

STQ法を応用したネオニコチノイド分析法の検討

e-mail : konishi@aisti.co.jp

○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)



【はじめに】

演者らは第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、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、玄米（穀類）、大豆（豆類）、ほうれん草（葉緑素を多く含むもの）、茶（茶）を分析試料として選択した。

【前処理フロー】

【抽出】

試料採取(※1)

- 添加 水(※2)
- 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 13,000rpm
- 添加 塩化ナトリウム 1 g
クエン酸3Na・2H₂O 1 g
クエン酸2Na・1.5H₂O 0.5 g
- 振とう溶解10秒
- 添加 硫酸マグネシウム(無水) 4 g
- 振とう 1分
- 遠心分離 3,500 rpm, 5分

抽出上澄液

【希釈】※3

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)

【精製】

Smart-SPE PBX-20mg : 精製

Smart-SPE PSA-30mg : 精製

- 負荷 **抽出上澄液または試験溶液①** 0.5 mL
- 通液 アセトニトリル-水(2/1) 0.5 mL
- 流出液
- 添加 水 0.5 mL
- Smart-SPE PBX-20mg : 精製**
- 通液 アセトニトリル-水(2/1) 0.5 mL
- 流出液
- 定容 : 2 mL 水で調整**



分析試料	※1 試料採取量 (g)	※2 水添加量 (mL)	※3 抽出液の希釈
ハチミツ	5	10	なし
玄米	5	10	なし
大豆	5	10	なし
ほうれん草	10	-	なし
茶	2	10	有り

【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, 3µm
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% (20.01-30 min)
カラム温度 : 40 °C
注入量 : 2 µL
イオン化モード : ESI positive, ESI negative

【測定条件の検討】

(1)酸性移動相によるCPMFピーク形状の改善

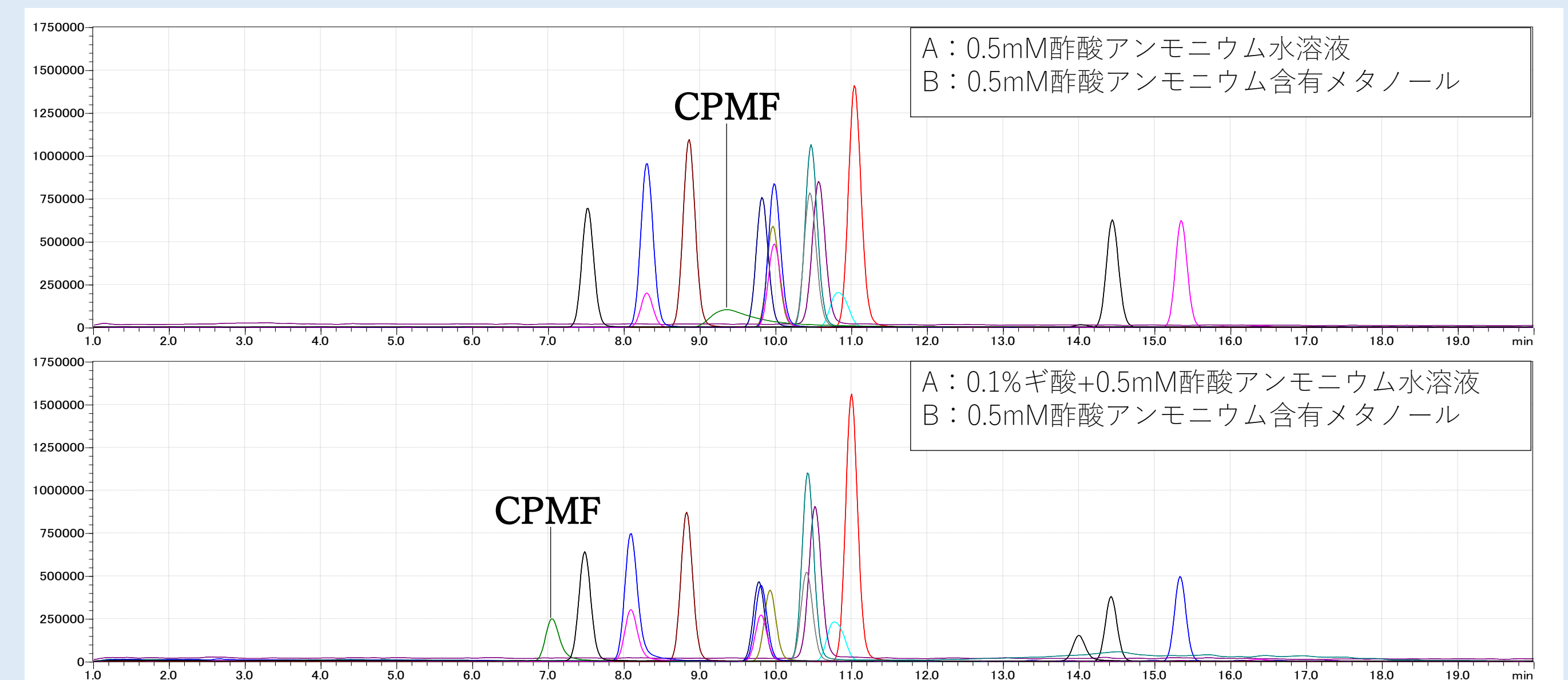


図3 移動相のpHによるピーク形状の比較 (上: 中性移動相, 下: 酸性移動相)

(2)分析開始時のB液の濃度によるピーク形状の比較

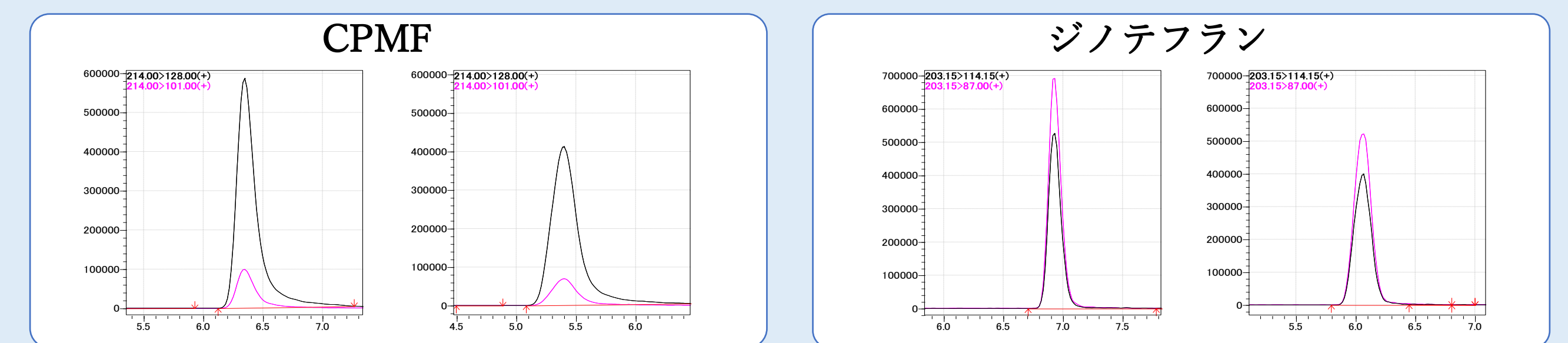


図4 分析開始時のB液の濃度によるピーク形状 (左: 5%, 右: 10%)

【前処理条件の検討】

(1)ポリマー系固相によるCPMF回収率の改善

アセトニトリルに標準溶液を添加して、PBX-20またはC18-50に通液し、流出液を受けた。続けて洗液として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、得られた流出液の回収率を調査した。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。また、アセトニトリルのみで溶出する場合と比べて各化合物の回収率が高くなることから溶出溶媒にアセトニトリル-水(2/1)を選択した。

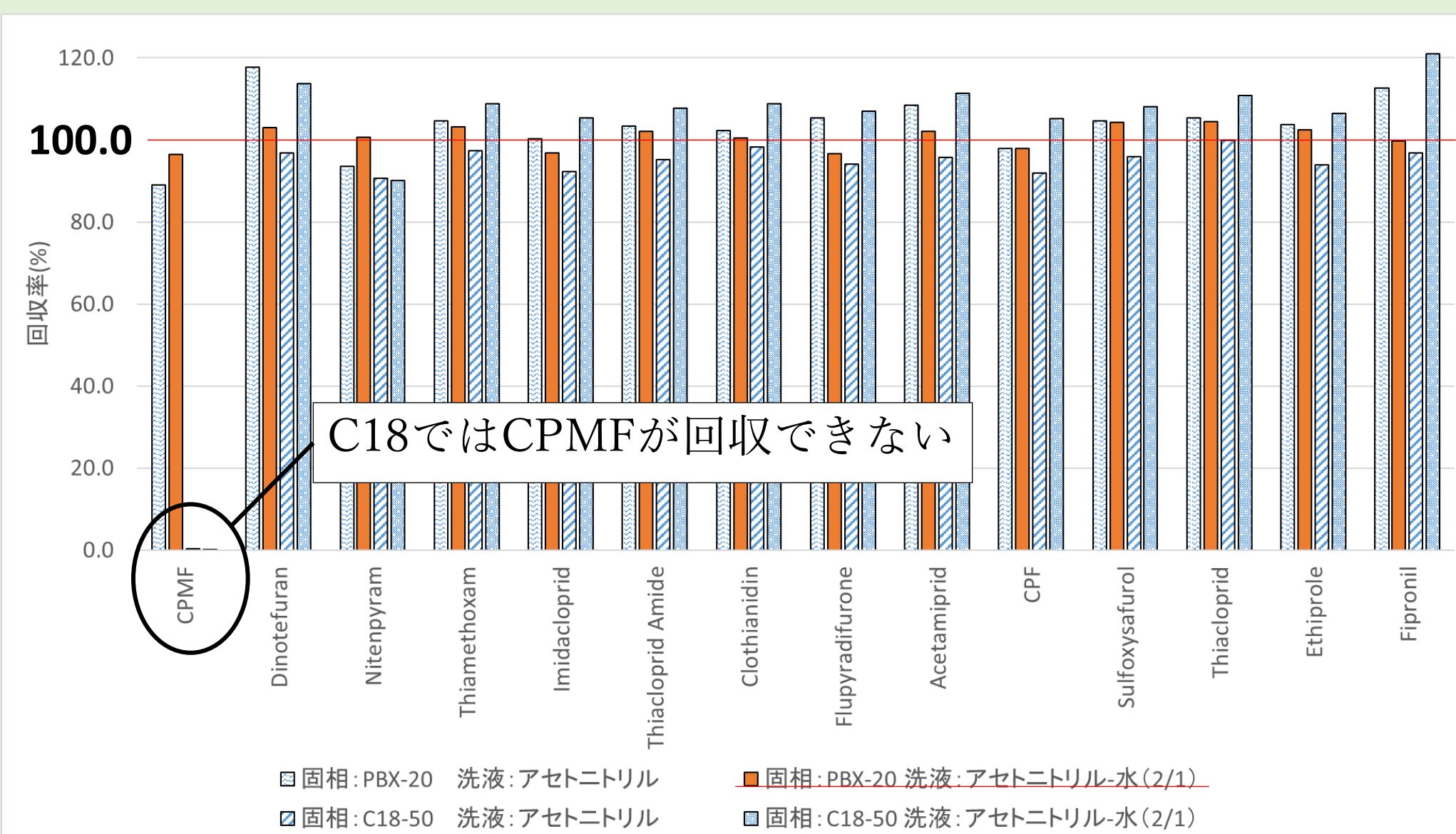


図1 PBXとC18の回収率比較

(2)イオン交換系固相PSAによるカテキン類の除去

茶に含まれるカテキン類の除去を目的として、抽出液を超純水で希釈して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の除去が可能であった。

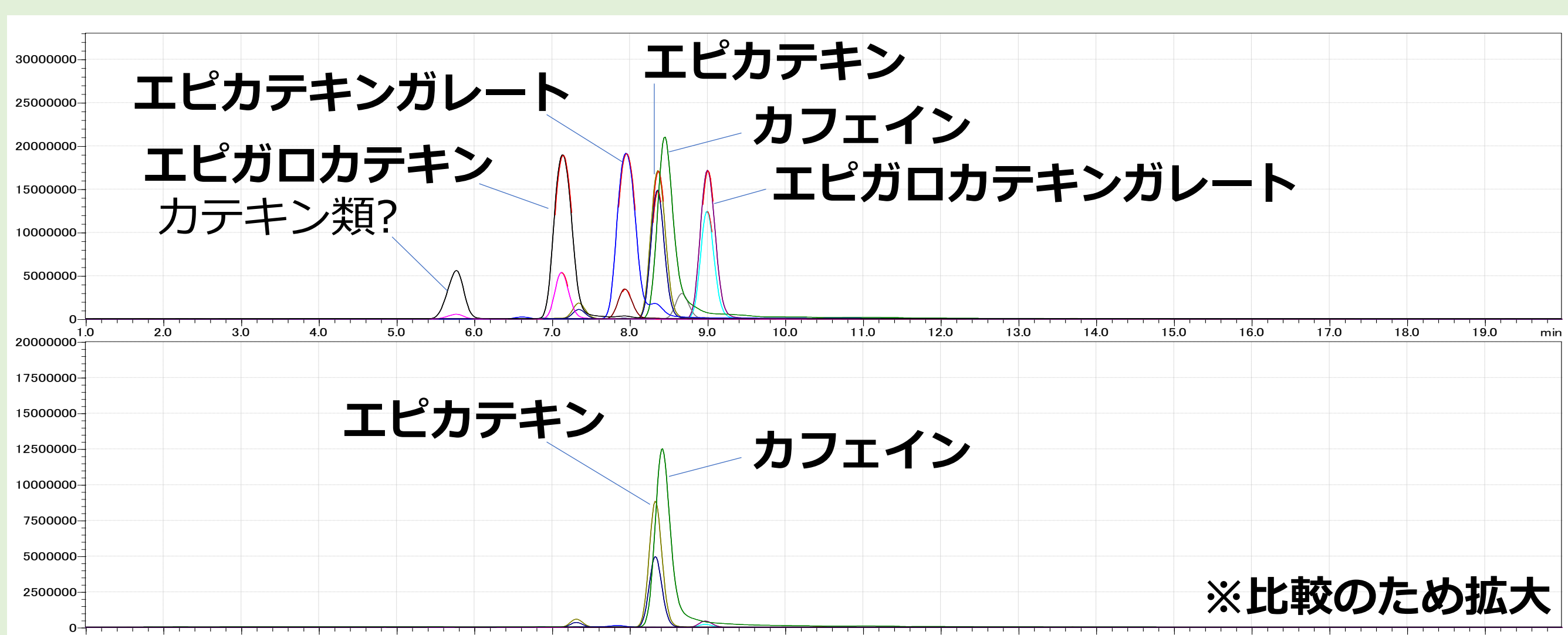


図2 茶抽出液のTICクロマトグラム (上: 試料0.033g相当, 下: 試料0.01g相当)

【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一年報第14巻, 32-39(2015)

【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、茶以外の試料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%、併行精度10%以内であった。

表2 添加回収試験結果

成分名	RT(min)	極性	ハチミツ		玄米		大豆		ほうれん草		茶	
			回収率(%)	RSD(%)	回収率(%)	RSD(%)	回収率(%)	RSD(%)	回収率(%)	RSD(%)	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
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
Sulfoxysafuroil	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
Flupyradifurone	15.1	(-)	99	1.5	99	2.5	109	5.2	96	4.5	71	5.0

※未知試料分を減算して算出

【まとめ】

残留農薬一斉分析法STQ法をもとにネオニコチノイドの分析法を検討した。①ポリマー系固相カートリッジPBXを使用することでCPMFの回収率が向上した。②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によりカテキン類の除去が可能であった。③酸性移動相を用いることでCPMFのテーリングが改善した。④B液濃度が10%以上となるとピーク形状が崩れ始めることから分析開始時のB液の濃度を5%とした。⑤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。