

Application News

No. C140

LC/MS
Liquid Chromatography Mass Spectrometry

ハチミツ中に極微量含まれるネオニコチノイド、フィプロニルおよび代謝物の高速定量分析

Ultra-Sensitive and Rapid Assay of Neonicotinoids, Fipronil and Some Metabolites in Honey by UHPLC-MS/MS [LCMS-8060]

クロロニコチニル系殺虫剤（ネオニコチノイド）およびフィプロニルは農業として幅広く利用されている殺虫剤です。

近年、これら殺虫剤とミツバチの蜂群崩壊症候群との関連が報告されており、農業におけるミツバチの受粉活動が重要であることから、さらなる調査研究および規制見直しの必要性が高まっています。これを受け、European Food Security Authority (EFSA) では、クロチアニジン、イミダクロプリド、チアメトキサムについて新たな規制基準を設け、また、フィプロニルのとうもろこしの種子コーティングへの利用を禁止する措置を取りました。

これらの化合物への暴露がミツバチに及ぼす影響、および、花粉やハチミツの汚染状況についてより深い知見を得るためには、高感度な定量分析法が必要不可欠です。ここでは、Nexera X2 および LCMS-8060 を用いたネオニコチノイド7種とフィプロニル（およびその代謝物）の高感度分析法をご紹介します。

T. Tanigawa E. Imoto

■ 実験方法

Sample Preparation

内部標準物質としてチアメトキサム-d3、イミダクロプリド-d4、クロチアニジン-d3 を用いました。化合物の抽出は QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) 法と固相精製を組み合わせて行いました。QuEChERS 試薬は (4 g 硫酸マグネシウム, 1 g クエン酸ナトリウム, 0.5 g クエン酸三ナトリウム二水和物, 1 g 塩化ナトリウム)、固相精製の試薬は (1.2 g 硫酸マグネシウム, 0.4 g PSA 充填剤, 0.4 g C18 充填剤) がプレミックスされたものを、それぞれ Biotage 社から購入し用いました。

50 mL チューブに 5 g のハチミツを秤量し、5 μ L の内部標準物質（各 5 μ g/mL の混合液）を添加し、10 分間減圧乾燥しました。これに 10 mL の超純水を加え 1 分間ボルテックスし、さらに 10 mL のアセトニトリルを加え 1 分間混合することで、懸濁液を調製しました。懸濁液を室温で穏やかに 1 時間振とう後、QuEChERS 試薬を添加し、混合液を 3000 g, 10 $^{\circ}$ C, 5 分間の条件で遠心分離しました。上澄み液 6 mL を固相精製試薬入りの 15 mL チューブへと移し、さらに振とう後、3000 g, 10 $^{\circ}$ C, 5 分間の条件で遠心分離しました。この上澄み液を LCMS 測定用のガラスバイアルへと移し、分析に供しました。

■ 回収率の評価

Recovery

市販のハチミツおよびハチミツを含まないブランク試料に各化合物を 50 ppt 添加し、それぞれ抽出、測定に供しました。結果を Table 1 に示します。算出した回収率は 70 - 120 % であり、EU の SANTE/11945/2015 が規定する許容範囲内に収まりました。

Table 1 各化合物のハチミツ中における回収率の測定値
Measured Recoveries in Honey

化合物	回収率	化合物	回収率
アセタミプリド	78.8 %	フィプロニルスルホン	74.2 %
アセタミプリド-N-デスメチル	93.4 %	イミダクロプリド	83.2 %
クロチアニジン	70.6 %	ニテンピラム	87.0 %
ジノテフラン	76.5 %	チアクロプリド	82.2 %
フィプロニル	78.1 %	チアメトキサム	75.6 %

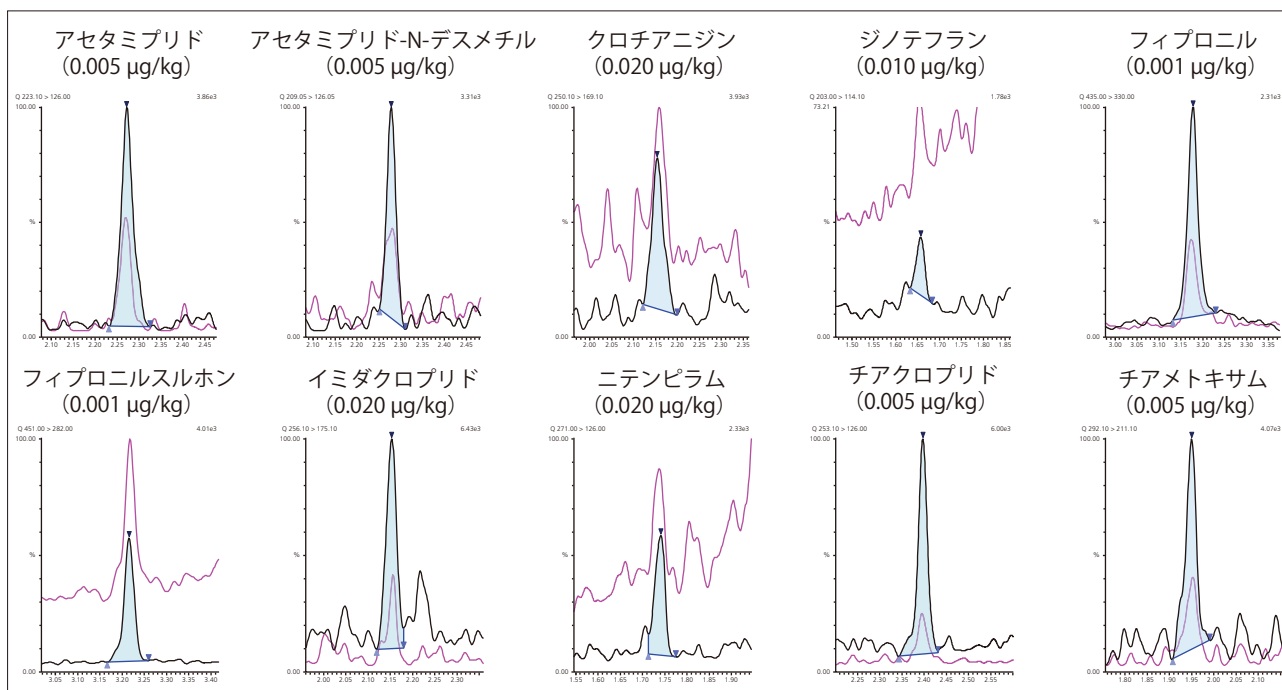


Fig. 1 各化合物の定量下限濃度におけるMRMクロマトグラム
Chromatogram of the Target Compounds at Their Lower Limit of Quantification

Table 2 測定条件
Analytical Conditions

UHPLC	: Nexera X2	LC/MS/MS	: LCMS-8060
分析カラム	: ACE SuperC18 2 μm (100 mm L. × 2.1 mm I.D.)	イオン化モード	: 加熱 ESI
カラム温度	: 30 °C	インターフェース電圧	: +1 kV (ポジティブ) / -1.5 kV (ネガティブ)
移動相	: A : 0.05 % アンモニア水 B : メタノール + 0.05 % アンモニア	インターフェース温度	: 400 °C
流速	: 600 μL/min	DL 温度	: 200 °C
グラジエントプログラム	: 5 %B to 100 %B in 3 min 100 %B to 5 %B in 0.1 min	ブロックヒータ温度	: 400 °C
分析時間	: 4 min	ネプライザガス流量	: 3 L/min
注入量	: 2 μL (10 μL の水と共注入)	ヒーティングガス流量	: 10 L/min
		ドライガス流量	: 5 L/min

Table 3 MS/MS 取得パラメータ
MS/MS Acquisition Parameters

MRM トランジション	和名	英名	Polarity	MRM Quan	MRM Qual	ISTD
	アセタミプリド	Acetamidiprid	+	223.1 > 126.0	223.1 > 56.1	2
	アセタミプリド-N-デスメチル	Acetamidiprid-N-desmethyl	+	209.1 > 126.0	211.1 > 128.0	2
	クロチアニジン	Clothianidin	+	250.1 > 169.1	250.1 > 132.0	3
	ジノテフラン	Dinotefuran	+	203.0 > 114.0	203.0 > 87.0	1
	フィプロニル	Fipronil	-	435.0 > 330.0	435.0 > 250.0	3
	フィプロニルスルホン	Fipronil sulfone	-	451.0 > 415.0	451.0 > 282.0	3
	イミダクロプリド	Imidacloprid	+	256.1 > 175.1	258.1 > 211.1	2
	ニテンピラム	Nitenpyram	+	271.0 > 126.0	271.0 > 225.0	3
	チアクロプリド	Thiacloprid	+	253.1 > 126	253.1 > 90.1	1
	チアメトキサム	Thiamethoxam	+	292.1 > 211.1	292.1 > 181.1	1
	チアメトキサム-D3	Thiamethoxam-D3	+	295.1 > 214.05	---	1
	イミダクロプリド-D4	Imidacloprid-D4	+	260.1 > 179.1	---	2
	クロチアニジン-D3	Clothianidin-D3	+	253.1 > 132.05	---	3

データ取り込み時間 : 3 msecから34 msecまで一つのピークに対して最低30点取得した場合の遷移時間(最大ループタイム140 msec)
 停止時間 : 1 msec
 分解能設定 : Q1: Unit Q3: Unit

■ キャリブレーション Calibration

各化合物の混合液を、内部標準を含むアセトニトリルを用いて 0.5 – 5000 pg/mL に希釈し、内部標準法による検量線を作成しました。このときの注入量は 1 fg – 10 pg で、ハチミツ中濃度に換算すると 0.001 – 10 μg/kg となります。

各化合物の定量下限値を Table 4 に、定量下限値における MRM クロマトグラムを Fig. 1 に、それぞれ示します。検量点 (n=1) の真度はすべて 80 – 120 % の範囲に収まり、広いダイナミックレンジにおける定量性が示されました。

例として、アセタミプリドの検量線を Fig. 2 に示します。

Table 4 ハチミツ中における各化合物の下限定量値
Limits of Quantification in Honey

化合物	LOQ (μg/kg)	化合物	LOQ (μg/kg)
アセタミプリド	0.005	フィプロニルスルホン	0.001
アセタミプリド-N-デスメチル	0.005	イミダクロプリド	0.020
クロチアニジン	0.020	ニテンピラム	0.020
ジノテフラン	0.010	チアクロプリド	0.005
フィプロニル	0.001	チアメトキサム	0.005

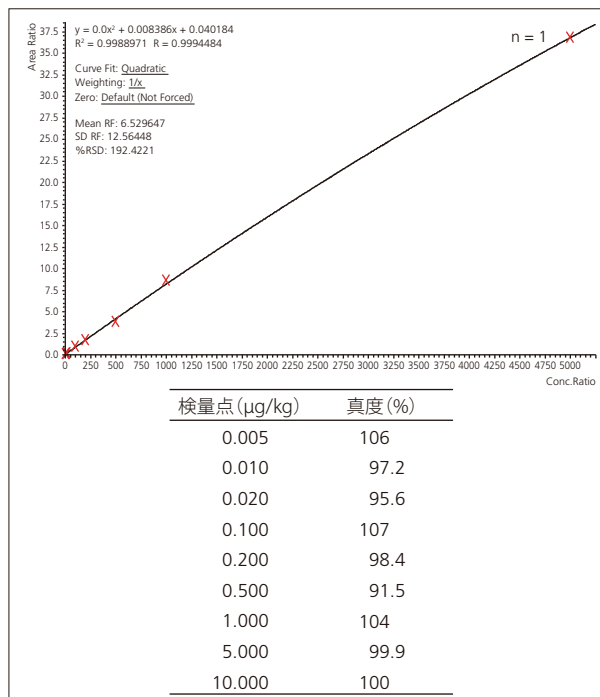


Fig. 2 Acetamidiprid の検量線
Calibration Curve of Acetamidiprid

■ サンプルの分析方法

Real Samples Analysis

食品や化粧品原料として市販されているハチミツ 9 品目を購入し、未知試料として高感度分析に供しました。その結果、不検出となった 1 品目を除くすべての試料において、基準値を大きく下回る濃度の残留農薬を定量することに成功しました。結果のサマ리를 Table 5 に示します。さらに Fig. 3 の MRM クロマトグラムでは、マトリクス由来の妨害ピークの影響を受けることなく農薬成分の検出ができており、今回の方法により実試料中の高感度な定量が行えることが示されました。

Table 5 ハチミツサンプル (濃度 $\mu\text{g}/\text{kg}$)
Honey Samples Results (concentrations in $\mu\text{g}/\text{kg}$)

品目	アセタミプリド	クロチアニジン	イミダクロプリド	チアクロプリド	チアメトキサム
1. プロヴァンス産, クリーム状	---	---	0.20	---	0.010
2. イタリア産, クリーム状	0.15	---	0.17	---	---
3. ピレネー産, 液状	0.38	---	0.043	0.020	---
4. フランス産+スペイン産, クリーム状	0.27	---	0.047	0.020	---
5. タイム, 液状	---	---	---	---	---
6. レモン, クリーム状	1.7	---	0.15	0.033	---
7. ミカン, 液状	1.2	---	0.62	---	---
8. 花, クリーム状	0.14	---	0.055	0.39	---
9. 花, 液状	0.34	---	0.11	0.010	---

品目	ジノテフラン	ニテンピラム	アセタミプリド-N- デスメチル	フィプロニル	フィプロニル スルホン
1. プロヴァンス産, クリーム状	---	0.052	0.005	---	---
2. イタリア産, クリーム状	---	0.040	---	---	---
3. ピレネー産, 液状	---	---	0.015	0.004	---
4. フランス産+スペイン産, クリーム状	---	0.032	---	---	---
5. タイム, 液状	---	---	---	---	---
6. レモン, クリーム状	---	---	0.020	---	---
7. ミカン, 液状	---	0.024	0.018	---	---
8. 花, クリーム状	---	---	0.016	---	---
9. 花, 液状	---	---	0.006	---	---

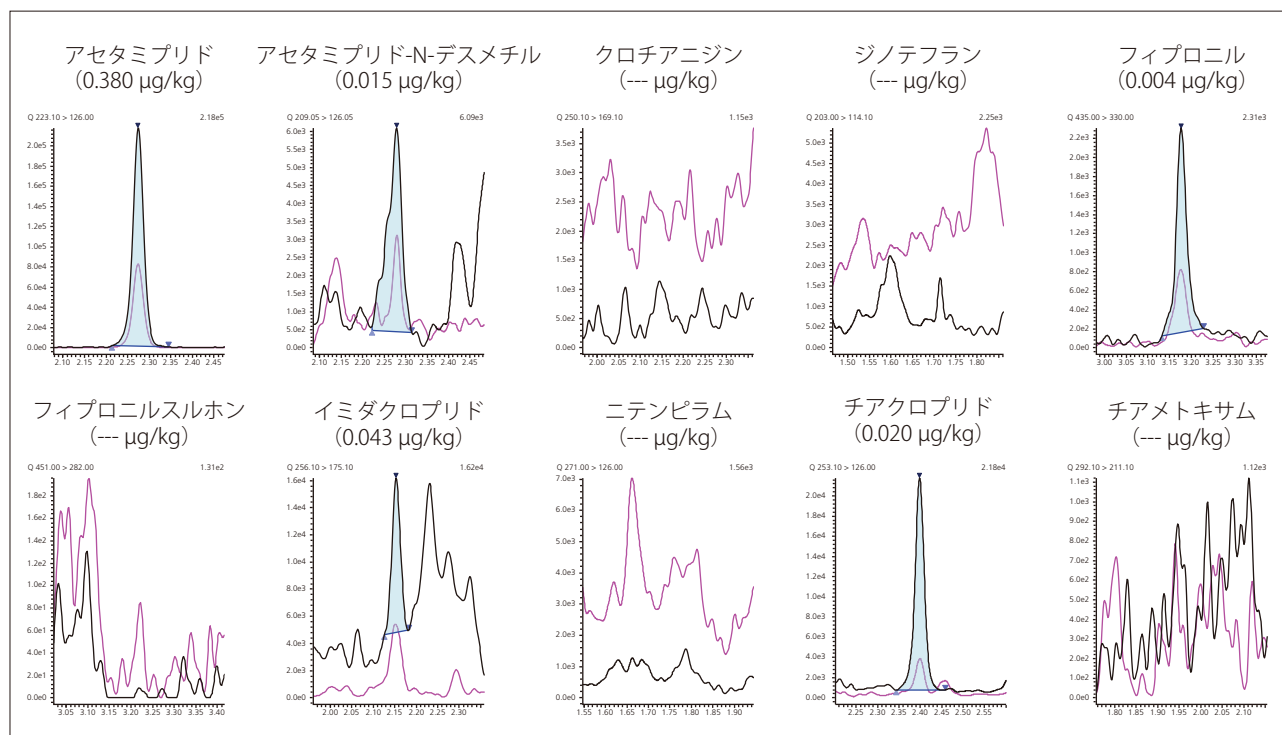


Fig. 3 ハチミツ中における農薬のクロマトグラム (ピレネー産, 液状)
Chromatograms of a Sample Honey (Pyrenees)

■測定の実安定性試験

Stability

今回の測定法における堅牢性および繰り返し再現性を評価するため、農薬が検出されなかった品目のハチミツ（タイム、液状）に各化合物を 0.05 µg/kg の濃度で添加し、150 回の連続測定を行いました。Fig. 4 に示されるように、実試料による低濃度の測定においても、高い注入間再現性および面積値の実安定性を担保する結果が示されました。高感度な測定を長時間維持するうえで、LCMS-8060 の堅牢なイオンソースの設計が生かされていると考えられます。

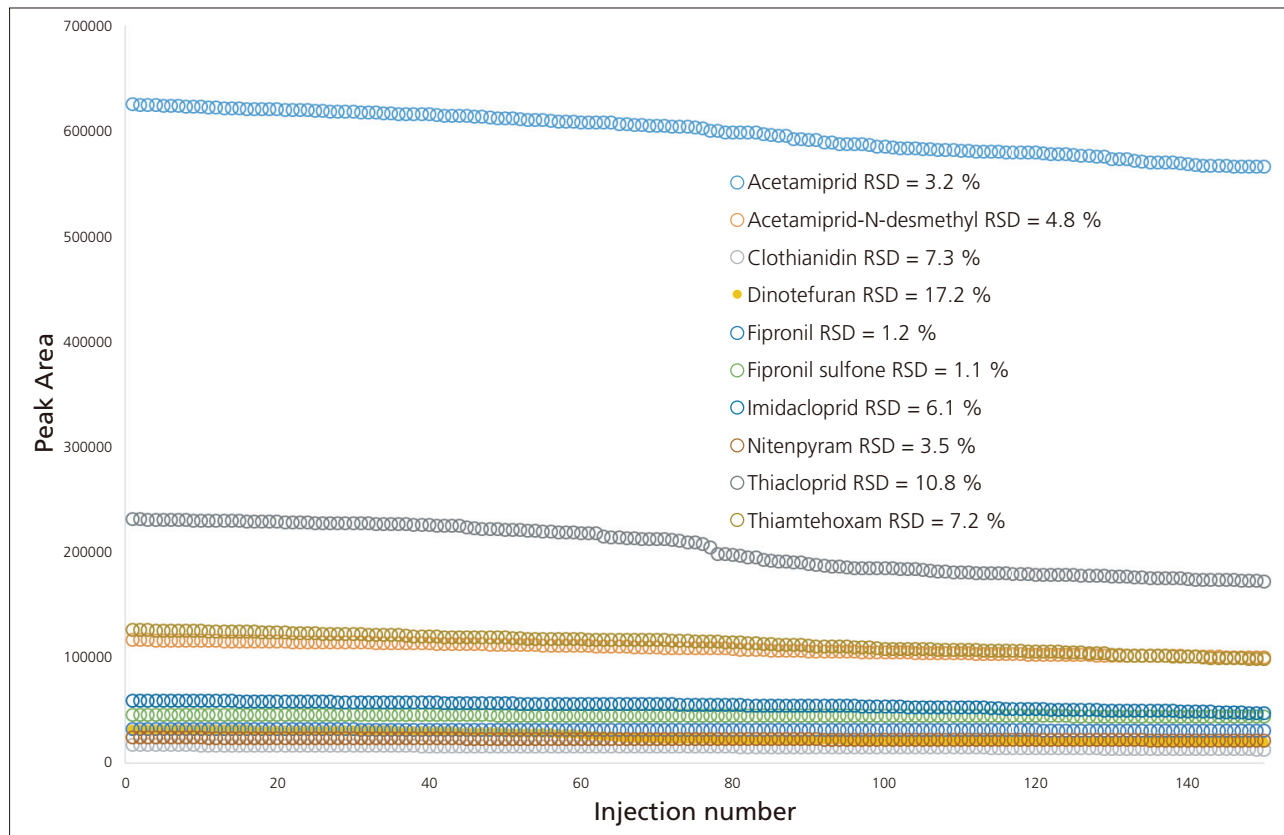


Fig. 4 150回連続測定における、農薬のピーク面積値の実安定性（ハチミツ試料）
Stability of Peak Areas in Real Honey Samples

■結論

Conclusion

ハチミツ中のネオニコチノイドやフィプロニルなどの農薬を超高感度かつ高速で分析する手法を確立しました。実験方法は簡便だけでなく高い回収率を実現することができました。これにより、規制されている残留基準値を大幅に下回る濃度でハチミツ中の農薬を定量することができました。また、測定の回数を重ねても感度への影響はありませんでした。

本実験手法はネオニコチノイドやフィプロニルなどの農薬がミツバチの巣に与える影響、および花粉やミツバチ中の残留農薬レベルを研究するためのツールとして有効で、花粉など他の試料形態にも容易に水平展開可能なものです。