

**技術レポート**

# 1 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の妥当性確認 ～乾牧草及び稲わら中のペンディメタリンについて～

船木 紀夫<sup>\*1</sup>, 設楽 賢治<sup>\*1</sup>, 牧野 大作<sup>\*2</sup>

## Validation of the Simultaneous Determination Method of Pesticides by GC-MS ～ Pendimethalin in Grass Hay and Rice Straw ~

Norio FUNAKI<sup>\*1</sup>, Kenji SHIDARA<sup>\*1</sup> and Daisaku MAKINO<sup>\*2</sup>(\*<sup>1</sup> Food and Agricultural Materials Inspection Center, Kobe Regional Center\*<sup>2</sup> Food and Agricultural Materials Inspection Center, Kobe Regional Center  
(Now Nagoya Regional Center))

### 1 緒 言

ペンディメタリンは、アメリカン・サイアナミッド社（現 BASF アグロ社）が開発したジニトロアニリン系除草剤であり、一年生雑草に効果がある<sup>1)</sup>。

飼料中のペンディメタリンの残留基準値は、農林水産省令<sup>2)</sup>においてえん麦、マイロ及び牧草で 0.1 mg/kg 並びに大麦、小麦、とうもろこし及びライ麦で 0.2 mg/kg と定められている。平成 25 年 6 月 10 日に開催された第 34 回農業資材審議会飼料分科会において、ペンディメタリンの牧草の基準値について 0.1 mg/kg から 15 mg/kg に改正することが適当と答申された<sup>3)</sup>。

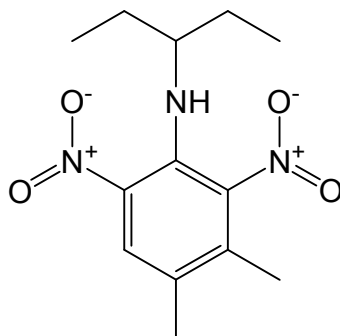
飼料中のペンディメタリンは、既に飼料分析基準<sup>4)</sup>に収載済みの野崎らが開発したガスクロマトグラフ質量分析計（以下「GC-MS」という。）による一斉分析法<sup>5)</sup>による定量が可能である。しかし、改正予定の乾牧草中のペンディメタリンの基準値 15 mg/kg 近辺では分析法の妥当性は確認されていないことから、今回、改正予定の基準値及びその 1/10 の 2 濃度にて添加回収試験を実施し、分析法の妥当性を確認した。

また、飼料の有害物質の指導基準<sup>6)</sup>においては、平成 22 年 9 月 8 日の改正により、稲わらに対するペンディメタリンの指導基準値が 0.02 mg/kg と設定されている<sup>7)</sup>が、現行の飼料分析基準における、フィプロニル、デルタメトリン及びトラロメトリンを除く 136 農薬の定量下限は一律 0.050 mg/kg としていることから、定量下限及び検出下限を再確認するとともに、基準値相当量を添加した飼料を用いて添加回収試験を実施した。

なお、参考までにペンディメタリンの構造式等を Fig. 1 に示した。

\*<sup>1</sup> 独立行政法人農林水産消費安全技術センター神戸センター

\*<sup>2</sup> 独立行政法人農林水産消費安全技術センター神戸センター，現 名古屋センター



*N*-(1-ethylpropyl)-2,6-dinitro-3,4-xylidine  
 $C_{13}H_{19}N_3O_4$  MW: 281.3 CAS No.: 40487-42-1

Fig. 1 Chemical structure of pendimethalin

## 2 実験方法

### 2.1 試料

アルファルファ乾草，スーダングラス乾草及び稲わらはは，粉砕機でそれぞれ 1 mm の網ふるいを通すまで粉砕した。

### 2.2 試薬

1) 2,2,4-トリメチルペンタンは液体クロマトグラフ用を用いた。アセトニトリル，シクロヘキサン，アセトン，酢酸エチル及びヘキサンは残留農薬・PCB 試験用を用いた。その他，特記している以外の試薬は特級を用いた。

#### 2) ペンディメタリン標準液

ペンディメタリン標準品（林純薬工業製，純度 99.3 %）25 mg を正確に量って 50 mL の褐色全量フラスコに入れ，アセトン 10 mL を加えて溶かし，更に標線まで 2,2,4-トリメチルペンタンを加えてペンディメタリン標準原液を調製した（この液 1 mL は，ペンディメタリンとして 1 mg ( $f=0.979$ ) を含有する。）。

使用に際して，標準原液の一定量を 2,2,4-トリメチルペンタン-アセトン（4+1）で正確に希釈し，1 mL 中にペンディメタリンとしてそれぞれ 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2 及び 0.5  $\mu\text{g}$  を含有する各標準液を調製した。

### 2.3 装置及び器具

1) 粉砕機：Retsch 製 SM-2000

2) 振とう機：宮本理研工業製 理研式シェーカー MW-DRV（300 rpm で使用）

3) ロータリーエバポレーター：

BÜCHI Labortechnik 製 Rotavapor R-200（真空コントローラ V-800 付き）

4) 多孔性ケイソウ土カラム（20 mL 保持用）：Agilent Technologies 製 Chem Elut, 20 mL

5) 遠心分離器：久保田製作所製 テーブルトップ遠心機 4000

6) メンブレンフィルター：東洋濾紙製 DISMIC-25HP（孔径 0.45  $\mu\text{m}$ ，直径 25 mm，PTFE）

7) ゲル浸透クロマトグラフ（以下「GPC」という。）：ジーエルサイエンス製 GPC システム

ポンプ：G-Prep GPC 8100

オートサンプラー：G-Prep AS

フラクションコレクターシステム：G-Prep GPC 8100 FC/Pump

8) グラファイトカーボン／アミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム：

Supelco 製 ENVI-Carb/LC-NH2 (500 mg/500 mg)

9) 合成ケイ酸マグネシウムミニカラム：Waters 製 Sep-Pak Plus Florisil Cartridge (充てん剤量 910 mg) にリザーバーを連結したもの

10) ガスクロマトグラフ質量分析計：

GC 部：島津製作所製 GC-2010

MS 部：島津製作所製 GCMS-QP2010nc

## 2.4 定量方法

飼料分析基準第 6 章第 3 節 1 農薬の GC-MS による一斉分析法に従って定量した。ただし、乾牧草は、得られた試料溶液を、更に 2,2,4-トリメチルペンタン-アセトン (4+1) で正確に 100 倍 (15 mg/kg 相当量添加) 又は 10 倍 (1.5 mg/kg 相当量添加) 希釈したものを測定に供した。

また、GPC 及び GC-MS 測定条件を Table 1 及び 2 に、定量法の概要を Scheme 1 にそれぞれ示した。

Table 1 Operating conditions of GPC

Column	Shodex CLNpak EV-2000 AC (20 mm i.d.×300 mm, 15 µm)
Guard column	Shodex CLNpak EV-G AC (20 mm i.d.×100 mm, 15 µm)
Eluent	Cyclohexane-acetone (4:1)
Flow rate	5 mL/min
Fraction volume	60~150 mL

Table 2 Operating conditions of GC-MS

Column	Agilent Technologies Rtx-5MS (0.25 mm i.d.×30 m, 0.25 µm film thickness)
Column temperature	70 °C (1 min) → 25 °C/min → 150 °C → 3 °C/min → 200 °C → 8 °C/min → 280 °C (10 min)
Injection mode	Splitless (60 s)
Injection port temperature	280 °C
Carrier gas	He 1.0 mL/min
Transferline temperature	250 °C
Ion source temperature	230 °C
Ionization	Electron ionization
Ionization energy	70 eV
Monitor ion	<i>m/z</i> 252 (for quantification), 281 (for confirmation)

- Sample (grass hay 5.0 g, others 10.0 g)
- add 15 mL of water and allow to stand 30 min
  - add 100 mL acetonitrile and shake (300 rpm) for 30 min
  - filtrate under suction filter (No.5B)
  - wash with 50 mL of acetonitrile
  - evaporate to the volume of 15 mL under 40 °C
- Chem Elut Cartridge
- apply sample solution and allow to stand for 5 min
  - wash with 100 mL of hexane-ethyl acetate (1:1)
  - add 1 mL of acetone-diethylene glycol (49:1)
  - evaporate to dryness under 40 °C
  - dissolve in 10 mL of cyclohexane-acetone (4:1)
  - filtrate with membrane filter (< 0.5 µm)
- GPC
- apply 5 mL of sample solution
  - collect 60 ~ 150 mL fraction
  - add a drop of acetone-diethylene glycol (49:1)
  - evaporate to dryness under 40 °C
  - dissolve in 2 mL of ethyl acetate
- ENVI-Carb/NH<sub>2</sub> Cartridge (prewashed with 10 mL of ethyl acetate)
- apply sample solution
  - elute with 8 mL of ethyl acetate
  - add a drop of acetone-diethylene glycol (49:1)
  - evaporate to dryness under 40 °C
  - dissolve in hexane-acetone (7:3) (grass hay 5.0 mL, others 10.0 mL)
- Sep-Pak Plus Florisil Cartridge (prewashed with 5 mL of acetone and 5 mL of hexane)
- apply 4.0 mL of sample solution
  - elute with 6 mL of hexane-acetone (7:3)
  - add a drop of acetone-diethylene glycol (49:1)
  - evaporate to dryness under 40 °C
  - dissolve in 2.0 mL of 2,2,4-trimethylpentane-acetone (4:1)
  - dilute one hundred-fold or ten-fold with 2,2,4-trimethylpentane-acetone (4:1) in grass hay
- GC-MS

Scheme 1 Analytical procedure for pesticide in feeds by using GC-MS

### 3 結果及び考察

#### 3.1 検量線の作成

2.2 の 1) に従って調製した 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2 及び 0.5 µg/mL 相当量のペンディメタリン標準液各 1 µL を GC-MS に注入し、得られた選択イオン検出 (以下「SIM」という。) クロマトグラムのピーク高さから検量線を作成した。

その結果、Fig. 2 のとおり、検量線は 0.01 ~ 0.5 µg/mL (注入量として 0.01 ~ 0.5 ng) の範囲で直線性を示した。

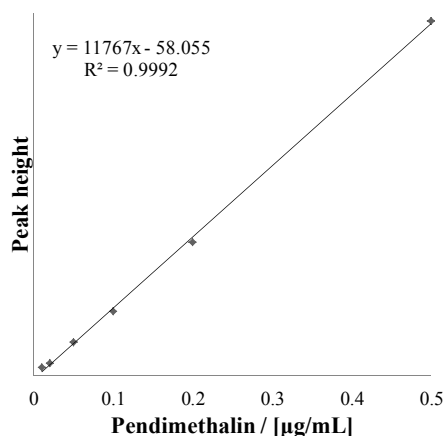


Fig. 2 Calibration curve of pendimethalin by peak height

### 3.2 妨害物質の検討

添加回収試験に用いたアルファルファ乾草，スーダングラス乾草及び稲わら各 1 点について，本法に従って SIM クロマトグラムを作成し，ペンディメタリンの定量を妨げるピークの有無を検討した。

その結果，ペンディメタリンの定量を妨げるピークは認められなかった。

### 3.3 添加回収試験

アルファルファ乾草及びスーダングラス乾草に対しては，ペンディメタリンをそれぞれ 15 及び 1.5 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で共に 0.15 µg/mL 相当量），稲わらに対しては 0.02 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 0.02 µg/mL 相当量）を添加した試料を用い，本法により 3 点併行で定量し，回収率及び繰返し精度を求めた。

その結果は，Table 3 のとおり，アルファルファ乾草では平均回収率が 97.8 及び 111 %，その繰返し精度は相対標準偏差（RSD<sub>r</sub>）として 7.9 %以下，スーダングラス乾草では平均回収率が 104 及び 103 %，その繰返し精度は RSD<sub>r</sub>として 4.9 %以下，稲わらでは平均回収率が 115 %，その繰返し精度は RSD<sub>r</sub>として 8.7 %であった。

なお，添加回収試験で得られた SIM クロマトグラムの一例を Fig. 3 に示した。

Table 3 Recoveries of pendimethalin

Spiked level (mg/kg)	Feed types					
	Alfalfa hay		Sudan grass hay		Rice straw	
	Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)
15	97.8	7.7	104	4.6	-	-
1.5	111	7.9	103	4.9	-	-
0.02	-	-	-	-	115	8.7

a) Mean (n=3)

b) Relative standard deviation of repeatability

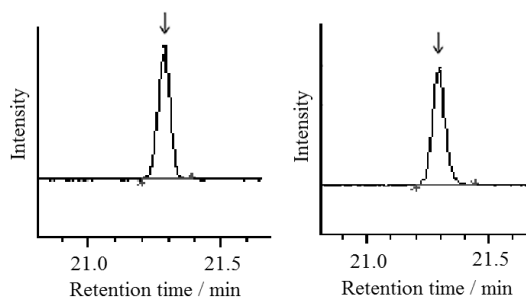


Fig. 3 Selected ion monitoring chromatograms of pendimethalin

(Arrows indicate the peak of pendimethalin.)

(Left) Standard solution (The concentration is 0.2  $\mu\text{g/mL}$ .)

(Right) Sample solution (100-fold diluted) of alfalfa hay (spiked at 15 mg/kg)

### 3.4 定量下限及び検出下限

現行の飼料分析基準におけるペンディメタリンの定量下限は、0.050 mg/kg としている。

この定量下限では、稲わら中のペンディメタリンの指導基準値 0.02 mg/kg を上回ることから、改めて稲わら中のペンディメタリンについて添加回収試験を実施し、得られたピークから SN 比が 10 及び 3 となる濃度を求め、定量下限および検出下限を再確認した。その結果、得られたピークの SN 比が 10 以上となる濃度は 0.02 mg/kg、また、SN 比が 3 となる濃度は 0.006 mg/kg となったことから、本法による稲わら中のペンディメタリンの定量下限を 0.02 mg/kg、検出下限を 0.006 mg/kg と確認した。

なお、Table 3 に示したとおり、当該定量下限濃度における添加回収試験は良好であった。

## 4 まとめ

牧草及び稲わらに対するペンディメタリンの残留基準値等が変更又は新設されたことから、飼料分析基準に収載済みのペンディメタリンの定量法について、改めて妥当性を確認したところ、以下の結果が得られた。

- 1) 検量線は、0.01 ~ 0.5  $\mu\text{g/mL}$  (注入量として 0.01 ~ 0.5 ng) の範囲で直線性を示した。
- 2) 添加回収試験に用いたアルファルファ乾草、スーダングラス乾草及び稲わらについて、本法に従って得られたクロマトグラムには、ペンディメタリンの定量を妨げるピークは認められなかった。
- 3) アルファルファ乾草及びスーダングラス乾草にペンディメタリンとして 15 及び 1.5 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.15  $\mu\text{g/mL}$  相当量)、稲わらにペンディメタリンとして 0.02 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.02  $\mu\text{g/mL}$  相当量) をそれぞれ添加し、本法に従って 3 点併行分析を実施し、回収率及び繰返し精度を求めたところ、良好な結果が得られた。
- 4) 本法による稲わら中のペンディメタリンの定量下限及び検出下限は、それぞれ 0.02 及び 0.006 mg/kg であった。

## 文 献

- 1) 食品安全委員会：ペンディメタリン農薬評価書 (第 2 版)，平成 24 年 8 月 (2012)。
- 2) 農林省令：飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令，昭和 51 年 7 月 24 日，省令第 35

号 (1976).

- 3) 農業資材審議会長答申：飼料の規格の改正に関する諮問について（答申），平成 25 年 6 月 10 日，25 資審第 4 号 (2013).
- 4) 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).
- 5) 野崎 友春，堀米 明日香，渡部 千会：飼料研究報告，31，39 (2006).
- 6) 農林水産省畜産局長通知：飼料の有害物質の指導基準の制定について，昭和 63 年 10 月 14 日，63 畜 B 第 2050 号 (1988).
- 7) 農林水産省消費・安全局長通知：飼料の有害物質の指導基準の一部改正について，平成 22 年 9 月 8 日，22 消安第 5163 号 (2010).