

※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 試験法開発事業報告書

## ラサロシド試験法（畜産物）

## ラサロシド試験法（畜産物）の検討結果

### [緒言]

#### 1. 目的

ラサロシド A は、*Streptomyces lasaliensis* が産生するポリエーテル系の抗生物質でありナトリウム塩として使用される。ラサロシドはラサロシド A を主成分（90%以上）とするラサロシド B、C、D 及び E との混合物である。主にグラム陽性菌に対して有効である。

海外では、牛、羊及び家きんのコクシジウム症予防のために動物用医薬品又は飼料添加物として使用されており、ヒト用医薬品としては使用されていない。

日本ではラサロシドナトリウムが牛及び鶏の飼料添加物として指定されている。動物用医薬品としては承認されていない。また、ヒト用医薬品として使用されていない。

関連企業から「国外で使用される動物用医薬品等に係る残留基準の設定及び改正に関する指針について」に基づく残留基準の設定要請がなされたことに伴い、食品中の動物医薬品等のポジティブリスト制度導入時に新たに設定され基準値が見直された。

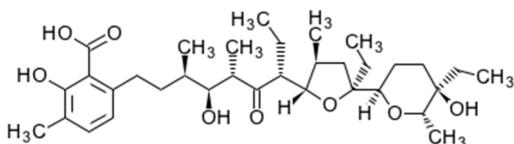
本検討においては、薬事食品衛生審議会食品衛生分科会報告書に記載されている内容を踏まえ、農産物中のラサロシド A 試験法の開発を行った。

#### 2. 分析対象化合物の構造式及び物理化学的性質

分析対象化合物：ラサロシド A

化学名：6-[(3R,4S,5S,7R)-7-[(2S,3S,5S)-5-ethyl-5-[(2R,5R,6S)-5-ethyltetrahydro-5-hydroxy-6-methyl-2H-pyran-2-yl]tetrahydro-3-methyl-2-furanyl]-4-hydroxy-3,5-dimethyl-6-oxononyl]-2-hydroxy-3-methylbenzoic acid (CAS)

構造式：



分子式：C<sub>34</sub>H<sub>54</sub>O<sub>8</sub>

分子量：590.79

溶解度：水 1.06 g/L (30°C)

分配係数：Log<sub>10</sub>P<sub>ow</sub>=2.3 (HPLC 法)

Log<sub>10</sub>P<sub>ow</sub>=1.4 (フラスコ振盪法)

出典：平成 24 年度食品安全確保総合調査 ポジティブリスト制度施行に伴う暫定基準の設定された農薬、動物用医薬品及び飼料添加物に係る食品健康影響評価に関する調査 No.25 ラサロシド

#### 3. 基準値（案）

牛の筋肉：0.02 ppm

牛の脂肪：0.02 ppm

牛の肝臓：0.7 ppm

牛乳：0.01 ppm

鶏卵：0.2 ppm

## [実験方法]

### 1. 試料

東京都内の小売店で購入した。試料の調製方法を以下に示した。

#### 1) 牛の筋肉

可能な限り脂肪層を除き、細切りした後、フードプロセッサーを用いて均一化した。

#### 2) 牛の脂肪

可能な限り筋肉層を除き、細切りした後、フードプロセッサーを用いて均一化した。

#### 3) 牛の肝臓

細切りした後、フードプロセッサーを用いて均一化した。

#### 4) 牛乳

よく混合して均一化した。

#### 5) 鶏卵

殻を除去し、卵白と卵黄を合わせてよく混合して均一化した。

### 2. 試薬・試液

ラサロシド A ナトリウム標準品：純度 97.17% (コスモバイオ(株)製)

メタノール：残留農薬試験用 (関東化学 (株) 製)

メタノール：LC/MS 用 (関東化学 (株) 製)

ギ酸：LC/MS 用 (富士フイルム和光純薬 (株) 製)

0.5 vol%ギ酸・水/メタノール (1 : 99)：ギ酸 5 mL に水及びメタノール (1 : 99) 混液を加えて 1000 mL とした。

水及びメタノール (1 : 1) 混液：水 500 mL 及びメタノール 500 mL を混合した。

水及びメタノール (9 : 1) 混液：水 90 mL 及びメタノール 900 mL を混合した。

ミニカラム：InertSep HLB (500 mg/6 mL) (ジーエルサイエンス (株) 製)

ミニカラム：InertSep SAX (500 mg/6 mL) (ジーエルサイエンス (株) 製)

#### 標準原液

ラサロシド A ナトリウム標準品 10.4 mg を精秤し、アセトニトリルに溶解して 100 mL とした。本溶液はラサロシド A として 100 mg/L を含む。

検量線用標準溶液：標準原液を水及びメタノール (9 : 1) 混液で適宜希釈し、0.00005~0.0003 mg/L の濃度の溶液を調製した。

添加用標準溶液：標準原液をメタノールを用いて適宜希釈して調製した。

### 3. 装置

ホモジナイザー：マルチディスペルサー PB-95 (シャフト：HG-2) (SMT COMPANY 社製)

フードプロセッサー：MK-K58 (National 社製)

濃縮装置：有機溶媒回収装置 V-703 (BUCHI 社製)

遠心分離器：日立高速冷却遠心機 CR22GIII (日立工機 (株) 製)

LC-MS/MS

|       |                  |       |
|-------|------------------|-------|
| 装置    | 型式               | 会社    |
| MS    | Triple Quad 4500 | SCIEX |
| LC    | Exion LC         | SCIEX |
| データ処理 | Analyst Software | SCIEX |

4. 測定条件

LC-MS/MS

| LC 条件          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |         |        |         |         |     |    |    |      |   |    |      |   |    |      |    |    |      |    |    |
|----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|--------|---------|---------|-----|----|----|------|---|----|------|---|----|------|----|----|------|----|----|
| カラム            | InertSustain C18 (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm : GLサイエンス (株) 製)                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |         |        |         |         |     |    |    |      |   |    |      |   |    |      |    |    |      |    |    |
| 移動相流速 (mL/min) | 0.20                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |         |        |         |         |     |    |    |      |   |    |      |   |    |      |    |    |      |    |    |
| 注入量 (μL)       | 10                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |         |        |         |         |     |    |    |      |   |    |      |   |    |      |    |    |      |    |    |
| カラム温度 (°C)     | 40                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |         |        |         |         |     |    |    |      |   |    |      |   |    |      |    |    |      |    |    |
| 移動相            | A 液 : 5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液<br>B 液 : 5 mmol/L 酢酸アンモニウム・メタノール溶液                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |         |        |         |         |     |    |    |      |   |    |      |   |    |      |    |    |      |    |    |
| グラジエント条件       | <table border="1"> <thead> <tr> <th>時間 (分)</th> <th>A 液 (%)</th> <th>B 液 (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.0</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>10.0</td> <td>1</td> <td>99</td> </tr> <tr> <td>20.0</td> <td>1</td> <td>99</td> </tr> <tr> <td>20.1</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>30.0</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> </tbody> </table> |         | 時間 (分) | A 液 (%) | B 液 (%) | 0.0 | 90 | 10 | 10.0 | 1 | 99 | 20.0 | 1 | 99 | 20.1 | 90 | 10 | 30.0 | 90 | 10 |
| 時間 (分)         | A 液 (%)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | B 液 (%) |        |         |         |     |    |    |      |   |    |      |   |    |      |    |    |      |    |    |
| 0.0            | 90                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 10      |        |         |         |     |    |    |      |   |    |      |   |    |      |    |    |      |    |    |
| 10.0           | 1                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 99      |        |         |         |     |    |    |      |   |    |      |   |    |      |    |    |      |    |    |
| 20.0           | 1                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 99      |        |         |         |     |    |    |      |   |    |      |   |    |      |    |    |      |    |    |
| 20.1           | 90                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 10      |        |         |         |     |    |    |      |   |    |      |   |    |      |    |    |      |    |    |
| 30.0           | 90                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 10      |        |         |         |     |    |    |      |   |    |      |   |    |      |    |    |      |    |    |
| MS 条件          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |         |        |         |         |     |    |    |      |   |    |      |   |    |      |    |    |      |    |    |
| 測定モード          | SRM (選択反応モニタリング)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |         |        |         |         |     |    |    |      |   |    |      |   |    |      |    |    |      |    |    |
| イオン化モード        | ESI (-)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |         |        |         |         |     |    |    |      |   |    |      |   |    |      |    |    |      |    |    |
| キャピラリー電圧 (V)   | -4500                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |         |        |         |         |     |    |    |      |   |    |      |   |    |      |    |    |      |    |    |
| 脱溶媒温度 (°C)     | 600                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |         |        |         |         |     |    |    |      |   |    |      |   |    |      |    |    |      |    |    |
| ネブライザーガス       | 窒素、30 psi                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |         |        |         |         |     |    |    |      |   |    |      |   |    |      |    |    |      |    |    |
| 脱溶媒ガス          | 窒素、30 psi                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |         |        |         |         |     |    |    |      |   |    |      |   |    |      |    |    |      |    |    |
| コリジョンガス        | 窒素                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |         |        |         |         |     |    |    |      |   |    |      |   |    |      |    |    |      |    |    |
| 定量イオン (m/z)    | 589.0→235.0 [DP : -20 (V)、CE : -48 (eV)]                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |         |        |         |         |     |    |    |      |   |    |      |   |    |      |    |    |      |    |    |
| 定性イオン (m/z)    | 589.0→121.0 [DP : -20 (V)、CE : -72 (eV)]                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |         |        |         |         |     |    |    |      |   |    |      |   |    |      |    |    |      |    |    |
| 保持時間 (min)     | 13.5 分                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |         |        |         |         |     |    |    |      |   |    |      |   |    |      |    |    |      |    |    |

DP : Declustering Potential, CE : Collision Energy

## 5. 定量

ラサロシド標準原液を水及びメタノール（9：1）混液で希釈して 0.00005~0.0003 mg/L の標準溶液を調製した。この溶液 10  $\mu$ L を LC-MS/MS に注入して、得られたピーク面積を用いて絶対検量線法により検量線を作成した。同様に試験溶液 10  $\mu$ L を LC-MS/MS に注入し、得られたピーク面積を用いて、作成した検量線から試料中のラサロシドの含量を算出した。また、基準値相当の添加試料については検量線の範囲内に収まるよう、試験溶液を牛の筋肉及び牛の脂肪は 2 倍希釈し、牛の肝臓は 100 倍希釈、鶏卵は 20 倍希釈した。

## 6. 試験溶液の調製

### 1) 添加試料の調製

試料 10.0 g に添加用標準溶液 1 mL（メタノール溶液）を添加しよく混合した後、30 分間放置した。各試料において使用した添加用標準溶液の濃度を表 1 に示す。

表 1 各試料における添加用標準溶液の濃度

| 試料   | 添加濃度<br>(ppm) | 添加用標準溶液濃度<br>(mg/L) |
|------|---------------|---------------------|
| 牛の筋肉 | 0.01          | 0.1                 |
|      | 0.02          | 0.2                 |
| 牛の脂肪 | 0.01          | 0.1                 |
|      | 0.02          | 0.2                 |
| 牛の肝臓 | 0.01          | 0.1                 |
|      | 0.7           | 7                   |
| 牛乳   | 0.01          | 0.1                 |
| 鶏卵   | 0.01          | 0.1                 |
|      | 0.2           | 2                   |

### 2) 抽出

試料 10.0 g にメタノール 100 mL を加え、ホモジナイズした後、毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離し、上澄液を採る。残留物にメタノール 50 mL を加えてホモジナイズした後、毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離し、得られた上澄液を合わせ、メタノールを加えて正確に 200 mL とする。この溶液から正確に 2 mL を分取する。

### 3) 精製

#### ① トリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム

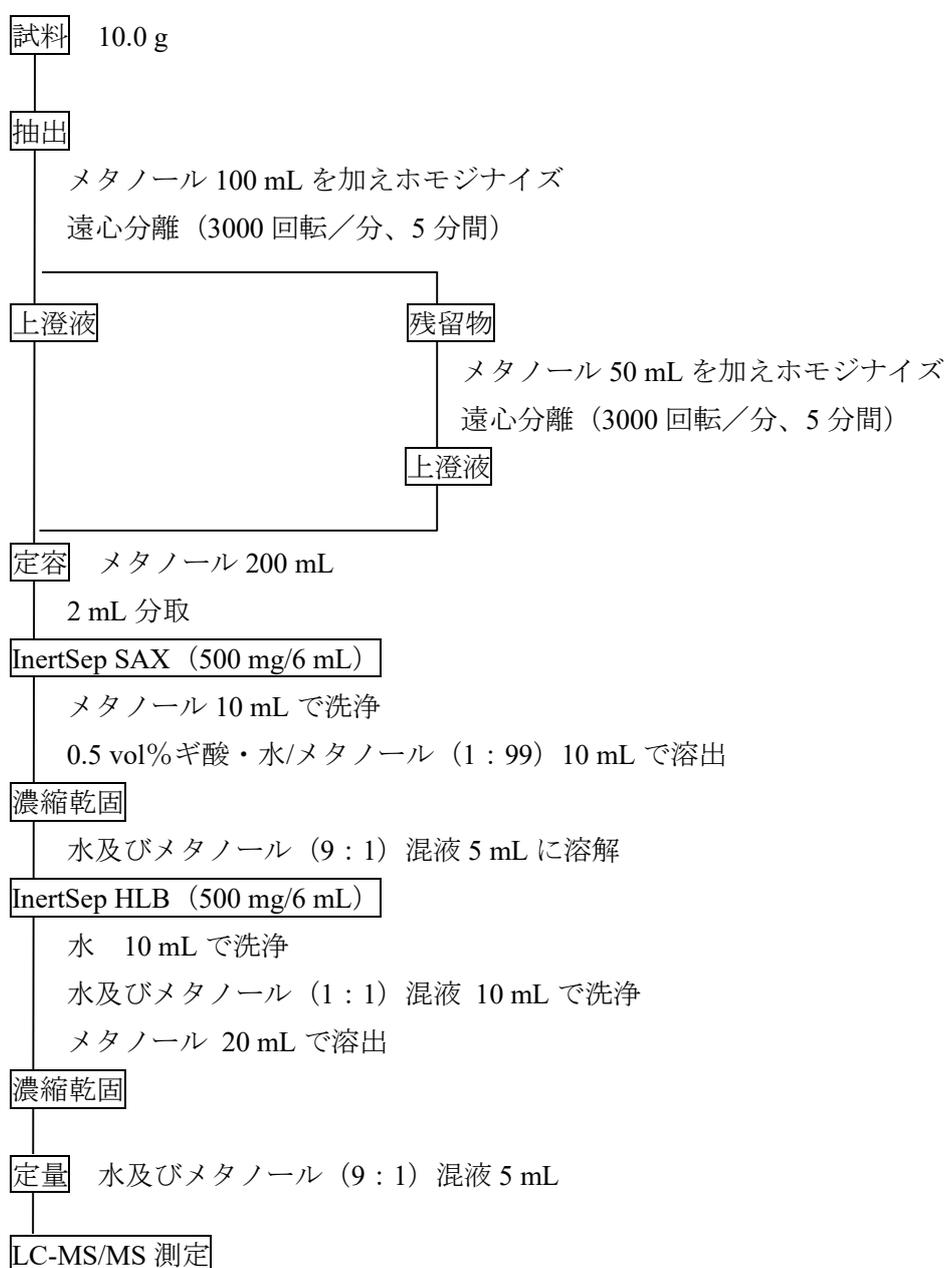
トリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム(500 mg) [InertSep SAX (500 mg/6 mL)] にメタノールを 10 mL 注入し、流出液は捨てる。このカラムに 2) で得られた溶液を注入し、メタノール 10 mL で洗浄し、流出液は捨てる。このカラムに 0.5 vol%ギ酸・水/メタノール（1：99）

10 mL を注入し、溶出液を採り、40℃以下で溶媒を除去し、水及びメタノール（9：1）混液 5 mL を加えて溶かす。

②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

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）〔InertSep HLB（500 mg/6 mL）〕にメタノール及び水各 10 mL を順次注入し、各流出液は捨てる。このカラムに①で得られた溶液を注入し、水 10 mL、水及びメタノール（1：1）10 mL を順次注入し、各流出液は捨てる。このカラムにメタノール 20 mL を注入し、溶出液を採り、40℃以下で溶媒を除去し、水及びメタノール（9：1）混液 5 mL を加えて正確に 5 mL としたものを試験溶液とする。

[分析法フローチャート]



#### 7. マトリックス添加標準溶液の調製

各検討対象食品のブランク試験溶液 0.2 mL を採り、窒素気流下で溶媒を除去した後、添加回収試験における回収率 100%相当濃度の溶媒標準溶液 0.2 mL を加えて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) MS 条件の検討

イオン化モードを選択するために、インフュージョン測定を行ったところ、ラサロシドのプロトン付加分子である  $m/z$  591.5[M+H]<sup>+</sup>と脱プロトン化分子である  $m/z$  589.0[M-H]<sup>-</sup>が検出された。しかし、脱プロトン化分子の方が良好な感度を得られたので、ラサロシドの測定には ESI (-) モードを用いることとした。このときのマススペクトルを図 1 に示す。

ラサロシドの脱プロトン化分子である  $m/z$  589.0[M-H]<sup>-</sup>をプリカーサーイオンとした場合のプロダクトイオンスペクトルを図 2 及び図 3 に示した。 $m/z$  235.0 が非常に高い強度で検出され、次いで  $m/z$  121.0 が検出されたことから、 $m/z$ 589.0→235.0 を定量用、 $m/z$  589.0→121.0 を定性用の測定イオンとした。

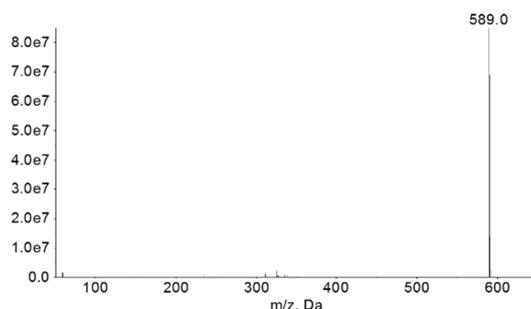


図 1 ラサロシド標準溶液のマススペクトル  
スキャン範囲：50～700 amu  
測定条件：ESI<sup>-</sup>， DP=-20 V

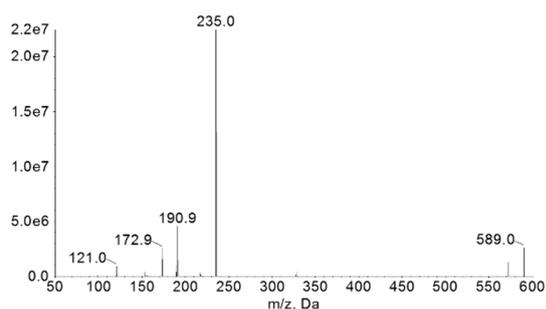


図 2 ラサロシドのプロダクトイオンスペクトル

(定量用)

プリカーサーイオン：589.0  $m/z$

測定条件：ESI<sup>-</sup> DP=-20 V, CE=-48 eV

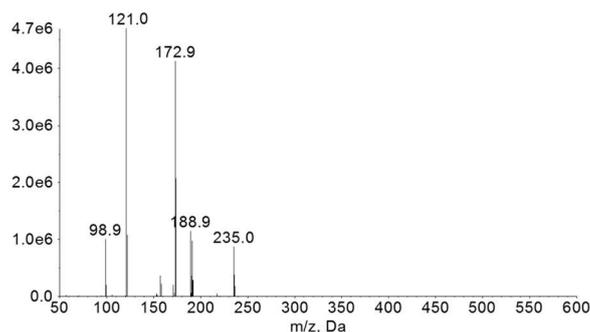


図 3 ラサロシドのプロダクトイオンスペクトル

(定性用)

プリカーサーイオン：589.0  $m/z$

測定条件：ESI<sup>-</sup> DP=-20 V, CE=-72 eV

## 2) LC 条件の検討

分析カラムについて検討を行った。Inertsil ODS-3 (ジーエルサイエンス (株) 製)、Inertsil ODS-4 (ジーエルサイエンス (株) 製)、X-Bridge C18 (日本ウォーターズ (株) 製) 及び L-column2 ((一財) 化学物質評価研究機構製) ではラサロシドは保持されたが、InertSustain C18 (ジーエルサイエンス (株) 製) において一番良好な感度及びピーク形状が得られたので測定には InertSustain C18 を用いることとした。

移動相条件について、ギ酸—アセトニトリル、ギ酸—メタノール、酢酸アンモニウム—アセトニトリル、酢酸アンモニウム—メタノールを検討した結果、酢酸アンモニウム—メタノールを用いた場合に最も良好な感度を得られた。次に酢酸アンモニウムについて 2 mmol/L、5 mmol/L、10 mmol/L の 3 濃度を検討した結果、5 mmol/L において最も良好な感度とピーク形状が得られたため 5 mmol/L 酢酸アンモニウム—5 mmol/L 酢酸アンモニウム・メタノールを移動相として用いることにした。

## 3) 検量線

図 4 に検量線の例を示した。0.00005~0.0003 mg/L の濃度範囲で作成した検量線の決定係数は、いずれの検量線も 0.999 以上であり良好な直線性を示した。

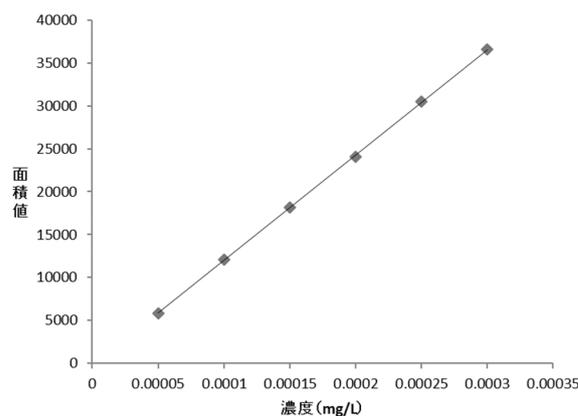


図 4 ラサロシド検量線の例  
濃度範囲 : 0.00005~0.0003 mg/L  
 $y = 123057x - 334$   $r^2 = 0.9999$

## 2. 試験溶液調製法の検討

### 1) 抽出溶媒の検討

牛の脂肪を用いて抽出溶媒の検討を行った。試料 10.0 g を 40°C で融解し、ラサロシド 10 mg/L 溶液 (メタノール溶液) 2 mL を添加して、再凝固してから 30 分放置した。ここに、①メタノール 100 mL を加えてホモジナイズまたは②*n*-ヘキサン 50 mL を加えてホモジナイズした後、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 50 mL を加えてホモジナイズした。この抽出溶液を毎分 3000 回転で 10 分間遠心分離し、それぞれ①は上澄液、②はアセトニトリル層を分取した。残留物及び *n*-ヘキサン層に①メタノール 50 mL または②*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 25 mL を加え、上記と同様の操作を行った。上澄液または

アセトニトリル層を合わせ、それぞれの抽出溶媒で正確に 200 mL とした。ここから 1 mL を分取しアセトニトリルを加えて 10 mL としたものを試験溶液とした。結果は表 2 に示したとおり、メタノールは 98.8%、アセトニトリル (*n*-ヘキサン存在下) は 80.8%であった。この結果から、抽出はメタノールを用いて行うこととした。

表 2 抽出溶媒の検討結果 (%、マトリックス添加標準溶液による補正值)

|         |                               |
|---------|-------------------------------|
| ① メタノール | ② アセトニトリル( <i>n</i> -ヘキサン存在下) |
| 98.8    | 80.8                          |

添加量 : 20 µg

## 2) カラム精製の検討

### ①陰イオン交換体ミニカラムによる精製 [InertSep SAX (500 mg/6 mL)]

InertSep SAX (500 mg/6 mL) における溶出状況の確認を行った。カラムをメタノール 10 mL で予備洗浄した後、0.01 mg/L ラサロシド溶液 (各溶出溶媒で調製した溶液) を 1 mL 負荷し、溶出溶媒を 5 mL ずつ負荷して各分画を分取した。結果は表 3 に示した。ラサロシドは、水、メタノール及びアセトニトリルでは溶出されず、0.5 vol%ギ酸・メタノール 10 mL で溶出された。

表 3 InertSep SAX(500 mg/6 mL)からのラサロシドの溶出状況 (%)

| 溶出溶媒量    | 水 | メタノール | アセトニトリル | 0.5 vol%ギ酸・メタノール |
|----------|---|-------|---------|------------------|
| 0-5 mL   | 0 | 0     | 0       | 110.3            |
| 5-10 mL  | 0 | 0     | 0       | 1.2              |
| 10-15 mL | 0 | 0     | 0       | 0                |
| 15-20 mL | 0 | 0     | 0       | 0                |
| 計        | 0 | 0     | 0       | 111.5            |

添加量 : 0.01 µg

次にマトリックス存在下 (牛の肝臓) における溶出状況を確認した。牛の肝臓抽出液 10 mL に 0.01 mg/L ラサロシド溶液 (メタノール溶液) 1 mL を加えて 40°C以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物に各溶出溶媒 5 mL を加えて溶解し、SAX ミニカラムに負荷し、各溶出溶媒を流下して 5 mL ずつ分画を分取した。この時の結果を表 4 に示す。

マトリックス存在下では、0.5 vol%ギ酸含有メタノールで回収率が 60.9%と著しく低下し、ギ酸濃度を 1 vol%に増やしても大きな変化は見られなかった。溶出溶媒に 1~2%の水を含有させることで良好な結果を得られたことから SAX ミニカラムにおいてはメタノールで洗浄、0.5 vol%ギ酸・水/メタノール (1 : 99) で溶出することとした。

表4 InertSep SAX(500 mg/6 mL)からのラサロシドの溶出状況 (%) (試料：牛の肝臓)

| 溶出<br>溶媒量   | 水 | メタ<br>ノール | 0.5 vol%ギ<br>酸・<br>メタノール | 1 vol%ギ酸・<br>メタノール | 0.5 vol%ギ<br>酸・<br>水/メタノール<br>(1 : 99) | 0.5 vol%ギ<br>酸・<br>水/メタノール<br>(2 : 98) | 0.5 vol%ギ酸・<br>水/メタノール<br>(5 : 95) |
|-------------|---|-----------|--------------------------|--------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|------------------------------------|
| 0-5<br>mL   | 0 | 0         | 59.5                     | 60.4               | 61.0                                   | 48.4                                   | 26.5                               |
| 5-10<br>mL  | 0 | 0         | 1.4                      | 0.9                | 26.3                                   | 25.0                                   | 15.2                               |
| 10-15<br>mL | 0 | 0         | 0                        | 0                  | 18.5                                   | 10.9                                   | 11.6                               |
| 15-20<br>mL | 0 | 0         | 0                        | 0                  | 0                                      | 8.5                                    | 6.6                                |
| 計           | 0 | 0         | 60.9                     | 61.3               | 105.8                                  | 92.8                                   | 59.9                               |

添加量：0.01 µg

②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よる精製 [InertSep HLB (500 mg/6 mL)]

SAX ミニカラムによる精製だけではマトリックス影響（マトリックス添加標準溶液の面積値／溶媒標準溶液の面積値）が0.55程度であったため追加精製が必要であると考えた。

そこでマトリックス存在下（牛の肝臓）における InertSep HLB (500 mg/6 mL) からの溶出状況を確認した。牛の肝臓抽出液 10 mL に 0.01 mg/L ラサロシド溶液（メタノール溶液）1 mL を加えて 40℃ 以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物に各溶出溶媒 5 mL を加えて溶解し、HLB ミニカラムに負荷し、各溶出溶媒を流下して 5 mL ずつ分画を分取した。この時の結果を表5に示した。水及びメタノール（1 : 1）ではラサロシドは溶出されず、メタノール比率が 60%以上に増加するとラサロシドが溶出した。マトリックス存在下で精製効果を確認したところ、水で洗浄後、水及びメタノール（1 : 1）で洗浄を行った場合に最もマトリックスの影響が小さくなった。そこで HLB ミニカラムにおける精製は、水 10 mL、水及びメタノール（1 : 1）混液 10 mL で洗浄後、メタノール 20 mL で溶出することとした。

表5 InertSep HLB(500 mg/6 mL)からのラサロシドの溶出状況 (%) (試料：牛の肝臓)

| 溶出溶媒量    | 水 | 水/メタノール<br>(9 : 1) | 水/メタノール<br>(1 : 1) | 水/メタノール<br>(4 : 6) | メタノール |
|----------|---|--------------------|--------------------|--------------------|-------|
| 0-5 mL   | 0 | 0                  | 0                  | 0                  | 19.0  |
| 5-10 mL  | 0 | 0                  | 0                  | 0.8                | 66.1  |
| 10-15 mL | 0 | 0                  | 0                  | 2.0                | 5.8   |
| 15-20 mL | 0 | 0                  | 0                  | 2.3                | 0     |

|   |   |   |   |     |      |
|---|---|---|---|-----|------|
| 計 | 0 | 0 | 0 | 5.1 | 90.9 |
|---|---|---|---|-----|------|

添加量：0.01 µg

### 3. 添加回収試験

牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳及び鶏卵の5食品を試料に用いて、実験方法の「6. 試験溶液の調製」に従って添加回収試験を実施した。

添加回収試験における回収率 100%相当の溶媒標準溶液、各食品のブランク試料及び添加試料の代表的なクロマトグラムを図5~9に示した。また、各食品のブランク試料のフルスキャン測定によるトータルイオンクロマトグラムを図10に示した。

#### 1) 選択性

選択性の検討結果を表6に示した。検討を行ったいずれの試料においても、ラサロシドの定量を妨害するピークは認められなかった。

表6 選択性の評価

| 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) <sup>1)</sup> |      |     |       |                            |       | 選択性の評価 <sup>3)</sup> | 備考    |                |       |
|-----|---------|-----------|--------------|-----------|---------------|---------|-------------------------|------|-----|-------|----------------------------|-------|----------------------|-------|----------------|-------|
|     |         |           |              |           | 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 <sup>2)</sup> |       |                      |       | 面積(高さ)比(a)/(b) |       |
|     |         |           |              |           |               |         |                         | n=1  | n=2 | 平均(a) | n=1                        | n=2   |                      |       |                | 平均(b) |
| 1   | ラサロシド   | 牛の筋肉(MRL) | 0.01         | 0.02      | 定量限界 0.01     | < 0.333 | 面積                      | 0    | 0   | 0     | 26817                      | 26350 | 26584                | 0.000 | ○              |       |
| 2   |         | 牛の脂肪(MRL) | 0.01         | 0.02      | 定量限界 0.01     | < 0.333 | 面積                      | 0    | 0   | 0     | 27720                      | 26970 | 27345                | 0.000 | ○              |       |
| 3   |         | 牛の肝臓(MRL) | 0.01         | 0.7       | 基準値 0.7       | < 0.100 | 面積                      | 0    | 0   | 0     | 17209                      | 17243 | 17226                | 0.000 | ○              |       |
| 5   |         | 牛乳        | 0.01         | 0.01      | 定量限界 0.01     | < 0.333 | 面積                      | 0    | 0   | 0     | 20768                      | 21046 | 20907                | 0.000 | ○              |       |
| 6   |         | 鶏卵(MRL)   | 0.01         | 0.2       | 基準値 0.2       | < 0.100 | 面積                      | 0    | 0   | 0     | 22756                      | 22743 | 22750                | 0.000 | ○              |       |
| 7   |         | 牛の筋肉(LOQ) | 0.01         |           | 定量限界 0.01     | < 0.333 | 面積                      | 0    | 0   | 0     | 25331                      | 25348 | 25340                | 0.000 | ○              |       |
| 8   |         | 牛の脂肪(LOQ) | 0.01         |           | 定量限界 0.01     | < 0.333 | 面積                      | 0    | 0   | 0     | 29701                      | 28291 | 28996                | 0.000 | ○              |       |
| 9   |         | 牛の肝臓(LOQ) | 0.01         |           | 定量限界 0.01     | < 0.333 | 面積                      | 0    | 0   | 0     | 20532                      | 20767 | 20650                | 0.000 | ○              |       |
| 10  |         | 鶏卵(LOQ)   | 0.01         |           | 定量限界 0.01     | < 0.333 | 面積                      | 0    | 0   | 0     | 23583                      | 23169 | 23376                | 0.000 | ○              |       |

<sup>1)</sup> ブランク試料、標準溶液の順に注入して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。)

<sup>2)</sup> 試料中の濃度が「評価濃度」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。

<sup>3)</sup> 面積(高さ)比が、妨害ピークの許容範囲の評価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。

#### 2) 真度、精度

真度及び併行精度の検討結果を表7に示した。

定量限界相当濃度の添加回収試験(牛乳を含む)では、真度 96.3~108.9%、併行精度 0.6~4.1%あり、真度 70~120%、併行精度 (RSD) <25%という目標値を満足した。また、S/N比は 153.8~322.8 であり、S/N ≥ 10 を満足した。

基準値相当濃度の添加回収試験では、真度 95.7~104.1%、併行精度 0.9~4.4%であり真度 70~120%、併行精度 (RSD) <10%という目標値を満足した。

表7 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 (mg/kg) | 基準値 (ppm) | 添加濃度 (ppm) | 定量限界の評価 <sup>*1</sup> | 検量線    |       |                  | 回収率 (%) |       |       |       |       | 真度 (%) | 併行精度 (RSD%) | S/N <sup>2</sup> |       |         | 備考 |
|-----|---------|-----------|--------------|-----------|------------|-----------------------|--------|-------|------------------|---------|-------|-------|-------|-------|--------|-------------|------------------|-------|---------|----|
|     |         |           |              |           |            |                       | 傾き     | 切片    | r <sup>2</sup> 値 | n=1     | n=2   | n=3   | n=4   | n=5   |        |             | Max              | Min   | 平均値     |    |
| 1   | ラサロンド   | 牛の筋肉(MRL) | 0.01         | 0.02      | 0.02       | -                     | 138571 | -1251 | 0.9996           | 107.7   | 110.0 | 98.8  | 101.3 | 102.7 | 104.1  | 4.4         | -                | -     | #VALUE! |    |
| 2   |         | 牛の脂肪(MRL) | 0.01         | 0.02      | 0.02       | -                     | 136642 | 1366  | 0.9996           | 100.6   | 102.6 | 98.3  | 93.6  | 95.1  | 98.0   | 3.8         | -                | -     | #VALUE! |    |
| 3   |         | 牛の肝臓(MRL) | 0.01         | 0.7       | 0.7        | -                     | 103046 | 927   | 0.9995           | 94.3    | 95.5  | 94.1  | 99.0  | 95.6  | 95.7   | 2.1         | -                | -     | #VALUE! |    |
| 5   |         | 牛乳        | 0.01         | 0.01      | 0.01       | S/N                   | 113655 | -638  | 0.9997           | 98.9    | 99.3  | 99.6  | 100.1 | 101.7 | 99.9   | 1.1         | 294.2            | 351.3 | 322.8   |    |
| 6   |         | 鶏卵(MRL)   | 0.01         | 0.2       | 0.2        | -                     | 120327 | -184  | 0.9997           | 100.1   | 98.5  | 99.6  | 100.4 | 98.4  | 99.4   | 3.0         | -                | -     | #VALUE! |    |
| 7   |         | 牛の筋肉(LOQ) | 0.01         |           | 0.01       | S/N                   | 132706 | -1056 | 0.9997           | 102.2   | 106.2 | 107.8 | 101.0 | 107.6 | 105.0  | 0.9         | 183.4            | 213.9 | 198.6   |    |
| 8   |         | 牛の脂肪(LOQ) | 0.01         |           | 0.01       | S/N                   | 141622 | 1502  | 0.9997           | 111.6   | 106.2 | 114.4 | 103.3 | 108.8 | 108.9  | 4.0         | 242.6            | 225.2 | 233.9   |    |
| 9   |         | 牛の肝臓(LOQ) | 0.01         |           | 0.01       | S/N                   | 94781  | 1227  | 0.9996           | 99.3    | 101.3 | 96.0  | 92.0  | 93.1  | 96.3   | 4.1         | 115.5            | 192.0 | 153.8   |    |
| 10  |         | 鶏卵(LOQ)   | 0.01         |           | 0.01       | S/N                   | 123057 | -334  | 0.9999           | 99.4    | 100.2 | 99.9  | 98.7  | 99.6  | 99.6   | 0.6         | 191.6            | 261.2 | 226.4   |    |

\*1 S/Nを求める必要がある場合には「S/N」と表示される。

\*2 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を求める。

### 3) 試料マトリックスの測定への影響

試料マトリックスの測定への影響について検討した結果を表 8 に示した。添加回収試験における回収率 100%相当濃度になるように調製した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比を求めた。定量限界相当濃度における面積比は 0.95~1.05 であった。また、基準値相当濃度における面積比は 0.98~1.02 であり、試料マトリックスの測定への影響はほとんどみられなかった。

添加回収試験における真度を表 8 で求めたピーク面積比で除して補正真度を求め、表 9 に示した。補正真度は 93.5~110.5%であり、試料マトリックスの影響を考慮した場合でも良好な結果が得られた。

表 8 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 (mg/kg) | 基準値 (ppm) | 添加濃度 (ppm) | 標準溶液濃度 <sup>*1</sup> (mg/L) | ピーク面積(高さ) <sup>*2</sup> |                    |                            |       |       |        |       |       |                          | 備考 |
|-----|---------|-----------|--------------|-----------|------------|-----------------------------|-------------------------|--------------------|----------------------------|-------|-------|--------|-------|-------|--------------------------|----|
|     |         |           |              |           |            |                             | 面積又は高さの別                | ブランク <sup>*3</sup> | マトリックス添加標準溶液 <sup>*4</sup> |       |       | 溶媒標準溶液 |       |       | ピーク面積(高さ)比 <sup>*5</sup> |    |
|     |         |           |              |           |            |                             |                         |                    | n=1                        | n=2   | 平均    | n=1    | n=2   | 平均    |                          |    |
| 1   | ラサロンド   | 牛の筋肉(MRL) | 0.01         | 0.02      | 0.02       | 0.01                        | 面積                      | 0                  | 26817                      | 26350 | 26584 | 25529  | 26653 | 26091 | 1.02                     |    |
| 2   |         | 牛の脂肪(MRL) | 0.01         | 0.02      | 0.02       | 0.01                        | 面積                      | 0                  | 27720                      | 26970 | 27345 | 26837  | 26670 | 26754 | 1.02                     |    |
| 3   |         | 牛の肝臓(MRL) | 0.01         | 0.7       | 0.7        | 0.007                       | 面積                      | 0                  | 17209                      | 17243 | 17226 | 17856  | 17159 | 17508 | 0.98                     |    |
| 5   |         | 牛乳        | 0.01         | 0.01      | 0.01       | 0.01                        | 面積                      | 0                  | 20768                      | 21046 | 20907 | 20828  | 21124 | 20976 | 1.00                     |    |
| 6   |         | 鶏卵(MRL)   | 0.01         | 0.2       | 0.2        | 0.01                        | 面積                      | 0                  | 22756                      | 22743 | 22750 | 22811  | 22883 | 22847 | 1.00                     |    |
| 7   |         | 牛の筋肉(LOQ) | 0.01         |           | 0.01       | 0.01                        | 面積                      | 0                  | 25331                      | 25348 | 25340 | 26214  | 27365 | 26790 | 0.95                     |    |
| 8   |         | 牛の脂肪(LOQ) | 0.01         |           | 0.01       | 0.01                        | 面積                      | 0                  | 29701                      | 28291 | 28996 | 28301  | 27159 | 27730 | 1.05                     |    |
| 9   |         | 牛の肝臓(LOQ) | 0.01         |           | 0.01       | 0.01                        | 面積                      | 0                  | 20532                      | 20767 | 20650 | 20282  | 19854 | 20068 | 1.03                     |    |
| 10  |         | 鶏卵(LOQ)   | 0.01         |           | 0.01       | 0.01                        | 面積                      | 0                  | 23583                      | 23169 | 23376 | 23179  | 23203 | 23191 | 1.01                     |    |

\*1 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。

\*2 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。)

\*3 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。

\*4 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。

\*5 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。

表 9 補正真度

| 分析対象化合物 | 食品名        | 添加濃度<br>(ppm) | 真度 (%) | 補正真度 (%) |
|---------|------------|---------------|--------|----------|
| ラサロシド   | 牛の筋肉 (MRL) | 0.02          | 104.1  | 102.1    |
|         | 牛の脂肪 (MRL) | 0.02          | 98.0   | 96.1     |
|         | 牛の肝臓 (MRL) | 0.7           | 95.7   | 97.7     |
|         | 牛乳         | 0.01          | 99.9   | 99.9     |
|         | 鶏卵 (MRL)   | 0.2           | 99.4   | 99.4     |
|         | 牛の筋肉 (LOQ) | 0.01          | 105.0  | 110.5    |
|         | 牛の脂肪 (LOQ) | 0.01          | 108.9  | 103.7    |
|         | 牛の肝臓 (LOQ) | 0.01          | 96.3   | 93.5     |
|         | 鶏卵 (LOQ)   | 0.01          | 99.6   | 98.6     |

#### 4. 考察

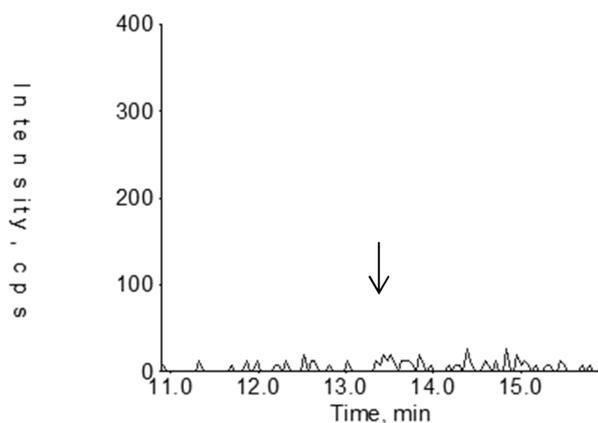
開発した試験法を用いて、牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳及び鶏卵の添加回収試験を行った結果、いずれの食品においてもラサロシドの定量を妨害するピークやマトリックスの影響はみられず、真度及び併行精度はいずれの化合物においても、定量限界相当では真度 70~120%、併行精度 (RSD) <25%、基準値相当では真度 70~120%、併行精度 (RSD) <10%という目標値を満たしていたことから、本試験法は、牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳及び鶏卵の畜産物に適用可能であると判断された。

#### [結論]

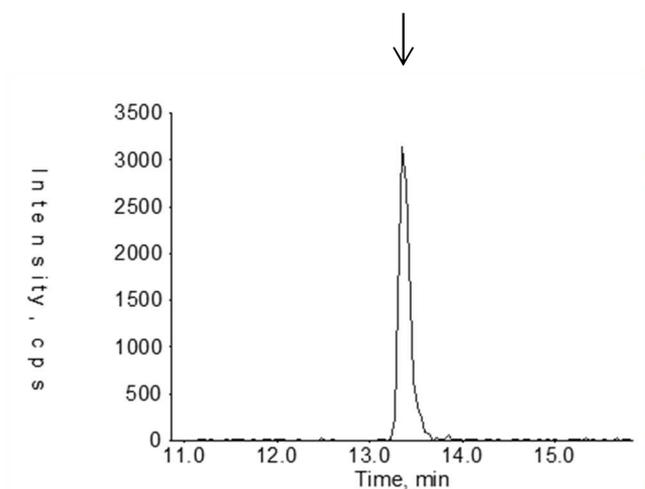
畜産物中のラサロシド試験法として、ラサロシドを試料からメタノールで抽出し、陰イオン交換体ミニカラムとジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムで精製を行い、LC-MS/MS で定量及び確認する方法を開発した。

牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳及び鶏卵に適用した結果、いずれの化合物においても選択性には問題なく、真度、併行精度、S/N の目標値を満足する良好な結果が得られた。

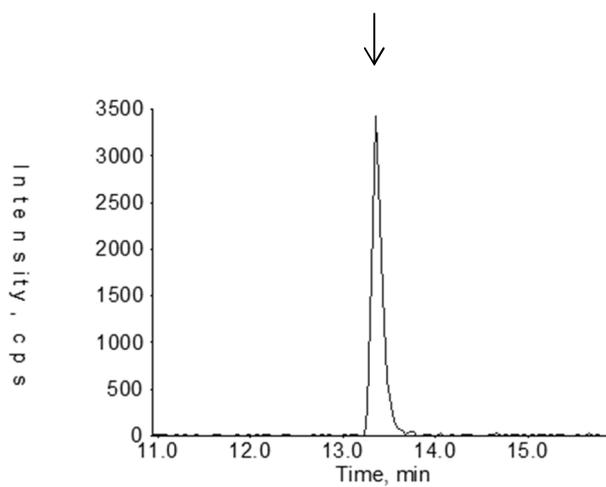
ブランク試料



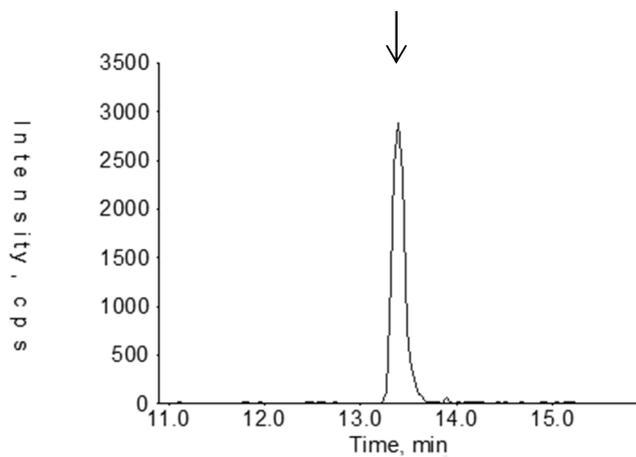
添加試料 (試料中 0.01 ppm 相当)



標準溶液 (0.2 μg/L)



添加試料 (試料中 0.02 ppm 相当、2 倍希釈)



標準溶液 (0.2 μg/L)

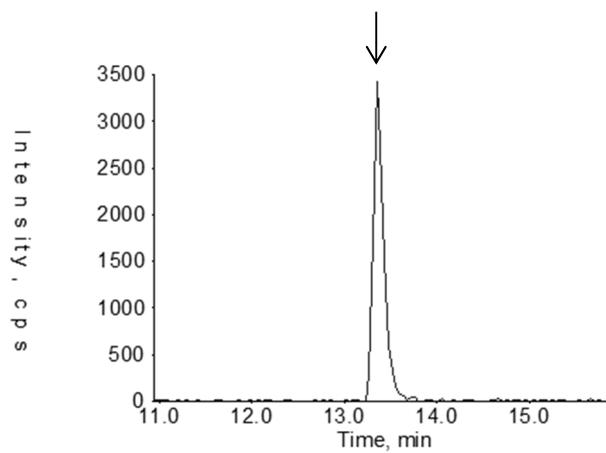
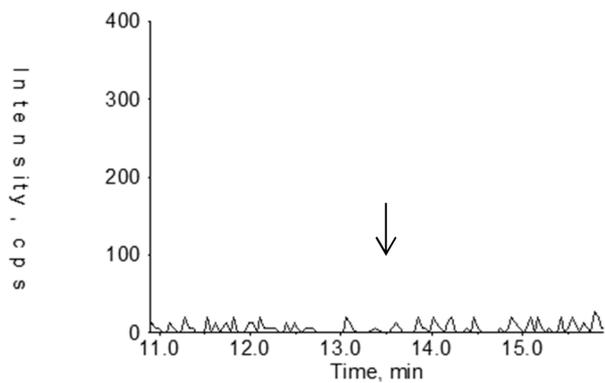


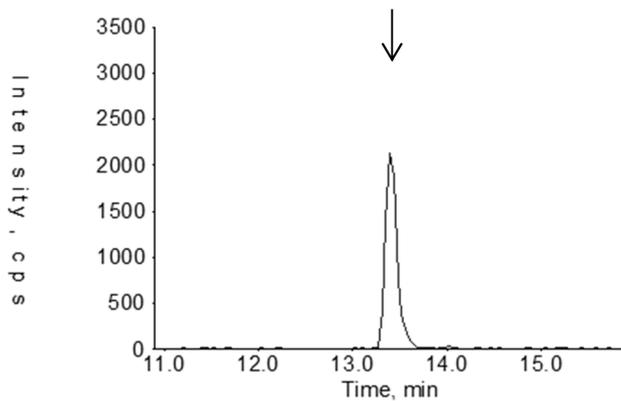
図5 ラサロシドの SRM クロマトグラム ( $m/z$  590.2→235.0)

試料：牛の筋肉

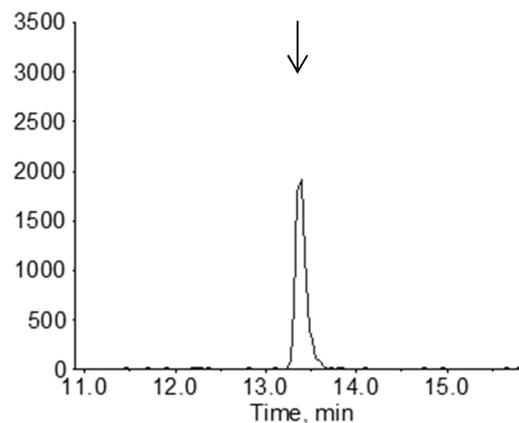
ブランク試料



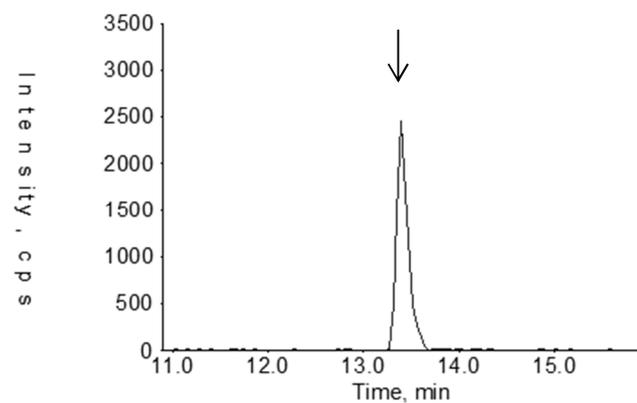
添加試料 (試料中 0.01 ppm 相当)



標準溶液 (0.2 μg/L)



添加試料 (試料中 0.02 ppm 相当、2 倍希釈)



標準溶液 (0.2 μg/L)

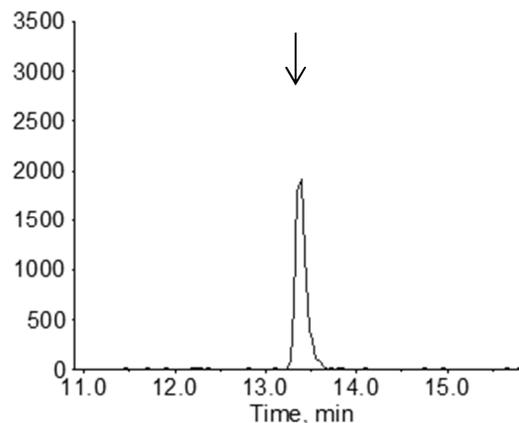
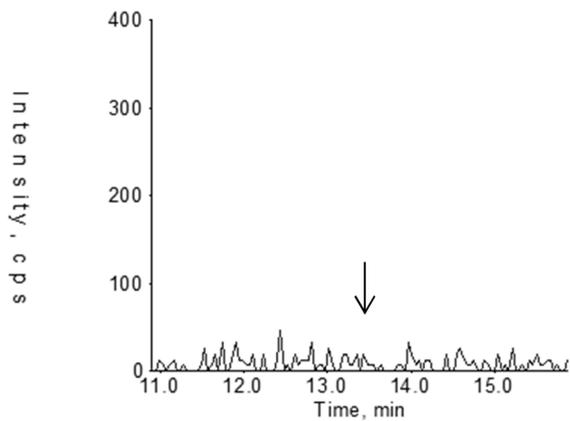


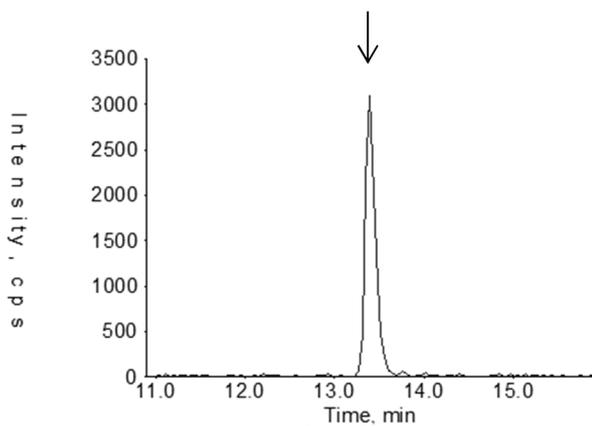
図6 ラサロシドの SRM クロマトグラム ( $m/z$  590.2→235.0)

試料：牛の脂肪

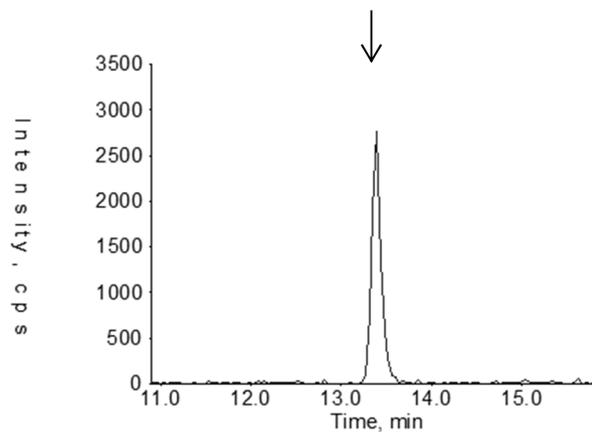
ブランク試料



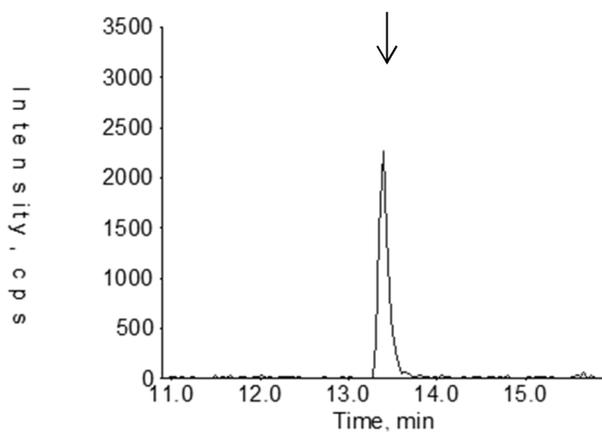
添加試料 (試料中 0.01 ppm 相当)



標準溶液 (0.2 μg/L)



添加試料 (試料中 0.7 ppm 相当、100 倍希釈)



標準溶液 (0.14 μg/L)

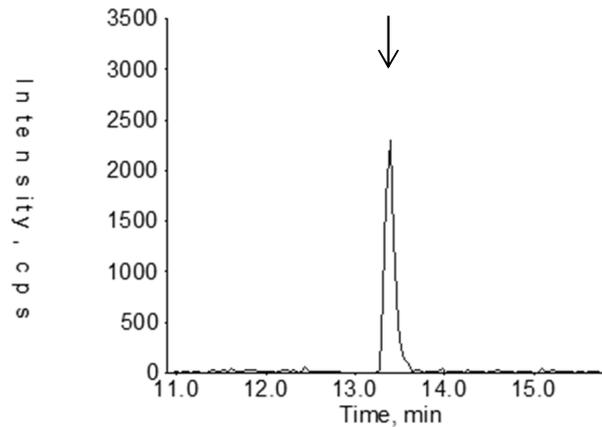
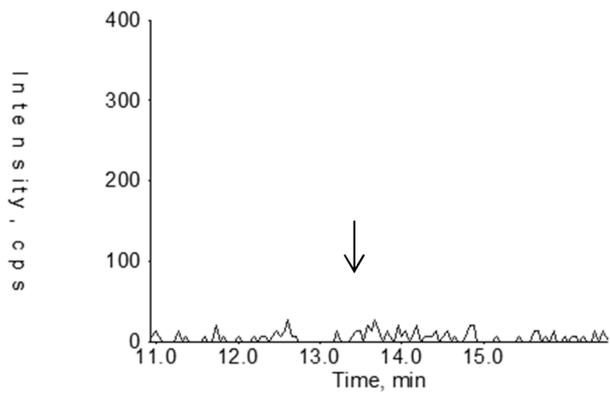


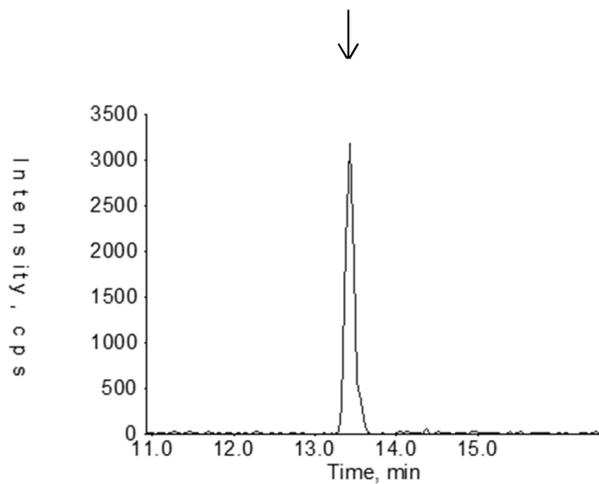
図7 ラサロシドの SRM クロマトグラム ( $m/z$  590.2→235.0)

試料：牛の肝臓

ブランク試料



添加試料 (試料中 0.01 ppm 相当)



標準溶液 (0.2 μg/L)

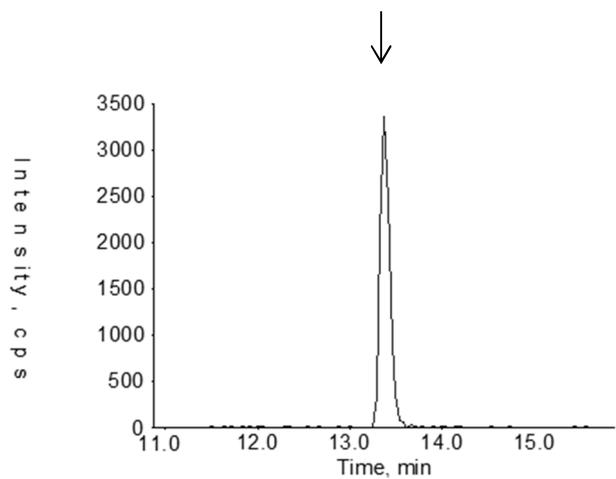
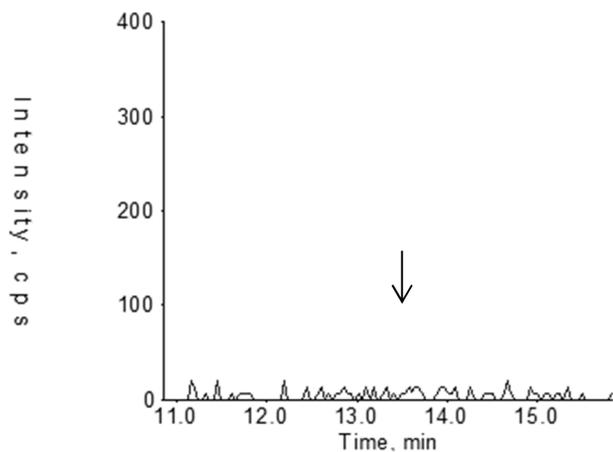
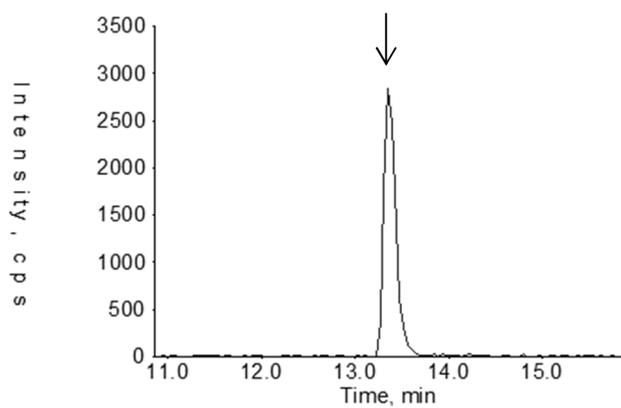


図 8 ラサロシドの SRM クロマトグラム ( $m/z$  590.2→235.0)  
試料：牛乳

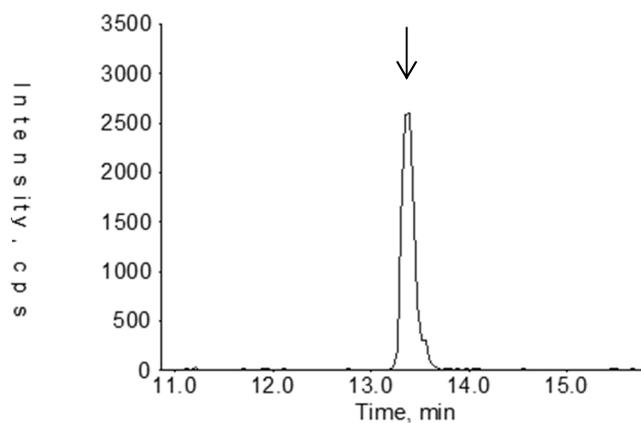
ブランク試料



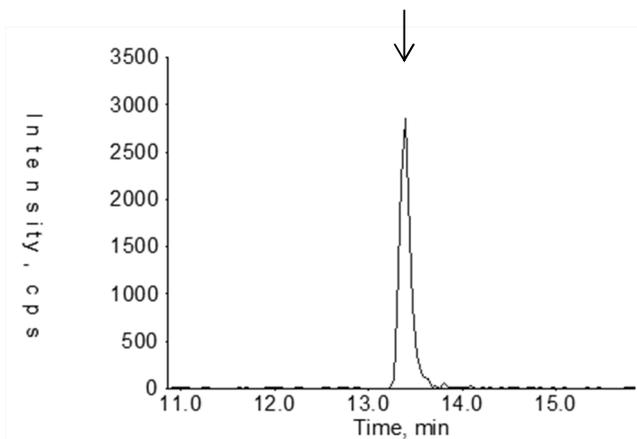
添加試料 (試料中 0.01 ppm 相当)



標準溶液 (0.2 μg/L)



添加試料 (試料中 0.2 ppm 相当、20 倍希釈)



標準溶液 (0.2 μg/L)

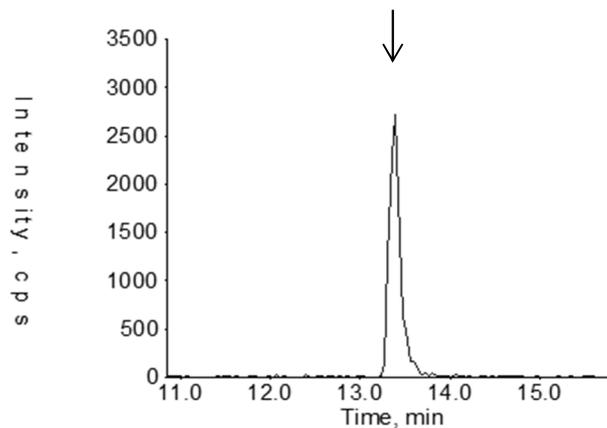
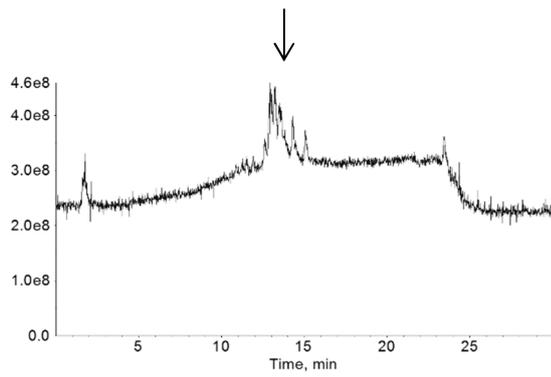


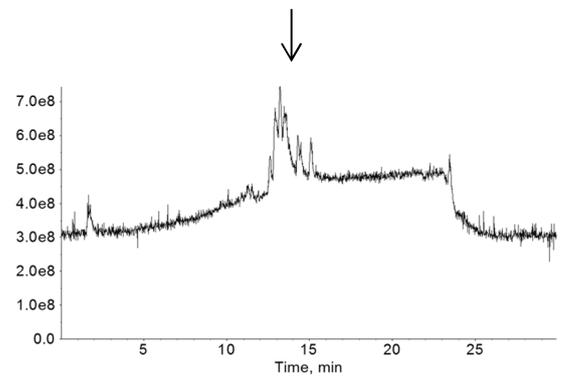
図9 ラサロシドの SRM クロマトグラム ( $m/z$  590.2→235.0)

試料：鶏卵

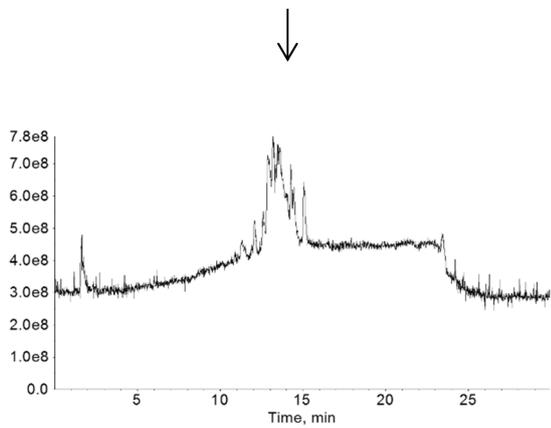
牛の筋肉



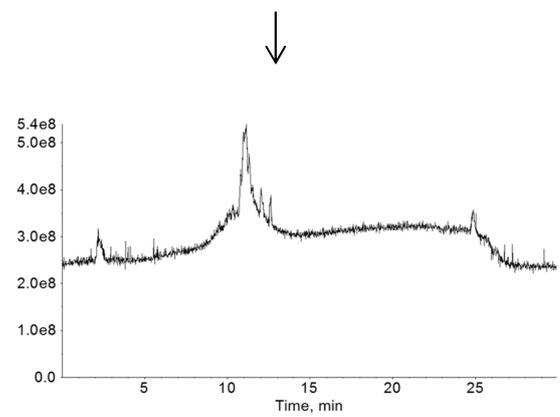
牛の脂肪



牛の肝臓



牛乳



鶏卵

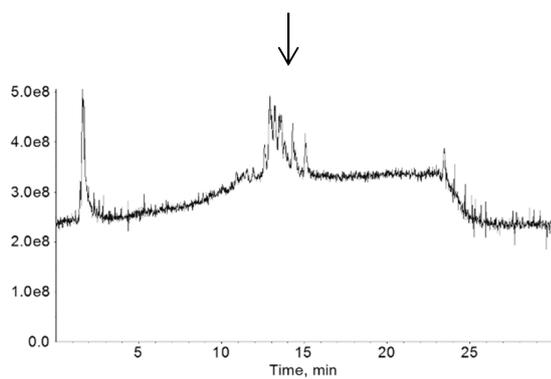


図 10 ブランク試料のフルスキャン測定におけるトータルイオンクロマトグラム  
(ポジティブイオンモード、スキャン範囲：50～700 amu)