

平成 26 年 6 月 21 日現在

機関番号：32676

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：22790050

研究課題名(和文)水環境中および食品中におけるネオニコチノイド系農薬の存在実態と分解挙動

研究課題名(英文)Occurrence and decomposition behavior of neonicotinoids in food and water environment

研究代表者

川口 里恵(伊藤里恵)(Kawaguchi, Rie)

星薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：90398892

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：近年、有機リン系殺虫剤に替わる農薬として、ニコチン様作用を示すネオニコチノイド系殺虫剤が広く使用されている。蜂群崩壊症候群(Colony collapse disorder; CCD)の原因物質の一つではないかと考えられていることから、ハチミツ中のネオニコチノイド系殺虫剤の高感度・高選択的な分析法に必要な前処理法を検討した。構築した固相抽出-液体クロマトグラフ タンデム質量分析法を用いることで、ハチミツ中ネオニコチノイド系農薬の残留分析に適用可能であり、汚染実態の解明に活用できると期待される。

研究成果の概要(英文)：In recent years, as an alternative of organophosphate insecticides, neonicotinoids has been widely used. In order to clarify the residue of neonicotinoids in honey, solid phase extraction (SPE) followed by liquid chromatography tandem mass spectrometry was developed for simultaneous determination of neonicotinoids in honey. When ENVI-Carb/LC-NH2 cartridge was used for SPE, the recoveries of neonicotinoids were improved. In addition, the limits of detection (LODs) and limits of qualification (LOQs) of neonicotinoids were 0.002-0.02 ng/mL and 0.005-0.1 ng/mL, respectively. Compared to liquid-liquid extraction or other SPE cartridge, proposed method is sensitive and simple. The results showed that proposed method is applicable to the determination of trace amounts of neonicotinoids in honey.

研究分野：分析化学

科研費の分科・細目：物理系薬学

キーワード：ネオニコチノイド 残留分析 ハチミツ

1. 研究開始当初の背景

ネオニコチノイド系殺虫剤は、ニコチン様作用を示す新しい農薬として知られている。有機リン系殺虫剤に替わる薬剤として期待され、広く穀物や野菜、茶、果物などの生産に使用されている。代表的な薬剤としてイミダクロプリド、アセタミプリド、クロチアニジンなどが挙げられるが、これらネオニコチノイド系薬剤は、蜂群崩壊症候群 (Colony collapse disorder; CCD) の原因物質の一つではないかと懸念されている。実際に、ドイツでは 2008 年にミツバチへの影響を理由にクロチアニジンと他の 7 種類の殺虫剤の使用が禁止され、フランスでは 1999 年にイミダクロプリドが禁止された。日本国内においても、2005 年に岩手県でミツバチが大量死した事例がある (読売新聞 2005 年 10 月 4 日)。裁判後に和解しているものの、死んだミツバチやその巣から、クロチアニジンが検出されている。

2. 研究の目的

近年、有機リン系殺虫剤に替わる農薬として、ニコチン様作用を示すネオニコチノイド系殺虫剤が広く使用されている。我が国では 1990 年代に農薬登録されて以来、現在も使用され続けており、飛散しやすいことから有用昆虫、特に蜜蜂に対する毒性が懸念され、蜂群崩壊症候群 (Colony collapse disorder; CCD) の原因物質の一つではないかと考えられている。実際にドイツでは 2008 年にミツバチへの影響を理由にクロチアニジンと他の 7 種類の殺虫剤の使用が禁止され、フランスでは 1999 年にイミダクロプリドが禁止された。

ネオニコチノイドは、ニコチン様アセチルコリン受容体 (nAChR) で昆虫の中樞神経系に特異的に作用し、哺乳類の脳の nAChR への親和性は低いとされている。しかしながら、国内で心機能不全や記憶障害など急性ニコチン中毒と類似性のネオニコチノイド中毒と疑われる症例が報告されており、農薬散布や食品由来のアセタミプリドが原因物質として考えられている。

各ネオニコチノイド系農薬の個別試験法は厚生労働省告示第 370 号に農作物および畜産物について規定されているが、蜂蜜に関する残留試験法は設定されていない。また、比較的新しい農薬のため、その使用歴が浅く、簡便な同時分析法が構築されていない。そこで本研究において、食品への残留などその存在実態を明らかにするため液体クロマトグラフィー タンデム質量分析 (LC-MS/MS) 法によるハチミツ中のネオニコチノイド系殺虫剤の高感度・高選択的な分析法に必要な前処理法を検討することとした。

3. 研究の方法

(1) 測定対象物質

測定対象物質はニテンピラム、イミダクロ

プリド、クロチアニジン、アセタミプリド、チアクロプリド、ジノテフランおよびチアマトキサムとし、内部標準物質としてイミダクロプリド-d₄およびチアクロプリド-d₆を用いた (Fig. 1)。

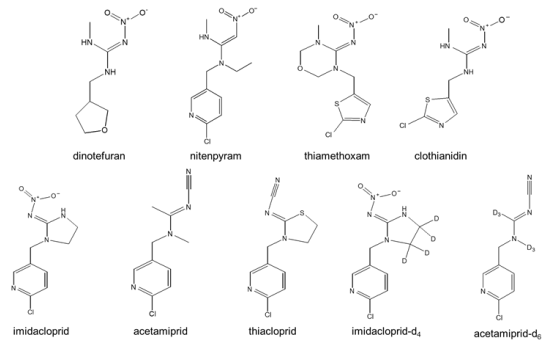


Fig. 1
Chemical structures of neonicotinoid

(2) LC-MS/MS 測定条件

LC-MS/MS 測定の装置には、Agilent 1100 Series HPLC および ABSCIEX API4000 を用いた。MS-MS のイオン源として ESI を採用し、MRM ポジティブモードでの測定を行った。

LC の移動相は、0.1 mM ギ酸アンモニウムとアセトニトリルを用い、流速は 0.2 mL/min でグラジエント溶出とした。グラジエントプロファイルを Fig. 2 に示す。分離カラムは、化学物質評価研究機構の L-Colum2 ODS (150 mm x 2.1 mm, i.d. 5 μm) を用い、40 度に設定したカラムオープン内に設置し、分離を行った。

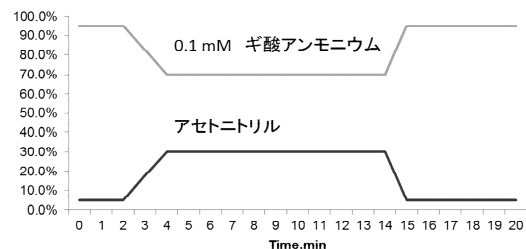


Fig. 2 Gradient profile

モニタリングイオンおよび MS/MS の諸条件は以下のとおりである。

モニタリングイオン

- ジノテフラン: m/z 203 129;
- ニテンピラム: m/z 271 126;
- チアマトキサム: m/z 292 211;
- フロニカミド: m/z 230 203;
- クロチアニジン: m/z 250 168;
- イミダクロプリド: m/z 256 175;
- アセタミプリド: m/z 223 126;
- チアクロプリド: m/z 253 126

MS-MS パラメータ

- カーテンガス (CUR): 10 psi;
- ネプライザーガス (GS1): 80 psi;
- ターボガス (GS2): 70 psi;

イオンスプレー電圧 (IS) : 5500 V ;
 イオン源温度 (TEM) : 600 ;
 コリジョンガス (CAD) : 6 unit
 なお、GS1、GS2、CUR、CAD には、すべて N₂ ガスを用いた。

(3) ハチミツの前処理法

ハチミツの前処理には、ケイソウ土カートリッジを用いた液液抽出法、および ENVI-Carb/LC-NH₂ (Supelco 社製) を用いた固相抽出法を検討した。

ケイソウ土カートリッジを用いた液液抽出法では、ハチミツ 5 g を精製水 20 mL で希釈後、Chem Elut ケイソウ土カートリッジに負荷し 10 分間静置させた。その後、酢酸エチル 20 mL × 5 回で溶出させた溶液をエバポレーターで減圧乾固させ、残留物を精製水に再溶解して試験溶液とした。

ENVI-Carb/LC-NH₂ を用いた固相抽出法は、ハチミツ 5 g を精製水 10 mL で攪拌希釈後、酢酸エチル・アセトニトリル混合溶液 20 mL × 3 回で液液抽出を行い、2500 rpm 5 分間の遠心分離を行って上層を回収した。回収した抽出溶液をエバポレーターで減圧濃縮させ、残留物をトルエン・アセトニトリル混合溶液で定容にして、ENVI-Carb/LC-NH₂ に負荷させた。その後、トルエン・アセトニトリル混合溶液を 20 mL 加え、溶出液をエバポレーターにより減圧乾固させ、残留物を精製水に再溶解して試験溶液とした。

4. 研究成果

(1) 分析法バリデーション

移動相について種々検討した。標準品を用いて、移動相に 0.001%、0.01%、0.1% となるように酢酸およびギ酸を添加し、ピーク強度を確認したところ、酸を加えた際に、ニテンピラムやジノテフランなど、感度の低い化合物で、ピーク強度が増強することが分かった。また、0.01% ギ酸を加えた際、両化合物において、最大のピーク強度を得た。さらに検討した結果、0.1 mM ギ酸アンモニウム溶液とアセトニトリルのグラジエント溶出を用いることで、各ネオニコチノイド系農薬の良好な相互分離が達成され、ピーク強度も改善されていたため (Fig. 3)、本グラジエント溶出を採用することとした。

最適化した LC-MS/MS 分析法で、標準品を用いた際の検出下限値 (LOD) および定量下限値 (LOQ) を確認したところ、LOD が 0.002 ~ 0.02 ng/mL、LOQ が 0.005 ~ 0.1 ng/mL であった。また、各化合物の検量線を作成したところ、各濃度範囲において、その相関係数も 0.999 以上と良好な直線性が得られた (Table 1)。

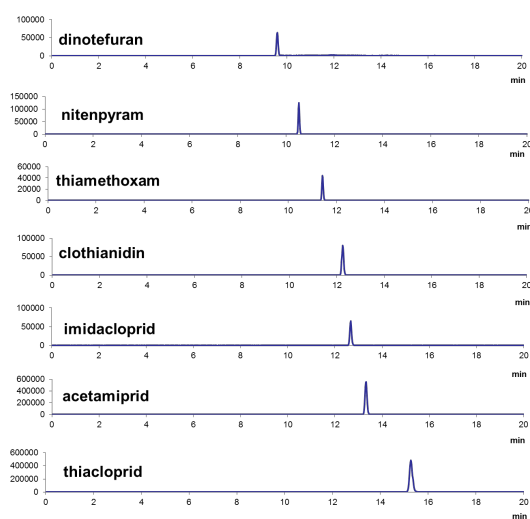


Fig. 3 MRM Chromatograms of 10 ng/mL standard solution

Table 1 Method validation

Analyte	LOD (ng mL ⁻¹)	LOQ (ng mL ⁻¹)	Linear range (ng mL ⁻¹)	Correlation coefficient (r)
dinotefuran	0.02	0.05	0.05-50	0.999
nitentpyram	0.005	0.01	0.01-50	0.999
thiamethoxam	0.005	0.01	0.01-50	0.999
clothianidin	0.02	0.05	0.05-50	0.999
imidacloprid	0.02	0.1	0.1-50	0.999
acetamiprid	0.002	0.005	0.005-50	0.999
thiacloprid	0.002	0.005	0.005-50	0.999

LOD: limit of detection (S/N=3)

LOQ: limit of quantification (S/N>10)

(2) 抽出溶媒の検討

Chem Elut および ENVI-Carb/LC-NH₂ カートリッジからの抽出溶媒を検討した。

Chem Elut カートリッジを用いた際、酢酸エチル、トルエン、ジエチルエーテルでの抽出を比較したところ、トルエンやジエチルエーテルでの抽出では、ジノテフランやニテンピラムの感度が低く、酢酸エチルを採用することとした (Fig. 4)。

ENVI-Carb/LC-NH₂ では、酢酸エチルを抽出溶媒として用いた場合、ニテンピラムが約 30% しか回収されなかった。そこで、アセトニトリルと酢酸エチルの混合溶液を用いることとし、混合割合を検討した。ニテンピラムは、酢酸エチルの含量が増えるに伴い、回収率が落ちることが分かったため、他の化合物の回収率も勘案し、アセトニトリルと酢酸エチルが 60:40 となる混合溶液を採用した。

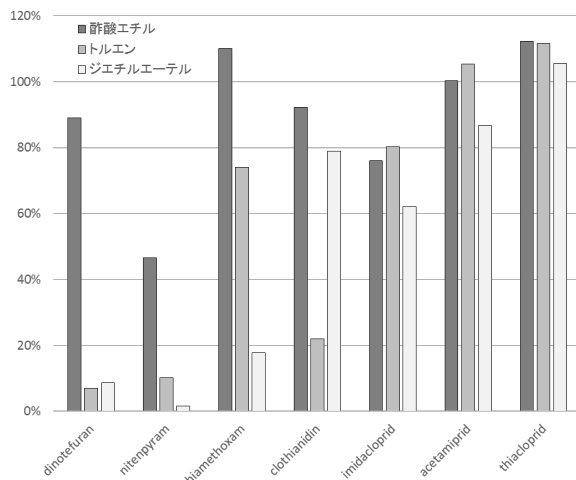


Fig. 4 Optimization of extraction solvent for Chem Elut cartridge

(3) 添加回収試験

これまでに最適化した前処理法および LC-MS/MS 測定を用いて、ハチミツ中に標準品を添加した添加回収用試料を測定した。

Chem Elut ケイソウ土カートリッジを用いた液液抽出法では Table 2 に示す通り、特にニテンピラムの回収率は、高濃度添加および低濃度添加の両方において 25% 前後と低く、RSD も 25% 以上と測定に課題が残った。ニテンピラムを除く化合物においては、2 ng/g 添加時は、回収率 79.8 ~ 117.7% であり、0.2 ng/g 添加時は、回収率 84.5 ~ 126.0% と良好であった。

Table 2 Recoveries of neonicotinoids in spiked honey sample

Analyte	Spiked amount (ng/g)	recovery (%)	RSD (%)
dinotefuran	2	117.7	4.3
	0.2	126.0	8.4
nitenpyram	2	26.2	18.2
	0.2	22.1	27.4
thiamethoxam	2	89.3	0.9
	0.2	102.5	10.9
clothianidin	2	79.8	1.9
	0.2	84.5	5.5
imidacloprid	2	100.7	1.6
	0.2	93.7	6.3
acetamiprid	2	110.8	1.1
	0.2	108.7	3.4
thiacloprid	2	110.6	0.7
	0.2	108.4	2.4

n=5

ENVI-Carb/LC-NH2 カートリッジを用い、最適化した固相抽出法および LC-MS/MS 測定に供した結果、Chem Elut ケイソウ土カートリッジでの液液抽出法では回収率の低かったニテンピラムが保持され、その回収率が改善した。

ニテンピラムを含むネオニコチノイド系農薬の回収率は、2 ng/g 添加および 0.2 ng/g 添加時に、それぞれ 61.8 ~ 109.5% および 80.2 ~ 117.4% であった (Table 3)。

Table 3 Recoveries of neonicotinoids in spiked honey sample

	Spiked amount (ng/g)	recovery (%)	RSD (%)
dinotefuran	2	98.5	4.9
	0.2	117.4	3.3
nitenpyram	2	61.8	14.4
	0.2	84.2	8.3
thiamethoxam	2	96.3	2.7
	0.2	80.2	1.8
clothianidin	2	88.8	4.6
	0.2	103.9	2.3
imidacloprid	2	103.1	4.6
	0.2	102.0	1.5
acetamiprid	2	100.2	3.5
	0.2	103.5	1.2
thiacloprid	2	109.5	2.1
	0.2	109.0	1.8

n=5

添加回収試験では、ENVI-Carb/LC-NH2 の他の固相抽出カートリッジとして、より一般的な HLB や、弱陽イオン交換および強陽イオン交換 (WCX および MCX) カートリッジを用いても検討を行った。しかしながら、HLB では保持力が弱く、試料負荷の際に保持されずに溶出してしまい、回収されなかった。WCX や MCX では、各ネオニコチノイド系農薬において、保持力が異なり、今回対象としたネオニコチノイド系農薬を全て適切に保持させるのは、困難であった。その点、ENVI-Carb/LC-NH2 は、ENVI-Carb と LC-NH2 の二層固相であり、グラファイトカーボン (ENVI-Carb 部分) は、ODS やポリマーゲルと比較して、幅広い極性範囲の化合物の保持が可能であるため、ネオニコチノイドのように、極性の異なる化合物群の同時分析に適していたと考えられる (Molinspiration property engine v 2011.04 における、対象化合物の LogP 予測値は、0.038 ~ 1.596 である)。

(4) 実試料の測定および残留実態の解明

前項までで ENVI-Carb/LC-NH2 カートリッジを用いた固相抽出法に LC-MS/MS 測定法を組み合わせた際に、ハチミツ中のネオニコチ

ノイド系農薬の測定が可能であったことから、実試料の測定を行い、ハチミツ中への残留実態の解明を試みた。購入したハチミツの分析を試みた結果、あるハチミツから定量下限値～0.4 ng/mL のネオニコチノイドが検出された (Fig. 5)。以上のことから、さらに産地の違いなどにおいて、その残留実態が異なるのかなど検討が必要であると考えられた。

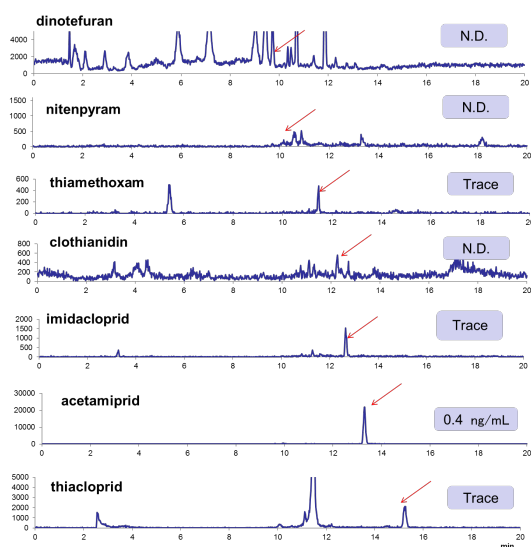


Fig. 5 MRM Chromatograms of neonicotinoid in honey sample

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

第 130 回 日本薬学会 (岡山)
液液抽出-LC-MS/MS 法を用いた蜂蜜中ネオニコチノイド系農薬の分析
大久保哲生、伊藤里恵、岩崎雄介、斉藤貢一、中澤裕之 (2010 年 3 月)

第 71 回 分析化学討論会 (島根)
蜂蜜中のネオニコチノイド系農薬分析における前処理の検討
大久保哲生、伊藤里恵、岩崎雄介、斉藤貢一、中澤裕之 (2010 年 5 月)

〔図書〕(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 里恵 (ITO, Rie)

星薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：90398892