

## 2 飼料中のチオファネートの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による分析法の開発

奥富 幸<sup>\*1</sup>, 田島 麻帆<sup>\*2</sup>, 酒井 妙衣<sup>\*1</sup>, 牧野 大作<sup>\*3</sup>

### Development of Determination Method of Thiophanate in Feed by LC-MS/MS

OKUTOMI Yuki<sup>\*1</sup>, TASHIMA Maho<sup>\*2</sup>, SAKAI Tae<sup>\*1</sup> and MAKINO Daisaku<sup>\*3</sup>

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

\*<sup>2</sup> Fukuoka Regional Center, FAMIC (Now Japan Accreditation Service for agriculture, forestry and fisheries, FAMIC),

\*<sup>3</sup> Fukuoka Regional Center, FAMIC (Now Kobe Regional Center, FAMIC))

We have developed a quantitative determination method of the concentration of thiophanate in feed using a liquid-chromatograph electrospray-ionization tandem mass spectrometer (LC-ESI-MS/MS).

Having added water and sodium L-ascorbate to a sample, thiophanate was extracted with methanol, and the extracted solution was filtered. The filtrate was diluted with methanol. An aliquot of the filtrate was refluxed at 120 °C for 30 minutes with copper acetate in 50 % acetic acid solution to form ethyl benzimidazole-2-ylcarbamate (EBC) by ring closure reaction. The solution was washed with *n*-hexane and the aqueous layer was adjusted to pH 6.8~6.9 with 1~10 mol/L sodium hydroxide solution. EBC was extracted with ethyl acetate, inverted into a methanol solution and then injected into an LC-MS/MS to determine the concentration of EBC. LC separation was then carried out on an ODS column (ZORBAX Eclipse XDB-C18, 2.1 mm i.d. × 150 mm, 5 μm, Agilent Technologies Inc.; Santa Clara, CA, USA) with a gradient of 2 mmol/L ammonium acetate solution and methanol as a mobile phase. In the MS/MS analysis, the positive mode electrospray ionization (ESI+) was used. Standard solution of EBC to make the calibration curve was also prepared from thiophanate by ring closure reaction.

Recovery tests were conducted on formula feed for layers, barley, maize, timothy hay, rice straw, paddy rice and whole-crop rice silage (WCRS). Thiophanate was added at different levels as following: 0.2 and 1.5 mg/kg for formula feed for layers; 0.2 and 1.2 mg/kg for barley; 0.2 and 1.5 mg/kg for maize; 3 and 20 mg/kg for timothy hay; 7 and 40 mg/kg for rice straw; 1 and 10 mg/kg for paddy rice; and 1.78 and 11.1 mg/kg for WCRS. The resulting mean recoveries ranged from 83.8 % to 116 % for EBC, excluding 122 % of paddy rice for which the recovery rate was out of target. The repeatability in the form of the relative standard deviation (RSD<sub>r</sub>) was less than 10 % for EBC.

Key words: thiophanate; ethyl benzimidazole-2-ylcarbamate; ring closure reaction; liquid-chromatograph tandem mass spectrometer (LC-MS/MS); electrospray ionization (ESI); feed

キーワード：チオファネート；エチル-2-ベンゾイミダゾールカルバマート；閉環反応；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

\*<sup>1</sup> 独立行政法人農林水産消費安全技術センター福岡センター

\*<sup>2</sup> 独立行政法人農林水産消費安全技術センター福岡センター，現 認定センター

\*<sup>3</sup> 独立行政法人農林水産消費安全技術センター福岡センター，現 神戸センター

## 1 緒 言

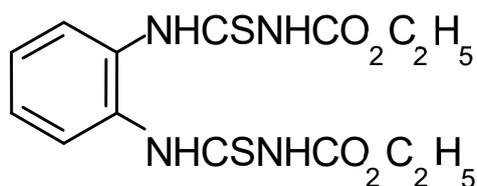
チオファネートは日本曹達が開発した野菜のウドンコ病，灰色カビ病，果樹のクロホシ病に適用されるベンズイミダゾール系殺菌剤である．日本では 1969 年に農薬として登録されたが，1974~1987 年にかけて登録が失効<sup>1)</sup>し，1983 年時点で原体の製造はなくチオファネートメチルに置き換わったとされている<sup>2)</sup>．海外での登録状況については，2021 年時点において EU，アメリカ，カナダ等での登録は確認できていない一方で，FAO がアジア圏を対象に 2015 年に行った調査では，唯一北朝鮮において現在も登録があると報告されている<sup>3)</sup>．

我が国での飼料中の基準は，カルベンダジム，ベノミルをカルベンダジム含量に換算したもの，チオファネートをカルベンダジム含量に換算したもの及びチオファネートメチルをカルベンダジム含量に換算したものの総和として，えん麦，大麦，小麦，マイロ及びライ麦で 0.6 mg/kg，とうもろこしで 0.7 mg/kg，牧草で 10 mg/kg，稲わらで 20 mg/kg，稲発酵粗飼料（以下「WCRS」という．）及び粃米で 5 mg/kg となっている<sup>4),5)</sup>．

飼料中の分析法としては，平成 17 年度に堀米ら<sup>6)</sup>が液体クロマトグラフ質量分析計を用いた飼料中のカルベンダジム，チオファネート，チオファネートメチル及びベノミルの同時定量法を検討したが，チオファネートの回収率が目標値の 70 %を下回ったため，チオファネートを除く 3 成分の同時分析法が飼料分析基準<sup>7)</sup>に収載されている．チオファネートについては，平成 22 年度に，財団法人日本食品分析センター<sup>8)</sup>が「飼料中の有害物質等分析法開発委託事業」において，堀米らの方法を基に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．）を用いた定量法（以下「JFRL 法」という．）の検討を行ったが，その平均回収率は 66.2~81.2 %となり，一部の試料において，飼料分析基準別表 3 の試験法の妥当性確認法ガイドライン（以下「妥当性確認法ガイドライン」という．）に定められた目標値（70~120 %）を満たしていなかった．

このため本検討では，飼料中の分析法が確立されていないチオファネートについて，JFRL 法の飼料分析基準への収載の可否を検討したので，その概要を報告する．

参考にチオファネートの構造式を Fig. 1 に示した．



Thiophanate

ethyl *N*-[[2-(ethoxycarbonylcarbamothioylamino)phenyl]carbamothioyl]carbamate

C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>S<sub>2</sub> MW: 370.5 CAS No.: 23564-06-9

Fig. 1 Chemical structure of thiophanate

## 2 実験方法

### 2.1 試 料

成鶏飼育用配合飼料，大麦，とうもろこし，チモシー乾草，稲わら及び粃米はそれぞれ目開き 1 mm のスクリーンを装着した粉碎機で粉碎し，分析用試料とした．WCRS は 60 °C で 10 時間乾

燥後，更に室内に静置して風乾した後，同様に粉碎し分析用試料とした。

なお，検討に用いた配合飼料を Table 1 に示した。

Table 1 Compositions of the formula feed

Formula feed type	Ingredient type	Proportion (%)	Ingredients
For layers	Grains	53	Corn, polished white rice, paddy rice
	Oil seed meal	24	Soybean meal, rapeseed meal, linseed meal
	Brans	7	Dried distiller's grains with solubles
	Animal by-products	2	Fish meal, poultry by-product meal
	Others	14	Animal fat, Calcium carbonate, salt, calcium phosphate, citric acid, purified wood vinegar, soft chacoal powder, paprika extract, silicic anhydride, extract of marigold petal, fermented milk powder, culture of Pannier Bacillus, feed additives

## 2.2 試薬

1) 酢酸エチル及びヘキサンは残留農薬・PCB 試験用を用いた。メタノールは溶離液及び最終試料溶液には LC-MS 用（富士フィルム和光純薬製又は関東化学製）を用い，それ以外には残留農薬・PCB 試験用を用いた。L-アスコルビン酸ナトリウム，塩化ナトリウム，塩酸，酢酸，酢酸銅（II）一水和物及び硫酸ナトリウム（無水）は試薬特級を用いた。1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液は高速液体クロマトグラフ用（富士フィルム和光純薬製）を用いた。水は市販の LC-MS 用（富士フィルム和光純薬製又は関東化学製）を用いた。

### 2) チオファネート標準原液

チオファネート標準品（富士フィルム和光純薬製，純度 99.6 %）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，更に標線まで同溶媒を加えてチオファネート標準原液を調製した（この液 1 mL は，チオファネートとして 0.5 mg を含有）。

使用に際して，この標準原液の一定量をメタノールで正確に希釈し，1 mL 中にチオファネートとして 400 ng を含有する検量線作成用の標準液を調製し，2.4 の 2)から 4)までの操作を試料溶液と同様に行った。その標準液の一定量をメタノールで希釈し，1 mL 中にチオファネートとして 1, 2, 10, 20, 50, 100 及び 200 ng（エチル-2-ベンゾイミダゾールカルバマート（以下「EBC」という。）として 0.554, 1.11, 2.77, 5.54, 11.1, 27.7, 55.4 及び 111 ng）を含有する検量線の各標準液を調製した。

### 3) EBC 標準液

EBC 標準品（林純薬工業製，純度 98.9 %）10 mg を正確に量って 100 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 EBC 標準原液を調製した（この液 1 mL は，EBC として 0.1 mg を含有）。

使用に際して，EBC 標準原液の一定量をメタノールで正確に希釈し，1 mL 中に EBC としてそれぞれ 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 25, 50 及び 100 ng を含有する検量線作成用の各標準液を調製した。

## 2.3 装置及び器具

### 1) 粉碎機：

粉碎機 1（配合飼料，大麦，とうもろこし及び粃米用）：

ZM 200 Retsch 製（目開き 1 mm スクリーン，使用時回転数 14000 rpm）

粉碎機 2（チモシー乾草，稲わら及び WCRS 用）：

SM 100 Retsch 製（目開き 1 mm スクリーン，回転数（仕様）1430 rpm）

### 2) 振り混ぜ機：レシプロシェーカーSR-2DW タイテック製（使用時振とう数 300 rpm）

### 3) LC-MS/MS：

LC 部：Nexera X2 島津製作所製

MS/MS 部：LCMS-8045 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，L-アスコルビン酸ナトリウム 1 g，水 20 mL（チモシー乾草，稲わら及び WCRS の場合は 30 mL）を加え 30 分間静置後，更にメタノール 100 mL（チモシー乾草，稲わら及び WCRS の場合は 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メタノール 50 mL で洗浄し，同様に吸引ろ過した．さらに全量フラスコの標線までメタノールを加えた．成鶏飼育用配合飼料，大麦，とうもろこしは，この液を閉環反応に供する試料溶液とした．チモシー乾草，稲わら，粃米及び WCRS は，この液 2 mL を 20 mL の全量フラスコに加え，標線までメタノールを加えた液を閉環反応に供する試料溶液とした．

### 2) 閉環反応

試料溶液 1 mL を 50 mL のなす形フラスコに正確に入れた．さらに，酢酸（1+1）10 mL，酢酸銅（II）一水和物 0.2 g 及び沸石を数個加え，空冷管を接続した後，120 °C の油浴上で 30 分間加熱してチオファネートを EBC に変換した後放冷した．放冷後，1 mol/L 塩酸 10 mL を空冷管の上部から加えて管壁を洗浄し，試料溶液に合わせ，液液分配 I に供する試料溶液とした．

検量線に用いる 400 ng/mL チオファネート標準液 1 mL を同様に閉環反応に供し，以降試料溶液と同様の操作を行った．

### 3) 液液分配 I

試料溶液をあらかじめ塩化ナトリウム 5 g を入れた 200 mL の分液漏斗 A に加え，試料溶液の入っていたなす形フラスコを 1 mol/L 塩酸 20 mL で洗浄し，洗液を試料溶液に合わせた．さらに分液漏斗 A にヘキサン 20 mL を加え，5 分間振り混ぜた後静置し，水層（下層）を 200 mL の分液漏斗 B に入れた．分液漏斗 B にヘキサン 20 mL を加え，5 分間振り混ぜた後静置し，水層（下層）を 100 mL のトールビーカーに入れ，液液分配 II に供する試料溶液とした．

### 4) 液液分配 II

試料溶液を 1 mol/L 及び 10 mol/L 水酸化ナトリウム溶液で pH 6.8~6.9 に調整した後，300 mL の分液漏斗 C に入れた．試料溶液の入っていたトールビーカーを酢酸エチル 50 mL で洗浄し，洗液を試料溶液に合わせた．分液漏斗 C を 5 分間振り混ぜた後静置し，水層（下層）を 300 mL の分液漏斗 D に入れ，酢酸エチル層（上層）を 200 mL の三角フラスコに入れた．分液漏

斗 D に酢酸エチル 50 mL を加え、5 分間振り混ぜた後静置し、水層を捨て、酢酸エチル層を先の三角フラスコに合わせた。酢酸エチル層を適量の硫酸ナトリウム（無水）で脱水し、300 mL のなす形フラスコにろ紙（5 種 B）でろ過した。先の三角フラスコを少量の酢酸エチルで洗浄し、洗液を先のろ紙を通してろ液に合わせた。ろ液を 40 °C 以下の水浴で約 1 mL まで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固した。メタノール 2 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、上澄み液を LC-MS/MS の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 EBC 標準液各 2 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。測定条件を Table 2 及び 3 に示した。

Table 2 Operation conditions of LC-MS/MS

Column	ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm i.d. × 150 mm, 5 µm), Agilent Technologies
Mobile phase	2 mmol/L ammonium acetate-methanol (3:2) (hold for 5 min) → 5 min → (5:95) (hold for 5 min) → 0.1 min → (3:2) (hold for 8 min)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temperature	40 °C
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Mode	Positive
Nebulizer gas	Air (3 L/min)
Drying gas	N <sub>2</sub> (10 L/min)
Heating gas	N <sub>2</sub> (10 L/min)
Interface temperature	350 °C
Heat block temperature	500 °C
Desolvation line temperature	120 °C
Collision gas	Ar (230 kPa)

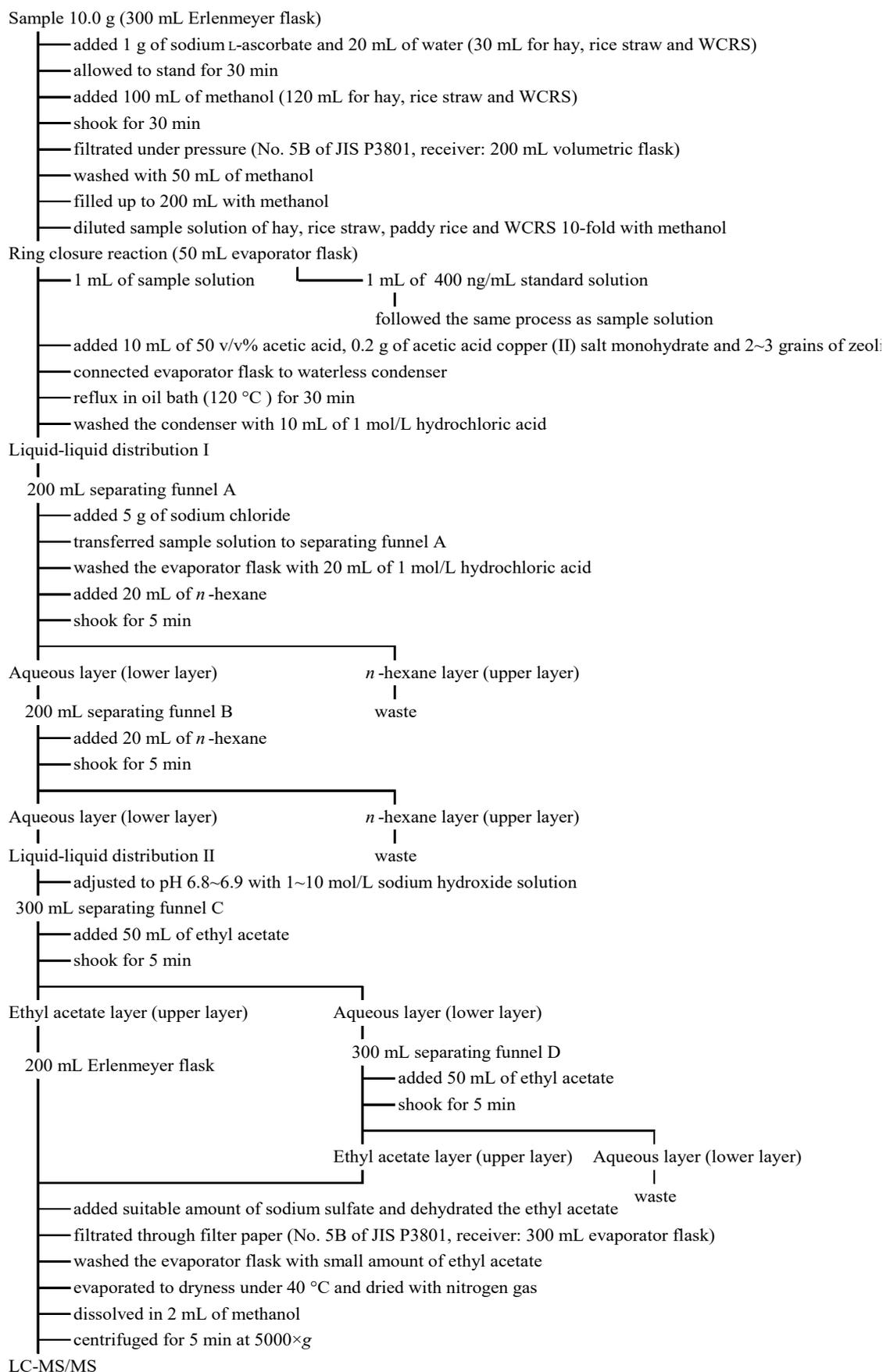
Table 3 MS/MS parameters

Target	Precursor ion ( <i>m/z</i> )	Product ion		Collision energy (eV)
		Quantifier ( <i>m/z</i> )	Qualifier ( <i>m/z</i> )	
Thiophanate	206	160	-	17
		-	134	20

#### 6) 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 EBC 量を算出した。なお、本法では、チオファネートは操作中に EBC に変換されるため EBC として定量し、EBC 量に 1.806 を乗じてチオファネート量に換算した。

なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。



Scheme 1 Analytical procedure for thiophanate in feed

## 2.5 添加回収試験

2.2 の 2) で調製したチオフアネート標準原液又はそれをメタノールで正確に希釈した標準液を添加に用いた。

チオフアネートとして、成鶏飼育用配合飼料に 0.2 及び 1.5 mg/kg 相当量（最終試料溶液中でチオフアネートとして 0.005 及び 0.0375 µg/mL, EBC として 0.00277 及び 0.0208 µg/mL）、大麦に 0.2 及び 1.2 mg/kg 相当量（最終溶液中でチオフアネートとして 0.005 及び 0.03 µg/mL, EBC として 0.00277 及び 0.0166 µg/mL）、とうもろこしに 0.2 及び 1.5 mg/kg 相当量（最終試料溶液中でチオフアネートとして 0.005 及び 0.0375 µg/mL, EBC として 0.00277 及び 0.0208 µg/mL）、チモシー乾草に 3 及び 20 mg/kg 相当量（最終試料溶液中でチオフアネートとして 0.0075 及び 0.05 µg/mL, EBC として 0.00415 及び 0.0277 µg/mL）、稲わらに 7 及び 40 mg/kg 相当量（最終試料溶液中でチオフアネートとして 0.0175 及び 0.1 µg/mL, EBC として 0.00969 及び 0.0554 µg/mL）、粳米に 1 及び 10 mg/kg 相当量（最終試料溶液中でチオフアネートとして 0.0025 及び 0.025 µg/mL, EBC として 0.00138 及び 0.0138 µg/mL）、WCRS に原物換算して 1.78 及び 11.1 mg/kg 相当量（最終試料溶液中でチオフアネートとして 0.01 及び 0.0625 µg/mL, EBC として 0.00554 及び 0.0346 µg/mL）になるようにそれぞれ添加後よく混合した後、一夜静置した後に 2.4 に従って 5 点で定量し、添加回収率及び繰返し精度を求めた。

なお、WCRS への添加は風乾物試料に対してチオフアネートとして 4 及び 25 mg/kg 相当量になるよう行い、原物中濃度への換算は、原物中及び風乾物中の水分含有量を 60 % 及び 10 % と想定して、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 の式により行った。

## 2.6 粳米における過回収の原因調査

粳米 10.0 g を量って 300 mL の共栓三角フラスコに入れ、2.4 の 1) に示すろ液を 200 mL の全量フラスコで定容する操作まで行い、得られた試料溶液をメタノールで 10 倍（通常の希釈倍率）、20 倍及び 40 倍に希釈し、その試料溶液 1 mL に対し、粳米の基準値である 10 mg/kg 相当量のチオフアネート（最終試料溶液中でチオフアネートとして 0.025 µg/mL 相当量, EBC として 0.0138 µg/mL 相当量）を添加量が 40 µL 以下になるように添加した。各試料は 2.4 の 2)~3) に従って操作後、4) に従ってろ液を約 1 mL になるまで減圧濃縮したものを 25 mL のなし型フラスコに移し、さらに酢酸エチル 2 mL で移し込みを行った後、窒素ガスを送って乾固した。メタノールを、10 倍希釈した試料には 2 mL、20 倍希釈をした試料には 1 mL、40 倍希釈をした試料には 0.5 mL をそれぞれ正確に加えて残留物を溶かした後、5000 × g で 5 分間遠心分離し、上澄み液を LC-MS/MS の測定に供する試料溶液とし、EBC の回収率を比較した。なお、分析操作は 2 試験者で各濃度 1 点ずつ行った。

# 3 結果及び考察

## 3.1 JFRL 法からの変更点

JFRL 法は市販の EBC 標準品から検量線を作成しているが、その報告書において、チオフアネート標準液について閉環反応、ヘキササン洗浄及び酢酸エチル転溶を行った結果、回収率は 80.6 % だったと報告している。また、我々がこの操作を稲わら及びチモシー乾草を用いて予備検討したところ、回収率が 70 % を下回る結果が得られた。そこで、チオフアネート標準液を試料溶液と

同時に閉環反応に供し、得られた EBC 標準液を用いて検量線を作成するよう変更することにより回収率が改善した。

### 3.2 検量線

2.2 の 2) に従って調製した EBC 標準液各 2  $\mu$ 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 のとおりであり、EBC は 0.554~111 ng/mL (注入量として 0.00111~0.222 ng 相当量) の範囲で直線性を示した。

なお、当該検量線の濃度範囲は、チオファネートを 0.04~8 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濃度範囲に相当する。

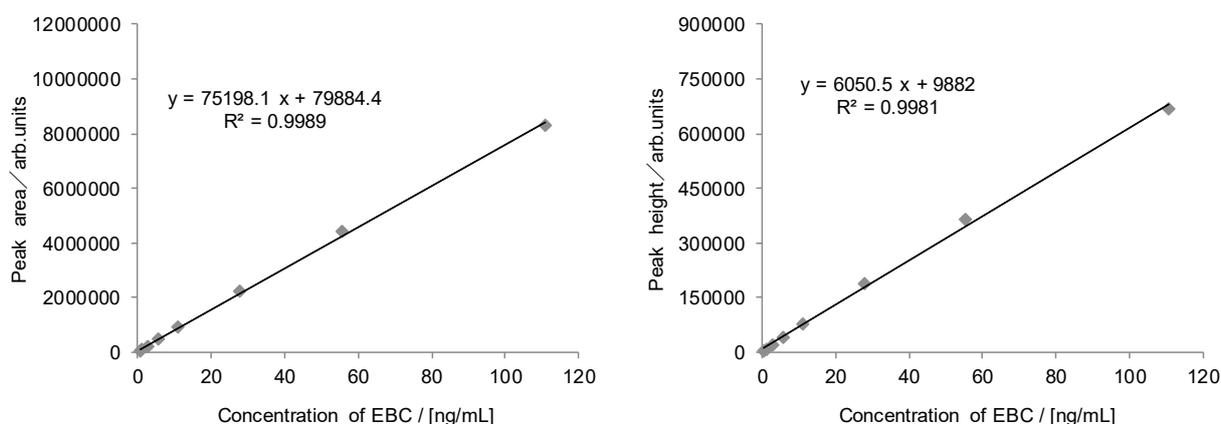


Fig. 2 Calibration curves of EBC standard by peak area (left) and height (right)

### 3.3 妨害物質の検討

成鶏飼育用配合飼料、大麦、とうもろこし、チモシー乾草、稲わら、粳米及び WCRS 各 1 点を用い、本法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。その結果、一部の試料において EBC と同じ保持時間にピークが認められたが、妥当性確認法ガイドラインに定められた妨害ピークの許容範囲内であったことから、当該ピークは定量を妨害するものではないと判断した。なお、得られた SRM クロマトグラムの一例を Fig. 3 に示した。

妨害ピークの許容範囲：定量下限が基準値の 1/3 以下の場合は、そのピークの面積（又は高さ）が、基準値に相当するピーク面積（又は高さ）の 1/10 未満（ただし、定量下限濃度に相当するピーク面積（又は高さ）を超えないこと。）。

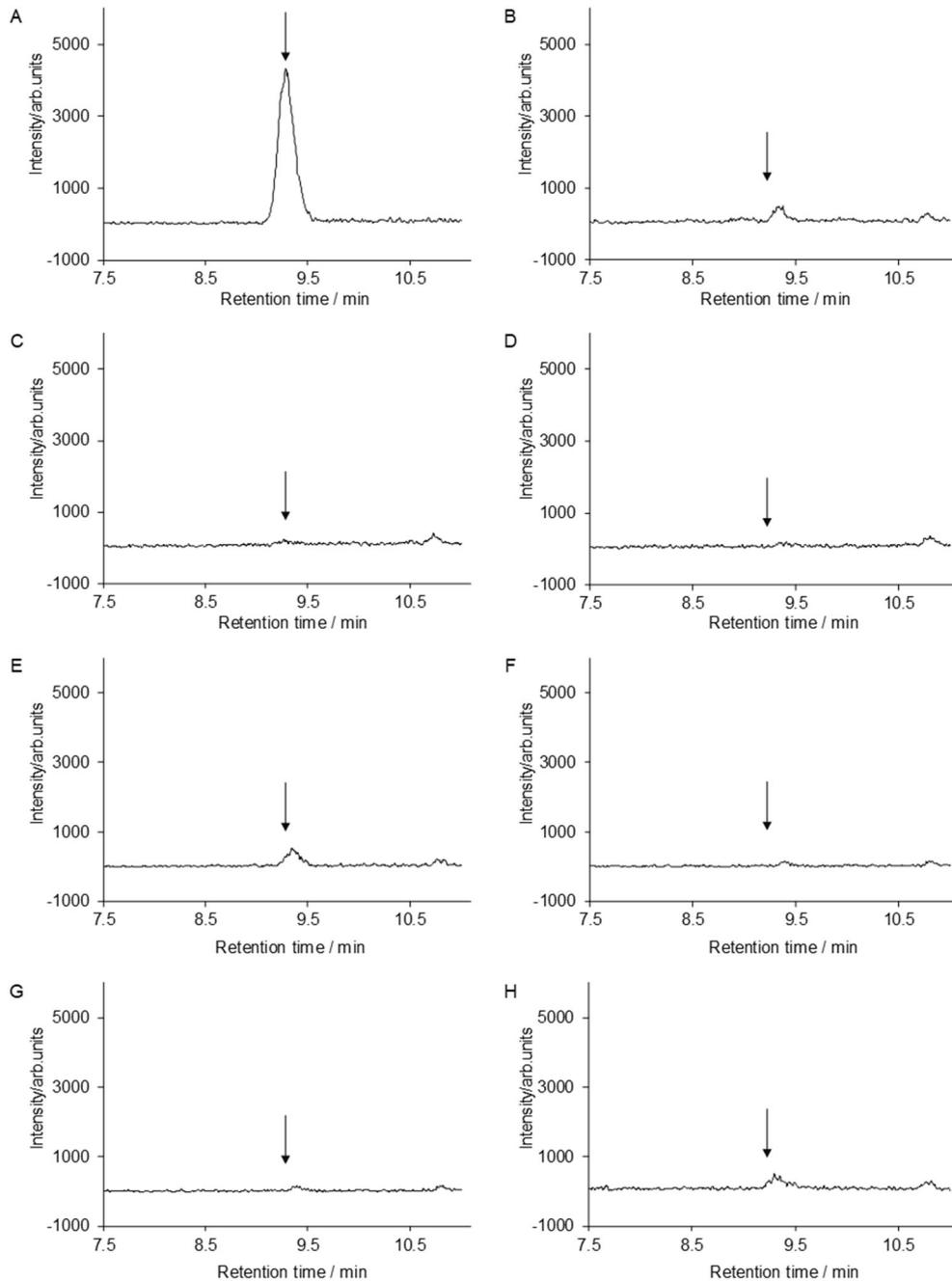


Fig. 3 Typical Selected Reaction Monitoring (SRM) chromatograms of EBC in standard and blank sample solutions

(LC-MS/MS conditions are shown in Tables 2 and 3. Arrows indicate the peaks of EBC)

A: Standard solution (0.5 ng/mL: 0.001 ng as EBC)

B~H: Sample solutions (B: Formula feed for layer, C: Barley, D: Maize, E: Timothy, F: Rice straw, G: Paddy rice, H: WCRS)

### 3.4 マトリックス効果の確認

2.4の1)~4)により調製した成鶏飼育用配合飼料，大麦，とうもろこし，チモシー乾草，稲わら，粳米及びWCRSのブランク試料溶液にチオフアネートとしてそれぞれ1.44，1.44，1.44，21.7，39.7，10.8及び21.7 mg/kg相当量（最終試料溶液でチオフアネートとしてそれぞれ0.036，0.036，

0.036, 0.054, 0.099, 0.027 及び 0.054 $\mu$ g/mL 相当量, EBC としてそれぞれ 20, 20, 20, 30, 55, 15 及び 30 ng/mL 相当量) の EBC を添加したマトリックス標準液について, 2.2 の 3) に従って調製した同濃度の EBC 標準液に対するピーク面積比を確認した.

その結果は Table 4 のとおりであり, 試料マトリックスによる大きな影響を受けることなく定量が可能であった.

Table 4 Matrix effect study

Samples	Concentration of thiophanate		Matrix effect <sup>b)</sup> (%)
	Matrix standard solution (ng/mL)	Sample <sup>a)</sup> (mg/kg air dry-basis)	
Formula feed for layers	20	1.44	93.4
Barley	20	1.44	99.6
Maize	20	1.44	98.2
Timothy	30	21.7	96.1
Rice straw	55	39.7	106
Paddy rice	15	10.8	103
WCRS	30	21.7	95.4

$n = 1$

a) Converted from the concentration in matrix standard solution

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

### 3.5 添加回収試験

2.5 に従って添加回収試験を実施した. その結果は Table 5 のとおり, 成鶏飼育用配合飼料, 大麦, とうもろこし, チモシー乾草, 稲わら及び WCRS については平均回収率 83.8~116 %, その繰返し精度は相対標準偏差 ( $RSD_r$ ) としては 10 %以下であり, 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. 本法と JFRL 法での結果を比較した結果, いずれの試料においても回収率が改善した. 一方, 粳米については, 平均回収率が 77.0~122 %,  $RSD_r$  が 8.2 %以下となり, 妥当性確認法ガイドラインに定められた真度の目標値をわずかに満たさない結果が得られた.

1) 真度: 70 %以上 120 %以下

2) 併行精度: 20 %以下 (添加濃度 0.2 mg/kg), 16 %以下 (同 1 及び 1.2 mg/kg), 15 %以下 (同 1.5 mg/kg), 14 %以下 (同 3 mg/kg), 13 %以下 (同 4 mg/kg), 12 %以下 (同 7 mg/kg), 11 %以下 (同 10 mg/kg), 10 %以下 (同 20 及び 25 mg/kg), 9 %以下 (同 40 mg/kg).

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 5 Recoveries of EBC from spiked feeds

Feed types	Spiked level (mg/kg as fed basis)	Our method		JFRL method	
		Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)
Formula feed for layers	0.2	99.1	10	75.8	10
	1.5	110	4.4	109	4.6
Barley	0.2	99.6	3.6	77.8	3.4
	1.2	116	4.8	88.6	4.6
Maize	0.2	83.8	2.9	71.0	2.7
	1.5	101	4.0	85.4	4.1
Timothy	3	87.2	3.7	70.8	3.8
	20	95.4	3.2	72.6	3.1
Rice straw	7	95.2	7.7	71.0	7.9
	40	91.5	2.7	45.2	2.8
Paddy rice	1	77.0	8.2	63.0	7.5
	10	122	7.4	75.0	8.0
WCRS <sup>c)</sup>	1.78	94.4	2.8	86.2	2.7
	11.1	108	2.4	91.9	2.5

a) Mean ( $n = 5$ )

b) Relative standard deviation of repeatability

c) Thiophanate were spiked to air-dried WCRS samples one night prior to extraction. The spike levels were 4 and 25 mg/kg as air-dry basis for thiophanate. The levels of thiophanate as fed basis were calculated with following equation on the assumption that the moisture content of WCRS samples was 60 % as fed basis and 10 % as air-dry basis.

The levels of pesticides as fed basis (moisture 60 %)

= the levels of pesticides as air-dry basis (moisture 10 %) / 2.25

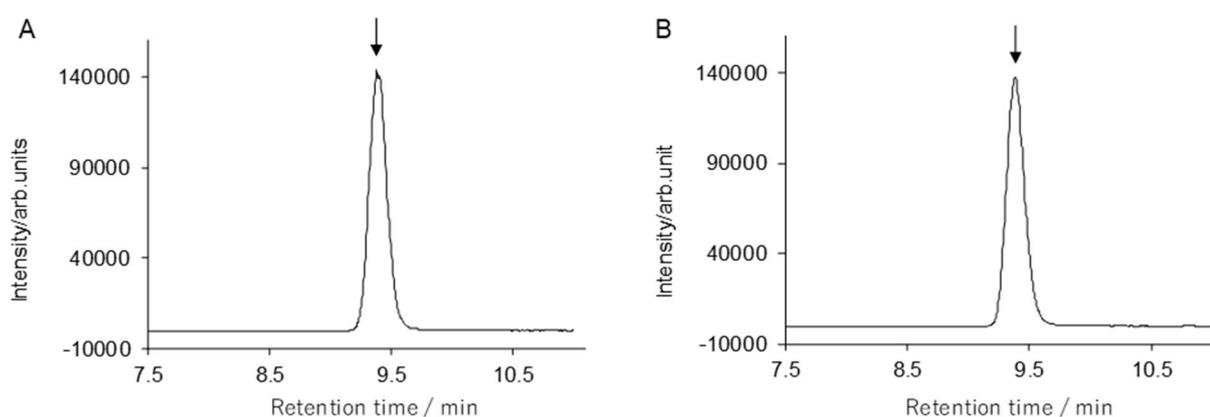


Fig. 4 Typical SRM chromatograms of EBC in standard and spiked sample solution (LC-MS/MS conditions are shown in Tables 2 and 3. Arrows indicate the peaks of EBC.)

A: Standard solution (55.4 ng/mL: 0.111 ng as EBC)

B: Sample solution of rice straw (spiked at 40 mg/kg as thiophanate (22.2 mg/kg: 0.111 ng as EBC))

### 3.6 定量下限及び検出下限

妥当性確認法ガイドラインに定められた定量下限の目標値（基準値に対して 1/5）以下の濃度（成鶏飼育用配合飼料，大麦及びとうもろこしは 0.2 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 0.005 ng/mL 相当量），チモシー乾草は 3 mg/kg 相当量（同 0.0075 ng/mL 相当量），稲わらは 7 mg/kg 相当量（同 0.0175 ng/mL 相当量）並びに WCRS（風乾物中）で 4 mg/kg 相当量（同 0.01 ng/mL 相当量））における添加回収試験の結果，得られたピークの SN 比が 10 以上であったため，これらをチオファネートの定量下限とした．なお，Table 5 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．

本法の検出下限を確認するため，添加回収試験により得られたピークの SN 比が 3 となる濃度を求めた．その結果，検出下限は成鶏飼育用配合飼料，大麦及びとうもろこしで 0.06 mg/kg，チモシー乾草で 0.9 mg/kg，稲わらで 2 mg/kg 及び WCRS（風乾物中）で 1 mg/kg であり，同様に妥当性確認法ガイドラインに定められた目標値（基準値に対して 1/10 以下）を満たしていた．

### 3.7 粳米における過回収の原因調査

3.5 において，粳米を用いて高濃度側の添加回収率を確認した際に過回収（122%）となったことについて，原因を調査した．3.4 より LC-MS/MS 測定時のイオン化促進は起こっておらず，また，標準液は試料溶液と同じ操作を行っており操作上の影響は相殺されていると考えられることから，試料溶液に含まれる成分による閉環反応の促進が原因ではないかと考えられた．そこで，粳米のブランク試料を用いて 2.6 に従い，閉環反応に供する試料溶液の希釈による回収率への影響を確認した．その結果は Table 6 のとおり，20 倍及び 40 倍希釈において過回収が改善され，また 40 倍希釈の方が良好な結果が得られた．

Table 6 Effect of sample solution volume for ring closure reaction on EBC recovery

Examiner	Recovery (%)		
	10-fold dilution (original rate)	20-fold dilution	40-fold dilution
A	110	86.5	93.3
B	105	82.2	100

$n = 1$

## 4 まとめ

飼料中に残留するチオファネートについて，JFRL 法を基に，LC-MS/MS を用いた定量法の飼料分析基準への収載の可否について検討したところ，チオファネートを試料と同時に閉環反応させて得た EBC を検量線に用いる方法に変更することで，以下の結果が得られた．

- 1) 検量線は EBC として 0.554~111 ng/mL 相当量（注入量として 0.001~0.22 ng 相当量）の範囲で直線性を示した．なお，当該検量線の濃度範囲は，チオファネートを 0.04~8 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濃度範囲に相当する．
- 2) 成鶏飼育用配合飼料，大麦，とうもろこし，チモシー乾草，粳米，稲わら及び WCRS 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) 本法に従って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，試料マトリックスによる大きな影響を受けることなく定量が可能であった．

- 4) チオファネートとして、成鶏飼育用配合飼料及びとうもろこしに 0.2 及び 1.5 mg/kg, 大麦に 0.2 及び 1.2 mg/kg, チモシー乾草に 3 及び 20 mg/kg, 稲わらに 7 及び 40 mg/kg 相当量を, 粳米に 1 及び 10 mg/kg 相当量を, WCRS に原物換算して 1.78 及び 11.1 mg/kg 相当量をそれぞれ添加し, 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, 粳米の高濃度側において妥当性確認法ガイドラインに定められた真度の目標値を超過する結果となり, その他については, 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) 本法の定量下限及び検出下限は, チオファネートとして, 成鶏飼育用配合飼料, 大麦及びとうもろこしでそれぞれ 0.2 及び 0.06 mg/kg, チモシー乾草で 3 及び 0.9 mg/kg, 稲わらで 7 及び 2 mg/kg であった. また WCRS では風乾物中で 4 及び 1 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値を満たしていた.
- 6) 粳米における, 妥当性確認法ガイドラインに示す真度の目標値を超過した原因を調査したところ, 閉環反応に供する試料溶液を 20 倍及び 40 倍希釈することにより過回収が改善され, また 40 倍希釈の方が良好な結果が得られた.

## 文 献

- 1) 農林水産消費安全技術センター：登録・失効農薬情報，失効農薬一覧，<http://www.acis.famic.go.jp/toroku/>, cited 25th Jan. 2022
- 2) 植村 振作, 河村 宏, 辻万 千子, 富田 重行, 前田 静夫：農薬毒性の事典，三省堂 (1988) (ISBN: 4-385-35605-X) .
- 3) FAO: Progress in pesticide risk assessment and phasing-out of highly hazardous pesticides in Asia, RAP publication 2015/01, Bangkok, Thailand (2015).
- 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).
- 6) 堀米 明日香, 野崎 友春：飼料中のカルベンダジム, チオファネート, チオファネートメチル及びベノミルの液体クロマトグラフ質量分析計による定量法，飼料研究報告，32, 30-44 (2007).
- 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 22 年度飼料中の有害物質等分析法開発委託事業（飼料中の有害物質等の分析法の開発）報告書，平成 23 年 1 月 (2011).