

## 4 飼料用稲中のベンスルフロンメ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分析法の開発

武田 然也\*, 船木 紀夫\*, 関口 好浩\*

### Development of Determination Method of Bensulfuron-Methyl in Rice Straw, Whole-Crop Rice Silage and Paddy Rice for Feed by LC-MS/MS

TAKEDA Zenya\*, FUNAKI Norio\* and SEKIGUCHI Yoshihiro\*

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

We have developed a quantitative determination method of the concentration of bensulfuron-methyl in rice straw, whole-crop rice silage (WCRS) and paddy rice for feed using a liquid-chromatograph electrospray-ionization tandem mass spectrometer (LC-ESI-MS/MS). In addition, the application of azimsulfuron, cyclosulfamuron, ethoxysulfuron, flucetosulfuron, halosulfuron-methyl and imazosulfuron for a simultaneous determination method with bensulfuron-methyl was examined.

Having added water to a sample, azimsulfuron, bensulfuron-methyl, cyclosulfamuron, ethoxysulfuron, flucetosulfuron, halosulfuron-methyl and imazosulfuron were extracted with acetone, and the extracted solution was filtered. The filtrate was then diluted with acetone. The diluted solution was purified with two types of solid phase extraction columns (InertSep K-solute, GL Sciences Inc.; Tokyo, Japan and ENVI-Carb, Sigma-Aldrich Co. LLC.; St. Louis, MO, USA), and injected into an LC-MS/MS to determine the concentration of azimsulfuron, bensulfuron-methyl, cyclosulfamuron, ethoxysulfuron, flucetosulfuron, halosulfuron-methyl and imazosulfuron. LC separation was then carried out on an ODS column (Mightysil RP-18, 2.1 mm i.d. × 150 mm, 5 μm, Kanto Chemical Co., Inc.; Tokyo, Japan) with a gradient of 2 mmol/L ammonium acetate solution and methanol as a mobile phase. In the MS/MS analysis, the positive mode electrospray ionization (ESI+) was used.

Recovery tests were conducted on rice straw, WCRS and paddy rice. Azimsulfuron, bensulfuron-methyl, cyclosulfamuron, ethoxysulfuron, flucetosulfuron, halosulfuron-methyl and imazosulfuron were added at the levels of 0.01 and 0.2 mg/kg for rice straw, 0.004 and 0.09 mg/kg for WCRS, and 0.01 and 0.2 mg/kg for paddy rice respectively. The resulting mean recoveries ranged as following: 65.1 % to 84.7 % for azimsulfuron; 88.4 % to 102 % for bensulfuron-methyl; 88.8 % to 105 % for cyclosulfamuron; 84.9 % to 91.2 % for ethoxysulfuron; 78.4 % to 87.9 % for flucetosulfuron; 60.9 % to 87.9 % for halosulfuron-methyl; and 62.5 % to 74.5 % for imazosulfuron. The repeatability in the form of the relative standard deviation (RSD<sub>r</sub>) was as following: less than 14 % for azimsulfuron; less than 5.3 % for bensulfuron-methyl; less than 7.1 % for cyclosulfamuron; less than 8.8 % for ethoxysulfuron; less than 18 % for flucetosulfuron; less than 15 % for halosulfuron-methyl; and less than 14 % for imazosulfuron.

Key words: bensulfuron-methyl; azimsulfuron; cyclosulfamuron; ethoxysulfuron; flucetosulfuron; halosulfuron-methyl; imazosulfuron; liquid-chromatograph tandem mass spectrometer (LC-MS/MS); electrospray ionization (ESI); rice straw; whole-crop rice silage; paddy rice

\* 独立行政法人農林水産消費安全技術センター名古屋センター

キーワード：アジムスルフロン；ベンスルフロロンメチル；シクロスルファミロン；エトキシスルフロン；フルセトスルフロン；ハロスルフロロンメチル；イマゾスルフロン；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；稲わら；稲発酵粗飼料；粃米

## 1 緒 言

ベンスルフロロンメチルは、DuPont de Nemours（米国）により開発されたスルホニルウレア系除草剤であり、ノビエを除く主要な水田雑草に卓効を示す<sup>1)</sup>。我が国では1987年に農薬登録されており、飼料中の管理基準値<sup>2)</sup>として、稲わらで0.1 mg/kg、稲発酵粗飼料（以下「WCRS」という。）で0.05 mg/kgと設定されているが、その分析法は飼料分析基準<sup>3)</sup>に記載されていない。

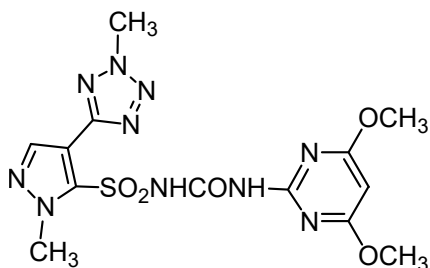
このため今回、一般財団法人日本食品分析センターが「平成25年度飼料中の有害物質等分析法開発委託事業」において開発した液体クロマトグラフタンデム型質量分析計（以下「LC-MS/MS」という。）を用いたアジムスルフロン、イマゾスルフロン、エトキシスルフロン、シクロスルファミロン及びベンスルフロロンメチルの同時定量法<sup>4)</sup>（以下「JFRL法」という。）を基に、飼料用稲（稲わら、WCRS及び粃米）中のベンスルフロロンメチルを対象に飼料分析基準への記載の可否を検討した。

なお、アジムスルフロン、イマゾスルフロン、エトキシスルフロン、シクロスルファミロン及びフルセトスルフロンについては管理基準値が定められていないため本検討課題の主目的とする成分ではないが、ベンスルフロロンメチルと同様のスルホニアウレア系除草剤であり、同じ分析法を適用できる可能性が高いことから、同時定量法としての適用を併行して検討した。フルセトスルフロンについては、平成27年に一般財団法人日本食品分析センターによりJFRL法への適用の妥当性が確認されている<sup>5)</sup>。

さらに、管理基準値として稲わらで0.2 mg/kg、WCRSで0.1 mg/kgと設定されており、平成21年にJFRL法とは異なる方法<sup>6)</sup>が開発されているハロスルフロロンメチルについても、上述の農薬と同じスルホニルウレア系除草剤であることから、同時定量法の適用の可能性を検討した。

参考に各農薬の構造式等をFig. 1に示した。

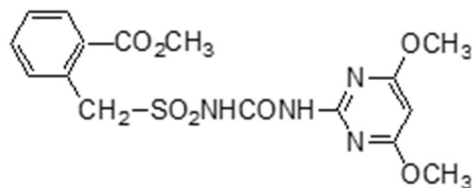
Azimsulfuron



1-(4,6-dimethoxypyrimidin-2-yl)-3-[1-methyl-4-(2-methyl-2H-tetrazol-5-yl)pyrazol-5-ylsulfamoyl]urea

C<sub>13</sub>H<sub>16</sub>N<sub>10</sub>O<sub>5</sub>S MW: 424.4 CAS No.: 120162-55-2

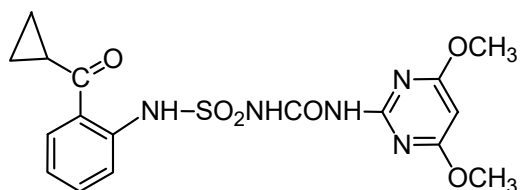
Bensulfuron-methyl



Methyl  $\alpha$ -(4,6-dimethoxypyrimidin-2-yl)carbamoylsulfamoyl)-*o*-toluate

C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>S MW: 410.4 CAS No.: 83055-99-6

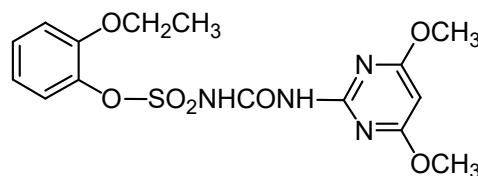
Cyclosulfamuron



1-[2-(cyclopropylcarbonyl)phenylsulfamoyl]-3-(4,6-dimethoxypyrimidin-2-yl)urea

C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>S MW: 421.4 CAS No.: 136849-15-5

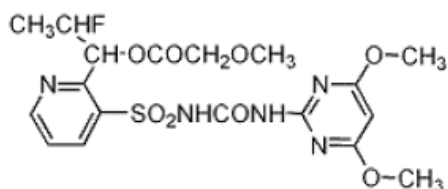
Ethoxysulfuron



1-(4,6-dimethoxypyrimidin-2-yl)-3-(2-ethoxyphenoxy)sulfamoyl]urea

C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>S MW: 398.4 CAS No.: 126801-58-9

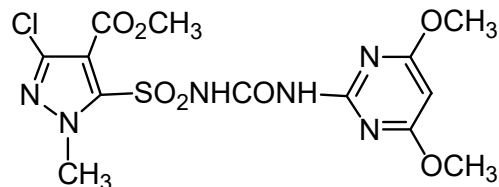
Flucetosulfuron



1-{3- [(4,6-dimethoxypyrimidin-2-ylcarbamoyl)sulfamoyl]-2-pyridyl}-2-fluoropropyl methoxyacetate

C<sub>18</sub>H<sub>22</sub>FN<sub>5</sub>O<sub>8</sub>S MW: 487.5 CAS No.: 412928-75-7

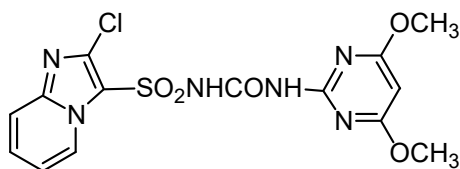
Halosulfuron-methyl



methyl 3-chloro-5-(4,6-dimethoxypyrimidin-2-yl)carbamoylsulfamoyl)-1-methylpyrazole-4-carboxylate

C<sub>13</sub>H<sub>15</sub>ClN<sub>6</sub>O<sub>7</sub>S MW: 434.8 CAS No.: 100784-20-1

Imazosulfuron



1-(2-chloroimidazo[1,2-a]pyridin-3-ylsulfamoyl)-3-(4,6-dimethoxypyrimidin-2-yl)urea

C<sub>14</sub>H<sub>13</sub>ClN<sub>6</sub>O<sub>5</sub>S MW: 412.8 CAS No.: 122548-33-8

Fig. 1 Chemical structures of azimsulfuron, bensulfuron-methyl, cyclosulfamuron, ethoxysulfuron, flucetosulfuron, halosulfuron-methyl and imazosulfuron

## 2 実験方法

### 2.1 試料

稲わら及び籾米はそれぞれ目開き 1 mm のスクリーンを装着した粉碎機で粉碎し、分析用試料とした。WCRS は 60 °C で 10 時間乾燥後、更に室内に静置して風乾した後、同様に粉碎し、分析用試料とした。

### 2.2 試薬

1) アセトニトリル、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（富士フィルム和光純薬製）を用いた。塩酸及びギ酸（質量分率 98 %）は試薬特級を用いた。酢酸アンモニウムは高速液体クロマトグラフ用（1 mol/L 水溶液、富士フィルム和光純薬製）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) 各農薬標準品

アジムスルフロン、 Bensulfuron-methyl, シクロスルファムロン, エトキシスルフロン, フルセトスルフロン, ハロスルフロンメチル及びイマゾスルフロンの標準品は、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）。

#### 4) 農薬混合標準液

7 成分の農薬標準原液各 1 mL を 25 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農薬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 20 µg を含有）。

使用に際して、農薬混合標準原液の一定量を、アセトニトリル-水（1+1）で正確に希釈し、1 mL 中に各農薬として 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 20, 40, 60, 80 及び 100 ng を含有する各農薬混合標準液を調製した。

#### 5) 1 v/v%ギ酸溶液

ギ酸 1 mL に水を加えて 100 mL とした。

Table 1 Pesticide standards used in the present study

Compound	Manufacturer	Molecular formula	MW	CAS No.	Purity(%)
Azimsulfuron	FUJIFILM Wako Pure Chemical	C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> N <sub>10</sub> O <sub>5</sub> S	424.40	120162-55-2	99.9
Bensulfuron-methyl	FUJIFILM Wako Pure Chemical	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>7</sub> S	410.40	83055-99-6	100
Cyclosulfamuron	FUJIFILM Wako Pure Chemical	C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub> S	421.43	136849-15-5	99.3
Ethoxysulfuron	FUJIFILM Wako Pure Chemical	C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>7</sub> S	398.39	126801-58-9	99.7
Flucetosulfuron	FUJIFILM Wako Pure Chemical	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> FN <sub>5</sub> O <sub>8</sub> S	487.46	412928-75-7	99.6
Halosulfuron-methyl	FUJIFILM Wako Pure Chemical	C <sub>13</sub> H <sub>15</sub> ClN <sub>6</sub> O <sub>7</sub> S	434.81	100784-20-1	99.9
Imazosulfuron	FUJIFILM Wako Pure Chemical	C <sub>14</sub> H <sub>13</sub> ClN <sub>6</sub> O <sub>5</sub> S	412.81	122548-33-8	100

## 2.3 装置及び器具

### 1) 粉碎機 :

粉碎機 1 (粃米用) : ZM 200 Retsch 製 (目開き 1 mm スクリーン, 使用時回転数 18000 rpm)

粉碎機 2 (稲わら及び WCRS 用) : SM 100 Retsch 製 (目開き 1 mm スクリーン, 回転数 (仕様) 1690 rpm)

### 2) 振り混ぜ機 : 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 保持用) ジーエルサイエンス製

### 4) グラファイトカーボンミニカラム (以下「ミニカラム」という.) : ENVI-Carb (500 mg) Sigma-Aldrich 製

### 5) メンブランフィルター : DISMIC-25HP (孔径 0.20 $\mu\text{m}$ , 直径 25 mm, 親水性 PTFE) 東洋濾紙製

### 6) LC-MS/MS :

LC 部 : ACQUITY UPLC System Waters 製

MS/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 を加え, 30 分間静置後, 更にアセトン 120 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. さらに, 全量フラスコの標線までアセトンを加えた. この液 10 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 1 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

試料溶液に 0.1 mol/L 塩酸 2.5 mL を加え軽く振り混ぜた後, 多孔性ケイソウ土カラム (5 mL 保持用) に入れ, 10 分間静置した.

100 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-酢酸エチル (3+1) 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た後, 更にヘキサン-酢酸エチル (3+1) 40 mL をカラムに加え, ベンスルフロメチル等を溶出させた.

溶出液を 40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後, 窒素ガスを送って乾固した. アセトニトリル-水-ギ酸 (50+50+1) 10 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

ミニカラムをアセトニトリル 5 mL 及び 1 v/v%ギ酸溶液 5 mL で順次洗浄した. 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下 (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.) した. 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-ギ酸 (99+1) 5 mL ずつで 2 回洗浄し, 洗液をミニカラムに加え, 同様に流出させた.

100 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き, アセトニトリル-トルエン-ギ酸

(75+25+1) 30 mL をミニカラムに加えてベンシルスロンメチル等を溶出させた。

溶出液を 40 °C 以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後，窒素ガスを送って乾固した。アセトニトリル-水 (1+1) 5 mL を正確に加えて残留物を溶かした後，メンブランフィルターでろ過し，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

試料溶液及び各農薬混合標準液各 4  $\mu$ L 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 Operation conditions of LC-MS/MS

Column	Mightysil RP-18 GP (2.0 mm i.d. $\times$ 150 mm, 5 $\mu$ m), Kanto Chemical
Mobile phase	2 mmol/L ammonium acetate solution- methanol (9:1) $\rightarrow$ 5 min $\rightarrow$ (1:1) (hold for 15 min) $\rightarrow$ (1:9) (hold for 15 min) $\rightarrow$ 5 min $\rightarrow$ (9:1)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temperature	40 °C
Ionization	Electrospray ionization (ESI) (Positive ion mode)
Source temperature	120 °C
Desolvation gas	N <sub>2</sub> (600 L/h, 400 °C)
Capillary voltage	1.0 kV
Cone gas	N <sub>2</sub> (50 L/h)
Collision gas	Ar (0.25 mL/min)

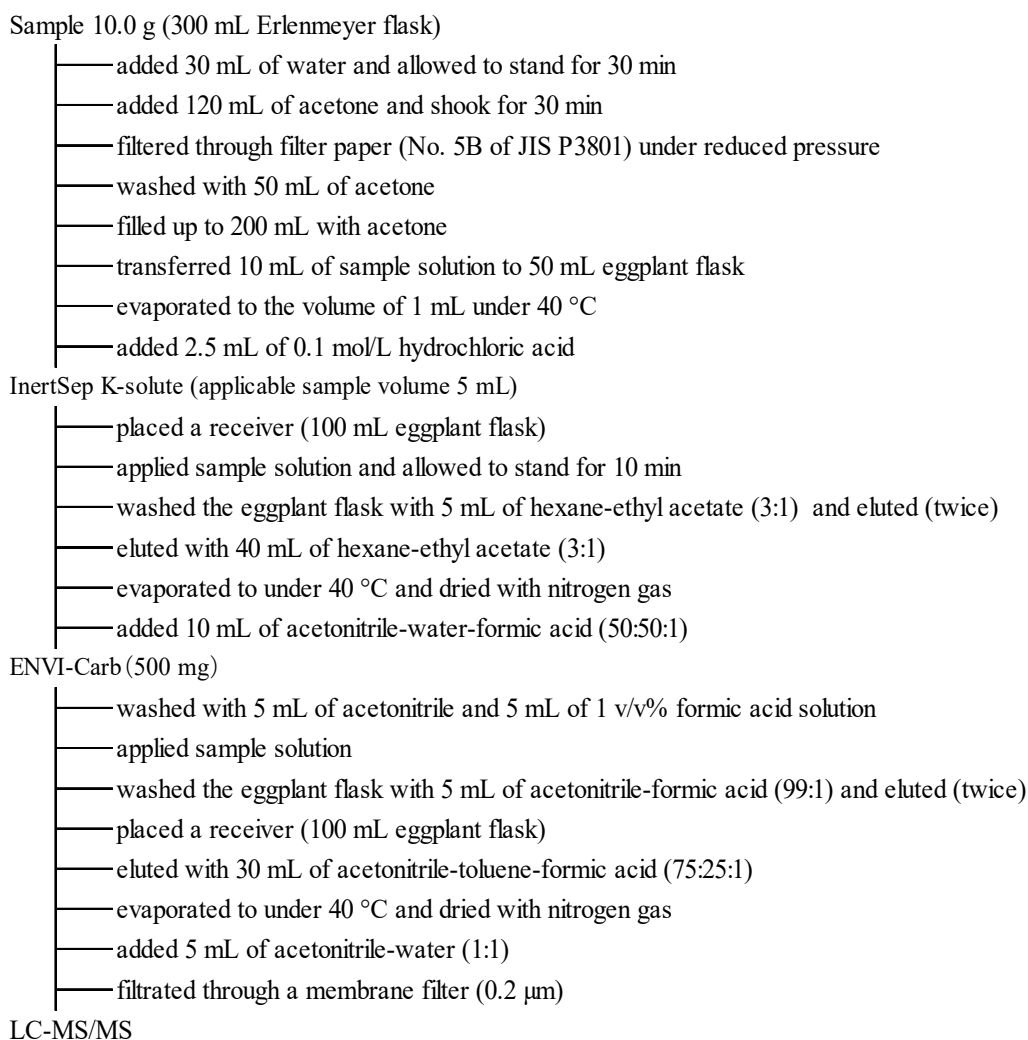
Table 3 MS/MS parameters

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> )		
Azimsulfuron	425	182	—	25	15
		—	156	25	36
Bensulfuron-methyl	411	149	—	28	21
		—	91	28	58
Cyclosulfamuron	422	261	—	25	16
		—	218	25	27
Ethoxysulfuron	399	261	—	27	14
		—	218	27	24
Flucetosulfuron	488	156	—	32	17
		—	273	32	23
Halosulfuron-methyl	435	182	—	27	20
		—	83	27	52
Imazosulfuron	413	153	—	22	10
		—	258	22	23

## 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、試料中の各農薬量を算出した。

なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。



**Scheme 1** Analytical procedure for azimsulfuron, bensulfuron-methyl, cyclosulfamuron, ethoxysulfuron, flucetosulfuron, halosulfuron-methyl and imazosulfuron in rice straw, whole-crop silage (WCRS) and paddy rice

## 2.5 添加回収試験

2.2 の 3) の各農薬標準原液をアセトニトリル-水 (1+1) で正確に希釈し添加に用いた。

アジムスルフロン、ベンスルフロンメチル、シクロスルファミロン、エトキシスルフロン、フルセトスルフロン、ハロスルフロンメチル及びイマゾスルフロンとしてそれぞれ、稲わらに 0.01 及び 0.2 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 1 及び 20 ng/mL) , WCRS に原物換算して 0.004 及び 0.09 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 1 及び 20 ng/mL) , 粳米に 0.01 及び 0.2 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 1 及び 20 ng/mL) になるようにそれぞれ添加後よく混合し、一夜静置した後に 2.4 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、WCRS への添加は風乾物試料に対し各農薬として 0.01 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。

### 3 結果及び考察

#### 3.1 検量線

2.2 の 4)により調製した農薬混合標準液各 4  $\mu$ 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. 2-1~2-7 のとおりであり、各 0.5~100 ng/mL（注入量として 0.002~0.4 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、各農薬を 0.005~1 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。

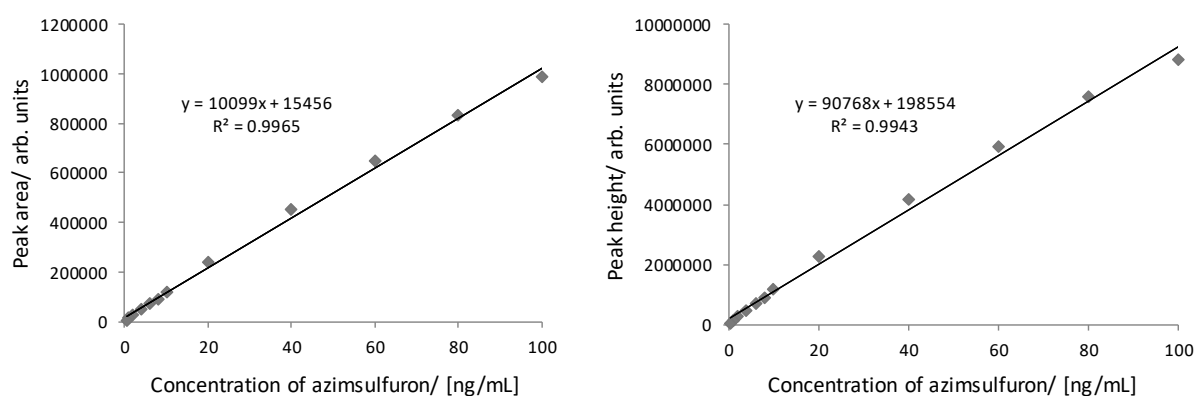


Fig. 2-1 Calibration curves of azimsulfuron by peak area (left) and peak height (right)

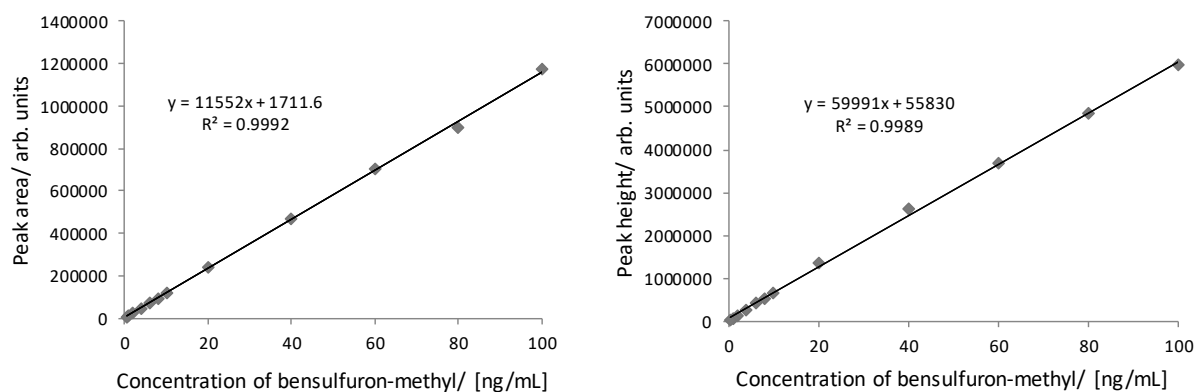


Fig. 2-2 Calibration curves of bensulfuron-methyl by peak area (left) and peak height (right)



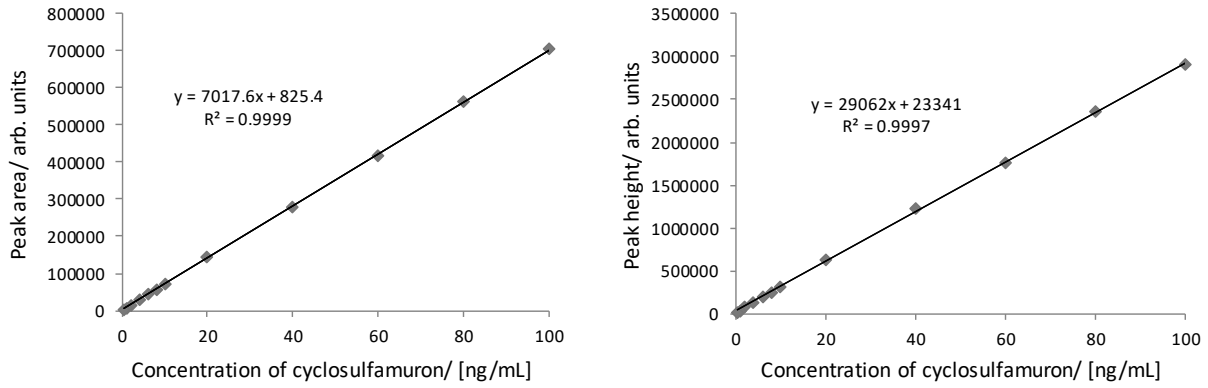


Fig. 2-3 Calibration curves of cyclosulfamuron by peak area (left) and peak height (right)

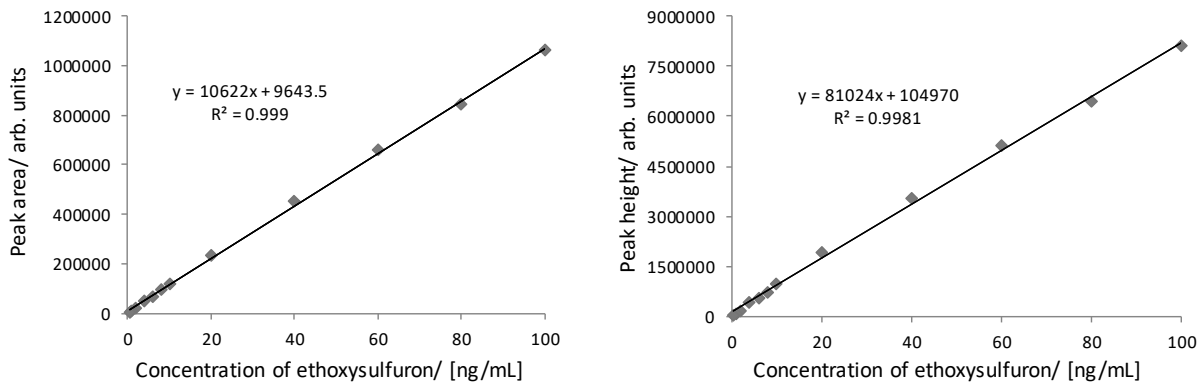


Fig. 2-4 Calibration curves of ethoxysulfuron by peak area (left) and peak height (right)

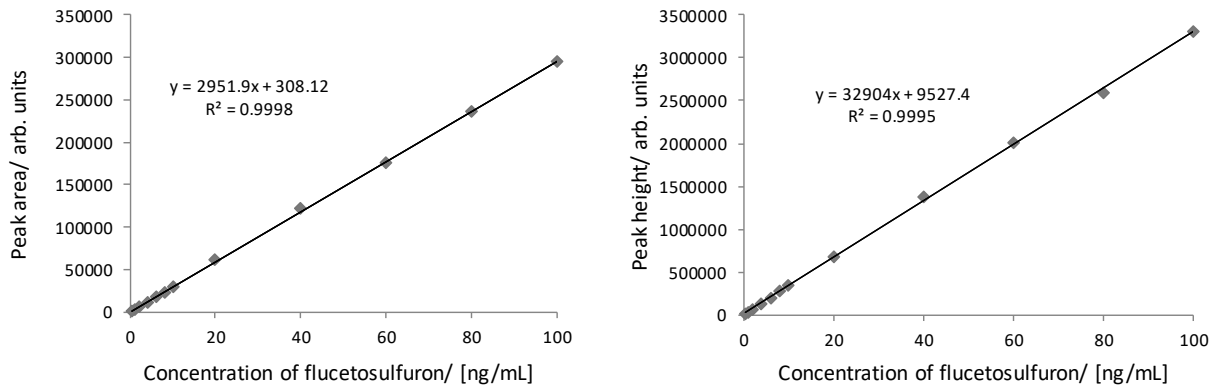


Fig. 2-5 Calibration curves of flucetosulfuron by peak area (left) and peak height (right)

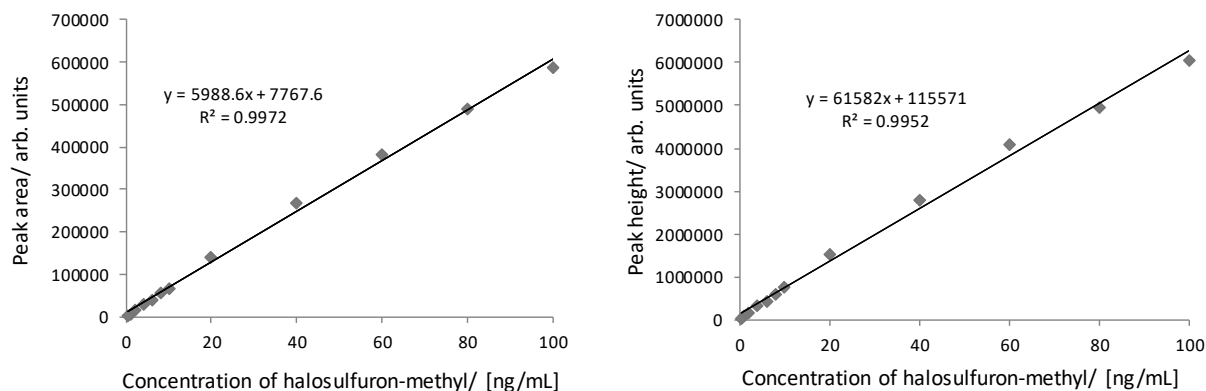


Fig. 2-6 Calibration curves of halosulfuron-methyl by peak area (left) and peak height (right)

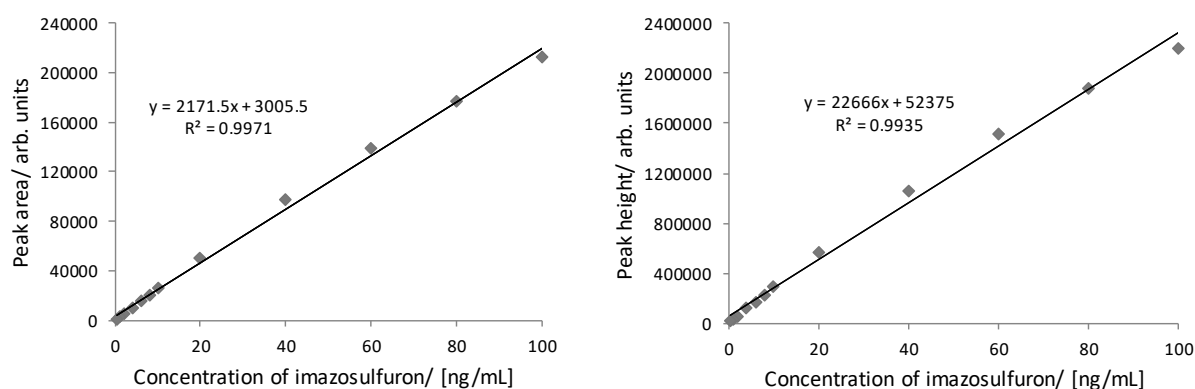


Fig. 2-7 Calibration curves of imazosulfuron by peak area (left) and peak height (right)

### 3.2 妨害物質の検討

稲わら 2 検体, WCRS 2 検体及び粃米 2 検体を試料として, 2.4 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, 得られた SRM クロマトグラムの一例を Fig. 3 に示した。

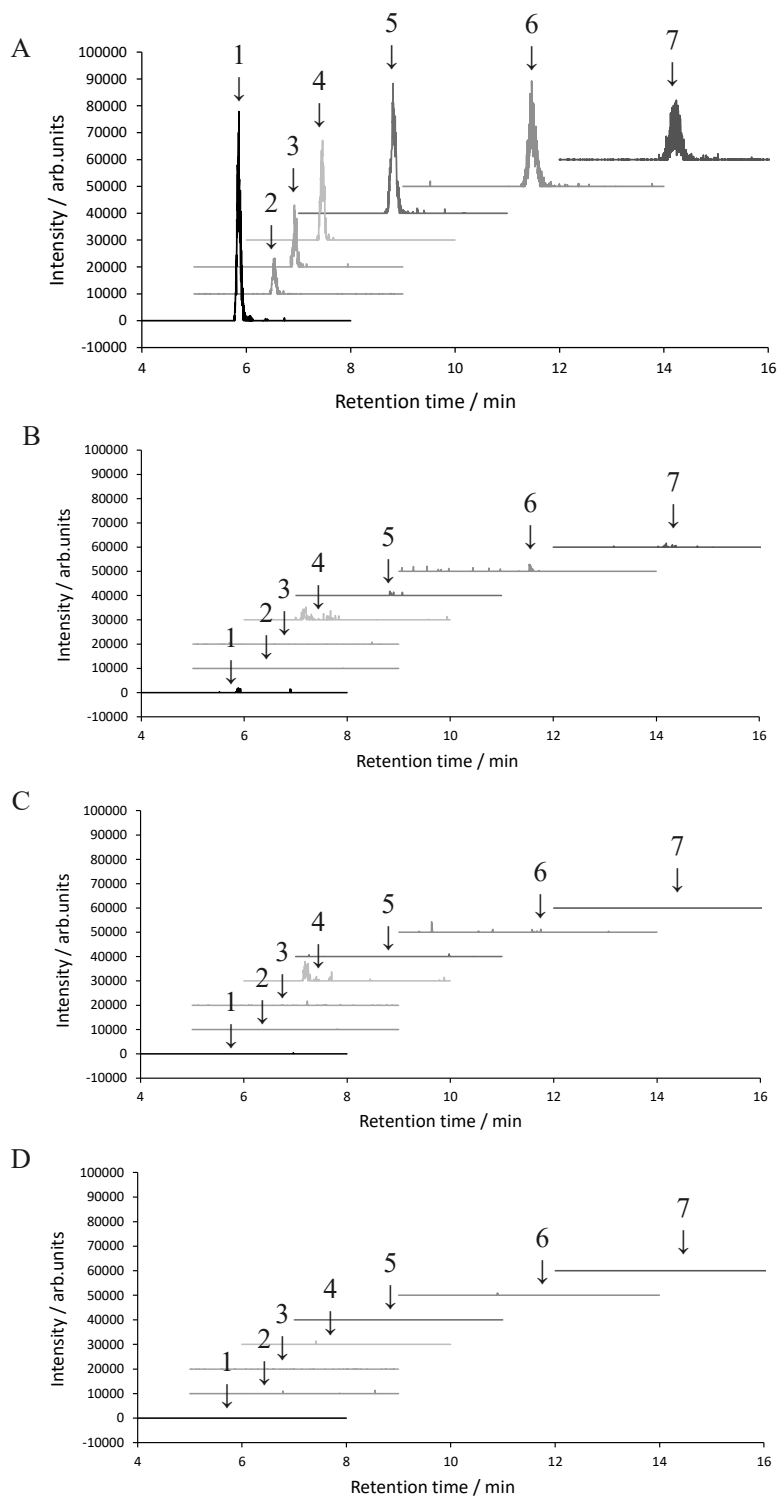


Fig. 3 Typical selected reaction monitoring (SRM) chromatograms of pesticides in standard and blank sample solutions

(LC-MS/MS conditions are shown in Tables 2 and 3. Arrows indicate the retention times of 1: azimsulfuron, 2: imazosulfuron, 3: flucetosulfuron, 4: halosulfuron-methyl, 5: ethoxysulfuron, 6: bensulfuron-methyl and 7: cyclosulfamuron. The baselines are shifted for display.)

A: Standard solution (1 ng/mL: 0.004 ng as each pesticide), B: Sample solution of rice straw,

C: Sample solution of WCRS, D: Sample solution of paddy rice

### 3.3 マトリックス効果の確認

2.4 の 1) から 3) により調製した稲わら, WCRS 及び籾米のブランク試料溶液にアジムスルフロン, ベンスルフロンメチル, シクロスルファミロン, エトキシスルフロン, フルセトスルフロン, ハロスルフロンメチル及びイマゾスルフロンとしてそれぞれ 0.1 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 10 ng/mL 相当量) を添加した各マトリックス標準液について, 2.2 の 4) に従って調製した同濃度の農薬混合標準液に対するピーク面積比を確認した. その結果は Table 4 のとおりであり, 稲わら及び WCRS 中のアジムスルフロン, ハロスルフロンメチル及びイマゾスルフロンについてはイオン化を抑制するマトリックス効果が認められたが, その他ではマトリックス効果は認められなかった.

Table 4 Matrix effect study

Pesticides	Matrix effect <sup>a)</sup> (%)		
	Rice straw	WCRS	Paddy rice
Azimsulfuron	62.4	68.9	89.1
Bensulfuron-methyl	109	107	102
Cyclosulfamuron	105	105	96.1
Ethoxysulfuron	91.7	93.3	94.1
Flucetosulfuron	82.7	87.7	96.8
Halosulfuron-methyl	51.3	49.7	85.2
Imazosulfuron	49.1	58.2	87.4

$n = 3$

a) Ratio of peak area of pesticides in the presence of matrix to that in the absence of matrix. The concentration in matrix standard solution was 10 ng/mL (spiked at 0.1 mg/kg as air-dry basis).

### 3.4 添加回収試験

2.5 により添加回収試験を実施した. その結果は Table 5 とおり, ベンスルフロンメチルについては, 平均回収率は 88.4~102 %, その繰返し精度は相対標準偏差 ( $RSD_r$ ) として 5.3 % 以下の成績が得られ, 飼料分析基準別表 3 の妥当性確認法ガイドライン<sup>4)</sup> (以下「妥当性確認法ガイドライン」という.) に定められた目標値 (真度: 70 % 以上 120 % 以下, 精度: 22 % 以下 (添加濃度 0.01 mg/kg) 又は 20 % 以下 (同 0.2 mg/kg)) を満たす良好な結果であった.

同様に, アジムスルフロンについては, 平均回収率は 65.1~84.7 %,  $RSD_r$  は 14 % 以下, シクロスルファミロンについては, 平均回収率は 88.8~105 %,  $RSD_r$  は 7.1 % 以下, エトキシスルフロンについては, 平均回収率は 84.9~91.2 %,  $RSD_r$  は 8.8 % 以下, フルセトスルフロンについては, 平均回収率は 78.4~87.4 %,  $RSD_r$  は 18 % 以下, ハロスルフロンメチルについては, 平均回収率は 60.9~87.9 %,  $RSD_r$  は 15 % 以下, イマゾスルフロンについては, 平均回収率は 62.5~74.5 %,  $RSD_r$  は 14 % 以下であり, シクロスルファミロン, エトキシスルフロン及びフルセトスルフロンは妥当性確認法ガイドラインに定められた目標値を満たす良好な結果であった. しかし, アジムスルフロン, ハロスルフロンメチル及びイマゾスルフロンについては, 稲わら及び WCRS では真度の目標値を満たしていなかった.

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 Recoveries for pesticides

Feed types	Spiked level (mg/kg as fed basis) <sup>a)</sup>	Azimsulfuron		Bensulfuron-methyl		Cyclosulfamuron		Ethoxysulfuron	
		Recovery <sup>b)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>c)</sup> (%)	Recovery <sup>b)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>c)</sup> (%)	Recovery <sup>b)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>c)</sup> (%)	Recovery <sup>b)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>c)</sup> (%)
Rice straw	0.01	75.2	9.8	96.2	2.6	99.2	1.4	88.7	4.1
	0.2	66.4	14	97.9	2.0	100	3.0	88.9	2.9
WCRS	0.004	65.1	14	88.4	2.2	95.4	3.8	84.9	4.0
	0.09	73.0	10	102	2.4	105	1.2	89.2	5.5
Paddy rice	0.01	77.4	2.0	91.9	5.3	88.8	7.1	85.3	8.8
	0.2	84.7	4.0	95.9	1.4	99.5	1.4	91.2	3.9

Feed types	Spiked level (mg/kg as fed basis) <sup>a)</sup>	Flucetosulfuron		Halosulfuron-methyl		Imazosulfuron	
		Recovery <sup>b)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>c)</sup> (%)	Recovery <sup>b)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>c)</sup> (%)	Recovery <sup>b)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>c)</sup> (%)
Rice straw	0.01	82.5	9.7	66.0	15	64.1	12
	0.2	80.8	6.8	60.9	11	62.5	7.0
WCRS	0.004	78.4	12	61.1	11	63.1	14
	0.09	82.4	15	65.5	15	67.6	9.6
Paddy rice	0.01	87.4	18	77.2	4.2	71.8	7.2
	0.2	85.1	6.9	87.9	11	74.5	9.0

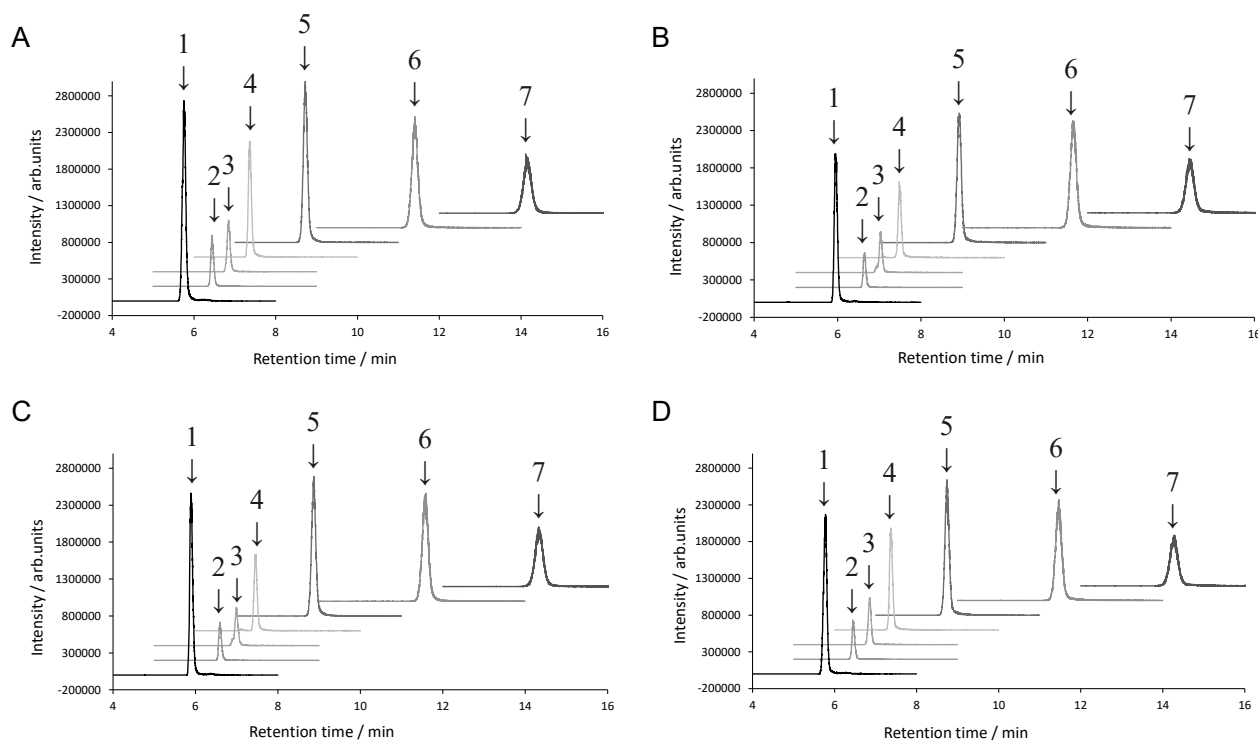
a) The pesticides were spiked to air-dried WCRS samples one night prior to extraction. The spiked levels were 0.01 and 0.2 mg/kg as air-dry basis for each pesticide. The levels of pesticides as fed basis were calculated with following equation on the assumption that the moisture content of WCRS samples was 60 % as fed basis and 10 % as air-dry basis.

The levels of pesticides as fed basis (moisture 60 %)

= the levels of pesticides as air-dry basis (moisture 10 %) / 2.25

b) Mean ( $n = 5$ )

c) Relative standard deviation of repeatability



**Fig. 4** Typical SRM chromatograms of pesticides in standard and spiked sample solutions (LC-MS/MS conditions are shown in Tables 2 and 3. Arrows indicate the peaks of 1: azimsulfuron, 2: imazosulfuron, 3: flucetosulfuron, 4: halosulfuron-methyl, 5: ethoxysulfuron, 6: bensulfuron-methyl and 7: cyclosulfamuron. The baselines are shifted for display.)

A: Standard solution (20 ng/mL: 0.08 ng as each pesticide)

B: Sample solution of rice straw (spiked at 0.2 mg/kg of each pesticide (as 20 ng/mL in sample solution))

C: Sample solution of WCRS (spiked at 0.09 mg/kg fed basis of each pesticide (as 20 ng/mL in sample solution))

D: Sample solution of paddy rice (spiked at 0.2 mg/kg of each pesticide (as 20 ng/mL in sample solution))

### 3.5 定量下限及び検出下限

ベンスルフロンメチルの検量線が直線性を示した範囲, 各 0.5~100 ng/mL の下端付近となる濃度 (試料中で 0.01 mg/kg 相当量 (最終試料液中濃度 1 ng/mL 相当量)) の添加回収試験の結果は Table 5 のとおり良好であり, 得られたピークの SN 比が 10 以上であったため, ベンスルフロンメチルの定量下限の濃度は試料中で 0.01 mg/kg とした. この濃度は, ベンスルフロンメチルの稲わら及び WCRS 中の管理基準値の風乾物中換算値 (それぞれ 0.1 及び 0.1125 mg/kg) に対してそれぞれ 1/10 及び 4/45 であり, 妥当性確認法ガイドラインに定められた目標値 (基準値に対して 1/5 以下) を満たしていた. また, ベンスルフロンメチル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, 検出下限は試料中で 0.003 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値 (基準値に対して 1/10 以下) を満たしていた.

同様に, 添加回収試験の結果が良好であったシクロスルファミロン, エトキシスルフロロン及びフルセトスルフロロンについても, 得られたピークの SN 比が 10 以上であったため, 定量下限の濃度は試料中で 0.01 mg/kg とした. また, 添加回収試験により得られたピークの SN 比が 3 となる

濃度を求めたところ、検出下限は試料中で 0.003 mg/kg であった。

### 3.6 希釈液におけるマトリックス効果の確認

3.3 において、稲わら及び WCRS 中のアジムスルフロン、ハロスルフロンメチル及びイマゾスルフロンについて、測定時にイオン化を抑制するマトリックス効果が認められた。そこで、最終試料溶液を希釈することによりマトリックス効果の低減を検討した。2.4 の 1)から 3)により調製した稲わら及び WCRS のブランク試料溶液に、各農薬として 0.1 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 10 ng/mL 相当量）を添加した各マトリックス標準液並びに同マトリックス標準液をアセトニトリル-水（1+1）で 2, 5, 7 及び 10 倍に希釈した液について、同濃度の農薬混合標準液に対するピーク面積比を確認した。その結果は Table 6 のとおり、アジムスルフロン、ハロスルフロンメチル及びイマゾスルフロンについて、希釈することでマトリックス効果によるイオン化抑制の低減が認められ、5 倍以上の希釈をすることで、農薬混合標準液に対するピーク面積比が 80~120 %以内となり、マトリックスによる大きな影響を受けることなく定量が可能であった。

Table 6 Matrix effect study by diluted sample solution

Pesticides	Matrix effect <sup>a)</sup> (%)									
	Rice straw					WCRS				
	×1 <sup>b)</sup>	×2 <sup>c)</sup>	×5 <sup>d)</sup>	×7 <sup>e)</sup>	×10 <sup>f)</sup>	×1 <sup>b)</sup>	×2 <sup>c)</sup>	×5 <sup>d)</sup>	×7 <sup>e)</sup>	×10 <sup>f)</sup>
Azimsulfuron	74.8	87.8	94.4	102	99.1	66.6	64.1	95.4	101	101
Bensulfuron-methyl	96.9	100	96.7	93.2	91.0	96.7	92.2	100	103	91.8
Cyclosulfamuron	96.4	101	96.8	102	92.3	96.1	98.0	97.5	104	94.7
Ethoxysulfuron	87.7	99.3	92.7	103	82.3	89.8	84.9	94.3	102	86.6
Flucetosulfuron	79.5	90.5	100	107	88.0	78.1	74.0	98.0	104	86.0
Halosulfuron-methyl	70.2	82.6	92.4	102	105	63.8	59.6	82.9	104	111
Imazosulfuron	67.7	83.1	91.9	98.1	86.6	65.5	67.0	89.7	104	81.0

a) Ratio of peak area of pesticides in the presence of matrix to that in the absence of matrix. The concentration in matrix standard solution was 10 ng/mL (spiked at 0.1 mg/kg as air-dry basis).

b)  $n = 3$  (no dilution)

c)  $n = 1$  (2 times dilution)

d)  $n = 3$  (5 times dilution)

e)  $n = 2$  (7 times dilution)

f)  $n = 1$  (10 times dilution)

## 4 まとめ

飼料用稲に残留するベンスルフロンメチルについて、LC-MS/MS を用いた定量法の飼料分析基準への収載の可否について検討したところ、以下の結果が得られた。また、アジムスルフロン、イマゾスルフロン、エトキシスルフロン、シクロスルファムロン、ハロスルフロンメチル及びフルセトスルフロンについて、ベンスルフロンメチルとの同時定量法としての適用を併行して検討したところ、以下の結果が得られた。

1) 検量線はそれぞれ 0.5~100 ng/mL 相当量（注入量として 0.002~0.4 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、各農薬を 0.005~1 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濃度範囲に相当する。

- 2) 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、ベンスルフロンメチルについてはマトリックス効果は認められなかったが、稲わら及び WCRS 中のアジムスルフロン、イマズスルフロン及びハロスルフロンメチルはマトリックスによる影響が認められた。
- 4) 稲わら及び粳米に各農薬として 0.01 及び 0.2 mg/kg 相当量、WCRS に各農薬として原物換算して 0.004 及び 0.09 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、ベンスルフロンメチルについては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。また、エトキシスルフロン、シクロスルフアムロン及びフルセトスルフロンについても妥当性確認法ガイドラインの目標値を満たしていた。
- 5) 本法のベンスルフロンメチルの定量下限は 0.01 mg/kg、検出下限は 0.003 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値を満たしていた。同様に、エトキシスルフロン、シクロスルフアムロン及びフルセトスルフロンの定量下限は 0.01 mg/kg、検出下限は 0.003 mg/kg であった。
- 6) 本法においてマトリックスによる影響が認められた稲わら及び WCRS 中のアジムスルフロン、イマズスルフロン及びハロスルフロンメチルについて、最終試料溶液を溶媒で希釈して測定したところ、5 倍以上に希釈することで、マトリックス効果による影響を受けずに測定が可能であった。

## 文 献

- 1) 食品安全委員会農薬専門調査会：農薬評価書 ベンスルフロンメチル，平成 22 年 10 月 (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) 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).
- 4) 一般財団法人日本食品分析センター：平成 25 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 (2014).
- 5) 一般財団法人日本食品分析センター：平成 27 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 (2016).
- 6) 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 飼料中の有害物質等の分析法の開発 (2010).