

※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 26 年度

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

ジルパテロール試験法（畜産物）

ジルパテロール試験法（畜水産物）の検討結果

[緒言]

1. 目的

ジルパテロールは β_2 -アドレナリン作動薬であり、脂肪蓄積の抑制、脂肪代謝回転の亢進、グリコーゲン分解及びタンパク質合成を介した筋肉増大作用により、牛の飼育成績の改善及び枝肉組成に影響を及ぼす栄養再分配剤である。

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、畜産物中のジルパテロール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： ジルパテロール

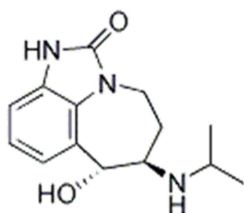
IUPAC 名：(±)-*trans*-4, 5, 6, 7-tetrahydro-7-hydroxy-6-(isopropylamino)imidazo

[4, 5, 1-*jk*][1]benzazepin-2(1*H*)-one

CAS 名：(6*R*, 7*R*)-*rel*-4, 5, 6, 7-tetrahydro-7-hydroxy-6-[(1-methylethyl)amino]imidazo

[4, 5, 1-*jk*][1]benzazepin-2(1*H*)-one

構造式：



分子式：C₁₄H₁₉N₃O₂

分子量：261.32

以下、塩酸塩としての物性

外観：黄白色固体

融点：>200°C

蒸気圧：8×10⁻⁶ Pa (25°C)

溶解性：水 150 g/L (20°C)、メタノールにわずかに可溶、クロロホルム、エタノール、アセトン、トルエンに不溶

1-オクタノール/水分配係数 (log P_{ow})：<1 (25°C)

安定性：光分解性 53 日(pH 4)、61 日(pH 5)、28 日(pH 9)

出典：ENVIRONMENTAL ASSESSMENT, ZILPATEROL HYDROCHLORIDE TYPE A MEDICATED ARTICLE (PREMIX) IN CONFINEMENT CATTLE (Food and Drug Administration)

3. 基準値 (案)：0.01 ppm (牛の筋肉・脂肪・肝臓・腎臓・食用部分)

[実験方法]

1. 試料

すべて東京都内の小売店で購入した。また、試料の調製方法を以下に記載した。

(1) 牛の筋肉

可能な限り脂肪層を除き、細切りした後、200 g を量り採り、0.6 mol/L 塩酸・エタノール及び水 (1 :

1) 混液溶液 100 g を加え、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、200 g を量り採り、0.6 mol/L 塩酸・エタノール及び水 (1 :

1) 混液溶液 100g を加え、フードプロセッサーを用いて均一化した。

(3) 牛の肝臓及び腎臓

試料を細切した後、200 g を量り採り、0.6 mol/L 塩酸・エタノール及び水 (1 : 1) 混液溶液 100g を加え、フードプロセッサーを用いて均一化した。

(4) 鶏卵

殻を除去し、卵白と卵黄を合わせて約 200 g を量り採り、試料に対し重量比で 1/2 量の 0.6 mol/L 塩酸・エタノール及び水 (1 : 1) 混液溶液を加え、フードプロセッサーを用いて均一化した。

(5) 牛乳

よく混合して均一化した。

以下、脂肪層や筋肉層などの不要な部分を除去して細切したものを試料とし、試料に 0.6 mol/L 塩酸・エタノール及び水 (1 : 1) 混液溶液を加えて均一化したものを調製試料とする。

2. 試薬・試液

ジルパテロール塩酸塩標準品：純度 99.3%、融点 230°C (SigmaAldrich 社製)

アセトニトリル、エタノール、*n*-ヘキサン：残留農薬試験用 (関東化学(株)製)

アセトニトリル：LC/MS 用 (関東化学(株)製)

ギ酸：高速液体クロマトグラフ用 (和光純薬工業(株)製)

ミニカラム：Inert Sep C18 (1 g/6 mL) (ジーエルサイエンス(株)製)

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

エタノール及び水 (1 : 1) 混液

エタノール 500 mL 及び水 500 mL を混合した。

0.6 mol/L 塩酸・エタノール及び水 (1 : 1) 混液溶液

塩酸 50 mL にエタノール及び水 (1 : 1) 混液を加えて 1000 mL とした。

1.2 mol/L 塩酸

塩酸 10 mL に水を加えて 100 mL とした。

アセトニトリル及び水 (1 : 1) 混液

アセトニトリル 500 mL と水 500 mL を混合した。

アセトニトリル及び水 (1 : 9) 混液

アセトニトリル 100 mL と水 900 mL を混合した。

25%アンモニア水及びアセトニトリル (1 : 99) 混液

25%アンモニア水 5 mL と水 495 mL を混合した。

標準原液： ジルパテロール塩酸塩標準品 11.4 mg を精秤し、メタノールで 100 mL に溶解してジルパテロール 100 mg/L 溶液を調製した。

検量線用標準溶液： 標準原液をアセトニトリル及び水 (1 : 9) 混液で適宜希釈し、0.000625~0.00375 mg/L の濃度の溶液を調製した。

添加用標準溶液： 標準原液をアセトンで希釈して 0.1 mg/L 溶液を調製した。

3. 装置

ホモジナイザー： マルチディスパーサー 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： ユニバーサル冷却遠心機 5930 (久保田商事(株)製)

LC-MS/MS

装置	型式	会社
MS	API4000QTRAP	AB SCIEX
LC	Prominence	島津製作所
データ処理	Analyst Software	AB SCIEX

4. 測定条件

LC-MS/MS

LC 条件			
カラム	Inertsil ODS-4 (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm : ジーエルサイエンス(株)製)		
移動相流速 (mL/min)	0.20		
注入量 (μL)	5		
カラム温度 (°C)	40		
移動相	A 液 : 0.1vol% ギ酸溶液 B 液 : アセトニトリル		
グラジエント条件	時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)
	0.0	98	2
	10.0	20	80
	20.0	20	80
	20.1	98	2
	30.0	98	2
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)	5500
脱溶媒温度 (°C)	500
ネブライザーガス	窒素、30 psi
脱溶媒ガス	窒素、50 psi
コリジョンガス	窒素
定量イオン (m/z)	+262.2→185.0 [コーン電圧 : 31 (V)、コリジョンエネルギー 33 (eV)]
定性イオン (m/z)	+262.2→244.2 [コーン電圧 : 31 (V)、コリジョンエネルギー 19 (eV)]
保持時間 (min)	6.0

5. 定量

ジルパテロール標準原液をアセトニトリル及び水 (1 : 9) 混液で希釈して 0.000625、0.00125、0.001875、0.0025、0.003125 及び 0.00375 mg/L の標準溶液を調製した。この溶液 5 μ 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 5 μ 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ジルパテロールの含量を算出した。

6. 添加試料の調製

牛の筋肉、脂肪、肝臓、腎臓及び鶏卵 (添加濃度 : 0.01 ppm) : 試料 10.0 g 相当量 (調製試料 15.0 g) に添加用標準溶液 1 mL を添加しよく混合した後、30 分間放置した。

牛乳 (添加濃度 : 0.01 ppm) : 試料 10.0 g に添加用標準溶液 1 mL を添加しよく混合した後、30 分間放置した。

7. 試験溶液の調製

概要

ジルパテロールを塩酸酸性下、試料から *n*-ヘキサン存在下、アセトニトリルで抽出した。オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム及び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で精製し、LC-MS/MS で定量及び確認した。

(1) 抽出

a 牛の筋肉、脂肪、肝臓、腎臓及び鶏卵の場合

試料 10.0 g 相当量を 250 mL 遠心管に採り、*n*-ヘキサン 50 mL を加えホモジナイズし、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 50 mL を加えてさらにホモジナイズした後、毎分 3000 回転で 5 分間遠心分離した。上清を綿栓ろ過して 100 mL 分液漏斗に移し、アセトニトリル層を 100 mL メスフラスコに分取した。*n*-ヘキサン層と残留物を合わせ、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 25 mL を加えてホモジナイズした後、毎分 3000 回転で 5 分間遠心分離した。上清を綿栓ろ過して 100 mL 分液漏斗に移し、アセトニトリル層を 100 mL メスフラスコに合わせ、アセトニトリルを加えて正確に 100 mL

とした。

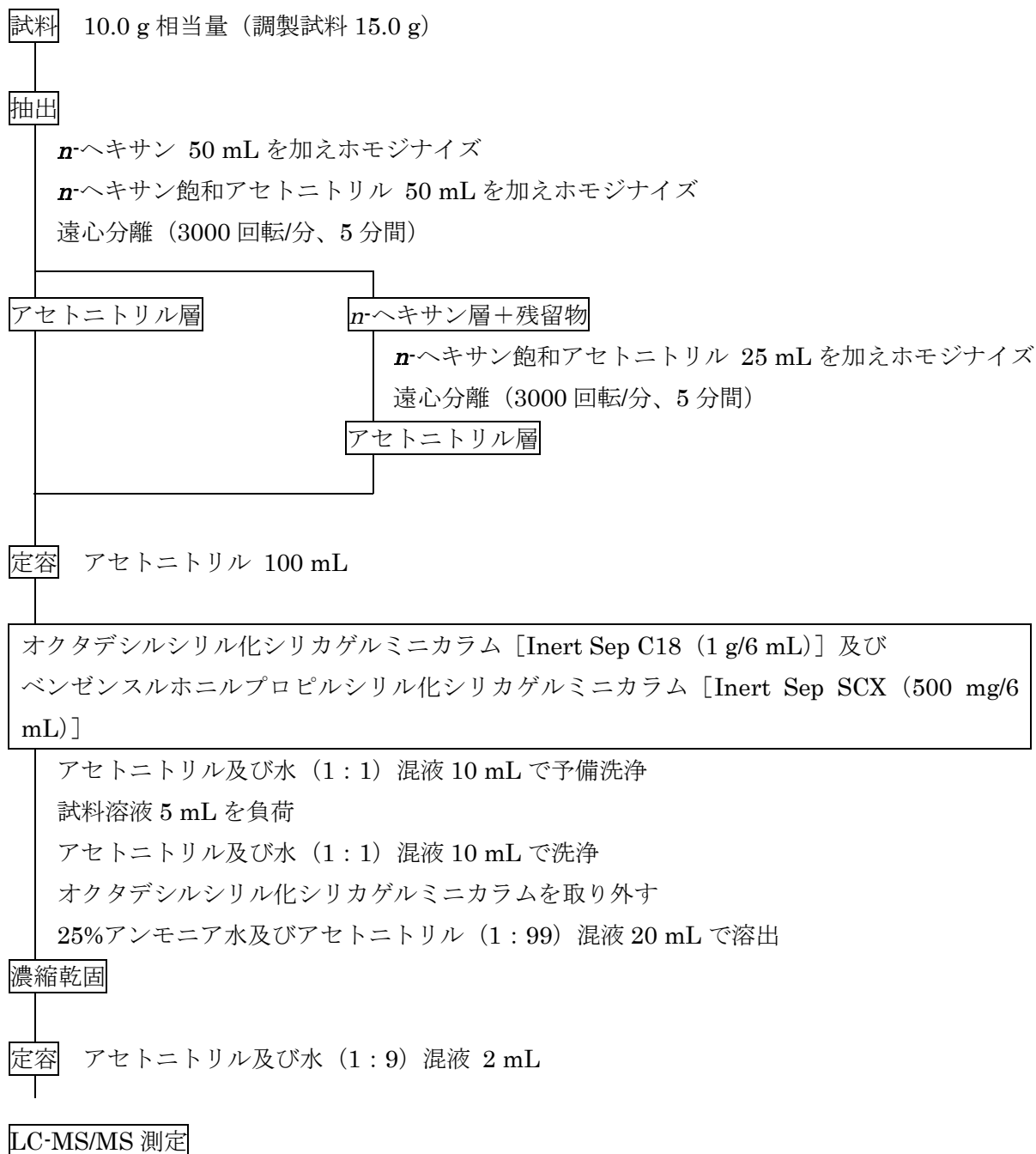
b 牛乳の場合

試料 10.0 g を 250 mL 遠心管に採り、1.2 mol/L 塩酸 2.5 mL 及び *n*-ヘキサン 50 mL を加えホモジナイズし、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 50 mL を加えてさらにホモジナイズした後、毎分 3000 回転で 5 分間遠心分離した。上清を綿栓ろ過して 100 mL 分液漏斗に移し、アセトニトリル層を 100 mL メスフラスコに分取した。*n*-ヘキサン層と残留物を合わせ、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 25 mL を加えてホモジナイズした後、毎分 3000 回転で 5 分間遠心分離した。上清を綿栓ろ過して 100 mL 分液漏斗に移し、アセトニトリル層を 100 mL メスフラスコに合わせ、アセトニトリルを加えて正確に 100 mL とした。

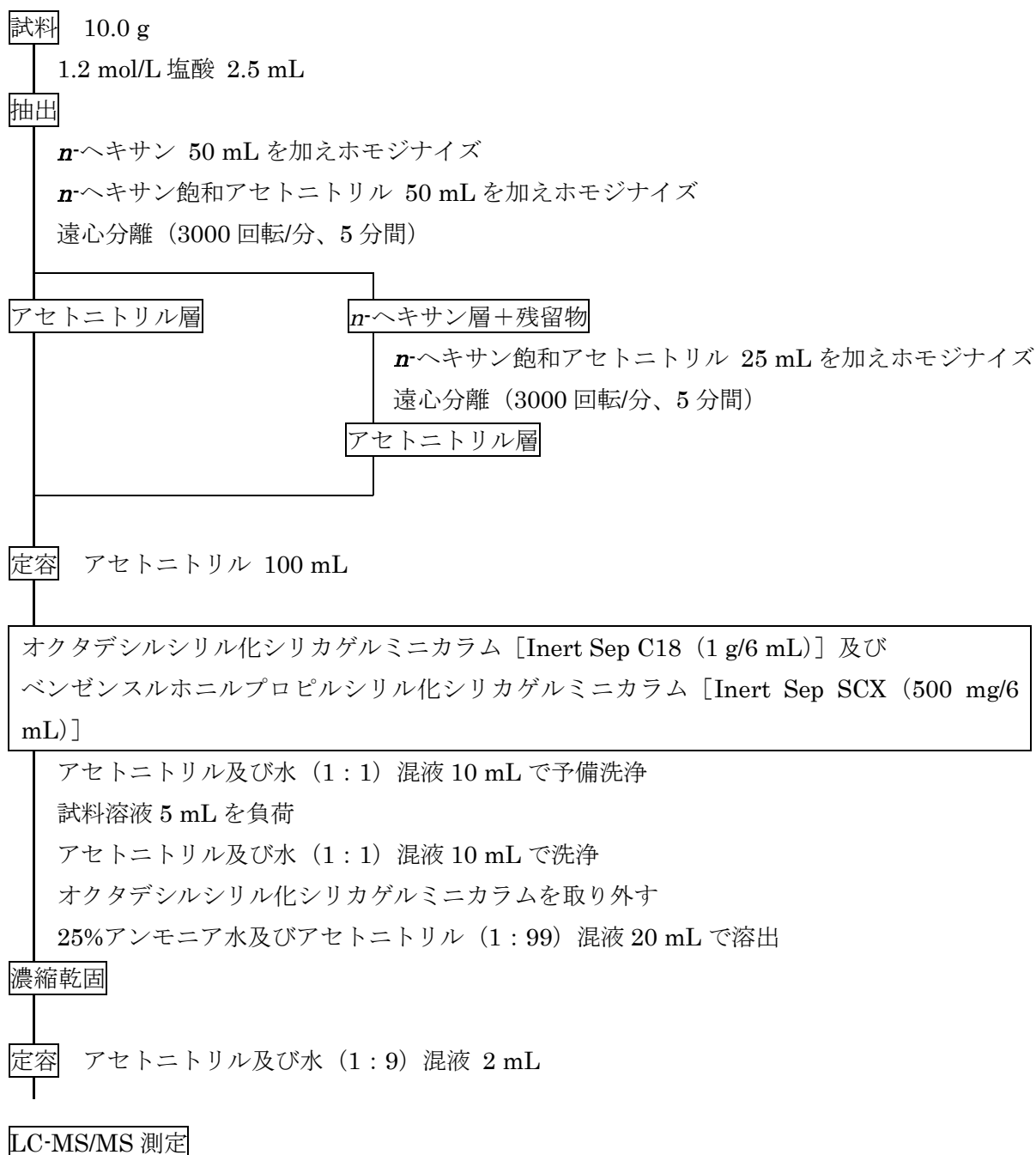
(2) 精製

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム [Inert Sep C18 (1 g/6 mL)] 及び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 [Inert Sep SCX (500 mg/6 mL)] にアセトニトリル及び水 (1 : 1) 混液 10 mL を注入し、流出液は捨てた。オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムの下部に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を接続し、(1) で得られた溶液を 5 mL 注入した後、アセトニトリル 及び水 (1 : 1) 混液 10 mL を注入し、流出液を捨てた。上部のオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムを取り外し、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に 25%アンモニア水及びアセトニトリル (1 : 99) 混液 20 mL を注入し、溶出液を 40°C以下で減圧濃縮し溶媒を除去した。この残留物をアセトニトリル及び水 (1 : 9) 混液に溶解し正確に 2 mL としたものを試験溶液とした。

[分析法フローチャート (牛の筋肉、脂肪、肝臓、腎臓及び鶏卵)]



[分析法フローチャート (牛乳)]



8. 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 (0.0025 mg/L) 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、ESI (+) モードではジルパテロールのプロトン付加分子である m/z 262.2 $[M+H]^+$ が検出されたが、ESI (-) モードではジルパテロールに由来するイオンが検出されなかったことから、測定には ESI (+) モードを用いることとした。

ESI (+) モードで、アセトニトリル及び 0.1vol% ギ酸 (1 : 1) 混液を移動相としてフローインジェクションにて測定を行ったところ、ジルパテロールのプロトン付加分子である m/z 262.2 $[M+H]^+$ が検出された為、 m/z 262.2 $[M+H]^+$ をプリカーサーイオンとした。このときのマススペクトルを図 1 に示した。

ジルパテロールのプロトン付加分子 (m/z 262.2 $[M+H]^+$) 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 244.2 が非常に高い強度で検出され、次いで m/z 185.0、202.2 が検出された。しかし、実サンプルの測定において、 m/z 244.2 は夾雑ピークが多く観測されたため、 m/z 185.0 を定量イオンとし、強度の高い m/z 244.2 及び夾雑ピークの少ない m/z 202.2 を定性イオンとした。

以上のことから、ESI (+) モードで測定し、 m/z +262.2 \rightarrow 185.0 を定量用、 m/z +262.2 \rightarrow 244.2 及び 202.2 を定性用の測定イオンとした。

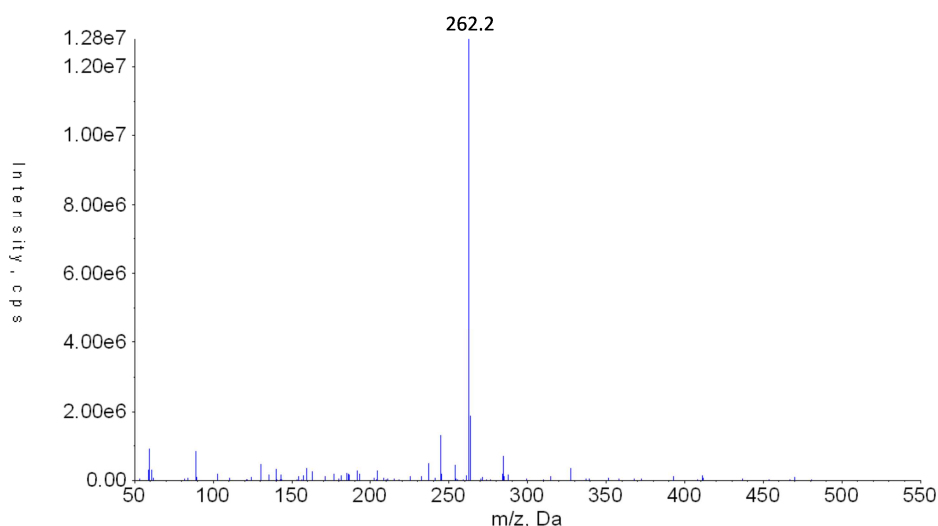


図 1 ジルパテロール標準溶液のマススペクトル
スキャン範囲 : 50~550amu
測定条件 : ESI+, CV=31 V
(CV : corn voltage)

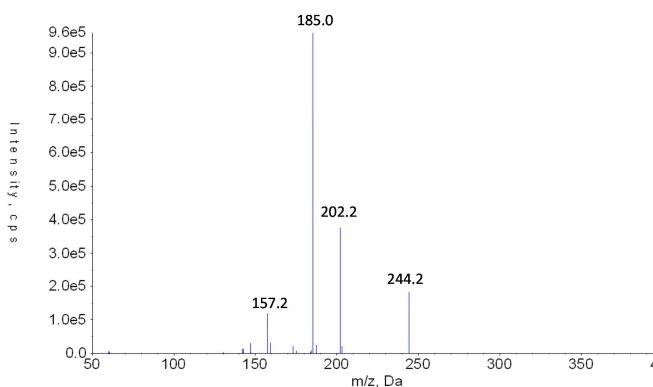


図 2 ジルパテロールの

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 : m/z 262.2

測定条件 : ESI+, CV=31 V, CE= 33 eV

(CV : corn voltage, CE=collision energy)

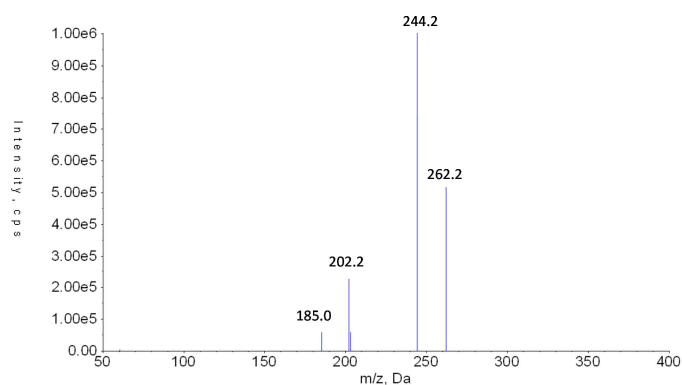


図 3 ジルパテロールの

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 : m/z 262.2

測定条件 : ESI+, CV=31 V, CE=19 eV

(CV : corn voltage, CE=collision energy)

(2) LC 条件の検討

分析カラムについてオクタデシルシリル化シリカゲルカラム [Inertsil ODS-4 (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μ m)] を用いて検討を行ったところ、良好な結果 (ピーク形状、分離、再現性、感度) が得られたので、オクタデシルシリル化シリカゲルカラムを使用することにした。

アセトニトリル - ギ酸及びアセトニトリル - 酢酸の 2 系統の移動相条件について、各 3 種の酸添加濃度 (0.05、0.1 及び 0.2vol%) を検討し、最も良好な感度を得られたアセトニトリル - 0.1vol%ギ酸を移動相に選択した。

(3) 検量線

図 4 に検量線の例を示した。0.000625~0.00375 mg/L の濃度範囲で作成した検量線の相関係数は、いずれの食品においても 0.999 以上であり良好な直線性を示した。

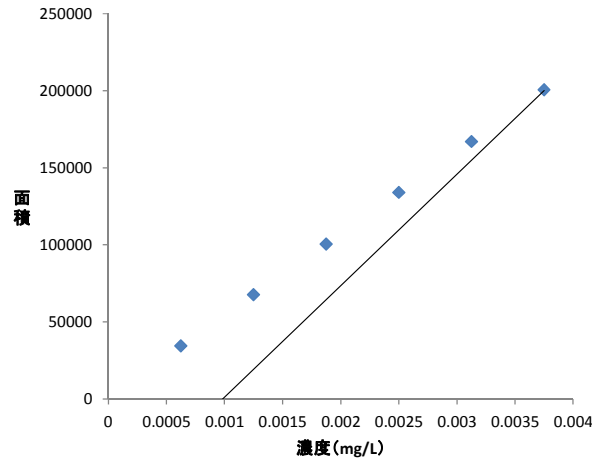


図 4 ジルパテロール検量線の例

$$y = 53100x + 960 \quad r=1.0000$$

2. 試験溶液調製法の検討

(1) 抽出溶媒の検討

牛の脂肪について、アセトン、メタノール、アセトン及び *n*-ヘキサン (1:2) 混液、ヘキサン存在下アセトニトリルを用い、添加回収試験を行った。40℃以下で融解した脂肪に標準溶液を添加し、再凝固させた後 30 分放置してから各溶媒を加え抽出を行った。なお、アセトニトリル及び *n*-ヘキサンは同時に加えて抽出を行った。回収率はアセトン、メタノール、アセトン及び *n*-ヘキサン (1:2) 混液を用いた場合にはそれぞれ 80.5%、23.5%、29.5% (マトリックス補正值) と低かったが、ヘキサン存在下アセトニトリルを用いた場合には 98.9% (マトリックス補正值) と良好な回収率が得られたことから、ヘキサン存在下アセトニトリルで抽出を行うこととした。次に、ヘキサン存在下アセトニトリルを用いて、牛の筋肉、脂肪、肝臓、腎臓、牛乳及び鶏卵で添加回収試験を行った。結果は表 1 に示したとおり、牛の肝臓、腎臓及び牛乳では回収率が低かった。また、牛乳では抽出時に白色の固形物が析出して容器内壁に付着し、溶媒中に均一に分散しなかった。

表 1 抽出溶媒の検討結果

	回収率 (%) () 内は補正值				マトリックス 影響*
	n=1	n=2	n=3	平均	
牛の筋肉	86.7	85.1	85.9	85.9 (96.0)	0.895
牛の脂肪	103.5	96.2	94.7	98.1 (98.9)	0.992
牛の肝臓	31.0	36.7	32.8	33.5 (50.3)	0.666
牛の腎臓	53.5	56.7	60.1	56.8(62.1)	0.914
牛乳	79.4	80.2	76.9	78.8(77.0)	1.024
鶏卵	100.4	107.1	100.7	102.7 (100.8)	1.019

*マトリックス影響：マトリックス標準のピーク面積/同一濃度の溶媒標準のピーク面積

添加量：0.01 ppm 相当

(2) 試料調製法の検討

①牛の肝臓及び腎臓

牛の肝臓及び腎臓における回収率の低下の原因として、酵素などによりジルパテロールの分解が起きている可能性が考えられた。そこで、試料調製時の分解を抑制する手法として、酸の添加を試みた。

まず、肝臓試料について、ギ酸及び塩酸を用いて添加する酸の濃度が回収率に与える影響を確認した。ギ酸及び塩酸にエタノール及び水（1：1）混液を加えて1、3、5及び10vol%となるよう調製した溶液（以下、それぞれギ酸 - エタノール - 水混液及び塩酸 - エタノール - 水混液とする）を調製した。肝臓試料 10.0 g に調製したそれぞれの酸 - エタノール - 水混液を 3 g 加えて攪拌した。ここにジルパテロール 0.1 ppm 相当を添加し 30 分間放置した。*n*-ヘキサン 50 mL を加えホモジナイズし、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 50 mL を加えてさらにホモジナイズした後、毎分 3000 回転で 5 分間遠心分離した。上清を綿栓ろ過して 100 mL 分液漏斗に移し、アセトニトリル層を 100 mL メスフラスコに採った。*n*-ヘキサン層と残留物を合わせ、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 25 mL を加えてホモジナイズした後、毎分 3000 回転で 5 分間遠心分離した。上清を綿栓ろ過して 100 mL 分液漏斗に移し、アセトニトリル層を 100 mL メスフラスコに合わせ、アセトニトリルを加えて正確に 100 mL とした。ここから 1 mL を分取してアセトニトリル及び水（1：9）混液を加えて 10 mL に定容し、試験溶液とした。結果は表 2 に示したとおり、酸の添加により回収率の改善がみられた。

表 2 酸の種類、濃度が回収率に与える影響 (%)

酸の種類	濃度 (vol%)	回収率 (%)
添加なし	0	50.3
ギ酸	1	60.5
	3	60.7
	5	66.1
	10	68.1
塩酸	0.5	55.0
	1	66.5
	3	67.4
	5	76.4

肝臓試料 10.0 g に各濃度の酸 - エタノール - 水混液 3 g を添加

次に、回収率が比較的良好だった 10vol%ギ酸 - エタノール - 水混液、3vol%及び 5vol%塩酸 - エタノール - 水混液を用いて、酸の添加量が回収率に与える影響を確認した。

肝臓試料 10.0 g に 10vol%ギ酸 - エタノール - 水混液、3vol%及び 5vol%塩酸 - エタノール - 水混液を 3、5 及び 10 g 添加し、上記と同様に操作を行った。結果は表 3 に示したとおり、ギ酸 - エタノール - 水混液を添加した場合には良好な回収率が得られなかったのに対し、5vol%塩酸 - エタノール - 水混液を 5 g 添加した場合には 100.1%と良好な結果が得られた。また、添加量 3 g の場合には酸 - エタノール - 水混液と試料の混和が十分でないように見受けられ、10 g の場合には溶媒と試料

が分離した。これらのことから、ギ酸より塩酸の方が回収率改善に有効であり、添加量は 5 g が最適であると考えられた。

表 3 酸 - エタノール - 水混液の添加量が回収率に与える影響 (%)

添加溶液	回収率 (%)		
	3 g 添加	5 g 添加	10 g 添加
10vol%ギ酸 - エタノール - 水混液	68.1	80.6	41.5
3vol%塩酸 - エタノール - 水混液	67.4	81.6	91.8
5vol%塩酸 - エタノール - 水混液	76.4	100.1	89.9

次に、加える塩酸 - エタノール - 水混液の最適濃度の検討を行った。

肝臓試料 10.0 g に 1、3、5、10、15 及び 20vol% (0.12、0.36、0.6、1.2、1.8 及び 2.4 mol/L) 塩酸 - エタノール - 水混液を 5 g 加え、上記と同様に抽出操作を行った。結果は表 4 に示したとおり、5vol% の塩酸 - エタノール - 水混液を添加した場合に最も良好な回収率となった。また、10vol% 以上では試料と溶媒の分離がみられた。この結果から、添加する塩酸 - エタノール - 水混液の濃度は 5vol% (0.6 mol/L) が最適であると判断した。

表 4 塩酸 - エタノール - 水混液の濃度が回収率に与える影響

塩酸 - エタノール - 水混液の濃度		試料中濃度 (mol/kg)	回収率 (%)
vol%	mol/L		
1	0.12	0.06	81.0
3	0.36	0.18	90.3
5	0.6	0.3	95.0
10	1.2	0.6	83.7
15	1.8	0.9	89.4
20	2.4	1.2	75.4

肝臓試料 10.0 g に各濃度の塩酸 - エタノール - 水混液 5 g を添加

また、腎臓において 5vol% 塩酸 - エタノール - 水混液 5 g を添加した場合にも、回収率 97.7%(n=2) と良好な結果が得られた。

以上の結果より、牛の肝臓及び腎臓では前処理時に試料に対して 5vol% (0.6 mol/L) 塩酸 - エタノール - 水混液を重量比で 1/2 量加えることにより、回収率が改善することがわかった。

②牛の筋肉、脂肪、鶏卵及び牛乳

内臓における回収率の低下の問題が、塩酸添加により改善する傾向が確認された。試験操作をなるべく統一するためには、全ての食品において酸を添加するほうが望ましいと考えられる。そこで牛の筋肉、脂肪、鶏卵及び牛乳においても塩酸添加が可能であるか検討を行った。

a 牛の筋肉、脂肪及び鶏卵

試料 10.0 g に 5vol% (0.6 mol/L) 塩酸 - エタノール - 水混液を 5 g 添加し攪拌した後、ジルパテロール 0.1 ppm 相当を添加し 30 分間放置した。*n*-ヘキサン 50 mL を加えてホモジナイズし、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 50 mL を加えてさらにホモジナイズした後、毎分 3000 回転で 5 分間遠心分離した。上清を綿栓ろ過して 100 mL 分液漏斗に移し、アセトニトリル層を 100 mL メスフラスコに採った。*n*-ヘキサン層と残留物を合わせ、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 25 mL を加えてホモジナイズした後、毎分 3000 回転で 5 分間遠心分離した。上清を綿栓ろ過して 100 mL 分液漏斗に移し、アセトニトリル層を 100 mL メスフラスコに合わせ、アセトニトリルを加えて正確に 100 mL とした。ここから 1 mL を分取してアセトニトリル及び水 (1 : 9) 混液を加えて 10 mL に定容し、試験溶液とした。結果は表 5 に示したとおり、いずれの食品においても良好な回収率が得られた。

b 牛乳

牛乳 10.0 g にジルパテロール 0.1 ppm 相当を添加した後 30 分間放置した。ここに 10vol% (1.2 mol/L) 塩酸 2.5 mL 及び *n*-ヘキサン 50 mL を加えてホモジナイズし、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 50 mL を加えてさらにホモジナイズした後、毎分 3000 回転で 5 分間遠心分離した。上清を綿栓ろ過して 100 mL 分液漏斗に移し、アセトニトリル層を 100 mL メスフラスコに採った。*n*-ヘキサン層と残留物を合わせ、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 25 mL を加えてホモジナイズした後、毎分 3000 回転で 5 分間遠心分離した。上清を綿栓ろ過して 100 mL 分液漏斗に移し、アセトニトリル層を 100 mL メスフラスコに合わせ、アセトニトリルを加えて正確に 100 mL とした。ここから 1 mL を分取してアセトニトリル及び水 (1 : 9) 混液を加えて 10 mL に定容し、試験溶液とした。結果は表 5 に示したとおり、良好な回収率が得られた。また、抽出時には白い固形物の析出はみられるものの、溶媒中に均一に分散しており、抽出における問題点も改善された。

表 5 牛の脂肪、筋肉、鶏卵及び牛乳における塩酸添加の検討結果

試料	回収率 (%)	補正回収率 (%)	マトリックス影響*
牛の筋肉	85.9	95.3	0.902
牛の脂肪	96.2	110.2	0.873
鶏卵	76.2	92.2	0.826
牛乳	75.2	96.0	0.783

*マトリックス影響：マトリックス標準のピーク面積／同一濃度の溶媒標準のピーク面積
添加量：0.01 ppm 相当

なお、牛の筋肉、脂肪、肝臓、腎臓及び鶏卵 200 g に 5vol% (0.6 mol/L) 塩酸 - エタノール - 水混液 100 g を加えフードプロセッサーを用いて粉碎した場合において、分離することなく均一化できることも確認した。

(3) カラム精製の検討

① オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムによる精製 [Inert Sep C18 (1 g/6 mL)]

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムにおける溶出挙動の検討を行った。カラムを溶出溶媒 10 mL で予備洗浄した後、ジルパテロール 1 mg/L 溶液（溶媒組成は溶出溶媒と同じ）を 1 mL 負荷し、溶出溶媒を 5 mL ずつ流下して各分画を分取した。溶出溶媒にはアセトニトリル、アセトニトリル及び水（1：1）混液を用いた。結果は表 6 に示した。いずれの場合もジルパテロールは 10 mL で溶出されたが、より高い脱脂効果が期待されるアセトニトリル及び水（1：1）混液 10 mL で溶出することとした。

表 6 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

溶出溶媒量 (mL)	溶出率 (%)	
	アセトニトリル	アセトニトリル及び水 (1 : 1) 混液
0 - 5	94.0	96.1
5 - 10	7.8	8.1
10 - 15	<0.5	<0.5
15 - 20	<0.5	<0.5
計	101.8	104.2

添加量：1 µg（溶出溶媒 1 mL に溶解）

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による精製 [Inert Sep SCX (500 mg/6 mL)]

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である Inert Sep SCX (500 mg/6 mL) における溶出挙動の検討を行った。カラムを各溶出溶媒 10 mL で予備洗浄した後、1 mg/L 溶液（溶媒組成は溶出溶媒と同じ）を 1 mL 負荷し、溶出溶媒を 5 mL ずつ流下して各分画を分取した。溶出溶媒にはアセトニトリル、アセトニトリル及び水（1：1）混液、25%アンモニア水及びアセトニトリル（1：99）混液を用いた。このときの結果を表 7 に示す。

表 7 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からの溶出状況

溶出溶媒量 (mL)	溶出率 (%)		
	アセトニトリル	アセトニトリル及び水 (1 : 1) 混液	25%アンモニア水及びアセトニトリル (1 : 99) 混液
0 - 5	<0.5	<0.5	14.8
5 - 10	<0.5	<0.5	81.7
10 - 15	<0.5	<0.5	1.9
15 - 20	<0.5	<0.5	<0.5
計	0	0	98.4

添加量：1 µg（溶出溶媒 1 mL に溶解）

③ オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム [Inert Sep C18 (1 g/6 mL)] 及び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 [Inert Sep SCX (500 mg/6 mL)] 連結カラムによる精製

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム及び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連結カラムにおける溶出挙動の検討を行った。オクタデシルシリル化シリカゲル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を接続し、アセトニトリル 10 mL、アセトニトリル及び水 (1 : 1) 混液 10 mL で予備洗浄した後、ジルパテロール 1 mg/L 溶液 (アセトニトリル及び水 (1 : 1) 混液で調製) を 1 mL 負荷し、アセトニトリル及び水 (1 : 1) 混液を 5 mL ずつ計 10 mL 流下した。接続を外した後、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 25%アンモニア水及びアセトニトリル (1 : 99) 混液を 5 mL ずつ流下して各分画を分取した。このときの結果を表 8 に示す。ジルパテロールは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から 20 mL でほぼ全量溶出された。確認のため、接続解除後のオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムにもアセトニトリル及び水 (1 : 1) 混液を 5 mL ずつ計 10 mL 流下したところ、ジルパテロールは溶出されなかった。

以上の結果より、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム及び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連結カラムにアセトニトリル 及び水 (1 : 1) 混液 10 mL を注入した後、上部のオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムを取り外し、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から 25%アンモニア水及びアセトニトリル (1 : 99) 混液 20 mL で溶出を行うこととした。

表 8 オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム及び
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連結カラムからの溶出状況

溶出溶媒	溶出 溶媒量 (mL)	溶出率 (%)		
		連結カラム	連結解除後の 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	連結解除後の オクタデシルシリル化シ リカゲルミニカラム
アセトニトリル及び水 (1 : 1) 混液	0 - 5	<0.5	—	<0.5
	5 - 10	<0.5	—	<0.5
25%アンモニア水 及びアセトニトリル (1 : 99) 混液	0 - 5	—	1.4	—
	5 - 10	—	92.0	—
	10 - 15	—	1.7	—
	15 - 20	—	0.5	—
	20 - 25	—	<0.5	—
計		0	95.6	0

添加量：1 µg (アセトニトリル及び水 (1 : 1) 混液 1 mL に溶解)

—：分取できなかった分画

3. 添加回収試験

牛の筋肉、脂肪、肝臓、腎臓、牛乳及び鶏卵の6食品を試料に用いて、実験方法の「7. 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5~10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11に示した。

(1) 選択性

選択性の検討結果を表9に示した。検討を行ったいずれの試料においても、ジルパテロールの定量を妨害するピークは認められなかった。

表9 選択性の評価

担当機関: 東京顕微鏡院

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (mg/kg)	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 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 (b)	面積(高さ)比 (a)/(b)			
	ジルパテロール	牛の筋肉	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	115900	0.000	○	
	ジルパテロール	牛の脂肪	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	118700	0.000	○	
	ジルパテロール	牛の肝臓	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	116700	0.000	○	
	ジルパテロール	牛の腎臓	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	113200	0.000	○	
	ジルパテロール	牛乳	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	113400	0.000	○	
	ジルパテロール	鶏卵	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	115400	0.000	○	

*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象化合物は、添加濃度と評価対象濃度が異なるため、別途、定量限界濃度相当のマトリックス添加標準溶液を調製して評価する。

*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。

(1) 真度、精度

真度及び併行精度の検討結果を表10に示した。真度は74.8~90.8%、併行精度は1.4~7.0%であり、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946~1343であり、S/N ≥ 10を満足した。

表10 真度、精度及び定量限界の評価

担当機関: 東京顕微鏡院

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (mg/kg)	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	
	ジルパテロール	牛の筋肉	0.01	0.01	0.01		53100	2540	1.0000	79.5	79.2	79.9	81.6	82.4	80.5	1.7	1254.5	1063.8	1159.2	
	ジルパテロール	牛の脂肪	0.01	0.01	0.01		53100	960	1.0000	89.0	91.4	90.9	90.3	92.5	90.8	1.4	1097.6	1587.5	1342.6	
	ジルパテロール	牛の肝臓	0.01	0.01	0.01		49700	5780	0.9994	77.6	71.3	77.0	73.3	74.7	74.8	3.5	1046.9	844.1	945.5	
	ジルパテロール	牛乳	0.01	0.01	0.01		44100	-951	0.9990	82.8	82.4	81.5	83.3	79.4	81.9	1.9	1564.1	788.7	1176.4	
	ジルパテロール	鶏卵	0.01	0.01	0.01		46200	3020	0.9996	79.7	92.2	95.6	92.6	93.8	90.8	7.0	1166.5	727.8	947.2	

*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。

(2) 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 11 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。面積比は 0.83~0.91 であり、いずれも試料マトリックスの測定への影響は少なかった。

添加回収試験における真度を表 11 で求めたピーク面積比で除して補正真度を求め、表 12 に示した。補正真度は 87.0~103.2%であり、試料マトリックスの影響を考慮した場合でも目標値 70~120%を満足した。

表 11 試料マトリックスの測定への影響

担当機関: 東京顕微鏡院

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (mg/kg)	基準値 ¹ (ppm)	添加濃度 (ppm)	標準溶液 濃度 ² (mg/L)	ピーク面積 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 比 ⁶
									n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均		
	ジルパテロール	牛の筋肉	0.01	0.01	0.01	0.005	面積	0	115900	115000	115450.0	135500	133800	134650.0	0.86	
	ジルパテロール	牛の脂肪	0.01	0.01	0.01	0.005	面積	0	114900	118700	116800.0	128300	129600	128950.0	0.91	
	ジルパテロール	牛の肝臓	0.01	0.01	0.01	0.005	面積	0	116700	109900	113300.0	131900	131900	131900.0	0.86	
	ジルパテロール	牛の腎臓	0.01	0.01	0.01	0.005	面積	0	113200	104700	108950.0	135700	126700	131200.0	0.83	
	ジルパテロール	牛乳	0.01	0.01	0.01	0.005	面積	0	113400	112600	113000.0	133800	133600	133700.0	0.85	
	ジルパテロール	鶏卵	0.01	0.01	0.01	0.005	面積	0	114700	115400	115050.0	130200	132700	131450.0	0.88	

*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。

表 12 補正真度

分析対象化合物	真度 (%)	補正真度 (%)
牛の筋肉	80.5	93.6
牛の脂肪	90.8	99.8
牛の肝臓	74.8	87.0
牛の腎臓	77.7	93.6
牛乳	81.9	96.4
鶏卵	90.8	103.2

4. 考察

開発した試験法を用いて、牛の筋肉、脂肪、肝臓、腎臓、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ジルパテロール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、真度及び精度は、真度 70~120%、併行精度 (RSD) < 25% という目標値を満たしていたことから、本試験法は、筋肉、内臓、脂肪、乳、卵のような畜産物に適用可能であると判断された。

[結論]

畜産物中のジルパテロール試験法として、試料調製時に塩酸・エタノール及び水 (1:1) 混液溶液を加えて前処理した後、*n*-ヘキサン存在下、アセトニトリルで抽出し、オクタデシルシリル化シリカゲル

ミニカラム及び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、脂肪、肝臓、腎臓、牛乳及び鶏卵に適用した結果、真度 74.8~90.8%、併行精度 1.4~7.0% の良好な結果が得られた。

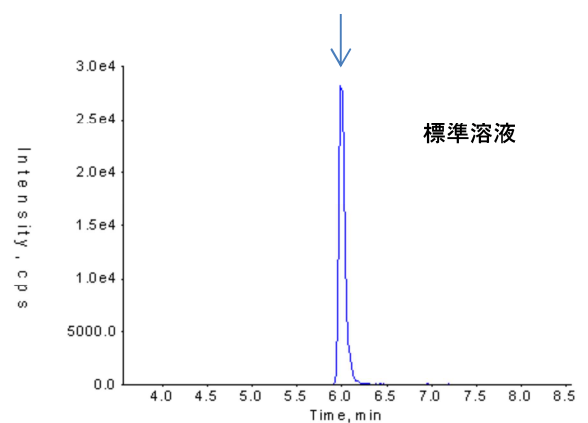
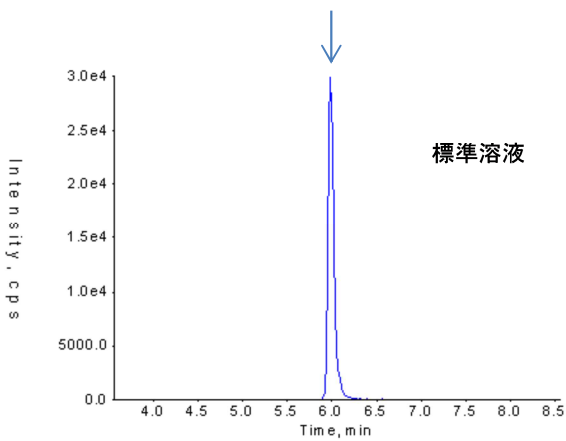
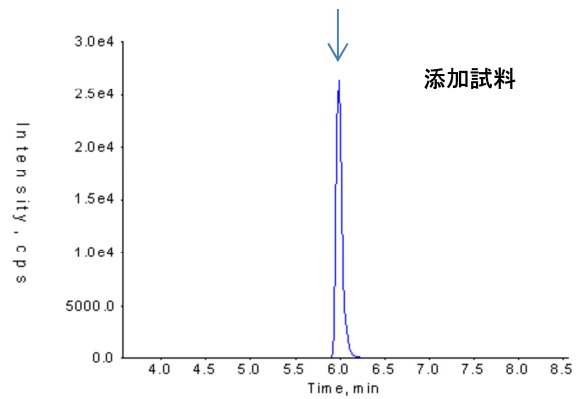
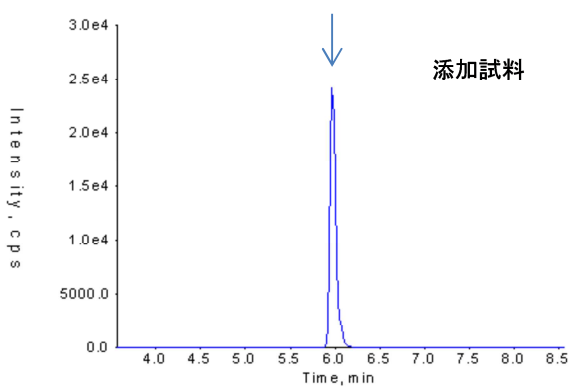
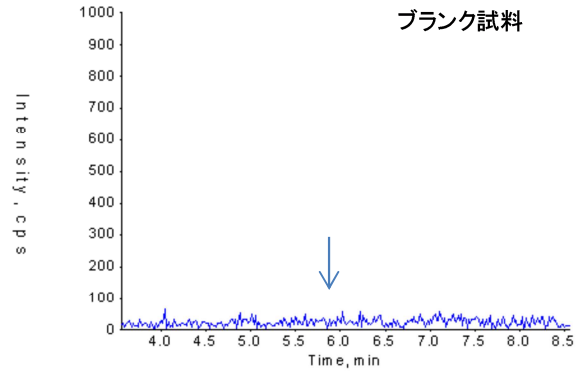
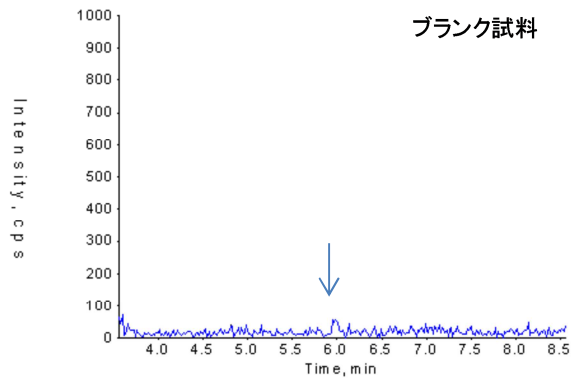


図5 牛の筋肉の SRM クロマトグラム
($m/z + 262.2 \rightarrow 185.0$)
試料中 0.01 ppm 相当

図6 牛の肝臓の SRM クロマトグラム
($m/z + 262.2 \rightarrow 185.0$)
試料中 0.01 ppm 相当

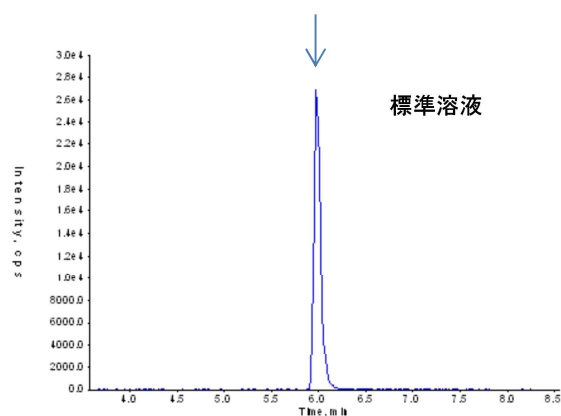
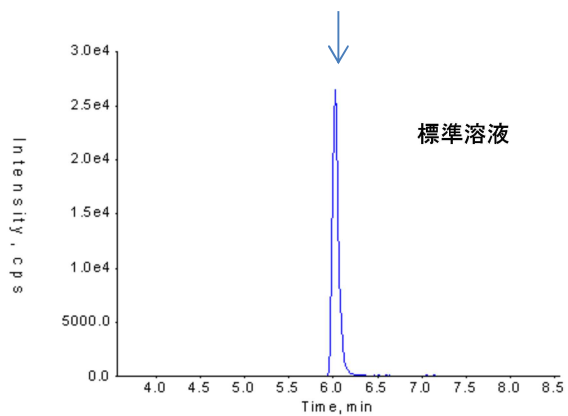
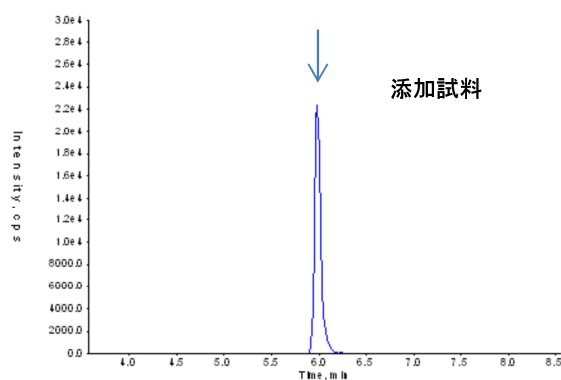
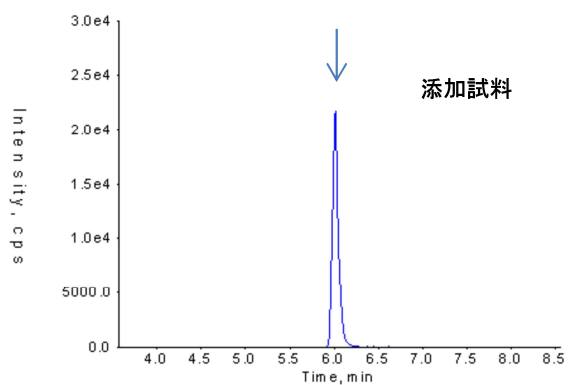
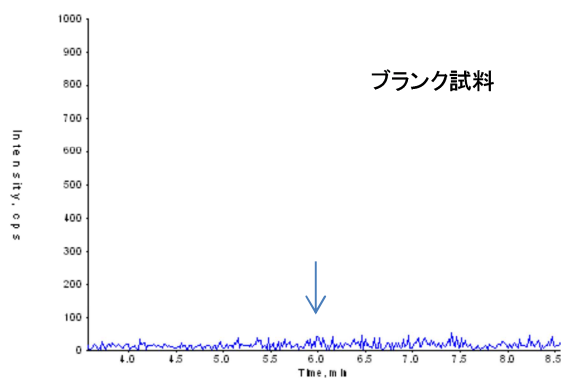
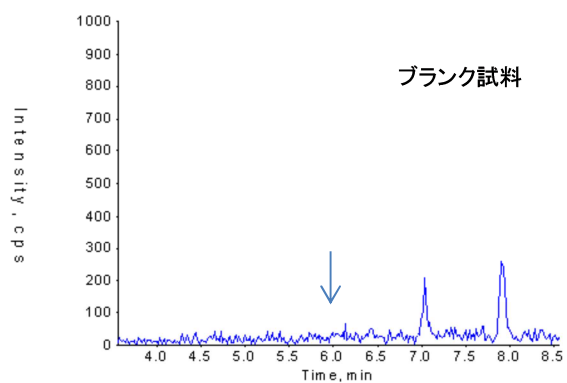


図7 牛の腎臓の SRM クロマトグラム
($m/z + 262.2 \rightarrow 185.0$)
試料中 0.01 ppm 相当

図8 牛の脂肪の SRM クロマトグラム
($m/z + 262.2 \rightarrow 185.0$)
試料中 0.01 ppm 相当

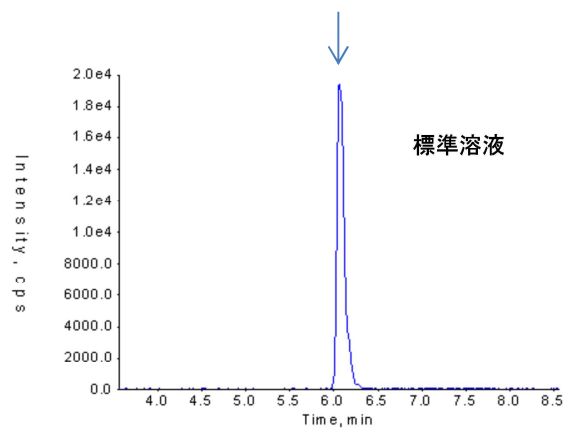
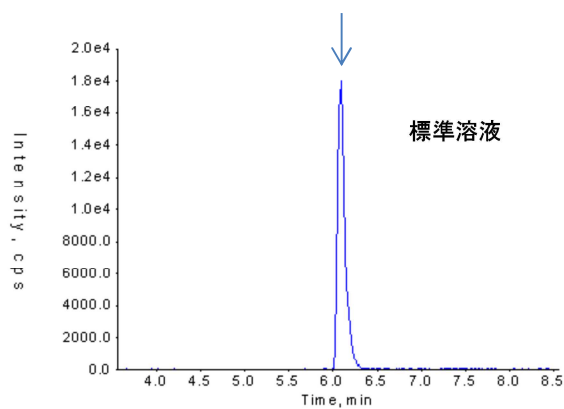
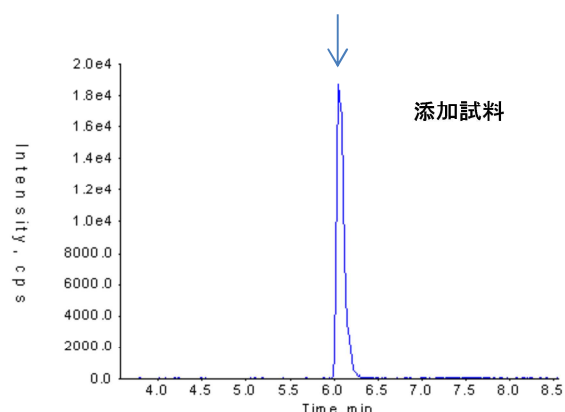
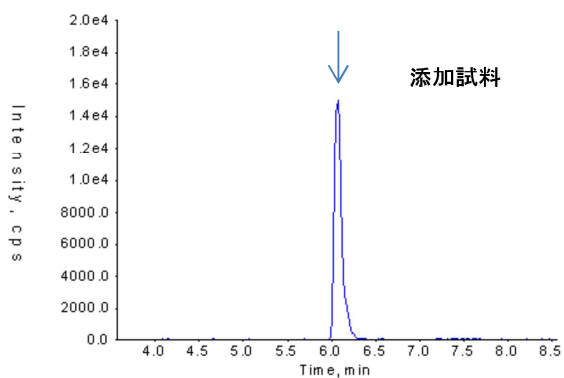
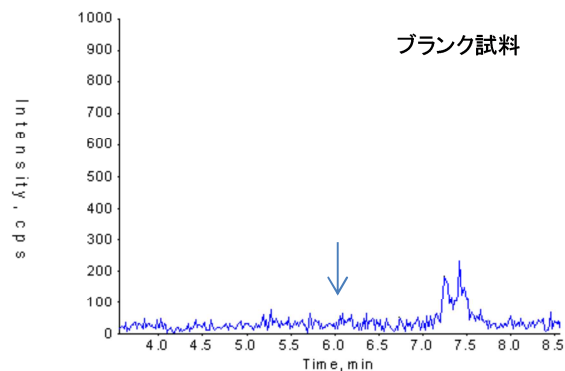
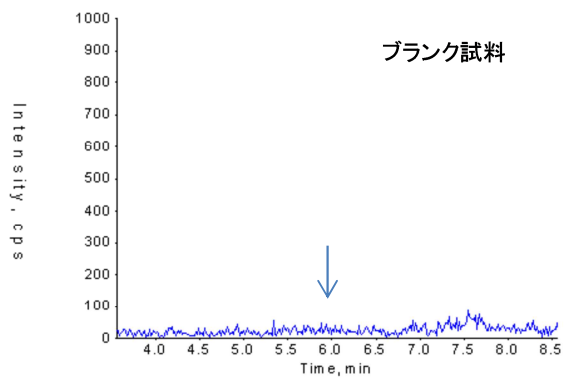


図9 牛乳の SRM クロマトグラム
($m/z + 262.2 \rightarrow 185.0$)
試料中 0.01 ppm 相当

図10 鶏卵の SRM クロマトグラム
($m/z + 262.2 \rightarrow 185.0$)
試料中 0.01 ppm 相当

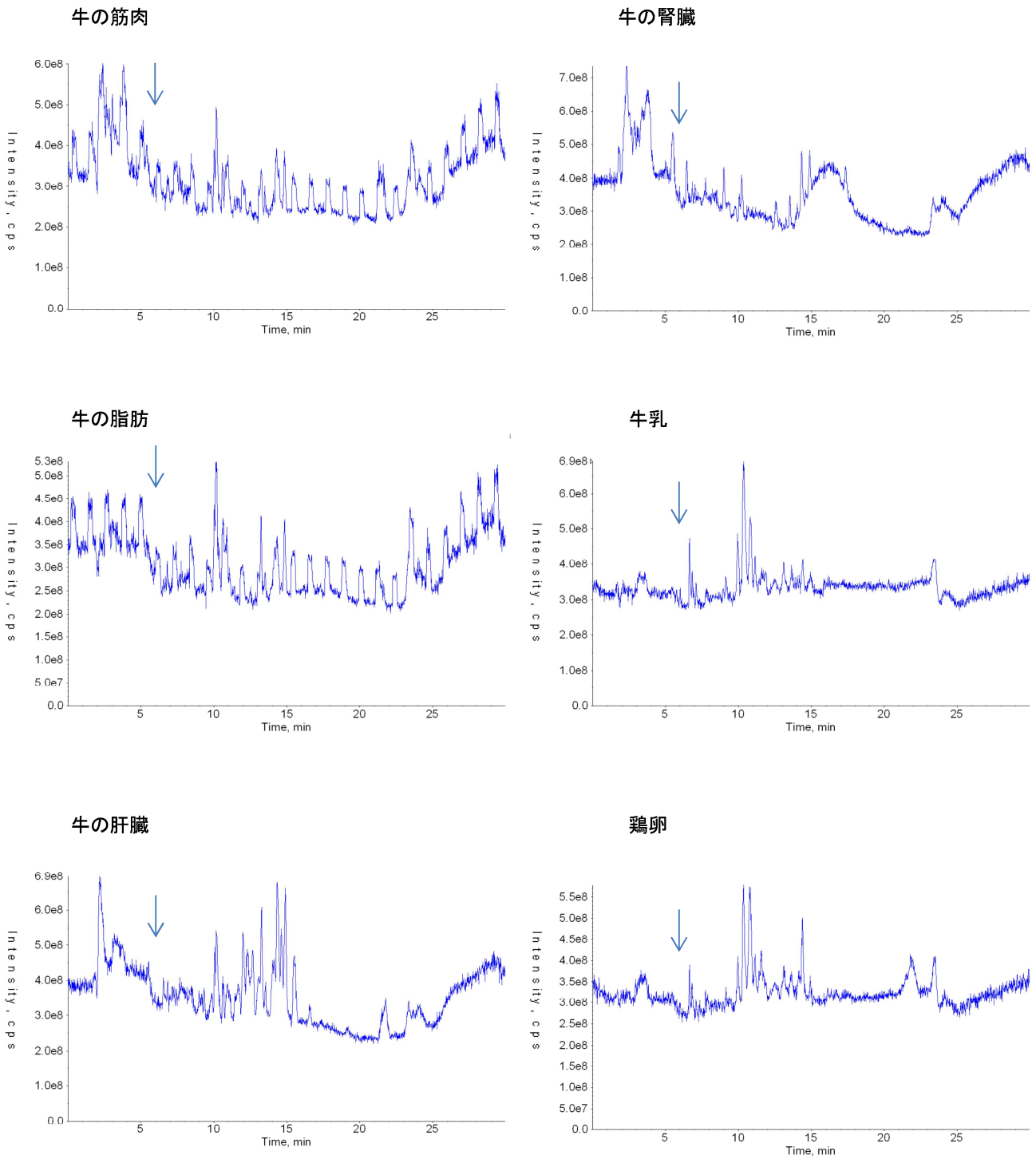


図 11 畜産物blank試料のフルスキャン測定におけるトータルイオンクロマトグラム
(スキャン範囲：50～550 amu)