

〔短 報〕

農産物中のネオニコチノイド系農薬分析法の検討

石川県保健環境センター 健康・食品安全科学部 小澤 祐子・竹田 正美

〔和文要旨〕

農産物中のネオニコチノイド系農薬7項目10成分の一斉分析法を検討した。試料をアセトニトリル/水の混合溶媒で抽出し、InertSep C18 FFおよびInertSep HLB FF固相カラムで精製し、LC-MS/MSで測定を行い、絶対検量線法で定量した。この方法を用いて、玄米、ほうれんそう、キャベツ、ばれいしょ、トマト、りんごの6農産物について、妥当性評価ガイドラインに基づき妥当性評価を実施した。その結果、玄米、キャベツ、ばれいしょでは9成分、ほうれんそう、トマト、りんごでは10成分が検査可能であった。

キーワード：ネオニコチノイド系農薬、農産物、LC-MS/MS

1 はじめに

ネオニコチノイド系農薬は、人畜に害が少なく、害虫に特異的に効果を発揮することから幅広い農作物に活用されている。

本県では、既報¹⁾の分析法により農産物中のジノテフラン検査を実施してきた。添加回収試験における回収率は概ね良好であったが、2017年に回収率が大幅に低下した。回収率低下の要因を検討したところ、精製に用いるグラファイトカーボン固相カラムでジノテフランの溶出にロット差が認められ、分析法を改良する必要が生じた。また、既報の精製方法は操作が複雑で、分析者の熟練度による回収率のばらつきが大きいという課題があった。

ニテンピラムについては、県内農産物で使用実績があったものの、これまで検査を実施していなかった。「食品、添加物等の規格基準」²⁾では、「ニテンピラムとは、ニテンピラム並びにその代謝物であるCPMA（2-[N-(6-クロロ-3-ピリジルメチル)-N-エチル]アミノ-2-メチルイミノ酢酸）およびCPMF（N-(6-クロロ-3-ピリジルメチル)-N-エチル-N'-メチルホルムアミジン）をニテンピラムに換算したものの和とする。」とされている。「食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の

成分である物質の試験法」³⁾では、ニテンピラムをHPLC-UV、CPMAおよびCPMFから誘導されるCPF（N-(6-クロロ-3-ピリジルメチル)-N-エチルホルムアミド）をGC-FTDまたはGC-NPDによりそれぞれ定量を行うため操作が煩雑であること、代謝物の濃度を個別に把握することができないことなどの問題があった。

そこで、今回、ジノテフランとニテンピラムを含むネオニコチノイド系農薬7項目10成分について、LC-MS/MSによる一斉分析法を検討し、「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」⁴⁾（以下、ガイドライン）に基づき妥当性評価を実施したので、その概要を報告する。

2 材料と方法

2.1 試料

抽出条件の検討には、行政試験でネオニコチノイド系農薬が検出された玄米、ほうれんそう、ねぎ、きゅうりを用いた。

妥当性評価には、ガイドラインの例示を参考に、当センターで行政試験を実施している玄米、ほうれんそう、キャベツ、ばれいしょ、トマト、りんごを用いた。

2.2 検討対象成分

アセタミプリド、イミダクロプリド、クロチアニジン、

Study of Determination of Neonicotinoid Pesticides in Agricultural Products. by OZAWA Yuko and TAKEDA Masami (Health and Food Safety Department, Ishikawa Prefectural Institute of Public Health and Environmental Science)

Key words : Neonicotinoid Pesticides, Agricultural Products, LC-MS/MS

ジノテフラン, チアクロプリド, チアメトキサム, ニテンピラム, CPMA, CPMF および CPF の 10 成分を検討対象とした。

2・3 試薬等

標準品は, 富士フィルム和光純薬(株), 関東化学(株)または林純薬(株)製を使用した。妥当性評価には, 富士フィルム和光純薬(株)製ネオニコチノイド系農薬混合標準液(各 20 μ g/mL アセトニトリル溶液)を使用した。

有機溶媒については, 高速液体クロマトグラフ用および LC/MS 用を使用した。その他試薬は, 試薬特級を使用した。水は, 超純水 (Milli-Q 水) をを使用した。

固相カラムは, ジーエルサイエンス(株)製 InertSep C18 FF 1g/6mL (以下, C18) および InertSep HLB FF 200mg/6mL (以下, HLB) をを使用した。

2・4 標準溶液の調製

CPMA 標準品は水で溶解して 200 μ g/mL の標準原液を調製し, これを水で希釈して 1 μ g/mL の CPMA 標準溶液とした。その他の標準品は, アセトニトリルまたはメタノールで溶解して 200 μ g/mL の標準原液を調製し, これらを合わせとりアセトニトリルで希釈して各 1 μ g/mL の混合標準溶液とした。

2・5 装置および測定条件

液体クロマトグラフは Agilent 製 1260 Infinity を, 質量分析計は Agilent 製 6460 Triple Quad LC/MSD を使

用し, 測定条件は表1に, 測定イオンは表2に示した。

2・6 試験溶液の調製

(1) 抽出

野菜および果実は, 試料 20g にアセトニトリル/水 (6:4) 40mL を加えてホモジナイズし, 3000rpm で 5 分間遠心分離し, 上清を得た。残渣にアセトニトリル/水 (6:4) 30mL を加えて同様の操作を行い, 得られた上清を合わせてアセトニトリル/水 (6:4) で 100mL に定容した。

玄米は, 試料 10g に水 20mL を加えて 15 分間放置し, これにアセトニトリル 40mL を加えてホモジナイズし, 2500rpm で 3 分間遠心分離し, 上清を得た。残渣にアセトニトリル/水 (6:4) 30mL を加えて同様の操作を行い, 得られた上清を合わせてアセトニトリル/水 (6:4) で 100mL に定容した。

(2) 精製

(1) で得られた溶液から 10mL (玄米は 20mL) を分取し, 予めアセトニトリル 5mL およびアセトニトリル/水 (6:4) 5mL でコンディショニングした C18 に注入し, さらにアセトニトリル/水 (6:4) 2mL を注入した。全溶出液を 40 $^{\circ}$ C 以下で濃縮し水 20mL で希釈した液を, 予めアセトニトリル 5mL および水 10mL でコンディショニングした HLB に負荷し, 水 20mL で洗浄後, アセト

表 1 LC-MS/MS 測定条件

カラム	Agilent 製 Poroshell 120 EC-C18 (内径 2.1mm, 長さ 100mm, 粒径 2.7 μ m)	
カラム温度	40 $^{\circ}$ C	
移動相	A: 0.1%ギ酸含有 5 mmol/L 酢酸アンモニウム水溶液 B: メタノール	
流量	0.2 mL/min	
グラジエント条件	B: 10%(0-2min)→45%(13.5min)→95%(15-20min)→10%(20.01-30min)	
注入量	1 μ L	
イオン源	Agilent Jet Stream (AJS)	
イオン化法	ESI ポジティブ	
ドライガス	N ₂ , 300 $^{\circ}$ C, 10L/min	
ネブライザー	N ₂ , 50psi	
シースガス	N ₂ , 300 $^{\circ}$ C, 12L/min	
キャピラリー電圧	3000 V	
測定モード	MRM (多重反応モニタリング)	

表 2 分析対象化合物の測定イオン

化合物名	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	CE (V)
アセタミプリド	223	126	20
イミダクロプリド	256	209	12
クロチアジジン	250	169	8
ジノテフラン	203	129	8
チアクロプリド	253	126	20
チアメトキサム	292	211	8
ニテンピラム	271	126	28
CPMA	256	126	24
CPMF	212	126	20
CPF	199	128	20

Q1: プリカーサーイオン
Q3: プロダクトイオン
CE: コリジョンエネルギー

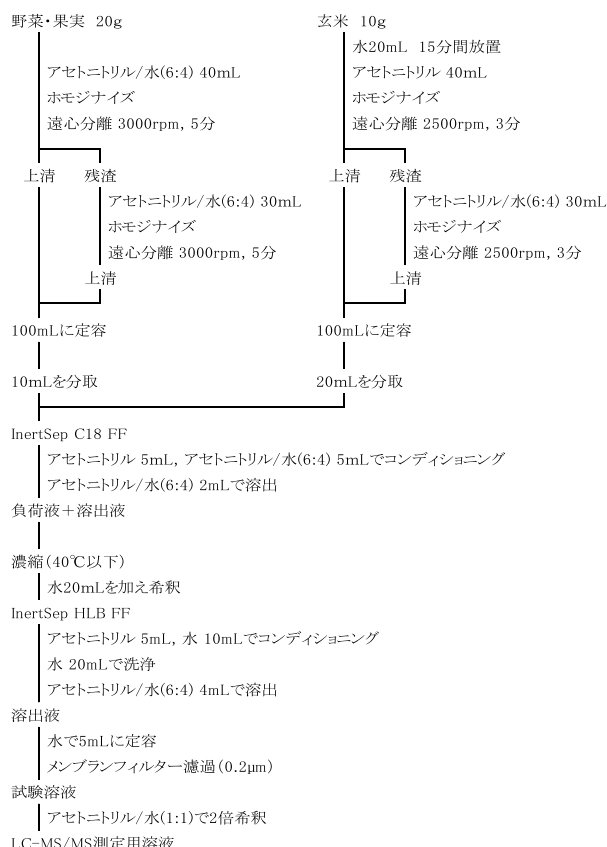


図 1 試験溶液の調製

ニトリル/水 (6:4) 4mLで溶出した。溶出液を水で5 mLに定容し、メンブランフィルター (0.2 μ m) で濾過して試験溶液とした (図1)。

2・7 定量

1 μ g/mL CPMA 標準溶液と1 μ g/mL 混合標準溶液を合わせとり、アセトニトリル/水 (1:1) で希釈し、1 ~ 20ng/mLの検量線用混合標準液を作成した。

試験溶液はアセトニトリル/水 (1:1) で2倍希釈し、測定用溶液とした。

検量線用混合標準液および測定用溶液1 μ LをLC-MS/MSに注入し、得られたピーク面積から絶対検量線法により定量した。

2・8 妥当性評価

ガイドラインに従い、選択性、定量限界、真度および精度の4項目について評価を行った。定量限界は一律基準値である0.01ppmを目標値とした。添加濃度は0.05ppmおよび0.01ppmの2濃度とし、分析者2名が1日2併行3日間または分析者3名が1日2併行2日間の枝分かれ試験を行った。

3 結果と考察

3・1 LC-MS/MS測定条件の検討

測定対象化合物のMRM条件は、機器付属の最適化ソフトMassHunter Optimizerにより最適化した。

移動相は、5mmol/L酢酸アンモニウム水溶液およびメタノールを用いて検討したが、CPMFのピークに顕著なテーリングが見られた。CPMFはアミジン基をもつ塩基性化合物であることから、ギ酸を加えて酸性条件にしたところピーク形状が改善したので、移動相は0.1%ギ酸含有5mmol/L酢酸アンモニウム水溶液およびメタノールとした。

3・2 抽出溶媒の検討

西名ら⁵⁾は、アセトニトリル/水の混合液を抽出溶媒として使い、水の比率がアセトニトリル/水 (80:20) 以上で高極性農薬が良好な回収率を示したと報告している。ネオニコチノイド系農薬は極性が高く、抽出にアセトニトリルを用いる既報の分析法では、農産物の種類によっては回収率の低いものもあった。

そこで、過去にネオニコチノイド系農薬が検出されたほうれんそう、ねぎ、きゅうりを用いて、アセトニトリル/水の比率による抽出効率の変化について検討した。細切均一化した試料5gに抽出溶媒としてアセトニトリル/水 (1:9, 6:4, 10:0) 20mLを加えて超音波で5分間、2回抽出し、遠心分離して得られた上清を合わせて50mLに定容した。この液を溶媒組成がアセトニトリル/水 (1:1) となるように希釈後、メンブランフィルター (0.2 μ m) で濾過した液をLC-MS/MSで測定し、

検体中濃度を求めた。検体中濃度はアセトニトリル/水 (6:4) が最も高く、アセトニトリルと比べて色素の溶出は少なかった。次いで、アセトニトリル/水 (1:9) の検体中濃度が高かったが、試料残渣を除去し透明な上清を得るためには吸引濾過する必要があった (表3)。抽出効率と操作性から、抽出溶媒にはアセトニトリル/水 (6:4) を用いることとした。

表3 抽出溶媒のアセトニトリル/水の比率の違いによる抽出効率の比較

農産物名	化合物名	検体中濃度 (ppm)		
		アセトニトリル/水 (1:9)	アセトニトリル/水 (6:4)	アセトニトリル/水 (10:0)
ほうれんそう	イミダクロプリド	0.37	0.39	0.31
ねぎ	クロチアニジン	0.021	0.022	0.016
きゅうり	ジノテフラン	0.031	0.035	0.031

3・3 玄米の抽出方法の検討

玄米10gに水20mLを加えて15分間放置後、アセトニトリル/水 (6:4) で2回抽出したところ、得られた溶液は白濁し、固相カラムが目詰まりして通液できなかった。そこで、1回目の抽出をアセトニトリル、2回目の抽出をアセトニトリル/水 (6:4) で行ったところ、透明な上清を得ることができた。過去にジノテフランが検出された玄米を用いて抽出溶媒の変更による抽出効率の変化を確認した結果、検体中濃度に顕著な差は認められなかったことから、玄米の抽出については1回目をアセトニトリル、2回目をアセトニトリル/水 (6:4) で行うこととした。

3・4 精製法の検討

(1) PLS-2およびHLBの検討

ポリマー系固相は、高極性から中極性の化合物を幅広く保持し、食品分析だけでなく医薬品や環境分野でも広く使用されている。今回、抽出液からの対象成分の抽出・濃縮を目的として、HLBおよびInertSep PLS-2 265mg/6mL (以下、PLS-2) について比較検討を行った。検討には、水20gに各成分1 μ gを添加しアセトニトリル/水 (6:4) で100mLに定容して調製した添加試料液を用いた。

添加試料液を20mL分取し40 $^{\circ}$ C以下で濃縮した液を、予めアセトニトリル5mL、水10mLでコンディショニングした固相カラムに負荷し、アセトニトリル/水 (6:4) 5mLで溶出し回収率を求めた。CPMFの回収率は、HLBでは73.5%だったが、PLS-2では1.5%と低く、固相に保持されたままの状態であると考えられた。また、ジノテフラン、ニテンピラム、CPMAの一部が固相に保持されなかった (表4)。これは負荷液中のアセトニトリルの影響により極性の高い農薬成分が十分に保持

表 4 ポリマー系固相カラムの回収率

化合物名	HLB		PLS-2	
	Fr0	Fr1	Fr0	Fr1
アセタミプリド		98.9		97.9
イミダクロプリド		97.3		96.1
クロチアニジン		99.0		97.5
ジノテフラン	44.9	49.3	42.7	51.6
チアクロプリド		99.9		98.6
チアメトキサム		100.3		98.6
ニテンピラム	22.2	73.7	8.6	84.2
CPMA	58.3	40.5	46.0	61.5
CPMF		73.5		1.5
CPF		99.8		101.0

Fr0：負荷時に流出した画分

Fr1：アセトニトリル/水 (6：4) 5mLで溶出した画分

されなかったためと考えられたことから、添加試料液 10mLを濃縮し水20mLを加えて希釈した液をHLBに負荷したところ、各成分の回収率は87.1～97.8%と改善された。以後の検討には、CPMFの回収率が70%以上得られ、通液性が高いHLBを用いることとした。

次に、HLBからの溶出に必要な溶出溶媒の量について検討した。添加試料液10mLを濃縮し水20mLで希釈した液をHLBに負荷し、アセトニトリル/水 (6：4) 1mL, 2mL, 3mLで溶出した。その結果、3mLでほぼすべての成分が溶出した (図2)。

(2) 追加精製の検討

HLBで除去できない脂質および低極性夾雑物を除去する目的で、C18による精製について検討を行った。

予めアセトニトリル5mL, アセトニトリル/水 (6：4) 5mLでコンディショニングしたC18に、添加試料液10mLを注入し、さらにアセトニトリル/水 (6：4) 2mLを注入した。全溶出液中の各成分の回収率は91.8

回収率 (%)

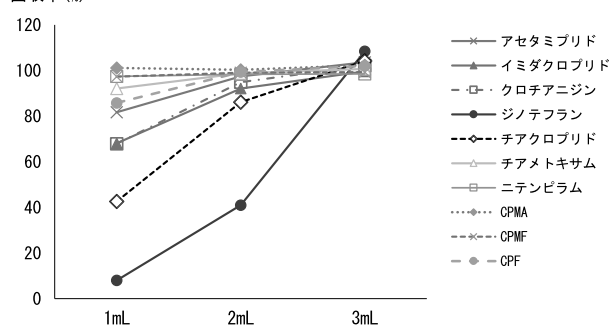


図2 溶出液量によるHLB固相カラムの回収率

～99.9%と良好であり、色素の一部も除去することができた。そこで、HLBによる精製の前にC18での精製を追加することとした。

3・5 試料溶媒の検討

LC-MS/MS測定では、試料溶媒の組成や注入量がピーク形状に影響することがある。標準溶液をHLBの溶出溶媒であるアセトニトリル/水 (6：4) で希釈し1μL注入すると、溶出時間の早いCPMF, ジノテフランのピークにショルダーが生じた。アセトニトリル/水 (1：1) で標準溶液を希釈し注入したところピーク形状が改善されたことから、試料溶媒はアセトニトリル/水 (1：1) とした。

3・6 妥当性評価結果

選択性、定量限界および精度で不適合となる成分はなかった。真度では、玄米のイミダクロプリドが0.01ppm添加で128.9%, 0.05ppm添加で125.5%, キャベツのニテンピラムが0.05ppm添加で67.0%, ばれいしょのCPMFが0.01ppm添加で125.9%となり、ガイドラインの目標値 (70～120%) を満たさなかった。ジノテフランについては、既報と比較して回収率の大幅

表 5 妥当性評価試験結果

分析対象化合物名	添加濃度 (ppm)	玄米			ほうれんそう			キャベツ			ばれいしょ			トマト			りんご		
		真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)
アセタミプリド	0.01 0.05	85.9 81.8	1.0 0.9	1.7 1.3	92.1 90.5	1.0 0.9	1.8 1.4	99.3 88.2	2.3 1.7	2.6 1.9	98.9 96.4	1.0 1.0	0.9 0.8	100.3 95.3	1.4 1.0	1.7 1.6	90.9 87.7	1.6 1.5	1.3 2.1
イミダクロプリド	0.01 0.05	128.9 125.5	1.7 1.1	8.5 6.2	109.5 114.8	1.4 1.3	5.0 3.0	110.8 104.3	1.7 2.7	4.6 3.8	109.4 104.3	0.9 1.1	1.9 1.0	116.1 109.0	2.1 3.4	2.4 3.4	97.2 94.5	1.6 1.6	2.9 2.6
クロチアニジン	0.01 0.05	107.5 103.4	1.3 1.4	7.8 6.8	97.0 95.9	1.1 1.0	6.1 3.7	92.8 91.0	2.1 2.3	3.6 3.3	98.6 93.4	1.1 1.5	2.9 1.4	104.7 95.9	1.5 1.3	2.1 2.7	92.0 85.4	2.8 2.1	4.0 2.0
ジノテフラン	0.01 0.05	99.8 91.3	1.5 2.8	2.2 2.8	94.9 91.8	2.8 1.4	4.5 2.7	100.1 89.7	3.1 4.4	3.7 4.9	99.3 91.7	2.4 2.5	2.3 2.4	103.7 97.1	1.1 1.8	1.4 2.5	96.2 92.0	2.6 2.9	4.2 2.6
チアクロプリド	0.01 0.05	80.0 76.2	0.9 0.7	2.6 1.6	81.4 78.3	1.6 0.9	1.5 1.5	96.4 89.6	2.3 2.8	3.0 4.0	99.3 94.8	1.1 1.3	1.0 1.2	99.9 93.7	1.2 1.8	1.5 1.8	90.2 86.1	1.0 2.0	2.3 2.7
チアメトキサム	0.01 0.05	93.1 90.8	1.2 1.2	5.5 3.0	90.0 89.6	2.7 2.3	3.3 3.0	92.6 89.1	3.5 4.7	3.7 4.0	98.6 95.1	1.1 1.2	1.4 1.1	102.0 96.7	1.9 1.2	2.5 2.5	92.2 89.3	1.8 2.6	1.9 2.7
ニテンピラム	0.01 0.05	97.1 89.0	2.7 1.0	3.6 1.3	97.5 96.3	3.3 1.1	3.5 2.2	73.1 67.0	3.8 3.8	7.9 3.4	107.3 96.5	2.4 0.8	2.3 1.6	103.3 95.4	2.8 1.1	2.3 1.4	93.5 89.7	1.8 3.0	2.3 3.2
CPMA	0.01 0.05	93.7 90.1	1.6 2.6	2.5 6.2	91.5 90.0	4.4 2.0	6.4 6.1	95.9 86.2	2.1 7.6	1.8 9.1	97.2 92.4	1.0 4.0	1.6 4.2	106.4 99.1	5.1 1.7	4.3 1.8	92.5 88.3	1.6 3.0	2.4 3.6
CPMF	0.01 0.05	99.8 85.6	2.3 6.1	6.5 10.9	117.6 112.6	3.4 4.0	9.3 6.8	114.8 102.4	3.7 10.0	6.2 11.2	125.9 106.6	1.7 5.7	2.4 8.5	115.1 99.8	5.3 7.6	6.4 6.9	107.1 92.1	3.9 8.4	7.1 10.5
CPF	0.01 0.05	91.6 85.6	1.4 0.7	2.5 1.5	100.5 95.9	1.6 0.5	2.4 2.0	100.6 92.9	2.2 2.8	2.7 2.6	104.0 97.6	1.4 1.7	1.3 1.8	103.6 95.3	1.4 1.6	1.6 1.9	92.7 88.6	0.8 2.3	1.6 2.5

：妥当性評価ガイドラインの目標値を満たさなかったもの

な改善が見られ、6農産物すべてでガイドラインの目標値に適合する結果を得ることができた（表5）。

真度がガイドラインの目標値を満たさなかった成分について試料マトリックスの影響を確認するため、ブランク試験溶液を用いて調製したマトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積比（以下、マトリックス比）を求めた。玄米のイミダクロプリドでは、マトリックス比が1.37～1.47と高く、イオン化促進により回収率が高くなったと考えられた。キャベツのニテンピラムは、マトリックス比が0.67～0.68と低く、イオン化抑制により回収率が低下したと考えられた。ばれいしょのCPMFのマトリックス比は0.97であり、マトリックスによる測定への顕著な影響は認められなかった（表6）。

表6 試料マトリックスによるLC-MS/MS測定への影響

農産物名	化合物名	添加濃度 (ppm)	マトリックス比*
玄米	イミダクロプリド	0.01	1.37
		0.05	1.47
キャベツ	ニテンピラム	0.01	0.68
		0.05	0.67
ばれいしょ	CPMF	0.01	0.97
		0.05	0.97

*マトリックス添加標準溶液のピーク面積/溶媒標準溶液のピーク面積

4 まとめ

農産物を対象とし、ネオニコチノイド系農薬7項目10成分の一斉分析法を検討した。

極性が高いネオニコチノイド系農薬を効率よく抽出するために、アセトニトリル/水の比率を変えて抽出効率を比較した結果、アセトニトリル/水（6：4）が抽出

効率、操作性ともに優れていた。この抽出液からC18固相カラムで脂質、色素などを除去した後、HLB固相カラムで農薬成分の抽出・濃縮を行い、LC-MS/MSで測定した。

この方法を用いて、玄米、ほうれんそう、キャベツ、ばれいしょ、トマト、りんごの6農産物について妥当性評価ガイドラインに基づき0.05ppmおよび0.01ppmの2濃度で妥当性評価を実施した。その結果、玄米、キャベツ、ばれいしょでは9成分、ほうれんそう、トマト、りんごでは10成分がガイドラインの目標値を満たしていた。

文 献

- 1) 金戸恵子, 水口竜人, 由田洋一, 新家薫子, 砺波和子: HPLC及びLC-MSによる農産物中のジノテフラン分析法の妥当性評価について, 石川県保健環境センター研究報告書, 52, 45-48 (2015)
- 2) 厚生労働省告示第370号: 食品, 添加物等の規格基準, 昭和34年
- 3) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知食安発第0124001号: 食品に残留する農薬, 飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について, 平成17年1月24日
- 4) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知食安発1224第1号: 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の一部改正について, 平成22年12月24日
- 5) 西名武士, 村上弘, 福島孝兵, 飛野敏明: 液体クロマトグラフ/タンデム質量分析計 (LC/MS/MS) を用いた食品中の残留農薬迅速分析法の検討 (第1報), 熊本県保健環境科学研究所報, 35, 51-56 (2005)