

※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

## スピラマイシン試験法（畜水産物）

## スピラマイシン試験法（畜水産物）の検討結果

### 〔緒言〕

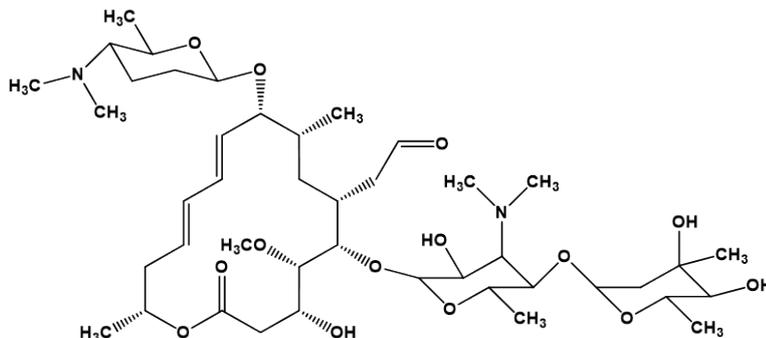
#### 1. 背景・目的

スピラマイシンは、*Streptomyces ambofaciens* が産生するマクロライド系の抗生物質で、スピラマイシン I、II 及び III の混合物である。50S リボソームに結合することにより、タンパク質合成を阻害すると考えられている。国内外でヒト用及び動物用医薬品として使用されている。日本では、動物用医薬品として、すずき目魚類を対象としたエンボン酸スピラマイシンを有効成分とする飼料添加剤が承認されている。現在の農畜産物の規制対象に関する留意点は、「スピラマイシンとは、スピラマイシン I 及びネオスピラマイシン I をスピラマイシン I 含量に換算したものの和」となっている。現在示されているスピラマイシン試験法では、HPLC（検出波長 235 nm）でスピラマイシン I のピークの確認もしくは、寒天培地を用いた阻止円の直径による定量となっている。いずれも、留意点を考慮した畜産物の試験法としては、不十分であり、現在の理化学的手法（LC-MS/MS）を用いて、改善及び改良をする必要がある。そこで、本検討において、新たに個別試験法「畜水産物中の試験法」を開発した。

#### 2. 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： スピラマイシン I（以下、SPM と略す）

構造式：



分子式：  $C_{43}H_{74}N_2O_{14}$

分子量： 843.05

化学名： 2-[(4R,5S,6S,7R,9R,10R,11E,13E,16R)-6-[(2S,3R,4R,5S,6R)-5-[(2S,4R,5S,6S)-4,5-Dihydroxy-4,6-dimethyloxan-2-yl]oxy-4-(dimethylamino)-3-hydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxy-10-[(5S,6R)-5-(dimethylamino)-6-methyloxan-2-yl]oxy-4-hydroxy-5-methoxy-9,16-dimethyl-2-oxo-1-oxacyclohexadeca-11,13-dien-7-yl]acetaldehyde (IUPAC)

CAS 番号： 24916-50-5

外観： 白色～淡黄色固体

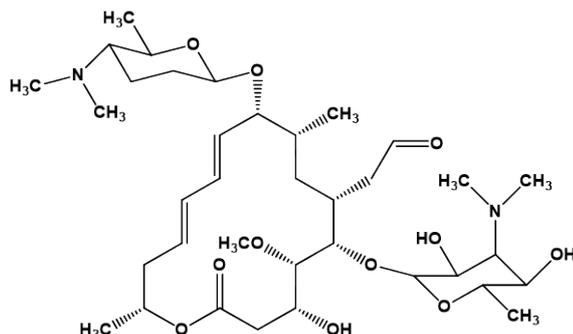
溶解性： アセトン及びメタノールに溶ける

融点： 134～137℃

出典：富士フイルム和光純薬 製品規格書

分析対象化合物：ネオスピラマイシン I (以下、NSPM と略す)

構造式：



分子式：C<sub>36</sub>H<sub>62</sub>N<sub>2</sub>O<sub>11</sub>

分子量：698.43

化学名：2-[6-[4-(Dimethylamino)-3,5-dihydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxy-10-[5-(dimethylamino)-6-methyloxan-2-yl]oxy-4-hydroxy-5-methoxy-9,16-dimethyl-2-oxo-1-oxacyclohexadeca-11,13-dien-7-yl]acetaldehyde (IUPAC)

CAS 番号：70253-62-2

外観：白色～淡黄色固体

溶解性：アセトン及びメタノールに溶ける

融点：119～120℃

出典：富士フイルム和光純薬 製品規格書

### 3. 基準値

スピラマイシンとは、スピラマイシン I 及びネオスピラマイシン I をスピラマイシン I に換算したものの和とする（生食発 0718 第 2 号(H29.7.18)より）。

食品分類名	基準値 (ppm)
牛の筋肉	0.2
豚の筋肉	0.2
牛の脂肪	0.3
豚の脂肪	0.3
牛の肝臓	0.6

豚の肝臓	0.6
牛の腎臓	0.3
豚の腎臓	0.3
牛の食用部分	0.6
豚の食用部分	0.6
乳	0.2
鶏の筋肉	0.2
鶏の脂肪	0.3
鶏の肝臓	0.6
鶏の腎臓	0.8
鶏の食用部分	0.8
魚介類（すずき目魚類に限る。）	0.2

#### [実験方法]

##### 1. 試料

試料は滋賀県内の小売店で購入した。試料の調製方法を以下に記載した。

###### (1) 豚の筋肉

可能な限り脂肪層を除き、試料を細切した後、フードプロセッサーを用いて均一化した。

###### (2) 豚の脂肪

可能な限り筋肉層を除き、試料を細切した後、フードプロセッサーを用いて均一化した。

###### (3) 牛乳

全体を混合し均一化した。

###### (4) ぶり

試料を細切した後、フードプロセッサーを用いて均一化した。

##### 2. 試薬・試液

###### (1) 標準品

SPM 標準品：純度 97.0%（富士フィルム和光純薬製）

NSPM 標準品：純度 95.0%（富士フィルム和光純薬製）

###### (2) 試薬等

アセトニトリル、アセトン、*n*-ヘキサン、メタノール： 残留農薬試験用（富士フィルム和光純薬製）

蒸留水、アセトニトリル、メタノール、ギ酸： LC-MS 用（富士フィルム和光純薬製）

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  
トリエチルアミン、トリフルオロ酢酸： 特級（富士フイルム和光純薬製）  
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）  
（Waters 製）

### (3) 試液

#### ① 標準原液

SPM 標準原液：SPM 標準品 10 mg を精秤し、メタノールに溶解して 1 mg/mL の濃度の溶液を調製した。

NSPM 標準原液：NSPM 標準品 10 mg を精秤し、メタノールに溶解して 1 mg/mL（SPM として）の濃度の溶液を調製した。なお、NSPM の濃度からスピラマイシン濃度への換算は、換算係数 1.206（SPM の分子量を NSPM の分子量で除した値）を用いて行った。

#### ② 添加用標準溶液（定量限界濃度（0.02 ppm；SPM 濃度））

SPM 標準原液及び NSPM 標準原液をそれぞれメタノールで希釈して、0.1 µg/mL 濃度の溶液を調製した。

#### ③ 添加用標準溶液（豚の筋肉、牛乳及びぶり：基準値濃度（0.2 ppm；スピラマイシン濃度））

SPM 標準原液及び NSPM 標準原液をそれぞれメタノールで希釈して、1.0 µg/mL 濃度の溶液を調製した。

#### ④ 添加用標準溶液（豚の脂肪：基準値濃度（0.3 ppm；スピラマイシン濃度））

SPM 標準原液及び NSPM 標準原液をそれぞれメタノールで希釈して、1.5 µg/mL 濃度の溶液を調製した。

### 3. 装置等

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

遠心分離機： Himac CF15RN（日立工機製）

蒸留水精製装置： 超高純度蒸留水精製装置 Flex3（ELGA 製）

ロータリーエバポレーター： N-1000/NVC-2100/DPE-1300/CCA-1111/SB-1000（東京理化学器械製）

### LC-MS/MS

装置	型式	会社
LC	Acquity UPLC H-Class	Waters 製
MS	Xevo TQD	Waters 製
データ処理	MassLynx V.4.1	Waters 製

#### 4. 測定条件

##### LC-MS/MS

LC 条件																											
カラム	TSKgel ODS-100 Z (内径 2.0 mm、長さ 150 mm、 粒子径 3 μm : 東ソー製)																										
移動相流速 (mL/min)	0.2																										
注入量 (μL)	10																										
カラム温度 (°C)	40																										
移動相	A 液 : 0.1 vol%ギ酸 B 液 : 0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液																										
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>85</td> <td>15</td> </tr> <tr> <td>1.0</td> <td>85</td> <td>15</td> </tr> <tr> <td>9.0</td> <td>60</td> <td>40</td> </tr> <tr> <td>9.1</td> <td>2</td> <td>98</td> </tr> <tr> <td>12.0</td> <td>2</td> <td>98</td> </tr> <tr> <td>12.1</td> <td>85</td> <td>15</td> </tr> <tr> <td>15.0</td> <td>85</td> <td>15</td> </tr> </tbody> </table>			時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)	0.0	85	15	1.0	85	15	9.0	60	40	9.1	2	98	12.0	2	98	12.1	85	15	15.0	85	15
時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)																									
0.0	85	15																									
1.0	85	15																									
9.0	60	40																									
9.1	2	98																									
12.0	2	98																									
12.1	85	15																									
15.0	85	15																									
MS 条件																											
測定モード	選択反応モニタリング (SRM)																										
イオン化モード	ESI (+)																										
キャピラリー電圧 (kV)	2.0																										
ソース温度 (°C)	150																										
脱溶媒温度 (°C)	400																										
コーンガス	N <sub>2</sub> , 50 L/hr																										
脱溶媒ガス	N <sub>2</sub> , 800 L/hr																										
コリジョンガス	Ar																										
定量イオン (m/z)	SPM MS/MS: +422.5→174.1 [コーン電圧 20 (V)、コリジョン エネルギー 20 (eV)]																										

	NSPM MS/MS: +350.4→174.2 [コーン電圧 20 (V)、コリジョンエネルギー 15 (eV)]
定性イオン (m/z)	SPM MS/MS: +422.5→101.0 [コーン電圧 20 (V)、コリジョンエネルギー 15 (eV)] NSPM MS/MS: +350.4→160.2 [コーン電圧 20 (V)、コリジョンエネルギー 15 (eV)]
保持時間 (分)	SPM 8.0 NSPM 7.0

## 5. 定量

SPM 及び NSPM の標準原液を混合して 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、定量限界濃度での添加回収試験においては 0.0004、0.0008、0.0016、0.0031、0.0063、0.0125、0.025、0.04、0.05 mg/L の標準溶液を調製した。検量線は、低濃度範囲 (6 点) および高濃度範囲 (6 点) に分けて実施した。これらの溶液 10 µL を LC-MS/MS に注入し、得られたピーク面積を用いて検量線を作成した。なお、検量線作成用の標準溶液は、SPM としての濃度で調製した。SPM としての濃度から NSPM 濃度への換算は、以下の換算係数 (NSPM の分子量を SPM の分子量で除した値) を用いて行った。

換算係数

NSPM 0.829

## 6. 添加試料の調製

### (1) 定量限界濃度

豚の筋肉 (添加濃度 0.01 mg/kg ; スピラマイシン濃度) : 試料 10.0 g に 0.1 µg/mL (SPM として) 添加用標準溶液 1.0 mL をそれぞれ添加して混合後、30 分間放置した。また、本試験では、SPM 及び NSPM はそれぞれ別に添加して検討を行った。

豚の脂肪 (添加濃度 0.01 mg/kg ; スピラマイシン濃度) : 試料 5.00 g を採り、約 40°C で加温して融解させたものに 0.1 µg/mL (SPM として) 添加用標準溶液 0.5 mL をそれぞれ添加して混合後、放置 (室温) して再度凝固させた後、30 分放置した。また、本試験では、SPM 及び NSPM はそれぞれ別に添加して検討を行った。

牛乳 (添加濃度 0.01 mg/kg ; スピラマイシン濃度) : 試料 10.0 g に 0.1 µg/mL (SPM として)

添加用標準溶液 1.0 mL をそれぞれ添加して混合後、30 分間放置した。また、本試験では、SPM 及び NSPM はそれぞれ別に添加して検討を行った。

ぶり（添加濃度 0.01 mg/kg；スピラマイシン濃度）：試料 10.0 g に 0.1 µg/mL（SPM として）添加用標準溶液 1.0 mL を添加して混合後、30 分間放置した。また、本試験では、SPM 及び NSPM はそれぞれ別に添加して検討を行った。

## （2）基準値濃度

豚の筋肉（添加濃度 0.1 mg/kg；スピラマイシン濃度）：試料 10.0 g に 1.0 µg/mL（SPM として）添加用標準溶液 1.0 mL をそれぞれ添加して混合後、30 分間放置した。また、本試験では、SPM 及び NSPM はそれぞれ別に添加して検討を行った。

豚の脂肪（添加濃度 0.15 mg/kg；スピラマイシン濃度）：試料 5.00 g を採り、約 40°C で加温して融解させたものに 1.5 µg/mL（SPM として）添加用標準溶液 0.5 mL をそれぞれ添加して混合後、放置（室温）して再度凝固させた後、30 分間放置した。また、本試験では、SPM 及び NSPM はそれぞれ別に添加して検討を行った。

牛乳（添加濃度 0.1 mg/kg；スピラマイシン濃度）：試料 10.0 g に 1.0 µg/mL（SPM として）添加用標準溶液 1.0 mL をそれぞれ添加して混合後、30 分間放置した。また、本試験では、SPM 及び NSPM はそれぞれ別に添加して検討を行った。

ぶり（添加濃度 0.1 mg/kg）：試料 10.0 g に 1.0 µg/mL（SPM として）添加用標準溶液 1.0 mL を添加して混合後、30 分間放置した。また、本試験では、SPM 及び NSPM はそれぞれ別に添加して検討を行った。

## 7. 試験溶液の調製

### 概要

SPM 及び NSPM 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）で抽出した。この抽出液をジビニルベンゼン-*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。SPM 及び NSPM のそれぞれについて定量を行い、NSPM の含量に換算係数を乗じて SPM の含量に変換し、これらの和をスピラマイシン濃度として基準値に対する分析値とする。

### （1）抽出

#### ① 豚の筋肉、牛乳、ぶりの場合

試料 10.0 g を量り採り、メタノール 50 mL を加えてホモジナイズした後、遠心分離（毎分 3,000 回転、10 分間）し、上澄液を採った。残留物にメタノール 25 mL を加えて同様に操作し、上澄液を合わせてメタノールで、100 mL に定容した。この抽出液から正確に 10 mL（試料 1 g 相当）分取し、40°C 以下で濃縮して、約 1 mL になるまで溶媒を除去した。この濃縮液に 0.5 vol% トリフルオロ酢酸溶液を加え、10 mL にした。

#### ② 豚の脂肪の場合

試料 5.00 g を量り採り、メタノール及び 0.4 w/v% メタリン酸溶液 (1 : 1) 混液 50 mL を加えてホモジナイズした後、遠心分離 (毎分 3,000 回転、10 分間) し、上澄液を採った。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 を加えて同様に操作し、上澄液を合わせてメタノールで、100 mL に定容した。この抽出液から正確に 20 mL (試料 1 g 相当) 分取し、40°C 以下で濃縮して、約 1 mL になるまで溶媒を除去した。この濃縮液に 0.5 vol% トリフルオロ酢酸溶液を加え、10 mL にした。

## (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 (200 mg) にメタノール 5 mL、0.5 vol% トリフルオロ酢酸 5 mL を順次注入し、各流出液は捨てた。(1) で得られた溶液を全量負荷し、水 5 mL、1 vol% トリエチルアミン 5 mL でカラムを洗浄した後、1 vol% トリエチルアミン・メタノール溶液 5 mL で溶出した。この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 (溶出した溶液 5 mL) を採り、各検討対象食品の添加用標準溶液を加えて、水を加えて 10 mL に定容したものをマトリックス添加標準溶液とした。なお、添加した標準溶液の濃度は、添加回収試験における回収率 100% 相当濃度となるように調製した。また、本試験では、SPM 及び NSPM はそれぞれ別に添加して検討を行った。

[分析法フローチャート]

**秤 取**

↓ 試料 10.0 g (脂肪の場合は 5.00 g)

**メタノール抽出**

↓ 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) 50 mL を加えホモジナイズ

↓ 遠心分離 (毎分 3,000 回転、10 分間) し、上澄液を採る

↓ 残留物はメタノール (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) 25 mL を加えホモジナイズ

↓ 遠心分離 (毎分 3,000 回転、10 分間) し、上澄液を採る

↓ 上澄液を合わせ、メタノールを加えて 100 mL に定容する

↓ 抽出液 10 mL (脂肪の場合は 20 mL) (試料 1 g 相当) をナス型フラスコに採り、溶媒を除去 (約 1 mL まで濃縮)

↓ 0.5 vol%トリフルオロ酢酸を加えて 10 mL にする

**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)]**

↓ メタノール 5 mL 及び 0.5 vol%トリフルオロ酢酸 5 mL でコンディショニング

↓ 抽出溶液を注入

↓ 水 5 mL、1 vol%トリエチルアミン 5 mL で洗浄

↓ 1 vol%トリエチルアミン・メタノール溶液 5 mL で溶出 (全溶出液を採取)

↓ 水を加えて 10 mL に定容する (試料 0.1 g 相当/1 mL)

**試験溶液**

↓

**LC-MS/MS**

[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、最適な条件を見つけるために、スキャン測定について検討したところ、SPM 及び NSPM のマススペクトルを検出することができた(図 1)。SPM 及び NSPM では、 $m/z$  200~900 の範囲で、いずれも $[M+2H]^{2+}$ のイオンが観察された。SPM で  $m/z$  422.5 が検出されたが、理論値では  $m/z$  422.26 となる。しかしながら、本分析装置は、精密質量を測定できないので、理論値に合わせて(小数点第一位で切り捨て)、 $m/z$  422.3 をプレカーサーイオンとした。NSPM も同様に、 $m/z$  350.4725 が検出され、理論値は  $m/z$  350.22 である。NSPM も理論値に合わせて(小数点第一位で切り捨て)、 $m/z$  350.2 をプレカーサーイオンとした。一方、ESI(-) モードでは、いずれも明確なイオンが観察されなかった。

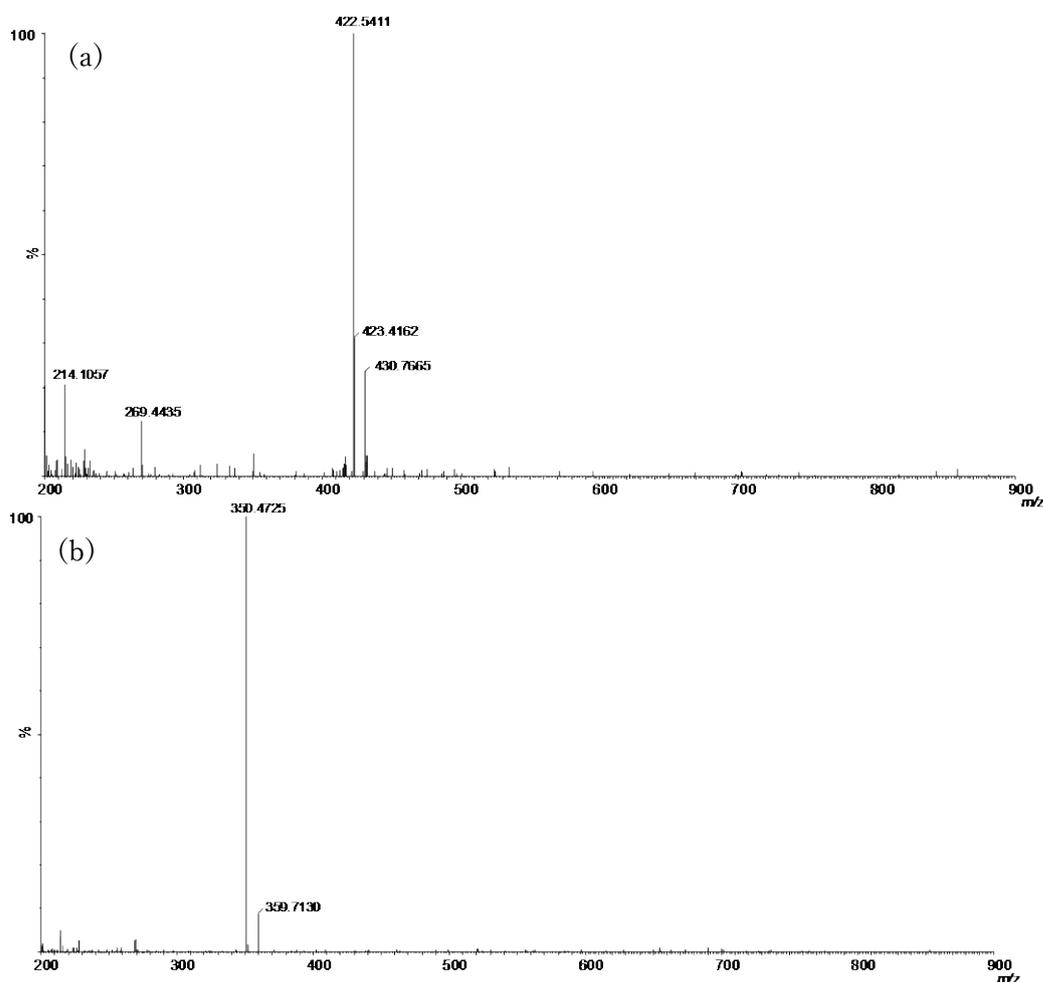


図 1 SPM(a)及び NSPM(b)のスキャン測定により得られるマススペクトル  
(a) SPM; スキャン範囲:  $m/z$  200~900、測定条件: ESI(+), コーン電圧 20V  
(b) NSPM; スキャン範囲:  $m/z$  200~900、測定条件: ESI(+), コーン電圧 20V

次に、SPMのプロダクトイオンスペクトルを図2に示した。SPMにおいて、 $m/z$  174.1745及び $m/z$  101.0135が観察された(図2(a)、コリジョンエネルギー：20 eV)。いずれのイオンについて、再現性を考慮した結果、 $m/z$  174.1745が良好であり、ピーク強度も十分得られたので定量用プロダクトイオンとして $m/z$  174.1を設定した。一方で、 $m/z$  101.0135は、コリジョンエネルギーを15 eV程度で再現性が取れたので、定性用プロダクトイオンとして $m/z$  101.0を用いることとした(図2(b)、コリジョンエネルギー：15 eV)。本結果から、夾雑物の影響を考慮して、モニタリングイオンを $m/z$  422.5→174.1(定量)もしくは、 $m/z$  422.5→101.0(定性)として利用することとした。

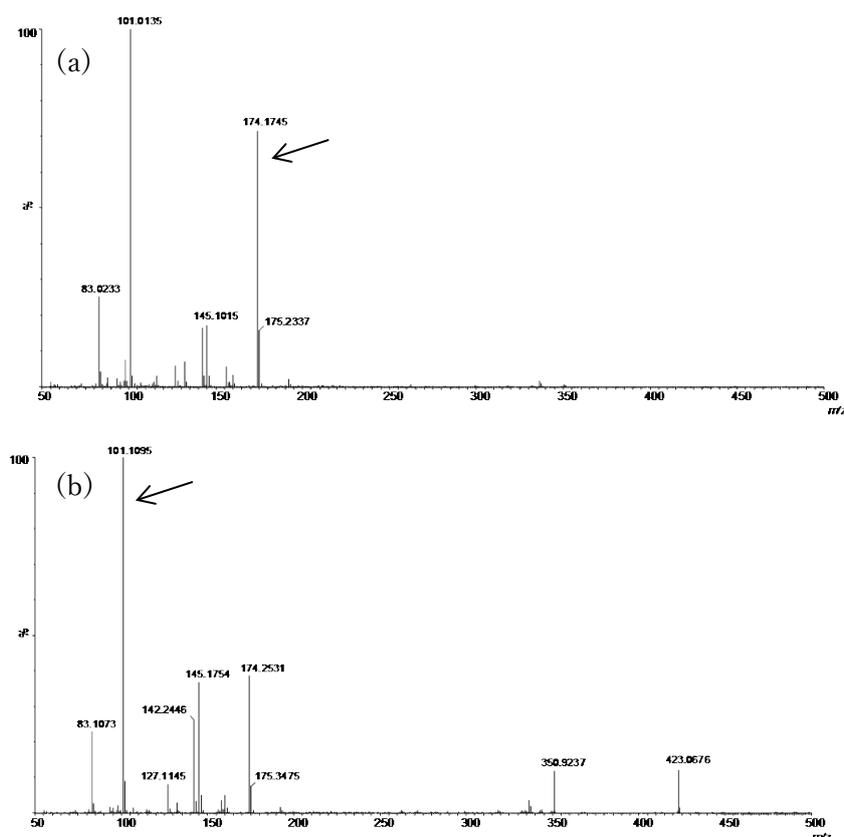


図2 SPMのプロダクトイオンスキャン測定により得られるマススペクトル  
 (a) プリカーサーイオン： $m/z$  422.5、測定条件：ESI (+)、コリジョンエネルギー 20 eV  
 (b) プリカーサーイオン： $m/z$  422.5、測定条件：ESI (+)、コリジョンエネルギー 15 eV

一方、NSPMのプロダクトイオンスペクトルを図3に示した。NSPMにおいて、 $m/z$  174.2684及び $m/z$  160.2767などが観察された(図3、コリジョンエネルギー：15 eV)。いずれのイオンについて、再現性も問題なく、コリジョンエネルギー15 eVで検出された。そこで、最も強度が高く、再現性に優れる $m/z$  174.2を定量用プロダクトイオンに設定した。また、次に強度の高い $m/z$  160.2767が検出されたので、定性用イオンとして $m/z$  160.2を選択することとした。以上より、NSPMのモニタリングイオンは、 $m/z$  350.4→174.2(定量)及び $m/z$

350.4→160.2 (定性) を用いることとした。

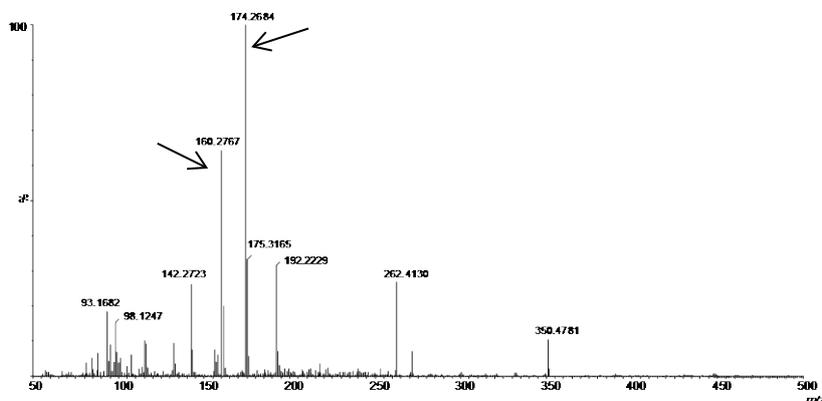


図3 NSPMのプロダクトイオンスキャン測定により得られるマススペクトル  
 プリカーサーイオン： $m/z$  350.4、測定条件：ESI (+)、コリジョンエネルギー 15 eV

## (2) LC 条件の検討

### ① 溶解液の検討

アセトニトリル、メタノール及び水を用いて、SPM 及び NSPM の溶解性を検討した。SPM 及び NSPM 5.0 mg を量り取り、アセトニトリル、メタノールまたは水 1.0 mL 加え、攪拌した (5000 mg/L)。沈殿物がないか目視で確認した結果を表 1 に示した。その結果、メタノール及びアセトニトリルが標準溶液の溶解液として利用できるが、固相抽出の過程において、メタノールが最適であったので、標準溶液の調製にはメタノールを用いることとした。

表 1 各溶媒における SPM 及び NSPM の溶解性

分析対象	アセトニトリル	メタノール	水
SPM	沈殿物なし	沈殿物なし	沈殿物あり
NSPM	沈殿物なし	沈殿物なし	沈殿物あり

### ② 分析カラムの検討

移動相にアセトニトリル及び水または、メタノール及び水で検討をした結果、ピーク形状と強度が十分でなく、そのため、一般的に用いられる 0.1 vol% のギ酸を添加することとした。0.1 vol% ギ酸・アセトニトリル溶液及び 0.1 vol% ギ酸・メタノール溶液の強度を比較した結果、アセトニトリルにおいてピーク強度が高かった。その後、0.1 vol% ギ酸・アセトニトリル溶液及び 0.1 vol% ギ酸の混液を用いて、オクタデシルシリル化シリカゲルカラムを検討した。TSKgel ODS-100V、TSKgel ODS-100Z 及び TSKgel ODS-120H (すべて内径 2.0 mm、長さ 150 mm、粒子径 3  $\mu$ m) において、シグナルノイズ比 (S/N) を比較した結果、TSKgel ODS-

100Z が S/N が高かった (表 2)。以上の結果より、分析カラムとして TSKgel ODS-100Z を用い、移動相には 0.1 vol%ギ酸含有アセトニトリル及び 0.1 vol%ギ酸とした。本カラムを用いて、アイソクラティック及びグラジエント溶離を比較したところ、アイソクラティック溶離 (0.1 vol%ギ酸含有アセトニトリル及び 0.1 vol%ギ酸 (13 : 7) 混液) では、ピーク幅が広がったのに対し、グラジエント溶離では良好なピーク形状が得られ、S/N が向上した。また、添加するギ酸濃度も検討したが、0.1~0.5 vol%の間では、S/N の向上は観察されなかったため、最も濃度が低い 0.1 vol%を採用した。以上の結果から、移動相として 0.1 vol%ギ酸含有アセトニトリル及び 0.1 vol%ギ酸の混液を用いて、グラジエント溶離を行うこととした。そのときの SRM クロマトグラムを図 4 に示した。

表 2 各カラムにおける SPM 及び NSPM の S/N

分析対象	TSKgel ODS-100Z	TSKgel ODS-100V	TSKgel ODS120H
SPM	2525	547	1380
NSPM	1741	802	1114

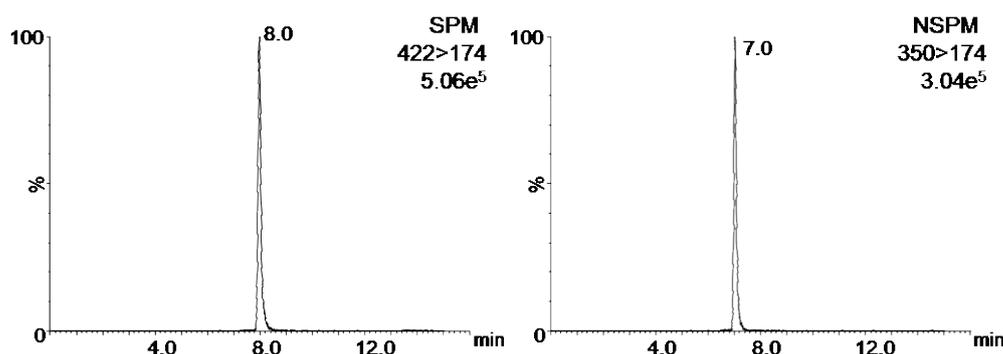


図 4 LC-MS/MS による SPM 及び NSPM の SPM クロマトグラム

### (3) 検量線

図 5 及び 6 に SPM 及び NSPM の検量線の例を示した。検量線は、低濃度 (0.0004~0.0125 mg/L : 6 点) と高濃度 (0.0031~0.05 mg/L : 6 点) とする。いずれの濃度範囲で作成した検量線の決定係数は、 $r^2 = 0.998$  以上であり良好な直線性を示した。



図 5 SPM の検量線 (定量イオン) の例

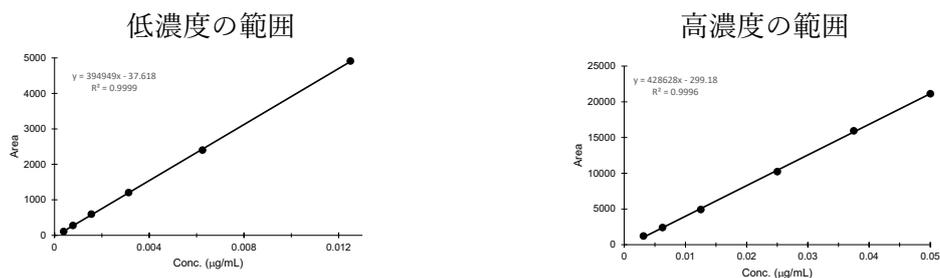


図6 NSPMの検量線(定量イオン)の例

#### (4) 定量限界

$$\text{SPM} : 0.01 \text{ mg/kg} = [10 \text{ mL/1 g} \times 0.01 \text{ ng/10 } \mu\text{L}]$$

$$\text{NSPM (SPM 換算値)} : 0.01 \text{ mg/kg} = [10 \text{ mL/1 g} \times 0.01 \text{ ng/10 } \mu\text{L}]$$

## 2. 試験溶液調製法の検討

### (1) 抽出方法の検討

#### ① 豚の筋肉の場合

抽出溶媒として、メタノール、*n*-ヘキサン及びアセトニトリル(1:1)溶液、アセトンを検討した。試料 10.0 g に添加用標準溶液(1.0 µg/mL) 1.0 mL を添加し、よく混合した後、30 分間放置した。「7. 試験溶液の調製」に従い、豚の筋肉の抽出溶液 100 mL のうち、10 mL をナス型フラスコに採り、1 mL 程度まで減圧濃縮した。その残留液にメタノール及び水(1:1)混液を加えて 10 mL に定容し、試験溶液とした。また、抽出液は精製を行っていないため、試料由来のマトリックスの影響も予想される。実際に、試料からピーク強度が増加するエンハンス効果が観察された。そのため、回収率の比較検討には、マトリックス添加標準溶液との相対回収率を算出した。その結果、アセトンでは SPM 及び NSPM の相対回収率が 68%及び 90%程度、*n*-ヘキサン及びアセトニトリル(1:1)混液では SPM 及び NSPM が 74%及び 80%程度、となったが、メタノールではいずれも良好な回収率(相対回収率 90%以上)となった(表 4)。これらの結果より、試料をメタノールで抽出することとした。

表 4 各種溶媒による SPM 及び NSPM の回収率 (豚の筋肉)

抽出溶媒	回収率 (%)	SPM	NSPM
メタノール	絶対回収率 <sup>※1</sup>	143	124
	マトリックス添加標準溶液 <sup>※1</sup>	142	126
	相対回収率 <sup>※2</sup>	101	98
アセトン	絶対回収率	103	197
	マトリックス添加標準溶液	151	217
	相対回収率	68	90
ヘキサン及びアセトニトリル (1 : 1) 混液	絶対回収率	88	105
	マトリックス添加標準溶液	119	132
	相対回収率	74	80

※1 [SPM 又は NSPM の検出濃度/SPM 又は NSPM の添加濃度] × 100

※2 [絶対回収率/マトリックス添加標準溶液] × 100

② 豚の脂肪の場合

上記の方法を脂肪に適用し、検討を行った。試料 10.0 g を採り、約 40℃で加温して融解させたものに 1.5 µg/mL 添加用標準溶液 1.0 mL をそれぞれ添加して混合後、放置 (室温) して再度凝固させた後、30 分放置した。また、本試験では、SPM 及び NSPM はそれぞれ別に添加して検討を行った。その結果、SPM 及び NSPM の相対回収率が 70~82%及び 47~84%となり、十分な回収率と再現性が得られなかった。そこで、スピラマイシン試験法<sup>1)</sup>に従い、試料を 5.00 g (添加用標準溶液 0.5 mL) に減らしたうえ、メタノール、メタノール及び 0.1, 0.4, 1.0 w/v%メタリン酸溶液 (1 : 1) 混液の抽出溶媒を比較検討した。その結果、表 5 のように、メタノール及び 0.4 w/v%メタリン酸溶液 (1 : 1) 混液を用いた SPM 及び NSPM のそれぞれが相対回収率で 98%となったため、スピラマイシン試験法<sup>1)</sup>と同じ抽出条件とすることとした。そのため、豚の脂肪試料のみ試料量 (5.00 g) 及び抽出溶媒 (メタノール及び 0.4 w/v%メタリン酸溶液 (1 : 1) 混液) と変更した。

表5 メタノール及びメタリン酸溶液の混液による SPM 及び NSPM の回収率 (豚の脂肪)

抽出溶媒	回収率 (%)	SPM	NSPM
メタノール	絶対回収率 <sup>※1</sup>	54	49
	マトリックス添加標準溶液 <sup>※1</sup>	59	57
	相対回収率 <sup>※2</sup>	92	86
メタノール及び 0.1 w/v%メ タリン酸溶液 (1:1) 混液	絶対回収率	95	102
	マトリックス添加標準溶液	100	104
	相対回収率	95	98
メタノール及び 0.4 w/v%メ タリン酸溶液 (1:1) 混液	絶対回収率	99	107
	マトリックス添加標準溶液	101	109
	相対回収率	98	98
メタノール及び 1.0 w/v%メ タリン酸溶液 (1:1) 混液	絶対回収率	91	109
	マトリックス添加標準溶液	109	118
	相対回収率	83	92

※1 [SPM 又は NSPM の検出濃度/SPM 又は NSPM の添加濃度] × 100

※2 [絶対回収率/マトリックス添加標準溶液] × 100

## (2) 精製方法の検討

スピラマイシン試験法<sup>1)</sup>では、強酸性陽イオン交換ミニカラムを用い、溶媒にはリン酸緩衝液などを利用している。本試験では、より汎用的なオクタデシルシリル化シリカゲルやポリマー系の充填剤ミニカラムを検討し、LC-MS/MS 装置を用いるため不揮発の塩を用いない改良を試みた。そこで、本検討では、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 (Oasis HLB [200 mg/6 mL])、オクタデシルシリルミニカラム (InertSep C18 [500 mg/6 mL]) 及び窒素含有極性基修飾メタクリレート-スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラム (InertSep PLS-3 [200 mg/6 mL]) の比較を行った。添加用標準溶液 (2.0 µg/mL) 1 mL をメタノール 1 mL 及び水 20 mL の溶液に加えて検討を実施した。コンディショニングにメタノール又はアセトニトリル 5 mL 及び水 5 mL を行い、添加用標準溶液 (2.0 µg/mL) をメタノール 1 mL 及び水 20 mL の溶液に加えた溶液を試料溶液とし、負荷した後、洗浄に水 5 mL、溶出にメタノール又はアセトニトリル 5 mL とした (表 6)。その結果、再現性と回収率が最もよかっ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及びメタ

ノールを用いて、さらなる詳細な条件検討を行うこととした。また、今回、入手が可能であった 6 mL カートリッジを用いているため、コンディショニング、洗浄及び溶出には 5 mL として検討した。

表 6 固相抽出に関する比較検討

固相抽出	回収率, % メタノール		回収率, % アセトニトリル	
	SPM	NSPM	SPM	NSPM
Oasis HLB (200 mg/6 mL)	35.7	31.5	17.3	19.4
InertSep C18 (500 mg/6 mL)	21.2	26.5	9.7	27.5
InertSep PLS-3 (200 mg/6 mL)	23.4	25.1	10.3	14.2

コンディショニング：メタノール又はアセトニトリル 5 mL、水 5 mL

洗浄：水 5 mL

溶出：メタノール又はアセトニトリル 5 mL

次に、固相抽出の保持の改善の目的で、負荷溶媒に揮発性の酸塩を加えることを検討した。SPM 及び NSPM はいずれもジメチルアミン構造 ( $(\text{CH}_3)_2\text{-N-R}$ ) を持つため、水溶液は弱アルカリ性を示し、塩基性はアンモニアより強いことがある。そこで、負荷溶媒を酸性もしくは中性付近にすることで、逆相系固相抽出に対する保持が改善されることが予想される。そこで、揮発性酸は、トリフルオロ酢酸、ギ酸及び酢酸として、いずれも最終濃度を 0.5 vol% に統一した。添加標準液などの条件は上記と同様とした。その結果、トリフルオロ酢酸で最も回収率がよかった (表 7)。トリフルオロ酢酸はイオンペアの効果もあるため、ジメチルアミン構造と弱い可逆的緊密イオン対を形成し、イオン対試薬としての役割を担ったと考えられる。しかし、トリフルオロ酢酸は、LC の配管などに吸着しやすく、LC-MS/MS のバックグラウンド上昇やイオン化効果 (エンハンス) に影響を与える。そこで、可能な限り、低濃度かつ再現性のある保持容量を検討した結果、0.5 vol% 以上では回収率の改善は観察されなかった (表 8)。よって、0.5 vol% トリフルオロ酢酸濃度とした。さらに、溶媒負荷容量の比較をした結果、10 mL で十分な回収率を得ることができた (表 9)。

表 7 負荷溶媒に添加する酸塩の比較検討

酸塩 (0.5 vol%)	回収率, %	
	SPM	NSPM
トリフルオロ酢酸	86.3	91.7
ギ酸	80.5	82.7
酢酸	77.5	78.3

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])

コンディショニング: メタノール 5 mL、検討の酸溶媒 5 mL

洗浄: 水 5 mL

溶出: メタノール 5 mL

表 8 負荷溶媒に添加するトリフルオロ酢酸濃度の比較検討

トリフルオロ酢酸濃度	回収率, %	
	SPM	NSPM
0.1 vol%	82.8	94.1
0.5 vol%	85.5	94.8
1 vol%	83.5	89.1

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])

コンディショニング: メタノール 5 mL、検討の酸溶媒 5 mL

洗浄: 水 5 mL

溶出: メタノール 5 mL

表 9 負荷溶媒における 0.5 vol% トリフルオロ酢酸の負荷溶媒容量の比較検討

0.5 vol% トリフルオロ酢酸 の負荷容量	回収率, %	
	SPM	NSPM
5 mL	87.4	91.0
10 mL	89.5	94.8
15 mL	88.5	92.4
20 mL	85.6	91.4

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])

コンディショニング: メタノール 5 mL、0.5 vol% トリフルオロ酢酸 5 mL

洗浄: 水 5 mL

溶出: メタノール 5 mL

次に、固相抽出に保持された分析対象物質を溶出させるための溶出溶媒の検討を実施した。固相抽出の保持には、揮発性の酸を用いたため、脱着には塩基性にすることで分析対象物質を溶出できると考えた。そこで、揮発性の塩基性溶媒であるトリエチルアミンを添加して、検討することとした。また、アンモニアも検討したが、揮発性が高くデータの再現性が得ることができなかった。トリエチルアミンの濃度は、トリフルオロ酢酸濃度（0.5 vol%）とのモル質量比（114 (C<sub>6</sub>H<sub>15</sub>N) / 101 (C<sub>2</sub>HF<sub>3</sub>O<sub>2</sub>))、それに加え、揮発性の性質（用事調製）と調製しやすさを考慮して、1 vol% トリエチルアミン・メタノール溶液とした。それに加え、洗浄液は水及び 1 vol% トリエチルアミン溶液を用いることとした。溶出溶媒量をカートリッジ容量から 5 mL もしくは 10 mL を検討した結果、いずれも回収率は 80% 以上となった（表 10）。よって、溶出溶媒は 5 mL とすることとした。

表 10 溶出溶媒における 1 vol% トリエチルアミン・メタノール溶液量の検討

トリエチルアミン・メタノール溶液 (1 vol%)	回収率, %	
	SPM	NSPM
5 mL	87.8	99.7
10 mL	85.5	99.0

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])

コンディショニング：メタノール 5 mL、0.5 vol% トリフルオロ酢酸溶液 5 mL

洗浄：水 5 mL のあと、1 vol% トリエチルアミン溶液 5 mL

溶出：1 vol% トリエチルアミン・メタノール 5 mL もしくは 10 mL

### (3) 試験溶液の調製溶媒の検討

上記の精製に関する検討結果より、最終的な溶出溶媒は 1 vol% トリエチルアミン・メタノール 5 mL となった。LC-MS/MS 測定用の溶液調製のために溶媒置換をする濃縮過程を考慮して、再溶解に用いる溶媒の検討を実施した。一方、基準値が 0.2 ppm と LC-MS/MS 感度からも比較的検出することができるので、濃縮過程を省略できる調製方法についても検討した。検討の溶媒として 1 vol% トリエチルアミン・メタノール溶液及び水 (1 : 1) 混液（濃縮過程を省略できるもの）もしくはメタノール及び水 (1 : 1) 混液（濃縮乾固を実施することを想定したもの）における、ピーク面積を比較した結果、1 vol% トリエチルアミン・メタノール溶液及び水 (1 : 1) 混液のピーク面積値が高かった（表 11）。よって、検量線用標準溶液の調製には 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。試験溶液の調製には、同じ比率になるように最終的な固相抽出からの溶出溶媒 (1 vol% トリエチルアミン・メタノール溶液) 5 mL を精製水で定容して 10 mL とした。

表 11 希釈溶媒の検討

希釈溶媒	LC-MS/MS ピーク面積	
	SPM	NSPM
メタノール及び水 (1 : 1) 混液	2126	941
1 vol% トリエチルアミン・メタノール 溶液及び水 (1 : 1) 混液	3843	1996

### 3. 添加回収試験

畜水産物4食品（豚の筋肉、豚の脂肪、牛乳及びぶり）を用いて、実験方法の『7. 試験溶液の調製』に従い、SPMの定量限界（「0.01 mg/kg）及び基準値濃度（豚の筋肉、牛乳及びぶり：0.2 mg/kg、豚の脂肪：0.3 mg/kg）で5併行の添加回収試験を行った。なお、SPM及びNSPMの添加回収試験は別々に実施した。その際、SPM及びNSPM（SPM換算）の基準値濃度の添加では、SPM及びNSPM（SPM換算）の和が基準値濃度となるように、各化合物の添加濃度は、豚の筋肉、牛乳及びぶりでは0.1 mg/kg、豚の脂肪では0.15 mg/kgとした。その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SPM及びNSPM溶媒標準溶液の代表的なクロマトグラムを図7～14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15に示した。今回、SPMからNSPMへの変換については面積比で9.0%以下であり、NSPMからSPMへの変換は0%であった。

#### (1) 選択性

いずれの食品においても、SPM及びNSPMの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12）。

表12 選択性の評価

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (mg/kg)	基準値 (ppm) (スピライシン)	妨害ピークの許容範囲の評価		ピーク面積(高さ) <sup>1)</sup>			マトリックス添加標準溶液 <sup>2)</sup>			面積(高さ)比 (a)/(b)	選択性の評価 <sup>3)</sup>	備考	
					評価濃度 (ppm)	評価基準	面積又は高さの別	ブランク	平均(a)	平均(b)						
1	SPM	豚の筋肉	0.01		定量限界 0.01	< 0.333	面積	0	0	0	234	220	227	0.000	○	
2		豚の脂肪	0.01		定量限界 0.01	< 0.333	面積	0	0	0	143	147	145	0.000	○	
3		牛の乳	0.01		定量限界 0.01	< 0.333	面積	0	0	0	238	203	221	0.000	○	
4		ぶり	0.01		定量限界 0.01	< 0.333	面積	0	0	0	130	148	139	0.000	○	
5		豚の筋肉	0.01	0.2	基準値 0.2	< 0.100	面積	0	0	0	1188	1252	1220	0.000	○	
6		豚の脂肪	0.01	0.3	基準値 0.3	< 0.100	面積	0	0	0	2059	2085	2072	0.000	○	
7		牛の乳	0.01	0.2	基準値 0.2	< 0.100	面積	0	0	0	4350	4487	4419	0.000	○	
8		ぶり	0.01	0.2	基準値 0.2	< 0.100	面積	0	0	0	1311	1225	1268	0.000	○	
9	NSPM(SPM換算)	豚の筋肉	0.01		定量限界 0.01	< 0.333	面積	0	0	0	142	110	126	0.000	○	
10		豚の脂肪	0.01		定量限界 0.01	< 0.333	面積	0	0	0	107	103	105	0.000	○	
11		牛の乳	0.01		定量限界 0.01	< 0.333	面積	0	0	0	117	120	118	0.000	○	
12		ぶり	0.01		定量限界 0.01	< 0.333	面積	0	0	0	79	80	79	0.000	○	
13		豚の筋肉	0.01	0.2	基準値 0.2	< 0.100	面積	0	0	0	725	786	745	0.000	○	
14		豚の脂肪	0.01	0.3	基準値 0.3	< 0.100	面積	0	0	0	1205	1186	1195	0.000	○	
15		牛の乳	0.01	0.2	基準値 0.2	< 0.100	面積	0	0	0	3202	3353	3278	0.000	○	
16		ぶり	0.01	0.2	基準値 0.2	< 0.100	面積	0	0	0	775	745	760	0.000	○	

<sup>1)</sup> 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。)

<sup>2)</sup> 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。

<sup>3)</sup> 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、併行精度及び定量限界

スピラマイシン定量限界及び基準値濃度での真度及び併行精度を表 13 に示した。SPM の定量限界及び基準値濃度は真度 91.3~102.7%及び 91.3~95.6%、併行精度 2.7~9.1%及び 1.4~4.5%、NSPM の定量限界及び基準値濃度は真度 84.6~107.4%及び 79.9~101.7%、併行精度 2.3~5.4%及び 1.4~2.2%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。

表 13 真度、併行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 (mg/kg)	基準値 (ppm) (スピラマイシン)	添加濃度 (ppm)	定量限界の評価 <sup>1)</sup>	検量線		回収率 (%)					真度		併行精度		S/N <sup>2)</sup>	備考	
							傾き	切片	r <sup>2</sup> 値	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5	(%)	(RSD%)	Max.			Min.
1	SPM	豚の筋肉	0.01	0.2	0.01	S/N	1042	1	0.9996	99.6	103.8	101.6	101.8	106.8	102.7	2.7	675.2	808.5	641.9	
2		豚の脂肪	0.01	0.3	0.01	S/N	883	46	0.9993	100.2	89.8	98.5	89.5	89.5	93.5	5.7	262.4	114.8	188.5	
3		牛の乳	0.01	0.2	0.01	S/N	523	205	0.9988	92.6	94.8	88.7	87.3	108.9	94.5	9.1	317.2	251.8	284.5	
4		ぶり	0.01	0.2	0.01	S/N	1240	19	0.9993	94.9	92.7	86.7	92.7	89.7	91.3	3.5	411.1	287.5	349.3	
5		豚の筋肉	0.01	0.2	0.1	—	1122	339	0.9988	97.1	94.6	89.9	89.0	88.5	91.8	4.2				
6		豚の脂肪	0.01	0.3	0.15	—	929	237	0.9994	90.8	88.2	88.5	89.5	89.5	91.3	4.5				
7		牛の乳	0.01	0.2	0.1	—	522	207	0.9998	93.3	95.3	93.9	95.0	92.1	83.9	1.4				
8		ぶり	0.01	0.2	0.1	—	1243	4	0.9991	98.4	95.2	95.7	94.4	94.1	95.6	1.8				
9	NSPM(SPM換算)	豚の筋肉	0.01	0.2	0.01	S/N	775	18	0.9995	107.1	110.3	101.7	104.9	102.8	105.4	3.3	571.4	517.9	544.7	
10		豚の脂肪	0.01	0.3	0.01	S/N	620	29	0.9997	111.0	102.8	104.2	100.0	95.9	102.8	5.4	60.8	51.8	56.3	
11		牛の乳	0.01	0.2	0.01	S/N	197	73	0.9986	107.9	109.4	109.9	104.3	105.3	107.4	2.3	254.8	122.0	188.4	
12		ぶり	0.01	0.2	0.01	S/N	1239	13	0.9993	89.2	85.6	84.4	80.8	83.2	84.6	3.7	660.7	439.6	550.2	
13		豚の筋肉	0.01	0.2	0.1	—	637	119	0.9995	98.2	103.5	102.3	103.7	100.7	101.7	2.2				
14		豚の脂肪	0.01	0.3	0.15	—	793	72	0.9998	100.4	98.6	100.0	95.9	98.2	98.6	1.8				
15		牛の乳	0.01	0.2	0.1	—	181	56	0.9973	92.6	96.7	94.7	94.2	94.9	94.6	1.6				
16		ぶり	0.01	0.2	0.1	—	1244	1	0.9992	81.5	79.0	79.0	79.5	80.6	79.9	1.4				

\*1 S/Nを求める必要がある場合には[S/N]と表示される。

\*2 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(Mn.)のそれぞれのS/Nを求める。

(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 14 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、SPM では 0.92~1.04、NSPM では 0.97~1.10 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 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 (mg/kg)	基準値 (ppm) (スピラマイシン)	添加濃度 (ppm)	標準溶液濃度 <sup>1)</sup> (mg/L)	面積又は高さの別	ブランク <sup>3)</sup>	ピーク面積(高さ) <sup>2)</sup>						備考	
									マトリックス添加標準溶液 <sup>4)</sup>			溶媒標準溶液				ピーク面積(高さ)比 <sup>5)</sup>
									n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均		
1	SPM	豚の筋肉	0.01	0.2	0.01	0.001	面積	0	216	229	223	229	232	231	0.97	
2		豚の脂肪	0.01	0.3	0.01	0.001	面積	0	179	150	164	195	130	163	1.01	
3		牛の乳	0.01	0.2	0.01	0.001	面積	0	238	203	221	218	235	226	0.97	
4		ぶり	0.01	0.2	0.01	0.001	面積	0	130	146	138	136	135	135	1.02	
5		豚の筋肉	0.01	0.2	0.1	0.01	面積	0	1174	1219	1196	1251	1310	1280	0.93	
6		豚の脂肪	0.01	0.3	0.15	0.015	面積	0	2007	1980	1994	2148	2202	2175	0.92	
7		牛の乳	0.01	0.2	0.1	0.01	面積	0	4350	4487	4419	4306	4230	4268	1.04	
8		ぶり	0.01	0.2	0.1	0.01	面積	0	1300	1309	1304	1251	1310	1280	1.02	
9	NSPM(SPM換算)	豚の筋肉	0.01	0.2	0.01	0.001	面積	0	120	125	122	117	108	112	1.09	
10		豚の脂肪	0.01	0.3	0.01	0.001	面積	0	76	84	80	83	74	78	1.02	
11		牛の乳	0.01	0.2	0.01	0.001	面積	0	126	106	116	112	99	105	1.10	
12		ぶり	0.01	0.2	0.01	0.001	面積	0	95	80	87	93	80	87	1.00	
13		豚の筋肉	0.01	0.2	0.1	0.01	面積	0	827	774	801	825	740	783	1.02	
14		豚の脂肪	0.01	0.3	0.15	0.015	面積	0	1260	1210	1235	1265	1294	1279	0.97	
15		牛の乳	0.01	0.2	0.1	0.01	面積	0	3202	3353	3278	3277	3328	3303	0.99	
16		ぶり	0.01	0.2	0.1	0.01	面積	0	794	746	770	825	740	783	0.98	

\*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。

(4) 補正真度

上記の真度及びマトリックス効果の値より補正真度を求め、表 15 に示した。なお、補正真度は、真度をマトリックス効果の値で除して算出した。その結果、表 15 に示したように、SPM の補正真度は基準値濃度で 90.3～99.2%。定量限界濃度で 89.5～105.9%となった。NSPM の補正真度は基準値濃度で 81.5～101.6%。定量限界濃度で 84.6～100.8%となった。いずれも良好であった。

表 15 補正真度

分析対象化合物	食品名	添加濃度 (ppm)	真度 (%)	マトリックス効果	補正真度※ (%)
SPM	豚の筋肉	0.01	102.7	0.97	105.9
	豚の脂肪	0.01	93.5	1.01	92.6
	牛乳	0.01	94.5	0.97	97.4
	ぶり	0.01	91.3	1.02	89.5
	豚の筋肉	0.1	91.8	0.93	98.7
	豚の脂肪	0.15	91.3	0.92	99.2
	牛乳	0.1	93.9	1.04	90.3
	ぶり	0.1	95.6	1.02	93.7
NSPM (SPM 換算)	豚の筋肉	0.01	105.4	1.09	96.7
	豚の脂肪	0.01	102.8	1.02	100.8
	牛乳	0.01	107.4	1.10	97.6
	ぶり	0.01	84.6	1.00	84.6
	豚の筋肉	0.1	101.7	1.02	99.7
	豚の脂肪	0.15	98.6	0.97	101.6
	牛乳	0.1	94.6	0.99	95.6
	ぶり	0.1	79.9	0.98	81.5

※補正真度＝真度 (%) /マトリックス効果

添加回収試験における代表的なクロマトグラム

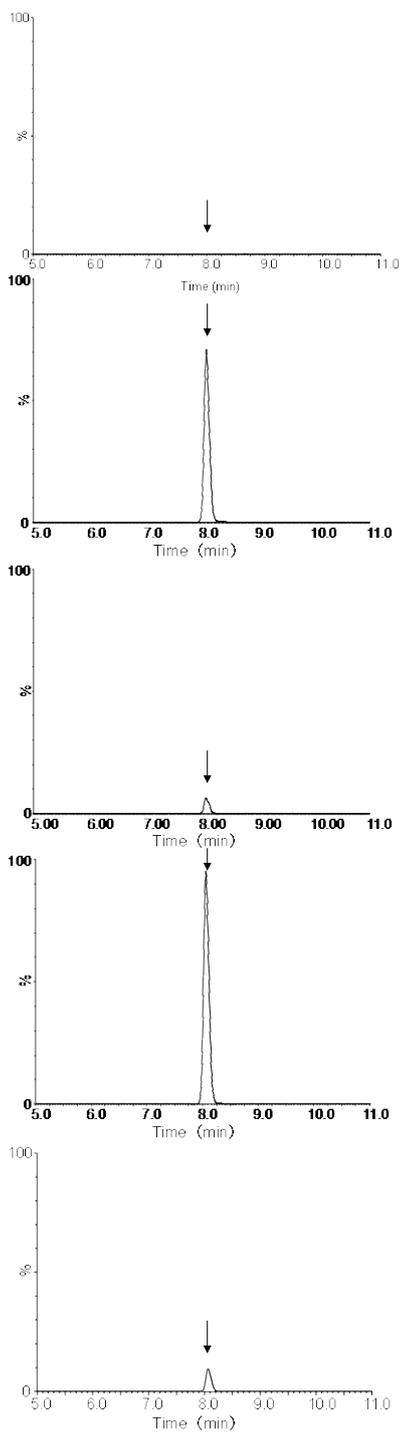


図7 豚の筋肉のSRMクロマトグラム  
SPM ( $m/z$  422→174)  
基準値濃度：0.2 ppm (SPM 0.1 ppm)  
定量限界濃度：0.02 ppm (SPM 0.01 ppm)

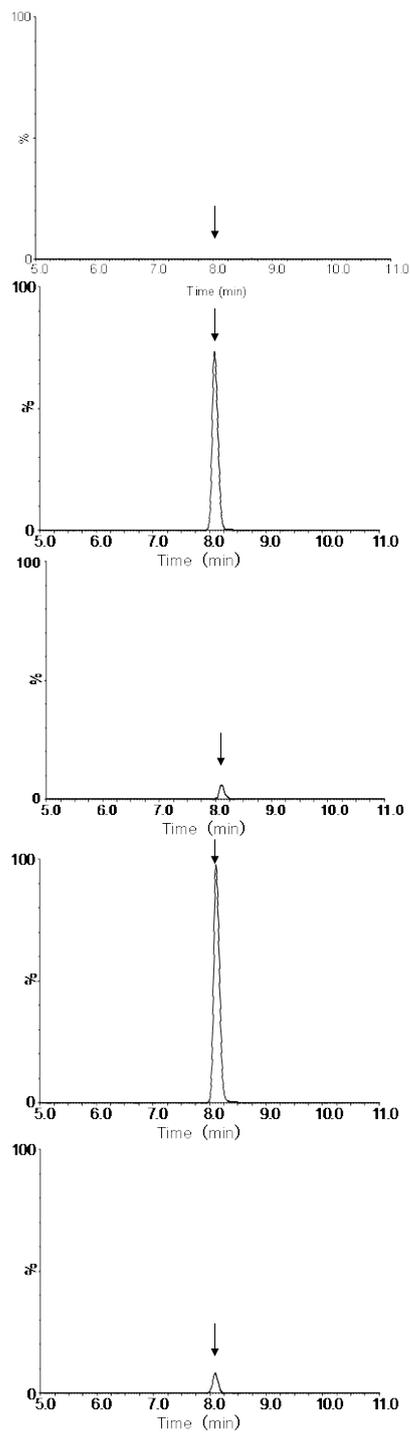


図8 豚の脂肪のSRMクロマトグラム  
SPM ( $m/z$  422→174)  
基準値濃度：0.3 ppm (SPM 0.15 ppm)  
定量限界濃度：0.02 ppm (SPM 0.01 ppm)

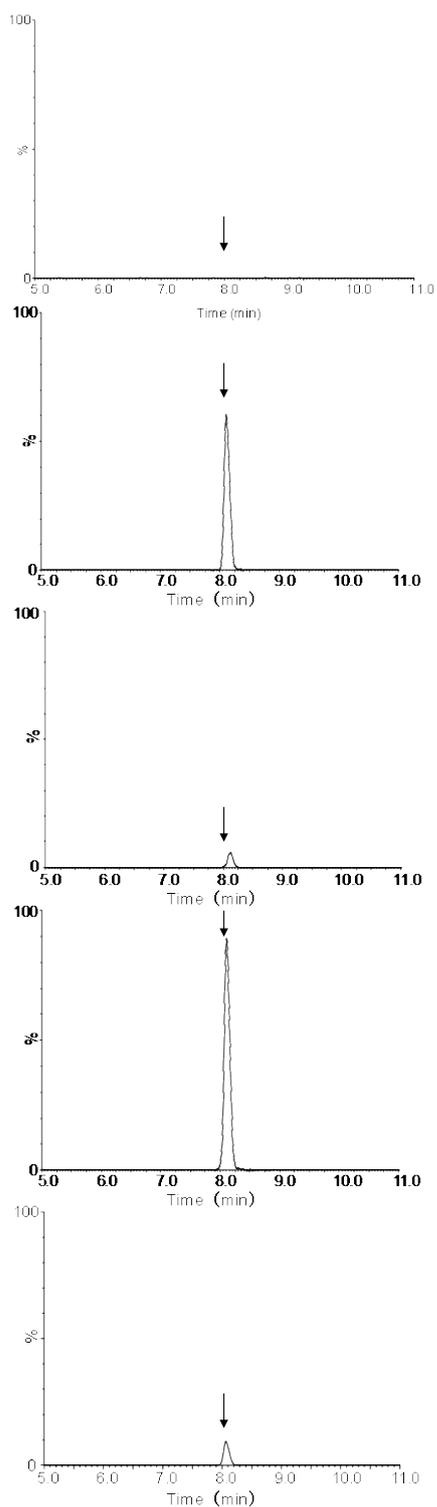


図9 牛乳のSRMクロマトグラム  
 SPM ( $m/z$  422→174)  
 基準値濃度：0.2 ppm (SPM 0.1 ppm)  
 定量限界濃度：0.02 ppm (SPM 0.01 ppm)

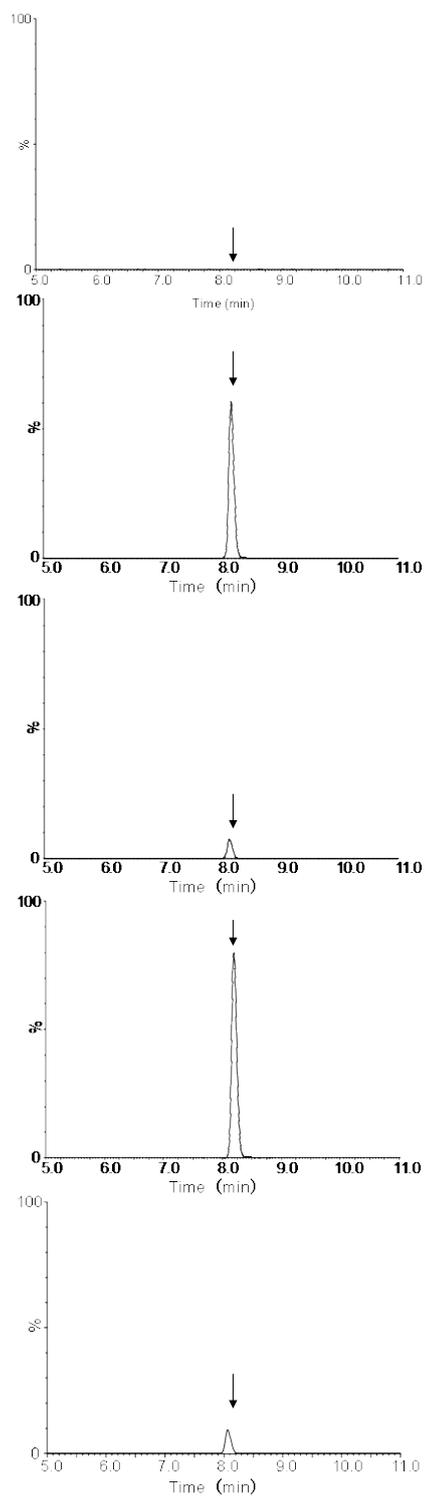


図10 ぶりのSRMクロマトグラム  
 SPM ( $m/z$  422→174)  
 基準値濃度：0.2 ppm (SPM 0.1 ppm)  
 定量限界濃度：0.02 ppm (SPM 0.01 ppm)

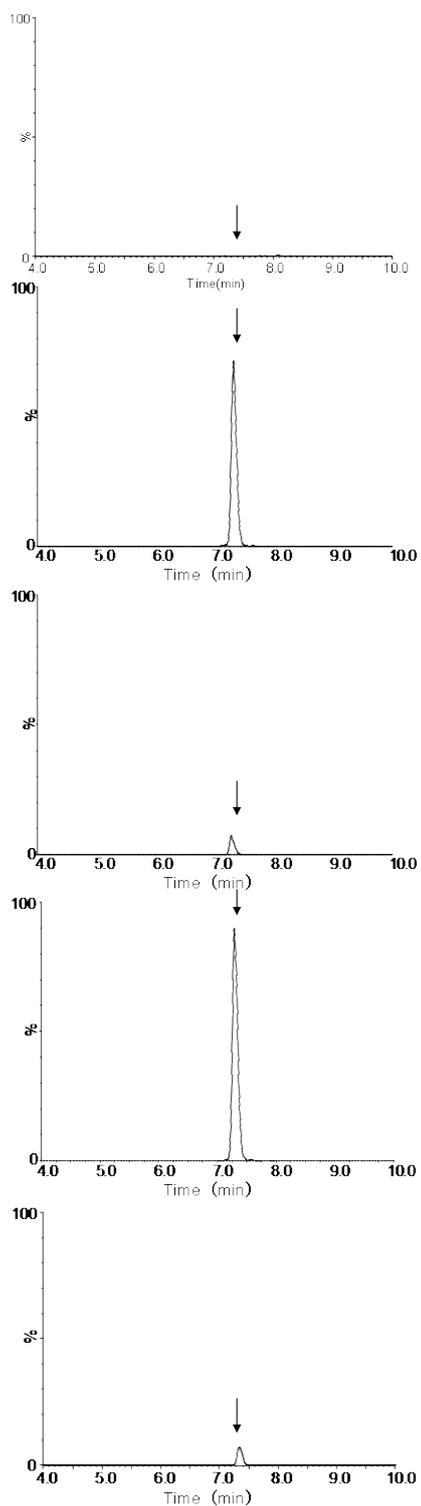


図 11 豚の筋肉の SRM クロマトグラム  
 NSPM ( $m/z$  350→174)  
 基準値濃度 : 0.2 ppm (NSPM 0.1 ppm)  
 定量限界濃度 : 0.02 ppm (NSPM 0.01 ppm)

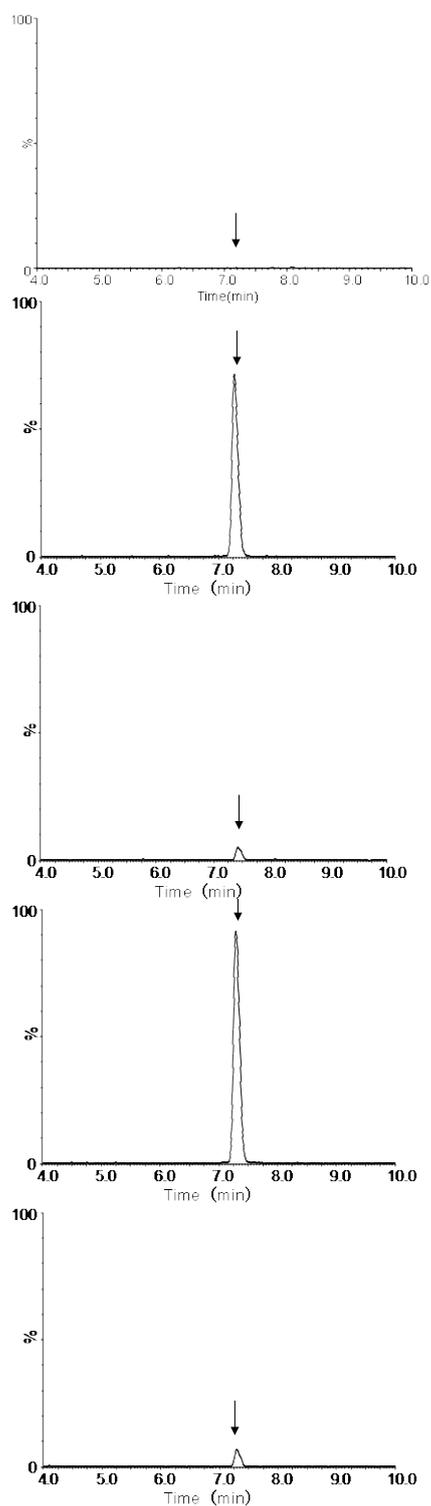


図 12 豚の脂肪の SRM クロマトグラム  
 NSPM ( $m/z$  350→174)  
 基準値濃度 : 0.3 ppm (NSPM 0.15 ppm)  
 定量限界濃度 : 0.02 ppm (NSPM 0.01 ppm)

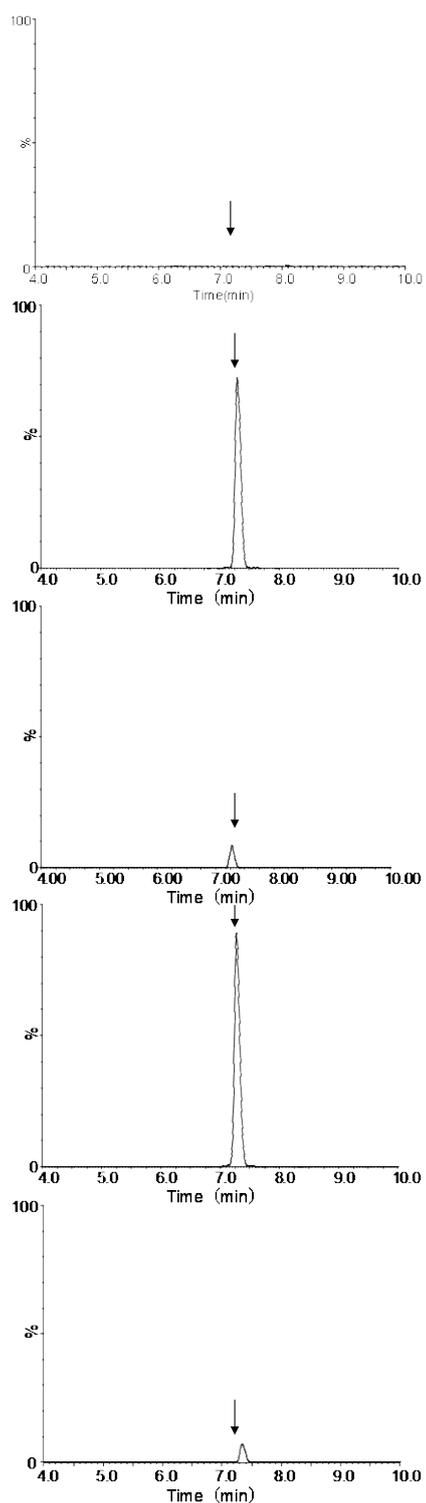


図 13 牛乳の SRM クロマトグラム

NSPM ( $m/z$  350→174)

基準値濃度 : 0.2 ppm (NSPM 0.1 ppm)

定量限界濃度 : 0.02 ppm (NSPM 0.01 ppm)

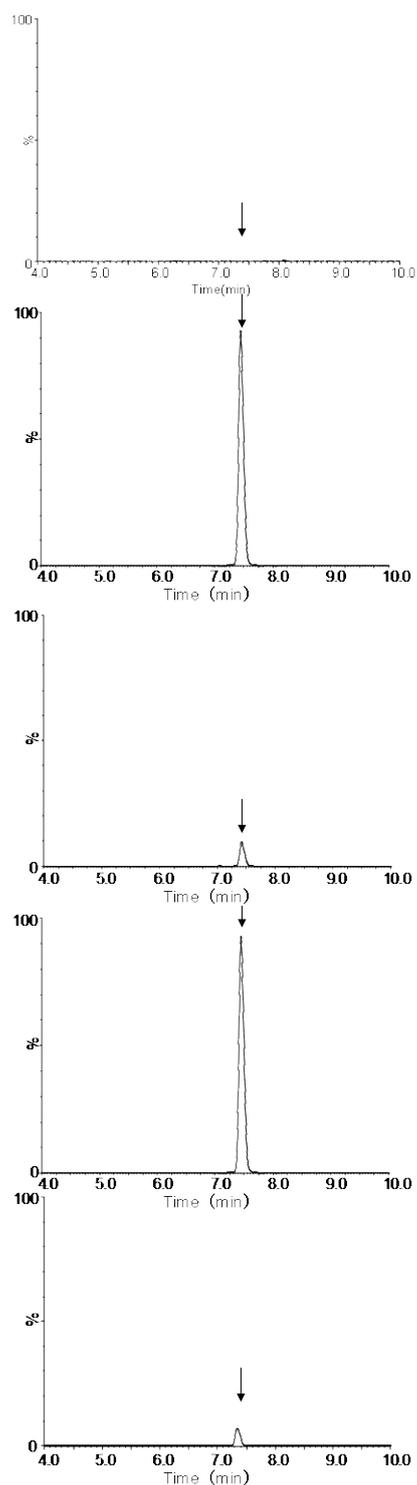


図 14 ぶりの SRM クロマトグラム

NSPM ( $m/z$  350→174)

基準値濃度 : 0.2 ppm (NSPM 0.1 ppm)

定量限界濃度 : 0.02 ppm (NSPM 0.01 ppm)

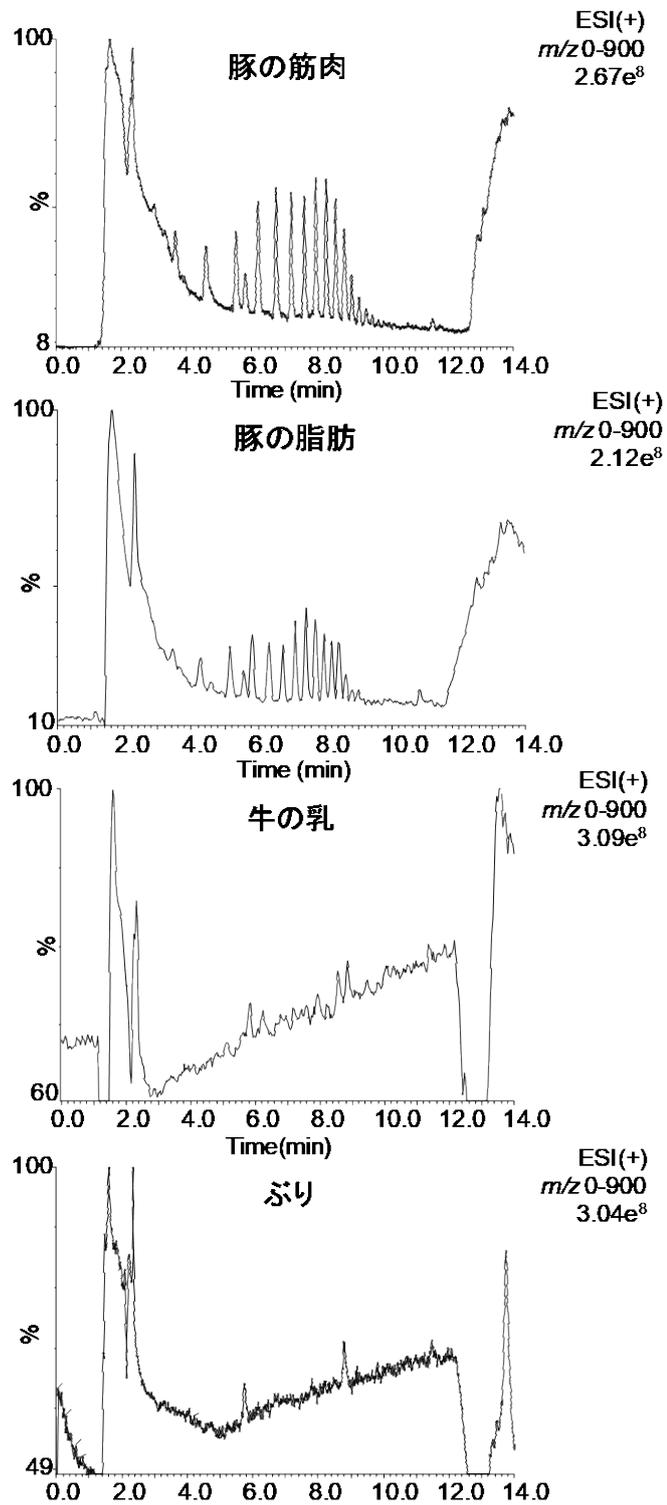


図 15 ブランク試料の代表的なトータルイオンカレントクロマトグラム

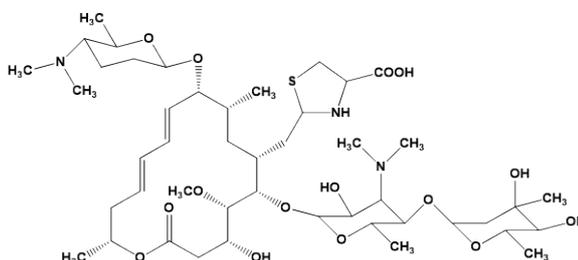
#### 4. その他の試験法検討に関連する事項

本試験の畜水産物の開発において、当初、豚の肝臓も対象に検討した。しかし、本試験法では良好な回収率を得ることができなかった。その理由として、豚の肝臓では、SPM 及び NSPM を試料に添加後（30 分間放置）、速やかに L-システインと結合し、チアゾリジン誘導体が生成されると予想された<sup>2,3)</sup>。既報<sup>2,3)</sup>で報告されているチアゾリジン誘導体（以下、cys-SPM 及び cys-NSPM とする）を確認するため、別途 LC-MS/MS による評価を検討した。

##### ① 分析対象化合物の構造及び物理化学的性質

分析対象化合物：スピラマイシン I のチアゾリジン誘導体（以下、cys-SPM と略す）

構造式：



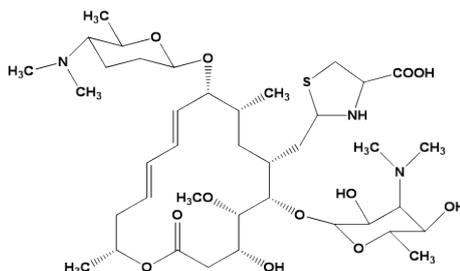
分子式：C<sub>46</sub>H<sub>79</sub>N<sub>3</sub>O<sub>15</sub>S

分子量：946.20 (Exact Mass: 945.52)

[ChemDraw Professional による計算値]

分析対象化合物：ネオスピラマイシンIのチアゾリジン誘導体（以下、cys-NSPM と略す）

構造式：



分子式：C<sub>39</sub>H<sub>67</sub>N<sub>3</sub>O<sub>12</sub>S

分子量：802.03 (Exact Mass: 801.44)

[ChemDraw Professional による計算値]

##### ② 試験溶液の調製

精製水 10 mL に L-システイン 30 mg を溶解した溶液に、添加用標準溶液（2.0 µg/mL）0.1 mL を添加し、よく混合した後、30 分放置した。この溶液をメタノール及び水（1 : 1）混液

を用いて、希釈した溶液を LC-MS/MS 測定した。

③ LC-MS/MS 測定条件

LC 条件			
カラム	TSKgel ODS-100 Z (内径 2.0 mm、長さ 150 mm、 粒子径 3 μm : 東ソー製)		
移動相流速 (mL/min)	0.2		
注入量 (μL)	10		
カラム温度 (°C)	40		
移動相	A 液 : 0.1 vol%ギ酸 B 液 : 0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液		
グラジエント条件	時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)
	0.0	85	15
	1.0	85	15
	9.0	60	40
	9.1	2	98
	12.0	2	98
	12.1	85	15
MS 条件			
測定モード	選択反応モニタリング (SRM)		
イオン化モード	ESI (+)		
キャピラリー電圧 (kV)	2.0		
ソース温度 (°C)	150		
脱溶媒温度 (°C)	400		
コーンガス	N <sub>2</sub> , 50 L/hr		
脱溶媒ガス	N <sub>2</sub> , 800 L/hr		
コリジョンガス	Ar		
定量イオン (m/z)	cys-SPM MS/MS: +474.0→174.0 [コーン電圧 30 (V)、コリジョン エネルギー 25 (eV)] cyc-NSPM		

	MS/MS: +402.0→174.0 [コーン電圧 30 (V)、コリジョンエネルギー 20 (eV)]
保持時間 (分)	cys-SPM 7.9 cys-NSPM 7.2

LC-MS/MS 測定結果、既報<sup>2,3)</sup>と同様に cys-SPM 及び cys-NSPM を SRM 測定することができた。そこで、本モニタリングを用いて、豚の肝臓へ添加した SPM 及び NSPM を測定した結果、いずれも cys-SPM 及び cys-NSPM へ変換していることが確認できた。一方で、豚の筋肉、脂肪、牛乳、ぶりでは cys-SPM 及び cys-NSPM のピークは観察されず、それらの変換は生じておらず、添加回収実験が良好だったことを裏付けることが分かった (図 16, 17)。

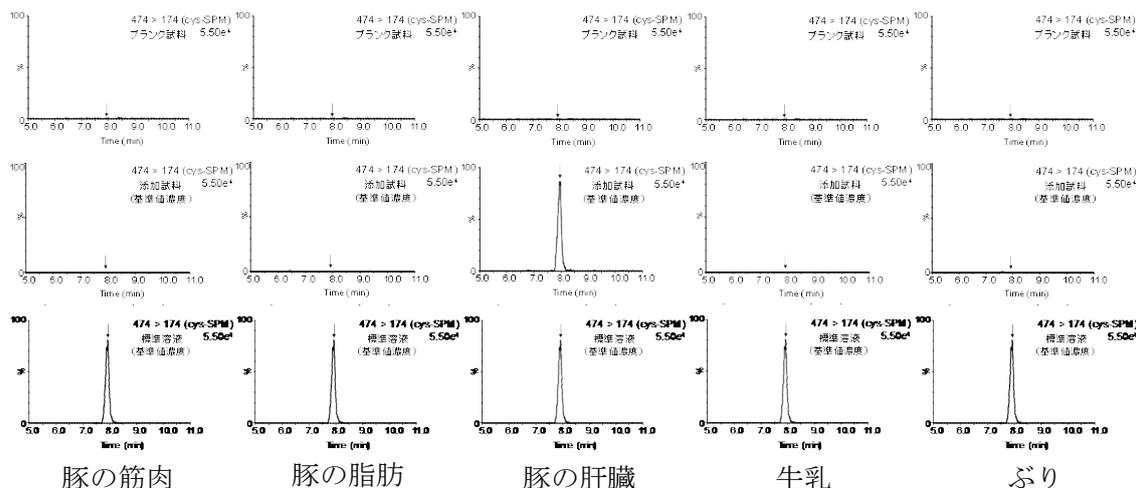


図 16 豚の筋肉、豚の脂肪、豚の肝臓、牛乳及びぶりの cys-SPM の SRM クロマトグラム  
各試料に SPM を添加後、LC-MS/MS 測定を実施した結果

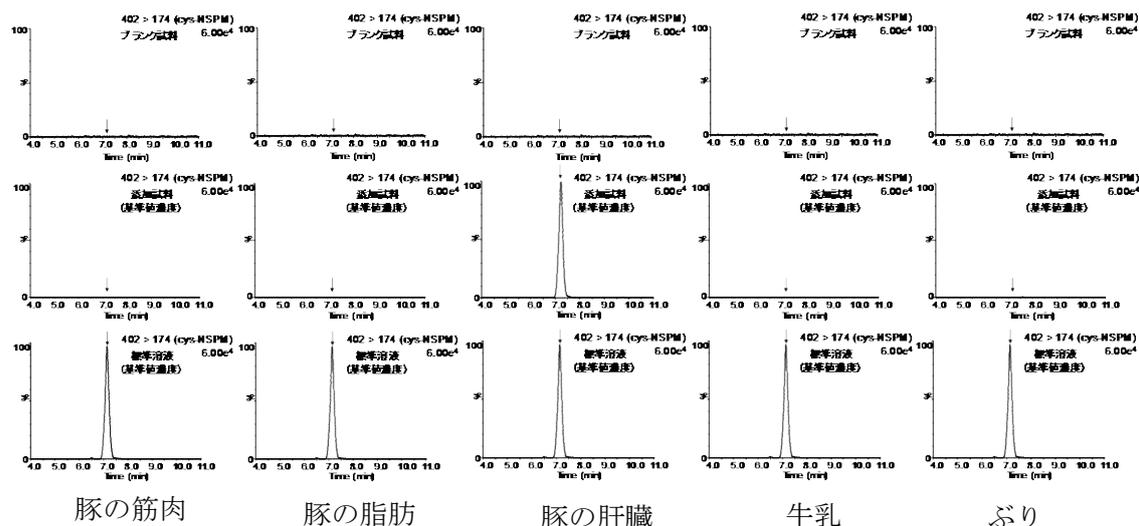


図 17 豚の筋肉、豚の脂肪、豚の肝臓、牛乳及びぶりの cys-NSPM の SRM クロマトグラム  
各試料に NSPM を添加後、LC-MS/MS 測定を実施した結果

## 5. 考察

SPM 及び NSPM 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、100 mL に定容後、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）で精製した後、LC-MS/MS で定量及び確認する方法である。SPM 及び NSPM 濃度は、それぞれ絶対検量線法により含量を算出する。なお、スピラマイシン基準値相当に変換する場合、NSPM の含量は、換算係数（1.206）を乗じて SPM の含量として、SPM との和を算出する。SPM の真度は基準値濃度で 91.3（豚の脂肪）～95.6

(ぶり) %。定量限界濃度で 91.3 (ぶり) ~102.7 (豚の筋肉) %となった。NSPM の真度は基準値濃度で 79.9 (ぶり) ~101.7 (豚の筋肉) %。定量限界濃度で 84.6 (ぶり) ~107.4(牛乳)%となった。よって、畜水産物(豚の筋肉、豚の脂肪、牛乳、ぶり)に適用可能であると判断された。一方で、豚の肝臓においては、SPM 及び NSPM は試料に添加後、迅速に(30分以内)システインと反応し、チアゾリジン誘導体である cys-SPM 及び cys-NSPM へと変換することが判明した。本検討では、これらの安定的な評価が困難であったため、正確な定量及び回収率などの算出は不可能であり、試験法案の「2. 適用食品」に「肝臓」は適用対象外とした。また、肝臓に適用する場合は、従来のバイオアッセイを適用する。

[参考文献]

- 1) スピラマイシン試験法(畜水産物)[食安発第 0124001 号(H17.1.24)]
- 2) P. Mourier, A. Brun, Study of the metabolism of spiramycin in pig liver, Centre de Recherche de Vitry Alfortville, 13 quai Jules Guesde, F-94403 Vitry sur Seine, France September 1997.
- 3) The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products Veterinary Medicines Evaluation, COMMITTEE FOR VETERINARY MEDICINAL PRODUCTS SPIRAMYCIN (Extension to pigs) SUMMARY REPORT Part 3. December 1991.