

3 飼料用イネ中のオキサジクロメホン、ジメタメトリン及びピリブチカルブ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

吉村 哲史*

Simultaneous Determination of Oxaziclomefone, Dimethametryn and Pyributicarb in Rice Straw, Whole-crop Rice Silage and Paddy Rice for Feed by LC-MS/MS

Satoshi YOSHIMURA*

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

An analytical method was developed to simultaneously determine the levels of dimethametryn, oxaziclomefone and pyributicarb in rice straw, whole-crop rice silage and paddy rice for feed using liquid chromatograph-electrospray ionization-tandem mass spectrometer (LC-ESI-MS/MS).

After addition of water to samples, the above pesticides 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 InertSep Slim-J C-18B (GL Sciences Inc.; Tokyo, Japan) and injected into the LC-ESI-MS/MS for determination of the levels of the three pesticides. LC separation was carried out on an ODS column (ZORBAX Eclipse XDB-C18, 2.1 mm i.d. × 150 mm, 5 μm from Agilent Technologies Inc.; Santa Clara, CA, USA) using a gradient with 2 mmol/L ammonium acetate solution and acetonitrile as a mobile phase. MS/MS analysis was performed in the selected reaction monitoring (SRM) mode.

Spike tests were conducted on rice straw, whole-crop rice silage, and paddy rice. Rice straw was spiked with 0.2 or 0.01 mg/kg of dimethametryn, 0.3 or 0.01 mg/kg of oxaziclomefone and 0.1 or 0.01 mg/kg of pyributicarb. Whole-crop rice silage and paddy rice were spiked with each compound at 0.1 or 0.01 mg/kg, respectively. The mean recoveries ranged from 88.3 % to 105 % for dimethametryn, 91.7 % to 100 % for oxaziclomefone and 84.1 % to 104 % for pyributicarb. Three times repeatability in terms of relative standard deviations (RSD_r) were not more than 4.7 % for dimethametryn, 7.1 % for oxaziclomefone and 7.8 % for pyributicarb.

A collaborative study was conducted in eight laboratories, using rice straw, whole-crop rice silage, and paddy rice spiked with dimethametryn, oxaziclomefone and pyributicarb in the following quantities: 0.1 mg/kg for rice straw, 0.04 mg/kg for whole-crop rice silage, and 0.05 mg/kg for paddy rice. The resulting range of mean recovery, repeatability and reproducibility in terms of relative standard deviations (RSD_r and RSD_R) and HorRat, respectively, were 94.1 to 96.4 % and not more than 3.8 %, 4.0 %, and 0.18 for dimethametryn, 94.1 to 96.8 % and not more than 7.4 %, 7.4 %, and 0.33 for oxaziclomefone, and 81.4 to 88.0 % and not more than 6.6 %, 7.0 %, and 0.32 for pyributicarb.

This method was validated and established for use in the inspection of oxaziclomefone, dimethametryn and pyributicarb in rice straw, whole-crop rice silage and paddy rice for feed.

Key words: dimethametryn; oxaziclomefone; pyributicarb; liquid chromatograph-tandem mass spectrometer (LC-MS/MS); electrospray ionization (ESI); rice for feed; rice straw; whole-crop rice silage; paddy rice; collaborative study

キーワード：ジメタメトリン；オキサジクロメホン；ピリブチカルブ；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；飼料用イネ；稲わら；稲発酵粗飼料；粃米；共同試験

* 独立行政法人農林水産消費安全技術センター福岡センター

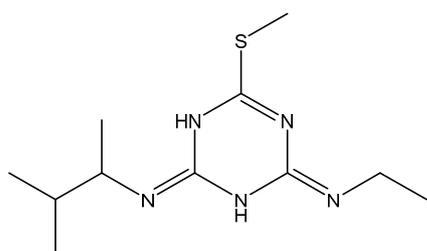
1 緒 言

ジメタメトリンはトリアジン系除草剤として、オキサジクロメホンはオキサジノン系水稲用・芝用除草剤として、ピリブチカルブはカーバメート系ホルモン型除草剤として、それぞれ日本国内で農薬登録されている¹⁾。

我が国では、飼料の有害物質の指導基準の制定について²⁾において、ジメタメトリンの残留基準値は稲わらで 0.2 mg/kg, オキサジクロメホンの残留基準値は稲わらで 0.3 mg/kg 及び稲発酵粗飼料（以下「WCS」という。）で 0.1 mg/kg と設定されている。定量法としては、厚生労働省通知によりガスクロマトグラフ質量分析計による一斉試験法³⁾等が示されているが、飼料に適用できる定量法はなかった。

今回、一般財団法人日本食品分析センターが、平成 22 年度の飼料中の有害物質等分析法委託事業において開発した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³⁾（以下「JFRL 法」という。）を基に、ジメタメトリン、オキサジクロメホン及びピリブチカルブ（以下「オキサジクロメホン等」という。）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。）による同時定量法について、飼料分析基準⁴⁾への適用の可否を検討したので、その概要を報告する。

参考にオキサジクロメホン等の化学構造式等を Fig. 1 に示した。

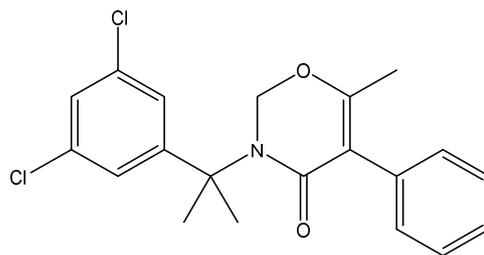


Dimethametryn

*N*₁-(1,2-dimethylpropyl)-*N*₂-ethyl-6-methylthio-1,3,5-triazine-2,4-diamine

C₁₁H₂₁N₅S MW: 255.4

CAS No.: 22936-75-0

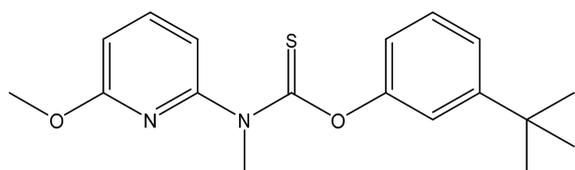


Oxaziclomefone

3-[1-(3,5-dichlorophenyl)-1-methylethyl]-3,4-dihydro-6-methyl-5-phenyl-2*H*-1,3-oxazin-4-one

C₂₀H₁₉Cl₂NO₂ MW: 376.3

CAS No.: 153197-14-9



Pyributicarb

o-3-*tert*-butylphenyl-6-methoxy-2-pyridyl(methyl)thiocarbamate

C₁₈H₂₂N₂O₂S MW: 330.4

CAS No.: 88678-67-5

Fig. 1 Chemical structures of dimethametryn, oxaziclomefone and pyributicarb

2 実験方法

2.1 試料

稲わら及び粳米はそれぞれ 1 mm の網ふるいを通過するまで粉碎した。WCS は 60 °C で 24 時間乾燥し、更に室内に静置して風乾した後、同様に粉碎した。

2.2 試薬

1) アセトン、アセトニトリルは残留農薬・PCB 試験用を用いた。水は超純水 (JIS K 0211 に定める 5218 の超純水) を用いた。酢酸アンモニウムは試薬特級を用いた。

2) ジメタメトリン標準原液

ジメタメトリン標準品 (関東化学製, 純度 99.6 %) 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, 更に標線まで同溶媒を加えてジメタメトリン標準原液を調製した (この液各 1 mL は, ジメタメトリンとして 0.5 mg ($f=0.996$) を含有する.)。

3) オキサジクロメホン標準原液

オキサジクロメホン標準品 (関東化学製, 純度 99.8 %) 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オキサジクロメホン標準原液を調製した (この液 1 mL は, オキサジクロメホンとして 0.5 mg ($f=0.998$) を含有する.)。

4) ピリブチカルブ標準原液

ピリブチカルブ標準品 (関東化学製, 純度 98.0 %) 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, 更に標線まで同溶媒を加えてピリブチカルブ標準原液を調製した (この液各 1 mL は, ピリブチカルブとして 0.5 mg ($f=0.980$) を含有する.)。

5) 農薬混合標準液

各標準原液各 1 mL を 50 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混合標準原液を調製した (この液 1 mL は, ジメタメトリン, オキサジクロメホン及びピリブチカルブとして各 10 μ g を含有する.)。

使用に際して, 混合標準原液の一定量をアセトニトリル-水 (4+1) で正確に希釈し, 1 mL 中にオキサジクロメホン等としてそれぞれ 0.1, 2, 4, 6, 8 及び 10 ng を含有する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, 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 1690 rpm)

3) オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム: InertSep Slim-J C18-B (充てん剤量 500 mg) ジェールサイエンス製にリザーバーを連結したもの

4) LC-MS/MS:

LC 部: ACQUITY UPLC System Waters 製

MS 部: ACQUITY TQ Detector Waters 製

2.4 定量方法

1) 抽出

分析試料 10.0 g を量って 300 mL の共栓三角フラスコに入れ, 水 30 mL (粳米は 20 mL) を加え, 30 分間静置後, 更にアセトン 120 mL (粳米は 100 mL) を加え, 30 分間振り混ぜて

(280 rpm) 抽出した。200 mL の全量フラスコをブフナー漏斗の下に置き、抽出液をろ紙 (5 種 B) で吸引ろ過した後、先の三角フラスコ及び残さを順次アセトン 50 mL で洗浄し、同様に吸引ろ過した。更に全量フラスコの標線までアセトンを加えた。この液 2 mL を 50 mL のなす形フラスコに正確に入れ、水 20 mL を加えて、カラム処理に供する試料溶液とした。

2) カラム処理

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムをアセトニトリル 5 mL 及び水 5 mL で順次洗浄した。試料溶液をミニカラムに入れ、流速 1 mL/min 程度で吸引して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水-アセトニトリル (3+2) 5 mL ずつで 2 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。10 mL の全量フラスコをミニカラムの下に置き、アセトニトリル-水 (4+1) 9 mL をミニカラムに加え、各農薬を溶出させた。更に全量フラスコの標線まで同溶媒を加え、その液の一定量を 5000×g で 5 分間遠心分離し、上澄み液を LC-MS/MS による測定に供する試料溶液とした。

3) LC-MS/MS による測定

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

Table 1 Operating conditions of LC-MS/MS

Column	ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm i.d.×150 mm, 5 µm), Agilent Technologies
Mobile phase	2 mmol/L Ammonium acetate solution - acetonitrile (4:1) → 15 min → (1:9) (hold for 5 min)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temperature	40 °C
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Mode	Positive
Ion Source temperature	120 °C
Desolvation gas temperature	N ₂ (650 L/h, 350 °C)
Cone gas	N ₂ (50 L/h)
Capillary voltage	3.5 kV

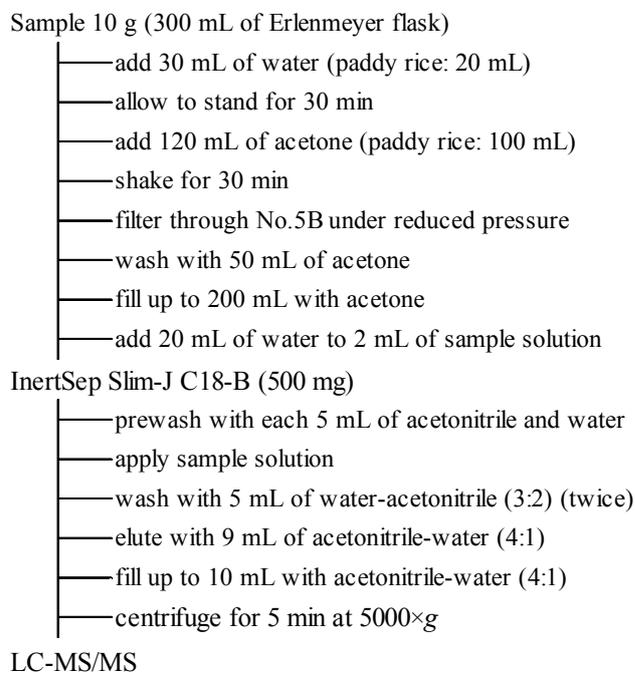
Table 2 MS/MS parameters

Target	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion (<i>m/z</i>)	Qualifier ion (<i>m/z</i>)	Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
Dimethametryn	256	186	-	31	27
		-	68		63
Oxaziclomefone	376	190	-	21	23
		-	161		43
Pyributycarb	331	181	-	16	23
		-	108		39

4) 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、試料中の各農薬量を算出した。

なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。



Scheme1 Analytical procedure for dimethametryn, oxaziclomefone and pyributicarb in rice straw, whole-crop rice silage and paddy rice for feed

3 結果及び考察

3.1 検量線

2.2 の 5)に従って調製した各農薬混合標準液各 5 μL を LC-MS/MS に注入し、得られた SRM クロマトグラムからピーク面積及び高さを用いて検量線を作成した。得られた検量線の一例は、Fig. 2 のとおりであり、オキサジクロメホン等は各 0.1~10 ng/mL 相当量（注入量として 0.0005~0.05 ng 相当量）の範囲で直線性を示した。

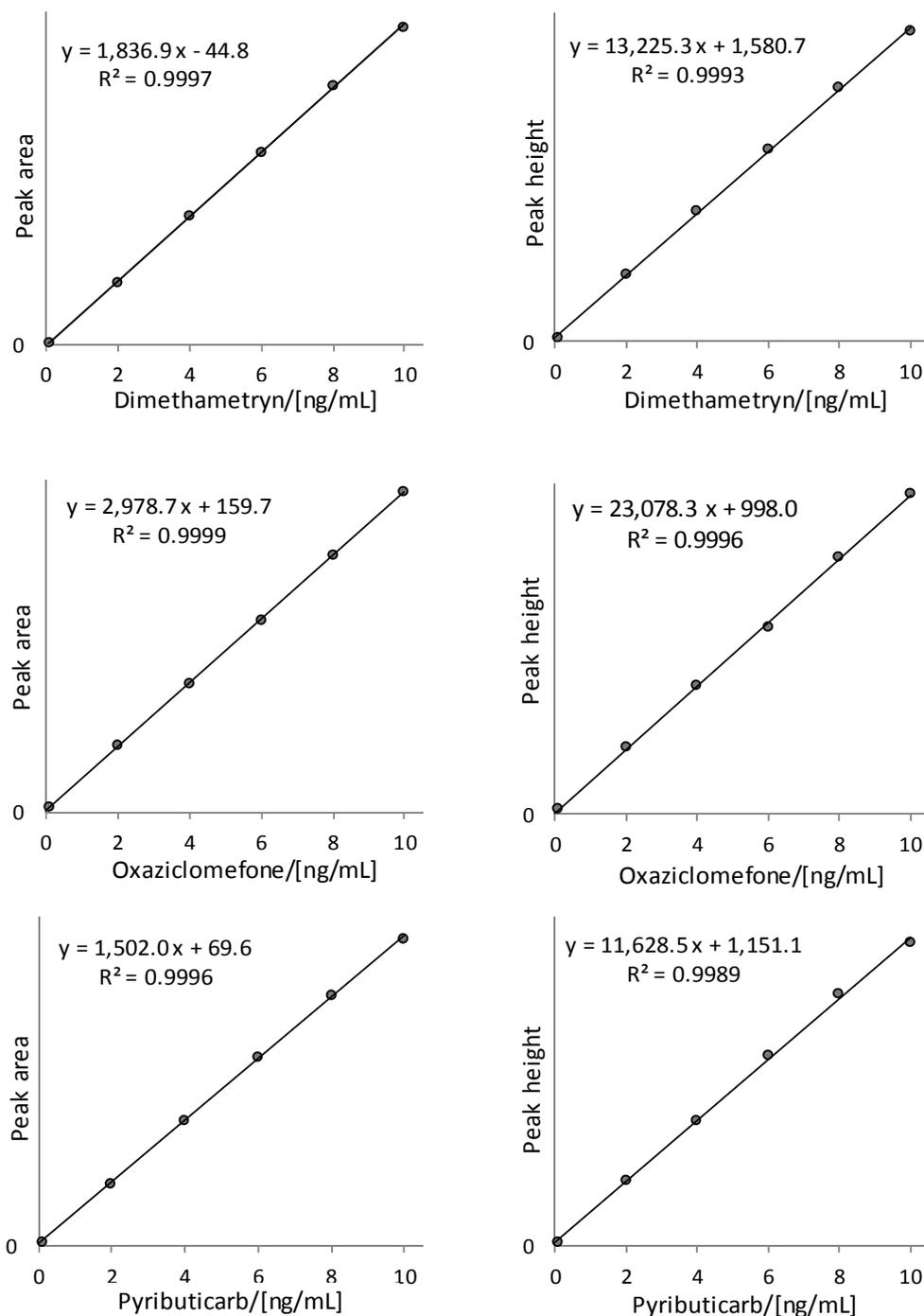


Fig. 2 Calibration curves of dimethametryn, oxaziclomefone and pyributicarb by peak area (left) and peak height (right)

3.2 オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムからの溶出画分の確認

2.4の1)により調製したカラム処理に供する試料溶液にオキサジクロメホン等として0.1 mg/kg相当量を添加（最終試料溶液中で1 ng/mL相当量）し、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムからの溶出画分を確認した。その結果はTable 3のとおりであり、オキサジクロメホン等は洗浄溶媒である水-アセトニトリル（3+2）10 mLの画分では溶出せず、アセトニトリル-水

(4+1) 0~8 mL の画分で全量溶出していた。JFRL 法では 10 mL で溶出させているが、溶出液を受ける容器が 10 mL の全量フラスコであり標線を超えるおそれがあることから、本法では、アセトニトリル-水 (4+1) 9 mL で溶出させた後、全量フラスコの標線まで同溶媒を加え LC-MS/MS による測定に供する試料溶液とした。

Table 3 Elution patterns of dimethametryn, oxaziclomefone, and pyributicarb from InertSep Slim-J C18-B

Feed types	Pesticides	Recovery ^{a)} (%)				Total
		Acetonitrile - water				
		(2:3) 10 mL	(4:1) 0~8 mL	(4:1) 8~9 mL	(4:1) 9~10 mL	
Rice straw	Dimethametryn	0	96.1	0	0	96.1
	Oxaziclomefone	0	106	0	0	106
	Pyributicarb	0	95.8	0	0	95.8
Whole-crop rice silage	Dimethametryn	0	97.9	0	0	97.9
	Oxaziclomefone	0	96.2	0	0	96.2
	Pyributicarb	0	95.9	0	0	95.9
Paddy rice	Dimethametryn	0	98.3	0	0	98.3
	Oxaziclomefone	0	97.1	0	0	97.1
	Pyributicarb	0	96.7	0	0	96.7

a) Mean ($n=3$)

3.3 マトリックス効果の確認

2.4 の 1)及び 2)により調製した稲わら、WCS 及び粳米のブランク試料溶液にオキサジクロメホン等として 0.1 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 1 ng/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、2.2 の 5)に従って調製した同濃度の各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 91.4~105 %であり、オキサジクロメホン等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。

3.4 妨害物質の検討

稲わら、WCS 及び粳米各 1 検体を試料として、本法により調製した試料溶液を LC-MS/MS に注入し、得られた SRM クロマトグラムを確認したところ、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、当該稲わらの SRM クロマトグラムを Fig. 3 に示した。

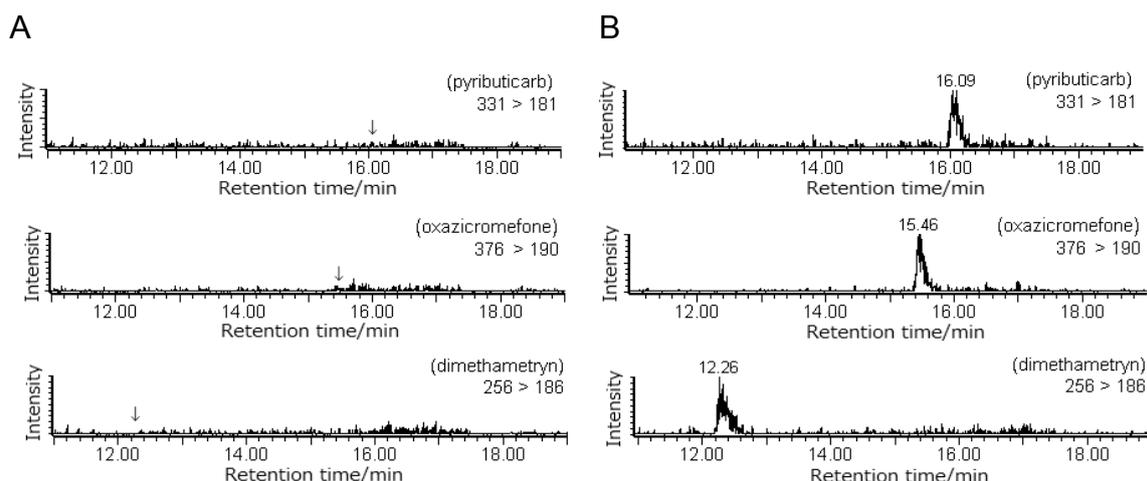


Fig. 3 SRM chromatograms of rice straw (blank) and standard solution

(Arrows indicate the retention times of pesticides.

Scales of y-axis are the same between A and B for each pesticide.)

A: Rice straw

B: Standard solution (0.1 ng/mL: 0.5 pg as each pesticide)

3.5 添加回収試験

2.1 により調製した飼料用イネ（稲わら、WCS 及び粃米）について、ジメタメトリンとして、稲わらに 0.2 及び 0.01 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 2 及び 0.1 ng/mL），WCS に原物換算して 0.1 及び 0.01 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 2.25 及び 0.225 ng/mL），粃米に 0.1 及び 0.01 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 1 及び 0.1 ng/mL），オキサジクロメホンとして、稲わらに 0.3 及び 0.01 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 3 及び 0.1 ng/mL），WCS に原物換算して 0.1 及び 0.01 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 2.25 及び 0.225 ng/mL），粃米に 0.1 及び 0.01 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 1 及び 0.1 ng/mL），ピリブチカルブとして、稲わら及び粃米に 0.1 及び 0.01 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 1 及び 0.1 ng/mL），WCS に原物換算して 0.1 及び 0.01 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 2.25 及び 0.225 ng/mL）それぞれ添加し、本法に従って 3 点併行による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。

また、WCS については原物の水分含有量を 60 %と想定し、原物中濃度への換算は、原物（水分含有量 60 %）中濃度＝風乾物（水分含有量 10 %）中濃度／2.25 の式から求めた。

その結果は Table 4 のとおり、ジメタメトリンについては、平均回収率は 88.3~105 %，その繰返し精度は RSD_r として 4.7 %以下，オキサジクロメホンについては、平均回収率は 91.7~100 %，その繰返し精度は相対標準偏差（ RSD_r ）として 7.1 %以下，ピリブチカルブについては、平均回収率は 84.1~104 %，その繰返し精度は RSD_r として 7.8 %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 4 Recoveries of pesticides

Pesticides	Spiked level (mg/kg)	Feed types					
		Rice straw		Whole-crop rice silage		Paddy rice	
		Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)
Dimethametryn	0.2	92.8	3.4	–	–	–	–
	0.1	–	–	90.8	1.8	98.6	0.6
	0.01	91.0	3.5	105	4.7	88.3	2.2
Oxaziclomefone	0.3	99.0	2.5	–	–	–	–
	0.1	–	–	94.2	2.6	99.5	7.1
	0.01	95.5	3.1	100	4.5	91.7	4.9
Pyributicarb	0.1	84.1	3.9	90.3	5.3	91.2	7.8
	0.01	93.1	1.1	95.5	3.6	104	4.9

a) Mean ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

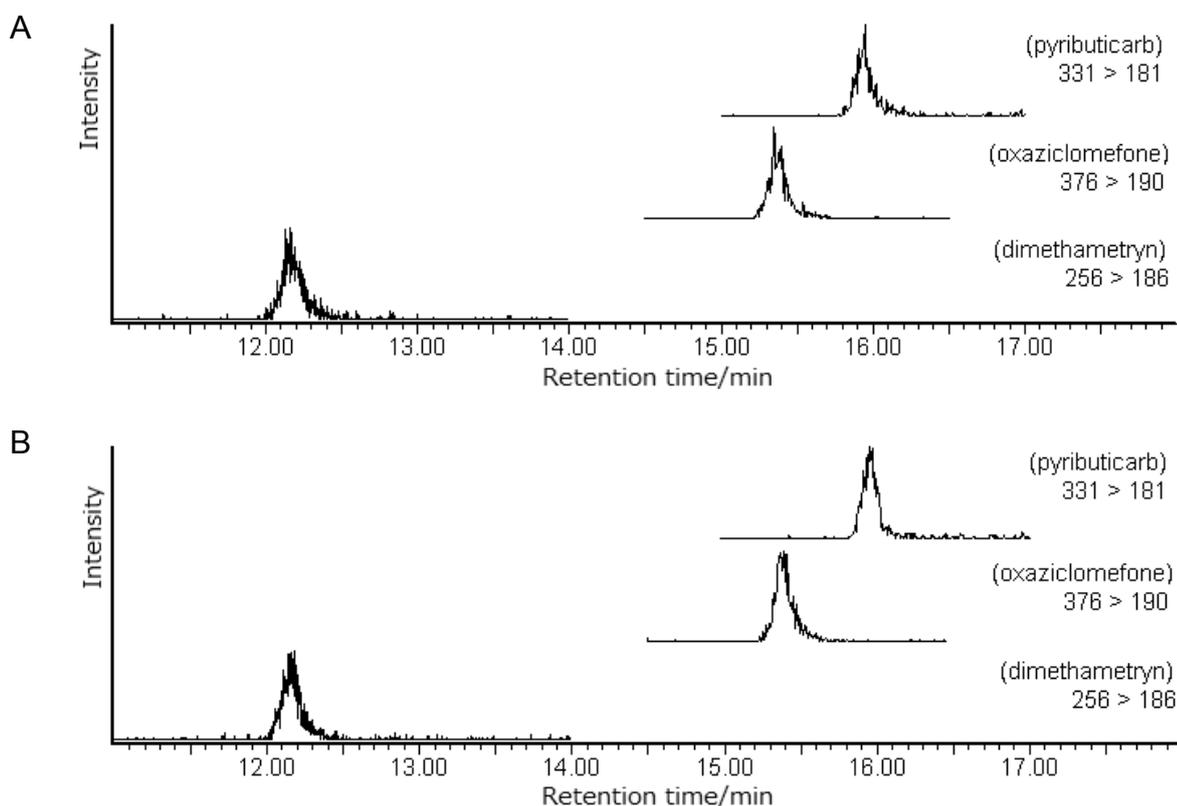


Fig. 4 SRM chromatograms of dimethametryn, oxaziclomefone and pyributicarb

A: Standard solution (The concentration is 1 ng/mL as each pesticide.)

B: Sample solution of paddy rice (spiked at 0.1 mg/kg of each pesticide)

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、飼料用イネにオキサジクロメホン等を添加し、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、得られたピークの SN 比が 10 以上となる濃度は 0.01 mg/kg であり、また、 SN 比が 3 となる濃度は 0.003 mg/kg であったことから、試料（WCS は風乾物）中の定量下限は 0.01 mg/kg、検出下限は 0.003 mg/kg であった。

なお、Table 4 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。

3.7 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、稲わらにオキサジクロメホン等として 0.1 mg/kg 相当量（分析用試料 10 g に対して 1 mL 中に 1 ng を含有する標準液 1 mL 添加）を、WCS に原物換算してオキサジクロメホン等として 0.04 mg/kg 相当量（分析用試料 10 g に対して 1 mL 中に 0.9 ng を含有する標準液 1 mL 添加）を、粳米にオキサジクロメホン等として 0.05 mg/kg 相当量（分析用試料 10 g に対して 1 mL 中に 0.5 ng を含有する標準液 1 mL 添加）を、それぞれ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、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、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 8 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^{5), 6)}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⁷⁾を用いて HorRat を求めた。

結果は Table 5~7 のとおりであった。ジメタメトリンについて、平均回収率は 94.1~96.4 %、 RSD_r は 3.8 % 以下、 RSD_R は 4.0 % 以下、HorRat は 0.18 以下であった。オキサジクロメホンについて、平均回収率は 94.1~96.8 %、 RSD_r は 7.4 % 以下、 RSD_R は 7.4 % 以下、HorRat は 0.33 以下であった。ピリブチカルブについて、平均回収率は 81.4~88.0 %、 RSD_r は 6.6 % 以下、 RSD_R は 7.0 % 以下、HorRat は 0.32 以下であった。HorRat がいずれも 0.5 を下回ったが、本分析法がカラムでの精製が 1 回のみと比較的簡便な操作であるためと考えられた。

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 5 Collaborative study results of dimethametryn

Lab. No.	Feed types					
	Rice straw (mg/kg)		Whole-crop rice silage (mg/kg)		Paddy rice (mg/kg)	
1	0.102	0.102	0.0386	0.0397	0.0510	0.0484
2	0.0991	0.0992	0.0396	0.0396	0.0507	0.0513
3	0.0882	0.0887	0.0352	0.0361	0.0442	0.0448
4	0.0859	0.0841	0.0360	0.0364	0.0416	0.0440
5	0.0820	0.0883	0.0421	0.0399	0.0501	0.0498
6	0.0952	0.0978	0.0391	0.0368	0.0462	0.0483
7	0.0981	0.0994	0.0348	0.0389	0.0493	0.0488
8	0.0960	0.0988	0.0374	0.0394	0.0507	0.0520
Spiked level (mg/kg)	0.1		0.04		0.05	
Mean value ^{a)} (mg/kg)	0.0941		0.0381		0.0482	
Recovery ^{a)} (%)	94.1		95.3		96.4	
RSD _r ^{b)} (%)	2.1		3.8		2.3	
RSD _R ^{c)} (%)	3.2		4.0		3.2	
PRSD _R ^{d)} (%)	22		22		22	
HorRat	0.15		0.18		0.14	

a) $n=16$

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 6 Collaborative study results of oxaziclomefone

Lab. No.	Feed types					
	Rice straw		Whole-crop rice silage		Paddy rice	
	(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)	
1	0.0974	0.105	0.0381	0.0410	0.0518	0.0478
2	0.0973	0.0930	0.0384	0.0387	0.0509	0.0481
3	0.0905	0.0934	0.0335	0.0344	0.0445	0.0457
4	0.0944	0.0901	0.0366	0.0366	0.0492	0.0476
5	0.0882	0.0972	0.0421	0.0328	0.0482	0.0496
6	0.0930	0.0945	0.0402	0.0373	0.0482	0.0503
7	0.0916	0.0974	0.0349	0.0385	0.0452	0.0465
8	0.0929	0.0977	0.0408	0.0383	0.0509	0.0502
Spiked level (mg/kg)	0.1		0.04		0.05	
Mean value ^{a)} (mg/kg)	0.0946		0.0376		0.0484	
Recovery ^{a)} (%)	94.6		94.1		96.8	
RSD _r ^{b)} (%)	4.1		7.4		3.1	
RSD _R ^{c)} (%)	4.1		7.4		3.3	
PRSD _R ^{d)} (%)	22		22		22	
HorRat	0.19		0.33		0.15	

a) $n=16$

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 pyributicarb

Lab. No.	Feed types					
	Rice straw (mg/kg)		Whole-crop rice silage (mg/kg)		Paddy rice (mg/kg)	
1	0.0816	0.0832	0.0328	0.0327	0.0482	0.0458
2	0.0794	0.0734	0.0320	0.0306	0.0417	0.0383
3	0.0746	0.0787	0.0296	0.0305	0.0401	0.0422
4	0.0824	0.0759	0.0313	0.0320	0.0442	0.0415
5	0.0766	0.0890	0.0311	0.0390	0.0440	0.0498
6	0.0900	0.0886	0.0378	0.0396	0.0495	0.0459
7	0.0809	0.0840	0.0309	0.0339	0.0386	0.0407
8	0.0829	0.0816	0.0342	0.0340	0.0498	0.0439
Spiked level (mg/kg)	0.1		0.04		0.05	
Mean value ^{a)} (mg/kg)	0.0814		0.0333		0.0440	
Recovery ^{a)} (%)	81.4		83.1		88.0	
RSD _r ^{b)} (%)	5.0		6.6		6.1	
RSD _R ^{c)} (%)	5.2		7.0		6.5	
PRSD _R ^{d)} (%)	22		22		22	
HorRat	0.23		0.32		0.30	

a) $n=16$

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 8 Instruments used in the collaborative study

Lab. No.	LC-MS/MS	LC column
		(i.d.×length, particle size)
1	LC: ACQUITY UPLC, Waters	Inertsil ODS-SP, GL Sciences
	MS/MS: Quattro premier XE, Waters	(2.1 mm×150 mm, 5 µm)
2	LC: Nexere X2, Shimadzu	ZORBAX Eclipse XDB-C18,
	MS/MS: LCMS-8040, Shimadzu	Agilent Technologies (2.1 mm×150 mm, 5 µm)
3	LC: 1200, Agilent Technologies	ZORBAX Eclipse XDB-C18,
	MS/MS: 6410 Triple Quad LC/MS, Agilent Technologies	Agilent Technologies (2.1 mm×150 mm, 5 µm)
4	LC: ACQUITY UPLC, Waters	ZORBAX Eclipse XDB-C18,
	MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	Agilent Technologies (2.1 mm×150 mm, 5 µm)
5	LC: ACQUITY UPLC, Waters	ZORBAX Eclipse XDB-C18,
	MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	Agilent Technologies (2.1 mm×150 mm, 5 µm)
6	LC: ACQUITY UPLC, Waters	ZORBAX Eclipse XDB-C18,
	MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	Agilent Technologies (2.1 mm×150 mm, 5 µm)
7	LC: ACQUITY UPLC, Waters	ACQUITY UPLC BEH C18, Waters
	MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	(2.1 mm×150 mm, 1.7 µm)
8	LC: 1200, Agilent Technologies	Mightysil RP-18 GP,
	MS/MS: API-3200, AB Sciex	Kanto Chemical (2.0 mm×150 mm, 5 µm)

4 まとめ

飼料用イネに残留するオキサジクロメホン等について、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、カラム処理における溶出溶媒量を 10 mL から 9 mL に変更し、以下の結果が得られたことから、適用が可能であると考えられた。

1) 検量線は、0.1~10 ng/mL (注入量として 0.0005~0.05 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、ジメタメトリンとして、稲わらに 2 及び 0.1 ng/mL 相当濃度、WCS に 2.25 及び 0.225 ng/mL 相当濃度、粳米に 1 及び 0.1 ng/mL 相当濃度、オキサジクロメホンとして、稲わらに 3 及び 0.1 ng/mL 相当濃度、WCS に 2.25 及び 0.225 ng/mL 相当濃度、粳米に 1 及び 0.1 ng/mL 相当濃度、ピリブチカルブとして、稲わら及び粳米に 1 及び 0.1 ng/mL 相当濃度、WCS に 2.25 及び 0.225 ng/mL 相当濃度とした。

2) 本法に従い得られる試料溶液についてマトリックス効果を確認した結果、オキサジクロメホン等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) 飼料用イネについて、本法に従って得られたクロマトグラムには、定量を妨げるピークは認められなかった。

4) 飼料用イネにジメタメトリンとして 0.1 mg/kg (稲わらは 0.2 mg/kg) 及び 0.01 mg/kg、オキサジクロメホンとして 0.1 mg/kg (稲わらは 0.3 mg/kg) 及び 0.01 mg/kg 相当量、ピリブチカルブと

して 0.1 及び 0.01 mg/kg 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を得た。

- 5) 本法におけるオキサジクロメホン等の定量下限は試料中で 0.01 mg/kg，検出下限は 0.003 mg/kg であった。
- 6) オキサジクロメホン等として，稲わらに 0.1 mg/kg，WCS に 0.04 mg/kg 及び粃米に 0.05 mg/kg 相当量を添加した試料を用いて 8 試験室において本法に従い共同試験を実施したところ，良好な結果を得た。

謝 辞

共同試験に参加していただいた全国農業協同組合連合会飼料畜産中央研究所及び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) 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委託事業（LC-MS/MS 多成分分析法）（2011）。
- 2) 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）。
- 3) 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）。
- 4) 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）。
- 5) Horwitz, W., Protocol for Design, Conduct and Interpretation of Method - Performance Studies, *Pure & Appl. Chem.*, **67**(2), 331-343 (1995)。
- 6) 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.
- 7) Thompson, M., Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria proficiency testing, *Analyst*, **125**, 385-386 (2000)。