

技術レポート

3 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

矢野 愛子*, 榊原 良成*

Development of Determination of Hydroxyisoxazol in Rice Straw and Paddy Rice for Feed by LC-MS

Aiko YANO* and Yoshinari SAKAKIBARA*

(* Fukuoka Regional Center, Food and Agricultural Materials Inspection Center)

For determining the concentration of hydroxyisoxazol in rice straw and paddy rice for feed, a quantitative method using liquid chromatograph-electrospray ionization-mass spectrometer (LC-ESI-MS) was developed.

After adding water to a sample, hydroxyisoxazol was extracted with acetone, and the sample solution was filtered. The filtrate was then purified with liquid-liquid extraction, and the purified sample solution was injected into the LC-MS to determine the concentration of hydroxyisoxazol. LC separation was 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, positive mode electrospray ionization (ESI+) was used.

Recovery tests were conducted on rice straw and paddy rice to which hydroxyisoxazol was added intentionally: 0.05 mg/kg and 1 mg/kg for rice straw, and 0.05 mg/kg and 0.5 mg/kg for paddy rice respectively. The mean recoveries of hydroxyisoxazol ranged from 71.4 % to 95.5 %, and the repeatability in the form of relative standard deviation (RSD_r) was less than 11 %.

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

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; 飼料用イネ; 稲わら; 粃米

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¹⁾。国内での初回登録は1969年であり、稲をはじめとして、野菜や花卉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²⁾。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³⁾。

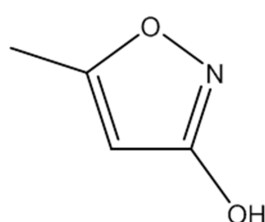
ヒドロキシイソキサゾールの定量法としては、厚生労働省通知試験法として高感度窒素リン検出

* 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

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定量法⁴⁾が定められている。また，環境省の排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。）を用いる定量法⁵⁾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定量法については飼料分析基準⁶⁾に記載されておらず，分析法の確立が急務となっている。

今回，「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⁷⁾（以下「JFRL 法」という。）をもとに，飼料用イネ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飼料分析基準への適用の可否を検討したので，その概要を報告する。

参考にヒドロキシイソキサゾールの構造式等を Fig. 1 に示した。



5-Methylisoxazol-3-ol

C₄H₅NO₂ MW: 99.1 CAS No.: 10004-44-1

Fig. 1 Chemical structure of hydroxyisoxazol

2 実験方法

2.1 試料

稲わら及び籾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。稲発酵粗飼料は 60 °C で 10 時間乾燥後，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，ジエチルエーテル及びヘキサンは残留農薬・PCB 試験用を用いた。メタノール及びギ酸は液体クロマトグラフ用（和光純薬工業製）を用いた。硫酸ナトリウム，塩化ナトリウム，炭酸水素ナトリウムは試薬特級を用いた。6 mol/L 塩酸は容量分析用（和光純薬工業製）を用いた。水は Ultra Pure Water System RFU354BA（東洋製作所製）により精製した超純水（JIS K0211 の 5218 に定義された超純水）を用いた。

2) 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 を含有する。）。

使用に際して，ヒドロキシイソキサゾール標準原液の一定量を水で正確に希釈し，1 mL 中にヒドロキシイソキサゾールとしてそれぞれ 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 200, 300 及び 400 ng を含有する各標準液を調製した。

2.3 装置及び器具

1) 粉砕機 :

粉砕機 1 (稲わら及び稲発酵粗飼料用) : SM-100 Retsch 製 (目開き 1 mm スクリーン, 回転数 (仕様) 1690 rpm)

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

2) 振とう機 : レシプロシェーカー SR-2DW タイテック製 (使用時振とう数 280 rpm)

3) ガラス繊維ろ紙 : GFP-95 桐山製作所製

4) pH 試験紙 : アズワン販売

5) メンブランフィルター : DISMIC-25HP (孔径 0.45 μm , 直径 25 mm, 親水性 PTFE) 東洋ろ紙製

6) LC-MS :

LC 部 : Prominence 島津製作所製

MS 部 : LCMS-2010EV 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, 抽出液をガラス繊維ろ紙で吸引ろ過した後, 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 20 mL を 50 mL のなす形フラスコに正確に入れ, 40 $^{\circ}\text{C}$ 以下の水浴で約 3 mL (粳米は約 2 mL) まで減圧濃縮し, ヘキサン洗浄に供する試料溶液とした.

2) ヘキサン洗浄

試料溶液を 2 %炭酸水素ナトリウム溶液 40 mL 及びヘキサン 40 mL を用いて, あらかじめ塩化ナトリウム 5 g を入れた 300 mL の分液漏斗 A に移した. 5 分間振り混ぜた後, 静置し, 水層 (下層) を別の 300 mL の分液漏斗 B に移した.

3) ジエチルエーテルによる精製

6 mol/L 塩酸を用いて分液漏斗 B に移した水層の pH を 2 以下に調整した後, ジエチルエーテル 100 mL を加えた. 5 分間振り混ぜた後, 静置し, 水層 (下層) を更に別の 300 mL の分液漏斗 C に移し, ジエチルエーテル層 (上層) は 300 mL の三角フラスコに入れた. ジエチルエーテル 50 mL を分液漏斗 C に加えて同様の操作を行い, ジエチルエーテル層 (上層) を合わせた. 適量の硫酸ナトリウムを加えてときどき振り混ぜながら 15 分間程度静置した後, ろ紙 (5 種 A) で 300 mL のなす形フラスコにろ過した. 300 mL の三角フラスコ及び硫酸ナトリウムを順次ジエチルエーテル 30 mL で洗浄し洗液を合わせた. 水 2 mL を加え 40 $^{\circ}\text{C}$ 以下の水浴で減圧濃縮した後, 窒素ガスを送ってジエチルエーテルを除去した. 残留物を水を用いて 5 mL の全量フラスコに移し, 更に標線まで水を加えた. この液の一定量をメンブランフィルターでろ過し, LC-MS による測定に供する試料溶液とした.

4) LC-MS による測定

試料溶液及び各ヒドロキシイソキサゾール標準液各 10 μL を LC-MS に注入し, 選択イオン

検出 (SIM) 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 LC-MS

Column	MSPak GF-310 4D (4.6 mm i.d. × 150 mm, 5 μm), Showa Denko
Mobile phase	0.1 v/v% formic acid solution-methanol (6:4)
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)
CDL temperature	250 °C
Heat block temperature	200 °C
Monitor ion	<i>m/z</i> 100

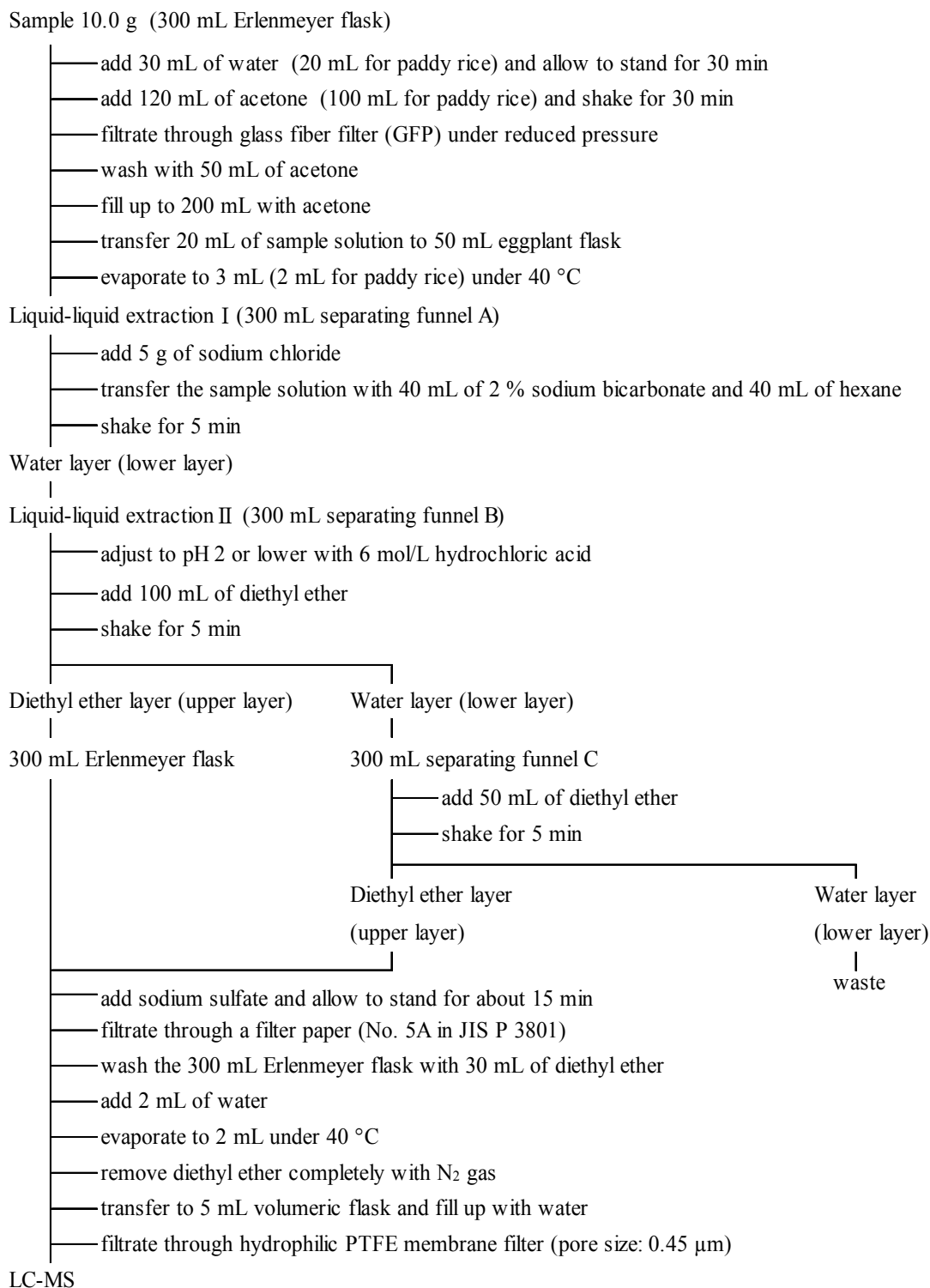
5) 計 算

得られた SIM 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、試料中のヒドロキシイソキサゾール量を算出した。

なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。

2.5 親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC) カラムを用いた定量方法

分析試料 10.0 g を量り、2.4 の 1)から 2)に従って試料溶液を調製した後、3) に従って操作し、ろ過後の 300 mL のなす形フラスコに水 1.5 mL を加えた。40 °C 以下の水浴で減圧濃縮した後、窒素ガスを送ってジエチルエーテルを除去した。残留物を水 0.5 mL を用いてあらかじめ 3 mL のアセトニトリルを入れた 5 mL の全量フラスコに移し定容した。この液の一定量をメンブランフィルターでろ過し、LC-MS による測定に供する試料溶液とした。LC-MS による測定では、HILIC カラムを用いて HILIC の移動相条件により、2.4 の 4)から 5)に従って定量した。



Scheme 1 Analytical procedure for hydroxyisoxazol in rice straw and paddy rice

3 結果及び考察

3.1 予備検討

ヒドロキシイソキサゾールは蒸気圧が高い¹⁾ため揮発しやすく、試料調製時の予備乾燥等の条件 (60 °C 以下, 乾燥するまで静置) によって揮発し含有量が減衰する可能性が考えられた。そのため、稲わらにヒドロキシイソキサゾールとして 1 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 200

ng/mL) を添加後よく混合し、常温及び 60 °C で一夜静置した後、本法に従って添加回収試験を実施した。また、対照試験として稲わらにヒドロキシイソキサゾールを同様に添加後よく混合した後、速やかに添加回収試験を実施した。その結果、Table 2 のとおり、ヒドロキシイソキサゾールは常温及び 60 °C の一夜静置でそれぞれ減衰することが認められたため、ヒドロキシイソキサゾールは添加回収試験の直前に添加することにした。また、ヒドロキシイソキサゾールは 60 °C で著しく減衰したため、分析用試料の調製に当たって予備乾燥が必要な稲発酵粗飼料については本検討の対象から除外した。

Table 2 Recoveries of hydroxyisoxazol from rice straw

Spiked level (mg/kg)	Conditions after the spike with hydroxyisoxazol		
	Room temperature ^{b)}	Room temperature, overnight ^{c)}	60 °C, overnight ^{c)}
	Recovery ^{a)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	Recovery ^{a)} (%)
1	71.4	48.4	10.5
	79.3	44.8	11.8

a) Two times trial

b) Hydroxyisoxazol was extracted soon after the spike at room temperature.

c) Rice straw sample spiked with hydroxyisoxazol was allowed to stand overnight at room temperature or 60 °C.

また、JFRL 法の LC-MS による測定で用いられたカラムは、ゲル濾過クロマトグラフィー用であり汎用性が低いため、極性化合物の分離に適するとされる HILIC カラム 3 種類の使用を試みた。ZIC-HILIC (Merck 製) カラム及び YMC-Triart Diol-HILIC (ワイエムシイ製) カラムについては、ヒドロキシイソキサゾールは保持が弱く、面積値として 100 倍以上にもなる巨大な妨害ピークと重なったため分離も難しく、定量できなかった。YMC-Pack Diol-60-NP (ワイエムシイ製) カラムはヒドロキシイソキサゾールを定量可能であったが、稲わらを用いて予備的に添加回収試験を実施したところ添加回収率の著しい低下がみられた (16 及び 19 %)。妨害成分によるマトリックス抑制によるものと考えられたことから、移動相条件を変更して妨害成分と分離することを検討したが、添加回収率の大きな改善は見られなかった。以上のことから、カラムの変更は行わないことにした。なお、YMC-Pack Diol-60-NP カラムを用い、妨害成分との分離検討前の移動相条件により得られた SIM クロマトグラムの一例を Fig. 2 に示した。

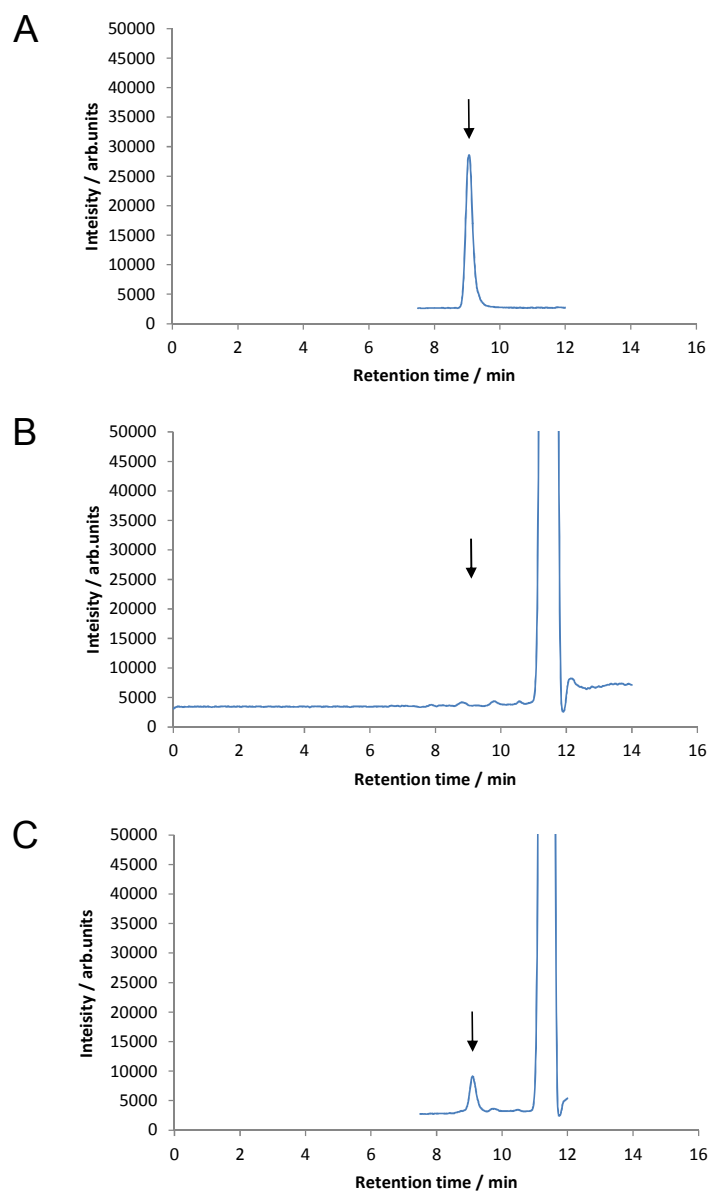


Fig. 2 Selected ion monitoring (SIM) chromatograms of hydroxyisoxazol standard solution and blank sample solution on HILIC column study

(LC-MS conditions except for column and mobile phase are shown in Table 1. Arrows indicate the retention time of hydroxyisoxazol.)

Column; YMC-Pack Diol-60-NP (4.6 mm i.d. × 150 mm, 5 μm), YMC,

Mobile phase; 0.1 v/v% formic acid solution-acetonitrile (1:9) → 7 min → (9:1) (hold for 5 min) → 18 min → (1:9) (hold for 30 min)

A: Standard solution (200 ng/mL of hydroxyisoxazol)

B: Blank sample solution of rice straw

C: Sample solution of rice straw (spiked at 1 mg/kg of hydroxyisoxazol (as 200 ng/mL in the sample solution))

3.2 検量線

2.2 の 2)により調製した各ヒドロキシイソキサゾール標準液各 10 μL を LC-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高さを用いて検量線を作成した。

得られた検量線の一例は Fig. 3 のとおりであり，各 5~400 ng/mL（注入量として 0.05~4 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，ヒドロキシイソキサゾールとして 0.025~2 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。

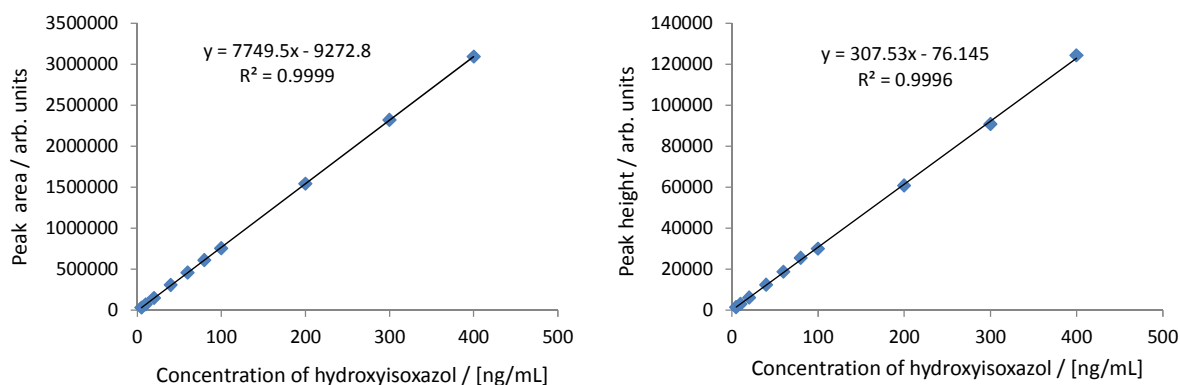


Fig. 3 Calibration curves of hydroxyisoxazol by peak area (left) and peak height (right)

3.3 ヘキサン及びジエチルエーテルへの転溶の確認

2%炭酸水素ナトリウム溶液 40 mL にヒドロキシイソキサゾール 1 μg を添加し，2.4 の 2)及び 3)によりヒドロキシイソキサゾールのヘキサン及びジエチルエーテルへの転溶を確認した。その結果，Table 3 に示す回収率のとおり，ヒドロキシイソキサゾールはアルカリ性下でヘキサンに転溶せず，酸性下でジエチルエーテル 150 mL により回収できることが確認できた。

Table 3 Extraction pattern of hydroxyisoxazol

Pesticide	Recovery (%)				Total
	Hexane		Diethyl ether		
	40 mL	100 mL	50 mL	50 mL	
Hydroxyisoxazol	0	81	11	0	92

n = 1

3.4 妨害物質の検討

稲わら 4 検体及び籾米 3 検体を試料として，2.4 により調製した試料溶液を LC-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ヒドロキシイソキサゾールの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. 4 に示した。

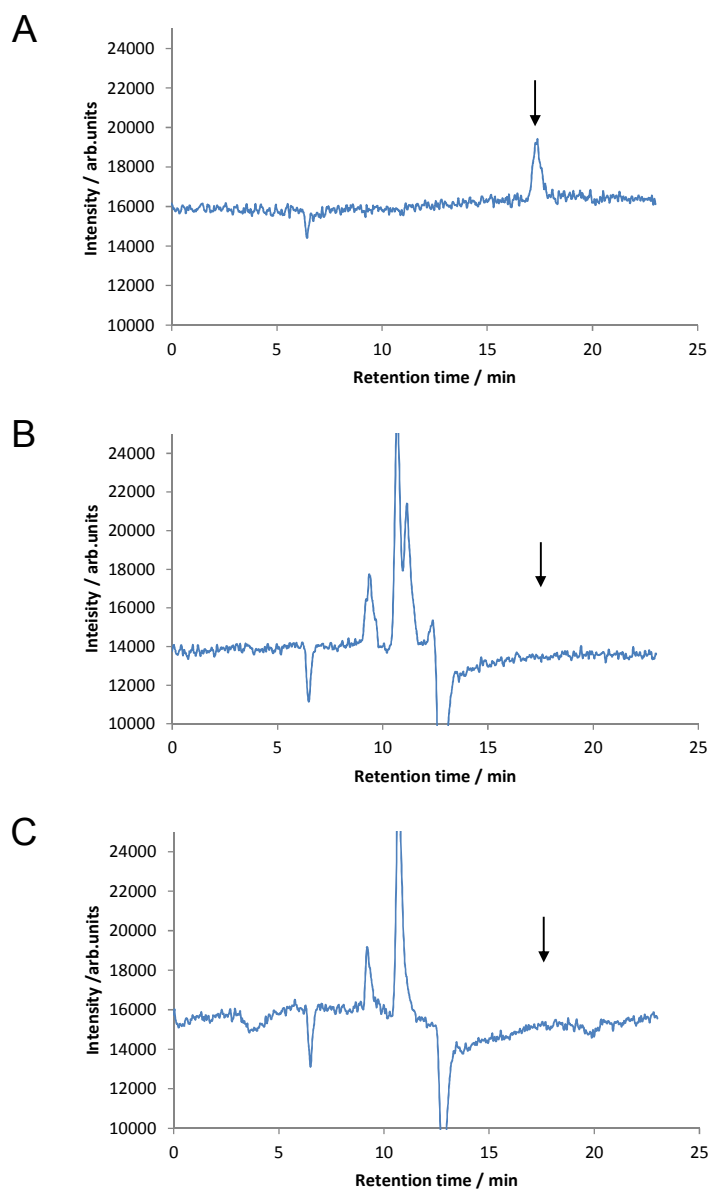


Fig. 4 SIM chromatograms of standard and blank sample solutions (LC-MS conditions are shown in Table 1. Arrows indicate the retention time of hydroxyisoxazol.)

A: Standard solution (10 ng/mL of hydroxyisoxazol)

B: Blank sample solution of rice straw

C: Blank sample solution of paddy rice

3.5 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及び粳米のブランク試料溶液にヒドロキシイソキサゾールとして1及び0.5 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で200及び100 ng/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 2)に従って調製したヒドロキシイソキサゾール標準液に対するピーク面積比を確認した。その結果、Table 4 のとおりヒドロキシイソキサゾールはマトリックスによる大きな影響なく測定が可能であった。

Table 4 Results of matrix effect

Matrix	Concentration of hydroxyisoxazol		Matrix effect ^{b)} (%)
	in the matrix standard solution (ng/mL)	in the sample ^{a)} (mg/kg)	
Rice straw	200	1	84
Paddy rice	100	0.5	93

$n = 1$

a) Converted from the concentration in the matrix standard solution

b) Ratio of the peak area of hydroxyisoxazol in the presence of matrix to that in the absence of matrix

3.6 添加回収試験

2.2 の 2)に従って調製したヒドロキシイソキサゾール標準原液を水で正確に希釈し添加に用いた。

ヒドロキシイソキサゾールとして稲わらに 0.05 及び 1 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 10 及び 200 ng/mL），籾米に 0.05 及び 0.5 mg/kg 相当量（最終試料溶液中で 10 及び 100 ng/mL）になるようにそれぞれ添加してよく混合した後，速やかに本法に従って定量し，平均回収率及び繰返し精度を求めた。

その結果は Table 5 のとおり，平均回収率は 71.4~95.5 %，その繰返し精度は相対標準偏差（RSD_r）として 11 %以下の成績が得られ，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，得られた SIM クロマトグラムの一例を Fig. 5 に示した。

Table 5 Recoveries for hydroxyisoxazol

Spiked level (mg/kg)	Sample types							
	Rice straw 1		Rice straw 2		Paddy rice 1		Paddy rice 2	
	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)
0.05	89.7	4.7	78.7	9.6	86.9	2.9	94.1	7.2
0.5	—	—	—	—	95.5	9.8	82.2	7.6
1	71.4	9.9	80.0	11	—	—	—	—

—: Not tested

a) Mean ($n = 5$)

b) Relative standard deviation of repeatability

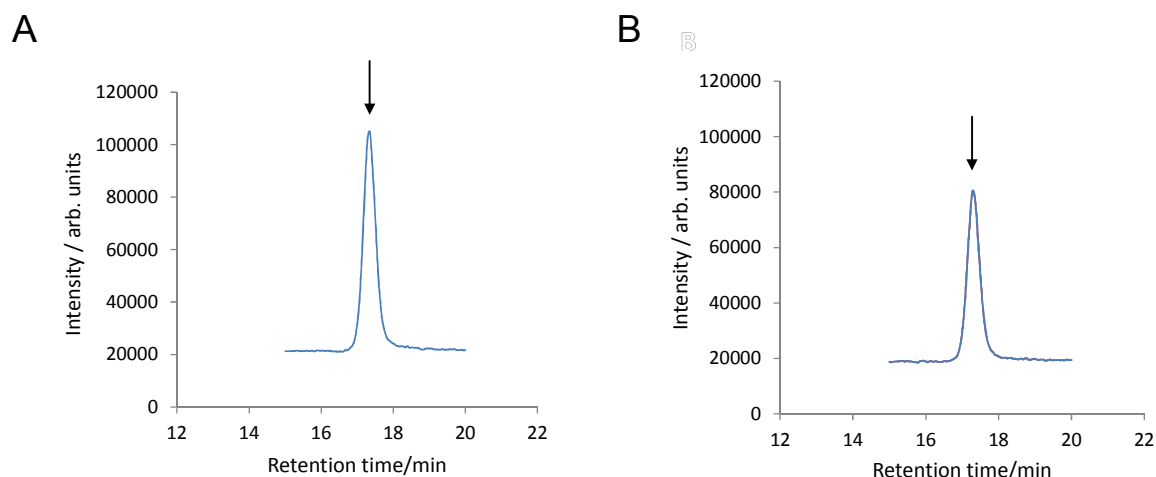


Fig. 5 SIM chromatograms on recovery test

(LC-MS conditions are shown in Table 1. Arrows indicate the peak of hydroxyisoxazol.)

A: Standard solution (200 ng/mL: 2 ng as hydroxyisoxazol)

B: Sample solution of rice straw (spiked at 1 mg/kg of hydroxyisoxazol (as 200 ng/mL in the sample solution))

3.7 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、稲わら及び粃米にヒドロキシイソキサゾールを添加し、添加回収試験により得られるピークの SN 比が 10 及び 3 となる濃度を求めた。

その結果、 SN 比が 10 及び 3 となる濃度は、0.05 mg/kg 及び 0.02 mg/kg であったため、この濃度を定量下限及び検出下限とした。この濃度は稲わらの管理基準値 1 mg/kg に対して 1/20 及び 1/50、粃米の管理基準値 0.5 mg/kg に対して 1/10 及び 1/25 であり、妥当性確認法ガイドラインに定められた基準値に対する定量下限及び検出下限の目標値を満たした。

なお、Table 5 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。

4 まとめ

飼料用稲わら、粃米及び稲発酵粗飼料中のヒドロキシイソキサゾールについて、JFRL 法をもとに、LC-MS による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、以下の結果を得た。

- 1) ヒドロキシイソキサゾールは試料調製時の予備乾燥条件により著しく減衰したため、稲発酵粗飼料については本検討の対象から除外した。
- 2) 検量線は 5~400 ng/mL 相当量（注入量として 0.05~4 ng 相当量）の範囲で直線性を示した。
- 3) 本法に従って得られた SIM クロマトグラムでは、2 種類の飼料原料（稲わら及び粃米）において定量を妨げるピークは認められなかった。
- 4) 稲わら及び粃米を用いて本法に従い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、ヒドロキシイソキサゾール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。
- 5) ヒドロキシイソキサゾールとして稲わらに 0.05 及び 1 mg/kg 相当量、粃米に 0.05 及び 0.5 mg/kg 相当量を添加した試料について本法に従って 5 点併行分析を実施し、平均回収率及び併行

精度を求めたところ、平均回収率は 71.4~95.5 %，その併行精度は相対標準偏差 (RSD_r) として 11 %以下の成績が得られ，妥当性確認法ガイドラインに定められた目標値を満たした。

- 6) 本法によるヒドロキシイソキサゾールの定量下限は 0.05 mg/kg，検出下限は 0.02 mg/kg であり，妥当性確認法ガイドラインに定められた目標値を満たした。

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).