

5 乾牧草中のテブコナゾールのガスクロマトグラフ質量分析計による簡易定量法

野村 昌代*

Simplified Method for Determination of Tebuconazole in Grass Hay by GC-MS

Masayo NOMURA*

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

A simplified analytical method for determination of tebuconazole in grass hay using gas chromatograph-mass spectrometer (GC-MS) was developed. After addition of acetonitrile-water (3:1) to samples, tebuconazole was extracted with acetonitrile. The extract was filtered and filled up to 200 mL with acetonitrile. After the sample solution was evaporated to dryness and dissolved in water, it was purified by Chem Elut cartridge with hexane. The eluate was evaporated to dryness and dissolved in hexane. It was purified by Sep-Pak Plus Florisil cartridge with hexane-acetone (7:3). The eluate was evaporated to dryness and dissolved in dilute solution, and subjected to GC-MS on fused silica capillary column (HP-5MS; 0.25 mm i.d.×30 m, film thickness: 0.25 μm) for determination of tebuconazole. A recovery test was conducted with four kinds of grass hay spiked with tebuconazole at 0.5 and 30 mg/kg. The mean recoveries of tebuconazole were 87.7~99.4% and the relative standard deviations (RSD) were within 8.2%. A collaborative study was conducted in ten laboratories using two kinds of grass hay spiked with tebuconazole at 20 mg/kg. The mean recovery of tebuconazole in oats hay was 91.5%, and the repeatability and reproducibility in terms of the relative standard deviations (RSD_F and RSD_R) were 5.8% and 9.7% respectively. For timothy hay, these values were 93.5%, 3.1% and 9.0%, respectively.

Key words: 残留農薬 pesticide residue ; トリアゾール系殺菌剤 triazole fungicide ; テブコナゾール tebuconazole ; ガスクロマトグラフ質量分析計 gas chromatograph-mass spectrometer (GC-MS) ; 多孔性ケイソウ土カートリッジ porous-diatomite cartridge ; フロリジルカートリッジ Florisil cartridge ; 共同試験 collaborative study ; 乾牧草 grass hay

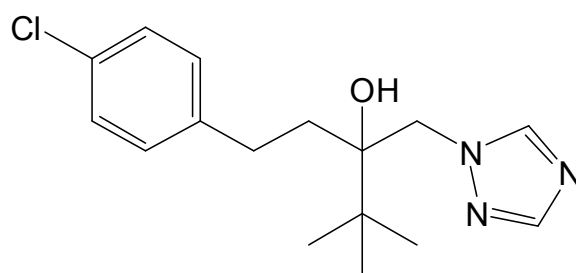
1 緒 言

テブコナゾール [C₁₆H₂₂ClN₃O] (Fig. 1)^{1),2)}は Bayer 社が開発したトリアゾール系殺菌剤であり、菌糸の正常な生育を抑制し、異常分枝を起こしたり、吸器の形成を阻止したりする。殺菌作用は脂質(ステロール)生合成阻害であることが解明されている。日本では1996年に登録され、適用作物も多い。

* 独立行政法人農林水産消費安全技術センター福岡センター

国内の食品，添加物等の規格基準値における残留農薬基準値は，麦・穀類で 0.05~0.5 ppm，豆類で 0.1~0.5 ppm，果実で 0.2~4 ppm，野菜で 0.02~1 ppm，綿実で 1 ppm となっている³⁾。

飼料中のテブコナゾールの定量法は，青山ら⁴⁾が検討した個別分析法が平成 18 年 3 月 24 日付けで飼料分析基準⁵⁾（以下「現行法」という．）に記載されているが，諸外国の牧草類の基準値は 2~30 ppm に設定されており，乾牧草における高濃度の添加回収試験が未実施であったため，今回，高濃度にも対応した分析法を検討した．現行法では，乾牧草中の高濃度の添加回収試験において回収率が低くなる傾向が認められたため，現行法の操作の一部を省略した，財団法人日本食品分析センターが開発した分析法（以下「分析センター法」という．）⁶⁾を基に，飼料検査分析法（飼料分析基準）への可否についての検討を行ったのでその概要を報告する．



Tebuconazole

(*RS*)-1-*p*-chlorophenyl-4,4-dimethyl-3-(1*H*-1,2,4-triazol-1-ylmethyl) pentan-3-ol

C₁₆H₂₂ClN₃O MW: 307.8

CAS No.: 107534-96-3

Fig. 1 Structure of tebuconazole

2 実験方法

2.1 試料

市販の乾牧草（オーツヘイ，アルファルファヘイ，チモシーヘイ及びバミューダグラスストロー）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．

2.2 試薬

1) テブコナゾール標準液

テブコナゾール標準品（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，テブコナゾール標準原液を調製した（この液 1 mL はテブコナゾール 0.5 mg を含有する．）．使用に際して，標準原液の一定量を希釈溶媒で正確に希釈し，1 mL 中にテブコナゾールとして 0.001，0.005，0.01，0.05，0.1，0.5 及び 1.5 µg を含有する各テブコナゾール標準液を調製した．

2) 希釈溶媒

2,2,4-トリメチルペンタン-アセトン（4+1）100 mL にポリエチレングリコール 50 µL を加えて希釈溶媒を調製した．

3) 試薬等

アセトニトリル，アセトン及びヘキサンは残留農薬試験用試薬を，ポリエチレングリコールは平均分子量 400（残留農薬試験用）の試薬を，2,2,4-トリメチルペンタンは高速液体クロマトグラフ用試薬を用いた．その他，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) 振とう機：タイテック製 レシプロシェーカーSR-2W
- 3) エバポレーター：柴田科学機械工業製 R-114
- 4) 多孔性ケイソウ土カートリッジ：Varian 製 EXTUBE Extraction Columns Chem Elut 1020 (20 mL 容)
- 5) フロリジルカートリッジ：Waters 製 Sep-Pak Plus Florisil (充てん剤量 910 mg)

2.4 定量方法

1) 含水アセトニトリル抽出

分析試料 10.0 g を 200 mL の共栓三角フラスコにとり、アセトニトリル-水 (3+1) 20 mL を加えた後 10 分間静置し、更にアセトニトリル 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、容器及び残さをアセトニトリル 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アセトニトリルを加えた。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、水 20 mL を加えて残留物を溶かし、多孔性ケイソウ土カートリッジ処理に供する試料溶液とした。

2) 多孔性ケイソウ土カートリッジ処理

試料溶液を多孔性ケイソウ土カートリッジに入れ、5 分間静置した。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、容器をヘキサン 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、更に、ヘキサン 60 mL を多孔性ケイソウ土カートリッジに加えて、液面が充てん剤の上端に達するまで流下し、テブコナゾールを溶出させた。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。ヘキサン 10 mL を正確に加えて残留物を溶かし、フロリジルカートリッジ処理に供する試料溶液とした。

3) フロリジルカートリッジ処理

フロリジルカートリッジを注射筒に連結し、あらかじめヘキサン 5 mL で洗浄した。試料溶液 2 mL を正確に注射筒に入れ、液面が充てん剤の上端に達するまで流出させた。注射筒にヘキサン 4 mL を加え、液面が充てん剤の上端に達するまで流出させ、更にヘキサン-アセトン (19+1) 10 mL をフロリジルカートリッジに加えて液面が充てん剤の上端に達するまで流出させた。50 mL のなす形フラスコをフロリジルカートリッジの下に置き、ヘキサン-アセトン (7+3) 15 mL をフロリジルカートリッジに加えてテブコナゾールを溶出させた。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。希釈溶媒 10 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。

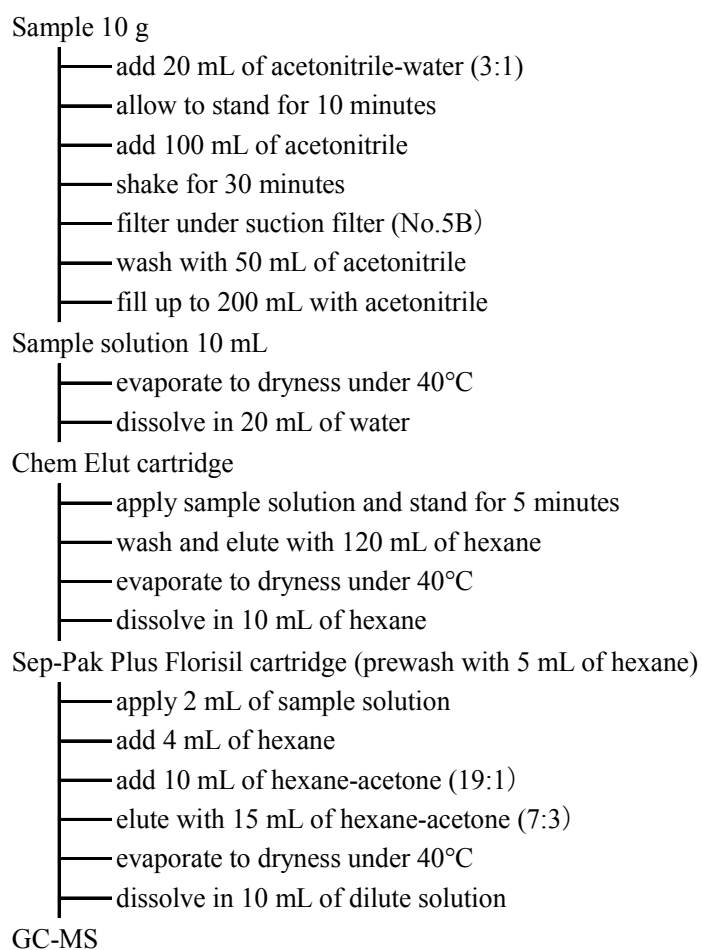
4) ガスクロマトグラフ質量分析計による測定

試料溶液及び各テブコナゾール標準液各 2 μ L をガスクロマトグラフ質量分析計 (以下「GC-MS」という。) 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。得られた SIM 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、試料中のテブコナゾールの量を算出した。

なお、GC-MS の測定条件を Table 1 に、定量法の概要を Scheme 1 に示した。

Table 1 Operating conditions for GC-MS

Column	HP-5MS (0.25 mm i.d×30 m, film thickness; 0.25 μm)
Column temp.	70°C (2 min)→20°C/min→280°C (10 min)
Injection mode	Splitless (60 s)
Injection temp.	250°C
Carrier gas	He 1.0 mL/min
Transferline temp.	280°C
Ion source temp.	200°C
Ionization	Electron impact
Ionization energy	70 eV
Monitor ion	<i>m/z</i> 250 (quantitation), 125 (confirmation)

**Scheme 1 Analytical procedure for tebuconazole**

3 結果及び考察

3.1 検量線

調製した 0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 及び 1.5 μg/mL の各テブコナゾール標準液各 2 μL を GC-MS に注入し, 得られた SIM クロマトグラムでのピーク高さ又は面積から検量線を作成した. その結果, 検量線は 0.002~3.0 ng の範囲で原点を通る直線性を示した.

3.2 多孔性ケイソウ土カートリッジ処理の検討

多孔性ケイソウ土カートリッジ処理によるテブコナゾールの溶出画分の確認を行った。

乾牧草（チモシーヘイ）にテブコナゾール標準液を 1 mg/kg 相当量を添加し，本法により操作した後，多孔性ケイソウ土カートリッジに供しヘキサンにより溶出した．各溶出液について，本法によりフロリジルカートリッジ処理を行い，溶出画分の回収率を確認した。

その結果，Table 2 のとおりテブコナゾールは 0~120 mL に溶出し，120 mL 以後の画分には溶出されなかった．以上の結果から本法では現行法及び分析センター法と同様に，ヘキサン 120 mL で溶出することとした。

Table 2 Elution pattern of tebuconazole from Chem Elut cartridge

Fraction volume (mL)	0~40	40~80	80~100	100~120	120~140	140~160	Total
Tebuconazole	87	20	2	1	0	0	110

(%)

3.3 フロリジルカートリッジ処理の検討

フロリジルカートリッジ処理によるテブコナゾールの溶出画分の確認を行った。

乾牧草（チモシーヘイ）にテブコナゾール標準液を 1 mg/kg 相当量を添加し，本法により操作した後，フロリジルカートリッジ処理を行い，溶出画分の回収率を確認した。

その結果，Table 3 のとおりテブコナゾールはヘキサン-アセトン（7+3）0~15 mL の画分に溶出し，15 mL 以後の画分には溶出されなかった．以上の結果から現行法ではヘキサン-アセトン（7+3）の溶出溶媒は 20 mL としているが，本法では溶出に用いるヘキサン-アセトン（7+3）の量は分析センター法と同様に 15 mL で十分と考えられた。

Table 3 Elution pattern of tebuconazole from Florisil cartridge

Fraction volume (mL)	0~15	15~20	20~25	25~30	Total
Tebuconazole	107	0	0	0	107

(%)

3.4 添加回収試験

乾牧草（オーツヘイ，アルファルファヘイ，チモシーヘイ及びバミューダグラスストロー）にテブコナゾールとして 0.5 及び 30 mg/kg 相当量を添加した試料を用いて，本法に従って回収率及び繰返し精度を検討した．その結果，Table 4 のとおり平均回収率は 87.7~99.4%，その繰返し精度は相対標準偏差（RSD）として 8.2%以下の結果が得られた。

なお，添加回収試験で得られた SIM クロマトグラムの一例を Fig. 2 に示した。

Table 4 Recoveries of tebuconazole spiked at 0.5 and 30 mg/kg in four kinds of grass hay (%)

Spiked level (mg/kg)	Oats hay		Alfalfa hay		Timothy hay		Bermudagrass straw	
	Recovery ^{a)}	RSD ^{b)}	Recovery ^{a)}	RSD ^{b)}	Recovery ^{a)}	RSD ^{b)}	Recovery ^{a)}	RSD ^{b)}
0.5	98.8	(1.5)	93.5	(5.2)	93.5	(1.7)	99.4	(2.8)
30	93.3	(2.3)	88.8	(2.6)	94.3	(8.2)	87.7	(5.4)

a) Mean recovery ($n=3$)

b) Relative standard deviations of repeatability

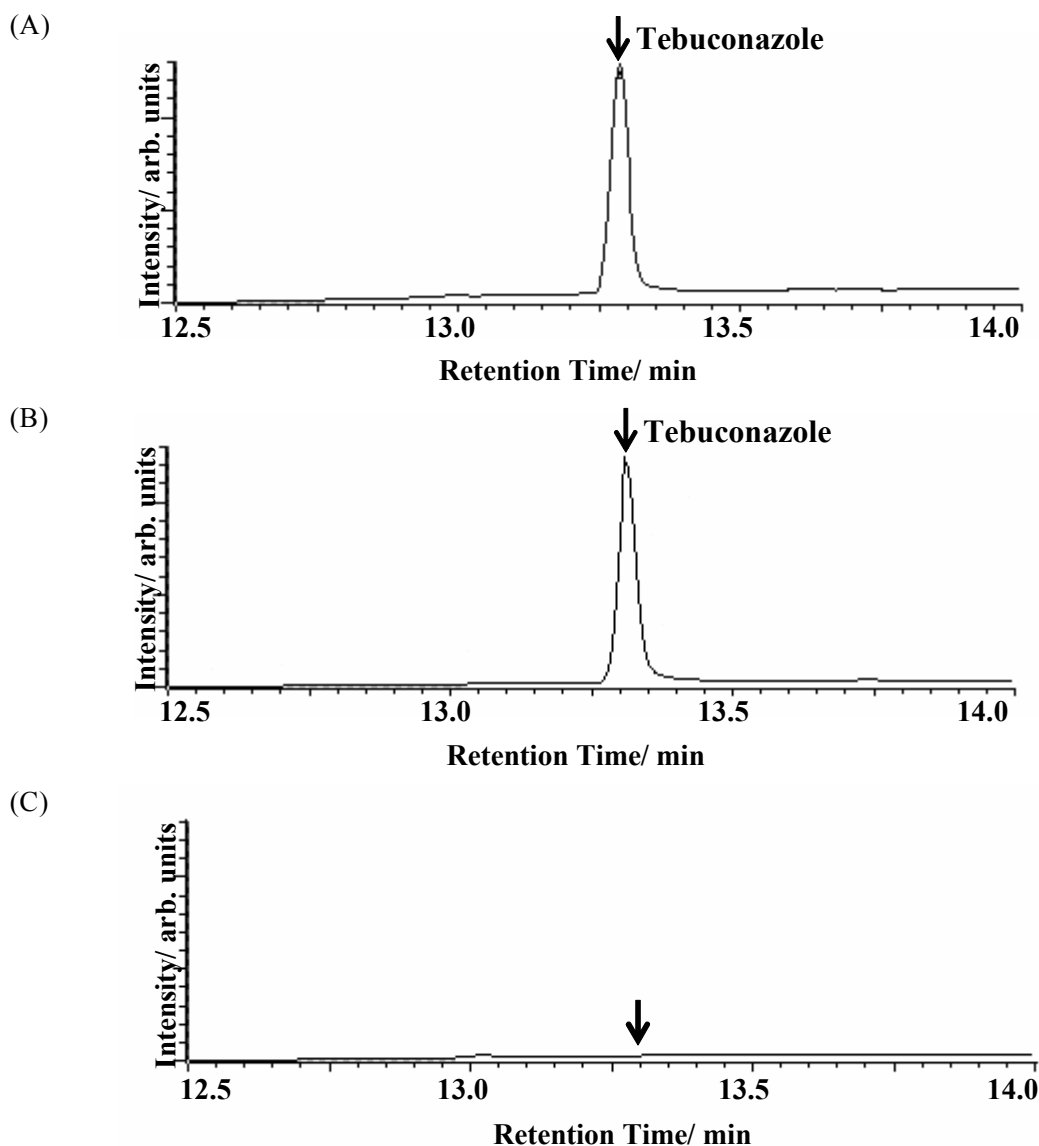


Fig. 2 GC-MS chromatograms of the standard solution and sample solution

GC-MS conditions are shown in Table 1.

(A) Standard solution (The amount of tebuconazole is 0.3 ng.)

(B) Sample solution of timothy spiked at 30 mg/kg

(C) Sample solution of timothy (not spiked)

3.5 定量下限及び検出下限

乾牧草の試料溶液 2 μL を GC-MS に注入し、得られたピークの SN 比が 10 となる濃度を定量下限とした。得られたピークの SN 比が 10 となるテブコナゾールの試料中の濃度は 0.5 mg/kg 相当量となったため、本法の定量下限は 0.5 mg/kg であると考えられた。また、同様にピークの SN 比が 3 となる濃度から、本法の検出下限は 0.2 mg/kg であると考えられた。

3.6 現行法の定量の上限

現行法の定量の上限を求めるため、添加回収試験を実施した。乾牧草（チモシーヘイ）にテブコナゾールとしてそれぞれ 0.5, 1.0, 5.0, 10, 15 及び 30 mg/kg 相当量を添加した試料を用い、現行法に従って操作を行った後、試料溶液を適宜希釈し、ガスクロマトグラフ質量分析計を用いて定量した。

得られた添加回収試験の結果は Table 5 のとおりであり、10 mg/kg 以上の高濃度の添加回収試験では回収率が低くなる傾向がみられ、高濃度では、ゲル浸透クロマトグラフィー操作において回収率が低下すると考えられた。これらのことから、現行法による定量は、5 mg/kg 相当量まで可能と考えられた。

Table 5 Recoveries of tebuconazole by the existing method (%)

Spiked level (mg/kg)	Timothy hay	
	Recovery ^{a)}	RSD ^{b)}
0.5	82.0	(8.2)
1.0	81.5	(10)
5.0	78.1	(11)
10	69.5	(7.4)
15	69.6	(6.0)
30	69.3	(2.5)

a) Mean recoveries ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

3.7 適用範囲

現行法は 10 mg/kg 以上の添加回収試験において回収率が低くなる傾向が認められたが、本法は 0.5~30 mg/kg での添加回収率に問題が認められなかったため、現行法で 5 mg/kg を超えた試料については、本法で確認のための試験をするべきと考えられた。

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。

乾牧草（オーツヘイ及びチモシーヘイ）にテブコナゾールとして 20 mg/kg 相当量を添加した試料を用いて、アジレント・テクノロジー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、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、全国酪農業協同組合連合会分析センター、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、同名古屋センター、同福岡センター及び同神戸

センター大阪事務所（10 試験室）において本法に従って共同試験を実施した。

その結果は Table 6 のとおりであり、オーツヘイの平均回収率は 91.5%，その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ相対標準偏差（ RSD_r 及び RSD_R ）として 5.8% 及び 9.7% であり，HorRat は 0.94 であった。

また，チモシーヘイの平均回収率は 93.5%，その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ RSD_r 及び RSD_R として 3.1% 及び 9.0% であり，HorRat は 0.87 であった。

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 7 に示した。

Table 6 Collaborative study results of tebuconazole

Lab. No.	(mg/kg)			
	Oats hay		Timothy hay	
1	16.6	16.3	16.0	16.0
2	18.7	18.0	18.2	18.0
3	20.3	20.8	20.5	21.4
4	18.8	19.5	19.1	20.0
5	19.8	20.4	20.6	19.3
6	18.0	16.8	14.4 ^{d)}	20.9 ^{d)}
7	19.8	16.1	20.5	19.0
8	17.8	20.0	18.6	18.7
9	15.0	15.6	16.3	16.5
10	18.7	19.2	18.9	18.3
Spiked level (mg/kg)	20.0		20.0	
Mean value ^{a)} (mg/kg)	18.3		18.7	
Recovery (%)	91.5		93.5	
RSD_r ^{b)} (%)	5.8		3.1	
RSD_R ^{c)} (%)	9.7		9.0	
HorRat	0.94		0.87	

a) Oats hay: $n=20$, Timothy hay: $n=18$ (without Lab. No. 6)

b) Relative standard deviations of repeatability within same laboratory

c) Relative standard deviations of reproducibility between laboratories

d) Excluded by the Cochran test

Table 7 Instruments used in the collaborative study

Lab. No.	GC-MS	Column (i.d.×length, film thickness)
1	Shimadzu GCMS-Q2010 Plus	Restek Rtx-5MS (0.25 mm i.d.×30 m, 0.25 μm)
2	Shimadzu GCMS-Q2010 Plus	Restek Rtx-5MS (0.25 mm i.d.×30 m, 0.25 μm)
3	Thermo Electron FOCUS-Polaris Q GC/MS Benchtop Ion Trap Mass Spectrometer	Thermo Electron TR-5MS (0.25 mm i.d.×30 m, 0.25 μm)
4	Shimadzu GCMS-Q2010	Restek Rtx-5MS (0.25 mm i.d.×30 m, 0.25 μm)
5	Shimadzu GCMS-Q2010	Agilent Technologies HP-5MS (0.25 mm i.d.×30 m, 0.25 μm)
6	GC: Agilent Technologies 7890 GC MS: Agilent Technologies 5975C MSD	Agilent Technologies HP-5MS (0.25 mm i.d.×30 m, 0.25 μm)
7	GC: Agilent Technologies 6890N MS: Agilent Technologies 5973	Agilent Technologies HP-5MSI (0.25 mm i.d.×30 m, 0.25 μm)
8	GC: Agilent Technologies 6890 MS: Agilent Technologies 5973N	Agilent Technologies HP-5MS (0.25 mm i.d.×30 m, 0.25 μm)
9	GC: Agilent Technologies 6890N MS: Agilent Technologies 5975B	Agilent Technologies DB-5MS (0.25 mm i.d.×30 m, 0.25 μm)
10	Shimadzu GCMS-Q2010	Phenomenex ZB-1 (0.32 mm i.d.×30 m, 0.25 μm)

4 まとめ

乾牧草中のテブコナゾールについて、ガスクロマトグラフ質量分析計による簡易定量法を検討したところ、次の結果が得られた。

- 1) テブコナゾールの検量線は 0.002~3.0 ng の範囲で原点を通る直線性を示した。
- 2) 多孔性ケイソウ土カートリッジ処理の溶出画分の確認を行ったところ、溶出溶媒の必要量は 120 mL であった。
- 3) フロリジルカートリッジ処理の溶出画分の確認を行ったところ、溶出溶媒の必要量は 15 mL であった。
- 4) 4 種類の乾牧草（オーツヘイ、アルファルファヘイ、チモシーヘイ及びバミューダグラスストロー）を用いて、テブコナゾールとして 0.5 mg/kg 及び 30 mg/kg 相当量添加し、添加回収試験を実施した結果、平均回収率は 87.7~99.4 %、その繰返し精度は相対標準偏差（RSD）として 8.2%以下の結果が得られた。
- 5) 本法によるテブコナゾールの定量下限は 0.5 mg/kg、検出下限は 0.2 mg/kg と考えられた。
- 6) 現行法により添加回収試験を実施した結果、現行法による定量の上限は、5 mg/kg と考えられた。
- 7) 乾牧草（オーツヘイ及びチモシーヘイ）にテブコナゾールとして 20 mg/kg 相当量を添加した試料を用いて、10 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、オーツヘイの平均回収率は 91.5%、その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ相対標準偏差（RSD_r 及び RSD_R）として 5.8%及び 9.7%であり、HorRat は 0.94 であった。また、チモシーヘイの平均回収率は 93.5%、

その室内繰返し精度及び室間再現精度はそれぞれ RSD_r 及び RSD_R として 3.1%及び 9.0%であり、HorRat は 0.87 であった。

以上の結果から、現行法で 5 mg/kg を超えた試料については、本法を適用するべきと考えられた。

謝 辞

共同試験に参加していただいたアジレント・テクノロジー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、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及び全国酪農業協同組合連合会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) 社団法人日本植物防疫協会編集：農薬ハンドブック 2005 年版（改訂新版），社団法人 日本植物防疫協会 (2005).
- 2) C.D.S. Tomlin. ed. : “The e-Pesticide Manual: A world compendium Version 4.0 2006-07”, 14th Ed., British Crop Production Council (2006).
- 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).
改正：“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，厚生労働省告示第 499 号 (2005).
- 4) 青山恵介，井上智江：飼料研究報告，30，7 (2005).
- 5) 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).
- 6) 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，X (2007).