

6 液体クロマトグラフトンデム型質量分析計(LC/MS/MS)による

液状肥料中の農薬の同時測定

八木寿治¹, 山西正将¹, 白井裕治¹

キーワード 農薬, 家庭園芸用複合肥料, 液状複合肥料, 一斉分析法, 液体クロマトグラフトンデム型質量分析計

1. はじめに

近年, 輸入された液状の家庭園芸用複合肥料に混入が認められていない農薬成分が確認される事例が頻発し, 農林水産省では, これら農薬成分の混入は肥料取締法上, 異物混入として指導等を行っているところである. 過去に混入が認められた事例から, 混入危険性の高い農薬成分として, アバメクチン, イベルメクチン, エプリノメクチン, ロテノン, ピペロニルブトキシド及びピレトリンの6種類が挙げられ, 対策が検討されている. 現在, 分析法としてはこれら農薬成分の一部を対象とし, 食品や飼料中の分析法^{1~5)}は構築されているが, 肥料中での分析法は確立されておらず, 分析法開発は急務となっている. このため, 今般, 厚生労働省より通知された分析法(通知分析法)¹⁾, 飼料分析基準⁵⁾及びLC/MS/MS²⁾法を参考に液状の家庭園芸用複合肥料及び液状複合肥料にも適用範囲を拡大し, 当該農薬成分の迅速かつ簡便な一斉分析法の確立を検討し, 良好な成績を得たのでその概要を報告する.

なお, 食品中の残留基準値⁶⁾としてはアバメクチンは農産物においてはアバメクチン B1a, アバメクチン B1b, 8,9-Z-アバメクチン B1a 及び 8,9-Z-アバメクチン B1b の総和で, 畜水産物においてはアバメクチン B1a, 8,9-Z-アバメクチン B1a の総和で規制がなされている. またイベルメクチンは主成分である 22, 23-ジヒドロアベルメクチン B1a(別名イベルメクチン B1a), エプリノメクチンも主成分であるエプリノメクチン B1a, ピレトリンにおいてはピレトリン I 及びピレトリン II の総和で規制がなされている. しかしながら, 通知分析法¹⁾においては分析対象成分としてはアバメクチン B1a, イベルメクチン B1a, エプリノメクチン B1a, ピレトリン I 及びピレトリン II を用いて定量下限の確認等がされていること, 及び現在, この 5 分析対象成分以外の標準品の入手も困難なことから, これら分析対象成分にロテノン, ピペロニルブトキシドを加えて同時測定法を検討した.

2. 材料及び方法

1) 試料

流通している液状の家庭園芸用複合肥料及び液状複合肥料をそのまま分析用試料とした.

2) 分析対象成分

アバメクチン: アバメクチン B1a

イベルメクチン: 22, 23-ジヒドロアベルメクチン B1a(別名イベルメクチン B1a)

エプリノメクチン: エプリノメクチン B1a

¹ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

ロテノン: ロテノン

ピペロニルブトキシド: ピペロニルブトキシド

ピレトリン: ピレトリン I 及びピレトリン II

3) 試薬等の調製

(1) 各農薬標準液: アバメクチン標準品(純度 99.2 % (内アバメクチン B1a: 92.3 %, アバメクチン B1b: 6.9 %), 林純薬工業), イベルメクチン標準品(純度 96.0 %, Dr.Ehrenstorfer GmbH), エプリノメクチン B1a 標準品(純度 99.9 %, 林純薬工業), ピレトリン標準品(純度 56.6 % (内ピレトリン I : 31.6 %, ピレトリン II : 25.0 %), 和光純薬工業), ロテノン標準品(純度 93.8%, Dr.Ehrenstorfer GmbH) 及びピペロニルブトキシド標準品(純度 92.5 %, Dr.Ehrenstorfer GmbH) 10 mg をそれぞれ正確に量って 100 mL の全量フラスコに入れ, メタノールを加えて溶かし, 更に標線まで同溶媒を加えて各標準原液を調製した(この液 1 mL は各農薬を 100 µg (ただし, ピレトリンに関してはピレトリン I・II の含量として 100 µg) を含有する.).

(2) 混合標準液: 各標準原液 10 mL を 100 mL の全量フラスコに入れ, 更に標線までメタノールを加えて混合標準原液を調製した(この液 1 mL は各農薬を 10 µg (ただし, ピレトリンに関してはピレトリン I・II の含量として 10 µg) を含有する.). 使用に際して, 混合標準原液の一定量をメタノールで正確に希釈し, 1 mL 中に各農薬としてそれぞれ 1~1,000 ng (ただし, ピレトリンに関してはピレトリン I・II の含量として 1~1,000 ng) を含有する混合標準液を調製した.

(3) 最終溶液調製用及び標準液調製用メタノールは LC/MS 用, 溶離液用アセトニトリルは残留農薬分析用を用いた. 特記している以外の試薬については特級を用いた.

(4) 水: 水精製装置 (ADVANTEC AQUARIUS PWE-500) で精製した JIS K 0557 に規定する A3 相当の水を用いた.

4) 器具及び装置

(1) 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計 (LC/MS/MS): Waters Quattro Premier XE

カラム: ACQUITY UPLC HSS C18 (内径 2.1 mm, 長さ 100 mm, 粒径 1.8 µm)

(2) 超音波発生器: AS ONE US-4R (発信周波数: 40 kHz, 出力: 160 W)

(3) ロータリーエバポレーター: BÜCHI R-200

(4) 多孔性けいそう土カートリッジカラム: Varian Chem Elut (5 mL 容)

(5) グラファイトカーボン-NH₂ 積層カートリッジカラム

: Supelco Envi-carb/LC-NH₂ (500 mg/500 mg, 6 mL 容)

5) 試験操作

(1) 抽出

分析試料 5.00 g 相当量を 10 mL の全量フラスコに入れ, アセトニトリル 3 mL を同全量フラスコに加え, 標線まで水を加えてよく振り混ぜた. 次に, 超音波発生器を用いて 5 分間超音波処理をし抽出液とした.

(2) 精製1

抽出液 5 mL を正確に多孔性けいそう土カートリッジカラムに入れ, 5 分間保持させた. 100 mL のなすフラスコを同カートリッジカラムの下に置き, 酢酸エチル 5 mL ずつ 4 回, 順次同カートリッジカラムに加え, 液面が充てん剤の上端に達するまで溶出させた. 溶出液を 40 °C 以下の水浴上でほとんど乾固するまで減圧濃縮

した後、窒素ガスを送って乾固し、アセトニトリル-トルエン(3+1)2 mL を加えて残留物を溶かした。当該溶液を精製 2 に供する試料溶液とした。

(3) 精製 2

グラファイトカーボン-NH₂ 積層カートリッジカラムを、予めアセトニトリル-トルエン(3+1)10 mL で洗浄した。100 mL のなすフラスコを同カートリッジカラムの下に置き、試料溶液を同カートリッジカラムに入れ、容器をアセトニトリル-トルエン(3+1)5 mL ずつで 5 回洗浄し、洗液を順次同カートリッジカラムに加え、液面が充てん剤の上端に達するまで流出させた。流出液を 40 °C 以下の水浴上でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固し、メタノール 5 mL を正確に加えて残留物を溶かした。溶解液の一定量をメタノールで正確に 5 倍希釈して液体クロマトグラフタンデム型質量分析計(以下「LC/MS/MS」という。)に供する試料溶液とした。

(4) 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定

試料溶液及び混合標準液各 5 µL を液体クロマトグラフタンデム型質量分析計に注入し、表 1 の測定条件に従って選択反応検出クロマトグラム(以下「SRM クロマトグラム」という。)を得た。

表1 LC/MS/MS測定条件

カラム	Waters, ACQUITY UPLC HSS C18 (内径2.1 mm, 長さ100 mm, 粒径1.8 µm)
溶離液	A: 0.1mmol/L ぎ酸アンモニウム溶液-0.1%ぎ酸溶液(1+1) B: 0.1%ぎ酸アセトニトリル溶液
グラジエント	0 min (50 %B) → 15 min (95 %B) → 20 min (98 %B) → 30 min (50 %B)
流速	0.2 mL/min
カラム槽温度	40 °C
イオン化法	エレクトロスプレーイオン化法 (ESI)
モード	ポジティブ
デソルベーションガス	N ₂ (800 L/h)
コーンガス	Ar (50 L/h)
イオン源温度	120 °C
デソルベーション温度	400 °C
キャピラリー電圧	3.0 kV
コーン電圧	表2のとおり
コリジョンエネルギー	表2のとおり
モニターイオン	表2のとおり

表2 モニターイオン等

農薬名	プリカーサー イオン (<i>m/z</i>)	プロダクトイオン (定量用) (<i>m/z</i>)	プロダクトイオン (確認用) (<i>m/z</i>)	コーン電圧 (V)	コリジョン エネルギー (eV)
アバメクチンB1a	891	305	567	20	25
イベルメクチンB1a	893	307	551	25	25
エプリノメクチンB1a	915	186	298	20	20
ロテノン	395	213	192	35	25
ピペロニルブトキシド	356	177	147	20	15
ピレトリン I	329	161	133	20	10
ピレトリン II	373	161	133	20	10

(5) 計 算

得られた SRM クロマトグラムから各農薬のピーク面積又は高さを求めて検量線を作成し、試料中の各農薬量を算出した。

なお、定量法の概要を図 1 に示した。

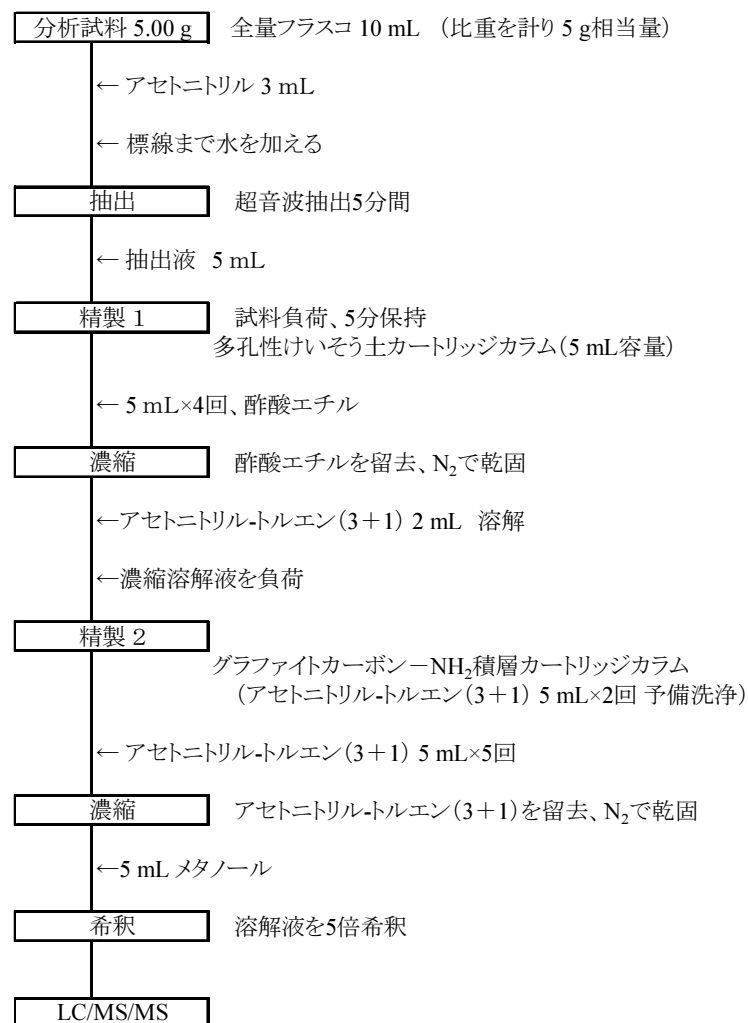


図 1 肥料中の農薬の一斉分析法フロー

3. 結果および考察

1) 試料の精製及びタンデム型質量分析計測定条件の検討

LC/MS/MS に供するための試料の精製は通知分析法¹⁾「GC/MS による農薬等の一斉試験法(農作物)」及び飼料分析基準⁵⁾「農薬のガスクロマトグラフ質量分析計による一斉分析法」を参考に、LC 条件に関しては井之上ら²⁾の条件を参考に、MS/MS における質量条件は Waters 製のソフト Quan Optimize を使用して各農薬の最適モニター質量数及びコーン電圧等を調査し、確定を行った。確定したモニター質量数はアバメクチン B1a, イベルメクチン B1a, エプリノメクチン B1a 及びロテノンに関しては過去に検討され採用されたモニター質量数^{2,7,8)}と一致した。また、B. Wittrig ら⁹⁾は定量用と確認用の二種類のプロダクトイオンを質量条件として示しているが、ピレトリン I は B. Wittrig ら⁹⁾の結果と一致した。ピレトリン II 及びピペロニルブトキシドは一種類のみ一致した。これは質量部における印加電圧やイオン源等の温度条件が異なるためと考えられた。

2) 検量線の作成

2.3) の(1)及び(2)に従って調製した混合標準液を 5 μ L, LC/MS/MS に注入し、得られた SRM クロマトグラムからピーク面積又は高さを求めて検量線を作成した。その結果、ピレトリン I は 0.0028~2.8 ng, ピレトリン II は 0.0022~2.2 ng, ピペロニルブトキシドは 0.005~2.5 ng, それ以外の各農薬においては 0.005~5 ng の範囲で直線性を示した。

3) 多孔性けいそう土カートリッジカラムの溶出画分の検討

多孔性けいそう土カートリッジカラムについて溶出液の溶出画分に関する検討を行った。

各農薬として 1 mL 中にそれぞれ 2 μ g (ピレトリンに関してはピレトリン I・II の含量として 2 μ g) を含有する混合標準液を調製し、この液 1 mL を 100 mL のなす形フラスコに正確に入れ、窒素ガスを送って乾固した。水約 5 mL を加えて残留物を溶かし、2.5) の(2)の精製 1 に従い、酢酸エチルによる溶出画分の確認を行った。

その結果、表 3 のとおり、各農薬は 0~20 mL に溶出し、それ以降の画分には溶出されなかった。以上の結果から、本法では酢酸エチル 20 mL で溶出することとした。

表3 多孔性けいそう土カートリッジカラムにおける溶出画分 (%)

農薬名	溶出画分 ^{a)}				合計
	0~10 mL	~15 mL	~20 mL	~25 mL	
アバメクチンB1a	84	14	3	0	101
イベルメクチンB1a	81	13	1	0	95
エプリノメクチンB1a	80	18	8	0	106
ロテノン	87	16	0	0	104
ピペロニルブトキシド	99	6	0	0	105
ピレトリン I	80	17	7	0	104
ピレトリン II	85	14	3	0	102

a) $n=2$ の平均回収率

4) グラファイトカーボン-NH₂ 積層カートリッジカラムの流出画分の検討

グラファイトカーボン-NH₂ 積層カートリッジカラムについて負荷・洗浄液及び流出液の流出画分に関する検討を行った。

各農薬として 1 mL 中にそれぞれ 2 µg (ピレトリンに関してはピレトリン I・II の含量として 2 µg) を含有する混合標準液を調製し、この液 1 mL を 100 mL のなす形フラスコに正確に入れ、窒素ガスを送って乾固した。アセトニトリル-トルエン (3+1) 約 2 mL を加えて残留物を溶かし、この液を 2.5) の (3) の精製 2 に従い、アセトニトリル-トルエン (3+1) による流出画分の確認を行った。

その結果、表 4 のとおり、各農薬は 0~25 mL に流出し、それ以降の画分には流出されなかった。以上の結果から、本法ではアセトニトリル-トルエン (3+1) 25 mL で流出することとした。

表4 グラファイトカーボン-NH₂積層カートリッジカラムにおける流出画分 (%)

農薬名	流出画分 ^{a)}					合計
	0~10 mL	~15 mL	~20 mL	~25 mL	~30 mL	
アバメクチンB1a	16	76	9	0	0	101
イベルメクチンB1a	37	67	0	0	0	104
エプリノメクチンB1a	9	77	19	10	0	114
ロテノン	96	3	0	0	0	99
ピペロニルブトキシド	114	0	0	0	0	114
ピレトリン I	93	5	0	0	0	98
ピレトリン II	103	0	0	0	0	103

a) $n=2$ の平均回収率

5) 希釈操作の検討

液状の家庭園芸用複合肥料と液状複合肥料に各農薬としてそれぞれ 400 µg/kg 相当量 (ピレトリンに関してはピレトリン I・II の含量として 400 µg/kg 相当量) を添加し、2.5) に従い 5 倍希釈操作の前まで調製した溶液と当該溶液を 5 倍希釈した最終調製溶液とを比較し、希釈操作の必要性の有無に関する確認を行った。結果を表 5 に示した。一般にイオン化抑制効果が存在すると回収率が低下するが、それを回避するには、希釈操作が有効であるとされている^{10,11)}。

各農薬について Welch の t 検定を有意水準 5%で行ったところ、液状の家庭園芸用複合肥料中のエプリノメクチン B1a、ピペロニルブトキシド及びピレトリン I、液状複合肥料中のエプリノメクチン B1a 及びピレトリン I に関して有意差が認められた。有意差が認められた農薬のうち、液状の家庭園芸用複合肥料中のピペロニルブトキシドは希釈操作により回収率の低下が認められたが、液状の家庭園芸用複合肥料及び液状複合肥料中のエプリノメクチン B1a 及びピレトリン I は回収率の向上が認められた。回収率の低下よりも向上がみられた農薬の方が多く、また、回収率の低下の幅よりも向上の幅の方が大きいことから、当該結果を考慮し希釈操作を行うこととした。

表5 希釈操作の検討

肥料種類	農薬名	添加量 ^{a)} ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回収率 ^{b)} (%)	回収率(5倍希釈後) ^{b)} (%)
家庭園芸用複合肥料	アバメクチンB1a	400	96.0	95.5
	イベルメクチンB1a	400	94.7	91.7
	エプリノメクチンB1a	400	89.3	102.1
	ロテノン	400	84.2	79.7
	ピペロニルブトキシド	400	96.8	90.4
	ピレトリン I	223 ^{a)}	88.2	103.6
	ピレトリン II	177 ^{a)}	99.6	102.7
液状複合肥料	アバメクチンB1a	400	100.2	99.5
	イベルメクチンB1a	400	102.8	102.3
	エプリノメクチンB1a	400	83.5	92.3
	ロテノン	400	103.0	96.8
	ピペロニルブトキシド	400	110.9	100.4
	ピレトリン I	223 ^{a)}	89.8	103.1
	ピレトリン II	177 ^{a)}	97.3	88.0

a) ピレトリンはピレトリン I・II の含量として400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量を添加

b) $n=3$ の平均回収率

6) マトリックスの検討

液状の家庭園芸用複合肥料(3種類)及び液状複合肥料(2種類)を用い、本法により調製した試料溶液を5 μL , LC/MS/MS に注入し、定量を妨げるピークの有無を確認したところ、妨害ピークは認められなかった。

各農薬を100 ng/mL含有する標準液(ピレトリンに関してはピレトリン I・IIの含量として100 ng/mL)と、液状の家庭園芸用複合肥料及び液状複合肥料に関して2.5)に従い調製した溶液に各農薬が100 ng/mL相当量(ピレトリンに関してはピレトリン I・IIの含量として100 ng/mL相当量)の濃度になるように標準液を添加した溶液とを比較しマトリックスによる各農薬の増感・減感効果の有無の確認を行った。結果を表6に示した。

標準液と、最終調製液に標準液を添加した溶液において、各農薬について Welch の t 検定を有意水準5%で行ったところ、液状の家庭園芸用複合肥料中では有意差は認められなかったが、液状複合肥料中のアバメクチン B1a, イベルメクチン B1a, エプリノメクチン B1a 及びピペロニルブトキシドでは有意差が認められた。これは液状の家庭園芸用複合肥料に比べて液状複合肥料は規格上、窒素,りん酸,加里等の含有量が多いため、主に試料溶液中のマトリックスによる増感効果が表れた結果であると考えられた。

なお、増感効果の割合は数%と小さいものであり定量に影響を及ぼすことは少ないと考えられ、また更なる希釈操作によるマトリックスの影響の回避は定量下限・検出下限の関係上困難であるため、当該検討結果を踏まえた試料溶液の調製操作にかかる変更は行わなかった。

表6 増感・減感効果の有無の確認

肥料種類	農薬名	設定溶液濃度 ^{a)} (ng/mL)	標準液測定値 ^{b)} (ng/mL)	試料溶液測定値 ^{b)c)} (ng/mL)
家庭園芸用複合肥料	アバメクチンB1a	100	101.4	105.3
	イベルメクチンB1a	100	100.4	104.0
	エプリノメクチンB1a	100	101.0	103.1
	ロテノン	100	105.4	106.3
	ピペロニルブトキシド	100	104.6	108.1
	ピレトリン I	56 ^{a)}	58.6	60.4
	ピレトリン II	44 ^{a)}	45.4	45.4
液状複合肥料	アバメクチンB1a	100	101.4	106.4
	イベルメクチンB1a	100	100.4	107.7
	エプリノメクチンB1a	100	101.0	106.7
	ロテノン	100	105.4	107.7
	ピペロニルブトキシド	100	104.6	110.7
	ピレトリン I	56 ^{a)}	58.6	61.4
	ピレトリン II	44 ^{a)}	45.4	46.4

a) ピレトリンはピレトリン I・II の含量として100 ng/mL

b) $n=3$ の平均回収率

c) 試料溶液に標準液を添加したもの

7) 添加回収試験

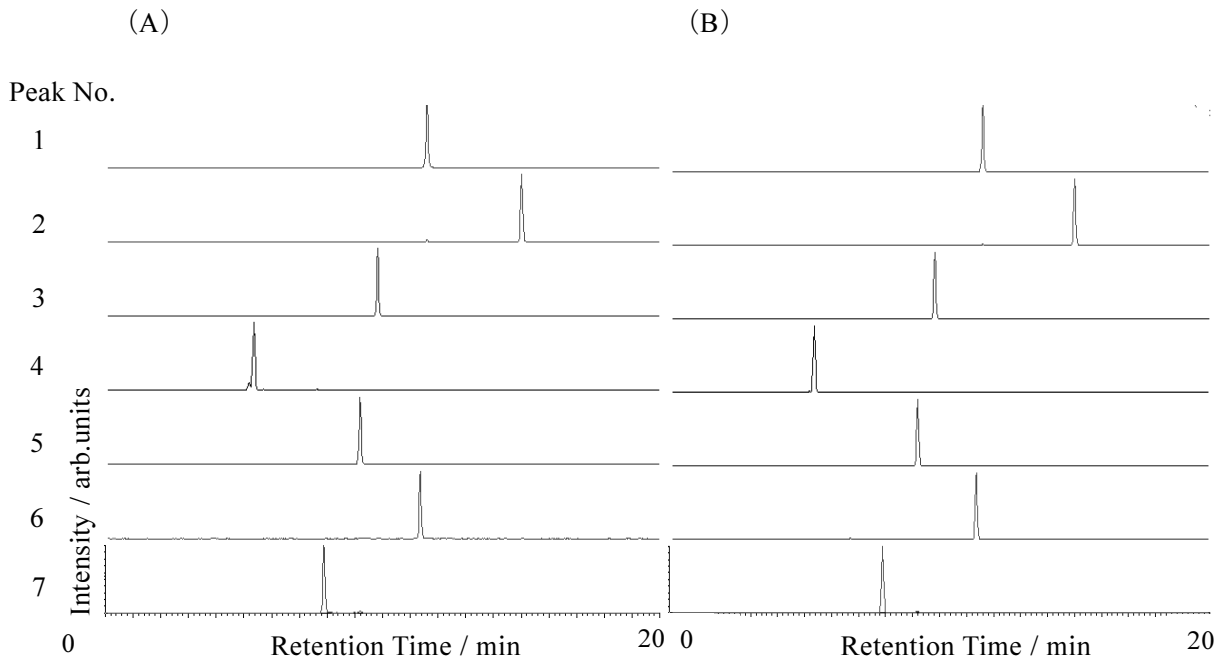
液状の家庭園芸用複合肥料(3種類)及び液状複合肥料(2種類)に、各農薬としてそれぞれ400及び4,000 µg/kg相当量(ピレトリンに関してはピレトリン I・II の含量として400 µg/kg または4,000 µg/kg相当量)添加し、本法に従って3点併行分析を行い、得られたその平均回収率、標準偏差及び併行相対標準偏差を表7に示した。各農薬の平均回収率は77.0~107.9%, それらの相対標準偏差(RSD)は0.1~9.1%であり、良好な回収率及び併行精度が得られた。

なお、混合標準液及び添加回収試験で得られた液状の家庭園芸用複合肥料におけるSRMクロマトグラムの一例を図2に示した。

表 7 添加回収試験結果

肥料種類	農薬名	添加量 ^{a)} ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回収率 ^{c)} (%)	標準偏差 (%)	併行相対標準偏差 (%)
家庭園芸用複合肥料1	アバメクチンB1a	400	98.6	8.7	8.8
		4000	91.8	4.0	4.4
	イベルメクチンB1a	400	97.3	6.6	6.8
		4000	96.1	1.4	1.4
	エプリノメクチンB1a	400	96.1	0.9	1.0
		4000	88.1	3.3	3.7
	ロテノン	400	90.7	0.4	0.4
		4000	91.5	2.7	3.0
	ピペロニルブトキシド	400	95.3	1.3	1.3
		4000	104.5	3.0	2.9
	ビレトリン I	223 ^{a)}	99.1	0.7	0.7
		2233 ^{b)}	88.9	2.5	2.8
ビレトリン II	177 ^{a)}	93.9	1.0	1.0	
	1767 ^{b)}	89.9	0.7	0.8	
家庭園芸用複合肥料2	アバメクチンB1a	400	87.9	4.2	4.8
		4000	90.2	2.4	2.6
	イベルメクチンB1a	400	87.5	7.9	9.1
		4000	92.8	2.0	2.2
	エプリノメクチンB1a	400	92.6	4.0	4.4
		4000	85.9	3.5	4.1
	ロテノン	400	89.8	5.6	6.3
		4000	88.4	1.9	2.1
	ピペロニルブトキシド	400	96.2	2.4	2.5
		4000	100.5	2.7	2.7
	ビレトリン I	223 ^{a)}	97.3	5.4	5.5
		2233 ^{b)}	85.9	4.0	4.6
ビレトリン II	177 ^{a)}	95.7	4.3	4.5	
	1767 ^{b)}	88.8	1.2	1.3	
家庭園芸用複合肥料3	アバメクチンB1a	400	98.8	4.5	4.6
		4000	93.6	2.8	3.0
	イベルメクチンB1a	400	90.1	3.3	3.7
		4000	102.3	3.3	3.2
	エプリノメクチンB1a	400	89.6	1.6	1.7
		4000	94.1	0.1	0.1
	ロテノン	400	86.5	1.3	1.5
		4000	97.2	0.9	0.9
	ピペロニルブトキシド	400	91.4	1.9	2.0
		4000	98.2	2.0	2.0
	ビレトリン I	223 ^{a)}	90.0	1.3	1.4
		2233 ^{b)}	92.5	1.8	2.0
ビレトリン II	177 ^{a)}	90.0	3.6	4.0	
	1767 ^{b)}	94.2	0.8	0.9	
液状複合肥料1	アバメクチンB1a	400	93.2	3.0	3.2
		4000	100.9	3.0	3.0
	イベルメクチンB1a	400	97.4	2.3	2.4
		4000	98.4	1.2	1.2
	エプリノメクチンB1a	400	94.3	2.4	2.6
		4000	96.5	0.7	0.7
	ロテノン	400	85.6	4.7	5.5
		4000	96.5	0.7	0.7
	ピペロニルブトキシド	400	96.8	1.6	1.7
		4000	99.1	0.8	0.9
	ビレトリン I	223 ^{a)}	90.4	2.7	3.0
		2233 ^{b)}	97.9	1.6	1.6
ビレトリン II	177 ^{a)}	93.8	3.5	3.8	
	1767 ^{b)}	96.9	1.1	1.1	
液状複合肥料2	アバメクチンB1a	400	98.7	1.5	1.5
		4000	89.2	0.5	0.5
	イベルメクチンB1a	400	103.2	2.8	2.7
		4000	84.5	3.4	4.0
	エプリノメクチンB1a	400	87.2	0.8	0.9
		4000	84.6	2.0	2.4
	ロテノン	400	103.4	4.6	4.5
		4000	90.2	2.0	2.2
	ピペロニルブトキシド	400	107.9	1.8	1.6
		4000	100.8	3.3	3.3
	ビレトリン I	223 ^{a)}	90.7	2.8	3.1
		2233 ^{b)}	77.0	6.8	8.8
ビレトリン II	177 ^{a)}	99.5	3.7	3.7	
	1767 ^{b)}	82.3	3.7	4.5	

a) ビレトリンはビレトリン I・II の含量として400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量を添加b) ビレトリンはビレトリン I・II の含量として4000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量を添加c) $n=3$ の平均回収率



Peak No.1: アバメクチン B1a
 No.2: イベルメクチン B1a
 No.3: エプリノメクチン B1a
 No.4: ロテノン
 No.5: ピペロニルブトキシド
 No.6: ピレトリン I
 No.7: ピレトリン II

図 2 添加回収試験で得られた SRM クロマトグラムの一例

- (A) 混合標準液(各農薬として 2,500 pg 相当量)
 (ピレトリンに関してはピレトリン I・II の含量として 2,500 pg 相当量)
 (B) 試料溶液(液状の家庭園芸用複合肥料, 試料中 400 μg/kg 相当量添加)
 (ピレトリンに関してはピレトリン I・II の含量として 400 μg/kg 相当量)

8) 定量下限及び検出下限

液状の家庭園芸用複合肥料及び液状複合肥料を用いて, 分析試料中の各農薬の含有量としてそれぞれ 10 μg/kg (ピレトリンに関してはピレトリン I・II の含量として 10 μg/kg) になるように添加した 7 点併行試験を実施し, 各農薬の定量下限及び検出下限の確認試験を行った結果を表 8-1 及び表 8-2 に示した. 定量下限は(標準偏差)×10, また, 検出下限は(標準偏差)×2×t(n-1, 0.05)として示される¹²⁾ので, 本法の定量下限及び検出下限は 10 μg/kg 程度及び 3 μg/kg 程度と推定された.

表8-1 液状の家庭園芸用複合肥料中の各農薬の定量下限の確認 (µg/kg)

農薬名	含有量 ^{a)}	平均定量値 ^{c)}	標準偏差	定量下限 ^{d)}	検出下限 ^{e)}
アバメクチンB1a	10	9.6	0.7	7	3
イベルメクチンB1a	10	9.6	0.4	4	1
エプリノメクチンB1a	10	9.9	0.3	3	1
ロテノン	10	9.7	0.4	4	1
ピペロニルブトキシド	10	9.5	0.3	3	1
ピレトリン I	5.6 ^{b)}	5.1	0.3	3	1
ピレトリン II	4.4 ^{b)}	4.2	0.2	2	1

a) 各農薬の含有量

b) ピレトリンはピレトリン I・II の含量として10 µg/kg相当量を添加

c) 7点併行試験の平均値

d) 標準偏差×10

e) 標準偏差×2×t(n-1,0.05)

表8-2 液状複合肥料中の各農薬の定量下限の確認 (µg/kg)

農薬名	含有量 ^{a)}	平均定量値 ^{c)}	標準偏差	定量下限 ^{d)}	検出下限 ^{e)}
アバメクチンB1a	10	10.6	0.6	6	2
イベルメクチンB1a	10	10.7	0.5	5	2
エプリノメクチンB1a	10	10.6	0.5	5	2
ロテノン	10	9.0	0.5	5	2
ピペロニルブトキシド	10	9.3	0.2	2	1
ピレトリン I	5.6 ^{b)}	4.6	0.4	4	2
ピレトリン II	4.4 ^{b)}	3.9	0.3	3	1

※脚注a)～e)は表8-1を参照

4. まとめ

肥料中の農薬の一斉分析法にかかる妥当性確認のための試験を実施したところ、次の結果を得た。

- 1) 分析操作中で使用する二種類の精製カートリッジに関して、溶出・流出液の溶出・流出画分を検討した結果、溶出・流出液量は多孔性けいそう土カートリッジカラムは 20 mL、グラファイトカーボン-NH₂ 積層カートリッジカラムは 25 mL が適当であった。
- 2) ピーク面積又は高さを用いて検量線を作成したところ、ピレトリン I は 0.0028~2.8 ng、ピレトリン II は 0.0022~2.2 ng、ピペロニルブトキシドは 0.005~2.5 ng、それ以外の各農薬は 0.005~5 ng の範囲で直線性を示した。
- 3) 3種類の液状の家庭園芸用複合肥料及び2種類の液状複合肥料について本法に従って各農薬の測定を実施した結果、定量を妨害する夾雑ピークはなかった。
- 4) 3種類の液状の家庭園芸用複合肥料及び2種類の液状複合肥料について各農薬の含有量が、400 µg/kg 及び 4,000 µg/kg (ピレトリンに関してはピレトリン I・II の含量として 400 µg/kg 及び 4,000 µg/kg) になるように添加し添加回収試験を実施した結果、平均回収率は 77.0~107.9 %、その併行精度は相対標準

偏差(RSD)として9.1%以下であった。

- 5) 本法における液状の家庭園芸用複合肥料及び液状複合肥料中の各農薬の定量下限及び検出下限は10 µg/kg程度及び3 µg/kg程度と推定された。

これらのことから、2010年度肥料等技術検討会の審議を受け、肥料等試験法(2011)に収載された¹³⁾。

文 献

- 1) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知:食品に残留する農薬,飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について,平成17年1月24日,食安発第0124001号(2005)
最終改正 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知:平成22年10月28日,食安発第1028第3号(2010)
- 2) 井之上浩一,吉見幸子,日野知証,岡尚男:LC/ESI-MS/MSによる畜水産物中の大環状ラクトン寄生虫駆除剤の一斉分析法,食品衛生学雑誌,51,1~9(2010)
- 3) H.Kobayashi, O.Matano and S.Goto:J.Pesticide Sci., 5, 89~92(1980)
- 4) 坂本美穂,竹葉和江,笹本剛生,草野友子,林洋,金井節子,神田真軌,永山敏廣,森謙一郎:LC-FL及びLC-MS/MSによる食肉中のイベルメクチン,エプリノメクチン,ドラメクチン及びモキシデクチンの分析,東京都健康安全研究センター研究年報,60,139~145(2009)
- 5) 農林水産省消費・安全局長通知:飼料分析基準の制定について,平成20年4月1日,19消安第14729号(2008)
最終改正 農林水産省消費・安全局長通知:平成22年6月4日,22消安第1227号(2010)
- 6) 厚生省告示:食品,添加物等の規格基準,昭和34年12月28日,厚生省告示第370号(1959)
最終改正 厚生労働省告示:平成20年11月27日,厚生労働省告示第529号(2008)
- 7) C. T. Yang, D. Ghosh, J. Beck, J. K. Humphries, K. Akervik, K. J. McHale, C. Gu:Screening for 250 Pesticides in Orange Oil and Ginseng Extract by LC-MS/MS Using TraceFinder Software, Thermo Fisher Scientific Application Note, 477, 1~8(2009)
- 8) X. Dun-ming, Z. Yu, L. Li-yi, Z. Zhi-gang, Z. Jin, L. Sheng-yu, Y. Fang, H. Peng-ying: Determination of Rotenone Residues in Foodstuffs by Solid-Phase Extraction(SPE)and Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry(LC-MS/MS), Agricultural Sciences in China, 9, (2010)
- 9) B. Wittrig, A. Schreiber:Comprehensive Pesticide Residue Analysis by LC/MS/MS Using an Ultra Aqueous C18 column, Applied Biosystems/MDS Analytical Technologies(2010)
- 10) 山辺真一,肥塚加奈江,山本淳,田邊英子,今中雅章:LC/MS/MSによる柑橘類中の残留農薬測定におけるイオン化抑制,岡山県環境保健センター年報,30,123~126(2006)
- 11) 畑野和広:LC/MS/MSによる食品分析,環境管理,37,22~30(2008)
- 12) 環境省水・大気環境局水環境課:要調査項目等調査マニュアル(水質,底質,水生生物),平成20年3月,8~11(2008)
- 13) 農林水産消費安全技術センター(FAMIC):肥料等試験法(2011)
<<http://www.famic.go.jp/ffis/fert/sub9.html>>

Simultaneous Determination of Agricultural Chemicals in Fluid Fertilizer by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry (LC/MS/MS)

Toshiharu YAGI¹, Masayuki YAMANISHI¹ and Yuji SHIRAI¹

¹ Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department

An analytical method for simultaneous determination of agricultural chemicals (abamectin, ivermectin, eprinomectin, rotenone, piperonylbutoxide and pyrethrin) in fluid fertilizer (fluid home garden-use mixed fertilizer and fluid mixed fertilizer) by liquid chromatography electrospray ionization-tandem mass spectrometry (LC/ESI-MS/MS) was developed. The fluid fertilizer that contains agricultural chemicals was purified with macroporous diatomaceous earth cartridge column and graphite carbon/aminopropyl – silanized silica gel column, and analyzed by LC/ESI-MS/MS. The LC separation was carried out on a C18 column using solvent gradient with formic acid ammonium solution (0.1 mmol/L) – formic acid solution (0.1 v/v%) [1+1] and formic acid acetonitrile solution (0.1 v/v%) as a mobile phase. The determination was performed in selected reaction monitoring (SRM) mode. As a result of 3 replicate analysis of 5 fertilizer samples (2 kinds of fluid mixed fertilizer and 3 kinds of fluid home garden-use mixed fertilizer) spiked with each agricultural chemicals at 400 and 4000 µg/kg, the mean recoveries and the relative standard deviations (RSD) were 77.0~107.9 % and 0.1~9.1 %, respectively. On the basis of 7 replicate measurements of spiked samples, the LOQ values were 10 µg/kg in the fluid home garden-use mixed fertilizer and fluid mixed fertilizer. Those results indicated that the developed method was valid for the determination of six kinds of agricultural chemicals.

Key words agricultural chemicals, fluid home garden-use mixed fertilizer, fluid mixed fertilizer, simultaneous determination, liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC/MS/MS)

(Research Report of Fertilizer, 4, 36~48, 2011)