

フルララネル分析法（畜産物）

1. 分析対象化合物

・フルララネル

2. 装置

液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析（LC-MS/MS）

3. 試薬、試液

フルララネル標準品	:	分析用標準品
重水素標識フルララネル（d4フルララネル）	:	分析用標準品
アセトニトリル、メタノール、テトラヒドロフラン	:	HPLC 用
酢酸アンモニウム	:	分析用
ギ酸	:	分析用（99%）
水	:	水道水を Milli-Q システム（Millipore 製）で精製したもの
ミニカラム	:	Oasis HLB、30 mg、1 mL（Waters 製）

4. 試験溶液の調製

1) 前処理

−20±5°Cで凍結した鶏卵及び鶏臓器・組織試料をホモジナイズし、融解した鶏卵試料 1.00±0.01 g 及び鶏臓器・組織試料 500±5 mg を採取する。3,200 g で1分間遠心分離した後、−20±5°Cで凍結し、保存する。

2) 抽出

①鶏卵の場合

前処理した鶏卵試料 1.00±0.01 g に各添加溶液 50 µL 及び内標準溶液 50 µL を混合する。試料を1分間ボルテックスした後、3,200 g で1分間遠心分離する。アセトニトリル及び水（4：1，v/v）混液 3 mL を加えた後、2回攪拌し、更に、振とう及び混合した後、3,200 g で5分間遠心分離する。

②肝臓、腎臓及び筋肉の場合

試料 500±5 mg に 50%アセトニトリル及び水（1：1，v/v）混液 25 µL 及び試料の内標準溶液 25 µL を混合する。試料を1分間攪拌した後、3,200 g で1分間遠心分離する。アセトニトリル及び水（4：1，v/v）混液 1.5 mL を加えた後、2回攪拌し、更に、振とう及び混合した後、3,200 g で5分間遠心分離する。

③皮膚及び脂肪の場合

試料 500±5 mg にアセトニトリル及び水（1：1，v/v）混液 25 µL 及び試料の

内標準溶液 25 μL を混合する。試料を 1 分間攪拌した後、3,200 g で 1 分間遠心分離する。テトラヒドロフラン、アセトニトリル及び水 (3 : 5 : 2, v/v/v) 混液, 1.5 mL を加えた後、ホモジナイズし、攪拌した後、3,200 g で 5 分間遠心分離する。

3) 精製

① 鶏卵、肝臓、腎臓、皮膚及び脂肪の場合

抽出液の上清 600 μL に水 600 μL を加えた後、攪拌し、3,200 g で 1 分間遠心分離する。この上清をメタノール 1 mL 及び水 1 mL でコンディショニングした HLB ミニカラムに負荷した後、メタノール及び水 (7 : 3, v/v) 混液 1 mL で洗浄し、1 分間通気した。アセトニトリル及び水 (7 : 3, v/v) 混液 1 mL で溶出する。本溶出液に水 200 μL を加え、1 分間攪拌した後、96 穴ウェルプレートに移して封をする。3,200 g で 1 分間遠心分離し試験溶液とする。

② 筋肉の場合

上記①同様に固相抽出する。溶出液を 96 穴ウェルプレートに移し、70 L/分の窒素気流下 70°C で乾固させた後、移動相 A 200 μL で再溶解し、プレートに封をする。3,200 g で 1 分間遠心分離し試験溶液とする。

5. 検量線の作成

フルララネル標準品 20 mg をアセトニトリル 50 mL に溶解し標準原液とする。重水素標識 (d4) フルララネル 5 mg をアセトニトリル 20 mL に溶解し 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の内標準原液を調製する。この内標準原液をアセトニトリル及び水 (5 : 5, v/v) 混液で適宜希釈し、180 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の溶液を調製し、更にこの液 1 mL にアセトニトリル及び水 (1 : 1, v/v) 混液を加えて 6 mL とする。

① 鶏卵の場合

標準原液をアセトニトリル及び水 (1 : 1, v/v) 混液で適宜希釈し、8, 12, 16, 20, 32, 40, 48 及び 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の溶液を調製し、この液 10 μL に内標準溶液 10 μL 、アセトニトリル及び水 (7 : 3, v/v) 混液 980 μL 及び水 200 μL を加え、標準溶液を調製する (フルララネル 400.0~3000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、内標準物質 1500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ に相当)。それぞれ LC-MS/MS に注入し、ピーク面積比法で検量線を作成する。

② 筋肉の場合

内標準原液をアセトニトリル及び水 (1 : 1, v/v) 混液で適宜希釈し、最終的に 0.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の筋肉分析用内標準溶液を調製する。標準原液をアセトニトリル及び水 (1 : 1, v/v) 混液で適宜希釈し、0.1、0.15、0.2、0.3、0.4、0.6、0.8 及び 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の溶液を調製し、この液 20 μL に内標準溶液 20 μL 及び移動相 A 360 μL を加え、筋肉分析用標準溶液を調製する (フルララネル 5~50 ng/g 、内標準物質 30 ng/g に相当)。それぞれ LC-MS/MS に注入し、ピーク面積比法で検量線を作成する。

③ 腎臓の場合

内標準原液をアセトニトリル及び水 (1 : 1, v/v) 混液で適宜希釈し、最終的に 2 µg/mL の腎臓分析用内標準溶液を調製する。標準原液をアセトニトリル及び水 (1 : 1, v/v) 混液で適宜希釈し、0.4、0.6、0.8、1、1.6、2、3.2 及び 4 µg/mL の溶液を調製し、この液 10 µL に内標準溶液 10 µL、アセトニトリル及び水 (7 : 3, v/v) 混液 980 µL 及び水 200 µL を加え、腎臓分析用標準溶液を調製する (フルララネル 20~200 ng/g、内標準物質 100 ng/g に相当)。それぞれ LC-MS/MS に注入し、ピーク面積比法で検量線を作成する。

④ 肝臓の場合

内標準原液をアセトニトリル及び水 (1 : 1, v/v) 混液で適宜希釈し、最終的に 3.6 µg/mL の肝臓分析用内標準溶液を調製する。標準原液をアセトニトリル及び水 (1 : 1, v/v) 混液で適宜希釈し、0.6、0.8、1.2、2、3、4、5.6 及び 7 µg/mL の溶液を調製し、この液 10 µL に内標準溶液 10 µL、アセトニトリル及び水 (7 : 3, v/v) 混液 980 µL 及び水 200 µL を加え、肝臓分析用標準溶液を調製する (フルララネル 30~350 ng/g、内標準物質 180 ng/g に相当)。それぞれ LC-MS/MS に注入し、ピーク面積比法で検量線を作成する。

⑤ 皮膚及び脂肪の場合

内標準原液をアセトニトリル及び水 (1 : 1, v/v) 混液で適宜希釈し、最終的に 4.6 µg/mL の皮膚及び脂肪分析用内標準溶液を調製する。標準原液をアセトニトリル及び水 (1 : 1, v/v) 混液で適宜希釈し、0.8、1.2、1.6、2、4、5、7.2 及び 9 µg/mL の溶液を調製し、この液 10 µL に内標準溶液 10 µL、アセトニトリル及び水 (7 : 3, v/v) 混液 980 µL 及び水 200 µL を加え、皮膚・脂肪分析用標準溶液を調製する (フルララネル 40~450 ng/g、内標準物質 230 ng/g に相当)。それぞれ LC-MS/MS に注入し、ピーク面積比法で検量線を作成する。

6. 定量

試験溶液を LC-MS/MS に注入し、5 の検量線を用いて含量を定量する。

7. 測定条件

(例)

装置	: HPLC ; Acquity シリーズ UPLC (Waters 製) MS ; タンデム四重極 MS (Xevo TQD, Waters 製)
カラム	: Hypersil Gold、粒径 ; 1.9 µm、2.1 mm i.d. × 50 mm (Thermo Scientific 製)
カラム温度	: 55°C
移動相	: 移動相 A : メタノール、10 mmol/L 酢酸アンモニウム 溶液及びギ酸混液 (67 : 33 : 0.4, v/v/v) 移動相 B : メタノール、10 mmol/L 酢酸アンモニウム 溶液及びギ酸混液 (90 : 10 : 0.4, v/v/v)

グラジエント
プログラム 1
(鶏卵の場合)

時間 (分)	移動相 A (%)	移動相 B (%)
0	100	0
3.75	100	0
4.00	0	100
6.00	0	100
6.25	100	0

グラジエント
プログラム 2
(臓器・組織の
場合)

時間 (分)	移動相 A (%)	移動相 B (%)
0	100	0
4.00	100	0
4.25	0	100
6.25	0	100
6.50	100	0

流量 : 0.3 mL/min

注入量 : 4 μ L (鶏卵)、15 μ L (臓器・組織),

保持時間の目安 : 約 3 分

イオン化モード : ESI (+)

イオン検出法 : MRM 法

モニタリングイ
オン

	プリカーサー イオン (m/z)	プロダクトイ オン (m/z)
フルララネル	556	400
d4 フルララネル	560	400

8. 定量限界

鶏の卵 ; 0.4ppm、鶏の肝臓 ; 0.03ppm、鶏の腎臓 ; 0.02ppm、鶏の皮膚・脂肪 ; 0.04ppm、鶏の筋肉 ; 0.005ppm

9. 添加回収試験を実施した食品

鶏の卵、鶏の肝臓、鶏の腎臓、鶏の皮膚・脂肪、鶏の筋肉

10. 留意事項

特になし

※ 本分析法は、畜産物における残留試験等において用いられた残留農薬等分析法であり、新たな試験法の開発等に際して参考として下さい。なお、当該分析法をもとに開発した試験法を食品規格への適合判定のために使用する場合には、「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインの一部改正について (平成 22 年 12 月 24 日薬食発 1224 第 1 号)」に従って使用する試験法の妥当性を評価する必要があります。