

6 飼料中のトリシクラゾールのガスクロマトグラフ質量分析計による定量法

野崎 友春*, 山多 利秋*

Determination of Tricyclazole in Feed by GC-MS

Tomoharu NOZAKI* and Toshiaki YAMATA*

(* Food and Agricultural Materials Inspection Center (I.A.A.), Fertilizer and Feed Inspection Department)

An analytical method for determination of tricyclazole in feed by using gas chromatograph-mass spectrometer (GC-MS) was developed.

Tricyclazole was extracted with acetonitrile-water and filtered. The filtrate was purified by Chem Elut cartridge chromatography, by gel permeation chromatography (GPC) with a Shodex CLNpak EV-2000AC column, and by silica-gel column chromatography. Tricyclazole was determined by capillary column GC-MS.

A recovery test was conducted with corn and alfalfa spiked with tricyclazole at 20 and 5,000 µg/kg. The mean recoveries of tricyclazole were in the range of 73.2~81.0% and the relative standard deviations (RSD) were within 13.9%.

A collaborative study was conducted with corn and timothy spiked with tricyclazole at 20 and 5,000 µg/kg was conducted in 8 laboratories. The mean quantitative value of corn was 20.1 µg/kg (100.7%), repeatability and reproducibility as the relative standard deviation (RSD_r and RSD_R) were 7.1% and 16%, and HorRat was 0.72. As for timothy, these values were 5,090 µg/kg (102%), 6.8%, 17% and 1.3, respectively.

Key words: トリシクラゾール tricyclazole ; 残留農薬 pesticide residue ; ガスクロマトグラフ質量分析計 gas chromatograph-mass spectrometer (GC-MS) ; ゲル浸透クロマトグラフィー gel permeation chromatography (GPC) ; 穀類 grain ; 乾牧草 grass hay ; 共同試験 collaborative study

1 緒 言

農林水産省では、食品の安全性を確保する観点から、飼料原料に用いられている農薬を中心に60種類の農薬について、飼料安全法に基づいて残留基準値を設定し、平成18年5月29日付で施行した。

しかしながら、トリシクラゾールについては、飼料中の分析法が確立されていないことから、昨年検討したガスクロマトグラフ質量分析計による飼料中の農薬の一斉分析法¹⁾及び厚生労働省の試験法²⁾を基にして、今回、飼料中のトリシクラゾールの分析法について検討を行ったのでその概要を報告する。

トリシクラゾールは、ダウアグロケミカルが開発した、メラニン生合成阻害系の殺虫殺菌剤である。国内では他の農薬との合剤として、稲のいもち病及び主要害虫対策として登録されている。

* 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

国内での飼料中の基準は、乾牧草が 5 mg/kg, その他穀物が 0.02 mg/kg である³⁾. 国内での食品中の暫定基準は玄米として 3 mg/kg, その他作物では 0.02 mg である²⁾.

2 実験方法

2.1 試料

市販の飼料原料（とうもろこし），配合飼料及び乾牧草（チモシー及びフェスク）をそれぞれ 1 mm の網ふるいを通過するまで粉碎し，供試試料とした．

2.2 試薬

1) トリシクラゾール標準原液

トリシクラゾール標準品（和光純薬工業製，純度 100.0%）25 mg を正確に量って 50 mL の褐色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トリシクラゾール標準原液を調製した（この液 1 mL は，各農薬 0.5 mg を含有する．）．

使用に際して，トリシクラゾール標準原液の一定量をアセトンで正確に希釈し，1 mL 中にトリシクラゾールとしてそれぞれ 0.002 µg, 0.005 µg, 0.01 µg, 0.02 µg, 0.05 µg, 0.1 µg 及び 0.2 µg を含有するトリシクラゾール標準液を調製した．

2) アセトニトリル，酢酸エチル，ヘキサン，シクロヘキサン及びアセトンは残留農薬分析用試薬を用いた．

特記している以外の試薬については特級を用いた．

2.3 装置及び器具

1) ガスクロマトグラフ質量分析計：島津製作所製 GCMS-QP2010

2) ゲル浸透クロマトグラフ：島津製作所製 GPC システム

ポンプ：LC-10ATvp

オートサンプラー：SIL-10A

フラクションコレクター：FRC-10A

3) 振とう機：タイテック製 レシプロシェーカー SR-2W

4) エバポレーター：BÜCHI 製 R-200

5) 多孔性ケイソウ土カートリッジ：Varian 製 Chem Elut CE 1020 (20 mL 容)

6) シリカゲルカートリッジ：Waters 製 Sep-Pak Plus Silica

7) メンブランフィルター：Waters 製 WTPS フィルター（孔径 0.5 µm, 直径 25 mm）

2.4 定量方法

1) 抽出

試料 10.0 g を量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ，アセトニトリル-水（13+7）を乾牧草にあっては 100 mL, その他の試料にあっては 50 mL 加え，30 分間振り混ぜて抽出した．乾牧草にあっては，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，容器及び残さをアセトニトリル 50 mL で洗浄し，吸引ろ過し更に全量フラスコの標線までアセトニトリルを加えた．抽出液 20 mL を正確に 100 mL のなす形フラスコに入れ，40°C 以下の水浴上で約 5 mL まで減圧濃縮し，カートリッジカラムクロマトグラフィー I に供する試料溶液とした．その他の試料にあっては，300 mL のなす形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，容器及び残さをアセトニトリル

50 mL で洗浄し、吸引ろ過した。ろ液を 40°C 以下の水浴上で約 15 mL まで減圧濃縮し、カートリッジカラムクロマトグラフィー I に供する試料溶液とした。

2) カートリッジカラムクロマトグラフィー I

試料溶液を多孔性ケイソウ土カートリッジに入れ、容器を水 5 mL で洗浄し、洗液を多孔性ケイソウ土カートリッジに加え 5 分間放置した。200 mL のなす形フラスコを多孔性ケイソウ土カートリッジの下に置き、容器を酢酸エチルーヘキサン (1+1) 20 mL ずつで 3 回洗浄し、洗液を順次多孔性ケイソウ土カートリッジに加え、液面が充てん剤の上面に達するまで流出させた。酢酸エチルーヘキサン (1+1) 40 mL を加えてトリシクラゾールを溶出させ、キーパーとしてジエチレングリコールアセトン (1+49) 1 mL を加え、溶出液を 40°C 以下の水浴上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。シクロヘキサンアセトン (4+1) 10 mL を正確に加えて残留物を溶かし、10 mL 遠心沈殿管に入れ、1,000×g で遠心分離をした後、上澄み液メンブランフィルター (孔径 0.5 μm 以下) でろ過し、ゲル浸透クロマトグラフィーに供する試料溶液とした。

3) ゲル浸透クロマトグラフィー

試料溶液 5.0 mL をゲル浸透クロマトグラフに注入し、トリシクラゾールが溶出する画分を 100 mL のなす形フラスコに分取し、40°C 以下の水浴上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。ゲル浸透クロマトグラフの条件を Table 1 に示した。

ヘキサンアセトン (1+1) 2 mL を加えて残留物を溶かし、カートリッジカラムクロマトグラフィー II に供する試料溶液とした。

Table 1 Operating conditions for GPC

Column	Shodex CLNpak EV-2000 AC (20 mm i.d.×300 mm, 15 μm)
Guard column	Shodex CLNpak EV-G AC (20 mm i.d.×100 mm, 15 μm)
Eluent	Cyclohexane-acetone (4:1)
Flow rate	5 mL/min
Fraction volume	150~190 mL

4) カートリッジカラムクロマトグラフィー II

シリカゲルカートリッジを注射筒に連結し、あらかじめアセトン 5 mL 及びヘキサン 5 mL で順次洗浄した。25 mL のなし形フラスコをシリカゲルカートリッジの下に置き、試料溶液を注射筒に入れ、液面が充てん剤の上面に達するまで流出させた。試料溶液の入っていた容器をヘキサンアセトン (1+1) 2 mL ずつで 2 回洗浄し、洗液を順次シリカゲルカートリッジに加え、液面が充てん剤の上面に達するまで流出させた。ヘキサンアセトン (1+1) 4 mL をシリカゲルカートリッジに加えてトリシクラゾールを溶出させ、溶出液を 40°C 以下の水浴上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。

アセトン 2 mL を正確に加えて残留物を溶かし、ガス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。

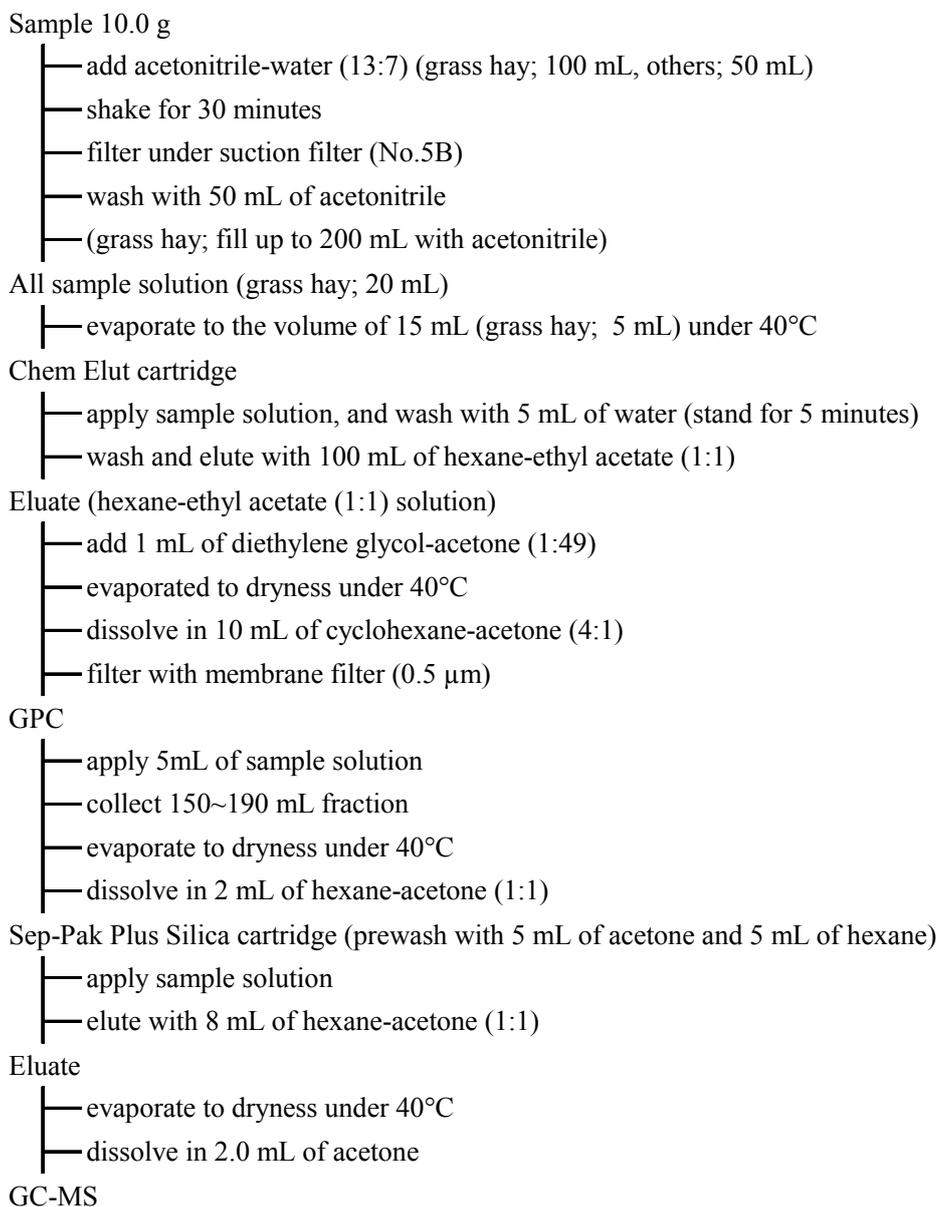
5) ガスクロマトグラフ質量分析計による測定

試料溶液及びトリシクラゾール標準液各 1 μL をガスクロマトグラフ質量分析計に注入し、選択イオン検出クロマトグラムを得た。

6) 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高さを求めて検量線を作成し、試料中のトリシクラゾールを算出した。

なお、定量法の概要を Scheme 1 に、ガスクロマトグラフィーの測定条件を Table 2 に示した。



Scheme 1 Analytical procedure for tricyclazole in feeds by using GC-MS

Table 2 Operating conditions for GC-MS

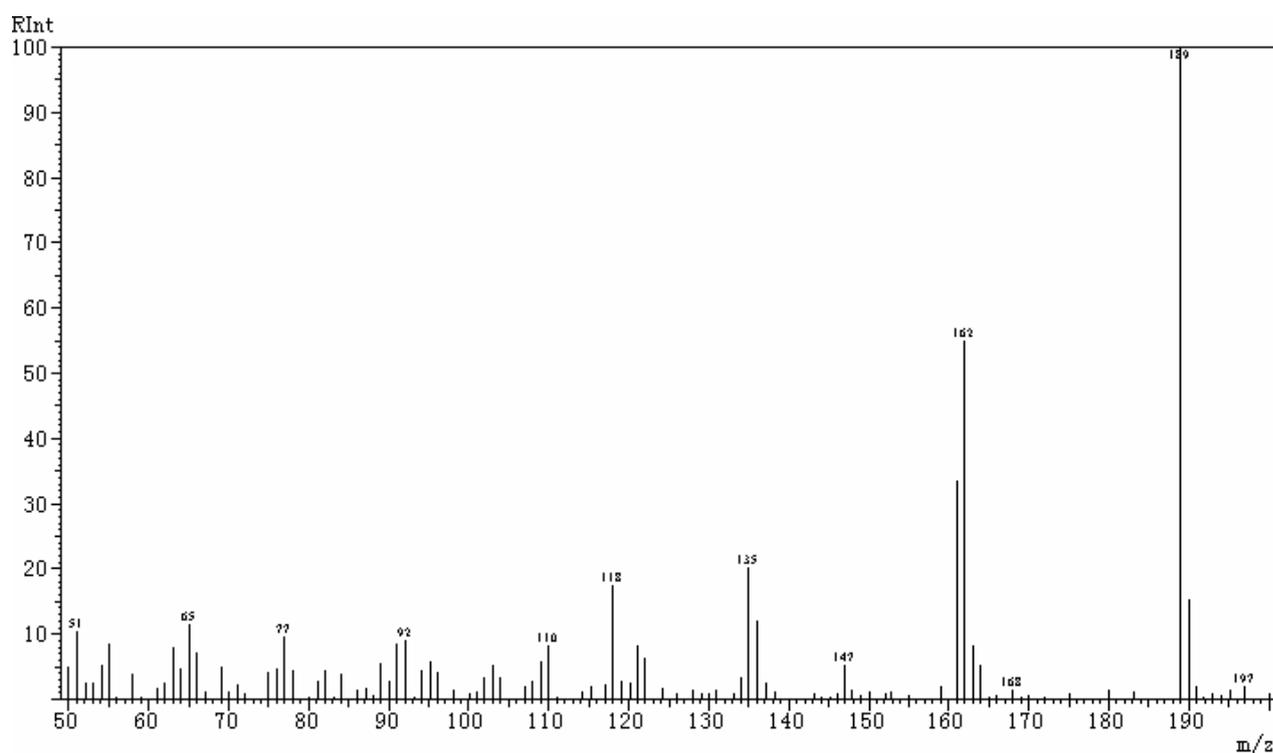
Column	Rtx-5MS (0.25 mm i.d.×30 m; 0.25 μm film thickness)
Column temp.	70°C (1 min) →25°C/min→200°C→8°C/min→280°C (10 min)
Injection mode	Splitless
Injector temp.	280°C
Carrier gas	He 1.0mL/min
Transferline temp.	250°C
Ion source temp.	230°C
Ionization	Electron impact
Ionization energy	70 eV
Monitor ion	<i>m/z</i> 189, 162, 161

3 結果及び考察

3.1 測定イオンの設定

0.1 μg/mL トリシクラゾール標準液 1 μL をガスクロマトグラフ質量分析計に注入し、scan モードで測定した。トリシクラゾールのマススペクトルを Fig. 1 に示す。

この結果から、分子イオンであると考えられる *m/z* 189 を定量イオンに、*m/z* 161 及び 162 を確認イオンとして設定した。

**Fig. 1 Mass spectrum of tricyclazole**

3.2 検量線

調製した 0.002, 0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1 及び 0.2 μg/mL のトリシクラゾール標準液各 1 μL をガスクロマトグラフに注入し、得られたクロマトグラムからトリシクラゾール

ルの検量線を作成した。

その結果、検量線は 0.005~0.5 ng の範囲で原点を通る直線性を示した。

3.3 カートリッジカラムクロマトグラフィーIの検討

先に検討したガスクロマトグラフ質量分析計による飼料中の農薬の一斉分析法の精製方法のうち多孔性ケイソウ土カートリッジを用いて、カートリッジカラムクロマトグラフィーIの溶出画分を検討した。

トリシクラゾール標準原液をアセトンで正確に希釈し、1 mL 中にトリシクラゾールとして 1.0 µg を含有する標準液を調製し、2.4 の 2) のカートリッジカラムクロマトグラフィーI に供する試料溶液とし、水 15 mL を負荷した後に、試料溶液 1 mL を負荷し、酢酸エチルーヘキサン (1+1) でトリシクラゾールを画分に溶出した。その結果は Table 3 のとおりであり、溶出に用いる酢酸エチルーヘキサン (1+1) の量は 100 mL で十分と考えられた。

Table 3 Elution pattern of tricyclazole from Chem Elut cartridge (standard solution)

	Fraction volume (mL)			
	0-50	50-100	100-150	150-200
Tricyclazole	94	5	1	0

3.4 ゲル浸透クロマトグラフィーの検討

ゲル浸透クロマトグラフィーの溶出画分を検討した。

3.3 と同様に 1 mL 中にトリシクラゾールとして 1.0 µg を含有する標準液を調製し、2 mL を正確にとり、乾固した後に、シクロヘキサン-アセトン (4+1) 10 mL に溶解し、2.4 の 3) のゲル浸透クロマトグラフィーに供する試料溶液とし、50 mL から 210 mL の間でトリシクラゾールを画分に溶出した。その結果は Table 4 のとおりであり、分取する溶出画分は 150~190 mL が適当と考えられた。

Table 4 Elution pattern of tricyclazole from GPC (standard solution)

	Fraction volume (mL)							
	50-70	-90	-110	-130	-150	-170	-190	-210
Tricyclazole	0	0	0	0	0	46	54	0

3.5 カートリッジカラムクロマトグラフィーIIの検討

シリカゲルカートリッジカラムクロマトグラフィーの溶出画分を検討した。

3.3 と同様に 1 mL 中にトリシクラゾールとして 1.0 µg を含有する標準液を調製し、2.4 の 4) のカートリッジカラムクロマトグラフィーII に供する試料溶液とし、1 mL を負荷した後にヘキサン-アセトン (1+1) でトリシクラゾールを画分に溶出した。その結果は Table 5 のとおりであり、溶出に用いるヘキサン-アセトン (1+1) の量は 10 mL で十分と考えられた。

Table 5 Elution pattern of tricyclazole from silica-gel cartridge (standard solution)

	(%)		
	Fraction volume (mL)		
	0-10	10-20	20-30
Tricyclazole	93	7	0

3.6 妨害物質の検討

成鶏飼育用配合飼料，とうもろこし及び乾牧草（フェスク）にトリシクラゾールをそれぞれ 100 µg/kg 相当量添加し，本法に従って分析したところ特に定量に影響する妨害はなかった。

3.7 添加回収試験

とうもろこしにトリシクラゾールとして 20 µg/kg 相当量添加した試料及び乾牧草（フェスク）にトリシクラゾールとして 5,000 µg/kg 相当量添加した試料を用い，本法に従って操作し，その回収率及び分析精度を検討した。

その結果，Table 6 のとおりであった。

Table 6 Recoveries of tricyclazole spiked two kinds of feed

Spiked level (µg/kg)	(%)	
	Corn	Alfalfa
20	73.2 ^{a)} (10) ^{b)}	---
5,000	---	81.0 (14)

a) Mean recovery ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

3.8 共同試験

本法の再現精度を調査するため，共通試料による共同試験を実施した。

穀類（とうもろこし）及び乾牧草（チモシー）を用い，株式会社島津総合分析試験センター，社団法人日本科学飼料協会科学飼料研究センター，財団法人日本穀物検定協会中央研究所，財団法人日本食品分析センター多摩研究所，全国酪農業協同組合連合会分析センター，独立行政法人肥飼料検査所（現（独）農林水産消費安全技術センター）本部，同大阪事務所（現同神戸センター大阪事務所）及び同福岡事務所（現同福岡センター）の 8 試験室で共同分析を実施した。

その結果は Table 8 のとおり，とうもろこし中のトリシクラゾールの平均回収率は 100.7%，その室内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 7.1%及び 16%であり，HorRat は 0.72 であった。また，チモシー中のトリシクラゾールの平均回収率は 101.8%，その室内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 6.8%及び 17%であり，HorRat は 1.3 であった。

なお，参考のため，各試験室で使用したガス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 Quantitative value of tricyclazole from corn spiked at 20 µg/kg and timothy spiked at 5,000 µg/kg in the collaborative study

Lab. No.	(µg/kg)			
	Corn		Timothy	
1	17.9	19.2	5,020	4,570
2	19.3	20.2	4,040	4,670
3	16.6	19.6	5,070	4,820
4	21.1	21.2	4,450	4,950
5	14.8	16.8	4,100	4,590
6	54.5 ^{e)}	53.1 ^{e)}	15,900 ^{e)}	15,400 ^{e)}
7	23.0	23.4	6,670	6,040
8	22.6	26.2	5,940	6,330
Spiked level	20.0		5,000	
Mean value ^{a)}	20.1		5,090	
Recovery (%)	101		102	
RSD _r ^{b)} (%)	7.1		6.8	
RSD _R ^{c)} (%)	16		17	
PRSD _R ^{d)} (%)	22		13	
HorRat	0.72		1.3	

a) $n=14$ (without Lab No. 6)

b) Relative standard deviation of repeatability within same laboratory

c) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

d) Predicted Relative standard deviation of reproducibility between laboratories calculated from the modified Horwitz equation

e) Excluded by the single Grubbs test

Table 9 Instruments used in the collaborative study

Lab. No.	GC-MS	Column (i.d.×length, film thickness)
1	SHIMADZU GCMS-QP2010	HP-5ms (0.25 mm×30 m, 0.25 µm)
2	GC: Agilent 6890, MS: Agilent 5973	HP-5ms (0.25 mm×30 m, 0.25 µm)
3	SHIMADZU GCMS-QP2010	HP-5ms (0.25 mm×30 m, 0.25 µm)
4	SHIMADZU GCMS-QP2010	HP-5ms (0.25 mm×30 m, 0.25 µm)
5	SHIMADZU GCMS-QP2010	HP-5ms (0.25 mm×30 m, 0.25 µm)
6	GC: Agilent 5890II plus, MS: Agilent 5972	Rtx-5MS (0.25 mm×30 m, 0.25 µm)
7	GC: Agilent 6890N, MS: Agilent 5973	HP-5ms (0.25 mm×30 m, 0.25 µm)
8	SHIMADZU GCMS-QP2010	ZB-1 (0.32 mm×30 m, 0.25 µm)

4 まとめ

ガスクロマトグラフ質量分析計を用いた飼料中のトリシクラゾールの定量法について検討したところ、次の結果を得た。

- 1) 検量線は 0.005~0.5 ng の範囲で原点を通る直線性を示した。
- 2) とうもろこし及び乾牧草にそれぞれトリシクラゾールとして 20 µg/kg 及び 5,000 µg/kg 相当量を添加し、添加回収試験を実施した結果、平均回収率は 73.2~81.0%、その繰返し精度は相対標

準偏差 (RSD) として、14%以下であった。

- 3) とうもろこし及び乾牧草にトリシクラゾールとしてそれぞれ 20 µg/kg 及び 5,000 µg/kg 相当量を添加した試料を用いて、8 試験室で本法による共同試験を実施した。その結果、とうもろこしの平均回収率は 101%であり、その室内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 7.1%及び 16%であり、HorRat は 0.72 であった。また、乾牧草の平均回収率は 102%であり、その室内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 6.8%及び 17%であり、HorRat は 1.3 であった。

なお、本法は、平成 18 年 12 月 18 日付けで飼料分析基準に収載された⁴⁾。

また、添加回収試験及び定量下限の検討については、財団法人日本食品分析センターで検討を行っている⁵⁾ことからこちらを参照されたい (p.225) . 謝 辞

共同試験にご協力をいただいた株式会社島津総合分析試験センター、社団法人日本科学飼料協会、財団法人日本穀物検定協会、財団法人日本食品分析センター及び全国酪農業協同組合連合会の試験室の各位に感謝の意を表します。

文 献

- 1) 農林水産省畜産局長通知：“飼料分析基準の制定について”，平成 7 年 11 月 15 日，7 畜 B 第 1660 号 (1995).
- 2) 厚生労働省告示：“食品，添加物等の規格基準の一部を改正する件”，平成 17 年 11 月 29 日，平成 17 年厚生労働省告示第 499 号 (2005).
- 3) 農林省令：“飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令”，昭和 51 年 7 月 24 日農林省令第 35 号 (1976).
- 4) 農林水産省消費・安全局長通知：“飼料分析基準の一部改正について”，平成 18 年 12 月 18 日，18 消安第 9921 号 (2006).
- 5) 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」，平成 19 年 3 月，財団法人日本食品分析センター (2007).