

※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

ガミスロマイシン試験法（畜産物）

ガミスロマイシン試験法（畜産物）の検討結果

〔緒言〕

1. 目的及び試験法の検討方針等

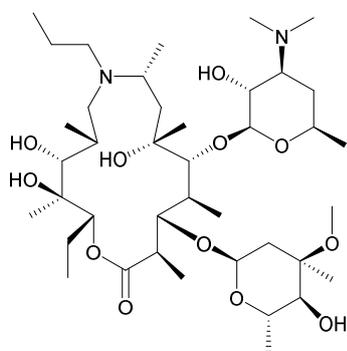
畜産物中のガミスロマイシンの分析法の開発を目的とし、分析条件の検討を行った。検討対象の食品は牛の筋肉、豚の肝臓及び牛の脂肪の3食品である。ガミスロマイシンは、広範囲な抗菌スペクトルを有する15員環のマクロライド系抗生物質で、欧州諸国等において動物用医薬品として承認されており、パスツレラ、マンヘミア等の感染による牛細菌性呼吸器複合感染症（Bovine Respiratory Disease : BRD）に対する治療薬として使用されている。これらの諸外国における有効性から、わが国においても牛及び豚の細菌性肺炎治療用の動物用医薬品として使用されている。作用機構は、細菌リボソームの構成ユニットの一つである50Sサブユニット中の23S rRNAに結合してペプチジル tRNAの転位を阻害し、細菌のタンパク質合成を阻害することにより、発育・増殖を阻止する静菌作用を示すと考えられている。

厚生労働省ホームページに掲載されている畜産物におけるガミスロマイシンの残留試験法（参考法）の概要は、次に示すとおりである。試料約2gに内標準物質として安定同位体²Hで標識したガミスロマイシン標準品を加え、0.1 mol/Lリン酸二水素カリウム緩衝液（pH 約4.5）で抽出する。直接又はヘキササンで洗浄後、水層を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（MCXカラム）を用いて精製した後、液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計（LC-MS/MS）で定量する（参考文献1）。この分析方法は、抽出溶媒に0.1 mol/Lリン酸二水素カリウム緩衝液（pH 約4.5）を用いており脂肪を均一に分散できないこと、試料採取量が少なく試料の均一性の確保が不十分であること、重水素で標識した安定同位体を用いていることが課題であった。本検討においては、この残留試験の方法を参考とし、抽出溶媒、分析試料量の変更を検討した。また、安定同位体を用いない分析方法を検討した。さらに、LC-MS/MSの分析条件についても検討を行った。

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：ガミスロマイシン

構造式：



分子式：C₄₀H₇₆N₂O₁₂

分子量：777.04

IUPAC名：(2*R*,3*S*,4*R*,5*S*,8*R*,10*R*,11*R*,12*S*,13*S*,14*R*)-11-[(2*S*,3*R*,4*S*,6*R*)-4-(Dimethylamino)-3-hydroxy-6-

methyloxan-2-yl]oxy-2-ethyl-3,4,10-trihydroxy-13-[(2*R*,4*R*,5*S*,6*S*)-5-hydroxy-4-methoxy-4,6-dimethyloxan-2-yl]oxy-3,5,8,10,12,14-hexamethyl-7-propyl-1-oxa-7-azacyclopentadecan-15-one

CAS No : 145435-72-9

外観 : 白色の粉末

融点 : 100-115°C

溶解性 : 水溶解度 (≦3.0%)

解離定数 (pKa) : 13.4

[出典 : Sigma-Aldrich Certificate of Analysis-Product 32161 LotBCBW0825]

3. 基準値

生食発 0330 第 6 号 (平成 30 年 3 月 30 日)

食品分類名	基準値(ppm)
牛の筋肉	0.01
豚の筋肉	0.05
牛の脂肪	0.01
豚の脂肪	0.05
牛の肝臓	0.4
豚の肝臓	0.1
牛の腎臓	0.4
豚の腎臓	0.2
牛の食用部分	0.06
豚の食用部分	0.05

[実験方法]

1. 試料

牛の筋肉、豚の肝臓及び牛の脂肪は、福岡県内の小売店で入手した。各食品の試料採取は以下のとおり実施した。

(1) 牛の筋肉

可能な限り脂肪層を除き、ハンドブレンダーを用いて細切均一化した。

(2) 豚の肝臓

ハンドブレンダーを用いて細切均一化した。

(3) 牛の脂肪

可能な限り筋肉層を除き、ハンドブレンダーを用いて細切均一化した。

2. 試薬・試液

ガミスロマイシン標準品：純度94.3%、融点115°C（シグマアルドリッチ製）

アセトン、アセトニトリル、*n*-ヘキサン：残留農薬試験用（関東化学製）

蒸留水、メタノール：LC/MS用（関東化学製）

アンモニア水：特級、アンモニア含量28%（富士フィルム和光純薬製）

ギ酸：LC/MS用（富士フィルム和光純薬製）

酢酸：高速液体クロマトグラフ用（富士フィルム和光純薬製）

1 mol/L酢酸アンモニウム溶液：高速液体クロマトグラフ用（富士フィルム和光純薬製）

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：Oasis MCX（150 mg/6 mL、Waters製）

脱脂綿（林衛材製）

フィルター付きバイアル（0.2 μm）（GEヘルスケア製）

アンモニア水、アセトニトリル及びメタノール（1：10：10）混液：アンモニア水5 mL、アセトニトリル50 mL及びメタノール50 mLを混合した。

アンモニア水及びアセトニトリル（1：20）混液：アンモニア水5 mL及びアセトニトリル100 mLを混合した。

アンモニア水及びメタノール（1：20）混液：アンモニア水5 mL、メタノール100 mLを混合した。

5 mmol/L酢酸アンモニウム溶液（pH4.0）：1 mol/L酢酸アンモニウム溶液5 mLを分取して蒸留水約950 mLに溶解し、酢酸を用いてpH4.0に調整した後、蒸留水を加えて1000 mLにした。

5 mmol/L酢酸アンモニウム・メタノール溶液：1 mol/L酢酸アンモニウム溶液5 mLを採り、メタノールで1000 mLにした。

標準原液：ガミスロマイシン標準品10 mgを精秤し、アセトンで溶解して100 mLに定容し、100 mg/L溶液を調製した。

検量線用標準溶液：標準原液を5 mmol/L酢酸アンモニウム・メタノール溶液で適宜希釈し、0.000625～0.075 mg/Lの濃度の溶液を調製した。

添加用標準溶液：標準原液をアセトンで希釈して2 mg/L、0.2 mg/L及び0.1 mg/L溶液を調製した。

3. 装置

ハンドブレンダー：MQ-700（ブラウン製）

水浴：EO-200RD（アズワン製）

ホモジナイザー：PT3100D（ポリトロン製）

遠心分離機：S700FR（KUBOTA製）

減圧濃縮装置：RotavaporR-100（BUCHI製）

LC-MS/MS

装置	型式	メーカー
MS	Xevo TQ	Waters
LC	ACQUITY UPLC	Waters
データ処理	MassLynx v4.1	Waters

4. 測定条件

LC-MS/MS

LC条件			
カラム	InertSustain AQ-C18 HP（内径 2.1 mm、長さ100 mm、粒子径3 μ m : GLサイエンス製）		
移動相流速 (mL/min)	0.3		
注入量 (μ L)	5		
カラム温度 (°C)	40		
移動相	A液：5 mmol/L酢酸アンモニウム溶液 (pH4.0) B液：5 mmol/L酢酸アンモニウム・メタノール溶液		
グラジエント条件	時間 (分)	A液 (%)	B液 (%)
	0.0	90	10
	1.0	90	10
	9.0	5	95
	14.0	5	95
	14.1	90	10
	20.0	90	10
MS条件			
測定モード	SRM		
イオン化モード	ESI (+)		
キャピラリー電圧 (V)	2500		
ソース温度 (°C)	150		
脱溶媒温度 (°C)	400		
コーンガス	窒素、50 L/hr		
脱溶媒ガス	窒素、800 L/hr		
コリジョンガス	アルゴン		
定量イオン (m/z)	+777.6→619.5 [コーン電圧45 (V)、コリジョンエネルギー30 (eV)]		
定性イオン (m/z)	+777.6→158.2 [コーン電圧45 (V)、コリジョンエネルギー40 (eV)] +777.6→116.2 [コーン電圧45 (V)、コリジョンエネルギー40 (eV)] +777.6→83.1 [コーン電圧45 (V)、コリジョンエネルギー50 (eV)]		
保持時間 (min)	6.5		

5. 定量

ガミスロマイシン標準品10 mgを精秤し、アセトンに溶解して100 mg/L溶液を調製した。この溶液を5 mmol/L酢酸アンモニウム・メタノール溶液で適宜希釈して0.000625～0.075 mg/Lの検量線用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、絶対検量線法によりガミスロマイシンの含量を算出した。各添加試料の定量は、回収率の25%、50%、75%、100%、125%、150%となる標準溶液を用いて検量線を作成した。

6. 添加試料の調製

(1) 牛の筋肉（添加濃度：0.01 ppm）

試料 10.0 g にアセトンで調製した添加用標準溶液（0.2 mg/L） 0.5 mL を添加しよく混合した後、30 分間放置した。

(2) 豚の肝臓（添加濃度：0.01 ppm）

試料 10.0 g にアセトンで調製した添加用標準溶液（0.2 mg/L） 0.5 mL を添加しよく混合した後、30 分間放置した。

(3) 豚の肝臓（添加濃度：0.1 ppm）

試料 10.0 g にアセトンで調製した添加用標準溶液（2 mg/L） 0.5 mL を添加しよく混合した後、30 分間放置した。

(4) 牛の脂肪（10 g 採取）（添加濃度：0.01 ppm）

試料 10.0 g を採り、約 40℃で加温して融解させたものにアセトンで調製した添加用標準溶液（0.2 mg/L） 0.5 mL を添加しよく混合した。室温で再度凝固させた後、30 分間放置した。

(5) 牛の脂肪（5 g 採取）（添加濃度：0.01 ppm）

試料 5.00 g を採り、約 40℃で加温して融解させたものにアセトンで調製した添加用標準溶液（0.1 mg/L） 0.5 mL を添加しよく混合した。室温で再度凝固させた後、30 分間放置した。

7. 試験溶液の調製

概要

ガミスロマイシンを試料からアセトンで抽出し、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で定量及び確認した。

(1) 抽出

牛の筋肉及び豚の肝臓の場合は試料10.0 g、牛の脂肪の場合は試料10.0 gまたは5.00 gをポリプロピレン製100 mL遠心チューブに採った。これにアセトン50 mLを加えてホモジナイズ（10,000rpm、2分間）した後、遠心分離した（4,000 rpm、10分間）。上澄液をポリプロピレン製100 mLメスフラスコに採り、残留物にアセトン25 mLを加えて先ほどと同様に上澄液を回収し、同100 mLメスフラスコに合わせ、アセトンで定容した。得られた抽出液5 mLをポリプロピレン製15 mL遠心チューブに正確に分取し、酢酸を12.5 μ L、1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液を25 μ L添加し、よく混合した。

(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

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 [Oasis MCX (150 mg/6 mL)] をメタノール 10 mL、アセトン 10 mL でコンディショニングした。(1) で得られた溶液を全量カラムに負荷し、流出液は捨てた。このカラムを水 10 mL、メタノール 10 mL 及びアセトニトリル 10 mL で順次洗浄した。アンモニア水及びアセトニトリル (1 : 20) 混液 10 mL を注入し、全溶出液を採った。ロータリーエバポレーターを用いて 40°C以下で約 0.5 mL まで濃縮し、窒素気流下で溶媒を除去した。この残留物を 5 mmol/L 酢酸アンモニウム・メタノール溶液に溶解し、正確に 1 mL としたものを試験溶液とした。

[分析法フローチャート]

秤 取

- ↓ 牛の筋肉： 試料 10.0g
- ↓ 豚の肝臓： 試料 10.0g
- ↓ 牛の脂肪： 試料 5.00g

アセトン抽出

- ↓ アセトン 50mL を加えホモジナイズ (10,000rpm、2 分間)
- ↓ 遠心分離 (4,000rpm、10 分間)
- ↓ 残留物はアセトン 25mL を加えホモジナイズ (10,000rpm、2 分間)
- ↓ 遠心分離 (4,000rpm、10 分間)
- ↓ 上澄液を PP 製 100 mL メスフラスコに合わせて、アセトンで定容

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 [Oasis MCX (150 mg/6mL)]

- ↓ メタノール 10 mL、アセトン 10 mL でコンディショニング
- ↓ 抽出液 5 mL に酢酸 12.5 μ L、1mol/L 酢酸アンモニウム溶液 25 μ L を添加し混合した溶液を注入
- ↓ 水 10 mL、メタノール 10 mL、アセトニトリル 10 mL で洗浄
- ↓ アンモニア水及びアセトニトリル (1 : 20) 混液 10 mL で溶出 (全溶出液を採取)

濃縮 (溶媒除去)

- ↓ 約 0.5 mL まで濃縮
- ↓ 窒素気流下乾固
- ↓ 残留物を 5 mmol/L 酢酸アンモニウム含有メタノールに溶解 (1 mL)

試験溶液

↓

LC-MS/MS

8. マトリックス添加標準溶液の調製

マトリックス添加標準溶液の調製用にブランク試料を精製し、約 0.5mL まで減圧濃縮した後、各検討対象食品の添加回収試験における回収率 200%相当濃度の溶媒標準溶液 (アセトン溶液) 0.5 mL を加えて窒素気流下乾固し 5 mmol/L 酢酸アンモニウム含有メタノール 1mL 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

MS/MSにおけるイオン化法は、汎用的なESIモードを検討した。ガミスロマイシン標準溶液 (1 mg /L) を流速0.02 mL/minでインフュージョン注入し、適切なプレカーサーイオンの有無を確認した。E

SI (+) モードでは、プレカーサーイオンとして適切なプロトン付加分子[M+H]⁺ (*m/z* 777.6) を確認できた (図1) が、ESI (-) モードにおいては、適切な測定イオンが確認されなかった。このことから、ESI (+) モードで MS/MS条件を最適化することとした。イオン生成に最適なコーン電圧を5~6 5Vの範囲で検討した。その結果、45Vにおいて最高の強度が得られたため、コーン電圧は45Vに設定した。また、*m/z* 777.6をプレカーサーイオンとしたプロダクトイオンスキャンをコリジョンエネルギー10~60 eVの範囲で実施し、最適なSRM条件を検討した。その結果、30 eVにおいて確認された高質量側の*m/z* 619.5を定量用イオンにすることとした (図2)。また、定性用イオンは、高い強度が得られた、*m/z* 158.2、116.2、83.1とした (図3)。

以上のことから、ESI (+) モードで測定し、*m/z* +777.6→619.5を定量用、*m/z* +777.6→158.2、*m/z* +777.6→116.2、*m/z* +777.6→83.1を定性用の測定イオンとした。

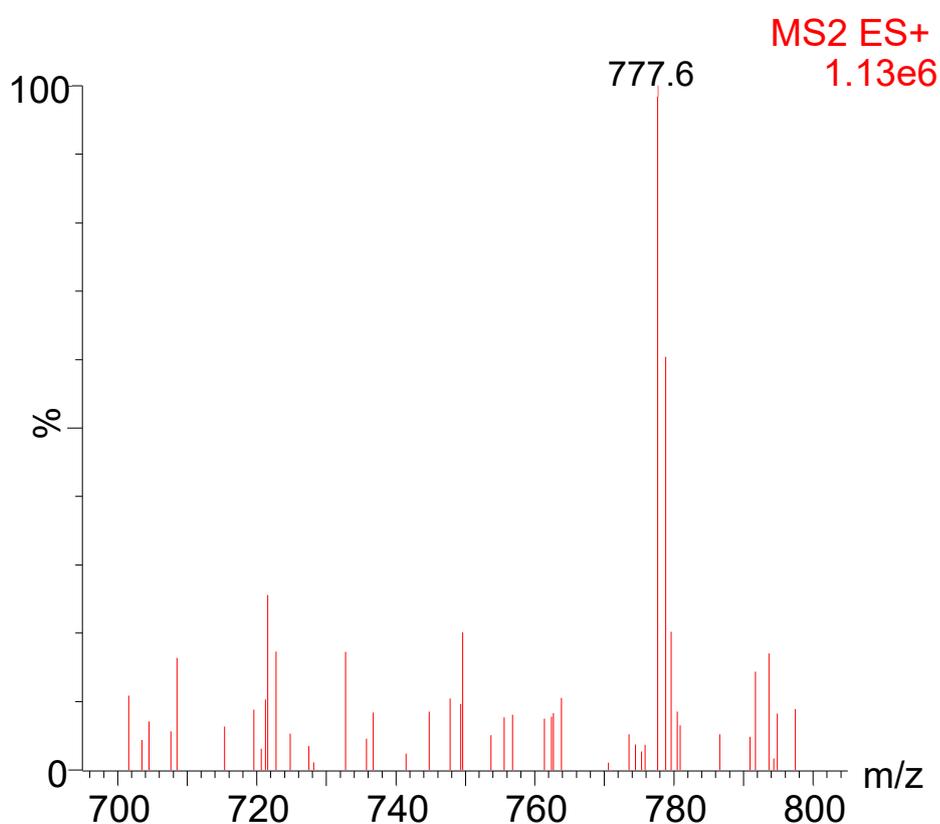


図1 ガミスロマイシンのマススキャンスペクトル、ガミスロマイシン：0.1 mg/L
スキャン範囲：700~800 *m/z* 測定条件：ESI (+) , CV=45 V (CV : corn voltage)

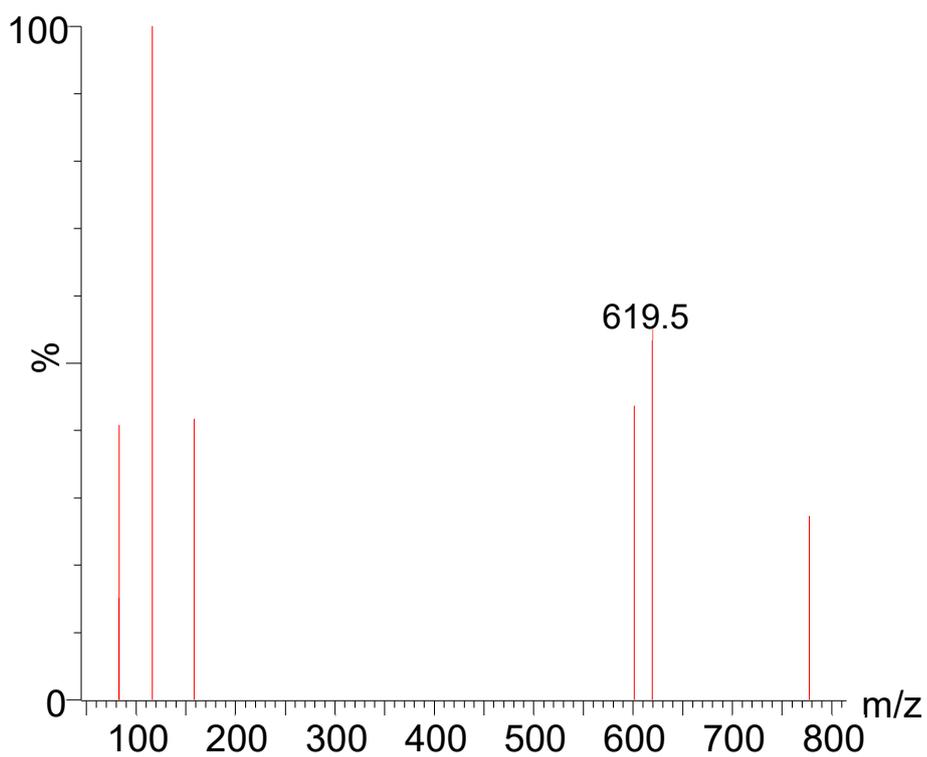


図2 ガミスロマイシンのプロダクトイオンペクトル (定量用)、ガミスロマイシン : 0.1 mg/L
プリカーサーイオン : m/z 777.6
測定条件 : ESI (+) , CV=45 V, CE=30 eV (CV : corn voltage, CE : collision energy)

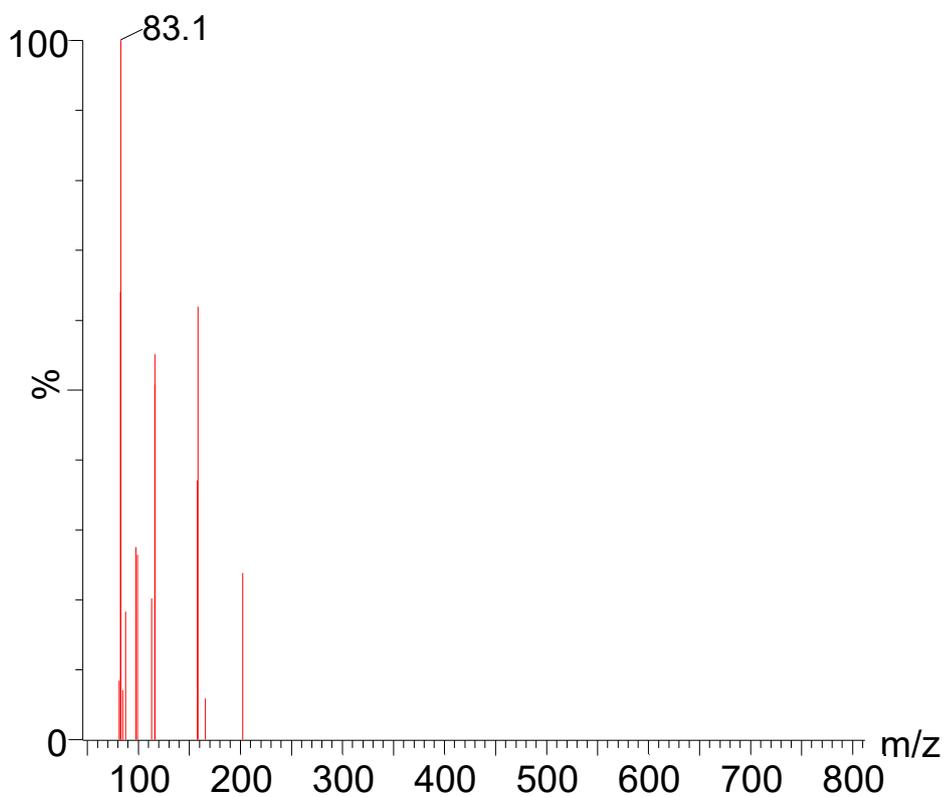
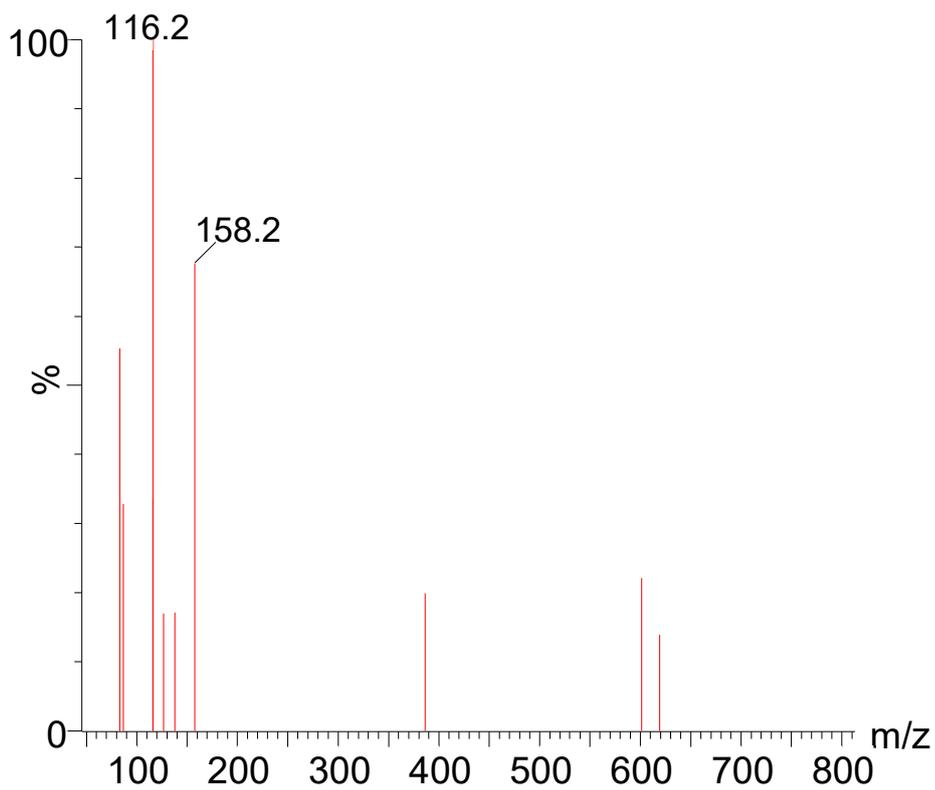


図3 ガミスロマイシンのプロダクトイオンペクトル（定性用）、ガミスロマイシン：0.1 mg/L プリカーサーイオン：m/z 777.6
測定条件：ESI（+），CV=45 V, CE=40 eV（上図）、50 eV(下図)

(2) LC条件の検討

分析カラムは、汎用性の高いODS系カラムを選択した。

移動相について、B液に用いる有機溶媒、添加する酸及び塩を検討した。

まず、B液に用いる有機溶媒としてアセトニトリル及びメタノール、添加する酸としてギ酸及び酢酸の組合せを検討した。測定して得られたガミスロマイシンのS/Nは有機溶媒にメタノールを用いた方が高く、ピーク形状も良かった。他方、添加する酸としてギ酸及び酢酸を用いた場合を比較すると、ギ酸を添加した方がより高いS/N及びピーク強度であった(図4)。

次に、添加する塩としてギ酸アンモニウム及び酢酸アンモニウムを検討した。添加塩として酢酸アンモニウム塩を用いた方がガミスロマイシンのピーク強度が高かった(図5)。

以上の検討結果から、B液に用いる有機溶媒にはメタノールを用いることとした。また、添加塩として酢酸アンモニウムを用いることとしたため、酢酸を添加する酸として選択した。

続いて、酢酸アンモニウム溶液について、1、2、5及び10 mmol/Lの4種濃度を比較した。その結果、ピークの保持時間は塩濃度が高いほど長くなった。ピーク形状は、1~5 mmol/Lでは塩濃度が高いほどピーク幅は若干狭くなったが、10 mmol/Lで得られたピーク幅は5 mmol/Lとほぼ同等であった(図6)。

以上のことから、移動相には、A液：5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液(pH4.0)及びB液：5 mmol/L 酢酸アンモニウム・メタノール溶液を用いることとした。

なお、本移動相を用いて0.01 mg/Lの標準溶液(移動相B液に溶解)を連続で繰り返し測定(n=206)した結果、ピーク面積：8,498±227 (RSD：2.7%)であり、良好な精度で測定可能であった。

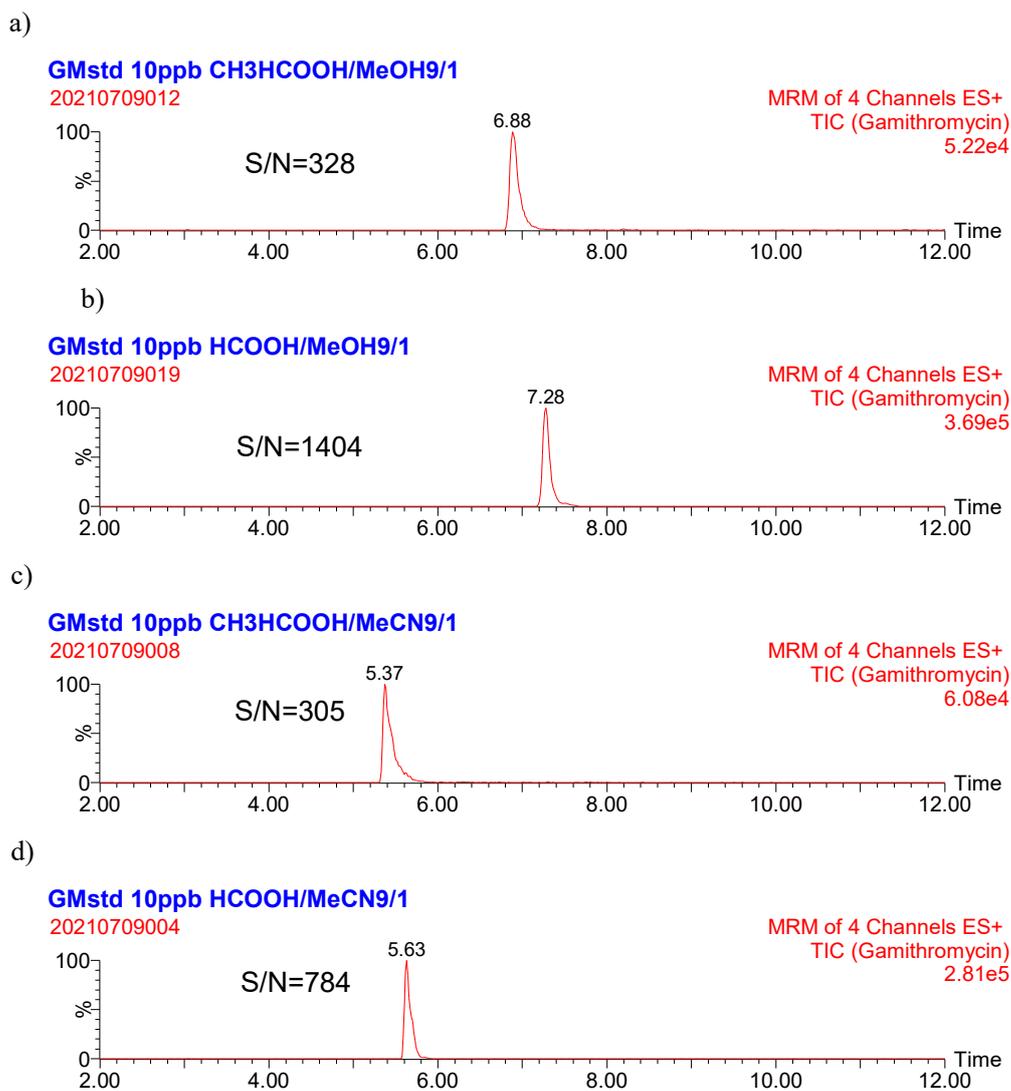


図4 ガミスロマイシン標準溶液のトータルイオンクロマトグラム
a) 酢酸；メタノール b) ギ酸；メタノール c) 酢酸；アセトニトリル d) ギ酸；アセトニトリル、流速：0.2 mL/min, 分析カラム：InertSustain AQ-C18 (2.1×100 mm, 3 μm)

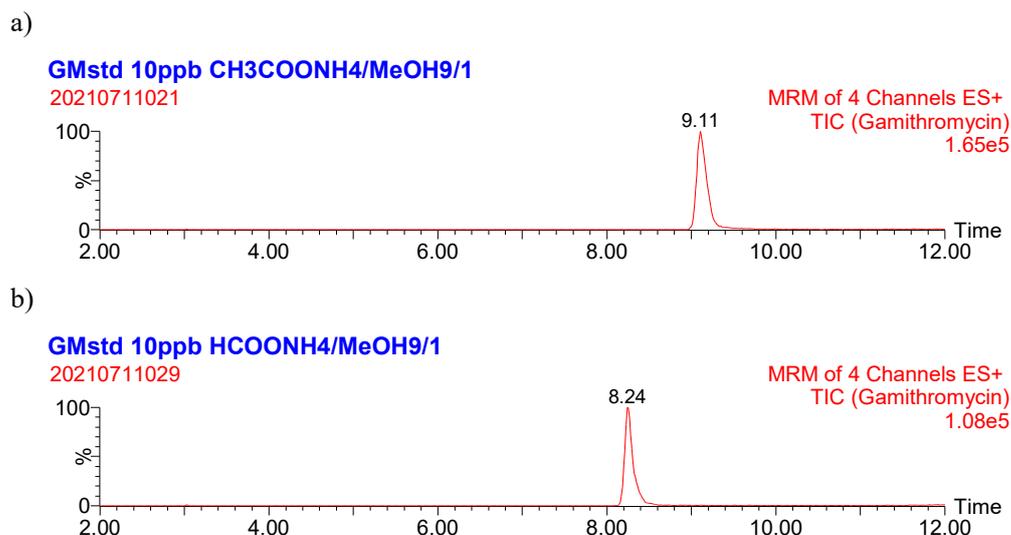


図5 ガミスロマイシン標準溶液のトータルイオンクロマトグラム
a) 10 mmol/L 酢酸アンモニウム；メタノール b) 10 mmol/L ギ酸アンモニウム；メタノール
流速：0.2 mL/min, 分析カラム：InertSustain AQ-C18 (2.1×100 mm, 3 μm)

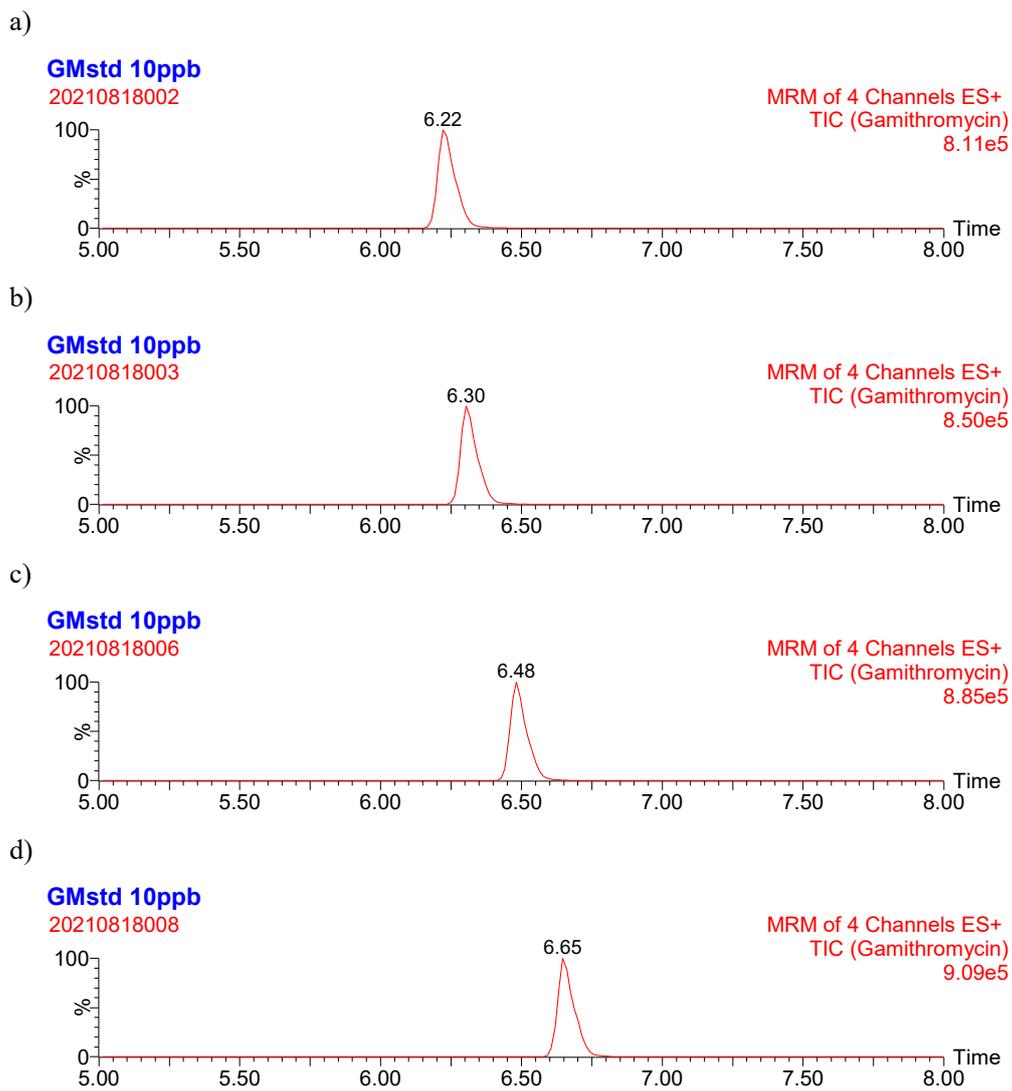


図6 ガミスロマイシン標準溶液のトータルイオンクロマトグラム

a) 1 mmol/L b) 2 mmol/L c) 5 mmol/L d) 10 mmol/L

流速 : 0.3 mL/min, 分析カラム : InertSustain AQ-C18 (2.1×100 mm, 3 μm)

(3) 検量線

図 7 にガミスロマイシン検量線の例を示した。牛の脂肪 (5 g) ・定量限界用 : 0.625~3.75 $\mu\text{g/L}$ (回収率 25~150%相当)、牛の筋肉、豚の肝臓及び牛の脂肪 (10 g) ・定量限界用 : 1.25~7.5 $\mu\text{g/L}$ (回収率 25~150%相当) 及び豚の肝臓・基準値用 : 12.5~75 $\mu\text{g/L}$ (回収率 25~150%相当) の濃度範囲で作成した検量線の決定係数は、いずれも 0.998 以上であり良好な直線性を示した。

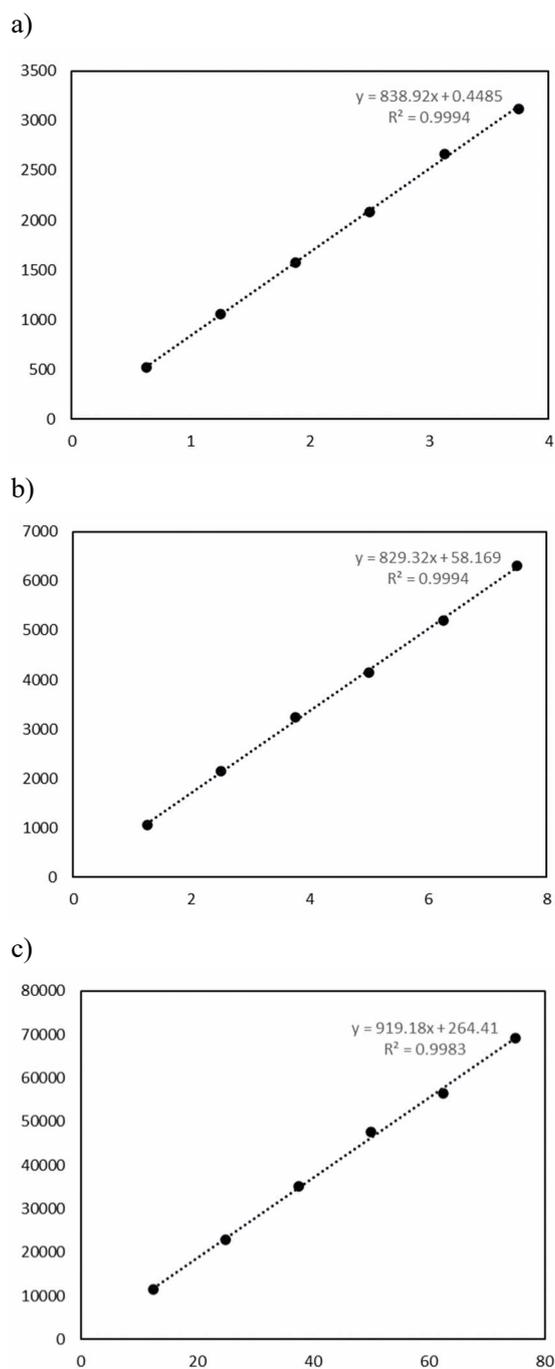


図 7. ガミスロマイシン検量線の例 (横軸 : 濃度 ($\mu\text{g/L}$)、縦軸 : ピーク面積)
a) 濃度範囲 0.625~3.75 $\mu\text{g/L}$ 、b) 1.25~7.5 $\mu\text{g/L}$ 、c) 12.5~75 $\mu\text{g/L}$

(4) 定量限界

定量限界の算出結果を以下に示した。

牛の筋肉、豚の肝臓： 0.01 mg/kg 【[試験溶液量 1(mL)／試験溶液中の試料量 0.5(g)]

× [分析対象化合物の定量限界相当量 0.025 (ng)／注入量 5(μL)】

牛の脂肪： 0.01 mg/kg 【[試験用容量 1(mL)／試験溶液中の試料量 0.25(g)]

× [分析対象化合物の定量限界相当量 0.0125(ng)／注入量 5(μL)】

2. 試験溶液調製法の検討

(1) 抽出溶媒について

ガミスロマイシン標準品 10 mg を秤量してアセトンを加えたところ、速やかに溶解した。抽出溶媒は、脂肪も均一に分散可能なアセトンを用いることとした。

(2) カラム精製の検討

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による精製 [Oasis MCX (150 mg/ 6 mL)]

強塩基性化合物であるガミスロマイシンの精製カラムとしては、強酸性陽イオン交換カラムや弱酸性陽イオン交換カラム等が効果的であると考えられるが、参考法と同じ上記ミニカラムについて検討することとした。上記カラムにガミスロマイシンを保持するためには解離状態にする必要がある。菊地らは、塩基性化合物を強陽イオン交換カラムに保持するため、アセトン抽出液に酸を添加して負荷し、良好な回収率を得ている（参考文献 2）。

そこでまず、アセトン抽出液に酸を添加して負荷した場合に、ガミスロマイシンをカラムから回収できるか検討した。ガミスロマイシン 5 ng を酢酸及びアセトン（1：400）混液 5 mL に溶解してカラムに負荷し、流出液を採った。水 10 mL、メタノール 10 mL 及びアセトニトリル 10 mL で順次洗浄し、各流出液を採取した。アンモニア水、アセトニトリル及びメタノール（1：10：10）混液 10 mL を加え、溶出液を採った。採取した各流出液及び溶出液を測定し、ガミスロマイシンのピークの有無を確認した。いずれのクロマトグラム上にもガミスロマイシンのピークは確認されず、保持されたガミスロマイシンがカラムから溶出していないと考えられた。

ガミスロマイシンのカラムへの強い保持を弱めるために、イオン強度を高める必要があると考えられた。また、企業の試験法においては、抽出液に 0.1mol/L リン酸塩緩衝液（pH4.5）を用いていたため、pH の調整の他、塩の共存が必要と考えた。そこで、LC-MS の移動相の添加塩として汎用されている 1 mol/L 酢酸アンモニウムを選択して検討を行った。アセトン抽出液に酸及び塩を添加して負荷した場合に、ガミスロマイシンをカラムから回収できるか検討した。すなわち、ガミスロマイシン 5 ng を酢酸、1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液及びアセトン（1：2：400）混液 5 mL に溶解して上記と同じ操作を行った。溶出液を測定した結果、ガミスロマイシンのカラムからの回収率は $99.8 \pm 0.5\%$ （ $n=3$ ）で、繰り返し精度も良好であった。なお、通液した負荷液、洗液（水 10 mL、メタノール 10 mL 及びアセトニトリル 10 mL）を LC-MS/MS で測定し、保持されたガミスロマイシンがカラムから溶出しないことを確認し

た。

続いて、溶出溶媒の検討を行った。カラムをメタノール及びアセトン10 mLで予備洗浄後、アセトンで調製したガミスロマイシン標準溶液（1 ng/mL）5 mLに、酢酸12.5 μ L、1 mol/L酢酸アンモニウム溶液25 μ Lを添加し混合した溶液を負荷した。アンモニア水：有機溶媒（1：20）で溶出したときの溶出状況を表1に示した。ガミスロマイシンは、いずれの溶媒においても5 mLで80%以上の回収率であった。特にアンモニア水：アセトニトリル（1：20）で溶出した際に回収率の合計値は理論値に近い値となった。このことから、アンモニア水：アセトニトリル（1：20）混液10 mLでガミスロマイシンをカラムから溶出することとした。

また、試料由来の高極性や中性の夾雑物を除去するため、水、メタノール及びアセトニトリル各10 mLを溶出前に通液することにした。通液した各溶媒をLC-MS/MSで測定し、保持されたガミスロマイシンがカラムから溶出しないことを確認した。なお、食品マトリックスが存在する場合における、酢酸アンモニウム塩の添加の必要性については検討しなかった。

ガミスロマイシン5 ngを各ブランク試料（牛の筋肉、豚の肝臓、牛の脂肪（10 g採取））のアセトン抽出液に溶解したものについて、7.(2)の操作を行いカラムの回収率を確認した（n=2）。回収率は、91.4～98.0%となり、実試料中においても良好な結果であった（表2）。

表1 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からの溶出状況

溶出溶媒	回収率 (%)				
	0-2.5mL	2.5-5mL	5-7.5mL	7.5-10mL	合計
アンモニア水：アセトニトリル（1：20）	79.9	13.6	0.1	0.0	93.7
アンモニア水：メタノール（1：20）	87.9	1.6	0.2	0.0	89.7
アンモニア水：メタノール：アセトニトリル（1：10：10）	75.0	6.0	0.5	0.0	81.5

表2 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からの回収率

食品名	回収率 (%)	
	1回目	2回目
牛の筋肉	98.0	91.6
豚の肝臓	91.4	92.2
牛の脂肪	91.9	94.3

(3) その他の基礎データ

①綿栓ろ過について

試料をアセトンで抽出後、遠心分離して得られた上澄液について、綿栓ろ過の必要性を検討した。得られた上澄液はいずれの試料においても綿栓ろ過の必要はなく、メスフラスコで定容可能であった。また、綿栓ろ過した標準溶液（10 μ g/L）と綿栓ろ過前の標準溶液（10 μ g/L）を測定し、強度を比較したところ、ピーク面積比は 1.03～1.06 となったことから、標準溶液では綿栓への吸着はないと考えられた。

②ガラスへの吸着性

アセトンで調製したガミスロマイシン標準溶液 5 µg/L を①ガラス製メスフラスコ、②ポリテトラフルオロエチレン製メスフラスコ、③ポリプロピレン製メスフラスコに入れ、24 時間後にピーク面積を確認した (表 3)。なお、ガミスロマイシンは、ポリプロピレン製容器中において安定であることが予め分かっている (ポリプロピレン製バイアル中の 10 µg/L の標準溶液について、調製直後のピーク面積: 8,634 ± 248 (n=10)、69 時間後のピーク強度: 8,516 ± 259 (n=10))。そこで、ポリプロピレン製容器中の標準溶液のピーク面積に対する①及び②のピーク面積比を確認したところ、①ガラス製では 0.61、②ポリテトラフルオロエチレン製では 1.01 となったことから、ガミスロマイシンはガラスへの吸着性があると判断した。このことから、分析時には可能な限りプラスチック製の器材を用いることとした。

表 3 24 時間後のピーク面積

メスフラスコ	ピーク面積 (n=3)	ピーク面積/③ピーク面積
①	1,978 ± 255	0.61
②	3,272 ± 122	1.01
③	3,237 ± 266	1.00

③ポリテトラフルオロエチレン製メンブランフィルターろ過について

カラムや機器への負担を軽減するためよく用いられるメンブランろ過フィルターへの吸着性について検討した。0.00125 mg/L から 0.0075 mg/L の範囲の検量点について、0.2 µm の PTFE フィルターろ過の有無におけるピーク強度を比較した。図 8 に示すように、ピーク強度はほぼ同等であったことから、標準溶液では、ろ過フィルターへの吸着は認められないと判断した。なお、試験法の検討においてはフィルターろ過は行わなかった。

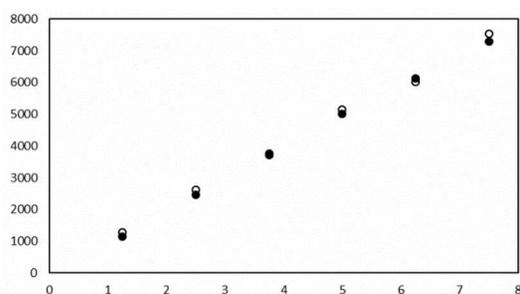


図 8 ガミスロマイシンのピーク強度の比較

○ : 0.2 µm PTFE フィルターろ過、● : フィルターろ過なし
横軸 : ガミスロマイシン濃度 (µg/L)、縦軸 : ピーク面積

④カラム精製における負荷液の検討

2. 試験溶液調製法の検討、(2) カラム精製の検討において、添加する酸をギ酸に変更してカラムからの回収率を確認した。洗浄に用いた溶媒も採取し、各流出液及び溶出液を測定し、ガミスロマイシンのピークの有無を確認した。いずれのクロマトグラム上にもガミスロマイシンのピークは確認されなかった。また、ガミスロマイシン 5 ng をギ酸、1 mol/L ギ酸アンモニウム溶液及びアセトン (1 : 2 : 400) 混液 5 mL に溶解して同様に操作し、得られた溶出液を測定した結果、ガミスロマイシンのカラムからの回収率は 89.5%であった。

3. 添加回収試験

牛の筋肉、豚の肝臓及び牛の脂肪の3食品を試料に用いて、実験方法の7. 試験溶液の調製に従って添加回収試験を実施した。ミニカラム精製後の残留物は、移動相の初期条件 (A/B=90/10%) の組成の溶媒では溶解しなかったため、移動相B (5 mmol/L酢酸アンモニウム・メタノール溶液) で溶解した。

添加回収試験における各食品のブランク試料、添加試料、回収率 100%相当のマトリックス添加標準溶液及び回収率 100%相当の溶媒標準溶液の代表的なクロマトグラムを図 9~13 に示した。また、各食品のブランク試料のプロダクトイオンスキャン及びマス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 14 及び 15 に示した。

(1) 選択性

選択性の検討結果を表4に示した。検討した何れの試料においても、ガミスロマイシンの定量を妨害するピークは認められず、評価基準を満たした。

表4 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)	妨害ピークの許容範囲の評価		ピーク面積 (高さ) ¹						選択性の評価 ³	備考		
					評価濃度 (ppm)	評価基準	面積又は高さの別	ブランク			マトリックス添加標準溶液 ²				面積 (高さ) 比 (a)/(b)	
								n=1	n=2	平均 (a)	n=1	n=2				平均 (b)
1	ガミスロマイシン	牛の筋肉	0.01	0.01	定量限界 0.01	< 0.333	面積	2	2	2	3293	3304	3298	0.001	○	
2	ガミスロマイシン	豚の肝臓	0.01	0.1	基準値 0.01	< 0.100	面積	5	4	4	4079	3899	3989	0.001	○	
3	ガミスロマイシン	豚の肝臓	0.01	0.1	基準値 0.1	< 0.100	面積	22	11	17	49604	50015	49809	0.000	○	
4	ガミスロマイシン	牛の脂肪	0.01	0.01	定量限界 0.01	< 0.333	面積	0	0	0	3441	3866	3654	0.000	○	分析試料量10 g
5	ガミスロマイシン	牛の脂肪	0.01	0.01	定量限界 0.01	< 0.333	面積	0	0	0	1845	1911	1878	0.000	○	分析試料量5 g

*1 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した。

*2 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) を用いた。

*3 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「×」を記載した。

(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5に示した。真度は76.4~92.3%、併行精度は2.8~6.6%であり、何れの試料においても良好な結果が得られた。また、定量限界濃度でのS/Nの平均値は3,139~5,186であり、評価基準を満足した。牛の脂肪の分析試料量については、10 g及び5 gを検討した。5 gで分析を実施した場合において若干の真度・併行精度の改善が認められた。

表5 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 (mg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	定量限界の評価 ¹	検査値			回収率 (%)					真度 (%)	併行精度 (RSD%)	S/N ²			備考
							傾き	切片	r ² 値	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5			Max.	Mn.	平均値	
1	ガミスロマイシン	牛の筋肉	0.01	0.01	0.01	S/N	746	86	0.9986	84.5	90.6	89.2	90.0	89.1	88.7	2.8	5682	1419	3550	
2	ガミスロマイシン	豚の肝臓	0.01	0.1	0.01	S/N	801	11	0.9989	89.9	88.1	91.7	92.3	99.4	92.3	4.7	5887	2343	4115	
3	ガミスロマイシン	豚の肝臓	0.01	0.1	0.1	—	923	198	0.9987	87.4	89.4	90.6	94.4	92.0	90.7	2.9	—	—	—	
4	ガミスロマイシン	牛の脂肪	0.01	0.01	0.01	S/N	829	58	0.9992	76.4	71.1	71.8	80.2	82.5	76.4	6.6	7928	2443	5186	分析試料量10 g
5	ガミスロマイシン	牛の脂肪	0.01	0.01	0.01	S/N	835	41	0.9991	85.5	77.2	81.8	86.0	82.7	82.6	4.3	4352	1925	3139	分析試料量5 g

*1 定量限界の評価のためにS/Nを求めた場合には『S/N』と記載した。

*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 (Min.) のそれぞれのS/Nを求めた。

(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6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について、溶媒標準溶液に対するピーク面積比を求めたところ、面積比は0.86~1.06であった。また、添加回収試験における真度を表6で求めたピーク面積比で除して補正真度を求め、表7に示した。補正真度は85.6~103.1%であった。

表 6 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)	添加濃度 (ppm)	標準溶液 濃度 ¹⁾ (mg/L)	面積又は 高さの別	ブランク ³⁾	ピーク面積(高さ) ²⁾						備考	
									マトリックス添加標準溶液 ⁴⁾			溶媒標準溶液				ピーク面積 (高さ)比 ⁵⁾
									n=1	n=2	平均	n=1	n=2	平均		
1	ガミスロマイシン	牛の筋肉	0.01	0.01	0.01	0.005	面積	2	3293	3304	3296	3798	3857	3828	0.86	
2	ガミスロマイシン	豚の肝臓	0.01	0.1	0.01	0.005	面積	4	4079	3899	3985	4030	3908	3969	1.00	
3	ガミスロマイシン	豚の肝臓	0.01	0.1	0.1	0.05	面積	17	49604	50015	49792	46888	46767	46827	1.06	
4	ガミスロマイシン	牛の脂肪	0.01	0.01	0.01	0.005	面積	0	3441	3866	3654	4112	4194	4153	0.88	分析試料量10 g
5	ガミスロマイシン	牛の脂肪	0.01	0.01	0.01	0.0025	面積	0	1845	1911	1878	2071	2121	2096	0.90	分析試料量5 g

*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）を作成した。

*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した。（必要に応じて起爆注入を行った。）

*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た。

*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した。

*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）の比を求めた。

表 7 補正真度

食品名	真度 (%)	ピーク面積比	補正真度 (%)	備考
牛の筋肉 (定量限界)	88.7	0.86	103.1	
豚の肝臓 (定量限界)	92.3	1.00	92.3	
豚の肝臓 (基準値)	90.7	1.06	85.6	
牛の脂肪 (定量限界)	76.4	0.88	86.8	10 g採取
牛の脂肪 (定量限界)	82.6	0.90	91.8	5 g採取

4. その他の試験法検討に関連する事項

(1) 最終試験溶液の希釈倍率の検討

牛の筋肉、豚の肝臓、牛の脂肪（10 g 採取）の添加回収試験およびマトリックス添加標準溶液について、試験溶液を2倍希釈して測定を行った。得られた真度及び併行精度、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は以下の通りであった。牛の筋肉：87.3%（RSD：5.5%、ピーク面積比：0.86）、豚の肝臓：90.7%（RSD：4.6%、ピーク面積比：1.04）、豚の肝臓（基準値）：86.7%（RSD：1.6%、ピーク面積比：1.03）、牛の脂肪（10 g 採取）：77.6%（RSD：7.7%、ピーク面積比：0.87）。3.添加回収試験結果とほぼ同等の結果が得られた。

5. 考察

厚生労働省ホームページに掲載されている畜産物におけるガミスロマイシンの残留試験法（参考法）は、抽出溶媒に0.1 mol/L リン酸二水素カリウム緩衝液（pH 約 4.5）を用いており脂肪を均一に分散できないこと、試料採取量が少なく試料の均一性の確保が不十分であること、重水素で標識した安定同位体を用いていることが課題であった。本検討においては、この残留試験の方法を参考とし、抽出溶媒、分析試料量の変更を検討した。また、安定同位体を用いない分析方法を検討した。今回、開発した試験法は抽出溶媒にアセトンを用いており、抽出時に脂肪を均一に分散可能にした。また、試料採取量を5～10 gに変更しても分析可能であった。

牛の脂肪の添加回収試験は、試料採取量5 g及び10 gの場合について真度、精度、試料マトリックスの影響を比較した。いずれの場合も、目標値である真度70～120%、併行精度<25%を満足していたが、10 gの場合には抽出操作時の回収率の低下が考えられたため、試料採取量は5 gが望ましいと判断した。

いずれの試料においても、精製後の残留物は、移動相の初期組成に溶解困難であった。そのため、5 mmol/L 酢酸アンモニウム含有メタノールに溶解することとした。

また、ガミスロマイシンはガラスへの吸着が確認されたことから、可能な限りプラスチック製の器材を使用する必要があった。

開発した方法を用いて、牛の筋肉等 3 食品の添加回収試験を行った結果、選択性、真度及び併行精度が目標値を満たしたことから、本試験法は、畜産物に適用可能であると判断された。

【結論】

畜産物中のガミスロマイシン試験法として、ガミスロマイシンを試料からアセトンで抽出し、酢酸及びアンモニウム塩を添加後、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を開発した。開発した試験法を牛の筋肉、豚の肝臓及び牛の脂肪の 3 食品に適用した結果、真度 82.6～92.3%、併行精度 2.8～4.7% 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。

【参考文献】

- 1) (参考) 農産物または畜水産物における残留試験で用いた分析法、厚生労働省ホームページ <https://www.mhlw.go.jp/content/000361439.pdf> (令和 4 年 3 月 18 日閲覧)
- 2) 菊地博之、坂井隆敏、大倉智子、根本了、穂山浩、LC-MS/MS による畜水産物中のクロルプロマジン分析法の開発、日本食品化学学会誌、Vol.26(3),125-131, 2019

添加回収試験における代表的なクロマトグラム

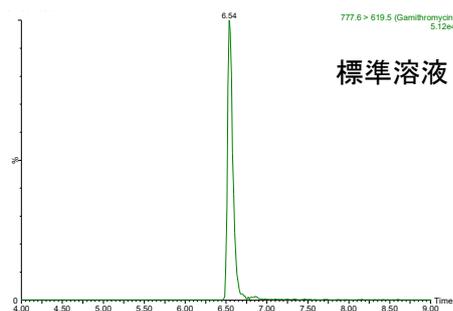
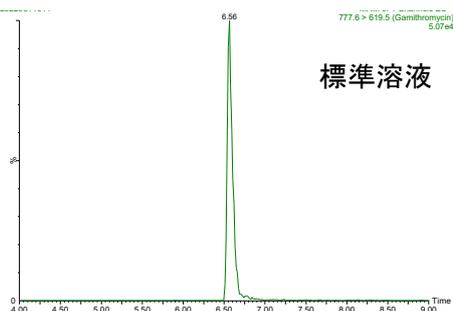
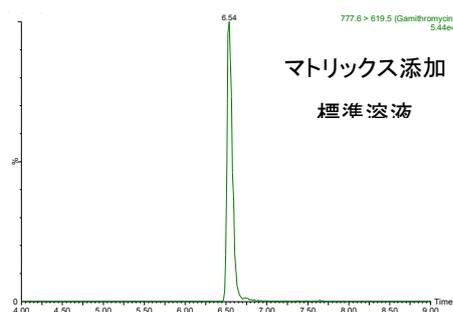
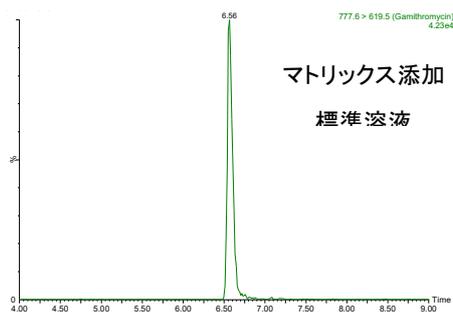
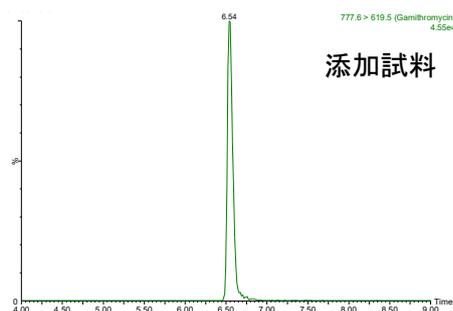
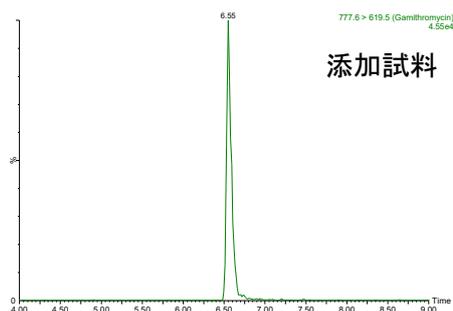
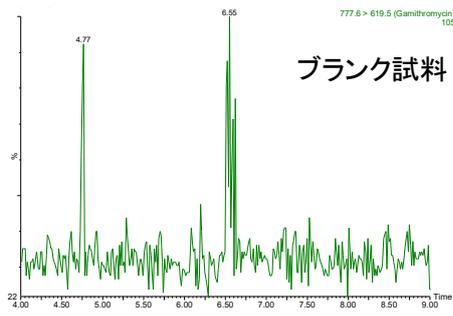
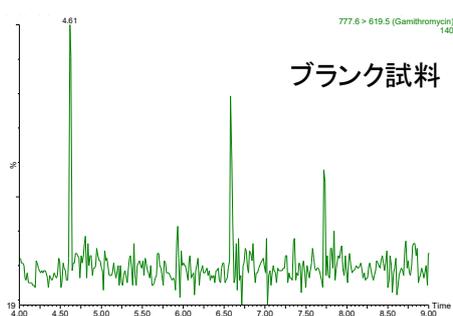


図9 ガミスロマイシンの
 SRMクロマトグラム
 ($m/z + 777.6 \rightarrow 619.5$)
 試料：牛の筋肉
 添加濃度：0.01ppm

図10 ガミスロマイシンの
 SRMクロマトグラム
 ($m/z + 777.6 \rightarrow 619.5$)
 試料：豚の肝臓
 添加濃度：0.01ppm

添加回収試験における代表的なクロマトグラム

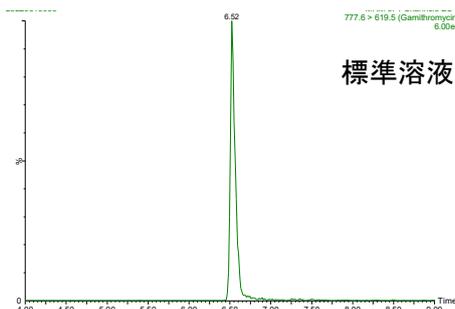
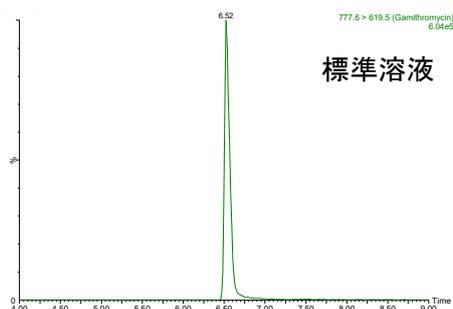
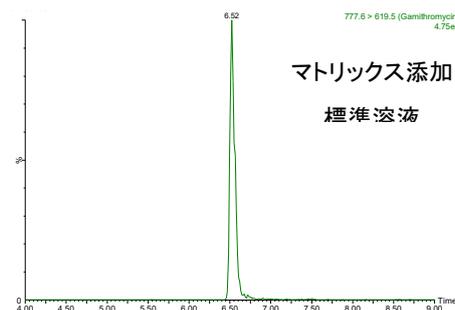
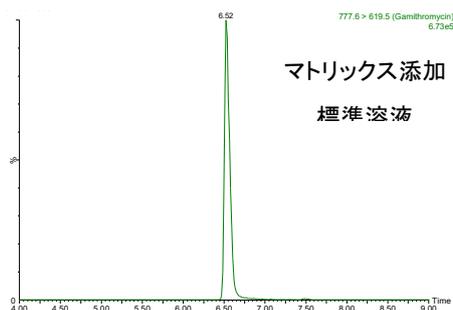
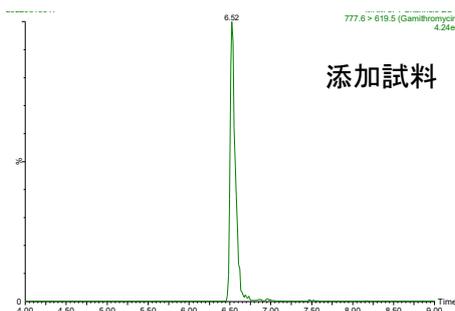
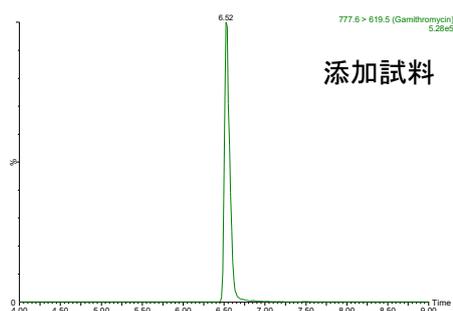
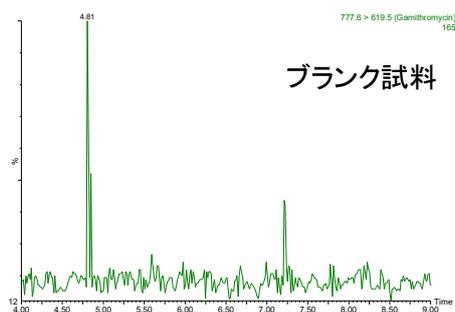
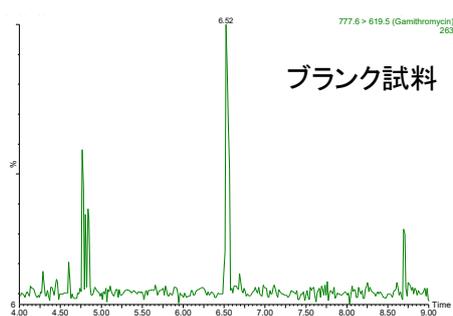


図11 ガミスロマイシンの
SRMクロマトグラム
(m/z +777.6→619.5)
試料：豚の肝臓
添加濃度：0.1ppm

図12 ガミスロマイシンの
SRMクロマトグラム
(m/z +777.6→619.5)
試料：牛の脂肪 (10 g)
添加濃度：0.01ppm

添加回収試験における代表的なクロマトグラム

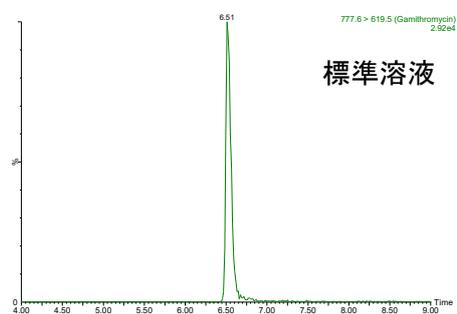
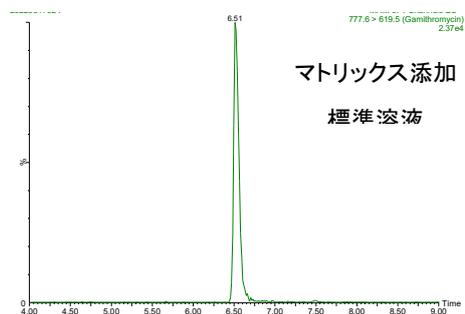
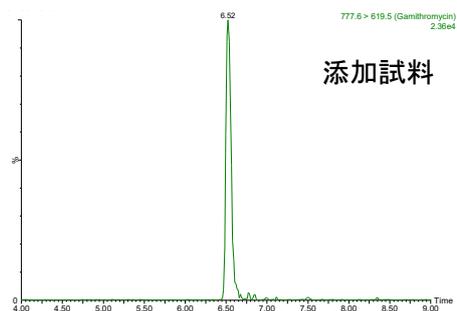
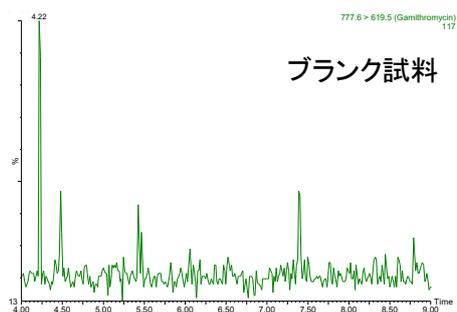


図 13 ガミスロマイシンの SRM クロマトグラム

(m/z +777.6→619.5)

試料 : 牛の脂肪 (5 g)

添加濃度 : 0.01ppm

ブランク試料の代表的なトータルイオンクロマトグラム

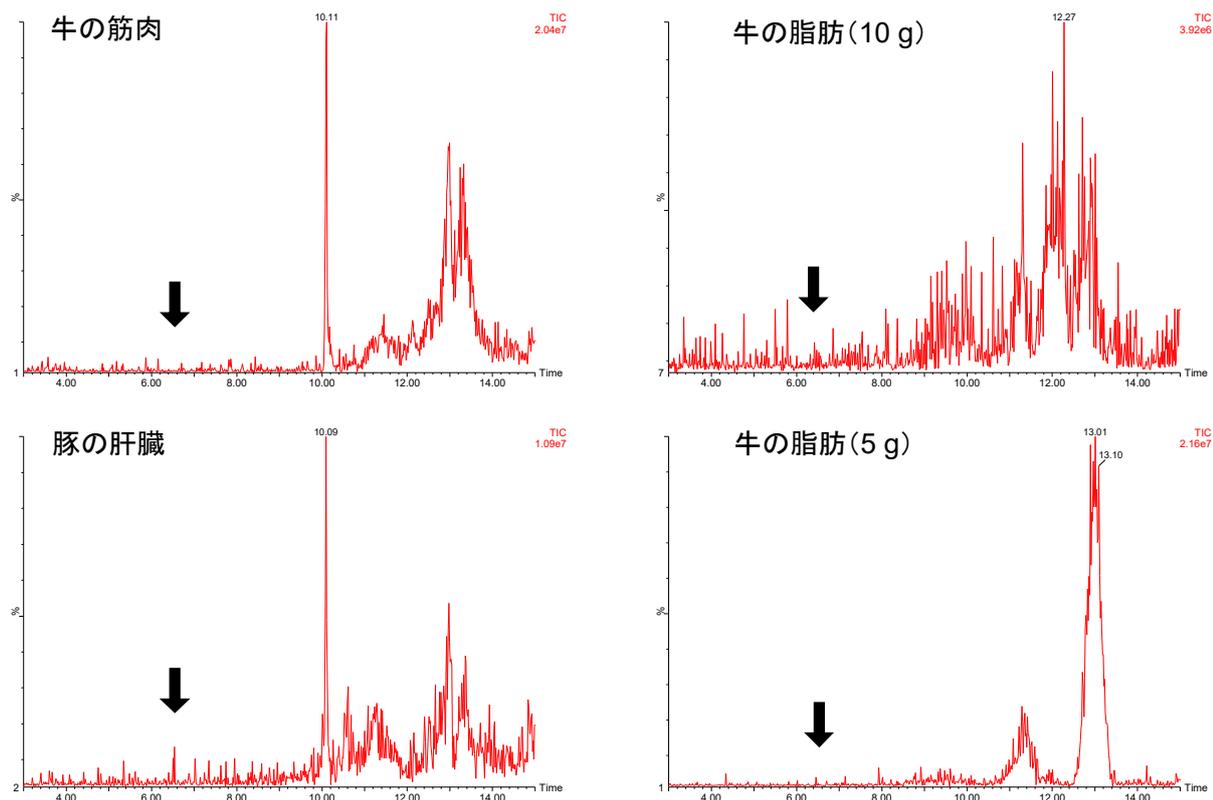


図 14 ブランク試料のトータルイオンクロマトグラム (プロダクトイオンスキャン範囲 : 80 ~ 800 m/z)

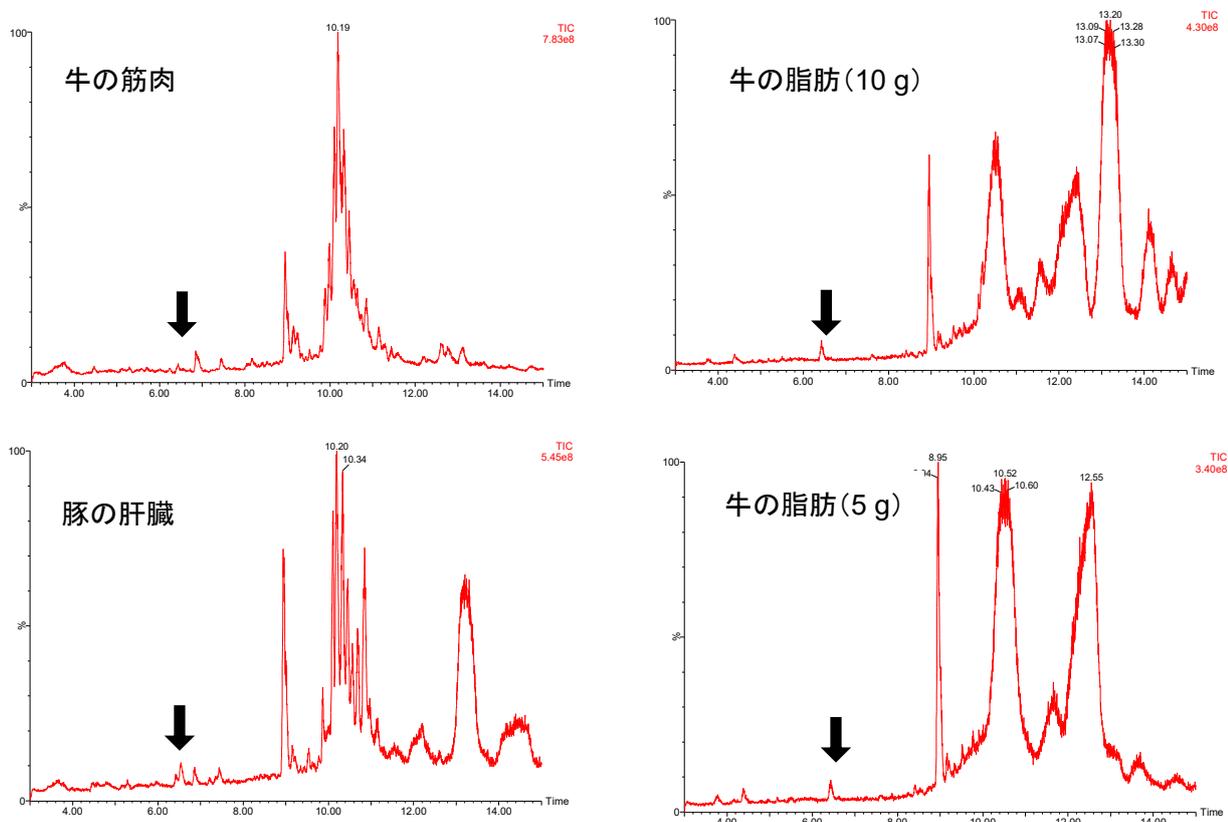


図 15 ブランク試料のトータルイオンクロマトグラム (スキャン範囲 : 50 ~ 800 m/z)