

# 1 稲わら及び稲発酵粗飼料中のベンスルフロンメチル及びその他の農薬6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分析法の開発

船木 紀夫\*, 小堀 拓也\*, 関口 好浩\*

## Development of Simultaneous Determination Method of Bensulfuron-Methyl and Other 6 Pesticide Ingredients in Rice Straw and Whole-Crop Rice Silage by LC-MS/MS

FUNAKI Norio\*, KOBORI Takuya\* and SEKIGUCHI Yoshihiro\*

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

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

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 seven pesticides. 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 and WCRS. Seven pesticide ingredients were added at the levels of 0.04 and 0.5 mg/kg for rice straw and 0.02 and 0.2 mg/kg for WCRS respectively. The resulting mean recoveries ranged as following: 84.1 % to 96.0 % for azimsulfuron; 91.7 % to 120 % for bensulfuron-methyl; 89.7 % to 118 % for cyclosulfamuron; 70.7 % to 90.0 % for ethoxysulfuron; 72.6 % to 85.7 % for flucetosulfuron; 71.4 % to 82.8 % for halosulfuron-methyl; and 75.2 % to 82.5 % for imazosulfuron. The repeatability in the form of the relative standard deviation (RSD<sub>r</sub>) was as following: less than 8.4 % for azimsulfuron; less than 3.2 % for bensulfuron-methyl; less than 3.4 % for cyclosulfamuron; less than 4.7 % for ethoxysulfuron; less than 6.4 % for flucetosulfuron; less than 8.9 % for halosulfuron-methyl; and less than 15 % for imazosulfuron.

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

キーワード：アジムスルフロン；ベンスルフロンメチル；シクロスルフアムロン；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；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

\* 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

## 1 緒 言

ベンスルフロンメチルは 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、飼料の有害物質の管理基準値<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。

令和 3 年度に武田ら<sup>4)</sup>は、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、ベンスルフロンメチル、シクロスルフアムロン、エトキシスルフロン及びイマゾスルフロンの同時定量法<sup>5)</sup> (以下「JFRL 法」という。) を基に、飼料用稲 (稲わら、WCRS 及び粃米) 中のベンスルフロンメチルを対象として飼料分析基準への収載の可否を検討し、稲わら、WCRS 及び粃米のいずれにも適用可能な定量法 (以下「LC-MS/MS 法」という。) であることを報告した。

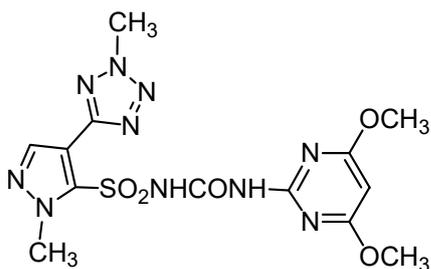
その際、ベンスルフロンメチルと同じスルホニアウレア系除草剤であるアジムスルフロン、シクロスルフアムロン、エトキシスルフロン、フルセトスルフロン及びイマゾスルフロンについても、JFRL 法を適用できる可能性を考慮し、同時定量法としての適用を併行して検討した。なお、フルセトスルフロンについては、平成 27 年に一般財団法人日本食品分析センターにより JFRL 法への適用の妥当性が確認されている<sup>6)</sup>。さらに、管理基準値として稲わらで 0.2 mg/kg、WCRS で 0.8 mg/kg と設定されており、平成 21 年に JFRL 法とは異なる方法<sup>7)</sup>が開発されているハロスルフ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、同時定量法としての適用を検討した。

その結果、シクロスルフアムロン、エトキシスルフロン及びフルセトスルフロンについては、ベンスルフロンメチルとの同時定量法として適用可能であることが確認された。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 においてマトリックス効果によるイオン化抑制のため、回収率が飼料分析基準別表 3 の試験法の妥当性確認法ガイドライン (以下「妥当性確認法ガイドライン」という。) に定められた真度の目標値を満たさなかった。

そこで今回、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を追加するため、稲わら及び WCRS を用いて、LC-MS/MS 法の改良を検討するとともに、7 成分同時定量法の飼料分析基準への収載の可否を検討したので、その概要を報告する。

参考に各農薬の構造式等を Fig. 1 に示した。

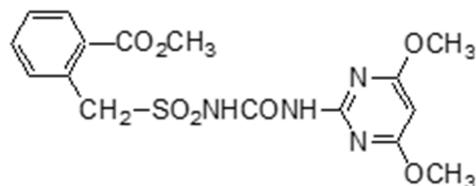
Azimsulfuron



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

C<sub>13</sub>H<sub>16</sub>N<sub>10</sub>O<sub>5</sub>S MW: 424.40 CAS No.: 120162-55-2

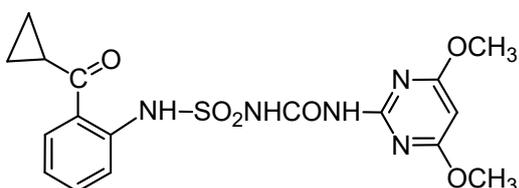
Bensulfuron-methyl



Methyl  $\alpha$ -(4,6-dimethoxypyrimidin-2-ylcarbamoylsulfamoyl)-o-toluate

C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>S MW: 410.40 CAS No.: 83055-99-6

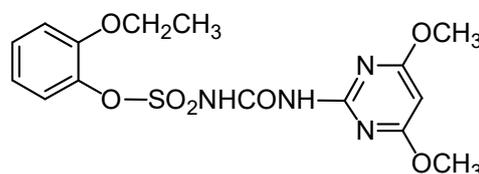
Cyclosulfamuron



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: 421.43 CAS No.: 136849-15-5

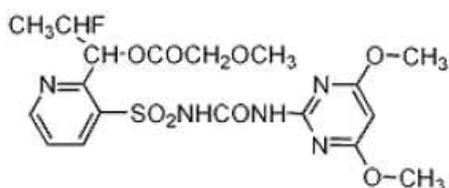
Ethoxysulfuron



1-(4,6-dimethoxypyrimidin-2-yl)-3-(2-ethoxyphenoxy)sulfonylurea

C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>S MW: 398.39 CAS No.: 126801-58-9

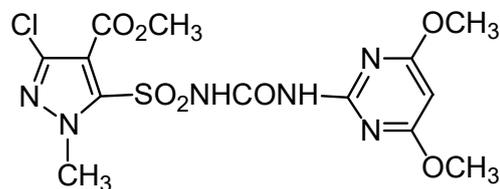
Flucetosulfuron



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: 487.46 CAS No.: 412928-75-7

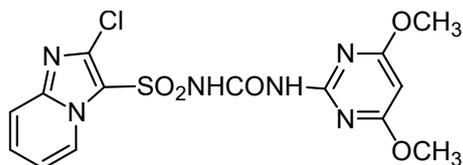
Halosulfuron-methyl



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

C<sub>13</sub>H<sub>15</sub>ClN<sub>6</sub>O<sub>7</sub>S MW: 434.81 CAS No.: 100784-20-1

Imazosulfuron



1-(2-chloroimidazo[1,2-a]pyridin-3-ylsulfonyl)-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: 412.81 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。稲発酵粗飼料は 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、ヘキサン及びトルエンは残留農薬・PCB 試験用を用いた。メタノールは LC-MS 用（富士フイルム和光純薬製）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 %溶液、富士フイルム和光純薬製）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) 農薬標準品

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各標準品は、Table 1 に示した供給業者、純度のものを用いた。

Table 1 Pesticide standards used in this study

Compound	Manufacturer	Purity(%)
Azimsulfuron	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	99.9
Bensulfuron-methyl	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	100
Cyclosulfamuron	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	99.3
Ethoxysulfuron	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	99.7
Flucetosulfuron	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	99.6
Halosulfuron-methyl	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	99.9
Imazosulfuron	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	100

#### 3) 農薬標準原液

農薬標準品各 25 mg を量ってそれぞれ 50 mL の全量フラスコに入れ、アセトンを加えて溶かし、更に標線までアセトン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 20 µg を含有）。

使用に際して、農薬混合標準原液の一部を、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 を含有する農薬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（目開き 1 mm スクリーン、回転数（仕様）1430 rpm）
- 2) 振り混ぜ機：レシプロシェーカーSR-2W タイテック製（使用時振動数 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 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。更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 2 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、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。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各農薬を溶出させた。

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。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、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。また、必要に応じて試料溶液の一部をアセトニトリル-水 (1+1) で正確に希釈し、同様に LC-MS/MS による測定に供した。

## 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- 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 $^{\circ}$ C
Detector	Quadrupole mass spectrometer
Ionization	Electrospray ionization (ESI) (Positive ion mode)
Ion source temperature	120 $^{\circ}$ C
Desolvation gas	N <sub>2</sub> (600 L/h, 400 $^{\circ}$ 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を求めて検量線を作成し、試料中のベンスルフロンメチル等の量を算出した。

なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。

- Sample 10.0 g (300 mL Erlenmeyer flask)
- added 30 mL of water and allowed to stand for 30 min
  - added 120 mL of acetone and shook for 30 min
  - filtered through filter paper (No. 5B of JIS P3801) under reduced pressure
  - washed with 50 mL of acetone
  - filled up to 200 mL with acetone
  - transferred 10 mL of sample solution to 50 mL evaporator flask
  - evaporated to the volume of 2 mL under 40 °C
  - added 2.5 mL of 0.1 mol/L hydrochloric acid
- InertSep K-solute (applicable sample volume 5mL)
- placed a receiver (100 mL evaporator flask)
  - applied sample solution and allowed to stand for 10 min
  - washed the 50 mL evaporator flask with 5 mL of hexane-ethyl acetate (3:1) and eluted (twice)
  - eluted with 40 mL of hexane-ethyl acetate (3:1)
  - evaporated under 40 °C and dried with nitrogen gas
  - added 10 mL of acetonitrile-water-formic acid (50:50:1)
- ENVI-carb (500 mg)
- washed with 5 mL of acetonitrile and 5 mL of 1 v/v% formic acid solution
  - applied sample solution
  - washed the evaporator flask with 5 mL of acetonitrile-formic acid (99:1) and eluted (twice)
  - placed a receiver (100 mL evaporator flask)
  - eluted with 30 mL of acetonitrile-toluene-formic acid (75:25:1)
  - evaporated under 40 °C and dried with nitrogen gas
  - added 5 mL of acetonitrile-water (1:1)
  - filtered through a membrane filter (0.2 µm)
  - (five-fold dilution with acetonitrile-water (1:1) )
- LC-MS/MS

Scheme 1 Analytical procedure for azimsurufuron, bensulfuron-methyl, cyclosurufamuron, etoxysulfuron, flucetosulfuron, halosulfuron-methyl and imazosulfuron in rice straw and whole-crop rice silage (WCRS)

## 2.5 添加回収試験

2.2 の 4) の農薬混合標準原液をアセトンで正確に希釈し添加に用いた。

各農薬として、稲わらに 0.04 及び 0.5 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 4 及び 50 ng/mL）、WCRS に原物換算して 0.02 及び 0.2 mg/kg 相当量（同 4 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 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。同時に、この試料溶液をアセトニトリル-水 (1+1) で 4 倍又は 5 倍に希釈したのもも定量した。

なお WCRS について、添加は風乾物試料に対して各農薬として 0.04 及び 0.5 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 マトリックス効果の確認

令和3年度の検討において、最終試料溶液を希釈することによりマトリックス効果を低減できる可能性が認められた。そこで、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（希釈しない最終試料溶液中で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4倍及び5倍に希釈した液それぞれについて、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、アジムスルフロン、ベンスルフロンメチル、シクロスルファムロン、エトキシスルフロン及びフルセトスルフロンについて、マトリックスによる影響は認められなかった。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試料溶液を4倍又は5倍希釈することで、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、試料マトリックスの測定値への顕著な影響は認められなかった。

Table 4 Matrix effect study by diluted sample solution

Pesticides	Matrix effect <sup>a)</sup> (%)					
	Rice straw			WCRS		
	×1 <sup>b)</sup>	×4 <sup>c)</sup>	×5 <sup>d)</sup>	×1 <sup>b)</sup>	×4 <sup>c)</sup>	×5 <sup>d)</sup>
Azimsulfuron	93.5	102	96.5	88.0	99.1	96.2
Bensulfuron-methyl	99.1	105	106	98.1	101	102
Cyclosulfamuron	101	103	104	98.5	99.7	104
Ethoxysulfuron	94.6	104	100	96.3	100	100
Flucetosulfuron	87.5	99.5	101	92.1	101	99.8
Halosulfuron-methyl	74.2	97.9	97.0	77.0	96.3	96.2
Imazosulfuron	72.1	91.0	97.5	72.3	92.1	90.0

$n = 3$

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).

b) No dilution

c) 4-times dilution

d) 5-times dilution

#### 3.2 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のとおり、ベンスルフロンメチル及びシクロスルファムロンについては、試料溶液を希釈しない場合で平均回収率はそれぞれ91.7~120%及び89.7~118%、その繰返し精度は相対標準偏差（RSD<sub>r</sub>）としてそれぞれ3.2%以下及び3.4%以下の成績が得られた。アジムスルフロン、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については、試料溶液を5倍希釈した場合で平均回収率はそれぞれ84.1~96.0%、70.7~90.0%、72.6~85.7%、71.4~82.8%及び75.2~82.5%、RSD<sub>r</sub>はそれぞれ8.4%以下、4.7%以下、6.4%以下、8.9%以下及び15%以下の成績が得られた。これらは妥当性確認法ガイドラインに定められた目標値（真度：70%以上120%以下、精度：0.04

mg/kg では 22 %以下, 0.5 mg/kg では 18 %以下) 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. 2 に示した.

Table 5 Recoveries for pesticides (1)

Pesticides	Feed types	Spiked level (mg/kg as fed basis) <sup>a)</sup>	Dilution ratio	Recovery <sup>b)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>c)</sup> (%)
Azimsulfuron	Rice straw	0.04	×1 <sup>d)</sup>	50.2	2.3
			×4 <sup>e)</sup>	83.6	3.8
			×5 <sup>f)</sup>	87.2	5.7
	WCRS	0.5	×1	81.0	6.4
			×4	93.4	5.5
			×5	96.0	7.0
		0.02	×1	79.8	7.1
			×4	85.3	2.2
			×5	84.1	3.7
Bensulfuron-methyl	Rice straw	0.04	×1	91.7	1.9
			×4	99.5	3.2
			×5	103	3.7
	WCRS	0.5	×1	116	3.2
			×4	120	3.8
			×5	123	2.7
		0.02	×1	120	1.4
			×4	120	5.0
			×5	120	2.4
Cyclosulfamuron	Rice straw	0.04	×1	89.7	3.4
			×4	92.0	2.7
			×5	94.7	3.8
	WCRS	0.5	×1	109	2.0
			×4	117	3.4
			×5	119	3.3
		0.02	×1	116	1.4
			×4	118	3.7
			×5	113	2.5
Ethoxysulfuron	Rice straw	0.04	×1	62.0	3.6
			×4	71.9	7.4
			×5	77.5	4.7
	WCRS	0.5	×1	83.9	2.4
			×4	89.2	2.2
			×5	90.0	2.5
		0.02	×1	71.9	3.6
			×4	69.9	3.2
			×5	70.7	1.4
0.2	×1	74.8	1.2		
	×4	74.1	2.0		
	×5	76.9	3.8		

Table 5 Recoveries for pesticides (2)

Pesticides	Feed types	Spiked level (mg/kg as fed basis) <sup>a)</sup>	Dilution ratio	Recovery <sup>b)</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> <sup>c)</sup> (%)
Flucetosulfuron	Rice straw	0.04	×1	59.0	3.8
			×4	75.6	5.8
			×5	85.7	5.8
		0.5	×1	76.0	2.7
			×4	84.0	3.2
			×5	84.9	5.4
	WCRS	0.02	×1	69.5	4.2
			×4	70.9	4.3
			×5	72.6	6.4
		0.2	×1	72.8	9.7
			×4	72.9	3.3
			×5	75.8	6.0
Halosulfuron-methyl	Rice straw	0.04	×1	47.8	2.0
			×4	74.3	8.0
			×5	82.8	7.7
		0.5	×1	61.7	3.2
			×4	78.1	4.8
			×5	80.6	5.1
	WCRS	0.02	×1	58.5	2.2
			×4	71.8	3.6
			×5	71.4	5.0
		0.2	×1	62.8	6.4
			×4	72.5	6.1
			×5	75.4	8.9
Imazosulfuron	Rice straw	0.04	×1	46.8	5.8
			×4	75.1	7.2
			×5	78.8	15
		0.5	×1	62.5	6.4
			×4	78.6	6.4
			×5	82.5	5.8
	WCRS	0.02	×1	61.1	10
			×4	75.1	4.9
			×5	75.3	2.8
		0.2	×1	64.9	8.8
			×4	70.9	8.8
			×5	75.2	7.3

a) The pesticides were spiked to air-dried WCRS samples one night prior to extraction. The spiked levels were 0.04 and 0.5 mg/kg as air-dry basis for each pesticide. The levels of each pesticide 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

d) No dilution

e) 4-times dilution

f) 5-times dilution

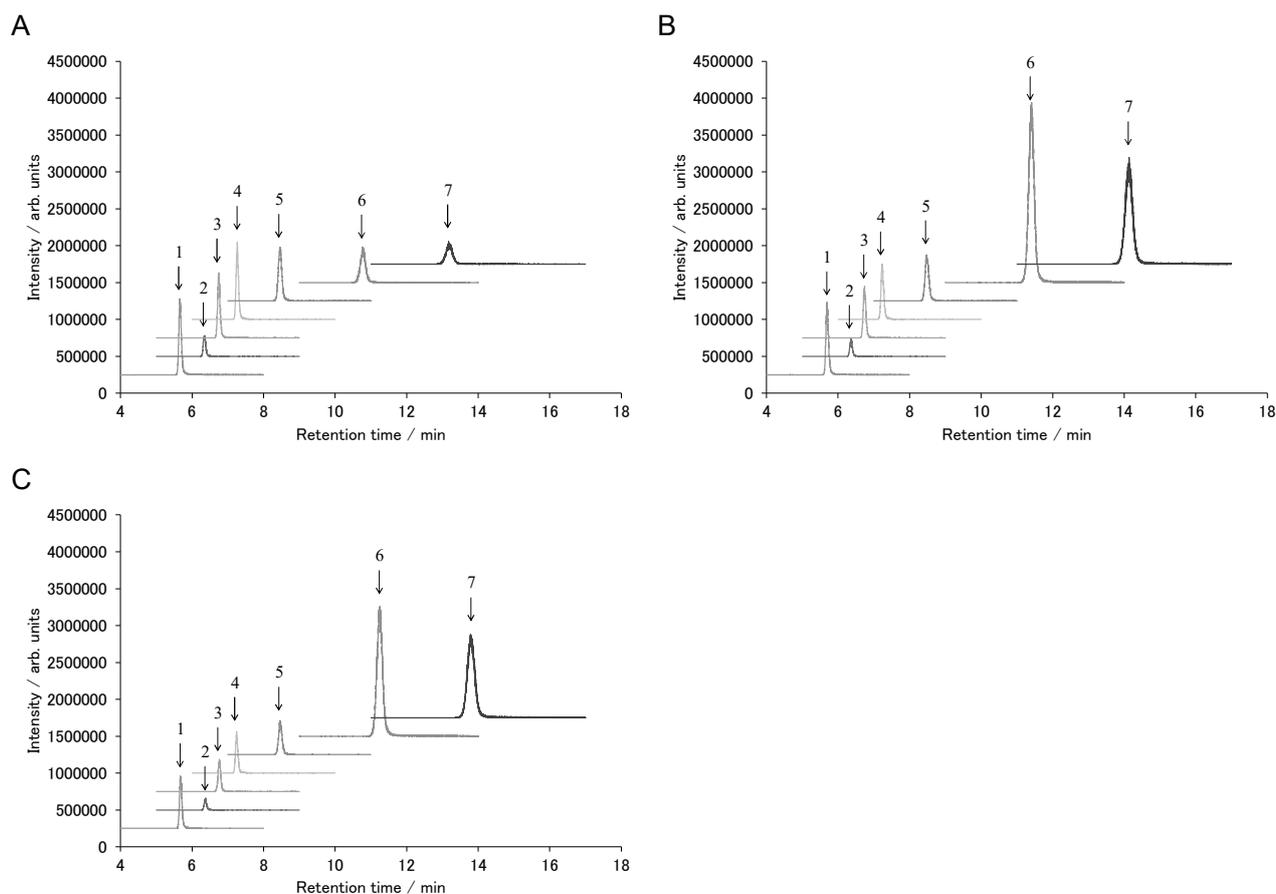


Fig. 2 Typical selected reaction monitoring chromatograms of pesticides in standard and spiked sample solutions

(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 (10 ng/mL: 0.04 ng as each pesticide)

B: Sample solution of rice straw (spiked at 0.5 mg/kg of azimsulfuron, imazosulfuron, flucetosulfuron, halosulfuron-methyl and ethoxysulfuron (as 10 ng/mL: 0.04 ng in five-fold diluted sample solution) and at 0.5 mg/kg bensulfuron-methyl and cyclosulfamuron (as 50 ng/mL: 0.2 ng in sample solution))

C: Sample solution of WCRS (spiked at 0.5 mg/kg of azimsulfuron, imazosulfuron, flucetosulfuron, halosulfuron-methyl and ethoxysulfuron (as 10 ng/mL: in five-fold diluted sample solution) and at 0.5 mg/kg of bensulfuron-methyl and cyclosulfamuron (as 50 ng/mL: 0.2 ng in sample solution))

### 3.3 定量下限及び検出下限

令和3年度の検討において、ベンスルフロンメチル及びシクロスルファムロンを除く5農薬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（稲わら中で0.04 mg/kg相当量（5倍希釈した試料溶液中で0.8 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、それら5農薬の定量下限の濃度

は 0.04 mg/kg とした。この濃度は、5 農薬の中で唯一管理基準値が設定されている、ハロスルフロ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 0.2 mg/kg 及び 0.225 mg/kg）に対してそれぞれ 1/5 及び 8/45 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 0.1 mg/kg 未満：2/5 以下，基準値 0.1 mg/kg 以上：1/5 以下）を満たしていた。なお、最終試料溶液を希釈せずに測定するベンスルフロンメチル及びシクロスルファミロンの定量下限の濃度は、令和 3 年度の検討に基づき 0.01 mg/kg とした。

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、検出下限は試料中でベンスルフロンメチル及びシクロスルファミロンを除く 5 農薬で 0.01 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 0.1 mg/kg 未満：1/5 以下，基準値 0.1 mg/kg 以上：1/10 以下）を満たしていた。なお、最終試料溶液を希釈せずに測定するベンスルフロンメチル及びシクロスルファミロンの検出下限は、令和 3 年度の検討に基づき 0.003 mg/kg とした。

#### 4 まとめ

飼料用稲（稲わら及び WCRS）に残留するアジムスルフロロン，ベンスルフロンメチル，シクロスルファミロン，エトキシスルフロロン，フルセトスルフロロン，ハロスルフロメチル及びイマズスルフロロンについて，JFRL 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収載の可否について検討したところ，ベンスルフロンメチル及びシクロスルファミロンについては最終試料溶液を希釈せずに，他の 5 農薬については稲わら及び WCRS 中のマトリックスによる影響を低減するため，最終試料溶液を 5 倍希釈することで以下の結果が得られた。

- 1) 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，各試料マトリックスの測定値への顕著な影響は認められなかった。
- 2) 各農薬として稲わらに 0.04 及び 0.5 mg/kg 相当量，WCRS に原物換算して 0.02 及び 0.2 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していた。
- 3) 本法のベンスルフロンメチル及びシクロスルファミロン（試料溶液を希釈せずに測定）の定量下限は 0.01 mg/kg，検出下限は 0.003 mg/kg であった。他の 5 農薬（試料溶液を 5 倍希釈して測定）の定量下限は 0.04 mg/kg，検出下限は 0.01 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。

#### 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) 武田 然也，船木 紀夫，関口 好浩：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，飼料研究報告，47，46-61 (2022).

- 5) 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).
- 6) 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).
- 7) 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).