

食品衛生基準科学研究費補助金(食品安全科学研究事業)
「食品中残留農薬等の試験法開発における課題の解決に向けた研究」
分担研究報告書（令和 6 年度）
研究代表者 田口貴章（国立医薬品食品衛生研究所）

課題 3 前処理と分析装置のオンライン化を目指した半自動分析法の確立

研究分担者 穂山 浩（星薬科大学薬学部）

研究要旨 ほうれんそうを対象として、LC-MS/MS を用いたネオニコチノイド系農薬 17 成分を一斉分析する方法を開発し、実試料への適用を試みた。アセタミプリド、イミダクロプリド、チアメトキサム、チアメトキサム代謝物(クロチアニジン)、ジノテフラン、チアクロプリド、チアクロプリド代謝物(チアクロプリドアミド)、ニテンピラム、ニテンピラム代謝物(CPMA、CPMF)、フロニカミド、フロニカミド代謝物(TFNG、TFNA)、フィプロニル、エチプロール、フルピラジフロロン、スルホキサフロルの 17 成分を測定物質とした。凍結粉碎したほうれんそう 10 g に対し、QuEChERS 抽出法と固相抽出法(SPE)を組み合わせた方法で抽出・精製を行った。固相カートリッジ Smart-SPE PBX および PSA を連結して使用し、夾雑成分を除去して得られた溶出液を LC-MS/MS で測定した。添加回収試験は試料中の各農薬が MRL または一律基準値(0.01 ppm)になるよう添加した。各成分の MRM は検討した移動相条件で最適化を行った。ほうれんそう中の夾雑成分を効率よく除去すべく、PBX と PSA を組み合わせた SPE による精製方法を確立した。妥当性評価試験を実験者 2 人、1 日 2 併行、3 日間で実施した。基準値が設定されている農薬については、いずれも良好な選択性と直線性が得られ、真度、併行精度、室内再現精度ともに概ね目標値に収まる良好な結果が得られた。本法を市販ほうれんそう 9 試料に適用し分析を行ったところ、イミダクロプリド、ジノテフラン、フロニカミドとその代謝物 2 成分、スルホキサフロル、フィプロニル、クロチアニジン、フルピラジフロロン等の農薬成分が各基準値内の濃度で検出された。本法は、ほうれんそう中のネオニコチノイド系農薬の分析法として適用可能であると示唆された。

協力研究者 伊藤里恵、岩崎雄介、勝本叶香、原野幹久、野村昂聖、藤田優麻（星薬科大学薬学部）、佐々野僚一（星薬科大学薬学部、アイスティサイエンス社）

A. 研究目的

我が国からの食品輸出促進のための食品の衛生管理手法の国際調和及びその推進のため、高毒性農薬及びネオニコチノイド農薬等を対象として、抽出は QuEChERS 法等の国際的に汎用されている方法と同じ溶媒を用い、その後の精製操作を変更すると共に精製操作から LC-MS/MS 分析ま

でをオンライン化し半自動化を検討することで、迅速、簡便で、高感度かつ高精度な残留農薬等検査法の確立を目指す。ネオニコチノイド系農薬（Fig. 1）は、ニコチンに類似した構造を持つ殺虫剤であり、国内外で広く使用されている。農薬・作物ごとに MRL（残留基準値）が設定され、MRL を超えた作物の販売や流通は禁止されている。近年日本で輸出入された農作物において MRL を上回るネオニコチノイド系農薬が検出された違反事例が報告されており、食品の安全確保に向けた簡便かつ迅速な分析法の開発が必要となっている。

公定法の分析は煩雑で前処理に時間を要することや、使用する溶媒量が多いこと等への懸念があり、これらを改善した迅速で簡便な一斉分析法が必要とされている。ほうれんそう中の複数のネオニコチノイド系農薬を同時分析した例は存在するが、日本の MRL を反映した例はないため、本研究では日本におけるほうれんそうの MRL に沿った分析法の開発を行った。

測定対象物質は、代表的なネオニコチノイド系農薬であるアセタミプリド、イミダクロプリド、ジノテフラン、チアメトキサム、チアメトキサム代謝物（クロチアニジン）、チアクロプリド、チアクロプリド代謝物（チアクロプリド-アミド）、ニテンピラム、ニテンピラム代謝物（CPMA (Z)-2-[[[(6-Chloropyridin-3-yl)methyl](ethyl)amino]-2-(methylimino)acetic acid]、CPMF ((E)-N-[(6-Chloropyridin-3-yl)methyl]-N-ethyl-N'-methylformimidamide)) の 10 成分に加え、ネオニコチノイド系農薬に類似した骨格構造を持ち、同様に殺虫剤として作用するピリジンカルボキシアミド系のフロニカミド、フロニカミド代謝物（TFNG ([4-(Trifluoromethyl)nicotinoyl]glycine)、TFNA (4-(Trifluoromethyl)nicotinic acid))、スルホキシミン系のスルホキサフロール、ブテノライド系のフルピラジフロンの 7 成分を測定対象物質とした (Fig. 1)。ニテンピラムは植物中で代謝されて CPMA となり、さらに代謝されて CPMF となる。これらの代謝物は不安定な化合物であることから、ニテンピラムの個別分析法の公定法では CPMA をアセトン条件下で 90 分間、50°C で加熱して CPMF にし、CPMF はトリエチルアミン中で 30 分間、50°C で加熱して CPF (N-[(6-Chloropyridin-3-yl)methyl]-N-ethylformamide) にする。最終的に生成した CPF をニテンピラムに換算し、ニテンピラムとの合算値で濃度を算出する (Fig. 2)。

本年度は、ほうれんそうから残留農薬分析の前処理に一般的に用いられる方法である QuEChERS 法の抽出法と固相抽出法を組み合

わせた方法を用いて抽出・精製を検討した。そして LC-MS/MS を使用し、ネオニコチノイド系農薬とそれらの代謝物 17 成分を一斉分析する方法の開発を試みた。

B. 研究方法

1. 使用試薬

アセタミプリド (98.0%)、イミダクロプリド (98.0%)、ジノテフラン (99.0%)、チアメトキサム (99.0%)、クロチアニジン (99.0%)、チアクロプリド (97.0%)、チアクロプリド-アミド (98.0%)、フロニカミド (98.0%)、TFNG (98.0%)、TFNA (98.0%)、ニテンピラム (99.0%)、CPMA (95.0%)、CPMF (90.0%)、スルホキサフロール (異性体混合品, 98.0%)、エチプロール (98%)、フィプロニル (98.0%)、フルピラジフロンの (≤100%)、アセトニトリル (LC-MS 用)、メタノール (HPLC 用)、ぎ酸 (98.0%)、酢酸アンモニウム (97.0%)、硫酸マグネシウム (無水, 99.0%)、塩化ナトリウム (99.5%)、くえん酸水素二ナトリウム 1.5 水和物 (97.0~103.0%)、くえん酸三ナトリウム二水和物 (99.0%)

2. 使用器具

1.5 mL チューブ (イナ・オブティカ社製)、50 mL チューブ (VIORAMO 社製)、50 mL チューブ用遠心分離機 (KUBOTA 社製 Model 2410)、固相カートリッジ C18、PSA、PBX (アイスティサイエンス社製 Smart-SPE)

3. 試薬の調製

一律基準である 0.01 mg/kg 相当の添加回収試験用として、各試薬 10 mg をアセトニトリル水溶液 (アセトニトリルと水を体積比 2:1 で調製) に溶解し、1000 mg/kg となるように標準溶液を調製した。調製したこれらの溶液を各 10 µL ずつ分注し、アセトニトリル水溶液で全量 10 mL として、各成分が 1 mg/kg となる混合標準溶液を調製した。

また、MRL 濃度相当添加での添加回収試験用と

して、各試薬 2 mg をアセトニトリルに溶解し、それぞれ 1000 mg/kg となるように調製した。

移動相添加用の酢酸アンモニウムは 1.927 g を水に溶解して 50 mL に定容し、0.5 M に調製した。試料の前処理のための塩は、塩化ナトリウム、くえん酸三ナトリウム二水和物、くえん酸水素二ナトリウム 1.5 水和物の 3 種類の試薬を重量比 2:2:1 の割合で量りとり乳鉢を用いて均一にし、混合塩とした。

4. 測定措置と LC-MS/MS 条件

分析法の開発にあたり、高速液体クロマトグラフ-タンデム質量分析計 (LC-MS/MS) を使用した。高速液体クロマトグラフ部分は全て島津製作所社製で、ポンプは LC-30AD、オートサンプラーは SIL-30AC、カラムオーブンは CTO-20AC を使用し、タンデム質量分析計部は島津製作所社製の LCMS-8060 を使用した。ネブライザーガス流量は 3 L/min、ドライイングガス流量は 10 L/min、ヒーティングガス流量は 10 L/min、インターフェイス温度は 400°C、脱溶媒温度は 150°C、ヒートブロック温度は 350°C で設定した。分析用のカラムは InertSustain ODS-3 (150 mm × 2.1 mm, 3 μm, GL Sciences 製) を使用した。測定はカラムの平衡化と洗浄時間を含め 30 分で行った。オートサンプラーの温度は 4°C、カラムオーブンの温度は 40°C、注入量は 4 μL で設定した。注入する試料と移動相の初期濃度の溶媒組成比の違いを緩和すべく、オートサンプラーの共注入設定を用いて 4 μL の注入に伴い 40 μL の水を共注入した。移動相の流速は 0.2 mL/min で、B conc. 5% (0-1 min) -99% (13-20 min) -5% (20-30 min) のグラジエント溶出で測定した。MS/MS は ESI (エレクトロスプレーイオン化 (Electrospray ionization)) 法でイオン化し、フィプロニルはネガティブモード、その他の成分はポジティブモードを用いて MRM (多重反応モニタリング (Multiple reaction monitoring)) で測定した。

5. 抽出

ほうれんそうを液体窒素で凍結させ粉碎機を用いて粉碎し、10 g を 50 mL ポリプロピレンチューブに量りとった。アセトニトリル 10 mL を加え、手での振とうとタッチミキサーによる振とうを各 10 秒ずつ行った。

混合塩 2.5 g を加え、手での振とうとタッチミキサーによる振とうを各 10 秒ずつ行った。硫酸マグネシウム 4.0 g を加え、手での振とうとタッチミキサーによる振とうを各 10 秒ずつ行った。1930 × g で遠心分離を 5 分間行い、試料抽出液とした。

6. 精製

固相カートリッジは PBX-20 mg、PSA-30 mg、PBX-20 mg の順番で連結した。アセトン 2 mL を通液させたのち、アセトニトリル水溶液 2 mL を通液して固相カートリッジのコンディショニングを行った。一番下に連結した PBX-20 mg を外し、PBX-20 mg、PSA-30 mg で連結している固相に、抽出液の上相 500 μL を分取して負荷し、加圧によって溶出した。溶出液は試験管で受けた。

固相カートリッジにアセトニトリル水溶液 500 μL を通液し、加圧によって溶出した。試験管に超純水 500 μL を加えたのち、パスツールピペットで 3 回ピペッティングを行った。はじめに連結して使用しなかった PBX-20 mg に試験管内の溶液を全量負荷し、加圧によって溶出した。溶出液は上とは異なる試験管で受けた。元の試験管にアセトニトリル水溶液 500 μL を加えパスツールピペットで 3 回ピペッティングを行い、固相カートリッジに試験管内の溶液を全量負荷した。溶出液は 2 つ目の試験管で受け、全量 2 mL を測定用溶液とした。

7. 統計処理

Microsoft Office and Business 2016 の Excel を用いて 2 群間の比較は t 検定、3 群間以上の比較は tukey 検定によって統計処理を行った。また、同様のソフトを用いて妥当性評価試験時の回収率か

ら算出する併行精度および室内再現精度は一元配置分散分析により算出した。

C. 研究結果

1. MS/MS 条件の検討

アセトニトリル水溶液で 1000 mg/kg にした標準溶液を、17 成分それぞれアセトニトリル水溶液で 10 µg/kg に希釈し、MRM 条件の最適化を行った。各 10 µg/kg 標準溶液を FIA 法と ESI 法を用いて MS/MS に導入し、スキャンモードでプリカーサーイオンの探索を行った。ESI 法のポジティブモード、ネガティブモードそれぞれで測定を行い、得られたプリカーサーイオンからプロダクトイオンの探索を行った。得られたプリカーサーイオンとプロダクトイオンの組み合わせを用いて、Q1 での電圧、CE、Q2 での電圧の最適化を行った。得られた MRM 条件を用いて、混合標準溶液をアセトニトリル水溶液で希釈し 2.5 µg/kg に調製した。これを分離カラムで測定し、ピーク形状や感度の高さから定量イオンと定性イオンを確定した。

ピークが確認できなかったものや感度やピーク形状が不良であった成分については、プリカーサーイオンの変更やプロダクトイオンの探索、電圧の最適化を再度行った。Cl 原子や N 原子をもつ成分があることから、精密質量を参考にしてプリカーサーイオンを設定し、プロダクトイオンの探索と各電圧の最適化を行った。

以上の検討の結果、フィプロニルではネガティブモード、その他の成分ではポジティブモードで良好な感度が得られた。

2. 移動相の検討

本研究でも先行研究と同様に水系移動相にギ酸を添加することとしたが、先行研究と同様の濃度である 0.1% のギ酸を添加したところ、TFNG、TFNA のピーク形状が不良であった。そのため、ギ酸濃度を 0.01%、0.02%、0.1% で添加した場合、またギ酸を添加しない場合で検討を行った。

CPMF は 0.1% よりも 0.02% で良好なピーク形状が得られた。TFNG はギ酸を添加しない場合、0.01%、0.02% で添加した場合でそれぞれ複数のピークが見られ、ピーク形状も不良であった。TFNA は、ピーク強度が他のギ酸濃度の添加時に比べて低いものの、0.02% で添加した場合で最もテーリングやリーディング抑えられた。したがって、水系移動相は 0.02% ギ酸含有 0.5 mM 酢酸アンモニウム水溶液、有機系移動相は 0.5 mM 酢酸アンモニウム・メタノール溶液を最適条件とした。

最適化した移動相条件を用いて、各 2.5 µg/kg の混合標準溶液を測定した際の 17 成分のクロマトグラムを Fig. 3 に示す。

3. 絶対検量線による直線性の確認と定量限界の決定

最適化した LC 条件、MS 条件を用いて絶対検量線による直線性の確認を行った。17 成分の混合標準液を用いて、1.25、2.5、5.0、10、20 µg/kg の範囲で検量線を作成し、決定係数を算出した。その結果、全成分で $R^2 = 0.9996$ 以上の直線性を示したため、直線性は良好であると判断した。また、検量線の下限值である 1.25 µg/kg を本分析法の定量限界値とした。

4. 固相カートリッジによる精製の検討

LC-MS/MS で測定をするにあたり、ほうれんそう中に含まれる夾雑物がマトリックス効果を引き起こし、測定の妨げになるのではないかと考えた。そこで前処理の 1 段階目として QuEChERS 法を用いた目的成分の抽出と夾雑成分の除去を行った。

極性の高い夾雑成分とほうれんそう中の水分を下相（水相）に移行させ、目的成分と比較的極性の低い夾雑成分を上相（アセトニトリル相）に移行させることで抽出を行った。今回用いた方法は、アセトニトリルで目的成分の抽出を行ったのち、粉末の代わりに PSA や C₁₈ が充填された固相

カートリッジを用いて精製を行う。精製方法の最適条件を検討するにあたり、カートリッジは PSA-30 mg、PSA-50 mg、PBX-20 mg、C18-30 mg を用いた。QuEChERS 法により得られた抽出液（アセトニトリル相）を、PBX と PSA を連結した固相に負荷し、夾雑成分の除去と目的成分の溶出を行ったのち、アセトニトリル水溶液を通液することで目的成分の溶出を行った。

固相カートリッジについての検討は、ほうれんそうでの添加回収試験を行い回収率によって評価した。

極性が比較的低い色素を主に PBX で除去する目的から、PBX は 2 個使用することとし、1 個目の PBX に連結させて使用する PSA について検討を行った。

まず、PSA-50 mg を用いて検討を行った。結果は 5 成分が目標値範囲外となった。この理由としては、希釈倍率が低いことによるマトリックス効果による影響と、陰イオン交換系である PSA にカルボキシ基を持つ TFNA、CPMA が相互作用し、固相に保持されたためであると考え、これらが保持されない固相を使用する必要があると判断した。

極性の低い色素の除去能を向上させるべく、PBX に連結させる固相カートリッジを PSA ではなく、無極性のシリカ系固相である C18 を用いる方法を試みた。この方法では TFNG、TFNA を回収することが出来なかった。この理由として、C18 の固相表面に存在する残留シラノール基とカルボキシ基が相互作用しているためであると考えた。

そのため、PBX-20 mg と C18-30 mg の連結固相に抽出液を負荷・溶出したのち、洗浄液であるアセトニトリル水溶液に 2%ギ酸を加えて固相への通液を行う方法を試みた。これにより TFNG、TFNA の回収率は改善したが、回収率が 120%以上となる成分が洗浄液に酸を加えなかった場合に比べて増加した。酸を加えると酸性の目的成分

が回収しやすくなる一方で、目的成分だけでなく夾雑成分も固相から溶出され、夾雑成分によるイオン化の増強が起こることが考えられた。したがって、今回の精製方法として、C18 固相カートリッジを用いることは適当でないと判断した。

再び PSA での検討を行い、PSA-30 mg を用いて回収率を算出した。15 成分が目標範囲内に収まり、概ね良好な結果が得られた。PSA の充填量を低下させたことで回収率が向上したことから、PSA を使用せず（PSA-なし）PBX のみで精製を行なう方法を試みた。

PSA を使用しない場合、14 成分の回収率が目標範囲内に収まった。PSA-30 mg を用いた場合と PSA-なしの場合とで、回収率に大きな違いは見られなかった。

そこで、ほうれんそうへ各農薬成分の MRL 濃度相当の添加を行い、PSA-50 mg、PSA-30 mg、PSA-なしの場合で比較を行った。個別の MRL が設定されている成分とされていない成分では希釈の倍率が異なるため、個別の MRL が設定されている成分のみを対象とした。PSA-50 mg を用いた場合は 10 成分のうち 7 成分、PSA-30 mg を用いた場合は 9 成分、PSA-なしの場合は 4 成分で回収率が目標範囲内となった。PSA-30 mg を用いた場合と PSA-なしの場合において、0.01 mg/kg では回収率に大きな違いは見られなかったが、MRL 相当濃度の添加を行った際には PSA-なしの場合で 120%を超過する成分が多かった（Table 1）。

また、PSA-なしの場合に比べ PSA を使用した場合の方が色素の除去能も高くなり、目的成分の回収と夾雑成分の除去を同時に行うことが可能となった。これらの結果から精製に使用する固相カートリッジは、PBX-20 mg と PSA-30 mg を連結したものと、単独の PBX-20 mg とした。

5. 抽出溶媒の検討

ほうれんそう中から目的の農薬成分を抽出する際に使用するアセトニトリルについて検討を

行った。先述の固相カートリッジの検討にて得た結果より、抽出の際にも酸を加えることでカルボキシ基を有する目的成分が分子型となり、それらが水相よりもアセトニトリル相に移行する割合が高くなることで最終的な回収率が高くなると予想した。ほうれんそう 10 g 中で 0.01 mg/kg となるように標準溶液を添加し、抽出溶媒のアセトニトリル 10 mL を加えたのち、ぎ酸原液 100 μ L 加えた。回収率は 10 成分で目標範囲内に収まったが、回収率が 120%以上となる成分が増加していた (Table 2)。固相カートリッジの検討と同様に、酸を加えるとカルボキシ基を有する目的成分が回収しやすくなる一方で、夾雑成分もほうれんそう中から抽出されてしまい、イオン化の増強に繋がるという弊害が起きることが分かった。

6. マトリックス効果の算出

添加回収試験で用いた有機栽培ほうれんそうを用いて ME (マトリックス効果 (Matrix effect)) の算出を行った。

添加回収試験において、ほうれんそうに 0.01 mg/kg 相当の添加を行った場合と個別の MRL 濃度相当の添加を行った場合とでは希釈倍率が異なるため、最終溶液に含まれるマトリックスの絶対量は異なる。その点を考慮し、抽出液への標準溶液の添加を行った。

0.01 mg/kg 相当の添加を想定した場合は、目標範囲内の回収率の成分が最も多く得られたのは PSA-なしの場合の 15 成分であり、回収率の結果と一致していなかった (Table 3)。

個別の MRL 濃度相当の添加を想定した場合には、固相カートリッジ PSA の種類ごとにマトリックス効果を算出したところ、目標範囲内の回収率の成分が最も多く得られたのは PSA-30 mg を用いた場合であり、全成分で目標範囲内に収まった (Table 4)。回収率も PSA-30 mg を用いた場合に良好であったため、使用する固相カートリッジは PSA-30 mg とした。

7. 妥当性評価試験

最適化した LC-MS/MS 条件、サンプルの前処理条件を用いて妥当性評価試験を行った。厚生労働省のガイドラインに基づき、選択性、回収率、精度、定量限界について確認を行った。測定対象物を含まないほうれんそうブランクを測定したところ、妨害するピークは検出されなかったため、選択性は十分であると判断した。各 17 成分の標準溶液、ほうれんそうブランク、ほうれんそう添加時のクロマトグラムを Fig. 4、Fig. 5 に示す。

ほうれんそうへ添加した標準溶液の濃度は、1. 個別の MRL が設定されている成分について、ほうれんそう中の添加濃度が MRL と同等の濃度になるように添加する方法、2. 個別の MRL が設定されていない成分について、ほうれんそう中の添加濃度が一律基準である 0.01 mg/kg になるように添加する方法の 2 パターンでの試験を行った。

最適化した LC 条件、MS 条件を用いて、目的対象物質を含まないほうれんそうブランクを測定したところ、妨害するピークは確認できず選択性は十分であった。

8. 妥当性の確認

得られたクロマトグラムから回収率を算出し、統計処理を一元配置分散分析で行い併行精度および室内再現精度を算出した。個別の MRL が設定されている農薬成分について、結果は、回収率はフルピラジフロンを除く 9 成分が目標値範囲内となり、併行精度、室内再現精度は全成分で目標値を満たしていた。

個別の MRL が設定されていない農薬成分について、結果は、回収率は 4 成分が目標値範囲内となり、併行精度は全成分、室内再現精度は CPMF を除く 6 成分が目標値を満たしていた。

以上のことから、MRL が設定されている成分、されていない成分それぞれにおいて概ねガイドラインの目標値範囲内に収まる良好な真度と精

度が得られ、本分析法の妥当性が確認された。

8. 実試料への適用

本分析法を市販ほうれんそう試料の分析に適用した。国産のほうれんそう試料 A（有機栽培表示）（国産 A）、試料 B（冷凍）（国産 B）、試料 C（国産 C）、中国産の表記があるほうれんそう（冷凍）（中国冷凍）を分析対象とした。いずれも基準値以下であった（Table 5）。親化合物だけでなく代謝物も検出されたことから、代謝物を網羅した分析が必須であることが考えられる。以上のことから、本分析法のほうれんそうへの適用性があると示唆された。

D. 考察

ほうれんそうは、残留農薬分析の前処理に一般的に用いられる方法である QuEChERS 抽出法と、固相抽出法を組み合わせた方法で抽出・精製を行った。LC-MS/MS 条件の検討に加え、ほうれんそうの前処理における固相カートリッジの検討を行った。その結果、ポリマー系固相である PBX（充填量 20 mg）と陰イオン交換系固相である PSA（充填量 30 mg）を連結したもの、さらに PBX（充填量 20 mg）を使用して段階的に精製を行なうことで夾雑成分を除去し、先行研究では測定対象としていなかったフロニカミドとその代謝物である TFNG、TFNA をガイドラインの目標値範囲内となる値で回収することが可能となった。最適化した条件で行った妥当性評価試験では、個別の MRL が設定されている農薬成分、されていない農薬成分ともに概ねガイドラインの目標値範囲内となり、本分析法の妥当性が示唆された。

本分析法を市販のほうれんそうに適用したところ、有機栽培表示の国産 A からはいずれの成分も検出されなかった。国産 B からはジノテフラン、TFNA、国産 C からはフロニカミド、TFNG、TFNA、中国産からはイミダクロプリド、スルホキサフロル、CPMF が検出された。いずれも MRL 以下であった。

本分析法はほうれんそう中のネオニコチノイド系農薬を簡便かつ迅速に一斉分析することが可能であり、市場に出回るほうれんそうの安全性を確保するための有用な方法となることが期待される。今後は、本法を応用して他の野菜やいちご等の果実への適用を目指し、市販の農作物に残留するネオニコチノイド系農薬の調査を行いたいと考えている。

E. 結論

ほうれんそうを対象として、LC-MS/MS を用いたネオニコチノイド系農薬 17 成分を一斉分析する方法を開発し、実試料への適用を試みた。基準値が設定されている農薬については、いずれも良好な選択性と直線性が得られ、真度、併行精度、室内再現精度ともに概ね目標値に収まる良好な結果が得られた。本法を市販ほうれんそう 9 試料に適用し分析を行ったところ、イミダクロプリド、ジノテフラン、フロニカミドとその代謝物 2 成分、スルホキサフロル、フィプロニル、クロチアニジン、フルピラジフロロン等の農薬成分が各基準値内の濃度で検出された。本法は、ほうれんそう中のネオニコチノイド系農薬の分析法として適用可能であると示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Sasano R, Sekizawa J, Saito I, Harano M, Katsunoto K, Ito R, Iwasaki Y, Taguchi T, Tsutsumi T, Akiyama H, Simultaneous Determination of Glyphosate, Glufosinate and their Metabolites in Soybeans using Solid-phase Analytical Derivatization and LC-MS/MS Determination, Food Chem X, 2024; 24, Article 101806

2. 学会発表

1. 佐々野僚一、穂山浩、関澤純平、原野幹久、勝本叶香、斎藤勲、田口貴章、堤智昭、伊藤

里恵、岩崎雄介、オンライン固相誘導体化-LC-MS/MS による大豆中のグリホサート、グルホシネートおよびそれら代謝物の分析法の開発 2024 年 5 月 24 日、日本食品化学学会第 30 回学術大会

2. 勝本叶香、佐々野僚一、島三記絵、原野幹久、野村昂聖、藤田優麻、岩崎雄介、伊藤里恵、田口貴章、堤智昭、穂山浩、LC-MS/MS を用いたほうれんそう中ネオニコチノイド系農薬とその代謝物の一斉分析法の開発、2024 年 11 月 7 日、第 120 回日本食品衛生学会学術講演会
3. 野村昂聖、勝本叶香、原野幹久、藤田優麻、佐々野僚一、岩崎雄介、伊藤里恵、田口貴章、堤智昭、穂山浩、LC-MS/MS を用いたトウモロコシ中グリホサートおよびグルホシネートとその代謝物の一斉分析法の開発、2025 年 3 月 27 日、日本薬学会第 145 年会
4. 藤田優麻、野村昂聖、勝本叶香、原野幹久、佐々野僚一、島三記絵、岩崎雄介、伊藤里恵、田口貴章、堤智昭、穂山浩、LC-MS/MS を用いたいちご中ネオニコチノイドとその代謝物の一斉分析法の開発、2025 年 3 月 27 日、日本薬学会第 145 年会

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Table 1

Analytes	Recovery (%)		
	PSA-50 mg	PSA-30 mg	PSA-なし
Acetamiprid	77	113	84
Imidacloprid	114	114	118
Dinotefuran	125	93	129
Thiamethoxam	124	115	125
Clothianidin	113	117	113
Flonicamid	129	99	126
TFNG	93	106	108
TFNA	109	96	126
Sulfoxaflor	107	94	123
Flupyradifurone	118	141	128

固相カートリッジごとの回収率（個別 MRL 濃度相当添加）

Table 2

Analytes	Mean (%)	RSD (%)
Acetamiprid	101	25
Imidacloprid	136	13
Dinotefuran	97	14
Thiamethoxam	131	17
Clothianidin	131	13
Flonicamid	130	15
TFNG	99	7
TFNA	80	13
Sulfoxaflor	100	23
Flupyradifurone	134	21
Thiacloprid	88	9
Thiacloprid-amide	112	14
Nitenpyram	92	3
CPMA	105	31
CPMF	156	19
Fipronil	101	2
Ethiprole	131	2

酸を添加した溶媒で抽出を行った回収率（各 0.01 mg/kg 相当添加）

Table 3

Analytes	ME (%)			
	PSA-50 mg	PSA-30 mg	PSA-なし	PSA-30 mg (ぎ酸)
Acetamiprid	85	86	89	88
Imidacloprid	120	140	110	140
Dinotefuran	72	86	77	146
Thiamethoxam	89	107	108	141
Clothianidin	119	121	99	132
Flonicamid	92	116	98	147
TFNG	69	107	105	115
TFNA	81	110	97	120
Sulfoxaflor	58	83	93	83
Flupyradifurone	89	122	96	126
Thiacloprid	76	92	95	94
Thiacloprid-amide	91	113	94	115
Nitenpyram	94	113	98	140
CPMA	90	123	106	154
CPMF	42	55	44	93
Ethiprole	89	99	87	134
Fipronil	119	93	85	110

固相カートリッジごとの ME% (各 0.01 mg/kg 相当添加)。一番右：ぎ酸を加えたアセトニトリルで抽出を行った。

Table 4

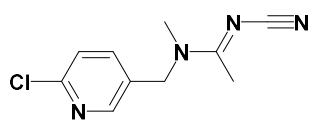
Analytes	ME (%)		
	PSA-50 mg	PSA-30 mg	PSA-なし
Acetamiprid	83	101	87
Imidacloprid	117	99	121
Dinotefuran	135	100	136
Thiamethoxam	126	104	125
Clothianidin	112	98	113
Flonicamid	141	108	133
TFNG	114	100	118
TFNA	130	98	135
Sulfoxaflor	116	99	143
Flupyradifurone	93	96	96

固相カートリッジごとの ME% (個別 MRL 濃度相当添加)

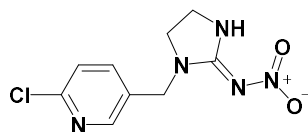
Table 5

Analytes	定量値 (mg/kg)			
	国産 A	国産 B	国産 C	中国冷凍
Acetamiprid	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Imidacloprid	N.D.	N.D.	N.D.	0.01
Dinotefuran	N.D.	0.03	N.D.	N.D.
Thiamethoxam	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Clothianidin	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Flonicamid	N.D.	N.D.	0.25	N.D.
TFNG	N.D.	N.D.	0.04	N.D.
TFNA	N.D.	0.03	0.08	N.D.
Sulfoxaflor	N.D.	N.D.	N.D.	0.01
Flupyradifurone	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Thiacloprid	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Thiacloprid-amide	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Nitenpyram	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
CPMA	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
CPMF	N.D.	N.D.	N.D.	0.01
Ethiprole	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Fipronil	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

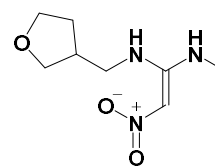
市販ほうれんそうの分析結果。N.D. (not determined) は定量限界値 (1.25 µg/kg) 以下を示す。



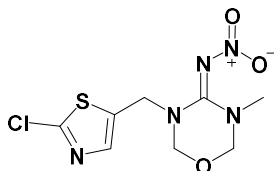
Acetamiprid



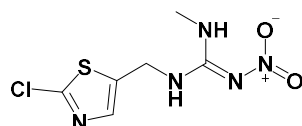
Imidacloprid



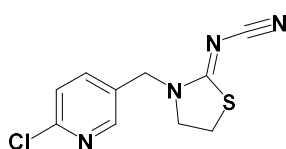
Dinotefuran



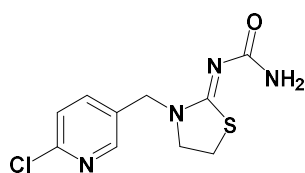
Thiamethoxam



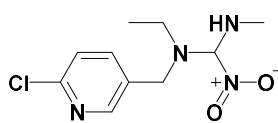
Clothianidin



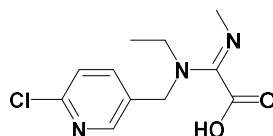
Thiachloprid



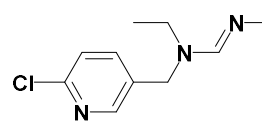
Thiachloprid-amide



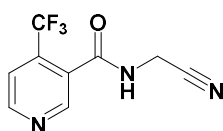
Nitenpyram



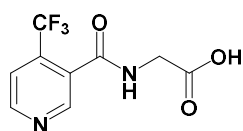
CPMA



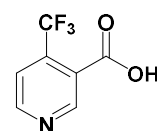
CPMF



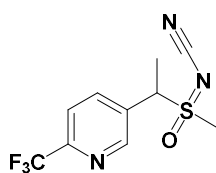
Flonicamid



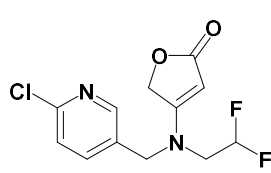
TFNG



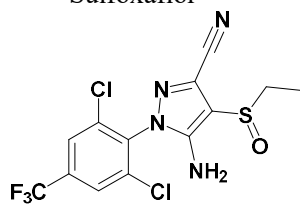
TFNA



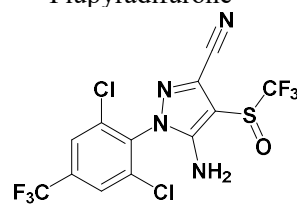
Sulfoxaflor



Flupyradifurone



Ethiprole



Fipronil

Fig. 1. 測定対象物質 17 成分の構造式

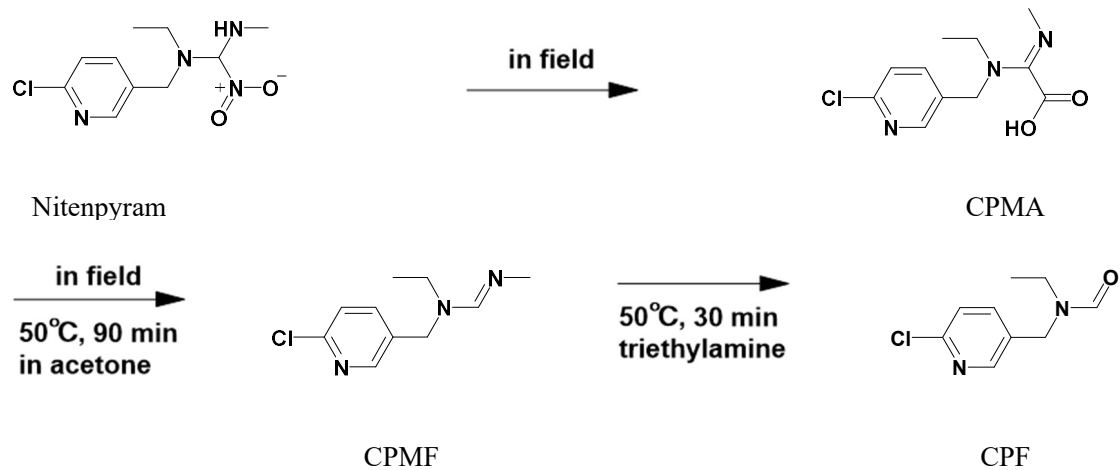


Fig. 2. ニテンピラムの変換

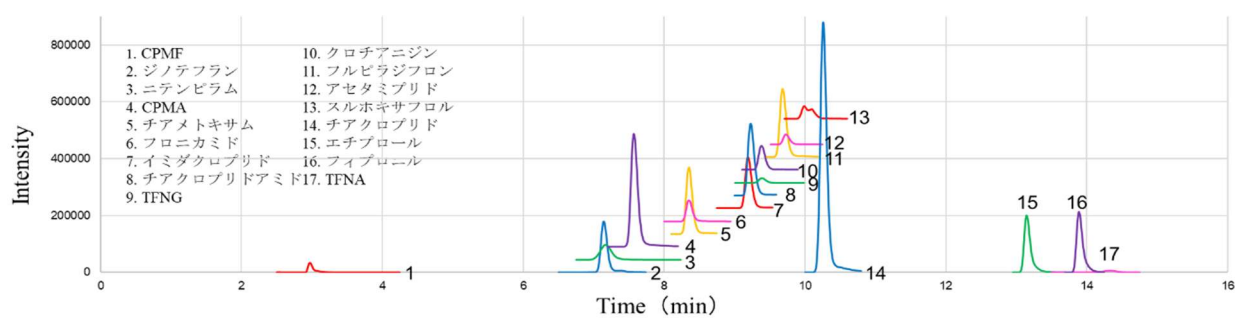
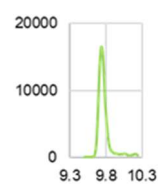
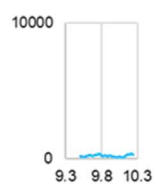
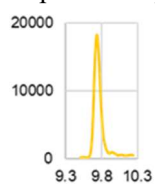
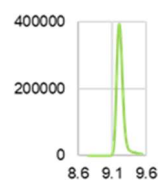
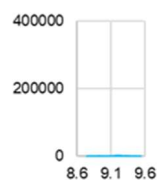
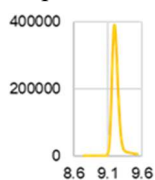


Fig. 3. 17 成分混合標準溶液のクロマトグラム (各 2.5 $\mu\text{g/kg}$)
化合物によってピークの色を変えている。

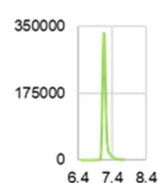
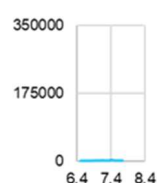
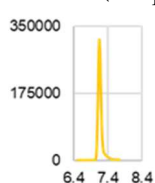
Acetamiprid (1.5 ppb)



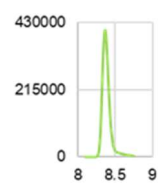
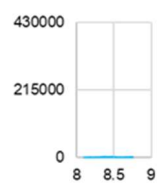
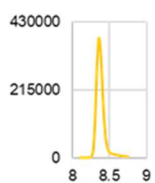
Imidacloprid (7.5 ppb)



Dinotefuran (7.5 ppb)



Thiamethoxam (5 ppb)



Clothianidin (20 ppb)

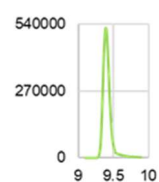
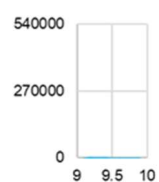
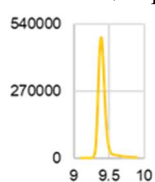
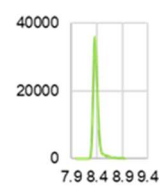
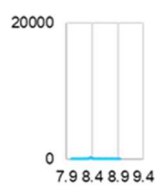
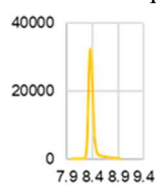
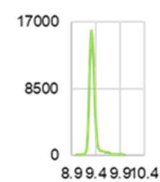
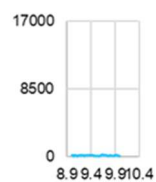
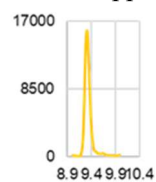


Fig. 4. 個別 MRL 濃度相当添加時のクロマトグラム。左（橙色）：個別 MRL の標準溶液（測定時、添加濃度から最終 2000 倍希釈）のクロマトグラム。中央（水色）：ほうれんそう blank のクロマトグラム。右（緑色）：個別 MRL 濃度相当の添加を行ったほうれんそうのクロマトグラム。縦軸は強度、横軸は時間（分）を示す。

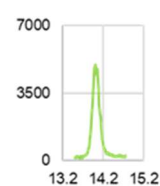
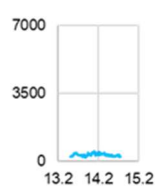
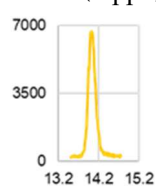
Flonicamid (1.5 ppb)



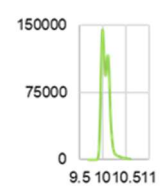
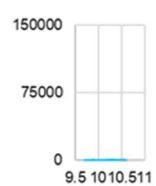
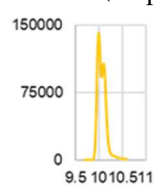
TFNG (4 ppb)



TFNA (4 ppb)



Sulfoxaflor (10 ppb)



Flupyredifurone (15 ppb)

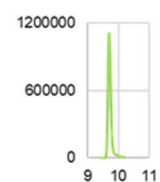
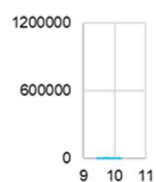
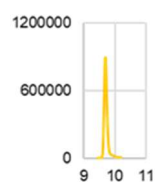


Fig. 4. (continued)

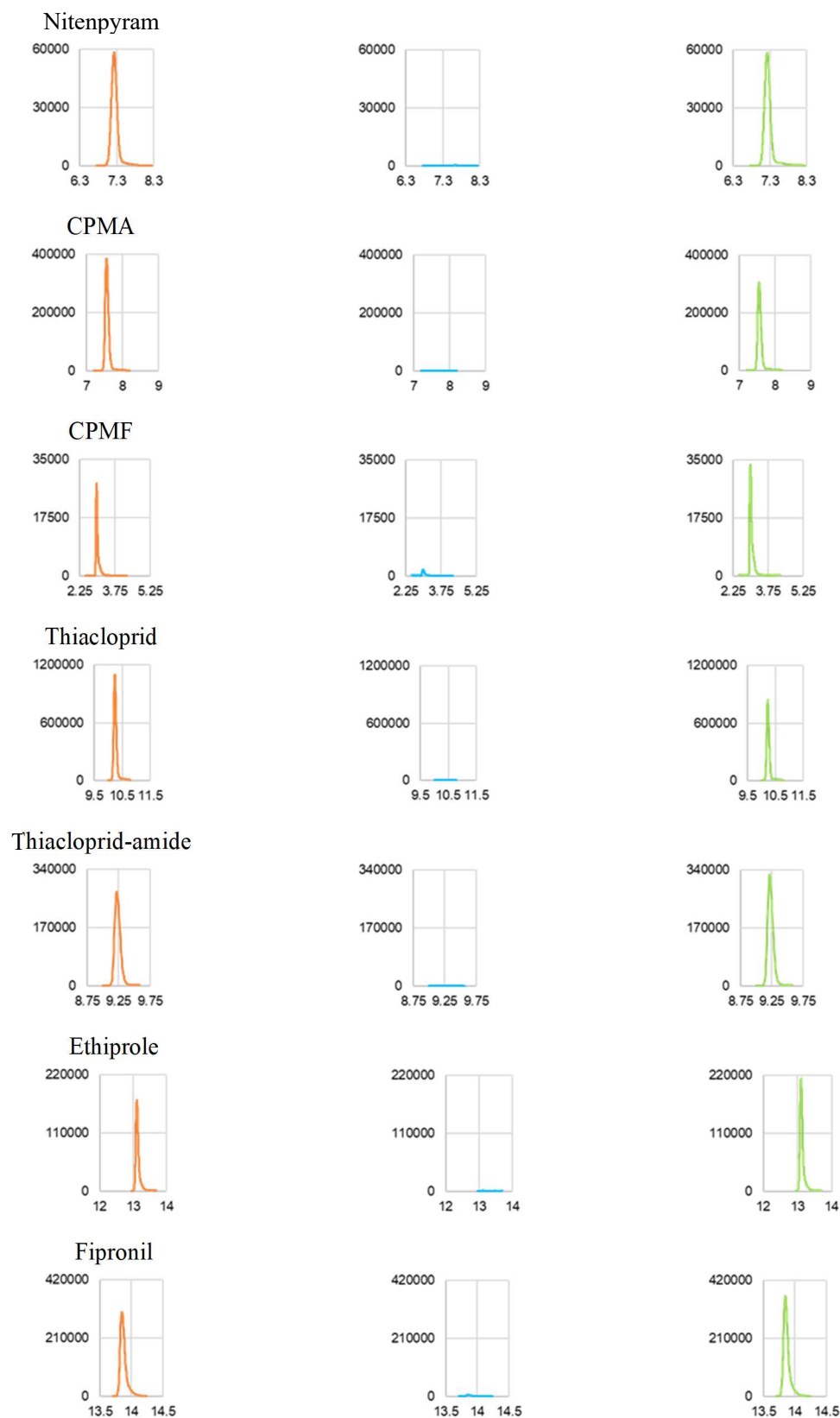


Fig. 5. 0.01 mg/kg 相当添加時のクロマトグラム。左（橙色）：各 0.01 mg/kg（測定時 2.5 μ g/kg）の標準溶液のクロマトグラム。中央（青色）：ほうれんそうブランクのクロマトグラム。右（緑色）：各 0.01 mg/kg 相当の添加を行ったほうれんそうのクロマトグラム。縦軸は強度、横軸は時間（分）を示す。