

# 1 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

山本 克己\*, 野村 昌代\*, 山本 謙吾\*

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

Katsumi YAMAMOTO\*, Masayo NOMURA\* and Kengo YAMAMOTO

(\* 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 grains 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 conditions, and the resulting solutions were filtered. The filtrate was then diluted with acetone to a final volume of 200 mL. The extract was purified by liquid-liquid distribution with hexane-ethyl acetate (1:1). 2,4-D related compounds, such as 2,4-D ethyl ester 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 neutralized and purified with an SPE mini-column (Mega Bond Elut C18 from Agilent Technologies Inc.; Santa Clara, CA, U.S.), liquid-liquid distribution with diethylether under acidic condition, and an SPE mini-column (InertSep GC/PSA from GL Sciences Inc.; Tokyo, Japan). The sample solution was 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, U.S.) using 5 mmol/L ammonium acetate solution and 5 mmol/L ammonium acetate methanol solution as the mobile phase. In the MS/MS analysis, negative mode electrospray ionization (ESI-) was used.

Spike tests were conducted on grains. Wheat and rye were spiked with 0.5 or 0.05 mg/kg of 2,4-D and 2,4-D ethyl ester. Corn was spiked with same compounds at 0.05 or 0.01 mg/kg. The resulting values obtained for mean recovery and repeatability in terms of relative standard deviations (RSD<sub>r</sub>), respectively, were 78.7 to 93.6 % and not more than 5.7 % for 2,4-D, 84.0 to 103 % and not more than 6.8 % for 2,4-D ethyl ester.

A collaborative study was conducted in nine laboratories using wheat spiked with 0.5 µg/kg of 2,4-D and 2,4-D ethyl ester. The mean recovery, repeatability and reproducibility in terms of the relative standard deviations (RSD<sub>r</sub> and RSD<sub>R</sub>), and HorRat, respectively, were 84.5 % and 7.1 %, 12 %, and 0.63 for 2,4-D, and 95.5 % and 6.5 %, 8.7 %, and 0.48 for 2,4-D ethyl ester.

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

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

\* 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

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；飼料

## 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る。広葉雑草を枯らすのが、イネ科作物には効果は小さく、水田用除草剤として広く使用されている<sup>1)</sup>。

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<sup>2)</sup>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<sup>3)</sup>は, 稲わらで 1 mg/kg となっている。さらに, 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<sup>4)</sup>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。

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<sup>5)</sup>として個別試験法 (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) が示されている。飼料中の 2,4-D の分析法としては, 既に飼料分析基準<sup>6)</sup>にガスクロマトグラフによる 2,4,5-T との同時分析法<sup>7)</sup>が記載されているが, この方法は操作が煩雑であり, また 2,4-D 関連物質を分析対象としていない。このことから, 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 2,4-D 及び MCPA エチルを分析対象とする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。) による同時分析法<sup>8)</sup> (以下「JFRL 法」という。) を基に, 2,4-D 及びその関連物質に対して適用可能な方法を開発し, 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 2,4-D 及び 2,4-D エチルの構造式等を Fig. 1 に示した。

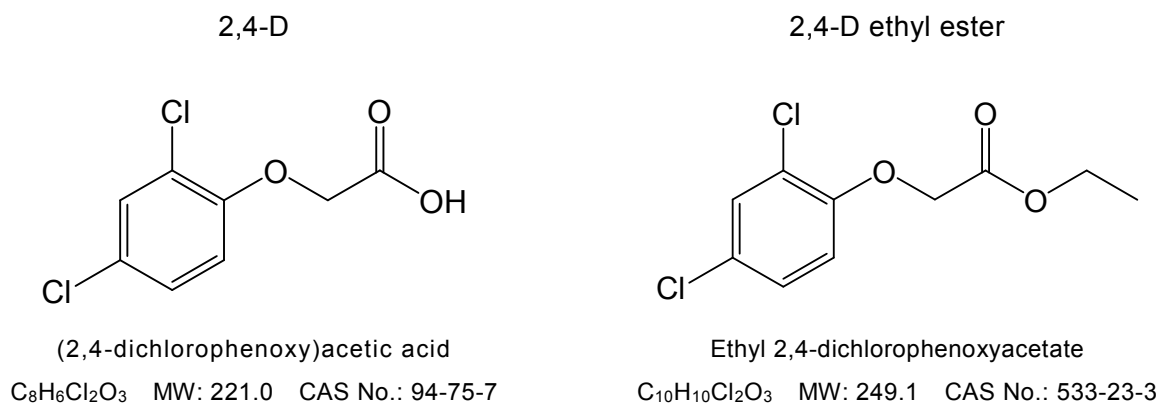


Fig. 1 Chemical structures of 2,4-D and 2,4-D ethyl ester

## 2 実験方法

### 2.1 試 料

小麦, とうもろこし, ライ麦, チモシー乾草及びライグラス乾草を, それぞれ 1 mm の網ふるいを通すまで粉砕して用いた。

## 2.2 試薬

1) アセトニトリル, アセトン, 酢酸エチル, ジエチルエーテル, トルエン, ヘキサン, 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。メタノールは抽出及び精製操作には残留農薬・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 1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液 LC 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。その他の試薬は特級(ただしギ酸は98%のもの)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 ( $f=0.986$ ) を含有する。)

使用に際して, 2,4-D 標準原液の一定量を, メタノール-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。

### 3) 2,4-D エチル標準原液

2,4-D エチルエステル標準品(Dr. Ehrenstorfer 製, 純度97.0%) 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, 更に標線までアセトンを加えて2,4-D エチル標準原液を調製した(この液1 mL は, 2,4-D エチルとして0.5 mg ( $f=0.970$ ) を含有する。)

## 2.3 装置及び器具

- 1) 粉碎機: Retsch 製 ZM-100 (使用時回転数: 14000 rpm)
- 2) 乾牧草用粉碎機: Retsch 製 SM-100 (使用時回転数: 1430 rpm)
- 3) 振とう機: タイテック製 レシプロシェーカーSR-2W
- 4) ロータリーエバポレーター: BÜCHI 製 R-200
- 5) ウォーターバス: BÜCHI 製 B-490
- 6) 吸引マニホールド: ジーエルサイエンス製 GL-SPE 吸引マニホールド
- 7) オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム: Agilent Technologies 製 Mega Bond Elut C18 カートリッジ(充てん剤量1 g) にリザーバー(20 mL) を連結したもの
- 8) 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: ジーエルサイエンス製 InertSep GC/PSA カートリッジ(充てん剤量500 mg/500 mg) にリザーバー(50 mL) を連結したもの
- 9) 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計:  
LC部: Waters 製 ACQUITY UPLC System  
MS部: Waters 製 ACQUITY Xevo TQD LC/MS/MS System

## 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 を加え, 30分間静置後, 更に塩酸(4 mol/L) 5 mL 及びアセトン100 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

引る過した後、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、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、あらかじめ塩化ナトリウム溶液 (10 w/v%) 100 mL 及び酢酸エチルーヘキサン (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、酢酸エチルーヘキサン層 (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 200 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。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。

## 7) 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 (以下「SRM」という。) 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                      | Waters, Atlantis T3 (2.1 mm i.d. × 150 mm, 3 µm)  |
| Mobile phase                | 5 mmol/L ammonium acetate solution - 5 mmol/L ammonium acetate methanol solution (70:30) → 10 min → (0:100)(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 substance | 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                          |                  |                       |

## 8) 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 2,4-D の濃度を次式により 2,4-D エチルの濃度に換算し、添加した 2,4-D エチルの濃度で除してその割合を求めることにより行った。

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。

## 2.5 乾牧草の定量方法

- 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、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。
- 2) 希釈 1) で得られた液の一定量をアセトンで正確に 500 倍希釈して液液分配 I に供する試料溶液とし、2.4 の 2) 以降の操作を行い定量した。

## 2.6 高濃度試料溶液 (乾牧草) の希釈方法の検討

2,4-D として、チモシー乾草に 260 mg/kg 相当量を添加し、2.5 の 1) のとおり操作し得られた抽出液 3 点を用いて、各々下記 1) 及び 2) に従い、得られた試料溶液を LC-MS/MS に供し、添加回収率を比較した。

- 1) 2.5 の 2) に従い抽出液をアセトンで正確に 500 倍希釈した後、2.4 の 2) 以降の操作を行った。
- 2) 抽出液を希釈せずに 2.4 の 2) から 6) までの操作を行った後、更にメタノールーギ酸 (1000+1) で正確に 500 倍希釈した。

## Sample 10.0 g (300 mL Erlenmeyer flask)

- add 20 mL of water and allow to stand for 30 min
- add 5 mL of HCl (4 mol/L) and 100 mL of acetone and shake for 30 min
- filtrate with suction filter (No.5B)
- wash with 50 mL of acetone
- top up to 200 mL with acetone
- 8 mL of sample solution

## Liquid liquid extraction I (300 mL separatory funnel)

- add 100 mL of sodium chloride solution (10 w/v%)
- add hexane-ethyl acetate (1:1) and shake for 5 min (twice: 100 mL and 50 mL)
- put hexane-ethyl acetate layer into 300 mL of Erlenmeyer flask
- add sodium sulfate
- filtrate (5A)
- evaporate to dryness under 40 °C
- dissolve in 2 mL of methanol

## Hydrolysis reaction

- add 1 mL of NaOH (1.5 mol/L)
- reflux in water bath (80 °C) for 30 min
- adjust pH to 7.5~8.0 with HCl (1.5 mol/L)
- add 16 mL of sodium bicarbonate solution (0.1 w/v%)

## Mega Bond Elut C18 cartridge

- prewash with 10 mL of methanol and 10 mL of water
- apply sample solution
- elute with 20 mL of sodium bicarbonate solution (0.1 w/v%) - methanol (1:1)

## Liquid liquid extraction II (300 mL separatory funnel)

- add 5 mL of HCl (4 mol/L) and 100 mL of sodium chloride solution (10 w/v%)
- apply sample solution
- add diethylether and shake for 5 min (twice: 50 mL)
- put diethylether layer into 200 mL Erlenmeyer flask
- add sodium sulfate
- filtrate (5A)
- evaporate to dryness under 40 °C
- dissolve in 5 mL of acetonitrile - toluene (3:1)

## InertSep GC/PSA cartridge

- prewash with 10 mL of acetonitrile - toluene (3:1)
- apply sample solution
- wash with 5 mL of acetonitrile - toluene (3:1)
- elute with 30 mL of acetonitrile - toluene - formic acid (75:25:1)
- evaporate to dryness under 40 °C
- dissolve in 1.0 mL of methanol - formic acid (1000:1)

## LC-MS/MS

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

### 3 結果及び考察

#### 3.1 LC-MS/MS 測定条件の検討

JFRL 法<sup>8)</sup>ではイオン化法としてエレクトロスプレーイオン化法（以下「ESI 法」という）を用いていることから、本法においても ESI 法を用いて検討を行った。

標準液について、本法の測定条件によりオートチューン機能を使用して、感度の高いプリカーサーイオン及びプロダクトイオンの最適なコーン電圧及びコリジョンエネルギーを確認したところ、Table 1 及び Table 2 に示した条件が最適であった。

#### 3.2 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  $\mu\text{g/mL}$  相当量の各標準液各 5  $\mu\text{L}$  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。得られた検量線は、Fig. 2 のとおりであり、2,4-D で各 0.004~0.4  $\mu\text{g/mL}$  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。

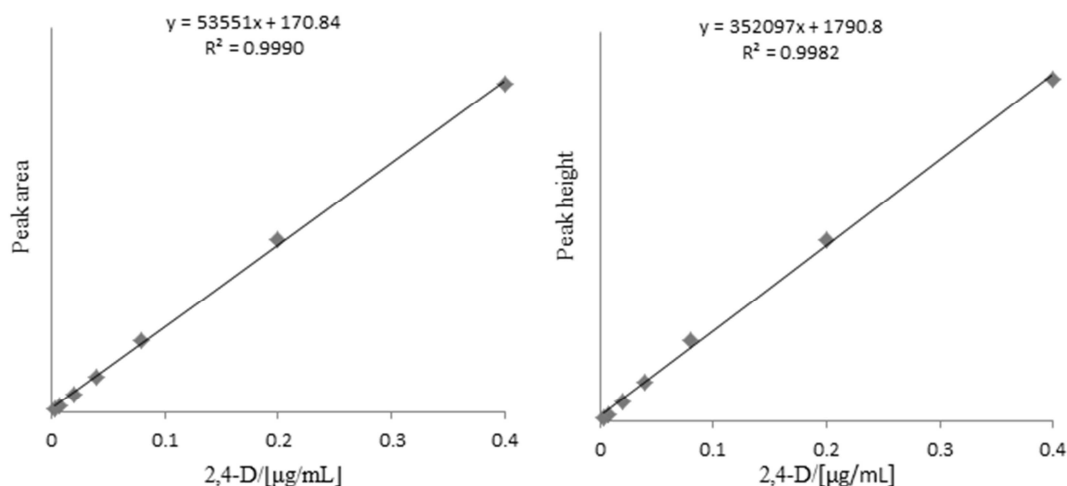


Fig. 2 Calibration curves of 2,4-D by peak area (Left) and peak height (Right)

#### 3.3 乾牧草を対象とした JFRL 法の適用について

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 となっている。本法を基準値相当量に汚染された乾牧草に適用するためには、試料溶液の希釈が必要となる。

JFRL 法では、最終的に得られた試料溶液を希釈し、LC-MS/MS に供している。そこで、2.6 のとおり試料溶液を調製し、回収率の比較を行った。その結果、Table 3 のとおり両者間で回収率に有意差は認められなかったが、高濃度の試料を分析に供することによるガラス器具等への汚染及びミニカラムからの溶出画分の変動を防止することを考慮し、乾牧草については抽出液をアセトンで 500 倍希釈した後、2.4 の 2) 以降の操作を行うこととした。



Table 3 Comparison of recoveries of 2,4-D in grass hay by dilution of sample solution

| Pesticide | Spiked level (mg/kg) | Run No. | diluted after extraction | diluted after InertSep GC/PSA |
|-----------|----------------------|---------|--------------------------|-------------------------------|
|           |                      |         | Recovery (%)             | Recovery (%)                  |
| 2,4-D     | 260                  | 1       | 76.1                     | 75.6                          |
|           |                      | 2       | 76.9                     | 78.1                          |
|           |                      | 3       | 77.5                     | 77.2                          |

### 3.4 妨害物質の検討

えん麦, 大麦, マイロ, 小麦, とうもろこし (2 種類), ライ麦及び乾牧草 (アルファルファ乾草, チモシー乾草及びライグラス乾草) を用い, 本法により調製した試料溶液を LC-MS/MS に注入し, 定量を妨げるピークの有無を確認した. 大麦において 2,4-D と同じ保持時間に検出下限相当のピークが認められたが, 確認イオンにおいても同様に検出されていることから, 2,4-D による残留と判断し, その結果, 定量を妨げる妨害ピークは認められなかった.

なお, 当該大麦の SRM クロマトグラムを Fig. 3 の B) に示した.

### 3.5 添加回収試験

JFRL 法<sup>8)</sup> では, 2,4-D 関連物質のうち, 最も極性の低い 2,4-D ブトキシエチルについて, 加水分解率の検討が行われ, 良好な結果が得られていることから, 本法では全ての 2,4-D 関連物質に適用可能であると考え, 本検討では, 2,4-D との含量として残留基準値に含まれるエステル体の 2,4-D 関連物質の代表として 2,4-D エチルを選定して検討した.

2,4-D として, 小麦及びライ麦に 0.5 及び 0.05 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で各 0.2 及び 0.02 µg/mL 相当量), とうもろこしに 0.05 及び 0.01 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で各 0.02 及び 0.004 µg/mL 相当量), 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 0.208 及び 0.008 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, 小麦及びライ麦に 0.5 及び 0.05 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 2,4-D として各 0.18 及び 0.018 µg/mL 相当量), とうもろこしに 0.05 及び 0.01 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 2,4-D として各 0.018 及び 0.0035 µg/mL 相当量), 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 2,4-D として各 0.185 及び 0.0071 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.

これらの結果を Table 4 及び Table 5 に示した. 2,4-D については, 小麦では平均回収率 86.0~90.2 %, その繰返し精度は, 相対標準偏差 (RSD<sub>r</sub>) として 5.0 % 以下, 同様にライ麦では 84.8~93.6 % 及び 4.7 % 以下, とうもろこしでは 78.7~91.3 % 及び 5.7 % 以下, ライグラス乾草では 78.3~87.0 % 及び 8.5 % 以下であった. また, 2,4-D エチルについては, 小麦では平均回収率 91.3~94.7 %, その繰返し精度は, RSD<sub>r</sub> として 1.9 % 以下, 同様にライ麦では 92.1~96.2 % 及び 6.8 % 以下, とうもろこしでは 84.0~103 % 及び 2.7 % 以下, ライグラス乾草では 88.8~96.9 % 及び

3.0 %以下であった。

なお、添加回収試験で得られた SRM クロマトグラムの一例を Fig. 3 に示した。

Table 4 Recoveries for 2,4-D

| Spiked level (mg/kg) | Feed types                 |                                    |                            |                                    |                            |                                    |                            |                                    |
|----------------------|----------------------------|------------------------------------|----------------------------|------------------------------------|----------------------------|------------------------------------|----------------------------|------------------------------------|
|                      | Wheat                      |                                    | Rye                        |                                    | Corn                       |                                    | Ryegrass hay               |                                    |
|                      | Recovery <sup>a)</sup> (%) | RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%) | Recovery <sup>a)</sup> (%) | RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%) | Recovery <sup>a)</sup> (%) | RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%) | Recovery <sup>a)</sup> (%) | RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%) |
| 260                  | -                          | -                                  | -                          | -                                  | -                          | -                                  | 78.3                       | 8.5                                |
| 10                   | -                          | -                                  | -                          | -                                  | -                          | -                                  | 87.0                       | 7.0                                |
| 0.5                  | 86.0                       | 5.0                                | 93.6                       | 1.9                                | -                          | -                                  | -                          | -                                  |
| 0.05                 | 90.2                       | 1.7                                | 84.8                       | 4.7                                | 78.7                       | 2.9                                | -                          | -                                  |
| 0.01                 | -                          | -                                  | -                          | -                                  | 91.3                       | 5.7                                | -                          | -                                  |

a) Mean ( $n = 3$ )

b) Relative standard deviation of repeatability

Table 5 Recoveries for 2,4-D ethyl ester

| Spiked level (mg/kg) | Feed types                 |                                    |                            |                                    |                            |                                    |                            |                                    |
|----------------------|----------------------------|------------------------------------|----------------------------|------------------------------------|----------------------------|------------------------------------|----------------------------|------------------------------------|
|                      | Wheat                      |                                    | Rye                        |                                    | Corn                       |                                    | Ryegrass hay               |                                    |
|                      | Recovery <sup>a)</sup> (%) | RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%) | Recovery <sup>a)</sup> (%) | RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%) | Recovery <sup>a)</sup> (%) | RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%) | Recovery <sup>a)</sup> (%) | RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%) |
| 260                  | -                          | -                                  | -                          | -                                  | -                          | -                                  | 88.8                       | 3.0                                |
| 10                   | -                          | -                                  | -                          | -                                  | -                          | -                                  | 96.9                       | 0.9                                |
| 0.5                  | 91.3                       | 1.8                                | 92.1                       | 6.8                                | -                          | -                                  | -                          | -                                  |
| 0.05                 | 94.7                       | 1.9                                | 96.2                       | 1.7                                | 84.0                       | 2.4                                | -                          | -                                  |
| 0.01                 | -                          | -                                  | -                          | -                                  | 103                        | 2.7                                | -                          | -                                  |

a) Mean ( $n = 3$ )

b) Relative standard deviation of repeatability

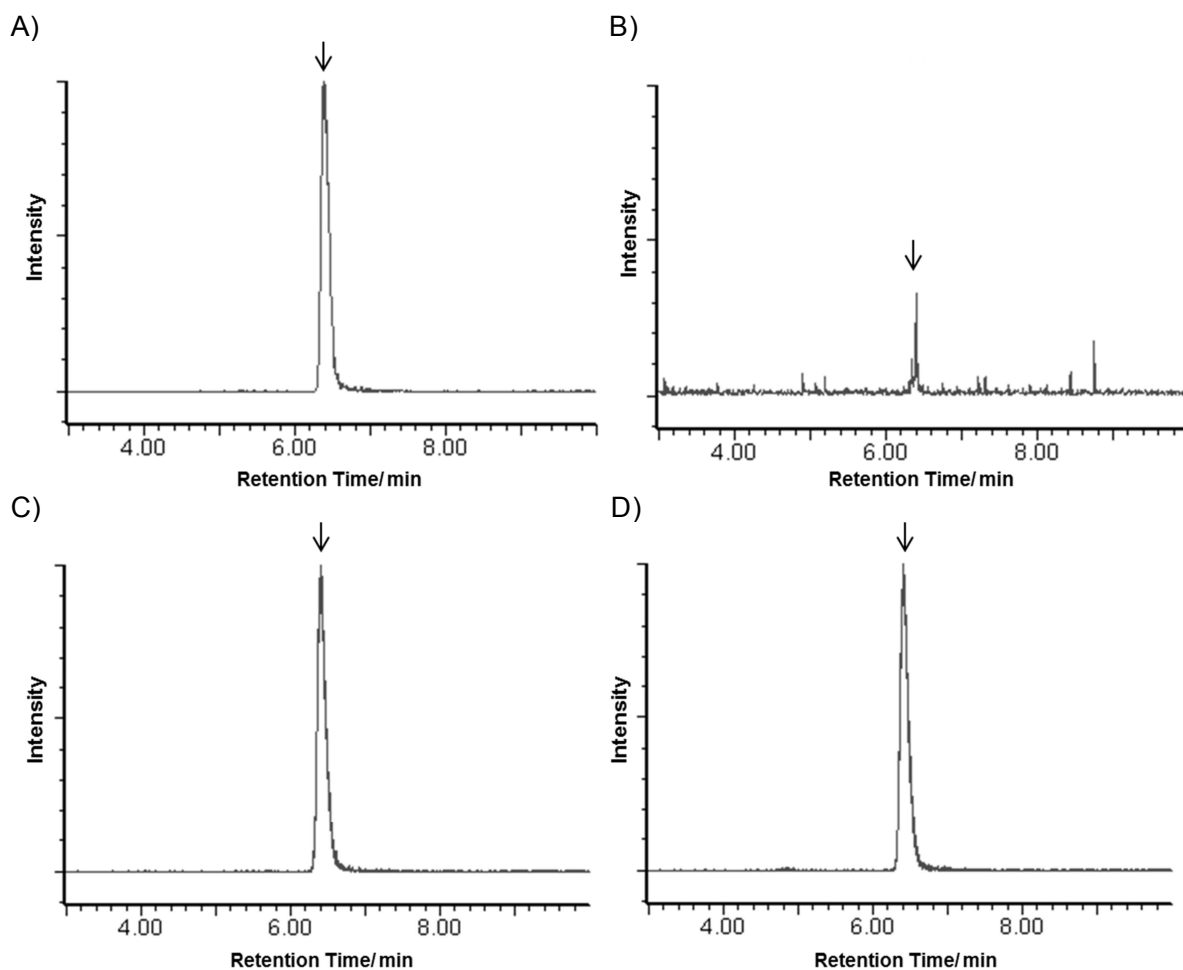


Fig. 3 SRM chromatograms

(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 barley (not spiked with 2,4-D)
- C) Sample solution of wheat (spiked at 0.5 mg/kg of 2,4-D)
- D) Sample solution of wheat (spiked at 0.5 mg/kg of 2,4-D ethyl ester)

### 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、とうもろこし及びライグラス乾草に2,4-D又は2,4-D エチルを添加した試料について、添加回収試験により得られる2,4-Dのピークの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、とうもろこしで0.01 mg/kg、ライグラス乾草で10 mg/kgであった。また、Table 4及びTable 5に示したとおり、当該濃度における添加回収試験結果は良好であった。

また、SN比が3となる濃度は、とうもろこしで0.003 mg/kg、ライグラス乾草で3 mg/kgであった。

以上の結果から、本法における2,4-Dの定量下限は0.01 mg/kg（乾牧草は10 mg/kg）、検出下限は0.003 mg/kg（乾牧草は3 mg/kg）であった。

### 3.7 共同試験

本法の室間再現精度を確認するため、共通試料による共同試験を濃度非通知、かつ非明示の 2 点反復（計 8 点）で実施した。

共通試料として、小麦に 2,4-D 及び 2,4-D エチルとしてそれぞれ 0.5 mg/kg 相当量（それぞれ 10 g に対して 1 mL 中に各 5 µg を含有する各標準液 1 mL 添加）及びライグラス乾草に 2,4-D 及び 2,4-D エチルとしてそれぞれ 260 mg/kg 相当量（それぞれ 10 g に対して 1 mL 中に各 2600 µg を含有する各標準液 1 mL）を、各試験室にて分析開始の前日にそれぞれ添加して調製した試料を用いた。参加試験室は、一般財団法人日本食品分析センター多摩研究所、一般社団法人日本科学飼料協会科学飼料研究センター、全国農業協同組合連合会飼料畜産中央研究所品質管理研究室、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<sup>9), 10)</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 ( $RSD_f$ ) 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 式を用いて HorRat を求めた。

結果は Table 6 及び Table 7 のとおりであった。

小麦においては 2,4-D 及び 2,4-D エチルについて、平均回収率は 84.5 及び 95.5 %、 $RSD_f$  はそれぞれ 7.1 及び 6.5 %、 $RSD_R$  はそれぞれ 12 及び 8.7 %、HorRat はそれぞれ 0.63 及び 0.48 であり、いずれも良好な室間再現精度が得られた。一方、ライグラス乾草においては 2,4-D 及び 2,4-D エチルについて、平均回収率は 81.9 及び 82.9 %、 $RSD_f$  はそれぞれ 13 及び 6.2 %、 $RSD_R$  はそれぞれ 33 及び 21 %、HorRat はそれぞれ 4.6 及び 2.9 であった。ライグラス乾草における HorRat がいずれも目標とする 2 以下に収まらなかったため、これらについては良好な室間再現精度が得られなかった。

ライグラス乾草の室間再現精度が小麦と比べて大きくなった原因として、加水分解後の中和操作における終点の見極めが非常に困難（小麦では中性に達した時点で試料溶液が白濁するが、ライグラス乾草では不変）であり、pH が酸性に行き過ぎた際に何らかの理由で損失が起こった可能性等が考えられた。このことから、乾牧草の定量については、手順の省略の可否等について更なる検討が必要であると考えられた。

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 6 Collaborative study results of 2,4-D

| Lab. No.   | Feed types       |       |                         |      |
|--|------------------|-------|-------------------------|------|
|  | Wheat<br>(mg/kg) |       | Ryegrass hay<br>(mg/kg) |      |
| 1  | 0.385            | 0.395 | 211                     | 249  |
| 2  | 0.452            | 0.436 | 226                     | 231  |
| 3  | 0.389            | 0.371 | 231                     | 216  |
| 4  | 0.408            | 0.389 | 198                     | 210  |
| 5  | 0.441            | 0.425 | 260                     | 237  |
| 6  | 0.440            | 0.520 | 225                     | 134  |
| 7  | 0.386            | 0.319 | 150                     | 194  |
| 8  | 0.483            | 0.421 | 327                     | 352  |
| 9  | 0.474            | 0.468 | 96.8                    | 87.0 |
| Spiked level ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )             | 0.5              |       | 260                     |      |
| Mean value <sup>a)</sup> ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) | 0.422            |       | 213                     |      |
| Recovery <sup>a)</sup> (%)                           | 84.5             |       | 81.9                    |      |
| RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)                   | 7.1              |       | 13                      |      |
| RSD <sub>R</sub> <sup>c)</sup> (%)                   | 12               |       | 33                      |      |
| PRSD <sub>R</sub> <sup>d)</sup> (%)                  | 18               |       | 7.1                     |      |
| HorRat   | 0.63             |       | 4.6                     |      |

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 Collaborative study results of 2,4-D ethyl ester

| Lab. No.   | Feed types          |                     |                         |     |
|--|---------------------|---------------------|-------------------------|-----|
|  | Wheat<br>(mg/kg)    |                     | Ryegrass hay<br>(mg/kg) |     |
| 1  | 0.442               | 0.440               | 184                     | 189 |
| 2  | 0.448               | 0.460               | 182                     | 178 |
| 3  | 0.434               | 0.453               | 196                     | 206 |
| 4  | 0.394               | 0.399               | 179                     | 180 |
| 5  | 0.421               | 0.435               | 225                     | 214 |
| 6  | 0.413               | 0.395               | 245                     | 241 |
| 7  | 0.409 <sup>a)</sup> | 0.324 <sup>b)</sup> | 128                     | 170 |
| 8  | 0.908 <sup>a)</sup> | 0.766 <sup>a)</sup> | 231                     | 251 |
| 9  | 0.467               | 0.450               | 130                     | 119 |
| Spiked level ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )             | 0.5                 |                     | 260                     |     |
| Spiked level as 2,4-D<br>( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) | 0.444               |                     | 231                     |     |
| Mean value <sup>c)</sup> (mg/kg)                     | 0.424               |                     | 192                     |     |
| Recovery <sup>c)</sup> (%)                           | 95.5                |                     | 82.9                    |     |
| RSD <sub>r</sub> <sup>d)</sup> (%)                   | 6.5                 |                     | 6.2                     |     |
| RSD <sub>R</sub> <sup>e)</sup> (%)                   | 8.7                 |                     | 21                      |     |
| PRSD <sub>R</sub> <sup>f)</sup> (%)                  | 18                  |                     | 7.3                     |     |
| HorRat   | 0.48                |                     | 2.9                     |     |

- a) Data excluded by the 1st Cochran test
- b) These data were included although it was an outlier by the 2nd Cochran test, since the results of RSD<sub>r</sub> and RSD<sub>R</sub> were good.
- c) Wheat:  $n=16$ ; Ryegrass hay:  $n=18$
- d) Relative standard deviation of repeatability within laboratory
- e) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories
- f) 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<br>(i.d.×length, particle size) |
|----------|----------------------------------|---|
| 1        | LC: Waters ACQUITY UPLC          | Agilent Technologies                      |
|          | MS/MS: Waters                    | ZORBAX Eclipse XDB-C18                    |
|          | ACQUITY TQD                      | (2.1 mm×150 mm, 5 µm)                     |
| 2        | LC: Waters ACQUITY UPLC          | Agilent Technologies                      |
|          | MS/MS: Waters                    | ZORBAX Eclipse XDB-C18                    |
|          | ACQUITY TQD                      | (2.1 mm×150 mm, 5 µm)                     |
| 3        | LC: Waters ACQUITY UPLC          | Waters                                    |
|          | MS/MS: Waters                    | Atlantis T3                               |
|          | ACQUITY Xevo TQD LC/MS/MS System | (2.1 mm×150 mm, 3 µm)                     |
| 4        | LC: Waters ACQUITY UPLC          | Waters                                    |
|          | MS/MS: Waters                    | ACQUITY UPLC® BEH C18                     |
|          | ACQUITY TQD                      | (2.1 mm×150 mm, 1.7 µm)                   |
| 5        | LC: Waters MassLynx              | Kanto Chemical                            |
|          | MS/MS: Waters                    | Mightysil RP-18GP                         |
|          | ACQUITY TQD                      | (2.0 mm×150 mm, 3 µm)                     |
| 6        | LC: Waters ACQUITY UPLC          | Agilent Technologies                      |
|          | MS/MS: Waters                    | ZORBAX Eclipse XDB-C18                    |
|          | Quattro premier XE               | (2.1 mm×150 mm, 5 µm)                     |
| 7        | LC: Shimadzu Mexera X2           | Waters                                    |
|          | MS/MS: Shimadzu                  | Atlantis T3                               |
|          | LC-MS 8040                       | (2.1 mm×150 mm, 3 µm)                     |
| 8        | LC: Agilent Technologies 1200    | GL Sciences                               |
|          | MS/MS: Agilent Technologies      | Inertsil ODS-SP                           |
|          | 6410 Triple Quad LC/MS           | (2.1 mm×150 mm, 5 µm)                     |
| 9        | LC: Agilent Technologies 1200    | Kanto Chemical                            |
|          | MS/MS: AB SCIEX                  | Mightysil RP-18GP                         |
|          | API-3200 Q Trap                  | (2.0 mm×150 mm, 5 µm)                     |

#### 4 まとめ

穀類及び乾牧草中に残留する 2,4-D 及びその関連物質について、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、以下の結果が得られ、穀類においては適用が可能であった。

- 1) 検量線は、0.004~0.4 ng/mL (注入量として 0.02~2 ng) の範囲で直線性を示した。
- 2) 2,4-D 関連物質のうち、2,4-D エチルを選定し、検討したところ良好な結果が得られたこと及び最も極性の低い 2,4-D ブトキシエチルについて、本法の条件で良好に加水分解が行われていることから、本法は全ての 2,4-D 関連物質に適用可能であると考えられた。
- 3) 本法に従って得られた SRM クロマトグラムでは、10 種類の飼料原料において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、小麦及びライ麦に 0.5 及び 0.05 mg/kg 相当量、とうもろこしに 0.05 及び 0.01 mg/kg 相当量を添加した試料並びに 2,4-D エチルとして、小麦及びライ麦に 0.5 及び 0.05 mg/kg

相当量，とうもろこしに 0.05 及び 0.01 mg/kg 相当量，ライグラス乾草に 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) 本法による定量下限は試料中で 0.01 mg/kg（乾牧草は 10 mg/kg），検出下限は 0.003 mg/kg（乾牧草は 3 mg/kg）であった．
- 6) 小麦及びライグラス乾草に 2,4-D 及び 2,4-D エチルを添加（試料中に 2,4-D 及び 2,4-D エチルとして 0.5 及び 260 mg/kg 相当量）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，小麦においては良好な室間再現精度が得られたが，ライグラス乾草においては良好な室間再現精度が得られなかった．

## 謝 辞

共同試験に参加していただいた一般財団法人日本食品分析センター多摩研究所，一般社団法人日本科学飼料協会科学飼料研究センター及び全国農業共同組合連合会飼料畜産中央研究所品質管理研究室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集：最新農薬の残留分析法，24 (1995).(中央法規出版株式会社).
- 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) 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).
- 6) 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).
- 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) 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).
- 9) Horwitz, W., Protocol for Design, Conduct and Interpretation of Method - Performance Studies, Pure & appl. Chem., 67(2), 331-343 (1995).
- 10) 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