

技術レポート**5 飼料中の 3-OH カルボフラン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の共同試験**

義本 将之*, 齊木 雅一*

Collaborative Study on Determination Method of 3-Hydroxycarbofuran in Feed by LC-MS/MS

Masayuki YOSHIMOTO* and Masakazu SAIKI*

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

For validating the determination method of 3-hydroxycarbofuran in feed using a liquid chromatograph-electrospray ionization-tandem mass spectrometer (LC-ESI-MS/MS), a collaborative study was conducted.

3-hydroxycarbofuran in a sample was extracted by boiling hydrochloric acid (1:29) and the solution was filtered. The filtrate was diluted with hydrochloric acid (1:29) to a volume of 200 mL. The sample solution was purified with two types of SPE columns (InertSep K-solute, GL Sciences Inc.; Tokyo, Japan and Sep-Pak Plus Silica cartridge, Waters Co.; Milford, MA, USA), and injected into a LC-MS/MS to determine the concentration of 3-hydroxycarbofuran. LC separation was carried out on an ODS column (Mightysil RP-18 GP, 2.0 mm i.d. × 150 mm, 5 μm from Kanto Chemical Co., Inc.; Tokyo, Japan) with a gradient of 2 mmol/L ammonium acetate solution and acetonitrile as a mobile phase. In the MS/MS analysis, positive mode electrospray ionization (ESI+) was used.

A collaborative study was conducted by nine laboratories using formula feed for dairy cattle, wheat, corn, alfalfa hay and rice straw, all of which were added with 3-hydroxycarbofuran according to the following specifications: 0.1 mg/kg for formula feed for dairy cattle, 0.01 mg/kg for wheat, 0.05 mg/kg of for corn, 10 mg/kg for alfalfa hay and 4 mg/kg for rice straw. The resulting range of mean recoveries, repeatability and reproducibility in the form of relative standard deviations (RSD_r and RSD_R), and HorRat were 81.4 % to 95.7 %, less than 5.8 % and less than 24 %, and less than 1.1 respectively.

This method was thus validated as useful for inspection of 3-hydroxycarbofuran in feed.

Key words: 3-Hydroxycarbofuran; liquid chromatograph-tandem mass spectrometer (LC-MS/MS); electrospray ionization (ESI); feed; wheat; alfalfa hay; rice straw; formula feed for dairy cattle; corn; collaborative study

キーワード: 3-OH カルボフラン; 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; 小麦; アルファルファ乾草; 稲わら; 乳用牛飼育用配合飼料; とうもろこし; 共同試験

1 緒 言

3-OH カルボフラン (3-ヒドロキシカルボフラン) は, カーバメート系殺虫剤であるカルボフラン誘導体のカルボスルファン, フラチオカルブ及びベンフラカルブの代謝物である^{1), 2)}. カルボス

* 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

ルフアンは米国 FMC 社，フラチオカルブは Ciba-Geigy 社（現：Syngenta 社），ベンフラカルブは大塚化学株式会社（現：OAT アグリオ株式会社）によって開発された²⁾。カルボフランも FMC 社によって開発された農薬であるが，日本での登録はない。また，フラチオカルブは 2006 年 1 月に国内での登録が失効している³⁾。

飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令⁴⁾において，上記農薬 4 成分のうち，カルボフランに飼料中の残留基準が設定されている。カルボフランの基準値は，カルボフラン及び 3-OH カルボフランをカルボフラン含量に換算したものの和と規定され⁵⁾，牧草で 13 mg/kg，大麦及び小麦で 0.2 mg/kg，えん麦，マイロ及びライ麦で 0.1 mg/kg，とうもろこしで 0.05 mg/kg となっている。また，飼料の有害物質の指導基準及び管理基準⁶⁾において，上記農薬 4 成分のうち，カルボスルファンに管理基準が設定されており，稲わらで 0.7 mg/kg，稲発酵粗飼料（以下「WCRS」という。）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⁷⁾において，カルボスルファン及びカルボフランに残留基準が設定されており，カルボスルファンが検出された場合に限り，カルボスルファン（カルボフラン及び 3-OH カルボフランをカルボスルファン含量に換算したものを含む。）として，玄米で 0.2 mg/kg となっている。また，カルボフラン又は 3-OH カルボフランが検出され，加えてカルボスルファン，フラチオカルブ又はベンフラカルブが検出されなかった場合に限り，カルボフラン及び 3-OH カルボフランをカルボフラン含量に換算したものの和として，玄米で 0.1 mg/kg となっている。

3-OH カルボフランは植物体中に一部配糖体として存在し，有機溶媒では完全に抽出することができない。そのため，塩酸を添加して加熱することで配糖体を加水分解し，抽出する方法が採用されており⁸⁾⁻¹²⁾，飼料分析基準¹²⁾には既に，ポストカラム蛍光誘導体化液体クロマトグラフで定量する方法が記載されている。しかし，この方法は，開発当時，飼料用イネを検討対象としていなかった。また，測定機器についても，より汎用性のあるものが望ましい。

そのため，当センターにおいて保田らが，飼料中の 3-OH カルボフランの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計（以下「LC-MS/MS」という。）を用いた定量法¹³⁾を開発したところであるが，更に今回，共通試料を用いた共同試験を行ったので，その結果を報告する。

2 試験方法

2.1 試料

3-OH カルボフランが残留していないことを確認した小麦，アルファルファ乾草，稲わら，乳用牛飼育用配合飼料及びとうもろこしをそれぞれ目開き 1 mm のスクリーンを装着した粉碎機で粉碎した。これらについて約 6 g ずつ小分けしたもの（試料名は非明示）各 2 袋を試験用試料として計 10 袋を各試験室に配付した。

なお，試験に用いた乳用牛飼育用配合飼料の配合割合を Table 1 に示した。

Table 1 Compositions of the formula feed

Formula feed type	Ingredient types	Proportion (%)	Ingredients
For dairy cattle	Grains	48	Heat-treated corn, wheat flour, corn, milo
	Brans	24	Wheat bran, corn gluten feed, rice bran
	Oil seed meal	23	Soybean meal, rapeseed meal
	Others	5	Molasses, calcium carbonate, salt, feed additives

2.2 試薬

1) アセトニトリル及びメタノールは高速液体クロマトグラフ用（関東化学製）を用いた。アセトン、酢酸エチル及びヘキサンは残留農薬・PCB 試験用を用いた。酢酸アンモニウムは高速液体クロマトグラフ用（1 mol/L 水溶液、和光純薬工業製）を用いた。塩酸は試薬特級を用いた。沸騰石は化学用（和光純薬工業製）を用いた。シリコン油は SRX310（東レ・ダウコーニング製）を用いた。水は Milli-Q Direct 8（Millipore 製）により精製した超純水（JIS K0211 の 5218 に定義された超純水）を用いた。

2) 3-OH カルボフラン標準原液

3-OH カルボフラン標準品（和光純薬工業製、純度 98.0 %）10 mg を正確に量って 100 mL の全量フラスコに入れ、メタノールを加えて溶かし、更に標線まで同溶媒を加えて 3-OH カルボフラン標準原液を調製した（この液 1 mL は、3-OH カルボフランとして 0.1 mg を含有する。）。

3) 検量線作成用標準原液

2)で調製した 3-OH カルボフラン標準原液 50 mL を 100 mL の全量フラスコに入れ、更に標線までアセトニトリルを加え、1 mL 中に 3-OH カルボフランとして 50 µg 含有する液を調製した。この液 2.5 mL を 250 mL の全量フラスコに入れ、更に標線までアセトニトリルを加え、1 mL 中に 3-OH カルボフランとして 0.5 µg 含有する液を調製した。この液 50 mL を 250 mL の全量フラスコに入れ、更に標線までアセトニトリルを加え、1 mL 中に 3-OH カルボフランとして 0.1 µg 含有する検量線作成用標準原液を調製した（小麦、アルファルファ乾草及び稲わら）。

2)で調製した 3-OH カルボフラン標準原液 10 mL を 200 mL の全量フラスコに入れ、更に標線までアセトニトリルを加え、1 mL 中に 3-OH カルボフランとして 5 µg 含有する検量線作成用標準原液を調製した（乳用牛飼育用配合飼料及びとうもろこし）。

4) 小麦添加用標準液

2)で調製した 3-OH カルボフラン標準原液 50 mL を 100 mL の全量フラスコに入れ、更に標線までアセトニトリルを加え、1 mL 中に 3-OH カルボフランとして 50 µg 含有する液を調製した。この液 2.5 mL を 250 mL の全量フラスコに入れ、更に標線までアセトニトリルを加え、1 mL 中に 3-OH カルボフランとして 0.5 µg 含有する液を調製した。この液 10 mL を 100 mL の全量フラスコに入れ、更に標線までアセトニトリルを加え、1 mL 中に 3-OH カルボフランとして 0.05 µg 含有する小麦添加用標準液を調製した。

5) アルファルファ乾草添加用標準液

2)で調製した 3-OH カルボフラン標準原液 50 mL を 100 mL の全量フラスコに入れ、更に標

線までアセトニトリルを加え、1 mL 中に 3-OH カルボフランとして 50 μg 含有するアルファルファ乾草添加用標準液を調製した。

6) 稲わら添加用標準液

2)で調製した 3-OH カルボフラン標準原液 50 mL を 100 mL の全量フラスコに入れ、更に標線までアセトニトリルを加え、1 mL 中に 3-OH カルボフランとして 50 μg 含有する液を調製した。この液 4 mL を 100 mL の全量フラスコに入れ、更に標線までアセトニトリルを加え、1 mL 中に 3-OH カルボフランとして 2 μg 含有する稲わら添加用標準液を調製した。

7) 乳用牛飼育用配合飼料添加用標準液

2)で調製した 3-OH カルボフラン標準原液 4 mL を 20 mL の全量フラスコに入れ、更に標線までメタノールを加え、1 mL 中に 3-OH カルボフランとして 20 μg 含有する液を調製した。この液 5 mL を 200 mL の全量フラスコに入れ、更に標線までメタノールを加え、1 mL 中に 3-OH カルボフランとして 0.5 μg 含有する乳用牛飼育用配合飼料添加用標準液を調製した。

8) とうもろこし添加用標準液

2)で調製した 3-OH カルボフラン標準原液 4 mL を 20 mL の全量フラスコに入れ、更に標線までメタノールを加え、1 mL 中に 3-OH カルボフランとして 20 μg 含有する液を調製した。この液 2.5 mL を 200 mL の全量フラスコに入れ、更に標線までメタノールを加え、1 mL 中に 3-OH カルボフランとして 0.25 μg 含有するとうもろこし添加用標準液を調製した。

3)の検量線作成用標準原液及び 4)~8)の各添加用標準液（各 2 本、濃度は非通知）を 2.1 の試験用試料と併せて各試験室に配付した。

2.3 定量方法

保田らの方法¹³⁾によった。

2.4 分析試料

非明示の 2 点反復で、2.1 の試験用試料を用いた。分析試料としては、小麦、アルファルファ乾草、稲わら、乳用牛飼育用配合飼料及びとうもろこしに 3-OH カルボフランとしてそれぞれ 0.01 mg/kg 相当量、10 mg/kg 相当量、0.4 mg/kg 相当量、0.1 mg/kg 相当量及び 0.05 mg/kg 相当量（試験用試料 5.0 g に対して 1 mL 中にそれぞれ 0.05 μg 、50 μg 、2 μg 、0.5 μg 及び 0.25 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。

2.5 報告方法

2.1 の分析試料 10 点の分析値は、分析試料中濃度 (mg/kg) で表し、4 桁目を四捨五入して有効桁数 3 桁まで報告させることとした。

2.6 分析実施期間

平成 29 年 11 月 6 日から平成 29 年 12 月 5 日まで（小麦、アルファルファ乾草及び稲わら）及び平成 30 年 1 月 29 日から平成 30 年 2 月 23 日まで（乳用牛飼育用配合飼料及びとうもろこし）

2.7 解析方法

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^{14), 15)}を参考に、Cochran 検定、single Grubbs 検定及び paired 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¹⁶⁾を用いて HorRat を求めた。

3 参加試験室

一般財団法人東京顕微鏡院食と環境の科学センター，一般財団法人日本穀物検定協会中央研究所，一般財団法人日本食品分析センター多摩研究所，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）

4 結果及び考察

結果は Table 2 のとおりであった。小麦，アルファルファ乾草，稲わら，乳用牛飼育用配合飼料及びとうもろこしについて，平均回収率はそれぞれ 87.4，95.7，87.6，81.4 及び 89.5%， RSD_r はそれぞれ 3.0，2.8，2.2，5.8 及び 3.4%， RSD_R はそれぞれ 24，12，11，11 及び 5.8%，HorRat はそれぞれ 1.1，1.0，0.58，0.50 及び 0.27 であった。これらは飼料分析基準の妥当性確認法ガイドライン（以下「妥当性確認法ガイドライン」という。）に定められた室間再現精度の目標値を満たしていた。

参考のため，各試験室で使用した LC-MS/MS の機種等を Table 3 に示した。

Table 2 Collaborative study for 3-Hydroxycarbofuran

Lab. No.	Feed types									
	Wheat		Alfalfa hay		Rice straw		Formula feed for dairy cattle		Corn	
	(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)	
1	0.00848	0.00801	7.68	8.42	0.328	0.339	0.0751	0.0614	0.0443	0.0402
2	0.00916	0.00972	10.4	10.3	0.387	0.386	0.0935	0.0928	0.0499	0.0463
3	0.0114	0.0115	10.8	10.7	0.378	0.375	0.0833	0.0867	0.0448	0.0460
4	0.00892	0.00908	9.41	9.37	0.327	0.336	0.0764	0.0754	0.0432	0.0417
5	0.00638	0.00656	8.81	8.77	0.321	0.320	0.0861	0.0859	0.0449	0.0445
6	0.00926	0.00980	9.29	9.84	0.369	0.394	0.0837	0.0835	0.0469	0.0457
7	0.00455	0.00443	7.91	8.05	0.268	0.279	0.0730	0.0683	0.0418	0.0402
8	0.0101	0.0106	11.1	10.5	0.377	0.370	0.0883	0.0877	0.0463	0.0477
9	0.00952	0.00982	10.5	10.4	0.373	0.377	0.0889	0.0754	0.0463	0.0446
Spiked level (mg/kg)	0.01		10		0.4		0.1		0.05	
No. labs ^{a)}	9		9		9		9		9	
No. outliers ^{b)}	0		0		0		0		0	
Mean value (mg/kg)	0.00874		9.57		0.350		0.0814		0.0447	
Mean recovery (%)	87.4		95.7		87.6		81.4		89.5	
RSD_r ^{c)} (%)	3.0		2.8		2.2		5.8		3.4	
RSD_R ^{d)} (%)	24		12		11		11		5.8	
$PRSD_R$ ^{e)} (%)	22		11		19		22		22	
HorRat	1.1		1.0		0.58		0.50		0.27	

- Number of laboratories retained after eliminating outliers
- Number of outlier laboratories removed in parentheses
- Relative standard deviation of repeatability within laboratory
- Relative standard deviation of reproducibility between laboratories
- Predicted relative standard deviation of reproducibility between laboratories calculated from the modified Horwitz equation

Table 3 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: Quattro premier XE, Waters	Mightysil RP-18GP Kanto Chemical (2.0 mm×150 mm, 5 μm)
2	LC: Nexera X2, Shimadzu MS/MS: LCMS-8040, Shimadzu	ZORBAX Eclipse XDB-C18 Kanto Chemical (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
3	LC: ACQUITY UPLC, Waters MS/MS: Xevo TQD, Waters	Mightysil RP-18GP Kanto Chemical (2.0 mm×150 mm, 5 μm)
4	LC: ACQUITY UPLC, Waters MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	ZORBAX Eclipse XDB-C18 Agilent Technologies (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
5	LC: ACQUITY UPLC, Waters MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	ZORBAX Eclipse XDB-C18 Agilent Technologies (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
6	LC: ACQUITY UPLC, Waters MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	Mightysil RP-18GP Kanto Chemical (2.0 mm×150 mm, 5 μm)
7	LC: Prominence, Shimadzu MS/MS: LCMS-8050, Shimadzu	Mightysil RP-18GP Kanto Chemical (2.0 mm×150 mm, 5 μm)
8	LC: Prominence, Shimadzu MS/MS: LCMS-8060, Shimadzu	CAPCELL PAK C18 MGIII Waters (2.0 mm×150 mm, 5 μm)
9	LC: 1200 Series, Agilent Technologies MS/MS: API-3200 Q TRAP, AB SCIEX	Mightysil RP-18GP Kanto Chemical (2.0 mm×150 mm, 5 μm)

5 まとめ

飼料中の 3-OH カルボフランについて、小麦、アルファルファ乾草、稲わら、乳用牛飼育用配合飼料及びとうもろこしに 3-OH カルボフランとしてそれぞれ 0.01 mg/kg 相当量、10 mg/kg 相当量、0.4 mg/kg 相当量、0.1 mg/kg 相当量及び 0.05 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、妥当性確認法ガイドラインに定められた室間再現精度の目標値を満たす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東京顕微鏡院食と環境の科学センター、一般財団法人日本穀物検定協会中央研究所、一般財団法人日本食品分析センター多摩研究所における関係者各位に感謝の意を表します。

文 献

- 1) 内閣府食品安全委員会：共通代謝物を有する農薬の評価方法について（案），
<http://www.fsc.go.jp/fsciis/meetingMaterial/show/kai20060719no1>, cited 12 Apr. 2018.
- 2) 農薬ハンドブック 2005 年版編集委員会：農薬ハンドブック 2005 年版，東京，日本植物防疫協会，51-56 (2005) (ISBN: 978-4889260991).
- 3) 独立行政法人農林水産消費安全技術センター：登録失効有効成分，
<http://www.acis.famic.go.jp/toroku/sikkouseibun.htm>, cited 12 Apr. 2018.
- 4) 農林省令：飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令，昭和 51 年 7 月 24 日，農林省令第 35 号 (1976).
- 5) 農林水産省消費・安全局長通知：飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令の一部を改正する省令の施行について，平成 18 年 5 月 26 日，18 消安第 2321 号 (2006).
- 6) 農林水産省畜産局長通知：飼料の有害物質の指導基準及び管理基準について，昭和 63 年 10 月 14 日，63 畜 B 第 2050 号 (1988).
- 7) 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).
- 8) 上路 雅子，小林 裕子，中村 幸二：残留農薬分析法，東京，ソフトサイエンス社，90-94 (2001) (ISBN 4-8817-1097-4).
- 9) 農薬残留分析法研究班編：最新農薬の残留分析法，東京，中央法規出版，110-112 (1995) (ISBN 4-8058-1321-0).
- 10) 後藤 真康，加藤 誠哉：増補 残留農薬分析法，東京，ソフトサイエンス社，32-35 (1987).
- 11) 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 0124001 号 (2005).
- 12) 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).
- 13) 保田 伊世，長久保 眞平：飼料中の 3-OH カルボフラン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の開発，飼料研究報告，**42**，34-46 (2017).
- 14) Horwitz, W., Protocol for Design, Conduct and Interpretation of Method - Performance Studies, *Pure & Appl. Chem.*, **67**(2), 331-343 (1995).
- 15) George W. Latimer, Jr.: Official methods of analysis of AOAC INTERNATIONAL 20th Edition, Appendix D, Guidelines for collaborative study procedures to validate characteristics of a method of analysis. Gaithersburg, MD, USA (2016) (ISBN: 978-0-935584-87-5).
- 16) 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).