

ホスホマイシン試験法（畜水産物）

1. 分析対象化合物

ホスホマイシン

2. 適用食品

畜水産物

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。

アンモニア水 25%アンモニア水（特級）

10 mmol/L酢酸アンモニウム溶液（pH 3） 酢酸アンモニウム0.77 gを量り採り水約900 mLに溶解し、酢酸を用いてpHを3に調整した後、水を加えて1 Lとする。

3級アルキルアミン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（150 mg） 内径8～9 mmのポリエチレン製のカラム管に、弱塩基性陰イオン交換樹脂150 mg を充てんしたもの又はこれと同等の分離特性を有するものを用いる。

ホスホマイシン二ナトリウム塩標準品 本品はホスホマイシン二ナトリウム塩 95%以上を含む。

5. 試験溶液の調製

1) 抽出

試料10.0 gにメタノール100 mLを加え、ホモジナイズした後、吸引ろ過する。ろ紙上の残留物にメタノール50 mLを加えてホモジナイズし、上記と同様にろ過する。得られたろ液を合わせ、メタノールで正確に200 mLとする。この溶液から正確に10 mLを分取し、40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物を水10 mLに溶かし、*n*-ヘキサン20 mLを加え振とう洗浄する。水層を分取した後、*n*-ヘキサン層に水10 mLを加え、水層を分取し、先の水層と合わせる。

2) 精製

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム（2 g）にメタノール及び水各10 mLを順次注入し、各流出液は捨てる。弱塩基性陰イオン交換樹脂ミニカラム（150 mg）にメタノール、2 vol%ギ酸及び水各10 mLを順次注入し、各流出液は捨てる。オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムの下部に弱塩基性陰イオン交換樹脂ミニカラムを連結し、1)で得られた溶液を注入し流出液を捨てる。次いで水10 mLを注入し、流出液を捨てる。オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムを外し、3級アルキルアミン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メタノール及び水各

10 mLを順次注入し、各流出液は捨てる。次いで10 mmol/L酢酸アンモニウム溶液 (pH 3) 20 mLを注入し、溶出液を40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物をアンモニア水、20 mmol/L炭酸水素アンモニウム溶液及びアセトニトリル (1 : 250 : 250) 混液に溶かし、正確に5 mLとしたものを試験溶液とする。

6. 検量線の作成

ホスホマイシン二ナトリウム塩標準品を水に溶かしてホスホマイシンとして1,000 mg/Lの標準原液とする。この標準原液をアンモニア水、20 mmol/L炭酸水素アンモニウム溶液及びアセトニトリル (1 : 250 : 250) 混液で適宜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0.05 mg/kgに相当する試験溶液中濃度は0.005 mg/Lである。

7. 定量

試験溶液をLC-MS/MSに注入し、6の検量線でホスホマイシンの含量を求める。

8. 確認試験

LC-MS/MSにより確認する。

9. 測定条件

(例1)

カラム：カルバモバイル基化学結合型シリカゲル 内径2.1 mm、長さ150 mm、粒子径3.5 μm

カラム温度：40°C

移動相：A液及びB液について下表の濃度勾配で送液する。

A液：アンモニア水及び10 mmol/L炭酸水素アンモニウム溶液 (1 : 500) 混液

B液：アンモニア水、50 mmol/L炭酸水素アンモニウム溶液及びアセトニトリル (1 : 100 : 400) 混液

時間 (分)	A液 (%)	B液 (%)
0	0	100
10	100	0
16	100	0

イオン化モード：ESI (-)

主なイオン (m/z)：プリカーサーイオン 137、プロダクトイオン 79、63

注入量：2 μL

保持時間の目安：5分

10. 定量限界

0.05 mg/kg

11. 留意事項

1) 試験法の概要

ホスホマイシンを試料からメタノールを用いて抽出し、*n*-ヘキサンで洗浄した後、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム及び3級アルキルアミン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、LC-MS/MSで定量及び確認する方法である。

2) 注意点

- ① ホスホマイシンの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 137、プロダクトイオン 63
定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン 137、プロダクトイオン 79
- ② 食品によっては、定性イオンのクロマトグラム上に妨害ピークの影響を受けるため、定性イオンでの定性確認が困難な場合は、以下の測定条件(例2)にて確認する。なお、測定条件(例2)で測定を実施する場合は、測定用標準溶液及び試験溶液はアンモニア水及び10 mmol/L炭酸水素アンモニウム溶液(1:500)混液にて調製する。
測定条件(例2)
カラム: 多孔性グラファイトカーボン 内径2.1 mm、長さ150 mm、粒子径3 μ m
カラム温度: 40°C
移動相: アンモニア水及び10 mmol/L炭酸水素アンモニウム溶液(1:500)混液
イオン化モード: ESI (-)
定量イオン (m/z) : プリカーサーイオン 137、プロダクトイオン 63
定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン 137、プロダクトイオン 79
注入量: 5 μ L
保持時間の目安: 4分
- ③ 試験法開発に検討した食品: 牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳、ぶり

12. 参考文献

なし

13. 類型

C