

## 6 稲わら及び籾米中のベンフレセート及びシハロホップブチルのガスクロマトグラフ質量分析計による同時定量法

佐藤 梢\*, 風間 鈴子\*

### Determination of Benfuresate and Cyhalofop-butyl in Rice Straw and Paddy Rice by GC-MS

Kozue SATOU\* and Reiko KAZAMA\*

(\* Food and Agricultural Materials Inspection Center, Sendai Regional Center)

An analytical method was developed to determine levels of benfuresate and cyhalofop-butyl in rice straw and paddy rice for feed using gas chromatograph-mass spectrometer (GC-MS).

After adding water to the samples, benfuresate and cyhalofop-butyl were extracted with acetone, and the resulting solutions were filtered. The extract was then purified with InertSep K-solute (GL Sciences Inc.; Tokyo, Japan), gel permeation chromatography (GPC), Bond Elut PSA cartridge (Agilent Technologies Inc.; Santa Clara, CA, U.S.) connected in tandem over a Sep-Pak Plus Florisil cartridge (Waters; Milford, MA, U.S.), and injected into the GC-MS for determination of pesticides. GC separation was carried out on a fused silica capillary column (DB-5MS+DG; 0.25 mm i.d.× 30 m, film thickness 0.25 µm with 10 m DuraGuard from Agilent Technologies). Mass spectrometer operation was carried out using electron ionization (EI) mode.

Spike tests were conducted on rice straw spiked with 2000, 300 and 20 µg/kg of each pesticide and paddy rice spiked with 2000, 200, 20 and 10 µg/kg of each pesticide. Recoveries ranged from 92.6 to 119 % for benfuresate and from 74.2 to 109 % for cyhalofop-butyl. The relative standard deviations of repeatability were not more than 4.9 % and 18 %, for benfuresate and cyhalofop-butyl, respectively.

A collaborative study was conducted in nine laboratories using rice straw spiked with 300 µg/kg of benfuresate and 2000 µg/kg of cyhalofop-butyl, and paddy rice spiked with 30 µg/kg of benfuresate and 200 µg/kg of cyhalofop-butyl. The range of mean recovery, repeatability and reproducibility in terms of the relative standard deviation ( $RSD_r$  and  $RSD_R$ ), and HorRat, respectively, were 96.3 to 103 % and not more than 6.8 %, 21 %, and 0.96 for benfuresate, and 77.9 to 80.2 % and not more than 9.4 %, 29 %, and 1.8 for cyhalofop-butyl.

This method was validated and established for use in the inspection of benfuresate and cyhalofop-butyl in rice straw and paddy rice for feed.

Key words: benfuresate, cyhalofop-butyl, gas chromatograph-mass spectrometer (GC-MS), feed, rice straw, paddy rice, collaborative study

\* 独立行政法人農林水産消費安全技術センター 仙台センター

キーワード：ベンフレセート；シハロホップブチル；ガスクロマトグラフ質量分析計；飼料；稲わら；粃米；共同試験

## 1 緒 言

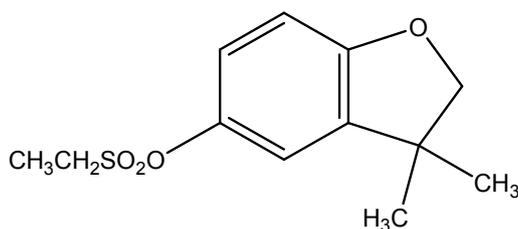
ベンフレセートはシェーリング社により開発されたベンゾフレミルアルキルスルホン酸系の水田用除草剤で、日本では 1994 年に農薬登録されている。飼料中の指導基準はないが、食品中の残留農薬基準値<sup>1)</sup>は玄米で 0.05 ppm となっている。

シハロホップブチルはダウ・ケミカル社が開発したフェノキシ系の水田用除草剤で、日本では 1996 年に農薬登録されている。飼料中の指導基準<sup>2)</sup>は稲わらで 2 mg/kg、稲発酵粗飼料で 0.1 mg/kg、粃米で 2 mg/kg となっており、食品中の残留農薬基準値は玄米で 0.1 ppm となっている。

両農薬とも飼料分析基準<sup>3)</sup>に分析法はないが、厚生労働省通知<sup>4)</sup>には、個別試験法（ガスクロマトグラフ及びガスクロマトグラフ質量分析計による方法）及びガスクロマトグラフ質量分析計による一斉試験法が示されている。

今回、一般財団法人日本食品分析センターが「平成 22 年度飼料中の有害物質等分析法開発委託事業」において、厚生労働省通知の個別試験法を基に開発した飼料中のベンフレセート及びシハロホップブチルの分析法<sup>5)</sup>（以下「JFRL 法」という。）について、飼料分析基準への適用の可否について検討を行ったので、その概要を報告する。

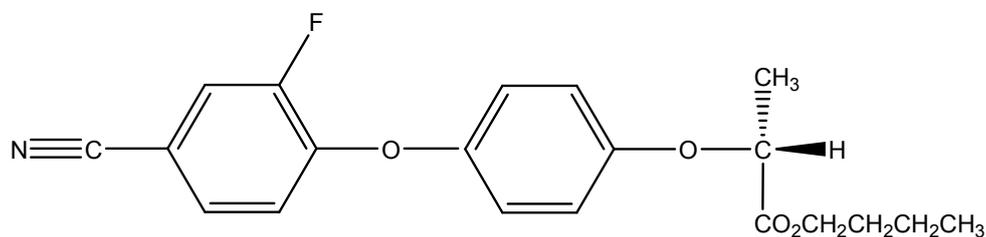
参考にベンフレセート及びシハロホップブチルの構造式等を Fig. 1-1 及び Fig. 1-2 に示した。



2,3-dihydro-3,3-dimethylbenzofuran-5-yl ethanesulfonate

$C_{12}H_{16}O_4S$  MW: 256.3 CAS No.: 68505-69-1

Fig. 1-1 Chemical structure of benfuresate



butyl (*R*)-2-[4-(4-cyano-2-fluorophenoxy) phenoxy] propionate

$C_{20}H_{20}FNO_4$  MW: 357.3 CAS No: 122008-85-9

Fig. 1-2 Chemical structure of cyhalofop-butyl

## 2 実験方法

### 2.1 試料

稲わら及び粃米を 1 mm の網ふるいを通過するまで粉碎し、供試試料とした。稲発酵粗飼料は、60 °C で 55 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) ベンフレセート標準原液

ベンフレセート標準品（和光純薬工業製，純度 99.0 %）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，更に標線まで同溶媒を加えてベンフレセート標準原液を調製した（この液 1 mL はベンフレセートとして 0.5 mg ( $f=0.990$ ) を含有する。）。

#### 2) シハロホップブチル標準原液

シハロホップブチル標準品（林純薬工業製，純度 99.9 %）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，更に標線まで同溶媒を加えてシハロホップブチル標準原液を調製した（この液 1 mL はシハロホップブチルとして 0.5 mg ( $f=0.999$ ) を含有する。）。

#### 3) 農薬混合標準原液

ベンフレセート標準原液及びシハロホップブチル標準原液の一定量を混合し，希釈溶媒で正確に希釈し，1 mL 中にベンフレセート及びシハロホップブチルとしてそれぞれ 0.002, 0.005, 0.01, 0.02, 0.03, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 及び 0.5  $\mu\text{g}$  を含有する各農薬混合標準液を調製した。

#### 4) 添加回収試験用混合標準液

ベンフレセート標準原液及びシハロホップブチル標準原液の一定量を混合し，アセトンで正確に希釈し，1 mL 中にベンフレセート及びシハロホップブチルとしてそれぞれ 0.1, 0.2, 2, 3 及び 20  $\mu\text{g}$  を含有する各添加回収試験用混合標準液を調製した。

#### 5) 希釈溶媒 ポリエチレングリコール（平均分子量 400）50 $\mu\text{L}$ をアセトン 100 mL に加えて希釈溶媒を調製した。

#### 6) ゲル浸透クロマトグラフィー（以下「GPC」という。）の溶離液のシクロヘキサン及びアセトンは液体クロマトグラフ用を用いた。それ以外のアセトン及びヘキサンは残留農薬・PCB 試験用を用いた。水は超純水（JIS K 0211 に定める 5218 の超純水）を用いた。その他，特記している以外の試薬については特級を用いた。

### 2.3 装置及び器具

#### 1) 振とう機：タイテック製 レシプロシェーカー SR-2W

#### 2) ロータリーエバポレーター：東京理化学器械製 N-1000

#### 3) ガスクロマトグラフ質量分析計（以下「GC-MS」という。）：

ガスクロマトグラフ部：Agilent Technologies 製 7890A

質量分析計部：Agilent Technologies 製 5975C inert XL MSD

#### 4) ゲル浸透クロマトグラフ：

ポンプ：ジーエルサイエンス製 G-Prep GPC8100 Plus

オートサンプラー：ジーエルサイエンス製 G-Prep AS

フラクションコレクター：ジーエルサイエンス製 G-Prep GPC8100 Plus

#### 5) 多孔性ケイソウ土カラム：ジーエルサイエンス製 InertSep K-solute（20 mL 保持用）

#### 6) フロリジルミニカラム：Waters 製 Sep-Pak Plus Florisil Cartridge（充てん剤量 910 mg）

- 7) エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラム : Agilent Technologies 製 Bond Elut PSA (充てん剤量 500 mg)
- 8) メンブランフィルター : 東洋濾紙製 DISMIC-13HP (孔径 0.45  $\mu\text{m}$ , 直径 13 mm, 親水性 PTFE)

## 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 (稲わらは 30 mL) を加え, 30 分間静置後, 更にアセトン 100 mL (稲わらは 120 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. 定容した抽出液 40 mL を 100 mL のなす形フラスコに正確に入れ, 40 °C 以下の水浴で約 4 mL (稲わらは約 6 mL) まで減圧濃縮し, カラム処理 I に供する試料溶液とした.

### 2) カラム処理 I

試料溶液を多孔性ケイソウ土カラムに入れ, 試料溶液の入っていたなす形フラスコを水 5 mL で洗浄し, 洗液をカラムに加えた後, 10 分間静置した. 200 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ヘキサン 5 mL ずつで 2 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させ各農薬を溶出させた. 更にヘキサン 70 mL をカラムに加えて同様に溶出させ, 溶出液を 40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後, 窒素ガスを送って乾固した. シクロヘキサン-アセトン (4+1) 10 mL を正確に加えて残留物を溶かし, メンブランフィルターでろ過し, GPC に供する試料溶液とした.

### 3) GPC

試料溶液 5.0 mL をゲル浸透クロマトグラフに注入し, 各農薬が溶出する画分を 200 mL のなす形フラスコに分取し, 40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後, 窒素ガスを送って乾固した. なお, GPC の条件を Table 1 に示した.

ヘキサン 2 mL を加えて残留物を溶かし, カラム処理 II に供する試料溶液とした.

Table 1 Operating conditions of GPC for purifying benfuresate and cyhalofop-butyl

Column	Shodex CLNpak EV-2000 AC (20 mm i.d.×300 mm, 15 $\mu\text{m}$ )
Guard column	Shodex CLNpak EV-G AC (20 mm i.d.×100 mm, 15 $\mu\text{m}$ )
Eluent	Cyclohexane-acetone (4:1)
Flow rate	5 mL/min
Fraction volume	60~115 mL

### 4) カラム処理 II

エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラム (以下「PSA ミニカラム」という.) の下にフロリジルミニカラムを連結し, ヘキサン 10 mL で洗浄した. 試料溶液をミニカラムに入れ, 流速 1~2 mL 程度で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ヘキサン 8 mL で洗浄し, 洗液をミニカラムに加え, 同様

に流出させた。更にヘキサン-アセトン (99+1) 10 mL で試料溶液の入っていたなす形フラスコを洗浄し、洗液をミニカラムに加え、同様に流出させた。

次に、PSA ミニカラムをはずし、50 mL のなす形フラスコをフロリジルミニカラムの下に置き、ヘキサン-アセトン (19+1) 20 mL をフロリジルミニカラムに加えて、流速 1~2 mL 程度で液面が充てん剤の上端に達するまで流下してベンフレセート及びシハロホップブチルを溶出させた。溶出液を 40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固した。希釈溶媒 1 mL を正確に加えて残留物を溶かし、GC-MS による測定に供する試料溶液とした。

#### 5) GC-MS による測定

試料溶液及び各農薬混合標準液各 2 µL を GC-MS に注入し、選択イオン検出 (以下「SIM」という。) クロマトグラムを得た。

GC-MS の測定条件を Table 2 に示した。

**Table 2** Operating conditions of GC-MS for analyzing benfuresate and cyhalofop-butyl

Column	Agilent Technologies DB-5MS+DG (0.25 mm i.d.×30 m+10 m guard column, 0.25 µm film thickness)
Column temperature	80 °C (1 min)→20 °C/min→280 °C (10 min)
Injection mode	Splitless (60 s)
Injection port temperature	250 °C
Carrier gas	He 1.0 mL/min
Transferline temperature	280 °C
Ion source temperature	230 °C
Ionization	Electron ionization
Ionization energy	70 eV
Monitor ion	Benfuresate: <i>m/z</i> 256 (for quantification) , 163 (for confirmation) Cyhalofop-butyl: <i>m/z</i> 357 (for quantification) , 256 (for confirmation)

#### 6) 計 算

得られた SIM 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、試料中のベンフレセート及びシハロホップブチルの量を算出した。

定量法の概要を Scheme 1 に示した。

**Sample 10 g**

- add 20 mL of water (rice straw: 30 mL) and allow to stand for 30 min
- add 100 mL of acetone (rice straw: 120 mL) and shake for 30 min
- filtrate under suction filter (No. 5B)
- wash with 50 mL of acetone
- top up to 200 mL with acetone
- evaporate 40 mL of sample solution to about 4 mL (rice straw: 6 mL) under 40 °C

**InertSep K-solute**

- apply sample solution
- wash flask with 5 mL of water and apply the solution and allow to stand for 10 min
- wash flask with 5 mL of hexane and apply the solution (twice)
- elute with 70 mL of hexane
- evaporate to dryness under 40 °C
- dissolve in 10 mL of cyclohexane-acetone (4:1)
- filtrate with membrane filter (<0.5 μm)

**GPC**

- apply 5 mL of sample solution
- collect the fraction of 60~115 mL
- evaporate to dryness under 40 °C
- dissolve in 2 mL of hexane

**Sep-Pak Plus Florisil and Bond Elut PSA cartridges**

- connect Sep-Pak Plus Florisil cartridge under Bond Elut PSA cartridge and prewash with 10 mL of hexane
- apply sample solution
- wash flask with 8 mL of hexane and apply the solution
- wash flask with 10 mL of hexane-acetone (99:1) and apply the solution
- remove Bond Elut PSA cartridge
- elute with 20 mL of hexane-acetone (19:1)
- evaporate to dryness under 40 °C
- dissolve in 1 mL of acetone-polyethylen glycol (2000:1)

**GC-MS**
**Scheme 1 Analytical procedure for benfuresate and cyhalofop-butyl in feeds**
**2.5 GPC 溶出画分の検討方法**

GPC におけるベンフレセート及びシハロホップブチルの最適な溶出画分は、以下の方法に従い確認した。1 mL 中にベンフレセート及びシハロホップブチルとして 2 μg を含有する標準液を調製し、この液 2 mL をなす形フラスコに入れ、窒素ガスを送って乾固した。シクロヘキサナーアセトン (4+1) 10 mL を正確に加えて残留物を溶かし、メンブランフィルターでろ過し、GPC に供する試料溶液とした。試料溶液を 2.4 の 3) に従って精製し、60~70 mL, 70~80 mL, 80~115 mL 及び 115~125 mL の溶出画分をそれぞれ 100 mL のなす形フラスコに分取し、それぞれの溶出液を 40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固した。60~70 mL 及び 115~125 mL の画分については希釈溶媒 1 mL を、70~80 mL 及び 80~115 mL の画分については希釈溶媒 5 mL を、正確に加えて残留物を溶かし、GC-MS による測定に供する試料溶液とした。

## 2.6 稲発酵粗飼料における検討方法

2.1 で調製した稲発酵粗飼料を用いて、以下の方法により本法への適用の可否を検討した。

- 1) 稲発酵粗飼料 10.0 g に 2 及び 0.1  $\mu\text{g/mL}$  の標準液 1 mL を添加し、一晩放置したものを、以下本法に従って定量し、回収率及び繰返し精度を求めた。
- 2) 稲発酵粗飼料 10.0 g を本法に従って調製し、2.4 の 4) で得られた溶出液を乾固した後、0.01  $\mu\text{g/mL}$  の標準液 1 mL を正確に加えて残留物を溶かし、2.4 の 5) に従って測定した。
- 3) 1) に従って調製した 10  $\mu\text{g/kg}$  相当量添加した試料液について、希釈溶媒を用いて 2 倍及び 5 倍に希釈し、それぞれを 2.4 の 5) に従って測定した。

## 3 結果及び考察

### 3.1 検量線

2.2 の 3) に従って調製した各農薬混合標準液 2  $\mu\text{L}$  を GC-MS に注入し、得られた SIM 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、Fig. 2-1 及び Fig. 2-2 のとおり、ベンフレセート及びシハロホップブチルとして 0.005~0.5  $\mu\text{g/mL}$  (注入量として 0.01~1.0 ng) の範囲で直線性を示した。

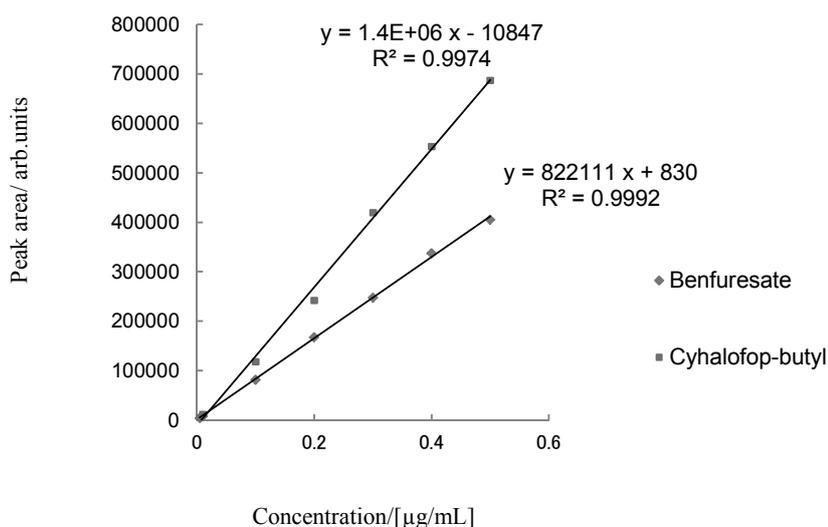


Fig. 2-1 Calibration curves of each pesticide by peak area

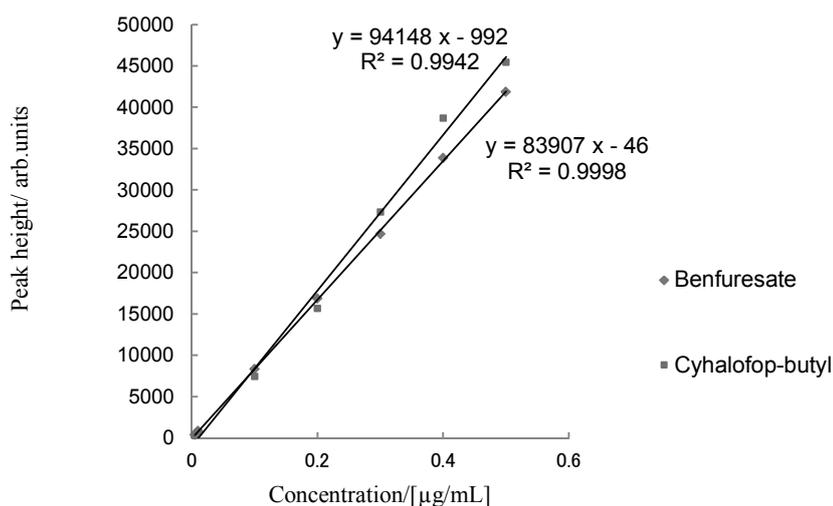


Fig. 2-2 Calibration curves of each pesticide by peak height

### 3.2 妨害物質の検討

稲わら（3種）、稲発酵粗飼料（4種）、籾米（2種）について、本法に従いGC-MSによる測定に供する試料溶液を調製し、ベンフレセート及びシハロホップブチルの定量を妨げるピークの有無を確認した。妨害物質の検討で得られたSIMクロマトグラムの一例をFig. 3-1及びFig. 3-2に示した。その結果、稲発酵粗飼料及び籾米のそれぞれ1試料において、Fig. 3-1の(B)及び(C)のとおり、ベンフレセートのSIMクロマトグラムにピークが認められたが、ベンフレセートは基準値がない農薬であり、定量下限相当ピークの1/3以下であるため、定量に問題はないと考えられた。その他の試料については、定量を妨害するピークは検出されなかった。

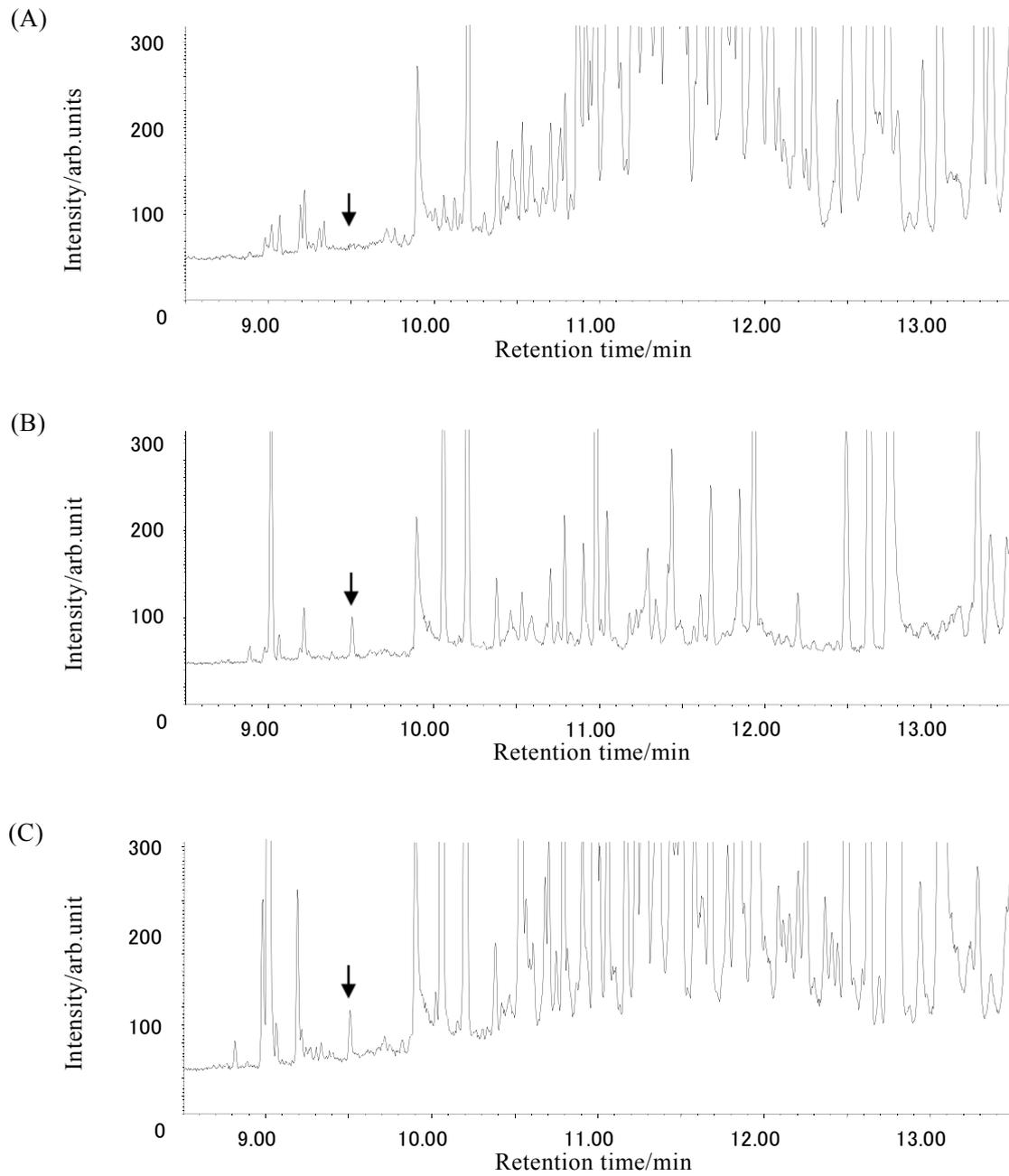


Fig. 3-1 SIM chromatograms of blank samples

(Arrows indicate peaks or retention time of benfuresate)

(A) Rice straw (B) Paddy rice (C) Whole-crop rice silage

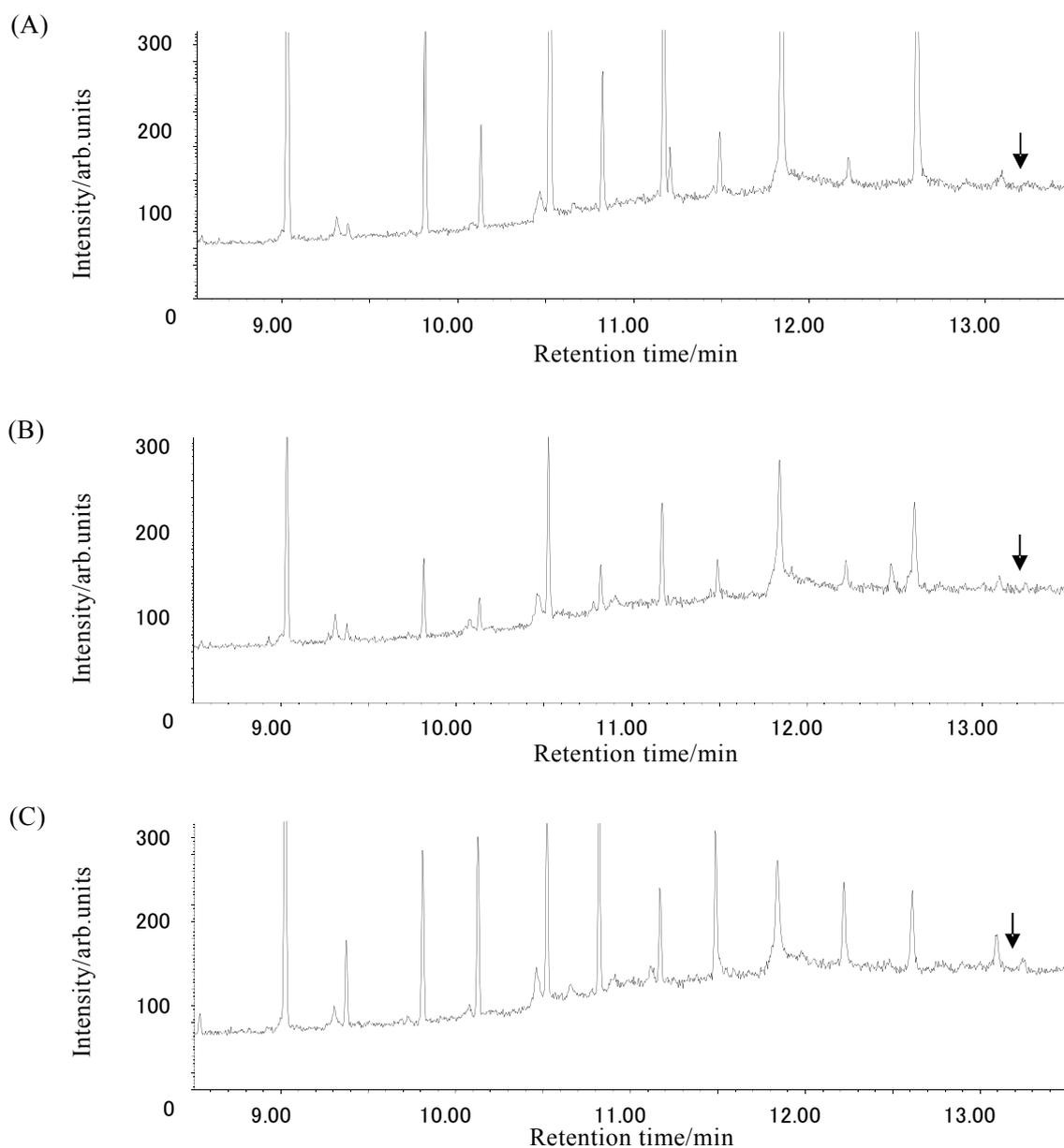


Fig. 3-2 SIM chromatograms of blank samples

(Arrows indicate peaks or retention time of cyhalofop-butyl)

(A) Rice straw (B) Paddy rice (C) Whole-crop rice silage

### 3.3 GPC 溶出画分の検討

2.5 に従い、GPC におけるベンフレゼート及びシハロホップブチルの溶出画分を検討した。なお、検討はベンフレゼート及びシハロホップブチルが 2 mg/kg (稲わら中のシハロホップブチルの指導基準) 残留していた場合を想定して行った。その結果、Table 3 のとおり、70~80 mL の画分で大半の溶出が認められたが、マトリックスの影響による変動を考慮して分取画分を 60~115 mL とすることとした。

Table 3 Elution pattern from GPC

Fraction volume (mL)	60~70	70~80	80~115	115~125	Total
Recovery of benfuresate (%) <sup>a)</sup>	0	92	0	0	92
Recovery of cyhalofop-butyl (%) <sup>a)</sup>	0	71	18	0	90

a)  $n=1$ 

## 3.4 稲発酵粗飼料における検討

2.1 で調製した稲発酵粗飼料にベンフレセート及びシハロホップブチルとして 200 及び 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  相当量を添加した試料を用いて、2.6 の 1) に従い回収率及び繰返し精度を求めた。その結果は Table 4 のとおりであり、ベンフレセートの平均回収率は 109 及び 130 %，その繰返し精度は相対標準偏差 ( $\text{RSD}_r$ ) として 7.5 % 以下，シハロホップブチルの平均回収率は 127 及び 136 %， $\text{RSD}_r$  は 5.6 % 以下となった。この原因は夾雑成分によるものと推定し、2.6 の 2) 及び 3) の検討を行った。

GC-MS 測定時の問題かどうかを確認するため、2.6 の 2) に従い回収率を求めた結果、ベンフレセートの回収率は 125 %，シハロホップブチルの回収率は 166 % であり、夾雑成分の影響を受けていると思われた。また、2.6 の 3) に従って調製した試料溶液を測定した結果、ベンフレセートについては、2 倍及び 5 倍に希釈した回収率はそれぞれ 129 及び 126 %，シハロホップブチルについてはそれぞれ 138 及び 127 % であり、回収率は多少改善したものの、稲発酵粗飼料についてはさらなる検討が必要であると考えられたため、本法から除外することとした。

Table 4 Recoveries from whole-crop rice silage

Kind of pesticide	Spiked level ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Recovery <sup>a)</sup> (%)	$\text{RSD}_r$ <sup>b)</sup> (%)
Benfuresate	200	109	7.5
	10	130	2.6
Cyhalofop-butyl	200	127	5.6
	10	136	2.4

a) Mean ( $n=3$ )

b) Relative standard deviation of repeatability

## 3.5 添加回収試験

稲わらにベンフレセート及びシハロホップブチルとして 2000, 300, 20 及び 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  相当量（最終試料溶液中で各 2, 0.3, 0.02 及び 0.01  $\mu\text{g}/\text{mL}$  相当量），粳米にそれぞれ 2000, 200, 20 及び 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  相当量（最終試料溶液中で各 2, 0.2, 0.02 及び 0.01  $\mu\text{g}/\text{mL}$  相当量）を添加した試料を用いて、回収率及び繰返し精度を求めた。

その結果、Table 5 のとおり、ベンフレセートの平均回収率は 92.6~124 %， $\text{RSD}_r$  は 5.3 % 以下，シハロホップブチルの平均回収率は 63.4~121 %， $\text{RSD}_r$  は 18 % 以下となった。

Table 5 Recoveries of benfuresate and cyhalofop-butyl

Kind of pesticide	Spiked level (µg/kg)	Rice straw		Paddy rice	
		Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	Recovery (%)	RSD <sub>r</sub> (%)
Benfuresate	2000	102	1.0	92.6	4.2
	300	102	4.9	-	-
	200	-	-	113	4.1
	20	119	1.7	116	4.1
	10	124	5.3	102	1.7
Cyhalofop-butyl	2000	84.7	6.3	74.2	13
	300	93.5	10	-	-
	200	-	-	89.9	18
	20	109	4.6	80.6	5.8
	10	121	5.0	63.4	18

a) Mean ( $n=3$ )

b) Relative standard deviation of repeatability

### 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、稲わら及び籾米に各農薬を添加し、添加回収試験により得られるピークの  $SN$  比が 10 以上及び 3 となる濃度を求めた。

その結果、稲わら中のベンフレセートについては、定量下限は 20 µg/kg、検出下限は 0.3 µg/kg であった。稲わら中のシハロホップブチルについては、定量下限は 20 µg/kg、検出下限は 2 µg/kg であった。また、籾米中のベンフレセートについては、定量下限は 10 µg/kg、検出下限は 0.3 µg/kg であった。籾米中のシハロホップブチルについては、定量下限は 20 µg/kg、検出下限は 2 µg/kg であった。

添加回収試験で得られたクロマトグラムの一例を Fig. 4 に示した。

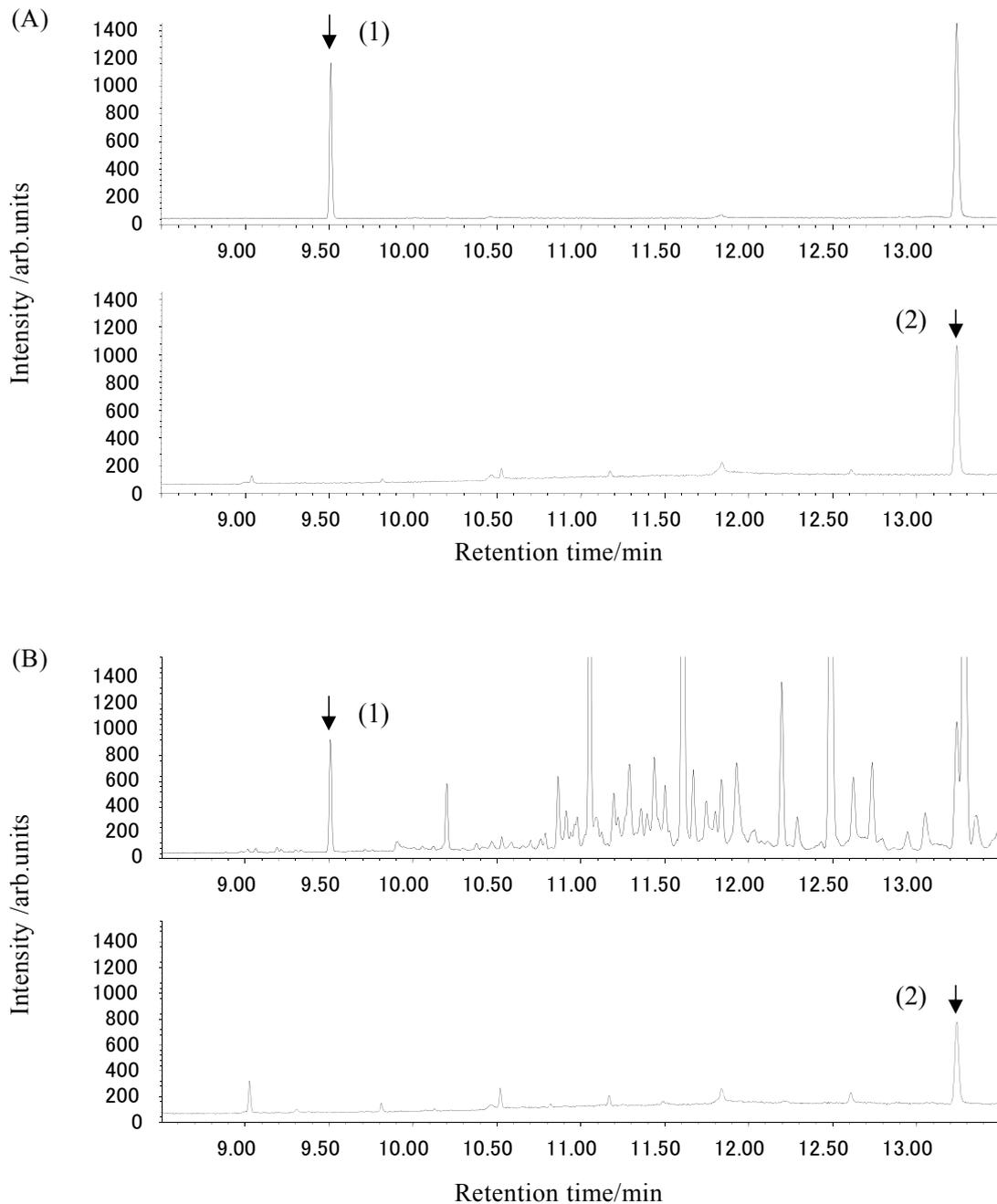


Fig. 4 SIM chromatograms

(Arrows indicate peaks of benfuresate (1) or cyhalofop-butyl (2) )

(A) Standard solution (The amount of each pesticide is 0.02  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )

(B) Sample solution of rice straw (Spiked at 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  of each pesticide)

### 3.7 共同試験

本法の室間再現精度を確認するため、稲わら及び粃米にベンフレート及びシハロホップブチル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。

i) 分析試料の調製 遠心粉碎機で粉碎した無添加試料を送付し、各試験室において一定量を

量り取った後、濃度非通知の添加用標準液（水溶液、各 1 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 点反復で試験を実施した。それぞれの添加濃度は Table 12 のとおりである。

ii) 参加試験室 一般社団法人日本科学飼料協会科学飼料研究センター、一般財団法人日本食品分析センター多摩研究所、JA 東日本くみあい飼料株式会社、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）。

iii) 結果の解析 国際的にハーモナイズされた共同試験に関する手順<sup>6), 7)</sup>を参考に、Cochran 検定、はずれ値 1 個の Grubbs 検定及びはずれ値 2 個の Grubbs 検定を行った後、平均回収率、繰返し精度の相対標準偏差 ( $RSD_r$ ) 及び室間再現精度の相対標準偏差 ( $RSD_R$ ) 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。なお、各検定により棄却された試験室はなかった。

結果の概要は以下のとおりである。

1) ベンフレセート ベンフレセートの分析結果及び統計解析結果は Table 6-1 のとおりであり、稲わら及び粃米について、平均回収率 (%) はそれぞれ 96.3 及び 103,  $RSD_r$  (%) はそれぞれ 5.5 及び 6.8,  $RSD_R$  (%) はそれぞれ 15 及び 21, HorRat はそれぞれ 0.80 及び 0.96 であった。いずれも良好な結果であった。

2) シハロホップブチル シハロホップブチルの分析結果及び統計解析結果は Table 6-2 のとおりであり、稲わら及び粃米について、平均回収率 (%) はそれぞれ 77.9 及び 80.2,  $RSD_r$  (%) はそれぞれ 9.4 及び 8.2,  $RSD_R$  (%) はそれぞれ 27 及び 29, HorRat はそれぞれ 1.8 及び 1.4 であった。

参考のため、各試験室で使用した GC-MS の機種等を Table 7 に示した。

Table 6-1 Collaborative study results of benfuresate

Lab. No.	Feed types			
	Rice straw ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )		Paddy rice ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	
1	301	313	27.2	29.6
2	327	339	32.4	32.6
3	258	298	34.8	29.1
4	346	347	40.5	39.3
5	275	304	29.2	26.9
6	199	197	19.2	16.7
7	292	277	27.8	28.9
8	308	296	36.1	31.5
9	281	243	38.3	35.8
Spiked level ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	300		30	
Mean value <sup>a)</sup> ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	289		31.0	
Recovery <sup>a)</sup> (%)	96.3		103	
RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	5.5		6.8	
RSD <sub>R</sub> <sup>c)</sup> (%)	15		21	
PRSD <sub>R</sub> <sup>d)</sup> (%)	19		22	
HorRat	0.80		0.96	

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 6-2 Collaborative study results of cyhalofop-butyl

Lab. No.	Feed types			
	Rice straw ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )		Paddy rice ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	
1	1790	1920	152	173
2	1640	1790	135	143
3	2180	2140	167	183
4	1790	1760	150	170
5	917	1260	106	132
6	844	856	78.4	73.5
7	1540	1770	184	169
8	1190	1600	219	226
9	1560	1500	228	197
Spiked level ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	2000		200	
Mean value <sup>a)</sup> ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	1560		160	
Recovery <sup>a)</sup> (%)	77.9		80.2	
RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	9.4		8.2	
RSD <sub>R</sub> <sup>c)</sup> (%)	27		29	
PRSD <sub>R</sub> <sup>d)</sup> (%)	15		21	
HorRat	1.8		1.4	

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 7 Instruments used in the collaborative study

Lab. No.	GC-MS <sup>a)</sup>
1	Shimadzu GCMS-QP2010Plus
2	Shimadzu GCMS-QP2010
3	Shimadzu GCMS-QP2010Plus
4	GC: Agilent Technologies 7890 A MS: Agilent Technologies 5975C inertXL MSD
5	Shimadzu GCMS-QP2010
6	GC: Agilent Technologies 6890N MS: Agilent Technologies 5973N
7	GC: Agilent Technologies 6890N MS: Agilent Technologies 5973inert
8	Shimadzu GCMS-QP2010Plus
9	GC: Agilent Technologies 6890N MS: Agilent Technologies 5973N

a) GC column (i.d. × length, film thickness) : Agilent Technologies

DB-5MS+DG (0.25 mm × 30 m + 10 m guard column (Duraguard), 0.25 μm)

#### 4 まとめ

稲わら，粃米及び稲発酵粗飼料中に残留するベンフレセート及びシハロホップブチルについて，JFRL 法を基に，GC-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，次の結果が得られ，適用が可能であると考えられた。

- 1) ベンフレセート及びシハロホップブチルの検量線は 0.005~0.5 μg/mL (注入量として 0.01~1.0 ng) の範囲で直線性を示した。
- 2) 稲わら (3 種)，稲発酵粗飼料 (4 種)，粃米 (2 種) について本法に従ってクロマトグラムを作成したところ，定量を妨害するピークは認められなかった。
- 3) 稲発酵粗飼料を用いてベンフレセート及びシハロホップブチルの添加回収試験を実施した結果，共に高く定量される傾向が認められたため，本法の適用は難しいと考えられた。
- 4) 稲わら及び粃米にベンフレセート及びシハロホップブチルを添加して，添加回収試験及び共同試験を実施した結果，ベンフレセート及びシハロホップブチルについて，真度，併行精度，室間再現精度のいずれも良好な結果が得られたため，当該 2 成分について本法の適用が可能であった。
- 5) 添加回収試験及びその際のピークの SN 比から定量下限及び検出下限を求めた。その結果，ベンフレセートは，稲わら中で定量下限が 20 μg/kg，検出下限が 0.3 μg/kg，粃米中で定量下限が 10 μg/kg，検出下限が 0.3 μg/kg となった。シハロホップブチルは稲わら中で定量下限が 20 μg/kg，検出下限が 2 μg/kg，粃米中で定量下限が 20 μg/kg，検出下限が 2 μg/kg となった。

#### 謝 辞

共同試験に参加していただいた一般社団法人日本科学飼料協会科学飼料研究センター，一般財団法人日本食品分析センター多摩研究所，JA 東日本くみあい飼料株式会社における関係者各位に感謝の意を表します。

## 文 献

- 1) 厚生省告示：食品，添加物等の規格基準，昭和 34 年 12 月 28 日，厚生省告示第 370 号 (1959).
- 2) 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).
- 3) 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).
- 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) 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委託事業 飼料中の有害物質等の分析法の開発 (2010).
- 6) Horwitz, W., Protocol for Design, Conduct and Interpretation of Method - Performance Studies, *Pure & Appl. Chem.*, 67 (2), 331-343 (1995).
- 7) 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).