

7 飼料中のモリネートのガスクロマトグラフ質量分析計による定量法

松尾 信吾*

Determination of Molinate in Feed by GC-MS

Shingo MATSUO*

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

An analytical method was developed to determine the level of molinate in feed using gas chromatograph-mass spectrometer (GC-MS).

After adding water to the samples, molinate was extracted with acetone and the resulting solutions were filtered. The filtrate was then diluted with acetone to a final volume of 200 mL. The extract was purified in a separatory funnel with sodium chloride solution (10 % w/w) and hexane. The sample solution was purified with Bond Elut PSA (Agilent Technologies Inc.; Santa Clara, CA, U.S.) connected in tandem over Sep-Pak Plus Florisil cartridge (Waters; Milford, MA, U.S.) and injected into the GC-MS system for determination of the molinate level. GC separation was carried out on a fused silica capillary column (Rtx-5MS ; 0.25 mm i.d.× 30 m, film thickness 0.25 μm from Restek Corporation; Bellefonte, PA, U.S.). The mass spectrometer was operated using electron ionization (EI).

Spike tests were conducted on rice straw, whole-crop rice silage and paddy rice spiked with 0.05, 0.1 or 0.3 mg/kg of molinate. Formula feed (cattle and chicken use) was also spiked with molinate at levels of 0.1 or 0.3 mg/kg. The resulting mean recoveries ranged from 90.8 % to 111 %, and the relative standard deviations (RSD_r) were not more than 7.6 %.

A collaborative study was conducted in nine laboratories using rice straw, paddy rice, and formula feed (cattle use) spiked with 0.3 mg/kg, 0.05 mg/kg, and 0.1 mg/kg of molinate, respectively. The mean recovery, and the repeatability and reproducibility, in terms of the relative standard deviation (RSD_r and RSD_R) and HorRat, respectively, were 105 % and 5.1 %, 16 %, and 0.84 for rice straw, 103 % and 5.6 %, 11 %, and 0.50 for paddy rice, and 107 %, and 7.4 %, 12 %, and 0.54 for formula feed.

This method was validated and established for use in the inspection of molinate in feed.

Key words: rice straw ; rice whole-crop silage roughage ; paddy rice ; feed ; molinate ; gas chromatograph-mass spectrometer (GC-MS) ; electron ionization (EI)

キーワード：稲わら；稲発酵粗飼料；粳米；飼料；モリネート；ガスクロマトグラフ質量分析計；電子イオン化（EI）法

1 緒 言

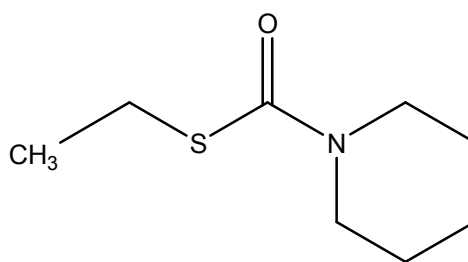
モリネートは、米国のストウファー・ケミカル社が開発した水稲用のチオカーバメイト系除草剤である。日本では 1971 年に農薬登録がされており、海外では米国などの稲作地帯で使用されている。また、飼料中のモリネートの基準値は、飼料の有害物質の指導基準¹⁾により稲わら中で 0.3

* 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

mg/kg となっており、さらに、厚生労働省の食品、添加物等の規格基準における残留農薬基準値²⁾では、米で 0.1 ppm、それ以外の食品では 0.02 ppm となっている。モリネートの分析法は、食品では厚生労働省通知試験法³⁾として個別試験法 (GC-MS) が示されているが、飼料中では、公定法が設定されておらず、分析法の確立が急務となっている。

そこで、「平成 22 年度飼料中の有害物質等分析法開発事業」において一般財団法人日本食品分析センターが開発したガスクロマトグラフ質量分析計による定量法⁵⁾ (以下「JFRL 法」という。) について、飼料分析基準への適用の可否を検討したので、その概要を報告する。

なお、モリネートの構造式を Fig. 1 に示した。



Molinate

S-ethyl azepane-1-carbothioate

C₉H₁₇NOS MW: 187.3

CAS No.: 2212-67-1

Fig. 1 Chemical structure of molinate

2 実験方法

2.1 試料

稲わら、粳米及び配合飼料はそれぞれ 1 mm の網ふるいを通過するまで粉砕し、供試試料とした。稲発酵粗飼料は、50 °C で 20 時間乾燥後、同様に粉砕したものを供試試料とした。

なお、検討に用いた配合飼料の配合割合を Table 1 に示した。

Table 1 Composition of the formula feed

Kind of formula feed	Group of ingredients	Proportion (%)	Ingredients
For cattle	Grains	76	Corn, barley, wheat, lupins
	Brans	17	Wheat bran, corn gulten feed, cron distiller's dried grains with solubles, screening pellet
	Oil meals	5	Soybean meal, rapeseed meal
	Others	2	Calcium carbonate, molasses, Salt
For growing chicken	Grains	64	Corn, dehulled rice
	Oil meals	20	Soybean meal, rapeseed meal, corn gulten meal
	Animal by-products	3	Fish meal, dried whey
	Brans	2	Rice bran, bran, corn distiller's dried grains with solubles
	Others	11	Calcium carbonate, animal fat, calcium phosphate, salt, solanum melanoxydon powder, saccharomyces cerevisiae, processed paprika extract, silica

2.2 試薬

1) モリネート標準液

モリネート標準品 (Dr. Ehrenstorfer 製, 純度 99.0 %) 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モリネート標準原液を調製した (この液 1 mL は, モリネートとして 0.5 mg を含有する ($f=0.990$) .) .

使用に際して, モリネート標準原液の一定量をヘキサンで正確に希釈し, 1 mL 中にモリネートとして 0.03, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 及び 0.5 μg を含有する各標準液を調製した.

2) アセトン, ジエチルエーテル, ヘキサン, 硫酸ナトリウム (無水) は, 残留農薬・PCB 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. 水は超純水 (JIS K 0211 に定める 5218 の超純水) 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 GCMS-QP2010 Plus
- 2) 振とう機: タイテック製 レシプロシェーカー SR-2W
- 3) ロータリーエバポレーター: 東京理化機器製 NAJ-160
- 4) エチレンジアミン-N-プロピルシリル化シリカゲルミニカラム (500 mg) : Agilent Technologies 製 Bond Elut PSA LRC カートリッジ (リザーバー容量 10 mL)
- 5) 合成ケイ酸マグネシウムミニカラム (910 mg) : Waters 製 Sep-Pak Plus Florisil Cartridge

2.4 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 20 mL (稲わら及び稲発酵粗飼料は 30 mL) を加え, 30 分間静置後, 更にアセトン 100 mL (稲わら及び稲発酵粗飼料は 120 mL) を加え, 30 分間振り混ぜて (300 rpm) 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 200 mL のなす形フラスコに正確に入れ, 40 °C 以下の水浴で約 3 mL まで減圧濃縮し, 液液分配に供する試料溶液とした.

2) 液液分配

試料溶液を 300 mL の分液漏斗 A に入れ、塩化ナトリウム水溶液 (10 w/v%) 100 mL 及びヘキサン 50 mL を加えた。試料溶液の入っていたなす形フラスコをヘキサン 25 mL で 2 回洗浄し、洗液を分液漏斗 A に合わせた。分液漏斗 A を 5 分間振り混ぜた (300 rpm) 後静置し、水層 (下層) を 300 mL の分液漏斗 B に入れ、残ったヘキサン層 (上層) を 300 mL の三角フラスコに入れた。分液漏斗 B にヘキサン 50 mL を加えて 5 分間振り混ぜた (300 rpm) 後静置し、水層を捨てヘキサン層を先の三角フラスコに合わせた。この三角フラスコに適量の硫酸ナトリウム (無水) を加えてヘキサン層を脱水し、300 mL のなす形フラスコにろ紙 (5 種 A) でろ過した。更に、三角フラスコを少量のヘキサンので洗浄し、洗液を先のろ紙を通してろ液を合わせた。ろ液を 40 °C 以下の水浴で約 3 mL まで減圧濃縮し、カラム処理に供する試料溶液とした。

3) カラム処理

エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラム (以下「PSA ミニカラム」という。) の下に合成ケイ酸マグネシウムミニカラム (以下「フロリジルミニカラム」という。) を連結し、ヘキサン 10 mL で洗浄した (吸引マニホールドを使用し、流速 1~2 mL/min 程度とした。以下同じ)。

50 mL のなす形フラスコを連結したミニカラムの下に置き、試料溶液をミニカラムに加え、液面が充てん剤の上端に達するまで流下させ、モリネートを流出させた。更に試料溶液の入っていたなす形フラスコをヘキサン 5 mL ずつで 3 回洗浄し、洗液を順次ミニカラムに加え、同様に流出させた。次に、PSA ミニカラムをはずし、フロリジルミニカラムの上部に注射筒を連結し、ヘキサノージエチルエーテル (9+1) 15 mL を加えてモリネートを溶出させた。溶出液にアセトノージエチレングリコール (100+1) 1 mL を加え、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 1 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

試料溶液及び各モリネート標準液各 2 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 (以下「SIM」という。) クロマトグラムを得た。測定条件を Table 2 に示した。

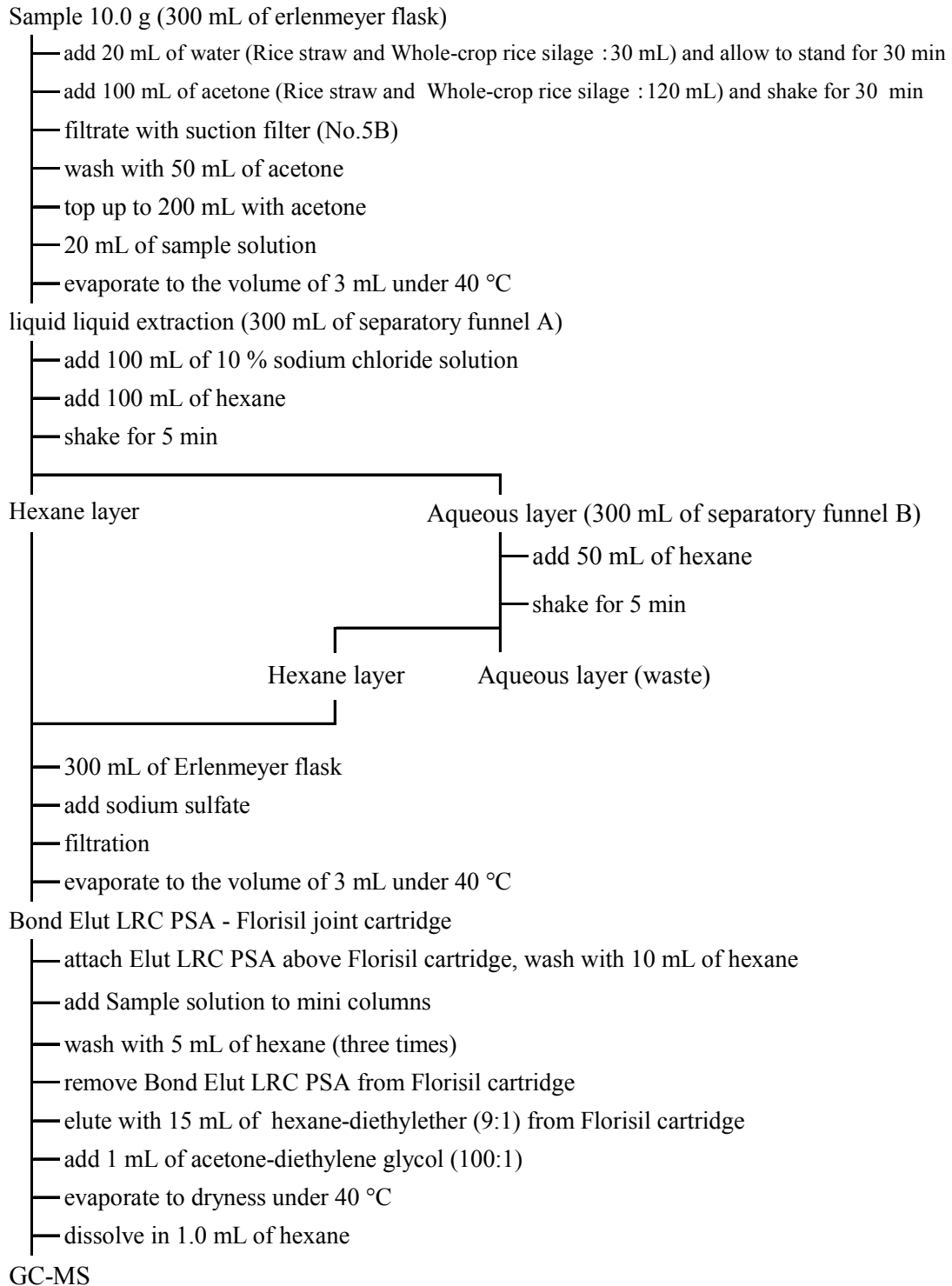
Table 2 Operating conditions of GC-MS

Column	Rtx-5MS (0.25 mm i.d.×30 m,0.25 μm film thickness)
Column temperature	80 °C (1 min) → 20 °C/min → 280 °C (10 min) → 300 °C (10 min)
Injection mode	Splitless (60 s)
Injectionport temperatur	250 °C
Carrier gas	He 1.0 mL/min
Transferline temperature	280 °C
Ion source temperature	230 °C
Ionization energy	70 eV
Ionization	Electron ionization (EI)
Monitor ion	<i>m/z</i> 187 (quantification), 126 (confirmation)

5) 計 算

得られた SIM クロマトグラムからピーク面積又は高さを求め検量線を作成し、試料中のモリネート量を求めた。

定量法の概要を Scheme 1 に示した。



Scheme 1 Analytical procedure for molinate in feed

2.5 モリネートの乾固操作による損失の防止検討方法

モリネートの乾固操作による損失を防止するため、残留農薬の分析でキーパーとして汎用されるアセトノージエチレングリコール (100+1) 及び同 (49+1) の使用の可否について、以下の方法に従い確認した。

試料に稲わらを用いて JFRL 法に従い操作を行ったミニカラムからの溶出液にモリネート (分析試料中でモリネートとして 0.3 mg/kg 相当量) を加えた後、それぞれのキーパー 1 mL を加えた。

得られた試料溶液を 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。その後、ヘキサン 1 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。

3 結果及び考察

3.1 検量線の作成

0.03, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 及び 0.5 µg/mL のモリネート標準液各 2 µL をガスクロマトグラフ質量分析計に注入し、得られた SIM クロマトグラムからピーク面積又は高さを求めて検量線を作成した。

その結果、検量線は 0.03~0.5 µg/mL (注入量として 0.06~1.0 ng) の範囲で直線性を示した。

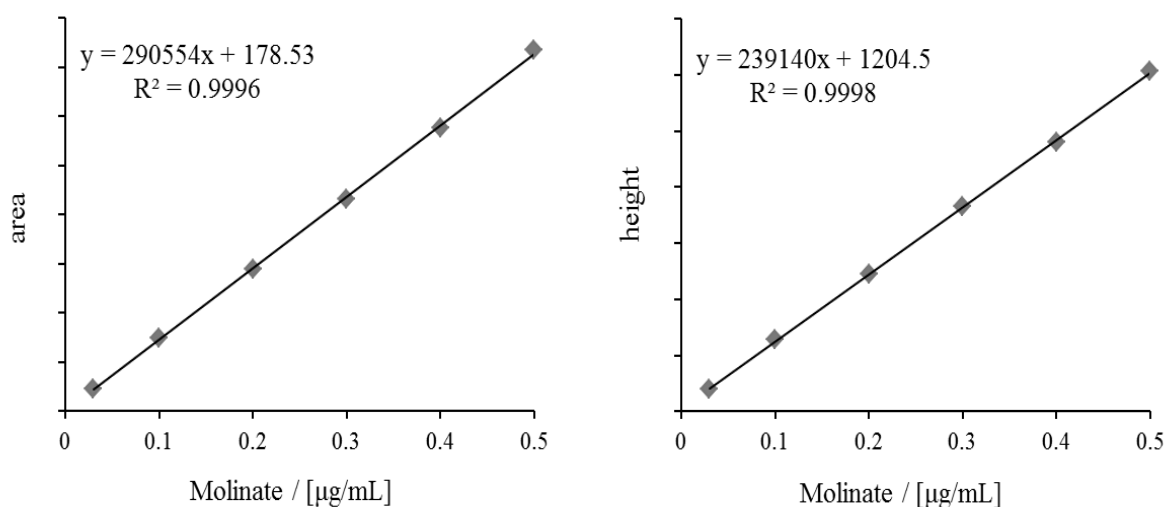


Fig. 2 Calibration curves of molinate
(left : area, right : height)

3.2 モリネートの乾固操作による損失の防止

試料にモリネートとして 0.3 mg/kg 相当量を添加し、JFRL 法に従い 3 回繰り返し定量したところ、稲わらでは、平均回収率は 48.3 %、その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD_r) として 14 %、また、稲発酵粗飼料では平均回収率は 55.5 %、その繰返し精度は RSD_r として 17 %であった。これらの低回収率の原因として、分析中の乾固操作によるモリネートの損失の可能性が考えられた。

そこで、2.5 に従い検討を行ったところ、Table 3 のとおり、試料溶液の濃縮時にキーパーとしてアセトノージエチレングリコール (100+1) を 1 mL 加えることにより、回収率に改善が認め

られた。また、同(49+1)では過回収となったが、これは、試料溶液中のジエチレングリコール濃度が高いことによる、ガスクロマトグラフの試料導入部でのマトリックス効果の影響と考えられた。

これらの結果から、本法では、ヘキサン転溶後の試料溶液は乾固せずに、ミニカラムへ注入するのに適当な量(3~5 mL)に減圧濃縮することとした。また、ミニカラムからの溶出液には、アセトン-ジエチレングリコール(100+1) 1 mLを加えて乾固操作によるモリネートの損失を防ぐこととした。

Table 3 Recovery test with addition of keeper in sample solution

Spiked level (mg/kg)	Acetone-diethylene glycol			
	100:1 1 mL		49:1 1 mL	
	Recovery(%) ^{a)}	RSD _r ^{b)}	Recovery(%) ^{a)}	RSD _r ^{b)}
0.3	103	3.5	115	0.0

a) Mean ($n = 3$)

b) Relative standard deviations repeatability

3.3 モリネートのヘキサンへの転溶率

試料に稲わらを使用して JFRL 法に従い得られた抽出液にモリネート 0.3 ng/mL 相当量(分析試料中 0.3 mg/kg 相当量)を添加し、ヘキサンへの転溶率を確認した。

その結果、Table 4 のとおり、モリネートはヘキサン 100 mL で 97 %、その後 50 mL で 3 % 転溶し、その後の 50 mL では転溶が認められなかった。これらのことから、本法では JFRL 法と同様に 1 回目は 100 mL、2 回目は 50 mL のヘキサンを用いて転溶操作を行うこととした。

なお、ヘキサン転溶操作以降は本法に従って回収率を求めた。

Table 4 Result of liquid-liquid extraction

Spiked level (mg/kg)	Hexane			Total
	0-100 mL	100-150 mL	150-200 mL	
	Recovery (%) ^{a)}			
0.3	97	3	0	100

a) Mean ($n=2$)

3.4 ミニカラムからの溶出画分の検討

PSA ミニカラム及び合成ケイ酸マグネシウムミニカラムからのモリネートの溶出画分を以下の方法により確認した。

JFRL 法に従い、稲わらを含水アセトンで抽出し、ヘキサン転溶を行って得られた試料溶液を約 3 mL まで 40 °C 以下の水浴で減圧濃縮した後、モリネート 0.3 ng/mL 相当量(分析試料中 0.3 mg/kg 相当量)を添加し、次の 1)及び 2)のとおりミニカラム処理を行い、それぞれの溶出画分における回収率を求めた。

1) PSA ミニカラムからの流出画分

試料溶液を PSA ミニカラムに入れ、更にヘキサンを PSA ミニカラムに加えて、その流出画分についてモリネートを測定し、PSA ミニカラムからのモリネートの流出状況を確認した。

その結果、Table 5 のとおり、モリネートはヘキサン 15 mL で全量流出したことから、本法では PSA ミニカラムにヘキサン 15 mL を加えてモリネートを流出させることとした。

Table 5 Elution pattern from Bond Elut PSA

Spiked level (mg/kg)	Hexane			Total
	0-10 mL	10-15 mL	15-20 mL	
	Recovery(%) ^{a)}			
0.3	95	10	0	105

a) Mean (n=3)

2) PSA ミニカラム及び合成ケイ酸マグネシウムミニカラムからの溶出画分

PSA ミニカラムの下に合成ケイ酸マグネシウムミニカラムを連結したものの（以下「連結カラム」という。）について、1) に従い、試料溶液を連結カラムの上部（PSA ミニカラム）に入れ、更にヘキサン 15 mL を加えて流出させた。次に、PSA ミニカラムをはずし、合成ケイ酸マグネシウムミニカラムに注射筒を連結し、ヘキサソージエチルエーテル (9+1) を順次加え、連結カラムからのモリネートの溶出状況を確認した。

その結果、Table 6 のとおり、連結カラムはヘキサン 15 mL を加えた時点でモリネートが回収率にして 5% 流出し、その後 PSA カラムをはずし、合成ケイ酸マグネシウムミニカラムにヘキサソージエチルエーテル (9+1) を 10 mL 加えた時点でほぼ全量が溶出した。

Table 6 Elution pattern from Florisil cartridge

Spiked level (mg/kg)	Recovery(%) ^{a)}				Total
	Hexane 15 mL	Hexane-Diethylether (9:1)			
		0-10 mL	10-15 mL	15-20 mL	
0.3	5	92	Tr	0	97

a) Mean (n=3)

1)及び2)の検討結果から、本法では、モリネートが流出及び溶出する可能性のある画分を広く回収することとし、連結カラムからのヘキサン 15 mL による流出液及び PSA カラムをはずした後の合成ケイ酸マグネシウムミニカラムからのヘキサソージエチルエーテル (9+1) 15 mL による溶出液を全て回収する方法とした。

3.5 妨害物質の検討

稲わら、稲発酵粗飼料、粳米、牛用配合飼料、鶏用配合飼料、とうもろこし及びふすまを用いて、本法により調製した試料溶液をガスクロマトグラフ質量分析計に注入し、定量を妨げるピークの有無を確認したところ、定量を妨げるピークは検出されなかった。なお、妨害物質の検討で得られた SIM クロマトグラムの一例を Fig. 3 に示した。

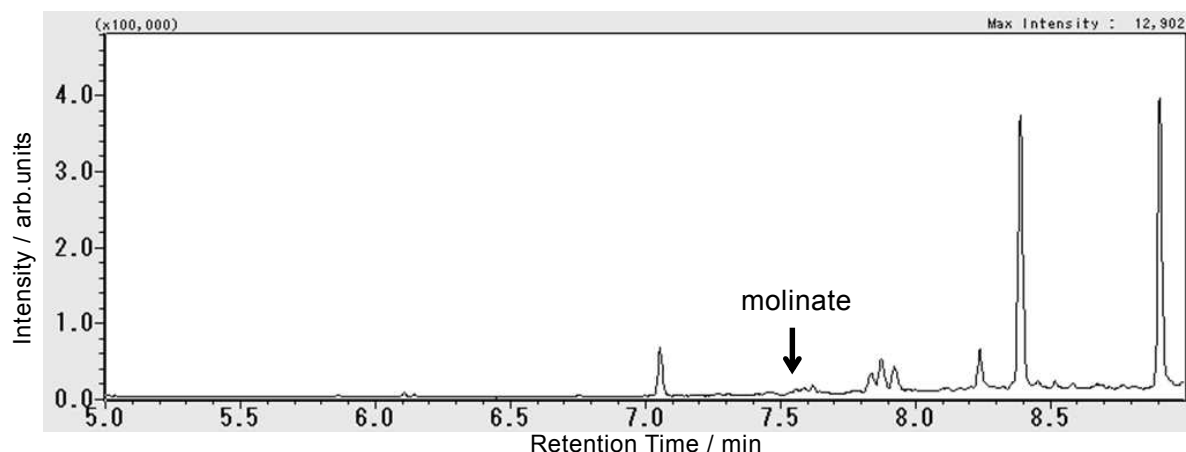


Fig.3 Chromatogram of rice straw (non-spiked)

3.6 添加回収試験

2.1 で調製した試料にモリネートを添加（分析試料中 0.3, 0.1 及び 0.05 mg/kg 相当量）した試料を用い、本法に従って 3 点併行分析を行い、その回収率及び繰返し精度について検討した。

その結果は、Table 7 のとおりであり、平均回収率は 90.8~111 %，その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD_r) として 7.6 %以下と良好であった。なお、添加回収試験の検討で得られた SIM クロマトグラムの一例を Fig. 4 に示した。

Table 7 Recovery test of molinate

Spiked level (mg/kg)	Rice straw		Whole crop rice silage		Paddy rice		Formula feed for cattle		Formula feed for chicken	
	Recovery ^{a)}	RSD_r ^{b)}	Recovery ^{a)}	RSD_r ^{b)}	Recovery ^{a)}	RSD_r ^{b)}	Recovery ^{a)}	RSD_r ^{b)}	Recovery ^{a)}	RSD_r ^{b)}
0.3	106	3.1	104	4.2	96.3	0.4	90.8	1.4	91.9	5.2
0.1	110	3.9	98.5	1.2	96.3	2.8	95.7	4.1	94.1	2.0
0.05	111	7.6	108	4.8	94.5	2.4	-	-	-	-

a) Mean recovery ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

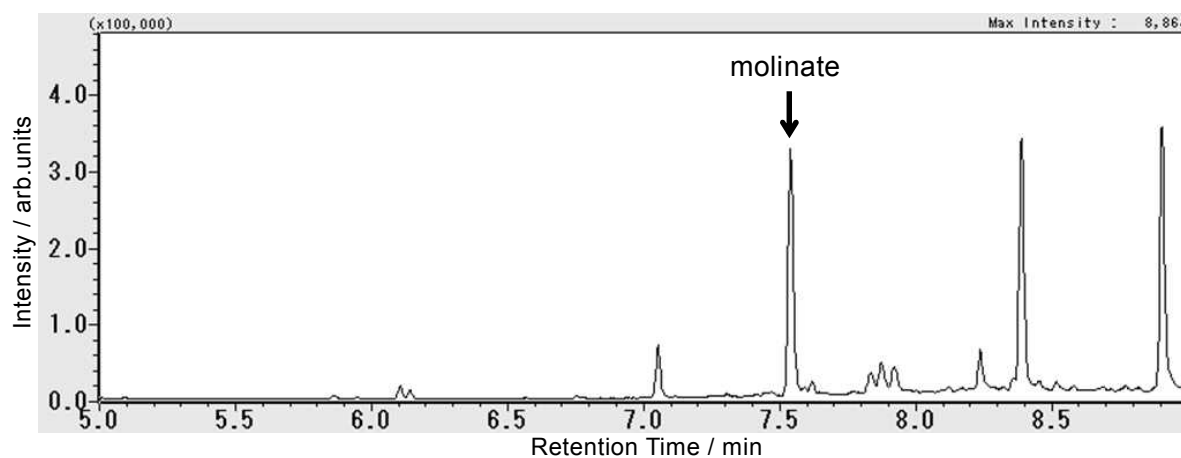


Fig.4 Chromatogram of rice straw (0.3 mg/kg)

3.7 定量下限及び検出下限

本法の定量下限及び検出下限を確認するため、稲わら及び粃米にモリネートを添加し、本法に従って3点併行分析を実施し、得られたピークのSN比及び回収率等を求めた。

その結果、ピークのSN比が10以上となる濃度は0.03 mg/kgであり、またTable 8のとおり添加回収試験の結果も良好であったことから、本法の定量下限を0.03 mg/kgとした。また、本法の検出下限はSN比3以上を満たす濃度として試料中0.01 mg/kgとした。

Table 8 Recovery test at the level of limit of quantification

Spiked level (mg/kg)	Rice straw		Paddy rice	
	Recovery ^{a)}	RSD _r ^{b)}	Recovery ^{a)}	RSD _r ^{b)}
0.03	110	2.2	101	12

a) Mean ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

3.8 共同試験

本法の室間再現精度を確認するため、稲わら、粃米及び乳用牛飼育用配合飼料にモリネートを添加した共通試料を用い、9試験室で試験を実施した。試験の概要は以下のとおりである。

1) 分析試料の調製

稲わら粃米及び乳用牛飼育用配合飼料について、2.1のとおり調製した分析用試料を送付し、各試験室においてそれぞれ10gを量り取った後、濃度非通知の添加用標準液を分析開始の前日に添加して調製した。添加濃度はモリネートとして、稲わらに0.3 mg/kg相当量(3 µg/mLのモリネート添加用標準液を1 mL添加)、粃米に0.05 mg/kg相当量(同様に0.5 µg/mLを1 mL)、乳用牛配合飼料に0.1 mg/kg相当量(同様に1 µg/mLを1 mL)各試料について、非明示の2点併行で試験を実施した。

2) 参加試験室

一般財団法人日本食品分析センター多摩研究所、一般社団法人日本科学飼料協会科学飼料研究センター、JA 東日本くみあい飼料株式会社、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9試験室)

3) 結果の解析

結果はTable 9のとおりであった。質量分析計がイオントラップ型検出器の2試験室において、定量用のモニターイオン m/z 187 では、0.5 µg/mL相当のモリネート標準液であってもSN比が10未満のため検量線の作成が困難である等の理由により定量値が得られなかった。ただし、確認用のモニターイオン m/z 126 では良好な感度が得られたため、参考値として確認用のモニターイオンで定量した結果をTable 9に示した。よって、結果の解析は、イオントラップ型検出器の2試験室を除いた7試験室について、国際的にハーモナイズされた共同試験に関する手順^{6), 7)}を参考に、Cochran検定、外れ値1個のGrubbs検定及び外れ値2個のGrubbs検定を行い、外れ値の棄却を行った上で平均回収率、繰返し精度(RSD_r)及び室間再現精度(RSD_R)を算出した。得られたRSD_Rから、修正Horwitz式を用いてHorRatを求めた。

稲わらでは、平均回収率は105%、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 5.1 % 及び 16 % であり, HorRat は 0.84 であった. 粃米では, 平均回収率は 103 %, 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 5.6 % 及び 11 % であり, HorRat は 0.50 であった. 乳用牛飼育用配合飼料では, 平均回収率は 107 %, 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 7.4 % 及び 12 % であり, HorRat は 0.54 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 10 に示した.

Table 9 Instruments used in the collaborative study

Lab. No.	Feed types				Formula feed for cattle (µg/kg)	
	Rice straw (µg/kg)		Paddy rice (µg/kg)			
1	353	374	58.8	50.4	123	124
2	297	249	41.2	43.3	103	98.1
3	333	345	50.6	51.1	106	125
4	358	344	53.3	53.8	112	92.3
5	318	300	59.8	57.7	86.7	84.5
6	320	308	50.4	48.9	105	110
7	256	257	47.4	53.2	119	110
8	313 ^{a)}	286 ^{a)}	49.1 ^{a)}	68.0 ^{a)}	113 ^{a)}	131 ^{a)}
9	324 ^{a)}	308 ^{a)}	54.6 ^{a)}	47.4 ^{a)}	108 ^{a)}	108 ^{a)}
Spiked level (µg/kg)	300		50		100	
Mean value ^{b)} (µg/kg)	315		51.4		107	
Recovery ^{b)} (%)	105		103		107	
RSD _r ^{c)} (%)	5.1		5.6		7.4	
RSD _R ^{d)} (%)	16		11		12	
PRSD _R ^{e)} (%)	19		22		22	
HorRat	0.84		0.50		0.54	

a) Data obtained by using ion trap type detectors monitoring m/z 126, which were excluded from statistical calculation.

b) $n=14$

c) Relative standard deviation of repeatability within laboratory

d) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

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

Table 10 Instruments used in the collaborative study

Lab. No.	GC-MS	GC Column (i.d.×length, film thickness)
1	SHIMADZU GCMS-QP2010 Ultra	Agilent Technologies HP-5MS (0.25 mm i.d.×30 m, 0.25 μm)
2	Agilent Technologies 6890N/5973 inert	Agilent Technologies HP-5MSI (0.25 mm i.d.×30 m, 0.25 μm)
3	SHIMADZU GCMS-QP2010 Plus	RESTEK Rtx-5MS (0.25 mm i.d.×30 m, 0.25 μm)
4	SHIMADZU GCMS-QP2010 Plus	RESTEK Rtx-5MS (0.25 mm i.d.×30 m, 0.25 μm)
5	SHIMADZU GCMS-QP2010	RESTEK Rtx-5MS (0.25 mm i.d.×30 m, 0.25 μm)
6	SHIMADZU GCMS-QP2010	RESTEK Rtx-5MS (0.25 mm i.d.×30 m, 0.25 μm)
7	SHIMADZU GCMS-QP2010	Agilent Technologies HP-5MS (0.25 mm i.d.×30 m, 0.25 μm)
8	Thermo ELECTRON FOCUS GC/POLARIS Q	Thermo TR-5ms SQC (0.25 mm i.d.×30 m, 0.25 μm)
9	Thermo ELECTRON FOCUS GC/POLARIS Q	Thermo TR-5ms SQC (0.25 mm i.d.×30 m, 0.25 μm)

4 まとめ

飼料中のモリネートについて、ガスクロマトグラム質量分析計を用いた定量法の飼料分析基準への適用の可否について検討したところ、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 0.03~0.5 μg/mL (注入量として 0.06~1.0 ng) の範囲で直線性を示した。
- 2) 2 種類の稲わら、1 種類の稲発酵粗飼料及び 2 種類の粃米、牛用配合飼料、鶏用配合飼料、とうもろこし及びふすまについて、本法に従って得られた SIM クロマトグラムからは、モリネートの定量を妨げるピークは認められなかった。
- 3) 稲わら、稲発酵粗飼料、粃米、牛用配合飼料及び鶏用配合飼料にモリネートを添加（稲わら、稲発酵粗飼料及び粃米に、試料中でモリネートとして 0.3, 0.1 及び 0.05 mg/kg 相当量。牛用配合飼料及び鶏用配合飼料に同じく 0.3 及び 0.1 mg/kg 相当量）した試料を用いて、本法により添加回収試験を実施したところ、平均回収率は、90.8~111 %、その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD_r) として 7.6 %以下と良好な結果であった。
- 4) 本法による定量下限は、試料中 0.03 mg/kg、検出下限は 0.01 mg/kg であった。
- 5) 稲わら、粃米及び牛用配合飼料にモリネートを添加（試料中でモリネートとして 0.3, 0.1 及び 0.05 mg/kg 相当量）した試料を用いて 9 試験室において本法に従い共同試験を実施した。その結果、2 試験室を除く 7 試験室で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日本食品分析センター多摩研究所、一般社団法人日本科学飼料協会科学飼料研究センター、JA 東日本くみあい飼料株式会社における関係者各位に感

謝の意を表します。

文 献

- 1) 農林水産省畜産局長通知：飼料の有害物質の指導基準の制定について，昭和 63 年 10 月 14 日，63 畜 B 第 2050 号 (1988).
- 2) 厚生省告示：食品，添加物等の基準規格，昭和 34 年 12 月 28 日，厚生省告示第 370 号(1959).
- 3) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知：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).
- 4) 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).
- 5) 財団法人日本食品分析センター：平成 22 年度飼料中の有害物質等分析法開発委託事業 (2011).
- 6) Horwitz, W., Protocol for Design, Conduct and Interpretation of Method - Performance Studies, *Pure & Appl. Chem.*, **67** (2), 331-343 (1995).
- 7) AOAC Int., Appendix D: Guidelines for Collaborative Study Procedures to Validate Characteristics of a Method of Analysis. In *Official Methods of Analysis of AOAC Int.* 19th Edition, Volume II, Gaithersburg, MD, USA (2012).