

2 飼料用イネ中のカルバリル他 8 成分の農薬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

榊原 良成*

Simultaneous Determination of Carbaryl and 8 Pesticides in Rice Straw, Whole-crop rice silage and Paddy rice for Feed by LC-MS/MS

Yoshinari SAKAKIBARA*

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

An analytical method was developed to determine nine pesticides (carbaryl, carbofuran, fenobucarb, fludioxonil, furametpyr, furametpyr-hydroxy, methoxyfenozide, tebufenozide, and thiacloprid) levels in rice straw and rice products for feed using liquid chromatograph-electrospray ionization-tandem mass spectrometer (LC-ESI-MS/MS).

After adding water to the samples, 9 pesticides 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 purified with octadecylsilanized silica gel mini column (InertSep Slim-J C18-B from GL sciences Inc.; Tokyo, Japan) and analyzed by LC-ESI-MS/MS. The LC separation was carried out with an ODS column (ZORBAX Eclipse XDB-18, 2.1 mm i.d.×150 mm, 5 μm from Agilent Technologies Inc.; Santa Clara, CA, U.S.) using gradient with 2 mmol/L ammonium acetate and acetonitrile as a mobile phase. MS/MS analysis was performed in the selected reaction monitoring (SRM) mode. Spike tests were conducted on rice straw, whole-crop rice silage and paddy rice spiked with 0.05 or 0.1 mg/kg of fludioxonil and 0.1, 0.2 or 1.0 mg/kg of other eight pesticides. This resulted in recoveries ranging from 77.1 % to 115 % with not more than 16 % in relative standard deviations of repeatability.

A collaborative study was conducted in 12 laboratories using rice straw and paddy rice spiked with 0.1 mg/kg of fludioxonil and 1.0 mg/kg each of the other eight pesticides. The mean recoveries of the pesticides in rice straw were 94.0 to 100%, the relative standard deviations of repeatability and reproducibility (RSD_r and RSD_R) were 4.4 to 9.8 % and 4.7 to 12 %, respectively. The mean recoveries of the pesticides in paddy rice were 92.5 to 107 %, RSD_r and RSD_R were 2.8 to 5.1 % and 5.2 to 12 %, respectively.

These results suggested that this method will be added to the Official Methods of Feed Analysis. This method was validated and established for use in the inspection for nine pesticides in rice straw and rice products for feed.

Key words: carbaryl ; carbofuran ; fenobucarb ; fludioxonil ; furametpyr ; furametpyr-hydroxy ; methoxyfenozide ; tebufenozide ; thiacloprid ; liquid chromatograph-tandem mass spectrometer (LC-MS/MS) ; electrospray ionization (ESI) ; feed ; rice straw ; whole crop rice silage ; paddy rice ; collaborative study

* 独立行政法人農林水産消費安全技術センター名古屋センター

キーワード：カルバリル；カルボフラン；フェノブカルブ；フルジオキシニル；フラメトピ
ル；フラメトピルヒドロキシ体；メトキシフェノジド；テブフェノジド；チアクロプリ
ド；液体クロマトグラフトンデム型質量分析計；エレクトロスプレーイオン化法；飼料
；稲わら；稲発酵粗飼料；粃米；共同試験

1 緒 言

農林水産省は基本政策である食料・農業・農村基本計画（平成 22 年 3 月 30 日閣議決定）において、平成 20 年度に 26 %（可消化養分総量（TDN）に換算）であった飼料自給率を平成 32 年までに 36 %に引き上げることを目標としている。そのための取り組みの一つとして、平成 19 年度の概算で 78 %であった粗飼料における国産の割合を、平成 27 年度までに 100 %とすることを目標とし、稲わら等の飼料利用を促進している。これに伴って、平成 21 年 1 月 29 日付けで飼料の有害物質の指導基準¹⁾が改正され、稲わら及び稲発酵粗飼料について残留農薬の基準値が設定された。その後も数回改正され、現在は粃米についても残留農薬の指導基準値が設定されている。

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。）に指導基準が設定されている農薬のうち、飼料分析基準²⁾に記載されていない成分があること、指導基準は設定されていないが国内で稲に適用される可能性のある農薬についてもモニタリングする必要があることから、これらの農薬を迅速に定量可能な分析法の開発が必要とされている。

今回、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開発した系統的分析法³⁾（以下、「食品分析センター法」という。）を基に、食品分析センター法が対象とする農薬成分のうちの A グループに区分された 8 種類 9 成分（カルバリル、カルボフラン、フェノブカルブ、フルジオキシニル、フラメトピル及びフラメトピルヒドロキシ体、メトキシフェノジド、テブフェノジド並びにチアクロプリド）の飼料分析基準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、参考までに、今回検討した農薬のうち指導基準値が設定されている 6 種類について、指導基準値を Table 1 に示した。

Table 1 Regulation values of the harmful substances in feed (extract)

Kind of pesticide	Target feed	Regulation value (mg/kg)
Fenobucarb	Rice straw	5
	Whole-crop rice silage	5
	Paddy Rice	3
Fludioxonil	Rice straw	0.05
	Whole-crop rice silage	0.1
Furametpyr	Rice straw	5
	Whole-crop rice silage	1
Methoxyfenozide	Rice straw	5
	Whole-crop rice silage	2
	Paddy Rice	2
Tebufenozide	Rice straw	20
	Whole-crop rice silage	10
Thiacloprid	Rice straw	0.5
	Whole-crop rice silage	0.2

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碎し、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碎し、供試試料とした。

2.2 試薬等

1) 各農薬標準原液

Table 2 の各農薬標準品 25 mg を正確に量ってそれぞれ 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各農薬標準原液を調製した（これらの液 1 mL は、各農薬 0.5 mg を含有する。）。

2) 農薬混合標準液

フルジオキシニル標準原液 10 mL 及びその他 8 成分の各農薬標準原液 2 mL を 100 mL の全量フラスコに入れて混合し、更に標線までアセトンを加えて農薬混合標準原液を調製した（この液 1 mL は、フルジオキシニルとして 50 µg、その他 8 成分の農薬として各 10 µg を含有する。）。

使用に際して、農薬混合標準原液の一定量を、アセトニトリル-水 (3+2) で正確に希釈し、1 mL 中にフルジオキシニルとして 0.5, 1, 2.5, 5 及び 10 ng、その他 8 成分の農薬として 0.1, 0.2, 0.5, 1 及び 2 ng を含有する各農薬混合標準液を調製した。

3) アセトンは残留農薬・PCB 試験用を用いた。アセトニトリルは抽出及び精製操作には残留農薬・PCB 試験用を、溶離液には液体クロマトグラフ用を用いた。水は超純水を用いた。

Table 2 Pesticide standards

Kind of pesticide	Manufacturer	Molecular formula	MW	CAS No	Purity(%)
Carbaryl	Wako pure chemical industries	C ₁₂ H ₁₁ NO ₂	201.2	63-25-2	99.0
Carbofuran	Wako pure chemical industries	C ₁₂ H ₁₅ NO ₃	221.3	1563-66-2	98.0
Fenobucarb	Wako pure chemical industries	C ₁₂ H ₁₇ NO ₂	207.3	3766-81-2	99.8
Fludioxonil	Wako pure chemical industries	C ₁₂ H ₆ F ₂ N ₂ O ₂	248.2	131341-86-1	99.0
Furametpyr	Wako pure chemical industries	C ₁₇ H ₂₀ ClN ₃ O ₂	333.8	123572-88-3	99.0
Furametpyr-hydroxy	Wako pure chemical industries	C ₁₇ H ₂₀ ClN ₃ O ₃	349.8	-	99.0
Methoxyfenozide	Dr.Ehrenstorfer	C ₂₂ H ₂₈ N ₂ O ₃	368.5	161050-58-4	99.5
Tebufenozide	Wako pure chemical industries	C ₂₂ H ₂₈ N ₂ O ₂	352.5	112410-23-8	99.0
Thiacloprid	Wako pure chemical industries	C ₁₀ H ₉ ClN ₄ S	252.7	111988-49-9	98.0

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) オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム：ジーエルサイエンス製 InertSep Slim-J C18-B (充てん剤量 500 mg) にリザーバーを連結したもの

4) 吸引マニホールド：ジーエルサイエンス製 GL-SPE 吸引マニホールド

5) 高速遠心分離器：コクサン製 H-51

2.4 定量方法

1) 抽出

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 (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 2 mL (フルジオキサニル以外のその他 8 成分の農薬を測定する場合にあっては、更にアセトンで正確に 10 倍希釈した後、その液 2 mL) を 50 mL のなす形フラスコに正確に入れ、水 20 mL を加えて混合した後、カラム処理に供する試料溶液とした。

2) カラム処理

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムをアセトニトリル 5 mL 及び水 5 mL で順次洗浄した。

試料溶液をミニカラムに入れ、流速 1 mL/min 程度で吸引して液面が充てん剤の上端に達するまで流出させた。更に試料溶液の入っていたなす形フラスコを水-アセトニトリル (9+1) 5 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。10 mL の全量フラスコをミニカラムの下に置き、アセトニトリル-水 (3+2) 10 mL をミニカラムに加え、圧注して各農薬成分を溶出させた。更に、全量フラスコの標線まで同溶媒を加え、その液の一定量を 5,000×g (10,000 rpm) で 5 分間遠心分離し、上澄み液を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。

3) 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定

試料溶液及び各混合標準液各 5 μ L 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 3 及び Table 4 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 3 Operating conditions of LC-MS/MS for analysing pesticide

Column	ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm i.d.×150 mm, 5 μ m)
Mobile phase	2 mmol/L Ammonium acetate-acetonitrile (4:1) → 15 min → (1:9) (5 min)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temperature	40 °C
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Source temperature	120 °C
Desolvation temperature	N ₂ (650 L/h, 350 °C)
Cone gas	N ₂ (50 L/h)
Capillary voltage	Positive: 3.5 kV, Negative: 1.0 kV

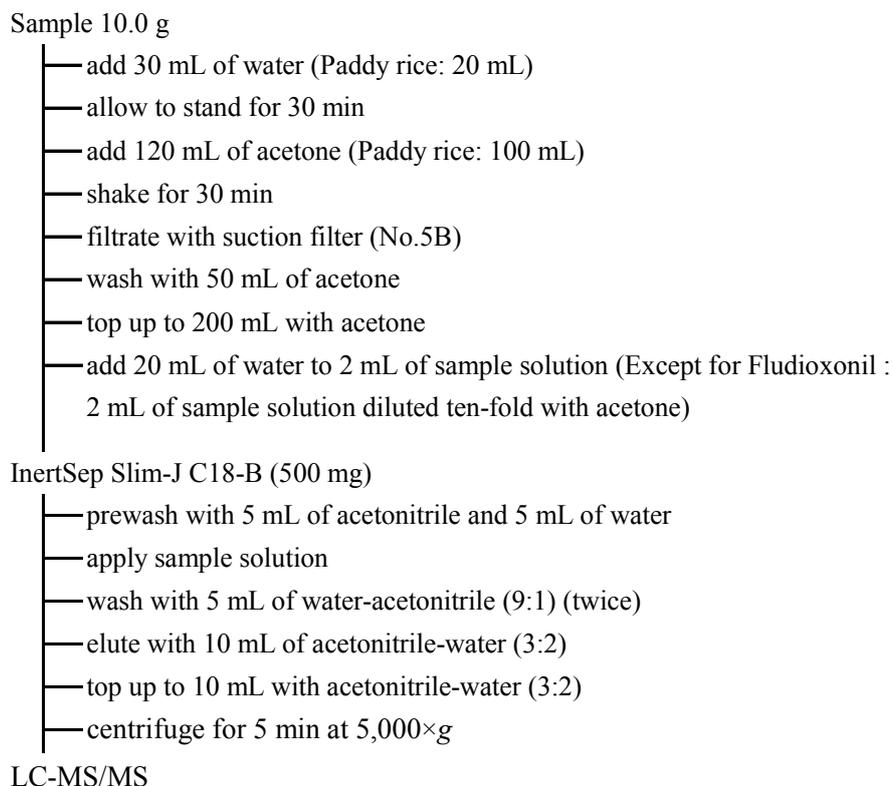
Table 4 MS/MS Parameters

Target ion	Mode	Precursor (<i>m/z</i>)	Product (<i>m/z</i>)	Qualifier (<i>m/z</i>)	Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
Carbaryl	+	202	145	-	24	11
			-	127	24	25
Carbofuran	+	222	165	-	32	11
			-	123	32	23
Fenobucarb	+	208	95	-	28	13
			-	77	28	35
Fludioxonil	-	247	180	-	48	28
			-	126	48	28
Furametpyr	+	334	157	-	36	32
			-	290	36	16
Furametpyr-hydroxy	+	332	157	-	38	22
			-	76	38	56
Methoxyfenozide	+	369	149	-	18	18
			-	133	18	28
Tebufenozide	+	353	133	-	18	20
			-	105	18	42
Thiacloprid	+	253	126	-	36	20
			-	90	36	36

4) 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、試料中の各農薬量を算出した。

なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。



Scheme 1 Analytical procedure for pesticides in feeds

3 結果及び考察

3.1 検量線の作成

2.2 の 2)に従って調製した農薬混合標準液各 5 μ L 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面積及び高さを求めて検量線を作成した。その結果、Fig. 1-1 から 1-2 のとおり、フルジオキシニルは、0.5~10 ng/mL (注入量として 0.0025~0.05 ng) の範囲で直線性を示した。その他 8 成分の農薬は 0.1~2 ng/mL (注入量として 0.0005~0.01 ng) の範囲で直線性を示した。

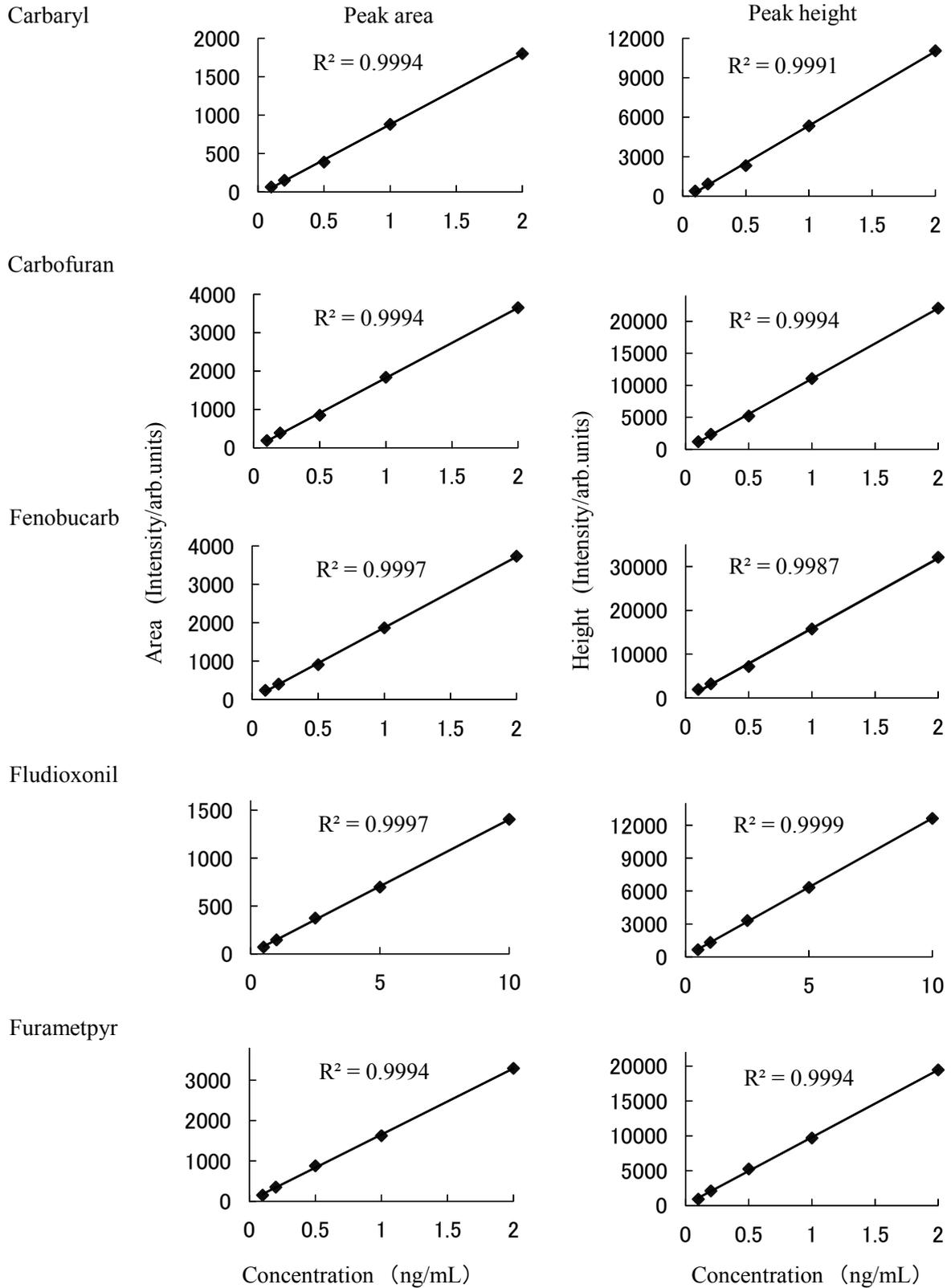


Fig. 1-1 Calibration curves of five pesticides by peak area (Left) and peak height (Right)

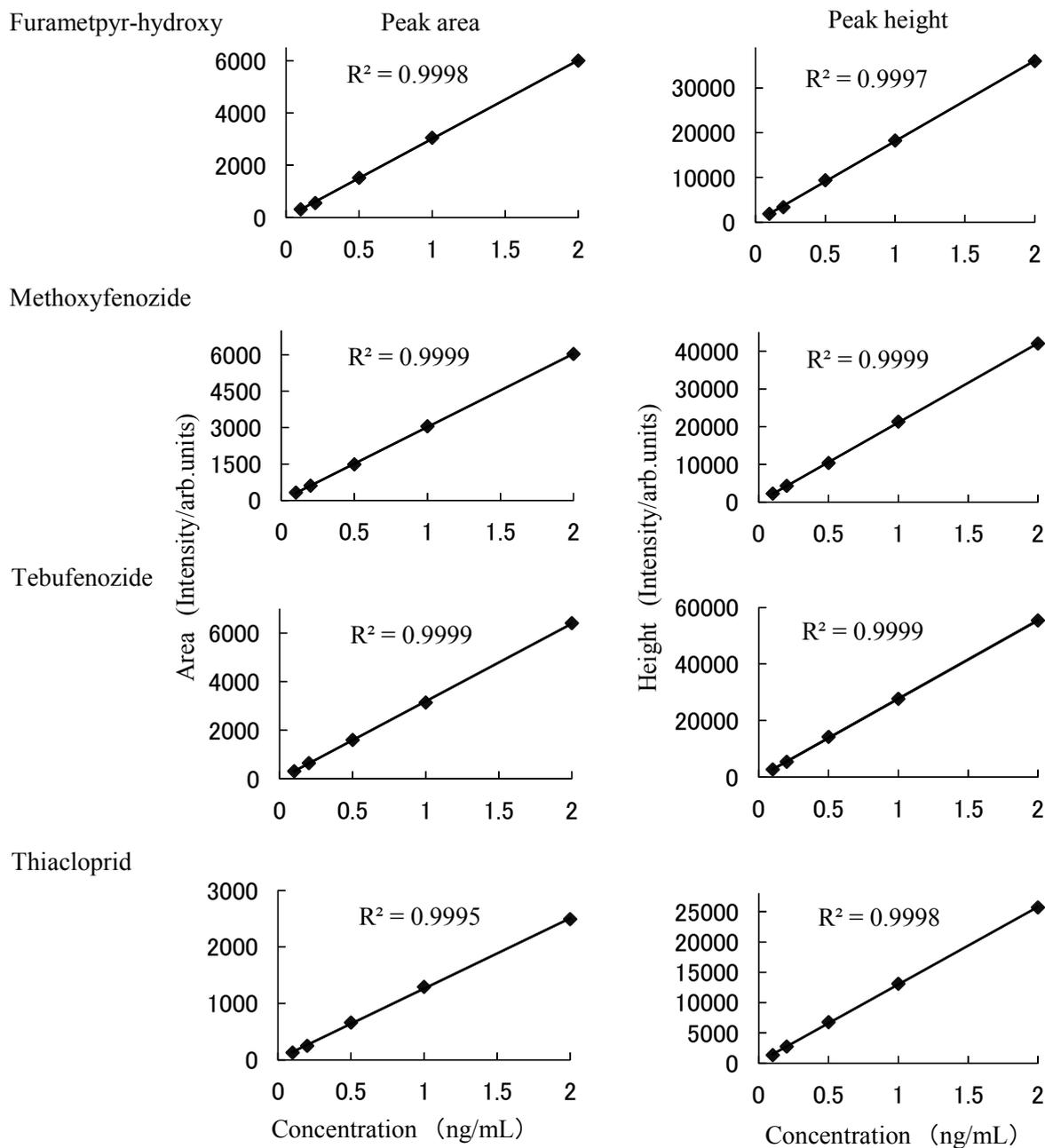


Fig. 1-2 Calibration curves of four pesticides by peak area (Left) and peak height (Right)

3.2 オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムの溶出画分の確認

市販の稲わら、稲発酵粗飼料及び粃米を用い、本法により抽出した試料溶液に各農薬の標準液 0.1 μg 相当量を添加して、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムからの溶出画分を確認した。その結果、Table 5-1 から 5-3 のとおりいずれの場合においても洗浄液である水-アセトニトリル (9+1) 10 mL には農薬成分の流出は見られず、溶出液であるアセトニトリル-水 (3+2) では 10 mL で全ての農薬成分の溶出が確認され、またその後の 10 mL には溶出は確認されなかった。

Table 5-1 Elution pattern of pesticides from InertSep Slim-J C18-B (rice straw)

Pesticide	Recovery ^{a)} (%)			Total
	Water-acetonitrile			
	(9:1)	(2:3)	(2:3)	
	10 mL	0~10 mL	~20 mL	
Carbaryl	0	93	0	93
Carbofuran	0	94	0	94
Fenobucarb	0	98	0	98
Fludioxonil	0	86	0	86
Furametpyr	0	98	0	98
Furametpyr-hydroxy	0	99	0	99
Methoxyfenozide	0	95	0	95
Tebufenozide	0	97	0	97
Thiacloprid	0	99	0	99

a) $n=1$

Table 5-2 Elution pattern of pesticides from InertSep Slim-J C18-B (whole-crop rice silage)

Pesticide	Recovery ^{a)} (%)			Total
	Water-acetonitrile			
	(9:1)	(2:3)	(2:3)	
	10 mL	0~10 mL	~20 mL	
Carbaryl	0	99	0	99
Carbofuran	0	99	0	99
Fenobucarb	0	100	0	100
Fludioxonil	0	87	0	87
Furametpyr	0	99	0	99
Furametpyr-hydroxy	0	103	0	103
Methoxyfenozide	0	104	0	104
Tebufenozide	0	102	0	102
Thiacloprid	0	102	0	102

a) $n=1$

Table 5-3 Elution pattern of pesticides from InertSep Slim-J C18-B (paddy rice)

Pesticide	Recovery ^{a)} (%)			Total
	Water-acetonitrile			
	(9:1) 10 mL	(2:3) 0~10 mL	(2:3) ~20 mL	
Carbaryl	0	105	0	105
Carbofuran	0	102	0	102
Fenobucarb	0	105	0	105
Fludioxonil	0	96	0	96
Furametpyr	0	101	0	101
Furametpyr-hydroxy	0	99	0	99
Methoxyfenozide	0	99	0	99
Tebufenozide	0	102	0	102
Thiacloprid	0	102	0	102

a) $n=1$

3.3 妨害物質の検討

稲わら 1 検体, 稲発酵粗飼料 1 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, いずれの試料においても妨害となるピークは認められなかった.

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. 2-1 に示した.

なお, Fig. 2-1 において保持時間の位置に微小のピークが認められるカルバルル及びメトキシフェノジドについて, 定量下限相当の標準液 (0.1 ng/mL) の選択反応検出クロマトグラムとの比較を Fig. 2-2 に示した.

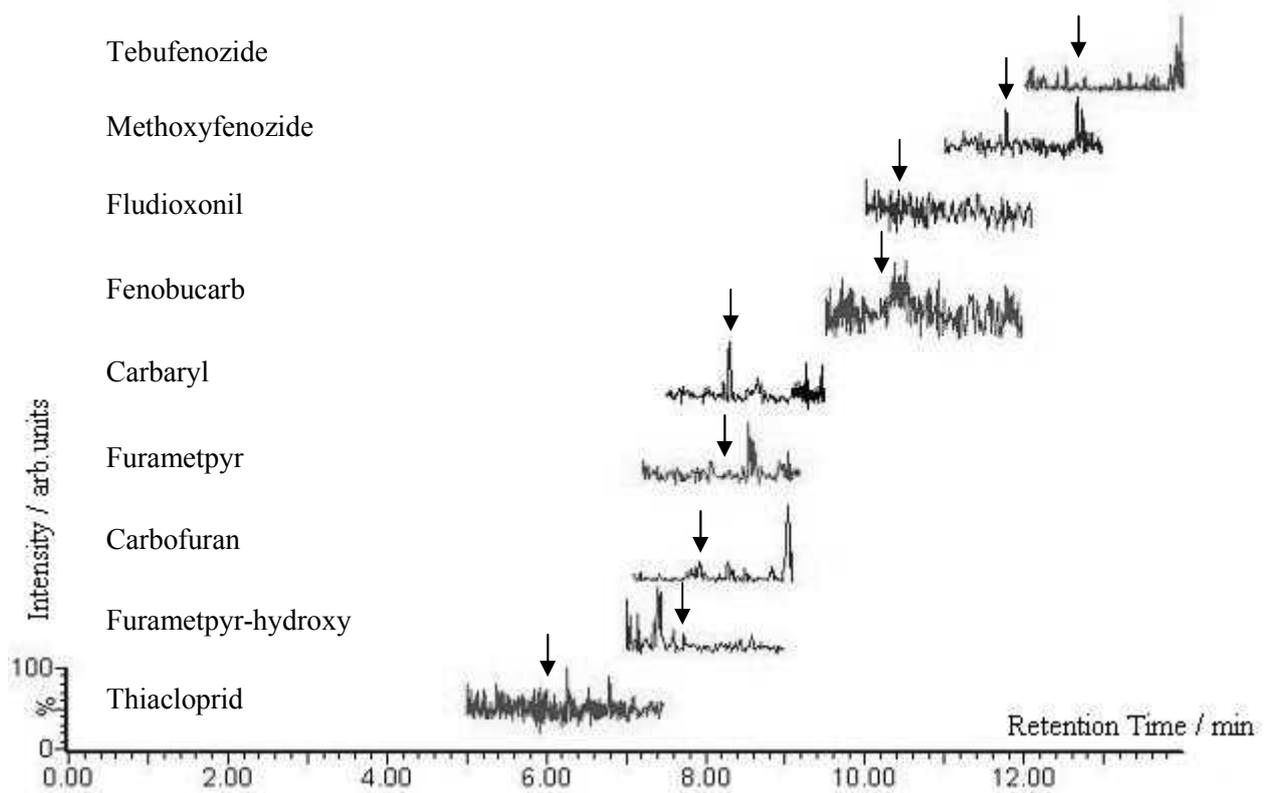


Fig. 2-1 SRM chromatograms of rice straw (non-spiked)

LC-MS/MS conditions are shown in Table 3 and 4.

(Arrows indicate the retention time of pesticides and highest intensity peak is shown as 100 % in each segment.)

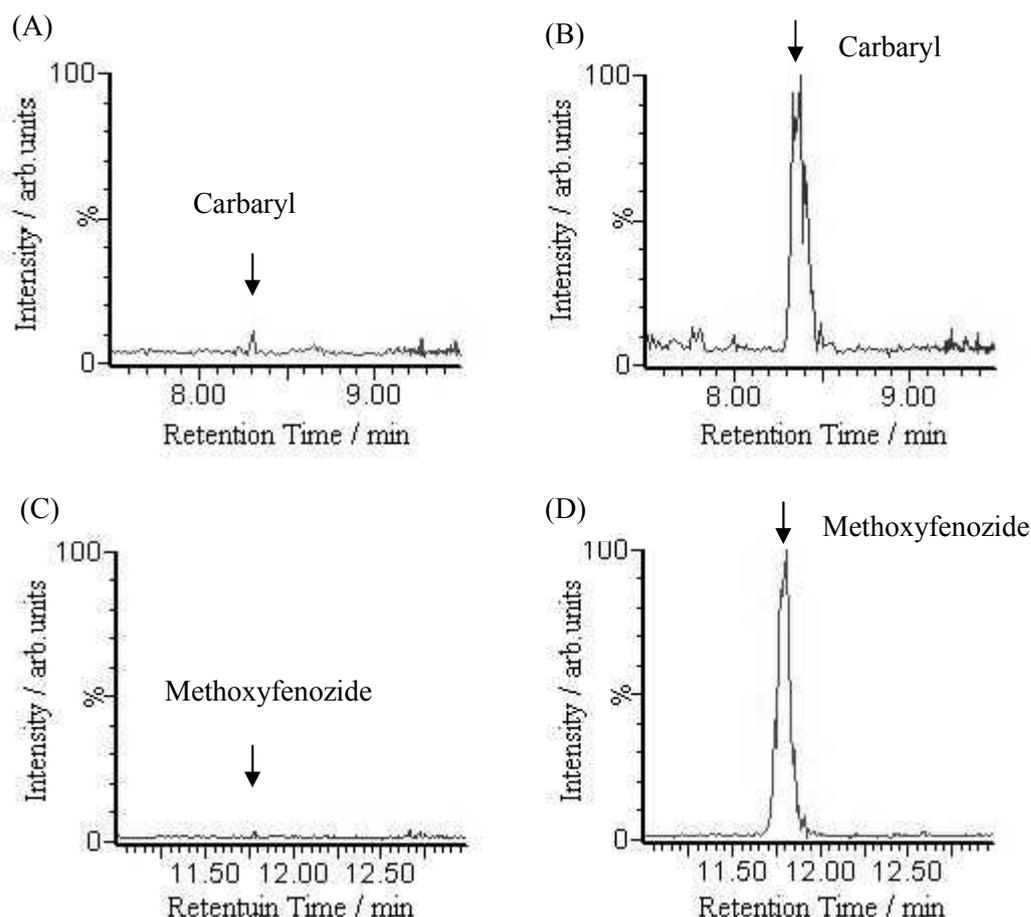


Fig. 2-2 SRM chromatograms of rice straw (non-spiked) and standard solution

LC-MS/MS conditions are shown in Table 3 and 4.

(Arrows indicate the retention time of pesticides.)

(A) (C) Sample solution of rice straw (non-spiked)

(B) (D) Standard solution (The amount of carbaryl and methoxyfenozide are 0.1 ng/mL.)

3.4 添加回収試験

2.1 で調製した稲わら、稲発酵粗飼料及び粃米にフルジオキサニルとして 0.1 及び 0.05 mg/kg 相当量、その他 8 成分の農薬については各農薬として 1 及び 0.2 mg/kg 相当量を添加し、本法に従って 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 6 のとおり、カルバリルについては平均回収率 90.1~101 %、その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD_r) として 8.2 %以下、カルボフランについては平均回収率 82.5~101 %、その繰返し精度は RSD_r として 9.1 %以下、フェノブカルブについては平均回収率 86.1~103 %、その繰返し精度は RSD_r として 7.9 %以下、フルジオキサニルについては平均回収率 92.0~104 %、その繰返し精度は RSD_r として 7.6 %以下、フラメトピルについては平均回収率 87.0~104 %、その繰返し精度は RSD_r として 11.1 %以下、フラメトピルヒドロキシ体については平均回収率 78.5~90.4 %、その繰返し精度は RSD_r として 7.1 %以下、メトキシフェノジドについては平均回収率 77.1~93.2 %、その繰返し精度は RSD_r として 7.7 %以下、テブフェノジドについては平均回収率 88.8~94.2 %、その繰返し精度は RSD_r として 3.7 %以下、チアクロプリドについては平均回収率 88.0~94.2 %、その繰返し精度は RSD_r

として 4.0 %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反応検出クロマトグラムの一例を Fig. 3 に示した。

Table 6 Recoveries of pesticides

Kind of pesticide	Spiked level (mg/kg)	Feed types					
		Rice straw		Whole-crop rice silage		Paddy rice	
		Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)
Carbaryl	1.0	96.0	4.0	99.4	1.6	99.0	0.7
	0.2	101	0.8	97.7	8.2	90.1	6.2
Carbofuran	1.0	89.0	2.5	96.7	1.8	96.3	7.1
	0.2	101	8.6	96.6	3.0	82.5	9.1
Fenobucarb	1.0	86.1	1.7	94.3	6.9	94.4	3.6
	0.2	103	6.4	96.3	6.9	91.4	7.9
Fludioxonil	0.1	92.9	2.6	92.0	1.7	95.9	2.7
	0.05	104	7.6	99.3	6.8	98.9	1.7
Furametpyr	1.0	87.0	4.1	93.8	3.7	93.7	3.0
	0.2	104	9.8	103	11	87.8	7.4
Furametpyr-hydroxy	1.0	89.6	3.7	90.4	4.9	90.0	3.5
	0.2	85.5	7.1	82.0	6.5	78.5	1.4
Methoxyfenozide	1.0	91.6	3.7	92.9	1.1	93.2	0.4
	0.2	92.5	6.3	77.1	7.7	90.7	5.1
Tebufenozide	1.0	89.2	1.0	94.2	1.9	92.9	2.8
	0.2	92.7	2.6	92.7	3.7	88.8	2.4
Thiacloprid	1.0	88.0	1.7	94.2	0.4	91.7	2.6
	0.2	89.9	2.9	89.3	3.4	89.5	4.0

a) Mean ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

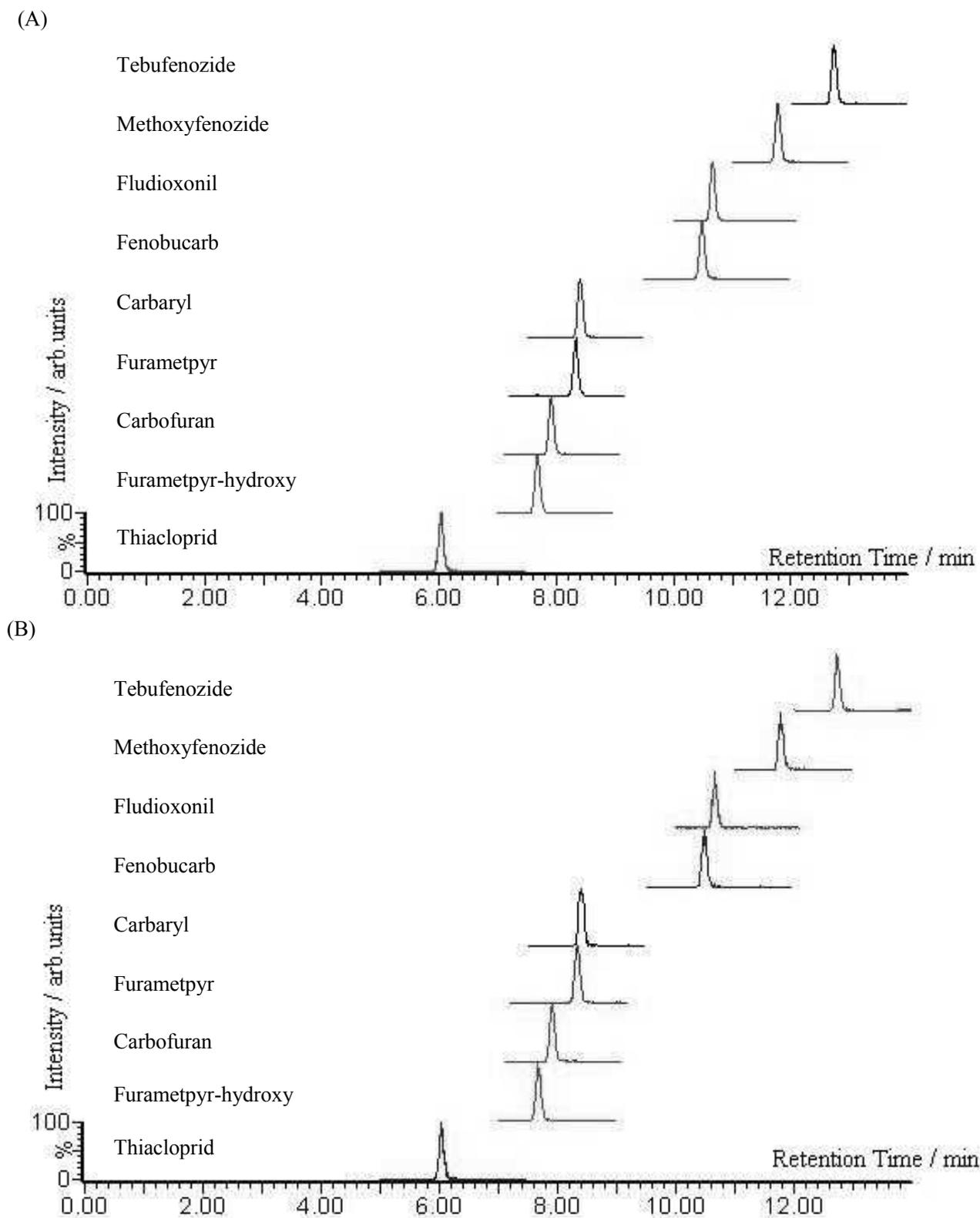


Fig. 3 SRM chromatograms of pesticides

LC-MS/MS conditions are shown in Table 3 and 4.

- (A) Standard solution (The concentration is 10 ng/mL for fludioxonil and 2 ng/mL for other pesticides.)
 (B) Sample solution of rice straw (Spiked at 0.1 mg/kg of fludioxonil and 1 mg/kg of other pesticides)
 (Highest intensity peak is shown as 100 % in each segment.)

3.5 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、稲発酵粗飼料及び粃米に 9 成分の各農薬を添加し、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。

フルジオキシニルについては、ピークの SN 比が 10 以上となる濃度は 0.05 mg/kg であり、また、SN 比が 3 となる濃度は 0.02 mg/kg であった。

確認のために、稲わら、稲発酵粗飼料及び粃米にフルジオキシニルとして 0.05 mg/kg 相当量を添加した試料について、本法に従って 3 点併行分析を実施したところ、その平均回収率及び繰返し精度は Table 7 のとおりであった。

その他 8 成分の農薬については、得られたピークの SN 比が 10 以上となる濃度は 0.1 mg/kg であり、また、SN 比が 3 となる濃度は 0.03 mg/kg であった。

確認のため、稲わら、稲発酵粗飼料及び粃米にその他 8 成分の農薬として 0.1 mg/kg 相当量を添加した試料について、本法に従って 3 点併行分析を実施したところ、その平均回収率及び繰返し精度は Table 7 のとおりであった。

以上の結果から、本法のフルジオキシニルの定量下限は 0.05 mg/kg、検出下限は 0.02mg/kg であり、その他 8 成分の農薬の定量下限は 0.1 mg/kg、検出下限は 0.03 mg/kg であった。

Table 7 Recoveries of pesticides at the level of limit of quantification

	Spiked level (mg/kg)	Feed types					
		Rice straw		Whole-crop rice silage		Paddy rice	
		Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)
Carbaryl	0.1	103	6.7	115	11	106	9.3
Carbofuran	0.1	89.4	11	92.1	16	94.4	8.0
Fenobucarb	0.1	99.1	9.3	101	2.8	92.3	13
Fludioxonil	0.05	104	7.6	99.3	6.8	98.9	1.7
Furametpyr	0.1	103	12	104	12	111	5.7
Furametpyr-hydroxy	0.1	102	5.7	96.4	9.9	89.1	9.8
Methoxyfenozide	0.1	95.3	6.7	96.7	9.6	89.8	0.7
Tebufenozide	0.1	102	12	97.3	1.6	93.0	7.3
Thiacloprid	0.1	107	11	99.1	6.9	97.0	11

a) Mean ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

3.6 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。

稲わら及び粃米にフルジオキシニルとして 0.1 mg/kg 相当量 (1 mL 中に 2 µg を含有する標準液 0.5 mL 添加)、その他 8 成分の農薬としてそれぞれ 1 mg/kg 相当量 (1 mL 中に 20 µg を含有する標準液 0.5 mL 添加) を添加した試料を用い、協同飼料株式会社研究所、株式会社島津テクノリサーチ、全国酪農業協同組合連合会分析センター、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 12 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⁴⁾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_f) 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.

結果を Table 8 から 16 に示した.

カルバリルでは稲わら及び粳米について, 平均回収率は 97.6 及び 101 %, RSD_f はそれぞれ 4.4 及び 4.3 %, RSD_R はそれぞれ 7.7 及び 11 %, HorRat はそれぞれ 0.48 及び 0.69 であった.

カルボフランでは稲わら及び粳米について, 平均回収率は 99.2 及び 102 %, RSD_f はそれぞれ 4.6 及び 3.8 %, RSD_R はそれぞれ 6.1 及び 7.8 %, HorRat はそれぞれ 0.38 及び 0.49 であった.

フェノブカルブでは稲わら及び粳米について, 平均回収率は 99.3 及び 105 %, RSD_f はそれぞれ 5.5 及び 5.0 %, RSD_R はそれぞれ 10 及び 6.2 %, HorRat はそれぞれ 0.65 及び 0.39 であった.

フルジオキソニルでは稲わら及び粳米について, 平均回収率は 100 及び 107 %, RSD_f はそれぞれ 9.8 及び 3.8 %, RSD_R はそれぞれ 12 及び 12 %, HorRat はそれぞれ 0.55 及び 0.53 であった.

フラメトピルでは稲わら及び粳米について, 平均回収率は 98.2 及び 100 %, RSD_f はそれぞれ 7.6 及び 4.5 %, RSD_R はそれぞれ 7.9 及び 9.5 %, HorRat はそれぞれ 0.50 及び 0.60 であった.

フラメトピルヒドロキシ体では稲わら及び粳米について, 平均回収率は 94.0 及び 92.5 %, RSD_f はそれぞれ 5.5 及び 3.7 %, RSD_R はそれぞれ 7.3 及び 8.0 %, HorRat はそれぞれ 0.45 及び 0.49 であった.

メトキシフェノジドでは稲わら及び粳米について, 平均回収率は 97.3 及び 103 %, RSD_f はそれぞれ 5.0 及び 5.0 %, RSD_R はそれぞれ 7.8 及び 5.9 %, HorRat はそれぞれ 0.49 及び 0.37 であった.

チアクロプリドでは稲わら及び粳米について, 平均回収率は 99.0 及び 103 %, RSD_f はそれぞれ 4.5 及び 2.8 %, RSD_R はそれぞれ 8.6 及び 5.2 %, HorRat はそれぞれ 0.53 及び 0.33 であった.

テブフェノジドでは稲わら及び粳米について, 平均回収率は 95.2 及び 102 %, RSD_f はそれぞれ 5.1 及び 5.1 %, RSD_R はそれぞれ 4.7 及び 6.1 %, HorRat はそれぞれ 0.29 及び 0.39 であった.

参考のため, 各試験室で使用した LC-MS/MS の機種等を Table 17 に示した.

Table 8 Collaborate study results of carbaryl

Lab. No.	Feed types			
	Rice straw		Paddy rice	
	(mg/kg)		(mg/kg)	
1	0.900	0.872	0.946	0.858
2	1.01	1.01	1.05	0.994
3	0.894	0.805	0.774	0.718
4	1.09	1.02	1.04	1.12
5	0.974	0.976	1.03	1.07
6	0.992	1.09	0.967	0.981
7	0.939	0.891	0.961	0.959
8	0.925	0.994	1.05	1.04
9	1.01	0.946	1.08	1.10
10	0.989	0.916	1.05	1.05
11	1.04	1.02	1.16	1.11
12	1.10	1.03	1.19	1.05
Spiked level (mg/kg)	1.00		1.00	
Mean value ^{a)} (mg/kg)	0.976		1.01	
Recovery ^{a)} (%)	97.6		101	
RSD _r ^{b)} (%)	4.4		4.3	
RSD _R ^{c)} (%)	7.7		11	
PRSD _R ^{d)} (%)	16		16	
HorRat	0.48		0.69	

a) $n=24$

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 9 Collaborate study results of carbofuran

Lab. No.	Feed types			
	Rice straw		Paddy rice	
	(mg/kg)		(mg/kg)	
1	0.986	0.932	0.841	0.854
2	0.986	0.989	1.01	1.00
3	0.936	0.990	1.17	1.04
4	1.06	1.06	0.992	1.06
5	0.952	0.971	1.00	1.01
6	1.04	1.15	1.14	1.08
7	0.946	1.03	1.01	0.975
8	1.03	1.02	1.01	0.941
9	1.01	0.889	0.965	0.999
10	0.900	0.924	1.01	1.00
11	0.973	1.07	1.14	1.09
12	0.978	0.978	1.09	1.05
Spiked level (mg/kg)	1.00		1.00	
Mean value ^{a)} (mg/kg)	0.992		1.02	
Recovery ^{a)} (%)	99.2		102	
RSD _r ^{b)} (%)	4.6		3.8	
RSD _R ^{c)} (%)	6.1		7.8	
PRSD _R ^{d)} (%)	16		16	
HorRat	0.38		0.49	

a) $n=24$

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 10 Collaborate study results of fenobucarb

Lab. No.	Feed types			
	Rice straw (mg/kg)		Paddy rice (mg/kg)	
1	0.987	0.927	0.96	0.99
2	0.961	0.982	1.03	1.02
3	0.840	0.747	0.763 ^{a)}	0.742 ^{a)}
4	1.10	0.967	1.05	1.07
5	0.993	1.02	1.02	1.02
6	1.03	1.18	1.17	1.06
7	0.975	0.969	1.01	0.99
8	1.04	0.974	1.11	1.12
9	1.00	0.927	1.03	0.93
10	0.952	0.976	1.05	1.02
11	1.21	1.19	1.08	1.01
12	0.988	0.908	1.21	1.04
Spiked level (mg/kg)	1.00		1.00	
Mean value ^{b)} (mg/kg)	0.993		1.05	
Recovery ^{b)} (%)	99.3		105	
RSD _r ^{c)} (%)	5.5		5.0	
RSD _R ^{d)} (%)	10		6.2	
PRSD _R ^{e)} (%)	16		16	
HorRat	0.65		0.39	

a) Data excluded by single Grubbs test

b) Rice straw: $n = 24$; Paddy rice: $n = 22$

c) Relative standard deviation of repeatability within laboratory

d) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

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

Table 11 Collaborate study results of fludioxonil

Lab. No.	Feed types			
	Rice straw		Paddy rice	
	(mg/kg)		(mg/kg)	
1	0.0924	0.0855	0.0909	0.0933
2	0.105	0.107	0.111	0.113
3	0.114	0.108	0.108	0.110
4	0.107	0.100	0.106	0.109
5	0.0936	0.0982	0.110	0.106
6	0.103	0.114	0.118	0.125
7	0.106	0.103	0.109	0.119
8	0.131	0.0969	0.0904	0.0926
9	0.0968	0.0847	0.0838	0.0940
10	0.0826	0.0833	0.103	0.101
11	0.0991	0.112	0.126	0.133
12	0.102	0.0790	0.100	0.107
Spiked level (mg/kg)	0.100		0.100	
Mean value ^{a)} (mg/kg)	0.100		0.107	
Recovery ^{a)} (%)	100		107	
RSD _r ^{b)} (%)	9.8		3.8	
RSD _R ^{c)} (%)	12		12	
PRSD _R ^{d)} (%)	22		22	
HorRat	0.55		0.53	

a) $n=24$

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 12 Collaborate study results of furametpyr

Lab. No.	Feed types			
	Rice straw		Paddy rice	
	(mg/kg)		(mg/kg)	
1	1.00	0.906	0.896	0.915
2	0.977	1.02	1.03	1.05
3	1.03	0.813	0.850	0.727
4	1.09	0.981	0.987	1.06
5	0.947	0.940	0.991	1.06
6	1.05	1.16	1.17	1.12
7	1.03	0.884	0.953	0.988
8	0.970	0.948	1.03	0.976
9	1.00	0.943	1.04	0.969
10	0.877	0.923	1.02	0.995
11	0.985	1.11	1.12	1.09
12	1.03	0.942	0.966	1.06
Spiked level (mg/kg)	1.00		1.00	
Mean value ^{a)} (mg/kg)	0.982		1.00	
Recovery ^{a)} (%)	98.2		100	
RSD _r ^{b)} (%)	7.6		4.5	
RSD _R ^{c)} (%)	7.9		9.5	
PRSD _R ^{d)} (%)	16		16	
HorRat	0.50		0.60	

a) $n=24$

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 13 Collaborate study results of furametpyr-hydroxy

Lab. No.	Feed types			
	Rice straw		Paddy rice	
	(mg/kg)		(mg/kg)	
1	0.936	0.944	0.879	0.905
2	0.917	0.931	0.929	0.930
3	0.908	0.850	0.751	0.763
4	1.05	0.959	0.941	1.05
5	0.935	0.982	0.946	0.935
6	1.00	1.15	1.04	0.985
7	0.924	0.919	0.968	0.904
8	0.950	0.937	0.944	0.936
9	0.915	0.879	0.875	0.836
10	0.880	0.841	0.922	0.929
11	0.917	1.01	1.04	0.960
12	0.972	0.842	0.907	0.921
Spiked level (mg/kg)	1.00		1.00	
Mean value ^{a)} (mg/kg)	0.940		0.925	
Recovery ^{a)} (%)	94.0		92.5	
RSD _r ^{b)} (%)	5.5		3.7	
RSD _R ^{c)} (%)	7.3		8.0	
PRSD _R ^{d)} (%)	16		16	
HorRat	0.45		0.49	

a) $n=24$

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 Collaborate study results of methoxyfenozide

Lab. No.	Feed types			
	Rice straw		Paddy rice	
	(mg/kg)		(mg/kg)	
1	0.885	0.941	0.904	1.07
2	0.944	0.952	1.02	0.999
3	0.899	0.922	1.02	0.899
4	1.07	1.05	1.08	1.09
5	0.958	0.967	1.03	0.995
6	1.03	1.14	1.17	1.09
7	0.839	0.887	1.06	0.965
8	1.04	0.998	1.02	1.03
9	0.998	0.884	1.01	0.967
10	0.930	0.926	1.03	1.03
11	0.961	1.09	1.11	1.07
12	1.06	0.981	1.04	1.01
Spiked level (mg/kg)	1.00		1.00	
Mean value ^{a)} (mg/kg)	0.973		1.03	
Recovery ^{a)} (%)	97.3		103	
RSD _r ^{b)} (%)	5.0		5.0	
RSD _R ^{c)} (%)	7.8		5.9	
PRSD _R ^{d)} (%)	16		16	
HorRat	0.49		0.37	

a) $n=24$

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 15 Collaborative study results of tebufenozide

Lab. No.	Feed types			
	Rice straw		Paddy rice	
	(mg/kg)		(mg/kg)	
1	0.939	0.928	0.863	0.969
2	0.935	0.945	1.01	1.01
3	0.960	0.923	0.952	0.956
4	1.11 ^{a)}	1.06 ^{a)}	1.00	1.13
5	0.945	0.997	1.08	1.04
6	0.925	1.05	1.08	1.00
7	0.967	0.839	0.929	1.01
8	0.997	0.978	0.972	1.08
9	0.996	0.945	1.03	0.949
10	0.926	0.899	1.03	1.03
11	0.902	1.00	1.09	1.04
12	1.00	0.951	1.08	1.08
Spiked level (mg/kg)	1.00		1.00	
Mean value ^{b)} (mg/kg)	0.952		1.02	
Recovery ^{b)} (%)	95.2		102	
RSD _F ^{c)} (%)	5.1		5.1	
RSD _R ^{d)} (%)	4.7		6.1	
PRSD _R ^{e)} (%)	16		16	
HorRat	0.29		0.39	

a) Data excluded by single Grubbs test

b) Rice straw: $n = 22$; Paddy rice: $n = 24$

c) Relative standard deviation of repeatability within laboratory

d) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

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

Table 16 Collaborative study results of thiacloprid

Lab. No.	Feed types			
	Rice straw		Paddy rice	
	(mg/kg)		(mg/kg)	
1	0.964	0.947	0.97	0.940
2	0.975	0.995	1.05	1.04
3	0.888	0.817	0.749 ^{a)}	0.718 ^{a)}
4	1.12	1.07	1.07	1.13
5	0.951	0.960	1.04	0.997
6	1.04	1.19	1.14	1.10
7	1.01	0.965	1.00	0.971
8	0.938	1.00	0.97	1.03
9	1.01	0.945	1.03	0.989
10	0.898	0.912	0.98	1.01
11	1.06	1.14	1.05	1.07
12	0.998	0.967	0.97	1.03
Spiked level (mg/kg)	1.00		1.00	
Mean value ^{b)} (mg/kg)	0.990		1.03	
Recovery ^{b)} (%)	99.0		103	
RSD _r ^{c)} (%)	4.5		2.8	
RSD _R ^{d)} (%)	8.6		5.2	
PRSD _R ^{e)} (%)	16		16	
HorRat	0.53		0.33	

a) Data excluded by single Grubbs test

b) Rice straw: $n = 24$; Paddy rice: $n = 22$

c) Relative standard deviation of repeatability within laboratory

d) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

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

Table 17 Instruments used in the collaborative study

Lab.No.	LC-MS/MS	LC column (i.d.×length, particle size)
1	LC: Agilent Technologies 1200 Series MS/MS: AB SCIEX API-2000	GL Sciences Inertsil ODS-SP (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
2	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, 5 μm)
3	Waters Quattro premier XE	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
4	Waters ACQUITY TQD	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
5	Waters ACQUITY TQD	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
6	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, 5 μm)
7	Waters ACQUITY TQD	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
8	LC: Waters 2695 MS/MS: Waters Quattro micro API	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm×150 mm, 3.5 μm)
9	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, 5 μm)
10	LC: Waters Alliance 2695 MS/MS: Micromass Quattro micro	KANTO CHEMICAL Mightysil RP-18 GP Aqua (2.0 mm×150 mm, 5 μm)
11	LC: Shimadzu Nexera System MS/MS: Shimadzu LCMS-8030	KANTO CHEMICAL Mightysil RP-18 MS (2.0 mm×150 mm, 5 μm)
12	LC: Agilent Technologies 1100 Series MS/MS: AB SCIEX API-2000	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm×150 mm, 5 μm)

4 まとめ

飼料用イネ中に残留する 8 種類 9 成分の農薬（カルバリル，カルボフラン，フェノブカルブ，フルジオキサニル，フラメトピル及びフラメトピルヒドロキシ体，メトキシフェノジド，テブフェノジド並びにチアクロプリド）について，液体クロマトグラフトンデム型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，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、フルジオキシニルは、0.5~10 ng/mL（注入量として 0.0025~0.05 ng）の範囲で直線性を示した。その他 8 成分の農薬は 0.1~2 ng/mL（注入量として 0.0005~0.01 ng）の範囲で直線性を示した。
- 2) 稲わら、稲発酵粗飼料及び粃米について、ミニカラムからの溶出画分を確認したところ、アセトニトリル-水（3+2）の溶出液量は 10 mL で十分であった。
- 3) 稲わら、稲発酵粗飼料及び粃米について、本法に従ってクロマトグラムを作成したところ、定量を妨げるピークは認められなかった。
- 4) 稲わら、稲発酵粗飼料及び粃米にフルジオキシニルとして 0.1 及び 0.05 mg/kg 相当量、その他 8 成分の農薬については各農薬として 1 及び 0.2 mg/kg 相当量を添加し、本法に従って 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ところ良好な結果が得られた。
- 5) 本法のフルジオキシニルの定量下限は 0.05 mg/kg、検出下限は 0.02 mg/kg であり、その他 8 成分の農薬の定量下限は 0.1 mg/kg、検出下限は 0.03 mg/kg であった。
- 6) 稲わら及び粃米にフルジオキシニルとして 0.1 mg/kg 相当量、その他の農薬としてそれぞれ 1 mg/kg 相当量を添加した試料を用いて 12 試験室において本法に従い共同試験を実施した。その結果、良好な室間再現精度が得られた。

謝 辞

共同試験に参加していただいた協同飼料株式会社研究所、株式会社島津テクノリサーチ、全国酪農業協同組合連合会分析センター、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) 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) 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).
- 4) Horwitz, W., Protocol for Design, Conduct and Interpretation of Method - Performance Studies, Pure & appl. Chem., 67(2), 331-343 (1995).