

※本報告書は、試験法開発における検討結果を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ください。

平成28年度

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

アピラマイシン試験法（畜産物）

## アビラマイシン試験法（畜産物）の検討結果

### 〔緒言〕

#### 1. 背景・目的

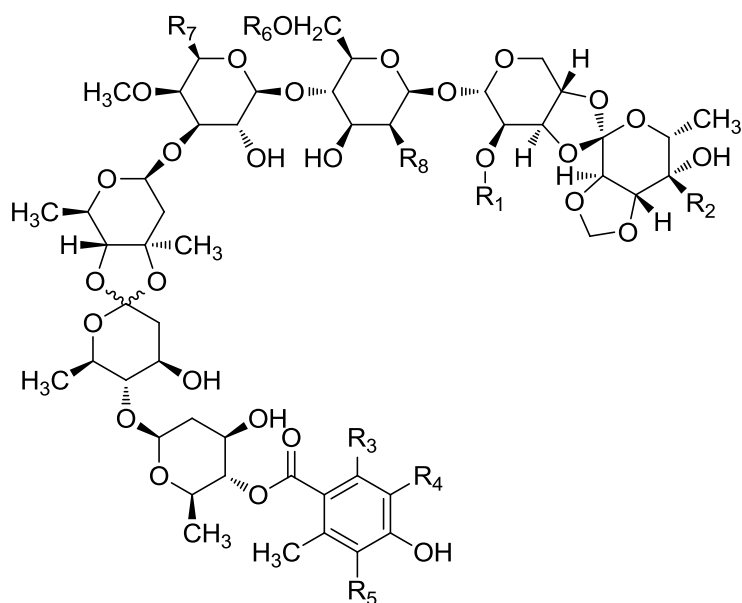
アビラマイシンは、Eli Lilly 社が開発したオルトソマイシン系抗生物質で、放線菌 *Streptomyces viridochromogenes* によって生産される。アビラマイシンは、グラム陽性菌に対して抗菌活性を示し、細菌のリボソーム 50S サブユニットに結合してタンパク質合成を阻害すると考えられている。国内では、豚及び鶏を対象とした飼料添加物として指定されており、動物用医薬品としては承認されていない。一方、海外においては、豚、鶏、七面鳥及びウサギの腸内細菌感染のコントロールを目的とし、動物用医薬品として使用されている。ヒト用医薬品としては使用されていない。

アビラマイシンは、現在までに図 1 に示した 16 成分が同定されている。各成分の比は、以下のようになっている。<sup>1)</sup>

アビラマイシン A： 60%以上  
アビラマイシン B： 18%未満  
アビラマイシン A 及び B： 70%以上  
その他の成分：6%未満

動物体内での主な代謝物としては、フラムビック酸（flambic acid、図 2）が知られている。<sup>1)</sup>

食品中の残留基準値は、アビラマイシン及びその代謝物を加水分解することで生成するジクロロイソエバニニック酸（DIA）に対して設定されているが（図 3）、公示試験法は示されていない。そこで本研究では、畜産物中のアビラマイシン試験法を開発することを目的とした。



成分	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>	R <sub>8</sub>	分子式	分子量
A	COCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	COCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	Cl	Cl	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	C <sub>61</sub> H <sub>88</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>32</sub>	1404.2
A'	COCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>	Cl	Cl	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	C <sub>58</sub> H <sub>84</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>31</sub>	1348.2
B	COCH <sub>3</sub>	COCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	Cl	Cl	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	C <sub>59</sub> H <sub>84</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>32</sub>	1376.2
C	COCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	CH(OH)CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	Cl	Cl	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	C <sub>61</sub> H <sub>90</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>32</sub>	1406.3
D <sub>1</sub>	H	COCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	Cl	Cl	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	C <sub>57</sub> H <sub>82</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>31</sub>	1334.2
D <sub>2</sub>	COCH <sub>3</sub>	CH(OH)CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	Cl	Cl	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	C <sub>59</sub> H <sub>86</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>32</sub>	1378.2
E	H	CH(OH)CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	Cl	Cl	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	C <sub>57</sub> H <sub>84</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>31</sub>	1336.2
F	COCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	COCH <sub>3</sub>	OH	H	Cl	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	C <sub>60</sub> H <sub>87</sub> ClO <sub>32</sub>	1355.8
G	CO(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	COCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	Cl	Cl	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	C <sub>62</sub> H <sub>90</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>32</sub>	1418.3
H	COCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	COCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	Cl	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	C <sub>61</sub> H <sub>89</sub> ClO <sub>32</sub>	1369.8
I	COCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	COCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	Cl	Cl	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	C <sub>60</sub> H <sub>86</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>32</sub>	1390.2
J	COCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	COCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	Cl	Cl	H	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	C <sub>60</sub> H <sub>86</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>32</sub>	1390.2
K	COCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	COCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	Cl	Cl	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> OH	OCH <sub>3</sub>	C <sub>61</sub> H <sub>88</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>33</sub>	1420.2
L	COCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	CHO	OCH <sub>3</sub>	Cl	Cl	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	C <sub>60</sub> H <sub>86</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>32</sub>	1390.2
M	COCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	COCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	Cl	Cl	CH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>	C <sub>60</sub> H <sub>86</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>32</sub>	1390.2
N	COCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	COCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	Cl	Cl	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OH	C <sub>60</sub> H <sub>86</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>32</sub>	1390.2

図1 アビラマイシンの構造

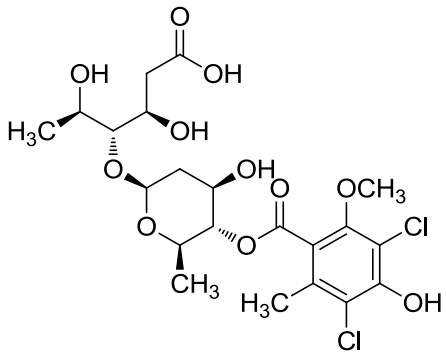


図2 フラムビック酸 (flambic acid) の構造

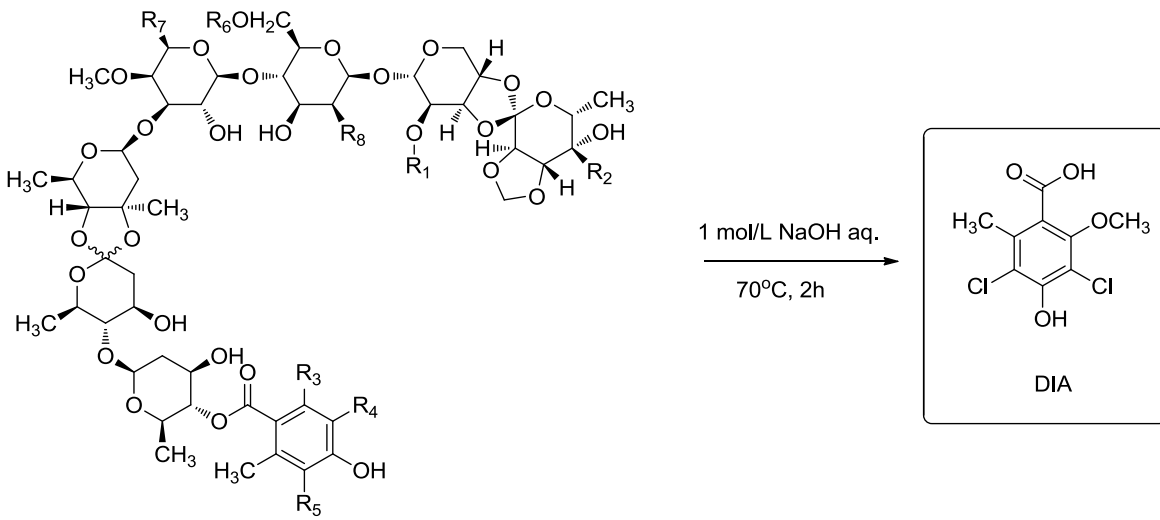


図3 加水分解反応

## 2. 基準値

アビラマイシンの基準値は、アビラマイシン及びその代謝物を加水分解することで生成するジクロロイソエバニニック酸（DIA）に対して設定されている。〔食安発 0424 第 1 号（H26.4.24）〕

食品名	基準値 (ppm)
豚の筋肉	0.2
その他の陸棲哺乳類に属する動物の筋肉	0.2
豚の脂肪	0.2
その他の陸棲哺乳類に属する動物の脂肪	0.2
豚の肝臓	0.3
その他の陸棲哺乳類に属する動物の肝臓	0.3
豚の腎臓	0.2
その他の陸棲哺乳類に属する動物の腎臓	0.2
豚の食用部分	0.3
その他の陸棲哺乳類に属する動物の食用部分	0.3
鶏の筋肉	0.2
その他の家きんの筋肉	0.2
鶏の脂肪	0.2
その他の家きんの脂肪	0.2
鶏の肝臓	0.3
その他の家きんの肝臓	0.3
鶏の腎臓	0.2
その他の家きんの腎臓	0.2
鶏の食用部分	0.3
その他の家きんの食用部分	0.3

基準値設定のない食品：含有するものであってはならない。

### 3. 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： アビラマイシン (Avilamycin)

構造式： 図 1 参照

分子式： 図 1 参照

分子量： 図 1 参照

化学名：

*O*-(1*R*)-4-*C*-acetyl-6-deoxy-2,3-*O*-methylene-*D*-galactopyranosylidene-(1→3,4)-2-*O*-(2-methyl-1-oxopropyl)- $\alpha$ -*L*-*lyxo*-pyranosyl *O*-2,6-dideoxy-4-*O*-(3,5-dichloro-4-hydroxy-2-methoxy-6-methylbenzoyl)- $\beta$ -*D*-*arabino*-hexopyranosyl-(1→4)-*O*-2,6-dideoxy-*D*-*arabino*-hexopyranosylidene-(1→3,4)-*O*-2,6-dideoxy-3-*C*-methyl- $\beta$ -*D*-*arabino*-hexopyranosyl-(1→3)-*O*-6-deoxy-4-*O*-methyl- $\beta$ -*D*-galactopyranosyl-(1→4)-2,6-di-*O*-methyl- $\beta$ -*D*-mannopyranoside (アビラマイシン A)

*O*-4-*C*-acetyl-6-deoxy-2,3-*O*-methylenehexopyranosylidene-(1→3,4)-2-*O*-acetyl-*L*-*lyxo*-pyranosyl *O*-2,6-dideoxy-4-*O*-(3,5-dichloro-4-hydroxy-2-methoxy-6-methylbenzoyl)- $\beta$ -*D*-*arabino*-hexopyranosyl-(1→4)-*O*-2,6-dideoxy-*D*-*ribo*-hexopyranosylidene-(1→3,4)-*O*-2,6-dideoxy-3-*C*-methyl-*D*-*arabino*-hexopyranosyl-(1→3)-*O*-6-deoxy-4-*O*-methyl- $\beta$ -*D*-galactopyranosyl-(1→4)-2,6-di-*O*-methyl-*D*-mannopyranoside (アビラマイシン B)

CAS 番号： 11051-71-1 (アビラマイシン)

69787-79-7 (アビラマイシン A)

73240-30-9 (アビラマイシン B)

外観： 白色粉末

融点<sup>a)</sup>： 166-169°C (アビラマイシン A)、179-182°C (アビラマイシン B)

溶解性 (アビラマイシン A、20°C)<sup>a)</sup>： 水 1 g/L、エタノール 4 g/L、メタノール 5 g/L、酢酸エチル 10 g/L、アセトン 50 g/L、ヘプタン < 1 g/L、クロロホルム 100 g/L

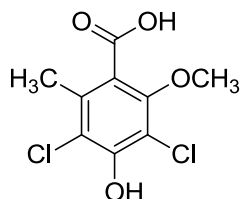
1-オクタノール/水分配係数 (log  $P_{ow}$ )<sup>b)</sup>： 0.681 (pH 9)、2.550 (pH 7)、3.970 (pH 4.5)

<sup>a)</sup> Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. (2009) Residue evaluation of certain veterinary drugs, 70th meeting 2008, 29-54.

<sup>b)</sup> Eli Lilly and Company. Avilamycin Safty data sheet.

分析対象化合物： ジクロロイソエバニニック酸 (dichloroisoverminic acid, DIA)

構造式：



分子式：  $C_9H_8Cl_2O_4$

分子量： 251.06

化学名： 3,5-dichloro-4-hydroxy-2-methoxy-6-methylbenzoic acid

CAS 番号： 4101-80-8

外観： 白色粉末

融点<sup>a)</sup>： 130°C

沸点 (計算値)<sup>b)</sup>：  $378.2 \pm 42.0^\circ\text{C}$  (760 Torr)

1-オクタノール/水分配係数 ( $\log P_{ow}$ 、計算値)<sup>b)</sup> :  $3.896 \pm 0.360$  (25°C)  
解離定数 ( $pK_a$ 、計算値)<sup>b)</sup> :  $3.53 \pm 0.38$  (25 °C)  
蒸気圧 (計算値)<sup>b)</sup> :  $2.1 \times 10^{-6}$  Torr (25 °C)

a) SciFinder (Buzzetti, F., *Experientia*, 24(4), 320-323 (1968))

b) SciFinder (Calculated using Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software V11.02)

#### 4. 開発メーカーの分析法<sup>2,3)</sup>

##### (1) 開発メーカーの試験溶液調製方法の概要

###### 秤 取

↓ 試料 1.00 g

###### 抽出

↓ アセトン 4 mL を加え、15 秒間振とう後、5 分間ボルテックス  
↓ 遠心分離 (4300 rpm、10 分間) し、上澄液を採る  
↓ 残留物にアセトン 4 mL を加え、15 秒間振とう後、5 分間ボルテックス  
↓ 遠心分離 (4300 rpm、10 分間) し、上澄液を採る  
↓ 残留物にアセトン 4 mL を加え、15 秒間振とう後、5 分間ボルテックス  
↓ 遠心分離 (4300 rpm、10 分間) し、上澄液を採る  
↓ 上澄液を合わせ、ターボバップを用いて 60°C でアセトンを除去

###### 加水分解

↓ 1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 4 mL を加え、30 秒間ボルテックス。70°C の水浴で 2 時間加熱

###### 転溶

↓ 85% リン酸 1 mL を加え、pH 1 に調整  
↓ 酢酸エチル 4 mL を加え、15 秒間振とう後、15 秒間ボルテックス  
↓ 遠心分離 (4300 rpm、10 分間) し、酢酸エチル層を採る  
↓ 水層に酢酸エチル 4 mL を加え、15 秒間振とう後、15 秒間ボルテックス  
↓ 遠心分離 (4300 rpm、10 分間) し、酢酸エチル層を採る  
↓ 水層に酢酸エチル 4 mL を加え、15 秒間振とう後、15 秒間ボルテックス  
↓ 遠心分離 (4300 rpm、10 分間) し、酢酸エチル層を採る  
↓ 酢酸エチル層を合わせる。ジカンバ (メタノール溶液 0.5 mL、内標) を加え、1 分間ボルテックス

###### アルミナ (中性) ミニカラム [Alumina N<sup>a)</sup> (1 g/6 mL)] 精製

↓ 酢酸エチル 10 mL でコンディショニング  
↓ 負荷。酢酸エチル 5 mL で容器を洗い、負荷  
↓ *n*-ヘキサン 5 mL、酢酸エチル 5 mL、メタノール 5 mL で洗浄  
↓ アセトニトリル/ギ酸 (95 : 5) 21 mL で溶出  
↓ ターボバップを用いて 50°C で溶媒除去  
↓ 残留物をメタノール 1 mL に溶解 (試料 1 g 相当/mL)

###### LC-MS/MS 測定

a) United Chemical Technologies 製

スキーム 1. 開発メーカーの試験溶液調製方法の概要

## (2) 測定条件

装置	型式	会社
MS	API 3000	Sciex
LC	1100 Series	Agilent

LC 条件																													
カラム	Synergi Polar-RP 80A (内径 4.6 mm、長さ 75 mm、粒子径 4 μm : Phenomenex 製)																												
ガードカラム	Security Guard C18 (内径 3.0 mm、長さ 4.0 mm : Phenomenex 製)																												
移動相流速	0.6 mL/min																												
注入量	10~25 μL																												
カラム温度	室温																												
移動相	A 液 : 0.1 vol% ギ酸溶液 B 液 : 0.1 vol% ギ酸・メタノール溶液																												
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>50</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>0.5</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>3.0</td> <td>21</td> <td>79</td> </tr> <tr> <td>4.0</td> <td>10</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>5.0</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>6.0</td> <td>0</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>6.1</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>8.0</td> <td>50</td> <td>50</td> </tr> </tbody> </table>		時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)	0.0	50	50	0.5	50	50	3.0	21	79	4.0	10	90	5.0	0	100	6.0	0	100	6.1	50	50	8.0	50	50
時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)																											
0.0	50	50																											
0.5	50	50																											
3.0	21	79																											
4.0	10	90																											
5.0	0	100																											
6.0	0	100																											
6.1	50	50																											
8.0	50	50																											
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	APCI (-)																												
測定イオン ( <i>m/z</i> )	<table border="1"> <tbody> <tr> <td>DIA</td> <td>249.0→190.0</td> </tr> <tr> <td>ジカンバ</td> <td>219.2→175.0</td> </tr> </tbody> </table>		DIA	249.0→190.0	ジカンバ	219.2→175.0																							
DIA	249.0→190.0																												
ジカンバ	219.2→175.0																												
保持時間	4.00 min (DIA)、4.33 min (ジカンバ)																												

## (3) 定量

DIA のピーク面積から絶対検量線法、または、ジカンバのピーク面積に対する DIA のピーク面積の比から内標準法により検量線を作成し、DIA の含量を求め、次式によりアビラマイシンの含量を求める。

$$\text{DIA の含量} \times 5.6 = \text{アビラマイシンの含量}$$



## [実験方法]

### 1. 試料

試料は、東京都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、ナイフミルを用いて細切均一化した。
- (2) 豚の脂肪： 可能な限り筋肉層を除き、ナイフミルを用いて細切均一化した。
- (3) 豚の肝臓： ナイフミルを用いて細切均一化した。

### 2. 試薬・試液

#### (1) 標準品

アピラマイシン標準品： 純度 98% (Eli Lilly 製)

成分	含量 (%)
A	81.50
B	4.96
C、K	0.97
C'	1.06
D <sub>1</sub> 、D <sub>2</sub>	0.70
L、M、N	1.79
J	1.05
I、A'	3.87
F	0.20
G	1.07
H	0.33
highest other	0.50
Total	98

DIA 標準品： 純度 99.0% (和光純薬製)

#### (2) 試薬

アセトン、酢酸エチル、*n*-ヘキサン： 残留農薬試験用 (関東化学製)

蒸留水、アセトニトリル、メタノール： LC-MS 用 (関東化学製)

塩化ナトリウム： 残留農薬試験用 (和光純薬工業製)

酢酸アンモニウム： 特級 (和光純薬工業製)

水酸化ナトリウム： 特級 (和光純薬工業製)

1 mol/L 塩酸： 容量分析用 (局方一般試験法標定品) (和光純薬工業製)

ギ酸： 試薬特級 (和光純薬工業製)

リン酸： 試薬特級 (85%) (和光純薬工業製)

シリカゲルミニカラム： InertSep SI (1 g/6 mL、ジーエルサイエンス製)

アルミナ (中性) ミニカラム： InertSep AL-N (1 g/6 mL、ジーエルサイエンス製)

#### (3) 試液

アピラマイシン標準原液： アピラマイシン標準品 10 mg を精秤し、アセトニトリルで溶解して 1.00 g/L の濃度の溶液を調製した。

DIA 標準原液： DIA 標準品 10 mg を精秤し、メタノールで溶解して 1.00 g/L の濃度の溶液を調製した。

アビラマイシン添加用標準溶液（定量限界濃度）： アビラマイシン標準原液をアセトンで希釈し、1.00 mg/L の濃度の溶液を調製した。

アビラマイシン添加用標準溶液（基準値濃度）： アビラマイシン標準原液をアセトンで希釈し、20.0 mg/L の濃度の溶液を調製した。

### 3. 装置等

ナイフミル： Grindomix GM200（Retsch 製）

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

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

遠心エバポレーター： EZ-2 Plus（Genevac 製）

遠心分離機： テーブルトップ多本架遠心機 8100（久保田商事製）

アルミブロック恒温槽： Dry Thermo Bath MG-2000（東京理化工械製）

試験管： IWAKI リム付き試験管、直径 18 mm、長さ 165 mm、肉厚 12 mm（AGC テクノグラス製）

#### LC-MS/MS

装置	型式	会社
MS	TQD	Waters
LC	Acquity UPLC	Waters

### 4. 測定条件

LC 条件			
カラム	InertSustain C18（内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm： ジェールサイエンス製）		
移動相流速	0.3 mL/min		
注入量	5 μL		
カラム温度	40℃		
移動相	A 液： 0.01 vol% ギ酸溶液 B 液： アセトニトリル		
グラジエント条件*			
グラジエント条件 1 (DIA のみを測定する場合)	時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)
	0.0	90	10
	8.0	30	70
	8.1	0	100
	13.0	0	100
13.1	90	10	
グラジエント条件 2 (DIA 及びアビラマイシン A を測定する場合)	時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)
	0.00	90	10
	12.00	0	100
	17.00	0	100
17.1	90	10	
MS 条件			
測定モード	SRM (DIA)、SIM (アビラマイシン A)		
イオン化モード	ESI (-)		
キャピラリー電圧	-3000 V		
ソース温度	120℃		

脱溶媒温度	350℃			
コーンガス	N <sub>2</sub> , 50 L/hr			
脱溶媒ガス	N <sub>2</sub> , 600 L/hr			
コリジョンガス	Ar, 3×10 <sup>-3</sup> mbar			
測定イオン (DIA)		イオン (m/z)	コーン電圧 (V)	コリジョン エネルギー (eV)
	定量イオン	248.9→189.8	20	20
	定性イオン	250.9→191.8	20	20
測定イオン (アビラマイシン A)		イオン (m/z)	コーン電圧 (V)	
	定量イオン	1401.5	130	
	定性イオン	1403.5	110	
保持時間	5.1 min (DIA) 、 9.0 min (アビラマイシン A)			

\*添加回収試験は「グラジエント条件1」で行った。

## 5. 定量

DIA 標準原液をメタノールで希釈し、以下の濃度の標準溶液を調製した。

定量限界濃度：0.0025、0.005、0.0075、0.01、0.0125 及び 0.015 mg/L

基準値濃度（豚の筋肉及び脂肪）：0.05、0.1、0.15、0.2、0.25 及び 0.3 mg/L

基準値濃度（豚の肝臓）：0.075、0.15、0.225、0.3、0.375 及び 0.45 mg/L

これらの溶液 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た。試験溶液 5 µL を LC-MS/MS に注入し、検量線から絶対検量線法により DIA の含量を算出した。（検量線の例を図 8-1～8-3 に示した。）

## 6. 添加試料の調製

基準値は DIA に対して設定されているため、評価濃度（定量限界または基準値濃度）に換算係数 5.6 を乗じてアビラマイシンに換算した濃度を添加した。

### (1) 定量限界濃度

試料 10.0 g に、1 mg/L アビラマイシン添加用標準溶液 0.56 mL (DIA として 0.01 ppm) を添加して混合後、30 分放置した。

### (2) 基準値濃度

豚の筋肉及び脂肪: 試料 10.0 g に、20 mg/L アビラマイシン添加用標準溶液 0.56 mL (DIA として 0.2 ppm) を添加して混合後、30 分放置した。

豚の肝臓: 試料 10.0 g に、20 mg/L アビラマイシン添加用標準溶液 0.84 mL (DIA として 0.3 ppm) を添加して混合後、30 分放置した。

## 7. 試験溶液の調製

### [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た。反応後の溶液を酢酸エチルで洗浄後、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で定量及び確認した。

#### (1) 抽出

試料10.0 gを量り採った。これにアセトン50 mLを加えてホモジナイズした後、遠心分離（毎分3000回転、5分間）し、上澄液を採った。残留物にアセトン25 mLを加えて同様に操作し、上澄液を合わせてアセトンで100 mLに定容し、抽出液とした。

#### (2) 加水分解

試験管にホールピペットで抽出液10 mL（試料1 g相当）を採り、遠心エバポレーターを用いて40°C以下で約0.5 mLまで濃縮後、窒素気流により溶媒を除去した。残留物に1 mol/L水酸化ナトリウム溶液4 mLを加え、約1分間超音波処理し、よく混合した。試験管上部にアルミホイルを被せ、アルミブロック恒温槽を用いて70°Cで2時間加熱した。

#### (3) 酢酸エチル洗浄及び酢酸エチル転溶

放冷後、(2)で得られた溶液を50 mL遠心管に移した。水10 mL及び酢酸エチル10 mLを用いて、試験管を洗い、遠心管に合わせ、5分間振とう後、遠心分離（毎分3000回転、5分間）した。酢酸エチル層を捨て、水層に85%リン酸2 mLを加えた。酢酸エチル15 mLを加え、5分間振とう後、遠心分離（毎分3000回転、5分間）し、酢酸エチル層を採った。水層に酢酸エチル15 mLを加えて同様に操作し、得られた酢酸エチル層を合わせ、ロータリーエバポレーターを用いて40°C以下で約1 mLまで減圧濃縮後、窒素気流により溶媒を除去した。残留物に酢酸エチル/*n*-ヘキサン/ギ酸（100 : 900 : 1）2 mLを加え、約1分間超音波処理し、溶解した。

#### (4) シリカゲルミニカラム精製

シリカゲルミニカラム [InerSep SI (1 g/6 mL)] に酢酸エチル/*n*-ヘキサン/ギ酸（100 : 900 : 1）10 mLを注入し、流出液は捨てた。このカラムに、(3)で得られた溶液を注入した後、酢酸エチル/*n*-ヘキサン/ギ酸（100 : 900 : 1）8 mL（負荷液と合わせて10 mL）を注入し、流出液を捨てた。酢酸エチル/*n*-ヘキサン/ギ酸（300 : 700 : 1）15 mLで溶出し、ロータリーエバポレーターを用いて40°C以下で約1 mLまで減圧濃縮後、窒素気流により溶媒を除去した。この残留物をメタノール1 mLに溶解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0.1 mLを採り、窒素気流により溶媒を除去した後、添加回収試験における回収率100%相当濃度のDIA溶媒標準溶液0.1 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。

[分析法フローチャート]

**秤 取**

↓ 試料 10.0 g

**抽出**

- ↓ アセトン 50 mL を加え、ホモジナイズ
- ↓ 遠心分離（毎分 3000 回転、5 分間）し、上澄液を採る
- ↓ 残留物にアセトン 25 mL を加え、ホモジナイズ
- ↓ 遠心分離（毎分 3000 回転、5 分間）し、上澄液を採る
- ↓ 上澄液を合わせ、アセトンを加えて 100 mL に定容
- ↓ 抽出液 10 mL（試料 1 g 相当）を試験管に採り、溶媒を除去

**加水分解**

↓ 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

**酢酸エチル洗浄**

- ↓ 放冷後、遠心管に移す
- ↓ 水 10 mL 及び酢酸エチル 10 mL を用いて試験管を洗い、遠心管に合わせる
- ↓ 5 分間振とう後、遠心分離（毎分 3000 回転、5 分間）
- ↓ 酢酸エチル層を捨てる

**転溶**

- ↓ 水層に 85%リン酸 2 mL を加える
- ↓ 酢酸エチル 15 mL を加え、5 分間振とう
- ↓ 遠心分離（毎分 3000 回転、5 分間）し、酢酸エチル層を採る
- ↓ 水層に酢酸エチル 15 mL を加え、5 分間振とう
- ↓ 遠心分離（毎分 3000 回転、5 分間）し、酢酸エチル層を合わせ、溶媒を除去
- ↓ 残留物を酢酸エチル/*n*-ヘキサン/ギ酸（100 : 900 : 1）2 mL に溶解

**シリカゲルミニカラム [InerSep SI (1 g/6 mL)] 精製**

- ↓ 酢酸エチル/*n*-ヘキサン/ギ酸（100 : 900 : 1）10 mL でコンディショニング
- ↓ 負荷
- ↓ 酢酸エチル/*n*-ヘキサン/ギ酸（100 : 900 : 1）8 mL（負荷液と合わせて 10 mL）で洗浄
- ↓ 酢酸エチル/*n*-ヘキサン/ギ酸（300 : 700 : 1）15 mL で溶出
- ↓ 溶媒を除去
- ↓ 残留物をメタノール 1 mL に溶解（試料 1 g 相当/mL）

**LC-MS/MS 測定**

スキーム 2. 確立した試験溶液調製方法の概要

## [結果及び考察]

### 1. 換算係数について

開発メーカーの分析法<sup>2,3)</sup>では、以下のように換算係数 5.6 を用いて DIA 含量をアビラマイシン含量に換算している。

$$\text{DIA の含量} \times 5.6 = \text{アビラマイシンの含量}$$

アビラマイシンの基準値は DIA に対して設定されているため、DIA 含量をアビラマイシン含量に換算する必要はない。しかし、試験法の性能評価を行う際には換算する必要があるため、本検討で用いたアビラマイシン標準品での DIA 含量からアビラマイシン含量への換算係数を求めた。アビラマイシンの各成分の分子量にそれぞれの組成比を乗じたものの和から平均分子量を求め(表 1)、DIA の分子量 251.06 で除したところ、5.57~5.58 となった(表 2)。換算係数 5.6 に対する比は 0.995~0.997 であり、試験法の性能評価を行う上では、開発メーカーの分析法<sup>2,3)</sup>と同様に換算係数 5.6 を用いても問題はないと判断した。

表 1 アビラマイシンの平均分子量

成分	含量 (%) <sup>1)</sup>	分子量		分子量の範囲			分子量×組成比 <sup>3)</sup>				
				最小	最大	平均	最小	最大	平均		
A	81.50	1404.24	A	1404.24	1404.24	1404.24	1167.81	1167.81	1167.81		
B	4.96	1376.19	B	1376.19	1376.19	1376.19	69.65	69.65	69.65		
C、K	0.97	1406.25	C	1420.24	K	1406.25	1420.24	1413.25	13.92	14.06	13.99
C'	1.06	1406.25	C'			1406.25	1406.25	1406.25	15.21	15.21	15.21
D <sub>1</sub> 、D <sub>2</sub>	0.70	1334.15	D <sub>1</sub>	1378.20	D <sub>2</sub>	1334.15	1378.20	1356.18	9.53	9.84	9.69
L、M、N	1.79	1390.21	L,M,N			1390.21	1390.21	1390.21	25.39	25.39	25.39
J	1.05	1390.21	J			1390.21	1390.21	1390.21	14.90	14.90	14.90
I、A'	3.87	1348.17	A'	1390.21	I	1348.17	1390.21	1369.19	53.24	54.90	54.07
F	0.20	1355.77	F			1355.77	1355.77	1355.77	2.77	2.77	2.77
G	1.07	1418.26	G			1418.26	1418.26	1418.26	15.49	15.49	15.49
H	0.33	1369.79	H			1369.79	1369.79	1369.79	4.61	4.61	4.61
その他	0.50	不明				1334.15	1420.24	1381.16 <sup>2)</sup>	6.81	7.25	7.05
合計	98							平均分子量	1399.32	1401.87	1400.62

1) メーカー提供標準品の添付文書

2) 分子量不明(最小 1334.15、最大 1420.24、平均 1381.16(全成分の平均)として計算)

3) 組成比=各成分の含量/アビラマイシンの純度(98%)

表 2 DIA 含量からアビラマイシン含量への換算係数

	アビラマイシン A	アビラマイシン(全成分)		
		最小	最大	平均
平均分子量	1404.24	1399.32	1401.87	1400.62
換算係数(平均分子量/251.06 <sup>4)</sup> )	5.59	5.57	5.58	5.58
換算係数 5.6 に対する比	0.999	0.995	0.997	0.996

4) DIA の分子量 251.06

## 2. 測定条件の検討

### (1) DIA の測定条件の検討

#### ①MS条件の検討

DIAは、スキャン測定においてESI (+) モードでは検出されず、ESI (-) モードでの測定が可能であった。コーン電圧-20Vでのマススペクトルを図4に示した。脱プロトン分子 ( $m/z$  249、[M-H]<sup>-</sup>) 及びその塩素原子同位体 ( $m/z$  251) のイオンが強く観測されたため、これらをプリカーサーイオンとした。 $m/z$  249をプリカーサーイオンとした場合、プロダクトイオンとして $m/z$  190及び205が観測された(図5)。一方、 $m/z$  251をプリカーサーイオンとした場合、プロダクトイオンとして $m/z$  192及び207が観測された(図6)。後述するLC条件で測定を行ったところ、 $m/z$  249→205及び $m/z$  251→207では若干バックグラウンドが高く、S/Nが低くなり、 $m/z$  249→190次いで $m/z$  251→192で高いS/Nが得られた。

以上の結果から、ESI (-) モードで測定し、 $m/z$  249→190を定量用、 $m/z$  251→192を定性用の測定イオンとして採用することとした。

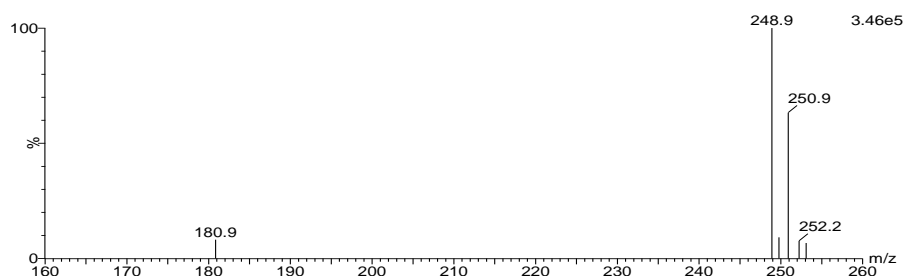


図4 DIAのマススペクトル

スキャン範囲： $m/z$  160～260、測定条件：ESI (-)、コーン電圧 -20 V

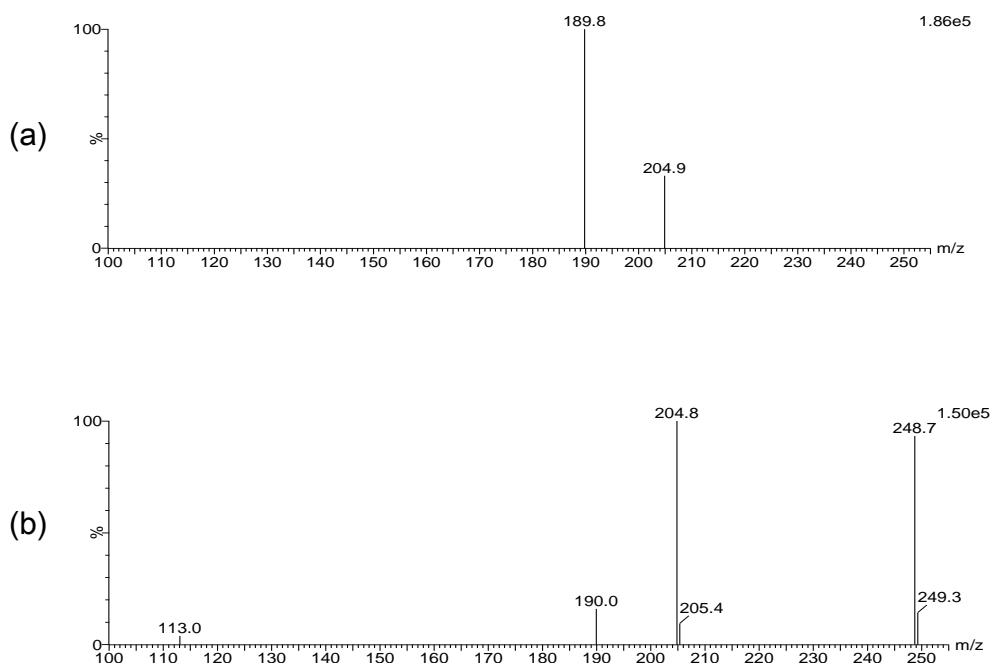


図5 DIAのプロダクトイオンスペクトル

プリカーサーイオン： $m/z$  248.9、スキャン範囲： $m/z$  100～260、測定条件：ESI (-)、コーン電圧 -20 V、コリジョンエネルギー (a) -20 eV、(b) -10 eV

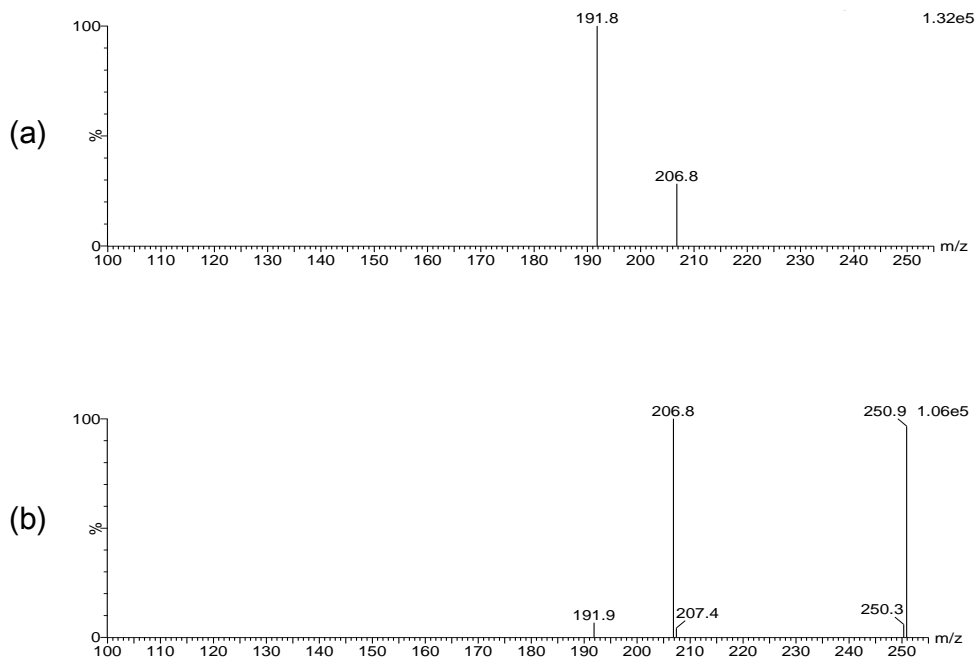


図6 DIAのプロダクトイオンスペクトル

プリカーサーイオン： $m/z$  250.9、スキャン範囲： $m/z$  100～260、測定条件：ESI（－）、  
 コーン電圧 -20 V、コリジョンエネルギー (a) -20 eV、 (b) -10 eV

## ②LC条件の検討

### a. 移動相条件

オクタデシルシリル化シリカゲルカラム（InertSustain C18、ジーエルサイエンス製）を用いて移動相条件を検討した。メタノール系とアセトニトリル系を比較したところ、アセトニトリル系の方が高いS/N（約1.5倍）が得られた。添加剤についてギ酸、酢酸及び酢酸アンモニウムを検討した結果、ギ酸または酢酸を添加することで良好なピーク形状が得られ、ギ酸の方が酢酸よりも若干S/Nが高かった。ギ酸の添加濃度について0.01、0.05及び0.1 vol%を検討したところ、0.01 vol%で最も高いS/Nが得られた。アイソクラティック及びグラジエント溶出を比較したところ、アイソクラティック溶出（0.01%ギ酸/アセトニトリル（75:25））では、ピーク幅が広がったのに対し、グラジエント溶出では良好なピーク形状が得られ、S/Nが向上した。以上の結果から、移動相として0.01 vol%ギ酸及びアセトニトリルを用いて、グラジエント溶出を行うこととした。

### b. 注入溶媒（試験溶液の調製溶媒）

図7に各溶媒で調製した標準溶液のクロマトグラムを示した。アセトニトリル/水（1:1）及びメタノールを用いてLC-MS/MSに注入した場合は良好なピーク形状が得られたが、アセトニトリルを用いた場合は若干リーディングし、ピーク幅が広がった。検量線を作成したところ、アセトニトリルを用いた場合は直線性が得られなかったが（ $r^2 < 0.99$ ）、アセトニトリル/水（1:1）及びメタノールでは良好な直線性（ $r^2 > 0.997$ ）が得られた（図8-1～8-3）。アセトニトリル、アセトニトリル/水（1:1）及びメタノールを用いて0.1及び0.01  $\mu\text{g/mL}$ の標準溶液を調製し、ピーク面積を比較した結果を表3に示した。アセトニトリル/水（1:1）及びメタノールで調製した標準溶液のピーク面積は同程度であった。一方、アセトニトリルで調製した場合はアセトニトリル/水（1:1）やメタノールで調製した場合と比較してピーク面積が顕著に小さくなった。これはDIAのアセトニトリルへの溶解性が低いことが原因と推察された。



一方、豚の筋肉、脂肪及び肝臓のシリカゲルミニカラム精製後の残留物は、アセトニトリル及びメタノールにはよく溶解したが、アセトニトリル/水（1：1）への溶解性は低かった。

以上の結果から、検量線の直線性、ピーク強度及び面積、ピーク形状及び残留物の溶解性が良いメタノールを注入溶媒（試験溶液の調製溶媒）とすることとした。

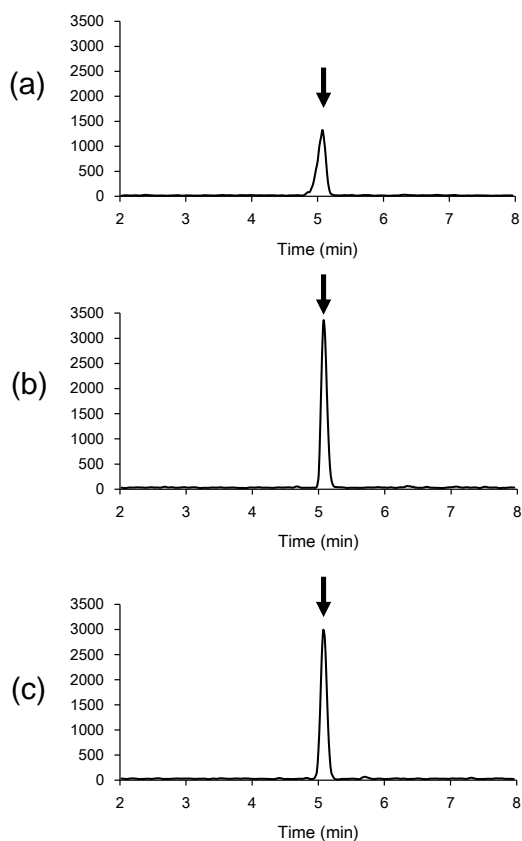


図 7 DIA のクロマトグラム

(0.01 µg/mL、注入量 5 µL、*m/z* 248.9→189.8)

標準溶液の調製溶媒 (a) アセトニトリル、(b) アセトニトリル/水（1：1）、(c) メタノール

表 3 各溶媒での DIA のピーク面積

	ピーク面積比 <sup>1)</sup>	
	アセトニトリル	アセトニトリル/水（1：1）
0.01 µg/mL	0.57	1.00
0.1 µg/mL	0.87	0.97

1) メタノールで調製した標準溶液のピーク面積を 1 としたときのピーク面積比

操作方法： 標準溶液（10 µg/mL、メタノール）をホールピペット（1 mL）とメスフラスコ（10 mL 容）を用いて希釈して 0.1 及び 0.01 µg/mL の標準溶液を調製し、LC-MS/MS で測定した。希釈溶媒にはアセトニトリル、アセトニトリル/水（1：1）及びメタノールを用いた。

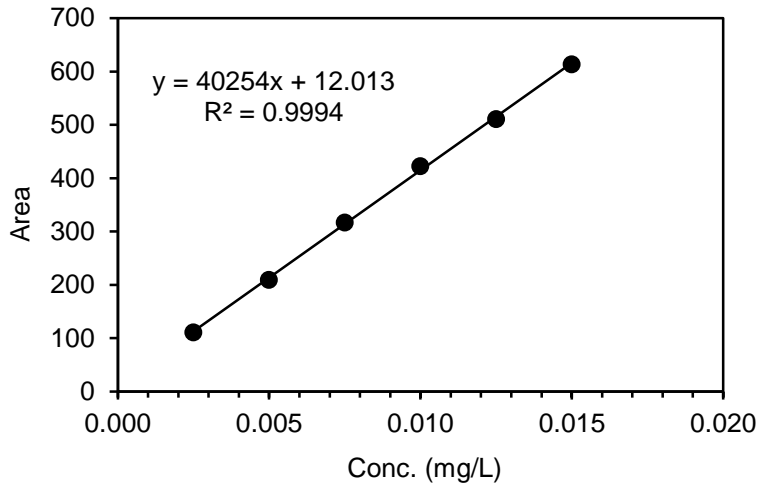


図 8-1 DIA の検量線の例 (0.0025~0.015 mg/L、注入溶媒メタノール)

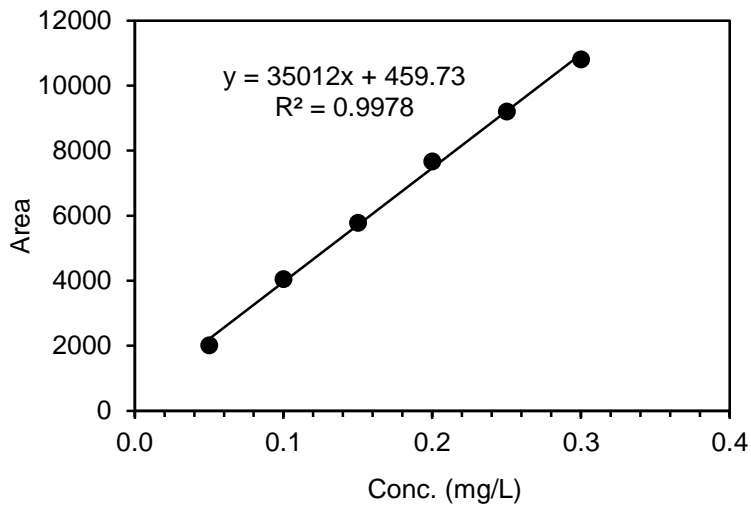


図 8-2 DIA の検量線の例 (0.05~0.3 mg/L、注入溶媒メタノール)

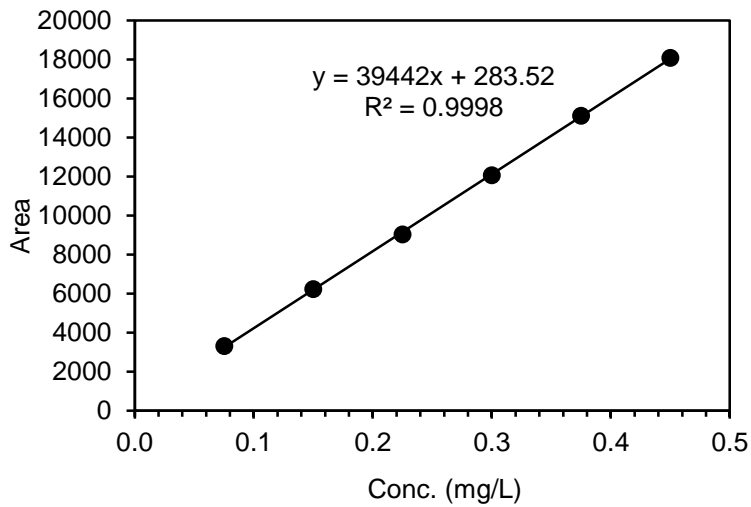


図 8-3 DIA の検量線の例 (0.075~0.45 mg/L、注入溶媒メタノール)

### ③定量限界

定量限界の算出結果を以下に示した。

$$0.01 \text{ mg/kg} \quad \left[ \left[ \text{試験溶液量 } 1 \text{ (mL)} \right] / \left[ \text{試験溶液中の試料量 } 1 \text{ (g)} \right] \right. \\ \left. \times \left[ \text{分析対象化合物の定量限界相当量 } 0.05 \text{ (ng)} \right] / \left[ \text{注入量 } 5 \text{ (}\mu\text{L)} \right] \right]$$

### (2) アビラマイシンの測定条件の検討

アビラマイシンの基準値は DIA に対して設定されているため、基準値判定の目的ではアビラマイシンを測定する必要はない。しかし、加水分解反応の進行状況を確認するためには、アビラマイシンについても分析した方がよいと考え、用いた標準品で最も含有量の高いアビラマイシン A の測定条件を検討した。

アビラマイシン A は、スキャン測定において ESI (+) モードでは検出されず、ESI (-) モードでの測定が可能であった。コーン電圧-130Vでのマスペクトルを図9に示した。脱プロトン分子( $m/z$  1401.5、[M-H])及びその同位体イオン ( $m/z$  1403.5 等) が観測された。これらをプリカーサーイオンとして、コリジョンエネルギーを 10~80 eV に設定してプロダクトスキャンを行ったが、フラグメントイオンは観測されなかった。このため、SIM での測定を行うこととし、 $m/z$  1401.5 を定量イオン、 $m/z$  1403.5 を定性イオンとすることとした。なお、アビラマイシン A 以外の成分は標準品中の濃度が低く、スキャン測定では確認することができなかったため、アビラマイシン A のみを測定することとした。

実験方法の『4. 測定条件』に示した「グラジエント条件2」で測定を行った結果、アビラマイシンAは良好なピーク形状が得られた (図10)。

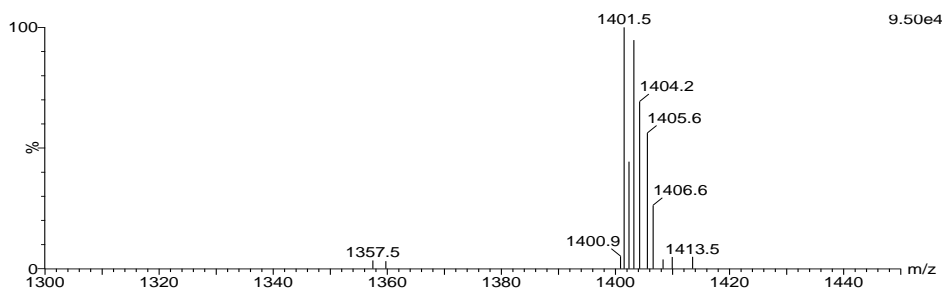


図9 アビラマイシンAのマスペクトル

スキャン範囲： $m/z$  1300~1450、測定条件：ESI (-)、コーン電圧 -130 V

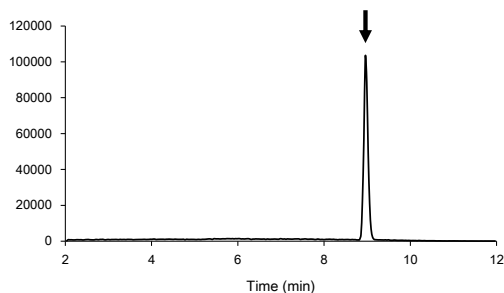


図10 アビラマイシンAのクロマトグラム

(アビラマイシンとして 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $m/z$  1401.5)

### 3. 試験溶液調製方法の検討

#### (1) 抽出

抽出溶媒は、開発メーカーの分析法<sup>2,3)</sup>と同様にアセトンを用いた。

#### (2) 転溶操作の検討

##### 1) DIA

##### ① 転溶溶媒の検討

DIA を表 4 に示した水溶液（水層）15 mL に溶解し、酢酸エチル 15 mL で 2 回抽出した。その結果、水層の pH が 7 の場合は食塩の有無に関わらず低回収率であったが、水層の pH を塩酸またはリン酸を用いて 2 以下とすると食塩を加えない場合においても、転溶操作を 2 回行うことでほぼ 100% の良好な回収率が得られた（表 4）。しかし、塩酸酸性下酢酸エチルで転溶した場合、翌日測定を行うと DIA のピークが消失した。リン酸酸性下酢酸エチルで転溶した場合は 3 日後に測定した場合においても調製直後と同等のピークが得られた。一方、転溶溶媒として *n*-ヘキサンを用いた場合は、食塩を加え、水層の pH を塩酸またはリン酸で 1 とした場合においても低回収率となった。これらの結果から、リン酸を用いて pH 2 以下とし、酢酸エチルで転溶することとした。

表4 転溶操作における回収率

水層			有機層	回収率 (%)		
食塩濃度	pH	酸		1 回目	2 回目	合計
-	1	塩酸	酢酸エチル	95	5	100
-	2	塩酸	酢酸エチル	98	3	101
-	1	リン酸	酢酸エチル	99	3	102
-	2	リン酸	酢酸エチル	99	4	103
-	7	-	酢酸エチル	46	15	61
10%	7	-	酢酸エチル	51	0	51
10%	1	塩酸	<i>n</i> -ヘキサン	1	1	2
10%	1	リン酸	<i>n</i> -ヘキサン	1	1	2

操作方法： DIA 標準溶液 1 mg/L を 0.1 mL (0.1 µg) 採り、窒素気流下、溶媒を除去した。表 4 に示した水溶液（水層）15 mL に溶解後、酢酸エチルまたは *n*-ヘキサンで 2 回（各 15 mL）振とうし、有機層を採り、溶媒を除去後、メタノールに溶解して LC-MS/MS で測定した。

##### ② 洗浄溶媒の検討

加水分解（塩基性条件）後の反応液を *n*-ヘキサンや酢酸エチル等で洗浄し、その後、酸性条件下酢酸エチルで転溶を行うことができれば、中性～塩基性の低極性夾雑成分を除去することが可能であるため、洗浄溶媒を検討した。塩基条件下（pH 13）、水層を *n*-ヘキサンまたは酢酸エチルで洗浄後、リン酸で酸性にし、酢酸エチルで 2 回転溶を行ったところ、いずれも良好な回収率が得られた（表 5）。豚の脂肪や肝臓での加水分解（70℃、2 時間）後の反応液を *n*-ヘキサンを用いて洗浄を行うと、有機層がゲル化してしまうのに対し、酢酸エチルを用いて洗浄した場合はゲル化しなかった。このため、加水分解後の反応液を酢酸エチルで洗浄した後、水層をリン酸で酸性（pH 2 以下）にし、酢酸エチルで 2 回転溶することとした。なお、反応液（1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 4 mL）に水 10 mL を加えた後、85%リン酸を 2 mL 加えると pH 1.0、0.5 mL 加えると pH 2.3 となったため、リン酸 2 mL を加

えることとした。豚の筋肉、脂肪及び肝臓でのリン酸添加後の水層の pH はそれぞれ 1.0、1.0 及び 0.9 となり、マトリックス存在下でもリン酸 2 mL を添加することで pH 2 以下となることが確認された。

表5 洗浄（塩基性条件下）及び酢酸エチル転溶（酸性条件下）での回収率

洗浄溶媒	洗浄画分	回収率 (%)		合計
		酢酸エチル転溶画分		
		1 回目	2 回目	
n-ヘキサン	0	99	4	103
酢酸エチル	0	102	3	105

操作方法： DIA 標準溶液 1 mg/L を 0.1 mL (0.1 µg) 採り、溶媒を除去した。1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 4 mL を加えて溶解後、水 10 mL 及び洗浄溶媒 10 mL を加えて振とうし、有機層を採った（洗浄画分）。水層に 85% リン酸 2 mL を加えた後、酢酸エチル 15 mL で 2 回振とうし、酢酸エチル層を採った（酢酸エチル転溶画分）。各画分の溶媒を除去後、メタノールに溶解して LC-MS/MS で測定した。

## 2) アピラマイシン A

アピラマイシンについても、DIA と同様に、塩基性条件下酢酸エチルで洗浄した後、水層をリン酸で酸性にし、酢酸エチルで 2 回転溶した（表 6）。その結果、アピラマイシン A はいずれの画分にも移行しなかった。DIA への変換も確認されなかった。中性条件では酢酸エチル層に移行したことから（表 7）、酸性または塩基条件では分解する可能性が示唆された。

表6 洗浄（塩基性条件下）及び酢酸エチル転溶（酸性条件下）での回収率

洗浄画分	回収率 (%)		合計
	酢酸エチル転溶画分		
	1 回目	2 回目	
0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

括弧内は DIA

操作方法： アピラマイシン標準溶液 1 mg/L を 0.1 mL (0.1 µg) 採り、溶媒を除去した。1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 4 mL を加えて溶解後、水 10 mL 及び酢酸エチル 10 mL を加えて振とうし、酢酸エチル層を採った（洗浄画分）。水層に 85% リン酸 2 mL を加えた後、酢酸エチル 15 mL で 2 回振とうし、酢酸エチル層を採った（酢酸エチル転溶画分）。各画分の溶媒を除去後、アセトニトリルに溶解して LC-MS/MS で測定した。

表7 転溶（中性条件）での回収率

水層		有機層	回収率 (%)		
食塩濃度	pH		1 回目	2 回目	合計
10%	7	酢酸エチル	100 (0)	0 (0)	100 (0)

括弧内は DIA

操作方法： アピラマイシン標準溶液 1 mg/L を 0.1 mL (0.1 µg) 採り、溶媒を除去した。10% 食塩水 15 mL に溶解後、酢酸エチル 15 mL で 2 回振とうし、酢酸エチル層を採った。各画分の溶媒を除去後、アセトニトリルに溶解して LC-MS/MS で測定した。

そこで、アビラマイシン A の酸性または塩基性条件下での安定性について検討した。表 8 に示した溶媒でアビラマイシン標準溶液を調製し、調製直後及び 20 時間後に LC-MS/MS で測定した。その結果、いずれの条件においても 20 時間以内にピークが消失し、DIA への変換は確認されなかった。これらの結果から、アビラマイシンは塩基性条件下での洗浄または酸性条件下での転溶の際に分解すると考えられた。また、DIA への変換は確認されなかったことから、室温条件では DIA まで加水分解反応が進まないと推察された。このため、アビラマイシンの分析による加水分解反応の進行状況の確認は行わないこととした。

表 8 各調製溶媒でのアビラマイシン A 標準溶液のピーク面積

	溶媒	アビラマイシンの濃度 (µg/mL)	調製直後	20 時間後
①	アセトニトリル/1 mol/L 水酸化ナトリウム (9:1)	0.1	98 (0)	0 (0)
②	アセトニトリル/0.01 mol/L 塩酸 (9:1)	0.1	6 (0)	0 (0)
③	アセトニトリル/85%リン酸 (9:1)	10	0 (0)	0 (0)

括弧内は DIA

①及び②は、アセトニトリル/水 (9 : 1) で調製した標準溶液のピーク面積を 100%とした

③はアセトニトリルで 100 倍希釈して測定した。アセトニトリル/水 (999 : 1) で調製した標準溶液のピーク面積を 100%とした。

### (3) シリカゲルミニカラム精製

シリカゲルミニカラム [Inertsep SI (1 g/6 mL)] を用いた精製を検討した。表9にカラムを溶出溶媒10 mLでコンディショニングした後、DIAを負荷・溶出したときの溶出状況を示した。DIAは酢酸エチル及びn-ヘキサンの混合溶媒では溶出せず、酸を加えると溶出した。そこで、酢酸エチル/n-ヘキサン/ギ酸の比率を検討した。DIAは酢酸エチル/n-ヘキサン/ギ酸 (100 : 900 : 1) 25 mLでは溶出されなかったが、酢酸エチル/n-ヘキサン/ギ酸 (200 : 800 : 1) では25 mL、酢酸エチル/n-ヘキサン/ギ酸 (300 : 700 : 1) では15 mLで良好な回収率が得られた。

表10に酢酸エチル/n-ヘキサン/ギ酸 (100 : 900 : 1) で洗浄後、酢酸エチル/n-ヘキサン/ギ酸 (300 : 700 : 1) で溶出した場合の回収率を示した。DIAは、酢酸エチル/n-ヘキサン/ギ酸 (100 : 900 : 1) 10 mLでは溶出せず、酢酸エチル/n-ヘキサン/ギ酸 (300 : 700 : 1) 15 mLで溶出した。

以上の結果から、酢酸エチル/n-ヘキサン/ギ酸 (100 : 900 : 1) 10 mLで洗浄後、酢酸エチル/n-ヘキサン/ギ酸 (300 : 700 : 1) 15 mLで溶出することとした。

表9 シリカゲルミニカラムからの各溶媒での回収率

負荷・溶出溶媒	回収率 (%)					
	0-5 (mL)	5-10 (mL)	10-15 (mL)	15-20 (mL)	20-25 (mL)	合計
酢酸エチル/n-ヘキサン (300 : 700)	0	0	0	0	0	0
酢酸エチル/n-ヘキサン/ギ酸 (100 : 900 : 1)	0	0	0	0	0	0
酢酸エチル/n-ヘキサン/ギ酸 (200 : 800 : 1)	0	28	62	10	1	101
酢酸エチル/n-ヘキサン/ギ酸 (300 : 700 : 1)	19	81	1	0	0	101

負荷量 : 0.1 µg

表10 シリカゲルミニカラムからの回収率 (%)

酢酸エチル/ <i>n</i> -ヘキサン/ギ酸 (900 : 100 : 1)		酢酸エチル/ <i>n</i> -ヘキサン/ギ酸 (300 : 700 : 1)				合計
0-5 (mL)	5-10 (mL)	0-5 (mL)	5-10 (mL)	10-15 (mL)	15-20 (mL)	
0	0	71	25	1	0	96

負荷量 : 0.1 µg

(4) アルミナ (中性) ミニカラム精製

開発メーカーの分析法<sup>2,3)</sup>において用いられているアルミナ (中性) ミニカラム精製について検討した。アルミナ (中性) ミニカラム [Inertsep AL-N (1 g/6 mL)] を用いて、メーカーの分析法と同条件で溶出したときの溶出状況を表 11 に示した。DIA は洗浄画分 (Fr.1~4) には溶出せず、溶出画分 (Fr.5、アセトニトリル/ギ酸 (95:5) 21 mL) に溶出したが、アセトニトリル/ギ酸 (95:5) を溶出溶媒として用いるとカラムから充てん剤も溶出したため、アルミナ (中性) ミニカラムでの精製は採用しなかった。

表11 アルミナ (中性) ミニカラムからの回収率 (%)

画分	Fr.1 <sup>1)</sup>	Fr.2	Fr.3	Fr.4	Fr.5	合計
溶出溶媒	酢酸エチル	<i>n</i> -ヘキサン	酢酸エチル	メタノール	アセトニトリル/ ギ酸 (95:5)	
溶媒量	17 mL	5 mL	5 mL	5 mL	21 mL	
回収率 (%)	0	0	0	0	88	

1) 酢酸エチル 10 mL でミニカラムをコンディショニングした後、DIA 0.1 µg を酢酸エチル 12 mL に溶解して負荷した。

(5) 加水分解

加水分解反応の温度及び時間について最適化を行った。

まず、アピラマイシンの標準品に 1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を加えて、反応温度を 60、70 及び 80°C とし、0.25、0.5、1、2 及び 4 時間での回収率を求めた。その結果、60°C では 4 時間、70°C では 1 時間、80°C では 0.5 時間でほぼ 100% の回収率が得られた (図 11)。

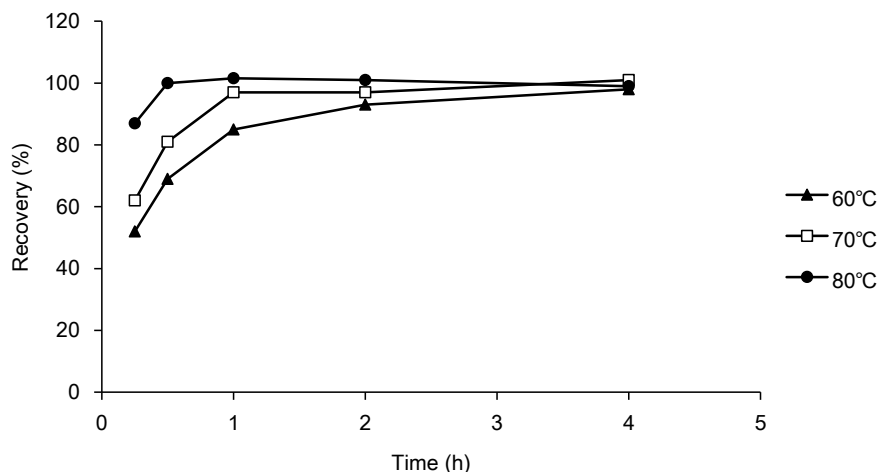


図 11 各反応条件における DIA の回収率

操作方法： 試験管に 10 µg/mL アピラマイシン標準溶液 56 µL (0.56 µg (DIA 0.1 µg 相当)) を採り、溶媒除去した。1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 4 mL を加えて、60°C、70°C 及び 80°C で反応 (0.25、0.5、1、2 及び 4 時間) させた。反応液に水 10 mL 及び 85% リン酸 2 mL を加え、酢酸エチル 15 mL で 2 回転溶し、溶媒を除去後、メタノールに溶解し、LC-MS/MS で測定した。

次に、マトリックス存在下での加水分解反応の検討を行った。豚の脂肪及び肝臓 (1 g 相当) を用いて、80°C で加水分解したところ、反応後の洗浄の際に、洗浄溶媒として酢酸エチル、*n*-ヘキサンのいずれを用いても有機層がゲル化した。これに対し、70°C で加水分解し、酢酸エチルを洗浄溶媒として用いたところ、ゲル化しなかった。このため、70°C で加水分解し、酢酸エチルを洗浄溶媒として用いることとした。

図 12 に豚の脂肪を用いて 70°C で 0.25、0.5、1、2 及び 4 時間加水分解を行った結果を示した。標準品での検討と同様に 70°C で 1 時間反応することにより、ほぼ 100% の回収率となり、4 時間まで概ね一定の回収率が得られた。食品の種類により加水分解の効率が変化する可能性も考慮し、加水分解は 70°C で 2 時間 (開発メーカーの分析法と同条件) 反応することとした。



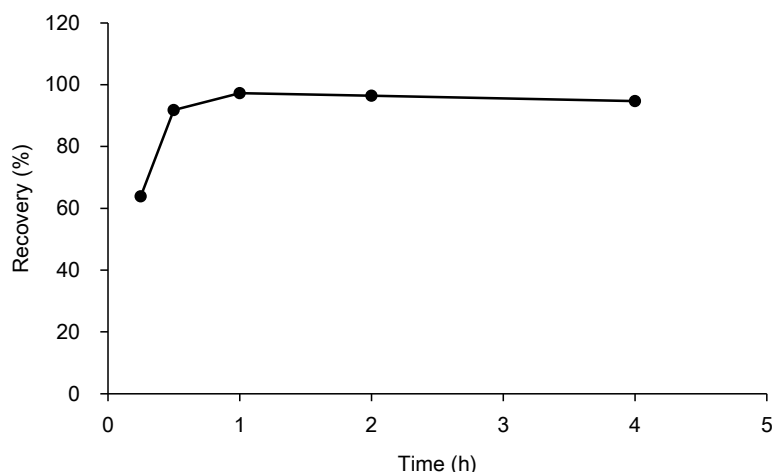


図12 加水分解反応（豚の脂肪、反応温度 70°C）における各反応時間での DIA の回収率

操作方法：試験管に豚の脂肪の抽出液 10 mL（試料 1 g 相当）及び 10 µg/mL アビラマイシン標準溶液 56 µL（0.56 µg（DIA 0.1 µg 相当））を採り、溶媒を除去した。1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 4 mL を加えて、70°C で 0.25、0.5、1、2 及び 4 時間反応させた。反応液を実験方法の「7. 試験溶液の調製」に従って精製し、LC-MS/MS で測定した。

#### 4. 添加回収試験

豚の筋肉、脂肪及び肝臓の3食品を用いて、試料にアビラマイシンを添加して、実験方法の「7. 試験溶液の調製」に従い、定量限界（0.01 ppm）及び基準濃度で5併行の添加回収試験を実施した。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13及び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。

##### (1) 選択性

いずれの食品においても、定量を妨害するピークは認められず、選択性は良好であった（表12）。

表12 選択性の評価

No.	食品名	定量限界 (mg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	妨害ピークの許容範囲の評価		面積又は高さの別	ピーク面積(高さ) <sup>1)</sup>						面積(高さ)比 (a)/(b)	選択性の評価 <sup>3)</sup>	
					評価濃度 (ppm)	評価基準		ブランク			マトリクス添加標準溶液 <sup>2)</sup>					
								n=1	n=2	平均 (a)	n=1	n=2	平均 (b)			
1	豚の筋肉	0.01		0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	410	442	426	0.000	○
2	豚の脂肪	0.01		0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	373	371	372	0.000	○
3	豚の肝臓	0.01		0.01	定量限界	0.01	< 0.333	面積	0	0	0	438	440	439	0.000	○
4	豚の筋肉	0.01	0.2	0.2	基準値	0.2	< 0.100	面積	0	0	0	7200	7220	7210	0.000	○
5	豚の脂肪	0.01	0.2	0.2	基準値	0.2	< 0.100	面積	0	0	0	7233	7483	7358	0.000	○
6	豚の肝臓	0.01	0.3	0.3	基準値	0.3	< 0.100	面積	0	0	0	12317	12470	12394	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。

\*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) 真度及び併行精度

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。定量限界濃度では真度100~108%、併行精度4~6%、基準値濃度では真度103~108%、併行精度2~4%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精度の目標値を満たした。また、定量限界濃度の添加試料から得られたピークのS/Nは230~441であり、S/N $\geq$ 10が得られた(表14)。

表13 真度及び精度

No.	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 <sup>1</sup>	検量線			回収率(%)					真度 (%)	併行精度 (RSD%)
						傾き	切片	r <sup>2</sup> 値	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5		
1	豚の筋肉	0.01	0.2	0.01	S/N	40254	12	0.9994	96	99	99	100	106	100	4
2	豚の脂肪	0.01	0.2	0.01	S/N	35435	1	0.9967	106	99	113	113	110	108	5
3	豚の肝臓	0.01	0.3	0.01	S/N	42509	8	0.9980	99	107	91	99	105	100	6
4	豚の筋肉	0.01	0.2	0.2	—	35637	126	0.9976	103	104	100	106	105	103	2
5	豚の脂肪	0.01	0.2	0.2	—	35012	460	0.9978	113	109	109	106	101	108	4
6	豚の肝臓	0.01	0.3	0.3	—	39442	284	0.9998	109	104	106	104	103	105	2

\*1 S/Nを求める必要がある場合には「S/N」と表示される。

表14 定量限界濃度の添加試料から得られたピークのS/N

No.	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 <sup>1</sup>	S/N <sup>2</sup>		
						Max.	Mn.	平均値
1	豚の筋肉	0.01	0.2	0.01	S/N	283	599	441
2	豚の脂肪	0.01	0.2	0.01	S/N	247	303	275
3	豚の肝臓	0.01	0.3	0.01	S/N	220	239	230
4	豚の筋肉	0.01	0.2	0.2	—	4602	3997	4300
5	豚の脂肪	0.01	0.2	0.2	—	4135	5990	5062
6	豚の肝臓	0.01	0.3	0.3	—	5783	7556	6669

\*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15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、0.98~1.03となり、大きな影響は認められなかった。

表15 試料マトリックスの測定への影響

No.	食品名	定量限界 (mg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	標準溶液 濃度 <sup>1</sup> (mg/L)	ピーク面積(高さ) <sup>2</sup>								
						面積又は 高さの別	ブランク <sup>3</sup>	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	豚の筋肉	0.01	0.2	0.01	0.01	面積	0	410	442	426	423	442	432	0.98
2	豚の脂肪	0.01	0.2	0.01	0.01	面積	0	373	371	372	374	378	376	0.99
3	豚の肝臓	0.01	0.3	0.01	0.01	面積	0	438	440	439	419	455	437	1.00
4	豚の筋肉	0.01	0.2	0.2	0.2	面積	0	7195	7172	7183	7200	7220	7210	1.00
5	豚の脂肪	0.01	0.2	0.2	0.2	面積	0	7233	7483	7358	7322	7296	7309	1.01
6	豚の肝臓	0.01	0.3	0.3	0.3	面積	0	12317	12470	12394	12109	12063	12086	1.03

\*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。

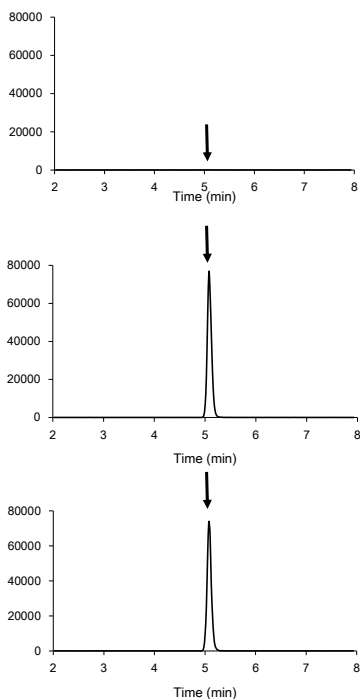
\*2 マトリックス添加標準溶液及び溶媒標準溶液の順に交互に2回以上測定した結果から評価する。(必要に応じて起爆注入を行う。)

\*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。

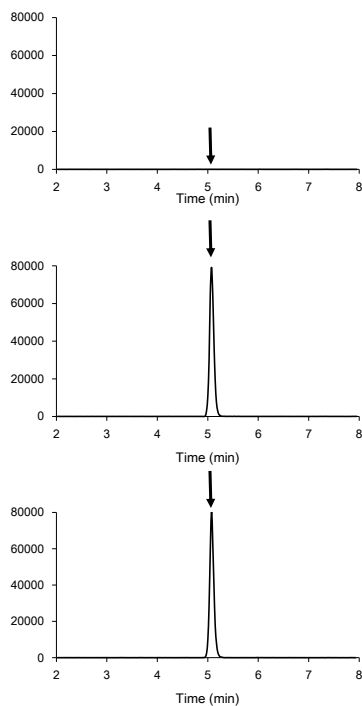
\*4 マトリックス添加標準溶液は試験当日のブランク試料の試験溶液を用いて調製する。

\*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。

①豚の筋肉  
基準値 0.2 ppm



②豚の脂肪  
基準値 0.2 ppm



③豚の肝臓  
基準値 0.3 ppm

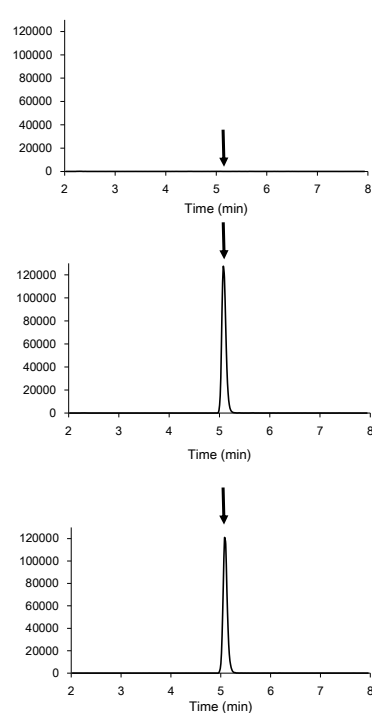
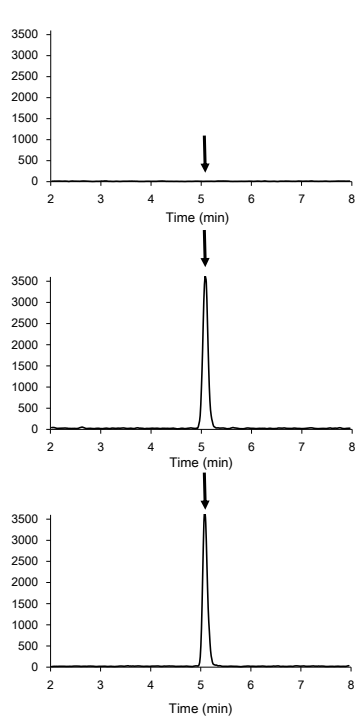
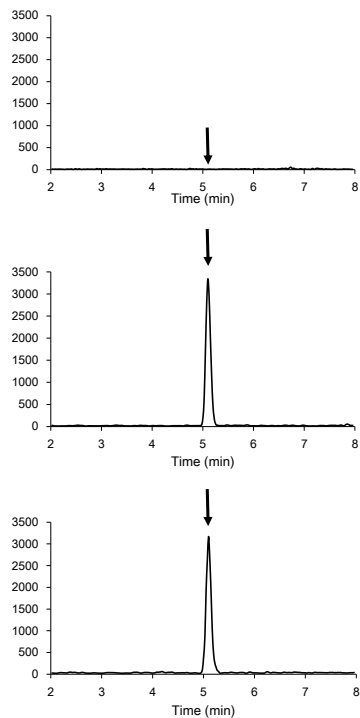


図 13 基準値濃度での添加回収試験における代表的なクロマトグラム  
上：空白試料、中：添加試料、下：回収率 100%相当の標準溶液

①豚の筋肉



②豚の脂肪



③豚の肝臓

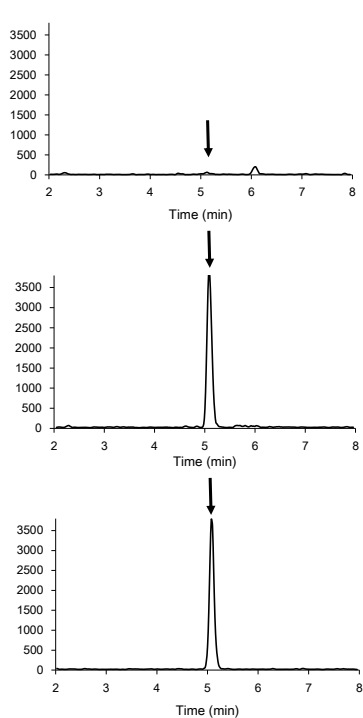
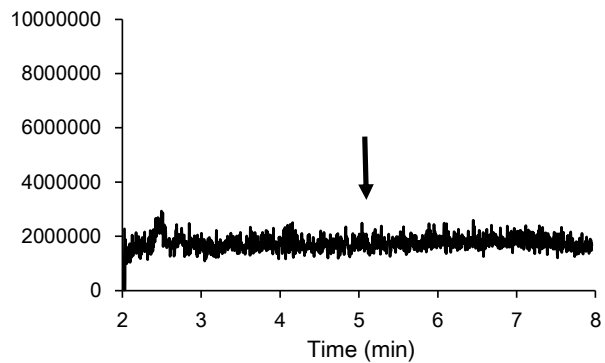
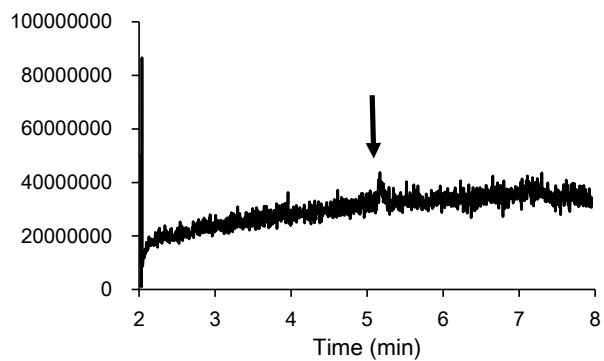
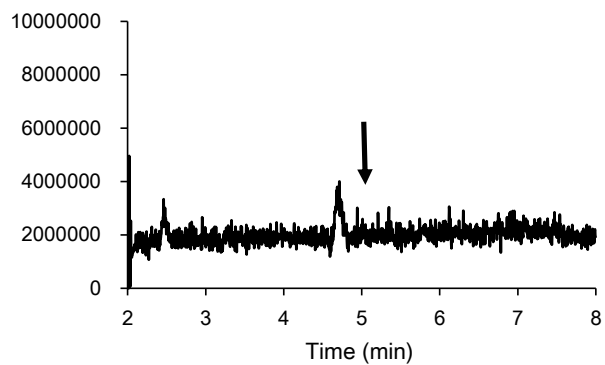
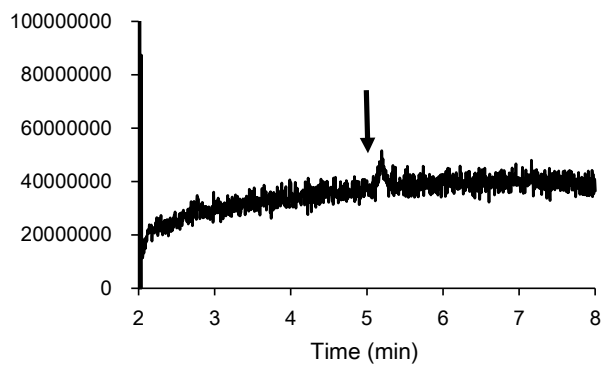


図 14 定量限界濃度 (0.01 ppm) での添加回収試験における代表的なクロマトグラム  
上：空白試料、中：添加試料、下：回収率 100%相当の標準溶液 (0.01 μg/mL)

①豚の筋肉



②豚の脂肪



③豚の肝臓

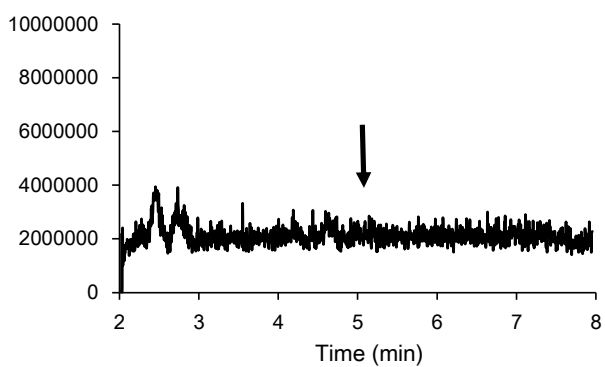
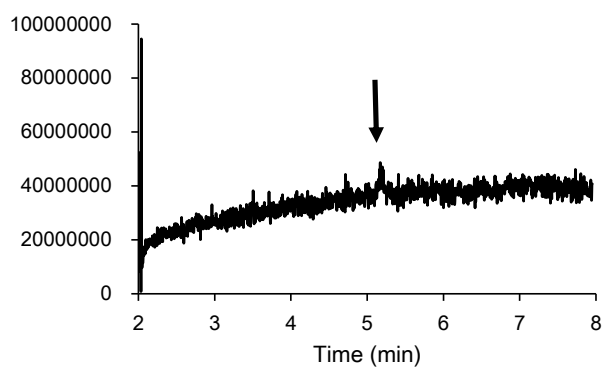


図 15 ブランク試料の代表的なトータルイオンカレントクロマトグラム

スキャン範囲： $m/z$  50～500

左：ESI (+)、コーン電圧 20 V

右：ESI (-) コーン電圧 -20 V

## 【結論】

畜産物中のアビラマイシン試験法として、試料からアセトンで抽出し、塩基性条件下加水分解後、反応液を酢酸エチル洗浄、リン酸酸性下酢酸エチル転溶し、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を開発した。本法を用いて豚の筋肉、脂肪及び肝臓を対象に定量限界及び基準値濃度で添加回収試験を行った結果、真度 100~108%、併行精度 2~6% の良好な結果が得られた。いずれの試料についても定量を妨害するピークは認められず、選択性は良好であった。また、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は 0.98~1.03 となり、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できた。これらの結果から、本法はアビラマイシンを精確に分析可能な方法と考えられた。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) Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. (2009) Residue evaluation of certain veterinary drugs, 70th meeting 2008, 29-54.
- 2) Eichmeier, L. S. (2006) Validation of an HPLC-MS/MS Method for the Determination of Avilamycin in Chicken Liver, Kidney, Muscle, and Fat/Skin. Report No. 49783. ABC Laboratories, Inc., Columbia, MO, USA. (ABC Method 49783-MI). Submitted to FAO by Elanco Animal Health, Division of Eli Lilly and Company, Indianapolis, IN, USA.
- 3) Eichmeier, L. S. (2006) Validation of an HPLC-MS/MS Method for the Determination of Avilamycin in Swine Liver, Kidney, Muscle, and Fat/Skin. Report No. 49784, ABC Laboratories, Inc., Columbia, MO, USA. (ABC Method 49784-MI-01). Submitted to FAO by Elanco Animal Health, Division of Eli Lilly and Company, Indianapolis, IN, USA.