

## チルジピロシン分析法（畜産）

### I. チルジピロシン分析法（豚）

#### 1. 分析対象化合物

- ・チルジピロシン

#### 2. 装置

液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計（LC-MS/MS）

#### 3. 試薬、試液

チルジピロシン標準品	:	分析用標準品
10D-PMT	:	内部標準物質
メタノール	:	LC/MS用
アセトニトリル	:	LC/MS用
超純水	:	LC/MS用
ギ酸	:	HPLC用
その他の試薬	:	特級
ミニカラム	:	Oasis HLB Cartridge 10 mg/1 mL

10D-PMT : 20-piperidinyl-23-10D-piperidinyl-mycaminosyl-tylonolide

#### 4. 試験溶液の調製

##### 1) 内部標準溶液の調製

内部標準物質約20 mgをアセトニトリル6 mLに溶解し、水を加え20 mLとした（内部標準原液；1,000 µg/mL）。内部標準原液4 mLに水を加えて10 mLとした2.5倍希釈液（400 µg/mL）を調製し、この液500 µLに水を加え20 mLとし、100倍希釈液（10 µg/mL）となるように内部標準溶液を調製した。

##### 2) 抽出

###### ① 筋肉、肝臓、腎臓、小腸及び肺

試料約20 gをホモジナイズし、その0.5 gに10 µg/mLの内部標準溶液50 µL及びアセトニトリル500 µLを加え、3,800 rpm（10°C）で30秒間ホモジナイズした後、4,000 rpm（10°C）で10分間遠心分離し、上清を採取した。

残渣にアセトニトリル500 µLを加え、同様に操作して、上清を採取する操作を2回繰り返した。採取した上清をあわせ、遠心エバポレーターを用い、室温減圧下で濃縮乾固し、乾固物を0.05 mol/L酢酸アンモニウム溶液500 µLに溶解した。

###### ② 脂肪

試料約20 gをホモジナイズし、その0.5 gに10 µg/mLの内部標準溶液50 µL、0.1%酢酸250 µL及びアセトニトリル250 µLを加え、3,800 rpm (10°C) で30秒間ホモジナイズした後、4,000 rpmで10分間遠心分離し、上清を採取した。残渣に0.1%酢酸250 µL及びアセトニトリル250 µLを加え、同様に操作して、上清を採取する操作を2回繰り返した。採取した上清をあわせ、*n*-ヘキサン500 µLを加え、15分間攪拌した後、3,800 rpm (10°C) で10分間遠心分離し、下層を分取した。これを、遠心エバポレーターを用い、室温減圧下で濃縮乾固し、乾固物を0.05 mol/L酢酸アンモニウム溶液500 µLに溶解した。

### 3) 精製

抽出した溶解液を、アセトニトリル1 mL及び精製水1 mLで前処理をしたOasis® HLB カートリッジ10 mg/1 mLに注入した。カートリッジを精製水1 mLで洗浄した後、アセトニトリル2 mLで溶出した。溶出液を、遠心エバポレーターを用い、室温減圧下で濃縮乾固し、乾固物を0.05 mol/L酢酸アンモニウム溶液5.0 mLに溶解した後、検液とした。

## 5. 検量線の作成

チルジピロシン標準品約20 mgをアセトニトリル6 mLに溶解し、水を加えて20 mLとし、1,000 µg/mLの標準原液を調製した。この標準原液4 mLに水を加えて全量を10 mLとした2.5倍希釈液 (400 µg/mL)、この2.5倍希釈液2.5 mLに水を加えて全量を20 mLとした20倍希釈液 (50 µg/mL) を調製し、0.5、1.0、2.5、10及び20 µg/mLの標準溶液をそれぞれ調製する。

標準溶液及び内部標準溶液を試料（ブランクの臓器・組織）に添加し、最終濃度がチルジピロシンを0.005、0.01、0.025、0.1及び0.2 µg/mL含む検量線溶液を調製し、これをLC-MS/MSに注入して分析し、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

装置	:	Waters AQUITY TQD タンデム四重極UPLC/MS/MSシステム (Waters Co. LTD)
カラム	:	ACQUITY UPLC BEH C <sub>18</sub> 1.7 µm (2.1 × 50 mm)
カラム温度	:	35 °C
流量	:	600 µL/min
注入量	:	5 µL
移動相	:	移動相A : 0.05%ギ酸 移動相B : 0.05%ギ酸アセトニトリル溶液

グラジエントプロ  
ログラム :

時間 (分)	移動相A (%)	移動相B (%)
0	95	5
0.30	95	5
1.30	5	95
4.00	5	95
4.20	95	5
6.30	95	5

イオン化モード : ESI (+)  
 分析モード : MRMモード  
 キャピラリー電  
 圧 : 3.0 kv  
 イオン源温度 : 150°C  
 脱溶媒温度 : 450°C  
 ガス流量 : 800 L/h  
 コーン電圧 : 50.0 V  
 検出イオン :

	プレカーサー イオン ( <i>m/z</i> )	プロダクトイ オン ( <i>m/z</i> )	コリジョンエネ ルギー (V)
チルジピロシン 標準品	734.5	98.0 174.0	40.0 30.0
10D-PMT	744.6	108.1	50.0

8. 定量限界  
0.05 mg/kg

9. 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。

## II. チルジピロシン分析法 (牛)

### 1. 分析対象化合物

・チルジピロシン

### 2. 装置

自動固相抽出・液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計 (Online SPE-LC-MS/MS)

### 3. 試薬、試液

チルジピロシン標準品	:	分析用標準品
10D-PMT	:	内部標準物質
メタノール	:	HPLC用
アセトニトリル	:	HPLC用
精製水	:	HPLC用
<i>n</i> -ヘキサン	:	HPLC用
その他の試薬	:	特級

10D-PMT : 20-piperidinyl-23-10D-piperidinyl-mycaminosyl-tylonolide

### 4. 試験溶液の調製

#### 1) 内部標準溶液の調製

内部標準物質約20 mgをアセトニトリル6 mLに溶解し、水を加え20 mLとした (内部標準原液 ; 1,000 µg/mL)。内部標準原液4 mLに水を加えて10 mLとした2.5倍希釈液 (400 µg/mL) を調製し、この液500 µLに水を加え20 mLとし、100倍希釈液 (10 µg/mL) となるように内部標準溶液を調製した。

#### 2) 抽出

##### ① 筋肉、肝臓、腎臓、小腸及び肺

10 mLガラス管にホモジナイズした試料約500 mg を入れ、精製水50 µL及び10 µg/mLの内部標準溶液を50 µL加える。さらに600 µLの精製水を加えて、約5秒間混合する。4,000 µLのアセトニトリルを加えて混合後、4,000 rpm (10°C) で約10分間遠心分離し、上清を採取した。採取した上清を、バス温度約45°C及び8 psi窒素圧カストリームで乾固させ、乾固物を0.05 mol/L酢酸アンモニウム溶液5 mLに再溶解した。

##### ② 脂肪

50 mLガラス管にホモジナイズした試料約500 mg を入れ精製水50 µL及び10 µg/mLの内部標準溶液50 µL、0.1%酢酸2,000 µL及びアセトニトリル2,000 µLを加え、約5秒間混合する。10 mLの*n*-ヘキサンを加え、約30秒間ホモジナ

イズした後、3,800 rpm (10°C) で10分間遠心分離、下層を採取した。採取した下層を、バス温度約45°C及び8 psi窒素圧カストリームで乾固させ、乾固物を0.05 mol/L酢酸アンモニウム溶液5 mLに再溶解した。

## 5. 検量線の作成

チルジピロシン標準品約20 mgをアセトニトリル6 mLに溶解し、水を加えて20 mLとし、1,000 µg/mLの標準原液を調製した。この標準原液4 mLに水を加えて全量を10 mLとした2.5倍希釈液 (400 µg/mL)、この2.5倍希釈液2.5 mLに水を加えて全量を20 mLとした20倍希釈液 (50 µg/mL) を調製し、0.5、1.0、2.5、10、20、40及び50 µg/mLの標準溶液をそれぞれ調製する。

各試料 (ブランクの臓器・組織500 mg) に標準溶液及び内部標準溶液をそれぞれ50 µL添加し、最終濃度がチルジピロシン を0、50、100、250、1,000、2,000、4,000及び5,000 ng/g含む検量線溶液を調製する。これらを分析法に示す方法に従って操作し、Online SPE-LC-MS/MSに注入して分析し、検量線を作成する。

## 6. 定量

試験溶液をに注入し、5. の検量線を用いて含量を定量する。

## 7. 測定条件 (例)

### 装置

Online SPE: Prospekt 2 ACE Dual, 2 ISS、  
Prospekt 2 Triathlon Cool、Prospekt 2 HPD Mix、  
2 SSM

HPLC: Agilent1100

Mass spectrometer: Applied Biosystems  
API4000, Triple Quadrupole

### (Online SPE)

・ハードウェアオートサンプ  
ラー

サンプルループ 100 µL

注入量 45 µL

シリンジ 250 µL

温度 10°C

・オートサンプラーの洗浄パ  
ラメーター

バイアル間の洗浄

洗浄量 2×1000 µL

洗浄液 メタノール/アセトニトリル/水 (30 : 30 : 40)

・注入の設定 全量注入方式

時間 0 : 00 : 00

フラッシュ量 60 µL

バイアルごとの注射数 1  
 注射量 100  $\mu$ L  
 (HPLC)  
 カラム Polaris C 18-A 3  $\mu$ m、50 $\times$ 3 mm  
 カラム温度 室温  
 移動相 移動相A : 0.05%ギ酸  
 移動相B : 0.05%ギ酸アセトニトリル溶液

グラジエントプログラム

時間 (分)	移動相A (%)	移動相B (%)
0	95	5
0.30	95	5
1.30	5	95
4.00	5	95
4.20	95	5
6.30	95	5

流量 900  $\mu$ L/min  
 Run time 6.30分  
 (質量分析計)  
 イオン化インターフェース Heated Nebulizer  
 イオン化モード Positive  
 MS Run time 6.18分  
 温度 450 $^{\circ}$ C  
 カーテンガス 25 Psi  
 コリジョンガス 4 Psi  
 イオン源ガス1 55 Psi  
 イオン源ガス2 55 Psi  
 ネブライザー電流 4  $\mu$ A  
 入口電位 10 V  
 データータイプ セントロイドデータ

	プレカ ーサー イオン (amu)	コリジョン セル exit potential (V)	プロダクト イオン (amu)	コリジョン エネルギー (V)	Dwell Time (Msec)
チルジピ ロシン 標準品	734.65	6.00 12.00	98.17 (quantifier) 173.95 (quantifier)	77.00 51.00	150 150
10D-PMT	744.64	22.00	108.09 (quantifier)	85.00	150

8. 定量限界  
0.05 mg/kg
9. 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。