

# 1 飼料中のアセフェート及びメタミドホス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

齊木 雅一\*

## Simultaneous Determination of Acephate and Methamidophos in Feed by LC-MS/MS

Masakazu SAIKI\*

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

An analytical method was developed to simultaneously determine the levels of acephate and methamidophos in feed using liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS).

After adding water to the samples, acephate and methamidophos were extracted with acetone and the resulting solutions were filtered. The filtrate was then diluted with acetone to a final volume of 200 mL. The sample solution was purified with Chem Elut (Agilent Technologies Inc.; Santa Clara, CA, USA), Envi-Carb (Sigma-Aldrich Co. LLC.; St. Louis, MO, USA) and Sep-Pak Plus Silica Cartridge (Waters Corporation; Milford, MA, USA) and injected into the LC-ESI-MS/MS for determination of the levels of acephate and methamidophos. LC separation was carried out on an ODS column (TSKgel ODS-100V, 2.0 mm i.d. × 150 mm, 5 μm from Tosoh Corporation; Tokyo, Japan). In the MS/MS analysis, positive mode electrospray ionization (ESI+) was used.

Recovery tests were conducted on formula feeds, wheat, corn, rice straw and alfalfa hay. Formula feeds and corn were spiked with acephate at the levels of 0.01 or 0.5 mg/kg and methamidophos at the levels of 0.01 or 0.1 mg/kg. Wheat was spiked with acephate at the levels of 0.01 or 0.1 mg/kg, and methamidophos at the levels of 0.01, 0.02 or 0.1 mg/kg. Rice straw was spiked with acephate and methamidophos at the levels of 0.01 or 0.1 mg/kg. Alfalfa hay was spiked with acephate and methamidophos at the levels of 0.1 or 3 mg/kg. The resulting mean recoveries ranged from 70.3 % to 86.9 % for acephate and 72.5 % to 90.3 % for methamidophos. The repeatability in terms of the relative standard deviations (RSD<sub>r</sub>) were not more than 9.9 % for acephate and 15 % for methamidophos.

A collaborative study was conducted in ten laboratories using formula feed for dairy cattle, corn and alfalfa hay spiked with acephate and methamidophos. Formula feed for dairy cattle was spiked with 0.1 mg/kg of acephate and 0.01 mg/kg of methamidophos. Corn was spiked with 0.5 mg/kg of acephate and 0.1 mg/kg of methamidophos. Alfalfa hay was spiked with 3 mg/kg of acephate and 0.1 mg/kg of methamidophos. The mean recoveries, the repeatability and reproducibility in terms of the relative standard deviations (RSD<sub>r</sub> and RSD<sub>R</sub>) and HorRat, respectively, were 74.9 % to 82.7 %, 1.7 % to 4.8 %, 8.4 % to 15 % and not more than 1.0 for acephate, and 81.5 % to 100 %, 2.0 % to 8.4 %, 15 % to 18 % and not more than 0.83 for methamidophos.

This method was validated and established for use in the inspection of acephate and methamidophos in feed.

Key words: feed; acephate; methamidophos; liquid chromatography-tandem mass spectrometer (LC-MS/MS); electrospray ionization (ESI); collaborative study

\* 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

キーワード：飼料；アセフェート；メタミドホス；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；共同試験

## 1 緒 言

アセフェートは有機リン系の殺虫剤であり，日本では 1973 年に農薬登録がされている．商品名「オルトラン」やジェネリック農薬「ジェイエース」などとして，アブラムシ等の防除を目的に，野菜や花き，未成熟とうもろこし，マメ科牧草等に使用されている．

アセフェートの加水分解生成物でもある有機リン系殺虫剤のメタミドホスは，毒性が高く，日本では農薬登録がないため，農薬取締法に基づき国内での製造・輸入・使用は禁止されているが，EU ではジャガイモ，アメリカではジャガイモ，トマト，綿花などに使用されている．

飼料中の残留基準値は，アセフェートについては，農林水産省令<sup>1)</sup>によりとうもろこしで 0.5 mg/kg，牧草で 3 mg/kg と設定されており，メタミドホスについては設定されていない．また，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は，アセフェートについては，とうもろこしで 0.5 ppm，綿実で 2 ppm，メタミドホス（アセフェート由来を含む．）については，玄米，小麦，大麦，ライ麦及びその他の穀類で 0.01 ppm，とうもろこし及び綿実で 0.1 ppm となっている<sup>2)</sup>．

今回，財団法人日本食品分析センターが開発した分析法<sup>3)</sup>（以下「JFRL 法」という．）を基に，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．

参考にアセフェート及びメタミドホスの構造式等を Fig. 1 に示した．

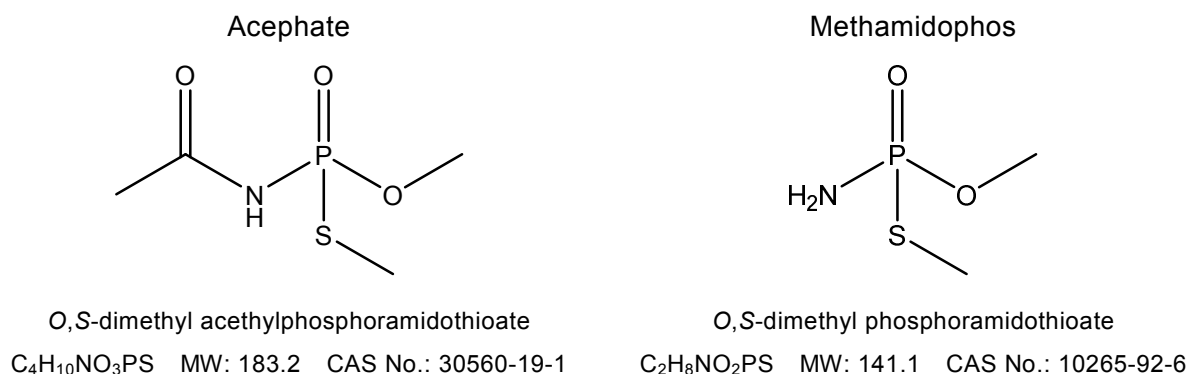


Fig. 1 Chemical structures of acephate and methamidophos

## 2 実験方法

### 2.1 試 料

配合飼料（成鶏飼育用，種豚育成用及び乳用牛飼育用），大麦，小麦，とうもろこし，稲わら及びアルファルファ乾草はそれぞれ 1 mm のスクリーンを装着した粉碎機で粉碎した．なお，検討に用いた配合飼料の原材料名等を Table 1 に示した．

Table 1 Composition of the formula feed

| Formula feed types | Ingredient types   | Proportion (%) | Ingredients  |
|--------------------|--------------------|----------------|--|
| For layer          | Grains             | 60             | Corn, milo, wheat, polished rice   |
|                    | Oil seed meal      | 27             | Soybean meal, rapeseed meal, corn gluten meal  |
|                    | Animal by-products | 1              | Fish meal, meat and bone meal (derived from pork and chicken)  |
|                    | Brans              | 1              | Wheat bran   |
|                    | Others             | 11             | Calcium carbonate, animal fat, calcium phosphate, salt, saponified paprika extracts, silica, feed additives  |
| For boar           | Grains             | 54             | Corn, milo, polished rice  |
|                    | Oil seed meal      | 17             | Rapeseed meal, soybean meal  |
|                    | Brans              | 13             | Wheat bran, rice bran  |
|                    | Animal by-products | 1              | Fish meal  |
|                    | Others             | 15             | Beet pulp, molasses, calcium carbonate, calcium phosphate, dried ocher, salt, glucose, oligosaccharide syrup, fatty acid calcium salt (soap), feed additives |
| For dairy cattle   | Grains             | 55             | Corn, lupine, wheat, corn starch   |
|                    | Oil seed meal      | 26             | Soybean meal, rapeseed meal, corn gluten meal  |
|                    | Brans              | 16             | Corn gluten feed, wheat bran, screening pellet, rice bran, corn distiller's dried grains with solubles   |
|                    | Others             | 3              | Molasses, calcium carbonate, salt, <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , feed additives  |

## 2.2 試薬

1) ヘキサン、酢酸エチル及びアセトンは残留農薬・PCB 試験用を用いた。メタノールは液体クロマトグラフ用を用いた。水は超純水（JIS K 0211 の 5218 に定義された超純水）を用いた。酢酸アンモニウム及び塩化ナトリウムは試薬特級を用いた。

### 2) アセフェート標準原液

アセフェート標準品（純度 99.0 %, Dr. Ehrenstorfer 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、更に標線まで同溶媒を加えてアセフェート標準原液を調製した（この液 1 mL は、アセフェートとして 0.5 mg を含有する。）。

### 3) メタミドホス標準原液

メタミドホス標準品（純度 98.5 %, Dr. Ehrenstorfer 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、更に標線まで同溶媒を加えてメタミドホス標準原液を調製した（この液 1 mL は、メタミドホスとして 0.5 mg を含有する。）。

### 4) 農薬混合標準液

アセフェート及びメタミドホス標準原液各 1 mL を 25 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、アセフェート及びメタミドホスとして各 20 µg を含有する。）。

使用に際して、農薬混合標準原液 1 mL を 50 mL のなす形フラスコに正確に入れ、窒素ガスを送って乾固した後、水 20 mL を正確に加えて、1 mL 中にアセフェート及びメタミドホスとして 1 µg を含有する溶液を調製した。この液の一定量を、水で正確に希釈し、1 mL 中にアセフェート及びメタミドホスとして 0.0025, 0.005, 0.0075, 0.01, 0.025, 0.05, 0.075, 0.1,

0.15, 0.2 及び 0.25  $\mu\text{g}$  を含有する各農薬混合標準液を調製した。

### 2.3 装置及び器具

- 1) 粉碎機：ZM-100 Retsch 製（1 mm スクリーン，使用時回転数 14000 rpm）
- 2) 乾牧草用粉碎機：SM-100 Retsch 製（1 mm スクリーン，回転数（仕様）1430 rpm）
- 3) 振とう機：レシプロシェーカーSR-2W タイテック製（使用時振動数 300 rpm）
- 4) 多孔性ケイソウ土カラム：Chem Elut（5 mL 保持用）Agilent Technologies 製
- 5) グラファイトカーボンミニカラム：ENVI-Carb（充てん剤量 500 mg）Sigma-Aldrich 製
- 6) シリカゲルミニカラム：Sep-Pak Plus Silica（充てん剤量 690 mg）Waters 製
- 7) 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。）：  
LC 部：ACQUITY UPLC Waters 製  
MS 部：Quattro Premier XE 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，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。乾牧草（稲わらを除く。以下同じ。）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。この液 8 mL を 50 mL のなす形フラスコに正確に入れ，40  $^{\circ}\text{C}$  以下の水浴で 1 mL 以下まで減圧濃縮した後，水 3 mL 及び塩化ナトリウム 1 g を加えて溶かし，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，10 分間静置した。試料溶液の入っていたなす形フラスコをヘキサン 10 mL ずつで 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出させた。

次に，グラファイトカーボンミニカラムを酢酸エチル 5 mL で洗浄し，これを多孔性ケイソウ土カラムの下部に連結させた。200 mL のなす形フラスコをグラファイトカーボン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酢酸エチル 10 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してアセフェート及びメタミドホスを溶出させた。更に酢酸エチル 40 mL をカラムに加えて同様に溶出させた。溶出液を 40  $^{\circ}\text{C}$  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。ヘキサン-アセトン（7+3）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。

#### 3) カラム処理 II

シリカゲルミニカラムをヘキサン-アセトン（7+3）5 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。試料溶液の入っていたなす形フラスコをヘキサン-アセトン（7+3）2.5 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。50 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き，ヘキサン-アセトン（1+1）20 mL をミニカラムに加えてアセフェート及びメタミドホスを溶出させた。溶出液を 40  $^{\circ}\text{C}$  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 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

試料溶液及び各農薬混合標準液各 2  $\mu$ 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             | TSKgel ODS-100V (2.0 mm i.d. $\times$ 150 mm, 5 $\mu$ m), Tosoh |
| Mobile phase       | 2 mmol/L ammonium acetate-methanol (19:1)                       |
| Flow rate          | 0.2 mL/min  |
| Column temperature | 40 $^{\circ}$ C   |
| Ionization         | Electrospray ionization (ESI)                                   |
| Mode               | Positive  |
| Source temperature | 120 $^{\circ}$ C  |
| Desolvation gas    | N <sub>2</sub> (800 L/h, 350 $^{\circ}$ C)                      |
| Cone gas           | N <sub>2</sub> (50 L/h)   |
| Collision gas      | Ar (0.20 mL/h)  |
| Capillary voltage  | 0.5 kV  |

Table 3 MS/MS parameters

| Target        | Precursor ion<br>( <i>m/z</i> ) | Product ion                  |                             | Cone voltage<br>(V) | Collision energy<br>(eV) |
|---------------|---------------------------------|------------------------------|-----------------------------|---------------------|--------------------------|
|               |                                 | Quantifier<br>( <i>m/z</i> ) | Qualifier<br>( <i>m/z</i> ) |                     |                          |
| Acephate      | 184                             | 143                          | —                           | 20                  | 5                        |
|               |                                 | —                            | 49                          | 20                  | 20                       |
| Methamidophos | 142                             | 94                           | —                           | 30                  | 15                       |
|               |                                 | —                            | 125                         | 30                  | 15                       |

#### 5) 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、試料中のアセフェート量及びメタミドホス量を算出した。

なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。

- Sample 10.0 g (300 mL Erlenmeyer flask)
- add 20 mL of water (grass hay: 30 mL) and allow to stand for 30 min
  - add 100 mL of acetone (grass hay: 120 mL) and shake for 30 min
  - filtrate through No. 5B under reduced pressure
  - wash with 50 mL of acetone
  - fill up to 200 mL with acetone
  - dilute sample solution of grass hay except rice straw 10-fold with acetone
  - 8 mL of sample solution
  - evaporate to the volume of 1 mL under 40 °C
  - add 3 mL of water and 1 g of sodium chloride
- Chem Elut and ENVI-Carb cartridge
- apply sample solution to Chem Elut and allow to stand for 10 min
  - wash with 10 mL of hexane (four times)
  - attach ENVI-Carb cartridge (prewashed with 5 mL ethylacetate) under Chem Elut
  - wash with 10 mL of ethylacetate (twice)
  - elute with 40 mL of ethylacetate
  - evaporate to dryness under 40 °C
  - dissolve in 5 mL of hexane-acetone (7:3)
- Sep-Pak Plus Silica cartridge
- prewash with 5 mL of hexane-acetone (7:3)
  - apply sample solution
  - wash with 2.5 mL of hexane-acetone (7:3) (three times)
  - elute with 20 mL of hexane-acetone (1:1)
  - evaporate to dryness under 40 °C
  - dissolve in 1 mL of water
- LC-MS/MS

Scheme 1 Analytical procedure for acephate and methamidophos in feed

### 3 結果及び考察

#### 3.1 検量線

2.2 の 4) に従って調製した各農薬混合標準液各 2  $\mu\text{L}$  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 に示すとおりであり、アセフェート及びメタミドホスは、いずれも 0.0025~0.25  $\mu\text{g/mL}$  (注入量として 0.005~0.5 ng 相当量) の範囲で直線性を示した。

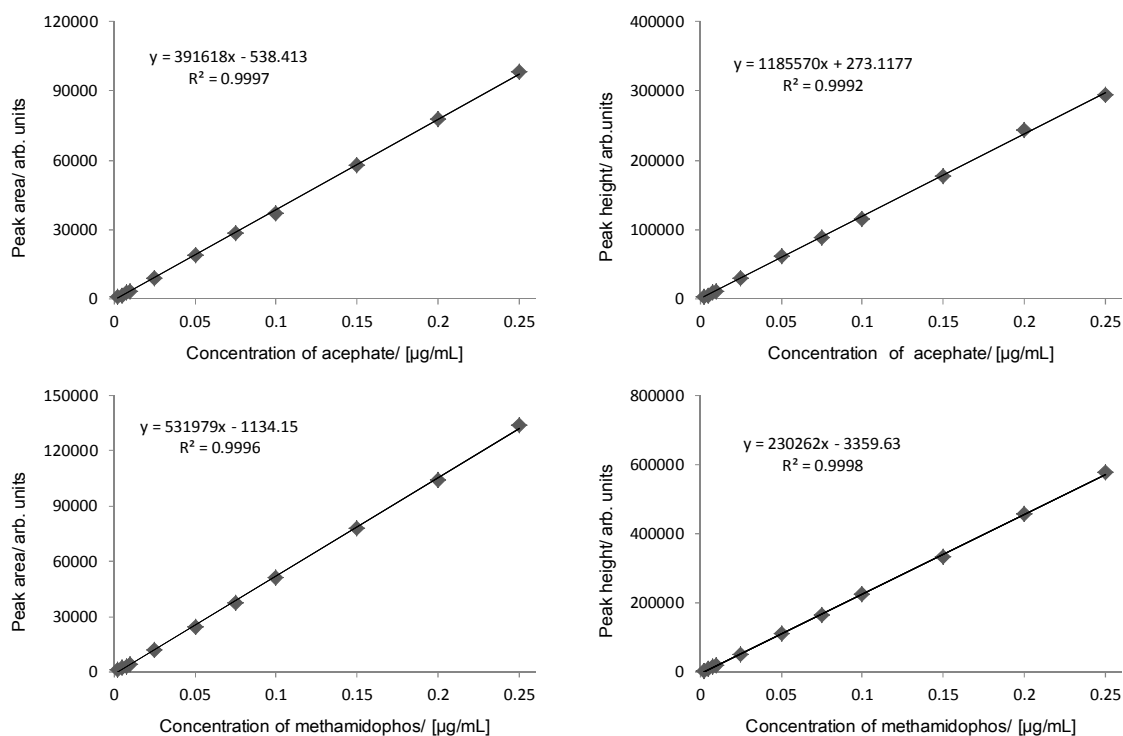


Fig. 2 Calibration curves of acephate and methamidophos by peak area (left) and peak height (right)

### 3.2 多孔性ケイソウ土カラム及びグラファイトカーボンミニカラムからの流出画分の確認

とうもろこしを用い、2.4の1)により調製したカラム処理Iに供する試料溶液に、アセフェートとして0.5 mg/kg相当量（最終試料溶液中で0.2 µg/mL相当量）及びメタミドホスとして0.1 mg/kg相当量（最終試料溶液中で0.04 µg/mL相当量）を添加し、多孔性ケイソウ土カラム及びグラファイトカーボン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、ヘキサン0~40 mLの画分では溶出せず、酢酸エチル0~60 mLの画分ですべて溶出し、60~120 mLの画分には溶出しなかった。このことから、JFRL法と同様に酢酸エチル60 mLで溶出させることにした。なお、JFRL法では試料溶液の入っていたなす形フラスコを酢酸エチル10 mLずつで6回洗浄しているが、操作の簡略化のために酢酸エチル10 mLずつで2回洗浄後、酢酸エチル40 mLを加えて溶出させることとした。

Table 4 Elution pattern of acephate and methamidophos from Chem-Elut / ENVI-Crb

| Pesticides    | Recovery <sup>a)</sup> (%) |               |          |          |           |            | Total |
|---------------|----------------------------|---------------|----------|----------|-----------|------------|-------|
|               | Hexane                     | Ethyl acetate |          |          |           |            |       |
|               | 0~40 mL                    | 0~40 mL       | 40~60 mL | 60~80 mL | 80~100 mL | 100~120 mL |       |
| Acephate      | 0.0                        | 76.7          | 3.2      | 0.0      | 0.0       | 0.0        | 79.9  |
| Methamidophos | 0.0                        | 91.9          | 0.0      | 0.0      | 0.0       | 0.0        | 91.9  |

a) Mean ( $n=3$ )

### 3.3 シリカゲルミニカラムからの流出画分の確認

とうもろこしを用い、2.4の1)及び2)により調製したカラム処理IIに供する試料溶液に、アセフェートとして0.5 mg/kg相当量（最終試料溶液中で0.2 µg/mL相当量）及びメタミドホスとして0.1 mg/kg相当量（最終試料溶液中で0.04 µg/mL相当量）を添加し、シリカゲルミニカラムからの溶出画分を確認した。また、JFRL法では試料溶液の入っていたなす形フラスコを洗浄する操作がないため、ヘキサン-アセトン（7+3）2.5 mLで3回洗浄する操作を追加した。その結果はTable 5のとおり、ヘキサン-アセトン（7+3）0~12.5 mLの画分では溶出せず、ヘキサン-アセトン（1+1）0~20 mLの画分で全て溶出し、20~40 mLの画分には溶出しなかった。このことから、JFRL法と同様にヘキサン-アセトン（1+1）20 mLで溶出させることにした。

Table 5 Elution pattern of acephate and methamidophos from Sep-Pak Plus Silica

| Pesticides    | Recovery <sup>a)</sup> (%) |                         |          |          |          | Total |
|---------------|----------------------------|-------------------------|----------|----------|----------|-------|
|               | Hexane-acetone<br>(7:3)    | Hexane-acetone<br>(1:1) |          |          |          |       |
|               | 0~12.5 mL                  | 0~10 mL                 | 10~20 mL | 20~30 mL | 30~40 mL |       |
| Acephate      | 0.0                        | 92.1                    | 0.7      | 0.0      | 0.0      | 92.8  |
| Methamidophos | 0.0                        | 87.0                    | 2.9      | 0.0      | 0.0      | 89.9  |

a) Mean (n=3)

### 3.4 妨害物質の検討

成鶏飼育用配合飼料，種豚育成用配合飼料，乳用牛飼育用配合飼料，大麦，小麦，とうもろこし，稲わら及びアルファルファ乾草各1検体を試料として，2.4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定量を妨げるピークは認められなかった。

なお，得られたSRMクロマトグラムの一例をFig. 3に示した。



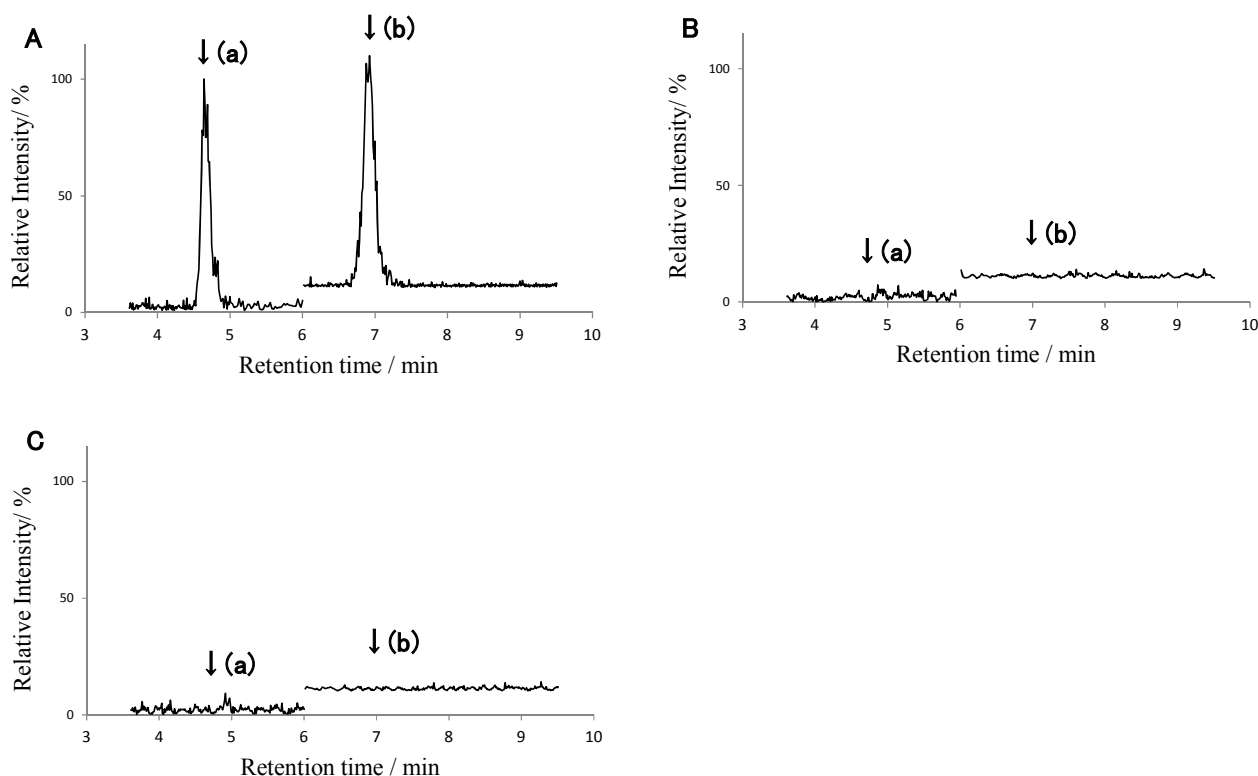


Fig. 3 Selected reaction monitoring chromatograms of standard solution and blank sample solutions of formula feed for layer and alfalfa hay (Scales of vertical axis are the same between three chromatograms for methamidophos (a) and acephate (b) respectively, and the baselines were shifted for display. Arrows indicate the retention times of methamidophos and acephate.)

A: Standard solution (0.0025  $\mu\text{g/mL}$ : 0.005 ng as each pesticide)

B: Formula feed for layer

C: Alfalfa hay

### 3.5 マトリックス効果の確認

2.4 の 1), 2)及び 3)により調製した成鶏飼育用配合飼料, 乳用牛飼育用配合飼料, 小麦, とうもろこし及び稲わらのブランク試料溶液にアセフェートとして 0.5 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.2  $\mu\text{g/mL}$  相当量) 及びメタミドホスとして 0.1 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.04  $\mu\text{g/mL}$  相当量), アルファルファ乾草のブランク試料溶液にアセフェートとして 2.5 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.1  $\mu\text{g/mL}$  相当量) 及びメタミドホスとして 1 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.04  $\mu\text{g/mL}$  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, 同濃度の標準液に対するピーク面積比を確認したところ, ピーク面積比はアセフェートでは 93~101 %, メタミドホスでは 94~101 %であり, アセフェート及びメタミドホス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 添加回収試験

成鶏飼育用配合飼料, 乳用牛飼育用配合飼料, 小麦, とうもろこし及び稲わらにアセフェートとして 0.01, 0.1 及び 0.5 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.004, 0.04 及び 0.2  $\mu\text{g/mL}$  相当量)

及びメタミドホスとして 0.01, 0.02 及び 0.1 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 0.004, 0.008 及び 0.04 µg/mL 相当量）を添加した試料及びアルファルファ乾草にアセフェートとして 0.1 及び 3 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 0.004 及び 0.12 µg/mL 相当量）及びメタミドホスとして 0.1 及び 3 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 0.004 及び 0.12 µg/mL 相当量）を添加し、本法に従って添加回収試験を実施し、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、アセフェートについては、平均回収率は 70.3~86.9 %，その繰返し精度は相対標準偏差 ( $RSD_r$ ) として 9.9 %以下，メタミドホスについては、平均回収率は 72.5~90.3 %，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、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 acephate and methamidophos

| Pesticides    | Spiked level (mg/kg) | Feed types                 |                           |                               |                           |                            |                           |
|---------------|----------------------|----------------------------|---------------------------|-------------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|
|               |                      | Formula feed for layer     |                           | Formula feed for dairy cattle |                           | Wheat                      |                           |
|               |                      | Recovery <sup>a)</sup> (%) | $RSD_r$ <sup>b)</sup> (%) | Recovery <sup>a)</sup> (%)    | $RSD_r$ <sup>b)</sup> (%) | Recovery <sup>a)</sup> (%) | $RSD_r$ <sup>b)</sup> (%) |
| Acephate      | 0.01                 | 78.4                       | 1.7                       | 83.4                          | 3.4                       | 78.0                       | 8.9                       |
|               | 0.1                  | —                          | —                         | —                             | —                         | 83.0                       | 9.9                       |
|               | 0.5                  | 70.3                       | 6.1                       | 83.5                          | 5.1                       | —                          | —                         |
| Methamidophos | 0.01                 | 90.3                       | 7.0                       | 79.6                          | 12                        | 75.8                       | 2.1                       |
|               | 0.02                 | —                          | —                         | —                             | —                         | 84.3                       | 12                        |
|               | 0.1                  | 83.3                       | 7.7                       | 87.6                          | 5.8                       | 90.2                       | 2.0                       |

| Pesticides    | Spiked level (mg/kg) | Feed types                 |                           |                            |                           |                            |                           |
|---------------|----------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|
|               |                      | Corn                       |                           | Rice straw                 |                           | Alfalfa hay                |                           |
|               |                      | Recovery <sup>a)</sup> (%) | $RSD_r$ <sup>b)</sup> (%) | Recovery <sup>a)</sup> (%) | $RSD_r$ <sup>b)</sup> (%) | Recovery <sup>a)</sup> (%) | $RSD_r$ <sup>b)</sup> (%) |
| Acephate      | 0.01                 | 77.1                       | 8.1                       | 79.0                       | 3.6                       | —                          | —                         |
|               | 0.1                  | —                          | —                         | 86.9                       | 2.4                       | 73.4                       | 8.8                       |
|               | 0.5                  | 80.5                       | 4.1                       | —                          | —                         | —                          | —                         |
|               | 3                    | —                          | —                         | —                          | —                         | 79.1                       | 2.3                       |
| Methamidophos | 0.01                 | 81.9                       | 9.5                       | 85.7                       | 13                        | —                          | —                         |
|               | 0.1                  | 82.3                       | 5.2                       | 72.5                       | 15                        | 89.0                       | 13                        |
|               | 3                    | —                          | —                         | —                          | —                         | 73.1                       | 5.8                       |

—: Not tested

a) Mean ( $n = 3$ )

b) Relative standard deviation of repeatability

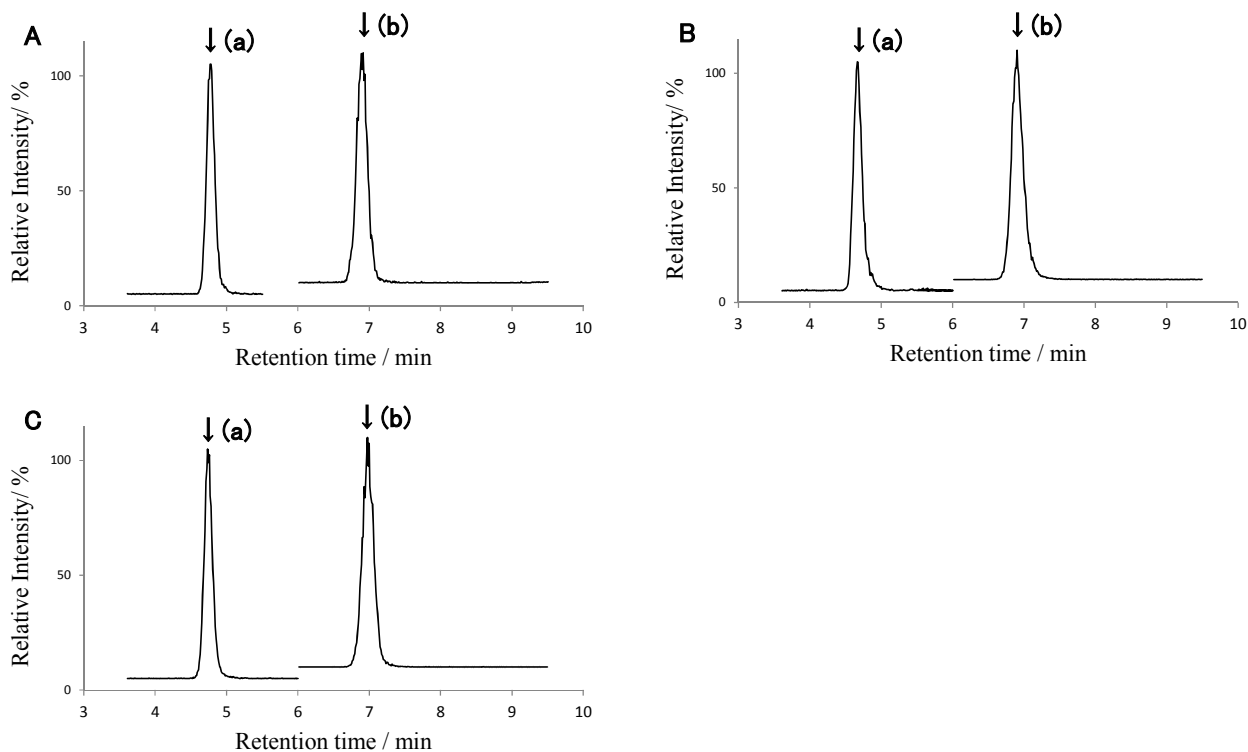


Fig. 4 Selected reaction monitoring chromatograms of acephate and methamidophos (Arrows indicate the peaks of methamidophos (a) and acephate (b). The peak heights are shown as 100 % in each segment, and the baselines were shifted for display.)

A: Standard solution (0.1  $\mu\text{g/mL}$ : 0.2 ng as each pesticide)

B: Sample solution of formula feed for layer spiked at 0.5 mg/kg of acephate and 0.1 mg/kg of methamidophos (0.2  $\mu\text{g/mL}$  as acephate and 0.04  $\mu\text{g/mL}$  as methamidophos)

C: Sample solution of alfalfa hay spiked at 3 mg/kg of acephate and 3 mg/kg of methamidophos (0.12  $\mu\text{g/mL}$  as each pesticide)

### 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、成鶏飼育用配合飼料、乳用牛飼育用配合飼料、小麦、とうもろこし、稲わら及びアルファルファ乾草にアセフェート及びメタミドホスを添加し、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、アセフェートとメタミドホス共に、成鶏飼育用配合飼料、乳用牛飼育用配合飼料、小麦、とうもろこし及び稲わらでは  $SN$  比が 10 となる濃度は 0.01 mg/kg,  $SN$  比が 3 となる濃度は 0.003 mg/kg, アルファルファ乾草では  $SN$  比が 10 となる濃度は 0.1 mg/kg,  $SN$  比が 3 となる濃度は 0.03 mg/kg であったことから、乾牧草以外では定量下限は 0.01 mg/kg, 検出下限は 0.003 mg/kg, 乾牧草では定量下限は 0.1 mg/kg, 検出下限は 0.03 mg/kg であった。

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。

### 3.8 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、乳用牛飼育用配合飼料にアセフェートとして 0.1 mg/kg 相当量及びメタミドホスとして 0.01 mg/kg 相当量（分析用試料 10 g に対して 1 mL 中にアセフェートとして 1 µg 及びメタミドホスとして 0.1 µg を含有する標準液 1 mL 添加）、とうもろこしにアセフェートとして 0.5 mg/kg 相当量及びメタミドホスとして 0.1 mg/kg 相当量（分析用試料 10 g に対して 1 mL 中にアセフェートとして 5 µg 及びメタミドホスとして 1 µg を含有する標準液 1 mL 添加）及びアルファルファ乾草にアセフェートとして 3 mg/kg 相当量及びメタミドホスとして 0.1 mg/kg 相当量（分析用試料 10 g に対して 1 mL 中にアセフェートとして 30 µg 及びメタミドホスとして 1 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、全国農業協同組合連合会飼料畜産中央研究所、一般財団法人日本食品分析センター多摩研究所、一般財団法人日本冷凍食品検査協会横浜試験センター、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 10 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<sup>4), 5)</sup>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 ( $RSD_r$ ) 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<sup>6)</sup>を用いて HorRat を求めた。

結果は Table 7-1 及び 7-2 のとおりであった。乳用牛飼育用配合飼料、とうもろこし及びアルファルファ乾草について、アセフェートの平均回収率は 81.9, 82.7 及び 74.9 %,  $RSD_r$  は 1.7, 4.8 及び 3.5 %,  $RSD_R$  は 11, 8.4 及び 15 %, HorRat は 0.48, 0.46 及び 1.0, メタミドホスの平均回収率は 81.5, 81.9 及び 100 %,  $RSD_r$  は 2.0, 8.4 及び 4.5 %,  $RSD_R$  は 15, 15 及び 18 %, HorRat は 0.67, 0.70 及び 0.83 であり良好な結果であった。HorRat が 0.50 をわずかに下回っているものがあつたが、本法が愛玩動物用飼料中のメタミドホス分析法<sup>7)</sup>とほぼ同様であり、多くの試験室が経験済みであったためと考えられた。

参考のため、各試験室で使用した LC-MS/MS の機種等を Table 8 に示した。

Table 7-1 Collaborative study for acephate

| Lab. No.                            | Feed types                       |        |         |       |             |      |
|-------------------------------------|----------------------------------|--------|---------|-------|-------------|------|
|                                     | Formula feed<br>for dairy cattle |        | Corn    |       | Alfalfa hay |      |
|                                     | (mg/kg)                          |        | (mg/kg) |       | (mg/kg)     |      |
| 1                                   | 0.0815                           | 0.0845 | 0.402   | 0.462 | 2.24        | 2.19 |
| 2                                   | 0.0727                           | 0.0732 | 0.385   | 0.409 | 2.06        | 1.96 |
| 3                                   | 0.0891                           | 0.0916 | 0.473   | 0.492 | 2.62        | 2.67 |
| 4                                   | 0.0779                           | 0.0770 | 0.371   | 0.421 | 2.13        | 2.12 |
| 5                                   | 0.0786                           | 0.0811 | 0.394   | 0.394 | 2.34        | 2.10 |
| 6                                   | 0.0908                           | 0.0921 | 0.437   | 0.438 | 2.58        | 2.62 |
| 7                                   | 0.0632                           | 0.0648 | 0.392   | 0.365 | 1.59        | 1.58 |
| 8                                   | 0.0854                           | 0.0847 | 0.385   | 0.378 | 2.29        | 2.21 |
| 9                                   | 0.0881                           | 0.0865 | 0.426   | 0.416 | 2.27        | 2.06 |
| 10                                  | 0.0892                           | 0.0860 | 0.411   | 0.414 | 2.66        | 2.62 |
| Spiked level (mg/kg)                | 0.1                              |        | 0.5     |       | 3           |      |
| Mean value <sup>a)</sup> (mg/kg)    | 0.0819                           |        | 0.413   |       | 2.25        |      |
| Mean recovery <sup>a)</sup> (%)     | 81.9                             |        | 82.7    |       | 74.9        |      |
| RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)  | 1.7                              |        | 4.8     |       | 3.5         |      |
| RSD <sub>R</sub> <sup>c)</sup> (%)  | 11                               |        | 8.4     |       | 15          |      |
| PRSD <sub>R</sub> <sup>d)</sup> (%) | 22                               |        | 18      |       | 14          |      |
| HorRat                              | 0.48                             |        | 0.46    |       | 1.0         |      |

a)  $n=20$ 

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 7-2 Collaborative study for methamidophos

| Lab. No.                            | Feed types                       |         |                      |                      |             |        |
|-------------------------------------|----------------------------------|---------|----------------------|----------------------|-------------|--------|
|                                     | Formula feed<br>for dairy cattle |         | Corn                 |                      | Alfalfa hay |        |
|                                     | (mg/kg)                          |         | (mg/kg)              |                      | (mg/kg)     |        |
| 1                                   | 0.00899                          | 0.00872 | 0.0820               | 0.0858               | 0.130       | 0.117  |
| 2                                   | 0.00853                          | 0.00838 | 0.0709               | 0.0743               | 0.0980      | 0.0963 |
| 3                                   | 0.00830                          | 0.00859 | 0.0955               | 0.0938               | 0.121       | 0.123  |
| 4                                   | 0.00702                          | 0.00700 | 0.0734               | 0.0815               | 0.0836      | 0.0906 |
| 5                                   | 0.00945                          | 0.00944 | 0.0848               | 0.0825               | 0.0833      | 0.0774 |
| 6                                   | 0.00817                          | 0.00808 | 0.0964               | 0.0955               | 0.108       | 0.106  |
| 7                                   | 0.00602                          | 0.00607 | 0.0690               | 0.0728               | 0.0723      | 0.0641 |
| 8                                   | 0.00806                          | 0.00781 | 0.0771 <sup>a)</sup> | 0.0502 <sup>a)</sup> | 0.106       | 0.0974 |
| 9                                   | 0.00991                          | 0.0102  | 0.0926               | 0.0954               | 0.117       | 0.118  |
| 10                                  | 0.00735                          | 0.00693 | 0.0953               | 0.0904               | 0.101       | 0.0987 |
| Spiked level (mg/kg)                | 0.01                             |         | 0.1                  |                      | 0.1         |        |
| Mean value <sup>b)</sup> (mg/kg)    | 0.00815                          |         | 0.0819               |                      | 0.100       |        |
| Mean recovery <sup>b)</sup> (%)     | 81.5                             |         | 81.9                 |                      | 100         |        |
| RSD <sub>r</sub> <sup>c)</sup> (%)  | 2.0                              |         | 8.4                  |                      | 4.5         |        |
| RSD <sub>R</sub> <sup>d)</sup> (%)  | 15                               |         | 15                   |                      | 18          |        |
| PRSD <sub>R</sub> <sup>e)</sup> (%) | 22                               |         | 22                   |                      | 22          |        |
| HorRat                              | 0.67                             |         | 0.70                 |                      | 0.83        |        |

a) Data excluded by Cochran test

b) Formula feed for cattle:  $n=20$ ; Corn:  $n=18$ ; Alfalfa hay:  $n=20$

c) Relative standard deviation of repeatability within laboratory

d) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

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

Table 8 Instruments used in the collaborative study

| Lab.No. | LC-MS/MS   | LC column                                     |
|---------|--|---|
|         |  | (i.d.×length, particle size)                  |
| 1       | LC: ACQUITY UPLC, Waters                               | TSKgel ODS-100V, Tosoh                        |
|         | MS/MS: Quattro premier XE, Waters                      | (2.0 mm×150 mm, 5 µm)                         |
| 2       | LC: ACQUITY UPLC, Waters                               | ZORBAX Eclipse XDB-C18,                       |
|         | MS/MS: ACQUITY TQD, Waters                             | Agilent Technologies<br>(2.1 mm×150 mm, 5 µm) |
| 3       | LC: ACQUITY UPLC, Waters                               | ZORBAX Eclipse XDB-C18,                       |
|         | MS/MS: ACQUITY TQD, Waters                             | Agilent Technologies<br>(2.1 mm×150 mm, 5 µm) |
| 4       | LC: ACQUITY UPLC, Waters                               | ZORBAX Eclipse XDB-C18,                       |
|         | MS/MS: ACQUITY TQD, Waters                             | Agilent Technologies<br>(2.1 mm×150 mm, 5 µm) |
| 5       | LC: Nexera X2, Shimadzu                                | TSKgel ODS-100V, Tosoh                        |
|         | MS/MS: LCMS-8040, Shimadzu                             | (2.0 mm×150 mm, 5 µm)                         |
| 6       | LC: 1200, Agilent Technologies                         | ZORBAX Eclipse XDB-C18,                       |
|         | MS/MS: 6410 Triple Quad LC/MS,<br>Agilent Technologies | Agilent Technologies<br>(2.1 mm×150 mm, 5 µm) |
| 7       | LC: 1200, Agilent Technologies                         | Acquity UPLC BEH C18, Waters                  |
|         | MS/MS: 6410 Triple Quad LC/MS,<br>Agilent Technologies | (2.1 mm×150 mm, 1.7 µm)                       |
| 8       | LC: ACQUITY UPLC, Waters                               | ZORBAX Eclipse XDB-C18,                       |
|         | MS/MS: ACQUITY TQD, Waters                             | Agilent Technologies<br>(2.1 mm×150 mm, 5 µm) |
| 9       | LC: 1200, Agilent Technologies                         | TSKgel ODS-100V, Tosoh                        |
|         | MS/MS: API-3200 Q TRAP, AB Sciex                       | (2.0 mm×150 mm, 5 µm)                         |
| 10      | LC: ACQUITY UPLC, Waters                               | TSKgel ODS-100V, Tosoh                        |
|         | MS/MS: Xevo TQ MS, Waters                              | (2.0 mm×150 mm, 5 µm)                         |

#### 4 まとめ

飼料中に残留するアセフェート及びメタミドホスについて、JFRL 法を基に、LC-MS/MS を用いた定量法の飼料分析基準への適用の可否について検討したところ、カラム処理 I において操作の簡略化のために酢酸エチルでの洗浄回数の変更及びカラム処理 II においてなす形フラスコの洗浄操作がなかったため追加し、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、0.0025~0.25 µg/mL (注入量として 0.005~0.5 ng) 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、0.004~0.2 µg/mL 相当濃度とした。
- 2) 成鶏飼育用配合飼料，種豚育成用配合飼料，乳用牛飼育用配合飼料，大麦，小麦，とうもろこし，稲わら及びアルファルファ乾草について，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) 成鶏飼育用配合飼料，乳用牛飼育用配合飼料，小麦，とうもろこし及び稲わらにアセフェートとして 0.01，0.1 及び 0.5 mg/kg 相当量及びメタミドホスとして 0.01，0.02 及び 0.1 mg/kg 相当量を添加し，アルファルファ乾草にアセフェート及びメタミドホスとして 0.1 及び 3 mg/kg 相当量を添加し，本法に従って 3 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良好な結果が得られた。

- 4) 本法のアセフェート及びメタミドホスの定量下限は、乾牧草（稲わらを除く。）中で各 0.1 mg/kg, その他の飼料中で各 0.01 mg/kg, 検出下限は、乾牧草（稲わらを除く。）中で各 0.03 mg/kg, その他の飼料中で各 0.003 mg/kg であった。
- 5) 乳用牛飼育用配合飼料にアセフェートとして 0.1 mg/kg 相当量及びメタミドホスとして 0.01 mg/kg 相当量, とうもろこしにアセフェートとして 0.5 mg/kg 相当量及びメタミドホスとして 0.1 mg/kg 相当量及びアルファルファ乾草にアセフェートとして 3 mg/kg 相当量及びメタミドホスとして 0.1 mg/kg 相当量を添加した試料を用いて 10 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食品環境検査協会東京事業所, 全国農業協同組合連合会飼料畜産中央研究所, 一般財団法人日本食品分析センター多摩研究所, 一般財団法人日本冷凍食品検査協会横浜試験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, 省令第 35 号 (1976).
- 2) 厚生省告示：食品, 添加物等の基準規格, 昭和 34 年 12 月 28 日, 告示第 370 号 (1959).
- 3) 財団法人日本食品分析センター：平成 20 年度飼料中の有害物質等残留基準を設定するための分析法開発及び家畜等への移行調査委託事業 飼料中の有害物質等の分析法の開発 (2009).
- 4) William Horwitz: Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies, *Pure & Appl. Chem.*, **67**(2), 331-343 (1995).
- 5) AOAC Int. (2012). Appendix D: Guidelines for collaborative study procedures to validate characteristics of a method of analysis. In official methods of an alysis of AOAC Int. 19 ed., Gaithersburg, MD, USA.
- 6) Michael Thompson: 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).
- 7) 独立行政法人農林水産消費安全技術センター理事長通知：「愛玩動物用飼料等の検査法」の制定について, 平成 21 年 9 月 1 日, 21 消技第 1764 号 (2009).