

## 農産物中ネオニコチノイド系農薬の分析

小林 麻紀, 大塚 健治, 田村 康宏, 富澤 早苗,  
木下 輝昭, 上條 恭子, 岩越 景子, 佐藤 千鶴子, 高野 伊知郎

### **Determination of Neonicotinoid Pesticide in Crops**

Maki KOBAYASHI, Kenji OTSUKA, Yasuhiro TAMURA, Sanae TOMIZAWA,  
Teruaki KINOSHITA, Kyoko KAMIJO, Keiko IWAKOSHI, Chizuko SATO and Ichiro TAKANO

## 農産物中ネオニコチノイド系農薬の分析

小林 麻紀\*, 大塚 健治\*, 田村 康宏\*, 富澤 早苗\*  
木下 輝昭\*, 上條 恭子\*, 岩越 景子\*, 佐藤 千鶴子\*, 高野 伊知郎\*

農産物中のネオニコチノイド系農薬の分析法を検討した。試料からアセトン・*n*-ヘキサン混液で抽出し、ジクロロメタンに転溶した。水層に一部移行したネオニコチノイド系農薬を多孔性ケイソウ土カラムに負荷して酢酸エチルで溶出した。次いでENVI-PSAカートリッジカラムに負荷し、トルエン・アセトニトリル混液で溶出して精製を行った。測定にはLC-MS/MSを用いた。種々農産物にネオニコチノイド系農薬添加したときの回収率は0.02 µg/g添加時で52.4%~133%, 0.1 µg/g添加時で59.6%~120%であった。本分析法は農産物中ネオニコチノイド系農薬のスクリーニング法として適用できると考える。

キーワード：残留農薬, 農産物, ネオニコチノイド系農薬, 液体クロマトグラフ-タンデム質量分析計

### はじめに

ネオニコチノイド系農薬は、有機リン系殺虫剤に替わるものとして1990年代から流通し始め<sup>1-3)</sup>、イネ、果樹、野菜や花等に広範囲に使用されている。しかし、ミツバチの大量死の原因の一つとされ、ネオニコチノイド系農薬に関しての消費者の不安は高まり、規制の強化を求める声があがっている<sup>4)</sup>。衛生行政にとって消費者の安全・安心を確保するためには、残留実態を把握し、より正確かつ適切な情報を提供していくことが重要である。著者らは選択的検出器及び質量分析計(MS)を組み合わせた系統別分析法を開発し<sup>5)</sup>、農産物中の残留農薬実態調査を行ってきた<sup>6-10)</sup>。

今回、ネオニコチノイド系農薬の検査に対応するため、従来より採用していた分析法に改良を加え、LC-MS/MSで測定する試験法について検討したので報告する。

### 実験方法

#### 1. 試料

市販のおくら、ピーマン、ほうれんそう、バナナ、レモン、玄米及び大豆を用いた。

#### 2. 試薬

##### 1) 標準品及び標準溶液

各農薬原液は和光純薬工業(株)及び関東化学(株)の残留農薬試験用農薬標準品10種類を各々アセトニトリルに溶解して1,000 µg/mlの標準原液を調製した。

農薬標準混合溶液は各農薬標準原液を混合し、アセトニトリルで10 µg/mlに調製した。これを適宜アセトニトリルで希釈して用いた。

##### 2) カートリッジカラム

Supelclean Envi-CarbII™/PSA (充てん剤量 500 mg/300 mg), 3 mL, SUPELCO 社製を用いた。

##### 3) 多孔性ケイソウ土カラム

Chem Elut™ 20 mL, VARIAN 社製を用いた。

#### 4) その他の試薬

有機溶媒は残留農薬試験用及び高速液体クロマトグラフ用を用いた。

#### 3. 検討対象農薬

代表的なネオニコチノイド系農薬として、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、ニテンピラム及びCPFの計9種類(代謝物を含む)について検討した。

#### 4. 装置

##### 1) 溶媒濃縮システム

東京理化学機器(株)製 N-1000 型ロータリーエバポレーター、同 CA-1110 型冷却水循環装置、同 DPE2100 型溶媒回収装置、同 NVC-1100 型真空制御装置、同 DIVAC2.2L 型ダイアフラム型真空ポンプ、同 PS-1000 型ウォーターバス及び Heto 社製 CT-110 型冷却トラップで構成されたもの。

##### 2) 液体クロマトグラフ-タンデム質量分析計

Waters 社製 Quattro Premier XE System

##### 3) 液体クロマトグラフ飛行時間型質量分析計

Waters 社製 Xevo QToF MS System

#### 5. 測定条件

##### 1) LC-MS/MS

###### (1) LC条件

分析カラム: Waters 社製 ACQUITY BEH C18 2.1 mm i.d. × 50 mm, 粒径 1.7 µm, 移動相: A 液 5 mmol/L 酢酸アンモニウム含有 10%メタノール溶液, B 液 5 mmol/L 酢酸アンモニウム含有 90%メタノール溶液, グラジエント条件: A : B = 95 : 5 → 1 分 A : B = 60 : 40 → 2 分 A : B = 35 : 65 → 8 分 B=100, 流速: 0.3 mL/min, カラム温度: 40°C, 注入量: 5 µL。

\* 東京都健康安全研究センター食品化学部残留物質研究科 169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

**(2) LC-MS/MS条件**

イオン化法：ESI (+), キャピラリー電圧：0.7 kV, ソース温度：120°C, デソルベーションガス温度：400°C, コーンガス流量：N<sub>2</sub>, 50 L/h, デソルベーションガス流量：N<sub>2</sub>, 900 L/h.

化合物毎の測定条件はTable 1に、標準溶液のクロマトグラムをFig.1に示した。

**2) LC- TOF/MS****(1) LC条件**

分析カラム：Waters 社製 ACQUITY BEH C18 2.1 mm i.d.×100 mm, 粒子 1.7 μm, 移動相：A液 メタノール：水 (1:9), B液 メタノール：水 (9:1), グラジエント条件:0分 A:B=90:10→10分 B=100, 流量:0.3 mL/min, カラム温度：40°C, 注入量：5 μL.

**(2) LC-MS条件**

イオン化法：ESI (+), キャピラリー電圧：3 kV, ソース温度：120°C, デソルベーション温度：350°C, コーンガス流量：N<sub>2</sub>, 50 L/h, デソルベーションガス流量：N<sub>2</sub>, 1000 L/h, コーン電圧：20 V

**6. 分析方法****1) 抽出法**

野菜, 果実類は約 1 kg を細切り, 穀類, 豆類などは約 1 kg を粉碎した後, その 50 g を分析に供した. また, 穀類, 豆類など水分含量の少ない試料は水を 50~100 mL 加えて試料を膨潤させ, 2 時間放置した. これにアセトン・*n*-ヘキサン(2:3)混液 250 mL を加え 5 分間ホモジナイズした後, 吸引ろ過し, ろ液を減圧濃縮した. 残さにジクロロメタン 100 mL 及び 5%塩化ナトリウム溶液 100 mL を加え 5 分間

激しく振とうした後, ジクロロメタン層を分取し, 水層にジクロロメタン 50 mL を加え, 上記と同様の操作を繰り返した後, ジクロロメタン層を合わせ, 無水硫酸ナトリウムで脱水後, 減圧濃縮した. 残さにアセトン・*n*-ヘキサン混液 (1:4) を加え, 5 mL に定容したものを抽出液 1 とした.

水層はジクロロメタン層を分取した後 100 mL に定容し, その 20 mL を Chem Elut カラムに負荷した. 10 分放置した後, 酢酸エチル 200 mL で溶出し, 減圧濃縮した. 残さに酢酸エチルを加え, 1 mL に定容したものを抽出液 2 とした.

試料が穀類及び豆類など油脂を多く含む場合は, ジクロロメタン層を減圧濃縮度, 残さに *n*-ヘキサン 25 mL 及び *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL を加え 10 分間激しく振とうした後, アセトニトリル層を分取し, *n*-ヘキサン層に *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL を加え, 上記と同様の操作を 2 回繰り返した後, アセトニトリル層を合わせ減圧濃縮した. 残さをアセトン・*n*-ヘキサン混液 (1:4) を加え, 5 mL としたものを抽出液 1 とした.

また, 本試験で 0.5 mL を使用した残りの抽出液 1 は, *N*-メチルカーバメイト系等の他の農薬の分析<sup>5,11)</sup>や農薬が検出された場合における再精製に使用した.

**2) 精製法**

あらかじめトルエン・アセトニトリル (1:3) 混液 20 mL でコンディショニングしておいた Envi-CarbII/PSA カートリッジカラムに抽出液 1 及び 2 の 0.5 mL を負荷し, トルエン・アセトニトリル (1:3) 混液 10 mL で溶出し, この溶出液を減圧濃縮後, 残さをアセトニトリルで正確に 5 mL として試験溶液とした.

Table 1. MRM settings for positive ion MS-MS analysis of Neonicotinoide Pesticides

Compound	Precursor ion	Product ion	Corn voltage(V)	Collision energy(eV)
Acetamiprid	223	126	28	20
Clothianidin	250	169	30	18
Dinotefuran	203	129	15	10
Imidacloprid	256	175	30	15
Nitenpyram	271	126	28	28
CPF	199	128	22	18
Thiacloprid	253	126	30	16
Thiacloprid amide	271	254	28	24
Thiamethoxam	292	211	30	10

## 結果及び考察

## 1. 抽出法の検討

抽出方法は転溶時にジクロロメタンを使用する永山ら<sup>9)</sup>及び津村ら<sup>10)</sup>の方法に従った。そのため、ジクロロメタンが流出しないよう溶媒濃縮システムに-110°Cの冷却トラップを装着した溶媒回収装置を使用した。

ジクロロメタン100 mLに標準溶液を負荷し、5%塩化ナトリウム溶液と5分間振とうしたときの転溶率を求めたところ、ジノテフラン及びニテンピラムで50%前後と低かった。そのため、この2農薬については、さらにジクロロメタン50 mLでの2回転溶を行った。ニテンピラムでは70%程度回収されたが、ジノテフランでは60%未満であった。いずれもオクタノール水分配係数が ( $K_{ow}$ )  $\log P = -0.64$  と水溶性が高いことから、水層部分に移行し、ジクロロメタンでは十分に回収されていないと考えられた。これを回収するため多孔性ケイソウ土カラムを用いる方法を検討した。

多孔性ケイソウ土カラムに標準溶液を負荷し、酢酸エチルで溶出したときの回収率を求めたところ200 mL溶出時に90%以上回収できた。

以上から、水層に移行したネオニコチノイド系農薬は多孔性ケイソウ土カラムを用いて捕集し、酢酸エチルで溶出し、精製時にジクロロメタン層の試料溶液と合わせることで

により回収率を向上させることができた。

## 2 精製法の検討

精製カラムには、脂肪酸などの夾雑物を除く目的で SAX や PSA などの陰イオン交換カートリッジカラムや、クロロフィル等の色素を除く目的でグラファイトカーボンカートリッジカラムが使用されている。ネオニコチノイド系農薬の精製にも Envi-Carb を用いた報告<sup>12)</sup>や、残留農薬分析で広く用いられ、従来採用している Envi-Carb を積層した Envi-Carb/LC-NH<sub>2</sub> あるいは Envi-CarbII/PSA を用いた報告がある<sup>13,14)</sup>。それらを参考にし、Envi-Carb/LC-NH<sub>2</sub> 及び Envi-CarbII/PSA を用いて精製する方法を検討した。

標準溶液を各カラムに負荷し、アセトン・*n*-ヘキサン混液、酢酸エチル・*n*-ヘキサン混液及びトルエン・アセトニトリル混液を溶出溶媒に用いたところ、アセトン・*n*-ヘキサン混液及び酢酸エチル・*n*-ヘキサン混液では、ジノテフラン、ニテンピラム、クロチアニジン及びチアメトキサム等で回収が10%前後と低かった。トルエン・アセトニトリル混液では、(1:3) 混液10 mL で2回溶出した時のカラムからの農薬溶出率は、Envi-CarbII/PSAでは最初の10 mL で95%以上回収できた。一方、Envi-Carb/LC-NH<sub>2</sub>では20 mL以上溶出する必要があった。

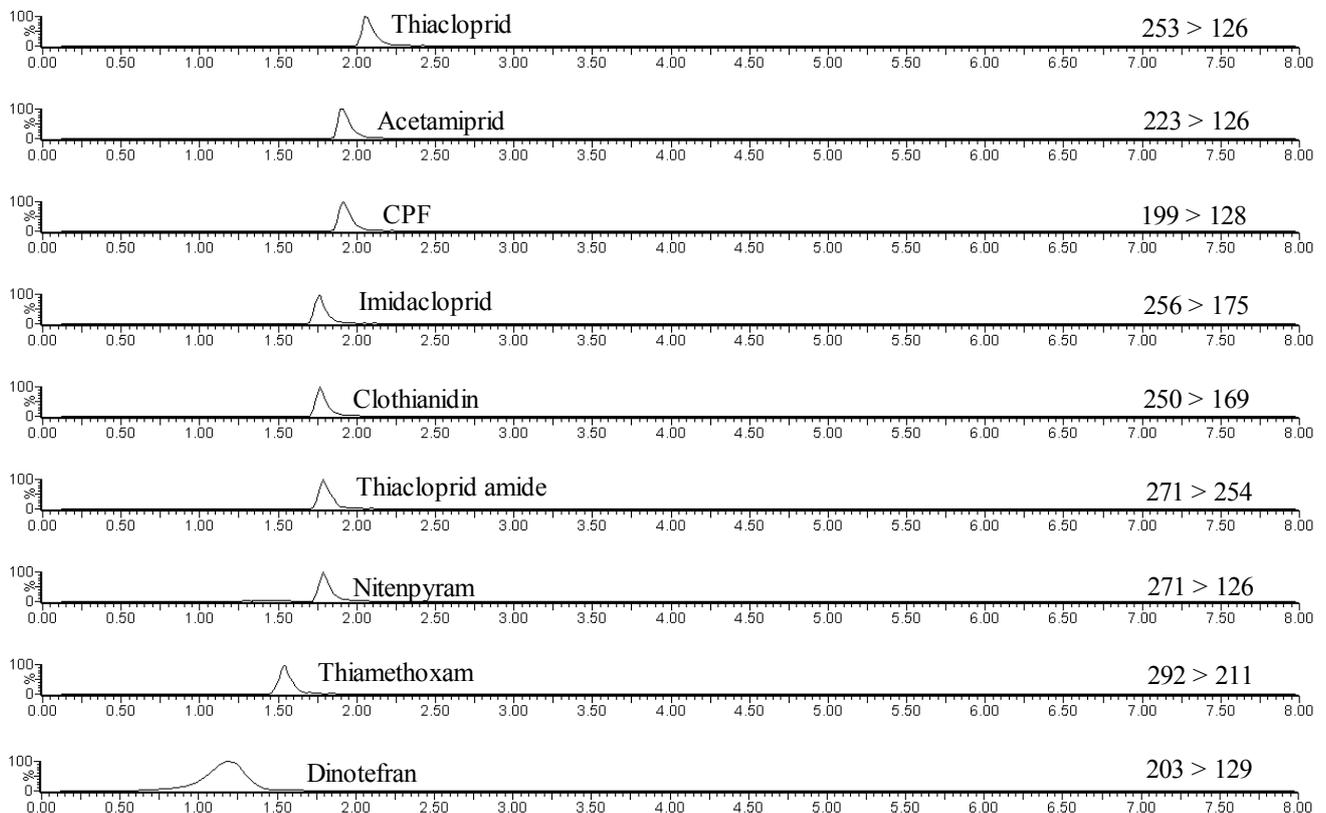


Fig. 1. LC-MS/MS chromatograms obtained MRM mode for Neonicotinoid Pesticide 0.1 µg/mL

Table 2. Recoveries of Neonicotinoide Pesticides Spiked in Sample

Compound	Spiked level ( $\mu\text{g/g}$ )	Recovery (CV) (%) (n=5)						
		Brown rice	Pimento	Soy bean	Spinach	Okura	Lemon	Banana
Acetamiprid	0.02	114(1.3)	71.4(5.1)	74.0(5.2)	98.0(14.2)	86.7(7.6)	60.1(3.9)	74.9(6.6)
	0.1	104(1.8)	72.4(9.0)	75.3(6.9)	98.3(4.6)	70.4(5.5)	68.7(2.7)	74.1(10.7)
Clothianidin	0.02	75.4(10.4)	89.4(6.4)	61.0(4.6)	102(3.1)	80.4(6.4)	60.2(3.8)	72.7(7.2)
	0.1	72.6(6.6)	82.6(7.9)	65.8(8.0)	95.6(12.1)	75.7(7.1)	68.3(6.9)	79.2(6.2)
Dinotefran	0.02	63.0(5.4)	79.3(8.5)	58.6(5.6)	107(9.7)	98.8(5.3)	52.4(2.5)	56.8(5.3)
	0.1	69.4(3.1)	79.2(9.9)	66.2(3.0)	95.9(2.1)	90.8(6.9)	59.6(7.1)	68.6(4.9)
Imidacloprid	0.02	81.7(4.2)	93.1(6.0)	76.4(2.9)	94.2(9.6)	94.2(7.1)	68.2(8.6)	102(8.9)
	0.1	107(3.3)	96.8(10.2)	74.1(5.5)	93.8(9.4)	93.8(9.4)	65.4(6.3)	88.5(3.3)
Nitenpyram	0.02	70.1(12.6)	62.5(4.6)	60.5(2.4)	107(8.9)	78.3(4.0)	65.7(12.7)	70.2(4.5)
	0.1	67.8(7.9)	68.3(12.4)	63.2(3.2)	98.8(4.8)	70.3(4.0)	65.8(6.6)	69.4(12.2)
CPF	0.02	81.4(13.0)	86.4(4.5)	101(9.4)	66.3(18.6)	101(7.3)	75.6(17.5)	93.7(13.5)
	0.1	98.9(11.2)	84.7(5.4)	87.4(13.8)	60.6(4.8)	97.5(9.8)	95.4(6.1)	122(4.9)
Thiacloprid	0.02	102(8.2)	67.4(6.2)	64.7(6.2)	92.7(9.3)	82.6(6.4)	66.3(5.9)	77.9(6.5)
	0.1	107(7.2)	65.3(3.1)	65.6(3.1)	99.8(3.5)	81.5(8.3)	64.5(4.0)	76.3(3.8)
Thiacloprid-amide	0.02	70.7(12.1)	75.7(6.0)	70.4(4.8)	110(8.4)	80.6(6.3)	58.7(20.1)	72.9(2.7)
	0.1	69.5(2.1)	76.2(8.9)	72.7(1.2)	98.8(5.3)	75.8(7.1)	60.8(7.1)	79.3(7.2)
Thiamethoxam	0.02	71.2(13.5)	86.9(3.5)	84.2(5.7)	97.4(7.4)	80.3(9.0)	61.6(9.2)	92.6(9.0)
	0.1	71.1(9.2)	99.8(9.0)	87.1(4.7)	92.6(7.9)	70.5(8.3)	64.8(2.8)	93.1(7.6)

精製時には食品由来の成分を可能な限り除去することが望ましい。溶出液量が多いと食品成分もより多く溶出してくる可能性がある。また、溶出溶媒であるトルエン・アセトニトリル (1:3) 混液は揮発性が低く、濃縮操作に時間を要する。食品由来の成分の影響を抑え、濃縮時間を短縮するため、Envi-CarbII/PSA を用いることとした。

### 3 確認試験

添加試料の抽出・精製後のアセトニトリル試験溶液を用いた測定により、マススペクトルのイオン確認が可能であった。農薬を検出した試料は、その試験溶液をLC-TOF/MSで測定し、標準品とマススペクトルを比較して確認した。

### 4. 検量線

各標準品の 0.005~0.2  $\mu\text{g/ml}$  アセトニトリル溶液を数点調製し、5  $\mu\text{L}$  を LC-MS/MS に注入し、ピーク面積で検量線を作成した。各化合物の相関係数 (r) は 0.997 以上で良好

な直線性が得られた。本法での定量限界はいずれも試料中濃度として 0.005  $\mu\text{g/g}$  である。

### 5. 添加回収試験

各農薬標準溶液をおくら、パプリカ、ほうれんそう、バナナ、レモン、玄米及び大豆に添加し、添加回収試験を行った。添加量は試料中濃度が0.02及び0.1  $\mu\text{g/g}$ となるよう添加した。5 回試行時における回収率の平均は0.02  $\mu\text{g/g}$ で52.4%~133%, 0.1  $\mu\text{g/g}$ で59.6%~120%であった。(Table 2)。レモンでアセタミプリド等若干回収率が低い場合が見られたが、概ね回収率は70%以上であった。

本試験法で正確な定量値を算出する場合は農薬が検出されていない同一試料で添加回収試験を行い、回収率が70~120%の範囲にあることを確認し、この範囲から回収率が外れる場合は、厚生労働省通知試験法等他の方法<sup>15)</sup>を用いて再試験を行う必要があると考える。

### まとめ

農産物を対象とし、ネオニコチノイド系農薬の分析法を検討した。試料からアセトン・*n*-ヘキサン混液で抽出し、ジクロロメタンに転溶した。水層部分に移行したものは多孔性ケイソウ土カラムに負荷し、酢酸エチルで溶出した。Envi-PSA ミニカラムによる精製を行い試験溶液を調製し、LC-MS/MS を用いて測定した。

本法による添加回収試験をオクラ等 7 作物において行ったところ概ね 70%以上の回収率が得られた。

本法はスクリーニング法として日常のルーチン検査業務に適用できると考える。

### 文献

- 1) 農薬要覧1995, 農林水産省生産局生産資材課・植物防疫課, 65-67, 1995, 日本植物防疫協会, 東京.
- 2) 農薬要覧1999, 農林水産省生産局生産資材課・植物防疫課, 84-88, 1999, 日本植物防疫協会, 東京.
- 3) 農薬要覧2000, 農林水産省生産局生産資材課・植物防疫課, 86-90, 2000, 日本植物防疫協会, 東京.
- 4) 東京新聞2010年4月26日付東京朝刊「ネオニコチノイド系農薬規制強化求める声」
- 5) 田村康宏, 高野伊知郎, 小林麻紀他: 東京健安研七 年 報, **58**, 129-133, 2007.
- 6) 大塚健治, 高野伊知郎, 小林麻紀他: 東京健安研七 年 報, **59**, 207-213, 2008.
- 7) 高野伊知郎, 小林麻紀, 大塚健治他: 東京健安研七 年 報, **59**, 215-220, 2008.
- 8) 田村康宏, 小林麻紀, 大塚健治他: 東京健安研七 年 報, **60**, 171-177, 2009.
- 9) 上條恭子, 小林麻紀, 大塚健治, 他: 東京健安研七 年 報, **60**, 179-185, 2009.
- 10) 富澤早苗, 小林麻紀, 大塚健治, 他: 東京健安研七 年 報, **60**, 154-164, 2009.
- 11) 永山敏廣, 小林麻紀, 塩田寛子, 他: 食衛誌, **35**, 652-660, 1994.
- 12) 津村ゆかり, 中村優美子, 外海泰秀, 他: 食衛誌, **39**, 127-134, 1998.
- 13) Obana, H., Okihashi, M., Akutsu, K., *et al*: J. Agric. Food Chem., **51**, 2501-2505, 2003.
- 14) 小林裕子: BUNSEKI KAGAKU, **58**, 985-997, 2009.
- 15) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知 “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” 平成 17 年 1 月 24 日食安発第 0124001 号.

**Determination of Neonicotinoid Pesticide in Crops**

Maki KOBAYASHI\*, Kenji OTSUKA\*, Yasuhiro TAMURA\*, Sanae TOMIZAWA\*,  
Teruaki KINOSHITA\*, Kyoko KAMIJO\*, Keiko IWAKOSHI\*, Chizuko SATO\* and Ichiro TAKANO\*

A procedure for neonicotinoid pesticide detection in crops by liquid-chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry (LC-MS/MS) was developed. Sample extraction was accomplished by using acetone/n-hexane (2:3) followed by re-extraction with dichloromethane. The water layer was loaded onto a Chem Elut column. Neonicotinoid pesticide in the water layer was adsorbed onto the column and eluted with ethyl acetate. The extract was cleaned on an Envi-Carb II/PSA cartridge column. Neonicotinoid pesticide was analyzed by LC-MS/MS. Recovery of these compounds added to several samples at a level of 0.02 µg/g was between 52.4% and 133% and that of 0.1 µg/g was between 59.6% and 120%. This method is useful for routine analysis of residual pesticides in food.

**Keywords:** pesticide residue, crop, neonicotinoide pesticide, LC-MS/MS

---

\* Tokyo Metropolitan Institute of Public Health  
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan