

## 牛乳、鶏卵及びはちみつ中のネオニコチノイド系農薬の分析

小林 麻紀<sup>a</sup>, 酒井 奈穂子<sup>a</sup>, 上條 恭子<sup>a</sup>, 小池 裕<sup>a</sup>, 新藤 哲也<sup>a</sup>

牛乳、鶏卵及びはちみつ中のネオニコチノイド系農薬の分析法を検討した。試料からアセトニトリルで抽出し、GC/PSAミニカラムに負荷し、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。牛乳、卵及びはちみつにネオニコチノイド系農薬を添加したときの回収率は0.01 µg/gで74.3%~104.6%, 0.1 µg/gで79.4%~103.7%であった。本分析法は牛乳、鶏卵及びはちみつを対象とした残留農薬の分析法として十分適用できると考える。

**キーワード** : 残留農薬, 牛乳, 鶏卵, はちみつ, 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、脊椎動物より昆虫 に対して選択的に強い神経毒性を有し、ヒトや水生生物への毒性が高い有機リン系農薬に替わるものとして、1990年代から我が国を含む多くの国で使用されている。

一方、ネオニコチノイド系農薬はミツバチの大量死の原因の一つと考えられており、EUでは使用を一部制限している<sup>1,2)</sup>。また、我が国においても河川からの検出事例<sup>3,4)</sup>やヒトの尿中からのネオニコチノイド系農薬の検出事例<sup>5)</sup>及びほ乳類への影響<sup>6)</sup>も報告されていることから、消費者の関心は高まっている。

食品中のネオニコチノイド系農薬の分析法としては、直接使用される農産物の分析法が報告されている<sup>7-10)</sup>。ネオニコチノイド系農薬は浸透移行性があり、根から吸収されて植物全体に浸透する。それらが残留する飼料を摂取した畜産物にネオニコチノイド系農薬が移行し、残留する可能性が考えられる。ミツバチの大量死の関連からはちみつに関する報告<sup>11-13)</sup>はあるものの、乳及び鶏卵等に関する報告はほとんどない。

今回、液状試料でのネオニコチノイド系農薬の検査に対応するため、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

市販の牛乳、鶏卵及びはちみつ(そばみつ)を用いた。

#### 2. 試薬

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11種類を各々メタノールに溶解して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、メタノールで10 µg/mlに調製した。これを適宜メタノールで希釈し

て用いた。

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ィー用を用いた。

GC/PSA(グラファイトカーボン/エチレンジアミン-N-プロピルシリル化シリカゲル)ミニカラムはジーエルサイエンス社製InertSep®GC/PSA(充てん量100 mg/200 mg/3mL)を用いた。

#### 3. 検討対象農薬

アセタミプリド、アセタミプリド代謝物(IM-2-1)、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、ニテンピラム及びニテンピラム代謝物(CPF及びCPMF)の計11種類について検討した。

#### 4. 装置

##### 1) 液体クロマトグラフ-タンデム質量分析計

Waters社製ACQUITY UPLC H-CLASS/XevoTQD System.

#### 5. 測定条件

##### 1) LC条件

分析カラム: Waters 社製 XSelect HSS T3 粒子径 2.5 µm, 2.1 mm i.d.×100 mm, 移動相: A液 0.1%(v/v)ギ酸含有 5 mM 酢酸アンモニウム溶液, B液 アセトニトリル, グラジエント条件: 0分 A:B=90:10→0.5分 A:B=60:40→1.5分 A:B=50:50→2.5分 A:B=30:70→3.5分 A:B=2:98→5分

流量: 0.2 mL/min, カラム温度: 50°C

##### 2) LC-MS/MS条件

イオン化法: ESI(+), キャピラリー電圧: 1.0 kV, ソース温度: 150°C, デソルベーション温度: 450°C, コ

<sup>a</sup> 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

ーンガス流量 : N<sub>2</sub>, 50 L/hr, デソルベーションガス流量 : N<sub>2</sub>, 1,100 L/h.

化合物毎の測定条件はTable 1に, クロマトグラムをFig.1に示した.

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

Compound	Precursor ion	Corn voltage(V)	Product ion	Collision energy(eV)
Acetamiprid	223.0	34	126 <sup>1)</sup>	20
			56.1 <sup>2)</sup>	15
Clothianidin	250.0	24	169.0	12
			132.0	18
Dinotefuran	203.0	25	129.0	10
			114.0	12
IM-2-1	208.9	34	125.9	18
			167.8	12
Imidacloprid	256.0	34	175.0	20
			209.1	15
Nitenpyram	271.0	28	224.0	12
			126.0	18
CPF	199.0	22	128.0	18
			92.1	34
CPMF	212.0	42	126.0	22
			90.0	22
Thiacloprid	253.0	41	126.0	20
			90.1	40
Thiacloprid-amide	271.1	24	125.9	28
			89.7	42
Thiamethoxam	292.0	28	211.0	12
			132.0	22

1) Used for quantitation

2) Used for confirmation

## 6. 分析方法

### 1) 抽出法

牛乳は, よく混合して均一化後, 鶏卵は卵白と卵黄を合わせてよく混合し均一化後, はちみつは40℃に加熱して溶かし, よく混合して均一化後, それぞれ5 gを試験管に採り, 水を3 mL加えてボルテックスで30秒間混和した. さらに水を加え10 mLに定容し, よく混和した後, その5 mLを遠心管に採り, 塩化ナトリウム1 g及びアセトニトリル10 mLを加え, 1分間ホモジナイズし, 3,000 rpmで5分間遠心分離した. 上層を分取し, 残さにアセトニトリル10 mLを加え同様に操作し, 得られた上層を合わせ, 正確に20 mLとした. この4 mLを分取し窒素吹付濃縮装置で濃縮した.

### 2) 精製法

濃縮した残さにトルエン・アセトニトリル (1:3) 混液1 mLを加え溶解し, あらかじめトルエン・アセトニトリル (1:3) 混液10 mLでコンディショニングした. InertSep®

GC/PSAミニカラムに全量を負荷し, トルエン・アセトニトリル (1:3) 混液3 mLで溶出した. 全溶出液を窒素吹付濃縮装置で濃縮した後, 残さにメタノールを加えて正確に1 mLとし, 試験溶液とした.

## 結果及び考察

### 1. LC及びMS条件の検討

LC条件はLC-MS/MSを用いた分析法の報告<sup>3-5,7,8)</sup>を参考に, 分析カラムはXBridge BEH C18, XSelect HSS T3及びXTerra MS C18について, 移動相はギ酸, 酢酸アンモニウム, アセトニトリル及びメタノールとのグラジエント分析について検討した. その結果, XSelect HSS T3を用い, 0.1%(v/v)ギ酸含有5 mmol/L酢酸アンモニウム溶液及びアセトニトリルとのグラジエントにより, 最も感度良く定量分析に適した良好なピーク形状を得ることができた.

### 2. 抽出法の検討

ネオニコチノイド系農薬は水溶性が高く, 分液ロートを用いての液液分配では回収が低いものがある<sup>8)</sup>. そこで, ケイソウ土カラムによる抽出及び操作の簡易化を検討した. ケイソウ土カラムに標準溶液を負荷し, アセトニトリルで溶出したところ, ほとんどのネオニコチノイド系農薬は90%以上の回収が得られたが, CPMFは30%程度であった. ギ酸及びメタノールをアセトニトリルに加えて検討したところ, 1%(v/v)ギ酸含有メタノール・アセトニトリル (1:9) 混液でCPMFの回収が90%以上得られた. しかし, 実試料では極性を高めたことによりケイソウ土カラムから試料成分の一部が溶出したため, 適していないと判断した.

次にアセトニトリル及び酢酸エチルを用いてホモジナイズ抽出を検討した. 水5 mLに標準溶液1 mg/mL (メタノール溶液) 25 µLを添加し, 塩化ナトリウム1 gを加え, 各溶媒10 mLでホモジナイズ後, 毎分3,000 rpmで5分間遠心分離した. 同様の操作を繰り返し, 得られた上層を窒素吹付濃縮装置で濃縮した後, メタノールに溶解し, LC-MS/MSで測定した. アセトニトリルでは, いずれも90%以上の回収が得られたが, 酢酸エチルでは60~80%程度であった. アセトニトリルを用いて, 加える塩化ナトリウム量0.1~2 gを検討したところ, 1 gで回収が90%以上であった. そこで抽出は, 塩化ナトリウム1 gを加え, アセトニトリルで行うこととした.

### 3. 精製法の検討

精製には色素除去等の目的で使用される GC 固相カラム, 脂肪酸等の夾雑物を除く目的で使用される PSA 固相カラム, それらを積層した固相カラムを用いた報告<sup>4,7,8,14)</sup>がある. そこで GC 及び PSA について検討を行った. 濃縮時間の短縮及び試料成分の溶出を避けるため, 可能な限り少ない溶出液量となるよう試みた. それぞれの固相について充てん量50, 100, 200及び500 mg を用いて検討した. 最初

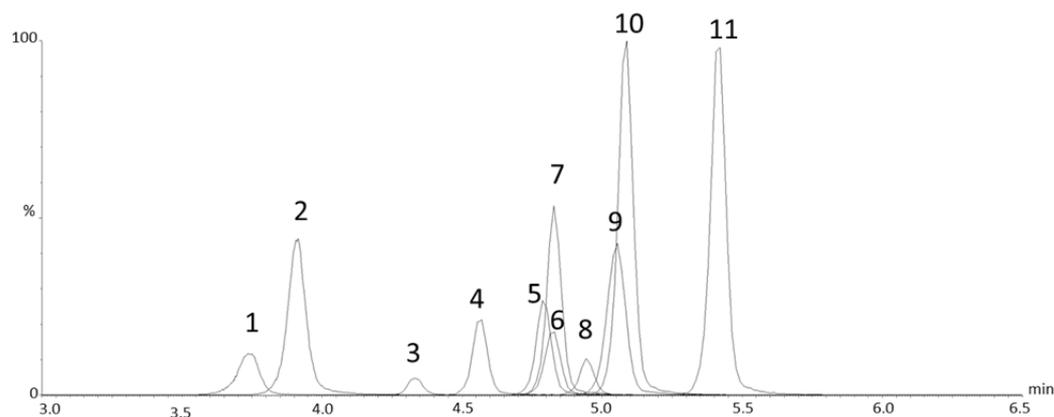


Fig.1 LC-MS/MS chromatograms obtained in MRM mode for neonicotinoid pesticide 5 ng/mL

Peaks: 1. Dinotefuran, 2. CPMF, 3. Nitenpyram, 4. Thiamethoxam, 5. Thiacloprid-amide, 6. IM-2-1, 7. Clothianidin, 8. Imidacloprid, 9. CPF, 10. Acetamiprid, 11. Thiacloprid

Table 2. Recoveries of Neonicotinoid Pesticides Spiked in Sample

Compound	Fortified level ( $\mu\text{g/g}$ )	Milk			Egg			Honey		
		Recovery <sup>1)</sup> (%)	RSD (%)	Mt <sup>2)</sup> /St <sup>3)</sup>	Recovery (%)	RSD (%)	Mt/St	Recovery (%)	RSD (%)	Mt/St
Acetamiprid	0.01	88.2	4.3	1.03	91.2	3.8	0.89	81.0	4.7	0.95
	0.1	88.3	4.3	0.98	86.7	2.5	0.99	82.6	3.1	0.95
Clothianidin	0.01	92.1	4.5	1.03	89.2	4.3	0.96	84.3	3.4	1.01
	0.1	92.0	4.0	0.99	96.1	2.8	1.03	95.5	4.4	1.07
CPF	0.01	94.6	3.2	0.98	101.9	3.3	0.95	89.2	3.4	0.86
	0.1	92.8	3.1	0.99	99.3	3.1	0.95	100.7	3.3	0.94
CPMF	0.01	96.1	8.4	0.92	98.6	8.6	0.91	74.3	11.2	0.82
	0.1	90.6	8.1	0.97	93.1	8.9	1.04	79.4	11.6	0.86
Dinotefuran	0.01	90.2	7.9	0.94	84.5	9.0	0.94	104.6	14.3	1.05
	0.1	90.6	7.2	0.98	85.2	8.3	1.01	103.7	10.0	1.12
IM-2-1	0.01	96.7	3.1	0.90	92.7	2.5	1.03	80.3	2.8	0.82
	0.1	96.6	5.5	0.94	93.2	2.2	0.99	88.9	2.5	0.86
Imidacloprid	0.01	90.2	9.0	0.81	94.5	9.5	0.88	94.6	9.6	1.07
	0.1	95.4	4.0	1.08	95.5	4.5	0.93	93.8	4.8	1.20
Nitenpyram	0.01	84.2	5.0	0.81	95.8	5.0	0.85	90.7	5.8	1.07
	0.1	82.7	4.4	0.96	88.4	4.4	0.96	93.8	5.2	1.05
Thiacloprid	0.01	83.9	7.7	0.93	83.2	8.3	0.92	80.3	10.2	0.88
	0.1	84.8	4.0	0.95	88.1	4.0	1.02	94.7	4.9	1.08
Thiacloprid-amide	0.01	85.4	6.6	1.02	81.2	7.5	1.00	83.7	9.1	1.26
	0.1	84.8	4.0	0.95	88.1	4.0	1.04	88.7	4.9	0.98
Thiamethoxam	0.01	98.6	4.1	0.94	88.3	5.0	0.91	94.0	5.7	0.93
	0.1	95.9	1.9	1.03	98.5	2.8	1.02	98.8	3.6	0.94

1)  $n=5$ 

2) Mt: area of the matrix standard solution

3) St: area of the standard solution

に、水でのネオニコチノイド系農薬の溶出を確認したところ、PSAでは水1 mLから溶出が見られたが、GCからは溶出されなかった。次に、アセトニトリルでの溶出を確認したところ、PSAでは1 mLから溶出が見られたが、GCではCPMF等の溶出が不十分であった。そこで通知試験法に用いられているトルエン・アセトニトリル (1:3) 混液について検討したところ、GC100 mg及びPSA200 mgの組合せでは溶出液量3 mLで90%以上の回収が得られた。

操作の簡便性から、それらの積層した固相カラムを用いることとした。すなわち、精製は濃縮した残さをトルエン・アセトニトリル (1:3) 混液に溶解し、GC/PSA (100/200 mg) カラムに負荷し、トルエン・アセトニトリル (1:3) 混液3 mLで溶出することとした。

#### 4. 検量線

各標準品の1.25~7.5 ng/ml及び12.5~75 ng/mlメタノール

溶液を各濃度範囲で6点調製し、2  $\mu$ LをLC-MS/MSに注入し、ピーク面積で検量線を作成した。相関係数 (r) はいずれの農薬も0.998以上で良好な直線性が得られた。本法での定量下限は、試料中濃度として $S/N \geq 10$  を満たした0.005  $\mu$ g/gであった。

### 5. 添加回収試験

各標準溶液を牛乳、鶏卵およびはちみつに添加し、添加回収試験を行った。試料中濃度が0.01及び0.1  $\mu$ 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0.01  $\mu$ g/gで74.3%~104.6%、0.1  $\mu$ g/gで79.4%~103.7%、併行精度は0.01  $\mu$ g/gで1.9~14.3%、0.1  $\mu$ g/gで2.2~11.6%であった。

(Table 2)。いずれも真度70~120%、併行精度15%未満の目標値を満たした。

試料マトリックスの測定への影響について添加回収試験における回収率100%相当濃度になるように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を求めた。面積比は0.81~1.26であり、いずれの試料においても、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。

### ま と め

牛乳、鶏卵およびはちみつを対象とし、ネオニコチノイド系農薬の分析法を検討した。試料からアセトニトリルで抽出し、GC/PSAミニカラムによる精製を行い調製した試験溶液をLC-MS/MSにより測定した。

本法による添加回収試験を牛乳、鶏卵およびはちみつにおいて行ったところ概ね74%以上の回収率が得られた。

本法は日常のルーチン検査業務に十分適用できると考える。

### 文 献

- 1) 農林水産省：農薬による蜜蜂の危害を防止するための我が国の取組，2015年9月改訂，2015.
- 2) European Commission Regulation (EU) No 485 / 2013, 2013.
- 3) 大塚宜寿, 野尻喜好, 蓑 康太郎, 他：環境化学討論会要旨集, 23,P-112,2014.
- 4) 久保田守, 須藤勇紀, 柴田 剛：環境化学討論会要旨集, 24,P-075,2015.
- 5) 渡邊清彦, 八十島誠, 高菅卓, 他：環境化学討論会要旨集, 24,P-074,2015.
- 6) 木村純子, 小牟田縁, 川野仁：臨床環境医学, 1,46-56,2012.
- 7) 小林裕子：BUNSEKI KAGAKU, 58,985-997,2009.
- 8) 小林麻紀, 大塚健治, 田村康宏他：東京健安研センター年報, 61,14-220,2010.
- 9) 荻野知美, 岩船 敬, 渡邊栄喜：農薬調査研究報告, 4,5-12,2012.
- 10) 金戸恵子, 水口竜人, 由田洋一, 他：石川県保健環境センター研究報告書, 52,45-48,2014.
- 11) 中島崇行, 永野智恵子, 林 洋, 他：日本食品衛生学会学術講演会講演要旨集, 106th,105,2013.
- 12) 小西賢治, 土居恵子, 佐々野僚一：第37回農薬残留分析研究会, 119-124,2014.
- 13) 平井知里,山岸浩：農薬環境科学研究, 23,87-95,2015.
- 14) 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 Neonicotinoide Pesticide in Milks, Eggs, and Honey**

Maki KOBAYASHI<sup>a</sup>, Naoko SAKAI<sup>a</sup>, Kyoko KAMIJO<sup>a</sup>, Hiroshi KOIKE<sup>a</sup> and Tetsuya SHINDO<sup>a</sup>

A procedure was developed for the determination of neonicotinoide pesticides in milk, eggs and honey using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Samples were extracted with acetonitrile and the extracts were cleaned up on a graphite carbon and ethylenediamine-*N*-propyl silylation silica gel (GC/PSA) cartridge column. Neonicotinoide pesticides were detected by LC-MS/MS, with 74.3% - 104.6% recovery at a level of 0.01 µg/g and 79.4% - 103.7% at a level of 0.1 µg/g, and a limit of determination of 0.005 µg/g.

**Keywords:** pesticide residue, milk, egg, honey, neonicotinoide pesticide, LC-/MS/MS

---

<sup>a</sup> Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,  
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan

