

※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

ビコザマイシン試験法（畜水産物）

ビコザマイシン試験法（畜水産物）の検討結果

[緒言]

1. 目的

ビコザマイシンは、土壌より分離した放線菌である *Streptomyces sapporonensis* から生産された、既存の抗生物質のいずれのグループにも属さない抗生物質である。抗菌活性はグラム陰性菌に限られ、中でも大腸菌及びサルモネラ菌に有効である。作用は殺菌的であり、細胞膜のタンパク質合成を阻害すると考えられている。

国内の動物用医薬品では、ビコザマイシンが子牛及び豚の細菌性下痢症治療薬用の経口投与剤として、安息香酸ビコザマイシンが水産用（すずき目魚類の類結節症治療用）の飼料添加剤として承認されている。また、飼料添加物として、豚及び鶏を対象にビコザマイシンが指定されている。

今般、食品中の動物用医薬品等のポジティブリスト制度導入時に新たに設定された基準値（いわゆる暫定基準）の見直しについて、食品安全委員会において食品健康影響評価がなされたことを踏まえ、農薬・動物用医薬品部会において基準値が見直された。

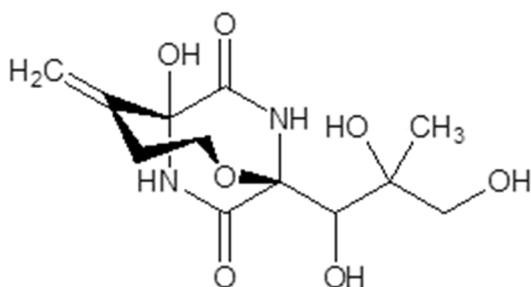
本検討においては、薬事食品衛生審議会食品衛生分科会報告書に記載されている内容を踏まえ、畜水産物中のビコザマイシン試験法の開発を行った。

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： ビコザマイシン

IUPAC 名： (1*S*,6*R*)-6-hydroxy-5-methylidene-1-[(1*S*,2*S*)-1,2,3-trihydroxy-2-methylpropyl]-2-oxa-7,9-diazabicyclo[4.2.2]decane-8,10-dione

構造式：



分子式： C₁₂H₁₈N₂O₇

分子量： 302.28

溶解度： 水 192 g/L

分配係数： log₁₀P_{ow} = -0.3

出典： ChemIDplus, U.S. National Library of Medicine (<https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/>)

3. 基準値

牛の筋肉	0.1 ppm
牛の脂肪	0.05 ppm
牛の肝臓	0.1 ppm
ブリ	0.05 ppm

[実験方法]

1. 試料

東京都内の小売店で購入した。試料の調製方法を以下に示した。

1) 牛の筋肉

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

2) 牛の脂肪

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

3) 牛の肝臓

細切りした後、フードプロセッサーを用いて均一化した。

4) ブリ

可食部（皮を含む）を細切りした後、フードプロセッサーを用いて均一化した。

2. 試薬・試液

ピコザマイシン標準品：純度 911.0 μg (力価) /mg ((株) インターベットより提供)

アセトニトリル：残留農薬試験用 (関東化学 (株) 製)

アセトニトリル：LC/MS 用 (関東化学 (株) 製)

1 mol/L 酢酸アンモニウム溶液：LC/MS 用 (富士フィルム和光純薬 (株) 製)

ギ酸：LC/MS 用 (富士フィルム和光純薬 (株) 製)

n-ヘキサン：残留農薬試験用 (関東化学 (株) 製)

メタノール：残留農薬試験用 (関東化学 (株) 製)

ミニカラム：InertSep SAX/PSA (500 mg/500 mg/6 mL) (ジーエルサイエンス (株) 製)

ミニカラム：InertSep PSA (500 mg/6 mL) (ジーエルサイエンス (株) 製)

ミニカラム：InertSep SAX (500 mg/6 mL) (ジーエルサイエンス (株) 製)

標準原液：ピコザマイシン標準品 11.0 mg を精秤し、メタノールに溶解して全量を 100 mL とし、ピコザマイシン 100 mg/L 溶液を調製した。

検量線用標準溶液：標準原液をアセトニトリル及び水 (9 : 1) 混液で適宜希釈し、0.00005~0.0003 mg/L の濃度の溶液を調製した。

添加用標準溶液：標準原液をメタノールで適宜希釈して調製した。

3. 装置

ホモジナイザー：マルチディスパーサー PB-95 (シャフト：HG-2) (SMT COMPANY 社製)

フードプロセッサー：MK-K58 (パナソニック (株) 製)

濃縮装置：有機溶媒回収装置 V-703 (BUCHI 社製)

遠心分離器：ユニバーサル冷却遠心機 5930（久保田商事（株）製）

LC-MS/MS

装置	型式	会社
MS	Triple Quad 4500	SCIEX
LC	ExionLC	SCIEX
データ処理	Analyst Software	SCIEX

4. 測定条件

LC-MS/MS

LC 条件																					
カラム	SeQuant ZIC-HILIC (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3.5 μm : Merck 製)																				
移動相流速 (mL/min)	0.20																				
注入量 (μL)	10																				
カラム温度 (°C)	40																				
移動相	A 液 : 0.1 vol% ギ酸溶液 B 液 : 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>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>10.0</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>20.0</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>20.1</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>30.0</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> </tbody> </table>			時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)	0.0	10	90	10.0	50	50	20.0	50	50	20.1	10	90	30.0	10	90
時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)																			
0.0	10	90																			
10.0	50	50																			
20.0	50	50																			
20.1	10	90																			
30.0	10	90																			
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 (V)	-4500																				
脱溶媒温度 (°C)	600																				
ネブライザーガス	窒素、80 psi																				
脱溶媒ガス	窒素、60 psi																				
コリジョンガス	窒素																				
定量イオン (m/z)	301.1→184.3 [DP : -40 (V)、CE : -18 (eV)]																				
定性イオン (m/z)	301.1→209.1 [DP : -40 (V)、CE : -22 (eV)]																				
保持時間 (min)	4.9 分																				

DP : Declustering Potential, CE : Collision Energy

5. 定量

ビコザマイシン標準原液をアセトニトリル及び水（9：1）混液で希釈して 0.00005~0.0003 mg/L の標準溶液を調製した。この溶液 10 μ L を LC-MS/MS に注入して、得られたピーク面積を用いて絶対検量線法により検量線を作成した。同様に試験溶液 10 μ L を LC-MS/MS に注入し、得られたピーク面積を用いて、作成した検量線から試料中のビコザマイシンの含量を算出した。なお、基準値相当の添加試料については検量線の範囲内に収まるよう、試験溶液を牛の筋肉及び牛の肝臓は 10 倍、牛の脂肪及びブリは 5 倍希釈した。

6. 試験溶液の調製

1) 添加試料の調製

試料 10.0 g に添加用標準溶液 1 mL（メタノール溶液）を添加しよく混合した後、30 分間放置した。牛の脂肪の場合は、試料 10.0 g を 40°C で加温して融解し、添加用標準溶液 1 mL（メタノール溶液）を添加しよく混合した後、再凝固してから 30 分間放置した。各試料において使用した添加用標準溶液の濃度を表 1 に示す。

表 1 各試料における添加用標準溶液の濃度

試料	添加濃度 (ppm)	添加用標準溶液濃度 (mg/L)
牛の筋肉	0.01	0.1
	0.1	1
牛の脂肪	0.01	0.1
	0.05	0.5
牛の肝臓	0.01	0.1
	0.1	1
ブリ	0.01	0.1
	0.05	0.5

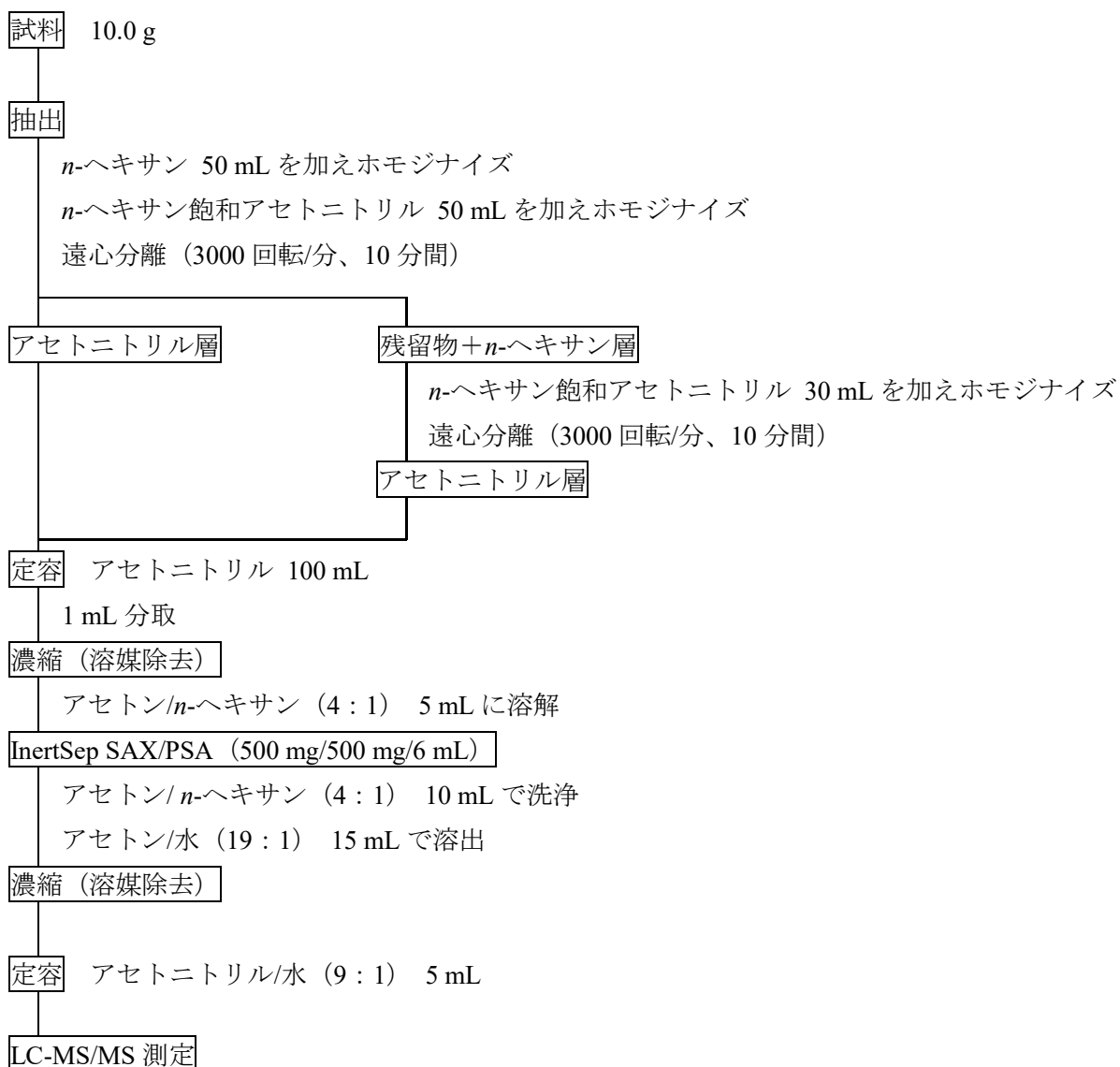
2) 抽出

試料 10.0 g に *n*-ヘキサン 50 mL を加え、ホモジナイズした後、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 50 mL を加え、さらにホモジナイズした後、毎分 3,000 回転で 10 分間遠心分離し、アセトニトリル層を採った。残留物及び *n*-ヘキサン層に *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL を加えてホモジナイズした後、上記と同様に遠心分離し、得られたアセトニトリル層を合わせ、アセトニトリルを加えて正確に 100 mL とした。この溶液から正確に 1 mL を分取して 40°C 以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物にアセトン及び *n*-ヘキサン（4：1）混液 5 mL を加えて溶かした。

3) 精製

トリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲル/エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム [InertSep SAX/PSA (500 mg/500 mg/6 mL)] にアセトン 10 mL、アセトン及び *n*-ヘキサン (4 : 1) 混液 10 mL を順次注入し、各流出液は捨てた。このカラムに 2) で得られた溶液を注入した後、アセトン及び *n*-ヘキサン (4 : 1) 混液 10 mL を注入し、流出液は捨てた。次いで、アセトン及び水 (19 : 1) 混液 15 mL を注入し、溶出液を 40°C 以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物をアセトニトリル及び水 (9 : 1) 混液に溶かし、正確に 5 mL としたものを試験溶液とした。

[分析法フローチャート]



7. マトリックス添加標準溶液の調製

各検討対象食品のブランク試験溶液 0.2 mL を採り、窒素気流下で溶媒を除去した後、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 0.2 mL を加えて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

イオン化モードを選択するために、インフュージョン測定を行ったところ、ビコザマイシンの脱プロトン化分子である m/z 301.1[M-H]⁻が検出された。そこで、ビコザマイシンの測定にはESI (-) モードを用いることとした。このときのマススペクトルを図1に示す。

ビコザマイシンの脱プロトン化分子である m/z 301.1 [M-H]⁻をプリカーサーイオンとした場合のプロダクトイオンスペクトルを図2及び図3に示した。 m/z 209.1 が非常に高い強度で検出され、次いで m/z 184.3 が検出されたが、 m/z 301.1→209.1 ではベースラインが高くなったため、 m/z 301.1→184.3 を定量用 m/z 301.1→209.1 を定性用の測定イオンとした。

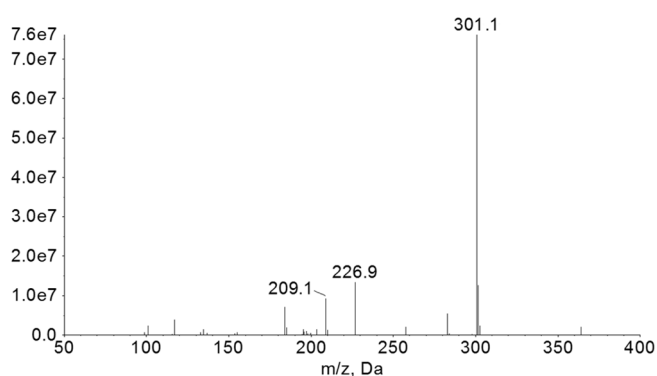


図1 ビコザマイシン標準溶液のマススペクトル

スキャン範囲：50~400 amu

測定条件：ESI⁻, DP=-40 V

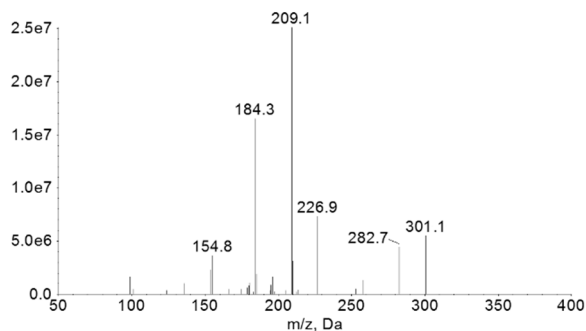


図2 ビコザマイシンのプロダクトイオン
 スペクトル (定量用)
 プリカーサーイオン : m/z 301.1
 測定条件 : ESI-, CV=-40 V, CE = -18 eV

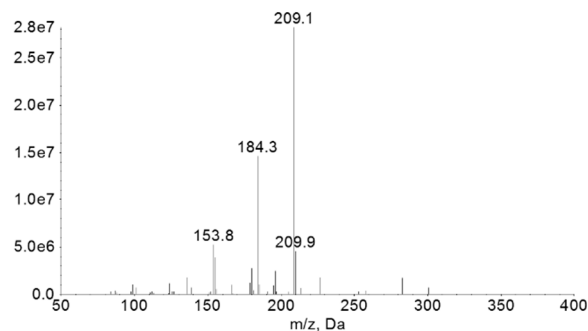


図3 ビコザマイシンのプロダクトイオン
 スペクトル (定性用)
 プリカーサーイオン : m/z 301.1
 測定条件 : ESI-, CV=-40 V, CE = -22 eV

2) LC 条件の検討

分析カラムについて検討を行った。オクタデシルシリル化シリカゲルカラムではビコザマイシンは保持されず、HILIC カラムにおいて保持が良好だった。InertSustain Amide (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm : GL サイエンス (株) 製) 及び SeQuant ZIC-HILIC (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3.5 μm : Merck 製) を用いて検討を行ったところ、いずれのカラムにおいても保持、ピーク形状ともに良好な結果が得られたが、実試料の測定において InertSustain Amide を用いた場合にはマトリックスの影響が大きく現れたことから、分析カラムには SeQuant ZIC-HILIC を用いることとした。

移動相条件については、アセトニトリル-ギ酸について、添加剤の 3 濃度 (0.05、0.1 及び 0.2vol%) 及び 5 mmol/L 酢酸アンモニウム-5 mmol/L 酢酸アンモニウム・メタノールについて検討した結果アセトニトリル-0.1vol%ギ酸を用いた場合に最も良好な感度とピーク形状が得られたので、アセトニトリル-0.1vol%ギ酸を移動相として用いることにした。別紙に HILIC カラムの違いによる標準溶液の LC-MS/MS クロマトグラムを示した。

3) 検量線

図4に検量線の例を示した。0.00005~0.0003 mg/L の濃度範囲で作成した検量線の決定係数は、いずれの検量線も 0.999 以上であり良好な直線性を示した。

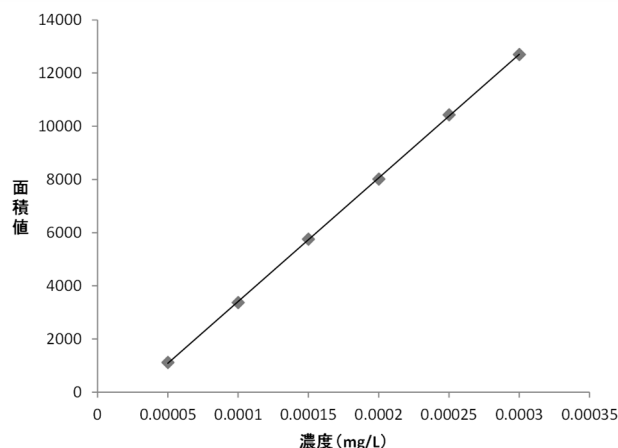


図4 ビコザマイシン検量線の例

濃度範囲：0.00005~0.0003 mg/L

$$y = 46474286x - 1235 \quad r^2 = 0.9999$$

2. 試験溶液調製法の検討

1) 抽出溶媒の検討

牛の脂肪を用いて抽出溶媒の検討を行った。

メタノールについては、試料 10.0 g を 40℃ で融解し、ビコザマイシン 10 mg/L 溶液（メタノール溶液）2 mL を添加して、再凝固してから 30 分放置した後、メタノール 100 mL を加えてホモジナイズした。この抽出溶液を毎分 3000 回転で 10 分間遠心分離し、上澄液を分取した。残留物にメタノール 50 mL を加え、上記と同様の操作を行った。上澄液を合わせ、正確に 200 mL とした。ここから 1 mL を分取しアセトニトリルを加えて 10 mL としたものを抽出液とした。

アセトニトリルについては、試料 10.0 g を 40℃ で融解し、ビコザマイシン 10 mg/L 溶液（メタノール溶液）2 mL を添加して、再凝固してから 30 分放置した後、*n*-ヘキサン 50 mL を加えてホモジナイズした後、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 50 mL を加えてホモジナイズした。この抽出溶液を毎分 3000 回転で 10 分間遠心分離し、アセトニトリル層を分取した。残留物及び *n*-ヘキサン層に *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 30 mL を加え、上記と同様の操作を行った後、アセトニトリル層を合わせ、正確に 200 mL とした。ここから 1 mL を分取しアセトニトリルを加えて 10 mL としたものを抽出液とした。

結果は表 2 に示したとおり、いずれの場合も良好な回収率が得られたが、アセトニトリル（*n*-ヘキサン存在下）を用いた場合の方が抽出液の着色やマトリックスの影響が少なかったため、抽出はアセトニトリル（*n*-ヘキサン存在下）を用いて行うこととした。

表 2 抽出溶媒の検討結果（マトリックス添加標準溶液による補正值）

抽出溶媒	回収率 (%)
メタノール	99.9
アセトニトリル（ <i>n</i> -ヘキサン存在下）	95.4

添加量：20 μg

2) カラム精製の検討

①陰イオン交換体ミニカラムによる精製 [InertSep SAX (500 mg/6 mL)]

InertSep SAX (500 mg/6 mL) からの溶出状況を確認した。アセトン 5 mL 及び各溶出溶媒 5 mL で予備洗浄したカラムに 0.1 mg/L ビコザマイシン溶液 (各溶出溶媒で調製した溶液) 1 mL を負荷し、各溶出溶媒を流下して 5 mL ずつ分画を分取した。このときの結果を表 3 に示す。ビコザマイシンはアセトン及び *n*-ヘキサン (4 : 1) 混液 30 mL 及びアセトン及び *n*-ヘキサン (1 : 1) 混液 30 mL では溶出せず、アセトン及び水 (19 : 1) 混液 15 mL またはアセトン及び水 (9 : 1) 混液 10 mL で溶出した。

表 3 Inert Sep SAX (500 mg/6 mL) からの溶出状況

溶出溶媒量	アセトン	アセトン/水 (99 : 1)	アセトン/水 (19 : 1)	アセトン/水 (9 : 1)	アセトン/ <i>n</i> - ヘキサン (4 : 1)	アセトン/ <i>n</i> - ヘキサン (1 : 1)
0-5 mL	0	0	93.5	106.4	0	0
5-10 mL	0	34.7	14.5	6.9	0	0
10-15 mL	3.2	16.7	2.5	0	0	0
15-20 mL	9.5	10.9	0	0	0	0
20-25 mL	8.1	8.2	0	0	0	0
25-30 mL	5.9	5.8	0	0	0	0
計	26.7	76.3	110.5	113.3	0	0

添加量 : 0.1 µg

次にマトリックス (牛の肝臓) 存在下における溶出状況を確認した。牛の肝臓抽出液*1 mL に 0.1 mg/L ビコザマイシン溶液 (アセトニトリル溶液) 1 mL を加えて 40°C 以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物に各溶出溶媒 5 mL を加えて溶解し、アセトン 5 mL 及び各溶出溶媒 5 mL で予備洗浄した SAX ミニカラムに負荷し、各溶出溶媒を流下して 5 mL ずつ分画を分取した。このときの結果を表 4 に示す。この結果より、SAX ミニカラムにおいてアセトン及び *n*-ヘキサン (4 : 1) 混液 10 mL で洗浄、アセトン及び水 (19 : 1) 混液 10 mL で溶出が可能であることが分かった。

※牛の肝臓抽出液の調製法 : 牛の肝臓 10.0 g に *n*-ヘキサン 50 mL を加えてホモジナイズし、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 50 mL を加えてさらにホモジナイズした後、毎分 3,000 回転で 10 分間遠心分離し、アセトニトリル層を採った。残留物に *n*-ヘキサン飽和アセトニトリル 25 mL を加えてホモジナイズした後、上記と同様に遠心分離し、得られたアセトニトリル層を合わせ、アセトニトリルを加えて正確に 100 mL とした。

表 4 Inert Sep SAX (500 mg/6 mL) からの溶出状況 (試料：牛の肝臓)

溶出溶媒量	アセトン/水 (19 : 1)	アセトン/水 (9 : 1)	アセトン/ <i>n</i> - ヘキサン (4 : 1)
0-5 mL	46.5	108.6	0
5-10 mL	50.5	3.4	0
10-15 mL	0	0	0
15-20 mL	0	0	0
20-25 mL	0	0	1.7
25-30 mL	0	0	6.7
計	97.0	112.0	8.4

添加量：0.1 µg

②PSA ミニカラムによる精製 [InertSep PSA (500 mg/6 mL)]

InertSep PSA (500 mg/6 mL) からの溶出状況を確認した。アセトン 5 mL 及び各溶出溶媒 5 mL で予備洗浄したカラムに 0.1 mg/L ビコザマイシン溶液 (各溶出溶媒で調製した溶液) 1 mL を負荷し、各溶出溶媒を流下して 5 mL ずつ分画を分取した。このときの結果を表 5 に示す。ビコザマイシンはアセトン及び *n*-ヘキサン (4 : 1) 混液 20 mL 及びアセトン及び *n*-ヘキサン (1 : 1) 混液 30 mL では溶出せず、アセトン及び水 (19 : 1) 混液 10 mL またはアセトン及び水 (9 : 1) 混液 10 mL で溶出した。

表 5 Inert Sep PSA (500 mg/6 mL) からの溶出状況

溶出溶媒量	アセトン	アセトン/水 (99 : 1)	アセトン/水 (19 : 1)	アセトン/水 (9 : 1)	アセトン/ <i>n</i> - ヘキサン (4 : 1)	アセトン/ <i>n</i> - ヘキサン (1 : 1)
0-5 mL	0	0	98.2	99.4	0	0
5-10 mL	0	0.6	4.1	4.3	0	0
10-15 mL	8.4	41.1	0	0	0	0
15-20 mL	15.1	30.2	0	0	0	0
20-25 mL	11.7	11.3	0	0	1.2	0
25-30 mL	6.6	5.0	0	0	2.1	0
計	41.8	88.2	102.3	103.7	3.3	0

添加量：0.1 µg

次にマトリックス (牛の肝臓) 存在下における溶出状況を確認した。牛の肝臓抽出液*1 mL に 0.1 mg/L ビコザマイシン溶液 (アセトニトリル溶液) 1 mL を加えて 40℃以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物に各溶出溶媒 5 mL を加えて溶解し、アセトン 5 mL 及び各溶出溶媒 5 mL で予備洗浄した SAX ミニカラムに負荷し、各溶出溶媒を流下して 5 mL ずつ分画を分取した。このときの結

果を表 6 に示す。この結果より、PSA ミニカラムにおいてアセトン及び *n*-ヘキサン (4 : 1) 混液 10 mL で洗浄、アセトン及び水 (19 : 1) 混液 15 mL またはアセトン及び水 (9 : 1) 混液 10 mL で溶出が可能であることが分かった。

表 6 Inert Sep PSA (500 mg/6 mL) からの溶出状況 (試料 : 牛の肝臓)

溶出溶媒量	アセトン/水 (19 : 1)	アセトン/水 (9 : 1)	アセトン/ <i>n</i> - ヘキサン (4 : 1)
0-5 mL	18.0	57.1	0
5-10 mL	73.5	37.1	0
10-15 mL	6.4	0	0
15-20 mL	0	0	0
20-25 mL	0	0	0
25-30 mL	0	0	1.7
計	97.9	94.2	1.7

添加量 : 0.1 µg

③SAX/PSA ミニカラムによる精製 [InertSep SAX/ PSA (500 mg/500 mg/6 mL)]

InertSep SAX/PSA (500 mg/500 mg/6 mL) からの溶出状況を確認した。アセトン 5 mL 及び各溶出溶媒 5 mL で予備洗浄したカラムに 0.1 mg/L ビコザマイシン溶液 (各溶出溶媒で調製した溶液) 1 mL を負荷し、各溶出溶媒を流下して 5 mL ずつ分画を分取した。このときの結果を表 7 に示す。ビコザマイシンはアセトン及び *n*-ヘキサン (4 : 1) 混液 30 mL 及びアセトン及び *n*-ヘキサン (1 : 1) 混液 30 mL では溶出せず、アセトン及び水 (19 : 1) 混液 15 mL またはアセトン及び水 (9 : 1) 混液 10 mL で溶出した。

表 7 InertSep SAX/ PSA (500 mg/500 mg/6 mL) からの溶出状況

溶出溶媒量	アセトン	アセトン/水 (99 : 1)	アセトン/水 (19 : 1)	アセトン/水 (9 : 1)	アセトン/ <i>n</i> - ヘキサン (4 : 1)	アセトン/ <i>n</i> - ヘキサン (1 : 1)
0-5 mL	0	0	0	89.5	0	0
5-10 mL	0	0	89.6	19.1	0	0
10-15 mL	0	0	10.4	0	0	0
15-20 mL	0	0	0	0	0	0
20-25 mL	0	10.1	0	0	0	0
25-30 mL	0	19.3	0	0	0	0
計	0	29.4	100.0	108.6	0	0

添加量 : 0.1 µg

次にマトリックス（牛の肝臓）存在下における溶出状況を確認した。牛の肝臓抽出液^{*}1 mLに0.1 mg/L ビコザマイシン溶液（アセトニトリル溶液）1 mLを加えて40℃以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物に各溶出溶媒5 mLを加えて溶解し、アセトン5 mL及び各溶出溶媒5 mLで予備洗浄したSAX/PSAミニカラムに負荷し、各溶出溶媒を流下して5 mLずつ分画を分取した。このときの結果を表8に示す。この結果より、SAX/PSAミニカラムにおいてアセトン及び*n*-ヘキサン（4：1）混液10 mLで洗浄、アセトン及び水（19：1）混液15 mLまたはアセトン及び水（9：1）混液10 mLで溶出が可能であることが分かった。

表8 InertSep SAX/PSA（500 mg/500 mg/6 mL）からの溶出状況（試料：牛の肝臓）

溶出溶媒量	アセトン/水 (99：1)	アセトン/水 (19：1)	アセトン/水 (9：1)	アセトン/ <i>n</i> - ヘキサン (4：1)
0-5 mL	0	20.8	78.9	0
5-10 mL	1.9	70.0	17.0	0
10-15 mL	24.6	4.7	0	0
15-20 mL	57.0	0	0	0
20-25 mL	4.4	0	0	0
25-30 mL	0	0	0	0
計	87.9	95.5	95.9	0

添加量：0.1 µg

④各ミニカラムにおける精製効果の比較

牛の肝臓を用いて添加回収試験を行い、各ミニカラムにおける精製効果の比較を行った。なお、精製操作は上記①～③において適用可能であると分かった条件を用いて行った。このときの結果を表9に示す。マトリックス影響が小さかったPSAミニカラム（溶出溶媒：アセトン及び水（9：1）混液）、SAX/PSAミニカラム（溶出溶媒：アセトン及び水（9：1）混液）及びSAX/PSAミニカラム（溶出溶媒：アセトン及び水（19：1）混液）において、SAX/PSAミニカラム（溶出溶媒：アセトン及び水（19：1）混液）以外の溶出液の場合、溶出液の溶媒除去後に黄色いオイル状の残留物がみられた。

以上の結果より、精製には回収率も良好でマトリックス影響も小さいSAX/PSAミニカラムを用いることとし、アセトン及び*n*-ヘキサン（4：1）混液10 mLで洗浄した後、アセトン及び水（19：1）混液15 mLで溶出することとした。

表 9 添加回収試験結果 (試料：牛の肝臓)

精製カラム	溶出溶媒	溶出溶媒量	回収率 (%)	補正回収率 (%)	マトリックス影響
SAX	アセトン/水 (19 : 1)	10 mL	59.0	96.9	0.609
PSA	アセトン/水 (19 : 1)	15 mL	79.0	97.9	0.807
PSA	アセトン/水 (9 : 1)	10 mL	90.7	93.7	0.968
SAX/PSA	アセトン/水 (19 : 1)	15 mL	95.4	98.2	0.971
SAX/PSA	アセトン/水 (9 : 1)	10 mL	93.1	98.4	0.946

添加量：0.01 mg/kg 相当

マトリックス影響：マトリックス添加標準溶液の面積値 / 溶媒標準溶液の面積値

3. 添加回収試験

牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、ブリの4食品を試料に用いて、実験方法の「6. 試験溶液の調製」に従って添加回収試験を実施した。なお、牛の筋肉及び牛の肝臓の基準値相当濃度の添加回収試験については試験溶液を10倍に希釈し、牛の脂肪及びブリの基準値相当濃度の添加回収試験については試験溶液を5倍に希釈して測定した。

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5~8に示した。また、各食品のブランク試料のフルスキャン測定によるトータルイオンクロマトグラムを図9に示した。

1) 選択性

選択性の検討結果を表10に示した。検討を行ったいずれの試料においても、ビコザマイシンの定量を妨害するピークは認められなかった。

表10 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⁾						面積(高さ)比 (a)/(b)	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⁾						
								n=1	n=2	平均 (a)	n=1	n=2				平均 (b)	
1	ビコザマイシン	牛の筋肉 (MRL)	0.01	0.1	基準値	0.1	< 0.100	面積	0	0	0	8691	8597	8644	0.000	○	
2		牛の脂肪 (MRL)	0.01	0.05	基準値	0.05	< 0.100	面積	0	0	0	8900	8953	8927	0.000	○	
3		牛の肝臓 (MRL)	0.01	0.1	基準値	0.1	< 0.100	面積	0	0	0	7344	7353	7349	0.000	○	
4		ブリ (MRL)	0.01	0.05	基準値	0.05	< 0.100	面積	0	0	0	7568	7389	7479	0.000	○	
5		牛の筋肉 (LOQ)	0.01		定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	7671	7409	7540	0.000	○	
6		牛の脂肪 (LOQ)	0.01		定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	8973	8518	8746	0.000	○	
7		牛の肝臓 (LOQ)	0.01		定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	7562	7538	7550	0.000	○	
8		ブリ (LOQ)	0.01		定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	7356	7422	7389	0.000	○	

*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する。(必要に応じて起爆注入を行う。)

*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)は求めなくてもよい。

*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「×」を記載する。

2) 真度、精度

真度及び併行精度の検討結果を表11に示した。

定量限界相当濃度の添加回収試験では、ビコザマイシンは真度92.8~97.7%、併行精度0.7~2.8%であり、真度70~120%、併行精度(RSD) < 25%という目標値を満足した。また、S/Nは33~78であり、S/N ≥ 10を満足した。

基準値相当濃度の添加回収試験では、ビコザマイシンは真度93.9~95.0%、併行精度0.6~2.7%であり、真度70~120%、併行精度(RSD) < 15%という目標値を満足した。

表11 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⁾	検量線			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	ビコザマイシン	牛の筋肉 (MRL)	0.01	0.1	0.1	—	42976000	-891	0.9997	94.3	94.6	95.2	93.9	95.0	94.6	0.6				
2		牛の脂肪 (MRL)	0.01	0.05	0.05	—	52177714	-1448	0.9937	98.0	95.6	93.4	92.7	95.3	95.0	2.2				
3		牛の肝臓 (MRL)	0.01	0.1	0.1	—	55459429	-1573	0.9998	93.7	96.7	97.1	95.3	92.3	95.0	2.1				
4		ブリ (MRL)	0.01	0.05	0.05	—	42365714	-1085	0.9995	92.6	91.8	94.7	98.0	92.6	93.9	2.7				
5		牛の筋肉 (LOQ)	0.01		0.01	S/N	42455429	-564	0.9998	93.2	94.6	92.7	91.8	96.5	93.8	2.0	38.8	27.1	32.9	
6		牛の脂肪 (LOQ)	0.01		0.01	S/N	55917714	-1385	0.9998	97.8	99.9	97.3	97.9	95.5	97.7	1.6	89.7	65.3	77.5	
7		牛の肝臓 (LOQ)	0.01		0.01	S/N	49442857	-1090	0.9998	97.2	91.2	94.6	91.2	94.8	93.8	2.8	67.6	48.3	57.9	
8		ブリ (LOQ)	0.01		0.01	S/N	46474286	-1235	0.9999	93.7	93.4	92.4	92.5	92.1	92.8	0.7	43.9	36.6	40.3	

*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

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 12 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。定量限界相当濃度におけるビコザマイシンの面積比は 0.91~0.99 であった。また、基準値相当濃度におけるビコザマイシンの面積比は 0.95~0.99 であり、いずれも試料マトリックスの測定への影響はほとんどみられなかった。

添加回収試験における真度を表 12 で求めたピーク面積比で除して補正真度を求め、表 13 に示した。補正真度は 93.7~103.1%であり、試料マトリックスの影響を考慮した場合でも良好な結果が得られた。

表 12 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	ビコザマイシン	牛の筋肉 (MRL)	0.01	0.1	0.1	0.0002	面積	0	8691	8597	8644	9058	9105	9082	0.95	
2		牛の脂肪 (MRL)	0.01	0.05	0.05	0.0002	面積	0	8900	8953	8927	9112	9009	9061	0.99	
3		牛の肝臓 (MRL)	0.01	0.1	0.1	0.0002	面積	0	7344	7353	7349	7619	7555	7587	0.97	
4		ブリ (MRL)	0.01	0.05	0.05	0.0002	面積	0	7568	7389	7479	7605	7528	7567	0.99	
5		牛の筋肉 (LOQ)	0.01		0.01	0.0002	面積	0	7671	7409	7540	8458	8063	8261	0.91	
6		牛の脂肪 (LOQ)	0.01		0.01	0.0002	面積	0	8973	8518	8746	8978	8729	8854	0.99	
7		牛の肝臓 (LOQ)	0.01		0.01	0.0002	面積	0	7562	7538	7550	7699	7786	7743	0.98	
8		ブリ (LOQ)	0.01		0.01	0.0002	面積	0	7356	7422	7389	7377	7549	7463	0.99	

*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。

表 13 補正真度

食品名	添加濃度 (ppm)	真度 (%)	補正真度 (%)	ピーク面積比※
牛の筋肉 (MRL)	0.1	94.6	99.6	0.95
牛の脂肪 (MRL)	0.05	95.0	96.0	0.99
牛の肝臓 (MRL)	0.1	95.0	97.9	0.97
ブリ (MRL)	0.05	93.9	94.8	0.99
牛の筋肉 (LOQ)	0.01	93.8	103.1	0.91
牛の脂肪 (LOQ)	0.01	97.7	98.7	0.99
牛の肝臓 (LOQ)	0.01	93.8	95.7	0.98
ブリ (LOQ)	0.01	92.8	93.7	0.99

※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の比

4. 考察

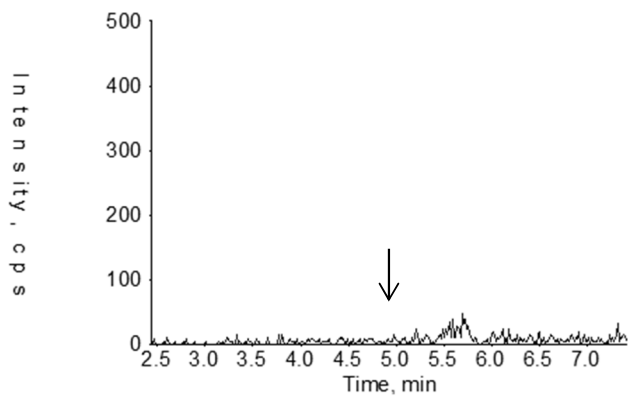
開発した試験法を用いて、牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓及びブリの添加回収試験を行った結果、いずれの食品においてもビコザマイシンの定量を妨害するピークやマトリックスの影響はみられず、真度及び併行精度はいずれの化合物においても、定量限界相当では真度 70~120%、併行精度 (RSD) <25%、基準値相当では真度 70~120%、併行精度 (RSD) <15%という目標値を満たしていたことから、本試験法は、畜水産物に適用可能であると判断された。

[結論]

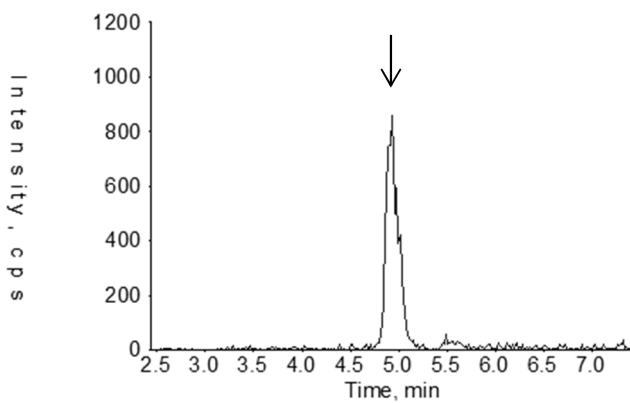
畜水産物中のビコザマイシン試験法として、ビコザマイシンを試料から *n*-ヘキサン存在下アセトニトリルで抽出し、トリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲル/エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラムで精製を行い、LC-MS/MS で定量及び確認する方法を開発した。

牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓及びブリに適用した結果、いずれの化合物においても選択性には問題なく、真度、併行精度、S/N の目標値を満足する良好な結果が得られた。

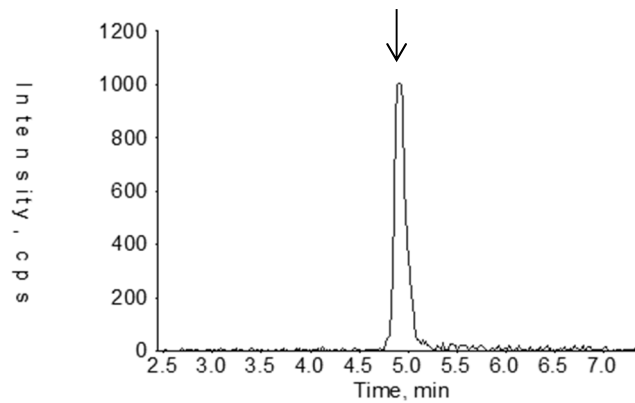
ブランク試料



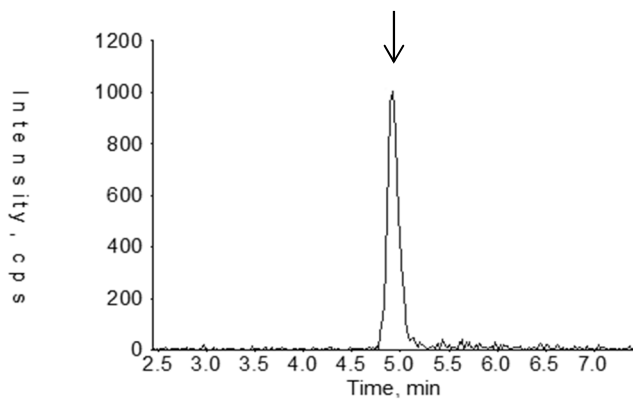
添加試料 (試料中 0.01 ppm 相当)



添加試料 (試料中 0.1 ppm 相当、10 倍希釈)



標準溶液 (0.0002 mg/L)



標準溶液 (0.0002 mg/L)

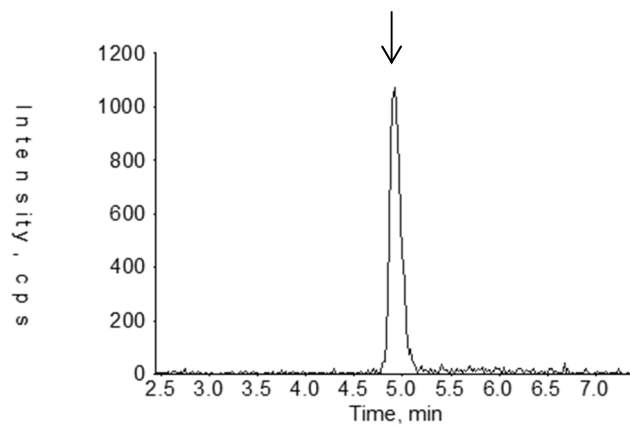
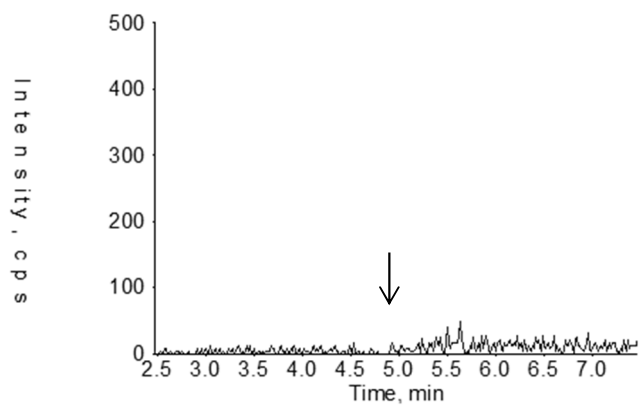
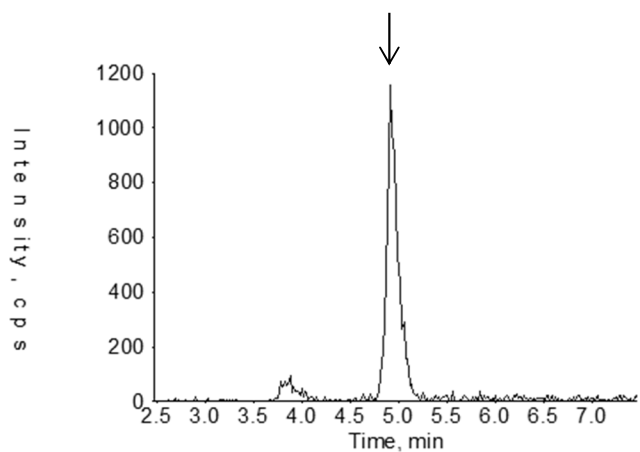


図5 ビコザマイシンの SRM クロマトグラム (m/z 301.1→184.3)
試料：牛の筋肉

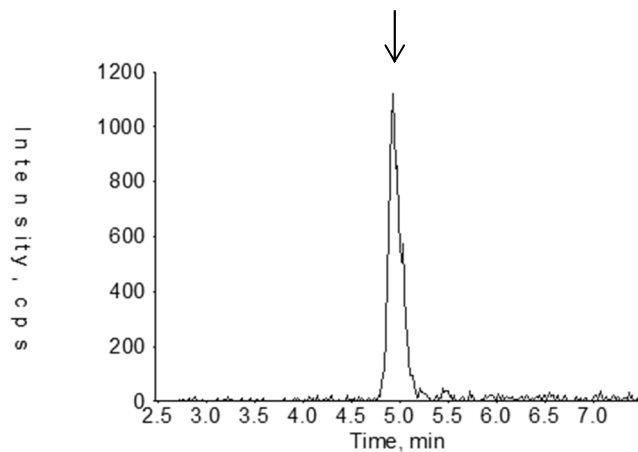
ブランク試料



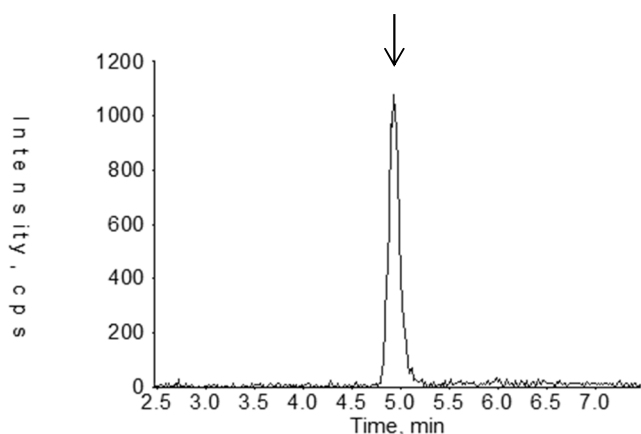
添加試料 (試料中 0.01 ppm 相当)



添加試料 (試料中 0.05 ppm 相当、5 倍希釈)



標準溶液 (0.0002 mg/L)



標準溶液 (0.0002 mg/L)

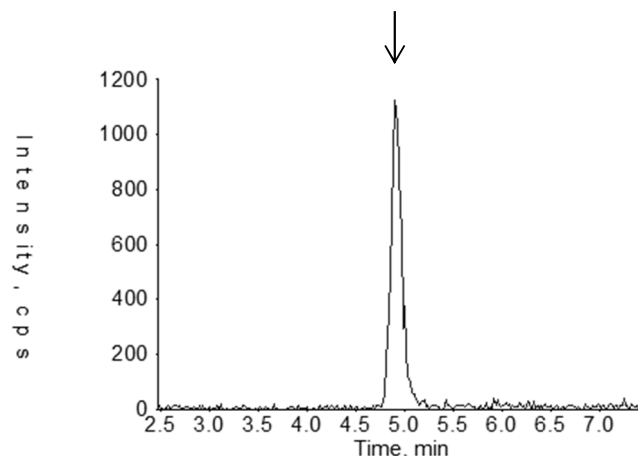
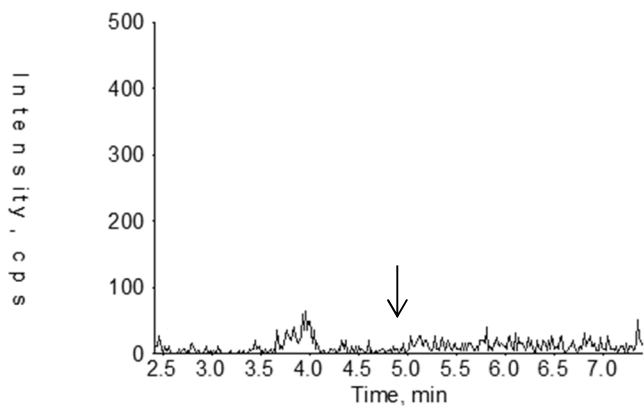
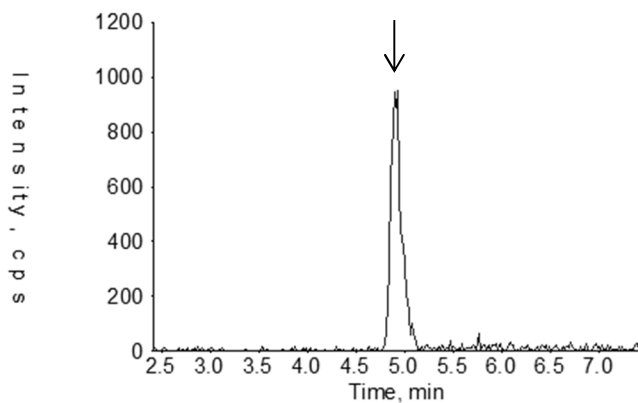


図 6 ビコザマイシンの SRM クロマトグラム (m/z 301.1→184.3)
試料：牛の脂肪

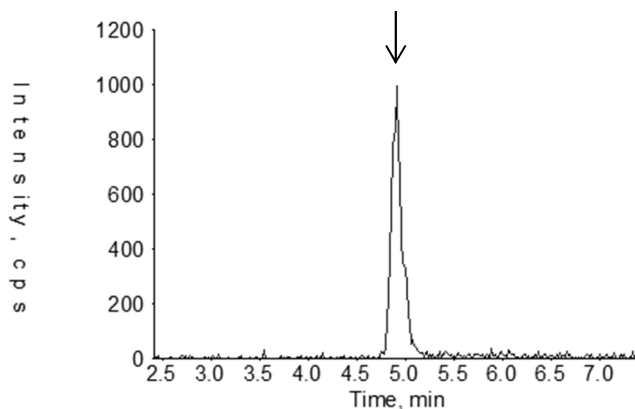
ブランク試料



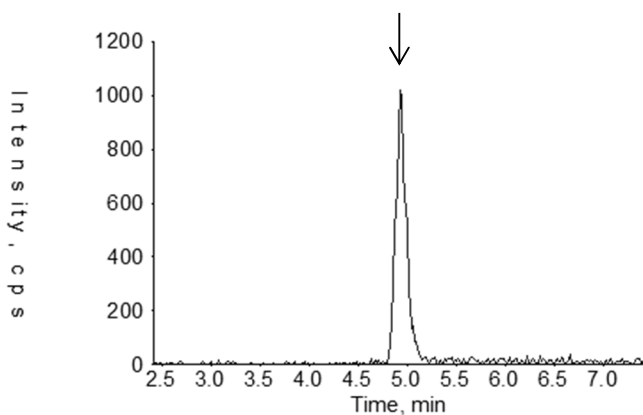
添加試料 (試料中 0.01 ppm 相当)



添加試料 (試料中 0.1 ppm 相当、10 倍希釈)



標準溶液 (0.0002 mg/L)



標準溶液 (0.0002 mg/L)

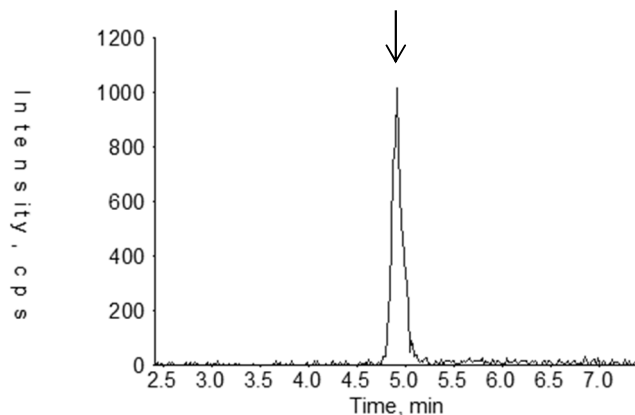
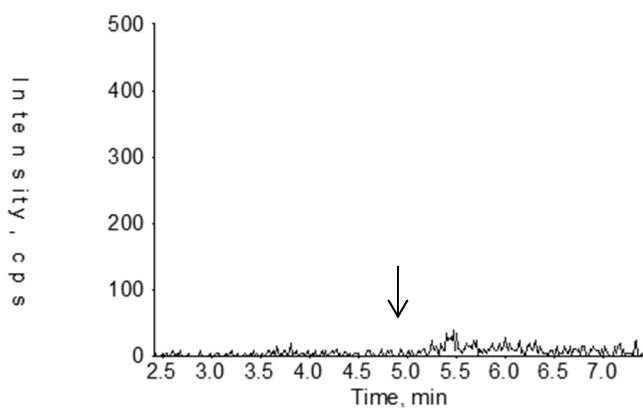
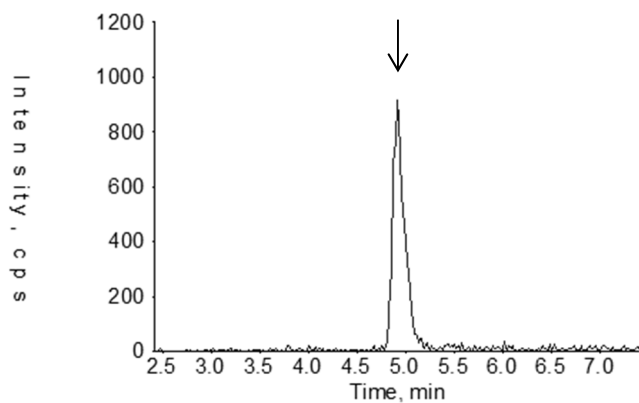


図7 ビコザマイシンの SRM クロマトグラム (m/z 301.1→184.3)
試料：牛の肝臓

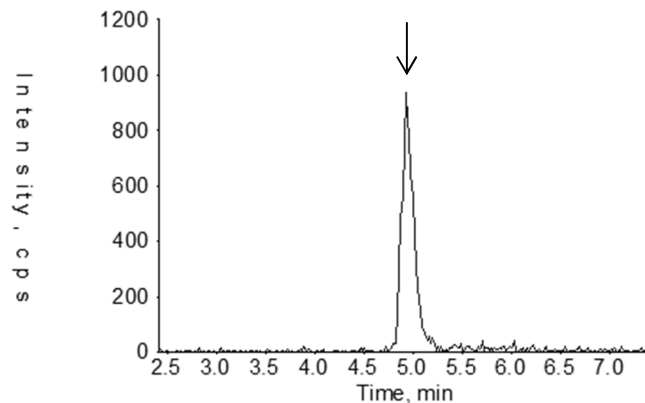
ブランク試料



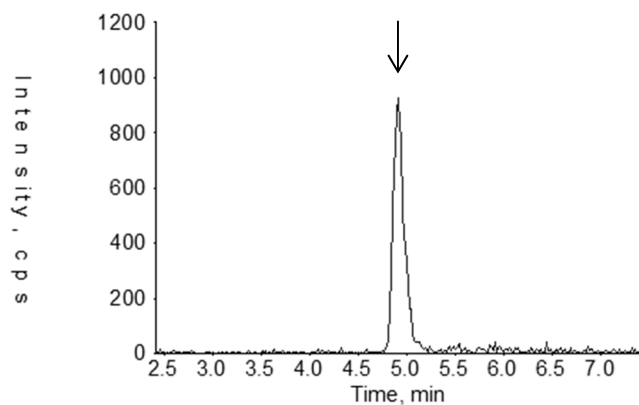
添加試料 (試料中 0.01 ppm 相当)



添加試料 (試料中 0.05 ppm 相当、5 倍希釈)



標準溶液 (0.0002 mg/L)



標準溶液 (0.0002 mg/L)

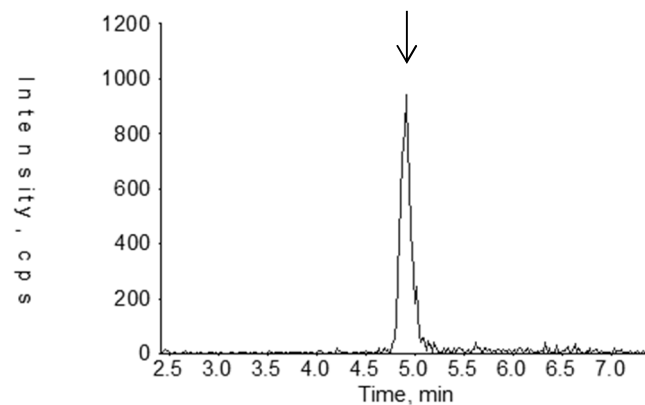
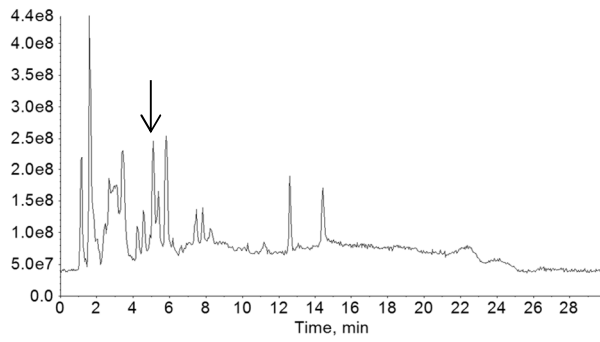
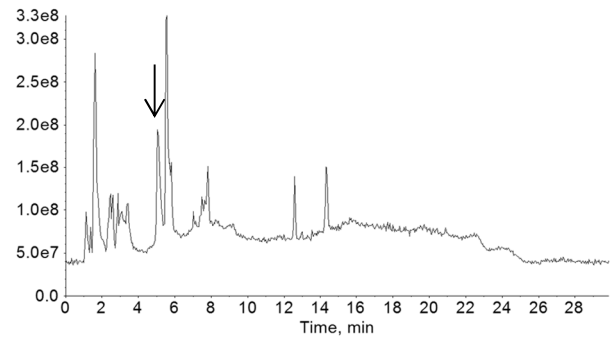


図 8 ビコザマイシンの SRM クロマトグラム (m/z 301.1→184.3)
試料：ブリ

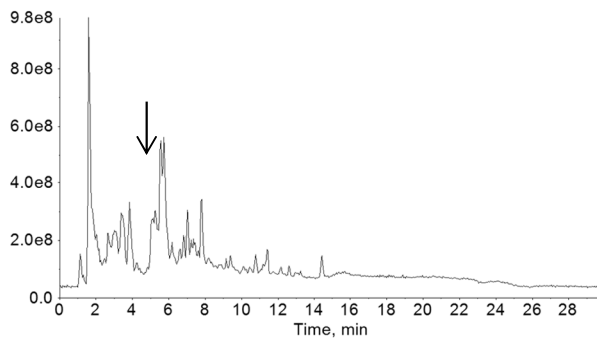
牛の筋肉



牛の脂肪



牛の肝臓



ブリ

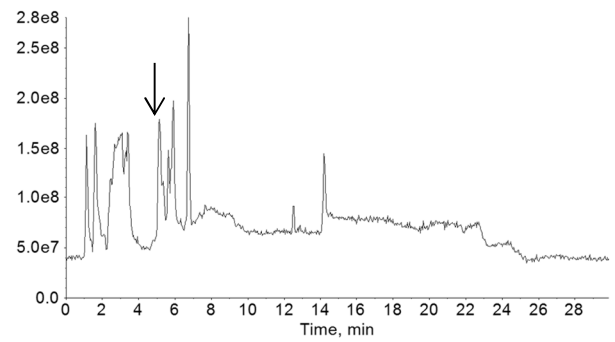


図9 ブランク試料のフルスキャン測定におけるトータルイオンクロマトグラム
(ネガティブイオンモード、スキャン範囲：50~550 amu)

ビコザマイシン標準溶液 (0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) の HILIC カラムの違いによる LC-MS/MS クロマトグラム

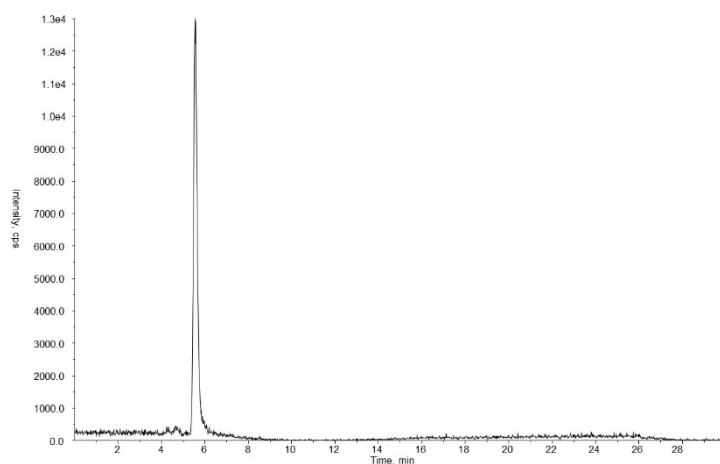


図 1. SeQuant ZIC-HILIC (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3.5 μm : Merck 製)

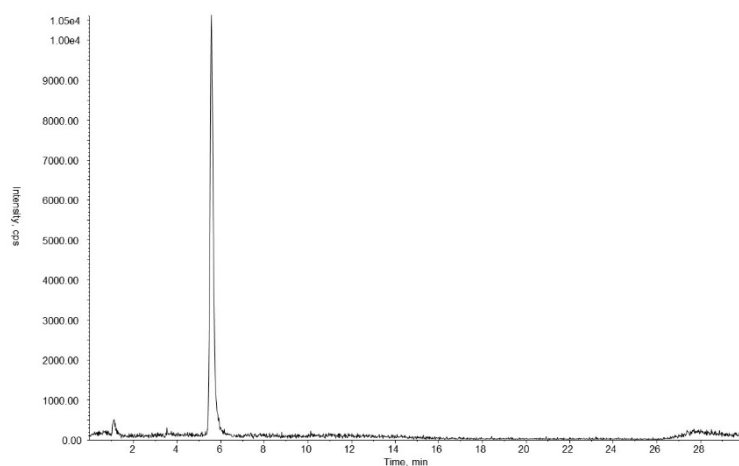


図 2. InertSustain Amide (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3.0 μm : GL サイエンス (株) 製)

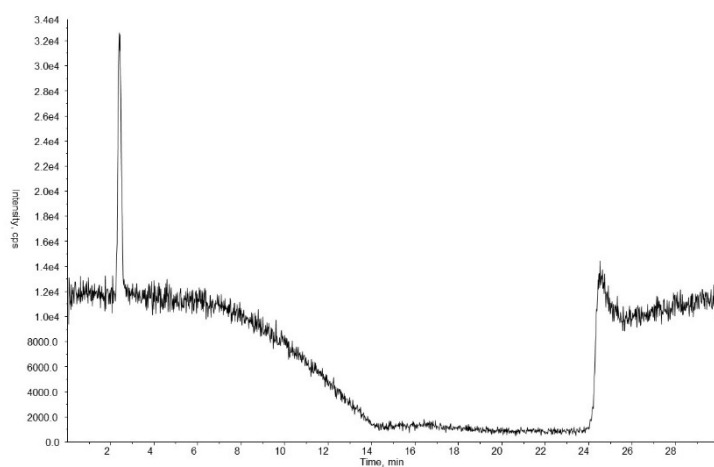


図 3. HILIC Column (内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3.0 μm : A 社製)