

3 飼料中のジクワット及びパラコートの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による同時分析法の開発

伊澤 淳修^{*1}, 加藤 耕一^{*1}, 桑原 正良^{*1}, 塩津 萌々子^{*2}, 山上 陽平^{*2}, 保田 伊世^{*2}

Development of Simultaneous Determination Method of Diquat and Paraquat in Feed by LC-MS/MS

IZAWA Atsunobu^{*1}, KATO Koichi^{*1}, KUWABARA Masayoshi^{*1}, SHIOTSU Momoko^{*2},
YAMAGAMI Yohei^{*2} and YASUDA Iyo^{*2}

(^{*1} Kobe Regional Center, Food and Agricultural Materials Inspection Center (FAMIC),

^{*2} Fertilizer and Feed Inspection Department, FAMIC)

We have developed a simultaneous quantitative determination method of the concentration of diquat and paraquat in feed using a liquid-chromatograph electrospray-ionization tandem mass spectrometer (LC-ESI-MS/MS).

Diquat and paraquat were extracted with water and sulfuric acid by heating under reflux, and the extracted solution was filtered. The filtrate was then purified with two types of solid phase extraction (SPE) columns (Oasis MCX and Oasis MAX, Waters Co.; Milford, MA, USA). Having oxidized these compounds, the sample solution was purified with an SPE column (Oasis HLB, Waters Co.), and injected into an LC-MS/MS to determine the concentration of diquat and paraquat. LC separation was then carried out on an ODS column (Inertsil ODS-3, 2.1 mm i.d. × 150 mm, 4 μm, GL Sciences Inc.; Tokyo, Japan) with a gradient of 0.1 v/v% formic acid solution and methanol as a mobile phase. In the MS/MS analysis, the positive mode electrospray ionization (ESI+) was used.

Recovery tests were conducted on formula feed for layers, as well as corn, rye, ryegrass hay, rice straw and whole-crop rice silage (WCRS). Diquat was added at different levels as following: 0.02 and 0.15 mg/kg for formula feed for layers; 0.02 and 0.1 mg/kg for corn; 0.01 and 0.06 mg/kg for rye; 1 and 100 mg/kg for ryegrass hay; 0.01 and 0.05 mg/kg for rice straw; 0.004 and 0.05 mg/kg for WCRS. Paraquat was added at different levels as following: 0.02 and 0.15 mg/kg for formula feed for layers; 0.02 and 0.2 mg/kg for corn; 0.01 and 0.1 mg/kg for rye; 1 and 5 mg/kg for ryegrass hay; 0.01 and 0.3 mg/kg for rice straw; 0.004 and 0.05 mg/kg for WCRS. The resulting mean recoveries ranged from 79.4 % to 108 % for diquat, and 73.4 % to 113 % for paraquat respectively. The repeatability in the form of the relative standard deviation (RSD_r) was less than 17 % for diquat and paraquat.

Key words: diquat; paraquat; liquid-chromatograph tandem mass spectrometer (LC-MS/MS); electrospray ionization (ESI); feed

キーワード：ジクワット；パラコート；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

ジクワット及びパラコートは、Imperial Chemical Industries (現 Syngenta) (スイス) により開発

^{*1} 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

^{*2} 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

された非選択性接触型のピピリジリウム系除草剤であり、植物の光合成により、ジクワットでは過酸化物が、パラコートでは活性酸素が発生し、植物細胞を破壊することで除草効果を示すと考えられている^{1),2)}。

ジクワットは、我が国では1963年に初回農薬登録されており、飼料中の基準値³⁾としては、えん麦、小麦及びマイロで2 mg/kg、大麦で5 mg/kg、とうもろこしで0.05 mg/kg、ライ麦で0.03 mg/kg、牧草で100 mg/kgが設定されている。飼料中の管理基準値⁴⁾としては、稲わら及び稲発酵粗飼料（以下「WCRS」という。）で0.05 mg/kgが設定されている。海外ではヨーロッパ、アジア等、数多くの国で登録されており^{1),5)}、ジャガイモ、大豆やとうもろこし等の穀類や果樹等に使用されている⁶⁾。

パラコートは、我が国では1965年に初回農薬登録されており、飼料中の基準値³⁾としては、えん麦及びマイロで0.5 mg/kg、大麦、小麦及びライ麦で0.05 mg/kg、とうもろこしで0.1 mg/kg、牧草で5 mg/kgと設定されている。飼料中の管理基準値⁴⁾としては、稲わらで0.3 mg/kg、WCRSで0.05 mg/kgと設定されている。海外では、アメリカ、カナダ、オーストラリア、南米等で登録^{7),8)}されており、大豆、とうもろこし等の穀類や果樹、牧草等に使用されている^{6),8),9)}。

飼料中のジクワット及びパラコートの分析法としては、飼料分析基準¹⁰⁾において液体クロマトグラフによる個別分析法が記載されているが、定量下限と基準値が一致するものがあり、また、発がんのおそれがあるクロロホルムを使用することから、分析法の改良が急務となっている。

そこで、一般財団法人日本食品分析センターが「平成28年度飼料中の農薬分析法開発委託事業」において開発した飼料中のジクワット及びパラコートの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¹¹⁾（以下「JFRL法」という。）について、飼料分析基準への記載の可否を検討することとした。令和3年度の検討では検量線、マトリックス効果及び妨害物質の確認、ガラス器具への残留除去方法等の検討を行った¹²⁾。令和4年度は引き続き添加回収試験、定量下限及び検出下限の確認を実施したので、その概要を報告する。

なお、飼料分析基準では、単にジクワットと記載した場合はジクワット二臭化物を、またパラコートと記載した場合はパラコート二塩化物を指すと規定されていることから、本検討内でもジクワット又はパラコートと記載した場合には同様の扱いとした。

参考にジクワット及びパラコートの構造式等を Fig. 1 に示した。

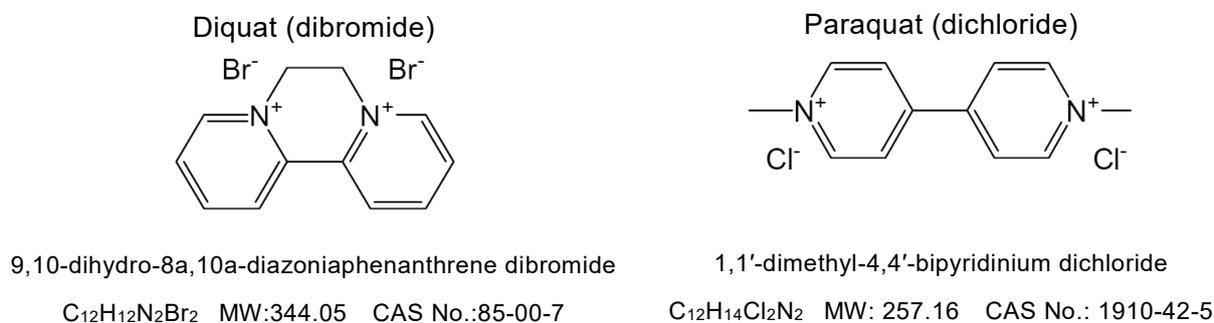


Fig. 1 Chemical structures of diquat and paraquat

2 実験方法

2.1 試料

成鶏飼育用配合飼料，とうもろこし，乾牧草（ライグラス乾草）及び稲わらはそれぞれ目開き 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．WCRS は 60 °C で 10 時間乾燥し，更に室内に静置して風乾した後，同様に粉碎し分析用試料とした．市販のライ麦（食用全粒粉細挽き）は 1 mm 網ふるいを通過したものを分析用試料とした．

なお，検討に用いた配合飼料を Table 1 に示した．

Table 1 Compositions of the formula feed

Formula feed type	Ingredient types	Proportion (%)	Ingredients
For layers	Grains	54	Corn
	Oil seed meal	25	Soybean meal, rapeseed meal, corn gluten meal, corn germ meal
	Animal by-products	2	Fish meal
	Brans	1	Rice bran
	Others	18	Calcium carbonate, animal fat, food by-products, corn steep liquor, calcium phosphate, salt, paprika extract, 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．メタノールは残留農薬・PCB 試験用（LC-MS/MS の溶離液のみ LC-MS 用（富士フィルム和光純薬製））を用いた．ギ酸は LC-MS 用（富士フィルム和光純薬製）を用いた．塩化アンモニウム，塩酸，水酸化ナトリウム，フェリシアン化カリウム及び硫酸は試薬特級を用いた．水は Milli-Q Integral 5（Merck Millipore 製）により精製した超純水（JIS K0211 の 5218 に定義された超純水）を用いた．

2) ジクワット標準原液

二臭化ジクワット一水和物標準品（富士フィルム和光純薬製，純度 99.0 %）26.31 mg を量って 50 mL の全量フラスコに入れ，塩酸（0.01 mol/L）を加えて溶かし，更に標線まで塩酸（0.01 mol/L）を加えてジクワット標準原液を調製した（この液 1 mL は，ジクワットとして 0.5 mg を含有）．

3) パラコート標準原液

パラコートジクロリド標準品（富士フィルム和光純薬製，純度 98.0 %）25 mg を量って 50 mL の全量フラスコに入れ，塩酸（0.01 mol/L）を加えて溶かし，更に標線まで塩酸（0.01 mol/L）を加えてパラコート標準原液を調製した（この液 1 mL は，パラコートとして 0.5 mg を含有）．

4) 混合標準原液

ジクワット標準原液 1 mL 及びパラコート標準原液 1 mL を 25 mL の全量フラスコに正確に入れて混合し，更に標線まで塩酸（0.01 mol/L）を加えて混合標準原液を調製した（この液 1 mL は，ジクワット及びパラコートとして各 20 µg を含有）．

2.3 装置及び器具

1) 粉碎機 :

粉碎機 1 (成鶏飼育用配合飼料, 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)

粉碎機 2 (乾牧草, 稲わら及び WCRS 用) :

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

2) 4 級アンモニウム塩修飾ジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム (以下「MAX ミニカラム」という.) : Oasis MAX (充てん剤量 500 mg, リザーバー容量 6 mL) Waters 製

3) スルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム (以下「MCX ミニカラム」という.) : Oasis MCX (充てん剤量 500 mg, リザーバー容量 6 mL) Waters 製

4) ジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム (以下「HLB ミニカラム」という.) : Oasis HLB (充てん剤量 60 mg, リザーバー容量 20 mL) Waters 製

5) メンブランフィルター : 13HP045AN (孔径 0.45 μm , 直径 13 mm, ポリテトラフルオロエチレン) 東洋濾紙製

6) LC-MS/MS :

LC 部 : Nexera X2 島津製作所製

MS/MS 部 : LCMS-8040 島津製作所製

2.4 定量方法

1) 抽出

分析試料 10 g を量って 300 mL のなす形フラスコに入れ, 水 60 mL 及び硫酸 30 mL を加え, 空冷管を付け 120 °C の油浴で 60 分間加熱還流して抽出した. 200 mL の全量フラスコをブフナー漏斗の下に置き, 放冷後の抽出液をろ紙 (5 種 B) で吸引ろ過した後, 先のなす形フラスコ及び残さを順次水 100 mL で洗浄し, 同様に吸引ろ過した. さらに, 全量フラスコの標線まで水を加えた. この液 2 mL (乾牧草は, 更に硫酸 (3 mol/L) で正確に 25 倍希釈した後, その液 2 mL) をポリプロピレン製ビーカーに正確に分取し, 水 30 mL を加え, 水酸化ナトリウム溶液 (12 mol/L) で pH 5.5~6.5 に調整した後, 50 mL 程度となるよう水を加え, カラム処理 I に供する試料溶液とした.

2) カラム処理 I

MAX 及び MCX ミニカラムをそれぞれメタノール 5 mL 及び水 5 mL で順次洗浄し, MAX ミニカラムの上にリザーバー (容量 30 mL) を取り付け, MAX ミニカラムの下に MCX ミニカラムを連結した. 試料溶液をリザーバーに入れ, 液面が充てん剤の上端に達するまで流下 (必要に応じて流速が 1 mL/min 程度になるよう吸引した. 以下同様.) した. 試料溶液の入っていたポリプロピレン製ビーカーを水 5 mL ずつで 2 回洗浄し, 洗液を順次連結ミニカラムに加え, 同様に流出させた.

MAX ミニカラムをはずし, 10 mL ポリプロピレン製全量フラスコを MCX ミニカラムの下に置き, 塩化アンモニウム溶液 (25 w/v%) 9 mL を MCX ミニカラムに加え, ジクワット及びパラコートを溶出させた. さらに標線まで塩化アンモニウム溶液 (25 w/v%) を加え, 酸化に供

する試料溶液とした。

3) 酸化

試料溶液 2 mL を、あらかじめ水酸化ナトリウム溶液 (12 mol/L) 10 mL 及びフェリシアン化カリウム溶液 (1 w/v%) 1 mL を入れ混合したポリプロピレン製ビーカーに、正確に加えて均質になるよう振り混ぜ、カラム処理 II に供する試料溶液とした。

4) カラム処理 II

HLB ミニカラムをアセトニトリル 5 mL 及び水 5 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。試料溶液の入っていたポリプロピレン製ビーカーを水 10 mL ずつで 2 回洗浄し、洗液を順次ミニカラムに加え、同様に流出させた。50 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き、アセトニトリル 5 mL をミニカラムに加え、ジクワット及びパラコートを出させた。

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。水-メタノール (4+1) 1 mL (とうもろこしは 2 mL, 乾牧草は 4 mL) を正確に加えて残留物を溶かし、LC-MS/MS による測定に供する試料溶液とした。

5) 標準液の酸化及びカラム処理

混合標準原液 1 mL を 20 mL の全量フラスコに入れ、標線まで塩酸 (0.01 mol/L) を加えて酸化用混合標準液を調製した (この液 1 mL は、ジクワット及びパラコートとして各 1 µg を含有)。塩化アンモニウム溶液 (25 w/v%) 2 mL に酸化用混合標準液 0.1 mL を正確に加えたものを、あらかじめ水酸化ナトリウム溶液 (12 mol/L) 10 mL 及びフェリシアン化カリウム溶液 (1 w/v%) 1 mL を入れ混合したポリプロピレン製ビーカーに加えた。以下 3) 及び 4) の操作を試料溶液と同様に行った後、水-メタノール (4+1) で正確に希釈し、1 mL 中にジクワット及びパラコートとして 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15 及び 20 ng 相当量を含有する混合標準液を調製した。

6) LC-MS/MS による測定

試料溶液及び混合標準液各 10 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 2 及び 3 に示した。

Table 2 Operation conditions of LC-MS/MS

Column	Inertsil ODS-3 (2.1 mm i.d. × 150 mm, 4 µm), GL Sciences
Mobile phase	0.1 v/v% formic acid aqueous solution – methanol (4:1) → 10 min → (3:7) (hold for 2 min) → 5 min → (4:1)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temperature	40 °C
Detector	Quadrupole mass spectrometer
Ionization	Electrospray ionization (ESI) (Positive ion mode)
Nebulizer gas	Air (3 L/min)
Drying gas	N ₂ (15 L/min)
Interface temperature	300 °C
Heat block temperature	500 °C
Desolvation line temperature	100 °C
Collision gas	Ar (230 kPa)

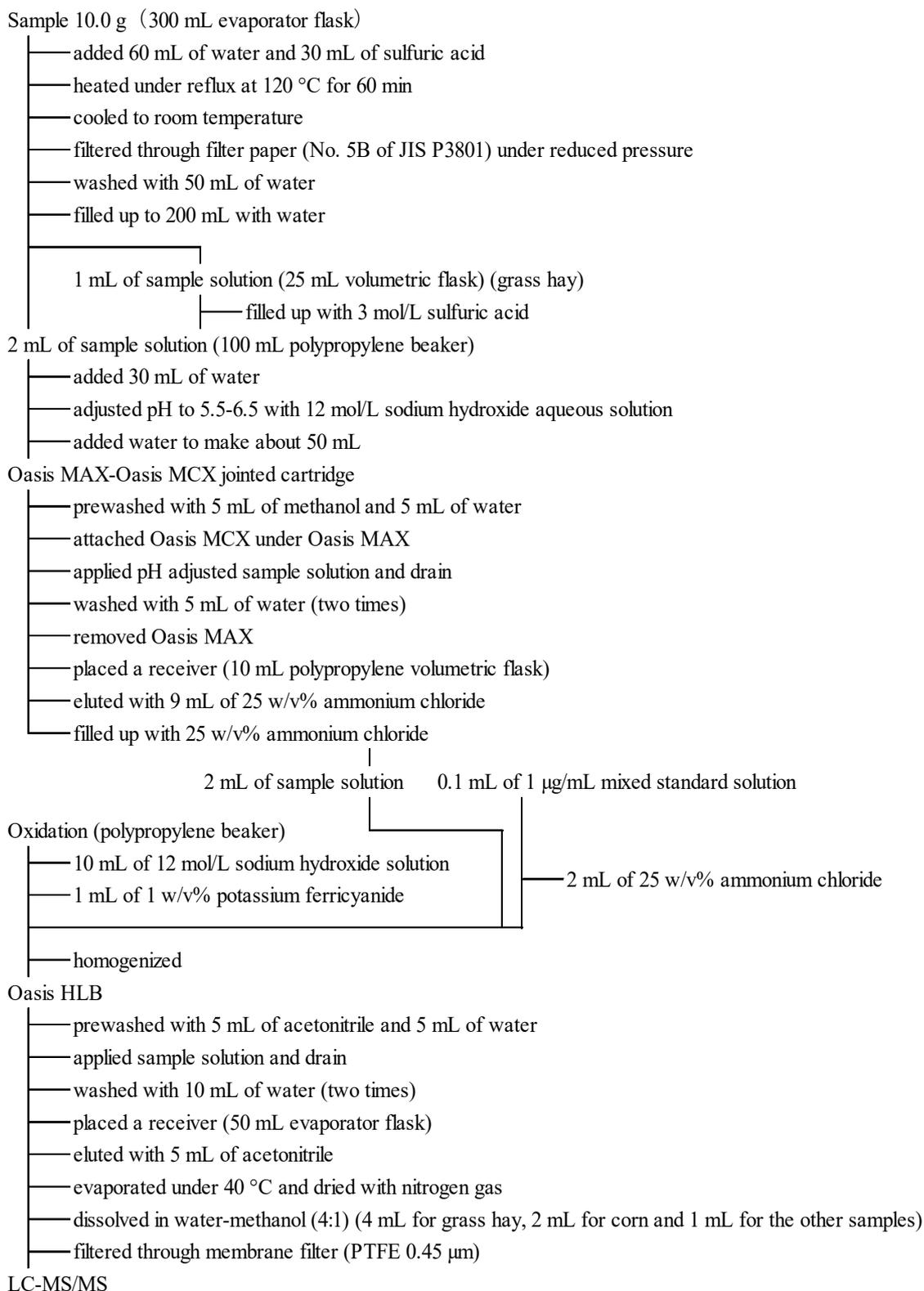
Table 3 MS/MS parameters

Target	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion		Collision energy (eV)
		Quantifier (<i>m/z</i>)	Qualifier (<i>m/z</i>)	
Diquat oxide	215	171	—	25
		—	153	10
Paraquat oxide	217	174	—	31
		—	104	45

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、試料中のジクワット量及びパラコート量を算出した。

なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。



Scheme 1 Analytical procedure for diquat and paraquat in feed

2.5 ガラス器具の洗浄方法

ジクワット及びパラコートはガラス器具に残留しやすい¹¹⁾ため、使用するガラス器具は全て次の処理を行ったものを用いた。

- 1) 2.4 の 1)で抽出に用いた 300 mL なす形フラスコは、水酸化ナトリウム溶液 (1 mol/L) による漬け置き洗浄 (約 15 分間) した後、洗剤や超音波による洗浄を行った。
- 2) 1)の処理を行ったなす形フラスコを含め使用する全てのガラス器具について硝酸 (1+10) による漬け置き洗浄 (一夜) を行った。

2.6 添加回収試験

2.2 の 2)及び 3)のジクワット標準原液及びパラコート標準原液を塩酸 (0.01 mol/L) で正確に希釈し添加に用いた。

ジクワットとして、成鶏飼育用配合飼料に 0.02 及び 0.15 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.4 及び 3 ng/mL) , とうもろこしに 0.02 及び 0.1 mg/kg 相当量 (同 0.2 及び 1 ng/mL) , ライ麦に 0.01 及び 0.06 mg/kg 相当量 (同 0.2 及び 1.2 ng/mL) , ライグラス乾草に 1 及び 100 mg/kg 相当量 (同 0.2 及び 20 ng/mL) , 稲わらに 0.01 及び 0.05 mg/kg 相当量 (同 0.2 及び 1 ng/mL) , WCRS に原物換算して 0.004 及び 0.05 mg/kg 相当量 (同 0.2 及び 2.25 ng/mL) , パラコートとして、成鶏飼育用配合飼料に 0.02 及び 0.15 mg/kg 相当量 (同 0.4 及び 3 ng/mL) , とうもろこしに 0.02 及び 0.2 mg/kg 相当量 (同 0.2 及び 2 ng/mL) , ライ麦に 0.01 及び 0.1 mg/kg 相当量 (同 0.2 及び 2 ng/mL) , ライグラス乾草に 1 及び 5 mg/kg 相当量 (同 0.2 及び 1 ng/mL) , 稲わらに 0.01 及び 0.3 mg/kg 相当量 (同 0.2 及び 6 ng/mL) , WCRS に原物換算して 0.004 及び 0.05 mg/kg 相当量 (同 0.2 及び 2.25 ng/mL) になるようにそれぞれ添加後よく混合し、一夜静置した後に 2.4 に従って定量し、平均回収率及び繰返し精度を求めた。

なお、WCRS への添加は風乾物試料に対してジクワット及びパラコートとして 0.01 及び 0.1125 mg/kg 相当量になるよう行い、原物中濃度への換算は、原物中及び風乾物中の水分含有量を 60 % 及び 10 % と想定して、 $\text{原物 (水分含有量 60 \%)} \text{中濃度} = \text{風乾物 (水分含有量 10 \%)} \text{中濃度} / 2.25$ の式により行った。

3 結果及び考察

3.1 妨害物質の検討

2.6 の添加回収試験の対象試料のうち、とうもろこし、ライグラス乾草、稲わら及び WCRS については令和 3 年度に確認済みのため¹¹⁾、未検討であった成鶏飼育用配合飼料及びライ麦について、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。その結果、ジクワット及びパラコートの定量を妨げるピークは認められなかった。なお、成鶏飼育用配合飼料及びライ麦においてジクワット及びパラコートと同じ保持時間にピークが認められたが、ライ麦については飼料分析基準別表 3 の試験法の妥当性確認法ガイドライン (以下「妥当性確認法ガイドライン」という。) に定められた妨害ピークの許容範囲内 (基準値に相当するピーク面積の 1/10 未満) であり、成鶏飼育用配合飼料においても妥当性確認法ガイドラインに定められた妨害ピークの許容範囲内 (基準値が定められていない場合は、定量下限濃度に相当するピーク面積の 1/3 未満) であった。

なお、得られた SRM クロマトグラムを Fig. 2 に示した。

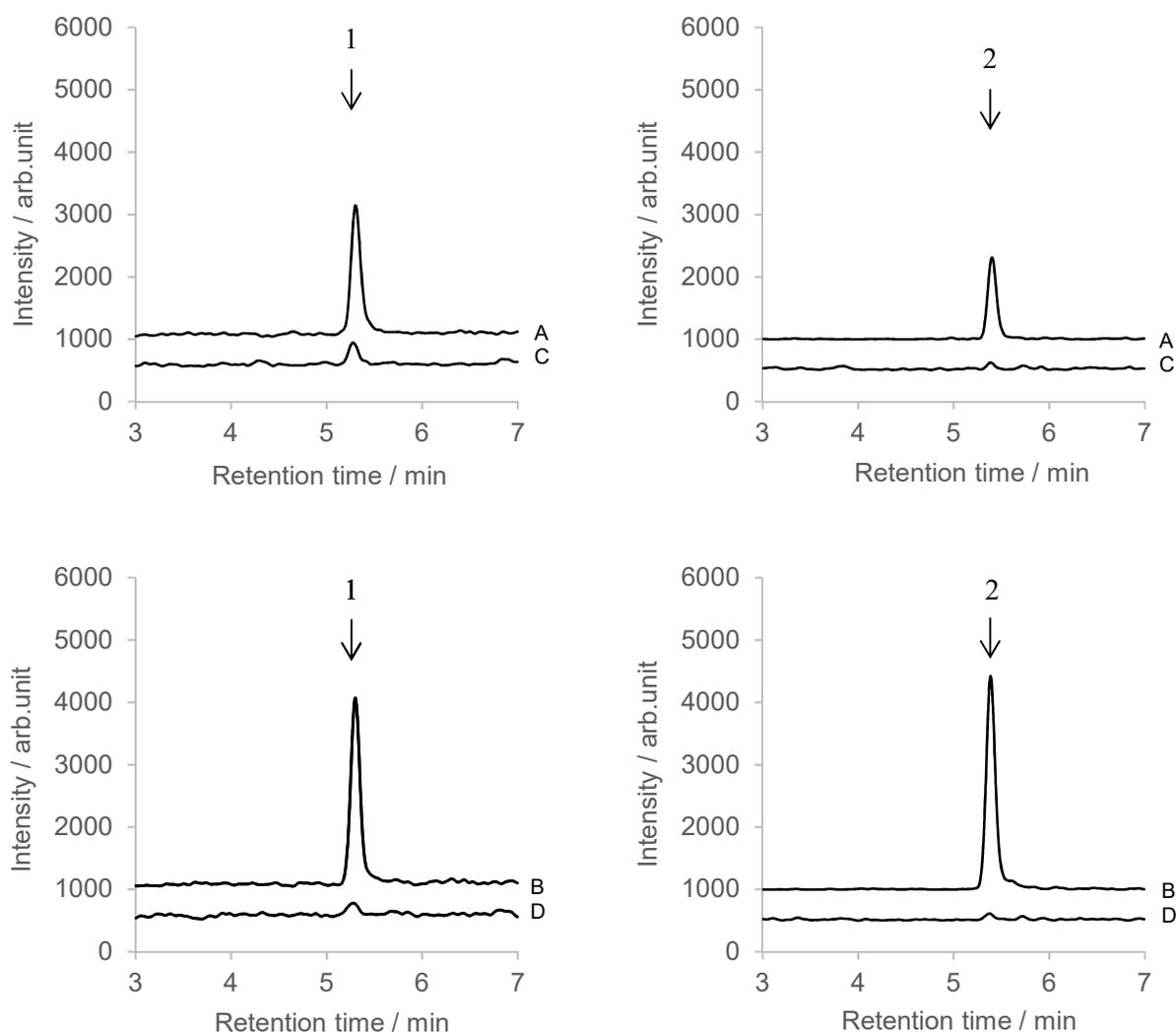


Fig. 2 Typical selected reaction monitoring (SRM) chromatograms of diquat oxide and paraquat oxide in standard and blank sample solutions

(LC-MS/MS conditions are shown in Table 2. Arrows indicate the retention times of 1: diquat oxide and 2: paraquat oxide. The baselines are shifted for display.)

A, B: Standard solution (A: The oxidative product of 0.4 ng/mL each as diquat and paraquat,

B: The oxidative product of 0.6 ng/mL as diquat and 1 ng/mL as paraquat),

C, D: Blank sample solution (C: Formula feed for layers, D: Rye)

3.2 マトリックス効果の確認

令和3年度に未検討であった成鶏飼育用配合飼料及びライ麦について、マトリックス効果を確認した。2.4の1)から4)により調製した成鶏飼育用配合飼料の空白試料溶液に、ジクワット及びパラコートとして0.15 mg/kg相当量（最終試料溶液中で3 ng/mL相当量）を、ライ麦の空白試料溶液に、ジクワットとして0.03 mg/kg相当量（同0.6 ng/mL相当量）及びパラコートとして0.05 mg/kg相当量（同1 ng/mL相当量）を添加した各マトリックス標準液について、2.2の2)から4)及び2.4の5)に従って調製した同濃度の各農薬標準液に対するピーク面積比を確認した。その結果、Table 4のとおり、試料マトリックスの測定値への顕著な影響は認められなかった。

Table 4 Matrix effect study

Samples	Concentration				Matrix effect ^{b)} (%)	
	Matrix standard solution (ng/mL)		Sample ^{a)} (mg/kg)			
	Diquat	Paraquat	Diquat	Paraquat	Diquat	Paraquat
Formula feed for layers	3	3	0.15	0.15	100	101
Rye	0.6	1	0.03	0.05	105	107

$n = 1$

a) Converted from the concentration in matrix standard solution

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

3.3 添加回収試験

2.6により添加回収試験を実施した。その結果はTable 5のとおり、ジクワットについては平均回収率は79.4~108%，その繰返し精度は相対標準偏差（ RSD_r ）として17%以下、パラコートについては平均回収率は73.4~113%， RSD_r は17%以下の成績が得られ、妥当性確認法ガイドラインに定められた目標値（真度：70%以上120%以下，精度：22%以下（添加濃度0.01~0.1125 mg/kg），21%以下（同0.15 mg/kg），20%以下（同0.2 mg/kg），19%以下（同0.3 mg/kg），16%以下（同1 mg/kg），13%以下（同5 mg/kg），8%以下（同100 mg/kg））を満たしていた。

なお，得られたSRMクロマトグラムの一例をFig. 3に示した。

Table 5 Recoveries for diquat and paraquat

Feed types	Diquat			Paraquat		
	Spiked level (mg/kg as fed basis) ^{a)}	Recovery ^{b)} (%)	RSD _r ^{c)} (%)	Spiked level (mg/kg as fed basis) ^{a)}	Recovery ^{b)} (%)	RSD _r ^{c)} (%)
Formula feed for layers	0.02	106	17	0.02	88.5	9.7
	0.15	94.7	4.4	0.15	92.3	4.1
Corn	0.02	79.4	4.4	0.02	74.7	15
	0.1	87.4	4.5	0.2	88.4	6.8
Rye	0.01	81.8	12	0.01	85.5	17
	0.06	81.3	6.2	0.1	90.1	5.2
Ryegrass hay	1	93.3	6.8	1	91.5	2.9
	100	86.7	2.4	5	86.2	4.3
Rice straw	0.01	104	6.0	0.01	73.4	7.4
	0.05	102	4.0	0.3	87.0	2.8
WCRS	0.004	108	11	0.004	113	11
	0.05	96.1	4.2	0.05	91.7	4.2

a) The pesticides were spiked to air-dried WCRS samples one night prior to extraction.

The spiked levels were 0.01 and 0.1125 mg/kg as air-dry basis for each pesticide. The levels of pesticides as fed basis were calculated with following equation on the assumption that the moisture content of WCRS samples was 60 % as fed basis and 10 % as air-dry basis.

The levels of pesticides as fed basis (moisture 60 %)

= the levels of pesticides as air-dry basis (moisture 10 %) / 2.25

b) Mean ($n = 6$, except corn ($n = 5$))

c) Relative standard deviation of repeatability

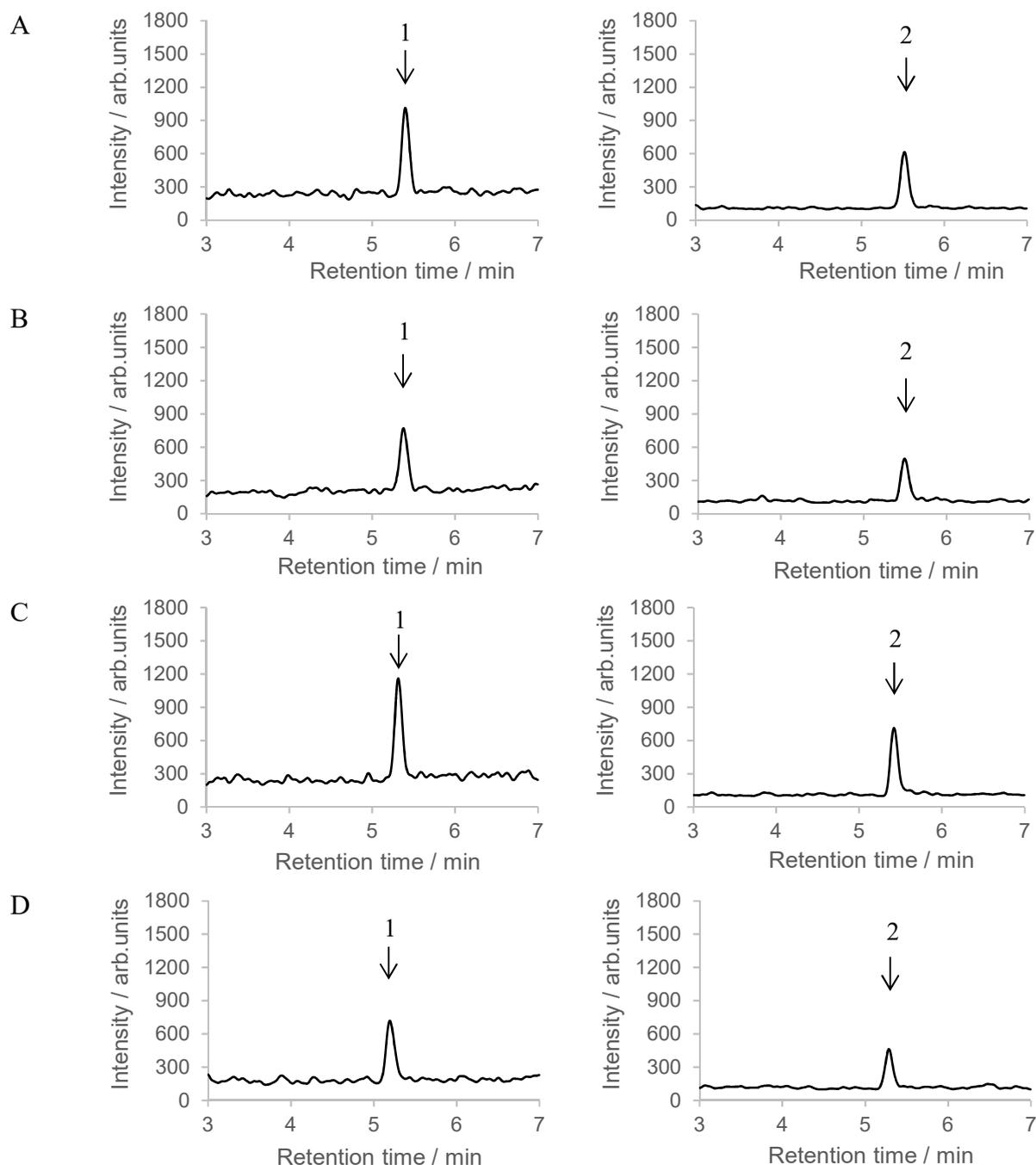


Fig. 3 Typical SRM chromatograms of diquat oxide and paraquat oxide in standard and spiked sample solutions

(LC-MS/MS conditions are shown in Tables 2 and 3. Arrows indicate the peaks of 1: diquat oxide and 2: paraquat oxide.)

A: Standard solution (The oxidative product of 0.2 ng/mL: 0.002 ng as each pesticide)

B: Sample solution of corn (spiked at 0.02 mg/kg of each pesticide (as 0.2 ng/mL in sample solution))

C: Sample solution of ryegrass hay (spiked at 1 mg/kg of each pesticide (as 0.2 ng/mL in sample solution))

D: Sample solution of rice straw (spiked at 0.01 mg/kg of each pesticide (as 0.2 ng/mL in sample solution))

3.4 定量下限及び検出下限の検討

ジクワット及びパラコートの検量線が直線性を示した範囲、各 0.1~20 ng/mL の下端付近となる濃度（成鶏飼育用配合飼料で 0.02 mg/kg 相当量（最終試料溶液中 0.4 ng/mL 相当量）、とうもろこしで 0.02 mg/kg 相当量（同 0.2 ng/mL 相当量）、ライ麦、稲わら及び WCRS（風乾物中）で 0.01 mg/kg 相当量（同 0.2 ng/mL 相当量）、ライグラス乾草で 1 mg/kg 相当量（同 0.2 ng/mL 相当量））の添加回収試験の結果は Table 5 のとおり良好であり、得られたピークの SN 比が 10 以上であったため、ジクワット及びパラコートの定量下限の濃度は成鶏飼育用配合飼料及びとうもろこしで 0.02 mg/kg、ライ麦、稲わら及び WCRS（風乾物中）で 0.01 mg/kg、ライグラス乾草で 1 mg/kg とした。この濃度は、ジクワット及びパラコートについてとうもろこしの基準値（それぞれ 0.05 mg/kg 及び 0.1 mg/kg）に対してそれぞれ 2/5 及び 1/5、ライ麦の基準値（それぞれ 0.03 mg/kg 及び 0.05 mg/kg）に対してそれぞれ 1/3 及び 1/5、ライグラス乾草の基準値（それぞれ 100 mg/kg 及び 5 mg/kg）に対してそれぞれ 1/100 及び 1/5、稲わらの管理基準値（それぞれ 0.05 mg/kg 及び 0.3 mg/kg）に対してそれぞれ 1/5 及び 1/30、WCRS 中の管理基準値の風乾物中換算値（0.1125 mg/kg）に対して 1/11 であり、妥当性確認法ガイドラインに定められた目標値（基準値 0.1 mg/kg 未満：2/5 以下、基準値 0.1 mg/kg 以上：1/5 以下）を満たしていた。

本法の検出下限を確認するため、添加回収試験により得られたピークの SN 比が 3 となる濃度を求めた。その結果、ジクワット及びパラコートの検出下限は成鶏飼育用配合飼料及びとうもろこしで 0.006 mg/kg、ライ麦、稲わら及び WCRS（風乾物中）で 0.003 mg/kg、ライグラス乾草で 0.3 mg/kg であり、同様に妥当性確認法ガイドラインに定められた目標値（基準値 0.1 mg/kg 未満：基準値の 1/5 以下、基準値 0.1 mg/kg 以上：基準値の 1/10 以下）を満たしていた。

4 まとめ

飼料中のジクワット及びパラコートについて、JFRL 法を基に、LC-MS/MS を用いた同時定量法の飼料分析基準への収載の可否について検討したところ、以下の結果が得られた。

- 1) 成鶏飼育用配合飼料及びライ麦について、本法に従って得られたクロマトグラムには、ジクワット及びパラコートと同じ保持時間にピークが認められたが、妥当性確認法ガイドラインに定められた妨害ピークの許容範囲内であり、定量を妨げるピークは認められなかった。
- 2) 成鶏飼育用配合飼料及びライ麦について、本法に従い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、試料マトリックスの測定値への顕著な影響は認められなかった。
- 3) ジクワットとして、成鶏飼育用配合飼料に 0.02 及び 0.15 mg/kg 相当量、とうもろこしに 0.02 及び 0.1 mg/kg 相当量、ライ麦に 0.01 及び 0.06 mg/kg 相当量、ライグラス乾草に 1 及び 100 mg/kg 相当量、稲わらに 0.01 及び 0.05 mg/kg 相当量、WCRS に原物換算して 0.004 及び 0.05 mg/kg 相当量、パラコートとして、成鶏飼育用配合飼料に 0.02 及び 0.15 mg/kg 相当量、とうもろこしに 0.02 及び 0.2 mg/kg 相当量、ライ麦に 0.01 及び 0.1 mg/kg 相当量、ライグラス乾草に 1 及び 5 mg/kg 相当量、稲わらに 0.01 及び 0.3 mg/kg 相当量、WCRS に原物換算して 0.004 及び 0.05 mg/kg 相当量を添加し、本法に従って分析を実施し、回収率及び繰返し精度を求めたところ、妥当性確認法ガイドラインに定められた真度及び併行精度の目標値を満たす結果が得られた。

- 4) 本法のジクワット及びパラコートの定量下限の濃度は成鶏飼育用配合飼料及びとうもろこしで 0.02 mg/kg, ライ麦, 稲わら及び WCRS (風乾物中) で 0.01 mg/kg, ライグラス乾草で 1 mg/kg であり, 検出下限は成鶏飼育用配合飼料及びとうもろこしで 0.006 mg/kg, ライ麦, 稲わら及び WCRS (風乾物中) で 0.003 mg/kg, ライグラス乾草で 0.3 mg/kg であった. 設定した定量下限及び検出下限は, 妥当性確認法ガイドラインに定められた目標値を満たしていた.

文 献

- 1) 食品安全委員会：食品健康影響評価の結果の通知について，令和元年 10 月 8 日，府食 368 号 (2019).
- 2) 水域の生活環境動植物の被害防止に係る農薬登録基準：評価書（水産動植物の被害防止に係る農薬登録保留基準の設定に関する資料 パラコートジクロリド（パラコート））
- 3) 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，農林省令第 35 号，昭和 51 年 7 月 24 日 (1976).
- 4) 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).
- 5) 独立行政法人農林水産消費安全技術センター：農薬抄録
<http://www.acis.famic.go.jp/syouroku/diquat-dibromide/index.htm>, cited 27 Dec. 2022.
- 6) United States Department of Agriculture, National agricultural statistics service : Agricultural chemical use program https://www.nass.usda.gov/Surveys/Guide_to_NASS_Surveys/Chemical_Use/, cited 27 Dec. 2022.
- 7) 食品安全委員会：食品健康影響評価の結果の通知について，令和 4 年 6 月 28 日，府食 338 号 (2022).
- 8) United States Environmental Protection Agency, Pesticide registration : <https://www.epa.gov/pesticide-registration>, cited 27 Dec. 2022.
- 9) SUMITOMO CHEMICAL Latin America : <https://www.sumitomochemical.com/asd/ar/herbicides-argentina/paraquat/>, cited 27 Dec. 2022.
- 10) 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).
- 11) 一般財団法人日本食品分析センター：平成 28 年度飼料中の農薬分析法開発委託事業報告書，平成 29 年 3 月 (2017).
- 12) 榊原 良成，伊澤 淳修，桑原 正良，高橋 雄一，保田 伊世，青山 幸二：飼料中のジクワット及びパラコートの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による分析法の開発，飼料研究報告，47，33-45 (2022).