

ツラスロマイシン試験法（畜産物）

1. 分析対象化合物

ツラスロマイシンA

ツラスロマイシンB

代謝物M1 【(2R,3S,4R,5R,8R,10R,11R,12S,13S,14R)-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】（加水分解により代謝物M1に変換される代謝物を含む。）

代謝物M1の異性体 【(2R,3R,6R,8R,9R,10S,11S,12R)-2-[(1R,2R)-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】（加水分解により代謝物M1の異性体に変換される代謝物を含む。）

2. 適用食品

畜産物

3. 装置

液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計（LC-MS/MS）

4. 試薬、試液

次に示すもの以外は、総則の3に示すものを用いる。

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（150 mg） 内径12～13 mmのポリエチレン製のカラム管に、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150 mgを充てんしたもの又はこれと同等の分離特性を有するものを用いる。

20 mmol/L酢酸緩衝液（pH 4.7）

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とする。

第2液：酢酸1.20 gを量り、水を加えて1 Lとする。

第1液と第2液を混和し、pHを4.7に調整する。

ツラスロマイシンA標準品 本品はツラスロマイシンA 90%以上を含む。

代謝物M1標準品 本品は代謝物M1 97%以上を含む。

5. 試験溶液の調製

1) 抽出及び加水分解

試料10.0 gに酢酸エチル25 mLを加え、ホモジナイズした後、2 mol/L塩酸25 mLを加え、さらにホモジナイズする。毎分3,000回転で5分間遠心分離した後、酢酸エチル層を捨て、水層を採る。残留物に酢酸エチル10 mL及び2 mol/L塩酸10 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、酢酸エチル層を捨てる。水層及び残留物に、先の水層を合わせ、2 mol/L塩酸5 mLで先の水層を採った容器を洗い、洗液を合わせる。得られた溶液及び残留物を60°Cで30分間加熱する。放冷後、ケイソウ土2 gを加えて混合した後、吸引ろ過する。容器及びろ紙上の残留物を2 mol/L塩酸5 mLで2回洗い、洗液を吸引ろ過する。ろ液を合わせ、水を加えて正確に100 mLとする。

2) 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（150 mg）にメタノール2 mL及び水5 mLを順次注入し、各流出液は捨てる。このカラムに1) で得られた溶液から正確に5 mLを分取して注入した後、メタノール5 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで、アンモニア水及びメタノール（1：49）混液4 mLを注入し、溶出液にアンモニア水及

びメタノール（1：49）混液を加えて正確に5 mLとしたものを試験溶液とする。

6. 検量線の作成

代謝物M1標準品を20 mmol/L酢酸緩衝液（pH 4.7）及びメタノール（1：1）混液に溶かして標準原液を調製する。これをアンモニア水及びメタノール（1：49）混液で希釈した溶液を数点調製し、それぞれLC-MS/MSに注入し、代謝物M1及び代謝物M1の異性体の各ピーク高又はピーク面積の和を用いて、ピーク高法又はピーク面積法で検量線を作成する。なお、本法に従って試験溶液を調製した場合、試料中0.01 mg/kg（ツラスロマイシン換算）に相当する試験溶液中濃度は0.001 mg/L（ツラスロマイシン換算）である。

7. 定量

試験溶液をLC-MS/MSに注入し、6. の検量線で代謝物M1及び代謝物M1の異性体の含量の和を求め、次式により、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含む。）の含量を求める。

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含む。）の含量（ppm）＝代謝物M1及び代謝物M1の異性体の含量の和（ppm）×1.398

8. 確認試験

LC-MS/MSにより確認する。

9. 測定条件

（例）

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲル 内径2.1 mm、長さ150 mm、粒子径3 μm

カラム温度：40℃

移動相：20 mmol/L酢酸緩衝液（pH 4.7）及びメタノール（9：1）から（0：10）までの濃度勾配を10分間で行う。

イオン化モード：ESI（+）

主なイオン（ m/z ）：プリカーサーイオン 577、プロダクトイオン 158、116

注入量：3 μL

保持時間の目安：代謝物M1：6分

代謝物M1の異性体：5分

10. 定量限界

0.01 mg/kg（ツラスロマイシン換算）

11. 留意事項

1) 試験法の概要

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塩酸で抽出する。塩酸性条件下で加熱して代謝物M1及び代謝物M1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である。なお、代謝物M1及び代謝物M1の異性体について定量を行い、代謝物M1及び代謝物M1の異性体の含量の和に換算係数を乗じてツラスロマイシン（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含む。）含量に変換したものを分析値とする。

2) 注意点

① ツラスロマイシンA標準品については、試験法開発時に入手可能であった標準品の純度

規格が90%以上であったため、4. では「ツラスロマイシンA標準品 本品はツラスロマイシンA 90%以上を含む。」とされたが、入手可能な場合には純度95%以上の標準品を試験に用いるのが望ましい。

- ② ツラスロマイシンは水溶液中でツラスロマイシンA及びツラスロマイシンBの平衡混合物となる。ツラスロマイシンA標準品を用いて添加回収試験を行った場合、代謝物M1及び代謝物M1の異性体の2本のピークとして検出される。
- ③ ツラスロマイシンA及び代謝物M1は、溶解する溶媒によってはガラス容器に吸着する。このため、ツラスロマイシンAの標準原液は、標準品を20 mmol/L酢酸緩衝液 (pH 4.7) 及びメタノール (1 : 1) 混液に溶かして調製すると良い。
- ④ ツラスロマイシンA標準品を用いて添加回収試験を実施し、加水分解が十分に行われていることを確認すること。
- ⑤ 吸引ろ過の際、ろ過速度が遅い場合は、ガラス繊維ろ紙を用いると良い。
- ⑥ 加水分解後、遠心分離を行うことにより浮遊物を除くことができる場合は、吸引ろ過を行う必要はない。
- ⑦ 定容の際、激しく振とうすると、試料によっては泡立つ場合があるため、穏やかに転倒混和する。
- ⑧ 代謝物M1及び代謝物M1の異性体のLC-MS/MS測定で、試験法開発時に使用したイオンを以下に示す。
定量イオン (m/z) : プリカーサーイオン577、プロダクトイオン158
定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン577、プロダクトイオン116
- ⑨ 代謝物M1に対する代謝物M1の異性体の相対保持時間は約0.8である。
- ⑩ 試験法開発時に検討した食品：牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓

12. 参考文献

なし

13. 類型

C