

技術レポート**1 飼料中のカルバリル，カルボフラン及びフェノブカルブの液体クロマトグラフトンデム型質量分析計による同時定量法の開発**田中 里美^{*}，桑原 正良^{*}**Development of Simultaneous Determination Method
of Carbaryl, Carbofuran and Fenobucarb in Feed by LC-MS/MS**Satomi TANAKA^{*} and Masayoshi KUWABARA^{*}

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

An analytical method was developed to determine the levels of carbaryl, carbofuran and fenobucarb in feed using a liquid chromatograph-electrospray ionization-tandem mass spectrometer (LC-ESI-MS/MS).

After adding water to the sample, carbaryl, carbofuran and fenobucarb were extracted with acetone and the extracted solutions were filtered. The filtrate was then diluted with acetone to a volume of 200 mL. The sample solution was purified with a SPE column (InertSep Slim-J C18-B, GL sciences Inc.; Tokyo, Japan) and injected into the LC-MS/MS to determine the levels of carbaryl, carbofuran and fenobucarb. LC separation was carried out on an ODS column (ZORBAX Eclipse XDB-C18, 2.1 mm i.d. × 150 mm, 5 μm from Agilent Technologies Inc.; Santa Clara, CA, USA) using a gradient with 2 mmol/L ammonium acetate solution and acetonitrile as a mobile phase. In the MS/MS analysis, positive mode electrospray ionization (ESI+) was used.

Recovery tests were conducted on formula feed for finishing beef cattle, wheat, corn, milo and oaten hay. Formula feed for finishing beef cattle and corn were spiked with 0.01 or 0.1 mg/kg of carbaryl, 0.01 or 0.05 mg/kg of carbofuran and 0.01 or 0.3 mg/kg of fenobucarb. Wheat was spiked with 0.01 or 2 mg/kg of carbaryl, 0.01 or 0.2 mg/kg of carbofuran and 0.01 or 0.3 mg/kg of fenobucarb. Milo was spiked with 0.01 or 10 mg/kg of carbaryl, 0.01 or 0.1 mg/kg of carbofuran and 0.01 or 0.3 mg/kg of fenobucarb. Oaten hay was spiked with 0.1 or 250 mg/kg of carbaryl, 0.1 or 13 mg/kg of carbofuran and 0.1 or 10 mg/kg of fenobucarb. The mean recoveries ranged from 86.6 to 103 % for carbaryl, 91.3 to 105 % for carbofuran and 85.5 to 99.1 % for fenobucarb. The relative standard deviations of repeatability (RSD_r) were not more than 10 % for carbaryl, 7.4 % for carbofuran and 11 % for fenobucarb.

Key words: carbaryl; carbofuran; fenobucarb; liquid chromatograph-tandem mass spectrometer (LC-MS/MS); electrospray ionization (ESI); feed

キーワード：カルバリル；カルボフラン；フェノブカルブ；液体クロマトグラフトンデム型質量分析計；エレクトロスプレーイオン化法；飼料

1 緒 言

カルバリルは、米国 Union Carbide 社が開発したカーバメート系の殺虫剤であり、我が国では1959年に国内登録されている¹⁾。カルボフランは米国 FMC 社が導入したカーバメート系の殺虫剤

^{*} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター神戸センター

であり、国内登録はされておらず、米国でも使用が中止されている²⁾。フェノブカルブはクミアイ化学が開発したカーバメート系の殺虫剤であり、1968年に国内登録されている^{1), 3)}。

これらの農薬の我が国における飼料中の残留基準としては、飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令⁴⁾において、カルバリルはえん麦及びマイロで 10 mg/kg、大麦及びライ麦で 5 mg/kg、小麦で 2 mg/kg、とうもろこしで 0.1 mg/kg 及び牧草で 250 mg/kg、カルボフランは、カルボフラン及び 3-OH カルボフランをカルボフラン含量に換算したものの和と規定され⁵⁾、えん麦、マイロ及びライ麦で 0.1 mg/kg、大麦及び小麦で 0.2 mg/kg、とうもろこしで 0.05 mg/kg 及び牧草で 13 mg/kg、フェノブカルブはえん麦、大麦、小麦、とうもろこし、マイロ及びライ麦ともに 0.3 mg/kg の基準値が設定されている。また、フェノブカルブは、飼料の有害物質の指導基準及び管理基準⁶⁾において飼料用イネ（稲わら、稲発酵粗飼料及び粃米）の管理基準値が設定されている。

飼料（飼料用イネを除く。）中の当該 3 成分を含むカーバメート系農薬の同時定量法としては、飼料分析基準⁷⁾にポストカラム蛍光誘導体化液体クロマトグラフで定量する分析法が収載されている。しかし、この方法は上記基準値を念頭に置いた妥当性確認が実施されていない。また、測定機器についても、より汎用性のあるものが望ましい。

榑原は、財団法人日本食品分析センターが平成 21 年度飼料中の有害物質等分析法開発委託事業において開発した LC-MS/MS を用いた定量法⁸⁾（以下「JFRL 法」という。）を基に、飼料用イネ中の当該 3 成分を含む 8 成分の同時定量法について飼料分析基準への適用の可否を検討し、稲わら、稲発酵粗飼料及び粃米に適用可能な定量法⁹⁾（以下「イネ法」という。）を確立した。今回、飼料（飼料用イネを除く。）中のカルバリル、カルボフラン及びフェノブカルブについて、JFRL 法及びイネ法を基に飼料分析基準への収載を目途とした同時定量法の開発等について検討したので、その概要を報告する。

参考にカルバリル、カルボフラン及びフェノブカルブの構造式等を Fig. 1 に示した。

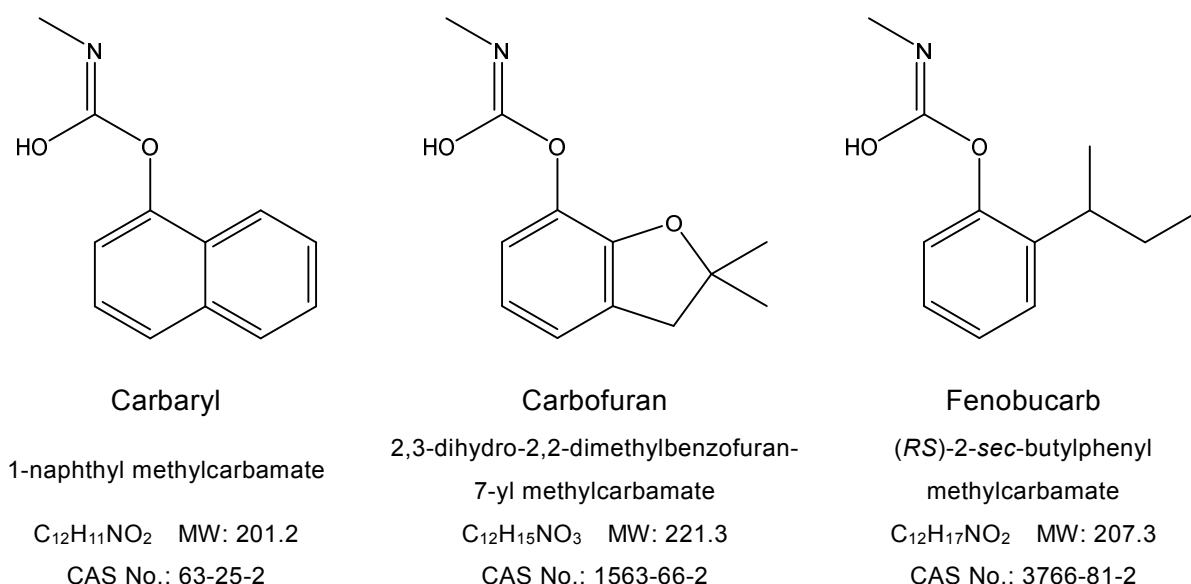


Fig. 1 Chemical structures of carbaryl, carbofuran and fenobucarb

2 実験方法

2.1 試料

成鶏飼育用配合飼料，種豚飼育用配合飼料，肉用牛肥育用配合飼料，えん麦，大麦，小麦，とうもろこし，マイロ，ライ麦，アルファルファ乾草及びオーツ乾草はそれぞれ 1 mm のスクリーンを装着した粉砕機で粉砕した。なお，検討に用いた配合飼料の配合割合を Table 1 に示した。

Table 1 Compositions of the formula feed

Formula feed types	Ingredient types	Proportion (%)	Ingredients
For breeding period chicken	Grains	55	Corn, brown rice, milo
	Oil seed meal	26	Soybean meal, rapeseed meal, corn gluten meal, sesame meal, corn germ meal
	Animal by-products	1	Meat-and-bone meal
	Brans	2	Rice bran, corn gluten feed
	Others	16	Calcium carbonate, animal fat, dried leftover, corn steep liquor, calcium phosphate, salt, enzyme-treated copra meal, feed additives
For breeding period pigs	Grains	65	Corn, milo, oat
	Oil seed meal	13	Soybean meal
	Animal by-products	3	Fish meal
	Brans	8	Wheat bran, rice powder
	Others	11	Alfalfa meal, bakery waste, calcium carbonate, calcium phosphate, salt, feed additives
For finishing beef cattle	Grains	56	Barley, corn, corn starch, potato starch
	Oil seed meal	5	Soybean meal
	Brans	38	Wheat bran, hominy feed, soybean hulls, corn gluten feed, rice bran, brewers grains
	Others	1	Molasses, calcium carbonate, salt, lactic acid bacteria, brewers yeast, butyric acid bacteria, saccharification bacteria, natural aluminum silicate, light silicic acid, galacto-oligosaccharide, glucose, zeolite, calcium propionate

2.2 試薬

1) アセトンは残留農薬・PCB 試験用を用いた。アセトニトリルはカラム処理には残留農薬・PCB 試験用を用い，標準液及び LC-MS/MS 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高速液体クロマトグラフ用（1 mol/L 溶液，和光純薬工業製）を用いた。水は Millipore, DIRECT-Q UV 3（Merck Millipore 製）により精製した超純水（JIS K0211 の 5218 に定義された超純水）を用いた。

2) カルバリル標準原液

カルバリル標準品（純度 99.8%，関東化学製）25 mg を正確に量って 50 mL の全量フラスコに入れ，アセトンを加えて溶かし，更に標線までアセトンを加えてカルバリル標準原液を調製した（この液 1 mL は，カルバリルとして 0.5 mg を含有する。）。

3) カルボフラン標準原液

カルボフラン標準品（純度 99.8%，関東化学製）25 mg を正確に量って 50 mL の全量フラスコに入れ，アセトンを加えて溶かし，更に標線までアセトンを加えてカルボフラン標準原液を調製した（この液 1 mL は，カルボフランとして 0.5 mg を含有する。）。

4) フェノブカルブ標準原液

フェノブカルブ標準品（純度 98.4%，関東化学製）25 mg を正確に量って 50 mL の全量フラスコに入れ，アセトンを加えて溶かし，更に標線までアセトンを加えてフェノブカルブ標準原液を調製した（この液 1 mL は，フェノブカルブとして 0.5 mg を含有する．）．

5) 混合標準液

各標準原液各 2 mL を 100 mL の全量フラスコに入れて混合し，更に標線までアセトンを加えて混合標準原液を調製した（この液 1 mL は，カルバリル，カルボフラン及びフェノブカルブとして各 10 µg を含有する．）．

使用に際して，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 中にカルバリル，カルボフラン及びフェノブカルブとして各 0.04，0.06，0.08，0.1，0.2，0.4，0.6，0.8，1，2，4，6，8，10，20，40，60，80，100，200，400 及び 600 ng を含有する混合標準液を調製した．

2.3 装置及び器具

1) 粉砕機：

粉砕機 1（乾牧草以外用）：ZM 200 Retsch 製（1 mm スクリーン，使用時回転数 14000 rpm）

粉砕機 2（乾牧草用）：SM 2000 Retsch 製（1 mm スクリーン，回転数（仕様）835 rpm）

2) 振とう機：MW-DRV 宮本理研工業製（使用時振とう数 300 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） ジューエルサイエンス製にリザーバーを連結したもの

4) LC-MS/MS：

LC 部：ACQUITY UPLC System Waters 製

MS/MS 部：ACQUITY TQ Detector 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 20 mL（乾牧草は 30 mL）を加え，30 分間静置後，更にアセトン 100 mL（乾牧草は 120 mL）を加え，30 分間振り混ぜて抽出した．200 mL の全量フラスコをブフナー漏斗の下に置き，抽出液をろ紙（5 種 B）で吸引ろ過した後，先の三角フラスコ及び残さを順次アセトン 50 mL で洗浄し，同様に吸引ろ過した．更に全量フラスコの標線までアセトンを加えた．この液 2 mL（乾牧草については，この液の一定量をアセトンで正確に 10 倍希釈した液 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）9 mL をミニカラムに加え，同様に吸引して各農薬成分を溶出させた．全量フラスコの標線まで同溶媒を加え，この液の一定量を 5000×g で 5 分間遠心分離し，上澄み液を LC-MS/MS による測定に供する試料溶液とし

た.

3) LC-MS/MS による測定

試料溶液及び各混合標準液各 5 μ L 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。測定条件を Table 2 及び 3 に示した。

Table 2 Operating conditions of LC-MS/MS

Column	ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1mm i.d. \times 150 mm, 5 μ m), Agilent Technologies
Mobile phase	2 mmol/L ammonium acetate solution–acetonitrile (4:1) → 15 min → (1:9) (hold for 5 min)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temperature	40 °C
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Mode	Positive
Source temperature	120 °C
Desolvation gas	N ₂ (650 L/h, 350 °C)
Capillary voltage	1 kV
Cone gas	N ₂ (50 L/h)
Collision gas	Ar (0.20 mL/h)

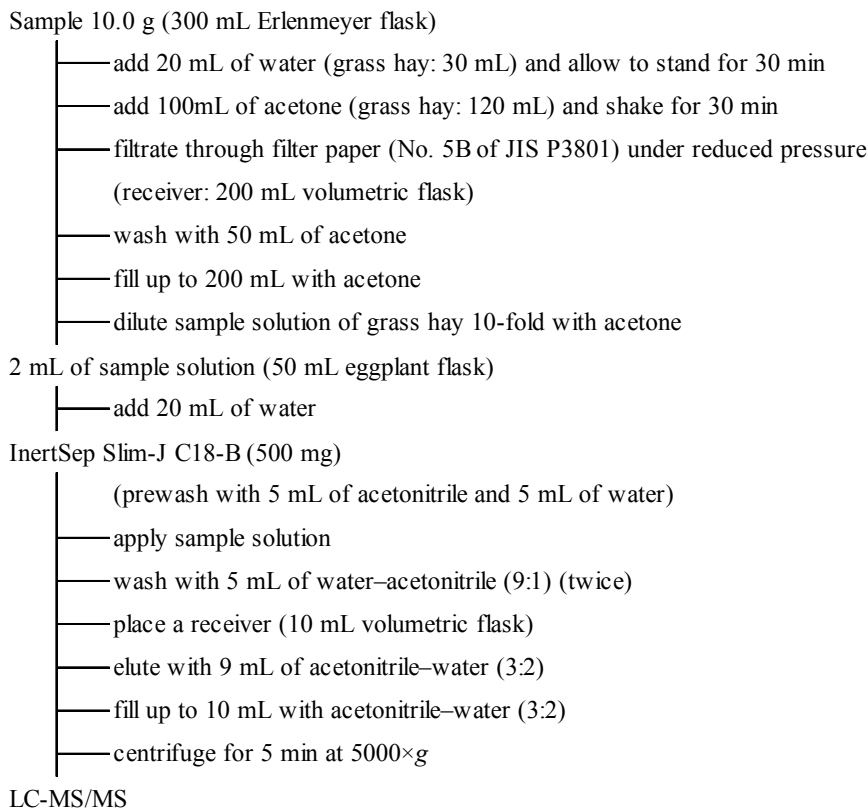
Table 3 MS/MS parameters

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>)		
Carbaryl	202	145	—	22	12
		—	127	22	28
Carbofuran	222	165	—	24	12
		—	123	24	23
Fenobucarb	208	95	—	24	16
		—	77	24	36

4) 計 算

得られた SRM 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、試料中のカルバリル、カルボフラン及びフェノブカルブ量を算出した。

なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。



Scheme 1 Analytical procedure for carbaryl, carbofuran and fenobucarb in feed

3 結果及び考察

3.1 検量線

2.2 の 5) に従って調製した各混合標準液各 5 μ 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及び高さを用いて検量線を作成した．得られた検量線の一例は，Fig. 2-1 から 2-3 のとおりであり，カルバリル，カルボフラン及びフェノブカルブは各 0.04~600 ng/mL (注入量として 0.0002~3 ng) の範囲で直線性を示した．

なお，当該検量線の濃度範囲は，カルバリル，カルボフラン及びフェノブカルブを 0.004~60 mg/kg 含有する分析用試料を本法に従い調製した最終試料溶液中のカルバリル，カルボフラン及びフェノブカルブ濃度範囲に相当する．

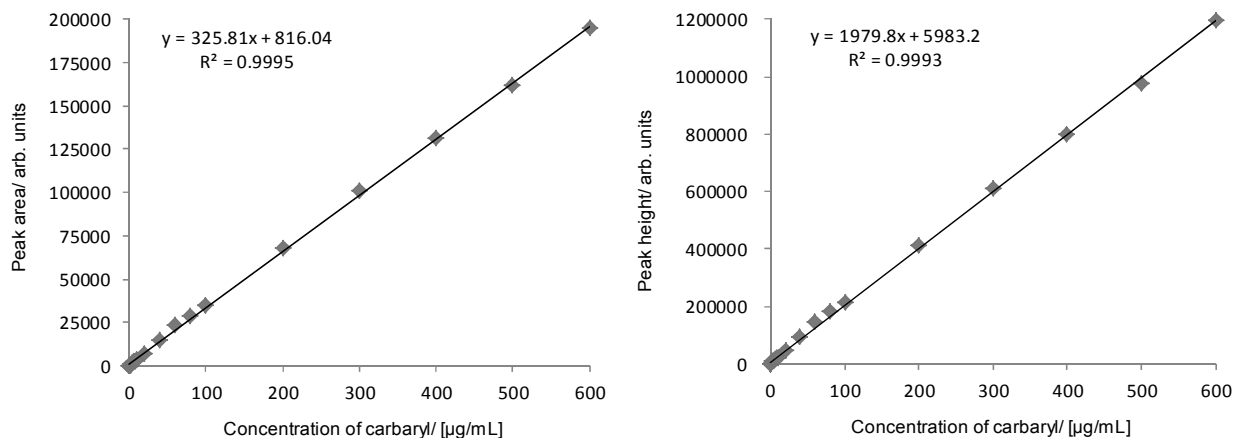


Fig. 2-1 Calibration curves of carbaryl by peak area (left) and peak height (right)

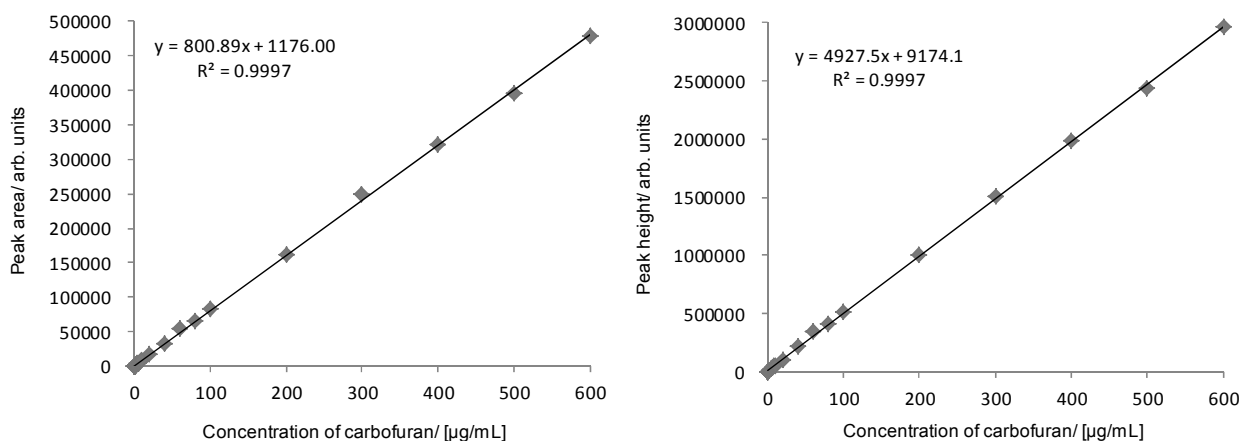


Fig. 2-2 Calibration curves of carbofuran by peak area (left) and peak height (right)

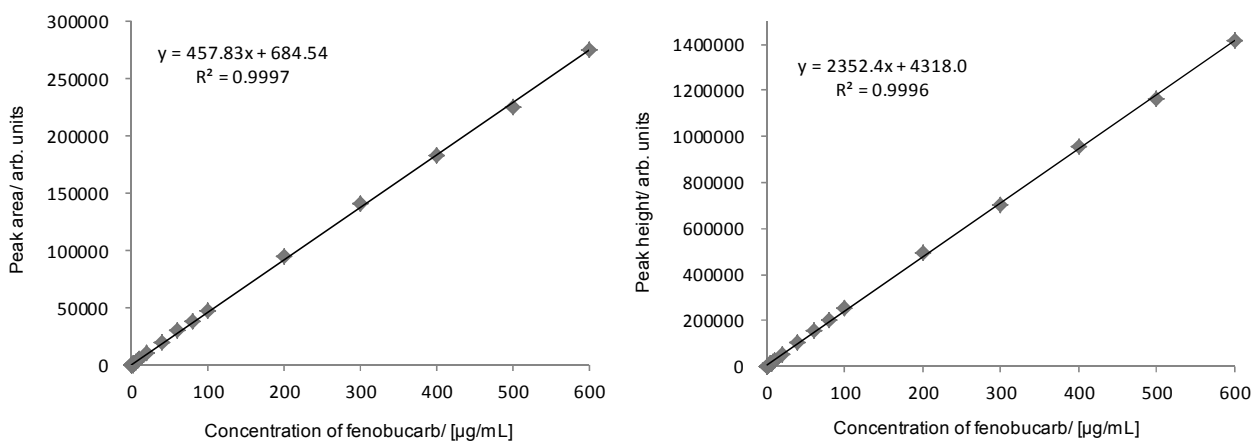


Fig. 2-3 Calibration curves of fenobucarb by peak area (left) and peak height (right)

3.2 抽出後の希釈操作について

飼料中のカルバリル等について最も低い基準値は、カルボフランのとうもろこしで 0.05 mg/kg と定められている。イネ法は、アセトン抽出後 200 mL に定容し、更に 10 倍希釈（稲発酵粗飼料は 100 倍希釈）を行うが、定量下限が 0.1 mg/kg であることから、飼料に適用するためにはよ

り低い濃度まで定量下限を下げる必要がある。そのため、基準値が高い乾牧草以外については、抽出後の 10 倍希釈を行わない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

小麦を用い、2.4 の 1)により調製したカラム処理に供する試料溶液に、カルバリル、カルボフラン及びフェノブカルブとして 1 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 10 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。その結果は Table 4 のとおりであり、カルバリル、カルボフラン及びフェノブカルブはアセトニトリル-水（3+2）0~9 mL の画分に溶出し、9~18 mL の画分には溶出が見られなかった。JFRL 法⁸⁾では 10 mL で溶出させているが、溶出液を受ける容器が 10 mL 全量フラスコであり標線を超えるおそれがあることから、本法では、9 mL で溶出させた後、全量フラスコの標線まで同溶媒を加え LC-MS/MS による測定に供する試料溶液とした。

Table 4 Elution pattern of pesticides from InertSep Slim-J C18-B

Pesticides	Mean recovery (%)			Total
	Water-acetonitrile	Acetonitrile-water	Acetonitrile-water	
	(9:1)	(3:2)	(3:2)	
	10 mL	0~9 mL	9~18 mL	
Carbaryl	0	97.0	0	97.0
Carbofuran	0	96.6	0	96.6
Fenobucarb	0	97.8	0	97.8

$n = 3$

3.4 妨害物質の検討

成鶏飼育用配合飼料，種豚飼育用配合飼料，肉用牛肥育用配合飼料，えん麦，大麦，小麦，とうもろこし，マイロ，ライ麦，アルファルファ乾草及びオーツ乾草各 1 検体を試料として，2.4 の 1)及び 2)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カルバリル，カルボフラン及びフェノブカルブの定量を妨げるピークは認められなかった。

なお，当該試料の SRM クロマトグラムを Fig. 3 に示した。

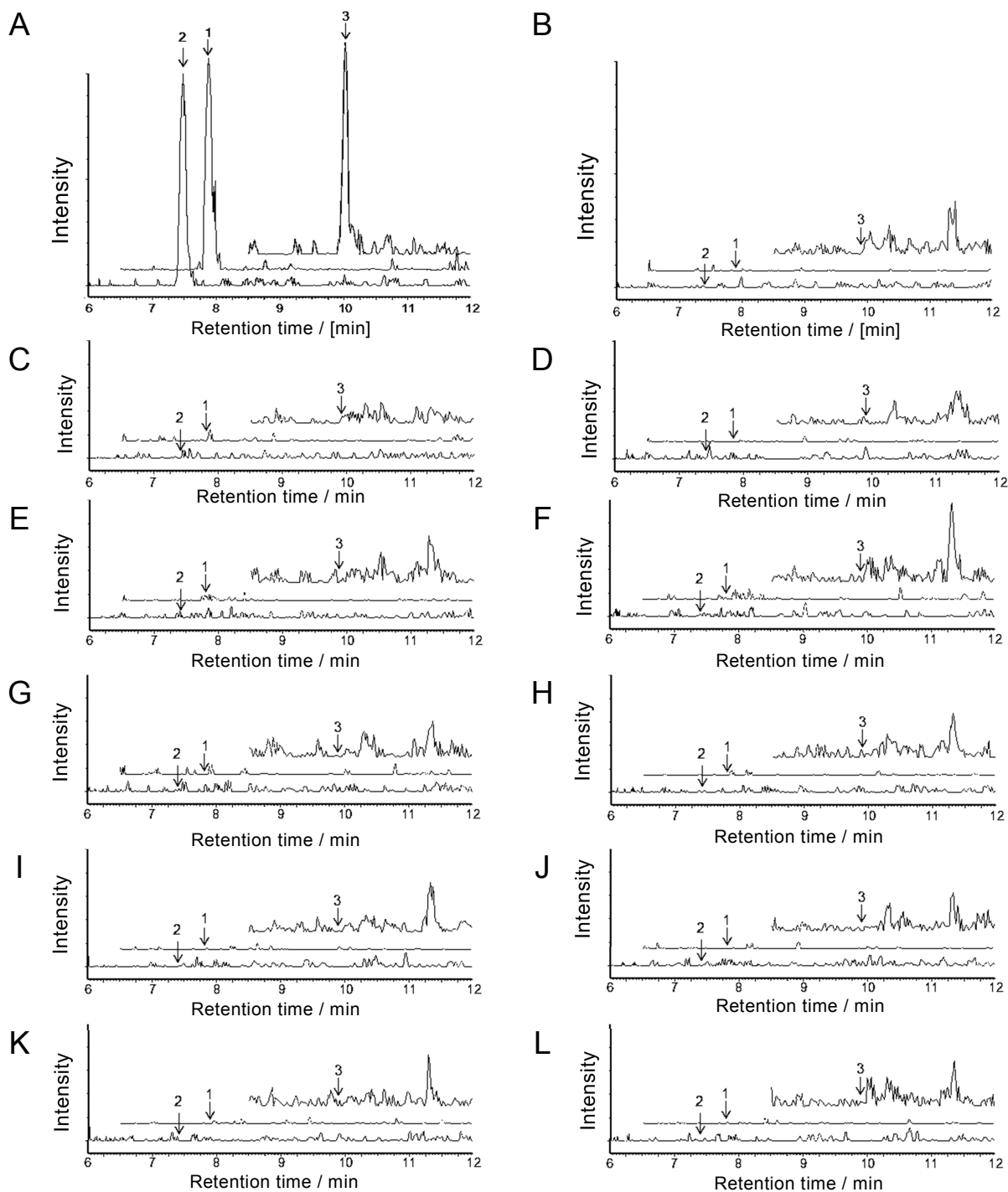


Fig. 3 Selected reaction monitoring (SRM) chromatograms of standard solution and blank sample solutions

(LC-MS/MS conditions are shown in Tables 2 and 3. Arrows indicate the retention time of 1: carbaryl, 2: carbofuran and 3: fenobucarb. The scale of vertical axis is normalized to chromatogram A, in which the peak height of the 0.1 ng/mL standard solution is to be shown as 100 % in each segment. The baselines are shifted for display.)

A: Standard solution (The concentration is each 0.1 ng/mL as carbaryl, carbofuran and fenobucarb.)

B~L: Blank sample solution (B: formula feed for breeding period chicken, C: formula feed for breeding period pigs, D: formula feed for finishing beef cattle, E: oat, F: barley, G: wheat, H: corn, I: milo, J: rye, K: alfalfa hay, L: oaten hay)

3.5 マトリックス効果の確認

2.4 の 1)及び 2)により調製した成鶏飼育用配合飼料，種豚飼育用配合飼料，肉用牛肥育用配合飼料及びとうもろこしのブランク試料溶液にカルバリルとして 1 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 10 ng/mL 相当量），カルボフラン及びフェノブカルブとして 0.5 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 5 ng/mL 相当量）を，えん麦，大麦，小麦，マイロ及びライ麦のブランク試料溶液にカルバリルとして 2 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 20 ng/mL 相当量），カルボフラン及びフェノブカルブとして 1 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 10 ng/mL 相当量）を，アルファルファ乾草及びオーツ乾草のブランク試料溶液にカルバリル，カルボフラン及びフェノブカルブとして 20 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 20 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 5)に従って調製した同濃度の混合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 Table 5 のとおり，カルバリルで 93~108 %，カルボフランで 97~109 %，フェノブカルブで 93~104 %であり，カルバリル，カルボフラン及びフェノブカルブ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。

Table 5 Results of matrix effect study

Feed types of matrix	Carbaryl			Carbofuran			Fenobucarb		
	Concentration		Matrix effect ^{b)} (%)	Concentration		Matrix effect ^{b)} (%)	Concentration		Matrix effect ^{b)} (%)
	in matrix standard solution (µg/mL)	in sample ^{a)} (mg/kg)		in matrix standard solution (µg/mL)	in sample ^{a)} (mg/kg)		in matrix standard solution (µg/mL)	in sample ^{a)} (mg/kg)	
Formula feed for									
breeding period chicken	10	1	96	5	0.5	98	5	0.5	93
breeding period pigs	10	1	96	5	0.5	99	5	0.5	96
finishing beef cattle	10	1	108	5	0.5	103	5	0.5	104
Oat	20	2	93	10	1	97	10	1	99
Barley	20	2	104	10	1	106	10	1	97
Wheat	20	2	106	10	1	109	10	1	104
Corn	10	1	97	5	0.5	101	5	0.5	94
Milo	20	2	98	10	1	101	10	1	93
Rye	20	2	104	10	1	103	10	1	100
Alfalfa hay	20	20	108	20	20	101	20	20	97
Oaten hay	20	20	102	20	20	101	20	20	101

$n = 1$

a) Converted from the concentration in the matrix standard solution

b) Ratio of peak area of pesticides in the presence of matrix to that in the absence of matrix

3.6 添加回収試験

2.2 の 2)~4)のカルバリル標準原液，カルボフラン標準原液及びフェノブカルブ標準原液をアセトニトリル-水 (3+2) で正確に希釈し添加に用いた。

肉用牛肥育用配合飼料及びとうもろこしについて，カルバリルとして 0.01 及び 0.1 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 0.1 及び 1 ng/mL），カルボフランとして 0.01 及び 0.05 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 0.1 及び 0.5 ng/mL），フェノブカルブとして 0.01 及び 0.3 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 0.1 及び 3 ng/mL），小麦について，カルバリルとして 0.01 及び 2 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 0.1 及び 20 ng/mL），カルボフランとして 0.01 及び 0.2 mg/kg 相当量（最終

試料溶液中で 0.1 及び 2 ng/mL) , フェノブカルブとして 0.01 及び 0.3 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.1 及び 3 ng/mL) , マイロについて, カルバリルとして 0.01 及び 10 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.1 及び 100 ng/mL) , カルボフランとして 0.01 及び 0.1 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.1 及び 1 ng/mL) , フェノブカルブとして 0.01 及び 0.3 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.1 及び 3 ng/mL) , オーツ乾草について, カルバリルとして 0.1 及び 250 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.1 及び 250 ng/mL) , カルボフランとして 0.1 及び 13 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.1 及び 13 ng/mL) , フェノブカルブとして 0.1 及び 10 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.1 及び 10 ng/mL) になるようにそれぞれ添加後よく混合し, 一夜静置した後に本法に従って定量し, 平均回収率及び繰返し精度を求めた.

その結果は Table 6 のとおり, カルバリルの平均回収率は 86.6~103 %, その繰返し精度は RSD_r として 10 %以下, カルボフランの平均回収率は 91.3~105 %, その繰返し精度は RSD_r として 7.4 %以下, フェノブカルブの平均回収率は 85.5~99.1 %, その繰返し精度は RSD_r として 11 %以下の成績が得られ, 飼料分析基準の妥当性確認法ガイドライン⁷⁾ (以下「妥当性確認法ガイドライン」という.) に定められた真度及び併行精度の目標値を満たしていた.

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 6 Recoveries for carbaryl, carbofrin and fenobucarb

Pesticides	Spiked level (mg/kg)	Feed types									
		Formula feed for cattle		Wheat		Corn		Milo		Oaten hay	
		Recovery ^{a)} (%)	RSD_r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD_r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD_r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD_r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD_r ^{b)} (%)
Carbaryl	0.01	89.6	7.2	92.6	8.8	96.0	10	90.6	7.2	—	—
	0.1	96.9	2.5	—	—	96.2	4.5	—	—	86.6	6.6
	2	—	—	92.9	4.0	—	—	—	—	—	—
	10	—	—	—	—	—	—	96.4	1.1	—	—
	250	—	—	—	—	—	—	—	—	103	1.1
Carbofuran	0.01	93.2	6.6	95.1	6.5	105	7.4	97.8	4.3	—	—
	0.05	95.8	3.7	—	—	94.0	1.2	—	—	—	—
	0.1	—	—	—	—	—	—	93.4	6.9	92.8	5.0
	0.2	—	—	91.3	1.9	—	—	—	—	—	—
	13	—	—	—	—	—	—	—	—	95.7	2.1
Fenobucarb	0.01	89.4	6.8	85.5	11	92.9	7.3	86.8	7.3	—	—
	0.1	—	—	—	—	—	—	—	—	95.3	5.5
	0.3	95.0	1.3	91.8	2.7	94.3	3.1	95.6	2.2	—	—
	10	—	—	—	—	—	—	—	—	99.1	2.6

—: Not tested

a) Mean ($n = 5$)

b) Relative standard deviation of repeatability

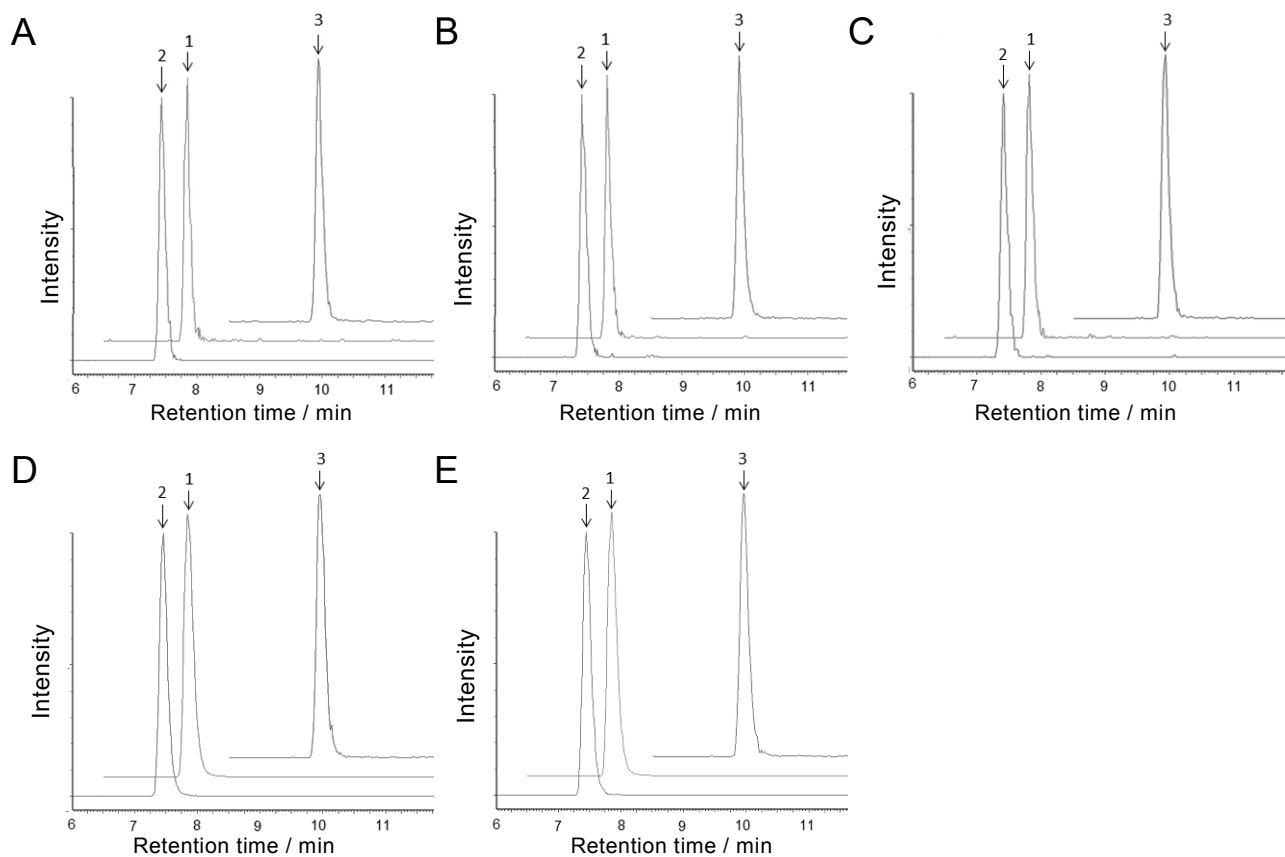


Fig. 4 Selected reaction monitoring chromatograms of standard solutions and spiked samples (LC-MS/MS conditions are shown in Tables 2 and 3. Arrows indicate the peak of 1: carbaryl, 2: carbofuran and 3: fenobucarb. Each peak is shown as 100 % in each segment. The baselines are shifted for display.)

A: Standard solution (The concentrations of carbaryl, carbofuran and fenobucarb are 1 ng/mL, 0.5 ng/mL and 0.3 ng/mL, respectively.)

B: Sample solution of formula feed for cattle spiked at 0.1 mg/kg of carbaryl, 0.05 mg/kg of carbofuran and 0.3 mg/kg of fenobucarb (corresponding to 1 ng/mL as carbaryl, 0.5 ng/mL as carbofuran and 0.3 ng/mL as fenobucarb)

C: Sample solution of corn spiked at 0.1 mg/kg of carbaryl, 0.05 mg/kg of carbofuran and 0.3 mg/kg of fenobucarb (corresponding to 1 ng/mL as carbaryl, 0.5 ng/mL as carbofuran and 0.3 ng/mL as fenobucarb)

D: Standard solution (The concentrations of carbaryl, carbofuran and fenobucarb are 250 ng/mL, 13 ng/mL and 10 ng/mL, respectively.)

E: Sample solution of oaten hay spiked at 250 mg/kg of carbaryl, 13 mg/kg of carbofuran and 10 mg/kg of fenobucarb (corresponding to 250 ng/mL as carbaryl, 13 ng/mL as carbofuran and 10 ng/mL as fenobucarb)

3.7 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、肉用牛肥育用配合飼料、小麦、とうもろこし、マイロ及びオーツ乾草にカルバリル、カルボフラン及びフェノブカルブを添加し、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。

その結果、SN比が10及び3となる濃度は、カルバリル、カルボフラン及びフェノブカルブともに、オーツ乾草以外の試料については0.01 mg/kg及び0.003 mg/kg、オーツ乾草については0.1 mg/kg及び0.03 mg/kgであったことから、試料中で定量下限は0.01 mg/kg（乾牧草については0.1 mg/kg）、検出下限は0.003 mg/kg（乾牧草については0.03 mg/kg）であった。設定した定量下限は、省令⁴⁾に定められた飼料中のカルボフランの基準値の最小濃度0.05 mg/kgに対して1/5の濃度であり、妥当性確認法ガイドラインに規定された目標を満たしていた。検出下限についても同様に目標を満たしていた。

なお、Table 6 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。

4 まとめ

飼料に残留するカルバリル、カルボフラン及びフェノブカルブについて、JFRL法及びイネ法を基に、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、抽出後の試料溶液を10倍希釈しないこと（乾牧草を除く）及びカラム処理における溶出溶媒量を10 mLから9 mLに変更することで、以下の結果が得られた。

- 1) 検量線は、0.04~600 ng/mL（注入量として0.0002~3 ng）の範囲で直線性を示した。
なお、当該検量線の濃度範囲は、カルバリル、カルボフラン及びフェノブカルブを0.004~60 mg/kg含有する分析用試料を、本法に従い調製した最終試料溶液中のカルバリル、カルボフラン及びフェノブカルブ濃度範囲に相当する。
- 2) 成鶏飼育用配合飼料、種豚飼育用配合飼料、肉用牛肥育用配合飼料、えん麦、大麦、小麦、とうもろこし、マイロ、ライ麦、アルファルファ乾草及びオーツ乾草について、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) 本法に従い得られた試料溶液についてマトリックス効果を確認した結果、カルバリル、カルボフラン及びフェノブカルブ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。
- 4) 肉用牛肥育用配合飼料、小麦、とうもろこし、マイロ及びオーツ乾草にカルバリル、カルボフラン及びフェノブカルブとして0.01~250 mg/kg相当量を添加し、本法に従って5点併行分析を実施し、回収率及び繰返し精度を求めたところ、妥当性確認法ガイドラインに定められた真度及び併行精度の目標値を満たす良好な結果が得られた。
- 5) 本法のカルバリル、カルボフラン及びフェノブカルブの定量下限は試料中で0.01 mg/kg（乾牧草については0.1 mg/kg）、検出下限は0.003 mg/kg（乾牧草については0.03 mg/kg）であった。設定した定量下限及び検出下限は、妥当性確認法ガイドラインに定められた目標を満たしていた。

文 献

- 1) 一般社団法人日本植物防疫協会：農薬ハンドブック 2016年版（改訂新版），420-421，日本植物防疫協会，東京，(2016) (ISBN: 978-4-88926-146-2).
- 2) 内閣府食品安全委員会：食品安全総合情報システム，
<http://www.fsc.go.jp/fsciis/foodSafetyMaterial/show/syu02850270108>, cited 21 Dec. 2016.

- 3) 食品安全委員会農薬専門調査会，食品安全委員会動物用医薬品専門調査会：農薬・動物用医薬品評価書 (2013).
- 4) 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).
- 5) 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 18 年 5 月 26 日，18 消安第 2321 号 (2006).
- 6) 農林水産省畜産局長通知：飼料の有害物質の指導基準及び管理基準について，昭和 63 年 10 月 14 日，63 畜 B 第 2050 号 (1988).
- 7) 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).
- 8) 財団法人日本食品分析センター：平成 21 年度飼料中の有害物質等分析法開発委託事業 (2010).
- 9) 榑原 良成：飼料用イネ中のカルバリル他 8 成分の農薬の液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による同時定量法，飼料研究報告，37，19-45 (2012).