

## 4 飼料用イネ中のピメトロジンの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による定量法

武田 然也\*

### Determination of Pymetrozine in Rice Straw, Whole-crop Rice Silage and Paddy Rice for Feed by LC-MS/MS

Zenya TAKEDA\*

(\* Food and Agricultural Materials Inspection Center, Nagoya Regional Center  
(Now Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of Japan))

An analytical method was developed to determine the level of pymetrozine in rice straw, whole-crop rice silage and paddy rice for feed using liquid chromatograph-tandem mass spectrometer (LC-MS/MS).

After adding water to the samples, pymetrozine was extracted with methanol and the resulting solutions were filtered. The filtrate was then diluted with methanol to a final volume of 200 mL. The sample solution was purified with an octadecylsilylated silica gel mini column (InertSep Slim-J C18-B from GL sciences Inc.; Tokyo, Japan) and injected into the LC-MS/MS for determination of the pymetrozine level. LC separation was carried out on an ODS column (Inertsil ODS-SP, 2.1 mm i.d. × 150 mm, 5 μm from GL Sciences Inc.) using a gradient with 2 mmol/L ammonium acetate solution and methanol as the mobile phase. In the MS/MS analysis, positive mode electrospray ionization (ESI+) was used.

Spike tests were conducted on rice straw, whole-crop rice silage, and paddy rice spiked with 1, 0.1 or 0.01 mg/kg of pymetrozine. The resulting mean recoveries ranged from 87.1 to 97.0 %, and the repeatability in terms of relative standard deviations (RSD<sub>r</sub>) was not more than 9.8 %.

A collaborative study was conducted in nine laboratories using rice straw and paddy rice spiked with 0.1 mg/kg of pymetrozine. The mean recovery, repeatability and reproducibility in terms of relative standard deviations (RSD<sub>r</sub> and RSD<sub>R</sub>) and HorRat, respectively, were 90.7 %, 1.8 %, 6.6 % and 0.30 for rice straw and 92.6 %, 2.9 %, 6.8 % and 0.31 for paddy rice.

This method was validated and established for use in the inspection of pymetrozine in rice straw, whole-crop rice silage and paddy rice for feed.

Key words: pymetrozine ; liquid chromatograph-tandem mass spectrometer (LC-MS/MS) ; electrospray ionization (ESI) ; feed, rice straw, whole-crop rice silage, paddy rice

キーワード：ピメトロジン；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；稲わら；稲発酵粗飼料；粃米

---

\* 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 農林水産省消費・安全局畜水産安全管理課

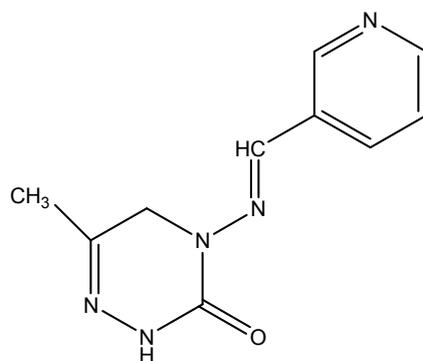
## 1 緒 言

ピメトロジンは1986年にチバガイギー社（現 シンジェンタ社）により開発されたピリジンアゾメチン系殺虫剤であり，半翅目昆虫（アブラムシ類，コナジラミ類，ウンカ類，ヨコバイ類等）にのみ選択的な殺虫活性を発現する<sup>1)</sup>。

我が国では，飼料の有害物質の指導基準において，稲わら中でその指導基準は1 mg/kgと設定されている<sup>2)</sup>。定量法としては，厚生労働省通知<sup>3)</sup>により，紫外吸光光度型検出器付き高速液体クロマトグラフ及び液体クロマトグラフ質量分析計（以下「LC-MS」という。）を用いた個別試験法，並びにLC-MSを用いた農薬等の一斉試験法が示されているが，飼料に適用できる定量法はない。

今回，一般財団法人日本食品分析センターが「平成22年度飼料中の有害物質等残留基準を設定するための分析法開発及び家畜等への移行調査委託事業」において開発した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。）を用いた定量法<sup>4)</sup>（以下「JFRL法」という。）を基に，飼料分析基準<sup>5)</sup>への適用の可否を検討したので，その概要を報告する。

参考にピメトロジンの構造式等をFig. 1に示した。



Pymetrozine

(E)-4,5-dihydro-6-methyl-4-(3-pyridylmethyleneamino)-1,2,4-triazin-3(2H)-one  
C<sub>10</sub>H<sub>11</sub>N<sub>5</sub>O MW: 217.2 CAS No.: 123312-89-0

Fig. 1 Chemical structure of pymetrozine

## 2 実験方法

### 2.1 試料

稲わら及び籾米はそれぞれ1 mmの網ふるいを通過するまで粉砕した。稲発酵粗飼料は60℃で5時間乾燥後，同様に粉砕した。

### 2.2 試薬

1) メタノールは液体クロマトグラフ用を用いた。水は超純水（JIS K 0211に定める5218の超純水）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。

2) ピメトロジン標準液

ピメトロジン標準品（和光純薬工業製，純度100.0%）25 mgを正確に量って50 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ピメトロジン標準原液を調製した（この液1 mLは，ピメトロジンとして0.5 mg ( $f=1.00$ )を含有する。）。

使用に際して，ピメトロジン標準原液5 mLを50 mLの全量フラスコに正確に入れ，更に標

線までメタノールを加えて、1 mL 中にピメトロジンとして 50  $\mu\text{g}$  を含有する液を調製した。この液の一定量を、水-メタノール (7+3) で正確に希釈し、1 mL 中にピメトロジンとしてそれぞれ 0.1, 1, 5, 10, 15 及び 20 ng を含有する各標準液を調製した。

### 2.3 装置及び器具

- 1) 乾燥器：ADVANTEC 製 DRM420DB
- 2) 粉碎機：Retsch 製 ZM-100
- 3) 乾牧草用粉碎機：Retsch 製 SM-100
- 4) 振とう機：タイテック製 レシプロシェーカーSR-2W
- 5) ブフナー漏斗：桐山製作所製 SU-95
- 6) オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム：ジューエルサイエンス製 InertSep Slim-J C18-B (充てん剤量 500 mg) にリザーバーを連結したもの
- 7) 吸引マニホールド：ジューエルサイエンス製 GL-SPE 吸引マニホールド
- 8) LC-MS/MS :  
LC 部：Waters 製 ACQUITY UPLC System  
MS 部：Waters 製 ACQUITY TQ Detector

### 2.4 定量方法

#### 1) 抽出

分析試料 10.0 g を量って 300 mL の共栓三角フラスコに入れ、水 30 mL (粃米は 20 mL) を加え、30 分間静置後、更に炭酸カリウム溶液 (7 w/v%) 5 mL 及びメタノール 120 mL (粃米は 100 mL) を加え、30 分間振り混ぜて (250 rpm) 抽出した。200 mL の全量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メタノール 50 mL で洗浄し、同様に吸引ろ過した。更に全量フラスコの標線までメタノールを加えた。この液 2 mL を 50 mL のなす形フラスコに正確に入れ、水 20 mL を加えて、カラム処理に供する試料溶液とした。

#### 2) カラム処理

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムをメタノール 5 mL 及び水 5 mL で順次洗浄した。試料溶液をミニカラムに入れ、流速 1 mL/min 程度で吸引して液面が充てん剤の上端に達するまで流出させた。10 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水-メタノール (7+3) 4 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てピメトロジンを溶出させた。全量フラスコの標線まで同溶媒を加え、LC-MS/MS による測定に供する試料溶液とした。

#### 3) LC-MS/MS による測定

試料溶液及び各ピメトロジン標準液各 5  $\mu\text{L}$  を LC-MS/MS に注入し、選択反応検出 (SRM) クロマトグラムを得た。測定条件を Table 1 及び 2 に示した。

Table 1 Operating conditions of LC-MS/MS

Column	Inertsil ODS-SP (2.1 mm i.d. × 150 mm, 5 μm)
Mobile phase	2 mmol/L ammonium acetate solution-methanol (4:1) → 15 min → (1:1) (5 min)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temperature	40 °C
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Mode	Positive
Ion source temperature	110 °C
Desolvation gas	N <sub>2</sub> (800 L/h, 400 °C)
Cone gas	N <sub>2</sub> (50 L/h)
Capillary voltage	1 kV

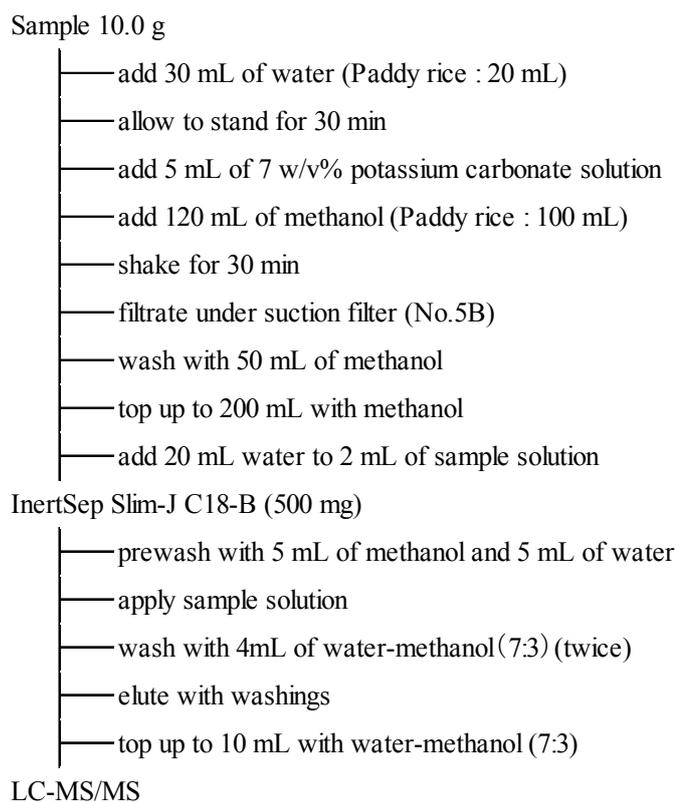
Table 2 MS/MS parameters

Target	Precursor ion ( <i>m/z</i> )	Product ion ( <i>m/z</i> )	Qualifier ion ( <i>m/z</i> )	Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
Pymetrozine	218	105	-	35	20
		-	78	35	40

## 4) 計 算

得られた SRM クロマトグラムからピーク面積及び高さを求めて検量線を作成し、試料中のピメトロジン量を算出した。

なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。



Scheme 1 Analytical procedure for pymetrozine

### 3 結果及び考察

#### 3.1 検量線

2.2 の 2) に従って調製したピメトロジン標準液各 5  $\mu$ L 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及び高さを用いて検量線を作成した。得られた検量線の一例は、Fig. 2 のとおりであり、ピメトロジンは各 0.1~20 ng/mL 相当量（注入量として 0.0005~0.1 ng 相当量）の範囲で直線性を示した。

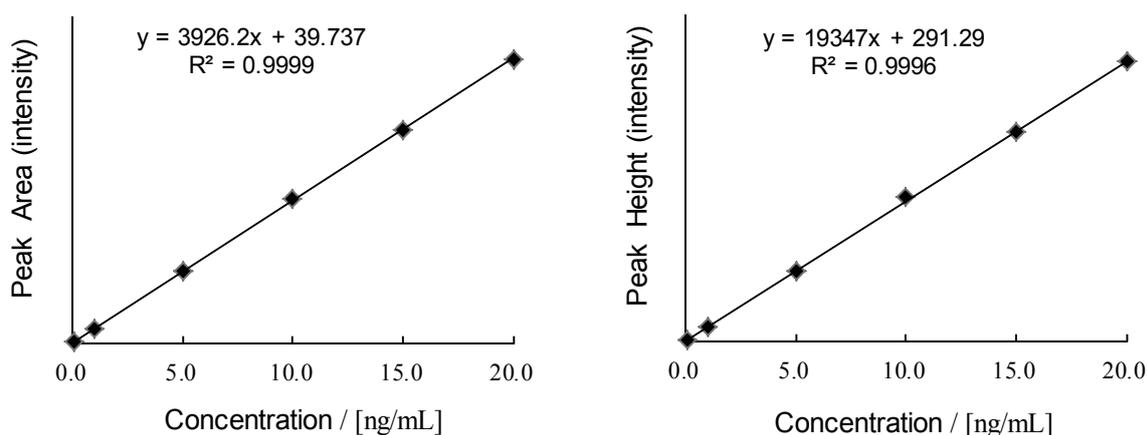


Fig. 2 Calibration curves of pymetrozine by peak area (Left) and peak height (Right)

### 3.2 カラム処理における溶出画分の確認

2.4 の 1)により調製したカラム処理に供する試料溶液にピメトロジンとして 1 mg/kg 相当量を添加（最終試料溶液中で 10 ng/mL 相当量）し、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムからの溶出画分を確認した。その結果は Table 3 のとおりであり、ピメトロジンは水-メタノール（7+3）6 mL で全量溶出していた。JFRL 法<sup>4)</sup>では 10 mL で溶出させているが、溶出液を受ける容器が 10 mL 全量フラスコであり標線を越える恐れがあることから、本法では、カラム処理に供する試料溶液が入っていたなす形フラスコを水-メタノール（7+3）4 mL ずつで 2 回洗浄し、その洗液を順次ミニカラムに加えてピメトロジンを溶出させた後、全量フラスコの標線まで同溶媒を加え LC-MS/MS による測定に供する試料溶液とした。

Table 3 Elution pattern of pymetrozine from InertSep Slim-J C18-B

Feed types	Recovery <sup>a)</sup> (%)					Total
	Water-methanol (7:3)					
	0~4 mL	4~6 mL	6~8 mL	8~10 mL	10~12 mL	
Rice straw	93	5	0	0	0	98
Whole-crop rice silage	101	4	0	0	0	105
Paddy rice	99	0	0	0	0	99

a) Mean ( $n=2$ )

### 3.3 妨害物質の検討

稲わら 2 検体、稲発酵粗飼料 2 検体及び粃米 2 検体を試料として、2.4 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ところ、いずれの試料においても定量を妨げるピークは認められなかった。

### 3.4 添加回収試験

飼料用イネ（稲わら，稲発酵粗飼料及び粃米）にピメトロジンとして各 1, 0.1 及び 0.01 mg/kg 相当量を添加した試料（最終試料溶液中で各 10, 1.0 及び 0.1 ng/mL 相当量）を用いて 3 点併行による添加回収試験を実施し，回収率及び繰返し精度を求めた。

その結果は Table 4 のとおり，ピメトロジンの平均回収率は 87.1~97.0 %，その繰返し精度は相対標準偏差（RSD<sub>r</sub>）として 9.8 % 以下であり，良好な成績が得られた。

なお，得られた SRM クロマトグラムの一例を Fig. 3 に示した。

Spiked level (mg/kg)	Rice straw		Whole-crop rice silage		Paddy rice	
	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> (%)
1	87.1	0.7	88.0	2.3	97.0	1.0
0.1	90.0	1.2	91.2	8.5	96.8	3.7
0.01	89.3	3.0	88.4	9.8	94.2	6.1

a) Mean ( $n=3$ )

b) Relative standard deviation of repeatability

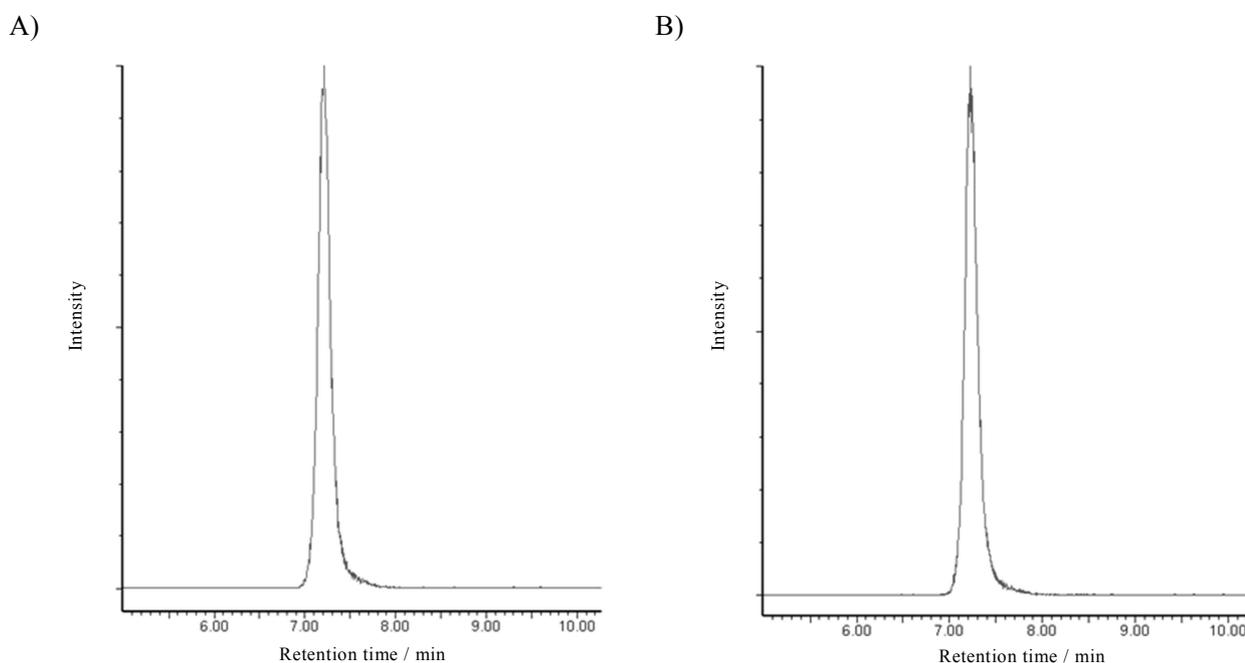


Fig. 3 Selected reaction monitoring chromatograms

LC-MS/MS conditions are shown in Table 1 and 2.

- A) Sample solution of rice straw spiked at 1 mg/kg pymetrozine.  
 B) Standard solution (The amount of pymetrozine is 0.05 ng.)

### 3.5 定量下限及び検出下限

本法の定量下限及び検出下限を確認するため、飼料用イネにピメトロジンを添加し、添加回収試験により得られるピークの  $SN$  比が 10 及び 3 となる濃度を求めた。

その結果、得られたピークの  $SN$  比が 10 以上となる濃度は 0.01 mg/kg であり、また、 $SN$  比が 3 となる濃度は 0.003 mg/kg であったことから、定量下限は 0.01 mg/kg、検出下限は 0.003 mg/kg であった。

なお、Table 4 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結果は良好であった。

### 3.6 共同試験

本法の室間再現精度を確認するため、濃度非通知、かつ非明示の 2 点反復で共通試料による共同試験を実施した。

共通試料としては、稲わら及び籾米にピメトロジンとして 0.1 mg/kg 相当量（分析用試料 10 g に対して 1 mL 中に 1  $\mu$ g を含有する標準液 1 mL 添加）を、各試験室にて分析開始の前日に添加して調製した試料を用いた。参加試験室は、一般社団法人日本科学飼料協会科学飼料研究センター、一般財団法人食品環境検査協会、協同飼料株式会社研究所、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、同札幌センター、同仙台センター、同名古屋センター、同神戸センター及び同福岡センター（計 9 試験室）であった。結果の解析については、国際的にハーモナイズされた共同試験に関する手順<sup>6), 7)</sup>を参考に、Cochran 検定、外れ値 1 個の Grubbs 検定及び外れ値 2 個の Grubbs 検定を行い、外れ値の有無を確認した上で平均回収率、平均回収率、繰返し精度 ( $RSD_r$ ) 及び室間再現精度 ( $RSD_R$ ) を算出し、得られた  $RSD_R$  から、修正 Horwitz 式を用いて HorRat を求めた。

結果は Table 5 のとおりであった。稲わら及び籾米について、平均回収率はそれぞれ 90.7 及び 92.6 %、 $RSD_r$  はそれぞれ 1.8 及び 2.9 %、 $RSD_R$  はそれぞれ 6.6 及び 6.8 %、HorRat はそれぞれ 0.30 及び 0.31 であった。

参考のため、各試験室で使用した LC-MS/MS の機種等を Table 6 に示した。

Table 5 Collaborative study results of pymetrozine

Lab.No.	Feed types			
	Rice straw (mg/kg)		Paddy rice (mg/kg)	
1	0.100 <sup>a)</sup>	0.0797 <sup>a)</sup>	0.0866	0.0855
2	0.0905	0.0894	0.0951	0.0962
3	0.0819	0.0836	0.0844	0.0898
4	0.0919	0.0939	0.100	0.109
5	0.0906	0.0873	0.0914	0.0920
6	0.0959	0.0944	0.0939	0.0932
7	0.0858	0.0834	0.0899	0.0930
8	0.0894	0.0911	0.0873	0.0852
9	0.103	0.0994	0.0969	0.0972
Spiked level (mg/kg)	0.1		0.1	
Mean value <sup>b)</sup> (mg/kg)	0.0907		0.0926	
Recovery <sup>b)</sup> (%)	90.7		92.6	
RSD <sub>F</sub> <sup>c)</sup> (%)	1.8		2.9	
RSD <sub>R</sub> <sup>d)</sup> (%)	6.6		6.8	
PRSD <sub>R</sub> <sup>e)</sup> (%)	22		22	
HorRat	0.30		0.31	

a) Data excluded by Cochran test

b) Rice straw:  $n=16$  ; Paddy rice:  $n=18$

c) Relative standard deviation of repeatability within laboratory

d) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

e) Predicted relative standard deviation of reproducibility between laboratories  
calculated from the modified Horwitz equation

Table 6 Instruments used in the collaborative study

Lab. No.	LC-MS/MS	LC column (i.d.×length, particle size)
1	LC: Agilent Technologies 1200 Series MS/MS: Agilent Technologies 6410	GL Sciences Inertsil ODS-SP (2.1 mm ×150 mm, 5 μm)
2	LC: Shimadzu LC-20A MS/MS: AB SCIEX API-4000	GL Sciences Inertsil ODS-SP (2.1 mm ×150 mm, 5 μm)
3	LC: Agilent Technologies 1200 Series MS/MS: Agilent Technologies 6410	GL Sciences Inertsil ODS-SP (2.1 mm ×150 mm, 5 μm)
4	LC: Waters ACQUITY UPLC MS/MS: Waters Quattro Premier XE	GL Sciences Inertsil ODS-SP (2.1 mm ×150 mm, 5 μm)
5	LC: Waters 2695 MS/MS: Micromass Quattro micro API	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm ×150 mm, 3.5 μm)
6	LC: Waters ACQUITY UPLC MS/MS: Waters Xevo TQD	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm ×150 mm, 5 μm)
7	LC: Waters ACQUITY UPLC MS/MS: Waters TQD	GL Sciences Inertsil ODS-SP (2.1 mm ×150 mm, 5 μm)
8	LC: Waters ACQUITY UPLC MS/MS: Waters TQD	GL Sciences Inertsil ODS-SP (2.1 mm ×150 mm, 5 μm)
9	LC: Waters ACQUITY UPLC MS/MS: Waters TQD	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm ×150 mm, 5 μm)

#### 4 まとめ

飼料用イネに残留するピメトロジンについて、JFRL 法を基に、LC-MS/MS を用いた定量法の飼料分析基準への適用の可否について検討したところ、カラム処理における溶出溶媒量を 10 mL から 8 mL に変更することで、以下の結果が得られ、適用が可能であると考えられた。

- 1) 検量線は、0.1~20 ng/mL (注入量として 0.0005~0.1 ng) の範囲で直線性を示した。
- 2) 飼料用イネについて、本法に従って得られたクロマトグラムには、定量を妨げるピークは認められなかった。
- 3) 飼料用イネにピメトロジンとして 1, 0.1 及び 0.01 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 10, 1 及び 0.1 ng/mL 相当量) を添加し、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) 本法のピメトロジンの定量下限は試料中で 0.01 mg/kg, 検出下限は 0.003 mg/kg であった。
- 5) 稲わら及び粃米にピメトロジンとしてそれぞれ 0.1 mg/kg 相当量を添加した試料を用いて 9 試験室において本法に従い共同試験を実施したところ、良好な結果が得られた。

## 謝 辞

共同試験に参加していただいた一般社団法人日本科学飼料協会科学飼料研究センター，一般財団法人食品環境検査協会及び協同飼料株式会社研究所における関係者各位に感謝の意を表します。

## 文 献

- 1) 食品安全委員会：ピメトロジン農薬評価書，平成 22 年 9 月 (2010).
- 2) 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).
- 3) 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 0124001 号 (2005).
- 4) 財団法人日本食品分析センター：平成 20 年度飼料中の有害物質等残留基準を設定するための分析法開発及び家畜等への移行調査委託事業（飼料中の有害物質等の分析法の開発）(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).
- 6) Horwitz, W., Protocol for Design, Conduct and Interpretation of Method - Performance Studies, *Pure & appl. Chem.*, 67(2), 331-343 (1995).
- 7) AOAC Int. (2012). Appendix D: Guidelines for Collaborative Study Procedures to Validate Characteristics of a Method of Analysis. In *Official Methods of Analysis of AOAC Int.* 19 ed. volume II, Gaithersburg, MD, USA