

## アピラマイシン試験法（畜産物）

### 1. 分析対象化合物

アピラマイシン

ジクロロイソエバニニック酸（加水分解によりジクロロイソエバニニック酸に変換される化合物を含む。）

### 2. 適用食品

畜産物

### 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。

アピラマイシン標準品 本品はアピラマイシン98%以上を含む。

ジクロロイソエバニニック酸標準品 本品はジクロロイソエバニニック酸98%以上を含む。

### 5. 試験溶液の調製

#### 1) 抽出

試料10.0 gにアセトン50 mLを加え、ホモジナイズした後、毎分3,000回転で5分間遠心分離し、上澄液を採る。残留物にアセトン25 mLを加えてホモジナイズし、上記と同様に遠心分離する。得られた上澄液を合わせ、アセトンを加えて正確に100 mLとする。

#### 2) 加水分解

1) で得られた溶液から正確に10 mLを分取し、40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物に1 mol/L水酸化ナトリウム溶液4 mLを加え、70°Cで2時間加熱する。放冷後、水10 mL及び酢酸エチル10 mLを加え振とうする。酢酸エチル層を捨て、水層にリン酸2 mLを加えた後、酢酸エチル15 mLで2回振とう抽出する。抽出液を合わせ、40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物にギ酸、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（1：100：900）混液2 mLを加えて溶かす。

#### 3) 精製

シリカゲルミニカラム（1,000 mg）にギ酸、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（1：100：900）混液10 mLを注入し、流出液は捨てる。このカラムに2) で得られた溶液を注入した後、ギ酸、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（1：100：900）混液8 mLを注入し、流出液は捨てる。次いでギ酸、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン（1：300：700）混液15 mLを注入し、溶出液を40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物をメタノールに溶かし、正確に1 mLとしたものを試験溶液とする。

### 6. 検量線の作成

ジクロロイソエバニニック酸標準品のメタノール溶液を数点調製し、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濃度は0.01 mg/Lである。

## 7. 定量

試験溶液をLC-MS/MSに注入し、6. の検量線でジクロロイソエバニニック酸の含量を求める。

## 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2.1 mm、長さ150 mm、粒子径3  $\mu\text{m}$

カラム温度：40°C

移動相：アセトニトリル及び0.01 vol%ギ酸混液（1：9）から（7：3）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（ $m/z$ ）

プリカーサーイオン249、プロダクトイオン190

プリカーサーイオン251、プロダクトイオン192

注入量：5  $\mu\text{L}$

保持時間の目安：5分

## 10. 定量限界

0.01 mg/kg

## 11. 留意事項

### 1) 試験法の概要

アビラマイシン及びその代謝物を試料からアセトンで抽出し、塩基性条件下で加水分解してジクロロイソエバニニック酸に変換する。酢酸エチルで洗浄後、リン酸酸性下酢酸エチルに転溶し、シリカゲル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。

### 2) 注意点

- ① 加水分解操作については、アビラマイシン標準品を用いて、加水分解が十分に行われていることを確認すること。
- ② 加水分解後の酢酸エチルでの洗浄及び酸性条件下での酢酸エチルへの転溶の際、エマルジョンが生成した場合は、毎分3,000回転で5分間遠心分離を行うこと。
- ③ ジクロロイソエバニニック酸の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。  
定量イオン（ $m/z$ ）：プリカーサーイオン249、プロダクトイオン190  
定性イオン（ $m/z$ ）：プリカーサーイオン251、プロダクトイオン192
- ④ 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、ジクロロイソエバニニック酸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。
- ⑤ 試験法開発時に検討した食品：豚の筋肉、豚の脂肪、豚の肝臓

## 12. 参考文献

なし

13. 類型  
C