

## アミトラズ試験法（畜産物）

### 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 B」という。）

### 2. 適用食品

畜産物、乳、はちみつ

### 3. 装置

液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計（LC-MS/MS）

### 4. 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 98%以上を含む。

代謝物 B 塩酸塩標準品 本品は代謝物 B 塩酸塩 98%以上を含む。

### 5. 試験溶液の調製

#### 1) 抽出

筋肉、脂肪及び内臓の場合は、試料を正確に量り、重量比で 1/2 量のエタノール及び 8 mol/L 水酸化ナトリウム溶液（1 : 1）混液を加え磨砕均一化した後、試料 10.0 g に相当する量を量り採る。乳及びはちみつの場合は、試料 10.0 g に、8 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 2.5 mL を加える。これにメタノール 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、上澄液を採る。残留物にメタノール 50 mL を加えてホモジナイズした後、上記と同様に遠心分離し、得られた上澄液を合わせ、メタノールを加えて正確に 200 mL とする。この溶液から正確に 2 mL を分取して多孔性ケイソウ土カラム（5 mL 保持用）に注入し、10 分間放置した後、アセトニトリル 30 mL を注入し溶出液を採る。この溶出液に *n*-ヘキサン 30 mL を加えて 5 分間振とうした後、アセトニトリル層を採る。*n*-ヘキサン層は、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL ずつで 2 回振とう抽出し、抽出液を先のアセトニトリル層に合わせる。40°C 以下で濃縮し溶媒を除去する。この残留物にメタノール 2 mL 加えて溶かした後、アセトニトリル 2 mL を加えて軽く振り混ぜる。

#### 2) 精製

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム（1,000 mg）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（500 mg）にそれぞれアセトニトリル 10 mL を注

入し、流出液は捨てる。オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムの下部にエチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムを接続し、1) で得られた溶液を注入した後、アセトニトリル 10 mL を注入し、負荷液を含む全溶出液を採る。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ニトリル及びメタノール (1 : 1) 混液に溶かし、正確に 2 mL としたものを代謝物 B 試験溶液とする。また、代謝物 B 試験溶液から正確に 1 mL を分取し、アセトニトリル及びメタノール (1 : 1) 混液を加えて正確に 10 mL としたものをアミトラズ試験溶液とする。

## 6. 検量線の作成

アミトラズ標準品及び代謝物 B 塩酸塩標準品のアセトニトリル及びメタノール (1 : 1) 混液の溶液を数点調製し、それぞれ LC-MS/MS 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。なお、本法に従って試験溶液を調製した場合、試料中 0.01 mg/kg に相当する試験溶液中の濃度は、アミトラズにあっては 0.00005 mg/L、代謝物 B にあっては 0.0005 mg/L (アミトラズ換算) である。

## 7. 定量

試験溶液を LC-MS/MS に注入し、6 の検量線でアミトラズ及び代謝物 B の各含量を求める。代謝物 B を含むアミトラズの含量を求める場合には、次式により求める。

アミトラズ (代謝物 B を含む) の含量 (ppm) =  $A + B \times 1.807$

A : アミトラズの含量 (ppm)

B : 代謝物 B の含量 (ppm)

## 8. 確認試験

LC-MS/MS により確認する。

## 9. 測定条件

(例)

カラム : オクタデシルシリル化シリカゲル 内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm

カラム温度 : 40°C

移動相 : 5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液及び 5 mmol/L 酢酸アンモニウム・メタノール溶液の混液 (9 : 1) で 5 分間保持し、(9 : 1) から (0 : 100) までの濃度勾配を 10 分間で行い、(0 : 100) で 10 分間保持する。

イオン化モード : ESI (+)

主なイオン ( $m/z$ )

アミトラズ : プリカーサーイオン 294、プロダクトイオン 163、122

代謝物 B : プリカーサーイオン 163、プロダクトイオン 122、107

注入量：10  $\mu$ L

保持時間の目安

アミトラズ：18 分

代謝物 B：14 分

## 10. 定量限界

各化合物 0.01 mg/kg（代謝物 B はアミトラズ換算）

## 11. 留意事項

### 1) 試験法の概要

アミトラズ及び代謝物 B を試料から塩基性条件下メタノールで抽出し、多孔性ケイソウ土カラム及びアセトニトリル／ヘキサン分配で脱脂した後、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い、LC-MS/MS で定量及び確認する方法である。なお、アミトラズ及び代謝物 B のそれぞれについて定量を行い、代謝物 B を含むアミトラズの含量を求める場合には、代謝物 B の含量に換算係数を乗じてアミトラズの含量に変換し、これらの和を分析値とする。

### 2) 注意点

- ① アミトラズ及び代謝物 B の LC-MS/MS 測定で、試験法開発時に使用したイオンを以下に示す。

アミトラズ

定量イオン ( $m/z$ )：プリカーサーイオン 294、プロダクトイオン 163

定性イオン ( $m/z$ )：プリカーサーイオン 294、プロダクトイオン 122

代謝物 B

定量イオン ( $m/z$ )：プリカーサーイオン 163、プロダクトイオン 122

定性イオン ( $m/z$ )：プリカーサーイオン 163、プロダクトイオン 107

- ② 試験法開発時に検討した食品：牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳、はちみつ

## 12. 参考文献

なし

## 13. 類型

C