

## 技術レポート

## 1 飼料中のイソフェンホスオキシソンのガスクロマトグラフ質量分析計による定量法

山本 謙吾\*

## 1 緒 言

イソフェンホスはバイエル社が開発した無色液体の有機リン系殺虫剤であり、主にさとうきび、落花生の土壌害虫の防除に用いられている。

わが国では、飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令（昭和 51 年農林省令第 35 号）の規定により、とうもろこし中のイソフェンホスの残留基準は 0.02 ppm と規定されている。ここでいうイソフェンホスとはイソフェンホスと代謝産物であるイソフェンホスオキシソンをイソフェンホス含量に換算したものの和として表している<sup>1)</sup>。

イソフェンホス及びイソフェンホスオキシソンは、飼料分析基準の有機リン系農薬の系統的分析法（その 1）<sup>2)</sup>により同時分析が可能であるが、当センターの検査分析でスクリーニング的に繁用している農薬のガスクロマトグラフ質量分析計（GC-MS）による一斉分析法<sup>2)</sup>（以下「一斉法」という。）は、イソフェンホスオキシソンが分析対象に含まれていない。そこで、イソフェンホスオキシソンの一斉法への適用の可否について検討したので、その概要を報告する。

なお、イソフェンホス及びイソフェンホスオキシソンの構造式を Fig. 1 に示した。

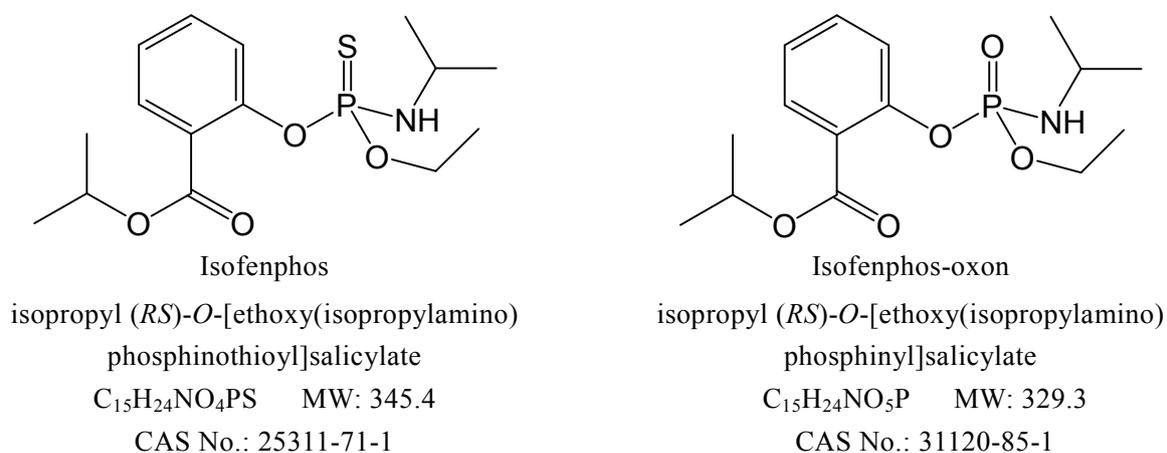


Fig. 1 Chemical structures of isofenphos (left) and isofenphos-oxon (right)

## 2 実験方法

## 2.1 試 料

市販の成鶏飼育用配合飼料及び乾牧草（アルファルファ乾草）をそれぞれ 1 mm の網ふるいを通すまで粉碎して用いた。検討に用いた配合飼料の配合割合を Table 1 に示した。

\* 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

Table 1 Compositions of the formula feed

Formula feed types	Ingredient types	Proportion (%)	Ingredients
for layer	Grains	61	Corn, Milo
	Oil seed meal	27	Soybean meal, Rapeseed meal, Corn gluten meal
	Animal by-products	1	Fish meal
	Others	11	Calcium carbonate, Animal fat, Calcium phosphate, Salt Paprika extract, Silicic anhydride, Feed additives

## 2.2 試薬

### 1) イソフェンホスオキソン標準液

有機リン系農薬混合標準液 B グループ（和光純薬工業特注品，イソフェンホスオキソン他 13 農薬各 20 µg/mL）を標準原液とした。

使用に際して，上記標準原液の一定量を 2,2,4-トリメチルペンタン-アセトン（4+1）で正確に希釈し，1 mL 中にイソフェンホスオキソンとしてそれぞれ 0.02, 0.05, 0.1, 0.2 及び 0.5 µg を含有する各標準液を調製した。

### 2) アセトニトリル，酢酸エチル，ヘキサン，シクロヘキサン及びアセトンは残留農薬分析用試薬を用いた。

## 2.3 装置及び器具

### 1) ガスクロマトグラフ質量分析計：島津製作所製 GCMS-QP2010

### 2) 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-20AT

オートサンプラー：SIL-10AP

フラクションコレクター：FRC-10A

### 3) 振とう機：タイテック製 ストロングシェーカー SR-2DW

### 4) ロータリーエバポレーター：BÜCHI 製 R-200

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

### 6) グラファイトカーボン／アミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム ：Supelco 製 ENVI-Carb/LC-NH2 (500 mg/500 mg)

### 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：Waters 製 WTPS フィルター (孔径 0.5 µm, 直径 25 mm)

## 2.4 定量方法

定量は，一斉法により実施した。ゲル浸透クロマトグラフ条件を Table 2 に，ガスクロマトグラフ質量分析計による測定条件を Table 3 に示した。

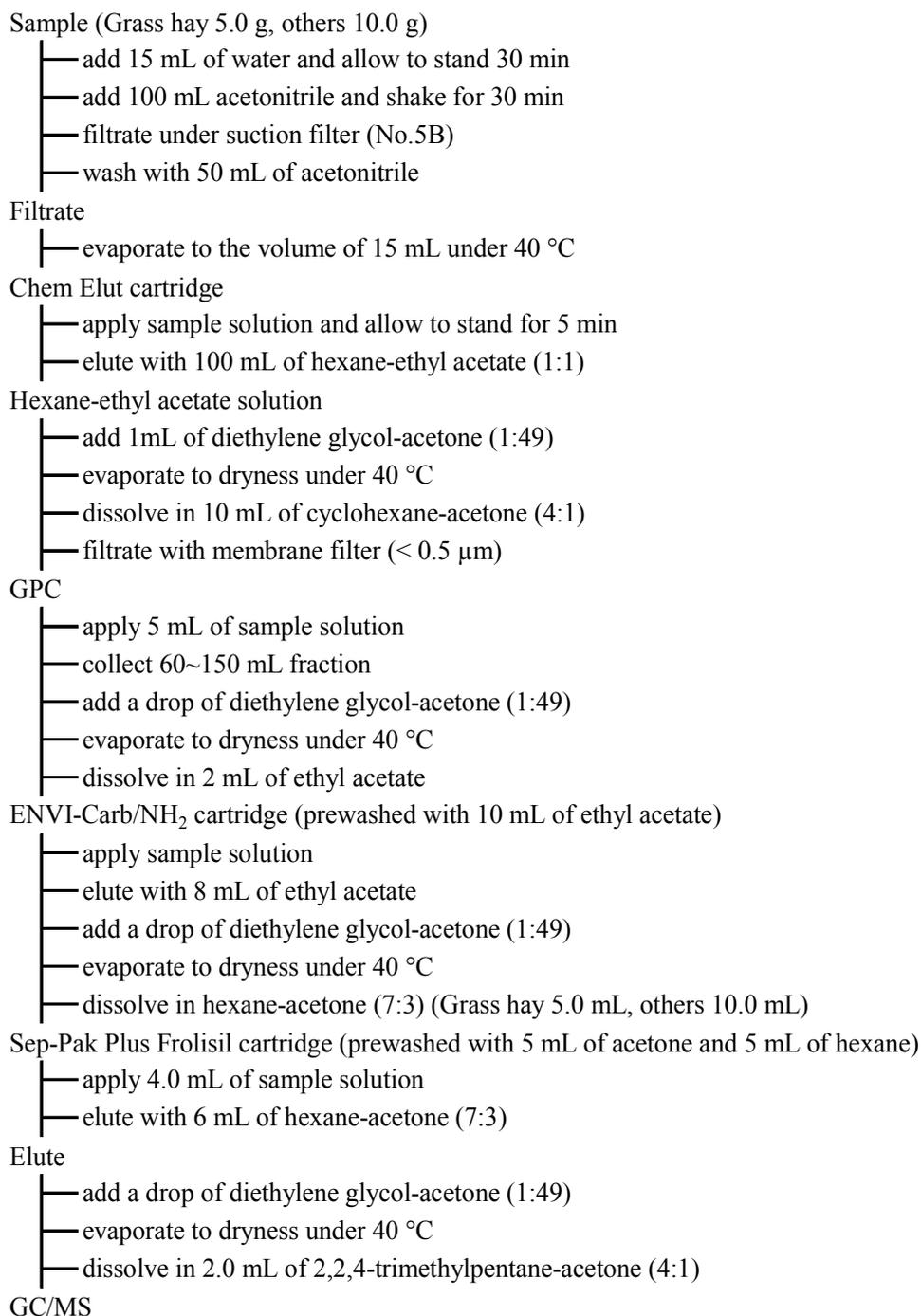
なお，定量法の概要を Scheme 1 に示した。

**Table 2** Operating conditions of GPC for analyzing isofenphos-oxon

Column	Shodex CLNpak EV-2000 AC (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	60~150 mL

**Table 3** Operating conditions of GC/MS for analyzing isofenphos-oxon

Column	Rtx-5ms (0.25 mm i.d.×30 m, 0.25 μm film thickness)
Column temperature	70 °C (1 min) → 25 °C /min → 150 °C → 3 °C /min → 200 °C → 8 °C /min → 280 °C (10 min)
Injection mode	Splitless (60s)
Injector temperature	280 °C
Carrier gas	He 1.0 mL/min
Transferline temperature	250 °C
Ion source temperature	230 °C
Ionization	Electron ionization
Ionization energy	70 eV
Monitor ion	<i>m/z</i> 229 (for quantitation), 201 (for confirmation)



Scheme 1 Analytical procedure for isofenphos-oxon in feeds

### 3 結果及び考察

#### 3.1 モニターイオンの設定

イソフェンホスオキシソンのモニターイオンは、食品の分析法である「GC/MS による農薬等の一斉試験法（農産物）」別表<sup>3)</sup>で規定するモニターイオンを準用して、定量イオンとして  $m/z$  229, 確認イオンとして  $m/z$  201 を採用した。

参考として 0.5 μg/mL のイソフェンホスオキシソン標準液 1 μL を GC-MS に注入し、スキャンモ

ードで測定したマススペクトルを Fig. 2 に示した.

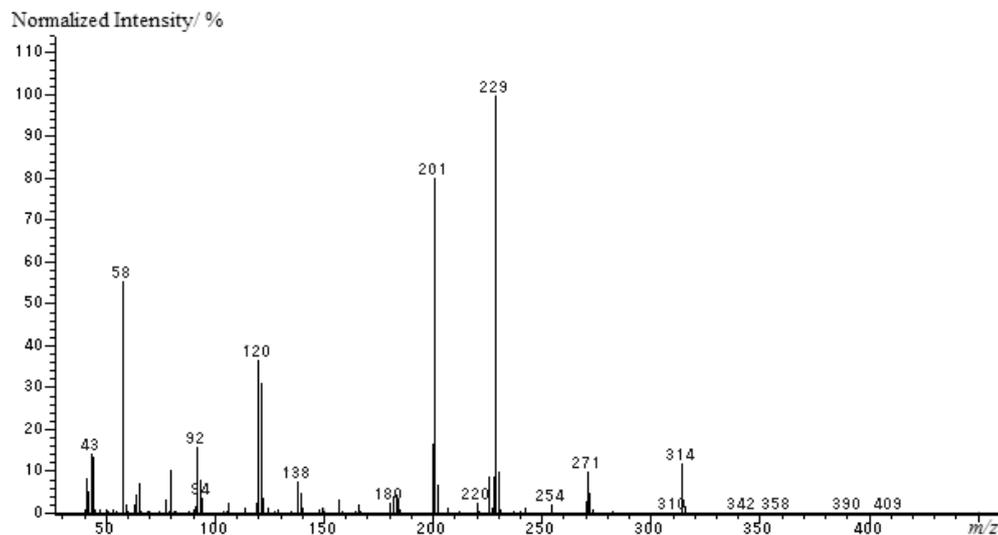


Fig. 2 Mass spectrum of isofenphos-oxon

### 3.2 検量線の作成

調製した 0.02, 0.05, 0.1, 0.2 及び 0.5  $\mu\text{g/mL}$  のイソフェンホスオキシソン標準液各 1  $\mu\text{L}$  を GC-MS に注入し, 得られた選択イオン検出クロマトグラムのピーク高さから検量線を作成した.

その結果, 検量線は 0.02~0.5  $\mu\text{g/mL}$  (注入量として 0.02~0.5 ng) の範囲で直線性を示した (Fig. 3) .

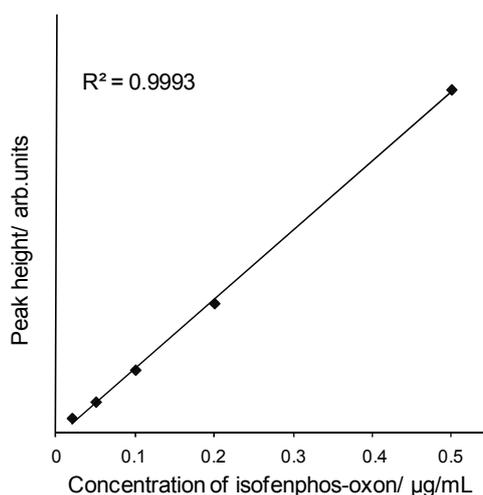


Fig. 3 Calibration curve of isofenphos-oxon

### 3.3 妨害物質の検討

4 種類の配合飼料 (成鶏飼育用, 肉豚肥育用, 肉用牛肥育用, 乳用牛飼育用), 3 種類の乾牧草 (アルファルファ乾草, スーダングラス乾草, えん麦乾草), えん麦, 大麦, とうもろこし, ビールかす, ふすま, なたね油かす及び綿実について, 本法に従って選択イオン検出クロマトグラムを作成し, イソフェンホスオキシソンの定量を妨害するピークの有無を検討した. その結果,

イソフェンホスオキシソンの定量を妨害するピークは認められなかった。

### 3.4 添加回収試験

成鶏飼育用配合飼料及びアルファルファ乾草にイソフェンホスオキシソンとしてそれぞれ 50, 100 及び 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  相当量添加した試料を用い、本法に従って 3 回併行分析を実施し、回収率及び繰返し精度を検討した。

その結果は、Table 4 に示したように、平均回収率が 124~161 %、その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD) として 14 %以下であり、この結果は、一斉法検討の際の平均回収率及び繰返し精度の目標値<sup>4)</sup> (平均回収率: 50~200 %, RSD: 20 %以下) に適合していた。

Table 4 Recoveries of isofenphos-oxon from two kinds of feed

Spiked level ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Formula feed for layer		Alfalfa hay	
	Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>	Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>
	(%)	(%)	(%)	(%)
500	150	0.7	147	8.1
100	124	5.2	155	14
50	139	2.2	161	5.6

a) Mean ( $n=3$ )

b) Relative standard deviation of repeatability

### 3.5 定量下限及び検出下限

本法によるイソフェンホスオキシソンの定量下限について、イソフェンホスと同様に試料中 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  を目標として以下の検討を行った。

成鶏飼育用配合飼料及びアルファルファ乾草にイソフェンホスオキシソンとして 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  相当量を添加した試料を用いて添加回収試験を行い、得られるピークの SN 比並びに回収率及び繰返し精度を求めた。その結果、SN 比は 10 以上であり、平均回収率は 139 及び 161 %、繰返し精度は RSD として 5.6 %以下であった。検出下限は、イソフェンホスと同様 SN 比 3 を確保できる 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  であった (Table 4)。

### 3.6 共同試験

飼料中のイソフェンホスの残留基準はイソフェンホスと代謝産物であるイソフェンホスオキシソンをイソフェンホス含量に換算したものの和として規定されていることから、本法の再現精度を確認するため、イソフェンホス及びイソフェンホスオキシソンについて共同試験を実施した。成鶏飼育用配合飼料及びアルファルファ乾草にイソフェンホス及びイソフェンホスオキシソンとしてそれぞれ 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  相当量を添加した試料を用い、独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥料安全検査部、同札幌センター、同仙台センター、同名古屋センター、同神戸センター、同福岡センターの 6 試験室で共同分析を実施した。

イソフェンホスオキシソンについての結果を Table 5 に示した。成鶏飼育用配合飼料では、平均回収率は 98.4 %、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<sub>r</sub> 及び RSD<sub>R</sub>) として 13 %及び 21 %であり、HorRat は 0.96 であった。アルファルファ乾草では、平均回収率は 107 %、RSD<sub>r</sub> 及び RSD<sub>R</sub> はそれぞれ 9.8 %及び 22 %であり、HorRat は 0.99 であった。

また、イソフェンホスについての結果を Table 6 に示した。成鶏飼育用配合飼料では、平均回収率は 107 %、 $RSD_r$  及び  $RSD_R$  はそれぞれ 6.4 % 及び 10 % であり、HorRat は 0.47 であった。アルファルファ乾草では、平均回収率は 119 %、 $RSD_r$  及び  $RSD_R$  はそれぞれ 4.4 % 及び 23 % であり、HorRat は 1.0 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 7 に示した。

Table 5 Collaborative study for isofenphos-oxon

Lab. No.	Formula feed for layer		Alfalfa hay	
	(µg/kg)		(µg/kg)	
1	42.4	54.0	31.6	45.2
2	37.7	48.8	46.5	49.3
3	37.8	35.1	53.2	50.7
4	57.5	67.1	67.0	68.2
5	44.2	51.3	48.2	51.9
6	52.9	61.2	70.6	59.7
Spiked level (µg/kg)	50		50	
Mean value <sup>a)</sup> (µg/kg)	49.2		53.5	
Recovery <sup>a)</sup> (%)	98.4		107	
$RSD_r$ <sup>b)</sup> (%)	13		9.8	
$RSD_R$ <sup>c)</sup> (%)	21		22	
$PRSD_R$ <sup>d)</sup> (%)	22		22	
HorRat	0.96		0.99	

a)  $n=12$

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 6 Collaborative study for isofenphos

Lab. No.	Formula feed for layer		Alfalfa hay	
	(µg/kg)		(µg/kg)	
1	55.9	60.9	61.7	64.7
2	44.5	46.3	43.6	41.7
3	49.6	58.7	84.0	79.8
4	57.2	60.8	61.0	62.8
5	50.9	53.9	49.6	51.2
6	51.5	54.5	59.2	52.5
Spiked level (µg/kg)	50		50	
Mean value <sup>a)</sup> (µg/kg)	53.7		59.3	
Recovery <sup>a)</sup> (%)	107		119	
RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	6.4		4.4	
RSD <sub>R</sub> <sup>c)</sup> (%)	10		23	
PRSD <sub>R</sub> <sup>d)</sup> (%)	22		22	
HorRat	0.47		1.0	

a)  $n=12$ 

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 7 Instruments used in the collaborative study

Lab.No.	GC-MS	GC column
		(i.d.×length, film thickness)
1	SHIMADZU GC-MS QP2010	RESTEK Rtx-5MS (0.25 mm×30 m, 0.25 µm)
2	SHIMADZU GC-MS QP2010Plus	RESTEK Rtx-5MS (0.25 mm×30 m, 0.25 µm)
3	Thermo Electron FOCUS/POLARISQ	Agilent Technologies DB-5MS (0.25 mm×30 m, 0.25 µm)
4	Thermo Electron FOCUS/POLARISQ	Thermo Electron TR-5ms SQC (0.25 mm×30 m, 0.25 µm)
5	SHIMADZU GC-MS QP2010	RESTEK Rtx-5MS (0.25 mm×30 m, 0.25 µm)
6	SHIMADZU GC-MS QP2010	Agilent Technologies HP-5MS (0.25 mm×30 m, 0.25 µm)

#### 4 まとめ

ガスクロマトグラフ質量分析計を用いた飼料中のイソフェンホスオキシソンの定量法について検討したところ、次の結果を得た。

- 1) イソフェンホスオキシソンの定量イオンとして  $m/z$  229, 確認イオンとして  $m/z$  201 を採用した。

- 2) イソフェンホスオキシソンの検量線は 0.02~0.5 ng の範囲で原点を通る直線性を示した。
- 3) 4 種類の配合飼料（成鶏飼育用，肉豚肥育用，肉用牛肥育用，乳用牛飼育用），3 種類の乾牧草（アルファルファ乾草，スーダングラス乾草，えん麦乾草），えん麦，大麦，とうもろこし，ビールかす，ふすま，なたね油かす及び綿実について，本法に従って選択イオン検出クロマトグラムを作成したところ，イソフェンホスオキシソンの定量を妨害するピークは認められなかった。
- 4) 配合飼料及び乾牧草にイソフェンホスオキシソンとして 50，100 及び 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  相当量を添加し，添加回収試験を実施した結果，平均回収率は 124~161 %，その繰返し精度は相対標準偏差（RSD）として 14 %以下であった。
- 5) 本法によるイソフェンホスオキシソンの定量下限及び検出下限は，イソフェンホスと同様に試料中で 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  及び 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  であった。
- 6) 成鶏飼育用配合飼料及びアルファルファ乾草にイソフェンホスオキシソンとして 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  相当量を添加した試料を用いて 6 試験室において共同試験を実施した結果，成鶏飼育用配合飼料では，平均回収率は 98.4 %，繰返し精度及び室間再現精度は相対標準偏差（ $\text{RSD}_r$  及び  $\text{RSD}_R$ ）としてそれぞれ 13 %及び 21 %，HorRat は 0.96 であり，アルファルファ乾草では，平均回収率は 107 %，繰返し精度及び室間再現精度は  $\text{RSD}_r$  及び  $\text{RSD}_R$  としてそれぞれ 9.8 %及び 22 %，HorRat は 0.99 であった。

## 文 献

- 1) 農林水産省消費・安全局長通知：“飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令の一部を改正する省令の施行について”，平成 18 年 5 月 26 日，18 消安第 2321 (2006).
- 2) 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).
- 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，食安発第 0124001 号 (2005).
- 4) 野崎 友春，堀米 明日香，渡部 千会：飼料研究報告，31，39 (2006).