

様式 3

愛媛大学沿岸環境科学研究センター  
共同利用・共同研究拠点「化学汚染・沿岸環境研究拠点」  
共同研究報告書

平成 30 年 2 月 28 日

化学汚染・沿岸環境研究拠点 拠点長 殿

申請者（研究代表者）

所属機関 国立環境研究所

職 主任研究員

氏名 磯部友彦

下記の共同研究について、別紙の通り報告します。

1 研究課題

アジア地域の尿試料を用いたネオニコチノイド系農薬汚染実態に関する予備調査  
Preliminary Survey on Neonicotinoid Pesticides in Urine Sample from Selected Asian Countries

2 研究組織

氏名	所属	職	分担研究課題
代表者 磯部友彦	国立環境研究所 環境リスク・健康研究センター	主任研究員	分析法開発と試料の測定
拠点構成員 国末 達也	愛媛大学 沿岸環境 科学研究センター 化学汚染・毒性解析 部門	教授	全体統括

3 研究内容 （別紙）

## 別紙

### 1. 背景と目的

我々の生活で使用する化学物質の種類や量は増加の一途を辿っており、しばしば新規環境汚染物質による生態系汚染が社会問題化する。新規環境汚染物質の曝露実態を解明するには、様々な地域において広域モニタリングを実施することが必要であり、愛媛大学の es-BANK に保存されている試料を活用することが効果的である。

現在、国立環境研究所では、大規模疫学調査における化学物質曝露評価に活用することを前提として、様々な化学物質について生体試料分析法の開発を進めている。これらの分析法を es-BANK のアーカイブ試料に適用することで、国立環境研究所では実施が困難な広域モニタリングを効率的に展開できる可能性がある。そこで、本研究は、es-BANK に保存されているアジア地域の尿試料を活用して、新規環境汚染物質として社会的懸念の高まっているネオニコチノイド系農薬の曝露実態について解析することを目的としている。ネオニコチノイド系農薬はクロロニコチル系殺虫剤の総称であり、昆虫に選択的に毒性を示すことから、1990 年代以降、農業用、家庭用等に世界中で幅広く使用されている。その使用量は近年増加傾向にあり、蜂群崩壊症候群 (CCD) との関連性も疑われていることから、生態系への影響が懸念されている。また、近年、環境水やヒトの尿などからの検出事例が報告され、ネオニコチノイド系農薬による広域的な環境汚染が明らかになりつつあるが、アジア地域におけるヒトの曝露実態に関して十分な知見がなく、実態解明が急務である。平成 29 年度は、尿試料を対象として 7 種のネオニコチノイド系農薬を迅速に分析する方法について検討した。

### 2. 試料と方法

#### 2-1. 分析対象物質

##### (1) 標準物質

- 1) アセタミプリド標準品 (Acetamiprid Reference Material、和光純薬工業株式会社)
- 2) チアクロプリド標準物質 (Thiacloprid Reference Material、和光純薬工業株式会社)
- 3) チアメソキサム標準品 (Thiamethoxam Reference Material、和光純薬工業株式会社)
- 4) ジノテフラン標準品 (Dinotefuran Standard、和光純薬工業株式会社)
- 5) クロチアニジン標準物質 (Clothianidin Reference Material、和光純薬工業株式会社)
- 6) イミダクロプリド標準品 (Imidacloprid Standard、和光純薬工業株式会社)
- 7) ニテンピラム標準品 (Nitenpyram Standard、和光純薬工業株式会社)

##### (2) 内部標準物質

- 1) アセタミプリド-d3 (Acetamiprid-d3 (N-methyl-d3) (mixture of isomers)、C/D/N ISOTOPES INC.)
- 2) チアクロプリド-d4 (Thiacloprid-d4 (thiazolidinylidene-d4)、C/D/N ISOTOPES INC.)
- 3) チアメソキサム-d3 (Thiamethoxam-d3 (N-methyl-d3)、C/D/N ISOTOPES INC.)

- 4) ジノテフラン-d3 (Dinotefuran-d3、林純薬工業株式会社)
- 5) クロチアニジン-d3 (Clothianidin-d3 (N-methyl-d3)、C/D/N ISOTOPES INC.)
- 6) イミダクロプリド-d4 (Imidacloprid-d4 (imidazolidine-4,4,5,5-d4)、C/D/N ISOTOPES INC.)
- 7) ニテンピラム-d3 (Nitenpyram-d3、林純薬工業株式会社)

## 2-2. 試料前処理法

尿試料は-80℃で凍結保存し、測定前日に 4℃設定の冷蔵庫に保存し溶解させる。溶解した尿を遠心分離 (1500×g、2 min) した後、上澄み 100 μL をマイクロピペットで分取し、内部標準溶液 10 μL および 10 mM 酢酸アンモニウム溶液 0.4ml を添加して軽く混合したものを試料溶液とした。操作ブランク試料については、尿試料の代わりにミリ Q 水を用いて同様の操作を行った。残余試料は、-20℃設定の冷凍庫で凍結させた後、速やかに-80℃設定の冷凍庫で保管した。Oasis HLB PRiME (30mg 1ml) にメタノール 0.9 ml および 10 mM 酢酸アンモニウム溶液 0.9ml を通液して固相をコンディショニングし、試料溶液を通液して固相に目的物質を保持させた。固相は水/メタノール (95:5、v/v) 0.9ml で洗浄後、メタノール/水 (80:20、v/v) 0.6ml で溶出させた。溶出液は遠心エバポレータを用いて乾固させ、0.1%ギ酸含有 10 mM 酢酸アンモニウム溶液/メタノール (95:5、v/v) 0.2ml で再溶解して測定溶液とした。前処理の概要を図 1 に示す。

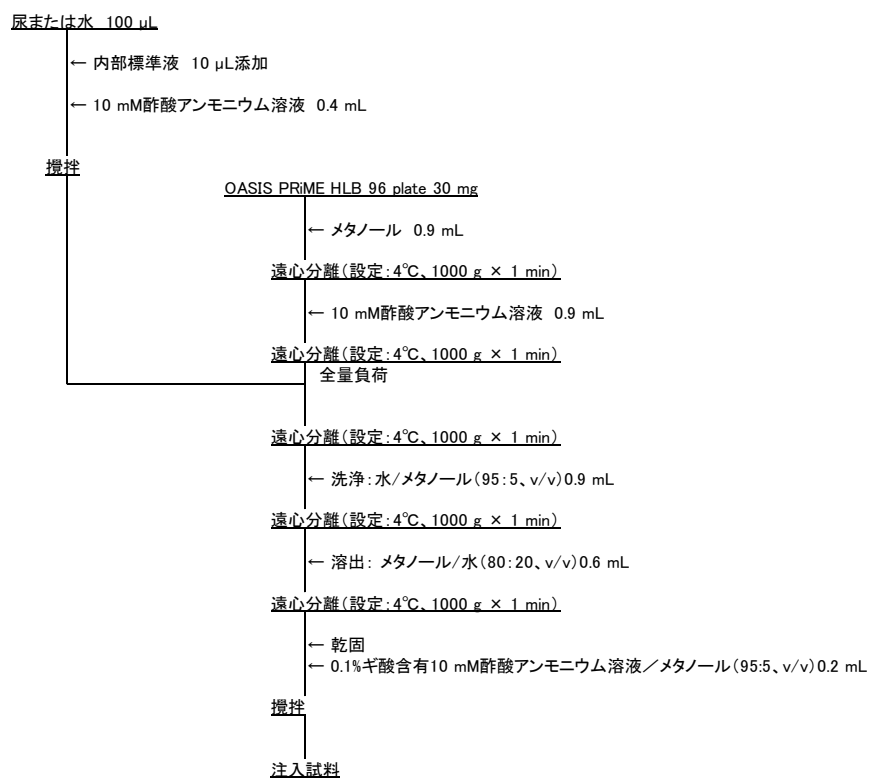


図 1. 尿試料の前処理概要

### 2-3. 機器分析

測定溶液 10ul を高速液体クロマトグラフ-タンデム質量分析装置 (LC-MS/MS) で分析し、標準品の測定結果から検量線を作成して以下の式(1)にもとづいて尿中の各対象物質濃度を算出した。LC は Nexera X2 システム (島津製作所)、MS/MS は Triple Quad 6500 (AB Sciex)、分析カラムには ACQUITY UPLC HSS C18、2.1 mm I.D.×100 mm L., 1.8 μm (Waters Corp.) を用いた。

$$C_S = (A_S / A_{IS} - b) / a \times V_i / V_a \quad (1)$$

ただし、

$C_S$	=	尿中の対象物質の濃度(ng/mL)
$A_S$	=	対象物質のピーク面積
$A_{IS}$	=	IS のピーク面積
$a$	=	検量線の一次回帰式の傾き
$b$	=	検量線の一次回帰式の y 切片
$V_i$	=	最終溶液量 (μL)
$V_a$	=	採取試料量 (μL)

### 2-4. 試料の選択と分注

愛媛大学 es-BANK に保存されている尿試料から、2013 年以降にインドで採取されたものを分析対象とし、100 検体について 5ml ずつ分注して国立環境研究所に持ち帰った。試料は検品後に-80°Cで凍結保存した。

## 3. 結果と考察

平成 29 年度は、精度管理用の尿試料を用いてネオニコチノイド系農薬の分析法を確立した。以下、機器の測定条件の最適化および精度管理試料の分析から得られた各パラメータの結果を示す。

### 3-1. 機器分析の条件検討

LC-MS/MS 分析におけるイオン化条件等の検討結果を表 1 に示す。

表 1. MS/MS 分析における測定条件

		Quantifier				Qualifier				Dwell (msec)	Ionization
		Precursor	Product	DP (V)	CE (eV)	Precursor	Product	DP (V)	CE (eV)		
Target	Acetamiprid	223.2	126	50	50	223.2	90.1	28	45	50	Positive
	Thiacloprid	253	126	40	40	253	90.1	27	50	50	Positive
	Thiamethoxam	292	211	30	30	292	181.1	17	30	50	Positive
	Dinotefuran	203.2	114.2	35	30	203.2	58.1	18	50	50	Positive
	Clothianidin	249.9	169.2	35	35	249.9	132	17	21	50	Positive
	Imidacloprid	256.3	209.1	35	35	256.3	175.2	21	26	50	Positive
	Nitenpyram	271.2	237.1	60	60	271.2	99.1	25	20	50	Positive
IS	Acetamiprid-d <sub>3</sub>	226.1	98.9	65	55	-	-	-	-	50	Positive
	Thiacloprid-d <sub>4</sub>	257.3	126	40	27	-	-	-	-	50	Positive
	Thiamethoxam-d <sub>3</sub>	295.3	214.2	30	17	-	-	-	-	50	Positive
	Dinotefuran-d <sub>3</sub>	206.3	132.2	35	18	-	-	-	-	50	Positive
	Clothianidin-d <sub>3</sub>	253.3	172.2	35	17	-	-	-	-	50	Positive
	Imidacloprid-d <sub>4</sub>	260.4	213.2	40	20	-	-	-	-	50	Positive
	Nitenpyram-d <sub>3</sub>	274.4	126	60	47	-	-	-	-	50	Positive

### 3-2. 精度管理パラメータ

今回取得した精度管理パラメータを表 2 に示す。

表 2. 本分析法の精度管理パラメータ

Target Compound	MDL	MQL	Calibration Range	Determination Coefficient	Repeatability	QC repeat.	Blank
	ng/mL	ng/mL	ng/mL	R <sup>2</sup>	RSD (%)	RSD (%)	ng/mL
Acetamiprid	0.0017	0.0044	0.0025-0.5	0.9961	4.3	10.9	<MDL
Thiacloprid	0.0016	0.004	0.0025-0.5	0.9973	6.2	-	<MDL
Thiamethoxam	0.0067	0.0172	0.01-2	0.9986	3.5	5	<MDL
Dinotefuran	0.0152	0.039	0.025-5	0.9969	3.9	5.1	<MDL
Clothianidin	0.0082	0.0211	0.025-5	0.996	6.7	11.9	<MDL
Imidacloprid	0.018	0.0463	0.025-5	0.9982	4.4	7	<MDL
Nitenpyram	0.0176	0.0454	0.025-5	0.9961	6.9	-	<MDL

## 4. まとめと今後の課題

今年度の検討の結果、尿試料のネオニコチノイド系農薬 7 種の分析法が確立された。現在、確立された分析法を尿試料に適用しており、次年度は es-BANK から提供された尿試料の分析を進める。また、実試料測定において一部の精度管理パラメータが安定しないことがあり、分析法の改良を予定している。