

STQ 法におけるハチミツ中ネオニコチノイド分析への応用

○小西賢治、土居恵子、佐々野僚一
株式会社アイスティサイエンス

【諸言】

日本を含む各国で広く使用されているネオニコチノイド系農薬はニコチン様物質を意味し、ニコチンに比べ急性毒性は低いとされているが、アセチルコリン受容体に作用するため、ヒトへの影響も懸念される。人体への影響としては、神経障害症状や免疫症状などがあげられている。ネオニコチノイド系農薬はいずれも浸透移行性があり、粒剤や箱粒剤を土壤に混和、根元に散布することにより有効成分が根から吸収されて植物全体に浸透する。そのため、ハチミツの蜜源である作物に残留していた場合、ハチミツにも残留する可能性があり、ハチミツ中の残留分析が必要である。実際に国産のハチミツからネオニコチノイド系農薬の一部が検出されたとの報告がある。また 1990 年代初めから世界各地でミツバチの大量死、大量失踪が報告されており、ネオニコチノイド系農薬との因果関係が指摘されている。EU など諸外国で規制の動きがあるため、ネオニコチノイド系農薬の残留農薬分析の必要性が増してくると思われる。国内で販売されているネオニコチノイド系農薬の内、イミダクロプリド、チアメトキサム、クロチアニジン、アセタミプリド、チアクロプリドの 5 成分について検討を行った。STQ 法を応用することで、ネオニコチノイド系農薬を含んだ多成分一斉分析を検討した。

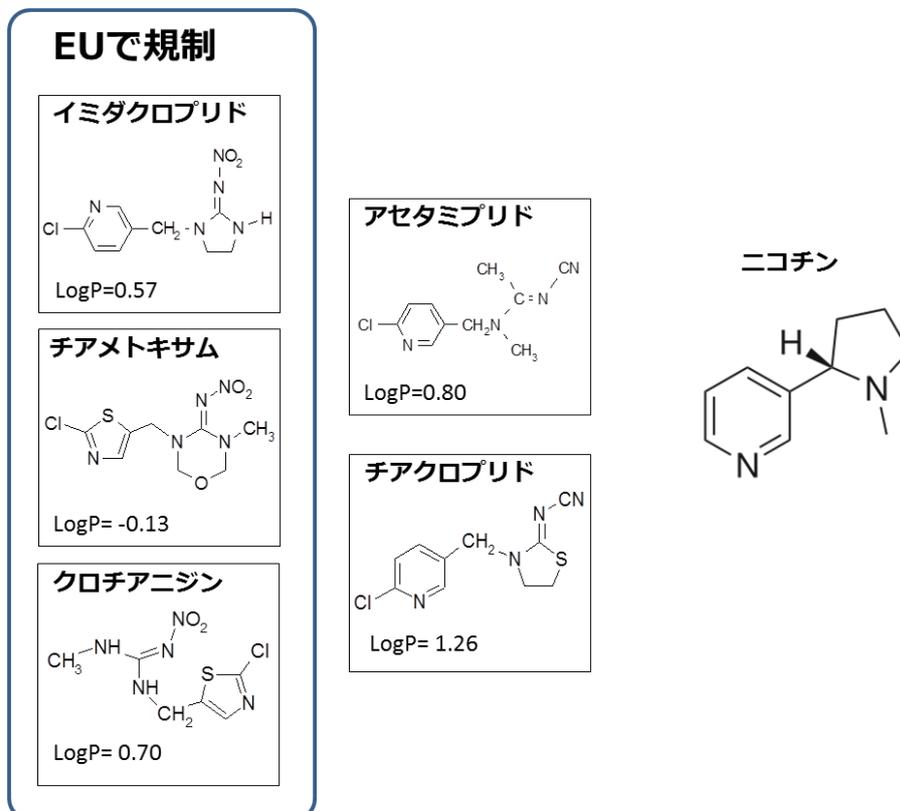


図 1 ネオニコチノイド系殺虫剤の構造式

【実験方法】

1. 試薬など

1) 標準品

PL2005 農薬 LC/MS Mix 4~6、8~10 (20ug/mL)、PL2005 農薬 LC/MS Mix7 (50ug/mL) を混合し 2ug/mL となるようにアセトニトリルで希釈したもの (STD①)、および STQ-LC 法用農薬混合標準溶液 (林純薬工業) (20ug/mL) をアセトニトリルで 2ug/mL となるように希釈したもの (STD②) を使用した。

2) その他試薬

その他試薬はそれぞれ以下の会社の製品を使用した。試薬のグレードについて特に記載のないものは、残留農薬分析用グレードを使用した。

【関東化学】

塩化ナトリウム、クエン酸水素二ナトリウム・1.5 水和物 (鹿 1 級)、クエン酸三ナトリウム・2 水和物 (特級)、アセトン、アセトニトリル、メタノール、メタノール (LC/MS 用)

【和光純薬工業】

硫酸マグネシウム (特級)、酢酸アンモニウム (特級)

【オルガノ】

超純水 (PURELAB Ultra により作成)

2. 試料

和歌山市内の食品スーパーに流通していたハチミツを使用した。

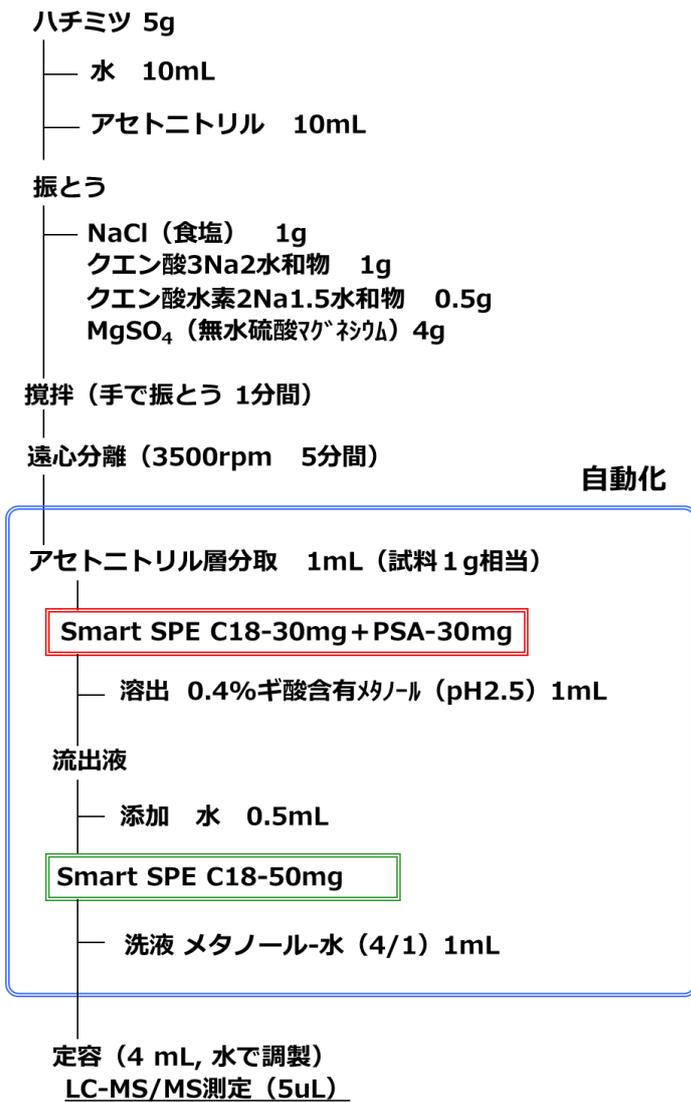
3. 装置及び測定条件

自動前処理装置	:	ST-L300 (アイスティサイエンス)
HPLC	:	Prominence (島津製作所)
MS/MS	:	API3200 (エービー・サイエックス)
分析カラム	:	Lcolumn2 ODS 2.1×150mm 3.0um (化学物質評価研究機構)
移動相	A液	: 0.5mmol/L 酢酸アンモニウム水溶液
	B液	: 0.5mmol/L 酢酸アンモニウム含有メタノール
流速	:	0.2ml/min
注入量	:	5uL
分析時間	:	30min
カラム温度	:	40℃
イオン化モード	:	ESI Postive
イオンスプレー電圧	:	5500V
イオン源温度	:	350℃
測定モード	:	MRM

グラジエント条件

time(min)	0	1	17	23	23.1	30
A(%)	90	50	2	2	90	90
B(%)	10	50	98	98	10	10

4. 前処理



残留農薬一斉分析 STQ-LC 法を参考に添加回収試験を行った。試料 5g に水 10mL を添加しボルトックス攪拌機で水と試料をよく混和させた。抽出溶媒としてアセトニトリルを 10mL 添加した。振とう抽出を行い、塩化ナトリウム 1g、クエン酸三ナトリウム・二水和物 1g、クエン酸水素二ナトリウム・1.5 水和物 0.5g、硫酸マグネシウム (無水) 4g を添加し、1 分間よく振とう攪拌した。遠心分離 (3500rpm 5 分間) を行い、アセトニトリル層をバイアルに詰めて前処理装置 (ST-L300) を用いて固相精製を行った。前処理フローの詳細は図 2 に示す。

図 2 前処理フロー

5. 添加回収試験

試料 5g に対し STD①および STD②を 25uL ずつ添加して添加回収試験を行った。(試料中濃度 0.01ug/mL) また、マトリックスによる影響を調べるため、前処理後に農薬を添加し、スパイク試料とした。

【結果および考察】

抽出操作について、抽出溶媒にアセトニトリルと過剰量の塩を加えて遠心分離を行うことで遠沈管の中でアセトニトリルと飽和食塩水による液液分配が行われる。LogPowの低い高極性成分は液液分配時に水層に分配する可能性があり、ネオニコチノイド系農薬もLogPowの低い傾向にあったが、添加回収試験の結果よりアセトニトリルへの分配が可能であることが示された。

ハチミツは試料の固形分が少ないため、有機層と水層の間の固形物層が薄く（図3）少しの衝撃で層が崩れる可能性があるため、操作に注意が必要である。衝撃により層が崩れてしまった際には再度遠心分離を行うことで対応が可能であると思われる。

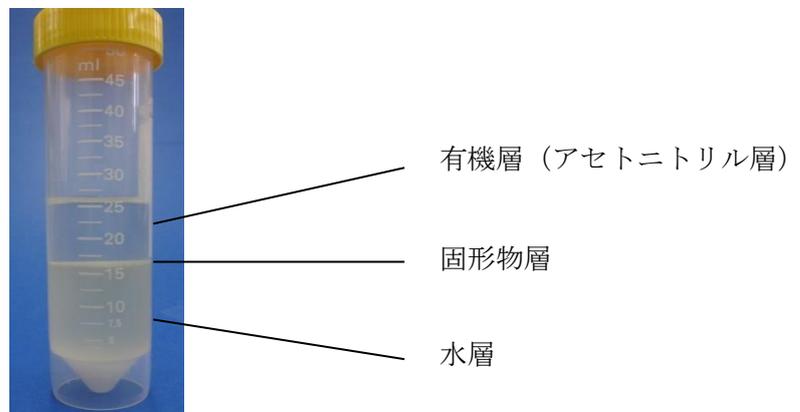


図3 遠心分離後の遠沈管の様子

ネオニコチノイド系農薬の添加回収試験の結果をTable1に示す。マトリックス検量線を用いて回収率を算出すると、全ての成分で良好な回収率が得られた。アセタミプリドに関しては、ブランク試料に試料中濃度0.15ng/mL相当(バイアル中濃度12ng/mL)のピークが検出されており、添加回収率を換算すると114%となった。それぞれの成分において定量を妨害するピークは見られなかった。また、大きなイオン化阻害も見られず、良好な精製ができたと思われる。

Table 1 ネオニコチノイド系農薬の回収率

化合物名	絶対検量線 回収率 (%)	マトリックス検量線 回収率 (%)
アセタミプリド	126	98
クロチアジン	72	114
イミダクロプリド	90	109
チアクロプリド	94	110
チアメトキサム	68	88

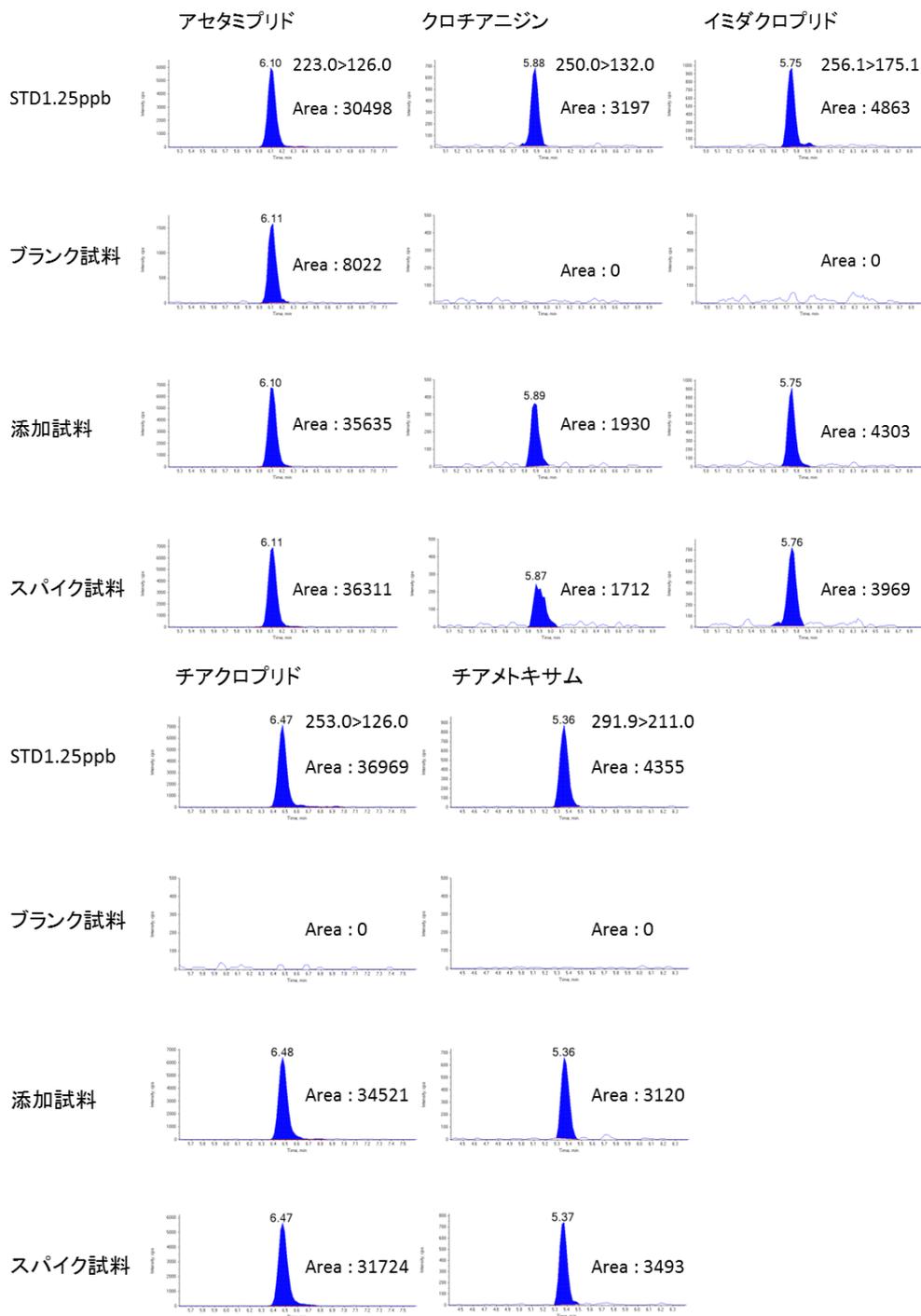


図 4 ハチミツ中ネオニコチノイド系農薬の MRM クロマトグラム

感度についても、5 成分中最も感度が低かったクロチアニジンにおいても $S/N \geq 25$ と十分な感度を示した。今回はハチミツ中に基準値が定められていなかったため一律基準値の $0.01\mu\text{g}/\text{mL}$ 相当で添加回収試験を行ったが、より低濃度領域での測定も可能であると思われる。

ネオニコチノイド系農薬以外の成分については、Table 2 に示す。絶対検量線とマトリックス検量線による回収率を併記している。絶対検量線による定量では全 222 項目中 195 成分が回収率 70~120%の範囲内に入っており夾雑物による影響はほとんどないと思われる。精製操作を自動化することで、作業者の熟練度に左右されない良好な再現性が期待できる。

【まとめ】

残留農薬一斉分析 STQ-LC 法を用いてハチミツ中のネオニコチノイド分析を行った。ネオニコチノイド系農薬 5 成分について添加回収試験を行ったところ、0.15ng/mL 相当のアセタミプリドが検出された。またそれぞれの成分において定量を妨害するピークは見られなかった。また、STQ-LC 法を用いることでネオニコチノイド系農薬以外の成分についても良好な回収率が得られた。試料中濃度 0.01ug/mL での添加回収試験において全 222 項目中 195 項目が 70~120%の回収率が得られた。

参考文献

- 1) http://www.maff.go.jp/j/nouyaku/n_mitubati/qanda.html
- 2) http://www.mizuho-ir.co.jp/publication/report/2013/mhir07_chemi.html
- 3) 谷澤春奈, LC/MS/MS を用いた残留農薬の多成分迅速一斉分析法の検討, 第 95 回食品衛生学会学術講演会講演要旨集, P39