

1 飼料用イネ中のクロチアニジン, ジノテフラン及びチアメトキサムの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による同時定量法

杉本 泰俊*

Simultaneous Determination of Clothianidin, Dinotefuran and Thiamethoxam in Rice Straw, Whole-crop rice silage and Paddy rice for Feed by LC-MS/MS Simultaneous

Yasutoshi SUGIMOTO*

(* Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fukuoka regional Center)

An analytical method was developed to determine clothianidin, dinotefuran and thiamethoxam levels in rice straw and rice products for feed using liquid chromatograph-electrospray ionization-tandem mass spectrometer (LC-ESI-MS/MS).

After addition of water to samples, clothianidin, dinotefuran and thiamethoxam were extracted with acetone and solutions were filtered. The filtrate was diluted with acetone to a final volume of 200 mL. The sample solution was evaporated to dryness and dissolved in water, and then purified by Chem Elut cartridge (Agilent Technologies Inc.; Santa Clara, CA, U.S.) with ethyl acetate. The elute was evaporated to dryness and dissolved in acetonitrile, and then purified by an ENVI-Carb/NH₂ cartridge (GL Sciences Inc.; Tokyo, Japan), with acetonitrile. The elute was desolvated again, dissolved in a water-methanol solution (9:1 v/v) and analyzed by LC-ESI-MS/MS for determination of clothianidin, dinotefuran and thiamethoxam. The LC separation was carried out on an ODS column (Mightysil RP-18 GP, 2.0 mm i.d.×150 mm, 3 μm from Kanto Chemical Co., Inc.; Tokyo, Japan) using gradient with 5 mmol/L ammonium acetate solution and acetonitrile as a mobile phase. The MS/MS analysis was performed using the selected reaction monitoring (SRM) mode.

Spike tests were conducted on rice straw, whole-crop rice silage and paddy rice spiked with 0.01, 0.02, 0.2, 2 or 5 mg/kg of clothianidin, dinotefuran and thiamethoxam. The mean recoveries of clothianidin were 77.5 to 101 % and its repeatability in terms of relative standard deviations (RSD_r) was not more than 16 %. The mean recoveries of dinotefuran were 76.9 to 106 %, and RSD_r were not more than 13 %. The mean recoveries of thiamethoxam were 79.8 to 105 %, and RSD_r were not more than 8.7 %.

A collaborative study was conducted in nine laboratories using rice straw, whole-crop rice silage and paddy rice spiked with clothianidin, dinotefuran and thiamethoxam at 5, 3 and 0.2 mg/kg, respectively. The mean recoveries of clothianidin were 90.4 to 94.5 % and the repeatability (RSD_r) and reproducibility (RSD_R) in terms of relative standard deviation, and Horwitz ratio (HorRat) were 8.3 %, 14 % and 0.68, respectively. The values for dinotefuran were 89.3 to 94.4 %, 4.0 %, 15 % and 0.71 respectively. The values for thiamethoxam were 92.1 to 98.6 %, 9.5 %, 11 % and 0.72 respectively.

This method was validated and established for use in inspection of rice straw and rice products for feed for clothianidin, dinotefuran and thiamethoxam.

*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

Key words: clothianidin ; dinotefuran ; thiamethoxam ; liquid chromatograph-tandem mass spectrometer (LC-MS/MS) ; electrospray ionization (ESI) ; rice straw ; whole-crop rice silage ; paddy rice ; collaborative study

キーワード：クロチアニジン；ジノテフラン；チアメトキサム；液体クロマトグラフタンデム型質量分析計；エレクトロスプレーイオン化法；稲わら；稲発酵粗飼料；粃米；共同試験

1 緒 言

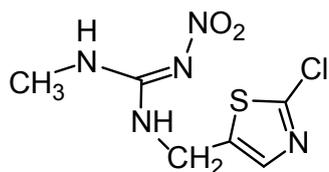
クロチアニジンは 1988 年武田薬品工業（現 住化武田農薬）が開発したネオニコチノイド系殺虫剤で、後述のチアメトキサムの変化生成物でもある。非食用作物については 2001 年に、食用作物については 2002 年に国内で農薬登録されている。飼料の有害物質の指導基準¹⁾（以下「指導基準」という。）は、稲わらで 2 mg/kg, 稲発酵粗飼料で 1 mg/kg となっており、厚生労働省の食品、添加物等の規格基準における残留農薬基準値²⁾は、玄米 0.7 ppm, 小麦 0.02 ppm, 大麦 0.1 ppm, ライ麦 0.02 ppm 及びとうもろこし 0.02 ppm となっている。厚生労働省通知試験法³⁾（以下「通知法」という。）として個別試験法（HPLC-UV 及び LC-MS）及び LC-MS 一斉試験法 I（農作物）が示されている。

ジノテフランは 1993 年に三井化学が開発したネオニコチノイド系殺虫剤である。国内では 2002 年に稲、野菜、果実等を対象に初めて農薬登録された。指導基準¹⁾は、稲わらで 5 mg/kg, 稲発酵粗飼料で 5 mg/kg となっており、厚生労働省の食品、添加物等の規格基準における残留農薬基準値²⁾は、玄米 2 ppm となっている。通知法³⁾として個別試験法（HPLC-UV 及び LC-MS）が示されている。

チアメトキサムはチバガイギー（現 シンジェンタ）が開発したネオニコチノイド系殺虫剤である。2000 年に国内で農薬登録されている。指導基準¹⁾は、稲わらで 0.2 mg/kg, 稲発酵粗飼料で 0.1 mg/kg, 粃米で 3 mg/kg となっており、厚生労働省の食品、添加物等の規格基準における残留農薬基準値²⁾は、玄米 0.3 ppm, 小麦 0.02 ppm, 大麦 0.3 ppm, その他穀類 0.02 ppm, とうもろこし 0.02 ppm となっている。通知法³⁾として LC-MS 一斉試験法 I（農作物）が示されている。

飼料中のこれらの残留農薬の検査法の迅速化、簡便化を図るため、財団法人日本食品分析センターが平成 21 年度飼料中の有害物質等分析法開発委託事業において LC-MS/MS による同時定量法⁴⁾（以下「食品分析センター法」という。）を検討し開発した。今回この食品分析センター法を基に、指導基準が設定されている稲わら、稲発酵粗飼料及び粃米（本報告中において、これらを併せて表現する場合には「飼料用イネ」と表記する。）中のこれらの農薬の同時定量法の飼料分析基準⁵⁾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、クロチアニジン、ジノテフラン及びチアメトキサムの構造式を Fig. 1 に示した。

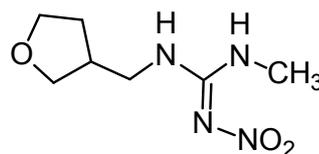


Clothianidin

(*E*)-1-(2-chloro-1,3-thiazol-5-ylmethyl)-3-methyl-2-nitroguanidine

C₆H₈ClN₅O₂S MW: 249.7

CAS No.: 210880-92-5

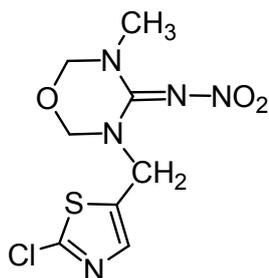


Dinotefuran

(*RS*)-1-methyl-2-nitro-3-(tetrahydro-3-furylmethyl)guanidine

C₇H₁₄N₄O₃ MW: 202.2

CAS No.: 165252-70-0



Thiamethoxam

(*EZ*)-3-(2-chloro-1,3-thiazol-5-ylmethyl)

-5-methyl-1,3,5-oxadiazinan-4-ylidene(nitro)amine

C₈H₁₀ClN₅O₃S MW: 291.7

CAS No.: 153719-23-4

Fig. 1 Chemical structures of clothianidin, dinotefuran and thiamethoxam

2 実験方法

2.1 試料

稲わら及び籾米についてはそれぞれ 1 mm の網ふるいを通すまで粉砕し、供試試料とした。稲発酵粗飼料については、乾燥した後、稲わら及び籾米と同様に粉砕し、供試試料とした。

2.2 試薬等

1) クロチアニジン標準原液

クロチアニジン標準品（和光純薬工業製、純度 99.0 %）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クロチアニジン標準原液を調製した（この液 1 mL は、クロチアニジンとして 0.5 mg ($f=0.990$) を含有する。）。

2) ジノテフラン標準原液

ジノテフラン標準品（林純薬工業製、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、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ジノテフラン標準原液を調製した（この液 1 mL は、ジノテフランとして 0.5 mg ($f=0.999$) を含有する。）。

3) チアメトキサム標準原液

チアメトキサム標準品（和光純薬工業製、純度 99.0 %）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チアメトキサム標準原液を調製した（この液 1 mL は、チアメトキサムとして 0.5 mg ($f=0.990$) を含有する.）.

4) 農薬混合標準液

使用に際して、クロチアニジン標準原液、ジノテフラン標準原液及びチアメトキサム標準原液の一定量を混合し、水-メタノール (9+1) で正確に希釈し、1 mL 中にクロチアニジン、ジノテフラン及びチアメトキサムとして 0.25, 0.5, 1.0, 5.0, 10, 25, 50 及び 100 ng を含有する各混合標準液を調製した.

5) アセトニトリル、アセトン、酢酸エチル、ヘキサン及びメタノールは、残留農薬試験用を用いた。水は液体クロマトグラフ用を用いた。その他、特記している以外の試薬は特級を用いた。

2.3 装置及び器具

1) 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計：

LC 部：Waters 製 ACQUITY UPLC System

MS 部：Waters 製 ACQUITY TQ Detector

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 製 R-210

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

5) 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：ジーエルサイエンス製 InertSep GC/NH₂ (500 mg/500 mg)

6) 中性アルミナミニカラム：ジーエルサイエンス製 InertSep Slim-J AL-N (充てん剤量 1,710 mg) にリザーバーを連結したもの

2.4 定量方法

1) 抽出

分析試料 10.0 g を量って 300 mL の共栓三角フラスコに入れ、水 30 mL (粃米は 20 mL) を加え、30 分間静置後、更にアセトン 120 mL (粃米は 100 mL) を加え、30 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。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 100 mL のなす形フラスコに正確に入れ、40 °C 以下の水浴で約 2 mL 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

試料溶液を多孔性ケイソウ土カラムに入れ、試料溶液の入っていたなす形フラスコを水 2 mL で洗浄し、洗液をカラムに加えた後、10 分間静置した。先のなす形フラスコをヘキサン 25 mL ずつで 2 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させた。

300 mL のなす形フラスコをカラムの下に置き、先のなす形フラスコを酢酸エチル 20 mL ずつで 2 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、各農薬を溶出させた。

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。アセトニトリル 5 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。

3) カラム処理 II

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をアセトニトリル 10 mL で洗浄した。100 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き、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下し、各農薬を流出させた。更に、試料溶液の入っていたなす形フラスコをアセトニトリル 10 mL ずつで 2 回洗浄し、洗液を順次ミニカラムに加え、同様に流出させた。

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た。

水-メタノール (9+1) 20 mL を正確に加えて残留物を溶かし、液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定に供する試料溶液とした。

4) 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定

試料溶液及び各農薬混合標準液各 5 µL を液体クロマトグラフタンデム型質量分析計（以下「LC-MS/MS」という。）に注入し、Table 1 及び Table 2 の測定条件に従って選択反応検出クロマトグラムを得た。

Table 1 Operating conditions of LC-MS/MS for analyzing clothianidin, dinotefuran and thiamethoxam

Column	Kanto Chemical, Mightysil RP-18 GP (2.0 mm i.d.×150 mm, 3 µm)
Mobile phase	5 mmol/L ammonium acetate solution-acetonitrile (9:1) → 15 min → acetonitrile (2 min) → 0.1 min → 5 mmol/L ammonium acetate solution-acetonitrile (9:1) (5 min)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temperature	40 °C
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Mode	Positive
Source temperature	110 °C
Desolvation gas	N ₂ (800 L/h, 400 °C)
Cone gas	N ₂ (50 L/h)
Capillary voltage	1 kV

Table 2 MS/MS Parameters

Target ion	Precursor (m/z)	Product (m/z)	Qualifier (m/z)	Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
Clothianidin	250	132	169	15	15
Dinotefuran	203	129	157	10	10
Thiamethoxam	292	211	132	15	15

5) 計 算

得られた選択反応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、試料中のクロチアニジン、ジノテフラン及びチアメトキサム量を算出した。

なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。

- Sample 10.0 g
- add 30 mL of water (Paddy rice: 20 mL)
 - allow to stand for 30 min
 - add 120 mL of acetone (Paddy rice: 100 mL)
 - shake for 30 min
 - filtrate with suction filter (No.5B)
 - wash with 50 mL of acetone
 - top up to 200 mL with acetone
 - evaporate 20 mL of sample solution to the volume of about 2 mL under 40 °C
- Chem Elut cartridge
- apply concentrated sample solution
 - wash with 2 mL of water
 - allow to stand for 10 min
 - wash with 25 mL of hexane (twice)
 - elute with 40 mL of ethyl acetate
 - evaporate to dryness under 40 °C
 - dissolve in 5 mL of acetonitrile
- InertSep GC/NH₂
- prewash with 10 mL of acetonitrile
 - apply sample solution
 - wash with 10 mL of acetonitrile (twice)
 - evaporate to dryness under 40 °C
 - dissolve in 20 mL of water-methanol (9:1)
- LC-MS/MS

Scheme 1 Analytical procedure for clothianidin, dinotefuran and thiamethoxam

3 結果及び考察

3.1 検量線の作成

2.2 の 4)に従って調製した農薬混合標準液各 5 µL を LC-MS/MS に注入し、得られた選択反応検出クロマトグラムからピーク高さ及び面積を求めて検量線を作成した。その結果、Fig. 2~4 のとおり、検量線はクロチアニジン、ジノテフラン及びチアメトキサムとして、それぞれ 0.25~100 ng/mL (注入量として 0.00125~0.5 ng) の範囲で直線性を示した。

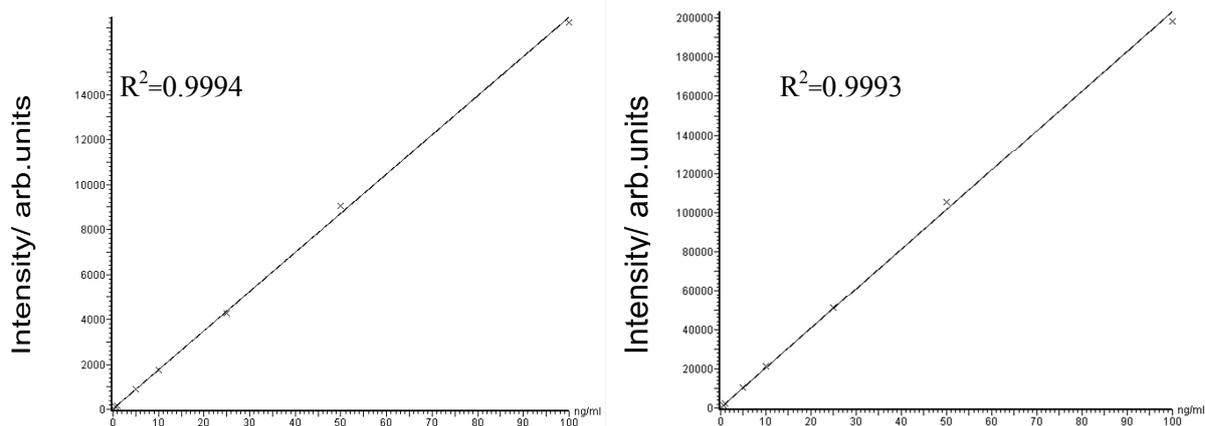


Fig. 2 Calibration curves of clothianidin (left : peak area, right : peak height)

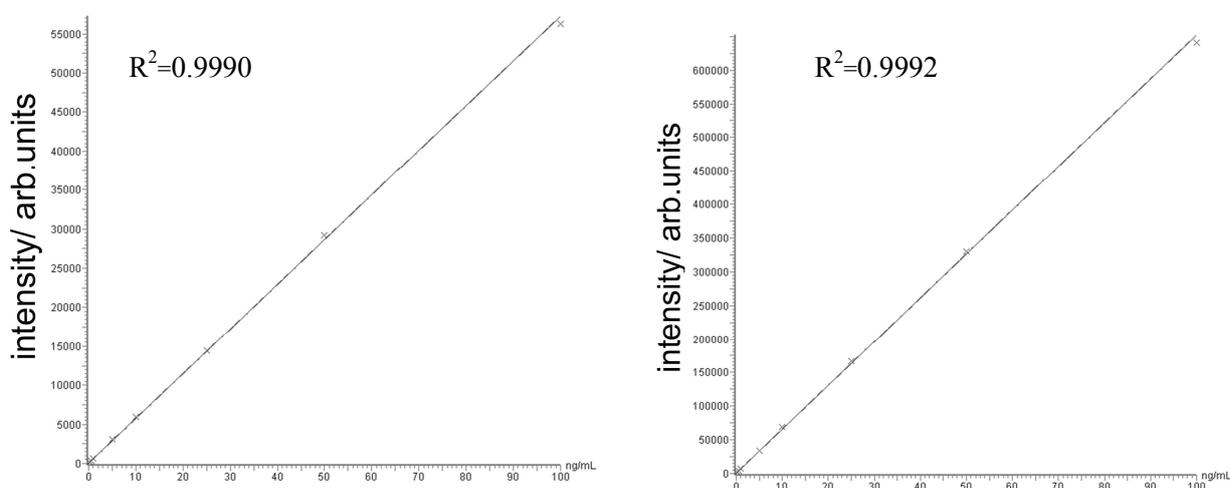


Fig. 3 Calibration curves of dinotefuran (left : peak area, right : peak height)

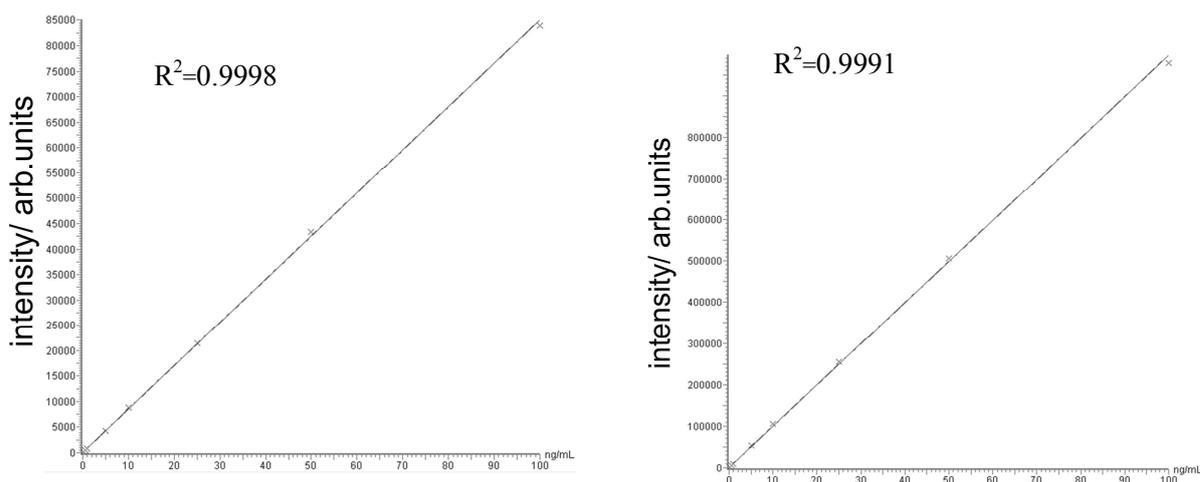


Fig. 4 Calibration curves of thiamethoxam (left : peak area, right : peak height)

3.2 ミニカラム処理の検討

稲わらにクロチアニジン、ジノテフラン及びピチアメトキサムとして各 2 mg/kg 相当量を添加した試料を用いて、食品分析センター法により測定したところ、クロチアニジン及びジノテフランの回収率

が70%を下回る結果であった。

そこで、低回収率の原因を確認するため、稲わらにクロチアニジン、ジノテフラン及びチアメトキサムとして各2 mg/kg 相当量を添加して、2.4の1)に従い抽出した試料溶液（以下「検討用試料溶液」という。）を用いて、食品分析センター法で使用されている3種類のカラム処理についてそれぞれ検討した。

1) 多孔性ケイソウ土カラムを用いた検討

検討用試料溶液について2.4の2)の手順により多孔性ケイソウ土カラム（以下「カラム I」という。）で処理し、ヘキサンによる洗浄液50 mL及び酢酸エチルによる溶出液40 mLをそれぞれ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。

水-メタノール(9+1)2 mLを加えて残留物を溶かした。この液1 mLを20 mLの全量フラスコに入れ、標線まで水-メタノール(9+1)を加えて調製した試料溶液をLC-MS/MSにより測定した。

2) 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を用いた検討

検討用試料溶液について2.4の2)に従い処理した後、2.4の3)の手順により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（以下「カラム II」という。）で処理したアセトニトリルによる流出液25 mL（負荷した試料溶液5 mLを含む。）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。

水-メタノール(9+1)2 mLを加えて残留物を溶かした。この液1 mLを20 mLの全量フラスコに入れ、標線まで水-メタノール(9+1)を加えて調製した試料溶液をLC-MS/MSにより測定した。

3) 中性アルミナミニカラムを用いた検討

検討用試料溶液について2.4の2)及び3)に従い処理し、カラム IIからの流出液を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た。酢酸エチル5 mLを加えて残留物を溶かし、あらかじめ酢酸エチル10 mLで洗浄した中性アルミナミニカラムに加えた。酢酸エチル10 mLずつで容器を2回洗浄し、洗液を順次カラムに加えた。酢酸エチルによる流出液25 mL（負荷した試料溶液5 mLを含む）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。

水-メタノール(9+1)2 mLを加えて残留物を溶かした。この液1 mLを20 mL全量フラスコに入れ、標線まで水-メタノール(9+1)を加えて調製した試料溶液をLC-MS/MSにより測定した。

1)~3)の結果は、Table 3のとおりであった。

カラム I 及び II による処理は良好な回収率であることが確認された。

中性アルミナミニカラムによる処理において、酢酸エチルによる洗浄の際にジノテフラン、クロチアニジン及びチアメトキサムが保持されずに一部流出することが確認された。このことが食品分析センター法でクロチアニジン及びジノテフランの回収率が低下した原因と考えられたため、本法では中性アルミナミニカラムによる処理を省略することとして、以降の検討を行った。

Table 3 Results of elution and spillage from column I, II and neutral alumina

Pesticide	Spiked level (mg/kg)	Recovery (%) ^{a)}			
		Column I		Column II	Neutral alumina
		Hexane (50 mL)	Ethyl acetate (40 mL)	Acetonitril e	Ethyl acetate (25 mL)
Clothianidin	2	0	92.0	97.0	56.0
Dinotefuran	2	0	99.0	95.0	28.0
Thiamethoxam	2	0	91.0	91.0	11.0

a) $n=1$

3.3 最終試料溶液量の検討

稲わらにクロチアニジン、ジノテフラン及びチアメトキサムとして各 0.2 mg/kg 相当量を添加した試料を用いて、2.4 の 1) ~3) に従い操作し、食品分析センター法に従い最終試料溶液を水-メタノール (9+1) 2 mL で調製し、LC-MS/MS により測定したところ、クロチアニジン及びチアメトキサムの回収率が 70 % を下回る結果であった。

そこで、この原因は夾雑成分によるイオン化抑制であると推定し、その影響を軽減するために、先の最終試料溶液を、更に水-メタノール (9+1) で 2~20 倍に希釈し、LC-MS/MS により測定し回収率を求めた。

その結果は、Table 4 のとおりであり、10 倍以上希釈した場合に良好な結果が得られた。

ここで、希釈倍率は 10 倍で十分な結果が得られると考えられたことから、本法では水-メタノール (9+1) の液量を食品分析センター法の 2 mL から 20 mL に変更して最終試料溶液を調製することにした。

Table 4 Comparison of recoveries of clothianidin, dinotefuran and thiamethoxam by dilution level

Pesticide	Spiked level (mg/kg)	Recovery (%) ^{a)}				
		undiluted	2-fold	5-fold	10-fold	20-fold
Clothianidin	0.2	43.8	61.3	84.2	94.0	94.1
Dinotefuran	0.2	96.7	96.0	101	91.2	94.6
Thiamethoxam	0.2	58.9	77.7	94.9	95.1	92.8

a) $n=1$

3.4 妨害物質の検討

稲わら (4 検体)、稲発酵粗飼料 (2 検体) 及び粃米 (3 検体) を用い、本法により調製した試料溶液を LC-MS/MS に注入し、定量を妨げるピークの有無を確認したところ、妨害ピークは認められなかった。

なお、妨害物質の検討で得られた選択反応検出クロマトグラムの一例を Fig. 5 に示した。

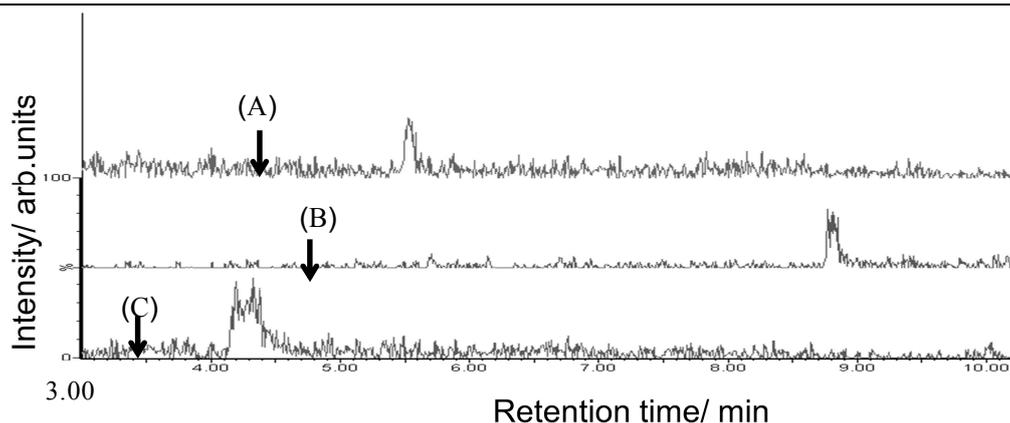


Fig. 5 SRM chromatograms of rice straw (non-spiked)

(Arrows indicate the retention time of thiamethoxam (A), clothianidin (B) and dinotefuran (C).)

3.5 添加回収試験

2.1 で調製した稲わら 2 検体, 稲発酵粗飼料及び粃米各 1 検体にクロチアニジン, ジノテフラン及びチアメトキサムとして各 5, 2 及び 0.2 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 5~7 のとおり, クロチアニジンの平均回収率は 83.1~101 %, その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD_r) として 7.0 %以下, ジノテフランの平均回収率は 81.5~106 %, その繰返し精度は RSD_r として 9.1 %以下, チアメトキサムの平均回収率は 87.9~105 %, その繰返し精度は RSD_r として 8.7 %以下であった.

なお, 添加回収試験の検討で得られた選択反応検出クロマトグラムの一例を Fig. 6 に示した.

Table 5 Recoveries for clothianidin

Spiked level (mg/kg)	Feed types							
	Rice straw 1		Rice straw 2		Whole-crop rice silage		Paddy rice	
	Recovery ^{a)} (%)	RSD_r ^{b)} (%)						
5	88.0	3.6	90.0	3.7	83.1	2.7	87.5	4.5
2	99.5	2.4	86.5	0.7	101	2.7	94.0	1.9
0.2	91.0	3.5	91.4	2.6	98.0	3.1	91.6	7.0

a) Mean ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

Table 6 Recoveries for dinotefuran

Spiked level (mg/kg)	Feed types							
	Rice straw 1		Rice straw 2		Whole-crop rice silage		Paddy rice	
	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)						
5	87.0	4.9	88.0	4.8	84.0	6.6	89.0	5.7
2	99.0	2.8	85.0	1.4	100	2.2	85.7	2.7
0.2	95.2	9.1	106	8.9	96.0	3.3	81.5	3.4

a) Mean ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

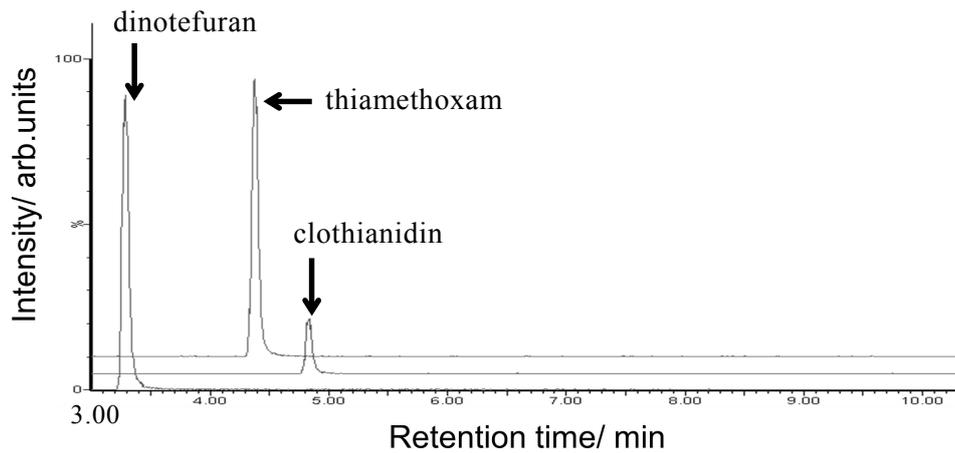
Table 7 Recoveries for thiamethoxam

Spiked level (mg/kg)	Feed types							
	Rice straw 1		Rice straw 2		Whole-crop rice silage		Paddy rice	
	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)						
5	95.0	3.0	93.0	2.0	96.0	2.7	91.0	2.1
2	105	8.0	96.8	2.3	101	2.7	95.7	1.4
0.2	102	6.5	92.0	8.2	87.9	8.7	98.8	5.7

a) Mean ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

(A)



(B)

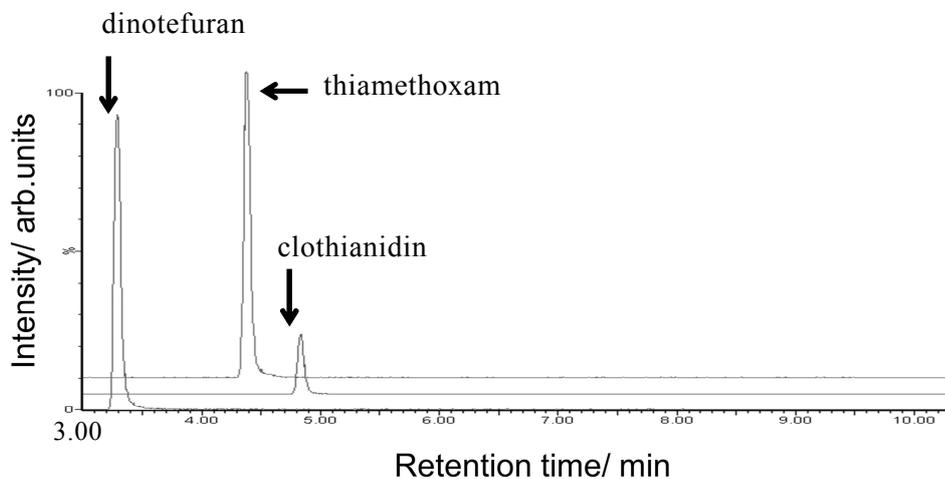


Fig. 6 SRM chromatograms of clothianidin, dinotefuran and thiamethoxam

(A) Standard solution (The amount of clothianidin, dinotefuran and thiamethoxam are each 0.25 ng.)

(B) Sample solution of rice straw spiked with clothianidin, dinotefuran and thiamethoxam at each 2 mg/kg

3.6 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、稲わら及び籾米にクロチアニジン、ジノテフラン及びチアメトキサムを添加し、添加回収試験により得られるピークの SN 比が 10 及び 3 となる濃度を求めた。

その結果、得られたピークの SN 比が 10 以上となる濃度は 0.01 mg/kg であった。

確認のために、稲わら及び籾米にクロチアニジン、ジノテフラン及びチアメトキサムとして各 0.02 mg/kg 及び 0.01 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 8~10 のとおり、クロチアニジンの平均回収率は 77.5~93.0 %、その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD_r) として 16 %以下、ジノテフランの平均回収率は 76.9~89.1 %、その繰返し精度は RSD_r として 13 %以下、チアメトキサムの平均回収率は 79.8~96.1 %、その繰返し精度は RSD_r として 6.5 %以下であった。

また、*SN* 比が 3 となる濃度は 0.003 mg/kg であった。

以上の結果から、本法の定量下限はクロチアニジン、ジノテフラン及びチアメトキサムともに 0.01 mg/kg、検出下限は 0.003 mg/kg であった。

Table 8 Recoveries for clothianidin at levels near the limit of quantification

Spiked level (mg/kg)	Feed types			
	Rice straw 1		Paddy rice	
	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)
0.02	81.6	3.7	93.0	2.3
0.01	77.5	7.3	80.2	16

a) Mean ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

Table 9 Recoveries for dinotefuran at levels near the limit of quantification

Spiked level (mg/kg)	Feed types			
	Rice straw 1		Paddy rice	
	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)
0.02	89.1	5.4	86.8	2.1
0.01	82.8	4.8	76.9	13

a) Mean ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

Table 10 Recoveries for thiamethoxam at levels near the limit of quantification

Spiked level (mg/kg)	Feed types			
	Rice straw 1		Paddy rice	
	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)
0.02	79.8	5.9	89.0	2.1
0.01	96.1	4.6	95.6	6.5

a) Mean ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

3.7 共同試験

本法の室間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。

稲わら、稲発酵粗飼料及び粳米にクロチアニジン、ジノテフラン及びチアメトキサムとしてそれぞれ 0.2 mg/kg、3 mg/kg 及び 5 mg/kg 相当量 (1 mL 中にそれぞれ 2 µg, 30 µg, 50 µg を含有する標準液 1 mL 添加) を添加した試料を用い、社団法人日本科学飼料協会科学飼料研究センター、財団法人日本食品分析センター多摩研究所、日本ハム株式会社中央研究所、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、同神戸センター及び同福岡センター (計 9 試験室) において、本法に従い共同試験を実施した。結果の解析につ

いては、IUPAC のプロトコール⁶⁾に従い、Cochran 検定、外れ値 1 個の Grubbs 検定及び外れ値 2 個の Grubbs 検定を行い、外れ値の棄却を行った上で平均回収率、繰返し精度 (RSD_r) 及び室間再現精度 (RSD_R) を算出した。得られた RSD_R から、修正 Horwitz 式を用いて HorRat を求めた。

結果は Table 11~13 のとおりであった。

クロチアニジンでは稲わら、稲発酵粗飼料及び粃米について、平均回収率はそれぞれ 90.4、94.5 及び 92.3 %、RSD_r はそれぞれ 8.3、4.2 及び 1.8 %、RSD_R はそれぞれ 14、5.9 及び 4.4 %、HorRat はそれぞれ 0.68、0.46 及び 0.32 であった。

ジノテフランでは稲わら、稲発酵粗飼料及び粃米について、平均回収率はそれぞれ 89.3、94.4 及び 92.3 %、RSD_r はそれぞれ 3.4、4.0 及び 3.5 %、RSD_R はそれぞれ 15、6.7 及び 8.9 %、HorRat はそれぞれ 0.71、0.53 及び 0.65 であった。

チアメトキサムでは稲わら、稲発酵粗飼料及び粃米について、平均回収率はそれぞれ 92.1、98.6 及び 93.7 %、RSD_r はそれぞれ 9.5、3.8 及び 3.5 %、RSD_R はそれぞれ 11、9.0 及び 5.8 %、HorRat はそれぞれ 0.52、0.72 及び 0.43 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タンデム型質量分析計の機種等を Table 14 に示した。

Table 11 Collaborative study results of clothianidin

Lab. No.	Feed types					
	Rice straw (mg/kg)		Whole-crop rice silage (mg/kg)		Paddy rice (mg/kg)	
1	0.213	0.204	5.05	5.03	2.70	2.61
2	0.156	0.152	4.66	4.64	2.75	2.75
3	0.160	0.166	4.66	4.78	2.94	2.92
4	0.167	0.152	4.32	4.59	2.72	2.67
5	0.195	0.169	4.18	4.78	2.67	2.70
6	0.163	0.185	5.06	5.03	2.81	2.93
7	0.160	0.170	4.52	4.55	2.73	2.62
8	0.222	0.191	6.24 ^{b)}	5.94 ^{b)}	2.90	2.96
9	0.195	0.233	4.68	5.09	3.55 ^{a)}	2.65 ^{a)}
Spiked level (mg/kg)	0.2		5		3	
Mean value ^{c)} (mg/kg)	0.181		4.73		2.77	
Recovery ^{c)} (%)	90.4		94.5		92.3	
RSD _r ^{d)} (%)	8.3		4.2		1.8	
RSD _R ^{e)} (%)	14		5.9		4.4	
PRSD _R ^{f)} (%)	21		13		14	
HorRat	0.68		0.46		0.32	

a) Data excluded by Cochran test

b) Data excluded by single Grubbs test

c) Rice straw: $n = 18$; whole-crop rice silage and paddy rice: $n = 16$

d) Relative standard deviation of repeatability within laboratory

e) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

f) Predicted relative standard deviation of reproducibility between laboratories calculated from the modified Horwitz equation

Table 12 Collaborative study results of dinotefuran

Lab. No.	Feed types					
	Rice straw (mg/kg)		Whole-crop rice silage (mg/kg)		Paddy rice (mg/kg)	
1	0.178	0.161	4.59	4.79	2.64	2.43
2	0.182	0.183	4.98	5.05	2.88	2.90
3	0.129	0.134	4.17	4.30	2.83	2.73
4	0.180	0.184	4.72	4.89	2.77	2.72
5	0.182	0.171	4.45	4.96	2.61	2.79
6	0.210	0.215	5.23	4.93	2.69	2.64
7	0.168	0.162	5.00	4.63	2.44	2.68
8	0.214	0.206	6.07 ^{b)}	6.28 ^{b)}	3.27	3.29
9	0.244 ^{a)}	0.315 ^{a)}	4.42	4.38	3.55 ^{a)}	2.40 ^{a)}
Spiked level (mg/kg)	0.2		5		3	
Mean value ^{c)} (mg/kg)	0.179		4.72		2.77	
Recovery ^{c)} (%)	89.3		94.4		92.3	
RSD _r ^{d)} (%)	3.4		4.0		3.5	
RSD _R ^{e)} (%)	15		6.7		8.9	
PRSD _R ^{f)} (%)	21		13		14	
HorRat	0.71		0.53		0.65	

a) Data excluded by Cochran test

b) Data excluded by single Grubbs test

c) Rice straw, whole-crop rice silage and paddy rice: $n=16$

d) Relative standard deviation of repeatability within laboratory

e) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

f) Predicted relative standard deviation of reproducibility between laboratories calculated from the modified Horwitz equation

Table 13 Collaborative study results of thiamethoxam

Lab. No.	Feed types					
	Rice straw (mg/kg)		Whole-crop rice silage (mg/kg)		Paddy rice (mg/kg)	
1	0.170	0.207	5.15	5.40	2.78	2.56
2	0.189	0.193	5.14	5.07	2.86	2.88
3	0.182	0.182	4.54	4.62	2.81	2.74
4	0.154	0.156	4.54	4.64	2.70	2.66
5	0.189	0.185	4.43	4.90	2.89	3.02
6	0.163	0.192	5.25	4.97	2.90	2.87
7	0.174	0.168	4.87	4.58	2.51	2.60
8	0.212	0.196	5.72	5.87	3.05	2.92
9	0.175	0.230	4.71	4.34	3.06	2.79
Spiked level (mg/kg)	0.2		5		3	
Mean value ^{a)} (mg/kg)	0.184		4.93		2.81	
Recovery ^{a)} (%)	92.1		98.6		93.7	
RSD _r ^{b)} (%)	9.5		3.8		3.5	
RSD _R ^{c)} (%)	11		9.0		5.8	
PRSD _R ^{d)} (%)	21		13		14	
HorRat	0.52		0.72		0.43	

a) Rice straw, whole-crop rice silage and paddy rice: $n=18$

b) Relative standard deviation of repeatability within laboratory

c) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

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

Table 14 Instruments used in the collaborative study

Lab. No.	LC-MS/MS	LC column (i.d.×length, particle size)
1	Waters Quattro premier XE	Kanto Chemical Mightysil RP-18 GP (2.0 mm×150 mm, 3 μm)
2	LC: Waters 2695 MS/MS: Micromass Quattro micro API	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm×150 mm, 3.5 μm)
3	LC: Agilent Technologies 1200 Series MS/MS: Agilent Technologies 6410 Triple Quad LC/MS	GL Sciences Inertsil ODS-SP (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
4	Waters ACQUITY TQD	Kanto Chemical Mightysil RP-18 GP (2.0 mm×150 mm, 3 μm)
5	Waters ACQUITY TQD	SHISEIDO SHISEIDO CAPCELL PAK C18 AQ (2.0 mm×150 mm, 5 μm)
6	Waters ACQUITY TQD	Kanto Chemical Mightysil RP-18 GP (2.0 mm×150 mm, 3 μm)
7	LC: Agilent Technologies 1200 Series MS/MS: AB SCIEX API-3200	GL Sciences Inertsil ODS-SP (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
8	LC: Agilent Technologies 1200 Series MS/MS: Agilent Technologies 6410 Triple Quad LC/MS	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm×150 mm, 3 μm)
9	LC: Agilent Technologies 1100 Series MS/MS: AB SCIEX API-2000	Tosoh TSKgel ODS-100S (2.0 mm×150 mm, 5 μm)

4 まとめ

飼料用イネ中に残留するクロチアニジン，ジノテフラン及びチアメトキサムについて，LC-MS/MS 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，以下の結果が得られ，適用が可能であると考えられた。

- 1) 検量線はそれぞれ 0.25~100 ng/mL (注入量として 0.00125~0.5 ng) の範囲で直線性を示した。
- 2) 多孔性ケイソウ土カラムからの溶出液量の検討を行ったところ，溶出溶媒は 40 mL で十分であった。
- 3) 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での流出液量の検討を行ったところ，流出溶媒は 20 mL で十分であった。
- 4) 食品分析センター法から中性アルミナカラムによる精製を省略し，最終試料溶液量を 2 mL から 20 mL とすることで良好な結果となった。
- 5) 稲わら 4 検体，稲発酵粗飼料 2 検体及び粃米 3 検体について，本法に従って選択反応検出クロマト

グラムを作成したところ、クロチアニジン、ジノテフラン及びチアメトキサムの定量を妨げるピークは認められなかった。

- 6) 稲わら 2 検体，稲発酵粗飼料及び粃米にクロチアニジン，ジノテフラン及びチアメトキサムとして，それぞれ 0.2~5 mg/kg 相当量を添加し，本法により添加回収試験を実施したところ，クロチアニジンについて平均回収率は，83.1~101 %，その繰返し精度は RSD_r として 7.0 % 以下，ジノテフランについて平均回収率は，81.5~106 %，その繰返し精度は RSD_r として 9.1 % 以下，チアメトキサムについて平均回収率は，87.9~105 %，その繰返し精度は RSD_r として 8.7 % 以下の成績が得られた。
- 7) 本法による定量下限は，クロチアニジン，ジノテフラン及びチアメトキサムともに試料中で 0.01 mg/kg，検出下限は，0.003 mg/kg であった。
- 8) クロチアニジン，ジノテフラン及びチアメトキサムとして，稲わらにそれぞれ 0.2 mg/kg，稲発酵粗飼料にそれぞれ 5 mg/kg 及び粃米にそれぞれ 3 mg/kg 相当量を添加した試料を用いて 9 試験室において本法に従い共同試験を実施したところ，良好な結果を得た。

謝 辞

共同試験に参加していただいた社団法人日本科学飼料協会科学飼料研究センター，財団法人日本食品分析センター多摩研究所及び日本ハム株式会社中央研究所における関係者各位に感謝の意を表します。

文 献

- 1) 農林水産省畜産局長通知：飼料の有害物質の指導基準の制定について，昭和 63 年 10 月 14 日，63 畜 B 第 2050 号 (1988)。
- 2) 厚生省告示：食品，添加物等の規格基準，昭和 34 年 12 月 28 日，厚生省告示第 370 号 (1959)。
- 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) 財団法人日本食品分析センター，平成 21 年度飼料中の有害物質等分析法委託事業 飼料中の有害物質等の分析法の開発 (2010)。
- 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)。
- 6) Horwitz, W., Protocol for Design, Conduct and Interpretation of Method - Performance Studies, Pure & appl. Chem., 67(2), 331-343 (1995)。