

3) LC-MS/MS による水稻中の農薬分析法の検討 及び育苗箱施用剤の施用時期の違いによる移植後農薬濃度の推移調査

門田健太郎 青木 愛 島 絵里子 田村香菜 今辻麻美

はじめに

米は日本人の食生活を支える主要な作物であり、水稻は本県農産物の作付け面積の 30%を占める重要な位置づけである¹⁾。米の安定生産には、病虫害被害の抑制が不可欠であり、海外から飛来し水田内で急速に増殖するトビイロウンカは、本県における水稻の重要害虫に指定されており、多発生すると坪枯れを引き起こし、収量を大幅に減少させる要因となる²⁾。

トビイロウンカの防除には、育苗箱施用剤（以下「苗箱剤」という。）と本田防除を組み合わせた防除体系が推奨されている。苗箱剤の施用は、以前は移植時施用が多かったものの、近年では水稻栽培の大規模化に伴い移植時期の省力化が求められていることから、播種時施用も普及している³⁾。

しかし、播種から移植までの育苗期間はおよそ 1 か月あるため、播種時施用と移植時施用では移植後の農薬効果の持続期間に差が出ると考えられ、播種時施用は移植時施用と比較して早く水稻中の農薬濃度が減少することが先行研究⁴⁾で報告されている。この先行研究では、水稻の育苗方法として、散水装置を用いて 1 日に数回かん水する頭上散水と用水を揚げて一時的に湛水状態を維持して育苗箱の底面から吸水させる底面給水について検討されている。

本県では、水田育苗法という水田の一部に区画を設けて育苗する方法も生産現場では行われており、水田育苗法では常時湛水状態が維持されるため、先行研究での育苗条件より育苗箱中の土壌水分が高い状態が維持される。この土壌水分条件の違いにより、先行研究の播種時処理と本県の水田育苗法での播種時処理では、水稻中の農薬濃度の推移に差が生じる可能性が考えられた。そこで、水田育苗法で育苗した場合における、苗箱剤の播種時施用と移植時施用について、移植後の農薬濃度の推移を調査したので報告する。

調査方法

1. 試料

試料は、熊本県農業研究センター生産環境研究所病虫害研究室より提供いただいた水稻を用いた。試料の耕種概要を表 1 に示す。

試料は、苗箱剤が施用されていない「無施用区」、苗箱

剤が播種時に施用された「播種時区」、移植時に施用された「移植時区」があり、播種時区と移植時区の苗箱剤の施用量は 50 g/箱であった。

試料は採取日に当所へ搬入され、分析当日まで-30°Cの条件で有姿のまま冷凍保管した。

表 1 耕種概要

供試作物 (品種)	水稻 (ヒノヒカリ)
播種日	令和 7 年 (2025 年) 5 月 19 日
移植日	同年 6 月 19 日

2. 分析対象農薬

分析対象農薬は、トリフルメゾピリム、ペンフルフェン、クロラントラニプロールとした。なお、試料に施用された苗箱剤は、これらの農薬を含んでおり、苗箱剤中の含有率はトリフルメゾピリムとクロラントラニプロールが 0.75%、ペンフルフェンが 2.0%である。

3. 試薬等

3.1 標準品

トリフルメゾピリム標準品、ペンフルフェン標準品、クロラントラニプロール標準品は、富士フィルム和光純薬製の残留農薬試験用を用いた。

3.2 その他の試薬

アセトニトリル (HPLC 用)、メタノール (HPLC 用)、メタノール (LC/MS 用)、ギ酸 (LC/MS 用)、酢酸アンモニウム (試薬特級)は、富士フィルム和光純薬製を用いた。

3.3 標準原液及び混合標準液の調製

各標準品を 10 µg/mL となるようにメタノールに溶解したものを標準原液とし、これらを混合し、0.4 µg/mL となるようアセトニトリルで希釈したものを混合標準液とした。

4. 測定機器及び測定条件

Waters 製の LC-MS/MS を用いて測定した (表 2, 表 3)。

分析対象農薬の測定条件について、トリフルメゾピリムは既報⁵⁾をもとに定め、ペンフルフェン、クロラントラニプロールは、インフュージョン分析を行い、最適条件を求めた (表 4)。

5. 分析フロー

試料は、解凍後にハサミで細切りし、マルチビーズショッカー (MB3200 (S), 安井器械製) で均質化して分析に供した。

均質化後の抽出法は、既報⁶⁾を参考にしたが、均質化の方法をホモジナイズからマルチビーズショッカーでの粉碎に変更したため、既報では2回の超音波抽出のところを1回ずつのホモジナイズ抽出と超音波抽出に変更した (図1)。

表2 LC-MSMS 測定条件

LC 部		ACQUITY UPLC H-Class Plus (Waters 製)
分析カラム	ACQUITY UPLC BEH C18 (Waters 製)	粒径 1.7 μm, 内径 2.1 mm, 長さ 100 mm
カラム温度	40°C	
移動相	A 液	0.1%ギ酸/0.25 mM 酢酸アンモニウム含有水溶液
	B 液	0.1%ギ酸/0.25 mM 酢酸アンモニウム含有メタノール溶液
グラジエント	表3のとおり	
流速	表3のとおり	
MS/MS 部		Xevo TQ-XS (Waters 製)
イオン化法	ESI	
分析モード	MRM	
注入量	2 μL	

表3 グラジエント条件

Time (min)	A (%)	B (%)	Flow (mL/min)
0	85	15	0.3
13.5	30	70	0.3
28.5	5	95	0.3
28.6	0	100	0.4
35	0	100	0.4
35.1	85	15	0.3
45	85	15	0.3

6. 検量線

検量線は、混合標準液をメタノールで適宜希釈し、無施用区抽出液と水を添加したマトリックス添加検量線を用いた (無施用区抽出液 : 水 : 混合標準液 = 5 : 4 : 1)。いずれの農薬でも、検量線は 0.05~10 ng/mL の範囲において良好な直線性を示し、相関係数 0.99 以上であったことから、この範囲での定量が可能であると考えられた。

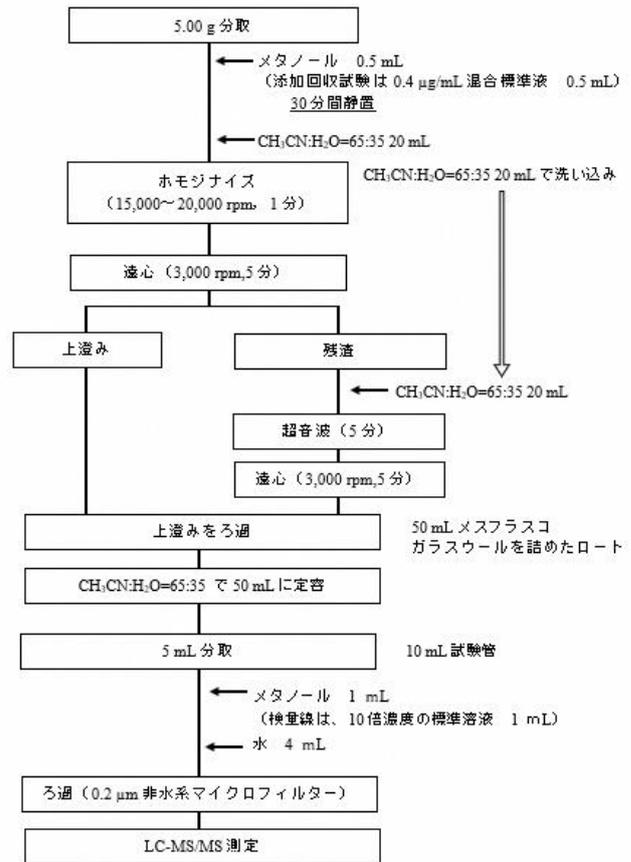


図1 分析フロー

表4 分析対象農薬と測定イオン等

農薬名	イオン化モード	保持時間 (min)	Q1 (m/z)	→	Q3 (m/z)	Cone (V)	Collision (eV)
トリフルメゾピリム	定量イオン	10.5	399.1	→	279.0	2	19
	定性イオン		399.1	→	306.0	2	19
ペンフルフェン	定量イオン	16.2	318.1	→	141.0	32	32
	定性イオン		318.1	→	234.0	32	16
クロラントラニプロール	定量イオン	13.1	484.0	→	112.0	12	68
	定性イオン		484.0	→	285.9	12	12

7. マルチビーズショッカーでの均質化の検討

マルチビーズショッカーは、専用チューブに試料と一緒に入れるメタルコーンによって破碎を行う。本研究では、50 mL の専用チューブ (ST5010PCR, 安井器械製) と 50 mL 粉碎チューブ用メタルコーン (MC-5038R, 安井器械製) を用いて、粉碎条件を検討した (表 5)。

表 5 マルチビーズショッカー検討条件

回転数	動作時間
2,500 rpm	15 秒
	20 秒
3,000 rpm	15 秒
	20 秒

8. 分析法の妥当性の評価

8.1 妥当性の評価方法

本研究の分析法は、当所が食品に対して実施している分析法と均質化の方法が異なっており、実試料分析では一定期間冷凍保管後に分析したことから、分析法の妥当性について検討した。なお、分析法の妥当性は、無施用区を用いた添加回収試験の回収率によって確認し、「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン」⁷⁾の真度の項目を参考に、回収率が 70%~120% の場合を良好な結果として評価した。

8.2 添加回収試験

均質化後の無施用区を 5.00 g はかり取り、試料中濃度が 0.04 µg/g となるように混合標準液を添加し、30 分静置後、抽出・測定した。

8.3 均質化の影響評価試験

均質化前の無施用区に試料中濃度が 0.04 µg/g となるよう混合標準液を添加し、30 分静置後、均質化した。均質化後の試料を 5.00 g はかり取り、抽出・測定した。

また、均質化後の無施用区に混合標準液を添加した添加回収試験を併せて実施し、均質化の影響を評価した。

8.4 冷凍保管による影響評価試験

均質化後の無施用区を 5.00 g はかり取り、試料中濃度が 0.04 µg/g となるように混合標準液を添加し、-30℃で 3 週間冷凍保管した後、解凍して抽出・測定した。

また、分析当日に混合標準液を添加した添加回収試験を併せて実施し、冷凍保管による影響を評価した。

9. 実試料分析

分析フローの方法により、無施用区、播種時区、移植時区の実試料分析を行った。分析した実試料の採取日及び分析日を表 6 に示す。

表 6 試料採取日及び分析日

試料採取日	分析日
6月24日 (5日)	7月10日
7月8日 (19日)	
7月22日 (33日)	8月12日
8月5日 (47日)	

※ () 中の日数は、移植から採取までの日数を示す。

結果及び考察

1. 均質化の検討

本研究を始めた時点では、均質化は当所で実施している農産物中の残留農薬分析と同様に、フードプロセッサーで細断後、ホモジナイザーによる均質化を試みた。しかし、今回の試料が水稻の茎葉であったため、フードプロセッサー及びホモジナイザーの刃に茎葉が巻き付き、均質化できなかった。そこで、均質化の方法をホモジナイズからマルチビーズショッカーでの破碎に変更した。

マルチビーズショッカーでの均質化は、均質化後のメタルコーンの発熱や処理時間を考慮して、回転数 3,000 rpm、処理時間 15 秒とした (図 2)。



図 2 均質化処理後の試料 (3,000 rpm, 15 秒)

2. 分析法の妥当性の評価

2.1 添加回収試験

均質化後の無施用区に対する添加回収試験の回収率はいずれの農薬も 70%~120% の範囲内であり、良好であった (表 7)。このことから、構築した分析フローで分析できることが示された。

表 7 添加回収試験の結果

農薬名	回収率 (%)
トリフルメゾピリム	85.2
ペンフルフェン	81.8
クロラントラニプロール	81.6

2.2 均質化による農薬への影響

均質化前の無施用区に混合標準液を添加して均質化した場合の添加回収試験の回収率は、いずれの農薬も 70%~120% の範囲内であり、良好であった (表 8)。また、均質化前に混合標準液を添加した場合の回収率は、均質化後

に混合標準液を添加した場合の回収率と比較して、すべての農薬で同程度であり、農薬は均質化時に分解されないと考えられた。

表 8 均質化の影響

農薬名	回収率 (%)	
	均質化前 農薬添加	均質化後 農薬添加
トリフルメゾピリム	81.6	78.7
ペンフルフェン	79.9	79.5
クロラントラニプロール	85.3	79.0

2.3 冷凍保管による農薬への影響

3 週間冷凍保管した場合の添加回収試験の回収率はいずれの農薬も 70%~120%の範囲内であり、良好であった(表 9)。また、3 週間冷凍保管した場合の添加回収試験の回収率は、分析当日に混合標準液を添加した場合の回収率と比較して、すべての農薬が同程度であり、農薬は 3 週間の冷凍保管中に分解されないと考えられた。

表 9 冷凍保管の影響

農薬名	回収率 (%)	
	冷凍保管	当日添加
トリフルメゾピリム	80.1	80.5
ペンフルフェン	82.7	81.1
クロラントラニプロール	82.2	80.1

3. 実試料分析の結果

実試料中のトリフルメゾピリム濃度の推移を表 10 に示す。6 月 24 日及び 7 月 8 日に採取した試料において、播種時区が移植時区より低く、水田育苗法により育苗した本試験の結果も先行研究と同様の結果となった。なお、7 月 22 日以降に採取した試料では定量下限値未達となり、その後の差は認められなかった。

ペンフルフェンもトリフルメゾピリムと同様に、播種時区が移植時区より低い試料中濃度で推移した(表 11)。

一方、クロラントラニプロールは、7 月 22 日採取試料を除いて播種時区が移植時区より高い試料中濃度で推移した(表 12)。

表 10 トリフルメゾピリムの推移

	各採取日の試料中農薬濃度(μg/g)			
	6/24	7/8	7/22	8/5
無施用区	ND	ND	ND	ND
播種時区	0.044	0.001	ND	ND
移植時区	1.252	0.018	ND	ND

※定量下限値:0.001 μg/g

表 11 ペンフルフェンの推移

	各採取日の試料中農薬濃度(μg/g)			
	6/24	7/8	7/22	8/5
無施用区	ND	ND	ND	ND
播種時区	0.368	0.077	0.014	0.003
移植時区	0.544	0.123	0.067	0.006

※定量下限値:0.001 μg/g

表 12 クロラントラニプロールの推移

	各採取日の試料中農薬濃度(μg/g)			
	6/24	7/8	7/22	8/5
無施用区	0.001	0.001	ND	ND
播種時区	0.734	0.303	0.035	0.018
移植時区	0.316	0.211	0.054	0.008

※定量下限値:0.001 μg/g

ま と め

本研究では、水稻中の農薬分析において、マルチピーズショッカーによる試料の均質化を行い、ホモジナイズと超音波により溶媒抽出し、LC-MS/MS で測定する分析法を構築し、構築した分析法の妥当性について検討した。

さらに、構築した分析法を用いて、播種時または移植時に苗箱剤を施用し、水田育苗法により育苗した水稻を対象として、移植後の水稻中農薬濃度の推移を調査した。その結果、本県の重要害虫であるトビイロウンカに対する有効成分トリフルメゾピリムは、苗箱剤の施用が約 1 か月早い播種時施用では、移植時施用と比較して移植後の農薬濃度が低く推移することが確認できた。

このことは、本田防除の時期を決めるにあたって、有益な情報であると考えられ、熊本県農業研究センターでの病害虫の発生状況調査や薬効調査を合わせることで、実際の防除効果の評価及び効果的な防除技術の開発につながると思われる。

また、本研究で得られたような栽培期間中の農薬濃度の推移に関する知見は、当所が実施している農産物中の残留農薬に関する研究に生かすことができる。また、分析法の検討を通して、基準値超過や健康危機管理事案発生時の分析技術の向上にも資する。

今後も引き続き熊本県農業研究センターをはじめとした他部署との連携を強化し、生産から消費までの各段階における食の安全安心の確保に取り組んでいくことが期待される。

謝 辞

本調査にあたり、水稻のサンプルをいただいた熊本県農業研究センター生産環境研究所に感謝申し上げます。

文 献

- 1) 熊本県：令和 4～5 年度熊本県農業動向年報, 35-36 (令和 6 年度) .
- 2) 農林水産省：薬剤感受性が低下したイネウンカ類に対する防除対策
https://www.maff.go.jp/j/syouan/syokubo/boujyo/pdf/250226_kumamoto.pdf (2025 年 12 月閲覧) .
- 3) JA 全農ながさき：肥料農薬レポート, 2019 年 4 月号
- 4) 成富毅誌：植物防疫, 78 (8), 40-44 (2024 年) .
- 5) 宇梶徳史, 八木一真, 小林将英, 福島宏暢：熊本県保健環境科学研究所報, 51, 57-62 (2021) .
- 6) 福島宏暢, 澤田 愛, 富永純司, 本田大輔, 松本理世, 山口奈穂, 小林将英, 中原優子, 西名武士：熊本県保健環境科学研究所報, 50, 26-34 (2020) .
- 7) 「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインについて」(平成 19 年 11 月 15 日, 食安発第 1115001 号厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知) (平成 22 年 12 月 24 日, 一部改正, 食安発第 1224 第 1 号) .