

1 飼料中のインドキサカルブの液体クロマトグラフ質量分析計による定量法

牧野 大作*, 松野 理恵*, 山田 美帆*

Determination of Indoxacarb in Feeds by LC-MS

Daisaku MAKINO*, Rie MATSUNO* and Miho YAMADA*

(*Food and Agricultural Materials Inspection Center, Kobe Regional Center Osaka Office
(Now Kobe Regional Center))

An analytical method for determination of indoxacarb in feeds using a liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry (LC-APCI-MS) was developed. After the addition of 20 mL (30 mL for grass hay) of water, the sample was left standing for 30 minutes. Indoxacarb was extracted with 100 mL of methanol. The extract was filtered and topped up to 200 mL with methanol. 20 mL of sample solution (20 mL of 100 times diluted sample solution for grass hay) was condensed and purified by Chem Elut cartridge (Varian) with 100 mL of ethyl acetate-hexane (1:1) and evaporated to dryness. The residue was dissolved in 5 mL of hexane-diethyl ether (9:1) and purified by Sep-Pak Plus Silica cartridge (Waters) and Sep-Pak Plus Florisil cartridge (Waters) with 20 mL of hexane-acetone (17:3). After the eluate was evaporated to dryness, the residue was dissolved in 2 mL of acetonitrile and subjected to LC-APCI-MS for determination of indoxacarb. The LC separation was carried out on an ODS column (ZORBAX Eclipse XDB-C18, 3.0 mm i.d.×250 mm, 5 μm (Agilent Technologies)) using methanol-5 mmol/L ammonium acetate solution (4:1) as a mobile phase. The determination was performed in a selected ion monitoring (SIM) mode. A recovery test was conducted using formula feed for layers, and for beef cattle corn and alfalfa hay spiked with 500 and 50 μg/kg (50 and 5 mg/kg for alfalfa hay) of indoxacarb. These resulted in the mean recovery of indoxacarb of 77.7~91.7 %, with relative standard deviations (RSD) of within 4.8 %. A collaborative study was conducted in six laboratories using formula feed for beef cattle and alfalfa hay spiked with indoxacarb at 50 μg/kg and 5 mg/kg. The mean recovery of formula feed for beef cattle was 93.8 %, and the repeatability and reproducibility in terms of the relative standard deviation (RSD_r and RSD_R) and HorRat were 5.1 %, 8.1 % and 0.37 respectively. These respective values were 87.6 %, 4.9 %, 14 % and 1.1 for alfalfa hay.

Key words: 残留農薬 pesticide residue ; 殺虫剤 insecticide ; インドキサカルブ indoxacarb ; 飼料 feed ; 乾牧草 grass hay ; 液体クロマトグラフ質量分析計 liquid chromatograph-mass spectrometer (LC-MS) ; 大気圧化学イオン化法 atmospheric pressure chemical ionization (APCI) ; 共同試験 collaborative study

* 独立行政法人農林水産消費安全技術センター神戸センター大阪事務所, 現 同神戸センター

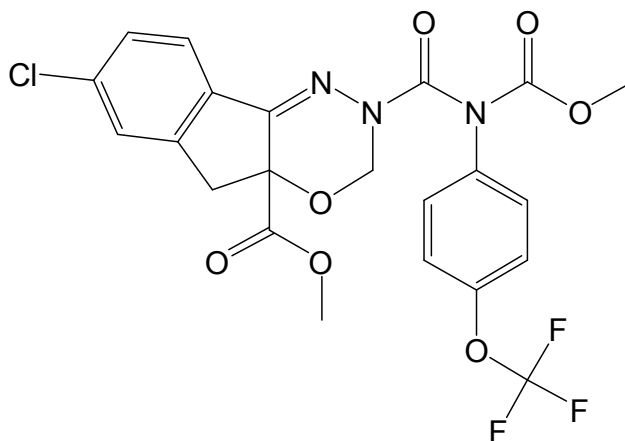
1 緒 言

インドキサカルブは DuPont が開発したオキサダイアジン系の殺虫剤で、2001 年に国内で農薬登録されている。神経軸索中のナトリウムチャンネルをブロックし、神経系情報伝達を妨害することにより作用するという、既存の殺虫剤とは異なる作用機構を持つ殺虫剤である。

インドキサカルブは、飼料安全法における基準値は設定されていないが、厚生労働省の食品、添加物等の規格基準における残留農薬基準値は、とうもろこしで 0.02 ppm、綿実で 2 ppm 等となっており、また米国におけるアルファルファ乾草の基準値は 50 ppm と設定されている。

飼料中のインドキサカルブの定量法は、平成 18 年 5 月 29 日付けで廃止された環境省告示法¹⁾を参考に、財団法人日本食品分析センターが「平成 18 年度飼料中の有害物質等残留基準を設定するための分析法開発及び家畜等への移行調査委託事業」において開発した方法²⁾(以下「分析センター法」という。)がある。筆者らは、この分析センター法を基に、飼料分析基準³⁾への適用の可否について検討したので報告する。

なお、インドキサカルブの構造式を Fig. 1 に示した。



methyl (*S*)-*N*-[7-chloro-2,3,4a,5-tetrahydro-4a-(methoxycarbonyl)indeno
[1,2-*e*][1,3,4]oxadiazin-2-ylcarbonyl]-4'-(trifluoromethoxy)carbanilate
C₂₂H₁₇ClF₃N₃O₇ MW: 527.9 CAS No.: 173584-44-6 ((*S*)-isomer)

Fig. 1 Chemical structure of indoxacarb

2 実験方法

2.1 試 料

市販の配合飼料（成鶏飼育用及び肉用牛肥育用），とうもろこし及び乾牧草（アルファルファ乾草）をそれぞれ 1 mm の網ふるいを通過するまで粉碎して用いた。

なお、検討に用いた配合飼料の配合割合は、Table 1 のとおりである。

Table 1 Compositions of the formula feeds used in this study

Formula feed types	Ingredient types	Proportion (%)	Ingredients
For layer	Grains	59	Corn
	Oil meal	25	Soybean meal, Rapeseed meal, Corn gluten meal
	Animal by-products	1	Fish meal
	Brans	1	Rice bran
	Others	14	Calcium carbonate, Calcium phosphate, Paprika extract, Feed additives
For beef cattle	Grains	63	Corn, Milo, Barley
	Brans	18	Wheat bran, Rice bran, Corn gluten feed
	Oil meal	10	Soybean meal
	Others	9	Alfalfa hay, Molasses, Calcium carbonate, Salt, Feed additives

2.2 試 薬

1) インドキサカルブ標準液

インドキサカルブ MP 標準品（和光純薬工業製，純度 99.7 %）25 mg を正確に量って 50 mL の全量フラスコに入れ，アセトニトリルを加えて溶かし，更に標線まで同溶媒を加えてインドキサカルブ標準原液を調製した（この液 1 mL は，インドキサカルブとして 0.5 mg ($f=0.997$) を含有する．）．

使用に際して，標準原液の一定量をアセトニトリルで正確に希釈し，1 mL 中にインドキサカルブとして 0.001, 0.0025, 0.005, 0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 及び 1 μ g を含有する各標準液を調製した．

2) メタノール，酢酸エチル，ヘキサン，ジエチルエーテル，アセトン及びアセトニトリルは，残留農薬分析用を用いた．LC-MS に用いるメタノール及び蒸留水は LC-MS 用を用いた．その他，特記している以外の試薬は特級を用いた．

2.3 装置及び器具

- 1) 液体クロマトグラフ：島津製作所製 Prominence
- 2) 質量分析計：島津製作所製 LCMS-2010EV
- 3) 振とう機：宮本理研工業製 理研式小型シェーカー MW-DR 型
- 4) ロータリーエバポレーター：東京理化学器械製 N-1N 型
- 5) 高速遠心分離器：日立製作所製 SCT15B
- 6) 多孔性ケイソウ土カラム：Varian 製 Extube Extraction Columns Chem Elut CE 1020 (20 mL 容)
- 7) シリカゲルミニカラム：Waters 製 Sep-Pak Plus Silica Cartridge (充てん剤量 690 mg) にリザーバーを連結したもの
- 8) 合成ケイ酸マグネシウムミニカラム：Waters 製 Sep-Pak Plus Florisil Cartridge (充てん剤量 910 mg)

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（乾牧草は 30 mL）を加

えて、30 分間静置後、更にメタノール 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メタノール 50 mL で洗浄し、同様に吸引ろ過し、更に全量フラスコの標線までメタノールを加えた。この液 20 mL（乾牧草にあつては、更にメタノールで正確に 100 倍希釈した後、その液 20 mL）を 100 mL のなす形フラスコに正確に入れ、40 °C 以下の水浴で約 2 mL まで（乾牧草はほとんど乾固するまで）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

試料溶液に水 15 mL を加えて多孔性ケイソウ土カラムに入れ、5 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酢酸エチルーヘキサン（1+1）20 mL ずつで 3 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、インドキサカルブを溶出させた。更に酢酸エチルーヘキサン（1+1）40 mL をカラムに加えて同様に溶出させ、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。

ヘキサノージエチルエーテル（9+1）5 mL を加えて残留物を溶かし、カラム処理 II に供する試料溶液とした。

3) カラム処理 II

シリカゲルミニカラムをヘキサノージエチルエーテル（9+1）5 mL で洗浄した。

試料溶液をミニカラムに入れ、液面が充てん剤の上端に達するまで流下させた。試料溶液の入っていたなす形フラスコをヘキサノージエチルエーテル（9+1）5 mL ずつで 3 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、ヘキサノージエチルエーテル（17+3）10 mL をミニカラムに加え、洗浄した。

先のミニカラムの下に、あらかじめヘキサノージエチルエーテル（7+3）5 mL で洗浄した合成ケイ酸マグネシウムミニカラムを連結した。

ヘキサノージエチルエーテル（7+3）20 mL をミニカラムに加え、液面が充てん剤の上端に達するまで流下して、インドキサカルブを合成ケイ酸マグネシウムミニカラムに移行させた。

次にシリカゲルミニカラムをはずし、50 mL のなす形フラスコを合成ケイ酸マグネシウムミニカラムの下に置き、ヘキサノーアセトン（17+3）20 mL を合成ケイ酸マグネシウムミニカラムに加えてインドキサカルブを溶出させた。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 2 mL を正確に加えて残留物を溶かし、5,000×g で 5 分間遠心分離し、上澄み液を液体クロマトグラフ質量分析計による測定に供する試料溶液とした。

4) 液体クロマトグラフ質量分析計による測定

試料溶液及び各標準液各 5 μL を液体クロマトグラフ質量分析計に注入し、Table 2 の測定条件に従って選択イオン検出クロマトグラムを得た。

5) 計 算

得られた選択イオン検出クロマトグラムからピーク面積又は高さを求めて検量線を作成し、試料中のインドキサカルブ量を算出した。

なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。

Table 2 Operating conditions for LC-MS for analysing indoxacarb

Column	Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C18 (3.0 mm i.d.×250 mm, 5 μm)
Mobile phase	Methanol-5 mmol/L ammonium acetate solution (4:1)
Flow rate	0.5 mL/min
Column temp.	40 °C
Ionization	Atmospheric pressure chemical ionization (APCI)
Mode	Positive
Nebulizer gas	N ₂ (2.5 L/min)
Interface temp.	400 °C
Heat block temp.	200 °C
CDL temp.	250 °C
Monitor ion	<i>m/z</i> 528

Sample 10 g

- add 20 mL of water (grass hay: 30 mL)
- allow to stand for 30 min
- add 100 mL of methanol
- shake for 30 min
- filtrate under suction filter (No.5B)
- wash with 50 mL of methanol
- top up to 200 mL with methanol

20 mL of sample solution(grass hay: 20 mL of 100 times diluted sample solution)

- evaporate to the volume of 2 mL (grass hay: to the near dryness) under 40 °C

Chem Elut cartridge

- add 15 mL of water to the sample solution
- apply sample solution
- allow to stand for 5 min
- wash and elute with 20 mL of ethyl acetate-hexane (1:1) (three times)
- elute with 40 mL of ethyl acetate-hexane (1:1)
- evaporate to the dryness under 40 °C
- dissolve in 5 mL of hexane-diethyl ether (9:1)

Sep-Pak Plus Silica cartridge (prewash with 5 mL of hexane-diethyl ether (9:1))

- apply sample solution
- wash with 5 mL of hexane-diethyl ether (9:1)(three times)
- wash with 10 mL of hexane-diethyl ether (17:3)
- connect Sep-Pak Plus Florisil cartridge (prewash with 5 mL of hexane-diethyl ether(7:3)) under the Sep-Pak Plus Silica cartridge
- elute with 20 mL of hexane-diethyl ether (7:3)
- remove Sep-Pak Plus Silica cartridge

Sep-Pak Plus Florisil cartridge

- elute with 20 mL of hexane-acetone (17:3)
- evaporate to the dryness under 40 °C
- dissolve in 2 mL of acetonitrile
- centrifuge for 5 min at 5,000×g (10,000 rpm)

LC-MS

Scheme 1 Analytical procedure for indoxacarb in feed

3 結果及び考察

3.1 定量物質について

インドキサカルブは *S* 体と *R* 体の 2 種類の光学異性体が存在しており、このうち殺虫活性を示すのは *S* 体のみである。しかし *S* 体と *R* 体は通常の液体クロマトグラフ条件では分離することができないことから、分析センター法²⁾では標準品として *S* 体と *R* 体の比率が 1 対 1 のラセミ体であるインドキサカルブ MP を用いている。

このことから、本法においても、前述の分析センター法と同様に標準品としてインドキサカルブ MP を用いることにした。

3.2 質量分析計条件の検討

インドキサカルブのイオン化法は、分析センター法²⁾ではエレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法 (以下「ESI 法」という。) の正イオンモードが用いられていたが、分析センター法に従って添加回収試験を行ったところ、筆者らが用いた機種では、回収率が低下することがあった。

この原因として、試料中の共存成分によるイオン化抑制が考えられたことから、その影響が少なくなる方法を検討することにした。

ここで、ESI 法と大気圧化学イオン化 (APCI) 法 (以下「APCI 法」という。) では、イオン化させやすい対象化合物が異なり、また APCI 法の方がイオン化させやすい対象化合物の範囲が狭いので、インドキサカルブが APCI 法でも分析可能であれば、イオン化抑制の影響がある共存成分のイオン化を減らすことが出来るのではないかと考えた。

そこで、APCI 法の正イオンモードによりスキャンモードで測定したところ、Fig. 2 に示すマススペクトルが得られた。

このマススペクトルにおいて基準ピークは、ESI 法と同様に m/z 528 (プロトン付加分子 $[M+H]^+$) であり、前述の ESI 法で測定を行っている分析センター法と比較しても、ほぼ同等の感度が得られた。

よって、イオン化法として APCI 法を、モニターイオンとして m/z 528 を採用することにした。

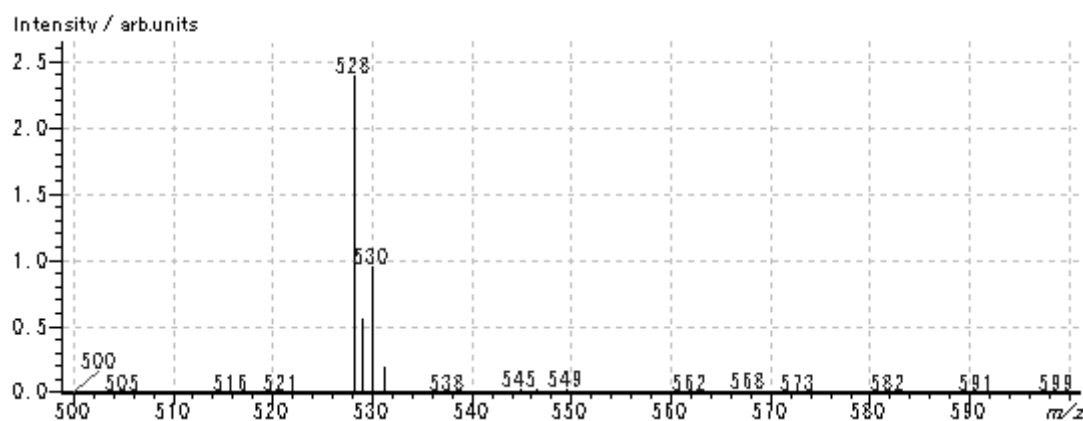


Fig. 2 Mass spectrum of standard solution

3.3 液体クロマトグラフ条件の検討

インドキサカルブ標準液を液体クロマトグラフ質量分析計に注入して、液体クロマトグラフ条件の検討を行った。

分析センター法²⁾では、流速として 0.2 mL/min, 溶離液としてアセトニトリル-0.1 v/v%酢酸溶液

(7+3) , カラムは Unison UK C18 (内径 2.0 mm, 長さ 150 mm) を使用しているが, ESI 法と APCI 法では最適な流量が異なること等から, ESI 法での LC 条件を APCI 法でそのまま適用することは困難であると考えられた。

そこで, 過去に筆者らが他の検討を行った際に採用した APCI 法の測定条件⁴⁾を参考にして, 流速 0.5 mL/min, カラムに ZORBAX Eclipse XDB-C18 (内径 3.0 mm, 長さ 250 mm, 粒径 5 μ m) , 溶離液としてメタノール-酢酸アンモニウム溶液を用いて, 溶離液組成と酢酸アンモニウム溶液濃度について検討を行った。

分析センター法²⁾では, インドキサカルブの保持時間が 6 分程度であったことから, 溶離液としてメタノール-酢酸アンモニウム溶液を用いた場合に同程度の保持時間となるように検討を行ったところ, その溶離液組成が (4+1) のとき, 保持時間は 6 分程度となったため, これを採用した。

また, 酢酸アンモニウム溶液の濃度については 5 mmol/L 及び 10 mmol/L を検討したが, 特に差異は無かったことから, 酢酸アンモニウム濃度は 5 mmol/L で十分と考えられた。

これらのことから, 本法では流速 0.5 mL/min, カラムに ZORBAX Eclipse XDB-C18 (内径 3.0 mm, 長さ 250 mm, 粒径 5 μ m) , 溶離液としてメタノール-5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 (4+1) を採用した。

3.4 検量線の作成

2.2 の 1) に従って調製した標準液各 5 μ L を液体クロマトグラフ質量分析計に注入し, 得られた選択イオン検出クロマトグラムからピーク高さ又は面積を求めて検量線を作成した。その結果, Fig. 3 のとおり, 検量線はインドキサカルブとして 0.005~5 ng の範囲で直線性を示した。

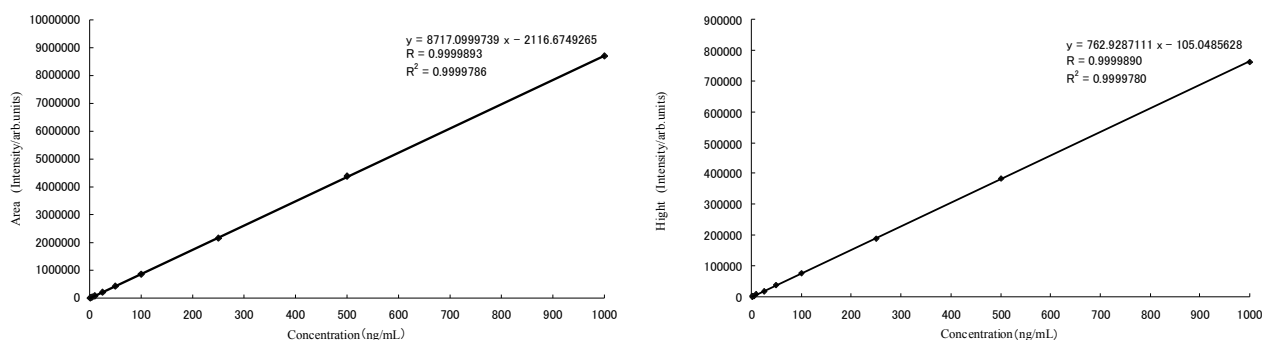


Fig. 3 Calibration curves of indoxacarb by peak area (left) and peak height (right)

3.5 多孔性ケイソウ土カラムの溶出画分の検討

インドキサカルブとして 1 mL 中に 50 ng を含有する標準液を調製し, この液 1 mL を 50 mL のなす形フラスコに正確に入れ, 窒素ガスを送って乾固した。水約 2 mL を加えた後, 2.4 の 2) のカラム処理 I に従い, ヘキサノール-酢酸エチル (1+1) による溶出画分の確認を行った。

その結果, Table 3 のとおり, インドキサカルブは 0~100 mL に溶出し, それ以降の画分には溶出されなかった。以上の結果から, 本法では分析センター法²⁾と同様にヘキサノール-酢酸エチル (1+1) 100 mL で溶出することとした。

Table 3 Elution pattern from Chem Elut cartridge

Fraction volume (mL)	0~50	~100	~120	~140	Total
Recovery of indoxacarb ^{a)}	90	7	0	0	97

a) Mean recovery ($n=2$)

3.6 シリカゲルミニカラムの溶出画分の検討

シリカゲルミニカラムについて負荷・洗浄液及び溶出液の溶出画分の検討を行った。

インドキサカルブとして 1 mL 中に 50 ng を含有する標準液を調製し、この液 1 mL をなす形フラスコに正確に入れ、窒素ガスを送って乾固した後、ヘキサソージエチルエーテル (9+1) 5 mL を加えて残留物を溶かした。この液を、2.4 の 3) のカラム処理 II の項のシリカゲルミニカラムによる処理操作に従って処理を行い、負荷・洗浄液であるヘキサソージエチルエーテル (9+1) 及び (17+3) 並びにシリカゲルミニカラムからの溶出液であるヘキサソージエチルエーテル (7+3) による各溶出画分をそれぞれなす形フラスコに分取した。これらを減圧濃縮、乾固後、残留物をアセトニトリルに溶かしたものを液体クロマトグラフ質量分析計による測定に供試し、インドキサカルブのシリカゲルミニカラムにおける負荷・洗浄中の流出の有無及び溶出液中の溶出画分を確認した。

その結果、Table 4 のとおり、インドキサカルブは負荷・洗浄液であるヘキサソージエチルエーテル (9+1) 及び (17+3) 中には流出していなかった。また、溶出に関してはヘキサソージエチルエーテル (7+3) 0~20 mL に溶出し、それ以降の画分には溶出されなかった。以上の結果から、本法では分析センター法²⁾と同様にヘキサソージエチルエーテル (7+3) 20 mL で溶出することとした。

Table 4 Elution pattern from Silica-gel mini column

	Hexane-diethyl ether					
	(9:1)		(17:3)		(7:3)	
	0~20 mL	0~10 mL	0~10 mL	~20 mL	~30 mL	Total
Recovery of indoxacarb ^{a)}	0	0	98	1	0	99

a) Mean recovery ($n=2$)

3.7 合成ケイ酸マグネシウムミニカラムの溶出画分の検討

合成ケイ酸マグネシウムミニカラムについて負荷・洗浄液及び溶出液の溶出画分の検討を行った。

インドキサカルブとして 1 mL 中に 50 ng を含有する標準液を調製し、この液 1 mL をなす形フラスコに正確に入れ、窒素ガスを送って乾固した後、ヘキサソージエチルエーテル (7+3) 20 mL で残留物を溶かし、合成ケイ酸マグネシウムミニカラムに移した。その後、2.4 の 3) のカラム処理 II の項の合成ケイ酸マグネシウムミニカラムによる処理操作に従って処理を行い、負荷・洗浄液であるヘキサソージエチルエーテル (7+3) 及び合成ケイ酸マグネシウムミニカラムからの溶出液であるヘキサソージエチルエーテル (17+3) による各溶出画分をそれぞれなす形フラスコに分取した。これらを減圧濃縮、乾固後、残留物をアセトニトリルに溶かしたものを液体クロマトグラフ質量分析計による測定に供試し、インドキサカルブの合成ケイ酸マグネシウムミニカラムにおける負荷・洗浄中の流出の有無及び溶出液中の溶出画分を確認した。

その結果, Table 5 のとおり, インドキサカルブは負荷・洗浄液であるヘキサーン-ジエチルエーテル (7+3) 中には流出していなかった. また, 溶出に関してはヘキサーン-アセトン (17+3) 0~20 mL に溶出し, それ以降の画分には溶出されなかった. 以上の結果から, 本法では分析センター法²⁾と同様にヘキサーン-アセトン (17+3) 20 mL で溶出することとした.

Table 5 Elution pattern from Florisil mini column

	(%)				Total
	Hexane-diethyl ether (7:3) 0~20 mL	Hexane-acetone (17:3)		~20 mL	
		0~10 mL	~20 mL		
Recovery of indoxacarb ^{a)}	0	96	1	0	97

a) Mean recovery ($n=2$)

3.8 妨害物質の検討

市販の配合飼料 (成鶏飼育用, 肉豚肥育用及び肉用牛肥育用), とうもろこし, とうもろこし DDGS, 大麦, 綿実, ビートパルプ及び乾牧草 (スーダングラス乾草, バミューダグラス乾草, アルファルファ乾草, オーツ乾草及びトールフェスクわら) を用い, 本法により調製した試料溶液を液体クロマトグラフ質量分析計に注入し, 定量を妨げるピークの有無を確認したところ, 妨害ピークは認められなかった.

なお, 妨害物質の検討で得られた選択イオン検出クロマトグラムの一例を Fig. 4 に示した.

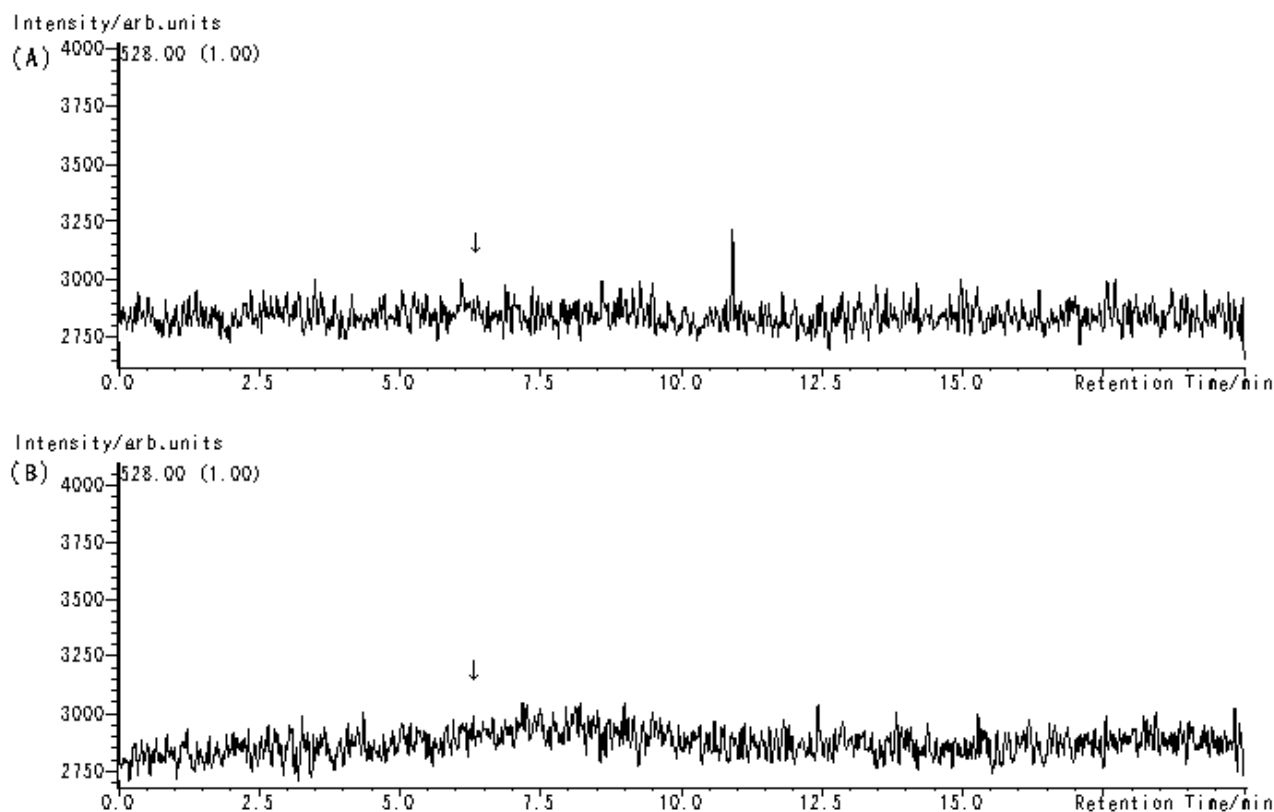


Fig. 4 SIM chromatograms of each sample solution

LC-MS condition are shown in Table 2

- (A) Sample solution of corn (not spiked)
- (B) Sample solution of tall fescue straw (not spiked)
- (↓ : Retention time of indoxacarb)

3.9 添加回収試験

2.1 で調製した成鶏飼育用配合飼料，肉用牛肥育用配合飼料及びとうもろこしにインドキサカルブとして 500 及び 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量，アルファルファ乾草に 50 及び 5 mg/kg 相当量を添加した試料を用いて，本法により 3 点併行で定量し，回収率及び繰返し精度を検討した。

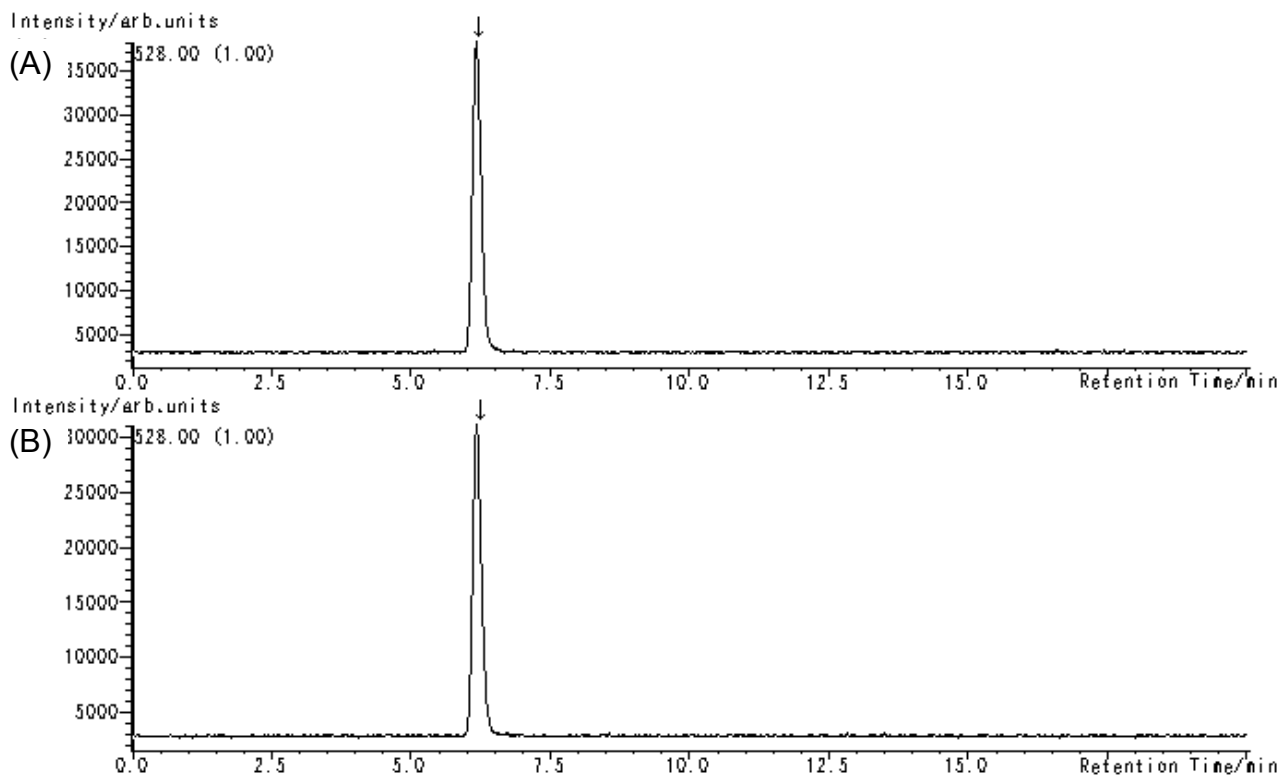
その結果は，Table 6 のとおり，インドキサカルブの平均回収率は 77.7~91.7 %，その繰返し精度は，相対標準偏差 (RSD) として 4.8 %以下の成績が得られた。なお，添加回収試験で得られた選択イオン検出クロマトグラムの一例を Fig. 5 に示した。

Table 6 Results of recovery test for indoxacarb

Spiked level	(%)							
	Formula feed for layer		Formula feed for beef cattle		Corn		Alfalfa hay	
	Recovery ^{a)}	RSD ^{b)}	Recovery ^{a)}	RSD ^{b)}	Recovery ^{a)}	RSD ^{b)}	Recovery ^{a)}	RSD ^{b)}
50 mg/kg							78.7	(2.8)
5 mg/kg							77.7	(3.0)
500 µg/kg	89.1	(2.9)	91.7	(2.5)	82.7	(4.8)		
50 µg/kg	85.5	(3.2)	89.4	(3.8)	85.0	(1.6)		

a) Mean ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

**Fig. 5 SIM chromatograms of standard solution and sample solution**

LC-MS condition are shown in Table 2

(A) Standard solution (The amount of indoxacarb is 0.125 ng.)

(B) Sample solution of formula feed for layer spiked indoxacarb at 50 µg/kg

(↓: Retention time of indoxacarb)

3.10 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、添加回収試験により得られるピークの SN 比が 10 及び 3 となる濃度をそれぞれ求めた。

その結果、ピークの SN 比が 10 となる濃度は、5 µg/kg (乾牧草では 0.5 mg/kg) であった。

確認のため、成鶏飼育用配合飼料、肉用牛肥育用配合飼料及びとうもろこしにインドキサカルブと

して 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量, 乾牧草 (アルファルファ乾草) に 0.5 mg/kg 相当量を添加した試料について, 本法により 3 点併行で定量を行った. その結果は Table 7 のとおりであり, 成鶏飼育用配合飼料, 肉用牛肥育用配合飼料及びとうもろこしについては, 平均回収率は 77.2~83.5 %, その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD) として 9.3 %以下であり, また, 乾牧草 (アルファルファ乾草) については, 平均回収率は 91.8 %, その繰返し精度は RSD として 17 %であった.

以上の結果から, 本法の定量下限は 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (乾牧草では 0.5 mg/kg) と考えられた.

また, 検出下限は, SN 比が 3 となる濃度として 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (乾牧草では 0.2 mg/kg) であった.

Table 7 Results of recovery test for indoxacarb at the level of limit of quantification

Spiked level	(%)							
	Formula feed for layer		Formula feed for beef cattle		Corn		Alfalfa hay	
	Recovery ^{a)}	RSD ^{b)}	Recovery ^{a)}	RSD ^{b)}	Recovery ^{a)}	RSD ^{b)}	Recovery ^{a)}	RSD ^{b)}
0.5 mg/kg							91.8	(17)
5 $\mu\text{g}/\text{kg}$	81.5	(9.3)	83.5	(4.3)	77.2	(6.3)		

a) Mean recovery ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

3.11 共同試験

本法の再現精度を調査するため, 肉用牛肥育用配合飼料及びアルファルファ乾草に, インドキサカルブとして, それぞれ 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 及び 5 mg/kg 相当量を添加した試料を用いて, アジレント・テクノロジ株式会社アプリケーションセンター, 株式会社島津総合分析試験センター, 全国酪農業協同組合連合会分析センター, 社団法人日本科学飼料協会科学飼料研究センター, 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, 同仙台センター及び同神戸センター大阪事務所 (8 試験室) において, 本法に従って共同試験を実施した.

ここでイオン化法として ESI 法を採用して共同試験を実施した試験室が 2 試験室あったが, 筆者らの機種で見られたのと同様と考えられる回収率の低下 (3.2 参照) が認められた試験室があったことから, ESI 法による試験結果は除外し, APCI 法で共同試験を実施した 6 試験室について結果の解析を行った.

その結果, Table 8 のとおり, 肉用牛肥育用配合飼料の平均回収率は 93.8 %, その繰返し精度及び室間再現精度は, 相対標準偏差 (RSD_r 及び RSD_R) としてそれぞれ 5.1 %及び 8.1 %であり, HorRat は 0.37 であった.

また, アルファルファ乾草の平均回収率は 87.6 %, その繰返し精度及び室間再現精度は, RSD_r 及び RSD_R としてそれぞれ 4.9 %及び 14 %であり, HorRat は 1.1 であった.

配合飼料において, HorRat が 0.5 を下回っていたが, 特に本分析法の手順及び共同試験の要領に異常があったとは考えられなかった.

なお, 参考のため, 各試験室で使用した液体クロマトグラフ質量分析計の機種等を Table 9 に示した.

Table 8 Collaborative study results

Lab. No.	Formula feed for beef cattle		Alfalfa hay	
	(µg/kg)		(mg/kg)	
1	50.3	48.7	4.78	4.74
2	43.2	44.2	3.98	3.82
3	45.5	44.6	4.33	4.18
4	48.6	56.6	5.22	5.48
5	45.4	45.0	3.56	4.16
6	45.6	45.2	4.26	3.99
Spiked level	50.0		5.00	
Mean value ^{a)}	46.9		4.38	
Recovery (%)	93.8		87.6	
RSD _r ^{b)} (%)	5.1		4.9	
RSD _R ^{c)} (%)	8.1		14	
PRSD _R ^{d)} (%)	22		13	
HorRat	0.37		1.1	

a) $n=12$

b) Relative standard deviations of repeatability within laboratory

c) Relative standard deviations of reproducibility between laboratories

d) Predicted relative standard deviations of reproducibility between laboratories calculated from the modified Horwitz equation

Table 9 Instruments used in the collaborative study

Lab.No.	Instrument	LC column
		(i.d. × length, particle size)
1	SHIMADZU LCMS-2010EV	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (3×250 mm, 5 µm)
2	Waters micromass Quattro Micro	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (4.6×150 mm, 5 µm)
3	SHIMADZU LCMS-2010EV	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (3×250 mm, 5 µm)
4	Agilent Technologies Agilent 6410	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1×150 mm, 5 µm)
5	SHIMADZU LCMS-2010EV	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (3×250 mm, 5 µm)
6	Agilent Technologies Agilent 6410	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (3×250 mm, 5 µm)

4 まとめ

飼料中のインドキサカルブについて、分析センター法を基に、液体クロマトグラフ質量分析計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、次の結果を得た。

1) イオン化法として、大気圧化学イオン化 (APCI) 法 (正イオンモード) , モニターイオンとし

て、 m/z 528 (プロトン付加分子 $[M+H]^+$) を適用したところ良好に測定が可能であった。

- 2) 液体クロマトグラフ質量分析計の溶離液にメタノール-5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 (4+1) , カラムに ZORBAX Eclipse XDB-C18 (内径 3.0 mm, 長さ 250 mm, 粒径 5 μ m) を適用したところ良好に測定が可能であった。
- 3) 検量線はインドキサカルブとして 0.005~5 ng の範囲で直線性を示した。
- 4) 多孔性ケイソウ土カラムからの溶出画分の検討を行ったところ, 溶出溶媒の必要量は 100 mL であった。
- 5) シリカゲルミニカラムからの溶出画分の検討を行ったところ, 溶出溶媒の必要量は 20 mL であった。
- 6) 合成ケイ酸マグネシウムミニカラムからの溶出画分の検討を行ったところ, 溶出溶媒の必要量は 20 mL であった。
- 7) 成鶏飼育用配合飼料, 肉用牛肥育用配合飼料, とうもろこし及びアルファルファ乾草にインドキサカルブとして 500 及び 50 μ g/kg 相当量 (アルファルファ乾草については 50 及び 5 mg/kg 相当量) を添加し, 本法に従って添加回収試験を実施したところ, 平均回収率 77.7~91.7 %, その繰返し精度は, 相対標準偏差 (RSD) として 4.8 %以下の成績が得られた。
- 8) 本法によるインドキサカルブの定量下限は試料中で 5 μ g/kg (乾牧草の試料では 0.5 mg/kg) , 検出下限は 2 μ g/kg (同 0.2 mg/kg) と考えられた。
- 9) 肉用牛肥育用配合飼料及びアルファルファ乾草に, インドキサカルブとして, それぞれ 50 μ g/kg 及び 5 mg/kg 相当量を添加した試料を用いて, 6 試験室において, 本法による共同試験を実施した。その結果, 肉用牛肥育用配合飼料の平均回収率は 93.8 %, その繰返し精度及び室間再現精度は, 相対標準偏差 (RSD_r 及び RSD_R) としてそれぞれ 5.1 %及び 8.1 %であり, HorRat は 0.37 であった。また, アルファルファ乾草の平均回収率は 87.6 %, その繰返し精度及び室間再現精度は, RSD_r 及び RSD_R としてそれぞれ 4.9 %及び 14 %であり, HorRat は 1.1 であった。
なお, 本法は, 平成 21 年 5 月 1 日付けで飼料分析基準に収載された。

謝 辞

共同試験に参加して頂いたアジレント・テクノロジー株式会社, 株式会社島津総合分析試験センター, 全国酪農業協同組合連合会, 社団法人日本科学飼料協会及び財団法人日本食品分析センターの試験室の各位に感謝の意を表します。

文 献

- 1) 環境庁告示: “農薬取締法第 3 条第 1 項第 4 号から第 7 号までに掲げる場合に該当するかどうかの基準を定める等の件第 1 号イの環境大臣の定める基準”, 昭和 48 年 7 月 24 日, 告示第 46 号 (1973).
- 2) 財団法人日本食品分析センター: 平成 18 年度飼料中の有害物質等残留基準を設定するための分析法開発及び家畜等への移行調査委託事業 飼料中の有害物質等の分析法の開発 (2007).
- 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) 石橋 隆幸, 吉村 正寿, 牧野 大作: 飼料研究報告, 32, 13 (2007).