

## アミトラズ試験法（農産物）

### 1. 分析対象化合物

アミトラズ

*N*-2,4-ジメチルフェニル-*N'*-メチルホルムアミジン（以下、代謝物という）

### 2. 装置

アルカリ熱イオン化検出器付きガスクロマトグラフ（GC-FTD）又は高感度窒素・リン検出器付きガスクロマトグラフ（GC-NPD）

ガスクロマトグラフ・質量分析計（GC/MS）

### 3. 試薬、試液

次に示すもの以外は、総則の3に示すものを用いる。

アミトラズ標準品 本品はアミトラズ99%以上を含み、融点は87～88℃である。代謝物標準品 本品は*N*-2,4-ジメチルフェニル-*N'*-メチルホルムアミジン98%以上を含み、融点は53～75℃である。総則の3に示すものを用いる。

### 4. 試験溶液の調製

#### 1) アミトラズの試験溶液

##### (1) 抽出

##### i. 穀類、豆類及び種実類の場合

試料10.0 gを量り採り、水20 mLを加え、2時間放置する。

これに1 mol/L水酸化ナトリウム溶液20 mLを加え、pH 11以上であることを確認し、さらに、アセトン100 mLを加え、ホモジナイズした後、吸引ろ過する。ろ紙上の残留物にアセトン50 mLを加えてホモジナイズし、上記と同様にろ過する。得られたろ液を合わせ、35℃以下で約40 mLに濃縮する。

これに10%塩化ナトリウム溶液100 mLを加え、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（1：4）混液100 mL及び50 mLで2回振とう抽出する。抽出液を合わせ、0.2 mol/L酢酸溶液100 mL及び50 mLで2回振とう抽出する。この抽出液（a）を代謝物の抽出液とする。

一方、残った酢酸エチル及び*n*-ヘキサン混液の層を、10%塩化ナトリウム溶液20 mLに1 mol/L水酸化ナトリウム溶液1 mLを加えた溶液で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムを加えて脱水し、無水硫酸ナトリウムをろ別した後、ろ液を40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。

この残留物を*n*-ヘキサン30 mLに溶解し、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル30 mLず

つで3回振とう抽出する。抽出液を40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物にアセトン及び*n*-ヘキサン（1：49）混液2 mLを加えて溶かす。

ii. 果実、野菜、ハーブ、茶及びホップの場合

果実、野菜及びハーブの場合は、検体約1 kgを精密に量り、1 mol/L水酸化ナトリウム溶液1,200 mLを加え、細切均一化し、pH 11以上であることを確認した後、検体20.0 gに相当する量を量り採る。

茶及びホップの場合は、試料5.00 gを量り採り、水20 mLを加え、2時間放置する。

これに、1 mol/L水酸化ナトリウム溶液20 mLを加え、pH 11以上であることを確認する。これにアセトン100 mLを加え、ホモジナイズした後、吸引ろ過する。ろ紙上の残留物にアセトン50 mLを加えてホモジナイズし、上記と同様にろ過する。得られたろ液を合わせ、35°C以下で約40 mLに濃縮する。

これに10%塩化ナトリウム溶液100 mLを加え、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（1：4）混液100 mL及び50 mLで2回振とう抽出する。抽出液を合わせ、0.2 mol/L酢酸溶液100 mL及び50 mLで2回振とう抽出する。この抽出液（a）を代謝物の抽出液とする。

一方、残った酢酸エチル及び*n*-ヘキサン混液の層を、10%塩化ナトリウム溶液20 mLに1 mol/L水酸化ナトリウム溶液1 mLを加えた溶液で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムを加えて脱水し、無水硫酸ナトリウムをろ別した後、ろ液を40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物にアセトン及び*n*-ヘキサン（1：49）混液2 mLを加えて溶かす。

(2) 精製

クロマトグラフ管（内径15 mm）に、カラムクロマトグラフィー用合成ケイ酸マグネシウム5 gをアセトン及び*n*-ヘキサン（1：49）混液に懸濁させて充てんし、無水硫酸ナトリウム約5 gを積層する。このカラムに(1)で得られた溶液を注入した後、アセトン及び*n*-ヘキサン（1：49）混液40 mLを注入する。溶出液を40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物をアセトンに溶解し、正確に2 mLとしたものをアミトラズの試験溶液とする。

2) 代謝物の試験溶液

1)で得られた代謝物を含む抽出液（a）に5 mol/L水酸化ナトリウム溶液20 mLを加え、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（1：4）混液100 mL及び50 mLで2回振とう抽出する。抽出液を合わせ、無水硫酸ナトリウムを加えて脱水し、無水硫酸ナトリウムをろ別した後、ろ液を40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物をアセトンに溶解し、正確に1 mLとしたものを代謝物の試験溶液とする。

## 5. 検量線の作成

アミトラズ標準品0.05～1.0 mg/L及び代謝物標準品0.1～2.0 mg/Lを含むアセトン溶液を数点調製し、それぞれ2 µLをGCに注入し、ピーク高法又はピーク面積法で検量線を作成する。

## 6. 定量

試験溶液2 µLをGCに注入し、5の検量線でアミトラズ及び代謝物の含量を求め、次式により、代謝物を含むアミトラズの含量を求める。

$$\text{アミトラズ (代謝物を含む) の含量} = \text{アミトラズの含量} + \text{代謝物の含量} \times 1.81$$

## 7. 確認試験

GC/MSにより確認する。

## 8. 測定条件

### 1) GC

検出器：FTD又はNPD

カラム：50%フェニルーメチルシリコン 内径0.53 mm、長さ30 m、膜厚1.0 µm

カラム温度：100°C (1分) -10°C/分-280°C (15分)

注入口温度：240°C

検出器温度：280°C

キャリアーガス：ヘリウム

保持時間の目安：アミトラズ17分、代謝物8分

### 2) GC/MS

カラム：5%フェニル-メチルシリコン 内径0.25 mm、長さ30 m、膜厚0.25 µm

カラム温度：100°C (1分) -10°C/分-280°C (15分)

注入口温度：240°C

キャリアーガス：ヘリウム

イオン化モード (電圧)：EI (70 eV)

主なイオン ( $m/z$ )：アミトラズ 293、162、132、121

代謝物 162、132、106、120

注入量：1 µL

## 9. 定量限界

各化合物 0.01 mg/kg (穀類、豆類及び種実類：0.02 mg/kg、茶及びホップ：0.04 mg/kg)

## 10. 留意事項

### 1) 試験法の概要

アミトラズ及び代謝物を塩基性下で試料からアセトンで抽出し、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（1：4）混液に転溶する。転溶した溶液から酢酸溶液で代謝物を抽出する。残った溶液を水酸化ナトリウム溶液で洗浄した後、果実、野菜、ハーブ、茶及びホップはそのまま、穀類、豆類及び種実類はアセトニトリル/ヘキサン分配で脱脂した後、合成ケイ酸マグネシウムカラムで精製してアミトラズの試験溶液とする。一方、代謝物を含む酢酸抽出液を塩基性にした後、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（1：4）混液で抽出したものを代謝物の試験溶液とする。両試験溶液をGC-FTD又はGC-NPDで測定し、GC/MSで確認する方法である。

### 2) 注意点

- (1) 代謝物の抽出率を向上させるために、試料に水酸化ナトリウム溶液を加え、pH 11以上であることを確認する。pH 11より低い場合は、水酸化ナトリウム溶液を追加する。
- (2) 代謝物の分解を抑えるため、アセトン抽出液の濃縮は低温で短時間に終了させる。
- (3) 抽出液から酢酸溶液で代謝物を抽出するときは、エマルジョンの生成を防ぐために、緩やかに短時間振とうする。
- (4) 酢酸溶液で代謝物を抽出した後の酢酸エチル及び*n*-ヘキサン層は、アミトラズの分解を抑えるため、速やかに水酸化ナトリウムを含む塩化ナトリウム溶液で洗浄する。

## 11. 参考文献

なし

## 12. 類型

C