8.3 残留農薬（多成分）

8.3.1 残留農薬多成分分析（その 1）

8.3.1.a 高速液体クロマトグラフタンデム質量分析法

（1） 分析対象化合物　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、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

（2） 概要

この試験法は液状の家庭園芸用複合肥料及び液状複合肥料に適用する。この試験法の分類は Type B であり、その記号は 8.3.1.a-2017 又は AG-C-1.a-1 とする。

肥料中の各農薬をアセトニトリル及び水にて溶解・抽出し、二種類のクリーンアップカートリッジを用いて精製後、高速液体クロマトグラフタンデム質量分析計（LC-MS/MS）を用いて測定し、分析試料中の分析対象化合物を求める。なお、この試験法の性能は**備考 3** に示す。

（3） 試薬等　試薬及び水は、次による。

a） 水: JIS K 0557 に規定する A3 の水。

b） アセトニトリル: JIS K 8039 に規定する残留農薬・PCB 試験用（濃縮 300 以上）又は同等の品質の試薬。

c） メタノール: JIS K 8891 に規定する特級又は同等の品質の試薬。

d） メタノール: 高速液体クロマトグラフタンデム質量分析計の溶離液に使用するメタノールは LC/MS 用又は同等の品質の試薬。

e） 酢酸エチル: JIS K 8361 に規定する特級又は同等の品質の試薬。

f） トルエン: JIS K 8680 に規定する特級又は同等の品質の試薬。

g） ぎ酸アンモニウム: 特級（純度 95 %（質量分率）以上）又は同等の品質の試薬。

h） ぎ酸アンモニウム溶液（0.1 mol/ L）(1): ぎ酸アンモニウム 6.306 g を水 1000 mL に加える。

i） ぎ酸アンモニウム溶液（0.1 mmol/ L）(1): ぎ酸アンモニウム溶液（0.1 mol/L）1 mL を水 1000 mL に加える。

j） ぎ酸: JIS K 8264 に規定する特級又は同等の品質の試薬。

k） ぎ酸溶液（0.1 v/v%）(1): ぎ酸 1 mL を水 1000 mL に加える。

l） ぎ酸アセトニトリル溶液（0.1 v/v%）(1): ぎ酸 1 mL をアセトニトリル 1000 mL に加える。

m） 各農薬標準液（100 μg/mL）(1): アバメクチン［$C_{48}H_{72}O_{14}$］(2)、イベルメクチン［$C_{48}H_{74}O_{14}$］(2)、エプリノメクチン［$C_{50}H_{75}NO_{14}$］(2)、ロテノン［$C_{23}H_{22}O_6$］(2)、ピペロニルブトキシド［$C_{19}H_{30}O_5$］(2)及びピレトリン［ピレトリンI:$C_{21}H_{28}O_3$ 及びピレトリンII:$C_{22}H_{28}O_5$］(2)約 0.01 g をひょう量皿にとり、その質量を 0.1 mg の桁まで測定する。少量のメタノールで溶かし、100 mL 全量フラスコに移し入れ、標線まで同溶媒を加える（ただし、ピレトリンに関してはピレトリンI・IIの合量として 100 μg/mL を含有する。）。

n） 混合標準液（10 μg/mL）: 各農薬標準液 10 mL を 100 mL 全量フラスコに移し入れ、標線までメタノールを加える。

o） 混合標準液（1000 ng/mL）: 混合標準液（10 μg/mL）10 mL を 100 mL 全量フラスコに移し入れ、標線までメタノールを加える。

p） 検量線用混合標準液（50 ng/mL～500 ng/mL）: 使用時に混合標準液（1000 ng/mL）の 2.5 mL～25 mL を 50 mL 全量フラスコに段階的にとり、標線までメタノールを加える。

q） **検量線用混合標準液（5 ng/mL～50 ng/mL）**： 使用時に混合標準液（100 ng/mL）の 2.5 mL～25 mL を 50 mL 全量フラスコに段階的にとり、標線までメタノールを加える。

注（**1**） 調製例であり、必要に応じた量を調製する。
（**2**） 標準試薬が市販されている。

備考 1. 各農薬の標準試薬は富士フイルム和光純薬、関東化学及び林純薬工業等より販売されている。

（**4**） **器具及び装置** 器具及び装置は、次のとおりとする。

a） **高速液体クロマトグラフ質量分析計**： JIS K 0136 に規定する高速液体クロマトグラフタンデム質量分析計で次の要件を満たすもの。

1） **高速液体クロマトグラフ**：

① カラム槽： カラム槽温度を 30 ℃～45 ℃ で調節できるもの。

② カラム： 内径 2 mm～3 mm、 長さ 50 mm～150 mm、 粒径 1.6 μm～3.0 μm のステンレス鋼のカラム管にオクタデシル基を化学結合したシリカゲルを充てんしたもの。質量分析計仕様のもの(3)。

2） **質量分析計**：

① イオン化法： エレクトロスプレーイオン化（ESI）法

② イオン検出方式： 選択反応検出法

b） **超音波発生器**： 超音波洗浄器を用いることができる。

c） **濃縮器**： 40 ℃ まで調節できるエバポレーター

d） **多孔性けいそう土カートリッジカラム**： 多孔性けいそう土を充てんしたもの（保持容量 5 mL）(4)。

e） **グラファイトカーボン－NH_2 積層カートリッジカラム**： グラファイトカーボン 500 mg 及びアミノプロピルシリル化シリカゲル 500 mg を 6 mL 注射筒に積層したもの(5)。

注（**3**） ACQUITY UPLC HSS C18 等の名称で市販されている。
（**4**） Chem Elut （5 mL）等の名称で市販されている。
（**5**） Envi-carb/LC-NH_2 （500 mg/500 mg、6 mL）等の名称で市販されている。

（**5**） **試験操作**

（**5.1**） **抽出** 抽出は、次のとおり行う。

a） 分析試料 5.00 mL(6)を、10 mL 全量フラスコに入れる。

b） 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る。

c） 超音波発生器を用いて 5 分間超音波処理をし(7)、抽出液とする。

注（**6**） 試料の比重を量り測定終了後、分析試料中の対象物質濃度を算出する。
（**7**） 超音波処理の結果、溶液の体積が膨張することがあるので注意する。膨張の際にはしばらく常温にて放置するとよい。

備考 2. 比重（密度）の測定は 10 mL 全量フラスコを電子天秤に乗せ、ゼロ合わせを行い、分析試料 5.00 mL を当該フラスコに入れ、秤量値を読み取り算出することができる。

(**5.2**) **クリーンアップ(1)** クリーンアップ(1)は、次のとおり行う。

a) 抽出液 5 mL を、多孔性けいそう土カートリッジカラムに入れ、約 5 分間保持させる。

b) 100 mL なすフラスコを同カートリッジカラムの下に置き、酢酸エチル約 5 mL を 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る[8]。

c) 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[9]、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す。

注(**8**) 試験導入前には溶出確認をすること。

(**9**) 乾固させすぎると農薬が揮散するおそれがある。

(**5.3**) **クリーンアップ(2)** クリーンアップ(2)は、次のとおり行う。

a) グラファイトカーボン－NH_2 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)約 10 mL で洗浄する。

b) 100 mL なすフラスコを同カートリッジカラムの下に置き、(**5.2**)**c**)の溶解液を同カートリッジカラムに入れ、液面が充てん剤の上端に達するまで流出させる。

c) 容器をアセトニトリル－トルエン(3+1)約 5 mL で 5 回洗浄し、洗液を順次同カートリッジに加え流出させる。

d) 流出液を 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[10]、メタノール 5 mL[11]を加えて残留物を溶かす。溶解液の一定量を正確にとり、メタノールで正確に 5 倍に希釈し、当該溶液を試料溶液とする。

注(**10**) 乾固させすぎると農薬が揮散するおそれがある。

(**11**) 試料溶液中の各農薬濃度が検量線の上限を超えるおそれのある場合は、試料溶液の一定量をメタノールで希釈する。

(**5.4**) **測定** 測定は、JIS K 0136 及び次のとおり行う。具体的な測定操作は、測定に使用する高速液体クロマトグラフ質量分析計の操作方法による。

a) **高速液体クロマトグラフ質量分析計の測定条件** 高速液体クロマトグラフ質量分析計の測定条件の一例を以下に示す。これを参考にして設定する。

1) **高速液体クロマトグラフ**:

① カラム: オクタデシル基を化学結合したシリカゲルカラム(内径 2 mm～3 mm、長さ 50 mm～150 mm、粒径 1.6 μm～3.0 μm)

② 流量: 0.2 mL/min～0.5 mL/min

③ 溶離液: A: ぎ酸アンモニウム溶液(0.1 mmol/L)－ぎ酸溶液(0.1 v/v%)〔1+1〕
B: ぎ酸アセトニトリル溶液(0.1 v/v%)

④ グラジエント: 0 min (50 %B)→15 min (95 %B)→20 min (98%B)→30 min (50 %B)

⑤ カラム恒温槽: 40 °C

⑥ 注入量: 5 μL

2) **質量分析計**:

① イオン化法: エレクトロスプレーイオン化(ESI)法

② モード: ポジティブ

③ モニターイオン: 表 1 のとおり

表1 各農薬のモニターイオン

農薬名	質量イオン比(*m/z*)		
	プレカーサーイオン	プロダクトイオン（定量用）	プロダクトイオン（確認用）
アバメクチンB1a	891	305	567
イベルメクチンB1a	893	307	551
エプリノメクチンB1a	915	186	298
ロテノン	395	213	192
ピペロニルブトキシド	356	177	147
ピレトリンI	329	161	133
ピレトリンII	373	161	133

b） 検量線の作成

1） 各検量線用混合標準液 5 µL を高速液体クロマトグラフタンデム質量分析計に注入し、測定対象物質の定量用イオン(*m/z*)及び確認用イオン(*m/z*)のクロマトグラムを記録する。

2） 測定対象物質の定量用イオン(*m/z*)と確認用イオン(*m/z*)のピーク面積比又は高さ比を算出する。

3） 各検量線用混合標準液の測定対象物質濃度と定量用イオン(*m/z*)のピーク面積又は高さとの検量線を作成する。検量線の作成は、試料の測定時に行う。

c） 試料の測定

1） 試料溶液を 5 µL を **b**）**2**）～**3**）と同様に操作する[12]。

2） ピーク面積又は高さから検量線より測定対象物質量を求め、分析試料中の測定対象物質を算出する。

注（**12**） 試料溶液の定量用イオン(*m/z*)と確認用イオン(*m/z*)のピーク面積比又は高さ比が、標準液のピーク面積比又は高さ比に対して±30 %程度の範囲内であることを確認する。なお、ピーク面積比又は高さ比は濃度によって異なることがある。

（5.5） 計算

次の式によって分析試料中の各農薬濃度を算出する。

分析試料中の各農薬濃度(µg/kg)＝(*A*×*B*×10)/*C*

A: 検量線から求めた最終試料溶液中の各測定対象物質濃度(ng/mL)

B: 検量線上限を超えたために最終試料溶液をさらに希釈した場合の希釈倍率

C: 分析試料における比重(密度)(g/mL)

備考 3. 液状の家庭園芸用複合肥料(3 種類)、液状複合肥料(2 種類)の回収試験の結果は、4000 µg/kg 及

び 400 μg/kg（ただし、ピレトリンに関してはピレトリンI・IIの合量として 4000 μg/kg 及び 400 μg/kg）の添加レベルで平均回収率が 77.0 %～104.5 %及び 85.6 %～107.9 %であった。

また、試験法の妥当性確認のための共同試験の成績及び解析結果を表 2 に示す。

なお、この試験法の各農薬の定量下限は 10 μg/kg 程度と推定された。

表2 残留農薬多成分分析試験法の妥当性確認のための共同試験成績の解析結果

農薬名	試料名	試験室数[1)]	平均値[2)] (μg/kg)	添加量 (μg/kg)	回収率 (%)	RSD_r[3)] (%)	RSD_R[4)] (%)
アバメクチン	家庭園芸用複合肥料1	8(0)	286.8	333.3	86.1	13.3	14.4
Bla	家庭園芸用複合肥料2	8(0)	358.9	416.7	86.1	13.4	14.8
	家庭園芸用複合肥料3	8(0)	425.8	500.0	85.2	8.6	11.6
	液状複合肥料1	8(0)	288.6	333.3	86.6	7.1	8.5
	液状複合肥料2	8(0)	405.5	500.0	81.1	7.1	7.2
イベルメクチン	家庭園芸用複合肥料1	8(0)	298.9	333.3	89.7	14.9	15.0
Bla	家庭園芸用複合肥料2	8(0)	382.5	416.7	91.8	14.1	19.3
	家庭園芸用複合肥料3	8(0)	431.1	500.0	86.2	9.8	10.9
	液状複合肥料1	8(0)	298.8	333.3	89.6	10.1	12.8
	液状複合肥料2	8(0)	405.2	500.0	81.0	3.8	5.8
エプリノメクチン	家庭園芸用複合肥料1	8(0)	293.5	333.3	88.1	7.0	10.4
Bla	家庭園芸用複合肥料2	8(0)	361.9	416.7	86.9	9.2	14.3
	家庭園芸用複合肥料3	8(0)	425.3	500.0	85.1	7.0	10.0
	液状複合肥料1	8(0)	277.3	333.3	83.2	9.0	12.0
	液状複合肥料2	8(0)	398.2	500.0	79.6	7.5	11.6
ロテノン	家庭園芸用複合肥料1	8(0)	276.8	333.3	83.1	5.7	7.8
	家庭園芸用複合肥料2	8(0)	353.5	416.7	84.8	9.8	12.5
	家庭園芸用複合肥料3	8(0)	426.6	500.0	85.3	6.6	8.5
	液状複合肥料1	8(0)	263.5	333.3	79.1	11.0	12.3
	液状複合肥料2	8(0)	385.2	500.0	77.0	5.7	12.1

1） 有効試験室数（外れ値を報告した試験室数）

2） 平均値（n=有効試験室数×試料数(2)）

3） 併行相対標準偏差

4） 室間再現相対標準偏差

表2（続き）

農薬名	試料名	試験室数[1)]	平均値[2)] (μg/kg)	添加量 (μg/kg)	回収率 (%)	RSD_r[3)] (%)	RSD_R[4)] (%)
ピペロニルブトキシド	家庭園芸用複合肥料1	8(0)	318.2	333.3	95.5	8.1	13.2
	家庭園芸用複合肥料2	8(0)	395.6	416.7	94.9	8.4	13.6
	家庭園芸用複合肥料3	8(0)	450.3	500.0	90.1	4.6	9.3
	液状複合肥料1	8(0)	299.7	333.3	89.9	7.4	11.0
	液状複合肥料2	8(0)	435.8	500.0	87.2	5.8	7.4
ピレトリンⅠ	家庭園芸用複合肥料1	8(0)	160.7	186.0	86.4	9.3	11.9
	家庭園芸用複合肥料2	8(0)	202.2	232.5	87.0	12.6	12.8
	家庭園芸用複合肥料3	8(0)	228.6	279.0	81.9	5.4	8.8
	液状複合肥料1	8(0)	158.2	186.0	85.1	6.8	10.4
	液状複合肥料2	8(0)	223.1	279.0	80.0	8.5	9.1
ピレトリンⅡ	家庭園芸用複合肥料1	8(0)	131.1	147.3	89.0	6.5	9.7
	家庭園芸用複合肥料2	8(0)	163.2	184.2	88.6	10.8	13.6
	家庭園芸用複合肥料3	8(0)	182.0	221.0	82.4	5.4	8.9
	液状複合肥料1	8(0)	126.2	147.3	85.7	7.8	11.4
	液状複合肥料2	8(0)	180.2	221.0	81.5	6.3	8.3

1） 有効試験室数（外れ値を報告した試験室数）
2） 平均値（n=有効試験室数×試料数（2））
3） 併行相対標準偏差
4） 室間再現相対標準偏差

参考文献

1） 八木寿治，山西正将，白井裕治： 液体クロマトグラフタ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，肥料研究報告，**4**，36~48 (2011)

2） 八木寿治，山西正将，白井裕治，柴田政人： 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計（LC-MS/MS）による液状肥料中の 6 種農薬の同時測定 －共同試験成績－，肥料研究報告，**5**，48~59 (2012)

（**6**） **6 種農薬一斉試験法フローシート** 肥料中の 6 種農薬の一斉試験法のフローシートを次に示す。

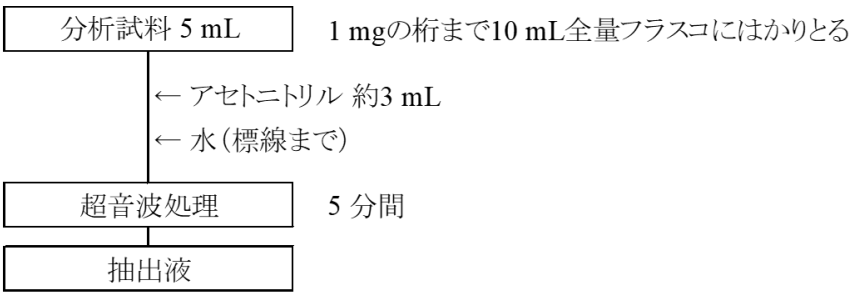


図1 肥料中の残留農薬多成分分析（その1：6種農薬の一斉試験法）フローシート（抽出操作）

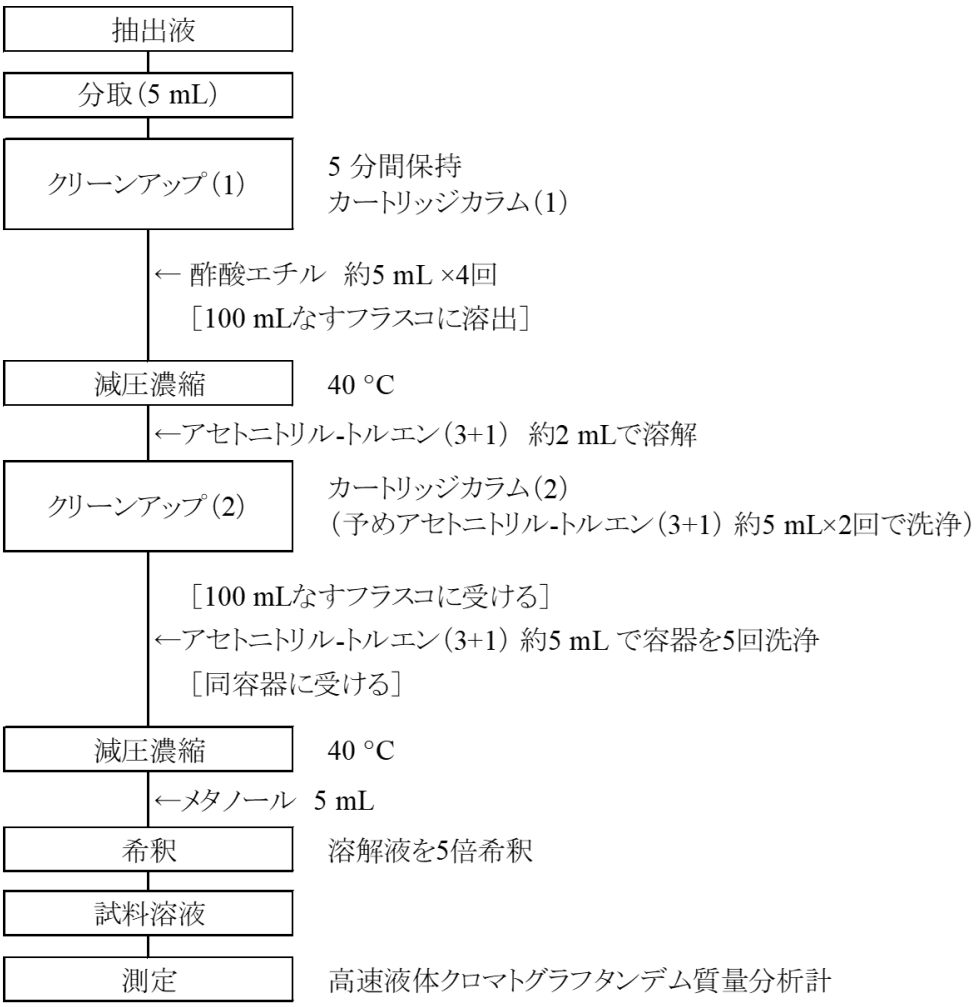
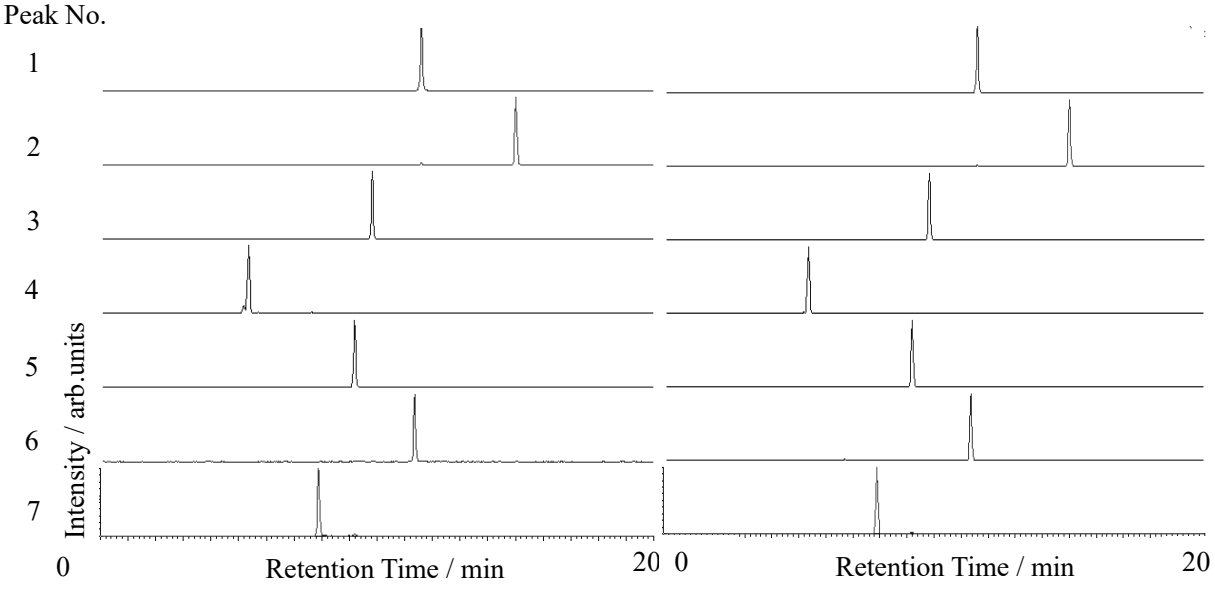


図2　肥料中の残留農薬多成分分析（その1：6種農薬の一斉試験法）フローシート
（クリーンアップ（1）、クリーンアップ（2）及び測定操作）

参考 検量線用混合標準液及び試料溶液（液状の家庭園芸用複合肥料）の選択反応検出クロマトグラム例を次に示す。



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

1） 混合標準液　　2） 試料溶液

参考図　各農薬の選択反応検出クロマトグラム

1） 混合標準液（各農薬として 2500 pg 相当量）
（ピレトリンに関してはピレトリンI・IIの合量として 2500 pg 相当量）
2） 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の合量として 400 µg/kg 相当量）

LC-MS/MS の測定条件

カラム： ACQUITY UPLC HSS C18（内径 2.1 mm、長さ 100 mm、粒径 1.8 µm）
流量： 0.2 mL/min
キャピラリー電圧： 3.0 kV
イオン源温度： 120 °C
デソルベーション温度： 400 °C
コーン電圧： 表 1 のとおり

コリジョンエネルギー： 参考表のとおり

その他の条件は（**5.4**）**a**）LC-MS/MS の測定条件の例示及び参考表のとおり

参考表　質量分析計のパラメーター

農薬名	質量イオン比（*m*/*z*）			コーン電圧	コリジョンエネルギー
	プレカーサーイオン	プロダクトイオン（定量用）	プロダクトイオン（確認用）	（V）	（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