

## 5 大豆及び大豆油かす中のジカンバ及びDCSAの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による定量法

小塚 健志<sup>\*1</sup>, 新井 詠子<sup>\*2</sup>, 伊藤 千晶<sup>\*1</sup>, 高橋 亜紀子<sup>\*1</sup>

### Determination of Dicamba and DCSA in Soybean and Soybean Meal by LC-MS/MS

Kenji KOZUKA<sup>\*1</sup>, Eiko ARAI<sup>\*2</sup>, Chiaki ITO<sup>\*1</sup> and Akiko TAKAHASHI<sup>\*1</sup>

<sup>\*1</sup> Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department

<sup>\*2</sup> Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department  
(Now Sendai Regional Center))

An analytical method was developed to simultaneously determine the levels of dicamba and 3,6-dichloro-2-hydroxybenzoic acid (DCSA) in soybean and soybean meal using liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS).

After spiking dicamba-<sup>13</sup>C<sub>6</sub> and DCSA-<sup>13</sup>C<sub>6</sub> to the samples, and further adding water, dicamba and DCSA were extracted with water-acetonitrile (1:1). The extract was hydrolyzed with hydrochloric acid. The sample solution was purified with liquid-liquid extraction and with Mega Bond Elut C18 (Agilent Technologies Inc.; Santa Clara, CA, USA), and injected into LC-ESI-MS/MS for determination of the levels of dicamba and DCSA. LC separation was carried out on a phenyl column (Inertsil Ph, 2.1 mm i.d. × 150 mm, 5µm from GL Sciences Inc.; Tokyo, Japan) using a gradient with 5 mmol/L ammonium acetate solution containing 0.1 % acetic acid and acetonitrile as the mobile phase. In the MS/MS analysis, negative mode electrospray ionization (ESI-) was used.

Recovery tests were conducted on two kinds of soybean and two kinds of soybean meal spiked with 1 mg/kg or 10 mg/kg of dicamba and DCSA. The resulting mean recoveries ranged from 88.3 % to 100 % for dicamba and 86.2 % to 101 % for DCSA, and the repeatability in terms of relative standard deviations (RSD<sub>r</sub>) were not more than 5.2 % for dicamba and 7.6 % for DCSA.

A collaborative study was conducted in nine laboratories, using soybean spiked with 1 mg/kg of dicamba and 5 mg/kg of DCSA, soybean (heat flaked) spiked with 5 mg/kg of dicamba and 10 mg/kg of DCSA and soybean meal spiked with 10 mg/kg of dicamba and 1 mg/kg of DCSA. For dicamba, the resulting mean recoveries, repeatability and reproducibility in terms of relative standard deviations (RSD<sub>r</sub> and RSD<sub>R</sub>) and HorRat, respectively, were 100 %, 8.2 %, 13 % and 0.80 for soybean, 103 %, 3.1 %, 6.8 % and 0.54 for soybean (heat flaked), and 98.2 %, 4.5 %, 5.1 % and 0.45 for soybean meal. For DCSA, the resulting mean recoveries, RSD<sub>r</sub>, RSD<sub>R</sub> and HorRat, respectively, were 101 %, 5.6 %, 8.6 % and 0.68 for soybean, 100 %, 4.7 %, 7.4 % and 0.65 for soybean (heat flaked), and 103 %, 7.9 %, 11 % and 0.66 for soybean meal.

This method was validated and established for use in the inspection of dicamba and DCSA in soybean and soybean meal.

Key words: dicamba; 3,6-dichloro-2-hydroxybenzoic acid (DCSA); liquid chromatograph-tandem mass spectrometer (LC-MS/MS); electrospray ionization (ESI); soybean; soybean meal; collaborative study

<sup>\*1</sup> 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

<sup>\*2</sup> 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, 現 仙台センター

キーワード：ジカンバ；3,6-ジクロロ-2-ヒドロキシ安息香酸（DCSA）；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；大豆；大豆油かす；共同試験

## 1 緒 言

ジカンバは芳香族カルボン酸系の除草剤で、選択性があり広葉雑草に効果がある。オーキシンの様の植物ホルモン作用により、雑草類を枯死させると考えられている<sup>1)</sup>。国内では、ジカンバ、ジカンバカリウム塩、ジカンバメチルアミン塩を有効成分とする農薬が登録されており、芝や樹木、草に適用がある。海外では米国、カナダ、豪州、EU 等において登録があり、麦類、大豆、牧草等に適用がある。ジカンバモノオキシゲナーゼ遺伝子を導入したジカンバ耐性大豆の主要な残留物質は、ジカンバの代謝物質 3,6-ジクロロ-2-ヒドロキシ安息香酸（以下「DCSA」という。）である<sup>1)</sup>。

飼料中のジカンバの残留基準値<sup>2)</sup>は、食品安全委員会によるジカンバについての食品健康影響評価が行われたこと及び関連企業からインポートトレランスの設定が申請されたことから、平成 27 年 7 月に Table 1 のとおり改正について公布され、大豆を除く穀類及び牧草については同日施行され、大豆及び大豆油かすについては平成 28 年 1 月 27 日付け施行され新たに設定された。また、大豆及び大豆油かすにおけるジカンバの残留基準値は、ジカンバ、DCSA をジカンバ含量に換算したものと及び DCSA の抱合体をジカンバ含量に換算したものの総和とされた<sup>3)</sup>。飼料分析基準<sup>4)</sup>には、飼料中のジカンバの分析法としてガスクロマトグラフによる単成分分析法が記載されているが、この方法は DCSA を分析対象としていない。

今回、一般財団法人日本食品分析センター及び一般財団法人食品環境検査協会が「平成 25 年度飼料中の有害物質等分析法開発事業」において開発したジカンバ及び DCSA の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。）による同時定量法<sup>5)</sup>（以下「JFRL 法」という。）を基に、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、JFRL 法は、ジカンバ耐性遺伝子組換えダイズの開発企業が開発した大豆製品中のジカンバ及び DCSA（抱合体を含む。）の定量法<sup>6)</sup>を参考にした方法である。

参考に、ジカンバ及び DCSA の構造式等を Fig. 1 に示した。

Table 1 Maximum residual limit of dicamba in feeds

Feed types	Maximum residual limits (mg/kg)	
	After revision	Before revision
Barley	7	0.5
Corn	0.5	0.5
Milo	4	3
Oats	3	3
Rye	0.1	0.1
Soybean	10*	—
Soybean meal	10*	—
Wheat	2	0.5
Grass	200	200

\* As total of dicamba, DCSA and glucuronide of DCSA

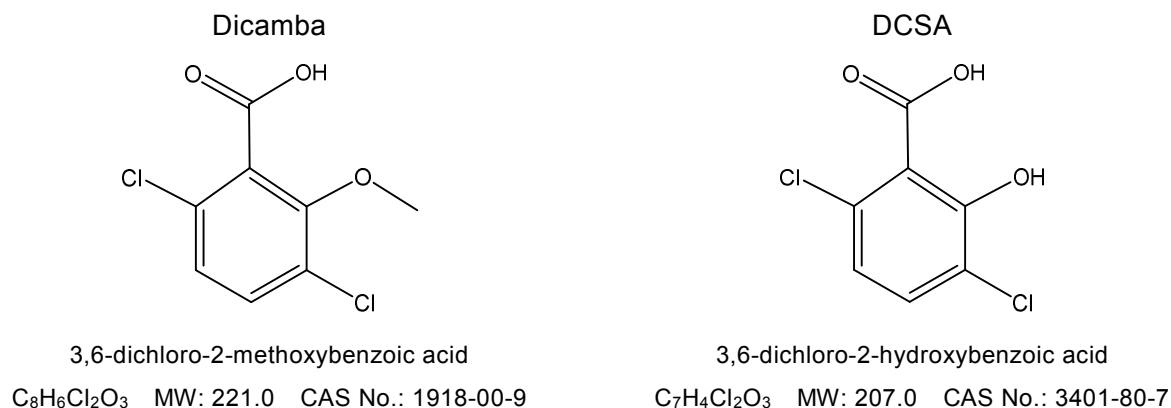


Fig. 1 Chemical structures of dicamba and 3,6-dichlorosalicylic acid (DCSA)

## 2 実験方法

### 2.1 試料

大豆, 大豆 (加熱圧ぺん), 大豆油かす及び大豆油かす (エクストルーダー処理) をそれぞれ 1 mm のスクリーンを装着した粉砕機で粉砕した。

### 2.2 試薬

1) アセトニトリルは, 抽出には残留農薬・PCB 試験用, LC-MS/MS の溶離液には LC/MS 用, 酢酸は LC/MS 用, 酢酸アンモニウム溶液は 1 mol/L HPLC 用, 塩化ナトリウム, ジエチルエーテル及びメタノールは残留農薬・PCB 試験用, その他の試薬は特級 (ギ酸は 98 %以上のもの) を用いた。ケイソウ土は Celite 545 (Imerys Minerals California, Inc.製) を用いた。水は超純水 (JIS K 0211 の 5218 に定義された超純水) を用いた。

#### 2) ジカンバ標準原液

ジカンバ標準品 (純度 98 %, 和光純薬工業製) 25 mg を正確に量って 50 mL の全量フラスコに入れ, メタノールを加えて溶かし, 更に標線までメタノールを加えてジカンバ標準原液を調製した (この液 1 mL は, ジカンバとして 0.5 mg を含有する。 ) 。

#### 3) DCSA 標準原液

DCSA 標準品 (純度 98 %, AK Scientific 製) 25 mg を正確に量って 50 mL の全量フラスコに入れ, メタノールを加えて溶かし, 更に標線までメタノールを加えて DCSA 標準原液を調製した (この液 1 mL は, DCSA として 0.5 mg を含有する。 ) 。

#### 4) 安定同位体元素標識ジカンバ (ジカンバ-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>) 内標準原液

安定同位体元素標識ジカンバ (ジカンバ-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>) 標準品 (純度 98 %, 大陽日酸製) 10 mg を正確に量って 20 mL の全量フラスコに入れ, メタノールを加えて溶かし, 更に標線まで同溶媒を加えてジカンバ-<sup>13</sup>C<sub>6</sub> 内標準原液を調製した (この液 1 mL は, ジカンバ-<sup>13</sup>C<sub>6</sub> として 0.5 mg を含有する。 ) 。

#### 5) 安定同位体元素標識 DCSA (DCSA-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>) 内標準原液

安定同位体元素標識 DCSA (DCSA-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>) 標準品 (純度 98 %, 大陽日酸製) 10 mg を正確に量って 20 mL の全量フラスコに入れ, メタノールを加えて溶かし, 更に標線まで同溶媒を加えて DCSA-<sup>13</sup>C<sub>6</sub> 内標準原液を調製した (この液 1 mL は, DCSA-<sup>13</sup>C<sub>6</sub> として 0.5 mg を含有する。 ) 。

## 6) 混合内標準液

ジカンバ- $^{13}\text{C}_6$ 内標準原液及び DCSA- $^{13}\text{C}_6$ 内標準原液各 1 mL を 25 mL の全量フラスコに入れ、標線までメタノールを加えて混合内標準液を調製した（この液 1 mL は、ジカンバ- $^{13}\text{C}_6$ 及び DCSA- $^{13}\text{C}_6$ を 20  $\mu\text{g}$  を含有する。）。

## 7) 混合標準液

使用に際して、ジカンバ標準原液、DCSA 標準原液、ジカンバ- $^{13}\text{C}_6$ 内標準原液及び DCSA- $^{13}\text{C}_6$ 内標準原液の一定量を 0.1 v/v%ギ酸溶液-メタノール (1+1) で正確に希釈し、1 mL 中にジカンバとして 10, 20, 50, 100, 150 及び 200 ng, DCSA として 1, 2, 5, 10, 15 及び 20 ng を含有し、かつジカンバ- $^{13}\text{C}_6$ として 20 ng, DCSA- $^{13}\text{C}_6$ として 2 ng を含有する各検量線作成用混合標準液を調製した。

## 2.3 装置及び器具

- 1) 粉碎機：ZM-100 Retsch 製（1 mm スクリーン、使用時回転数 14000 rpm）
- 2) 振とう機：レシプロシェーカーSR-2W タイテック製（使用時振動数 300 rpm）
- 3) オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム：Mega Bond Elut C18 カートリッジ（充てん剤量 1 g, 粒径 40  $\mu\text{m}$ , リザーバー容量 6 mL）Agilent Technologies 製
- 4) LC-MS/MS：  
LC-MS/MS 1 LC 部：ACQUITY UPLC Waters 製  
MS/MS 部：Xevo TQD Waters 製  
LC-MS/MS 2 LC 部：Nexera X2 島津製作所製  
MS/MS 部：LCMS-8040 島津製作所製

## 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、混合内標準液 1 mL を正確に加え、更に水 20 mL を加え、30 分間静置した後、更に水-アセトニトリル (1+1) 80 mL を加え、30 分間振り混ぜて抽出した。抽出液を 100 mL の共栓遠心沈殿管に入れ、1500 $\times$ g で 10 分間遠心分離し、上澄み液を加水分解に供する試料溶液とした。

## 2) 加水分解

試料溶液 10 mL を 100 mL の共栓遠心沈殿管に正確に入れ、塩酸 (27+170) 20 mL を加え、密栓して 95  $^{\circ}\text{C}$  の油浴で 1 時間加温した後放冷し、1500 $\times$ g で 10 分間遠心分離し、上澄み液を液液分配に供する試料溶液とした。

## 3) 液液分配

試料溶液 3 mL をあらかじめ塩化ナトリウム溶液 (10 w/v%) 20 mL を入れた 100 mL の分液漏斗 A に正確に加え、更にジエチルエーテル 20 mL を加えて 5 分間振り混ぜた後静置した。水層 (下層) を 100 mL の分液漏斗 B に入れ、ジエチルエーテル層 (上層) を 100 mL のなす形フラスコに入れた。分液漏斗 A をジエチルエーテル 20 mL で洗浄し、洗液を分液漏斗 B に加え、5 分間振り混ぜた後静置した。水層を捨て、ジエチルエーテル層を先のなす形フラスコに合わせて、40  $^{\circ}\text{C}$  以下の水浴で減圧濃縮し、窒素ガスを送ってジエチルエーテルを除去した。0.1 v/v%ギ酸溶液-メタノール (4+1) 5 mL を残留物に加えて溶かし、カラム処理に供する試料溶液とした。

## 4) 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メタノール 10 mL 及び 0.1 v/v%ギ酸溶液 10 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。試料溶液の入っていたなす形フラスコを 0.1 v/v%ギ酸溶液-メタノール (4+1) 5 mL で洗浄し、洗液をミニカラムに加え、同様に流出させた。10 mL の試験管をミニカラムの下に置き、0.1 v/v%ギ酸溶液-メタノール (1+1) 10 mL をミニカラムに加え、流速 1 mL/min 程度で吸引してジカンバ及び DCSA を溶出させて、LC-MS/MS によるジカンバの測定に供する試料溶液（以下「試料溶液 I」という。）とした。

試料溶液 I 2mL を 20 mL の全量フラスコに正確に入れ、0.1 v/v%ギ酸溶液-メタノール (1+1) を全量フラスコの標線まで加え、LC-MS/MS による DCSA の測定に供する試料溶液（以下「試料溶液 II」という。）とした。

## 5) LC-MS/MS による測定

各試料溶液及び各混合標準液各 5 µL を LC-MS/MS に注入し、選択反応検出（以下「SRM」という。）クロマトグラムを得た。この測定は 2.3 の 4) の LC-MS/MS 1 を用い、Table 2 及び Table 3 の測定条件で行った。

Table 2 Operating conditions of LC-MS/MS

Column	Inertsil Ph (2.1 mm i.d. × 150 mm, 5 µm), GL Sciences
Mobile phase	0.1 v/v% acetic acid, 5 mmol/L ammonium acetate solution - methanol (19:1) → 2 min → (7:3) (hold for 8 min)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temperature	40 °C
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Mode	Negative
Source temperature	150 °C
Desolvation gas	N <sub>2</sub> (800 L/h, 400 °C)
Cone gas	N <sub>2</sub> (50 L/h)
Collision gas	Ar (0.4 Pa)
Capillary voltage	0.6 kV

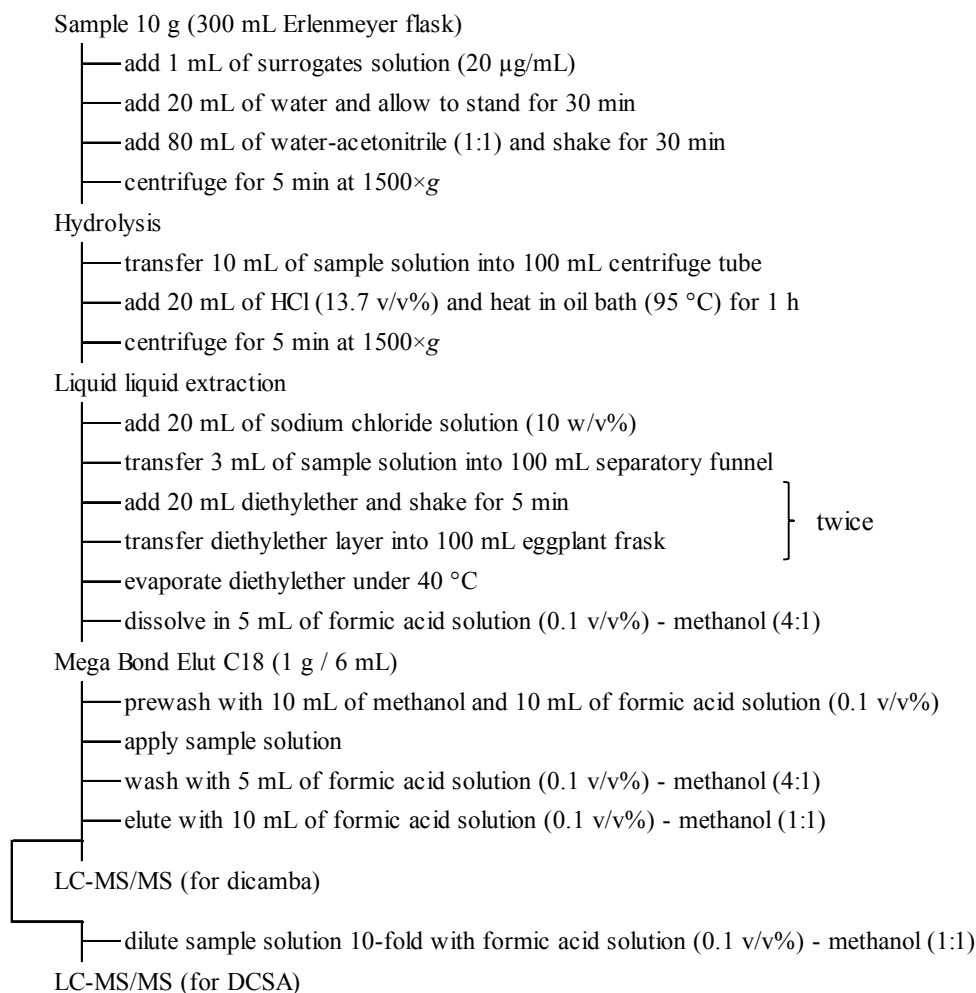
Table 3 MS/MS parameters

Target	Precursor ion ( <i>m/z</i> )	Product ion		Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
		Quantifier ( <i>m/z</i> )	Qualifier ( <i>m/z</i> )		
Dicamba	219	175	—	20	6
		—	145		10
Dicamba- <sup>13</sup> C <sub>6</sub>	225	181	—	26	6
DCSA	205	161	—		12
		—	125	20	
DCSA- <sup>13</sup> C <sub>6</sub>	211	167	—	26	12

## 6) 計 算

得られた SRM クロマトグラムからジカンバ, DCSA, ジカンバ- $^{13}\text{C}_6$  及び DCSA- $^{13}\text{C}_6$  のピーク面積を求めて内標準法により検量線を作成し, 試料中のジカンバ及び DCSA のそれぞれの量を算出した.

なお, 定量法の概要を Scheme 1 に示した.



Scheme 1 Analytical procedure for determination of dicamba and DCSA in soybean and soybean meal

## 2.5 内標準物質を用いない方法の検討

内標準物質を用いない JFRL 法を基に予備的な検討を行った.

## 1) 定量方法

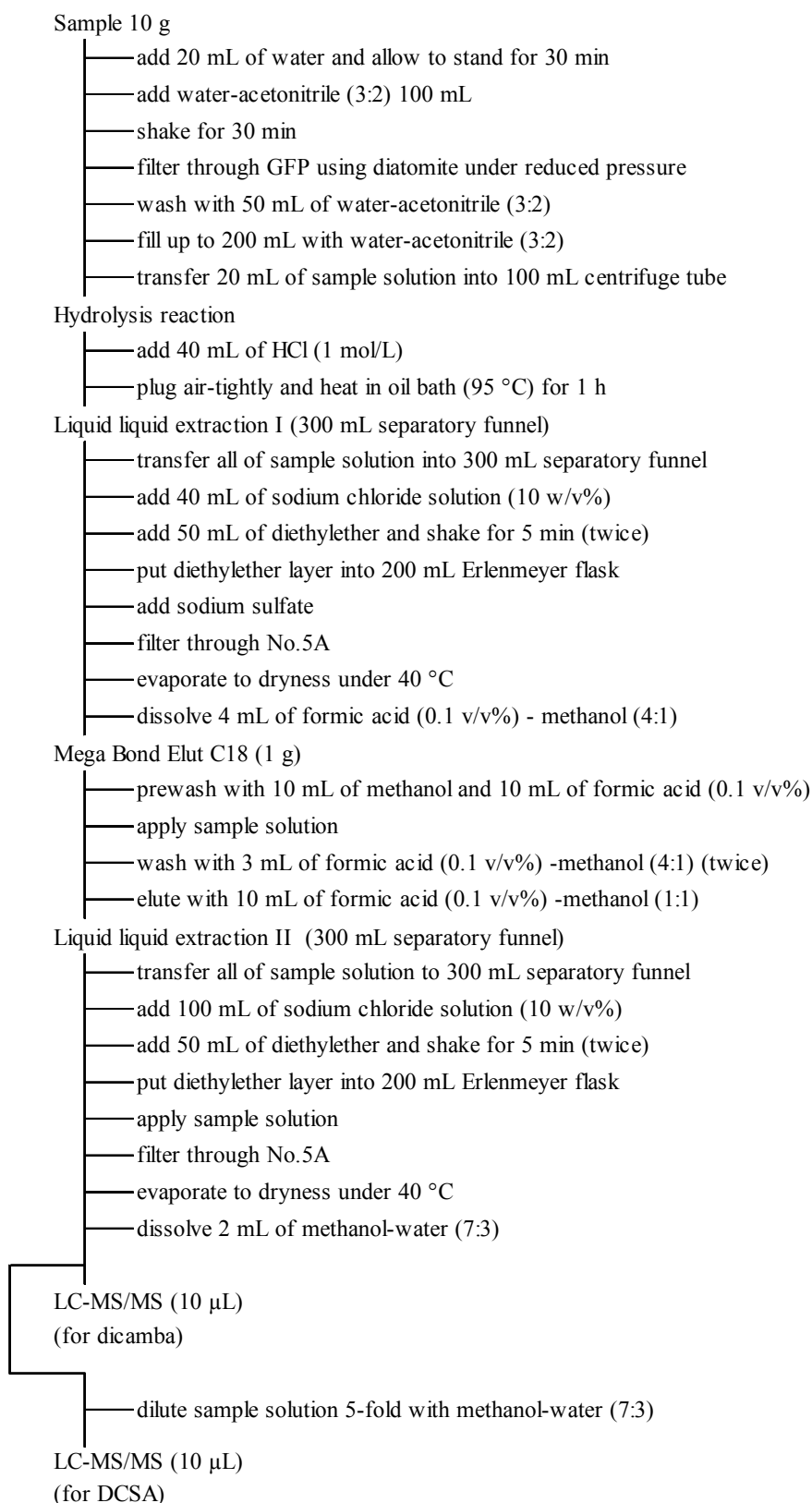
方法は, LC-MS/MS に注入する試料溶液及び標準溶液の溶媒のみ, JFRL 法の希釈溶媒をメタノールからメタノール-水 (7+3) に変更した JFRL 法を基にした Scheme 2 に示す方法で行った. この測定は 2.3 の 4) の LC-MS/MS 2 を用い, Table 4 及び Table 5 の測定条件で行った.

Table 4 Operating conditions of LC-MS/MS

Column	Inertsil Ph (2.1 mm i.d. × 150 mm, 5 µm), GL Sciences
Mobile phase	0.1 v/v% acetic acid, 5 mmol/L ammonium acetate solution - methanol (19:1) → 2 min → (7:3) (hold for 8 min)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temperature	40 °C
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Mode	Negative
Desolvation gas	N <sub>2</sub> (3 L/min)
Drying gas	N <sub>2</sub> (15 L/min)
Collision gas	Ar (230 kPa)
Source temperature	200 °C
Heat block temperature	500 °C

Table 5 MS/MS parameters

Target	Precursor ion ( <i>m/z</i> )	Product ion		Collision energy (eV)
		Quantifier ( <i>m/z</i> )	Qualifier ( <i>m/z</i> )	
Dicamba	219	175	—	7
		—	145	6
	221	—	177	14
DCSA	207	163	—	11
	205	—	161	12



Scheme 2 Analytical procedure for determination of dicamba and DCSA in soybean and soybean meal (without using internal standards)



## 2) 内標準物質を用いない方法による予備的添加回収試験

大豆, 大豆 (加熱圧ぺん), 大豆油かす及び大豆油かす (エクストルーダー処理) にジカンバ及び DCSA として各 0.02, 0.4 及び 10 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中でジカンバとして 10, 200 及び 200 (希釈溶媒で 25 倍希釈) ng/mL 相当量並びに DCSA として 2, 40 及び 40 (希釈溶媒で 25 倍希釈) ng/mL 相当量) を添加した各試料を 2.5.1 により 3 点併行で定量し, 回収率及び繰返し精度を求めた.

## 3 結果及び考察

### 3.1 内標準物質を用いない方法における予備検討

JFRL 法で得られた SRM クロマトグラムでは, ジカンバのピークに肩が生じ良好なピーク形状が得られなかったため, 内標準物質を用いない方法においては, 希釈溶媒を JFRL 法のメタノールからメタノール-水 (7+3) とした.

2.5 の 2) に従い予備的に添加回収試験を実施した結果は, Table 6 のとおりであった. 基準値に相当する 10 mg/kg では, ジカンバ及び DCSA の平均回収率は, 71.5~88.4 %, その繰返し精度は相対標準偏差 ( $RSD_r$ ) として 8.0 % 以下の良好な結果が得られたが, 低濃度添加では DCSA は回収率が高くなる傾向が認められた. 一方, 大豆中のジカンバについては回収率が低くなる傾向が認められた.

2.5 の 1) により調製した大豆及び大豆油かすの試料溶液にジカンバ及び DCSA として 0.2 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中でジカンバとして 100 ng/mL 相当量及び DCSA として 20 ng/mL) をそれぞれ添加した各マトリックス標準液について, 同濃度のジカンバ及び DCSA 標準液に対するピーク面積比を確認したところ, ピーク面積比は大豆及び大豆油かす中のジカンバにおいて 111 及び 133 %, DCSA において 97.4 及び 215 % であり, 回収率が高くなる要因としてマトリックス効果が考えられた.

大豆中のジカンバの回収率が低くなったことについては, 大豆については他の試料と異なり, 抽出の際, 吸引ろ過に 1 点 1 時間 30 分以上要したこと, 液液分配の際に大量のエマルジョンが生じジェチルエーテル層の分離が困難であったことなどから, 定量操作中のロスが要因と考えられた.

JFRL 法の開発の際参考とされた方法<sup>6)</sup>では, 安定同位体元素標識内標準物質 (ジカンバ- $^{13}C_6$  及び DCSA- $^{13}C_6$ ) が用いられていたため, マトリックス効果及び定量操作によるロスを補正することを目的として内標準物質を用いることとした. このことから, 吸引ろ過で行っていた抽出操作における固液分離を遠心分離で行い, 更に, 改正後の大豆及び大豆油かすの残留基準値は 10 mg/kg と比較的高く, 低濃度まで測定する必要性が低いこともあって, JFRL 法で行っていた 2 回目の液液分配による濃縮工程を省略し, ミニカラムの溶出液をそのまま LC-MS/MS の測定に供する試料溶液とする方法を検討した.

Table 6 Recovery tests for dicamba and DCSA without using surrogates

Pesticides	Spiked level (mg/kg)	Feed types							
		Soybean		Soybean (heat flaked)		Soybean meal		Soybean meal (extruded)	
		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> (%)	Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)
Dicamba	0.02	66.5	2.7	141	15	77.8	2.7	165	8.0
	0.4	64.0	6.2	90.8	7.5	73.7	4.7	116	3.4
	10	73.2	6.4	85.5	2.4	86.4	2.7	71.5	1.7
DCSA	0.02	242	4.2	220	5.2	210	22	282	14
	0.4	87.0	12	99.0	8.2	113	4.4	149	5.8
	10	75.1	8.0	85.9	1.5	88.4	2.0	75.5	0.8

Colored cells stand for recoveries of less than 70 % or more than 120 %

a) Mean ( $n=3$ )

b) Relative standard deviation of repeatability

### 3.2 検量線

2.5 の内標準物質を用いない方法の検討では、2.3 の 4) の LC-MS/MS 2 を用いた測定により、ジカンバで 5~250 ng/mL を 10  $\mu$ L 注入（注入量として 0.05~2.5 ng 相当量）、DCSA で 1~50 ng/mL を 10  $\mu$ L 注入（注入量として 0.01~0.5 ng 相当量）した範囲で直線性を示していた。しかし、機種を換えて 2.3 の 4) の LC-MS/MS 1 を用いて測定したところ、ジカンバで 10~500 ng/mL を 10  $\mu$ L 注入（注入量として 0.1~5.0 ng 相当量）、DCSA で 1~50 ng/mL を 10  $\mu$ L 注入（注入量として 0.01~0.5 ng 相当量）した範囲で良好な直線性が得られなかった。このことは注入量を減らすことで改善が見られたため、ジカンバで 200 ng/mL を 5  $\mu$ L（注入量として 1 ng 相当量）、DCSA で 20 ng/mL を 5  $\mu$ L（注入量として 0.1 ng 相当量）以下の注入量に変更した。

また、ミニカラムの溶出液をそのまま LC-MS/MS の測定に供するために、ジカンバ及び DCSA の希釈溶媒を 0.1 v/v% ギ酸溶液-メタノール (1+1) として LC-MS/MS で測定したところ、良好なピーク形状であることが確認できたため希釈溶媒は同溶媒とした。

2.2 の 7) に従って調製した混合標準液各 5  $\mu$ L 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求めて検量線を作成した。その結果、Fig. 2 のとおり、ジカンバで 10~200 ng/mL（注入量として 0.05~1 ng 相当量）、DCSA で 1~20 ng/mL（注入量として 0.005~0.1 ng 相当量）の範囲で直線性を示した。

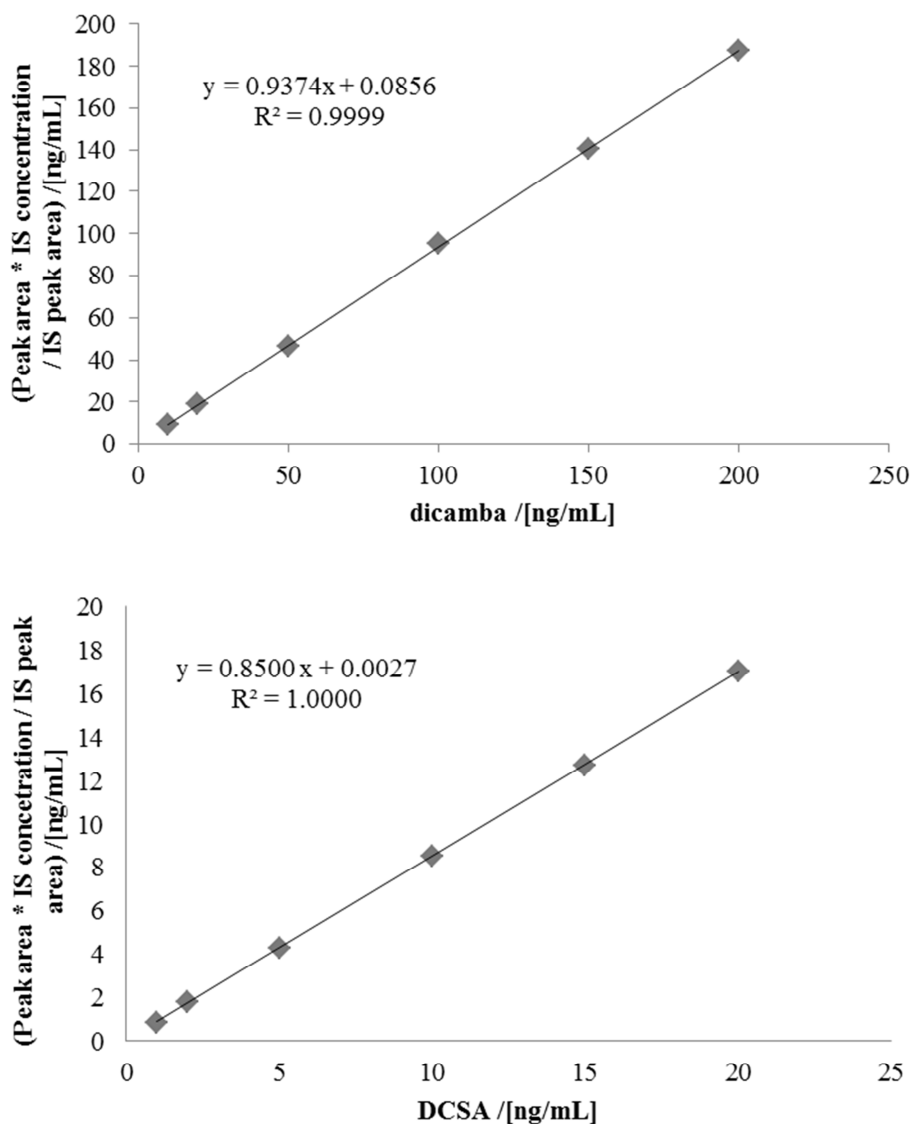


Fig. 2 Internal standard calibration curves of dicamba and DCSA by peak area

### 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

大豆及び大豆油かすを用い、混合内標準液を加えずに 2.4 に従い調製して途中 3) で窒素ガスを送ってジエチルエーテルを除去した残留物を、ジカンバとして 300 ng 及び DCSA として 30 ng を含有する 0.1 v/v%ギ酸溶液-メタノール (4+1) 5 mL で溶かして試料溶液とし、2.4 の 4) に従いオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムに入れてミニカラムからの溶出画分を確認した。その結果、Table 7 のとおり、ジカンバ及び DCSA は 0.1 v/v%ギ酸溶液-メタノール (1+1) 3~9 mL の画分で溶出することが確認された。このことから、JFRL 法と同様 0.1 v/v%ギ酸溶液-メタノール (1+1) 10 mL で溶出させることとした。

Table 7 Elution patterns of dicamba and DCSA from Mega Bond Elut C18

Fraction		Formic acid solution (0.1 v/v%) - methanol (4:1)		Formic acid solution (0.1 v/v%) - methanol (1:1)				Total
		Load	Wash	Elution				
		0~5 mL	5~10 mL	0~3 mL	3~6 mL	6~9 mL	9~12 mL	
Only standard solution		0	0	0	75	31	0	106
Recovery of dicamba <sup>a)</sup>	In the presence of matrix components of soybean	0	0	0	64	27	0	90
	(%) In the presence of matrix components of soybean meal	0	0	0	53	45	0	98
Only standard solution		0	0	0	99	3	0	102
Recovery of DCSA <sup>a)</sup>	In the presence of matrix components of soybean	0	0	0	112	2	0	114
	(%) In the presence of matrix components of soybean meal	0	0	0	112	3	0	116

a)  $n=1$ 

## 3.4 妨害物質の検討

大豆 4 検体及び大豆油かす 4 検体を用い、混合内標準液の添加は行わず、2.4 に従って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、得られた SRM クロマトグラムの一例を Fig. 3 に示した。

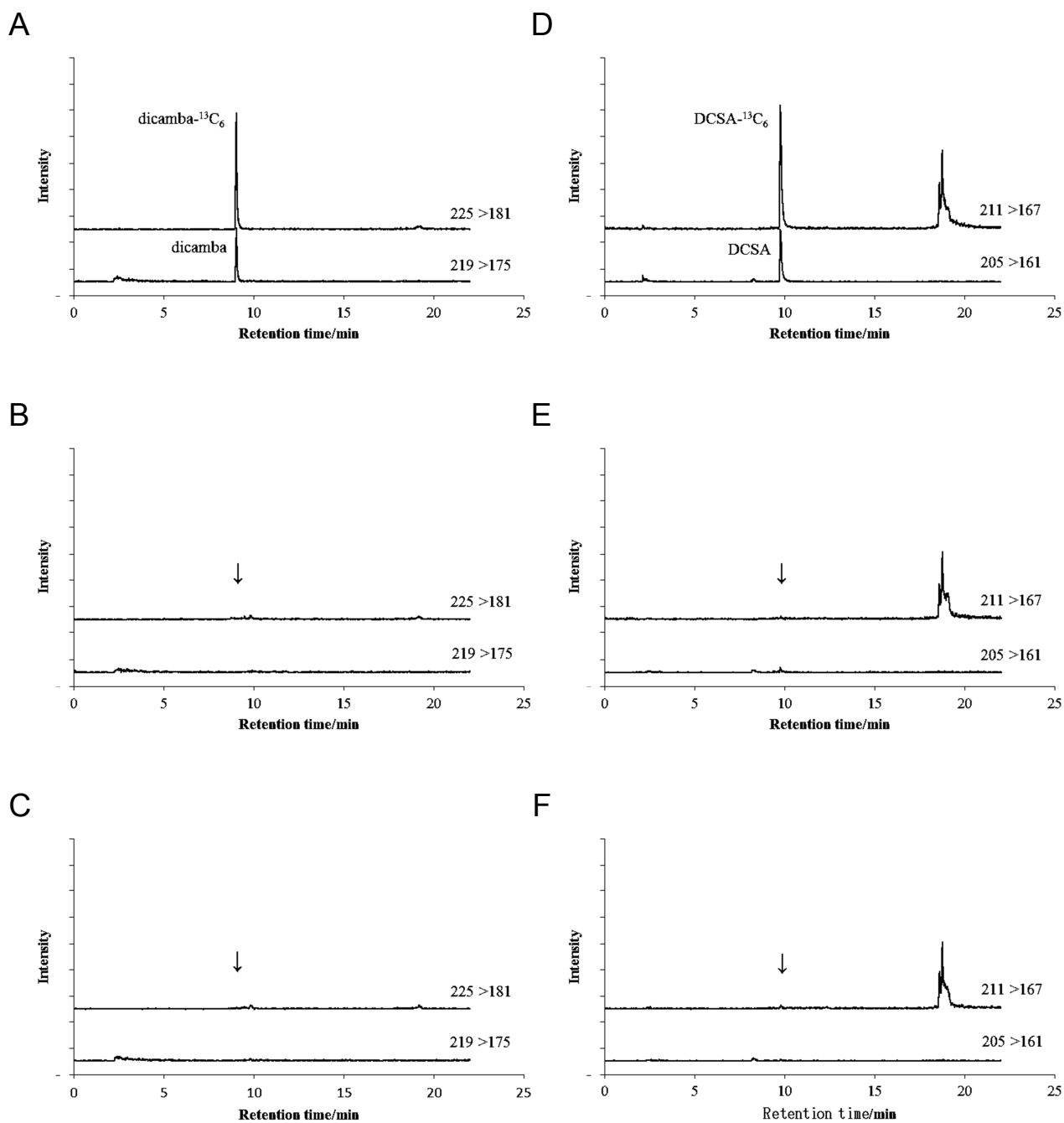


Fig. 3 Selected reaction monitoring chromatograms of standard solution and blank samples (Arrows indicate the retention time of dicamba and dicamba- $^{13}\text{C}_6$ , or DCSA and DCSA- $^{13}\text{C}_6$ . Scales of y-axis are the same all chromatograms. The baselines were shifted for display.)

A: Standard solution

(10 ng/mL: 0.05 ng as dicamba)

(20 ng/mL: 0.10 ng as dicamba- $^{13}\text{C}_6$ )

B: Blank sample of soybean

(sample solution I)

C: Blank sample of soybean meal

(sample solution I)

D: Standard solution

(1 ng/mL: 0.005 ng as DCSA)

(2 ng/mL: 0.010 ng as DCSA- $^{13}\text{C}_6$ )

E: Blank sample of soybean

(sample solution II)

F: Blank sample of soybean meal

(sample solution II)

## 3.5 添加回収試験

大豆及び大豆油かすにジカンバ及び DCSA として各 1 及び 10 mg/kg 相当量（最終試料溶液中でジカンバとして 10 及び 100, DCSA として 1 及び 10 ng/mL 相当量）を添加した各試料を本法により 3 点併行で定量し、回収率及び繰返し精度を求めた。その結果は Table 8 のとおり、ジカンバの平均回収率は 88.3~100 %, その繰返し精度は相対標準偏差 ( $RSD_r$ ) として 5.2 %以下で、DCSA の平均回収率は 86.2~101 %, その繰返し精度は  $RSD_r$  として 7.6 %以下であった。

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 for dicamba and DCSA

Pesticides	Spiked level (mg/kg)	Feed types			
		Soybean		Soybean (heat-flaked)	
		Recovery <sup>a),b)</sup> (%)	$RSD_r$ <sup>c)</sup> (%)	Recovery <sup>a),b)</sup> (%)	$RSD_r$ <sup>c)</sup> (%)
Dicamba	1	100 ( 95.8 )	3.9	98.4 ( 77.2 )	2.1
	10	97.1 ( 84.7 )	0.9	94.7 ( 60.9 )	1.4
DCSA	1	101 (112 )	7.6	86.5 (111 )	4.2
	10	88.0 (103 )	1.5	91.9 (106 )	1.3

Pesticides	Spiked level (mg/kg)	Feed types			
		Soybean meal		Soybean meal (extruded)	
		Recovery <sup>a),b)</sup> (%)	$RSD_r$ <sup>c)</sup> (%)	Recovery <sup>a),b)</sup> (%)	$RSD_r$ <sup>c)</sup> (%)
Dicamba	1	95.0 (102 )	0.9	88.3 ( 91.7 )	2.5
	10	95.7 ( 71.2 )	5.2	98.8 ( 73.3 )	0.4
DCSA	1	98.7 (111 )	6.7	86.2 (100 )	4.0
	10	93.4 ( 86.9 )	3.1	91.1 (104 )	2.1

a) Mean ( $n=3$ )

b) Cells in parentheses stand for the recoveries of surrogates.

c) Relative standard deviation of repeatability

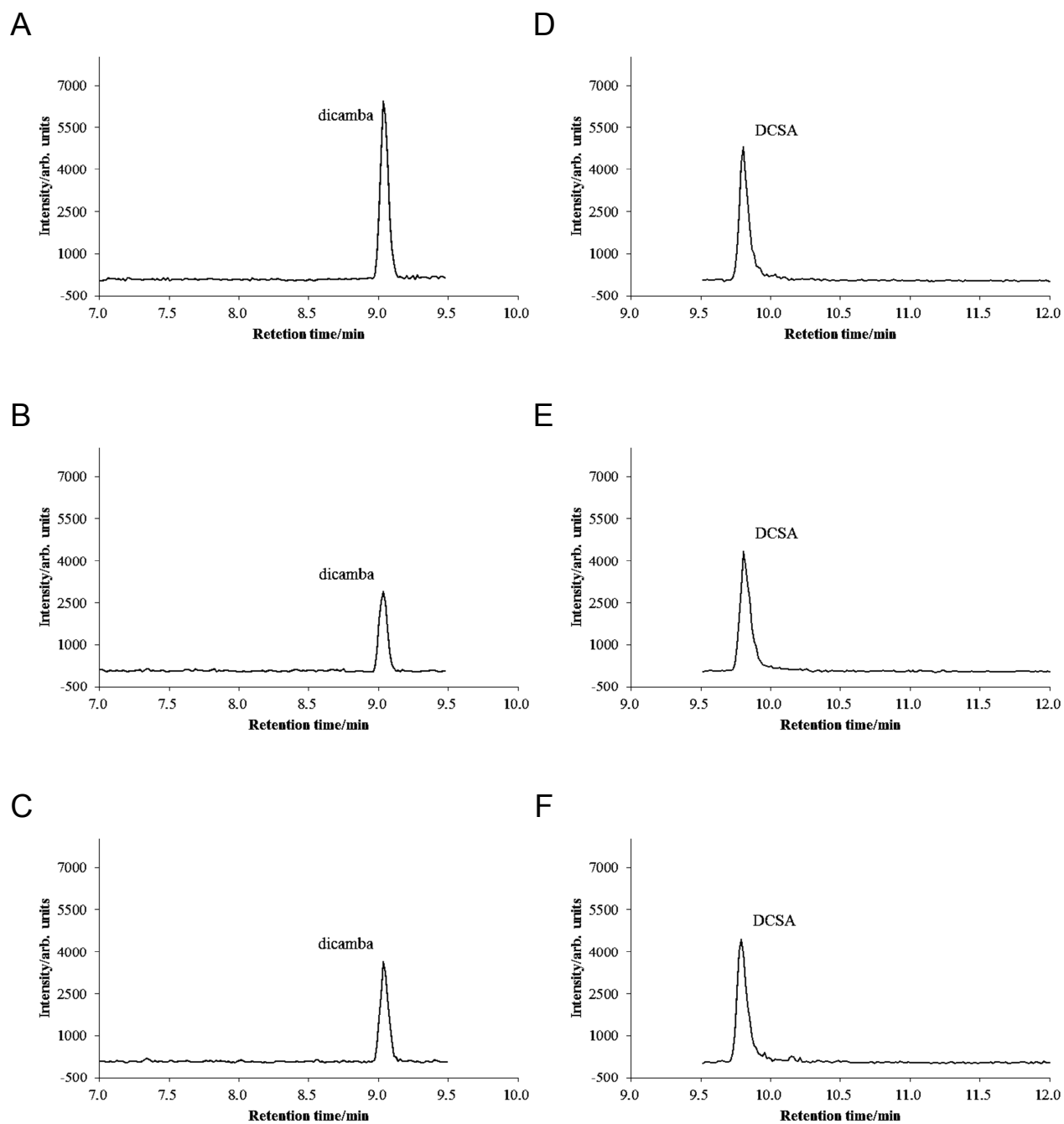


Fig. 4 Selected reaction monitoring chromatograms of standard solution and spiked samples

A: Standard solution

(10 ng/mL: 0.05 ng as dicamba)

B: Soybean spiked at 1 mg/kg of dicamba

(10 ng/mL as dicamba)

(sample solution I)

C: Soybean meal spiked at 1 mg/kg of dicamba

(10 ng/mL as dicamba)

(sample solution I)

D: Standard solution

(1 ng/mL: 0.005 ng as DCSA)

E: Soybean spiked at 1 mg/kg of DCSA

(1 ng/mL as DCSA)

(sample solution II)

F: Soybean meal spiked at 1 mg/kg of DCSA

(1 ng/mL as DCSA)

(sample solution II)

### 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、3.5 の添加回収試験で調製した 1 mg/kg 相当量（最終試料溶液中でジカンバとして 10 及び DCSA として 1 ng/mL 相当量）の最終試料溶液 5  $\mu$ L を LC-MS/MS に注入し、得られた SRM クロマトグラムからジカンバ及び DCSA のピークの SN 比が 10 及び 3 となる濃度を求めた。その結果、SN 比が 10 以上となるジカンバ及び DCSA 濃度は 1 mg/kg, SN 比が 3 以上となる濃度は 0.3 mg/kg であったことから、本法におけるジカンバ及び DCSA の定量下限は 1 mg/kg, 検出下限は 0.3 mg/kg であった。

なお、Table 8 に示したとおり、当該定量下限濃度における添加回収試験結果は良好であった。

### 3.7 共同試験

本法の室間再現精度を確認するため、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、大豆にジカンバとして 1 mg/kg 及び DCSA として 5 mg/kg 相当量（試験用試料 10 g に対して 1 mL 中にジカンバとして 10  $\mu$ g 及び DCSA として 50  $\mu$ g を含有する標準液 1 mL 添加）、大豆（加熱圧ぺん）にジカンバとして 5 mg/kg 及び DCSA として 10 mg/kg 相当量（試験用試料 10 g に対して 1 mL 中にジカンバとして 50  $\mu$ g 及び DCSA として 100  $\mu$ g を含有する標準液 1 mL 添加）及び大豆油かすにジカンバとして 10 mg/kg 及び DCSA として 1 mg/kg 相当量（試験用試料 10 g に対して 1 mL 中にジカンバとして 100  $\mu$ g 及び DCSA として 10  $\mu$ g を含有する標準液 1 mL 添加）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、一般財団法人日本食品分析センター多摩研究所、一般財団法人日本穀物検定協会中央研究所、フィード・ワン株式会社研究所、全国農業協同組合連合会飼料畜産中央研究所品質管理研究室、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、同名古屋センター及び同神戸センター（計 9 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<sup>7), 8)</sup>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<sup>9)</sup>を用いて HorRat を求めた。

結果は Table 9 及び Table 10 のとおりであった。大豆、大豆（加熱圧ぺん）及び大豆油かすについて、ジカンバの平均回収率はそれぞれ 100, 103 及び 98.2 %,  $RSD_r$  はそれぞれ 8.2, 3.1 及び 4.5 %,  $RSD_R$  はそれぞれ 13, 6.8 及び 5.1 %, HorRat はそれぞれ 0.80, 0.54 及び 0.45 であった。DCSA の平均回収率はそれぞれ 101, 100 及び 103 %,  $RSD_r$  はそれぞれ 5.6, 4.7 及び 7.9 %,  $RSD_R$  はそれぞれ 8.6, 7.4 及び 11 %, HorRat はそれぞれ 0.68, 0.65 及び 0.66 であった。1 つの試料について、ジカンバの HorRat がわずかに 0.5 を下回っていたが、これは、本法が安定同位体元素標識物質を用いた内標準法であるためと考えられた。

参考のため、各試験室で使用した LC-MS/MS の機種等を Table 11 に示した。



Table 9 Collaborative study for dicamba

Lab. No.	Feed types					
	Soybean (mg/kg)		Soybean (heat-flaked) (mg/kg)		Soybean meal (mg/kg)	
1	0.918	0.890	5.31	5.71	9.51	8.93
2	0.991	1.01	4.99	4.98	9.74	10.2
3	0.914	1.14	4.87	5.05	9.31	10.5
4	0.812	0.954	5.10	4.89	9.79	9.78
5	1.32	1.17	5.52	5.97	9.94	10.6
6	0.968	1.01	5.25	5.19	10.0	10.2
7	1.02	1.07	5.11	5.00	9.56	9.54
8	0.881	0.981	4.62	4.70	10.2	10.4
9	1.62 <sup>a)</sup>	1.82 <sup>a)</sup>	5.40	5.35	8.79	9.77
Spiked level (mg/kg)	1		5		10	
Mean value <sup>b)</sup> (mg/kg)	1.00		5.17		9.82	
Mean recovery <sup>b)</sup> (%)	100		103		98.2	
RSD <sub>r</sub> <sup>c)</sup> (%)	8.2		3.1		4.5	
RSD <sub>R</sub> <sup>d)</sup> (%)	13		6.8		5.1	
PRSD <sub>R</sub> <sup>e)</sup> (%)	16		12		11	
HorRat	0.80		0.54		0.45	

a) Data excluded by single Grubbs test

b) Soybean:  $n=16$ ; Soybean (steam-flaked):  $n=18$ ; Soybean meal:  $n=18$

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 for DCSA

Lab. No.	Feed types					
	Soybean (mg/kg)		Soybean (heat-flaked) (mg/kg)		Soybean meal (mg/kg)	
1	5.00	5.06	10.7	10.4	1.09	1.01
2	4.16	4.75	9.93	9.44	0.976	0.965
3	5.04	4.84	10.6	9.61	1.07	1.13
4	4.92	4.69	8.90	9.86	0.794	1.02
5	5.92	5.67	11.8	11.0	1.30	1.14
6	5.20	4.64	9.74	10.5	1.07	1.01
7	5.35	5.39	10.0	9.79	1.02	1.02
8	5.50	4.77	9.85	9.89	1.02	0.908
9	4.65	4.96	9.52	8.82	1.04	0.914
Spiked level (mg/kg)	5		10		1	
Mean value <sup>a)</sup> (mg/kg)	5.03		10.0		1.03	
Mean recovery <sup>a)</sup> (%)	101		100		103	
RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	5.6		4.7		7.9	
RSD <sub>R</sub> <sup>c)</sup> (%)	8.6		7.4		11	
PRSD <sub>R</sub> <sup>d)</sup> (%)	13		11		16	
HorRat	0.68		0.65		0.66	

a)  $n=18$ 

b) Relative standard deviation of repeatability within laboratory

c) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

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

Table 11 Instruments used in the collaborative study

Lab. No.	LC-MS/MS	LC column (i.d.×length, particle size)
1	LC: ACQUITY UPLC, Waters MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	Inertsil Ph, GL Sciences (2.1 mm×150 mm, 5 µm)
2	LC: ACQUITY UPLC, Waters MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	Inertsil Ph, GL Sciences (2.1 mm×150 mm, 5 µm)
3	LC: 1200 Series, Agilent Technologies MS/MS: API-3200 Q TRAP, AB SCIEX	Inertsil Ph, GL Sciences (2.1 mm×150 mm, 5 µm)
4	LC: ACQUITY UPLC, Waters MS/MS: Quatro Premier XE, Waters	Inertsil Ph, GL Sciences (2.1 mm×150 mm, 5 µm)
5	LC: Prominence, Shimadzu MS/MS: LCMS-8040, Shimadzu	Inertsil Ph, GL Sciences (2.1 mm×150 mm, 5 µm)
6	LC: ACQUITY UPLC, Waters MS/MS: Xevo TQD, Waters	Inertsil Ph, GL Sciences (2.1 mm×150 mm, 5 µm)
7	LC: Nexera X2, Shimadzu MS/MS: LCMS-8040, Shimadzu	Inertsil Ph, GL Sciences (2.1 mm×150 mm, 5 µm)
8	LC: ACQUITY UPLC, Waters MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	Inertsil Ph, GL Sciences (2.1 mm×150 mm, 5 µm)
9	LC: 1200 Series, Agilent Technologies MS/MS: 6410, Agilent Technologies	Inertsil Ph, GL Sciences (2.1 mm×150 mm, 5 µm)

#### 4 まとめ

大豆及び大豆油かす中のジカンバ及び DCSA 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、内標準物質を用い、吸引ろ過を遠心分離に変更し、2 回目の液液分配を省略、混合標準液の希釈溶媒を変更及び LC-MS/MS への注入量を 10 µL から 5 µL 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) 検量線は、ジカンバで 10~200 ng/mL (注入量として 0.05~1 ng) , DCSA で 1~20 ng/mL (注入量として 0.005~0.1 ng) 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、ジカンバとして 10 及び 100 ng/mL 相当量、DCSA として 1 及び 10 ng/mL 相当量とした。

2) 大豆及び大豆油かすについて、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。

3) 大豆及び大豆油かすにジカンバ及び DCSA として各 1 及び 10 mg/kg 相当量を添加し、本法に従って 3 点併行で定量して回収率及び繰返し精度を求めたところ、良好な結果が得られた。

4) 本法におけるジカンバ及び DCSA の定量下限は試料中で 1 mg/kg, 検出下限は 0.3 mg/kg であった。

5) 大豆にジカンバとして 1 mg/kg 相当量及び DCSA として 5 mg/kg 相当量、大豆 (加熱圧ペン) にジカンバとして 5 mg/kg 相当量及び DCSA として 10 mg/kg 相当量及び大豆油かすにジカンバとして 10 mg/kg 相当量及び DCSA として 1 mg/kg 相当量を添加した試料を用いて、9 試験室において本法に従い共同試験を実施したところ、良好な結果が得られた。

## 謝 辞

共同試験に参加していただいた一般財団法人日本食品分析センター多摩研究所，一般財団法人日本穀物検定協会中央研究所，フィード・ワン株式会社研究所，全国農業協同組合連合会飼料畜産中央研究所品質管理研究室における関係者各位に感謝の意を表します。

## 文 献

- 1) 食品安全委員会：ジカンバ農薬評価書，平成 24 年 10 月 (2012).
- 2) 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).
- 3) 農林水産省消費・安全局長通知：飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令の一部を改正する省令の施行について，平成 27 年 7 月 27 日，19 消安第 2140 号 (2015).
- 4) 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).
- 5) 一般財団法人日本食品分析センター，一般財団法人食品環境検査協会：平成 25 年度飼料中の飼料中の有害物質等分析法開発事業 (2014).
- 6) Monsanto Company Standard Operating Procedure: Determination of dicamba and its major metabolites in soybean matrices by LC/MS/MS, AG-ME-1321-01 July 22 (2009), 非公開.
- 7) William Horwitz: Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies, Pure & appl. Chem., 67(2), 331-343 (1995).
- 8) 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., Gaithersburg, MD, USA.
- 9) Michael Thompson: 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).