

※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 試験法開発業務に関する報告書

フラボフォスフォリポール試験法（畜産物）

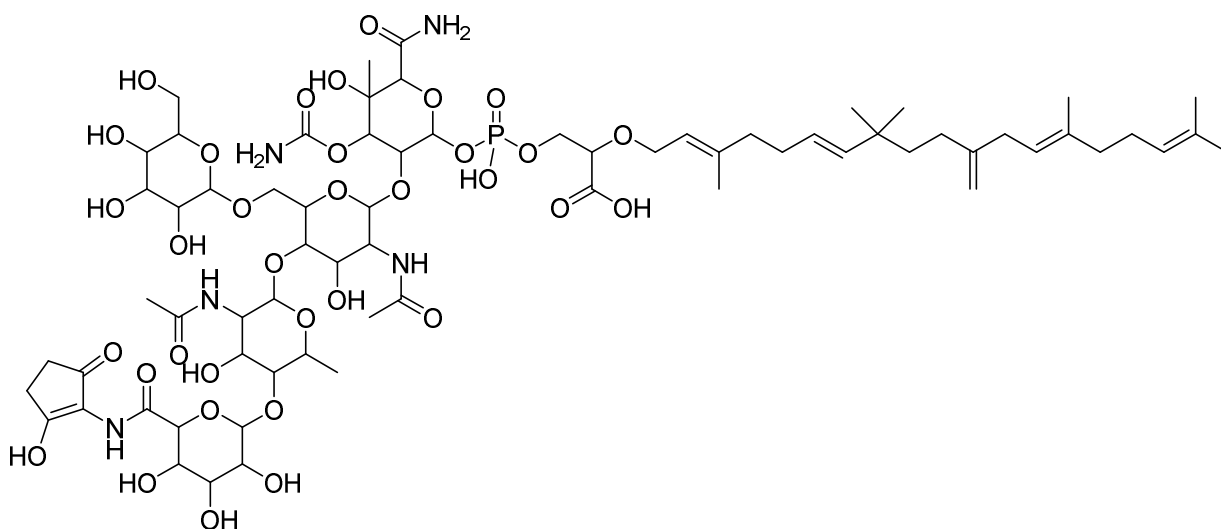
フラボフォスフォリポール試験法（畜産物）

[緒言]

1. 目的及び試験法の検討方針

フラボフォスフォリポールは、*Streptomyces*属の細菌が産生するホスホグリコリピッド系の抗生物質であり、細菌の細胞壁の生合成を阻害することにより抗菌活性を示す。別名に、バンベルマイシン、フラボマイシン、モエノマイシンなどがある。国内では、豚及び鶏への飼料添加物として指定されている。海外では、牛、豚、鶏及び七面鳥の増体率の上昇、飼料効率の改善等を目的とした飼料添加物として使用されている。フラボフォスフォリポールは化学的に類似した複数の混合物であり、残留の規制対象は主成分であるモエノマイシンAとされている。本検討では、LC-MS/MSを用いて畜産物に残留するモエノマイシンAを精確に定量可能な試験法を検討した。

2. 分析対象化合物の構造式及び物理化学的性質



モエノマイシンA

分子式：C₆₉H₁₀₈N₅O₃₄P

化学名（IUPAC）：3-{{{3-[(3-Acetamido-5-{[3-acetamido-4-hydroxy-6-methyl-5-({3,4,5-trihydroxy-6-[(2-hydroxy-5-oxocyclopent-1-en-1-yl)carbamoyl]tetrahydro-2H-pyran-2-yloxy}tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy]-4-hydroxy-6-[(2S,3R,4R,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl]methyl}tetrahydro-2H-pyran-2-yl}oxy)-6-carbamoyl-4-(carbamoyloxy)-5-hydroxy-5-methyltetrahydro-2H-pyran-2-yl]oxy}(hydroxy)phosphoryl}oxy]-2-[[{(2E,6E,13E)-3,8,8,14,18-pentamethyl-11-methylenonadeca-2,6,13,17-tetraen-1-yl]oxy} propanoic acid

分子量：1582.58

外観：白色結晶

1-オクタノール/水分配係数（log Pow）¹：-11.7（推定値）

酸解離定数（pKa）²：1.26 ± 0.50（予測値）

[出典] ¹ChemIDplus (U.S. National Library of Medicine)、²SciFinder（化学情報協会）

3. 残留の規制対象及び基準値

生食発0530第1号（平成30年5月30日）

・残留の規制対象

今回残留基準値を設定するフラボフォスフォリポールとは、モエノマイシンAのみとする。

食品、添加物等の規格基準（昭和34年厚生省告示370号）第1食品の部A食品一般の成分規格の1に規定する抗生物質に該当することから、残留基準値の欄に記載のない食品及び表中にない食品については、当該物質を含有するものであってはならない。

・基準値

豚の筋肉、豚の脂肪、豚の肝臓、豚の腎臓、豚の食用部分、鶏の筋肉、鶏の脂肪、鶏の肝臓、鶏の腎臓、鶏の食用部分、鶏卵：0.05 ppm

[実験方法]

1. 試料

1) 購入先

豚の筋肉、豚の脂肪は、インターネットを介して購入したものをを用いた。豚の肝臓、鶏卵は、神奈川県内のスーパーマーケットで購入したものをを用いた。

2) 試料の採取方法

- ① 豚の筋肉は、可能な限り脂肪層を除き細切均一化した。
- ② 豚の脂肪は、可能な限り筋肉部を除き細切均一化した。
- ③ 豚の肝臓は、全体を細切均一化した。
- ④ 鶏卵は、殻を除去し卵黄と卵白をよく混合し均一化した。

2. 試薬・試液

1) 標準品

モエノマイシンA標準品：純度96.4%（富士フイルム和光純薬製）

2) 試薬

アセトニトリル、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、メタノール：LC-MS用（関東化学製）

アンモニア水（28%）：特級（関東化学製）

トリエチルアミン：特級（富士フイルム和光純薬製）

アセトニトリル、ギ酸：LC-MS用（富士フイルム和光純薬製）

メタノール：残留農薬試験用（富士フイルム和光純薬製）

トリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム：InertSep SAX（500 mg/6 mL）、エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラム：InertSep PSA（500 mg/6 mL）、アミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム：InertSep NH₂（500 mg/6 mL）（ジーエルサイエンス製）

3級アンモニウム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 WAX（500 mg/6 cc）（Waters製）

3) 標準溶液、試液の調製方法

① 標準溶液の調製方法

モエノマイシンA標準原液：モエノマイシンA標準品を精秤し、メタノールに溶解して1

mg/mL溶液を調製した。

モエノマイシンA標準溶液：モエノマイシンA標準原液を、メタノールで希釈して100 µg/mL、10 µg/mL及び1 µg/mL溶液を調製した。

モエノマイシンA添加用標準溶液：モエノマイシンA標準原液をメタノールで希釈し、0.2 µg/mL及び1 µg/mLの濃度の溶液を調製した。

② 試液の調製方法

アンモニア水及びメタノール（1：9）混液：アンモニア水100 mL及びメタノール900 mLを混合した。

3. 装置

ホモジナイザー：PT 10-35 GT（キネマティカ製）

遠心分離機：S700FR（久保田商事製）

LC-MS/MS

| | 型式 | 会社 |
|-------|-----------------------------------|--------|
| LC 装置 | ACQUITY H class | Waters |
| MS 装置 | Xevo TQ-XS | Waters |
| データ処理 | MassLynx Ver.4.2 TargetLynx XS | Waters |

4. 測定条件

| LC 条件 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----------------|--|--------|--|--------|---------|--------|---|----|----|---|----|----|----|----|----|------|---|----|----|---|----|------|----|----|----|----|----|
| カラム | InertSustain C8 HP サイズ:内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 µm 会社：ジューエルサイエンス株式会社 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 流速 (mL/min) | 0.3 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 注入量(µL) | 5 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| カラム温度 (°C) | 40 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 移動相 | A 液：0.3 vol%ギ酸 B 液：0.3 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 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</td> <td>60</td> <td>40</td> </tr> <tr> <td>1</td> <td>60</td> <td>40</td> </tr> <tr> <td>10</td> <td>25</td> <td>75</td> </tr> <tr> <td>10.1</td> <td>1</td> <td>99</td> </tr> <tr> <td>15</td> <td>1</td> <td>99</td> </tr> <tr> <td>15.1</td> <td>60</td> <td>40</td> </tr> <tr> <td>25</td> <td>60</td> <td>40</td> </tr> </tbody> </table> | | | 時間 (分) | A 液 (%) | B 液(%) | 0 | 60 | 40 | 1 | 60 | 40 | 10 | 25 | 75 | 10.1 | 1 | 99 | 15 | 1 | 99 | 15.1 | 60 | 40 | 25 | 60 | 40 |
| 時間 (分) | A 液 (%) | B 液(%) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 0 | 60 | 40 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1 | 60 | 40 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 10 | 25 | 75 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 10.1 | 1 | 99 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 15 | 1 | 99 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 15.1 | 60 | 40 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 25 | 60 | 40 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| MS 条件 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 測定モード | SRM（選択反応モニタリング） | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| イオン化モード | ESI（－） | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| キャピラリー電圧 (kV) | 2.3 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 脱溶媒温度 (°C) | 650 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| イオンソース温度 (°C) | 150 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 脱溶媒ガス流量 (L/hr) | 850 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

| | |
|---------------------|-------------|
| コーンガス流量 (L/hr) | 150 |
| ネブライザーガス (Bar) | 7.0 |
| コリジョンガス (mL/min) | 0.15 (アルゴン) |

| | |
|-------------|--|
| 定量イオン (m/z) | m/z 790.2→575.8 [コーン電位：-40 V、コリジョンエネルギー：-25 eV] |
| 定性イオン (m/z) | m/z 790.2→554.0 [コーン電位：-40 V、コリジョンエネルギー：-30 eV] |
| 保持時間 (分) | 6.9 |

5. 定量

モエノマイシンA標準原液を0.3 vol%ギ酸及び0.3 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液（3：2）混液で希釈して、基準値濃度または定量限界濃度（0.01 mg/mL）に対して、25、50、75、100、125、150%の回収率に相当する濃度の検量溶液を調製した。各濃度に調製した検量溶液5 µLをLC-MS/MSに注入して、得られたピーク面積値を用いて検量線を作成した。なお、本法に従って試験溶液を調製した場合には、試料中0.01 mg/kgのモエノマイシンAの相当する試験溶液の濃度は、0.002 mg/Lである。試験溶液は5 µLをLC-MS/MSに注入した。

6. 添加試料の調製

1) 基準値濃度の添加試料の作成

豚の筋肉・肝臓、鶏卵（添加濃度：0.05 mg/kg）：試料10.0 gに、1 µg/mL添加用標準溶液0.5 mLを添加し混合後、30分間放置した。

豚の脂肪（添加濃度：0.05 mg/kg）：試料10.0 gを採り、約40℃の湯浴で融解し、1 µg/mL添加用標準溶液0.5 mLを添加し混合後、-30℃で30分間放置して凝固させた。

2) 定量限界濃度（0.01 mg/kg）の添加試料の作成

豚の筋肉・肝臓、鶏卵（添加濃度：0.01 mg/kg）：試料10.0 gに、0.2 µg/mL添加用標準溶液0.5 mLを添加し混合後、30分間放置した。

豚の脂肪（添加濃度：0.01 mg/kg）：試料10.0 gを採り、約40℃の湯浴で融解し、0.2 µg/mL添加用標準溶液0.5 mLを添加し混合後、-30℃で30分間放置して凝固させた。

7. 試験溶液の調製

概要

モエノマイシンAを試料から50℃に加温したアンモニア水及びメタノール（1：9）混液で抽出し、酢酸エチルで洗浄した後、トリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲル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。

1) 抽出

試料 10.0 g を 250 mL 容ポリプロピレン（PP）製遠心管に量り採り、これに 50℃に加温したアンモニア水及びメタノール（1：9）混液 100 mL を加えてホモジナイズした後、毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離し、上澄液を採った。残留物に 50℃に加温したアンモニア水及びメタノー

ル（1：9）混液 80 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た。上澄液を採り、先の上澄液と合わせてメタノールで正確に 200 mL とした。この溶液から正確に 20 mL を分取し、40℃以下で濃縮した後、室温で窒素気流下で乾固した。次に、残留物をアンモニア水、水及びメタノール（1：60：40）混液 20 mL に溶解した。

2) 酢酸エチル洗浄

1) から得られた溶液に酢酸エチル20 mLを加えて振とうし、毎分3,000回転で5分間遠心分離した後、酢酸エチル層を捨てた。次いで、アンモニア水、水及びメタノール混液層に酢酸エチル20 mLを加えて振とうし、毎分3,000回転で5分間遠心分離した後、酢酸エチル層を捨てた。アンモニア水、水及びメタノール混液層を40℃以下で約1 mLに濃縮した後、窒素を吹き付けて乾固した。残留物にギ酸、水及びメタノール（1：20：80）混液2 mLを加えて溶解した。

3) 精製

トリメチルアミノプロピルシリル化シリカゲルミニカラム [InertSep SAX (500 mg)] に、メタノール5 mL、ギ酸、水及びメタノール（1：20：80）混液5 mLを注入し、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、メタノール5 mLを注入し、流出液は捨てた。次いで、アンモニア水及びメタノール（1：9）混液20 mLを注入し、溶出液を採った。この溶出液を40℃以下で約1 mLまで濃縮し、0.3 vol%ギ酸及び0.3 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液（3：2）混液で正確に5 mLと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

各検討食品の添加回収試験における回収率100%相当濃度となるように、モエノマイシンA標準溶液100 µLを1.5 mL容バイアルに採った。室温で窒素気流下で乾固し、ブランク試験溶液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]

試料

↓ 試料 10.0 g を 250 mL 容ポリプロピレン (PP) 製遠心管に量り採る

抽出

↓ 50℃に加温したアンモニア水及びメタノール (1 : 9) 混液 100 mL を加え、ホモジナイズ

↓ 遠心分離 (3,000 回転、5 分間) し、上澄液を採る

↓ 残留物に 50℃に加温したアンモニア水及びメタノール (1 : 9) 混液 80 mL を加え、ホモジナイズ

↓ 遠心分離 (3,000 回転、5 分間) し、上澄液を合わせ、メタノールを加えて 200 mL に定容

酢酸エチル洗浄

↓ 抽出液 20 mL を正確に採り、40℃以下で約 1 mL に濃縮し、室温で窒素気流下で乾固する
残留物をアンモニア水、水及びメタノール (1 : 60 : 40) 混液 20 mL に溶解して、50 mL 容 PP 製遠心管に移す

↓ 酢酸エチル 20 mL を加え、5 分間振とうする

↓ 遠心分離 (3,000 回転、5 分間) 後、酢酸エチル層を捨てる

↓ アンモニア水、水及びメタノール混液層に酢酸エチル 20 mL を加え、5 分間振とうする

↓ 遠心分離 (3,000 回転、5 分間) 後、酢酸エチル層を捨てる

↓ アンモニア水、水及びメタノール混液層を 40℃以下で約 1 mL に濃縮し、室温で窒素気流下で乾固する

↓ ギ酸、水及びメタノール混液 (1 : 20 : 80) 混液 2 mL を加えて溶解する

InertSep SAX (500 mg) ミニカラム精製

↓ メタノール 5 mL、ギ酸、水及びメタノール混液 (1 : 20 : 80) 混液 5 mL を通液して、流出を捨てる

↓ 上記の溶液全量をカラムに注入し、流出液を捨てる

↓ メタノール 5 mL を注入して、流出液を捨てる

↓ アンモニア水及びメタノール (1 : 9) 混液 20 mL を注入し、溶出液を採る

↓ 溶出液を 40℃以下で濃縮して、0.3 vol%ギ酸及び 0.3 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液 (3 : 2) 混液で 5 mL に定容する

LC-MS/MS 測定 (0.2 g 試料/mL) 試験溶液 5 µL を注入

[結果及び考察]

1. 測定条件の検討

1) モエノマイシンAのMS条件の検討

モエノマイシンAのプリカーサーイオンを確認するために、標準溶液をLC-MS/MSに注入し、ESIのポジティブ及びネガティブモードでスキャン測定した。図1に示すように、ポジティブモードにおいては、プロトン付加分子に由来すると考えられるイオンは確認できなかった。一方で、ネガティブモードでは、 m/z 790.2に $[M-2H]^{2-}$ の2価イオンと考えられる脱プロトン分子に由来するイオンが強く検出された。このため、 m/z 790.2に検出されたイオンをプリカーサーイオンとした。図2には、 m/z 790.2をプリカーサーイオンに設定した場合のプロダクトイオンスペクトルを示した。最も高いSN比が得られた m/z 790.2 \rightarrow 575.8 (コーン電圧 (CV) : -40 V、コリジョンエネルギー (CE) : -25 eV) を定量イオンとし、 m/z 790.2 \rightarrow 554.0 (CV : -40 V、CE : -30 eV) を定性イオンとした。

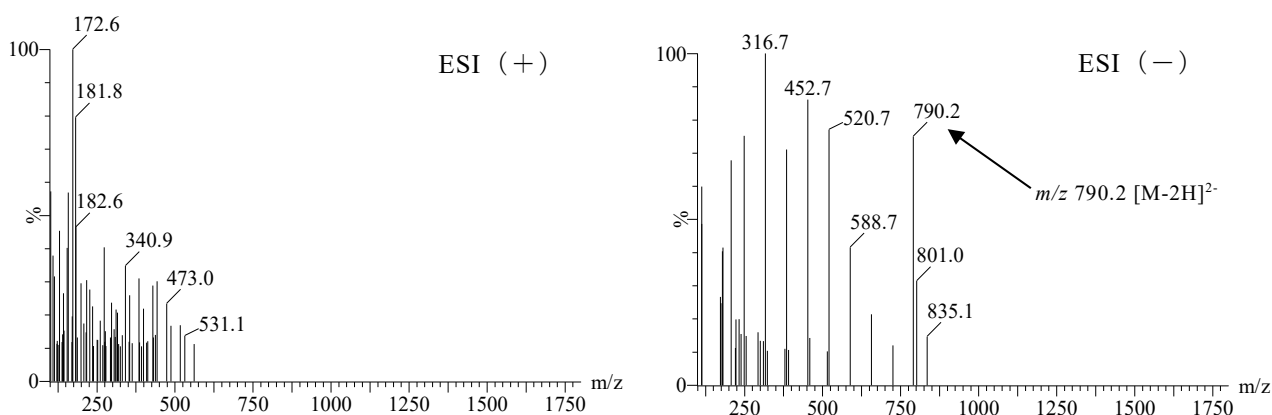


図1 モエノマイシンAのマススペクトル (スキャン測定)

スキャン範囲 : 100~1,800 m/z 、測定条件 : ESI (+) 及び ESI (-)、CV = 40 V

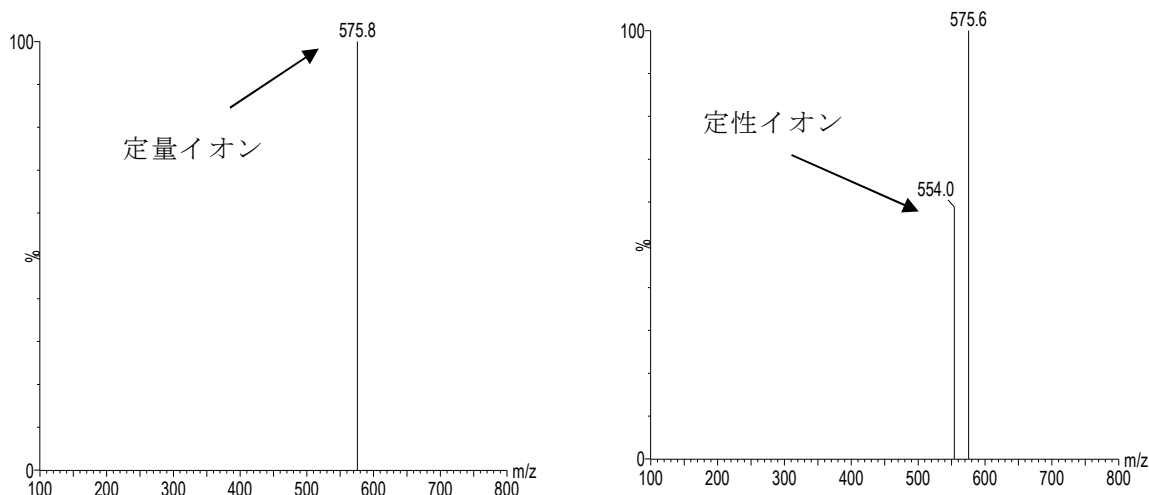


図2 モエノマイシンAのプロダクトイオンスペクトル

プリカーサーイオン : m/z 790.2、測定条件 : ESI (-)、

CV = -40 V、CE = -25 eV (定量用 : 左)、CV = -40 V、CE = -30 eV (定性用 : 右)

2) LC条件の検討

① 移動相条件の検討

水系溶媒として、5 mmol/L酢酸アンモニウム溶液、5 mmol/Lギ酸アンモニウム溶液、0.1 vol%酢酸溶液、0.1 vol%～0.3 vol%ギ酸溶液を、有機溶媒には、アセトニトリルまたはギ酸または酢酸を添加したアセトニトリルを調製した。これらの複数の移動相の組み合わせにより、モエノマイシンA標準溶液を繰り返し測定して、得られたピーク面積値、SN比、ピーク形状を指標として、適切な移動相を検討した。表1に示すように、水系溶媒としてアンモニウム塩を、有機系溶媒にアセトニトリルを用いた場合には、良好なピークが確認されたが、水系溶媒にギ酸を用いた場合に比べてSN比が小さいため不適とした。また、0.1 vol%酢酸を水系溶媒に用いた場合には、モエノマイシンAのピークを検出できなかった。水系溶媒に0.3 vol%ギ酸を、有機系溶媒に0.3 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液を用いたときに、ピークのSN比が最大で、ピーク形状も良好であったため、移動相は、0.3 vol%ギ酸及び0.3 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液の混液を用いることとした。

表1 各移動相条件におけるモエノマイシンAのピーク面積値、SN比、ピーク形状など

| LC 移動相 | | モエノマイシン A | | | |
|-------------------|----------------------|-----------|------------------|-------------|-----------|
| 水系溶媒 | 有機系溶媒 | 保持時間 (分) | ピーク面積値 | SN 比 | ピーク形状 |
| 5 mmol/L 酢酸アンモニウム | アセトニトリル | 4.7 | 27,067 ± 862 | 1,787 ± 72 | 良好 |
| 5 mmol/L ギ酸アンモニウム | | 4.8 | 9,693 ± 620 | 479 ± 86 | 良好 |
| 0.1 vol% 酢酸 | 0.1 vol%酢酸・アセトニトリル溶液 | - | - | - | ピークを確認できず |
| 0.1 vol% ギ酸 | 0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液 | 6.3 | 113,000 ± 11,790 | 2,347 ± 371 | テーリング |
| 0.2 vol% ギ酸 | 0.2 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液 | 6.3 | 80,600 ± 1,000 | 2,293 ± 606 | 良好 |
| 0.3 vol% ギ酸 | 0.3 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液 | 6.3 | 82,633 ± 1,258 | 3,333 ± 299 | 良好 |

100 ng/mL モエノマイシンA標準溶液 5 µLを注入

カラム：InertSustain C8 HP (2.1 x 150 mm, 3 µm)、流速：0.3 mL/min、グラジエント溶出：4)測定条件に記載の通り、n = 5

② 分析カラムの検討

モエノマイシンAの測定に適した分析カラムを選定するために、一般に汎用されるODSカラム（5種）、C8カラム（2種）を用いて標準溶液を測定した。測定により確認されたモエノマイシンAのピーク形状、SN比を選定の指標とした。モエノマイシンAはODSカラムへの保持が極めて強く、アイソクラティックモードでは溶出できなかった。このため、グラジエントモードで溶出することとした。表2に示すように、検討に用いた分析カラムのうち、Inertsil ODS-4 HP、InertSustain C8 HP及びInertsil C8-4では、モエノマイシンAの良好なピーク形状が得られた。それ以外の分析カラムでは、ピークが検出されないか、ピーク形状が著しく悪くなることが分かった。また、比較的炭素量（%）の小さい分析カラムの方が良好なピーク形状が得られたことから、モエノマイシンAは疎水性が高いものと考えられる。しかし、本化合物のlog Pは-12程度と小さく、この物性値からは高極性の化合物であると考えられる。このため、溶液中のpHにより物理化学的性質が大きく変化するものと推察された。以上の結果から、分析カラムは、最も高いSN比が得られたInertSustain C8 HPカラムを用いることとした。

表2 各分析カラムを用いたときの、モエノマイシンAのピーク面積値及びSN比

| 分析カラム | 炭素量 (%) | モエノマイシン A | | | ピーク形状 |
|---|---------|------------|--------|-------|-----------|
| | | 保持時間 (min) | ピーク面積値 | SN 比 | |
| InertSustain C18 HP 内径 2.1mm、長さ 150mm、粒子径 3 μ m (ジーエルサイエンス製) | 14 | -* | - | - | ピーク幅が広い |
| InertSustainSwift C18 HP 内径 2.1mm、長さ 150mm、粒子径 3 μ m (ジーエルサイエンス製) | 9 | - | - | - | ピーク幅が広い |
| Inertsil ODS-4 HP 内径 2.1mm、長さ 150mm、粒子径 3 μ m (ジーエルサイエンス製) | 11 | 7.2 | 70,900 | 1,490 | 良好 |
| CAPCELL PAK C18 MG III 内径 2.1mm、長さ 150mm、粒子径 3 μ m (大阪ソーダ製) | 15 | - | - | - | ピークを確認できず |
| Mightysil RP-18GP II 内径 2.1mm、長さ 150mm、粒子径 3.5 μ m (関東化学製) | 15 | - | - | - | ピークを確認できず |
| InertSustain C8 HP 内径 2.1mm、長さ 150mm、粒子径 3 μ m (ジーエルサイエンス製) | 8 | 6.7 | 66,700 | 1,530 | 良好 |
| Inertsil C8-4 内径 2.1mm、長さ 150 mm、粒子径 5 μ m (ジーエルサイエンス製) | 5 | 6.3 | 68,000 | 890 | 良好 |

*モエノマイシンAのピーク幅が広い、または確認できない。

100 ng/mLモエノマイシンA標準溶液 5 μ Lを注入、グラジエント溶出：4)測定条件に記載の通り。

流速：0.3 mL/min、n = 1

3) 検量線

基準値濃度 (0.05 ppm) 及び定量限界濃度 (0.01 ppm) に対する回収率25%、50%、75%、100%、125%、150%に相当する濃度の検量溶液を0.3 vol%ギ酸及び0.3 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液 (3 : 2) 混液で調製し、5 μ LをLC-MS/MSに注入して作成した検量線の例を示した (図3)。本濃度範囲で作成した検量線の決定係数 R^2 は0.999以上と良好な直線性が認められた。また、定量限界濃度を想定した検量線の最下点の検量溶液 (0.0005 mg/L) から得られるピークのSN比は218と十分であった。なお、試験溶液中の試料濃度は、0.2 g試料/mLとした。

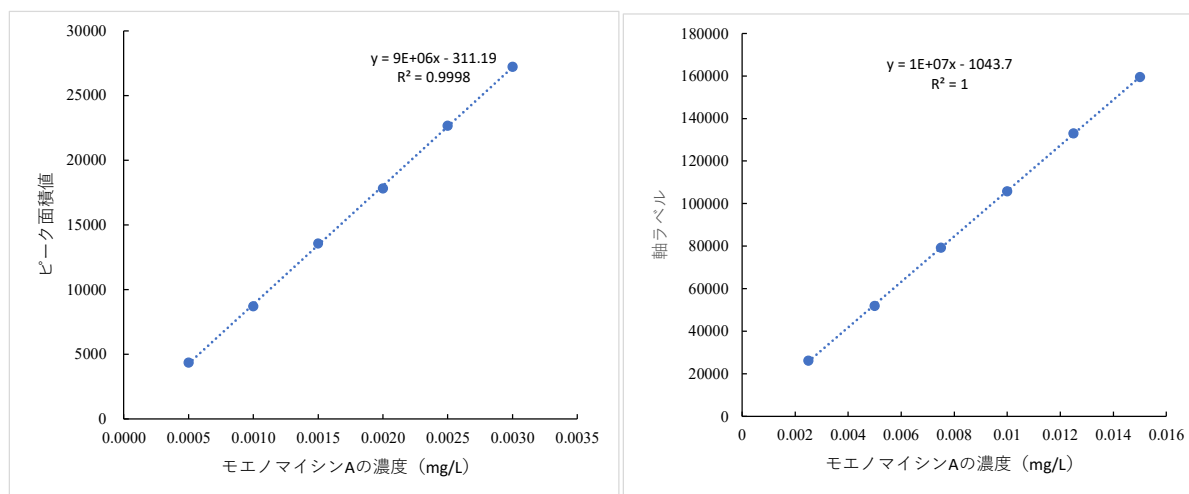


図3 モエノマイシンAの検量線の例

左：定量限界濃度（0.01 mg/kg）の添加、右：基準値濃度（0.05 mg/kg）の添加

2. 試験溶液の調製方法の検討

1) 申請企業の残留分析法

筋肉、肝臓及び腎臓は、試料に水を加えてホモジナイズし、メタノールを加えて50%メタノール溶液とする。脂肪は、試料をメタノールでホモジナイズした後に、水を加えて50%メタノール溶液とする。pH 6.8に調整した後、約87℃で15分間加熱還流して抽出する。鶏卵は、卵白と卵黄で前処理方法が異なる。卵白は、エチレングリコールモノメチルエーテルを加えてホモジナイズした後、メタノールで抽出する。遠心分離して上澄液を採り、60℃で乾固後、50%メタノールを加えて溶かす。卵黄は、水を加えてホモジナイズした後、*Bacillus cereus* ATCC 19637の芽胞懸濁液を加えて培養する。メタノールを加え、15分間加熱還流して抽出する。遠心分離して上澄液を採り、蒸発乾固後、50%メタノールを加えて溶かす。各操作により得られた溶液を、*B. cereus*を試験菌とした寒天平板カップ（穿孔）法による微生物学的定量法により定量する。

2) 抽出方法の検討

申請企業の残留分析法では、筋肉、脂肪、肝臓、腎臓では水及びメタノール混液を、卵白ではエチレングリコールモノメチルエーテルを、卵黄では水を加えた後にセレウス菌を加えて培養後に抽出する。特に、卵黄中ではモエノマイシンAとリン脂質が結合するため抽出が極めて困難となることが示されている。また、文献調査の結果では、草魚、鶏肉のくず肉（飼料）、鶏の筋肉・脂肪・肝臓・腎臓などを対象として、メタノールを用いた高圧液体抽出法、水及びメタノール混液、アンモニア水及びメタノール混液を用いた超音波による抽出方法が報告されている¹⁻⁴⁾。

①水及びメタノール混液を用いた抽出方法の検討

豚の筋肉・脂肪・肝臓、鶏卵の4食品を検討対象とした。抽出溶媒は、メタノール、水及びメタノール（1：9）混液、水及びメタノール（1：4）混液の3種類を用い、それぞれを室温または50℃に加熱した溶媒で抽出操作を行い回収率を求めた。4食品にモエノマイシンAを0.5 ppmとなるように添加した後、各溶媒（1回目：50 mL、2回目：30 mL）を加えて2回ホモジナイズ抽出した。遠心分離後に得られた上澄液を併せて、同溶媒で100 mLに定容した。抽出液の一部を採取し0.3 vol%ギ酸及び0.3 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液（3：2）混液で100倍希釈したものをLC-MS/MSに注入した。回収率は、添加試料から得られるピーク面積値に対するマトリックス添加標準溶液から得られるピーク面積値の比に100を乗じて算出した。表5に示すように、室温でメタノールを抽出溶媒とした場合には、回収率が6～47%と低回収となった。水とメタノールの混液にすることで、若干の回収率の向上は認められたが、鶏卵を除き50%以下の回収率となった。抽出溶媒を50℃とした場合では、すべての抽出溶媒で室温の場合とほぼ同等の回収率が得られた。以上のことから、これらの溶媒ではモエノマイシンAの抽出は困難と判断した。

表5. 水及びメタノール混液を抽出溶媒としたときのモエノマイシンAの回収率

| 試料 | 添加濃度 (ppm) | 抽出溶媒の温度 | 回収率 (%) * | | |
|------|------------|---------|-----------|-----------------|-----------------|
| | | | メタノール | 水及びメタノール（1：9）混液 | 水及びメタノール（1：4）混液 |
| 豚の筋肉 | 0.5 | 室温 | 17 | 19 | 17 |

| | | | | | |
|------|--|-----|----|----|----|
| 豚の脂肪 | | | 6 | 9 | 16 |
| 豚の肝臓 | | | 41 | 41 | 47 |
| 鶏卵 | | | 47 | 62 | 67 |
| 豚の筋肉 | | 50℃ | 20 | 17 | 16 |
| 豚の脂肪 | | | 10 | 14 | 17 |
| 豚の肝臓 | | | 43 | 50 | 47 |
| 鶏卵 | | | 50 | 62 | 71 |

*添加試料から得られるピーク面積値/マトリックス添加標準溶液から得られるピーク面積値x100
各溶媒50、30 mLでホモジナイズ抽出した後に100 mLに定容した。

②アンモニア水、トリエチルアミン及びメタノール混液を用いた抽出方法の検討

塩基性の抽出溶媒を用いて検討を行った。抽出溶媒は、トリエチルアミン及びメタノール（1：99）混液、アンモニア水及びメタノール（1：19）混液、アンモニア水及びメタノール（1：9）混液の3種類として、それぞれ室温及び50℃に加温した溶媒を用いた。①と同様の方法で検討を実施した。表6に示すように、室温の抽出溶媒を用いた場合に比べて、50℃に加温した場合に、全ての食品で回収率が上昇した。また、塩基の種類ではアンモニア水を用いた場合に比較的良好な回収率が得られた。しかし、何れの抽出溶媒においても十分な回収率が得られなかったため、抽出液量を増加させて同様の検討を行うこととした。

表6. 塩基性の抽出溶媒を用いた際のモエノマイシンAの回収率（%）

| 試料 | 添加濃度 (ppm) | 抽出溶媒の温度 | 回収率 (%) * | | |
|------|------------|---------|-------------------------|-----------------------|----------------------|
| | | | トリエチルアミン及びメタノール（1：99）混液 | アンモニア水及びメタノール（1：19）混液 | アンモニア水及びメタノール（1：9）混液 |
| 豚の筋肉 | 0.5 | 室温 | 68 | 68 | 81 |
| 豚の脂肪 | | | 77 | 68 | 88 |
| 豚の肝臓 | | | 66 | 75 | 85 |
| 鶏卵 | | | 67 | 84 | 72 |
| 豚の筋肉 | | 50℃ | 84 | 84 | 88 |
| 豚の脂肪 | | | 95 | 115 | 93 |
| 豚の肝臓 | | | 77 | 93 | 89 |
| 鶏卵 | | | 78 | 93 | 88 |

*添加試料から得られるピーク面積値/マトリックス添加標準溶液から得られるピーク面積値x100
各溶媒50、30 mLでホモジナイズ抽出した後に100 mLに定容した。

③抽出溶媒量の検討

50℃に加温したアンモニア水及びメタノール（1：19）混液、アンモニア水及びメタノール（1：9）混液を抽出溶媒に用いて、抽出液量を2倍（200 mL）にして検討を行った。4食品にモエノマイシンAを0.5 ppmとなるように添加した後、各溶媒（1回目：100 mL、2回目：80 mL）で2回ホモジナイズ抽出した後、遠心分離後に得られた上澄液をメタノールで200 mLに定容した。抽出液の一部を採取して100倍希釈したものをLC-MS/MSに注入した。表7に示すように、アンモニア水及びメ

タノール（1：9）混液を用いることで、全ての食品で100%に近い回収率が得られた。以上の検討結果から、抽出溶媒は50℃に加温したアンモニア水及びメタノール（1：9）混液を用いることにした。試料を100、80mLで2回ホモジナイズ抽出し、遠心分離後に得られた抽出液にメタノールを加えて正確に200 mLに定容することとした。

表7. アンモニア水及びメタノール混液を抽出溶媒としたときのモエノマイシンAの回収率

| 試料 | 添加濃度 (ppm) | 回収率 (%) * | |
|------|------------|-----------------------|----------------------|
| | | アンモニア水及びメタノール（1：19）混液 | アンモニア水及びメタノール（1：9）混液 |
| 豚の筋肉 | 0.5 | 93 | 100 |
| 豚の脂肪 | | 90 | 103 |
| 豚の肝臓 | | 91 | 99 |
| 鶏卵 | | 90 | 100 |

*添加試料から得られるピーク面積値/マトリックス添加標準溶液から得られるピーク面積値x100
各溶媒100、80 mLでホモジナイズ抽出した後に200 mLに定容した。抽出溶媒の温度：50℃

3) アセトニトリル/ヘキサン分配による脱脂方法の検討

1 µg/mLモエノマイシンA標準溶液100 µLを採り、*n*-ヘキサン10 mLに溶解した。これに*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル10 mLを加えて、5分間振とう後に遠心分離した。本操作を3回繰り返す、各抽出回における回収率を求めた。表8に示すように、両画分ともに、モエノマイシンAは分配されなかった。これは、モエノマイシンAはアセトニトリル及び*n*-ヘキサンへの溶解性が極めて低いため、分配操作時に不溶化したものと考えられた。従って、アセトニトリル及び*n*-ヘキサン分配による脱脂は困難であると判断した。

表8 アセトニトリル/ヘキサン分配の検討結果

| | 回収率 (%) | | | | |
|-----------|-------------------------|-------------|-------------|----------------|--------|
| | <i>n</i> -ヘキサン飽和アセトニトリル | | | <i>n</i> -ヘキサン | 合計 (%) |
| | 10 mL (1回目) | 10 mL (2回目) | 10 mL (3回目) | 10 mL | |
| モエノマイシン A | 1 | 0 | 1 | 4 | 6 |

モエノマイシンAの添加量：100 ng

4) 酢酸エチル転溶方法の検討

モエノマイシンAの溶解性は、溶液中のpHの影響を強く受けることが予測されるため、酸性、中性、アルカリ性条件下で転溶操作を行った。1 µg/mLモエノマイシンA標準溶液100 µLを採り、水、1 vol%ギ酸、5%アンモニア水、1 vol%トリエチルアミン10 mLに溶解した。これに、酢酸エチル10 mLを加えて、5分間振とうして遠心分離後に酢酸エチル層を採取した。本操作を2回繰り返す、酢酸エチル層を合わせて回収率を求めた。表9に示すように、酢酸エチル層にはモエノマイシンAはほとんど分配されないことが分かった。また、水層からの回収率は塩基性とした場合

を除いて十分な回収率を得ることが出来なかった。以上のことから、酢酸エチルへの転溶操作による精製は困難であると判断した。

表9 酢酸エチル転溶による各層の回収率 (%)

| 回収率(%) | 水層 | | | |
|-----------------------|------------|-------------------|-------------------|-------------------------|
| | 水 10 mL | 1 vol%ギ酸 10 mL | 5%アンモニア水 10 mL | 1 vol%トリエチルアミン 10 mL |
| 酢酸エチル層 10 mL x 2 回 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 水層 | 87 | 66 | 106 | 95 |

モエノマイシンAの添加量：100 ng

5) 酢酸エチル洗浄方法の検討

4) の検討結果から、モエノマイシンAは塩基性条件下では水層に分配され、酢酸エチル層には分配されないことが示された。この性質を利用して、酢酸エチルを用いて、脂質等の夾雑成分を除去する方法を検討した。豚の肝臓から調製した抽出液20 mLを採取して40℃以下で濃縮乾固した後に、1 µg/mLモエノマイシンA溶液100 µL (0.1 ppm相当量) を添加した。アンモニア水、水及びメタノール (1 : 60 : 40) 、 (2 : 60 : 40) 、 (5 : 60 : 40) 、 (10 : 60 : 40) 混液20 mLに溶解して、酢酸エチル20 mLを加えた。振とう後に遠心分離して、酢酸エチル層を捨てた。次に、水層に酢酸エチル20 mLを加えて同様に操作した。水層を濃縮後に、0.3 vol%ギ酸及び0.3 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液 (3 : 2) 混液20 mLに溶解して、LC-MS/MS分析した。その結果、表10に示すように、すべての溶媒で0.83~0.88程度のマトリックス効果が認められたが、マトリックス効果の値で補正した回収率 (補正回収率) はすべて97%以上であった。いずれの条件においても、回収率、マトリックス効果の値に大きな違いは認められなかった。

表10 各酢酸エチル洗浄条件でのモエノマイシンAの補正回収率 (%) 及びマトリックス効果

| 試料 | 添加濃度 (ppm) | 補正回収率 (マトリックス効果*) | | | |
|------|---------------|---|---|---|--|
| | | アンモニア水/水/ メタノール (1 : 60 : 40) 混液 | アンモニア水/水/ メタノール (2 : 60 : 40) 混液 | アンモニア水/水/ メタノール (5 : 60 : 40) 混液 | アンモニア水/水/ メタノール (10 : 60 : 40) 混液 |
| 豚の肝臓 | 0.1 | 101 (0.83) | 97 (0.88) | 103 (0.85) | 99 (0.85) |

* マトリックス添加標準溶液から得られたピーク面積値/溶媒標準溶液から得られたピーク面積値

次に、4食品を用いて、酢酸エチル洗浄方法の効果を確認した。4食品から調製した抽出液20 mLを採取して40℃以下で濃縮乾固した後に、1 µg/mLモエノマイシンA 100 µL (0.1 ppm相当量) を添加した。アンモニア水、水及びメタノール (1 : 60 : 40) 混液20 mLに溶解して、酢酸エチル20 mLを加えた。振とう後に遠心分離して、酢酸エチル層を捨てた。水層に酢酸エチル20 mLを加えて同様に操作した。水層を濃縮後に、0.3 vol%ギ酸及び0.3 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液 (3 : 2) 混液20 mLに溶解して、LC-MS/MS分析した。その結果、表11に示すように、豚の肝臓で0.89程度の弱いマトリックス効果が認められたが、補正回収率は全ての食品で90%以上で

あった。以上のことから、液々分配による洗浄には、アンモニア水、水及びメタノール（1：60：40）混液と酢酸エチルを用いることにした。

表11 酢酸エチル洗浄による回収率とマトリックス効果

| 試料 | 添加濃度 (ppm) | アンモニア水、水及びメタノール（1：60：40）混液 | |
|------|------------|----------------------------|------------|
| | | 補正回収率* (%) | マトリックス効果** |
| 豚の筋肉 | 0.1 | 92 | 0.95 |
| 豚の脂肪 | | 100 | 0.99 |
| 豚の肝臓 | | 96 | 0.89 |
| 鶏卵 | | 93 | 0.93 |

* 回収率/マトリックス効果

** マトリックス添加標準溶液から得られたピーク面積値/溶媒標準溶液から得られたピーク面積値

6) ミニカラム精製方法の検討

①ミニカラムの選定

モエノマイシンAの酸解離定数は1.3程度であり酸性化合物と考えられるため、陰イオン交換カラムを用いる精製方法を検討した。InertSep SAX、Oasis WAX、InertSep PSA、InertSep NH₂を候補とした。豚の筋肉のブランク抽出液を濃縮乾固後に0.05 ppmとなるようにモエノマイシンAを添加して、ギ酸、水及びメタノール（1：20：80）混液2 mLに溶解して、ミニカラムに負荷した。メタノール5 mLでカラムを洗浄した後に、アンモニア水及びメタノール（1：9）混液20 mLで溶出した。その結果、表12に示すように、全てのミニカラムで補正回収率は100%程度と良好であった。Oasis WAX及びInertSep SAXを用いたときに、マトリックス効果が0.84程度と比較的小さくなったが、Oasis WAXではミニカラムからの溶出時の液滴の滴下速度が遅く、溶出操作により多くの時間を費やした。このため、操作性を考慮して、InertSep SAXミニカラムを用いることにした。

表12 ミニカラムを用いたときの溶出状況（豚の筋肉）

| ミニカラム | 回収率 (%) | マトリックス効果 | 補正回収率* (%) |
|-----------------------------------|---------|----------|------------|
| Oasis WAX (500 mg) | 82 | 0.84 | 98 |
| InertSep SAX (500 mg) | 80 | 0.83 | 97 |
| InertSep PSA (500 mg) | 79 | 0.76 | 105 |
| InertSep NH ₂ (500 mg) | 77 | 0.76 | 101 |

* 回収率/マトリックス効果

②InertSep SAXミニカラムの負荷溶媒の検討

豚の筋肉のブランク抽出液20 mLを採取して、7. 試験溶液の調製で示した方法に従い酢酸エチル洗浄まで実施した。アンモニア水、水及びメタノール混液層を濃縮乾固して、1 µg/mLモエノマイシンA 100 µL（試料中の濃度で0.1 ppm相当）を加えた後に、ギ酸、水及びメタノール（1：20：80）混液、または水及びメタノール（1：4）混液2 mLに溶解した。この溶液をInertSep SAXミニカラムに負荷した後、メタノール5 mLで洗浄して、アンモニア水及びメタノール（1：

9) 混液20 mLで溶出した。表13に各画分からの回収率を示すが、水及びメタノール混液を負荷溶媒とした場合には、微量ではあるが最後の画分までモエノマイシンAのピークが検出された。一方で、ギ酸、水及びメタノール混液の場合は、15 mLの溶出液量で100%程度が回収された。以上のことから、負荷溶媒はギ酸、水及びメタノール（1：20：80）混液とした。また、溶出液量は、多様な試料に適用可能とするため、余裕をもって20 mLとした。

表13 InertSep SAXミニカラムを用いたときの溶出状況

| 負荷溶媒 | 負荷液 | メタノール | アンモニア水及びメタノール（1：9）混液 | | | | | | | | | | | | | | | 合計 (%) | |
|----------------------------|------|-------|----------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|--------|-----|
| | 2 mL | 5 mL | 5 mL | 1 mL | 1 mL | 1 mL | 1 mL | 1 mL | 1 mL | 1 mL | 1 mL | 1 mL | 1 mL | 1 mL | 1 mL | 1 mL | 1 mL | | |
| ギ酸、水及びメタノール （1：20：80）混液 | 0 | 0 | 64 | 19 | 10 | 4 | 1 | 1 | 0.3 | 0.2 | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 |
| 水及びメタノール （1：4）混液 | 0 | 0 | 53 | 20 | 11 | 6 | 3 | 1 | 1 | 0.5 | 0.3 | 0.2 | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 97 |

③4食品を用いたInertSep SAXミニカラム精製の効果の確認

4食品について、7. 試験溶液の調製方法で示した方法に従い酢酸エチル洗浄まで実施した。アンモニア水、水及びメタノール混液層を濃縮乾固後に、1 µg/mLモエノマイシンA 100 µLを加えた後に、ギ酸、水及びメタノール（1：20：80）混液2 mLに溶解した。この溶液をInertSep SAXミニカラムに負荷した後、メタノール5 mLで洗浄して、アンモニア水及びメタノール（1：9）混液20 mLで溶出した。表14に示すように、全ての食品で補正回収率が96%以上となったが、肝臓では弱いマトリックス効果（0.87）が認められた。肝臓のマトリックス効果を低減すること目的として、洗浄溶媒、溶出溶媒の種類の検討、他のミニカラムを用いた追加精製などを実施したが、マトリックスの影響を低減することは出来なかった。これらのことから、この夾雑成分はモエノマイシンAと物理化学的性質が極めて類似した成分である推測される。豚の肝臓でも85%以上の回収率が得られているため、本条件でミニカラム精製を行うこととした。

表14 InertSep SAXミニカラムを用いたときの溶出状況

| | 回収率 (%) | マトリックス効果 | 補正回収率* (%) |
|------|---------|----------|------------|
| 豚の筋肉 | 95 | 0.95 | 96 |
| 豚の脂肪 | 90 | 0.96 | 98 |
| 豚の肝臓 | 86 | 0.87 | 101 |
| 鶏卵 | 92 | 0.94 | 96 |

モエノマイシンAの添加濃度：0.01 ppm

④InertSep SAXミニカラム精製操作時の留意点

本ミニカラム精製方法の検討を進める過程で、豚の脂肪を試料に用いた際に、回収率がばらつくことが認められた。この原因として、脂肪マトリックスの影響により、モエノマイシンAがナス型フラスコに残存しやすくなることが疑われた。ナス型フラスコ内の溶液をミニカラムに負荷する際には、溶液を負荷した後のナス型フラスコを、ミニカラムの洗浄溶媒であるメタノールで洗い、洗液をミニカラムに負荷する操作を実施している。しかし、この操作のみではナス型フラスコ内に残留しているモエノマイシンAを回収しきれていない可能性がある。そこで、本操作後に、更に溶出溶媒であるアンモニア水及びメタノール（1：9）混液で再度ナス型フラスコ洗浄して、洗液をミニカラムに注入して回収率を求めた。その結果、アンモニア水及びメタノール（1：9）混液の洗液を負荷した画分から、モエノマイシンAが約24%回収され、メタノールのみ

では洗い込みが不十分である事が明らかとなった。以上のことから、マトリックスの影響によりモエノマイシンAはミニカラム精製における負荷溶媒であるギ酸、水及びメタノール（1：20：80）混液や洗浄溶媒であるメタノールへの溶解が不十分となり、容器内に残留する場合がある。このため、溶出溶媒であるアンモニア水及びメタノール（1：9）混液5 mLで容器を洗う操作を2回繰り返して、洗液をミニカラムに注入する操作を行うことが望ましいと考えられる。

3. 添加回収試験

畜産物4食品（豚の筋肉・脂肪・肝臓、鶏卵）を用いて、[実験方法] 7. 試験溶液の調製に示す方法に従い、各食品に設定されている基準値濃度及び定量限界濃度（0.01 mg/kg）で添加回収試験を実施した。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4～11に示した。また、各食品のブランク試料のスクリー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12に示した。

1) 選択性の評価

選択性の評価結果を表15に示した。豚の肝臓から、モエノマイシンAと同じ保持時間にピークが検出された。本ピークのSN比は10未満と強度が低く、確認イオンは検出されなかったため、モエノマイシンAであるかは不明である。また、豚の肝臓以外ではモエノマイシンAの定量を妨害するピークは検出されなかった。このため、検討した全ての食品で、選択性の評価基準を満たしていることから、選択性は問題が無いと判断した。また、参考のため、定量限界相当濃度における選択性を確認したところ、基準値濃度と同様に選択性の評価基準を満たすことが確認された。

表15 選択性の評価

| No. | 分析対象化合物 | 食品名 | 定量限界 [検出限界] (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} | | |
|-----|----------|------|---------------------------|--------------|---------------|------|--------------|-------------------------|-----|-------|----------------------------|-------|-------|--------------------------|--------------------|---|
| | | | | | 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) | | | |
| | モエノマイシンA | 豚の筋肉 | 0.01 | 0.05 | 基準値 | 0.05 | < 0.100 | 面積 | 0 | 0 | 0 | 96138 | 97166 | 96652 | 0.000 | ○ |
| | モエノマイシンA | 豚の脂肪 | 0.01 | 0.05 | 基準値 | 0.05 | < 0.100 | 面積 | 0 | 0 | 0 | 96509 | 97921 | 97215 | 0.000 | ○ |
| | モエノマイシンA | 豚の肝臓 | 0.01 | 0.05 | 基準値 | 0.05 | < 0.100 | 面積 | 405 | 467 | 436 | 88283 | 88579 | 88431 | 0.005 | ○ |
| | モエノマイシンA | 鶏卵 | 0.01 | 0.05 | 基準値 | 0.05 | < 0.100 | 面積 | 0 | 0 | 0 | 84896 | 85673 | 85284 | 0.000 | ○ |
| | モエノマイシンA | 豚の筋肉 | 0.01 | 0.01 | 定量限界 | 0.01 | < 0.333 | 面積 | 0 | 0 | 0 | 17836 | 19906 | 18871 | 0.000 | ○ |
| | モエノマイシンA | 豚の脂肪 | 0.01 | 0.01 | 定量限界 | 0.01 | < 0.333 | 面積 | 0 | 0 | 0 | 17092 | 16936 | 17014 | 0.000 | ○ |
| | モエノマイシンA | 豚の肝臓 | 0.01 | 0.01 | 定量限界 | 0.01 | < 0.333 | 面積 | 374 | 355 | 365 | 15089 | 14876 | 14982 | 0.025 | ○ |
| | モエノマイシンA | 鶏卵 | 0.01 | 0.01 | 定量限界 | 0.01 | < 0.333 | 面積 | 0 | 0 | 0 | 14071 | 14136 | 14104 | 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、精度

基準値濃度及び定量限界濃度（0.01 mg/kg）における真度、精度の検討結果を表16に示した。真度及び併行精度は、基準値濃度でそれぞれ80～92%及び0.6～1.3%であり、定量限界濃度でそれぞれ、79～93%及び0.5～2.8%であり、ガイドラインの目標値を十分に満たした。また、定量限界濃度における添加試料のピークのS/Nの平均値は560～1318であり、S/N≥10以上を十分に満たした。

表16 真度、精度の評価

| No. | 分析対象化合物 | 食品名 | 定量限界 [検出限界] (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 | | |
|-----|----------|------|---------------------------|--------------|---------------|---------------------------|----------|-------|------------------|--------|------|------|------|------|-----------|----------------|------------------|--------|--------|
| | | | | | | | 傾き | 切片 | r ² 値 | n=1 | n=2 | n=3 | n=4 | n=5 | | | Max. | Min. | 平均値 |
| | モエノマイシンA | 豚の筋肉 | 0.01 | 0.05 | 0.01 | S/N | 10333501 | -275 | 0.9996 | 92.5 | 93.3 | 93.2 | 92.6 | 93.6 | 93.0 | 0.5 | 1283.6 | 1352.3 | 1318.0 |
| | モエノマイシンA | 豚の脂肪 | 0.01 | 0.05 | 0.01 | S/N | 9540224 | -396 | 0.9996 | 86.9 | 87.4 | 91.7 | 90.0 | 92.6 | 89.7 | 2.8 | 1037.9 | 1003.6 | 1020.8 |
| | モエノマイシンA | 豚の肝臓 | 0.01 | 0.05 | 0.01 | S/N | 9069998 | -90 | 0.9995 | 78.9 | 78.6 | 80.1 | 79.4 | 78.0 | 79.0 | 1.0 | 606.5 | 513.8 | 560.1 |
| | モエノマイシンA | 鶏卵 | 0.01 | 0.05 | 0.01 | S/N | 9163890 | -311 | 0.9996 | 82.4 | 82.9 | 82.6 | 83.5 | 84.4 | 83.2 | 0.9 | 860.3 | 836.2 | 848.2 |
| | モエノマイシンA | 豚の筋肉 | 0.01 | 0.05 | 0.05 | — | 10702719 | -1044 | 1.0000 | 88.7 | 89.6 | 88.1 | 90.0 | 88.8 | 89.1 | 0.8 | 3106.7 | 3019.7 | 3063.2 |
| | モエノマイシンA | 豚の脂肪 | 0.01 | 0.05 | 0.05 | — | 10483414 | -1656 | 0.9999 | 92.1 | 91.5 | 92.5 | 92.7 | 92.9 | 92.3 | 0.6 | 2791.3 | 2517.9 | 2654.6 |
| | モエノマイシンA | 豚の肝臓 | 0.01 | 0.05 | 0.05 | — | 10324853 | 537 | 0.9993 | 81.0 | 80.9 | 80.9 | 79.9 | 78.8 | 80.3 | 1.2 | 3288.0 | 2569.3 | 2928.7 |
| | モエノマイシンA | 鶏卵 | 0.01 | 0.05 | 0.05 | — | 9383623 | -1898 | 0.9996 | 84.2 | 83.8 | 81.9 | 84.7 | 83.0 | 83.5 | 1.3 | 2563.8 | 2732.5 | 2648.2 |

*1 S/Nを求める必要がある場合には『S/N』と表示される。

*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17に示した。添加回収試験における回収率100%相当濃度と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。その結果、ピーク面積比は、基準値濃度で0.85~0.94、定量限界濃度で0.81~0.98であった。豚の肝臓試料では、基準値及び定量限界濃度で、それぞれ0.85、0.81とマトリックス効果が認められたが、その他の試料では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可能と考えられた。

表17 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 [検出限界] (mg/kg) | 基準値 (ppm) | 添加濃度 (ppm) | 標準溶液 濃度 ^{*2} (mg/L) | ピーク面積(高さ) ^{*2} | | | | | | | | |
|-----|----------|------|---------------------------|--------------|---------------|------------------------------------|-------------------------|--------------------|----------------------------|-------|-------|--------|--------|--------|------------------------------|
| | | | | | | | 面積又は 高さの別 | ブランク ^{*3} | 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 | | | |
| | モエノマイシンA | 豚の筋肉 | 0.01 | 0.05 | 0.01 | 0.002 | 面積 | 0 | 19906 | 20231 | 20068 | 20411 | 20456 | 20433 | 0.98 |
| | モエノマイシンA | 豚の脂肪 | 0.01 | 0.05 | 0.01 | 0.002 | 面積 | 0 | 17505 | 18068 | 17787 | 18560 | 18794 | 18677 | 0.95 |
| | モエノマイシンA | 豚の肝臓 | 0.01 | 0.05 | 0.01 | 0.002 | 面積 | 365 | 15055 | 15014 | 14670 | 17970 | 18097 | 18034 | 0.81 |
| | モエノマイシンA | 鶏卵 | 0.01 | 0.05 | 0.01 | 0.002 | 面積 | 0 | 16641 | 16473 | 16557 | 17828 | 17638 | 17733 | 0.93 |
| | モエノマイシンA | 豚の筋肉 | 0.01 | 0.05 | 0.05 | 0.01 | 面積 | 0 | 96138 | 97166 | 96652 | 105811 | 105150 | 105480 | 0.92 |
| | モエノマイシンA | 豚の脂肪 | 0.01 | 0.05 | 0.05 | 0.01 | 面積 | 0 | 96509 | 97921 | 97215 | 103300 | 102840 | 103070 | 0.94 |
| | モエノマイシンA | 豚の肝臓 | 0.01 | 0.05 | 0.05 | 0.01 | 面積 | 436 | 88283 | 88579 | 87995 | 100714 | 105333 | 103023 | 0.85 |
| | モエノマイシンA | 鶏卵 | 0.01 | 0.05 | 0.05 | 0.01 | 面積 | 0 | 84896 | 85673 | 85284 | 90100 | 91921 | 91011 | 0.94 |

*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。

4) 補正真度

添加回収試験の結果、得られた真度、マトリックス効果の値から補正真度を求めた。補正真度は、回収率をマトリックス効果の値で除して求めた。表18に示すように、補正真度は、基準値濃度で89~98%、定量限界濃度で89~97%と良好であった。

表18 補正真度

| 分析対象化合物 | 食品名 | 添加濃度 (ppm) | 真度 (%) | マトリックス効果 | 補正真度* (%) |
|-----------|------|---------------|--------|----------|-----------|
| モエノマイシン A | 豚の筋肉 | 0.01 | 93.0 | 0.98 | 94.7 |
| | 豚の脂肪 | 0.01 | 89.7 | 0.95 | 94.2 |
| | 豚の肝臓 | 0.01 | 79.0 | 0.81 | 97.1 |
| | 鶏卵 | 0.01 | 83.2 | 0.93 | 89.1 |
| | 豚の筋肉 | 0.05 | 89.1 | 0.92 | 97.2 |
| | 豚の脂肪 | 0.05 | 92.3 | 0.94 | 97.9 |

| | | | | | |
|--|------|------|------|------|------|
| | 豚の肝臓 | 0.05 | 80.3 | 0.85 | 94.0 |
| | 鶏卵 | 0.05 | 83.5 | 0.94 | 89.1 |

*補正真度=真度 (%) /マトリックス効果

[結論]

モエノマイシンAを試料から50℃に加温したアンモニア水及びメタノール（1：9）混液で抽出して、酢酸エチルで洗浄する。トリメチルアミノプロピルシリル化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検討した。開発した分析法を基準値濃度及び定量限界濃度（0.01 mg/kg）で、豚の筋肉、脂肪、肝臓、鶏卵の4食品に適用した。真度及び併行精度（RSD%）は、それぞれ79～93%及び0.5～2.8%であった。また、各食品におけるマトリックス添加標準溶液に対する溶媒標準溶液のピーク面積比は、0.81～0.98であったことから、本法は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可能と考えられた。以上のことから、開発した分析法は、畜産物中のモエノマイシンAを基準値濃度及び定量限界濃度で精度良く定量することが可能であると考えられた。

[参考文献]

- 1) Liang-liang, T., *et. al.*, Determination of flavomycin residue in grass carp by high performance liquid chromatography. 3rd International Conference on Material, Mechanical and Manufacturing Engineering (IC3ME 2015).
- 2) Perez, S. *et. al.*, Determination of the antimicrobial growth promoter moenomycin-A in chicken litter. *Journal of chromatography A.*, 1175, 234-241 (2007).
- 3) Hui, X., *et. al.*, Determination of moenomycin A residues in poultry tissues by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Food Safety and Quality.* 5, 3784-3789 (2014).
- 4) Gallo, P., *et. al.*, Determination of the banned growth promoter moenomycin A in feed stuffs by liquid chromatography coupled to electrospray ion trap mass spectrometry. *Rapid communication in Mass Spectrum.* 24, 1017-1024 (2010).

添加回収試験における代表的なクロマトグラム（添加濃度：基準値濃度）

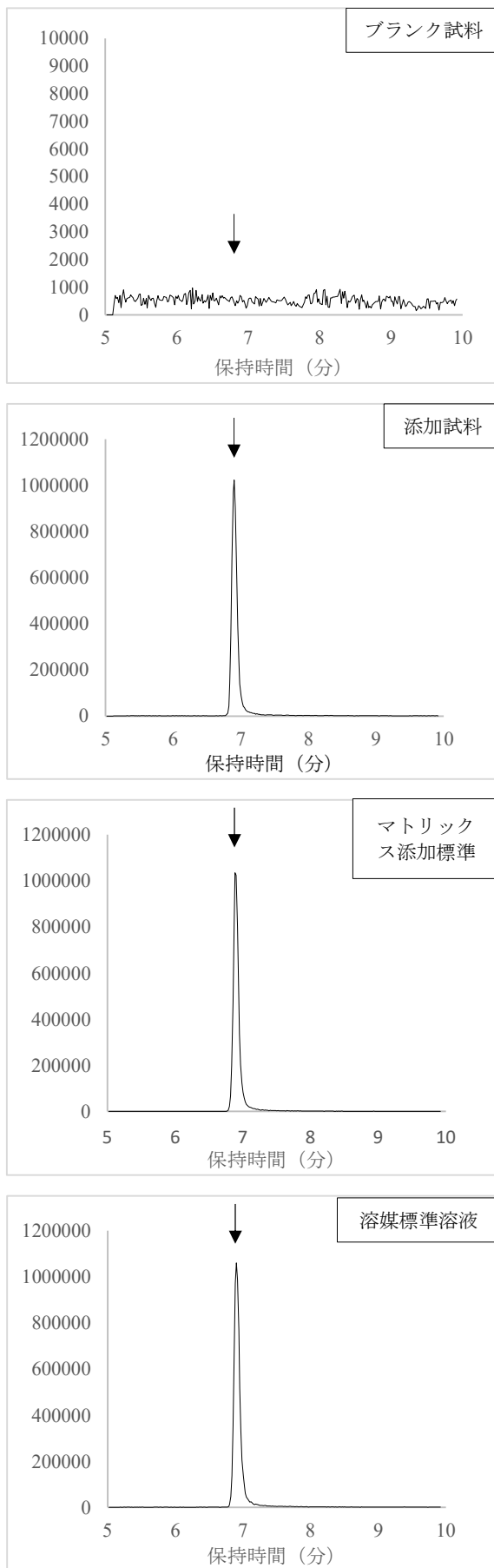


図4 豚の筋肉のSRMクロマトグラム
モエノマイシンA (m/z 790.2→575.8)、添加濃度：0.05 mg/kg

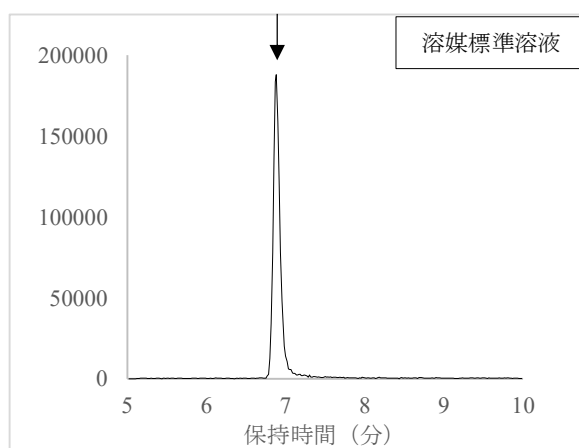
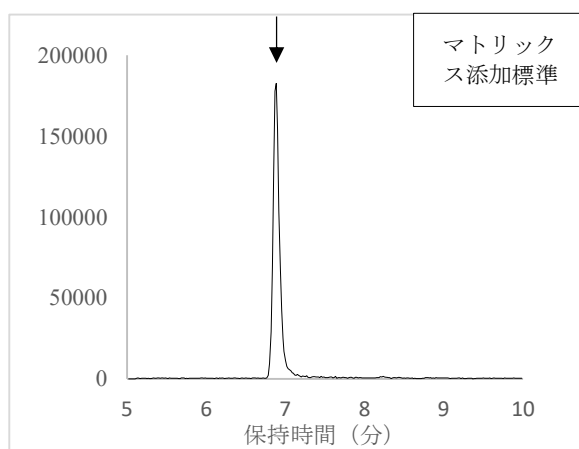
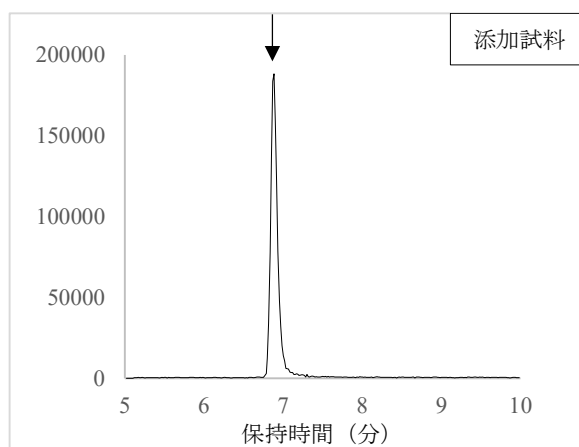
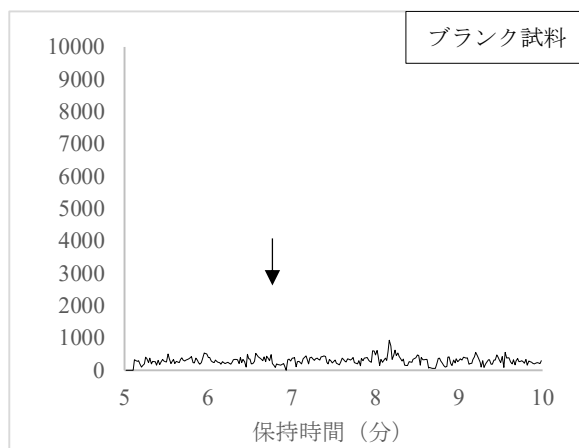


図5 豚の脂肪のSRMクロマトグラム
モエノマイシンA (m/z 790.2→575.8)、添加濃度：0.05 mg/kg

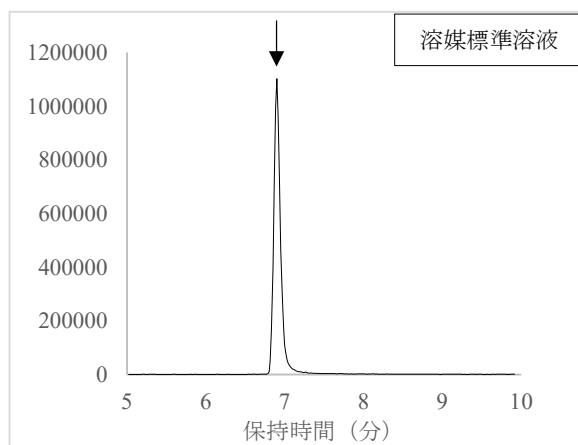
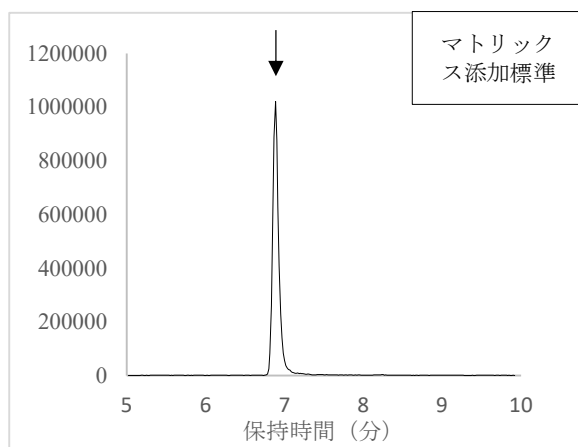
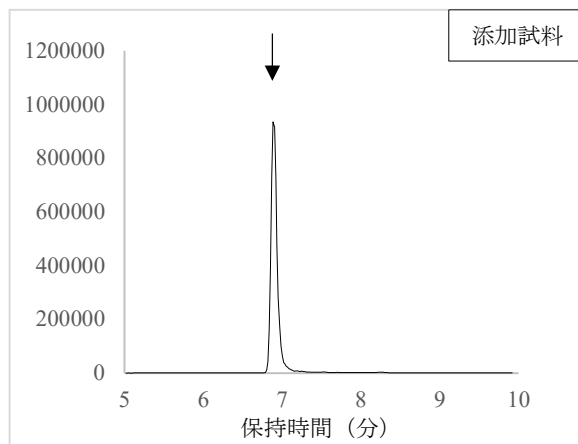
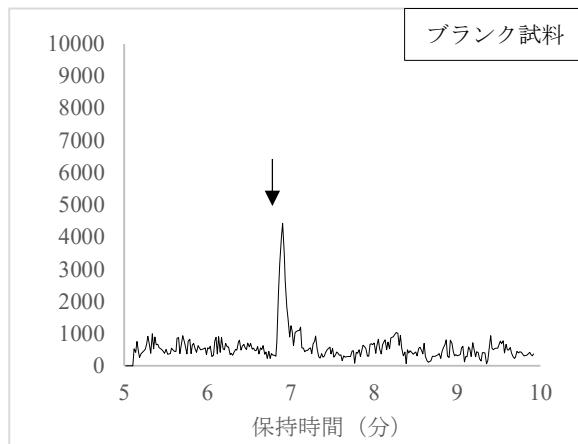


図6 豚の肝臓のSRMクロマトグラム
モエノマイシンA (m/z 790.2→575.8)、添加濃度：0.05 mg/kg

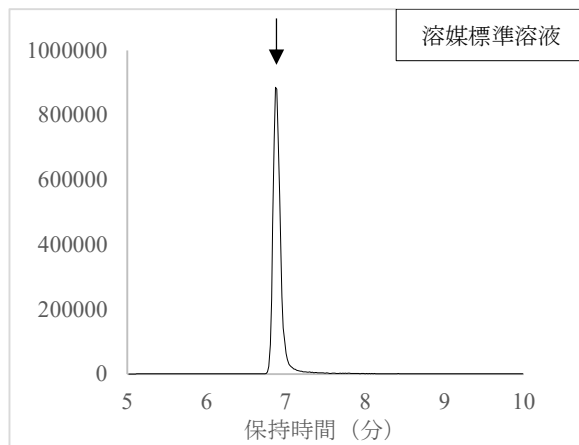
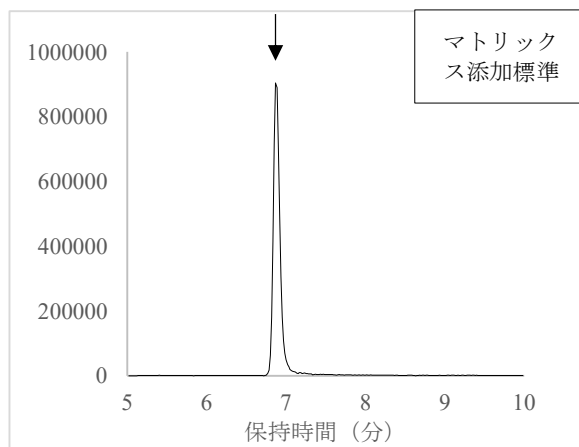
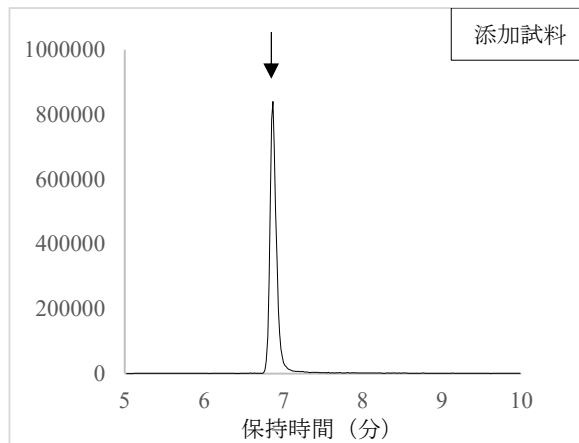
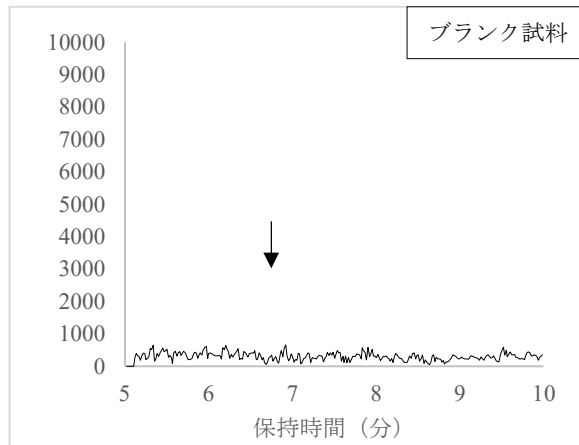


図7 鶏卵のSRMクロマトグラム

モエノマイシンA (m/z 790.2→575.8)、添加濃度：0.05 mg/kg

添加回収試験における代表的なクロマトグラム（添加濃度：定量限界濃度）

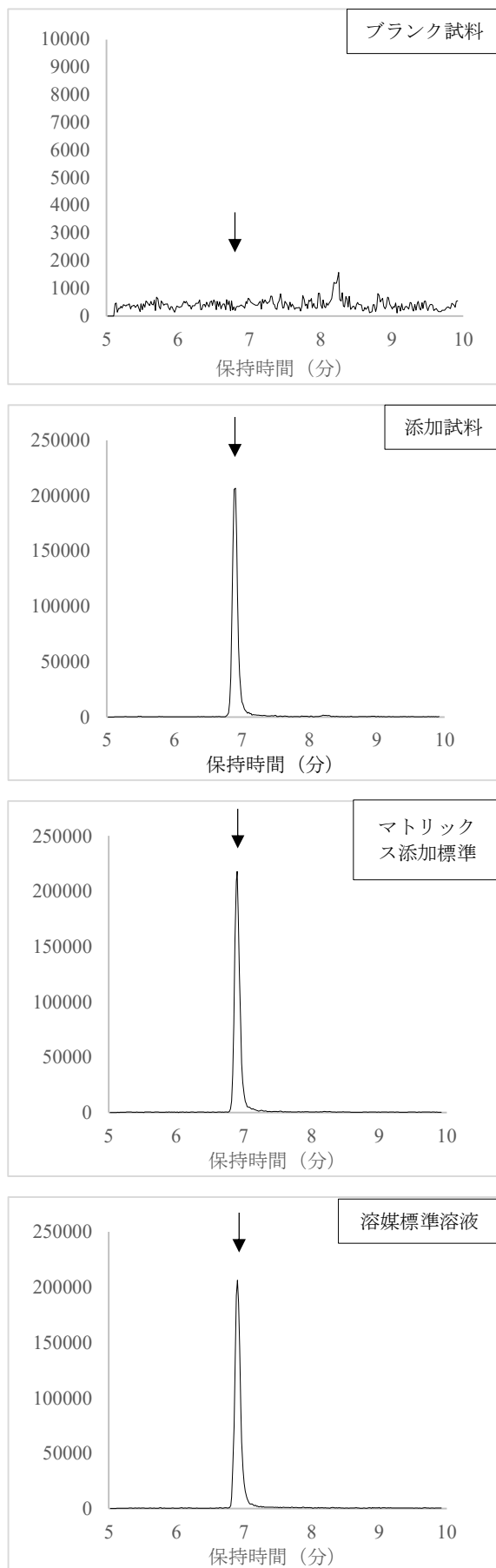


図8 豚の筋肉のSRMクロマトグラム
モエノマイシンA (m/z 790.2→575.8)、添加濃度：0.01 mg/kg

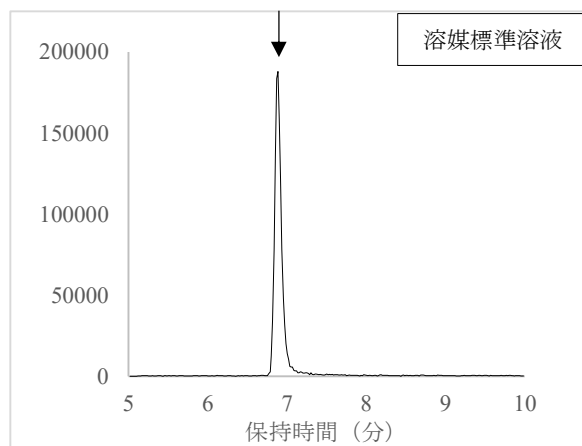
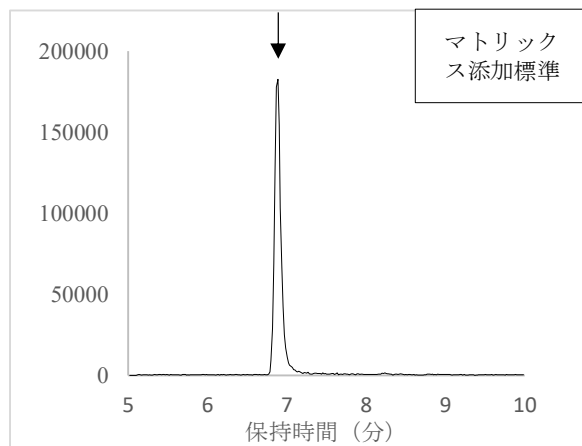
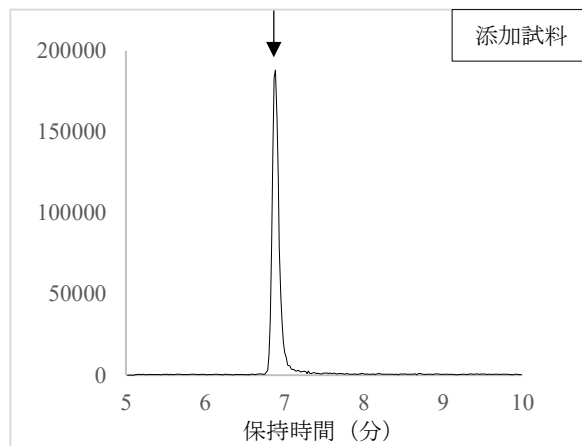
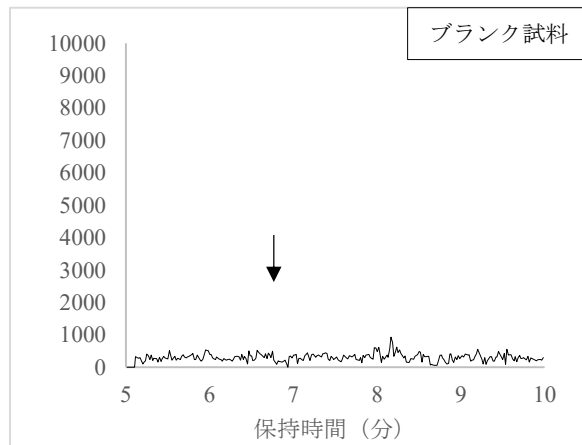


図9 豚の脂肪のSRMクロマトグラム

モエノマイシンA (m/z 790.2→575.8)、添加濃度：0.01 mg/kg

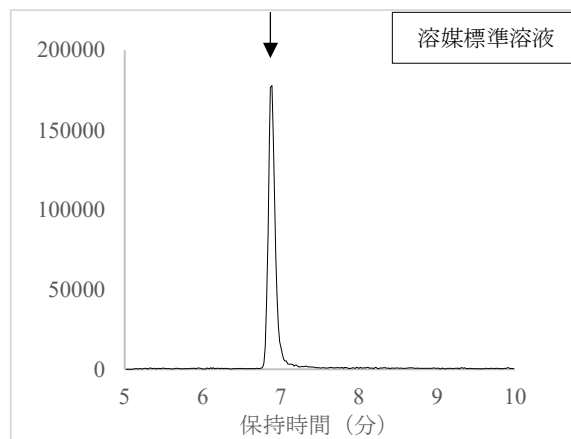
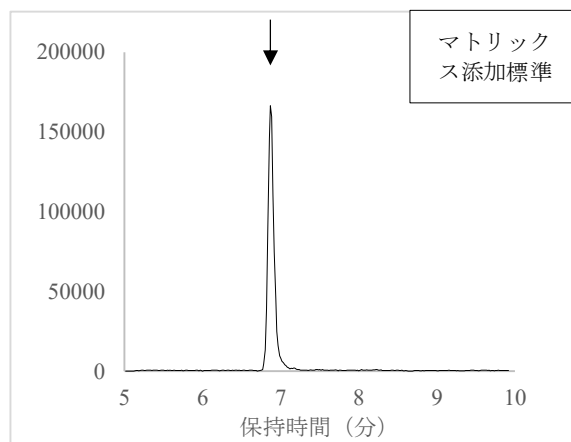
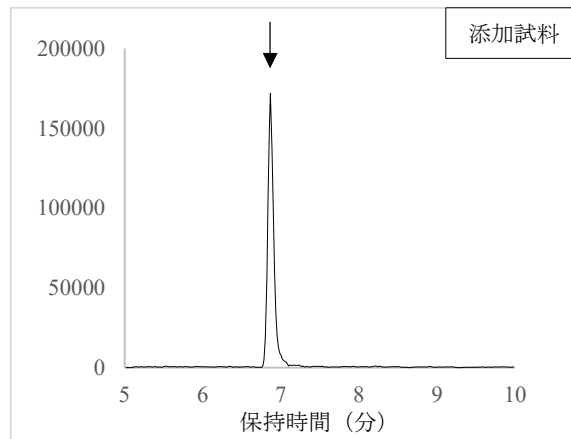
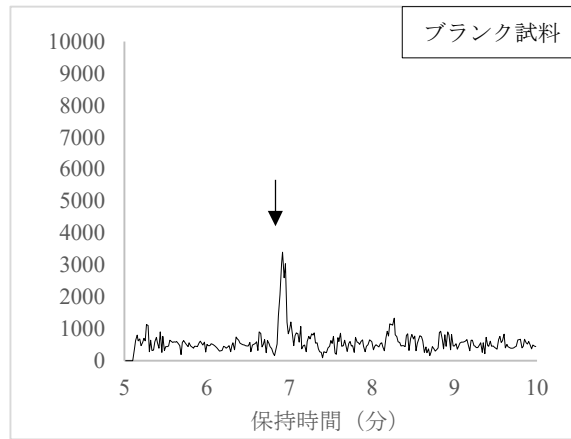


図10 豚の肝臓のSRMクロマトグラム
モエノマイシンA (m/z 790.2→575.8)、添加濃度：0.01 mg/kg

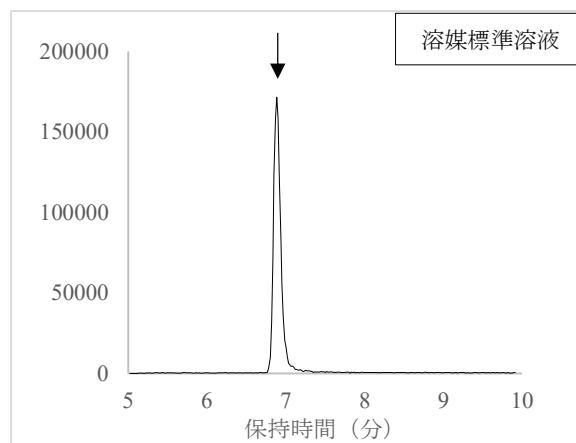
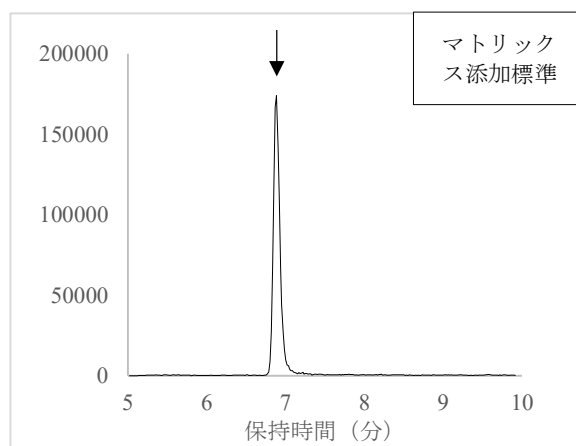
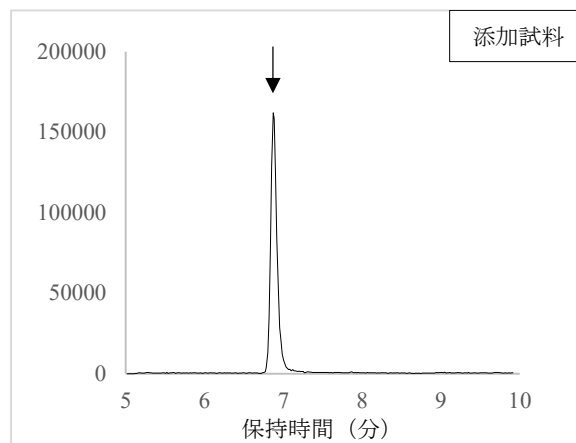
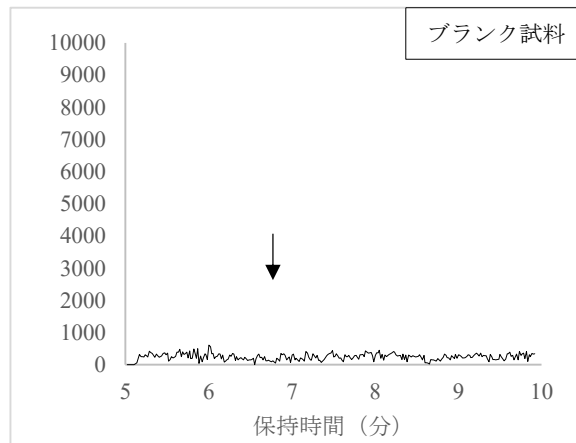


図11 鶏卵のSRMクロマトグラム
モエノマイシンA (m/z 790.2→575.8)、添加濃度：0.01 mg/kg

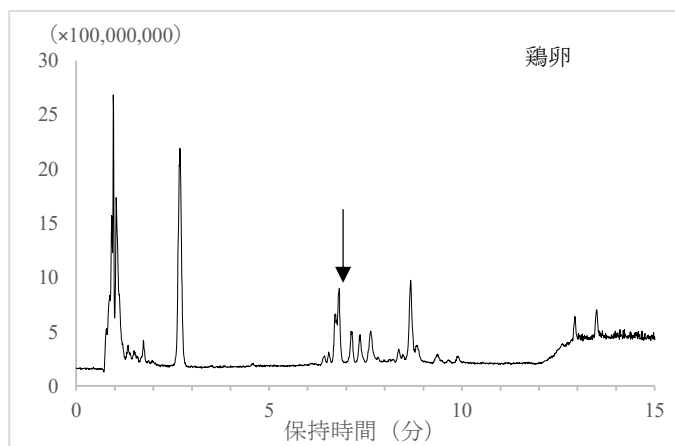
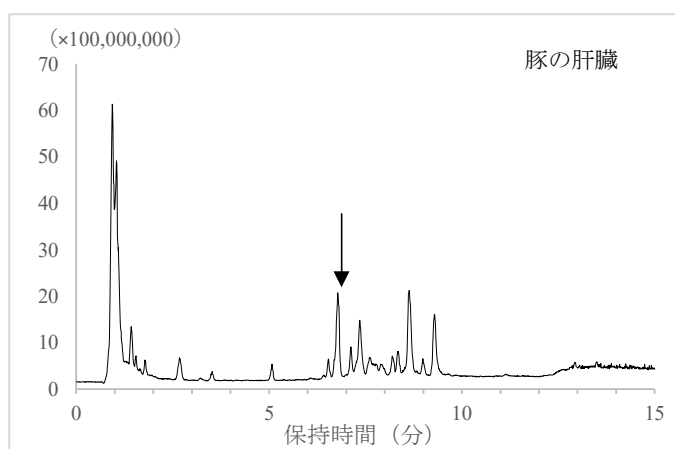
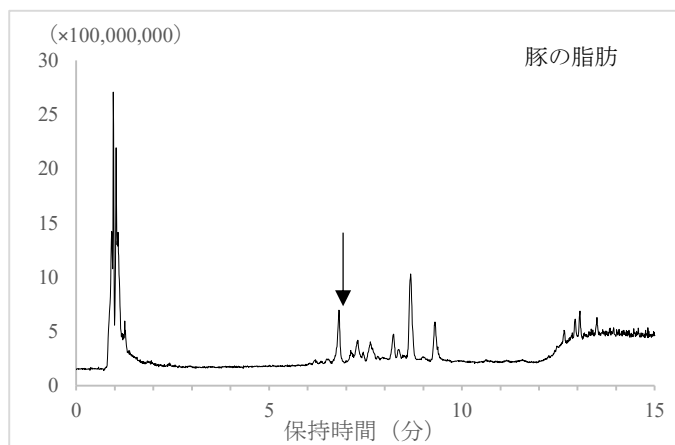
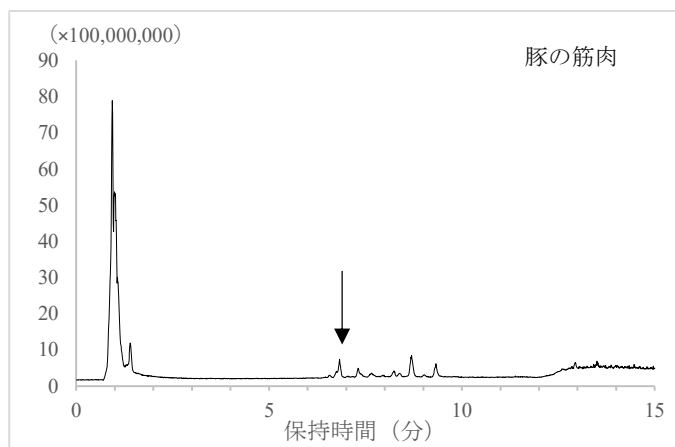


図12 ブランク試料のトータルイオンクロマトグラム
(スキャン範囲：100～1800 amu)