

1 飼料用稲中のプロクロラズの高クロマトグラフ質量分析計による定量法の開発及び共同試験

齊木 雅一*

Development and Collaborative Study of Determination Method of Prochloraz in Rice Straw, Whole-crop Rice Silage and Paddy Rice for Feed by GC-MS

Masakazu SAIKI*

(* Sapporo Regional Center, Food and Agricultural Materials Inspection Center)

This paper presents the results of a validation and a collaborative study that I have conducted for developing a quantitative determination method of the concentration of prochloraz in rice straw, whole-crop rice silage (WCRS) and paddy rice for feed using a gas chromatograph-mass spectrometer (GC-MS).

Having added water to a sample, prochloraz was extracted with acetone, and the extracted solution was filtered. The filtrate was then diluted with acetone to a volume of 200 mL. The diluted solution was purified with Chem Elut (Agilent Technologies Inc.; Santa Clara, CA, USA). Having decomposed to 2,4,6-trichlorophenol in pyridinium chloride, purified with liquid-liquid partition, trimethylsilylated, and injected into a GC-MS to determine the concentration of 2,4,6-trichlorophenol. The GC separation was then carried out on a fused silica capillary column (DB-1MS, 0.32 mm i.d. × 30 m, 0.25 µm film thickness, Agilent Technologies Inc.; Santa Clara, CA, USA). The mass spectrometer was operated in electron ionization (EI) mode.

Recovery tests were conducted on rice straw, WCRS and paddy rice. Prochloraz was intentionally added at the levels of 0.02 and 0.2 mg/kg for rice straw, 0.00889 and 0.0889 mg/kg for WCRS in original matter, and 0.02 and 2 mg/kg for paddy rice respectively. 2,4,6-trichlorophenol was intentionally added at the levels of 0.01 and 0.1 mg/kg for rice straw, 0.0044 and 0.044 mg/kg for WCRS in original matter, and 0.01 and 1 mg/kg for paddy rice respectively. The resulting mean recoveries ranged from 101 % to 117 % for prochloraz and 99.3 % to 117 % for 2,4,6-trichlorophenol respectively. The repeatability in the form of the relative standard deviation (RSD_r) was less than 15 % for prochloraz and less than 12 % for 2,4,6-trichlorophenol respectively.

A collaborative study was conducted by eleven laboratories using rice straw, WCRS and paddy rice, all of which were added with prochloraz according to the following specifications: 0.2 mg/kg for rice straw, 0.2 mg/kg for WCRS and 2 mg/kg for paddy rice respectively. The resulting mean recoveries ranged from 97.6 % to 101 %. The repeatability and reproducibility in the form of relative standard deviation (RSD_r and RSD_R) were less than 10 % and less than 18 % respectively. The HorRat was less than 1.2.

This method was thus validated as useful for inspections of prochloraz in rice straw, WCRS and paddy rice for feed.

Key words: prochloraz ; 2,4,6-trichlorophenol ; gas chromatograph-mass spectrometer (GC-MS); rice for feed; rice straw; whole-crop rice silage; paddy rice; collaborative study

* 独立行政法人農林水産消費安全技術センター札幌センター

キーワード：プロクロラズ；2,4,6-トリクロロフェノール；ガスクロマトグラフ質量分析計；飼料用稲；稲わら；稲発酵粗飼料；粃米；共同試験

1 緒 言

プロクロラズは、Boots 社が開発したイミダゾール系の殺菌剤である¹⁾。エルゴステロール合成を阻害し、子囊菌類及び大部分の不完全菌類に対して抗菌活性を示す¹⁾。浸透性に優れ、稲のいもち病、ばか苗病等の防除を主とした種子消毒、その他に小麦、らっきょう、チューリップ等の殺菌防除に使用されている¹⁾。

飼料中のプロクロラズの管理基準値は、稲わらで0.2 mg/kg、稲発酵粗飼料（以下「WCRS」という。）で0.1 mg/kg²⁾、食品、添加物等の規格基準における残留基準値は、米（玄米）で2 ppm、小麦、大麦及びライ麦で0.5 ppmである³⁾。プロクロラズは環境中や植物体中で代謝され、イミダゾール環が開裂して尿素骨格をもつ *N*-ホルミル-*N'*-1-プロピル-*N'*-[2-(2,4,6-トリクロロフェノキシ)エチル]尿素及び *N*-プロピル-*N*-[2-(2,4,6-トリクロロフェノキシ)エチル]尿素となり、更に加水分解を受けて2,4,6-トリクロロフェノールになることが明らかになっている⁴⁾。

今回、財団法人日本食品分析センターが「平成21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。）を用いた定量法⁵⁾（以下「JFRL法」という。）を基に、飼料用稲中のプロクロラズのGC-MSを用いた定量法を開発するとともに、共通試料を用いた共同試験を実施し、飼料分析基準⁶⁾への適用の可否を検討したので、その概要を報告する。

参考にプロクロラズ及びその代謝物の構造式等を Fig. 1 に示した。本法は食品の試験法⁷⁾と同様、プロクロラズ及びその代謝物を2,4,6-トリクロロフェノールに分解して定量するため、これらの物質が共存している場合には定量値は全ての合計量として算出されるが、*N*-ホルミル-*N'*-1-プロピル-*N'*-[2-(2,4,6-トリクロロフェノキシ)エチル]尿素及び *N*-プロピル-*N*-[2-(2,4,6-トリクロロフェノキシ)エチル]尿素については標準品が入手困難であったため、本検討は2,4,6-トリクロロフェノール及びプロクロラズを用いて実施した。

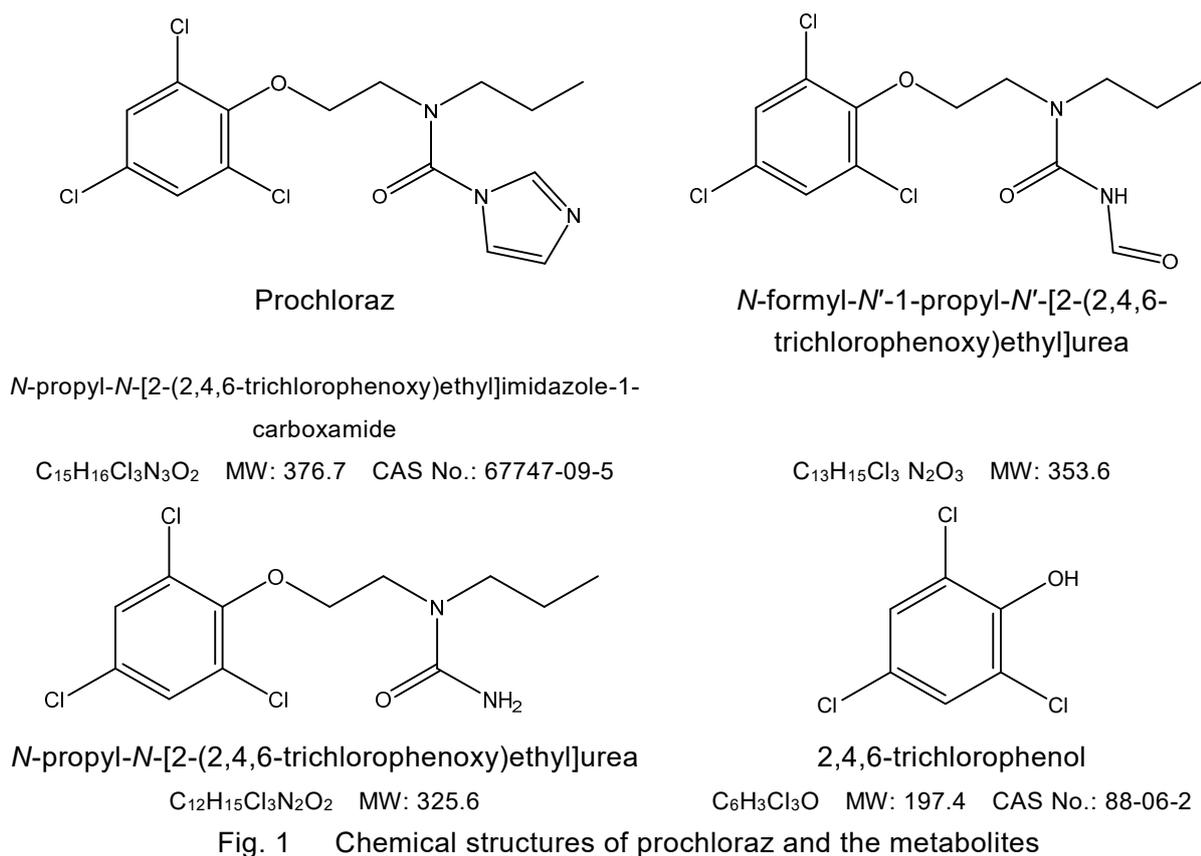


Fig. 1 Chemical structures of prochloraz and the metabolites

2 実験方法

2.1 分析法開発

2.1.1 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砕機で粉砕した。WCRS は 60 °C で 5 時間乾燥後、更に室内に静置して風乾した後、同様に粉砕した。

2.1.2 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。*N,O*-ビス（トリメチルシリル）トリフルオロアセトアミドはガスクロマトグラフ用（和光純薬工業製）を用いた。ジエチレングリコール及び塩酸は試薬特級を用いた。塩化ピリジニウムは和光一級（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) プロクロラズ標準原液

プロクロラズ標準品（和光純薬工業製，純度 98 %）25 mg を正確に量って 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プロクロラズ標準原液を調製した（この液 1 mL は，プロクロラズとして 0.5 mg を含有する。）。

3) 2,4,6-トリクロロフェノール標準液

2,4,6-トリクロロフェノール標準品（和光純薬工業製，純度 99 %）25 mg を正確に量って 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 2,4,6-トリクロロフェノール標準原液を調製した（この液 1 mL は，2,4,6-トリクロロフェノールとして 0.5 mg を含有する。）。

使用に際して、2,4,6-トリクロロフェノール標準原液の一定量を、ヘキサンで正確に希釈し、1 mL 中に2,4,6-トリクロロフェノールとしてそれぞれ0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 20, 40, 60, 80 及び100 ng を含有する各2,4,6-トリクロロフェノール標準液を調製した。

4) 検量線作成用標準液

3)の各2,4,6-トリクロロフェノール標準液各1 mL をGC-MS用バイアルに正確に入れ、これに*N,O*-ビス(トリメチルシリル)トリフルオロアセトアミド50 µLを加え、ふたをして軽く振り混ぜ、GC-MSによる測定に供する各検量線作成用標準液とした。

2.1.3 装置及び器具

1) 粉碎機：

粉碎機1(粳米用)：

ZM-100 Retsch 製(目開き1 mm スクリーン, 使用時回転数14000 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)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：Chem Elut (20 mL 保持用) Agilent Technologies 製

4) ドライブロックバス：THB-1 アズワン販売

5) 反応管：Vacuum Hydrolysis Tube (19 × 100 mm) Wilmad-LabGlass 製

6) GC-MS：

GC部：GC-2010 島津製作所製

MS部：GCMS-QP2010 Plus 島津製作所製

2.1.4 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(粳米は20 mL)を加え、30分間静置した後、更にアセトン120 mL(粳米は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3 mL以下まで減圧濃縮し、カラム処理に供する試料溶液とした。

2) カラム処理

試料溶液を多孔性ケイソウ土カラムに入れ、10分間静置した。300 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プロクロラズを溶出させた。更に酢酸エチル100 mLをカラムに加えて同様に溶出させた。溶出液にアセトン-ジエチレングリコール(49+1)1 mLを加え、40 °C以下の水浴で約1 mLまで減圧濃縮し、5 mLの全量フラスコに入れた。溶出液の入っていたなす形フラスコを酢酸エチル1 mLずつで3回洗浄し、洗液を順次先の全量フラスコに合わせた。更に全量フラスコの標線まで酢酸エチルを加え、分解に供する試料溶液とした。

3) 分解

試料溶液 1 mL を反応管に正確に入れ、40 °C 以下で加温しながら窒素ガスを送って乾固させた。残留物に塩化ピリジニウム 1 g を加え、真空ポンプで吸引して反応管内を減圧した後密封した。これをドライブロックバスを用いて 200 °C で 3 時間加熱した後放冷し、ヘキサン転溶に供した。

4) ヘキサン転溶

反応管を開封し、塩酸 (1+50) 5 mL を加えて内容物を溶かし、内容物を 50 mL の共栓遠心沈殿管に入れた。反応管を塩酸 (1+50) 5 mL ずつで 3 回洗浄し、洗液を順次共栓遠心沈殿管に加えた。ヘキサン 4 mL を共栓遠心沈殿管に正確に加え、5 分間振り混ぜた。1000×g で 5 分間遠心分離し、更にヘキサン層の一部を 5000×g で 5 分間遠心分離した。上澄み液 1 mL を GC-MS 用バイアルに正確に入れた。これに *N,O*-ビス (トリメチルシリル) トリフルオロアセトアミド 50 µL を加え、ふたをして軽く振り混ぜ、GC-MS による測定に供する試料溶液とした。

5) GC-MS による測定

試料溶液及び各検量線作成用標準液各 2 µL を GC-MS に注入し、選択イオン検出 (以下「SIM」という。) クロマトグラムを得た。測定条件を Table 1 に示した。

Table 1 Operation conditions of GC-MS

Column	DB-1MS (0.32 mm i.d. × 30 m, 0.25 µm film thickness), Agilent Technologies
Column temperature	50 °C (hold for 1 min) → ramp 20 °C/min → 280 °C (hold for 10 min)
Injection mode	Splitless (60 s)
Injection port temperature	250 °C
Carrier gas	He 1.5 mL/min
Transferline temperature	250 °C
Ion source temperature	230 °C
Ionization	Electron ionization
Ionization energy	70 eV
Monitor ion	<i>m/z</i> 253 (for quantification) , 217 (for confirmation)

6) 計算

得られた SIM 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 2,4,6-トリクロロフェノール量を算出し、これに 1.91 を乗じて試料中のプロクロラズ量を算出した。

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 (paddy rice: 20 mL) and allowed to stand for 30 min
- added 120 mL of acetone (paddy rice: 100 mL) and shook for 30 min
- filtrated through No. 5B under reduced pressure
- washed with 50 mL of acetone
- filled up to 200 mL with acetone
- transferred 20 mL of sample solution to eggplant flask
- evaporated to the volume of 3 mL under 40 °C

Chem Elut

- applied sample solution to Chem Elut and allowed to stand for 10 min
- washed the eggplant flask with 20 mL of ethyl acetate and eluted (three times)
- eluted with 100 mL of ethyl acetate
- added 1 mL of acetone – diethylene glycol (49:1)
- evaporated to the volume of 1 mL under 40 °C
- transferred to 5 mL volumetric flask
- washed with 1 mL of ethyl acetate (three times)
- filled up to 5 mL with ethyl acetate

Decomposition

- 1 mL of sample solution
- dried with nitrogen
- added 1 g of pyridinium chloride and vacuumed
- heated to 200 °C for 3 hours
- dissolved in 5 mL of hydrochloric acid (1:50) and transferred to 50 mL centrifuge tube
- washed with 5 mL of hydrochloric acid (1:50) (three times)
- added 4 mL of hexane and shook for 5 min
- centrifuged at 1000×g and transferred hexane layer to tube
- centrifuged at 5000×g and transferred 1 mL of supernatant to GC-MS vial
- added 50 µL of *N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide

GC-MS

Scheme 1 Analytical procedure for prochloraz in rice straw, whole-crop rice silage (WCRS) and paddy rice for feed

2.1.5 窒素乾固における損失の防止の検討

2,4,6-トリクロロフェノール標準原液の一定量を酢酸エチルで正確に希釈し、1 mL 中に 2,4,6-トリクロロフェノールとして 5 ng を含有する標準液を調製した。標準液 2 mL ずつを 50 mL のなす形フラスコに正確に入れ、窒素ガスを吹き付け乾固させた後、更にそれぞれ窒素ガスを 0 秒間、30 秒間及び 60 秒間吹き付けたものを調製した。同様に標準液 2 mL ずつを 50 mL のなす形フラスコに正確に入れ、アセトン–ジエチレングリコール (49+1) 0.1 mL を加え窒素ガスを吹き付け乾固させた後、更にそれぞれ窒素ガスを 0 秒間、30 秒間及び 60 秒間吹き付けたものを調製した。ヘキササン 2 mL を正確に加えて残留物を溶かし、その 1 mL を GC-MS 用バイアルに正確に入れた。N,O-ビス (トリメチルシリル) トリフルオロアセトアミド 50 µL を加え、ふたをして軽く振り混ぜ、GC-MS による測定に供する試料溶液とした。

2.1.6 添加回収試験

2.1.2 の 2) のプロクロラズ標準原液及び 3) の 2,4,6-トリクロロフェノール標準原液をアセトン

で正確に希釈し添加に用いた。

プロクロラズとして、稲わらに 0.02 及び 0.2 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 2,4,6-トリクロロフェノールとして 0.524 及び 5.24 ng/mL），WCRS に原物換算して 0.00889 及び 0.0889 mg/kg 相当量（同 0.524 及び 5.24 ng/mL），粳米に 0.02 及び 2 mg/kg 相当量（同 0.524 及び 52.4 ng/mL），2,4,6-トリクロロフェノールとして、稲わらに 0.01 及び 0.1 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 0.5 及び 5 ng/mL），WCRS に原物換算して 0.00444 及び 0.0444 mg/kg 相当量（同 0.5 及び 5 ng/mL），粳米に 0.01 及び 1 mg/kg 相当量（同 0.5 及び 50 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、本法はプロクロラズを 2,4,6-トリクロロフェノールに分解して定量するため、添加回収試験はプロクロラズ及び 2,4,6-トリクロロフェノールをそれぞれ単独で添加して実施した。

また、WCRS において、添加は風乾物試料に対してプロクロラズとして 0.02 及び 0.2 mg/kg，2,4,6-トリクロロフェノールとして 0.01 及び 0.1 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。

2.2 共同試験

2.2.1 試料

プロクロラズ（代謝物を含む）を含有しないことを確認した稲わら及び粳米を、目開き 1 mm のスクリーンを装着した粉碎機で粉碎した。また、WCRS を 60 °C 以下で 5 時間乾燥し、更に室内に静置して風乾した後、同様に粉碎した。これらについて、約 12 g ずつ小分けしたもの（試料名は非明示）各 2 袋を試験用試料として計 6 袋を各試験室に配付した。

2.2.2 試薬

1) アセトン、酢酸エチル及びヘキサンは残留農薬・PCB 試験用又はこれ以上のものを用いた。N,O-ビス（トリメチルシリル）トリフルオロアセトアミドはガスクロマトグラフ用（和光純薬工業製）を用いた。ジエチレングリコール及び塩酸は試薬特級又はこれ以上の純度のものを用いた。塩化ピリジニウムは試薬一級又はこれ以上の純度のものを用いた。水は超純水（JIS K0211 の 5218 に定義された超純水）又は市販の液体クロマトグラフ用又はこれ以上のものを用いた。

2) プロクロラズ標準原液

2.1.2 の 2)と同様にプロクロラズ標準原液を調製した。

3) 2,4,6-トリクロロフェノール標準原液

2.1.2 の 3)と同様に 2,4,6-トリクロロフェノール標準原液を調製した。

4) 検量線作成用標準原液

3)で調製した 2,4,6-トリクロロフェノール標準原液 2.5 mL を 250 mL の全量フラスコに入れ、更に標線までアセトンを加えて、1 mL 中に 2,4,6-トリクロロフェノールとして 5 µg を含有する検量線作成用標準原液を調製した。

5) 稲わら及び WCRS 添加用標準液

2)で調製したプロクロラズ標準原液 2 mL を 500 mL の全量フラスコに入れ、更に標線までアセトンを加え、1 mL 中にプロクロラズとして 2 µg を含有する稲わら及び WCRS 添加用標準液

を調製した。

6) 粃米添加用標準液

2)で調製したプロクロラズ標準原液 10 mL を 250 mL の全量フラスコに入れ、更に標線までアセトンを加え、1 mL 中にプロクロラズとしてそれぞれ 20 µg を含有する粃米添加用標準液を調製した。

1)の *N,O*-ビス (トリメチルシリル) トリフルオロアセトアミド並びに濃度を非表示にした 4)の 1 本、5)の 4 本及び 6)の 2 本を、2.2.1 の試験用試料と併せて各試験室に配付した。

2.2.3 分析試料

非明示の 2 点反復で、2.2.1 の試験用試料を用いた。分析試料としては、プロクロラズとして稲わら及び WCRS にそれぞれ 0.2 mg/kg 相当量 (試験用試料 10 g に対して稲わら及び WCRS 添加用標準液 1 mL 添加) を、粃米にそれぞれ 2 mg/kg 相当量 (試験用試料 10 g に対して粃米添加用標準液 1 mL 添加) を、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。

2.2.4 定量方法

2.1.4 によった。

2.2.5 報告方法

2.2.3 の分析試料 6 点の分析値は、分析試料中濃度 (mg/kg) で表し、4 桁目を四捨五入して有効桁数 3 桁まで報告させることとした。

2.2.6 分析実施期間

平成 28 年 12 月 14 日から平成 29 年 2 月 3 日まで

2.2.7 解析方法

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、single Grubbs 検定及び paired 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_r) 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。

2.2.8 参加試験室

一般財団法人東京顕微鏡院 食と環境の科学センター、一般財団法人日本穀物検定協会 中央研究所、一般財団法人日本食品分析センター 多摩研究所、JA 東日本くみあい飼料株式会社 品質安全部 分析・開発センター、一般財団法人マイコトキシン検査協会、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)

3 結果及び考察

3.1 分析法開発

3.1.1 検量線

2.1.2 の 4)に従って調製した 2,4,6-トリクロロフェノール標準液の各検量線作成用標準液各 2 µL を GC-MS に注入し、得られた SIM 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 のとおりであり、2,4,6-トリクロロフェノールは 0.2~10 ng/mL (注入量として 0.04~20 pg 相当量) 及び 10~100 ng/mL (注入量として 20~200 pg 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、プロクロラズを 0.0076~0.38 mg/kg 及び 0.38~3.8 mg/kg 又は 2,4,6-トリクロロフェノールを 0.004~0.2 mg/kg 及び 0.2~2 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 2,4,6-トリクロロフェノール濃度範囲に相当する。

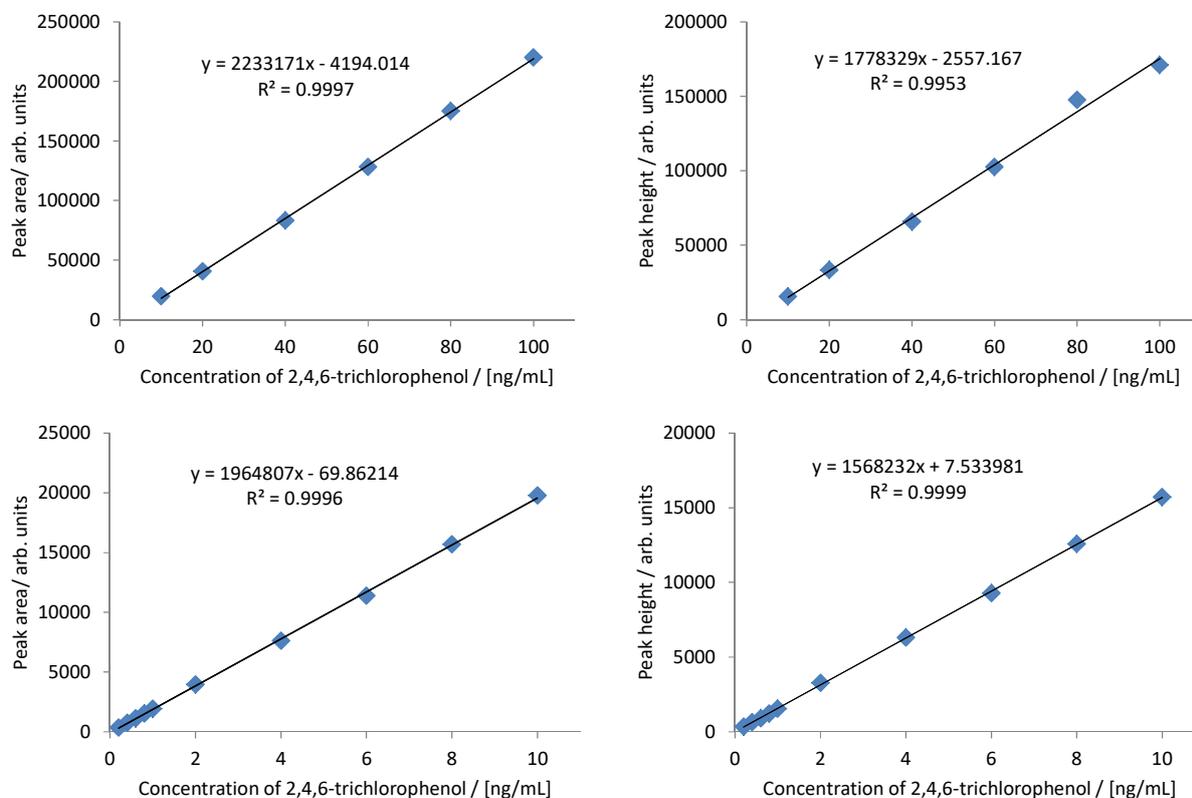


Fig. 2 Calibration curves of 2,4,6-trichlorophenol derivative
Peak area (left), peak height (right), 10~100 ng/mL (upper), 0.2~10 ng/mL (lower)

3.1.2 多孔性ケイソウ土カラムによる精製の適用の検討

2.1.4 の 1)により調製した試料溶液を JFRL 法に従い 500 mL の分液漏斗を用いて液液分配に供したところ、稲わら及び WCRS でエマルジョンが発生した。エマルジョンは静置しておけば消滅するものであったが、消滅するのに 15 分以上かかるものもあり、液液分配の操作に長時間を要した。そこで、多孔性ケイソウ土カラムの使用を検討した。

2.1.4 の 1)により調製したカラム処理に供する試料溶液にプロクロラズとして 200 ng (最終試料溶液中で 2,4,6-トリクロロフェノールとして 5.24 ng/mL 相当量) 及び 2,4,6-トリクロロフェノールとして 100 ng (最終試料溶液中で 5 ng/mL 相当量) をそれぞれ添加し、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 2 のとおりであり、プロクロラズ及び 2,4,6-トリクロロフェノールは酢酸エチル 160 mL で全て溶出した。このことから、JFRL 法の液液分配の代わりに多孔性ケイソウ土カラムによる精製を行うこととし、溶出溶媒は酢酸エチル 160 mL とした。

Table 2 Elution pattern of prochloraz and 2,4,6-trichlorophenol from Chem Elut

Feed types	Spiked components	Recovery ^{a)} (%)						Total
		Ethyl acetate (mL)						
		0~100	100~120	120~140	140~160	160~180	180~200	
Rice Straw	Prochloraz	94	3	3	1	0	0	101
	2,4,6-Trichlorophenol	98	7	2	0	0	0	107
WCRS	Prochloraz	91	1	1	0	0	0	93
	2,4,6-Trichlorophenol	87	1	0	0	0	0	88
Paddy rice	Prochloraz	86	12	6	3	0	0	107
	2,4,6-Trichlorophenol	101	0	0	0	0	0	101

a) Mean ($n = 2$)

3.1.3 分解に供する試料溶液の調製方法の変更

JFRL 法では酢酸エチル転溶後に減圧濃縮、窒素乾固、アセトン 2 mL で溶解し、その 1 mL を分解に供している。しかし、稲わら及び WCRS では、窒素乾固時に約 0.5 mL 程度の残留物が生じ、多孔性ケイソウ土カラムを用いた方法でも同程度の残留物が生じた。これをアセトン 2 mL で溶解し、その 1 mL を分解に供することは、定量操作において不正確であることから、カラム処理後の溶出液を 40 °C 以下の水浴で約 1 mL まで減圧濃縮した試料液を、5 mL の全量フラスコで定容し、その 1 mL を分解に供することとした。

3.1.4 窒素乾固における損失の防止

窒素気流による乾固操作における分析対象成分の損失の有無を確認するため、プロクロラズ標準液及び 2,4,6-トリクロロフェノール標準液をそれぞれ反応管に入れ窒素乾固し分解したところ、プロクロラズの回収率はほぼ 100 %であったが、2,4,6-トリクロロフェノールは 0 %に近い低回収率であった。

そこで、2.1.5 に従い検討を行ったところ、Table 3 のとおり、アセトン-ジエチレングリコール (49+1) を加えることにより、2,4,6-トリクロロフェノールの損失を防止することができた。そこで、カラム処理後の溶出液にアセトン-ジエチレングリコール (49+1) 1 mL を加えることとした。

Table 3 Loss of 2,4,6-trichlorophenol due to dryness

Acetone – diethylene glycol (49:1)	Recovery ^{a)} (%)		
	Duration of N ₂ gas spray after drying up		
	0 s	30 s	60 s
Spiked	114	105	94
Not spiked	22.6	6.3	0.0

a) Mean ($n = 2$)

3.1.5 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、2.1.4 により調製した試料溶液を GC-MS に注入し、得られた SIM クロマトグラムを確認したところ、WCRS 1 検体において妨害ピーク（風乾物試料に対して 0.001 mg/kg）が認められた。他の試料については定量を妨げるピ

ークは認められなかった。

そこで検出したピークの定量イオンと確認イオンの強度比を確認したところ、プロクロラズ（2,4,6-トリクロロフェノール）ではなく、妨害ピークと判断した。しかし、その面積は 3.1.8 で確認された定量下限に相当するピーク面積の 1/10 未満であり、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。）に定める選択性の許容範囲であることから、試験に支障のないものと判断した。

なお、得られた SIM クロマトグラムの一例を Fig. 3 に示した。

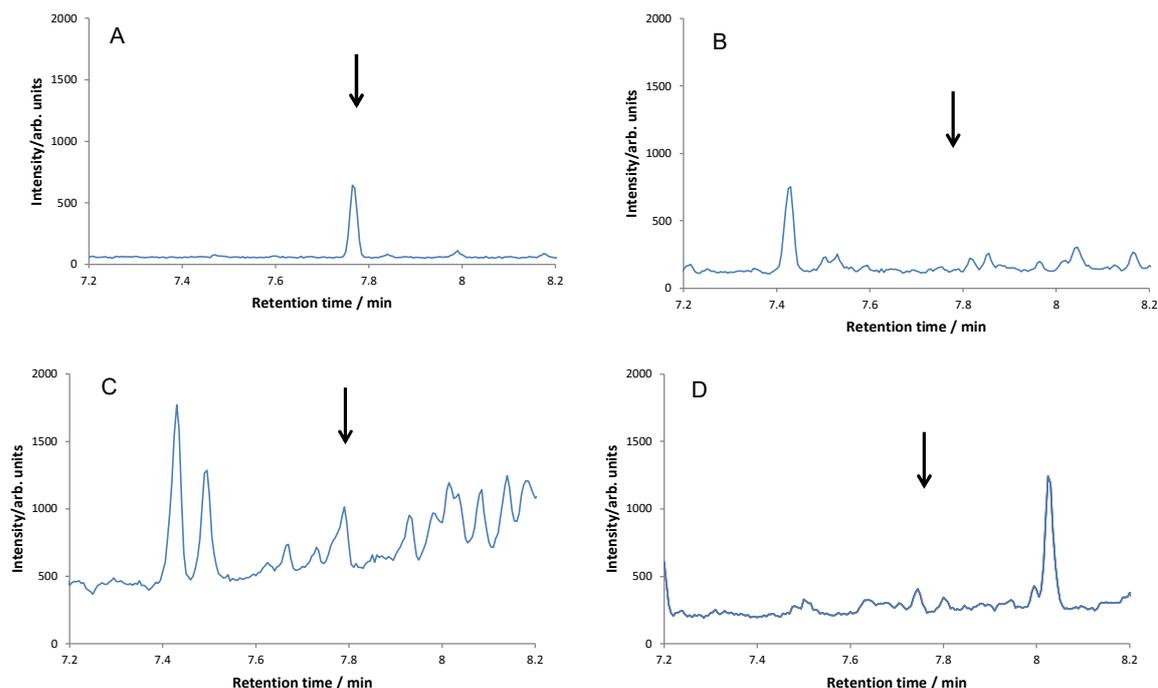


Fig. 3 Typical Selected Ion Monitoring (SIM) chromatograms of 2,4,6-trichlorophenol derivative in standard and blank sample solutions (GC-MS conditions are shown in Table 1. Arrows indicate the retention time of 2,4,6-trichlorophenol derivative.)

A: Standard solution (0.2 ng/mL)

B: Blank sample solution (rice straw)

C: Blank sample solution (WCRS)

D: Blank sample solution (paddy rice)

3.1.6 マトリックス効果の確認

2.1.4 の 1) から 4)により調製した稲わら、WCRS 及び粳米の *N,O*-ビス（トリメチルシリル）トリフルオロアセトアミドを加える前のブランク試料溶液 1 mL に、2,4,6-トリクロロフェノールとして 0.1 mg/kg 相当量（プロクロラズとして 0.191 mg/kg 相当量、最終試料溶液中で 5 ng/mL）及び *N,O*-ビス（トリメチルシリル）トリフルオロアセトアミド 50 μ L をそれぞれ添加した各マトリックス標準液について、ヘキサン 1 mL に 2,4,6-トリクロロフェノールとして 0.1 mg/kg 相当量（同 0.191 mg/kg 相当量、同 5 ng/mL）及び *N,O*-ビス（トリメチルシリル）トリフルオロアセトアミド 50 μ L をそれぞれ添加した標準液に対するピーク面積比を確認したところ、Table 4 のとお

りであり、2,4,6-トリクロロフェノー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。

Table 4 Matrix effect study

Samples	Concentration of 2,4,6-trichlorophenol		Matrix effect ^{b)} (%)
	in matrix standard solution (ng/mL)	in sample ^{a)} as prochloraz (mg/kg)	
Rice straw	5	0.191	109
WCRS	5	0.191 ^{c)}	110
Paddy rice	5	0.191	115

$n = 1$

a) Converted from the concentration in matrix standard solution

b) Ratio of peak area of 2,4,6-trichlorophenol in the presence of matrix to that in the absence of matrix

c) mg/kg air-dry matter

3.1.7 添加回収試験

2.1.6 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、プロクロラズについては平均回収率 101~117 %，その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD_r) として 15 %以下，2,4,6-トリクロロフェノールについては平均回収率 99.3~117 %， RSD_r として 12 %以下の成績が得られ，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（真度：70 %以上 120 %以下，精度：0.01，0.02 及び 0.1 mg/kg では 22 %以下，0.2 mg/kg では 20 %以下，1 mg/kg では 16 %以下，2 mg/kg では 14 %以下）を満たしていた。

なお，得られた SIM クロマトグラムの一例を Fig. 4 に示した。

Table 5 Recoveries for prochloraz and 2,4,6-trichlorophenol

Spiked components	Spiked level (mg/kg as fed basis)	Rice Straw		WCRS ^{c)}		Paddy rice	
		Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)
Prochloraz	0.00889	—	—	108	13	—	—
	0.02	114	12	—	—	102	15
	0.0889	—	—	117	4.8	—	—
	0.2	109	11	—	—	—	—
	2	—	—	—	—	101	5.5
2,4,6-Trichlorophenol	0.00444	—	—	117	6.4	—	—
	0.01	109	4.3	—	—	117	6.4
	0.0444	—	—	110	12	—	—
	0.1	99.3	3.0	—	—	—	—
	1	—	—	—	—	114	7.6

—: Not tested

a) Mean ($n = 5$)

b) Relative standard deviation of repeatability

c) Prochloraz and 2,4,6-trichlorophenol were spiked to air-dried WCRS samples one night prior to extraction.

The spiked levels were 0.02 and 0.2 mg/kg as air-dry basis for prochloraz, and 0.01 and 0.1 mg/kg as air-dry basis for 2,4,6-trichlorophenol respectively. The levels of prochloraz and 2,4,6-trichlorophenol in 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 prochloraz and 2,4,6-trichlorophenol as fed basis (moisture 60 %)

= the levels of prochloraz and 2,4,6-trichlorophenol as air-dry basis (moisture 10 %) / 2.25

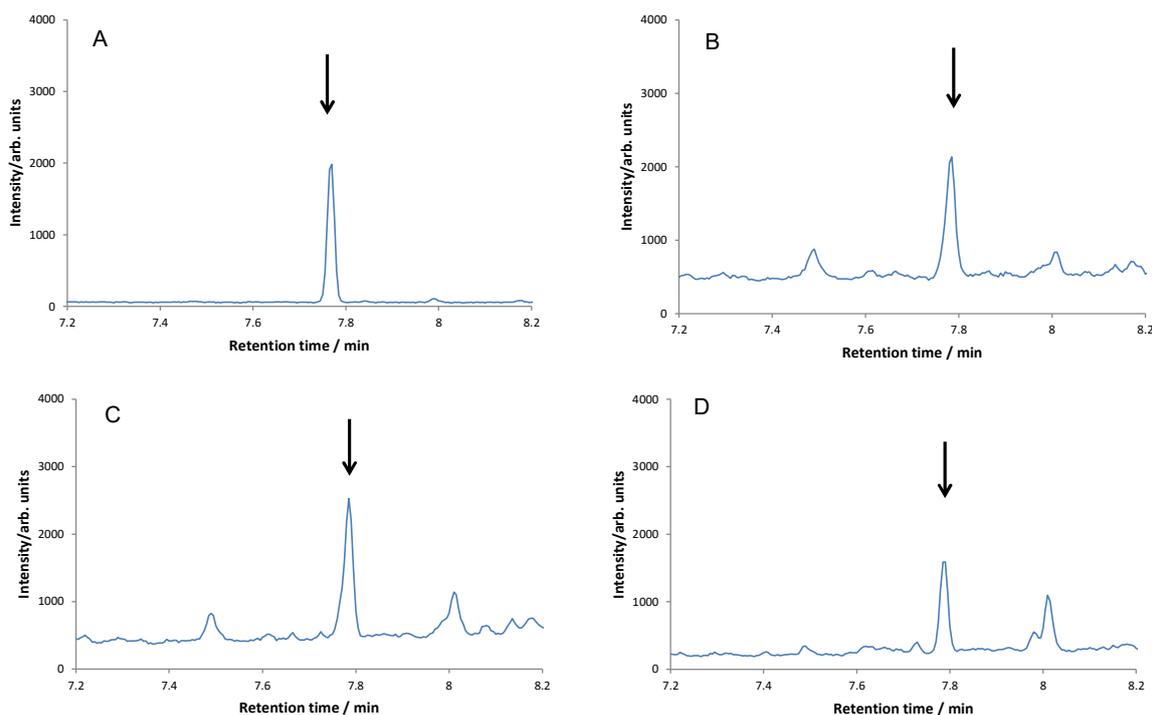


Fig. 4 Typical SIM chromatograms of 2,4,6-trichlorophenol derivative
in standard and spiked sample solutions

(GC-MS conditions are shown in Table 1. Arrows indicate the retention time of 2,4,6-trichlorophenol derivative.)

- A: Standard solution (The concentration is 0.6 ng/mL as 2,4,6-trichlorophenol.)
 B: Sample solution of rice straw spiked at 0.02 mg/kg of prochloraz (The concentration in the sample solution is about 0.5 ng/mL as 2,4,6-trichlorophenol.)
 C: Sample solution of WCRS spiked at 0.02 mg/kg of prochloraz (The concentration in the sample solution is about 0.5 ng/mL as 2,4,6-trichlorophenol.)
 D: Sample solution of paddy rice spiked at 0.02 mg/kg of prochloraz (The concentration in the sample solution is about 0.5 ng/mL as 2,4,6-trichlorophenol.)

3.1.8 定量下限及び検出下限

2,4,6-トリクロロフェノールの検量線が直線性を示した範囲、2,4,6-トリクロロフェノールとして0.2~100 ng/mLの下端付近となる濃度（稲わら、WCRS 風乾物及び粳米にプロクロラズとして0.02 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で2,4,6-トリクロロフェノールとして0.5 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、プロクロラズの定量下限は稲わら、WCRS 風乾物及び粳米で0.02 mg/kgとした。この濃度は、プロクロラズの稲わらの管理基準値及びWCRSの管理基準値の風乾物中換算値（それぞれ0.2及び0.225 mg/kg）に対してそれぞれ1/10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値（1/5以下）を満たしていた。なお、Table 5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。

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、検出下限は稲わら、WCRS 風乾物及び粳米でプロクロラズとして0.006

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 (1/10 以下) を満たしていた。

3.2 共同試験

開発した分析法の室間再現精度を確認するため、2.2 により共同試験を実施した。

結果は Table 6 のとおりであった。稲わら、WCRS 及び粳米についてそれぞれ、平均回収率は 99.1, 101 及び 97.6 %, RSD_r は 10, 4.3 及び 4.6 %, RSD_R は 14, 18 及び 18 %, HorRat は 0.68, 0.91 及び 1.2 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 (稲わら及び WCRS については 41 %以下, 粳米については 29 %以下) を満たしていた。

参考のため、各試験室で使用した LC-MS/MS の機種等を Table 7 に示した。

Table 6 Collaborative study for prochloraz

Lab. No.	Rice straw		WCRS		Paddy rice	
	(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)	
1	0.166	0.206	0.196	0.183	1.79	1.99
2	0.218	0.225	0.225	0.206	2.12	2.27
3	0.296 ^{b)}	0.310 ^{b)}	0.277	0.296	2.62	2.68
4	0.241	0.213	0.213	0.192	1.92	1.78
5	0.193	0.188	0.186	0.182	1.80	1.86
6	0.206	0.209	0.203	0.197	1.90	1.88
7	0.152	0.155	0.150	0.154	1.31	1.30
8	0.178	0.183	0.212	0.202	2.11	2.02
9	0.224	0.224	0.219	0.214	1.97	2.12
10	0.198	0.172	0.162	0.162	1.90	1.70
11	0.170	0.243	0.187 ^{a)}	0.252 ^{a)}	1.71 ^{a)}	2.45 ^{a)}
Spiked level (mg/kg)	0.2		0.2		2	
No. labs ^{c)}	10		10		10	
No. outliers ^{d)}	1		1		1	
Mean value (mg/kg)	0.198		0.202		1.95	
Mean recovery (%)	99.1		101		97.6	
RSD_r ^{e)} (%)	10		4.3		4.6	
RSD_R ^{f)} (%)	14		18		18	
$PRSD_R$ ^{g)} (%)	20		20		14	
HorRat	0.68		0.91		1.2	

a) Data excluded by Cochran test.

b) Data excluded by single Grubbs test.

c) Number of laboratories retained after eliminating outliers

d) Number of outlier laboratories removed in parentheses

e) Relative standard deviation of repeatability within laboratory

f) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

g) Predicted relative standard deviation of reproducibility between laboratories calculated from the modified Horwitz equation

Table 7 Instruments used in the collaborative study

Lab. No.	GC-MS	GC column (i.d. × length, film thickness)
1	GCMS-QP2010 Plus, Shimadzu	DB-1MS, Agilent Technologies (0.32 mm × 30 m, 0.25 μm)
2	GC: 7890A, Agilent Technologies MS: 5975C, Agilent Technologies	DB-1MS, Agilent Technologies (0.25 mm × 30 m, 0.25 μm)
3	GC: 6890N, Agilent Technologies MS: 597 inertMSD, Agilent Technologies	DB-1MS, Agilent Technologies (0.32 mm × 30 m, 0.25 μm)
4	GCMS-QP2010 Plus, Shimadzu	DB-1MS, Agilent Technologies (0.32 mm × 30 m, 0.25 μm)
5	GCMS-QP2010 Plus, Shimadzu	DB-1MS, Agilent Technologies (0.32 mm × 30 m, 0.25 μm)
6	GC: 6890, Agilent Technologies MS: 5973, Agilent Technologies	HP-5MS, Agilent Technologies (0.25 mm × 30 m, 0.25 μm)
7	GC: 7890A, Agilent Technologies MS: 5975C Inert XL MSD, Agilent Technologies	Rxi-1MS, Restek (0.25 mm × 30 m, 0.25 μm)
8	GCMS-QP2010 Plus, Shimadzu	DB-1MS, Agilent Technologies (0.32 mm × 30 m, 0.25 μm)
9	GC: 7890A, Agilent Technologies MS: 5975C, Agilent Technologies	HP-1MS, Agilent Technologies (0.25 mm × 30 m, 0.25 μm)
10	GCMS-QP2010, Shimadzu	DB-1MS, Agilent Technologies (0.32 mm × 30 m, 0.25 μm)
11	GC: 7890A, Agilent Technologies MS: 5975C, Agilent Technologies	DB-1MS, Agilent Technologies (0.32 mm × 30 m, 0.25 μm)

4 まとめ

飼料用稲に残留するプロクロラズについて、JFRL法を基に、GC-MSを用いた定量法を開発するとともに、共同試験を実施し、飼料分析基準への適用の可否について検討したところ、①液液分配をケイソウ土カラムによる精製に変更、②酢酸エチル転溶後のアセトン 2 mL 添加を 5 mL の全量フラスコを用いた定容に変更、③カラム処理後の溶液にアセトン-ジエチレングリコール (49+1) 0.1 mL を加えることで、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、0.2~10 ng/mL (注入量として 0.4~20 pg 相当量) 及び 10~100 ng/mL (注入量として 20~200 pg 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、プロクロラズを 0.0076~0.38 mg/kg 及び 0.38~3.8 mg/kg 又は 2,4,6-トリクロロフェノール 0.004~0.2 mg/kg 及び 0.2~2 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 2,4,6-トリクロロフェノール濃度範囲に相当する。

2) 稲わら、WCRS 及び粃米について、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) 本法に従い得られる試料溶液についてマトリックス効果を確認した結果、2,4,6-トリクロロフェノー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) プロクロラズとして、稲わらに 0.02 及び 0.2 mg/kg 相当量，WCRS に原物換算して 0.00889 及び 0.0889 mg/kg 相当量，粃米に 0.02 及び 2 mg/kg 相当量，2,4,6-トリクロロフェノールとして稲わらに 0.01 及び 0.1 mg/kg 相当量，WCRS に原物換算して 0.00444 及び 0.0444 mg/kg 相当量，粃米に 0.01 及び 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) 本法のプロクロラズの定量下限は試料中で 0.02 mg/kg，検出下限は 0.006 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。
- 6) 稲わら，WCRS 及び粃米にプロクロラズとしてそれぞれ 0.2，0.2 及び 2 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東京顕微鏡院 食と環境の科学センター，一般財団法人日本穀物検定協会 中央研究所，一般財団法人日本食品分析センター 多摩研究所，JA 東日本くみあい飼料株式会社 品質安全部 分析・開発センター，一般財団法人マイコトキシン検査協会における関係者各位に感謝の意を表します。

文 献

- 1) 一般社団法人日本植物防疫協会：農薬ハンドブック 2016 年版（改訂新版），420-421，東京，日本植物防疫協会，(2016) (ISBN: 978-4-88926-146-2).
- 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) 厚生省告示：食品，添加物等の規格基準，昭和 34 年 12 月 28 日，厚生省告示第 370 号 (1959).
- 4) 布施 淳一，金森 久幸，井手吉 範久：GC による野菜・果実中のプロクロラズの分析法，食品衛生学雑誌，41，61-65 (2000).
- 5) 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).
- 6) 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).
- 7) 厚生労働省医薬食品局食品安全全部長通知：食品に残留する農薬，飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について，平成 17 年 1 月 24 日，食安発第 0124001 号 (2005).
- 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).