

スピラマイシン試験法（畜水産物）

1. 分析対象化合物

スピラマイシン I
ネオスピラマイシン I

2. 適用食品

畜産物、水産物（魚類）
ただし、畜産物の「肝臓」は適用対象外とする。

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。

スピラマイシン I 標準品 本品はスピラマイシン I 95%以上を含む。

ネオスピラマイシン I 標準品 本品はネオスピラマイシン I 95%以上を含む。

5. 試験溶液の調製

1) 抽出

① 筋肉、乳及び魚類の場合

試料10.0 gにメタノール50 mLを加え、ホモジナイズした後、毎分3,000回転で10分間遠心分離し、上澄液を採る。残留物にメタノール25 mLを加えてホモジナイズし、上記と同様に遠心分離し、上澄液を採る。得られた上澄液を合わせ、メタノールを加えて正確に100 mLとする。この溶液から正確に10 mLを分取し、40°C以下で約1 mLに濃縮する。この溶液に0.5 vol%トリフルオロ酢酸9 mLを加える。

② 脂肪の場合

試料5.00 g にメタノール及び0.4 w/v%メタリン酸溶液（1：1）混液 50 mLを加え、ホモジナイズした後、毎分3,000回転で10分間遠心分離し、上澄液を採る。残留物にメタノール及び0.4 w/v%メタリン酸溶液（1：1）混液 25 mLを加えてホモジナイズし、上記と同様に遠心分離し、上澄液を採る。得られた上澄液を合わせ、メタノールを加えて正確に100 mLとする。この溶液から正確に20 mLを分取し、40°C以下で約1 mLに濃縮する。この溶液に0.5 vol%トリフルオロ酢酸を加え、10 mLにする。

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（200 mg）にメタノール及び0.5 vol%トリフルオロ酢酸各5 mLを順次注入し、各流出液は捨てる。このカラムに1）で得られた溶液を注入した後、水及び1 vol%トリエチルアミン各5 mLを順次注入し、各流出液は捨てる。次いで、1 vol%トリエチルアミン・メタノール溶液 5 mLを注入し、溶出液に水を加えて正確に10 mLとしたものを試験溶

液とする。

6. 検量線の作成

スピラマイシン I 標準品及びネオスピラマイシン I 標準品をメタノールに溶かしてそれぞれ1,000 mg/Lとし、標準原液とする。各標準原液を適宜混合して1 vol%トリエチルアミン・メタノール溶液及び水（1：1）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、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に相当する試験溶液中の濃度は0.001 mg/L（ネオスピラマイシン I はスピラマイシン I 換算）である。

7. 定量

試験溶液をLC-MS/MSに注入し、6. の検量線でスピラマイシン I 及びネオスピラマイシン I の各含量を求める。ネオスピラマイシン I を含むスピラマイシン I の含量を求める場合には、次式により求める。

スピラマイシン I（ネオスピラマイシン I を含む。）の含量（ppm）= A + B × 1.206

A：スピラマイシン I の含量（ppm）

B：ネオスピラマイシン I の含量（ppm）

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2.0 mm、長さ150 mm、粒子径3 μm

カラム温度：40°C

移動相：0.1 vol%ギ酸及び0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液の混液（17：3）で1分間保持した後、（3：

2）までの濃度勾配を8分間で行う。

イオン化モード：ESI（+）

主なイオン（*m/z*）

スピラマイシン I：プリカーサーイオン422、プロダクトイオン174、101

ネオスピラマイシン I：プリカーサーイオン350、プロダクトイオン174、160

注入量：10 μL

保持時間の目安

スピラマイシン I：8分

ネオスピラマイシン I：7分

10. 定量限界

各化合物0.01 mg/kg（ネオスピラマイシン I はスピラマイシン I 換算）

11. 留意事項

1) 試験法の概要

スピラマイシン I 及びネオスピラマイシン I を試料からメタノール（脂肪の場合は、メタノール及び0.4 w/v%メタリン酸溶液（1：1）混液）で抽出し、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である。なお、スピラマイシン I 及びネオスピラマイシン I のそれぞれについて定量を行い、ネオスピラマイシン I を含むスピラマイシン I の含量を求める場合には、ネオスピラマイシン I の含量に換算係数を乗じてスピラマイシン I の含量に換算し、これらの和を分析値とする。

2) 注意点

- ① 開発時に用いた遠心分離機における毎分3,000回転は、約2,130×gである。
- ② LC-MS/MS測定では、試料中の夾雑成分のキャリーオーバーの影響を軽減させるため、スピラマイシン I が溶出した後に移動相のアセトニトリル濃度を上げてカラムを洗浄すると良い。
- ③ LC-MS/MS測定を用いて、肝臓のスピラマイシン I 及びネオスピラマイシン I を測定する場合、いずれも速やかにチアゾリジン誘導体へ変換してしまい、設定した定量イオン及び定性イオンでは測定することができない。そのため、肝臓を試験する場合、バイオアッセイによる方法を用いる。
- ④ スピラマイシン I 及びネオスピラマイシン I 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。
スピラマイシン I
定量イオン (m/z) : プリカーサーイオン422、プロダクトイオン174
定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン422、プロダクトイオン101
ネオスピラマイシン I
定量イオン (m/z) : プリカーサーイオン350、プロダクトイオン174
定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン350、プロダクトイオン160
- ⑤ 試験法開発時に検討した食品：豚の筋肉、豚の脂肪、牛乳、ぶり

12. 参考文献

なし

13. 類型

C