

2 飼料用イネ中のエチプロール他 5 成分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

義本 将之*, 屋方 光則*, 齊木 雅一*

Simultaneous Determination of Ethiprole and 5 Pesticides in Rice Straw, Whole-crop Rice Silage and Paddy Rice for Feed by LC-MS/MS

Masayuki YOSHIMOTO*, Mitsunori YAKATA* and Masakazu SAIKI*

(* Food and Agricultural Materials Inspection Center, Sapporo Regional Center)

An analytical method was developed to simultaneously determine the levels of six pesticides (carpropamide, chlorantraniliprole, chromafenozide, ethiprole, pyroquilon and thifluzamide) in rice straw, whole-crop rice silage and paddy rice for feed using liquid chromatograph-electrospray ionization-tandem mass spectrometer (LC-ESI-MS/MS).

After adding water to the samples, the above pesticides were extracted with acetone and resulting solutions were filtered. The filtrate was then diluted with acetone to a final volume of 200 mL. Sample solutions were then purified with InertSep Slim-J C18-B (GL Sciences Inc.; Tokyo, Japan), Chem Elut (Agilent Technologies Inc.; Santa Clara, CA, USA) and ENVI-Carb/NH₂ (Supelco Inc.; Bellefonte, PA, USA), and injected into the LC-ESI-MS/MS for determination of the levels of six pesticides. LC separation was carried out on an ODS column (Inertsil ODS-SP, 2.1 mm i.d. × 150 mm, 5 μm from GL Sciences Inc.; Tokyo, Japan) 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 for feed. Rice straw was spiked with 3.0 or 0.1 mg/kg of carpropamide, 0.1 or 0.01 mg/kg of chlorantraniliprole, 5.0 or 0.1 mg/kg of chromafenozide, 3.0 or 0.1 mg/kg of ethiprole, 3.0 or 0.1 mg/kg of pyroquilon, and 1.0 or 0.1 mg/kg of thifluzamide. Whole-crop rice silage was spiked with 0.89 or 0.044 mg/kg of carpropamide and pyroquilon, and 1.3 or 0.044 mg/kg of other four pesticides. Paddy rice was spiked with 3.0 or 0.1 mg/kg of chromafenozide, and 1.0 or 0.1 mg/kg of other five pesticides. The resulting mean recovery and repeatability in terms of relative standard deviations (RSD_r), respectively, were 83.3 to 105 % and not more than 12 % for carpropamide, 93.5 to 103 % and not more than 10 % for chlorantraniliprole, 85.9 to 105 % and not more than 11 % for chromafenozide, 83.5 to 94.6 % and not more than 16 % for ethiprole, 79.4 to 103 % and not more than 13 % for pyroquilon and 85.2 to 119 % and not more than 20 % for thifluzamide.

A collaborative study was conducted in eight laboratories using rice straw and paddy rice spiked with the six pesticides. The rice straw was spiked with 0.1 mg/kg of chlorantraniliprole, and with 1.0 mg/kg each of the other pesticides. Paddy rice was spiked with 1.0 mg/kg each of the six pesticides. The mean recoveries of carpropamide were 91.7 to 97.0 % and repeatability and reproducibility in terms of relative standard deviations (RSD_r and RSD_R) and HorRat were 3.5 %, 4.0 %, 4.6 %, 4.3 %, 0.28, and 0.27, respectively. The respective values obtained for the other pesticides were as follows: (chlorantraniliprole) 75.8 %, 95.6 %, 11 %, 7.3 %, 25 %, 9.4 %, 1.2, and 0.58; (chromafenozide) 94.8 %, 101 %, 8.1 %, 1.9 %, 8.1 %, 4.3 %, 0.50, and 0.27; (ethiprole) 92.5 %, 98.5 %, 5.0 %, 4.8 %, 6.0 %, 8.0 %, 0.37, and 0.50; (pyroquilon) 90.8 %, 94.2 %, 4.4 %, 3.8 %, 6.3 %, 5.8 %, 0.39, and 0.36; (thifluzamide) 92.6 %, 99.2 %, 5.4 %, 3.5 %, 6.4 %, 5.1 %, 0.40, and 0.32.

This method was validated and established for use in the inspection of six pesticides in rice straw, whole-crop rice silage and paddy rice for feed.

* 独立行政法人農林水産消費安全技術センター札幌センター

Key words: carpropamide; chlorantraniliprole; chromafenozide; ethiprole; pyroquilon; thifluzamide; liquid chromatograph-tandem mass spectrometer (LC-MS/MS); electrospray ionization (ESI); rice for feed; rice straw; whole-crop rice silage; paddy rice; collaborative study

キーワード：カルプロパミド；クロラントラニリプロール；クロマフェノジド；エチプロール；ピロキロン；チフルザミド；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；飼料用イネ；稲わら；稲発酵粗飼料；粃米；共同試験

1 緒 言

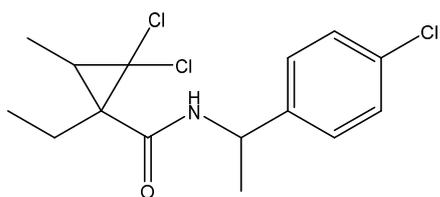
飼料の有害物質の指導基準¹⁾の改正（平成 21 年 1 月 29 日）により，飼料用イネ（稲わら，稲発酵粗飼料及び粃米）について残留農薬の指導基準値が追加設定された．飼料用イネに基準が設定されている農薬のうち，分析法が飼料分析基準²⁾に記載されていない成分があること，基準は設定されていないが国内で稲に適用のある農薬についてもモニタリングする必要があることから，これらの農薬を迅速に定量できる分析法の開発が必要であった．

今回，一般財団法人日本食品分析センターが「平成 20 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．）による多成分分析法³⁾（以下「JFRL 法」という．）を基に，JFRL 法が対象とする農薬成分のうちの 5 成分（カルプロパミド，クロマフェノジド，エチプロール，ピロキロン及びチフルザミド）にクロラントラニリプロールを加えた 6 成分を対象とした同時定量法の飼料分析基準への適用の可否について検討を行ったので，その概要を報告する．

なお，今回検討した農薬のうち指導基準値が定められていないチフルザミドを除いた 5 成分について，その指導基準値を Table 1 に示した．また，参考に各農薬の構造式等を Fig. 1-1~1-6 に示した．

Table 1 Regulation values of the pesticides in feed

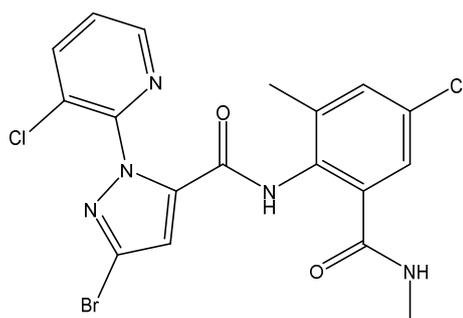
Pesticide	Feed types	Regulation value (mg/kg)
Carpropamide	Rice straw	3
	Whole-crop rice silage	0.7
Chlorantraniliprole	Rice straw	0.1
Chromafenozide	Rice straw	5
	Paddy rice	3
Ethiprole	Rice straw	3
	Paddy rice	1
Pyroquilon	Rice straw	3
	Whole-crop rice silage	0.5



(1*RS*,3*SR*)-2,2-dichloro-*N*-[1-(4-chlorophenyl)ethyl]-1-ethyl-3-methylcyclopropanecarboxamide

$C_{15}H_{18}Cl_3NO$ MW: 334.7 CAS No.: 104030-54-8

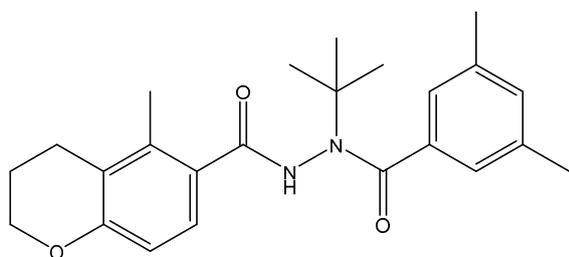
Fig. 1-1 Chemical structure of carpropamide



3-bromo-*N*-[4-chloro-2-methyl-6-(methylcarbamoyl)phenyl]-1-(3-chloropyridin-2-yl)-1*H*-pyrazole-5-carboxamide

$C_{18}H_{14}BrCl_2N_5O_2$ MW: 483.2 CAS No.: 500008-45-7

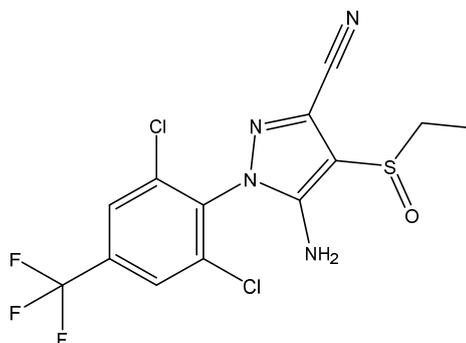
Fig. 1-2 Chemical structure of chlorantraniliprole



2'-*tert*-butyl-5-methyl-2'-(3,5-xyloyl)chromane-6-carbohydrazide

$C_{24}H_{30}N_2O_3$ MW: 394.5 CAS No.: 143807-66-3

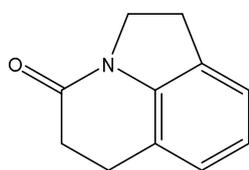
Fig. 1-3 Chemical structure of chromafenozide



5-amino-1-(2,6-dichloro- α,α,α -trifluoro-*p*-tolyl)-4-ethylsulfanylpyrazole-3-carbonitrile

$C_{13}H_9Cl_2F_3N_4OS$ MW: 397.2 CAS No.: 181587-01-9

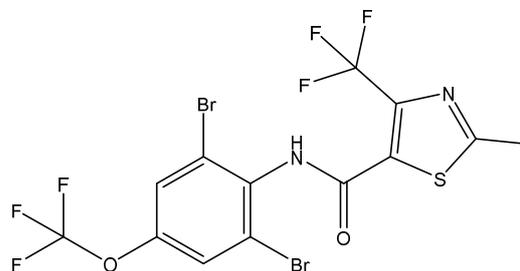
Fig. 1-4 Chemical structure of ethiprole



1,2,5,6-tetrahydropyrrolo[3,2,1-*ij*]quinolin-4-one

$C_{11}H_{11}NO$ MW: 217.2 CAS No.: 57369-21-1

Fig. 1-5 Chemical structure of pyroquilon



2',6'-dibromo-2-methyl-4'-trifluoromethoxy-4-trifluoromethyl-1,3-thiazole-5-carboxanilide

$C_{13}H_6Br_2F_6N_2O_2S$ MW: 528.1 CAS No.: 130000-40-7

Fig. 1-6 Chemical structure of thifluzamide

2 実験方法

2.1 試料

稲わら及び籾米はそれぞれ 1 mm の網ふるいを通すまで粉碎した。稲発酵粗飼料（以下「WCS」という。）は 60 °C で 5 時間乾燥し、更に室内に静置して風乾した後、同様に粉碎した。

2.2 試薬

1) アセトン、酢酸エチル及びトルエンは残留農薬試験用を用いた。アセトニトリルは抽出及び精製操作には残留農薬試験用を、溶離液には液体クロマトグラフ用を用いた。酢酸アンモニウムは特級を用いた。水は超純水（JIS K 0211 に定める 5218 の超純水）を用いた。

2) 各農薬標準品

カルプロパミド、クロラントラニプロール、クロマフェノジド、エチプロール、ピロキロン及びチフルザミドの標準品は、Table 2 に示した供給業者、純度のものを用いた。

3) 各農薬標準原液

農薬標準品各 50 mg を正確に量ってそれぞれ 100 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。）。

4) 農薬混合標準液

6 成分の農薬標準原液各 2 mL を 100 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 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 中に各農薬として 0.5, 0.1, 2.5, 5, 7.5, 10, 25 及び 50 ng を含有する各農薬混合標準液を調製した。

Table 2 Pesticide standards used in this study

Pesticides	Manufacturers	Purity (%)
Carpropamide	Kanto Chemical	98
Chlorantraniliprole	Dr. Ehrenstorfer	99.5
Chromafenozide	Kanto Chemical	99
Ethiprole	Dr. Ehrenstorfer	97.5
Pyroquilon	Wako Pure Chemical Industries	98.0
Thifluzamide	Wako Pure Chemical Industries	99.0

2.3 装置及び器具

- 1) 粉碎機：ZM-100 Retsch 製（1 mm スクリーン、回転数 14000 rpm）
- 2) 乾牧草用粉碎機：SM-100 Retsch 製（1 mm スクリーン、回転数 1430 rpm）
- 3) オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム：InertSep Slim-J C18-B（充てん剤量 500 mg）
ジーエルサイエンス製にリザーバーを連結したもの
- 4) 多孔性ケイソウ土カラム：Chem Elut（5 mL 保持用）Agilent Technologies 製
- 5) グラファイトカーボン／アミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム：ENVI-

Carb/LC-NH₂ (充てん剤量 500 mg/500 mg) Supelco 製

6) LC-MS/MS :

LC 部 : ACQUITY UPLC System Waters 製

MS 部 : Quattro Premier XE Waters 製

2.4 定量方法

1) 抽出

分析試料 10.0 g を量って 300 mL の共栓三角フラスコに入れ、水 30 mL (粃米は 20 mL) を加えて、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 (300 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 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 I に供する試料溶液とした。

2) カラム処理 I

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 (吸引マニホールドを使用して流速 1 mL/min とした。以下すべてのカラム処理において同様の操作を行った。)。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) 9 mL をミニカラムに加え、各農薬を溶出させた。更に全量フラスコの標線まで同溶媒を加えた。この液 5 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 2 mL まで減圧濃縮した後、水 2 mL を加えてカラム処理 II に供する試料溶液とした。

3) カラム処理 II

試料溶液を多孔性ケイソウ土カラムに入れ、10 分間静置した。100 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 4 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各農薬を溶出させた。更に同溶媒 10 mL をカラムに加えて同様に溶出させ、溶出液を 40 °C 以下の水浴で約 1 mL まで減圧濃縮し、窒素ガスを送って乾固した。アセトニトリル-トルエン (3+1) 5 mL を加えて残留物を溶かし、カラム処理 III に供する試料溶液とした。

4) カラム処理 III

グラファイトカーボン/アミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラムをアセトニトリル-トルエン (3+1) 10 mL で洗浄した。100 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き、試料溶液をミニカラムに入れ、液面が充てん剤の上端に達するまで流下して各農薬を流出させた。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-トルエン (3+1) 5 mL ずつで 3 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。更にアセトニトリル-トルエン (3+1) 5 mL をミニカラムに加えて同様に流出させた。流出液を 40 °C 以下の水浴で約 1 mL まで減圧濃縮し、窒素ガスを送って乾固した。

アセトニトリル-水 (3+2) 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、上澄み液の一定量を同溶媒で正確に 10 倍希釈して LC-MS/MS による測定に供する試料

溶液とした。また、試料が稲わらである場合は、先の遠心分離した後の上澄み液をクロラントラニプロールの定量に用いるための LC-MS/MS による測定に供する試料溶液とした。

5) LC-MS/MS による測定

試料溶液及び各農薬混合標準液各 5 μ L を LC-MS/MS に注入し、選択反応検出 (SRM) クロマトグラムを得た。測定条件を Table 3 及び 4 に示した。

Table 3 Operating conditions of LC-MS/MS

Column	Inertsil ODS-SP (2.1 mm i.d.×150 mm, 5 μ m), GL Sciences
Mobile phase	2 mmol/L Ammonium acetate solution - acetonitrile (4:1) → 15 min → (1:9) (hold for 5 min)→ (4:1) (hold for 5 min)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temperature	40 °C
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Ion source temperature	120 °C
Desolvation gas	N ₂ , 450 °C, 600 L/h
Cone gas	N ₂ , 50 L/h
Capillary voltage	Positive: 2.0 kV, Negative: 1.0 kV

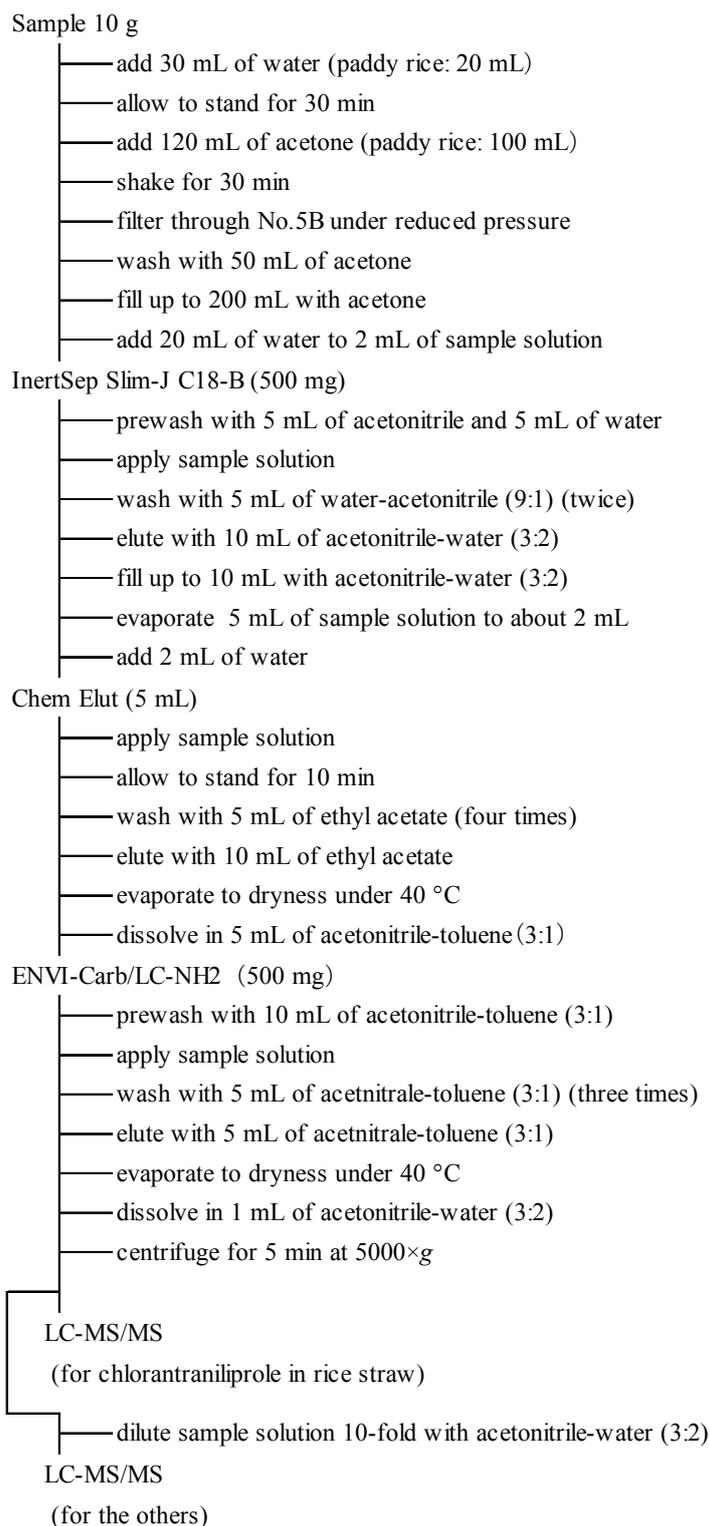
Table 4 MS/MS parameters

Target	Mode	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion (<i>m/z</i>)	Qualifier ion (<i>m/z</i>)	Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
Carpropamide	+	334	139		30	20
				103		30
Chlorantraniliprole	+	482	284		25	15
				112		25
Chromafenozide	+	395	175		15	15
				91		15
Ethiprole	-	395	330		20	15
				250		20
Pyroquilon	+	174	132		45	20
				117		45
Thifluzamide	-	527	125		25	45
				166		25

6) 計 算

得られた SRM クロマトグラムからピーク面積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 the 6 pesticides in rice straw, whole-crop rice silage and paddy rice for feed

3 結果及び考察

3.1 検量線

2.2 の 4)に従って調製した各農薬混合標準液各 5 μL を LC-MS/MS に注入し、得られた SRM ク

ロマトグラムからピーク面積を用いて検量線を作成した。得られた検量線の一例は、Fig. 2 のとおりであり、0.5~50 ng/mL 相当量（注入量として 0.0025~0.25 ng 相当量）の範囲で直線性を示した。

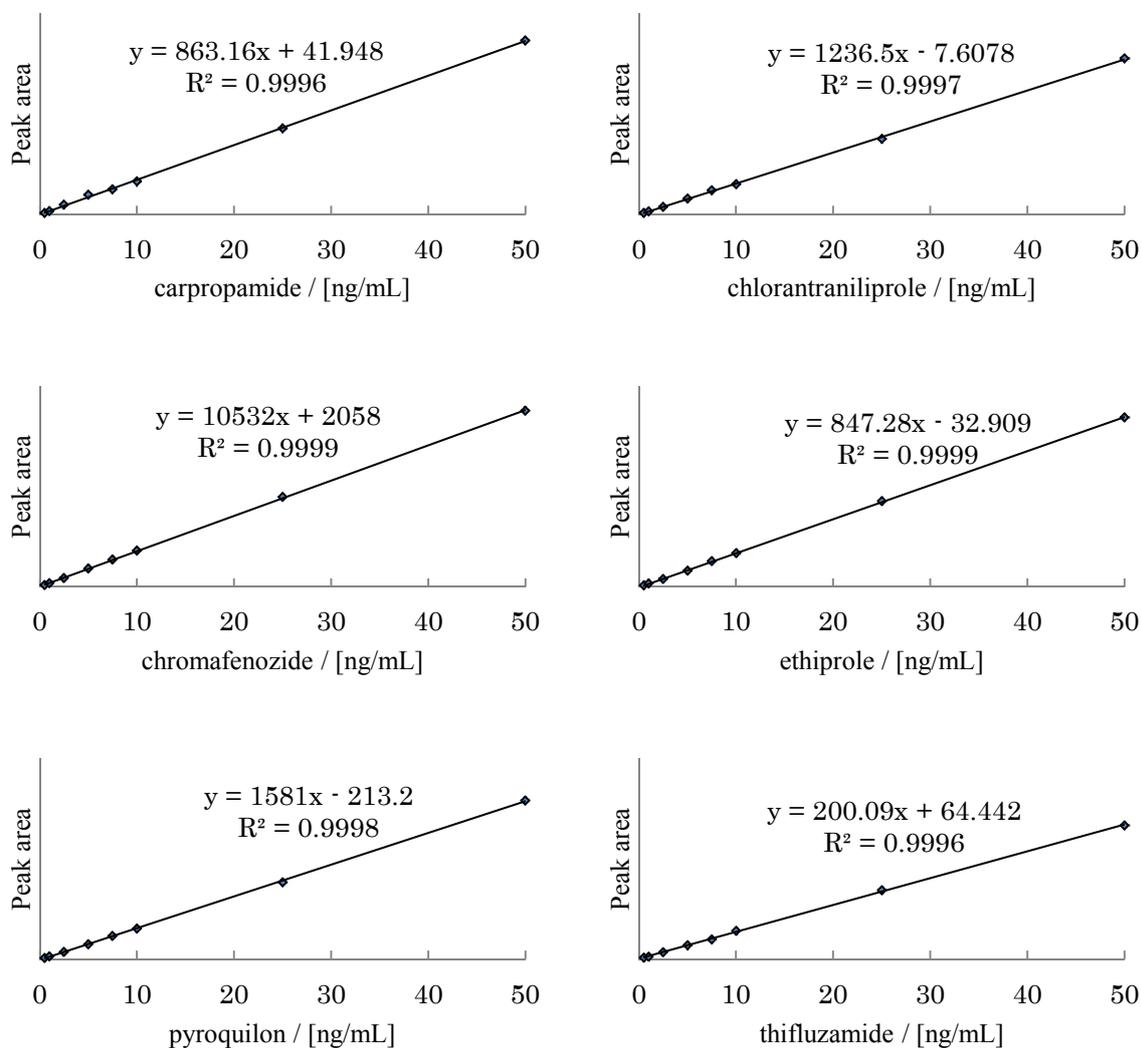


Fig. 2 Calibration curves of six pesticides (carpropamide, chlorantraniliprole, chromafenozide, ethiprole, pyroquilon and thifluzamide)

3.2 抽出液の希釈操作について

稲わら中のクロラントラニプロールについては、指導基準値が 0.1 mg/kg（最終試料溶液中 0.5 ng/mL）と定められている。JFRL 法は、アセトン抽出後 200 mL に定容し、更に 10 倍希釈を行うが、定量下限が指導基準値と同じ 0.1 mg/kg であることから、より低い濃度まで定量下限を下げる必要がある。そのため、抽出液の 10 倍希釈は行わないこととして以後の検討を行った。また、これに合わせて、WCS 及び籾米中のクロラントラニプロール並びに飼料用イネ中のクロラントラニプロール以外の 5 成分の定量においてもアセトン抽出後に 10 倍希釈を行わず、カラム処理 III で得られる試料溶液を 10 倍希釈することとして以後の検討を行った。

3.3 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の確認

稲わら及び籾米を用い、2.4 の 1)に従って調製した試料溶液に各農薬として最終試料溶液中で 8 ng/mL 相当量を添加し、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。分画したオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム溶出液は、それぞれ 2.4 の 3)及び 4)の精製を行った後定量に供した。その結果は Table 5-1 及び Table 5-2 のとおりであり、いずれの試料においても洗浄溶媒である水-アセトニトリル (9+1) 10 mL の画分では農薬の溶出は見られず、溶出溶媒であるアセトニトリル-水 (3+2) 0~9 mL の画分にすべての農薬が溶出し、その後の 9~20 mL の画分には溶出しなかった。

JFRL 法では、溶出溶媒であるアセトニトリル-水 (3+2) 10 mL で各農薬を溶出させているが、溶出液を 10 mL の全量フラスコで受けるため、標線を超えるおそれがある。そのため、溶出溶媒量を少なくできないか検討したところ、上記のとおりアセトニトリル-水 (3+2) 9 mL ですべての農薬の溶出が確認されたことから、JFRL 法を一部変更して、アセトニトリル-水 (3+2) 9 mL をオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムに加えて各農薬を溶出させ、更にアセトニトリル-水 (3+2) で 10 mL に定容させることとした。

Table 5-1 Elution patterns of 6 pesticides from InertSep Slim-J C18-B (rice straw)

Pesticides	Recovery ^{a)} (%)			Total
	Water - acetonitrile			
	(9:1) 10 mL	(2:3) 0~9 mL	(2:3) 9~20 mL	
Carpropamide	0	96	0	96
Chlorantraniliprole	0	88	0	88
Chromafenozide	0	90	0	90
Ethiprole	0	93	0	93
Pyroquilon	0	90	0	90
Thifluzamide	0	88	0	88

a) Mean ($n=2$)

Table 5-2 Elution patterns of 6 pesticides from InertSep Slim-J C18-B (paddy rice)

Pesticides	Recovery ^{a)} (%)			Total
	Water - acetonitrile			
	(9:1) 10 mL	(2:3) 0~9 mL	(2:3) 9~20 mL	
Carpropamide	0	97	0	97
Chlorantraniliprole	0	86	0	86
Chromafenozide	0	88	0	88
Ethiprole	0	95	0	95
Pyroquilon	0	91	0	91
Thifluzamide	0	85	0	85

a) Mean ($n=2$)

3.4 多孔性ケイソウ土カラムからの溶出画分の確認

稲わら及び籾米を用い、2.4 の 1)及び 2)に従って調製した試料溶液に各農薬として最終試料溶液中で 10 ng/mL 相当量を添加し、多孔性ケイソウ土カラムからの溶出画分を確認した。分画した多孔性ケイソウ土カラムからの溶出液は、それぞれ 2.4 の 4)の精製を行った後定量に供した。その結果は Table 6-1 及び Table 6-2 に示したとおり、JFRL 法と同様にいずれも酢酸エチル 0~30 mL の画分にすべての農薬が溶出し、30~35 mL の画分には溶出しなかった。

Table 6-1 Elution patterns of 6 pesticides from Chem Elut (rice straw)

Pesticides	Recovery ^{a)} (%)			Total
	Ethyl acetate			
	0~20 mL	20~30 mL	30~35 mL	
Carpropamide	97	0	0	97
Chlorantraniliprole	90	0	0	90
Chromafenozide	93	0	0	93
Ethiprole	98	0	0	98
Pyroquilon	91	0	0	91
Thifluzamide	98	0	0	98

a) $n=1$

Table 6-2 Elution patterns of 6 pesticides from Chem Elut (paddy rice)

Pesticides	Recovery ^{a)} (%)			Total
	Ethyl acetate			
	0~20 mL	20~30 mL	30~35 mL	
Carpropamide	92	4	0	96
Chlorantraniliprole	90	2	0	92
Chromafenozide	91	3	0	94
Ethiprole	99	2	0	101
Pyroquilon	87	0	0	87
Thifluzamide	96	3	0	99

a) $n=1$

3.5 グラファイトカーボン／アミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラムからの流出画分の確認

稲わら及び籾米を用い、2.4 の 1), 2)及び 3)に従って調製した試料溶液に各農薬として最終試料溶液中で 10 ng/mL 相当量を添加し、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からの流出画分を確認した。その結果は Table 7-1 及び Table 7-2 に示したとおり、いずれもアセトニトリルルートルエン (3+1) 0~20 mL の画分にすべての農薬が流出し、20~45 mL の画分には流出しなかった。

JFRL 法では、アセトニトリルルートルエン (3+1) 15 mL で各農薬を流出させているが、JFRL 法の対象ではなく今回の検討に加えたクロラントラニプロールは、15~20 mL の画分にも流出が認められた。そこで、JFRL 法を一部変更して、アセトニトリルルートルエン (3+1) 20 mL で農

薬成分を流出させることとした。

Table 7-1 Elution patterns of 6 pesticides from ENVI-Carb/LC-NH₂ (rice straw)

Pesticides	Recovery ^{a)} (%)			Total
	Acetonitrile - toluene (3:1)			
	0~15 mL	15~20 mL	20~45 mL	
Carpropamide	92	0	0	92
Chlorantraniliprole	98	2	0	100
Chromafenozide	97	0	0	97
Ethiprole	99	0	0	99
Pyroquilon	90	0	0	90
Thifluzamide	101	0	0	101

a) $n=1$

Table 7-2 Elution patterns of 6 pesticides from ENVI-Carb/LC-NH₂ (paddy rice)

Pesticides	Recovery ^{a)} (%)			Total
	Acetonitrile - toluene (3:1)			
	0~15 mL	15~20 mL	20~45 mL	
Carpropamide	94	0	0	94
Chlorantraniliprole	92	4	0	96
Chromafenozide	96	0	0	96
Ethiprole	98	0	0	98
Pyroquilon	86	0	0	86
Thifluzamide	100	0	0	100

a) $n=1$

3.6 マトリックス効果の確認

2.4 の 1), 2), 3)及び 4)により調製した稲わら, WCS 及び籾米のブランク試料溶液に各農薬として 1 mg/kg 相当量 (稲わら中のクロラントラニプロールは 0.1 mg/kg 相当量) (最終試料溶液中で 5 ng/mL 相当量) をそれぞれ添加した各マトリックス標準液について, 2.2 の 4)に従って調製した同濃度の各農薬標準液に対するピーク面積比を確認したところ, ピーク面積比は 90~113 %であり, 各農薬は試料マトリックスによる大きな影響を受けることなく測定可能であった。

3.7 妨害物質の検討

稲わら 1 検体, WCS 1 検体及び籾米 1 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 SRM 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。

なお, 妨害物質の検討で得られた SRM クロマトグラムを Fig. 3 に示した。

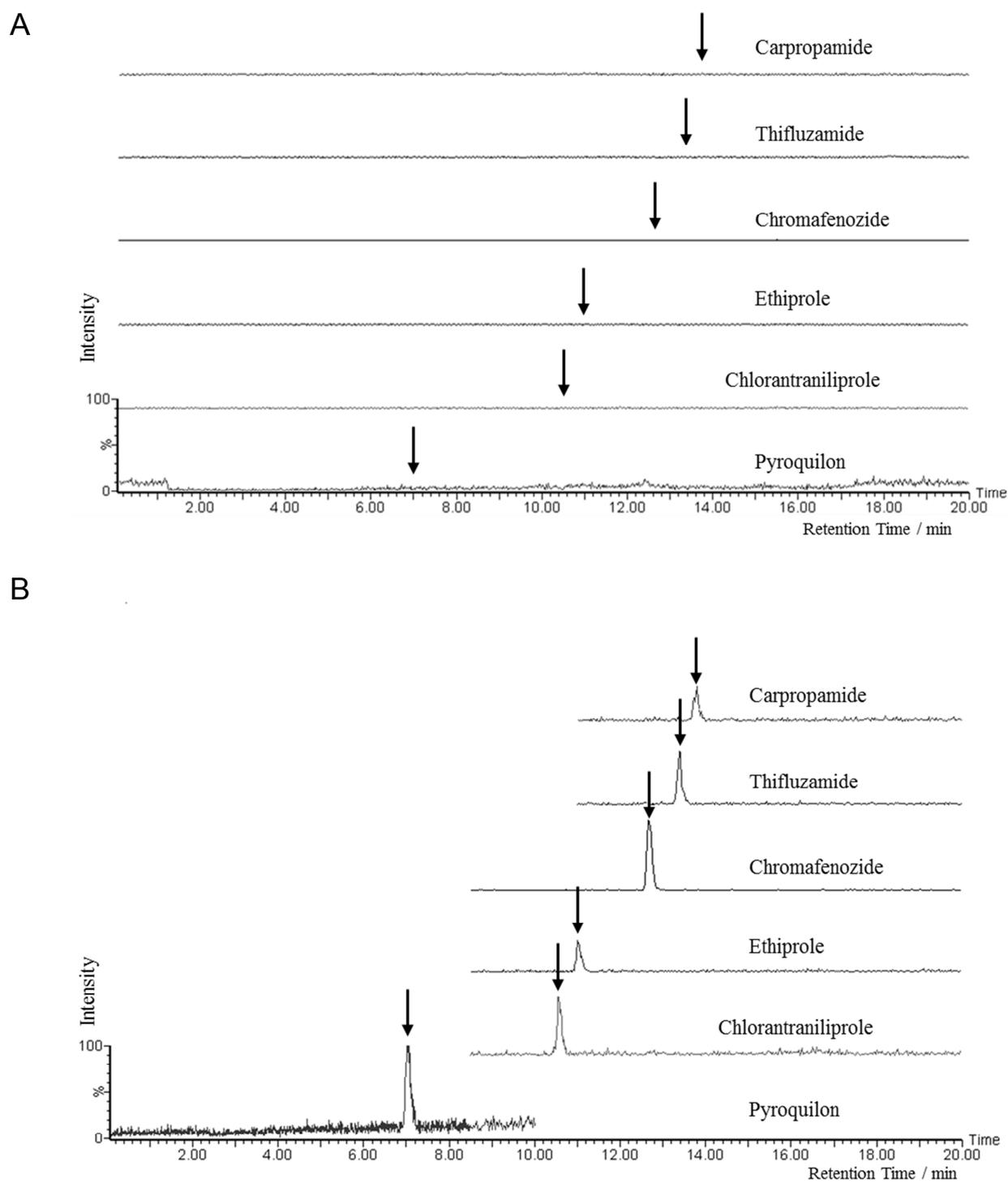


Fig. 3 SRM chromatograms of rice straw (blank) and standard solution (Arrows indicate the retention times of pesticides. Scales of y-axis are the same between A and B for each pesticide.)

A: Rice straw

B: Standard solution (0.5 ng/mL: 2.5 pg as each pesticide)

3.8 添加回収試験

2.1 により調製した飼料用イネについて、カルプロパミドとして、稲わらに 3.0 及び 0.1 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 15 及び 0.5 ng/mL）、WCS に原物換算して 0.89 及び 0.044 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 10 及び 0.5 ng/mL）、粃米に 1.0 及び 0.1 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 5 及び 0.5 ng/mL）、クロラントラニリプロールとして、稲わらに 0.1 及び 0.01 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 5 及び 0.5 ng/mL）、WCS に原物換算して 1.3 及び 0.044 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 15 及び 0.5 ng/mL）、粃米に 1.0 及び 0.1 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 5 及び 0.5 ng/mL）、クロマフェノジドとして、稲わらに 5.0 及び 0.1 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 25 及び 0.5 ng/mL）、WCS に原物換算して 1.3 及び 0.044 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 15 及び 0.5 ng/mL）、粃米に 3.0 及び 0.1 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 15 及び 0.5 ng/mL）、エチプロールとして、稲わらに 3.0 及び 0.1 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 15 及び 0.5 ng/mL）、WCS に原物換算して 1.3 及び 0.044 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 15 及び 0.5 ng/mL）、粃米に 1.0 及び 0.1 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 5 及び 0.5 ng/mL）、ピロキロンとして、稲わらに 3.0 及び 0.1 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 15 及び 0.5 ng/mL）、WCS に原物換算して 0.89 及び 0.044 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 10 及び 0.5 ng/mL）、粃米に 1.0 及び 0.1 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 5 及び 0.5 ng/mL）、チフルザミドとして、稲わらに 1.0 及び 0.1 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 5 及び 0.5 ng/mL）、WCS に原物換算して 1.3 及び 0.044 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 15 及び 0.5 ng/mL）、粃米に 1.0 及び 0.1 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 5 及び 0.5 ng/mL）それぞれ添加し、本法に従って添加回収試験を実施し、平均回収率及び繰返し精度を求めた。

また、WCS については原物の水分含有量を 60 %と想定し、原物中濃度への換算は、原物（水分含有量 60 %）中濃度 = 風乾物（水分含有量 10 %）中濃度 / 2.25 の式から求めた。

その結果は Table 8 のとおり、カルプロパミドについては平均回収率は 83.3~105 %、その繰返し精度は RSD_r として 12 %以下、クロラントラニリプロールについては平均回収率は 93.5~103 %、その繰返し精度は RSD_r として 10 %以下、クロマフェノジドについては平均回収率は 85.9~105 %、その繰返し精度は RSD_r として 11 %以下、エチプロールについては平均回収率は 83.5~94.6 %、その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD_r) として 16 %以下、ピロキロンについては平均回収率は 79.4~103 %、その繰返し精度は RSD_r として 13 %以下、チフルザミドについては平均回収率は 85.2~119 %、その繰返し精度は RSD_r として 20 %以下の成績が得られた。

なお、得られた SRM クロマトグラムの一例を Fig. 4 に示した。

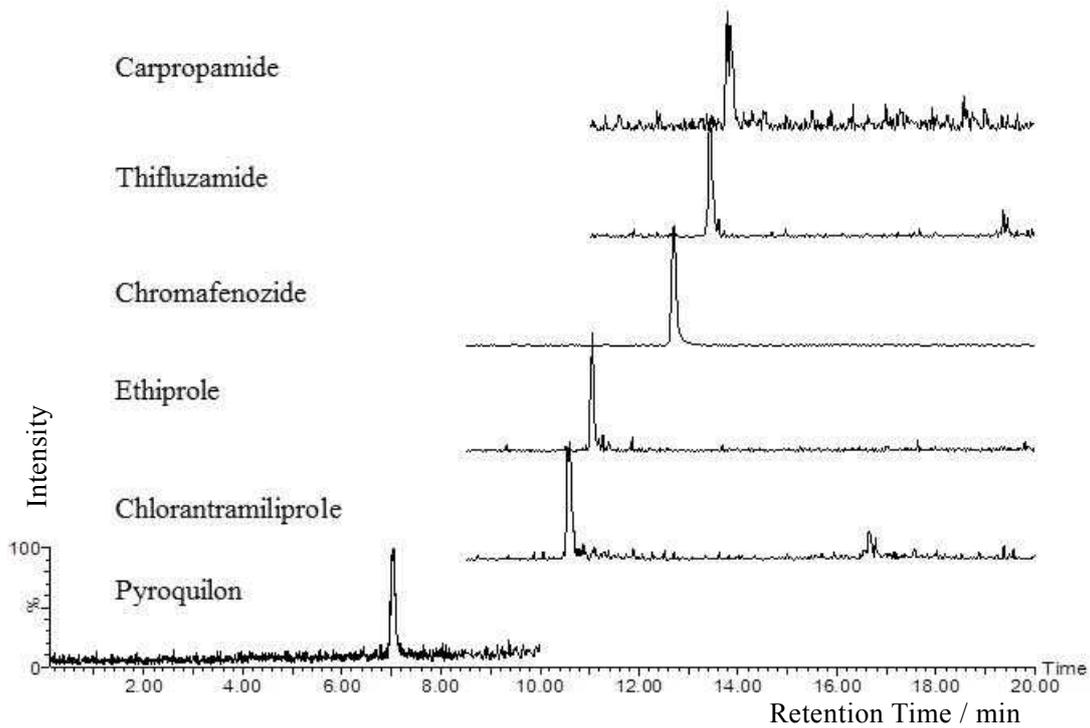
Table 8 Recoveries of pesticides

Pesticides	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)} (%)
Carpropamide	3.0	83.3	3.7	-	-	-	-
	1.0	-	-	-	-	91.8	6.6
	0.89	-	-	89.9	4.3	-	-
	0.1	100	12	-	-	102	9.2
	0.044	-	-	105	3.5	-	-
Chlorantraniliprole	1.3	-	-	93.5	5.6	-	-
	1.0	-	-	-	-	103	2.9
	0.1	95.5	2.8	-	-	103	10
	0.044	-	-	98.3	4.2	-	-
	0.01	96.8	10	-	-	-	-
Chromafenozide	5.0	85.9	1.5	-	-	-	-
	3.0	-	-	-	-	92.7	1.1
	1.3	-	-	97.4	2.7	-	-
	0.1	105	11	-	-	101	1.6
	0.044	-	-	99.9	2.8	-	-
Ethiprole	3.0	90.4	5.0	-	-	-	-
	1.3	-	-	86.5	2.2	-	-
	1.0	-	-	-	-	94.6	4.3
	0.1	83.5	16	-	-	86.7	10
	0.044	-	-	88.8	12	-	-
Pyroquilon	3.0	79.4	13	-	-	-	-
	1.0	-	-	-	-	88.7	12
	0.89	-	-	97.4	3.7	-	-
	0.1	103	9.9	-	-	102	5.5
	0.044	-	-	103	3.8	-	-
Thifluzamide	1.3	-	-	119	6.6	-	-
	1.0	85.2	6.7	-	-	92.3	4.6
	0.1	87.8	20	-	-	90.8	11
	0.044	-	-	98.2	3.6	-	-

a) Mean ($n = 3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

A



B

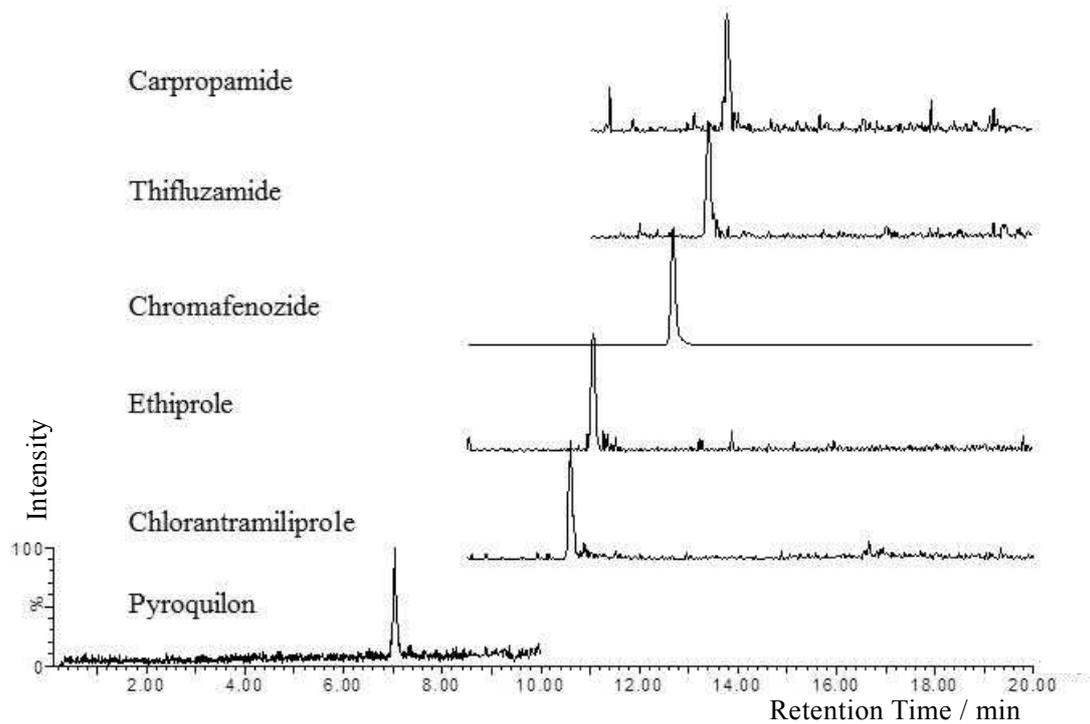


Fig. 4 SRM chromatograms of 6 pesticides

(The highest intensity peak is shown as 100 % in each segment.)

A: Standard solution (The concentration is 0.5 ng/mL for all pesticides.)

B: Sample solution of barley (spiked at 0.1 mg/kg of all pesticides)

3.9 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、2.1 に従って調製した飼料用イネを試料として各農薬を添加し、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。

クロラントラニリプロールについては、得られたピークの SN 比が 10 以上となる濃度は、稲わらで 0.01 mg/kg, WCS (風乾物) 及び粃米で 0.1 mg/kg であった。カルプロパミド, クロマフェノジド, エチプロール, ピロキロン及びチフルザミドについては、得られたピークの SN 比が 10 以上となる濃度は、稲わら、WCS (風乾物) 及び粃米で 0.1 mg/kg であった。

以上の結果から、本法のクロラントラニリプロールの定量下限は試料 (WCS は風乾物) 中で 0.1 mg/kg (稲わら 0.01 mg/kg), 検出下限は試料 (WCS は風乾物) 中で 0.03 mg/kg (稲わら 0.003 mg/kg), カルプロパミド, クロマフェノジド, エチプロール, ピロキロン及びチフルザミドの定量下限は試料 (WCS は風乾物) 中で 0.1 mg/kg, 検出下限は試料 (WCS は風乾物) 中で 0.03 mg/kg であった。

3.10 共同試験

本法の室間再現精度を確認するため、濃度非通知, かつ非明示の 2 点反復で共通試料による共同試験を実施した。

共通試料としては、稲わら及び粃米に各農薬として 1 mg/kg 相当量 (分析用試料 10 g に対して 1 mL 中に 1 μ g を含有する標準液 1 mL 添加) (稲わら中のクロラントラニリプロールは 0.1 mg/kg 相当量) を、各試験室にて分析開始の前日に添加して調製した試料を用いた。参加試験室は、全国農業協同組合連合会飼料畜産中央研究所, 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) であった。結果の解析については、国際的にハーモナイズされた共同試験に関する手順^{4), 5)}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、外れ値の有無を確認した上で平均回収率, 繰返し精度 (RSD_r) 及び室間再現精度 (RSD_R) を算出し、得られた RSD_R から、修正 Horwitz 式⁶⁾を用いて HorRat を求めた。

結果は Table 9-1~9-6 のとおりであった。稲わら及び粃米について、カルプロパミドの平均回収率は 91.7 及び 97.0 %, RSD_r は 3.5 及び 4.0 %, RSD_R は 4.6 及び 4.3 %, HorRat は 0.28 及び 0.27, クロラントラニリプロールの平均回収率は 75.8 及び 95.6 %, RSD_r は 11 及び 7.3 %, RSD_R は 25 及び 9.4 %, HorRat は 1.2 及び 0.58, クロマフェノジドの平均回収率は 94.8 及び 101 %, RSD_r は 8.1 及び 1.9 %, RSD_R は 8.1 及び 4.3 %, HorRat は 0.50 及び 0.27, エチプロールの平均回収率は 92.5 及び 98.5 %, RSD_r は 5.0 及び 4.8 %, RSD_R は 6.0 及び 8.0 %, HorRat は 0.37 及び 0.50, ピロキシロンの平均回収率は 90.8 及び 94.2 %, RSD_r は 4.4 及び 3.8 %, RSD_R は 6.3 及び 5.8 %, HorRat は 0.39 及び 0.36, チフルザミドの平均回収率は 92.6 及び 99.2 %, RSD_r は 5.4 及び 3.5 %, RSD_R は 6.4 及び 5.1 %, HorRat は 0.40 及び 0.32 であった。得られた HorRat について、0.50 を下回っているものが散見されたが、分析法操作が比較的簡便であることによるものと思われた。

参考のため、各試験室で使用した LC-MS/MS の機種等を Table 10 に示した。

Table 9-1 Collaborative study results of carpropamide

Lab.No.	Feed types			
	Rice straw		Paddy rice	
	(mg/kg)		(mg/kg)	
1	0.940	0.857	0.884	0.999
2	0.875	0.869	0.947	0.927
3	0.862	0.902	0.969	0.966
4	0.949	0.974	1.03	1.02
5	0.925	0.910	0.947	0.990
6	0.932	0.860	0.930	0.975
7	0.977	0.931	0.914	0.994
8	0.956	0.951	1.01	1.01
Spiked level (mg/kg)	1		1	
Mean value ^{a)} (mg/kg)	0.917		0.970	
Recovery ^{a)} (%)	91.7		97.0	
RSD _r ^{b)} (%)	3.5		4.0	
RSD _R ^{c)} (%)	4.6		4.3	
PRSD _R ^{d)} (%)	16		16	
HorRat	0.28		0.27	

a) Rice straw: $n=16$; Paddy rice: $n=16$

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 9-2 Collaborative study results of chlorantraniliprole

Lab.No.	Feed types			
	Rice straw (mg/kg)		Paddy rice (mg/kg)	
1	0.111	0.0872	1.02	1.02
2	0.0589	0.0527	0.867	0.873
3	0.0644	0.0681	0.874	0.795
4	0.0582	0.0558	1.01	1.02
5	0.0980	0.0850	1.08	0.847
6	0.0745	0.0679	0.863	0.958
7	0.0930	0.107	1.07	0.980
8	0.0655	0.0650	1.02	0.994
Spiked level (mg/kg)	0.1		1	
Mean value ^{a)} (mg/kg)	0.0758		0.956	
Recovery ^{a)} (%)	75.8		95.6	
RSD _r ^{b)} (%)	11		7.3	
RSD _R ^{c)} (%)	25		9.4	
PRSD _R ^{d)} (%)	22		16	
HorRat	1.2		0.58	

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 9-3 Collaborative study results of chromafenozide

Lab.No.	Feed types			
	Rice straw		Paddy rice	
	(mg/kg)		(mg/kg)	
1	0.956	0.971	1.09	1.06
2	0.912	0.909	0.996	0.990
3	0.914	0.963	1.05	1.00
4	0.984	0.967	1.04	1.04
5	0.877	1.14	0.947	0.970
6	0.965	0.815	0.931	0.975
7	0.952	0.964	1.01	1.01
8	0.926	0.947	1.01	0.999
Spiked level (mg/kg)	1		1	
Mean value ^{a)} (mg/kg)	0.948		1.01	
Recovery ^{a)} (%)	94.8		101	
RSD _r ^{b)} (%)	8.1		1.9	
RSD _R ^{c)} (%)	8.1		4.3	
PRSD _R ^{d)} (%)	16.0		16	
HorRat	0.50		0.27	

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 9-4 Collaborative study results of ethiprole

Lab.No.	Feed types			
	Rice straw (mg/kg)		Paddy rice (mg/kg)	
1	0.906	0.900	1.05	0.933
2	0.903	0.925	0.962	0.972
3	0.875	0.926	0.946	0.985
4	1.01	0.991	0.989	1.02
5	0.909	0.853	1.01	0.876
6	0.950	0.802	0.856	0.896
7	0.924	0.995	1.13	1.12
8	0.964	0.970	0.997	1.01
Spiked level (mg/kg)	1		1	
Mean value ^{a)} (mg/kg)	0.925		0.985	
Recovery ^{a)} (%)	92.5		98.5	
RSD _r ^{b)} (%)	5.0		4.8	
RSD _R ^{c)} (%)	6.0		8.0	
PRSD _R ^{d)} (%)	16		16	
HorRat	0.37		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 9-5 Collaborative study results of pyroquilon

Lab.No.	Feed types			
	Rice straw		Paddy rice	
	(mg/kg)		(mg/kg)	
1	0.959	0.952	1.01	0.977
2	0.897	0.895	0.931	0.926
3	0.817	0.896	0.898	0.903
4	0.865	0.823	0.897	0.813
5	0.951	0.930	0.979	0.879
6	0.925	0.800	0.939	0.986
7	0.913	0.952	0.978	0.967
8	0.975	0.974	1.00	0.985
Spiked level (mg/kg)	1		1	
Mean value ^{a)} (mg/kg)	0.908		0.942	
Recovery ^{a)} (%)	90.8		94.2	
RSD _r ^{b)} (%)	4.4		3.8	
RSD _R ^{c)} (%)	6.3		5.8	
PRSD _R ^{d)} (%)	16		16	
HorRat	0.39		0.36	

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 9-6 Collaborative study results of thifluzamide

Lab.No.	Feed types			
	Rice straw (mg/kg)		Paddy rice (mg/kg)	
1	0.925	0.987	1.06	1.04
2	0.950	0.914	0.981	1.01
3	0.884	0.923	0.955	0.933
4	0.998	1.00	1.02	1.07
5	0.892	0.871	1.04	0.997
6	0.951	0.782	0.890	0.992
7	0.946	1.01	0.974	1.02
8	0.885	0.897	0.959	0.934
Spiked level (mg/kg)	1		1	
Mean value ^{a)} (mg/kg)	0.926		0.992	
Recovery ^{a)} (%)	92.6		99.2	
RSD _r ^{b)} (%)	5.4		3.5	
RSD _R ^{c)} (%)	6.4		5.1	
PRSD _R ^{d)} (%)	16		16	
HorRat	0.40		0.32	

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	LC: ACQUITY UPLC, Waters	Inertsil ODS-SP, GL Sciences
	MS/MS: Quattro premier XE, Waters	(2.1 mm×150 mm, 5 μm)
2	LC: LC-30AD, Shimadzu	ZORBAX Eclipse XDB-C18,
	MS/MS: LCMS-8040, Shimadzu	Agilent Technologies (2.1 mm×150 mm, 3.5 μm)
3	LC: 1200, Agilent Technologies	ZORBAX Eclipse XDB-C18,
	MS/MS: 6410 Triple Quad LC/MS Agilent Technologies	Agilent Technologies (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
4	LC: ACQUITY UPLC, Waters	ZORBAX Eclipse XDB-C18,
	MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	Agilent Technologies (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
5	LC: ACQUITY UPLC, Waters	Inertsil ODS-SP, GL Sciences
	MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	(2.1 mm×150 mm, 5 μm)
6	LC: ACQUITY UPLC, Waters	ZORBAX Eclipse XDB-C18,
	MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	Agilent Technologies (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
7	LC: ACQUITY UPLC, Waters	ACQUITY UPLC BEH C18, Waters
	MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	(2.1 mm×150 mm, 1.7 μm)
8	LC: 1200, Agilent Technologies	Mightysil RP-18 GP,
	MS/MS: Xevo TQ-S MS, Waters	Kanto Chemical) (2.0 mm×150 mm, 5 μm)
9	LC: ACQUITY UPLC, Waters	ZORBAX Eclipse XDB-C18,
	MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	Agilent Technologies (2.1 mm ×150 mm, 5 μm)

4 まとめ

飼料用イネに残留する農薬 6 成分について、JFRL 法を基に、LC-MS/MS を用いた定量法の飼料分析基準への適用の可否について検討したところ、抽出試料溶液を 10 倍希釈する方法からカラム処理試料溶液を 10 倍希釈する方法（稲わら中のクロラントラニリプロールについては、抽出試料溶液及びカラム処理試料溶液の 10 倍希釈を実施しない方法）へ変更し、カラム処理 I における溶出溶媒量を 10 mL から 9 mL に変更し、カラム処理 III における溶出溶媒量を 15 mL から 20 mL に変更することで、以下の結果が得られ、適用が可能であると考えられた。

1) 各農薬の検量線は、0.5～50 ng/mL（注入量として 0.0025～0.25 ng 相当量）の範囲で直線性を示した。

なお、当該検量線における各マトリックスの添加回収試験の設定濃度は、稲わら、WCS 及び粳米に、各農薬として 0.5 ng/mL 相当濃度、稲わらに、クロラントラニリプロール及びチフルザミドとして 5 ng/mL 相当濃度、クロマフェノジドとして 25 ng/mL 相当濃度、その他 3 農薬として 15 ng/mL 相当濃度、WCS に、カルプロパミド及びピロキロンとして 10 ng/mL 相当濃度、その他の 4 農薬として 15 ng/mL 相当濃度、粳米に、クロマフェノジドとして 15 ng/mL 相当濃度、

その他の 5 農薬として 5 ng/mL 相当濃度とした。

- 2) 本法に従い得られる試料溶液についてマトリックス効果を確認した結果、各農薬は試料マトリックスによる大きな影響を受けることなく測定可能であった。
- 3) 飼料用イネについて、本法に従って得られた SRM 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。
- 4) 1 種類の稲わら及び粃米について、試料共存下での農薬標準品の多孔性ケイソウ土カラムの溶出率を確認したところ、洗浄溶媒と溶出溶媒を合わせた 30 mL で全ての農薬成分が溶出した。
- 5) 飼料用イネを用いて、本法に従って添加回収試験を実施したところ、良好な回収率及び繰返し精度が得られた。
- 6) 本法のクロラントラニプロールの定量下限は試料 (WCS は風乾物) 中で 0.1 mg/kg (稲わら 0.01 mg/kg) , 検出下限は試料 (WCS は風乾物) 中で 0.03 mg/kg (稲わら 0.003 mg/kg) , カルプロパミド, クロマフェノジド, エチプロール, ピロキロン及びチフルザミドの定量下限は試料 (WCS は風乾物) 中で 0.1 mg/kg, 検出下限は試料 (WCS は風乾物) 中で 0.03 mg/kg であった。
- 7) 稲わら及び粃米に各農薬成分としてそれぞれ 1 mg/kg 相当量 (稲わら中のクロラントラニプロールは 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、良好な結果が得られた。

謝 辞

共同試験に参加していただいた全国農業協同組合連合会飼料畜産中央研究所, 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) 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 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 (2008).
- 4) Horwitz, W., Protocol for Design, Conduct and Interpretation of Method - Performance Studies, Pure & Appl. Chem., 67(2), 331-343 (1995).
- 5) AOAC Int. (2012) Appendix D: Guidelines for Collaborative Study Procedures to Validate Characteristics of a Method of Analysis. In Official Methods of Analysis of AOAC Int. 19 ed. volume II, Gaithersburg, MD, USA.
- 6) Thompson, M., Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria proficiency testing, Analyst, 125, 385-386 (2000).