

技術レポート

3 飼料中のジスルホトン及びジスルホトンスルホンのガスクロマトグラフによる定量法

野崎 友春*, 井手 康人*

1 緒 言

ジスルホトン（エチルチオメトン）はバイエル社とサンド社が開発した浸透性有機リン系殺虫剤である。環境中では酸化によりジスルホトンスルホンに変化する可能性があるため、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は、ジスルホトンスルホン含有量をジスルホトン相当に換算した上でジスルホトンとの和で設定されている。日本では1964年に農薬登録され、適用作物も多い¹⁾。

食品中の残留農薬基準値は、麦・穀類で0.02~0.2 mg/kg、綿実で0.1 mg/kgとなっている。また、諸外国の牧草類の基準値は3~10 mg/kgである。現在のところ、日本国内での飼料中の基準は設定されていない。

飼料中のジスルホトン及びジスルホトンスルホンの定量法としては、財団法人日本食品分析センターが「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」において開発した、ガスクロマトグラフによるジスルホトンの残留分析法¹⁾（以下「分析センター法」という。）がある。筆者らはこの分析センター法を基に、飼料分析基準²⁾への適用の可否について検討を行ったので、その概要を報告する。

なお、ジスルホトン及びジスルホトンスルホンの構造式をFig. 1に示した。

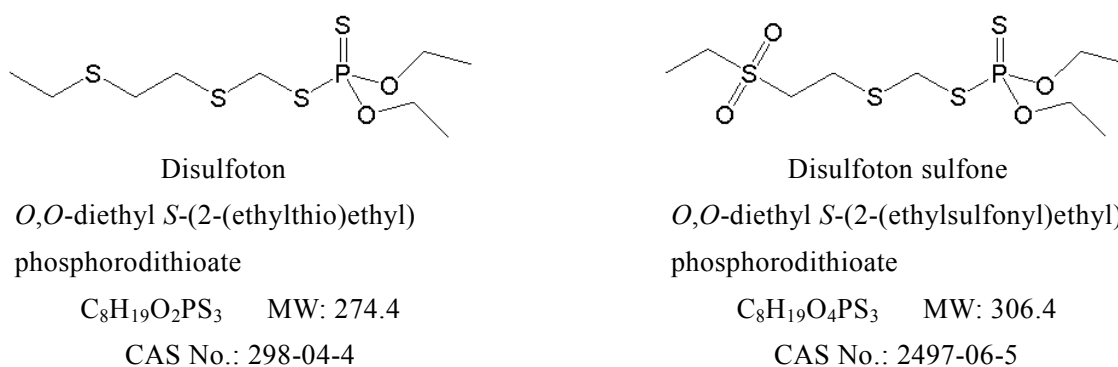


Fig. 1 Chemical structures of disulfoton (left) and disulfoton sulfone (right)

2 実験方法

2.1 試料

市販のとうもろこし、スーダングラス乾草及び配合飼料（若令牛育成用）をそれぞれ1 mmの網ふるいを通すまで粉碎し、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。

* 独立行政法人農林水産消費安全技術センター名古屋センター

Table 1 Compositions of the formula feed

Formula feed types	Ingredient types	Proportion (%)	Ingredients
For growing cattle	Grains	56	Corn, Wheat flour
	Brans	21	Wheat bran
	Oil seed meal	12	Soybean meal
	Others	11	Molassess, Alfalfa meal, Calcium carbonate Calcium phosphate, Salt, Feed additives

2.2 試 薬

1) ジスルホトン標準原液

ジスルホトン ($C_8H_{19}O_2PS_3$) 標準品 (Dr. Ehrenstorfer 製, 純度 93.5 %) 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, 更に標線までアセトンを加えてジスルホトン標準原液を調製した (この液 1 mL は, ジスルホトンとして 0.5 mg ($f=0.935$) を含有する.) .

2) ジスルホトンスルホン標準原液

ジスルホトンスルホン ($C_8H_{19}O_4PS_3$) 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, 更に標線までアセトンを加えてジスルホトンスルホン標準原液を調製した (この液 1 mL は, ジスルホトンスルホンとして 0.5 mg ($f=0.990$) を含有する.) .

3) 混合標準液

使用に際して, ジスルホトン標準原液及びジスルホトンスルホン標準原液の一定量を正確にとり, アセトンで正確に希釈し, 1 mL 中にジスルホトン及びジスルホトンスルホンとしてそれぞれ 20, 50, 100, 200, 500 及び 1,000 ng を含有する各混合標準液を調製した.

4) アセトン, ヘキサン, 酢酸エチル及びアセトニトリルは残留農薬分析用試薬を用いた. ジエチレングリコールは純度 99.5 % 以上のものを用いた. 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装置: Agilent Technologies 製 6890 Series

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: BÜCHI 製 R-200

4) 遠心分離器: 久保田商事製 5200

5) 多孔性ケイソウ土カラム: Varian 製 Chem Elut, 20 mL (20 mL 保持用)

6) グラファイトカーボン/アミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム: Supelco 製 ENVI-Carb/LC-NH2 (500 mg /500 mg)

2.4 定量方法

1) 抽 出

分析試料 10.0 g を量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ, 水 15 mL (乾牧草は 30 mL) を加え, 10 分間静置後, アセトン 100 mL を加え, 60 分間振り混ぜて抽出した. 200 mL の全量フラスコ (とうもろこしは 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、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、更に全量フラスコの標線までアセトンを加えた。この液 40 mL (乾牧草は 10 mL) を 300 mL のなす形フラスコに正確に入れ (とうもろこしはなす形フラスコに受けたろ液全量を)、40 °C 以下の水浴で約 10 mL まで減圧濃縮 (乾牧草は 2 mL まで) し、カラム処理 I に供する試料溶液とした。

2) カラム処理 I

試料溶液を多孔性ケイソウ土カラムに入れ、試料溶液の入っていたなす形フラスコを水 5 mL で洗浄し、洗液をカラムに加えた後、30 分間静置した。200 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-ヘキサン (1+1) 10 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、各農薬を溶出させた。更に、酢酸エチル-ヘキサン (1+1) 70 mL をカラムに加えて同様に溶出させ、溶出液にアセトン-ジエチレングリコール (49+1) (以下「キーパー」という。) 100 μ L を加える。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。

乾牧草以外の試料は、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、この液を 10 mL の遠心沈殿管に入れ、650 \times g で 5 分間遠心分離した。上澄み液をメンブランフィルター (孔径 0.5 μ m 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。

乾牧草試料は、ヘキサン-アセトン (4+1) 5 mL を加えて残留物を溶かし、カラム処理 II 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、各農薬が溶出する画分を 200 mL のなす形フラスコに分取した。溶出液にキーパー 100 μ L 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。ゲル浸透クロマトグラフの条件を Table 2 に示した。

ヘキサン-アセトン (4+1) 5 mL を加えて残留物を溶かし、カラム処理 II に供する試料溶液とした。

Table 2 Operating conditions of GPC for analyzing disulfoton and disulfoton sulfone

Column	Shodex CLNpak EV-2000AC (20 mm i.d. \times 300 mm, 15 μ m)
Guard column	Shodex CLNpak EV-G AC (20 mm i.d. \times 100 mm, 15 μ m)
Eluent	Cyclohexane-acetone(4:1)
Flow rate	5 mL/min
Column temperature	35 °C
Fraction volume	70~110 mL

4) カラム処理 II

グラファイトカーボン/アミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラムをヘキサン-アセトン (4+1) 10 mL で洗浄した。

50 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き、試料溶液をミニカラムに入れ、液面が充てん剤の上端に達するまで流下して各農薬を溶出させた。試料溶液の入っていたなす形フラスコをヘキサン-アセトン (4+1) 2 mL ずつで3回洗浄し、洗液を順次ミニカラムに加え、同様に溶出させた。更にヘキサン-アセトン (4+1) 9 mL をミニカラムに加えて同様に溶出させ、溶出液にキーパー100 μ L を加える。溶出液を 40 $^{\circ}$ 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。アセトン 1 mL (乾牧草は 5 mL) を正確に加えて残留物を溶かし、ガスクロマトグラフィーに供する試料溶液とした。

5) ガスクロマトグラフィー

試料溶液及び各混合標準液各 2 μ L をガスクロマトグラフに注入し、Table 3 の測定条件に従ってクロマトグラムを得た。

Table 3 Operating conditions of GC for analyzing disulfoton and disulfoton sulfone

Column	HP-5 (0.32 mm i.d.×30 m, 0.25 μ m film thickness)
Column temperature	80 $^{\circ}$ C (1 min) \rightarrow 20 $^{\circ}$ C /min \rightarrow 280 $^{\circ}$ C (10 min)
Injection mode	Splitless (60s)
Injection temperature	250 $^{\circ}$ C
Carrier gas	He 2.0 mL/min
Hydrogen	75 mL/min
Air	100 mL/min
Make up gas	N ₂ (30 mL /min)
Detector	FPD
Detector temperature	250 $^{\circ}$ C

6) 計 算

得られたクロマトグラムからピーク高さ又は面積を求めて検量線を作成し、試料中のジスルホトン量及びジスルホトンスルホン量を算出した。

3 結果及び考察

3.1 精製条件の検討

分析センター法¹⁾の追試を行ったところ、液液分配による精製操作で懸濁がおこり回収率が悪くなったことから、各精製段階を検討することとした。

1) キーパーの必要性の検討

従来、揮散しやすい農薬等の分析では、ジエチレングリコール含有アセトン等のキーパーを使用して乾固ロスを減少させてきた。

今回の分析対象であるジスルホトン及びジスルホトンスルホンは、リン系の農薬であり、比較的揮散しやすいと考えられるため、キーパーの使用について検討を行った。

200 ng/mL の混合標準液 1 mL を 50 mL のなす形フラスコに正確に入れ、40 $^{\circ}$ C 以下の水浴で減圧濃縮した後に窒素ガスを送って乾固し、アセトン 1 mL を正確に加えた試験溶液と、減圧濃縮時にアセトン-ジエチレングリコール (49+1) 100 μ L 及び 200 μ L をそれぞれ加えたもの

を同様に操作した試験溶液をガスクロマトグラフで測定した。

その結果、Table 4 のとおり、キーパーを使用した方が高い回収率が得られたことから、以後の検討ではキーパーを使用することとした。また、キーパーの量による変化は見られなかったことから、100 μ L を加えることとした。

Table 4 Effectiveness of the usage of keeper

	Added amount of acetone - diethylene glycol (49:1)		
	No addition	100 μ L	200 μ L
Relative recovery of disulfoton (%) ^{a)}	61	100	99
Relative recovery of disulfoton sulfone (%) ^{a)}	84	100	91

a) Relative value to maximum recovery indicated with bold type

2) 多孔性ケイソウ土カラムによる精製の検討

分析センター法¹⁾では試料溶液を2 mLまで減圧濃縮した後に水15 mL及び塩化ナトリウム3 gを加えて多孔性ケイソウ土カラムに入れ、更に容器を水5 mLで洗浄し、洗液をカラムに加えた後、ヘキサンで溶出している。

この方法では、ヘキサン溶出時、ヘキサンと混合しない溶液が流出することがあることから、その後の精製に影響を及ぼしていると考えられた。

このことから、多孔性ケイソウ土カラムによる精製に用いる溶出溶媒として、飼料分析基準²⁾でよく用いられている酢酸エチル、酢酸エチル-ヘキサン(1+1)及びヘキサンについて検討を行った。また、分析センター法では試料溶液と洗浄用の水の負荷量合計が20 mLを超えていること及びとうもろこし由来の試料溶液は2 mLまで濃縮が不可能であることから、試料溶液を10 mL以下、洗浄水を5 mLに変更した。

若令牛育成用配合飼料を2.4の1)に従って抽出、定容後、試料溶液40 mLに1,000 ng/mLの混合標準液0.2 mLを加え、40 $^{\circ}$ C以下の水浴で約10 mLまで減圧濃縮(乾牧草は2 mLまで)して2.4の2)のカラム処理Iに供する試料溶液とした。多孔性ケイソウ土カラムに負荷した後、水5 mLで容器を洗浄し、洗液をカラムに負荷した。一定時間静置した後に、各溶媒を流下させ、分画し、それぞれについて2.4の残りの操作を行って試料溶液とし、測定を行った。

その結果はTable 5, 6及び7のとおりであった。ジスルホトンスルホンでは溶媒による差より、静置時間の差が大きくなる傾向であった(静置時間30分の時の回収率74~88%, 静置時間10分の時の回収率105~123%)が、ジスルホトンでは静置時間及び溶出溶媒と回収率の間に明確な関連性がないように思われた。今回の検討では、1回目の結果において、ジスルホトン及びジスルホトンスルホンで良好な結果が得られた酢酸エチル-ヘキサン(1+1)を多孔性ケイソウ土カラムからの溶出溶媒とすることとしたが、更なる検討が必要であると考えられた。また、溶出液量は100 mLとした。

Table 5 Elution pattern from Chem Elut cartridge (The first time, allow to stand for 30 min)

	Eluent	Fraction volume			Total
		0~50 mL	50~100 mL	100~150 mL	
Recovery of disulfoton (%) ^{a)}	Ethyl acetate	54	N.D.	N.D.	54
Recovery of disulfoton sulfone (%) ^{a)}		60	19	N.D.	79
Recovery of disulfoton (%) ^{a)}	Ethyl acetate - hexane (1:1)	116	10	N.D.	126
Recovery of disulfoton sulfone (%) ^{a)}		75	N.D.	N.D.	75
Recovery of disulfoton (%) ^{a)}	Hexane	112	11	N.D.	123
Recovery of disulfoton sulfone (%) ^{a)}		60	14	N.D.	74

a) $n=1$

Table 6 Elution pattern from Chem Elut cartridge (The second time, allow to stand for 30 min)

	Eluent	Fraction volume			Total
		0~50 mL	50~100 mL	100~150 mL	
Recovery of disulfoton (%) ^{a)}	Ethyl acetate	75	18	2	95
Recovery of disulfoton sulfone (%) ^{a)}		63	15	1	79
Recovery of disulfoton (%) ^{a)}	Ethyl acetate - hexane (1:1)	51	6	1	58
Recovery of disulfoton sulfone (%) ^{a)}		81	7	N.D.	88
Recovery of disulfoton (%) ^{a)}	Hexane	46	13	1	60
Recovery of disulfoton sulfone (%) ^{a)}		65	19	1	85

a) $n=1$

Table 7 Elution pattern from Chem Elut cartridge (The third time, allow to stand for 10 min)

	Eluent	Fraction volume			Total
		0~50 mL	50~100 mL	100~150 mL	
Recovery of disulfoton (%) ^{a)}	Ethyl acetate	55	19	1	75
Recovery of disulfoton sulfone (%) ^{a)}		101	19	3	123
Recovery of disulfoton (%) ^{a)}	Ethyl acetate - hexane (1:1)	56	17	1	74
Recovery of disulfoton sulfone (%) ^{a)}		71	34	N.D.	105
Recovery of disulfoton (%) ^{a)}	Hexane	71	7	1	79
Recovery of disulfoton sulfone (%) ^{a)}		105	17	N.D.	122

a) $n=1$

3) ゲル浸透クロマトグラフィーの溶出画分の検討

分析センター法¹⁾では、配合飼料のみ多孔性ケイソウ土カラムによる精製を行った後、液液分配による精製を行っている。

液液分配では、エマルジョンがおこりやすく、作業者が溶媒に触れる時間も長くなることから、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定量法²⁾等で使用しているゲル浸透クロマトグラフィー（GPC）による精製の検討を行った。

若令牛育成用配合飼料を 2.4 の 1)及び 2)に従って操作を行い、多孔性ケイソウ土カラムによる精製後の試料溶液に 1,000 ng/mL の混合標準液 1 mL 及びアセトン-ジエチレングリコール (49+1) 100 μ L を加え、40 $^{\circ}$ C 以下の水浴で減圧濃縮し、窒素ガスを送って乾固し、シクロヘ

キサン-アセトン (4+1) 10 mL を正確に加えて試料溶液とした。操作条件は、分画条件以外は 2.4 の 3) と同一とした。分画後の各試料溶液にキーパー 100 μ L を加え、40 $^{\circ}$ C 以下の水浴でほぼ乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固し、ヘキサン-アセトン (4+1) 5 mL を加えて残留物を溶かした。その後 2.4 の 4) のカラム処理 II 以下の操作を行い試料溶液とし、定量を行った。

その結果は Table 8 のとおりであり、ジスルホトンは 80 mL から 100 mL の画分で、ジスルホトンスルホンは 90 mL から 110 mL の画分でそれぞれ溶出したことから、本法では 70 mL から 110 mL の画分を分取することとした。

Table 8 Elution pattern from GPC

	Fraction volume (mL)						Total	
	60~70	~80	~90	~100	~110	~120		~130
Recovery of disulfoton (%) ^{a)}	N.D.	4	93	8	N.D.	N.D.	N.D.	105
Recovery of disulfoton sulfone (%) ^{a)}	N.D.	N.D.	9	102	6	N.D.	N.D.	117

a) $n=1$

3.2 検量線の作成

2.2 の 3) に従って調製した各混合標準液各 2 μ L 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ピーク高さ又は面積を求めて検量線を作成した。その結果、Fig. 2 及び 3 のとおり、ジスルホトン及びジスルホトンスルホンのいずれの検量線も 20~1,000 ng/mL (注入量として 40~2,000 pg) で直線性を示した。

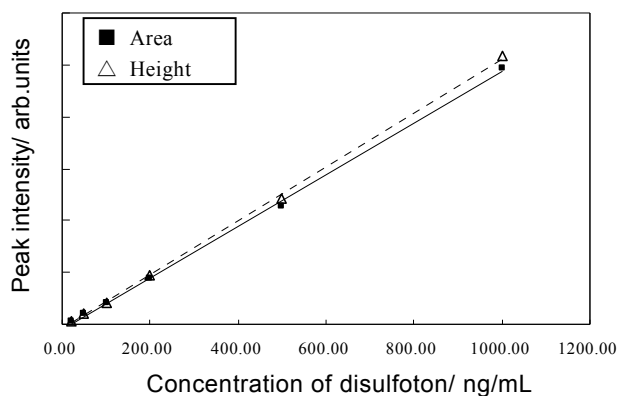


Fig. 2 Calibration curves of disulfoton

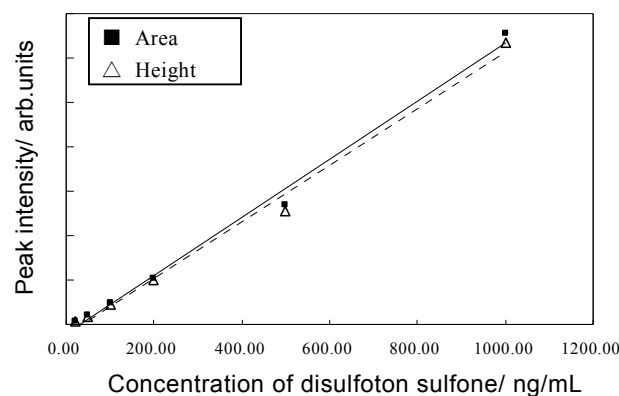


Fig. 3 Calibration curves of disulfoton sulfone

3.3 妨害物質の検討

分析センター法から精製方法を変更したことから、妨害物質について検討を行った。

とうもろこし、若令牛育成用配合飼料及びスーダングラス乾草について、本法に従って操作を行ったところ、定量を妨害するピークは検出されなかった。クロマトグラム例を Fig. 4 に示した。

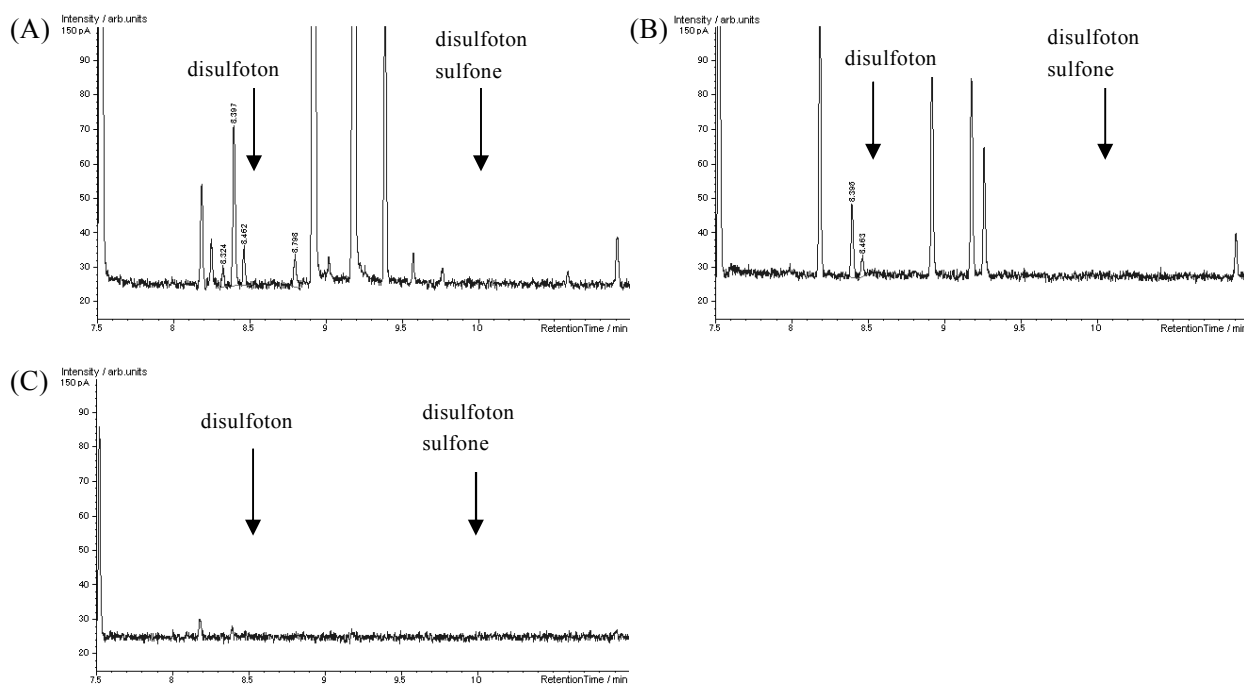


Fig. 4 Chromatograms of blank solutions

GC conditions are shown in Table 3.

(A) Sample solution of corn (not spiked)

(B) Sample solution of formula feed for beef cattle (not spiked)

(C) Sample solution of sudangrass hay (not spiked)

(Arrows indicate the retention times of disulfoton and disulfoton sulfone)

3.4 添加回収試験

本法による回収率及び繰返し精度を確認するために添加回収試験を実施した。

ジスルホトン及びジスルホトンスルホンとして、とうもろこしに 10 及び 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量、配合飼料に 40 及び 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量、スーダングラス乾草に 100 及び 1,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量をそれぞれ添加した試料について、本法に従って 3 点併行で定量を行い、その回収率及び繰返し精度を求めた。

その結果、Table 9 のとおり、ジスルホトンの平均回収率は 21.1~142 %、その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD) として 47 % 以下、ジスルホトンスルホンの平均回収率は 72.6~211 %、その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD) として 6.5 % 以下であった。

ジスルホトンスルホンは、ばらつきは少ないが一部の試料で回収率が高かった。ジスルホトンはばらつきも大きく、回収率の差も大きかった。

そこで、試料に各農薬を添加してからの時間経過による差を検討するため、とうもろこしに標準液を添加した後、速やかに抽出作業を行い精製した場合と、一晚放置した後に抽出作業を行い精製した場合の比較を行った。

その結果、Table 10 のとおり、ジスルホトンでは明確な回収率の低下が見られたが、ジスルホトンスルホンでは回収率は高いものの、回収率の変動は少なかった。

この結果より、ジスルホトンは標準液添加後の静置時間によって定量に影響がでることが考えられた。

Table 9 Recoveries of disulfoton and disulfoton sulfone from three kinds of feed

Pesticide	Feed types	Spiked level ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Recovery ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)
Disulfoton	Corn	10	54.9	17
		20	57.9	6.5
	Formula feed	40	82.5	2.7
		200	21.1	47
	Sudangrass hay	100	142	5.3
		1,000	70.0	5.3
Disulfoton sulfone	Corn	10	111	6.5
		20	72.6	2.5
	Formula feed	40	127	3.2
		200	77.3	3.8
	Sudangrass hay	100	211	3.8
		1,000	83.6	5.4

a) Mean ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

Table 10 Influence of standing time on recoveries

Pesticide	Spiked level ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Recovery ^{a)} (%)	RSD ^{b)} (%)
Disulfoton ^{c)}	20	122	3.9
Disulfoton sulfone ^{c)}		244	5.2
Disulfoton ^{d)}	20	12.0	20
Disulfoton sulfone ^{d)}		247	2.9

a) Mean ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

c) Extract at once after addition of standard solution

d) Allow to stand for over night after addition of standard solution

3.5 共同試験

本法の室間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。

とうもろこし、若令牛育成用配合飼料及びスーダングラス乾草にジスルホトン及びジスルホトンスルホンとしてそれぞれ 20, 200 及び 1,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量を添加した共通試料を用い、株式会社島津総合分析試験センター、財団法人日本食品分析センター多摩研究所、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の 8 試験室で共同分析を実施した。

ジスルホトンの結果は Table 11 のとおりであり、とうもろこしでは、平均回収率は 50.4 %、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として 7.4 及び 39 %であり、HorRat は 1.77 であった。

また、若令牛育成用配合飼料では、平均回収率は 32.8 %、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として 15 及び 80 %であり、HorRat は 3.91 であった。

また、スーダングラス乾草では、平均回収率は 49.5 %、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として 5.0 及び 44 % であり, HorRat は 2.74 であった.

ジスルホトンスルホンの結果は Table 12 のとおりであり, とうもろこしでは, 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として 7.9 及び 10 % であり, HorRat は 0.46 であった.

また, 若令牛育成用配合飼料では, 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として 4.6 及び 10 % であり, HorRat は 0.50 であった.

また, スーダングラス乾草では, 平均回収率は 97.4 %, 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として 5.7 及び 27 % であり, HorRat は 1.66 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の機種等を Table 13 に示した.

Table 11 Collaborative study for disulfoton

	Corn ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		Formula feed for growing cattle ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		Sudangrass hay ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	
1	3.26	3.22	11.8	19.7	349	405
2	10.20	8.25	78.8	85.9	443	500
3	8.95	9.02	54.1	40.0	496	511
4	13.2	14.0	150	171	918	919
5	14.4	15.9	25.9	37.6	401	367
6	13.1	12.1	113	134	702	703
7	11.7	10.7	26.5	40.8	374	328
8	6.90	6.40	34.2	27.6	249	258
Spiked level ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	20.0		200		1000	
Mean value ^{a)} ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	10.1		65.7		495	
Recovery ^{a)} (%)	50.4		32.8		49.5	
RSD _r ^{b)} (%)	7.4		15		5.0	
RSD _R ^{c)} (%)	39		80		44	
PRSD _R ^{d)} (%)	22		20		16	
HorRat	1.77		3.91		2.74	

a) $n=16$

b) Relative standard deviations of repeatability within laboratory

c) Relative standard deviations of reproducibility between laboratories

d) Predicted relative standard deviations of reproducibility between laboratories calculated from the modified Horwitz equation

Table 12 Collaborative study for disulfoton sulfone

	Corn ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		Formula feed for growing cattle ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		Sudangrass hay ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	
1	19.9	19.9	193	191	1140	1160
2	22.0	19.1	216	190	1070	1250
3	19.8	20.6	216	226	1030	1010
4	24.8	24.6	252	228	1150	1200
5	21.6	21.3	201	206	980	932
6	23.7	17.8	189	194	972	936
7	21.8	21.8	221	217	946	1040
8	18.5	18.9	176	180	403	364
Spiked level ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	20.0		200		1000	
Mean value ^{a)} ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	21.0		206		974	
Recovery ^{a)} (%)	105		103		97.4	
RSD _r ^{b)} (%)	7.9		4.6		5.7	
RSD _R ^{c)} (%)	10		10		27	
PRSD _R ^{d)} (%)	22		20		16	
HorRat	0.46		0.50		1.66	

a) $n=16$

b) Relative standard deviations of repeatability within laboratory

c) Relative standard deviations of reproducibility between laboratories

d) Predicted relative standard deviations of reproducibility between laboratories calculated from the modified Horwitz equation

Table 13 Instruments used in the collaborative study

Lab. No.	GC-FPD	GC column (i.d.×length, film thickness)
1	Agilent Technologies 6890N	Agilent Technologies HP-5 (0.32 mm × 30 m, 0.25 μm)
2	Agilent Technologies HP6890N	Agilent Technologies HP-5 (0.32 mm × 30 m, 0.25 μm)
3	Hewlett-Packard 6890 plus	Agilent Technologies HP-5 (0.32 mm × 30 m, 0.25 μm)
4	Agilent Technologies 6890N	Agilent Technologies HP-5 (0.32 mm × 30 m, 0.25 μm)
5	Shimadzu GC-17A (FPD-17)	Agilent Technologies HP-5MS (0.25 mm × 30 m, 0.25 μm)
6	Agilent Technologies 6890N	Agilent Technologies HP-5 (0.32 mm × 30 m, 0.25 μm)
7	Agilent Technologies 6890	Agilent Technologies HP-5 (0.32 mm × 30 m, 0.25 μm)
8	Shimadzu GC-2010AF (FPD-2010)	Agilent Technologies HP-5 (0.32 mm × 30 m, 0.25 μm)

4 まとめ

飼料中のジスルホトン及びジスルホトンスルホンについて、分析センター法を基に、ガスクロマトグラフ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、次の結果を得た。

- 1) ジスルホトン及びジスルホトンスルホンの窒素ガス乾固による影響を確認したところ、キーパーとしてアセトン-ジエチレングリコール (1+1) を添加する必要があることが確認された。
- 2) 多孔性ケイソウ土カラムによる精製を検討したところ、酢酸エチル-ヘキサン (1+1) で溶出する方法を選択したが、更なる検討が必要であると考えられた。
- 3) ゲル浸透クロマトグラフィーによる精製を検討したところ、70 mL~110 mL の画分でジスルホトン及びジスルホトンスルホンが溶出することが確認された。
- 4) ジスルホトン及びジスルホトンスルホンの検量線は20~1,000 ng/mL (注入量として40~2,000 pg) で直線性を示した。
- 5) とうもろこし、若令牛育成用配合飼料及びスーダングラス乾草について、本法に従ってクロマトグラムを作成したところ、ジスルホトン及びジスルホトンスルホンの定量を妨害するピークは認められなかった。
- 6) とうもろこし、若令牛育成用配合飼料及びスーダングラス乾草を用いて、とうもろこしに10及び20 µg/kg 相当量、配合飼料に40及び200 µg/kg 相当量、スーダングラス乾草に100及び1,000 µg/kg 相当量をそれぞれ添加した試料について添加回収試験を実施した結果、ジスルホトンの平均回収率は21.1~142 %、その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD) として47 %以下、ジスルホトンスルホンの平均回収率は72.6~211 %、その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD) として6.5 %以下の結果が得られた。
- 7) 添加回収試験を行う際に、各農薬を添加した後静置する時間について検討を行ったところ、一晚静置した場合、ジスルホトンの回収率が低くなる傾向があった。
- 8) とうもろこし、若令牛育成用配合飼料及びスーダングラス乾草にジスルホトン及びジスルホトンスルホンとしてそれぞれ20, 200及び1,000 µg/kg 相当量を添加した共通試料を用いて8試験室で本法による共同分析を実施した。その結果、ジスルホトンについて、とうもろこしでは、平均回収率は50.4 %、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として7.4及び39 %であり、HorRatは1.77であった。若令牛育成用配合飼料では、平均回収率は32.8 %、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として15及び80 %であり、HorRatは3.91であった。スーダングラス乾草では、平均回収率は49.5 %、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として5.0及び44 %であり、HorRatは2.74であった。
ジスルホトンスルホンについて、とうもろこしでは、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として7.9及び10 %であり、HorRatは0.46であった。若令牛育成用配合飼料では、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として4.6及び10 %であり、HorRatは0.50であった。スーダングラス乾草では、平均回収率は97.4 %、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として5.7及び27 %であり、HorRatは1.66であった。
- 9) 以上のことから、本法による飼料中のジスルホトン及びジスルホトンスルホンの同時定量は難しいと思われる。

謝 辞

共同試験にご協力いただいた株式会社島津総合分析センター及び財団法人日本食品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) 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，85 (2007).
- 2) 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).