

3 穀類及び乾牧草中のアルジカルブ, アルジカルブスルホン及びアルジカルブスルホキシド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

西村 真由美*

Simultaneous Determination of Aldicarb, Aldicarb sulfone and Aldicarb sulfoxide in Grain and Grass Hay by LC-MS/MS

Mayumi NISHIMURA*

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

An analytical method was developed to simultaneously determine aldicarb, aldicarb sulfone, and aldicarb sulfoxide levels in feed using liquid chromatograph-electrospray ionization-tandem mass spectrometer (LC-ESI-MS/MS).

After addition of water to samples, aldicarb, aldicarb sulfone, and aldicarb sulfoxide were extracted with acetone, and the resulting solutions were filtered. The filtrate was then diluted with acetone to a final volume of 200 mL. The sample solution was purified with InertSep K-solute (GL Sciences Inc.; Tokyo, Japan) and InertSep GC/NH₂ (GL Sciences Inc.), followed by LC-ESI-MS/MS analysis for determination of aldicarb, aldicarb sulfone, and aldicarb sulfoxide. LC separation was carried out on an ODS column (ZORBAX Eclipse XDB-C18, 2.1 mm i.d.×150 mm, 5 µm from Agilent Technologies Inc.; Santa Clara, U.S.) using a gradient with 2 mmol/L ammonium acetate solution and methanol as the mobile phase. MS/MS analysis was performed in the selected reaction monitoring (SRM) mode.

Spike tests were conducted on feed spiked with aldicarb, aldicarb sulfone, and aldicarb sulfoxide at levels of 0.01 or 0.05 mg/kg (corn), 0.01 or 0.02 mg/kg (wheat), and 0.05 or 1 mg/kg (sudangrass hay). The resulting values obtained for mean recovery and repeatability in terms of relative standard deviation (RSD_r), respectively, were 81.3 to 118 % and not more than 13 % for aldicarb, 84.7 to 99.6 % and not more than 12 % for aldicarb sulfone, and 89.5 to 97.4 % and not more than 7.7 % for aldicarb sulfoxide.

A collaborative study was conducted in eight laboratories using corn, wheat and sudangrass hay spiked with aldicarb, aldicarb sulfone and aldicarb sulfoxide at 0.02, 0.01, 0.1 mg/kg respectively. The mean recoveries of aldicarb were 90.9 % to 105 %, and the repeatability and reproducibility in terms of relative standard deviation, and HorRat were not more than 9.2 %, 14 % and 0.63, respectively. The values for aldicarb sulfone were 93.6 % to 102 %, with not more than 8.8 %, 11 % and 0.50, respectively. The values for aldicarb sulfoxide were 93.0 % to 97.9 %, with not more than 7.5 %, 8.4 % and 0.38, respectively.

This method was validated and established for use in the inspection of feed for aldicarb, aldicarb sulfone and aldicarb sulfoxide.

* 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 肥飼料安全検査部

Key words: aldicarb ; aldicarbsulfone ; aldicarbsulfoxide ; liquid chromatograph-tandem mass spectrometer (LC-MS/MS) ; electrospray ionization (ESI) ; feed ; collaborative study

キーワード：アルジカルブ；アルジカルブスルホン；アルジカルブスルホキシド；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；飼料；共同試験

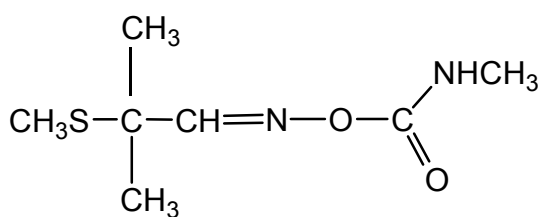
1 緒 言

アルジカルブはユニオン・カーバイド社が開発したカーバメート系の殺虫剤であり，植物及び土壤中で酸化されてスルホキシド化及びスルホン化することが知られている^{1),2)}．これらの酸化代謝物にも生物活性があり，最も極性の高いスルホキシドもコリンエステラーゼ阻害活性を示す．また，スルホン体は欧米ではアルドキシカルブとして，農薬として販売，使用されている．国内で農薬登録されていないが，国内における飼料のアルジカルブの残留基準値³⁾は小麦，大麦及びライ麦で 0.02 ppm，とうもろこしで 0.05 ppm，えん麦及びマイロで 0.2 ppm，乾牧草で 1 ppm となっている．また，食品の残留基準値⁴⁾は，アルジカルブ及びアルドキシカルブ（アルジカルブ，アルジカルブスルホキシドをアルジカルブに換算したもの及びアルジカルブスルホンをアルジカルブに換算したものの和）として，小麦及び大麦で 0.02 ppm，とうもろこしで 0.05 ppm となっている．

アルジカルブ，アルジカルブスルホキシド及びアルジカルブスルホン（以下「アルジカルブ等」という．）の分析法は，飼料では既に飼料分析基準⁵⁾に，カーバメート系農薬の液体クロマトグラフによる同時分析法（その 1）が示されている．また，食品では厚生労働省通知試験法⁶⁾に，アルジカルブ等の個別試験法（ポストカラム反応蛍光検出器付き高速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）とアルジカルブ及びアルジカルブスルホンの一斉試験法（液体クロマトグラフタンデム型質量分析計）が示されている．

筆者は，一般財団法人日本食品分析センターが，平成 22 年度飼料中の有害物質等分析法開発委託事業において，飼料分析基準収載法を基に開発した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⁷⁾（以下「JFRL 法」という．）について，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，アルジカルブ等の構造式を Fig. 1 に示した．

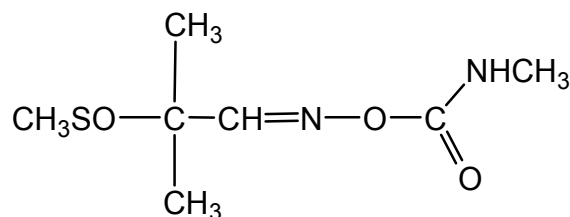


Aldicarb

2-methyl-2-(methylthio)propionaldehyde

O-(methylcarbamoyl)oxime $C_7H_{14}N_2O_2S$ MW: 190.3

CAS No.: 116-06-3

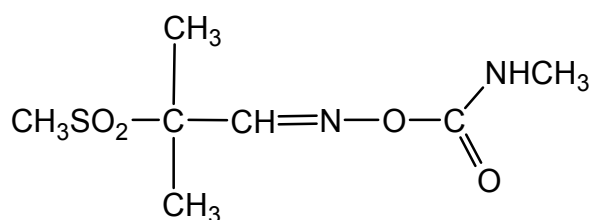


Aldicarb sulfoxide

2-methyl-2-(methylsulfinyl)propionaldehyde

O-(methylcarbamoyl)oxime $C_7H_{14}N_2O_3S$ MW: 206.3

CAS No.: 1646-87-3



Aldicarb sulfone

2-methyl-2-(methylsulfonyl)propionaldehyde

O-(methylcarbamoyl)oxime $C_7H_{14}N_2O_4S$ MW: 222.3

CAS No.: 1646-88-4

Fig. 1 Chemical structures of aldicarb, aldicarb sulfoxide and aldicarb sulfone

2 実験方法

2.1 試料

小麦、とうもろこし及びスーダングラス乾草をそれぞれ 1 mm の網ふるいを通すまで粉碎し、供試試料とした。

2.2 試薬等

1) アルジカルブ標準原液

アルジカルブ標準品 (Sigma-Aldrich 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, 更に标线まで同溶媒を加えてアルジカルブ標準原液を調製した (この液 1 mL は, アルジカルブとして 0.5 mg ($f=0.999$) を含有する.) .

2) アルジカルブスルホキシド標準原液

アルジカルブスルホキシド標準品 (Sigma-Aldrich 製, 純度 96.2 %) 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, 更に标线まで同溶媒を加えてアルジカルブスルホキシド標準原液を調製した (この液 1 mL は, アルジカルブスルホキシドとして 0.5 mg ($f=0.977$) を含有する.) .

3) アルジカルブスルホン標準原液

アルジカルブスルホン標準品 (Sigma-Aldrich 製, 純度 99.4 %) 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アルジカルブスルホン標準原液を調製した（この液 1 mL は、アルジカルブスルホンとして 0.5 mg ($f=1.006$) を含有する。）。

4) 混合標準液

各標準原液 1 mL を 25 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混合標準原液を調製した（この液 1 mL は、アルジカルブ、アルジカルブスルホキシド及びアルジカルブスルホンとして各 20 μg を含有する。）。

使用に際して、混合標準原液の一定量を、メタノールで正確に希釈し、1 mL 中にアルジカルブ、アルジカルブスルホキシド及びアルジカルブスルホンとして 0.0002, 0.0004, 0.0006, 0.0008, 0.001, 0.002, 0.004, 0.006, 0.008, 0.01, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 及び 0.1 μg を含有する各混合標準液を調製した。

5) メタノール、アセトニトリル、アセトン及び酢酸エチルは残留農薬・PCB 試験用、水は液体クロマトグラフ用を用いた。塩化ナトリウム及び酢酸アンモニウムは特級を用いた。

2.3 装置及び器具

- 1) 振とう機：タイテック製 ストロングシェーカーSR-2DW
- 2) ロータリーエバポレーター：BÜCHI 製 R-210
- 3) 多孔性ケイソウ土カラム：ジーエルサイエンス製 InertSep K-solute (5 mL 保持用)
- 4) 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)
- 5) 高速遠心分離機：日立工機製 himac TC15D
- 6) 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計：
液体クロマトグラフ部：Waters 製 ACQUITY UPLC System
タンデム型質量分析計部：Waters 製 ACQUITY TQ Detector

2.4 定量方法

1) 抽出

分析試料 10.0 g を正確に量って 300 mL の共栓三角フラスコに入れ、水 20 mL（スーダングラス乾草、アルファルファ乾草及びえん麦乾草は 30 mL）を加えて 30 分間静置した後、更にアセトン 100 mL（スーダングラス乾草、アルファルファ乾草及びえん麦乾草は 120 mL）を加え、30 分間振り混ぜて（250 rpm）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後、更に全量フラスコの標線までアセトンを加えた。この液 4 mL（スーダングラス乾草、アルファルファ乾草及びえん麦乾草は、更にアセトンで正確に 10 倍希釈した後、その液 4 mL）を 50 mL のなす形フラスコに正確に入れ、40 °C 以下の水浴で約 1 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

試料溶液に塩化ナトリウム 1 g 及び水 2 mL を加え、これを多孔性ケイソウ土カラムに入れて 10 分間静置した。200 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酢酸エチル 5 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てアルジカルブ等を溶出させた。更に酢酸エチル 80 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。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（以下「GC/NH₂ミニカラム」という。）をアセトニトリル 10 mL で洗浄した。

50 mL のなす形フラスコを GC/NH₂ミニカラムの下に置き、試料溶液を GC/NH₂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てアルジカルブ等を流出させた。次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 5 mL ずつで 2 回洗浄し、洗液を順次 GC/NH₂ミニカラムに加え、同様に流出させた。更にアセトニトリル 5 mL を GC/NH₂ミニカラムに加えて同様に流出させた。

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。

メタノール 1 mL を正確に加えて残留物を溶かし、5000×g で 5 分間遠心分離した後、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。

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

試料溶液及び各混合標準液各 2 µL を液体クロマトグラフタンデム型質量分析計に注入し、Table 1 及び Table 2 の測定条件に従い、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 aldicarb, aldicarbsulfone and aldicarbsulfoxide

Column	Agilent Technologies, ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm i.d.×150 mm, 5 µm)
Mobile phase	2 mmol/L ammonium acetate solution- methanol(17:3)(2 min)→10 min →(1:9)(3 min)→(17:3)(15 min)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temperature	40 °C
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Source temperature	150 °C
Desolvation temperature	N ₂ (500 L/h, 250 °C)
Cone gas	N ₂ (50 L/h)
Capillary voltage	Positive: 0.8 kV

Table 2 MS/MS Parameters

Substance	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion (<i>m/z</i>)	Qualifier ion (<i>m/z</i>)	Cone voltage (<i>m/z</i>)	Collision energy (eV)
Aldicarb	208	116	-	10	6
		-	89		18
Aldicarb sulfoxide	207	132	-	20	6
		-	89		12
Aldicarb sulfone	223	86	-	25	16
		-	148		8

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及び高さを求めて検量線を作成し、試料溶液中のアルジカルブ等のそれぞれの量を算出した。

なお、アルジカルブスルホキシドをアルジカルブに換算して試料中のアルジカルブとしての総和を求める場合には、次式により算出した。

$$\text{試料中のアルジカルブ量 (mg/kg)} = (A + B \times 0.922) \times 5^*$$

A : 検量線から求めた試料溶液中のアルジカルブの濃度 ($\mu\text{g/mL}$)

B : 検量線から求めた試料溶液中のアルジカルブスルホキシドの濃度 ($\mu\text{g/mL}$)

*スーダングラス乾草、アルファルファ乾草及びえん麦乾草については、50 を乗じる

なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。

- Sample 10.0 g (300 mL of Erlenmeyer flask)
- add 20 mL of water (grass hay ; 30 mL) and allow to stand for 30 min
 - add 100 mL of acetone (grass hay ; 120 mL) and shake for 30 min
 - filtrate with suction filter (No.5B)
 - wash with 50 mL of acetone
 - top up to 200 mL with acetone
 - 4 mL of sample solution (grass hay ; 4 mL of 10-fold diluted sample solution with acetone)
 - evaporate to the volume of 1 mL under 40 °C
 - add 2 mL of water and 1 g of NaCl
- InertSep K-solute
- apply sample solution and allow to stand for 10 min
 - wash flask with 5 mL of ethyl acetate (twice)
 - elute with 80 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 flask with 5 mL of acetonitrile (twice)
 - elute with 5 mL of acetonitrile
 - evaporate to dryness under 40 °C
 - dissolve in 1 mL of methanol
 - centrifuge at 5000×g for 5 min
- LC-MS/MS

Scheme 1 Analytical procedure for aldicarb, aldicarbsulfoxide and aldicarbsulfone

3 結果及び考察

3.1 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計の測定条件の検討

JFRL 法ではイオン化法としてエレクトロスプレーイオン化法（以下「ESI 法」という。）を用いて良好な結果を得ていたことから、本法においても ESI 法を用いて検討を行った。

各標準液について、本法の測定条件によりオートチューン機能を使用し、プリカーサーイオン及びプロダクトイオンのコーン電圧及びコリジョンエネルギーを確認したところ、Table 2 に示した条件が最適であった。

3.2 検量線の作成

2.2 の 4)に従って調製した各標準液各 2 µL を液体クロマトグラフタンデム型質量分析計に注入し、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。その結果は、Fig. 2 のとおり、検量線は 0.0002 ~ 0.1 µg/mL（注入量として 0.0004~0.2 ng 相当量）の範囲で直線性を示した。

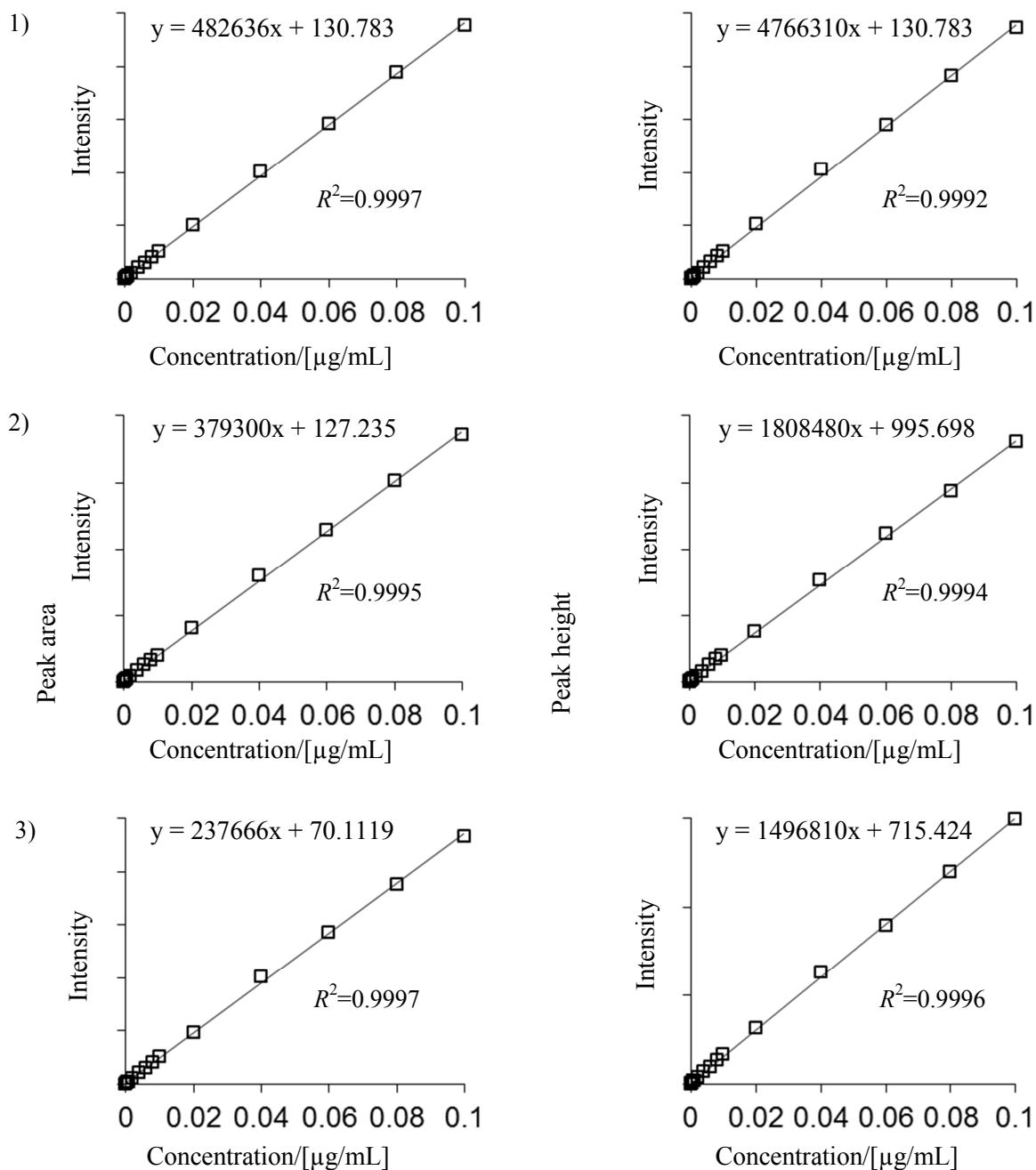


Fig. 2 Calibration curves of 1) aldicarb, 2) aldicarb sulfoxide, 3) aldicarb sulfone
(left : peak area, right : peak height)

3.3 精製方法の検討

アルジカルブは、本法の操作により一部が酸化し、スルホキシド化することを本検討において確認した。したがって、以下の検討は、アルジカルブのみの標準液を添加したものと、アルジカルブスルホキシド及びアルジカルブスルホンの混合標準液を添加したものを調製して行った。なお、アルジカルブ全量は、分子量に基づきアルジカルブスルホキシド量をアルジカルブ量に換算して合算した。その換算式は以下のとおりである。

$$\text{アルジカルブ全量} = \text{アルジカルブ量} + \text{アルジカルブスルホキシド量} \times 0.922$$

1) 多孔性ケイソウ土カラムの溶出画分の検討

小麦及びスーダングラス乾草を 2.4 の 1) に従い処理（ただし、スーダングラス乾草は抽出液を 10 倍希釈せずに処理）した液に、アルジカルブ、アルジカルブスルホキシド及びアルジカルブスルホンを分析試料中の濃度として小麦にそれぞれ 0.02 mg/kg 相当量、スーダングラス乾草にそれぞれ 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て、JFRL 法により溶出画分の回収率を確認した。その結果は Table 3 の 1) 及び 2) のとおり、スーダングラスでは 90~100 mL の溶出画分においてアルジカルブスルホキシドの微小なピークが認められた。そこで、スーダングラス乾草を 2.4 の 1) に従い処理した液をアセトンで正確に 10 倍希釈した後に、同様に溶出画分の回収率を確認した。その結果は Table 3 の 3) のとおり、アルジカルブ等は 0~90 mL に溶出し、90 mL 以後の画分には溶出されなかった。

以上の結果から、乾牧草は抽出液を 10 倍希釈した後に、それ以外の飼料は抽出液をそのまま精製することとし、その溶出溶媒量は酢酸エチル 90 mL で十分と判断した。

Table 3 Elution pattern from InertSep K-solute

1) Wheat

Pesticide	Recovery ^{a)} (%)									Total
	Ethyl acetate (mL)									
	0~	30~	40~	50~	60~	70~	80~	90~	100	
Aldicarb	98.7	1.8	tr	0	0	0	0	0	0	101
Aldicarb-sulfoxide	75.6	9.4	3.8	1.7	0	0	0	0	0	90.5
Aldicarb-sulfone	99.2	0	0	0	0	0	0	0	0	99.2

a) n=1

2) Sudangrass hay

Pesticide	Recovery ^{a)} (%)									Total
	Ethyl acetate (mL)									
	0~	30~	40~	50~	60~	70~	80~	90~	100	
Aldicarb	98.2	1.8	tr	0	0	0	0	0	0	100
Aldicarb-sulfoxide	69.1	13.6	6.0	2.9	1.6	0.9	tr	tr	tr	94.1
Aldicarb-sulfone	99.2	0	0	0	0	0	0	0	0	99.2

a) n=1

Table 3 Elution pattern from InertSep K-solute (contd.)

3) Sudangrass hay (10-fold diluted)

Pesticide	Recovery ^{a)} (%)								Total
	Ethyl acetate (mL)								
	0~ 30	30~ 40	40~ 50	50~ 60	60~ 70	70~ 80	80~ 90	90~ 100	
Aldicarb	108	tr	tr	0	0	0	0	0	108
Aldicarb sulfoxide	67.4	14.4	8.6	4.3	2.3	tr	tr	0	97.0
Aldicarb sulfone	98.6	2.5	0	0	0	0	0	0	101

a) n=1

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の流出画分の検討

JFRL 法では、乾牧草はイオン化阻害が懸念されるため、ゲル浸透クロマトグラフィーにより精製した後に、GC/NH₂ ミニカラムを用いて精製を行っている。しかし、乾牧草は 3.3 の 1) の検討で 10 倍希釈することとしたことから、ゲル浸透クロマトグラフィーによる精製が不要と考え、他の試料と同様の操作で問題がないことを検討した。

乾牧草としてスーダングラス乾草、アルファルファ乾草及びえん麦乾草を 2.4 の 1) 及び 2) に従い処理した液にアルジカルブ、アルジカルブスルホキシド及びアルジカルブスルホンとして（試料中の濃度として）1 mg/kg 相当量を添加し、2.4 の 3) に従ってカラム処理 II を行った。アセトニトリルを洗浄溶媒として GC/NH₂ ミニカラムからの各溶出画分の回収率及び夾雑ピーク等の妨害を確認した。また、小麦についても 2.4 の 1) 及び 2) に従い処理した液にアルジカルブ、アルジカルブスルホキシド及びアルジカルブスルホンとして（試料中の濃度として）0.02 mg/kg 相当量を添加し、同様に流出画分の回収率を確認した。

その結果は、Table 4 のとおり、試料溶液負荷後にアセトニトリル 15 mL ですべての農薬が流出することが確認され、乾牧草では夾雑ピーク等の妨害も認められなかった。

Table 4 Elution pattern from InertSep GC/NH₂

1) Sudangrass hay

Pesticide	Recovery ^{a)} (%)			Total
	Acetonitrile (mL)			
	0~10	10~15	15~20	
Aldicarb	99.3	tr	0	99.3
Aldicarb sulfoxide	93.6	1.7	0	95.3
Aldicarb sulfone	92.8	2.1	0	94.9

a) n=1

Table 4 Elution pattern from InertSep GC/NH₂ (contd.)

2) Alfalfa hay

Pesticide	Recovery ^{a)} (%)			Total
	Acetonitrile (mL)			
	0~10	10~15	15~20	
Aldicarb	90.9	1.1	0	90.9
Aldicarbsulfoxide	87.7	1.6	0	89.3
Aldicarbsulfone	92.2	2.8	0	95.0

a) *n*=1

3) Oat hay

Pesticide	Recovery ^{a)} (%)			Total
	Acetonitrile (mL)			
	0~10	10~15	15~20	
Aldicarb	96.2	tr	0	96.2
Aldicarbsulfoxide	89.0	tr	0	89.0
Aldicarbsulfone	95.2	1.7	0	96.9

a) *n*=1

4) Wheat

Pesticide	Recovery ^{a)} (%)			Total
	Acetonitrile (mL)			
	0~10	10~15	15~20	
Aldicarb	111	0	0	111
Aldicarbsulfoxide	105	0	0	105
Aldicarbsulfone	105	0	0	105

a) *n*=1

3.4 妨害物質の検討

穀類（とうもろこし，マイロ），麦類（小麦，大麦），乾牧草（スーダングラス乾草，アルファルファ乾草，えん麦乾草）及び副原料（大豆油かす，ふすま，コーングルテンミール，とうもろこしジスチラーズグレインソリュブル）を用い，本法により調製した試料溶液を液体クロマトグラフタンデム型質量分析計に注入し，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. 3 の 1) に示した。

なお，Fig. 3 の 1) において保持時間の位置に微小のピークが認められたアルジカルブ及びアルジカルブスルホキシドについて，比較のため，基準値の 1/20 相当の標準液（0.001 µg/mL（注入量として 2 pg 相当量））の選択反応検出クロマトグラムを Fig. 3 の 2) に示した。

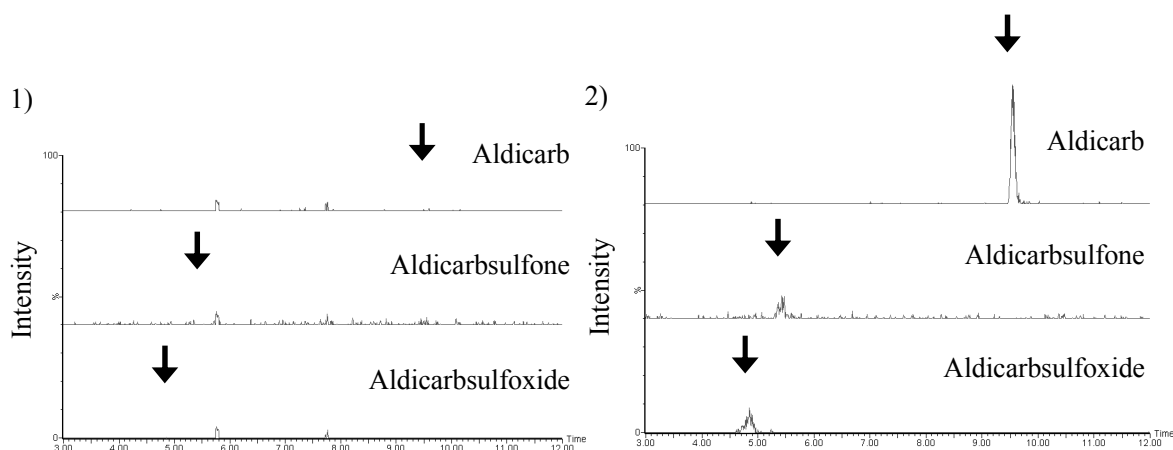


Fig. 3 SRM chromatograms of oat hay (non-spiked)

(Arrows indicate the retention time of pesticides.)

- 1) Oat hay
- 2) Standard solution (0.001 µg/mL : 2 pg as each pesticide.)

3.5 添加回収試験

アルジカルブ等として、とうもろこしに 0.05 及び 0.01 mg/kg 相当量（最終試料中で 0.01 及び 0.002 µg/mL 相当量），小麦に 0.02 及び 0.01 mg/kg 相当量（最終試料中で 0.004 及び 0.002 µg/mL 相当量），スーダングラスに 1 及び 0.05 mg/kg 相当量（最終試料中で 0.02 及び 0.001 µg/mL 相当量）を添加した試料を用いて、本法に従って 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、Table 5 のとおり、アルジカルブの平均回収率は 81.3~118 %，その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD_r)として 13 %以下，アルジカルブスルホキシドの平均回収率は 89.5~97.4 %，その繰返し精度は RSD_rとして 7.7 %以下，アルジカルブスルホンの平均回収率は 84.7~99.6 %，その繰返し精度は RSD_rとして 2.2 %以下となった。

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. 4 に示した。

Table 5 Recoveries for aldicarb and it derivatives

Pesticides	Spiked level (mg/kg)	Feed types					
		Maize		Wheat		Sudangrass hay	
		Recovery ^{a)}	RSD _r ^{b)}	Recovery ^{a)}	RSD _r ^{b)}	Recovery ^{a)}	RSD _r ^{b)}
		(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
Aldicarb	1	—	—	—	—	104	4.5
	0.05	81.3	8.3	—	—	118	13
	0.02	—	—	81.7	3.7	—	—
	0.01	101	5.9	93.7	1.6	—	—
Aldicarb sulfoxide	1	—	—	—	—	91.1	1.6
	0.05	95.9	1.6	—	—	89.5	7.7
	0.02	—	—	93.7	2.2	—	—
	0.01	97.2	6.8	97.4	4.1	—	—
Aldicarb sulfone	1	—	—	—	—	95.6	2.4
	0.05	99.6	1.4	—	—	84.7	12
	0.02	—	—	98.7	4.7	—	—
	0.01	93.6	6.0	88.5	6.0	—	—

a) Mean (n=3)

b) Relative standard deviation of repeatability

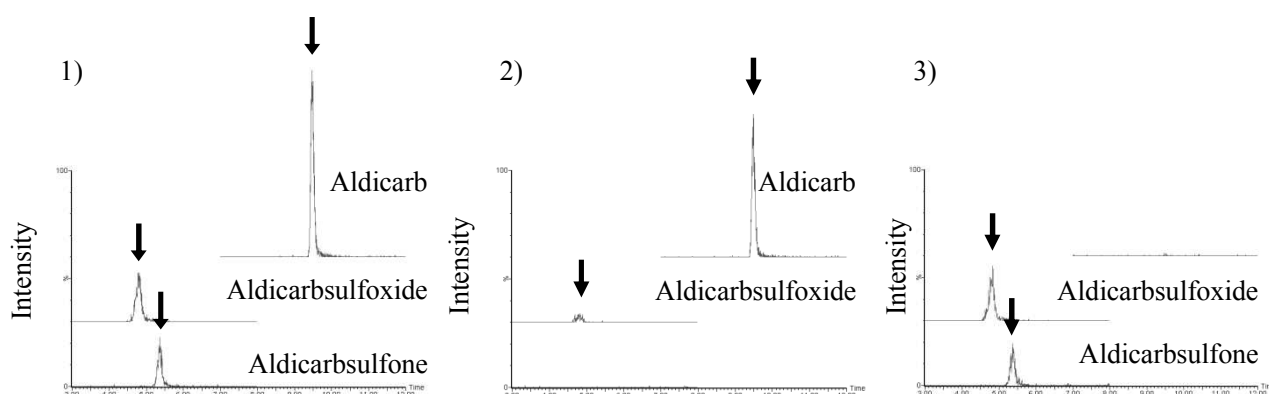


Fig. 4 Selected reaction monitoring chromatograms
(Arrows indicate the peaks of pesticides)

- 1) Standard solution (0.004 $\mu\text{g/mL}$)
- 2) Sample solution of wheat (Spiked at 0.02 mg/kg of aldicarb)
- 3) Sample solution of wheat (Spiked at 0.02 mg/kg of aldicarb sulfoxide and aldicarb sulfone)

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、とうもろこし、小麦及びスーダングラス乾草にアルジカルブ等を添加した試料について、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 以上となる濃度はとうもろこし及び小麦で 0.01 mg/kg 及びスーダングラス乾草で 0.05 mg/kg であった。しかし、アルジカルブは、本検討においてスルホキシド化することが確認されており、試料溶液中のアルジカルブ及びアルジカルブスルホキシドは、添加した濃度より低い濃度で定量されることとなる。そこで、添加回収試験で定量されたそれぞれの試料溶液中の濃度も考慮し、とうもろこし及び小麦にアルジカルブ等として 0.005 及び 0.002 mg/kg 相当量を添加した試料（最終試料溶液中で各 0.001 及び 0.0004 mg/kg 相当量）及びスーダングラス乾草にアルジカルブ等として 0.02 mg/kg 相当量を添加した試料（最終試料溶液中で各 0.0004 mg/kg 相当量）を用いて、本法により 3 点併行分析を実施し、その平均回収率及び繰返し精度を検討した。

その結果、Table 6 のとおり、とうもろこし及び小麦にアルジカルブ等として 0.002 mg/kg 相当量を添加した試料では、アルジカルブの平均回収率は 104 及び 90.5 %、その繰返し精度は RSD_r として 6.0 及び 4.8 % 以下、アルジカルブスルホキシドの平均回収率は 95.8 及び 88.2 %、その繰返し精度は RSD_r として 7.8 及び 17 % 以下、アルジカルブスルホンの平均回収率は 84.5 及び 101 %、その繰返し精度は RSD_r として 4.5 及び 19 % 以下となった。スーダングラス乾草にアルジカルブ等として 0.02 mg/kg 相当量を添加した試料では、アルジカルブの平均回収率は 88.3 %、その繰返し精度は RSD_r として 16 % 以下、アルジカルブスルホキシドの平均回収率は 82.0 %、その繰返し精度は RSD_r として 6.5 % 以下、アルジカルブスルホンの平均回収率は 91.2 %、その繰返し精度は RSD_r として 2.2 % 以下となった。

また、 SN 比が 3 となる濃度はとうもろこし及び小麦で 0.0006 mg/kg 及びスーダングラス乾草で 0.006 mg/kg であった。

以上の結果から、アルジカルブ等の定量下限は、それぞれ試料中で 0.002 mg/kg（乾牧草では 0.02

mg/kg), 検出下限はそれぞれ 0.0006 mg/kg (同 0.006 mg/kg) であった。

Table 6 Recoveries of pesticides at the level of limit of quantification

pesticides	Spiked level (mg / kg)	Feed types					
		Corn		Wheat		Sudangrass hay	
		Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)
Aldicarb	0.02	—	—	—	—	88.3	16
	0.005	83.9	8.8	97.3	4.5	—	—
	0.002	104	6.0	90.5	4.8	—	—
Adicarb-sulfoxide	0.02	—	—	—	—	82.0	6.5
	0.005	105	3.5	96.2	5.0	—	—
	0.002	95.8	7.8	88.2	17	—	—
Aldicarb-sulfone	0.02	—	—	—	—	91.2	2.2
	0.005	96.7	12	96.5	3.5	—	—
	0.002	84.5	4.5	101	19	—	—

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確認するため、とうもろこし、小麦及びスーダングラス乾草にアルジカルブ、アルジカルブスルホキシド及びアルジカルブスルホンを添加した共通試料を用い、8 試験室で共同試験を実施した。試験の概要は以下のとおりである。

i) 分析試料の調製 とうもろこし、小麦及びスーダングラス乾草を 1 mm の網ふるいを通過するまで粉碎したものを配付し、各試験室において 10 g を量り取った後、濃度非通知の添加用標準液（アルジカルブ標準液及びアルジカルブスルホキシド及びアルジカルブスルホン混合標準液を各 1 mL）を分析開始の前日に添加して調製した。3 種類の試料について、非明示の 2 点反復で試験を実施した。

それぞれの添加濃度は、とうもろこしに 0.02 mg/kg 相当量（1 mL 中に 0.2 µg を含有する各標準液を添加）、小麦に 0.01 mg/kg 相当量（1 mL 中に 0.1 µg を含有する各標準液を添加）及びスーダングラス乾草に 0.1 mg/kg 相当量（1 mL 中に 1 µg を含有する各標準液を添加）のとおりである。

ii) 参加試験室 一般社団法人日本科学飼料協会科学飼料研究センター、一般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 8 試験室）

iii) 結果の解析 国際的にハーモナイズされた共同試験に関する手順^{8), 9)}を参考に、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、外れ値の棄却等を行ったうえで平均回収率、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。

その結果の概要は以下のとおりである。

1) アルジカルブ

とうもろこし、小麦及びスーダングラス乾草について、平均回収率は 103, 90.9 及び 105 %, RSD_r はそれぞれ 5.5, 9.2 及び 5.7 %, RSD_R はそれぞれ 11, 14 及び 8.2 %, HorRat はそれぞれ

0.50, 0.63 及び 0.37 であった。なお、スーダングラスの結果において、Grubbs 検定で外れ値とされるデータが認められた。そのデータを除外しなくても前述のとおり良好な成績であったが、参考までにそのデータを除外して平均回収率、 RSD_r 、 RSD_R 及び HorRat について算出した結果、それぞれ 107 %、5.4 %、5.0 % 及び 0.23 であった。

2) アルジカルブスルホキシド

とうもろこし、小麦及びスーダングラスについて、平均回収率は 96.0, 97.9 及び 93.0 %、 RSD_r はそれぞれ 7.5, 3.4 及び 4.1 %、 RSD_R はそれぞれ 8.4, 5.0 及び 6.5 %、HorRat はそれぞれ 0.38, 0.23 及び 0.30 であった。

3) アルジカルブスルホン

とうもろこし、小麦及びスーダングラスについて、平均回収率は 102, 98.2 及び 93.6 %、 RSD_r はそれぞれ 4.4, 6.5 及び 8.8 %、 RSD_R はそれぞれ 7.2, 7.5 及び 11 %、HorRat はそれぞれ 0.33, 0.34 及び 0.50 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 10 に示した。

Table 7 Collaborative study results of aldicarb

Lab. No.	Feed types					
	Corn		Wheat		Sudangrass hay	
	(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)	
1	0.0169	0.0167	0.00810	0.00788	0.0875 ^{a)}	0.0872 ^{a)}
2	0.0175	0.0192	0.00698	0.00726	0.102	0.108
3	0.0201	0.0197	0.00971	0.00942	0.113	0.0966
4	0.0219	0.0202	0.00850	0.0104	0.110	0.103
5	0.0207	0.0213	0.00932	0.00825	0.113	0.108
6	0.0229	0.0234	0.0107	0.00846	0.106	0.110
7	0.0216	0.0219	0.0112	0.0103	0.110	0.0972
8	0.0206	0.0243	0.00916	0.00975	0.110	0.112
Spiked level (mg/kg)	0.02		0.01		0.1	
Mean value ^{b)} (mg/kg)	0.0206		0.00909		0.105	
Recovery ^{b)} (%)	103		90.9		105	
RSD _r ^{c)} (%)	5.5		9.2		5.7	
RSD _R ^{d)} (%)	11		14		8.2	
PRSD _R ^{e)} (%)	22		22		22	
HorRat	0.50		0.63		0.37	
Mean value ^{f)} (mg/kg)					0.107	
Recovery ^{f)} (%)					107	
RSD _r ^{f)} (%)					5.9	
RSD _R ^{f)} (%)					5.0	
PRSD _R ^{f)} (%)					22	
HorRat ^{f)}					0.23	

a) Data excluded by single Grubbs test

b) $n = 16$

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

f) Calculated excluding Lab.1

Table 8 Collaborative study results of aldicarbsulfoxide

Lab. No.	Feed types					
	Corn		Wheat		Sudangrass hay	
	(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)	
1	0.0169	0.0182	0.00921	0.00861	0.0947	0.0908
2	0.0190	0.0176	0.0103	0.00962	0.0795	0.0839
3	0.0211	0.0201	0.00989	0.0104	0.100	0.0944
4	0.0171	0.0198	0.00977	0.00937	0.0993	0.0940
5	0.0190	0.0195	0.00964	0.0102	0.100	0.0989
6	0.0220	0.0207	0.0102	0.0104	0.0925	0.0942
7	0.0181	0.0206	0.00987	0.00952	0.0845	0.0958
8	0.0169	0.0205	0.0100	0.00970	0.0943	0.0917
Spiked level (mg/kg)	0.02		0.01		0.1	
Mean value ^{a)} (mg/kg)	0.0192		0.00979		0.0930	
Recovery ^{a)} (%)	96.0		97.9		93.0	
RSD _r ^{b)} (%)	7.5		3.4		4.1	
RSD _R ^{c)} (%)	8.4		5.0		6.5	
PRSD _R ^{d)} (%)	22		22		22	
HorRat	0.38		0.23		0.30	

a) $n = 16$

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 Collaborative study results of aldicarbsulfone

Lab. No.	Feed types					
	Corn		Wheat		Sudangrass hay	
	(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)	
1	0.0195	0.0200	0.00894	0.00989	0.0958	0.0938
2	0.0223	0.0228	0.0111	0.0107	0.0773	0.0768
3	0.0201	0.0222	0.00967	0.0110	0.100	0.101
4	0.0215	0.0189	0.00913	0.00912	0.0770	0.105
5	0.0190	0.0200	0.00910	0.0103	0.103	0.0968
6	0.0214	0.0212	0.0105	0.00966	0.0865	0.0956
7	0.0208	0.0209	0.00970	0.00971	0.0842	0.0960
8	0.0185	0.0179	0.00997	0.00870	0.107	0.101
Spiked level (mg/kg)	0.02		0.01		0.1	
Mean value ^{a)} (mg/kg)	0.0204		0.00982		0.0936	
Recovery ^{a)} (%)	102		98.2		93.6	
RSD _r ^{b)} (%)	4.4		6.5		8.8	
RSD _R ^{c)} (%)	7.2		7.5		11	
PRSD _R ^{d)} (%)	22		22		22	
HorRat	0.33		0.34		0.50	

a) $n = 16$

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 Instruments used in the collaborative study

Lab. No.	LC-MS/MS	LC column (i.d.×length, particle size)
1	Waters Quattro premier XE	GL Sciences Inertsil ODS-SP (2.1 mm×150 mm, 5 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	Waters ACQUITY Xevo TQD	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	Waters ACQUITY TQD	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm×150 mm, 5 µm)
7	LC: Agilent Technologies 1200 Series MS/MS: AB SCIEX API-3200	Tosoh TSK-gel ODS-100V (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, 5 µm)

4 まとめ

穀類及び乾牧草中のアルジカルブ, アルジカルブスルホキシド及びアルジカルブスルホンについて, 液体クロマトグラフタ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, 次の結果が得られ, 適用が可能であると考えられた.

- 1) 検量線はそれぞれ 0.0002~0.1 µg/mL (注入量として 0.0004~0.2 ng 相当量) 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画分の検討を行ったところ, 乾牧草については, 試料溶液を 10 倍希釈した後に負荷することで, 溶出溶媒は 90 mL が適当であった. また, これによりゲル浸透クロマトグラフィーを省略しても夾雑ピーク等の妨害はなく, 良好な結果となった.
- 3) GC/NH₂ ミニカラムの流出画分の検討を行ったところ, 流出溶媒は 15 mL が適当であった.
- 4) 穀類 (とうもろこし, マイロ), 麦類 (小麦, 大麦), 乾牧草 (スーダングラス乾草, アルファルファ乾草, えん麦乾草) 及び副原料 (大豆油かす, ふすま, コーングルテンミール, とうもろこしジスチラーズグレインソリュブル) について, 本法に従った選択反応検出クロマトグラムでは, アルジカルブ, アルジカルブスルホキシド及びアルジカルブスルホンの定量を妨げるピークは認められなかった.

- 5) アルジカルブ等として、とうもろこしにそれぞれ 0.05 及び 0.01 mg/kg 相当量、小麦にそれぞれ 0.02 及び 0.01 mg/kg 相当量、スーダングラス乾草にそれぞれ 1 及び 0.05 mg/kg 相当量を添加し、本法にて添加回収試験を実施した。その結果、アルジカルブの平均回収率は 81.3~118 %、その繰返し精度は RSD_r として 13 %以下、アルジカルブスルホキシドの平均回収率は 89.5~97.4 %、その繰返し精度は RSD_r として 7.7 %以下、アルジカルブスルホンの平均回収率は 84.7~99.6 %、その繰返し精度は RSD_r として 2.2 %以下の成績が得られた。
- 6) 本法による定量下限は、アルジカルブ、アルジカルブスルホキシド及びアルジカルブスルホンともに試料中で 0.002 mg/kg (乾牧草では 0.02 mg/kg)、検出下限はそれぞれ 0.0006 mg/kg (同 0.006 mg/kg) であった。
- 7) アルジカルブ等として、とうもろこしにそれぞれ 0.02 mg/kg、小麦にそれぞれ 0.01 mg/kg 相当量及びスーダングラス乾草にそれぞれ 0.1 mg/kg 相当量を添加した試料を用いて 8 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一般社団法人日本科学飼料協会科学飼料研究センター及び一般財団法人日本食品分析センター多摩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) Australia APVMA: The NRA Review of ALDICALB (2001), Section 4: Residue and trade assessment
- 2) Australia APVMA: The NRA Review of ALDICALB (2001), Section 7: Environmental assessment
- 3) 農林省令：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 7 月 24 日，農林省令第 35 号(1976).
- 4) 厚生省告示：食品，添加物等の基準規格，昭和 34 年 12 月 28 日，厚生省告示第 370 号(1959).
- 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) 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).
- 7) 財団法人日本食品分析センター：平成 22 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).
- 8) Horwitz, W., Protocol for Design, Conduct and Interpretation of Method - Performance Studies, Pure & Appl. Chem., 67(2), 331-343 (1995).
- 9) AOAC Int., Appendix D: Guidelines for Collaborative Study Procedures to Validate Characteristics of a Method of Analysis. In Official Methods of Analysis of AOAC Int. 19th Edition, Volume II, Gaithersburg, MD, USA (2012).