

1 飼料中のジウロンの液体クロマトグラフ質量分析計による定量法

野村 昌代^{*1}, 杉本 泰俊^{*2}, 鷲尾 和也^{*2}

Determination of Diuron in Feeds by LC-MS

Masayo NOMURA^{*1}, Yasutoshi SUGIMOTO^{*2} and Kazuya WASHIO^{*2}

(*¹Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fukuoka Regional Center
(Now Fertilizer and Feed Inspection Department),

*²Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fukuoka Regional Center)

An analytical method for determination of diuron in feeds using liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry (LC-ESI-MS) was developed. After addition of 15 mL (30 mL for grass hay) of water, the sample was left for 30 minutes. Diuron was extracted with 100 mL of acetone and filtered. (The extract was topped up to 200 mL for grass hay.) All sample solution (20 mL of the sample solution for grass hay) was condensed. After the addition of 5 g of sodium chloride (10 mL of water and 5 g of sodium chloride for grass hay) into the condensed solution, the sample solutions were purified by Chem Elut cartridge with hexane and evaporated to dryness. The residue was dissolved in cyclohexane-acetone (4:1). It was purified by gel permeation chromatography (GPC) with cyclohexane-acetone (4:1) and Sep-Pak Plus Florisil cartridge with hexane-acetone (17:3). The eluate was evaporated to dryness and dissolved in 2 mL of methanol, and subjected to LC-ESI-MS for determination of diuron. The LC separation was carried out on an ODS column (ZORBAX Eclipse XDB-C18, 2.1 mm i.d.×150 mm, 5 μm (Agilent Technologies)) using methanol-2 mmol/L ammonium acetate solution (13:7) as a mobile phase. The determination was performed in selected ion monitoring (SIM) mode using $[M(^{12}C_9^1H_{10}^{35}Cl_2^{14}N_2^{16}O)+H]^+$ ion at m/z 233 ($[M(^{12}C_9^1H_{10}^{35}Cl^{37}Cl^{14}N_2^{16}O)+H]^+$ ion at m/z 235 for ryegrass straw). A recovery test was conducted using two kinds of formula feed, corn, oats hay and ryegrass straw spiked with diuron at 0.2 and 0.02 mg/kg (4 and 0.4 mg/kg for oats hay, 2, 1 and 0.4 mg/kg for ryegrass straw). The mean recoveries of diuron were 84.8~99.2 % and the relative standard deviations (RSD) were within 7.8 %. A collaborative study was conducted in seven laboratories using formula feed for breeding hen and corn and oats hay spiked with diuron at 0.05 mg/kg (4 mg/kg for oats hay). The mean recovery of formula feed for breeding hen was 92.3 %, and the repeatability and reproducibility in terms of the relative standard deviations (RSD_r and RSD_R) were 4.7 % and 12 % respectively. These values were 86.9 %, 3.3 % and 12 % for corn ; 91.0 %, 2.6 % and 8.3 % for oats hay respectively.

Key words: 残留農薬 pesticide residue ; フェニル尿素系除草剤 phenylurea herbicide ; ジウロン diuron ; 液体クロマトグラフ質量分析計 liquid chromatograph-mass spectrometer

*¹ 独立行政法人農林水産消費安全技術センター福岡センター, 現 同肥飼料安全検査部

*² (独) 農林水産消費安全技術センター福岡センター

(LC-MS) ; エレクトロスプレーイオン化法 electrospray ionization (ESI) ; ゲル浸透クロマトグラフィー gel permeation chromatography (GPC) ; 飼料 feed ; 共同試験 collaborative study

1 緒 言

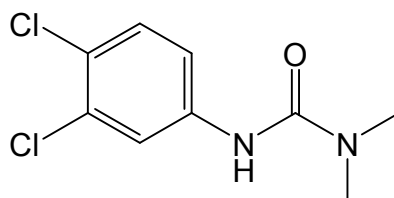
ジウロンはデュポン社によって開発された非ホルモン型のフェニル尿素系除草剤であり、光合成電子伝達系 II を阻害する。日本では 1960 年に登録されており、畑地、果樹園、非農耕地などで広く使用されている¹⁾。

国内の食品、添加物等の規格基準における残留農薬基準値は、小麦及びとうもろこしで 0.7 ppm、大麦及びライ麦で 0.6 ppm、その他の穀類で 0.05 ppm となっている。

ジウロンの定量法は、「平成 17 年度飼料の有害物質等残留基準設定等委託事業」において、液体クロマトグラフ質量分析計一斉分析法²⁾が検討されたが、鶏用配合飼料及び乾牧草での添加回収試験の回収率が低かったことから、一斉分析法への適用は不可能と判断された。また、食品では、厚生労働省よりウレア系 6 農薬の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を用いた同時分析法³⁾が試験法として通知されている。

飼料中のジウロンの個別定量法としては、(財)日本食品分析センターが「平成 19 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」において開発した方法(以下「分析センター法」という。)⁴⁾がある。筆者らはこの分析センター法を基に、飼料分析基準⁵⁾への適用の可否について検討したので報告する。

なお、ジウロンの構造式を Fig. 1 に示した。



Diuron

3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea

$C_9H_{10}Cl_2N_2O$ MW: 233.1

CAS No.: 330-54-1

Fig. 1 Chemical structure of diuron

2 実験方法

2.1 試 料

市販の配合飼料(ブロイラー肥育後期用及び肉用牛肥育用)、とうもろこし及び乾牧草(えん麦乾草及びライグラスわら)をそれぞれ 1 mm の網ふるいを通すまで粉砕し、供試試料とした。

なお、添加回収試験に用いた配合飼料の一例を Table 1 に示した。

Table 1 Compositions of the formula feeds

Formula feed types	Ingredient types	Proportion (%)	Ingredients
For broiler finishing chick	Grains	67	Milo, Corn
	Oil seed meal	22	Soybean meal, Rapeseed meal
	Animal by-products	2	Fish meal, Chicken meal, Feather meal
	Others	9	Animal fat, Calcium carbonate, Calcium phosphate, Salt, Garlic powder, Green tea extract, Fermented milk powder, Dried yeast cell wall, Cinnamon, Pumpkin seed, Feed additives
For beef cattle	Grains	75	Corn, Barley
	Brans	17	Wheat bran, Corn gluten feed
	Oil seed meal	7	Soybean meal, Rapeseed meal
	Othes	1	Calcium carbonate, Salt

2.2 試薬

1) ジウロン標準液

ジウロン標準品（関東化学製，純度 99.9 %）25 mg を正確に量って 50 mL の全量フラスコに入れ，アセトンを加えて溶かし，更に標線まで同溶媒を加えてジウロン標準原液を調製した（この液 1 mL はジウロンとして 0.5 mg ($f=0.999$) を含有する．）．使用に際して，標準原液の一定量をメタノールで正確に希釈し，1 mL 中にジウロンとして 0.01, 0.02, 0.04, 0.1, 0.2, 0.4, 1, 2 及び 4 μg を含有する各ジウロン標準液を調製した．

2) 試薬等

アセトニトリル，メタノール及び蒸留水は液体クロマトグラフ用試薬を用いた．アセトン，ヘキサン及びシクロヘキサンは残留農薬試験用試薬を用いた．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：

LC 部：島津製作所製 Prominence

MS 部：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) ロータリーエバポレーター：BÜCHI Labortechnik 製 R-210

4) 遠心分離器：久保田製作所製 5100

5) 多孔性ケイソウ土カラム：Varian 製 Chem Elut, 20 mL (20 mL 保持用)

6) ゲル浸透クロマトグラフ：島津製作所製 GPC システム

ポンプ：LC-10ATvp

オートサンプラー：SIL-10AP

フラクションコレクター：FRC-10A

7) 合成ケイ酸マグネシウムミニカラム：Waters 製 Sep-Pak Plus Florisil cartridge (充てん剤量 910 mg) にリザーバーを連結したもの

8) メンブランフィルター：東洋濾紙製 DISMIC-25HP (孔径 0.45 μm , 直径 25 mm, PTFE)

2.4 定量方法

1) 抽出

i 乾牧草 分析試料 10.0 g を量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、水 30 mL を加え、30 分間静置後、更にアセトン 100 mL を加え、60 分間振り混ぜて抽出した。200 mL の全量フラスコをブフナー漏斗の下に置き、抽出液をろ紙（5 種 B）で吸引ろ過した。先の三角フラスコ及び残さを順次アセトン 50 mL で洗浄し、同様に吸引ろ過し、更に全量フラスコの標線までアセトンを加えた。この液 20 mL を 300 mL のなす形フラスコに正確に入れ、40 °C 以下の水浴で 3 mL 以下まで減圧濃縮し、カラム処理 I に供する試料溶液とした。

ii その他の飼料 分析試料 10.0 g を量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、水 15 mL を加え、30 分間静置後、更にアセトン 100 mL を加え、60 分間振り混ぜて抽出した。300 mL のなす形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アセトン 50 mL で洗浄し、同様に吸引ろ過した。ろ液を 40 °C 以下の水浴で 15 mL 以下まで減圧濃縮し、カラム処理 I に供する試料溶液とした。

2) カラム処理 I

試料溶液に塩化ナトリウム 5 g（乾牧草は水 10 mL 及び塩化ナトリウム 5 g）を加え、これを多孔性ケイソウ土カラムに入れ、5 分間静置した。300 mL のなす形フラスコをカラムの下に置き、試料溶液の入っていたなす形フラスコをヘキサン 5 mL ずつで 3 回洗浄し、洗液を順次カラムに加え、液面が充てん剤の上端に達するまで流下し、ジウロンを溶出させた。更に、ヘキサン 85 mL をカラムに加えて同様に溶出させ、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。

シクロヘキサン-アセトン（4+1）10 mL を正確に加えて残留物を溶かし、この液を 10 mL の共栓遠心沈殿管に入れ、1,000×g で 5 分間遠心分離した後、上澄み液をメンブランフィルターでろ過し、ゲル浸透クロマトグラフィーに供する試料溶液とした。

3) ゲル浸透クロマトグラフィー

試料溶液 4 mL（乾牧草は 2 mL）をゲル浸透クロマトグラフに注入し、ジウロンが溶出する画分を 50 mL のなす形フラスコに分取し、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。ゲル浸透クロマトグラフの条件を Table 2 に示した。

ヘキサン 10 mL を加えて残留物を溶かし、カラム処理 II に供する試料溶液とした。

Table 2 Operating conditions of GPC for analyzing diuron

Column	Shodex CLNpak EV-2000AC (20 mm i.d.×300 mm, 15 μm)
Guard column	Shodex CLNpak EV-G AC (20 mm i.d.×100 mm, 15 μm)
Eluent	Cyclohexane-acetone(4:1)
Flow rate	5 mL/min
Fraction volume	90~110 mL

4) カラム処理 II

合成ケイ酸マグネシウムミニカラムをヘキサン 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。

50 mL のなす形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容器をヘキサ-

アセトン (17+3) 2 mL ずつで 3 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ジウロンを溶出させた。更に、ヘキサン-アセトン (17+3) 19 mL をミニカラムに加え、同様に溶出させた。

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。

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

試料溶液及び各ジウロン標準液各 2 μ L を液体クロマトグラフ質量分析計に注入し、Table 3 の測定条件に従って、選択イオン検出クロマトグラムを得た。

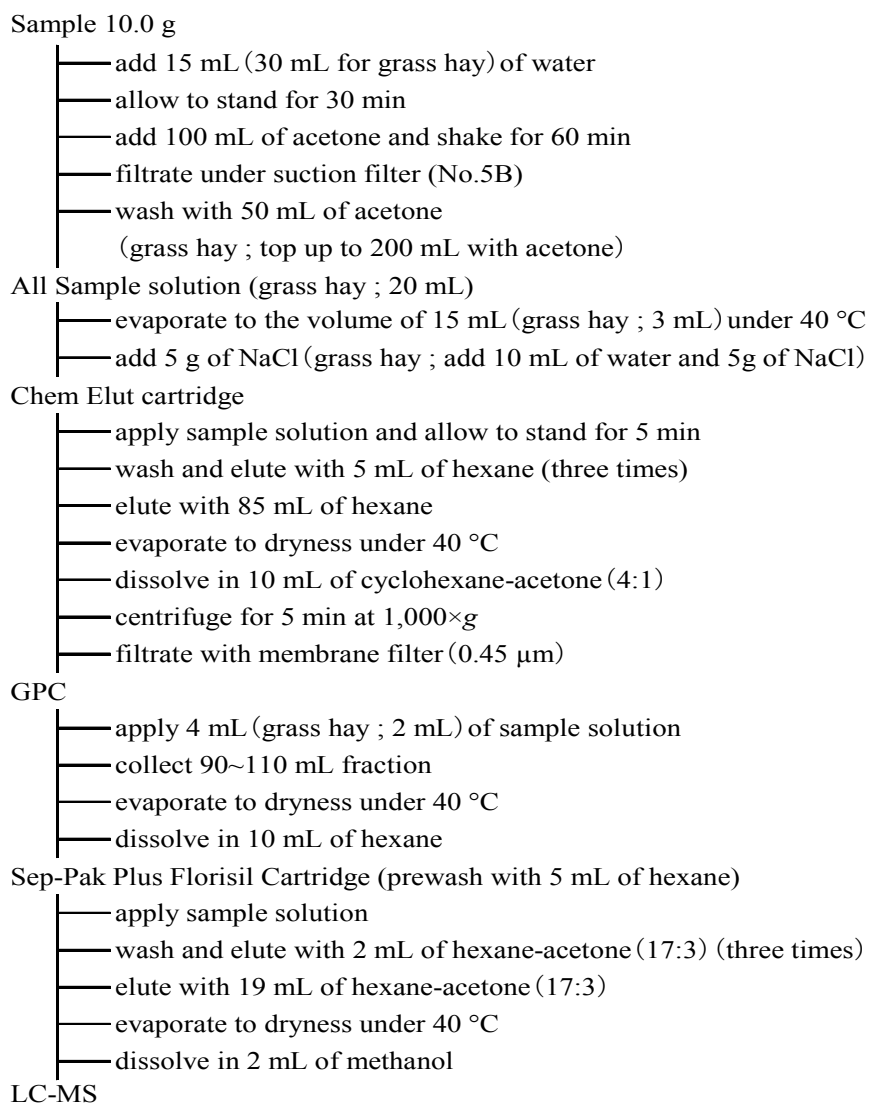
Table 3 Operating conditions of LC-MS for analyzing diuron

Column	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm i.d.×150 mm, 5 μ m)
Mobile phase	Methanol-2 mmol/L ammonium acetate solution(13:7)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temperature	40 °C
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Mode	Positive
Nebulizer gas	N ₂ (1.5 L/min)
Heat block temperature	200 °C
CDL temperature	250 °C
Monitor ion	<i>m/z</i> 233 (235 for rye grass straw)

6) 計 算

得られた選択イオン検出クロマトグラムからピーク面積又は高さを求めて検量線を作成し、試料中のジウロン量を算出した。

なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。



Scheme 1 Analytical procedure for diuron in feeds

3 結果及び考察

3.1 質量分析計条件の検討

分析センター法では、ジウロンのイオン化法としてエレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法 (以下「ESI 法」という.) の正イオンモードが用いられていることから、本法においても ESI 法を用いて検討を行った。

ジウロンの標準液を、今回の分析条件においてスキャンモードにて測定したところ、Fig. 2 のようなマススペクトルが得られ、モニターイオンとして最も感度のよい m/z 233 ($^{35}\text{Cl}_2$ 体のプロトン付加分子 $[\text{M}(^{12}\text{C}_9^1\text{H}_{10}^{35}\text{Cl}_2^{14}\text{N}_2^{16}\text{O})+\text{H}]^+$) を用いることとした。ライグラスわらについては、 m/z 233 では妨害ピークが認められたため、 m/z 233 の次に感度のよい m/z 235 ($^{35}\text{Cl}^{37}\text{Cl}$ 体のプロトン付加分子 $[\text{M}(^{12}\text{C}_9^1\text{H}_{10}^{35}\text{Cl}^{37}\text{Cl}^{14}\text{N}_2^{16}\text{O})+\text{H}]^+$) を用いることとした。

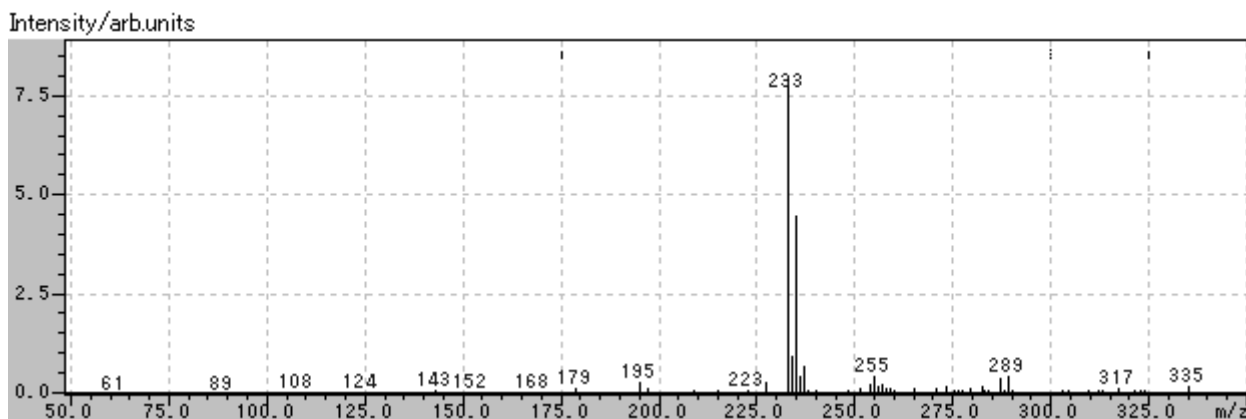


Fig. 2 Mass spectrum of standard solution of diuron

3.2 検量線の作成

調製した 0.01, 0.02, 0.04, 0.1, 0.2, 0.4, 1, 2 及び 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のジウロン標準液各 2 μL を液体クロマトグラフ質量分析計に注入し、得られたクロマトグラムのピーク面積及び高さを求めて検量線を作成した。

その結果、検量線は Fig. 3 のとおり 0.01~4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (注入量として 0.02~8 ng) の範囲で直線性を示した。

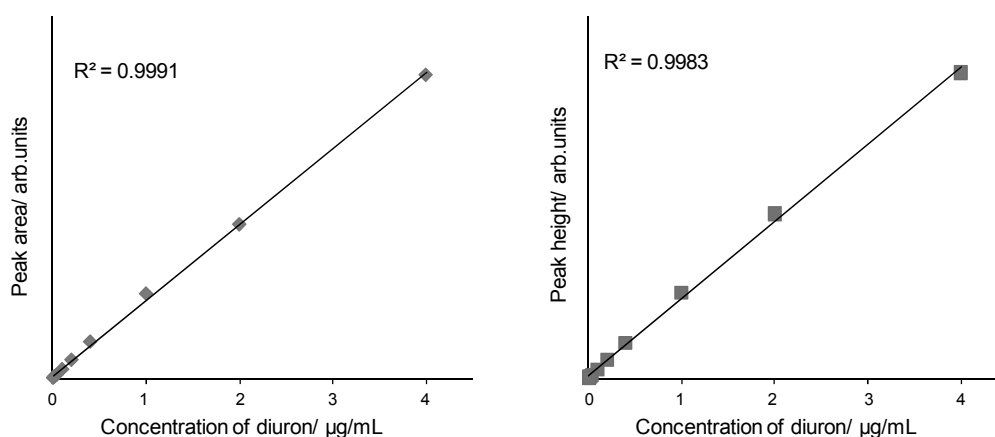


Fig. 3 Calibration curves of diuron by peak area (left) and peak height (right)

3.3 多孔性ケイソウ土カラムの溶出画分の検討

多孔性ケイソウ土カラム処理の溶出画分の確認を行った。

肉用牛肥育用配合飼料を 2.4 の 1) により抽出した液にジウロンとして 1 mg/kg 相当量を添加し、2.4 の 2) の多孔性ケイソウ土カラム処理に供する試料溶液とし、その後、本法により操作した後、溶出画分の回収率を確認した。

その結果、Table 4 のとおりジウロンは 0~100 mL に溶出し、100 mL 以後の画分には溶出されなかった。以上の結果から、本カラムにおける溶出には分析センター法と同様にヘキサン 100 mL を用いることとした。

Table 4 Elution pattern from Chem Elut cartridge

Fraction volume (mL)	0~50	~100	~150	~200	Total
Recovery of diuron ^{a)} (%)	93	5	0	0	98

a) Mean (n=2)

3.4 ゲル浸透クロマトグラフィーの溶出画分の検討

ゲル浸透クロマトグラフィーの溶出画分の確認を行った。

肉用牛肥育用配合飼料を 2.4 の 1) 及び 2) により操作した試料溶液にジウロンとして 1 mg/kg 相当量を添加し, 2.4 の 3) のゲル浸透クロマトグラフィーに供する試料溶液とし, 80 mL から 115 mL の間を 5 mL 間隔で分画した. その後, 本法により操作した後, 溶出画分の回収率を確認した.

その結果, Table 5 のとおりジウロンはシクロヘキサン-アセトン (4+1) 90~110 mL の画分に溶出され, 90 mL 以前及び 110 mL 以後の画分には溶出されなかった. 分析センター法では, シクロヘキサン-アセトン (4+1) 85~105 mL の溶出画分を分取しているが, 本法ではシクロヘキサン-アセトン (4+1) 90~110 mL の溶出画分を分取することとした.

Table 5 Elution pattern from GPC

Fraction volume (mL)	80~85	~90	~95	~100	~105	~110	~115	Total
Recovery of diuron ^{a)} (%)	0	0	9	54	31	3	0	97

a) Mean (n=2)

3.5 合成ケイ酸マグネシウムミニカラムの溶出画分の検討

合成ケイ酸マグネシウムミニカラムの溶出画分の確認を行った。

肉用牛肥育用配合飼料を 2.4 の 1), 2) 及び 3) により操作した試料溶液にジウロンとして 1 mg/kg 相当量を添加し, 2.4 の 4) のカラム処理 II に供する試料溶液とし, 10 mL を負荷した後にヘキサン-アセトン (17+3) でジウロンを画分に溶出した. その後, 本法により操作した後, 溶出画分の回収率を確認した.

その結果, Table 6 のとおりジウロンはヘキサン-アセトン (17+3) 0~25 mL の画分で溶出し, 25 mL 以後の画分には溶出しなかった. 以上の結果から, 本カラムにおける溶出には分析センター法と同様にヘキサン-アセトン (17+3) 25 mL を用いることとした.

Table 6 Elution pattern from Florisil mini column

	Hexane	Hexane-acetone (17:3)				Total
	0~10 mL	0~10 mL	~20 mL	~25 mL	~30 mL	
Recovery of diuron ^{a)} (%)	0	84	11	1	0	96

a) Mean (n=2)

3.6 妨害物質の検討

市販の配合飼料 (肉用牛肥育用, 乳用牛飼育用, プロイラー肥育後期用, 種鶏飼育用, 子豚育成用及び種豚飼育用), とうもろこし, 大麦, 小麦, えん麦, マイロ, ふすま及び乾牧草 (えん麦乾草, アルファルファ乾草及びライグラスわら) を用い, 本法に従って調製した試料溶液を液

体クロマトグラフ質量分析計に注入し、妨害ピークの有無を確認したところ、ライグラスわらのみにおいて定量を妨げるピークが認められたが、モニターイオンを m/z 235 に変更すると妨害ピークは認められなかった。このため、ライグラスわらの測定においては、モニターイオンを m/z 235 に変更する必要がある。

なお、妨害物質の検討で得られた選択イオン検出クロマトグラムの一例を Fig. 4 に示した。

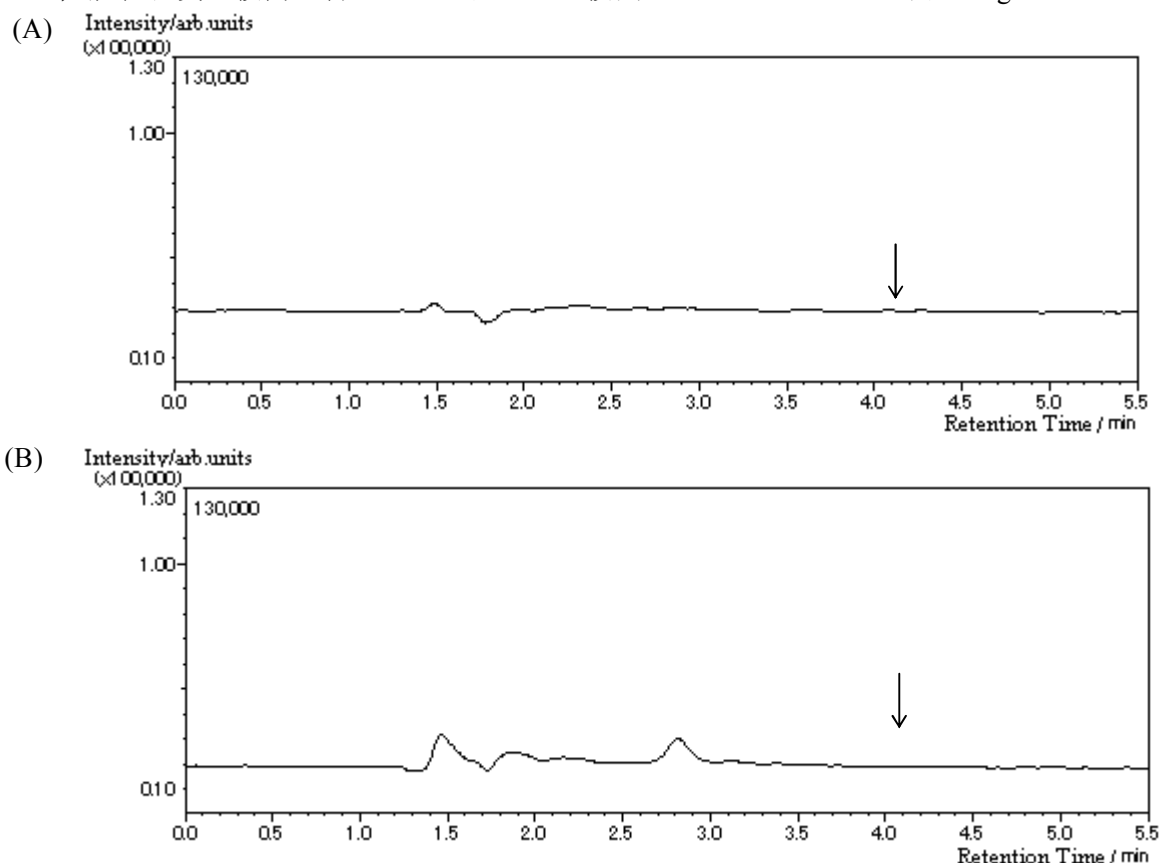


Fig. 4 SIM chromatograms of blank solutions

LC-MS conditions are shown in Table 3.

(A) Sample solution of corn (not spiked)

(B) Sample solution of formula feed for beef cattle (not spiked)

(Arrows indicate the retention times of diuron.)

3.7 添加回収試験

2.1 で調製したブロイラー肥育後期用配合飼料、肉用牛肥育用配合飼料及びとうもろこしにジウロンとして 0.2 及び 0.02 mg/kg 相当量、えん麦乾草に 4 及び 0.4 mg/kg 相当量を添加した試料を用いて、本法により 3 点併行で定量し、回収率及び繰返し精度を検討した。その結果は、Table 7 のとおり、ジウロンの平均回収率は 84.8~97.5%，その繰返し精度は、相対標準偏差 (RSD) として 6.9 %以下の成績が得られた。また、妨害ピークが認められたライグラスわらに 2, 1 及び 0.4 mg/kg 相当量を添加した試料を用いて、 m/z 235 のモニターイオンを用いて定量した結果、平均回収率は 90.3~99.2%，その繰返し精度は、相対標準偏差 (RSD) として 7.8 %以下の成績が得られた。

なお、添加回収試験で得られた選択イオン検出クロマトグラムの一例を Fig. 5 に示した。

Table 7 Recoveries of diuron from five kinds of feed

Spiked level (mg/kg)	Feed types									
	Formula feed for broiler finishing chick		Formula feed for beef cattle		Corn		Oats hay		Ryegrass straw	
	Recovery ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)
4							97.2	1.0		
2									98.3	7.8
1									90.3	5.5
0.4							97.5	2.6	99.2	1.5
0.2	84.8	6.9	88.0	4.2	96.6	2.2				
0.02	95.0	2.6	95.8	5.4	94.2	3.1				

a) Mean ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

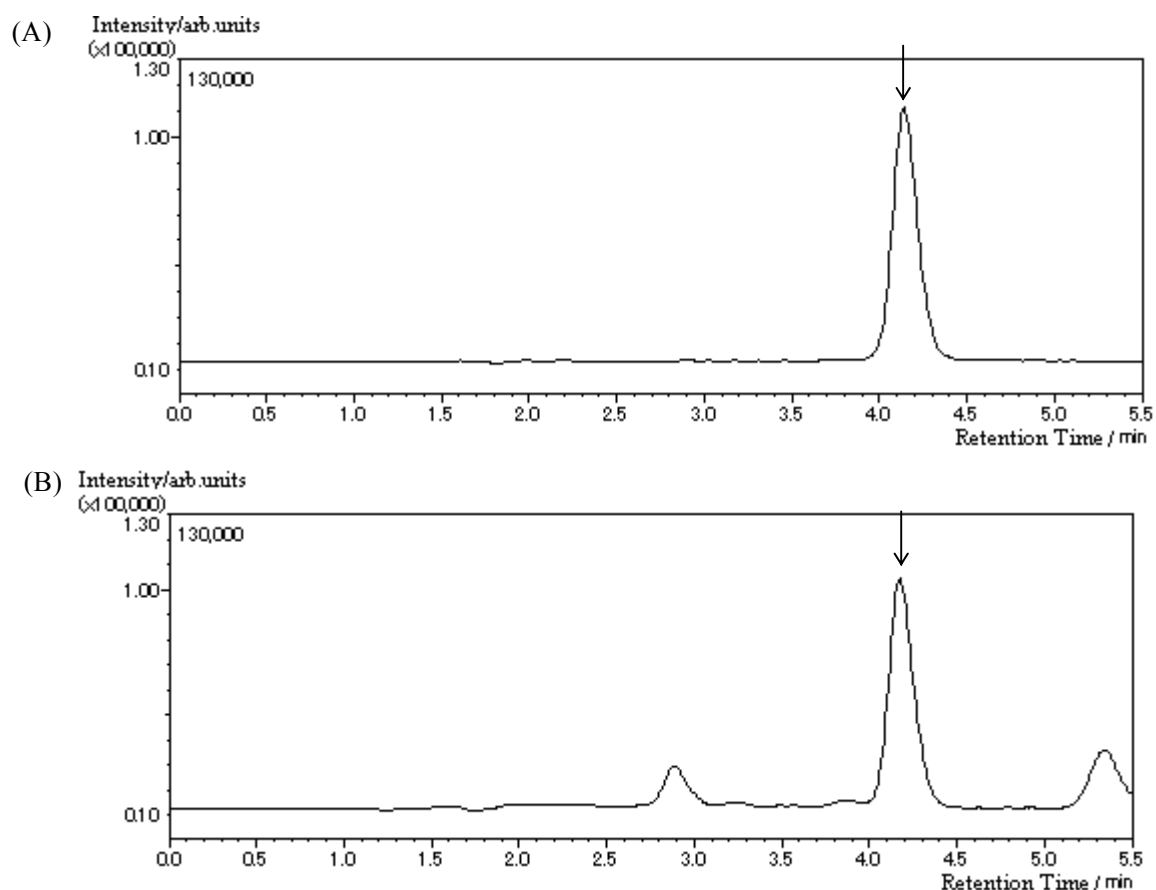


Fig. 5 SIM chromatograms of diuron

LC-MS conditions are shown in Table 3.

(A) Standard solution (The amount of diuron is 0.8 ng.)

(B) Sample solution of formula feed for broiler finishing chick spiked diuron at 200 µg/kg

(Arrows indicate the peak of diuron.)

3.8 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に、ブロイラー肥育後期用配合飼料、肉用牛肥育用配合飼料、とうもろこし及び乾牧草（えん麦乾草）に、ジウロンをそれぞれ添加し、本法に従って分析を3点併行で実施し、得られたピークのSN比が10及び3となる濃度をそれぞれ求めた。

ブロイラー肥育後期用配合飼料、肉用牛肥育用配合飼料及びとうもろこしに、ジウロンとして0.005及び0.01 mg/kg相当量、乾牧草（えん麦乾草）に0.1及び0.2 mg/kg相当量を添加した試料について、本法に従って分析を3点併行で実施した結果、SN比が10となる濃度は、0.01 mg/kg（乾牧草では0.2 mg/kg）であり、本法の定量下限は0.01 mg/kg（乾牧草では0.2 mg/kg）であった。なお、その結果はTable 8のとおり、0.01 mg/kg相当量添加における平均回収率は93.3~95.0%，その繰返し精度は相対標準偏差（RSD）として6.2%以下であり、0.2 mg/kg相当量添加の乾牧草（えん麦乾草）については、平均回収率は90.0%，その繰返し精度はRSDとして5.6%であった。検出下限はSN比が3となる濃度から0.003 mg/kg（乾牧草では0.06 mg/kg）であった。

また、ライグラスわらにおいて、添加回収試験により m/z 235 のモニターイオンを用いて得られるピークのSN比を求めた。その結果、ピークのSN比が10となる濃度は0.2 mg/kgであり、本法の定量下限は0.2 mg/kgであった。なお、その結果はTable 8のとおり、平均回収率は95.0%，その繰返し精度はRSDとして3.1%であった。検出下限はSN比が3となる濃度から0.06 mg/kgであった。

Table 8 Recoveries and near level of limit of quantification of diuron

Spiked level (mg/kg)	Feed types									
	Formula feed for broiler finishing chick		Formula feed for beef cattle		Corn		Oats hay		Ryegrass straw	
	Recovery ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)
0.2							90.0	5.6	95.0	3.1
0.1							86.7	29		
0.01	93.3	6.2	95.0	5.3	93.3	3.1				
0.005	90.0	19	76.7	20	100	10				

a) Mean ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

3.9 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。

配合飼料（種鶏飼育用配合飼料）及びとうもろこしにジウロンとして0.05 mg/kg相当量、乾牧草（えん麦乾草）にジウロンとして4 mg/kg相当量を添加した試料を用いて、株式会社島津総合分析試験センター、財団法人日本食品分析センター多摩研究所、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7試験室）において本法に従って共同試験を実施した。

その結果はTable 9のとおりであり、配合飼料では平均回収率は92.3%，その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ相対標準偏差（RSD_I及びRSD_R）として4.7%及び12%であり、HorRat

は 0.53 であった. とうもろこしでは, 平均回収率は 86.9 %, その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ RSD_r 及び RSD_R として 3.3 % 及び 12 % であり, HorRat は 0.54 であった. 乾牧草では, 平均回収率は 91.0 %, その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ RSD_r 及び RSD_R として 2.6 % 及び 8.3 % であり, HorRat は 0.63 であった.

参考のため, 各試験室で使用した液体クロマトグラフ質量分析計の機種等を Table 10 に示した.

Table 9 Collaborative study results of diuron

Lab. No.	Formula feed for breeding hen		Corn		Oats hay	
	(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)	
1	0.0460	0.0395	0.0385	0.0430	3.89	4.06
2	0.0509	0.0490	0.0489	0.0475	4.04	4.08
3	0.0426	0.0425	0.0370	0.0392	3.43	3.20
4	0.0516	0.0531	0.0472	0.0480	3.41	3.56
5	0.0453	0.0446	0.0452	0.0447	3.71	3.64
6	0.0389	0.0392	0.0363	0.0363	3.35	3.28
7	0.0492	0.0535	0.0489	0.0478	3.70	3.61
Spiked level (mg/kg)	0.050		0.050		4.0	
Mean value ^{a)} (mg/kg)	0.0461		0.0435		3.64	
Recovery ^{a)} (%)	92.3		86.9		91.0	
RSD_r ^{b)} (%)	4.7		3.3		2.6	
RSD_R ^{c)} (%)	12		12		8.3	
$PRSD_R$ ^{d)} (%)	22		22		13	
HorRat	0.53		0.54		0.63	

a) $n=14$

b) Relative standard deviations of repeatability within laboratory

c) Relative standard deviations of reproducibility between laboratories

d) Predicted relative standard deviations of reproducibility between laboratories calculated from the modified Horwitz equation

Table 10 Instruments used in the collaborative study

Lab.No.	Instrument	LC column
		(i.d.×length, particle size)
1	Shimadzu LCMS-2010EV	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1×150 mm, 5 μm)
2	Shimadzu LCMS-2010EV	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1×150 mm, 5 μm)
3	Shimadzu LCMS-2010EV	Shimadzu Shim-pack VP-ODS (2.0×150 mm, 5 μm)
4	Waters micromass Quattro micro API	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1×150 mm, 3.5 μm)
5	Agilent Technologies Agilent 1100 Series G1946A	Kanto Chemical Mightysil RP-18 GP (2.0×150 mm, 5 μm)
6	Shimadzu LCMS-2010EV	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1×150 mm, 5 μm)
7	Waters ACQUITY TQ Detector	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1×150 mm, 5 μm)

4 まとめ

飼料中に残留しているジウロンについて、分析センター法を基に、液体クロマトグラフ質量分析計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、次の結果を得た。

- 1) イオン化法として、エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法 (正イオンモード)、モニターイオンとして、 m/z 233 ($^{35}\text{Cl}_2$ 体のプロトン付加分子 $[\text{M}(^{12}\text{C}_9^1\text{H}_{10}^{35}\text{Cl}_2^{14}\text{N}_2^{16}\text{O})+\text{H}]^+$) (ライグラスわらについては、 m/z 235 ($^{35}\text{Cl}^{37}\text{Cl}$ 体のプロトン付加分子 $[\text{M}(^{12}\text{C}_9^1\text{H}_{10}^{35}\text{Cl}^{37}\text{Cl}^{14}\text{N}_2^{16}\text{O})+\text{H}]^+$)) を適用したところ良好な測定が可能であった。
- 2) 検量線はジウロンとして 0.02~8 ng の範囲で直線性を示した。
- 3) 多孔性ケイソウ土カラムからの溶出画分の検討を行ったところ、溶出溶媒の必要量は 100 mL であった。
- 4) ゲル浸透クロマトグラフィーにおけるジウロンの溶出画分の検討を行ったところ、分取する溶出画分は 90~110 mL が適当と考えられた。
- 5) 合成ケイ酸マグネシウムミニカラムからの溶出画分の検討を行ったところ、溶出溶媒の必要量は 25 mL であった。
- 6) 6 種類の配合飼料及び 9 種類の飼料原料について、本法に従ってクロマトグラムを作成したところ、ライグラスわらのみにおいて、ジウロンの定量を妨げるピークが認められた。そこで、ライグラスわらの測定において、モニターイオンを m/z 235 に変更したところ、定量を妨げるピークは認められなかった。
- 7) ジウロンとして、2 種類の配合飼料に 0.2 及び 0.02 mg/kg 相当量を、ライグラスわらを除く 2 種類の飼料原料に 4 及び 0.4 mg/kg 相当量を添加し、本法にて添加回収試験を実施したところ、平均回収率は、84.8~97.5 %、その繰返し精度は、相対標準偏差 (RSD) として 6.9 %以下の成績が得られた。また、ライグラスわらに 2, 1 及び 0.4 mg/kg 相当量を添加し、 m/z 235 のモニターイオンを用いて定量した結果、平均回収率は 90.3~99.2 %、その繰返し精度は、相対標準偏差 (RSD)

として 7.8 %以下の成績が得られた.

- 8) 本法によるジウロンの定量下限は, 試料中で 0.01 mg/kg (乾牧草では 0.2 mg/kg), 検出下限は 0.003 mg/kg (同 0.06 mg/kg) であり, ライグラスわらについて, m/z 235 のモニターイオンを用いて定量した結果, 定量下限は, 試料中で 0.2 mg/kg, 検出下限は 0.06 mg/kg であった.
- 9) 種鶏飼育用配合飼料及びとうもろこしにジウロンとして 0.05 mg/kg 相当量, えん麦乾草にジウロンとして 4 mg/kg 相当量を添加した試料を用いて, 7 試験室において, 本法による共同試験を実施した. その結果, 種鶏飼育用配合飼料では平均回収率は 92.3 %, その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ相対標準偏差 (RSD_r 及び RSD_R) として 4.7 %及び 12 %であり, HorRat は 0.53 であった. とうもろこしでは, 平均回収率は 86.9 %, その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ RSD_r 及び RSD_R として 3.3 %及び 12 %であり, HorRat は 0.54 であった. えん麦乾草では, 平均回収率は 91.0 %, その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ RSD_r 及び RSD_R として 2.6 %及び 8.3 %であり, HorRat は 0.63 であった.

謝 辞

共同試験に参加していただいた株式会社島津総合分析試験センター, 財団法人日本食品分析センター多摩研究所の試験室の各位に感謝の意を表します.

文 献

- 1) 農薬残留分析法研究班編: “最新 農薬の残留分析法 [改訂版]”, 中央法規出版, 338 (2006).
- 2) 財団法人日本食品分析センター: 平成 17 年度飼料の有害物質等残留基準設定等委託事業 (分析法の開発) 飼料中の有害物質等の分析法の開発 (2005).
- 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, 食安第 0124001 号 (2005).
- 4) 財団法人日本食品分析センター: 平成 19 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, 110 (2007).
- 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).