

※本報告書は、試験法開発における検討結果を取りまとめたものであり、試験法の実施に際して参考として下さい。なお、報告書の内容と通知または告示試験法との間に齟齬がある場合には、通知または告示試験法が優先することをご留意下さい。

食品に残留する農薬等の成分である物質の 試験法開発事業報告書

オキシリニック酸試験法（農産物）

オキシリニック酸試験法（農産物）の検討結果

[緒言]

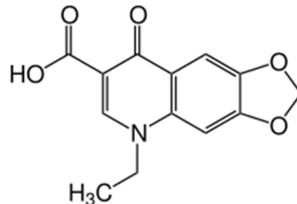
1. 目的

オキシリニック酸はキノロン系抗生物質の一つであり、DNAジャイレースに作用して細菌のDNA合成を阻害することにより抗生物質として作用すると考えられている。わが国では1989年2月に種子処理剤として初回農薬登録され、海外では韓国、インドネシア等で登録されている¹⁾。現在、オキシリニック酸の通知試験法ではジクロロメタンを使用していることから、他の溶媒を用いる試験法の開発を行った。

2. 分析対象化合物の構造式及び物理化学的性質

(1) 分析対象化合物：オキシリニック酸 (oxolinic acid)

構造式：



分子式：C₁₃H₁₁NO₅

分子量：261.23

IUPAC名：5-ethyl-5,8-dihydro-8-oxo[1,3]dioxolo[4,5-g]quinoline-7-carboxylic acid

CAS名：5-ethyl-5,8-dihydro-8-oxo-1,3-dioxolo[4,5-g]quinoline-7-carboxylic acid

CAS番号：14698-29-4

外観：白色～わずかにうすい黄色、結晶性粉末～粉末

融点：313℃（分解）

溶解性：水；3.2 mg/L (25℃)、アセトン・キシレン・酢酸エチル・ヘキサン・メタノール；<10 g/kg、1 mol/L 水酸化ナトリウム；200～300 g/kg

n-オクタノール／水分配係数：log *P*_{ow} = 0.95 (25℃)

酸解離定数：pK_a 6.9 (25℃)

安定性：耐熱；150℃まで安定

[出典]

・富士フイルム和光純薬（株）オキシリン酸標準品 詳細情報（2020年12月14日参照）

<https://labchem-wako.fujifilm.com/jp/product/detail/W01W0115-0185.html>

・C. MacBean, ed. The pesticide manual, 16th ed. Alton, UK, British Crop Protection Council, 2012, p.844. (ISBN 978-1-901396-86-7)

・オキシリニック酸農薬抄録 平成24年9月28日改訂

https://www.acis.famic.go.jp/syouroku/oxolinic-acid/oxolinic-acid_01.pdf

3. 基準値

品目名：オキシリニック酸 英名：oxolinic acid	
食品分類名	基準値 (ppm)
米(玄米)	0.3
とうもろこし	0.01
ばれいしょ	0.3
こんにゃくいも	0.5
だいこん類(ラディッシュを含む)の根	0.06
だいこん類(ラディッシュを含む)の葉	15
はくさい	2
キャベツ	2
チンゲンサイ	2
カリフラワー	0.3
ブロッコリー	0.2
その他のあぶらな科野菜	5
エンダイブ	1
レタス(サラダ菜及びちしゃを含む)	6
その他のきく科野菜	0.2
たまねぎ	0.1
ねぎ(リーキを含む)	4
にんにく	0.05
アスパラガス	0.7
その他のゆり科野菜	0.3
にんじん	0.2
パセリ	3
セロリ	1
ピーマン	3
かぼちゃ(スカッシュを含む)	2
日本なし	0.3
西洋なし	0.3
もも(果皮及び種子を含む)	5
ネクタリン	1
あんず(アブリコットを含む)	30
すもも(プルーンを含む)	0.7
うめ	30
茶	20
その他のハーブ	2

[実験方法]

1. 試料

玄米、ばれいしょ、チンゲンサイ、たまねぎ、日本なし、すもも、茶は市内の小売店で購入した。

(1) 玄米

小型強力粉砕機を用いて 425 μm の標準網ふるいを通して粉砕し、均一化した。

(2) ばれいしょ

泥を水で洗い流し、細切した後、フードプロセッサーを用いて磨砕均一化した。

(3) チンゲンサイ

根及び変質葉を除去し、細切した後、フードプロセッサーを用いて磨砕均一化した。

(4) たまねぎ

外皮及びびげ根を除去し、細切した後、フードプロセッサーを用いて磨砕均一化した。

(5) 日本なし

果梗を除去し、細切した後、フードプロセッサーを用いて磨砕均一化した。

(6) すもも

果梗及び種子を除去し、細切した後、フードプロセッサーを用いて磨砕均一化した。

(7) 茶

小型強力粉砕機を用いて 425 μm の標準網ふるいを通して粉砕し、均一化した。

2. 試薬・試液

オキシリニック酸標準品：オキシリン酸標準品（残留農薬試験用） 純度 98.0% [富士フィルム和光純薬（株）製]

試験溶液調製に用いた試薬

アセトニトリル、トルエン、メタノール：残留農薬試験用 [関東化学（株）及び富士フィルム和光純薬（株）製]

塩酸：特級品 [関東化学（株）及び純正化学（株）製]

水：高速液体クロマトグラフ用 [ナカライテスク（株）製]

LC-MS/MS 測定に用いた試薬・試液

アセトニトリル：LC/MS 用及び残留農薬試験用 [関東化学（株）製]

ギ酸、ギ酸アンモニウム：特級 [富士フィルム和光純薬（株）製]

水：LC/MS 用 [関東化学（株）及び富士フィルム和光純薬（株）製]

0.1 vol%ギ酸含有 5 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液：ギ酸を 5 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液に溶解して、ギ酸濃度が 0.1 vol%の溶液を調製した。

ろ紙：No.707×60 m/m [日本理化学器械（株）製]

セライト：No.545 [富士フィルム和光純薬（株）製]

グラフaitカーボンミニカラム：Agilent Technologies 社製 Bond Elut Carbon (250 mg/6 mL)、ジューエルサイエンス社製 InertSep GC (250mg/3 mL) または Sigma-Aldrich 社製 Supelclean ENVI-Carb (250 mg/3 mL) をアセトニトリル 10 mL で予備洗浄した後、用いた。

標準原液：オキシリニック酸標準品 5 mg を精密にはかり採り、アセトニトリルで溶解し

て 100 mg/L 溶液を調製した。

添加用標準溶液：標準原液をアセトンで希釈して 0.1 mg/L、0.4 mg/L、2 mg/L、6 mg/L、7 mg/L 及び 50 mg/L の標準溶液を調製した。また、オキシリニック酸標準品 2 mg を精密にはかり採り、アセトンで溶解して 200 mg/L 溶液を調製した。

検量線用標準溶液：標準原液をアセトニトリル及び水 (7:3) 混液で適宜希釈し、0.000125 ~ 0.15 mg/L の標準溶液を調製した。

3. 装置

ホモジナイザー：ウルトラタラックス T25 デジタル (シャフトジェネレーターは S25N-18G) (IKA 社製)

フードプロセッサー：MK-K77 [松下電器産業 (株) (現 パナソニック (株)) 製]

小型強力粉碎機：フォースミル FM-1 [大阪ケミカル (株) 製]

LC-MS/MS

装 置	型 式	会 社
MS	LCMS-8050	(株) 島津製作所
LC	Prominence 高圧グラジエントシステム	
ポンプ	LC-20AD	(株) 島津製作所
デガッサー	DGU-20A3R	(株) 島津製作所
インジェクター	SIL-20AC	(株) 島津製作所
システムコントローラ	CBM-20A	(株) 島津製作所
カラムオーブン	CTO-20AC	(株) 島津製作所
データ処理	LabSolution	(株) 島津製作所

4. 測定条件

LC-MS/MS

LC 条件	
カラム	Atrantis T3 [内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 µm : Waters 社製]
移動相流速	0.2 mL/min
注入量	5 µL
カラム温度	40°C
移動相	A 液 : 0.1 vol% ギ酸含有 5 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液 B 液 : アセトニトリル A : B = 13 : 7 (アイソクラティック溶出)
MS 条件	
測定モード	SRM (選択反応モニタリング)
イオン化モード	ESI (+)
プローブ電圧	4 kV
DL 温度	250°C
インターフェイス温度	150°C
ヒートブロック温度	200°C
ネブライザー流量	3.0 L/min

ドライイングガス流量	10.0 L/min
ヒーティングガス流量	10.0 L/min
コリジョンガス	アルゴン
定量イオン (m/z)	+262.1→244.1 (CE 19 V)
定性イオン (m/z)	+262.1→216.0 (CE 29 V)
保持時間	5.5 分

5. 定量

標準原液をアセトニトリル及び水（7：3）混液で希釈して、以下の濃度の検量線用標準溶液を調製した。

・基準値濃度添加

米（玄米）、ばれいしょ、日本なし（基準値 0.3 ppm）：0.00375、0.0075、0.01125、0.015、0.01875 及び 0.0225 mg/L

チンゲンサイ（基準値 2 ppm）：0.025、0.05、0.075、0.1、0.125 及び 0.15 mg/L

たまねぎ（基準値 0.1 ppm）：0.00125、0.0025、0.0375、0.005、0.00625 及び 0.0075 mg/L

すもも（基準値 0.7 ppm）：0.00875、0.0175、0.02625、0.035、0.04375 及び 0.0525 mg/L

茶（基準値 20 ppm；10 倍希釈して分析）：0.00625、0.0125、0.01875、0.025、0.03125 及び 0.0375 mg/L

・定量限界濃度添加

茶以外（0.01 mg/kg）：0.000125、0.00025、0.000375、0.0005、0.000625 及び 0.00075 mg/L

茶（0.04 mg/kg）：0.000125、0.00025、0.000375、0.0005、0.000625 及び 0.00075 mg/L

この溶液 5 μ L を LC-MS/MS に注入して、得られたピーク面積を用いてオキシソリニック酸の検量線を作成した。試験溶液 5 μ L を LC-MS/MS に注入し、絶対検量線法によりオキシソリニック酸の含量を算出した。

6. 添加試料の調製

玄米（基準値 0.3 ppm、定量限界濃度 0.01 mg/kg）：試料 10.0 g に基準値濃度添加の場合は 6 mg/L 添加用標準溶液 0.5 mL を、定量限界濃度添加の場合は 0.1 mg/L 添加用標準溶液 1 mL を添加し、混合した後、30 分間放置した。

ばれいしょ及び日本なし：（基準値 0.3 ppm、定量限界濃度 0.01 mg/kg）：試料 20.0 g に基準値濃度添加の場合は 6 mg/L 添加用標準溶液 1 mL を、定量限界濃度添加の場合は 0.1 mg/L 添加用標準溶液 2 mL を添加し、混合した後、30 分間放置した。

チンゲンサイ：（基準値 2 ppm、定量限界濃度 0.01 mg/kg）：試料 20.0 g に基準値濃度添加の場合は 50 mg/L 添加用標準溶液 0.8 mL を、定量限界濃度添加の場合は 0.1 mg/L 添加用標準溶液 2 mL を添加し、混合した後、30 分間放置した。

たまねぎ：（基準値 0.1 ppm、定量限界濃度 0.01 mg/kg）：試料 20.0 g に基準値濃度添加の場合は 2 mg/L 添加用標準溶液 1 mL を、定量限界濃度添加の場合は 0.1 mg/L 添加用標準溶液 2 mL を添加し、混合した後、30 分間放置した。

すもも：（基準値 0.7 ppm、定量限界濃度 0.01 mg/kg）：試料 20.0 g に基準値濃度添加の場

合は 7 mg/L 添加用標準溶液 2 mL を、定量限界濃度添加の場合は 0.1 mg/L 添加用標準溶液 2 mL を添加し、混合した後、30 分間放置した。

茶：(基準値 20 ppm、定量限界濃度 0.04 mg/kg)：試料 5.00 g に基準値濃度添加の場合は 200 mg/L 添加用標準溶液 0.5 mL を、定量限界濃度添加の場合は 0.4 mg/L 添加用標準溶液 0.5 mL を添加し、混合した後、30 分間放置した。

7. 試験溶液の調製

概要

オキシソリニック酸を試料からアセトニトリル及び 1 mol/L 塩酸 (9 : 1) 混液で抽出した後、グラファイトカーボンミニカラムで精製し、LC-MS/MS で定量及び確認した。

1) 抽出

① 玄米及び茶の場合

試料 10.0 g (茶は 5.00 g) に水 20 mL を加え、30 分間放置した。これにアセトニトリル及び 1 mol/L 塩酸 (9 : 1) 混液 100 mL を加え、ホモジナイズした後、セライトをろ過補助剤として使用し吸引ろ過した。セライト上の試料を回収し、アセトニトリル及び 1 mol/L 塩酸 (9 : 1) 混液 50 mL を加えてホモジナイズし、吸引ろ過した。得られたろ液を合わせ、アセトニトリル及び 1 mol/L 塩酸 (9 : 1) 混液を加えて正確に 200 mL とした。

② 果実及び野菜の場合

試料 20.0 g にアセトニトリル及び 1 mol/L 塩酸 (9 : 1) 混液 100 mL を加え、ホモジナイズした後、セライトをろ過補助剤として使用し吸引ろ過した。セライト上の試料を回収し、アセトニトリル及び 1 mol/L 塩酸 (9 : 1) 混液 50 mL を加えてホモジナイズし、吸引ろ過した。得られたろ液を合わせ、アセトニトリル及び 1 mol/L 塩酸 (9 : 1) 混液を加えて正確に 200 mL とした。

2) 精製

グラファイトカーボンミニカラム (250 mg) にアセトニトリル 10 mL を注入し、流出液は捨てた。グラファイトカーボンミニカラムに 1) で得られた溶液 5 mL を注入した後、メタノール 10 mL を注入し、流出液は捨てた。トルエン及びメタノール (1 : 3) 混液 25 mL を注入し、溶出液を 40℃以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物をアセトニトリル及び水 (7 : 3) 混液に溶かし、穀類の場合は正確に 5 mL、果実、野菜及び茶の場合は正確に 10 mL としたものを試験溶液とした。

[分析法フローチャート]

秤取

- ↓ 玄米 10.0 g、果実及び野菜 20.0 g、茶 5.00 g
- ↓ 玄米及び茶には、水 20 mL を加えて 30 分間放置

抽出

- ↓ アセトニトリル及び 1 mol/L 塩酸 (9 : 1) 混液 100 mL を加え、ホモジナイズ
- ↓ 吸引ろ過 (セライト使用)
- ↓ セライト上の試料を回収し、アセトニトリル及び 1 mol/L 塩酸 (9 : 1) 混液 50 mL を加え、ホモジナイズ
- ↓ 吸引ろ過
- ↓ ろ液を合わせ、アセトニトリル及び 1 mol/L 塩酸 (9 : 1) 混液で 200 mL に定容

グラファイトカーボンミニカラム

[Agilent Technologies 社製 Bond Elut Carbon (250 mg/6 mL)]

- ↓ アセトニトリル 10 mL でコンディショニング
- ↓ 抽出液 5 mL (玄米 0.25 g、果実及び野菜 0.5 g、茶 0.125 g 相当分) を加える
- ↓ メタノール 10 mL を注入し、流出液を捨てる
- ↓ トルエン及びメタノール (1 : 3) 混液 25 mL を注入し、溶出液を採る
- ↓ 40℃以下で濃縮し、溶媒を除去
- ↓ 残留物をアセトニトリル及び水 (7 : 3) 混液に溶解 (玄米は 5 mL、野菜・果実及び茶は 10 mL)

試験溶液

↓

LC-MS/MS 測定

8. マトリックス添加標準溶液の調製

各検討対象食品のブランク試験溶液から 0.2 mL を分取し、窒素気流下で溶媒を除去した後、添加回収試験における回収率 100%相当濃度の検量線用標準溶液 0.2 mL を加えて溶解したものをマトリックス添加標準溶液とした。

[結果及び考察]

1. 測定条件の検討

(1) MS条件の検討

オキシリニック酸標準溶液をESI (+) でスキャン測定したマススペクトルを図1に示した。オキシリニック酸(モノアイソトピック質量: 261.0637)のプロトン付加分子 (m/z 262.1 $[M+H]^+$) が強く観察されたため、本イオンをプリカーサーイオンに選択した。図2及び図3には、 m/z 262.1をプリカーサーイオンとした場合のプロダクトイオンスペクトルを示した。プロダクトイオンには、強度の強い m/z 244.1、 m/z 216.0を選択し、S/N比がより高かった m/z 262.1→244.1を定量イオンとし、 m/z 262.1→216.0を定性イオンとした。

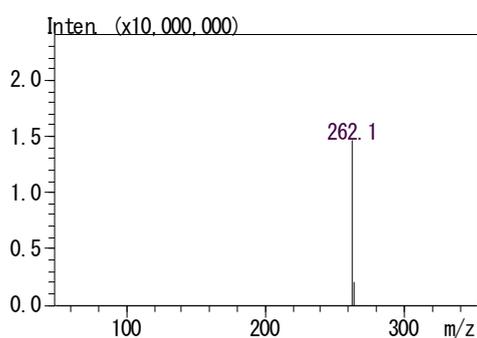


図1 オキシリニック酸のマススペクトル

スキャン範囲: 50~350 amu

測定条件: ESI(+)

オキシリニック酸: 10 mg/L

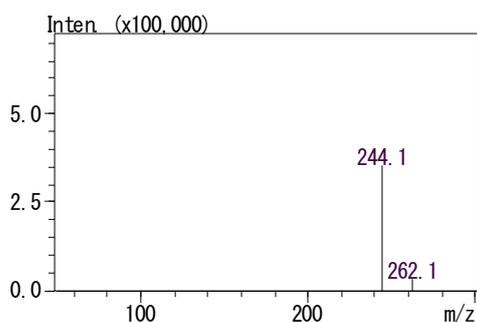


図2 プロダクトイオンスペクトル(定量)

プリカーサーイオン: m/z 262.1

測定条件: ESI(+)

CE=19 V (CE: collision energy)

オキシリニック酸: 0.1 mg/L

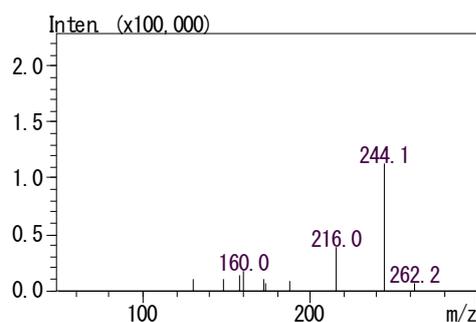


図3 プロダクトイオンスペクトル(定性)

プリカーサーイオン: m/z 262.1

測定条件: ESI(+)

CE=29 V (CE: collision energy)

オキシリニック酸: 0.1 mg/L

(2) LC条件の検討

分析カラムは、汎用されているオクタデシルシリル (ODS) 化シリカゲル充填カラムである Atrantis T3 (Waters 社製、内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μ m)、Inertsil ODS-4、

Inertsustain AQ-C18 [ともにジーエルサイエンス (株) 製、内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm]、Mightysil RP-18 PA、Mightysil RP-18 GP Aqua [ともに関東化学 (株) 製、内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm] を比較検討した。その結果、ピーク形状がもっとも良好であった Atrantis T3 を選択した。

移動相条件については、最初にフローインジェクション分析を用いて添加剤の検討を行った。アセトニトリル及び水 (1 : 1) 混液、水及びメタノール (1 : 1) 混液に各種添加剤 [ギ酸 (0.05~0.2 vol%)、酢酸 (0.05~0.2 vol%)、ギ酸アンモニウム (2.5~7.5 mmol/L) 及び酢酸アンモニウム (2.5~7.5 mmol/L)] を添加してオキシリニック酸のピーク強度を比較した。その結果、両溶媒ともにピーク面積は、ギ酸アンモニウム > 酢酸アンモニウム > ギ酸 > 酢酸という結果が得られた。そこで、ギ酸アンモニウムを添加剤としたときのピーク形状を検討した。検討した移動相 (A 液及び B 液) を以下に示した。なお、流速は 0.2 mL/min、A : B は 13 : 7 に設定した。

I A : 水、B : アセトニトリル

II A : 2.5 mmol/L、5 mmol/L または 7.5 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液、
B : アセトニトリル

III A : 0.05 vol%、0.1 vol% または 0.2 vol% ギ酸含有 5 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液、
B : アセトニトリル

検討の結果、

I リーディング及びテーリングが認められた (図 4)。

II リーディングに改善が認められたが、テーリングは改善が認められなかった (図 5)。ギ酸アンモニウム濃度差によるピーク形状及び面積に差はほとんど認められなかった。

III II に比べピーク面積は低下したが、リーディング及びテーリングに改善が認められた (図 6)。0.1 vol% 及び 0.2 vol% ギ酸に比べて 0.05 vol% ギ酸はピーク形状がややブロードであった。ギ酸濃度差はピーク面積に大きな影響を与えなかった。

同様の検討を B : メタノール (A : B = 1 : 1) として行ったところ、B : アセトニトリルに比較して、ピーク形状はブロードで感度も低下した (代表的なクロマトグラムの例を図 7 に示した)。以上の結果から、移動相は、A : 0.1 vol% ギ酸含有 5 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液、B : アセトニトリルを選択した。

次に、アイソクラティック分析とグラジエント分析における測定値への影響を比較した。茶のブランク試験溶液から 0.01 mg/L のマトリックス添加標準溶液 (Mt) を調製し、溶媒標準溶液 (Std) と面積を比較した。その結果、アイソクラティック分析の「Mt の面積」 / 「Std の面積」は 0.98、グラジエント分析では 0.79 であり、グラジエント分析において約 20% のイオン化抑制が認められたことからアイソクラティック分析を選択した。また、上記マトリックス添加標準溶液を 5 回繰り返しアイソクラティック分析したところ、いずれもピーク形状は良好であり、保持時間の相対標準偏差 (RSD) は 0.2%、面積については 1.1% と精度良く測定可能であった。

以上の検討結果から、HPLC 条件は、分析カラムに Atrantis T3 を使い、A : 0.1% ギ酸含有 5 mmol/L ギ酸アンモニウム、B : アセトニトリル (A : B = 13 : 7) のアイソクラティック分析とした。

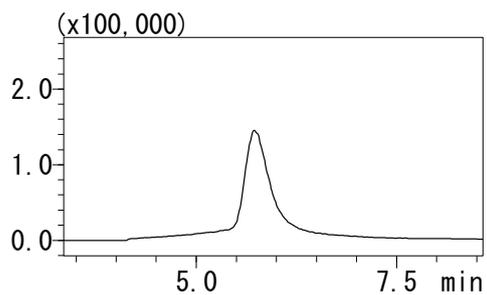


図4 A : 水、B : アセトニトリル
Std : 0.01 mg/L

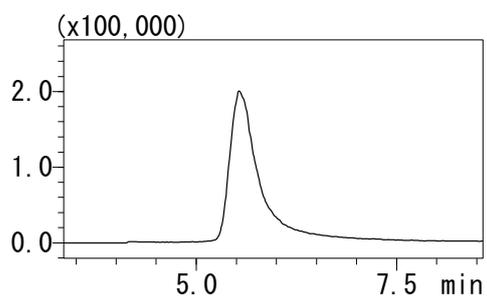


図5 A : 5 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液、B : アセトニトリル
Std : 0.01 mg/L

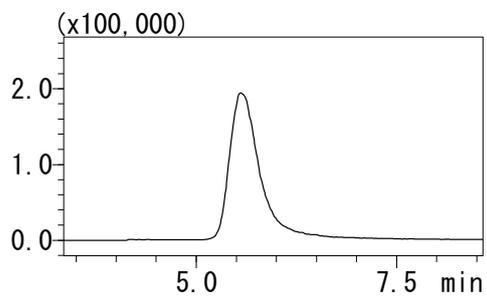


図6 A : 0.1 vol%ギ酸含有 5 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液、B : アセトニトリル
Std : 0.01 mg/L

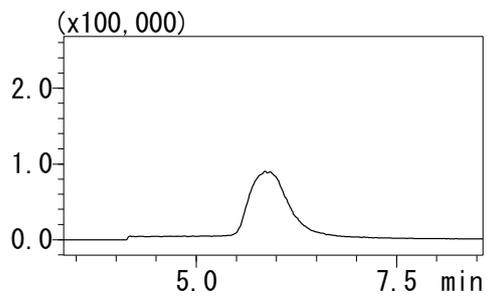


図7 A : 0.1 vol%ギ酸含有 5 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液、B : メタノール
Std : 0.01 mg/L

(3) 検量線

オキシリニック酸の検量線の例として、図 8-1 に 0.025～0.15 mg/L 及び図 8-2 に 0.000125～0.00075 mg/L の濃度範囲で作成した検量線を示した。検量線の決定係数 r^2 は 0.999 以上であり、良好な直線性を示した。

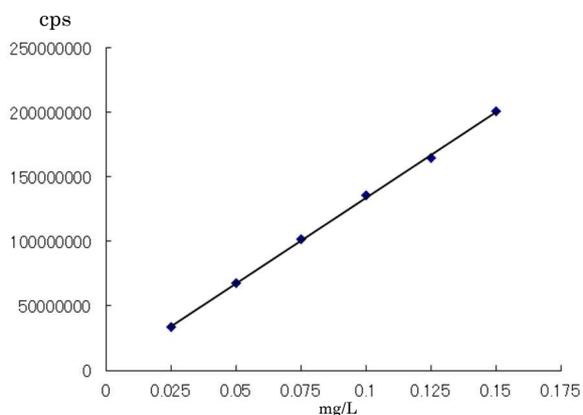


図 8-1 オキシリニック酸の検量線の例

濃度範囲：0.025～0.15 mg/L

$$y = 1328298301x + 1084372$$

$$r^2 = 0.9994$$

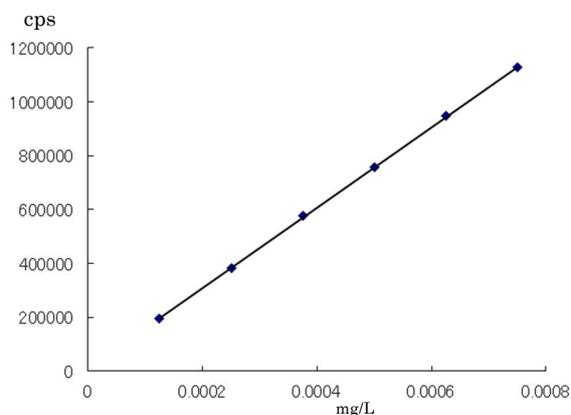


図 8-2 オキシリニック酸の検量線の例

濃度範囲：0.000125～0.00075 mg/L

$$y = 1495515429x + 9751$$

$$r^2 = 0.9999$$

(4) 定量限界

定量限界の算出結果を以下に示した。

- ・ 穀類：0.01 mg/kg

[試験溶液量 5 (mL) / 試験溶液中の試料量 0.25 (g)]

× [オキシリニック酸の定量限界相当量 0.0025 (ng) / 注入量 5 (μL)]

- ・ 果実及び野菜：0.01 mg/kg

[試験溶液量 10 (mL) / 試験溶液中の試料量 0.5 (g)]

× [オキシリニック酸の定量限界相当量 0.0025 (ng) / 注入量 5 (μL)]

- ・ 茶：0.04 mg/kg

[試験溶液量 10 (mL) / 試験溶液中の試料量 0.125 (g)]

× [オキシリニック酸の定量限界相当量 0.0025 (ng) / 注入量 5 (μL)]

2. 試験溶液調製法の検討

(1) 抽出方法の検討

① 抽出溶媒の検討

抽出溶媒としてアセトニトリル、アセトン及びメタノールについて検討した。各試料（玄米 5 g、チンゲンサイ 10 g 及び茶 2.5 g）にオキシリニック酸を 50 µg 添加し、30 分間放置した後、玄米と茶は水 10 mL を加えて 30 分間放置し、各抽出溶媒 50 mL を加えてホモジナイズ抽出し、吸引ろ過した（セライトは未使用）。ろ紙上の残留物を回収し、抽出溶媒 25 mL を加えて上記と同様に操作し、ろ液を合わせ、抽出溶媒で 100 mL に定容し、試験溶液とした。これらの試験溶液について、各試料のマトリックス添加標準溶液を用いて回収率を求めた。その結果を表 1 に示した。玄米及びチンゲンサイでは、アセトニトリル及びアセトンにおいていずれも 95% 以上の良好な回収率が得られたものの、メタノールでは 80% 台の回収率であった。また、茶では、アセトニトリル及びアセトンでは各々 81% 及び 80% の回収率であったが、メタノールでは 58% であり、検討した 3 種の溶媒のうち、メタノールは他の溶媒に比較して低回収率という傾向が認められた。アセトニトリル及びアセトンを比較すると回収率に差は認められなかったが、今回は厚生労働省通知 LC-MS による一斉分析法 I（農産物）等で抽出溶媒として用いられ、アセトンに比べて脂質及び葉緑素等の抽出が少ないアセトニトリルを用いて、さらに検討を行った。

茶の回収率が他の食品に比べて低かったことから、茶を用いて抽出溶媒の検討を行った。茶 2.5 g にオキシリニック酸を 50 µg 添加した後、各種溶媒を用いて上記と同様に操作し、マトリックス添加標準溶液により回収率を求めた。その結果を表 2 に示した。アセトニトリル及び水（9：1）混液による抽出では 90%、1 vol% 塩酸・アセトニトリル溶液では 82%、アセトニトリル及び 1 mol/L 塩酸（9：1）混液では 98% の回収率が得られた。そこで、アセトニトリル及び 1 mol/L 塩酸の比率を検討したところ、（19：1）混液及び（4：1）混液の回収率はともに 97% であった。以上の結果から、抽出溶媒としてアセトニトリル及び 1 mol/L 塩酸（9：1）混液を選択した。

表 1 各種抽出溶媒による回収率の比較

食品名	回収率 (%)		
	アセトニトリル	アセトン	メタノール
玄米	96	96	88
チンゲンサイ	97	95	82
茶	81	80	58

表 2 抽出溶媒による回収率の比較

抽出溶媒	回収率 (%)
アセトニトリル及び水（9：1）混液	90
1 vol% 塩酸・アセトニトリル溶液	82
アセトニトリル及び 1 mol/L 塩酸（9：1）混液	98
アセトニトリル及び 1 mol/L 塩酸（19：1）混液	97
アセトニトリル及び 1 mol/L 塩酸（4：1）混液	97

試料：茶、添加濃度：20 mg/kg

② セライトへの吸着の検討

オキシリニック酸は土壤に吸着するとの報告がある¹⁾。吸引ろ過ではセライトをろ過補助剤として使用することから、オキシリニック酸のセライトへの吸着を検討した。アセトニトリル及び1 mol/L 塩酸 (9 : 1) 混液で調製した 0.001 mg/L オキシリニック酸標準溶液 50 mL を遠沈管に採り、セライト 5 g を加えて 1 分間激しく振とうした後、遠心分離し、上澄液を試験溶液として LC-MS/MS 測定した。比較として、アセトニトリル及び水 (9 : 1) 混液でも同様に操作した。測定の結果、アセトニトリル及び水 (9 : 1) 混液を用いたとき、試験溶液中のオキシリニック酸の濃度は 0.00090 mg/L ($n=1$) であったのに対し、アセトニトリル及び 1 mol/L 塩酸 (9 : 1) 混液では 0.00097 mg/L ($n=2$) であった。以上のことから、オキシリニック酸は、使用する抽出溶媒によってはセライトに吸着する可能性が考えられたが、アセトニトリル及び 1 mol/L 塩酸 (9 : 1) 混液ではセライトにほとんど吸着しないと考えられた。

(2) 精製方法の検討

① グラファイトカーボンミニカラムの検討

抽出液にはクロロフィルなどの色素や脂質などが含まれる場合があるため、精製を行うこととし、グラファイトカーボンミニカラムの使用を検討した。Agilent Technologies 社製 Bond Elut Carbon (250 mg) をアセトニトリル 10 mL で予備洗浄した後、オキシリニック酸 5 µg (100 mg/L アセトニトリル標準溶液を 0.05 mL) を負荷し、アセトニトリル 10 mL を注入したところ、オキシリニック酸の溶出は認められなかった。引き続きトルエン及びアセトニトリル (1 : 3) 混液 30 mL を注入したところ、オキシリニック酸は 86% 回収された。次にアセトニトリルに替えてメタノールを用いたところ、メタノールのみでは溶出は認められず、トルエン及びメタノール (1 : 3) 混液 30 mL で 99% が回収された。Agilent Technologies 社製 Bond Elut Carbon (500 mg) についても同様に検討を行ったが、トルエン及びアセトニトリル (1 : 3) 混液 30 mL による溶出で 87%、トルエン及びメタノール (1 : 3) 混液 30 mL による溶出で 91% の回収率であった。以上の結果から、250 mg のミニカラムを用いてメタノール系の溶媒で溶出することにした。

次に Bond Elut Carbon (250 mg) の溶出パターンについて検討した。同時にミニカラムのロット間差及びメーカー間差についても確認した。ロット間差については、Bond Elut Carbon (250 mg) を 3 ロット (A、B 及び C)、メーカー間差については、ジーエルサイエンス社製 InertSep GC (250mg) 及び Sigma-Aldrich 社製 Supelclean ENVI-Carb (250 mg) を用いて検討した。結果を表 3 に示した。Bond Elut Carbon では、いずれのロットにおいてもメタノール 10 mL ではオキシリニック酸は溶出せず、トルエン及びメタノール (1 : 3) 混液 25 mL でほぼ全量が溶出し、顕著なロット間差は認められなかった。InertSep GC は Bond Elut Carbon とほぼ同様な溶出パターンを示し、回収率も 101% と良好であった。一方、ENVI-Carb は回収率が 30% と低かった。以上の検討結果から、本試験法開発では、Bond Elut Carbon 及び InertSep GC が使用可能と考えられた。今回行った添加回収試験においては、Bond Elut Carbon を用い、抽出溶媒を負荷した後、メタノール 10 mL で洗浄し、トルエン及びメタノール (1 : 3) 混液 25 mL で溶出することとした。本精製方法により、色素の大部分が除去可能であった。なお、茶試料に基準値濃度添加した抽出液については、Bond Elut Carbon 及

び InertSep GC 両方で精製し、真度等を比較した。その結果については、【結果及び考察】
3. 添加回収試験で述べる。

表3 グラファイトカーボンミニカラムの溶出パターン

製品名	回収率 (%)						合計
	メタノール 10 mL	トルエン及びメタノール (1:3) 混液					
		0-5 mL	5-10 mL	10-15 mL	15-20 mL	20-25 mL	
Bond Elut Carbon (250 mg) A	ND	60	36	3	3	<1	102
Bond Elut Carbon (250 mg) B	ND	46	46	5	1	<1	98
Bond Elut Carbon (250 mg) C	ND	62	38	1	<1	<1	101
InertSep GC (250 mg)	ND	52	47	2	<1	<1	101
ENVI-Carb (250 mg)	ND	6	14	5	3	2	30

負荷量：5 µg (100 mg/L アセトニトリル標準溶液を 0.05 mL) ND：不検出

② 溶解溶媒の検討

グラファイトカーボンミニカラムの溶出液を減圧下濃縮し、窒素気流下で乾固した残留物を溶解する溶媒について検討した。トルエン及びメタノール (1:3) 混液 25 mL にオキシソリニック酸 0.05 µg (2 mg/L アセトン標準溶液を 0.025 mL) を添加して 40°C 以下で濃縮し、溶媒を除去した。残留物にアセトニトリル、アセトニトリル及び水 (9:1) 混液、メタノール、メタノール及び水 (9:1) 混液をそれぞれ加えて溶解し、5 mL に定容して試験溶液とし、オキシソリニック酸の回収率を検討した。その結果、各溶媒の回収率は、アセトニトリルでは 12%、アセトニトリル及び水 (9:1) 混液では 99%、メタノールでは 96%、メタノール及び水 (9:1) 混液では 99% であった。以上の結果から、残留物を溶解する溶媒として、アセトニトリル及び水混液またはメタノール及び水混液が適していると考えられた。今回、LC-MS/MS 分析の移動相はアセトニトリル系であるため、アセトニトリル及び水混液を使用することにした。

次にアセトニトリル及び水混液の混合比率について検討した。試料中のマトリックス成分の影響を確認するため、茶のブランク抽出液を使用して以下のとおり検討を行った。茶のブランク抽出液 5 mL をグラファイトカーボンミニカラムに負荷し、流出液は捨てた。次いでメタノール 10 mL を注入し、流出液は捨てた。トルエン及びメタノール (1:3) 混液 25 mL を注入し、溶出液にオキシソリニック酸 0.05 µg (2 mg/L アセトン標準溶液を 0.025 mL) を添加して 40°C 以下で濃縮し、溶媒を除去した後、残留物にアセトニトリル及び水 (9:1) ~ (1:1) 混液 10 mL を加え、残留物の溶解性を確認した。その結果、残留物はアセトニトリル含量が高い方が溶けやすく、(3:2) 及び (1:1) 混液では不溶物が認められた。そこで、(9:1)、(4:1) 及び (7:3) 混液について LC-MS/MS 測定を行った。オキシソリニック酸の回収率は (9:1) 混液では 100%、(4:1) 混液及び (7:3) 混液では 99% (いずれも $n=3$) であった。また、オキシソリニック酸のピーク形状は、(7:3) 混液が最も良好であった。以上の結果から、溶媒はアセトニトリル及び水 (7:3) 混液を選択した。なお、茶試料によっては、マトリックスが溶けにくい事例が認められたが、超音波処理により容易に溶解した。

③ LC-MS/MS測定用バイアル等の検討

オキシソリニック酸のLC-MS/MS測定用バイアル及びインサートについて検討した。今回

の検討では、ポリプロピレン製バイアル（Waters社製）、ガラス製バイアル（不活性化処理なし、Agilent Technologies社製）、ガラス製バイアル（不活性化処理済み、Waters社製）及びガラス製インサート（不活性化処理済み、Agilent Technologies社製）を使用した。（株）AGCテクノグラス製ポリプロピレン製15 mLチューブ（以下、PPチューブ）で0.001 mg/Lオキシソリニック酸標準溶液 [アセトニトリル及び水（7：3）混液] を調製し、その一部を上記の各容器に分注した。分注してから0時間、24時間及び72時間経過後にPPチューブ及び各容器で保管した標準溶液を測定し、ピーク面積を比較した。なお、PPチューブは冷蔵庫（4℃）に保管し、設定時間経過後にその都度標準溶液の一部をポリプロピレン製バイアル（Waters社製）に分注して測定した。その他の容器は、分注後、HPLCのオートサンプラ（4℃）で保管し、設定時間経過後にそのまま測定した。結果を表4に示した。表中では、PPチューブのピーク面積に対する各容器のピーク面積比を示した。PPチューブの面積を100すると、各容器のピーク面積は、0時間では99～100、24時間後は99～102であり、容器間の差はほとんど認められなかった。一方、72時間経過後では、ガラス製バイアル（不活性化処理なし）で93、ガラス製バイアル（不活性化処理済み）で96と面積の低下が認められた。以上の結果から、どの容器を用いても24時間までは測定値に対する影響がないと思われたが、今回の測定ではガラス製インサート（不活性化処理済み）を使用した。

表4 LC-MS/MS測定用バイアル等中保管時間に対するピーク面積の変動状況

分注後経過時間 (hr)	ポリプロピレン製 バイアル	ガラス製バイアル (不活性化処理なし)	ガラス製バイアル (不活性化処理済み)	ガラス製インサート (不活性化処理済み)
0	100	99	100	99
24	101	99	100	102
72	101	93	96	103

PPチューブのピーク面積を100として各ピーク面積を換算

3. 添加回収試験

農産物7食品（玄米、ばれいしょ、チンゲンサイ、たまねぎ、日本なし、すもも及び茶）を用いて、[実験方法] の7. 試験溶液の調製に従ってオキシソリニック酸の添加回収試験を実施した。添加濃度は、基準値濃度及び定量限界濃度（0.01 mg/kg、茶の場合は0.04 mg/kg）の2濃度とした。なお、基準値（20 mg/kg）濃度を添加した茶の試験溶液は、高濃度のために検量線の直線性が低下したことから、アセトニトリル及び水（7：3）混液で10倍に希釈して測定した。添加回収試験における各ブランク試料、添加試料及び回収率100%相当の溶媒標準溶液のクロマトグラムを図9-1～図9-14に示した。また、各ブランク試料のスキャン測定による代表的なトータルイオンクロマトグラムを図10に示した。

（1）選択性

選択性の評価結果を表5に示した。検討したいずれの試料においても、オキシソリニック酸の定量を妨害するピークは認められず、妥当性ガイドラインの選択性の目標値²⁾（定量限界が基準値の1/3以下の場合、妨害ピークのピーク面積（又は高さ）が基準値に相当するピーク面積（又は高さ）の1/10未満）を満たしていた。また、定量限界相当濃度においても定量を妨害するピークは認められなかった。

(2) 真度、精度及び定量限界

真度、精度及び定量限界の評価結果を表6に示した。基準値濃度では、真度91.7~101.1%、併行精度0.5~2.6%、定量限界濃度では、真度88.5~98.4%、併行精度0.7~6.7%と良好な結果が得られ、妥当性評価ガイドラインの真度及び精度の目標値²⁾を満たした。また、定量限界濃度の添加試料から得られたピークのS/Nはいずれも250以上あり、十分な検出感度が得られた。

(3) 試料マトリックスの測定への影響

試料マトリックスの測定への影響について評価した結果を表7に示した。添加回収試験における回収率100%相当濃度になるように調製したマトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積比を求めたところ、0.97~1.02であり、測定に対する試料マトリックスの影響はほとんど認められなかった。添加回収試験により得られた真度を上記に示すピーク面積比で除して補正した真度を表8に示した。補正後の真度は、基準値濃度では91.7~102.2%、定量限界濃度では89.4~97.4%と良好な結果が得られた。

(4) 茶抽出液 (20 mg/kg 添加) の InertSep GC (250 mg) 精製による真度等について

基準値 (20 mg/kg) 濃度を添加した茶の抽出液を InertSep GC (250 mg) で精製し、真度等を検討した。その結果、定量を妨害するピークは認められず、真度は92.3% (Bond Elut Carbon では91.7%)、併行精度は2.3% (同1.4%)、マトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積比は0.99 (同1.00) であり、Bond Elut Carbon (250 mg) で精製した場合とほぼ同じ結果が得られた。

表5 選択性の評価

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (mg/kg)	基準値 (ppm)	妨害ピークの許容範囲の評価			ピーク面積 (高さ) ^{*1}						選択性の評価 ^{*2}		
					評価濃度 (ppm)	評価基準	面積又は高さの別	ブランク			マトリックス添加標準溶液 ^{*2}				面積 (高さ) 比 (a)/(b)	
							面積	n=1	n=2	平均 (a)	n=1	n=2	平均 (b)			
1	オキシロニック酸	米 (玄米)	0.01	0.3	基準値	0.3	< 0.100	面積	0	0	0	16903712	16924838	16914275	0.000	○
		ばれいしよ	0.01	0.3	基準値	0.3	< 0.100	面積	0	0	0	17808324	17950101	17879213	0.000	○
		チンゲンサイ	0.01	2.	基準値	2.	< 0.100	面積	0	0	0	130137089	130327999	130232544	0.000	○
		たまねぎ	0.01	0.1	基準値	0.1	< 0.100	面積	0	0	0	10086079	10090691	10088385	0.000	○
		日本なし	0.01	0.3	基準値	0.3	< 0.100	面積	0	0	0	32954760	32895442	32925101	0.000	○
		りんご (ブルークをきり)	0.01	0.7	基準値	0.7	< 0.100	面積	0	0	0	76086648	76561200	76323924	0.000	○
		茶 ^{*4}	0.04	20.	基準値	20.	< 0.100	面積	0	0	0	58002528	58161109	58081819	0.000	○

*1 ブランク試料、標準溶液の順に注入して測定した結果から評価する。(必要に応じて起爆注入を行う。)

*2 試料中の濃度が「評価濃度」相当になるように、ブランク試料の試験溶液で調製した標準溶液 (マトリックス添加標準溶液) を用いる。ブランク試料に妨害ピークが観察されなかった場合には、標準溶液のピーク面積 (高さ) は求めなくてもよい。

*3 面積 (高さ) 比が、妨害ピークの許容範囲の評価基準に適合する場合には「○」、適合しない場合には「×」を記載する。

*4 試験溶液をアセトニトリル及び水 (7:3) 混液で10倍希釈して分析した。

表 6 真度、精度及び定量限界の評価

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (mg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	定量限界 の評価 ^{*1}	検量線			回収率 (%)					真度 (%)	併行精度 (RSD%)	S/N ^{*2}		
							傾き	切片	r ² 値	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5			Max.	Min.	平均値
1	オキシロニック酸 (基準値濃度添加)	米 (玄米)	0.01	0.3	0.3	—	182375	-744137	0.9997	98.0	101.1	100.3	103.5	102.8	101.1	2.2			—
		ばれいしょ	0.01	0.3	0.3	—	181094	-300920	0.9994	96.1	96.8	99.2	101.0	102.3	99.1	2.6			—
		チンゲンサイ	0.01	2.	2.	—	1328298	1084372	0.9994	100.1	101.1	99.4	99.3	98.2	99.6	1.1			—
		たまねぎ	0.01	0.1	0.1	—	105538	98238	0.9979	95.6	95.3	96.1	94.8	95.2	95.4	0.5			—
		日本なし	0.01	0.3	0.3	—	330423	331821	0.9997	96.4	98.7	97.5	97.8	97.9	97.7	0.9			—
		すもも (プルーンを含む)	0.01	0.7	0.7	—	808607	-758009	0.9996	94.1	93.4	93.0	94.4	95.0	94.0	0.8			—
		茶 ^{*3}	0.04	20.	20.	—	587121	570294	0.9997	90.1	93.1	92.9	91.3	91.3	1.4			—	
		オキシロニック酸 (定量限界濃度添加)	0.01	0.3	0.01	S/N	7593	12796	0.9995	90.7	91.9	93.3	97.7	97.2	94.2	3.3	338.3	371.6	354.9
		ばれいしょ	0.01	0.3	0.01	S/N	10594	5587	0.9999	93.8	97.4	99.2	97.7	97.0	97.0	2.1	449.6	475.6	462.6
		チンゲンサイ	0.01	2.	0.01	S/N	9540	61229	0.9915	94.1	93.1	93.4	96.8	94.6	94.4	1.6	405.1	428.8	417.0
		たまねぎ	0.01	0.1	0.01	S/N	9014	4700	0.9989	93.6	109.6	96.7	93.6	98.4	98.4	6.7	246.1	266.9	256.5
		日本なし	0.01	0.3	0.01	S/N	10451	27677	0.9994	98.9	97.6	97.0	96.5	97.1	97.4	0.9	507.1	394.0	450.5
		すもも (プルーンを含む)	0.01	0.7	0.01	S/N	11198	12870	0.9995	92.4	91.9	92.7	91.3	92.7	0.7	429.9	365.9	397.9	
		茶	0.04	20.	0.04	S/N	10937	27753	0.9994	85.1	88.7	90.1	89.0	89.5	2.2	395.0	520.5	457.8	

*1 S/Nを求める必要がある場合には「S/N」と表示される。
 *2 得られた回収率の中で最大値を与えるピーク (Max.) 及び最小値を与えるピーク (Min.) のそれぞれのS/Nを求める。
 *3 試験溶液をアセトニトリル及び水 (7 : 3) 混液で10倍希釈して分析した。

表 7 試料マトリックスの測定への影響

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (mg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	標準溶液 濃度 ^{*1} (mg/L)	ピーク面積 (高さ) ^{*2}								
							面積又は 高さの別	ブランク ^{*3}	マトリックス添加標準溶液 ^{*4}			溶媒標準溶液			ピーク面積 (高さ) 比 ^{*5}
									n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均	
1	オキシロニック酸 (基準値濃度添加)	米 (玄米)	0.01	0.3	0.3	0.015	面積	0	16903712	16924838	16914275	16896865	16876162	16886514	1.00
		ばれいしょ	0.01	0.3	0.3	0.015	面積	0	17808324	17950101	17879213	18446584	18536414	18491499	0.97
		チンゲンサイ	0.01	2.	2.	0.1	面積	0	130137089	130327999	130232544	130372877	129896670	130134774	1.00
		たまねぎ	0.01	0.1	0.1	0.005	面積	0	10086079	10090691	10088385	10047013	9919156	9983085	1.01
		日本なし	0.01	0.3	0.3	0.015	面積	0	32954760	32895442	32925101	33580859	33203579	33392219	0.99
		すもも (プルーンを含む)	0.01	0.7	0.7	0.035	面積	0	76086648	76561200	76323924	74583864	76230446	75407155	1.01
		茶 ^{*6}	0.04	20.	20.	0.025	面積	0	58002528	58161109	58081819	58184045	57597047	57890546	1.00
		オキシロニック酸 (定量限界濃度添加)	0.01	0.3	0.01	0.0005	面積	0	762072	764378	763225	749847	751200	750524	1.02
		ばれいしょ	0.01	0.3	0.01	0.0005	面積	0	1064871	1035557	1050214	1052418	1045212	1048815	1.00
		チンゲンサイ	0.01	2.	0.01	0.0005	面積	0	1054296	1051145	1052721	1032354	1054317	1043336	1.01
		たまねぎ	0.01	0.1	0.01	0.0005	面積	0	918139	915891	917015	911290	904825	908058	1.01
		日本なし	0.01	0.3	0.01	0.0005	面積	0	1121301	1114326	1117814	1101677	1090326	1096002	1.02
		すもも (プルーンを含む)	0.01	0.7	0.01	0.0005	面積	0	1105141	1105604	1105373	1096422	1100381	1098402	1.01
		茶	0.04	20.	0.04	0.0005	面積	0	1093627	1082864	1088246	1108406	1091099	1099753	0.99

*1 添加回収試験における回収率100%相当濃度になるように、ブランク試料の試験溶液で調製した標準溶液 (マトリックス添加標準溶液) 及び溶媒で調製した標準溶液 (溶媒標準溶液) を作成する。
 *2 マトリックス添加標準溶液及び溶媒標準溶液の順に交互に2回以上測定した結果から評価する。(必要に応じて起爆注入を行う。)
 *3 ブランクにピークが認められた場合には、マトリックス添加標準溶液の値はブランク値を差し引いた値を用いる。
 *4 マトリックス添加標準溶液は試験当日のブランク試料の試験溶液を用いて調製する。
 *5 マトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積 (又は高さ) の比を求める。
 *6 試験溶液をアセトニトリル及び水 (7 : 3) 混液で10倍希釈して分析した。

表 8 補正真度

分析対象化合物	食品名	真度 (%)	ピーク面積比	補正真度 (%)
オキシリニック酸 (基準値濃度添加)	米 (玄米)	101.1	1.00	101.1
	ばれいしょ	99.1	0.97	102.2
	チンゲンサイ	99.6	1.00	99.6
	たまねぎ	95.4	1.01	94.5
	日本なし	97.7	0.99	98.7
	すもも (プルーンを含む)	94.0	1.01	93.1
	茶*	91.7	1.00	91.7
オキシリニック酸 (定量限界濃度添加)	米 (玄米)	94.2	1.02	92.4
	ばれいしょ	97.0	1.00	97.0
	チンゲンサイ	94.4	1.01	93.5
	たまねぎ	98.4	1.01	97.4
	日本なし	97.4	1.02	95.5
	すもも (プルーンを含む)	92.2	1.01	91.3
	茶	88.5	0.99	89.4

* 試験溶液をアセトニトリル及び水 (7 : 3) 混液で 10 倍希釈して分析した。

4. その他の試験法検討に関連する事項

(試験法には採用しなかった事項)

① Oasis MAX ミニカラム (500 mg/6 mL、Waters 社製) による精製

オキシリニック酸はカルボン酸を有していることから、逆相-強陰イオン交換ポリマーミニカラムである Oasis MAX ミニカラムによる精製について検討した。まず、Oasis MAX ミニカラム (500 mg/6 mL) のオキシリニック酸保持性能を確認した。Oasis MAX ミニカラムにアセトニトリル 10 mL、水 10 mL、28%アンモニア水及び水 (1 : 9) 混液 10 mL を順次注入し、流出液は捨てた。このカラムにオキシリニック酸 5 µg (100 mg/L アセトニトリル標準溶液 50 µL) を負荷し、アセトニトリル、28%アンモニア水及び水混液を注入したときの溶出率を表 9 に示した。オキシリニック酸は、アセトニトリル、28%アンモニア水及び水 (2 : 1 : 7) 混液から (8 : 1 : 1) 混液各 10 mL を注入しても溶出が認められず、ミニカラムに保持することが確認された。そこで、チンゲンサイをアセトニトリルで抽出した溶液を用いて保持状況を検討したところ、アセトニトリル、28%アンモニア水及び水 (5 : 1 : 4) 混液で 30%以上の溶出が認められ、試料マトリックスにより保持状況が大きく変化することが確認されたことから、本ミニカラムによる精製は不採用とした。

表 9 Oasis MAX ミニカラムからの溶出状況

	アセトニトリル、28%アンモニア水及び水混液 (各 10 mL)						
	2 : 1 : 7	3 : 1 : 6	4 : 1 : 5	5 : 1 : 4	6 : 1 : 3	7 : 1 : 2	8 : 1 : 1
回収率 (%)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Oasia MAX (500 mg/6 mL、Waters社製)

負荷量 : 5 µg

ND : 不検出

② Oasis HLB (500 mg/6 mL、Waters 社製) による精製

Oasis HLB ミニカラム (500 mg/6 mL) の溶出状況を確認した。Oasis HLB ミニカラムにアセトニトリル 10 mL、水 10 mL を順次注入し、流出液は捨てた。このカラムにオキシリニック酸 5 µg (100 mg/L アセトニトリル標準溶液 50 µL) を負荷し、アセトニトリル及び水混液で溶出したときの溶出状況を表 10 に示した。オキシリニック酸は、アセトニトリル及び水 (3 : 7) 混液から溶出しはじめることが確認された。そこで試料をアセトニトリルで抽出した溶液を用いて検討したところ、試料マトリックスにより溶出状況が変化し、精製条件が設定不能だったことから、本ミニカラムによる精製は不採用とした。

表 10 Oasis HLB ミニカラムからの溶出状況

	アセトニトリル及び水混液 (各 10 mL)							合計
	1 : 9	2 : 8	3 : 7	4 : 6	5 : 5	6 : 4	7 : 3	
回収率 (%)	ND	ND	4	82	12	2	<1	100

Oasis HLB (500 mg/6 mL、Waters社製)

負荷量 : 5 µg

ND : 不検出

まとめ

抽出溶媒を検討した結果、アセトニトリル及び 1 mol/L 塩酸 (9 : 1) 混液を採用した。

抽出液の精製方法について、グラファイトカーボンミニカラム (250 mg) による精製を検討した。その結果、本ミニカラムを用いることで、色素が概ね除去可能であった。また、アイソクラティック測定により、LC-MS/MS 測定に対するマトリックスの影響はほとんど認められなかった。

玄米、ばれいしょ、チンゲンサイ、たまねぎ、日本なし、すもも及び茶にオキシリニック酸を基準値濃度及び定量限界濃度 (0.01 mg/kg、茶は 0.04 mg/kg) で添加し、開発した方法を用いて添加回収試験を行なったところ、いずれの試料においても選択性は問題なく、真度は 88.5~101.1%、併行精度は 0.5~6.7% の良好な結果が得られた。また、各試料におけるマトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積比は 0.97~1.02 であり、LC-MS/MS 測定において顕著なマトリックスの影響は認められなかった。定量限界については、0.01 mg/kg (茶は 0.04 mg/kg) を設定することが可能であった。

[結論]

農産物を対象としたオキシリニック酸試験法として、試料をアセトニトリル及び 1 mol/L 塩酸 (9 : 1) 混液で抽出し、グラファイトカーボンミニカラムで精製した後、LC-MS/MS で定量及び確認する方法を開発した。開発した試験法を用いて玄米、ばれいしょ、チンゲンサイ、たまねぎ、日本なし、すもも及び茶の 7 試料で添加回収試験を行ったところ、良好な結果が得られたため、本法は農産物の残留試験法として適用可能であると考えられた。

[参考文献]

1) 食品安全委員会農薬専門調査会 “農薬・動物用医薬品評価書 オキシリニック酸 (第

4版)” 2019年8月

- 2) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知“食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインの一部改正について”平成22年12月24日、食安発第1224第1号(2010)

①添加回収試験における代表的なクロマトグラム
【オキシリニック酸】

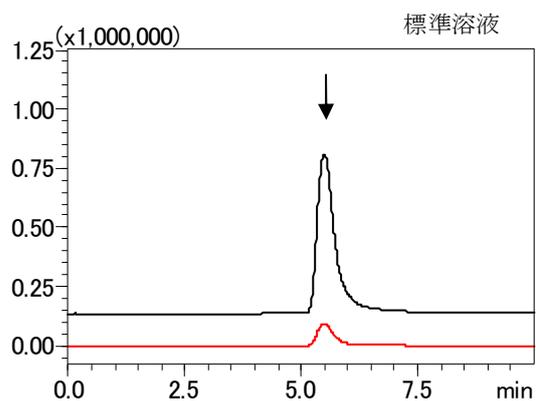
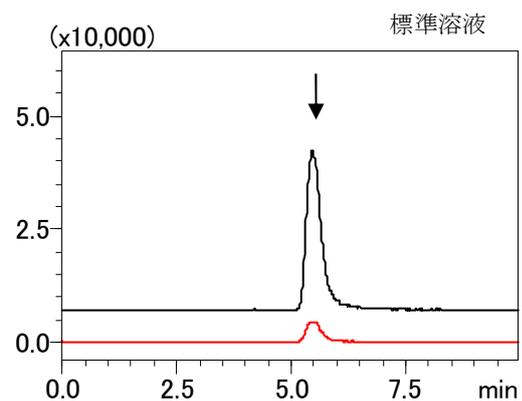
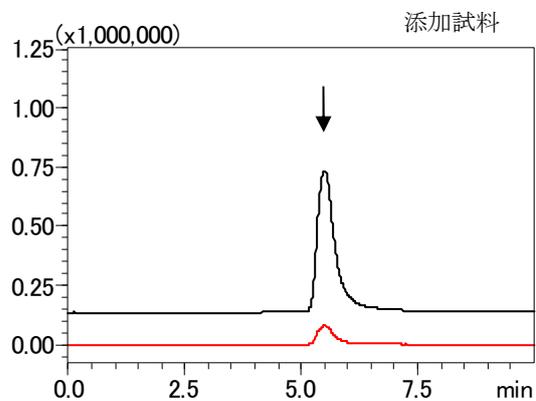
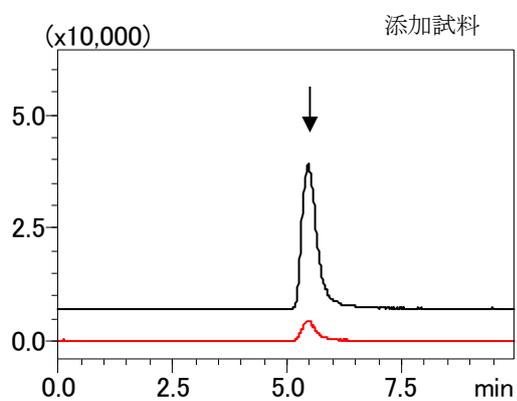
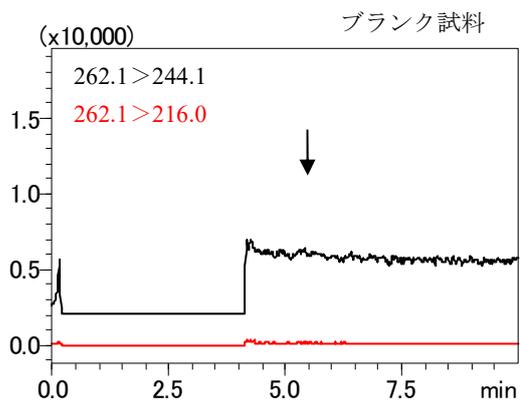
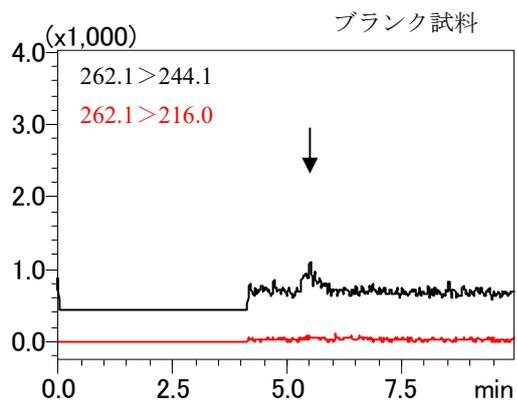


図 9-1 玄米の SRM クロマトグラム
(添加濃度 0.01 mg/kg)

図 9-2 玄米の SRM クロマトグラム
(添加濃度 0.3 mg/kg)

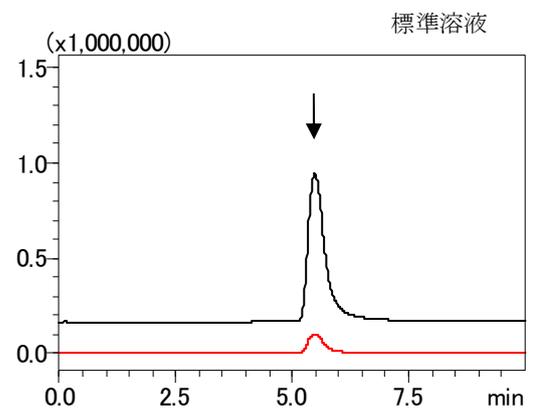
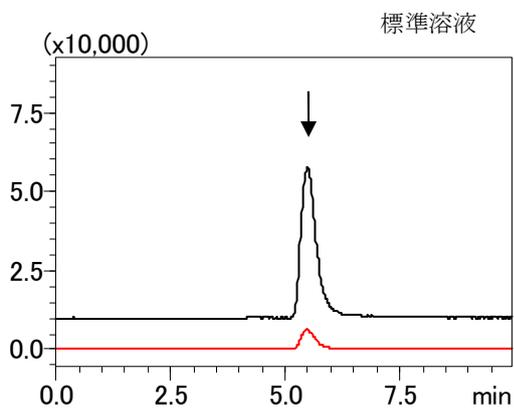
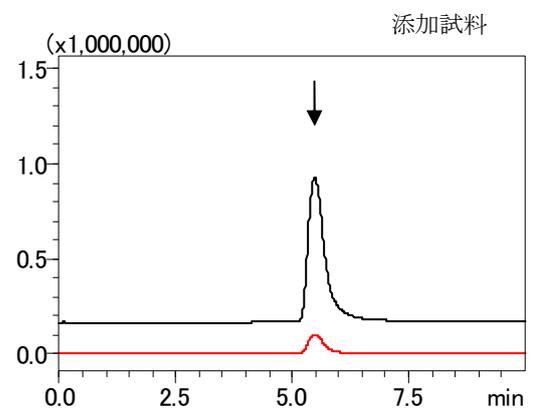
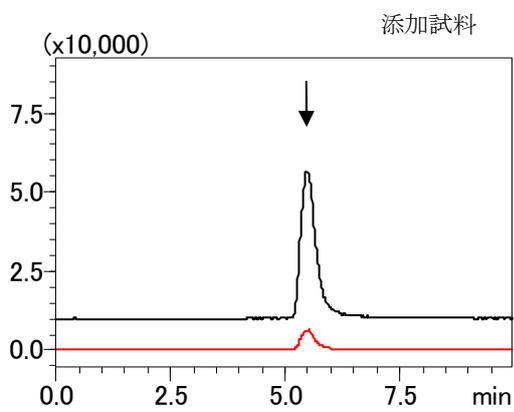
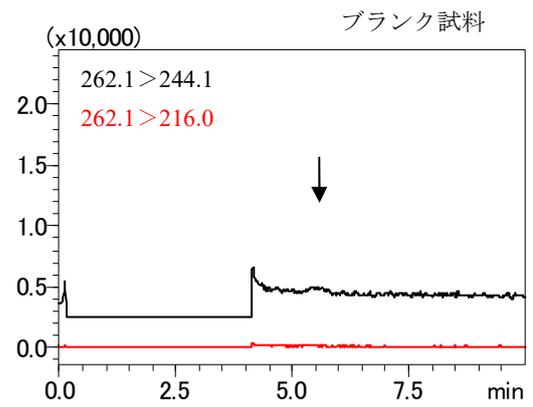
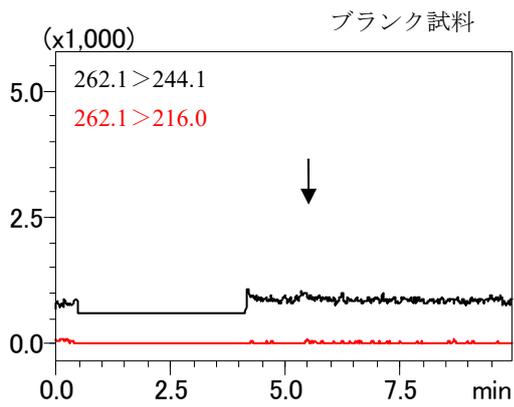


図 9-3 ばれいしょの SRM クロマトグラム
(添加濃度 0.01 mg/kg)

図 9-4 ばれいしょの SRM クロマトグラム
(添加濃度 0.3 mg/kg)

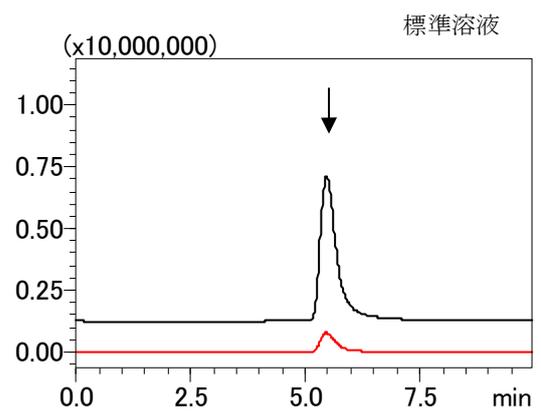
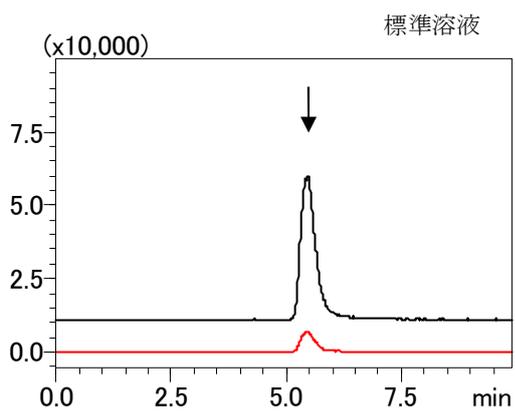
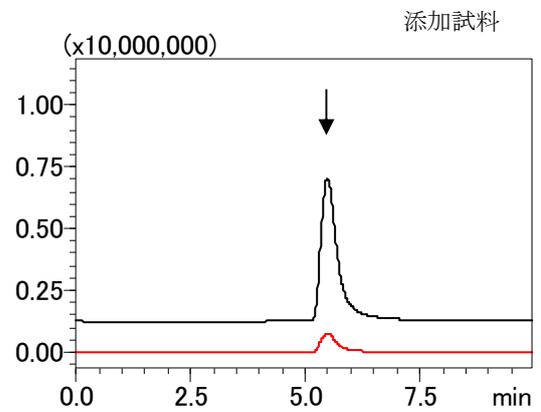
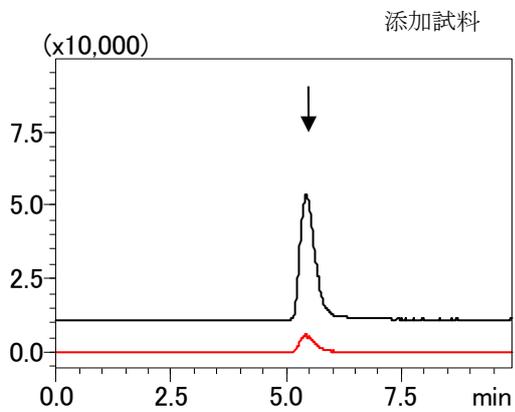
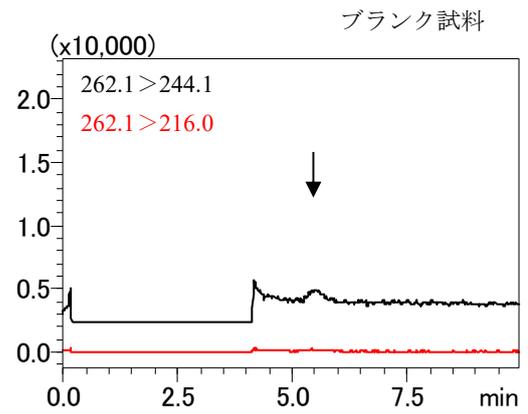
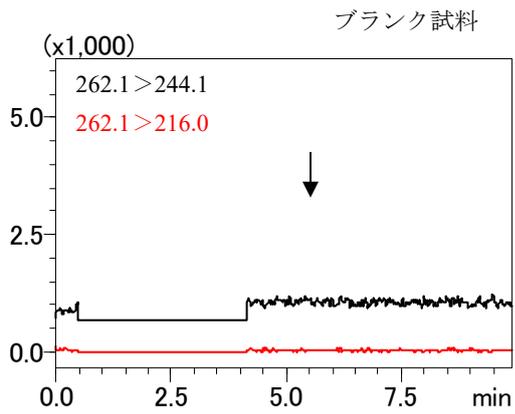


図 9-5 チンゲンサイの SRM クロマトグラム
(添加濃度 0.01 mg/kg)

図 9-6 チンゲンサイの SRM クロマトグラム
(添加濃度 2 mg/kg)

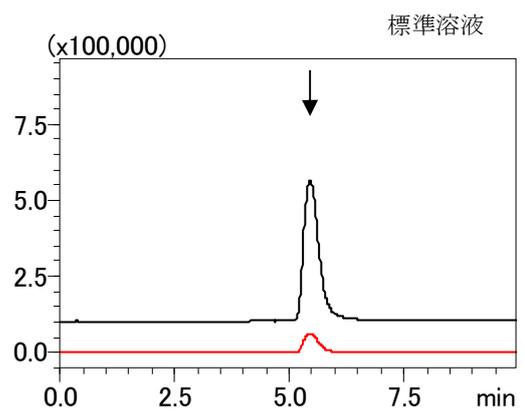
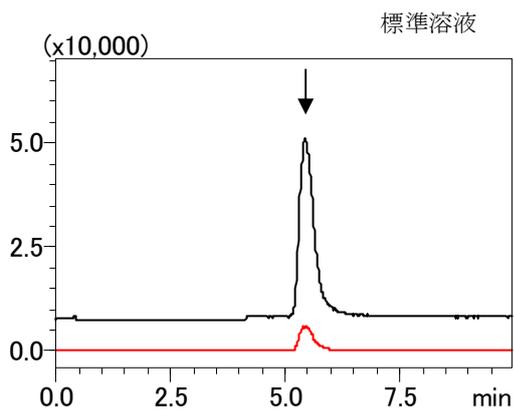
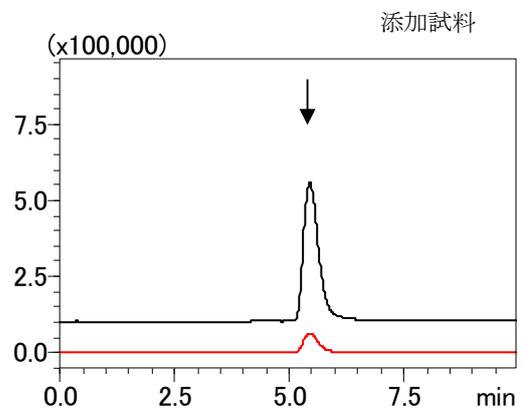
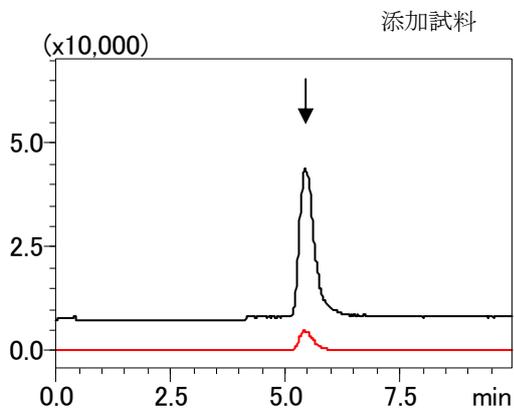
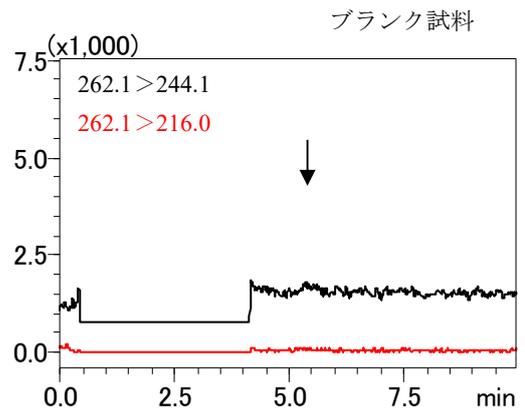
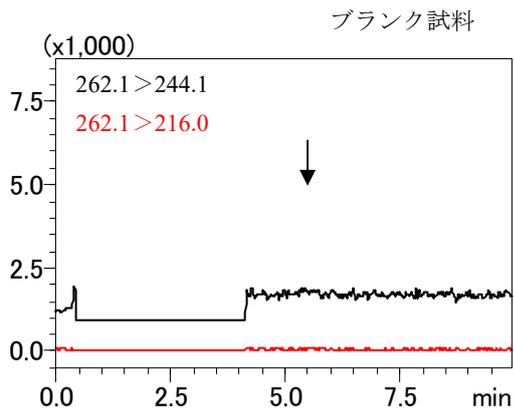


図 9-7 たまねぎの SRM クロマトグラム
(添加濃度 0.01 mg/kg)

図 9-8 たまねぎの SRM クロマトグラム
(添加濃度 0.1 mg/kg)

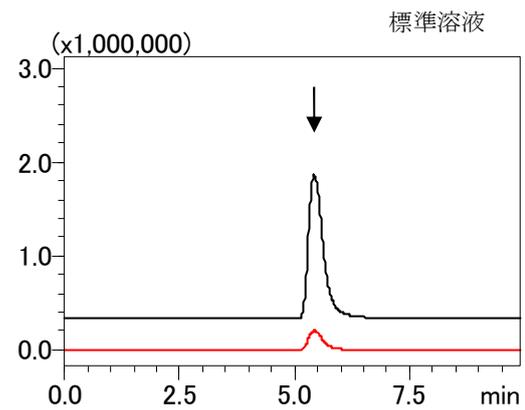
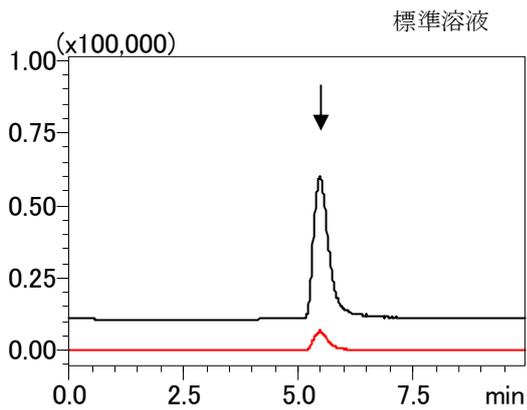
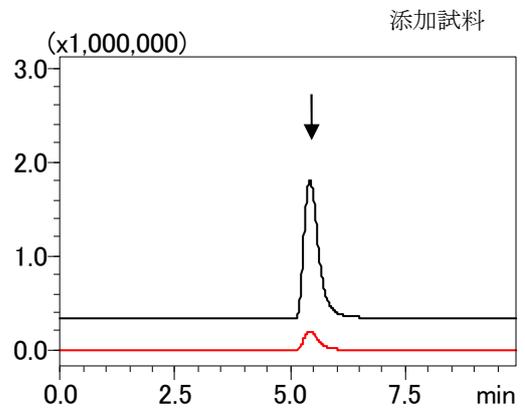
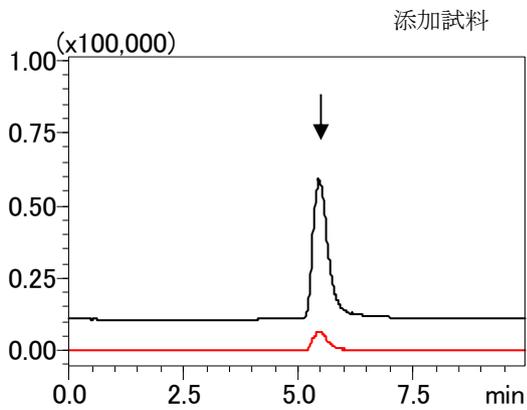
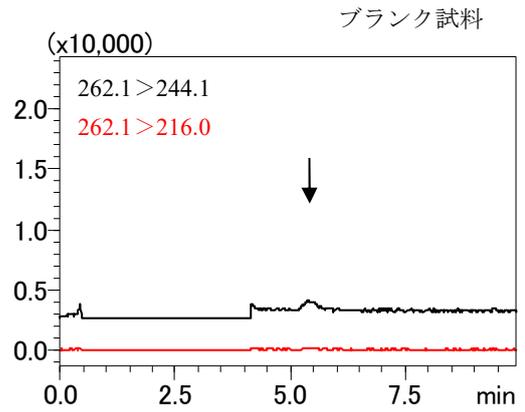
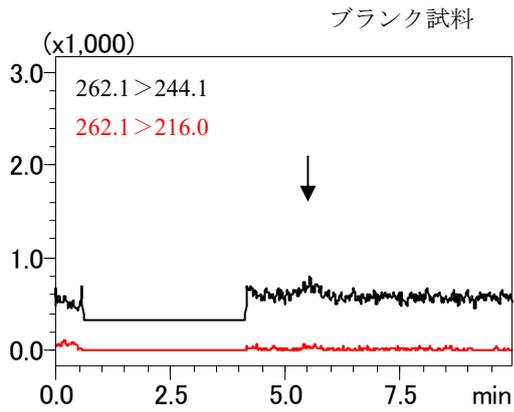


図 9-9 日本なしの SRM クロマトグラム
(添加濃度 0.01 mg/kg)

図 9-10 日本なしの SRM クロマトグラム
(添加濃度 0.3 mg/kg)

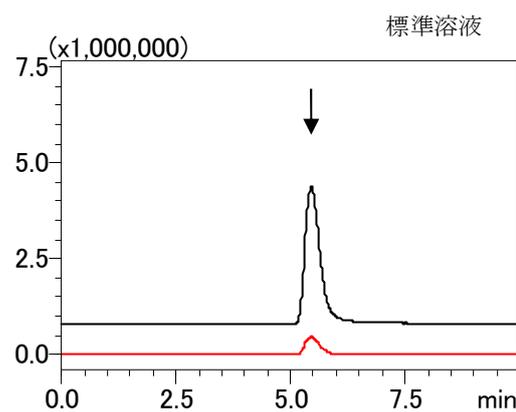
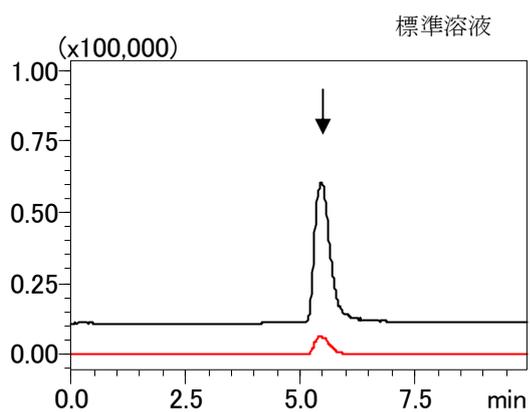
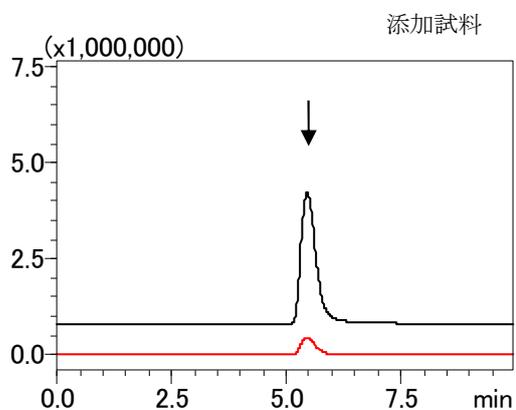
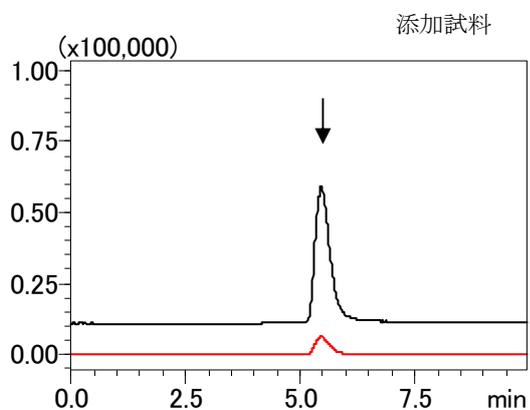
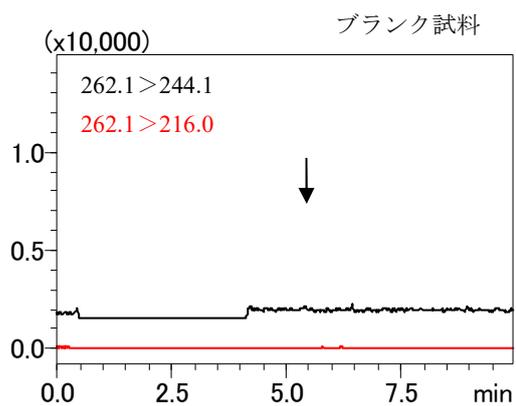
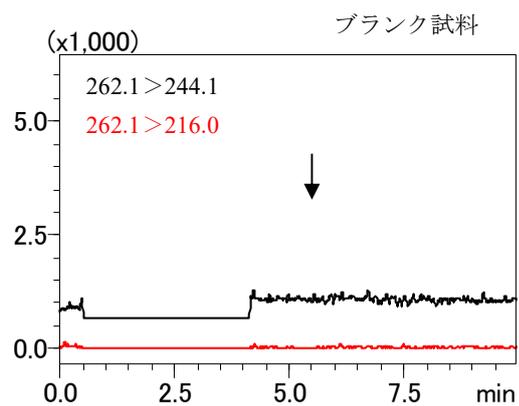


図 9-11 すもも（プルーン）の SRM クロマトグラム
(添加濃度 0.01 mg/kg)

図 9-12 すもも（プルーン）の SRM クロマトグラム
(添加濃度 0.7 mg/kg)

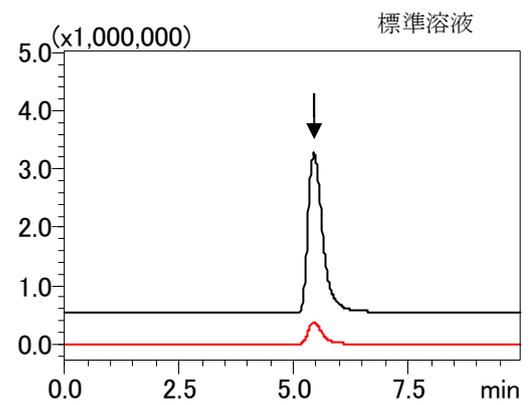
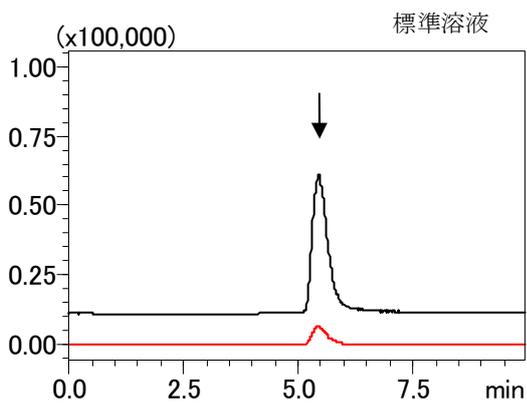
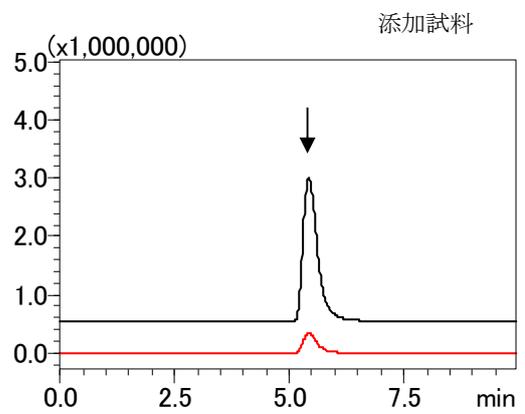
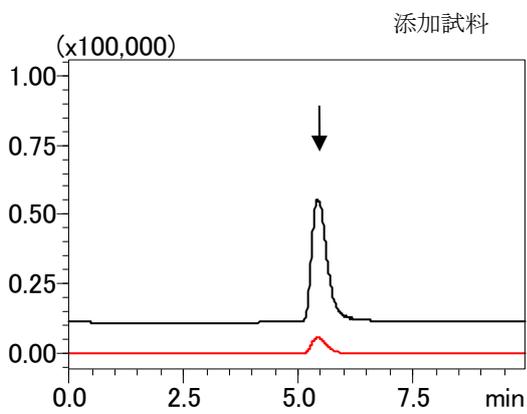
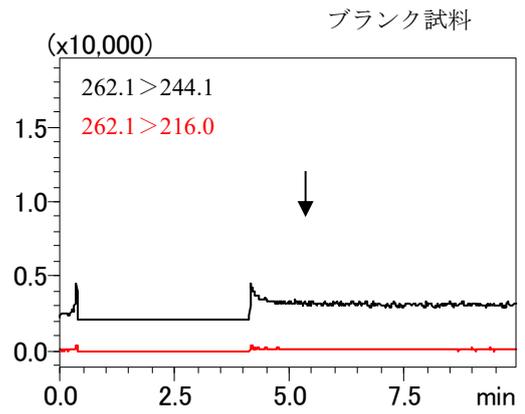
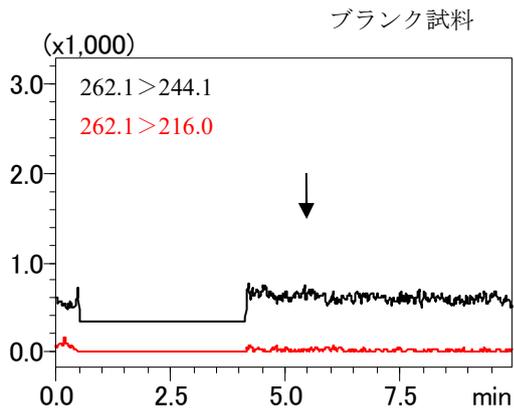


図 9-13 茶の SRM クロマトグラム
(添加濃度 0.01 mg/kg)

図 9-14 茶の SRM クロマトグラム
(添加濃度 20 mg/kg)

②ブランク試料の代表的なトータルイオンクロマトグラム

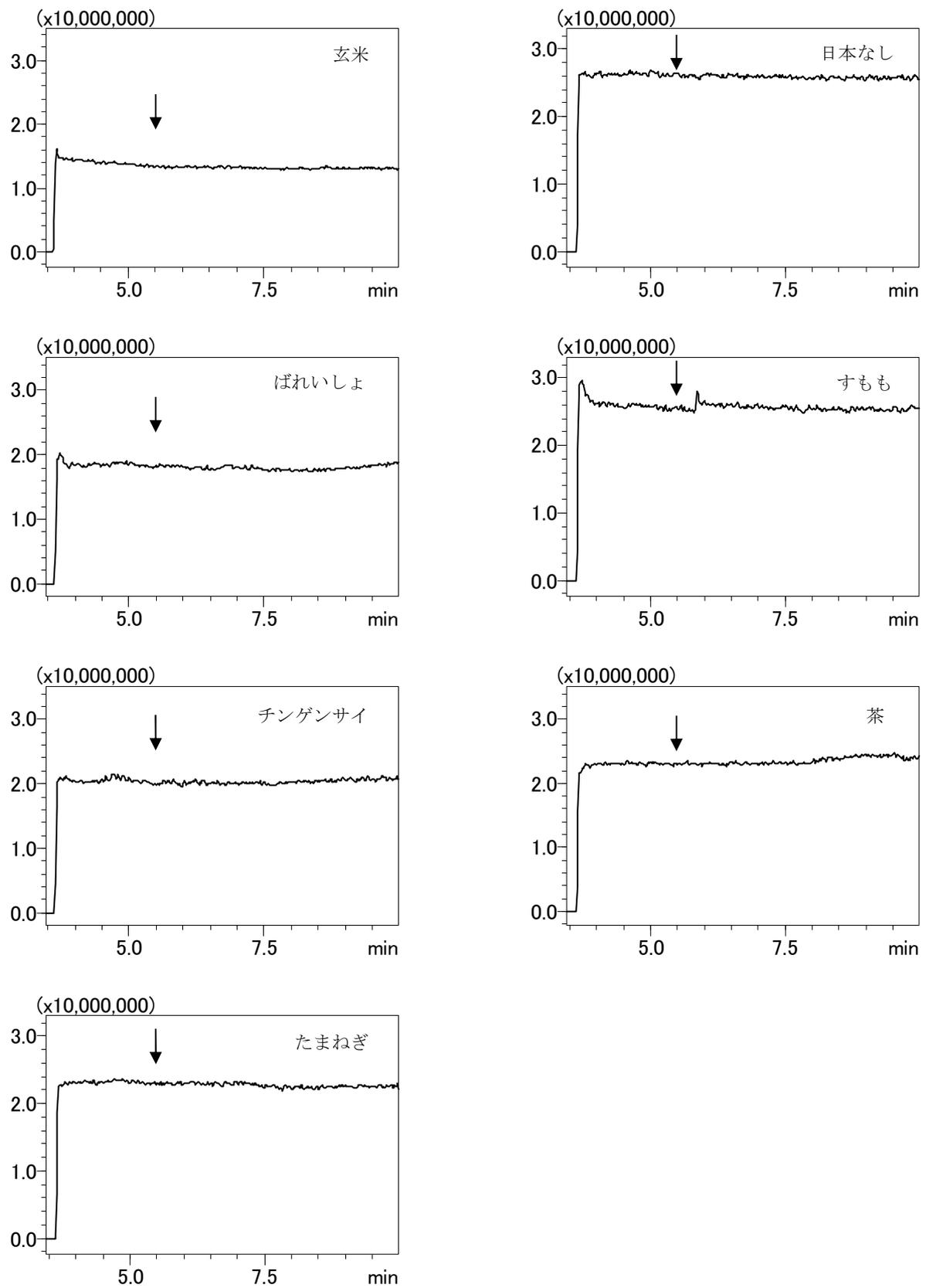


図 10 ブランク試料のトータルイオンクロマトグラム (スキャン範囲 : 50~550 amu)