

2 飼料用イネ中のアゾキシストロビン他 6 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

藤田 敏文*

Simultaneous Determination of Azoxystrobin and 6 Pesticides in Rice Straw, Whole-crop rice silage, and Paddy rice for Feed by LC-MS/MS

Toshifumi FUJITA*

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

An analytical method was developed to determine the levels of azoxystrobin and six other pesticides (diclocymet, isoprocarb, metalaxyl, metolcarb, pirimicarb and propoxur) in rice and rice products 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 diluted with acetone to a final volume of 200 mL. Sample solutions were then purified with octadecylsilylated silica gel mini-column (InertSep Slim-J C18-B from GL Sciences Inc.; Tokyo, Japan), porous-diatomite cartridge (Chem Elut from Agilent Technologies Inc.; Santa Clara, CA, U.S.) and layered solid phase extraction (SPE) tube (ENVI-Carb/NH₂ from Supelco Inc.; Bellefonte, PA, U.S.) , and analyzed using LC-ESI-MS/MS. 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.) 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 1.0 or 5.0 mg/kg of azoxystrobin, 1.0 or 15.0 mg/kg of diclocymet, 0.04 or 1.0 mg/kg of metalaxyl, 0.4 or 1.0 mg/kg of metolcarb, and 0.1 or 1.0 of other three pesticides. Whole-crop rice silage was spiked with 0.04 or 1.0 mg/kg of metalaxyl, 0.4 or 1.0 mg/kg of metolcarb, and 0.1 or 1.0 mg/kg of other five pesticides. Paddy rice was spiked with 0.1 or 2.0 mg/kg of azoxystrobin, 0.04 or 1.0 mg/kg of metalaxyl, 0.4 or 1.0 mg/kg of metolcarb, and 0.1 or 1.0 mg/kg of other four pesticides. The resulting mean recovery and repeatability in terms of relative standard deviations (RSD_r), respectively, were 81.4 to 119 % and not more than 18 % for azoxystrobin, 82.1 to 102 % and not more than 16 % for diclocymet, 81.0 to 107 % and not more than 8.8 % for isoprocarb, 81.8 to 114 % and not more than 8.1 % for metalaxyl, 76.2 to 95.2 % and not more than 19 % for metolcarb, 88.5 to 113 % and not more than 8.8 % for pirimicarb, and 82.3 to 114 % and not more than 15 % for propoxur.

A collaborative study was conducted in nine laboratories using rice straw and paddy rice spiked with seven pesticides. The rice straw was fortified with azoxystrobin and diclocymet at levels of 5.0 mg/kg and 15 mg/kg, respectively, and with each of the other pesticides at respective levels of 1.0 mg/kg. Paddy rice was fortified with azoxystrobin at a level 2.0 mg/kg, which each of the others at respective levels of 1.0 mg/kg. The mean recoveries of azoxystrobin were 79.5 to 84.3 %, while the RSD_r and reproducibility (RSD_R), in terms of relative standard deviations and HorRat were 8.0 %, 8.8 %, 11 %, 8.8 %, 0.90, and 0.61, respectively. The respective measured

* 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

values obtained for the other pesticides were as follows: (diclocymet) 84.0 %, 85.0 %, 6.3 %, 8.0 %, 10 %, 9.5 %, 0.97, and 0.59; (isoprocarb) 83.5 %, 83.3 %, 7.3 %, 3.9 %, 15 %, 14%, 0.94, and 0.90; (metalaxyl) 94.2 %, 99.5 %, 3.4 %, 3.5 %, 5.3%, 7.7%, 0.33, and 0.48; (metolcarb) 78.8 %, 74.5 %, 7.8 %, 5.7 %, 6.6 %, 12 %, 0.41, and 0.76; (pirimicarb) 97.0 %, 102 %, 4.6 %, 5.0 %, 12 %, 6.3 %, 0.76, and 0.39; (propoxur) 86.3 %, 85.1 %, 6.6 %, 5.9 %, 13 %, 10 %, 0.80, and 0.65.

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

Key words: azoxystrobin; diclocymet; isoprocarb; metalaxyl; metolcarb; pirimicarb; propoxur; 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：アゾキシストロビン；ジクロシメット；イソプロカルブ；メタラキシル；メトルカルブ；ピリミカーブ；プロポキスル；液体クロマトグラフタンデム型質量分析計；エレクトロスプレーイオン化法；飼料用イネ；稲わら；稲発酵粗飼料；粃米；共同試験

1 緒 言

近年、国産飼料として牛への給与割合が増加している飼料用の稲わら、稲発酵粗飼料及び粃米（本報告では、これらを併せて表現する場合には「飼料用イネ」と表記する。）について、残留農薬に係る指導基準¹⁾の設定が随時進められている。

これら指導基準のある成分のうち飼料分析基準²⁾に分析法が記載されていない成分、あるいは、指導基準は設定されていないがモニタリングの必要性がある農薬成分については、定量可能な分析法の開発が急務とされている。

今回、一般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方法³⁾（以下「JFRL 法」という。）及びその基となった分析法^{4), 5)}を基に、JFRL 法が対象とする農薬成分のうちの 7 成分（アゾキシストロビン、イソプロカルブ、ジクロシメット、ピリミカーブ、プロポキスル、メタラキシル及びメトルカルブ）の飼料分析基準への適用の可否について検討したので、その概要を報告する。

なお、参考までに、今回検討した農薬のうち指導基準値が設定されている 3 成分について、指導基準値を Table 1 に示した。

Table 1 Regulation values of the pesticides in feed

Compound	Subject to feed	Regulation value (mg/kg)
Azoxystrobin	Rice straw	5
	Whole-crop rice silage	1
	Paddy rice	2
Isoprocarb	Rice straw	1
	Whole-crop rice silage	0.1
Metalaxyl	Rice straw	0.5
	Whole-crop rice silage	0.2

2 実験方法

2.1 試料

稲わら及び粃米をそれぞれ 1 mm の網ふるいを通すまで粉碎し、稲発酵粗飼料については、50 °C で 20 時間乾燥後、同様に粉碎したものを供試試料とした。

2.2 試薬

1) 各農薬標準品

アゾキシストロビン，ジクロシメット，イソプロカルブ，メタラキシル，メトルカルブ，ピリミカーブ及びプロポキシルの標準品は，Table 2 に示した供給業者，純度のものを用いた。

2) 各農薬標準原液

各農薬標準品 25 mg を正確に量ってそれぞれ 50 mL の全量フラスコに入れ，アセトンを加えて溶かし，更に標線まで同溶媒を加えて各農薬標準原液を調製した（これらの液各 1 mL は，各農薬としてそれぞれ 0.5 mg を含有する．）。

3) 農薬混合標準液

7 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 0.25，1.0，2.5，5.0，10 及び 20 ng を含有する各農薬混合標準液を調製した。

4) アセトン及びトルエンは残留農薬・PCB 試験用を用いた。アセトニトリルは抽出及び精製操作には残留農薬・PCB 試験用を，溶離液には液体クロマトグラフ用を用いた。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。

Table 2 Pesticide standard

Compound	Manufacturer	Molecular formula	MW	CAS No.	Purity(%)	Factor of standard solution
Azoxystrobin	Dr. Ehrenstorfer	C ₂₂ H ₁₇ N ₃ O ₅	403.4	131860-33-8	99.0	0.990
Diclocymet	Wako pure chemical industries	C ₁₅ H ₁₈ Cl ₂ N ₂ O	313.2	139920-32-4	99.0	0.993
Isoprocarb	Wako pure chemical industries	C ₁₁ H ₁₅ NO ₂	193.2	2631-470-5	99.0	0.994
Metalaxyl	Kanto chemical	C ₁₅ H ₂₁ NO ₄	279.3	57837-19-1	99	0.994
Metolcarb	Dr. Ehrenstorfer	C ₉ H ₁₁ NO ₂	165.1	129-41-5	98.0	0.983
Pirimicarb	Dr. Ehrenstorfer	C ₁₁ H ₁₈ N ₄ O ₂	238.1	23103-98-2	98.7	0.989
Propoxur	Dr. Ehrenstorfer	C ₁₁ H ₁₅ NO ₃	209.2	114-26-1	99.5	0.998

2.3 装置及び器具

1) 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計：

LC部：Waters 製 ACQUITY UPLC

MS部：Waters 製 ACQUITY Quattro Premier XE

2) 振とう機：タイテック製 レシプロシェーカー SR-2W

3) 高速遠心分離器：日立工機製 SCT15B

4) ロータリーエバポレーター：東京理化工機製 NAJ-160（真空コントローラ DPE-2120 付き）

5) 吸引マニホールド：Waters 製 吸引マニホールド

6) オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム：ジーエルサイエンス製 InertSep Slim-J C18-B（充てん剤量 500 mg）

7) 多孔性ケイソウ土カラム：Agilent Technologies 製 Chem Elut（5 mL 保持用）

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

2.4 定量方法

1) 抽出

分析試料 10.0 g を正確に量って 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 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。この液をアセトンで 10 倍希釈した後、希釈試料溶液 2 mL を 50 mL のなす形フラスコに正確に入れ、水 20 mL を加えた後、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。以下同様。）。

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、この操作を更に同様に流出させた。10 mL の全量フラスコをミニカラムの下に置き、水-アセトニトリル（2+3）10 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、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、カラム処理 II に供する試料溶液とした。

3) カラム処理 II

試料溶液に水 2 mL を加え、これを多孔性ケイソウ土カラムに入れた後 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 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。更に酢酸エチル 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、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にアセトニトリル-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。

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。水-アセトニトリル (2+3) 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、上澄み液を液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定に供する試料溶液とした。

また、試料が稲わらである場合は、試料溶液は一定量を更に水-アセトニトリル (2+3) で正確に 10 倍希釈し、アゾキシストロビン及びジクロシメットの定量に用いた。

5) 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による測定

試料溶液及び各農薬混合標準液各 5 µL を液体クロマトグラフタンデム型質量分析計 (以下「LC-MS/MS」という。) に注入し、選択反応検出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 for determination of the 7 pesticides

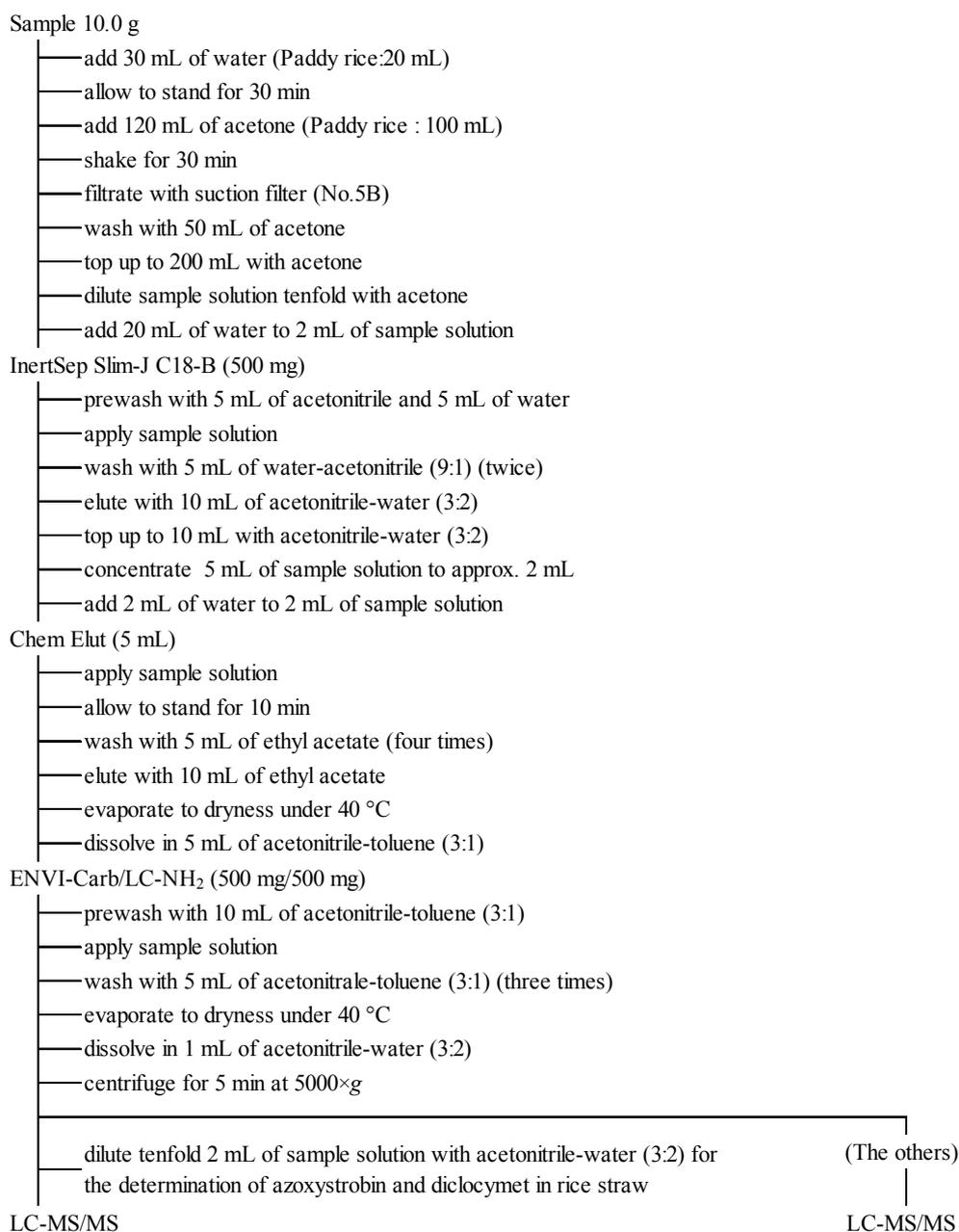
Column	Inertsil ODS-SP (2.1 mm i.d. × 150 mm, 5 µm)
Mobile phase	2 mmol/L ammonium acetate-acetonitrile (4:1) → 15 min → (1:9) (5 min)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temperature	40 °C
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Source temperature	120 °C
Desolvation temperature	N ₂ (600 L/h, 350 °C)
Cone gas	N ₂ (50 L/h)
Capillary voltage	Positive: 3.5 kV

Table 4 Mass spectrometry optimized parameters for the determination of the pesticides

Compound	Mode	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion (<i>m/z</i>)	Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
Azoxystrobin	+	404	372 (Quantitative)	20	15
			344 (Qualifier)		25
Diclocymet	+	313	173 (Quantitative)	35	23
			137 (Qualifier)		47
Isoprocarb	+	194	95 (Quantitative)	30	15
			137 (Qualifier)		10
Metalaxyl	+	280	220 (Quantitative)	30	15
			192 (Qualifier)		20
Metolcarb	+	166	109 (Quantitative)	11	15
			94 (Qualifier)		43
Pirimicarb	+	239	182 (Quantitative)	35	15
			72 (Qualifier)		20
Propoxur	+	210	111 (Quantitative)	25	15
			93 (Qualifier)		25

6) 計 算

得られた選択反応検出クロマトグラムからピーク面積又は高さを求めて検量線を作成し、試料中の各農薬量を算出した。定量法の概要を Scheme 1 に示した。



Scheme 1 Analytical procedure for the 7 pesticides in feeds

3 結果及び考察

3.1 質量分析条件の最適化及び検量線の作成

7成分のうち、アゾキシストロビンについては、JFRL法で用いられた確認イオン及び定量イオンの設定質量数では、1.0 ng/mL以下の濃度の標準液では感度が安定しなかったため、設定質量数を当試験室で使用した機種に最適化した。

また、質量分析条件については、コーン電圧及びコリジョンエネルギーを当試験室で使用した機種に最適化した。

2.2 の 2) に従って調製した標準液各 5 μL を LC-MS/MS に注入し、得られた選択反応検出クロマトグラムからピーク面積及び高さを求めて検量線を作成した。その結果は、Fig. 1-1 及び 1-2 のとおりであり、メトルカルブ以外の農薬は、0.25 ~ 20 ng/mL の範囲で直線性を示した。メトルカルブは 1.0 ng/mL 以下の濃度では SN 比が 10 以下となったため、2.5 ~ 20 ng/mL の範囲で直線性を示した。

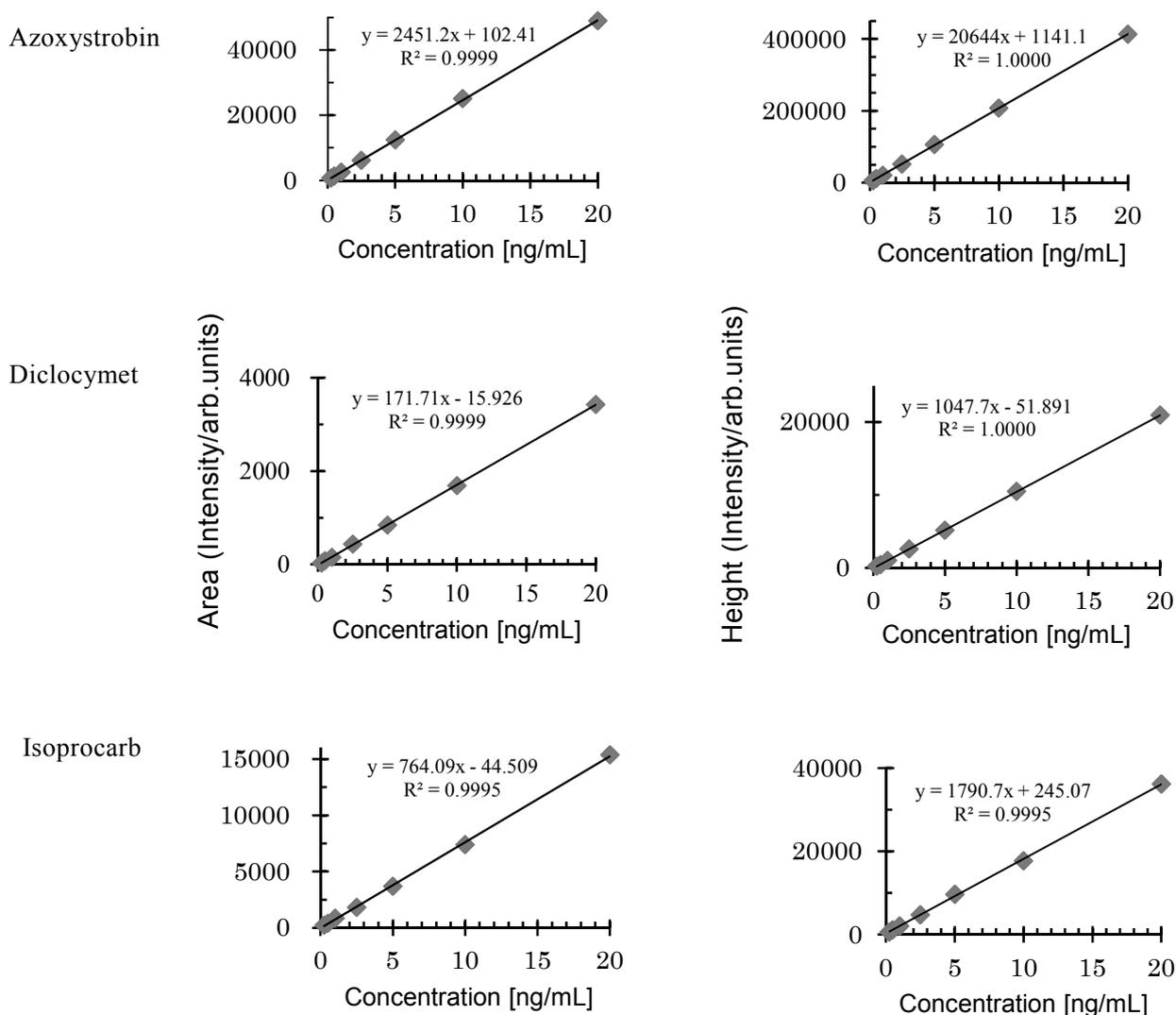


Fig. 1-1 Calibration curves of three pesticides (azoxystrobin, diclocymet and isoprocarb)

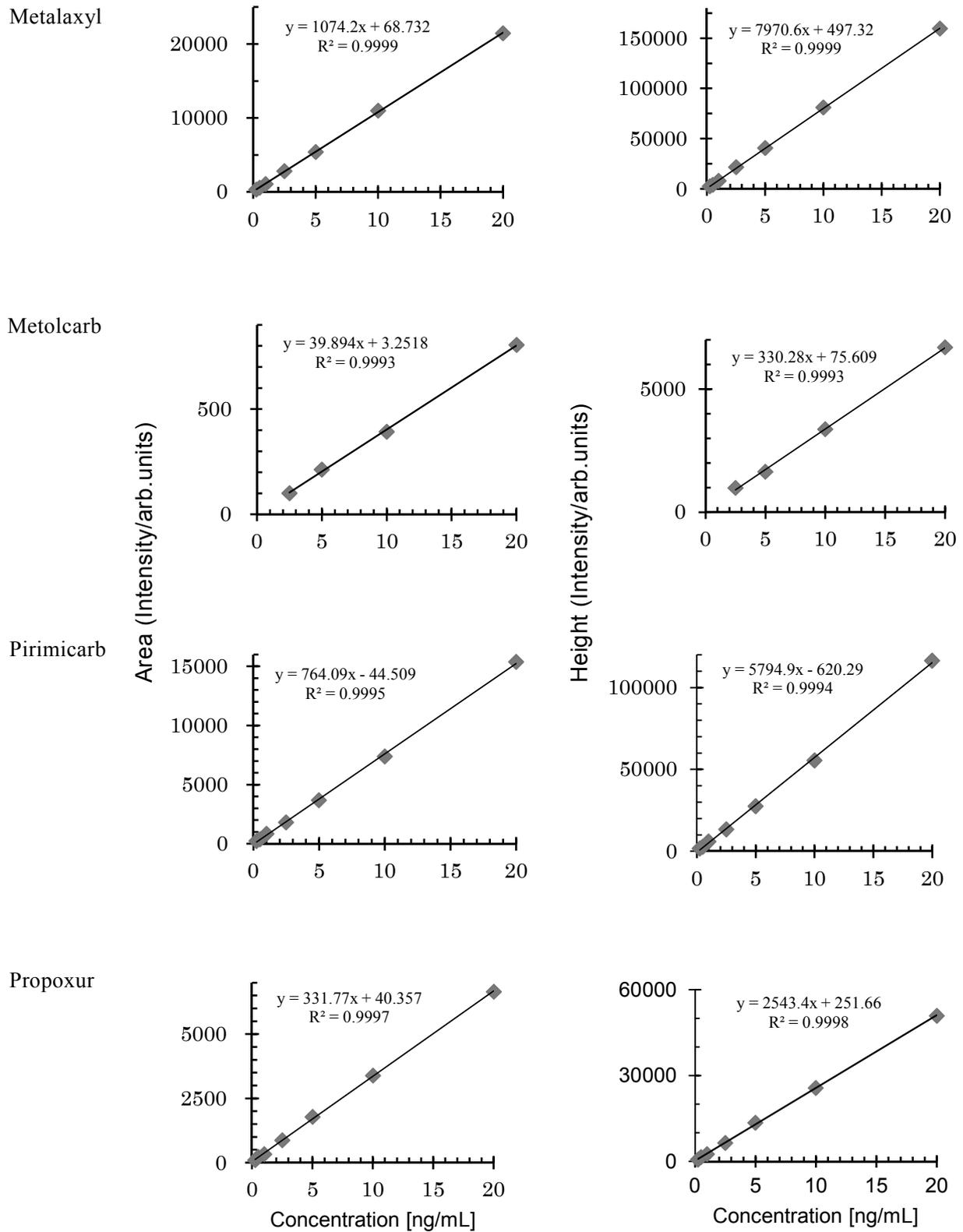


Fig. 1-2 Calibration curves of four pesticides (metalaxyl, metolcarb, pirimicarb and propoxur)

3.2 オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムの溶出画分の確認

稲わら及び籾米を用い、2.4 の 1)に従って調製した試料溶液に各農薬として 20 mg/kg 相当量 (試料液中 0.1 µg/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。ミニカラムからの溶出液はいずれも 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 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 の画分では農薬成分の流出は見られず、抽出溶媒である水-アセトニトリル (2+3) 10 mL の画分に全ての農薬が溶出し、またその後の 10 mL の画分には溶出しなかった。

Table 5-1 Elution pattern of 7 pesticides by InertSep Slim-J (Rice straw)

	Recovery (%) ^{a)}			Total (%)
	Water - acetonitrile			
	(9:1) 10 mL	(2:3) 0~10 mL	(2:3) ~20 mL	
Azoxystrobin	0	95	0	95
Diclocymet	0	91	0	91
Isoprocarb	0	94	0	94
Metalaxyl	0	96	0	96
Metorcarb	0	98	0	98
Pirimicarb	0	99	0	99
Propoxur	0	92	0	92

a) *n*=1

Table 5-2 Elution pattern of 7 pesticides by InertSep Slim-J (Paddy rice)

	Recovery (%) ^{a)}			Total (%)
	Water - acetonitrile			
	(9:1) 10 mL	(2:3) 0~10 mL	(2:3) ~20 mL	
Azoxystrobin	0	82	0	82
Diclocymet	0	87	0	87
Isoprocarb	0	86	0	86
Metalaxyl	0	94	0	94
Metorcarb	0	91	0	91
Pirimicarb	0	95	0	95
Propoxur	0	82	0	82

a) *n*=1

3.3 多孔性ケイソウ土カラムの溶出画分の確認

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1 mg/kg 相当量（試料液中5 ng/mL相当量）を添加したものをを用いて、多孔性ケイソウ土カラムからの溶出画分を確認した。多孔性ケイソウ土カラムからの溶出液はいずれも2.4の4)の処理を行い、その結果はTable 6-1及び6-2のとおりであり、いずれも酢酸エチル25 mLの画分に全ての農薬が溶出し、25 mL以降の画分には溶出しなかった。

Table 6-1 Elution pattern of 7 pesticides by Chem Elut (Rice straw)

	Recovery (%) ^{a)}		
	Ethyl acetate		Total
	0~25 mL	~40 mL	
Azoxystrobin	96	0	96
Diclocymet	91	0	91
Isoprocarb	109	0	109
Metalaxyl	107	0	107
Metorcarb	97	0	97
Pirimicarb	108	0	108
Propoxur	86	0	86

a) $n=1$

Table 6-2 Elution pattern of 7 pesticides by Chem Elut (Paddy rice)

	Recovery (%) ^{a)}		
	Ethyl acetate		Total
	0~25 mL	~40 mL	
Azoxystrobin	82	0	82
Diclocymet	81	0	81
Isoprocarb	84	0	84
Metalaxyl	92	0	92
Metorcarb	81	0	81
Pirimicarb	98	0	98
Propoxur	82	0	82

a) $n=1$

3.4 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の溶出画分の確認

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 1 mg/kg 相当量 (試料液中 5 ng /mL 相当量) を添加したものをを用いて、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溶出画分を確認した。その結果は Table 7-1 及び 7-2 のとおりであり、いずれもアセトニトリル-トルエン (3+1) 15 mL の画分に全ての農薬が溶出し、15 mL 以降の画分には溶出しなかった。

Table 7-1 Elution pattern of 7 pesticides by ENVI-Carb/LC-NH₂ (Rice straw)

	Recovery (%) ^{a)}		Total
	Acetonitrile - toluene (3:1)		
	0~15 mL	~25 mL	
Azoxystrobin	98	0	98
Diclocymet	88	0	88
Isoprocarb	91	0	91
Metalaxyl	99	0	99
Metorcarb	110	0	110
Pirimicarb	99	0	99
Propoxur	90	0	90

a) *n*=1

Table 7-2 Elution pattern of 7 pesticides by ENVI-Carb/LC-NH₂ (Paddy rice)

	Recovery (%) ^{a)}		Total
	Acetonitrile - toluene (3:1)		
	0~15 mL	~25 mL	
Azoxystrobin	99	0	99
Diclocymet	97	0	97
Isoprocarb	89	0	89
Metalaxyl	94	0	94
Metorcarb	84	0	84
Pirimicarb	101	0	101
Propoxur	86	0	86

a) *n*=1

3.5 妨害物質の検討

飼料用イネを用い、本法により調製した試料溶液 ($n=1$) を LC-MS/MS に注入し、定量を妨げるピークの有無を確認したところ、試料用イネ中において、妨害とな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選択反応検出 (SRM) クロマトグラムの一例を Fig. 2-1, 2-2 及び 2-3 に示した。

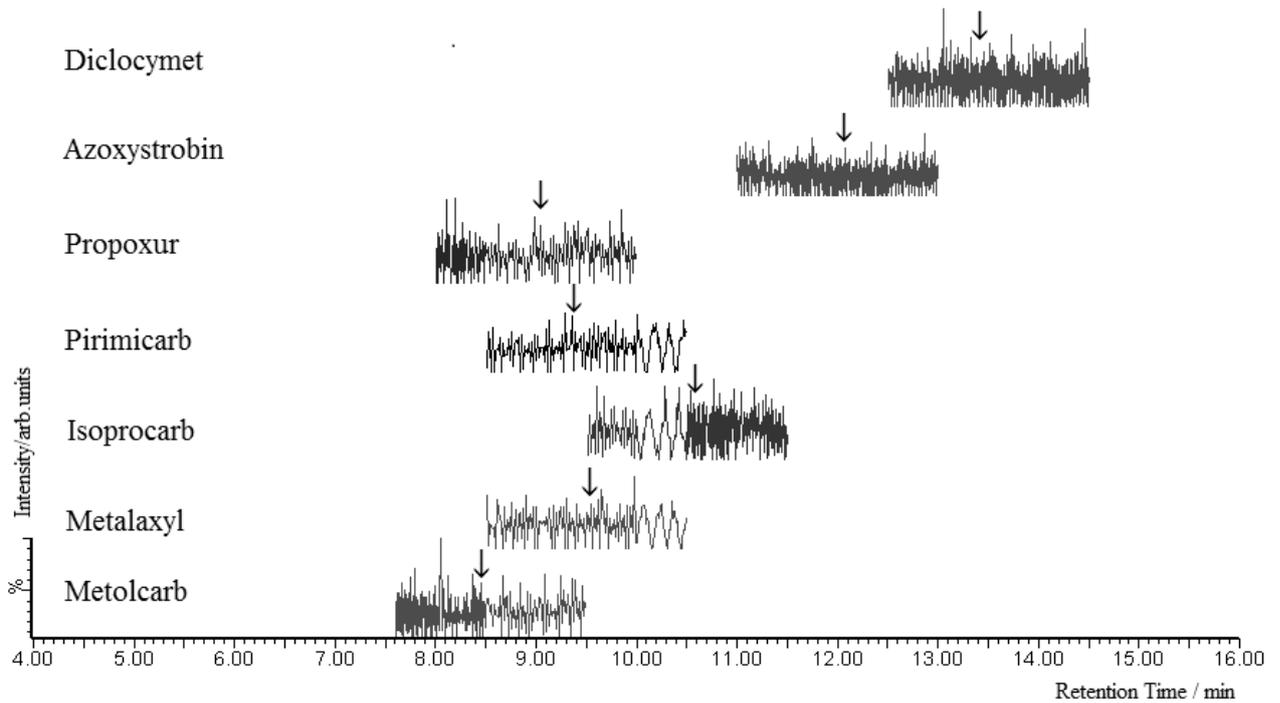


Fig. 2-1 Selected reaction monitoring chromatograms of rice straw (non-spiked)
(Arrows indicate the retention time of each pesticide)

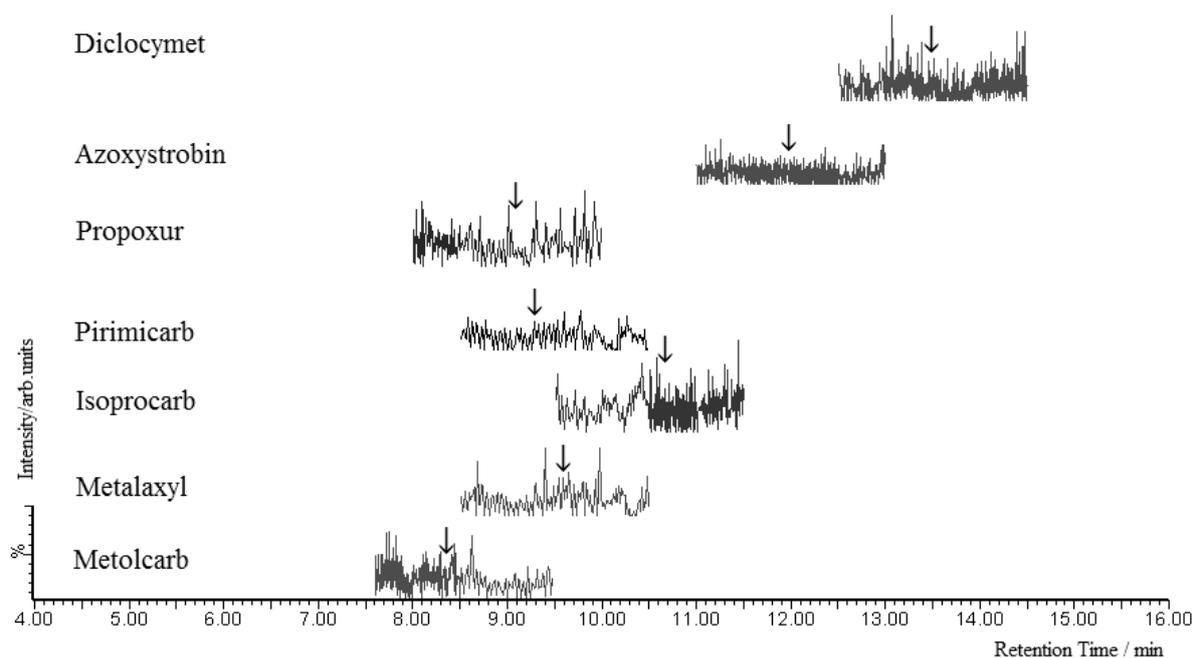


Fig. 2-2 Selected reaction monitoring chromatograms of whole-crop rice silage (non-spiked)

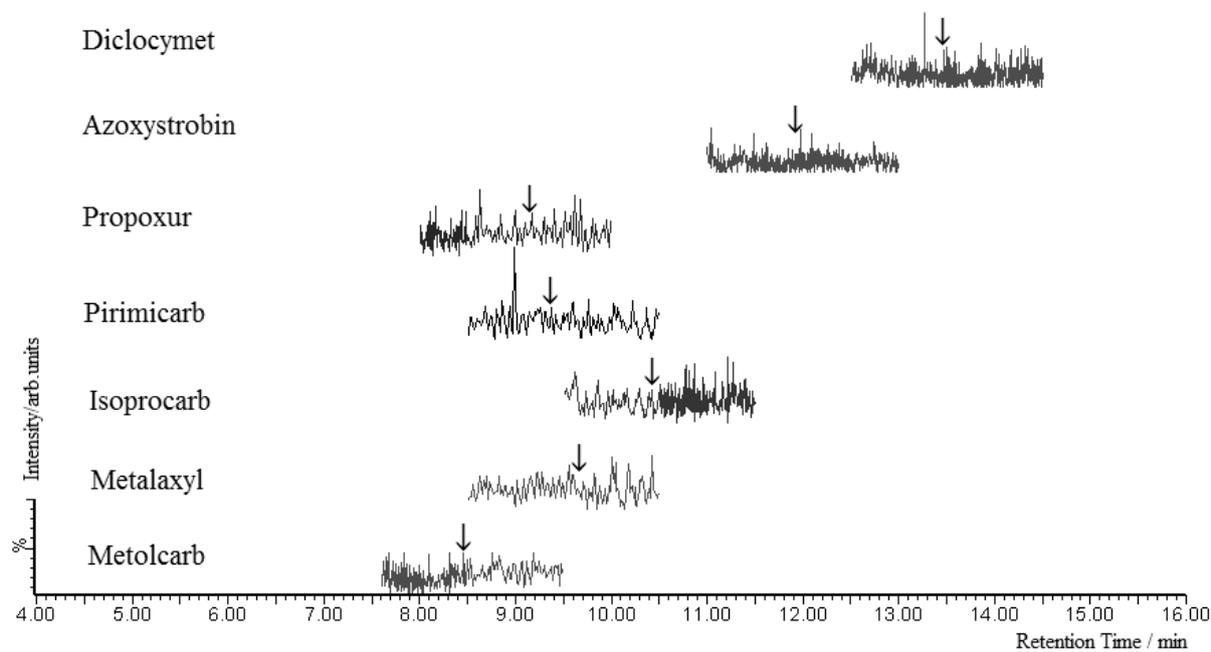


Fig. 2-3 Selected reaction monitoring chromatograms of paddy rice (non-spiked)

3.6 添加回収試験

2.1 で調製した飼料用イネを用いて添加回収試験を行った。アゾキシストロビンについては、稲わらに 5 及び 1 mg/kg 相当量（最終試料中 25 及び 5 µg 相当量），稲発酵粗飼料に 1 及び 0.1 mg/kg 相当量（最終試料中 5 及び 0.5 µg 相当量）並びに粃米に 2 及び 0.1 mg/kg 相当量（最終試料中 10 及び 0.5 µg 相当量），ジクロシメットについては、稲わらに 15 及び 1 mg/kg 相当量（最終試料中 75 及び 5 µg 相当量），稲発酵粗飼料及び粃米に 1 及び 0.1 mg/kg 相当量（最終試料中 5 及び 0.5 µg 相当量），メタラキシルについては、試料用イネに 1 及び 0.04 mg/kg 相当量（最終試料中 0.5 及び 0.2 µg 相当量），メトルカルブについては、飼料用イネに 5 及び 2 µg（最終試料中 1 及び 0.4 mg/kg 相当量），その他の農薬は、飼料用イネに 1 及び 0.4 mg/kg 相当量（最終試料中 5 及び 0.5 µg 相当量）添加し，本法により 3 点併行で定量し，回収率及び繰返し精度を検討した。

その結果は Table 8 のとおり，アゾキシストロビンについては平均回収率 81.4~119 %，その繰返し精度は，相対標準偏差（RSD_r）として 18 %以下，ジクロシメットについては平均回収率 82.1~102 %，その繰返し精度は，RSD_rとして 16 %以下，イソプロカルブについては平均回収率 81.0~107 %，その繰返し精度は，RSD_rとして 8.8 %以下，メタラキシルについては平均回収率 81.8~114 %，その繰返し精度は，RSD_rとして 8.1 %以下，メトルカルブについては平均回収率 76.2~95.2 %，その繰返し精度は，RSD_rとして 19 %以下，ピリミカーブについては平均回収率 88.5~113 %，その繰返し精度は，RSD_rとして 8.8 %以下，プロポキシルについては平均回収率 82.3~114 %，その繰返し精度は，RSD_rとして 15 %以下の成績が得られた。

なお，添加回収試験で得られた選択反応検出クロマトグラムの一例を Fig.3 に示した。

Table 8 Result of recovery tests

Compound	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)} (%)
Azoxystrobin	5.0	89.1	2.1	—	—	—	—
	2.0	—	—	—	—	97.2	3.4
	1.0	106	1.7	81.4	11	—	—
	0.1	—	—	104	18	119	14
Diclocymet	15	94.8	6.8	—	—	—	—
	1.0	101	11	82.1	8.6	102	16
Isoprocarb	0.10	—	—	90.7	7.5	91.0	9.1
	1.0	81.0	6.3	83.5	5.4	87.2	5.4
Metalaxyl	0.10	93.6	8.8	105	6.3	107	6.8
	1.0	91.3	3.9	81.8	8.1	101	5.4
Metolcarb	0.04	90.7	3.6	114	1.7	103	6.8
	1.0	76.2	19	89.2	11	82.0	17
Pirimicarb	0.4	85.6	2.1	95.2	11	94.9	6.4
	1.0	88.8	4.0	88.5	8.8	96.7	1.3
Propoxur	0.10	90.5	2.4	110	2.7	113	5.0
	1.0	82.3	3.1	93.0	6.9	96.7	1.3
	0.10	85.4	4.5	110	15	114	10

a) Mean (n=3)

b) Relative standard deviations of repeatability

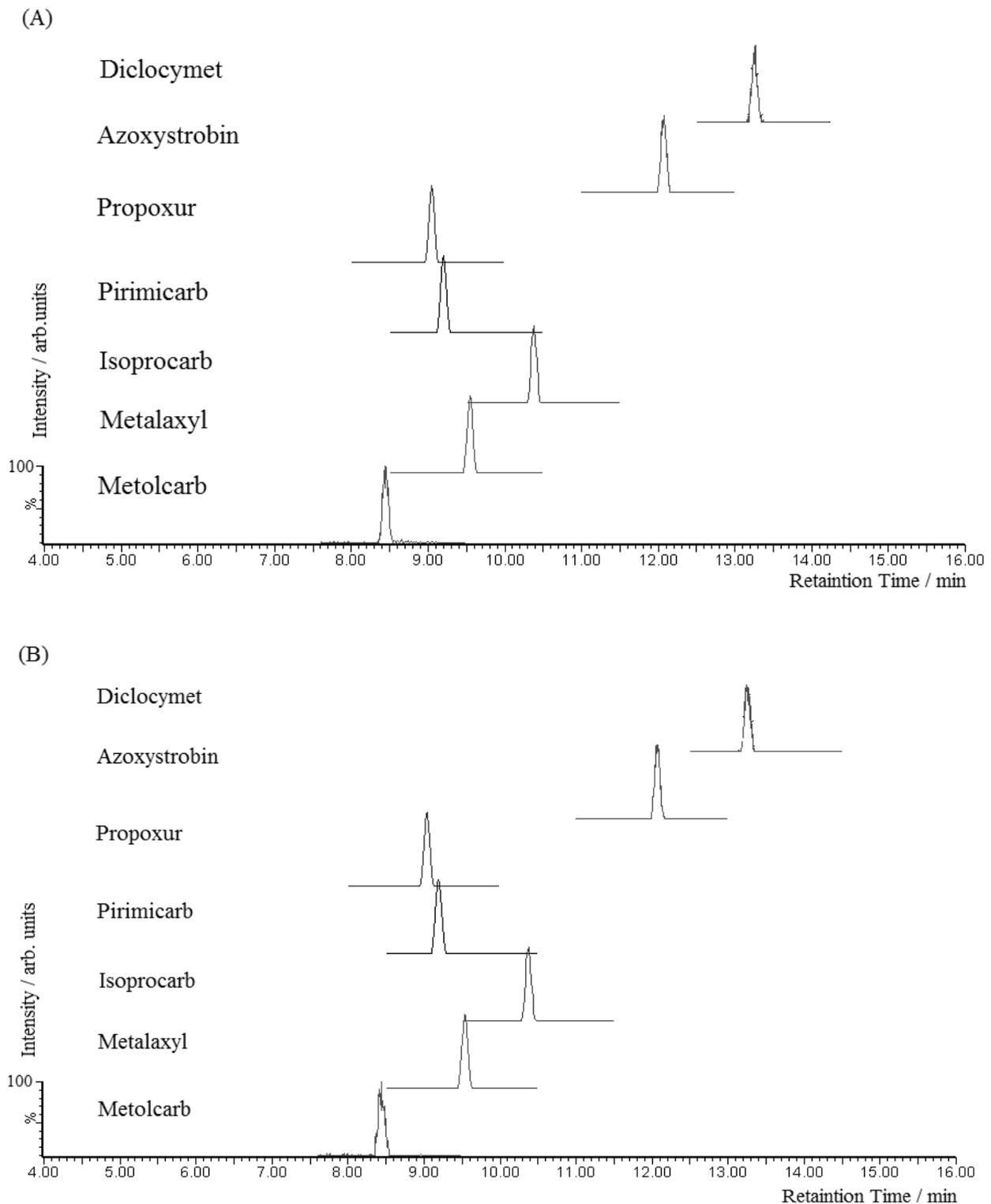


Fig. 3 Selected reaction monitoring chromatograms of pesticide standard

(A) Standard solution (The concentration is 10 ng/mL for all pesticides)

(B) Sample solution of rice straw (Spiked at 1.0 mg/kg of azoxystrobin and diclocymet, 0.4 mg/kg of metolcarb, 0.10 mg/kg of isoprocarb, pirimicarb and propoxur, and 0.04 mg/kg of metalaxyl)

(Highest intensity peak is shown as 100 % in each segment)

3.7 定量下限及び検出下限の検討

本法の定量下限及び検出下限を確認するために、飼料用イネに 7 成分の各農薬を添加し、添加回収試験により得られるピークの SN 比が 10 及び 3 となる濃度を求めた。

アゾキシストロビン及びジクロシメットについては、SN 比が 10 以上となる濃度は 0.1 mg/kg (稲わら 1.0 mg/kg) であり、SN 比が 3 となる濃度は 0.03 mg/kg (稲わら 0.3 mg/kg) であった。

メタラキシルについては、SN 比が 10 以上となる濃度は 0.04 mg/kg であり、SN 比が 3 となる濃度は 0.02 mg/kg であった。

メトルカルブについては、SN 比が 10 以上となる濃度は 0.4 mg/kg であり、SN 比が 3 となる濃度は 0.2 mg/kg であった。

その他の 3 成分の農薬については、SN 比が 10 以上となる濃度は 0.1 mg/kg であり、SN 比が 3 となる濃度は 0.03 mg/kg であった。

確認のため、飼料用イネに各農薬の SN 比が 10 及び 3 となる濃度を添加した試料について、本法に従って 3 点併行分析を実施したところ、その平均回収率及び繰返し精度は Table 8 のとおりであった。

以上の結果から、アゾキシストロビン及びジクロシメットの定量下限は 0.1 mg/kg (稲わら 1.0 mg/kg)、検出下限は 0.03 mg/kg (稲わら 0.3 mg/kg)、メタラキシルの定量下限は 0.04 mg/kg、検出下限は 0.02 mg/kg、メトルカルブの定量下限は 0.4 mg/kg、検出下限は 0.2 mg/kg、イソプロカルブ、ピリミカーブ及びプロポキシルの定量下限は 0.1 mg/kg、検出下限は 0.03 mg/kg であった。

3.8 共同試験

本法の室間再現精度を確認するため、稲わら及び粳米にアゾキシストロビン他 6 成分の農薬を添加した共通試料を用い、9 試験室で共同試験を実施した。試験の概要は以下のとおりである。

1) 分析試料の調製

稲わら及び粳米をそれぞれ 1 mm の網ふるいを通過するまで粉砕した無添加試料を送付し、各試験室において一定量を量りとった後、濃度非通知の添加用標準液 (水溶液、各 0.5 mL) を分析開始の前日に添加して調製した。2 種類の試料について、非明示の 2 点反復で実施した。

各農薬の添加濃度は、試料 10.0 g に、稲わらについてはアゾキシストロビンとして 5 mg/kg 相当量 (最終試料中 25 µg 相当量)、ジクロシメットとして 15 mg/kg 相当量 (最終試料中 75 µg 相当量)、その他の農薬としてそれぞれ 1 mg/kg 相当量 (最終試料中 5 µg 相当量) である。また、粳米についてはアゾキシストロビンとして 2 mg/kg 相当量 (最終試料中 10 µg 相当量)、その他の農薬としてそれぞれ 1 mg/kg 相当量 (最終試料中 5 µg 相当量) である。

2) 参加試験室

一般財団法人日本食品分析センター多摩研究所、協同飼料株式会社研究所、一般社団法人日本科学飼料協会科学飼料研究センター、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 9 試験室)。

3) 結果の解析

各試験室から有効数字 3 けたで分析値を報告させ、国際的にハーモナイズされた共同試験に関する手順を^{5), 6)}を参考に、Cochran 検定並びに外れ値 1 個及び 2 個の Grubbs 検定を行い、外れ値の棄却等を行った上で平均回収率、繰返し精度 (RSD_f) 及び室間再現精度 (RSD_R) を算出した。得られた RSD_R から、修正 Horwitz 式を用いて HorRat を求めた。その結果は Table 9 ~ 15 のとおりである。

アゾキシストロビンでは稲わら及び粃米について、平均回収率は 79.5 及び 84.3 %、 RSD_f はそれぞれ 8.0 及び 8.8 %、 RSD_R はそれぞれ 11 及び 8.8 %、HorRat はそれぞれ 0.90 及び 0.61 であった。

ジクロシメットでは稲わら及び粃米について、平均回収率は 84.0 及び 85.0 %、 RSD_f はそれぞれ 6.3 及び 8.0 %、 RSD_R はそれぞれ 10 及び 9.5 %、HorRat はそれぞれ 0.97 及び 0.59 であった。

イソプロカルブでは稲わら及び粃米について、平均回収率は 83.5 及び 83.3 %、 RSD_f はそれぞれ 7.3 及び 3.9 %、 RSD_R はそれぞれ 15 及び 14 %、HorRat はそれぞれ 0.94 及び 0.90 であった。

メタラキシルでは稲わら及び粃米について、平均回収率は 94.2 及び 99.5 %、 RSD_f はそれぞれ 3.4 及び 3.5 %、 RSD_R はそれぞれ 5.3 及び 7.7 %、HorRat はそれぞれ 0.33 及び 0.48 であった。

メトルカルブでは稲わら及び粃米について、平均回収率は 78.8 及び 74.5 %、 RSD_f はそれぞれ 7.8 及び 5.7 %、 RSD_R はそれぞれ 6.6 及び 12 %、HorRat はそれぞれ 0.41 及び 0.76 であった。

ピリミカーブでは稲わら及び粃米について、平均回収率は 97.0 及び 102 %、 RSD_f はそれぞれ 4.6 及び 5.0 %、 RSD_R はそれぞれ 12 及び 6.3 %、HorRat はそれぞれ 0.76 及び 0.39 であった。

プロポキシルでは稲わら及び粃米について、平均回収率は 86.3 及び 85.1 %、 RSD_f はそれぞれ 6.6 及び 5.9 %、 RSD_R はそれぞれ 13 及び 10 %、HorRat はそれぞれ 0.80 及び 0.65 であった。いずれも良好な室間再現精度が得られた。

参考のため、各試験室で使用した LC-MS/MS の機種等を Table 16 に示した。

Table 9 Collaborative study results of azoxystrobin

Lab. No.	Feed types			
	Rice straw (mg/kg)		Paddy rice (mg/kg)	
1	3.32	3.27	1.58	1.51
2	3.74	3.94	1.60	1.70
3	3.36	3.74	1.81	1.77
4	3.56	4.52	1.45	1.97
5	4.38	4.86	1.72	1.95
6	3.98	3.91	1.84	1.73
7	4.32	4.14	1.79	1.60
8	3.68	4.34	1.60	1.64
9	4.19	4.29	1.50	1.59
Spiked level (mg/kg)	5		2	
Mean value ^{a)} (mg/kg)	3.97		1.69	
Recovery ^{a)} (%)	79.5		84.3	
RSD _r ^{b)} (%)	8.0		8.8	
RSD _R ^{c)} (%)	11		8.8	
PRSD _R ^{d)} (%)	13		14	
HorRat	0.90		0.61	

a) $n=18$

b) Relative standard deviations of repeatability within laboratory

c) Relative standard deviations of reproducibility between laboratories

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

Table 10 Collaborative study results of diclocymet

Lab. No.	Feed types			
	Rice straw (mg/kg)		Paddy rice (mg/kg)	
1	10.9	10.2	0.830	0.769
2	12.4	12.7	0.788	0.810
3	11.9	11.5	0.852	0.760
4	13.1	10.8	1.05	0.902
5	13.6	14.9	0.824	1.01
6	14.4	13.5	2.24 ^{a)}	1.95 ^{a)}
7	13.8	12.4	0.861	0.837
8	11.8	12.4	0.865	0.833
9	12.9	13.5	0.777	0.827
Spiked level (mg/kg)	15		1	
Mean value ^{b)} (mg/kg)	12.6		0.850	
Recovery ^{b)} (%)	84.0		85.0	
RSD _r ^{c)} (%)	6.3		8.0	
RSD _R ^{d)} (%)	10		9.5	
PRSD _R ^{e)} (%)	11		16	
HorRat	0.97		0.59	

a) Data excluded by single Grubbs test

b) Rice straw: $n=18$; Paddy rice: $n=16$

c) Relative standard deviations of repeatability within laboratory

d) Relative standard deviations of reproducibility between laboratories

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

Table 11 Collaborative study results of isoprocarb

Lab. No.	Feed types			
	Rice straw (mg/kg)		Paddy rice (mg/kg)	
1	0.874	0.799	0.838	0.844
2	0.580	0.716	0.747	0.798
3	0.697	0.739	0.844	0.808
4	1.01	1.09	0.949	0.898
5	0.683	0.813	0.593	0.537
6	0.897	0.787	0.850	0.880
7	0.920	0.877	0.911	0.827
8	0.928	0.861	0.969	1.01
9	0.872	0.881	0.839	0.845
Spiked level (mg/kg)	1		1	
Mean value ^{a)} (mg/kg)	0.835		0.833	
Recovery ^{a)} (%)	83.5		83.3	
RSD _r ^{b)} (%)	7.3		3.9	
RSD _R ^{c)} (%)	15		14	
PRSD _R ^{d)} (%)	16		16	
HorRat	0.94		0.90	

a) $n=18$

b) Relative standard deviations of repeatability within laboratory

c) Relative standard deviations of reproducibility between laboratories

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

Table 12 Collaborative study results of metalaxyl

Lab. No.	Feed types			
	Rice straw (mg/kg)		Paddy rice (mg/kg)	
1	0.934	0.874	0.922	0.890
2	0.939	0.934	0.977	1.02
3	0.854	0.910	1.06	1.01
4	0.993	0.974	0.908	0.898
5	1.22 ^{a)}	1.29 ^{a)}	1.19	1.08
6	1.06 ^{a)}	1.09 ^{a)}	0.967	1.00
7	1.05	0.973	1.07	1.02
8	0.927	0.940	0.982	1.00
9	0.926	0.961	0.946	0.961
Spiked level (mg/kg)	1		1	
Mean value ^{b)} (mg/kg)	0.942		0.995	
Recovery ^{b)} (%)	94.2		99.5	
RSD _r ^{c)} (%)	3.4		3.5	
RSD _R ^{d)} (%)	5.3		7.7	
PRSD _R ^{e)} (%)	16		16	
HorRat	0.33		0.48	

a) Data excluded by paired Grubbs test

b) Rice straw: $n=14$; Paddy rice: $n=18$

c) Relative standard deviations of repeatability within laboratory

d) Relative standard deviations of reproducibility between laboratories

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

Table 13 Collaborative study results of metolcarb

Lab. No.	Feed types			
	Rice straw		Paddy rice	
	(mg/kg)		(mg/kg)	
1	0.752	0.747	0.783	0.770
2	0.466 ^{a)}	0.671 ^{a)}	0.738	0.684
3	0.722	0.851	0.733	0.667
4	0.702	0.829	0.829	0.702
5	0.654 ^{a)}	0.624 ^{a)}	0.542	0.588
6	0.784	0.833	0.813	0.770
7	0.797	0.735	0.736	0.716
8	0.830	0.812	0.888	0.859
9	0.757	0.874	0.827	0.763
Spiked level (mg/kg)	1		1	
Mean value ^{b)} (mg/kg)	0.788		0.745	
Recovery ^{b)} (%)	78.8		74.5	
RSD _F ^{c)} (%)	7.8		5.7	
RSD _R ^{d)} (%)	6.6		12	
PRSD _R ^{e)} (%)	16		16	
HorRat	0.41		0.76	

a) Data excluded by double Grubbs test

b) Rice straw: $n=14$; Paddy rice: $n=18$

c) Relative standard deviations of repeatability within laboratory

d) Relative standard deviations of reproducibility between laboratories

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

Table 14 Collaborative study results of pirimicarb

Lab. No.	Feed types			
	Rice straw (mg/kg)		Paddy rice (mg/kg)	
1	0.923	0.868	1.04	1.04
2	0.916	0.979	0.951	0.971
3	0.711	0.790	1.04	1.01
4	0.936	0.936	0.963	0.974
5	1.20	1.11	1.04	1.19
6	1.02	0.960	1.07	0.943
7	1.08	0.987	1.08	1.02
8	1.08	1.04	1.04	1.08
9	0.976	0.954	0.934	0.984
Spiked level (mg/kg)	1		1	
Mean value ^{a)} (mg/kg)	0.970		1.02	
Recovery ^{a)} (%)	97.0		102	
RSD _r ^{b)} (%)	4.6		5.0	
RSD _R ^{c)} (%)	12		6.3	
PRSD _R ^{d)} (%)	16		16	
HorRat	0.76		0.39	

a) $n=18$

b) Relative standard deviations of repeatability within laboratory

c) Relative standard deviations of reproducibility between laboratories

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

Table 15 Collaborative study results of propoxur

Lab. No.	Feed types			
	Rice straw (mg/kg)		Paddy rice (mg/kg)	
1	0.818	0.878	0.792	0.714
2	0.757	0.826	0.830	0.838
3	0.607	0.691	0.806	0.767
4	0.906	0.905	0.724	0.746
5	0.778	0.948	0.842	0.925
6	0.869	0.889	1.040	0.882
7	0.918	0.829	0.890	0.839
8	1.05	0.984	0.933	0.975
9	0.922	0.967	0.863	0.904
Spiked level (mg/kg)	1		1	
Mean value ^{a)} (mg/kg)	0.863		0.851	
Recovery ^{a)} (%)	86.3		85.1	
RSD _r ^{b)} (%)	6.6		5.9	
RSD _R ^{c)} (%)	13		10	
PRSD _R ^{d)} (%)	16		16	
HorRat	0.80		0.65	

a) $n=18$

b) Relative standard deviations of repeatability within laboratory

c) Relative standard deviations of reproducibility between laboratories

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

Table 16 Instruments used in the collaborative study

Lab. No.	Instrument	LC column (i.d. × length, particle size)
1	LC: Agilent Technologies 1100 Series MS/MS: AB SCIEX API-2000	GL Science Inertsil ODS-SP (2.1 mm × 150 mm, 5 μm)
2	LC: Agilent Technologies 1200 Series MS/MS: Agilent Technologies 6410	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm × 150 mm, 5 μm)
3	LC: Agilent Technologies 1200 Series MS/MS: Agilent Technologies 6410	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm × 150 mm, 5 μm)
4	LC: Waters Acquity UPLC MS/MS: Waters Quatro Premier XE	GL Science Inertsil ODS-SP (2.1 mm × 150 mm, 5 μm)
5	LC: Waters Alliance 2695 MS/MS: Micromass Quatro micro	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm × 150 mm, 5 μm)
6	LC: Waters Acquity UPLC MS/MS: Waters Xevo TQD	GL Science Inertsil ODS-SP (2.1 mm × 150 mm, 5 μm)
7	LC: Waters Acquity UPLC MS/MS: Waters ACQUITY TQDetector	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm × 150 mm, 5 μm)
8	LC: Waters Acquity UPLC MS/MS: Waters ACQUITY TQDetector	GL Science Inertsil ODS-SP (2.1 mm × 150 mm, 5 μm)
9	LC: Waters Acquity UPLC MS/MS: Waters Xevo TQD	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm × 150 mm, 5 μm)

4 まとめ

飼料用イネ中に残留する農薬 7 成分について、液体クロマトグラフタンデム型質量分析計を用いた同時定量法（以下「本法」という。）の飼料分析基準への適用の可否について検討したところ、以下の結果が得られ、適用が可能であると考えられた。

- 1) 検量線は、メトルカルブは 2.5 ~ 20 ng/mL, その他 6 成分は 0.25 ~ 20 ng/mL の範囲で直線性を示した。
- 2) 飼料用イネについて、本法に従って得られた選択反応検出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) 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。
- 4) 本法のアゾキシストロビン及びジクロシメットの定量下限は 0.1 mg/kg (稲わら 1.0 mg/kg) 検出下限は 0.03 mg/kg (稲わら 0.3 mg/kg), メタラキシルの定量下限は 0.04 mg/kg, 検出下限は 0.02 mg/kg, メトルカルブの定量下限は 0.4 mg/kg, 検出下限は 0.2 mg/kg, 並びにイソプロカルブ, ピリミカーブ及びプロポキシルの定量下限は 0.1 mg/kg, 検出下限は 0.03 mg/kg であった。
- 5) 稲わらにアゾキシストロビン 5 mg/kg 相当量, ジクロシメット 15 mg/kg 相当量, その他の農薬としてそれぞれ 1 mg/kg 相当量を添加した試料及び粃米にアゾキシストロビン 2 mg/kg 相当量, その他の農薬としてそれぞれ 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。その結果, 良好な室間再現精度が得られた。

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，協同飼料株式会社研究所，一般社団法人日本科学飼料協会科学飼料研究センター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 21 年度飼料中の有害物質等分析法委託事業 飼料中の有害物質等の分析法の開発 (2009).
- 4) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知：食品に残留する農薬，飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について，平成 17 年 1 月 24 日，食安発第 0124001 号 (2005).
- 5) Horwitz, W., Protocol for Design, Conduct and Interpretation of Method - Performance Studies, *Pure & Appl. Chem.*, **67** (2), 331-343 (1995).
- 6) AOAC Int., Appendix D: Guidelines for Collaborative Study Procedures to Validate Characteristics of a Method of Analysis. In *Official Methods of Analysis of AOAC Int. 19th Edition, Volume II*, Gaithersburg, MD, USA (2012).