

技術レポート

2 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

新井 詠子^{*1}, 三枝 尚子^{*1}, 山本 克己^{*2}

Development of Determination Method of Ferimzone in Rice Straw, Whole-crop Rice Silage and Paddy Rice for Feed by LC-MS/MS

Eiko ARAI^{*1}, Naoko SAEGUSA^{*1} and Katsumi YAMAMOTO^{*2}(*¹ Sendai Regional Center, Food and Agricultural Materials Inspection Center (FAMIC),*² Sendai Regional Center, FAMIC (Now Kobe Regional Center, FAMIC))

For determining the concentration of (*Z*)-ferimzone and (*E*)-ferimzone in rice straw, whole-crop rice silage (WCRS) and paddy rice for feed, a quantitative method using a liquid chromatograph-electrospray ionization-tandem mass spectrometer (LC-ESI-MS/MS) was developed.

After adding water to a sample, ferimzones were 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 carried out on an ODS column (Inertsil ODS-SP, 2.1 mm i.d. × 100 mm, 3 μm, GL Sciences Inc.; Tokyo, Japan) with a gradient of 2 mmol/L ammonium acetate solution and acetonitrile as a mobile phase. In the MS/MS analysis, positive mode electrospray ionization (ESI+) was used.

Recovery tests were conducted on rice straw, WCRS and paddy rice. (*Z*)-ferimzone and (*E*)-ferimzone were intentionally added at the levels of 0.2 and 20 mg/kg for rice straw, 0.2 and 5 mg/kg for paddy rice, and 0.1 and 9 mg/kg for WCRS respectively. The resulting mean recoveries ranged from 88.9 % to 94.5 % for (*Z*)-ferimzone, and 83.5 % to 90.9 % for (*E*)-ferimzone respectively. The repeatability in the form of the relative standard deviation (RSD_r) was less than 8.0 % for (*Z*)-ferimzone, and less than 7.4 % for (*E*)-ferimzone.

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

キーワード：フェリムゾン；フェリムゾン *Z* 体；フェリムゾン *E* 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；飼料用イネ；稲わら；稲発酵粗飼料；粃米

1 緒 言

フェリムゾンは、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、粃米中で 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、

*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 神戸センター

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* 体及びフェリムゾン *E* 体と呼称する。）の和（以下「総フェリムゾン」という。）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、飼料中の定量法はなく、その確立が急務となっている。

今回、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等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⁴⁾（以下「JFRL 法」という。）を基に、飼料用イネ（稲わら、稲発酵粗飼料（以下「WCRS」という。）及び粃米）中のフェリムズンを対象とした飼料分析基準⁵⁾への適用の可否を検討したので、その概要を報告する。

参考として、フェリムゾン *Z* 体及び *E* 体の構造式等を Fig. 1 に示した。

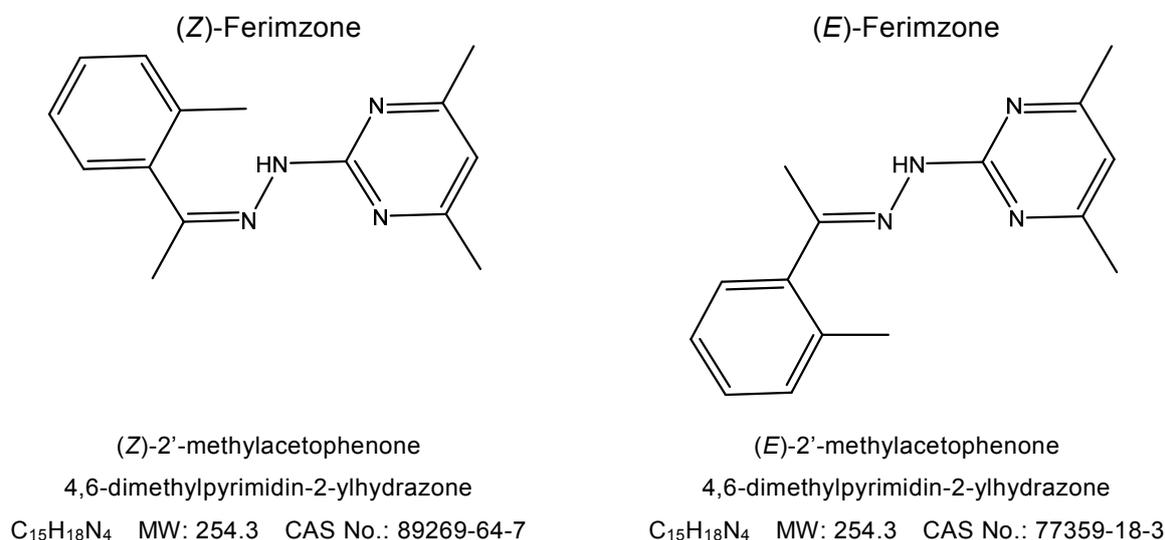


Fig. 1 Chemical structures of (*Z*)-ferimzone and (*E*)-ferimzone

2 実験方法

2.1 試料

稲わら及び粃米は、それぞれ目開き 1 mm のスクリーンを装着した粉碎機で粉碎した。WCRS は 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、同様に粉碎した。

2.2 試薬

1) アセトンは残留農薬・PCB 試験用を用いた。アセトニトリルは LC/MS 用（関東化学製）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 *Z* 体標準原液

フェリムゾン *Z* 体標準品（和光純薬工業製，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。）。

3) フェリムゾン E 体標準原液

フェリムゾン E 体標準品（和光純薬工業製，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．）．

4) フェリムゾン混合標準液

使用に際して，各標準原液 1 mL を 50 mL の褐色全量フラスコに入れて混合し，更に標線までアセトンを加えてフェリムゾン混合標準原液を調製した．（この液 1 mL は，フェリムゾン Z 体及び E 体として各 10 µg を含有する．）．フェリムゾン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 Z 体及び E 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．

2.3 装置及び器具

1) 粉砕機

粉砕機 1（稲わら及び WCRS 用）：SM-100 Retsch 製（目開き 1 mm スクリーン，回転数（仕様）1430 rpm）

粉砕機 2（粳米用）：ZM-100 Retsch 製（目開き 1 mm スクリーン，回転数 14000 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

2.4 定量方法

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（粳米は 20 mL）を加え，30 分間静置後，更にアセトン 120 mL（粳米は 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 程度で吸引して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，フェリムゾンを溶出させた．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. × 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	
(Z)-Ferimzone and (E)-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高さを求めて検量線を作成し、試料中のフェリムゾン Z 体量及びフェリムゾン E 体量を算出した。

なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。

Under the light-shielding conditions

Sample 10.0 g (200 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 (No. 5B of JIS P 3801) 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 (*Z*)-ferimzone and (*E*)-ferimzone

3 結果及び考察

3.1 検量線

2.2 の 4) に従って調製した各混合標準液各 5 μ L を LC-MS/MS に注入し、得られた SRM クロマトグラムからピーク高さを用いてフェリムゾン *Z* 体及び *E* 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. 2-1 及び 2-2 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。

なお、当該検量線の濃度範囲は、フェリムゾン *Z* 体及び *E* 体としてそれぞれ 0.1~50 mg/kg を含有する分析用試料を本法に従い調製した最終試料溶液中の各フェリムゾン濃度範囲に相当する。

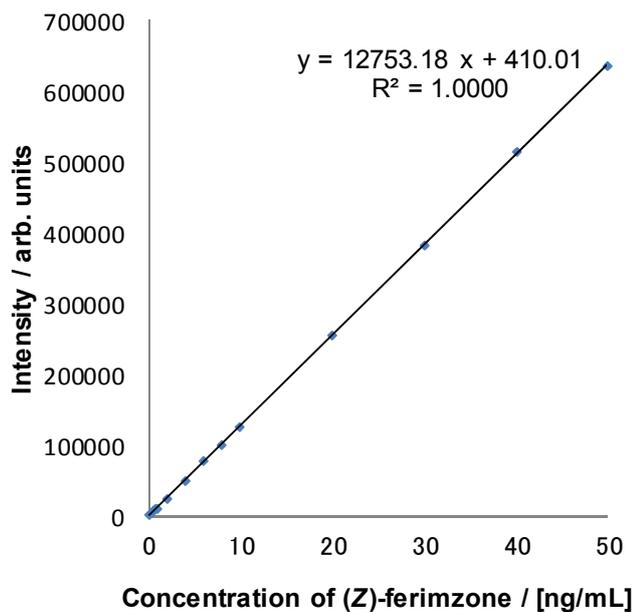


Fig. 2-1 Calibration curve of (Z)-ferimzone by peak height

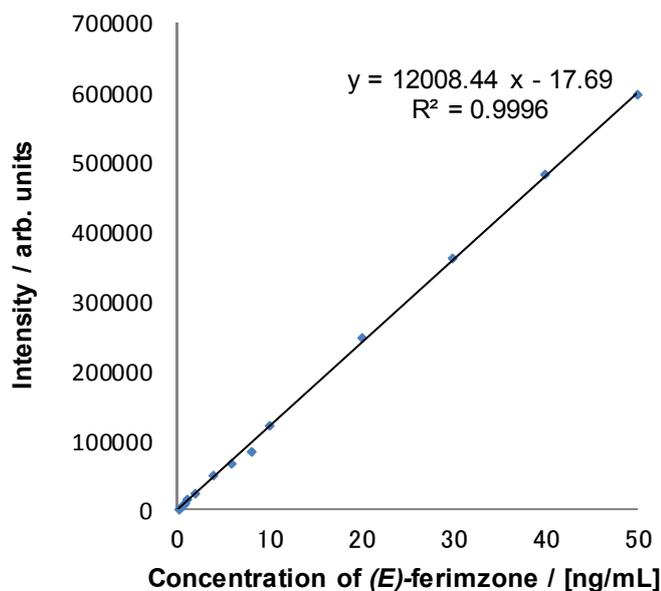


Fig. 2-2 Calibration curve of (E)-ferimzone by peak height

3.2 異性化に関する検討

フェリムゾン Z 体及び E 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。そこで異性化を抑えるため、定量操作条件を検討した。2.2 の 2) 及び 3) に従って調製したフェリムゾン Z 体標準原液及び E 体標準原液について、アセトニトリル-水 (3+2) で 20 ng/mL の標準液となるよう希釈し、Fig. 3 のとおり、単独のピークが得られることを確認した。また各標準原液をアセトンで希釈し、フェリムゾン Z 体又は E 体として、粳米について 5 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 5 ng/mL）になるようにそれぞれ添加してよく混合し、遮光条件下で一夜静置した後、日光の入らない試験室において、遮光条件下（紫外線カット照明下で共栓三角フラスコ及び全量フラスコは褐色ガラス製）及び遮光せず（白色蛍

光灯下で共栓三角フラスコ及び全量フラスコは透明ガラス製) に定量した. その結果, 定量操作で得られた測定溶液ではいずれも添加していない異性体のピークが検出されたことから, 定量結果への異性化の影響を確認するため, 総フェリムゾンとしての平均回収率及び繰返し精度を算出した. 添加したフェリムゾン (フェリムゾン *Z* 体又は *E* 体) 及びその異性体のそれぞれのピークについて, 検量線に基づき濃度を決定した後足し合わせたものを総フェリムゾン濃度とし, その添加量に対する割合を総フェリムゾンの回収率とした.

結果は Table 3 のとおり, 特にフェリムゾン *E* 体において遮光することにより平均回収率及び繰返し精度の改善が認められ, また総フェリムゾンの平均回収率に対するフェリムゾン *E* 体の平均回収率の割合が改善された. これらのことは, 遮光することにより異性化が軽減されたことを示唆している. したがって, 本法における定量操作はすべて遮光条件下で行うこととした.

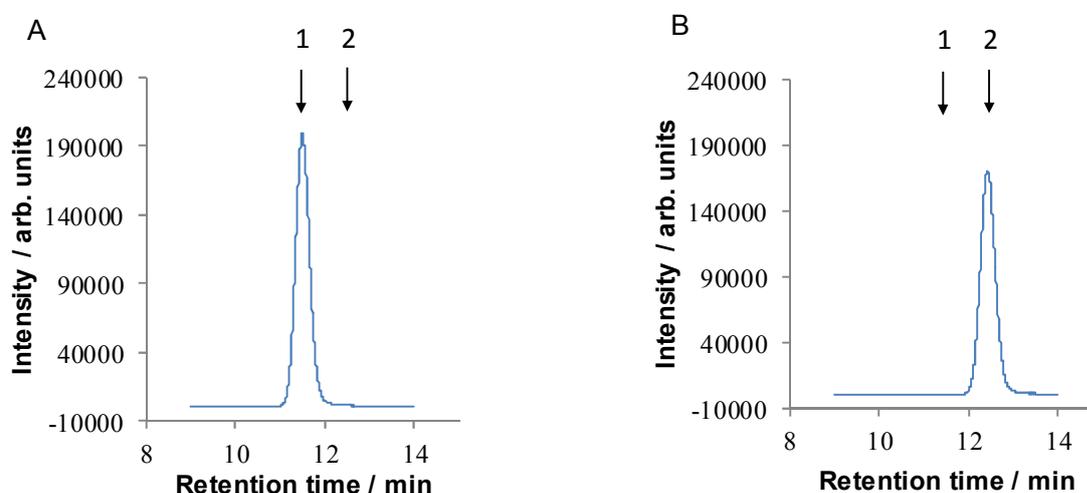


Fig. 3 Selected reaction monitoring (SRM) chromatograms of standard solution of (*Z*)-ferimzone and (*E*)-ferimzone

(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: Standard solution of (*Z*)-ferimzone (20 ng/mL)

B: Standard solution of (*E*)-ferimzone (20 ng/mL)

Table 3 Comparison of recoveries between lighting conditions

Spiked isomer of ferimzones	Condition of room lighting	Spiked level (mg/kg)	Spiked isomer		Total ferimzones ^{a)}	
			Recovery ^{b)} (%)	RSD _r ^{c)} (%)	Recovery ^{b)} (%)	RSD _r ^{c)} (%)
(Z)-Ferimzone	shading ^{d)}	5	91.7	1.4	98.4	1.6
	no shading ^{e)}		90.0	1.2	95.8	1.2
(E)-Ferimzone	shading ^{d)}	5	88.2	2.0	95.3	2.0
	no shading ^{e)}		70.9	16	81.7	14

a) Calculated from the total amount of (Z)-ferimzone and (E)-ferimzone

b) Mean ($n = 5$)

c) Relative standard deviation of repeatability

d) Conducted under the lighting having been removed ultraviolet rays, in a laboratory that daylight doesn't enter, and using brown glass apparatuses

e) Conducted under the fluorescent lighting, and using clear glass apparatuses

3.3 オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムからの溶出画分の確認

稲わら, WCRS 及び粃米を 2.4 の 1) に従って吸引ろ過まで操作し, 得られたろ液にフェリムゾン Z 体及び E 体を, 稲わら及び WCRS について各 10 mg/kg 相当量 (WCRS は風乾物中濃度, 最終試料溶液中で 10 ng/mL 相当量), 粃米について各 2.5 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 5 ng/mL 相当量) 添加した後, 標線までアセトンを加えた. これを 2.4 の 1) 及び 2) に従って調製し, オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムからの溶出画分を確認した. 溶出液量について, JFRL 法においては 10 mL のアセトニトリル-水 (3+2) をミニカラムに加えて溶出させているが, 本法においては標線を越えることがないよう 9 mL とした.

結果は Table 4 のとおりであり, 稲わら, WCRS 及び粃米について, いずれの農薬も 0~9 mL の画分に大部分が溶出したが, 9~14 mL の画分においても溶出が見られたため, 15 mL のアセトニトリル-水 (3+2) による溶出を検討した. 溶出液量による回収率の違いを確認するため, フェリムゾン Z 体及び E 体を稲わら及び WCRS について各 20 mg/kg 相当量, 粃米について各 5 mg/kg 相当量添加し, 2.4 の 1) 及び 2) に従って調製して, 9 mL 及び 15 mL のアセトニトリル-水 (3+2) でそれぞれ溶出し, 同溶媒で 10 mL 及び 20 mL にそれぞれ定容して, 回収率を求めた. 結果は Table 5 のとおりであり, 溶出液量による回収率の違いは見られなかった.

また, 溶出液量によるマトリックス効果の違いを確認するため, 稲わら, WCRS 及び粃米を 2.4 の 1) 及び 2) に従って調製し, 9 mL 及び 15 mL のアセトニトリル-水 (3+2) でそれぞれ溶出して得られた液に, フェリムゾン Z 体及び E 体を稲わら及び WCRS については各 200 ng (試料中濃度として 20 mg/kg, WCRS は風乾物中濃度), 粃米については各 50 ng (試料中濃度として 5 mg/kg) 添加した. それぞれについてアセトニトリル-水 (3+2) で 10 mL 及び 20 mL に定容し, 2.2 の 4) に従って調製した同濃度のフェリムゾン Z 体及び E 体標準液に対するピーク高さ比を確認したところ, 結果は Table 5 のとおりであり, 溶出液量によるマトリックス効果の違いは見られなかった.

全てのマトリックスで, 9~14 mL の画分においてフェリムゾン Z 体及び E 体の溶出が見られたが, 溶出液量を 15 mL とした場合と同程度の添加回収率が得られたことから, 溶出液量は 9 mL とした.

Table 4 Elution pattern of (Z)-ferimzone and (E)-ferimzone from InertSep Slim-J C18-B

Samples	Recovery (%)						Total
	0~8 mL	8~9 mL	9~10 mL	10~14 mL	14~18 mL		
(Z)-Ferimzone	Rice straw	94.6	Tr.	1.1	Tr.	N.D.	95.7
	WCRS	102	Tr.	1.1	Tr.	N.D.	103
	Paddy rice	94.7	Tr.	Tr.	Tr.	N.D.	94.7
(E)-Ferimzone	Rice straw	91.7	Tr.	Tr.	Tr.	N.D.	91.7
	WCRS	95.8	Tr.	Tr.	Tr.	N.D.	95.8
	Paddy rice	93.0	0.5	0.5	Tr.	N.D.	94.0

$n = 1$

Tr.: S/N of the peak was less than 10, N.D.: Not detected

WCRS: whole-crop rice silage

Table 5 Effect of elution volume on recovery and matrix effect

Applied volume (mL)	Recovery (%)			Matrix effect ^{a)} (%)		
	Spiked level (mg/kg)	(Z)-Ferimzone	(E)-Ferimzone	Spiked level (ng)	(Z)-Ferimzone	(E)-Ferimzone
Rice straw	20	106	100	200	101	100
WCRS	9	20	110	200	101	102
Paddy rice	5	105	99.4	50	100	102
Rice straw	20	108	101	200	101	100
WCRS	15	20	107	200	100	100
Paddy rice	5	106	103	50	100	98.6

$n = 1$

WCRS: whole-crop rice silage

a) Calculated by the ratio of the peak height

3.4 妨害物質の検討

稲わら 2 検体, WCRS2 検体及び粳米 2 検体を試料として, 2.4 により調製した試料溶液を LC-MS/MS に注入し, 得られた SRM 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 SRM クロマトグラムの一例を Fig. 4 に示した。

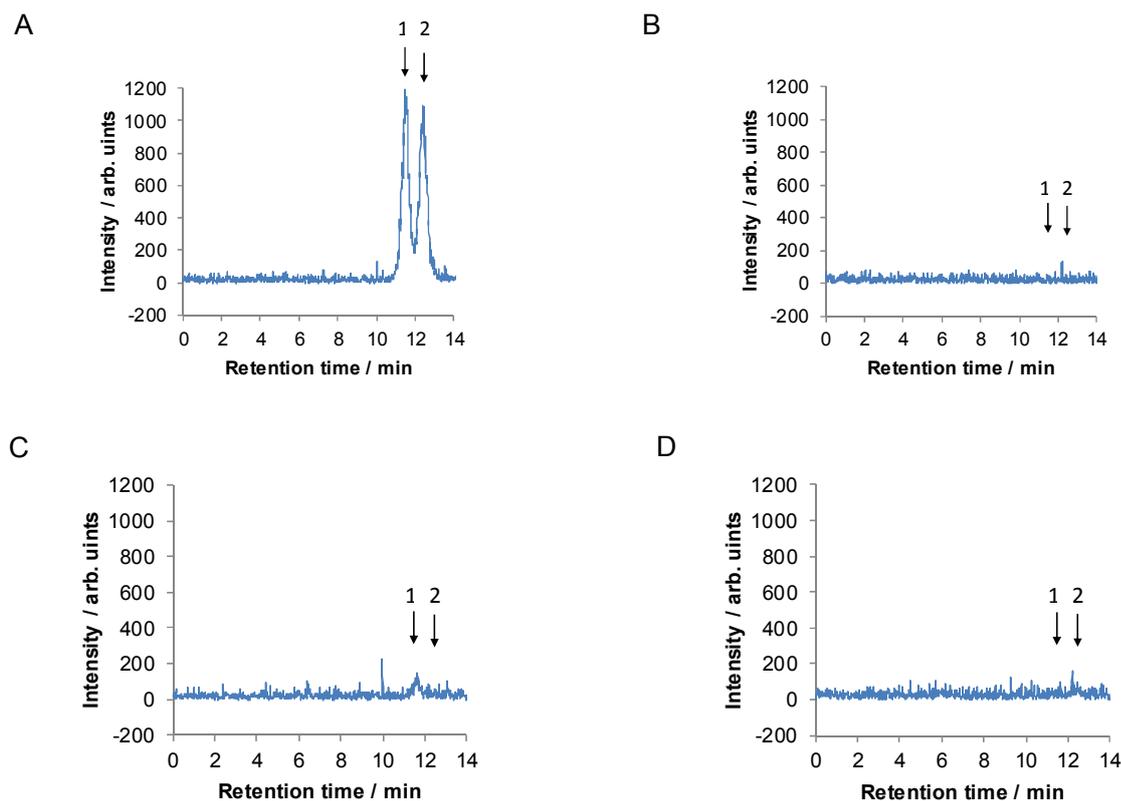


Fig. 4 SRM chromatograms of standard and blank solution

(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: Standard solution (0.2 ng/mL each),

B~D: Blank sample solution (B: rice straw, C: whole-crop rice silage (WCRS) and D: paddy rice)

3.5 マトリックス効果の確認

2.4の1)及び2)により10 mL褐色全量フラスコで受けた稲わら、WCRSのミニカラム溶出液に、1 mL中にフェリムゾンZ体及びE体を各400 ng含有する標準液を0.5 mL添加した。同様に粃米のミニカラム溶出液に、1 mL中にフェリムゾンZ体及びE体を各100 ng含有する標準液を0.5 mL添加した。それぞれ褐色全量フラスコの標線までアセトニトリル-水(3+2)を加えた後5000×gで5分間遠心分離し、上澄み液をマトリックス標準液とした。各マトリックス標準液について、2.2の4)に従って調製した同濃度のフェリムゾンZ体及びE体標準液に対するピーク高さ比を確認したところ、Table 6のとおりであり、フェリムゾンZ体及びE体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。

Table 6 Matrix effect

Samples	Concentration of ferimzone		Matrix effect ^{b)}	
	in matrix standard solution (ng/mL)	in sample ^{a)} (mg/kg)	(%)	
			(Z)-ferimzone	(E)-ferimzone
Rice straw	0.2	0.2	104	104
	20	20	99	99
WCRS	0.2	0.2 ^{c)}	107	102
	20	20 ^{c)}	100	100
Paddy rice	0.2	0.2	105	102
	5	5	102	100

$n = 3$

WCRS: whole-crop rice silage

a) Converted from the concentration in matrix standard solution

b) Ratio of peak height of ferimzones in the presence of matrix to that in the absence of matrix

c) mg/kg air-dry matter

3.6 添加回収試験

2.2 の 2) 及び 3) に従って調製したフェリムゾン Z 体標準原液及び E 体標準原液をアセトンで正確に希釈し添加に用いた。

フェリムゾン Z 体又は E 体として、稲わらに 0.2 及び 20 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 0.2 及び 20 ng/mL），WCRS に原物換算して 0.1 及び 9 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 0.2 及び 20 ng/mL），粳米に 0.2 及び 5 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 0.2 及び 5 ng/mL）になるようにそれぞれ添加してよく混合し、一夜静置した後に本法に従って定量し、平均回収率及び繰返し精度を得た。

なお、WCRS において、添加は風乾物試料に対してフェリムゾン Z 体又は E 体として 0.2 mg/kg 及び 20 mg/kg 相当量になるよう行い、原物中濃度への換算は、原物中及び風乾物中の水分含有量を 60 % 及び 10 % と想定して、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 の式により行った。

結果は Table 7 のとおりであり、フェリムゾン Z 体については平均回収率は 88.9~94.5 %，その繰返し精度は相対標準偏差（RSD_r）として 8.0 % 以下，フェリムゾン E 体については平均回収率は 83.5~90.9 %，その繰返し精度は RSD_r として 7.4 % 以下の成績が得られ、いずれも飼料分析基準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。）に定められた真度及び併行精度の目標値を満たしていた。なお、フェリムゾン Z 体を添加した場合の総フェリムゾンの平均回収率は 92.1~98.6 %，その繰返し精度は RSD_r として 7.1 % 以下，フェリムゾン E 体を添加した場合の総フェリムゾンの平均回収率は 89.2~99.2 %，その繰返し精度は RSD_r として 7.5 % 以下であった。

なお、得られた SRM クロマトグラムの一例を Fig. 5 に示した。

Table 7 Recoveries of (Z)-ferimzone and (E)-ferimzone

Samples	Spiked level (mg/kg)	Spiked components							
		(Z)-Ferimzone				(E)-Ferimzone			
		Recovery of (Z)-ferimzone ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery of ferimzones ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery of (E)-ferimzone ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery of ferimzones ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)
Rice straw	0.2	89.3	8.0	92.1	7.1	89.6	1.8	91.0	3.4
	20	88.9	1.3	92.3	1.6	83.5	2.3	91.5	1.1
WCRS ^{c)}	0.1	94.5	3.7	98.6	4.4	90.9	5.2	99.2	4.3
	9	92.2	2.4	97.2	1.8	84.3	0.7	97.3	0.6
Paddy rice	0.2	90.5	4.6	94.3	5.1	85.4	7.4	89.2	7.5
	5	91.7	1.4	98.4	1.6	88.2	2.0	95.2	2.0

WCRS: whole-crop rice silage

a) Mean ($n = 5$)

b) Relative standard deviation of repeatability

c) The ferimzones were spiked to air-dried WCRS samples one night prior to extraction. The spiked levels were 0.2 and 20 mg/kg air-dry matter for (Z)-ferimzone and (E)-ferimzone, respectively. The levels of ferimzones in original matter were calculated with following equation on the assumption that the moisture content of WCRS samples was 60 % for original matter and 10 % for air-dry matter.

The levels of ferimzones in original matter (moisture 60 %)

= the levels of ferimzones in air-dry matter (moisture 10 %) / 2.25

3.7 定量下限及び検出下限

フェリムゾン Z 体及び E 体の検量線が直線性を示した範囲、各 0.1~50 ng/mL の下端付近となる濃度（稲わら、WCRS（風乾物）及び粳米について 0.2 mg/kg 相当量、最終試料溶液中で 0.2 ng/mL 相当量）の添加回収試験の結果、得られたピークの SN 比が 10 以上であったため、これをフェリムゾン Z 体及び E 体の定量下限の濃度とした。この濃度は、稲わら及び粳米のフェリムゾンの管理基準値（それぞれ 20 及び 5 mg/kg）に対してそれぞれ 1/100 及び 1/25、WCRS のフェリムゾンの管理基準値の風乾物中換算値（20 mg/kg）に対して 1/100 であり、妥当性確認法ガイドラインに定められた目標を満たしていた。なお、Table 7 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の結果は良好であった。

また、本法の検出下限として添加回収試験により得られたピークから SN 比が 3 となる濃度を算出した結果、稲わら、WCRS（風乾物）及び粳米における検出下限は 0.04 mg/kg であった。

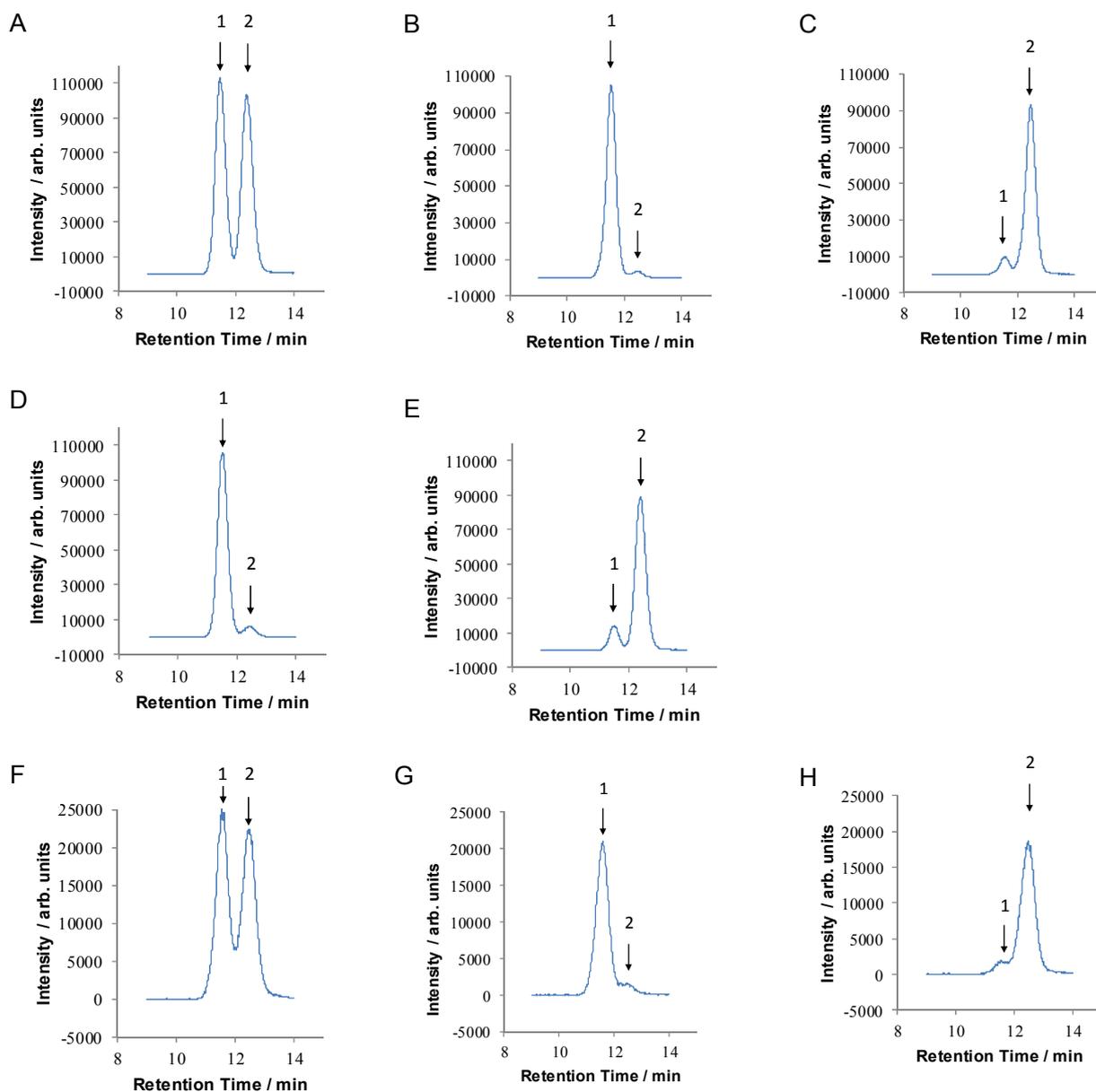


Fig. 5 SRM chromatograms on recovery test

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

- A: Standard solution of (*Z*)-ferimzone and (*E*)-ferimzone (20 ng/mL: 0.1 ng each)
- B: Sample solution of rice straw spiked at 20 mg/kg of (*Z*)-ferimzone (as 20 ng/mL in sample solution)
- C: Sample solution of rice straw spiked at 20 mg/kg of (*E*)-ferimzone (as 20 ng/mL in sample solution)
- D: Sample solution of WCRS spiked at 9 mg/kg original matter of (*Z*)-ferimzone (as 20 ng/mL in sample solution)
- E: Sample solution of WCRS spiked at 9 mg/kg original matter of (*E*)-ferimzone (as 20 ng/mL in sample solution)
- F: Standard solution of (*Z*)-ferimzone and (*E*)-ferimzone (5 ng/mL: 0.025 ng each)
- G: Sample solution of paddy rice spiked at 20 mg/kg of (*Z*)-ferimzone (as 5 ng/mL in sample solution)
- H: Sample solution of paddy rice spiked at 20 mg/kg of (*E*)-ferimzone (as 5 ng/mL in sample solution)

4 まとめ

飼料中に残留するフェリムゾン Z 体及び E 体について、JFRL 法を基に LC-MS/MS 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、遮光条件下で実施すること及びミニカラム処理における溶出溶媒量を 10 mL から 9 mL に変更することで以下の結果が得られた。

1) 検量線はそれぞれ 0.1~50 ng/mL (注入量として 0.0005~0.25 ng 相当量) の範囲で直線性を示した。

なお、当該検量線の濃度範囲は、フェリムゾン Z 体及び E 体としてそれぞれ 0.1~50 mg/kg を含有する分析用試料を本法に従い調製した最終試料溶液中の濃度範囲に相当する。

2) 稲わら、WCRS 及び粃米について、本法に従って得られたクロマトグラムにはフェリムゾン Z 体及び E 体の定量を妨げるピークは認められなかった。

3) 本法に従って得られた試料溶液についてマトリックス効果を確認した結果、フェリムゾン Z 体及び E 体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定量可能であった。

4) フェリムゾン Z 体又は E 体として、稲わらについて 0.2 及び 20 mg/kg, WCRS について原物中濃度に換算して 0.1 及び 9 mg/kg, 粃米について 0.2 及び 5 mg/kg 相当量をそれぞれ添加し、本法に従って 5 点併行分析を実施して回収率及び繰返し精度を求めたところ、良好な結果が得られた。

5) 稲わら、WCRS 風乾物及び粃米について、本法のフェリムゾン Z 体及び E 体の定量下限はそれぞれ 0.2 mg/kg, 検出下限は 0.04 mg/kg であった。

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) 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等分析法開発委託事業 (2009).
- 5) 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).