

技術レポート

6 飼料用稲中のフェリムゾンの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による定量法の追加検討及び共同試験

鈴木 知華^{*1}, 新井 詠子^{*2}, 三枝 尚子^{*2}

Additional Consideration and Collaborative Study of Determination Method of Ferimzone in Rice Straw, Whole-Crop Rice Silage and Paddy Rice for Feed by LC-MS/MS

Chika SUZUKI^{*1}, Eiko ARAI^{*2} and Naoko SAEGUSA^{*2}(*¹ Food and Agricultural Materials Inspection Center (FAMIC), Sendai Regional Center,*² FAMIC, Sendai Regional Center (Now Food Safety and Consumer Affairs Bureau, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of Japan))

We have conducted a collaborative study for validating the determination method of (*E*)-ferimzone and (*Z*)-ferimzone in rice straw, whole-crop rice silage (WCRS) and paddy rice for feed using a liquid chromatograph-electrospray ionization-tandem mass spectrometer (LC-ESI-MS/MS).

Having added water to a sample, ferimzone was extracted with acetone, and the extracted solution was filtered. The filtrate was then diluted with acetone to a volume of 200 mL. The diluted solution was purified with a SPE column (InertSep Slim-J C18-B, GL Sciences Inc.; Tokyo, Japan), and injected into a LC-MS/MS to determine the concentration of ferimzone. LC separation was then carried out on an ODS column (Inertsil ODS-SP, 2.1 mm i.d. × 100 mm, 3 μm, GL Sciences Inc.) with a gradient of 2 mmol/L ammonium acetate solution and acetonitrile as a mobile phase. In the MS/MS analysis, the positive mode electrospray ionization (ESI+) was used.

A collaborative study was conducted by eleven laboratories using rice straw, WCRS and paddy rice, all of which were added with (*E*)-ferimzone and (*Z*)-ferimzone according to the following specifications: 2 and 20 mg/kg for rice straw, 5 and 30 mg/kg for WCRS, 0.5 and 10 mg/kg for paddy rice. The resulting mean recoveries, repeatability and reproducibility in the form of relative standard deviation (RSD_r and RSD_R), and HorRat, were 85.6 % to 96.0 %, less than 5.9 % and less than 10 %, and less than 1.0 for (*E*)-ferimzone, and 91.8 % to 97.3 %, less than 4.8 % and less than 6.6 %, and less than 0.64 for (*Z*)-ferimzone respectively.

This method was thus validated as useful for inspections of (*E*)-ferimzone and (*Z*)-ferimzone in rice straw, WCRS and paddy rice for feed.

Key words: ferimzone; (*E*)-ferimzone; (*Z*)-ferimzone; liquid chromatograph-tandem mass spectrometer (LC-MS/MS); electrospray ionization (ESI); rice for feed; rice straw; whole-crop rice silage; paddy rice; collaborative study

キーワード：フェリムゾン；フェリムゾン *E* 体；フェリムゾン *Z* 体；液体クロマトグラフタンデム型質量分析計；エレクトロスプレーイオン化法；飼料用稲；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 農林水産省消費・安全局

1 緒 言

フェリムゾン¹⁾は、イネ病害の防除を目的として武田薬品工業が開発し、1991年に国内登録されたピリミジン系殺菌剤である¹⁾。我が国では、飼料の有害物質の指導基準及び管理基準²⁾において、稲わら中で20 mg/kg、稲発酵粗飼料及び粳米中で5 mg/kgの管理基準値が設定されている。また、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³⁾は、玄米についてフェリムゾン及びその変化生成物である(*E*)-2'-メチルアセトフェノン-4,6-ジメチルピリミジン-2-イルヒドラゾン(本法においてはそれぞれフェリムゾン*Z*体、フェリムゾン*E*体と呼称する。)の和として2 ppmと設定されている。定量法としては、厚生労働省より液体クロマトグラフ質量分析計(LC/MS)による農薬等の一斉試験法Ⅰ(農産物)が示されているが、飼料分析基準⁴⁾に記載された飼料中の定量法はなく、その確立が急務となっている。

そのため、財団法人日本食品分析センターが平成20年度飼料中の有害物質分析法開発委託事業において開発した液体クロマトグラフタンデム型質量分析計(以下「LC-MS/MS」という。)を用いた定量法⁵⁾(以下「JFRL法」という。)を基に、当センターにおいて、飼料用稲中のフェリムゾンのLC-MS/MSを用いた定量法⁶⁾を開発したところであるが、更に今回、追加検討及び共通試料を用いた共同試験を実施し、飼料分析基準への適用の可否について検討したので、その概要を報告する。

参考にフェリムゾン*E*体及び*Z*体の構造式等をFig. 1に示した。

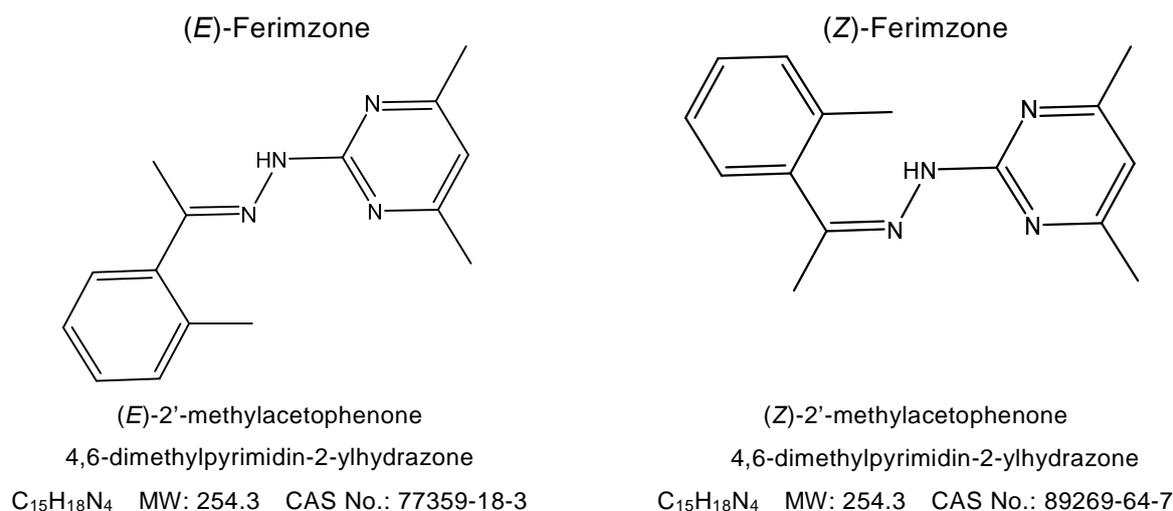


Fig. 1 Chemical structure of (*E*)-ferimzone and (*Z*)-ferimzone

2 実験方法

2.1 追加検討

2.1.1 試料

稲わらを目開き1 mmのスクリーンを装着した粉碎機で粉碎した。

2.1.2 試薬

- 1) アセトニトリルは残留農薬・PCB試験用(LC-MS/MS測定時の溶離液のみLC/MS用(富士フィルム和光純薬製))を用いた。アセトンは残留農薬・PCB試験用を用いた。酢酸アンモニウムは高速液体クロマトグラフ用(1 mol/L溶液, 富士フィルム和光純薬製)を用いた。水はMilli-Q Advantage(Merck Millipore製)により精製した超純水(JIS K 0211の5218に定義された超純水)

を用いた。

2) フェリムゾン E 体標準原液

フェリムゾン E 体標準品（富士フィルム和光純薬製，純度 99.3 %）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てフェリムゾン E 体標準原液を調製した（この液 1 mL は，フェリムゾン E 体として 0.5 mg を含有する．）。

3) フェリムゾン Z 体標準原液

フェリムゾン Z 体標準品（富士フィルム和光純薬製，純度 100 %）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てフェリムゾン Z 体標準原液を調製した（この液 1 mL は，フェリムゾン Z 体として 0.5 mg を含有する．）。

4) フェリムゾン混合標準液

フェリムゾン E 体標準原液及びフェリムゾン Z 体標準原液各 1 mL を 50 mL の褐色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 中にフェリムゾン E 体及び Z 体としてそれぞれ 10 µg を含有するフェリムゾン混合標準原液を調製した．使用に際して，混合標準原液の一定量をアセトニトリル-水（3+2）で正確に希釈し，1 mL 中にフェリムゾン E 体及び Z 体としてそれぞれ 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 20, 30, 40 及び 50 ng を含有する各混合標準液を調製した．

2.1.3 装置及び器具

- 1) 粉碎機：SM-100 Retsch 製（目開き 1 mm スクリーン，回転数（仕様）1430 rpm）
- 2) 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）
- 3) オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム：InertSep Slim-J C18-B（充てん剤量 500 mg）ジューエルサイエンス製にリザーバーを連結したもの
- 4) LC-MS/MS：
LC 部：Nexera X2 島津製作所製
MS 部：LCMS-8040 島津製作所製

2.1.4 定量方法

本法は，遮光条件下で行った。

1) 抽出

分析試料 10.0 g を量って 300 mL の褐色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，この液の一部をアセトンで正確に 10 倍希釈した後，希釈液 2 mL を 50 mL のなす形フラスコに正確に入れ，水 20 mL を加えてカラム処理に供する試料溶液とした．

2) カラム処理

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムをアセトニトリル 5 mL 及び水 5 mL で順次洗浄した．試料溶液をミニカラムに入れ，流速 1 mL/min 程度で吸引し，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水-アセトニトリル（9+1）5 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。10 mLの褐色全量フラスコをミニカラムの下に置き、アセトニトリル-水 (3+2) 9 mLをミニカラムに加えて、フェリムゾンを経出させた。更に、褐色全量フラスコの標線まで同溶媒を加えた後、この液の一定量を5000×gで5分間遠心分離し、上澄み液をLC-MS/MSによる測定に供する試料溶液とした。

3) LC-MS/MSによる測定

試料溶液及び各フェリムゾン混合標準液各5 µLをLC-MS/MSに注入し、選択反応検出(SRM)クロマトグラムを得た。測定条件をTable 1及び2に示した。

Table 1 Operating conditions of LC-MS/MS

Column	Inertsil ODS-SP (2.1 mm i.d. x 100 mm, 3 µm), GL Sciences
Mobile phase	2 mmol/L ammonium acetate solution - acetonitrile (13:7) (hold for 14 min) → 1 min → (1:9) (hold for 5 min)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temperature	40 °C
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Mode	Positive
Nebulizer gas	N ₂ (1.5 L/min)
Drying gas	N ₂ (10 L/min)
Heat block temperature	350 °C
DL temperature	150 °C
Collision gas	Ar (230 kPa)

Table 2 MS/MS parameters

Target	Monitor ion (<i>m/z</i>)		Collision energy (eV)
	Precursor ion	product ion	
(E)-Ferimzone and (Z)-Ferimzone	255	132 (quantifier)	21
		91 (qualifier)	35

4) 計 算

得られたSRMクロマトグラムからピーク面積及び高さを求めて検量線を作成し、試料中のフェリムゾンE体量及びフェリムゾンZ体量を算出した。

なお、定量法の概要をScheme 1に示した。

- Sample 10.0 g (300 mL amber Erlenmeyer flask)
- add 30 mL of water (paddy rice: 20 mL) and allow to stand for 30 min
 - add 120 mL of acetone (paddy rice: 100 mL) and shake for 30 min
 - filtrate through No. 5B (JIS P3801) under reduced pressure
 - wash with 50 mL of acetone
 - fill up to 200 mL with acetone
 - dilute 10-fold
- 2 mL of sample solution (50 mL eggplant flask)
- add 20 mL of water
- InertSep Slim-J C18-B (500 mg)
- (prewash with 5 mL of acetonitrile and with 5 mL of water)
 - apply sample solution
 - wash with 5 mL of water-acetonitrile (9:1) (twice)
 - place a receiver (10 mL amber volumetric flask)
 - elute with 9 mL of acetonitrile-water (3:2)
 - fill up to 10 mL with acetonitrile-water (3:2)
 - centrifuge for 5 min at 5000×g
- LC-MS/MS

Scheme 1 Analytical procedure for (*E*)-ferimzone and (*Z*)-ferimzone

2.2 共同試験

2.2.1 共同試験用試料

フェリムゾン *E* 体及び *Z* 体を含有しないことを確認した 2 種類の稲わら及び粳米を、1 mm のスクリーンを装着した粉砕機で粉砕した。また、2 種類の稲発酵粗飼料（以下「WCRS」という。）を 60 °C 以下で 20 時間乾燥し、更に室内に静置して風乾した後、同様に粉砕した。これらについて、約 12 g ずつ小分けしたもの（試料名は非明示）各 2 袋を試験用試料として計 12 袋を各試験室に配付した。

2.2.2 配付試薬

1) フェリムゾン *E* 体標準原液

フェリムゾン *E* 体標準品（関東化学製，純度 99.9 %）200 mg を正確に量って 20 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ェリムゾン *E* 体標準原液を調製した（この液 1 mL は，フェリムゾン *E* 体として 10 mg を含有する.）。

2) フェリムゾン *Z* 体標準原液

フェリムゾン *Z* 体標準品（関東化学製，純度 100 %）200 mg を正確に量って 20 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ェリムゾン *Z* 体標準原液を調製した（この液 1 mL は，フェリムゾン *Z* 体として 10 mg を含有する.）。

3) 検量線作成用標準原液

1)及び2)で調製した各標準原液 2.5 mL をそれぞれ 50 mL の全量フラスコに入れ，更に標線までアセトンを加えて，1 mL 中にフェリムゾン *E* 体及びフェリムゾン *Z* 体としてそれぞれ 500 µg を含有する液を調製した。これらの液 2 mL を 100 mL の全量フラスコに入れ，更に標線までアセトンを加え，1 mL 中にフェリムゾン *E* 体及びフェリムゾン *Z* 体としてそれぞれ 10 µg を含有

する検量線作成用標準原液を調製した。

4) 稲わら 1 添加用標準液

1)及び2)で調製した各標準原液 4 mL を 200 mL の全量フラスコに入れ、更に標線までアセトンを加え、1 mL 中にフェリムゾン E 体及びフェリムゾン Z 体としてそれぞれ 200 µg を含有する稲わら 1 添加用標準液を調製した。

5) 稲わら 2 添加用標準液

4)で調製した稲わら 1 添加用標準液 20 mL を 200 mL の全量フラスコに入れ、更に標線までアセトンを加え、1 mL 中にフェリムゾン E 体及びフェリムゾン Z 体としてそれぞれ 20 µg を含有する稲わら 2 添加用標準液を調製した。

6) WCRS 1 添加用標準液

1)及び2)で調製した各標準原液 6 mL を 200 mL の全量フラスコに入れ、更に標線までアセトンを加え、1 mL 中にフェリムゾン E 体及びフェリムゾン Z 体としてそれぞれ 300 µg を含有する WCRS 1 添加用標準液を調製した。

7) WCRS 2 添加用標準液

1)及び2)で調製した各標準原液 1 mL を 200 mL の全量フラスコに入れ、更に標線までアセトンを加え、1 mL 中にフェリムゾン E 体及びフェリムゾン Z 体としてそれぞれ 50 µg を含有する WCRS 2 添加用標準液を調製した。

8) 粳米 1 添加用標準液

1)及び2)で調製した各標準原液 2 mL を 200 mL の全量フラスコに入れ、更に標線までアセトンを加え、1 mL 中にフェリムゾン E 体及びフェリムゾン Z 体としてそれぞれ 100 µg を含有する粳米 1 添加用標準液を調製した。

9) 粳米 2 添加用標準液

7)で調製した WCRS 2 添加用標準液 20 mL を 200 mL の全量フラスコに入れ、更に標線までアセトンを加え、1 mL 中にフェリムゾン E 体及びフェリムゾン Z 体としてそれぞれ 5 µg を含有する粳米 2 添加用標準液を調製した。

3)を 1 本及び4)~9)を各 2 本、濃度は非通知で 2.2.1 の試験用試料と併せて各試験室に配付した。

2.2.3 分析試料

非明示の 2 点反復で、2.2.1 の試験用試料を用いた。分析試料としては、フェリムゾン E 体及びフェリムゾン Z 体として稲わら 1 にそれぞれ 20 mg/kg 相当量（試験用試料 10 g に対して稲わら 1 添加用標準液 1 mL 添加）を、稲わら 2 にそれぞれ 2 mg/kg 相当量（試験用試料 10 g に対して稲わら 2 添加用標準液 1 mL 添加）を、WCRS 1 にそれぞれ 30 mg/kg 相当量（試験用試料 10 g に対して WCRS 1 添加用標準液 1 mL 添加）を、WCRS 2 にそれぞれ 5 mg/kg 相当量（試験用試料 10 g に対して WCRS 2 添加用標準液 1 mL 添加）を、粳米 1 にそれぞれ 10 mg/kg 相当量（試験用試料 10 g に対して粳米 1 添加用標準液 1 mL 添加）を、粳米 2 にそれぞれ 0.5 mg/kg 相当量（試験用試料 10 g に対して粳米 2 添加用標準液 1 mL 添加）を、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。

2.2.4 定量方法

2.1.4 によった。

2.2.5 報告方法

2.2.3 の分析試料 12 点の分析値は、分析試料中濃度 (mg/kg) で表し、4 桁目を四捨五入して有効桁数 3 桁まで報告させることとした。

2.2.6 分析実施期間

平成 30 年 11 月 27 日から平成 30 年 12 月 25 日まで

2.2.7 解析方法

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^{7), 8)}を参考に、Cochran 検定, single Grubbs 検定及び paired 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⁹⁾を用いて HorRat を求めた。

2.2.8 参加試験室

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, ジーエルサイエンス株式会社, 一般社団法人日本海事検定協会食品衛生分析センター, 一般財団法人日本穀物検定協会中央研究所, 一般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 (計 11 試験室)

3 結果及び考察

3.1 追加検討

3.1.1 異性体の分離についての検討

フェリムゾン E 体及び Z 体の同時定量において、二つの異性体のピークの変離の可否が分析カラムの種類に依存することから、Table 3 に示した分析カラムについて変離度を確認した。また、変離度は次式によって求めた。

$$R = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{(W_1 + W_2)/2} = \frac{1.18(t_{R2} - t_{R1})}{W_{1/2,1} + W_{1/2,2}}$$

t_{R1} : 前のピークの保持時間 t_{R2} : 後ろのピークの保持時間
 W_1 : 前のピークのピーク幅 W_2 : 後ろのピークのピーク幅
 $W_{1/2,1}$: 前のピークの半値幅 $W_{1/2,2}$: 後ろのピークの半値幅

2.1.2 の 4) に従って調製した各 20 ng/mL の混合標準液 5 μ L を LC-MS/MS に注入し測定したところ、Table 3 及び Fig. 2 のとおりの変離度及び SRM クロマトグラフが得られた。Inertsil ODS-SP (150 mm), Inertsil ODS-SP (100 mm), InertSustain C18 (150 mm), InertSustain C18 (100 mm) 及び Inertsil ODS-3 の変離度はそれぞれ 2.213, 1.654, 1.511, 1.261 及び 1.809 であり、変離度が 1.5 以上の分析カラムを用いることで面積での測定が可能と考えられた。

また、Table 3 のカラムのうち変離度の良い Inertsil ODS-SP (150 mm), Inertsil ODS-SP (100 mm) 及び Inertsil ODS-3 を用いて、2.1.2 の 4) に従って調製した各フェリムゾン混合標準液 (0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 20, 30, 40 及び 50 ng/mL) 5 μ L を LC-MS/MS に注入し測定し、得られた SRM クロマトグラムからピーク面積及び高さを用いてフェリムゾン E 体及び Z 体

それぞれについて検量線を作成した。得られた検量線は Fig. 3-1~3-3 のとおりであり、いずれも 0.1~50 ng/mL 相当量の範囲で直線性を示した。このことから、面積及び高さでの定量が可能であると考えられた。

更に、本法又は他の分析において繰返し使用している分析カラムについて 2.1.2 の 4) に従って調製した各 20 ng/mL の混合標準液 5 μ L を LC-MS/MS に注入し測定したところ、Table 4 のとおりの分離度が得られ、カラムの特性及び使用状況等が分離度に関与すると考えられた。

Table 3 Column and resolution (Use new columns)

Column ^{a)}	Manufacturer	i.d.×length (mm) × (mm)	Particle size (μ m)	Surface area (m ² /g)	Pore diameter (nm)	Pore volume (mL/g)	Functional group	Endcap	Carbon loading (%)	Retention time		Resolution
										(Z)-Ferimzone (min)	(E)-Ferimzone (min)	
Inertsil ODS-SP	GL Sciences	2.1 × 150	3	450	10	1.05	Octadecyl	Yes	8.5	16.291	17.609	2.213
Inertsil ODS-SP	GL Sciences	2.1 × 100	3	450	10	1.05	Octadecyl	Yes	8.5	10.664	11.535	1.654
InertSustain C18	GL Sciences	2.1 × 150	3	350	10	0.85	Octadecyl	Yes	14	15.342	16.200	1.511
InertSustain C18	GL Sciences	2.1 × 100	3	350	10	0.85	Octadecyl	Yes	14	10.253	10.822	1.261
Inertsil ODS-3	GL Sciences	2.1 × 150	3	450	10	1.05	Octadecyl	Yes	15	18.572	19.768	1.809

a) Columns started to be used in this study

Table 4 Column and resolution (Use columns repeatedly used)

Column ^{a)}	Manufacturer	i.d.×length (mm) × (mm)	Particle size (μ m)	Surface area (m ² /g)	Pore diameter (nm)	Pore volume (mL/g)	Functional group	Endcap	Carbon loading (%)	Retention time		Resolution
										(Z)-Ferimzone (min)	(E)-Ferimzone (min)	
Inertsil ODS-SP	GL Sciences	2.1 × 100	3	450	10	1.05	Octadecyl	Yes	8.5	11.873	12.819	1.296
InertSustain C18	GL Sciences	2.1 × 150	3	350	10	0.85	Octadecyl	Yes	14	15.446	16.293	1.394
Inertsil ODS-3	GL Sciences	2.1 × 150	3	450	10	1.05	Octadecyl	Yes	15	18.781	20.032	1.669
Inertsil ODS-4	GL Sciences	3.0 × 150	3	450	10	1.05	Octadecyl	Yes	11	16.035	17.860	1.427
Atlantis T3	Waters	2.1 × 150	3	330	10	1.00	Octadecyl (Trifunctional)	Yes	14	16.702	18.211	2.277
Atlantis dC18	Waters	2.1 × 150	3	330	10	1.00	Octadecyl (Difunctional)	Yes	12		9.228	Without separation
Shim-pak XR-ODS II	Shimadzu	3.0 × 150	2.2	470	8	1.00	Octadecyl (Monofunctional)	Yes	20.2	7.380	8.863	1.344
CAPCELL PAK C18 AQ	Osaka Soda	2.0 × 150	5	300	8	Unknown	Octadecyl	— ^{b)}	11	13.015	14.183	1.820
ZORBAX Eclipse Plus C18	Agilent Technologies	2.1 × 150	3.5	160	9.5	Unknown	Octadecyl	Yes (double)	9	12.318	13.220	1.525
ZORBAX Eclipse XDB-C18	Agilent Technologies	2.1 × 150	5	180	8	Unknown	Octadecyl	Yes (double)	10	11.982	12.600	0.748
Mightsil RP-18 GP	Kanto Chemical	2.0 × 150	3	330	12.5	Unknown	Octadecyl (Monofunctional)	Yes	19	12.438	12.885	1.059

a) Columns repeatedly used in this study or other analysis

b) Coated with a mono-layer silicone-polymer

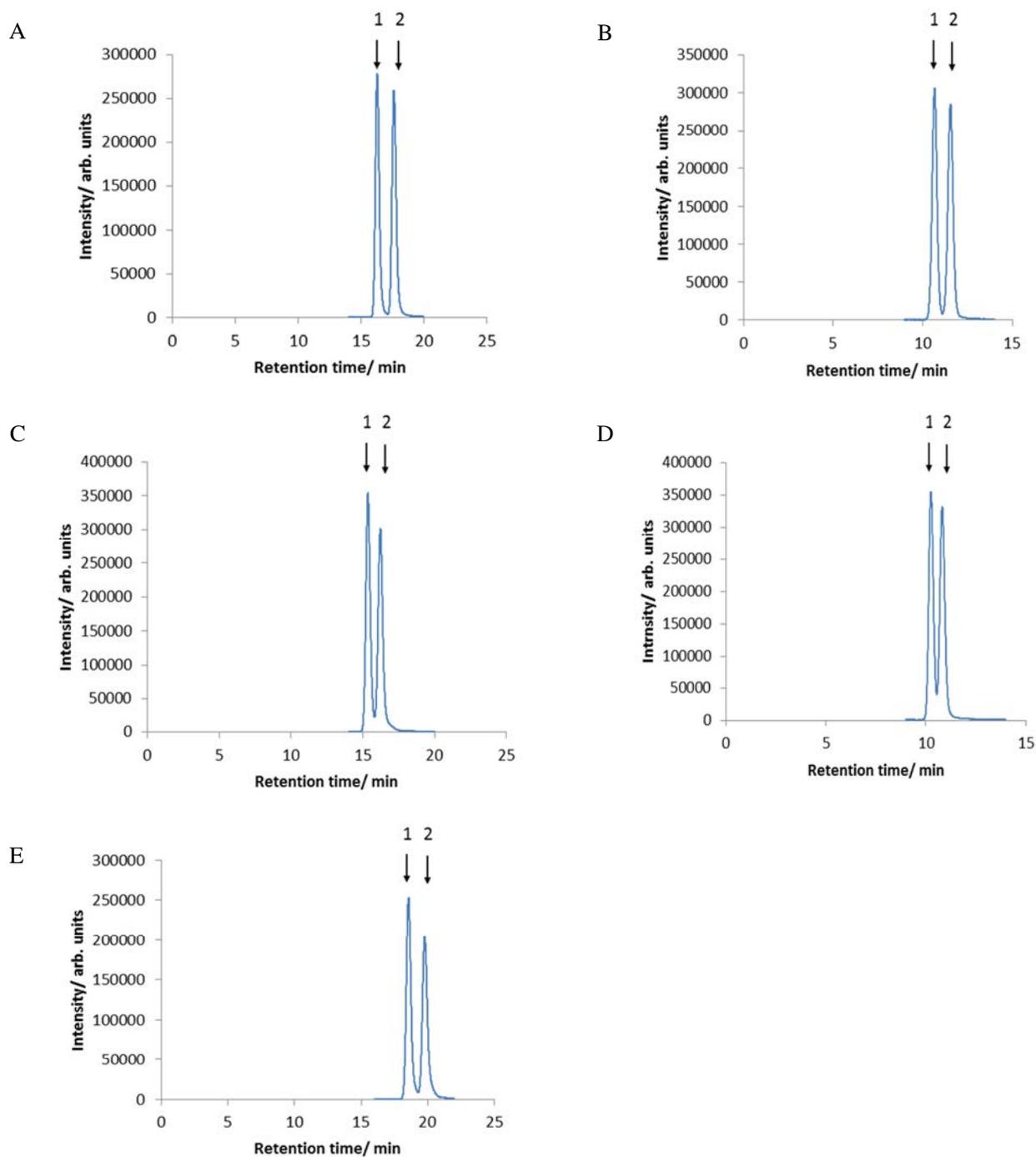


Fig. 2 Selected reaction monitoring (SRM) chromatograms of (*E*)-ferimzone and (*Z*)-ferimzone by each column

(LC-MS/MS conditions are shown in Tables 1 and 2. Arrows indicate the retention times of 1: (*Z*)-ferimzone and 2: (*E*)-ferimzone.)

A: Inertsil ODS-SP (150 mm)

B: Inertsil ODS-SP (100 mm)

C: InertSustain C18 (150 mm)

D: InertSustain C18 (100 mm)

E: Inertsil ODS-3 (150 mm)

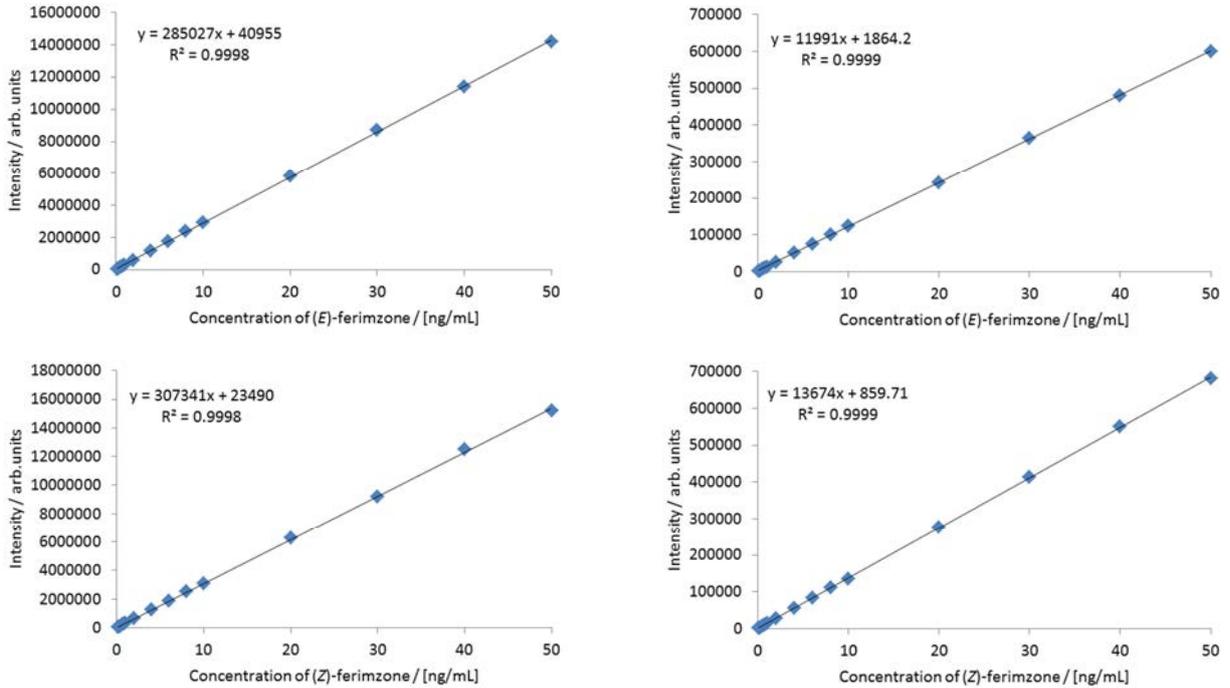


Fig. 3-1 Calibration curves of (E)-ferimzone and (Z)-ferimzone by peak area (left) and height (right) (Used column: Inertsil ODS-SP (150 mm))

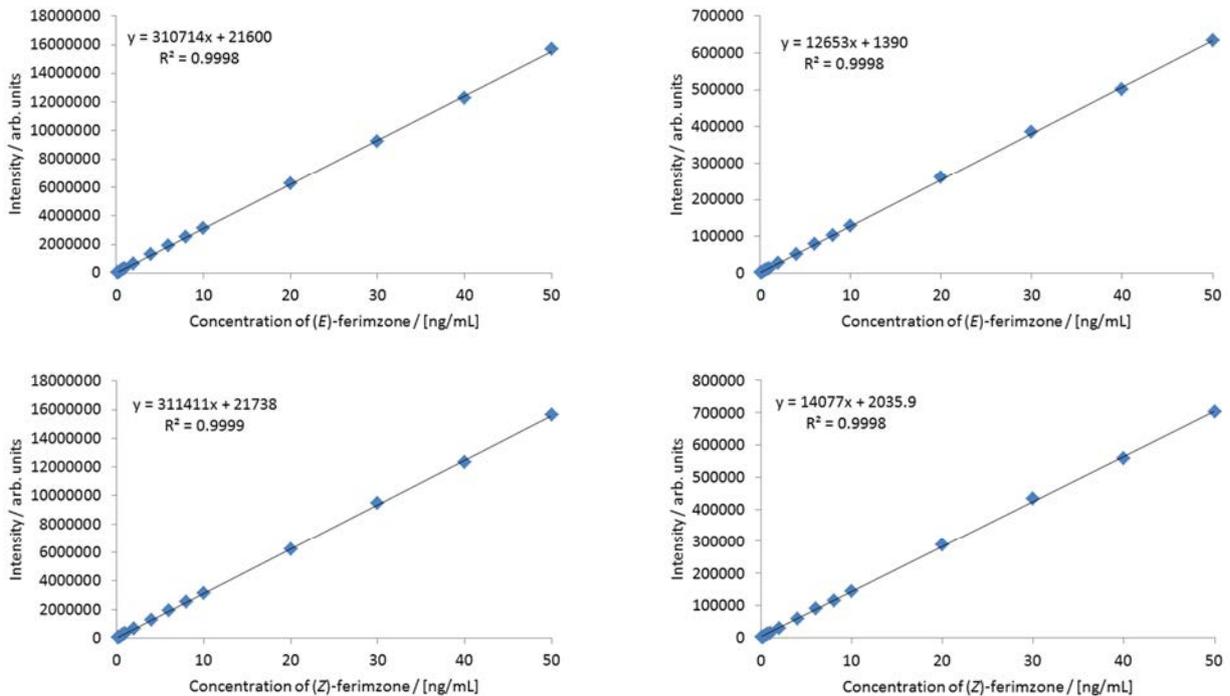


Fig. 3-2 Calibration curves of (E)-ferimzone and (Z)-ferimzone by peak area (left) and height (right) (Used column: Inertsil ODS-SP (100 mm))

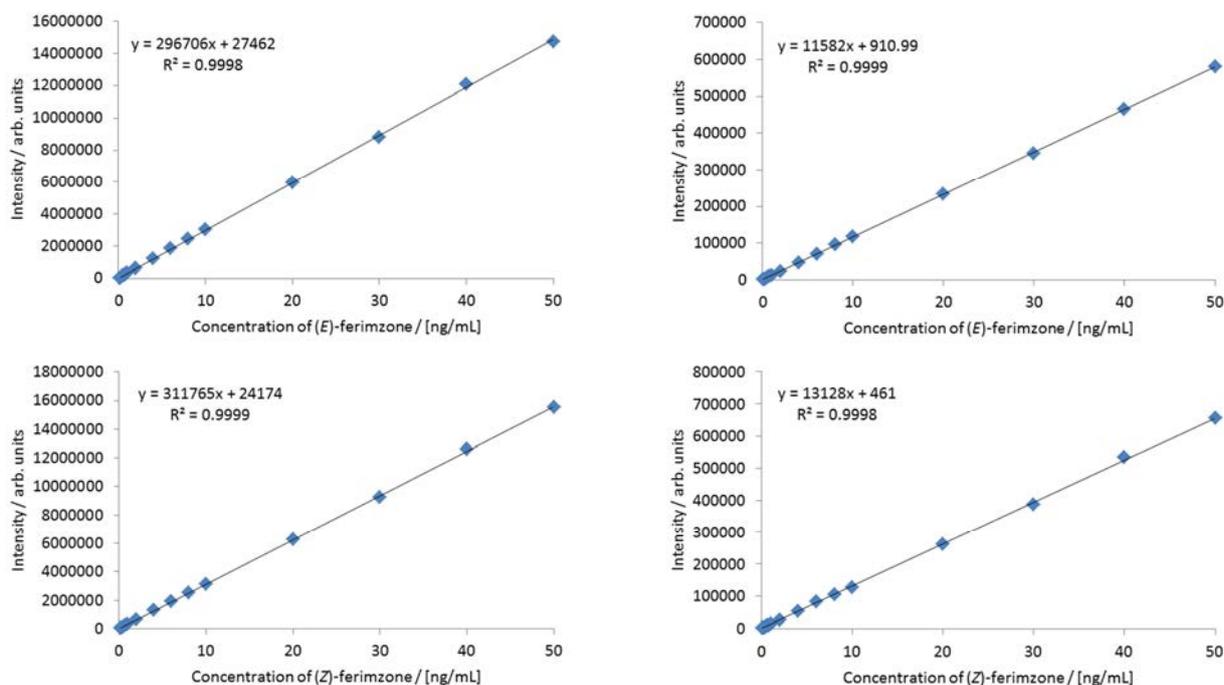


Fig. 3-3 Calibration curves of (E)-ferimzone and (Z)-ferimzone by peak area (left) and height (right) (Used column: Inertsil ODS-3 (150 mm))

3.1.2 操作時間の定量に対する影響の確認

フェリムゾン E 体及び Z 体は時間経過に伴って相互に変換（以下「異性化」という。）し、この現象が正確な定量の妨げとなる可能性があるため、操作中の時間経過による異性化の定量への影響を確認した。2.1.2 の 2) から 4) に従って調製したフェリムゾン混合標準原液をアセトンで希釈し添加に用いた。2.1.4 の 1) に従って得られた稲わらの空白抽出液に、20 mg/kg 相当量のフェリムゾン混合標準液を添加し、2.1.4 の 1) に従ってカラム処理に供する試料溶液を得た。2.1.4 の 2) に従ってカラムを洗浄した後、カラム処理中の時間経過が定量結果に与える影響を確認するため、吸引マニホールドを用いて流速 1 mL/min 程度で流出及び溶出させたもの、同様に吸引マニホールドを用いるが試料溶液を液面が充てん剤の上端に達するまで流出させたところで中断したもの、吸引マニホールドを用いず自然流下によって流出及び溶出させたものについて、2.1.4 に従って測定溶液を得た。カラム処理にはそれぞれ、3 時間、7 時間及び 7 時間を要した。これを測定して定量結果を比較したところ、Table 5 のとおり、いずれも飼料分析基準別表 3 の妥当性確認ガイドライン（以下「妥当性確認法ガイドライン」という。）に定められた真度及び併行精度の目標値を満たしていた。このことから、カラム処理中の時間経過は妥当性確認法ガイドラインの真度及び精度を満たす範囲で定量結果に影響しないと考えられた。

Table 5 Influence of time required for column processing on quantification

Operation	Time required	Spiked level (mg/kg)	Spiked components			
			(E)-ferimzone		(Z)-ferimzone	
			Recovery (%)	RSD _r ^{a)} (%)	Recovery (%)	RSD _r ^{a)} (%)
Vacuum suction	3 h	20	101	1.1	104	2.8
Vacuum suction and standstill for 4 h	7 h	20	102	0.5	106	1.5
Gravity flow	7 h	20	102	1.2	107	2.0

$n = 3$

a) Relative standard deviation of repeatability

3.2 共同試験

開発した分析法の室間再現精度を確認するため、2.2により共同試験を実施した。

フェリムゾン E 体の結果は Table 6 のとおりであった。稲わら 1, 稲わら 2, WCRS 1, WCRS 2, 粃米 1 及び粃米 2 についてそれぞれ、平均回収率は 91.2, 85.6, 92.2, 91.0, 96.0 及び 94.1 %, RSD_r は 5.9, 3.3, 1.7, 2.6, 3.7 及び 2.5 %, RSD_R は 10, 3.3, 6.2, 7.2, 5.0 及び 3.9 %, HorRat は 1.0, 0.22, 0.64, 0.56, 0.43 及び 0.22 であった。

フェリムゾン Z 体の結果は Table 7 のとおりであった。稲わら 1, 稲わら 2, WCRS 1, WCRS 2, 粃米 1 及び粃米 2 についてそれぞれ、平均回収率は 93.7, 91.8, 96.4, 96.0, 97.3 及び 95.2 %, RSD_r は 2.5, 3.3, 4.8, 2.3, 1.3 及び 1.7 %, RSD_R は 6.6, 3.3, 5.9, 6.0, 2.8 及び 5.0 %, HorRat は 0.64, 0.22, 0.62, 0.48, 0.25 及び 0.28 であり、それぞれの成分ともに、妥当性確認法ガイドラインに定められた室間再現精度の目標値を満たしていた。HorRat については、0.5 を下回るものが散見されたが、分析操作が比較的簡便であるためと考えられた。

参考のため、各試験室で使用した LC-MS/MS の機種等を Table 8 に示した。また、各試験室で使用したカラムの特性を Table 9 に示した。

Table 6 Collaborative study for (E)-ferimzone

Lab. No.	Rice straw 1		Rice straw 2		WCRS 1		WCRS 2		Paddy rice 1		Paddy rice 2	
	(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)	
1	17.5	16.5	1.70	1.73	27.0	27.3	4.78	4.82	9.73	9.68	0.476	0.476
2	18.9	19.0	1.63	1.73	29.4	28.0	4.58	4.63	9.77	9.89	0.486	0.494
3	18.4	18.9	1.77	1.71	28.4	27.1	4.63	4.62	9.62	9.78	0.481	0.474
4	18.7	18.1	1.75	1.59	26.8	26.8	4.68	4.45	9.60	9.47	0.463	0.454
5	18.4	19.4	1.66	1.76	27.8	27.8	4.28	4.55	9.42	9.75	0.446	0.472
6	18.5	18.5	1.72	1.72	27.6	27.9	4.69	4.54	9.62	9.45	0.473	0.499
7	20.2	20.4	2.06 ^{b)}	1.98 ^{b)}	31.1	30.9	5.06	4.98	10.3 ^{d)}	10.6 ^{d)}	0.551 ^{b)}	0.539 ^{b)}
8	16.5	12.7	1.73	1.76	24.9	25.6	4.65	4.38	8.13 ^{c)}	9.65 ^{c)}	0.470	0.466
9	18.8	21.6	1.33 ^{b)}	1.34 ^{b)}	27.1 ^{a)}	32.4 ^{a)}	3.78	3.87	9.56	9.62	0.419 ^{b)}	0.369 ^{b)}
10	19.5	18.8	1.71	1.78	28.7	29.0	4.81	4.82	9.73	9.79	0.484	0.480
11	15.8	16.3	1.68	1.67	25.7	25.3	4.38	4.12	9.21 ^{d)}	8.88 ^{d)}	0.424	0.453
Spiked level (mg/kg)	20		2		30		5		10		0.5	
No. labs ^{e)}	11		9		10		11		11		9	
No. outliers ^{f)}	0		2		1		0		0		2	
Mean value (mg/kg)	18.2		1.71		27.7		4.55		9.60		0.471	
Mean recovery (%)	91.2		85.6		92.2		91.0		96.0		94.1	
RSD _w ^{g)} (%)	5.9		3.3		1.7		2.6		3.7		2.5	
RSD _R ^{h)} (%)	10		3.3		6.2		7.2		5.0		3.9	
PRSD _R ⁱ⁾ (%)	10		15		9.7		13		11		18	
HorRat	1.0		0.22		0.64		0.56		0.43		0.22	

- a) Data excluded by Cochran test
b) Data excluded by paired Grubbs test
c) Data excluded by Cochran test but effective as the exclusion laboratories exceeded 2/9
d) Data excluded by paired Grubbs test but effective as the exclusion laboratories exceeded 2/9
e) Number of laboratories retained after eliminating outliers
f) Number of outlier laboratories removed in parentheses
g) Relative standard deviation of repeatability within laboratory
h) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories
i) Predicted relative standard deviation of reproducibility between laboratories calculated from the modified Horwitz equation

Table 7 Collaborative study for (Z)-ferimzone

Lab. No.	Rice straw 1		Rice straw 2		WCRS 1		WCRS 2		Paddy rice 1		Paddy rice 2	
	(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)		(mg/kg)	
1	18.6	17.5	1.86	1.83	28.8	29.4	5.08	5.04	10.2	10.1	0.513	0.514
2	20.1	19.4	1.76	1.90	31.1	29.5	4.88	5.14	9.92	10.0	0.492	0.505
3	19.2	19.6	1.88	1.84	29.4	29.0	4.88	4.92	9.66	9.82	0.442	0.447
4	19.7	19.9	1.92	1.78	28.7	29.6	5.21	5.19	9.69	10.1	0.472	0.495
5	18.6	19.4	1.82	1.83	28.5	28.0	4.52	4.69	9.25	9.32	0.442	0.449
6	19.6	19.2	1.82	1.85	29.6	29.5	4.89	4.76	9.74	9.76	0.486	0.488
7	19.2	19.0	1.94	1.81	29.8	29.5	4.94	4.85	9.66	9.67	0.469	0.470
8	17.1	16.0	1.70 ^{b)}	1.54 ^{b)}	25.6 ^{d)}	26.6 ^{d)}	4.72	4.41	9.01 ^{a)}	10.3 ^{a)}	0.495	0.475
9	19.5 ^{a)}	22.8 ^{a)}	1.50 ^{b)}	1.44 ^{b)}	27.5 ^{c)}	33.5 ^{c)}	4.19	4.36	9.72	9.69	0.432 ^{a)}	0.385 ^{a)}
10	19.7	19.4	1.80	1.87	29.6	29.9	4.92	4.98	9.78	9.84	0.486	0.477
11	16.5	17.2	1.78	1.77	27.0 ^{d)}	26.2 ^{d)}	4.55	4.45	9.50	9.19	0.452	0.447
Spiked level (mg/kg)	20		2		30		5		10		0.5	
No. labs ^{e)}	10		9		11		11		10		10	
No. outliers ^{f)}	1		2		0		0		1		1	
Mean value (mg/kg)	18.7		1.84		28.9		4.80		9.73		0.476	
Mean recovery (%)	93.7		91.8		96.4		96.0		97.3		95.2	
RSD _r ^{g)} (%)	2.5		3.3		4.8		2.3		1.3		1.7	
RSD _R ^{h)} (%)	6.6		3.3		5.9		6.0		2.8		5.0	
PRSD _R ⁱ⁾ (%)	10		15		9.6		13		11		18	
HorRat	0.64		0.22		0.62		0.48		0.25		0.28	

a) Data excluded by Cochran test

b) Data excluded by single Grubbs test

c) Data excluded by Cochran test but effective as the exclusion laboratories exceeded 2/9

d) Data excluded by paired Grubbs test but effective as the exclusion laboratories exceeded 2/9

e) Number of laboratories retained after eliminating outliers

f) Number of outlier laboratories removed in parentheses

g) Relative standard deviation of repeatability within laboratory

h) Relative standard deviation of reproducibility between laboratories

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

Table 8 Instruments used in the collaborative study

Lab.No	LC-MS/MS	LC colume
		(i.d.×length, particle size)
1	LC: ACQUITY UPLC, Waters	Inertsil ODS-SP, GL Sciences
	MS/MS: Quattro premier XE, Waters	(2.1 mm×150 mm, 3 µm)
2	LC: Nexera X2, Shimadzu	InertSustain C18, GL Sciences
	MS/MS: LCMS-8040, Shimadzu	(2.1 mm×150 mm, 3 µm)
3	LC: ACQUITY UPLC, Waters	Inertsil ODS-3, GL Sciences
	MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	(2.1 mm×150 mm, 3 µm)
4	LC: ACQUITY UPLC, Waters	Inertsil ODS-SP, GL Sciences
	MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	(2.1 mm×150 mm, 3 µm)
5	LC: ACQUITY UPLC, Waters	Inertsil ODS-SP, GL Sciences
	MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	(2.1 mm×150 mm, 5 µm)
6	LC: ACQUITY UPLC, Waters	InertSustain C18, GL Sciences
	MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	(2.1 mm×150 mm, 3 µm)
7	LC: Nexera X2, Shimadzu	Inertsil ODS-3, GL Sciences
	MS/MS: LCMS-8045, Shimadzu	(2.1 mm×150 mm, 3 µm)
8	LC: Nexera X2, Shimadzu	Inertsil ODS-SP, GL Sciences
	MS/MS: 4000Q TRAP, AB SCIEX	(2.1 mm×100 mm, 3 µm)
9	LC: Prominence, Shimadzu	YMC-Triart C18, YMC
	MS/MS: API4000Q, AB SCIEX	(2.1 mm×100 mm, 3 µm)
10	LC: Prominence, Shimadzu	Inertsil ODS-SP, GL Sciences
	MS/MS: LCMS-8040, Shimadzu	(2.1 mm×150 mm, 3 µm)
11	LC: Nexera X2, Shimadzu	Inertsil ODS-3, GL Sciences
	MS/MS: LCMS-8050, Shimadzu	(2.1 mm×150 mm, 3 µm)

Table 9 Characteristics of column used in the collaborative study

Column	Manufacturer	i.d.×length (mm) × (mm)	Particle size (µm)	Surface area (m ² /g)	Pore diameter (nm)	Pore volume (mL/g)	Functional group	Endcap	Carbon loading (%)
Inertsil ODS-SP	GL Sciences	2.1 × 150	3	450	10	1.05	Octadecyl	Yes	8.5
Inertsil ODS-SP	GL Sciences	2.1 × 150	5	450	10	1.05	Octadecyl	Yes	8.5
Inertsil ODS-SP	GL Sciences	2.1 × 100	3	450	10	1.05	Octadecyl	Yes	8.5
InertSustain C18	GL Sciences	2.1 × 150	3	350	10	0.85	Octadecyl	Yes	14
Inertsil ODS-3	GL Sciences	2.1 × 150	3	450	10	1.05	Octadecyl	Yes	15
YMC-Triart C18	YMC	2.1 × 100	3	360	12	Unknown	Octadecyl (Trifunctional)	Yes	20

4 まとめ

飼料用稲に残留するフェリムゾン E 体及び Z 体について、JFRL 法を基に開発した LC-MS/MS を用いた定量法について、追加検討及び共同試験を実施し、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) 5 種類の分析カラムを用い、ピーク面積及び高さを用いてフェリムゾン E 体及び Z 体それぞれについて異性体の分離を確認した結果、分離度が 1.5 以上の分析カラムを用いることで面積での測定が可能と考えられ、検量線はいずれも 0.1~50 ng/mL の範囲で直線性を示した。

- 2) 精製カラム処理中の時間経過に伴う異性化の定量への影響を確認したところ、遮光条件下において、妥当性確認法ガイドラインの真度及び精度を満たす範囲で定量結果に影響しないと考えられた。
- 3) 稲わらにフェリムゾン E 体及び Z 体としてそれぞれ 20 及び 2 mg/kg 相当量, WCRS にフェリムゾン E 体及び Z 体としてそれぞれ 30 及び 5 mg/kg 相当量, 粳米にフェリムゾン E 体及び Z 体としてそれぞれ 10 及び 0.5 mg/kg 相当量を添加した試料を用いて 11 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 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, ジーエルサイエンス株式会社, 一般社団法人日本海事検定協会食品衛生分析センター, 一般財団法人日本穀物検定協会中央研究所及び一般財団法人日本食品分析センター多摩研究所における関係者各位に感謝の意を表します。

文 献

- 1) 食品安全委員会：農薬評価書 フェリムゾン（第 2 版），平成 24 年 2 月（2012）。
- 2) 農林水産省畜産局長通知：飼料の有害物質の指導基準及び管理基準について，昭和 63 年 10 月 14 日，63 畜 B 第 2050 号（1988）。
- 3) 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）。
- 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 20 年度飼料中の有害物質分析法開発委託事業（2009）。
- 6) 新井 詠子，三枝 尚子，山本 克己：飼料用イネ中のフェリムゾンの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による定量法の開発，飼料研究報告，43，22-35（2018）。
- 7) Willian Horwitz: Protocol for the design, conduct and interpretation of method - performance studies, Pure & Appl. Chem., 67(2), 331-343 (1995).
- 8) George W. Latimer, Jr.: Official methods of analysis of AOAC INTERNATIONAL 20th edition, Appendix D, Guidelines for collaborative study procedures to validate characteristics of a method of analysis. Gaithersburg, MD, USA (2016) (ISBN: 978-0-935584-87-5).
- 9) Michael 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).