

※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。

酢酸イソ吉草酸タイロシン試験法（畜水産物）

[緒言]

1. 目的及び試験法の検討方針

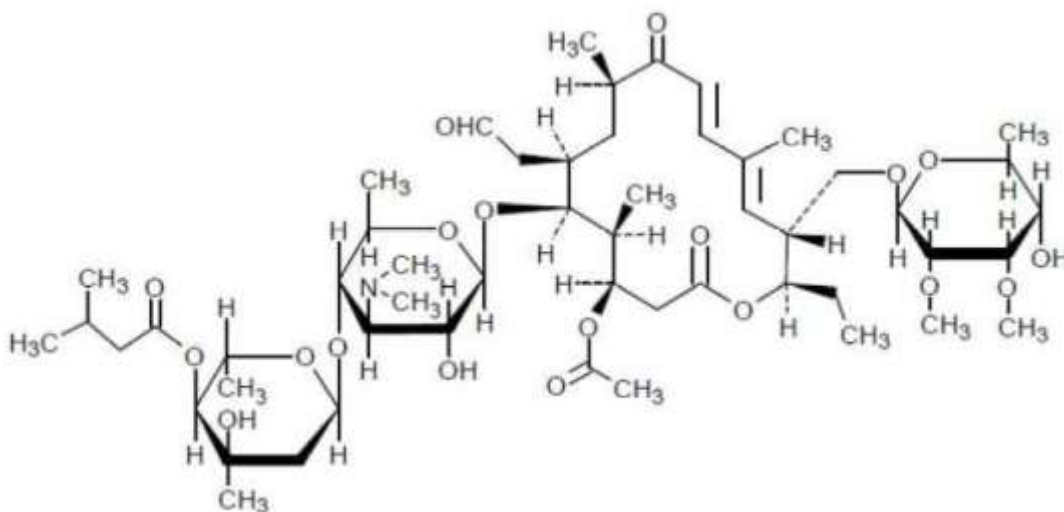
マクロライド系抗生物質である酢酸イソ吉草酸タイロシンは、タイロシンの酢酸イソ吉草酸エステルであり、鶏及び豚のマイコプラズマ感染症等に用いられる。この物質に対して新たに個別試験法を開発した。

規制対象物質

酢酸イソ吉草酸タイロシン

2. 分析対象化合物の構造式、物理化学的性質及び基準値等に関する情報

1) 構造式及び物理化学的性質



化学式：C₅₃H₈₇NO₁₉

分子量：1042.25

化学名（一般名）：Tylosin, 3-acetate 4B-(3-methylbutanoate)

(IUPAC)：(4R,5S,6S,7R,9R,11E,13E,15R,16R)-15-(((6-Deoxy-2,3-di-O-methyl-beta-D-allopyranosyl)oxy)methyl)-6-(((3,6-dideoxy-4-O-(2,6-dideoxy-3-C-methyl-4-O-(3-methylbutanoyl)-alpha-L-ribo-hexopyranosyl)-3-(dimethylamino)-beta-D-glucopyranosyl)oxy)-16-ethyl-5,9,13-trimethyl-2,10-dioxo-7-(2-oxoethyl)oxacyclohexadeca-11,13-dien-4-yl acetate

2) 基準値

豚の筋肉 0.04 ppm

豚の脂肪 0.04 ppm

豚の肝臓 0.04 ppm
豚の腎臓 0.04 ppm
豚の食用部分 0.04 ppm
鶏の筋肉 0.04 ppm
鶏の脂肪 0.04 ppm
鶏の肝臓 0.04 ppm
鶏の腎臓 0.04 ppm
鶏の食用部分 0.04 ppm

[実験方法]

1. 試料

1) 購入先

うなぎは愛知県内の業者から購入した。その他は大阪府内のスーパーマーケットにて購入した。

2) 試料の採取方法

- ①豚の筋肉は可能な限り脂肪層を除いた後、試料100 gを正確に量り、重量比で9/10量のエタノール及び水（1：1）混液及び重量比で1/10量のリン酸をそれぞれ加え磨砕均一化した。
- ②豚の脂肪は可能な限り筋肉部を除いた後、試料100 gを正確に量り、重量比で9/10量のエタノール及び水（1：1）混液及び重量比で1/10量のリン酸をそれぞれ加え磨砕均一化した。
- ③豚の肝臓は試料100 gを正確に量り、重量比で9/10量のエタノール及び水（1：1）混液及び重量比で1/10量のリン酸をそれぞれ加え磨砕均一化した。
- ④鶏の筋肉は脂肪層を除いた後、試料100 gを正確に量り、重量比で9/10量のエタノール及び水（1：1）混液及び重量比で1/10量のリン酸をそれぞれ加え磨砕均一化した。
- ⑤鶏の肝臓は試料100 gを正確に量り、重量比で9/10量のエタノール及び水（1：1）混液及び重量比で1/10量のリン酸をそれぞれ加え磨砕均一化した。
- ⑥牛乳は試料100 gを正確に量り、重量比で9/10量のエタノール及び水（1：1）混液及び重量比で1/10量のリン酸をそれぞれ加え磨砕均一化した。
- ⑦鶏卵は、殻を除き卵白と卵黄を合わせてよく混合した後、試料100 gを正確に量り、重量比で9/10量のエタノール及び水（1：1）混液及び重量比で1/10量のリン酸をそれぞれ加え磨砕均一化した。
- ⑦はちみつは百花蜜を使用し、加温（40℃以下）した後、試料100 gを正確に量り、重量比で9/10量のエタノール及び水（1：1）混液及び重量比で1/10量のリン酸をそれぞれ加え磨砕均一化した。
- ⑧うなぎは活鰻を使用し、頭部を除いた可食部（内臓、骨及び皮を含む）100 gを正確に量り、重量比で9/10量のエタノール及び水（1：1）混液及び重量比で1/10量のリン酸をそれぞれ加え磨砕均一化した。
- ⑩しじみは、貝殻を除いた後約5分間水切りを行った試料100 gを正確に量り、重量比で9/10量のエタノール及び水（1：1）混液及び重量比で1/10量のリン酸をそれぞれ加え磨砕均一化した。

2. 試薬・試液

1) 標準品

酢酸イソ吉草酸タイロシン標準品：996 μg (力価) /mg (農林水産省 動物医薬品検査所) 純度不明のため、99.6%と仮定した。

2) 試薬

アセトン：試薬特級 (関東化学製)

メタノール：試薬特級 (和光純薬工業製)

アセトニトリル：LC/MS用 (関東化学製)

ギ酸：LC/MS用 (和光純薬工業製)

リン酸：試薬特級 (和光純薬工業製)

塩化ナトリウム：試薬特級 (和光純薬工業製)

ケイソウ土：ハイフロスーパーセル (和光純薬工業製)

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 HLB (充てん量200 mg、Waters製)

3) 標準溶液、試液の調製方法

①標準溶液の調製方法

標準原液：酢酸イソ吉草酸タイロシン標準品20 mgを精秤し、メタノールで溶解して1000 mg/L溶液を調製した。

検量線用標準溶液：酢酸イソ吉草酸タイロシン標準原液をメタノールで適宜希釈し、0.00025~0.006 mg/Lの濃度の溶液を調製した。

添加用標準溶液：酢酸イソ吉草酸タイロシン標準原液をメタノールで希釈して、0.1、0.4及び5 mg/Lの濃度の溶液を調製した。

②試液の調製方法

水及びメタノール (3 : 2) 混液

水600 mL及びメタノール400 mLを混合した。

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。

3. 装置

ホモジナイザー：BM-2 (日本精機製)

ロータリーエバポレーター：N-1000V (東京理化器械) 等

LC-MS/MS

	型式	会社
MS 装置	API-3200	AB SCIEX
LC 装置	LC-20AD	島津製作所
データ処理	Analyst	AB SCIEX

4. 測定条件

LC 条件															
カラム	Inertsil ODS-4 サイズ：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 (mL/min)	0.2														
注入量 (μL)	5														
カラム温度 (°C)	40														
移動相	A液：0.05 vol%ギ酸水溶液 B液：0.05 vol%ギ酸含有アセトニトリル														
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>70</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>15.0</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>15.01</td> <td>70</td> <td>30</td> </tr> </tbody> </table>			時間(分)	A液(%)	B液(%)	0.0	70	30	15.0	0	100	15.01	70	30
時間(分)	A液(%)	B液(%)													
0.0	70	30													
15.0	0	100													
15.01	70	30													
MS 条件															
測定モード	MS/MS、SRM (選択反応モニタリング)														
イオン化モード	ESI (+)														
イオンスプレー電圧 (V)	5500														
イオン化温度 (°C)	400														
カーテンガス (psi)	20														
コリジョンガス (psi)	3														
イオンソースガス (psi)	1 : 80、2 : 70														
定量イオン (m/z)	+1043→109[コーン電圧:96(V)、コリジョンエネルギー:75(eV)]														
定性イオン (m/z)	+1043→174[コーン電圧:96(V)、コリジョンエネルギー:55(eV)]														
保持時間 (min)	9.6														

5. 定量

酢酸イソ吉草酸タイロシン標準品を精秤し、メタノールに溶解して1000 mg/L溶液を調製した。この溶液をメタノールで希釈して、0.00025、0.000375、0.0005、0.000625、0.00075、0.0015 mg/L及び0.001、0.002、0.003、0.004、0.005、0.006 mg/Lの濃度の標準溶液を調製した。この溶液5 μLをLC-MS/MSに注入して、得られたピーク面積を用いて検量線を作成した。試験溶液5 μLをLC-MS/MSに注入し、検量線から絶対検量線法により酢酸イソ吉草酸タイロシンの含量を算出した。

6. 添加試料の調製

豚の筋肉、豚の脂肪、豚の肝臓、鶏の筋肉及び鶏の肝臓（添加濃度：0.04 ppm相当）：試料10.0 g相当に添加用標準溶液0.4 mg/Lを1 mL添加しよく混合した後、30分間放置した。

うなぎ、しじみ、牛乳、鶏卵及びはちみつ（添加濃度：0.01 ppm）：試料10.0 g相当に添加用標準溶液0.1 mg/Lを1 mL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

酢酸イソ吉草酸タイロシンを試料からリン酸酸性下でアセトン抽出、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) 抽出

①はちみつ以外の場合

1. 2) の試料10.0 gに相当する量を250 mL遠心管に量り採り、アセトン100 mLを加え、ホモジナイズした後、ケイソウ土を厚さ約1 cmに敷いたろ紙（直径40 mm、GA-200、ADVANTEC製）を用いて

吸引ろ過し、200 mL容全量フラスコに採取した。ろ紙上の残留物にアセトン50 mLを加えてホモジナイズし、上記と同様にろ過した。得られたろ液を合わせ、アセトンを用いて正確に200 mLとし、この溶液から正確に4 mLを分取し、水15 mLを加えた。

②はちみつの場合

1. 2) の試料10.0 gに相当する量を250 mL遠心管に量り採り、水20 mLを加えよく均一化した。アセトン100 mLを加え、ホモジナイズした後、ケイソウ土を厚さ約1 cmに敷いたろ紙(直径40 mm、G-200、ADVANTEC製)を用いて吸引ろ過し、200 mL容全量フラスコに採取した。ろ紙上の残留物に水10 mL及びアセトン50 mLを加えてホモジナイズし、上記と同様にろ過した。得られたろ液を合わせ、アセトンを用いて正確に200 mLとし、この溶液から正確に4 mLを分取し、水15 mLを加えた。

2) 精製

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 HLB (200 mg/6 mL)]にメタノール10 mL、次いで水及びメタノール(3:2)混液10 mLを注入し、流出液は捨てた。このカラムに1)で得られた溶液を注入した後、さらに水及びメタノール(3:2)混液10 mLを注入し、流出液は捨てた。次いでメタノール10 mLを注入し、溶出液を採り、ロータリーエバポレーターを用いて40°C以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物をメタノール2 mLに溶解したものを試験溶液とした。

分析法フローチャート

秤 取

- | はちみつ以外：試料100 gにエタノール及び水（1：1）混液90 g及びリン酸10 gを加え、
- | 磨砕均一化後、20.0 g（試料10.0 g相当）を量り採る
- | はちみつ：試料100 gにエタノール及び水（1：1）混液90 g及びリン酸10 gを加え、
- ↓ 磨砕均一化後、試料10.0 g相当を量り採り、水20 mLを加え溶解

アセトン抽出

- | アセトン100 mLを加えホモジナイズ
- | 吸引ろ過
- | 残留物はアセトン50 mL（はちみつの場合、水10 mL及びアセトン50 mL）を加え、
- | ホモジナイズ
- | 吸引ろ過
- | ろ液を合わせ、アセトンで正確に200 mLとする
- ↓ 抽出液4 mL分取し、水15 mLを加える

Oasis HLB（200 mg/6 mL）精製

- | メタノール10 mL、水及びメタノール（3：2）混液10 mLでコンディショニング
- | 抽出液を注入
- | 水及びメタノール（3：2）混液10 mLで洗浄
- ↓ メタノール10 mLで溶出

濃縮（溶媒除去）

- | 減圧濃縮、窒素乾固
- ↓ 残留物をメタノール2 mLに溶解し、試験溶液とする

LC-MS/MS定量

5 μ L注入

8. マトリックス添加標準溶液の調製

1) 定量限界相当濃度（定量限界の推定用）

豚筋肉、豚脂肪、豚の肝臓、鶏筋肉及び鶏の肝臓はブランク試験溶液から0.5 mLを採り、溶媒を除去した後、0.001 mg/Lの標準溶液0.5 mLに溶解したものを、マトリックス添加標準溶液とした。

2) 添加回収試験における回収率 100%相当濃度（試料マトリックスの測定への影響確認用）

豚筋肉、豚脂肪、豚の肝臓、鶏筋肉及び鶏の肝臓はブランク試験溶液から0.5 mLを採り、溶媒を除去した後、0.004 mg/Lの標準溶液0.5 mLに溶解したものを、鶏卵、牛乳、はちみつ、しじみ及びうなぎはブランク試験溶液から0.5 mL分取し溶媒を除去した後、0.001 mg/Lの標準溶液0.5 mLに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

ESI (-) モードではプリカーサーイオンが確認できなかったが、ESI (+) モードでの測定が可能であり、酢酸イソ吉草酸タイロシンのプロトン付加分子 (m/z 1043 [M+H]⁺) をプリカーサーイオンとした。 m/z 1043 をプリカーサーイオンとした場合のプロダクトイオンの強度としては m/z 109 が最も強く、次いで m/z 174 が続いた。より強度の強かった m/z 109 を定量用イオンに、 m/z 174 を定性用イオンとした。

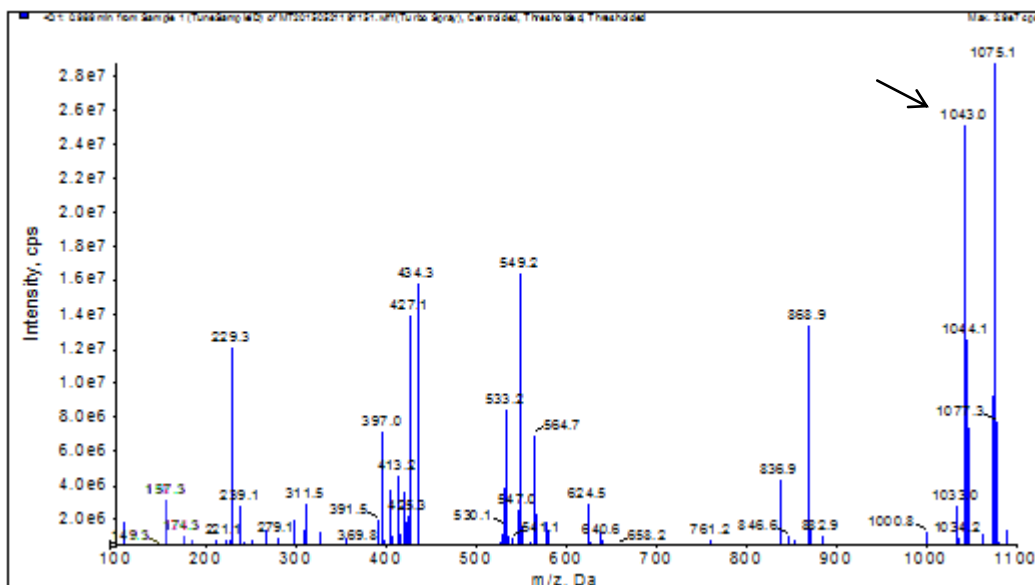


図1 酢酸イソ吉草酸タイロシン

スキャン範囲：100～1100 m/z

測定条件：ESI (+)、CV=40

(CV：コーン電圧)

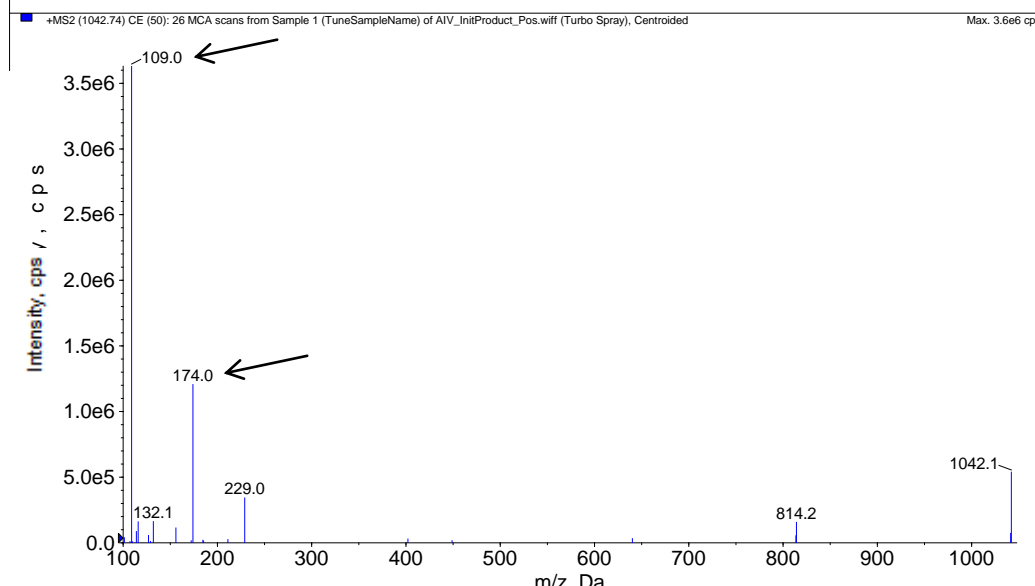


図2 酢酸イソ吉草酸タイロシンのプロダクトイオンスペクトル

プリカーサーイオン： m/z 1043

スキャン範囲：100～1050 m/z

測定条件：ESI (+)、CV=40、CE=50

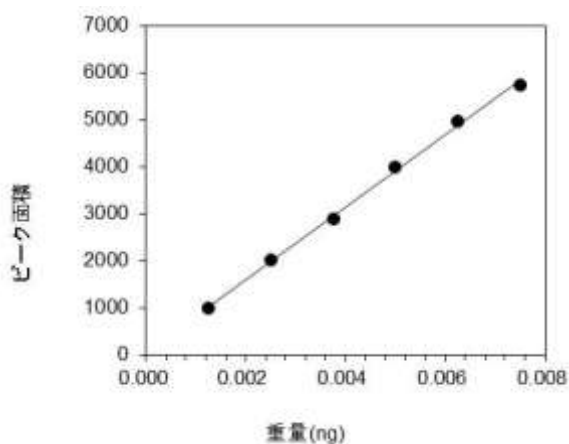
(CV：コーン電圧、CE：コリジョンエネルギー)

2) LC条件の検討

分析カラムについて、Inertsil ODS-4（内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm）を用い、移動相について、0.05 vol%ギ酸水溶液及び0.05 vol%ギ酸含有アセトニトリルを用いて検討を行ったところ、ピーク形状、分離、再現性及び感度のいずれも良好な結果が得られたため、カラムはInertsil ODS-4（内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm）を、移動相には0.05 vol%ギ酸水溶液及び0.05 vol%ギ酸含有アセトニトリルを用いることとした。なお、移動相についてはメタノールよりアセトニトリルを用いた方で高いピーク強度が得られ、さらにギ酸を加えることでピーク形状及び感度が良好となった。

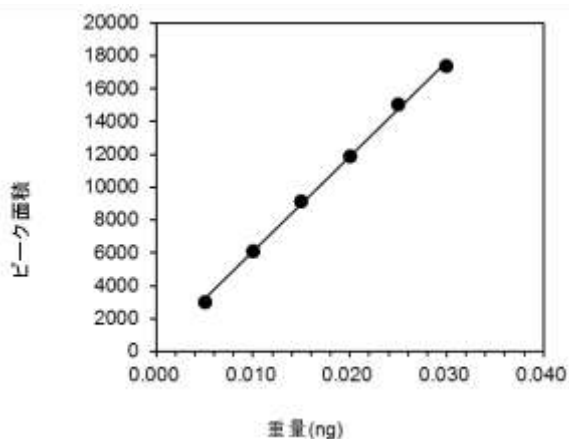
3) 検量線

図3及び4に酢酸イソ吉草酸タイロシンの検量線の例を示した。0.00025 mg/L (0.00125 ng) ~ 0.0015 mg/L (0.0075 ng) 及び0.001 mg/L (0.005 ng) ~0.006 mg/L (0.03 ng) の濃度範囲で作成した検量線は、良好な直線性を示した。



データ処理装置設定条件の一例
 データ処理ソフトウェア（メーカー）：Analyst
 （AB SCIEX製）
 ピークの定量方法：ピーク面積法
 検量線の種類：最小二乗法
 検量線基準ピークの重量：0.00125 ng~0.0075 ng
 傾き (a) : a=767749
 切片 (b) : b=79
 R^2 : 0.9982

図3 酢酸イソ吉草酸タイロシン検量線例 (0.00125 ng~0.0075 ng) (m/z +1043→109)



データ処理装置設定条件の一例
 データ処理ソフトウェア（メーカー）：Analyst
 （AB SCIEX製）
 ピークの定量方法：ピーク面積法
 検量線の種類：最小二乗法
 検量線基準ピークの重量：0.005 ng~0.03ng
 傾き (a) : a= 578526
 切片 (b) : b=298
 R^2 : 0.9985

図4 酢酸イソ吉草酸タイロシン検量線例 (0.005 ng~0.03 ng) (m/z +1043→109)

4) 定量限界

定量限界の算出結果を以下に示した。

$$0.01 \text{ mg/kg} [(2 \text{ mL}/0.2 \text{ g}^{*1}) \times (0.005 \text{ ng}/5 \text{ μL})]$$

$$*^1 10.0 \text{ g} \times 4 \text{ mL}/200 \text{ mL}$$

2. 試験溶液調製法の検討

1) 減圧濃縮及び溶媒除去操作の検討

メタノールを試薬ブランク試験溶液とし、一方で [分析法フローチャート] に従って、豚の肝臓をマトリックスとしたブランク試料の抽出液を調製し、それぞれ10 mLに酢酸イソ吉草酸タイロシン0.1 µgを加え、ロータリーエバポレーターで1 mL程度まで濃縮後、窒素ガスで乾固させ、メタノール10 mLに再溶解した。

また、再溶解の検討は超音波洗浄機を用いる方法にて、①乾固後即時溶解、②30分室温で放置後に溶解といった時間による確認も実施した。

表1 試料マトリックスの有無によるメタノールへの再溶解率

試験溶液	再溶解率 (%)	
	乾固後即時	30分室温で放置後
試薬ブランク試験溶液	86	53
豚の肝臓ブランク試料試験溶液	104	91

添加量 : 0.1 µg

再溶解時は超音波洗浄機を使用

以上の結果より、試薬ブランク試験溶液では乾固による損失が認められ、放置することでその損失は顕著であった。一方で、試料マトリックス存在下では損失が抑えられることが示唆されたが、放置することで若干の減少が確認され、また、試料マトリックスの違いによる損失の懸念もあるため、本試験法においては濃縮乾固操作を必要最小限とすることとした。また、乾固後のメタノールへの再溶解は時間をおかず速やかに行うこととした。

2) 前処理及び抽出方法の検討

①抽出溶媒

本分析法においては脂肪その他畜水産食品試料との混和性を考慮しアセトンでの抽出を行った。

②豚の肝臓での酢酸イソ吉草酸タイロシン損失の確認

豚の肝臓10 gに酢酸イソ吉草酸タイロシン0.4 µgを添加混合し、添加直後に抽出操作を開始した場合と、添加混合30分後に抽出操作を開始した場合での回収率の比較を行った。結果を表2に示した。添加30分後に抽出操作を開始した場合には回収率40%程度と低い値となり、酢酸イソ吉草酸タイロシンの損失が確認されたため試料の前処理の検討を行うこととした。

表2 豚の肝臓における抽出開始時間の比較

抽出開始時間	回収率 (%)		
	1回目	2回目	平均
添加直後に抽出	97	95	96
添加30分後に抽出	41	42	42

添加量 : 0.4 µg

抽出以降の操作は [分析法フローチャート] に従って試験溶液を調製

③前処理方法の検討

豚の肝臓での酢酸イソ吉草酸タイロシンの損失が認められたため、肝臓中の酵素による分解を想定し、試料の前処理による酢酸イソ吉草酸タイロシンの分解防止を試みた。前処理方法として以下の方法を検討した。なお、エタノール及び水（1：1）は脂肪とリン酸が混合しやすくするために用いた。

I. エタノール及び水（1：1）混液処理

試料、エタノール及び水（1：1）混液を等重量混合し、ホモジナイズにより均一化した。

II. エタノール及び水（1：1）混液及びリン酸処理

試料、エタノール及び水（1：1）混液、リン酸を重量比10：9：1の割合で混合し、ホモジナイズにより均一化した。

添加は基準値添加とした。前処理済み試料の添加回収結果を表3に示した。リン酸を加えない場合では前処理無しと同程度の低い回収率となった。以上の結果より、酢酸イソ吉草酸タイロシンの損失を抑えることの出来た、エタノール及び水（1：1）混液及びリン酸を加える前処理方法を採用した。

表3 前処理方法の比較（豚の肝臓）

前処理方法	回収率（%）		
	1回目	2回目	平均
エタノール及び水（1：1）混液処理	51	51	51
エタノール及び水（1：1）混液及びリン酸処理	95	83	89

添加量：0.4 µg

抽出以降の操作は「分析法フローチャート」に従って試験溶液を調製

3) カラム精製の検討

①カラムの検討

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム及びジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムでの精製について豚の肝臓のブランク試料を用いて検討した。

カラムをメタノール10 mL、水及びメタノール（4：1）混液10 mLで予備洗浄した後、酢酸イソ吉草酸タイロシン0.1 µgを水及びメタノール（4：1）混液10 mLで負荷し、同混液10 mLで洗浄、メタノール10 mLで溶出させたときの溶出状況を表4及び5に示した。なお、予め溶出しない濃度として確認した、水及びメタノール（4：1）混液で負荷及び洗浄を用いた。オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムでは溶出率が低かったが、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を用いたところ良好な回収率が得られたため、本分析法ではオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムは採用せず、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を採用した。

表4 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（%）

	水及びメタノール（4：1）混液		メタノール
	10 mL（負荷）	10 mL（洗浄）	10 mL（溶出）
酢酸イソ吉草酸タイロシン	0	0	34

添加量：0.1 µg

Mega BondElute-C18（1 g/6 mL、Agilent製）

表5 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からの溶出状況 (%)

	水及びメタノール (4 : 1) 混液		メタノール
	10 mL (負荷)	10 mL (洗浄)	10 mL (溶出)
酢酸イソ吉草酸タイロシン	0	0	91

添加量 : 0.1 µg

Oasis HLB (200 mg/6 mL、Waters製)

②カラム容量の検討

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の容量について検討を行った。

Oasis HLB (60 mg/3 mL) 及びOasis HLB (200 mg/6 mL) での溶出状況について、豚の肝臓のブランク試料を用いて検討した。

カラムをメタノール10 mL、水及びメタノール (4 : 1) 混液10 mLで予備洗浄した後、酢酸イソ吉草酸タイロシン0.1 µgを水及びメタノール (4 : 1) 混液10 mLで負荷し、同混液10 mLで洗浄、メタノール10 mLで溶出させたときの溶出状況を表6に示した。いずれも良好な回収率が得られたが、本分析法では複数の試料に適用可能な分析法とするため、容量に余裕を持たせOasis HLB (200 mg/6 mL) を採用した。

表6 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からの溶出状況

カラム容量	回収率 (%)
Oasis HLB (60 mg/3 mL)	105
Oasis HLB (200 mg/6 mL)	97

添加量 : 0.1 µg

③カラム溶出液の検討

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 HLB (200 mg/6 mL)] での溶出液について検討した。

カラムをメタノール10 mL、水10 mLで予備洗浄した後、酢酸イソ吉草酸タイロシン0.1 µgを水及びメタノール (4 : 1) 混液10 mLで負荷し、水及びメタノール (3 : 2) 混液10 mL、水及びメタノール (2 : 3) 混液10 mL、水及びメタノール (1 : 4) 混液10 mL、及びメタノール10 mLで順次溶出させたときの溶出状況を表7に示した。

酢酸イソ吉草酸タイロシンは水及びメタノール (2 : 3) 混液10 mLまでは溶出せず、水及びメタノール (1 : 4) 混液10 mLで溶出した。本分析法では、試料溶液負荷後の洗浄は余裕をもたせ水及びメタノール (3 : 2) 10 mLとした。また、測定機器 (測定カラムやイオン源等) への汚染等の不具合もなかったため、溶出溶媒は濃縮乾固操作での簡便さを優先し、メタノールで行うこととした。

表7 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からの溶出状況 (%)

	水及びメタノール		水及びメタノール			メタノール
	(4 : 1) 混液	(3 : 2)	(2 : 3)	(1 : 4)	メタノール	
			10 mL	10 mL		
酢酸イソ吉草酸タイロシン	0	0	0	96	0	

添加量 : 0.1 µg

Oasis HLB (200 mg/6 mL、Waters製)

溶出溶媒としてメタノールを想定し、メタノールの溶出量の検討を行った。カラムをメタノール10 mL、水及びメタノール（3：2）混液10 mLで予備洗浄した後、酢酸イソ吉草酸タイロシン0.1 µgを水及びメタノール（3：2）混液10 mLで負荷し、メタノールで溶出した。結果を表8に示した。

メタノールでの溶出は5 mLで95%が溶出した。本分析法では、メタノールによる溶出溶媒量は余裕をもたせ10 mLとした。

表8 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からの溶出状況 (%)

	水及びメタノール (3：2) 混液		メタノール		合計
	10 mL (負荷)	0-5 mL	5-10 mL	10-15 mL	
	酢酸イソ吉草酸タイロシン	0	95	0	

添加量：0.1 µg

Oasis HLB (200 mg/6 mL、Waters製)

④抽出液に添加する水の液量検討

酢酸イソ吉草酸タイロシンは濃縮乾固工程で低回収となりやすいため、カラム負荷の際に濃縮乾固工程を省くことを想定し、カラム負荷する前にアセトン抽出液4 mLに加える水の量の検討を行った。豚の肝臓ブランク試料のアセトン抽出液4 mLに酢酸イソ吉草酸タイロシン0.1 µgを添加し、水を5 mL、10 mL、15 mL及び20 mL混合した後、カラムに負荷し、水及びメタノール（3：2）10 mL洗浄後、メタノール10 mLで溶出した際の回収率を求めた。検討結果を表9に示した。

検討結果より、本分析法では、アセトン抽出液4 mLに加える水の量は余裕をもたせ15 mL加えることとし、カラム負荷前には濃縮乾固操作を行わないこととした。

表9 アセトン抽出液に対する水添加量の検討

水添加量	回収率 (%)
アセトン 4 mL + 水 5 mL	26
アセトン 4 mL + 水 10 mL	102
アセトン 4 mL + 水 15 mL	96
アセトン 4 mL + 水 20 mL	108

添加量：0.1 µg

Oasis HLB (200 mg/6 mL、Waters製)

⑤最終条件での溶出状況の確認

カラムをメタノール10 mL、水及びメタノール（3：2）混液10 mLで予備洗浄した後、豚の肝臓ブランク試料のアセトン抽出液4 mLに酢酸イソ吉草酸タイロシン0.1 µgを添加し、水を15 mLを混合した溶液をカラムに負荷し、水及びメタノール（3：2）10 mL洗浄後、メタノールで溶出した際の回収率を求めた。確認結果を表10に示した。

確認結果より、最終条件で良好な結果が得られることを確認した。

表10 溶出状況の確認 (%)

	アセトン4 mL及 水及びメタノール		メタノール			合計
	び水15 mL混液 (3:2) 混液		0-5 mL	5-10 mL	10-15 mL	
	19 mL (負荷)	10 mL (洗浄)				
酢酸イソ吉草酸タイロシン	0	0	96	0	0	96

添加量 : 0.1 µg

Oasis HLB (200 mg/6 mL, Waters製)

3. 添加回収試験

1) 添加回収試験

豚の筋肉、豚の脂肪、豚の肝臓、鶏の筋肉、鶏の肝臓、鶏卵、牛乳、はちみつ、うなぎ、及びしじみの10食品を用いて、[実験方法] 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5-1~5-10に示した。また、各食品のブランク試料のスキャン測定による代表的なトータルイオンクロマトグラムを図7に示した。

選択性の結果を表11に示した。検討した何れの試料においても酢酸イソ吉草酸タイロシンの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。

表11 選択性の評価

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	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(高さ) 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)	
1	酢酸イソ吉草酸タイロシン	豚筋肉	0.01	0.04	0.04	基準値	0.04	< 0.100	面積	0		#DIV/0!	○	
		豚脂肪	0.01	0.04	0.04	基準値	0.04	< 0.100	面積	0		#DIV/0!	○	
		豚肝臓	0.01	0.04	0.04	基準値	0.04	< 0.100	面積	0		#DIV/0!	○	
		鶏筋肉	0.01	0.04	0.04	基準値	0.04	< 0.100	面積	0		#DIV/0!	○	
		鶏肝臓	0.01	0.04	0.04	基準値	0.04	< 0.100	面積	0		#DIV/0!	○	
		鶏卵	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		牛乳	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		はちみつ	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		しじみ	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	
		うなぎ	0.01	0.01	0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0		#DIV/0!	○	

*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。

2) 真度、精度及び定量限界

真度及び併行精度の検討結果を表12に示した。真度は88~104%、併行精度は2~4%であり、目標値を十分に満たした。添加濃度が定量限界濃度と同一である、鶏卵、牛乳、はちみつ、しじみ及びうなぎについては、S/N比の平均値は128~239であり S/N ≥ 10 を十分に満たした。

添加濃度が定量限界濃度と異なる試料について、定量限界の推定を行った結果を表13に示した。また、定量限界の推定における代表的なクロマトグラムを図6-1~6-5に示した。S/N比の平均値は142~287であり S/N ≥ 10 を十分に満たした。

表12 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 (ppm)	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	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5			Max.	Min.		平均値	
1	酢酸イソ吉草酸タイロシン	豚筋肉	0.01	0.04	0.04	*	3557286	341	0.9997	96	92	94	93	95	94	2		#DIV/0!		
		豚脂肪	0.01	0.04	0.04	*	2892629	298	0.9985	94	93	100	99	100	97	3		#DIV/0!		
		豚肝臓	0.01	0.04	0.04	*	3557286	341	0.9997	97	95	93	95	90	94	3		#DIV/0!		
		鶏筋肉	0.01	0.04	0.04	*	3557286	341	0.9997	89	91	91	94	94	92	2		#DIV/0!		
		鶏肝臓	0.01	0.04	0.04	*	3694343	-72	0.9979	89	86	84	92	89	88	3		#DIV/0!		
		鶏卵	0.01	0.01	0.01		3219429	99	0.9978	88	95	91	98	93	93	4	114	143	128	
		牛乳	0.01	0.01	0.01		3838743	79	0.9982	90	94	89	88	89	90	3	143	143	143	
		はちみつ	0.01	0.01	0.01		3154400	57	0.9955	93	90	88	85	90	89	3	95	190	142	
		しじみ	0.01	0.01	0.01		3154400	57	0.9955	104	105	107	104	99	104	3	190	287	239	
		うなぎ	0.01	0.01	0.01		3838743	79	0.9982	95	87	94	98	92	93	4	143	190	143	

*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。

表13 定量限界の推定

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	基準値 ¹⁾ (ppm)	添加濃度 (ppm)	定量限界の評価 ²⁾	標準溶液濃度 ³⁾ (mg/L)	面積又は高さの別	ブランク ⁴⁾	ピーク面積(高さ) ⁵⁾			溶媒標準溶液			S/N比		平均値		備考		
										マトリックス添加標準溶液			溶媒標準溶液			マトリックス添加標準溶液		溶媒標準溶液			面積(高さ)比(%) ⁶⁾	S/N比
										n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均	n=1	n=2					
1	酢酸イソ吉草酸タイロシン	豚筋肉	0.01	0.04	0.04	*	0.001	面積	0	3848	3972	3910	3674	3788	3731	287	287	105	287			
		豚脂肪	0.01	0.04	0.04	*	0.001	面積	0	3506	3235	3371	3293	3421	3357	114	190	100	152			
		豚肝臓	0.01	0.04	0.04	*	0.001	面積	0	3936	4021	3979	4018	4009	4014	143	190	99	166			
		鶏筋肉	0.01	0.04	0.04	*	0.001	面積	0	3811	3686	3749	3809	3878	3844	287	286	98	286			
		鶏肝臓	0.01	0.04	0.04	*	0.001	面積	0	3805	3649	3727	4003	3815	3909	95	190	95	142			
		鶏卵	0.01	0.01	0.01								0.0						#DIV/0!	#DIV/0!		
		牛乳	0.01	0.01	0.01								0.0						#DIV/0!	#DIV/0!		
		はちみつ	0.01	0.01	0.01								0.0						#DIV/0!	#DIV/0!		
		しじみ	0.01	0.01	0.01								0.0						#DIV/0!	#DIV/0!		
		うなぎ	0.01	0.01	0.01								0.0						#DIV/0!	#DIV/0!		

*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 定量限界の推定を行う対象(添加濃度と定量限界濃度と異なる場合)には、『』が表示される。
 *3 試料中の濃度が定量限界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。
 *4 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回以上測定する。(必要に応じて起爆注入を行う。)
 *5 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。
 *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。

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14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0.95~1.05であり、測定への影響はないものと考えられた。

表14 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 (ppm)	基準値 ¹⁾ (ppm)	添加濃度 (ppm)	標準溶液濃度 ²⁾ (mg/L)	面積又は高さの別	ブランク ⁴⁾	ピーク面積(高さ) ³⁾			溶媒標準溶液			ピーク面積(高さ)比 ⁶⁾	備考
									マトリックス添加標準溶液 ⁵⁾			溶媒標準溶液				
									n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均		
1	酢酸イソ吉草酸タイロシン	豚筋肉	0.01	0.04	0.04	0.004	面積	0	14711	15534	15123	15532	15325	15429	0.98	
		豚脂肪	0.01	0.04	0.04	0.004	面積	0	13558	14046	13802	13024	13451	13238	1.04	
		豚肝臓	0.01	0.04	0.04	0.004	面積	0	15590	15539	15565	15915	16223	16069	0.97	
		鶏筋肉	0.01	0.04	0.04	0.004	面積	0	14978	14592	14785	15405	15707	15566	0.95	
		鶏肝臓	0.01	0.04	0.04	0.004	面積	0	14133	14315	14224	14664	14759	14712	0.97	
		鶏卵	0.01	0.01	0.01	0.001	面積	0	3343	3479	3411	3380	3480	3430	0.99	
		牛乳	0.01	0.01	0.01	0.001	面積	0	3847	3955	3901	3949	3809	3879	1.01	
		はちみつ	0.01	0.01	0.01	0.001	面積	0	3037	3095	3066	3074	3016	3045	1.01	
		しじみ	0.01	0.01	0.01	0.001	面積	0	3939	3626	3783	3702	3502	3602	1.05	
		うなぎ	0.01	0.01	0.01	0.001	面積	0	3957	3875	3916	4144	4020	4082	0.96	

*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。

4. 考察

豚の肝臓での検討結果から試料の前処理では酸の必要性が確認されたため、エタノール及び水(1:1)混液及びリン酸を加える前処理方法を採用することとした。

精製カラムとしてはジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムを用いた。

開発した方法を用いて、豚の筋肉等10食品の添加回収試験を行った結果、選択性、回収試験による真度、併行精度とも基準を十分に満たしたことから、本試験法は、陸棲哺乳類に属する動物の筋肉、脂肪及び肝臓並びに魚介類、鶏卵、はちみつ等の畜水産物に適用可能であると判断された。

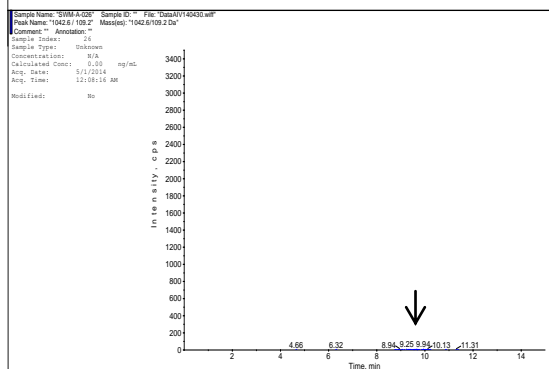
[結論]

畜水産物中の酢酸イソ吉草酸チロシン試験法として、酢酸イソ吉草酸チロシンを試料からリン酸酸性下でアセトン抽出し、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。

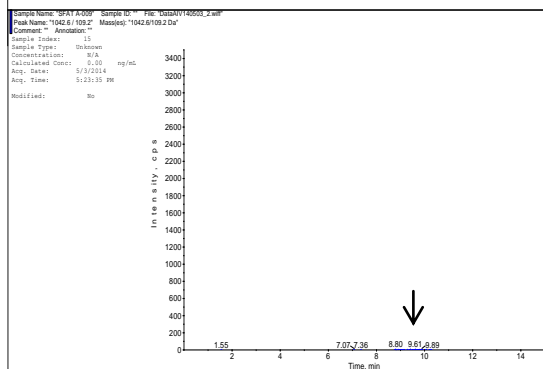
開発した試験法を豚の筋肉、豚の脂肪、豚の肝臓、鶏の筋肉、鶏の肝臓、鶏卵、牛乳、はちみつ、しじみ及びうなぎの10食品に適用した結果、選択性は良好で何れの試料においても酢酸イソ吉草酸チロシンの定量を妨害するピークは認められず、真度は87~104%、併行精度は1~5%の良好な結果が得られた。また、定量限界として、0.01 mg/kgを設定可能であることが確認された。

酢酸イソ吉草酸タイロシンの添加回収試験におけるクロマトグラム

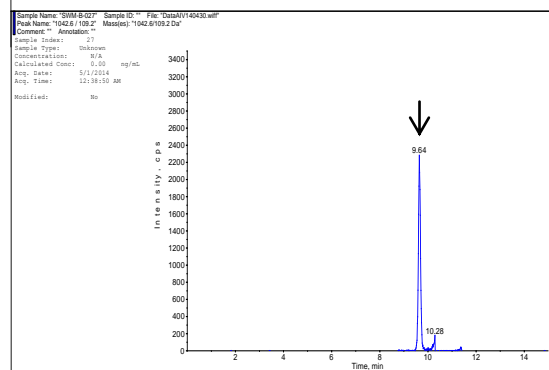
ブランク



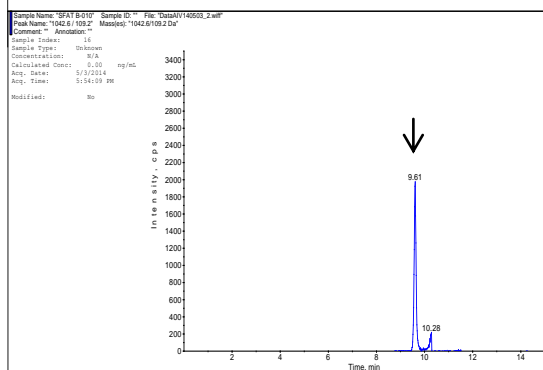
ブランク



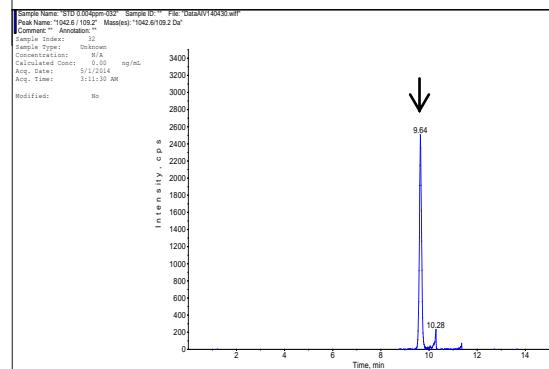
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

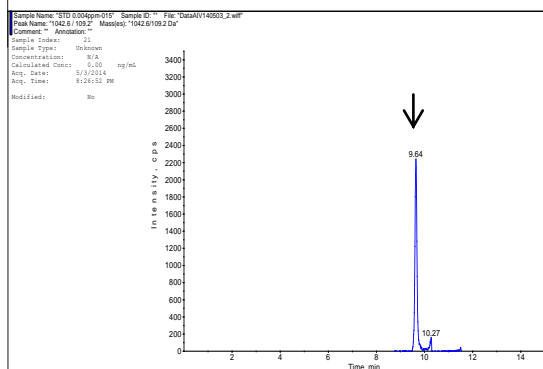


図 5-1 豚の筋肉の SRM クロマトグラム
 酢酸イソ吉草酸タイロシン (m/z +1043→109)
 添加濃度: 0.04 ppm 添加濃度: 0.04 ppm

図 5-2 豚の脂肪の SRM クロマトグラム
 酢酸イソ吉草酸タイロシン (m/z +1043→109)