

※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

ツラスロマイシン試験法（畜産物）

ツラスロマイシン試験法（畜産物）の検討結果

【緒言】

1. 背景・目的

ツラスロマイシン（図1）は、半合成マクロライド系抗生物質で、2つの異性体（ツラスロマイシンA及びB）の平衡混合物である。溶液中での異性体比は約9：1とされている。

ツラスロマイシンは、細菌細胞のリボソームの50Sサブユニットに結合してタンパク質合成を阻害すると考えられている。牛及び豚における細菌性肺炎の病原菌である *Pasteurella* 属 (*P. haemolytica*、*P. multocida*)、*Haemophilus soumnuis*、*Actinobacillus pleuropneumoniae* 及び *Mycoplasma hyopneumoniae* 等に有効である。国内外において、牛及び豚の細菌性呼吸器疾患の治療及び予防を目的とする動物用医薬品として使用されている。ヒト用医薬品としては使用されていない。

ツラスロマイシンの主な代謝物としては、代謝物M1及びその異性体（図1）がある。ツラスロマイシンの残留基準値は、ツラスロマイシン、代謝物M1、代謝物M1の異性体及び加水分解により代謝物M1又は代謝物M1の異性体に変換される代謝物をツラスロマイシンに換算したものの和として設定されている。しかし、現行の通知試験法はツラスロマイシンのみを分析対象としており、代謝物を分析することはできない。そこで、本研究では畜産物中の代謝物を含めたツラスロマイシン試験法を開発することを目的とした。

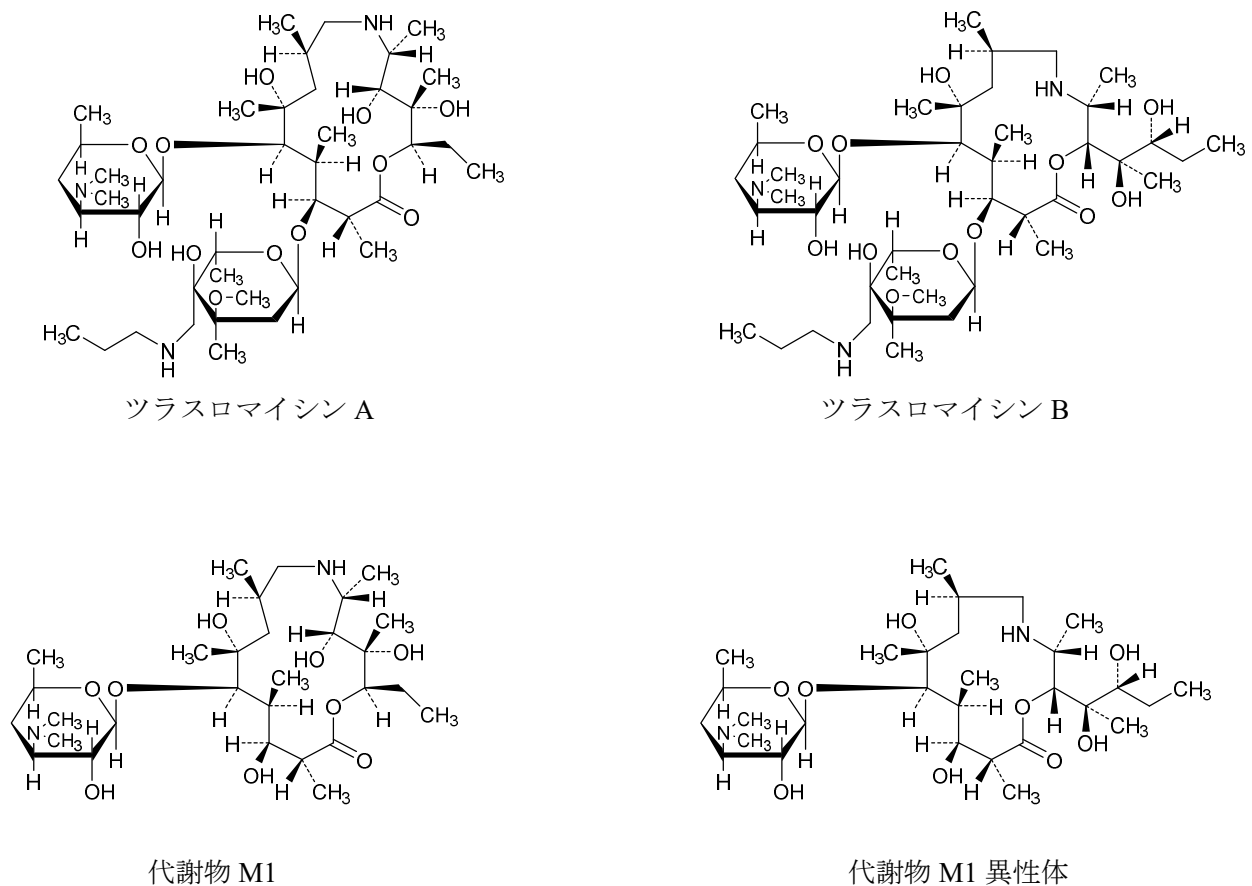


図1 ツラスロマイシン及びその代謝物

2. 基準値

ツラスロマイシンとは、ツラスロマイシン、代謝物 M1 [(2*R*,3*S*,4*R*,5*R*,8*R*,10*R*,11*R*,12*S*,13*S*,14*R*)-2-エチル-3,4,10,13-テトラヒドロキシ-3,5,8,10,12,14-ヘキサメチル-11-[[3,4,6-トリデオキシ-3-(ジメチルアミノ)-β-D-キシロ-ヘキソピラノシル]オキシ]-1-オキサ-6-アザシクロペンタデカン-15-オン]、代謝物 M1 の異性体 [(2*R*,3*R*,6*R*,8*R*,9*R*,10*S*,11*S*,12*R*)-2-[(1*R*,2*R*)-1,2-ジヒドロキシ-1-メチルブチル]-8,11-ジヒドロキシ-3,6,8,10,12-ペンタメチル-9-[[3,4,6-トリデオキシ-3-(ジメチルアミノ)-β-D-キシロ-ヘキソピラノシル]オキシ]-1-オキサ-4-アザシクロトリデカン-13-オン] 及び加水分解により代謝物 M1 又は代謝物 M1 の異性体に変換される代謝物をツラスロマイシンに換算したものの和をいうこと。 [生食発 0607 第 1 号 (H28.6.7)]

食品名	基準値 (ppm)
牛の筋肉	0.3
豚の筋肉	2
牛の脂肪	0.2
豚の脂肪	0.3
牛の肝臓	5
豚の肝臓	4
牛の腎臓	3
豚の腎臓	9
牛の食用部分	3
豚の食用部分	5

基準値設定のない食品：含有するものであってはならない。

3. 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： ツラスロマイシン (Tulathromycin)

構造式： 図 1 に示す

化学名：

ツラスロマイシン A

(2*R*,3*S*,4*R*,5*R*,8*R*,10*R*,11*R*,12*S*,13*S*,14*R*)-13-({2,6-Dideoxy-3-*C*-methyl-3-*O*-methyl-4-*C*-[(propylamino)methyl]-α-*L*-ribo-hexopyranosyl}oxy)-2-ethyl-3,4,10-trihydroxy-3,5,8,10,12,14-hexamethyl-11-{{3,4,6-trideoxy-3-(dimethylamino)-β-*D*-xylo-hexopyranosyl}oxy}-1-oxa-6-azacyclopentadecan-15-one

ツラスロマイシン B

(2*R*,3*R*,6*R*,8*R*,9*R*,10*S*,11*S*,12*R*)-11-({2,6-Dideoxy-3-*C*-methyl-3-*O*-methyl-4-*C*-[(propylamino)methyl]-α-*L*-ribo-hexopyranosyl}oxy)-2-[(1*R*,2*R*)-1,2-dihydroxy-1-methylbutyl]-8-hydroxy-3,6,8,10,12-pentamethyl-9-[[3,4,6-trideoxy-3-(dimethylamino)-β-*D*-xylo-hexopyranosyl}oxy]-1-oxa-4-azacyclotridecan-13-one

CAS 番号： ツラスロマイシン A 217500-96-4、ツラスロマイシン B 280755-12-6

分子式： C₄₁H₇₉N₃O₁₂

分子量： 806.08

外観： 白色粉末

融点^{a)}： 190-193°C

沸点 (計算値)^{b)} : 853.8±65.0°C (760 Torr)

1-オクタノール/水分配係数 (log P_{ow}, 計算値)^{b)} : 4.632 ± 0.853 (25°C)

解離定数 (pK_a, 計算値)^{b)} : 13.19±0.70 (Most acidic, 25 °C)

10.28±0.20 (Most basic, 25 °C)

蒸気圧 (計算値)^{b)} : 6.12 × 10⁻³⁴ Torr (25 °C)

a) Cayman Chemical. Tulathromycin A 標準品添付文書

b) SciFinder (Calculated using Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software V11.02)

分析対象化合物 : 代謝物 M1 及びその異性体

構造式 : 図 1 に示す

化学名 :

代謝物 M1

(2*R*,3*S*,4*R*,5*R*,8*R*,10*R*,11*R*,12*S*,13*S*,14*R*)-2-Ethyl-3,4,10,13-tetrahydroxy-3,5,8,10,12,14-hexamethyl-11-
{[3,4,6-trideoxy-3-(dimethylamino)-β-D-xylo-hexopyranosyl]oxy}-1-oxa-6-azacyclopentadecan-15-one

代謝物 M1 異性体

(2*R*,3*R*,6*R*,8*R*,9*R*,10*S*,11*S*,12*R*)-2-[(1*R*,2*R*)-1,2-Dihydroxy-1-methylbutyl]-8,11-dihydroxy-3,6,8,10,12-
pentamethyl-9- {[3,4,6-trideoxy-3-(dimethylamino)-β-D-xylo-hexopyranosyl]oxy}-1-oxa-4-
azacyclotridecan-13-one

分子式 : C₂₉H₅₆N₂O₉

分子量 : 576.76

外観 : 白色粉末

4. 申請企業の残留分析法¹⁾

(1) 試験溶液調製方法の概要

秤 取

↓ 試料 1.0 g

加水分解・抽出

↓ 2 mol/L 塩酸 4 mL を加える

↓ 攪拌 2 分間 (筋肉の場合は 30 秒間ホモジナイズ)

↓ 振とう 10 分間

↓ 60°C で 1 時間加熱

↓ (脂肪の場合) ヘキサン 4 mL を加えて、攪拌 2 分間

↓ 遠心分離 (4000 rpm、10 分間)

↓ 上清を採る (脂肪の場合は、ヘキサン層を捨て、水層を採る) ①

↓ (脂肪以外の場合) 残留物に 2 mol/L 塩酸 4 mL を加え、攪拌 2 分間、振とう 10 分間

↓ 遠心分離 (4000 rpm、10 分間)

↓ 上清を採り、①に合わせる

Oasis MCX ミニカラム (30 mg) 精製

↓ アセトニトリル 1 mL 及び水 1 mL でコンディショニング

↓ 筋肉、脂肪は 1 mL、肝臓は 0.6 mL、腎臓は 0.8 mL を負荷

↓ 0.1 mol/L 塩酸 2 mL 及びメタノール 2 mL で洗浄 (吸引)

↓ アンモニア水/アセトニトリル (5:95) 混液 3 mL で溶出 (吸引)

↓ 溶媒を除去

↓ 残留物を 20 mmol/L 酢酸緩衝液 (pH 4) 1 mL に溶解 (IS を加える)

↓ 攪拌 2 分間

LC-MS/MS 測定

スキーム 1. 申請企業の試験溶液調製方法の概要

(2) 測定条件

装 置	型 式	会 社
LC	LC-26B、PM-80	Bioanalytical Systems
MS	Micromass Quattro LC	Waters

LC 条件	
カラム	YMC Basic (内径 2.0 mm、長さ 100 mm : YMC 製)
移動相流速	0.5 mL/min
注入量	肝臓及び腎臓 10 µL ; 筋肉及び脂肪 50 µL
移動相	20 mmol/L 酢酸緩衝液 (pH 4.0) /アセトニトリル (9 : 1)
MS 条件	
イオン化モード	ESI (+)
キャピラリー電圧	1 kV

コーン電圧	40 V
ソース温度	150°C
脱溶媒温度	400°C
コーンガス	95 L/h
脱溶媒ガス	1045 L/h
測定モード	選択反応モニタリング (SRM)
モニターイオン (m/z)	577.3→420.3
保持時間	3.5 min

[実験方法]

1. 試料

試料は、インターネットで購入した。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、磨砕装置を用いて細切均一化した。
- (2) 牛の脂肪： 可能な限り筋肉層を除き、磨砕装置を用いて細切均一化した。
- (3) 牛の肝臓： 磨砕装置を用いて細切均一化した。

2. 試薬・試液

(1) 標準品

ツラスロマイシン A 標準品：純度 100% (Cayman Chemical 製)

代謝物 M1 標準品：純度 100% (ゾエティス・ジャパン株式会社より供与)

(2) 試薬

アセトン、酢酸エチル、ヘキサン： 残留農薬試験用 (関東化学製)

蒸留水、アセトニトリル、メタノール： LC-MS 用 (関東化学製)

水 (試験溶液調製用)： 超高純度蒸留水精製装置で精製したもの

酢酸：特級 (富士フイルム和光純薬製)

ギ酸：特級 (富士フイルム和光純薬製)

アンモニア水： 特級、アンモニア含量 28.0~30.0% (関東化学製)

酢酸アンモニウム：特級 (富士フイルム和光純薬製)

1 mol/L 塩酸：容量分析用 (富士フイルム和光純薬製)

2 mol/L 塩酸：容量分析用 (富士フイルム和光純薬製)

6 mol/L 塩酸：容量分析用 (富士フイルム和光純薬製)

ケイソウ土： セライト No.545 (富士フイルム和光純薬製)

スルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム：Oasis MCX (150 mg/6 mL, Waters 製)

ガラス繊維ろ紙： GA-100 (アドバンテック製)

ろ紙： 桐山ロート用ろ紙、No.5B (桐山製作所製)

遠心管：遠心管 (100 mL、ポリプロピレン (PP)) (AGC テクノグラス製)

20 mmol/L 酢酸緩衝液 (pH 4.7)： 以下の第 1 液と第 2 液を混和し、pH を 4.7 に調整した。

第 1 液：酢酸アンモニウム 1.54 g を量り、水を加えて溶かし、1 L とした。

第 2 液：酢酸 1.20 g を量り、水を加えて 1 L とした。

(3) 試液

① 標準原液

ツラスロマイシン A 及び代謝物 M1 標準原液：各標準品 10 mg を精秤し、20 mmol/L 酢酸緩衝液 (pH 4.7) /メタノール (1 : 1) 混液に溶解して 1 mg/mL の濃度の溶液を調製した。

② 添加用標準溶液 (定量限界濃度)

ツラスロマイシン A 及び代謝物 M1 の各標準原液をアンモニア水/メタノール (1 : 49) 混液で希釈し、ツラスロマイシンとして 0.1 µg/mL (ツラスロマイシン A 0.1 µg/mL ; 代謝物 M1 0.07155 µg/mL) の濃度の溶液を調製した。

③ 添加用標準溶液 (基準値濃度)

- a. 牛の筋肉 (基準値 0.3 ppm)

ツラスロマイシン A 及び代謝物 M1 の各標準原液をアンモニア水/メタノール (1 : 49) 混液で希釈し、ツラスロマイシンとして 3 µg/mL (ツラスロマイシン A 3 µg/mL ; 代謝物 M1 2.147 µg/mL) の濃度の溶液を調製した。

b. 牛の脂肪 (基準値 0.2 ppm)

ツラスロマイシン A 及び代謝物 M1 の各標準原液をアンモニア水/メタノール (1 : 49) 混液で希釈し、ツラスロマイシンとして 2 µg/mL (ツラスロマイシン A 2 µg/mL ; 代謝物 M1 1.431 µg/mL) の濃度の溶液を調製した。

c. 牛の肝臓 (基準値 5 ppm)

ツラスロマイシン A 及び代謝物 M1 の各標準原液をアンモニア水/メタノール (1 : 49) 混液で希釈し、ツラスロマイシンとして 50 µg/mL (ツラスロマイシン A 50 µg/mL ; 代謝物 M1 35.78 µg/mL) の濃度の溶液を調製した。

なお、ツラスロマイシン A の濃度から代謝物 M1 の濃度への換算は、換算係数 0.7155 (代謝物 M1 の分子量をツラスロマイシン A の分子量で除した値) を用いて行った。

3. 装置等

磨砕装置 : Grindomix GM200 (Verder Scientific 製)

ホモジナイザー : Polytron PT 10-35 GT (Kinematica 製)

卓上型振とう恒温槽 : Personal-11 (タイテック製)

振とう機 : SR-2w (タイテック製)

遠心分離機 : テーブルトップ遠心機 4000 (久保田商事製)

蒸留水精製装置 : 超高純度蒸留水精製装置 NZJ-2DSYW (藤原製作所製)

LC-MS/MS

装置	型式	会社
LC	Acquity UPLC I-Class	Waters
MS	Triple Quad 5500	Sciex
データ処理	Analyst 1.6.2	Sciex

4. 測定条件

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製)															
移動相流速	0.2 mL/min															
注入量	3 µL															
カラム温度	40°C															
移動相	A 液 : 20 mmol/L 酢酸緩衝液 (pH 4.7) B 液 : メタノール															
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</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>20</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>20.1</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> </tbody> </table>	時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)	0.0	90	10	10	0	100	20	0	100	20.1	90	10
時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)														
0.0	90	10														
10	0	100														
20	0	100														
20.1	90	10														

保持時間			分		
	ツラスロマイシン A		6.2		
	ツラスロマイシン B		5.1		
	代謝物 M1		5.6		
	代謝物 M1 の異性体		4.6		
MS 条件					
測定モード	SRM				
イオン化モード	ESI (+)				
イオンスプレー電圧	5500 V				
ヒーター温度	650°C				
エントランス電位	10 V				
カーテンガス	N ₂ , 10 psi				
ネブライザーガス	N ₂ , 80 psi				
ターボガス	N ₂ , 80 psi				
コリジョンガス	N ₂ , 8 (任意単位)				
測定イオン					
	イオン (<i>m/z</i>)		デクラスタ リング電位 (V)	コリジョン エネルギー (eV)	コリジョンセル イグジット電位 (V)
ツラスロマイシン A 及び B	806.4→577.3	定量	41	33	42
	404.1→577.3	定性	41	20	30
代謝物 M1 及びその異性体	577.3→158.2	定量	171	39	12
	577.3→116.1	定性	171	37	10

5. 定量

代謝物 M1 標準原液をアンモニア水/メタノール (1 : 49) 混液で希釈し、25、50、75、100、125 及び 150%の回収率に相当する濃度の溶液を調製した。これらの溶液 3 µL を LC-MS/MS に注入し、得られた代謝物 M1 とその異性体の合計ピーク面積を用いて検量線を作成した。なお、検量線作成用の代謝物 M1 標準溶液は、ツラスロマイシンとしての濃度で調製した。試験溶液 3 µL を LC-MS/MS に注入し、代謝物 M1 とその異性体の合計ピーク面積を用いて、検量線から絶対検量線法によりツラスロマイシンの含量を算出した。

6. 添加試料の調製

添加濃度はツラスロマイシンとしての濃度で示した。

(1) 定量限界濃度 (添加濃度 0.01 mg/kg)

試料 10.0 g に、0.1 µg/mL (ツラスロマイシンとして) 添加用標準溶液 1 mL を添加して混合後、30 分間放置した。

(2) 基準値濃度

牛の筋肉 (添加濃度 0.3 mg/kg) : 試料 10.0 g に、3 µg/mL (ツラスロマイシンとして) 添加用標準溶液 1 mL を添加して混合後、30 分間放置した。

牛の脂肪 (添加濃度 0.2 mg/kg) : 試料 10.0 g に、2 µg/mL (ツラスロマイシンとして) 添加用標準溶液 1 mL を添加して混合後、30 分間放置した。

牛の肝臓（添加濃度 5 mg/kg）：試料 10.0 g に、50 µg/mL（ツラスロマイシンとして）添加用標準溶液 1 mL を添加して混合後、30 分間放置した。

7. 試験溶液の調製

〔概要〕

ツラスロマイシン及びその代謝物を試料から酢酸エチル存在下 2 mol/L 塩酸で抽出した。塩酸酸性条件下で加熱して代謝物 M1 及びその異性体に変換し、スルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムで精製した後、LC-MS/MS で定量及び確認した。

(1) 加水分解

PP製の遠心管（100 mL容）に試料10.0 gを量り採り、酢酸エチル25 mLを加えて約30秒間ホモジナイズした。これに2 mol/L塩酸25 mLを加え、さらに約1分間ホモジナイズ後、毎分3,000回転で5分間遠心分離した。酢酸エチル層を捨て、水層を別のPP製の容器に採った。残渣物に酢酸エチル10 mL及び2 mol/L塩酸10 mLを加え、約1分間ホモジナイズ後、毎分3,000回転で5分間遠心分離した。酢酸エチル層を捨て、得られた水層及び残留物に先の水層を戻し、容器を2 mol/L塩酸5 mLで洗い、洗液を合わせた。

この溶液及び残留物を60°Cの水浴中で30分間加熱した。放冷後、ケイソウ土2 gを加えて混合し、ガラス繊維ろ紙を用いて吸引ろ過した。容器及び残留物を2 mol/L塩酸5 mLで2回洗い、洗液を吸引ろ過した。ろ液を合わせ、水を加えて正確に100 mLとした。

(2) スルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムによる精製

スルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム [Oasis MCX (150 mg)] にメタノール2 mL及び水5 mLを順次注入し、各流出液は捨てた。(1) で得られた溶液5 mL (試料0.5 g相当) をスルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムに注入した後、メタノール5 mLを注入し、流出液を捨てた。アンモニア水/メタノール (1 : 49) 4 mLを注入し、溶出液をメスフラスコ (5 mL容) に採り、アンモニア水/メタノール (1 : 49) を加えて正確に5 mLとしたものを試験溶液とした。なお、基準値濃度の添加回収試験においては、アンモニア水/メタノール (1 : 49) で牛の筋肉は30倍、牛の脂肪は20倍、牛の肝臓は500倍希釈して測定した。

8. マトリックス添加標準溶液の調製

ブランク試験溶液を 100 µL 採り、窒素気流下、溶媒を除去後、添加回収試験における回収率 100%相当濃度の代謝物 M1 溶媒標準溶液（ツラスロマイシンとして 0.001 µg/mL）を 100 µL 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。

[分析法フローチャート]

秤 取

↓ 試料 10.0 g を採る

抽出

↓ 酢酸エチル 25 mL を加え、約 30 秒間ホモジナイズ

↓ 2 mol/L 塩酸 25 mL を加え、約 1 分間ホモジナイズ

↓ 遠心分離（毎分 3000 回転、5 分間）

↓ 酢酸エチル層を捨てる。水層を採る①

↓ 残留物に酢酸エチル 10 mL 及び 2 mol/L 塩酸 10 mL を加え、約 1 分間ホモジナイズ

↓ 遠心分離（毎分 3000 回転、5 分間）

↓ 酢酸エチル層を捨てる

↓ 水層及び残留物に①を合わせる。①の容器を 2 mol/L 塩酸 5 mL で洗い、洗液を合わせる

加水分解

↓ 60°C で 30 分加熱

定容

↓ 放冷後、セライト 2 g を加えて吸引ろ過

↓ 容器及び残留物を 2 mol/L 塩酸 5 mL で 2 回洗う

↓ 水を加えて 100 mL に定容②

Oasis MCX

↓ メタノール 2 mL 及び水 5 mL でコンディショニング

↓ ②を正確に 5 mL 採り、負荷

↓ メタノール 5 mL で洗浄

↓ アンモニア水/メタノール（1：49）混液 4 mL で溶出

↓ アンモニア水/メタノール（1：49）混液で 5 mL に定容*

LC-MS/MS 測定

スキーム 2. 確立した試験溶液調製方法の概要

*基準値濃度の添加回収試験では、アンモニア水/メタノール（1：49）混液で牛の筋肉は 30 倍、牛の脂肪は 20 倍、牛の肝臓は 500 倍に希釈して測定

[結果及び考察]

1. 測定条件の検討

ツラスロマイシンの基準値は、ツラスロマイシン、代謝物 M1、代謝物 M1 の異性体及び加水分解により代謝物 M1 又は代謝物 M1 の異性体に変換される代謝物をツラスロマイシンに換算したものの和として設定されている。このため、加水分解によってツラスロマイシンを代謝物 M1 及びその異性体に変換することができれば、ツラスロマイシンを測定する必要はない。しかし、加水分解反応の進行状況を確認するためには、ツラスロマイシンについても測定した方がよいと考えられたため、代謝物 M1 及びその異性体に加え、ツラスロマイシンについても測定条件を検討した。

(1) MS 条件

①代謝物M1及びその異性体

代謝物M1標準溶液をESI (+) 及びESI (-) モードでフルスキャン測定をしたところ、ESI (+) モードにおいて、より高感度に測定が可能であったため、ESI (+) モードで測定を行うこととした。ESI (+) モードではプロトン付加分子 (m/z 577.3, $[M+H]^+$) が強く観測された (図2)。本イオンをプリカーサーイオンとしてプロダクトイオンスキャンを行ったところ、プロダクトイオンとして m/z 420.2、158.2及び116.1等が観測された (図3)。実験方法の『4. 測定条件』に示した「LC条件」で測定を行ったところ、 m/z 577.3→158.2及び m/z 577.3→116.1で高い S/N が得られたため、これらをそれぞれ定量用及び定性用イオンとした。

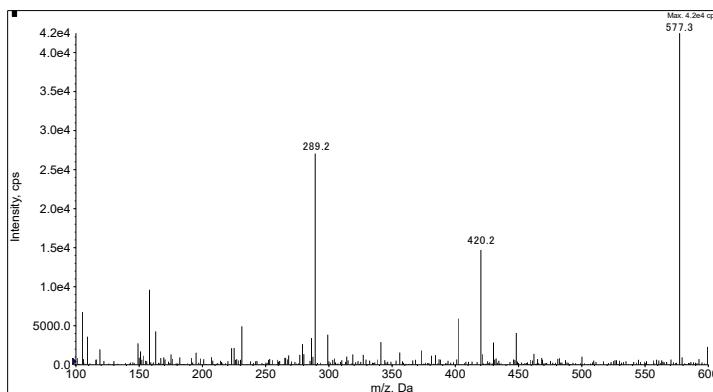


図2 代謝物M1標準溶液のマススペクトル

スキャン範囲： m/z 100～600、測定条件：ESI (+)、デクラスタリング電位 171 V

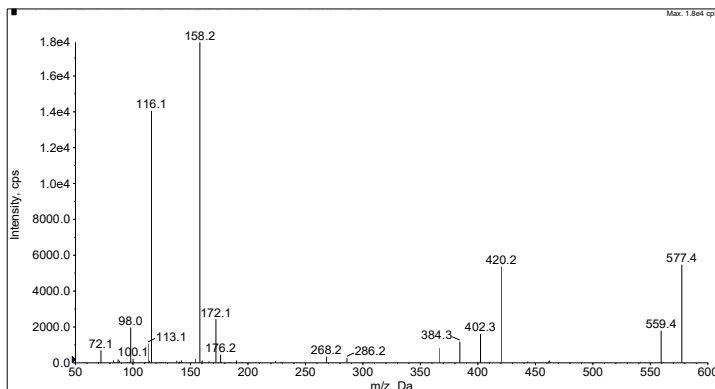


図3-1 代謝物M1標準溶液のプロダクトイオンスペクトル

プリカーサーイオン： m/z 577.3、スキャン範囲： m/z 50～600、測定条件：ESI (+)、デクラスタリング電位171 V、コリジョンエネルギー39 eV

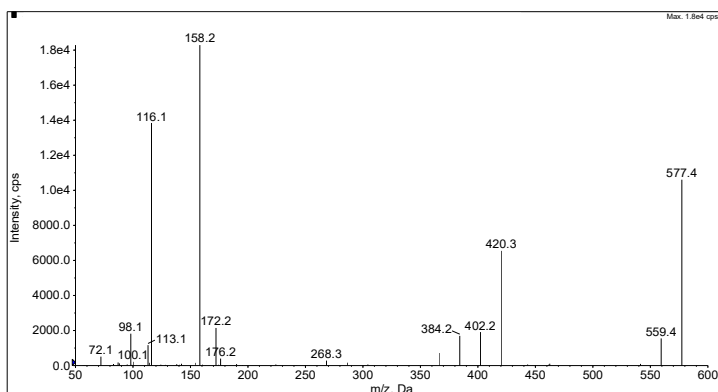


図3-2 代謝物M1標準溶液のプロダクトイオンスペクトル
 プリカーサーイオン： m/z 577.3、スキャン範囲： m/z 50～600、測定条件：ESI（+）、
 デクラスタリング電位171 V、コリジョンエネルギー37 eV

②ツラスロマイシン

ツラスロマイシン A 標準溶液を ESI（+）及び ESI（-）モードでフルスキャン測定したところ、ESI（+）モードにおいて、より高感度に測定が可能であったため、ESI（+）モードで測定を行うこととした。ESI（+）モードでは、2 価のプロトン付加分子 (m/z 404.1、 $[M+2H]^{2+}$) が最も強く観測され、次いで 1 価のプロトン付加分子 (m/z 806.4、 $[M+H]^+$)、ナトリウム付加分子 (m/z 828.5、 $[M+Na]^+$) 及び、カリウム付加分子 (m/z 844.4、 $[M+K]^+$) が観測された (図 4)。2 価のプロトン付加分子 (m/z 404.1、 $[M+2H]^{2+}$) または 1 価のプロトン付加分子 (m/z 806.4、 $[M+H]^+$) をプリカーサーイオンとしてプロダクトイオンスキャンを行ったところ、いずれも m/z 577、72 等が観測された (図 5)。実験方法の『4. 測定条件』に示した「LC 条件」で測定を行ったところ、 m/z 806.4→577.3 及び m/z 404.1→577.3 で高い S/N が得られたため、これらをそれぞれ定量用及び定性用イオンとすることとした。

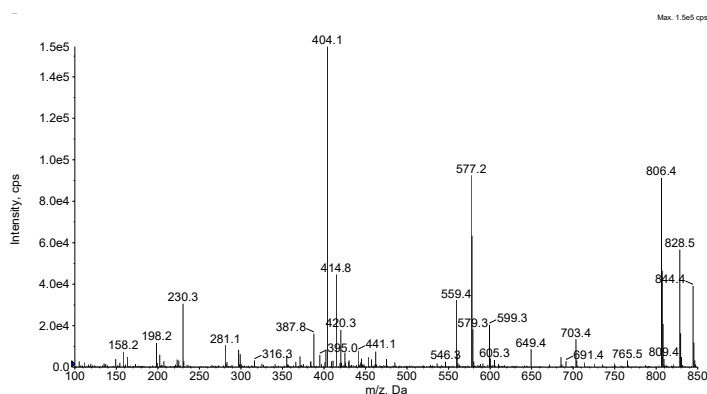


図4 ツラスロマイシンA標準溶液のマススペクトル
 スキャン範囲： m/z 100～850、測定条件：ESI（+）、デクラスタリング電位 41 V

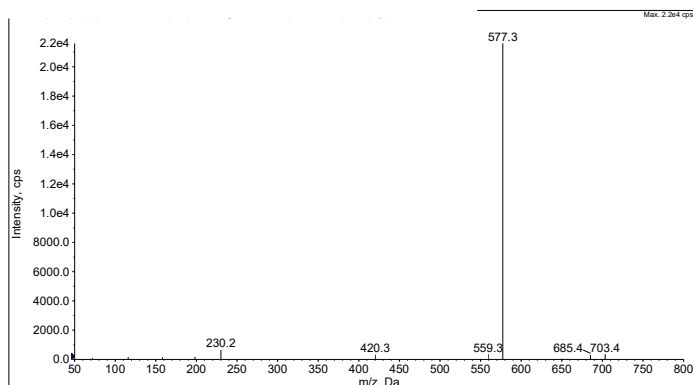


図5-1 ツラスロマイシンA標準溶液のプロダクトイオンスペクトル
 プリカーサーイオン： m/z 806.4、スキャン範囲： m/z 50～800、測定条件：ESI（+）、
 デクラスタリング電位41 V、コリジョンエネルギー33 eV

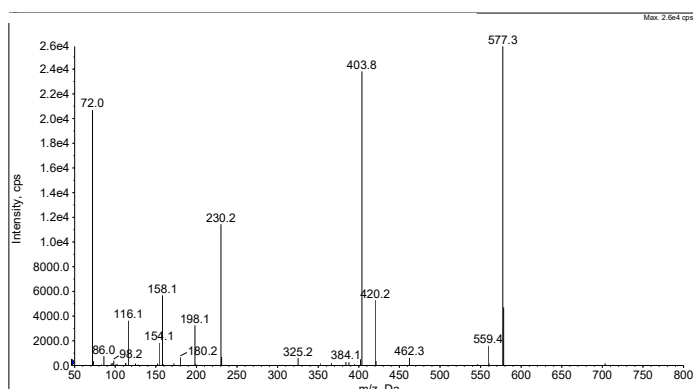


図5-2 ツラスロマイシンA標準溶液のプロダクトイオンスペクトル
 プリカーサーイオン： m/z 404.1、スキャン範囲： m/z 50～800、測定条件：ESI（+）、
 デクラスタリング電位41 V、コリジョンエネルギー20 eV

代謝物 M1 の測定に最適なヒーター温度は 650℃であったのに対し、ツラスロマイシン A は 500℃と最適なヒーター温度が大きく異なった。ヒーター温度 650℃でツラスロマイシン A の測定を行った結果、500℃で測定した場合と比べてピーク強度が 1/3 程度となったが、本試験法ではツラスロマイシン及びその代謝物を代謝物 M1 とその異性体に変換して測定を行うため、代謝物 M1 の測定に最適な温度（ヒーター温度 650℃）でツラスロマイシン A、代謝物 M1 及びそれらの異性体を同時に測定することとした。

(2) LC 条件

まず、代謝物 M1 及びその異性体に最適な移動相条件を Inertsil ODS-4 を分析カラムに用いて検討した。移動相の有機溶媒としてメタノール及びアセトニトリルを検討したところ、アセトニトリルよりもメタノールを用いた方が保持時間が長く、高いピーク強度が得られた。水系溶媒の添加剤として酢酸、ギ酸及び酢酸アンモニウムを検討した結果、酢酸アンモニウムで最も高いピーク強度が得られた。酢酸アンモニウムの濃度（2～20 mmol/L）を検討したところ、濃度が高い方がピーク幅が狭くなり、ピーク形状が良かった。水系溶媒の pH（pH 7 及び 4.7）を検討したところ、ピーク強度はほぼ同程度であったが、pH 4.7 の方が若干ピーク幅が狭くなり、ピーク形状が

良かった。これらの結果から、20 mmol/L 酢酸緩衝液 (pH 4.7) 及びメタノールを用いることとした。

次に、分析カラムとして Inertsil ODS-4、InertSustain C18 及び InertSustainSwift C18 (いずれもジエールサイエンス製) を用いてピーク形状や感度等を比較した。その結果、いずれのカラムを用いた場合も良好なピーク形状が得られ、ピーク強度も同程度であったが、InertSustain C18 及び InertSustainSwift C18 と比較して Inertsil ODS-4 では保持が強かった。

以上の結果から、分析カラムとして Inertsil ODS-4、移動相として 20 mmol/L 酢酸緩衝液 (pH 4.7) 及びメタノールを用いて測定を行うこととした。本条件を用いてツラスロマイシン A 標準溶液を測定したところ、良好なピーク形状が得られた。なお、ツラスロマイシン A 標準溶液を 20 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 (pH 7) 及びメタノールを用いて測定したところ、非常にブロードなピークとなった。

代謝物 M1 及びツラスロマイシン A 標準溶液のクロマトグラムをそれぞれ図 6 及び図 7 に示した。代謝物 M1 標準溶液では、代謝物 M1 及びその異性体の合計ピーク面積に対する代謝物 M1 異性体のピーク面積の比率 (%) は約 2%であった。一方、ツラスロマイシン A 標準溶液では、ツラスロマイシン A 及び B の合計ピーク面積に対するツラスロマイシン B のピーク面積の比率 (%) は約 10%であった。

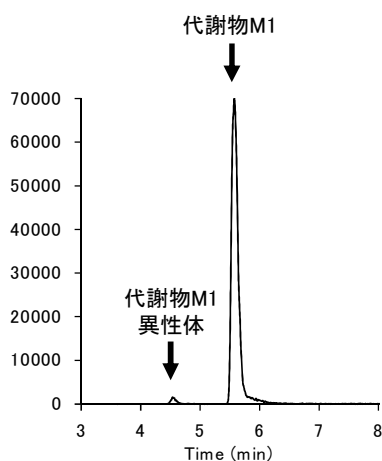


図 6 代謝物 M1 標準溶液 (0.005 µg/mL) のクロマトグラム

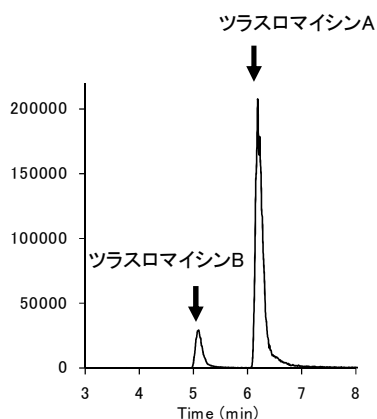


図 7 ツラスロマイシン A 標準溶液 (0.025 µg/mL) のクロマトグラム

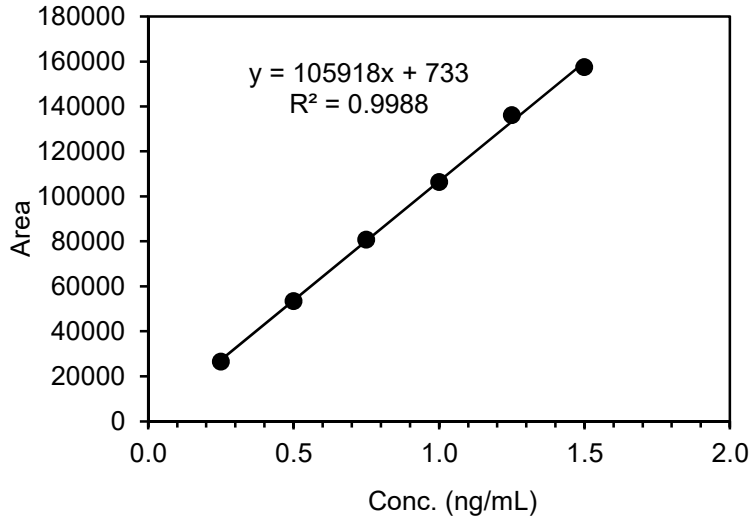


図 8 代謝物 M1 標準溶液（代謝物 M1 の異性体を含む）の検量線の例（ツラスロマイシンとして 0.25～1.5 ng/mL）

(3) 定量限界

定量限界の算出結果を以下に示した。

$$0.01 \text{ mg/kg} \quad \left[\left[\text{試験溶液量 } 5 \text{ (mL)} \right] / \left[\text{試験溶液中の試料量 } 0.5 \text{ (g)} \right] \right. \\ \left. \times \left[\text{分析対象化合物の定量限界相当量 } 0.003 \text{ (ng)} \right] / \left[\text{注入量 } 3 \text{ (}\mu\text{L)} \right] \right]$$

(4) 溶解溶媒及び LC 用バイアルの検討

ツラスロマイシン A 及び代謝物 M1 の標準溶液は、溶解溶媒の種類によっては時間とともにピーク面積が減少する傾向が見られた。そこで、様々な溶媒で調製した標準溶液をガラス製及び PP 製バイアルに分注し、調製直後、3、6 及び 24 時間後に LC-MS/MS で測定してピーク面積（各異性体を含む）を比較した。

ツラスロマイシン A 及び代謝物 M1 は、酸性または塩基性条件（20 mmol/L 酢酸緩衝液（pH 4.7）、20 mmol/L 酢酸緩衝液（pH 4.7）/メタノール（1：1）混液及びアンモニア水/メタノール（1：49）混液）では、0.1 vol% 酢酸/メタノール（1：1）混液を除き、ガラス製、PP 製のいずれのバイアルを用いた場合も 24 時間後まで安定であったが、中性条件（メタノール及びメタノール/水（1：1）混液）ではガラス製バイアルを用いた場合において時間とともに顕著にピーク面積が減少した（図 9、10）。0.1 vol% 酢酸/メタノール（1：1）混液では代謝物 M1 はガラス製、PP 製のいずれのバイアルを用いた場合も 24 時間後まで安定であったが、ツラスロマイシン A はガラス製バイアルを用いた場合において時間とともにピーク面積が減少した。なお、ツラスロマイシン A は、検討したすべての溶媒において代謝物 M1 及びその異性体への変換は認められなかった。

ツラスロマイシン A は分子内にアミノ基を 3 個、代謝物 M1 は 2 個有することから、特に中性条件ではガラス表面に吸着しやすいものと考えられた。20 mmol/L 酢酸緩衝液（pH 4.7）/メタノール（1：1）混液では、ガラス製、PP 製のいずれのバイアルを用いた場合も、ツラスロマイシン A 及び代謝物 M1 標準溶液は 24 時間後まで安定であったことから、この溶媒を用いて標準原液を調製することとした。ツラスロマイシン A 及び代謝物 M1 標準原液をそれぞれガラス製及び PP 製容器に分注し、冷蔵（5℃）及び冷凍（-30℃）で 2 か月間保存後、希釈をして測定を行ったとこ

ろ、いずれも新たに調製した標準原液から調製した標準溶液とピーク面積がよく一致し、安定であることが確認された。

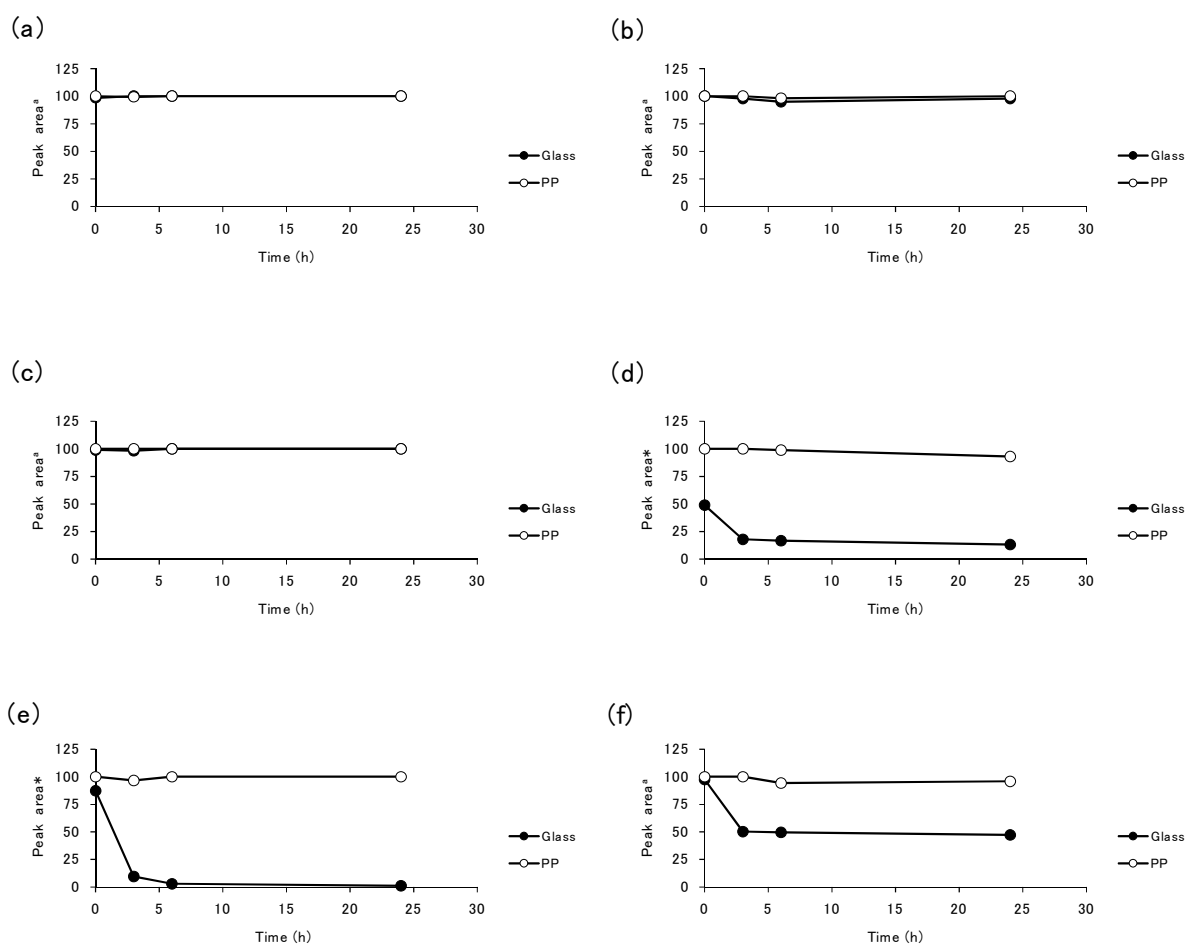


図9 ガラス製及びPP製バイアルを用いた場合のツラスロマイシンA標準溶液(0.05 µg/mL)のピーク面積**の経時変化

(a) 20 mmol/L 酢酸緩衝液 (pH 4.7)、(b) 20 mmol/L 酢酸緩衝液 (pH 4.7) / メタノール (1:1) 混液、(c) アンモニア水/メタノール (1:49) 混液、(d) メタノール、(e) メタノール/水 (1:1) 混液、(f) 0.1 vol% 酢酸/メタノール (1:1) 混液

* PP製バイアルでの調製直後のピーク面積を100とした。

**ツラスロマイシンA及びBの合計ピーク面積

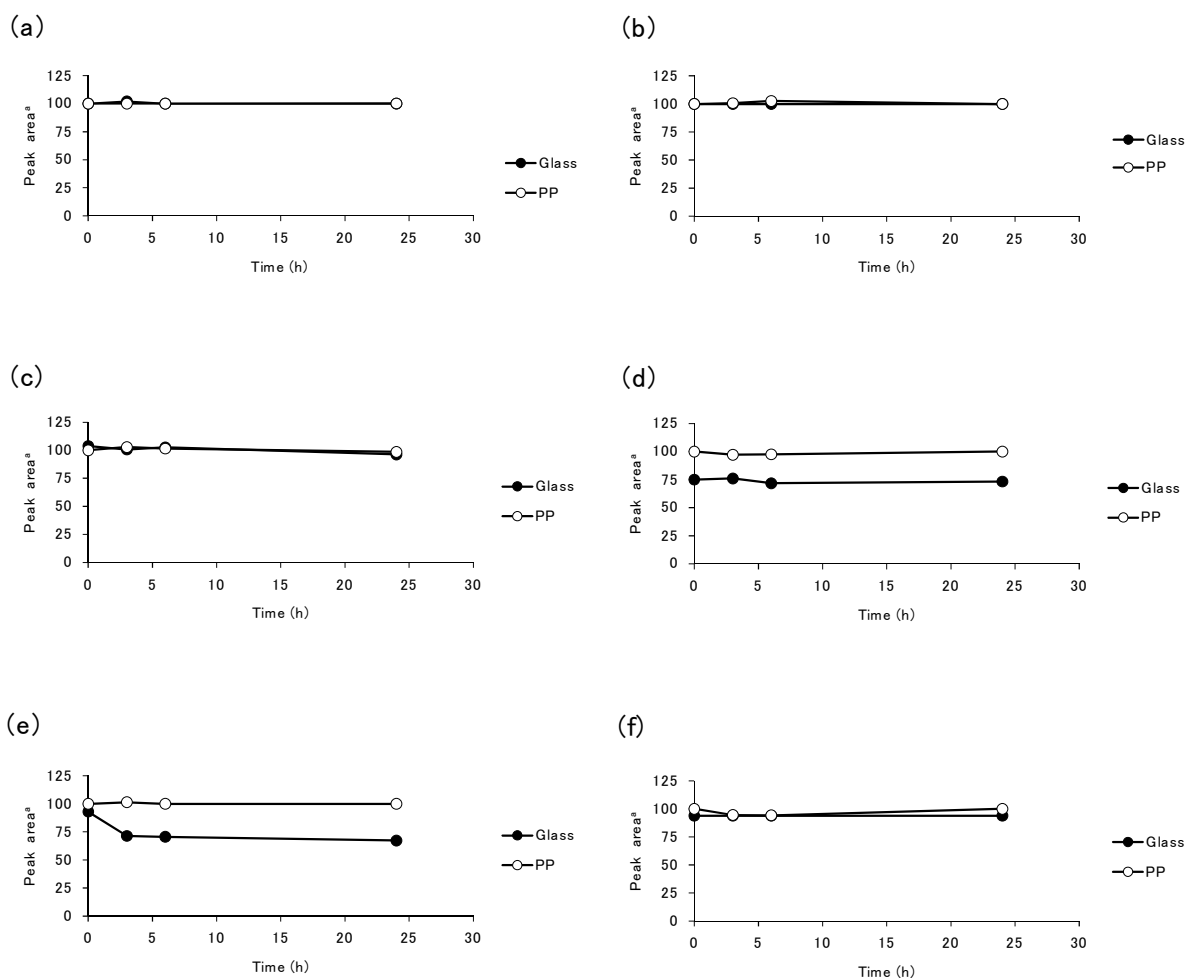


図 10 ガラス製及び PP 製バイアルを用いた場合の代謝物 M1 標準溶液 (0.005 µg/mL) のピーク面積の経時変化

(a) 20 mmol/L 酢酸緩衝液 (pH 4.7)、(b) 20 mmol/L 酢酸緩衝液 (pH 4.7) /メタノール (1:1) 混液、(c) アンモニア水/メタノール (1:49) 混液、(d) メタノール、(e) メタノール/水 (1:1) 混液、(f) 0.1 vol% 酢酸/メタノール (1:1) 混液

* PP 製バイアルでの調製直後のピーク面積を 100 とした。

**代謝物 M1 及びその異性体の合計ピーク面積

2. 試験溶液の調製方法の検討

(1) 抽出及び加水分解

① 試料の分解及び抽出

ツラスロマイシンは蛋白と結合しやすいことが知られており、申請企業の残留分析法¹⁾では、試料に 2 mol/L 塩酸を加えて(筋肉の場合はホモジナイズ及び振とう、脂肪及び肝臓の場合は攪拌及び振とう後)そのまま 60°C で 1 時間加熱し、試料からツラスロマイシン及びその代謝物を遊離させるとともに、代謝物 M1 及びその異性体に変換する方法を採用している。そこで申請企業の分析法と同様に、試料(牛の筋肉、牛の肝臓及び牛の脂肪、各 10.0 g)に 2 mol/L 塩酸 (40 mL) を加え、ホモジナイズした後、60°C で加熱し、試料の分解状況を確認した。その結果、筋肉では 2 mol/L 塩酸でホモジナイズを行っても試料が分散しなかった。また、いずれの食品も 5 時間加熱した後の試料の色は薄い茶色であり、試料の塊も残っていたことから(図 11)、本条件 (2 mol/L 塩

酸、60℃)では試料の分解は十分進行しないものと考えられた。このため、申請企業の方法を用いた場合、特に筋肉の残留試料では十分、抽出することができない可能性が高いと考えられた。そこで、有機溶媒存在下 2 mol/L 塩酸を用いて試料からホモジナイズ抽出した後、有機層を捨て、得られた水層及び残渣を加熱する方法を検討した。有機溶媒としては、ヘキサン、ヘキサン/酢酸エチル (1 : 1)、ヘキサン/アセトン (9 : 1) 及び酢酸エチルを検討した。試料 (牛の筋肉、肝臓、脂肪、各 10 g) に有機溶媒 (25 mL) 及び 2 mol/L 塩酸 (25 mL) を加え、ホモジナイズした結果、いずれの試料も分散し、操作上の問題はなかった。しかしながら、ホモジナイズ後の溶液を遠心分離したところ、ヘキサンを用いた場合は有機層がゲル化し、ヘキサン/酢酸エチル (1 : 1) またはヘキサン/アセトン (9 : 1) を用いた場合は、有機層と水層の間に中間層が形成され、水層及び残渣を分取することが困難であった。これに対し、酢酸エチルを用いた場合は、いずれの試料においても有機層と水層が分離した。これらの結果から、2 mol/L 塩酸及び酢酸エチルでホモジナイズ抽出し、遠心分離後、酢酸エチル層を捨て、得られた水層及び残渣を加熱することとした。本操作を行うことにより、低極性の夾雑成分を除去することができた。

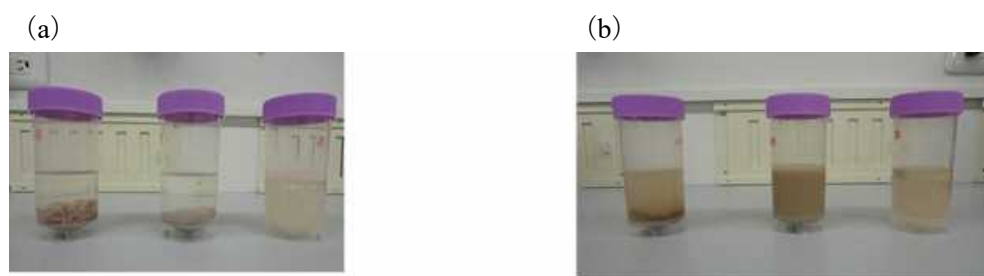


図11 各反応時間における試料の分解状況

(a) 0時間、(b) 5時間

試料：左から、牛の筋肉、牛の肝臓、牛の脂肪

② 2 mol/L 塩酸及び酢酸エチルによる液-液分配

2 mol/L 塩酸及び酢酸エチルでの液-液分配の回収率を求めた。ツラスロマイシン A 及び代謝物 M1 をそれぞれ 2 mol/L 塩酸に溶解後、酢酸エチルを加えて振とうしたところ、いずれも酢酸エチル層への移行は認められなかった (表 1)。なお、ツラスロマイシン A は、本操作で 1/3 程度が代謝物 M1 とその異性体に変換した。これらの結果から試料 10.0 g に 2 mol/L 塩酸及び酢酸エチルを加えてホモジナイズ抽出後、酢酸エチル層を捨て、得られた水層及び残留物を加熱することとした。

表 1 2 mol/L 塩酸及び酢酸エチルでの液-液分配における回収率 (%)

	定量	水層		酢酸エチル層	
			(合計)		(合計)
ツラスロマイシン A	ツラスロマイシン A	69	99	0	0
	ツラスロマイシン B	7		0	
	代謝物 M1	20		0	
	代謝物 M1 異性体	3		0	
代謝物 M1	代謝物 M1	99	99	0	0
	代謝物 M1 異性体	0		0	

操作方法：ツラスロマイシン A または代謝物 M1 標準溶液 (10 µg/mL) を 100 µL 採り、2 mol/L 塩酸 20 mL を加えて混合した。これに酢酸エチル 20 mL を加え、5 分間振とう後、遠心分離した。得られた水層及び酢酸エチル層をそれぞれ水及びメタノールで希釈して LC-MS/MS で測定した。

③ 標準品の加水分解

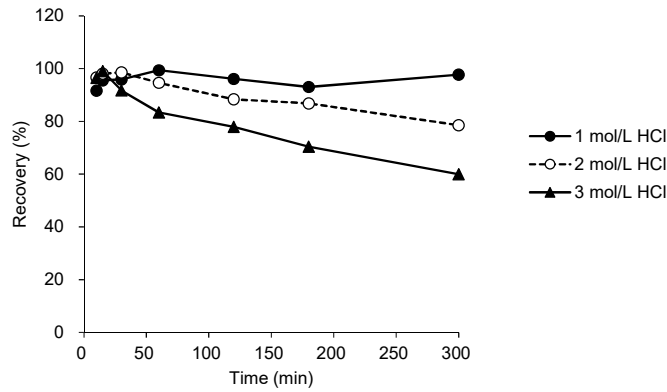
③-1 塩酸濃度の検討

加水分解における塩酸の濃度を最適化するため、ツラスロマイシン A 標準品に塩酸 (1、2 及び 3 mol/L) を加えて、60°C で 10～300 分間加熱し、代謝物 M1 及びその異性体の回収率を求めた (図 12 (a))。その結果、2 及び 3 mol/L 塩酸を用いた場合は、反応 10 分以内に代謝物 M1 とその異性体に変換したが、加熱時間を長くすると徐々に回収率が低下し、2 mol/L 塩酸では 120 分間、3 mol/L 塩酸では 30 分間以上加熱すると回収率が 90% 以下となった。1 mol/L 塩酸を用いた場合は、反応 10 分では未変換のツラスロマイシン (9%) が認められたものの、反応 15 分～300 分では良好な回収率が得られ、回収率の低下は見られなかった。代謝物 M1 標準品に塩酸 (1、2 及び 3 mol/L) を加えて 60°C で加熱したところ、ツラスロマイシン A と同様に、2 及び 3 mol/L 塩酸を用いた場合では長時間加熱すると回収率が低下した (図 12 (b))。試料からツラスロマイシン及びその代謝物を遊離するためには、より高い条件の方が望ましいと考えられることから、本検討では申請企業の分析法と同様に、2 mol/L 塩酸を用いて加熱することとした。

③-2 反応温度の検討

反応温度について最適化するため、ツラスロマイシン A 標準品に 2 mol/L 塩酸を加えて、50、60、70 及び 80°C で 10～300 分間加熱し、代謝物 M1 及びその異性体の回収率を求めた (図 13)。その結果、いずれの温度でもツラスロマイシン A は反応 10 分以内に代謝物 M1 及びその異性体に変換し、長時間加熱すると回収率が低下した。反応温度が高い程、急速に回収率が低下し、70 及び 80°C では 60 分、60°C では 120 分以上加熱すると回収率が 90% 未満となった。70°C 以上では短時間の加熱で回収率が低下するため、本検討では申請企業の分析法と同様に 60°C で反応することとした。

(a) ツラスロマイシン A



(b) 代謝物 M1

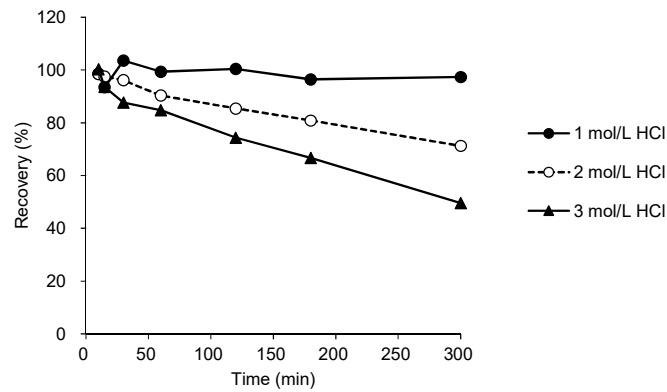


図 12 各塩酸濃度での加水分解反応における代謝物 M1 及びその異性体の回収率 (%)

操作方法： 各濃度の塩酸 40 mL に (a) ツラスロマイシン A または (b) 代謝物 M1 標準溶液 (10 µg/mL) 100 µL を加え、60°C で 10~300 分間加熱した後、水で 200 mL に定容し、LC-MS/MS で測定した。

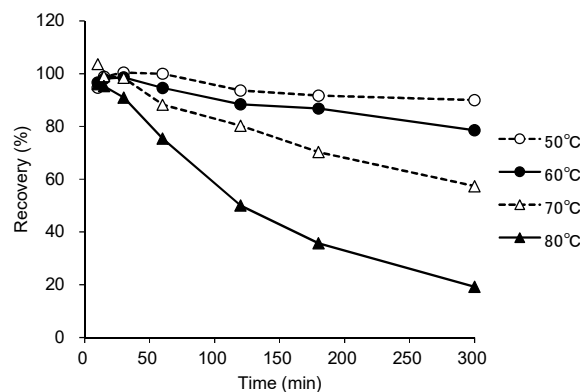


図 13 各反応温度でのツラスロマイシン A の加水分解反応における代謝物 M1 及びその異性体の回収率 (%)

操作方法： 2 mol/L 塩酸 40 mL に、ツラスロマイシン A 標準溶液 (10 µg/mL) 100 µL を加え、50、60、70 及び 80°C で 10~300 分間加熱した後、水で 200 mL に定容し、LC-MS/MS で測定した。

④ マトリックス存在下での加水分解

マトリックス（牛の筋肉及び牛の肝臓）存在下、ツラスロマイシン A を 2 mol/L 塩酸中 60°C で 10~300 分間加熱し、代謝物 M1 及びその異性体の回収率を求めた（図 14）。その結果、標準品を加水分解した場合と比べてやや反応が遅くなり、反応 15 分（2%未満）まで未反応のツラスロマイシンが残存していた。反応 10~60 分では 95%以上の良好な回収率が得られたが、60 分以上加熱すると回収率が徐々に低下し、反応 120 分では回収率が 90%未満となった。これらの結果から 2 mol/L 塩酸を用いて 60°C で 30 分間加熱することとした。

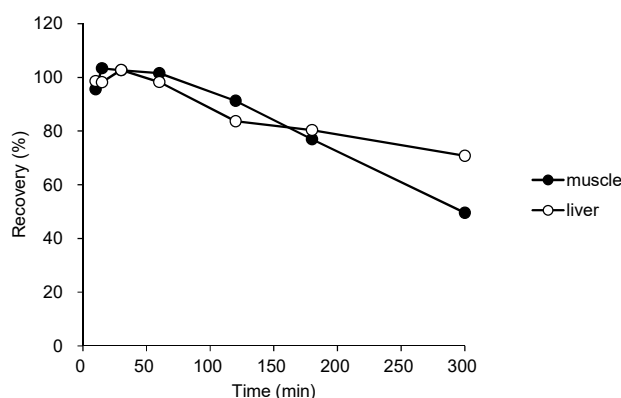


図 14 マトリックス（牛の筋肉及び牛の肝臓）存在下でのツラスロマイシン A の加水分解反応における代謝物 M1 及びその異性体の回収率

操作方法： 牛の筋肉または肝臓を『7. 試験溶液の調製』に従って 2 mol/L 塩酸及び酢酸エチルを用いてホモジナイズ抽出し、得られた水層及び残留物にツラスロマイシン A 標準溶液（10 µg/mL）100 µL を添加して、60°C で 10~300 分間加熱した後、『7. 試験溶液の調製』に従って精製し、LC-MS/MS で測定した。

⑤ 加水分解後の定容操作の検討

牛の筋肉、牛の脂肪及び牛の肝臓を『7. 試験溶液の調製』に従って抽出及び加水分解を行い、得られた溶液を遠心分離（毎分 3000 回転、5 分間）したところ、牛の肝臓や牛の脂肪では少量の浮遊物が観察された。定容や定容後の分取を正確に行うためにはこの浮遊物を取り除く必要があるため、ろ過方法について検討した。まず、残留農薬等の分析で一般的に用いられるろ紙（桐山ロート用ろ紙、No.5B）及びセライトを用いて吸引ろ過した。その結果、流速が非常に遅く、ろ過操作が困難であった。そこで、ガラス繊維ろ紙（GA-10、アドバンテック製）及びセライトを用いて吸引ろ過を行ったところ、流速が速く、操作に問題はなかった。セライトを用いず、ガラス繊維ろ紙のみを用いて吸引ろ過した場合は、流速が遅く、詰まる場合があった。これらの結果から、加水分解した溶液をガラス繊維ろ紙及びセライトを用いて吸引ろ過し、得られたろ液に水を加えて 100 mL に定容することとした。なお、牛の筋肉では遠心分離によって浮遊物を除くことができるため、ろ過を行う必要はないが、本検討では全ての食品についてろ過操作を行った。

(3) ミニカラム精製

スルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム [Oasis MCX (150 mg/6 mL)] を用いた精製を検討した。簡便な方法とするため、加水分解後、定容した溶液 5 mL（約 1 mol/L 塩酸、試料 0.5 g 相当）をそのまま負荷する方法を検討した。代謝物 M1 を 1 mol/L 塩酸 5 mL に溶解して、カラムに負荷したところ、1 mol/L 塩酸 10 mL（負荷液 5 mL を含む）及びメタノール 5 mL では溶出せず、アンモニア水/メタノールまたはアンモニア水/アセトニトリルの混合溶媒で溶出した（表 2）。アンモニア水/メタノールの混合溶媒を用いた場合、代謝物 M1（異性

体を含む)は(1:99)混液では6 mL、(1:49)混液では4 mL、(1:19)混液では3 mLで溶出した。一方、アンモニア水/アセトニトリルの混合溶媒を用いた場合は、(1:99)混液では溶出せず、(1:19)混液では8 mLで溶出し、アンモニア水/アセトニトリルよりもアンモニア水/メタノールの方が溶出しやすかった。これらの結果から、加水分解後、定容した溶液5 mLをミニカラムに負荷し、メタノール5 mLで洗浄後、アンモニア水/メタノール(1:49)混液4 mLで溶出し、得られた溶出液を5 mLに定容してそのままLC-MS/MSで測定することとした。『1.測定条件の検討(4)試験溶液の溶媒及びLC用バイアルの検討』で述べたように、アンモニア水/メタノール(1:49)混液を試験溶液として用いた場合、ガラス製、PP製のいずれのバイアルを用いても吸着等によるピーク面積の減少は見られなかった。本条件で精製することにより、試料中濃度0.01 ppmの分析においても、代謝物M1及びその異性体の定量を妨害する夾雑成分のピークは認められなかった。

表2-1 Oasis MCXミニカラムからの代謝物M1の回収率* (%)

1 mol/L 塩酸	メタノール	アンモニア水/メタノール (1:99)										合計
		0-1 mL	1-2 mL	2-3 mL	3-4 mL	4-5 mL	5-6 mL	6-7 mL	7-8 mL	8-9 mL	9-10 mL	
10 mL	5 mL	0	48	38	8	3	1	0	0	0	0	98
0	0	0	48	38	8	3	1	0	0	0	0	98

表2-2 Oasis MCXミニカラムからの代謝物M1の回収率* (%)

1 mol/L 塩酸	メタノール	アンモニア水/メタノール (1:49)										合計
		0-1 mL	1-2 mL	2-3 mL	3-4 mL	4-5 mL	5-6 mL	6-7 mL	7-8 mL	8-9 mL	9-10 mL	
10 mL	5 mL	1	93	4	<1	0	0	0	0	0	0	98
0	0	1	93	4	<1	0	0	0	0	0	0	98

表2-3 Oasis MCXミニカラムからの代謝物M1の回収率* (%)

1 mol/L 塩酸	メタノール	アンモニア水/メタノール (1:19)										合計
		0-1 mL	1-2 mL	2-3 mL	3-4 mL	4-5 mL	5-6 mL	6-7 mL	7-8 mL	8-9 mL	9-10 mL	
10 mL	5 mL	23	69	2	0	0	0	0	0	0	0	94
0	0	23	69	2	0	0	0	0	0	0	0	94

表2-4 Oasis MCXミニカラムからの代謝物M1の回収率* (%)

1 mol/L 塩酸	メタノール	アンモニア水/アセトニトリル (1:99)					合計
		0-2 mL	2-4 mL	4-6 mL	6-8 mL	8-10 mL	
10 mL	5 mL	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0

表2-5 Oasis MCXミニカラムからの代謝物M1の回収率* (%)

1 mol/L 塩酸	メタノール	アンモニア水/アセトニトリル (1:19)					合計
		0-2 mL	2-4 mL	4-6 mL	6-8 mL	8-10 mL	
10 mL	5 mL	12	70	7	1	0	90
0	0	12	70	7	1	0	90

*代謝物M1の異性体を含む。

操作方法： 1 mol/L 塩酸 5 mL に代謝物 M1 標準溶液 (1 µg/mL) を 100 µL 加え、混合した。これを、予めメタノール 2 mL 及び水 5 mL でコンディショニングしたカラムに負荷し、1 mol/L 塩酸 5 mL (負荷液を含めて 10 mL)、メタノール 5 mL、アンモニア水/メタノールまたはアンモニア水/アセトニトリルの混合溶媒 10 mL で順次溶出し、各画分を 10 mL に定容後、LC-MS/MS で測定した。

3. 添加回収試験

畜産物3食品（牛の筋肉、牛の脂肪及び牛の肝臓）を用いて、実験方法の『7. 試験溶液の調製』に従い、ツラスロマイシンA及び代謝物M1について定量限界（0.01 ppm）及び基準値濃度で5併行の添加回収試験を行った。なお、ツラスロマイシンA及び代謝物M1の添加回収試験は別々に実施した。添加回収試験におけるブランク試料、添加試料及び回収率100%相当の代謝物M1溶媒標準溶液の代表的なクロマトグラムを図15及び16に示した。また、各食品のブランク試料の代表的なトータルイオンカレントクロマトグラムを図17に示した。

(1) 選択性

いずれの食品においても、定量を妨害するピークは検出されず、選択性は良好であった（表3）。

表3 選択性の評価

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) ^{*1}							選択性 の評価 ^{*3}		
				評価濃度 (ppm)		面積又は 高さの別	ブランク			マトリックス添加標準溶液 ^{*2}				面積(高さ) 比(a)/(b)	
				基準値	定量限界		n=1	n=2	平均(a)	n=1	n=2	平均(b)			
ツラスロマイシンA	牛の筋肉	0.01	0.3	基準値	0.3	< 0.100	面積	0	0	0	108988	111935	110462	0.000	○
		0.01		定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	104051	103789	103920	0.000	○
	牛の脂肪	0.01	0.2	基準値	0.2	< 0.100	面積	0	0	0	114294	113476	113885	0.000	○
		0.01		定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	98456	98982	98719	0.000	○
	牛の肝臓	0.01	5	基準値	5	< 0.100	面積	0	0	0	107909	111123	109516	0.000	○
		0.01		定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	114200	114800	114500	0.000	○
代謝物M1	牛の筋肉	0.01	0.3	基準値	0.3	< 0.100	面積	0	0	0	111674	108817	110246	0.000	○
		0.01		定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	119938	119036	119487	0.000	○
	牛の脂肪	0.01	0.2	基準値	0.2	< 0.100	面積	0	0	0	118447	118995	118721	0.000	○
		0.01		定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	104448	101993	103221	0.000	○
	牛の肝臓	0.01	5	基準値	5	< 0.100	面積	0	0	0	104330	108048	106189	0.000	○
		0.01		定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	118800	117200	118000	0.000	○

*1 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。)

*2 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。

*3 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) 真度及び併行精度

定量限界及び基準値濃度での真度及び併行精度を表4に示した。ツラスロマイシンAは真度98～107%、併行精度1～2%、代謝物M1は真度99～105%、併行精度1～3%と良好な結果が得られ、妥当性評価ガイドラインの真度及び併行精度の目標値を満たした。

代謝物M1標準溶液、代謝物M1の添加試料のいずれも、代謝物M1及びその異性体の合計ピーク面積に対する代謝物M1異性体のピーク面積の比率(%)は約2%であった。一方、ツラスロマイシンA標準溶液中のツラスロマイシンA及びBの合計ピーク面積に対するツラスロマイシンBのピーク面積の比率(%)は約10%、ツラスロマイシンAの添加試料中の代謝物M1及びその異性体の合計ピーク面積に対する代謝物M1異性体のピーク面積の比率(%)は約10%であり、分析操作中では異性体比はほとんど変化しないことがわかった。

定量限界濃度(0.01 ppm)の添加試料から得られたピークのS/Nは211～1067であり、S/N \geq 10が得られた(表5)。

表4 真度及び併行精度

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)	検量線			回収率 (%)					真度 (%)	併行精度 (RSD%)
					傾き	切片	r ² 値	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5		
ツラスロマイシンA	牛の筋肉	0.01	0.3	0.3	105918	733	0.9988	102	99	105	102	103	102	2
		0.01		0.01	99353	649	0.9982	95	97	99	98	99	98	2
	牛の脂肪	0.01	0.2	0.2	112408	681	0.9980	103	103	104	107	103	104	2
		0.01		0.01	102897	1921	0.9993	101	100	98	98	98	99	1
	牛の肝臓	0.01	5	5	110221	825	0.9997	101	104	106	105	107	105	2
		0.01		0.01	101314	-928	0.9960	105	108	107	108	106	107	1
代謝物M1	牛の筋肉	0.01	0.3	0.3	107943	-1645	0.9989	101	99	99	95	99	99	2
		0.01		0.01	108419	-1198	0.9993	102	104	104	104	103	103	1
	牛の脂肪	0.01	0.2	0.2	117272	-820	0.9976	101	103	100	99	103	101	2
		0.01		0.01	105190	-2369	0.9991	102	101	104	100	102	102	1
	牛の肝臓	0.01	5	5	106702	-750	0.9994	104	101	103	104	97	102	3
		0.01		0.01	103696	-498	0.9982	104	106	103	106	108	105	2

表5 定量限界濃度の添加試料から得られたピークのS/N

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)	S/N		
					Max.	Min.	平均値
ツラスロマイシンA	牛の筋肉	0.01	0.3	0.01	289	267	278
	牛の脂肪	0.01	0.2	0.01	1110	1024	1067
	牛の肝臓	0.01	5	0.01	246	177	211
代謝物M1	牛の筋肉	0.01	0.3	0.01	332	277	304
	牛の脂肪	0.01	0.2	0.01	706	818	762
	牛の肝臓	0.01	5	0.01	213	213	213

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

(3) 試料マトリックスの測定への影響

定量限界及び基準値濃度での試料マトリックスの測定への影響を表6に示した。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に対するマトリックス添加標準溶液のピーク面積比を求めた結果、0.96~1.12となり、本試験法は試料由来のマトリックスの影響をほとんど受けずに測定することが可能であると考えられた。

表6 試料マトリックスの測定への影響

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 ¹⁾ (mg/L)	面積又は高さの別	ブランク ³⁾	ピーク面積(高さ) ²⁾						ピーク面積(高さ)比 ⁵⁾
								マトリックス添加標準溶液 ⁴⁾			溶媒標準溶液			
								n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均	
ツラスロマイシンA	牛の筋肉	0.01	0.3	0.3	0.001	面積	0	108988	111935	110462	108436	111530	109983	1.00
		0.01		0.01	0.001	面積	0	104051	103789	103920	105403	103407	104405	1.00
	牛の脂肪	0.01	0.2	0.2	0.001	面積	0	114294	113476	113885	109780	109184	109482	1.04
		0.01		0.01	0.001	面積	0	98456	98982	98719	105204	100785	102995	0.96
	牛の肝臓	0.01	5	5	0.001	面積	0	107909	111123	109516	109196	110129	109663	1.00
		0.01		0.01	0.001	面積	0	114200	114800	114500	100121	103528	101825	1.12
代謝物M1	牛の筋肉	0.01	0.3	0.3	0.001	面積	0	111674	108817	110246	109141	109262	109202	1.01
		0.01		0.01	0.001	面積	0	119938	119036	119487	109505	106452	107979	1.11
	牛の脂肪	0.01	0.2	0.2	0.001	面積	0	118447	118995	118721	113382	119428	116405	1.02
		0.01		0.01	0.001	面積	0	104448	101993	103221	106205	109633	107919	0.96
	牛の肝臓	0.01	5	5	0.001	面積	0	104330	108048	106189	107223	106709	106966	0.99
		0.01		0.01	0.001	面積	0	118800	117200	118000	104669	106882	105776	1.12

*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。)

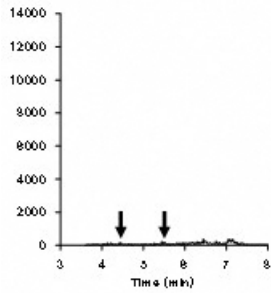
*3 ブランクにピークが認められた場合には、マトリックス添加標準溶液の値はブランク値を差し引いた値を用いる。

*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。

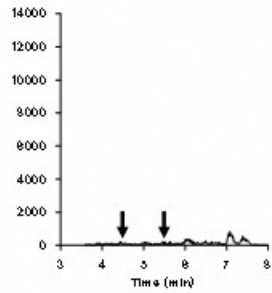
*5 マトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積(又は高さ)の比を求める。

① 牛の筋肉

ツラスロマイシン A

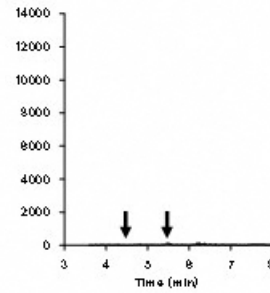


代謝物 M1



②牛の脂肪

ツラスロマイシン A



代謝物 M1

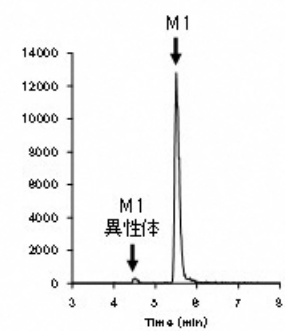
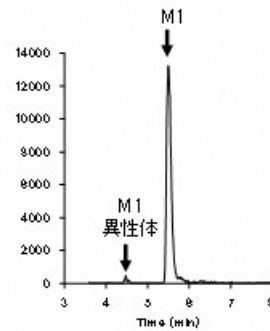
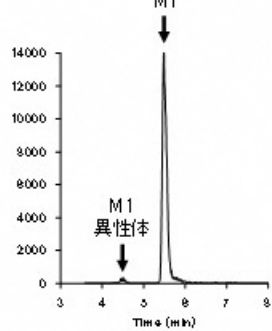
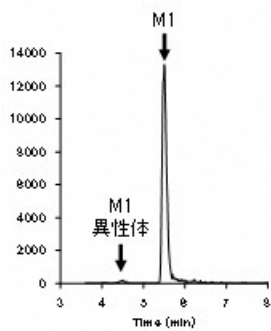
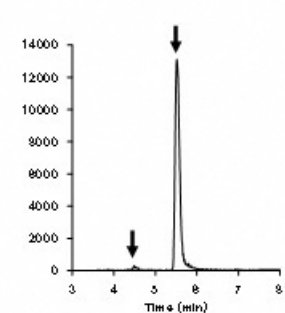
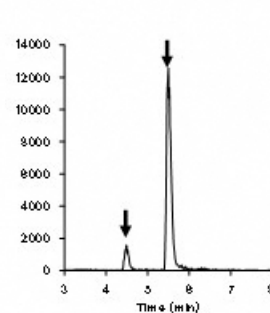
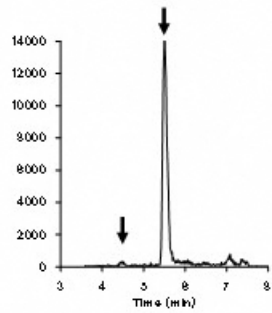
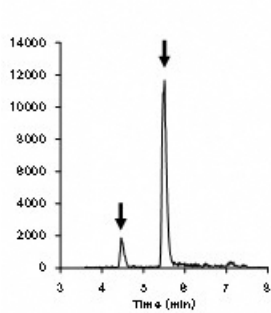
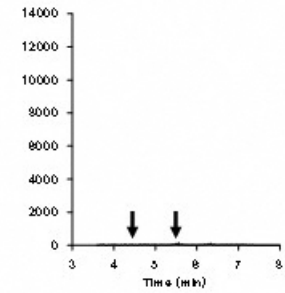


図 15-1 定量限界濃度 (0.01 ppm) での添加回収試験における代表的なクロマトグラム
 上: ブランク試料、中: 添加試料、下: 回収率 100%相当の代謝物 M1 溶媒標準溶液 (0.001 μg/mL)

③牛の肝臓

ツラスロマイシン A

代謝物 M1

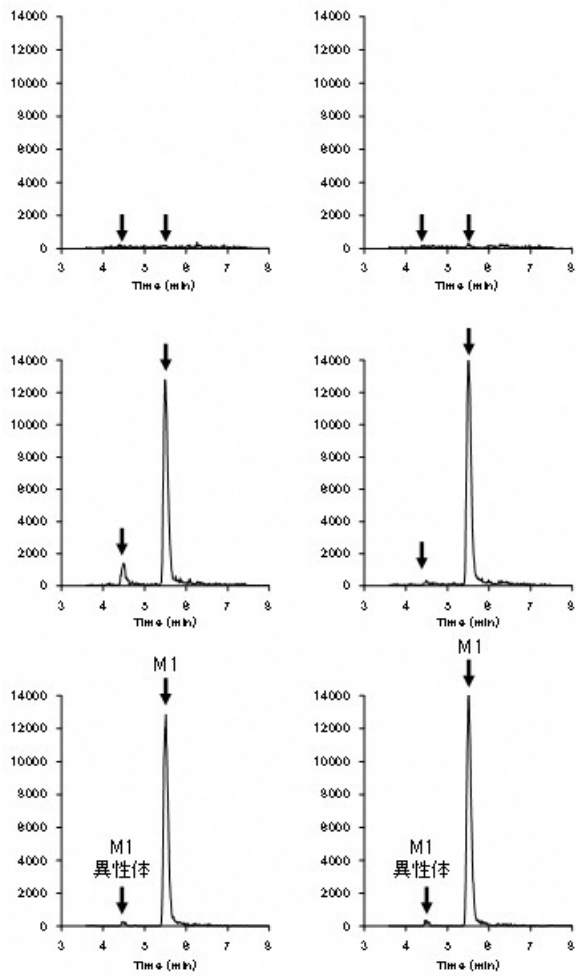
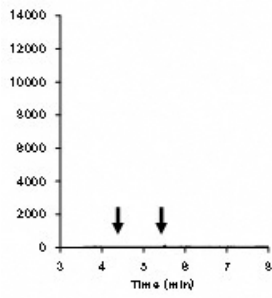


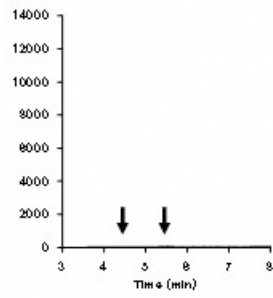
図 15-2 定量限界濃度 (0.01 ppm) での添加回収試験における代表的なクロマトグラム
 上: ブランク試料、中: 添加試料、下: 回収率 100%相当の代謝物 M1 溶媒標準溶液 (0.001 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

① 牛の筋肉

ツラスロマイシン A

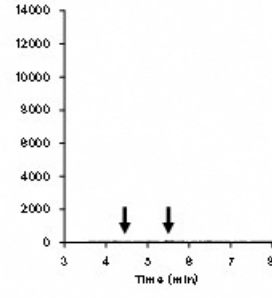


代謝物 M1



②牛の脂肪

ツラスロマイシン A



代謝物 M1

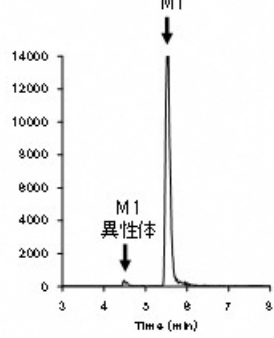
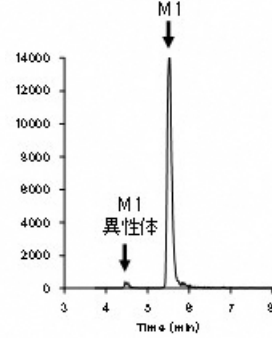
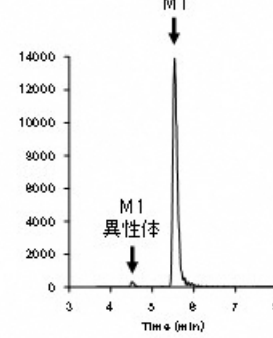
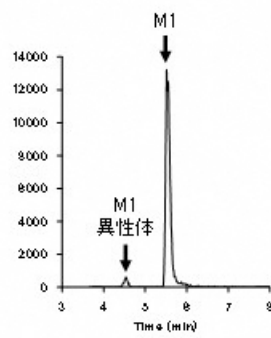
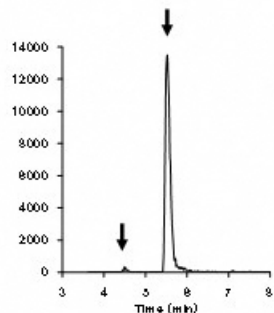
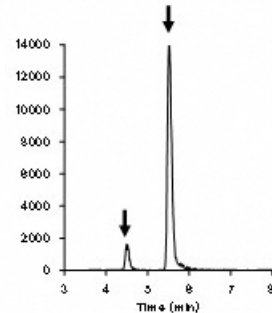
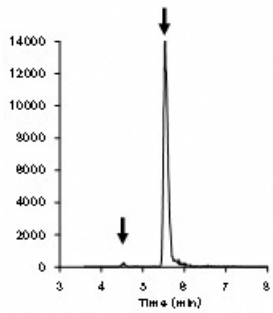
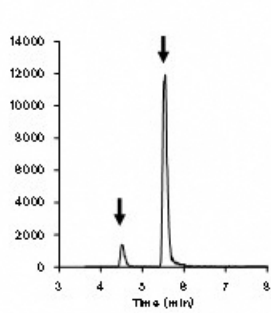
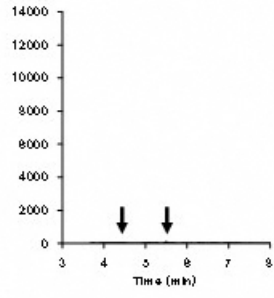


図 16-1 基準値濃度での添加回収試験における代表的なクロマトグラム

上：ブランク試料、中：添加試料、下：回収率 100%相当の代謝物 M1 溶媒標準溶液 (0.001 μg/mL)

③牛の肝臓

ツラスロマイシン A

代謝物 M1

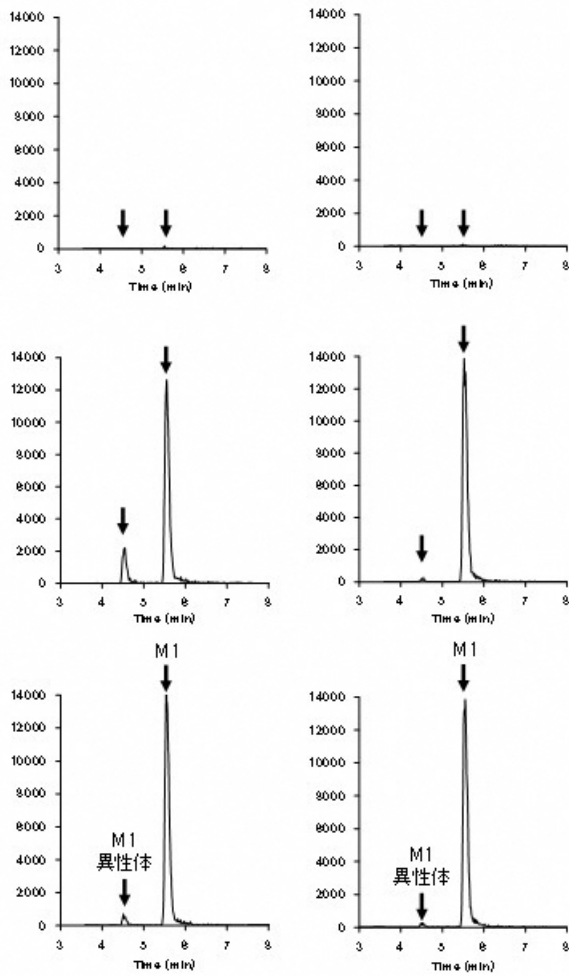
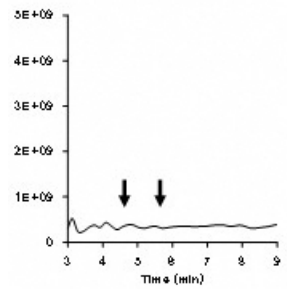
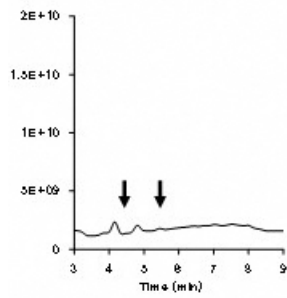


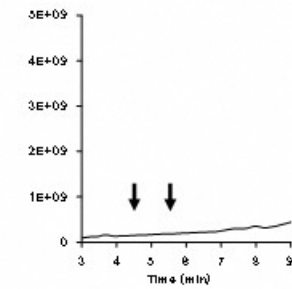
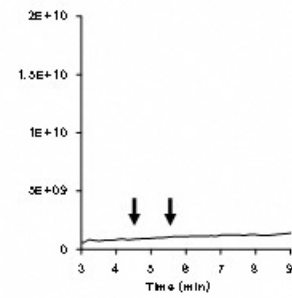
図 16-2 基準値濃度での添加回収試験における代表的なクロマトグラム

上：空白試料、中：添加試料、下：回収率 100%相当の代謝物 M1 溶媒標準溶液 (0.001 $\mu\text{g/mL}$)

①牛の筋肉



②牛の脂肪



③牛の肝臓

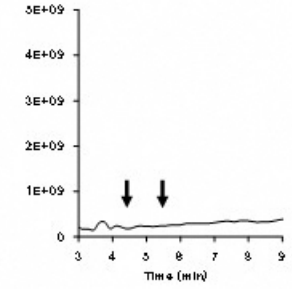
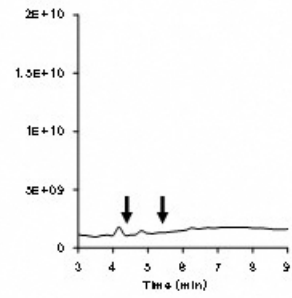
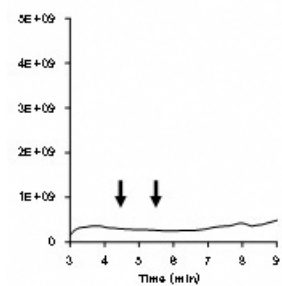
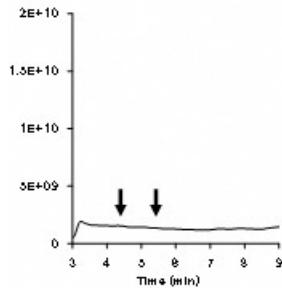


図 17-1 定量限界濃度での添加回収試験におけるブランク試料の代表的なトータルイオンカレントクロマトグラム

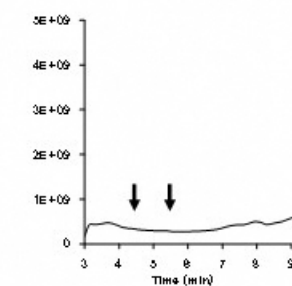
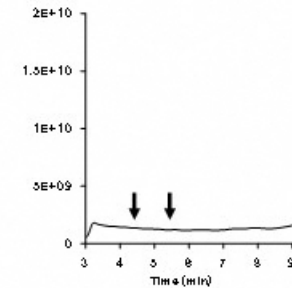
スキャン範囲： m/z 50～1000

上: ESI (+)、デクラスタリング電位 171 V； 下: ESI (-)、デクラスタリング電位 -171 V

①牛の筋肉



②牛の脂肪



③牛の肝臓

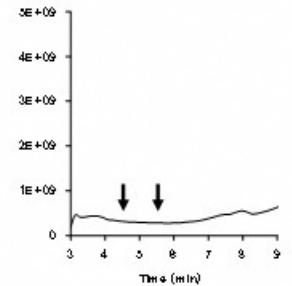
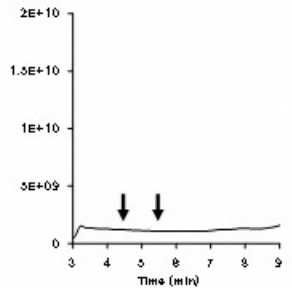


図 17-2 基準値濃度での添加回収試験におけるブランク試料の代表的なトータルイオンカレントクロマトグラム

スキャン範囲： m/z 50～1000

上: ESI (+)、デクラスタリング電位 171 V； 下: ESI (-)、デクラスタリング電位 -171 V

【結論】

畜産物中のツラスロマイシン試験法として、ツラスロマイシン及びその代謝物を試料から酢酸エチル及び塩酸で抽出し、酢酸エチル層を捨てた後、酸性条件下で加熱して代謝物 M1 及びその異性体に変換し、スルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムで精製した後、LC-MS/MS で定量及び確認する方法を開発した。牛の筋肉、牛の脂肪及び牛の肝臓を対象に、ツラスロマイシン A 及び代謝物 M1 について定量限界及び基準値濃度で添加回収試験を行った結果、ツラスロマイシン A は真度 98~107%、併行精度 1~2%、代謝物 M1 は真度 99~105%、併行精度 1~3% の良好な結果が得られた。いずれの試料についても定量を妨害するピークは認められず、選択性は良好であった。溶媒標準溶液に対するマトリックス添加標準溶液のピーク面積比は 0.96~1.12 となり、試料由来のマトリックスの影響をほとんど受けずに測定することが可能であった。これらの結果から、本試験法はツラスロマイシン及びその代謝物を精確に分析可能な方法と考えられた。

【参考文献】

1) Study 1531N-60-99-330. Marker Residue Depletion Study in Edible Tissues of Cattle Treated Subcutaneously with CP-472,295(e). Appendix 3: CP-472,295(e) Equivalentents in Bovine Tissues by CP-60,300, the Common Fragment. Document No. 820-0445. Pfizer global Research and Development.