討

アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム [InertSep NH₂ (500 mg/3 mL)] からの溶出状況を確認した。

カラムをアセトニトリル20 mLで予備洗浄した後、塩酸ホルメタネート0.01 mg/kg (アセトニトリル溶液) 0.5mLを負荷し、アセトニトリルで溶出したときの溶出状況を表14に示した。塩酸ホルメタネートの回収は、86.8%と不十分であった。

表14 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

ミニカラム	充てん量	アセトニトリル量(mL)						回収率 (%)
		0-5	5-10	10-15	15-20	20-25	25-30	合計
InertSep NH ₂	500 mg	86.4	0.3	0.1	nd	nd	nd	86.8

添加濃度：0.01mg/kg (n=1), nd：不検出

5. 考察

塩酸ホルメタネートは、水溶性が高くLCでの分析に適しているが、使用する有機溶媒により安定性に違いが見られたため、溶媒中での安定性の確認を行った。アセトニトリルを抽出及び精製に使用することにより、安定した回収率を得ることができた。

カラムによる精製では、一種類のカラムのみでは精製が不十分であったことから、試料溶液中の色素及び脂肪酸等を除去するため、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及びグラファイトカーボンミニカラムを接続して用いた。

検討した試験法を用いて、米、大豆、ほうれんそう、キャベツ、ばれいしょ、オレンジ、ライム、りんご、ネクタリン及び緑茶の10食品を試料に用いて、添加回収試験を実施した。その結果、選択性は良好でいずれの試料においても測定を妨害するようなピークは認められなかった。0.01～0.03 mg/kgでは真度92～103%、併行精度は2～5%、0.4～2 mg/kgでは真度98～99%、併行精度は1～3%の良好な結果が得られたことから、本試験法は、農産物に適用可能であると判断された。

[結論]

農産物中の塩酸ホルメタネート試験法として、塩酸ホルメタネートを試料からアセトニトリルで抽出し、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及びグラファイトカーボン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。開発した試験法を玄米、大豆、ほうれんそう、キャベツ、ばれいしょ、オレンジ、ライム、りんご、ネクタリン及び緑茶の10食品に適用した結果、0.01～0.03 mg/kgでは真度92～103%、併行精度は2～5%、0.4～2 mg/kgでは真度98～99%、併行精度は1～3%の良好な結果が得られた。また、定量限界として、0.01 mg/kgを設定可能であることが確認された。

[参考文献]

- 1) 農薬評価書 塩酸ホルメタネート, 2010年1月食品安全委員会農薬専門調査会.
- 2) J.F.Lawrence et al, Determination of the insecticide / acaricide formetanate in fresh fruit by reversed - phase liquid chromatography, J. Agric. Food Chem.,29, 722-724(1981).
- 3) R. A. Niemann, Determination of formetanate hydrochloride in selected fruits by coupled - column cation exchange liquid chromatography, A.O.A.C., 1362-1368(1993).
- 4) R. Hu, et al, Determination of formetanate hydrochloride in strawberries, J. Agric. Food Chem., 44, 181-184(1996).
- 5) J. Wang et al, . Determination of pesticides in apple based infant foods using liquid chromatography with electro spray ionization tandem mass spectrometry, J. Agric. Food Chem., 53, 528-537(2005).

- 6) J. Wang and W. Cheung, Determination of pesticides in soy based infant formula using liquid chromatography with the electrospray ionization tandem mass spectrometry, A. O.A. C., 214-224(2006)
- 7) L. V. Podhorniak, et al, Determination of formetanate hydrochloride in fruit samples using liquid chromatography – mass selective detection or – tandem mass spectrometry, J. Agric. Food Chem., 58, 5862-5867(2010).
- 8) The Pesticide Manual (16th edition) (British Crop Protection Council): 440 Formetanete 568-570, 2012.
- 9) T. Roberts and D. Hutson(ED in Chief), Metabolic Pathway of Agrochemicals, PART 2, Insecticides and Fungicides, The Royal Society of Chemistry, UK, 1999, p43-48(ISBN0-85404-499X).

*厚生労働省, 農作物対象の GC/MS 一斉分析法及び LC-MS 一斉分析法、並びに畜水産物対象の GC/MS 一斉分析法の検討結果 (平成 15・16 年度),
<http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/syoku-anzen/positivelist/dl/040806-112.pdf>

[クロマトグラム報告例]

① 添加回収試験における代表的なクロマトグラム

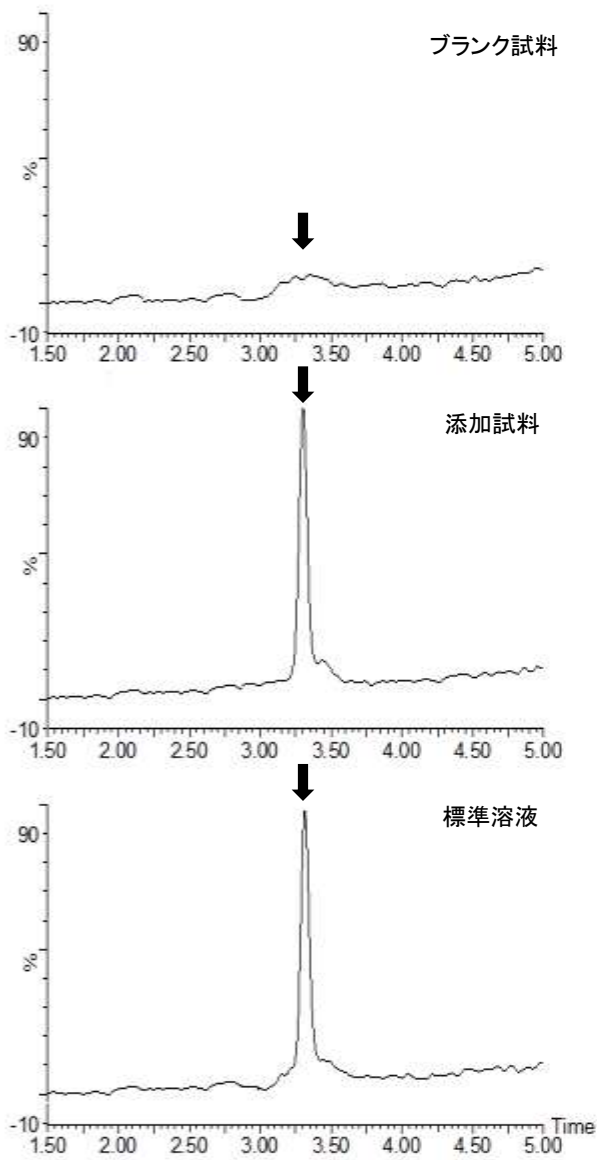


図 10 玄米の SRM クロマトグラム
(m/z +222→165)
添加濃度 : 0.01 mg/kg

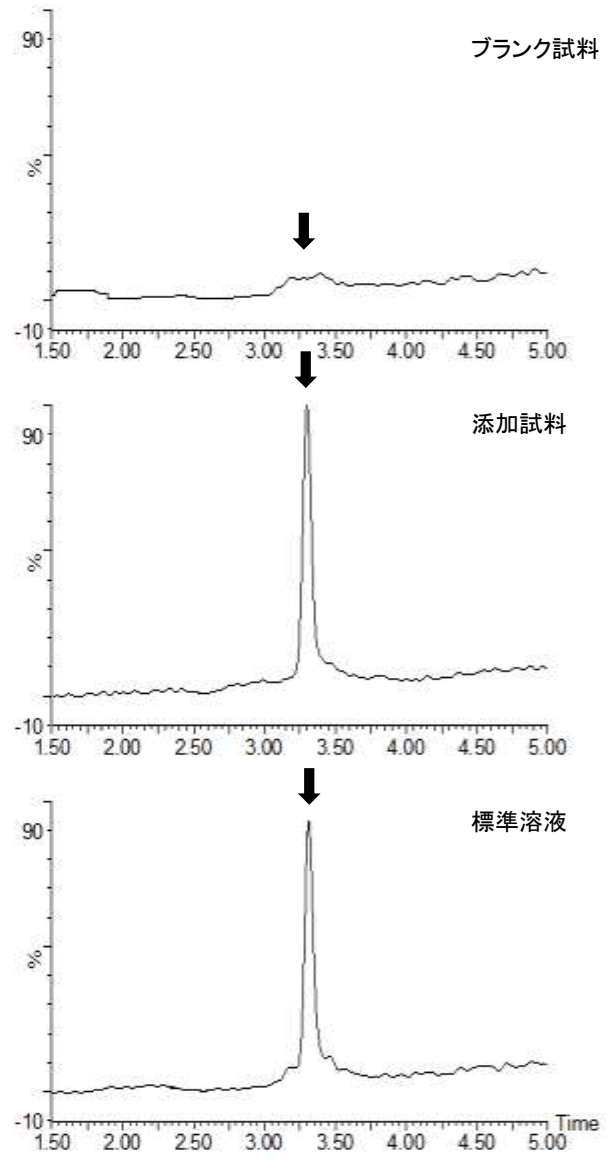


図 11 大豆の SRM クロマトグラム
(m/z +222→165)
添加濃度 : 0.01 mg/kg

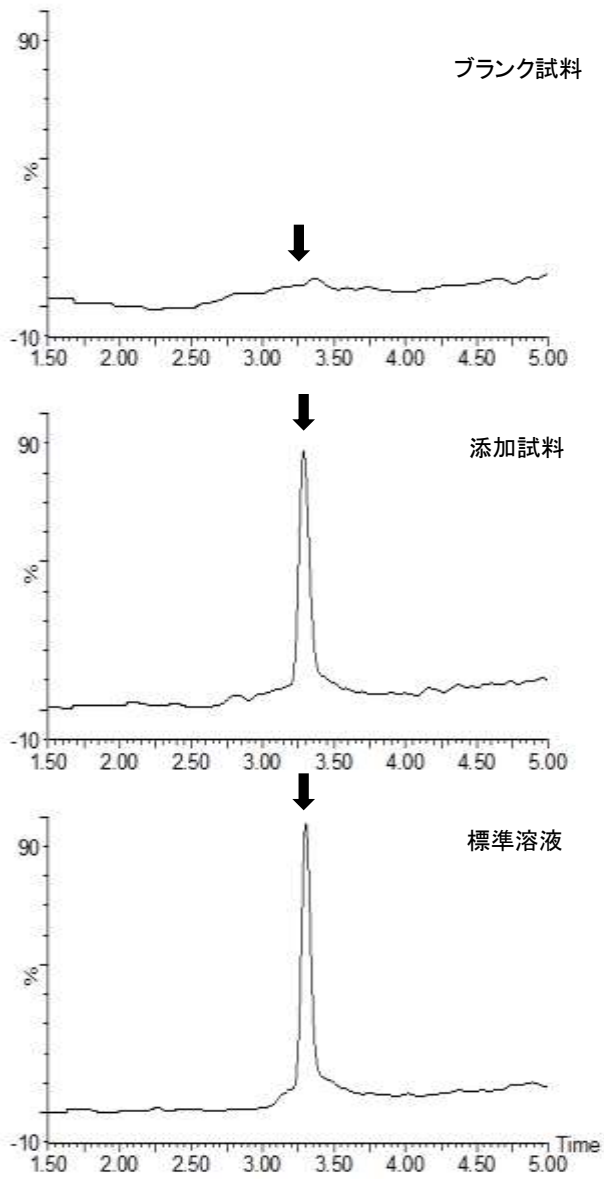


図 12 ほうれんそうの SRM クロマトグラム
 ($m/z + 222 \rightarrow 165$)
 添加濃度 : 0.01 mg/kg

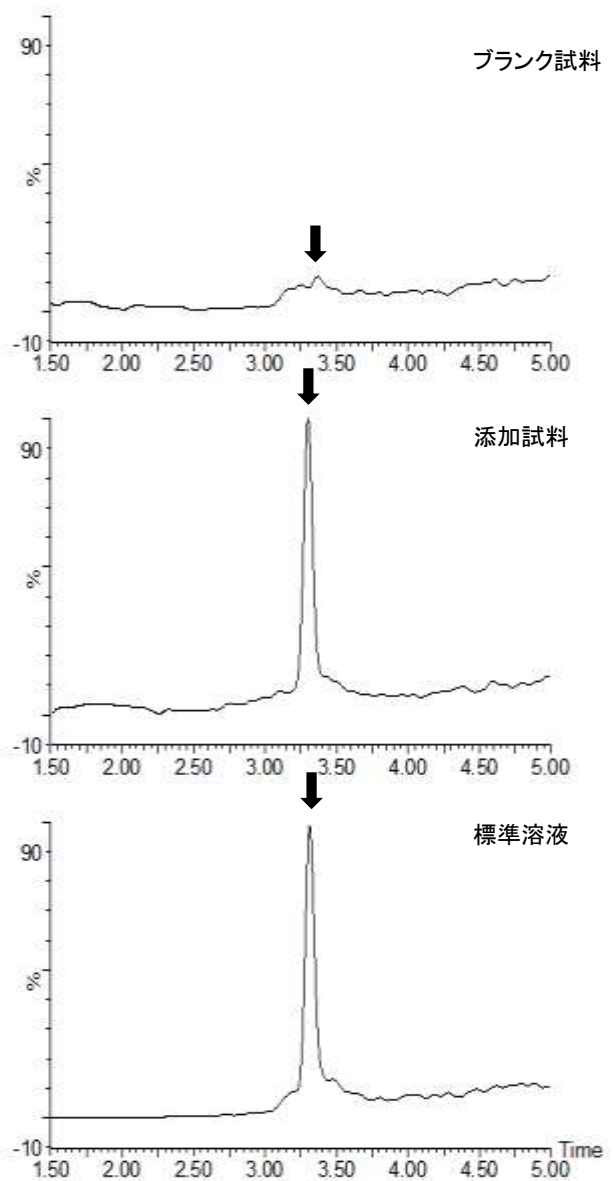


図 13 キャベツの SRM クロマトグラム
 ($m/z + 222 \rightarrow 165$)
 添加濃度 : 0.01 mg/kg

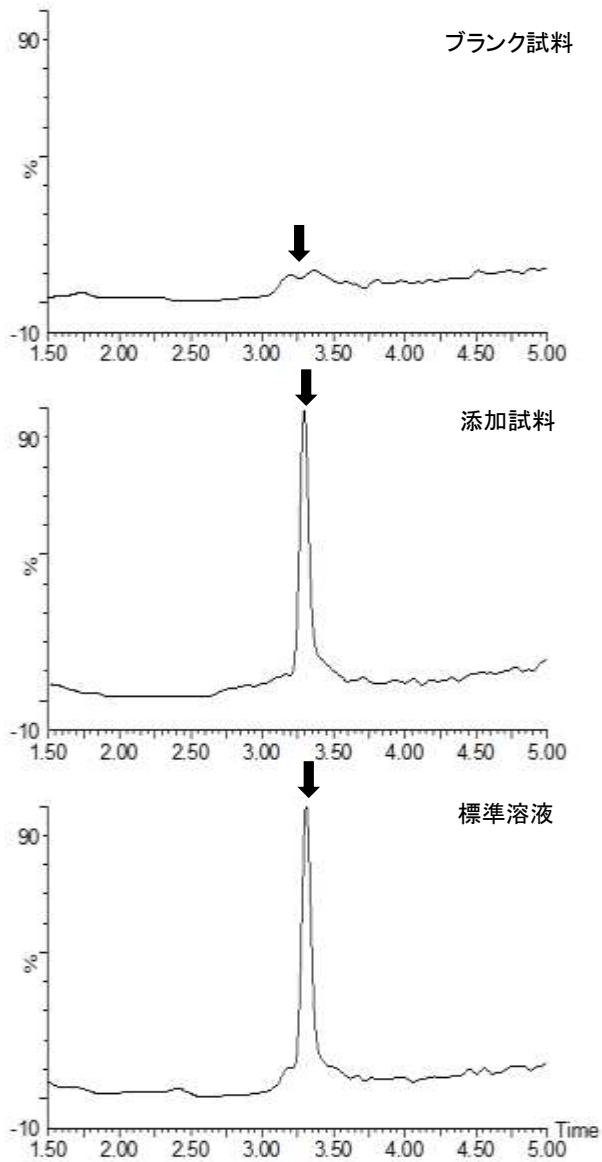


図 14 ばれいしょの SRM クロマトグラム
 (m/z +222→165)
 添加濃度 : 0.01 mg/kg

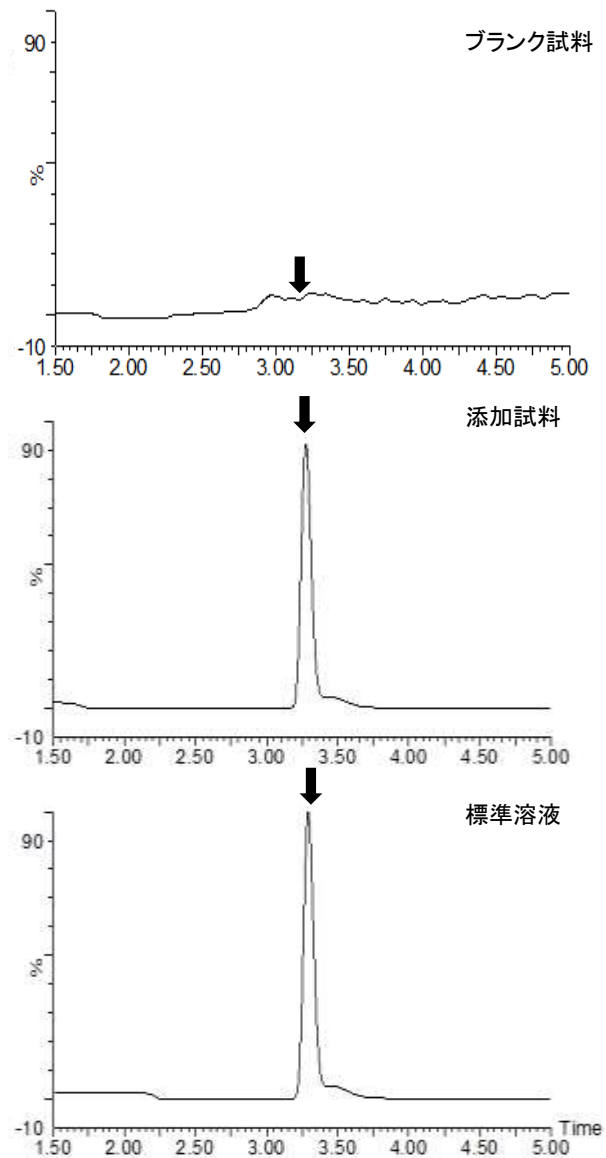


図 15 オレンジの SRM クロマトグラム
 (m/z +222→165)
 添加濃度 : 2 mg/kg

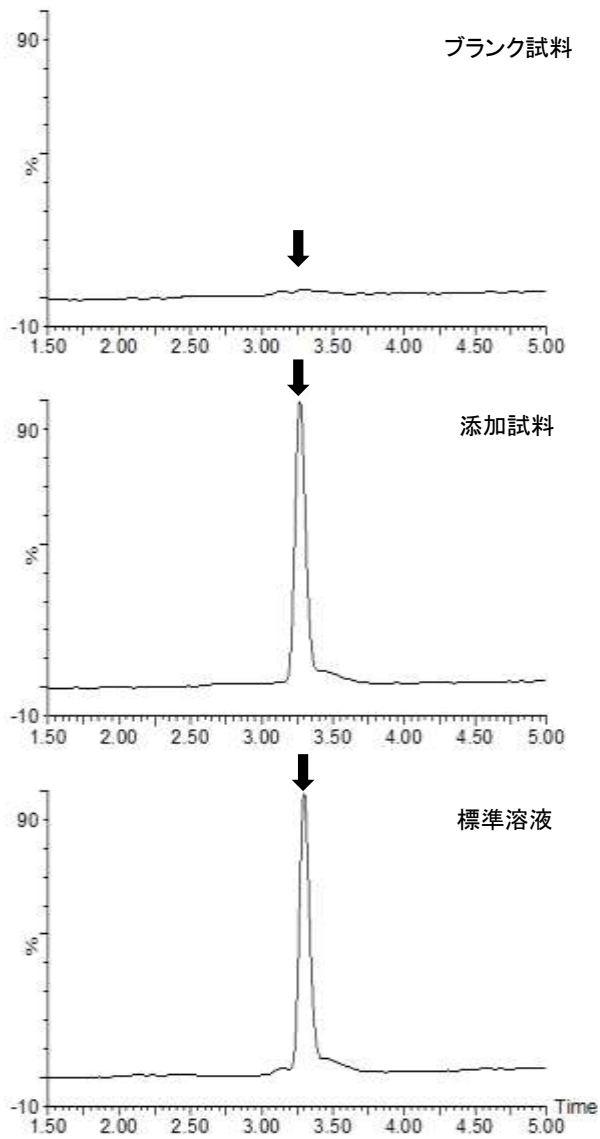


図 16 ライムの SRM クロマトグラム
 (m/z +222→165)
 添加濃度 : 0.03 mg/kg

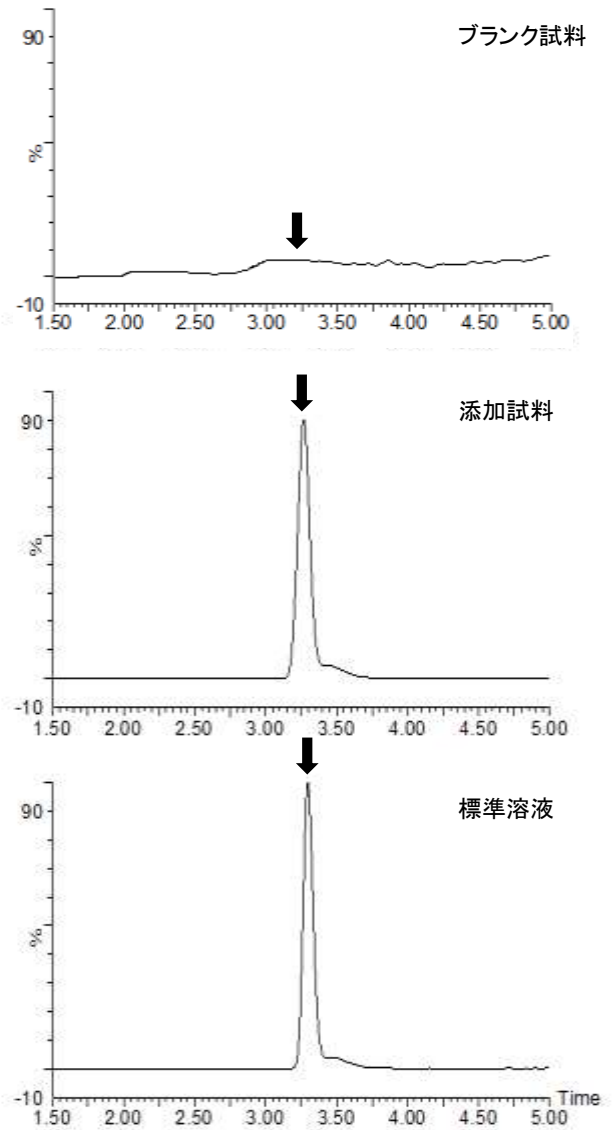


図 17 りんごの SRM クロマトグラム
 (m/z +222→165)
 添加濃度 : 0.5 mg/kg

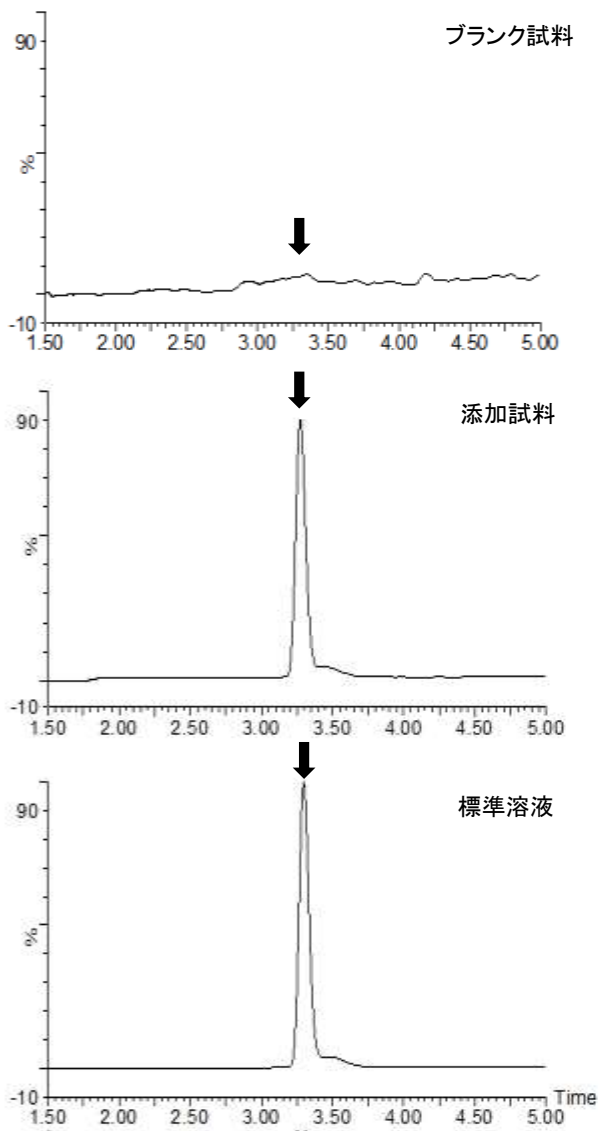


図 18 ネクタリンの SRM クロマトグラム
 ($m/z + 222 \rightarrow 165$)
 添加濃度 : 0.2 mg/kg

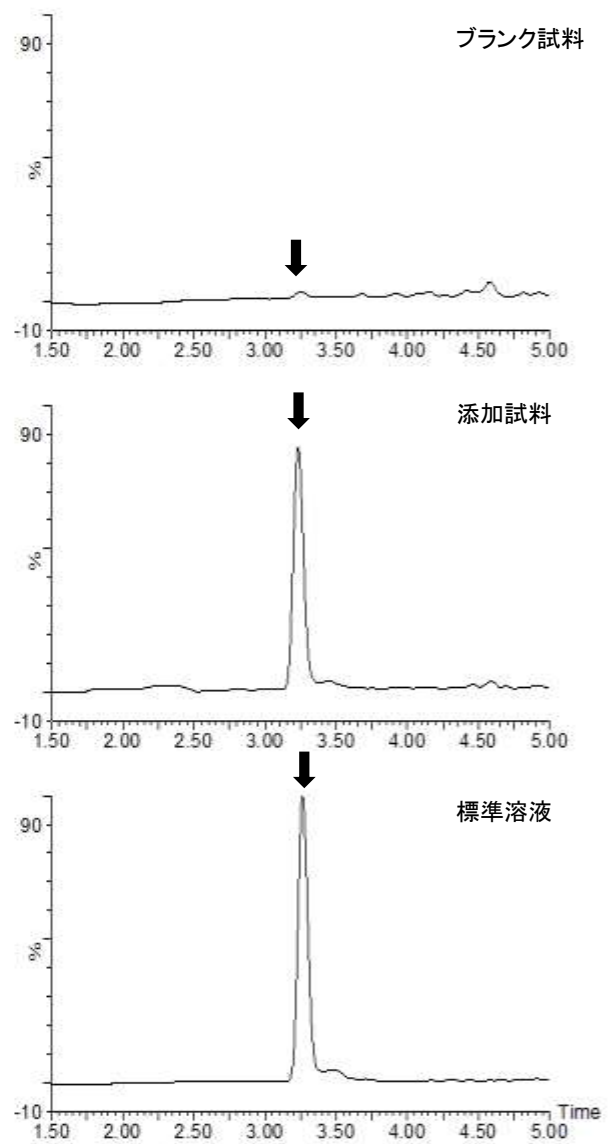


図 19 緑茶の SRM クロマトグラム
 ($m/z + 222 \rightarrow 165$)
 添加濃度 : 0.01 mg/kg

②定量限界における代表的なクロマトグラム（定量限界濃度）

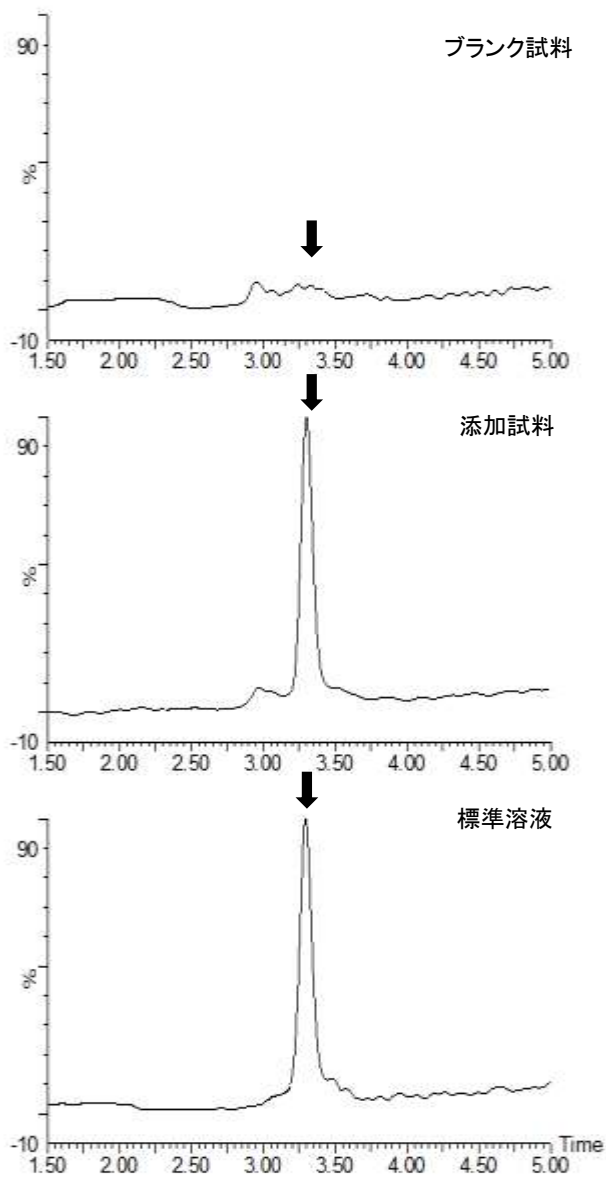


図 20 オレンジ SRM クロマトグラム
($m/z + 222 \rightarrow 165$)
試料中0.01mg/kg相当

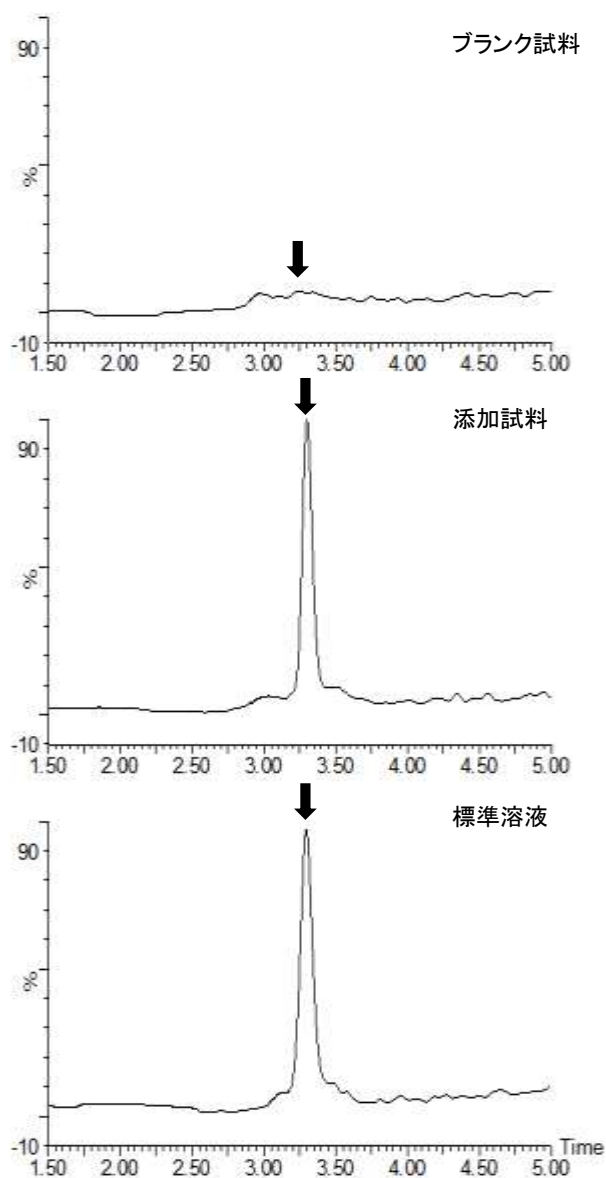


図 21 ライム SRM クロマトグラム
($m/z + 222 \rightarrow 165$)
試料中0.01 mg/kg相当

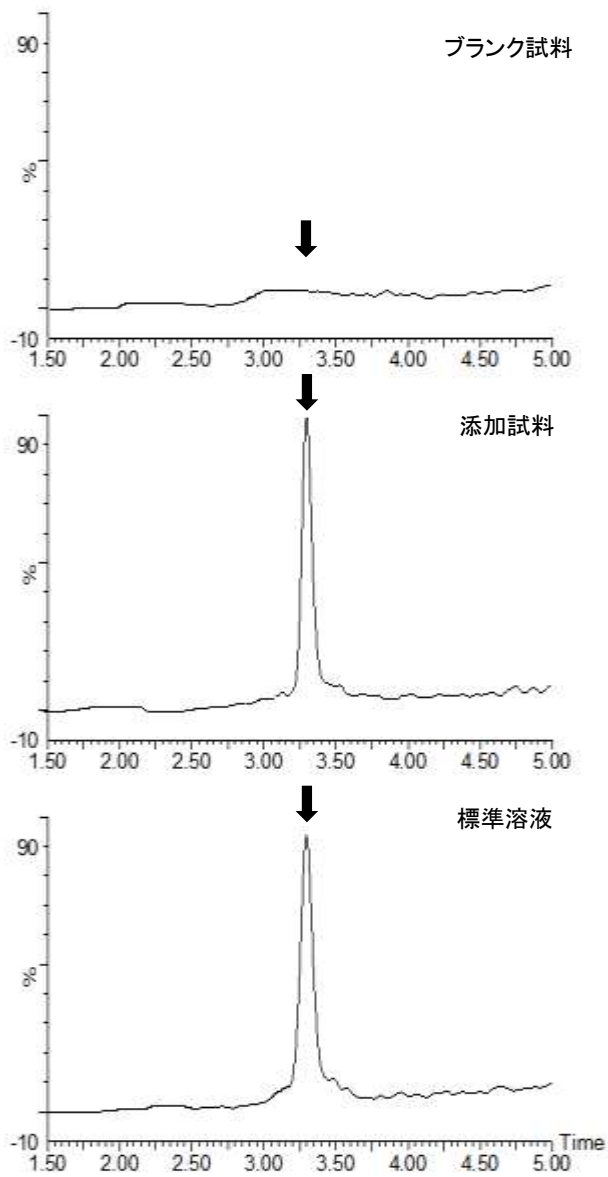


図 22 りんご SRM クロマトグラム
 ($m/z + 222 \rightarrow 165$)
 試料中0.01mg/kg相当

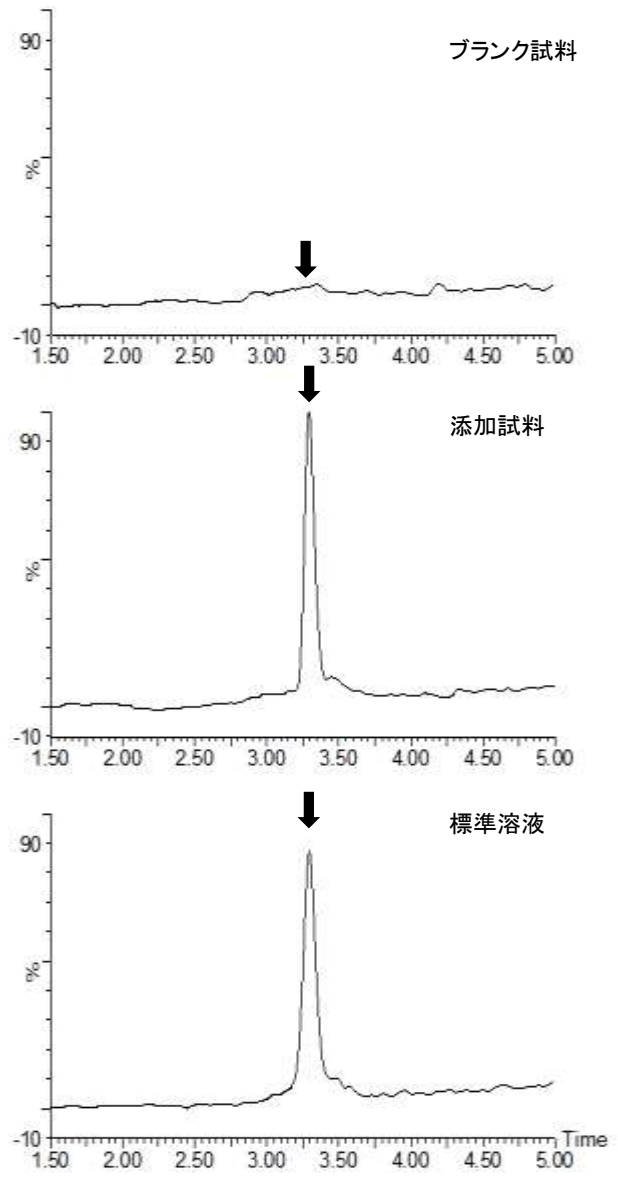


図 23 ネクタリン SRM クロマトグラム
 ($m/z + 222 \rightarrow 165$)
 試料中0.01 mg/kg相当

③ 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

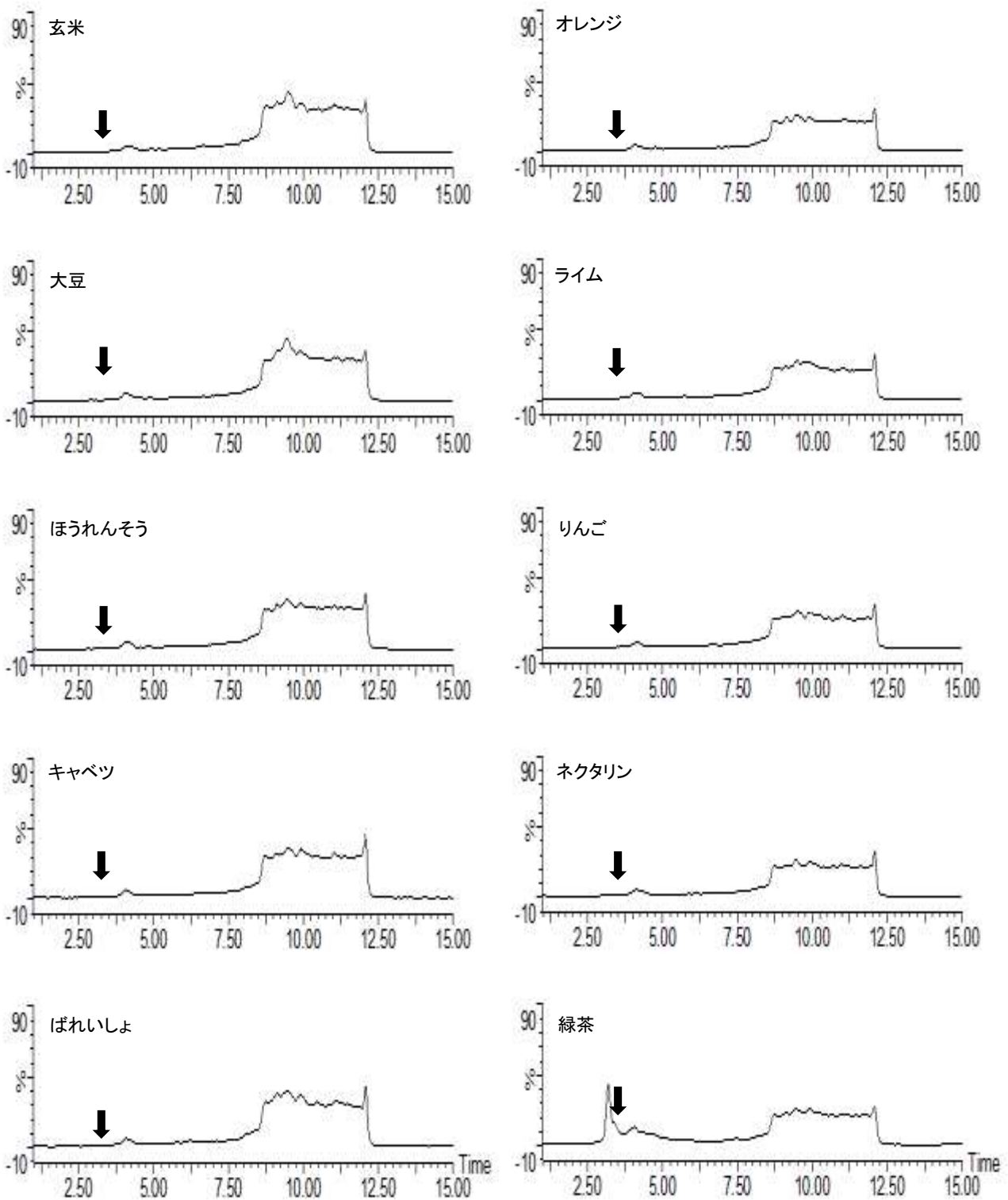


図 24 ブランク試料のトータルイオンクロマトグラム

(スキャン範囲：50～1000 m/z)