

4 稲発酵粗飼料及び粃米中のオキシリニック酸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

牧野 大作*, 三井 友紀子*, 大谷 俊子*

Determination of Oxolinic Acid in Whole-crop Rice Silage and Paddy Rice for Feed by LC-MS/MS

Daisaku MAKINO*, Yukiko MITSUI* and Toshiko OTANI*

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

An analytical method was developed to determine the level of oxolinic acid in whole-crop rice silage and paddy rice for feed using liquid chromatograph-tandem mass spectrometer (LC-MS/MS).

After adding water to the samples, oxolinic acid was extracted with 0.2 w/v% metaphosphoric acid solution-acetonitrile (3:2). The extract was purified with Oasis HLB (Waters; Milford, MA, USA) and injected into the LC-MS/MS. LC separation was carried out on an ODS column (Inertsil ODS-4, 3.0 mm i.d. × 150 mm, 3 μm from GL Sciences Inc.; Tokyo, Japan) using 0.1 v/v% formic acid solution-acetonitrile as a mobile phase. In the MS/MS analysis, positive mode electrospray ionization (ESI+) was used.

Spike tests were conducted on feed ingredients spiked with oxolinic acid at the levels of 0.1 or 0.01 mg/kg (whole-crop rice silage), and 3, 0.3 or 0.01 mg/kg (paddy rice). The resulting mean recoveries ranged from 83.9 to 101 % and the repeatability in terms of relative standard deviations (RSD_r) was not more than 6.4 %.

A collaborative study was conducted in nine laboratories using whole-crop rice silage and paddy rice spiked with 0.1 and 3 mg/kg of oxolinic acid, respectively. The mean recovery, repeatability and reproducibility in terms of relative standard deviations (RSD_r and RSD_R) and HorRat, respectively, were 89.4 %, 2.9 %, 9.2 % and 0.42 for whole-crop rice silage and 92.6 %, 4.8 %, 6.3 % and 0.46 for paddy rice.

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

Key words: oxolinic acid; liquid chromatograph-tandem mass spectrometer (LC-MS/MS); electrospray ionization (ESI); whole-crop rice silage; paddy rice; collaborative study

キーワード：オキシリニック酸；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；稲発酵粗飼料；粃米；共同試験

1 緒 言

オキシリニック酸（オキシリン酸）は 1976 年に住友化学株式会社により開発されたキノリン骨格を有する殺菌剤（抗菌剤）である¹⁾。農薬としての有効成分の一般名はオキシリニック酸とされており¹⁾、我が国では、飼料の有害物質の指導基準において、その基準値は、稲わら中で 10 mg/kg、稲発酵粗飼料（以下「WCS」という。）中で 0.1 mg/kg、粃米中で 3 mg/kg と設定されている²⁾。また、食品では米、野菜、果実、食肉等に残留基準値が定められており、玄米中で 0.3 ppm と設定

* 独立行政法人農林水産消費安全技術センター名古屋センター

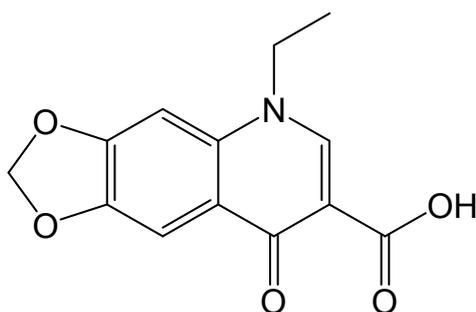
されている³⁾。

また、オキシリニック酸は農薬以外に動物用医薬品としても使用されており、この場合、動物医薬品の有効成分名としてはオキシリン酸とされている⁴⁾。

飼料中の定量法としては、杉本らが検討した蛍光検出器付き液体クロマトグラフ（以下「LC-FL」という。）によるオキシリン酸及びフルメキンの同時定量法⁵⁾が既に飼料分析基準⁶⁾に記載されているが、この方法は、配合飼料及び魚粉を対象とした抗菌剤の残留試験法として開発しており、その定量限界は0.5 mg/kgと高く、飼料用イネ（稲わら、WCS及び粃米）に適用できる農薬としてのオキシリニック酸の分析法の開発が急務であった。一方、食品中の定量法としては、LC-FL、液体クロマトグラフ質量分析計等による農作物を対象とした個別試験法及び畜水産物を対象とした一斉試験法が厚生労働省通知⁷⁾に示されている。

今回、一般財団法人日本食品分析センターが「平成22年度飼料中の有害物質等分析法開発事業」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⁸⁾（以下「JFRL法」という。）について、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。

参考にオキシリニック酸の構造式等を Fig. 1 に示した。



5-ethyl-5,8-dihydro-8-oxo-1,3-dioxolo(4,5-g)quinoline-7-carboxylic acid

C₁₃H₁₁NO₅ MW: 261.2 CAS No.: 14698-29-4

Fig. 1 Chemical structure of oxolinic acid

2 実験方法

2.1 試料

稲わら及び粃米はそれぞれ1 mmの網ふるいを通過するまで粉砕した。WCSは60℃で5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。

2.2 試薬

1) アセトニトリルは、抽出及び精製操作には残留農薬・PCB試験用を、溶離液には液体クロマトグラフ用を用いた。メタノールは液体クロマトグラフ用を用いた。水は超純水（JIS K 0211に定める5218の超純水）を用いた。その他、特記している以外の試薬は特級を用いた。

2) オキシリニック酸標準液

オキシリニック酸標準品（和光純薬工業製、純度99.9%）10 mgを正確に量って100 mLの褐色全量フラスコに入れ、水酸化ナトリウム溶液（0.1 mol/L）1 mL及び水-メタノール（1+1）

約 50 mL を加えた。超音波処理してオキシリニック酸を溶かし、更に標線まで水-メタノール (1+1) を加えてオキシリニック酸標準原液を調製した (この液 1 mL は、オキシリニック酸として 0.1 mg ($f=0.999$) を含有する。)

使用に際して、標準原液の一定量を、水-メタノール (7+3) で正確に希釈し、1 mL 中にオキシリニック酸としてそれぞれ 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20 及び 50 ng を含有する各オキシリニック酸標準液を調製した。

2.3 装置及び器具

- 1) 粉碎機 : ZM-100 Retsch 製 (1 mm スクリーン, 回転数 10000 rpm)
- 2) 乾牧草用粉碎機 : SM-100 Retsch 製 (1 mm スクリーン, 回転数 1690 rpm)
- 3) ガラス繊維ろ紙 : GFP-95 桐山製作所製
- 4) ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム : Oasis HLB カートリッジ (充てん剤量 200 mg, リザーバー容量 6 mL) Waters 製
- 5) LC-MS/MS :
 LC 部 : ACQUITY UPLC System Waters 製
 MS 部 : ACQUITY TQ Detector Waters 製

2.4 定量方法

定量操作は、遮光した状態で行った。

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 (粳米は 20 mL) を加え 30 分間静置した後、更に 0.2 w/v%メタリン酸溶液-アセトニトリル (3+2) 120 mL (粳米は 100 mL) を加え、30 分間振り混ぜて (250 rpm) 抽出した。200 mL の褐色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 0.2 w/v%メタリン酸溶液-アセトニトリル (3+2) 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 0.2 w/v%メタリン酸溶液-アセトニトリル (3+2) を加えた。この液の一定量を 0.2 w/v%メタリン酸溶液-アセトニトリル (3+2) で正確に 10 倍希釈した後、希釈液 4 mL を 50 mL のなす形フラスコに正確に入れ、水 10 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

ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムをアセトニトリル 10 mL 及び水 10 mL で順次洗浄した。試料溶液をミニカラムに入れ、流速 1~2 mL/min 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。更に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、液面が充てん剤の上端に達するまで流出させた。50 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き、水-アセトニトリル (4+1) 20 mL をミニカラムに加えてオキシリニック酸を溶出させた。溶出液を 50 °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。水-メタノール (7+3) 2 mL を正確に加えて残留物を溶かし、5000×g で 5 分間遠心分離した後、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

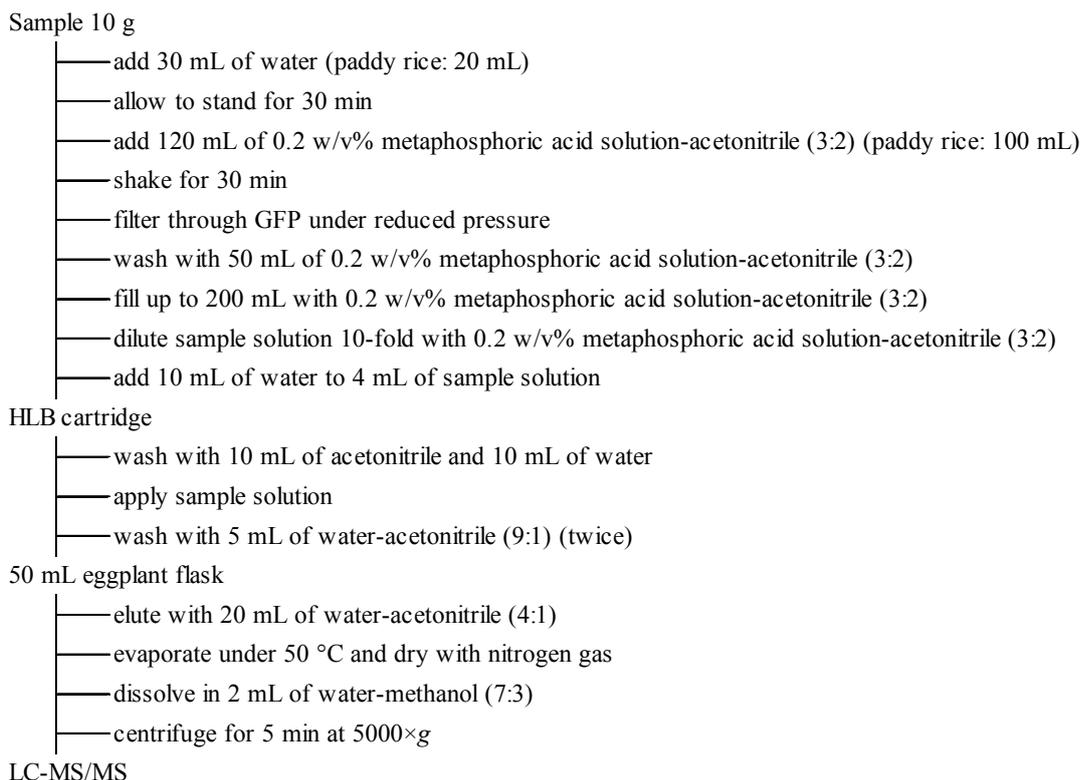
Column	Inertsil ODS-4 (3.0 mm i.d. × 150 mm, 3 μm), GL Sciences
Mobile phase	0.1 v/v% Formic acid solution - acetonitrile (7:3) (hold for 19 min) → 1 min → (5:95) (hold for 5 min) → 1 min → (7:3) (hold for 5 min)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temperature	40 °C
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Mode	Positive
Ion source temperature	120 °C
Desolvation gas	N ₂ , 350 °C, 800 L/h
Cone gas	N ₂ , 50 L/h
Capillary voltage	2 kV

Table 2 MS/MS parameters

Target	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion (<i>m/z</i>)	Qualifier ion (<i>m/z</i>)	Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
Oxolinic acid	262	244	-	30	15
		-	216	30	25

4) 計 算

得られた SRM クロマトグラムからピーク面積を求めて検量線を作成し、試料中のオキシリニック酸量を算出した。なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。



Scheme 1 Analytical procedure for oxolinic acid in whole-crop rice silage and paddy rice for feed (analyzed under the shading condition)

2.5 JFRL法の飼料分析基準への適用の可否の検討方法

稲わら及び粳米にオキシリニック酸としてそれぞれ1及び0.3 mg/kg相当量を添加した試料並びにWCSに原物換算して0.1 mg/kg相当量を添加した試料を用いて、JFRL法に従って定量を行った。また、WCS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。なお、この換算については2.6、2.7、3.6、3.8及び3.10でも同様とした。

2.6 希釈操作及び遮光の有効性の検討方法

稲わら及び粳米にオキシリニック酸としてそれぞれ1及び0.3 mg/kg相当量を添加した試料及びWCSに原物換算して0.1 mg/kg相当量を添加した試料を用いて添加回収試験を実施した。

定量方法としてJFRL法及びJFRL法で吸引る過後、全量フラスコの標線まで0.2 w/v%メタリン酸溶液－アセトニトリル（3+2）を加え調製した試料溶液について、その一定量を0.2 w/v%メタリン酸溶液－アセトニトリル（3+2）で正確に10倍希釈する操作を追加して以降の操作を行い、定量を行った方法について比較検討を行った。

また、前述の2法について、遮光で定量操作を行った場合も検討した。

2.7 モニターイオンの検討方法

WCSにオキシリニック酸として原物換算して0.1及び0.01 mg/kg相当量及び粳米に3及び0.3 mg/kg相当量を添加した試料を用いて、2.4に従って定量した。この際に2.4に記載のm/z 244で定量した結果と、JFRL法に記載のm/z 216で定量した結果を比較検討した。

2.8 ジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムからの溶出画分の確認方法

粃米を用い、2.4 の 1)により得られた抽出精製液にオキシリニック酸として 3 mg/kg 相当量を添加し、2.4 の 2)のカラム処理に供する試料溶液を調製した。その後、本法により操作した後、各溶出画分における回収率を確認した。

3 結果及び考察

3.1 LC-MS/MS 測定条件について

JFRL 法の液体クロマトグラフ条件は 0.1 v/v%ギ酸溶液-アセトニトリル (7+3) のイソクラティック溶出であるが、夾雑成分からの影響を受けにくくすることを意図して、目的成分溶出後にグラジェント溶出でカラムを洗浄することにした。

また、質量分析条件については、コーン電圧及びコリジョンエネルギーを当試験室で使用した機種に最適化した。

3.2 検量線

2.2 の 2)により調製したオキシリニック酸標準液各 5 μ L を LC-MSMS に注入し、得られた SRM クロマトグラムからピーク面積を用いて検量線を作成した。その結果、Fig. 2 のとおり、オキシリニック酸は 0.1~50 ng/mL 相当量（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。

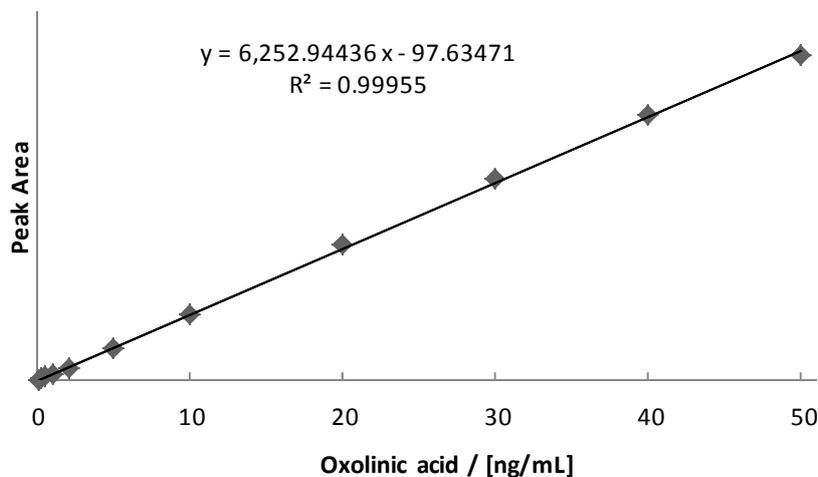


Fig. 2 Calibration curve of oxolinic acid by peak areas

3.3 JFRL 法の飼料分析基準への適用の可否の検討

JFRL 法が飼料分析基準に適用できるか 2.5 により検討した。

その結果は Table 3 のとおりであり、稲わら及び WCS で良好な回収率が得られなかったため、JFRL 法をそのまま適用するのは難しいと考えられた。

Table 3 Recoveries of oxolinic acid by JFRL method

Rice straw		Whole-crop rice silage		Paddy rice	
Recovery (%)		Recovery (%)		Recovery (%)	
run1	run2	run1	run2	run1	run2
49.2	28.0	48.0	67.6	73.0	99.1

3.4 JFRL 法の改良の検討

1) 希釈操作及び遮光の有効性の検討

JFRL 法をそのまま飼料分析基準に適用することは難しかったため、その改良を検討した。

筆者らが実施した他の農薬の検討⁹⁾において、夾雑成分に由来するイオン化の阻害が疑われたために希釈を検討し、試料溶液を 10 倍希釈することにより改善が認められた事例があった。そこで今回もこの例を参考に、2.6 に記載のとおり JFRL 法と JFRL 法に 10 倍希釈操作を追加した方法を比較することにより希釈操作の有効性を検討した。

また、オキシロニック酸の水中光分解半減期は、最も短い条件では 2.31 日¹⁾とされており、このことから、オキシロニック酸は、分析操作中にも若干の低下が認められるおそれがあると考えられた。そこで、遮光条件下での分析操作の有効性を検討するために、昼光の入る試験室において蛍光灯をつけた場合を通常の遮光していない条件、昼光が入らないようにした試験室において紫外線を除去した照明をつけた場合を遮光した条件として、2.6 に記載のとおり前述の 2 法を共に遮光条件下で操作し、その有効性を検討した。

すなわち、今回はこの希釈操作の有無及び遮光の有無の 4 法の組み合わせで操作を実施し、最適な操作条件を比較検討することとした。

その結果は Table 4 のとおりであり、JFRL 法の抽出液を 10 倍希釈することによりマトリックスの影響によるイオン化抑制が低減されたこと及び遮光の効果により回収率等が改善されたと考えられた。よって JFRL 法に対して抽出液を 10 倍希釈する操作及び遮光条件下の定量操作を追加して以降の検討を行うことにした。

なお、稲わらについては、改善されたがその回収率は低回収率傾向であり、更なる検討を要することから、今回は本法の適用対象外とすることにした。

Table 4 Effects of dilution of extract and room lighting on recovery tests

Conditions of room lighting and dilution	Rice straw		Whole-crop rice silage		Paddy rice	
	Recovery (%)		Recovery (%)		Recovery (%)	
	run1	run2	run1	run2	run1	run2
no shading ^{a)} , no dilution	49.2	28.0	48.0	67.6	73.0	99.1
no shading ^{a)} , dilution	66.5	38.0	74.2	75.0	79.7	92.3
shading ^{b)} , no dilution	35.1	46.3	67.7	58.5	96.6	79.4
shading ^{b)} , dilution	72.4	59.1	93.7	82.2	92.3	79.0

- a) Conducted under the fluorescent lighting, in a laboratory that daylight enters through windows
- b) Conducted under the lighting having been removed ultraviolet rays, in a laboratory that daylight doesn't enter

2) モニターイオンの検討

JFRL 法は分析対象を飼料全般としたため、近接妨害ピークのない m/z 216 が採用されている。しかし、本検討の分析対象は WCS 及び粳米の 2 種類であり、このマトリックスでは妨害がない可能性があること、WCS の基準値相当量の 1/10 の濃度を測定するには m/z 216 では感度が不足することが想定されたことから、モニターイオンとして最も感度が良かった m/z 244 が採用できないか 2.7 により比較検討を行った。

その結果、Table 5 のとおり、 m/z 216 と 244 ではほぼ同等の結果が得られた。しかし、 m/z 216 では WCS について基準値の 1/10 の濃度が感度不足のため測定不可能であった。よって以降の検討はモニターイオン m/z 244 で定量を行うことにした。

また妨害を妨げるピークは 3.7 に記載のとおり認められなかった。

Table 5 Comparison of product ions

Spiked level (mg/kg)	Whole-crop rice silage				Paddy rice			
	m/z 216		m/z 244		m/z 216		m/z 244	
	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)
3	-	-	-	-	90.5	3.0	90.6	2.8
0.3	-	-	-	-	94.5	2.6	92.4	4.2
0.1	87.6	1.9	90.1	1.1	-	-	-	-
0.01	ND	-	95.5	3.4	-	-	-	-

a) Mean ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

3.5 ジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムからの溶出画分の確認

JFRL 法に改良を行ったことから、カラム処理の溶出画分にずれが生じていないか確認するために、2.8 によりカラム処理の溶出画分を確認した。

その結果、Table 6 のとおり、オキシロニック酸は水-アセトニトリル (4+1) 5~20 mL で溶出し、その他の画分には溶出は認められなかった。このことから、JFRL 法と同様に水-アセトニトリル (4+1) 20 mL で溶出させることにした。

Table 6 Elution pattern of oxolinic acid from Oasis HLB

Fraction volume (mL)	Water-acetonitrile (9:1)		Water-acetonitrile (4:1)				Total	
	0-5	5-10	0-5	5-10	10-15	15-20		20-25
Recovery (%) ^{a)}	0	0	0	24.5	68.3	7.3	0	100

a) $n=1$

3.6 マトリックス効果の確認

2.4 の 1)及び 2)により調製した WCS のブランク試料溶液にオキシロニック酸として原物換算して 0.1 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 2.25 ng/mL 相当量) 及び粳米のブランク試料溶液に 0.3 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 3 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)に従って調製した同濃度のオキシロニック酸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 96.2~105 %であり、オキシロニック酸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。

3.7 妨害物質の検討

WCS 3 検体及び籾米 3 検体を用い、本法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. 3 に示した。

3.8 添加回収試験

WCS (2 検体) にオキシリニック酸として原物換算してそれぞれ 0.1 及び 0.01 mg/kg 相当量 (最終試料溶液で 2.25 及び 0.225 ng/mL 相当量), 籾米 (2 検体) に 3, 0.3 及び 0.01 mg/kg 相当量 (最終試料溶液で 30, 3 及び 0.1 ng/mL 相当量) を添加した試料を用い、本法により 3 点併行で定量し、回収率及び繰返し精度を求めた。

その結果は Table 7 のとおり、平均回収率及びその繰返し精度は相対標準偏差 (RSD_r) として WCS では 90.1~101 % 及び 4.8 % 以下, 籾米では 83.9~95.5 % 及び 6.4 % 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. 3 に示した。

Table 7 Recoveries for oxolinic acid

Spiked level (mg/kg)	Feed types							
	Whole-crop rice silage 1		Whole-crop rice silage 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)} (%)
3	-	-	-	-	90.6	2.8	95.5	0.4
0.3	-	-	-	-	92.4	4.2	93.5	3.0
0.1	90.1	1.1	92.7	0.8	-	-	-	-
0.01	95.5	3.4	101	4.8	83.9	6.4	93.7	5.6

a) Mean (n=3)

b) Relative standard deviation of repeatability

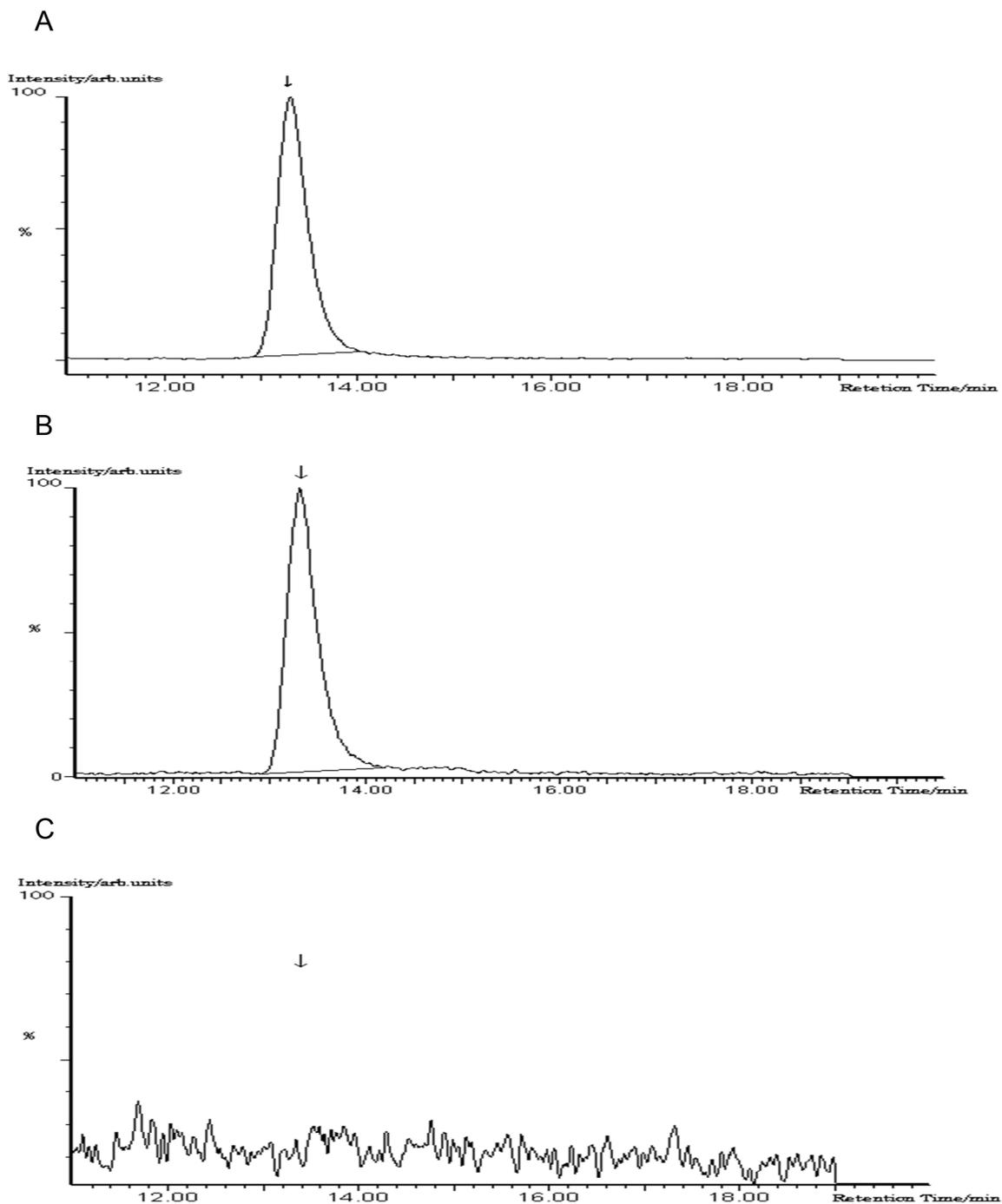


Fig. 3 Selected reaction monitoring chromatograms

(Arrows indicate the peak or retention time of oxolinic acid and each peak is shown as 100 % in each segment except C, in which the peak height of the lowest standard solution (0.1 ng/mL) is to be shown as 100 %.)

A: Standard solution (The concentration is 5 ng/mL for oxolinic acid.)

B: Sample solution of paddy rice (spiked at 0.3 mg/kg of oxolinic acid)

C: Sample solution of whole-crop rice silage (blank)

3.9 定量下限及び検出下限の検討

本法の定量下限及び検出下限を確認するため、WCS 及び粳米にオキシリニック酸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 WCS（風乾物）及び粳米中でそれぞれ 0.02 及び 0.01 mg/kg, SN 比が 3 となる濃度は WCS（風乾物）及び粳米中でそれぞれ 0.007 及び 0.003 mg/kg であったことから、本法の定量下限は WCS（風乾物）及び粳米中でそれぞれ 0.02 及び 0.01 mg/kg, 検出下限は WCS（風乾物）及び粳米中でそれぞれ 0.007 及び 0.003 mg/kg 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、WCS にオキシリニック酸として原物換算して 0.1 mg/kg 相当量（分析用試料 10 g に対して 1 mL 中に 3 µg を含有する標準液 0.75 mL 添加）及び粳米にオキシリニック酸として 3 mg/kg 相当量（分析用試料 10 g に対して 1 mL 中に 30 µg を含有する標準液 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。

参加試験室は、協同飼料株式会社研究所、一般財団法人食品環境検査協会東京事業所、一般財団法人日本食品分析センター彩都研究所、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 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^{10), 11)}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_f) 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¹²⁾を用いて HorRat を求めた。

結果は Table 8 のとおりであった。WCS 及び粳米について、平均回収率はそれぞれ 89.4 及び 92.6 %, RSD_f はそれぞれ 2.9 及び 4.8 %, RSD_R はそれぞれ 9.2 及び 6.3 %, HorRat はそれぞれ 0.42 及び 0.46 であった。なお、HorRat が 0.5 を下回っていたが、特に共同試験の実施要領に異常があったとは考えられず、本定量法が抽出後、ミニカラムで 1 回精製してから LC-MS/MS で測定するという比較的平易なものとなっていることが原因ではないかと考えられた。

参考のため、各試験室で使用した LC-MS/MS の機種等を Table 9 に示した。

Table 8 Collaborative study results of oxolinic acid

Lab. No.	Feed types			
	Whole-crop rice silage (mg/kg)		Paddy rice (mg/kg)	
1	0.0908	0.0890	2.98	2.87
2	0.0853	0.0891	2.78	2.82
3	0.0700 ^{a)}	0.0495 ^{a)}	2.56	2.54
4	0.0844	0.0788	2.80	2.51
5	0.0897	0.0956	2.95	2.89
6	0.0785	0.0825	2.87	2.61
7	0.108	0.105	2.98	2.77
8	0.0882	0.0873	2.45	2.77
9	0.0898	0.0890	2.98	2.90
Spiked level (mg/kg)	0.1		3	
Mean value ^{b)} (mg/kg)	0.0894		2.78	
Recovery ^{b)} (%)	89.4		92.6	
RSD _r ^{c)} (%)	2.9		4.8	
RSD _R ^{d)} (%)	9.2		6.3	
PRSD _R ^{e)} (%)	22		14	
HorRat	0.42		0.46	

- a) Data excluded by Cochran test
- b) Whole-crop rice silage: $n=16$; Paddy Rice: $n=18$
- 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 9 Instruments used in the collaborative study

Lab. No.	LC-MS/MS	LC column (i.d.×length, particle size)
1	LC: ACQUITY UPLC, Waters MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	Inertsil ODS-4, GL Sciences (3.0 mm×150 mm, 3 μm)
2	LC: ACQUITY UPLC, Waters MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	Inertsil ODS-4, GL Sciences (3.0 mm×150 mm, 3 μm)
3	LC: Nexera X2, Shimadzu MS/MS: LCMS-8040, Shimadzu	ZORBAX Eclipse XDB-C18, Agilent Technologies (3.0 mm×150 mm, 3.5 μm)
4	LC: ACQUITY UPLC, Waters MS/MS: ACQUITY TQD, Waters	Inertsil ODS-4, GL Sciences (3.0 mm×150 mm, 3 μm)
5	LC: ACQUITY UPLC, Waters) MS/MS: Quattro premier XE, Waters	Inertsil ODS-4, GL Sciences (3.0 mm×150 mm, 3 μm)
6	LC: Alliance 2695, Waters MS/MS: Quattro premier XE, Waters	Inertsil ODS-4, GL Sciences (3.0 mm×150 mm, 3 μm)
7	LC: 1200, Agilent Technologies MS/MS: 6410 Triple Quad LC/MS, Agilent Technologies	Inertsil ODS-4, GL Sciences (3.0 mm×150 mm, 3 μm)
8	LC: 1200, Agilent Technologies MS/MS: 6410 Triple Quad LC/MS, Agilent Technologies	Inertsil ODS-4, GL Sciences (3.0 mm×150 mm, 3 μm)
9	LC: ACQUITY UPLC, Waters MS/MS: Quattro premier, Waters	Inertsil ODS-4, GL Sciences (3.0 mm×150 mm, 3 μm)

4 まとめ

飼料用イネ中に残留するオキシリニック酸について、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を検討したところ、飼料用イネのうち WCS 及び粳米を対象として JFRL 法の抽出液を 10 倍希釈する操作の追加及び定量操作を遮光条件下で実施することにより、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、0.1~50 ng/mL 相当量（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、当該検量線における各マトリックスの添加回収試験の設定濃度は、WCS で 2.25 及び 0.225 ng/mL 相当濃度、粳米で 30, 3 及び 0.1 ng/mL 相当濃度とした。

2) 本法に従い得られる試料溶液についてマトリックス効果を確認した結果、オキシリニック酸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) WCS 及び粳米について、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。

4) WCS にオキシリニック酸として原物中に換算して 0.1 及び 0.01 mg/kg 相当量、粳米に 3, 0.3 及び 0.01 mg/kg 相当量を添加し、本法に従って 3 点併行分析を実施し、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) 本法のオキシリニック酸の定量下限は WCS（風乾物）及び粳米中でそれぞれ 0.02 及び 0.01

mg/kg, 検出下限は WCS (風乾物) 及び粃米中でそれぞれ 0.007 及び 0.003 mg/kg であった.

- 6) WCS にオキシリニック酸として原物中に換算して 0.1 mg/kg 相当量及び粃米にオキシリニック酸として 3 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協同飼料株式会社研究所, 一般財団法人食品環境検査協会東京事業所, 一般財団法人日本食品分析センター彩都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・動物用医薬品評価書 オキシリニック酸 (第 3 版) 平成 25 年 11 月 (2013).
- 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) 農林水産省令: 動物用医薬品等取締規則, 平成 16 年 12 月 24 日, 農林水産省令第 107 号 (2004).
- 5) 杉本 泰俊, 野村 昌代, 鷺尾 和也: 飼料中のオキシリニン酸及びフルメキンの液体クロマトグラフによる同時定量法, 飼料研究報告, **34**, 28-42 (2009).
- 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) 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, 食安発第 0124001 号 (2005).
- 8) 財団法人日本食品分析センター: 平成 22 年度飼料中の有害物質等分析法委託事業 飼料中の有害物質等の分析法の開発 (2010).
- 9) 牧野 大作, 若宮 洋市, 榊原 良成, 上野山 智洋: 穀類, 乾牧草及び稲わら中のグルホシネート, 3-メチルホスフィニコプロピオン酸及び N-アセチルグルホシネートの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による同時定量法, 飼料研究報告, **38**, 89-107 (2013).
- 10) Horwitz, W., Protocol for Design, Conduct and Interpretation of Method - Performance Studies, Pure & Appl. Chem., **67**(2), 331-343 (1995).
- 11) 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. volume II, Gaithersburg, MD, USA.
- 12) Thompson, M., 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).