

6 飼料用イネ中のフサライドのガスクロマトグラフ質量分析計による定量法

山本 克己^{*1}, 長久保 眞平^{*2}, 関口 好浩^{*3}

Determination of Phthalide in Rice Straw, Whole-crop Rice Silage and Paddy Rice for Feed by GC-MS

Katsumi YAMAMOTO^{*1}, Shinpei NAGAKUBO^{*2} and Yoshihiro SEKIGUCHI^{*3}

(^{*1} Food and Agricultural Materials Inspection Center, Sendai Regional Center

^{*2} Food and Agricultural Materials Inspection Center, Sendai Regional Center

(Now Fertilizer and Feed Inspection Department)

^{*3} Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department)

An analytical method was developed to determine the level of phthalide in rice straw, whole-crop rice silage and paddy rice for feed using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS).

After adding water to the sample, phthalide was extracted with acetone and resulting solution was filtered. The sample solution was then diluted with acetone to a final volume of 200 mL. The extract was purified with InertSep K-solute (GL Sciences Inc.; Tokyo, Japan) and Presep-C Florisil cartridge (Wako Pure Chemical Industries Ltd.; Osaka, Japan). The resulting solution was injected into the GC-MS for determination of the phthalide level. The GC separation was carried out on a fused silica capillary column (DB-5MS; 0.25 mm i.d.× 30 m, film thickness 0.25 μm from Agilent Technologies Inc.; Santa Clara, CA, USA). The mass spectrometer was operated in electron ionization (EI) mode.

Recovery tests were conducted on rice straw, whole-crop rice silage and paddy rice. Rice straw spiked with 6.5, 13 and 130 mg/kg, whole-crop rice silage spiked with 1.5, 3 and 30 mg/kg and paddy rice spiked with 0.5 and 10 mg/kg of phthalide respectively. The resulting mean recoveries ranged from 88.1 % to 102 %, and the relative standard deviations (RSD_r) were not more than 4.0 %.

A collaborative study was conducted in nine laboratories using rice straw, whole-crop rice silage and paddy rice spiked with 130 mg/kg, 30 mg/kg and 1 mg/kg of phthalide respectively. The mean recovery, repeatability and reproducibility in the terms of relative standard deviations (RSD_r and RSD_R) and HorRat, respectively, were 100 %, 2.1 %, 6.3 % and 0.83 for rice straw, 93.7 %, 1.8 %, 3.8 % and 0.40 for whole-crop rice silage, and 94.9 %, 5.0 %, 7.4 % and 0.46 for paddy rice.

This method was validated and established for use in the inspection of phthalide in rice straw, whole-crop rice silage and paddy rice for feed.

Key words: phthalide; gas chromatograph-mass spectrometer (GC-MS); electron ionization (EI); rice straw; whole-crop rice silage; paddy rice; collaborative study

キーワード：フサライド；ガスクロマトグラフ質量分析計；電子イオン化法；稲わら；稲発酵粗飼料；粃米；共同試験

^{*1} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター仙台センター

^{*2} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター仙台センター，現 肥飼料安全検査部

^{*3} 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

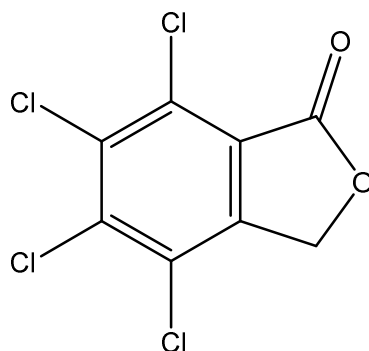
1 緒 言

フサライドは呉羽化学工業株式会社（現 株式会社クレハ）が開発したイネいもち病専用の防除剤で、優れた殺菌効果を持ち、国内外で広く用いられている¹⁾。

我が国では、飼料の有害物質の指導基準²⁾において、稲わら中で 130 mg/kg、稲発酵粗飼料（以下「WCS」という。）中で 30 mg/kg の管理基準値が定められている。定量法としては、厚生労働省通知³⁾によりガスクロマトグラフ質量分析計（以下「GC-MS」という。）を用いた一斉試験法が示されているが、飼料に適用できる分析法は飼料分析基準⁴⁾にはなく、開発が急務であった。

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」において開発したフサライド試験法⁵⁾（以下「JFRL 法」という。）を基にした定量法について飼料分析基準への適用の可否を検討し、JFRL 法の電子捕獲検出器付きガスクロマトグラフ（以下「GC-ECD」という。）による測定から GC-MS による測定に変更することにより良好な結果を得たので、その概要を報告する。

参考にフサライドの構造式等を Fig. 1 に示した。



4,5,6,7-tetrachlorophthalide

$C_8H_2Cl_4O_2$ MW: 271.9 CAS No.: 27355-22-2

Fig. 1 Chemical structure of phthalide

2 実験方法

2.1 試料

稲わら及び粃米はそれぞれ 1 mm のスクリーンを装着した粉砕機で粉砕した。WCS 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。

2.2 試薬

1) アセトン、ジエチルエーテル、シクロヘキサン及びヘキサンは残留農薬分析用を用いた。水は超純水（JIS K 0211 の 5218 に定義された超純水）を、ポリエチレングリコール（以下「PEG」という。）は平均分子量 300 のものを、塩化ナトリウムは特級を用いた。

2) 希釈溶媒

PEG 1 mL にアセトンを加えて 100 mL とし、更にこの液 1 mL にヘキサンを加えて 200 mL の希釈溶媒を調製した。

3) フサライド標準液

フサライド標準品（純度 99.8%，関東化学製）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フサライド標準原液を調製した（この液 1 mL は、フサライドとして 0.5 mg を含有する。）。

使用に際して、標準原液 2 mL を 50 mL の全量フラスコに正確に入れ、更に標線までアセトンを加えて、1 mL 中にフサライドとして 20 μ g を含有する液を調製した。この液の一定量を希釈溶媒で正確に希釈し、1 mL 中にフサライドとして 0.002, 0.005, 0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.15 及び 0.2 μ g を含有する各標準液を調製した。

2.3 装置及び器具

- 1) 粉碎機：ZM-100 Retsch 製（1 mm スクリーン、使用時回転数 14000 rpm）
- 2) 乾牧草用粉碎機：SM-100 Retsch 製（1 mm スクリーン、回転数（仕様）1430 rpm）
- 3) 振とう機：レシプロシェーカーSR-2W タイテック製（使用時振動数 300 rpm）
- 4) 多孔性ケイソウ土カラム：InertSep K-solute（10 mL 及び 20 mL 保持用） ジーエルサイエンス製
- 5) 合成ケイ酸マグネシウムミニカラム：Presep-C Florisil Cartridge（充てん剤量 800 mg） 和光純薬工業製にリザーバーを連結したもの
- 6) GC-MS：
GC 部：7890A Agilent Technologies 製
MS 部：5975C Agilent Technologies 製
- 7) GC-ECD：
GC 部：GC-2010 Plus 島津製作所製
ECD 部：ECD-2010 Plus 島津製作所製
- 8) メンブランフィルター：DISMIC-25HP（孔径 0.45 μ m, 直径 25 mm, PTFE） 東洋濾紙製
- 9) ゲル浸透クロマトグラフ（以下「GPC」という。）：GPC システム ジーエルサイエンス製

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 30 mL（粃米は 20 mL）を加え、30 分間静置後、更にアセトン 120 mL（粃米は 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 4 mL を 50 mL のなす形フラスコに正確に入れ、40 $^{\circ}$ C 以下の水浴で約 1 mL 以下まで減圧濃縮した後、水 5 mL を加えてカラム処理 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（10 mL 保持用）に入れ、10 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ヘキサン 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てフサライドを溶出させた。更にヘキサン 70 mL をカラムに加えて同様に溶出させ、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。ヘキサン 2 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) カラム処理 II

合成ケイ酸マグネシウムミニカラムをヘキサン 10 mL で洗浄した。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 2 mL ずつで 2 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。更にヘキサノジエチルエーテル (24+1) 20 mL をミニカラムに加え、同様に流出させた。50 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き、ヘキサノアセトン (19+1) 10 mL を加えてフサライドを溶出させた。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 5 mL を正確に加えて残留物を溶かし、更にこの液の一定量を希釈溶媒で正確に希釈（稲わら 50 倍、WCS 25 倍、粃米 4 倍）し、GC-MS による測定に供する試料溶液とした。

4) GC-MS による測定

試料溶液及び各標準液 2 μ L 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。

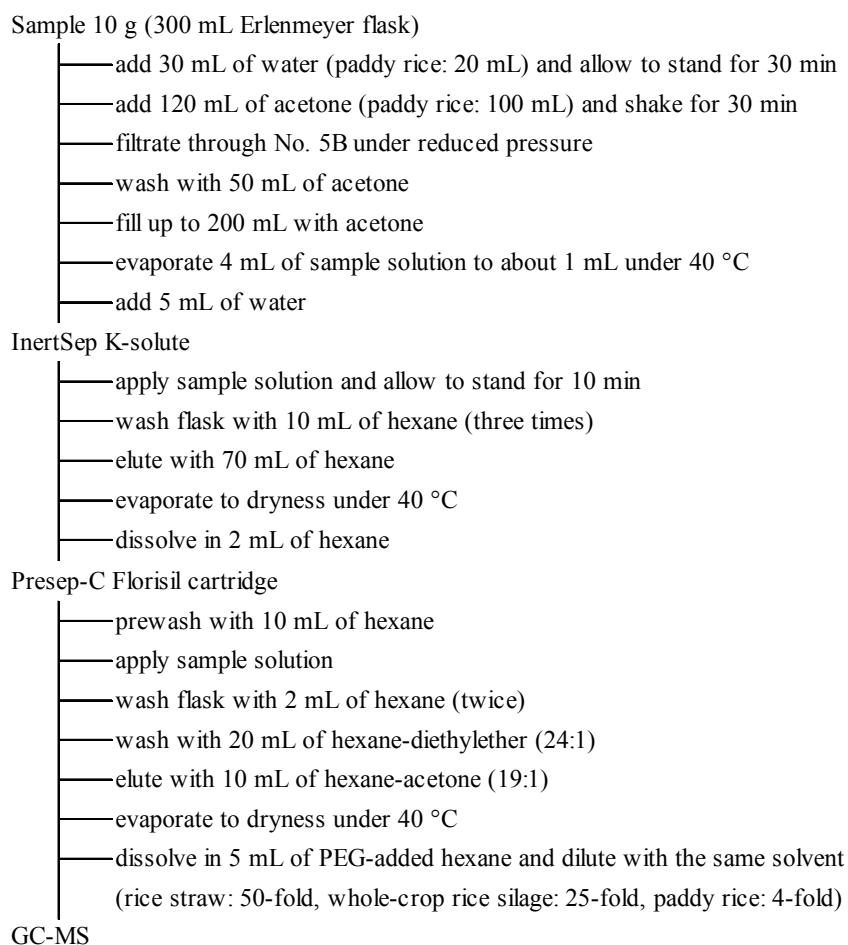
Table 1 Operating conditions of GC-MS

Column	DB-5MS (0.25 mm i.d.×30 m, 0.25 μ m film thickness), Agilent Technologies
Column temperature	70 °C (hold for 2 min) \rightarrow ramp 20 °C/min \rightarrow 280 °C (hold for 10 min)
Injection mode	Splitless (120 s)
Injection port temperature	250 °C
Carrier gas	He 1.0 mL/min
Interface temperature	280 °C
Ion source temperature	250 °C
Ionization	Electron ionization
Ionization energy	70 eV
Monitor ion	m/z 243 (for quantification), 272 (for confirmation)

5) 計 算

得られた SIM クロマトグラムからフサライドのピーク面積を求めて検量線を作成し、試料中のフサライド量を算出した。

なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。



Scheme 1 Analytical procedure for phthalide in rice straw, whole-crop rice silage and paddy rice for feed by GC-MS

2.5 GC-ECD による測定

2.2 の 3) に従い調製した 20 µg/mL 標準液の一定量をヘキサンで正確に希釈し、1 mL 中にフサライドとして 0.005, 0.01, 0.025, 0.05, 0.1 及び 0.25 µg を含有する各標準液を調製した。各標準液 1 µL を GC-ECD に注入し、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-ECD

Column	DB-1701 (0.25 mm i.d.×30 m, 0.25 µm film thickness), Agilent Technologies
Column temperature	70 °C (hold for 2 min) → ramp 20 °C/min → 280 °C (hold for 10 min)
Injection mode	Splitless (120 s)
Injection port temperature	250 °C
Carrier gas	He 1.0 mL/min
Make-up gas	N ₂ 60 mL/min
Detector temperature	300 °C

2.6 カラム処理 I に係る検討方法

稲わらを用い、2.4 の 1) に従い調製した試料溶液にフサライドとして 65 mg/kg 相当量 (最終試

料溶液中で 0.052 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 相当濃度) を添加し, 水 5 mL 又は飽和塩化ナトリウム溶液 10 mL (直後の操作で多孔性ケイソウ土カラム (20 mL 保持用) を用いた場合は 20 mL) を加えた. この液を多孔性ケイソウ土カラム (10 mL 保持用又は 20 mL 保持用) に入れ, 10 分間静置し, 以下 2.4 の 2)以降に従いフサライドを定量した.

2.7 GPC による精製操作を追加した定量方法

粃米を用い, 2.4 の 1)及び 2)に従い操作して得られたカラム処理 I の溶出液を 40 $^{\circ}\text{C}$ 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. 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, メンブランフィルターでろ過した. この液 5.0 mL を GPC に注入し, フサライドが溶出する画分を 200 mL のなす形フラスコに分取し, 40 $^{\circ}\text{C}$ 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. なお, GPC の条件を Table 3 に示した.

ヘキサン 2 mL を加えて残留物を溶かし, 2.4 の 3)に従い操作した.

Table 3 Operating condition 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 - acetone (4:1)
Flow rate	5 mL/min
Fraction volume	110~135 mL

2.8 GPC による精製操作の省略の可否に係る検討方法

フサライドとして粃米に 10 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で GPC による精製を省略した場合は 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 相当量, 省略しない場合は 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 相当量) を添加し, 2.4 及び 2.7 に従い操作して得られた試料溶液を GC-MS に注入し, 回収率を比較した.

3 結果及び考察

3.1 GC-ECD による検討

2.5 に従い調製したフサライド標準液各 1 μL を GC-ECD に注入し, 得られたクロマトグラムからフサライドのピーク面積及び高さを用いて検量線を作成した. その結果, Fig. 2 のとおり, フサライドは 0.005~0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (注入量として 0.005~0.25 ng 相当量) の範囲で決定係数 0.99 以上の直線の検量線が得られたものの, 低濃度ではその直線から下に外れる結果となった. この検量線を用いた場合, 低濃度ではフサライドの定量値が低く見積もられることから, 筆者らが用いた GC-ECD による定量は困難であると判断した.

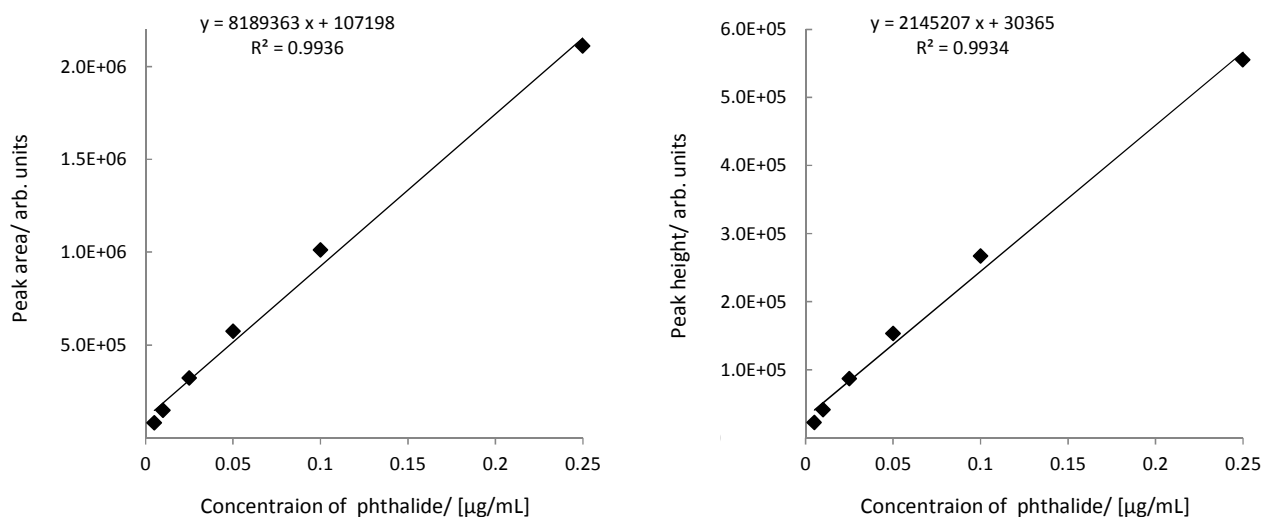


Fig. 2 Calibration curves of phthalide by peak area (left) and peak height (right) for GC-ECD

3.2 GC-MS による検討

1) モニターイオンの検討

2.2 の 3) に従い調製したフサライド標準液を用いて、本法の測定条件によりスキャンモードで測定したところ、Fig. 3 に示すマススペクトルが得られた。この結果から、モニターイオンとして m/z 243 を定量イオンに、 m/z 272 を確認イオンに設定した。

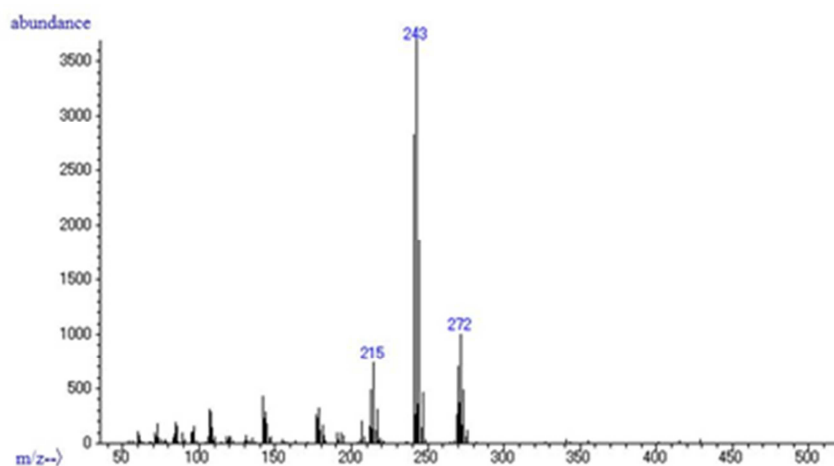


Fig. 3 Mass spectrum of phthalide standard solution

2) 希釈溶媒の検討

JFRL 法では、希釈溶媒にヘキサンを用いることから、同溶媒を用いて標準液を調製し GC-MS に注入したところ、低濃度になるに従いフサライドのピークのテーリングが大きくなり、良好な検量線を作成することができなかった。

このことを解消するため、ヘキサンに PEG を 0.005 v/v% 相当量添加した希釈溶媒を用いて標準液を調製し GC-MS に注入したところ、テーリングが改善され、ピーク形状が良好となった。このことから、本法では希釈溶媒として 0.005 v/v% 相当量の PEG を添加したヘキサンを使用することとした。

参考として、希釈溶媒の違いによるフサライド標準液の SIM クロマトグラムを Fig. 4 に示した。

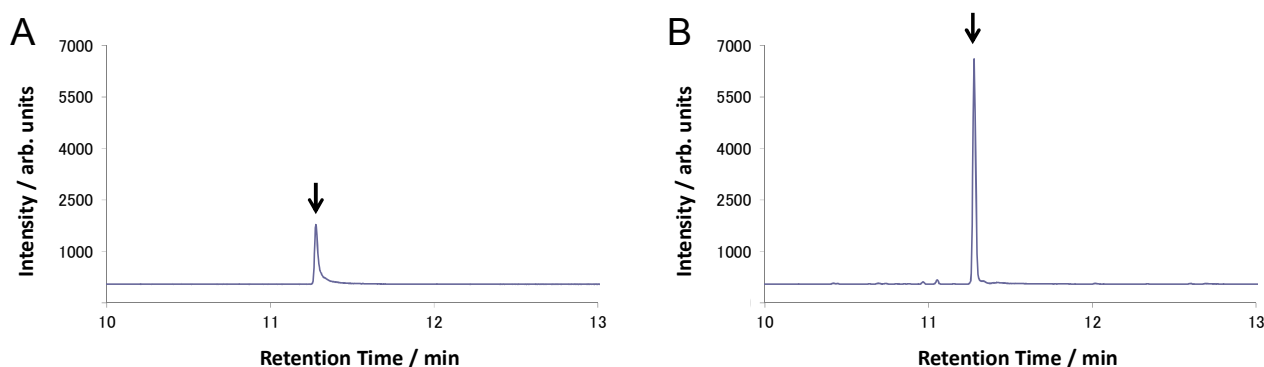


Fig. 4 Selected ion monitoring chromatograms of phthalide standard solution (0.05 µg/mL)
(Arrows indicate the retention time of phthalide.)

A: Standard solution prepared with hexane

B: Standard solution prepared with 0.005 % PEG-added hexane

3.3 検量線

2.2 の 3) に従い調製した各フサライド標準液各 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ピーク高さを用いて検量線を作成した。その結果、Fig. 5 のとおり、ピーク面積の場合、フサライドは 0.002~0.2 µg/mL (注入量として 0.004~0.4 ng 相当量) の範囲で直線性を示した。ピーク高さはピーク面積よりも決定係数が悪かったため、ピーク面積で定量することとした。

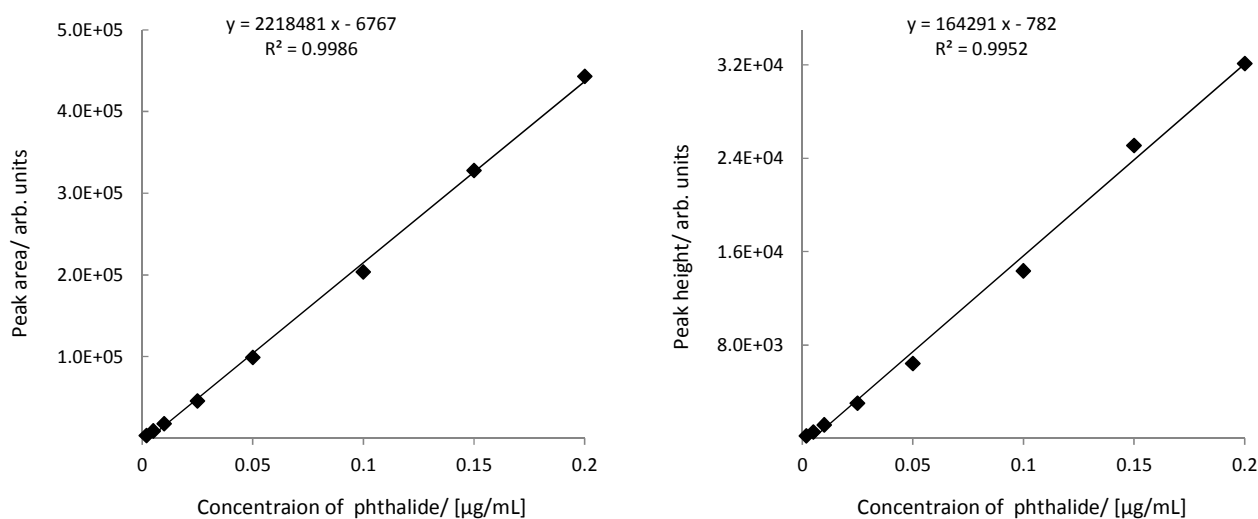


Fig. 5 Calibration curves of phthalide by peak area (left) and peak height (right) for GC-MS

3.4 カラム処理 I に係る検討

JFRL 法では保持容量が 20 mL の InertSep K-solute を用いているが、供試液量が約 6 mL であることを考慮すると容量が大きいと考えられた。また、JFRL 法における稲わらでの検討結果が回

収率 85 %と低い傾向が認められたことから、多孔性ケイソウ土カラムにフサライドが残留している可能性が考えられた。このことから、2.6 に基づき、保持容量が少ない 10 mL の多孔性ケイソウ土カラム使用の可否、更に飽和塩化ナトリウム溶液の使用の有無が回収率に与える影響を確認した。

結果は Table 4 のとおり、保持容量 10 mL で飽和塩化ナトリウム溶液を用いない条件が最も良い回収率であった。

以上の結果から、多孔性ケイソウ土カラムは保持容量 10 mL のものを用い、かつ飽和塩化ナトリウム溶液を用いないこととした。

Table 4 Recoveries of phthalide compared by aqueous capacity of InertSep K-solute and use of saturated NaCl solution

Aqueous capacity of InertSep K-solute (mL)	Saturated NaCl solution	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)
20	Not used	92.9	9.8
20	Used	85.3	2.5
10	Not used	96.5	4.3
10	Used	95.4	2.1

a) Mean ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

3.5 GPC による精製操作の省略の検討

JFRL 法では、稲わらを除く飼料において、カラム処理 I を行った試料溶液を GPC により精製しているが、稲わらでは抽出液の採取量を減らし、かつヘキサシによる希釈倍率を高めることにより GPC による精製操作を省略している。そこで、飼料用イネのうち希釈倍率が最も低い粳米を用いて、同様に GPC による精製操作の省略の可能性を 2.8 に基づき検討した。

結果は Table 5 のとおり、両者間で明確な差が認められなかったことから、飼料用イネにおいては GPC による精製操作が省略可能であると考えられた。

Table 5 Effects of omission of clean-up by GPC

Spiked level (mg/kg)	Run No.	Preparation with clean-up by GPC	Preparation without clean-up by GPC
		Recovery (%)	Recovery (%)
10	1	108	103
	2	110	105
	3	101	105
Mean recovery (%)		106	104
RSD _r ^{a)} (%)		4.5	1.5

a) Relative standard deviation of repeatability

3.6 妨害物質の検討

稲わら 4 検体、WCS 4 検体及び粳米 2 検体を用い、本法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、いずれの試料においても定量を妨げるピークは認められなかった。

なお、得られた SIM クロマトグラムの一例を Fig. 6 に示した。

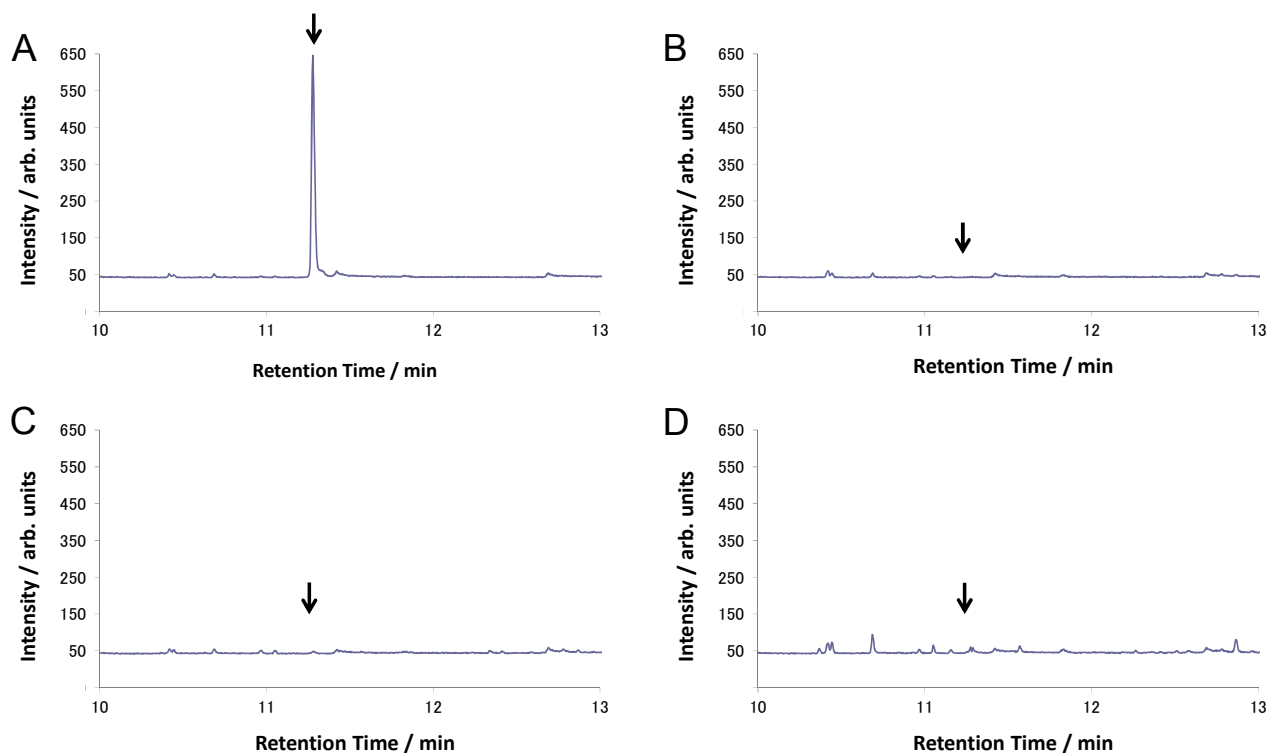


Fig. 6 Selected ion monitoring chromatograms of standard solution and sample solution (blank)
(Arrows indicate the retention time of phthalide.)

A: Standard solution (0.005 $\mu\text{g/mL}$: 0.01 ng as phthalide)

B: Rice straw

C: Whole-crop rice silage

D: Paddy rice

3.7 マトリックス効果の確認

2.4 の 1)から 3)により調製した稲わら、WCS 及び粳米のブランク試料溶液にフサライドとして 12.5, 2.75 及び 1 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.01 $\mu\text{g/mL}$ 相当量) をそれぞれ添加した各マトリックス標準液について、2.2 の 3)に従って調製した同濃度のフサライド標準液に対するピーク面積比を確認したところ、ピーク面積比はそれぞれ 104 %, 97 %及び 108 %であり、フサライド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。

3.8 添加回収試験

2.1 により調製した飼料用イネについて、フサライドとして、稲わらに 6.5, 13 及び 130 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.0052, 0.0104 及び 0.104 $\mu\text{g/mL}$ 相当量) を添加した試料、WCS に原物中に換算して 1.5, 3 及び 30 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.0055, 0.0109 及び 0.109 $\mu\text{g/mL}$ 相当濃度) 及び粳米に 0.5 及び 10 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 0.005 及び 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 相当濃度) をそれぞれ添加し、本法に従って添加回収試験を実施し、平均回収率及び繰返し精度を求めた。

また、WCS については原物の水分含有量を 60 %と想定し、原物中濃度への換算は、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 の式から求めた。

その結果は Table 6 のとおり、稲わら、WCS 及び粳米におけるフサライドの平均回収率は 88.1~102 %，その繰返し精度は相対標準偏差（RSD_r）として 4.0 %以下の成績が得られた。

なお，得られた SIM クロマトグラムの一例を Fig. 7 に示した。

Table 6 Recoveries for phthalide

Spiked level (mg/kg)	Feed types					
	Rice straw		Whole-crop rice silage		Paddy rice	
	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)
0.5	—	—	—	—	92.8	2.1
1.5	—	—	90.5	4.0	—	—
3.0	—	—	92.0	2.9	—	—
6.5	92.1	3.4	—	—	—	—
10	—	—	—	—	102	1.4
13	89.0	3.4	—	—	—	—
30	—	—	93.9	0.4	—	—
130	88.1	0.9	—	—	—	—

—: Not tested

a) Mean ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

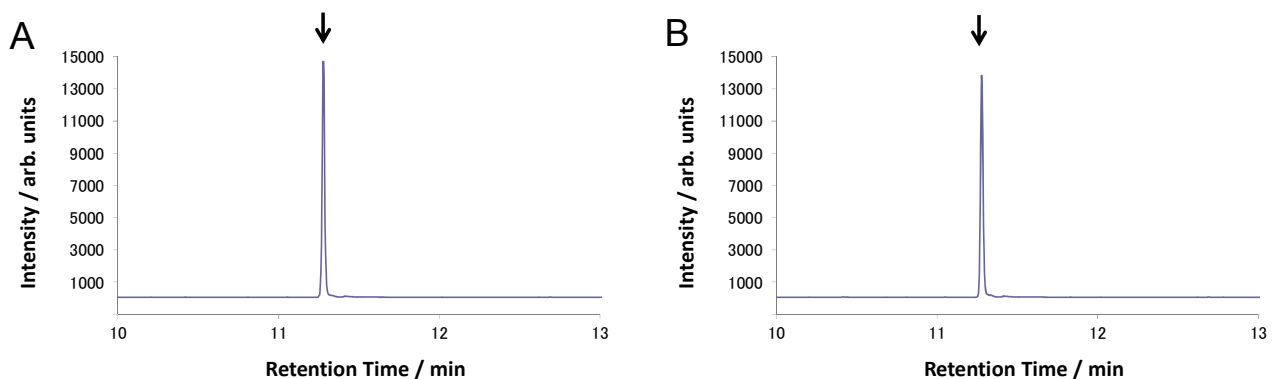


Fig. 7 Selected ion monitoring chromatograms

(Arrows indicate the retention time of phthalide.)

A: Standard solution (0.1 µg/mL: 0.2 ng as phthalide)

B: Sample solution of rice straw spiked at 130 mg/kg of phthalide (0.104 µg/mL as phthalide)

3.9 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，WCS 及び粳米にフサライドを添加した添加回収試験により得られたピークの SN 比が 10 及び 3 となる濃度を求めた。

その結果，得られたピークの SN 比が 10 以上となる濃度は稲わら，WCS（風乾物）及び粳米

中でそれぞれ 7, 3 及び 0.5 mg/kg, SN 比が 3 となる濃度はそれぞれ 2, 1 及び 0.2 mg/kg であったことから, 本法の稲わら, WCS (風乾物) 及び粳米中での定量下限はそれぞれ 7, 3 及び 0.5 mg/kg, 検出下限はそれぞれ 2, 1 及び 0.2 mg/kg であった.

なお, Table 6 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.

3.10 共同試験

本法の室間再現精度を確認するため, 濃度非通知, かつ非明示の 2 点反復で共通試料による共同試験を実施した.

共通試料としては, フサライドとして稲わらに 130 mg/kg (分析用試料 10 g に対して 1 mL 中に 1300 µg を含有する標準液 1 mL 添加) を, WCS に原物換算して 30 mg/kg (分析用試料 10 g に対して 1 mL 中に 675 µg を含有する標準液 1 mL 添加) を, 粳米に 1 mg/kg 相当量 (分析用試料 10 g に対して 1 mL 中に 10 µg を含有する標準液 1 mL 添加) を, それぞれ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. 参加試験室は, 一般財団法人マイコトキシン検査協会, 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, 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, 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) であった. 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^{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⁸⁾を用いて HorRat を求めた.

結果は Table 7 のとおりであった. 稲わら, WCS 及び粳米について, フサライドの平均回収率は 100, 93.7 及び 94.9 %, RSD_r は 2.1, 1.8 及び 5.0 %, RSD_R は 6.3, 3.8 及び 7.4 %, HorRat は 0.83, 0.40 及び 0.46 であり良好な結果であった. HorRat が 0.50 をわずかに下回っているものがあったが, 分析操作が比較的簡便であることによるものと思われた.

参考のため, 各試験室で使用した GC-MS の機種等を Table 8 に示した.

Table 7 Collaborative study for phthalide

Lab. No.	Feed types					
	Rice straw		Whole-crop rice silage		Paddy rice	
	(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)	
1	113	112	30.3	28.9	0.954	0.950
2	135	140	28.2	27.9	0.907	1.02
3	132	134	27.4	26.8	0.929	0.920
4	134	132	29.4	28.5	1.08	0.942
5	142	135	28.0	28.4	0.892	0.873
6	120	127	27.9	27.9	0.880	0.914
7	129	130	26.5	27.4	0.926	0.987
8	134	132	29.4	29.2	0.872	0.904
9	135	133	26.6	27.2	1.05	1.09
Spiked level (mg/kg)	130		30		1	
Mean value ^{a)} (mg/kg)	131		28.1		0.949	
Mean recovery ^{a)} (%)	100		93.7		94.9	
RSD _r ^{b)} (%)	2.1		1.8		5.0	
RSD _R ^{c)} (%)	6.3		3.8		7.4	
PRSD _R ^{d)} (%)	7.7		9.7		16	
HorRat	0.83		0.40		0.46	

a) $n=18$

b) Relative standard deviation of repeatability within laboratory

c) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

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

Table 8 Instruments used in the collaborative study

Lab. No.	GC-MS	GC colume
		(i.d.×length, film thickness)
1	GCMS-QP2010 Plus, Shimadzu	Rtx-5MS, Restek (0.25 mm×30 m, 0.25 μm)
2	GCMS-QP2010 Plus, Shimadzu	Rtx-5MS, Restek (0.25 mm×30 m, 0.25 μm)
3	GCMS-QP2010 Plus, Shimadzu	Rtx-5MS, Restek (0.25 mm×30 m, 0.25 μm)
4	GC: 7890A, Agilent Technologies MS: 5975C, Agilent Technologies	DB-5MS, Agilent Technologies (0.25 mm×30 m, 0.25 μm)
5	GCMS-QP2010 nc, Shimadzu	DB-5MS, Agilent Technologies (0.25 mm×30 m, 0.25 μm)
6	GC: 7890A, Agilent Technologies MS: 5975C, Agilent Technologies	DB-5MS + DG, Agilent Technologies (0.25 mm×30 m, 0.25 μm, Duraguard 10 m)
7	GC: 7890A, Agilent Technologies MS: 5975C, Agilent Technologies	DB-5MS + DG, Agilent Technologies (0.25 mm×30 m, 0.25 μm, Duraguard 10 m)
8	GC: 7890GC, Agilent Technologies MS: 5977A extractorMSD, Agilent Technologies	DB-5MS, Agilent Technologies (0.25 mm×30 m, 0.25 μm)
9	GC: 6890N, Agilent Technologies MS: 5973 inertMSD, Agilent Technologies	HP-5MS, Agilent Technologies (0.25 mm×30 m, 0.25 μm)

4 まとめ

飼料用イネ中に残留するフサライドの定量法について、JFRL 法を基に飼料分析基準への適用の可否を検討したところ、検出器 (GC-ECD から GC-MS へ) の変更、希釈溶媒の変更、カラム処理 I での保持容量の変更及び GPC による精製を省略することにより、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、0.002~0.2 μg/mL (注入量として 0.004~0.4 ng 相当量) 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、稲わらで 0.0052, 0.0104 及び 0.104 μg/mL 相当, WCS で 0.0055, 0.0109 及び 0.109 μg/mL 相当及び粃米で 0.005 及び 0.1 μg/mL 相当とした。
- 2) 飼料用イネについて、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) フサライドとして、稲わらに 6.5, 13 及び 130 mg/kg 相当量, WCS に原物中に換算して 1.5, 3 及び 30 mg/kg 相当量及び粃米に 0.5 及び 10 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ところ、良好な結果が得られた。
- 4) 本法のフサライドの定量下限は稲わら, WCS (風乾物) 及び粃米中でそれぞれ 7, 3 及び 0.5 mg/kg, 検出下限は稲わら, WCS (風乾物) 及び粃米中でそれぞれ 2, 1 及び 0.2 mg/kg であった。
- 5) フサライドとして、稲わらに 130 mg/kg, WCS に原物換算して 30 mg/kg 及び粃米に 1 mg/kg 相当量を添加した試料を用いて 9 試験室において本法に従い共同試験を実施したところ、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マイコトキシン検査協会，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，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における関係者各位に感謝の意を表します。

文 献

- 1) 青木勝道：農薬の作用点と作用機構 (3) フサライドの作用機構，日本農薬学会誌，6，355-364 (1981).
- 2) 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).
- 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 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 21 年度飼料中の有害物質等分析法開発委託事業 (2010).
- 6) William Horwitz: Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies, *Pure & Appl. Chem.*, **67**(2), 331-343 (1995).
- 7) AOAC Int. (2012). Appendix D: Guidelines for collaborative study procedures to validate characteristics of a method of analysis. In official methods of analysis of AOAC Int. 19 ed., Gaithersburg, MD, USA.
- 8) Michel 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).