

4 稲わら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

三井 友紀子^{*1}, 森口 里美^{*2}

Determination of Oxolinic Acid in Rice Straw by LC-MS/MS

Yukiko MITSUI^{*1} and Satomi MORIGUCHI^{*2}

^{*1} Food and Agricultural Materials Inspection Center, Nagoya Regional Center

^{*2} Food and Agricultural Materials Inspection Center, Nagoya Regional Center
(Now Kobe Regional Center))

An analytical method was developed to determine the level of oxolinic acid in rice straw using liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry (LC-ESI-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 Corporation; Milford, MA, USA) and injected into the LC-ESI-MS/MS for determination of the levels of oxolinic acid. 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 the mobile phase. In the MS/MS analysis, positive mode electrospray ionization (ESI+) was used.

Recovery tests were conducted on rice straw spiked with oxolinic acid at the levels of 0.6, 1 or 10 mg/kg. The resulting mean recoveries ranged from 89.8 to 92.7 % and the repeatability in terms of relative standard deviations (RSD_r) were not more than 6.4 %.

A collaborative study was conducted in nine laboratories using two kinds of rice straw spiked with 10 and 2 mg/kg of oxolinic acid, respectively. The mean recovery, repeatability and reproducibility in terms of the relative standard deviations (RSD_r and RSD_R) and HorRat, respectively, were 91.9 %, 2.8 %, 5.3 % and 0.46 for rice straw 1, and 97.6 %, 2.5 %, 7.6 % and 0.52 for rice straw 2.

This method was validated and established for use in the inspection of oxolinic acid in rice straw

Key words: oxolinic acid; liquid chromatograph-tandem mass spectrometer (LC-MS/MS); electrospray ionization (ESI); rice straw; 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；稲わら；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）であり，農薬以外に動物用医薬品としても使用されている¹⁾。

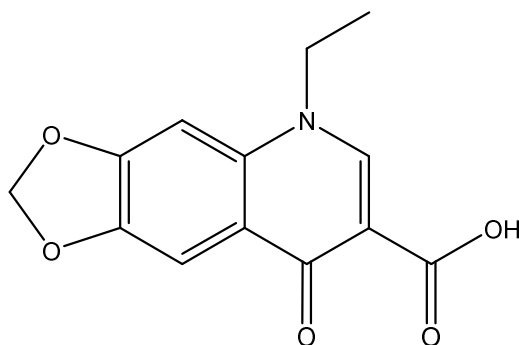
我が国では，飼料の有害物質の指導基準²⁾において，その基準値は，稲わら中で 10 mg/kg，稲発酵粗飼料（以下「WCS」という。）中で 0.1 mg/kg，粳米中で 3 mg/kg と設定されている²⁾。また，食品では米，野菜，果実，食肉等に残留基準値が定められており，例えば玄米中で 0.3 ppm と設定されている³⁾。

^{*1} 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

^{*2} 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，現 神戸センター

牧野らは、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⁴⁾（以下「JFRL 法」という。）を基に、飼料用イネを対象として飼料分析基準⁵⁾への適用の可否を検討し、WCS 及び粃米に適用可能な定量法（以下「WCS 法」という。）を確立した⁶⁾。その際、稲わらについても検討したが、回収率が低い傾向にあり、更なる検討が必要であった⁶⁾。そこで今回、稲わらを対象としたオキシリニック酸の定量法を、WCS 法を基に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

$C_{13}H_{11}NO_5$ MW: 261.2 CAS No.: 14698-29-4

Fig. 1 Chemical structure of oxolinic acid

2 実験方法

2.1 試料

稲わらは 1 mm のスクリーンを装着した粉碎機で粉碎した。

2.2 試薬

1) アセトニトリルは抽出には残留農薬・PCB 試験用を用い、LC-MS/MS 溶離液には液体クロマトグラフ用を用いた。メタノールはカラム処理には残留農薬・PCB 試験用を用い、標準液及び試料溶液調製には液体クロマトグラフ用を用いた。水は超純水（JIS K0211 の 5218 に定義された超純水）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（純度 99.9 %，和光純薬工業製）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 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, 30, 40 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。

これらの標準原液及び標準液の調製は、遮光した状態で行った。

2.3 装置及び器具

- 1) 乾牧草用粉碎機：SM-100 Retsch 製 (1 mm スクリーン, 回転数 (仕様) 1690 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) 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 TQD 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 5 g を正確に量って 300 mL の褐色共栓三角フラスコに入れ、水 30 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 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 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 100 倍希釈した後、希釈試料溶液 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メタノール 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 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、メタノール 5 mL をミニカラムに加えてオキシソ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

試料溶液及び各オキシソリニック酸標準液各 5 µL を LC-MS/MS に注入し、選択反応検出 (以下「SRM」という。) 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

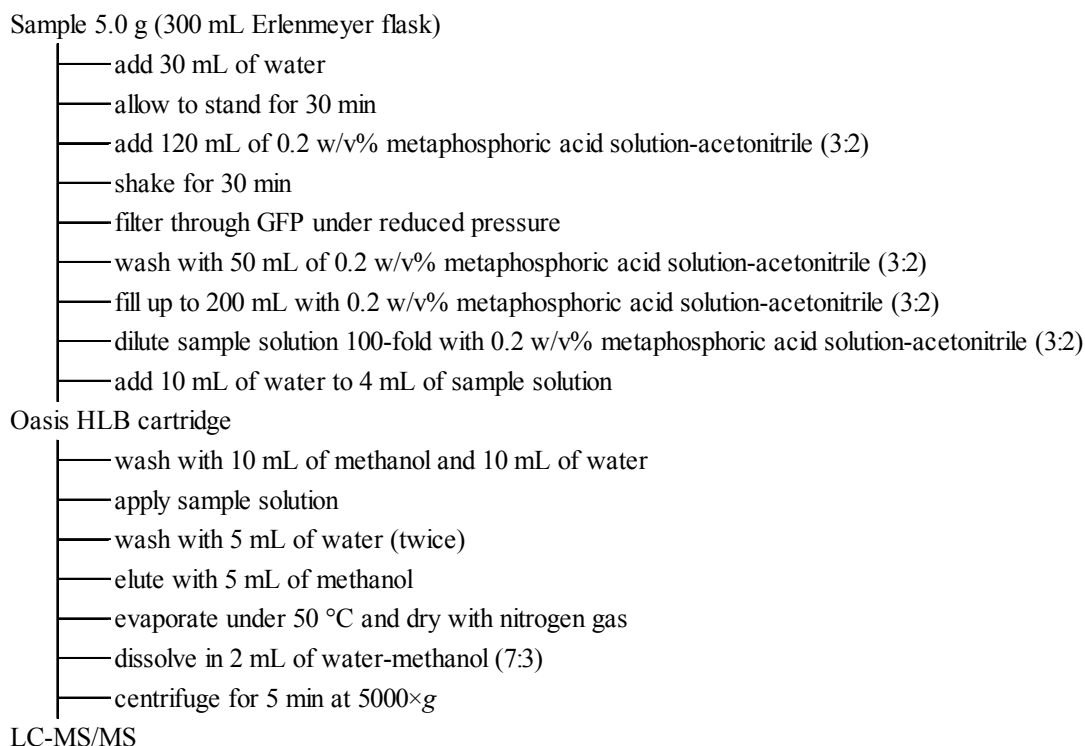
Column	Inertsil ODS-4 (3.0 mm i.d. × 150 mm, 3 μm), GL Sciences
Mobile phase	0.1 v/v% Formic acid solution - acetonitrile (7:3) (hold for 19 min) → 1 min → (5:95) (hold for 5 min) → 1 min → (7:3) (hold for 5 min)
Flow rate	0.2 mL/min
Column temperature	40 °C
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Mode	Positive
Source temperature	120 °C
Desolvation gas	N ₂ (800 L/h, 350 °C)
Cone gas	N ₂ (50 L/h)
Collision gas	Ar (0.20 mL/min)
Capillary voltage	2 kV

Table 2 MS/MS parameters

Target	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion		Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
		Quantifier (<i>m/z</i>)	Qualifier (<i>m/z</i>)		
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 rice straw
(analyzed under the shading condition)

2.5 抽出液の希釈倍率の検討

稲わらについて、WCS 法により調製したブランク試料溶液及び WCS 法において 0.2 w/v%メタリン酸溶液-アセトニトリル (3+2) で 10 倍希釈するところを 100 倍希釈とした方法により調製したブランク試料溶液にオキシリニック酸としてそれぞれ 10 mg/kg 相当量を添加した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リニック酸標準液に対するピーク面積比を確認した。

また、稲わらについてオキシリニック酸としてそれぞれ 10 mg/kg 相当量を添加した試料を用い、WCS 法及び WCS 法において 0.2 w/v%メタリン酸溶液-アセトニトリル (3+2) で 10 倍希釈するところを 100 倍希釈とした方法により定量し、回収率及び繰返し精度を求めた。

2.6 試料採取量の検討方法

稲わら (3 検体) について、それぞれ 2.5, 5.0, 10 及び 15 g を採取し、オキシリニック酸としてそれぞれ 10 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 5 ng/mL 相当量) を添加した試料を用いて回収率を求めた。

定量方法は、WCS 法で抽出し、吸引ろ過後、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) を加えて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 100 倍希釈し、以降 WCS 法で定量を行った。

3 結果及び考察

3.1 抽出液の希釈倍率の検討

牧野らが報告した WCS 法では、遮光条件下での操作と抽出液を 0.2 w/v%メタリン酸溶液-アセトニトリル (3+2) で定容した液を 10 倍希釈することにより良好な結果が得られたが、稲わらのみ低回収率の傾向になった⁶⁾。稲わらは、試料溶液を 10 倍希釈するだけでは夾雑成分に由来するイオン化阻害の低減が十分にされていない可能性が考えられたため、更に試料液を希釈することで改善されるかどうか 2.5 によりマトリックスの影響を比較した。

その結果は Table 3 のとおり、稲わらは試料液を同溶媒で 100 倍希釈することにより、稲わら中のオキシリニック酸に対するマトリックスの影響が低減される結果が得られた。

そこで 2.5 により、稲わら (1 検体) にオキシリニック酸として 10 mg/kg 相当量を添加した試料を用い、10 倍希釈した試料溶液と 100 倍希釈した試料溶液を用いて 3 点併行で定量し、オキシリニック酸の回収率及び繰返し精度を求めた。

その結果は Table 4 のとおり、試料溶液の希釈操作を 100 倍希釈とすることにより、回収率等が改善した。よって、WCS 法の希釈を 10 倍希釈から 100 倍希釈に変更して以降の検討を行うことにした。

Table 3 Matrix effects by different dilution factors

Dilution factor of extract	Matrix factor ^{a)} (%)	
	run1	run2
10-fold dilution	87.8	93.1
100-fold dilution	103	99.8

a) Response ratio of oxolinic acid calculated as peak area in the presence of matrix component divided by peak area in the pure solution

Table 4 Effects of dilution on recovery tests

Dilution factor of extract	Recovery ^{a)}	RSD _r ^{b)}
	(%)	(%)
10-fold dilution	75.1	6.4
100-fold dilution	80.5	2.6

a) Mean ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

3.2 試料採取量の検討

WCS 法では試料採取量を 10 g とし、振とう抽出後に吸引ろ過をして抽出液を得ている。しかし、試料が稲わらの場合、そのろ過後のろ紙上に残る稲わら残さは、籾米残さに比べ 3 倍程度の厚みがあるため、ろ紙上の残さを更に 0.2 w/v%メタリン酸溶液-アセトニトリル (3+2) 50 mL で洗浄しても、稲わら残さにオキシリニック酸が残留している可能性も考えられた。そこで 2.6 により、稲わら 3 検体を用いて、稲わらに適する試料採取量の検討を行った。

その結果は Table 5 のとおり、試料採取量が 10 g より少ない方が回収率は高い傾向であった。一方、飼料中の有害物質の定量に際し、対象成分が試料中で偏在する可能性も考慮すると、試料採取量は 2.5 g より 5 g を採用する方が適していると判断し、稲わらでは試料採取量を 5 g とすることにした。

Table 5 Effects of sample weight on recovery tests

Sample weight (g)	Recovery (%) ^{a)}		
	Rice straw 1	Rice straw 2	Rice straw 3
2.5	83.5	92.1	80.4
5	88.5	91.2	74.8
10	85.7	86.5	65.8
15	75.5	69.2	52.2

a) $n=1$ 3.3 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検討

WCS法ではミニカラム精製時にオキシロニック酸を水-アセトニトリル (4+1) 20 mL で溶出しているが、厚生労働省通知に示されている食品中のオキシロニック酸試験法のうち、液体クロマトグラフ質量分析計 (LC/MS) による畜水産物を対象とした一斉試験法⁷⁾では、WCS法と同じ種類のミニカラム (Oasis HLB) を用い、メタノール 5 mL でオキシロニック酸を溶出している⁷⁾。水-アセトニトリル (4+1) 20 mL による溶出は水を多く含むことから、溶出液の減圧乾固にかなりの時間を要しており、メタノールによる溶出に変えることで分析操作の効率化が見込まれる。メタノール溶出に変えることにより意図しない夾雑物の溶出が懸念されるが、試料採取量を 10 g から 5 g に、抽出液の希釈倍率を 10 倍から 100 倍に変更したことにより、WCS法で溶出した時より最終試料溶液中のマトリックスは低減していると推察される。以上のことからメタノールを用いた溶出画分の検討を行った。

2.4 の 1)により得られた試料溶液にオキシロニック酸として 10 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 5 ng/mL 相当量) を添加し、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を確認した。その結果、Table 6 のとおり、オキシロニック酸はメタノール 0~5 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、稲わらではメタノール 5 mL で溶出させることにした。メタノール 5 mL で溶出させることに変更した結果、溶出及び減圧乾固に要する時間が合計で 1 時間程度短縮できた。

Table 6 Elution pattern of oxolinic acid from Oasis HLB

Feed types	Recovery ^{a)} (%)						Total
	Water		Methanol				
	0~5 mL	5~10 mL	0~5 mL	5~10 mL	10~15 mL	15~20 mL	
Rice straw 1	0	0	99.4	0	0	0	99.4
Rice straw 2	0	0	100	0	0	0	100

a) $n=1$

3.4 妨害物質の検討

稲わら 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. 2 に示した。

3.5 マトリックス効果の確認

2.4 の 1)及び 2)により調製した稲わらのブランク試料溶液にオキシロニック酸として 10 mg/kg 相当量 (最終試料溶液中で 5 ng/mL 相当量) を添加した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リ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98~106 %であり、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。

3.6 添加回収試験

稲わら（2 検体）にオキシリニック酸としてそれぞれ 0.6, 1 及び 10 mg/kg 相当量（最終試料溶液で 0.3, 0.5 及び 5 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 89.8~92.7 %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. 2 に示した。

Table 7 Recoveries for oxolinic acid

Spiked level (mg/kg)	Feed types			
	Rice straw 1		Rice straw 2	
	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD _r ^{b)} (%)
0.6	92.7	3.9	91.0	4.1
1	91.0	6.4	92.7	4.9
10	89.8	3.0	91.3	2.9

a) Mean ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

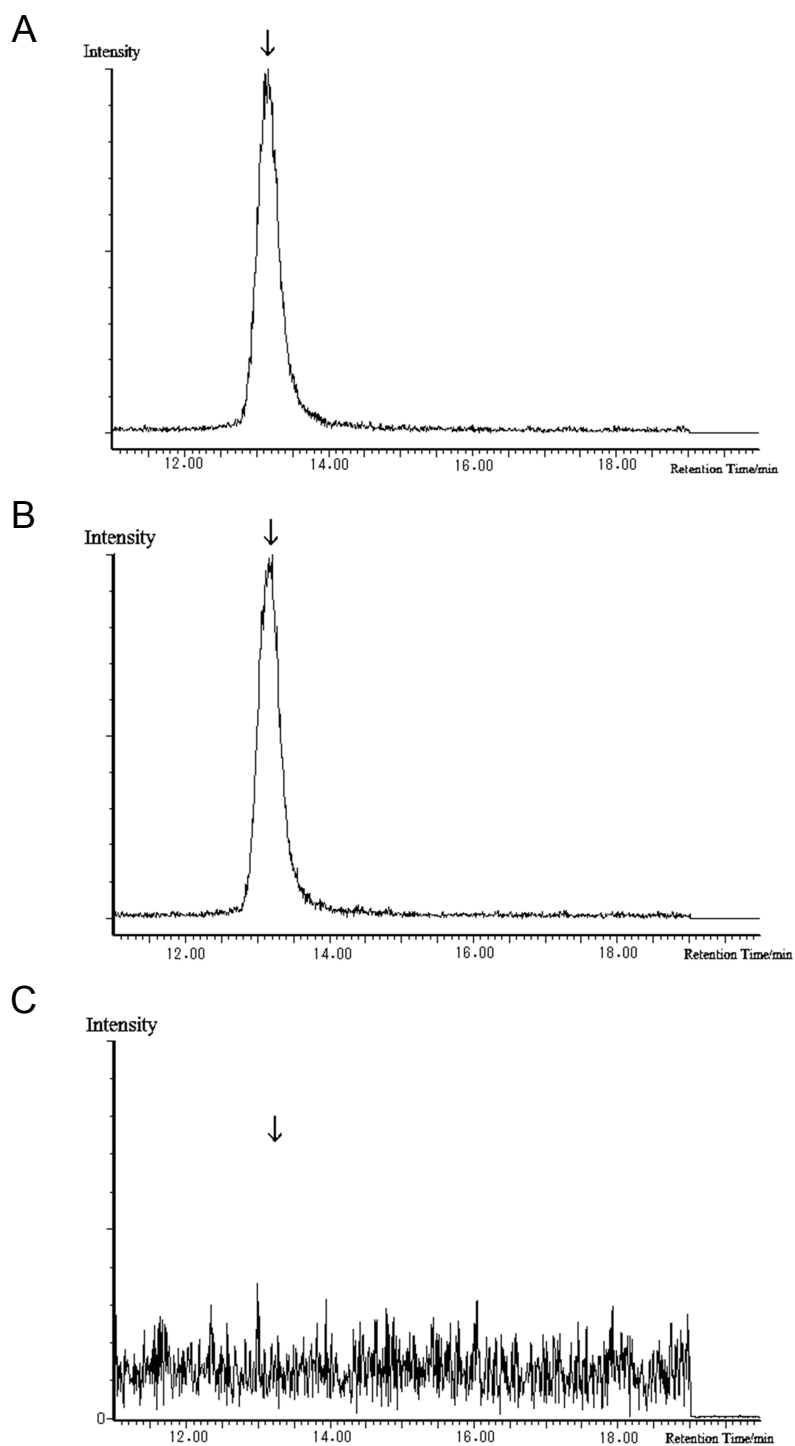


Fig. 2 Selected reaction monitoring chromatograms

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

A: Standard solution (5 ng/mL: 0.025 ng as oxolinic acid)

B: Sample solution of rice straw spiked at 10 mg/kg of oxolinic acid (5 ng/mL as oxolinic acid)

C: Sample solution of rice straw (blank)

3.7 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、稲わら（2 検体）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 0.6 mg/kg, SN 比が 3 となる濃度は 0.2 mg/kg であったことから、本法の定量下限は 0.6 mg/kg, 検出下限は 0.2 mg/kg であった。

3.8 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、稲わら 1 にオキシリニック酸として 10 mg/kg 相当量（分析用試料 5 g に対して 1 mL 中に 50 µg を含有する標準液 1 mL 添加）及び稲わら 2 にオキシリニック酸として 2 mg/kg 相当量（分析用試料 5 g に対して 1 mL 中に 10 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、フィード・ワン株式会社研究所、全国農業協同組合連合会飼料畜産中央研究所、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^{8), 9)}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_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¹⁰⁾を用いて HorRat を求めた。

結果は Table 8 のとおりであった。稲わら 1 及び稲わら 2 について、平均回収率はそれぞれ 91.9 及び 97.6 %, RSD_r はそれぞれ 2.8 及び 2.5 %, RSD_R はそれぞれ 5.3 及び 7.6 %, HorRat はそれぞれ 0.46 及び 0.52 であった。なお、HorRat が 0.5 を下回っているものがあったが、分析操作が比較的簡便であ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 for oxolinic acid

Lab. No.	Feed types			
	Rice straw 1 (mg/kg)		Rice straw 2 (mg/kg)	
1	9.16	9.85	1.83	1.99
2	9.23	9.10	1.81	1.85
3	9.29	9.21	1.88	1.87
4	9.89	9.45	1.95	2.00
5	9.66	9.91	1.94	1.94
6	8.75	8.38	1.70	1.78
7	8.94	8.64	2.15	2.14
8	10.1 ^{a)}	8.38 ^{a)}	2.22	2.17
9	8.66	8.91	1.99	1.93
Spiked level (mg/kg)	10		2	
Mean value ^{b)} (mg/kg)	9.19		1.95	
Mean recovery ^{b)} (%)	91.9		97.6	
RSD _r ^{c)} (%)	2.8		2.5	
RSD _R ^{d)} (%)	5.3		7.6	
PRSD _R ^{e)} (%)	11		14	
HorRat	0.46		0.52	

a) Data excluded by Cochran test

b) Rice straw 1: $n=16$; Rice straw 2: $n=18$

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 Series, 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 Series, 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: ACQUITY TQD, Waters	Inertsil ODS-4 HP, GL Sciences (3.0 mm×150 mm, 3 μm)

4 まとめ

稲わら中に残留するオキシソリニック酸について、WCS 法を基に改良し、稲わらにおける 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、試料採取量を 5 g に、抽出液の希釈を 100 倍に、ミニカラムからの溶出をメタノール 5 mL で行うことに変更することにより、以下の結果が得られ、適用が可能であると考えられた。

- 1) 稲わらについて、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。
- 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、オキシソ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) 稲わらにオキシソリニック酸として 0.6, 1 及び 10 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。
- 4) 本法のオキシソリニック酸の定量下限は試料中 0.6 mg/kg, 検出下限は 0.2 mg/kg であった。
- 5) 稲わらにオキシソリニック酸として 10 mg/kg 相当量及び 2 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フィード・ワン株式会社研究所, 全国農業協同組合連合会飼料畜産中

央研究所，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) 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 (2011).
- 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).
- 6) 牧野 大作，三井 友紀子，大谷 俊子：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，飼料研究報告，**40**，57-70 (2015).
- 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) William Horwitz: Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies, *Pure & Appl. Chem.*, **67**(2), 331-343 (1995).
- 9) 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., Gaithersburg, MD, USA.
- 10) 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).