

1 稲発酵粗飼料中のベンフレセート及びシハロホップブチル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の確立

佐藤 梢^{*1}, 新井 詠子^{*1}, 風間 鈴子^{*2}

Development and Validation of Simultaneous Determination Method of Benfuresate and Cyhalofop-butyl in Whole-crop Rice Silage by LC-MS/MS

Kozue SATOU^{*1}, Eiko ARAI^{*1} and Reiko KAZAMA^{*2}

(^{*1} Sendai Regional Center, Food and Agricultural Materials Inspection Center (FAMIC)

^{*2} Fertilizer and Feed Inspection Department, FAMIC)

An analytical method was developed to simultaneously determine the levels of benfuresate and cyhalofop-butyl in whole-crop rice silage (WCRS) using a liquid chromatograph-atmospheric pressure chemical ionization-tandem mass spectrometer (LC-APCI-MS/MS).

After adding water to the sample, benfuresate and cyhalofop-butyl were extracted with acetone and the extracted solutions were filtered. The filtrate was purified with two types of SPE columns (InertSep K-solute, GL Sciences Inc.; Tokyo, Japan and ENVI-Carb/LC-NH₂, Sigma-Aldrich Co. LLC.; St. Louis, MO, USA), and injected into the LC-APCI-MS/MS to determine the levels of benfuresate and cyhalofop-butyl. LC separation was carried out on an ODS column (Inertsil ODS-3, 2.1 mm i.d. × 150 mm, 3 μm from GL Sciences Inc.) using a gradient with 0.1 v/v% formic acid aqueous solution and 0.1 v/v% formic acid methanol solution as a mobile phase. In the MS/MS analysis, positive mode atmospheric pressure chemical ionization (APCI+) was used.

Recovery tests were conducted on WCRS spiked with benfuresate at the levels of 0.009 or 0.2 mg/kg original matter and cyhalofop-butyl at the levels of 0.009 or 0.1 mg/kg original matter. The resulting mean recoveries ranged from 86.0 % to 101 % for benfuresate and 85.3 % to 93.2 % for cyhalofop-butyl. The repeatability in terms of the relative standard deviations (RSD_r) were not more than 12 % for benfuresate and 14 % for cyhalofop-butyl.

A collaborative study was conducted in eleven laboratories using two kinds of WCRS. One WCRS was spiked with 0.2 mg/kg air-dry matter of benfuresate and 0.1 mg/kg air-dry matter of cyhalofop-butyl. The other of WCRS was spiked with 0.02 mg/kg air-dry matter of benfuresate and cyhalofop-butyl. The resulting mean recoveries, RSD_r, reproducibility in terms of the relative standard deviations (RSD_R), and HorRat, respectively for two kinds of spiked WCRS, were 96.1 % and 94.7 %, 2.6 % and 3.7 %, 8.1 % and 10 %, and not more than 0.45 for benfuresate, and 92.7 % and 97.0 %, 2.7 % and 4.8 %, 22 % and 32 %, and not more than 1.5 for cyhalofop-butyl.

This method was validated and established for use in the inspection of benfuresate and cyhalofop-butyl in whole-crop rice silage.

Key words: benfuresate; cyhalofop-butyl; liquid chromatograph-tandem mass spectrometer (LC-MS/MS); atmospheric pressure chemical ionization (APCI); whole-crop rice silage; collaborative study

^{*1} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター仙台センター

^{*2} 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：ベンフレセート；シハロホップブチル；液体クロマトグラフタンデム型質量分析計；大気圧化学イオン化法；稲発酵粗飼料；共同試験

1 緒 言

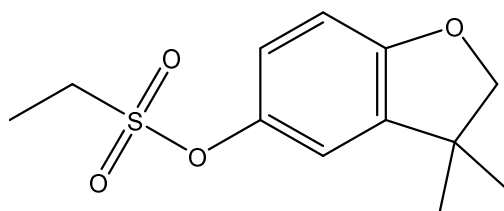
ベンフレセートは、Schering Agrochemicals（英国）により開発されたベンゾフラニルアルキルスルホン酸系除草剤であり、作用機構の詳細は解明されていないが、炭素数 18 以上の長鎖の脂肪酸の合成阻害と考えられており、湛水処理及び土壌処理により殺草活性を示す¹⁾。我が国では、1994 年より水稻、芝を対象に農薬登録されており、飼料中の管理基準値²⁾として、稲わらで 0.3 mg/kg、稲発酵粗飼料（以下「WCRS」という。）で 0.2 mg/kg が設定されている。

シハロホップブチルは、The Dow Chemical Company（米国）により開発されたアリルオキシフェノキシ構造を有する除草剤であり、その作用機構は、アセチル CoA カルボキシラーゼを阻害することによる脂肪酸の生合成の阻害である³⁾。我が国では 1996 年に水稻を対象に農薬登録されており、飼料中の管理基準値²⁾として、稲わら及び粃米で 2 mg/kg、WCRS で 0.1 mg/kg が設定されている。

平成 24 年度に、筆者らは、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委託事業において開発したガスクロマトグラフ質量分析計（以下「GC-MS」という。）による飼料中のシハロホップブチル及びベンフレセートの分析法⁴⁾（以下「JFRL 法」という。）を基に、飼料用イネ（稲わら、稲発酵粗飼料及び粃米）を対象として飼料分析基準⁵⁾への適用の可否を検討し、稲わら及び粃米に適用可能な定量法（以下「GC-MS 法」という。）を確立した⁶⁾。その際、WCRS についても検討したが、回収率が高い傾向にあり、更なる検討が必要であった⁶⁾。

そこで、今回、GC-MS 法を基に、WCRS 中のベンフレセート及びシハロホップブチル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。）による同時定量法を開発し、飼料分析基準への適用の可否を検討したので、その概要を報告する。

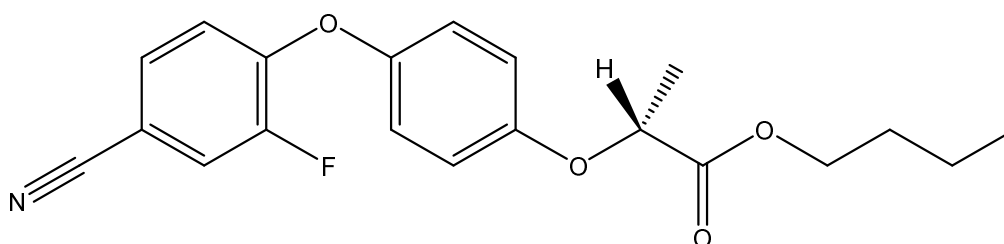
参考にベンフレセート及びシハロホップブチルの構造式等を Fig. 1 に示した。



Benfuresate

2,3-dihydro-3,3-dimethylbenzofuran-5-yl ethanesulfonate

$C_{12}H_{16}O_4S$ MW: 256.3 CAS No.: 68505-69-1



Cyhalofop-butyl

butyl (*R*)-2-[4-(4-cyano-2-fluorophenoxy)phenoxy]propionate

$C_{20}H_{20}FNO_4$ MW: 357.1 CAS No.: 122008-85-9

Fig. 1 Chemical structures of benfuresate and cyhalofop-butyl

2 実験方法

2.1 試料

2種類のWCRSを60℃以下で20時間乾燥し、更に室内に静置して風乾した後、1mmのスクリーンを装着した粉砕機で粉砕した。

2.2 試薬

1) アセトン、酢酸エチル及びヘキサンは残留農薬・PCB試験用を用いた。メタノールは液体クロマトグラフ用及びギ酸は液体クロマトグラフ用（約99%、和光純薬工業製）を用いた。水はMilli-Q Advantage（Merck Millipore製）により精製した超純水（JIS K0211の5218に定義された超純水）を用いた。

2) ベンフレセート標準原液

ベンフレセート標準品（純度99.8%、和光純薬工業製）25mgを正確に量って50mL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ベンフレセート標準原液を調製した（この液1mLは、ベンフレセートとして0.5mgを含有する。）。

3) シハロホップブチル標準原液

シハロホップブチル標準品（純度99.7%、和光純薬工業製）25mgを正確に量って50mL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シハロホップブチル標準原液を調製した（この液1mLは、シハロホップブチルとして0.5mgを含有する。）。

4) 農薬混合標準原液

ベンフレセート標準原液及びシハロホップブチル標準原液各5mLを50mL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、1mL中にベンフレセート及びシハロホップ

ブチルとしてそれぞれ 50 μg を含有する農薬混合標準原液を調製した。

5) 検量線作成用農薬混合標準液

使用に際して、農薬混合標準原液の一定量を、水-メタノール (1+1) で正確に希釈し、1 mL 中にベンフレセート及びシハロホップブチルとしてそれぞれ 1.0, 2.5, 5.0, 10, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200 ng を含有する各混合標準液を調製した。

2.3 装置及び器具

- 1) 粉碎機 : SM-100 Retsch 製 (1 mm スクリーン, 回転数 (仕様) 1430 rpm)
- 2) 振とう機 : レシプロシェーカー SR-2W タイテック製 (使用時振とう数 300 rpm)
- 3) 多孔性ケイソウ土カラム : InertSep K-solute (5 mL, 10 mL 及び 20 mL 保持用) ジーエルサイエンス製
- 4) グラファイトカーボン/アミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム (以下「積層ミニカラム」という。) : ENVI-Carb/LC-NH₂ (500 mg/500 mg) Sigma-Aldrich 製
- 5) LC-MS/MS :
LC 部 : Nexera X2 島津製作所製
MS/MS 部 : LCMS-8040 島津製作所製

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 5 mL を 50 mL のなす形フラスコに正確に入れ、40 °C 以下の水浴で約 0.5 mL 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

試料溶液を多孔性ケイソウ土カラム (5 mL 保持用) に入れ、試料溶液の入っていたなす形フラスコを水 4 mL で洗浄し、洗液をカラムに加えた後、10 分間静置した。

200 mL のなす形フラスコをカラムの下に置き、試料溶液の入っていたなす形フラスコをヘキサン 5 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、ベンフレセート及びシハロホップブチルを溶出させた。更に、ヘキサン 90 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。酢酸エチル 2 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

積層ミニカラムを酢酸エチル 10 mL で洗浄した。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下 (自然流下させ、必要に応じて流速が 1 mL/min 程度になるよう吸引した。以下同様。) してベンフレセート及びシハロホップブチルを流出させた。試料溶液の入っていたなす形フラスコを酢酸エチル 2 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。更に、酢酸エチル 4 mL をミニカラムに加え、同様に流出させた。

流出液を 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-メタノール (1+1) 1 mL を正確に加えて残留物を溶かし，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．

4) LC-MS/MS による測定

試料溶液及び各検量線作成用農薬混合標準液各 10 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	Inertsil ODS-3 (2.1 mm i.d. × 150 mm, 3 μm), GL Sciences
Mobile phase	0.1 v/v% formic acid aqueous solution – 0.1 v/v% formic acid methanol solution (2:3) (hold for 1 min) → 12 min → (1:99) (hold for 20 min)
Flow rate	0.1 mL/min
Column temperature	40 °C
Ionization	Atmospheric pressure chemical ionization (APCI)
Mode	Positive
Nebulizer gas	Air (4.4 L/min)
Drying gas	N ₂ (20 L/min)
Interface temperature	350 °C
Heat block temperature	300 °C
Desolvation line temperature	300 °C
Collision gas	Ar (230 kPa)

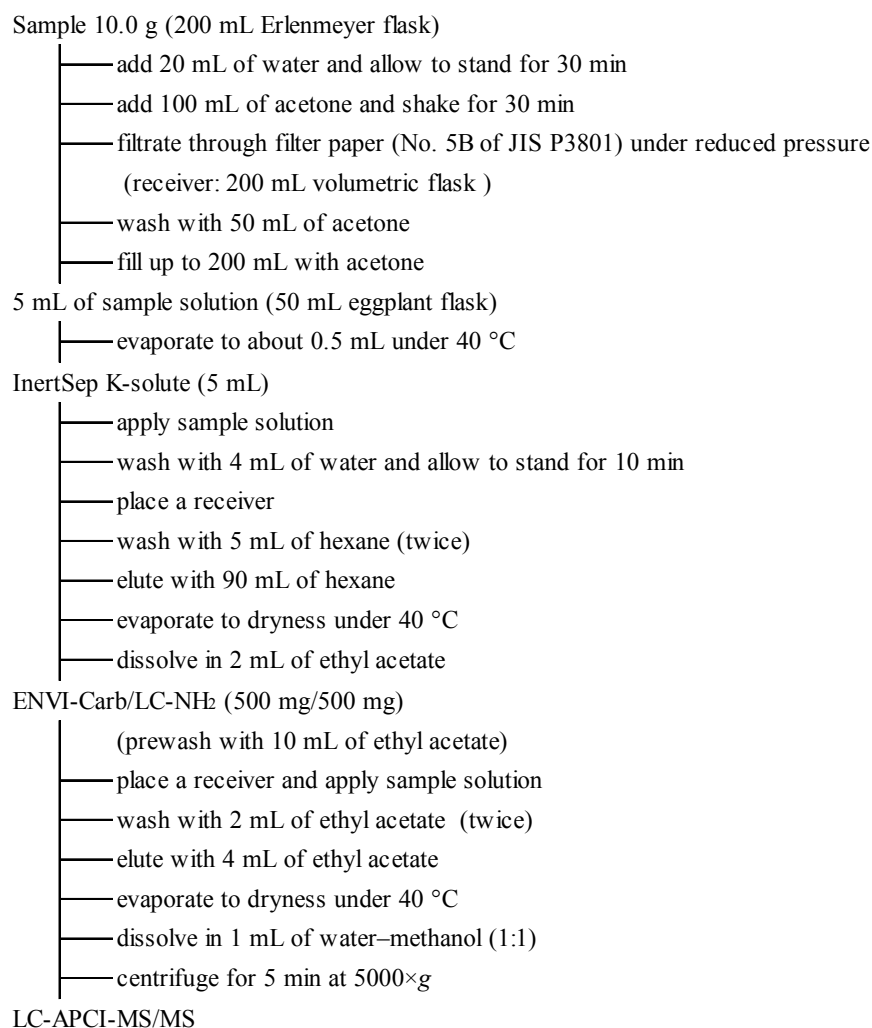
Table 2 MS/MS parameters

Target	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion		Collision energy (eV)
		Quantifier (<i>m/z</i>)	Qualifier (<i>m/z</i>)	
Benfuresate	257	163	—	11
		—	121	22
Cyhalofop-butyl	358	256	—	11
		—	120	28

5) 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，試料中のベンフレセート量及びシハロホップブチル量を算出した．

なお，定量法の概要を Scheme 1 に示した．



Scheme 1 Analytical procedure for benfuresate and cyhalofop-butyl in whole-crop rice silage (WCRS)

2.5 抽出定容液の分取液量の検討方法

WCRS 10.0 g を 2.4 の 1) に従って抽出，ろ過及び定容した液 5, 10 及び 20 mL を 50 mL のなす形フラスコに，40 mL を 100 mL のなす形フラスコに分取した．これにそれぞれベンフレセートとして 0.4 mg/kg 相当量，シハロホップブチルとして 0.2 mg/kg 相当量を添加した後，40 °C 以下の水浴でそれぞれ約 0.5, 1, 2 及び 4 mL まで減圧濃縮し，分取液量 5 mL については保持容量が 5 mL，分取液量 10 mL については保持容量が 10 mL，分取液量 20 及び 40 mL については保持容量が 20 mL の多孔性ケイソウ土カラムに，試料溶液及び試料溶液の入っていたなす形フラスコを洗浄した水 4 mL を負荷した．分取液量 5 mL についてはヘキサン 100 mL で，分取液量 10, 20 及び 40 mL についてはそれぞれヘキサン 80 mL で各農薬を溶出させた．ヘキサンによる溶出後は 2.4 に従い定量し，回収率を求めた．なお，2.4 の 3) で得られた上澄み液の一部を水–メタノール (1+1) で，分取液量 10 mL については 2 倍，分取液量 20 mL については 4 倍，分取液量 40 mL については 8 倍に希釈して LC-MS/MS による測定を行った．

3 結果及び考察

3.1 予備検討

GC-MS 法では、GC-MS による測定において夾雑物の影響を受け、ベンフレセート及びシハロホップブチルともに回収率が 120 %を上回った。夾雑物による影響の低減を試みたが、GC-MS では良好な結果が得られなかった。

ベンフレセート及びシハロホップブチルの LC-MS/MS による分析例として、岡本らが検討した、LC-MS/MS (エレクトロスプレーイオン化法 (以下「ESI」という。)) による餃子中の残留農薬一斉分析法⁷⁾がある。この方法を参考に精製方法を検討した結果、飼料分析基準の農薬一斉分析法でも使用されている積層ミニカラムによる精製が比較的良好な回収率が得られたが、シハロホップブチルの回収率は不十分であった。その要因として、イオン化阻害の影響が考えられたため、イオン化法をイオン化阻害の影響が比較的少ないとされる大気圧化学イオン化法 (以下「APCI」という。) に変更して測定した結果、両成分ともに比較的良好な回収率が得られた。予備検討の結果から、GC-MS 法を一部変更し、精製には積層ミニカラムを用い、LC-MS/MS (APCI) で測定する方法について以下詳細に検討をすることとした。

3.2 LC-MS/MS (APCI) の測定条件

液体クロマトグラフ条件については、岡本らの方法に準じ、オクタデシルシリル化シリカゲルカラム (内径 2.1 mm, 長さ 150 mm, 粒径 3 μm) を用い、0.1 v/v%ギ酸溶液-0.1 v/v%ギ酸メタノール溶液のグラジェントの溶離液で測定したところ、測定液中のシハロホップブチルが流路に残留し、次の測定液のクロマトグラムに検出されることがあった。このため、最初の溶離液組成を 0.1 v/v%ギ酸メタノール溶液 55 %から 60 %に変更し、100 %での送液時間を 10 分から 15 分にしたところ、残留はなくなり、両成分とも良好なピークが得られた。また、流速を変えて標準液を測定した結果、0.1 mL/min とした場合に感度が最も良かった。

質量分析条件については、ベンフレセート標準原液及びシハロホップブチル標準原液の一定量をそれぞれ水-メタノール (1+1) で正確に希釈した各標準液から得られたマスペクトル (Fig. 2) 及びプロダクトイオンスペクトル (Fig. 3) からモニターイオン等を Table 2 のとおり定めた。

次にインターフェイス温度の条件を検討した。標準液を繰り返し測定した結果、シハロホップブチルのピーク強度のばらつきが大きく、この原因がインターフェイス温度にあると考えられた。このため、インターフェイス温度を変えて標準液を測定した結果、350 °C で最も繰り返し精度が良好であったため、インターフェイス温度は 350 °C とした。

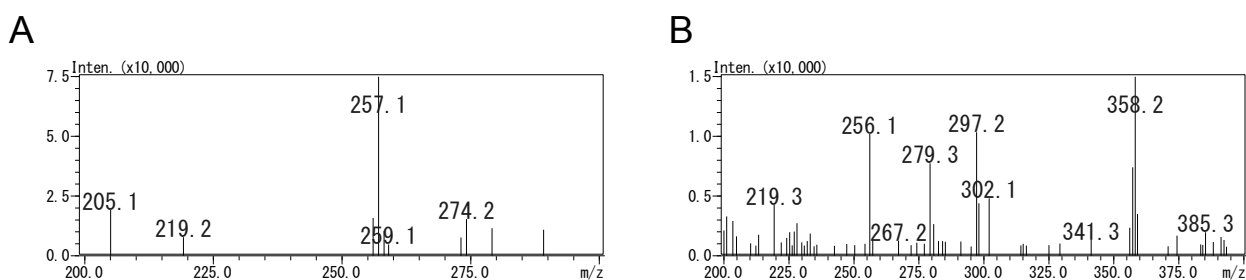


Fig. 2 Mass spectra of benfuresate (A) and cyhalofop-butyl (B)

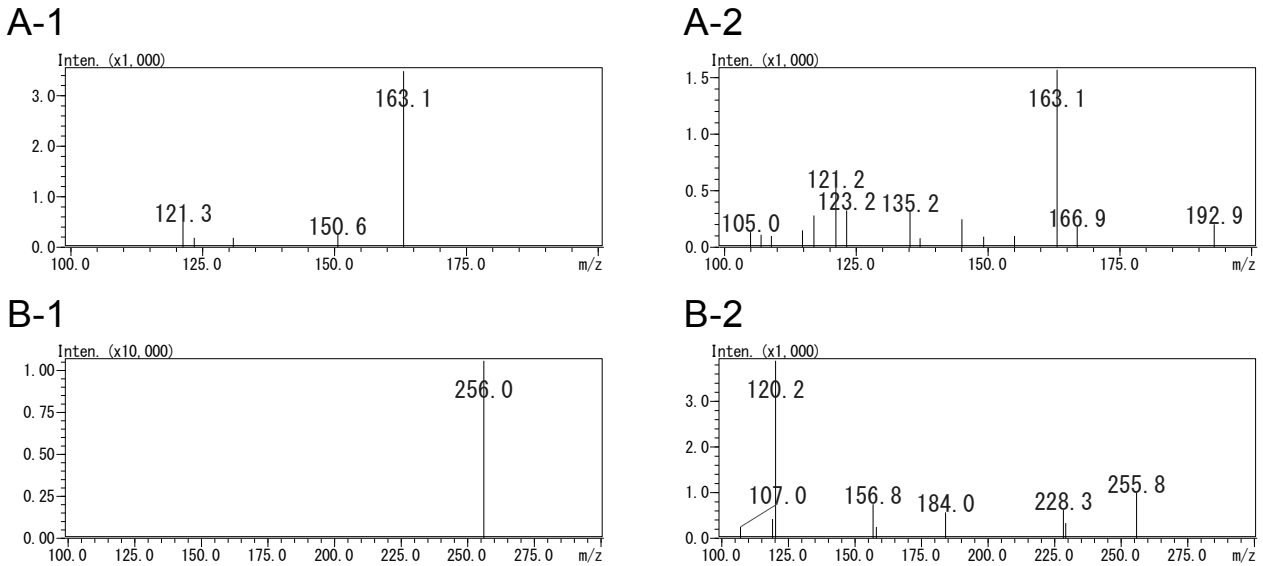


Fig. 3 Product ion spectra of benfuresate and cyhalofop-butyl

A-1: Benfuresate (precursor ion: m/z 257, collision energy: 11 eV)

A-2: Benfuresate (precursor ion: m/z 257, collision energy: 22 eV)

B-1: Cyhalofop-butyl (precursor ion: m/z 358, collision energy: 11 eV)

B-2: Cyhalofop-butyl (precursor ion: m/z 358, collision energy: 28 eV)

3.3 検量線

2.2 の 5)により調製した各検量線作成用農薬混合標準液各 10 μ 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. 4-1 及び Fig. 4-2 のとおりであり、各 1~200 ng/mL (注入量として 0.01~2 ng 相当量) の範囲で直線性を示した。

なお、当該検量線の濃度範囲は、ベンフレセート及びシハロホップブチルを 0.004~0.8 mg/kg 含有する分析用試料を本法に従い調製した最終試料溶液中の各農薬濃度範囲に相当する。

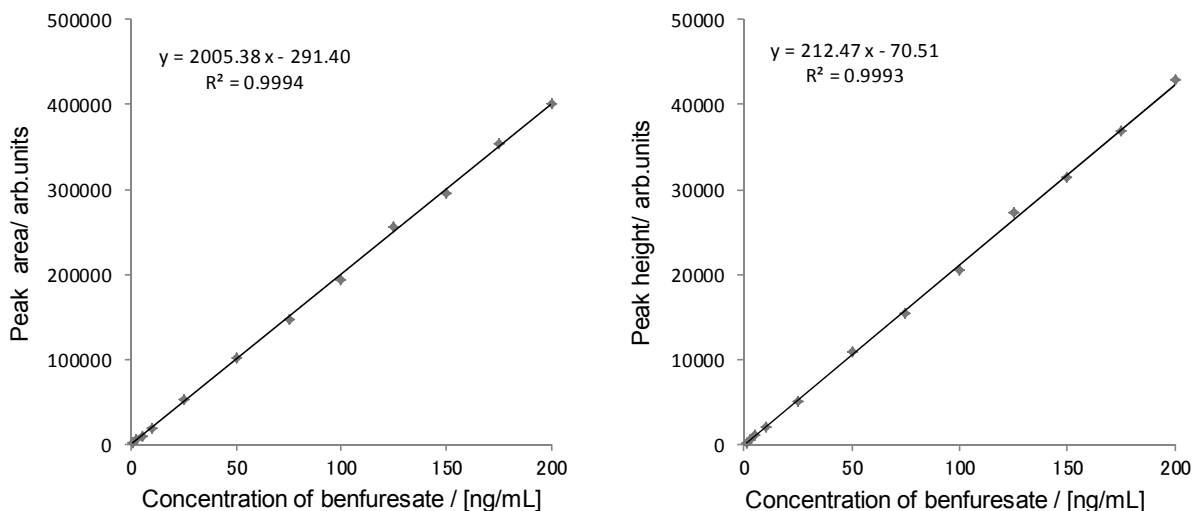


Fig. 4-1 Calibration curves of benfuresate by peak area (left) and peak height (right)

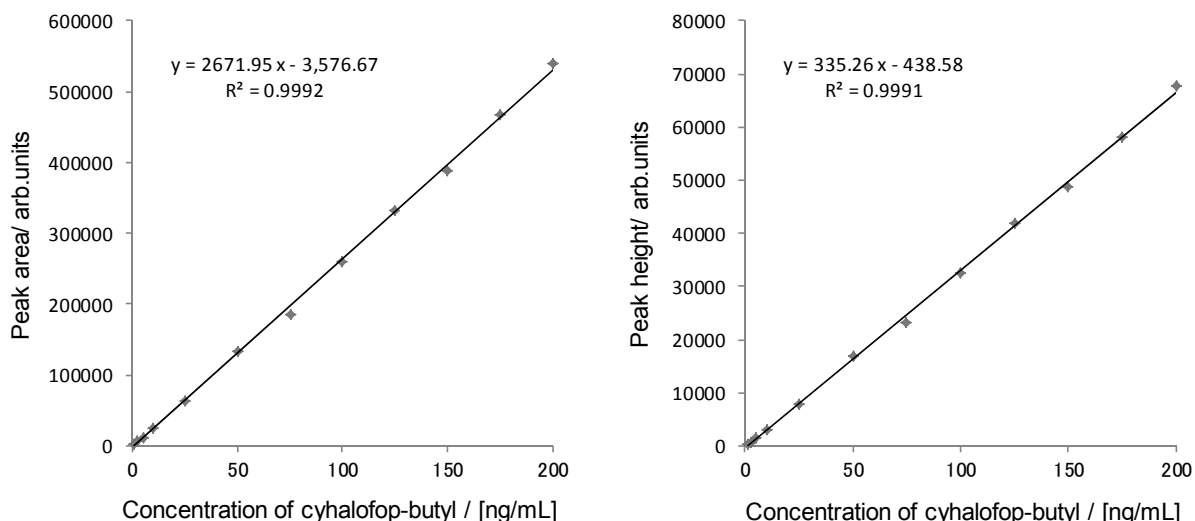


Fig. 4-2 Calibration curves of cyhalofop-butyl by peak area (left) and peak height (right)

3.4 抽出定容液の分取液量の検討

GC-MS 法では分析試料 10.0 g を本法 2.4 の 1) に従って抽出，ろ過及び定容した液 40 mL を分取し，保持容量が 20 mL の多孔性ケイソウ土カラムに供しているが，夾雑物低減を期待して，多孔性ケイソウ土カラムに供する抽出定容液の分取液量について，2.5 に従って検討を行った．その結果，得られた回収率は Table 3 のとおりであった．そこで，比較的回収率の良好な分取液量 5 mL 及び 10 mL の場合について，最終試料溶液における各農薬のマトリックス効果を確認したところ，分取液量 10 mL についてはイオン化促進が見られたため，抽出定容液の分取液量は 5 mL とした．

Table 3 Effects of volume of sample solution for purification on recoveries

Pesticides	Spiked level (mg/kg air-dry matter)	Recovery (%)			
		Volume of sample solution for purification			
		5 mL	10 mL	20 mL	40 mL
Benfuresate	0.4	95.8	116	120	116
Cyhalofop-butyl	0.2	98.3	106	86.3	44.6

n = 1

3.5 多孔性ケイソウ土カラムからの溶出画分の確認

WCRS 10.0 g を本法 2.4 の 1) に従って抽出，ろ過及び定容し，得られた試料溶液 5 mL にベンフレセート及びシハロホップブチルとしてそれぞれ 0.4 及び 0.2 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 50 及び 25 ng/mL 相当量）を添加し，多孔性ケイソウ土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，ベンフレセート及びシハロホップブチルは，0~60 mL の画分に大部分が溶出し，シハロホップブチルについては 60~100 mL の画分においても溶出が認められたため，多孔性ケイソウ土カラムからのヘキサンでの溶出液量は 100 mL とした．

Table 4 Elution pattern of benfuresate and cyhalofop-butyl from InertSep K-solute

Pesticides	Recovery (%)				Total
	Hexane				
	0~60 mL	60~80 mL	80~100 mL	100~120 mL	
Benfuresate	90	0	0	0	90
Cyhalofop-butyl	90	2	1	0	93

$n = 1$

3.6 積層ミニカラムからの流出画分の確認

WCRS 10.0 g を 2.4 の 1) 及び 2) に従って調製し、得られた溶出液にベンフレセート及びシハロホップブチルとしてそれぞれ 0.4 及び 0.2 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 100 及び 50 ng/mL 相当量）を添加し、積層ミニカラムからの流出画分を確認した。その結果は Table 5 のとおりであり、いずれの農薬も 0~10 mL の画分に流出し、その他の画分には流出は認められなかった。このことから、酢酸エチル 10 mL で流出させることとした。

Table 5 Elution pattern of benfuresate and cyhalofop-butyl from ENVI-Carb/LC-NH₂

Pesticides	Recovery (%)			Total
	Ethyl acetate			
	0~10 mL	10~12 mL	12~14 mL	
Benfuresate	99	0	0	99
Cyhalofop-butyl	100	0	0	100

$n = 1$

3.7 妨害物質の検討

WCRS 2 検体を用い、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ベンフレセート及びシハロホップブチルの定量を妨げるピークは認められなかった。

なお、得られた SRM クロマトグラムを Fig. 5 に示した。

3.8 マトリックス効果の確認

2.4 の 1) から 3) により調製した WCRS のブランク試料溶液にベンフレセートとして 0.02 及び 0.4 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 5 及び 100 ng/mL 相当量）、シハロホップブチルとして 0.02 及び 0.2 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 5 及び 50 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農薬標準液に対するピーク面積比を確認したところ、Table 6 のとおりであり、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。

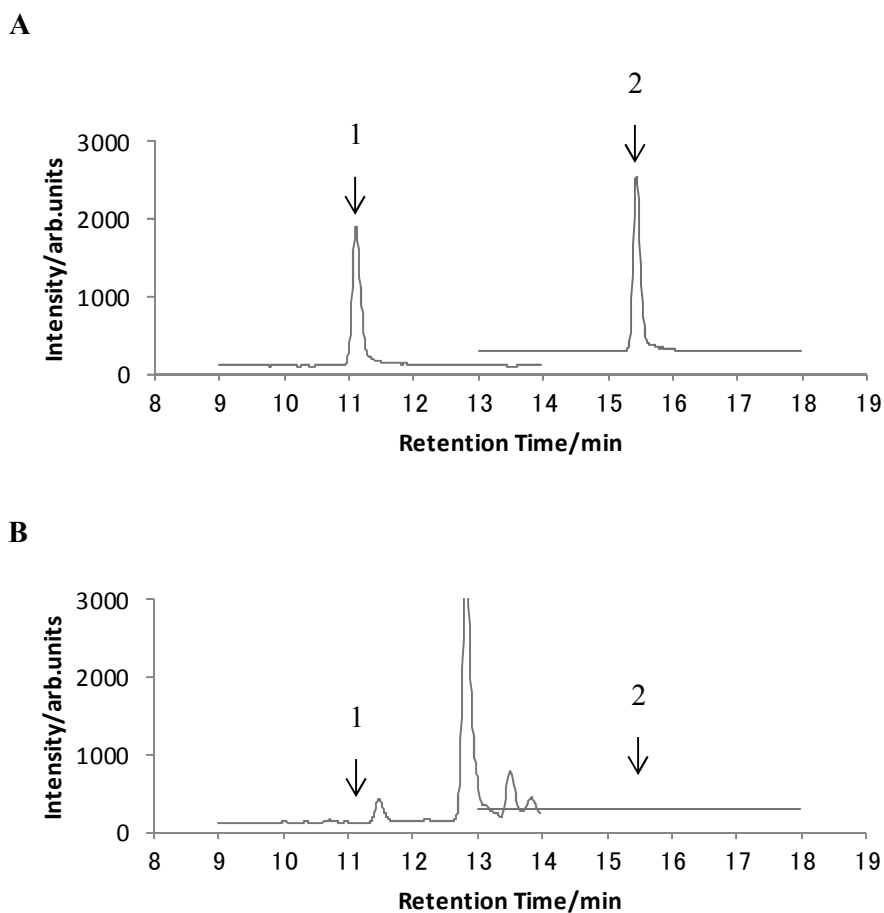


Fig. 5 Selected reaction monitoring (SRM) chromatograms of standard and blank sample solution

(LC-MS/MS conditions are shown in Tables 1 and 2. Arrows indicate the retention times of 1: benfuresate and 2: cyhalofop-butyl. The baselines are shifted for display.)

A: Standard solution (5 ng/mL: 50 pg as each pesticide)

B: Sample solution of WCRS (blank)

Table 6 Results of matrix effect study

Pesticides	Concentration of pesticides		Matrix effect ^{b)} (%)
	in matrix standard solution (ng/mL)	in sample ^{a)} (mg/kg air-dry matter)	
Benfuresate	5	0.02	100
	100	0.4	100
Cyhalofop-butyl	5	0.02	112
	50	0.2	107

$n = 1$

a) Converted from the concentration in matrix standard solution

b) Ratio of peak area of pesticides in the presence of matrix to that in the absence of matrix

3.9 添加回収試験

2.2 の 2)~4)のベンフレセート標準原液及びシハロホップブチル標準原液をアセトンで正確に希

釈し添加に用いた。

WCRS について、ベンフレセートとして、原物換算して 0.009 及び 0.2 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 5 及び 100 ng/mL），シハロホップブチルとして、原物換算して 0.009 及び 0.1 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 5 及び 50 ng/mL）になるようにそれぞれ添加してよく混合し、一夜静置した後に本法に従って定量し、平均回収率及び繰返し精度を求めた。

なお、添加は風乾物試料に対してベンフレセートとして 0.02 及び 0.4 mg/kg 相当量、シハロホップブチルとして 0.02 及び 0.2 mg/kg 相当量になるよう行い、原物中濃度への換算は、原物中及び風乾物中の水分含有量を 60 % 及び 10 % と想定して、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 の式により行った。

その結果は Table 7 のとおり、ベンフレセートの平均回収率は 86.0~101 %， RSD_r は、12 % 以下、シハロホップブチルの平均回収率は 85.3~93.2 %，その繰返し精度は RSD_r として 14 % 以下の成績が得られ、飼料分析基準の妥当性確認法ガイドライン⁵⁾（以下「妥当性確認法ガイドライン」という。）に定められた真度及び併行精度の目標値を満たしていた。

なお、得られた SRM クロマトグラムの一例を Fig. 6 に示した。

Table 7 Recoveries for benfuresate and cyhalofop-butyl

Pesticides	Spiked level (mg/kg original matter) ^{a)}	Sample			
		WCRS 1		WCRS 2	
		Recovery ^{b)} (%)	RSD_r ^{c)} (%)	Recovery ^{b)} (%)	RSD_r ^{c)} (%)
Benfuresate	0.009	86.0	6.4	91.1	12
	0.2	89.2	11	101	2.7
Cyhalofop-butyl	0.009	93.2	7.7	85.3	14
	0.1	87.0	11	91.0	5.4

a) Mean ($n = 5$)

b) Relative standard deviation of repeatability

c) The pesticides were spiked to air-dried WCRS samples one night prior to extraction. The spiked levels were 0.02 and 0.4 mg/kg air-dry matter for benfuresate and 0.02 and 0.2 mg/kg air-dry matter for cyhalofop-butyl, respectively. The levels of pesticides in original matter were calculated with following equation on the assumption that the moisture content of WCRS samples was 60 % for original matter and 10 % for air-dry matter.

The levels of pesticides in original matter (moisture 60 %)

= the levels of pesticides in air-dry matter (moisture 10 %) / 2.25

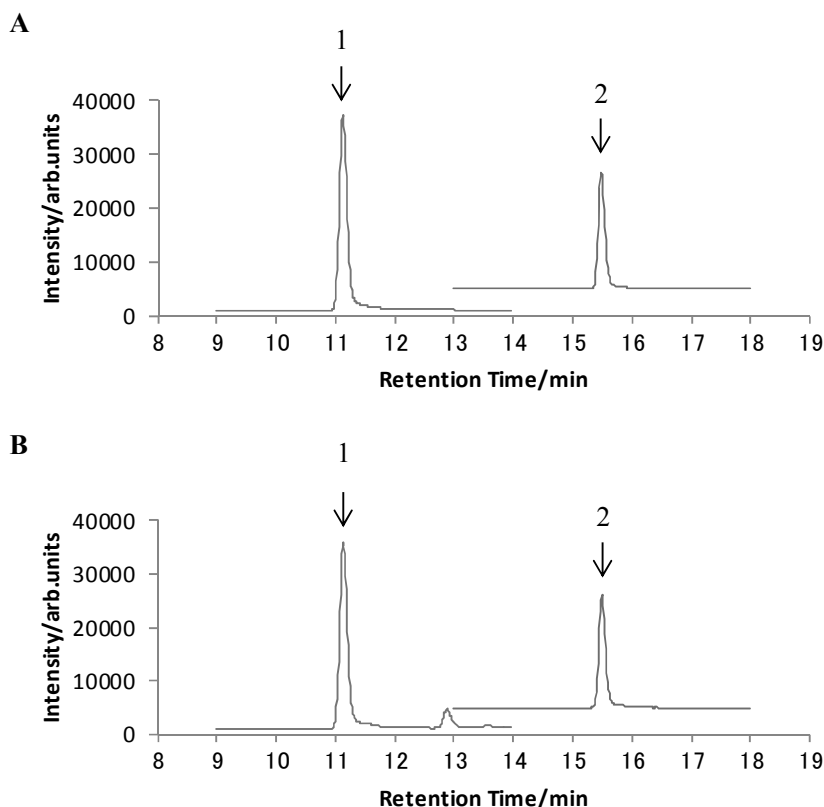


Fig. 6 SRM chromatograms on recovery test

(LC-MS/MS conditions are shown in Tables 1 and 2. Arrows indicate the peaks of 1: benfuresate and 2: cyhalofop-butyl. The baselines are shifted for display.)

A: Standard solution (100 ng/mL: 1 ng as benfuresate and 50 ng/mL: 0.5 ng as cyhalofop-butyl)

B: Sample solution of WCRS (spiked at 0.2 mg/kg original matter of benfuresate (as 100 ng/mL in sample solution), and 0.1 mg/kg original matter of cyhalofop-butyl (as 50 ng/mL in sample solution))

3.10 定量下限及び検出下限

ベンフレセート及びシハロホップブチル検量線が直線性を示した範囲，各 1~200 ng/mL の下端付近となる濃度（WCRS 風乾物中で 0.02 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 5 ng/mL 相当量））の添加回収試験の結果，得られたピークの SN 比が 10 以上であったため，ベンフレセート及びシハロホップブチルの定量下限の濃度は WCRS の風乾物中で 0.02 mg/kg とした．この濃度は，ベンフレセート及びシハロホップブチルの WCRS 中の管理基準値の風乾物中換算値（それぞれ 0.45 及び 0.225 mg/kg）に対してそれぞれ 1/22 及び 1/11 であり，妥当性確認法ガイドラインに定められた目標を満たしていた．

本法の検出下限を確認するため，添加回収試験により得られたピークの SN 比が 3 となる濃度を求めた．その結果，検出下限は風乾物中でベンフレセートは 0.006 mg/kg，シハロホップブチルは 0.0005 mg/kg であり，同様に妥当性確認法ガイドラインに定められた目標を満たしていた．

なお，Table 7 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．

3.11 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、WCRS 1 (風乾物) にベンフレセートとして 0.45 mg/kg 相当量及びシハロホップブチルとして 0.225 mg/kg 相当量 (分析用試料 10 g に対して 1 mL 中にベンフレセート 4.5 μ g 及びシハロホップブチル 2.25 μ g を含有する混合標準液 1 mL) を、WCRS 2 (風乾物) にベンフレセート及びシハロホップブチルとしてそれぞれ 0.045 mg/kg 相当量 (分析用試料 10 g に対して 1 mL 中にベンフレセート及びシハロホップブチル各 0.45 μ g を含有する混合標準液 1 mL) 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、一般財団法人日本食品分析センター彩都研究所、一般財団法人化学物質評価研究機構東京事業所、一般財団法人東京顕微鏡院食と環境の科学センター、フィード・ワン株式会社研究所、株式会社島津製作所分析計測事業部グローバルアプリケーション開発センター、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 11 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^{8), 9)}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¹⁰⁾を用いて HorRat を求めた。

ベンフレセートの結果は Table 8 のとおりであり、WCRS 1 及び WCRS 2 について、平均回収率は 96.1 及び 94.7 %、 RSD_f は 2.6 及び 3.7 %、 RSD_R は 8.1 及び 10 %、HorRat は 0.45 及び 0.45 であり、妥当性確認法ガイドラインに定められた室間再現精度の目標値を満たしていた。HorRat が 0.5 をわずかに下回ったが、分析操作が比較的簡便であるためと考えられた。

シハロホップブチルの結果は Table 9 のとおりであり、WCRS 1 及び WCRS 2 について、平均回収率は 92.7 及び 97.0 %、 RSD_f は 2.7 及び 4.8 %、 RSD_R は 22 及び 32 %、HorRat は 1.1 及び 1.5 であり、試験法の妥当性確認法ガイドラインに定められた室間再現精度の目標値を満たしていた。シハロホップブチルの RSD_R は、ベンフレセートに比べ大きい傾向が認められたが、一部の試験室からシハロホップブチルの感度が安定しないとの報告があったことから、LC-MS/MS 機体のコンディションによる影響を受けているものと考えられた。

参考のため、各試験室で使用した LC-MS/MS の機種等を Table 10 に示した。

Table 8 Collaborative study for benfuresate

Lab. No.	Sample			
	WCRS 1		WCRS 2	
	(mg/kg air-dry matter)		(mg/kg air-dry matter)	
1	0.426	0.420	0.0435	0.0407
2	0.398	0.397	0.0386	0.0394
3	0.459	0.437	0.0466	0.0512
4	0.444	0.408	0.0470	0.0456
5	0.403	0.390	0.0394	0.0375
6	0.480	0.483	0.0370	0.0379
7	0.442	0.445	0.0413	0.0409
8	0.485	0.509	0.0475	0.0482
9	0.383	0.394	0.0402	0.0375
10	0.444	0.435	0.0468	0.0458
11	0.420	0.415	0.0440	0.0409
Spiked level (mg/kg air-dry matter)	0.45		0.045	
Mean value ^{a)} (mg/kg air-dry matter)	0.433		0.0426	
Mean recovery ^{a)} (%)	96.1		94.7	
RSD _r ^{b)} (%)	2.6		3.7	
RSD _R ^{c)} (%)	8.1		10	
PRSD _R ^{d)} (%)	18		22	
HorRat	0.45		0.45	

a) $n = 22$

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 cyhalofop-butyl

Lab. No.	Sample			
	WCRS 1		WCRS 2	
	(mg/kg air-dry matter)		(mg/kg air-dry matter)	
1	0.213	0.212	0.0444	0.0383
2	0.179	0.175	0.0337	0.0332
3	0.193	0.181	0.0324	0.0327
4	0.324	0.314	0.0708	0.0688
5	0.211	0.212	0.0561	0.0586
6	0.184	0.180	0.0368	0.0386
7	0.251	0.246	0.0643	0.0644
8	0.217	0.210	0.0399	0.0388
9	0.128	0.143	0.0260	0.0261
10	0.199	0.210	0.0399	0.0333
11	0.206	0.201	0.0419	0.0409
Spiked level (mg/kg air-dry matter)	0.225		0.045	
Mean value ^{a)} (mg/kg air-dry matter)	0.209		0.0436	
Mean recovery ^{a)} (%)	92.7		97.0	
RSD _r ^{b)} (%)	2.7		4.8	
RSD _R ^{c)} (%)	22		32	
PRSD _R ^{d)} (%)	20		22	
HorRat	1.1		1.5	

a) $n = 22$

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 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-3, GL Sciences
	MS/MS: Quattro premier XE, Waters	(2.1 mm×150 mm, 3 μm)
2	LC: Nexera X2, Shimadzu	Inertsil ODS-3, GL Sciences
	MS/MS: LCMS-8040, Shimadzu	(2.1 mm×150 mm, 3 μm)
3	LC: Nexera X2, Shimadzu	Inertsil ODS-3, GL Sciences
	MS/MS: LCMS-8040, Shimadzu	(2.1 mm×150 mm, 3 μm)
4	LC: ACQUITY UPLC, Waters	Inertsil ODS-3, GL Sciences
	MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	(2.1 mm×150 mm, 3 μm)
5	LC: ACQUITY UPLC, Waters	ZORBAX Eclipse XDB-C18
	MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	Agilent Technologies (4.6 mm×150 mm, 3.5 μm)
6	LC: ACQUITY UPLC, Waters	Mightysil RP-18GP
	MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	Kanto Chemical (2.0 mm×150 mm, 3 μm)
7	LC: Nexera XR, Shimadzu	Inertsil ODS-3, GL Sciences
	MS/MS: QTRAP 5500 AB SCIEX	(2.1 mm×150 mm, 3 μm)
8	LC: Alliance 2695, Waters	Inertsil ODS-3, GL Sciences
	MS/MS: Quattro premier XE, Waters	(2.1 mm×150 mm, 3 μm)
9	LC: Prominence Shimadzu	Inertsil ODS-3, GL Sciences
	MS/MS: QTRAP 5500 AB SCIEX	(2.1 mm×150 mm, 3 μm)
10	LC: Nexera X2, Shimadzu	Inertsil ODS-3 HP, GL Sciences
	MS/MS: LCMS-8040, Shimadzu	(2.1 mm×150 mm, 3 μm)
11	LC: 1200 Series Agilent Technologies	Inertsil ODS-3, GL Sciences
	MS/MS: 6410 Triple Quadrupole LC/MS Agilent Technologies	(2.1 mm×150 mm, 3 μm)

4 まとめ

WCRS に残留するベンフレセート及びシハロホップブチルについて、GC-MS 法を基に、LC-MS/MS を用いた同時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、抽出定容液の分取液量の変更、多孔性ケイソウ土カラムの保持容量の変更、ゲル浸透クロマトグラフ及びエチレンジアミン-N-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムによる精製を積層ミニカラムによる精製に変更並びに GC-MS による測定から LC-MS/MS (APCI) による測定に変更することで、以下の結果が得られ、適用が可能であると考えられた。

- 1) 検量線はそれぞれ 1~200 ng/mL (注入量として 0.01~2 ng 相当量) の範囲で直線性を示した。
 なお、当該検量線の濃度範囲は、ベンフレセート及びシハロホップブチルを 0.004~0.8 mg/kg 含有する分析用試料を本法に従い調製した最終試料溶液中の各農薬濃度範囲に相当する。
- 2) WCRS 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。

- 3) 本法に従い得られた試料溶液についてマトリックス効果を確認した結果、ベンフレセート及びシハロホップブチル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。
- 4) 原物中に換算してベンフレセートとして 0.009 及び 0.2 mg/kg 相当量、シハロホップブチルとして 0.009 及び 0.1 mg/kg 相当量を添加し、本法に従って 5 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、妥当性確認法ガイドラインに定められた真度及び併行精度の目標値を満たす良好な結果が得られた。
- 5) 本法のベンフレセートの定量下限は風乾物中で 0.02 mg/kg、検出下限は 0.006 mg/kg、シハロホップブチルの定量下限は風乾物中で 0.02 mg/kg、検出下限は 0.0005 mg/kg であった。設定した定量下限及び検出下限は、妥当性確認法ガイドラインに定められた目標を満たしていた。
- 6) WCRS 1 (風乾物) にベンフレセートとして 0.45 mg/kg 相当量及びシハロホップブチルとして 0.225 mg/kg 相当量を、WCRS 2 (風乾物) にベンフレセート及びシハロホップブチルとしてそれぞれ 0.045 mg/kg 相当量を添加した試料を用いて 11 試験室において本法に従い共同試験を実施したところ、妥当性確認法ガイドラインに定められた室間再現精度の目標値を満たす良好な結果が得られた。

謝 辞

共同試験に参加していただいた一般財団法人日本食品分析センター彩都研究所、一般財団法人化学物質評価研究機構東京事業所、一般財団法人東京顕微鏡院食と環境の科学センター、フィード・ワン株式会社研究所及び株式会社島津製作所分析計測事業部グローバルアプリケーション開発センターにおける関係者各位に感謝の意を表します。

文 献

- 1) 環境省中央環境審議会土壌農薬部会農薬小委員会 (第 23 回) : 水質汚濁に係る農薬登録保留基準の設定に関する資料, 平成 22 年 11 月 19 日 (2010).
- 2) 農林水産省畜産局長通知: 飼料の有害物質の指導基準及び管理基準について, 昭和 63 年 10 月 14 日, 63 畜 B 第 2050 号 (1988).
- 3) 環境省中央環境審議会土壌農薬部会農薬小委員会 (第 38 回) : 水産動植物の被害防止に係る農薬登録保留基準として環境大臣が定める基準の設定に関する資料, 平成 26 年 1 月 21 日 (2014).
- 4) 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 飼料中の有害物質等の分析法の開発 (2010).
- 5) 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).
- 6) 佐藤 梢, 風間 鈴子: 稲わら及び粳米中のベンフレセート及びシハロホップブチルのガスクロマトグラフ質量分析計による同時定量法, 飼料研究報告, **38**, 108-125 (2013).
- 7) 岡本 葉, 高取 聡, 北川 陽子, 起橋 雅浩, 福井 直樹, 村田 弘, 住本 建夫, 田中 之雄, 尾花 裕孝: LC-MS/MS による餃子中の農薬一斉分析法の検討, 食品衛生学雑誌, **50**, 10-15 (2009).

- 8) William Horwitz: Protocol for design, conduct and interpretation of method-performance studies, *Pure & Appl. Chem.*, **67**(2), 331-343 (1995).
- 9) George W. Latimer, Jr.: Official methods of analysis of AOAC INTERNATIONAL 20th edition, Appendix D, Guidelines for collaborative study procedures to validate characteristics of a method of analysis. Gaithersburg, MD, USA (2016) (ISBN: 978-0-935584-87-5).
- 10) 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).