

4 飼料中のイミダクロプリドの液体クロマトグラフ質量分析計による定量法

野崎 友春*, 山多 利秋*

Determination of Imidacloprid in Feed by LC-MS

Tomoharu NOZAKI* and Toshiaki YAMATA*

(* Food and Agricultural Materials Inspection Center (I.A.A.), Fertilizer and Feed Inspection Department)

An analytical method for determination of imidacloprid in feed by using liquid chromatograph-mass spectrometer (LC-MS) was developed.

Imidacloprid was extracted with acetonitrile-water and filtered. The filtrate was purified by salting-out, by C₁₈ cartridge chromatography and by graphitized non-porous carbon column chromatography. Imidacloprid was determined by LC-MS.

A collaborative study with corn spiked with imidacloprid at 100 µg/kg and with alfalfa spiked with imidacloprid at 5,000 µg/kg was conducted in 8 laboratories. The mean quantitative value of corn was 83.0 µg/kg (83.0%), and the repeatability and reproducibility as the relative standard deviation (RSD_r and RSD_R) and HorRat were 3.0%, 15% and 0.66 respectively. As for alfalfa, they were 4,220 µg/kg (84.3%), 3.5%, 12% and 0.96 respectively.

Key words: イミダクロプリド imidacloprid ; 残留農薬 pesticide residue ; 液体クロマトグラフ質量分析計 liquid chromatograph-mass spectrometer (LC-MS) ; 穀類 grain ; 乾牧草 grass hay ; 共同試験 collaborative study

1 緒 言

農林水産省では、食品の安全性を確保する観点から、飼料原料に用いられている農薬を中心に60種類の農薬について、飼料安全法に基づいて残留基準値を設定し、平成18年5月29日付で施行した。

しかしながら、イミダクロプリドについては、飼料中の分析法が確立されていないことから、今回、厚生労働省の食品中のイミダクロプリドの分析法¹⁾を基にして、飼料中のイミダクロプリドの分析法について検討を行ったのでその概要を報告する。

イミダクロプリドは、日本特殊農薬製造(株)(現バイエル クロップサイエンス)が開発した、クロロニコチニル系殺虫剤である。国内では稲、果樹、野菜等の広範囲の主要害虫対策として登録されている²⁾。

国内での飼料中の基準は、乾牧草が6 mg/kg、とうもろこしが0.1 mg/kg、その他穀物が0.05 mg/kgである³⁾。国内での食品中の暫定基準は0.05~10 mg/kgである¹⁾。

* 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

2 実験方法

2.1 試料

市販のとうもろこし及び乾牧草（アルファルファ）をそれぞれ 1 mm の網ふるいを通すまで粉碎し、供試試料とした。

2.2 試薬

1) イミダクロプリド標準原液

イミダクロプリド標準品（関東化学製，純度 99.7%）25 mg を正確に量って 50 mL の褐色メスフラスコに入れ，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イミダクロプリド標準原液を調製した（この液 1 mL は，イミダクロプリドとして 0.5 mg を含有する．）。

使用に際して，イミダクロプリド標準原液の一定量をメタノールで正確に希釈し，1 mL 中にイミダクロプリドとしてそれぞれ 0.002 µg，0.005 µg，0.01 µg，0.02 µg，0.05 µg，0.1 µg 及び 0.2 µg を含有するイミダクロプリド標準液を調製した。

2) アセトニトリル，メタノールは残留農薬分析用試薬を用いた。

特記している以外の試薬については特級を用いた。

2.3 装置及び器具

1) 液体クロマトグラフ質量分析計：島津製作所製 LCMS-2010EV

2) 振とう機：タイテック製 レシプロシェーカー SR-2W

3) エバポレーター：BÜCHI 製 R-200

4) C₁₈カートリッジ：Waters 製 Sep-Pak Plus C₁₈ cartridge

5) グラファイトカーボン-NH₂ 積層カートリッジ：

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

2.4 定量方法

1) 抽出

試料 10.0 g を量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ，アセトニトリル-水（13+7）を乾牧草は 100 mL，その他の試料は 50 mL 加え，30 分間振り混ぜて抽出した。乾牧草は 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，容器及び残さをアセトニトリル 50 mL で洗浄し，吸引ろ過し更に全量フラスコの標線までアセトニトリルを加えた。200 mL に定容した抽出液の 10 mL を正確に取り，アセトニトリルで 100 mL に定容し，液液分配に供する試料溶液とした。その他の試料は 100 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，容器及び残さをアセトニトリル 25 mL で洗浄し，吸引ろ過し更に全量フラスコの標線までアセトニトリルを加えて液液分配に供する試料溶液とした。

2) 液液分配

試料溶液（乾牧草は 10 mL，その他の試料は 20 mL）を正確に取り，100 mL の分液漏斗に入れ，塩化ナトリウム 10 g を加え，0.5 mol/L リン酸緩衝液（pH 7.0）20 mL を加え，10 分間振り混ぜた後静置した。水層を捨て，アセトニトリル層をカートリッジカラムクロマトグラフィー I に供する試料溶液とした。

3) カートリッジカラムクロマトグラフィー I

C₁₈ カートリッジをアセトニトリル 10 mL であらかじめ洗浄した。100 mL の三角フラスコを C₁₈ カートリッジの下に置き，試料溶液をカートリッジに入れ，液面が充てん剤の上面に達

するまで流下させ、イミダクロプリドを流出させた。アセトニトリル 2 mL を加え同様に流出させた。

三角フラスコに硫酸ナトリウム（無水）を適量加え脱水し、100 mL のなす形フラスコにろ紙（5種B）でろ過した。

ろ液を 40°C 以下の水浴上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-トルエン（3+1）2 mL を加えて残留物を溶かし、カートリッジカラムクロマトグラフィーIIに供する試料溶液とした。

4) カートリッジカラムクロマトグラフィーII

グラファイトカーボン-NH₂ 積層カートリッジを注射筒に連結し、アセトニトリル-トルエン（3+1）10 mL であらかじめ洗浄した。50 mL のなす形フラスコをグラファイトカーボン-NH₂ 積層カートリッジの下に置き、試料溶液を注射筒に入れ、容器をアセトニトリル-トルエン（3+1）2 mL ずつで2回洗浄し、洗液を順次グラファイトカーボン-NH₂ 積層カートリッジに加え、液面が充てん剤の上面に達するまで流下させ、イミダクロプリドを流出させた。アセトニトリル-トルエン（3+1）16 mL を加えて同様に流出させた。

溶出液を 40°C 以下の水浴上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。

メタノール 2 mL を正確に加えて残留物を溶かし、液体クロマトグラフ質量分析計による測定に供する試料溶液とした。

5) 液体クロマトグラフ質量分析計による測定

試料溶液及びイミダクロプリド標準液各 5 µL を液体クロマトグラフ質量分析計に注入し、選択イオン検出（SIM）クロマトグラムを得た。

6) 計算

得られた SIM クロマトグラムからピーク高さを求めて検量線を作成し、試料中のイミダクロプリド量を算出した。

なお、定量法の概要を Scheme 1 に、液体クロマトグラフ質量分析計の測定条件を Table 1 に示した。

Sample 10.0 g

- add acetonitrile-water (13:7) (grass hay; 100 mL, others; 50 mL)
- shake for 30 minutes
- filtrate with suction filter (No.5B)
- wash with acetonitrile (grass hay; 50 mL, others; 25 mL)
- grass hay; fill up to 200 mL with acetonitrile
- others; fill up to 100 mL with acetonitrile

100 mL Separating funnel

- grass hay; 10 mL of 1/10 diluted sample solution, others; 20 mL
- add 10 g of NaCl
- add 20 mL of 0.5 mol/L phosphate buffered saline (pH7.0)
- shake for 10 minutes

Upper layer (acetonitrile layer)

Sep-Pak Plus C₁₈ cartridge (prewash with 10 mL of acetonitrile)

- apply sample solution
- elute with 2 mL of acetonitrile

Elute

- dehydrate with Na₂SO₄ anhydride
- filtrate with filter paper (No.5B)
- evaporate to dryness under 40°C
- dissolve in 2.0 mL of acetonitrile-toluene (3:1)

ENVI-Carb/NH₂ cartridge (prewash with 10 mL of acetonitrile-toluene (3:1))

- apply sample solution
- add 4 mL of acetonitrile-toluene (3:1)
- elute with 16 mL of acetonitrile-toluene (3:1)
- evaporate to dryness under 40°C
- dissolve in 2.0 mL of methanol

LC-MS

Scheme 1 Analytical procedure for imidacloprid in feeds by using LC-MS

Table 1 Operating conditions for LC-MS

Column	Agilent ZORBAX XDB-C18 (2.1 mm i.d.×150 mm, 3.5 μm)
Mobile phase	A: 5 mmol/L ammonium acetate solution, B: 5 mmol/L ammonium acetate methanol solution B(%) 15%(0 min)→40%(1 min)→40%(3.5 min)→50%(6 min)→55%(8 min)→ 95%(17.5 min)→95%(30 min)→15%(30.1 min)→47 min(15%)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temp.	40°C
Ionization	Electrospray ionization(ESI) positive mode
Monitor ion	<i>m/z</i> 256

3 結果及び考察

3.1 共同試験

本法の再現精度を調査するため、共通試料による共同試験を実施した。

穀類（とうもろこし）及び乾牧草（アルファルファ）を用い、株式会社島津総合分析試験センター、社団法人日本科学飼料協会科学飼料研究センター、財団法人日本穀物検定協会中央研究所、財団法人日本食品分析センター多摩研究所、全国酪農業協同組合連合会分析センター、独立行政法人肥飼料検査所（現（独）農林水産消費安全技術センター）本部、同大阪事務所（現同神戸センター大阪事務所）及び同仙台事務所（現同仙台センター）の8試験室で共同試験を実施した。その結果は Table 2 のとおり、とうもろこし中のイミダクロプリドの平均回収率は 83.0%、その室内繰返し精度及び室間再現精度は相対標準偏差（ RSD_r 及び RSD_R ）として 3.0% 及び 15% であり、HorRat は 0.66 であった。また、アルファルファ中のイミダクロプリドの平均回収率は 84.3%、その室内繰返し精度及び室間再現精度は相対標準偏差（ RSD_r 及び RSD_R ）として 3.5% 及び 12% であり、HorRat は 0.96 であった。

なお、参考のため、各試験室で使用したガスクロマトグラフ質量分析計の機種等を Table 3 に示した。

Table 2 Quantitative value of imidacloprid from corn spiked at 100 µg/kg and alfalfa spiked at 5,000 µg/kg in the collaborative study

Lab No.			(µg/kg)	
	Corn		Alfalfa	
1	89.4	87.0	4,330	4,100
2	101.2	97.8	5,020	4,890
3	84.1	85.4	4,080	4,360
4	89.5	84.7	4,400	4,210
5	71.2	70.0	3,560	3,830
6	71.8	75.8	3,500	3,520
7	68.0	62.6	1,280 ^{e)}	1,230 ^{e)}
8	92.6	96.3	4,490	4,730
Spiked level	100.0		5,000	
Mean value ^{a)}	83.0		4,217	
Recovery (%)	83.0		84.3	
RSD_r ^{b)} (%)	3.0		3.5	
RSD_R ^{c)} (%)	15		12	
$PRSD_R$ ^{d)} (%)	22		13	
HorRat	0.66		0.96	

a) Corn: $n=16$, Alfalfa: $n=14$ (without Lab No. 7)

b) Relative standard deviation of repeatability within same laboratory

c) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

d) Predicted Relative standard deviation of reproducibility between laboratories calculated from the modified Horwitz equation

e) Excluded by the single Grubbs test

Table 3 Instruments used in the collaborative study

Lab No.	LC/MS	Column
1	SHIMADZU LCMS-2010EV prominence	Agilent ZORBAX XDB-C18 (2.1 mm i.d.×150 mm, 3.5 μm)
2	LC:Agilent 1100 series MS:Agilent G1956B	Kanto Chemical Mightysil RP-18GP (2.0 mm i.d.×150 mm)
3	SHIMADZU LCMS-2010EV	SHIMAZDU VP-ODS (2.0 mm i.d.×150 mm, 5 μm)
4	LC:Waters alliance2695 MS:Waters Micromass Quattro micro	GL Sciences Inertsil ODS-3 (2.1 mm i.d.×150 mm, 5 μm)
5	Waters Quattro micro API Mass Analyzer	Agilent ZORBAX XDB-C18 (2.1 mm i.d.×150 mm, 3.5 μm)
6	SHIMADZU LCMS-2010EV	Agilent ZORBAX XDB-C18 (2.1 mm i.d.×150 mm, 3.5 μm)
7	SHIMADZU LCMS-2010EV	Phenomenex Gemini 5u C18 110A (2.0 mm i.d.×150 mm, 5 μm)
8	SHIMADZU LCMS-2010EV	Agilent ZORBAX XDB-C18 (2.1 mm i.d.×150 mm, 3.5 μm)

4 まとめ

飼料中のイミダクロプリドの液体クロマトグラフ質量分析計による定量法について検討したところ、次の結果を得た。

とうもろこし及び乾牧草にイミダクロプリドとしてそれぞれ 100 μg/kg 及び 5,000 μg/kg 相当量を添加した試料を用いて、8 試験室で本法による共同試験を実施した。その結果、とうもろこしの平均回収率は 83.0%であり、その室内繰返し精度及び室間再現精度は相対標準偏差 (RSD_f 及び RSD_R) として 3.0%及び 15%であり、HorRat は 0.66 であった。また、乾牧草の平均回収率は 84.3%であり、その室内繰返し精度及び室間再現精度は相対標準偏差 (RSD_f 及び RSD_R) として 3.5%及び 12%であり、HorRat は 0.96 であった。

なお、本法は、平成 18 年 12 月 18 日付けで飼料分析基準に収載された³⁾。

また、添加回収試験及び定量下限の検討については、財団法人日本食品分析センターで検討を行っている⁵⁾ことからこちらを参照されたい (p.225)。

謝 辞

共同試験にご協力をいただいた株式会社島津総合分析試験センター、社団法人日本科学飼料協会科学飼料研究センター、財団法人日本穀物検定協会中央研究所、財団法人日本食品分析センター多摩研究所及び全国酪農業協同組合連合会分析センターの試験室の各位に感謝の意を表します。

文 献

- 1) 厚生労働省告示：“食品、添加物等の規格基準の一部を改正する件”，平成 17 年 11 月 29 日，平成 17 年厚生労働省告示第 499 号 (2005)。

- 2) 第 188 回食品安全委員会配付資料「資料 2:農薬専門調査会における審議状況について(イミダクロプリド)」(2007).
- 3) 農林水産省令：“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，農林省令第 35 号 (1976).
- 4) 農林水産省消費・安全局長通知：“飼料分析基準の一部改正について”，平成 18 年 12 月 18 日，18 消安第 9921 号 (2006).
- 5) 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」，平成 19 年 3 月，財団法人日本食品分析センター (2007).