

**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**
○平井知里，山岸浩（福井県衛生環境研究センター）

【はじめに】

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で、天然の殺虫剤といわれる「ニコチン」からその名が付けられたものである。有機リン系農薬の代替農薬として1990年代半ばから使われ始めた農薬であるが、近年ミツバチなど花粉媒介昆虫への毒性が問題視されている。EU諸国では、ミツバチへの危害を防止するためクロチアニジンなど3種類のネオニコチノイド系農薬とフェニルピラゾール系農薬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ヒトへの毒性は比較的低いとされているが、近年の研究で、一部のネオニコチノイド系農薬が哺乳類の神経系に影響を与える可能性があるとの報告がなされており、欧州ではこれらの農薬のADI、ARfDを見直す動きもある。

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。

そこで、本県においてもネオニコチノイド系農薬等の検査体制を整え、県内に流通する食品中の残留実態を把握することを目的として、ネオニコチノイド系農薬等の一斉分析法を検討することとした。検討には、ミツバチ斃死との関連が深い蜂蜜および玄米を試料として用いた。

今回、QuEChERS法を用いた前処理法について検討した結果、欧州で広く用いられているEuropean Committee for Standardization Standard Method EN 15662（以下、EN法）を抽出操作に用いることにより良好な結果が得られ、検討した試験法について妥当性評価を行ったので報告する。

【方法】

1) 対象農薬

アセタミプリド、イミダクロプリド、クロチアニジン、ジノテフラン、チアクロプリド、チアクロプリドアミド、チアメトキサム、ニテンピラム、CPMA、CPMF、CPF、フィプロニル、エチプロール、フロニカミド、TFNAおよびTFNGの計16化合物

2) 内部標準物質

アセタミプリド-d3、イミダクロプリド-d4、クロチアニジン-d3およびチアメトキサム-d3

3) 標準品および標準溶液

農薬標準原液：和光純薬工業(株)の残留農薬試験用標準品を各々アセトニトリルまたはメタノールに溶解して100 μ g/mLの標準原液を調製した。

農薬混合標準溶液：各標準原液を混合し、メタノールで1 μ g/mLに調製した。

内部標準原液：Sigma-Aldrich Japan社の分析用標準品をアセトニトリルに溶解して100 μ g/mLに調製した。

内部標準混合溶液：各内部標準原液を混合し、アセトニトリルで $1\mu\text{g/mL}$ に調製した。

検量線用標準溶液：混合標準溶液（各 $1\mu\text{g/mL}$ ）をメタノール・水（1:1）混液またはマトリクス溶液で適宜希釈し、 $0.5\sim 25\text{ng/mL}$ の検量線用標準溶液を調製した。試験法の妥当性評価において、定量は内部標準法を用い、各標準溶液 1mL に内部標準混合溶液（各 $1\mu\text{g/mL}$ ）を $25\mu\text{L}$ 添加した。

4) 試薬等

試薬はそれぞれ以下の製品を用いた。特に記載のないものは、下記2社の残留農薬分析用グレードを用いた。

関東化学(株)：0.1vol% ぎ酸-蒸留水（高速液体クロマトグラフィー用）、ぎ酸（高速液体クロマトグラフィー用）

和光純薬工業(株)：クエン酸水素二ナトリウム1.5水和物（和光一級）、クエン酸三ナトリウム二水和物（試薬特級）、無水硫酸マグネシウム（試薬特級）、無水酢酸ナトリウム（試薬特級）、 1mol/L 酢酸アンモニウム（高速液体クロマトグラフィー用）、メタノール（LC/MS用）、超純水（LC/MS用）

水：Milli-Q Reference 超純水装置（メルク(株)）により精製したものを用いた。

ミニカラム：(株)アイスティサイエンス製C18-30mg、C18-50mg、PSA-30mgを用いた。

セラミックホモジナイザ：アジレント・テクノロジー(株)製セラミックホモジナイザ（50mLチューブ用）を用いた。

5) 試料

蜂蜜：県内産アカシア蜜を用いた。

玄米：平成7年に県内で生産されたコシヒカリを用いた。

6) 装置および測定条件

表1、2のとおりとした。

LC移動相溶媒は、TFNAなど酸性化合物について感度良く定量するため酸性条件とした。

また、対象16化合物のMRM条件について、3200QTRAPの最適化プログラムを用いて48モニターイオンを決定し、真空部の条件を最適化した。（図1）

Positive/Negative両モードでの検出が可能な化合物については、両モードでモニターイオンを設定した。また、塩素原子には安定同位体として塩素35（存在比76%）と塩素37（存在比24%）が存在することから、分子内に塩素原子を含む化合物の一部について、塩素37含有化合物のモニターイオンを設定した。

7) 試験溶液の調製および定量

蜂蜜は試料5gに水10mLを加えて、下記の抽出操作を行った。

玄米は均一に粉砕した試料5gに水10mLを加えて30分間放置後、下記の抽出操作を行った。

①QuEChERS法の検討：試料および試料に農薬混合標準溶液を添加したものについて、図2の方法により、試験溶液を調製した。抽出操作は、EN法、AOAC Official Method 2007.01（以下、AOAC法）およびアセトニトリル/リン酸緩衝液（pH7）に

よる抽出法（以下、比較法）の3種類の方法を検討した。（表3）

精製は、アイスティサイエンス㈱が開発したSTQ法を参考に、抽出操作で得られたアセトニトリル層1mLを、C18-30mg、PSA-30mgおよびC18-50mg固相カートリッジで精製した。

得られた試験溶液および検量線用標準溶液（溶媒標準溶液）をLC/MS/MSに注入し、得られたクロマトグラムのピーク面積から絶対検量線法により定量した。

②EN法およびマトリクス標準溶液の検討：試料および試料に農薬混合標準溶液を添加したものについて、図3の方法により、試験溶液を調製した。得られた試験溶液およびマトリクス標準溶液をLC/MS/MSに注入し、得られたクロマトグラムのピーク面積から絶対検量線法により定量した。

③試験法の妥当性評価：試料および試料に農薬混合標準溶液を添加したものについて、図4の方法により、試験溶液を調製した。得られた試験溶液およびマトリクス標準溶液をLC/MS/MSに注入し、得られたクロマトグラムのピーク面積から内部標準法により定量した。

8) 添加回収試験

①QuEChERS法の検討：試料中濃度で0.1ppmになるよう添加した水、蜂蜜および玄米について2併行で試験を行い、回収率を求めた。

②EN法およびマトリクス標準溶液の検討：試料中濃度で0.01ppmおよび0.1ppmになるよう添加した蜂蜜および玄米について2併行で試験を行い、回収率を求めた。

③試験法の妥当性評価：試料中濃度で0.01ppmおよび0.1ppmになるよう添加した蜂蜜および玄米について、分析者1名が1日2併行で5日間の繰り返し試験を行った。得られた結果から選択性、定量限界、真度、併行精度および室内精度を求め、厚生労働省から通知されたガイドライン*（以下、ガイドライン）に基づいて評価した。

※厚生労働省「食品中に残留する農薬等の試験法の妥当性評価ガイドラインの一部改正について」（H22.12.24食安発1224第1号）

【結果および考察】

1) QuEChERS法の検討

QuEChERS法は2003年にAnastassiadesらのグループによって開発されたもので、ポリプロピレン製遠心管の中でアセトニトリル抽出、塩析、脱水を同時に行い、遠心分離して得られた抽出液を分散固相抽出により精製する簡便迅速な方法である。その後改良が加えられ、現在ではバッファを用いた2種類のメソッドが広く用いられている。

今回は、抽出操作について、欧州で広く用いられているEN法、米国などで用いられているAOAC法および比較法の3種類の方法で添加回収試験を行った。

その結果、水については、抽出法にEN法を用いた場合にすべての化合物で良好な回収率を得た。AOAC法と比較法については、抽出液のpHや使用した塩の影響により、酸性化合物であるTFNAおよびTFNGの回収率が低くなった。（表4）

実試料の結果については、マトリクスの影響から水での結果に比べ全体的に低くなり、EN法の結果のみを見ても、蜂蜜で3化合物、玄米で6化合物が70%を下回った。

他の二つの方法の結果を見ても、実試料の結果ではマトリクスの影響から回収率が70%を下回る化合物が増えた。

水に添加した試料では、水溶性の高いCPMAやTFNAを除きほとんどの化合物が90%以上回収されていることから、実試料で回収率が低下した原因は、試料由来のマトリクスによるイオン化抑制によるものと考えられた。

そこで抽出法についてはEN法を採用することとし、さらにマトリクスの影響を補正するため、マトリクス標準溶液を用いて定量を行うこととした。

2) EN法およびマトリクス標準溶液の検討

蜂蜜および玄米のブランク試料を試験方法に従って操作して得たマトリクス溶液で混合標準溶液を希釈し、0.5~25ng/ μ Lの検量線用標準溶液を調製した。このマトリクス標準溶液を用いて、添加試料から得られた試験液を絶対検量線法で定量した結果、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し、ほとんどの化合物について良好な回収率を得ることができた。16化合物中14化合物について、蜂蜜および玄米のいずれの試料においても回収率は70~120%の範囲内となり、CPMAとTFNAの2化合物についても、6割程度を回収することができた。(表5)

CPMAとTFNAはともに水溶性の高い酸性化合物であり、アセトニトリル/水分配時に水層に残留することが回収率低下の原因と考えられた。なお、TFNAについては、PSA固相から十分に溶出できていない可能性があることから、溶出に用いるギ酸メタノールのギ酸濃度を0.4%から2%に変更したところ、回収率の向上が見られた。

3) 試験法の妥当性評価

試験法の妥当性評価は、試験機関において農薬等の試験法を採用する際に、分析結果の信頼性を保証するため、国のガイドラインに基づき実施するものである。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、選択性、真度、精度および定量限界を評価する。当センターで使用している質量分析計はイオン源の極性切り替えによるPos/Neg同時測定には対応しておらず、また装置の耐圧性能も低く分析時間を一定程度必要とすることから、定量精度を向上するためには、質量分析計の感度変動によるバラツキや夾雑成分によるマトリクス効果を低減することが重要と思われた。そこで、1)および2)の結果から、抽出法にはEN法を用い、定量法にはマトリクス標準溶液を用いた内部標準法を用いて、試験法の妥当性評価を実施することとした。

蜂蜜および玄米を試料として、分析者1名が1日2併行5日間の繰り返し試験を行った。その結果、蜂蜜、玄米いずれの試料についても、CPMAを除く15化合物が選択性、定量限界、真度および精度においてガイドラインの目標値を満たした。(表6)

CPMAについては、真度は40~60%であった。また、CPMFはガイドラインの目標値を満たしたものの、真度は100%を上回った。CPMAおよびCPMFはニテンピラムの代謝物であり、CPMAについてはアセトン等の有機溶媒中で加温されることにより容易にCPMFへ変化することが知られている。このことから、CPMAで回収率が低下したのは、水溶性が高いことによる抽出時のロスに加え、精製中にCPMFへ変化したためではないかと考えた。そこで、CPMAのみを玄米に添加し試験したところ、2割程度がCPMFへ変化していた。従って妥当性評価結果においてもCPMFの

真度に変化したCPMAが寄与している可能性が高いと考えられた。

以上の結果から、CPMAだけでなく目標値を満たしたCPMFについても参考値とし、今回検討した一斉試験法で試験可能な対象化合物は、CPMAおよびCPMFを除いた14化合物とすることが適当と考えている。14化合物については、妥当性評価において良好な結果が得られたことから、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迅速、簡便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を用いて県内に流通する蜂蜜および玄米の残留実態調査を進める予定である。

Analysis of Neonicotinoid Insecticides in Honey and Brown Rice by QuEChERS
Chisato HIRAI and Hiroshi YAMAGISHI (Fukui Prefectural Institute of Public
Health and Environmental Science)

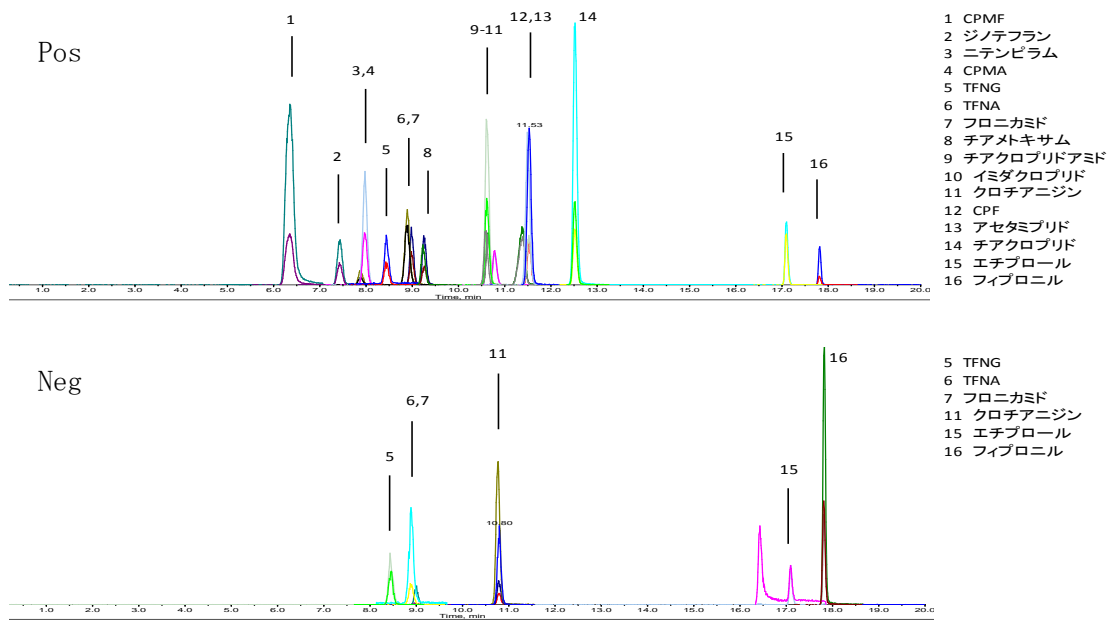


図1 MRMクロマトグラム

(抽出操作: EN法)

試料 5g

- 水 10mL (玄米: 30min 放置)
- アセトニトリル 10mL
- セラミックホモジナイザ

振とう (1分間)

- NaCl 1g
- クエン酸3Na・2水和物 1g
- クエン酸水素2Na・1.5水和物 0.5g
- 無水硫酸マグネシウム 4g

振とう (1分間)

遠心分離 (3000rpm, 5分間)

アセトニトリル層

1mLを分取、精製操作へ

(抽出操作: 比較法)

試料 5g

- 0.5mol/Lリン酸緩衝液 (pH7) 10mL (玄米: 30min 放置)
- アセトニトリル 10mL
- セラミックホモジナイザ

振とう (1分間)

- NaCl 1g
- 無水硫酸マグネシウム 4g

振とう (1分間)

遠心分離 (3000rpm, 5分間)

アセトニトリル層

1mLを分取、精製操作へ

(抽出操作: AOAC法)

試料 5g

- 水 10mL (玄米: 30min 放置)
- 1%酢酸・アセトニトリル 10mL
- 無水硫酸マグネシウム 4g
- 無水酢酸ナトリウム 1g
- セラミックホモジナイザ

振とう (1分間)

遠心分離 (3000rpm, 5分間)

アセトニトリル層

1mLを分取、精製操作へ

(精製操作)

1mLを分取

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

水 0.5mL

C18-50mg^{※2}に負荷、80%メタノール 1mLで溶出

水で4mLに定容

※1 アセトン 2mL、アセトニトリル 2mLでコンディショニング
 ※2 アセトン 2mL、80%メタノール 2mLでコンディショニング

図2 試験溶液の調製方法①

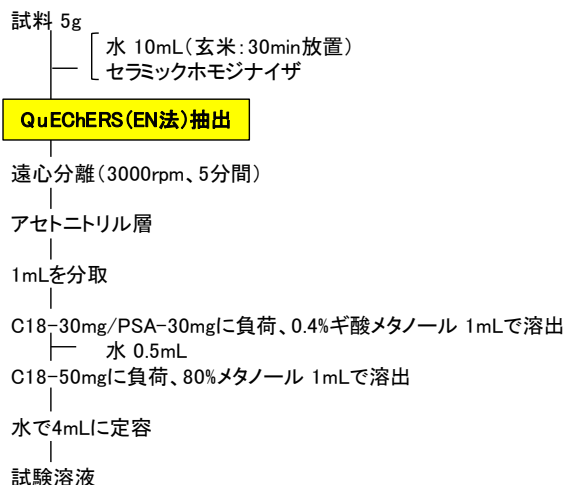


図 3 試験溶液の調製方法②

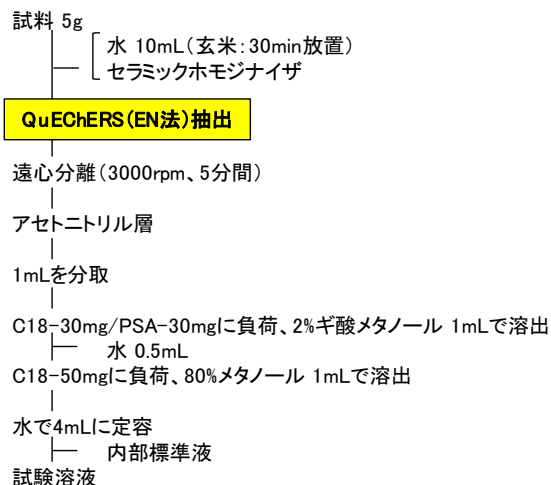


図 4 試験溶液の調製方法③

表1 装置および測定条件

機器	パラメータ	設定値
LC	機器	LC20A(島津)
	カラム	TSKgel ODS-100V 3μ m (2.0mmI.D. × 150mm)
	移動相A	0.1%ギ酸水溶液
	移動相B	0.1%ギ酸含有メタノール
	グラジエント条件	B: 10%(0min)-10%(1min)-40%(6min)-65%(12min)-95%(15min)-95%(20min)-Stop(20.1min)
	平衡化	7min
	流速	0.2mL/min
	カラム温度	40°C
	サンプル温度	4°C
	注入量(μ L)	5μ L
MS/MS	機器	3200QTRAP LC/MS/MS (ABサイエックス)
	イオン化法	ESI (+)/(-)
	プローブ電圧	5500/-4000(V)
	イオンソース温度	500(°C)
	カーテンガス	30psi
	ネブライズガス GS1	50psi
	ターボガス GS2	80psi

表2 MRMトランジション

No.	化合物名	Mw	RT (min)	Q1(m/z)	Q3(m/z)	No.	化合物名	Mw	RT (min)	Q1(m/z)	Q3(m/z)
(Positive)											
1	アセタミプリド_1	222.7	11.5	223	126	31	TFNA_1	191.1	8.9	192	148
2	アセタミプリド_2			223	99	32	TFNA_2			192	98
3	アセタミプリド_3 (³⁷ Cl)			225	128	33	TFNG_1	248.2	8.4	249	203
4	イミダクロプリド_1	255.7	10.6	256	209	34	TFNG_2			249	148
5	イミダクロプリド_2			256	175						
6	クロチアニジン_1	249.7	10.8	250	132	(Negative)					
7	クロチアニジン_2			250	169	35	クロチアニジン_1	249.7	10.8	248	58
8	ジノテフラン_1	202.2	7.3	203	129	36	クロチアニジン_2			248	165
9	ジノテフラン_2			203	87	37	クロチアニジン_3 (³⁷ Cl)			250	58
10	チアクロプリド_1	252.7	12.5	253	126	38	フィプロニル_1	437.1	17.9	435	330
11	チアクロプリド_2			253	99	39	フィプロニル_2			435	250
12	チアクロプリド_3 (³⁷ Cl)			255	128	40	フィプロニル_3 (³⁷ Cl)			437	332
13	チアクロプリドアミド_1	270.7	10.5	271	126	41	エチプロール_1	397.2	17.1	395	330
14	チアクロプリドアミド_2			271	228	42	エチプロール_2			395	331
15	チアメキサム_1	291.7	9.2	292	211	43	フロニカミド_1	229.2	9.0	228	81
16	チアメキサム_2			292	181	44	フロニカミド_2			228	146
17	ニテンピラム_1	270.7	7.9	271	126	45	TFNA_1	191.1	8.9	190	146
18	ニテンピラム_2			271	237	46	TFNA_2			190	69
19	フィプロニル_1	437.1	17.9	437	368	47	TFNG_1	248.2	8.4	247	146
20	フィプロニル_2			437	255	48	TFNG_2			247	163
21	CPF_1	198.7	11.4	199	128	内部標準 (Positive)					
22	CPF_2			199	126	49	チアメキサム_d3	294.7	9.2	295	214
23	CPMA_1	255.7	7.9	256	126	50	イミダクロプリド_d4	259.7	10.6	260	213
24	CPMA_2			256	176	51	アセタミプリド_d3	225.7	11.5	226	126
25	CPMF_1	211.7	6.4	212	126	内部標準 (Negative)					
26	CPMF_2			212	99	52	クロチアニジン_d3	252.7	10.8	251	58
27	エチプロール_1	397.2	17.1	397	351						
28	エチプロール_2			397	255						
29	フロニカミド_1	229.2	9.0	230	203						
30	フロニカミド_2			230	148						

表3 抽出操作の概要

	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 放置、+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

表4 抽出法検討結果（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
Acetamidrid	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
Flonicamid	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

表5 EN法およびマトリクス標準溶液検討結果

（単位％、n=2）

Compound	蜂蜜		玄米	
	0.01ppm	0.1ppm	0.01ppm	0.1ppm
Acetamidrid	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

表6 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				
Acetamidrid	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	○	○	○	○

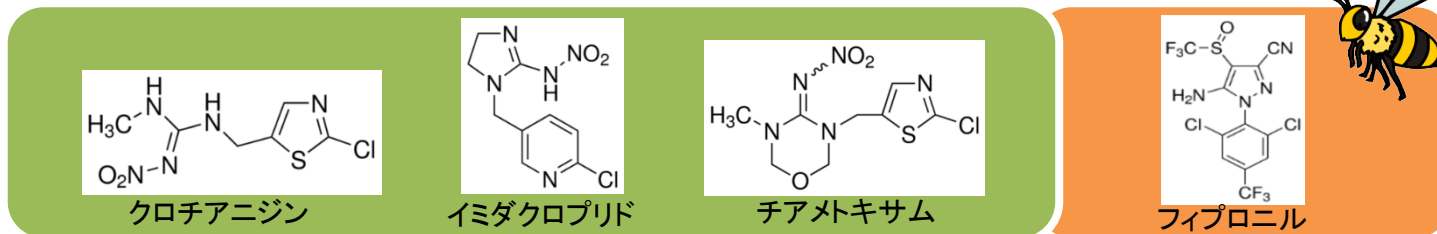
第38回農薬残留分析・第33回農薬環境科学合同研究会(2015.10.15-16)

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。



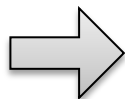
- ネオニコチノイド系農薬は、その浸透性・残効性の高さから日本でも多用されており、同農薬との関連が疑われるミツバチ斃死や赤とんぼ減少などが各地で報告されている。

- 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。

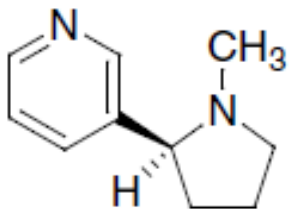


国内で使用されている ネオニコチノイド系農薬等の新規農薬

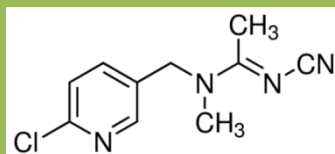
構造・作用が
似ている



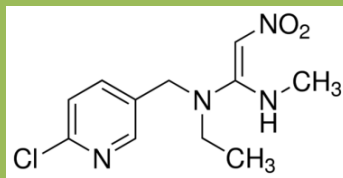
「天然の殺虫剤」
ニコチン



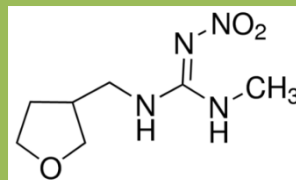
ネオニコチノイド系農薬



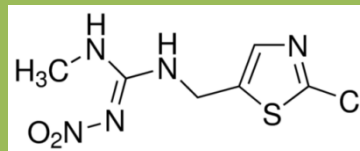
アセタミプリド



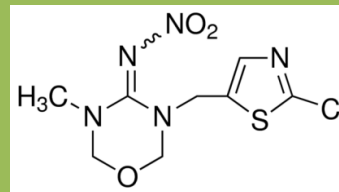
ニテンピラム



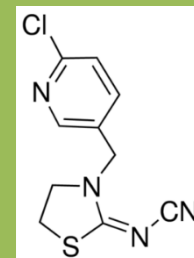
ジノテフラン



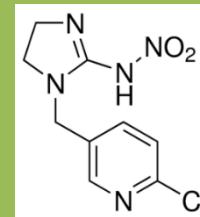
クロチアニジン



チアメトキサム

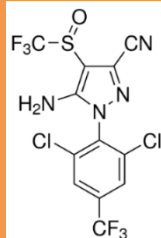


チアクロプリド

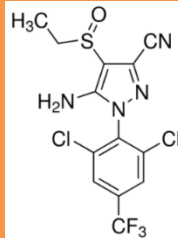


イミダクロプリド

フェニルピラゾール系農薬

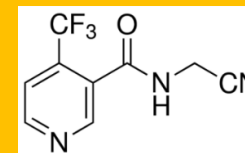


フィプロニル



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

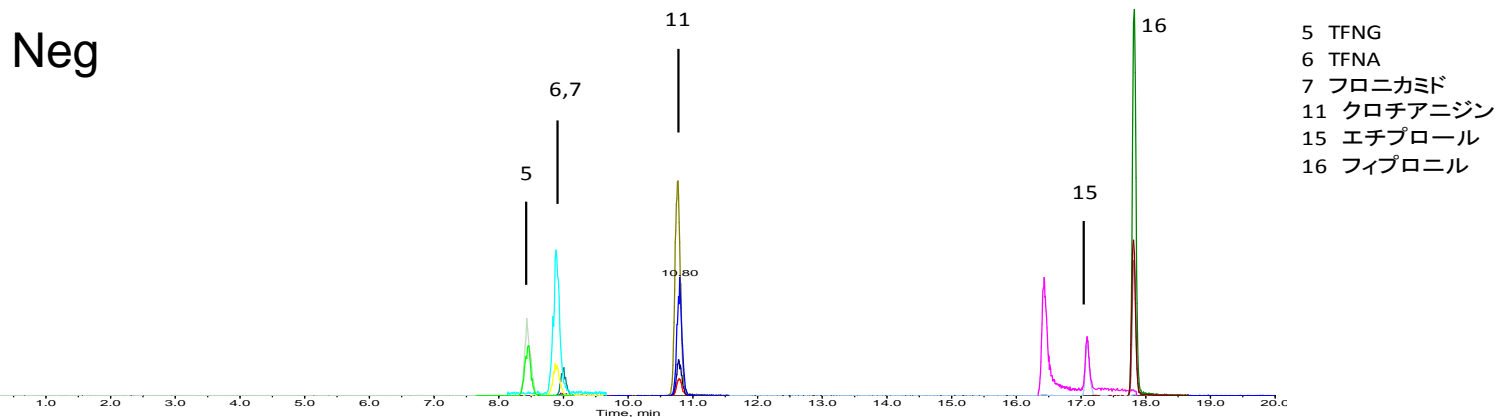
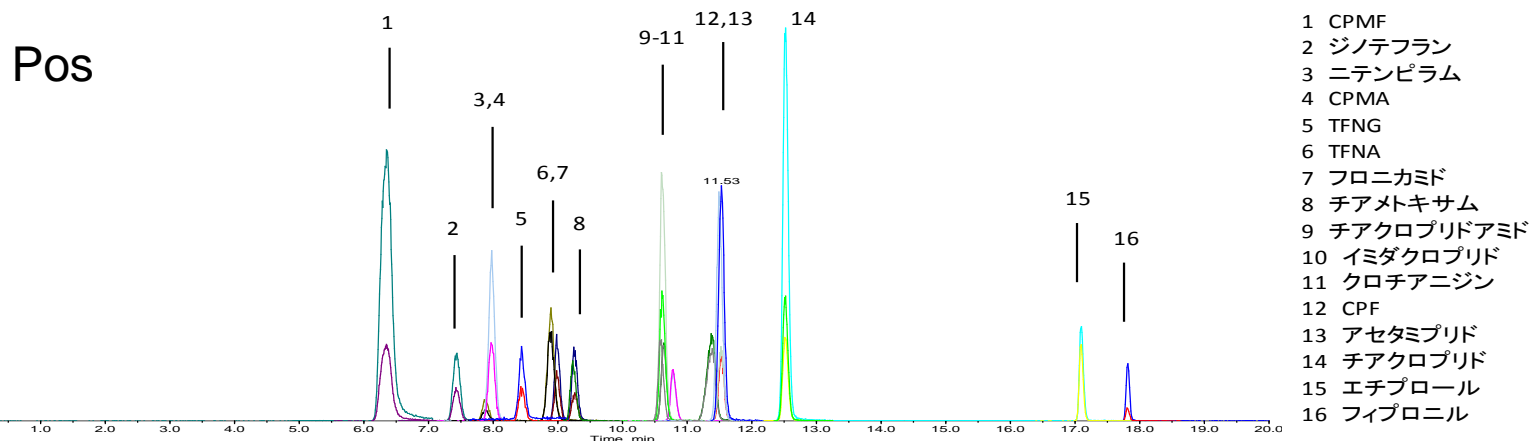
グラジエント B: 10%(0min)-10%(1min)-40%(6min)-65%(12min)-
95%(15min)-95%(20min)



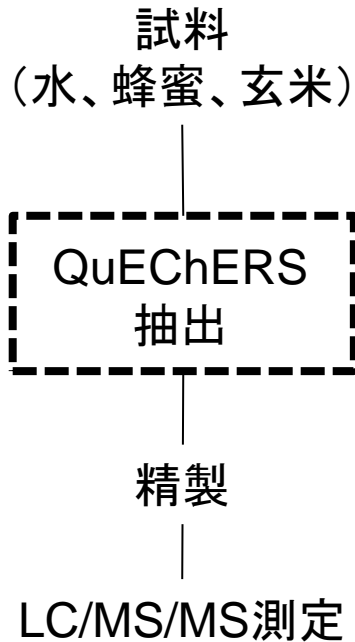
移動相は酸性条件とし、
分離の良いカラム、溶媒、
グラジエント条件を決定

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

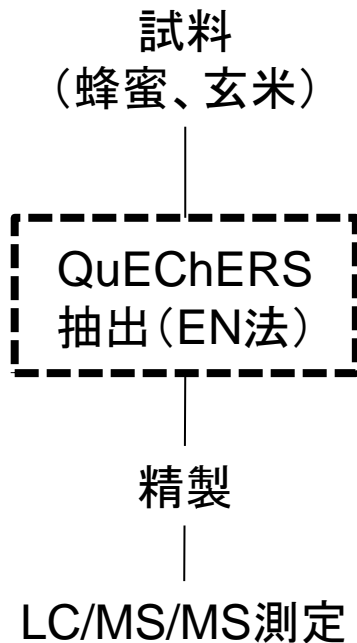
3種類の抽出法を比較

- 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

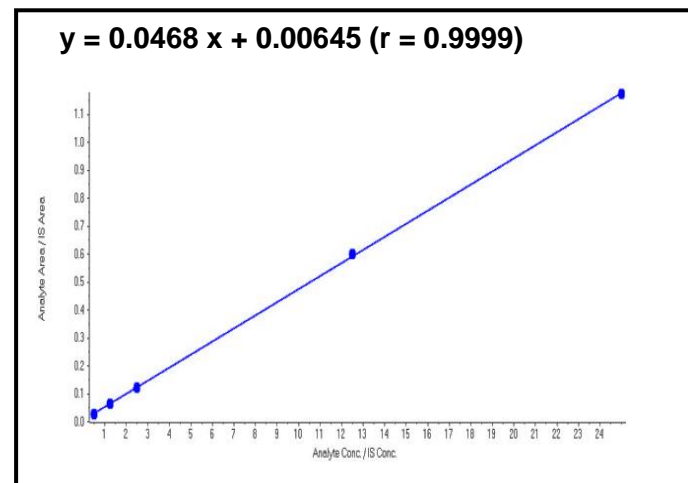
検量線(内部標準法)

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



$R^2 > 0.999$
 相関の良い
 検量線

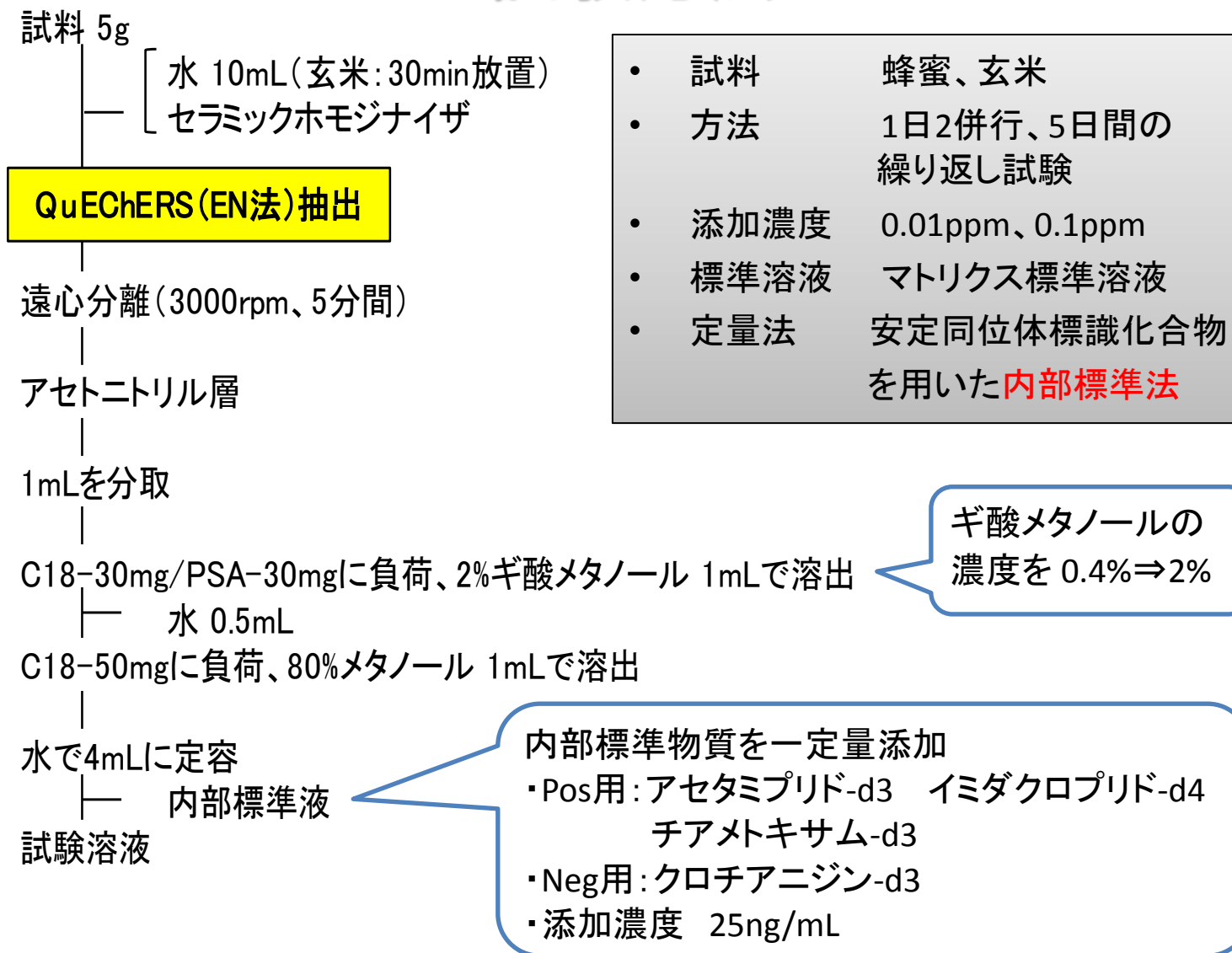
アセタミプリドの検量線(試料:蜂蜜)



濃度範囲: 0.5-25ng/mL

③ 試験法の妥当性評価

試験方法



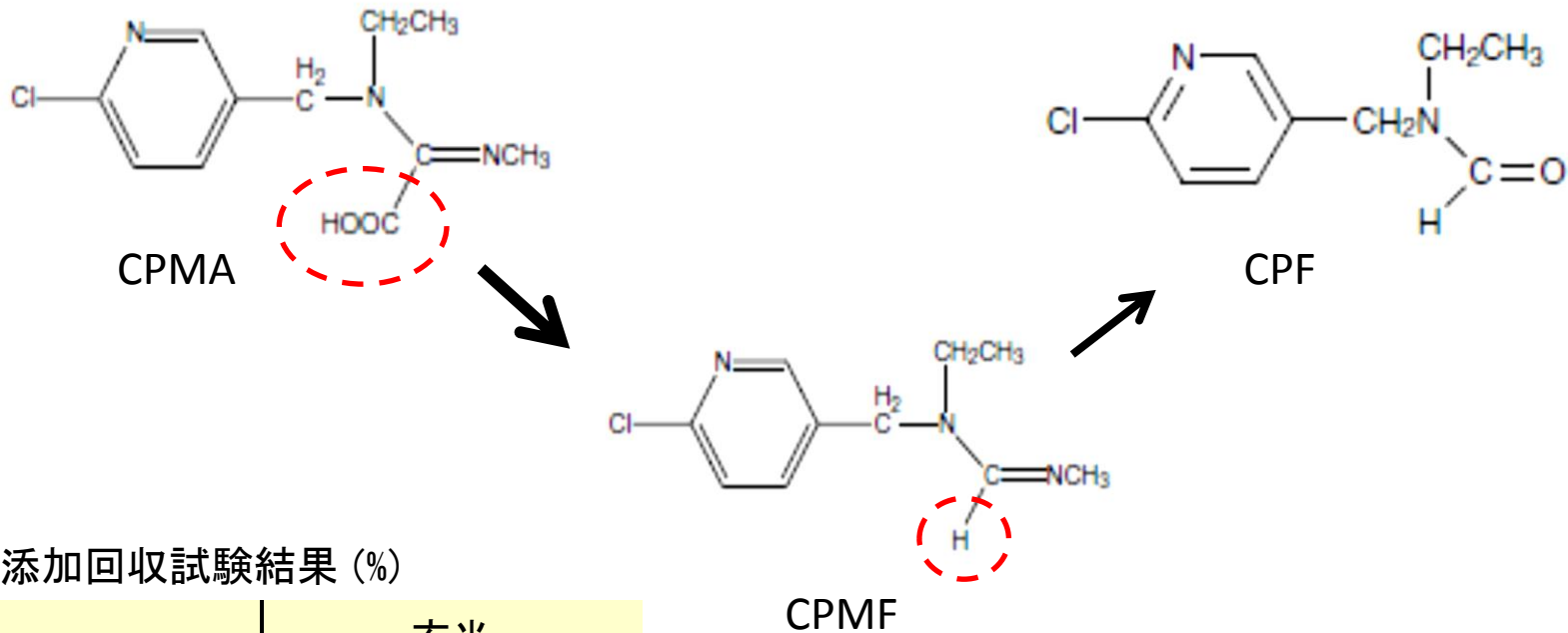
③ 試験法の妥当性評価

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。