

### 3 飼料用イネ中のエスプロカルブ他4成分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\*, 若宮 洋市\*

#### Simultaneous Determination of Esprocarb and 4 Pesticides in Rice Straw, Whole-crop Rice Silage and Paddy Rice for Feed by LC-MS/MS

Satoshi YOSHIMURA\* and Youichi WAKAMIYA\*

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

An analytical method was developed to simultaneously determine the levels of buprofezin, cafenstrole, esprocarb, pyrazolynate and pyrazoxyfen in feed using liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS).

After adding water to samples, buprofezin, cafenstrole, esprocarb, pyrazolynate and pyrazoxyfen 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 Science Inc.; Tokyo, Japan) and injected into the LC-ESI-MS/MS for determination of the levels of five 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 the mobile phase. MS/MS analysis was performed in the selected reaction monitoring (SRM) mode.

Recovery tests were conducted on rice straw, whole-crop rice silage and paddy rice spiked. Rice straw was spiked with 0.01 or 25 mg/kg of buprofezin, 0.01 or 0.2 mg/kg of other pesticides except buprofezin. Whole-crop rice silage was spiked with 0.01 or 15 mg/kg of buprofezin, 0.01 or 0.2 mg/kg of other pesticides except buprofezin. Paddy rice was spiked with 0.01 or 10 mg/kg of buprofezin, 0.01 or 0.02 mg/kg of cafenstrole and esprocarb, 0.01 or 0.1 mg/kg of pyrazolynate and pyrazoxyfen. The mean recoveries ranged from 85.6 % to 101 % for buprofezin, 93.6 % to 103 % for cafenstrole, 88.5 % to 104 % for esprocarb, 90.3 % to 98.8 % for pyrazolynate and 86.2 % to 106 % for pyrazoxyfen. The relative standard deviations of repeatability (RSD<sub>r</sub>) were not more than 7.1% for buprofezin, 5.2 % for cafenstrole, 7.9 % for esprocarb, 7.1 % for pyrazolynate and 5.9 % for pyrazoxyfen.

A collaborative study was conducted in nine laboratories, using rice straw, whole-crop rice silage and paddy rice spiked with buprofezin, cafenstrole, esprocarb, pyrazolynate and pyrazoxyfen in the following quantities: 25 mg/kg of buprofezin and 0.2 mg/kg of other pesticides except buprofezin for rice straw, 15 mg/kg of buprofezin and 0.2 mg/kg of other pesticides except buprofezin for whole-crop rice silage, and 10 mg/kg of buprofezin and 0.02 mg/kg of cafenstrole and esprocarb and 0.1 mg/kg of pyrazolynate and pyrazoxyfen for paddy rice. For each pesticide, the resulting range of mean recoveries, repeatability and reproducibility in the terms of relative standard deviations (RSD<sub>r</sub> and RSD<sub>R</sub>) and HorRat, respectively, were 90.5 % to 97.6 % and not more than 4.4 %, 11 % and 1.1 for buprofezin, 95.8 % to 97.0 % and not more than 7.1 %, 9.6 % and 0.46 for cafenstrole, 88.4 to 94.0 % and not more than 8.0 %, 10 % and 0.49 for esprocarb, 91.0 % to 99.3 % and not more than 5.2 %, 15 % and 0.71 for pyrazolynate, and 88.3 % to 94.2 % and not more than 4.0 %, 13 % and 0.65 for pyrazoxyfen.

\* 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

This method was validated and established for use in the inspection of buprofezin, cafenstrole, esprocarb, pyrazolynate and pyrazoxyfen in rice straw, whole-crop rice silage and paddy rice for feed.

**Key words:** buprofezin; cafenstrole; esprocarb; pyrazolynate; pyrazoxyfen; 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:** ブプロフェジン; カフェンストロール; エスプロカルブ; ピラゾリネート; ピラゾキシフェン; 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; 飼料用イネ; 稲わら; 稲発酵粗飼料; 粃米; 共同試験

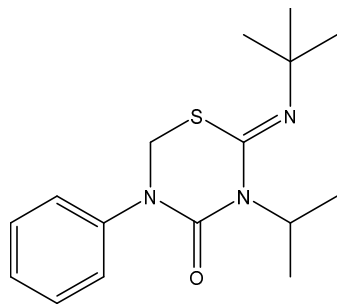
## 1 緒 言

ブプロフェジンはチアジアジン系の殺虫剤として<sup>1)</sup>, カフェンストロールはトリアゾール系の一年生イネ科雑草向け除草剤として<sup>2)</sup>, エスプロカルブはチオカーバメート系除草剤として<sup>3)</sup>, ピラゾリネート及びピラゾキシフェンはピラゾール系水稻用の除草剤として<sup>4), 5)</sup>, 日本国内でそれぞれ農薬登録されている。

我が国では, 飼料の有害物質の指導基準<sup>6)</sup>の改正(平成21年1月29日)により, 飼料用イネ(稲わら, 稲発酵粗飼料及び粃米)について残留農薬の指導基準値が追加設定され, 上記5成分のうちブプロフェジンのみ管理基準値が設定されており, 稲わらで25 mg/kg, 稲発酵粗飼料(以下「WCS」という。)で15 mg/kg 及び粃米で10 mg/kg となっている。その他の農薬については飼料中の基準値は設定されていない。これら農薬の定量法としては, 厚生労働省通知により, ガスクロマトグラフ質量分析計や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。)による試験法<sup>7)</sup>等が示されているが, 飼料に適用できる分析法の開発が急務であった。

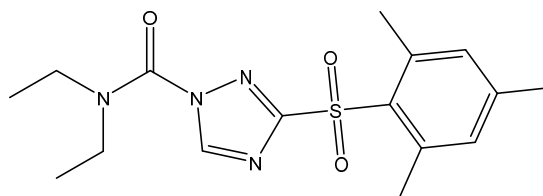
今回, 財団法人日本食品分析センターが, 平成21年度及び平成24年度の飼料中の有害物質等分析法委託事業において開発した液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による定量法<sup>8), 9)</sup>(以下「JFRL法」という。)を基に, ブプロフェジン, カフェンストロール, エスプロカルブ, ピラゾリネート及びピラゾキシフェン(以下「ブプロフェジン等」という。)のLC-MS/MSによる同時定量法について, 飼料分析基準<sup>10)</sup>への適用の可否を検討したので, その概要を報告する。

参考にブプロフェジン等の化学構造式等を Fig. 1 に示した。



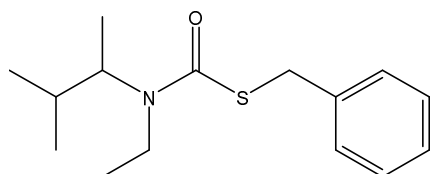
### Buprofezin

2-*tert*-butylimino-3-isopropyl-5-phenyl-  
1,3,5-thiadiazinan-4-one  
 $C_{16}H_{23}N_3OS$  MW : 305.4  
CAS No.: 69327-76-0



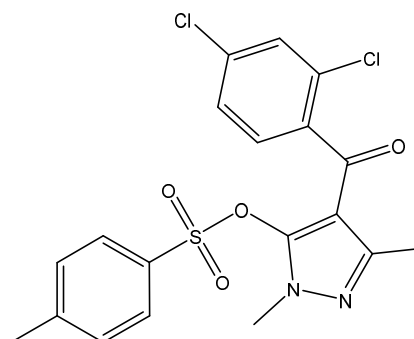
### Cafenstrole

*N,N*-diethyl-3-mesitylsulfonyl-1*H*-1,2,4-  
triazole-1-carboxamide  
 $C_{16}H_{22}N_4O_3S$  MW : 350.4  
CAS No.: 125306-83-4



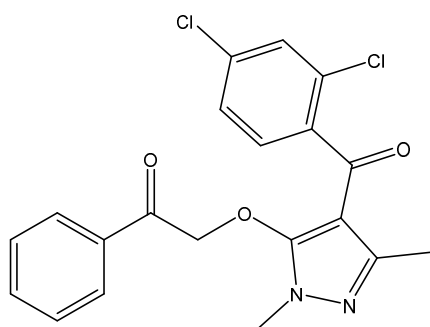
### Esprocarb

*S*-benzyl(*RS*)-1,2-  
dimethylpropyl(ethyl)thiocarbamate  
 $C_{15}H_{23}NOS$  MW : 265.4  
CAS No.: 85785-20-2



### Pyrazolynate

4-(2,4-dichlorobenzoyl)-1,3-  
dimethylpyrazol-5-yl toluene-4-sulfonate  
 $C_{20}H_{16}Cl_2N_2O_3$  MW : 403.3  
CAS No.: 58011-68-0



### Pyrazoxyfen

2-[4-(2,4-dichlorobenzoyl)-1,3-  
dimethylpyrazol-5-yl oxy]acetophenone  
 $C_{20}H_{16}Cl_2N_2O_3$  MW : 403.3  
CAS No.: 71561-11-0

Fig. 1 Chemical structures of buprofezin, cafenstrole, esprocarb, pyrazolynate and pyrazoxyfen

## 2 実験方法

### 2.1 試料

稲わら及び粃米はそれぞれ 1 mm のスクリーンを装着した粉碎機で粉碎した。WCS は 60 °C で 6 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 の 5218 に定義された超純水) を用いた。酢酸アンモニウムは試薬特級を用いた。

2) 各農薬標準品

ブプロフェジン, カフェンストロール, エスプロカルブ, ピラゾリネート及びピラゾキシフェンの標準品は, Table 1 に示した供給業者, 純度のものを用いた。

3) 各農薬標準原液

農薬標準品各 25 mg を正確に量ってそれぞれ 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各農薬標準原液を調製した (これらの液各 1 mL は, 各農薬として 0.5 mg を含有する。)

4) 農薬混合標準液

各農薬標準原液各 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, 各農薬としてそれぞれ 10 µg 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 中に各農薬としてそれぞれ 0.05, 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。

Table 1 Pesticide standards used in this study

Pesticides	Manufacturers	Purity (%)
Buprofezin	Wako Pure Chemical Industries	99.4
Cafenstrole	Wako Pure Chemical Industries	99.6
Esprocarb	Kanto Chemical	99.8
Pyrazolynate	Kanto Chemical	100
Pyrazoxyfen	Kanto Chemical	100

### 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) (粃米)
- 2) 乾牧草用粉碎機 : SM-100 Retsch 製 (1 mm スクリーン, 回転数 (仕様) 1690 rpm) (粃米以外)
- 3) 振とう機 : SR-2DW タイテック製 (使用時振動数 280 rpm)
- 4) 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) ジーエルサイエンス製にリザーバーを連結したもの
- 5) LC-MS/MS :  
 LC 部 : ACQUITY UPLC System Waters 製  
 MS 部 : ACQUITY TQD 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（粃米は 20 mL）を加え、30 分間静置後、更にアセトン 120 mL（粃米は 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 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、試料溶液をアセトニトリル-水（4+1）で 500 倍に希釈した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（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	ZORBAX Eclipse XDB C18, Agilent Technologies (2.1 mm i.d.×150 mm, 5 μm)
Mobile phase	2 mmol/L Ammonium acetate solution - acetonitrile (4:1) → 15 min → (1:9) (hold for 5 min)→(4:1) (hold for 10 min)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temperature	40 °C
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Mode	Positive
Source temperature	120 °C
Desolvation gas	N <sub>2</sub> (650 L/h, 350 °C)
Cone gas	N <sub>2</sub> (50 L/h)
Collision gas	Ar (0.25 mL/min)
Capillary voltage	3.5 kV

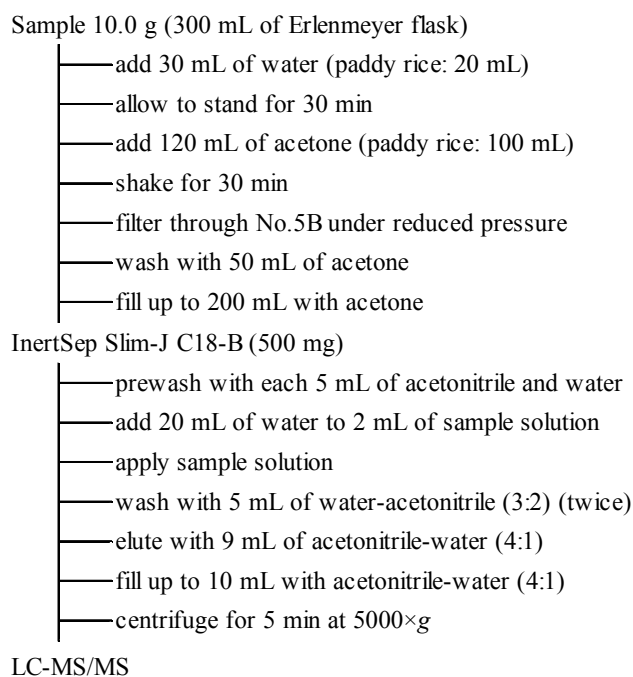
Table 3 MS/MS parameters

Target	Precursor ion ( <i>m/z</i> )	Product ion		Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
		Quantifier ( <i>m/z</i> )	Qualifier ( <i>m/z</i> )		
Buprofezin	306	201	—	35	14
		—	116		18
Cafenstrole	351	100	—	20	16
		—	72		36
Esprocarb	266	91	—	35	25
		—	71		20
Pyrazolynate	439	91	—	45	37
		—	173		19
Pyrazoxyfen	403	91	—	45	35
		—	105		23

## 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 esprocarb and 4 pesticides 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 4) に従って調製した各農薬混合標準液各 5  $\mu$ 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 のとおりであり、ブプロフェジン等は各 0.05~10 ng/mL（注入量として 0.00025~ 0.05 ng 相当量）の範囲で直線性を示した。

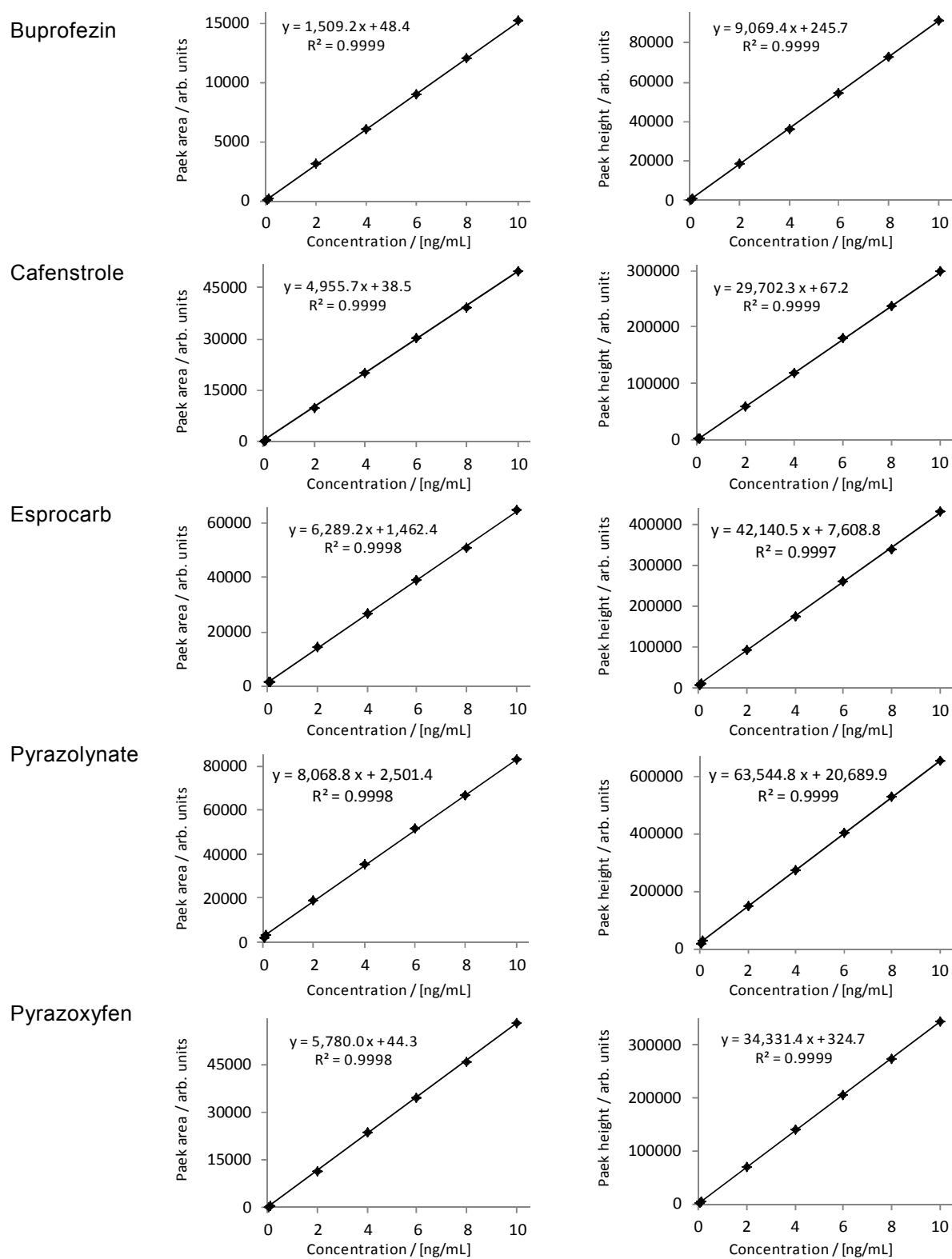


Fig. 2 Calibration curves of buprofezin, cafenstrole, esprocarb, pyrazolynate and pyrazoxyfen by peak area (left) and peak height (right)

### 3.2 オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムにおける溶出画分の確認

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ブプロフェジン等として 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 4 のとおりであり、ブプロフェジン等はアセトニトリル-水（4+1）8 mL で全量溶出していた。JFRL 法では 10 mL で溶出させているが、溶出液の受器が 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 4 Elution pattern from InertSep Slim-J C18-B

Feed types	Pesticides	Recovery <sup>a)</sup> (%)				Total
		acetonitrile-water				
		(2:3) 10 mL	(4:1) 0~8 mL	(4:1) 8~9 mL	(4:1) 9~10 mL	
Rice straw	Buprofezin	0	90.4	0	0	90.4
	Cafenstrole	0	97.4	0	0	97.4
	Esprocarb	0	95.8	0	0	95.8
	Pyrazolynate	0	89.0	0	0	89.0
	Pyrazoxyfen	0	101	0	0	101
Whole-crop rice silage	Buprofezin	0	91.3	0	0	91.3
	Cafenstrole	0	102	0	0	102
	Esprocarb	0	99.8	0	0	99.8
	Pyrazolynate	0	102	0	0	102
	Pyrazoxyfen	0	98.6	0	0	98.6
Paddy rice	Buprofezin	0	94.4	0	0	94.4
	Cafenstrole	0	101	0	0	101
	Esprocarb	0	105	0	0	105
	Pyrazolynate	0	96.4	0	0	96.4
	Pyrazoxyfen	0	107	0	0	107

a) Mean ( $n=3$ )

### 3.3 マトリックス効果の確認

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ブプロフェジン等として 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 3)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 83~109 %であり、各農薬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 2 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、各試料において定量を妨げるピーク



は認められなかった。なお、稲わらにおいてエスプロカルブのピークが認められた。検出したピークは、定量イオンと確認イオンの強度比からエスプロカルブと判断した。

なお、当該稲わらの SRM クロマトグラムを Fig. 3 に示した。

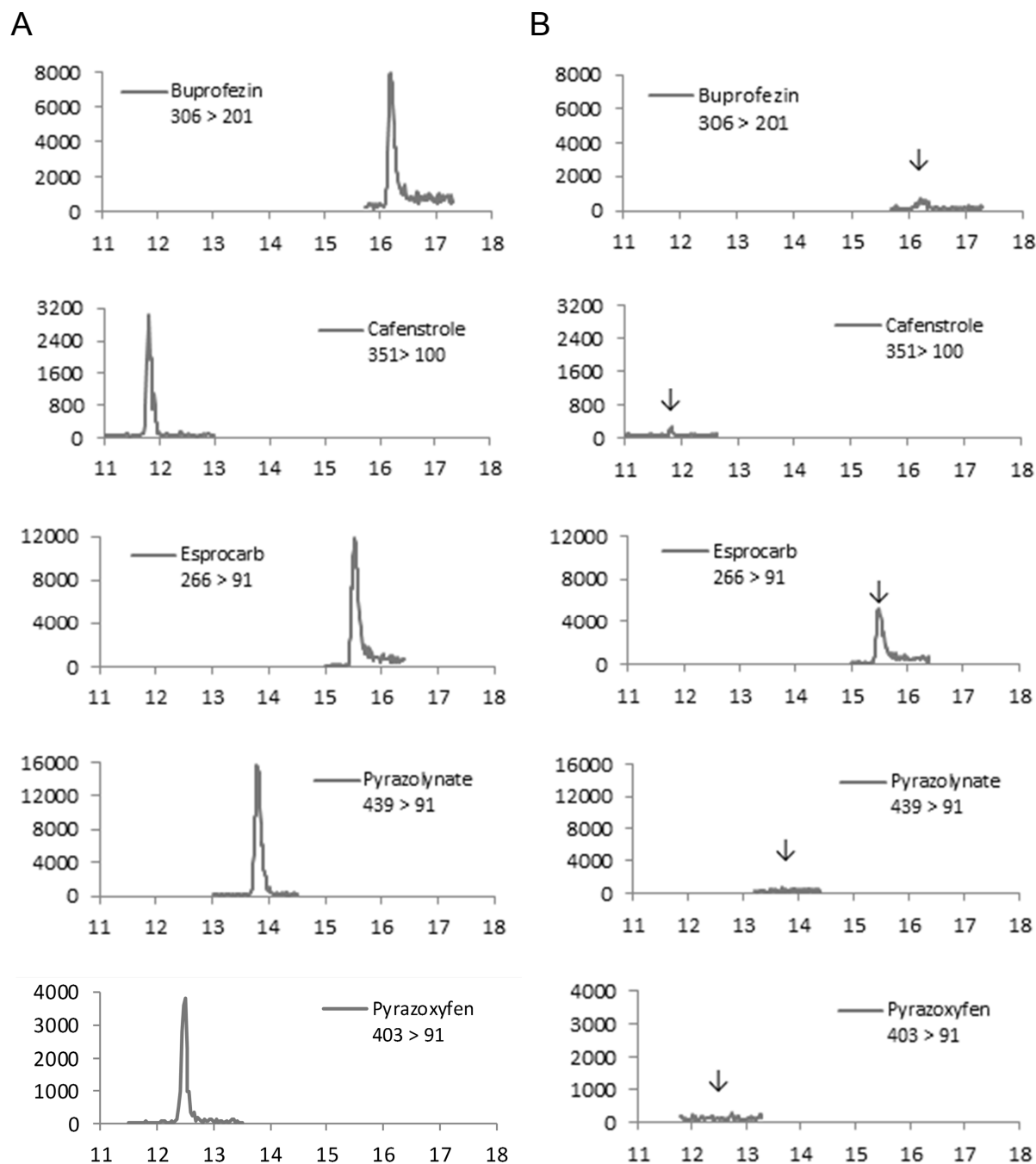


Fig. 3 Selected reaction monitoring chromatograms of blank rice straw and standard solution (Vertical axis: Intensity (unit: arbitrary units) / Horizontal axis: Retention time (unit: min)) (Arrows indicate the retention time of pesticides.)

A: Standard solution (0.1 ng/mL: 0.0005 ng as each pesticide)

B: Rice straw

### 3.5 添加回収試験

飼料用イネについて、ブプロフェジンとして、稲わらに 0.01 及び 25 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で各 0.1 及び 0.5 ng/mL 相当量），WCS に原物中に換算して 0.01 及び 15 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で各 0.225 及び 0.675 ng/mL 相当量），粳米に 0.01 及び 10 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で各 0.1 及び 0.2 ng/mL 相当量），カフェンストロール及びエスプロカルブとして、稲わらに 0.01 及び 0.2 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で各 0.1 及び 2 ng/mL 相当量），WCS に原物中に換算して 0.01 及び 0.2 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で各 0.225 及び 4.5 ng/mL 相当量），粳米に 0.01 及び 0.02 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で各 0.1 及び 0.2 ng/mL 相当量），ピラゾリネート及びピラゾキシフェンとして、稲わらに 0.01 及び 0.2 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で各 0.1 及び 2 ng/mL 相当量），WCS に原物中に換算して 0.01 及び 0.2 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で各 0.225 及び 4.5 ng/mL 相当量），粳米に 0.01 及び 0.1 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で各 0.1 及び 1 ng/mL 相当量），それぞれ添加し，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。

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 5 のとおり，ブプロフェジンについては平均回収率は 85.6~101 %，その繰返し精度は相対標準偏差（ $RSD_r$ ）として 7.1 %以下，カフェンストロールについては平均回収率は 93.6~103 %，その繰返し精度は  $RSD_r$  として 5.2 %以下，エスプロカルブについては平均回収率は 88.5~104 %，その繰返し精度は  $RSD_r$  として 7.9 %以下，ピラゾリネートについては平均回収率は 90.3~98.8 %，その繰返し精度は  $RSD_r$  として 7.1 %以下，ピラゾキシフェンについては平均回収率は 86.2~106 %，その繰返し精度は  $RSD_r$  として 5.9 %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 5 Recovery for pesticides

Pesticides	Spiked level (mg/kg)	Feed types					
		Rice straw		Whole-crop rice silage		Paddy rice	
		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> (%)
Buprofezin	0.01	90.0	7.1	95.0	1.7	101	3.5
	10	—	—	—	—	99.9	2.4
	15	—	—	85.6	3.6	—	—
	25	99.3	5.2	—	—	—	—
Cafenstrole	0.01	93.6	5.2	98.1	2.4	96.6	3.3
	0.02	—	—	—	—	98.0	4.2
	0.2	94.9	3.1	103	2.1	—	—
Esprocarb	0.01	97.0	4.7	104	1.3	92.4	6.2
	0.02	—	—	—	—	88.5	7.9
	0.2	98.0	4.4	103	1.9	—	—
Pyrazolynate	0.01	97.5	1.8	92.0	7.1	96.7	3.2
	0.1	—	—	—	—	98.8	5.3
	0.2	93.7	3.6	90.3	6.3	—	—
Pyrazoxyfen	0.01	88.3	5.9	97.6	2.0	86.5	1.3
	0.1	—	—	—	—	86.2	5.0
	0.2	92.6	3.1	106	1.2	—	—

—: Not tested

a) Mean ( $n=3$ )

b) Relative standard deviation of repeatability

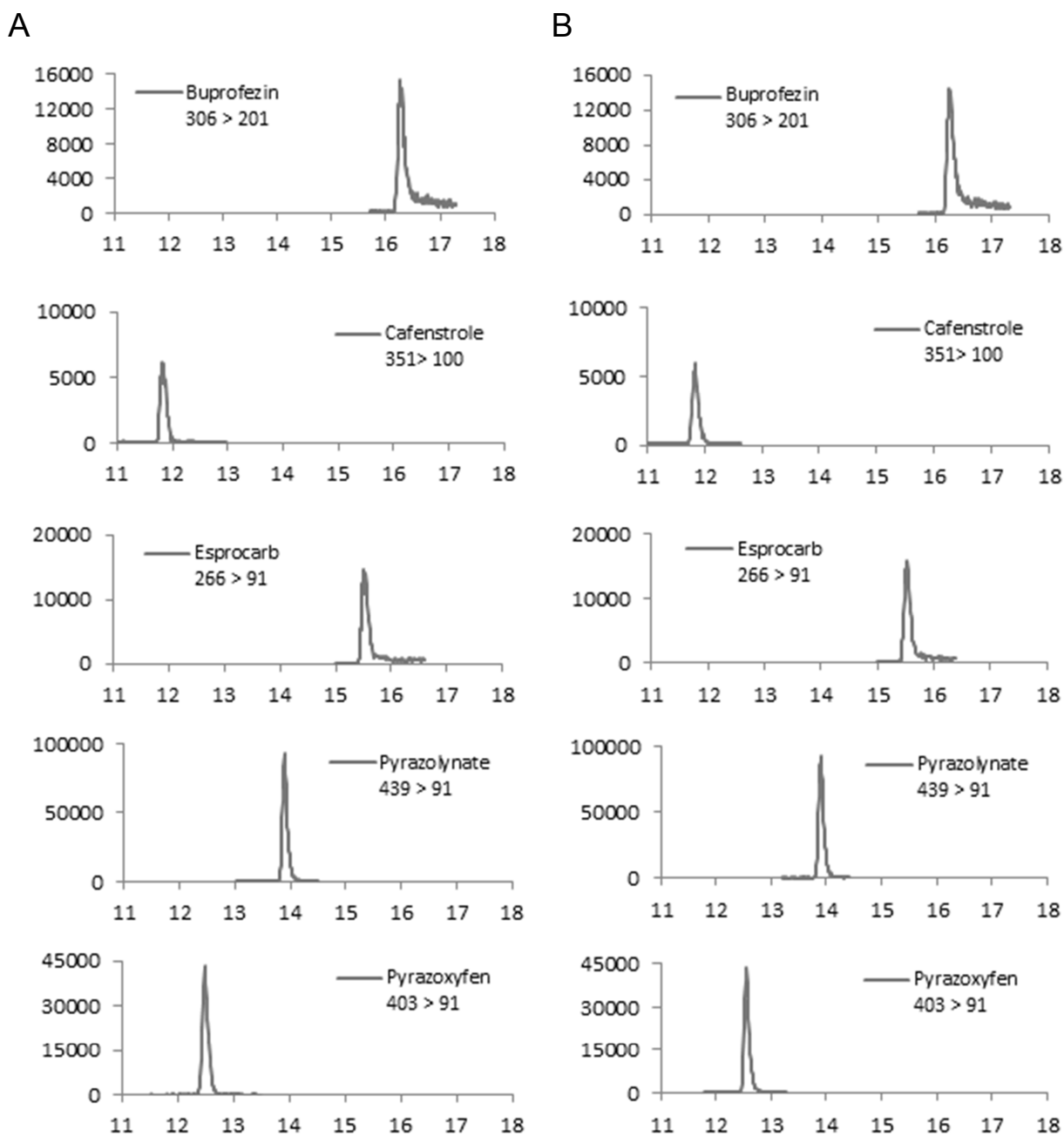


Fig. 4 Selected reaction monitoring chromatograms of each pesticide  
(Vertical axis: Intensity (unit: arbitrary units) / Horizontal axis: Retention time (unit: min))

A: Standard solution

Buprofezin, cafenstrole and esprocarb (0.2 ng/mL: 0.001 ng as each pesticide)

Pyrazolynate and pyrazoxyfen (1 ng/mL: 0.005 ng as each pesticide)

B: Sample solution of paddy rice

Spiked at 10 mg/kg of buprofezin (0.2 ng/mL as buprofezin)\*, 0.02 mg/kg of cafenstrol and esprocarb (0.2 ng/mL as each pesticide), and 0.1 mg/kg of pyrazolynate and pyrazoxyfen (1 ng/mL as each pesticide)

\* buprofezin: diluted sample solution 500-fold with acetonitrile-water(4:1)

### 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、飼料用イネにブプロフェジン等を添加し、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 5 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、稲わらにブプロフェジンとして25 mg/kg相当量並びにカフェンストロール、エスプロカルブ、ピラゾリネート及びピラゾキシフェンとしてそれぞれ0.2 mg/kg相当量（分析用試料10 gに対して1 mL中にブプロフェジン250 µg並びにカフェンストロール、エスプロカルブ、ピラゾリネート及びピラゾキシフェン各2 µgを含有する混合標準液を1 mL添加）を、WCS（風乾物）にブプロフェジンとして33.75 mg/kg相当量並びにカフェンストロール、エスプロカルブ、ピラゾリネート及びピラゾキシフェンとしてそれぞれ0.45 mg/kg相当量（分析用試料10 gに対して1 mL中にブプロフェジン337.5 µg並びにカフェンストロール、エスプロカルブ、ピラゾリネート及びピラゾキシフェン各4.5 µgを含有する混合標準液を1 mL添加）を、粳米にブプロフェジンとして10 mg/kg相当量、カフェンストロール及びエスプロカルブとしてそれぞれ0.02 mg/kg並びにピラゾリネート及びピラゾキシフェンとしてそれぞれ0.1 mg/kg相当量（分析用試料10 gに対して1 mL中にブプロフェジン100 µg、カフェンストロール及びエスプロカルブ0.2 µg並びにピラゾリネート及びピラゾキシフェン1 µgを含有する混合標準液を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。

なお、WCS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の式で換算した分析値を報告させることとした。

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、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>11), 12)</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<sub>f</sub>）及び室間再現精度（RSD<sub>R</sub>）を算出し、得られたRSD<sub>R</sub>から、修正Horwitz式<sup>13)</sup>を用いてHorRatを求めた。

結果はTable 6~10のとおりであった。ブプロフェジンについては稲わら、WCS及び粳米について、平均回収率は90.5、92.4及び97.6%、RSD<sub>f</sub>はそれぞれ2.7、2.9及び4.4%、RSD<sub>R</sub>はそれぞれ10、11及び7.7%、HorRatはそれぞれ1.1、1.0及び0.68であった。カフェンストロールについては稲わら、WCS及び粳米について、平均回収率は96.1、95.8及び97.0%、RSD<sub>f</sub>はそれぞれ2.5、3.0及び7.1%、RSD<sub>R</sub>はそれぞれ9.4、7.7及び9.6%、HorRatはそれぞれ0.46、0.38及び

0.44 であった。エスプロカルブについては稲わら、WCS 及び粃米について、平均回収率は 89.3、88.4 及び 94.0 %、 $RSD_r$  はそれぞれ 4.6、3.3 及び 8.0 %、 $RSD_R$  はそれぞれ 10、7.3 及び 7.1 %、HorRat はそれぞれ 0.49、0.35 及び 0.32 であった。ピラゾリネートについては稲わら、WCS 及び粃米について、平均回収率は 94.1、91.0 及び 99.3 %、 $RSD_r$  はそれぞれ 1.8、5.2 及び 4.5 %、 $RSD_R$  はそれぞれ 15、13 及び 8.8 %、HorRat はそれぞれ 0.71、0.65 及び 0.40 であった。ピラゾキシフェンについては稲わら、WCS 及び粃米について、平均回収率は 88.3、89.3 及び 94.2 %、 $RSD_r$  はそれぞれ 4.0、3.8 及び 3.8 %、 $RSD_R$  はそれぞれ 13、8.9 及び 8.7 %、HorRat はそれぞれ 0.65、0.43 及び 0.40 であった。

なお、一部の結果で HorRat の値が 0.5 を下回るものがあったが、要因の一つとして、本分析法の操作が昨年度共同試験を実施したオキサジクロメホン等の分析法と同一で、比較的簡便であることが考えられた。

参考のため、各試験室で使用した LC-MS/MS の機種等を Table 11 に示した。

Table 6 Collaborative study for buprofezin

Lab. No.	Feed types					
	Rice straw (mg/kg)		Whole-crop rice silage (mg/kg)		Paddy rice (mg/kg)	
1	22.5	22.8	15.3	13.9	10.6	10.1
2	24.6	23.7	15.0	14.9	9.87	9.79
3	16.4	17.4	10.8	11.0	8.45	8.00
4	23.9	23.7	15.5	15.2	8.97	10.0
5	22.6	21.7	12.6	12.8	9.43	9.18
6	22.3	21.5	12.3	12.4	10.2	9.97
7	24.4	25.0	15.2	15.1	9.89	9.78
8	24.4	22.7	14.4	13.6	11.0	9.76
9	24.0	23.8	14.7	14.9	10.1	10.5
Spiked level (mg/kg)	25		15		10	
Mean value <sup>a)</sup> (mg/kg)	22.6		13.9		9.76	
Mean recovery <sup>a)</sup> (%)	90.5		92.4		97.6	
$RSD_r$ <sup>b)</sup> (%)	2.7		2.9		4.4	
$RSD_R$ <sup>c)</sup> (%)	10		11		7.7	
PRSD <sub>R</sub> <sup>d)</sup> (%)	10		11		11	
HorRat	1.1		1.0		0.68	

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 for cafenstrole

Lab. No.	Feed types					
	Rice straw		Whole-crop rice silage		Paddy rice	
	(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)	
1	0.185	0.174	0.191	0.184	0.0176	0.0222
2	0.195	0.198	0.197	0.206	0.0196	0.0183
3	0.149	0.159	0.160	0.162	0.0184	0.0164
4	0.213	0.216	0.215	0.211	0.0225	0.0215
5	0.193	0.189	0.191	0.194	0.0216	0.0196
6	0.204	0.204	0.194	0.196	0.0208	0.0214
7	0.194	0.185	0.197	0.185	0.0183	0.0174
8	0.194	0.191	0.199	0.197	0.0175	0.0183
9	0.203	0.212	0.176	0.193	0.0187	0.0192
Spiked level (mg/kg)	0.2		0.2		0.02	
Mean value <sup>a)</sup> (mg/kg)	0.192		0.192		0.0194	
Mean recovery <sup>a)</sup> (%)	96.1		95.8		97.0	
RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	2.5		3.0		7.1	
RSD <sub>R</sub> <sup>c)</sup> (%)	9.4		7.7		9.6	
PRSD <sub>R</sub> <sup>d)</sup> (%)	21		21		22	
HorRat	0.46		0.38		0.44	

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 8 Collaborative study for esprocarb

Lab. No.	Feed types					
	Rice straw (mg/kg)		Whole-crop rice silage (mg/kg)		Paddy rice (mg/kg)	
1	0.186	0.172	0.182	0.178	0.0168	0.0176
2	0.184	0.183	0.186	0.190	0.0175	0.0185
3	0.134	0.154	0.147	0.155	0.0219	0.0195
4	0.196	0.186	0.192	0.185	0.0191	0.0197
5	0.171	0.170	0.170	0.174	0.0192	0.0172
6	0.181	0.170	0.172	0.169	0.0202	0.0192
7	0.175	0.180	0.184	0.180	0.0179	0.0188
8	0.184	0.171	0.190	0.187	0.0190	0.0176
9	0.201	0.215	0.161	0.181	0.0181	0.0207
Spiked level (mg/kg)	0.2		0.2		0.02	
Mean value <sup>a)</sup> (mg/kg)	0.179		0.177		0.0188	
Mean recovery <sup>a)</sup> (%)	89.3		88.4		94.0	
RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	4.6		3.3		8.0	
RSD <sub>R</sub> <sup>c)</sup> (%)	10		7.3		7.1	
PRSD <sub>R</sub> <sup>d)</sup> (%)	21		21		22	
HorRat	0.49		0.35		0.32	

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 9 Collaborative study for pyrazolynate

Lab. No.	Feed types					
	Rice straw		Whole-crop rice silage		Paddy rice	
	(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)	
1	0.159	0.156	0.193	0.196	0.102	0.0981
2	0.160	0.161	0.161	0.177	0.0951	0.0936
3	0.144	0.151	0.162	0.147	0.101	0.104
4	0.218	0.217	0.228	0.217	0.113	0.111
5	0.161	0.155	0.147	0.169	0.108	0.0945
6	0.173	0.170	0.181	0.186	0.103	0.103
7	0.144	0.141	0.154	0.171	0.0774	0.0892
8	0.173	0.174	0.186	0.184	0.0935	0.0923
9	0.207	0.200	0.202	0.216	0.104	0.105
Spiked level (mg/kg)	0.2		0.2		0.1	
Mean value <sup>a)</sup> (mg/kg)	0.170		0.182		0.0993	
Mean recovery <sup>a)</sup> (%)	94.1		91.0		99.3	
RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	1.8		5.2		4.5	
RSD <sub>R</sub> <sup>c)</sup> (%)	15		13		8.8	
PRSD <sub>R</sub> <sup>d)</sup> (%)	21		21		22	
HorRat	0.71		0.65		0.40	

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 10 Collaborative study for pyrazoxyfen

Lab. No.	Feed types					
	Rice straw (mg/kg)		Whole-crop rice silage (mg/kg)		Paddy rice (mg/kg)	
1	0.183	0.159	0.184	0.185	0.0943	0.0934
2	0.158	0.157	0.165	0.169	0.0789	0.0767
3	0.133	0.140	0.147	0.156	0.0970	0.0952
4	0.209	0.206	0.210	0.194	0.108	0.108
5	0.163	0.154	0.170	0.167	0.0952	0.0859
6	0.196	0.186	0.183	0.184	0.0993	0.0937
7	0.179	0.173	0.184	0.181	0.0932	0.100
8	0.187	0.194	0.193	0.195	0.0907	0.0949
9	0.203	0.198	0.163	0.184	0.0924	0.0987
Spiked level (mg/kg)	0.2		0.2		0.1	
Mean value <sup>a)</sup> (mg/kg)	0.177		0.179		0.0942	
Mean recovery <sup>a)</sup> (%)	88.3		89.3		94.2	
RSD <sub>r</sub> <sup>b)</sup> (%)	4.0		3.8		3.8	
RSD <sub>R</sub> <sup>c)</sup> (%)	13		8.9		8.7	
PRSD <sub>R</sub> <sup>d)</sup> (%)	21		21		22	
HorRat	0.65		0.43		0.40	

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 11 Instruments used in the collaborative study

Lab.No.	LC-MS/MS	LC column (i.d.×length, particle size)
1	LC: 1200 Series, Agilent Technologies MS/MS: API-3200, AB Sciex	Inertsil ODS-SP, GL Science (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
2	LC: LC-20A, Shimadzu MS/MS: API-4000, AB Sciex	Inertsil ODS-SP, GL Science (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
3	LC: ACQUITY UPLC, Waters MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	UPLC BEH C18, Waters (2.1 mm×150 mm, 1.7 μm)
4	LC: ACQUITY UPLC, Waters MS/MS: Quattro Premier XE, Waters	ZORBAX Eclipse XDB-C18, Agilent Technologies (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
5	LC: Nexera X2, Shimadzu MS/MS: LCMS-8040, Shimadzu	ZORBAX Eclipse XDB-C18, Agilent Technologies (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
6	LC: 1200Series, Agilent Technologies MS/MS: 6410 Triple Quad LC/MS, Agilent Technologies	ZORBAX Eclipse XDB-C18, Agilent Technologies (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
7	LC: ACQUITY UPLC, Waters MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	ZORBAX Eclipse XDB-C18, Agilent Technologies (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
8	LC: ACQUITY UPLC, Waters MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	ZORBAX Eclipse XDB-C18, Agilent Technologies (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
9	LC: ACQUITY UPLC, Waters MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	ZORBAX Eclipse XDB-C18, Agilent Technologies (2.1 mm×150 mm, 5 μm)

#### 4 まとめ

飼料用イネに残留するブプロフェジン等について、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、0.05~10 ng/mL（注入量として0.00025~0.05 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、ブプロフェジンとして、稲わらに0.1及び0.5 ng/mL相当濃度、WCSに0.225及び0.675 ng/mL相当濃度、粳米に0.1及び0.2 ng/mL相当濃度、カフェンストロール及びエスプロカルブとして、稲わらに0.1及び2 ng/mL相当濃度、WCSに0.225及び4.5 ng/mL相当濃度、粳米に0.1及び0.2 ng/mL相当濃度、ピラゾリネート及びピラゾキシフェンとして、稲わらに0.1及び2 ng/mL相当濃度、WCSに0.225及び4.5 ng/mL相当濃度、粳米に0.1及び1 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、各農薬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) ブプロフェジンとして稲わらに 0.01 及び 25 mg/kg 相当量, WCS (原物中に換算) に 0.01 及び 15 mg/kg 相当量, 粳米に 0.01 及び 10 mg/kg 相当量, カフェンストロール及びエスプロカルブとして稲わら及び WCS (原物中に換算) に 0.01 及び 0.2 mg/kg 相当量, 粳米に 0.01 及び 0.02 mg/kg 相当量, ピラゾリネート及びピラゾキシフェンとして, 稲わら及び WCS (原物中に換算) に 0.01 及び 0.2 mg/kg 相当量, 粳米に 0.01 及び 0.1 mg/kg 相当量をそれぞれ添加し, 本法により 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) 本法における各農薬の定量下限は, 試料 (WCS は風乾物) 中で 0.01 mg/kg, 検出下限は 0.003 mg/kg であった.
- 6) 稲わらにブプロフェジンとして 25 mg/kg 相当量, ブプロフェジン以外の各農薬としてそれぞれ 0.2 mg/kg 相当量, WCS (風乾物) にブプロフェジンとして 33.75 mg/kg 相当量, ブプロフェジン以外の各農薬としてそれぞれ 0.45 mg/kg 相当量, 粳米にブプロフェジンとして 10 mg/kg 相当量, カフェンストロール及びエスプロカルブとしてそれぞれ 0.02 mg/kg, ピラゾリネート及びピラゾキシフェンとしてそれぞれ 0.1 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, 良好な結果を得た.

## 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, 一般財団法人食品環境検査協会東京事業所及び全国農業協同組合連合会飼料畜産中央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) 食品安全委員会: 農薬評価書 ブプロフェジン, 平成 20 年 5 月 (2008)
- 2) 食品安全委員会: 農薬評価書 カフェンストロール, 平成 20 年 2 月 (2008).
- 3) 食品安全委員会: 農薬評価書 エスプロカルブ, 平成 20 年 1 月 (2008).
- 4) 三共株式会社: 三共研年報, 36, 44-92 (1984).
- 5) 日本農薬学会: 日本農薬学会誌, 13, 167-169 (1988).
- 6) 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).
- 7) 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).
- 8) 財団法人日本食品分析センター: 平成 21 年度飼料中の有害物質等分析法開発委託事業 (2010).
- 9) 財団法人日本食品分析センター: 平成 24 年度飼料中の有害物質等分析法開発委託事業 (2013).
- 10) 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).
- 11) William Horwitz: Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies, Pure & Appl. Chem., 67(2), 331-343 (1995).

- 
- 12) 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. Gaithersburg, MD, USA.
  - 13) 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).