

※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。

平成 23 年度

食品に残留する農薬等の成分である物質
(ノシヘプタイド)の試験法開発事業報告書

ノシヘプタイド試験法の検討結果

[緒言]

1. 目的及び試験法の検討方針

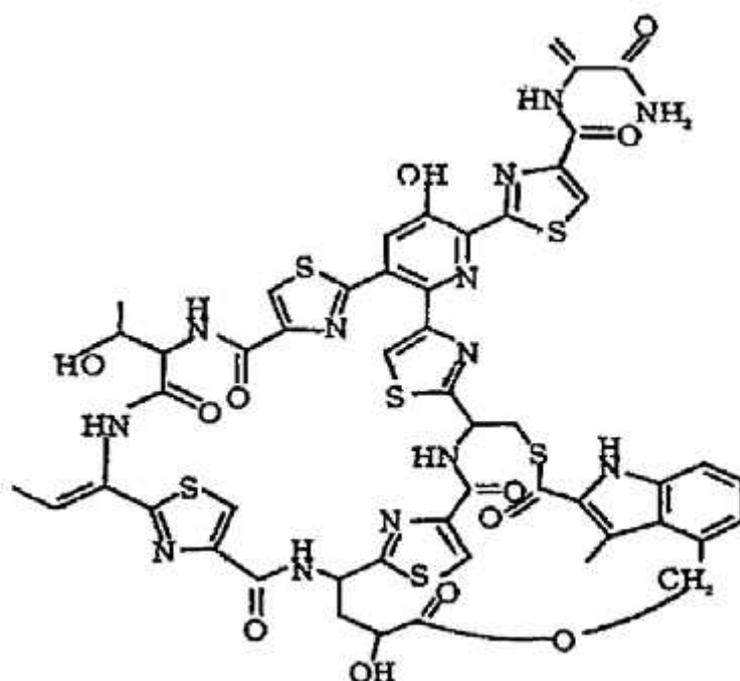
ノシヘプタイドは放線菌*Streptomyces actuosus* が産生する抗生物質で、1961年にフランスのローヌ・プーラン社がアルゼンチンのコリエンテス地方で採取した土壌より単離したものである。「薬事食品衛生審議会 食品衛生分科会報告書」に記載されている規制対象物質及び残留基準値案を踏まえ、試験法の開発を行った。

1) 規制対象物質

ノシヘプタイド

2. 分析対象化合物の構造式、物理化学的性質、基準値等に関する情報

1) 構造式及び物理化学的性質



化学式：C₅₁H₄₃O₁₂N₁₃S₆

分子量：1222.37

化学名：N-[1-(Aminocarbonyl)ethenyl]-2-[14-ethylidene-9,10,11,12,13,14,19,20,21,22,23,24,26,33,35,36-hexadecahydro-3,23-dihydroxy-11-(1-hydroxyethyl)-31-methyl-9,12,19,24,33,43-hexaoxo-30,32-imino-8,5:18,15:40,37-trinitrilo-21,36-([2,4]-endo-thiazolomethanimino)-5H,15H,37H-pyrido[3,2-w][2,11,21,27,31,7,14,17]benzoxatetrathiazacyclohexatriacontin-2-yl]-4-thiazole-carboxamide

融点：310～320℃

溶解性：シクロヘキサンにやや溶けやすく、水にほとんど溶けない

(出典：ノシヘプタイド飼料添加物評価書)

2) 基準値

豚の筋肉、豚の脂肪、鶏の肝臓 0.03 ppm

[実験方法]

1. 試料

1) 購入先

うなぎは愛知県の業者から、しじみは熊本県の業者から、その他の試料については都内のスーパーにて購入した。

2) 試料の採取方法

- ① 豚の筋肉は脂肪層を除き、細切均一化した。
- ② 豚の脂肪は筋肉部を除き、細切均一化した。
- ③ 豚の肝臓は、全体を細切均一化した。
- ④ さけは可食部（皮を含む）を細切均一化した。
- ⑤ うなぎは、活鰻を使用し、頭部を除いた可食部（内臓、骨及び皮を含む）を細切均一化した。
- ⑥ しじみは、貝殻を除き細切均一化した。
- ⑦ 牛乳は全体をよく混合して均一化した。
- ⑧ 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。
- ⑨ はちみつはそば蜜を使用し、加温（40℃以下）してから、よく混合して均一化した。
- ⑩ えびは頭部及び殻を除き、細切均一化した。

2. 試薬・試液

1) 標準品

ノシヘプタイド標準品（力価936 μ g/mg、独立行政法人 農林水産消費安全技術センターより入手）
純度不明のため、93.6%と仮定した。

2) 試薬

アセトン、*n*-ヘキサン、メタノール：残留農薬試験用（関東化学製）

アセトニトリル、メタノール：高速液体クロマトグラフ用（関東化学製）

酢酸（試薬特級）：試薬特級（関東化学製）

ケイソウ土：セライト545（関東化学製）

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム：Bond Elut C18（充てん量1000 mg、バリアン製）

3) 標準溶液、試液の調製方法

① 標準溶液の調製方法

標準原液：ノシヘプタイド標準品（力価936 μ g/mg）10.67 mgを精秤し、1vol%酢酸含有メタノールで溶解して100 mg/L溶液を調製した。

検量線用標準溶液：標準原液を酢酸、水及びメタノール（1：5：95）混液で適宜希釈し、0.0005～0.02 mg/Lの濃度の溶液を調製した。

添加用標準溶液：標準原液を酢酸、水及びメタノール（1：5：95）混液で希釈して0.1及び0.3 mg/L溶液を調製した。

② 試液の調製方法

5 vol%酢酸

酢酸50 mLに水を加えて混合し、1000 mLとした。

酢酸、水及びメタノール（1：50：50）混液

酢酸2 mL、水100 mL及びメタノール100 mLを混合した。

酢酸、水及びメタノール（1：5：95）混液

酢酸2 mL、水10 mL及びメタノール190 mLを混合した。

酢酸、水及びメタノール（1：35：65）混液

酢酸10 mL、水350 mL及びメタノール650 mLを混合した。

アセトニトリル、酢酸及び水の混液（950：1：50）

アセトニトリル950 mL、酢酸1 mL及び水50 mLを混合した。

3. 装置

	型式	会社
LC 装置	LC-20AD	島津製作所
検出器	RF-20Axs	島津製作所

4. 測定条件

1) 定量条件

LC 条件	
カラム	Mightysil RP-18 GP サイズ：内径 4.6 mm、長さ 150 mm、粒子径 5 μm 会社：関東化学株式会社
検出器	蛍光光度型検出器(FL)
移動相流速 (mL/min)	1.0
注入量 (μL)	20
カラム温度 (°C)	40
移動相	酢酸、水及びメタノール（1：35：65）混液
励起波長 (nm)	365
蛍光波長 (nm)	515
保持時間	9.7分

2) 確認条件

LC 条件	
カラム	TSK-gel NH ₂ -100 サイズ：内径 4.6 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm 会社：東ソー株式会社
検出器	蛍光光度型検出器(FL)
移動相流速 (mL/min)	1.0
注入量 (μL)	20
カラム温度 (°C)	40
移動相	アセトニトリル、酢酸及び水の混液（950：1：50）
励起波長 (nm)	365
蛍光波長 (nm)	515
保持時間	9.1分

ノシヘプタイトの励起スペクトル及び蛍光スペクトルを図1に示した。

5. 定量

ノシヘプタイト標準原液を酢酸、水及びメタノール（1：5：95）混液で希釈し、0.0005、0.001、0.003、0.005、0.01及び0.02 mg/Lの濃度の標準溶液を調製した。標準溶液20 µLをHPLC-FLに注入し、得られたピーク面積から検量線を作成した。試験溶液20 µLをHPLC-FLに注入し、得られたピーク面積と作成した検量線からノシヘプタイトの含量を算出した。

1) 検量線の直線性（図2）

4. の測定条件において、濃度0.0005 mg/L（0.01 ng）～0.02 mg/L（0.4 ng）の範囲で良好な直線性を示した。

2) 標準溶液の検出感度（図3）

定量限界相当の検出量：0.02 ng（0.001 mg/L×20 µL）のピークのS/N比は10以上であった。

6. 試験溶液の調製

1) 試験法の分析操作

ノシヘプタイトを試料からアセトンで抽出し、脂肪はヘキサン洗浄で脱脂した。オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムで精製した後、HPLC-FLで定量及び確認した。

① 抽出

a 脂肪以外の場合

試料10.0 gを200 mL遠心管に採り、5 vol%酢酸20 mLを加え、混合した。これにアセトン100 mLを加え、ホモジナイズした後、ケイソウ土を厚さ約1 cmに敷いたろ紙を用いて吸引ろ過し、200 mL容メスフラスコに採取した。ろ紙上の残留物にアセトン50 mLを加えてホモジナイズした後、上記と同様にろ過した。得られたろ液を合わせて、アセトンで正確に200 mLとした。

抽出液10 mLを採り、水50 mL及び酢酸0.5 mLを加えた。

b 脂肪の場合

試料5.00 gを200 mL遠心管に採り、5 vol%酢酸20 mLを加え、混合した。これにアセトン100 mLを加え、ホモジナイズした後、ケイソウ土を厚さ約1 cmに敷いたろ紙を用いて吸引ろ過し、200 mL容メスフラスコに採取した。ろ紙上の残留物にアセトン50 mLを加えてホモジナイズした後、上記と同様にろ過した。得られたろ液を合わせて、アセトンで正確に200 mLとした。

抽出液20 mLを100 mL分液漏斗に採り、水50 mL、酢酸0.5 mL及び*n*-ヘキサン20 mLを加え、5分間振とうした後、水層を分取した。

② 精製

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム（1000 mg）にメタノール及び5 vol%酢酸各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、さらに酢酸、水及びメタノール（1：50：50）混液10 mLを注入し、流出液は捨てた。次いで酢酸、水及びメタノール（1：5：95）混液5 mLを注入し、溶出液を10 mL試験管に採り、酢酸、水及びメタノール（1：5：95）混液で正確に5 mLとし、試験溶液とした。

[分析法フローチャート]

秤 取

- | 脂肪以外：試料10.0 gに5 vol%酢酸20 mLを加え、混合する
- ↓ 脂肪：試料5.00 gに5 vol%酢酸20 mLを加え、混合する

アセトン抽出

- | アセトン100 mLを加え、ホモジナイズ
- | 吸引ろ過
- | ろ紙上の残留物にアセトン50 mLを加え、ホモジナイズ
- | 吸引ろ過
- | ろ液を合わせて、アセトンを加えて、正確に200 mLとする
- | 脂肪以外：抽出液10 mL分取、水50 mL及び酢酸0.5 mLを加える
- ↓ 脂肪：抽出液20 mL分取、水50 mL及び酢酸0.5 mLを加える

n-ヘキサン洗浄（脂肪のみ実施）

- | *n*-ヘキサン20 mLを加え、5分間振とう
- ↓ 水層分取

オクタデシル化シリカゲルミニカラム

- | メタノール及び5%酢酸各5 mL予備洗浄
- | 全量負荷
- | 酢酸、水及びメタノール（1：50：50）混液10 mLで洗浄
- | 酢酸、水及びメタノール（1：5：95）混液5 mLで溶出
- ↓ 酢酸、水及びメタノール（1：5：95）混液で正確に5 mLとし、試験溶液とする

HPLC-FL定量

20 μL注入

2) 定量限界

0.01 mg/kg [(5 mL/0.5 g^{*1}) × (0.02 ng/20 μL)]

^{*1} 10.0 g × 10 mL/200 mL（脂肪以外の場合）

5.00 g × 20 mL/200 mL（脂肪の場合）

7. マトリックス添加標準溶液の調製

1) 定量限界相当濃度（定量限界の推定用）

ノシヘプタイドはガラスへの吸着の可能性が示唆され、乾固後の再溶解での損失が懸念されたため、豚の筋肉、豚の脂肪及び鶏の肝臓はブランク試験溶液950 μLに0.02 mg/Lの標準溶液から50 μL分取し混合したものをマトリックス添加標準溶液とした。

2) 添加回収試験における回収率 100%相当濃度（試料マトリックスの測定への影響用）

ノシヘプタイドは不安定であり濃縮操作が出来ないため、豚の筋肉、豚の脂肪及び鶏の肝臓はブランク試験溶液950 μLに0.06 mg/Lの標準溶液から50 μL分取し混合したものを、さけ、うなぎ、しじみ、牛乳、鶏卵、はちみつ及びえびはブランク試験溶液950 μLに0.02 mg/Lの標準溶液から50 μL分取し混合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) 分析カラムの検討

市販されているMightysil RP-18GP（内径4.6 mm、長さ150 mm、粒子径5 μm）のODSカラムについて移動相の組成を検討した。ギ酸、リン酸及び酢酸とアセトニトリル及びメタノールの数種の組み合わせを検討した結果、本試験ではピーク形状及び夾雑物との分離が一番良好であった酢酸、水及びメタノール（1：35：65）混液を用いることとした。

2) MS条件の検討

LC-MS及びLC-MS/MSでの確認が可能かどうか検討した。標準溶液を用いて、LC-MS（ESI）、LC-MS（APCI）及びLC-MS/MSでの感度を確認したところ、ノシヘプタイドはフローインジェクションの段階でプリカーサーイオンの確認ができず、MSでの測定は困難であると考えられた。

3) 確認カラムの検討

LC-MS及びLC-MS/MSでの確認を検討したが、いずれも感度が悪くHPLC-FLの感度レベルでの測定が困難であったためHPLC-FLでの確認カラムについて検討した。カラムにアミノプロピルシリル化シリカゲルTSK-gel NH₂-100（内径4.6 mm、長さ150 mm、粒子径3 μm）を、移動相にアセトニトリル、酢酸及び水の混液（950：1：50）を用いたところ、うなぎについては試料由来の妨害ピークが認められたが、うなぎ以外ではピーク形状及び夾雑物との分離、ともに良好なクロマトグラムが得られた。さらにSche rzo SS-C18（内径4.6 mm、長さ150 mm、粒子径3 μm）、Inertsil Amide（内径4.6 mm、長さ150 mm、粒子径3 μm）でも検討を行ったが、いずれも良好なピーク形状を得ることが出来なかったため、確認条件にはTSK-gel NH₂-100を用いることとした。

2. 試験溶液調製法の検討

1) 抽出溶媒について

抽出溶媒にはアセトンを用いた。ノシヘプタイド0.1 mg/Lを1 mL分取し窒素で乾固した後、各種溶媒10 mLで溶解（30秒間超音波処理）し回収率を確認した。結果をTable1に示した。アセトン及び5 vol%酢酸（5：1）混液で十分に溶解することが確認できた。アセトンで溶解後、酢酸を加えて再溶解した回収率は9割程度であったため、ガラスへの吸着の可能性が示唆された。また標準溶液の安定性確認において、酸性条件下でないと不安定であることが確認されたため、本試験法では酢酸酸性下で操作を行うこととした。

鶏の肝臓を用い、酢酸以外に塩酸についても検討を行った。回収率に大きな違いは認められなかったが目視で抽出液を比較すると、塩酸は酢酸を用いたときよりも抽出液の色が濃く、きょう雑成分も多く抽出しているようだったため、酢酸を用いることとした。

Table1 再溶解試験（%）

	アセトン	アセトン及び水（5：1） 混液	アセトン及び5 vol%酢 酸（5：1）混液
ノシヘプタイド	55	64	97

供試量：ノシヘプタイド0.1 μg

標準原液から各溶媒で用時調製したものを100%とした。

抽出に用いる酢酸20 mLの濃度の検討を鶏の肝臓共存下で行い、回収率をTable2に示した。いずれの濃度でも回収率に影響はなかった。本試験法では5 vol%20 mLを加え混合した後、アセトンで抽出する方法を採用した。

Table2 鶏の肝臓における酢酸の各濃度での回収率（%）

	0 vol%	2 vol%	4 vol%	5 vol%	10 vol%
ノシヘプタイド	101	90	96	101	101

供試量：ノシヘプタイド0.3 μg

鶏の肝臓10 g共存下

2) 安定性の確認

ノシヘプタイド標準溶液の安定性を確認した。ノシヘプタイド0.01 mg/Lをメタノールで調製し、室温で保管すると翌日には2割程度の減衰が見られた。オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムの溶出溶媒である酢酸、水及びメタノール（1：5：95）混液で調製したところ、メタノールで調製したものよりも安定であった。しかし、冷蔵保存で徐々に減衰することが確認されたため、測定用標準溶液は用時調製することとし、抽出から測定まで即日で行うこととした。なお、標準原液は検討期間の約6ヶ月間は冷蔵保存で安定であることを確認した。

Table3 標準溶液の安定性 (%)

	メタノール	酢酸、水及びメタノール（1：5：95）混液	酢酸、水及びメタノール（1：5：95）混液
	保存日数（温度帯）		
	1日（室温）	1日（室温）	14日（冷蔵）
ノシヘプタイド	78	94	79

ノシヘプタイド0.01 mg/Lを調製し比較。
透明容器を使用。
標準原液から各定容溶媒で用時調製したものを100%とした。

3) 濃縮操作について

ノシヘプタイド0.1 mg/Lを1 mL分取し窒素で乾固した後、各種溶媒10 mLで溶解（30秒間超音波処理）し回収率を確認した。結果をTable4に示した。いずれの溶媒でも十分に再溶解ができなかった。また、2) 安定性の確認よりノシヘプタイドは不安定であることが確認されているため、本試験法では濃縮操作を行わない方法を検討した。

Table4 再溶解試験 (%)

	アセトニトリル	メタノール	アセトン	酢酸、水及びメタノール（1：5：95）混液
ノシヘプタイド	42	81	51	85

供試量：ノシヘプタイド0.1 µg
標準原液から酢酸、水及びメタノール（1：5：95）混液で用時調製したものを100%とした。

4) オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム精製について

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムをメタノール及び水各5 mLで予備洗浄した後、ノシヘプタイド0.1 µgを水及びメタノール（1：1）混液で負荷したときの溶出状況をTable5に示した。

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムをメタノール及び5 vol%酢酸各5 mLで予備洗浄した後、ノシヘプタイド1 µgにアセトンを加えて正確に200 mLとし、20 mL分取し、水50 mL及び酢酸0.5 mLを加えたものを全量負荷した。酢酸、水及びメタノール（1：50：50）混液及び酢酸、水及びメタノール（1：5：95）混液で溶出したときの溶出状況をTable6に示した。ノシヘプタイドは酢酸、水及びメタノール（1：50：50）混液10 mLでは溶出せず、酢酸、水及びメタノール（1：5：95）混液5 mLで良好な回収率が得られた。

Table5 オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムからの溶出状況 (%)

	水及びメタノール				合計
	(1 : 1)	(2 : 3)	(3 : 7)	(1 : 4)	
	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL	
ノシヘプタイド	0	0	49	37	86

Bond Elut C18、(充てん量1000 mg、バリアン製)

供試量：ノシヘプタイド0.1 µg

Table6 オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムからの溶出状況 (%)

	酢酸、水及びメタ	酢酸、水及びメタ	酢酸、水及びメタ	合計
	ノール (1 : 50 : 50)	ノール (1 : 5 : 95)	ノール (1 : 5 : 95)	
	10 mL	0-5 mL	5-10 mL	
ノシヘプタイド	0	97	0	97

Bond Elut C18、(充てん量1000 mg、バリアン製)

供試量：ノシヘプタイド0.1 µg

5) ヘキサン洗浄について

豚の筋肉、豚の脂肪、鶏の肝臓、さけ、うなぎ、しじみ、牛乳、鶏卵及びはちみつの9品目にえびを加えた10品目を試料とし、6. 試験溶液の調製に従って添加回収試験を行ったところ、次項のオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム精製において、豚の脂肪のみ溶出ずれが確認されたため、ヘキサン洗浄の検討を行った。豚脂肪のアセトン抽出液20 mL (0.5 g相当) 分取し、水50 mL及び酢酸0.5 mLを加え、*n*-ヘキサン20 mLで洗浄を行った。同様に豚の脂肪のアセトン抽出液20 mL (0.5 g相当) 分取し、水100 mL及び酢酸1 mLを加え、*n*-ヘキサン50 mLで洗浄を行い、洗浄後のそれぞれの水層を4) オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム精製で溶出した。その結果、溶媒量の差による洗浄効果の違いは見られなかったため、豚の脂肪のアセトン抽出液20 mL (0.5 g相当) 分取し、水50 mL及び酢酸0.5 mLを加え、*n*-ヘキサン20 mLで洗浄を行うこととした。溶出状況をTable7及びTable8に示した。ヘキサン洗浄後の豚の脂肪共存下では酢酸、水及びメタノール (1 : 5 : 95) 混液5 mLで良好な回収率が得られた。

Table7 豚の脂肪共存下でのオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムからの溶出状況 (%)

	酢酸、水及びメタ	酢酸、水及びメタ	酢酸、水及びメタ	合計
	ノール (1 : 50 : 50)	ノール (1 : 5 : 95)	ノール (1 : 5 : 95)	
	10 mL	0-5 mL	5-10 mL	
ノシヘプタイド	0	44	19	63

Bond Elut C18、(充てん量1000 mg、バリアン製)

供試量：ノシヘプタイド0.015 µg

豚の脂肪0.5g共存下 (ヘキサン洗浄なし)

Table8 ヘキサン洗浄後の豚の脂肪共存下での
オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムからの溶出状況 (%)

	酢酸、水及びメタ	酢酸、水及びメタ	酢酸、水及びメタ	合計
	ノール (1 : 50 : 50)	ノール (1 : 5 : 95)	ノール (1 : 5 : 95)	
	10 mL	0-5 mL	5-10 mL	
ノシヘプタイド	0	91	0	91

Bond Elut C18、(充てん量1000 mg、バリアン製)

供試量：ノシヘプタイド0.015 µg

豚の脂肪0.5g共存下 (ヘキサン洗浄実施)

3. 添加回収試験

豚の筋肉、豚の脂肪、鶏の肝臓、さけ、うなぎ、しじみ、牛乳、鶏卵及びはちみつの9品目にえびを加えた10品目を試料とし、[実験方法]の6. 試験溶液の調製に従って添加回収試験を行った。なお、添加試料の調製方法は以下の通り調製した。

豚の筋肉、豚の脂肪及び鶏の肝臓 (添加濃度：0.03 ppm)：試料10.0 gに0.3 mg/L添加用混合標準溶液を1 mL添加しよく混合した後、30分間放置した。

さけ、うなぎ、しじみ、牛乳、鶏卵、はちみつ及びえび (添加濃度：0.01 ppm)：試料10.0 gに0.1 mg/L添加用混合標準溶液を1 mL添加しよく混合した後、30分間放置した。

1) 選択性の評価

表1 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 ^{*1} (ppm)	添加濃度 ^{*2} (ppm)	妨害ピークの許容範囲		ピーク面積(高さ) ^{*3}				選択性の評価 ^{*5}	備考	
						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 ^{*4} (b)	面積(高さ)比 (a)/(b)			
ノシヘプタイド	豚の筋肉	豚の脂肪	0.01	0.03	0.03	基準値	0.03	< 0.100	面積	0		#DIV/0!	○	
						基準値	0.03	< 0.100	面積	0		#DIV/0!	○	
	鶏の肝臓	さけ	0.01	0.03	0.03	基準値	0.03	< 0.100	面積	0		#DIV/0!	○	
						定量限界	0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
	うなぎ	しじみ	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
						定量限界	0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
	牛乳	鶏卵	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
						定量限界	0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
	はちみつ	えび	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
						定量限界	0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	

*1 基準値は、基準値未設定の場合には一律基準(0.01 ppm)を用いる。

2 添加濃度と評価対象濃度が異なる場合(定量限界と基準値との関係が、『定量限界<基準値<定量限界×3』となる場合)には、『』が表示される。『*』が表示された分析対

*3 ブランク試料及び標準溶液の順に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。)

*4 試料中の濃度が「評価対象濃度(基準値濃度又は定量限界濃度)」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)は求めなくても良い。

*5 面積(高さ)比が、妨害ピークの許容範囲の判定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。

10品目何れの試料においても妨害ピークは認められず、選択性は良好であった。

2) 真度、精度及び定量限界の評価

表2 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 (ppm)	基準値 ^{*1} (ppm)	添加濃度 (ppm)	定量限界の評価 ^{*2}	検量線			回収率(%)					真度 (%)	併行精度 (RSD%)	S/N比 ^{*3}			備考
							傾き	切片	r ² 値	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5			Max.	Min.	平均値	
	ソシヘブタイド	豚の筋肉	0.01	0.03	0.03	*	191765	-319	0.998	82	89	93	91	93	90	5	/	/	#DIV/0!	
		豚の脂肪	0.01	0.03	0.03	*	186293	-464	0.999	96	82	90	87	83	88	6	/	/	#DIV/0!	
		鶏の肝臓	0.01	0.03	0.03	*	191765	-319	0.998	94	95	98	98	94	94	6	/	/	#DIV/0!	
		さけ	0.01	0.01	0.01		200279	-161	0.999	86	95	101	108	96	97	8	63	59	61	
		うなぎ	0.01	0.01	0.01		200279	-161	0.999	99	100	80	105	102	97	10	54	42	48	
		しじみ	0.01	0.01	0.01		168316	-337	0.998	106	120	104	101	102	107	7	52	36	44	
		牛乳	0.01	0.01	0.01		175602	13	0.999	95	99	113	99	98	101	7	67	64	66	
		鶏卵	0.01	0.01	0.01		186293	-464	0.999	87	97	96	70	97	89	13	57	38	49	
		はちみつ	0.01	0.01	0.01		175602	13	0.999	116	108	104	101	109	108	5	43	39	41	
		えび	0.01	0.01	0.01		168316	-337	0.998	113	104	105	116	115	111	5	83	68	76	

*1 基準値は、基準値未設定の場合には一律基準(0.01 ppm)を用いる。

2 添加濃度が定量限界濃度と異なる場合には、『』が表示される。その場合には、S/N比の算出は不要であるが、別途、定量限界の推定を行う。

*3 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比を求める。

真度は88~111%、併行精度は5~13%であり、目標値を十分に満たした。また定量限界濃度の添加回収試験を行った、さけ、うなぎ、しじみ、牛乳、鶏卵、はちみつ及びえびの添加回収試験におけるS/N比の平均値は41~76でありS/N≥10を十分に満たした。

3) 定量限界の推定

表3 定量限界の推定

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	基準値 ^{*1} (ppm)	添加濃度 (ppm)	定量限界の評価 ^{*2}	標準溶液濃度 ^{*3} (mg/L)	ピーク面積(高さ) ^{*4}						S/N比		平均値		備考	
								面積又は高さの別	ブランク ^{*5}	マトリックス添加標準溶液			溶媒標準溶液			n=1	n=2		面積(高さ)比(%) ^{*6}
	ソシヘブタイド	豚の筋肉	0.01	0.03	0.03	*	0.001	面積	0	3231	3306	3269	3657	3729	3693	51	50	89	51
		豚の脂肪	0.01	0.03	0.03	*	0.001	面積	0	3596	3638	3617	3382	3178	3280	85	114	110	100
		鶏の肝臓	0.01	0.03	0.03	*	0.001	面積	0	3648	3778	3713	3642	3567	3605	95	73	103	84
		さけ	0.01	0.01	0.01			面積	/	/	/	0	/	0	/	/	#DIV/0!	#DIV/0!	
		うなぎ	0.01	0.01	0.01			面積	/	/	/	0	/	0	/	/	#DIV/0!	#DIV/0!	
		しじみ	0.01	0.01	0.01			面積	/	/	/	0	/	0	/	/	#DIV/0!	#DIV/0!	
		牛乳	0.01	0.01	0.01			面積	/	/	/	0	/	0	/	/	#DIV/0!	#DIV/0!	
		鶏卵	0.01	0.01	0.01			面積	/	/	/	0	/	0	/	/	#DIV/0!	#DIV/0!	
		はちみつ	0.01	0.01	0.01			面積	/	/	/	0	/	0	/	/	#DIV/0!	#DIV/0!	
		えび	0.01	0.01	0.01			面積	/	/	/	0	/	0	/	/	#DIV/0!	#DIV/0!	

*1 基準値は、基準値未設定の場合には一律基準(0.01 ppm)を用いる。

2 定量限界の推定を行う対象(添加濃度と定量限界濃度と異なる場合)には、『』が表示される。

*3 試料中の濃度が定量限界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。

*4 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回以上測定する。(必要に応じて起爆注入を行う。)

*5 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。

*6 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。

基準値濃度の添加回収試験を行った、豚の筋肉、豚の脂肪及び鶏の肝臓のブランク試料の試験溶液で調製した定量限界相当濃度のマトリックス添加標準溶液と溶媒で調製した標準溶液の面積比の平均値は89~110%であった。また、マトリックス添加標準溶液のS/N比の平均値は51~100であった。

4) 試料マトリックスの影響

表4 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 (ppm)	基準値 ^{*1} (ppm)	添加濃度 (ppm)	標準溶液濃度 ^{*2} (mg/L)	ピーク面積(高さ) ^{*3}									備考
							面積又は高さの別	ブランク ^{*4}	マトリックス添加標準溶液 ^{*5}			溶媒標準溶液			ピーク面積(高さ)比 ^{*6}	
	ソシヘブタイド	豚の筋肉	0.01	0.03	0.03	0.003	面積	0	11242	10946	11094	11278	11342	11310	0.98	
		豚の脂肪	0.01	0.03	0.03	0.003	面積	0	10862	11266	11064	10580	10600	10580	1.05	
		鶏の肝臓	0.01	0.03	0.03	0.003	面積	0	10961	10933	10947	11403	11317	11360	0.96	
		さけ	0.01	0.01	0.01	0.001	面積	0	3991	3838	3815	3909	3789	3849	1.02	
		うなぎ	0.01	0.01	0.01	0.001	面積	0	4129	4135	4132	3912	3629	3771	1.10	
		しじみ	0.01	0.01	0.01	0.001	面積	0	3042	3078	3060	3251	3155	3203	0.96	
		牛乳	0.01	0.01	0.01	0.001	面積	0	3441	3191	3316	3487	3496	3492	0.95	
		鶏卵	0.01	0.01	0.01	0.001	面積	0	3467	3259	3363	3581	3410	3496	0.96	
		はちみつ	0.01	0.01	0.01	0.001	面積	0	3084	3186	3135	3250	3602	3426	0.92	
		えび	0.01	0.01	0.01	0.001	面積	0	3667	3091	3378	3315	3130	3223	1.05	

*1 基準値は、基準値未設定の場合には一律基準(0.01 ppm)を用いる。

*2 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。

*3 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。)

*4 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。

*5 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。

*6 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。

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マトリックス添加標準溶液と溶媒で調製した標準溶液の面積比の平均値は0.92~1.10であった。

[結論]

ノシヘプタイドを試料から酢酸酸性下でアセトン抽出し、豚の脂肪はヘキサンで洗浄する。オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムで精製した後、HPLC-FLで定量及び確認する方法を提案する。

この試験法を豚の筋肉、豚の脂肪、鶏の肝臓、さけ、うなぎ、しじみ、牛乳、鶏卵、はちみつ及びえびに適用した場合、選択性は良好で何れの試料においても妨害ピークは認められず、真度は88～111%、定量限界は0.01 mg/kgが可能であることが確認できた。

[参考文献]

なし

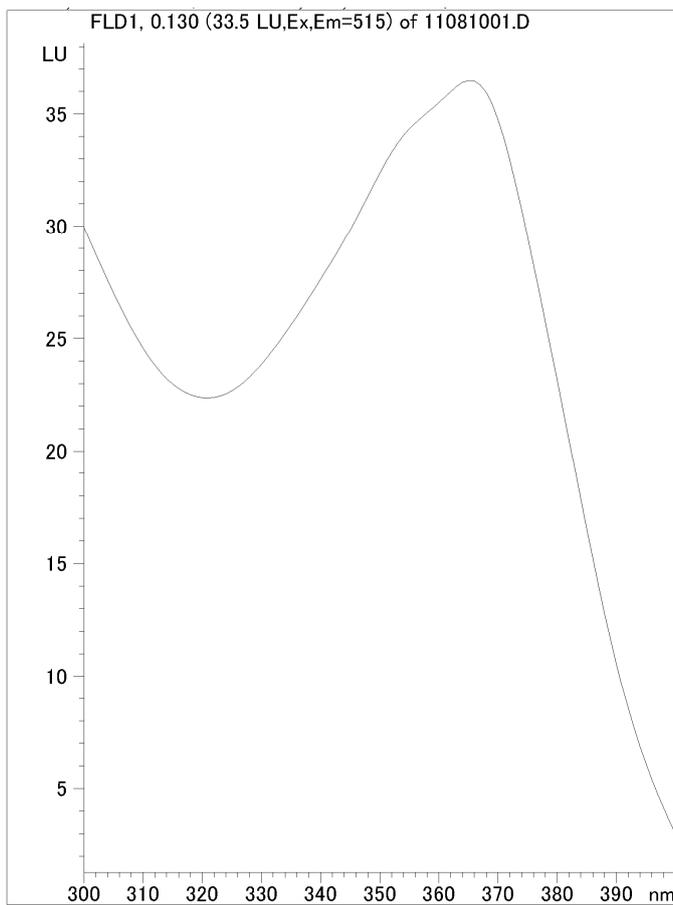


図1-1 ノシヘプタイド励起スペクトル (励起波長365 nm)

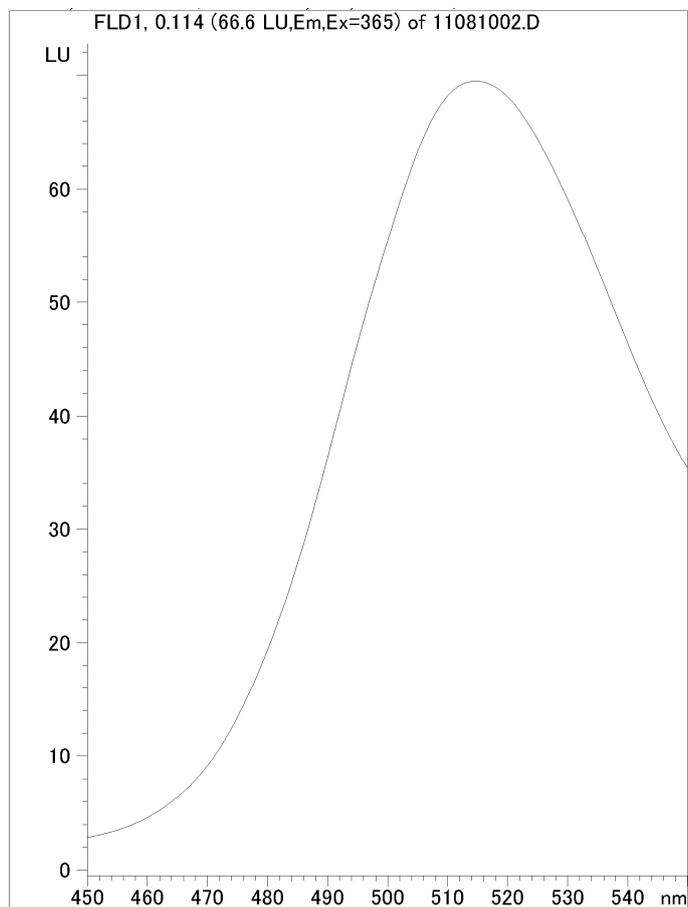
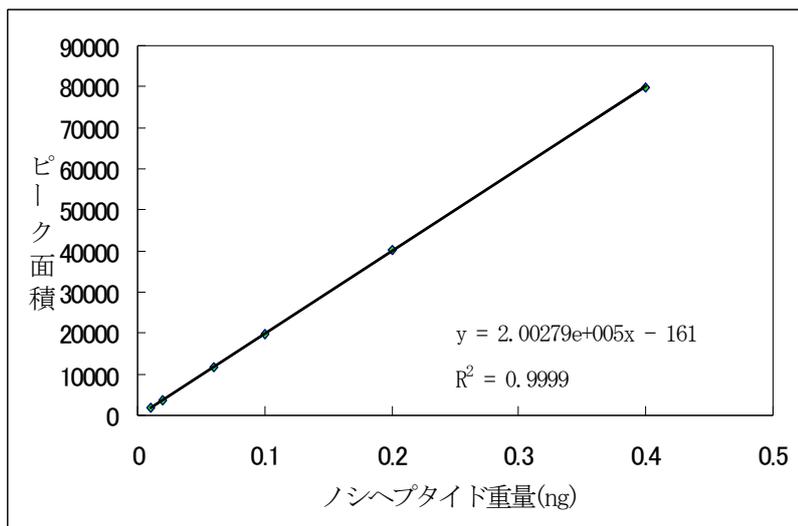
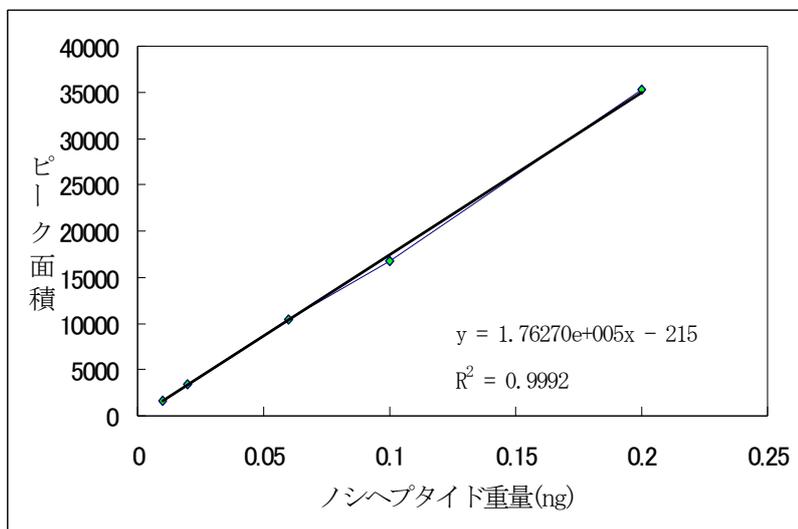


図1-2 ノシヘプタイド蛍光スペクトル (蛍光波長515 nm)



データ処理装置設定条件の一例
 機種（メーカー）：LCsolution
 （島津製作所製）
 ピークの定量方法：ピーク面積法
 検量線の種類：最小二乗法
 検量線基準ピークの重量：0.01 ng～0.4 ng
 検量線傾き (a) : a=200279.1067
 検量線切片 (b) : b=-161.249

図2-1 ノシヘプタイト検量線（一例）（測定分析カラムMigthysil RP-18GP）



データ処理装置設定条件の一例
 機種（メーカー）：LCsolution
 （島津製作所製）
 ピークの定量方法：ピーク面積法
 検量線の種類：最小二乗法
 検量線基準ピークの重量：0.01 ng～0.2 ng
 検量線傾き (a) : a=176270.4392
 検量線切片 (b) : b=-215.694

図2-2 ノシヘプタイト検量線（一例）（測定分析カラムTSK-gel NH₂-100）

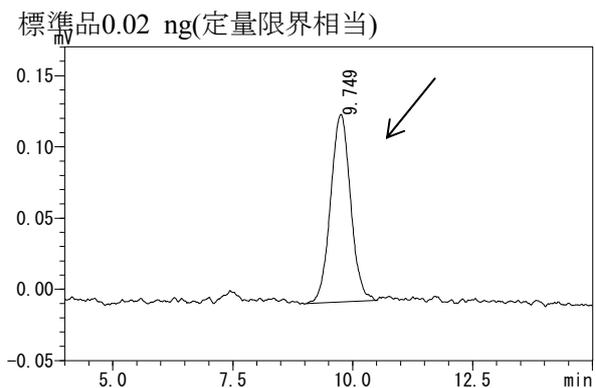
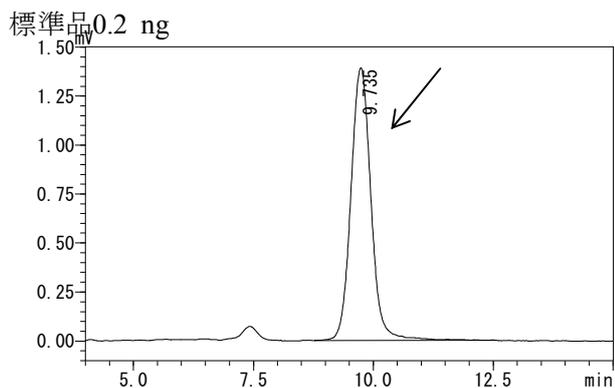


図 3-1 標準溶液のクロマトグラム（一例）（測定分析カラム Migthysil RP-18GP）

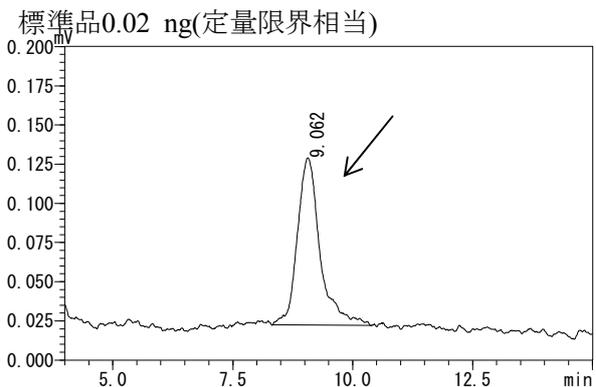
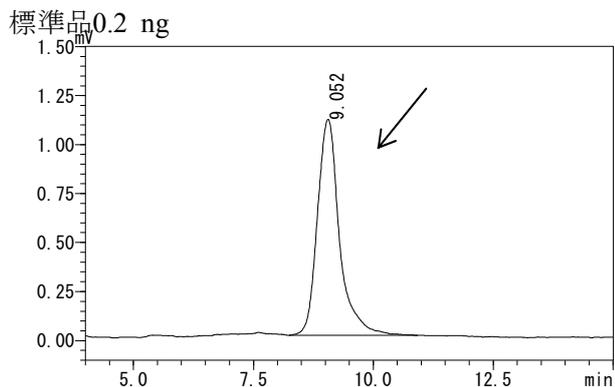
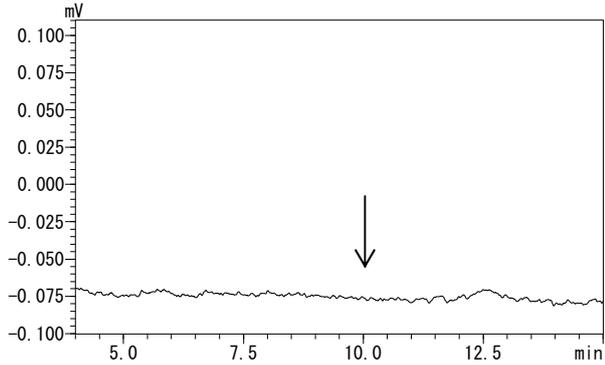
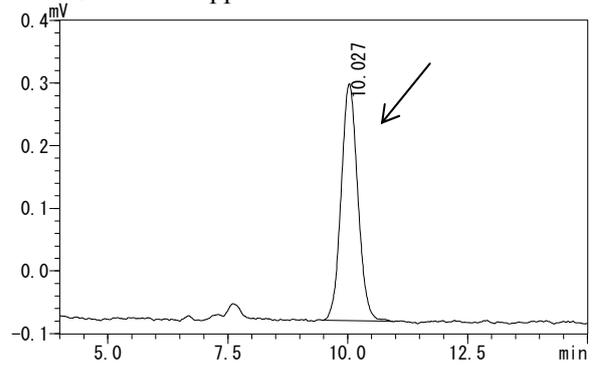


図 3-2 標準溶液のクロマトグラム（一例）（測定分析カラム TSK-gel NH₂-100）

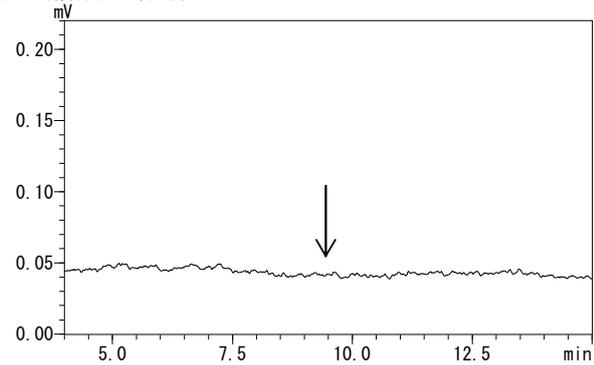
豚の筋肉 無添加



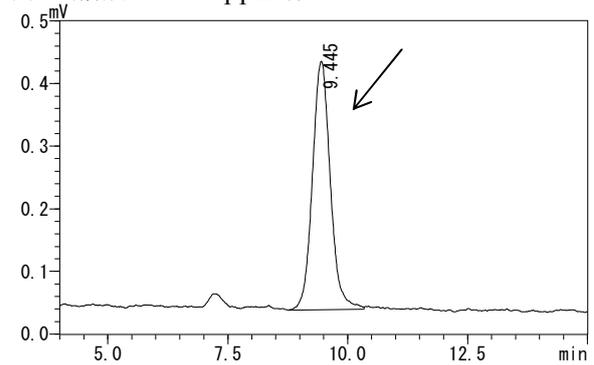
豚の筋肉 0.03 ppm 添加



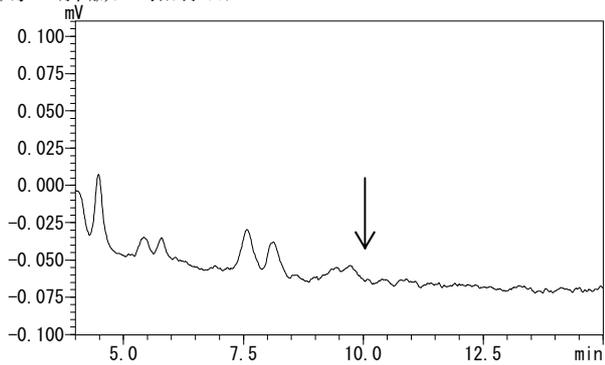
豚の脂肪 無添加



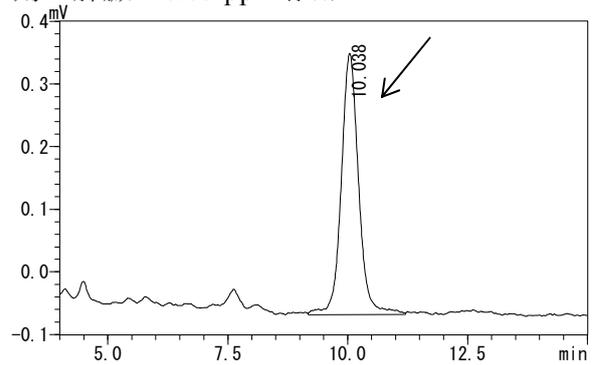
豚の脂肪 0.03 ppm 添加



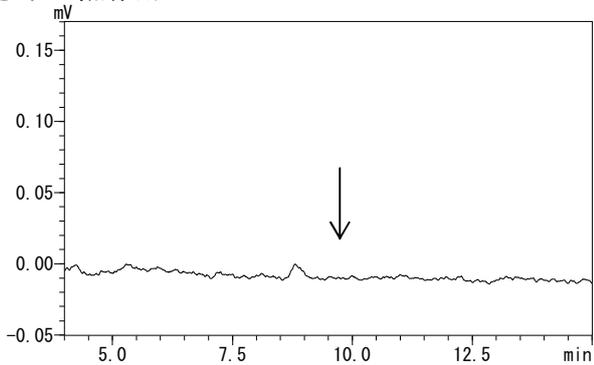
鶏の肝臓 無添加



鶏の肝臓 0.03 ppm 添加



さけ 無添加



さけ 0.01 ppm 添加

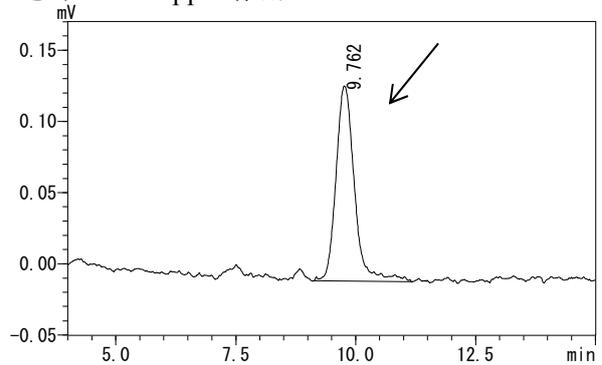
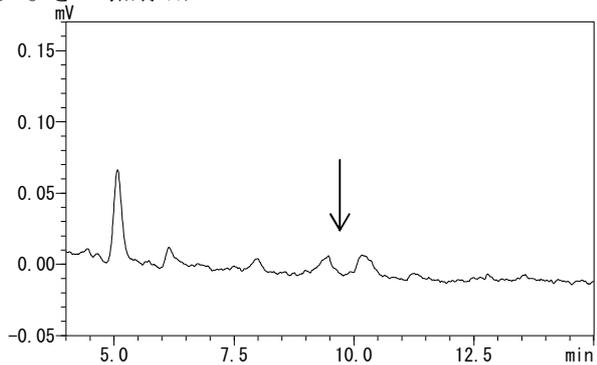
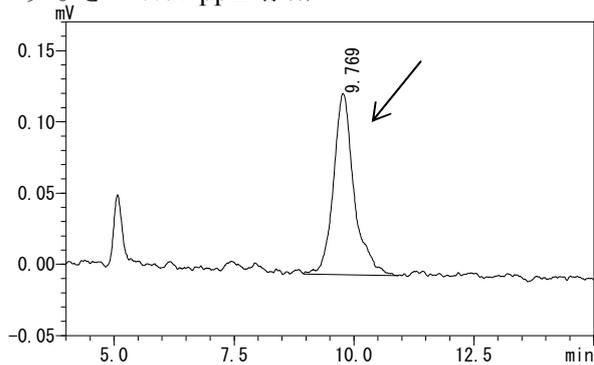


図 4-1 試料のクロマトグラム (測定分析カラム Migthysil RP-18GP)

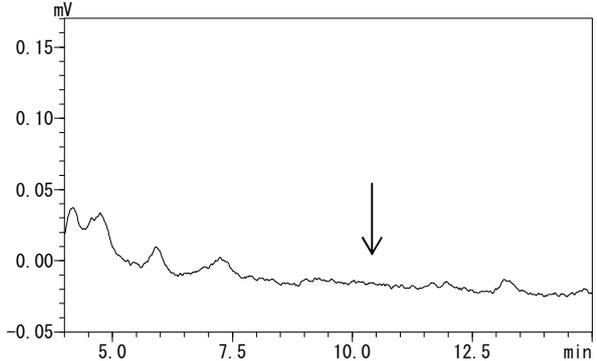
うなぎ 無添加



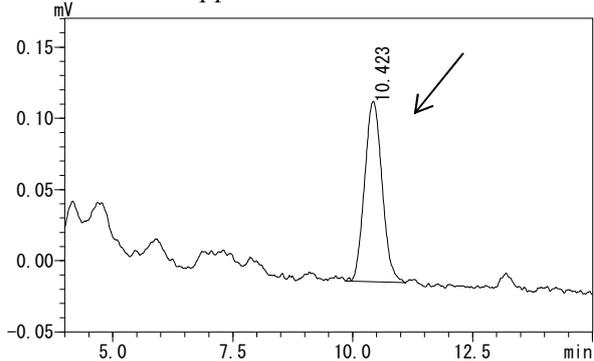
うなぎ 0.01 ppm 添加



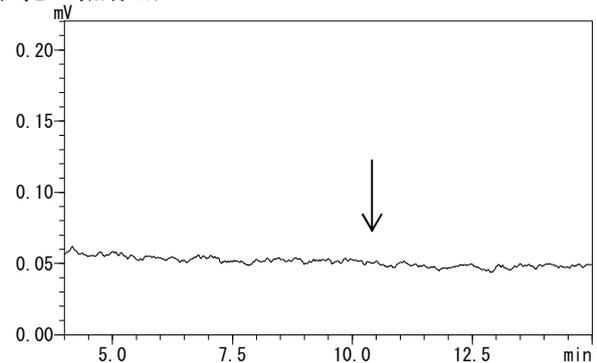
しじみ 無添加



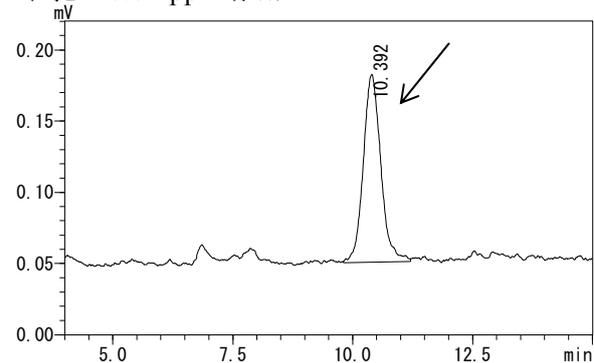
しじみ 0.01 ppm 添加



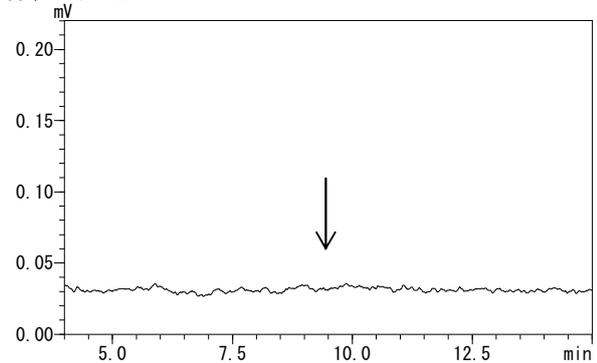
牛乳 無添加



牛乳 0.01 ppm 添加



鶏卵 無添加



鶏卵 0.01 ppm 添加

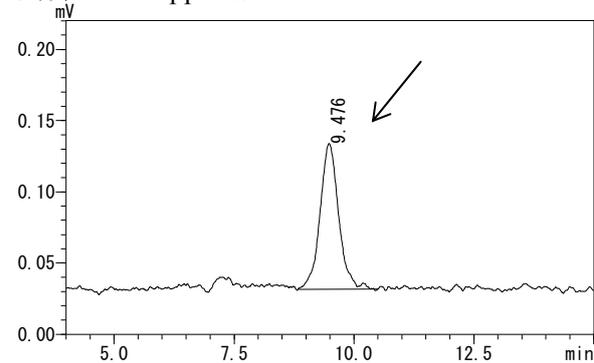
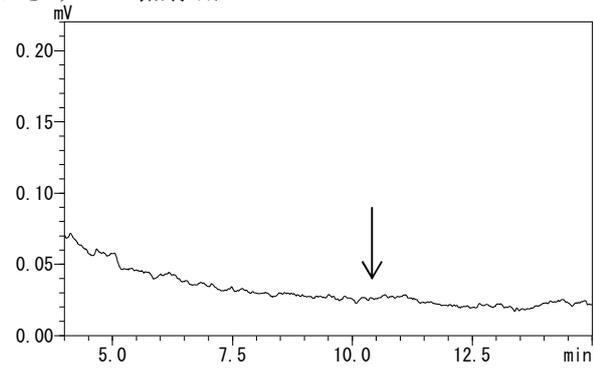
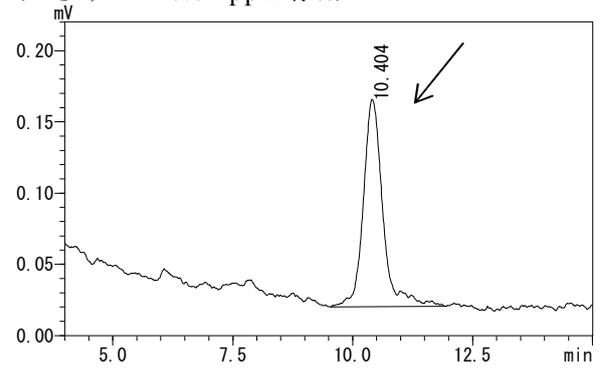


図 4-2 試料のクロマトグラム (測定分析カラム Migthysil RP-18GP)

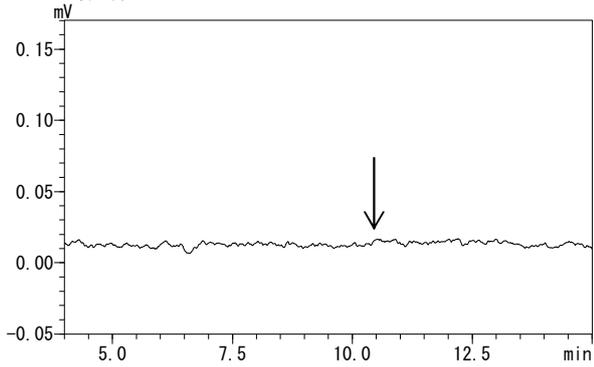
はちみつ 無添加



はちみつ 0.01 ppm 添加



えび 無添加



えび 0.01 ppm 添加

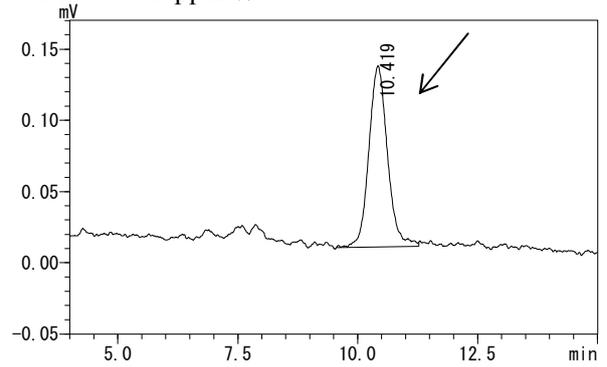
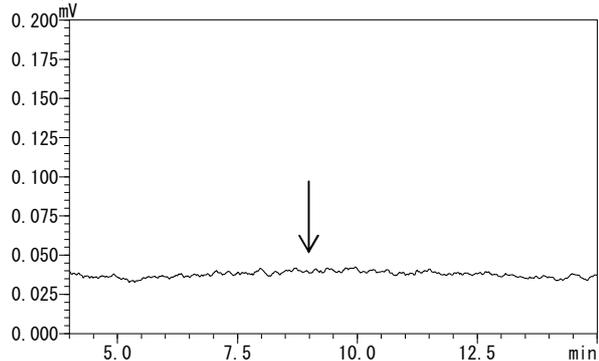
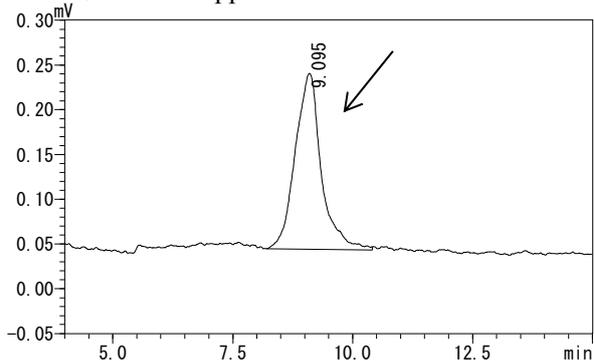


図 4-3 試料のクロマトグラム (測定分析カラムMighthsil RP-18GP)

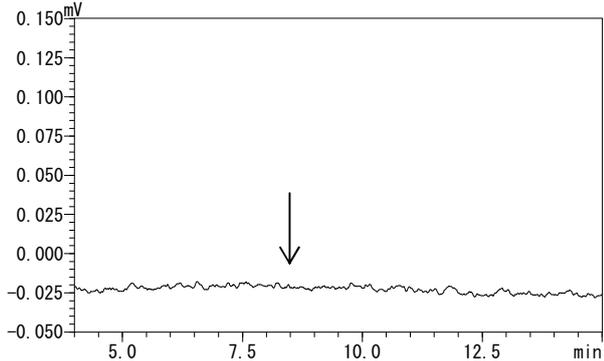
豚の筋肉 無添加



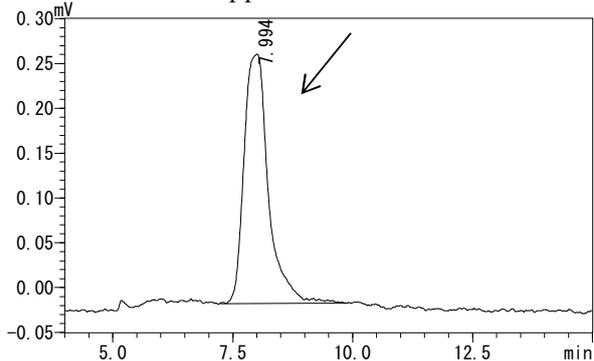
豚の筋肉 0.03 ppm 添加



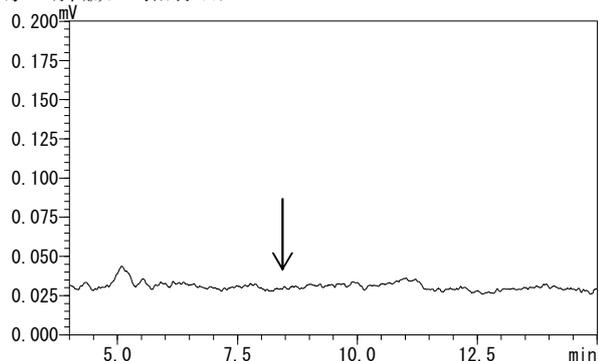
豚の脂肪 無添加



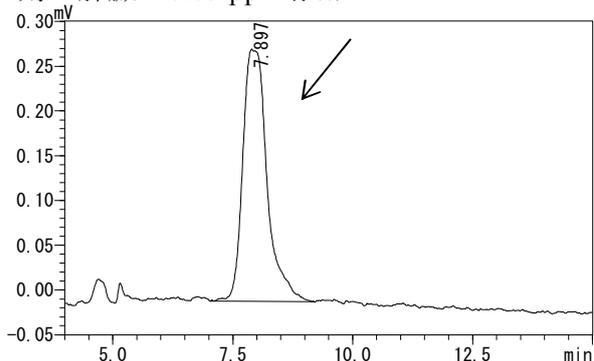
豚の脂肪 0.03 ppm 添加



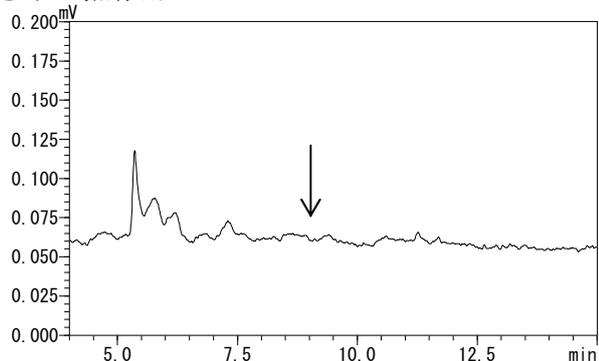
鶏の肝臓 無添加



鶏の肝臓 0.03 ppm 添加



さけ 無添加



さけ 0.01 ppm 添加

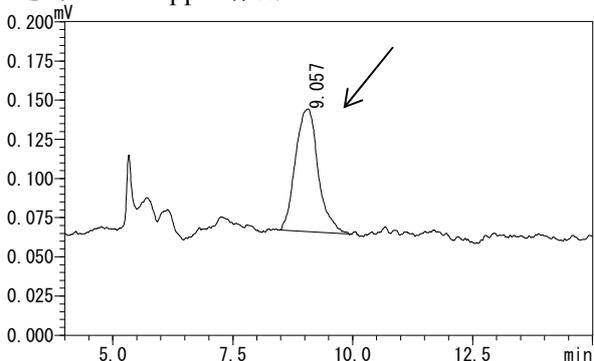


図 5-1 試料のクロマトグラム (測定分析カラム TSK-gel NH₂-100)

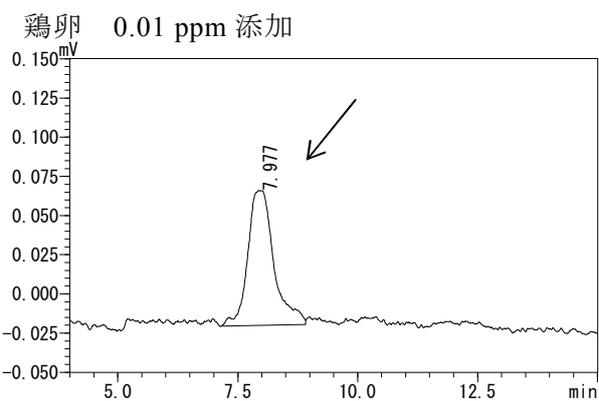
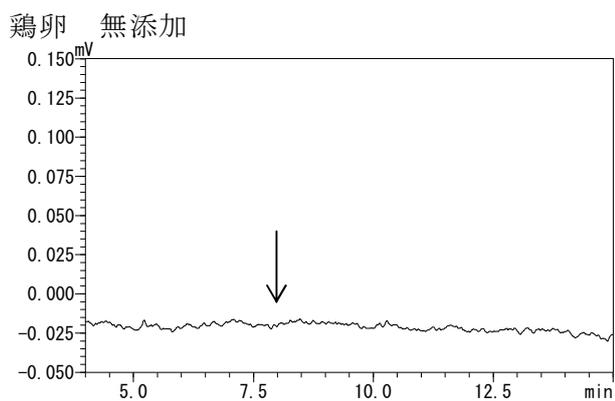
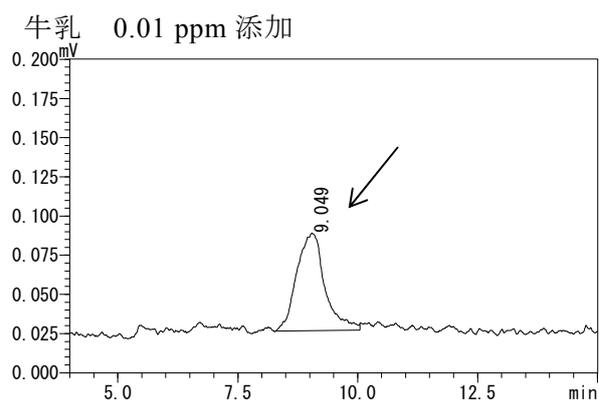
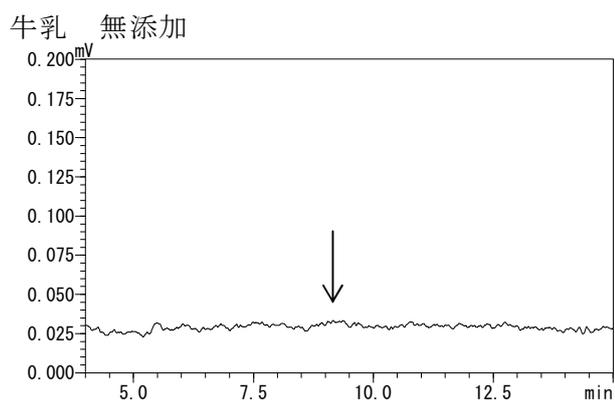
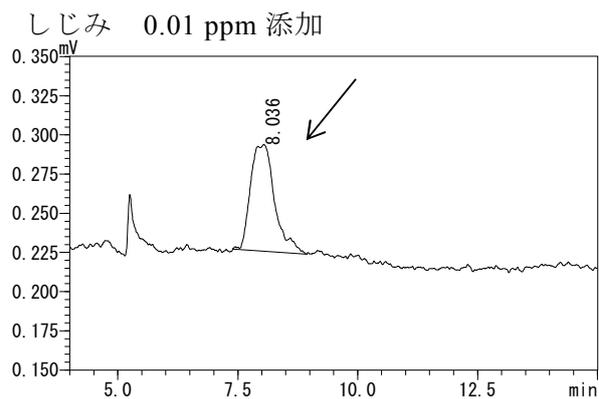
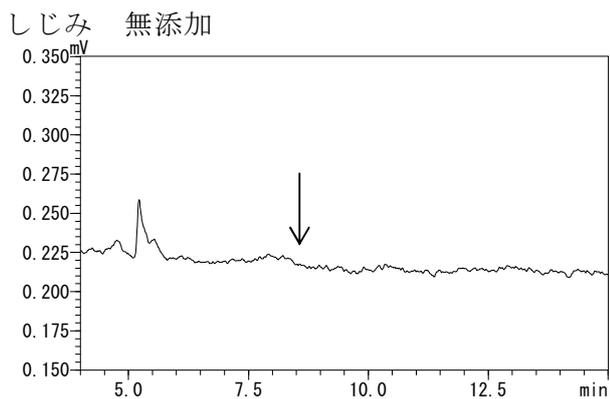
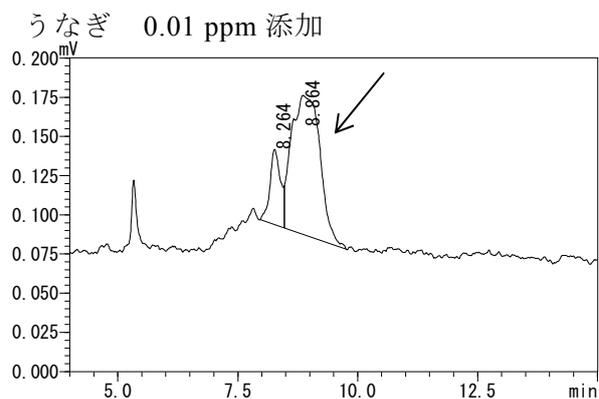
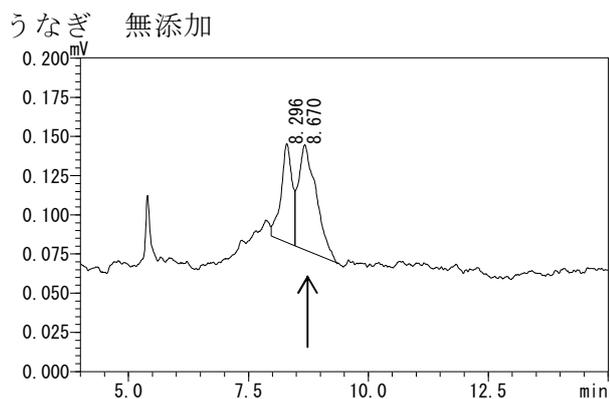
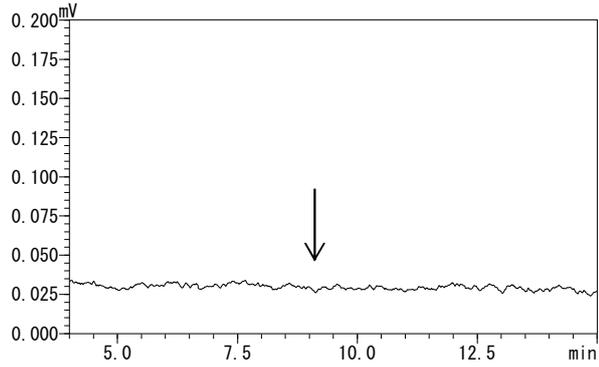
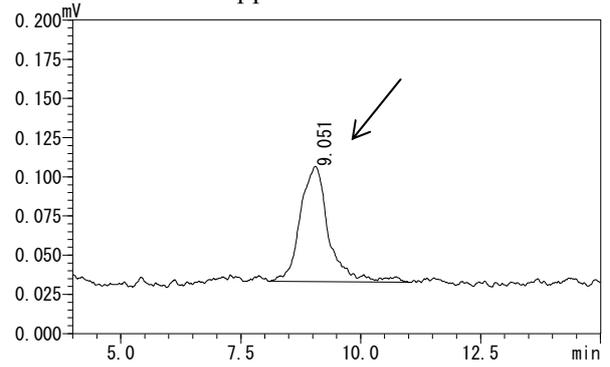


図 5-2 試料のクロマトグラム (測定分析カラム TSK-gel NH₂-100)

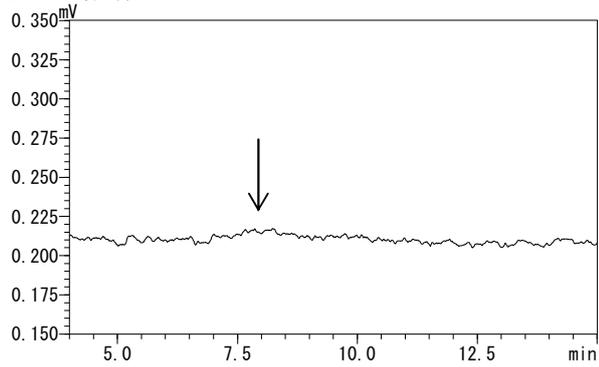
はちみつ 無添加



はちみつ 0.01 ppm 添加



えび 無添加



えび 0.01 ppm 添加

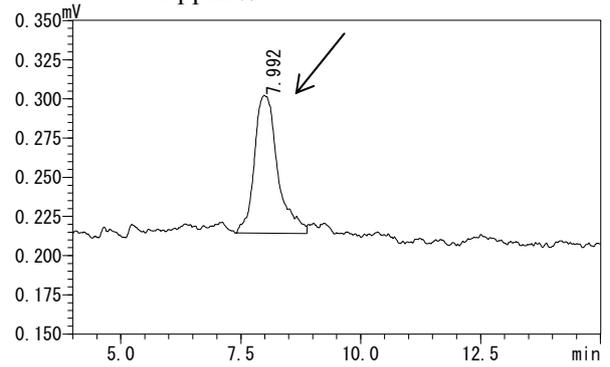


図 5-3 試料のクロマトグラム (測定分析カラム TSK-gel NH₂-100)