

※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

ロキサルソン及びニタルソン試験法（畜産物）

ニタルソン及びロキササルソン試験法の検討

[目的]

ロキササルソンは、主に鶏の寄生虫症の治療や成長促進を目的として使用される飼料添加物であり、米国、中国、南米等で使用されている。

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、ロキササルソンは、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。

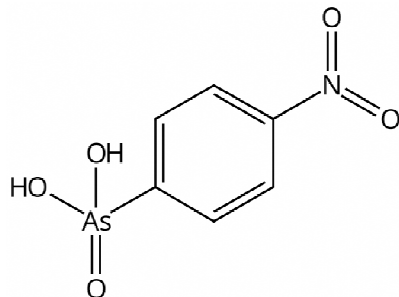
また、本成分は、規格基準において「食品に含有されるものであってはならない。」とは規定されておらず、不検出として管理されていないことから、その食品健康影響は無視できる程度と考えることはできないとされている。

恐らく、食品安全委員会より、ロキササルソンについては「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、畜産物中のロキササルソンの試験法を検討した。

また、ニタルソンについては、使用に関する情報は無いものの、ロキササルソンと同様に、『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ことから、「暫定基準が設定された動物用医薬品及び飼料添加物に係る食品健康影響評価の考え方について」（令和 2 年 5 月 18 日動物用医薬品専門調査会及び令和 2 年 6 月 15 日肥料・飼料等専門調査会決定）の 3 の（2）に該当する。』旨の評価がなされたことから、ロキササルソンと同時に分析可能な試験法を検討した。

[検討対象化合物の構造]

○ニタルソン



分子式 : $C_6H_6AsNO_5$

分子量 : 247.04

IUPAC名 : (4-Nitrophenyl)arsonic acid

CAS : Arsonic acid, As-(4-nitrophenyl)-

CAS 番号 : 98-72-6

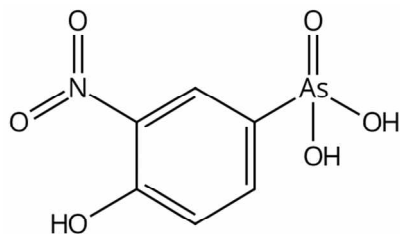
Melting Point : $>310^{\circ}C$ (decomp)

Boiling Point : $540.9 \pm 52.0^{\circ}C$ (Press : 760 Torr)

pKa : 3.03 ± 0.10

(出典:SciFinder)

○ロキササルソン



分子式 : $C_6H_6AsNO_6$

分子量 : 263.04

IUPAC名 : (4-Hydroxy-3-nitrophenyl)arsonic acid

CAS : Arsonic acid, As-(4-hydroxy-3-nitrophenyl)-

CAS 番号 : 121-19-7

Boiling Point : $573.3 \pm 60.0^{\circ}C$ (Press : 760 Torr)

Density : $2.02 g/cm^3$

pKa : 3.51 ± 0.10

(出典:SciFinder)

[実験方法]

1. 試料

国産の牛の筋肉・脂肪・肝臓、牛乳、鶏の筋肉・脂肪・肝臓・卵を用いた。
以下に各食品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、細切均一化した。
- 4) 牛乳は、よく攪拌し均一化した。
- 5) 鶏卵は、殻を除き卵白と卵黄を合わせてよく混合し均一化した。

2. 試薬、試液

1) 標準品、標準原液及び標準溶液

① 標準品

- ・ニタルソン：Fluka 製、純度 99.6%
- ・ロキササルソン：富士フイルム和光純薬(株)製、純度 100.0%

② 標準原液

ニタルソン及びロキササルソンの各標準品 10 mg 程度を精秤し、それぞれ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

各標準原液を適宜混合し、アセトニトリル、ギ酸及びジヘキシルアンモニウム酢酸塩試液 (1 : 2 : 7) 混液で希釈して調製した。

④ 添加用標準溶液

ニタルソン標準原液及びロキササルソン標準原液を混合し、メタノールで希釈して 0.02 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

アンモニア水：関東化学(株)製、特級

水：関東化学(株)製、蒸留水、LC-MS 用

ギ酸：富士フイルム和光純薬(株)製、特級

酢酸：富士フイルム和光純薬(株)製、LC/MS 用

ジヘキシルアンモニウム酢酸塩溶液：東京化成工業(株)製、約 0.5 mol/L

トリメチルアンモニウム塩修飾メタクリレート重合体ミニカラム (500 mg) : ジーエルサイエンス(株)製、InertSep MA-1

ベンゼンスルホンプロピルシリル化シリカゲルミニカラム (500 mg) : ジーエルサイエンス(株)製、InertSep SCX

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) : Waters 製、Oasis HLB

ジヘキシルアンモニウム酢酸塩試液 ジヘキシルアンモニウム酢酸塩溶液を水で 100 倍希釈した。

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-S（Waters 製）

濃縮装置：ロータリーエバポレーターNVC-2100（東京理化学器械(株)製）

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

4. 測定条件

カラム：L-Column3 C18（粒子径 3 μm 、内径 2 mm、長さ 150 mm、メタルフリーカラム、(一財)化学物質評価研究機構製）

カラム温度：40 $^{\circ}\text{C}$

移動相：ジヘキシルアンモニウム酢酸塩試液（A 液）及び 0.02 vol% 酢酸・アセトニトリル溶液（B 液）

送液条件：下表

時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)
0.0	90	10
5.0	90	10
15.0	50	50
15.1	5	95
20.0	5	95
20.1	90	10
30.0	90	10

移動相流速：0.4 mL/min

注入量：5 μL

保持時間：

ニタルソン 10.7 分

ロキサルソン 11.9 分

イオン化モード：エレクトロスプレーイオン化法 ネガティブイオンモード

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 $^{\circ}\text{C}$

脱溶媒ガス：窒素

コリジョンガス：アルゴン

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)
ニタルソン	246.0	20	108.0	25	138.0	15
ロキサルソン	262.0	20	123.0	25	153.0	20

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

5. 定量

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、ギ酸及び 5 mmol/L ジヘキシルアンモニウム酢酸塩溶液（1：2：7）混液）を調製した。それぞれ 5 μ L を LC-MS/MS に注入し、ピーク面積法によりニタルソン及びロキササルソンの検量線を作成した。

試験溶液（1 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ニタルソン及びロキササルソンの含量を求めた。

図 1 に、添加濃度 0.002 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。

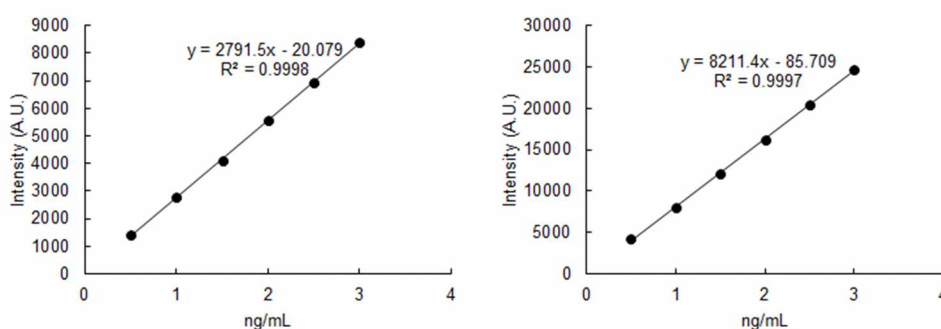


図 1-1 ニタルソンの検量線の一例

左：測定イオン m/z 246.0 > 108.0、右：測定イオン m/z 246.0 > 138.0

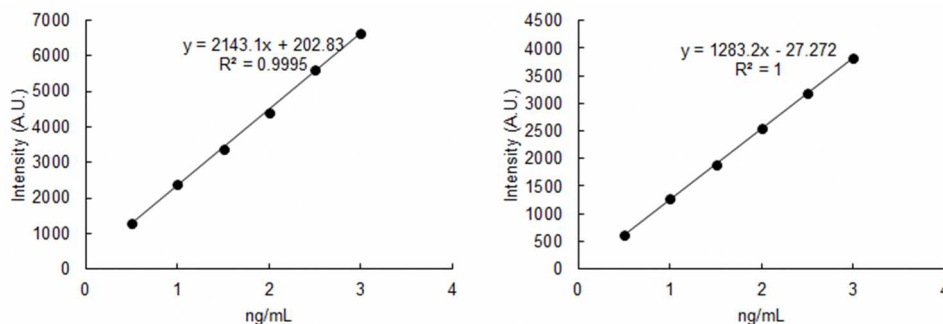


図 1-2 ロキササルソンの検量線の一例

左：測定イオン m/z 262.0 > 123.0、右：測定イオン m/z 262.0 > 153.0

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 $^{\circ}$ C 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 $^{\circ}$ C 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

① 卵以外の食品の場合

試料 10.0 g を量り採った。これにアンモニア水、水及びメタノール (1 : 3 : 16) 混液 50 mL を加えてホモジナイズした後、毎分 3,500 回転で 10 分間遠心分離した。上澄液を採り、残留物にアンモニア水、水及びメタノール (1 : 3 : 16) 混液 40 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。上澄液を採り、先の上澄液と合わせ、メタノールを加えて正確に 100 mL とした。この溶液から正確に 10 mL を採取し、40°C以下で 1 mL 以下まで濃縮し、溶媒を除去した。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。

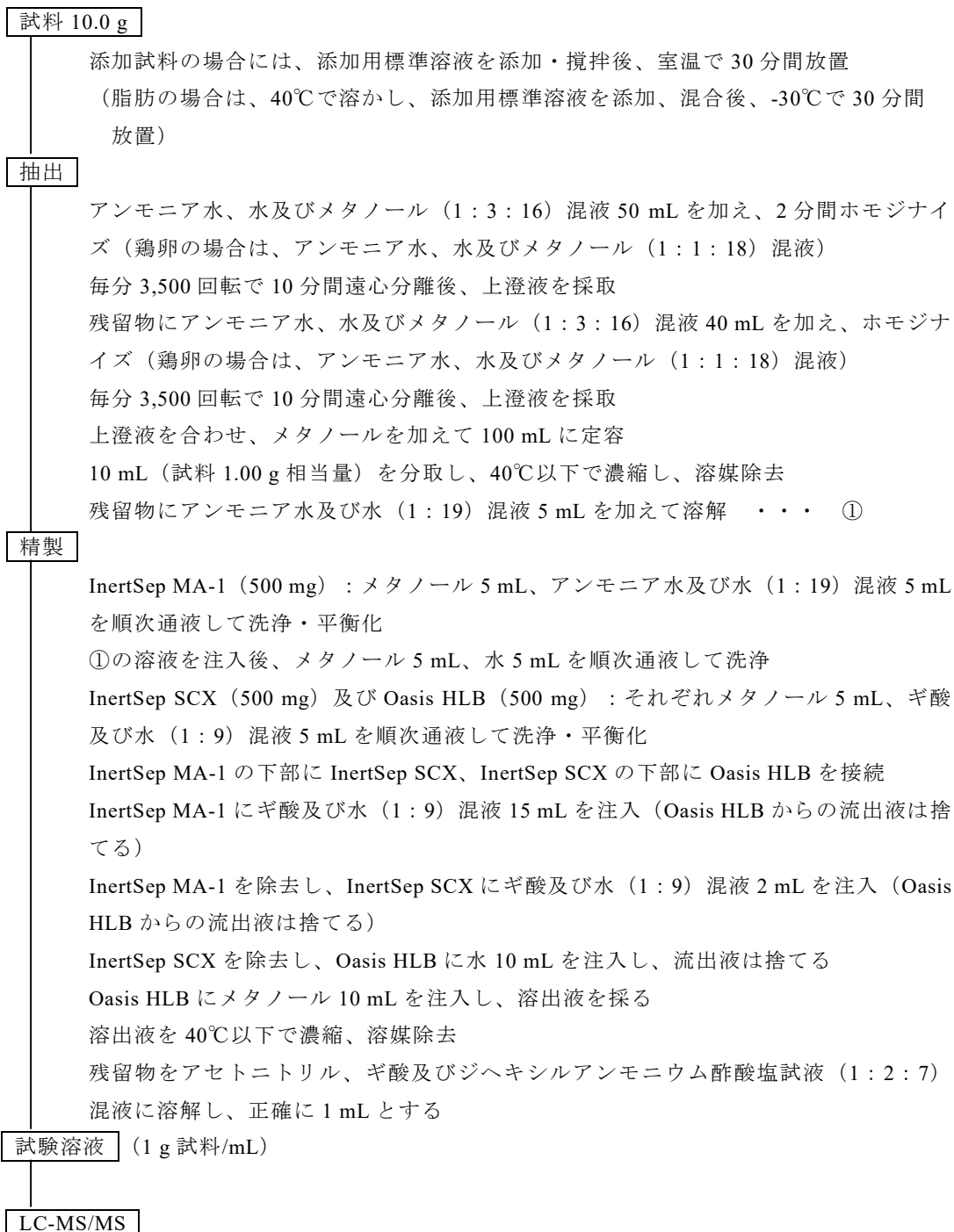
② 卵の場合

試料 10.0 g を量り採った。これにアンモニア水、水及びメタノール (1 : 1 : 18) 混液 50 mL を加えてホモジナイズした後、毎分 3,500 回転で 10 分間遠心分離した。上澄液を採り、残留物にアンモニア水、水及びメタノール (1 : 1 : 18) 混液 40 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。上澄液を採り、先の上澄液と合わせ、メタノールを加えて正確に 100 mL とした。この溶液から正確に 10 mL を採取し、40°C以下で 1 mL 以下まで濃縮し、溶媒を除去した。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

トリメチルアンモニウム塩修飾メタクリレート重合体ミニカラム (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、メタノール 5 mL、水 5 mL を順次注入し、各流出液は捨てた。次いで、ベンゼンスルホニルプロピルシリル化シリカゲルミニカラム (500 mg) 及びジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム (500 mg) にそれぞれメタノール 5 mL、ギ酸及び水 (1 : 9) 混液 5 mL を順次注入し、各流出液は捨てた。トリメチルアンモニウム塩修飾メタクリレート重合体ミニカラムの下部にベンゼンスルホニルプロピルシリル化シリカゲルミニカラム、更にベンゼンスルホニルプロピルシリル化シリカゲルミニカラムの下部にジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムを接続した後、トリメチルアンモニウム塩修飾メタクリレート重合体ミニカラムにギ酸及び水 (1 : 9) 混液 15 mL を注入し、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流出液は捨てた。トリメチルアンモニウム塩修飾メタクリレート重合体ミニカラムを取り外した後、ベンゼンスルホニルプロピルシリル化シリカゲルミニカラムにギ酸及び水 (1 : 9) 混液 2 mL を注入し、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流出液は捨てた。ベンゼンスルホニルプロピルシリル化シリカゲルミニカラムを取り外した後、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に水 10 mL を注入し、流出液は捨てた。次に、メタノール 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、ギ酸及びジヘキシルアンモニウム酢酸塩試液 (1 : 2 : 7) 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、ニタルソン及びロキササルソンの標準溶液（1,000 ng/mL、水及びメタノール（1：1）混液）をスキャン測定した。

ESI(+)においては、ニタルソン及びロキササルソンともにプロトン付加分子 ($[M+H]^+$) は検出されなかった。

ESI (-) においては、ニタルソン及びロキササルソンともに、それぞれの脱プロトン分子 ($[M-H]^-$) と推察される m/z 246.0 及び m/z 262.0 のイオンが検出された（図 2-1 及び図 2-2）。

イオン化モードとして ESI (-) を選択し、ニタルソン及びロキササルソンのプロダクトイオンスキャン測定を行った。ニタルソンの結果を図 3-1 に、ロキササルソンの結果を図 3-2 に示した。ニタルソンにおいては m/z 138.0、 m/z 108.0 などのプロダクトイオンが検出された。また、ロキササルソンにおいては m/z 153.0、 m/z 123.0 などのプロダクトイオンが検出された。

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、

ニタルソン：定量イオン m/z 246.0 > 108.0、定性イオン m/z 246.0 > 138.0

ロキササルソン：定量イオン m/z 262.0 > 123.0、定性イオン m/z 262.0 > 153.0

を選択した。

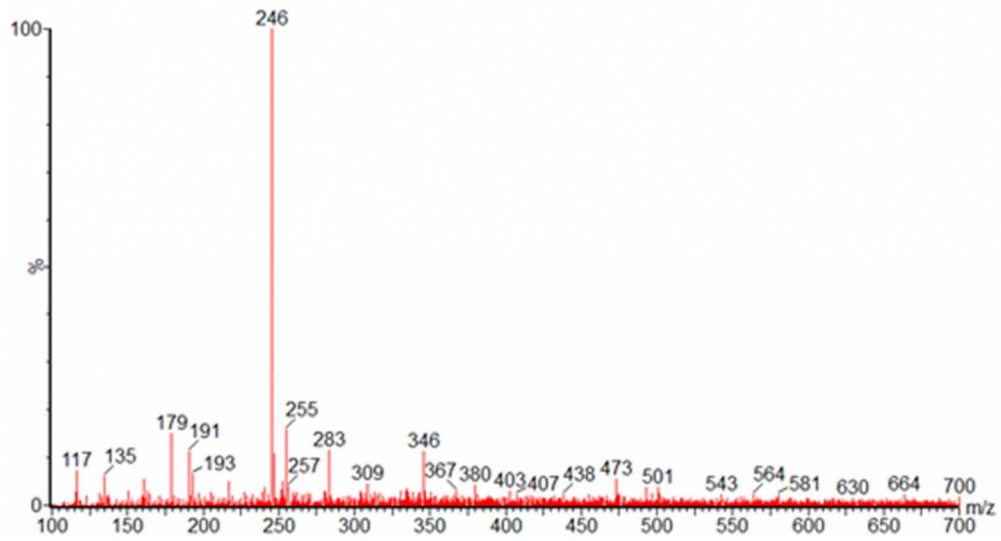


図 2-1 ESI (-) におけるニタルソンのマススペクトル
 スキャン範囲 m/z 100~700、CV 20 V

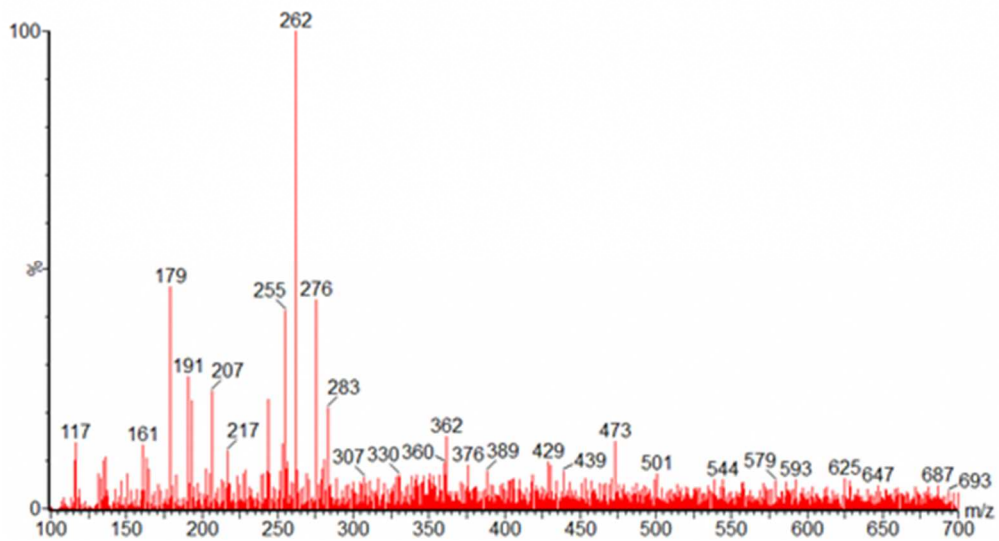


図 2-2 ESI (-) におけるロキササルソンのマススペクトル
 スキャン範囲 m/z 100~700、CV 20 V

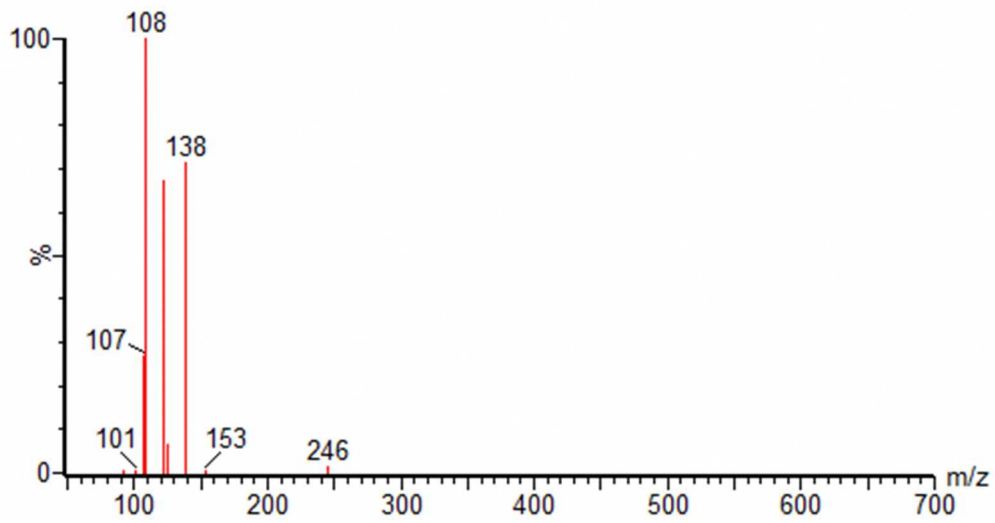


図 3-1 ニタルソンのプロダクトイオンキャンスペクトル
ESI (-)、プリカーサーイオン m/z 246.0、
スキャン範囲 m/z 50~700、CV 20 V、CE 25 eV

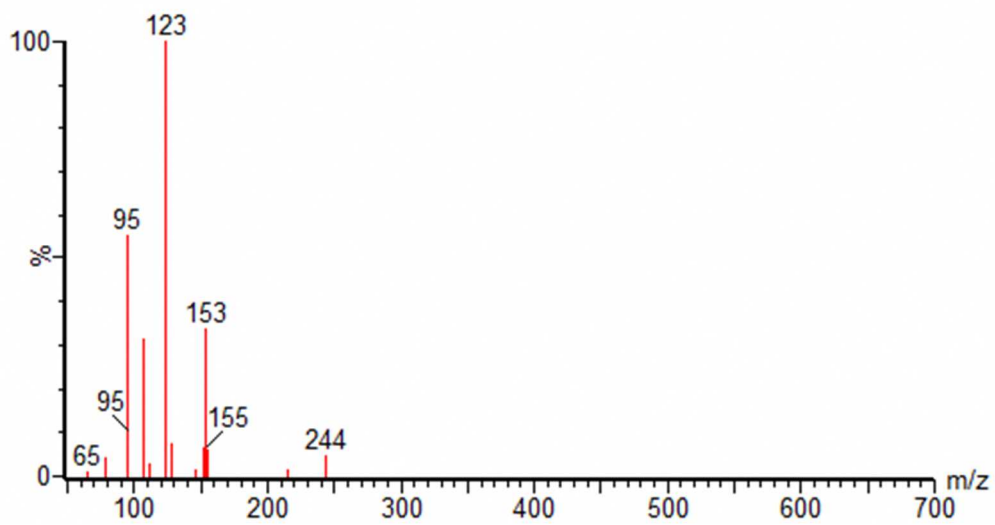


図 3-2 ロキシサルソンのプロダクトイオンキャンスペクトル
ESI (-)、プリカーサーイオン m/z 262.0、
スキャン範囲 m/z 50~700、CV 20 V、CE 25 eV

2) LC 測定条件の検討

まず、一般的な ODS 系の分析カラム（ジエールサイエンス(株)製 Inertsil ODS-4、InertSustain C18、関東化学(株)製 Mightysil RP-18 GP）を用い、移動相に水 100%を用いた条件で測定したところ、ニタルソン及びロキササルソンともにカラムに保持されなかった。そこで、親水性相互作用クロマトグラフィー用の分析カラム（Merck 社製 ZIC-HILIC 及び ZIC-cHILIC、ともにメタルフリーカラム）を用いて測定したところ、カラムへの保持は良好であったが、良好なピーク形状が得られなかった。

イオンペア試薬を含む溶液（ジヘキシルアンモニウム酢酸塩試液）を移動相として、ODS 系分析カラム（(一財)化学物質評価研究機構製 L-Column3 ODS）を用いたところ、ニタルソン及びロキササルソンともにカラムに保持されるものの、良好なピーク形状は得られなかった（図 4-2）。ニタルソン及びロキササルソンと、分析カラムのカラム管との相互作用の影響が疑われたため、同カラムのメタルフリーのもの（カラム管の内側がステンレス製ではないもの）を用いたところ、良好な保持とピーク形状が得られた（図 4-1）。

また、非水系の移動相について種々検討したところ（アセトニトリル及びメタノール、両溶媒について種々の濃度のギ酸及び酢酸を添加）、0.02 vol%酢酸・アセトニトリル溶液を用いることで、ニタルソン及びロキササルソンについて良好な保持・ピーク形状・測定感度が得られた。

以上の結果から、本検討における LC 条件としては、

分析カラム：メタルフリーの ODS カラム（L-Column3 ODS、メタルフリー）

移動相 A 液：5 mmol/L ジヘキシルアンモニウム酢酸塩溶液

移動相 B 液：0.02 vol%酢酸・アセトニトリル溶液

を使用する条件を採用した。

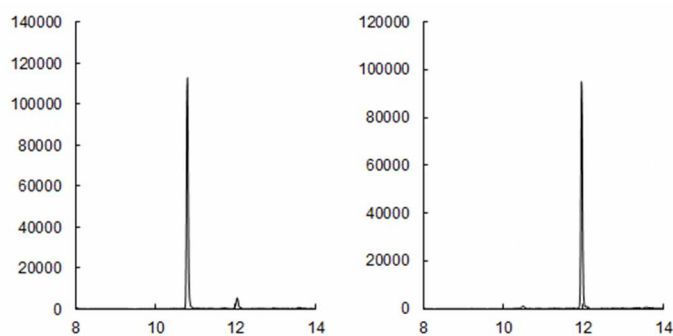


図 4-1 ニタルソン及びロキササルソンの SRM クロマトグラム

分析カラム：L-Column3 ODS（粒子径 3 μm 、2 \times 150 mm、メタルフリー）

移動相：5 mmol/L ジヘキシルアンモニウム酢酸塩溶液（A 液）及び 0.02 vol%
酢酸・アセトニトリル溶液（B 液）

グラジエント： t_0 : B=10%、 t_5 : B=10%、 t_{15} : B=70%

左：ニタルソン（2 ng/mL、測定イオン m/z 246.0>108.0）

右：ロキササルソン（2 ng/mL、測定イオン m/z 262.0>123.0）

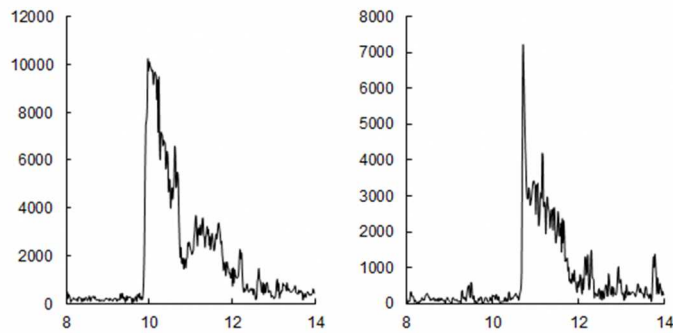


図 4-2 ニタルソン及びロキササルソンの SRM クロマトグラム
 分析カラム：L-Column3 ODS（粒子径 3 μm 、2 \times 150 mm）
 移動相：5 mmol/L ジヘキシルアンモニウム酢酸塩溶液（A 液）及び 0.02 vol%
 酢酸・アセトニトリル溶液（B 液）
 グラジエント： t_0 ：B=10%、 t_5 ：B=10%、 t_{15} ：B=70%
 左：ニタルソン（2 ng/mL、測定イオン m/z 246.0>108.0）
 右：ロキササルソン（2 ng/mL、測定イオン m/z 262.0>123.0）

2. 試験溶液調製法の検討

1) 抽出

ニタルソン及びロキササルソンともに水/オクタノール分配係数等の情報は不明であるが、標準原液を調製する際に水及びメタノール以外の溶媒に溶解し難かったこと、「LC測定条件の検討」の項に記載した通り ODS 系の分析カラムに保持され難かったことから、比較的極性の高い化合物であることが予想された。

抽出溶媒として水を用いた場合には、試料によっては遠心分離において良好な層分離が得られず、抽出液を採取する操作が困難な食品も確認された。一方、メタノールを抽出溶媒として用いた場合には、種々の畜産物由来の試料において遠心分離後の層分離が良好であり、抽出液の採取が容易であった。これらの結果から、本検討では、抽出溶媒はメタノールを基本とした溶媒を用いることとした。

均質化した牛の肝臓 (10.0 g) にニタルソン及びロキササルソンを添加・攪拌後、室温で 30 分間放置し、メタノールで抽出した (抽出 1 回目 50 mL、2 回目 30 mL)。抽出液を合わせ、メタノールで 100 mL に定容後、抽出液中のニタルソン及びロキササルソンの回収率を求めた。その結果、ニタルソン及びロキササルソンともに回収率は 50% 程度であり、良好な回収率は得られなかった。

牛の脂肪については、メタノール抽出により良好な回収率が得られたことから (ニタルソン 97%、ロキササルソン 95%)、肝臓中の酵素等による分解などが予想された。そこで、「LC/MS による農薬等の一斉試験法Ⅲ (畜水産物)」を基に、試料に重量比で等量のエタノール及び水 (1:1) 混液を加えて磨砕均一化した牛の肝臓にニタルソン及びロキササルソンを添加・攪拌後、室温で 30 分間放置し、メタノール抽出を行った。抽出液中の回収率はほとんど変わらず、エタノール及び水 (1:1) 混液の添加による改善効果は確認できなかった。エタノール及び水混液に、種々の酸や塩 (ギ酸、酢酸、塩酸、ギ酸アンモニウム、酢酸アンモニウム等) を添加した場合においても、良好な回収率は得られなかった。

上記のエタノール及び水混液にアンモニア水を加えた場合に回収率が若干改善されたことから (ニタルソン及びロキササルソンともに 60%程度)、抽出溶媒にアンモニア水及びメタノール混液を用い、アンモニア水とメタノールの比率について検討した。

抽出溶媒としてアンモニア水及びメタノール (5:95) 混液、(10:90) 混液、(15:85) 混液及び (20:80) 混液を用い、牛の肝臓からニタルソン及びロキササルソンを抽出した。ニタルソン及びロキササルソンの回収率は、アンモニア水の比率に依らずほとんど一定であった (表 2)。

次に、アンモニア水の比率を一定 (5 vol%) として、水の比率について検討した。すなわち、アンモニア水、水及びメタノール (5:0:95) 混液、(5:5:90) 混液及び (5:15:80) 混液を用い、牛の肝臓からニタルソン及びロキササルソンを抽出した。ニタルソンの回収率は水の比率に依らず一定であり、ロキササルソンの回収率は水比率の増加に伴い高くなることが示唆された (表 2)。なお、水の比率が 15 vol% 以上の抽出液においては、遠心分離 (毎分 3,000 回転、5 分間) において良好な層分離が得られない場合もあることが確認された。また、遠心分離により上澄液と沈殿物の分離が可能であった場合であっても、沈殿物が膨潤することにより適切な量の上澄液が得られず (抽出液 50 mL を加え、ホモジナイズ・遠心分離した際に得られる上澄液の量が

25～30 mL 程度)、回収率が低下する場合もあることが確認された。

遠心分離条件を毎分 3,500 回転・10 分間に変更することで、鶏卵を除く検討食品において良好な層分離が可能であり、得られる上澄液量も適量であった。

一方、鶏卵においては、抽出液としてアンモニア水、水及びメタノール (5 : 15 : 80) 混液を使用した場合には、毎分 3,500 回転・10 分間の遠心分離条件であっても得られる上澄液量が少なく(抽出溶媒 50 mL を加えた場合、上澄液の採取量 20 mL 程度)、回収率も低値であった(ニタルソン 60%程度、ロキササルソン 55%程度)。抽出溶媒の水比率を検討したところ、アンモニア水、水及びメタノール (5 : 5 : 90) 混液を用いた場合には得られる上澄液量が増加し、回収率も改善された(ニタルソン 80%程度、ロキササルソン 75%程度)。

以上の結果から、卵以外の食品の場合は抽出溶媒として「アンモニア水、水及びメタノール (1 : 3 : 16) 混液を用い、卵の場合は「アンモニア水、水及びメタノール (1 : 1 : 18) 混液」を用いることとした。

表 2 各抽出溶媒における牛の肝臓試料からのニタルソン及びロキササルソンの回収率 (n=1)

	回収率 (%)	
	ニタルソン	ロキササルソン
アンモニア水及びメタノール (5 : 95) 混液	75	63
アンモニア水及びメタノール (10 : 90) 混液	78	65
アンモニア水及びメタノール (20 : 80) 混液	78	64
アンモニア水、水及びメタノール (5 : 0 : 95) 混液	78	48
アンモニア水、水及びメタノール (5 : 5 : 90) 混液	76	60
アンモニア水、水及びメタノール (5 : 15 : 80) 混液	79	70

2) ミニカラム精製について

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

① トリメチルアンモニウム塩修飾メタクリレート重合体ミニカラム精製

分析対象化合物であるニタルソン及びロキササルソンが ESI (-) でイオン化されたことから、強塩基性陰イオン交換樹脂カラムの適用性について検討した。

トリメチルアンモニウム塩修飾メタクリレート重合体ミニカラム (ジーエルサイエンス(株)製 InertSep MA-1、500 mg) をメタノール 5 mL、アンモニア水及びメタノール (1:19) 混液 5 mL で予備洗浄した。ニタルソン及びロキササルソンの混合標準溶液 5 mL (各 2 ng/mL、アンモニア水及び水 (1 : 19) 混液) をミニカラムに注入した。メタノール 5 mL、水 5 mL、ギ酸及び水 (1 : 9) 混液 15 mL を順次注入し、各流出液・溶出液を採り、ニタルソン及びロキササルソンの回収率を求めた。結果を表 3 に示した。ニタルソン及びロキササルソンともに、メタノール、水を注入した場合にはカラムからの溶出は確認されず、ギ酸及び水 (1 : 9) 混液を注入した場合にはニタルソン及びロキササルソンが溶出した。溶出液量については、10 mL を注入した場合には若干低い回収率

であり（ニタルソン 78%、ロキササルソン 79%）、15 mL を注入した場合に良好な回収率が得られた（ニタルソン 102%、ロキササルソン 102%）。

なお、ギ酸及び水（1：19）混液 15 mL で溶出した際の回収率は、ニタルソン 70%・ロキササルソン 68%であり、ギ酸及び水（1：9）混液 15 mL で溶出することで上記の通り良好な回収率が得られたことから、溶出はギ酸及び水（1：9）混液 15 mL で行うこととした。

② ベンゼンスルホニルプロピルシリル化シリカゲルミニカラム精製

トリメチルアンモニウム塩修飾メタクリレート重合体ミニカラムのみで精製を行った場合、試料によっては試験溶液の濁りや浮遊物が確認された。強酸性陽イオン交換カラムを使用することで、牛の肝臓由来の夾雑物を除去可能であったことから、InertSep SCX（ジーエルサイエンス(株)製、500 mg）の適用性について検討した。

InertSep SCX（500 mg）をメタノール 5 mL、ギ酸及び水（1：9）混液 5 mL で予備洗浄した。ニタルソン及びロキササルソンの混合標準溶液 15 mL（各 10 ng、ギ酸及び水（1：9）混液）を注入した後、更にギ酸及び水（1：9）混液 2 mL を注入し、全溶出液を合わせ、ニタルソン及びロキササルソンの回収率を求めた。結果を表 4 に示した。強酸性の溶液を強酸性陽イオン交換カラムに注入することにより、ニタルソン及びロキササルソンはカラムに保持されることなくカラムを素通りし、肝臓由来の夾雑物はカラムに保持されることが推察された。

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精製

強塩基性陰イオン交換樹脂カラム精製を行った後、強酸性陽イオン交換カラム精製を行うことにより、肝臓由来の夾雑物等を効果的に除去可能であったが、試料によっては試験溶液を調製した際に時間の経過とともに沈殿物の生成が確認された。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精製を行うことで、試験溶液中の沈殿物の生成を抑制可能であったことから、Oasis HLB（Waters 製、500 mg）による精製について検討した。

まず、ニタルソン及びロキササルソンの Oasis HLB への保持について検討した。ニタルソン及びロキササルソンは高極性化合物であるため、水もしくはアンモニア水など、中性や塩基性の水溶液で Oasis HLB に負荷した場合には、カラムに保持されなかった。一方、ギ酸水溶液で負荷した場合には、10 vol%ギ酸で良好な保持が得られた。溶出は、メタノールを通液することで効率的な溶出が可能であり、10 mL の液量で良好な回収率が得られた。（表 5）

表 3 InertSep MA-1（500 mg）からの回収率（n=1）

	回収率 (%)	
	ニタルソン	ロキササルソン
負荷（アンモニア水及び水（1：19）混液 5 mL）	N.D.	N.D.
洗浄①（メタノール 5 mL）	N.D.	N.D.
洗浄②（水 5 mL）	N.D.	N.D.
溶出（ギ酸及び水（1：9）混液 10 mL）	78	79
溶出（ギ酸及び水（1：9）混液 15 mL）	102	102

N.D.：ピークの S/N<3

表 4 InertSep SCX (500 mg) からの回収率 (n=1)

	回収率 (%)	
	ニタルソン	ロキササルソン
負荷及び追加溶出 (ギ酸及び水 (1:9) 混液 15 mL+2 mL)	104	99

表 5 Oasis HLB (500 mg) からの回収率 (n=1)

	回収率 (%)	
	ニタルソン	ロキササルソン
負荷 (ギ酸及び水 (1:9) 混液 17 mL)	N.D.	N.D.
洗浄 (水 10 mL)	N.D.	N.D.
溶出 (メタノール 10 mL)	101	104
溶出 (メタノール 15 mL)	101	102

上記 3 種のミニカラム精製における負荷・洗浄・溶出の結果、並びに、操作の効率を考慮し、本検討では連結カラムによる精製法を採用した。

すなわち、

InertSep MA-1 (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、流出液は捨てる。このカラムに、抽出で得られた溶液を注入した後、メタノール 5 mL、水 5 mL を順次注入し、各流出液は捨てる。次いで、InertSep SCX (500 mg) 及び Oasis HLB (500 mg) にそれぞれメタノール 5 mL、ギ酸及び水 (1:9) 混液 5 mL を順次注入し、各流出液は捨てる。InertSep MA-1 の下部に InertSep SCX、更に InertSep SCX の下部に Oasis HLB を接続した後、InertSep MA-1 にギ酸及び水 (1:9) 混液 15 mL を注入し、Oasis HLB からの流出液は捨てる。InertSep MA-1 を取り外した後、InertSep SCX にギ酸及び水 (1:9) 混液 2 mL を注入し、Oasis HLB からの流出液は捨てる。InertSep SCX を取り外した後、Oasis HLB に水 10 mL を注入し、流出液は捨てる。次に、メタノール 10 mL を注入し、溶出液を採り、40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物をアセトニトリル、ギ酸及び 5 mmol/L ジヘキシルアンモニウム酢酸塩溶液 (1:2:7) 混液に溶解し、正確に 1 mL としたものを試験溶液とする。

操作とした。

なお、ニタルソン及びロキササルソンの標準溶液 (各 2 ng、アンモニア水及び水 (1:19) 混液 5 mL) について、上記精製法における回収率を確認したところ、それぞれ 98%及び 96%と良好であった。

3. 添加回収試験

検討食品は、牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳、鶏の筋肉、鶏の脂肪、鶏の肝臓、鶏卵（全8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

ニタルソン及びロキササルソンともに、金属等に吸着し易い化合物であるため、検討した全食品のブランク試料においてキャリーオーバーに由来するピークが検出されたものの、選択性の目標値は満足した。

結果の詳細を表 6-1 及び 6-2 に示した。

表 6-1 選択性の評価結果（ニタルソン）

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	ニタルソン (m/z 246→108)	牛の筋肉	0.002		定量限界 0.002	<0.333	面積	633	702	688	5611	5568	5584	0.136	○
2		牛の脂肪	0.002		定量限界 0.002	<0.333	面積	116	91	103	5246	5214	5230	0.020	○
3		牛の肝臓	0.002		定量限界 0.002	<0.333	面積	55	68	61	3352	3351	3351	0.019	○
4		牛乳	0.002		定量限界 0.002	<0.333	面積	237	188	212	6151	6325	6238	0.035	○
5		鶏の筋肉	0.002		定量限界 0.002	<0.333	面積	1036	1097	1066	5871	5831	5851	0.223	○
6		鶏の脂肪	0.002		定量限界 0.002	<0.333	面積	102	122	112	5236	5007	5122	0.022	○
7		鶏の肝臓	0.002		定量限界 0.002	<0.333	面積	759	854	806	5811	5835	5823	0.161	○
8		鶏卵	0.002		定量限界 0.002	<0.333	面積	63	101	82	3575	3687	3631	0.023	○

表 6-2 選択性の評価結果（ロキササルソン）

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	ロキササルソン (m/z 262→123)	牛の筋肉	0.002		定量限界 0.002	<0.333	面積	439	500	470	4370	4295	4333	0.122	○
2		牛の脂肪	0.002		定量限界 0.002	<0.333	面積	221	149	185	3828	3826	3827	0.051	○
3		牛の肝臓	0.002		定量限界 0.002	<0.333	面積	73	70	72	2424	2330	2377	0.031	○
4		牛乳	0.002		定量限界 0.002	<0.333	面積	285	260	273	3969	4066	4017	0.073	○
5		鶏の筋肉	0.002		定量限界 0.002	<0.333	面積	462	534	498	4453	4461	4457	0.126	○
6		鶏の脂肪	0.002		定量限界 0.002	<0.333	面積	190	178	184	3789	3751	3770	0.051	○
7		鶏の肝臓	0.002		定量限界 0.002	<0.333	面積	801	761	781	4883	4869	4876	0.191	○
8		鶏卵	0.002		定量限界 0.002	<0.333	面積	108	88	98	2608	2632	2620	0.039	○

② 真度及び精度

ニタルソン及びロキササルソンを添加した試料（添加濃度 0.002 mg.kg）における真度及び併行精度は、

ニタルソン：真度 76%～101%、併行精度 0.5 RSD%～5.1 RSD%

ロキササルソン：真度 71%～81%、併行精度 1.5 RSD%～4.4 RSD%

であり（表 7-1 及び表 7-2）、全検討食品において真度及び併行精度の目標値を満たした。

また、S/N については、全検討食品の添加試料において、

ニタルソン：300 以上

ロキササルソン：200 以上

であった。

表 7-1 添加回収試験結果（ニタルソン）

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	ニタルソン (m/z 246→108)	牛の筋肉	0.002		0.002	S/N	2791495	-20	0.9998	83	83	82	83	83	83	0.5	1046	498	772
2		牛の脂肪	0.002		0.002	S/N	2706025	250	0.9997	82	88	87	89	82	86	3.5	861	432	646
3		牛の肝臓	0.002		0.002	S/N	1914743	5	0.9993	79	74	77	76	76	76	2.1	577	426	502
4		牛乳	0.002		0.002	S/N	2787441	48	0.9999	99	103	104	101	102	101	2.0	1230	871	1051
5		鶏の筋肉	0.002		0.002	S/N	2736960	74	0.9996	88	91	88	85	82	87	4.0	1125	703	914
6		鶏の脂肪	0.002		0.002	S/N	2722946	131	1.0000	88	89	89	88	84	88	2.5	956	654	805
7		鶏の肝臓	0.002		0.002	S/N	2818924	86	0.9997	81	83	81	85	83	83	2.0	793	408	600
8		鶏卵	0.002		0.002	S/N	1983470	-66	0.9998	74	85	81	82	80	80	5.1	549	364	456

表 7-2 添加回収試験結果（ロキササルソン）

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	ロキササルソン (m/z 262→123)	牛の筋肉	0.002		0.002	S/N	2143078	203	0.9995	79	83	83	80	78	81	2.8	685	354	520
2		牛の脂肪	0.002		0.002	S/N	2156425	231	0.9999	76	79	79	82	75	78	3.6	591	315	453
3		牛の肝臓	0.002		0.002	S/N	1463014	85	0.9997	74	69	70	72	70	71	2.6	398	297	348
4		牛乳	0.002		0.002	S/N	2245486	173	0.9999	85	80	79	76	78	80	4.4	713	428	571
5		鶏の筋肉	0.002		0.002	S/N	2186740	134	0.9989	79	84	83	79	83	81	3.1	720	519	620
6		鶏の脂肪	0.002		0.002	S/N	2144798	189	0.9993	79	82	81	81	80	81	1.5	725	434	580
7		鶏の肝臓	0.002		0.002	S/N	2144626	317	0.9995	70	73	71	71	76	72	2.9	666	287	476
8		鶏卵	0.002		0.002	S/N	1517296	106	0.9996	74	77	77	75	79	76	2.3	587	248	417

4. 測定の際の試料マトリックスの影響

ニタルソン及びロキササルソンの測定の際の試料マトリックスの影響をそれぞれ表 8-1 及び表 8-2 に示した。

ニタルソンでは 0.85~1.07、ロキササルソンでは 0.76~0.89 であった。

これらの結果から、ニタルソン及びロキササルソンともに、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 8-1 測定の際の試料マトリックスの影響 (ニタルソン)

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	ニタルソン (<i>m/z</i> 246→108)	牛の筋肉	0.002		0.002	0.002	面積	668	5611	5558	4917	5545	5614	5579	0.88	
2		牛の脂肪	0.002		0.002	0.002	面積	103	5246	5214	5127	5660	5663	5661	0.91	
3		牛の肝臓	0.002		0.002	0.002	面積	61	3352	3351	3290	3899	3806	3852	0.85	
4		牛乳	0.002		0.002	0.002	面積	212	6151	6325	6026	5616	5637	5626	1.07	
5		鶏の筋肉	0.002		0.002	0.002	面積	1066	5871	5831	4785	5564	5583	5574	0.86	
6		鶏の脂肪	0.002		0.002	0.002	面積	112	5236	5007	5009	5568	5325	5447	0.92	
7		鶏の肝臓	0.002		0.002	0.002	面積	806	5811	5835	5017	5718	5751	5734	0.87	
8		鶏卵	0.002		0.002	0.002	面積	82	3575	3687	3549	3886	3921	3904	0.91	

表 8-2 測定の際の試料マトリックスの影響 (ロキササルソン)

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	ロキササルソン (<i>m/z</i> 262→123)	牛の筋肉	0.002		0.002	0.002	面積	470	4370	4295	3863	4415	4381	4398	0.88	
2		牛の脂肪	0.002		0.002	0.002	面積	185	3828	3826	3642	4556	4441	4499	0.81	
3		牛の肝臓	0.002		0.002	0.002	面積	72	2424	2330	2305	3032	3039	3036	0.76	
4		牛乳	0.002		0.002	0.002	面積	273	3969	4066	3745	4647	4689	4688	0.80	
5		鶏の筋肉	0.002		0.002	0.002	面積	498	4453	4461	3959	4404	4578	4491	0.88	
6		鶏の脂肪	0.002		0.002	0.002	面積	184	3789	3751	3586	4508	4304	4406	0.81	
7		鶏の肝臓	0.002		0.002	0.002	面積	781	4883	4869	4095	4691	4505	4598	0.89	
8		鶏卵	0.002		0.002	0.002	面積	98	2608	2632	2522	3183	3147	3165	0.80	

各検討対象食品におけるニタルソン及びロキササルソンの SRM クロマトグラムを図 5 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 6 に示した。

[結論]

畜産物中のニタルソン及びロキササルソンの試験法について検討した。

抽出法については、メタノール抽出（アンモニア塩基性下）により、種々の畜産物からニタルソン及びロキササルソンを効率的に抽出可能と考えられた。精製操作については、トリメチルアンモニウム塩修飾メタクリレート重合体ミニカラム、ベンゼンスルホンプロピルシリル化シリカゲルミニカラム及びジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムを用いて精製を行うことで、種々の畜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、LC測定については、イオンペア試薬・ジヘキシルアンモニウム酢酸塩を含む移動相を用い、更にメタルフリータイプのODS系分析カラムを使用することで、分析対象化合物であるニタルソン及びロキササルソンの良好な保持・溶出が可能であった。

開発した方法を用い、牛の筋肉・脂肪・肝臓・乳、鶏の筋肉・脂肪・肝臓・卵を対象に添加回収試験（添加濃度 0.002 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、選択性に問題はなかった。

- ・ 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 0.002 mg/kg に設定可能と考えられた。

以上の結果から、畜産物中のニタルソン及びロキササルソンの試験法として、本報告で開発した方法を適用可能（定量限界は 0.002 mg/kg）と判断された。

なお、ニタルソン及びロキササルソンは、金属に吸着し易い化合物であるため、分析カラムのカラム管や LC-MS/MS 装置の配管などは、可能な限り金属製のものを使用しないよう注意が必要と考えられた。

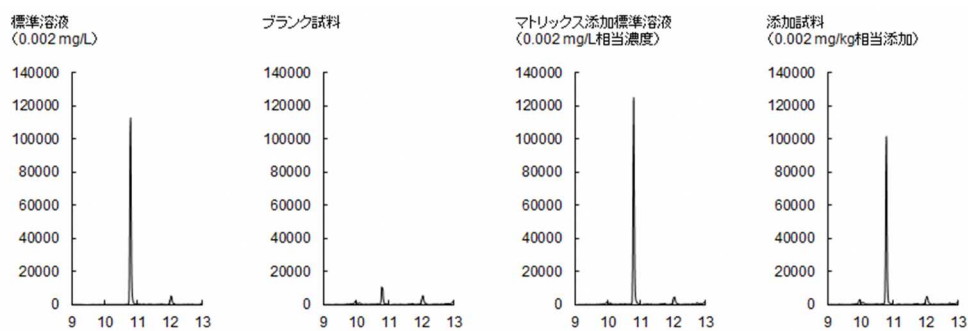


図 5-1-1 ニタルソンの SRM クロマトグラム(測定イオン m/z 246.0>108.0、牛の筋肉)

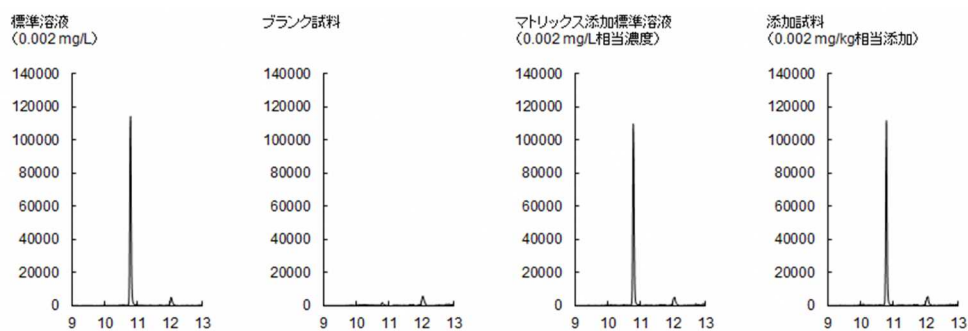


図 5-1-2 ニタルソンの SRM クロマトグラム(測定イオン m/z 246.0>108.0、牛の脂肪)

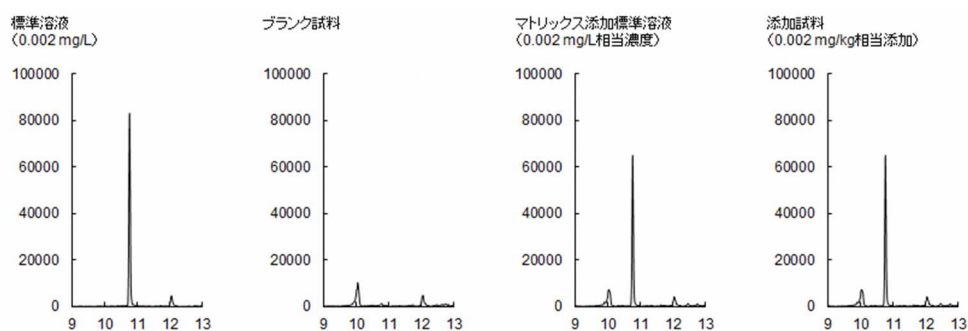


図 5-1-3 ニタルソンの SRM クロマトグラム(測定イオン m/z 246.0>108.0、牛の肝臓)

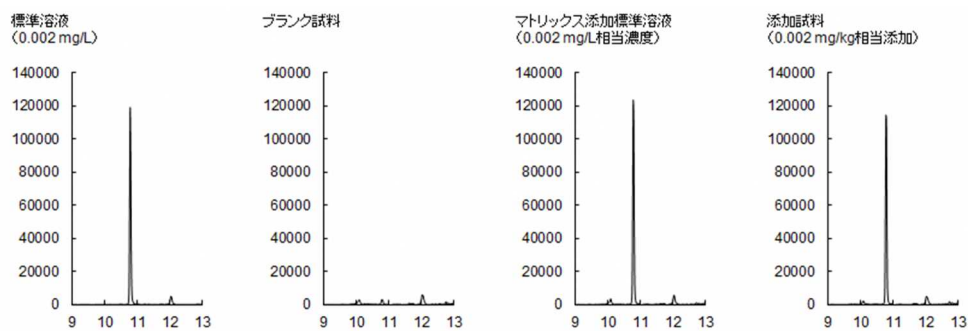


図 5-1-4 ニタルソンの SRM クロマトグラム (測定イオン m/z 246.0>108.0、牛乳)

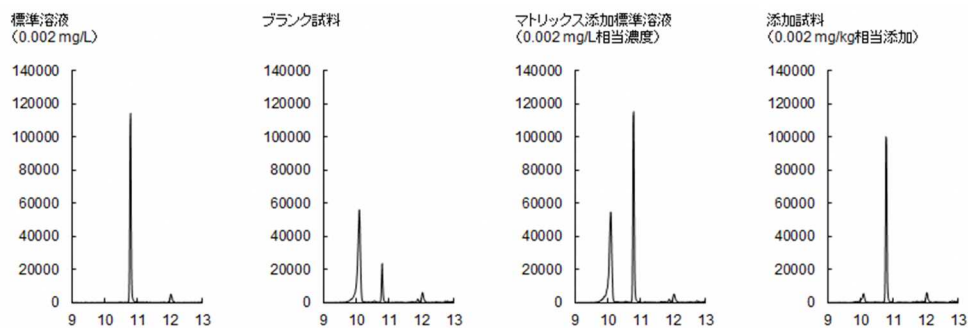


図 5-1-5 ニタルソンの SRM クロマトグラム (測定イオン m/z 246.0>108.0、鶏の筋肉)

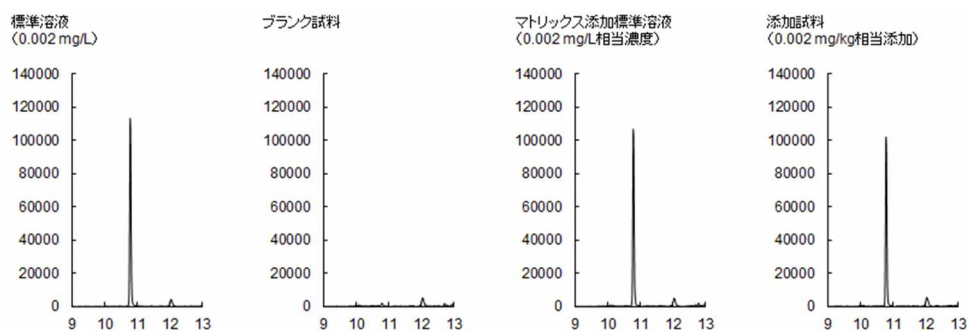


図 5-1-6 ニタルソンの SRM クロマトグラム (測定イオン m/z 246.0>108.0、鶏の脂肪)

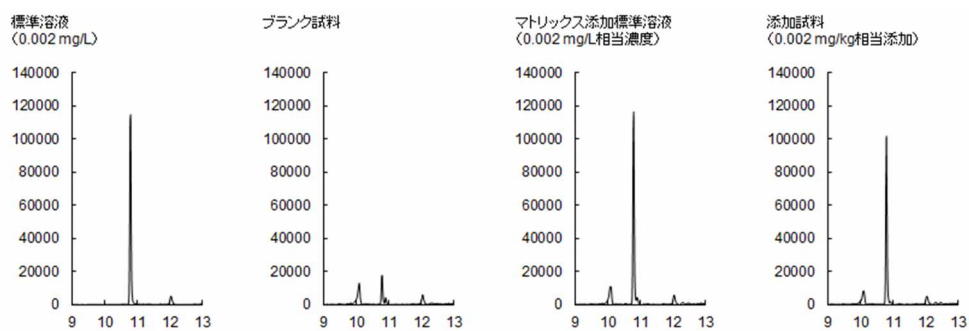


図 5-1-7 ニタルソンの SRM クロマトグラム(測定イオン m/z 246.0>108.0、鶏の肝臓)

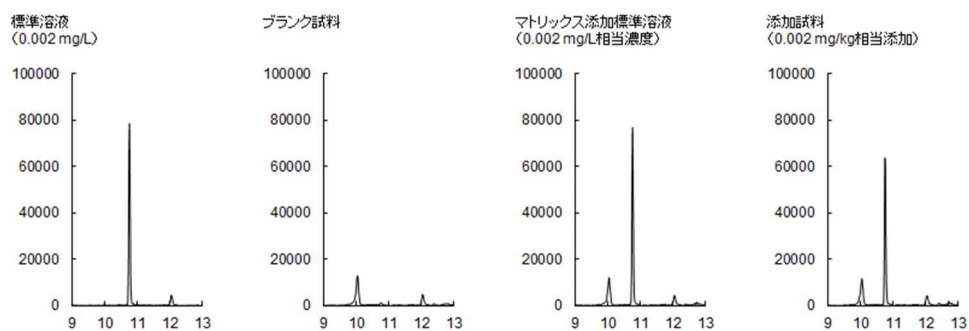


図 5-1-8 ニタルソンの SRM クロマトグラム (測定イオン m/z 246.0>108.0、鶏卵)

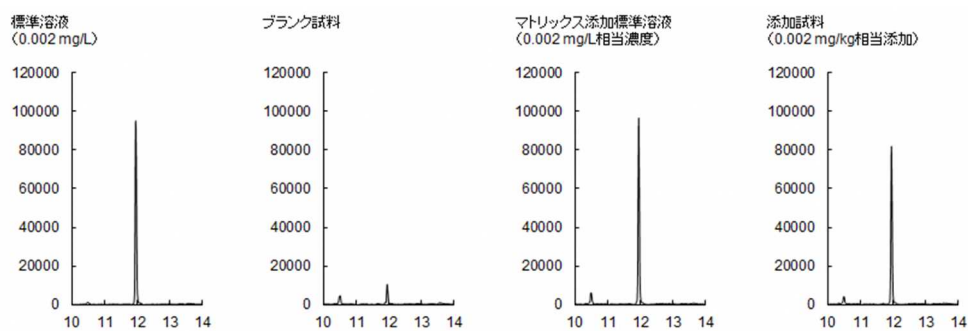


図 5-2-1 ロキササルソンの SRM クロマトグラム (測定イオン m/z 262.0>123.0、牛の筋肉)

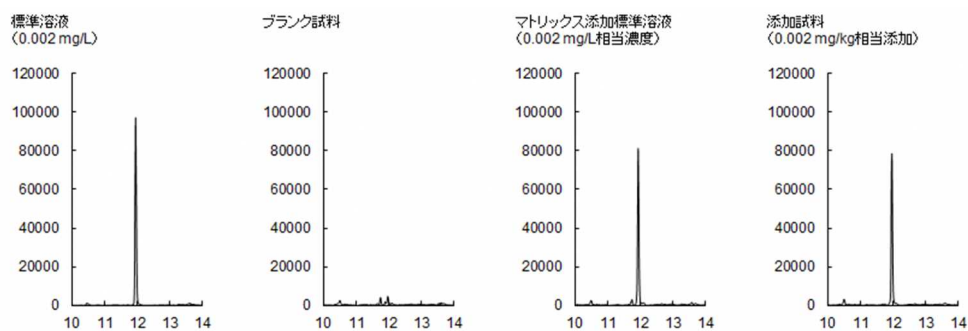


図 5-2-2 ロキササルソンの SRM クロマトグラム (測定イオン m/z 262.0>123.0、牛の脂肪)

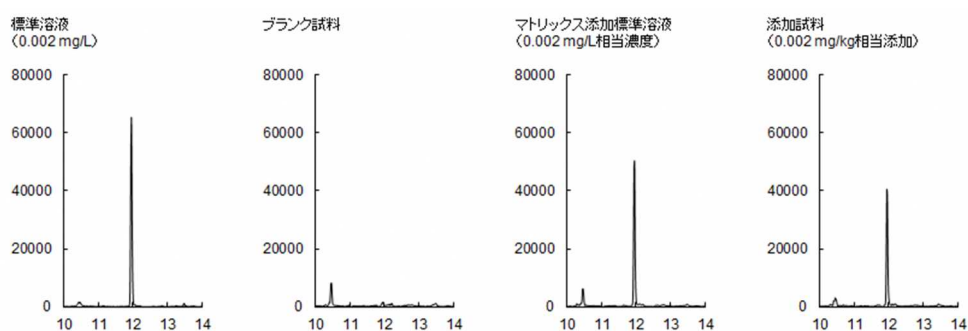


図 5-2-3 ロキササルソンの SRM クロマトグラム (測定イオン m/z 262.0>123.0、牛の肝臓)

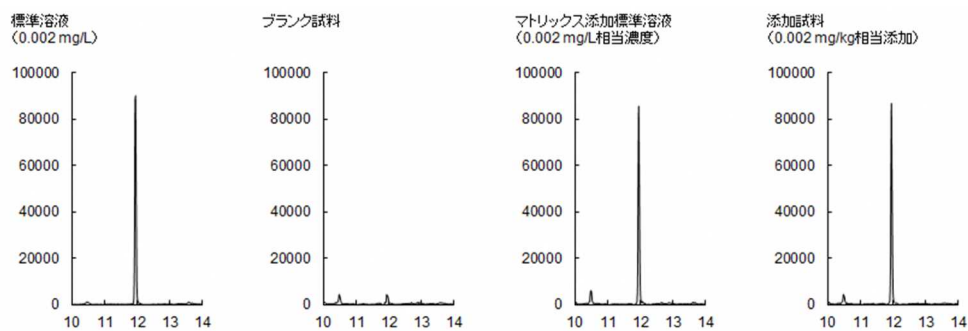


図 5-2-4 ロキササルソンの SRM クロマトグラム (測定イオン m/z 262.0>123.0、牛乳)

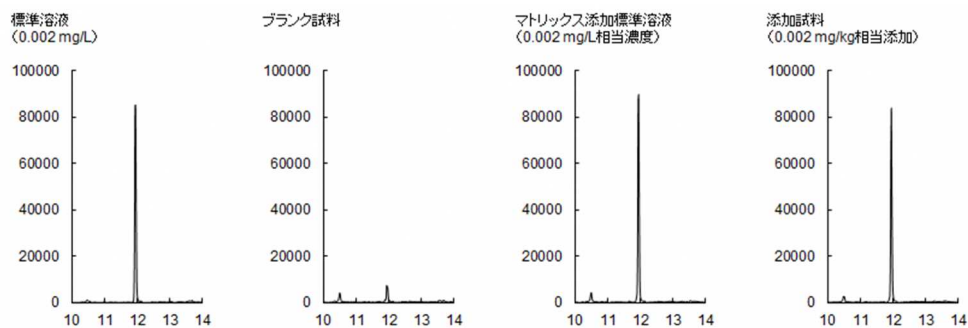


図 5-2-5 ロキササルソンの SRM クロマトグラム (測定イオン m/z 262.0>123.0、鶏の筋肉)

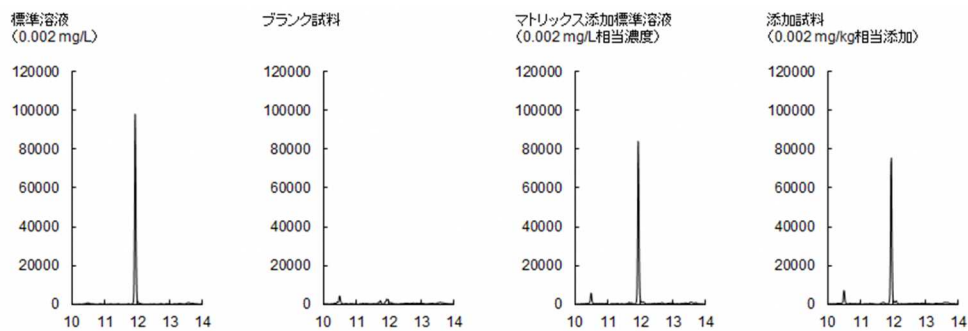


図 5-2-6 ロキササルソンの SRM クロマトグラム (測定イオン m/z 262.0>123.0、鶏の脂肪)

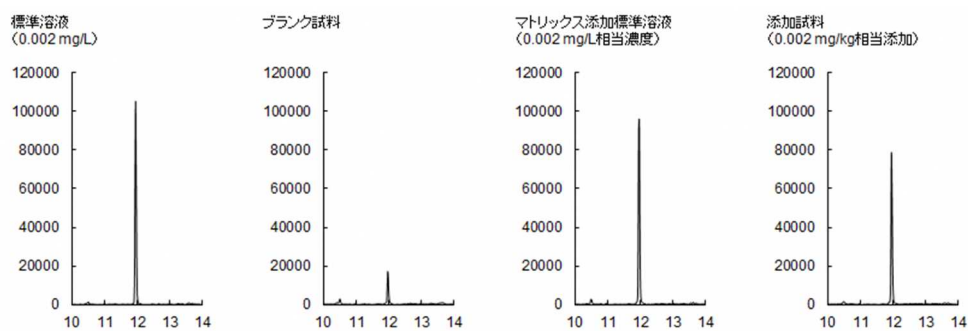


図 5-2-7 ロキササルソンの SRM クロマトグラム (測定イオン m/z 262.0>123.0、鶏の肝臓)

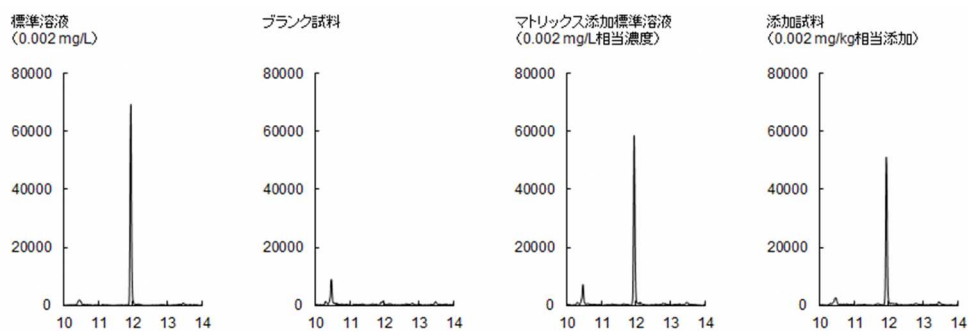


図 5-2-8 ロキササルソンの SRM クロマトグラム (測定イオン m/z 262.0>123.0、鶏卵)

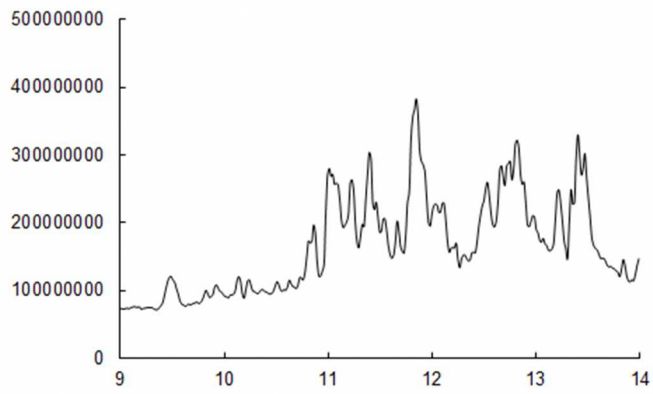


図 6-1 トータルイオンクロマトグラム (牛の筋肉)

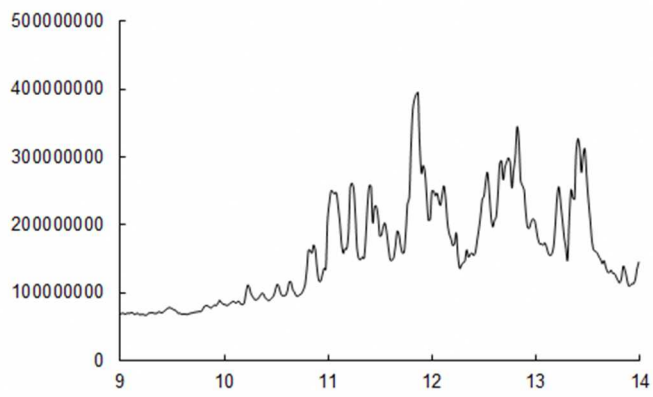


図 6-2 トータルイオンクロマトグラム (牛の脂肪)

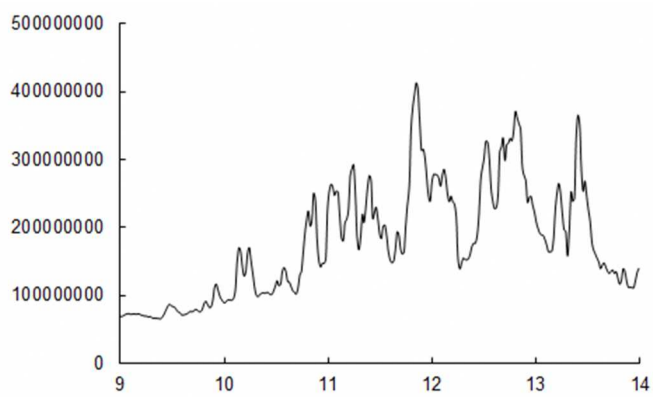


図 6-3 トータルイオンクロマトグラム (牛の肝臓)

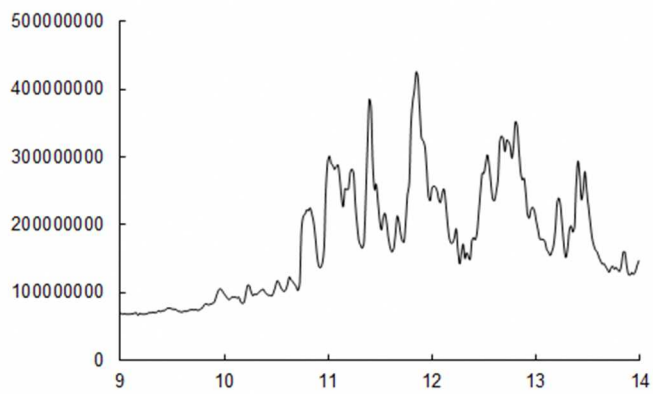


図 6-4 トータルイオンクロマトグラム (牛乳)

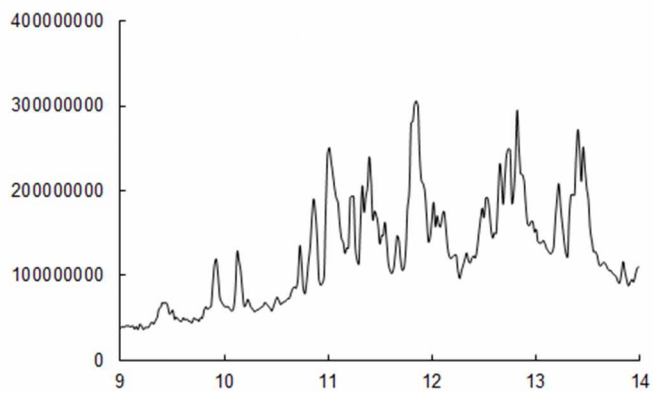


図 6-5 トータルイオンクロマトグラム (鶏の筋肉)

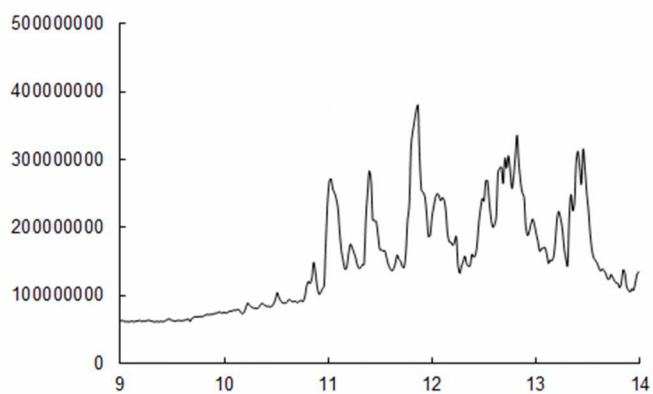


図 6-6 トータルイオンクロマトグラム (鶏の脂肪)

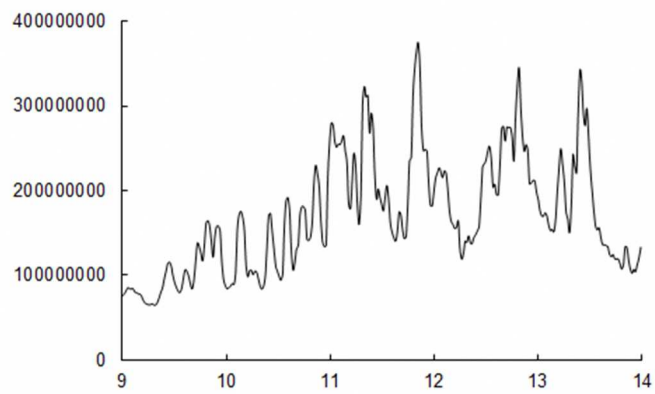


図 6-7 トータルイオンクロマトグラム (鶏の肝臓)

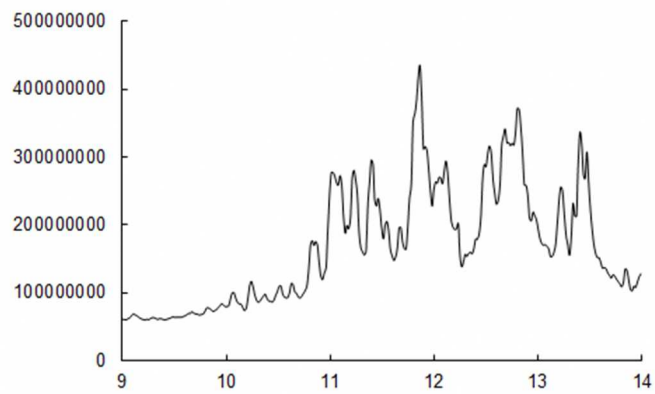


図 6-8 トータルイオンクロマトグラム (鶏卵)