

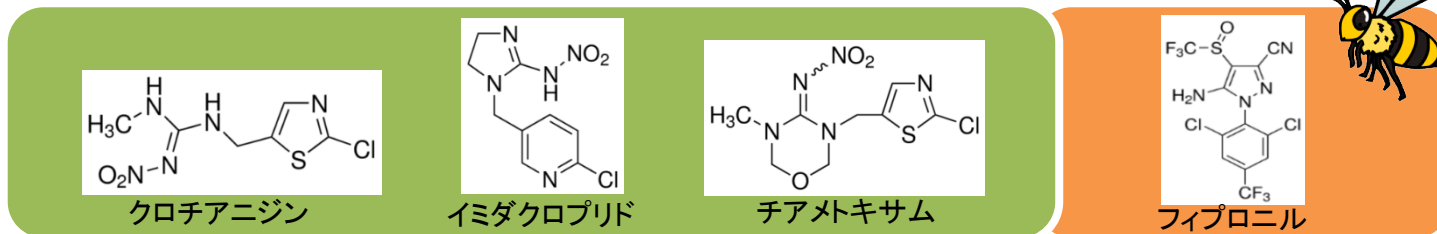
第38回農薬残留分析・第33回農薬環境科学合同研究会(2015.10.15-16)

QuEChERS法を用いた蜂蜜および玄米中 ネオニコチノイド系農薬の一斉分析法の検討

福井県衛生環境研究センター
保健衛生部食品衛生研究G
○平井知里、山岸浩

背景

- ネオニコチノイド系農薬は、クロロニコチニル系殺虫剤の総称。有機リン系農薬の代替農薬として1990年代半ばから世界的に使用されているが、近年ミツバチなど花粉媒介昆虫への毒性が問題となっている。
- EUでは、ミツバチへの危害を防止するため、3種類のネオニコチノイド系農薬(クロチアニジン、イミダクロプリド、チアメトキサム)とフィプロニルに対し、使用規制が開始された。



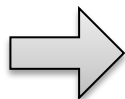
- ネオニコチノイド系農薬は、その浸透性・残効性の高さから日本でも多用されており、同農薬との関連が疑われるミツバチ斃死や赤とんぼ減少などが各地で報告されている。

- ヒトが口にする**食品中の残留**についても消費者の関心が高まっており、ネオニコチノイド系農薬分析の必要性が増している。

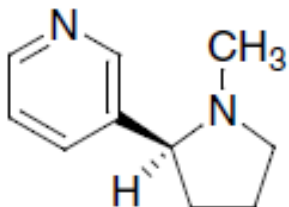


国内で使用されている ネオニコチノイド系農薬等の新規農薬

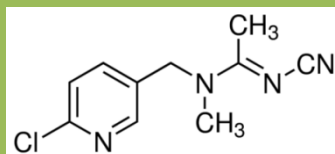
構造・作用が
似ている



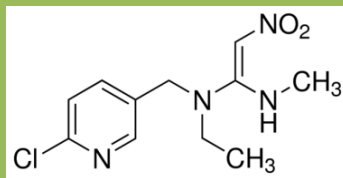
「天然の殺虫剤」
ニコチン



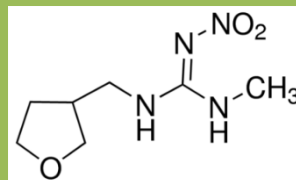
ネオニコチノイド系農薬



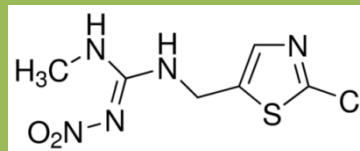
アセタミプリド



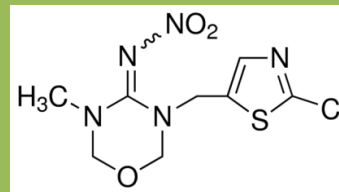
ニテンピラム



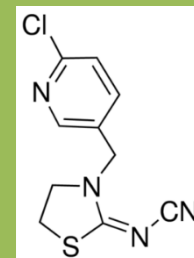
ジノテフラン



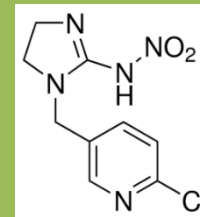
クロチアニジン



チアメトキサム

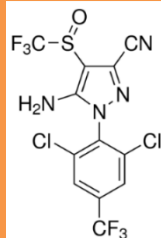


チアクロプリド

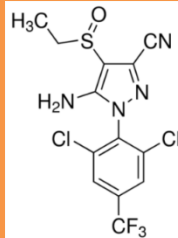


イミダクロプリド

フェニルピラゾール系農薬

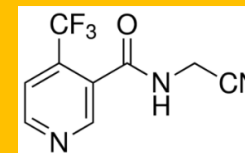


フィプロニル



エチプロール

ピリジんカルボキシアミド系農薬



フロニカミド

目的

- ネオニコチノイド系農薬等の検査体制の整備
- 食品中の残留実態の把握

ネオニコチノイド系農薬およびその代謝物等の 一斉分析法の検討

<対象化合物>

- ・ネオニコチノイド系農薬7種類
- ・フェニルピラゾール系農薬2種類およびフロニカミド
- ・チアクロプリド代謝物 チアクロプリドアミド
- ・ニテンピラム代謝物 CPMA、CPMF、CPF
- ・フロニカミド代謝物 TFNG、TFNA

計16化合物

分析条件

● 対象農薬のMRM条件

- ・対象化合物: 16化合物
- ・Pos/Neg両モードで検討
⇒エチプロール、フロニカミド、クロチアニジン
フィプロニル、TFNA、TFNG
- ・ ^{37}Cl 含有化合物を標的としたMRM条件を設定
⇒アセタミプリド、チアクロプリド、クロチアニジン
フィプロニル



48モニターイオン
を決定

● LC条件

カラム TOSOH TSKgel ODS-100V

移動相 A: 0.1%ギ酸水溶液
B: 0.1%ギ酸メタノール

流速 0.2mL/min

注入量 5 μ L

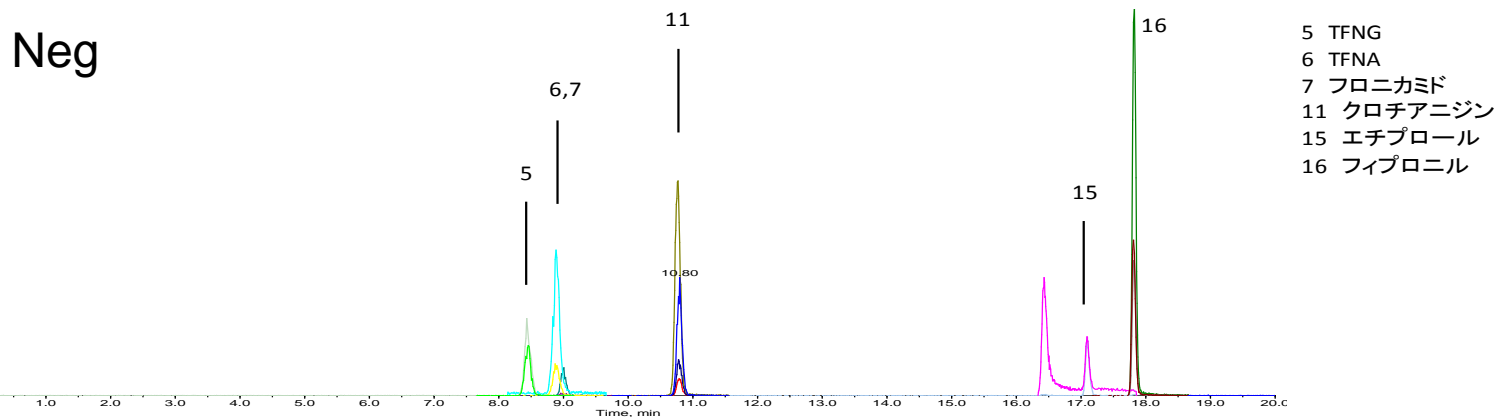
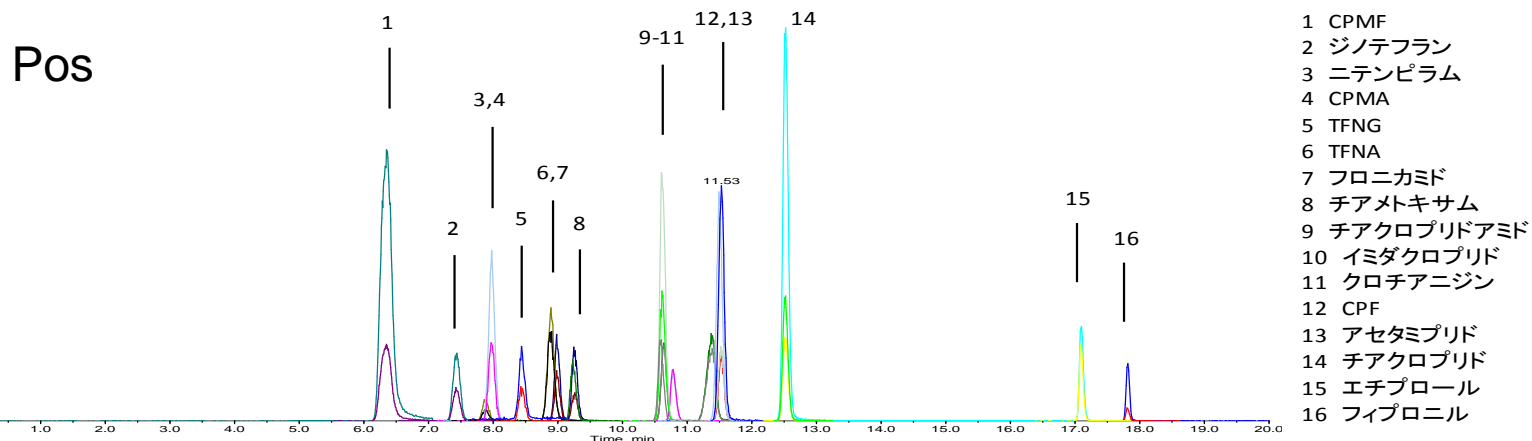
グラジエント B: 10%(0min)-10%(1min)-40%(6min)-65%(12min)-
95%(15min)-95%(20min)



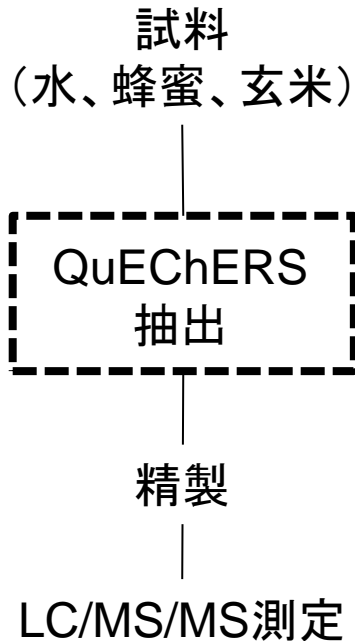
移動相は酸性条件とし、
分離の良いカラム、溶媒、
グラジエント条件を決定

クロマトグラム(16化合物)

- ・機器: 3200QTRAP LC/MS/MS(AB SCIEX)、LC20A(島津)
- ・イオン化法: ESI Pos/Neg
- ・イオンソース温度: 500(°C)
- ・プローブ電圧: 5500/-4000(V)
- ・検出方法: Scheduled MRM



今回の検討内容(1)



検討① QuEChERS抽出法の検討

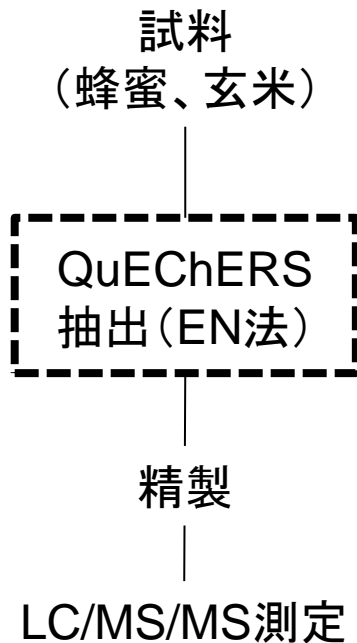
3種類の抽出法を比較

- European Committee for Standardization Standard Method EN 15662 (以下、EN法)
- AOAC Official Method 2007.01 (以下、AOAC法)
- MeCN/リン酸緩衝液(pH7)による抽出 (以下、比較法)

	EN法	AOAC法	比較法
抽出溶媒	MeCN	1%酢酸/MeCN	MeCN
抽出方法	+水30min静置、 +MeCN1min振とう、 +塩1min振とう	+水30min静置、 +1%酢酸/MeCN、 塩1min振とう	+リン酸緩衝液30min 静置、+MeCN振とう、 +塩1min振とう
塩	無水MgSO ₄ NaCl クエン酸水素2Na クエン酸3Na	無水MgSO ₄ 無水酢酸Na	無水MgSO ₄ NaCl
pH [※]	3.3-3.5	5.6-5.8	4.0-4.2

※水ブランク試料における遠心後水層の実測値

今回の検討内容(2)



検討② マトリクス標準溶液の検討

- 抽出法 EN法
- 添加濃度 0.01ppm、0.1ppm
- 標準溶液 **マトリクス標準溶液**
- 定量法 絶対検量線法

検討③ 試験法の妥当性評価

- 方法 1日2併行、5日間の繰り返し試験
- 添加濃度 0.01ppm、0.1ppm
- 標準溶液 マトリクス標準溶液
- 定量法 内部標準法

① QuEChERS抽出法の検討

試験方法

試料
(水、蜂蜜、玄米)

添加濃度 0.1ppm

抽出
(3種類の抽出法
を検討)

抽出法

	EN法	AOAC法	比較法
抽出溶媒	MeCN	1%酢酸/MeCN	MeCN
抽出操作	+水30min静置、 +MeCN1min振とう、 +塩1min振とう	+水30min静置、 +1%酢酸/MeCN、 塩1min振とう	+リン酸緩衝液30min 静置、+MeCN振とう、 +塩1min振とう
塩	無水MgSO ₄ NaCl クエン酸水素2Na クエン酸3Na	無水MgSO ₄ 無水酢酸Na	無水MgSO ₄ NaCl

遠心分離

精製

精製法

	共通
ミニカラム	①C18-30mg / PSA-30mg ②C18-50mg
溶出液	抽出液1mLを①に負荷 0.4%ギ酸メタノール1mLで溶出 溶出液 + 水0.5mLを②に負荷 80%メタノール1mLで溶出 水で4mLに定容

LC/MS/MS測定

① QuEChERS抽出法の検討

結果(回収率)

(単位%、n=2、添加濃度:0.1ppm)

Compound	水			蜂蜜			玄米		
	EN法	AOAC法	比較法	EN法	AOAC法	比較法	EN法	AOAC法	比較法
Acetamiprid	96	90	96	84	82	82	72	72	71
CPF	92	90	97	92	90	89	78	77	78
CPMA	75	77	77	53	57	53	52	58	55
CPMF	100	94	100	100	92	101	89	93	96
Dinotefuran	101	97	100	91	87	98	72	71	75
Ethiprole (Neg)	90	84	88	99	94	96	71	71	77
Fonicamid	98	96	101	98	98	100	81	79	80
Imidacloprid	89	87	97	69	64	71	53	53	51
Nitenpyram	98	90	94	85	79	90	76	71	76
Thiacloprid amide	95	91	101	93	87	91	82	81	80
Thiacloprid	98	93	99	80	81	82	66	65	66
Thiamethoxam	98	94	98	73	70	77	57	59	57
Clothianidin (Neg)	99	94	94	98	92	94	63	59	61
Fipronil (Neg)	92	87	91	101	97	99	95	89	96
TFNA	80	34	69	68	11	43	59	22	43
TFNG (Neg)	93	32	83	91	14	63	79	20	67

- 水については、EN法を用いた場合にすべての化合物で回収率良好
⇒ EN法を採用
- 実試料では、EN法においても、蜂蜜3化合物、玄米6化合物の回収率<70%
- 試料マトリクスの影響大 ⇒ マトリクス標準溶液を検討

② マトリクス標準溶液検討

試験方法

試料 5g

水 10mL(玄米:30min放置)
セラミックホモジナイザ

QuEChERS(EN法)抽出

遠心分離(3000rpm、5分間)

アセトニトリル層

1mLを分取

C18-30mg/PSA-30mgに負荷、0.4%ギ酸メタノール 1mLで溶出

水 0.5mL

C18-50mgに負荷、80%メタノール 1mLで溶出

水で4mLに定容

試験溶液

- 試料 蜂蜜、玄米
- 添加濃度 0.01ppm、0.1ppm
- 標準溶液 **マトリクス標準溶液**
- 定量法 絶対検量線法

② マトリクス標準溶液検討

結果(回収率)

(単位%、n=2)

Compound	蜂蜜		玄米	
	0.01ppm	0.1ppm	0.01ppm	0.1ppm
Acetamiprid	107	87	81	98
CPF	85	86	94	98
CPMA	74	63	62	74
CPMF	104	88	102	100
Dinotefuran	104	95	81	94
Ethiprole (Neg)	95	99	106	104
Flonicamid	109	91	96	102
Imidacloprid	101	87	96	94
Nitenpyram	94	88	95	96
Thiacloprid amide	100	86	88	97
Thiacloprid	104	88	101	102
Thiamethoxam	105	88	88	95
Clothianidin (Neg)	100	95	102	100
Fipronil (Neg)	102	104	106	107
TFNA (Pos)	76	71	66	71
TFNG (Neg)	90	90	86	88

- 溶媒標準溶液による定量で低回収率であった化合物の回収率が改善
- 14化合物の回収率良好⇒マトリクス標準溶液を採用
- 水溶性の高いCPMAおよびTFNAについては、6割程度の回収率

妥当性評価とは？

- 妥当性評価とは・・・農薬等の新しい試験法を採用する際に、厚生労働省の「ガイドライン※」に基づき、試験法の性能評価が求められる
 - ※「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン」(H22.12.24一部改正)
- ブランク試料および添加試料について繰り返し試験を実施し、**真度(回収率)**、**精度**、**選択性**、**定量限界**を評価
- 定量精度を上げるには、質量分析計イオン化部の感度変動によるバラツキ、夾雑成分によるマトリクス効果の低減が重要

内部標準法で定量

ネオニコチノイド系農薬の安定同位体標識化合物を使用
アセタミプリド-d3、イミダクロプリド-d4
チアメキサム-d3、クロチアニジン-d3

③ 試験法の妥当性評価

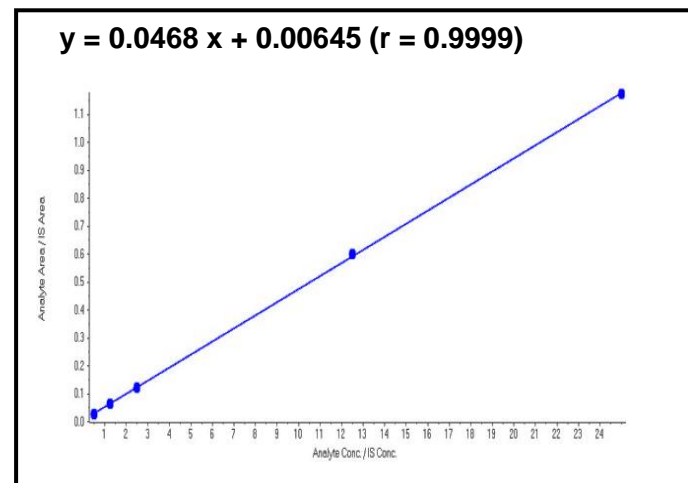
検量線 (内部標準法)

Compound	相関係数R ²	
	蜂蜜	玄米
Acetamiprid	0.9998	0.9998
CPF	0.9998	1.0000
CPMA	1.0000	1.0000
CPMF	1.0000	1.0000
Dinotefuran	0.9996	1.0000
Ethiprole (Pos)	1.0000	1.0000
Flonicamid (Pos)	0.9996	0.9998
Imidacloprid	0.9996	0.9996
Nitenpyram	0.9996	0.9998
Thiacloprid amide	0.9996	1.0000
Thiacloprid	0.9998	1.0000
Thiamethoxam	0.9996	1.0000
Clothianidin (Neg)	0.9996	1.0000
Fipronil (Neg)	0.9998	0.9998
TFNA (Pos)	0.9996	0.9996
TFNG (Neg)	1.0000	1.0000



R² > 0.999
 相関の良い
 検量線

アセタミプリドの検量線 (試料: 蜂蜜)



濃度範囲: 0.5–25ng/mL

③ 試験法の妥当性評価

試験方法

試料 5g
├── 水 10mL (玄米: 30min 放置)
└── セラミックホモジナイザ

QuEChERS (EN法) 抽出

遠心分離 (3000rpm、5分間)

アセトニトリル層

1mLを分取

C18-30mg/PSA-30mgに負荷、2%ギ酸メタノール 1mLで溶出
├── 水 0.5mL

C18-50mgに負荷、80%メタノール 1mLで溶出

水で4mLに定容

├── 内部標準液
試験溶液

- 試料 蜂蜜、玄米
- 方法 1日2併行、5日間の繰り返し試験
- 添加濃度 0.01ppm、0.1ppm
- 標準溶液 マトリクス標準溶液
- 定量法 安定同位体標識化合物を用いた**内部標準法**

ギ酸メタノールの濃度を 0.4% ⇒ 2%

内部標準物質を一定量添加

- Pos用: アセタミプリド-d3 イミダクロプリド-d4
チアメトキサム-d3
- Neg用: クロチアニジン-d3
- 添加濃度 25ng/mL

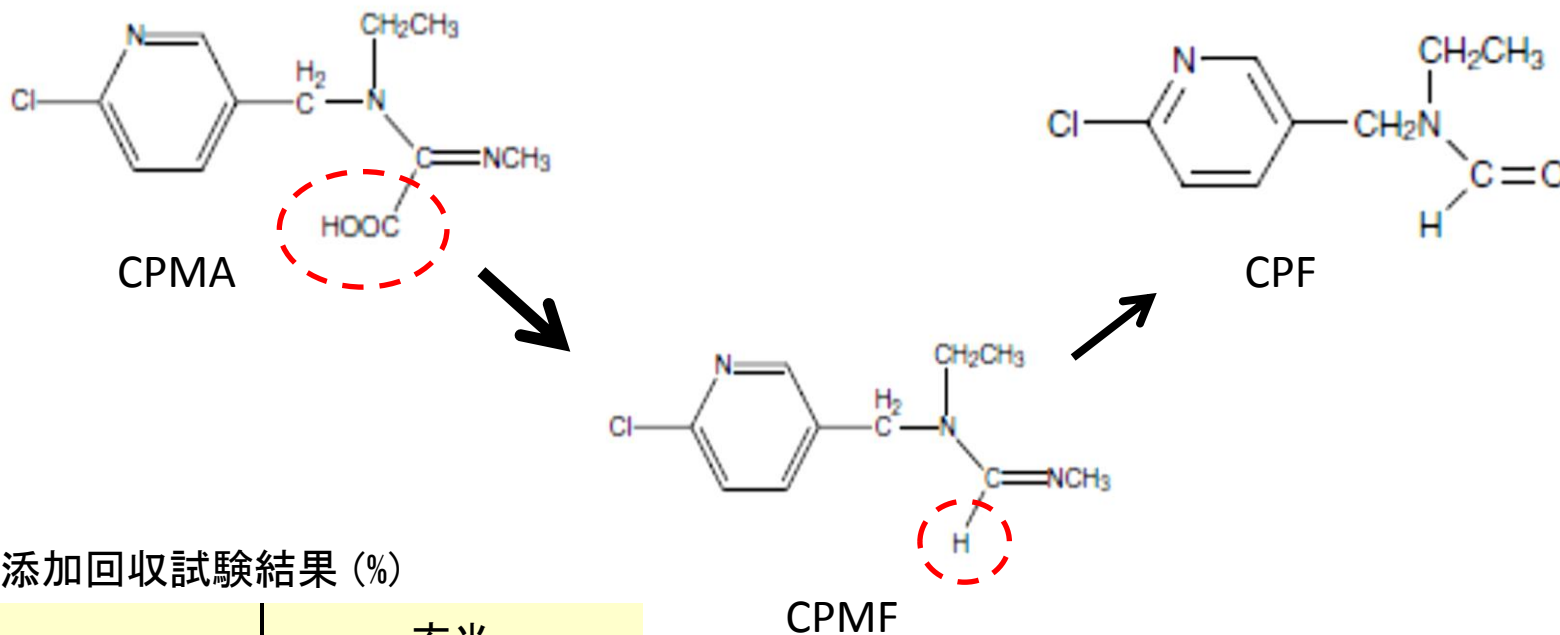
③ 試験法の妥当性評価

結果

Compound	蜂蜜						玄米					
	回収率(%)		真度	精度	選択性	定量限界	回収率(%)		真度	精度	選択性	定量限界
	0.01ppm	0.1ppm					0.01ppm	0.1ppm				
Acetamiprid	96	93	○	○	○	○	97	97	○	○	○	○
CPF	95	90	○	○	○	○	99	94	○	○	○	○
CPMA	46	56	×	○	○	○	56	59	×	○	○	○
CPMF	114	103	○	○	○	○	118	108	○	○	○	○
Dinotefuran	89	91	○	○	○	○	93	95	○	○	○	○
Ethiprole (Pos)	91	89	○	○	○	○	95	92	○	○	○	○
Flonicamid (Pos)	101	92	○	○	○	○	106	99	○	○	○	○
Imidacloprid	95	92	○	○	○	○	100	96	○	○	○	○
Nitenpyram	91	94	○	○	○	○	98	96	○	○	○	○
Thiacloprid amide	94	91	○	○	○	○	98	93	○	○	○	○
Thiacloprid	96	92	○	○	○	○	103	97	○	○	○	○
Thiamethoxam	94	93	○	○	○	○	101	96	○	○	○	○
Clothianidin (Neg)	94	93	○	○	○	○	96	95	○	○	○	○
Fipronil (Neg)	92	94	○	○	○	○	98	100	○	○	○	○
TFNA (Pos)	85	73	○	○	○	○	86	76	○	○	○	○
TFNG (Neg)	87	82	○	○	○	○	85	82	○	○	○	○

- 15化合物がガイドラインの目標値を満たした
- CPMAの真度は40~60%、CPMFの真度>100%
⇒抽出時のロスに加え、CPMAがCPMFに変化？

CPMAからCPMFへの変化について



添加回収試験結果 (%)

Compound	玄米	
	CPMA	0.1ppm添加
CPMA	70	
CPMF	17	
CPF	ND	

玄米においては**2割程度**
CPMA→CPMFに変化

CPMAおよびCPMFは
参考値とすることが適当

まとめ

- 欧州で広く用いられているEN法を抽出操作に用い、マトリクス標準溶液で定量することにより、良好な結果が得られた。
- 検討した一斉分析法について妥当性評価を行った結果、CPMAを除く15化合物について目標値を満たした。CPMAについては真度が目標値を満たさず、一部CPMFへ変化してしまうことから、CPMAおよびCPMFについては参考値としたい。
- 本一斉分析法を用いることにより、蜂蜜および玄米中ネオニコチノイド系農薬の簡便、迅速かつ精度の良い定量が可能となった。今後は、開発した一斉分析法により、県内に流通する蜂蜜および玄米の残留実態調査を行う予定である。