

7 ヘリウムを使用しない代替法の検討

(1) 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による農薬一斉分析法の検討

船木 紀夫*¹, 小堀 拓也*²

Study of Alternative Determination Method without Helium (1) Simultaneous Determination Method of Pesticides by LC-MS/MS

FUNAKI Norio*¹ and KOBORI Takuya*²

(*¹ Nagoya Regional Center, Food and Agricultural Materials Inspection Center (FAMIC)

(Now Kobe Regional Center, FAMIC),

(*² Nagoya Regional Center, FAMIC)

We have examined a simultaneous determination method of the concentration of 64 pesticides in feed using a liquid-chromatograph electrospray-ionization tandem mass spectrometer (LC-ESI-MS/MS), instead of gas-chromatograph mass spectrometer (GC-MS).

Having added water to a sample, pesticides were extracted with acetonitrile, and the solution was filtered. The filtrate was purified with GPC and three types of solid phase extraction columns (Chem Elut CE 1020, GL Sciences Inc.; Tokyo, Japan, ENVI-Carb/NH₂, Sigma-Aldrich Co. LLC.; St. Louis, MO, USA and Sep-Pak Plus Florisil cartridge, Waters Co.; Milford, MA, USA), and injected into an LC-MS/MS to determine the concentration of each pesticides. LC separation was then carried out on an ODS column (Wakopak Ultra C18-2, 2.1 mm i.d. × 100 mm, 2 μm, Fuji Film Wako Pure Chemical Industries, Ltd.; Osaka, Japan) with a gradient of 5 mmol/L ammonium acetate aqueous solution and 5 mmol/L ammonium acetate methanol solution as a mobile phase. In the MS/MS analysis, the positive mode electrospray ionization (ESI+) was used.

Suitable measurement ion conditions were found for 48 out of 64 pesticides. Linearity of calibration curve was confirmed in the range of 20 to 400 ng/mL for 47 out of 48 pesticides mentioned above. Peaks that interfered with the quantification of each pesticide were not observed in the chromatogram of formula feed, corn and alfalfa hay, obtained according to this method. Under the measurement conditions that the peak intensity of each pesticide was the highest, 23 out of 47 had a matrix effect range of 80 to 120 % in all samples. And no pesticides had a matrix effect of less than 50 % in all samples.

Key words: pesticide; simultaneous determination method; gas-chromatograph mass spectrometer (GC-MS); liquid-chromatograph tandem mass spectrometer (LC-MS/MS); electrospray ionization (ESI); feed

キーワード：農薬；一斉分析法；ガスクロマトグラフ質量分析計；液体クロマトグラフタンデム型質量分析計；エレクトロスプレーイオン化法；飼料

1 緒 言

独立行政法人農林水産消費安全技術センターでは、飼料製造事業場等に対して行った立入検査に

*¹ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター名古屋センター，現 神戸センター

*² 独立行政法人農林水産消費安全技術センター名古屋センター

て収去した飼料について、飼料分析基準¹⁾に記載された試験法により試験を実施し、製造及び使用方法等の基準並びに成分の規格²⁾への適合状況を確認している。飼料分析基準収載法のうち、農薬については主にガスクロマトグラフ質量分析計による一斉分析法（以下「GC-MS 法」という。）により試験を実施しているが、この方法ではヘリウムを使用する必要がある。

近年、我が国ではヘリウムの入手が困難な状況が長期化しており、今後も安定供給の見通しが立っていない状況である。そこで今回、GC-MS 法の対象農薬について、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。）による同時定量法の測定条件を検討したので、その概要を報告する。

なお、今回検討した農薬を Table 1 に示した。

Table 1 Target compounds in this study

Compounds (Group A)		Compounds (Group B)	
Alachlor	Deltamethrin	Atrazine	Fipronil
Aldrin	Diazinon	Cadusafos	Flutolanil
alpha-BHC	Dieldrin	Chlorobenzilate	Iprobenfos
beta-BHC	Edifenphos	Clorpyrifos	Isofenphos
gamma-BHC, Lindane	Endrin	Clorpyrifos-methyl	Isofenphos-oxon
delta-BHC	Fenpropathrin	Cyhalothrin	Isoprothiolane
Bifenthrin	Flucythrinate	Difenoconazole	Malathion
Bromobutide	Heptachlor	Dimethoate	Pendimethalin
deBr-Bromobutide	Heptachlor epoxide	EPN	Phenothrin
Chlordane	Methidathion	Ethion	Phenthoate
(<i>cis</i> -, <i>trans</i> -)	(<i>E</i>)-Methominostrobin	Ethofenprox	Phorate
Chlorfenvinphos	permethrin	Fenbuconazole	Phosmet
(<i>Z</i> -, <i>E</i> -)	(<i>cis</i> -, <i>trans</i> -)	Fenitrothion	Procymidone
Chlorpropham	Pirimiphos-methyl	Fenthion	Tebuconazole
Chlorthal-dimethyl	Propanil	Fenvalerate	Terbufos
DDD	Propargite	(+Esfenvalerate)	
(<i>o</i> , <i>p</i> '-, <i>p</i> , <i>p</i> '-)	Propiconazole		
DDE	Silafluofen		
(<i>o</i> , <i>p</i> '-, <i>p</i> , <i>p</i> '-)	Trifluralin		
DDT			
(<i>o</i> , <i>p</i> '-, <i>p</i> , <i>p</i> '-)			

2 実験方法

2.1 試料

配合飼料（肉豚肥育用及び種牛飼育用），とうもろこし及び乾牧草（アルファルファヘイ）はそれぞれ目開き 1 mm のスクリーンを装着した粉碎機で粉碎し、分析用試料とした。

なお、検討に用いた配合飼料の配合割合を Table 2 に示した。

Table 2 Compositions of the formula feed

Formula feed types	Ingredient types	Proportion	
		(%)	Ingredients
For piglets	Grains	70	Corn, wheat flour, roasted soybean flour, rice
	Brans	22	Bran
	Oil seed meal	3	Soybean meal, corn germ meal
	Others	5	Calcium carbonate, animal fat, calcium phosphate, salt, garlic powder, molasses, corn steep liquor, feed additives
For dairy cattle	Oil seed meal	58	Corn gluten feed, potato gluten feed, rapeseed meal, soybean meal
	Grains	36	Corn, barley, rice, wheat flour
	Brans	2	Rice bran, bran
	Others	4	Molasses, calcium carbonate, feed additives

2.2 試薬

- 1) アセトニトリルは残留農薬・PCB 試験用を用いた。メタノールは LC-MS 用（富士フィルム和光純薬製）を用いた。1%酢酸アンモニウム溶液は高速液体クロマトグラフ用（富士フィルム和光純薬製）を用いた。酢酸アンモニウム及び炭酸カリウムは試薬特級を用いた。水は Milli-Q Advantage（Merck Millipore 製）により精製した超純水（JIS K 0211 の 5218 に定義された超純水）を用いた。
- 2) A グループ追加農薬標準品
アルドリン、 α -BHC、 β -BHC、 γ -BHC、クロルデン（*cis* 体）、クロルデン（*trans* 体）、*p*、*p'*-DDT、ディルドリン、エンドリン及びヘプタクロル（以下「A グループ追加農薬」という。）の各標準品は、Table 3 に示した供給業者、純度のものを用いた。
- 3) A グループ追加農薬標準原液
A グループ追加農薬標準品各 25 mg を量ってそれぞれ 50 mL の全量フラスコに入れ、アセトンを加えて溶かし、更に標線までアセトンを加えて各 A グループ追加農薬標準原液を調製した（これらの液各 1 mL は、各農薬として 0.5 mg を含有）。
- 4) 農薬混合標準液
A グループ追加農薬標準原液各 4 mL を 200 mL の全量フラスコに正確に入れて混合し、更に標線までアセトンを加えて A グループ追加農薬混合標準原液を調製した（この液 1 mL は、各農薬として 10 μ g を含有）。

Table 1 の A グループの農薬（A グループ追加農薬は除く。）を含む 10 μ g/mL の A グループ農薬混合標準原液（林純薬工業製。アセトン溶液。）及び 10 μ g/mL の A グループ追加農薬混合標準原液各 2 mL を 20 mL の全量フラスコに正確に入れて混合し、更に標線までアセトニトリルを加えて A グループ農薬混合標準液を調製した（この液 1 mL は、各農薬として 1 μ g を含有）。Table 1 の B グループの農薬を含む B グループ農薬混合標準原液（林純薬工業製。アセトン溶液。）についても同様に操作し、B グループ農薬混合標準液を調製した。

使用に際して、各農薬混合標準液の一定量を、アセトニトリル-水（1+1）で正確に希釈し、1 mL 中に各農薬としてそれぞれ 20, 40, 60, 80, 100, 200, 300 及び 400 ng を含有する農薬

混合標準液を調製した。

Table 3 Additional group A pesticide standards used in the present study

Pesticides	Manufacturer	Purity (%)
Aldrin	Accu standard	100
alpha-BHC	Dr. Ehrenstorfer GmbH	98.6
beta-BHC	Dr. Ehrenstorfer GmbH	97.5
gamma-BHC, Lindane	Dr. Ehrenstorfer GmbH	99.5
cis-Chlordane	Accu standard	100
trans-Chlordane	Dr. Ehrenstorfer GmbH	99.1
<i>p, p'</i> -DDT	Accu standard	99.5
Dieldrin	Accu standard	100
Endrin	Dr. Ehrenstorfer GmbH	96.5
Heptachlor	Dr. Ehrenstorfer GmbH	99.0

2.3 装置及び器具

1) 粉砕機 :

粉砕機 1 (配合飼料及びとうもろこし用) :

ZM-200 Retsch 製 (目開き 1 mm スクリーン, 使用時回転数 14000 rpm)

粉砕機 2 (乾牧草用) :

SM-100 Retsch 製 (目開き 1 mm スクリーン, 回転数 (仕様) 1430 rpm)

2) 振り混ぜ機 : レシプロシェーカーSR-2W タイテック製 (使用時振動数 300 rpm)

3) ケイソウ土カラム : Chem Elut CE 1020 (20 mL) Agilent Technologies 製

4) 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 : ENVI-Carb/NH₂ (500 mg/500 mg) Supelco 製

5) フロリジルカラム : Sep-Pak Plus Florisil Waters 製にリザーバーを連結したもの

6) ゲル浸透クロマトグラフ : GPC システム 島津製作所製

7) メンブランフィルター : DISMIC-25HP (孔径 0.45 μm, 直径 25 mm, 親水性 PTFE) 東洋濾紙製

8) LC-MS/MS :

LC 部 : ACQUITY UPLC System Waters 製

MS/MS 部 : ACQUITY TQ Detector Waters 製

2.4 定量方法

1) 抽出

分析試料 10 g (乾牧草は 5 g) を量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ, 水 15 mL を加え, 30 分間静置後, 更にアセトニトリル 100 mL を加え, 30 分間振り混ぜて抽出した. 300 mL のなす形フラスコをブフナー漏斗の下に置き, 抽出液をろ紙 (5 種 B) で吸引ろ過した後, 先の三角フラスコ及び残さを順次アセトニトリル 50 mL で洗浄し, 同様に吸引ろ過した. ろ液を 40 °C 以下の水浴で 15 mL 以下まで減圧濃縮した後, カラム処理に供する試料溶液とした.

2) カラム処理 I

試料溶液をケイソウ土カラムに入れ、試料溶液の入っていたなす形フラスコを水 5 mL で洗浄し、洗液をケイソウ土カラムに加え、5 分静置後、300 mL のなす形フラスコをカラムの下に置き、試料溶液の入っていたなす形フラスコを酢酸エチル-ヘキサン (1+1) 20 mL ずつで 3 回洗浄し、洗液を順次カラムに加え、液面が充てん剤の上端に達するまで流下した後、更に酢酸エチル-ヘキサン (1+1) 40 mL をカラムに加え、同様に溶出させた。

溶出液を 40 °C 以下の水浴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た。シクロヘキサン-アセトン (4+1) 10 mL を正確に加えて残留物を溶かし、10 mL の遠心沈殿管に入れて、1000×g で遠心分離した後、上澄み液をメンブランフィルター (孔径 0.45 μm) でろ過し、GPC に供する試料溶液とした。

3) GPC

試料溶液 5 mL を GPC に注入し、定量する各農薬が溶出する画分を 200 mL のなす形フラスコに分取し、キーパーとしてジエチレングリコール-アセトン (1+49) 1 滴を加え、40 °C 以下の水浴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た。酢酸エチル 2 mL を加えて残留物を溶かし、カラム処理 II に供する試料溶液とした。

4) カラム処理 II

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を酢酸エチル 10 mL で洗浄した。試料溶液をミニカラムに入れ、液面が充てん剤の上端に達するまで流出させた。50 mL の全量フラスコをミニカラムの下に置き、試料溶液の入っていたなす形フラスコを酢酸エチル 2 mL ずつで 2 回洗浄し、洗液を順次ミニカラムに加え、液面が充てん剤の上端に達するまで流下した後、更に酢酸エチル 4 mL をカラムに加え、同様に溶出させた。

溶出液にキーパーとしてジエチレングリコール-アセトン (1+49) 1 滴を加え、40 °C 以下の水浴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た。ヘキサン-アセトン (7+3) 10 mL (乾牧草は 5 mL) を加えて残留物を溶かし、カラム処理 III に供する試料溶液とした。

5) カラム処理 III

フロリジルミニカラムにリザーバーを取り付け、アセトン 5 mL 及びヘキサン 5 mL で順次洗浄した。試料溶液 4 mL を正確に取ってミニカラムに入れ、液面が充てん剤の上端に達するまで流出させた。50 mL の全量フラスコをミニカラムの下に置き、ヘキサン-アセトン (7+3) 6 mL を加えて各農薬を溶出させた。

溶出液にキーパーとしてジエチレングリコール-アセトン (1+49) 1 滴を加え、40 °C 以下の水浴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た。アセトニトリル-水 (1+1) 2 mL を加えて残留物を溶かし、メンブランフィルター (孔径 0.45 μm) でろ過し、LC-MS/MS による測定に供する試料溶液とした。

6) LC-MS/MS による測定

試料溶液及び各農薬標準液各 2 μL を LC-MS/MS に注入し、選択反応検出 (以下「SRM」という。) クロマトグラムを得た。測定条件を Table 4 に示した。

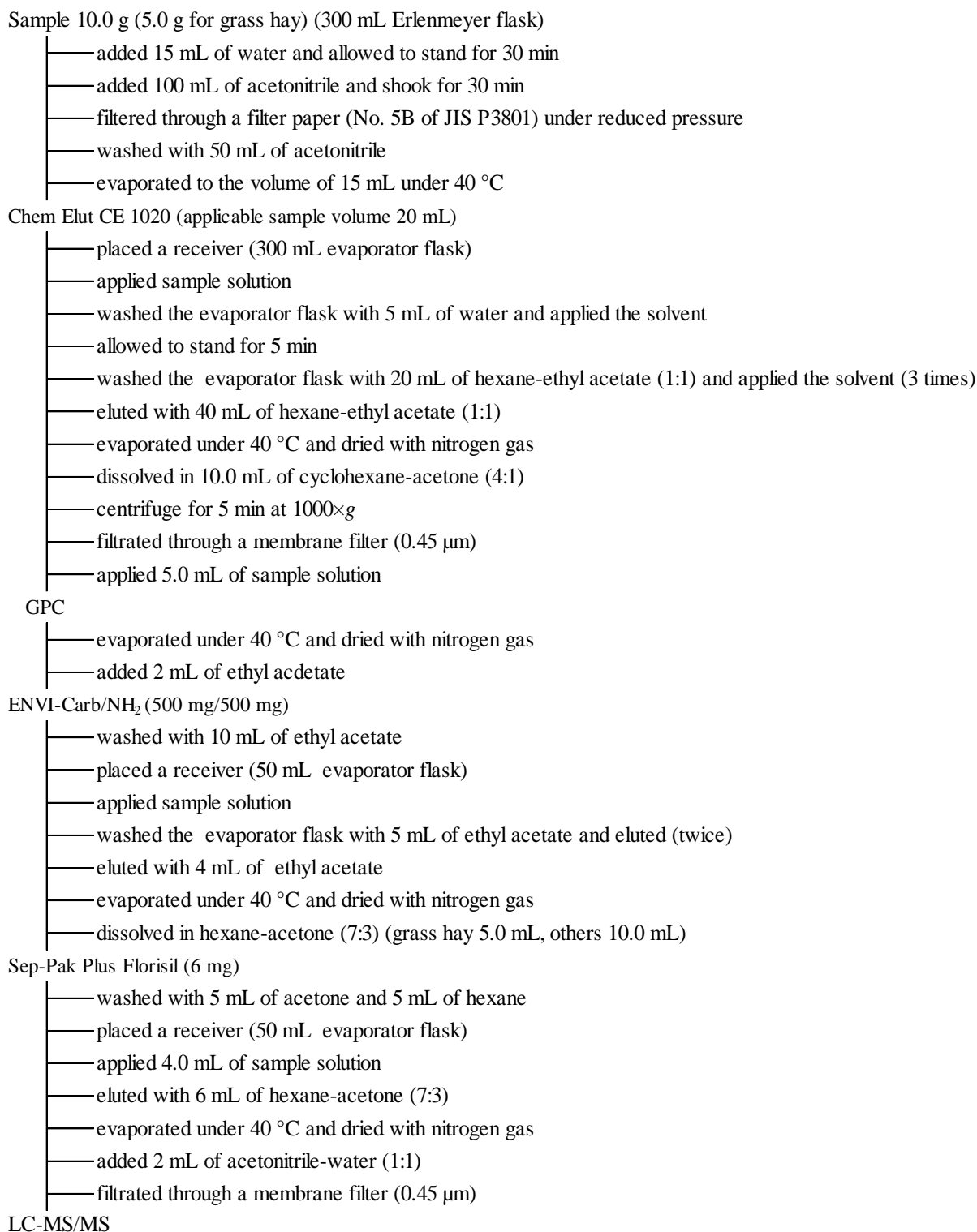
Table 4 Operating conditions of LC-MS/MS

Column	WAKO pak C18-2 (2.1 mm i.d. × 100 mm, 2 μm), Fujifilm wako pure chemicals
Mobile phase	5 mmol/L ammonium acetate aqueous solution- 5 mmol/L ammonium acetate methanol solution (85:15) (hold for 0.25 min) → 0.25 min → (40:60) → 8.5 min → (20:80) → 9 min → (1:9) (hold for 15 min) → 3 min → (1:99) → (hold for 5 min) → 0.1 min (85:15) → (hold for 3.9 min)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temperature	40 °C
Detector	Quadrupole mass spectrometer
Ionization	Electrospray ionization (ESI) (Positive ion mode)
Ion source temperature	120 °C
Desolvation gas	N ₂ (600 L/h, 350 °C)
Capillary voltage	3.5 kV
Cone gas	N ₂ (50 L/h)
Collision gas	Ar (0.4 Pa)
Collision energy	10 eV, 20 eV, 30 eV, 40 eV or 50 eV

7) 計 算

得られた SRM クロマトグラムからピーク面積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 Scheme 1 に示した。



Scheme 1 Analytical procedure for pesticides in feed

2.5 MS/MS 測定条件の検討方法

最初に予備測定として、コリジョンエネルギーを 30 eV に固定し、コロン電圧を 10, 20, 30, 40 又は 50 V と変化させながら SRM 測定を行うことで、各プリカーサーイオン及びプロダクトイオンの組み合わせ毎に、ピークの保持時間、形状及び信号強度を比較した。なお、プリカーサーイオン及びプロダクトイオンの組み合わせについては、LC-MS/MS 法の各文献³⁾⁻¹²⁾等を参考に

設定した。予備測定の結果から、成分毎にモニターイオンを 2~11 種類選別し、コーン電圧を 10, 20, 30 又は 40 V, コリジョンエネルギーを 10, 20, 30, 40 又は 50 eV とそれぞれ変化させて測定した。なお、コーン電圧 50 V については、予備測定時にピークを検出しなかった成分が多かったため除外した。

3 結果及び考察

3.1 測定溶媒の検討

アセトニトリル又はアセトニトリル-水 (1+1) で希釈して調製した 100 ng/mL 農薬混合標準液の各成分について、ピーク形状及び信号強度を比較したところ、全成分においてアセトニトリル-水 (1+1) の方が良好であったことから、この後の検討ではアセトニトリル-水 (1+1) を用いることとした。クロマトグラムの一例を Fig. 1 に示した。

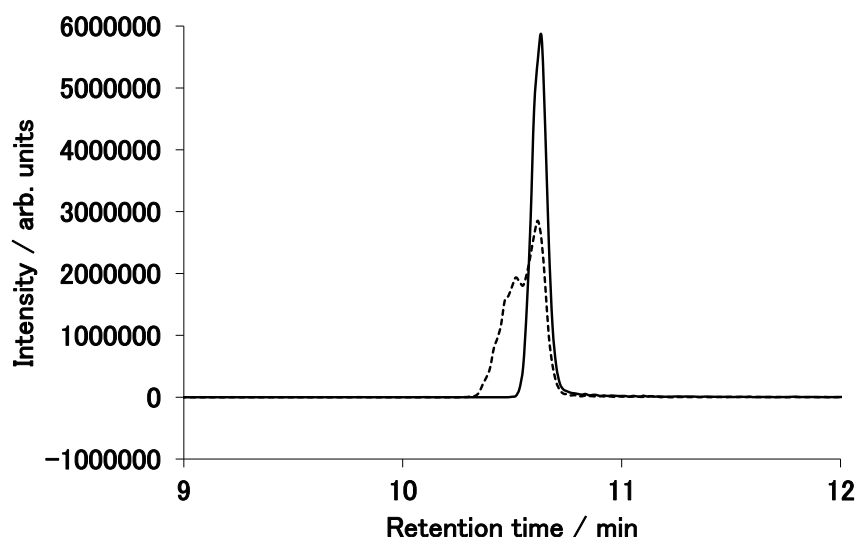


Fig. 1 Typical selected reaction monitoring (SRM) chromatogram of pirimiphos-methyl (100 ng/mL) by different solvents

(Precursor ion > Product ion (m/z): 306 > 108, Cone voltage: 30 V, Collision energy: 30 eV, Solid line: acetonitrile-water (1:1), Dotted line: acetonitrile)

3.2 測定条件の検討

2.5 の予備測定において塩素系農薬等、定量に十分な感度のイオンが見いだせなかった成分 (A グループ: アルドリル, BHC, クロルタルジメチル, クロルデン, DDD, DDE, ディルドリル, エンドリン, ヘプタクロル及びヘプタクロルエポキシド, B グループ: クロルベンジレート及びプロシミドン) を除いた各成分について、プリカーサーイオン及びプロダクトイオンの組み合わせを選別し、100 ng/mL 農薬混合標準液についてコーン電圧及びコリジョンエネルギーを 10 刻みに調整して測定し、概ね 10^3 以上の信号強度が得られた測定条件を Table 5 及び 6 に示した。なお、DDT については十分な信号強度が得られたものの、合算として基準値が設定されている DDD 及び DDE の測定条件が見いだせなかったため、今回の検討からは除外した。

今回測定した A グループの 34 成分のうち 18 成分及び B グループの 30 成分のうち 27 成分に

ついて、それぞれプリカーサーイオン及びプロダクトイオンの組み合わせ 2 組以上で十分な信号強度が得られ、定量イオン及び確認イオンとして設定できる可能性が示唆された。なお、A グループのアラクロール及びトリフルラリン並びに B グループのホレートについては、1 組のイオンで十分な感度が得られた。

Table 5 Confirmation result of MS/MS conditions (compound group A)

Compounds	Cone voltage (V)	Precursor ion >Product ion (m/z)	Collision energy (eV)	Retention time (min)	Compounds	Cone voltage (V)	Precursor ion >Product ion (m/z)	Collision energy (eV)	Retention time (min)
Alachlor	20	<u>270 > 162</u>	20	8.2			350 > 97	30	
		440 > 165	50		Fenpropathrin	20	<u>350 > 125</u>	10	15.2
Bifenthrin	10	440 > 166	40	20.4			367 > 125	20	
		<u>440 > 181</u>	10				469 > 107	50	
		312 > 119	20		Flucythrinate-1, 2 (Not seprated)	20	469 > 157	40	14.4
Bromobutide	10	<u>312 > 194</u>	10	7.9			<u>469 > 199</u>	20	
		314 > 119	20				285 > 191	30	
		314 > 196	10		(E)-Methominostrobin	20	<u>285 > 196</u>	10	5.2
deBr-Bromobutide	10	<u>234 > 116</u>	10	6.9			285 > 238	10	
		234 > 119	20				303 > 58	30	
Chlorfenvinphos-1 (Z or E)	20	<u>359 > 155</u>	10	9.5	Methidathion	20	<u>303 > 85</u>	20	5.5
		359 > 170	40				320 > 85	30	
		361 > 172	40				408 > 168	40	
Chlorfenvinphos-2 (Z or E)	20	<u>359 > 155</u>	10	10.1	Permethrin-1 (cis or trans)	10	<u>408 > 183</u>	20	18.3
		359 > 170	40				410 > 183	20	
		361 > 172	40		Permethrin-2 (cis or trans)	10	<u>408 > 183</u>	20	19.5
Chlorpropham	20	<u>214 > 154</u>	20	5.0			410 > 183	20	
		214 > 172	10				<u>306 > 108</u>	30	
		504 > 172	30		Pirimiphos-methyl	30	306 > 125	30	10.5
		506 > 93	50				306 > 164	20	
		506 > 172	30				218 > 127	20	
Deltamethrin (Metabolite of tralomethrin)	20	521 > 172	30	16.5	Propanil	30	<u>218 > 162</u>	10	6.3
		521 > 181	50				220 > 127	20	
		521 > 279	20				<u>368 > 57</u>	20	
		523 > 172	30		Propargite	20	368 > 107	30	14.6
		523 > 181	40				368 > 175	20	
		<u>523 > 281</u>	20				<u>342 > 69</u>	20	
		305 > 93	40		Propiconazole-1, 2 (Not seprated)	30	342 > 159	30	9.4
		305 > 97	30				344 > 161	30	
Diazinon	30	305 > 125	20	9.7			426 > 59	40	
		305 > 153	20		Silafluofen	10	426 > 168	40	22.5
		<u>305 > 169</u>	20				<u>426 > 287</u>	10	
Edifenphos	20	<u>311 > 109</u>	30	9.2	Trifluralin	30	<u>353 > 236</u>	20	10.9
		311 > 111	20						
		311 > 173	20						

Double line: The ions that achieved the highest sensitivity under the conditions for measurement for each component

Table 6 Confirmation result of MS/MS conditions (compound group B)

Compounds	Cone voltage (V)	Precursor ion >Product ion (m/z)	Collision energy (eV)	Retention time (min)	Compounds	Cone voltage (V)	Precursor ion >Product ion (m/z)	Collision energy (eV)	Retention time (min)
Atrazine	30	<u>216 > 104</u>	30	5.0	Flutolanil	30	324 > 65	50	6.6
		216 > 174	20				<u>324 > 93</u>	30	
Cadusafos	20	271 > 97	30	10.7	Iprobenfos	10	324 > 173	30	8.8
		<u>271 > 159</u>	10				324 > 242	20	
Clorpyrifos	20	<u>350 > 97</u>	30	14.0	Isofenphos	10	<u>289 > 91</u>	20	10.3
		350 > 198	20				306 > 91	30	
		352 > 97	30		346 > 121	40			
Clorpyrifos-methyl	10	352 > 200	20	11.1	Isofenphos-oxon (Contains in isofenphos)	10	<u>346 > 217</u>	20	7.2
		322 > 125	20				330 > 121	40	
		<u>324 > 125</u>	20				330 > 201	20	
Cyhalothrin-1	30	450 > 141	40	15.7	Isoprothiolane	10	<u>330 > 229</u>	10	6.9
		<u>450 > 225</u>	10				291 > 189	20	
		467 > 225	20				<u>291 > 231</u>	10	
Cyhalothrin-2	30	450 > 141	40	16.1	Malathion	20	331 > 99	20	6.9
		<u>450 > 225</u>	10				331 > 125	30	
		467 > 225	20				<u>331 > 127</u>	10	
Difenoconazole-1, 2 (Not separated)	30	<u>406 > 251</u>	20	10.6	Pendimethalin	10	348 > 99	30	14.3
		406 > 265	40				282 > 43	30	
		408 > 253	30				282 > 194	20	
Dimethoate	20	408 > 267	30	2.6	Phenothrin-1	20	<u>282 > 212</u>	10	18.9
		230 > 47	40				351 > 153	40	
		230 > 79	30				351 > 168	40	
EPN	20	<u>230 > 125</u>	20	11.2	Phenothrin-2	20	<u>351 > 183</u>	20	19.4
		324 > 77	50				351 > 153	40	
		324 > 110	50				351 > 168	40	
Ethion	20	<u>324 > 157</u>	20	13.5	Phenthoate	20	<u>351 > 183</u>	20	9.0
		385 > 129	40				321 > 79	40	
		<u>385 > 171</u>	20				321 > 107	30	
Ethofenprox	20	385 > 175	30	20.1	Phosmet	20	321 > 125	20	5.8
		385 > 199	20				321 > 135	20	
		394 > 107	40				<u>321 > 163</u>	10	
Fenbuconazole	30	<u>394 > 177</u>	10	8.0	Phorate	10	338 > 79	50	10.4
		394 > 183	30				338 > 107	30	
		<u>337 > 70</u>	20				338 > 135	20	
Fipronil	30	337 > 125	30	8.3	Tebuconazole	30	318 > 133	40	9.1
		337 > 129	30				<u>318 > 160</u>	10	
		437 > 367	20				335 > 160	20	
Fenitrothion	20	<u>437 > 368</u>	20	9.6	Terbufos	10	<u>261 > 75</u>	10	12.7
		454 > 367	20				<u>308 > 70</u>	20	
		454 > 368	20				308 > 125	30	
Fenthion	20	<u>278 > 109</u>	20	9.6	Fenvalerate-1, 2 (Not separated)	20	310 > 70	20	17.0
		278 > 125	20				310 > 127	30	
		279 > 125	20				289 > 57	20	
Fenvalerate-1, 2 (Not separated)	20	<u>279 > 169</u>	20	9.6	Terbufos	10	<u>289 > 103</u>	10	12.7
		420 > 125	40						
		420 > 167	10						
Fenvalerate-1, 2 (Not separated)	20	437 > 125	40	17.0	Terbufos	10	<u>437 > 167</u>	20	12.7
		437 > 125	40						
		<u>437 > 167</u>	20						

Double line: The ions that achieved the highest sensitivity under the conditions for measurement for each component

3.3 検量線

2.2 の 4) に従って調製した各農薬混合標準液各 2 μL を 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を用いて検量線を作成した。Table 5 及び 6 に記載の農薬のうち、B グループの EPN 以外の農薬について、各 20~400 ng/mL (注入量として 0.04~0.8 ng 相当量) の範囲で直線性を示した。参考までに、得られた EPN の検量線を Fig. 2 に示した。EPN は、どの測定イオンについても直線性を示さなかったため本法の対象外とした。ピーク高さを用いて検量線を作成した場合は、ほとんどの成分で直線性を示さなかった。

なお、当該検量線の濃度範囲は、各農薬を 0.02~0.4 mg/kg 含有する分析用試料を GC-MS 法に従い調製した最終試料溶液中の各農薬濃度範囲に相当する。

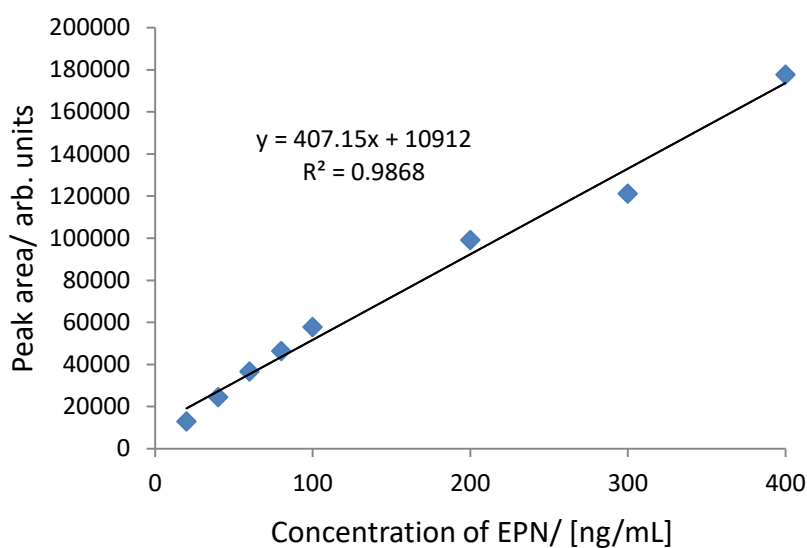


Fig. 2 Calibration curve of EPN by peak area
(Precursor ion > Product ion (m/z): 324 > 157)

3.4 妨害物質の検討

GC-MS 法による試験にて全ての対象農薬が不検出であった肉豚肥育用配合飼料、種牛飼育用配合飼料、とうもろこし及びアルファルファヘイ各 1 検体を用い、本法により調製した試料溶液を LC-MS/MS に注入し、得られた SRM クロマトグラムを確認した結果、いずれの農薬の保持時間においても定量を妨げるピークは認められなかった。本検討により得られた SRM クロマトグラムの一例を Fig. 3 に示した。Fig. 3 のとおり、種牛飼育用配合飼料はピリミホスメチルと同じ保持時間にピークが認められたが、プリカーサーイオン>プロダクトイオン: 306 > 108 (m/z) 以外のモニターイオン (306 > 125 及び 306 > 164 (m/z)) においても同様のピークが確認されたことからピリミホスメチルであると判断した。

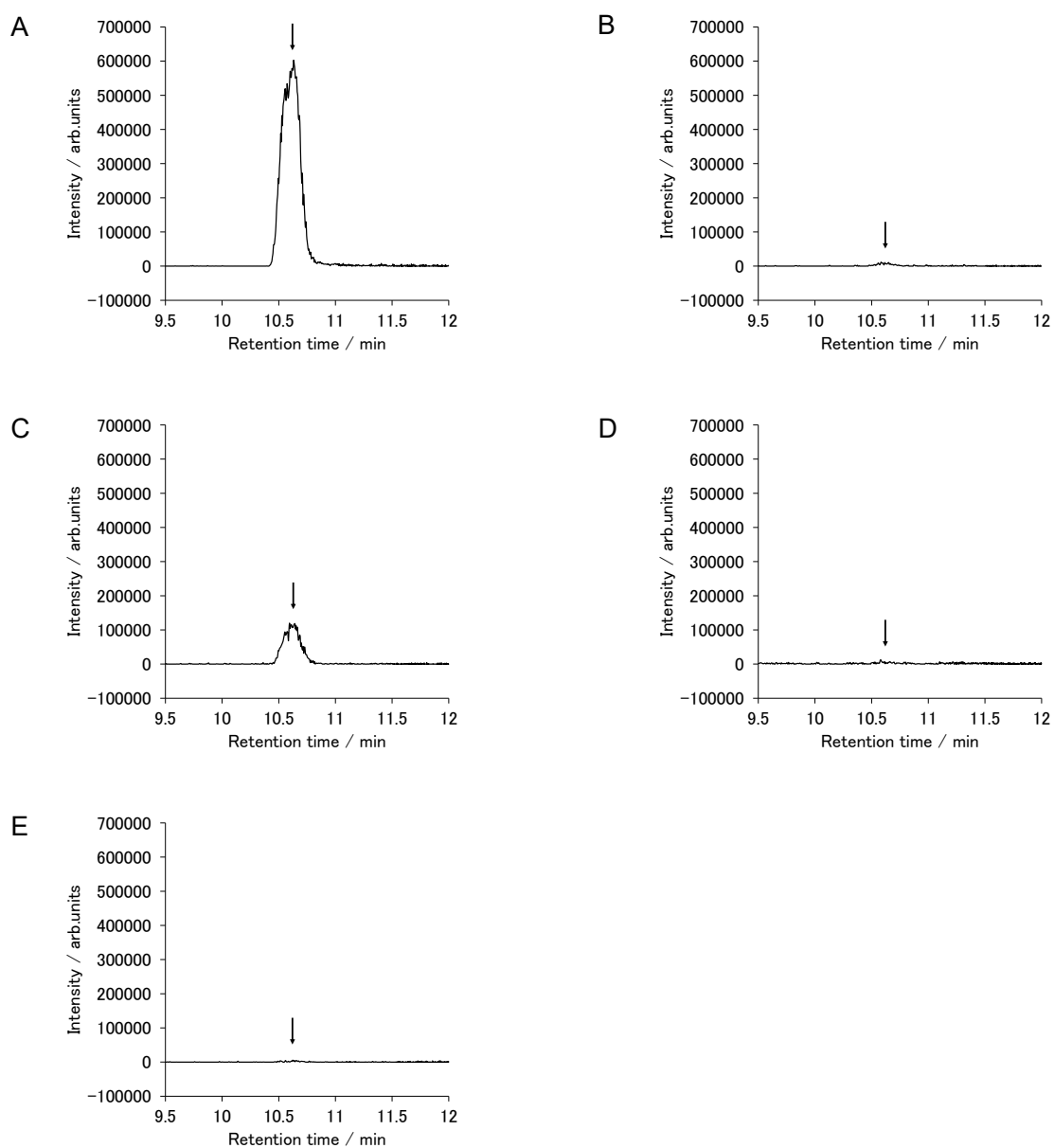


Fig. 3 Typical SRM chromatograms of pirimiphos-methyl in standard and blank sample solutions (LC-MS/MS conditions are shown in Table 4. Precursor ion > Product ion (m/z): 306 > 108, Cone voltage: 30 V, Collision energy: 30 eV. Arrows indicate the retention time of pirimiphos-methyl.)
 A: Standard solution (20 ng/mL),
 B~E: Blank sample solution (B: formula feed for growing pigs, C: formula feed for dairy cattle, D: corn and E: alfalfa hay)

3.5 マトリックス効果の確認

検量線の直線性を確認できた 47 成分 (A グループ 20 成分, B グループ 27 成分) について, 2.4 の 1)~5)により調製した肉豚肥育用配合飼料, 種牛飼育用配合飼料, とうもろこし及びアルファルファヘイのブランク試料溶液に各農薬として 0.1 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 100 ng/mL 相当量) を添加したマトリックス標準液について, 2.2 の 4)に従って調製した同濃度の標準液に

対するピーク面積比を確認した。

成分ごとに最もピーク強度が大きかった測定条件におけるマトリックス効果は Table 7 及び 8 のとおりであり、全ての試料についてマトリックス効果が 80~120 %となった農薬は A グループで 9 成分、B グループで 14 成分であった。一方、A グループの 2 成分（ペルメトリン及びプロパニル）及び B グループの 3 成分（シハロトリン、ジメトエート及びフィプロニル）では、全ての試料についてマトリックス効果が 80 %を下回った。

なお、GC-MS 法では、添加回収試験における回収率の目安を 50~200 %の範囲としていた。全ての試料についてマトリックス効果がこの範囲内であった農薬は A グループで 18 成分、B グループで 25 成分であり、全ての試料についてマトリックス効果が 50 %を下回った成分はなかった。

Table 7 Matrix effect study (group A)

Compounds	Precursor ion >Product ion (m/z)	Matrix effect ^{a)} (%)			
		Formula feed for growing pig	Formula feed for dairy cattle	Corn	Alfalfa hay
Alachlor	270 > 162	94.3	95.8	99.2	83.7
Bifenthrin	440 > 181	68.3	77.4	86.1	56.6
Bromobutide	312 > 194	98.9	95.4	100	89.4
deBr-Bromobutide	234 > 116	99.4	97.9	102	91.1
Chlorfenvinphos (Total amount) ^{b)}	359 > 155	98.2	93.4	98.3	86.6
Chlorpropham	214 > 172	95.1	93.6	101	72.4
Diazinon	305 > 169	103	103	104	105
Deltamethrin	523 > 281	83.7	81.4	83.3	70.9
Edifenphos	311 > 109	96.5	94.8	99.0	86.9
Fenpropathrin	350 > 125	91.2	88.4	92.9	78.7
Flucythrinate-1, 2 (Not separated)	469 > 199	96.8	88.7	95.4	71.1
Methidathion	303 > 85	92.5	89.7	96.3	57.9
(E)-Methomino-strobin	285 > 196	96.0	90.5	98.6	61.9
Permethrin (Total amount) ^{b)}	408 > 183	56.5	57.4	61.7	46.5
Pirimiphos-methyl	306 > 108	101	104	101	102
Propanil	218 > 162	63.0	58.8	66.3	49.3
Propargite	368 > 57	99.0	94.9	100	80.6
Propiconazole-1, 2 (Not separated)	342 > 69	82.7	79.0	84.6	69.8
Silafluofen	426 > 287	74.4	62.5	83.1	56.6
Trifluralin	353 > 236	101	98.9	96.6	90.4

$n = 3$

Light gray: 50 % or more but less than 80 %, Dark gray: less than 50 %

a) Ratio of peak area of pesticides in the presence of matrix to that in the absence of matrix

b) Components with isomers detected as two peaks is calculated as a total amount.

Table 8 Matrix effect study (group B)

Compounds	Precursor ion >Product ion (m/z)	Matrix effect ^{a)} (%)			
		Formula feed for growing pig	Formula feed for dairy cattle	Corn	Alfalfa hay
Atrazine	216 > 104	79.0	73.8	88.5	48.1
Cadusafos	271 > 159	96.3	92.5	96.8	88.2
Clorpyrifos	350 > 97	102	96.2	99.5	89.8
Clorpyrifos-methyl	324 > 125	100	97.3	100	98.8
Cyhalothrin (Total amount) ^{b)}	450 > 225	71.6	71.2	76.4	59.6
Difenoconazole-1, 2 (Not separated)	406 > 251	82.1	74.9	83.9	63.7
Dimethoate	230 > 125	72.2	56.3	77.8	29.0
Ethion	385 > 171	96.7	91.1	96.0	84.2
Ethofenprox	394 > 177	60.8	79.2	86.3	57.7
Fenbuconazole	337 > 70	82.1	77.6	83.1	65.6
Fenitrothion	278 > 109	96.8	97.2	95.3	104
Fenthion	279 > 169	92.2	87.7	92.9	86.7
Fenvalerate-1, 2 (Not separated)	437 > 167	82.1	79.7	78.7	74.0
Fipronil	437 > 368	75.9	72.5	78.7	64.7
Flutolanil	324 > 93	96.3	88.0	97.1	72.0
Isofenphos	346 > 217	86.2	74.0	78.0	75.6
Isofenphos-oxon	330 > 229	99.0	96.1	97.9	96.7
Isoprothiolane	291 > 231	97.3	92.7	97.8	82.4
Iprobenfos	289 > 91	97.6	94.0	97.7	91.0
Malathion	331 > 127	101	97.7	100	89.1
Pendimethalin	282 > 212	97.8	93.1	95.4	87.4
Phenothrin (Total amount) ^{b)}	351 > 183	74.9	75.7	80.3	59.1
Phenthoate	321 > 163	94.3	91.5	98.4	85.9
Phorate	261 > 75	99.3	102	99.3	97.7
Phosmet	318 > 160	85.1	77.1	86.7	51.8
Tebuconazole	308 > 70	80.7	77.4	82.4	71.0
Terbufos	289 > 103	101	96.6	100	98.7

$n = 3$

Light gray: 50 % or more but less than 80 %, Dark gray: less than 50 %

a)~b) Refer to the footnote of Table 7

4 まとめ

農薬一斉法の対象農薬 64 成分について、LC-MS/MS を用いた同時定量法の測定条件を検討したところ、以下の結果が得られ、一部の成分について測定が可能であると考えられた。

- 1) 標準液の希釈溶媒をアセトニトリル又はアセトニトリル-水 (1+1) とした場合のクロマトグラムを比較したところ、ピーク形状及び信号強度ともに後者の方が良好であった。
- 2) 各種報告を参考にモニターイオンを設定し、コーン電圧を 10~40 V の範囲、コリジョンエネルギーを 10~50 eV の範囲でそれぞれ変化させて測定したところ、64 成分のうち 48 成分についての測定イオン条件を見出した。

- 3) 検量線は、2)で測定イオン条件を見出した 48 成分のうち、EPN を除く 47 成分についてそれぞれ 20~400 ng/mL 相当量（注入量として 0.04~0.8 ng 相当量）の範囲で直線性を示した。なお、当該検量線の濃度範囲は、各農薬を 0.02~0.4 mg/kg 含有する分析用試料を GC-MS 法に従い調製した最終試料溶液中の濃度範囲に相当する。
- 4) 肉豚肥育用配合飼料，種牛飼育用配合飼料，とうもろこし及びアルファルファヘイについて，本法に従って得られたクロマトグラムには各農薬の定量を妨げるピークは認められなかった。
- 5) 本法に従って得られた試料溶液についてマトリックス効果を確認した結果，マトリックス効果が 80~120 % となった農薬は A グループで 9 成分，B グループで 14 成分であった。また，全ての試料についてマトリックス効果が 50~100 % であった農薬は A グループで 18 成分，B グループで 25 成分であり，全ての試料についてマトリックス効果が 50 % を下回った成分はなかった。

文 献

- 1) 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，令和 5 年 12 月 1 日，5 消安第 4714 号 (2023).
- 2) 農林水産省畜産局長通知：飼料の有害物質の指導基準及び管理基準について，昭和 63 年 10 月 14 日，63 畜 B 第 2050 号 (1988).
- 3) 山本 謙吾，友成 真菜，金丸 正：残留農薬分析業務における分析法の検討（希釈の効果を用いた LC-MS/MS による茶中の残留農薬一斉試験法），農薬調査研究報告，14，14-30 (2021).
- 4) 佐々木 秀幸，代市 守，鈴木 徹也，岸田 繁二，臼井 裕一，野村 哲也：残留農薬分析業務における分析法の検討（LC/MS/MS を用いた大豆中の残留農薬一斉試験法の妥当性評価），農薬調査研究報告，11，23-31 (2018).
- 5) 佐々木 秀幸，守山 智章，山田 篤司，鈴木 徹也，臼井 裕一，野村 哲也：残留農薬分析業務における分析法の検討（LC-MS/MS を用いた野菜・果実類中の残留農薬一斉試験法の同時分析法の開発），農薬調査研究報告，10，30-39 (2017).
- 6) 佐々木 秀幸，守山 智章，山田 篤司，鈴木 徹也，青山 吉一，臼井 裕一：残留農薬分析業務における分析法の検討（LC-MS/MS による一斉試験法（野菜・果実類）対象農薬追加の妥当性検証），農薬調査研究報告，9，46-59 (2016).
- 7) 小澤 祐子，細川 明香，山森 泰大，竹田 正美：LC-MS/MS による農産物中の残留農薬一斉試験法の妥当性評価，石川保環研報，56，26-30 (2019).
- 8) 水口 竜人，小澤 祐子，由田 洋一，新家 薫子，砺波 和子：LC-MS/MS を用いた農産物中の残留農薬一斉試験法の妥当性評価について（第 2 報），石川保環研報第，54，1-11 (2017).
- 9) 菅谷 京子，齋藤 仁美，小篠 智江，徳田 侑子，市本 範子：LC-MS/MS による農産物中残留農薬測定項目拡大の検討，栃木県保健環境センター年報，27，26-30 (2021).
- 10) 中野 裕太，長澤 英子，内田 丈晴，坂牧 寛：アンモニア溶液を溶離液とする LC-MS/MS による残留農薬の高感度検出，分析化学，69 (3)，141-150 (2020).
- 11) 上野 英二，渡邊 美奈恵，梅村 優子，井上 知美，猪飼 誉友：LC-MS/MS による農産物中の残留農薬一斉分析法の妥当性評価，日本食品衛生学会誌，55 (6)，290-296 (2014).
- 12) 大垣 有紀，林 克弘，川合 啓之，志村 恭子：農産物残留農薬一斉分析法の検討，三重保環研年報，13，44-59 (2011).