

※本報告書は、試験法開発における検討結果を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ください。

残留農薬等に関するポジティブリスト 制度導入に係る分析法開発

ナラシン試験法
(畜産物)

[目的]

ナラシンは、*Streptomyces aureofaciens* NRRL 8092 株が産生するポリエーテル系のイオノフォア抗生物質であり、カリウムイオンやナトリウムイオンなどと脂溶性複合物を形成し、これら金属イオンの細胞膜の通過を容易にする。

ナラシンは、ナラシン A、ナラシン B、ナラシン D 及びナラシン I で構成され、構成比率はナラシン A : 96%、ナラシン B : 1%、ナラシン D : 2% 及びナラシン I : 1% である。また、ナラシンの活性の大部分 (85%) は、主要構成成分であるナラシン A によるものである。

海外では、鶏のкокシジウム症の予防を目的として、飼料に添加して使用されており、肉用鶏の壊死性腸炎予防にも用いられる。牛では成長促進剤として使用される。

日本では、動物用医薬品としては承認されておらず、鶏を対象とした飼料添加物が指定されている。

ヒト用医薬品としては使用されていない。

今般、ナラシンについて暫定基準値の見直しが行われたことから、新たな基準値 (本基準値) での検査に対応可能な試験法を開発した。

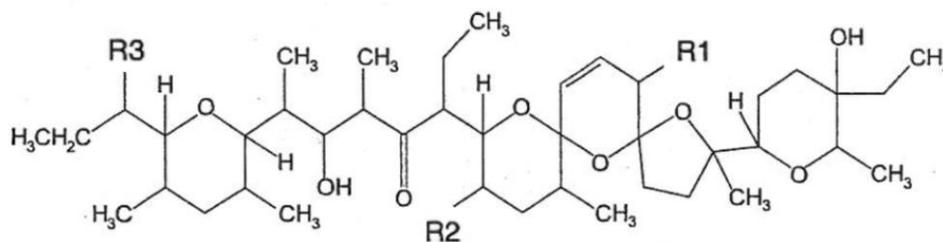
なお、ナラシンの規制対象物質は「ナラシン A」と規定されたことから、ナラシン A を分析対象化合物として試験法開発を実施した。

ナラシンの基準値 (規制対象物質はナラシン A)

	基準値 (ppm)	
	暫定基準値	本基準値案
牛の筋肉	0.05	0.02
牛の脂肪	0.05	0.05
牛の肝臓	0.05	0.05
牛の腎臓	0.05	0.02
牛の食用部分	0.05	0.05
豚の筋肉	—	0.02
豚の脂肪	—	0.05
豚の肝臓	—	0.05
豚の腎臓	—	0.02
豚の食用部分	—	0.05
鶏の筋肉	0.1	0.02
鶏の脂肪	0.5	0.05
鶏の肝臓	0.3	0.05
鶏の腎臓	0.3	0.02
鶏の食用部分	0.3	0.05
その他の家きんの筋肉	0.1	0.02
その他の家きんの脂肪	0.1	0.05
その他の家きんの肝臓	0.3	0.05
その他の家きんの腎臓	0.3	0.02
その他の家きんの食用部分	0.3	0.05

[検討対象化合物の構造等]

ナラシン



Structural variants of narasin	R1	R2	R3
A	OH	CH ₃	COOH
B	=O	CH ₃	COOH
D	OH	C ₂ H ₅	COOH
I	OH	CH ₃	COOCH ₃

分子式：C₄₃H₇₂O₁₁

IUPAC名：α-ethyl-6-[5-[2-(5-ethyltetrahydro-5-hydroxy-6-methyl-2H-pyran-2-yl)-15-hydroxy-2,10,12-trimethyl-1,6,8-trioxadispiro[4.1.5.3]pentadec-13-en-9-yl]-2-hydroxy-1,3-dimethyl-4-oxoheptyl]tetrahydro-3,5-dimethyl-2H-pyran-2-acetic acid

CAS 番号：55134-13-9

Salinomycin, 4-methyl-, (4S)-

物性等に関する情報

ナラシンの物性等に関する情報は得られなかった。

なお、CASにおけるナラシンの名称 (Salinomycin, 4-methyl-, (4S)-) から、ナラシンはサリノマイシンと類似の構造及び物性等を有することが推察されるが、サリノマイシンは log P_{ow} 値 8.53 と非常に極性が低い物質であることから、類似構造を有するナラシンも非常に極性が低い物質であると予想された。

[実験方法]

1. 試料

市販の牛の筋肉・脂肪・肝臓を用いた。以下に試料の採取方法を示した。

- 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、可能な限り筋などを除き、細切均一化した。

2. 試薬、試液

1) 標準品及び標準溶液

標準品は、以下のものを用いた。

ナラシン：シグマ・アルドリッチ製、USP Reference Standard

(純度：ナラシンとして 98%、ナラシン A として 86.1% (w/w))

ナラシン標準品をアセトニトリルに溶解し、ナラシン A として 1 mg/mL の標準原液を調製した。

以下、添加用標準溶液及び検量線作成用標準溶液の調製法を記載した。

・添加用標準溶液

標準原液をアセトンで適宜希釈した。

・検量線作成用標準溶液

標準原液をアセトニトリルで適宜希釈した。

2) その他の試薬等

アセトニトリル：関東化学(株)製、残留農薬・PCB 試験用 (300 倍濃縮検定品)

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)

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

アセトン：関東化学(株)製、残留農薬・PCB 試験用 (300 倍濃縮検定品)

メタノール：関東化学(株)製、LC-MS 用

エタノール：関東化学(株)製、特級 (99.5%)

0.1 vol%ギ酸：関東化学(株)製、HPLC 用

0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液：関東化学(株)製、HPLC 用

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 (Waters 製、500 mg/6 mL)

オクチルシリル化シリカゲルカラム：Inertsil C8-4 (粒子径 5 μm、内径 2.1 mm、長さ 150 mm、ジーエルサイエンス(株)製)

3. 装置

液体クロマトグラフ：Nexera X2 シリーズ UHPLC ((株)島津製作所製)

タンデム質量分析計：API 4000 (SCIEX 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)

4. 測定条件

カラム：Inertsil C8-4 (粒子径 5 μm、内径 2.1 mm、長さ 150 mm)

カラム温度：40℃

移動相：0.1 vol%ギ酸 (A 液) 及び 0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液 (B 液)

グラジエント：下表

時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)
0.0	20	80
5.0	5	95
10.0	5	95
10.1	20	80
15.0	20	80

移動相流速： 0.4 mL/min

保持時間： 2.5 分

イオン化モード： ESI (-)

質量分析パラメータ：

イオンスプレー電圧 -4.5 kV、脱溶媒温度 700°C、イオンソースガス 1 流量 70 psig、イオンソースガス 2 流量 70 psig、カーテンガス流量 10 psig、コリジョンガス (N₂) 流量 10

表 1-1 測定イオン (m/z) 及び測定条件 (ネガティブモードの場合)

	プリカーサー イオン	DP (V)	プロダクト イオン (定量用)	CE (定量 用、eV)	プロダクト イオン (定性用)	CE (定性 用、eV)
ナラシン A	764	-120	87	-80	255	-48

表 1-2 測定イオン (m/z) 及び測定条件 (ポジティブモードの場合)

	プリカーサー イオン	DP (V)	プロダクト イオン (定量用)	CE (定量 用、 eV)	プロダクト イオン (定性用)	CE (定性 用、 eV)
ナラシン A	788	121	431	69		

DP : Declustering Potential (V)

CE : Collision Energy (eV)

5. 定量

各添加濃度の回収率 25%、50%、75%、100%、125%及び 150%相当濃度の検量線作成用標準溶液 (アセトニトリル) を調製した。

調製した標準溶液をそれぞれ LC-MS/MS に注入 (注入量 5 μ L) し、ピーク面積法によりナラシン A の検量線を作成した。

試験溶液 (0.5 g 試料/1 mL 試験溶液) 5 μ L を LC-MS/MS に注入し、絶対検量線法によりナラシン A の含量を求めた。

図 1 に、代表的な検量線 (添加濃度 0.005 mg/kg の場合)、回帰式及び決定係数 (R^2 値) を示した (左 : 定量イオン、右 : 定性イオン)。

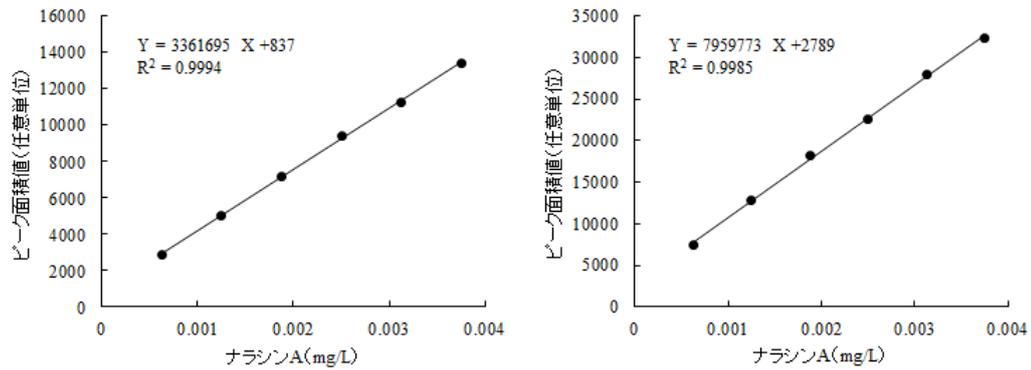


図1 ナラシン A の検量線の一例（左：定量イオン、右：定性イオン）

6. 試験溶液の調製

1) 抽出

試料 10.0 g を量り採った。これにメタノール 50 mL を加えて 2 分間ホモジナイズした。毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離した後、メタノール層を採った。残留物にメタノール 30 mL を加えて 2 分間ホモジナイズした後、上記と同様に遠心分離した。メタノール層を採り、先のメタノール層と合わせ、メタノールを加えて正確に 100 mL とした。この溶液から 5 mL（試料 0.5 g 相当量）を正確に分取し、水 1 mL を加えた。

2) 精製

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 (500 mg) にメタノール 5 mL、水及びメタノール (1 : 9) 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、更に水及びメタノール (1 : 9) 混液 5 mL を注入し、流出液は捨てた。次いで、水及びメタノール (1 : 19) 混液 10 mL を注入し、溶出液を採り、40°C 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

試料 10.0 g

添加試料の場合、添加用標準溶液を添加・攪拌後、室温で 30 分間放置

抽出

メタノール 50 mL を加えて 2 分間ホモジナイズ
毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離後、メタノール層を採取
残留物にメタノール 30 mL を加えて 2 分間ホモジナイズ
毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離後、メタノール層を採取
採取したメタノール層を合わせ、メタノールを加えて 100 mL に定容
この 5 mL (試料 0.5 g 相当量) を採り、水 1 mL を添加・・・抽出溶液①

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 (500 mg)

カラムを予めメタノール 5 mL、水及びメタノール (1 : 9) 混液 5 mL で順次洗浄
抽出溶液①を注入
容器を水及びメタノール (1 : 9) 混液 1 mL ずつで 3 回洗い、洗液を順次注入
水及びメタノール (1 : 9) 混液 2 mL を注入し、全流出液を廃棄
水及びメタノール (1 : 19) 混液 10 mL を注入
溶出液を採り、40°C 以下で濃縮し、溶媒を除去
残留物をアセトニトリルに溶解し、正確に 1 mL に定容
(試験溶液 : 0.5 g 試料 / 1 mL 試験溶液)

LC-MS/MS 測定

7. マトリックス添加標準溶液の調製

「6. 試験溶液の調製」に記載した方法に従い、ブランク試料を処理した。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液を濃縮・溶媒除去して得られた残留物を、回収率 100%相当濃度の検量線作成用標準溶液 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. 測定条件の検討

1) タンデム質量分析における測定イオン及び測定パラメータの選択

まず、タンデム型質量分析計におけるナラシン A の測定イオンの選択及び測定条件の最適化を試みた。すなわち、ナラシン A の標準溶液 (10 ng/mL) をタンデム型質量分析計に注入 (流速 0.02 mL/min でインフュージョン注入) し、プリカーサーイオン及びプロダクトイオンの選択、測定条件の最適化を行った。

まず、エレクトロスプレーイオン化・ポジティブモード (ESI (+)) においてスキャン測定を行った結果、ナラシン A のプロトン付加分子イオン ($[M+H]^+$) と推察されるイオンは検出されず、ナトリウム付加分子イオン ($[M+Na]^+$) と推察されるイオンが検出された (図 2-1)。

一方、エレクトロスプレーイオン化・ネガティブモード (ESI (-)) のスキャン測定においては、ナラシン A の脱プロトン分子イオン ($[M-H]^-$) と推察されるイオンが検出された (図 2-2)。

次いで、ESI (+) のスキャン測定で得られた m/z 788 のイオン ($[M+Na]^+$ と推察されるイオン) 及び ESI (-) のスキャン測定で得られた m/z 764 のイオン ($[M-H]^-$ と推察されるイオン) をそれぞれ衝突誘起解離によりフラグメント化し、プロダクトイオンを選択した。

その結果、ESI (+) で得られた m/z 788 のイオンにおいては、 m/z 431 及び 545 のイオンで高いシグナル強度が得られたが、分析カラムを取り付けて LC-MS/MS で測定を行ったところ、 m/z 788→545 のイオンにおいては良好な測定感度が得られなかった。一方、ESI (-) で得られた m/z 764 のイオンにおいては、 m/z 87 及び m/z 255 のイオンで高いシグナル強度が得られ、LC-MS/MS で測定した場合でも両イオンで良好な測定感度が得られた。

以上の結果から、本報告書におけるナラシン A のイオン化法としては、定量・定性に使用可能な 2 つのプロダクトイオンが得られた ESI (-) を選択した。また、プリカーサーイオンとしては、ナラシン A の $[M-H]^-$ と推察された m/z 764 のイオンを選択した。

プロダクトイオンについては、実際に分析カラムを取り付けて測定を行ったところ、

m/z 764→87 : シグナル強度は m/z 764→255 のイオンよりも若干弱い、特に試料マトリックス存在下におけるベースライン上昇が小さい

m/z 764→255 : シグナル強度は強い、試料マトリックス存在下でのベースラインの上昇が大きい

ことが明らかとなった。

したがって、本報告書では、ESI (-) で得られた m/z 764→87 を定量イオン、 m/z

764→255 を定性イオンとして採用した。

図 2 に、得られたスペクトル（マススペクトル、プロダクトイオンスペクトル）を示した。

図 2-1 ESI (+) におけるナラシン A のマススペクトル及びプロダクトイオン
スキンスペクトル

上：マススペクトル (DP 121 V) 、下： m/z 788 のプロダクトイオンスペクトル
(CE 69 eV)

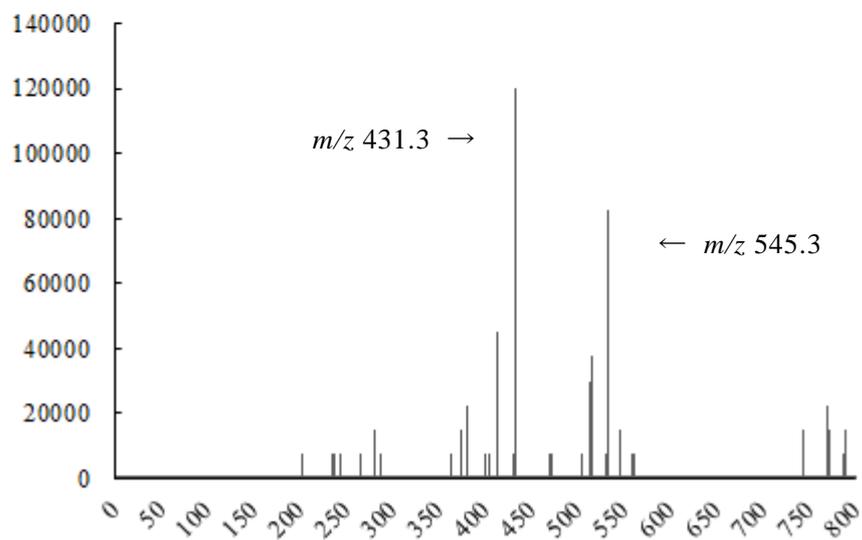
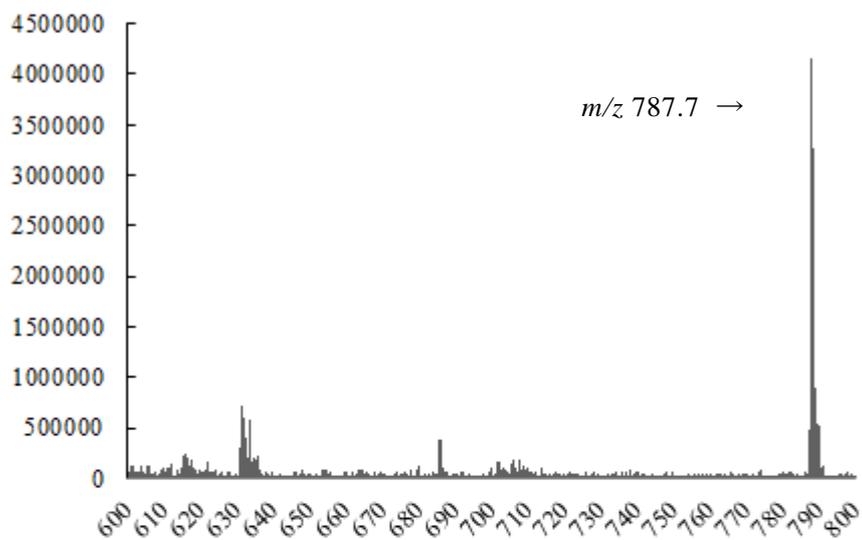
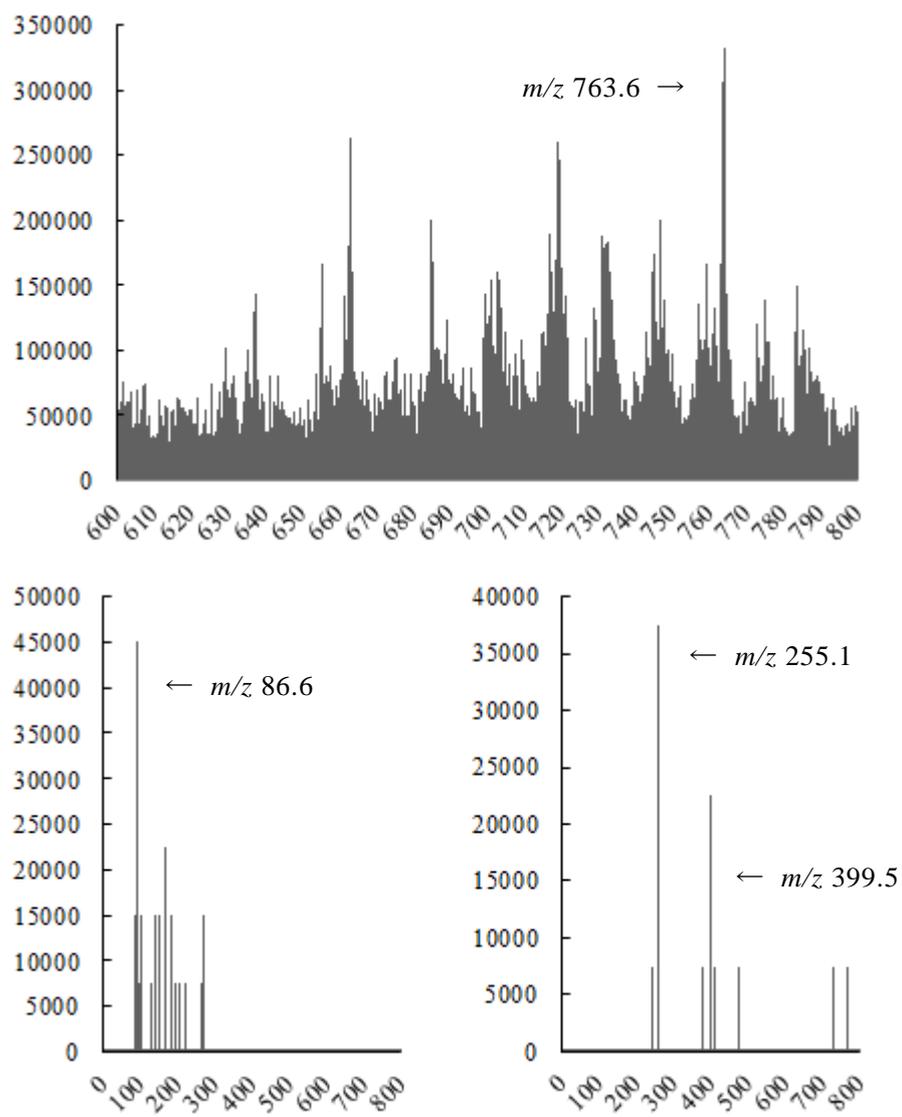


図 2-2 ESI (-) におけるナラシン A のマススペクトル及びプロダクトイオン
スキンスペクトル

上：マススペクトル (DP -120 V)、左下： m/z 764 のプロダクトイオンスペクトル
(CE -80 eV)、右下： m/z 764 のプロダクトイオンスペクトル (CE -48 eV)



2) HPLC における測定条件について

ナラシンは非常に極性が低い物質であるため、逆相 HPLC 分析において一般的に用いられるオクタデシルシリル化シリカゲル (ODS) 充填カラム (本報告書においては、ジーエルサイエンス(株)製 InertSustain Swift C18 (粒子径 3 μm 、内径 3 mm、長さ 150 mm) を使用した。) を用いた場合には、カラムへの保持が非常に強く、溶出にはアセトニトリル (100%) の通液が必要であった (図 3 の左)。アセトニトリルのみで溶出する場合には、試料由来の低極性夾雑物との分離が悪くなると考えられたことから、ODS 充填カラムよりも保持が弱く、アセトニトリル比率が低い移動相でもナラシン A の溶出が可能と考えられたオクチルシリル化シリカゲル充填カラム (本報告書においては、ジーエルサイエンス(株)製 Inertsil C8-4 (粒子径 5 μm 、内径 2.1 mm、長さ 150 mm) を使用した。) の適用を試みた。

その結果、オクチルシリル化シリカゲル充填カラムを用いた場合には、約 90% のアセトニトリル比率でナラシン A を溶出可能であり (図 3 の右)、低極性夾雑物との分離も可能であると考えられた。

ピーク形状については、若干ではあるが、ODS 充填カラムよりもオクチルシリル化シリカゲル充填カラムを用いた場合の方がシャープな形状であった。また、測定感度については、ODS 充填カラムよりもオクチルシリル化シリカゲル充填カラムを用いた場合の方が良好であった (図 3)。

以上の結果から、本報告書においては、分析カラムとしてオクチルシリル化シリカゲル充填カラム (ジーエルサイエンス(株)製、Inertsil C8-4 (粒子径 5 μm 、内径 2.1 mm×長さ 150 mm)) を採用した。

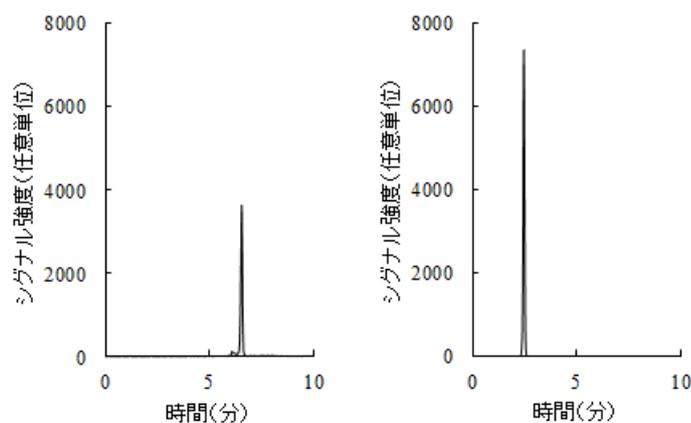


図 3 ナラシン A 標準溶液 (0.005 mg/L) のクロマトグラム

左 : InertSustain Swift C18 (粒子径 3 μm 、内径 3 mm、長さ 150 mm)

右 : Inertsil C8-4 (粒子径 5 μm 、内径 2.1 mm、長さ 150 mm)

LC 条件 :

移動相 0.1 vol% ギ酸 (A 液)

0.1 vol% ギ酸・アセトニトリル溶液 (B 液)

グラジエント 0 分 B 液 80%、5 分 B 液 99%、10 分 B 液 99%

また、移動相については 0.1 vol% ギ酸 (A 液) 及び 0.1 vol% ギ酸・アセトニトリル

溶液（B液）を用い、測定の効率化を考慮し、以下のグラジエント条件を採用した。

時間 (分)	A液 (%)	B液 (%)
0.0	20	80
5.0	5	95
10.0	5	95
10.1	20	80
15.0	20	80

2. 試験法の組み立てについて

1) 抽出溶媒について

抽出溶媒の選択については、牛の脂肪を用いて検討した。すなわち、均一化した牛の脂肪 10.0 g を 40℃ の湯浴上で融解し、ナラシン A を 500 ng (5,000 ng/mL アセトン溶液を 0.1 mL) 添加・混合した後、-30℃ で 30 分程度放置して再固化し、添加試料を調製した。調製した添加試料を各検討溶媒で抽出し、抽出液中のナラシン A の回収率を求めた。なお、回収率は、ブランク試料を用いて調製したマトリックス添加標準溶液で得られたピーク面積値に対する、抽出液で得られたピーク面積値の比から算出した。

まず、アセトニトリル/ヘキサン抽出の適用性について検討した。すなわち、添加試料 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 及び無水硫酸ナトリウム 20 g を加えてホモジナイズ及び遠心分離後、*n*-ヘキサン層を除去し、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及び遠心分離後、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、100 mL に定容した。定容後の溶液をそのまま LC-MS/MS で測定した結果、ナラシン A のアセトニトリル層中への回収率は約 37% であり、多くは *n*-ヘキサン層に分配されていることが推察された。

次いで、抽出溶媒としてのメタノールの適用性について検討した。すなわち、添加試料 10.0 g にメタノール 50 mL を加えてホモジナイズ及び遠心分離後、メタノール層を採った。残留物にメタノール 30 mL を加えてホモジナイズ及び遠心分離後、メタノール層を採り、先のメタノール層と合わせ、100 mL に定容した。定容後の溶液をそのまま LC-MS/MS で測定した結果、メタノール層中への回収率は約 86% であった。

また、エタノールについて、上記のメタノールの方法と同様に検討したところ、エタノール層中への回収率は約 89% であった。

以上の結果から、畜産食品中のナラシン A の抽出法としては、アセトニトリル/ヘキサン抽出（無水硫酸ナトリウム存在下）の適用性は低く、メタノールもしくはエタノールを使用することで良好な回収率が得られる可能性が高いと推察された。

2) 抽出溶媒の選択について

通常は、アセトニトリル/ヘキサン分配等を実施し、大部分の低極性夾雑物を除去した後、ミニカラム精製を行うが、上述の通り、アセトニトリル及び *n*-ヘキサンを用いて抽出した場合に回収率が低下したことから、アセトニトリル/ヘキサン分配を適用できない可能性があることが示唆された。そこで、ナラシン A については、試料から抽出した後、アセトニトリル/ヘキサン分配を実施することなく、ミニカラム精製を行う必要があると考えられた。

牛の脂肪のエタノール抽出液を 5 mL (試料 0.5 g 相当量) 採取し、40℃ 以下で濃縮し、溶媒を除去したところ、多量の残留物が確認された。得られた残留物にミニカラム (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) 精製で使用する負荷溶媒を加えた結果、完全には溶解出来なかった。また、抽出液 5 mL に水 1 mL を加えた場合には白濁が確認され、Oasis HLB に負荷した場合には常圧ではほとんど流下しなかった。

一方、メタノール抽出液 (牛の脂肪) においては、残留物は比較的少なく、Oasis

HLB 精製で使用する負荷溶媒に溶解可能であった。また、抽出液 5 mL に水 1 mL を加えた場合の白濁も少なく、Oasis HLB に負荷した場合にも常圧で流下することが確認された。

以上の結果から、操作効率などを考慮し、本報告における抽出溶媒としてはメタノールを採用した。

3) ミニカラム精製について

試料から抽出したナラシン A の精製法として、ミニカラム精製を検討した。

先ず、ナラシン A が低極性化合物であること、並びに、残留試験で使用された分析法において使用されていることから、シリカゲルミニカラム精製について検討した。InertSep SI (1,000 mg、ジーエルサイエンス(株)製)を用い、種々の溶媒 (*n*-ヘキサン、酢酸エチル、アセトン、アセトニトリル、エタノール、メタノール) を通液した結果、いずれの溶媒を用いた場合であってもナラシン A はシリカゲルミニカラムから溶出されなかった。水及びメタノール (1 : 4) 混液を通液した場合には、カラムからの回収率は 80% 程度であったが、他の高極性の夾雑物も同様に溶出するため精製効果は低いと考えられた。以上のことから、シリカゲルミニカラム精製は採用しなかった。

次に、ODS ミニカラム (InertSep C18 FF、1,000 mg、ジーエルサイエンス(株)製) を検討した結果、アセトニトリル及び水 (9 : 1) 混液などの溶媒で溶出が確認されたが、回収率は 40% 程度であった。

続いて、ポリマー系逆相ミニカラムであるジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム (Oasis HLB、500 mg、Waters 製) を検討した。その結果、メタノール、エタノール、アセトニトリル等の溶媒で良好な回収率が得られることが確認された。

自然流下における流下速度は、メタノールを用いた場合よりもアセトニトリルを用いた場合の方が若干早く、アセトニトリルを用いることで迅速なカラム精製が可能であると考えられた。一方、本報告書においては、抽出溶媒としてメタノールを選択しており、メタノール抽出液に水を加えて負荷・洗浄を行った場合の方がより迅速且つ簡便なカラム精製が可能と考えられた。以上の理由から、カラム精製を行う溶媒についてもメタノールを選択し、以下、カラム精製の最適化を行った。

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精製の最適化

Oasis HLB (500 mg) にメタノール 5 mL、水及びメタノール (1 : 1) 混液 5 mL を順次注入し、カラムを平衡化した。このカラムにナラシン A を 50 ng (水及びメタノール (1 : 1) 混液で調製した 100 ng/mL 溶液を 0.5 mL) 添加した後、水及びメタノール (1 : 1) 混液、(2 : 3) 混液、(3 : 7) 混液、(1 : 4) 混液、(1 : 9) 混液、メタノールをそれぞれ 5 mL ずつ順次注入した。各溶出液を採り、アセトニトリルを加えて 10 mL に定容し、定容後の溶液を LC-MS/MS で測定した。結果を表 2-1 に示した。

表 2-1 に示される通り、ナラシン A は水及びメタノール (1 : 9) 混液でも溶出されず、メタノールを注入した場合に溶出された。

表 2-1 Oasis HLB からのナラシン A の溶出状況①

溶出溶媒	回収率 (%)
水及びメタノール (1 : 1) 混液 5 mL	ND
水及びメタノール (2 : 3) 混液 5 mL	ND
水及びメタノール (3 : 7) 混液 5 mL	ND
水及びメタノール (1 : 4) 混液 5 mL	ND
水及びメタノール (1 : 9) 混液 5 mL	ND
メタノール 5 mL	75%

ND : ナラシン A のピークの S/N<3

上記の結果から、負荷及び洗浄溶媒として水及びメタノール (1 : 9) 混液を使用し、溶出溶媒としてメタノールが使用可能であることが示唆された。

牛の肝臓のメタノール抽出液 5 mL に水 1 mL を加え (メタノール比率は約 83%)、Oasis HLB に注入後、水及びメタノール (1 : 9) 混液 5 mL で洗浄後、メタノール 10 mL で溶出し、溶出液を濃縮、溶媒除去したところ、ナスフラスコ低部に比較的多くの白色残留物が得られた。溶出液をメタノールから水及びメタノール (1 : 19) 混液に変更し、同様の検討を行ったところ、残留物量は減少し、精製効果の改善が示唆された。

以下、Oasis HLB の洗浄、溶出状況について確認試験を実施した。

すなわち、Oasis HLB (500 mg) にメタノール 5 mL、水及びメタノール (1 : 9) 混液 5 mL を注入し、流出液を捨てた。このカラムに、「メタノール 5 mL にナラシン 25 ng を溶解し、水 1 mL を加えて攪拌した溶液」を注入した。次いで、水及びメタノール (1 : 9) 混液 5 mL を注入した。さらに、水及びメタノール (1 : 19) 混液を 5 mL ずつ 3 回注入した。各流出液・溶出液を採り、アセトニトリルを加えて 10 mL に定容後、定容した溶液を LC-MS/MS で測定した。結果を表 2-2 に示した。

表 2-2 に示される通り、ナラシン A は負荷液 (メタノール 5 mL に水 1 mL を加えた溶液) 及び洗浄液 (水及びメタノール (1 : 9) 混液 5 mL) では溶出せず、水及びメタノール (1 : 19) 混液 10 mL で良好な回収率が得られることが確認された。

以上の結果から、本報告書で採用した Oasis HLB ミニカラム精製操作は、

『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 (500 mg) にメタノール 5 mL、水及びメタノール (1 : 9) 混液 5 mL を順次注入し、流出液は捨てる。このカラムに、「抽出液 5 mL に水 1 mL を加えて攪拌した溶液」を注入した後、更に水及びメタノール (1 : 9) 混液 5 mL を注入し、流出液は捨てる。次いで、水及びメタノール (1 : 19) 混液 10 mL を注入し、溶出液を採る。』

操作とした。

表 2-2 Oasis HLB からのナラシン A の溶出状況②

注入溶媒	回収率 (%)
負荷液 (メタノール 5 mL に水 1 mL を加えた溶液)	ND
洗浄液 (水及びメタノール (1 : 9) 混液 5 mL)	ND
溶出液① (水及びメタノール (1 : 19) 混液 5 mL)	101
溶出液② (水及びメタノール (1 : 19) 混液 5 mL)	Tr
溶出液③ (水及びメタノール (1 : 19) 混液 5 mL)	ND

ND : ナラシン A のピークの S/N < 3

Tr : $3 \leq$ ナラシン A のピークの S/N < 10

3. 添加回収試験

検討食品は、ナラシンの基準値が設定された食品（牛・豚・鶏・その他の家きん、それぞれの筋肉・脂肪・肝臓・腎臓・食用部位）の中から、牛の筋肉、牛の脂肪及び牛の肝臓を選択して用いた。

選択した食品をそれぞれ均一化したものをブランク試料として用いた。添加試料は、牛の筋肉及び牛の肝臓については、各ブランク試料に添加用標準溶液を添加・攪拌後、室温で 30 分間放置したものを用いた。牛の脂肪の添加試料は、ブランク試料を 40℃の湯浴中で加温して融解させ、添加用標準溶液を加えて攪拌後、-30℃で約 30 分間放置して再固化したものを用いた。

調製した各食品のブランク試料及び添加試料について、先に記載した方法（[実験方法] 6. 試験溶液の調製）に従って操作し、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、定量限界を求めた。

1) 添加回収試験結果

① 選択性

検討した 3 食品（牛の筋肉・脂肪・肝臓）において、ナラシン A の測定を妨害する夾雑ピークは確認されず、選択性に問題は無いことが確認された（表 3）。

② 真度及び精度（基準値相当濃度を添加した添加試料の結果）

真度及び併行精度（カッコ内に記載）は、以下の通りであった。また、詳細を表 4 に示した。

牛の筋肉 : 97% (5.8 RSD%)

牛の脂肪 : 107% (3.7 RSD%)

牛の肝臓 : 106% (4.4 RSD%)

上記の結果から、全ての検討食品において、真度の目標値（70%～120%の範囲内）及び併行精度の目標値（15 RSD%未満）を満足することが確認された。

③ 定量限界（0.005 mg/kg 相当濃度を添加した添加試料の結果）

真度、併行精度（カッコ内に記載）及び S/N は、以下の通りであった。また、詳細を表 4 に示した。

牛の筋肉 : 102% (3.3 RSD%)、S/N 1717 (n=5 の Max. と Min. の平均値)

牛の脂肪 : 100% (8.2 RSD%)、S/N 1374 (n=5 の Max. と Min. の平均値)

牛の肝臓 : 103% (5.5 RSD%)、S/N 1137 (n=5 の Max. と Min. の平均値)

上記の結果から、全ての検討食品において、添加回収試験溶液（添加濃度 0.005 mg/kg）中のナラシン A のピークは S/N ≥ 10 の目標値を満足しており、また、真度の目標値（70%～120%の範囲内）及び併行精度の目標値（25 RSD%未満）を満足することが確認されたことから、0.005 mg/kg の定量限界を設定可能であることが示された。

2) 測定の際の試料マトリックスの影響

「[実験方法] 7. マトリックス添加標準溶液の調製」に記載した方法に従い、各検討食品のマトリックス添加標準溶液を調製し、LC-MS/MS で測定した。

結果を表 5 に示した。

各食品におけるピーク面積比（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）は、以下の通りであった。

牛の筋肉：0.95（基準値相当濃度）及び 1.01（定量限界相当濃度）

牛の脂肪：1.02（基準値相当濃度）及び 1.06（定量限界相当濃度）

牛の肝臓：1.04（基準値相当濃度）及び 1.04（定量限界相当濃度）

以上の結果から、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。

結論

畜産食品中のナラシン試験法の開発を検討した。種々の検討結果から、規制対象化合物であるナラシン A を、試料からメタノールで抽出し、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で精製後、LC-MS/MS で測定する方法を確立した。

基準値が設定された食品のうち、牛の筋肉・脂肪・肝臓を対象に添加回収試験（添加濃度は、検討食品における基準値相当濃度及び 0.005 mg/kg）を実施した結果、

- ・ 選択性

全ての検討食品において良好な選択性が得られた。

- ・ 真度及び併行精度

全ての検討食品において、真度及び併行精度の目標値を満足した。

- ・ 定量限界

添加濃度 0.005 mg/kg の添加試料を用いた添加回収試験において、真度、併行精度及びピークの S/N の目標値を全て満足したことから、定量限界は 0.005 mg/kg に設定可能であると考えられた。

以上の結果から、畜産食品中のナラシン試験法として、本報告書で開発した方法を採用可能（定量限界は 0.005 mg/kg）であると判断された。

表 3 選択性の評価

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	妨害ピークの許容範囲			ピーク面積(高さ)			選択性の評価	
						評価対象濃度 (ppm)	判定基準	面積又は高さの別	ブランク試料 (a)	標準溶液 (b)	面積(高さ)比 (a)/(b)		
1	ナラシンA	牛の筋肉	0.005	0.02	0.02	基準値	0.02	< 0.100	面積	0	37558	0.000	○
2		牛の脂肪	0.005	0.05	0.05	基準値	0.05	< 0.100	面積	0	86996	0.000	○
3		牛の肝臓	0.005	0.05	0.05	基準値	0.05	< 0.100	面積	0	77275	0.000	○
4		牛の筋肉(LOQ)	0.005	0.02	0.005	定量限界	0.005	< 0.333	面積	0	9422	0.000	○
5		牛の脂肪(LOQ)	0.005	0.05	0.005	定量限界	0.005	< 0.333	面積	0	8619	0.000	○
6		牛の肝臓(LOQ)	0.005	0.05	0.005	定量限界	0.005	< 0.333	面積	0	8474	0.000	○

表 4 真度、精度及び定量限界

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	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比		
							傾き	切片	r ² 値	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5			Max.	Min.	平均値
1	ナラシンA	牛の筋肉	0.005	0.02	0.02	*	3479324	1754	0.9983	104	99	95	89	97	97	5.8	4271	2054	3163
2		牛の脂肪	0.005	0.05	0.05	*	3320098	2791	0.9992	110	109	110	105	101	107	3.7	4854	2339	3596
3		牛の肝臓	0.005	0.05	0.05	*	3021636	1030	0.9996	99	104	110	106	110	106	4.4	4846	2831	3839
4		牛の筋肉(LOQ)	0.005	0.02	0.005		3361695	837	0.9994	108	101	101	102	99	102	3.3	2210	1224	1717
5		牛の脂肪(LOQ)	0.005	0.05	0.005		3022561	948	0.9988	110	106	102	92	92	100	8.2	1725	1022	1374
6		牛の肝臓(LOQ)	0.005	0.05	0.005		2883475	918	0.9994	101	105	108	106	94	103	5.5	1549	724	1137

表 5 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 (ppm)	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	ナラシンA	牛の筋肉	0.005	0.02	0.02	0.01	面積	0	35145	34760	34953	37558	36311	36934	0.95
2		牛の脂肪	0.005	0.05	0.05	0.025	面積	0	89320	88471	88896	86996	86693	86845	1.02
3		牛の肝臓	0.005	0.05	0.05	0.025	面積	0	81474	80454	80964	77275	77938	77606	1.04
4		牛の筋肉(LOQ)	0.005	0.02	0.005	0.0025	面積	0	9825	9366	9496	9422	9366	9394	1.01
5		牛の脂肪(LOQ)	0.005	0.05	0.005	0.0025	面積	0	9257	9072	9165	8619	8671	8645	1.06
6		牛の肝臓(LOQ)	0.005	0.05	0.005	0.0025	面積	0	8691	8591	8641	8474	8061	8277	1.04

図 4-1 牛の筋肉における SRM クロマトグラム
 (上段：基準値相当濃度、下段：定量限界相当濃度)

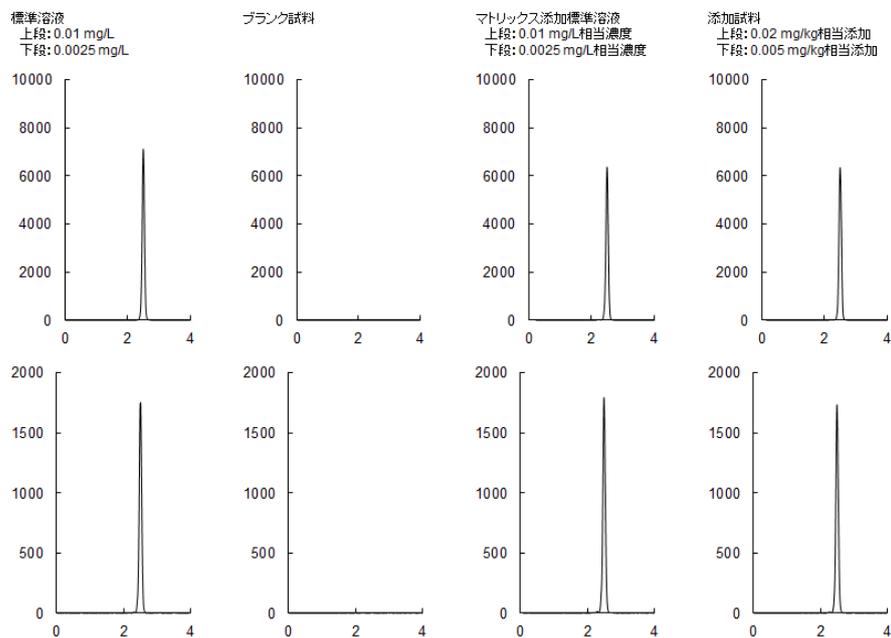


図 4-2 牛の脂肪における SRM クロマトグラム
 (上段：基準値相当濃度、下段：定量限界相当濃度)

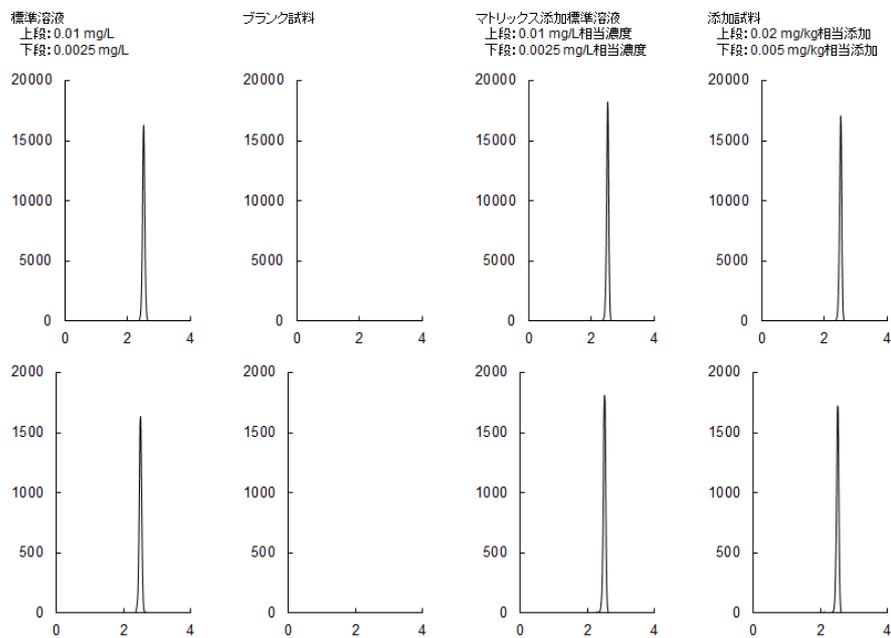


図 4-3 牛の肝臓における SRM クロマトグラム
 (上段：基準値相当濃度、下段：定量限界相当濃度)

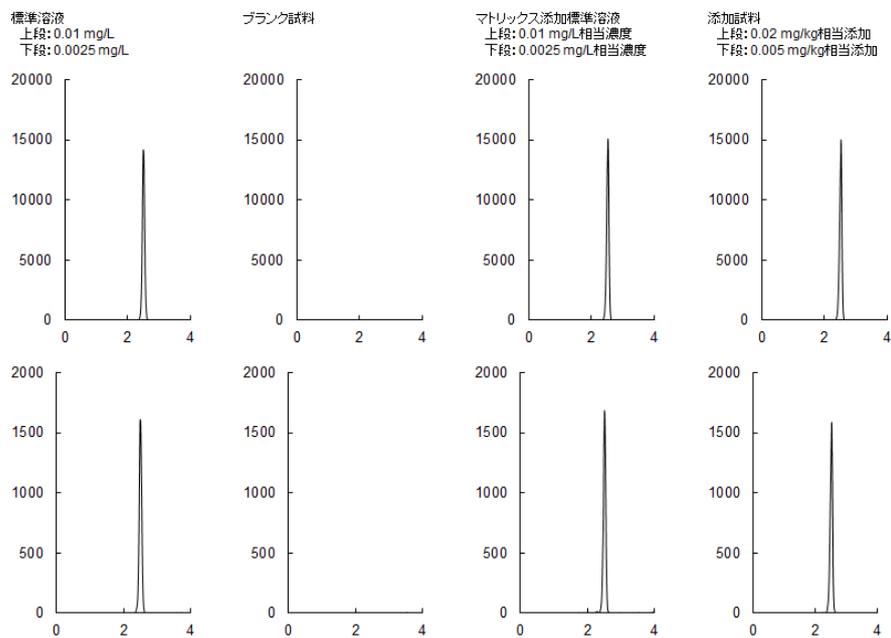


図 5-1 牛の筋肉におけるトータルイオンクロマトグラム
スキャン範囲 m/z 650~860、DP -120 V

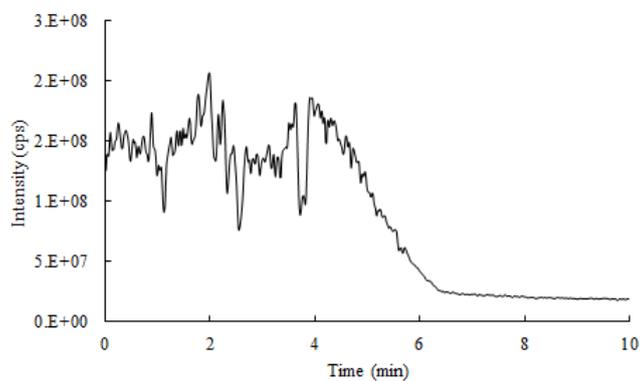


図 5-2 牛の脂肪におけるトータルイオンクロマトグラム
スキャン範囲 m/z 650~860、DP -120 V

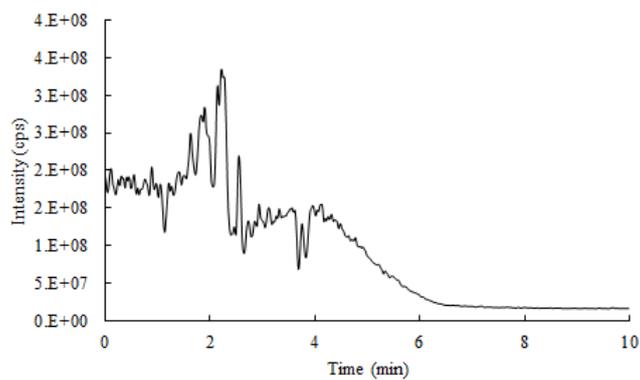


図 5-3 牛の肝臓におけるトータルイオンクロマトグラム
スキャン範囲 m/z 650~860、DP -120 V

