

技術レポート

1 飼料中のジカンバのガスクロマトグラフ質量分析計による定量法の妥当性確認

屋方 光則*

Validation of the Determination Method of Dicamba in Feeds by GC-MS

Mitsunori YAKATA*

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

1 緒 言

ジカンバは、アメリカのベルシコール社が開発したホルモン型の選択性系除草剤であり、イネ科植物には効果はないが広葉植物には一年生、多年生を問わず効果がある¹⁾。

ジカンバは平成 18 年 5 月にポジティブリスト制度導入に伴い暫定的な残留基準値が飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令²⁾に定められたが、平成 25 年 10 月に食品安全委員会によるジカンバについての食品健康影響評価が行われたこと及び関連企業からインポートトレランスの設定が申請されたことから、残留基準値の一部を Table 1 のとおり改正する省令が平成 27 年 7 月に公布された。

飼料中のジカンバは、飼料分析基準³⁾に既記載の筆者らが検討したガスクロマトグラフ質量分析計（以下「GC-MS」という。）による分析法⁴⁾により定量が可能である。しかし、基準値が大幅に改正される大麦及び小麦については、改正基準値近辺での妥当性を確認していないことから、今回、設定された改正基準値及びその 1/10 の 2 濃度にて添加回収試験を実施し、分析法の妥当性を確認したので、その概要を報告する。

なお、大豆については、ジカンバ代謝物の DCSA との含量値での基準であることから、別法の検討が行なわれている。

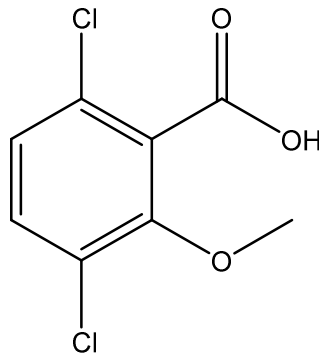
参考までにジカンバの構造式等を Fig. 1 に示した。

* 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

Table 1 Maximum residual limit of dicamba in feeds

Feed types	Maximum residual limits (mg/kg)	
	Before revision	After revision
Barley	0.5	7
Corn	0.5	0.5
Milo	3	4
Oats	3	3
Rye	0.1	0.1
Soybean	-	10*
Soybean meal	-	10*
Wheat	0.5	2
Grass	200	200

* As total of dicamba and DCSA



3,6-dichloro-2-methoxybenzoic acid

C₈H₆Cl₂O₃ MW: 221.0 CAS No.: 1918-00-9

Fig. 1 Chemical structure of dicamba

2 実験方法

2.1 試料

とうもろこし，大麦及び小麦は，それぞれ 1 mm の網ふるいを通過するまで粉碎した。

2.2 試薬

1) アセトン，シクロヘキサン，酢酸エチル，ジエチルエーテル，ヘキサン及び硫酸ナトリウム（無水）は残留農薬試験用を用いた。その他，特記している以外の試薬は特級を用いた。

2) ジカンバ標準原液

ジカンバ標準品（Sigma-Aldrich Laborchemikalien 製，純度 99.9 %）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た（この液 1 mL は，ジカンバとして 0.5 mg ($f=0.999$) を含有する。）。

使用に際して，この液の一定量をアセトンで正確に希釈して，1 mL 中にジカンバとして 5.0 µg を含有するジカンバ標準原液を調製した。

2.3 装置及び器具

- 1) 粉碎機：ZM-100 Retsch 製（1 mm スクリーン，回転数 14000 rpm）
- 2) 振とう機：レシプロシェーカー SR-2W タイテック製（300 rpm で使用）
- 3) 多孔性ケイソウ土カラム（20 mL 保持用）：Chem Elut, 20 mL Agilent Technologies 製
- 4) メンブランフィルター：DISMIC-25HP（孔径 0.45 μm ，直径 25 mm，PTFE）東洋濾紙製
- 5) ゲル浸透クロマトグラフ（以下「GPC」という。）：GPC システム 日本分光製
- 6) 合成ケイ酸マグネシウムミニカラム：Sep-Pak Plus Florisil Cartridge（充てん剤量 910 mg）Waters 製 にリザーバーを連結したもの
- 7) GC-MS :
 GC 部：GC-2010 島津製作所製
 MS 部：GCMS-QP2010Plus 島津製作所製

2.4 定量方法

飼料分析基準のジカンバ分析法（第 6 章第 1 節 73）に従って定量した。ただし，GC-MS に注入するためのトリフルオロエチルエステル化した標準液は，1 mL 中に 0.002，0.005，0.01，0.025，0.05，0.075，0.1，0.2，0.3，0.4 及び 0.5 μg を含有するものを調製した。

また，基準値相当量を添加した大麦は，得られた抽出液をアセトンで正確に 10 倍希釈してから以降の操作に供した。

GPC 及び GC-MS 測定条件を Table 2 及び 3 に，定量法の概要を Scheme 1 にそれぞれ示した。

Table 2 Operating conditions of GPC

Column	Shodex CLNpak EV-2000 AC (20 mm i.d.×300 mm, 15 μm), Showa Denko
Guard column	Shodex CLNpak EV-G AC (20 mm i.d.×100 mm, 15 μm), Showa Denko
Eluent	Cyclohexane-ethyl acetate (4:1)
Flow rate	5 mL/min
Fraction volume	75~125 mL

Table 3 Operating conditions of GC-MS

Column	Rtx-5MS (0.25 mm i.d.×30 m, 0.25 μm film thickness), Restek
Column temperature	80 °C (hold for 2 min) → 5 °C/min → 180 °C → 15 °C/min → 280 °C (hold for 5 min)
Injection mode	Splitless (60 s)
Injection port temperature	250 °C
Carrier gas	He 1.0 mL/min
Transferline temperature	280 °C
Ion source temperature	200 °C
Ionization	Electron ionization
Ionization energy	70 eV
Monitor ion	m/z 302

- Sample (grass hay 10 g, others 20 g)
- add 30 mL of water and 1 mL of 20 w/v% hydrochloric acid, allow to stand for 30 min
 - add 70 mL acetone and shake for 30 min
 - filtrate under suction filter (No. 5B)
 - wash with 50 mL of acetone and fill up to 200 mL
- 20 mL (grass hay 40 mL) of sample solution
- evaporate to the volume of 5 mL
- Hydrolysis
- add 5 mL of 4 w/v% sodium hydroxide solution
 - allow to stand for 30 min
- Chem Elut cartridge
- add 2 mL of 20 w/v% hydrochloric acid
 - apply sample solution and allow to stand for 5 min
 - wash with 100 mL of ethyl acetate
 - evaporate to dryness
 - dissolve with 10 mL of cyclohexane-ethyl acetate (4:1)
 - filtrate with membrane filter (< 0.5 μm)
- GPC (cyclohexane-ethyl acetate (4:1))
- apply 5 mL of sample solution
 - collect 75~125 mL fraction
 - evaporate to dryness
- Esterification
- add 1 mL of 2,2,2-trifluoroethanol and 0.2 mL of sulfuric acid
 - esterify at 90 °C for 30 min
- Liquid-liquid extraction
- add 10 mL of 5 w/v% sodium chloride solution and 5 mL of hexane
 - shake for 5 min and collect hexane layer (twice)
 - dehydrate hexane layer with Na_2SO_4
- Sep-Pak Plus Frolisil Cartridge (prewashed with 5 mL of hexane)
- apply sample solution
 - elute with 10 mL of hexane-diethyl ether (24:1)
 - evaporate to volume of 1 mL
 - fill up to 5 mL with hexane
- GC-MS

Scheme 1 Analytical procedure for dicamba in feeds

3 結果及び考察

3.1 検量線の作成

本法の定量下限は、試料中で 0.01 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 0.002 $\mu\text{g/mL}$ 相当量）としている。著者らが本法検討時に確認した検量線の直線範囲の下限濃度は 0.01 $\mu\text{g/mL}$ 相当量であり、本法の定量下限濃度における最終試料溶液中濃度 0.002 $\mu\text{g/mL}$ は、この検量線の直線範囲から外れている。そこで、検量線の下限濃度を 0.002 $\mu\text{g/mL}$ まで下げて検量線を作成し、その直線性を確認した。

2.2 の 2)に従って調製した 0.002, 0.005, 0.01, 0.025, 0.05, 0.075, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 及び

0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のジカンバトリフルオロエチルエステル化物標準液各 2 μL を GC-MS に注入し、得られた選択イオン検出 (SIM) クロマトグラムからのピーク高さ及び面積から検量線を作成した。

その結果、Fig. 2 のとおり、検量線は 0.002 ~ 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (注入量として 0.004 ~ 1.0 ng) の範囲で直線性を示した。

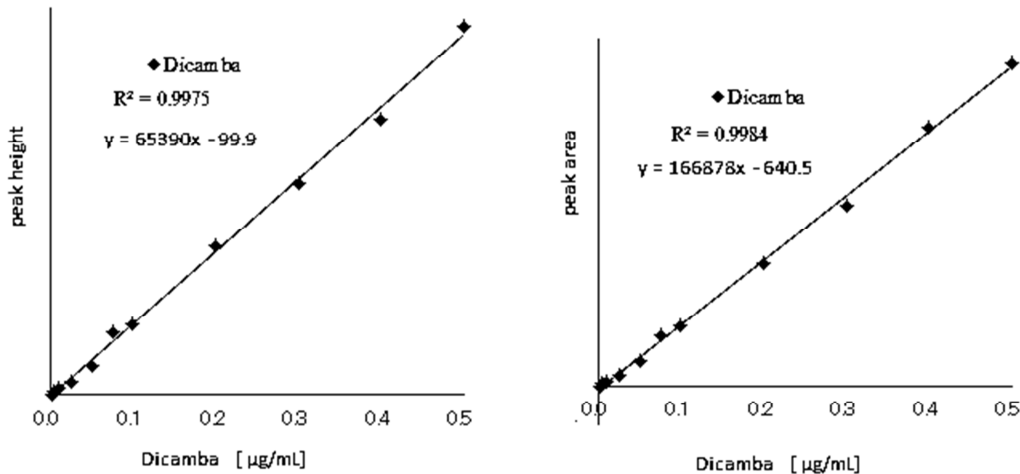


Fig. 2 Calibration curves of dicamba by peak height and area

3.2 妨害物質の検討

添加回収試験に用いた大麦及び小麦について、本法に従って SIM クロマトグラムを作成しジカンバの定量を妨害するピークの有無を検討した。

その結果、ジカンバの定量を妨害するピークは認められなかった。

3.3 添加回収試験

大麦についてはジカンバを 7 及び 0.7 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で共に 0.14 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 相当量)、小麦については 2 及び 0.2 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.4 及び 0.04 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 相当量) を添加した試料を用い、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 4 のとおり、大麦では平均回収率が 87.3 及び 94.5 %、その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD_r) として 11 %以下、小麦では平均回収率が 93.5 及び 92.2 %、その繰返し精度は RSD_r として 11 %以下であった。

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. 3 に示した。

Table 4 Recoveries of dicamba

Spiked level (mg/kg)	Feed types			
	Barley		Wheat	
	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)
7	87.3	4.9	-	-
2	-	-	93.5	9.3
0.7	94.5	11	-	-
0.2	-	-	92.2	11

a) Mean ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

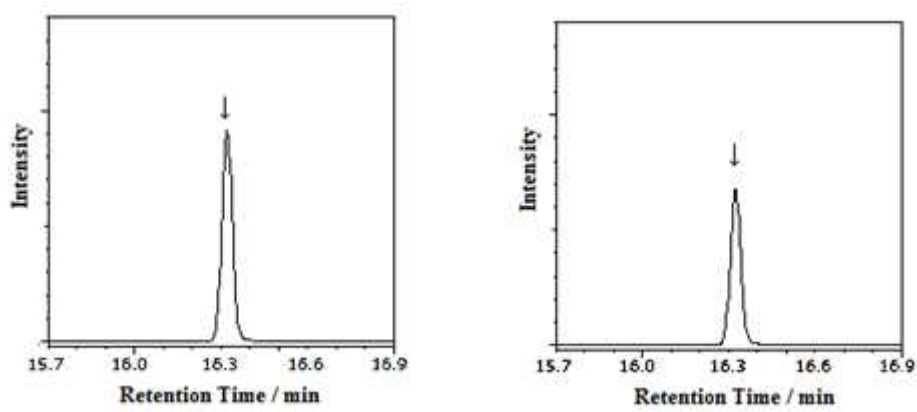


Fig. 3 SIM chromatograms of dicamba

(Arrows indicate the peaks of dicamba derivative.)

(left) Standard solution (The concentration is 0.5 µg/mL as dicamba.)

(right) Sample solution of wheat (spiked at 2 mg/kg of dicamba)

3.4 定量下限及び検出下限

3.1 での検討により、検量線の直線範囲の下限濃度を 0.002 µg/mL まで下げたことから、改めて本法の定量下限及び検出下限を確認するため、とうもろこしにジカンバを添加した試料を用い、添加回収試験により得られるピークの SN 比が 10 及び 3 となる濃度を求めた。

その結果、 SN 比が 10 となる濃度は 0.01 mg/kg、 SN 比が 3 となる濃度は 0.003 mg/kg であったことから、本法の定量下限は 0.01 mg/kg、検出下限は 0.003 mg/kg であった。

なお、当該定量下限濃度 (0.01 mg/kg 相当量) における添加回収試験の結果は、平均回収率 93.8 %、その繰返し精度は RSD_r として 10 % であり、良好であった。

4 まとめ

飼料中のジカンバの残留基準値等が変更されたことから、飼料分析基準に収載済みのジカンバの定量法について、改めて妥当性を確認したところ、以下の結果が得られた。

1) 検量線は 0.002 ~ 0.5 µg/mL (注入量として 0.004 ~ 1.0 ng) の範囲で直線性を示した。

なお、当該検量線における各マトリックスの添加回収試験の設定濃度は、大麦で 0.14 µg/mL

相当濃度，小麦で 0.4 及び 0.04 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 相当濃度とした。

- 2) 本法に従って得られた SIM クロマトグラムでは，添加回収試験に用いた大麦及び小麦について，ジカンバの定量を妨害するピークは認められなかった。
- 3) 大麦に 7 及び 0.7 mg/kg 相当量，小麦に 2 及び 0.2 mg/kg 相当量，とうもろこしに 0.01 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，大麦では平均回収率 87.3 及び 94.5 %，その繰返し精度は RSD_r として 11 %以下，小麦では平均回収率 93.5 及び 92.2 %，その繰返し精度は RSD_r として 11 %以下，とうもろこしでは平均回収率 93.8 %，その繰返し精度は RSD_r として 10 %であった。

- 4) 新たに直線性を確認した検量線の範囲による本法の定量下限は 0.01 mg/kg ，検出下限は 0.003 mg/kg であった。

文 献

- 1) 食品安全委員会：ジカンバ農薬評価書，平成 24 年 6 月 (2012).
- 2) 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，省令第 35 号 (1976).
- 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) 屋方 光則，永原 貴子：飼料研究報告，31，65 (2006).