

1 乾牧草中の 2,4-D 及びその関連物質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

山本 克己^{*1}, 加藤 耕一^{*2}

Determination of 2,4-D and Related Compounds in Grass Hay for Feed by LC-MS/MS

Katsumi YAMAMOTO^{*1} and Kouichi KATO^{*2}

(*¹ Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department
(Now Sendai Regional Center)

*² Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department)

An analytical method was developed to determine levels of 2,4-D and related compounds in grass hay for feed using liquid chromatograph-tandem mass spectrometer (LC-MS/MS).

After adding water to the samples, 2,4-D and related compounds were extracted with acetone under acidic condition, and the resulting solutions were filtered. The filtrate was then diluted with acetone to a final volume of 200 mL, furthermore, it was diluted 500-fold with acetone. 2,4-D related compounds, such as 2,4-D-ethyl in the sample solutions were hydrolyzed to 2,4-D by heating for 30 minutes at 80 °C under alkaline condition. Then the sample solution was purified with liquid-liquid extraction with diethylether under acidic condition, and injected into the LC-MS/MS for determination of the 2,4-D level. LC separation was carried out on an ODS column (Atlantis T3, 2.1 mm i.d. × 150 mm, 3 µm from Waters; Milford, MA, USA) using 5 mmol/L ammonium acetate solution and 5 mmol/L ammonium acetate methanol solution as a mobile phase. In the MS/MS analysis, negative mode electrospray ionization (ESI-) was used.

Spike tests were conducted on 2 kinds of grass hay. Timothy hay was spiked with 260 or 10 mg/kg of 2,4-D. Ryegrass straw was spiked with the same compound at 260, 10 or 5 mg/kg, respectively. 2,4-D mean recoveries ranged from 98.2 % to 105 % for timothy hay and 91.7 % to 98.6 % for ryegrass straw. The repeatability in terms of relative standard deviations (RSD_r) were not more than 4.2 % for timothy hay and 4.8 % for ryegrass straw. Subsequently, timothy hay and ryegrass straw were spiked with 260 or 10 mg/kg of 2,4-D-ethyl, respectively. 2,4-D-ethyl mean recoveries ranged from 94.9 % to 96.2 % for timothy hay and 90.0 % to 94.7 % for ryegrass straw. The relative standard deviations of repeatability were not more than 5.0 % for timothy hay and 5.7 % for ryegrass straw.

A collaborative study was conducted in nine laboratories, using 2 kinds of grass hay spiked with 2,4-D and 2,4-D-ethyl in the following quantities: 260 mg/kg for timothy hay, and 52 mg/kg for oats hay. The mean recovery, repeatability and reproducibility in terms of relative standard deviations (RSD_r and RSD_R) and HorRat, respectively, were 94.2 %, 3.4 %, 11 % and 1.5 (timothy hay) and 93.5 %, 2.7 %, 15 % and 1.7 (oats hay) for 2,4-D and 84.8 %, 6.9 %, 11 % and 1.5 (timothy hay) and 82.4 %, 3.2 %, 8.0 % and 0.86 (oats hay) for 2,4-D-ethyl.

This method was validated and established for use in the inspection of 2,4-D and related compounds in grass hay for feed.

Key words: 2,4-D and related compounds; liquid chromatograph-tandem mass spectrometer (LC-MS/MS); electrospray ionization (ESI); grass hay; collaborative study

キーワード : 2,4-D 及びその関連物質 ; 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 ; 乾牧草 ; 共同試験

*¹ 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

*² 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

1 緒 言

2,4-D は 1950 年に国内登録されたホルモン型の選択性除草剤であり、イネ科作物よりも広葉雑草に対する効果が大きく、水田用除草剤として広く使用されている¹⁾。

我が国では、農林水産省令における飼料の 2,4-D (2,4-D ナトリウム塩, 2,4-D ジメチルアミン塩, 2,4-D エチル, 2,4-D イソプロピル, 2,4-D ブトキシエチル及び 2,4-D アルカノールアミン塩 (以下「2,4-D 関連物質」という。)) を含む。) の残留基準値²⁾は、えん麦, 大麦, マイロ, 小麦及びライ麦で 0.5 mg/kg, とうもろこしで 0.05 mg/kg, 牧草で 260 mg/kg となっている。また、飼料の有害物質の指導基準における残留基準値³⁾は、稲わらで 1 mg/kg となっている。更に、厚生労働省の食品, 添加物等の規格基準における残留農薬基準値⁴⁾は、米 (玄米) で 0.1 ppm, とうもろこしで 0.05 ppm, その他穀類では 0.5 ppm となっている。

飼料中の 2,4-D の分析法としては、既に飼料分析基準⁵⁾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。)) による単成分分析法 (適用範囲: 穀類)⁶⁾及びガスクロマトグラフによる 2,4,5-T との同時分析法⁷⁾ (2,4-D 関連物質は非対象) が記載されている。また、食品中の 2,4-D の分析法としては、厚生労働省通知試験法⁸⁾として個別試験法 (ガスクロマトグラフ (ECD) 及びガスクロマトグラフ質量分析計) が示されている。

既に飼料分析基準に記載されている LC-MS/MS による 2,4-D の分析法を開発するにあたり、この分析法を穀類及び乾牧草に適用した場合の再現精度等を共同試験により確認したところ、穀類では良好な室間再現精度が得られたが、乾牧草では HorRat が 2 を大幅に超え、良好な再現精度を得ることができなかった⁶⁾。よって、穀類を適用範囲とする分析法のみを先行して飼料分析基準に記載し、乾牧草を適用範囲とする分析法は継続検討することとされた。

穀類を対象とした飼料分析基準既記載法は、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事業」において開発した LC-MS/MS を用いた定量法 (以下「JFRL 法」という。))⁹⁾を基にした、2,4-D 関連物質を加水分解により 2,4-D に変換し、2,4-D として定量する方法である。JFRL 法の開発過程において、2,4-D 関連物質のうち最も極性の低い 2,4-D ブトキシエチルの加水分解率の検討が行われ、良好な結果が得られている。穀類を対象とした飼料分析基準既記載法においては、2,4-D エチルを用いて 2,4-D 関連物質を含めた定量法としての妥当性を確認しており、乾牧草を適用範囲とする本検討においても 2,4-D エチルを用いて検討を行った。

飼料分析基準既記載法を乾牧草に適用した場合に良好な室間再現精度が得られなかった原因は、加水分解後の中和操作が困難であった (穀類では中性に達した時点で試料溶液が白濁するため調整が容易であったが、乾牧草では中性に達した時点でも白濁せず、見極めが難しいため、試料溶液が酸性側に片寄ってしまった。) こと、酸性下での抽出液をアセトンで希釈すると酸性が弱まり、その後の酢酸エチル-ヘキサン (1+1) による転溶 (以下「液液分配 I」という。)) が不十分となった可能性があること等が考えられた。そこで、牧草における 2,4-D 及びその関連物質の残留基準値が主要穀類に比べて極めて高く設定されていることから、乾牧草の試料溶液を希釈することにより、穀類を対象とした飼料分析基準既記載法の定量手順のうち、液液分配 I, オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムによる精製 (供試前の中和操作を含む。以下「カラム処理 I」という。)) 及びグラファイトカーボン/エチレンジアミン-N-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラムによる精製 (以下「カラム処理 II」という。)) の操作が省略可能となるのではないかと考え、その実証等を行ったので、その概要を報告する。

参考に 2,4-D 及び 2,4-D エチルの構造式等を Fig. 1 に示した。

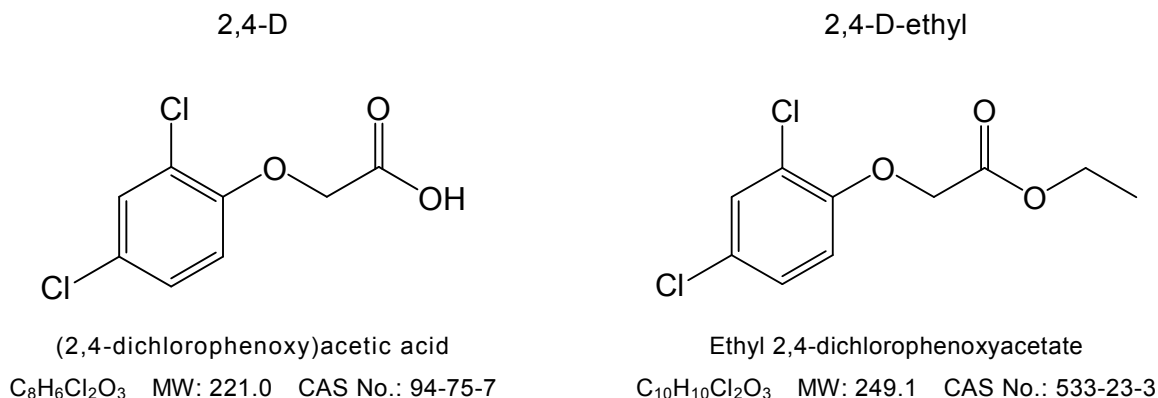


Fig. 1 Chemical structures of 2,4-D and 2,4-D-ethyl

2 実験方法

2.1 試料

チモシー乾草、オーツ乾草及びライグラスわらはそれぞれ 1 mm の網ふるいを通過するまで粉碎した。

2.2 試薬

1) アセトン、ジエチルエーテル、塩化ナトリウム及び硫酸ナトリウム（無水）は残留農薬・PCB 試験用を用いた。メタノールは抽出操作には残留農薬・PCB 試験用を、溶離液には LC/MS 用を用いた。酢酸アンモニウム溶液は和光純薬工業製 LC 用 1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液を用いた。水は超純水（JIS K 0211 に定める 5218 の超純水）を用いた。その他の試薬は特級（ギ酸は 98 % のもの）を用いた。2,4-D エチル標準品は Dr. Ehrenstorfer 製（純度 99.0 %）を用いた。

2) 2,4-D 標準液

2,4-D 標準品（関東化学製，純度 98.6 %）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検量線作成用 2,4-D 標準原液を調製した（この液 1 mL は，2,4-D として 0.5 mg を含有する ($f=0.986$) . .）。

使用に際して，2,4-D 標準原液の一定量を，メタノールーギ酸（1000+1）で正確に希釈し，1 mL 中に 2,4-D として 0.004, 0.008, 0.02, 0.04, 0.08, 0.2 及び 0.4 µg を含有する各 2,4-D 標準液を調製した。

2.3 装置及び器具

- 1) 乾牧草用粉碎機：SM-100 Retsch 製（1 mm スクリーン，回転数 1430 rpm）
- 2) 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）Agilent Technologies 製にリザーバー（20 mL）を連結したもの
- 3) グラファイトカーボン／エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム：InertSep GC/PSA カートリッジ（充てん剤量 500 mg/500 mg）ジーエルサイエンス製にリザーバー（50 mL）を連結したもの

4) LC-MS/MS :

LC 部 : ACQUITY UPLC System Waters 製

MS 部 : ACQUITY Xevo TQD 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 30 mL を加え、30 分間静置後、更に塩酸 (4 mol/L) 5 mL 及びアセトン 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。この液をアセトンで正確に 500 倍希釈した後、希釈液 8 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 1 mL まで減圧濃縮し、窒素ガスを送って乾固した。メタノール 2 mL を加えて残留物を溶かし、加水分解に供する試料溶液とした。

2) 加水分解

試料溶液の入った 100 mL のなす形フラスコに水酸化ナトリウム溶液 (1.5 mol/L) 1 mL を加え、冷却管を付けて 80 °C の水浴で 30 分間加温した後放冷した。この液を液液分配に供する試料溶液とした。

3) 液液分配

試料溶液をあらかじめ塩酸 (4 mol/L) 5 mL 及び塩化ナトリウム溶液 (10 w/v%) 100 mL を入れた 300 mL の分液漏斗 A に加えた。試料溶液の入っていたなす形フラスコをジエチルエーテル 50 mL で洗浄し、洗液を分液漏斗 A に加え、5 分間振り混ぜた後静置した。水層 (下層) を 300 mL の分液漏斗 B に入れ、ジエチルエーテル層 (上層) を 200 mL の三角フラスコに入れた。分液漏斗 A をジエチルエーテル 50 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、水層を捨て、ジエチルエーテル層を先の三角フラスコに合わせた。ジエチルエーテル層を適量の硫酸ナトリウム (無水) で脱水し、200 mL のなす形フラスコにろ紙 (5 種 A) でろ過した。分液漏斗 B 及び先の三角フラスコを少量のジエチルエーテルで洗浄し、洗液を先のろ紙を通してろ液を合わせた。ろ液を 40 °C 以下の水浴で約 1 mL まで減圧濃縮し、窒素ガスを送って乾固した。メタノール-ギ酸 (1000+1) 1 mL を正確に加えて残留物を溶かし、LC-MS/MS による測定に供する試料溶液とした。

4) LC-MS/MS による測定

試料溶液及び各 2,4-D 標準液各 5 µL を LC-MS/MS に注入し、選択反応検出 (SRM) クロマトグラムを得た。測定条件を Table 1 及び 2 に示した。

Table 1 Operating conditions of LC-MS/MS

Column	Atlantis T3 (2.1 mm i.d. × 150 mm, 3 μm), Waters
Mobile phase	5 mmol/L ammonium acetate solution - 5 mmol/L ammonium acetate methanol solution (7:3) → 10 min → (0:10) (hold for 10 min) → 1 min → (7:3) (hold for 10 min)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temperature	40 °C
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Mode	Negative
Ion source temperature	150 °C
Desolvation gas temperature	400 °C
Capillary voltage	0.6 kV

Table 2 MS/MS parameters

Target	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion (<i>m/z</i>)	Qualifier ion (<i>m/z</i>)	Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
2,4-D	219	161	-	28	12
	221	-	163		

5) 計 算

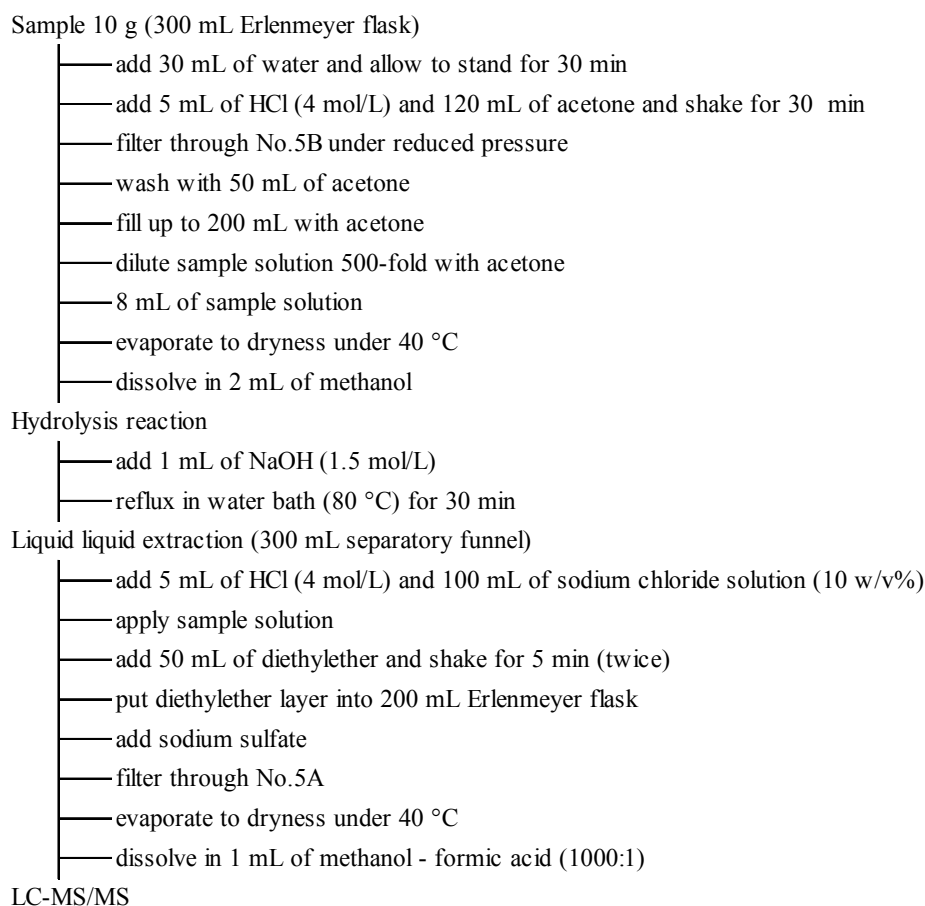
得られた SRM クロマトグラムから 2,4-D のピーク面積及び高さを求めて検量線を作成し、試料中の 2,4-D 量を算出した。

また、2,4-D エチルのみを添加して添加回収試験を行った際の回収率の計算は、検量線から求めた試料中の 2,4-D 量を次式により 2,4-D エチル量に換算し、添加した 2,4-D エチルの試料中濃度で除してその割合を求めることにより行った。

$$\text{試料中の 2,4-D エチル量} = A \times 249.1 / 221.0$$

A : 検量線から求めた試料中の 2,4-D 量

なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。



Scheme 1 Analytical procedure for 2,4-D and related compounds in grass hay

2.5 液液分配操作及びカラム処理操作の省略の可否に係る検討で用いた定量方法

穀類を適用範囲とする飼料分析基準収載法（第6章第1節2.1）を基に、各種精製操作の省略の可否に係る検討を行った。ただし、飼料中の2,4-Dの残留基準値は、主要穀類において0.5 mg/kg以下であるのに対し、乾牧草では260 mg/kgと極めて高くなっているため、飼料分析基準収載法の抽出において500倍希釈を加え、更に希釈を行うことにより水層の酸性が弱まるため、液液分配Iにおいてあらかじめ分液漏斗に塩酸を入れる操作をそれぞれ加えた以下の方法を用いた。

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30 mLを加え、30分間静置後、更に塩酸（4 mol/L）5 mL及びアセトン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。この液をアセトンで正確に500倍希釈し、液液分配Iに供する試料溶液とした。

2) 液液分配I

試料溶液8 mLを、あらかじめ塩酸（4 mol/L）5 mL、塩化ナトリウム溶液（10 w/v%）100 mL及び酢酸エチル-ヘキサン（1+1）100 mLを入れた300 mLの分液漏斗Aに正確に加え、5分間振り混ぜた後静置した。水層（下層）を300 mLの分液漏斗Bに入れ、酢酸エチル-ヘキ

サン層（上層）を 300 mL の三角フラスコに入れた。分液漏斗 A を酢酸エチルーヘキサン（1+1）50 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、水層を捨て、酢酸エチルーヘキサン層を先の三角フラスコに合わせた。酢酸エチルーヘキサン層を適量の硫酸ナトリウム（無水）で脱水し、200 mL のなす形フラスコにろ紙（5 種 A）でろ過した。分液漏斗 B 及び先の三角フラスコを少量の酢酸エチルーヘキサン（1+1）で洗浄し、洗液を先のろ紙を通してろ液を合わせた。ろ液を 40 °C 以下の水浴で約 1 mL まで減圧濃縮し、窒素ガスを送って乾固した。メタノール 2 mL を加えて残留物を溶かし、加水分解に供する試料溶液とした。

3) 加水分解

試料溶液の入ったなす形フラスコに水酸化ナトリウム溶液（1.5 mol/L）1 mL を加え、冷却管を付けて 80 °C の水浴で 30 分間加温した後放冷した。pH を塩酸（1.5 mol/L）で 7.5~8.0 に調整（pH は pH 試験紙を用いて確認）した後、炭酸水素ナトリウム溶液（0.1 w/v%）16 mL を加え、カラム処理 I に供する試料溶液とした。

4) 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メタノール 10 mL 及び水 10 mL で順次洗浄した（吸引マニホールドを用い、流速を 1 mL/min 程度とした。以下同じ。）。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。50 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き、試料溶液の入っていたなす形フラスコを炭酸水素ナトリウム溶液（0.1 w/v%）-メタノール（1+1）5 mL で洗浄し、洗液をミニカラムに加えて 2,4-D を溶出させ、更に同溶媒 15 mL をミニカラムに加えて同様に溶出させた。この溶出液を液液分配 II に供する試料溶液とした。

5) 液液分配 II

試料溶液をあらかじめ塩酸（4 mol/L）5 mL 及び塩化ナトリウム溶液（10 w/v%）100 mL を入れた 300 mL の分液漏斗 C に加えた。試料溶液の入っていたなす形フラスコをジエチルエーテル 50 mL で洗浄し、洗液を分液漏斗 C に加え、5 分間振り混ぜた後静置した。水層（下層）を 300 mL の分液漏斗 D に入れ、ジエチルエーテル層（上層）を 200 mL の三角フラスコに入れた。分液漏斗 C をジエチルエーテル 50 mL で洗浄し、洗液を分液漏斗 D に加え、5 分間振り混ぜた後静置し、水層を捨て、ジエチルエーテル層を先の三角フラスコに合わせた。ジエチルエーテル層を適量の硫酸ナトリウム（無水）で脱水し、200 mL のなす形フラスコにろ紙（5 種 A）でろ過した。分液漏斗 D 及び先の三角フラスコを少量のジエチルエーテルで洗浄し、洗液を先のろ紙を通してろ液を合わせた。ろ液を 40 °C 以下の水浴で約 1 mL まで減圧濃縮し、窒素ガスを送って乾固した。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 II に供する試料溶液とした。

6) カラム処理 II

グラファイトカーボン/エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラムをアセトニトリル-トルエン（3+1）10 mL で洗浄した。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アセトニトリル-トルエン（3+1）5 mL で洗浄し、洗液をミニカラムに入れ、同様に流出させた。50 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き、試料溶液の入っていたなす形フラスコをア

セトニトリル-トルエン-ギ酸 (75+25+1) 5 mL で洗浄し、洗液をミニカラムに加えて 2,4-D を溶出させ、更に同溶媒 25 mL をミニカラムに加えて同様に溶出させた。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。メタノール-ギ酸 (1000+1) 1 mL を正確に加えて残留物を溶かし、LC-MS/MS による測定に供する試料溶液とした。

2.6 液液分配 I の操作省略の可否に係る検討方法

2,4-D エチルとして、チモシー乾草に 260 mg/kg 相当量を添加し、下記 1)及び 2)に基づき操作して得られた試料溶液を LC-MS/MS に供し、回収率を比較した。

- 1) 2.5 の 1)から 6)までの操作を行った (操作の省略なし)。
- 2) 2.4 の 1)の操作を行った後、2.5 の 3)以降の操作を行った (液液分配 I 操作の省略)。

2.7 カラム処理 I の操作省略の可否に係る検討方法

2,4-D エチルとして、チモシー乾草に 260 mg/kg 相当量を添加し、下記 1)及び 2)に基づき操作して得られた試料溶液を LC-MS/MS に供し、回収率を比較した。

- 1) 2.4 の 1)の操作を行った後、2.5 の 3)以降の操作を行った (液液分配 I 操作の省略)。
- 2) 2.4 の 2)までの操作を行い得られた試料溶液について、2.5 の 5)以降の操作を行った (液液分配 I 及びカラム処理 I 操作の省略)。

2.8 カラム処理 II の操作省略の可否に係る検討方法

2,4-D エチルとして、チモシー乾草に 260 mg/kg 相当量を添加し、下記 1)及び 2)に基づき操作して得られた試料溶液を LC-MS/MS に供し、回収率を比較した。

- 1) 2.4 の 2)までの操作により得られた試料溶液について、2.5 の 5)以降の操作を行った (液液分配 I 及びカラム処理 I 操作の省略)。
- 2) 2.4 の 1)から 3)までの操作を行った (液液分配 I, カラム処理 I 及びカラム処理 II 操作の省略)。

3 結果及び考察

3.1 検量線

2.2 の 2)に従って調製した 2,4-D として各 0.004, 0.008, 0.02, 0.04, 0.08, 0.2 及び 0.4 µg/mL 相当量の各標準液各 5 µL 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。得られた検量線は、Fig. 2 のとおりであり、2,4-D で各 0.004~0.4 µg/mL 相当量 (注入量として 0.02~2 ng 相当量) の範囲で直線性を示した。

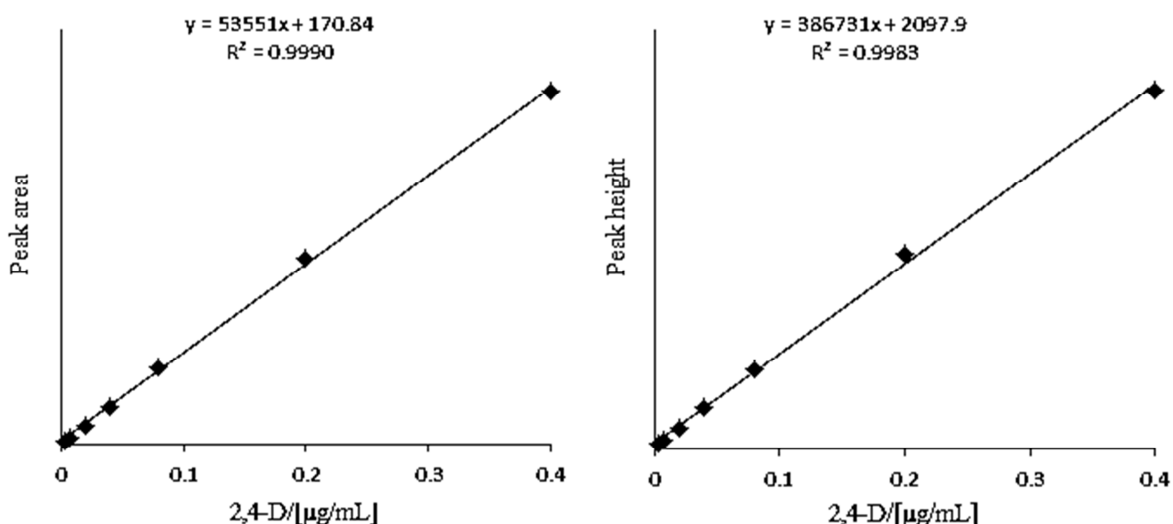


Fig. 2 Calibration curves of 2,4-D by peak area (left) and peak height (right)

3.2 液液分配 I の操作省略の可否に係る検討

2.6 の 1)及び 2)に従って試料溶液を調製し、それぞれ 3 点併行で定量した。その結果は Table 3 のとおり、液液分配 I 操作を省略したことによる定量への影響は認められなかった。このことから、液液分配 I の操作は省略可能と考えられた。

Table 3 Effects of omission of liquid liquid extraction I

Spiked level (mg/kg)	Run No.	Preparation with liquid liquid extraction I	Preparation without liquid liquid extraction I
		Recovery (%)	Recovery (%)
260	1	88.9	88.0
	2	87.9	91.2
	3	91.9	91.1
Mean recovery (%)		89.6	90.1
RSD _r ^{a)} (%)		2.4	2.0

a) Relative standard deviation of repeatability

3.3 カラム処理 I の操作省略の可否に係る検討

2.7 の 1)及び 2)に従って試料溶液を調製し、それぞれ 3 点併行で定量した。その結果は Table 4 のとおり、カラム処理操作 I を省略したことによる定量への影響は認められなかった。このことから、カラム処理 I の操作は省略可能と考えられた。

Table 4 Effects of omission of clean-up column I (Mega Bond Elut C18)

Spiked level (mg/kg)	Run No.	Preparation with clean-up column I	Preparation without clean-up column I
		Recovery (%)	Recovery (%)
260	1	93.0	90.7
	2	92.3	94.1
	3	83.9	89.0
Mean recovery (%)		89.7	91.2
RSD _r ^{a)} (%)		5.7	2.8

a) Relative standard deviation of repeatability

3.4 カラム処理 II の操作省略の可否に係る検討

2.8 の 1)及び 2)に従って試料溶液を調製し、それぞれ 3 点併行で定量した。その結果は Table 5 のとおり、カラム処理 II 操作を省略したことによる定量への影響は認められなかった。このことから、カラム処理 II の操作は省略可能であると考えられた。

Table 5 Effects of omission of clean-up column II (InertSep GC/PSA)

Spiked level (mg/kg)	Run No.	Preparation with clean-up column II	Preparation without clean-up column II
		Recovery (%)	Recovery (%)
260	1	97.5	92.2
	2	90.5	95.7
	3	87.7	97.0
Mean recovery (%)		91.9	94.9
RSD _r ^{a)} (%)		5.5	2.6

a) Relative standard deviation of repeatability

3.5 マトリックス効果の確認

2.4 の 1)から 3)により調製したチモシー乾草のブランク試料溶液に 2,4-D として 5 及び 10 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 0.004 及び 0.008 µg/mL 相当量）をそれぞれ添加したマトリックス標準液について、2.2 の 2)に従って調製した同濃度の 2,4-D 標準液に対するピーク面積比を確認したところ、ピーク面積比はともに 98 % であり、2,4-D 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。

3.6 妨害物質の検討

小麦わら 1 検体、オーツ乾草 2 検体、クレイングラス乾草 2 検体、スーダングラス乾草 2 検体、チモシー乾草 2 検体、フェスクわら 1 検体及びライグラスわら 1 検体を用い、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ところ、スーダングラス乾草 1 検体において、検出下限以上（定量下限未満）のピークが認められた。

当該試料では確認イオンでも同様にピークが検出され、このイオンで別途検量線を作成し、確認したところ、定量イオンとほぼ同等の濃度となったことから、2,4-D 及びその関連物質が残留している試料であると判断した。その他の試料では、定量を妨げるピークは認められなかった。

なお、当該スーダングラス乾草の SRM クロマトグラムの一例を Fig. 3 の B に示した。

3.7 添加回収試験

2,4-D として、チモシー乾草に 260 及び 10 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で各 0.208 及び 0.008 µg/mL 相当量）、ライグラスわらに 260, 10 及び 5 mg/kg を添加（最終試料溶液中で各 0.208, 0.008 及び 0.004 µg/mL 相当量）を添加し、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。

また、2,4-D エチルは、加水分解により 2,4-D に変換されることから、両者が共存している場合には定量値は 2,4-D 及び 2,4-D エチルの含量として算出される。このことから 2,4-D エチルの添加回収試験による試験の際には 2,4-D エチルのみを添加して評価を行うこととした。2,4-D エチルとして、チモシー乾草及びライグラス乾草に 260 及び 10 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で各 0.185 及び 0.007 µg/mL 相当量）を添加し、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 6 及び Table 7 のとおり、2,4-D は、チモシー乾草では平均回収率 98.2~105 %、その繰返し精度は、相対標準偏差 (RSD_r) として 4.2 %以下、同様にライグラスわらでは 91.7~98.6 %及び 4.8 %以下であった。一方、2,4-D エチルは、チモシー乾草では平均回収率 94.9~96.2 %、その繰返し精度は、RSD_r として 5.0 %以下、同様にライグラスわらでは 90.0~94.7 %及び 5.7 %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. 3 に示した。

Table 6 Recoveries for 2,4-D

Spiked level (mg/kg)	Feed types			
	Timothy hay		Ryegrass straw	
	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)
260	105	4.2	93.1	1.9
10	98.2	0.4	91.7	4.0
5	-	-	98.6	4.8

a) Mean (n=3)

b) Relative standard deviation of repeatability

Table 7 Recoveries for 2,4-D-ethyl

Spiked level (mg/kg)	Feed types			
	Timothy hay		Ryegrass straw	
	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)
260	94.9	2.6	90.0	5.7
10	96.2	5.0	94.7	5.0

a) Mean (n=3)

b) Relative standard deviation of repeatability

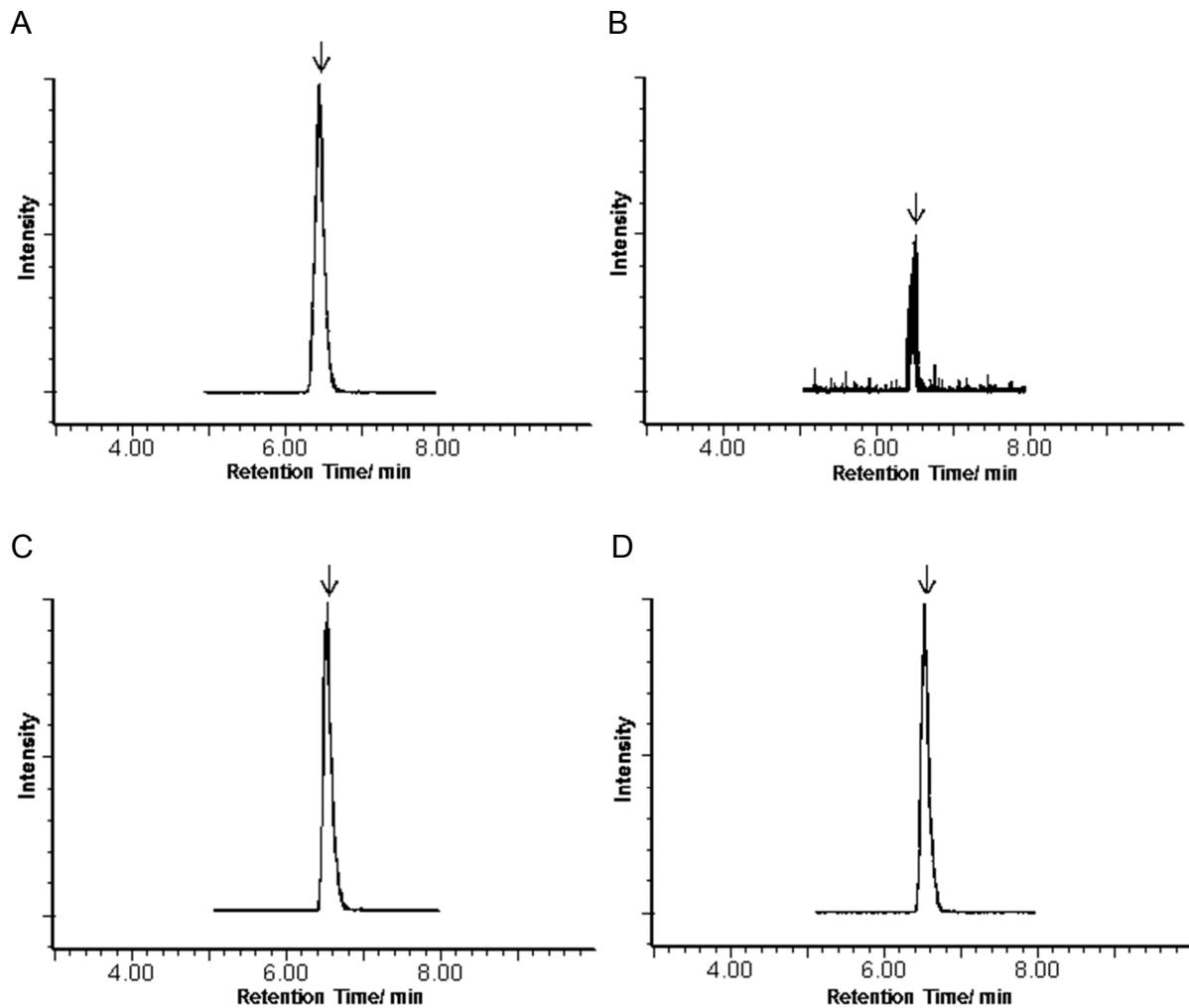


Fig. 3 SRM chromatograms

(Arrows indicate the peak of 2,4-D and each peak is shown as 100 % in each segment except B, in which the peak of 2,4-D in the lowest standard solution (0.004 $\mu\text{g/mL}$) is to be shown as 100 %.)

A: Standard solution (The concentration is 0.2 $\mu\text{g/mL}$ for 2,4-D.)

B: Sample solution of sudan grass hay (not spiked with 2,4-D)

C: Sample solution of timothy hay (spiked with 2,4-D at 260 mg/kg)

D: Sample solution of timothy hay (spiked with 2,4-D-ethyl at 260 mg/kg)

3.8 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、2,4-Dを添加した添加回収試験により得られたピークのSN比が10及び3となる濃度を求めた。その結果、得られたピークのSN比が10以上となる濃度は5 mg/kgであった。また、SN比が3となる濃度は2 mg/kgであった。

なお、この定量下限濃度における回収率及び繰返し精度は、先にTable 6に示したとおり良好であった。

3.9 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、チモシー乾草及びオーツ乾草にそれぞれ 2,4-D 及び 2,4-D エチルとして 260 及び 52 mg/kg 相当量（分析用試料 10 g に対して 1 mL 中に 2600 及び 520 μg 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個別に添加して調製した試料を用いた。参加試験室は、一般財団法人食品環境検査協会東京事業所、協同飼料株式会社研究所、全国農業協同組合連合会飼料畜産中央研究所、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）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^{10), 11)}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_f) 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¹²⁾を用いて HorRat を求めた。

結果は Table 8 及び Table 9 のとおりであった。2,4-D では、チモシー乾草及びオーツ乾草について、平均回収率は 94.2 及び 93.5 %、 RSD_f は 3.4 及び 2.7 %、 RSD_R は 11 及び 15 %、HorRat は 1.5 及び 1.7 であった。2,4-D エチルでは、チモシー乾草及びオーツ乾草について、平均回収率は 84.8 及び 82.4 %、 RSD_f は 6.9 及び 3.2 %、 RSD_R は 11 及び 8.0 %、HorRat は 1.5 及び 0.86 であった。

参考のため、各試験室で使用した LC-MS/MS の機種等を Table 10 に示した。

Table 8 Collaborative study results of 2,4-D

Lab. No.	Feed types			
	Timothy hay (mg/kg)		Oats hay (mg/kg)	
1	243	244	52.2	49.8
2	268	257	51.7	49.5
3	229	231	47.7	45.1
4	235	253	52.1	51.1
5	263	254	47.7	48.0
6	228	230	39.4	37.8
7	272	258	47.6	47.8
8	203	184	40.0	41.3
9	285	272	61.9	64.7
Spiked level (mg/kg)	260		52	
Mean value ^{a)} (mg/kg)	245		48.6	
Recovery ^{a)} (%)	94.2		93.5	
RSD _r ^{b)} (%)	3.4		2.7	
RSD _R ^{c)} (%)	11		15	
PRSD _R ^{d)} (%)	7.0		8.9	
HorRat	1.5		1.7	

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 9 Collaborative study results of 2,4-D-ethyl

Lab. No.	Feed types			
	Timothy hay (mg/kg)		Oats hay (mg/kg)	
1	179	186	34.1	36.5
2	213	207	41.2	43.4
3	191	197	38.1	35.8
4	216	203	42.3	40.2
5	228	192	35.2	36.9
6	188	159	35.2	34.7
7	220	228	41.4	41.3
8	173	165	36.3	35.0
9	177	203	37.6	38.9
Spiked level (mg/kg)	260		52	
Spiked level as 2,4-D (mg/kg)	231		46.1	
Mean value ^{a)} (mg/kg)	196		38.0	
Recovery ^{a)} (%)	84.8		82.4	
RSD _r ^{b)} (%)	6.9		3.2	
RSD _R ^{c)} (%)	11		8.0	
PRSD _R ^{d)} (%)	7.2		9.3	
HorRat	1.5		0.86	

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 10 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	ZORBAX Eclipse XDB-C18, Agilent Technologies (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
2	LC: ACQUITY UPLC, Waters MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	ZORBAX Eclipse XDB-C18, Agilent Technologies (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
3	LC: ACQUITY UPLC, Waters MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	Mightysil RP-18GP, Kanto Chemical (2.0 mm×150 mm, 3 μm)
4	LC: ACQUITY UPLC, Waters MS/MS: ACQUITY Xevo TQD, Waters	Atlantis T3, Waters (2.1 mm×150 mm, 3 μm)
5	LC: ACQUITY UPLC, Waters MS/MS: Quattro premier XE, Waters	Inertsil ODS-SP, GL Sciences (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
6	LC: 1200, Agilent Technologies MS/MS: 6410 Triple Quad LC/MS, Agilent Technologies	Inertsil ODS-SP, GL Sciences (2.1 mm×150 mm, 3 μm)
7	LC: LC-20A, Shimadzu MS/MS: API4000, Applied Biosystems	Atlantis T3, Waters (2.1 mm×150 mm, 3 μm)
8	LC: ACQUITY UPLC, Waters MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	ACQUITY UPLC BEH C18, Waters (2.1 mm×150 mm, 1.7 μm)
9	LC: LC-30AD, Shimadzu MS/MS: LCMS-8040, Shimadzu	Atlantis dc18, Waters (2.1 mm×150 mm, 3 μm)

4 まとめ

乾牧草中に残留する 2,4-D 及びその関連物質について、穀類の分析法を基に LC-MS/MS を用いた定量法の飼料分析基準への適用の可否を検討したところ、液液分配 I, カラム処理 I 及びカラム処理 II を省略することにより、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、2,4-D で各 0.004~0.4 μg/mL 相当量（注入量として 0.02~2 ng 相当量）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、2,4-D において 0.004, 0.008 及び 0.208 μg/mL 相当濃度、2,4-D エチルにおいて 0.007 及び 0.185 μg/mL 相当濃度とした。

2) 本法に従い得られる試料溶液についてマトリックス効果を確認した結果、2,4-D 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。

3) 乾牧草について、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。

4) 2,4-D として、乾牧草に 260, 10 及び 5 mg/kg 相当量を添加した試料並びに 2,4-D エチルとして、乾牧草に 260 及び 10 mg/kg 相当量を添加した試料を用いて、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ところ、良好な結果を得た。

- 5) 本法の 2,4-D の定量下限は 5 mg/kg, 検出下限は 2 mg/kg であった.
- 6) チモシー乾草及びオーツ乾草にそれぞれ 2,4-D 及び 2,4-D エチルとして 260 及び 52 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, 良好な結果を得た.

謝 辞

共同試験に参加していただいた一般財団法人食品環境検査協会東京事業所, 協同飼料株式会社研究所及び全国農業協同組合連合会飼料畜産中央研究所における関係者各位に感謝の意を表します.

文 献

- 1) 農薬残留分析法研究班編: 最新農薬の残留分析法, 中央法規出版, 24 (1995) (ISBN 4-8058-1321-0).
- 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).
- 4) 厚生省告示: 食品, 添加物等の基準規格, 昭和 34 年 12 月 28 日, 厚生省告示第 370 号 (1959).
- 5) 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).
- 6) 山本 克己, 野村 昌代, 山本 謙吾: 穀類中の 2,4-D 及びその関連物質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, 飼料研究報告, 39, 1-16 (2014).
- 7) 古賀 龍二: 飼料中の 2,4-D 及び 2,4,5-T の定量法の分析精度の検討, 飼料研究報告, 21, 69-79 (1996).
- 8) 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).
- 9) 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事業 (2011).
- 10) Horwitz, W., Protocol for Design, Conduct and Interpretation of Method - Performance Studies, Pure & Appl. Chem., 67(2), 331-343 (1995).
- 11) 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. volume II, Gaithersburg, MD, USA.
- 12) Thompson, M., 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).