

ミロサマイシン試験法（畜水産物）

1. 分析対象化合物

ミロサマイシン

2. 装置

液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計（LC-MS/MS）

3. 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。

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（60 mg） 内径8～9 mm のポリエチレン製のカラム管にジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体60 mg を充て込んだもの又はこれと同等の分離特性を有するものを用いる。

ミロサマイシン標準品 本品はミロサマイシン95%以上を含む。

4. 試験溶液の調製

1) 抽出

①肉、脂肪、肝臓、腎臓、魚介類、乳及び卵の場合

試料10.0 g にアセトン100 mL を加え、ホモジナイズした後、毎分3,500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50 mL を加えてホモジナイズした後、毎分3,500回転で5分間遠心分離し、得られた上澄液を合わせ、アセトンを加えて正確に200 mL とする。この10 mL を採り、2-プロパノール5 mL を加えて40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物に*n*-ヘキサン30 mL を加え、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル30 mL ずつで3回振とう抽出する。抽出液を合わせ、40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物に水及びメタノール（7：3）混液10 mL を加えて溶かす。

②はちみつの場合

試料10.0 g に水10 mL を加えて溶かした後、アセトン100 mL を加え、振とう抽出した後、毎分3,500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50 mL を加えてホモジナイズした後、毎分3,500回転で5分間遠心分離し、得られた上澄液を合わせ、アセトンを加えて正確に200 mL とする。この10 mL を採り、2-プロパノール5 mL を加えて40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物に*n*-ヘキサン30 mL を加え、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル30 mL ずつで3回振とう抽出する。抽出液を合わせ、40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物に水及びメタノール（7：3）混液10 mL を加えて溶かす。

2) 精製

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（60 mg） にメタノール5 mL 及び水及びメタノール（7：3）混液5 mL を順次注入し、流出液は捨てる。このカラムに1) で得られた溶液を注入した後、さらに水及びメタノール（7：3）混液5 mL を注入し、流出

液は捨てる。次いでアセトニトリル 10 mL を注入し、溶出液を 40℃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解し、正確に 5 mL としたものを試験溶液とする。

5. 検量線の作成

ミロサマイシン標準品の 0.001~0.02 mg/L 溶液（メタノール）を数点調製し、それぞれ 5 µL を 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。

6. 定量

試験溶液 5 µL を LC-MS/MS に注入し、5 の検量線でミロサマイシンの含量を求める。

7. 確認試験

LC-MS/MS により確認する。

8. 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 3.5 µm

カラム温度：40℃

移動相：0.05 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液及び 0.05 vol%ギ酸混液（1：4）から（1：1）までの濃度勾配を 15 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 728、プロダクトイオン 158、116

保持時間の目安：8 分

9. 定量限界

0.01 mg/kg

10. 留意事項

1) 試験法の概要

ミロサマイシンを試料からアセトンで抽出し、アセトニトリル/ヘキサン分配で脱脂した後、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ミロサマイシンの 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 728、プロダクトイオン 158

定性イオン (m/z)：プリカーサーイオン 728、プロダクトイオン 116

②遠心分離後の上澄液を採る際に、浮遊物等がある場合には綿栓ろ過を行うと良い。

③組織・臓器（肝臓、腎臓など）によっては、特に鮮度が高い場合、試料採取後放置すると

ミロサマイシンが減少する可能性があることが報告されており、試料採取後速やかに抽出操作を開始することが望ましい。また、必要に応じて、放置中の減少がないことを確認することが望ましい。

1 1. 参考文献

なし。

1 2. 類型

C