

STQ 法を応用したネオニコチノイド分析法の検討
 ○小西賢治、川上正美、島三記絵、松尾俊介、佐々野僚一、斎藤勲
 (株式会社アイスティサイエンス)

【目的】

筆者らは第 37 回農薬残留分析研究会にて、ハチミツをサンプルとしたネオニコチノイド系殺虫剤の分析法について発表した¹⁾。今回は、対象成分及び分析試料を拡大して分析法を検討したため報告する。ネオニコチノイド系殺虫剤ジノテフラン、ニテンピラム、チアクロプリド、チアクロプリドアミド、CPF および CPMF (ニテンピラム代謝物)、並びにネオニコチノイド系殺虫剤と同じくアセチルコリン受容体に作用するフルピラジフロンの、スルホキサフロル、エチプロール、フィプロニルを追加した。前回報告したハチミツに加え、生鮮野菜の代表作物として、ほうれん草(葉緑素を多く含むもの)、玄米(穀類)、大豆(豆類)茶(茶)を分析試料として選択した。

【実験方法】

1. 測定対象化合物

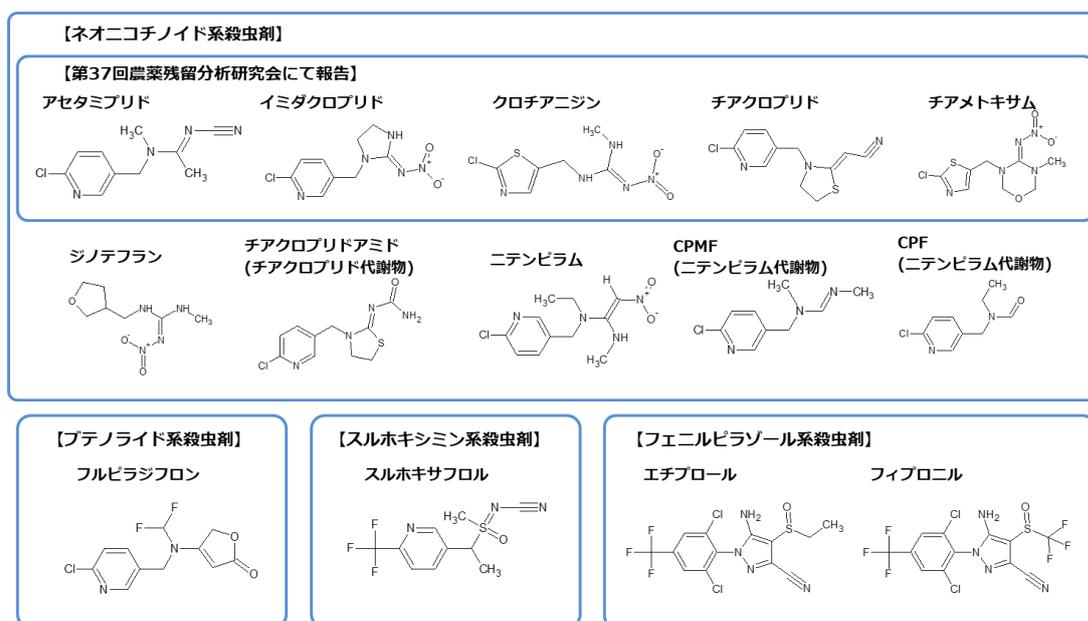


図 1 分析対象化合物一覧

2. 標準溶液

ネオニコチノイド系農薬混合標準液(富士フィルム和光純薬)およびフルピラジフロンの、スルホキサフロル、エチプロール、フィプロニルを各 2ppm となるようアセトニトリルで調製した。

3. 分析試料

市販のハチミツおよび、予冷方式ドライアイス凍結粉碎法²⁾により粉碎したほうれん草、玄米、大豆、茶を分析試料として用いた。

4. 測定条件

LC : UHPLC(Nexera X2) (島津製作所)

MS : LCMS-8045 (島津製作所)

分析カラム : Shim-pack FC-ODS, 2 mm I.D. x 150 mm, 3 μ m

移動相 : A 液 : 0.1% ギ酸+0.5 mM 酢酸アンモニウム水溶液

B 液 : 0.5 mM 酢酸アンモニウム含有メタノール

流速 : 0.2 mL/min

グラジエント : B Conc. 5%(0-1 min)-99%(15-20 min)-5%(20-30 min)

カラム温度 : 40 °C

注入量 : 2 μ L

イオン化モード : ESI positive, ESI negative

5. 前処理

5-1. 使用機器

自動前処理装置 : 全自動固相抽出装置 ST-L400 (アイスティサイエンス)

固相カートリッジ : Smart-SPE C18-50, PBX-20, PSA-30 (アイスティサイエンス)

5-2. 前処理フロー

ハチミツ、玄米、大豆は 5.0 g、茶は 2.0 g を秤量し水 10.0 mL を加えて膨潤させたもの、ほうれん草は 10.0 g を秤量したものを試料とし、STQ-LC 法をアレンジして添加回収試験を行った。

【抽出操作】

試料採取(※1)

— 添加 水 (※2) —

手振とう 1分

↓
静置 15分

— 添加 アセトニトリル 10 mL

ホモジナイズ 1 min 13000rpm

— 添加 塩化ナトリウム 1 g

クエン酸3Na \cdot 2HO 1 g

クエン酸2Na \cdot 1.5H₂O 0.5 g

手振とう ★ 塩が溶解する程度

— 添加 硫酸マグネシウム(無水) 4 g

手振とう 1分

↓
遠心分離 3500 rpm, 5 min

抽出上澄液

【希釈】 ※茶のみ

抽出上澄液 1 mL 分取

— 添加 水 9 mL

試験溶液① 10 mL (抽出液 : 水 = 1:9)

| 分析試料 | ※1 試料採取量 (g) | ※2 水添加量 (mL) |
|-------|--------------------|--------------------|
| ハチミツ | 5 | 10 |
| 玄米 | 5 | 10 |
| 大豆 | 5 | 10 |
| 茶 | 2 | 10 |
| ほうれん草 | 10 | - |

【精製】

コンディショニング
アセトン 2 mL
アセトニトリル-水(2/1) 2mL

PBX-20mg : 精製

PSA-30mg : 精製

— 負荷 抽出上澄液または試験溶液① 0.5 mL

— 洗浄 アセトニトリル-水(2/1) 0.5 mL

溶出液

— 添加 水 0.5 mL

PBX-20mg : 精製

— 洗浄 アセトニトリル-水(2/1) 0.5 mL

溶出液

定容 : 2 mL 水で調整

図 2 前処理フロー

【結果と考察】

1.測定条件の検討

1-1.移動相の検討

測定条件について、中性の移動相（A：0.5mM 酢酸アンモニウム水溶液, B：0.5mM 酢酸アンモニウム含有メタノール）で分析を実施したところ、CPMF のピークがテーリングしていた。ギ酸を加えて酸性移動相（A：0.1%ギ酸+0.5mM 酢酸アンモニウム水溶液, B：0.5mM 酢酸アンモニウム含有メタノール）にすることでピーク形状の改善が見られた(図 3)。

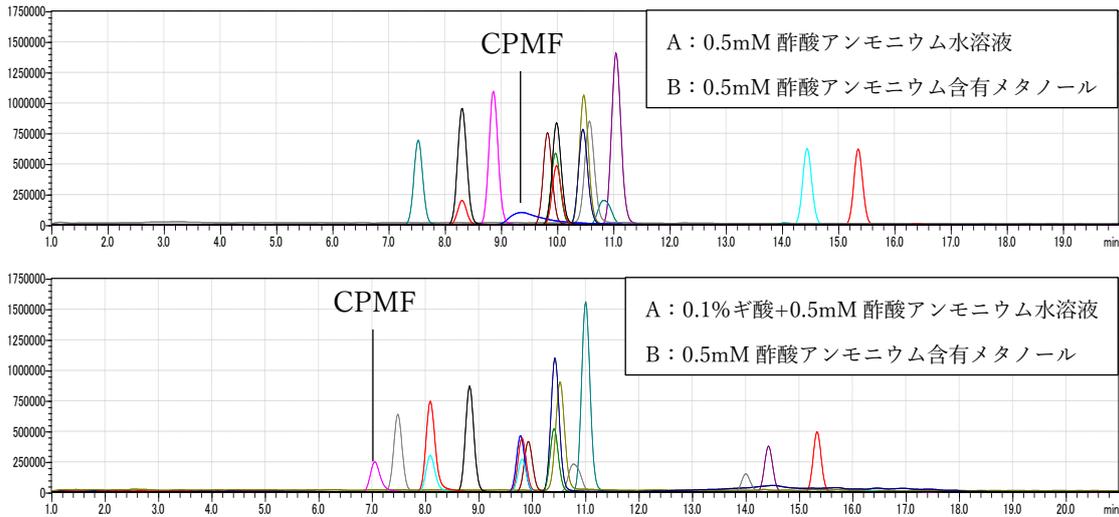


図 3 移動相の pH によるピーク形状の比較 (上) 中性移動相 (下) 酸性移動相

1-2. 分析開始時の移動相組成

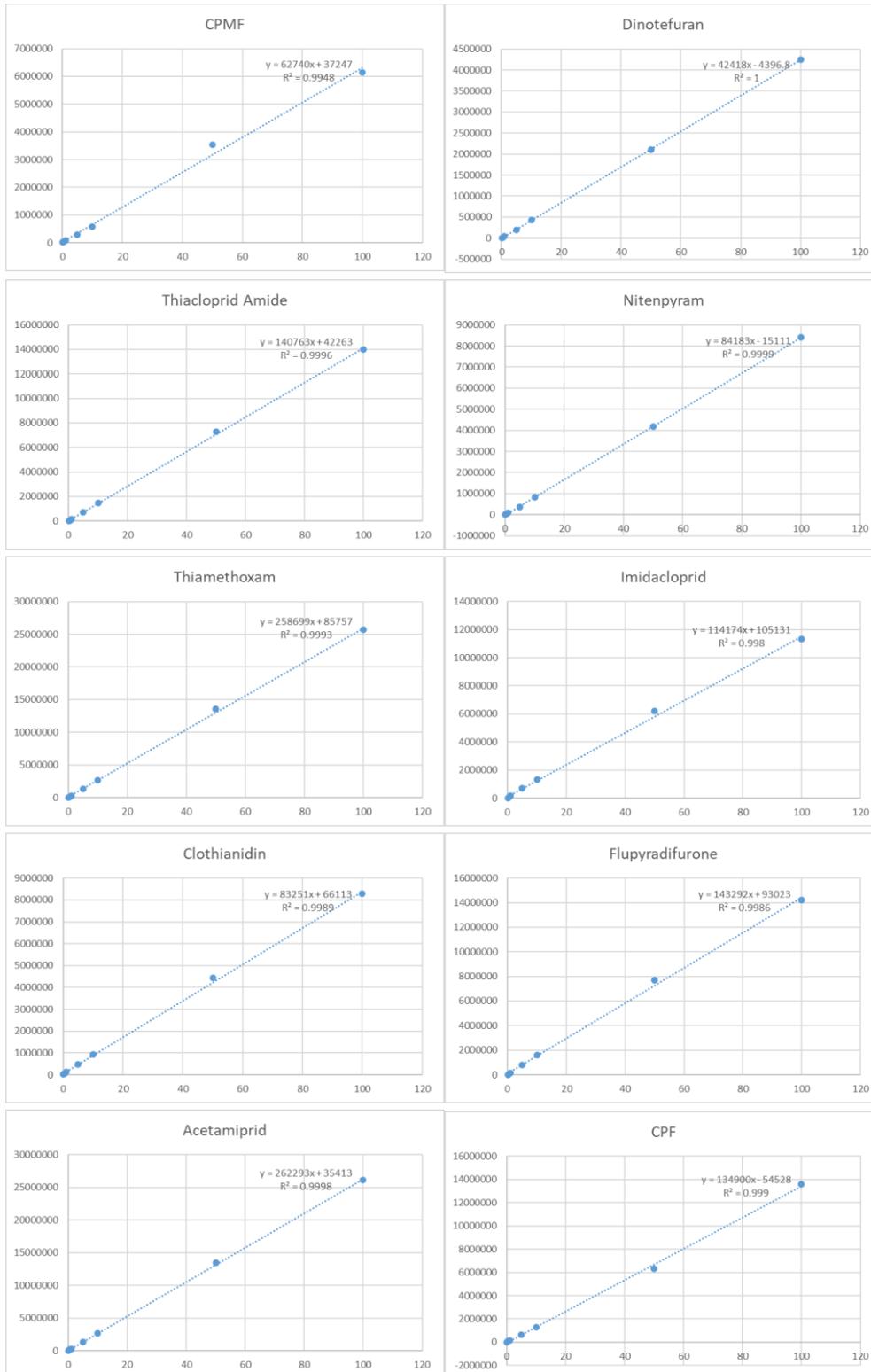
分析開始時 (=サンプル注入時) の移動相組成を 1,5,10,20%(B Conc.)と変化させて各成分のピーク形状を比較した。移動相組成が 1%,5%(B Conc.)では大きな差は見られなかったが、10%,20%(B Conc.)となるにつれてピーク形状の悪化が見られた。特に溶出時間の早い CPMF、ジノテフランに顕著であったため、分析開始時の移動相組成を 5%(B Conc.)と設定した。

| B Conc. | 1% | 5% | 10% | 20% |
|---------|----|----|-----|-----|
| CPMF | | | | |
| ジノテフラン | | | | |

表 1 分析開始時の移動相組成によるピーク形状の変化

1-3. 検量線の直線性

得られた条件をもとに、0.1,0.5,1,5,10,50,100ppb の7点で検量線を作成し直線性を確認したところ、良好な結果が得られた(図4)。



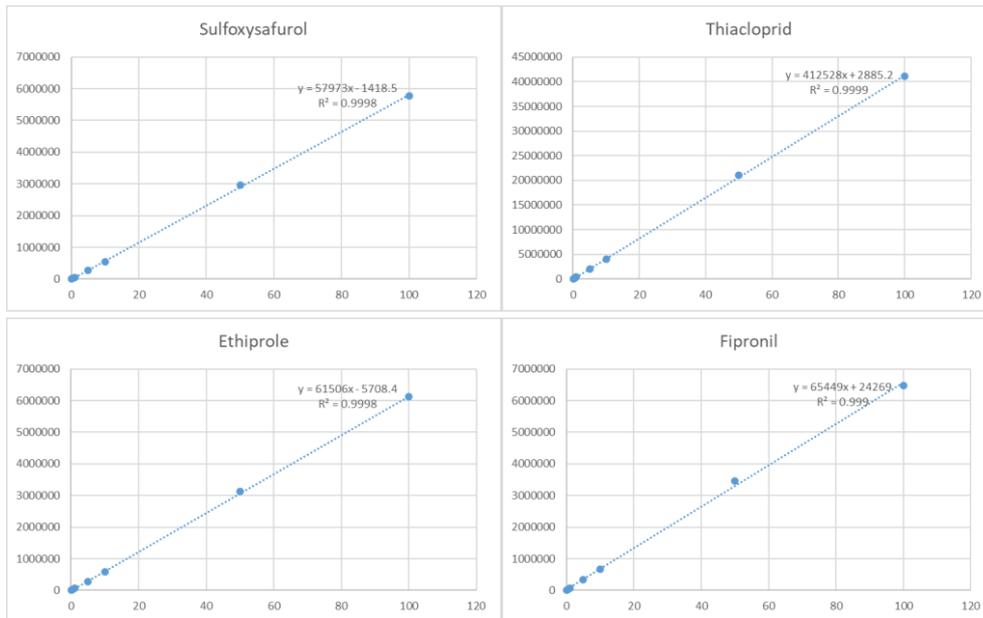


図4 各成分の検量線の直線性

3-1. 無極性固相による精製

3-1-1. 無極性固相の比較

アセトニトリルに標準溶液を添加して、無極性固相（C18-50 および PBX-20）に通液し、流出液を受けた。固相にアセトニトリルまたはアセトニトリル-水(2/1) 0.5mL を通液し、得られた流出液を合わせて試験液とした。

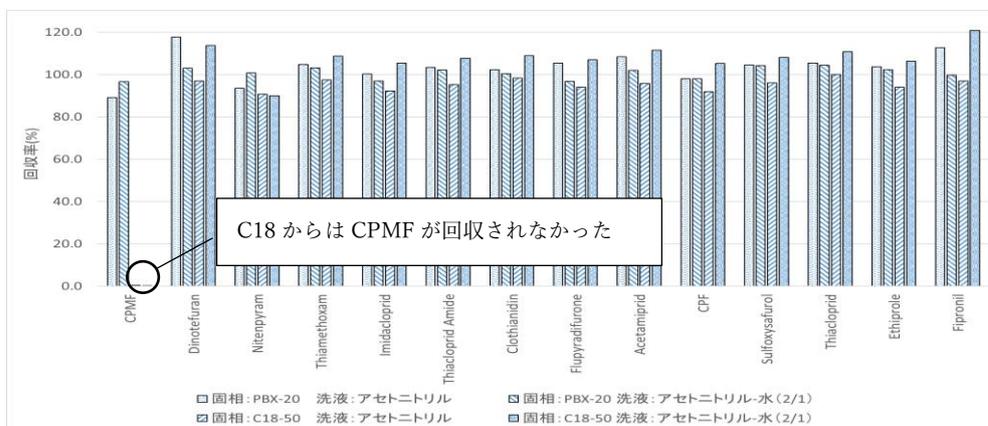


図5 無極性固相と洗液による回収率

PBX-20 の流出液ではすべての成分が回収されたのに対し、C18-50 の流出液からは CPMF が回収されなかった。そこで、C18 から CPMF が回収されなかった原因の調査を行った。

3-1-2. C18 からの CPMF の溶出

上記試験に用いた C18 に 0.1%ギ酸含有アセトニトリル（または 0.1%ギ酸含有アセトニトリル-水(2/1)）を通液したところ CPMF が回収されたことから、C18 の残存シラ

ノール基と CPMF の相互作用によるものと推測された。これは「1-1. 移動相の検討」の項目で確認された酸性移動相によるピーク形状の改善 (図 3) と一致する。C18 に吸着した CPMF は 0.1%ギ酸含有アセトニトリル(または 0.1%ギ酸含有アセトニトリル-水 (2/1))で溶出が可能であったが、陰イオン交換固相 (PSA) の精製効果が減少することが懸念されたため、中性溶媒で溶出可能な PBX を選択した。

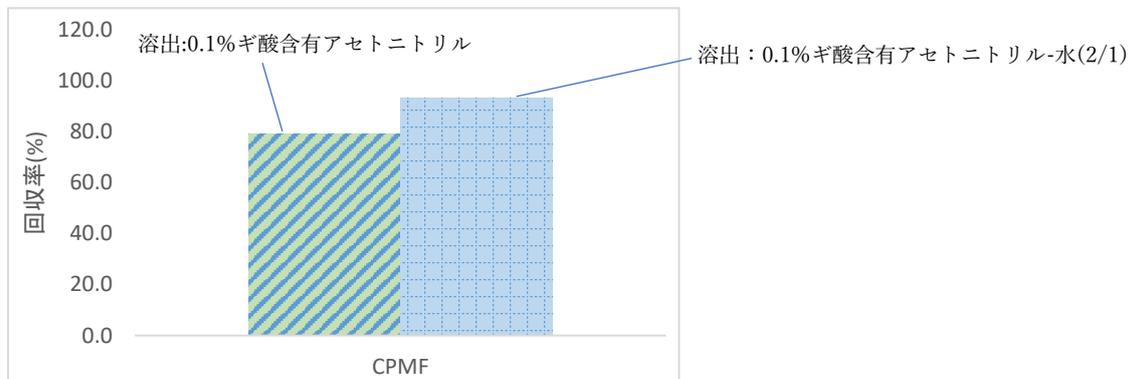


図 6 標準溶液+洗浄溶媒通液後の C18-50 に残留した CPMF の溶出

3-1-3. 無極性固相による各成分の回収率

サンプル通液後の PBX の洗浄溶媒を調査するために、目的成分を保持させた PBX-20 に、アセトニトリルおよびアセトニトリル-水の比率を 5:1~1:1 まで変更して通液し流出液を測定して回収率を調査した(図 7)。

アセトニトリル-水(1/1)では CPMF およびフィプロニルが十分回収されなかったが、アセトニトリル-水(2/1)以上であれば回収率に大きな差はなく、いずれの成分も 0.5 mL の通液で 90%以上回収された。また、アセトニトリルのみを溶出液とした場合 CPMF を十分回収するためには 1 mL 程度通液する必要がある。これは上記結果(図 5)とも一致する。以上の結果より サンプル通液後の洗浄溶媒にアセトニトリル-水(2/1)を用いることとした。

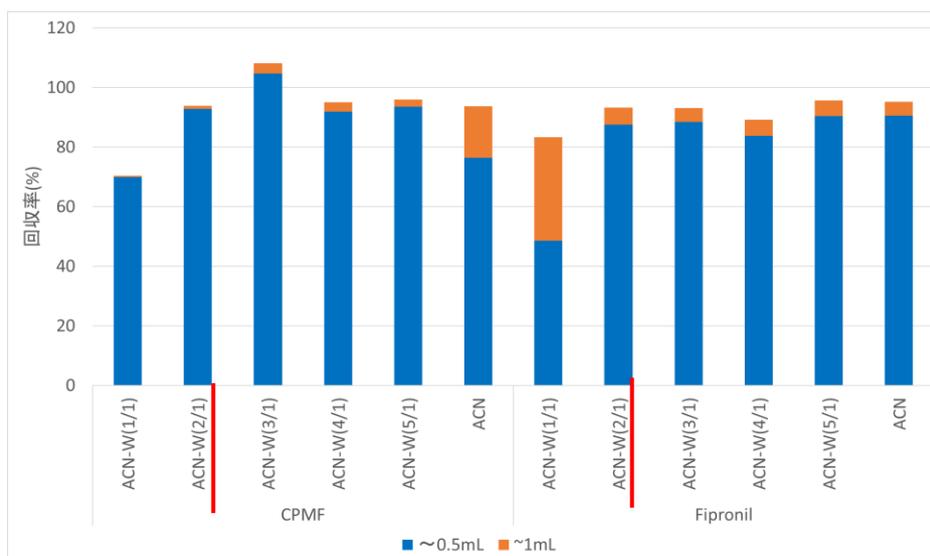


図 7 PBX-20 と洗浄溶媒による各成分の回収率

3-2. 茶におけるカテキン類の除去

得られた条件から前処理フローを作成して、添加回収試験を実施したところ、茶において14成分中8成分がイオン化阻害を受けて回収率が70%未満となった(図8)。

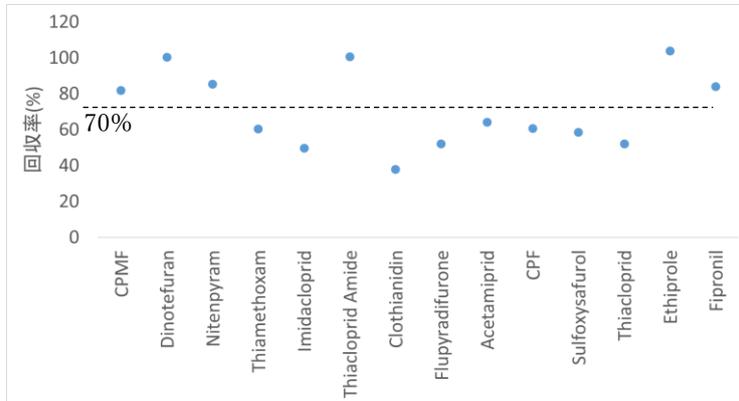


図8 茶添加回収試験結果

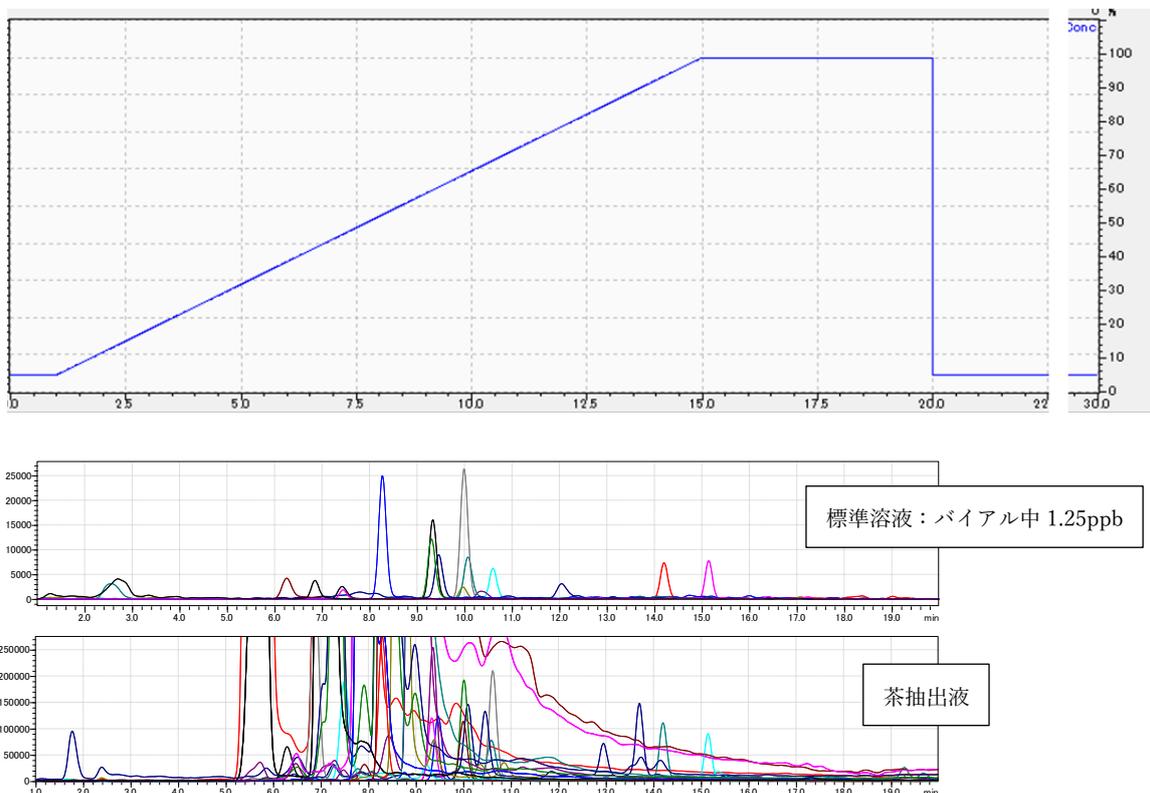


図9 グラジエント条件と測定結果の比較 (上)グラジエント条件 (中)標準溶液(バイアル中 1.25ppb)のTICクロマトグラム (下)茶抽出液のTICクロマトグラム(拡大)

茶抽出液からはカテキン類が18分ごろまで溶出されており(図9)、標準溶液に比べて非常に高濃度含まれていることがわかる。茶の添加回収試験においてカテキン類によるイオン化阻害が低回収率の原因ではないかと推測された。

3-2-1. 固相負荷量によるカテキンの除去

茶に含まれるカテキン類はその構造から陰イオン交換固相により除去できるのではないかと推測された。そこで抽出液を超純水で希釈して固相へ負荷されるマトリックス量を調整(表 2)して PBX-20 と PSA-30 を連結した固相カートリッジに通液しアセトニトリル-水(2/1)で洗浄した。流出液を LC-MS/MS で測定して精製効果を確認した。試料 0.01 g 相当では、カフェインおよびエピカテキンを除くカテキン類が除去された(図 10)。試料負荷量が 0.033 g 相当以上ではカテキン類のピークがサチュレーションを起こしており、正確な相関が取れなかった。操作性を勘案してカテキン類が除去できる **0.01 g 相当で試験法を検討することとした。**

表 2 水添加量と試料負荷量

| 水添加量(mL) | 1 | 2 | 4 | 9 | 19 |
|-----------------|------|-------|------|-------------|-------|
| 固相への試料負荷量(mL) | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 |
| 固相への試料負荷量(g 相当) | 0.05 | 0.033 | 0.02 | 0.01 | 0.005 |

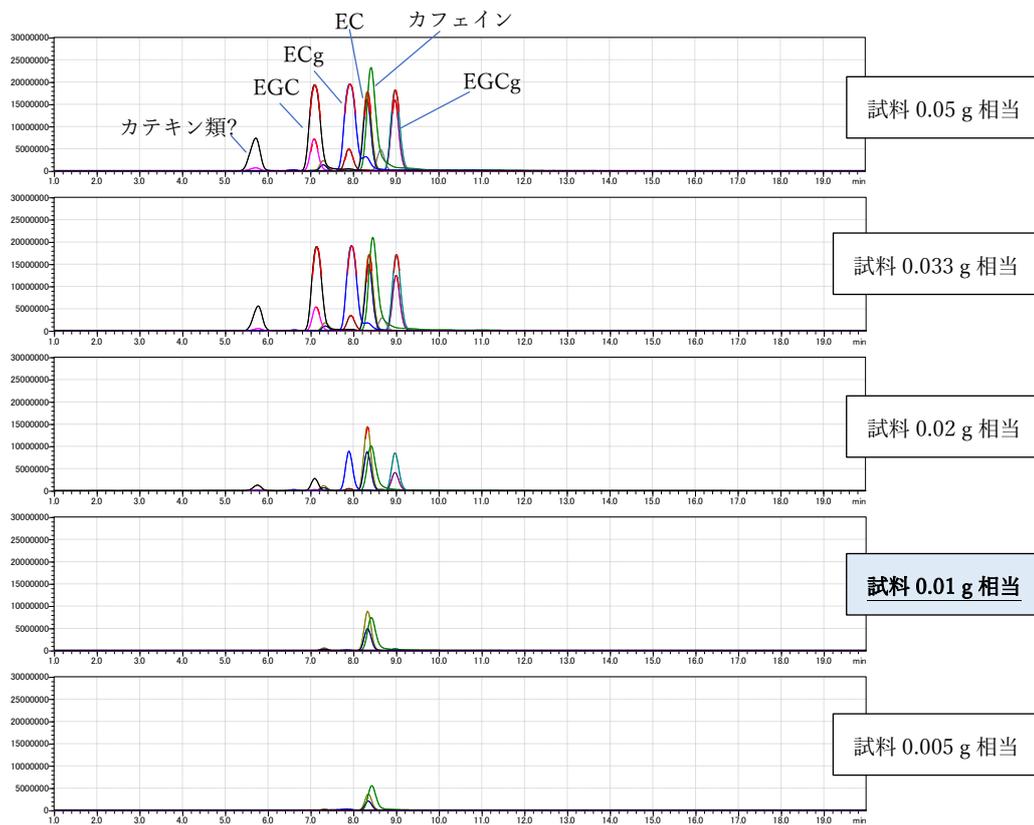


図 10 試料負荷量を変化させた際の茶抽出液の TIC クロマトグラム (下から試料負荷量 0.005, 0.01, 0.02, 0.033, 0.05(g)相当)

EC : エピカテキン, ECg : エピカテキンガレート,
EGC : エピガロカテキン, EGCg エピガロカテキンガレート

3-2-2. PSA による精製効果の確認

上記より PBX と PSA を連結して精製することにより茶中のカテキン類が除去されたが、どちらの固相による精製効果を確認するため、茶抽出液に超純水を加え希釈したサンプルを①PBX-20 のみ、②PBX-20 と PSA-30 を連結したもの、③さらに PSA-30 を連結したものに通液しアセトニトリル-水(2/1)で洗浄し、流出液を LC-MS/MS で測定した。その結果、①PBX のみの流出液からはカテキン類が高濃度で検出されたのに対し、②PBX + PSA および③PBX + PSA + PSA からはカテキン類が除去されていることが分かった。

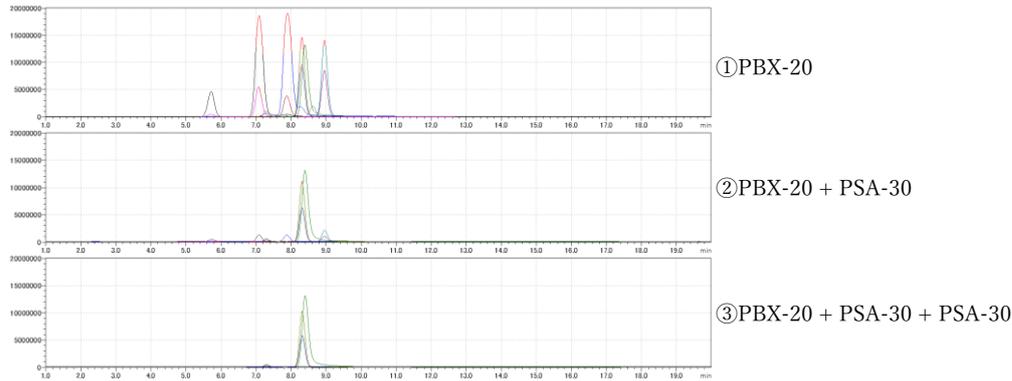


図 11 固相からの流出液の TIC クロマトグラム(茶抽出液)

(上) ①PBX-20 (中) ②PBX-20 + PSA-30 (下) ③PBX-20 + PSA-30 + PSA-30

4. 添加回収試験

ハチミツ、玄米、大豆、ほうれん草に試料中 0.01ppm、茶に試料中 0.25ppm となるように混合標準溶液を添加して添加回収試験を実施した。ほうれん草では分析試料から添加濃度の 10 倍程度のイミダクロプリドが検出されたため正確に評価できなかった。クロチアニジンはイオン化阻害の影響を受けやすかったため、ポジティブ、ネガティブ両分析モードで測定を実施し、茶以外の作物ではいずれかの分析モードで良好な結果が得られたが、茶においては両モードとも低回収率となった。上記以外の項目およびハチミツ、玄米、大豆ではすべての成分で回収率 70%-120%、並行精度 10%以内であった。

表 3 添加回収試験結果

| 分析試料 | | | はちみつ | | 玄米 | | 大豆 | | ほうれん草 | | 茶 | |
|-------------------|---------|-----|---------|--------|---------|--------|---------|--------|---------|--------|---------|--------|
| 併行回数 | | | n=5 | | n=5 | | n=5 | | n=5 | | n=5 | |
| 添加濃度 | | | 0.01ppm | | 0.01ppm | | 0.01ppm | | 0.01ppm | | 0.25ppm | |
| バイアル中濃度 | | | 1.25ppb | | 1.25ppb | | 1.25ppb | | 2.5ppb | | 1.25ppb | |
| 成分名 | RT(min) | 極性 | 回収率(%) | RSD(%) |
| CPMF | 6.2 | (+) | 104 | 1.3 | 115 | 5.4 | 105 | 5.5 | 108 | 2.3 | 111 | 1.8 |
| Dinotefuran | 6.8 | (+) | 102 | 1.8 | 91 | 4.0 | 96 | 3.6 | 94 | 3.8 | 75 | 3.8 |
| Nitenpyram | 7.4 | (+) | 95 | 4.6 | 86 | 3.1 | 90 | 5.1 | 94 | 2.8 | 113 | 9.0 |
| Thiamethoxam | 8.3 | (+) | 105 | 0.8 | 90 | 1.5 | 107 | 1.4 | 97 | 2.1 | 81 | 2.6 |
| Imidacloprid | 9.3 | (+) | 104 | 3.1 | 92 | 3.1 | 102 | 3.5 | 140 | 31.9 | 85 | 3.5 |
| Thiacloprid Amide | 7.4 | (+) | 100 | 1.8 | 95 | 3.0 | 111 | 2.9 | 110 | 1.8 | 108 | 2.3 |
| Clothianidin | 9.4 | (+) | 54 | 6.3 | 82 | 3.7 | 77 | 8.3 | 99 | 3.6 | 67 | 4.1 |
| | | (-) | 105 | 8.3 | 77 | 15.3 | 100 | 14.6 | 106 | 12.3 | 52 | 12.0 |
| Flupyradifurone | 10.6 | (+) | 92 | 3.2 | 90 | 2.1 | 94 | 4.7 | 116 | 4.3 | 92 | 3.3 |
| Acetamiprid | 10.0 | (+) | 102 | 1.5 | 90 | 2.8 | 93 | 4.8 | 99 | 2.4 | 92 | 0.9 |
| CPF | 10.1 | (+) | 107 | 3.0 | 73 | 4.3 | 92 | 4.9 | 108 | 4.6 | 83 | 2.4 |
| Sulfoxysafurol | 10.4 | (+) | 108 | 6.7 | 91 | 5.2 | 106 | 4.8 | 98 | 6.8 | 79 | 3.9 |
| Thiacloprid | 10.6 | (+) | 103 | 1.5 | 87 | 0.7 | 94 | 4.9 | 100 | 2.7 | 85 | 1.3 |
| Ethiprole | 14.2 | (+) | 106 | 2.7 | 96 | 3.2 | 110 | 8.1 | 104 | 2.0 | 88 | 4.3 |
| Fipronil | 15.1 | (-) | 99 | 1.5 | 99 | 2.5 | 109 | 5.2 | 96 | 4.5 | 71 | 5.0 |

【まとめ】

第 37 回農薬残留分析研究会で報告したハチミツに加えて、玄米、大豆、ほうれん草、茶についてネオニコチノイド系殺虫剤およびフルピラジフロン、スルホキサフロル、エチプロール、フィプロニルについて分析方法を検討した。①中性移動相では CPMF のピークがテーリングしたが、酸性移動相を用いることでピーク形状が改善された。②分析開始時の移動相組成について、10%(Bconc.)以上で CPMF およびジノテフランのピーク形状が悪化したため初期移動相組成を 5%(Bconc.)とした。③CPMF の回収率および PSA での精製効果の向上を目的として固相カートリッジを C18 から PBX に変更した。④サンプル通液後の洗浄溶媒にはすべての成分が回収可能であるアセトニトリル水(2/1)を用いることとした。⑤茶抽出液に水を加えて固相負荷量が 0.01g 相当になるよう調整することで PSA によりカテキン類が除去された。⑥上記食品を分析試料として添加回収試験により分析法の評価を行ったところ、良好な回収率および再現性を得られた。

【参考文献】

- 1)小西賢治ら：第 37 回農薬残留分析研究会講演要旨集，119-126 (2014)
- 2)佐々野僚一ら：第 106 回日本食品衛生学会学術講演会要旨集，115(2013)
- 3)平井知里,山岸浩：福井県衛生環境研究センター年報第 14 巻，32-39(2015)

Examination of neonicotinoid analysis method applying STQ method

○Kenji Konishi, Masami Kawakami, Mikie Shima, Syunsuke Matsuo, Ryoichi Sasano and Isao Saito (AiSTI SCIENCE)