

#### 4 飼料用イネ中のオリサストロビン他 13 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

武田 然也<sup>\*1</sup>, 岡田 かおり<sup>\*1</sup>, 榑原 良成<sup>\*2</sup>

##### Simultaneous Determination of Oryastrobin and 13 Pesticides in Rice Straw, Whole-crop rice silage and Paddy rice for Feed by LC-MS/MS

Zenya TAKEDA<sup>\*1</sup>, Kaori OKADA<sup>\*1</sup>, and Yoshinari SAKAKIBARA<sup>\*2</sup>

(<sup>\*1</sup>Food and Agricultural Materials Inspection Center, Nagoya Regional Center,

<sup>\*2</sup>Food and Agricultural Materials Inspection Center, Kobe Regional Center)

An analytical method was developed to determine the levels of 14 pesticides (benzofenap, cumyluron, dymron, fenoxanil, mepronil, oryastrobin, oryastrobin metabolite (5Z isomer), paclobutrazol, pencycuron, pyriminobac-methyl (E isomer), pyriminobac-methyl (Z isomer), simeconazole, simetryn, and thenylchlor) 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, 14 pesticides 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 an octadecylsilylated silica gel mini column (InertSep Slim-J C18-B from GL sciences Inc.; Tokyo, Japan) and analyzed by LC-ESI-MS/MS. 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 a 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, 1 mg/kg, or regulation value levels of paclobutrazol and 0.1, 1 mg/kg, or regulation value levels of each of the other 13 pesticides, resulting in recovery values ranging from 73.8 % to 110 % with a repeatability values of not more than 16 % in terms of relative standard deviation.

A collaborative study was conducted in ten laboratories using rice straw and paddy rice spiked with 2.0 mg/kg each of the 14 pesticides. The mean recoveries of the pesticides in rice straw ranged from 89.7 to 97.8 %, and the relative standard deviations of the repeatability (RSD<sub>r</sub>) and reproducibility (RSD<sub>R</sub>) ranged from 1.8 to 6.1 % and 3.6 to 9.3 %, respectively. The mean recoveries of the pesticides in paddy rice ranged from 93.1 to 97.7 %, and RSD<sub>r</sub> and RSD<sub>R</sub> ranged from 1.5 to 4.1 % and 4.2 to 8.4 %, respectively.

This method was validated and established for use in the inspection of 14 pesticides in rice straw and rice products for feed.

<sup>\*1</sup> 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

<sup>\*2</sup> 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, 現 神戸センター

Key words: benzofenap, cumyluron, dymron, fenoxanil, mepronil, orysastrobin, orysastrobin metabolite (5Z isomer), paclobutrazol, pencycuron, pyriminobac-methyl (*E* isomer), pyriminobac-methyl (*Z* isomer), simeconazole, simetryn, thenylchlor, liquid chromatograph-tandem mass spectrometer (LC-MS/MS), electrospray ionization (ESI), feed, rice straw, whole-crop rice silage, paddy rice, collaborative study

キーワード：ベンゾフェナップ；クミルロン；ダイムロン；フェノキサニル；メプロニル；オリサストロビン；オリサストロビン 5Z 異性体；パクロブトラゾール；ペンシクロン；ピリミノバックメチル (*E* 体)；ピリミノバックメチル (*Z* 体)；シメコナゾール；シメトリン；テニルクロール；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；稲わら；稲発酵粗飼料；粃米；共同試験

## 1 緒 言

飼料自給率の向上に向けた取り組みの一つとして、粗飼料における国産割合を高めるために、飼料用イネ（稲わら、稲発酵粗飼料及び粃米）の利用が図られている。これに伴い、飼料の有害物質の指導基準<sup>1)</sup>が改正され、飼料用イネについて農薬の指導基準値が順次設定されてきた。

指導基準が設定された農薬について、飼料分析基準<sup>2)</sup>に分析法が収載されていない、あるいは指導基準が未設定であってもモニタリングの必要性がある成分について、分析法の開発が急務とされている。

今回、平成 20 年度及び平成 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、一般財団法人日本食品分析センターが厚生労働省の試験法<sup>3)</sup>を基に開発した、12 種類 14 成分（ベンゾフェナップ、クミルロン、ダイムロン、フェノキサニル、メプロニル、オリサストロビン、オリサストロビン 5Z 異性体、パクロブトラゾール、ペンシクロン、ピリミノバックメチル (*E* 体)、ピリミノバックメチル (*Z* 体)、シメコナゾール、シメトリン及びテニルクロール) の農薬の系統的分析法<sup>4,5)</sup>（以下「JFRL 法」という。）について、飼料分析基準への適用の可否を検討したので、その概要を報告する。

なお、今回、分析法を検討した農薬のうち、指導基準値が設定されている 9 種類に対する基準値を Table 1 に示した。

Table 1 Regulation values of the pesticides in feed

Pesticides	Feed types	Regulation value (mg/kg)
Benzofenap	Rice straw	0.7
Cumyluron	Rice straw	2
Dymron	Rice straw	0.7
Fenoxanil	Rice straw	30
	Whole-crop rice silage	3
Mepronil	Rice straw	25
	Whole-crop rice silage	10
	Paddy rice	7
Orysastrobins	Rice straw	5
	Paddy rice	1
Paclobutrazol	Rice straw	0.7
Pyriminobac-methyl	Rice straw	0.2
	Whole-crop rice silage	0.1
Simeconazole	Rice straw	1
	Paddy rice	0.3

## 2 実験方法

### 2.1 試料

稲わら及び籾米をそれぞれ 1 mm の網ふるいを通過するまで粉碎し、供試試料とした。稲発酵粗飼料は 60 °C で 5 時間乾燥後、同様に粉碎したものを供試試料とした。

### 2.2 試薬等

#### 1) 各農薬標準品

ベンゾフェナップ、クミルロン、ダイムロン、フェノキサニル、メプロニル、オリサストロビン、オリサストロビン 5Z 異性体、パクロブトラゾール、ペンシクロン、ピリミノバックメチル (E 体)、ピリミノバックメチル (Z 体)、シメコナゾール、シメトリン及びテニルクロールの標準品は、Table 2 に示した供給業者、純度のものを用いた。

#### 2) 各農薬標準原液

農薬標準品各 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（これらの液各 1 mL は、各農薬として 0.5 mg を含有する。）。

#### 3) 農薬混合標準液

14 成分の農薬標準原液各 2.5 mL を 50 mL の全量フラスコに正確に入れて混合し、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、各農薬としてそれぞれ 25 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 中に各農薬として 0.05, 0.1, 1, 2, 3, 4 及び 5 ng を含有する各農薬混合標準液を調製した。

- 4) 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 (JIS K 0211 に定める 5218 の超純水) を用いた。

Table 2 Pesticide standards

Pesticides	Manufacturer	Molecular formula	Molecular weight	CAS No	Purity (%)	Factor of standard solution
Benzofenap	Wako <sup>a)</sup>	C <sub>22</sub> H <sub>20</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	431.3	82692-44-2	98.0	1.001
Cumyluron	Wako <sup>a)</sup>	C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> ClN <sub>2</sub> O	302.8	99485-76-4	99.5	1.000
Dymron	Wako <sup>a)</sup>	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O	268.4	42609-52-9	99.0	0.996
Fenoxanil	Wako <sup>a)</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	329.2	115852-48-7	98.0	0.986
Mepronil	Wako <sup>a)</sup>	C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>2</sub>	269.3	55814-41-0	99.2	1.005
Oryastrobin	Hayashi <sup>b)</sup>	C <sub>18</sub> H <sub>25</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub>	391.4	248593-16-0	99.7	0.997
Oryastrobin metabolite (5Z isomer)	Hayashi <sup>b)</sup>	C <sub>18</sub> H <sub>25</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub>	391.4	-	98.5	0.989
Paclobutrazol	Wako <sup>a)</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> ClN <sub>3</sub> O	293.8	76738-62-0	97.0	0.988
Pencycuron	Wako <sup>a)</sup>	C <sub>19</sub> H <sub>21</sub> ClN <sub>2</sub> O	328.8	66063-05-6	99.0	1.008
Pyriminobac-methyl (E isomer)	Wako <sup>a)</sup>	C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub>	361.4	147411-69-6	99.0	1.005
Pyriminobac-methyl (Z isomer)	Hayashi <sup>b)</sup>	C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub>	361.4	147411-70-9	99.5	0.995
Simeconazole	Wako <sup>a)</sup>	C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> FN <sub>3</sub> OSi	293.4	149508-90-7	99.0	1.000
Simetryn	Wako <sup>a)</sup>	C <sub>8</sub> H <sub>15</sub> N <sub>5</sub> S	213.3	1014-70-6	99.9	0.999
Thenylchlor	Wako <sup>a)</sup>	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> ClNO <sub>2</sub> S	323.8	96491-05-3	99.0	1.000

a) Wako pure chemical industries

b) Hayashi pure chemical industries

### 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 (充填剤量 500 mg)

- 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

- 6) ブフナー漏斗: 桐山製作所製 SU-95

### 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 (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。更に全量フラスコの標線までアセトンを加えた。この液をアセトンで正確に 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、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 5000×g (10000 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 3 及び Table 4 の測定条件等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

Column	ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm i.d. × 150 mm, 5 µm)
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 <sub>2</sub> (600 L/h, 350 °C)
Cone gas	N <sub>2</sub> (50 L/h)
Capillary voltage	Positive: 1.0 kV

Table 4 MS/MS Parameters

Pesticides	Precursor ion ( <i>m/z</i> )	Product ion ( <i>m/z</i> )	Qualifier ion ( <i>m/z</i> )	Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
Benzofenap	431	105	-	48	30
		-	119	48	20
Cumyluron	303	185	-	30	12
		-	125	30	36
Dymron	269	151	-	24	14
		-	91	24	36
Fenoxanil	329	302	-	32	12
		-	86	32	24
Mepronil	270	119	-	34	22
		-	91	34	44
Orysastrobin	392	205	-	31	16
		-	116	31	29
Orysastrobin metabolite (5Z isomer)	392	205	-	31	16
		-	116	31	29
Paclobutrazol	294	70	-	36	18
		-	125	36	42
Pencycuron	329	125	-	36	24
		-	89	36	60
Pyriminobac-methyl ( <i>E</i> isomer)	362	330	-	28	12
		-	284	28	32
Pyriminobac-methyl ( <i>Z</i> isomer)	362	330	-	28	14
		-	75	28	110
Simeconazole	294	70	-	36	18
		-	73	36	40
Simetryn	214	68	-	44	32
		-	124	44	18
Thenylchlor	324	127	-	18	20
		-	53	18	60

## 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及び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。

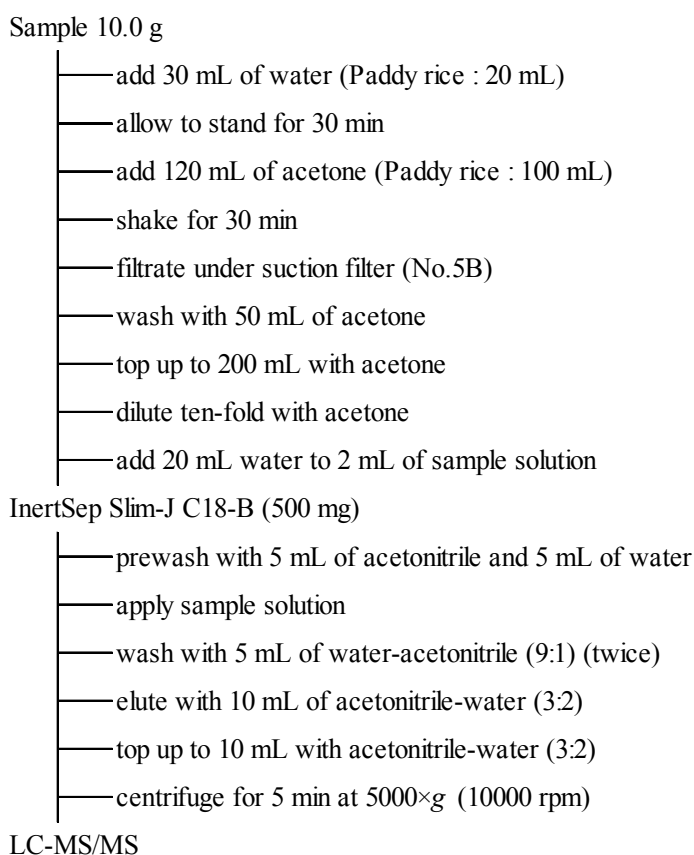
## 2.5 試料溶液の希釈に関する検討

## 1) カラム処理前で希釈した場合

稲わら 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 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。更に全量フラスコの標線までアセトンを加えた。この液をアセトンで 1~20 倍としてそれぞれ調製した試料溶液に、最終試料溶液中に各農薬濃度 1 ng/mL を含有するように農薬混合標準液を添加した。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、カラム処理に供する試料溶液とし、2.4 2) のカラム処理を行い、回収率を求めた。

## 2) カラム処理後に希釈した場合

稲わら 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 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。更に全量フラスコの標線までアセトンを加えた。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、カラム処理に供する試料溶液とした。この液を 2.4 2) のカラム処理を行い、溶出液をアセトニトリル-水 (3+2) で 1~20 倍としてそれぞれ調製した試料溶液に、最終試料溶液中に各農薬濃度 1 ng/mL を含有するように農薬混合標準液を添加し、回収率を求めた。



Scheme 1 Analytical procedure for oryastrobin and 13 other pesticides in feeds

### 3 結果及び考察

#### 3.1 検量線の作成

農薬混合標準液各 5  $\mu\text{L}$  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 1-3 のとおり、パクロブトラゾールは、0.05~5 ng/mL（注入量として 0.00025~0.025 ng）の範囲で直線性を示した。その他 13 成分の農薬は 0.1~5 ng/mL（注入量として 0.0005~0.025 ng）の範囲で直線性を示した。

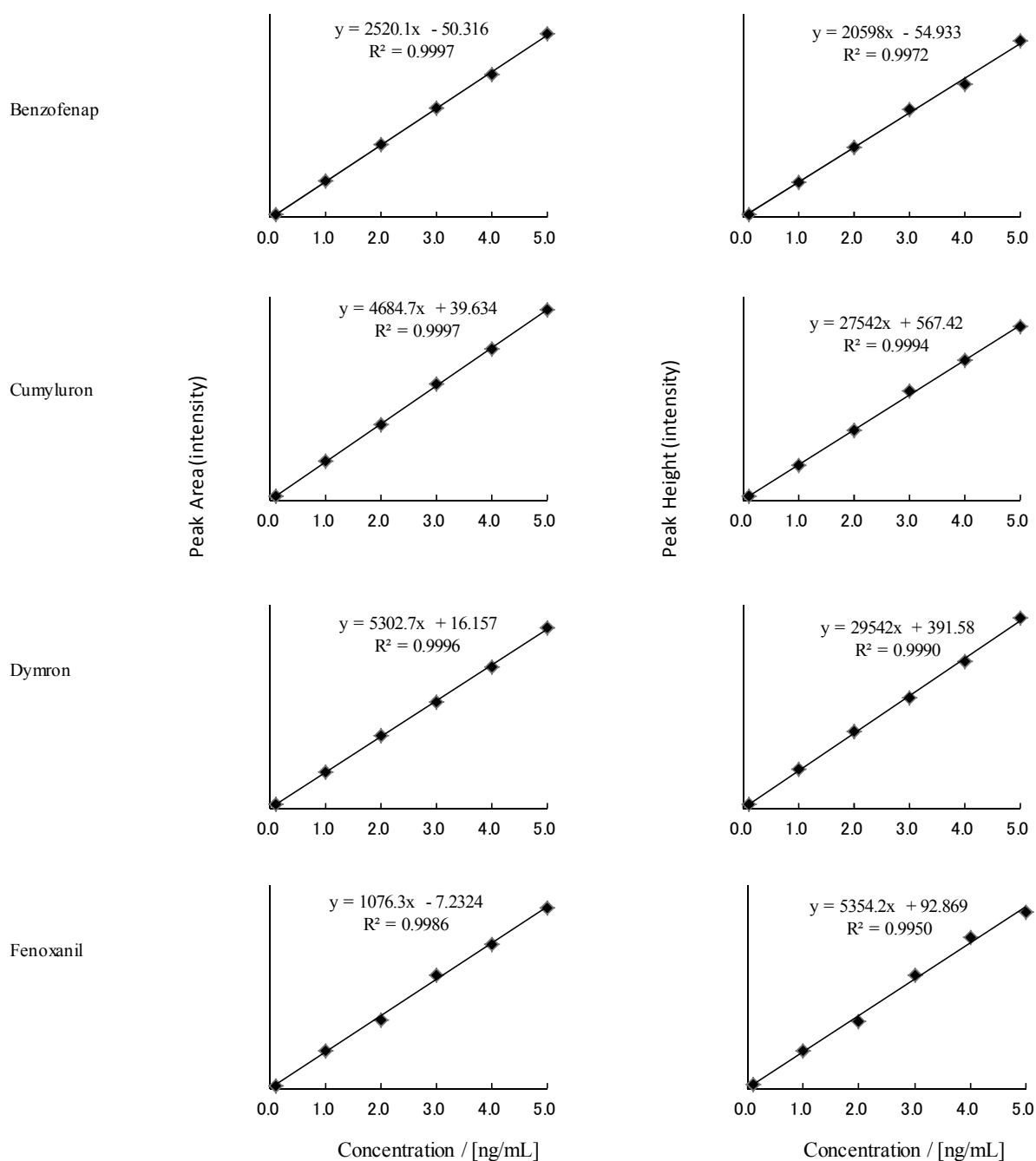


Fig. 1-1 Calibration curves of four pesticides by peak area (Left) and peak height (Right)



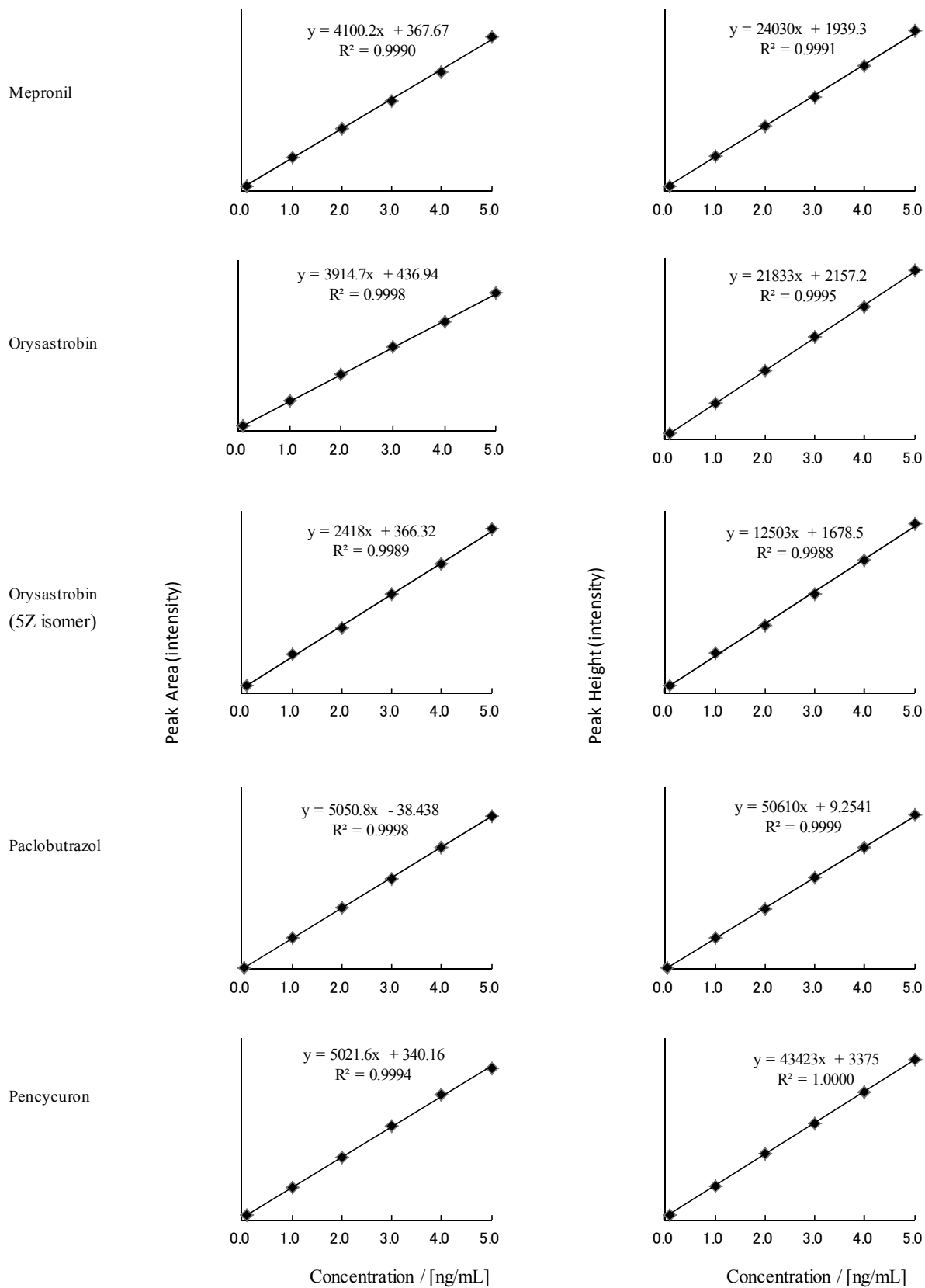


Fig. 1-2 Calibration curves of five pesticides by peak area (Left) and peak height (Right)

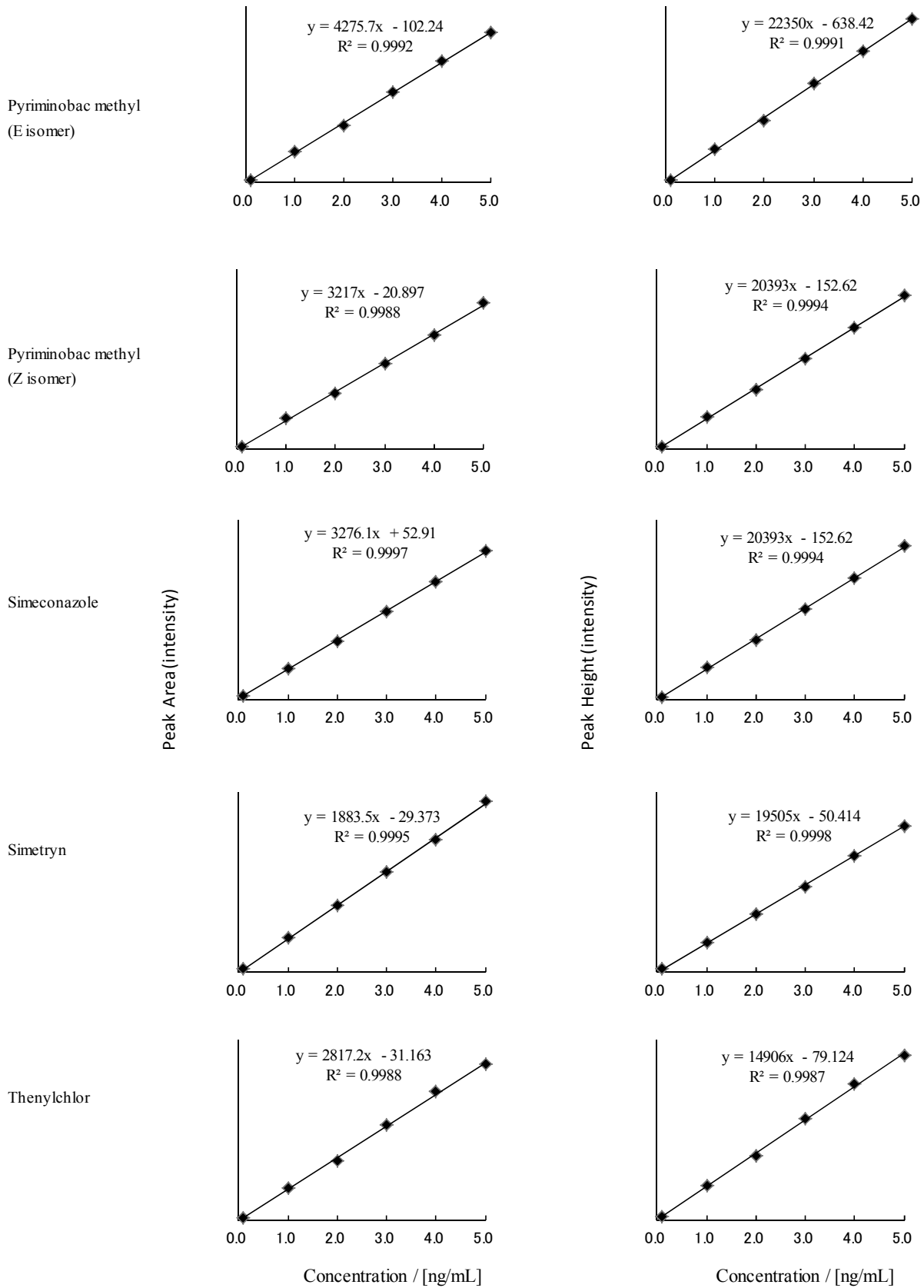


Fig. 1-3 Calibration curves of five pesticides by peak area (Left) and peak height (Right)

## 3.2 試料溶液の希釈に関する検討

飼料用イネに、各農薬 0.1 mg/kg 相当量を添加した試料を用い、2.4 1) のアセトンによりメスアップされた溶液を 10 倍希釈せずに、回収率を求めたところ、Table 5 のとおり、シメコナゾール、パクロブトラゾール及びフェノキサニルにおける回収率が 70 % を下回る結果となった。

この原因が夾雑物によるイオン化抑制である可能性があったため、希釈操作により、その影響が軽減できると考え、カラム処理操作の前後で試料溶液を 1~20 倍に希釈して回収率を求めた。その結果は Table 6 のとおりであり、5 倍以上に希釈した場合に改善が認められた。

以上により、イオン化抑制を低減させるためには、希釈操作はカラム処理の前後において結果に差はなく、希釈倍率も 5 倍で十分と考えられた。そこで、本法では試料溶液をアセトンで 10 倍希釈した溶液をカラム処理することとした。

Table 5 Recoveries of pesticides by JFRL method

Pesticides	Spiked level (mg/kg)	Feed types					
		Rice straw		Whole-crop rice silage		Paddy rice	
		Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)
Benzofenap	0.1	80.3	2.8	82.8	2.8	90.7	1.4
Cumyluron	0.1	86.3	5.5	94.2	2.8	96.2	2.9
Dymron	0.1	87.0	5.0	95.5	1.9	99.1	1.8
Fenoxanil	0.1	67.8	1.6	85.3	1.8	84.7	6.6
Mepronil	0.1	84.2	1.2	92.0	1.3	92.4	2.0
Oryastrobin	0.1	84.9	3.5	94.7	0.7	94.9	2.4
Oryastrobin metabolite (SZ isomer)	0.1	89.0	0.1	100	3.0	100	4.0
Paclobutrazol	0.1	69.9	2.0	88.6	3.6	95.6	1.0
Pencycuron	0.1	85.8	1.9	90.2	3.1	92.4	4.6
Pyriminobac-methyl (E isomer)	0.1	88.9	1.1	96.9	2.3	97.7	3.7
Pyriminobac-methyl (Z isomer)	0.1	85.3	2.9	92.5	3.1	95.7	2.0
Simeconazole	0.1	61.9	1.6	65.5	4.3	86.6	1.2
Simetryn	0.1	87.2	1.2	94.4	2.6	86.6	1.2
Thenylchlor	0.1	89.2	3.4	90.3	0.5	91.0	4.0

a) Mean ( $n = 3$ )

b) Relative standard deviation of repeatability

Table 6 Recoveries of pesticides compared by dilution level in Rice straw

## (A) Dilutions performed before purification with InertSep Slim-J C-18-B

Pesticides	Recovery (%) <sup>a)</sup>				
	undiluted	2-fold	5-fold	10-fold	20-fold
Benzofenap	90.2	92.9	91.6	93.3	91.6
Cumyluron	96.9	96.0	100	101	97.1
Dymron	97.4	94.4	94.2	93.4	95.1
Fenoxanil	80.8	91.4	90.2	96.5	93.6
Mepronil	94.4	94.7	92.2	93.7	97.3
Orysastrobin	95.9	94.7	99.3	97.3	99.5
Orysastrobin metabolite (5Z isomer)	96.2	101	92.8	97.2	95.7
Paclobutrazol	92.8	94.8	100	95.6	93.6
Pencycuron	97.0	95.9	96.0	94.8	96.2
Pyriminobac-methyl ( <i>E</i> isomer)	96.4	96.2	98.2	96.4	96.1
Pyriminobac-methyl ( <i>Z</i> isomer)	99.8	99.2	99.1	98.0	94.4
Simeconazole	81.4	87.5	94.9	92.8	93.7
Simetryn	101	95.4	96.8	97.2	98.3
Thenylchlor	90.8	90.7	95.3	94.0	96.0

a)  $n = 1$ 

## (B) Dilutions performed after purification with InertSep Slim-J C-18-B

Pesticides	Recovery (%) <sup>a)</sup>				
	undiluted	2-fold	5-fold	10-fold	20-fold
Benzofenap	90.8	89.6	93.7	88.6	96.7
Cumyluron	99.8	95.4	101	101	99.7
Dymron	93.4	93.3	97.8	92.1	94.2
Fenoxanil	80.4	88.9	96.6	95.3	96.9
Mepronil	93.6	94.8	94.5	93.3	98.1
Orysastrobin	98.1	95.7	97.8	97.4	96.6
Orysastrobin metabolite (5Z isomer)	92.5	93.3	98.9	97.6	97.5
Paclobutrazol	99.8	99.1	93.9	98.0	97.7
Pencycuron	94.1	94.2	98.5	101	101
Pyriminobac-methyl ( <i>E</i> isomer)	98.3	100	96.8	96.6	101
Pyriminobac-methyl ( <i>Z</i> isomer)	97.7	99.4	103	102	97.3
Simeconazole	81.6	90.6	94.5	100	98.7
Simetryn	93.8	96.0	104	96.3	96.7
Thenylchlor	86.5	93.9	97.1	96.2	102

a)  $n = 1$

### 3.3 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

稲わらを試料として、2.4 1)により調製したカラム処理に供する試料溶液に各農薬として 0.1 ng/mL 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。その結果は Table 7 のとおりであり、洗浄液である水-アセトニトリル (9+1) 10 mL では農薬成分の流出は認められず、溶出液であるアセトニトリル-水 (3+2) では最初の 10 mL ではほぼ全ての農薬成分が溶出することが認められた。

Table 7 Elution pattern of pesticides from InertSep Slim-J C18-B (rice straw)

Pesticides	Recovery (%) <sup>a)</sup>			Total
	Water-acetonitrile			
	(9:1) 10 mL	(2:3) 0 ~ 10 mL	(2:3) 10 ~ 20 mL	
Benzofenap	0	98	1	99
Cumyluron	0	101	0	101
Dymron	0	99	0	99
Fenoxanil	0	97	0	97
Mepronil	0	102	0	102
Oryastrobin	0	98	0	98
Oryastrobin metabolite (5Z isomer)	0	102	0	102
Paclobutrazol	0	98	0	98
Pencycuron	0	97	0	97
Pyriminobac-methyl (E isomer)	0	98	0	98
Pyriminobac-methyl (Z isomer)	0	100	0	100
Simeconazole	0	97	0	97
Simetryn	0	99	0	99
Thenylchlor	0	99	0	99

a)  $n = 1$

### 3.4 妨害物質の検討

稲わら 2 検体、稲発酵粗飼料 3 検体及び粃米 4 検体を試料として、2.4 により調製した試料溶液を LC-MS/MS に注入し、得られた選択反応検出クロマトグラムを確認したところ、いずれの試料においても定量を妨げ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たパクロブトラゾール、オリサストロビン及びテニルクロールについて、定量下限相当のこれらの標準液 (0.05 及び 0.1 ng/mL) から得られた選択反応検出クロマトグラムと比較した結果を Fig. 2-2 に示した。

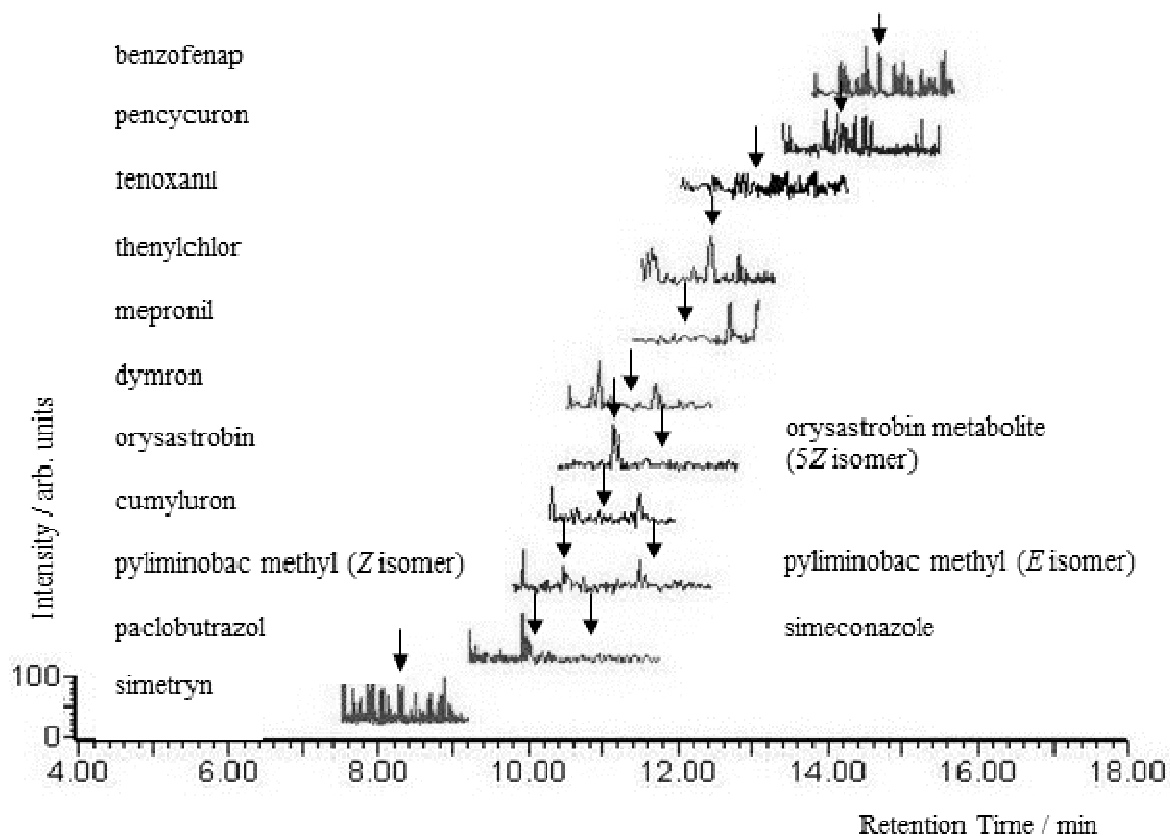


Fig. 2-1 SRM chromatograms of rice straw (non-spiked)

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.)

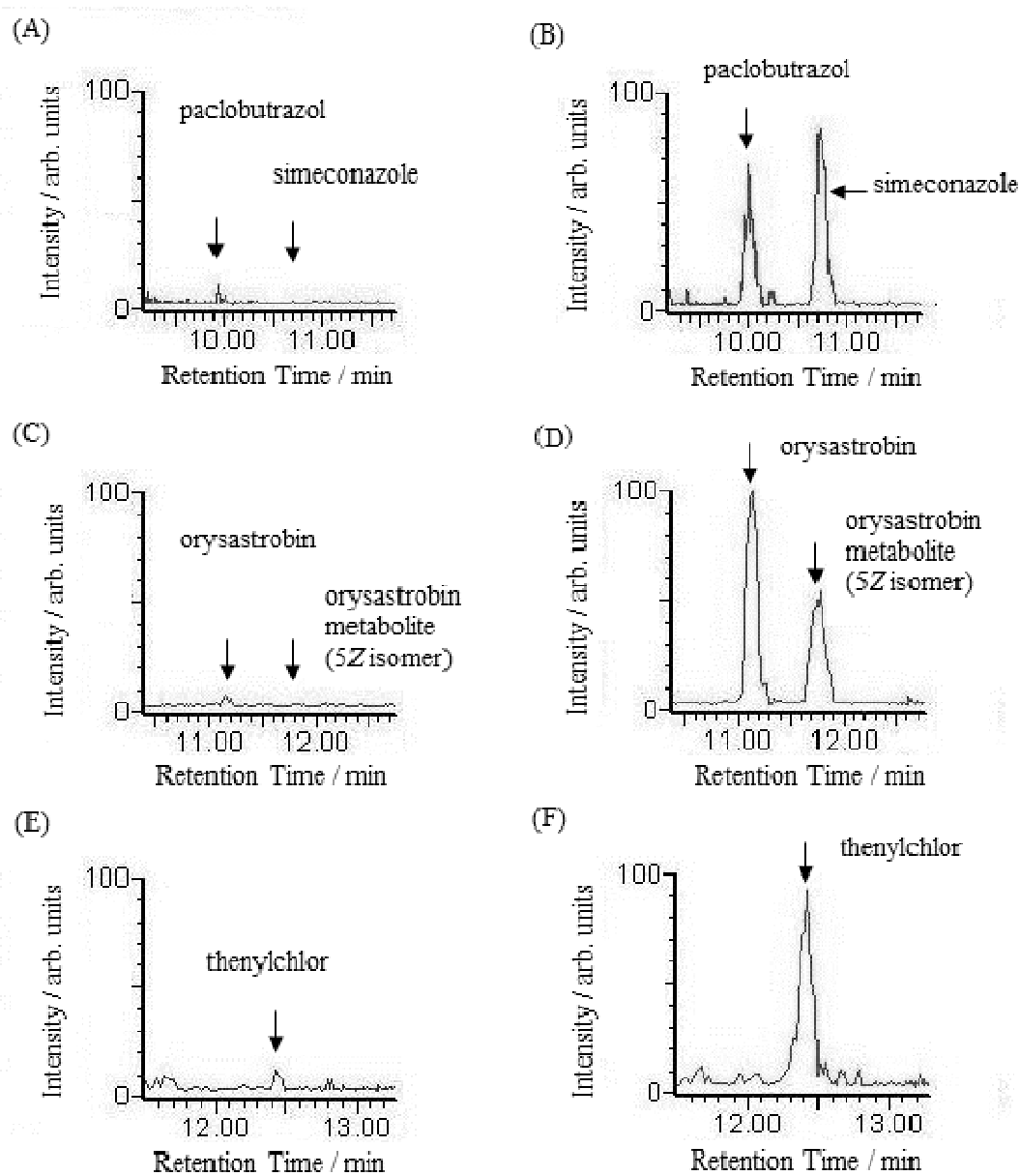


Fig. 2-2 SRM chromatograms of rice straw (non-spiked) and standard solution

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

(Arrows indicate the retention time of pesticides.)

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

(B) (D) (F) Standard solution (paclobutrazol: 0.05 ng/mL, orysastrobin and thenylchlor: 0.1 ng/mL)

Drawn on the same scale of (B), (D) and (F) respectively.

### 3.5 添加回収試験

飼料用イネにパクロブトラゾールとして 0.05, 0.5 及び 1.0 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で各 0.05, 0.5 及び 1.0 ng/mL 相当量）並びにその他 13 成分の農薬として 0.1 mg/kg（最終試料溶液中で 0.1 ng/mL 相当量）, 1.0 mg/kg 及び基準値（基準値のないものについては 0.5 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求めた。なお、最終試料溶液中の各農薬濃度が検量線範囲を超える場合は、2.4 2) のカラム処理の前に試料溶液を希釈した。

その結果は、Table 8 のとおり、オリサストロビンには平均回収率 81.1~101 %、その繰返し精度は相対標準偏差 ( $RSD_r$ ) として 4.4 %以下、オリサストロビン 5Z 異性体は平均回収率 73.8~100 %、その繰返し精度は  $RSD_r$  として 16 %以下、クミルロンは平均回収率 84.2~105 %、その繰返し精度は  $RSD_r$  として 14 %以下、シメコナゾールは平均回収率 83.5~98.6 %、その繰返し精度は  $RSD_r$  として 7.3 %以下、シメトリンは平均回収率 84.7~100 %、その繰返し精度は  $RSD_r$  として 7.0 %以下、ダイムロンは平均回収率 83.9~101 %、その繰返し精度は  $RSD_r$  として 13 %以下、テニルクロールは平均回収率 90.1~109 %、その繰返し精度は  $RSD_r$  として 9.3 %以下、パクロブトラゾールは平均回収率 87.6~105 %、その繰返し精度は  $RSD_r$  として 16 %以下、ピリミノバックメチル (E 体) は平均回収率 87.8~101 %、その繰返し精度は  $RSD_r$  として 13 %以下、ピリミノバックメチル (Z 体) は平均回収率 88.8~98.7 %、その繰返し精度は  $RSD_r$  として 11 %以下、フェノキサニルは平均回収率 91.8~110 %、その繰返し精度は  $RSD_r$  として 14 %以下、ペンシクロンは平均回収率 82.8~107 %、その繰返し精度は  $RSD_r$  として 11 %以下、ベンゾフェナップは平均回収率 88.4~99.1 %、その繰返し精度は  $RSD_r$  として 7.7 %以下、メプロニルは平均回収率 85.4~108 %、その繰返し精度は  $RSD_r$  として 9.0 %以下であった。いずれも良好な成績が得られた。

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。



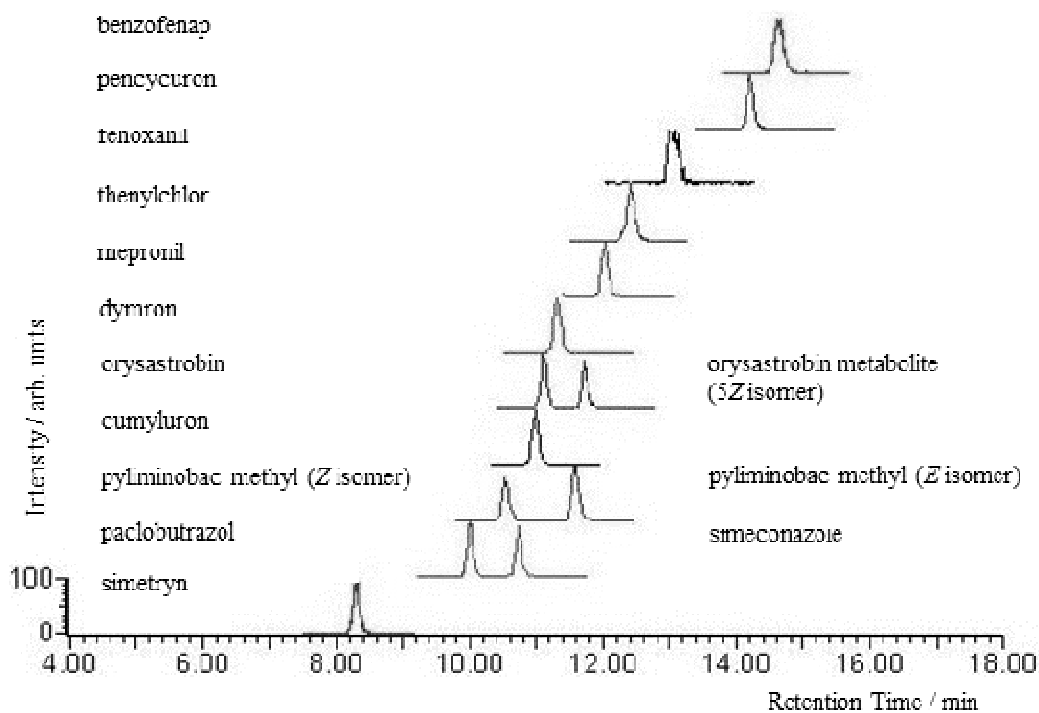
Table 8 Recoveries of pesticides

Pesticides	Feed types								
	Rice straw			Whole-crop rice silage			Paddy rice		
	Spiked level (mg/kg)	Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	Spiked level (mg/kg)	Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	Spiked level (mg/kg)	Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)
Benzofenap	0.1	92.5	3.7	0.1	95.0	4.2	0.1	96.2	7.7
	0.5	89.1	4.9	0.5	93.8	4.3	0.5	93.5	5.9
	1.0	88.5	1.0	1.0	88.4	7.6	1.0	99.1	2.7
Cumyluron	0.1	84.2	14	0.1	86.9	14	0.1	91.3	0.8
	1.0	93.9	1.7	0.5	92.2	2.3	0.5	93.9	4.7
	2.0	99.0	2.3	1.0	100	2.8	1.0	105	4.3
Dymron	0.1	83.9	5.5	0.1	97.8	13	0.1	99.7	3.3
	0.5	90.5	3.9	0.5	95.8	4.0	0.5	96.8	8.6
	1.0	94.4	1.6	1.0	99.2	2.3	1.0	101	3.8
Fenoxanil	0.1	109	14	0.1	109	7.2	0.1	91.8	9.6
	1.0	92.4	4.2	1.0	95.0	3.2	1.0	98.3	3.2
	30	94.3	1.9	3.0	104	1.9	10	110	1.3
Mepronil	0.1	88.4	9.0	0.1	85.4	7.7	0.1	92.8	2.4
	1.0	95.0	1.5	1.0	99.3	2.8	1.0	98.3	3.4
	25	98.3	2.0	10	107	1.6	7.0	108	3.8
Orysastrobin	0.1	81.1	3.5	0.1	92.4	0.8	0.1	101	2.8
	1.0	90.3	0.8	0.5	96.0	1.9	0.5	94.0	4.4
	5.0	92.3	1.2	1.0	98.4	2.8	1.0	99.8	2.5
Orysastrobin metabolite (5Z isomer)	0.1	86.5	5.6	0.1	73.8	12	0.1	94.5	16
	1.0	92.2	5.7	0.5	99.7	4.9	0.5	96.2	1.7
	5.0	91.5	0.5	1.0	98.6	2.4	1.0	100	0.5
Paclobutrazol	0.05	97.9	16	0.05	105	2.6	0.05	105	3.5
	0.5	87.6	4.1	0.5	94.8	3.7	0.5	93.8	4.4
	1.0	90.5	4.7	1.0	98.4	1.2	1.0	96.7	0.6
Pencycuron	0.1	98.0	7.1	0.1	97.3	2.2	0.1	83.5	9.3
	1.0	85.2	3.8	0.5	90.9	2.7	1.0	90.7	1.4
	30	89.2	11	1.0	82.8	2.8	10	107	0.3
Pyriminobac-methyl ( <i>E</i> isomer)	0.1	87.8	13	0.1	101	8.8	0.1	98.0	8.7
	0.5	91.0	2.0	0.5	99.3	1.1	0.5	100	3.0
	1.0	90.8	1.5	1.0	99.5	1.3	1.0	101	1.7
Pyriminobac-methyl ( <i>Z</i> isomer)	0.1	96.8	2.0	0.1	90.8	10	0.1	95.2	3.8
	0.5	88.8	8.2	0.5	93.2	11	0.5	98.6	5.4
	1.0	93.8	2.9	1.0	98.7	2.4	1.0	97.6	2.6
Simeconazole	0.1	83.5	7.3	0.1	85.2	3.2	0.1	93.1	0.5
	0.5	90.1	0.7	0.5	93.7	6.5	0.5	98.1	3.7
	1.0	86.0	1.0	1.0	95.8	2.1	1.0	98.6	1.9
Simetryn	0.1	86.4	4.7	0.1	100	4.8	0.1	84.7	7.0
	0.5	89.1	4.7	0.5	96.1	3.0	0.5	94.0	5.7
	1.0	92.4	2.0	1.0	94.1	2.5	1.0	96.8	3.9
Thenylchlor	0.1	106	4.3	0.1	109	5.6	0.1	92.3	9.3
	0.5	91.3	4.6	0.5	94.8	5.6	0.5	100	6.3
	1.0	90.1	1.6	1.0	93.4	6.5	1.0	94.1	1.9

a) Mean ( $n = 3$ )

b) Relative standard deviation of repeatability

(A)



(B)

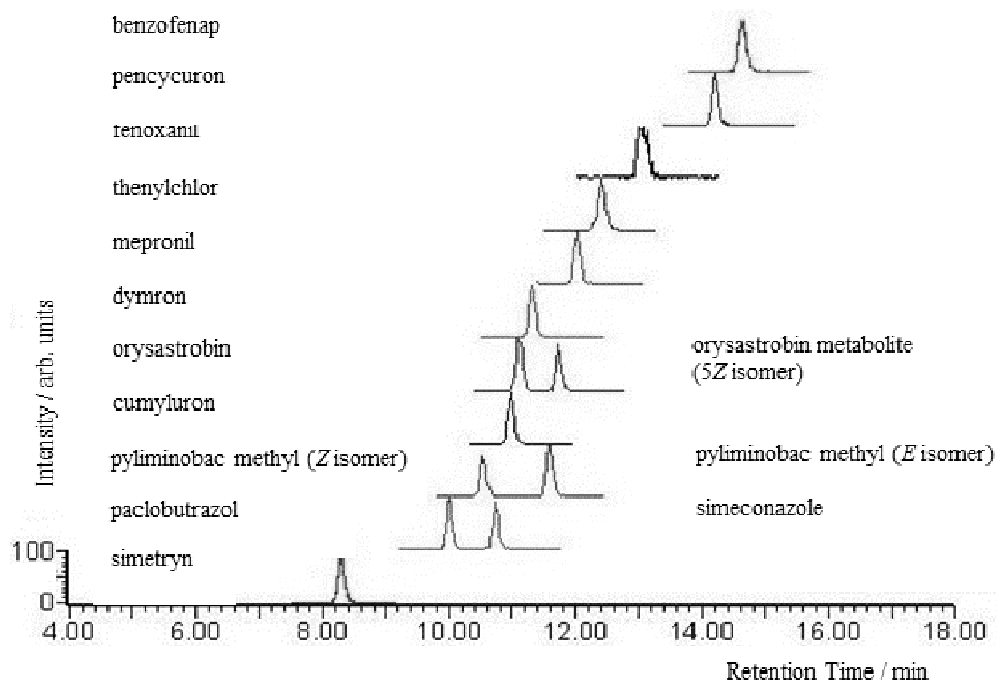


Fig. 3 SRM chromatograms of pesticides

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

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

### 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、飼料用イネに 14 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。

パクロブトラゾールは、得られたピークの 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、飼料用イネにパクロブトラゾールとして 0.05 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 0.05 ng/mL 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 8 のとおりであった。

その他の 13 成分の農薬は、全て得られたピークの 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。

確認のために、飼料用イネにこれら 13 成分の農薬として 0.1 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 0.1ng/mL 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 8 のとおりであった。

以上の結果から、本法のパクロブトラゾールの定量下限は 0.05 mg/kg、検出下限は 0.02 mg/kg であり、その他 13 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。

### 3.7 共同試験

本法の室間再現精度を確認するため、稲わら及び粳米に農薬 14 成分（ベンゾフェナップ、クミルロン、ダイムロン、フェノキサニル、メプロニル、オリサストロビン及びオリサストロビン 5Z 異性体、パクロブトラゾール、ペンシクロン、ピリミノバックメチル (E 体)、ピリミノバックメチル (Z 体)、シメコナゾール、シメトリン及びテニルクロール) を添加した共通試料を用いて共同試験を実施した。試験の概要は以下のとおりである。

#### 1) 分析試料の調製

稲わら及び粳米について、2.1 のとおり調製した分析用試料を送付し、各試験室においてそれぞれ 10 g を量り取った後、濃度非通知の添加用標準液（各農薬としてそれぞれ 20 µg/mL）を分析開始の前日に 1 mL 添加して調製した。各試料について、非明示の 2 点併行で試験を実施した。

#### 2) 参加試験室

協同飼料株式会社研究所、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、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 10 試験室）

#### 3) 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<sup>6),7)</sup>を参考に、Cochran 検定、はずれ値 1 個の Grubbs 検定及びはずれ値 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、繰返し精度の相対標準偏差 ( $RSD_f$ ) 及び室間再現精度の相対標準偏差 ( $RSD_R$ ) 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 9 から 22 に示した。

#### 4) 結果の解析

ベンゾフェナップでは稲わら及び粳米について、平均回収率は 92.6 及び 93.5 %、 $RSD_f$  はそれぞれ 3.1 及び 2.4 %、 $RSD_R$  はそれぞれ 4.8 及び 6.7 %、HorRat はそれぞれ 0.33 及び 0.46 であった。

クミロンでは稲わら及び粃米について、平均回収率は 94.1 及び 95.6 %,  $RSD_f$  はそれぞれ 6.1 及び 3.9 %,  $RSD_R$  はそれぞれ 5.9 及び 5.6 %, HorRat はそれぞれ 0.41 及び 0.39 であった。

ダイムロンでは稲わら及び粃米について、平均回収率は 94.0 及び 96.3 %,  $RSD_f$  はそれぞれ 2.1 及び 2.1 %,  $RSD_R$  はそれぞれ 4.7 及び 6.8 %, HorRat はそれぞれ 0.32 及び 0.47 であった。

フェノキサニルでは稲わら及び粃米について、平均回収率は 89.9 及び 93.8 %,  $RSD_f$  はそれぞれ 3.3 及び 3.8 %,  $RSD_R$  はそれぞれ 7.2 及び 7.9 %, HorRat はそれぞれ 0.49 及び 0.54 であった。

メプロニルでは稲わら及び粃米について、平均回収率は 96.4 及び 96.5 %,  $RSD_f$  はそれぞれ 3.6 及び 3.5 %,  $RSD_R$  はそれぞれ 5.3 及び 4.9 %, HorRat はそれぞれ 0.36 及び 0.34 であった。

オリサストビンでは稲わら及び粃米について、平均回収率は 93.4 及び 96.4 %,  $RSD_f$  はそれぞれ 3.3 及び 3.6 %,  $RSD_R$  はそれぞれ 4.6 及び 5.8 %, HorRat はそれぞれ 0.32 及び 0.40 であった。

オリサストビン 5Z 異性体では稲わら及び粃米について、平均回収率は 94.1 及び 96.8 %,  $RSD_f$  はそれぞれ 3.0 及び 4.0 %,  $RSD_R$  はそれぞれ 3.9 及び 6.6 %, HorRat はそれぞれ 0.27 及び 0.45 であった。

パクロボトラゾールでは稲わら及び粃米について、平均回収率は 91.1 及び 93.7 %,  $RSD_f$  はそれぞれ 1.8 及び 2.4 %,  $RSD_R$  はそれぞれ 3.6 及び 4.2 %, HorRat はそれぞれ 0.25 及び 0.29 であった。

ペンシクロンでは稲わら及び粃米について、平均回収率は 94.6 及び 96.1 %,  $RSD_f$  はそれぞれ 2.4 及び 1.8 %,  $RSD_R$  はそれぞれ 5.7 及び 6.4 %, HorRat はそれぞれ 0.39 及び 0.44 であった。

ピリミノバックメチル (E 体) では稲わら及び粃米について、平均回収率は 93.8 及び 96.1 %,  $RSD_f$  はそれぞれ 3.4 及び 2.9 %,  $RSD_R$  はそれぞれ 4.7 及び 5.1 %, HorRat はそれぞれ 0.32 及び 0.35 であった。

ピリミノバックメチル (Z 体) では稲わら及び粃米について、平均回収率は 94.3 及び 95.7 %,  $RSD_f$  はそれぞれ 3.0 及び 3.1 %,  $RSD_R$  はそれぞれ 5.8 及び 6.9 %, HorRat はそれぞれ 0.40 及び 0.47 であった。

シメコナゾールでは稲わら及び粃米について、平均回収率は 89.7 及び 93.5 %,  $RSD_f$  はそれぞれ 3.9 及び 4.1 %,  $RSD_R$  はそれぞれ 5.0 及び 6.7 %, HorRat はそれぞれ 0.34 及び 0.46 であった。

シメトリンでは稲わら及び粃米について、平均回収率は 93.7 及び 93.1 %,  $RSD_f$  はそれぞれ 4.0 及び 1.5 %,  $RSD_R$  はそれぞれ 6.4 及び 8.4 %, HorRat はそれぞれ 0.44 及び 0.57 であった。

テニルクロールでは稲わら及び粃米について、平均回収率は 97.8 及び 97.7 %,  $RSD_f$  はそれぞれ 3.6 及び 3.0 %,  $RSD_R$  はそれぞれ 9.3 及び 4.9 %, HorRat はそれぞれ 0.64 及び 0.34 であった。

いずれも良好な結果が得られた。

参考のため、各試験室で使用した LC-MS/MS の機種等を Table 23 に示した。

Table 9 Collaborative study results of benzofenap

Lab.No.	Feed types			
	Rice straw (mg/kg)		Paddy rice (mg/kg)	
1	1.85	1.86	1.88	1.95
2	2.47 <sup>a)</sup>	2.48 <sup>a)</sup>	1.81	1.82
3	1.74	1.76	1.79	1.74
4	1.83	1.73	1.57	1.61
5	2.02	1.89	1.94	1.85
6	1.83	1.78	1.92	2.00
7	1.97	1.98	1.99	1.98
8	1.88	1.80	1.93	1.96
9	1.77	1.84	1.85	1.88
10	1.98	1.84	2.03	1.91
Spiked level (mg/kg)	2.00		2.00	
Mean value <sup>b)</sup> (mg/kg)	1.85		1.87	
Recovery <sup>b)</sup> (%)	92.6		93.5	
RSD <sub>r</sub> <sup>c)</sup> (%)	3.1		2.4	
RSD <sub>R</sub> <sup>d)</sup> (%)	4.8		6.7	
PRSD <sub>R</sub> <sup>e)</sup> (%)	15		15	
HorRat	0.33		0.46	

a) Data excluded by single Grubbs test

b) Rice straw:  $n = 18$ ; Paddy rice:  $n = 20$

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 10 Collaborative study results of cumyluron

Lab.No.	Feed types			
	Rice straw (mg/kg)		Paddy rice (mg/kg)	
1	1.65	1.87	1.85	1.71
2	2.42 <sup>a)</sup>	2.43 <sup>a)</sup>	1.82	1.79
3	1.81	1.83	1.86	1.81
4	1.97	1.81	1.84	1.85
5	2.31 <sup>a)</sup>	2.25 <sup>a)</sup>	2.15	1.90
6	1.70	2.04	2.02	1.89
7	1.95	1.98	1.97	1.94
8	1.88	1.78	1.88	1.95
9	1.89	1.98	1.96	1.90
10	2.01	1.95	2.08	2.05
Spiked level (mg/kg)	2.00		2.00	
Mean value <sup>b)</sup> (mg/kg)	1.88		1.91	
Recovery <sup>b)</sup> (%)	94.1		95.6	
RSD <sub>r</sub> <sup>c)</sup> (%)	6.1		3.9	
RSD <sub>R</sub> <sup>d)</sup> (%)	5.9		5.6	
PRSD <sub>R</sub> <sup>e)</sup> (%)	15		15	
HorRat	0.41		0.39	

a) Data excluded by single Grubbs test

b) Rice straw:  $n = 16$ ; Paddy rice:  $n = 20$

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 Collaborative study results of dymron

Lab.No.	Feed types			
	Rice straw (mg/kg)		Paddy rice (mg/kg)	
1	1.86	1.88	2.00	1.91
2	2.51 <sup>b)</sup>	2.41 <sup>b)</sup>	1.87	1.81
3	1.79	1.79	1.77	1.75
4	1.86	1.89	1.83	1.81
5	2.35 <sup>a)</sup>	1.85 <sup>a)</sup>	2.04	1.98
6	1.98	1.88	2.03	2.08
7	1.80	1.88	1.82	1.86
8	1.85	1.78	1.88	1.91
9	1.84	1.88	1.90	1.88
10	2.07	2.05	2.24	2.13
Spiked level (mg/kg)	2.00		2.00	
Mean value <sup>c)</sup> (mg/kg)	1.88		1.93	
Recovery <sup>c)</sup> (%)	94.0		96.3	
RSD <sub>r</sub> <sup>d)</sup> (%)	2.1		2.1	
RSD <sub>R</sub> <sup>e)</sup> (%)	4.7		6.8	
PRSD <sub>R</sub> <sup>f)</sup> (%)	15		14	
HorRat	0.32		0.47	

a) Data excluded by Cochran test

b) Data excluded by single Grubbs test

c) Rice straw:  $n = 16$ ; Paddy rice:  $n = 20$

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 fenoxanil

Lab.No.	Feed types			
	Rice straw (mg/kg)		Paddy rice (mg/kg)	
1	1.69	1.87	1.80	1.67
2	2.45 <sup>a)</sup>	2.57 <sup>a)</sup>	2.00	1.95
3	1.69	1.70	1.80	1.78
4	1.69	1.66	1.77	1.72
5	1.96	1.95	2.04	1.85
6	1.87	1.96	2.13	2.02
7	1.77	1.81	1.95	1.92
8	1.80	1.77	1.86	1.95
9	1.58	1.68	1.65	1.64
10	2.01	1.92	2.08	1.94
Spiked level (mg/kg)	2.00		2.00	
Mean value <sup>b)</sup> (mg/kg)	1.80		1.88	
Recovery <sup>b)</sup> (%)	89.9		93.8	
RSD <sub>r</sub> <sup>c)</sup> (%)	3.3		3.8	
RSD <sub>R</sub> <sup>d)</sup> (%)	7.2		7.9	
PRSD <sub>R</sub> <sup>e)</sup> (%)	15		15	
HorRat	0.49		0.54	

a) Data excluded by single Grubbs test

b) Rice straw:  $n = 18$ ; Paddy rice:  $n = 20$

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 13 Collaborative study results of mepronil

Lab.No.	Feed types			
	Rice straw (mg/kg)		Paddy rice (mg/kg)	
1	1.86	2.06	1.97	1.89
2	2.41 <sup>a)</sup>	2.45 <sup>a)</sup>	1.82	1.86
3	1.82	1.87	1.83	1.84
4	1.94	1.82	1.73	1.95
5	2.12	2.02	1.93	2.07
6	1.92	2.02	1.97	2.06
7	1.99	1.99	2.01	2.02
8	1.82	1.73	1.91	1.86
9	1.90	1.88	1.93	1.86
10	2.00	1.94	2.03	2.04
Spiked level (mg/kg)	2.00		2.00	
Mean value <sup>b)</sup> (mg/kg)	1.928		1.929	
Recovery <sup>b)</sup> (%)	96.4		96.5	
RSD <sub>r</sub> <sup>c)</sup> (%)	3.6		3.5	
RSD <sub>R</sub> <sup>d)</sup> (%)	5.3		4.9	
PRSD <sub>R</sub> <sup>e)</sup> (%)	14		14	
HorRat	0.36		0.34	

a) Data excluded by single Grubbs test

b) Rice straw:  $n = 18$ ; Paddy rice:  $n = 20$

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 14 Collaborative study results of orysastrobin

Lab.No.	Feed types			
	Rice straw (mg/kg)		Paddy rice (mg/kg)	
1	1.80	1.78	1.83	1.86
2	2.46 <sup>a)</sup>	2.50 <sup>a)</sup>	1.82	1.84
3	1.78	1.80	1.84	1.84
4	1.91	1.75	1.80	1.83
5	2.66 <sup>a)</sup>	2.35 <sup>a)</sup>	2.13	1.91
6	1.86	2.04	1.95	2.15
7	1.88	1.89	1.91	1.94
8	1.82	1.78	1.88	1.90
9	1.93	1.96	1.99	1.97
10	1.96	1.95	2.12	2.05
Spiked level (mg/kg)	2.00		2.00	
Mean value <sup>b)</sup> (mg/kg)	1.87		1.93	
Recovery <sup>b)</sup> (%)	93.4		96.4	
RSD <sub>r</sub> <sup>c)</sup> (%)	3.3		3.6	
RSD <sub>R</sub> <sup>d)</sup> (%)	4.6		5.8	
PRSD <sub>R</sub> <sup>e)</sup> (%)	15		14	
HorRat	0.32		0.40	

a) Data excluded by single Grubbs test

b) Rice straw:  $n = 16$ ; Paddy rice:  $n = 20$

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 15 Collaborative study results of oryastrobin metabolite (5Z isomer)

Lab.No.	Feed types			
	Rice straw (mg/kg)		Paddy rice (mg/kg)	
1	1.91	1.83	1.85	2.06
2	2.43 <sup>b)</sup>	2.44 <sup>b)</sup>	1.79	1.82
3	1.81	1.81	1.86	1.84
4	1.81	1.75	1.69	1.76
5	2.40 <sup>a)</sup>	2.06 <sup>a)</sup>	2.14	1.90
6	1.96	1.92	2.15	2.07
7	1.91	1.92	1.94	1.95
8	1.94	1.77	1.94	1.96
9	1.96	1.93	1.94	1.99
10	1.98	1.89	2.07	2.00
Spiked level (mg/kg)	2.00		2.00	
Mean value <sup>c)</sup> (mg/kg)	1.88		1.94	
Recovery <sup>c)</sup> (%)	94.1		96.8	
RSD <sub>r</sub> <sup>d)</sup> (%)	3.0		4.0	
RSD <sub>R</sub> <sup>e)</sup> (%)	3.9		6.6	
PRSD <sub>R</sub> <sup>f)</sup> (%)	15		14	
HorRat	0.27		0.45	

a) Data excluded by Cochran test

b) Data excluded by single Grubbs test

c) Rice straw:  $n = 16$ ; Paddy rice:  $n = 20$

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 16 Collaborative study results of paclobutrazol

Lab.No.	Feed types			
	Rice straw (mg/kg)		Paddy rice (mg/kg)	
1	1.76	1.66	1.77	1.82
2	2.49 <sup>b)</sup>	2.46 <sup>b)</sup>	1.88	1.89
3	1.78	1.77	1.76	1.80
4	1.77	1.80	1.74	1.85
5	2.36 <sup>a)</sup>	1.89 <sup>a)</sup>	1.88	1.86
6	1.86	1.92	1.92	2.05
7	1.86	1.87	1.88	1.89
8	1.83	1.81	1.85	1.88
9	1.83	1.85	1.89	1.93
10	1.91	1.86	2.01	1.94
Spiked level (mg/kg)	2.00		2.00	
Mean value <sup>c)</sup> (mg/kg)	1.82		1.87	
Recovery <sup>c)</sup> (%)	91.1		93.7	
RSD <sub>r</sub> <sup>d)</sup> (%)	1.8		2.4	
RSD <sub>R</sub> <sup>e)</sup> (%)	3.6		4.2	
PRSD <sub>R</sub> <sup>f)</sup> (%)	15		15	
HorRat	0.25		0.29	

a) Data excluded by Cochran test

b) Data excluded by single Grubbs test

c) Rice straw:  $n = 16$ ; Paddy rice:  $n = 20$

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 17 Collaborative study results of pencycuron

Lab.No.	Feed types			
	Rice straw (mg/kg)		Paddy rice (mg/kg)	
1	1.86	1.85	1.88	1.91
2	2.74 <sup>a)</sup>	2.72 <sup>a)</sup>	2.04	2.02
3	1.87	1.81	1.88	1.86
4	1.87	1.72	1.70	1.66
5	2.09	2.10	2.08	2.00
6	1.88	1.86	2.07	1.95
7	1.94	1.97	1.97	1.97
8	1.88	1.82	1.92	1.94
9	1.76	1.79	1.78	1.77
10	2.03	1.96	2.03	2.02
Spiked level (mg/kg)	2.00		2.00	
Mean value <sup>b)</sup> (mg/kg)	1.89		1.92	
Recovery <sup>b)</sup> (%)	94.6		96.1	
RSD <sub>r</sub> <sup>c)</sup> (%)	2.4		1.8	
RSD <sub>R</sub> <sup>d)</sup> (%)	5.7		6.4	
PRSD <sub>R</sub> <sup>e)</sup> (%)	15		14	
HorRat	0.39		0.44	

a) Data excluded by single Grubbs test

b) Rice straw:  $n = 18$ ; Paddy rice:  $n = 20$

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 18 Collaborative study results of pyriminobac-methyl (*E* isomer)

Lab.No.	Feed types			
	Rice straw (mg/kg)		Paddy rice (mg/kg)	
1	1.86	1.68	1.85	1.94
2	2.44 <sup>a)</sup>	2.47 <sup>a)</sup>	1.84	1.84
3	1.81	1.81	1.86	1.83
4	1.82	1.80	1.82	1.75
5	2.29 <sup>a)</sup>	2.07 <sup>a)</sup>	2.05	1.94
6	1.86	1.96	1.94	2.12
7	1.92	1.94	1.95	1.94
8	1.91	1.79	1.86	1.88
9	1.97	1.89	1.97	1.94
10	1.99	1.99	2.08	2.03
Spiked level (mg/kg)	2.00		2.00	
Mean value <sup>b)</sup> (mg/kg)	1.88		1.92	
Recovery <sup>b)</sup> (%)	93.8		96.1	
RSD <sub>r</sub> <sup>c)</sup> (%)	3.4		2.9	
RSD <sub>R</sub> <sup>d)</sup> (%)	4.7		5.1	
PRSD <sub>R</sub> <sup>e)</sup> (%)	15		14	
HorRat	0.32		0.35	

a) Data excluded by single Grubbs test

b) Rice straw:  $n = 16$ ; Paddy rice:  $n = 20$

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 19 Collaborative study results of pyriminobac-methyl (Z isomer)

Lab.No.	Feed types			
	Rice straw (mg/kg)		Paddy rice (mg/kg)	
1	1.88	1.81	1.88	1.82
2	2.48 <sup>b)</sup>	2.49 <sup>b)</sup>	1.83	1.84
3	1.79	1.84	1.86	1.83
4	1.70	1.76	1.58	1.75
5	2.63 <sup>a)</sup>	2.10 <sup>a)</sup>	1.95	2.03
6	1.88	1.99	2.00	2.14
7	1.89	1.92	1.91	1.94
8	1.88	1.81	1.86	1.97
9	1.95	1.96	1.97	1.96
10	2.14	1.99	2.09	2.08
Spiked level (mg/kg)	2.00		2.00	
Mean value <sup>c)</sup> (mg/kg)	1.89		1.91	
Recovery <sup>c)</sup> (%)	94.3		95.7	
RSD <sub>r</sub> <sup>d)</sup> (%)	3.0		3.1	
RSD <sub>R</sub> <sup>e)</sup> (%)	5.8		6.9	
PRSD <sub>R</sub> <sup>f)</sup> (%)	15		15	
HorRat	0.40		0.47	

a) Data excluded by Cochran test

b) Data excluded by single Grubbs test

c) Rice straw:  $n = 16$ ; Paddy rice:  $n = 20$

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 20 Collaborative study results of simeconazole

Lab.No.	Feed types			
	Rice straw (mg/kg)		Paddy rice (mg/kg)	
1	1.82	1.80	1.75	1.89
2	2.40 <sup>a)</sup>	2.40 <sup>a)</sup>	1.86	1.85
3	1.79	1.76	1.78	1.83
4	1.78	1.66	1.61	1.79
5	2.47 <sup>a)</sup>	2.18 <sup>a)</sup>	1.94	2.08
6	2.06	1.85	1.96	2.13
7	1.76	1.76	1.93	1.89
8	1.82	1.77	1.80	1.87
9	1.69	1.76	1.71	1.79
10	1.86	1.75	2.00	1.95
Spiked level (mg/kg)	2.00		2.00	
Mean value <sup>b)</sup> (mg/kg)	1.79		1.87	
Recovery <sup>b)</sup> (%)	89.7		93.5	
RSD <sub>r</sub> <sup>c)</sup> (%)	3.9		4.1	
RSD <sub>R</sub> <sup>d)</sup> (%)	5.0		6.7	
PRSD <sub>R</sub> <sup>e)</sup> (%)	15		15	
HorRat	0.34		0.46	

a) Data excluded by single Grubbs test

b) Rice straw:  $n = 16$ ; Paddy rice:  $n = 20$

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 21 Collaborative study results of simetryn

Lab.No.	Feed types			
	Rice straw (mg/kg)		Paddy rice (mg/kg)	
1	1.74	1.69	1.80	1.79
2	2.39 <sup>b)</sup>	2.44 <sup>b)</sup>	1.80	1.84
3	1.83	1.84	1.87	1.88
4	1.85	1.70	1.72	1.72
5	2.00	2.06	1.97	1.90
6	1.87	1.67	1.54	1.60
7	1.91	1.95	2.01	1.99
8	1.91	1.86	1.93	1.99
9	1.92	1.99	2.07	2.08
10	1.89	2.05	2.08 <sup>a)</sup>	1.89 <sup>a)</sup>
Spiked level (mg/kg)	2.00		2.00	
Mean value <sup>c)</sup> (mg/kg)	1.87		1.86	
Recovery <sup>c)</sup> (%)	93.7		93.1	
RSD <sub>r</sub> <sup>d)</sup> (%)	4.0		1.5	
RSD <sub>R</sub> <sup>e)</sup> (%)	6.4		8.4	
PRSD <sub>R</sub> <sup>f)</sup> (%)	15		15	
HorRat	0.44		0.57	

a) Data excluded by Cochran test

b) Data excluded by single Grubbs test

c) Rice straw:  $n = 18$ ; Paddy rice:  $n = 18$

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 22 Collaborative study results of thenylchlor

Lab.No.	Feed types			
	Rice straw (mg/kg)		Paddy rice (mg/kg)	
1	2.03	2.01	1.98	2.12
2	2.32	2.37	1.81	1.91
3	1.67	1.81	1.82	1.81
4	1.78	1.67	1.83	1.89
5	2.14	1.96	2.04	1.93
6	1.96	1.99	1.99	2.08
7	1.93	1.96	1.98	2.03
8	1.94	1.84	1.89	1.99
9	1.84	1.92	1.92	1.94
10	2.05	1.94	2.07	2.03
Spiked level (mg/kg)	2.00		2.00	
Mean value <sup>a)</sup> (mg/kg)	1.96		1.95	
Recovery <sup>a)</sup> (%)	97.8		97.7	
RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	3.6		3.0	
RSD <sub>R</sub> <sup>c)</sup> (%)	9.3		4.9	
PRSD <sub>R</sub> <sup>d)</sup> (%)	14		14	
HorRat	0.64		0.34	

a)  $n = 20$

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 23 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-3200	GL Sciences Inertsil ODS-SP (2.1 mm ×150 mm, 5 μm)
2	LC: Agilent Technologies 1200 Series MS/MS: Agilent Technologies 6410	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm ×150 mm, 5 μm)
3	LC: Agilent Technologies 1200 Series MS/MS: Agilent Technologies 6410	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm ×150 mm, 5 μm)
4	LC: Agilent Technologies 1100 Series MS/MS: AB SCIEX API-2000	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm ×150 mm, 5 μm)
5	LC: Waters ACQUITY UPLC MS/MS: Waters Quattro Premier XE	GL Sciences Inertsil ODS-SP (2.1 mm ×150 mm, 5 μm)
6	LC: Waters 2695 MS/MS: Micromass Quattro microAPI	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm ×150 mm, 5 μm)
7	LC: Waters ACQUITY UPLC MS/MS: Waters Xevo TQD	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm ×150 mm, 5 μm)
8	LC: Waters ACQUITY UPLC MS/MS: Waters TQD	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm ×150 mm, 5 μm)
9	LC: Waters ACQUITY UPLC MS/MS: Waters TQD	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm ×150 mm, 5 μm)
10	LC: Waters ACQUITY UPLC MS/MS: Waters TQD	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 12 種類 14 成分の農薬（ベンゾフェナップ、クミルロン、ダイムロン、フェノキサニル、メプロニル、オリサストロビン、オリサストロビン 5Z 異性体、パクロブトラゾール、ペンシクロン、ピリミノバックメチル (E 体)、ピリミノバックメチル (Z 体)、シメコナゾール、シメトリン及びテニルクロール) 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、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、パクロブトラゾールは 0.05~5 ng/mL（注入量として 0.00025~0.025 ng）の範囲で直線性を示した。その他 13 成分の農薬は 0.1~5 ng/mL（注入量として 0.0005~0.025 ng）の範囲で直線性を示した。
- 2) カラム処理操作の前後で試料溶液を希釈することで良好な結果が得られたため、本法では平成 20 年度の JFRL 法と同様に、試料溶液をアセトンで 10 倍希釈したものをカラム処理することとした。

- 3) 飼料用イネについて、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。
- 4) 飼料用イネについて、本法に従って得られたクロマトグラムには、定量を妨げるピークは認められなかった。
- 5) 飼料用イネにパクロブトラゾールとして0.05, 0.5及び1.0 mg/kg相当量(最終試料溶液中で各0.05, 0.5及び1.0 ng/mL相当量)並びにその他13成分の農薬として0.1 mg/kg(最終試料溶液中で0.1 ng/mL相当量), 1.0 mg/kg及び基準値(基準値のないものについては0.5 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もとめたところ良好な結果が得られた。
- 6) 本法のパクロブトラゾールの定量下限は0.05 mg/kg, 検出下限は0.02 mg/kgであり、その他13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。
- 7) 稲わら及び粃米に各農薬としてそれぞれ2 mg/kg相当量を添加した試料を用いて10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協同飼料株式会社研究所, 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) 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0124001号(2005).
- 4) 財団法人日本食品分析センター: 平成20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(2009).
- 5) 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(2011).
- 6) Horwitz, W., Protocol for Design, Conduct and Interpretation of Method - Performance Studies, *Pure & Appl. Chem.*, 67 (2), 331-343 (1995).
- 7) 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).