

アセタミプリド試験法（畜水産物）

1. 分析対象化合物

アセタミプリド

代謝物 IM-2-1 (N^1 -[(6-クロロ-3-ピリジル)メチル]- N^2 -シアノアセトアミジン) (以下、IM-2-1 という。)

2. 装置

液体クロマトグラフ・質量分析計 (LC-MS) 又は液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計 (LC-MS/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。

アセタミプリド標準品 本品はアセタミプリド98%以上を含み、融点は98.9°Cである。

IM-2-1 標準品 本品はIM-2-1 98%以上を含む。

4. 試験溶液の調製

1) 抽出

① 筋肉、脂肪、肝臓、腎臓及び魚介類の場合

試料10.0 g (脂肪の場合は5.00 g) 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、40°C以下で約20 mLまで濃縮する。これに10 w/v%塩化ナトリウム溶液100 mLを加え、*n*-ヘキサン50 mLを加えて振とうし、*n*-ヘキサン層を捨てる。残った水層を酢酸エチル100 mL及び50 mLで2回振とう抽出する。抽出液に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、ろ液に酢酸エチルを加えて正確に200 mLとする。この4 mL (脂肪の場合は8 mL) を分取し、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 (3 : 17) 混液5 mLを加えて溶かす。

② 乳、卵及びはちみつの場合

試料10.0 gにアセトン100 mL (はちみつの場合は水20 mL及びアセトン100 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。アセトン及び水混液層を採り、残留物にアセトン50 mL (はちみつの場合は水20 mL及びアセトン50 mL) を加えてホモジナイズし、上記と同様に遠心分離する。得られたアセトン及び水混液層を合わせ、40°C以下で約20 mL (はちみつの場合は約50 mL) まで濃縮する。これに10 w/v%塩化ナトリウム溶液100 mLを加え、*n*-ヘキサン50 mLを加えて振とうし、*n*-ヘキサン層を捨てる。残った水層を酢酸エチル100 mL及び50 mLで2回振とう抽出する。抽出液に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、ろ液に酢酸エチルを加えて正確に200 mLとする。この4 mLを分取し、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 (3 : 17) 混液5 mLを加えて溶かす。

2) 精製

① 合成ケイ酸マグネシウムカラムクロマトグラフィー

合成ケイ酸マグネシウムミニカラム (910 mg) にアセトン及び*n*-ヘキサン各5 mLを順次注入し、流出液は捨てる。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 (3 : 17) 混液15 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで、アセトン及び*n*-ヘキサン (1 : 4) 混液10 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで、アセトン及び*n*-ヘキサン (2 : 3) 混液20 mLを注入し、溶出液を40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物に水及びメタノール (2 : 3) 混液5 mLを加えて溶かす。

② グラファイトカーボンカラムクロマトグラフィー

グラファイトカーボンミニカラム (250 mg) にメタノール及び水各 5 mL を順次注入し、流出液は捨てる。このカラムに①で得られた溶液を注入した後、水及びメタノール (2 : 3) 混液 5 mL を注入し、流出液は捨てる。次いで、メタノール 10 mL を注入し、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水 (1 : 4) 混液に溶解し、正確に 4 mL としたものを試験溶液とする。

5. 検量線の作成

アセタミプリド標準品及び IM-2-1 標準品をそれぞれアセトニトリルに溶解して 500 mg/L とし標準原液とする。各標準原液を適宜混合してアセトニトリル及び水 (1 : 4) 混液で希釈した溶液を数点調製し、それぞれ LC-MS 又は 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濃度は各化合物 0.0005 mg/L (IM-2-1 はアセタミプリド換算) である。

6. 定量

試験溶液を LC-MS 又は LC-MS/MS に注入し、5 の検量線でアセタミプリド及び IM-2-1 の含量を求める。IM-2-1 を含むアセタミプリドの含量を求める場合には、次式により求める。

アセタミプリド (IM-2-1 を含む。) の含量 (ppm) = A + B × 1.067

A : アセタミプリドの含量 (ppm)

B : IM-2-1 の含量 (ppm)

7. 確認試験

LC-MS 又は LC-MS/MS により確認する。

8. 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 2.0 mm、長さ 150 mm、粒子径 5 µm

カラム温度 : 40°C

移動相 : アセトニトリル及び 0.01 vol% ギ酸溶液の混液 (1 : 4) から (4 : 1) までの濃度勾配を 10 分間で行い、(9 : 1) で 5 分間保持する。

イオン化モード

アセタミプリド : ESI (+)

IM-2-1 : ESI (+)

主なイオン (m/z)

1) LC-MS の場合

アセタミプリド : 223

IM-2-1 : 209

2) LC-MS/MS の場合

アセタミプリド : プリカーサーイオン 223、プロダクトイオン 126

プリカーサーイオン 225、プロダクトイオン 128

IM-2-1 : プリカーサーイオン 209、プロダクトイオン 126

プリカーサーイオン 211、プロダクトイオン 128

注入量 : 4 µL

保持時間の目安

アセタミプリド : 8 分

IM-2-1 : 7 分

9. 定量限界

各化合物 0.01 mg/kg (IM-2-1 はアセタミプリド換算)

10. 留意事項

1) 試験法の概要

アセタミプリド及び IM-2-1 を試料からアセトンで抽出し、*n*-ヘキサンで脱脂した後、酢酸エチルに転溶する。合成ケイ酸マグネシウム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 又は LC-MS/MS で定量し、LC-MS 又は LC-MS/MS で確認する方法である。なお、アセタミプリド及び IM-2-1 のそれぞれについて定量を行い、IM-2-1 を含むアセタミプリドの含量を求める場合には、IM-2-1 の含量に換算係数を乗じてアセタミプリドの含量に変換し、これらの和を分析値とする。

2) 注意点

- ①抽出液を減圧濃縮する際、突沸に注意する。試料によってはグラファイトカーボンミニカラム精製を省略できる。
- ②アセタミプリド及びIM-2-1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。

アセタミプリド

定量イオン (m/z) : プリカーサーイオン 223、プロダクトイオン 126

定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン 225、プロダクトイオン 128

IM-2-1

定量イオン (m/z) : プリカーサーイオン 209、プロダクトイオン 126

定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン 211、プロダクトイオン 128

11. 参考文献

なし

12. 類型

C