

## ニテンピラム試験法

### 1. 分析対象化合物

ニテンピラム、CPMA [2-[N-(6-クロロ-3-ピリジルメチル)-N-エチル]アミノ-2-メチルイミノ酢酸]、CPMF [N-(6-クロロ-3-ピリジルメチル)-N-エチル-N'-メチルホルムアミジン]

### 2. 装置

紫外分光光度型検出器付き高速液体クロマトグラフ、アルカリ熱イオン化検出器又は高感度窒素・リン検出器付きガスクロマトグラフ及びガスクロマトグラフ・質量分析計を用いる。

### 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。

スチレンジビニルベンゼン共重合体吸着剤 スチレンジビニルベンゼン共重合体（無極性、粒径250～600 μm、平均孔径30 nm）をアセトンを用いて十分洗い、アセトン中に保存する。

### 4. 標準品

ニテンピラム 本品はニテンピラム99%以上を含む。

融点 本品の融点は83℃である。

N-(6-クロロ-3-ピリジルメチル)-N-エチルホルムアミド（以下「CPF」という。）本品はCPF97%以上を含む。

### 5. 試験溶液の調製

#### a ニテンピラム試験溶液

##### (1) 抽出法

##### イ 穀類の場合

検体を420 μmの標準網ふるいを通して粉砕した後、その10.0 gを量り採り、水20 mLを加え、2時間放置する。

これにアセトン100 mLを加え、3分間細砕した後、ケイソウ土を1 cmの厚さに敷いたろ紙を用いてすり合わせ減圧濃縮器中に吸引ろ過する。ろ紙上の残留物を採り、アセトン50 mLを加え、3分間細砕した後、上記と同様に操作して、ろ液をその減圧濃縮器中に合わせ、40℃以下で約20 mLに濃縮する。

これをあらかじめ10%塩化ナトリウム溶液100 mLを入れた300 mLの分液漏斗に移す。ジクロロメタン100 mLを用いて上記の減圧濃縮器のナス型フラスコを洗い、洗液を上記の分液漏斗に合わせる。振とう機を用いて5分間激しく振り混ぜた後、静置し、ジクロロ

メタン層を300 mLの三角フラスコに移す。水層にジクロロメタン50 mLを加え、上記と同様に操作して、ジクロロメタン層を上記の三角フラスコに合わせる操作を2回繰り返す。これに適量の無水硫酸ナトリウムを加え、時々振り混ぜながら15分間放置する。

#### ロ 果実及び野菜の場合

検体約1 kgを細切均一化した後、その20.0 gを量り採る。

これにアセトン100 mLを加え、3分間細砕した後、ケイソウ土を1 cmの厚さに敷いたろ紙を用いてすり合わせ減圧濃縮器中に吸引ろ過する。ろ紙上の残留物を採り、アセトン50 mLを加え、3分間細砕した後、上記と同様に操作して、ろ液をその減圧濃縮器中に合わせ、40℃以下で約20 mLに濃縮する。

多孔性ケイソウ土カラム（20 mL保持用）に上記の減圧濃縮器中の溶液を注入し、15分間放置した後、*n*-ヘキサン50 mLを注入し、流出液は捨てる。エーテル及び*n*-ヘキサンの混液（1：1）50 mLを注入し、流出液は捨てる。次いでジクロロメタン50 mLを注入し、流出液を100 mLの三角フラスコ中に採る。

#### ハ 抹茶の場合

検体5.00 gを量り採り、0.05 mol/L塩酸100 mLを加え、2時間放置した後、振とう機を用いて30分間激しく振り混ぜる。これにケイソウ土10 gを加えて振り混ぜた後、ケイソウ土を1 cmの厚さに敷いたろ紙を用いて300 mLの三角フラスコ中に吸引ろ過する。0.05 mol/L塩酸50 mLを用いてろ紙上の残留物を洗い、洗液を上記の三角フラスコ中に合わせ、0.05 mol/L塩酸を加えて200 mLとする。

内径15 mm、長さ300 mmのクロマトグラフ管に、スチレンジビニルベンゼン共重合体吸着剤20 mLをアセトンに懸濁したものを入れ、カラムの上端に少量のアセトンが残る程度までアセトンを流出させる。このカラムにアセトン50 mLを注入し、流出液は捨てる。水200 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで上記の溶液を注入し、毎分約5 mLの流速で流出させ、流出液は捨てる。0.05 mol/L塩酸50 mLを注入し、流出液は捨てる。水50 mLを注入し、毎分約5 mLの流速で流出させ、流出液は捨てる。次いでアセトン100 mLを注入し、毎分約5 mLの流速で流出させ、流出液を100 mLの三角フラスコ中に採る。

ベンゼンスルホニルプロピルシリル化シリカゲルミニカラム（500 mg）の上部に脱脂綿を挿入した後、アセトン5 mLを注入し、流出液は捨てる。このカラムに上記の溶液を注入し、毎分約3 mLの流速で流出させ、流出液は捨てる。水20 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで0.5 mol/Lアンモニア水10 mLを注入し、流出液を50 mLの三角フラスコ中に採り、酢酸0.3 mLを加える。

多孔性ケイソウ土カラム（20 mL保持用）に上記の溶液を注入し、15分間放置した後、*n*-ヘキサン50 mLを注入し、流出液は捨てる。エーテル及び*n*-ヘキサンの混液（1：1）50 mLを注入し、流出液は捨てる。次いでジクロロメタン50 mLを注入し、流出液を100 mLの三角フラスコ中に採る。

#### ニ 抹茶以外の茶の場合

検体9.00 gを100℃の水540 mLに浸し、室温で5分間放置した後、ろ過し、冷後ろ液360 mLを500 mLの三角フラスコに移し、2 mol/L塩酸8 mLを加える。

内径15 mm、長さ300 mmのクロマトグラフ管に、スチレンジビニルベンゼン共重合体吸着剤20 mLをアセトンに懸濁したものを入れ、カラムの上端に少量のアセトンが残る程度までアセトンを流出させる。このカラムにアセトン50 mLを注入し、流出液は捨てる。水200 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで上記の溶液を注入し、毎分約5 mLの流速で流出させ、流出液は捨てる。0.05 mol/L塩酸50 mLを注入し、流出液は捨てる。水50 mLを注入し、毎分約5 mLの流速で流出させ、流出液は捨てる。次いでアセトン100 mLを注入し、毎分約5 mLの流速で流出させ、流出液を100 mLの三角フラスコ中に採る。

ベンゼンスルホニルプロピルシリル化シリカゲルミニカラム (500 mg) の上部に脱脂綿を挿入した後、アセトン5 mLを注入し、流出液は捨てる。このカラムに上記の溶液を注入し、毎分約3 mLの流速で流出させ、流出液は捨てる。水20 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで0.5 mol/Lアンモニア水10 mLを注入し、流出液を50 mLの三角フラスコ中に採り、酢酸0.3 mLを加える。

多孔性ケイソウ土カラム (20 mL保持用) に上記の溶液を注入し、15分間放置した後、*n*-ヘキサン50 mLを注入し、流出液は捨てる。エーテル及び*n*-ヘキサンの混液 (1 : 1) 50 mLを注入し、流出液は捨てる。次いでジクロロメタン50 mLを注入し、流出液を100 mLの三角フラスコ中に採る。

## (2) 精製法

内径15 mm、長さ300 mmのクロマトグラフ管に、カラムクロマトグラフィー用シリカゲル (粒径63~200 μm) 10 gをジクロロメタンに懸濁したものを、次いでその上に無水硫酸ナトリウム約5 gを入れ、カラムの上端に少量のジクロロメタンが残る程度までジクロロメタンを流出させる。このカラムに(1) 抽出法で得られた溶液を注入した後、アセトン及びジクロロメタンの混液 (1 : 1) 50 mLを注入し、流出液は捨てる。次いでアセトン50 mLを注入し、流出液をすり合わせ減圧濃縮器中に採り、40℃以下でアセトンを除去する。この残留物にメタノール及び0.05 mol/Lリン酸二水素カリウム溶液の混液 (3 : 17) を加えて溶かし、正確に5 mLとして、これを試験溶液とする。

b 2- [N-(6-クロロ-3-ピリジルメチル)-*N*-エチル] アミノ-2-メチルイミノ酢酸 (以下「CPMA」という。) 及びN-(6-クロロ-3-ピリジルメチル)-*N*-エチル-*N*'-メチルホルムアミジン (以下「CPMF」という。) 試験溶液

### (1) 抽出法

#### イ 穀類の場合

検体を420 μmの標準網ふるいを通るように粉碎した後、その10.0 gを量り採り、水20 mLを加え、2時間放置する。

これにアセトン100 mLを加え、3分間細砕した後、ケイソウ土を1 cmの厚さに敷いたろ紙を用いてすり合わせ減圧濃縮器中に吸引ろ過する。ろ紙上の残留物を採り、アセトン50 mL

を加え、3分間細砕した後、上記と同様に操作して、ろ液をその減圧濃縮器中に合わせる。これを50℃の水浴中で90分間加温した後、40℃以下で約10 mLに濃縮する。これにトリエチルアミン0.2 mLを加え、50℃の水浴中で30分間加温する。

これをあらかじめ10%塩化ナトリウム溶液100 mLを入れた300 mLの分液漏斗に移す。エーテル100 mLを用いて上記の減圧濃縮器のナス型フラスコを洗い、洗液を上記の分液漏斗に合わせる。振とう機を用いて5分間激しく振り混ぜた後、静置し、エーテル層を300 mLの三角フラスコに移す。水層にエーテル50 mLを加え、上記と同様に操作して、エーテル層を上記の三角フラスコに合わせる。これに適量の無水硫酸ナトリウムを加え、時々振り混ぜながら15分間放置する。

#### ロ 果実及び野菜の場合

検体約1 kgを精密に量り、必要に応じ適量の水を量って加え、細切均一化した後、検体20.0 gに相当する量を量り採る。

これにアセトン100 mLを加え、3分間細砕した後、ケイソウ土を1 cmの厚さに敷いたろ紙を用いてすり合わせ減圧濃縮器中に吸引ろ過する。ろ紙上の残留物を採り、アセトン50 mLを加え、3分間細砕した後、上記と同様に操作して、ろ液をその減圧濃縮器中に合わせる。これを50℃の水浴中で90分間加温した後、40℃以下で約10 mLに濃縮する。これにトリエチルアミン0.2 mLを加え、50℃の水浴中で30分間加温する。

多孔性ケイソウ土カラム (20 ml保持用) に上記の溶液を注入し、15分間放置した後、*n*-ヘキサン50 mLを注入し、流出液は捨てる。次いでエーテル50 mLを注入し、流出液を100 mLの三角フラスコ中に採る。

#### ハ 抹茶の場合

検体5.00 gを量り採り、0.05 mol/L塩酸100 mLを加え、2時間放置する。振とう機を用いて30分間激しく振り混ぜる。これにケイソウ土10 gを加えて振り混ぜた後、ケイソウ土を1 cmの厚さに敷いたろ紙を用いて300 mLの三角フラスコ中に吸引ろ過する。0.05 mol/L塩酸50 mLを用いてろ紙上の残留物を洗い、洗液を上記の三角フラスコ中に合わせ、0.05 mol/L塩酸を加えて200 mLとする。

内径15 mm、長さ300 mmのクロマトグラフ管に、スチレンジビニルベンゼン共重合体吸着剤20 mLをアセトンに懸濁したものを入れ、カラムの上端に少量のアセトンが残る程度までアセトンを流出させる。このカラムにアセトン50 mLを注入し、流出液は捨てる。水200 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで上記の溶液を注入し、毎分約5 mLの流速で流出させ、流出液は捨てる。0.05 mol/L塩酸50 mLを注入し、流出液は捨てる。水50 mLを注入し、毎分約5 mLの流速で流出させ、流出液は捨てる。次いでアセトン100 mLを注入し、毎分約5 mLの流速で流出させ、流出液をすり合わせ減圧濃縮器中に採る。これを50℃の水浴中で90分間加温した後、40℃以下で約10 mLに濃縮する。これにトリエチルアミン0.2 mLを加え、50℃の水浴中で30分間加温する。

多孔性ケイソウ土カラム（20 mL保持用）に上記の溶液を注入し、15分間放置した後、*n*-ヘキサン50 mLを注入し、流出液は捨てる。次いでエーテル50 mLを注入し、流出液を100 mLの三角フラスコ中に採る。

#### ニ 抹茶以外の茶の場合

検体9.00 gを100℃の水540 mLに浸し、室温で5分間放置した後、ろ過し、冷後ろ液360 mLを500 mLの三角フラスコに移し、2 mol/L塩酸8 mLを加える。

内径15 mm、長さ300 mmのクロマトグラフ管に、スチレンジビニルベンゼン共重合体吸着剤20 mLをアセトンに懸濁したものを入れ、カラムの上端に少量のアセトンが残る程度までアセトンを流出させる。このカラムにアセトン50 mLを注入し、流出液は捨てる。水200 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで上記の溶液を注入し、毎分約5 mLの流速で流出させ、流出液は捨てる。0.05 mol/L塩酸50 mLを注入し、流出液は捨てる。水50 mLを注入し、毎分約5 mLの流速で流出させ、流出液は捨てる。次いでアセトン100 mLを注入し、毎分約5 mLの流速で流出させ、流出液をすり合わせ減圧濃縮器中に採る。これを50℃の水浴中で90分間加温した後、40℃以下で約10 mLに濃縮する。これにトリエチルアミン0.2 mLを加え、50℃の水浴中で30分間加温する。

多孔性ケイソウ土カラム（20 mL保持用）に上記の溶液を注入し、15分間放置した後、*n*-ヘキサン50 mLを注入し、流出液は捨てる。次いでエーテル50 mLを注入し、流出液を100 mLの三角フラスコ中に採る。

#### (2) 精製法

内径15 mm、長さ300 mmのクロマトグラフ管に、カラムクロマトグラフィー用シリカゲル（粒径63~200 μm）10 gをエーテルに懸濁したもの、次いでその上に無水硫酸ナトリウム約5 gを入れ、カラムの上端に少量のエーテルが残る程度までエーテルを流出させる。このカラムに(1) 抽出法で得られた溶液を注入した後、アセトン及び*n*-ヘキサンの混液（1:4）50 mLを注入し、流出液は捨てる。次いでアセトン50 mLを注入し、流出液をすり合わせ減圧濃縮器中に採り、40℃以下でアセトンを除去する。この残留物にアセトンを加えて溶かし、正確に5 mLとして、これを試験溶液とする。

## 6. 操作法

### a 定性試験

#### (1) ニテンピラムの試験を行う場合

紫外分光光度型検出器付き高速液体クロマトグラフを用いて、次の操作条件で試験を行う。試験結果は標準品と一致しなければならない。

#### 操作条件

カラム充てん剤 オクタデシルシリル化シリカゲル（粒径5 μm）を用いる。

クロマトグラフ管 内径4.6 mm、長さ150 mmのステンレス管を用いる。

カラム温度 40℃

検出器 波長270 nmで操作する。

移動相 メタノール及び0.05 mol/Lリン酸二水素カリウム溶液の混液（3：17）を用いる。  
ニテンピラムが約9分で流出する流速に調整する。

(2) CPMA及びCPMFの試験を行う場合

アルカリ熱イオン化検出器又は高感度窒素・リン検出器付きガスクロマトグラフを用いて、次の操作条件で試験を行う。試験結果はCPFの標準品と一致しなければならない。

操作条件

カラム 内径0.25 mm、長さ30 mのケイ酸ガラス製の細管に、ガスクロマトグラフィ用50%フェニル-メチルシリコンを0.25 μmの厚さでコーティングしたもの。

カラム温度 50℃で2分間保持し、その後毎分10℃で昇温し、250℃に到達後10分間保持する。

試験溶液注入口温度 270℃

検出器 270℃で操作する。

ガス流量 キャリヤーガスとしてヘリウムを用いる。CPFが約22分で流出する流速に調整する。空気及び水素の流量を至適条件に調整する。

b 定量試験

a 定性試験と同様の操作条件で得られた試験結果に基づき、ニテンピラム並びにCPMA及びCPMFから誘導されるCPFのそれぞれについてピーク高法又はピーク面積法により定量を行い、ニテンピラム及びCPFの含量を求め、次式により、CPMA及びCPMFを含むニテンピラムの含量を求める。

ニテンピラム（CPMA及びCPMFを含む。）の含量（ppm） = A + B × 1.36

A：ニテンピラムの含量（ppm）

B：CPFの含量（ppm）

c 確認試験

CPMA及びCPMFの試験溶液について、a 定性試験と同様の操作条件でガスクロマトグラフィー・質量分析を行う。試験結果は標準品と一致しなければならない。また、必要に応じ、ピーク高法又はピーク面積法により定量を行う。

7. 定量限界

米0.05 mg/kg、果実・野菜0.025 mg/kg、茶0.1 mg/kg

8. 留意事項

ニテンピラムは、ニテンピラム並びにその代謝物であるCPMA及びCPMFから誘導されるCPFのそれぞれについて定量を行い、ニテンピラム及びCPFの含量を求め、CPFについてはその含量に係数を乗じてニテンピラムの含量に換算し、これらの和を分析値とすること。

9. 参考文献

なし

10. 類型

A