

※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 物質の試験法開発報告書

ニフルスチレン酸ナトリウム試験法(畜水産物)

ニフルスチレン酸ナトリウム試験法の検討

[目的]

ニフルスチレン酸ナトリウムは、滑走細菌に対して有効な水産用医薬品である。

食用魚への使用については、代替品が開発されるまでの限定的な使用が認められていた。平成 26 年 3 月 31 日以降、国内での製造が禁止されている。

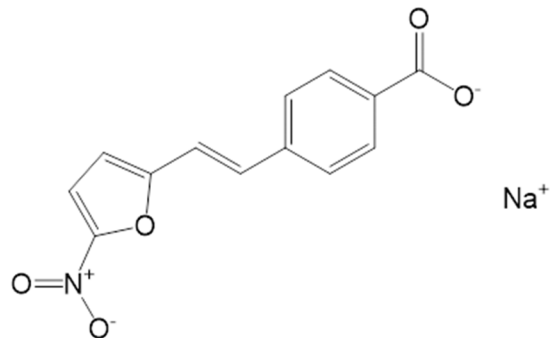
食品安全委員会における食品健康影響評価用に提出された資料等によると、ニフルスチレン酸ナトリウムは、これまで国内外において ADI の設定が行われておらず、遺伝毒性発がん性物質であることが否定できず、毒性学的な閾値の設定はできないとされている。

また、本成分は、規格基準において「食品に含有されるものであってはならない。」とは規定されておらず、不検出として管理されていないことから、その食品健康影響は無視できる程度と考えることはできないとされている。

恐らく、食品安全委員会より、ニフルスチレン酸ナトリウムについては「ADI を設定できない」旨の答申があると予想され、規格基準は「食品に含有されるものであってはならない。」となる可能性が高く、“不検出”として管理可能な試験法を整備する必要性が生じたことから、本報告においては、畜水産物中のニフルスチレン酸ナトリウムの試験法を検討した。

[検討対象化合物の構造]

○ニフルスチレン酸ナトリウム



分子式 : C₁₃H₈NNaO₅

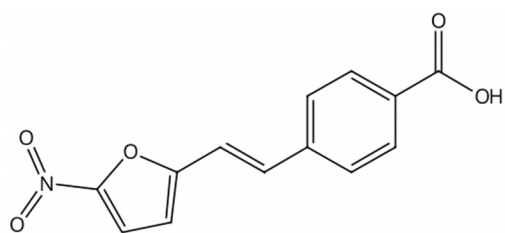
分子量 : 281.20

Melting Point : 不明

Boiling Point : 不明

pKa : 不明

なお、Chemical Abstracts では以下の通り登録されている。



• Na

分子式 : C₁₃H₉NO₅ • Na

分子量 : 282.20

CAS : Benzoic acid, 4-[2-(5-nitro-2-furanyl)ethenyl]-, sodium salt (1:1)

CAS 登録番号 : 54992-23-3

[実験方法]

1. 試料

国産の牛の筋肉・脂肪・肝臓、どじょう、うなぎ、さけ、かれい、えび、しじみを用いた。
以下に各食品の調製方法を示した。

- 1) 筋肉は、可能な限り脂肪層を除き、細切均一化した。
- 2) 脂肪は、可能な限り筋肉層を除き、細切均一化した。
- 3) 肝臓は、全体を細切均一化した。
- 4) どじょうは、頭を含む全体を細切均一化した。
- 5) さけ及びかれいは、皮を含む可食部を細切均一化した。
- 6) えびは、頭及び殻を除去し、得られたむき身を細切均一化した。
- 7) しじみは、殻を除去し、得られたむき身を金網に乗せ、約5分間水切りしたものを細切均一化した。

2. 試薬、試液

1) 標準品、標準原液及び標準溶液

① 標準品

ニフルスチレン酸ナトリウム：林純薬工業(株)製、純度 99.9%

② 標準原液

ニフルスチレン酸ナトリウム標準品 10 mg を精秤し、メタノールに溶解して 1.0 mg/mL の標準原液を調製した。

③ 検量線作成用標準溶液

標準原液を 0.1 vol%ギ酸及び 0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液 (1:1) 混液で希釈して調製した。

④ 添加用標準溶液

標準原液をメタノールで希釈して 0.01 mg/L の濃度の溶液を調製した。

2) その他の試薬等

アセトニトリル：関東化学(株)製、LC/MS 用

メタノール：関東化学(株)製、LC/MS 用

n-ヘキサン：関東化学(株)製、残留農薬・PCB 試験用、300 倍濃縮検定品

ギ酸：富士フイルム和光純薬(株)製、特級

水：関東化学(株)製、蒸留水、LC-MS 用

アンモニア水：関東化学(株)製、特級

0.1 vol%ギ酸：関東化学(株)製、LC/MS 用

0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル：関東化学(株)製、LC/MS 用

無水硫酸ナトリウム：富士フイルム和光純薬(株)製、残留農薬・PCB 試験用

四級アンモニウム塩修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体カラム (500 mg) : Oasis MAX、Waters 製

3. 装置

液体クロマトグラフ：Acquity UPLC (Waters 製)

タンデム型質量分析計：Xevo TQ-XS（Waters 製）

濃縮装置：ロータリーエバポレーターNVC-2100（東京理化工機(株)製）

ホモジナイザー：POLYTRON PT3100（Kinematica AG）

4. 測定条件

カラム：InertSustain C18 HP（粒子径 3 μm 、内径 3 mm、長さ 150 mm、ジーエルサイエンス(株)製）

カラム温度：40 $^{\circ}\text{C}$

移動相：0.1 vol%ギ酸及び 0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液（1：1）混液

移動相流速：0.4 mL/min

注入量：5 μL

保持時間：4.8 分

イオン化：エレクトロスプレーイオン化（ネガティブイオンモード）

脱溶媒ガス：窒素

コリジョンガス：アルゴン

質量分析パラメータ：

キャピラリー電圧 1.0 kV、脱溶媒温度 600 $^{\circ}\text{C}$ 、脱溶媒ガス流量 1000 L/hr、コーンガス流量 150 L/hr、ネブライザー 7.0 Bar、ソース温度 120 $^{\circ}\text{C}$

表 1 測定イオン (m/z)

	プリカーサー イオン	CV (kV)	プロダクトイオン① (定量用)		プロダクトイオン② (定性用)	
			m/z	CE (eV)	m/z	CE (eV)
			ニフルスチレン酸ナ トリウム	258.0	30	214.0

CV : Cone Voltage (V) 、 CE : Collision Energy (eV)

5. 定量

各添加濃度の回収率 25%相当濃度、回収率 50%相当濃度、回収率 75%相当濃度、回収率 100%相当濃度、回収率 125%相当濃度及び回収率 150%相当濃度の検量線作成用標準溶液（0.1 vol%ギ酸及び 0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液（1：1）混液）を調製した。それぞれ 5 μL を LC-MS/MS に注入し、ピーク面積法によりニフルスチレン酸ナトリウムの検量線を作成した。

試験溶液（1 g 試料/1 mL 試験溶液）5 μL を LC-MS/MS に注入し、絶対検量線法によりニフルスチレン酸ナトリウムの含量を求めた。

図 1 に、添加濃度 0.001 mg/kg の場合の検量線、回帰式及び決定係数（ R^2 値）を示した。

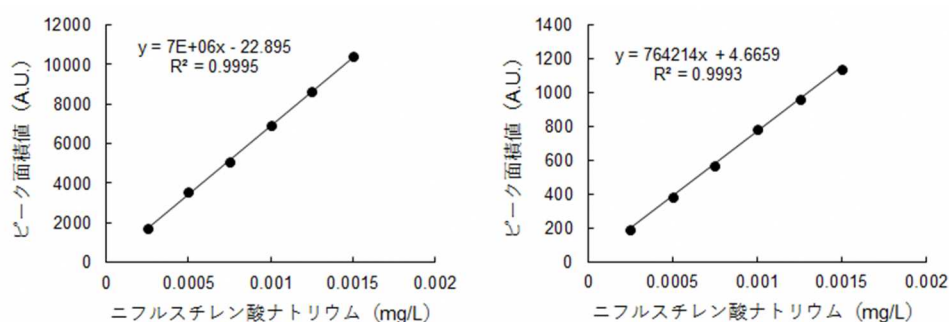


図1 ニフルスチレン酸ナトリウムの検量線の一例

左：測定イオン m/z 258.0>214.0、右：測定イオン m/z 258.0>114.0

6. 添加試料の調製

試料 10.0 g に添加用標準溶液 1.0 mL を添加して混合後、室温で 30 分間放置したものを添加試料とした。牛の脂肪の場合は、試料 10.0 g を 40℃ の湯浴中で加温して融解し、添加用標準溶液 1.0 mL を添加して混合後、-30℃ で 30 分間放置して再固化したものを添加試料とした。

7. 試験溶液の調製

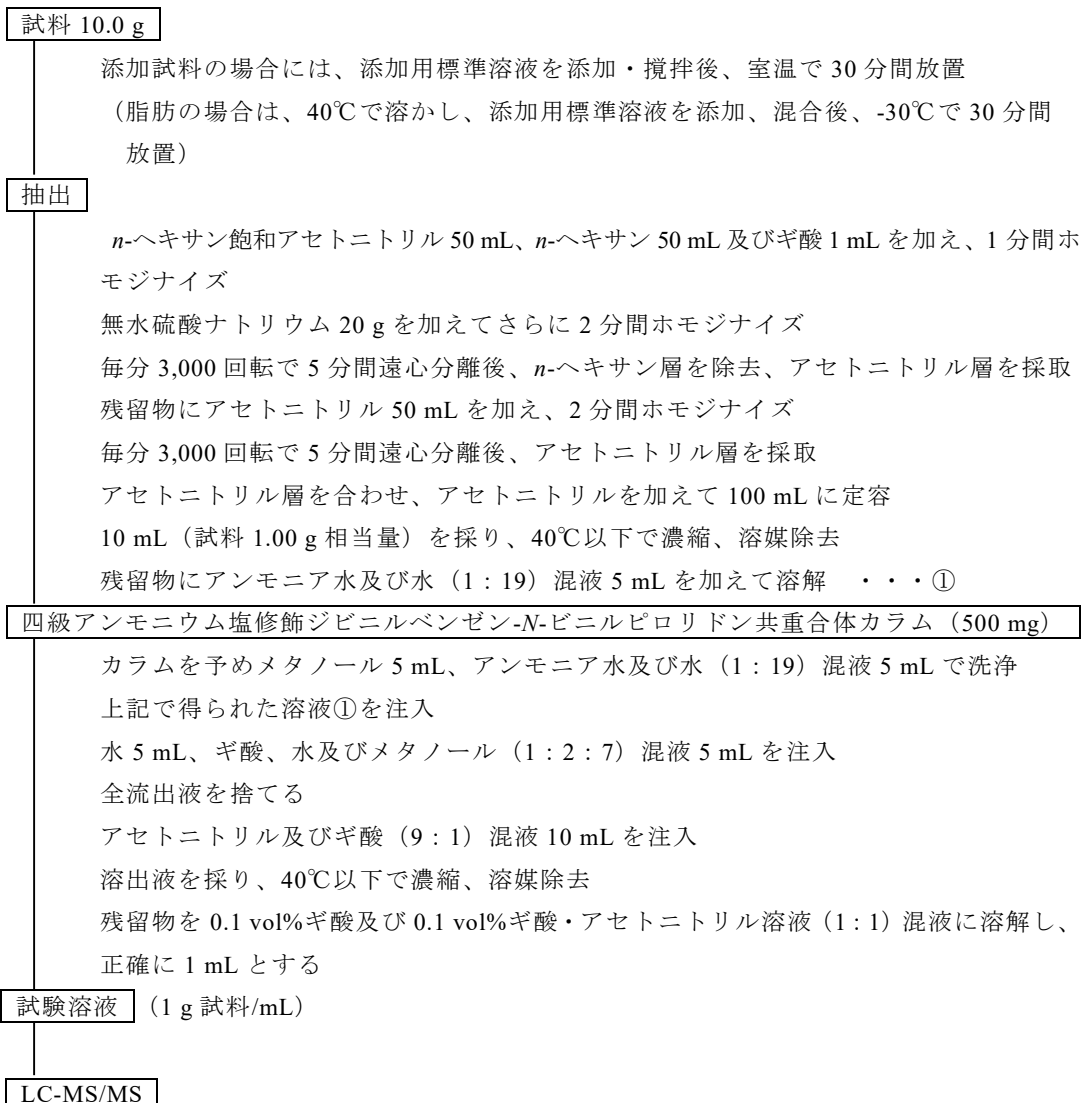
1) 抽出

試料 10.0 g に *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 50 mL、*n*-ヘキサン 50 mL 及びギ酸 1 mL を加えてホモジナイズした後、無水硫酸ナトリウム 20 g を加えてさらにホモジナイズした。毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離した後、*n*-ヘキサン層を捨て、アセトニトリル層を採った。残留物にアセトニトリル 50 mL を加えてホモジナイズした後、上記と同様に遠心分離した。アセトニトリル層を採り、先のアセトニトリル層と合わせ、アセトニトリルを加えて正確に 100 mL とした。この溶液から正確に 10 mL を分取し、40℃ 以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物にアンモニア水及び水 (1 : 19) 混液 5 mL を加えて溶かした。

2) 精製

四級アンモニウム塩修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体カラム (500 mg) にメタノール 5 mL、アンモニア水及び水 (1 : 19) 混液 5 mL を順次注入し、流出液は捨てた。このカラムに、1) で得られた溶液を注入した後、水 5 mL、ギ酸、水及びメタノール (1 : 2 : 7) 混液 5 mL を注入し、流出液は捨てた。次いで、アセトニトリル及びギ酸 (9 : 1) 混液 10 mL を注入し、溶出液を採り、40℃ 以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物を 0.1 vol% ギ酸及び 0.1 vol% ギ酸・アセトニトリル溶液 (1 : 1) 混液に溶解し、正確に 1 mL としたものを試験溶液とした。

フローチャート



8. マトリックス添加標準溶液の調製

「7. 試験溶液の調製」に記載した方法に従いブランク試料を用いて試験溶液を調製した。試験溶液の溶媒を除去して得られた残留物を、検量線作成用標準溶液（回収率 100%相当濃度）1 mL に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. LC-MS/MS 測定条件の検討

1) 測定イオンの選択

まず、フローインジェクション分析により、ニフルスチレン酸ナトリウムの標準溶液（100 ng/mL、0.1 vol%ギ酸及び 0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液（1：1）混液）をスキャン測定した。

ESI（+）においては、ニフルスチレン酸の[M+H]⁺と推察されるイオンは検出されなかった。

一方、ESI（-）においては、ニフルスチレン酸の[M-H]⁻と推察される m/z 258.0 のイオンが検出された（図 1）。

よって、イオン化モードとして ESI（-）を選択し、プロダクトイオンスキャン測定を行った。結果を図 2 に示した。プリカーサーイオン m/z 258.0 から得られるプロダクトイオンとして m/z 214.0、 m/z 114.0 などが検出された。

本検討においては、測定感度や測定の際の夾雑ピークの影響等を考慮し、

定量イオン m/z 258.0>214.0、定性イオン m/z 258.0>114.0 を選択した。

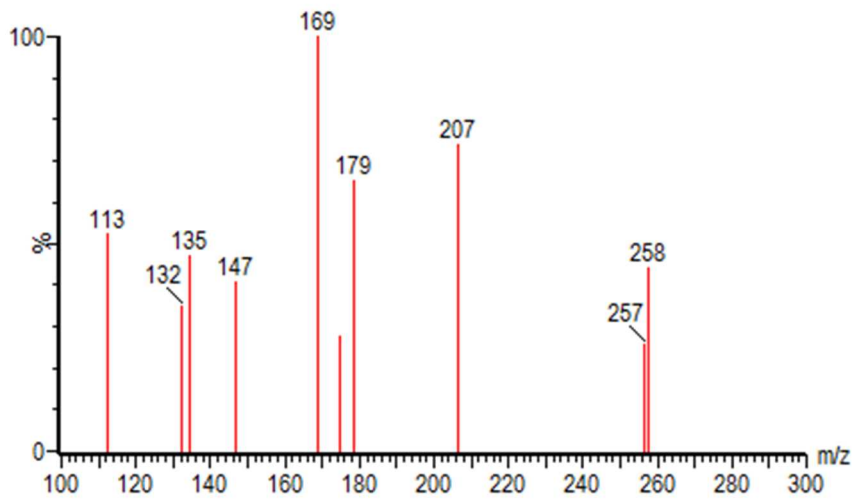


図1 ESI (-)におけるニフルスチレン酸のマススペクトル
スキャン範囲 m/z 100~300、CV 30 V

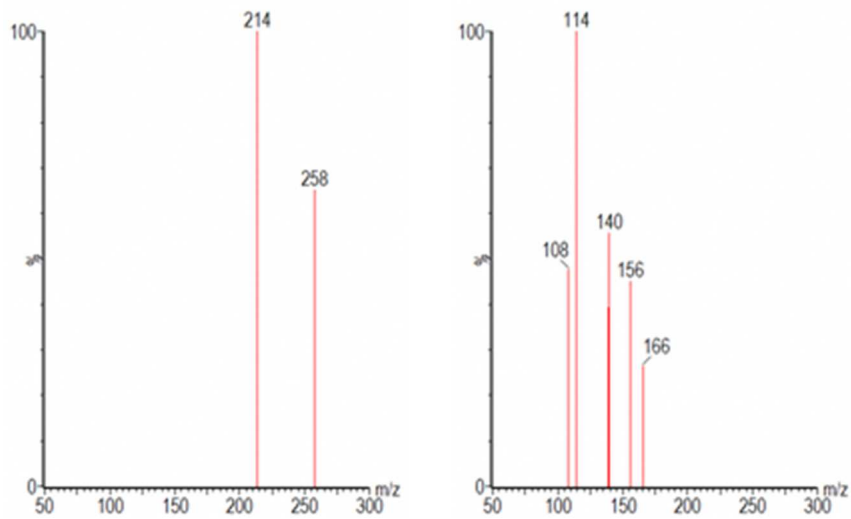


図2 ニフルスチレン酸のプロダクトイオンスキャンスペクトル
ESI (-)、プリカーサーイオン m/z 258.0、
スキャン範囲 m/z 50~300、CV 30 V、
左 : CE 10 eV、右 : CE 25 eV

2) LC 測定条件の検討

分析カラムについては、一般的な ODS 系分析カラムである InertSustain C18 (HP タイプ、粒子径 3 μm 、3 \times 150 mm) を用いることで良好なピーク形状が得られた。

また、移動相については、0.1 vol%ギ酸及び 0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液 (1 : 1) 混液を用いることで、良好なピーク形状及び測定感度が得られ、また、分析カラムへの保持も良好であった。(図 3)

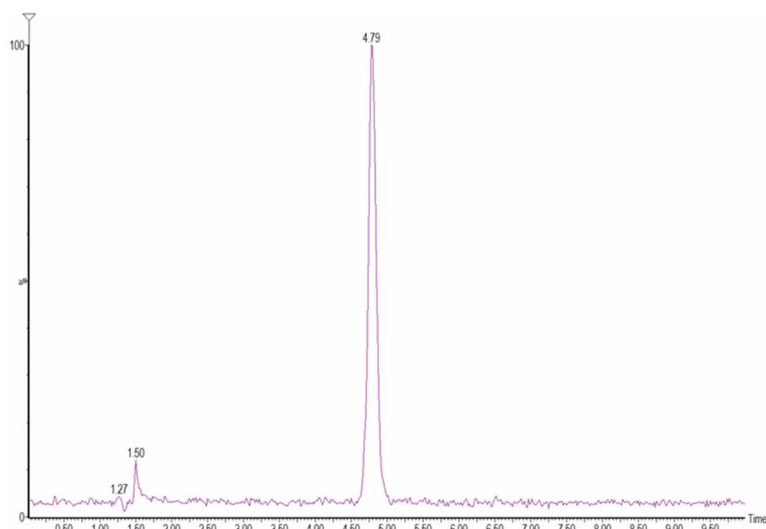


図 3 ニフルスチレン酸ナトリウムの SRM クロマトグラム
1 ng/mL 標準溶液、 m/z 258.0>214.0

2. 試験溶液調製法の検討

1) 抽出

まず、抽出操作について、『LC/MSによる動物用医薬品等の一斉試験法 I (畜水産物)』で採用されている「酢酸酸性下、*n*-ヘキサン及び無水硫酸ナトリウム共存下アセトニトリル抽出」の適用性について検討した。

すなわち、どじょう試料 (添加濃度 1 ng/g) を用い、試料 10.0 g を量り採り、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 50 mL、*n*-ヘキサン 50 mL 及び酢酸 1 mL を加えてホモジナイズした後、無水硫酸ナトリウム 20 g を加えてさらにホモジナイズした。毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離した後、*n*-ヘキサン層を捨て、アセトニトリル層を採る。残留物にアセトニトリル 50 mL を加えてホモジナイズし、上記と同様に遠心分離した。アセトニトリル層を採り、先のアセトニトリル層と合わせ、アセトニトリルを加えて正確に 100 mL とし、得られた抽出液 (定容後の溶液 10 mL、試料 1.00 g 相当量) を Oasis MAX で精製し、試験溶液を調製した。得られた試験溶液を LC-MS/MS で測定し、絶対検量線法により定量したところ、ニフルスチレン酸ナトリウムの回収率は 81%であった。酢酸を添加しない場合の回収率が 75%であったことから、酢酸の代わりにギ酸 1 mL、2 mL 及び 5 mL を添加して抽出操作を行ったところ、回収率はそれぞれ 91%、83%及び 86%であった。(表 2)

以上の結果から、本報告における抽出操作は、ギ酸 (1 mL)、*n*-ヘキサン及び無水硫酸ナトリウム共存下、アセトニトリル抽出を採用した。

表 2 ニフルスチレン酸ナトリウムの回収率に及ぼす酸添加及び液量の影響 (n=1)

	回収率 (%)
酢酸 1 mL (一斉試験法 I と同様)	81
添加無し	75
ギ酸 1 mL	91
ギ酸 2 mL	83
ギ酸 5 mL	86

2) ミニカラム精製について

種々の畜水産物由来の試料マトリックスの効果的且つ効率的な除去を目的として、ミニカラム精製法を検討した。

ニフルスチレン酸ナトリウムはカルボン酸を有する化合物であるため、陰イオン性化合物を効率的に保持可能な強塩基性陰イオン交換カラムである四級アンモニウム塩修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体カラム (Oasis MAX、500 mg、Waters 製) の適用性を検討した。

・負荷及び洗浄操作の検討

予め、メタノール 5 mL、アンモニア水及び水 (1 : 19) 混液 5 mL で洗浄した Oasis MAX に、ニフルスチレン酸ナトリウム 1 ng (アンモニア水及び水 (1 : 19) 混液 5 mL) を負荷した。流出液を採り、40°C以下で濃縮、溶媒除去後、残留物を 0.1 vol%ギ酸及び 0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液 (1 : 1) 混液 1 mL に溶解し、LC-MS/MS で測

定した。ニフルスチレン酸ナトリウムの溶出は確認されず、Oasis MAX に良好に保持されていることが推察された。

続いて、上記のカラムに「水 5 mL」、「ギ酸、水及びメタノール (1 : 2 : 7) 混液 5 mL」、「ギ酸、水及びメタノール (1 : 1 : 8) 混液 5 mL」を順次注入し、各流出液を採り、40℃以下で濃縮、溶媒除去後、残留物を 0.1 vol%ギ酸及び 0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液 (1 : 1) 混液 1 mL に溶解し、LC-MS/MS で測定した。「水 5 mL」、「ギ酸、水及びメタノール (1 : 2 : 7) 混液 5 mL」の流出液においてはニフルスチレン酸ナトリウムの溶出は確認されなかったが、「ギ酸、水及びメタノール (1 : 1 : 8) 混液 5 mL」の流出液においては 5%程度の溶出が確認された。

・溶出操作の検討

次に、溶出操作について検討した。予め、メタノール 5 mL、アンモニア水及び水 (1 : 19) 混液 5 mL で洗浄した Oasis MAX に、ニフルスチレン酸ナトリウム 1 ng (アンモニア水及び水 (1 : 19) 混液 5 mL) を負荷した。水 5 mL、ギ酸、水及びメタノール (1 : 2 : 7) 混液 5 mL で順次洗浄後、「ギ酸及びアセトニトリル (1 : 99) 混液 10 mL」、「ギ酸及びアセトニトリル (1 : 49) 混液 10 mL」、「ギ酸及びアセトニトリル (1 : 19) 混液 10 mL」、「ギ酸及びアセトニトリル (1 : 9) 混液 10 mL」でそれぞれ溶出し、溶出液を 40℃以下で濃縮、溶媒除去後、残留物を 0.1 vol%ギ酸及び 0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液 (1 : 1) 混液 1 mL に溶解し、LC-MS/MS で測定した。各溶出液におけるニフルスチレン酸ナトリウムの回収率は表 3 の通りであった。

なお、溶出液 (ギ酸及びアセトニトリル (1 : 9) 混液) の液量について、標準品の検討においては 5 mL の液量で良好な回収率が得られたが、試料マトリックスによる溶出画分のずれなどを考慮し、10 mL の液量を採用した。

表 3 各溶出液におけるニフルスチレン酸ナトリウムの回収率

	回収率 (%)
ギ酸及びアセトニトリル (1 : 99) 混液 10 mL	83
ギ酸及びアセトニトリル (1 : 49) 混液 10 mL	88
ギ酸及びアセトニトリル (1 : 19) 混液 10 mL	92
ギ酸及びアセトニトリル (1 : 9) 混液 10 mL	103

以上の結果から、本報告における精製操作は、

Oasis MAX (500 mg) にメタノール 5 mL、アンモニア水及び水 (1 : 19) 混液 5 mL を注入し、流出液は捨てる。このカラムに、抽出で得られた溶液 (アンモニア水及び水 (1 : 19) 混液 5 mL に置換したもの) を注入した後、水 5 mL、ギ酸、水及びメタノール (1 : 2 : 7) 混液 5 mL を順次注入し、流出液は捨てる。次いで、アセトニトリル及びギ酸 (9 : 1) 混液 10 mL を注入し、溶出液を採る。

操作とした。

3) その他

ニフルスチレン酸ナトリウムは光に対して不安定との情報 (林純薬工業(株)、安全

データシート、「10. 安定性及び反応性」の項など)があることから、牛の筋肉及びどじょうを用いて、試験溶液の調製操作を通常通り行った際の回収率と可能な限り遮光下で行った際の回収率を比較した。

通常通りの操作：遠沈管やナスフラスコのガラス器具は透明なものを使用、ミニカラム精製等も通常通りの操作

遮光下での操作：ナスフラスコは茶褐色のものを用い、遠沈管及びミニカラムはアルミ箔で覆って使用した

添加濃度 0.001 mg/kg の添加試料における結果を表 4 に示した。若干ではあるが、試験溶液調製操作を可能な限り遮光下で実施した場合の方が回収率は良好であった。

表 4 ニフルスチレン酸ナトリウムの回収率

	回収率 (%)	
	通常操作	遮光下での操作
牛の筋肉	83	106
どじょう	80	91

以上の結果から、本報告における試験溶液調製操作は、可能な限り遮光下で実施した。(添加：アルミ箔で覆った遠沈管に試料を採り、ニフルスチレン酸ナトリウムを添加、攪拌、アルミ箔で蓋をして室温で 30 分間放置。抽出：アルミ箔で覆った遠沈管を使用。定容：定容操作の際を除き、メスフラスコをアルミ箔で覆って使用。濃縮・溶媒除去：茶褐色のナスフラスコを使用。ミニカラム精製：溶液を注入する際を除き、アルミ箔で覆った条件で実施。)

3. 添加回収試験

検討食品は、どじょう、うなぎ、さけ、かれい、えび、しじみ、牛の筋肉、牛の脂肪及び牛の肝臓（全9食品）を用いた。

ブランク試料に添加用標準溶液 1 mL を添加、攪拌し、室温で約 30 分放置したものを添加試料とした。脂肪については約 40°C で溶かした後、添加用標準溶液 1 mL を添加、攪拌し、-30°C で約 30 分間放置したものを添加試料とした。

ブランク試料及び添加試料について、「[実験方法] 7. 試験溶液の調製」に記載した方法に従い操作し、試験溶液を調製した。調製した試験溶液を LC-MS/MS で測定し、選択性、真度及び精度、S/N を求めた。

① 選択性

検討した全食品のブランク試料においてニフルスチレン酸ナトリウムの定量を妨害するピークは検出されず、選択性の目標値を満足した。

結果の詳細を表 5 に示した。

表 5 選択性の評価結果

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)							選択性の評価		
					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		面積(高さ)比 (a)/(b)			
								n=1	n=2	平均 (a)	n=1	n=2			平均 (b)	
1	ニフルスチレン酸ナトリウム (m/z 258>214)	どじょう	0.001		定量限界	0.001	<0.333	面積	0	0	0	7015	6888	6951	0.000	○
2		うなぎ	0.001		定量限界	0.001	<0.333	面積	0	0	0	6949	6800	6875	0.000	○
3		さけ	0.001		定量限界	0.001	<0.333	面積	0	0	0	7187	7188	7187	0.000	○
4		かれい	0.001		定量限界	0.001	<0.333	面積	0	0	0	6825	6953	6899	0.000	○
5		えび	0.001		定量限界	0.001	<0.333	面積	0	0	0	7659	7694	7677	0.000	○
6		しじみ	0.001		定量限界	0.001	<0.333	面積	0	0	0	8301	8161	8231	0.000	○
7		牛の筋肉	0.001		定量限界	0.001	<0.333	面積	0	0	0	6998	7103	7051	0.000	○
8		牛の脂肪	0.001		定量限界	0.001	<0.333	面積	0	0	0	7694	7453	7573	0.000	○
9		牛の肝臓	0.001		定量限界	0.001	<0.333	面積	0	0	0	6713	6690	6701	0.000	○

② 真度及び精度

ニフルスチレン酸ナトリウムを添加した試料（添加濃度 0.001 mg/kg）における真度及び併行精度は、

真度 80%~94%、併行精度 1.3 RSD%~6.6 RSD%

であり（表 6）、目標値を満足した。

また、S/N については、全検討食品の全ての添加試料において、

S/N ≥ 100

であった。

表 6 添加回収試験結果

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	検量線			回収率(%)					真度 (%)	併行精度 (RSD%)	S/N		
							傾き	切片	r ² 値	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5			Max.	Min.	平均値
1	ニフルスチレン酸ナトリウム (m/z 258>214)	どじょう	0.001		0.001	S/N	6858270	13	0.9998	87	99	95	96	92	94	4.9	358	278	318
2		うなぎ	0.001		0.001	S/N	7801027	-110	1.0000	75	82	82	82	80	80	4.0	317	257	287
3		さけ	0.001		0.001	S/N	7236342	-38	0.9998	87	86	86	88	87	1.3	390	225	307	
4		かれい	0.001		0.001	S/N	6867926	9	0.9998	82	85	83	86	83	84	1.9	391	216	303
5		えび	0.001		0.001	S/N	7721619	-17	0.9998	80	73	83	84	85	81	5.7	368	245	306
6		しじみ	0.001		0.001	S/N	8040305	170	0.9998	94	96	91	97	82	92	6.6	420	232	326
7		牛の筋肉	0.001		0.001	S/N	6819889	-10	0.9995	90	91	93	93	90	91	1.8	567	314	441
8		牛の脂肪	0.001		0.001	S/N	7584350	44	0.9998	83	82	85	85	88	85	2.7	432	344	388
9		牛の肝臓	0.001		0.001	S/N	6938738	-23	0.9995	83	82	86	85	92	86	4.6	413	174	293

4. 測定の際の試料マトリックスの影響

ニフルスチレン酸ナトリウムの測定の際の試料マトリックスの影響を表7に示した。

「マトリックス添加標準溶液におけるピーク面積値/溶媒標準溶液におけるピーク面積値」の値は0.96~1.01であり、測定の際の試料マトリックスの影響により定量値が大きく変動する可能性は少ないと考えられた。

表7 測定の際の試料マトリックスの影響

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 (mg/L)	面積又は 高さの別	ブランク	ピーク面積(高さ)						
									マトリックス添加標準溶液			溶媒標準溶液			ピーク面積 (高さ)比
									n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均	
1	ニフルスチレン酸 ナトリウム (<i>m/z</i> 258-214)	どじょう	0.001		0.001	0.001	面積	0	7015	6888	6951	6937	6880	6908	1.01
2		うなぎ	0.001		0.001	0.001	面積	0	6949	6800	6875	7061	7091	7076	0.97
3		否ナ	0.001		0.001	0.001	面積	0	7187	7188	7187	7253	7173	7213	1.00
4		かれい	0.001		0.001	0.001	面積	0	6825	6953	6889	6932	6990	6961	0.99
5		えび	0.001		0.001	0.001	面積	0	7659	7694	7677	7728	7724	7726	0.99
6		しじみ	0.001		0.001	0.001	面積	0	8301	8181	8231	8174	8325	8249	1.00
7		牛の筋肉	0.001		0.001	0.001	面積	0	6839	6840	6840	6998	7103	7051	0.97
8		牛の脂肪	0.001		0.001	0.001	面積	0	7694	7453	7573	7675	7731	7703	0.98
9		牛の肝臓	0.001		0.001	0.001	面積	0	6713	6690	6701	6932	7004	6968	0.96

各検討対象食品におけるニフルスチレン酸ナトリウムのSRMクロマトグラムを図4に、トータルイオンクロマトグラム（スキャン範囲 *m/z* 100~300）を図5に示した。

[結論]

畜水産物中のニフルスチレン酸ナトリウムの試験法について検討した。

抽出については、既存の一斉試験法の抽出操作を若干変更し、ギ酸、*n*-ヘキサン及び無水硫酸ナトリウム共存下アセトニトリル抽出により、種々の畜水産物からニフルスチレン酸ナトリウムを効率的に抽出可能と考えられた。精製操作については、四級アンモニウム塩修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体カラムを用いて精製を行うことで、種々の畜水産物由来のマトリックスを効果的且つ効率的に除去可能であった。

また、ニフルスチレン酸ナトリウムは光に対して不安定との情報を基に、試験溶液調製操作を可能な限り遮光下で実施したところ、通常通り実施した際の回収率と比較してより良好な回収率が得られた。

開発した方法を用い、どじょう、うなぎ、さけ、かれい、えび、しじみ、牛の筋肉、牛の脂肪及び牛の肝臓を対象に添加回収試験(添加濃度 0.001 mg/kg)を実施した結果、

- ・ 選択性

検討した全ての食品において、選択性に問題は無かった。

- ・ 真度及び併行精度

検討した全ての食品において、真度及び併行精度の目標値を満足した。

- ・ 定量限界

上述の真度及び併行精度の評価結果に加え、添加回収試験において得られたピークは全て $S/N \geq 10$ であった。これらの結果から、定量限界は 0.001 mg/kg に設定可能と考えられた。

以上の結果から、畜水産物のニフルスチレン酸ナトリウムの試験法として、本報告で開発した方法を適用可能(定量限界は 0.001 mg/kg)と判断された。

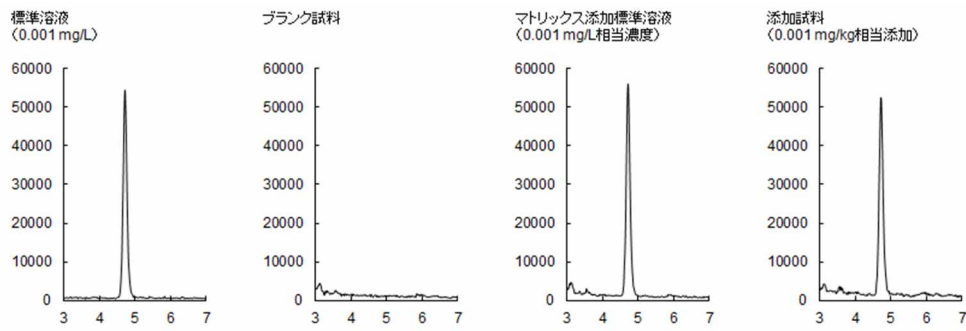


図 4-1 SRM クロマトグラム (測定イオン m/z 258.0>214.0、どじょう)

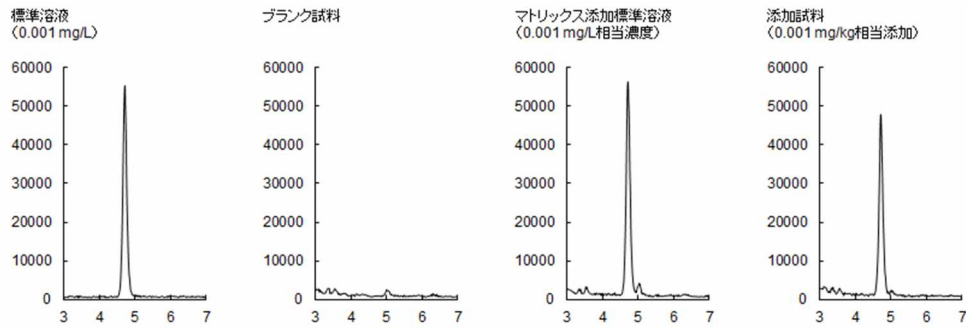


図 4-2 SRM クロマトグラム (測定イオン m/z 258.0>214.0、うなぎ)

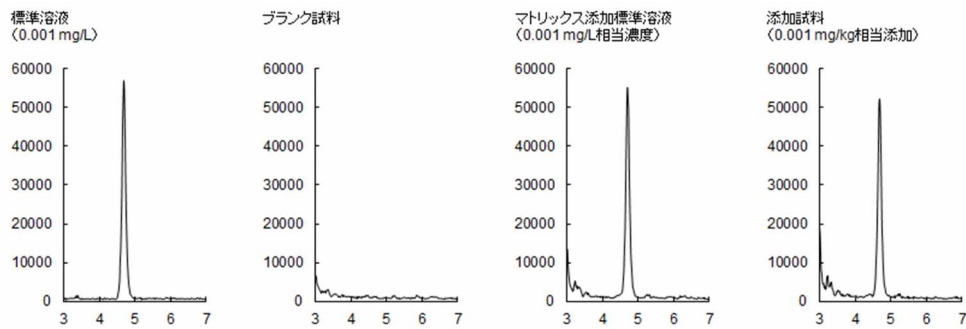


図 4-3 SRM クロマトグラム (測定イオン m/z 258.0>214.0、さけ)

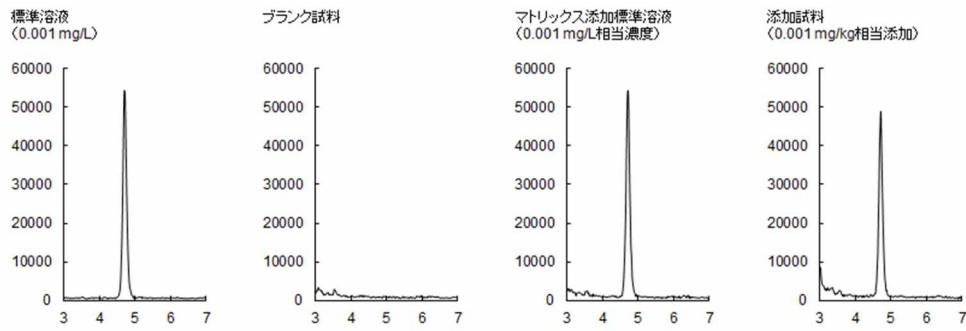


図 4-4 SRM クロマトグラム (測定イオン m/z 258.0>214.0、かれい)

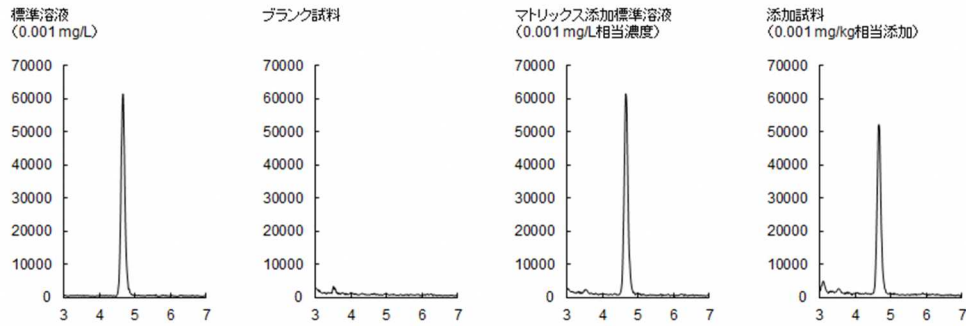


図 4-5 SRM クロマトグラム (測定イオン m/z 258.0>214.0、えび)

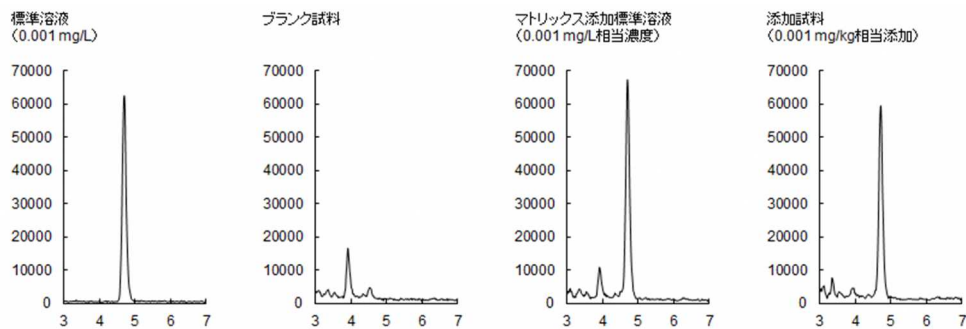


図 4-6 SRM クロマトグラム (測定イオン m/z 258.0>214.0、しじみ)

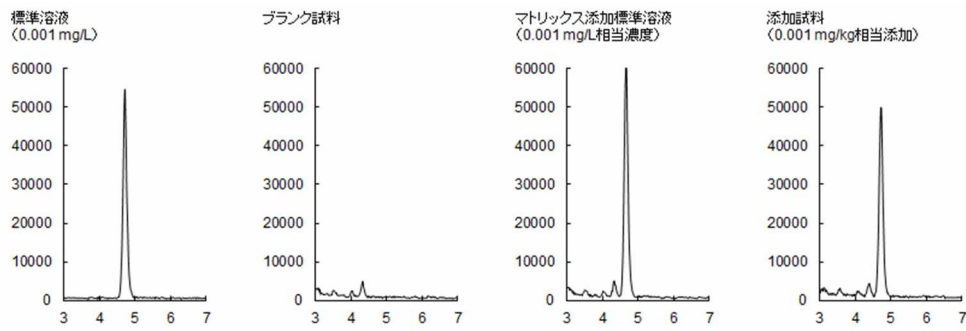


図 4-7 SRM クロマトグラム (測定イオン m/z 258.0>214.0、牛の筋肉)

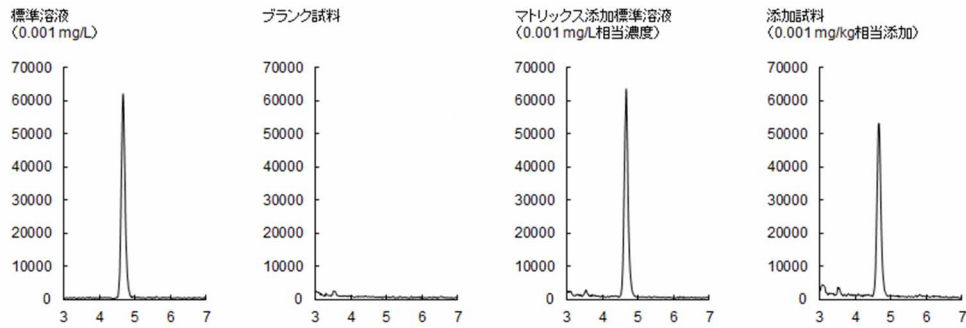


図 4-8 SRM クロマトグラム (測定イオン m/z 258.0>214.0、牛の脂肪)

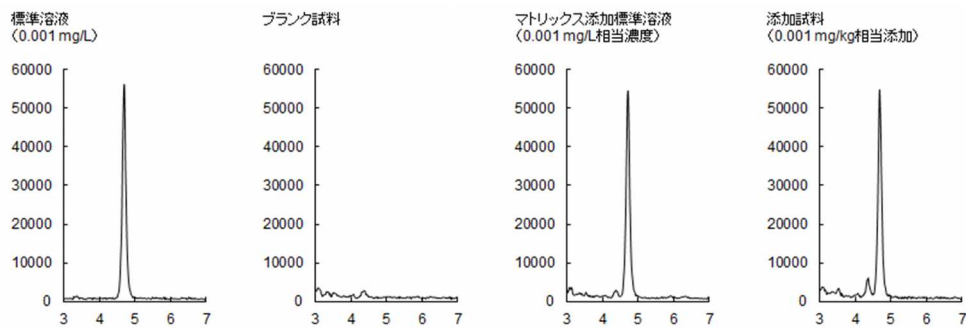


図 4-9 SRM クロマトグラム (測定イオン m/z 258.0>214.0、牛の肝臓)

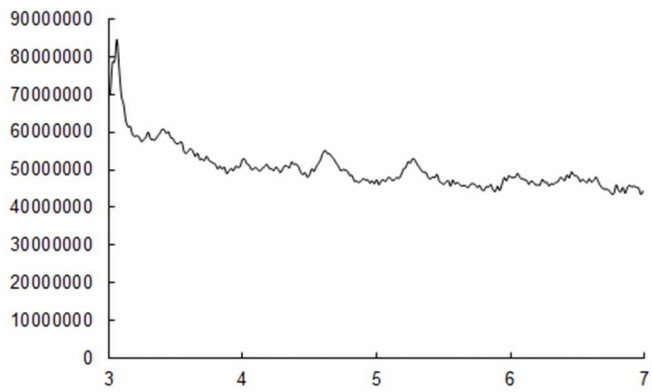


図 5-1 トータルイオンクロマトグラム (どじょう)

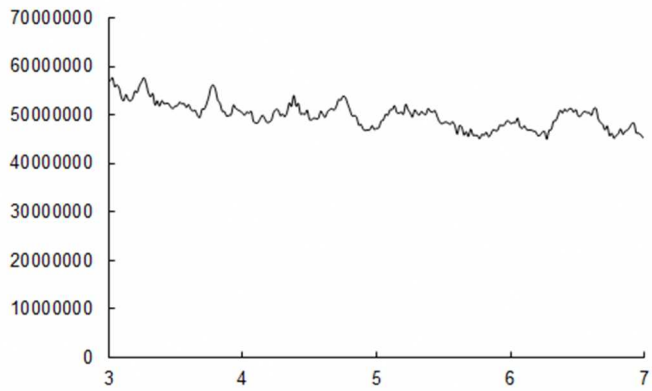


図 5-2 トータルイオンクロマトグラム (うなぎ)

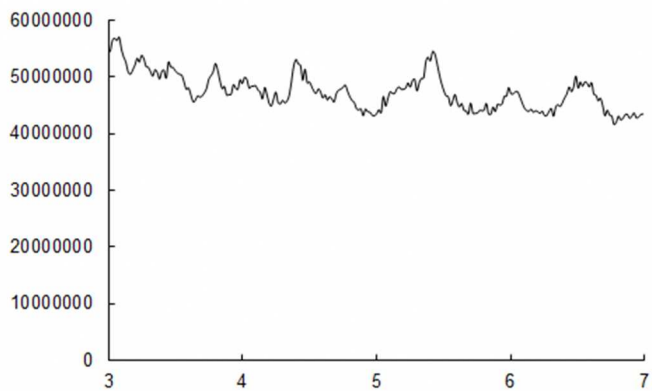


図 5-3 トータルイオンクロマトグラム (さけ)

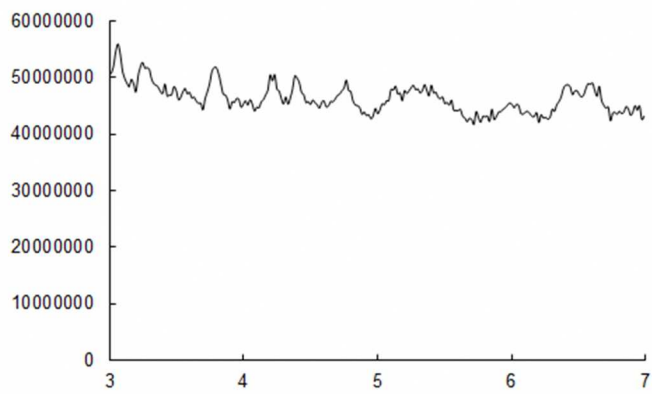


図 5-4 トータルイオンクロマトグラム (かれい)

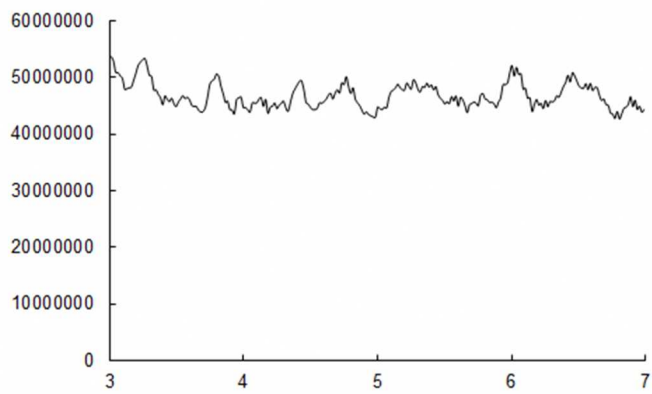


図 5-5 トータルイオンクロマトグラム (えび)

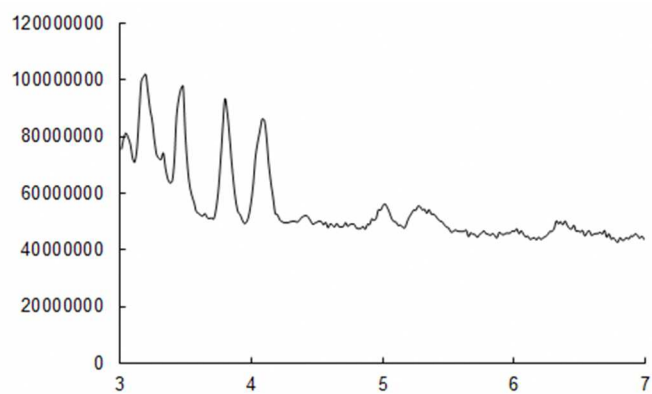


図 5-6 トータルイオンクロマトグラム (しじみ)

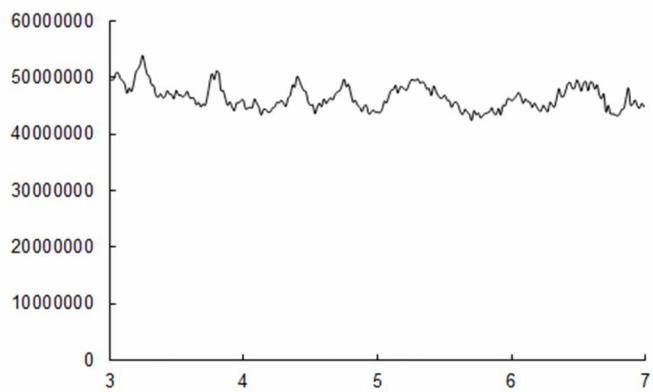


図 5-7 トータルイオンクロマトグラム (牛の筋肉)

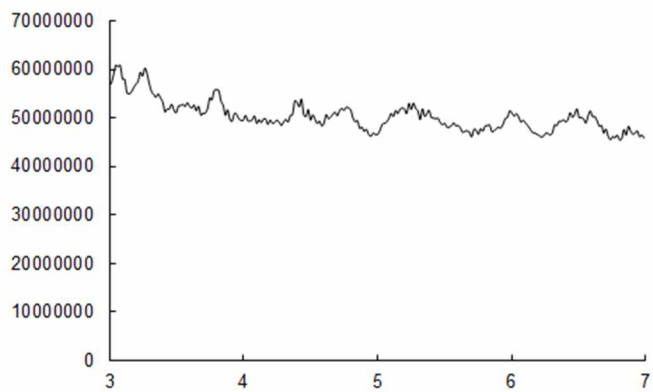


図 5-8 トータルイオンクロマトグラム (牛の脂肪)

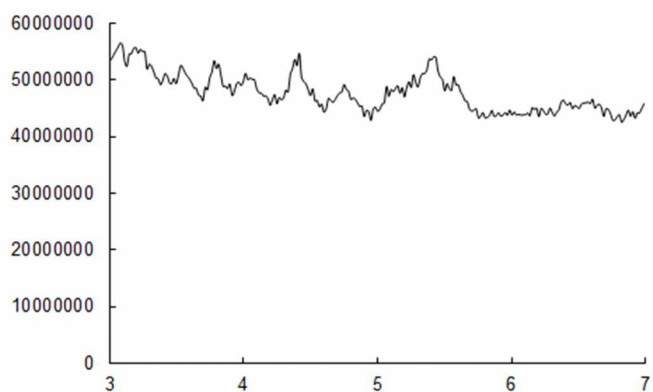


図 5-9 トータルイオンクロマトグラム (牛の肝臓)