

Ⅱ．分担研究報告

1．動物性食品中の残留物質及び汚染物質の分析法の確立 と妥当性評価

研究分担者 志田(齊藤) 静夏

令和5年度 厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)
分担研究報告書

動物性食品中の残留物質及び汚染物質の分析法の確立と妥当性評価

研究分担者 志田(齊藤)静夏 国立医薬品食品衛生研究所 食品部 室長

研究要旨

欧州連合(EU)へ牛肉を輸出する際のモニタリング検査において、A 物質が検出された場合に必要原因調査のための分析法として、①牛尿中の 2-チオウラシル、4-チオウラシルおよび 6-メチル-2-チオウラシル分析法および②牛尿中のレゾルシル酸ラクトン類分析法を確立した。牛尿中の 2-チオウラシル、4-チオウラシルおよび 6-メチル-2-チオウラシル分析法は、試料に塩酸およびエチレンジアミン四酢酸溶液を加えた後、3-ヨードベンジルブロミドで誘導体化し、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 で測定する方法である。牛尿を用いて添加濃度 10 $\mu\text{g/L}$ で分析法の性能を評価した結果、真度 95~100%、併行精度 5%未満および室内精度 8%未満となり、良好な結果が得られた。定量を妨害するピークは認められず、選択性に問題はなかった。本分析法はモニタリング検査で 2-チオウラシルが検出された場合に、2-チオウラシルの不正使用によるものか、アブラナ科植物を含む飼料を与えたことによるものかを判別する方法として有用と考えられた。牛尿中のレゾルシル酸ラクトン類(ゼラノール、タレラノール、ゼアララノンおよびゼアラレノン)分析法は、試料に β -グルクロニダーゼ/アシルスルファターゼを加えて抱合体を加水分解した後、イムノアフィニティーカラムで精製し、LC-MS/MS で測定する方法である。牛尿を用いて添加濃度 1 および 2 $\mu\text{g/L}$ で分析法の性能を評価した結果、真度 92~101%、併行精度 9%未満および室内精度 13%未満となり、良好な結果が得られた。定量を妨害するピークは認められず、選択性に問題はなかった。本分析法はモニタリング検査においてレゾルシル酸ラクトン類が検出された場合に、ゼラノールの使用によるものか、フザリウムトキシンに汚染された飼料を摂取したことによるものかを判別する方法として有用と考えられた。

研究協力機関

(一財)日本食品分析センター

研究協力者

伊藤里恵、穂山浩(星薬科大学)

A. 研究目的

欧州連合(EU)への牛肉等の動物性食品の輸出に際しては、欧州議会および理事会規則(EU) 2017/625、欧州委員会委任規則(EU) 2022/1644 および欧州委員会実施規則(EU) 2022/1646 に基づき残留物質モニタリング計画を作成し、A 物質(スチルベン類、抗甲状腺薬、ステロイド類、ゼラノ

ールを含むレゾルシル酸ラクトン、 β -作動薬、クロラムフェニコール等のその他の禁止物質)および B 物質(抗菌性物質、殺虫剤、殺菌剤、駆虫剤、鎮静剤、非ステロイド性抗炎症薬、抗コクシジウム剤、その他の薬理活性物質)のモニタリング検査を行う必要がある。B 物質がモニタリング部位(肝臓、腎臓等)から検出された場合は筋肉を検査し、基準値を超過した場合は原因の調査が求められる。一方、A 物質が検出された場合は、原因を調査して

必要な措置をとるまでの間、EU へ輸出することはできない。

牛を対象とした A 物質として抗甲状腺薬の 2-チオウラシル (Fig. 1) やメチマゾール等がある。2-チオウラシル等の抗甲状腺薬を与えると、組織中に水分が保持されやすくなるため、屠殺前に枝肉重量を増加させる目的で用いられることがあるが、肉質の低下を招くことが知られている。また、2-チオウラシルは国際がん研究機関 (IARC) において Group 2B に分類され、人に対する発がん性が疑われている。このようなことから、EU では 2-チオウラシル等の抗甲状腺薬の使用が禁止されており、EU へ牛肉を輸出する際はモニタリング検査が求められている。

現在、EU では 2-チオウラシルに Maximum residue limit (MRL) および Reference point for action (RPA) は設定されていないが、牛の尿および甲状腺の minimum method performance requirement (MMPR) をそれぞれ 10 µg/L および 10 µg/kg とすることが提案されている。しかしながら、2-チオウラシルを不正に使用していなくても、アブラナ科植物を含む飼料を与えると尿から 10 µg/L 以上検出される場合がある。モニタリング検査において牛の尿から 2-チオウラシルが 10 µg/L 以上検出された場合は不正使用によるものか、アブラナ科植物を含む飼料を与えたことによるものかを調査することが求められる。前述のように A 物質が検出された場合、原因を調査して必要な措置をとるまでの間、EU へ牛肉を輸出することができないため、迅速に原因を調査する方法の確立が望まれている。

2-チオウラシルの不正使用か否かの判別方法に関して、Blokland ら¹⁾は牛に 2-チオウラシルを投与した場合と、アブラナ科植物を飼料として与えた場

合で両者を判別可能な尿中のバイオマーカーを探索した。その結果、2-チオウラシルを投与した場合は、2-チオウラシルおよび 6-メチル-2-チオウラシル (Fig. 1) が検出され、4-チオウラシルは検出されなかった。一方、アブラナ科植物を飼料として与えた場合は、2-チオウラシルおよび 4-チオウラシルが検出され、6-メチル-2-チオウラシルは検出されなかった。加えて、4-チオウラシルは、その構造 (Fig. 1) から 2-チオウラシルの代謝物ではないと考えられた。これらの結果から、4-チオウラシルが検出され、6-メチル-2-チオウラシルは検出されなかった場合、2-チオウラシルの検出は不正使用によるものではないと判断できると結論された。したがって、2-チオウラシルに加えて、4-チオウラシルおよび 6-メチル-2-チオウラシルを分析すれば、2-チオウラシルの不正使用によるものか、アブラナ科植物を含む飼料を与えたことによるものかを判別することが可能と考えられる。

その他の牛肉を対象とした A 物質としてゼラノール (α -ZAL) 等のレゾルシル酸ラクトン類がある。 α -ZAL は、我が国ではこれまで動物用医薬品として承認されたことはないが、海外では肥育促進や飼料効率の改善を目的として使用されることがあり、米国、カナダおよび豪州等においては使用が認められている。一方、EU では、食肉の生産において成長促進を目的として α -ZAL 等のホルモン剤を使用すること、およびこれらを使用した動物の食肉の輸入が禁止されている。

α -ZAL を投与すると、ゼアララノン (ZAN) およびタレラノール (β -ZAL) に代謝されることが知られている (Fig. 2)。しかしながら、 α -ZAL を使用していなくても、飼料が *Fusarium* 属の真菌によって産生されるゼアラレノン (ZEN: Fig. 2) 等のマイコトキシン (フザリウムトキシン) に汚染されていると α -ZAL、 β -

ZAL および ZAN が検出される場合がある。モニタリング検査においてレゾルシル酸ラクトン類が検出された場合は原因が α -ZAL の投与によるものではないことが明らかになるまで、EU へ牛肉を輸出することができないため、 α -ZAL の使用によるものか、フザリウムトキシンに汚染された飼料を摂取したことによるものかを簡便に判別できる方法の確立が望まれている。

牛尿からレゾルシル酸ラクトン類が検出された場合に、 α -ZAL の使用によるものか、フザリウムトキシンに汚染された飼料を摂取したことによるものかを判別する方法として、 α -ZAL、 β -ZAL および ZAN の和と、ZEN、 α -ゼアラレノール (α -ZEL) および β -ゼアラレノール (β -ZEL) の和を比較し、 α -ZAL、 β -ZAL および ZAN の和の方が高い場合に α -ZAL の使用が原因と判断する方法が報告されている。しかし、本方法は分析が必要な化合物数が 6 化合物と多い。より少数の分析対象化合物を用い、且つ α -ZAL を使用しているにもかかわらず、陰性となる確率 (偽陰性率) を下げるためには α -ZAL、 β -ZAL、ZAN および ZEN を分析し、 α -ZAL、 β -ZAL および ZAN の和と、ZEN の濃度を比較して、 α -ZAL、 β -ZAL および ZAN の方が高い場合に α -ZAL の使用が原因と判断するのが良いと考えられる。

そこで、本研究では、EU への牛肉輸出時のモニタリング検査で 2-チオウラシルが検出された場合に、その原因調査に必要な牛尿中の 2-チオウラシル、4-チオウラシルおよび 6-メチル-2-チオウラシル分析法を確立し、その性能を評価した。また、モニタリング検査でレゾルシル酸ラクトン類が検出された場合に、その原因調査に必要な牛尿中のレゾルシル酸ラクトン類 (α -ZAL、 β -ZAL、ZAN および ZEN) 分析法を確立し、その性能を評価した。

B. 研究方法

[1] 2-チオウラシル、4-チオウラシルおよび 6-メチル-2-チオウラシル分析法

1. 試料

牛尿をよく混合後、毎分 3,500 回転で 5 分間遠心分離し、上澄みを試料とした。

2. 試薬・試液

2.1 試薬等

アセトニトリル:LC-MS用(関東化学製)

アセトニトリル、メタノール、塩酸、酢酸、リン酸二水素カリウム、水酸化ナトリウム:特級(富士フィルム和光純薬製)

エタノール:特級(99.5%:キシダ化学製)

リン酸水素二ナトリウム二水和物:分析用(Merck 製)

エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水和物:試験研究用(同仁化学研究所製)

3-ヨードベンジルブロミド(東京化成工業製)

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 (150 mg/6 mL:Waters製)

メンブランフィルター:PTFEシリンジフィルター(0.22 μ m:中部科学機器製)

1 mol/Lリン酸緩衝液(pH 8):リン酸二水素カリウム 2.1 gおよびリン酸水素二ナトリウム二水和物 86.3 gに水を加えて温めながら溶解後、水を加えて正確に 500 mLとした。

6 mol/L水酸化ナトリウム溶液:水酸化ナトリウム 120 gに水を加えて溶解後、水を加えて正確に 500 mLとした。

0.25 mol/Lエチレンジアミン四酢酸溶液:エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水和物 9.3 gに水約 80 mLを加えた後、攪拌しながら 6 mol/L水酸化ナトリウム溶液で pH を 8.0 に調整し、さらに約 10 分間

攪拌して溶解後、水を加えて正確に100 mLとした。

3-ヨードベンジルブロミド・メタノール溶液:3-ヨードベンジルブロミド20 mgにメタノール8 mLを加えて溶解した。

2.2 標準品

以下を標準品として使用した。

2-チオウラシル:純度99.91% (Toronto Research Chemicals製)

4-チオウラシル:純度98.9% (Merck製)

6-メチル-2-チオウラシル:純度98.3% (Merck製)

[¹³C,¹⁵N₂]-チオウラシル([¹³C,¹⁵N₂]-2-チオウラシル):純度97% (Toronto Research Chemicals製)

[¹³C,¹⁵N₂]-4-チオウラシル:純度99.3% (Alsachim製)

[¹³C₅,¹⁵N₂]-4-ヒドロキシ-2-メルカプト-6-メチルピリミジン([¹³C₅,¹⁵N₂]-6-メチル-2-チオウラシル):純度99.8% (Alsachim製)

2.3 標準原液

2-チオウラシル, 4-チオウラシル, 6-メチル-2-チオウラシル:各標準品約10 mgを精秤し, エタノールに溶解してそれぞれ100 mg/Lの濃度の溶液を調製した。

[¹³C,¹⁵N₂]-2-チオウラシル, [¹³C,¹⁵N₂]-4-チオウラシル, [¹³C₅,¹⁵N₂]-6-メチル-2-チオウラシル:各標準品1 mgを精秤し, エタノールに溶解してそれぞれ50 mg/Lの濃度の溶液を調製した。

2.4 添加用標準溶液および添加用内標準溶液

添加用標準溶液:2-チオウラシル標準原液, 4-チオウラシル標準原液および6-メチル-2-チオウラシル標準原液を混合後, エタノールで希釈して0.1 mg/L標準溶液を調製した。

添加用内標準溶液:[¹³C,¹⁵N₂]-2-チオウラシル内標準原液, [¹³C,¹⁵N₂]-4-チオウラシル内標準原液および[¹³C₅,¹⁵N₂]-6-メチル-2-チオウラシル内標準

原液を混合後, エタノールで希釈して1 mg/L内標準溶液を調製した。

3. 装置

ロータリーエバポレーター:N-1000(東京理化工械製)

遠心分離機:H-60R(コクサン製)

pH計:F-72(堀場製)

振とう恒温水槽:BT101(ヤマト科学製)

4. LC-MS/MS測定条件

液体クロマトグラフ:Nexera X2(島津製作所製)

質量分析計:Triple Quad 6500+(Sciex製)(一部の検討はTriple Quad 5500(Sciex製)を用いて行った。)

4.1 LC条件

分析カラム:Shim-pack Scepter C18-120(内径2.1 mm, 長さ100 mm, 粒子径1.9 μm:島津製作所製)

移動相:A液0.01 vol%酢酸, B液 アセトニトリル

流速:0.4 mL/min

グラジエント条件:0 min 30%B, 2 min 38%B, 4.5 min 38%B, 7.5 min 95%B, 9.5 min 95%B, 9.51 min 30%B, 14 min 30%B

注入量:1 μL

カラム温度:40°C

保持時間:Table 1に示した。

4.2 MS条件

イオン化モード:ESI(-)

測定モード:選択反応モニタリング(SRM)

イオンスプレー電圧:-4500 V

ヒーター温度:650°C

ネブライザーガス:空気, 40 psi

ターボガス:空気, 70 psi

コリジョンガス:窒素

SRM条件:Table 1に示した。

5. 試験溶液の調製

5.1 前処理

試料2.5 mLを遠心管(15 mL容)に採取し、塩酸10 μ Lおよび0.25 mol/Lエチレンジアミン四酢酸溶液100 μ Lを加えて混合した。

5.2 誘導体化反応

5.1で得られた溶液に1 mol/Lリン酸緩衝液(pH 8)7.5 mLおよび3-ヨードベンジルブロミド・メタノール溶液250 μ Lを加え、40°Cの水浴中で60分間振とうした。

5.3 精製

5.2で得られた反応液を、あらかじめメタノール5 mLおよび水5 mLでコンディショニングしたジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム[Oasis HLB(150 mg/6 mL)]に負荷した。遠心管内を水5 mLで洗い、洗液をミニカラムに負荷した。水5 mLおよび水/メタノール(3:2)5 mLで順次洗浄した後、1分間吸引した。アセトニトリル約25 mLで溶出し、全量をフラスコ(25 mL容)に受けた後、アセトニトリルで25 mLに定容し、メンブランフィルターでろ過したものを試験溶液とした。

6. 定量

水2.5 mLに塩酸10 μ Lおよび0.25 mol/Lエチレンジアミン四酢酸溶液100 μ Lを加え、標準溶液および内標準溶液を添加した後、実験方法5.2および5.3に従い、0.5, 1, 2, 5および10 μ g/L(内標準溶液は5 μ g/L)の濃度の内標準混合標準溶液を調製した。この溶液1 μ LをLC-MS/MSに注入して、得られた $[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}_2]$ -2-チオウラシルに対する2-チオウラシル、 $[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}_2]$ -4-チオウラシルに対する4-チオウラシルおよび $[^{13}\text{C}_5, ^{15}\text{N}_2]$ -6-メチル-2-チオウラシルに対する6-メチル-2-チオウラシルのピーク面積比を用いて検量線を作成した。試験溶液1 μ LをLC-MS/MSに注入し、検量線から内部標準法により2-

チオウラシル、4-チオウラシルおよび6-メチル-2-チオウラシルの含量を算出した。

7. マトリックス標準溶液

無添加試験溶液2.5 mLをロータリーエバポレーター(40°C)で濃縮乾固し、2-チオウラシル、4-チオウラシルおよび6-メチル-2-チオウラシル混合標準溶液(0.001 mg/L)2.5 mLを加えて溶解したものをマトリックス標準溶液とした。

8. 性能評価試験

牛尿を対象に添加濃度10 μ g/Lで性能評価試験を実施した。「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について」(妥当性評価ガイドライン)に従って1日2併行、5日間の枝分かれ実験を行い、各性能パラメータを求めた。牛尿を5.1に従って前処理を行った後、添加用標準溶液(0.1 mg/L)250 μ Lおよび添加用内標準溶液(1 mg/L)125 μ Lを添加したものを添加試料として用いた。なお、無添加試料から飼料由来と考えられる2-チオウラシルのピークが検出されたため、2-チオウラシルについては、添加試料から得られた測定値から無添加試料の測定値を差引いた値を用いて各性能パラメータを算出した。

[2] レゾルシル酸ラクトン類分析法

1. 試料

牛尿をよく混合し静置後、上澄みを採取した。

2. 試薬・試液

2.1 標準品

以下を標準品として用いた。

β -ZAL 標準品:純度 99.22%(Merck 製)

ZAN 標準品:純度 98.0%(富士フイルム和光純薬製)

ZEN 標準品:純度 99.5%(Merck 製)

α -ZAL 標準品:純度 98.6%(富士フイルム和光

純薬製)

2.2 試薬等

メタノール: 残留農薬試験用(関東化学製)

メタノール: 高速液体クロマトグラフ用(富士フイルム和光純薬製)

アセトニトリル: 高速液体クロマトグラフィー用(関東化学製)

酢酸, 酢酸ナトリウム, 酢酸アンモニウム: 特級(関東化学製)

β -グルクロニダーゼ/アリルスルファターゼ(Helix pomatia 由来): 生化学用(Merck 製)

イムノアフィニティーカラム: ZearalaTest WB (VICAM 製)

メンブランフィルター: Millex-LG (0.2 μ m, Merck 製)

0.25 mol/L 酢酸ナトリウム緩衝液(pH 4.8): 酢酸ナトリウム 4.1 g を量り, 水 200 mL を加えて溶かし, 酢酸で pH を 4.8 に調整した.

2.3 標準溶液

α -ZAL, β -ZAL および ZAN 標準原液: 各標準品約 2 mg(α -ZAL は約 5 mg) を精秤し, それぞれ水/アセトニトリル(1:1)に溶解して 100 mg/L 濃度の溶液を調製した.

ZEN 標準原液: 標準品約 10 mg を精秤し, メタノール(高速液体クロマトグラフ用)に溶解して 100 mg/L 濃度の溶液を調製した.

添加用混合標準溶液: 各標準原液を混合後, 水/アセトニトリル(3:1)で希釈して 10 及び 20 μ g/L 混合標準溶液を調製した.

3. 装置

ロータリーエバポレーター: N-1300(東京理化学器械製)

pH 計: D-72(堀場製)

振とう恒温水槽: T-N22S(トーマス科学器械製)

試験管ミキサー: AUTOMATIC MIXER S-100 (タイテック製)

LC-MS/MS: Nexera X2(島津製作所製)および TripleQuad 4500(Sciex 製)

4. LC-MS/MS 測定条件

カラム: InertSustain C18(内径 2.1 mm, 長さ 150 mm, 粒子径 3 μ m: ジーエルサイエンス製)にガードカラム InertSustain C18(内径 2.1 mm, 長さ 10 mm, 粒子径 3 μ m: ジーエルサイエンス製)を接続したものの

移動相流速: 0.3 mL/min

注入量: 5 μ L

カラム温度: 40°C

移動相: A 液 10 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液, B 液アセトニトリル/メタノール(4:1)

グラジエント条件: 0min 40%B, 1 min 40%B, 16 min 80%B, 21 min 80%B, 21.01 min 40%B, 26 min 40%B

保持時間: Table 2

選択反応モニタリング(SRM)

イオン化モード: ESI(-)

イオンスプレー電圧: -4500 V

ヒーター温度: 700°C

ネブライザーガス: 空気, 70 psi

ターボガス: 空気, 40 psi

コリジョンガス: 窒素

SRM条件: Table 2に示した.

5. 定量

添加用混合標準溶液を水/アセトニトリル(3:1)で希釈し, 0.5, 1, 2, 5 及び 10 μ g/L 濃度の混合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検量線を作成した. 試験溶液 5 μ L を LC-MS/MS に注入し, 検量線から絶対検量線法により α -ZAL, β -ZAL,

ZAN および ZEN の含量を算出した。

6. 試験溶液の調製

試料 2 mL を遠心管 (50 mL 容) に量り取り、0.25 mol/L 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH4.8) 2 mL を加えた後、0.25 mol/L 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.8) 及び β -グルクロニダーゼ/アリルスルファターゼの混液 (9:1) 20 μ L を加え、試験管ミキサーでよく攪拌した。これを密栓した後、55°C の水浴中で 2 時間振とうした。

反応液を室温に戻した後、イムノアフィニティーカラム (ZearalaTest WB) に負荷した。遠心管内を水 20 mL で洗い、洗液を負荷した。カラムを水/メタノール (9:1) 10 mL で 3 回洗浄後、メタノール 5 mL で溶出した。溶出液をロータリーエバポレーター (40°C) で濃縮し、窒素気流下で溶媒を除去した。残留物を水/アセトニトリル (3:1) 2 mL に溶解し、メンブランフィルターでろ過したものを試験溶液とした。

7. マトリックス標準溶液の調製

ブランク試験溶液 1 mL を遠心管 (50 mL 容) に分取し、ロータリーエバポレーター (40°C) で濃縮乾固した。これに、1 または 2 μ g/L の混合標準溶液 1 mL を加えて溶解したものをそれぞれ 1 および 2 μ g/L 濃度のマトリックス標準溶液とした。

8. 性能評価試験

牛尿を対象に添加濃度 1 および 2 μ g/L で性能評価試験を実施した。「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について」(妥当性評価ガイドライン) に従って 1 日 2 併行、5 日間の枝分かれ実験を行い、各性能パラメータを求めた。牛尿試料 2 mL に、10 または 20 μ g/L 濃度の混合標準溶液を 0.2 mL 添加したものをそれぞれ添加濃度 1 および 2 μ g/L の添加試料として用いた。なお、無添加試料から飼料由来と考えられ

る ZEN のピークが検出されたため、ZEN については、添加試料から得られた測定値から無添加試料の測定値を差引いた値を用いて各性能パラメータを算出した。

C. 結果及び考察

[1] 2-チオウラシル、4-チオウラシルおよび6-メチル-2-チオウラシル分析法

1. LC-MS/MS 条件の検討

1.1 MS 条件

2-チオウラシル、4-チオウラシルおよび 6-メチル-2-チオウラシルは LC-MS (ESI 法および APCI 法) で測定可能であるが、感度が低い。このため、3-ヨードベンジルブロミドや 4-クロロ-7-ニトロベンゾフラザン等で誘導体化後、LC-MS/MS で測定するのが一般的である。本検討では 3-ヨードベンジルブロミドで誘導体化後、LC-MS/MS で測定することとした。各化合物の 3-ヨードベンジルブロミド誘導体化物 (Fig. 1) をフルスキャン測定した。その結果、いずれも ESI(+) および ESI(-) モードで測定が可能であったが、ESI(-) モードの方がバックグラウンドが低く、高い S/N が得られたため、ESI(-) モードで測定することとした。2-チオウラシルおよび 4-チオウラシルは位置異性体であるため、ESI(-) モードではいずれも m/z 343 ($[M-H]^-$) が検出された。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、2-チオウラシルでは m/z 309、4-チオウラシルでは m/z 249 が観測され、両化合物で異なるイオンが検出された。このため、 m/z 309 および 249 をそれぞれ 2-チオウラシルおよび 4-チオウラシルの定量用プロダクトイオンとした。その他の S/N が高いプロダクトイオンは両化合物で共通のイオンであったが、保持時間の違いにより両化合物を分離することが可能であるため、最も

S/N が高い m/z 127 を定性用プロダクトイオンとすることとした。

1.2 LC 条件

Blokland ら¹⁾の LC 条件と同一の移動相(0.1%ギ酸含有水/メタノール), 分析カラム(Acquity UPLC BEH C18; 内径 2.1 mm, 長さ 100 mm, 粒子径 1.7 μm ; Waters 製)およびグラジエント条件で 3-ヨードベンジルブロミド誘導体化物の測定を行った。その結果, 本条件では 2-チオウラシルおよび 4-チオウラシルの誘導体化物を分離することができなかった。そこで, LC 条件(移動相, 分析カラムおよびグラジエント条件)を変更することとした。水系溶媒として 0.01 vol%酢酸, 有機溶媒としてアセトニトリルを用いたところ, 2-チオウラシルおよび 4-チオウラシルの誘導体化物の分離および S/N が向上した。また, 分析カラムとして Shim-pack Scepter C18-120 (内径 2.1 mm, 長さ 100 mm, 粒子径 1.9 μm)を用いたところ, 2-チオウラシルおよび 4-チオウラシルの誘導体化物のピークの分離度は 1.5 以上となり, 良好な分離が得られた。6-メチル-2-チオウラシルの誘導体化物についても本 LC 条件で良好なピーク形状および強度が得られた。これらの結果から, 移動相として 0.01 vol%酢酸およびアセトニトリル, 分析カラムとして Shim-pack Scepter C18-120 を用いて測定を行うこととした。

2. 試験溶液調製方法の検討

2.1 前処理

2-チオウラシル等は pH 3 以上の尿中では安定性が低い。また, 尿中に銅イオン等の金属イオンが共存すると, チオール基と相互作用して分解することが知られている。このため, 尿中の 2-チオウラシル等の分析では, 分解を抑えるため, 試料を塩酸等で pH 1 以下に調整し, エチレンジアミン四酢酸を加えた後, 誘導体化等を行うことが多い。本検

討においても牛尿に塩酸およびエチレンジアミン四酢酸を加えた後, 誘導体化を行うこととした。

2.2 誘導体化反応

各化合物の誘導体化反応は Blokland ら¹⁾の方法を参考にした。3-ヨードベンジルブロミドを加え, 40°C で 60 分間加熱する方法を採用しているため, 本条件で誘導体化反応が進行するか確認を行った。

まず, 牛尿の代わりに水を試料として用いて検討を行った。実験方法 5.1 に従い, 塩酸および 0.25 mol/L エチレンジアミン四酢酸溶液を加えた後, 試料中濃度 100 $\mu\text{g/L}$ 相当となるように 2-チオウラシル, 4-チオウラシルおよび 6-メチル-2-チオウラシルを添加し, 実験方法 5.2 および 5.3 に従って誘導体化反応および精製を行った。ただし, 誘導体化の反応時間は 20~120 分間とした。120 分(参考文献¹⁾の 2 倍の反応時間)でのピーク面積値に対する各反応時間でのピーク面積値の割合(%)を Fig. 3 に示した。いずれの化合物も反応時間 60 分以上では 97%以上となった。

次に, 牛尿を試料として用いて誘導体化の反応時間(50~120 分)の検討を行った。その結果, いずれの化合物も反応時間 60 分以上では 94%以上となった(Fig. 4)。これらの結果より, Blokland ら¹⁾の方法と同様に, 3-ヨードベンジルブロミドを加えた後, 40°C の水浴中で 60 分間加熱することで十分反応が進行すると考えられた。このため, 本条件で各化合物を 3-ヨードベンジルブロミド誘導体化物へ変換することとした。

2.3 精製方法

Blokland ら¹⁾は誘導体化後, 反応液をケイソウ土が充填された 96 ウェルプレートに負荷し, 酢酸エチルで溶出した後, 溶媒を除去し, アセトニトリル/水に再溶解して LC-MS/MS で測定する方法を

採用している。しかし、本方法では酢酸エチルの除去操作が必要であった。そこで、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(150 mg/6 mL)を用いて溶媒の除去を必要としない方法を検討した。牛尿の代わりに水を試料として用いて、実験方法 5.1 に従い、塩酸 10 μ L および 0.25 mol/L エチレンジアミン四酢酸溶液 100 μ L を加えた後、試料中濃度 100 μ g/L 相当の 2-チオウラシル、4-チオウラシルおよび 6-メチル-2-チオウラシルを添加し、実験方法 5.2 に従って誘導体化反応を行った。得られた反応液を Oasis HLB(あらかじめメタノール 5 mL、水 5 mL でコンディショニングしたもの)に負荷し、水 5 mL および水/メタノール (3:2) 5 mL で順次洗浄した後、アセトニトリルで溶出した。その結果、アセトニトリル 20 mL で 2-チオウラシルは 98%、4-チオウラシルは 89%、6-メチル-2-チオウラシルは 93%が溶出され、アセトニトリル 20~25 mL の画分にはいずれの化合物も溶出されなかった (Table 3)。これらの結果から、アセトニトリル約 25 mL で溶出することとした。

3. 性能評価

牛尿を対象に 2-チオウラシル、4-チオウラシルおよび 6-メチル-2-チオウラシルについて添加濃度 10 μ g/L で 1 日 2 併行、5 日間の添加回収試験を行い、確立した分析法の性能を評価した。なお、妥当性評価ガイドラインでは尿を対象としていないが、本ガイドラインに従って評価を行い、0.01 ppm での目標値を参照した。

無添加試料を分析したところ、飼料由来と考えられる 2-チオウラシルのピークが検出されたが、定量限界の 1/3 未満であった。4-チオウラシルおよび 6-メチル-2-チオウラシルはクロマトグラム上に定量を妨害するピークは検出されず、選択性に問題はないことが確認された (Fig. 5 ~7)。

真度、併行精度および室内精度の結果を Table 4に示した。真度 95~100%、併行精度 5%未満および室内精度 8%未満となり、妥当性評価ガイドラインの 0.01 ppm での目標値(真度 70~120%、併行精度 25%未満、室内精度 30%未満)を満たした。また、内標準物質として用いた [^{13}C , $^{15}\text{N}_2$]-2-チオウラシル, [^{13}C , $^{15}\text{N}_2$]-4-チオウラシル, [$^{13}\text{C}5$, $^{15}\text{N}_2$]-6-メチル-2-チオウラシルの回収率はいずれも 90%以上であった。0.5~10 μ g/L (試料中濃度 0.05~100 μ g/L 相当)の範囲で検量線を作成したところ、いずれの化合物も決定係数 $r^2 > 0.997$ となり、良好な直線性が得られた。

試料マトリックスの測定への影響を評価するため、1 μ g/L (試料中濃度 10 μ g/L 相当)において溶媒標準溶液に対するマトリックス標準溶液のピーク面積比を求めた。その結果、1.01~1.03 であったことから、いずれの化合物も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できることが示された。また、添加試料から得られたピークはいずれも S/N ≥ 10 であった。以上の結果から、本分析法は牛尿中の 2-チオウラシル、4-チオウラシルおよび 6-メチル-2-チオウラシル分析法(定量限界はいずれの化合物も 10 μ g/L)として妥当であると考えられた。牛肉輸出時のモニタリング検査において本分析法を適用することにより、2-チオウラシルが検出された場合に、2-チオウラシルの不正使用によるものか、アブラナ科植物を含む飼料を与えたことによるものを判別することが可能と考えられた。

[2] レゾルシル酸ラクトン類分析法

1. LC-MS/MS条件の検討

カラムとしてInertSustain C18(内径2.1 mm, 長さ150 mm, 粒子径3 μ m), ガードカラムとしてInertSustain C18(内径2.1 mm, 長さ10 mm, 粒子

径 3 μm)を用いて測定条件を検討した. 移動相の添加剤は, 酢酸アンモニウムを用いると, 酢酸と比べて感度が向上することが知られているため, 水系移動相として10 mmol/L酢酸アンモニウム溶液を用いることとした. 移動相の有機溶媒は, メタノールよりもアセトニトリルの方が, ベースラインが低くなることが報告されている. そこで, アセトニトリルとアセトニトリル/メタノール(4:1)を比較したところ, アセトニトリル/メタノール(4:1)の方がピーク形状, ピークの分離, 再現性及びピーク強度のいずれも良好な結果が得られた. これらの結果から, 10 mmol/L酢酸アンモニウム溶液及びアセトニトリル/メタノール(4:1)を移動相として用いることとした.

2. 試験溶液調製方法の検討

レゾルシル酸ラクトン類は抱合体として存在している場合があるため, LC-MS/MS測定を行う前に加水分解を行う必要がある. しかし, 本研究ではレゾルシル酸ラクトン類の抱合体の標準品を入手できず, 加水分解条件を検討することはできなかった. このため, 加水分解反応はArrizabalaga-Larrañagaらの方法²⁾に従い, β -グルクロニダーゼ/アシルスルファターゼを加えて55°Cで2時間振とうすることとした.

牛や豚の尿中のレゾルシル酸ラクトン類の分析では, 加水分解後の溶液を液々分配, C18ミニカラム及びNH₂ミニカラムを用いて精製する方法や, 液々分配, HLBミニカラム及びNH₂ミニカラムを用いて精製する方法, 多孔性ケイソウ土カラムおよびNH₂ミニカラムによって精製する方法等が報告されているが, 操作が煩雑であった. 一方, 飼料や食品中のフザリウムトキシシン(ZEN等)の分析ではイムノアフィニティーカラムを用いた方法も報告されている. そこで本検討では操作を簡便化するため, イムノアフィニティーカラムを用いた精製を尿中の

レゾルシル酸ラクトン類の分析に用いることとした. 加水分解後の溶液をそのままイムノアフィニティーカラム(ZearalaTest WB)に負荷して精製する方法を検討した.

まず, カラムへ負荷後の洗浄方法を検討するため, 水/メタノール混液(10 mL)を洗浄溶媒として用いた場合の溶出状況を確認した. 水20 mLに α -ZAL, β -ZAL, ZANおよびZEN(各0.1 μg)を添加し, ZearalaTest WBへ負荷した後, 水/メタノール混液(9:1), (8:2), (7:3), (6:4)および(5:5)各10 mLで順次溶出した(Table 5). その結果, 水/メタノール(9:1)の画分にはいずれの化合物も溶出しなかったが, (8:2)~(5:5)の画分には溶出が認められた. このため, カラムに負荷後, 水/メタノール(9:1)で洗浄を行うこととした.

次に, 洗浄溶媒量を検討するため, 水20 mLに α -ZAL, β -ZAL, ZANおよびZEN(各0.1 μg)を添加し, ZearalaTest WBへ負荷した後, 水/メタノール(9:1)40 mLを注入し, 各化合物の溶出状況を確認した(Table 6). その結果, いずれの化合物も水/メタノール(9:1)40 mLまでは溶出しないことが確認された.

ZearalaTest WBからの溶出溶媒の検討を行った. 水20 mLに α -ZAL, β -ZAL, ZANおよびZEN(各0.1 μg)を添加し, ZearalaTest WBへ負荷した後, メタノールで溶出した(Table 7). その結果, いずれの化合物もメタノール5 mLでカラムから十分に溶出された. これらの結果から, 加水分解後の溶液をZearalaTest WBへ負荷後, 水/メタノール(9:1)で洗浄し, メタノール(5 mL)で溶出することとした.

そこで, 水/メタノール(9:1)による洗浄の効果を確認するため, 牛尿(2 mL)に α -ZAL, β -ZAL, ZANおよびZEN(各0.002 μg)を添加後, 実験方法6に従って加水分解を行い, 得られた溶液をイムノ

アフィニティーカラムへ負荷し、水/メタノール(9:1) 10, 20, 30および40 mLで洗浄した後、メタノール5 mLで溶出した。回収率をTable 8, クロマトグラムをFig. 8に示した。その結果、いずれの化合物も洗浄に用いた水/メタノール(9:1)の量は回収率に影響しなかった(Table 8)。しかし、洗浄に用いる水/メタノール(9:1)の量を増やすほど、 α -および β -ZALの定性イオンのクロマトグラムにおいて、 α -および β -ZALの保持時間付近に認められた夾雑成分のピークが小さくなった(Fig. 8)。洗浄溶媒量30 mLと40 mLでは夾雑成分のピーク強度に差は認められなかった。このため、洗浄に用いる水/メタノール(9:1)の溶媒量は30 mLとすることとした。以上の結果から、加水分解後の溶液をZearalaTest WBへ負荷し、水/メタノール(9:1) 30 mLで洗浄した後、メタノール5 mLで溶出することとした。

3. 性能評価

EU では、牛尿中の β -ZAL および ZEN の minimum method performance requirements (MMPR)はそれぞれ 1 および 2 ppb(1 および 2 $\mu\text{g/L}$)と設定されている。このため、牛尿を対象に α -ZAL, β -ZAL, ZAN および ZEN について添加濃度 1 および 2 $\mu\text{g/L}$ で 1 日 2 併行, 5 日間の添加回収試験を行い、確立した分析法の性能を評価した。なお、妥当性評価ガイドラインでは尿を対象としていないが、本ガイドラインに従って評価を行い、0.01 ppm での目標値を参照した。

無添加試料を分析したところ、飼料由来フザリウムトキシンと考えられる ZEN のピークが検出されたが、定量限界の 1/3 未満であった。いずれの化合物もクロマトグラム上に定量を妨害するピークは認められず、選択性に問題はないことが確認された(Fig. 9~12)。

真度, 併行精度および室内精度の結果を Table

9に示した。真度 92~101%, 併行精度 9%未満および室内精度 13%未満となり、妥当性評価ガイドラインの 0.01 ppm での目標値(真度 70~120%, 併行精度 25%未満, 室内精度 30%未満)を満たした。0.5~10 $\mu\text{g/L}$ (試料中濃度 0.5~10 $\mu\text{g/L}$ 相当)の範囲で検量線を作成したところ、いずれの化合物も決定係数 $r^2>0.998$ となり、良好な直線性が得られた。

試料マトリックスの測定への影響を評価するため、1 および 2 $\mu\text{g/L}$ (試料中濃度 1 および 2 $\mu\text{g/L}$ に相当)において溶媒標準溶液に対するマトリックス標準溶液のピーク面積比を求めた。その結果、いずれの化合物も 1 $\mu\text{g/L}$ においては 0.93~1.01, 2 $\mu\text{g/L}$ においては 0.99~1.05 であったことから、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できることが示された。また、定量限界濃度(1 $\mu\text{g/L}$)を添加した試料から得られたピークはいずれも $S/N \geq 10$ であった。以上の結果から、本分析法は牛尿中の α -ZAL, β -ZAL, ZAN および ZEN 分析法(定量限界はいずれの化合物も 1 $\mu\text{g/L}$)として妥当であると考えられた。

D. 結論

牛尿中の 2-チオウラシル, 4-チオウラシルおよび 6-メチル-2-チオウラシル分析法を確立した。また、牛尿中のレゾルシル酸ラクトン類(α -ZAL, β -ZAL, ZAN および ZEN)分析法を確立した。分析法の性能を評価した結果、いずれも良好な結果が得られた。これらの分析法は EU への牛肉輸出時のモニタリング検査においてそれぞれ2-チオウラシルおよびレゾルシル酸ラクトン類が検出された場合に、その原因を調査する方法として有用と考えられた。

[参考文献]

1) Blokland, M. H., van Tricht, F. E., Groot, M. J., Van Ginkel, L. A., Sterk, S. S. Discrimination between the exogenous and endogenous origin of thiouracil in farm animals, the final chapter? Food Addit. Contam. Part A, **38**, 2077-2090 (2021).

2) Arrizabalaga-Larrañaga, A., Linders, R., Blokland, M. H., Sterk, S. Occurrence of resorcyclic acid lactones in porcine urine: discrimination between illegal use and contamination. Food Addit. Contam. Part A., **40**, 838-851 (2023).

E. 研究発表

1. 論文発表 なし

2. 学会発表 なし

1. 志田(齊藤)静香、残留農薬検査における課題と展望について、第21回食品安全フォーラム、令和5年12月8日、東京

F. 知的財産権の出願・登録状況 なし

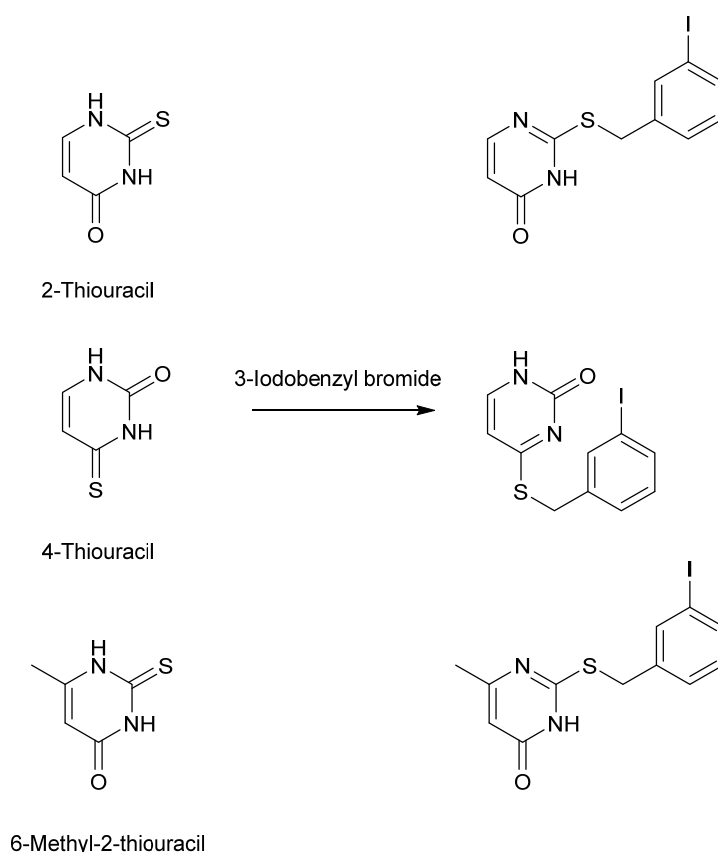


Fig. 1. Structures of 2-thiouracil, 4-thiouracil, 6-methyl-2-thiouracil, and their derivatives with 3-iodobenzyl bromide

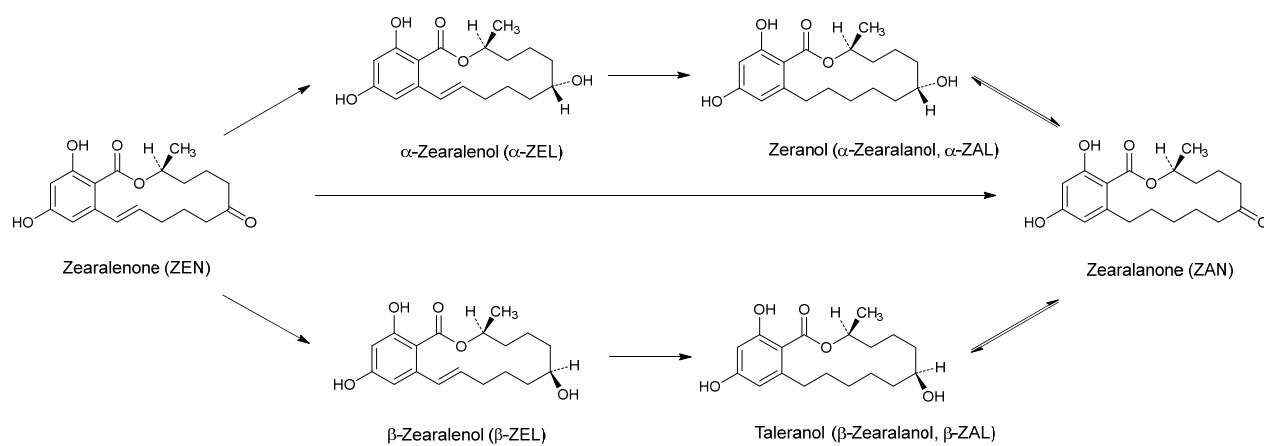


Fig.2. Structures of resorcylic acid lactones and plausible metabolic pathways

Table 1. Retention times and SRM parameters

	Retention time (min)	SRM transition	Declustering potential (V)	Collision energy (eV)
2-Thiouracil*	5.0	m/z 343 $\rightarrow$ 309 (Quantifier ion)	-70	-24
		m/z 343 $\rightarrow$ 127 (Qualifier ion)	-70	-32
$[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}_2]$ -2-Thiouracil*	4.2	m/z 346 $\rightarrow$ 312	-55	-24
4-Thiouracil*		m/z 343 $\rightarrow$ 249 (Quantifier ion)	-20	-20
		m/z 343 $\rightarrow$ 127 (Qualifier ion)	-20	-40
$[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}_2]$ -4-Thiouracil*	6.2	m/z 346 $\rightarrow$ 249	-20	-20
		m/z 357 $\rightarrow$ 127 (Quantifier ion)	-55	-34
6-Methyl-2-thiouracil*		m/z 357 $\rightarrow$ 58 (Qualifier ion)	-55	-102
$[^{13}\text{C}_5, ^{15}\text{N}_2]$ -6-Methyl-2-thiouracil*		m/z 364 $\rightarrow$ 127	-80	-34

* 3-Iodobenzyl bromide derivatives

Table 2. Retention times and SRM parameters

	Retention time (min)	SRM transition	Declustering potential (V)	Collision energy (eV)
α -ZAL	7.0	m/z 321 $\rightarrow$ 277 (Quantifier ion)	-90	-32
		m/z 321 $\rightarrow$ 303 (Qualifier ion)	-90	-32
β -ZAL	5.7	m/z 321 $\rightarrow$ 277 (Quantifier ion)	-105	-30
		m/z 321 $\rightarrow$ 303 (Qualifier ion)	-105	-30
ZAN	9.1	m/z 319 $\rightarrow$ 275 (Quantifier ion)	-115	-30
		m/z 319 $\rightarrow$ 205 (Qualifier ion)	-115	-32
ZEN	9.3	m/z 317 $\rightarrow$ 175 (Quantifier ion)	-20	-34
		m/z 317 $\rightarrow$ 131 (Qualifier ion)	-20	-36

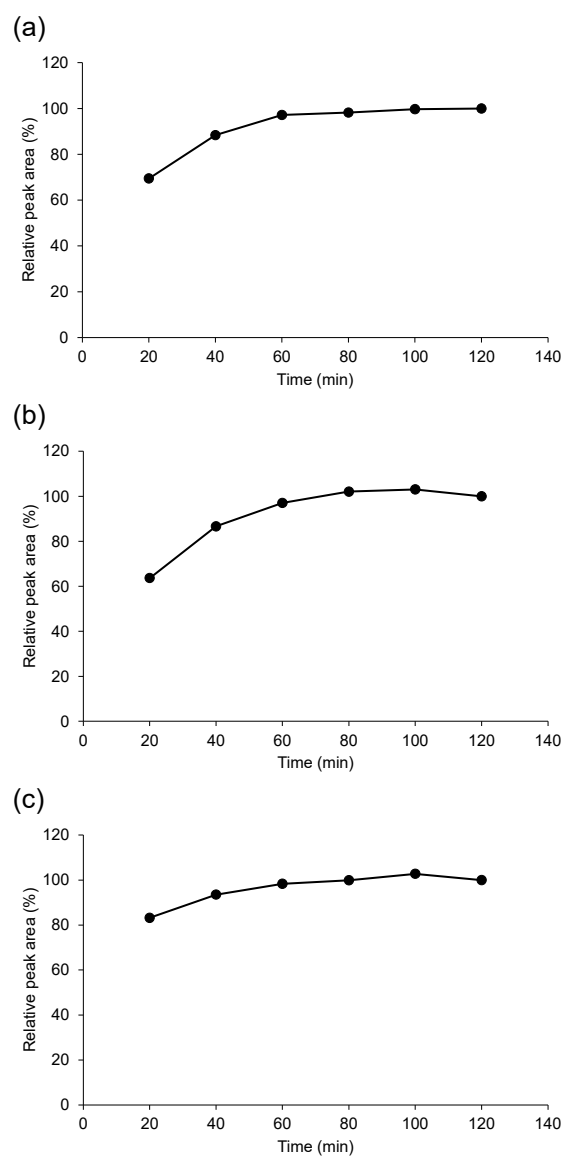


Fig. 3. Relative peak area (%) of 3-iodobenzyl bro-mide derivatives of (a) 2-thiouracil, (b) 4-thiouracil, and (c) 6-methyl-2-thiouracil compared to peak area of those at 120 min in water sample

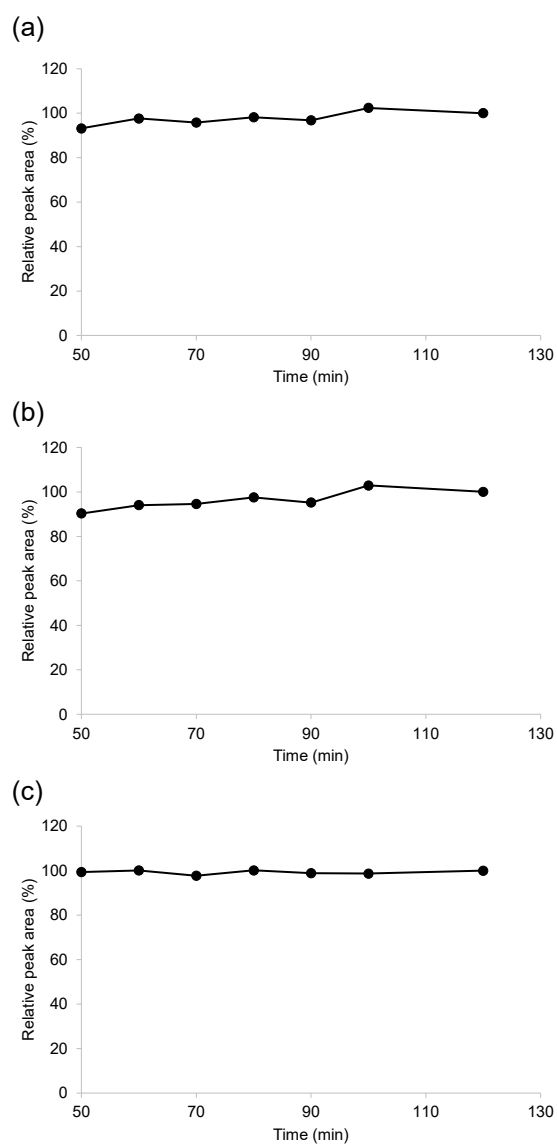


Fig. 4. Relative peak area (%) of 3-iodobenzyl bromide derivatives of (a) 2-thiouracil, (b) 4-thiouracil, and (c) 6-methyl-2-thiouracil compared to peak area of those at 120 min in bovine urine

Table 3. Recovery (%) of 2-thiouracil, 4-thiouracil, and 6-methyl-2-thiouracil from Oasis HLB (150 mg)

	Acetonitrile					Total
	0-5 mL	5-10 mL	10-15 mL	15-20 mL	20-25 mL	
2-Thiouracil	86	10	1	1	0	98
4-Thiouracil	83	5	1	0	0	89
6-Methyl-2-thiouracil	72	18	2	1	0	93

Table 4. Trueness and intra- and inter-day precisions

	Trueness (%)	Intra-day precision (%RSD)	Inter-day precision (%RSD)
2-Thiouracil	95	4.9	4.9
4-Thiouracil	100	2.3	4.2
6-Methyl-2-thiouracil	97	3.0	7.2

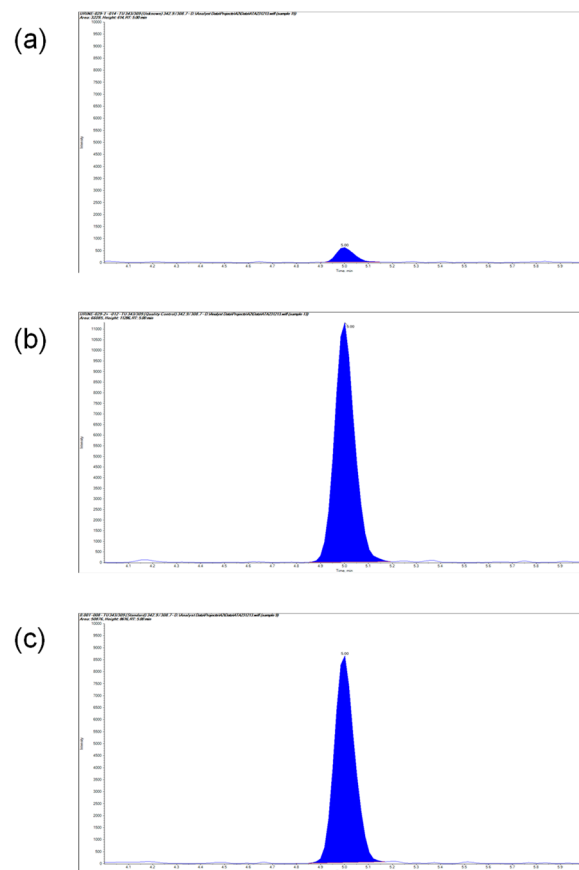


Fig. 5. SRM chromatograms of 3-iodobenzyl bromide derivatives of 2-thiouracil.
 (a) Blank bovine urine extract, (b) bovine urine extract spiked with 10 µg/L 2-thiouracil, and (c) a 1 µg/L standard solution (corresponding to 10 µg/L in sample)

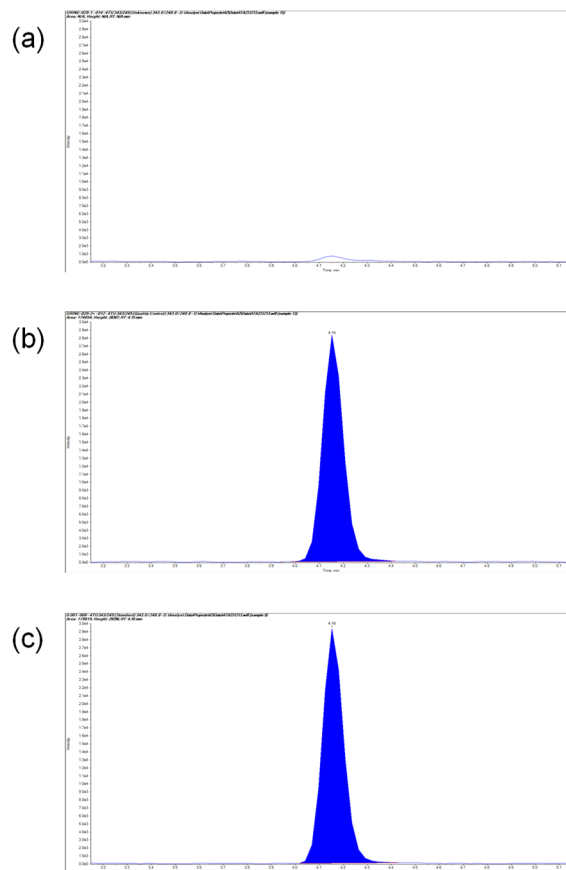


Fig. 6. SRM chromatograms of 3-iodobenzyl bromide derivatives of 4-thiouracil.
 (a) Blank bovine urine extract, (b) bovine urine extract spiked with 10 $\mu\text{g/L}$ 4-thiouracil, and
 (c) a 1 $\mu\text{g/L}$ standard solution (corresponding to 10 $\mu\text{g/L}$ in sample)

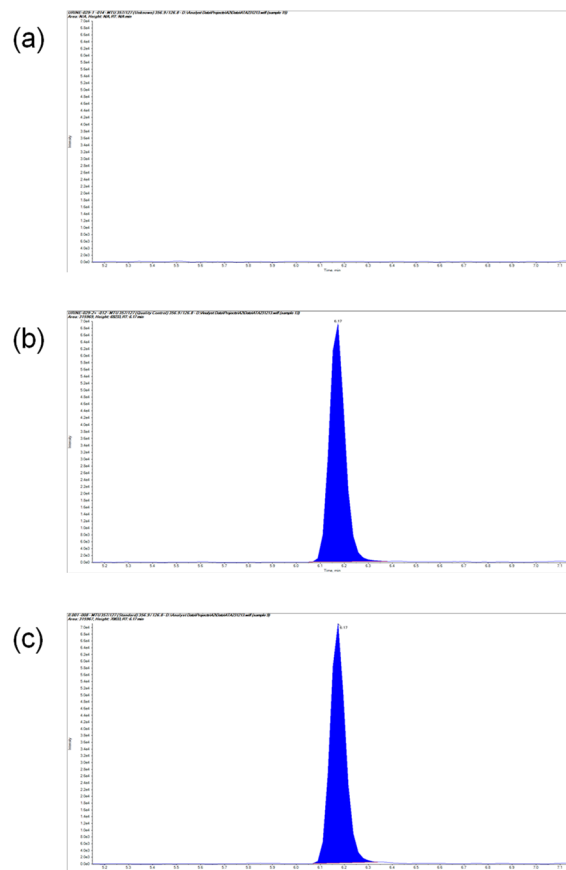


Fig. 7. SRM chromatograms of 3-iodobenzyl bromide derivatives of 6-methyl-2-thiouracil.
 (a) Blank bovine urine extract, (b) bovine urine extract spiked with 10 µg/L 6-methyl-2-thiouracil,
 and (c) a 1 µg/L standard solution (corresponding to 10 µg/L in sample)

Table 5. Recovery (%) of α -ZAL, β -ZAL, ZAN, and ZEN from ZearalaTest WB eluted with water/methanol (10 mL)

	Water/methanol				
	9:1	8:2	7:3	6:4	5:5
α -ZAL	0	0	2	14	53
β -ZAL	0	2	7	52	37
ZAN	0	0	1	9	46
ZEN	0	1	2	18	60

Table 6. Recovery (%) of α -ZAL, β -ZAL, ZAN, and ZEN from ZearalaTest WB eluted with water/methanol (9:1)

	Water/methanol (9:1)			
	0-10 mL	10-20 mL	20-30 mL	30-40 mL
α -ZAL	0	0	0	0
β -ZAL	0	0	0	0
ZAN	0	0	0	0
ZEN	0	0	0	0

Table 7. Recovery (%) of α -ZAL, β -ZAL, ZAN, and ZEN from ZearalaTest WB eluted with methanol

	Methanol		Total
	0-5 mL	5-10 mL	
α -ZAL	96	0	96
β -ZAL	107	0	107
ZAN	102	0	102
ZEN	100	0	100

Table 8. Recovery (%) of α -ZAL, β -ZAL, ZAN, and ZEN from ZearalaTest WB eluted with water/methanol (9:1)

	Water/methanol (9:1)			
	10 mL	20 mL	30 mL	40 mL
α -ZAL	100	90	98	112
β -ZAL	100	103	99	94
ZAN	92	106	98	109
ZEN	108	111	108	107

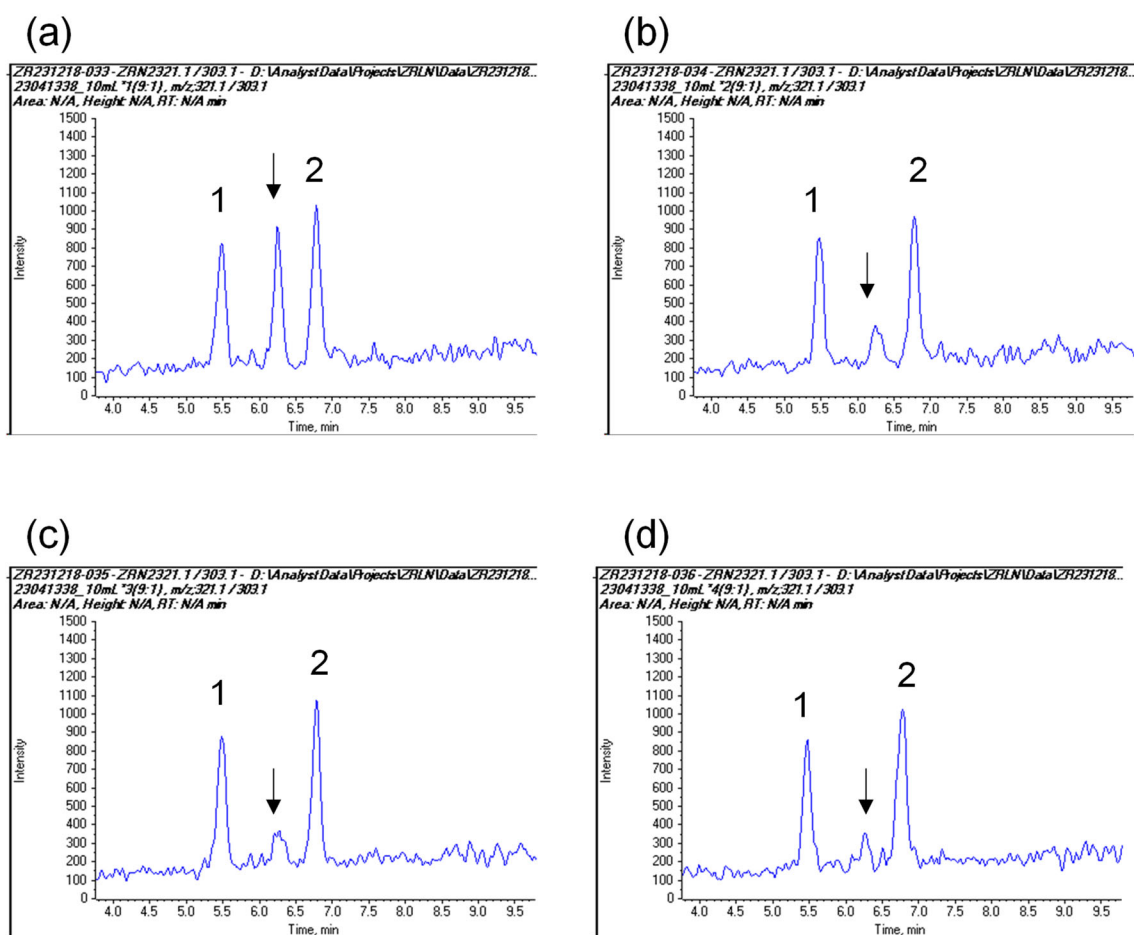


Fig. 8. SRM chromatograms (m/z 321→303; qualifier ion of α - and β -ZAL) of α -ZAL (2) and β -ZAL (1) (spiked concentration: 1 μ g/L) in bovine urine after cleanup with ZearalaTest WB. Amount of water/methanol (9:1) used for washing: (a) 10 mL, (b) 20 mL, (c) 30 mL, and (d) 40 mL. Arrows indicate co-extracted matrix components.

Table 9. Trueness and intra- and inter-day precisions

Compound	Spiked concentration (mg/kg)	Trueness (%)	Intra-day precision (%RSD)	Inter-day precision (%RSD)
α -ZAL	1	99	4.6	8.1
	2	98	5.4	5.6
β -ZAL	1	101	6.3	12.7
	2	99	4.6	5.0
ZAN	1	92	6.1	8.9
	2	95	7.4	7.7
ZEN	1	94	8.7	9.5
	2	96	7.2	7.2

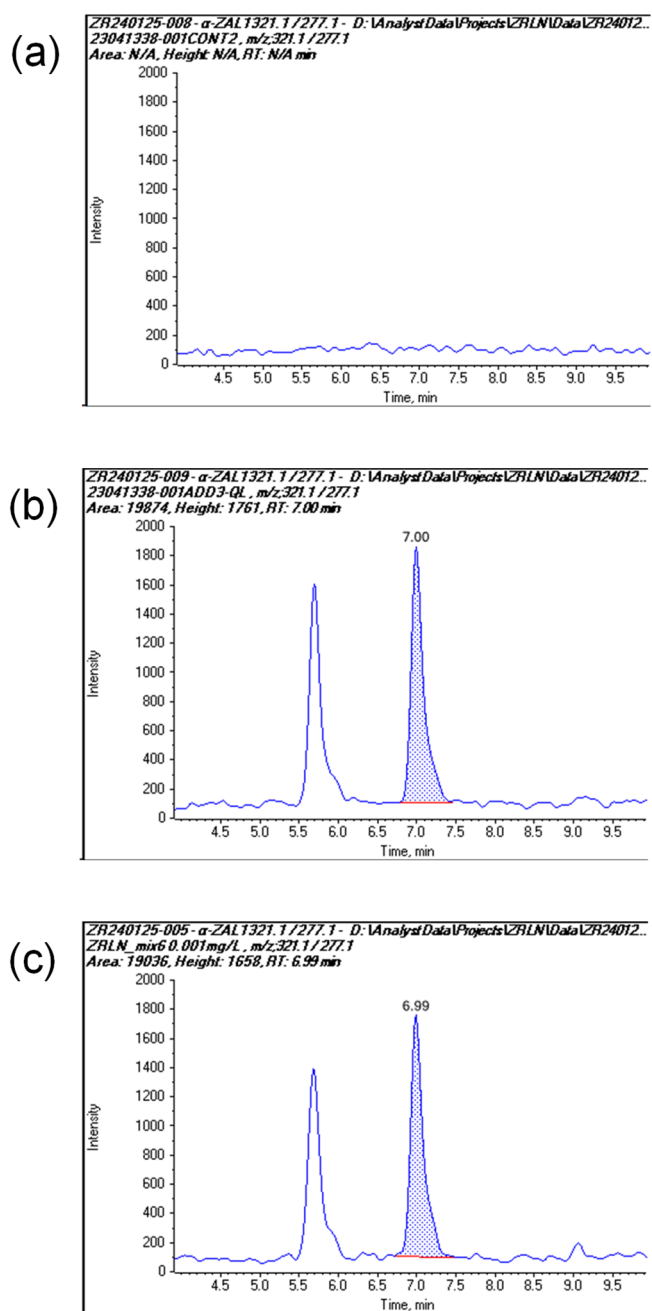


Fig. 9. SRM chromatograms of α -ZAL.

(a) Blank bovine urine extract, (b) bovine urine extract spiked with 1 μ g/L α -ZAL, and (c) a 1 μ g/L standard solution (corresponding to 1 μ g/L in sample)

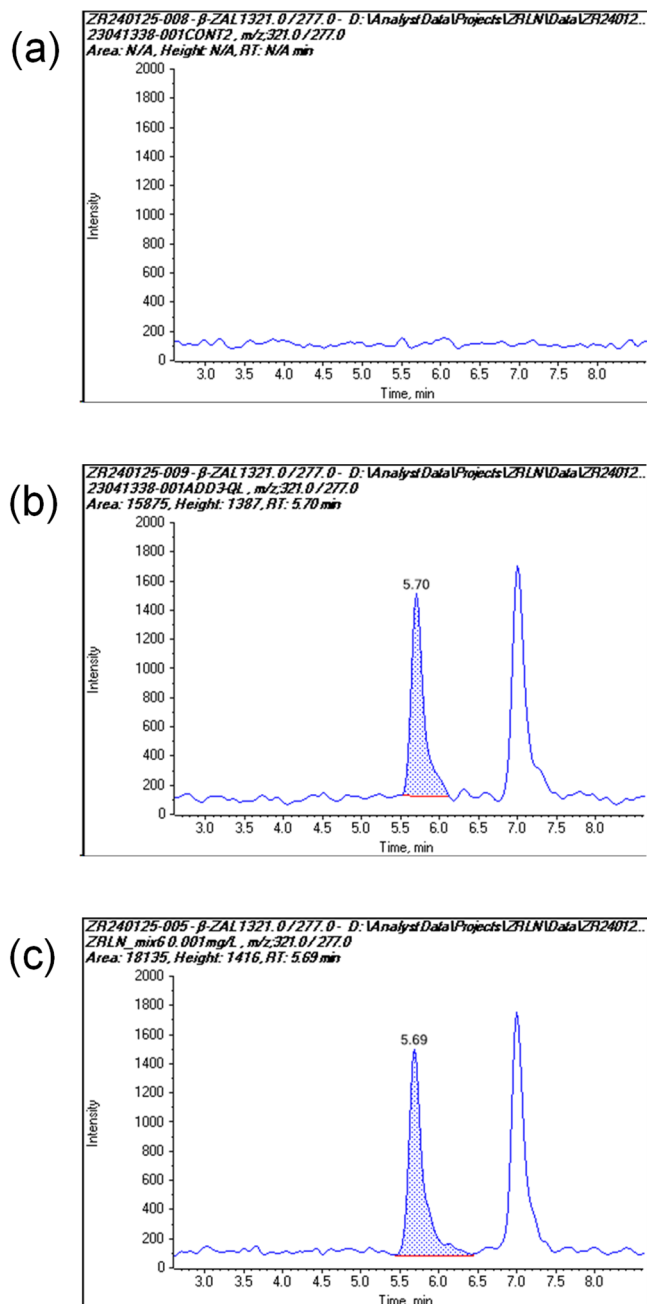


Fig. 10. SRM chromatograms of β-ZAL.

(a) Blank bovine urine extract, (b) bovine urine extract spiked with 1 µg/L β-ZAL, and (c) a 1 µg/L standard solution (corresponding to 1 µg/L in sample)

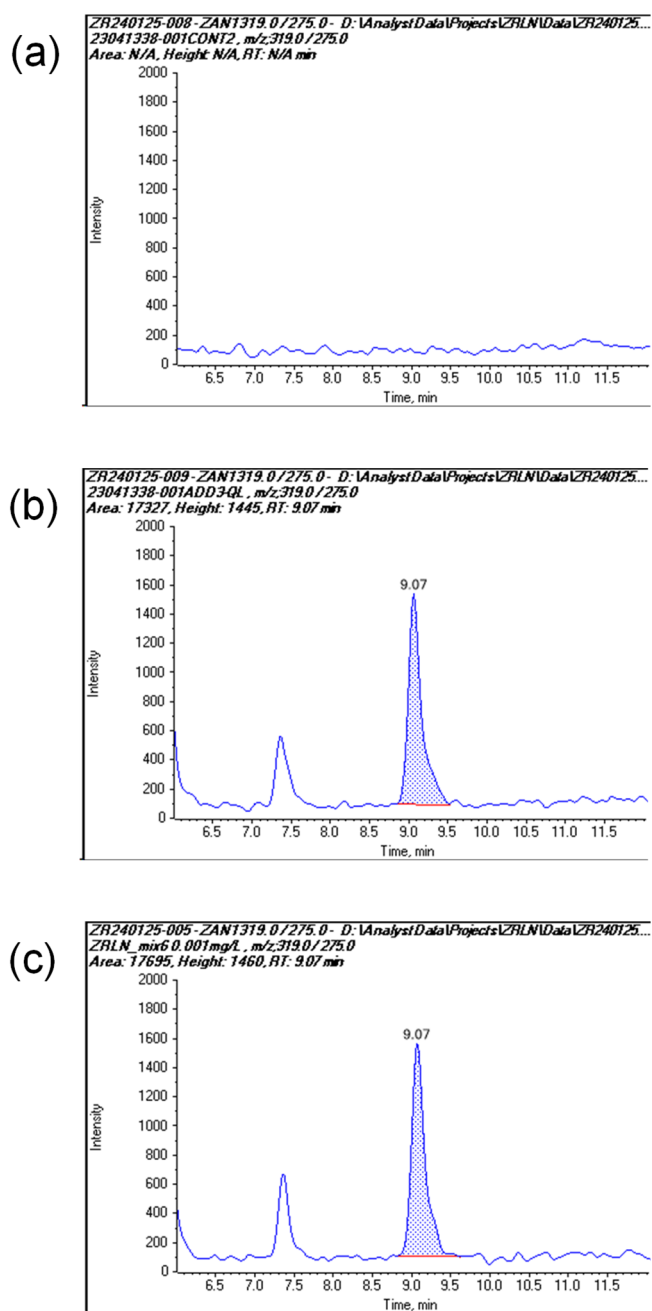


Fig. 11. SRM chromatograms of ZAN.

(a) Blank bovine urine extract, (b) bovine urine extract spiked with 1 $\mu\text{g/L}$ ZAN, and (c) a 1 $\mu\text{g/L}$ standard solution (corresponding to 1 $\mu\text{g/L}$ in sample)

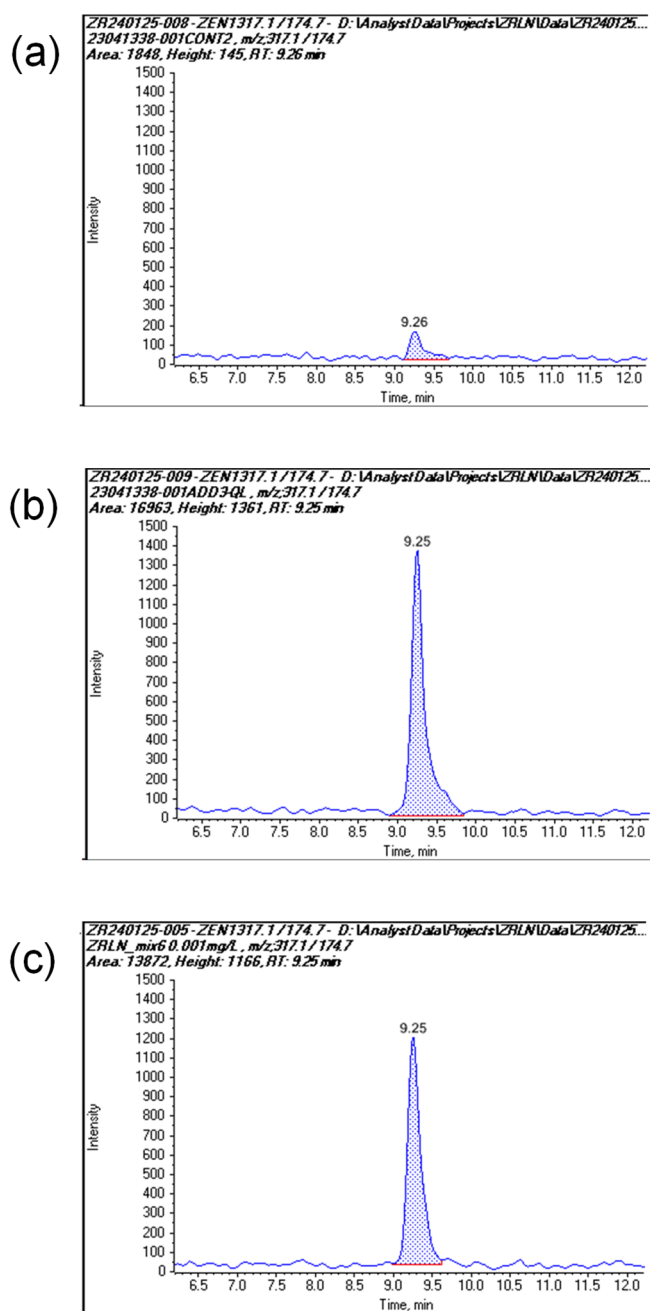


Fig. 12. SRM chromatograms of ZEN.

(a) Blank bovine urine extract, (b) bovine urine extract spiked with 1 µg/L ZEN, and (c) a 1 µg/L standard solution (corresponding to 1 µg/L in sample)