

## 6 稲わら及び粃米中のヒドロキシイソキサゾールの液体クロマトグラフ質量分析計による分析法の共同試験

牧野 大作<sup>\*1</sup>, 土井 雄悟<sup>\*2</sup>, 田島 麻帆<sup>\*1</sup>

### Collaborative Study of Determination Method of Hydroxyisoxazol in Rice Straw and Paddy Rice for Feed by LC-MS

MAKINO Daisaku<sup>\*1</sup>, DOI Yugo<sup>\*2</sup> and TASHIMA Maho<sup>\*1</sup>

(\*<sup>1</sup> Fukuoka Regional Center, Food and Agricultural Materials Inspection Center (FAMIC), \*<sup>2</sup> Fukuoka Regional Center, FAMIC (Now Fertilizer and Feed Inspection Department, FAMIC))

We have conducted a collaborative study for validating a determination method of hydroxyisoxazol in rice straw and paddy rice for feed using a liquid-chromatograph electrospray-ionization mass spectrometer (LC-ESI-MS).

Having added water to a sample, hydroxyisoxazol was extracted with acetone, and the extracted solution was filtered. The filtrate was then purified with liquid-liquid extraction, and the purified solution was injected into a LC-MS to determine the concentration of hydroxyisoxazol. LC separation was then carried out on a polymer column (MSPak GF-310 4D, 4.6 mm i.d. × 150 mm, 5 μm from Showa Denko Inc.; Tokyo, Japan) using 0.1 v/v% formic acid solution-methanol (6:4) as a mobile phase. In the MS analysis, the positive mode electrospray ionization (ESI+) was used.

A collaborative study was conducted by eight laboratories using rice straw and paddy rice, all of which were added with hydroxyisoxazol according to the following specifications: 0.5, 1 and 1.5 mg/kg for rice straw; 0.1, 0.25 and 1 mg/kg for paddy rice. The resulting mean recoveries ranged from 68.8 % to 78.5 %. The repeatability and reproducibility in the form of relative standard deviation (RSD<sub>r</sub> and RSD<sub>R</sub>) were less than 6.3 % and less than 13 % respectively. The HorRat was less than 0.60.

This method was thus validated as useful for inspections of hydroxyisoxazol in rice straw and paddy rice for feed.

Key words: hydroxyisoxazol; liquid-chromatograph mass spectrometer (LC-MS); electrospray ionization (ESI); rice straw; paddy rice; collaborative study

キーワード：ヒドロキシイソキサゾール；液体クロマトグラフ質量分析計；エレクトロスプレーイオン化法；稲わら；粃米；共同試験

## 1 緒 言

ヒドロキシイソキサゾール（ヒメキサゾール）は、イソキサゾール骨格を有する土壌殺菌剤・植物生長調整剤である<sup>1)</sup>。国内での初回登録は1969年であり、稲をはじめとして、野菜や花き等幅広い植物に適用されている。厚生労働省の定める「食品、添加物等の規格基準」においては、玄米及び大豆で0.5 mg/kg、大麦、小麦及びライ麦等で0.02 mg/kgの基準値が定められている<sup>2)</sup>。飼料中のヒドロキシイソキサゾールについては、「飼料の有害物質の指導基準及び管理基準」において、稲

\*<sup>1</sup> 独立行政法人農林水産消費安全技術センター福岡センター

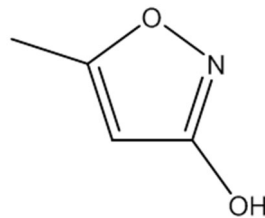
\*<sup>2</sup> 独立行政法人農林水産消費安全技術センター福岡センター，現 肥飼料安全検査部

わら中で 1 mg/kg, 粃米中で 0.5 mg/kg 及び稲発酵粗飼料中で 0.1 mg/kg の管理基準が設定されている<sup>3)</sup>。

ヒドロキシイソキサゾールの分析法としては、厚生労働省通知試験法として高感度窒素リン検出器付きガスクロマトグラフ, アルカリ熱イオン化検出器付きガスクロマトグラフ及びガスクロマトグラフ質量分析計を用いる方法<sup>4)</sup>が定められている。また、環境省の排出水に係る標準分析方法に液体クロマトグラフ質量分析計（以下「LC-MS」という。）を用いる方法<sup>5)</sup>が定められている。一方、飼料中のヒドロキシイソキサゾールの分析法については飼料分析基準<sup>6)</sup>に記載されておらず、分析法の確立が急務となっている。

そこで、平成 29 年に矢野らは、「平成 21 年度飼料中の有害物質等分析法開発委託事業」において財団法人日本食品分析センターが開発した分析法<sup>7)</sup>を用いて、稲わら及び粃米を対象に単一試験室内の妥当性確認を実施し、その結果を報告<sup>8)</sup>したところであるが、更に今回、共通試料を用いた共同試験を実施し、飼料分析基準への記載の可否を検討したので、その概要を報告する。

参考にヒドロキシイソキサゾールの構造式を Fig.1 に示した。



5-Methylisoxazol-3-ol

C<sub>4</sub>H<sub>5</sub>NO<sub>2</sub> MW: 99.1 CAS No.: 10004-44-1

Fig. 1 Chemical structure of hydroxyisoxazol

## 2 試験方法

### 2.1 試料

ヒドロキシイソキサゾールが残留していないことを確認した稲わら（2 種類）及び粃米（3 種類）をそれぞれ目開き 1 mm のスクリーンを装着した粉砕機で粉砕した。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（稲わら 1 種類については 4 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 試薬

1) アセトン, ジエチルエーテル及びヘキサンは残留農薬・PCB 試験用又はこれと同等以上のものを用いた。メタノールは LC-MS 用又はこれと同等以上のものを用いた。ギ酸は液体クロマトグラフ用又はこれと同等以上のものを用いた。塩化ナトリウム, 塩酸, 硫酸ナトリウム, 炭酸水素ナトリウムは試薬特級又はこれと同等以上のものを用いた。水は超純水（JIS K0211 の 5218 に定義された超純水）又は市販の液体クロマトグラフ用を用いた。

#### 2) ヒドロキシイソキサゾール標準原液

ヒドロキシイソキサゾール標準品（和光純薬工業製, 純度 99.7%）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ヒドロキシイソキサゾール標準原液を調製した（この液 1 mL は, ヒドロキシイソキサゾールとして 0.5

mg を含有) .

3) ヒドロキシイソキサゾール標準液

ヒドロキシイソキサゾール標準原液 10 mL を 100 mL の全量フラスコに入れ, 更に標線まで水を加えて, ヒドロキシイソキサゾール標準液を調製した. (この液 1 mL 中は, ヒドロキシイソキサゾールとして 50  $\mu$ g を含有) .

4) 検量線作成用標準原液

3)で調製したヒドロキシイソキサゾール標準液 10 mL を 500 mL の全量フラスコに入れ, 更に標線まで水を加えて, 検量線作成用標準原液を調製した (この液 1 mL は, ヒドロキシイソキサゾールとして 1  $\mu$ g を含有) .

5) 稲わら 1 添加用標準液 1

3)で調製したヒドロキシイソキサゾール標準液 10 mL を 100 mL の全量フラスコに入れ, 更に標線まで水を加え, 1 mL 中にヒドロキシイソキサゾールとして 5  $\mu$ g を含有する稲わら 1 添加用標準液 1 を調製した.

6) 稲わら 1 添加用標準液 2

3)で調製したヒドロキシイソキサゾール標準液 20 mL を 100 mL の全量フラスコに入れ, 更に標線まで水を加え, 1 mL 中にヒドロキシイソキサゾールとして 10  $\mu$ g を含有する稲わら 1 添加用標準液 2 を調製した.

7) 稲わら 2 添加用標準液

3)で調製したヒドロキシイソキサゾール標準液 30 mL を 100 mL の全量フラスコに入れ, 更に標線まで水を加え, 1 mL 中にヒドロキシイソキサゾールとして 15  $\mu$ g を含有する稲わら 2 添加用標準液を調製した.

8) 粳米 1 添加用標準液

3)で調製したヒドロキシイソキサゾール標準液 2 mL を 100 mL の全量フラスコに入れ, 更に標線まで水を加え, 1 mL 中にヒドロキシイソキサゾールとして 1  $\mu$ g 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

3)で調製したヒドロキシイソキサゾール標準液 5 mL を 100 mL の全量フラスコに入れ, 更に標線まで水を加え, 1 mL 中にヒドロキシイソキサゾールとして 2.5  $\mu$ g を含有する粳米 2 添加用標準液を調製した.

10) 粳米 3 添加用標準液

3)で調製したヒドロキシイソキサゾール標準液 20 mL を 100 mL の全量フラスコに入れ, 更に標線まで水を加え, 1 mL 中にヒドロキシイソキサゾールとして 10  $\mu$ g を含有する粳米 3 添加用標準液を調製した.

4)を 1 本並びに 5)~10)を各 2 本, 濃度は非通知で 2.1 の試験用試料と併せて各試験室に配付した. なお, 1)の試薬については各試験室において準備した.

### 2.3 分析試料

2.1 の試験用試料を非明示の 2 点反復で用いた. ヒドロキシイソキサゾールとして稲わら 1 に 0.5 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 1 に 1 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 2 mL 添加) を, 稲わら 2 に

1.5 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，粳米 1 に 0.1 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 0.25 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，粳米 3 に 1 mg/kg 相当量（試験用試料 10 g に対して粳米 3 添加用標準液 1 mL 添加）を，分析開始の直前に添加して調製した。

#### 2.4 定量方法

矢野らの方法<sup>8)</sup>によった。

#### 2.5 報告方法

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 桁まで報告させた。

#### 2.6 分析実施期間

令和 2 年 12 月 1 日から令和 3 年 1 月 31 日まで

#### 2.7 解析方法

結果の解析は，国際的にハーモナイズされた共同試験に関する手順<sup>9), 10)</sup>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<sub>f</sub>）及び室間再現精度（RSD<sub>R</sub>）を算出し，得られた RSD<sub>R</sub> から，修正 Horwitz 式<sup>11)</sup>を用いて HorRat を求めた。

### 3 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，一般財団法人東京顕微鏡院食と環境の科学センター，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 8 試験室）

### 4 結果と考察

ヒドロキシイソキサゾールの結果は Table 1-1 及び 1-2 のとおりであり，稲わら 1（0.5 mg/kg 相当量添加），稲わら 1（1 mg/kg 相当量添加），稲わら 2，粳米 1，粳米 2 及び粳米 3 について，平均回収率は 69.9，68.8，69.2，78.5，78.3 及び 77.9%，RSD<sub>f</sub> は 4.4，3.9，4.0，6.1，5.2 及び 6.3%，RSD<sub>R</sub> は 9.6，7.9，9.6，13，9.0 及び 9.9%，HorRat は 0.51，0.47，0.60，0.60，0.44 及び 0.60 であった。飼料分析基準別表 3 の試験法の妥当性確認法ガイドライン（以下「妥当性確認法ガイドライン」という。）に定められた室間再現精度の目標値（稲わら 1（0.5 mg/kg 相当量添加）については 38%以下，稲わら 1（1 mg/kg 相当量添加）については 34%以下，稲わら 2 については 32%以下，粳米 1 については 44%以下，粳米 2 については 40%以下，粳米 3 については 34%以下）を満たす良好な結果が得られた。HorRat については，0.5 を下回るものが見られたが，特に分析手法等に問題は認められなかった。

参考のため，各試験室で使用した LC-MS（液体クロマトグラフタンデム型質量分析計を LC-MS として使用したものを含む）の機種等を Table 2 に示した。また，LC カラムは全ての試験室で MSPak GF-310 4D（昭和電工製，4.6 mm×150 mm，5 μm）を使用した。

Table 1-1 Collaborative study for hydroxyisoxazol (1)

| Lab. No.                            | Rice straw 1 |       | Rice straw 1 |       | Rice straw 2 |       |
|-------------------------------------|--------------|-------|--------------|-------|--------------|-------|
|                                     | (mg/kg)      |       | (mg/kg)      |       | (mg/kg)      |       |
| 1                                   | 0.382        | 0.362 | 0.712        | 0.722 | 1.10         | 1.12  |
| 2                                   | 0.420        | 0.367 | 0.723        | 0.735 | 1.04         | 1.13  |
| 3                                   | 0.321        | 0.331 | 0.734        | 0.704 | 0.988        | 1.03  |
| 4                                   | 0.369        | 0.356 | 0.714        | 0.721 | 1.01         | 1.03  |
| 5                                   | 0.315        | 0.301 | 0.681        | 0.620 | 0.997        | 0.886 |
| 6                                   | 0.367        | 0.366 | 0.726        | 0.751 | 1.08         | 1.09  |
| 7                                   | 0.360        | 0.358 | 0.581        | 0.660 | 1.20         | 1.15  |
| 8                                   | 0.301        | 0.314 | 0.616        | 0.614 | 0.902        | 0.860 |
| Spiked level (mg/kg)                | 0.5          |       | 1            |       | 1.5          |       |
| No. labs <sup>a)</sup>              | 8            |       | 8            |       | 8            |       |
| No. outliers <sup>b)</sup>          | 0            |       | 0            |       | 0            |       |
| Mean value (mg/kg)                  | 0.349        |       | 0.688        |       | 1.04         |       |
| Mean recovery (%)                   | 69.9         |       | 68.8         |       | 69.2         |       |
| RSD <sub>F</sub> <sup>c)</sup> (%)  | 4.4          |       | 3.9          |       | 4.0          |       |
| RSD <sub>R</sub> <sup>d)</sup> (%)  | 9.6          |       | 7.9          |       | 9.6          |       |
| PRSD <sub>R</sub> <sup>e)</sup> (%) | 19           |       | 17           |       | 16           |       |
| HorRat                              | 0.51         |       | 0.47         |       | 0.60         |       |

a) Number of laboratories retained after the outliers were removed

b) Number of the removed outliers

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 1-2 Collaborative study for hydroxyisoxazol (2)

| Lab. No.                            | Paddy rice 1 |        | Paddy rice 2 |       | Paddy rice 3 |       |
|-------------------------------------|--------------|--------|--------------|-------|--------------|-------|
|                                     | (mg/kg)      |        | (mg/kg)      |       | (mg/kg)      |       |
| 1                                   | 0.0815       | 0.0826 | 0.215        | 0.208 | 0.782        | 0.807 |
| 2                                   | 0.0822       | 0.0730 | 0.220        | 0.194 | 0.882        | 0.906 |
| 3                                   | 0.0895       | 0.102  | 0.172        | 0.178 | 0.836        | 0.675 |
| 4                                   | 0.0930       | 0.0856 | 0.210        | 0.226 | 0.778        | 0.688 |
| 5                                   | 0.0735       | 0.0665 | 0.176        | 0.175 | 0.711        | 0.737 |
| 6                                   | 0.0720       | 0.0719 | 0.189        | 0.191 | 0.772        | 0.772 |
| 7                                   | 0.0699       | 0.0720 | 0.201        | 0.197 | 0.877        | 0.851 |
| 8                                   | 0.0681       | 0.0720 | 0.177        | 0.202 | 0.675        | 0.719 |
| Spiked level (mg/kg)                | 0.1          |        | 0.25         |       | 1            |       |
| No. labs <sup>a)</sup>              | 8            |        | 8            |       | 8            |       |
| No. outliers <sup>b)</sup>          | 0            |        | 0            |       | 0            |       |
| Mean value (mg/kg)                  | 0.0785       |        | 0.196        |       | 0.779        |       |
| Mean recovery (%)                   | 78.5         |        | 78.3         |       | 77.9         |       |
| RSD <sub>r</sub> <sup>c)</sup> (%)  | 6.1          |        | 5.2          |       | 6.3          |       |
| RSD <sub>R</sub> <sup>d)</sup> (%)  | 13           |        | 9.0          |       | 9.9          |       |
| PRSD <sub>R</sub> <sup>e)</sup> (%) | 22           |        | 20           |       | 17           |       |
| HorRat                              | 0.60         |        | 0.44         |       | 0.60         |       |

a) Number of laboratories retained after the outliers were removed

b) Number of the removed outliers

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 2 Instruments used in the collaborative study

| Lab.No | LC-MS  |
|--------|--|
| 1      | LC: Prominence, Shimadzu<br>MS: LCMS-2010EV, Shimadzu      |
| 2      | LC: ACQUITY UPLC, Waters<br>MS: ACQUITY TQD, Waters        |
| 3      | LC: Prominence, Shimadzu<br>MS: LCMS-2010EV, Shimadzu      |
| 4      | LC: ACQUITY UPLC, Waters<br>MS: Quattro premier XE, Waters |
| 5      | LC: Prominence, Shimadzu<br>MS: LCMS-2010EV, Shimadzu      |
| 6      | LC: Nexera X2, Shimadzu<br>MS: LCMS-8040, Shimadzu         |
| 7      | LC: Prominence, Shimadzu<br>MS: LCMS-8060, Shimadzu        |
| 8      | LC: ExionLC AD, SCIEX<br>MS: TRIPLE QUAD 6500+, SCIEX      |

## 5 まとめ

稲わら及び粃米に残留するヒドロキシイソキサゾールについて、稲わらにヒドロキシイソキサゾールとしてそれぞれ 0.5, 1 及び 1.5 mg/kg 相当量を、粃米にヒドロキシイソキサゾールとしてそれぞれ 0.1, 0.25 及び 1 mg/kg 相当量を添加した試料を用いて 8 試験室において本法に従い共同試験を実施したところ、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す良好な結果が得られ、飼料分析基準への収載が可能であると考えられた。

## 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及び一般財団法人東京顕微鏡院食と環境の科学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) 環境省中央環境審議会土壌農薬部会農薬小委員会（第 43 回）：水産動植物の被害防止に係る農薬登録保留基準として環境大臣が定める基準の設定に関する資料，平成 26 年 12 月 17 日 (2014).
- 2) 厚生省告示：食品，添加物等の規格基準，昭和 34 年 12 月 28 日，第 370 号 (1959).
- 3) 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).
- 4) 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，平成 17 年 1 月 24 日，食安発第 0124001 号 (2005).

- 5) 環境庁水質保全局長通知：ゴルフ場で使用される農薬による水質汚濁の防止に係る暫定指導指針，平成 2 年 5 月 24 日，環水土第 77 号 (1990).
- 6) 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).
- 7) 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 (2009).
- 8) 矢野 愛子，榊原 良成：稲わら及び粃米中のヒドロキシイソキサゾールの液体クロマトグラフ質量分析計による定量法の開発，飼料研究報告，43，36-47 (2018).
- 9) William Horwitz: Protocol for the design, conduct and interpretation of method - performance studies, *Pure & Appl. Chem.*, 67(2), 331-343 (1995).
- 10) 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).
- 11) 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).