

## 5 愛玩動物用飼料（ドライ製品及びセミドライ製品）中の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定量法

小森谷 敏一\*

### Determination of Methamidophos in Dry and Semi-dry Type Pet Foods by LC-MS/MS

Toshiichi KOMORIYA \*

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

An analytical method was developed to determine methamidophos levels in pet food using liquid chromatograph-electrospray ionization-tandem mass spectrometer (LC-ESI-MS/MS).

Methamidophos was extracted with acetone-water. The extract was purified with macroporous diatomaceous earth, Envi ENVI-Carb (Supelco; Bellefonte, PA, U.S.) and Sep-Pak Plus Silica Cartridge (Waters; Milford, MA, U.S.), followed by LC-ESI-MS/MS analysis for determination of methamidophos. The LC separation was performed with an ODS column (ZORBAX Eclipse XDB-C18, 2.1 mm i.d.×150 mm, 5 μm from Agilent Technologies Inc.; Santa Clara CA, U.S.) using 2 mmol/L ammonium acetate solution-methanol (19:1 v/v) as the mobile phase. MS/MS analysis was performed in the selected reaction monitoring (SRM) mode. Spike tests were conducted on adult dry dog food, all life stages semi-dry dog food, and two kinds of dry cat food spiked with 0.02 or 0.2 mg/kg of methamidophos and adult dry dog food and dry kitten food spiked with 0.01 mg/kg of methamidophos. The mean recoveries of methamidophos ranged from 72.6 to 86.8 % and the relative standard deviations of repeatability were not more than 8.7 %.

A collaborative study was conducted in nine laboratories using adult dry dog food, all life stages semi-dry dog food or adult dry cat food spiked with 0.08, 0.05 or 0.08 mg/kg of methamidophos. The mean recovery of adult dry dog food was 85.9 %, the repeatability and reproducibility in terms of the relative standard deviations ( $RSD_T$  and  $RSD_R$ ) were 2.1 % and 11 %, respectively, and the Horwitz ratio (HorRat) was 0.48. The values for all life stages semi-dry dog food and adult dry cat food were 85.6 %, 4.0 %, 11 % and 0.49, and 80.6 %, 2.6 %, 12 % and 0.53, respectively.

This method was validated and established for use in the inspection of pet food for methamidophos.

Key words: pesticide residue ; methamidophos ; liquid chromatograph-tandem mass spectrometer (LC-MS/MS) ; electrospray ionization (ESI) ; pet food ; collaborative study

キーワード：残留農薬；メタミドホス；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；愛玩動物用飼料；共同試験

\* 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

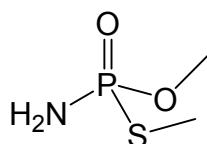
メタミドホスは 1964 年にバイエル社によって開発された有機リン系化合物であり、海外では殺虫剤として使用されている。メタミドホスは水に溶けやすい性質で浸透性が高く、動物の中樞神経系にあるアセチルコリンエステラーゼの活性を阻害することにより殺虫効果を示し、毒性が高い。

日本において農薬登録はなく、農薬取締法に基づき国内での農薬としての製造・輸入・使用は禁止されている。

国内における愛玩動物用飼料中の成分規格として、0.2 µg/g の基準値が設定されている<sup>1)</sup>が、メタミドホスの定量法がないことから、今回、検討することとなった。

そこで、「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」において財団法人日本食品分析センターが開発した畜産用飼料中のメタミドホス及びアセフェートとの同時定量法<sup>2)</sup>（以下「食品分析センター法」という。）を基に、愛玩動物用飼料等の検査法<sup>3)</sup>への適用の可否についての検討を行ったので、その概要を報告する。

なお、メタミドホスの構造式を Fig. 1 に示した。



*O,S*-dimethyl phosphoramidothioate

C<sub>2</sub>H<sub>8</sub>NO<sub>2</sub>PS MW: 141.1

CAS No.: 10265-92-6

Fig. 1 Chemical structure of methamidophos

## 2 実験方法

### 2.1 試 料

愛玩動物用飼料（成犬用ドライ製品、全成長段階犬用セミドライ製品、成猫用ドライ製品及び幼猫用ドライ製品。）をそれぞれ 1 mm の網ふるいを通過するまで粉碎して用いた。それぞれに表示されていた原材料を Table 1 に示した。

Table 1 Ingredients list of pet foods

Pet food types	Ingredients
Dry type for adult dogs	Corn, Gluten feed, Rice bran, Soybean meal, Wheat bran, Poultry by-product meal, Animal fat, Feather meal, Fish oil (DHA, EPA), Yeast extracts, Carrot, Chamomile, Rosemary, Oolong tea extracts, Minerals (Calcium carbonate, Salt, Zinc sulfate, Calcium iodate, Copper sulfate), Vitamins (A, B <sub>2</sub> , B <sub>12</sub> , D <sub>3</sub> , E, Calcium D-pantothenate, Choline chloride, d-biotin), Coloring agents (Yellow-4, Blue-1)
Semi-dry type for dogs of all life stage	Grains (Corn, Wheat, Bread crumb), Meat (Poultry by-product meal, Beef meat meal, Beef powder), Soybean meal, High-fructose corn syrup, Animal fat, Defatted rice bran, Beer yeast, Vegetables (Spinach, Carrot, Pumpkin), Dried small fish, Powdered cheese, Oligosaccharide, Propyleneglycol, Minerals (Ca, Cl, Cu, I, Na, P, Zn), Emulsifier, Preservative (Potassium sorbate), Malic acid, Citric acid, Coloring agents (Titanium dioxide, Red-106, Yellow-4, Yellow-5 Blue-1)
Dry type for adult cats	Grains (Corn, Bakery waste), Meat (Poultry by-product meal, Pork meat meal), Corn gluten meal, Fish (Fish meal, Powdered fish extracts, Tuna meal), Animal fat, Powdered cellulose, Vegetables (Beat pulp), Minerals (Cl, Co, Cu, Fe, I, K, Mn, Zn), Vitamins (A, B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , B <sub>6</sub> , B <sub>12</sub> , C, D, E, K, Choline, Niacin, Pantothenate, Biotin, Folic acid), Amino acids (Methionine, Taurine), Coloring agents (Red-102, Red-106, Yellow-4, Yellow-5, Blue-1), Antioxidants (Mixed tocopherol, Herb extracts)
Dry food for kittens	Grains, Meat, Plant protein extracts, Fish (White fish, Bonito, Tuna, Salmon), Amino acids (Taurine), Vitamins, Minerals

## 2.2 試薬

### 1) メタミドホス標準液

メタミドホス標準品 (Dr. Ehrenstorfer 製, 純度 98.5 %) 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 ( $f=0.985$ ) . ) .

使用に際して, メタミドホス標準原液 2 mL を 50 mL の全量フラスコに正確に入れ, 更に標線までアセトンを加えて, 1 mL 中にメタミドホスとして 20  $\mu\text{g}$  を含有する液を調製した. この液 1 mL を正確にとり, 窒素ガスを送って乾固した後に水で正確に希釈し, 1 mL 中にメタミドホスとしてそれぞれ 0.002, 0.004, 0.008, 0.02, 0.04, 0.08 及び 0.16  $\mu\text{g}$  を含有する各標準液を調製した.

2) アセトン, 酢酸エチル, ヘキサン及び塩化ナトリウムは残留農薬・PCB 試験用を用いた. メタノールは液体クロマトグラフ用, 酢酸アンモニウムは遺伝子工学研究用 10 mol/L 溶液 (ニッポンジーン製) を用いた.

## 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 : Agilent Technologies 製 1200 Series

MS 部 : Agilent Technologies 製 6410 Triple Quad LC/MS

2) 振とう機 : タイテック製 レシプロシェーカー SR-2W

3) ロータリーエバポレーター : BÜCHI 製 R-200

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

5) グラファイトカーボンミニカラム : Supelco 製 ENVI-Carb (充てん剤量 500 mg)

6) シリカゲルミニカラム : Waters 製 Sep-Pak Plus Silica Cartridge (充てん剤量 690 mg) にリザーバーを連結したもの

## 2.4 定量方法

### 1) 抽出

分析試料 10.0 g を量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ, 水 20 mL を加え, 30 分間静置後, 更にアセトン 100 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. この液 8 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 2 mL 以下まで減圧濃縮し, カラム処理 I に供する試料溶液とした.

### 2) カラム処理 I

試料溶液に水 3 mL 及び塩化ナトリウム 1 g を加えた後, 多孔性ケイソウ土カラムに入れ, 10 分間静置した. 先の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下させた.

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. 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メタミドホスを溶出させた. 更に同溶媒 40 mL をカラムに加え, 同様に溶出させた. 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。

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 (7+3) 5 mL をミニカラムに加え、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メタミドホスを溶出させた。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。

水 1 mL を正確に加えて残留物を溶かし、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。

### 4) 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、Table 2 及び Table 3 の測定条件に従って選択反応検出クロマトグラムを得た。

Table 2 Operating conditions of LC-MS/MS for analyzing methamidophos

Column	Agilent Technologies, ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm i.d.×150 mm, 5 µm)
Mobile phase	2 mmol/L ammonium acetate solution-methanol (19:1)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temperature	40 °C
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Mode	Positive
Nebulizer	N <sub>2</sub> (340 kPa)
Drying gas temperature	N <sub>2</sub> (350 °C)
Capillary voltage	4 kV

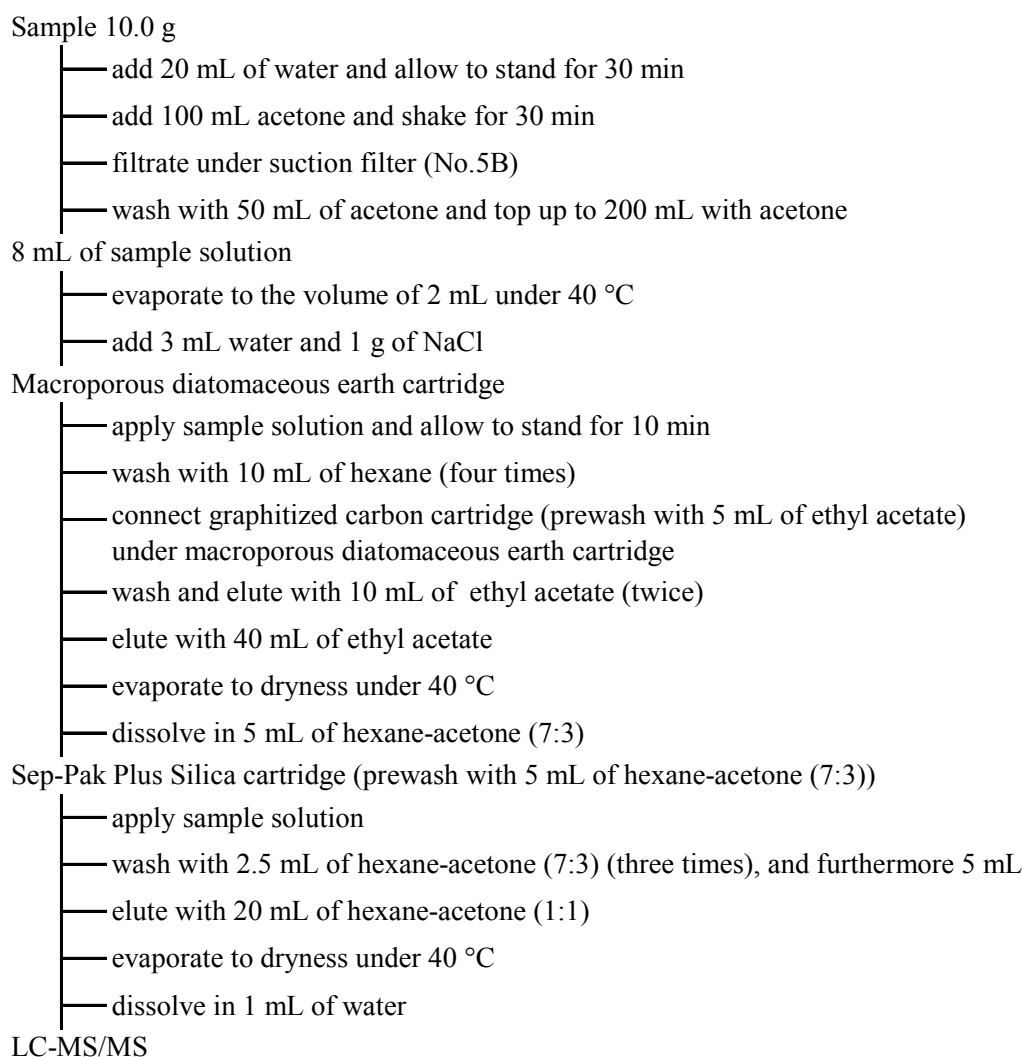
Table 3 MS/MS Parameters

Target ion	Precursor ( <i>m/z</i> )	Product ( <i>m/z</i> )	Qualifier ( <i>m/z</i> )	Fragmentor voltage (V)	Collision energy (eV)
Methamidophos	142	94	125	100	12

### 5) 計 算

得られた選択反応検出クロマトグラムからメタミドホスのピーク高さ又は面積を求めて検量線を作成し、試料中の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。



Scheme 1 Analytical procedure for methamidophos in pet foods

### 3 結果及び考察

#### 3.1 検量線

2.2 の 1)に従ってメタミドホスとして 1 mL 中に 0.002, 0.004, 0.008, 0.02, 0.04, 0.08 及び 0.16  $\mu\text{g}$  を含有する各標準液を調製し, 各標準液 5  $\mu\text{L}$  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メタミドホスのピーク高さ及び面積を求めて検量線を作成した. その結果, 検量線は Fig. 2 のとおり, 0.002~0.16  $\mu\text{g/mL}$  (注入量として 0.01~0.8 ng) の範囲で直線性を示した.

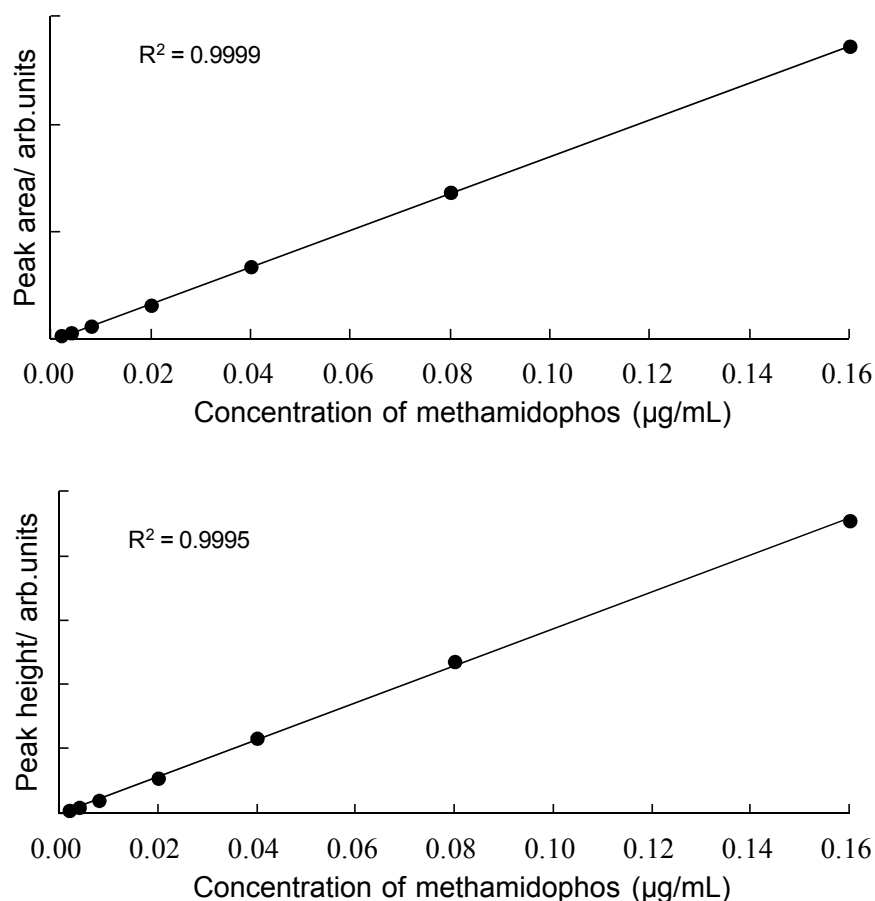


Fig. 2 Calibration curves of methamidophos by peak area (upper) and peak height (lower)

### 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処理の検討

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処理の溶出画分の確認を以下のとおり行った。

成犬用ドライ製品を 2.4 の 1)により抽出し、吸引ろ過した後、200 mL に定容した液 8 mL にメタミドホスとして 0.1 µg (試料中濃度として 0.25 mg/kg 相当量) を添加し、40 °C 以下の水浴で 2 mL 以下まで減圧濃縮して確認のための試料溶液とした。この試料溶液を 2.4 の 2)により操作し、メタミドホスの溶出画分の回収率を確認した。

その結果、Table 4 のとおりメタミドホスは酢酸エチル 0~60 mL の画分で溶出し、60 mL 以降の画分には溶出されなかった。また、ヘキサン洗浄液からメタミドホスの溶出は認められなかった。

以上の結果から本法では酢酸エチル 60 mL で溶出することとした。

Table 4 Elution pattern from macroporous diatomaceous earth cartridge and graphitized carbon cartridge

Fraction volume (mL)	Hexane 0~40	Ethyl acetate							Total
		0~10	~20	~30	~40	~50	~60	~70	
Recovery of methamidophos (%)	0	8	39	24	20	3	Tr.	0	94

### 3.3 シリカゲルミニカラム処理の検討

シリカゲルミニカラム処理の溶出画分の確認を以下のとおり行った。

成犬用ドライ製品を 2.4 の 1)及び 2)により操作した液にメタミドホスとして 0.1 $\mu$ g (試料中濃度として 0.25 mg/kg 相当量) を添加した溶液を、2.4 の 3)にしたがって処理し、メタミドホスの溶出画分の回収率を確認した。

その結果、Table 5 のとおりメタミドホスはヘキサン-アセトン (1+1) 0~15 mL の画分で溶出し、20 mL 以降の画分には溶出されなかった。また、ヘキサン-アセトン (7+3) 洗浄液からメタミドホスの溶出は認められなかった。

以上の結果から、食品分析センター法と同様、本法はヘキサン-アセトン (1+1) 20 mL で溶出することとした。

Table 5 Elution pattern from silica-gel mini column

Fraction volume (mL)	Hexane-acetone (7:3) (0~12.5)	Hexane-acetone (1:1)					Total
		0~5	~10	~15	~20	~25	
Recovery of methamidophos (%)	0	5	85	2	0	0	92

### 3.4 酢酸エチルによるなす形フラスコの洗浄回数の検討

食品分析センター法ではカラム処理 I においてメタミドホスを溶出する際、酢酸エチル 10 mL で容器を洗浄し、洗液を多孔性ケイソウ土カラムに加える操作を 6 回繰り返しているが、操作が煩雑になることから、洗浄回数を軽減する目的で以下の検討を行った。

なす形フラスコに、メタミドホスとして 100 ng を含有する水溶液 5 mL 及び塩化ナトリウム 1 g を加えた。次に、それらをディスポーザブルピペットにて除去した後、更にヘキサン 10 mL ずつで 4 回洗浄し酢酸エチルによる洗浄回数の検討を行った。

その結果、1 回目の洗浄液においてメタミドホスとして 0.4 ng ( $n=2$ ) の残留が認められたがそれ以降は残留が認められなかったことから、酢酸エチルによるなす形フラスコの洗浄回数を 2 回とした。

### 3.5 妨害物質の検討

市販の愛玩動物用飼料 (犬用ドライ製品及びセミドライ製品各 3 種類並びに猫用ドライ製品 4 種類) を用い、本法に従って調製した試料溶液を LC-MS/MS に注入し、妨害ピークの有無を確認したところ、妨害ピークは認められなかった。

### 3.6 添加回収試験

2.1 で調製した成犬用ドライ製品、全成長段階犬用セミドライ製品、成猫用ドライ製品及び幼

猫用ドライ製品にメタミドホスとして 0.2 及び 0.02 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。その結果は Table 6 のとおりであり、メタミドホスの平均回収率は 72.6~86.8 %，その繰返し精度は、相対標準偏差 ( $RSD_r$ ) として 8.7 %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 6 Recoveries of methamidophos from four kinds of pet food

Spiked level (mg/kg)	Pet food types							
	Dry type for adult dogs		Semi-dry type for dogs of all life stages		Dry type for adult cats		Dry type for kittens	
	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> (%)	Recovery <sup>a)</sup> (%)	$RSD_r$ <sup>b)</sup> (%)
0.2	84.8	1.1	77.3	8.7	75.9	4.6	72.6	4.0
0.02	86.8	2.7	78.7	7.8	73.8	5.3	77.5	3.6

a) Mean recovery ( $n=3$ )

b) Relative standard deviation of repeatability

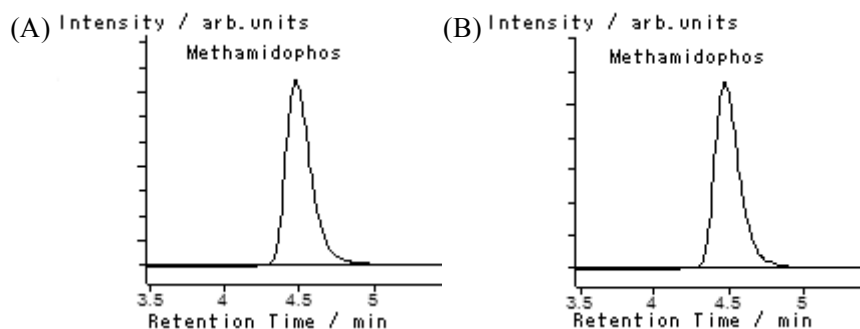


Fig. 3 SRM chromatograms of standard solution and sample solution

LC-MS/MS conditions are shown in Table 2 and 3.

(A) Standard solution (The amount of methamidophos is 0.4 ng.)

(B) Sample solution of dry food for adult dogs spiked methamidophos at 0.2 mg/kg

### 3.7 定量限界及び検出限界

本法の定量下限を確認するため、成犬用ドライ製品及び幼猫用ドライ製品にメタミドホスとして 0.01 mg/kg 相当量を添加した試料を用いて、本法により定量し、得られたピークの  $SN$  比を求めた。その結果、 $SN$  比が 10 となる濃度は 0.01 mg/kg であったことから、メタミドホスの定量下限は 0.01 mg/kg であった。また、同試料を用いて本法に従って 3 点併行で定量した結果は Table 7 のとおりであり、平均回収率は 82.0~85.7 %，その繰返し精度は  $RSD_r$  として 2.0 %以下であった。また、メタミドホスの検出下限は  $SN$  比が 3 となる濃度から 0.003 mg/kg であった。



Table 7 Recoveries of methamidophos at the level of limit of quantitation

Spiked level (mg/kg)	Pet food types			
	Dry type for adult dogs		Dry type for kittens	
	Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)
0.01	85.7	1.5	82.0	2.0

a) Mean recovery ( $n=3$ )

b) Relative standard deviation of repeatability

### 3.8 共同試験

本法の室間再現精度を調査するため、成犬用ドライ製品及び成猫用ドライ製品にメタミドホスとして 0.08 mg/kg 相当量 (1 mL 中に 0.8 µg を含有する標準液 1 mL 添加)、全成長段階犬用セミドライ製品にメタミドホスとして 0.05 mg/kg 相当量 (1 mL 中に 0.5 µg を含有する標準液 1 mL 添加) を添加した試料を用いて、財団法人日本食品分析センター多摩研究所、社団法人日本科学飼料協会、全国酪農業協同組合連合会分析センター、協同飼料株式会社研究所、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 (9 試験室) において、本法に従って共同試験を実施した。結果の解析については、IUPAC のプロトコール<sup>4)</sup>に従い、Cochran 検定、外れ値 1 個の Grubbs 検定及び外れ値 2 個の Grubbs 検定を行った上で平均回収率、繰返し精度及び室間再現精度の相対標準偏差 (RSD<sub>r</sub> 及び RSD<sub>R</sub>) を算出した。得られた RSD<sub>R</sub> から、修正 Horwitz 式を用いて HorRat を求めた。

その結果を Table 8 に示した。成犬用ドライ製品では、平均回収率は 85.9 %、その繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ RSD<sub>r</sub> 及び RSD<sub>R</sub> として 2.1 % 及び 11 % であり、HorRat は 0.48 であった。全成長段階犬用セミドライ製品では、平均回収率は 85.6 %、その繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ RSD<sub>r</sub> 及び RSD<sub>R</sub> として 4.0 % 及び 11 % であり、HorRat は 0.49 であった。成猫用ドライ製品では、平均回収率は 80.6 %、その繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ RSD<sub>r</sub> 及び RSD<sub>R</sub> として 2.6 % 及び 12 % であり、HorRat は 0.53 であった。

なお、参考のため、各試験室で使用した LC-MS/MS の機種等を Table 9 に示した。

Table 8 Collaborative study results of methamidophos

Lab. No.	Pet food types					
	Dry type for adult dogs		Semi-dry type for dogs of all life stages		Dry type for adult cats	
	(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)	
1	0.0708	0.0731	0.0470	0.0449	0.0646	0.0687
2	0.0815	0.0838	0.0495	0.0510	0.0773	0.0793
3	0.0596	0.0609	0.0390	0.0381	0.0608	0.0596
4	0.0599	0.0572	0.0387	0.0360	0.0560	0.0548
5	0.0709	0.0728	0.0430	0.0432	0.0681	0.0668
6	0.0660	0.0647	0.0386	0.0365	0.0537	0.0539
7	0.0704	0.0713	0.0494	0.0437	0.0677	0.0684
8	0.0697	0.0732	0.0431	0.0439	0.0666	0.0678
9	0.0655	0.0663	0.0430	0.0422	0.0608	0.0654
Spiked level (mg/kg)	0.08		0.05		0.08	
Mean value <sup>a)</sup> (mg/kg)	0.0688		0.0428		0.0645	
Recovery <sup>a)</sup> (%)	85.9		85.6		80.6	
RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	2.1		4.0		2.6	
RSD <sub>R</sub> <sup>c)</sup> (%)	11		11		12	
PRSD <sub>R</sub> <sup>d)</sup> (%)	22		22		22	
HorRat	0.48		0.49		0.53	

a)  $n=18$ 

b) Relative standard deviations of repeatability within laboratory

c) Relative standard deviations of reproducibility between laboratories

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

Table 9 Instruments used in the collaborative study

Lab. No.	LC	MS/MS	LC column
			(i.d.×length, particle size)
1	Agilent Technologies 1200 series	Applied Biosystems API 3200	Tosoh TSK-GEL ODS-100V (2.0 mm ×150 mm, 5 μm)
2	Agilent Technologies 1200 series	Agilent Technologies 6410 Triple Quad LC/MS	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm ×150 mm, 5 μm)
3	Waters Alliance 2695	Waters Micromass Quattro micro API	GL Sciences Inertsil ODS-3 (2.1 mm ×150 mm, 5 μm)
4	Agilent Technologies 1200 series	Agilent Technologies 6410 Triple Quad LC/MS	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm ×150 mm, 5 μm)
5	Waters Alliance 2695	Waters Micromass Quattro micro API	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm ×150 mm, 5 μm)
6	Agilent Technologies 1200 series	Agilent Technologies 6410 Triple Quad LC/MS	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm ×150 mm, 5 μm)
7	Waters ACQUITY UPLC System	Waters ACQUITY TQ Detector	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm ×150 mm, 5 μm)
8	Waters ACQUITY UPLC System	Waters ACQUITY TQ Detector	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm ×150 mm, 5 μm)
9	Waters ACQUITY UPLC System	Waters ACQUITY TQ Detector	Shiseido CAPCELL-PAK C18 AQ (2.1 mm ×150 mm, 5 μm)

## 4 まとめ

愛玩動物用飼料中に残留するメタミドホスについて、液体クロマトグラフタンデム型質量分析計を用いた定量法を検討したところ、以下の結果が得られ、愛玩動物用飼料等の検査法へ適用が可能であると考えられた。

なお、本法は平成 22 年 8 月 18 日付けで愛玩動物用飼料等の検査法に収載された。

- 1) 検量線はメタミドホスとして 0.01~0.8 ng の範囲で直線性を示した。
- 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溶出画分の検討を行ったところ、溶出溶媒の必要量は 60 mL であった。
- 3) シリカゲルミニカラムからの溶出画分を検討したところ、溶出溶媒の必要量は 20 mL であった。
- 4) 酢酸エチルによるなす形フラスコの洗浄回数を検討を行ったところ、2 回が適当であった。
- 5) 市販の愛玩動物用飼料（犬用ドライ製品及びセミドライ製品各 3 種類並びに猫用ドライ製品 4 種類）について、本法に従って選択反応検出クロマトグラムを作成したところ、メタミドホスの定量を妨げるピークは認められなかった。
- 6) 成犬用ドライ製品、全成長段階犬用セミドライ製品、成猫用ドライ製品及び幼猫用ドライ製品にメタミドホスとして 0.2, 0.02 及び 0.01 mg/kg 相当量を添加し、本法にて添加回収試験を実施したところ、平均回収率は、72.6~86.8 %、その繰返し精度は、相対標準偏差 (RSD<sub>r</sub>) として 8.7 %以下の成績が得られた。
- 7) 本法によるメタミドホスの定量下限は、試料中で 0.01 mg/kg、検出下限は 0.003 mg/kg であり、基準値に対して十分な精度が得られた。
- 8) 成犬用ドライ製品及び成猫用ドライ製品にメタミドホスとして 0.08 mg/kg 相当量、全成長段階犬用セミドライ製品にメタミドホスとして 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。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頂いた財団法人日本食品分析センター多摩研究所、社団法人日本科学飼料協会、全国酪農業協同組合連合会分析センター及び協同飼料株式会社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) 農林水産省令・環境省令：愛玩動物用飼料の成分規格等に関する省令，平成 21 年 4 月 28 日，省令第 1 号 (2009)。
- 2) 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（飼料中の有害物質の分析法の開発）(2009)。
- 3) 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)。
- 4) Horwitz, W., Protocol for Design, Conduct and Interpretation of Method - Performance Studies, Pure & appl. Chem., 67(2), 331-343 (1995)。