

※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。

イミダクロプリド試験法の検討結果

1. 目的及び試験法の検討方針

イミダクロプリドは ██████████ 株式会社によって開発されたクロロニコチル系殺虫剤であり、ニコチン性アセチルコリン受容体に結合し、神経伝達を遮断するなどの作用により殺虫作用を示すと考えられている。

「薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会 農薬・動物用医薬品部会報告について」に記載されている規制対象物質は、『農産物にあつてはイミダクロプリドのみをいい、畜産物にあつてはイミダクロプリド及び6-クロロピリジル基を有する代謝物をイミダクロプリド含量に換算したものの和をいうこと。』とされている。現在畜産物について6-クロロピリジル基を有する代謝物を測定対象に含む試験法は示されていない。以上を考慮し、「薬事食品衛生審議会 食品衛生分科会報告書」に記載されている規制対象物質及び残留基準値案を踏まえ、6-クロロピリジル基を有する代謝物を測定対象に含む試験法の開発を行った。

1) 規制対象物質

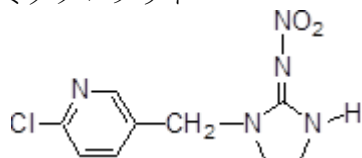
イミダクロプリド

6-クロロピリジル基を有する代謝物

2. 分析対象化合物の構造式、物理化学的性質及び基準値等に関する情報

1) 構造式及び物理化学的性質

イミダクロプリド



化学式：C₉H₁₀ClN₅O₂

分子量：255.66

化学名（IUPAC）：1-(6-chloro-3-pyridylmethyl)-N-nitroimidazolidin-2-ylideneamine

外 観：白色結晶

融 点：144℃

蒸気圧：4.0×10⁻⁷ Pa (20℃)、9.0×10⁻⁷ mPa (25℃)

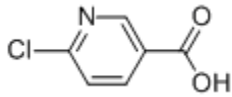
溶解性：水 0.61 g/L (20℃)

ジクロロメタン 67、イソプロパノール 2.3、トルエン 0.69 (以上 g/L、20℃)

オクタノール/水分配係数：log Pow=0.57 (21℃)

(出典：The e-Pesticide Manual 15th ed.,ver.5.2)

6-クロロニコチン酸



化学式：C₆H₄ClNO₂

分子量：157.5

化学名 (IUPAC)：6-chloronicotinic acid

外 観：白色結晶

融 点：186°C-190°C

溶解性：水 2.0 g/L (20°C)

(出典：MSDS)

2) 基準値の一例

牛の筋肉、脂肪及び肝臓 0.3 ppm

鶏の筋肉及び鶏卵 0.02 ppm

乳 0.1 ppm

[実験方法]

1. 試料

1) 購入先

うなぎは愛知県の業者から、しじみは都内の市場から、その他の試料については都内のスーパーにて購入した。

2) 試料の採取方法

- ① 牛の筋肉は可能な限り脂肪層を除き、細切均一化した。
- ② 牛の脂肪は可能な限り筋肉部を除き、細切均一化した。
- ③ 牛の肝臓は、全体を細切均一化した。
- ④ 鶏の筋肉は可能な限り脂肪層を除き、細切均一化した。
- ⑤ 鶏卵は、殻を除き卵白と卵黄を合わせてよく混合し均一化した。
- ⑥ 牛乳は全体をよく混合して均一化した。
- ⑦ はちみつは百花蜜を使用し、加温 (40°C以下) してから、よく混合して均一化した。
- ⑧ うなぎは、活鰻を使用し、頭部を除いた可食部 (内臓、骨及び皮を含む) を細切均一化した。
- ⑨ さけは可食部 (皮を含む) を細切均一化した。
- ⑩ しじみは貝殻を除き、約5分間水切りを行った後細切均一化した。

2. 試薬・試液

1) 標準品

イミダクロプリド標準品：純度99.6% (関東化学製)

6-クロロニコチン酸標準品：純度98%以上 (和光純薬工業製)

2) 試薬

アセトン、酢酸エチル、メタノール、*n*-ヘキサン：残留農薬試験用 (関東化学製)

アセトニトリル：高速液体クロマトグラフ用 (関東化学製)

無水硫酸ナトリウム：PCB分析用 (関東化学製)

亜硫酸水素ナトリウム、酢酸：試薬特級 (関東化学製)

過マンガン酸カリウム、硫酸：試薬特級 (小宗化学製)

水酸化ナトリウム：試薬特級（和光純薬工業製）

3) 標準溶液、試液の調製方法

①標準溶液の調製方法

標準原液：イミダクロプリド標準品25 mgを精秤し、アセトンに溶解して50 mLに定容し、500 mg/L溶液を調製した。

6-クロロニコチン酸標準品30.8 mgを精秤し、アセトンに溶解して100 mLに定容し、イミダクロプリド濃度として500 mg/L溶液を調製した。

検量線用標準溶液：6-クロロニコチン酸標準原液を0.1 vol%酢酸及びメタノール（9：1）混液で希釈し、イミダクロプリド濃度として0.0005～0.045 mg/Lの濃度の標準溶液を調製した。

添加用標準溶液：イミダクロプリド標準原液及び6-クロロニコチン酸標準原液をそれぞれアセトンで希釈して各0.2、1及び20 mg/Lの濃度の標準溶液を調製した。

②試液の調製方法

水及びメタノール（1：3）混液

水250 mL及びメタノール750 mLを混合した。

32 w/v%水酸化ナトリウム溶液

水酸化ナトリウム160 gに水を加えて溶解し、500 mLとした。

5 w/v%過マンガン酸カリウム溶液

過マンガン酸カリウム50 gに水を加えて溶解し、1,000 mLとした。

10 vol%硫酸

水900 mLに硫酸100 mLを少量ずつ混合し、水で1,000 mLとした。

0.1 vol%酢酸

酢酸1 mLに水を加えて1,000 mLとした。

0.1 vol%酢酸及びメタノール（9：1）混液

0.1 vol%酢酸180 mL及びメタノール20 mLを混合した。

3. 装置

ホモジナイザー：ウルトラタラックスT-25ベーシック（イカ・ジャパン製）

遠心分離機：H-700F（コクサン製）

ロータリーエバポレーター：R-200（柴田科学製）等

LC-MS/MS

	型式	会社
MS 装置	API-3200	AB SCIEX
LC 装置	Prominence 高圧グラジエントシステム	島津製作所
解析ソフト	Analyst	AB SCIEX

4. 測定条件

LC 条件																					
カラム	Inertsil ODS-4 HP サイズ：内径 2.1 mm、長さ 250 mm、粒子径 3 μm 会社：ジーエルサイエンス株式会社																				
移動相流速 (mL/min)	0.2																				
注入量 (μL)	10																				
カラム温度 (°C)	40																				
移動相	A液：0.1 vol% 酢酸 B液：アセトニトリル																				
グラジエント条件	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間(分)</th> <th>A液(%)</th> <th>B液(%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.0</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>10.0</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>15.0</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>15.1</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>20.0</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> </tbody> </table>			時間(分)	A液(%)	B液(%)	0.0	90	10	10.0	10	90	15.0	10	90	15.1	90	10	20.0	90	10
時間(分)	A液(%)	B液(%)																			
0.0	90	10																			
10.0	10	90																			
15.0	10	90																			
15.1	90	10																			
20.0	90	10																			
MS 条件																					
測定モード	MS/MS、SRM (選択反応モニタリング)																				
イオン化モード	ESI (+)																				
キャピラリ電圧 (V)	5500																				
脱溶媒温度 (°C)	700																				
脱溶媒ガス	窒素 40 psi																				
コリジョンガス	窒素																				
定量イオン (m/z)	+158→122[コーン電圧：41(V)、コリジョンエネルギー：25(eV)]																				
定性イオン (m/z)	+158→78[コーン電圧：41(V)、コリジョンエネルギー：25(eV)]																				
保持時間 (min)	9.1																				

5. 定量

[実験方法] 2. 3) ①に従い調製した標準溶液10 μLをLC-MS/MSに注入し、得られたピーク面積から絶対検量線法で検量線を作成した。試験溶液10 μLをLC-MS/MSに注入し、得られたピーク面積と作成した検量線から6-クロロピリジル基を有する代謝物を含むイミダクロプリドの量を算出した。

6. 添加試料の調製

2. 3) で調製した添加用標準溶液を使用した。なお、添加試料はイミダクロプリド添加及び6-クロロニコチン酸添加を別々に作製した。

牛の筋肉及び牛の肝臓（添加濃度：0.3 ppm相当）：1. 2) の試料10.0 gに添加用標準溶液20 mg/Lを0.15 mL添加しよく混合した後、30分間放置した。

牛の脂肪（添加濃度：0.3 ppm相当）：1. 2) の試料5.00 gに添加用標準溶液20 mg/Lを0.075 mL添加しよく混合した後、30分間放置した。

牛乳（添加濃度：0.1 ppm相当）：1. 2) の試料10.0 gに添加用標準溶液1 mg/Lを1 mL添加しよく混合した後、30分間放置した。

鶏の筋肉及び鶏卵（添加濃度：0.02 ppm相当）：1. 2) の試料10.0 gに添加用標準溶液1 mg/Lを0.2 mL添加しよく混合した後、30分間放置した。

はちみつ、うなぎ、さけ及びしじみ（添加濃度：0.01 ppm相当）：1. 2) の試料10.0 gに添加用標準溶液0.2 mg/Lを0.5 mL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

イミダクロプリド及び6-クロロピリジル基を有する代謝物をn-ヘキサン並びに水及びメタノール

(1 : 3) 混液を用いて抽出し、水及びメタノール (1 : 3) 混液層を採った。塩基性下で過マンガン酸カリウム溶液を加えて加熱還流を行い、イミダクロプリド及び6-クロロピリジル基を有する代謝物を6-クロロニコチン酸に酸化した。硫酸酸性下で亜硫酸水素ナトリウムを加えて酸化反応を終了させた後、酢酸エチルに抽出し、LC-MS/MSで定量及び確認した。

1) 抽出

1. 2) の試料10.0 g (脂肪の場合は5.00 g) を200 mL遠心管に量り採り、*n*-ヘキサン50 mL並びに水及びメタノール (1 : 3) 混液100 mLを加え、ホモジナイズした後、毎分3000回転で5分間遠心分離を行った。水及びメタノール (1 : 3) 混液層を採り、*n*-ヘキサン層及び残留物に水及びメタノール (1 : 3) 混液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、得られた水及びメタノール (1 : 3) 混液層を合わせて、水及びメタノール (1 : 3) 混液で正確に200 mLとした。この溶液から正確に5 mL (脂肪の場合は10 mL、はちみつの場合は2 mL) を分取し300 mL遠心管に採り、ロータリーエバポレーターを用いて40°C以下で約1 mLまで濃縮した。

2) 酸化反応

1) で得られた液に32 w/v%水酸化ナトリウム溶液5 mL及び50 g/L過マンガン酸カリウム溶液50 mLを加え、空冷管を取り付けて120 °Cに設定したオイルバス内で15分間加熱を行った。加熱操作後冷水を用いて反応液を冷やししながら水50 mL、10 vol%硫酸50 mL及び亜硫酸水素ナトリウム5 gを加えて反応を終了させた。反応終了後の液を500 mL分液漏斗に移し、酢酸エチル100 mL及び50 mLで2回振とう抽出した。抽出液を300 mL三角フラスコに採り、無水硫酸ナトリウムを加えて時々振り混ぜながら15分間放置した。200 mLなす形フラスコにろ過した後、ロータリーエバポレーターを用いて40°C以下で約1 mLに濃縮し、更に窒素を吹き付けて溶媒を除去した。この残留物を0.1 vol%酢酸及びメタノール (9 : 1) 混液に溶かし、正確に2.5 mL (はちみつの場合は1 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

↓ 試料10.0 g (脂肪の場合は5.00 g)

ヘキサン存在下含水メタノール抽出

- | *n*-ヘキサン50 mL、水及びメタノール (1 : 3) 混液100 mLを加え、ホモジナイズ
 - | 遠心分離 (3000回転/分、5分)
 - | メタノール層を採る
 - | 残留物及び*n*-ヘキサン層に水及びメタノール (1 : 3) 混液50 mLを加え、ホモジナイズ
 - | 遠心分離 (3000回転/分、5分)
 - | 水及びメタノール (1 : 3) 混液層を合わせ、同混液で正確に200 mLとする
 - | 脂肪、はちみつ以外：抽出液5 mL分取
 - | 脂肪：抽出液10 mL分取
 - | はちみつ：抽出液2 mL分取
- ↓ 約1 mLまで濃縮

酸化反応

- | 32 w/v%水酸化ナトリウム溶液5 mL、50 g/L過マンガン酸カリウム溶液50 mL
- | 空冷管をつけ、120 °Cに設定したオイルバスで15分間加熱
- | 加熱操作後、冷水下で水50 mL、10 vol%硫酸50 mL及び亜硫酸水素ナトリウム5 g
- | 酢酸エチル100 mLを加え、5分間振とう

- | 酢酸エチル層を採る
- | 水層に酢酸エチル50 mLを加え、5分間振とう
- | 酢酸エチル層を合わせ脱水する

濃縮（溶媒除去）

- | 減圧濃縮、窒素乾固
- ↓ 残留物を0.1 vol%酢酸及びメタノール（9：1）混液2.5 mL（はちみつの場合は1 mL）

LC-MS/MS定量

10 μ L注入

8. マトリックス添加標準溶液の調製

1) 定量限界相当濃度（定量限界の推定用）

牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、鶏の筋肉及び鶏卵はブランク試験溶液から0.4 mL分取し溶媒を除去した後、0.001 mg/Lの標準溶液0.4 mLに溶解したものを、マトリックス添加標準溶液とした。

2) 添加回収試験における回収率100%相当濃度（試料マトリックスの測定への影響用）

牛の筋肉、牛の脂肪及び牛の肝臓は、ブランク試験溶液から0.4 mL分取し溶媒を除去した後、0.03 mg/Lの標準溶液0.4 mLに溶解したものを、マトリックス添加標準溶液とした。

牛乳は、ブランク試験溶液から0.4 mL分取し溶媒を除去した後、0.01 mg/Lの標準溶液0.4 mLに溶解したものを、マトリックス添加標準溶液とした。

鶏の筋肉及び鶏卵は、ブランク試験溶液から0.4 mL分取し溶媒を除去した後、0.002 mg/Lの標準溶液0.4 mLに溶解したものを、マトリックス添加標準溶液とした。

はちみつ、うなぎ、さけ及びしじみはブランク試験溶液から0.4 mL分取し溶媒を除去した後、0.001 mg/Lの標準溶液0.4 mLに溶解したものを、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

6-クロロニコチン酸はESI（+）モードでの測定が可能であった。6-クロロニコチン酸のESI（+）モード測定時のマススペクトルを図1に示した。6-クロロニコチン酸のプロトン付加分子 (m/z 158 [M+H]⁺) が得られたため、 m/z 158をプリカーサーイオンとした。 m/z 158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に示した。強度として m/z 122が一番強く、次いで m/z 78が続いたため、 m/z 122を定量用イオン、 m/z 78を定性用イオンとした。

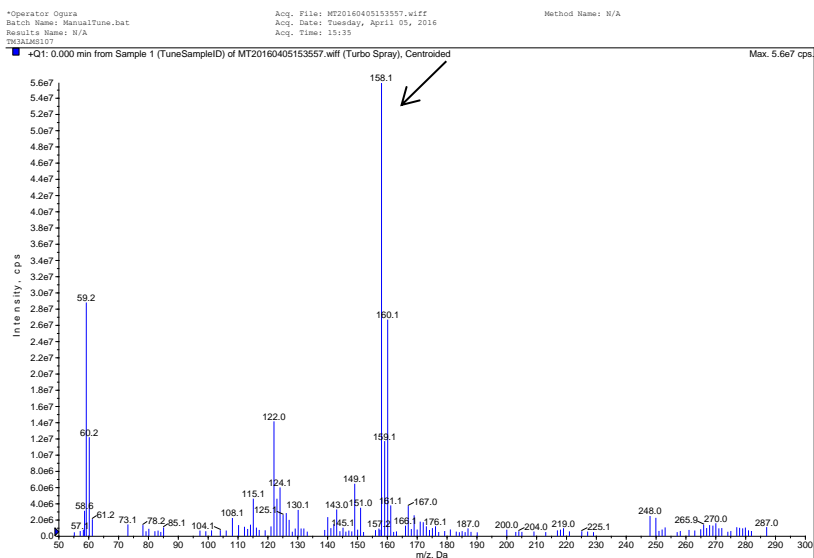


図1 6-クロロニコチン酸のマススペクトル
スキャン範囲：50～300 m/z
測定条件：ESI (+)、CV=41 (CV：コーン電圧)

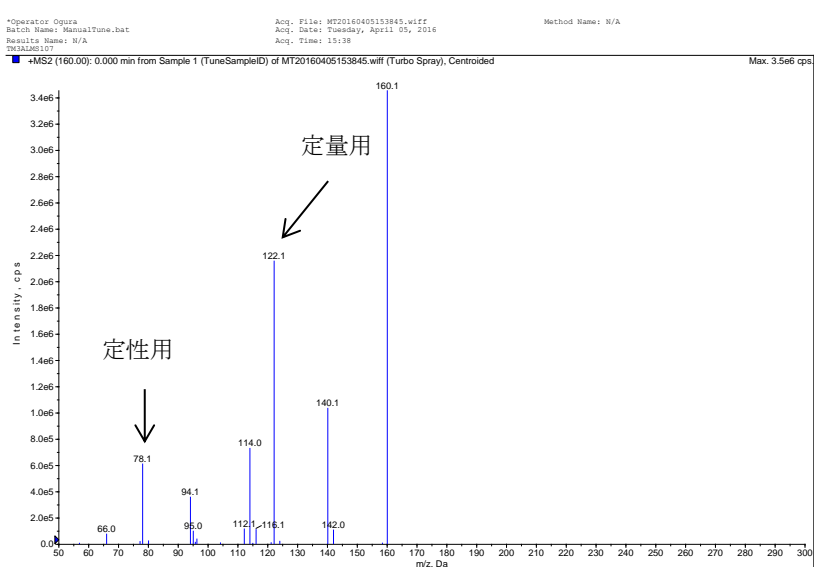


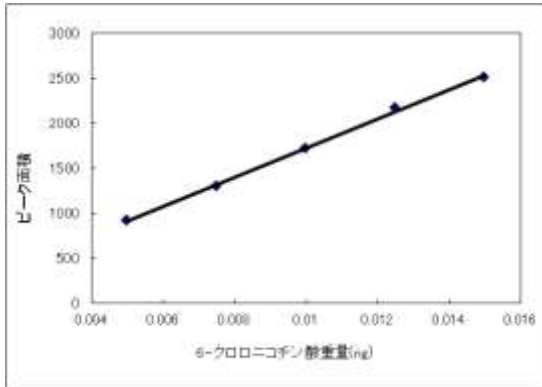
図2 6-クロロニコチン酸のプリカーサーイオン m/z 158 のプロダクトイオンスペクトル
スキャン範囲：50～300 m/z
測定条件：ESI (+)、CV=41、CE=25 (CV：コーン電圧、CE：コリジョンエネルギー)

2) LC 条件の検討

分離カラムについて、Inertsil ODS-4 HP (内径 2.1 mm、長さ 250 mm、粒子径 3 μm) を、移動相について、アセトニトリル及び0.1 vol%酢酸を用いて検討を行ったところ、ピーク形状、分離、再現性及び感度のいずれも良好な結果が得られたので、カラムはInertsil ODS-4 HPを、移動相はアセトニトリル及び0.1 vol%酢酸を用い、アセトニトリル及び0.1 vol%酢酸 (1 : 9) から (9 : 1) までの濃度勾配を10分間で行い、(9 : 1) で5分間保持することとした。

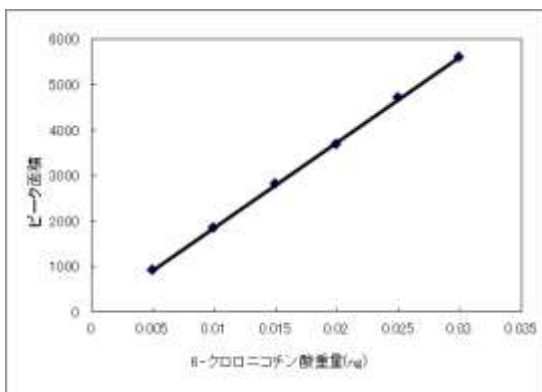
3) 検量線

図3に6-クロロニコチン酸の検量線の例を示した。0.0005 mg/L (0.005 ng) ~0.0015 mg/L (0.015 ng) 、0.0005 mg/L (0.005 ng) ~0.003 mg/L (0.03 ng) 、0.0025 mg/L (0.025 ng) ~0.015 mg/L (0.15 ng) 及び0.0075 mg/L (0.075 ng) ~0.045 mg/L (0.45 ng) の濃度範囲で作成した検量線の決定係数は0.993以上であり良好な直線性を示した。



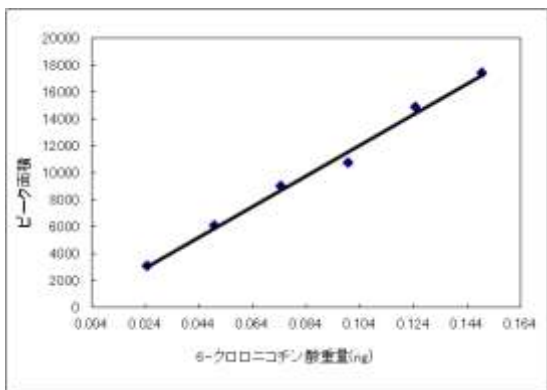
データ処理装置設定条件の一例
データ処理ソフト (メーカー) : Analyst
(AB SCIEX製)
ピークの定量方法 : ピーク面積法
検量線の種類 : 最小二乗法
検量線基準ピークの重量 : 0.005 ng~0.015 ng
傾き (a) : a=162000
切片 (b) : b=107
 $R^2 : 0.9986$

図 3-1 6-クロロニコチン酸検量線例 ($m/z +158 \rightarrow 122$)



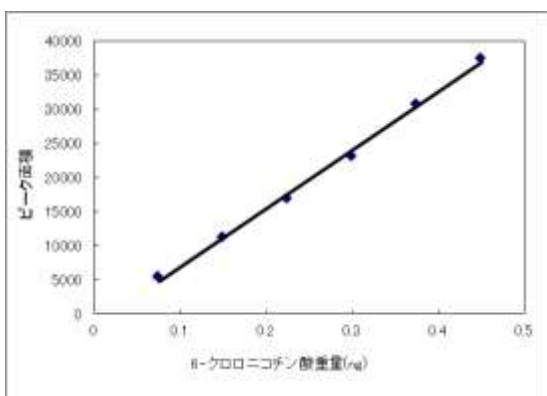
データ処理装置設定条件の一例
データ処理ソフト (メーカー) : Analyst
(AB SCIEX製)
ピークの定量方法 : ピーク面積法
検量線の種類 : 最小二乗法
検量線基準ピークの重量 : 0.005 ng~0.03 ng
傾き (a) : a=188000
切片 (b) : b=-29
 $R^2 : 0.9996$

図 3-2 6-クロロニコチン酸検量線例 ($m/z +158 \rightarrow 122$)



データ処理装置設定条件の一例
 データ処理ソフト (メーカー) : Analyst
 (AB SCIEX製)
 ピークの定量方法 : ピーク面積法
 検量線の種類 : 最小二乗法
 検量線基準ピークの重量 : 0.025 ng~0.15 ng
 傾き (a) : a=114000
 切片 (b) : b=232
 $R^2 : 0.9930$

図 3-3 6-クロロニコチン酸検量線例 ($m/z + 158 \rightarrow 122$)



データ処理装置設定条件の一例
 データ処理ソフト (メーカー) : Analyst
 (AB SCIEX製)
 ピークの定量方法 : ピーク面積法
 検量線の種類 : 最小二乗法
 検量線基準ピークの重量 : 0.075 ng~0.45 ng
 傾き (a) : a=85900
 切片 (b) : b=-1720
 $R^2 : 0.9970$

図 3-4 6-クロロニコチン酸検量線例 ($m/z + 158 \rightarrow 122$)

4) 定量限界

定量限界の算出結果を以下に示した。

①はちみつの場合

$$0.01 \text{ mg/kg} [(1 \text{ mL}/0.1 \text{ g}^{*1}) \times (0.01 \text{ ng}/10 \text{ }\mu\text{L})]$$

$$*1 \quad 10.0 \text{ g} \times 2 \text{ mL}/200 \text{ mL}$$

②はちみつ以外の場合

$$0.01 \text{ mg/kg} [(2.5 \text{ mL}/0.25 \text{ g}^{*2}) \times (0.01 \text{ ng}/10 \text{ }\mu\text{L})]$$

$$*2 \quad 5.00 \text{ g} \times 10 \text{ mL}/200 \text{ mL} \text{ (脂肪の場合)}$$

$$10.0 \text{ g} \times 5 \text{ mL}/200 \text{ mL} \text{ (脂肪以外の場合)}$$

2. 試験溶液調製法の検討

1) 抽出方法の検討

株式会社提供資料（以下、メーカー提供資料）ではイミダクロプリド及び6-クロロピリジル基を有する代謝物を水及びメタノール（1：3）混液で抽出している。この抽出溶媒を用いた抽出率について、融解脂肪を用いて検討を行った。牛の脂肪5 gを加温して融解させ、イミダクロプリド及び6-クロロニコチン酸各5 μg 相当を添加した後放冷し再度凝固させた。この試料から水及びメタノール（1：3）混液100 mL及び50 mLでホモジナイズ抽出を行い、200 mLに定容した際の回収率を、マトリックス標準溶液中のイミダクロプリド及び6-クロロニコチン酸の面積を100%として算出した結果を表1に示した。イミダクロプリド及び6-クロロニコチン酸ともに80%程度の回収率となり、脂肪から十分に抽出できていない可能性が推測された。

表1 水及びメタノール（1：3）混液で抽出を行った結果（%）

	牛の脂肪（融解脂肪）共存下				平均
	試行1	試行2	試行3	試行4	
イミダクロプリド	78	80	85	73	79
6-クロロニコチン酸	73	81	83	81	80

添加量：各5 μg

マトリックス標準溶液中のイミダクロプリド及び6-クロロニコチン酸の面積を100%として算出

表1の結果から、脂肪組織との混和性を考慮して水及びメタノール（1：3）混液に*n*-ヘキサンを加えた抽出について検討を行った。*n*-ヘキサン50 mLにイミダクロプリド及び6-クロロニコチン酸各5 μg 相当を添加し、水及びメタノール（1：3）混液100 mL及び50 mLで3回抽出を行った際の抽出率を表2に示した。2回の抽出操作でイミダクロプリド及び6-クロロニコチン酸ともにほぼ100%抽出することができた。

表2 水及びメタノール（1：3）混液への抽出率（%）

	水及びメタノール（1：3）混液			合計
	100 mL	50 mL	50 mL	
	(1回目)	(2回目)	(3回目)	
イミダクロプリド	93	6	0	99
6-クロロニコチン酸	93	9	0	102

添加量：各5 μg

次に、融解脂肪を用いて検討を行った。牛の脂肪5 gを加温して融解させ、イミダクロプリド及び6-クロロニコチン酸各5 µg相当を添加した後放冷し再度凝固させた。この試料から*n*-ヘキサン50 mL並びに水及びメタノール（1：3）混液100 mLを加えホモジナイズ抽出を行い、水及びメタノール（1：3）混液層を採った。残渣及び*n*-ヘキサン層を抽出容器に戻し、再度水及びメタノール（1：3）混液50 mLで抽出を行い、水及びメタノール（1：3）混液層を合わせ、200 mLに定容した際の回収率を、マトリックス標準溶液中のイミダクロプリド及び6-クロロニコチン酸の面積を100%として算出した結果を表3に示した。*n*-ヘキサンを加えて抽出を行うことでイミダクロプリド及び6-クロロニコチン酸ともに良好な回収率が得られたため、抽出溶媒としては*n*-ヘキサン並びに水及びメタノール（1：3）混液を用い、水及びメタノール（1：3）混液層を採った後残渣及び*n*-ヘキサン層に再度水及びメタノール（1：3）混液を加え2回抽出する方法とした。

表3 *n*-ヘキサン並びに水及びメタノール（1：3）混液で抽出を行った結果（%）

	牛の脂肪（融解脂肪）共存下					平均	相対標準偏差
	試行1	試行2	試行3	試行4			
イミダクロプリド	101	102	102	99	101	1.4	
6-クロロニコチン酸	94	117	108	107	107	9.5	

添加量：各5 µg

2) 酸化方法の検討

①酸化時間の検討

メーカー提供資料では、イミダクロプリド及び6-クロロピリジル基を有する代謝物を塩基性下で過マンガン酸カリウムを加えてホットプレート上で攪拌しながら15分間加熱還流を行い、6-クロロニコチン酸に酸化しているため、この酸化法に従って検討を行った。ただし、ホットプレートを用いたところ試験溶液が十分に加熱されなかったため、より熱が伝わりやすいオイルバスを用いて検討を行った。イミダクロプリド0.1 µg相当を32 w/v%水酸化ナトリウム溶液5 mL及び5 w/v%過マンガン酸カリウム溶液50 mLに添加し、空冷管をつけて120 °Cに設定したオイルバス中で加熱還流を行った結果を図4に示した。加熱5分以内ではほぼ100%の回収率が得られ、加熱時間が増えるにつれ、6-クロロニコチン酸の回収率が低下する結果となったが、イミダクロプリド及び6-クロロニコチン酸以外の6-クロロピリジル基を有する代謝物全てでも十分に酸化できる時間として、加熱時間は15分間を選択した。

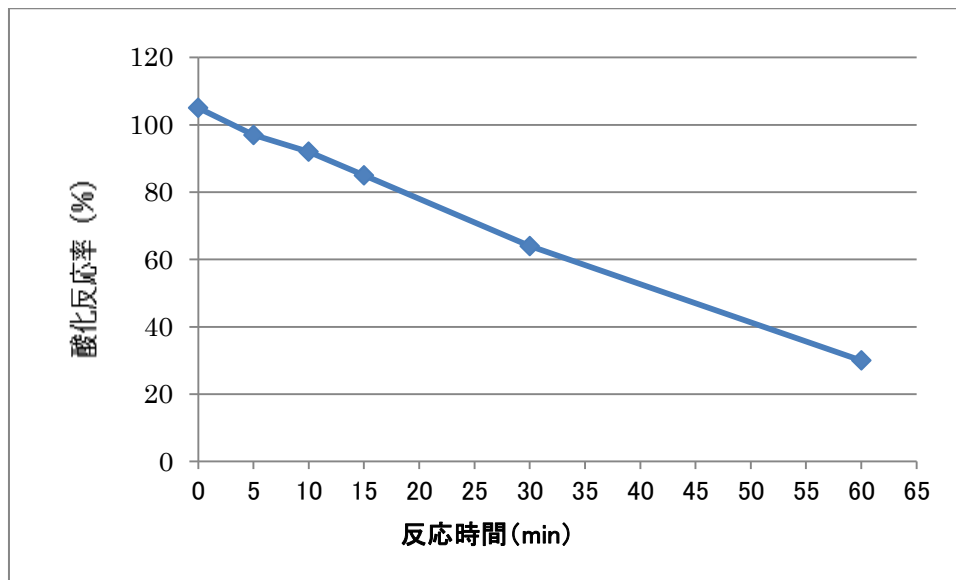


図4 オイルバスを用いて酸化反応を行った際の6-クロロニコチン酸への酸化反応率
 イミダクロプリド添加量：0.1 μg
 酸化反応後、[分析法フローチャート]に従って試験溶液を調製

②はちみつ（百花密）試料共存下における酸化反応率について

はちみつ試料共存下で酸化反応を行った際、酸化反応に供する試料量によって添加回収率に大きく差が出ることを確認された。はちみつは還元糖を多く含んでいるため、酸化に供する負荷量によっては酸化反応が十分に進行せず、低回収となると推測し、酸化反応に供する試料量について検討を行った。正確に200 mLとした抽出液からそれぞれ5 mL（試料0.25 g相当）、2 mL（試料0.1 g相当）及び1 mL（試料0.05 g相当）分取し、濃縮した後、予定分析法フローに従って試験した結果を表4に示した。0.25 g相当負荷では酸化反応時に茶褐色の沈殿を生じ、酸化反応が十分に行われていないと推測され、回収率が基準外となった。負荷量を0.1 g相当まで下げた結果、酸化反応時に茶褐色の沈殿は生じず、良好な回収率が得られた。ただし、負荷量をさらに下げて0.05 g相当とした場合、基準内ではあるが0.1 g相当よりも低回収となった。これは、試料量が少ないと加熱還流中に回収率の減衰が早まるからであると推測された。図5に標準品のみ及びはちみつ試料共存下において各時間酸化反応を行った際の回収率の変化を示した。以上から、酸化反応に供する試料量は0.1 g相当、すなわち2 mLが適当と判断した。なお、はちみつ以外の試料については供する試料量によって添加回収率に差はみられなかったため、加熱還流中の回収率の減衰を抑えるため分取量は5 mLとした。

表4 はちみつ（百花密）試料において添加回収試験を行った結果（%）

添加成分： イミダクロプリド	はちみつ試料共存下				平均	相対標準 偏差
	試行数 1	試行数 2	試行数 3			
5 mL (0.25 g 相当) 分取	12	34	46	31	17.2	
2 mL (0.1 g 相当) 分取	102	95	90	96	6.0	
1 mL (0.05 g 相当) 分取	76	84	77	79	4.4	

イミダクロプリド添加量：各0.005 μg

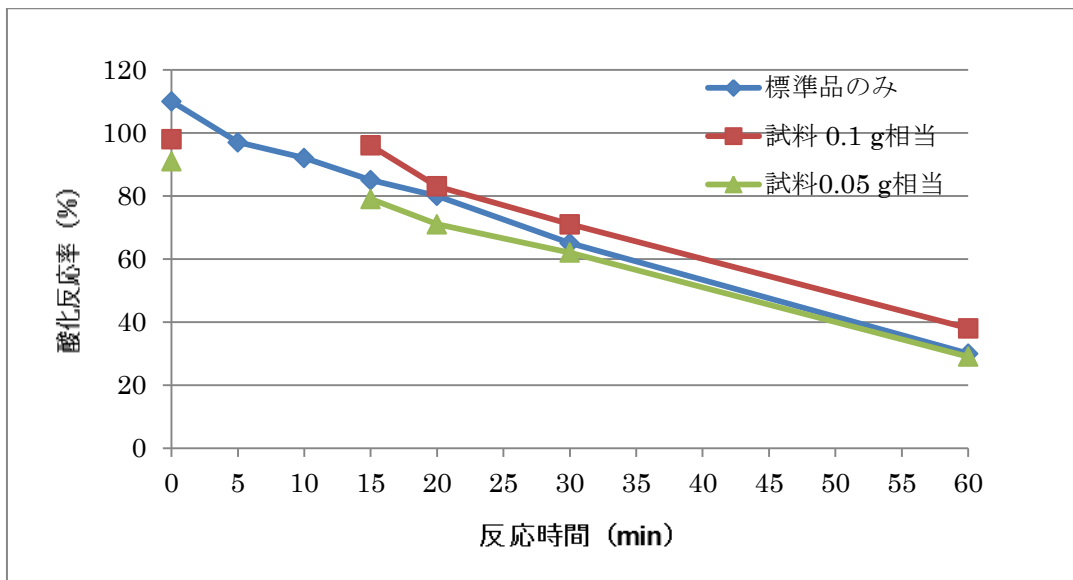


図5 各反応時間で酸化反応を行った酸化反応率
 イミダクロプリド添加量：0.005 μg
 酸化終了後の試験溶液を[分析法フローシート]に従って調製

3) 酸化後の転溶操作について

酸化反応後の6-クロロニコチン酸の転溶操作について検討を行った。6-クロロニコチン酸1 μg 相当を10 w/v%塩化ナトリウム溶液100 mLに添加し、以下のpH条件下で酢酸エチルを用いて100 mL及び50 mLで3回抽出を行った際の酢酸エチルへの抽出率を表5に示した。

- ①20%塩酸でpH1に調整
- ②pH5.5酢酸緩衝液を加えpH5.5に調整
- ③pH7.0リン酸緩衝液を加えpH7に調整

6-クロロニコチン酸はpH1では酢酸エチル層に、pH7では水層に分配されることが確認されたことから、 $\text{pK}_a3\sim5$ 程度の酸性化合物であると推測された。

表5 各 pH 条件下での酢酸エチルへの転溶率 (%)

	100 mL	50 mL	50 mL	合計
	(1回目)	(2回目)	(3回目)	
pH1 (20%塩酸)	81	5	0	86
pH5.5 (酢酸緩衝液)	20	9	4	33
pH7 (リン酸緩衝液)	2	1	1	4

6-クロロニコチン酸添加量：1 μg

さらに、酸化反応が終了した状態の反応液からの酢酸エチルへの抽出率を表6に示した。反応後は10 v/v%硫酸を加えたことによりpH1以下となっているため、表5と同様の理由で酢酸エチル層に抽出できると考えられた。

表6 酸化反応液から酢酸エチルへの転溶率 (%)

	酢酸エチル			合計
	100 mL (1回目)	50 mL (2回目)	50 mL (3回目)	
酸化反応液	94	2	0	96

6-クロロニコチン酸添加量：1 µg

[分析法フローシート]に従って酸化反応液を調製

さらに、表5の結果から、6-クロロニコチン酸を酸性下で酢酸エチル層に転溶した後、pH7リン酸緩衝液に転溶可能か検討した。6-クロロニコチン酸1 µg相当を酢酸エチル150 mLに添加し、20 mmol/L pH7.0リン酸緩衝液50 mLで3回振とう抽出を行った際の水層への抽出率を表7に示した。2回の抽出で水層に回収できることが確認された。

表7 20 mmol/L リン酸緩衝液 (pH7.0) への転溶率 (%)

	20 mmol/L リン酸緩衝液			合計
	50 mL (1回目)	50 mL (2回目)	50 mL (3回目)	
6-クロロニコチン酸	87	3	0	90

6-クロロニコチン酸添加量：1 µg

表5～7の結果より、以下の液液分配操作で6-クロロニコチン酸が回収できるか検討した。

- | 酸化反応終了後の反応液に6-クロロニコチン酸1 µg相当を添加
- | 酢酸エチル100 mL及び50 mLで抽出し酢酸エチル層を分取し水層を捨てた後、
- | 酢酸エチル層に20 mmol/L pH7.0リン酸緩衝液50 mLで2回抽出を行い水層を分取、酢酸エチル層を
- | 捨てる
- | 水層に20%塩酸を加えpH1以下に調整、塩化ナトリウム10 gを加える
- | 水層から酢酸エチル100 mL及び50 mLで抽出
- | 酢酸エチル層を採る
- | 脱水ろ過、減圧濃縮、窒素乾固
- | 0.1 vol%酢酸及びメタノール (9 : 1) 混液2 mLに溶解

以上の操作で6-クロロニコチン酸の添加回収率は94%であり、適用可能であると考えられた。ただし、リン酸緩衝液への転溶操作を行わなくても測定が可能であったため、酸化反応後の転溶操作は酢酸エチルによる転溶のみとした。

4) 精製カラムの検討

4級アンモニウム塩修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムによる精製が可能か検討した。カラムをメタノール及び水各10 mLで予備洗浄した後、6-クロロニコチン酸1 µg相当を水10 mLに添加し、負荷した後、メタノール、0.01 vol%塩酸含有メタノール及び0.1 vol%塩酸含有メタノール各10 mLを順次流下した。結果を表8に示した。6-クロロニコチン酸は水、メタノール及び0.01 vol%塩酸含有メタノールでは溶出せず、0.1 vol%塩酸含有メタノール10 mLで溶出することができた。しかし、酢

酸エチルによる転溶のみで測定が可能であったため不採用とした。

表8 4級アンモニウム塩修飾ジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムからの溶出状況(%)

	水		メタノール		0.01 vol%塩酸含有 メタノール		0.1 vol%塩酸含有 メタノール		合計
	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL	0-10 mL	10-20 mL	0-10 mL	10-20 mL	
	6-クロロニコチン酸	0	0	0	0	98	0	98	

Oasis MAX、充てん量500 mg、Waters製

6-クロロニコチン酸添加量：1 µg

3. 添加回収試験

牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、鶏の筋肉、鶏卵、牛乳、はちみつ、うなぎ、さけ及びしじみの10食品を用いて、[実験方法] 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代表的なクロマトグラムを図6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代表的なトータルイオンクロマトグラムを図8に示した。

1) 選択性

選択性の結果を表9に示した。検討した何れの試料においても6-クロロニコチン酸の定量を妨害するようなピークは認められず、選択性は良好であった。

表9 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 ¹ (ppm)	添加濃度 ² (ppm)	妨害ピークの許容範囲			ピーク面積(高さ) ³			選択性 の評価 ⁵	備考	
						評価対象濃度 (ppm)	判定基準	面積又は 高さの別	ブランク試料 (a)	標準溶液 ⁴ (b)	面積(高さ) 比(a)/(b)			
1	6-クロロニコチン酸	牛の筋肉	0.01	0.3	0.3	基準値	0.3	< 0.100	面積	0		#DIV/0!	○	
		牛の脂肪	0.01	0.3	0.3	基準値	0.3	< 0.100	面積	0		#DIV/0!	○	
		牛の肝臓	0.01	0.3	0.3	基準値	0.3	< 0.100	面積	0		#DIV/0!	○	
		鶏の筋肉	0.01	0.02	0.02	定量限界	0.02	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		鶏卵	0.01	0.02	0.02	定量限界	0.02	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		牛乳	0.01	0.1	0.1	基準値	0.1	< 0.100	面積	0		#DIV/0!	○	
		はちみつ	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		うなぎ	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		さけ	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		しじみ	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	

*1 基準値は、基準値未設定の場合には一律基準(0.01 ppm)を用いる。

2 添加濃度と評価対象濃度が異なる場合(定量限界と基準値との関係が、『定量限界<基準値<定量限界×3』となる場合)には、『』が表示される。『*』が表示された分析対象化合物は、添加濃度と評価対象濃度が異なるため、別途、定量限界濃度相当のマトリックス添加標準溶液を調製して評価する。

*3 ブランク試料及び標準溶液の順に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。)

*4 試料中の濃度が「評価対象濃度(基準値濃度又は定量限界濃度)」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。

*5 面積(高さ)比が、妨害ピークの許容範囲の判定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10に示した。イミダクロプリド添加の真度は74.5~105.1%、併行精度は2.5~9.2%であり、目標値を十分に満たした。6-クロロニコチン酸添加の真度は75.9~98.6%、併行精度は2.2~8.6%であり、目標値を十分に満たした。6-クロロニコチン酸のS/N比の平均値は41.5~105.6でありS/N≥10を十分に満たした。

添加濃度が定量限界濃度と異なる試料について、定量限界の推定を行った結果を表11に示した。また、定量限界の推定における代表的なクロマトグラムを図7に示した。6-クロロニコチン酸のS/N比の平均値は49.8~90.4でありS/N≥10を十分に満たした。

表10 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 ¹ (ppm)	添加濃度 (ppm)	定量限界の評価 ²	検量線					回収率 (%)					真度 (%)	併行精度 (RSD%)	S/N比 ³			備考
							傾き	切片	r ² 値	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5	Max.	Mn.			平均値			
1	イミダクロプリド	牛の筋肉	0.01	0.3	0.3	*	127000	-1960	0.9928	71.4	75.0	79.0	73.4	73.9	74.5	3.8	-	-	#DIV/0!			
		牛の脂肪	0.01	0.3	0.3	*	127000	-1960	0.9928	72.0	76.1	75.2	76.4	76.3	75.2	2.5	-	-	#DIV/0!			
		牛の肝臓	0.01	0.3	0.3	*	85900	-1720	0.9970	88.3	97.2	87.1	83.3	83.2	87.8	6.5	-	-	#DIV/0!			
		鶏の筋肉	0.01	0.02	0.02	*	188000	-29	0.9996	84.6	106.8	106.1	104.2	100.4	100.4	9.2	-	-	#DIV/0!			
		鶏卵	0.01	0.02	0.02	*	90200	17	0.9952	76.4	83.3	87.4	94.8	83.7	85.1	7.9	-	-	#DIV/0!			
		牛乳	0.01	0.1	0.1	*	114000	232	0.9930	81.6	93.0	84.8	81.0	82.0	84.5	5.9	-	-	#DIV/0!			
		はちみつ	0.01	0.01	0.01	*	199000	-189	0.9980	89.1	99.8	97.7	101.8	108.6	99.4	7.1	67.6	60.8	64.2			
		うなぎ	0.01	0.01	0.01	*	162000	107	0.9986	102.4	98.3	90.5	94.2	91.3	95.3	5.2	81.8	72.8	77.3			
		さけ	0.01	0.01	0.01	*	162000	107	0.9986	106.3	99.5	110.3	102.4	107.1	105.1	4.0	108.3	102.8	105.6			
		しじみ	0.01	0.01	0.01	*	225000	-92	0.9976	82.2	96.7	87.2	97.6	88.9	90.5	7.2	47.7	35.2	41.5			
2	6-クロロニコチン酸	牛の筋肉	0.01	0.3	0.3	*	127000	-1960	0.9928	71.4	75.0	79.0	73.8	83.1	75.9	6.0	-	-	#DIV/0!			
		牛の脂肪	0.01	0.3	0.3	*	127000	-1960	0.9928	77.5	79.6	79.0	74.7	74.4	77.0	3.1	-	-	#DIV/0!			
		牛の肝臓	0.01	0.3	0.3	*	85900	-1720	0.9970	88.5	90.7	91.8	87.4	91.8	85.0	2.2	-	-	#DIV/0!			
		鶏の筋肉	0.01	0.02	0.02	*	188000	-29	0.9996	98.0	101.1	93.0	97.5	103.6	98.6	4.1	-	-	#DIV/0!			
		鶏卵	0.01	0.02	0.02	*	90200	17	0.9952	82.2	85.7	84.3	81.3	94.5	85.6	6.1	-	-	#DIV/0!			
		牛乳	0.01	0.1	0.1	*	114000	232	0.9930	82.6	84.8	75.1	82.8	78.6	80.8	4.8	-	-	#DIV/0!			
		はちみつ	0.01	0.01	0.01	*	199000	-189	0.9980	87.6	92.2	98.2	102.4	96.6	95.4	6.0	-	-	#DIV/0!			
		うなぎ	0.01	0.01	0.01	*	206000	176	0.9980	86.1	102.9	89.1	92.4	84.1	90.9	8.1	-	-	#DIV/0!			
		さけ	0.01	0.01	0.01	*	206000	176	0.9980	87.7	108.1	95.7	93.2	88.9	94.7	8.6	-	-	#DIV/0!			
		しじみ	0.01	0.01	0.01	*	199000	-189	0.9980	88.8	85.8	93.5	87.2	91.7	89.4	3.6	-	-	#DIV/0!			

*1 基準値は、基準値未設定の場合には一律基準 (0.01 ppm) を用いる。
 2 添加濃度が定量限界濃度と異なる場合には、『』が表示される。その場合には、S/N比の算出は不要であるが、別途、定量限界の推定を行う。
 *3 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 (Mn.) のそれぞれのS/N比を求める。

表11 定量限界の推定

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (mg/kg)	基準値 ¹ (ppm)	添加濃度 (ppm)	定量限界の評価 ²	標準溶液濃度 ³ (mg/L)	ピーク面積 (高さ) ⁴									S/N比		平均値		備考
								面積又は高さの別	ブランク ⁵	マトリックス添加標準溶液			溶媒標準溶液			n=1	n=2	面積比 (%) ⁶	S/N比		
1	6-クロロニコチン酸	牛の筋肉	0.01	0.3	0.3	*	0.001	面積	0	853	880	866.5	861	879	870.0	79.9	58.6	99.6	69.3		
		牛の脂肪	0.01	0.3	0.3	*	0.001	面積	0	1619	1616	1617.7	1685	1536	1610.4	53.3	46.2	100.5	49.8		
		牛の肝臓	0.01	0.3	0.3	*	0.001	面積	0	829	798	813.5	799	800	799.5	58.3	57.3	101.8	57.8		
		鶏の筋肉	0.01	0.02	0.02	*	0.001	面積	0	1769	1755	1762.0	1874	2011	1942.5	91.5	89.3	90.7	90.4		
		鶏卵	0.01	0.02	0.02	*	0.001	面積	0	948	977	962.5	1078	1021	1049.4	80.3	79.0	91.7	79.7		
		牛乳	0.01	0.1	0.1	*	0.001	面積	0	1195	1186	1190.9	1215	1189	1202.1	92.9	63.8	99.1	78.4		
		はちみつ	0.01	0.01	0.01	*												#DIV/0!	#DIV/0!		
		うなぎ	0.01	0.01	0.01	*												#DIV/0!	#DIV/0!		
		さけ	0.01	0.01	0.01	*												#DIV/0!	#DIV/0!		
		しじみ	0.01	0.01	0.01	*												#DIV/0!	#DIV/0!		

*1 基準値は、基準値未設定の場合には一律基準 (0.01 ppm) を用いる。
 2 定量限界の推定を行う対象 (添加濃度と定量限界濃度と異なる場合) には、『』が表示される。
 *3 試料中の濃度が定量限界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。
 *4 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回以上測定する。(必要に応じて起爆注入を行う。)
 *5 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。
 *6 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。

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12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。6-クロロニコチン酸の面積比は0.91~1.04であり、測定への影響は少ないものと考えられた。

添加回収試験における真度を表12で求めたピーク面積比で除して補正真度を求め、表13に示した。補正真度はイミダクロプリド添加で78.5~108.0%、6-クロロニコチン酸添加で80.4~106.0%であり、試料マトリックスの測定への影響と真度との間に矛盾は見られなかった。

表12 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 ¹ (ppm)	添加濃度 (ppm)	標準溶液濃度 ² (mg/L)	ピーク面積 (高さ) ³									備考
							面積又は高さの別	ブランク ⁴	マトリックス添加標準溶液 ⁵			溶媒標準溶液			ピーク面積 (高さ) 比 ⁶	
1	6-クロロニコチン酸	牛の筋肉	0.01	0.3	0.3	0.03	面積	0	33554	32261	32907.5	37046	35633	36339.5	0.91	
		牛の脂肪	0.01	0.3	0.3	0.03	面積	0	62658	61961	62309.5	65981	64051	65016.0	0.96	
		牛の肝臓	0.01	0.3	0.3	0.03	面積	0	28545	28313	28429.0	30931	28765	29848.0	0.95	
		鶏の筋肉	0.01	0.02	0.02	0.002	面積	0	3532	3397	3464.2	3696	3753	3724.4	0.93	
		鶏卵	0.01	0.02	0.02	0.002	面積	0	2973	3034	3003.5	2835	2972	2903.5	1.03	
		牛乳	0.01	0.1	0.1	0.01	面積	0	8558	8411	8484.5	8579	8718	8648.5	0.98	
		はちみつ	0.01	0.01	0.01	0.001	面積	0	1561	1655	1608.0	1608	1616	1612.0	1.00	
		うなぎ	0.01	0.01	0.01	0.001	面積	0	1941	1859	1900.0	1818	1845	1831.5	1.04	
		さけ	0.01	0.01	0.01	0.001	面積	0	2102	2012	2057.0	2028	1977	2002.5	1.03	
		しじみ	0.01	0.01	0.01	0.001	面積	0	2210	2206	2207.8	2127	2117	2122.2	1.04	

*1 基準値は、基準値未設定の場合には一律基準 (0.01 ppm) を用いる。
 *2 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。
 *3 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。)
 *4 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。
 *5 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。
 *6 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 13 補正真度

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	基準値 ^{*1} (ppm)	添加濃度 (ppm)	真度 (%)	ピーク面積比 (%)	補正真度 (%)	備考
1	イミダクロプリド	牛の筋肉	0.01	0.3	0.3	74.5	0.91	82.3	
		牛の脂肪	0.01	0.3	0.3	75.2	0.96	78.5	
		牛の肝臓	0.01	0.3	0.3	87.8	0.95	92.2	
		鶏の筋肉	0.01	0.02	0.02	100.4	0.93	108.0	
		鶏卵	0.01	0.02	0.02	85.1	1.03	82.3	
		牛乳	0.01	0.1	0.1	84.5	0.98	86.1	
		はちみつ	0.01	0.01	0.01	99.4	1.00	99.7	
		うなぎ	0.01	0.01	0.01	95.3	1.04	91.9	
		さけ	0.01	0.01	0.01	105.1	1.03	102.2	
		しじみ	0.01	0.01	0.01	90.5	1.04	87.0	
2	6-クロロニコチン酸	牛の筋肉	0.01	0.3	0.3	75.9	0.91	83.8	
		牛の脂肪	0.01	0.3	0.3	77.0	0.96	80.4	
		牛の肝臓	0.01	0.3	0.3	90.0	0.95	94.5	
		鶏の筋肉	0.01	0.02	0.02	98.6	0.93	106.0	
		鶏卵	0.01	0.02	0.02	85.6	1.03	82.8	
		牛乳	0.01	0.1	0.1	80.8	0.98	82.3	
		はちみつ	0.01	0.01	0.01	95.4	1.00	95.6	
		うなぎ	0.01	0.01	0.01	90.9	1.04	87.6	
		さけ	0.01	0.01	0.01	94.7	1.03	92.1	
		しじみ	0.01	0.01	0.01	89.4	1.04	85.9	

*1 基準値は、基準値未設定の場合には一律基準(0.01 ppm)を用いる。

4. 考察

抽出溶媒としては*n*-ヘキサン並びに水及びメタノール (1 : 3) 混液を用い、水及びメタノール (1 : 3) 混液層を採ったところ、良好な結果が得られた。酸化法はメーカー提供資料の方法に倣い、塩基性下で過マンガン酸カリウム溶液を加え、15分間加熱還流することでイミダクロプリドを6-クロロニコチン酸に酸化することができた。酸化反応後の溶液を酢酸エチルで抽出を行ったところ、良好な結果が得られた。

開発した方法を用いて、牛の筋肉等10食品の添加回収試験を行った結果、選択性は良好で何れの試料においても妨害ピークは認められず、イミダクロプリド添加の真度は74.5~105.1%、併行精度は2.5~9.2%、6-クロロニコチン酸添加の真度は75.9~98.6%、併行精度は2.2~8.6%の良好な結果が得られたことから、本試験法は、陸棲哺乳類に属する動物の筋肉、脂肪及び肝臓並びに魚介類、鶏卵、はちみつ等の畜水産物に適応可能であると判断された。

[結論]

畜水産物中のイミダクロプリド及び6-クロロピリジル基を有する代謝物の試験法として、試料から*n*-ヘキサン並びに水及びメタノール (1 : 3) 混液を用いて抽出し、水及びメタノール (1 : 3) 混液層を採った。塩基性下で過マンガン酸カリウムを用いて加熱還流を行いイミダクロプリド及び6-クロロピリジル基を有する代謝物を6-クロロニコチン酸に酸化した。酸化反応後酢酸エチルに転溶し、LC-MS/MSで定量及び確認する方法を開発した。

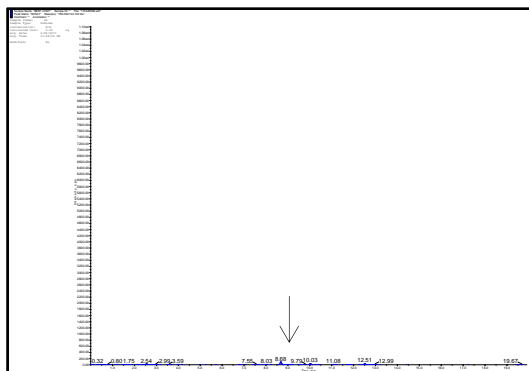
開発した試験法を牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、鶏の筋肉、鶏卵、牛乳、はちみつ、うなぎ、さけ及びしじみに適用した結果、選択性は良好で何れの試料においても妨害ピークは認められず、イミダクロプリド添加の真度は74.5~105.1%、併行精度は2.5~9.2%、6-クロロニコチン酸添加の真度は75.9~98.6%、併行精度は2.2~8.6%、定量限界は0.01 mg/kgが可能であることが確認できた。

[参考文献]

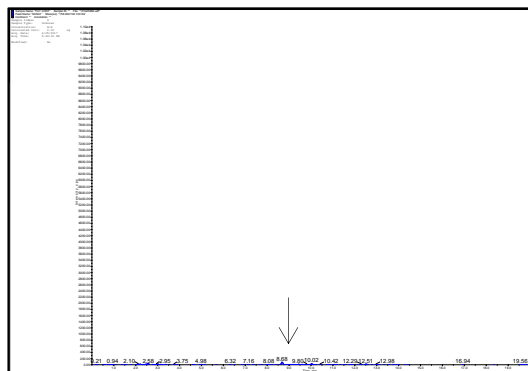
株式会社提供資料

6-クロロニコチン酸の添加回収試験におけるクロマトグラム

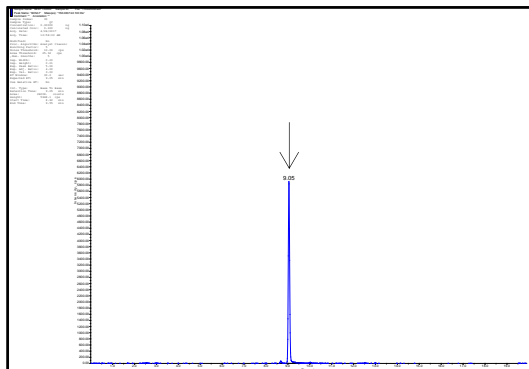
ブランク



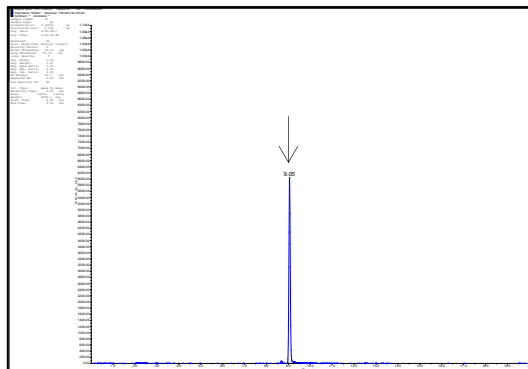
ブランク



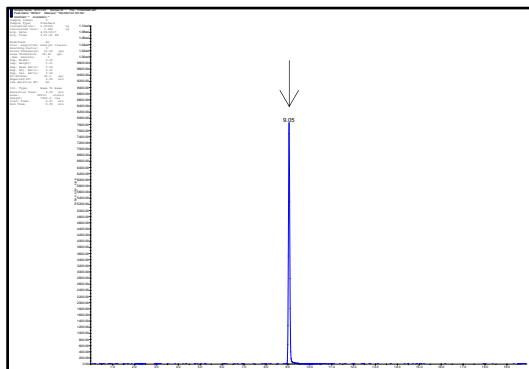
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

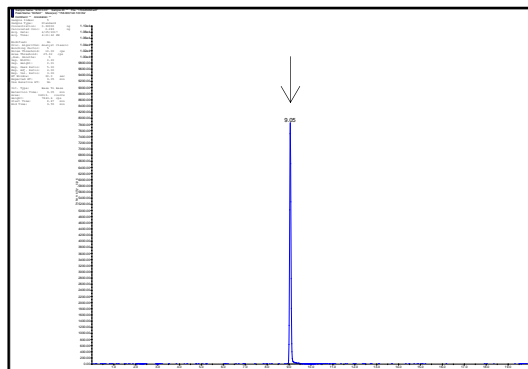


図 6-1 牛の筋肉の SRM クロマトグラム

6-クロロニコチン酸

(m/z +158→122)

添加濃度 : 0.3 ppm

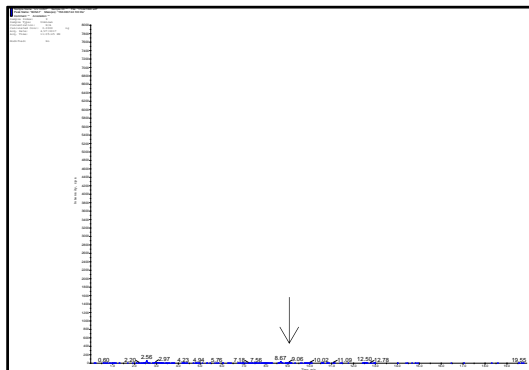
図 6-2 牛の脂肪の SRM クロマトグラム

6-クロロニコチン酸

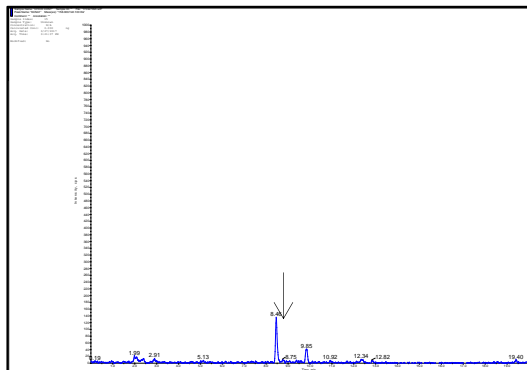
(m/z +158→122)

添加濃度 : 0.3 ppm

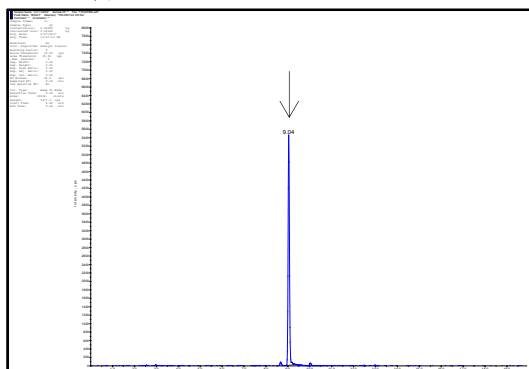
ブランク



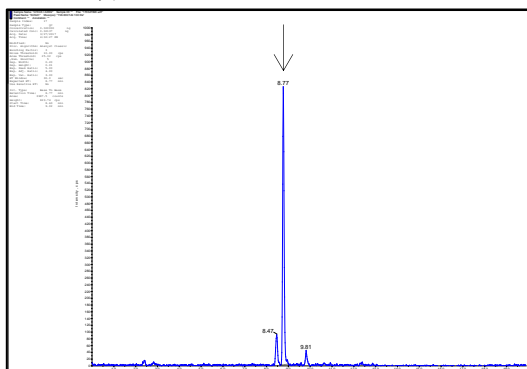
ブランク



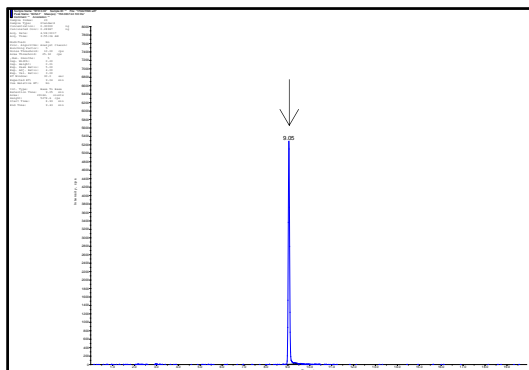
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

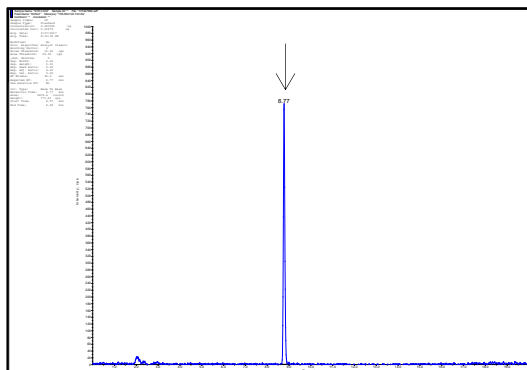
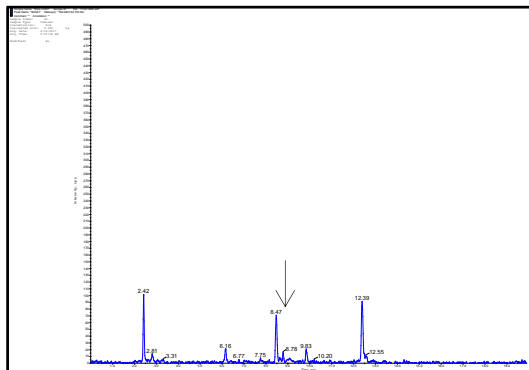


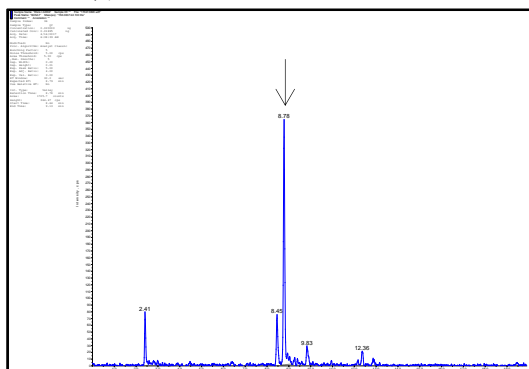
図 6-3 牛の肝臓の SRM クロマトグラム
6-クロロニコチン酸
(m/z +158→122)
添加濃度 : 0.3 ppm

図 6-4 鶏の筋肉の SRM クロマトグラム
6-クロロニコチン酸
(m/z +158→122)
添加濃度 : 0.02 ppm

ブランク



添加試料



標準溶液

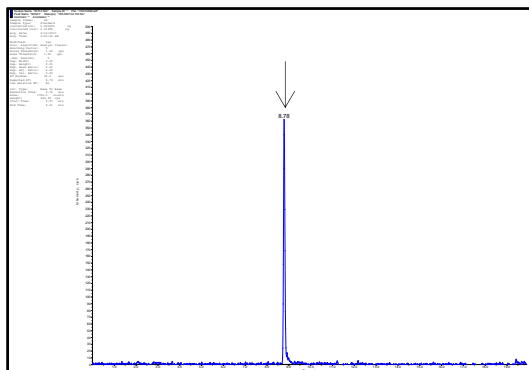


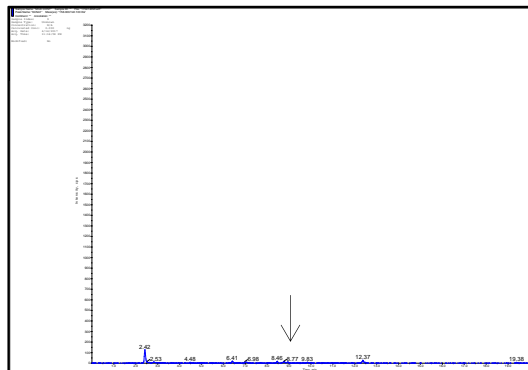
図 6-5 鶏卵 SRM クロマトグラム

6-クロロニコチン酸

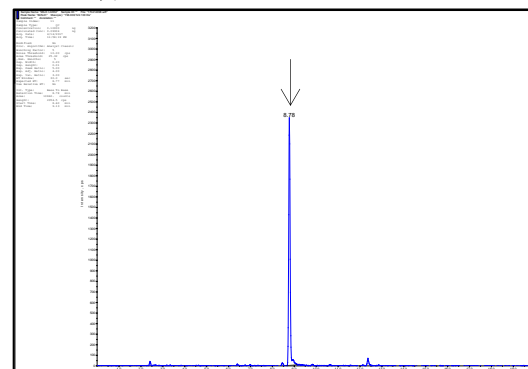
(m/z +158→122)

添加濃度 : 0.02 ppm

ブランク



添加試料



標準溶液

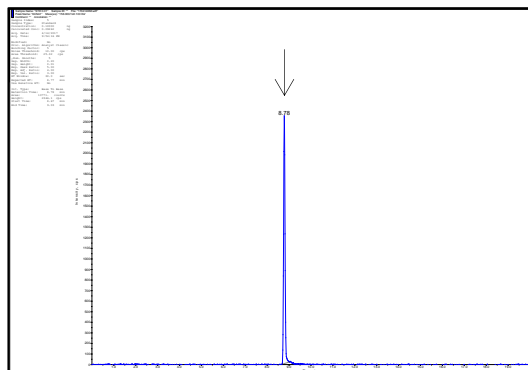


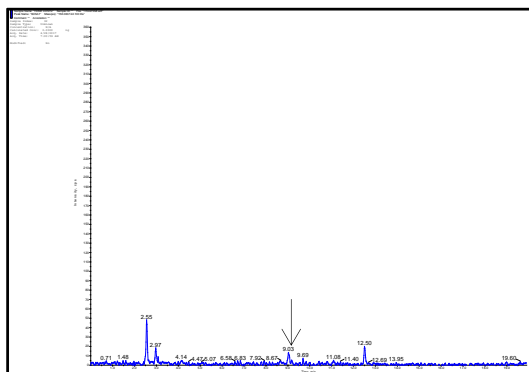
図 6-6 牛乳の SRM クロマトグラム

6-クロロニコチン酸

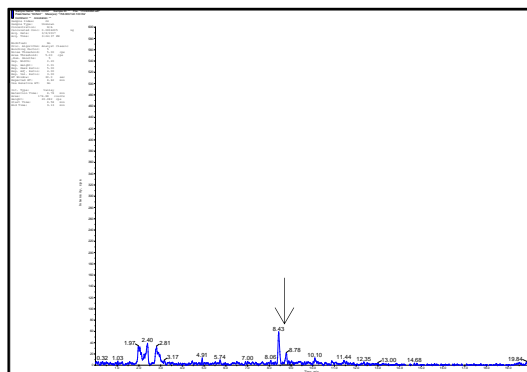
(m/z +158→122)

添加濃度 : 0.1 ppm

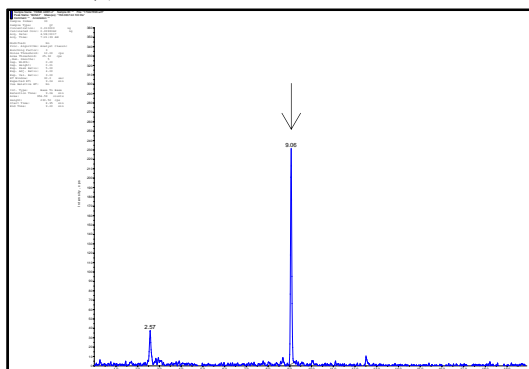
ブランク



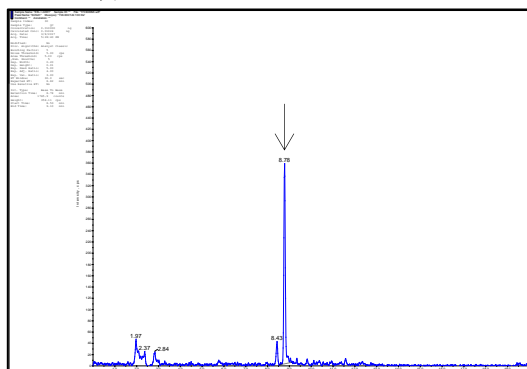
ブランク



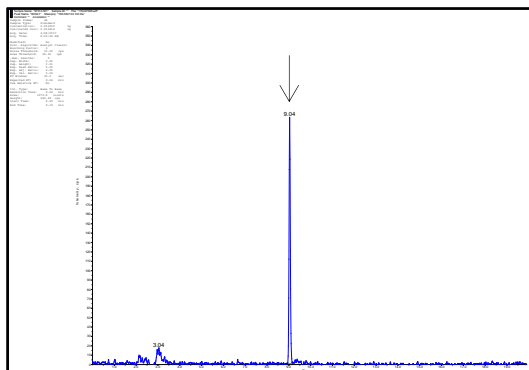
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

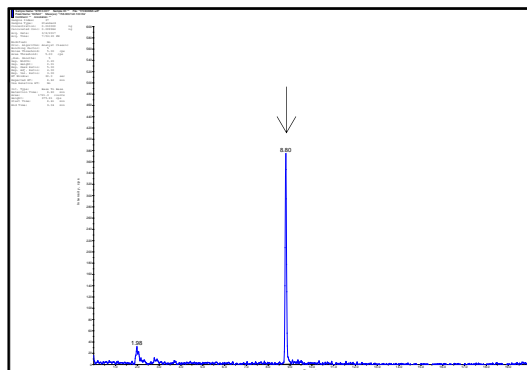
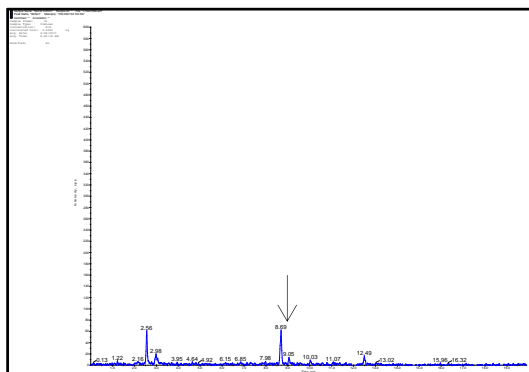


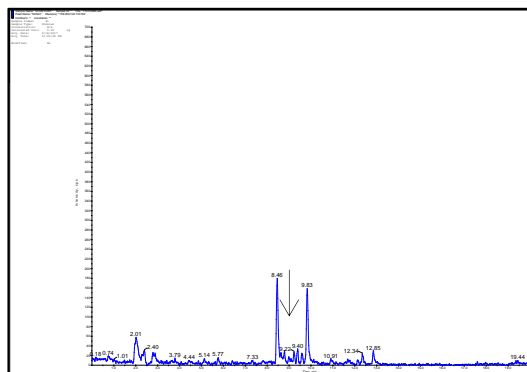
図 6-7 はちみつの SRM クロマトグラム
6-クロロニコチン酸
($m/z + 158 \rightarrow 122$)
添加濃度 : 0.01 ppm

図 6-8 うなぎの SRM クロマトグラム
6-クロロニコチン酸
($m/z + 158 \rightarrow 122$)
添加濃度 : 0.01 ppm

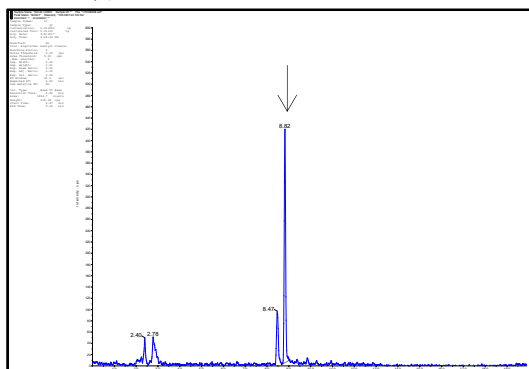
ブランク



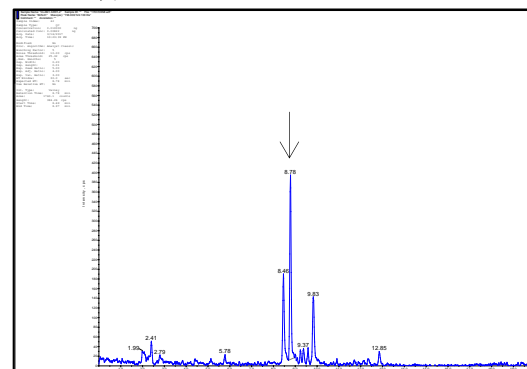
ブランク



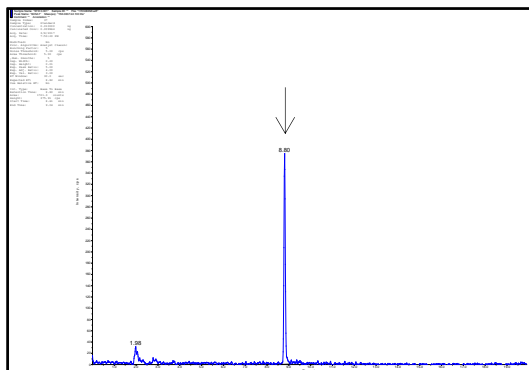
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

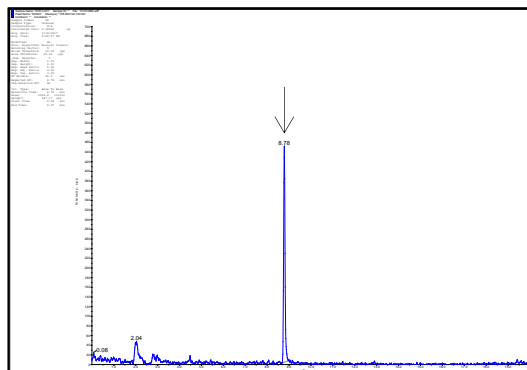


図 6-9 さけの SRM クロマトグラム

6-クロロニコチン酸

(m/z +158→122)

添加濃度 : 0.01 ppm

図 6-10 しじみの SRM クロマトグラム

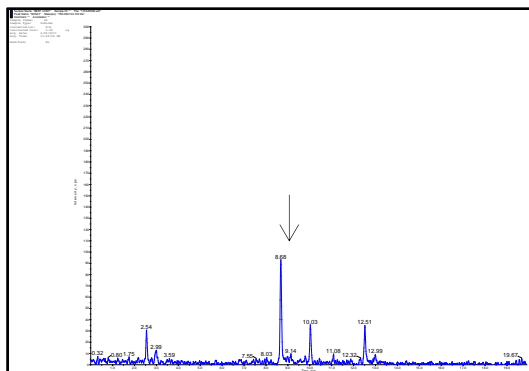
6-クロロニコチン酸

(m/z +158→122)

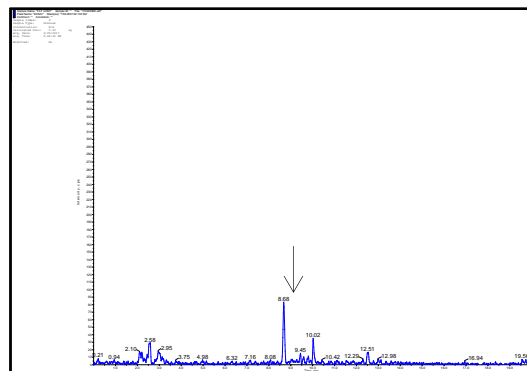
添加濃度 : 0.01 ppm

6-クロロニコチン酸の定量限界の推定におけるクロマトグラム

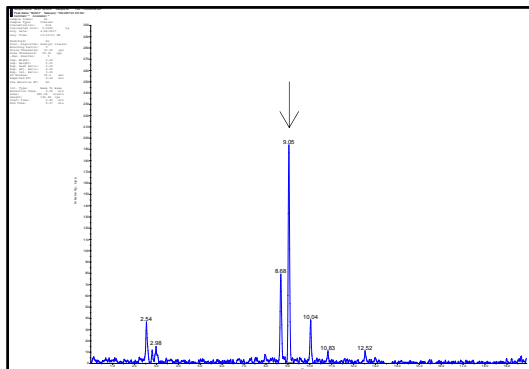
ブランク



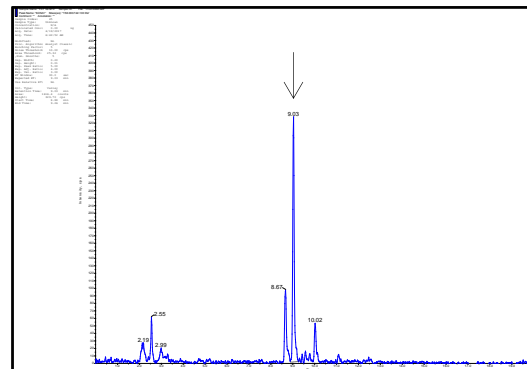
ブランク



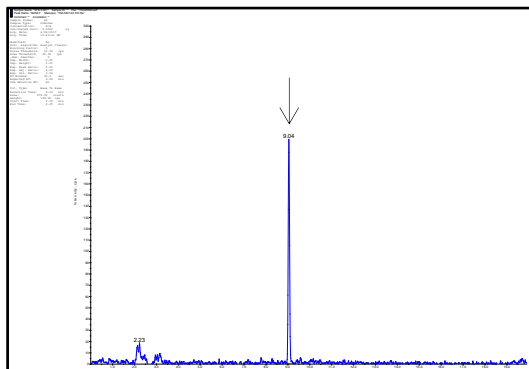
マトリックス添加標準溶液



マトリックス添加標準溶液



溶媒標準溶液



溶媒標準溶液

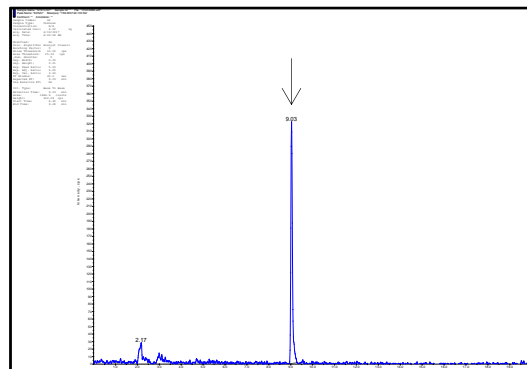
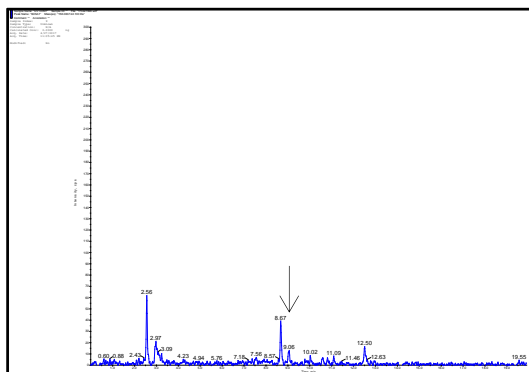


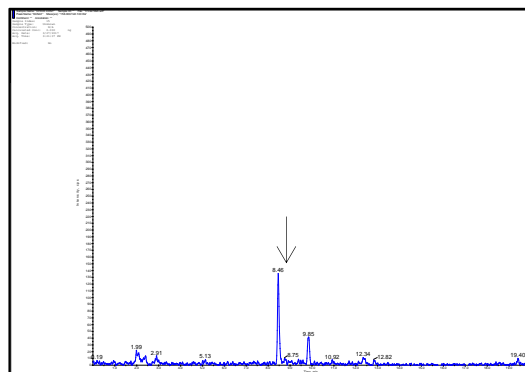
図 7-1 牛の筋肉の SRM クロマトグラム
6-クロロニコチン酸
試料中 0.01 ppm 相当

図 7-2 牛の脂肪の SRM クロマトグラム
6-クロロニコチン酸
試料中 0.01 ppm 相当

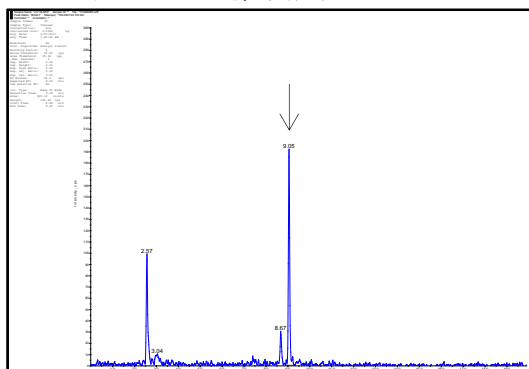
ブランク



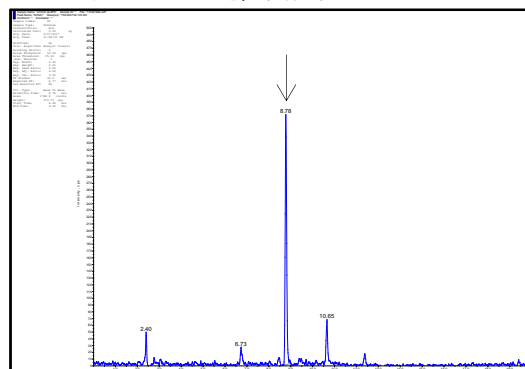
ブランク



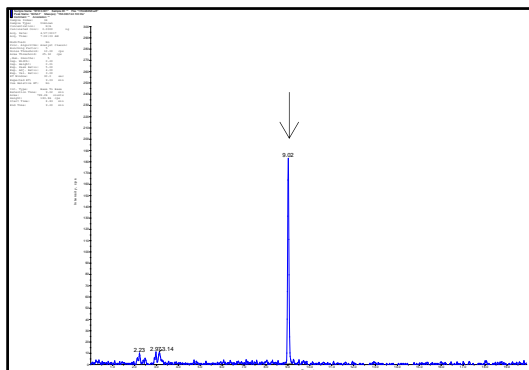
マトリックス添加標準溶液



マトリックス添加標準溶液



溶媒標準溶液



溶媒標準溶液

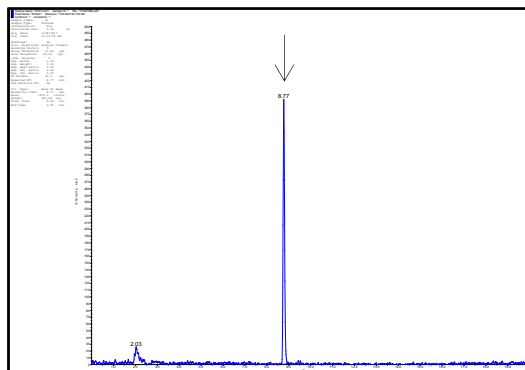
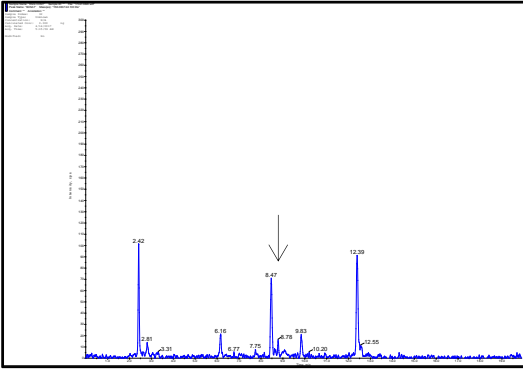


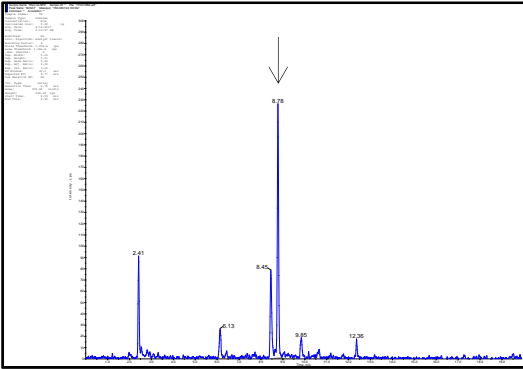
図 7-3 牛の肝臓の SRM クロマトグラム
6-クロロニコチン酸
試料中 0.01 ppm 相当

図 7-4 鶏の筋肉の SRM クロマトグラム
6-クロロニコチン酸
試料中 0.01 ppm 相当

ブランク



マトリックス添加標準溶液



溶媒標準溶液

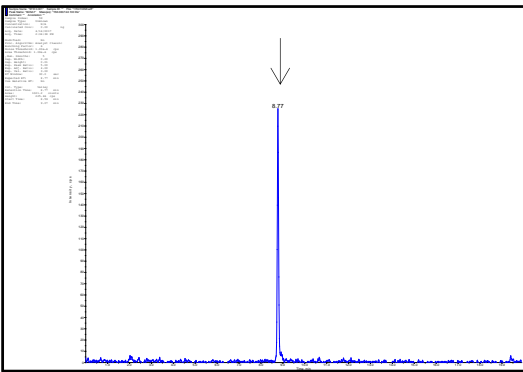
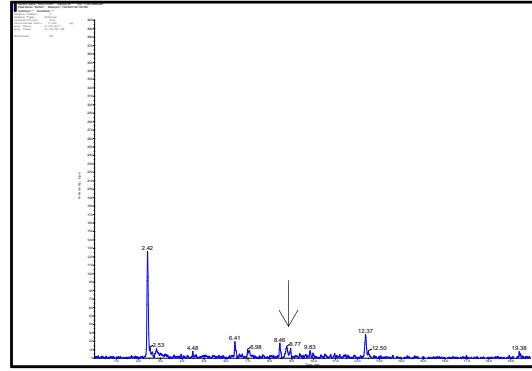
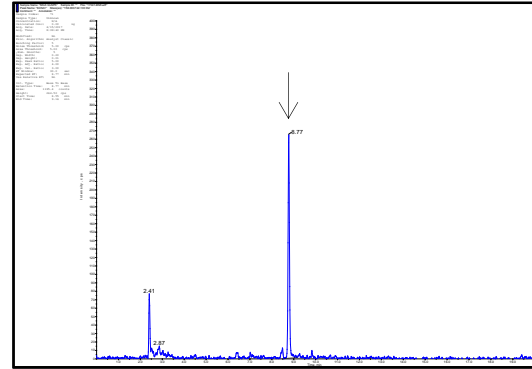


図 7-5 鶏卵の SRM クロマトグラム
6-クロロニコチン酸
試料中 0.01 ppm 相当

ブランク



マトリックス添加標準溶液



溶媒標準溶液

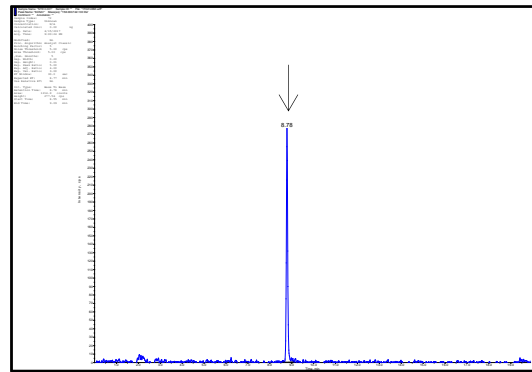
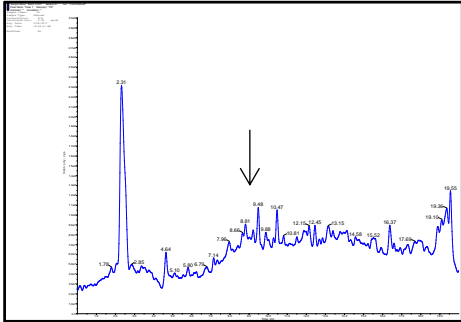
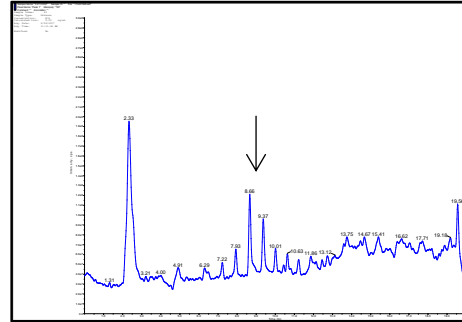


図 7-6 牛乳の SRM クロマトグラム
6-クロロニコチン酸
試料中 0.01 ppm 相当

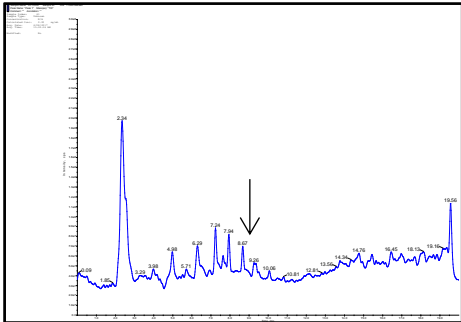
牛の筋肉



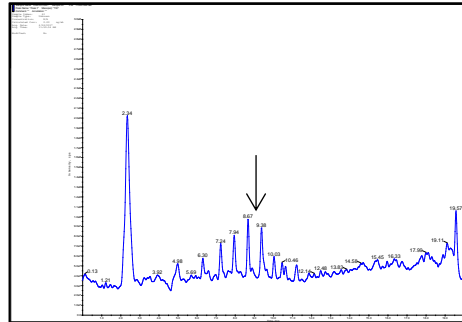
牛の脂肪



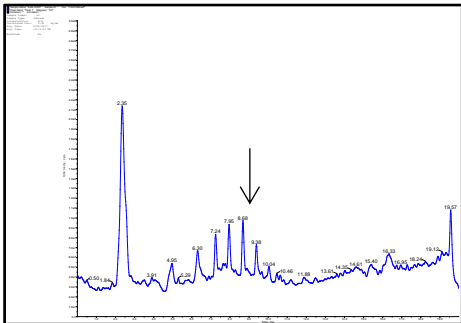
牛の肝臓



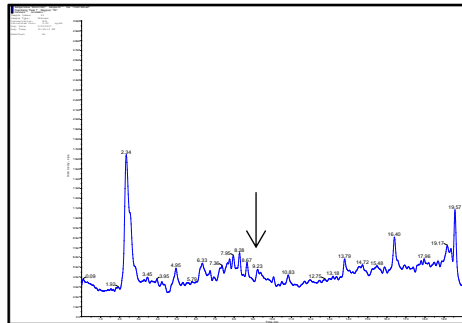
鶏の筋肉



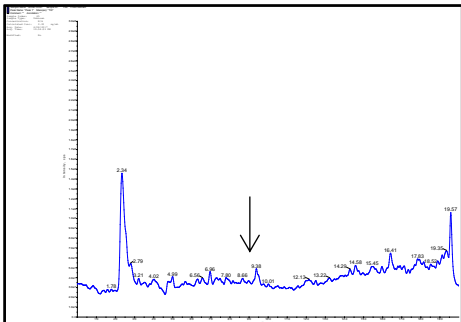
鶏卵



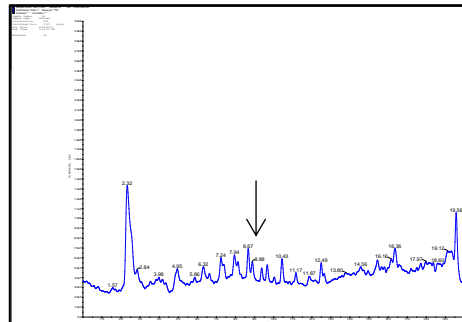
牛乳



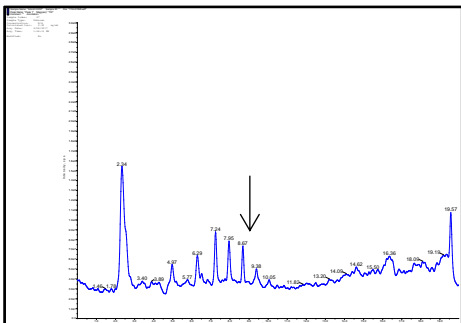
はちみつ



うなぎ



さけ



しじみ

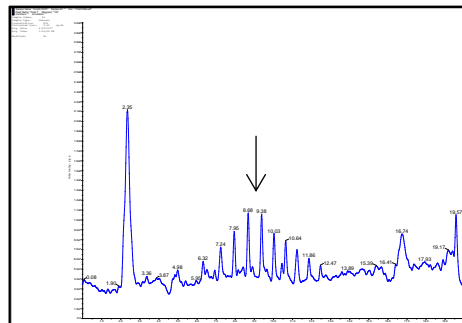


図 8 ブランク試料のトータルイオンクロマトグラム (スキャン範囲：100～500 m/z)