

2014年10月16日～17日

第37回 農薬残留分析研究会（仙台国際センター）

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

株式会社アイスティサイエンス

○小西賢治、土居恵子、佐々野僚一



背景

2

- クロチアニジン、イミダクロプリド、チアメトキサムは2013年12月より2年間EU全域で使用禁止。
- 国産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。

➡ **迅速な分析が必要**

目的

- **ハチミツ中ネオニコチノイド系農薬の分析**

⇒ネオニコチノイド系殺虫剤5成分について添加回収試験を行った。

- **ハチミツ中残留農薬の一斉分析**

⇒ネオニコチノイド系農薬を含む222成分について添加回収試験を行った。

➔ **STQ-LC法[※]を使用**

※残留農薬一斉分析法

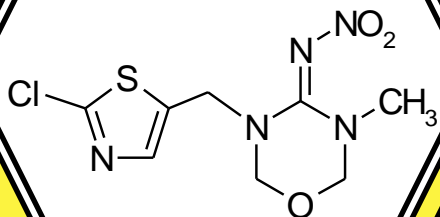
(Solid phase extraction Technique with QuEChERS method)



測定農薬

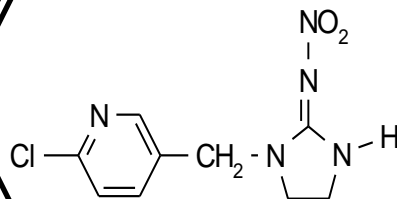
4

チアメトキサム



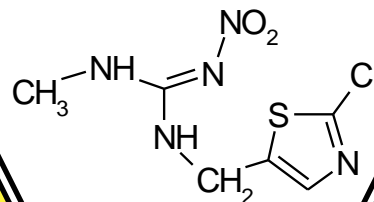
LogP= -0.13

イミダクロプリド



LogP=0.57

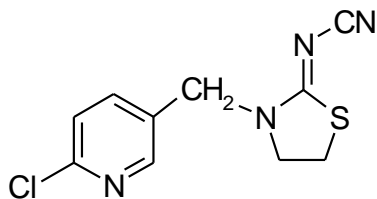
クロチアニジン



LogP=0.70

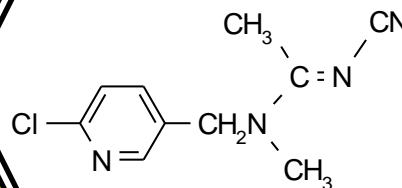
ネオニコ
チノイド
系殺虫剤

チアクロプリド



LogP= 1.26

アセタミプリド

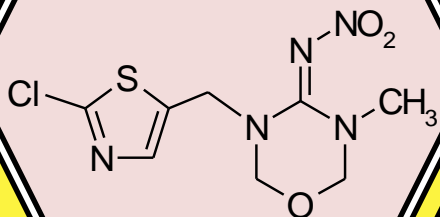


LogP=0.80

測定農薬

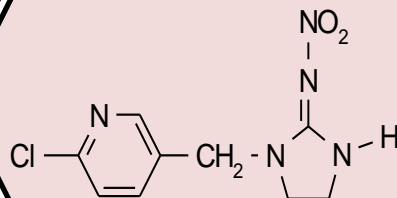
EUで規制

チアメトキサム



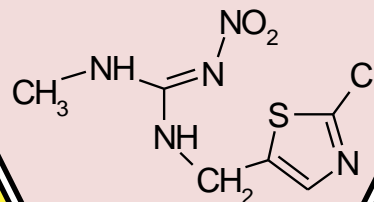
LogP= -0.13

イミダクロプリド



LogP=0.57

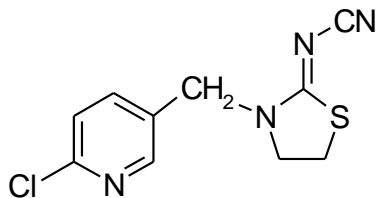
クロチアニジン



LogP=0.70

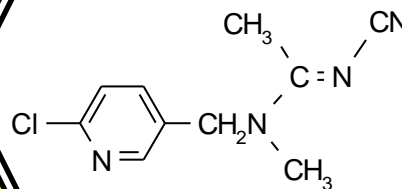
ネオニコチノイド系殺虫剤

チアクロプリド



LogP= 1.26

アセタミプリド



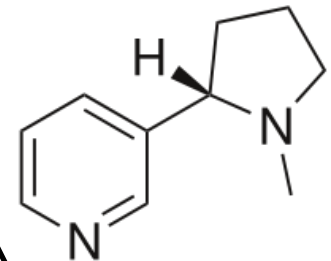
LogP=0.80

5

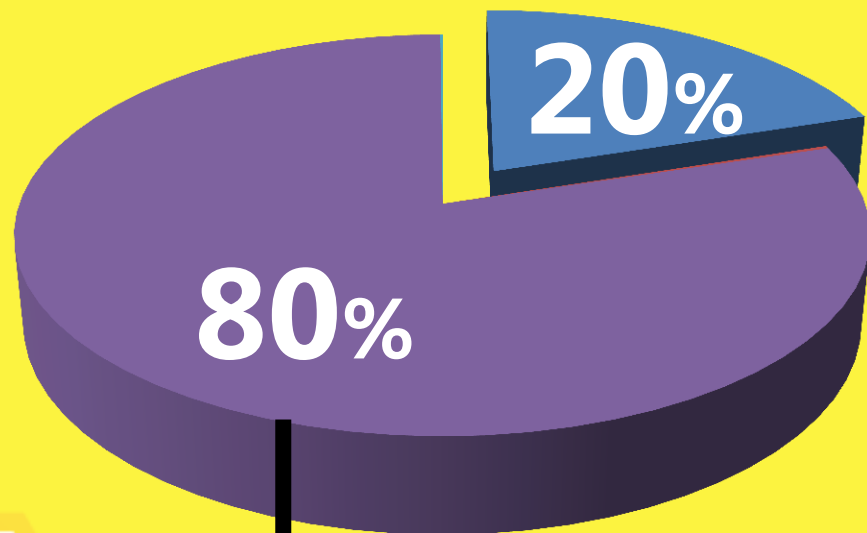
特長

- **ニコチン**と似た構造、性質を持っているが、**毒性は比較的低い**。
- 浸透移行性が高く、根から吸収された成分が植物全体に浸透する。
- 分配係数(LogPow)が低い（＝極性が高い）成分が多い。

ニコチン

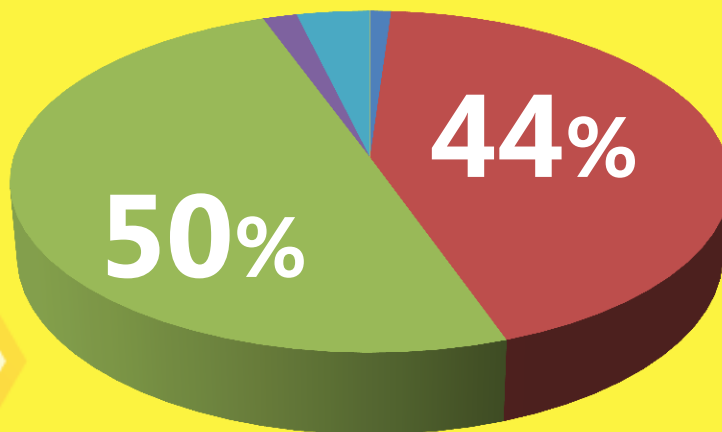


はちみつの成分



- 水分
- タンパク質
- 脂質
- 炭水化物
- 灰分

炭水化物の成分組成



- スクロース
- グルコース
- フルクトース
- マルトース
- ガラクトース

実験方法（使用試薬）



1) 標準品

- PL2005 農薬LC/MS Mix 4~10（林純薬工業）
- STQ-LC法用農薬混合標準溶液（林純薬工業）

2) その他試薬

【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）

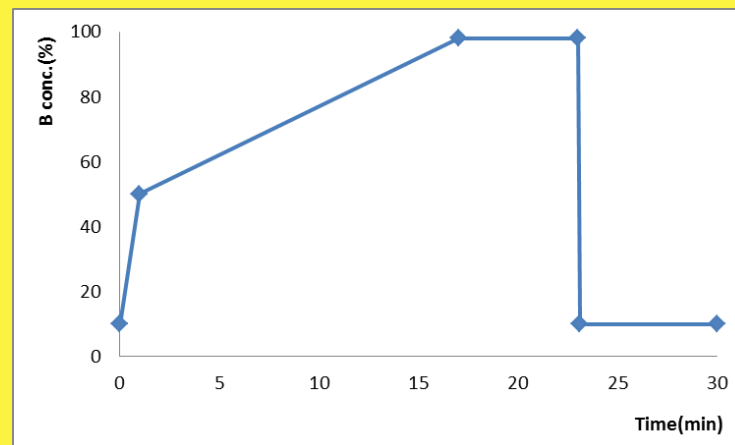
【オルガノ】

超純水（PURELAB Ultraにより作成）

装置および測定条件



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°C
イオン化モード	: ESI Positive
イオンスプレー電圧	: 5500V
イオン源温度	: 350°C
測定モード	: MRM



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

前処理フロー

ハチミツ 5g

— 水 10mL

— アセトニトリル 10mL

振とう

— NaCl (食塩) 1g

クエン酸3Na2水和物 1g

クエン酸水素2Na1.5水和物 0.5g

● MgSO₄ (無水硫酸マグネシウム) 4g

攪拌 (手で振とう 1分間)

遠心分離 (3500rpm 5分間)

上澄みを分取



前処理フロー

Point 1

ハチミツ 5g

— 水 10mL

— アセトニトリル 10mL

試料中水分量と抽出溶媒量が
1 : 1 となるように水分を添加



11

振とう

Point 2

— NaCl (食塩) 1g

— クエン酸3Na2水和物 1g

— クエン酸水素2Na1.5水和物 0.5g

● MgSO₄ (無水硫酸マグネシウム) 4g

NaCl+MgSO₄ : 塩析作用
クエン酸 : 緩衝作用

攪拌 (手で振とう 1分間)

遠心分離 (3500rpm 5分間)

上澄みを分取

ポイント

12



遠心分離前

遠心分離前は全体的に白濁している様子であった。



遠心分離後

有機層、試料層、水層に分かれる。有機層と水層が混ざりやすく、操作に注意が必要である。

前処理フロー

自動化



13

アセトニトリル層分取 1mL (試料 0.5g相当)

Smart SPE C18-30mg + PSA-30mg

溶出 0.4%ギ酸含有メタノール (pH2.5) 1mL

流出液

添加 水 0.5mL

Smart SPE C18-50mg

洗液 メタノール-水 (4/1) 1mL

定容 (4 mL, 水で調製)
LC-MS/MS測定 (5uL)



前処理フロー

14

Point 3

アセトニトリル層分取 1mL (試料 0.5g相当)

Smart SPE C18-30mg + PSA-30mg

溶出 0.4%ギ酸含有メタノール (pH2.5) 1mL

C18 : 無極性
PSA : 陰イオン、極性

流出液

Point 4

添加 水 0.5mL

Smart SPE C18-50mg

洗液 メタノール-水 (4/1) 1mL

水添加により溶媒極性を調整

定容 (4 mL, 水で調製)
LC-MS/MS測定 (5uL)

添加回収試験結果

ネオニコチノイド系農薬のみ抜粋

15

試料	はちみつ			
	試料中添加濃度	10 ppb		n=5
化合物名	絶対検量線 回収率 (%)	RSD (%)	マトリックス検量線 回収率 (%)	RSD (%)
アセタミプリド	95	6	100	6
クロチアニジン	79	6	100	6
イミダクロプリド	97	7	101	7
チアクロプリド	90	4	112	4
チアメトキサム	77	4	118	4

MRMクロマトグラム

ネオニコチノイド系農薬のみ抜粋



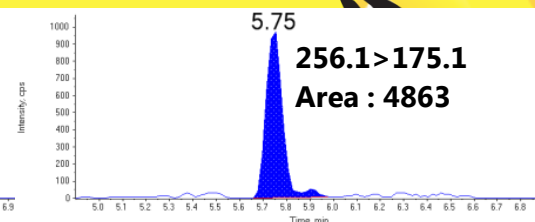
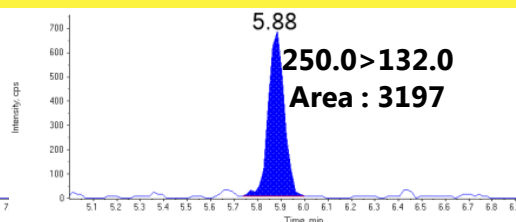
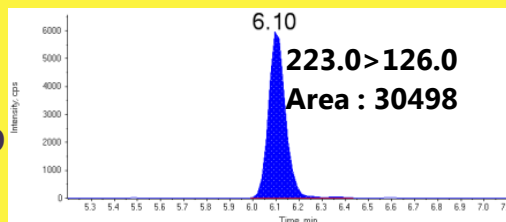
16

アセタミプリド

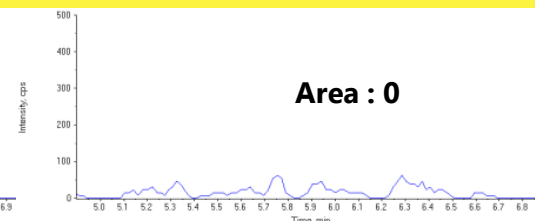
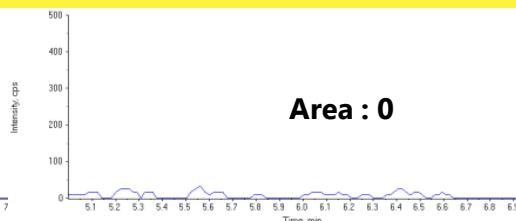
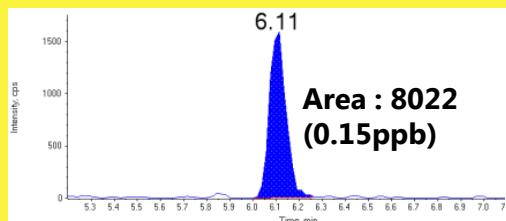
クロチアニジン

イミダクロリド

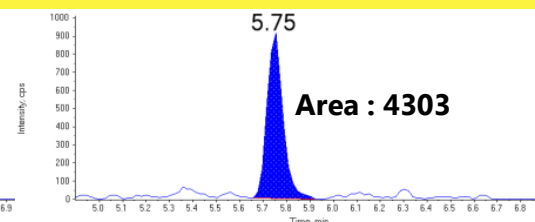
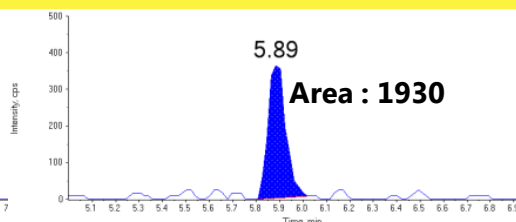
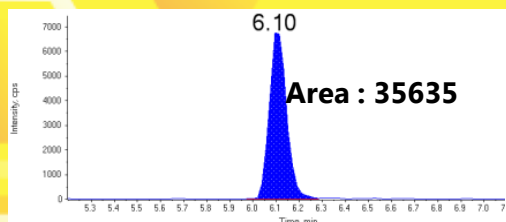
STD1.25ppb
試料中濃度10ppb



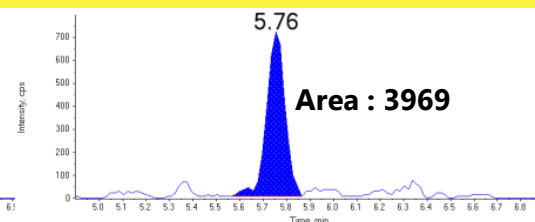
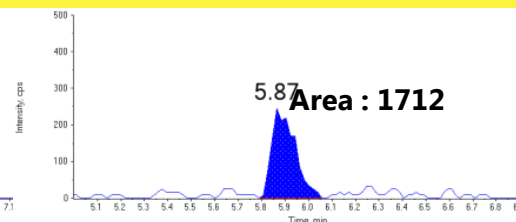
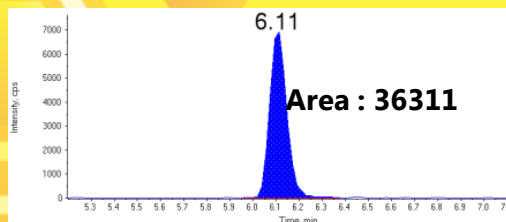
ブランク試料



添加試料



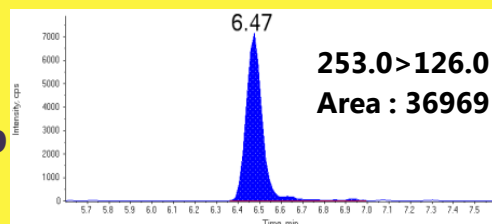
スパイク試料



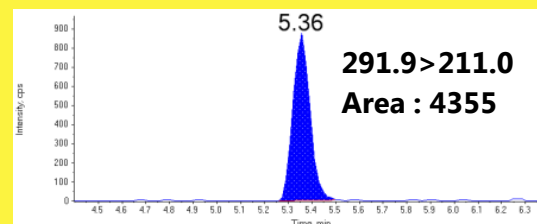
MRMクロマトグラム

ネオニコチノイド系農薬のみ抜粋

チアクロプリド

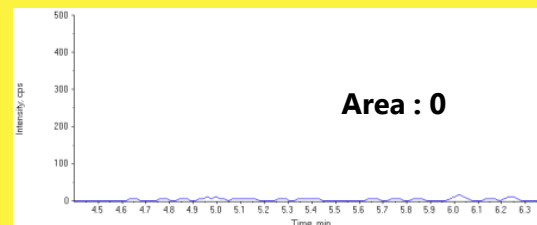
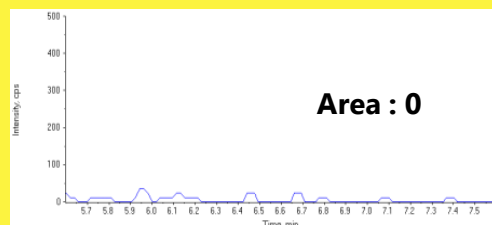


チアメトキサム

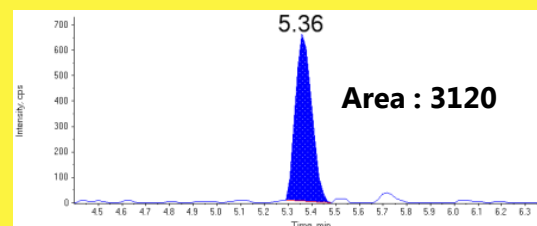
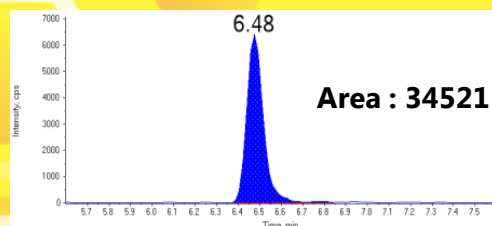


STD1.25ppb
試料中濃度10ppb

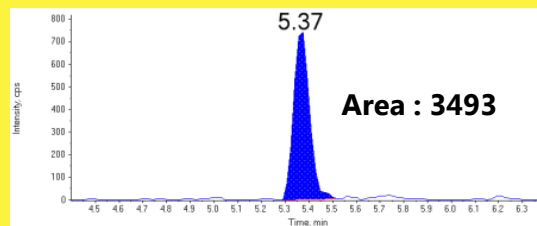
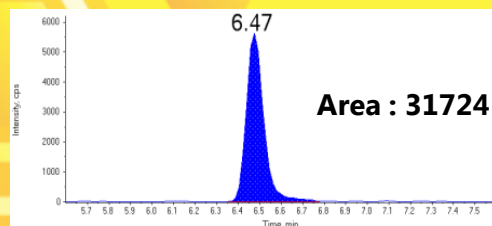
ブランク試料



添加試料



スパイク試料



添加回収試験結果①

試料中濃度0.01ppm(n=5)

18

No.	Sample Name	絶対検量線		マトリックス検量線		No.	Sample Name	絶対検量線		マトリックス検量線	
		平均回収率 (%)	RSD (%)	平均回収率 (%)	RSD (%)			平均回収率 (%)	RSD (%)	平均回収率 (%)	RSD (%)
1	1-Naphthylacetamide	94.6	6.2	108.4	6.2	38	Cloransulam-methyl	102.7	11.1	116.7	11.1
2	3-OH-carbofuran	96.3	12.1	102.0	12.1	39	Clothianidin	78.7	5.9	100.0	5.9
3	Abamectin	89.1	3.1	102.2	3.1	40	Cumyruon	98.6	10.7	105.3	10.7
4	Acephate	63.9	1.4	92.5	1.4	41	cyanazine	92.0	8.7	121.4	8.7
5	Acetamiprid	95.0	5.8	99.8	5.8	42	Cyazofamid	102.9	12.3	123.7	12.3
6	Acibenzolar-S-methyl	96.7	16.7	95.2	16.7	43	Cycloate	94.7	7.4	100.3	7.4
7	Aldicarb	115.0	9.2	128.4	9.2	44	Cycloprothrin	-	-	-	-
8	Aldoxycarb	80.3	3.5	108.9	3.5	45	Cyclosulfamuron	92.5	7.0	110.1	7.0
9	Anilofos	94.6	1.8	104.6	1.8	46	Cyflufenamide	99.2	6.5	101.6	6.5
10	Aramite	78.4	7.8	95.1	7.8	47	Cyproconazole-1	97.6	5.0	113.0	5.0
11	atrazine	92.6	2.7	113.5	2.7	48	Cyproconazole-2	93.9	9.1	88.9	9.1
12	Azafenidin	97.3	7.9	113.6	7.9	49	Cyprodinil	105.0	3.8	107.5	3.8
13	Azamethiphos	176.6	6.4	101.8	6.4	50	DDVP	117.1	10.1	86.1	10.1
14	Azimsulfuron	-	-	-	-	51	demeton-S-methyl	99.5	7.8	143.6	7.8
15	Azinphos-methyl	94.7	19.0	108.6	19.0	52	Di-allate	90.9	11.5	107.2	11.5
16	Azoxystrobin	102.1	5.7	113.9	5.7	53	Dichlosulam	88.4	15.5	96.1	15.5
17	Bendiocarb	103.8	4.3	112.9	4.3	54	Diclomezine	108.0	18.1	128.6	18.1
18	Bensulfuron-methyl	94.9	6.7	110.8	6.7	55	Diclotopos	101.0	4.0	105.2	4.0
19	Benzofenap	97.4	5.5	107.8	5.5	56	Difenoconazole 1and2	97.3	12.3	109.5	12.3
20	Bitertanol	106.1	8.9	111.4	8.9	57	Diflubenzuron	99.0	13.3	110.5	13.3
21	Boscalid	101.0	9.8	114.7	9.8	58	Dimethirimol	95.8	1.6	95.1	1.6
22	Bromacil	60.1	31.1	113.1	31.1	59	Dimethoate	93.0	7.3	104.7	7.3
23	Butafenacil	91.0	2.9	106.4	2.9	60	DimethomorphE	94.9	11.3	96.4	11.3
24	Carbaryl	111.8	7.8	117.5	7.8	61	DimethomorphZ	95.7	5.8	121.9	5.8
25	Carbofuran	104.2	4.7	101.7	4.7	62	Dimeton-s-methyl	111.8	9.8	99.1	9.8
26	carboxin	102.4	7.6	102.4	7.6	63	Diuron	100.1	15.8	107.0	15.8
27	Carpropamide	87.7	9.7	96.2	9.7	64	Dymuron	102.4	4.0	96.2	4.0
28	Chloridazon	73.3	10.1	101.8	10.1	65	Epoconazole	96.5	5.6	107.7	5.6
29	Chlorimuron-ethyl	104.2	6.3	115.2	6.3	66	Ethametsulfuron-methyl	96.0	7.2	118.8	7.2
30	Chlorsulfuron	116.0	9.1	155.9	9.1	67	Ethoxysulfuron	89.5	21.2	101.7	21.2
31	Chlorxuron	108.8	7.6	103.8	7.6	68	Fenamidone	96.2	8.3	107.3	8.3
32	Chromafenozide	100.6	5.1	108.4	5.1	69	Fenamiphos	100.3	3.0	111.0	3.0
33	Cinosulfuron	122.9	3.0	112.1	3.0	70	Fenbuconazole	95.4	8.6	108.4	8.6
34	Clodinafop acid	91.4	12.0	93.6	12.0	71	Fenhexamid	93.9	12.4	100.3	12.4
35	Clofentezine	94.7	8.2	97.9	8.2	72	Fenobucarb	98.1	3.9	106.6	3.9
36	Clomeprop	101.1	11.8	108.0	11.8	73	Fenoxaprop-ethyl	132.6	28.1	77.5	28.1
37	Cloquintocet-mexyl	94.7	3.8	99.5	3.8	74	Fenoxycarb	97.4	9.4	99.8	9.4

添加回収試験結果②

試料中濃度0.01ppm(n=5)

19

No.	Sample Name	絶対検量線		マトリックス検量線		No.	Sample Name	絶対検量線		マトリックス検量線	
		平均回収率 (%)	RSD (%)	平均回収率 (%)	RSD (%)			平均回収率 (%)	RSD (%)	平均回収率 (%)	RSD (%)
75	Fenpyroximate E	100.8	5.0	101.6	5.0	112	isoxathion-oxon	96.5	3.6	107.7	3.6
76	Fenpyroximate Z	86.4	2.1	94.7	2.1	113	Lactofen	101.0	7.7	105.2	7.7
77	Fensulfothion	107.5	14.6	114.9	14.6	114	Lenacil	103.7	4.6	102.9	4.6
78	Ferimzone EandZ	102.1	3.5	108.1	3.5	115	Linuron	116.8	8.6	123.7	8.6
79	Flazasulfuron	102.2	6.8	98.3	6.8	116	Lufenuron	100.8	6.9	92.0	6.9
80	Florasulam	112.0	6.2	120.7	6.2	117	Mepanipyrim	88.9	17.2	88.2	17.2
81	Fluazifop	95.0	9.4	115.3	9.4	118	Mesosulfuron-methyl	97.8	3.2	102.7	3.2
82	Flufenacet	103.2	6.8	100.8	6.8	119	Methabenzthiazuron	99.2	5.1	110.7	5.1
83	Flufenoxuron	86.7	4.5	111.2	4.5	120	Methamidophos	72.9	1.1	87.7	1.1
84	Flumetsulam	126.9	2.5	99.1	2.5	121	Methiocarb	108.5	6.9	102.7	6.9
85	Fluridone	97.4	3.9	106.8	3.9	122	Methomyl	91.8	10.5	95.6	10.5
86	Flusilazole	103.4	8.2	110.4	8.2	123	Methoxyfenozide	92.8	12.8	100.8	12.8
87	Flutriafol	91.8	10.7	99.8	10.7	124	Metosulam	101.4	8.9	100.6	8.9
88	Foramsulfuron	89.6	18.0	96.5	18.0	125	Metsulfuron-methyl	156.8	3.7	110.1	3.7
89	Forchlorfenuron	92.6	5.5	103.4	5.5	126	mevinphosE	107.8	11.0	112.3	11.0
90	Fosthiazate 1and2	100.8	6.5	117.8	6.5	127	mevinphosZ	97.9	4.1	106.4	4.1
91	Furametpyr	101.3	3.8	114.1	3.8	128	monocrotophos	96.5	8.1	102.2	8.1
92	Furathiocarb	93.0	3.7	109.6	3.7	129	Monolinuron	94.9	5.5	105.9	5.5
93	Halosulfuron-methyl	89.0	5.2	89.0	5.2	130	Myclobutanil	91.4	3.9	96.0	3.9
94	Haloxyfop	103.8	4.0	115.9	4.0	131	Naproanilide	95.7	7.9	92.7	7.9
95	Hexaconazole	128.3	23.8	97.2	23.8	132	Naptalam	109.1	10.2	115.6	10.2
96	Hexaflumuron	120.3	13.6	101.6	13.6	133	Norflurazon	93.3	6.6	101.4	6.6
97	hexazinon	97.9	3.9	108.3	3.9	134	Novaluron	98.1	7.5	101.3	7.5
98	Hexythiazox	90.7	5.7	101.3	5.7	135	omethoate	76.8	2.5	104.3	2.5
99	Imazalil	101.1	8.3	109.9	8.3	136	oxadixyl	103.7	6.4	111.7	6.4
100	imazamethabenz-methyl	104.2	6.5	115.2	6.5	137	Oxamyl	97.9	3.5	98.7	3.5
101	Imazaquin	96.0	3.6	122.3	3.6	138	Oxaziclomefone	98.4	5.8	108.8	5.8
102	Imazosulfuron	128.6	30.8	53.1	30.8	139	Oxycarboxin	102.2	3.8	105.6	3.8
103	Imibenconazole	87.7	23.8	106.4	23.8	140	Pencycuron	90.9	2.4	102.3	2.4
104	Imidacloprid	97.3	6.8	101.3	6.8	141	Penoxsulam	105.6	7.4	125.7	7.4
105	Indanofan	112.0	16.9	89.7	16.9	142	Pentoxazone	102.9	10.3	111.8	10.3
106	Indoxacarb	96.3	10.0	114.7	10.0	143	Phenmedipham	119.2	6.1	115.5	6.1
107	Iodosulfuron-methyl	92.0	10.6	120.6	10.6	144	PhosphamidoneE	94.9	7.8	88.5	7.8
108	Iprodion	-	-	-	-	145	PhosphamidoneZ	94.7	16.2	120.7	16.2
109	Iprovalicarb	104.3	8.1	111.5	8.1	146	Primicarb	95.8	3.3	115.2	3.3
110	Isoprocarb	109.4	5.3	91.2	5.3	147	Primisulfuron methyl	96.0	14.6	96.0	14.6
111	Isoxaflutole	121.0	10.3	101.5	10.3	148	prohydrojasmon 1and2	94.9	8.1	114.0	8.1

添加回収試験結果③

試料中濃度0.01ppm(n=5)

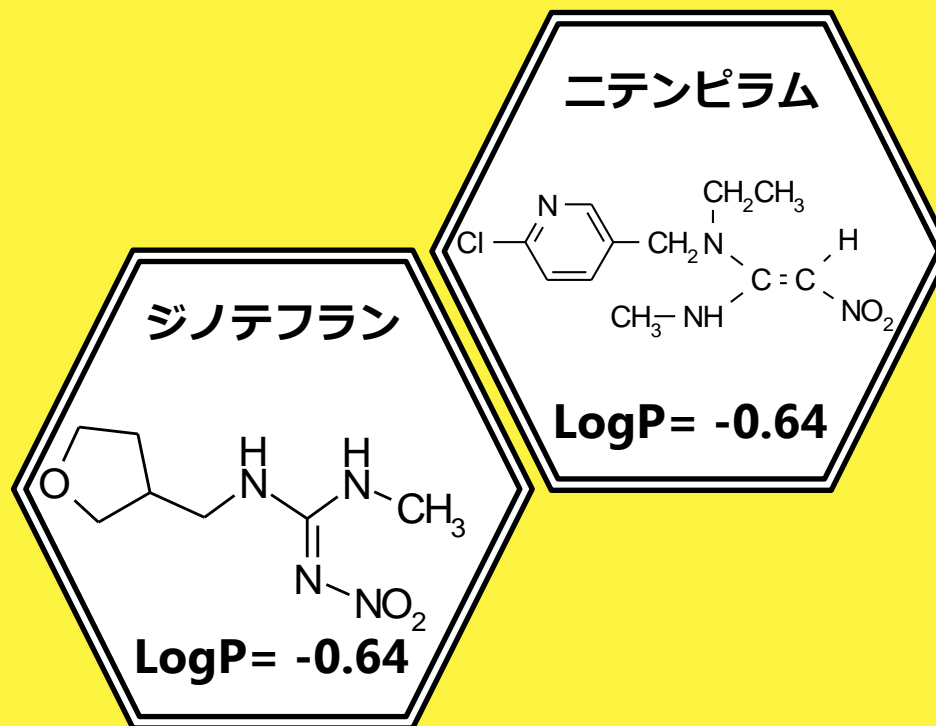
20

No.	Sample Name	絶対検量線		マトリックス検量線		No.	Sample Name	絶対検量線		マトリックス検量線	
		平均回収率 (%)	RSD (%)	平均回収率 (%)	RSD (%)			平均回収率 (%)	RSD (%)	平均回収率 (%)	RSD (%)
149	Propaquizafop	92.2	6.0	101.1	6.0	186	Triasulfuron	110.9	12.3	105.8	12.3
150	propoxur	100.8	10.2	105.9	10.2	187	Tribenuron methyl	55.0	13.4	63.7	13.4
151	Propoxycarbazono	100.3	15.2	68.5	15.2	188	Tricyclazole	88.0	6.5	105.8	6.5
152	Prosulfuron	315.7	12.3	107.2	12.3	189	Tridemorph E	70.4	6.5	79.9	6.5
153	Pyraclostrobin	103.5	11.0	106.1	11.0	190	Tridemorph Z	64.0	29.6	65.6	29.6
154	Pyrazolynate	149.9	5.3	116.4	5.3	191	Trifloxysulfuron	79.4	17.3	93.7	17.3
155	Pyrazosulfuron-ethyl	94.6	3.5	94.6	3.5	192	Triflumuron	96.5	5.1	116.0	5.1
156	Pyrifthalid	98.9	6.2	116.6	6.2	193	Triflusulfuron methyl	104.0	12.8	103.2	12.8
157	pyroquilon	95.5	3.4	104.7	3.4	194	Triticonazole	103.0	7.2	103.9	7.2
158	Quinoclamine	-	-	-	-	195	XMC	100.8	3.0	99.2	3.0
159	Quizalofop-ethyl	91.4	4.9	110.9	4.9	Neg-1	2-4-D	-	-	-	-
160	Silafluofen	39.4	5.8	39.4	5.8	Neg-2	2-4-DP (Dichlorprop)	-	-	-	-
161	Simazine	106.1	11.6	100.5	11.6	Neg-3	4-Chlorophenoxyacetic acid	-	-	-	-
162	Simeconazole	98.9	12.0	113.4	12.0	Neg-4	Acifluorfen	-	-	-	-
163	Simetryn	100.5	8.1	116.3	8.1	Neg-5	Bromoxynil	-	-	-	-
164	Spinosyn A	74.0	3.3	83.4	3.3	Neg-6	Cloprop	-	-	-	-
165	Spinosyn D	62.8	2.5	74.7	2.5	Neg-7	Cyclanilide	-	-	-	-
166	Spiroxamine-AandB	91.5	4.7	91.5	4.7	Neg-8	Dicloran	69.8	97.4	144.3	97.4
167	Sulfentrazone	87.8	23.3	95.4	23.3	Neg-9	Dimethipin	-	-	-	-
168	Sulfosulfuron	87.9	14.0	115.6	14.0	Neg-10	Fluroxypyr	73.6	11.5	85.2	11.5
169	TCMTB	113.4	9.2	103.5	9.2	Neg-11	Fomesafen	45.8	52.5	158.0	52.5
170	Tebufenozide	104.0	6.9	104.0	6.9	Neg-12	Formothion	-	-	-	-
171	Tebuthiuron	96.8	4.0	108.0	4.0	Neg-13	Gibberellin	149.6	2.2	101.1	2.2
172	Teflubenzuron	115.7	19.6	140.4	19.6	Neg-14	Hexaflumuron	98.1	4.0	107.5	4.0
173	terbacil	-	-	-	-	Neg-15	Ioxynil	-	-	-	-
174	Tetrachlorvinphos	97.0	4.5	112.2	4.5	Neg-16	Lufenuron	94.4	2.7	107.3	2.7
175	Tetraconazole	78.4	35.5	82.4	35.5	Neg-17	MCPA	-	-	-	-
176	Thiabendazole	96.6	3.4	115.0	3.4	Neg-18	MCPB	72.8	38.2	117.2	38.2
177	Thiacloprid	89.6	4.1	112.0	4.1	Neg-19	MCPP (Mecoprop)	-	-	-	-
178	Thiamethoxam	76.5	3.6	117.9	3.6	Neg-20	Methoxyfenozide	88.0	12.3	107.8	12.3
179	Thidiazuron	91.7	9.3	134.0	9.3	Neg-21	Naphthaleneacetic acid	-	-	-	-
180	Thifensulfuron-methyl	148.0	4.6	123.3	4.6	Neg-22	Naproanilide	89.9	3.6	101.3	3.6
181	Thifluzamide	100.2	8.6	106.1	8.6	Neg-23	Norflurazon	106.1	8.4	118.4	8.4
182	Thiodicarb	109.3	8.0	114.8	8.0	Neg-24	Oryzalin	97.3	6.9	113.6	6.9
183	Tolfenpyrad	93.0	3.6	95.2	3.6	Neg-25	Thidiazuron	104.8	4.2	98.5	4.2
184	Tralkoxydim	75.0	11.6	86.0	11.6	Neg-26	Triclopyr	-	-	-	-
185	Triadimenol	101.1	10.1	104.5	10.1	Neg-27	Trifluzamide	94.6	5.5	138.7	5.5

今後の課題

ニテンピラム、ジノテフランを含んだ
ネオニコチノイド系農薬一斉分析法

21



まとめ

22

- ハチミツを試料として**ネオニコチノイド系殺虫剤**の分析法を検討した。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。
- **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。