

短報 (Short Report)

底質中のネオニコチノイドの分析法

中山駿一, 三島聡子
(調査研究部)

Analytical method of neonicotinoid pesticides in sediment

Shunichi NAKAYAMA, Satoko MISHIMA
(Research Division)

キーワード: ネオニコチノイド系農薬, 底質, LC/MS, 固相抽出

1. はじめに

ネオニコチノイド系農薬(以下、「ネオニコ」と呼称する。)とは、ニチアジン様の主骨格を持つ農薬類の総称であり、その高い選択毒性により、1992年に初めてイミダクロプリドが農薬登録されて以来世界中で急速に使用されるようになった。ネオニコは花き、果樹、水稻及び野菜に幅広く効果が認められており、現在、7種類のネオニコが開発され、農薬登録されている。しかし、様々な研究からミツバチ及びマルハナバチへの毒性が懸念されるようになって以来、欧州を始めとして世界各国で規制の動きが広まっている。

最近になって、河川水、大気中のネオニコに関する様々な調査がなされ、分析法²⁾も確立されてきているが、底質については、まだ確立されていない。そこで、本研究では、底質中のこれらの物質の分析法、特にクリーンアップの方法を検討した。

本研究で対象としたネオニコ等の農薬の物性

及び毒性を表1に示す。ネオニコの変化物、ネオニコではないが、構造の類似点から、EUのミツバチ保護のための特別規定で規制されているフィプロニル、特定化学物質の環境への排出量の把握等及び管理の改善の促進に関する法律(化管法)の第一種指定化学物質のダイアジン及びオキサミルについても、ネオニコとLC/MS一斉分析が可能のため、同様の検討を行った(以下、この3物質とネオニコを併せて「ネオニコ等」と呼称する。)

2. 方法

2.1 対象物質及び試薬等

ネオニコについては、ジノテフラン、ニテンピラム、CPF(ニテンピラム変化物)、チアメトキサム、クロチアニジン、イミダクロプリド、チアクロプリド、チアクロプリド-アミド(チアクロプリド変化物)、アセタミプリド、それぞれが20 µg/mL混合されている、和光純薬工業(株)製の残留農薬試験用のネオニコチノイド系農薬混合標準液を用

表1 ネオニコ等の農薬の物性及び毒性

CAS番号	153719-23-4	138261-41-3	210880-92-5	135410-20-7, 160430-64-8	165252-70-0	11988-49-9	120738-89-8	120068-37-3	23135-22-0	333-41-5
和名	チアメトキサム	イミダクロプリド	クロチアニジン	アセタミプリド	ジノテフラン	チアクロプリド	ニテンピラム	フィプロニル	オキサミル	ダイアジン
英名	THIAMETHOXAM	IMIDACLOPRID	CLOTHIANIDIN	ACETAMIPRID	DINOTEFURAN	THIACLOPRID	NITENPYRAM	FIPRONIL	OXAMYL	DIAZINON
商品名	アクトラ、アトラック	アドマイヤー、メリット、アースガデン、ハチクサ、アドバンテージ	ダントツ、フルスウィング、モリエートSC、ダントツ、タケロック	モスピラン、マツグリーン、イールダー、アリベル	スタークル、ミケブロック、アルバリン	バリアード、エコワン	ベストガード	プリンス、フロライン、アジェンダ	バイデート	ダイアジン、エキゾジン、ショットガン、ダイヤ
オクタノール/水分係数	-0.13(25°C)	0.57(21°C)	0.7(25°C)	0.80(25°C)	-0.549(25°C)	1.26(20°C)	-0.66(25°C)	4.00(20°C)	-0.04±0.015 (pH6.31, 25°C)	3.42(24°C)
ADI (mg/kg体重/日)	0.018	0.057	0.097	0.071	0.22	0.012	0.53	0.00019	0.02	0.01
コイLD ₅₀ (96h, mg/L)	>120	170	>100	>100	>97	>97	>100 (ヒメダカ)	0.43	23.8	10.5
ミジンコ類 EC ₅₀ (48h, mg/L)	>100	85	40	50	>970	>97	>100	0.19	0.32	0.00023
ミツバチ LD ₅₀ (48h, µg/頭)	0.024	0.045	0.044	8.09(72h)	0.023	>100	0.071	0.006	0.47	0.24(24h)
H25県別農薬出荷量(t又はKL)	0.27	0.52	1.2	0.36	0.33	0.10	0.07	0.07	0.05	4.4
農薬登録	2000	1992年	2001年(非食用)、2002年(食用)	1995年	2002年	2001年	1995年	1996年	1981年	1955年

いた。オキサミル、フィプロニル、ダイアジンは AccuStandard 製の 100 µg/mL を使用した。分析全般における補正のためのサロゲート内標準物質については、ジノテフランの 3 箇所の水素が重水素で置換された安定同位体のジノテフラン-*d*₃, 3 水素置換体のニテンピラム-*d*₃, 4 水素置換体のチアメトキサム-*d*₄, 3 水素置換体のクロチアニジン-*d*₃, 4 水素置換体のイミダクロプリド-*d*₄, 4 水素置換体のチアクロプリド-*d*₄, 3 水素置換体のアセタミプリド-*d*₃それぞれが 10 µg/mL 混合されている, 和光純薬(株)製の残留農薬試験用の安定同位元素ネオニコチノイド系農薬混合標準液を使用した。サロゲート内標準の回収率の算出のためシリンジスパイク内標準として使用したカルバリル (NAC) の 7 水素置換体の NAC-*d*₇ は, 林純薬工業(株)製を使用した。各ネオニコ等の標準液の調整, 抽出溶媒に使用したアセトン, メタノールは和光純薬(株)製を使用した。水試料から対象物質を抽出するための固相カートリッジは, ジーエルサイエンス(株)製の InertSep® Pharma FF (以下, 「FF」と呼称する。)を, クリーンナップのためのカートリッジは, ジーエルサイエンス(株)製の InertSep® Pharma GC (以下, 「GC」と呼称する。)を使用した。LC/MS の溶離液に用いたメタノール及び酢酸アンモニウムについては和光純薬工業(株)製の LC/MS 用を用いた。

2. 2 分析方法

底質中のネオニコ等の分析におけるクリーンナップの方法を検討した。底質試料はアセトンを用いた 20 分間超音波照射下での抽出及び 3,000 rpm の 20 分間遠心分離し, ロータリエバポレーターで 5 mL 以下に濃縮し, ①20 mL のヘキサンを加え, 無水硫酸ナトリウムで脱水のみをしたものと, ②20 mL のヘキサンを加え, 無水硫酸ナトリウムで脱水したものを GC に通してクリーンナップしたもの, ③5 mL に濃縮したものを 250 mL の純水 (MilliQ 水) に溶解し, FF に通水して固相抽出し, 3,000rpm の 10 分間の遠心分離及び 10 分間窒素ガスを流して脱水し, GC を下に連結してアセトン 8 mL で抽出したものを作成した。各抽出溶液は窒素ガス吹きつけして 0.5 mL のメタノール溶液にし, ネオニコ等, 安定同位元素ネオニコ及びシリンジスパイクの NAC-*d*₇をそれぞれ 10 ng

となるように加え, 超純水 (和光純薬工業(株)製 PFOS・PFOA 分析用超純水)を加えて 1 mL に定容した。定量は LC/MS (島津製作所(株)製 LC/MS-8050)で行った。測定条件を表 2 に示す。水試料から対象物質を抽出するための固相カートリッジ FF 及びクリーンナップのためのカートリッジ GC は, 既報²⁾の水中のネオニコ分析で使用されているものである。標準試料と各試料中の各物質のピーク強度を比べ, 妨害物質の影響が最も少なかった方法を底質の分析法とした。

表 2 LC/MS 測定条件

(1) HPLC conditions (Shimadzu Nexera X2)	
Column	Acquity UPLC™ BEH Phenyl (1.7 µm, Φ3 mm×75 mm)
Mobile phase	A: 5 mM Ammonium acetate water solution B: Methanol
Gradient	0 min - 2 min 90 %A, 10 %B liner gradient 7 min 7.5 min 35 %A, 65 %B liner gradient 5 min 12.5 min 5 %A, 95 %B liner gradient 0.1 min 12.6 min - 18 min 90 %A, 10 %B
Flow	200 µL/min
Oven temperature	40 °C
Injection volume	5 µL
(2) MS/MS conditions (Shimadzu LCMS-8050)	
Ionization mode	Positive-ESI
Interface Voltage	4 kV
Heat block temperature	300 °C
Interface temperature	200 °C
Desolvation Line temperature	250 °C
Drying gas	10 L/hr
Heating gas	10 L/hr
Nebulizer gas	2 L/min

MS 開裂条件, 装置検出下限 (IDL) 及び IDL 試料換算値を表 3 に示す。オキサミル及びチアメトキサムのサロゲート内標準物質にはチアメトキサム-*d*₄ を, イミダクロプリド, チアクロプリド-アミド及び CPF にはイミダクロプリド-*d*₄ を, クロチアニジンにはクロチアニジン-*d*₃ を, アセタミプリドにはアセタミプリド-*d*₃ を, ダイアジン, チアクロプリド及びフィプロニルにはチアクロプリド-*d*₄ を, ジノテフランにはジノテフラン-*d*₃ を使用した。表中の網掛けが同じもの同士がこれらの対応関係を示している。以下の表において同じである。IDL については, S/N=10 以上が得られる, 検量線作成用の最低濃度 (0.5 ng/mL) を 7 回繰り返し LC/MS に導入して分析し, 一連の分析値の標準偏差を求め, 2 倍し, 有意水準とした 95%信頼上限 (片側) の値 (1.9432) を乗じて求めた³⁾。

表 3 MS 開裂条件, IDL 及び IDL 試料換算値

Compound	m/Z	IDL(ng/mL)	IDL試料換算値(ng/g)	Surrogate	m/Z
Oxamyl	237.10>72.10	0.056	0.0028	Thiamethoxam- <i>d</i> ₄	274.00>128.20
Thiamethoxam	292.00>132.05	0.088	0.0044		295.00>214.10
Nitenpyram	271.10>125.70	0.20	0.010	Nitenpyram- <i>d</i> ₃	274.00>128.20
Imidacloprid	256.05>209.10	0.080	0.0040	Imidacloprid- <i>d</i> ₄	259.95>213.10
Thiacloprid-amid	270.70>125.70	0.029	0.0014		259.95>213.10
CPF	198.80>128.10	0.040	0.0020		259.95>213.10
Clothianidin	250.00>132.00	0.18	0.0088	Clothianidin- <i>d</i> ₃	253.00>172.10
Acetamiprid	223.05>126.05	0.040	0.0020	Acetamiprid- <i>d</i> ₃	225.95>126.05
Diazinon	305.05>169.15	0.26	0.013	Thiacloprid- <i>d</i> ₄	257.10>126.00
Thiacloprid	253.00>126.00	0.036	0.0018		257.10>126.00
Fipronil	434.50>330.00	0.22	0.011		257.10>126.00
Dinotefuran	202.90>129.00	0.045	0.0022	Dinotefuran- <i>d</i> ₃	206.00>132.20
NAC- <i>d</i> ₇ (Syringe spike)	209.00>152.00				

3 結果と考察

3.1 クリーンナップによるピーク強度への影響

LC/MS 法では試料に含まれる夾雑成分によってイオン化の抑制や促進が観測され、定量分析において誤った定量値を与えることが報告されている⁴⁾。試料前処理におけるその対処方法としては、夾雑成分の量を減少させることであり、試料液のクリーンナップ、試料液の希釈、注入量の減少があげられるが、試料液の希釈及び注入量を少なくすることは、感度の問題もあり限界がある⁴⁾。そこで、本研究ではクリーンナップを検討した。底質を抽出したアセトン溶液を濃縮し、①ヘキサンを加え脱水のみし、クリーンナップしなかった試料と、②ヘキサンを加え脱水し、GCに通してクリーンナップしたもの、③純水に溶解し、FFでの固相抽出及びGCによるクリーンナップをしてLC/MSに注入した。得られたLC/MSの面積値を比較したものを表4に示す。

これにより、概ねI→II→IIIとクリーンナップ操作が増えることにより、値が1に近づく、すなわち標準の面積値に近づくことから、夾雑成分によるイオン化抑制及びイオン化促進の効果が抑えられていることが解った。

以上のことにより底質の分析は、③アセトン抽出液を純水に溶解し、FFでの固相抽出及びGCによるクリーンナップで、夾雑成分によるイオン化抑制及びイオン化促進の効果を抑えることとした。

3.2 底質の回収率

妨害物質の影響が最も少なかった③の底質の分析法により回収率を算出した。底質試料にネオ

表 4 イオン化抑制及び促進効果

(標準品 10 µg/mL に対する面積比) (n = 3)

	I ※1	II ※2	III ※3
Oxamyl	1.6	1.6	1.6
Thiamethoxam	1.1	1.2	0.90
Nitenpyram	1.3	1.3	1.2
Imidacloprid	1.1	1.1	0.92
Thiacloprid-amid	1.3	1.3	1.2
CPF	1.1	1.1	0.99
Clothianidin	1.1	1.2	0.98
Acetamiprid	1.1	1.1	1.0
Diazinon	1.2	1.2	1.1
Thiacloprid	1.0	1.1	1.1
Fipronil	1.1	1.2	1.2
Dinotefuran	1.3	1.4	0.89
Thiamethoxam- <i>d</i> ₃	1.3	1.3	0.86
Nitenpyram- <i>d</i> ₃	1.2	1.1	0.93
Imidacloprid- <i>d</i> ₄	1.1	1.1	1.0
Clothianidin- <i>d</i> ₃	1.1	1.2	1.1
Acetamiprid- <i>d</i> ₃	1.2	1.2	1.0
Thiacloprid- <i>d</i> ₄	1.2	1.2	1.1
Dinotefuran- <i>d</i> ₃	1.3	1.4	0.95
※1	I ①に標準液の濃度が10 µg/mLとなるよう添加し測定した面積値を標準液10 µg/mLの面積値で除した値		
※2	II ②に標準液の濃度が10 µg/mLとなるよう添加し測定した面積値を標準液10 µg/mLの面積値で除した値		
※3	III ③に標準液の濃度が10 µg/mLとなるよう添加し測定した面積値を標準液10 µg/mLの面積値で除した値		

ニコ等の農薬及び安定同位体のネオニコ等をそれぞれ 10 ng となるように加え、アセトンを用いた 20 分間超音波照射下での抽出及び 20 分間遠心分離し、ロータリエバポレーターで 5 mL に濃縮し、250 mL の純水に溶解し、FF に通水して固相抽出し、10 分間の遠心分離及び 10 分間窒素ガスを流して脱水し、GC を下に連結してアセトン 8 mL で抽出し、窒素ガス吹きつけして 0.5 mL にし、シリンジスパイクの NAC-*d*₇ を 10 ng となるように加え、超純水を加えて 1 mL に定容し、LC/MS で定量した。結果を表 5 に示す。本研究で対象としたネオニコ等について、96%以上の回収率が得られたが、下線を施したサロゲートのニテンピラム-*d*₃ 及びジノテフラン-*d*₃ の回収率は 50% に満たなかった。これは、これらの成分の親水性が高い (ニテンピラム : LogP_{o/w} = -0.66, ジノテフラン : LogP_{o/w} = -0.544) ことにより底質中の水分に溶け込んでしまったことで回収できなかったためと考えられた。なお、ニテンピラム-*d*₃ によって補正するニテンピラム及びジノテフラン-*d*₃ によって補正するジノテフランは参考値とすることとした。その他のサロゲートについては、環境省化学物質環境実態調査実施の手引き³⁾で示された 50%~120% の範囲内であった。

表 5 底質への添加回収試験結果 (n = 5)

	回収率平均[%]	変動係数[%]
Oxamyl	96.3	12.1
Thiamethoxam	114.7	4.5
Nitenpyram	115.8	15.5
Imidacloprid	113.6	5.0
Thiacloprid-amid	111.1	8.3
CPF	104.0	8.5
Clothianidin	114.4	10.3
Acetamiprid	119.1	2.0
Diazinon	98.8	8.7
Thiacloprid	119.7	4.2
Fipronil	119.4	7.2
Dinotefuran	113.5	2.9
Thiamethoxam- <i>d</i> ₃	92.5	14.2
Nitenpyram- <i>d</i> ₃	27.5	86.4
Imidacloprid- <i>d</i> ₄	90.9	14.6
Clothianidin- <i>d</i> ₃	91.2	13.6
Acetamiprid- <i>d</i> ₃	83.0	12.0
Thiacloprid- <i>d</i> ₄	83.4	9.3
Dinotefuran- <i>d</i> ₃	27.3	13.8

3. 2 濃縮液中の残留アセトンの影響

本研究では、底質を抽出したアセトン溶液をロータリエバポレーターで 5 mL に濃縮して 250 mL の超純水に添加したが、この濃縮液中のアセトンにより超純水の極性が変わり、ニテンピラム及びジノテフランの回収率が低下したと考えられる。底質の回収率における残留アセトンの影響を検討した。本研究における底質は湿泥で水分が 36.0%~48.6% あり、ロータリエバポレーターで 5 mL に濃縮した際も数 mL の水が含まれていたと考えられるので、250 mL の純水にアセトンを 0, 1, 2, 3 mL 溶解した水溶液で添加回収を実施した。水溶液にネオニコ等及び安定同位体のネオニコ等をそれぞれ 10 ng となるように加え、FF に通水して固相抽出し、10 分間の遠心分離及び 10 分間窒素ガスを流して脱水し、GC を下に連結してアセトン 8 mL で抽出し、窒素ガス吹きつけして 0.5 mL にし、シリンジスパイクの NAC-*d*₇ を 10 ng となるように加え、超純水を加えて 1 mL に定容し、LC/MS で定量した。結果を図 1 及び図 2 に示す。ここで、エラーバーの上端は最大値、下端は最小値を示す。また、ネイティブ体の回収率は、サロゲート面積値で補正していない面積の絶対値から求めた。

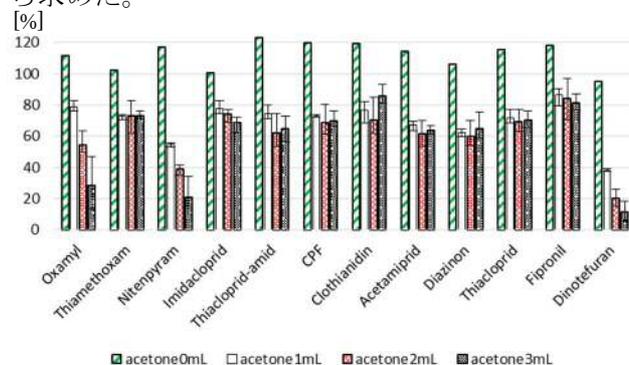


図 1 ネオニコネイティブ体回収率へのアセトンの影響 (アセトン 0 mL のみ n = 1, その他 n = 3)

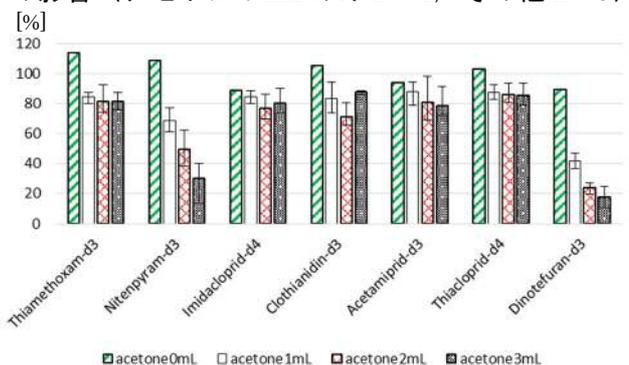


図 2 ネオニコ重水素置換体回収率へのアセトンの影響 (アセトン 0 mL のみ n = 1, その他 n = 3)

添加したアセトンの量が増加するほど、オキサミル、ジノテフラン、ニテンピラム、ジノテフラン- d_3 及びニテンピラム- d_3 の回収率が減少した。それ以外の物質については、添加したアセトンの影響はなかった。これにより、添加する溶液中のアセトンの量を 1 mL 以下にまで減らす必要があることが分かった。底質の水分が混合したアセトンは、ロータリエバポレーターの設定圧力 280 mbar 及び設定温度 40 °C では十分に留去できなかったが、今後、設定圧力を今回よりさらに低くするなど、アセトンの留去法の検討が必要である。

4. まとめ

ネオニコ等の底質分析法について検討を行った。その結果、GC 及び FF を用いたクリーンナップで、夾雑成分によるイオン化抑制及びイオン化促進の効果が抑えられることが解った。これを踏まえ添加回収試験を行い、チアメトキサム- d_4 、イミダクロプリド- d_4 、クロチアニジン- d_3 、アセタミプリド- d_3 及びチアクロプリド- d_4 については、83%~93% の良好な回収率が得られた。また、底質抽出液中のアセトンの量の回収率への影響を調べるために、底質抽出液に段階的にアセトンを加え、添加回収試験を実施した。その結果、添加したアセトンの量が増加するほどオキサミル、ジノテフラン、ニテンピラム、ジノテフラン- d_3 及びニテンピラム- d_3 の回収率が減少した。これにより、添加する溶液中のアセトンの量を 1 mL 以下にまで減らす必要があることが分かった。

参考文献

- 1) 国立研究開発法人産業技術総合研究所安全科学研究部門：ネオニコチノイド系農薬のリスクをめぐる科学と社会，<https://www.aist-riss.jp/column/991/>（参照；2018.8）
- 2) 大塚宜寿，茂木守，野尻喜好，蓑毛康太郎，堀井勇一：河川水中ネオニコチノイド系殺虫剤濃度の年間変動，埼玉県環境科学国際センター報，15 (1)，173 (2015)
- 3) 環境省環境保健部環境安全課：化学物質環境実態調査実施の手引き（平成 27 年度版），<https://www.env.go.jp/chemi/kurohon/tebiki/mat01.pdf>（参照；2018.8）
- 4) 四ノ宮美保：LC-MS/MS による河川水中農薬分析におけるマトリックス効果，環境化学，26(4)，191-201(2016)