

※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下さい。

## ホスホマイシン（畜水産物）の検討結果

### 〔緒言〕

#### 1. 目的及び試験法の検討方針

ホスホマイシンは*Streptomyces fradiae*、*S.viridochromogenes*及び*S.wedmorensis*の培養による産生又は合成により製造される抗菌性物質で、広い抗菌性スペクトルと殺菌的作用を有し、他の抗菌性物質と交差耐性が認められていない。細菌の細胞壁のペプチドグリカン合成を阻害することにより作用を示す。

ホスホマイシンはエポキシプロピル基にリン酸がC-P結合した構造を持つエポキシプロピルホスホン酸である。この遊離酸は不安定で室温に放置すると速やかに生物活性を失うため、実際は一価または二価の安定な塩として存在する。

日本では、牛のパスツレラ性肺炎、大腸菌性下痢及びサルモネラ症、すずき目魚類（マダイ、ブリ等）の類結節症を適応症に承認されている。

また、国内ではヒト用医薬品としても用いられ、眼科、耳鼻科、皮膚科等の感染症に経口投与剤、注射剤、点耳薬として使用されている

「薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会農薬・動物用医薬品部会報告書（別添2）」に記載されている規制対象物質及び残留基準値案を踏まえ、ホスホマイシン試験法の開発を行った。

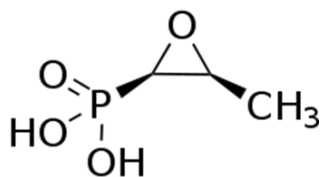
#### 1) 規制対象物質

ホスホマイシン

#### 2. 分析対象化合物の構造式、物理化学的性質、基準値等に関する情報

##### 1) 構造式及び物理化学的性質

名称：ホスホマイシン



化学式：C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>O<sub>4</sub>P

分子量：138.06

化学名（IUPAC）：[(2*R*,3*R*)-3-methyloxiran-2-yl]phosphonic acid

水溶解度：46.9 mg/mL (ALOGPS)

Log Pow：-0.86 (ALOGPS)、-0.74 (ChemAxon)

pKa：1.25 (ChemAxon)

(出典：DrugBank; <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00828>)

##### 2) 基準値

牛の筋肉：0.5 ppm

牛の脂肪：0.5 ppm

牛の肝臓：0.5 ppm

牛の腎臓：0.5 ppm

牛の食用部分：0.5 ppm

乳：0.05 ppm

魚介類（すずき目魚類に限る）：0.05 ppm

#### [実験方法]

### 1. 試料

#### 1) 購入先

大阪府内のスーパーにて購入した。

#### 2) 試料の採取方法

- ① 牛の筋肉は可能な限り脂肪層を除いた後、細切均一化した。
- ② 牛の脂肪は可能な限り筋肉部を除いた後、細切均一化した。
- ③ 牛の肝臓は、細切均一化した。
- ④ 牛乳は、全体をよく混合して均一化した。
- ⑤ ブリは、皮を含む筋肉部を細切均一化した。

### 2. 試薬・試液

#### 1) 標準品

ホスホマイシン二ナトリウム塩：ホスホマイシン二ナトリウムとしての純度98.1%（富士フィルム和光純薬製）

#### 2) 試薬・ミニカラム

アセトニトリル、*n*-ヘキサン、メタノール：残留農薬試験用（関東化学製）

アセトニトリル：LC/MS用（関東化学製）

ギ酸：試薬特級（富士フィルム和光純薬製）

酢酸：試薬特級（富士フィルム和光純薬製）

アンモニア水（25%）：一級（富士フィルム和光純薬製）

炭酸水素アンモニウム：一級（富士フィルム和光純薬製）

酢酸アンモニウム：試薬特級（富士フィルム和光純薬製）

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム：InertSep C18（2 g、ジーエルサイエンス製）

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：Oasis WAX（150 mg、Waters製）

#### 3) 標準溶液、試液の調製方法

##### ①標準溶液の調製方法

標準原液：ホスホマイシン二ナトリウム標準品をホスホマイシンとして20 mgを精秤し、水に溶かして20 mLに定容し、1,000 mg/L溶液を調製した。

検量線用標準溶液（定量条件用）：ホスホマイシン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）混液で希釈し、0.00125～0.0075 mg/Lの濃度の溶液を調製した。

検量線用標準溶液（確認条件用）：ホスホマイシン標準原液をアンモニア水及び10 mmol/L炭酸水素アンモニウム溶液（1：500）混液で希釈し、0.00125～0.0075 mg/Lの濃度の溶液を調製した。

添加用標準溶液：ホスホマイシン標準原液をメタノールで希釈し、1及び10 mg/Lの濃度の溶液を調製した。

## ② 試液の調製方法

### 2 vol%ギ酸

ギ酸2 mLに水を加えて混合し、100 mLとした。

### 10 mmol/L炭酸水素アンモニウム溶液

炭酸水素アンモニウム0.79 gを水に溶解し、1,000 mLとした。

### 20 mmol/L炭酸水素アンモニウム溶液

炭酸水素アンモニウム1.58 gを水に溶解し、1,000 mLとした。

### 50 mmol/L炭酸水素アンモニウム溶液

炭酸水素アンモニウム3.95 gを水に溶解し、1,000 mLとした。

### 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

アンモニア水2 mL及び10 mmol/L炭酸水素アンモニウム溶液1,000 mLを混合した。

### 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

アンモニア水2 mL、50 mmol/L炭酸水素アンモニウム溶液200 mL及びアセトニトリル800 mLを混合した。

### 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

アンモニア水2 mL、20 mmol/L炭酸水素アンモニウム溶液500 mL及びアセトニトリル500 mLを混合した。

### 10 mmol/L酢酸アンモニウム溶液（pH3）

酢酸アンモニウム0.77 gを約900 mLの水に溶解し、酢酸でpH3に調整後、水で1,000 mLとした。

## 3. 装置

ホモジナイザー：ヒスコトロン NS-52（マイクロテック・ニチオン製）

ロータリーエバポレーター：N-1110（東京理化器械製）

### LC-MS/MS

	型式	会社
MS 装置	LCMS-8060	島津製作所
LC 装置	Nexera X2	島津製作所
解析ソフト	LabSolutions Insight	島津製作所

## 4. 測定条件

### 1) 定量条件

LC 条件	
カラム	XBridge BEH Amide サイズ：内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3.5 µm 会社：Waters
移動相流速（mL/min）	0.20
注入量（µL）	2
カラム温度（℃）	40
移動相	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

グラジエント条件	時間(分)	A液(%)	B液(%)
	0.00	0	100
	10.00	100	0
	16.00	100	0
	16.01	0	100
	25.00	0	100
MS 条件			
測定モード	MS/MS、SRM (選択反応モニタリング)		
イオン化モード	ESI (-)		
プローブ電圧 (V)	3000		
インターフェイス温度 (°C)	400		
DL 温度 (°C)	250		
ヒートブロック温度 (°C)	500		
ネブライザーガス	窒素 3 L/min		
ドライイングガス	窒素 10 L/min		
ヒーティングガス	空気 10 L/min		
コリジョンガス	アルゴン		
定量イオン (m/z)	137→63[コリジョンエネルギー：13(eV)]		
定性イオン (m/z)	137→79[コリジョンエネルギー：21(eV)]		
保持時間 (min)	4.8 分		

## 2) 確認条件

LC 条件	
カラム	Hypercarb サイズ：内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3.0 μm 会社：Thermo Scientific
移動相流速 (mL/min)	0.15
注入量 (μL)	5
カラム温度 (°C)	40
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
MS 条件	
測定モード	MS/MS、選択反応モニタリング
イオン化モード	ESI (-)
インターフェイス電圧 (V)	3000
インターフェイス温度 (°C)	400
脱溶媒管温度 (°C)	250
ヒートブロック温度 (°C)	500
ネブライザーガス	窒素 3 L/min
ドライイングガス	窒素 10 L/min
コリジョンガス	アルゴン
定量イオン (m/z)	137→63[コリジョンエネルギー：13(eV)]
定性イオン (m/z)	137→79[コリジョンエネルギー：21(eV)]
保持時間 (min)	3.8 分

## 5. 定量

[実験方法] 2. 3) ①に従い調製した標準溶液2  $\mu$ LをLC-MS/MSに注入し、得られたピーク面積から絶対検量線法で検量線を作成した。試験溶液2  $\mu$ LをLC-MS/MSに注入し、得られたピーク面積と作成した検量線からホスホマイシンの量を算出した。

## 6. 添加試料の調製

2. 3) ①に従い調製した添加用標準溶液を使用した。

牛の筋肉、牛の肝臓、牛乳及びブリー（添加濃度：0.05 ppm相当）：1. 2) の試料10.0 gを量り採り、添加用標準溶液1 mg/Lを0.5 mL添加しよく混合した後、30分間放置した。

牛の筋肉及び牛の肝臓（添加濃度：0.5 ppm相当）：1. 2) の試料10.0 gを量り採り、添加用標準溶液10 mg/Lを0.5 mL添加しよく混合した後、30分間放置した。

牛の脂肪（添加濃度：0.05 ppm相当）：1. 2) の試料10.0 gを量り採り、40°Cの水浴中で溶解させた。そこに添加用標準溶液1 mg/Lを0.5 mL添加しよく混合し再凝固後、30分間放置した。

牛の脂肪（添加濃度：0.5 ppm相当）：1. 2) の試料10.0 gを量り採り、40°Cの水浴中で溶解させた。そこに添加用標準溶液10 mg/Lを0.5 mL添加しよく混合し再凝固後、30分間放置した。

## 7. 試験溶液の調製

ホスホマイシンを試料からメタノールで抽出し、*n*-ヘキサン洗浄した。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た後、LC-MS/MSで定量及び確認した。

### 1) 抽出

1. 2) の試料10.0 gを広口ビンに量り採り、メタノール100 mLを加え、ホモジナイズした後、ケイソウ土を厚さ約1 cmに敷いたろ紙（直径60 mm、No. 5、桐山製作所製）を用いて吸引ろ過した。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た後、上記と同様にろ過した。得られたろ液を合わせて、メタノールで正確に200 mLとした。この溶液から正確に10 mLを分取し、40°C以下で濃縮し、溶媒を除去した。この残留物に水10 mLを加え分液漏斗に移し、*n*-ヘキサン20 mLを加え、5分間振とうした後、水層を分取した。残った*n*-ヘキサン層と使用した分液漏斗を洗浄する目的で水10 mLを加え、分取した後、水層を合わせた。

### 2) 精製

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム [InertSep C18 (2 g)] に、メタノール及び水各10 mLを順次注入し、各流出液は捨てた。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 [Oasis WAX (150 mg)] に、メタノール、2 vol%ギ酸及び水各10 mLを順次注入し、各流出液は捨てた。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た後、水10 mLを注入し、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムを外した。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、各流出液は捨てた。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、溶媒を除去した。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) 混液に溶解し、正確に5 mLとしたものを試験溶液とした。なお、確認条件用の場合は、この残留物にアンモニア水及び10 mmol/L炭酸水素アンモニウム溶液 (1 : 500) 混液に溶解し、正確に5 mLとしたものを試験溶液とした。

[分析法フローチャート]

秤 取

↓ 試料10.0 g

メタノール抽出

- | メタノール100 mLを加え、ホモジナイズ
- | 吸引ろ過
- | 残留物にメタノール50 mLを加え、ホモジナイズ
- | 吸引ろ過、ろ液を合わせ、メタノールで正確に200 mLとする
- ↓ 抽出液10 mL分取、減圧濃縮、溶媒を除去

*n*-ヘキサン洗浄

- | 残留物を水10 mL及び*n*-ヘキサン20 mLに順次溶解し分液漏斗に移す
- | 5分間振とう
- | 水層を採る
- ↓ 分液漏斗の内壁を水10 mLで洗い、水層を合わせる

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム (2 g) 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 (150 mg) 精製

- | InertSep C18 : メタノール及び水各10 mLで予備洗浄
- | Oasis WAX : メタノール、2 vol%ギ酸及び水各10 mLで予備洗浄
- | InertSep C18の下部にOASIS WAXを連結
- | 試料溶液注入
- | 水10 mL注入
- | InertSep C18を外し、Oasis WAXをメタノール、水各10 mLで洗浄
- ↓ 10 mmol/L酢酸アンモニウム溶液 (pH 3) 20 mLで溶出

濃縮 (溶媒除去)

- | 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5 mLに溶解 (定量用)
- | 残留物をアンモニア水及び10 mmol/L炭酸水素アンモニウム溶液 (1 : 500) 混液5 mL
- ↓ に溶解 (確認用)

LC-MS/MS定量

- 2 µL注入 (定量用)
- 5 µL注入 (確認用)

8. マトリックス添加標準溶液の調製

1) 定量限界相当濃度 (定量限界の推定用)

牛の筋肉、牛の脂肪及び牛の肝臓は、7. 試験溶液の調製に従って調製し、残留物を0.005 mg/L標準溶液5 mLに溶解したものを、マトリックス添加標準溶液とした。

2) 添加回収試験における回収率 100%相当濃度 (試料マトリックスの測定への影響用)

牛の筋肉、牛の脂肪及び牛の肝臓は、7. 試験溶液の調製に従って調製し、残留物を0.05 mg/L標準溶液5 mLに溶解したものを、マトリックス添加標準溶液とした。

牛乳及びブリは、7. 試験溶液の調製に従って調製し、残留物を0.005 mg/L標準溶液5 mLに溶解したものを、マトリックス添加標準溶液とした。

## [結果及び考察]

### 1. 測定条件の検討

#### 1) MS条件の検討

[実験方法] 4. 1) の移動相組成 (1 : 1) 混液を用い、フローインジェクションにてイオン化の確認を行った。

ホスホマイシンは ESI (－) モードでの測定が可能であった。

ホスホマイシンの ESI (－) モード測定時のマススペクトルを図 1 に示した。その結果から、基準ピークとして 137 が得られたので、ホスホマイシンの脱プロトン化分子 ( $m/z$  137  $[M-H]^-$ ) をプリカーサーイオンとした。また、 $m/z$  137 をプリカーサーイオンとした場合のプロダクトイオンスペクトルを図 2 に示した。強度として  $m/z$  79 のプロダクトイオンが強く、次いで  $m/z$  63 であったが、使用した装置では  $m/z$  79 よりも  $m/z$  63 のプロダクトイオンの方が S/N が良好だったこと、また  $m/z$  79 は試験溶液の測定において選択性が低かったため、 $m/z$  63 を定量用イオン、 $m/z$  79 を定性用イオンとした。なお、 $m/z$  81 のプロダクトイオンは  $m/z$  79 よりも S/N が非常に悪かったため採用しなかった。

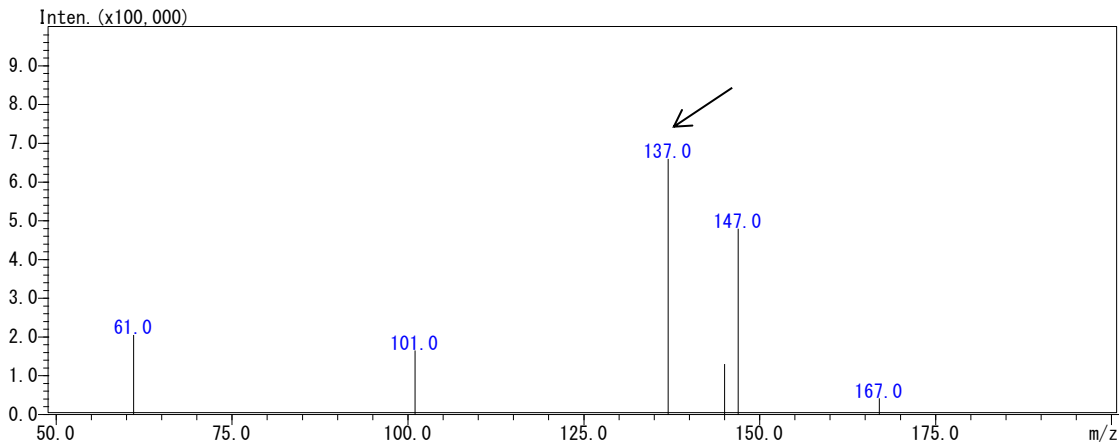


図 1 ホスホマイシンのマススペクトル

スキャン範囲：50～200  $m/z$

測定条件：ESI (－)

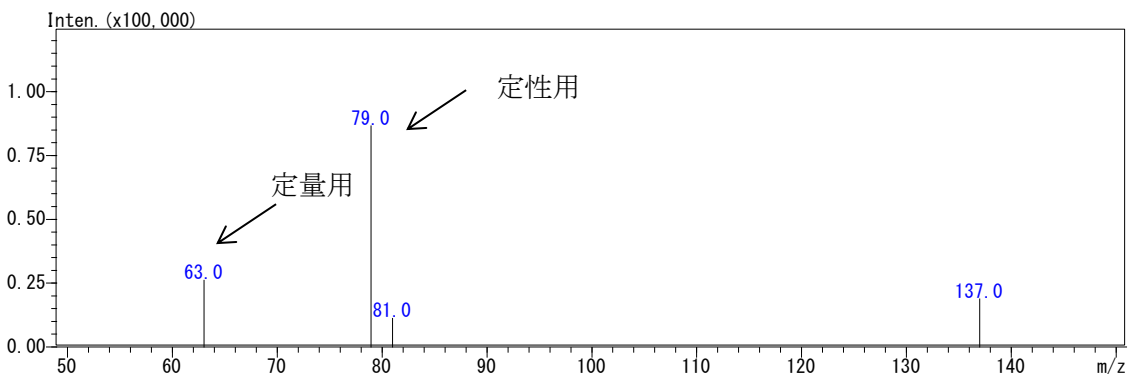


図 2 ホスホマイシンのプリカーサーイオン  $m/z$  137 のプロダクトスキャンスペクトル (定量用)

スキャン範囲：50～150  $m/z$

測定条件：ESI (－)、コリジョンエネルギー：20 (eV)

#### 2) LC条件の検討

分離カラムについて検討を行った。ホスホマイシンは高極性物質であるため、オクタデシルシリル化

シリカゲルカラムではイオンペア剤を使用しないと保持が困難である。イオンペア剤を使用せず、測定を行うために、HILICカラムを検討した。カラムにInertsil HILIC（内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3  $\mu$ m）を、移動相についてはアセトニトリル及びギ酸又はギ酸アンモニウム溶液を用いて検討を行ったところ、保持及びピーク形状とも悪かったが、移動相としてアセトニトリル及びアンモニア溶液を用いて検討を行ったところ、ホスホマイシンを保持することが可能であった。Inertsil HILICは推奨のpH範囲が2～7.5のため、XBridge BEH HILIC（内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3.5  $\mu$ m）及びXBridge BEH Amide（内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3.5  $\mu$ m）を用いて検討を行った。XBridge BEH Amideカラムの方が保持及びピーク形状が良好だったため、XBridge BEH Amideカラムを用いることとした。

移動相中のアンモニア濃度の変化を抑えるため、加えるアンモニウム塩及びアンモニア量について検討を行った。アンモニウム塩として、ギ酸アンモニウム、酢酸アンモニウム及び炭酸水素アンモニウムを用いて検討したところ、炭酸水素アンモニウムを用いた移動相がピーク保持及びピーク形状とも良好であったため、炭酸水素アンモニウムを用いることとした。

分離カラムはXBridge BEH Amide（内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3.5  $\mu$ m）を、移動相はA液にアンモニア水及び10 mmol/L炭酸水素アンモニウム溶液（1：500）混液、B液にアンモニア水、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）混液を用い、A液及びB液（0：100）から（100：0）までの濃度勾配を10分間で行い、（100：0）で6分間保持することとした。

### 3) 確認条件の検討

ホスホマイシンの定性イオン ( $m/z$  137 $\rightarrow$ 79) は試料由来の妨害ピークの影響で選択性が悪く、1の2)の条件での試料溶液の測定において定性が困難な場合があったため、分離カラムに多孔性グラファイトカーボンカラムHypercarb（内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3  $\mu$ m）を用いて確認条件の検討を行った。ホスホマイシンは、水及びアセトニトリルではカラムから溶出しなかったため、移動相にギ酸、酢酸及びアンモニア溶液を検討したところ、アンモニア溶液を用いた場合にピーク保持することが可能であった。アンモニア水及び水の比率を（1：500）、（1：250）及び（1：100）で比較したところ、保持時間はほとんど変わらなかったため、アンモニア水及び水の比率は（1：500）とした。

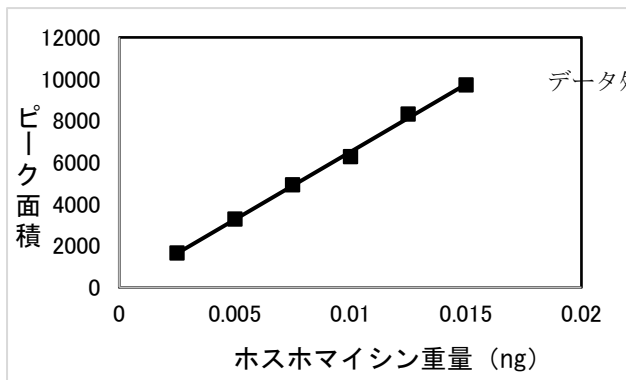
移動相中のアンモニア濃度の変化を抑えるため、加えるアンモニウム塩について検討した。アンモニウム塩として、ギ酸アンモニウム、酢酸アンモニウム及び炭酸水素アンモニウムを用いて検討したところ、ギ酸アンモニウム及び酢酸アンモニウムではピーク形状が崩れたが、炭酸水素アンモニウムを用いた移動相では、ピーク保持及びピーク形状とも良好であったため、炭酸水素アンモニウムを用いることとした。炭酸水素アンモニウム濃度を10 mmol/L及び50 mmol/Lで比較したところ保持時間はほとんど変わらなかったため、炭酸水素アンモニウムの濃度は10 mmol/Lとした。なお、移動相にアセトニトリルを加えるとピーク形状が崩れる傾向にあったため、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）混液のアイソクラティック条件とした。次に流速の検討を行った。流速0.2 mL/minでは保持時間が約2.5分、流速0.15 mL/minでは保持時間が約3.8分であったため、流速は0.15 mL/minとした。

本試験法では、1の2)の条件で定量及び定性を行う方法（定量条件）とした。ただし、試料からホスホマイシンを検出した場合で、定性イオン ( $m/z$  137 $\rightarrow$ 79) によるホスホマイシンの確認が困難な場合は、1の3)の条件で確認する方法（確認条件）を開発した。

### 4) 検量線

図3にホスホマイシンの検量線の例を示した。定量条件では、0.00125 mg/L (0.0025 ng) ～0.0075 mg/L (0.015 ng)、確認条件では、0.00125 mg/L (0.00625 ng) ～0.0075 mg/L (0.0375 ng) の濃度範囲で作成した検量線の相関係数は、いずれも0.995以上であり良好な直線性を示した。

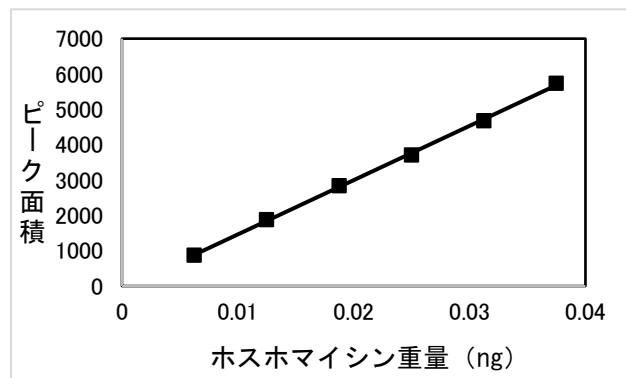




データ処理装置設定条件の一例

データ処理ソフト (メーカー)  
: LabSolutions insight (島津製作所製)  
ピークの定量方法: ピーク面積法  
検量線の種類: 最小二乗法  
検量線基準ピークの重量: 0.0025 ng~0.015 ng  
傾き (a) : a= 649109  
切片 (b) : b= 13  
R : 0.9990

図 3-1 定量条件のホスホマイシン検量線例 ( $m/z$  137→63)



データ処理装置設定条件の一例

データ処理ソフト (メーカー)  
: LabSolutions insight (島津製作所製)  
ピークの定量方法: ピーク面積法  
検量線の種類: 最小二乗法  
検量線基準ピークの重量: 0.00625 ng~0.0375 ng  
傾き (a) : a= 153609  
切片 (b) : b= -76  
R : 0.9997

図 3-2 確認条件のホスホマイシン検量線例 ( $m/z$  137→63)

## 5) 定量限界

定量限界の算出結果を以下に示した。

### ① 定量条件の場合

$$0.05 \text{ mg/kg} [ (5 \text{ mL}/0.5 \text{ g}^{*1}) \times (0.01 \text{ ng}/2 \mu\text{L}) ]$$

$$*1 \quad 10.0 \text{ g} \times 10 \text{ mL}/200 \text{ mL}$$

### ② 確認条件の場合

$$0.05 \text{ mg/kg} [ (5 \text{ mL}/0.5 \text{ g}^{*2}) \times (0.025 \text{ ng}/5 \mu\text{L}) ]$$

$$*2 \quad 10.0 \text{ g} \times 10 \text{ mL}/200 \text{ mL}$$

## 2. 試験溶液調製法の検討

### 1) 抽出方法の検討

ホスホマイシンはアセトニトリル、アセトンにほとんど溶解せず、水またはメタノールに溶解可能であったため、溶解性及び畜水産物試料との混和性を考慮し、メタノールを用いて抽出することとした。

### 2) 脱脂方法の検討

脂溶性の妨害物質の除去を目的として、ヘキサン洗浄を検討した。実際の操作を想定してメタノール 10 mL に、メタノールで調製した 1 mg/L のホスホマイシン標準溶液を 0.25 mL 加えた後、40°C 以下で濃縮し、溶媒を除去した。ここに、水 10 mL を加え分液漏斗に移し、*n*-ヘキサン 20 mL を加え、5 分間振とうした後、水層を分取した。次に、水層に *n*-ヘキサン 20 mL を加え、同様に 5 分間振とうした後、水層を分取した。結果を表 1 に示した。ホスホマイシンは *n*-ヘキサンには移行せず、肝臓を用いてヘキサン洗浄 1 回及び 2 回での精製効果を比較したところ、ほぼ同様であったため、洗浄回数は 1 回とした。

表1 *n*-ヘキサン洗浄の検討 (%)

	水		<i>n</i> -ヘキサン		合計
	10 mL	20 mL			
		(1回目)	(2回目)		
ホスホマイシン	102	0	0	102	

添加量 : 0.25 µg

## 3) 精製方法の検討

## ①オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムによる精製の検討

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムを用いた精製を検討した。InertSep C18 500 mg、1 g及び2 gをメタノール及び水各10 mLで予備洗浄した後、ホスホマイシン0.25 µgを水20 mLで溶解、負荷、溶出したときの溶出状況を表2に示した。ホスホマイシンは、カラムに保持せず溶出した。肝臓を用いて比較したところ、充てん量500 mgでは目詰まりが確認されたため採用しなかった。充てん量1 g及び2 gでは、どちらも負荷液20 mL及び水10 mLでホスホマイシンは溶出したが、本試験法開発では、精製効果を考慮して、充てん量の多いInertSep C18 2 gを用い、負荷後、水10 mLを注入し、全溶出液を回収することとした。

表2 オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムからの溶出状況 (%)

充てん量	負荷液		水		合計
	20 mL	0-10 mL	10-20 mL		
500 mg	96	2	0	98	
1 g	86	15	0	101	
2 g	84	17	0	101	

InertSep C18、ジーエルサイエンス製

添加量 : 0.25 µg

②3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よる精製の検討 I

Oasis WAXを用いた精製を検討した。Oasis WAXをメタノール、2 vol%ギ酸及び水各10 mLで順次予備洗浄した後、ホスホマイシン0.25 µgを水30 mLで溶解、負荷した後、2 vol%ギ酸、メタノール、水並びにアンモニア水及び水 (1 : 19) 混液で溶出したときの溶出状況を表3に示した。ホスホマイシンは2 vol%ギ酸で一部溶出したこと、また合計の回収が低かったことから2 vol%ギ酸を用いないこととし、2 vol%ギ酸を用いず溶出したときの溶出状況の確認を別途実施し、結果を表4に示した。ホスホマイシンはメタノール及び水画分では溶出せず、アンモニア水及び水 (1 : 19) 混液10 mLで全て溶出が可能であった。

表3 Oasis WAXからの溶出状況 (%)

負荷液	2vol%ギ酸 溶液	メタノール	水	アンモニア水及び水 (1 : 19) 混液		合計
				10 mL	10 mL	
30 mL	10 mL	10 mL	10 mL	0-10 mL	10-20 mL	
0	31	12	0	27	0	70

Oasis WAX 150 mg、Waters製

添加量 : 0.25 µg

表4 Oasis WAXからの溶出状況 (%)

負荷液	メタノール	水	アンモニア水及び水 (1:19) 混液		合計
			0-10 mL	10-20 mL	
30 mL	10 mL	10 mL	0	0	103
0	0	0	103	0	103

Oasis WAX 150 mg、Waters製  
添加量：0.25 µg

表4の結果を踏まえ、牛の肝臓及び牛乳を用いて、検討を行った。[分析法フローチャート]に従い、ヘキサン洗浄まで行った試料溶液を、連結したInertSep C18 (2 g) 及びOasis WAXに負荷、水10 mLを注入後、InertSep C18 (2 g) を取り外した。Oasis WAXにメタノール10 mL及び水10 mLで洗浄後、アンモニア水及び水 (1:19) 混液10 mLで溶出させた。4の1) 及び2) の条件で測定した添加回収率、試料マトリックスの測定への影響の状況を表5に示した。なお、添加濃度0.01 ppmの検討では、LC-MS/MS測定用の試験溶液は1 mLに定容して測定した。

確認条件での結果、牛乳において試料マトリックスの測定への影響が大きかったため、Oasis WAXの溶出条件の再検討を行った。

表5-1 肝臓及び牛乳での回収率、試料マトリックスの測定への影響及び補正真度状況 (定量条件)

食品名	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)	ピーク面積比	補正回収率 (%)
牛の肝臓	0.01	78	0.89	88
	0.05	99	1.08	92
牛乳	0.01	74	0.86	86
	0.05	84	0.90	93

表5-2 肝臓及び牛乳での回収率、試料マトリックスの測定への影響及び補正真度状況 (確認条件)

食品名	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)	ピーク面積比	補正回収率 (%)
牛の肝臓	0.01	81	0.88	92
	0.05	99	1.03	95
牛乳	0.01	40	0.44	92
	0.05	63	0.69	91

### ③3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よる精製の検討 II

Oasis WAXからの溶出液として、塩基性溶媒での溶出では、試料マトリックスの測定へ影響する成分が同時に溶出していることから、塩基性溶媒以外の溶出液として酢酸アンモニウム溶液を検討した。試料マトリックスの測定への影響が大きかった牛乳のブランク抽出液を用い、*n*-ヘキサン洗浄、InertSep C18精製後の溶液に、水で調製した1 mg/Lのホスホマイシン標準溶液を0.25 mL添加し、Oasis WAXに負荷後、酢酸アンモニウム濃度を各10、20、30及び40 mmol/Lでホスホマイシンの溶出状況を確認した。溶出状況を表6に示した。測定は確認条件で行った。表6の結果より、牛乳では10 mmol/L酢酸アンモニウム溶液での洗浄が可能であったため、牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓及びブリでも洗浄が可能か確認した。結果を表7に示した。その結果、牛の肝臓において、10 mmol/L酢酸アンモニウム溶液10 mLの画分にホスホ

マイシンの溶出が認められた。

表6 酢酸アンモニウム溶液を用いたOasis WAXからの溶出状況 (%)

食品名	酢酸アンモニウム濃度 (mmol/L)	回収率 (%)					合計
		10 mL	10-20 mL	20-30 mL	30-40 mL	40-50 mL	
牛乳	10	0	0	1	2	5	8
	20	4	24	33	23	10	94
	30	23	50	22	4	0	100
	40	43	46	9	0	0	98

Oasis WAX 150 mg、Waters製

添加量 : 0.25 µg

表7 各食品での10 mmol/L酢酸アンモニウム溶液を用いたOasis WAXからの溶出状況 (%)

食品名	回収率 (%)			
	10 mL	10-20 mL	20-30 mL	合計
牛の筋肉	0	2	4	6
牛の脂肪	0	0	0	0
牛の肝臓	2	5	8	15
ブリ	0	3	6	9

Oasis WAX 150 mg、Waters製

添加量 : 0.25 µg

牛の肝臓において、10 mmol/L酢酸アンモニウム溶液10 mLの画分にホスホマイシンの溶出が認められたが、10 mmol/L酢酸アンモニウム溶液10 mLを用いた洗浄工程の効果の確認を行った。試料マトリックスの測定への影響が大きかった牛乳を用い、*n*-ヘキサン洗浄、InertSep C18精製後、Oasis WAXに負荷、10 mmol/L酢酸アンモニウム溶液、メタノール及び水各10 mLで洗浄後、アンモニア及び水 (1 : 19) 混液10 mLで溶出した場合の状況を確認した。溶出状況を表8に示した。確認条件での測定結果より、10 mmol/L酢酸アンモニウム溶液10 mLによる洗浄効果はあまり認められなかった。10 mmol/L酢酸アンモニウム溶液による洗浄は精製効果が低いこと、及び牛の肝臓では10 mmol/L酢酸アンモニウム溶液の洗浄画分にホスホマイシンの溶出が認められることから、本試験法開発では採用しなかった。

表8-1 牛乳での回収率、試料マトリックスの測定への影響及び補正真度状況 (定量条件)

食品名	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)	ピーク面積比	補正回収率 (%)
牛乳	0.01	73	0.88	83
	0.05	87	0.89	97

表8-2 牛乳での回収率、試料マトリックスの測定への影響及び補正真度状況 (確認条件)

食品名	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)	ピーク面積比	補正回収率 (%)
牛乳	0.01	41	0.46	90
	0.05	59	0.63	93

④3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よる精製の検討  
III

測定へ影響する試料マトリックスの主要成分は、定量条件より確認条件でより強く影響していること、及びOasis WAXの検討③の結果からホスホマイシンより強い強酸性物質と想定し、ホスホマイシンの溶出条件の検討を行った。酢酸を用いてpH 3、pH 4及びpH 5の10 mmol/L酢酸アンモニウム溶液を調製し、ホスホマイシンの溶出状況を確認した。試料マトリックスとして牛乳のブランク抽出液を用い、*n*-ヘキサン洗浄、InertSep C18精製後の溶液にホスホマイシンを0.25 µg添加し、Oasis WAXに負荷、メタノール及び水各10 mLで洗浄後、pH 3、pH 4及びpH 5の10 mmol/L酢酸アンモニウム溶液でのホスホマイシンの溶出状況を表9に示した。測定は確認条件で行った。

10 mmol/L酢酸アンモニウム溶液のpHを3~5に調整することで、Oasis WAXからホスホマイシンの溶出が可能であり、表9の結果より、Oasis WAXからのホスホマイシンの溶出は10 mmol/L酢酸アンモニウム溶液 (pH3) 20 mLとした。

表9 10 mmol/L酢酸アンモニウム溶液を用いた各pHにおけるOasis WAXからの溶出状況 (%)

食品名	pH	回収率 (%)				合計
		10 mL	10-20 mL	20-30 mL	30-40 mL	
牛乳	3	75	26	0	0	101
	4	52	57	0	0	109
	5	3	47	35	11	96

Oasis WAX 150 mg、Waters製

添加量 : 0.25 µg

4) 定量条件での試験溶液作製用溶媒の検討

Oasis WAXからのホスホマイシンの溶出液を10 mmol/L酢酸アンモニウム (pH 3) 20 mLとしたため、試験溶液に約15 mgの酢酸アンモニウムを含むこととなった。試験溶液をアンモニア水、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 (移動相B) 5 mLを用いて作製した場合、試験溶液が2層になった。試験溶液を作製する溶媒として、アセトニトリル含量を減らし、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) 混液とすることで試験溶液が分離することなく測定することが可能であったため、定量条件において、試験溶液はアンモニア水、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) 混液で作製することとした。

5) 定量限界の検討

[実験方法] 7. 試験溶液の調製に従い、0.01 ppm及び0.05 ppm相当濃度の添加回収試験を行った。添加回収試験の状況を表10に示した。添加濃度0.01 ppmの添加回収試験では、LC-MS/MS測定用の試験溶液は1 mLに定容して測定した。定量条件では、0.05 ppm相当濃度の添加回収試験の結果は良好であったが、0.01 ppm相当濃度の添加回収試験では牛の肝臓及びブリにおいて、試料マトリックスによる測定への影響があった。確認条件では、0.05 ppm相当濃度の添加回収試験の結果は良好であったが、0.01 ppm相当濃度の添加回収試験では、試験溶液に含まれる酢酸アンモニウム量の影響でホスホマイシンのピーク形状が崩れ、0.01 ppm相当濃度の添加回収試験の結果を評価することが出来なかった。本試験法開発では、定量条件、確認条件とも良好な結果の得られた0.05 ppmを定量限界に設定することとした。

表10-1 各食品での回収率、試料マトリックスの測定への影響及び補正真度状況（定量条件）

食品名	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)	ピーク面積比	補正回収率 (%)
牛の筋肉	0.01	97	0.99	99
	0.05	93	1.07	87
牛の脂肪	0.01	78	1.01	77
	0.05	84	1.00	84
牛の肝臓	0.01	63	0.71	89
	0.05	83	0.93	89
牛乳	0.01	84	1.01	83
	0.05	102	1.02	100
ブリ	0.01	79	0.85	93
	0.05	102	1.06	96

表10-2 各食品での回収率、試料マトリックスの測定への影響及び補正真度状況（確認条件）

食品名	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)	ピーク面積比	補正回収率 (%)
牛の筋肉	0.01	—	—	—
	0.05	100	1.04	96
牛の脂肪	0.01	—	—	—
	0.05	82	1.03	80
牛の肝臓	0.01	—	—	—
	0.05	94	1.04	90
牛乳	0.01	—	—	—
	0.05	105	1.08	97
ブリ	0.01	—	—	—
	0.05	98	1.06	92

—：測定不能

### 3. 添加回収試験

牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳及びブリの5食品を用いて、[実験方法] 7. 試験溶液の調製に従って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に示した。また、各食品のブランク試料のスキャ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5に示した。

#### 1) 選択性

選択性の結果を表11に示した。検討した何れの試料においても定量イオン ( $m/z$  137→63) においてホスホマイシンの定量を妨害するようなピークは認められず、選択性は良好であった。

表11-1 選択性の評価（定量条件）

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) <sup>1)</sup>						選択性の 評価 <sup>3)</sup>	備考		
					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 <sup>2)</sup>					面積(高さ) 比(a)/(b)	
								n=1	n=2	平均(a)	n=1	n=2	平均(b)				
1	ホスホマイシン	牛の筋肉	0.05	0.5	基準値	0.5	< 0.100	面積	0	0	0			#DIV/0!	#DIV/0!	○	
		牛の脂肪	0.05	0.5	基準値	0.5	< 0.100	面積	0	0	0			#DIV/0!	#DIV/0!	○	
		牛の肝臓	0.05	0.5	基準値	0.5	< 0.100	面積	0	0	0			#DIV/0!	#DIV/0!	○	
		乳	0.05	0.05	定量限界	0.05	< 0.333	面積	0	0	0			#DIV/0!	#DIV/0!	○	
		ブドウ糖	0.05	0.05	定量限界	0.05	< 0.333	面積	0	0	0			#DIV/0!	#DIV/0!	○	

- \*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。

表11-2 選択性の評価（確認条件）

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) <sup>1)</sup>						選択性の 評価 <sup>3)</sup>	備考		
					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 <sup>2)</sup>					面積(高さ) 比(a)/(b)	
								n=1	n=2	平均(a)	n=1	n=2	平均(b)				
1	ホスホマイシン	牛の筋肉	0.05	0.5	基準値	0.5	< 0.100	面積	0	0	0			#DIV/0!	#DIV/0!	○	
		牛の脂肪	0.05	0.5	基準値	0.5	< 0.100	面積	0	0	0			#DIV/0!	#DIV/0!	○	
		牛の肝臓	0.05	0.5	基準値	0.5	< 0.100	面積	0	0	0			#DIV/0!	#DIV/0!	○	
		乳	0.05	0.05	定量限界	0.05	< 0.333	面積	0	0	0			#DIV/0!	#DIV/0!	○	
		ブドウ糖	0.05	0.05	定量限界	0.05	< 0.333	面積	0	0	0			#DIV/0!	#DIV/0!	○	

- \*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、精度及び定量限界

真度及び併行精度の検討結果を表12に示した。ホスホマイシンの真度は定量条件で82.0~104.2%、確認条件で83.5~108.3%、併行精度は定量条件で2.5~4.0%、確認条件で2.2~7.0%、であり、目標値を十分に満たした。ホスホマイシンのS/N比の平均値は定量条件で84.9~170.3、確認条件で93.5~149.0でありS/N ≥ 10を十分に満たした。

表12-1 真度、精度及び定量限界の評価（定量条件）

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 <sup>1)</sup>	検査線			回収率(%)					真度 (%)	併行精度 (RSD%)	SN <sup>2)</sup>			備考
							傾き	切片	r <sup>2</sup> 値	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5			Max.	Min.	平均値	
1	ホスホマイシン	牛の筋肉	0.05	0.5	0.05	S/N	988023	-210	0.9990	93.4	95.2	95.2	93.6	99.3	95.3	2.5	84.9	84.9	84.9	
		牛の脂肪	0.05	0.5	0.05	S/N	880640	-21	0.9958	84.0	85.9	78.8	83.7	81.2	82.7	3.3	170.3	102.0	136.2	#DIV/0!
		牛の肝臓	0.05	0.5	0.05	S/N	1298217	13	0.9980	82.8	77.5	83.1	81.1	85.6	82.0	3.7	127.6	127.6	127.6	#DIV/0!
		乳	0.05	0.05	0.05	S/N	1041280	-203	0.9957	101.6	103.0	106.9	107.9	101.5	104.2	2.9	170.3	170.3	170.3	#DIV/0!
		ブドウ糖	0.05	0.05	0.05	S/N	1376297	-291	0.9993	101.9	94.5	98.7	97.3	93.2	97.1	3.6	84.9	102.0	93.5	

- \*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。

表12-2 真度、精度及び定量限界の評価（確認条件）

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 <sup>1)</sup>	検査線			回収率(%)					真度 (%)	併行精度 (RSD%)	SN <sup>2)</sup>			備考
							傾き	切片	r <sup>2</sup> 値	n=1	n=2	n=3	n=4	n=5			Max.	Min.	平均値	
1	ホスホマイシン	牛の筋肉	0.05	0.5	0.05	S/N	863406	511	0.9950	99.9	97.4	101.4	90.7	85.6	95.0	7.0	84.9	102.0	93.5	
		牛の脂肪	0.05	0.5	0.05	S/N	78880	434	0.9971	116.7	105.5	112.1	106.3	100.9	108.3	5.7	-	-	-	#DIV/0!
		牛の肝臓	0.05	0.5	0.05	S/N	1292777	-122	0.9974	82.1	84.8	84.4	80.9	85.0	83.5	2.2	102.0	127.6	114.8	#DIV/0!
		乳	0.05	0.05	0.05	S/N	59737	170	0.9983	100.1	106.1	96.4	100.3	92.2	99.0	5.2	-	-	-	#DIV/0!
		ブドウ糖	0.05	0.05	0.05	S/N	768046	-76	0.9993	93.9	91.0	96.6	89.5	92.9	92.8	2.9	170.3	127.6	149.0	

- \*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13に示した。添加回収試験における回収率100%相当濃度に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。ホスホマイシンの面積比は定量条件で0.93~1.08、確認条件で1.01~1.10であり、測定への影響は少ないものと考えられた。

表13で求めた添加回収試験における真度をピーク面積比で除して補正真度を求め、表14に示した。補正真度は定量条件で83.2～104.1%、確認条件で80.8～104.7であり、試料マトリックスの測定への影響と真度との間に矛盾は見られなかった。

表 13-1 試料マトリックスの測定への影響（定量条件）

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 <sup>1</sup> (mg/L)	ピーク面積(高さ) <sup>2</sup>						備考			
							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	ホスホマイシン	牛の筋肉	0.05	0.5	0.05	0.005	面積	0	4915	4995	4955	4604	4588	4596	1.08	
		牛の筋肉	0.05	0.5	0.5	0.005	面積	0	5402	5358	5380	5645	5778	5712	0.94	
		牛の脂肪	0.05	0.5	0.05	0.005	面積	0	4131	4249	4190	4149	4278	4214	0.99	
		牛の脂肪	0.05	0.5	0.5	0.005	面積	0	5678	5467	5573	5616	5461	5539	1.01	
		牛の肝臓	0.05	0.5	0.05	0.005	面積	0	6384	6300	6342	6886	6776	6831	0.93	
		牛の肝臓	0.05	0.5	0.5	0.005	面積	0	5466	5725	5596	5231	5339	5285	1.06	
		乳	0.05	0.05	0.05	0.005	面積	0	5223	4940	5082	5096	4951	5024	1.01	
		ブリー	0.05	0.05	0.05	0.005	面積	0	6841	7067	6954	6448	6720	6584	1.06	

- \*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。

表 13-2 試料マトリックスの測定への影響（確認条件）

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 <sup>1</sup> (mg/L)	ピーク面積(高さ) <sup>2</sup>						備考			
							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	ホスホマイシン	牛の筋肉	0.05	0.5	0.05	0.005	面積	0	4644	4629	4637	4464	4319	4392	1.06	
		牛の筋肉	0.05	0.5	0.5	0.005	面積	0	3889	4005	3947	3672	3958	3815	1.03	
		牛の脂肪	0.05	0.5	0.05	0.005	面積	0	6454	6206	6330	6256	5997	6127	1.03	
		牛の脂肪	0.05	0.5	0.5	0.005	面積	0	3137	3086	3112	3113	3002	3058	1.02	
		牛の肝臓	0.05	0.5	0.05	0.005	面積	0	3589	3563	3576	3447	3492	3470	1.03	
		牛の肝臓	0.05	0.5	0.5	0.005	面積	0	4036	4035	4036	4145	3821	3983	1.01	
		乳	0.05	0.05	0.05	0.005	面積	0	3237	3097	3167	2994	2747	2871	1.10	
		ブリー	0.05	0.05	0.05	0.005	面積	0	3589	3563	3576	3447	3492	3470	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。

表 14-1 補正真度（定量条件）

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	基準値 <sup>1</sup> (ppm)	添加濃度 (ppm)	真度 (%)	ピーク面積 比 (%)	補正真度 (%)	備考
1	ホスホマイシン	牛の筋肉	0.05	0.5	0.05	95.3	1.08	88.4	
		牛の筋肉	0.05	0.5	0.5	98.1	0.94	104.1	
		牛の脂肪	0.05	0.5	0.05	82.7	0.99	83.2	
		牛の脂肪	0.05	0.5	0.5	96.2	1.01	95.6	
		牛の肝臓	0.05	0.5	0.05	82.0	0.93	88.3	
		牛の肝臓	0.05	0.5	0.5	92.9	1.06	87.8	
		乳	0.05	0.05	0.05	104.2	1.01	103.0	
		ブリー	0.05	0.05	0.05	97.1	1.06	91.9	

\*1 基準値は、基準値未設定の場合には一律基準(0.01 ppm)を用いる。

表 14-2 補正真度（確認条件）

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 (ppm)	基準値 <sup>1</sup> (ppm)	添加濃度 (ppm)	真度 (%)	ピーク面積 比 (%)	補正真度 (%)	備考
1	ホスホマイシン	牛の筋肉	0.05	0.5	0.05	95.0	1.06	90.0	
		牛の筋肉	0.05	0.5	0.5	108.3	1.03	104.7	
		牛の脂肪	0.05	0.5	0.05	83.5	1.03	80.8	
		牛の脂肪	0.05	0.5	0.5	99.0	1.02	97.3	
		牛の肝臓	0.05	0.5	0.05	92.8	1.03	90.0	
		牛の肝臓	0.05	0.5	0.5	99.4	1.01	98.1	
		乳	0.05	0.05	0.05	103.6	1.10	93.9	
		ブリー	0.05	0.05	0.05	92.8	1.03	90.0	

\*1 基準値は、基準値未設定の場合には一律基準(0.01 ppm)を用いる。



#### 4. 考察

抽出はホスホマイシンの溶解性及び試料との混和性を考慮しメタノールを用いた。脱脂操作として、*n*-ヘキサン洗浄を検討したところ、良好な結果が得られた。精製カラムについては、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム及び弱塩基性陰イオン交換樹脂ミニカラムについて検討したところ、良好な結果が得られた。なお、食品によってはホスホマイシンの定性イオン ( $m/z$  137→79) は定性を妨害する成分の影響を受ける場合があったため、ホスホマイシンを検出した場合は、分離カラムの異なる確認条件で確認する方法とした。

本試験法開発において定量限界の目標値として0.01 mg/kgを検討したが、主に確認条件において定量限界0.01 mg/kgの開発には至らなかったため、定量限界を0.05 mg/kgとした。確認条件において、0.01 mg/kgの定量限界の開発に至らなかった要因のひとつとして、試験溶液に含まれる酢酸アンモニウムの影響があったため、試験溶液から酢酸アンモニウムを除く方法の開発が課題である。

開発した方法を用いて、牛の筋肉等5食品の添加回収試験を行った結果、定量イオン ( $m/z$  137→63) での選択性は良好で何れの試料においても妨害ピークは認められず、ホスホマイシンの真度は定量条件において82.0～104.2%、併行精度は2.5～4.0%、確認条件において真度は83.5～108.3%、併行精度は2.2～7.0%の良好な結果が得られたことから、本試験法は、陸棲哺乳類に属する動物の筋肉、脂肪及び肝臓並びに魚介類等の畜水産物に適用可能であると判断された。

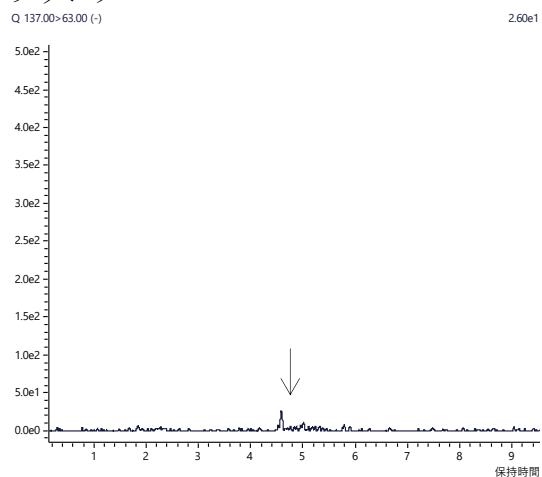
#### [結論]

畜水産物のホスホマイシンの試験法として、試料からメタノールを用いて抽出し、*n*-ヘキサン洗浄による脱脂後、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム及び弱塩基性陰イオン交換樹脂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。

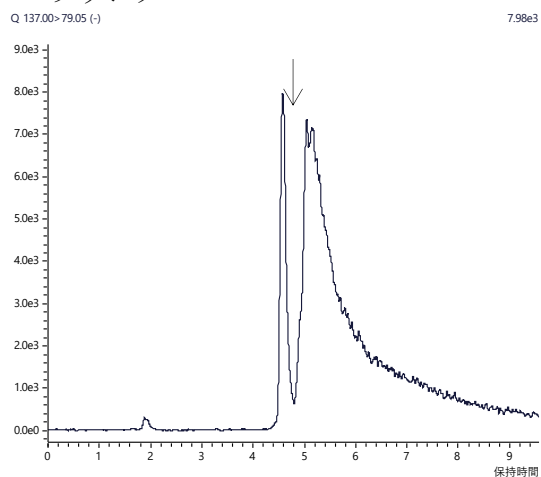
開発した試験法を牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳及びブりに適用した結果、選択性は良好で何れの試料においても妨害ピークは認められず、ホスホマイシンの真度は定量条件において82.0～104.2%、併行精度は2.5～4.0%、確認条件において真度は83.5～108.3%、併行精度は2.2～7.0%、定量限界は0.05 mg/kgが可能であることが確認できたため、基準値の設定されている畜水産物に適用可能であると考えられた。

ホスホマイシンの添加回収試験におけるクロマトグラム（定量条件）

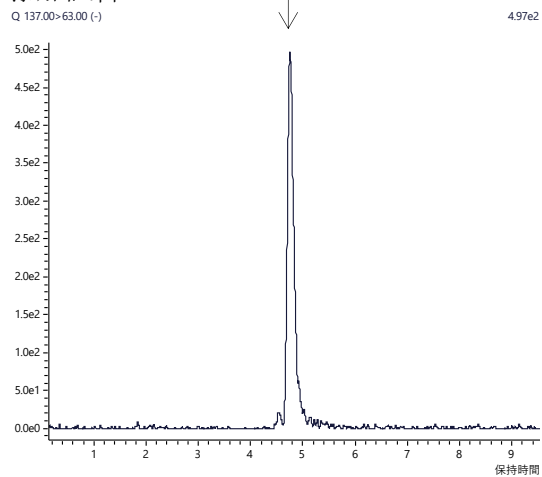
ブランク



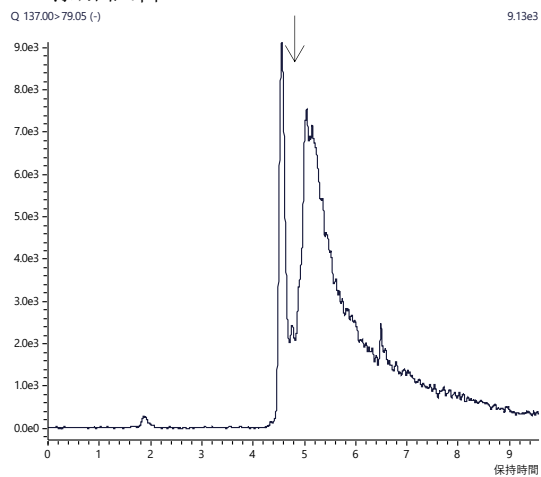
ブランク



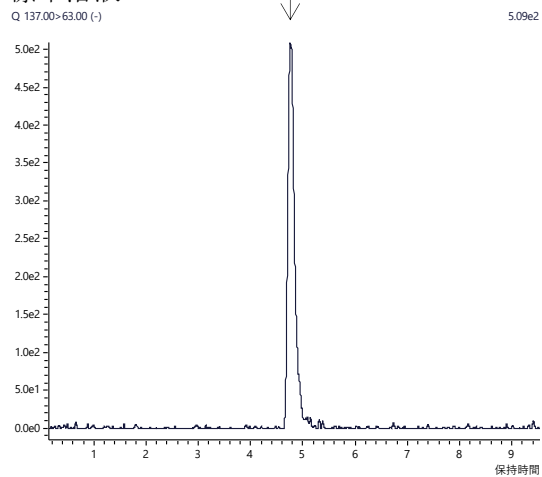
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

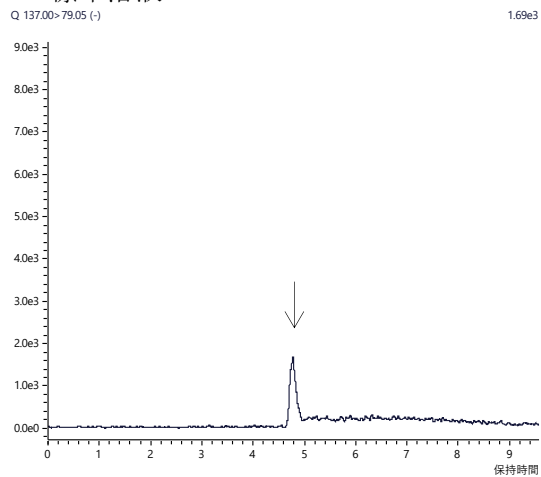


図 4-1 牛の筋肉の SRM クロマトグラム

ホスホマイシン

定量イオン ( $m/z$  -137→63)

添加濃度：0.05 ppm

図 4-2 牛の筋肉の SRM クロマトグラム

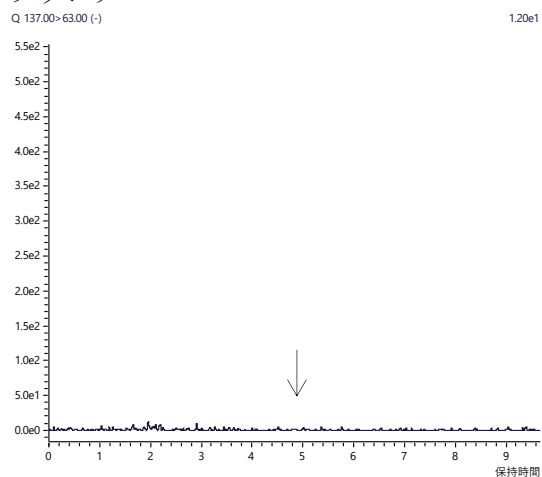
ホスホマイシン

定性イオン ( $m/z$  -137→79)

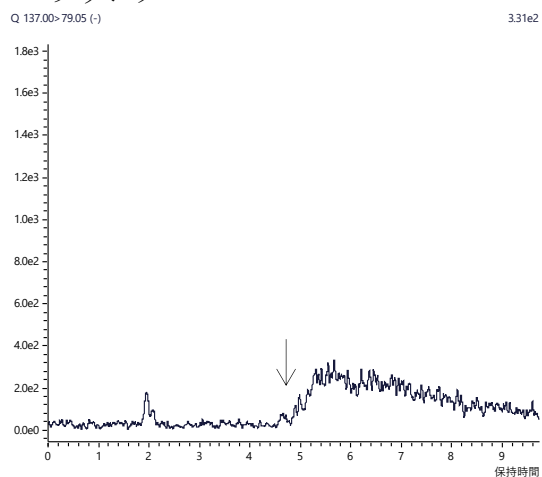
添加濃度：0.05 ppm

ホスホマイシンの添加回収試験におけるクロマトグラム（定量条件）

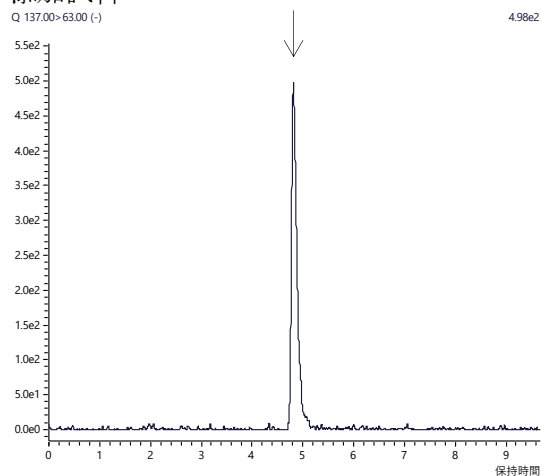
ブランク



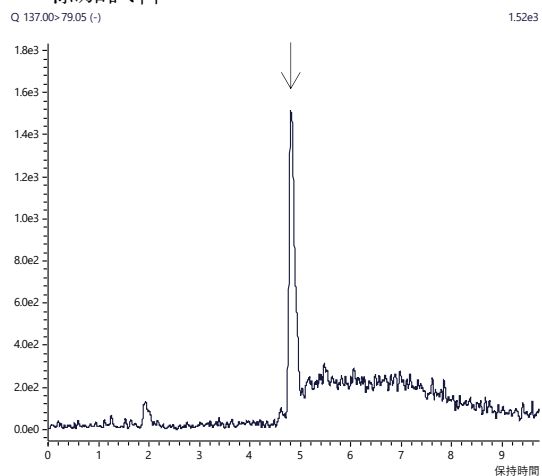
ブランク



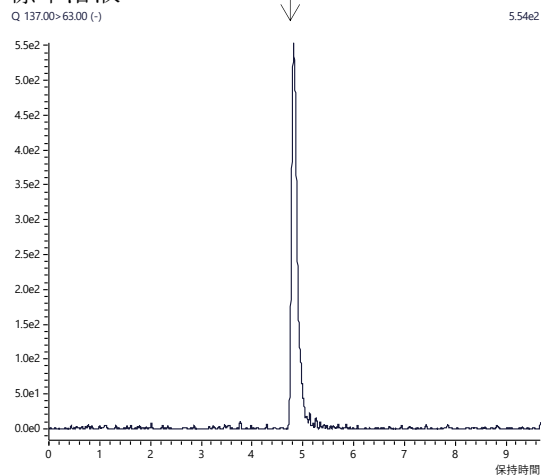
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

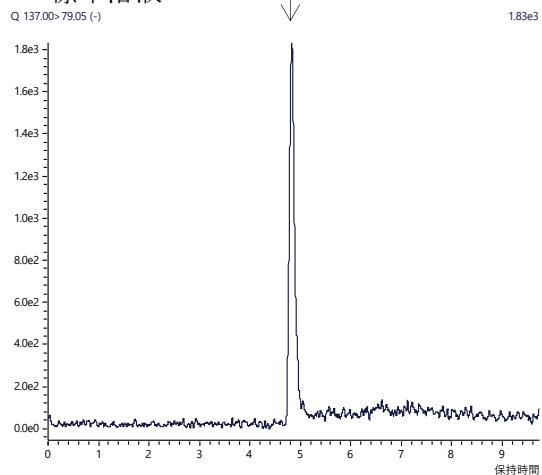


図 4-3 牛の脂肪の SRM クロマトグラム

ホスホマイシン

定量イオン ( $m/z$  -137→63)

添加濃度：0.05 ppm

図 4-4 牛の脂肪の SRM クロマトグラム

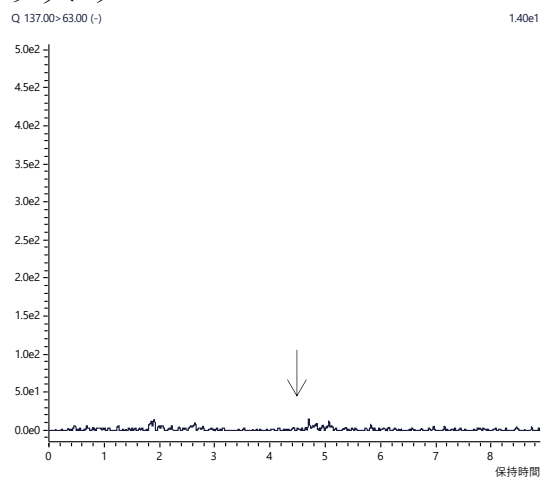
ホスホマイシン

定性イオン ( $m/z$  -137→79)

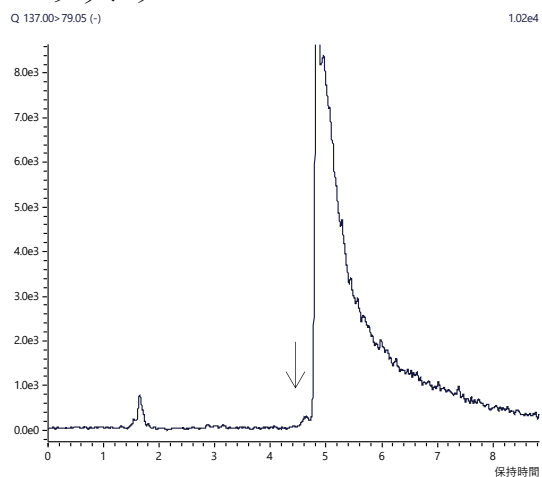
添加濃度：0.05 ppm

ホスホマイシンの添加回収試験におけるクロマトグラム（定量条件）

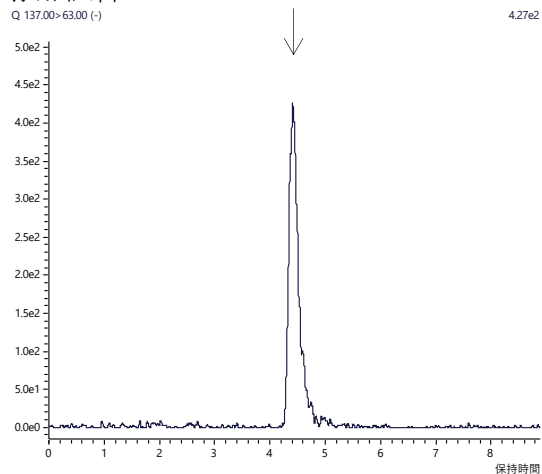
ブランク



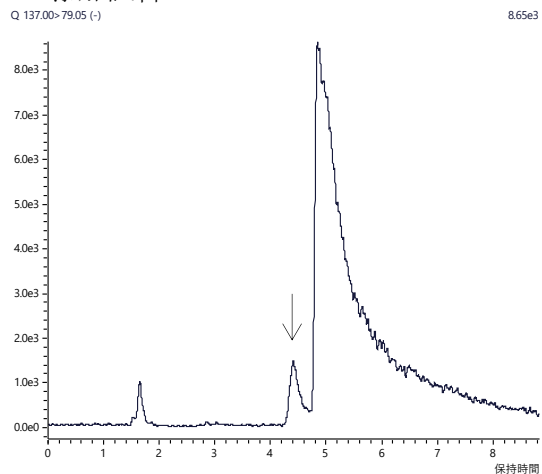
ブランク



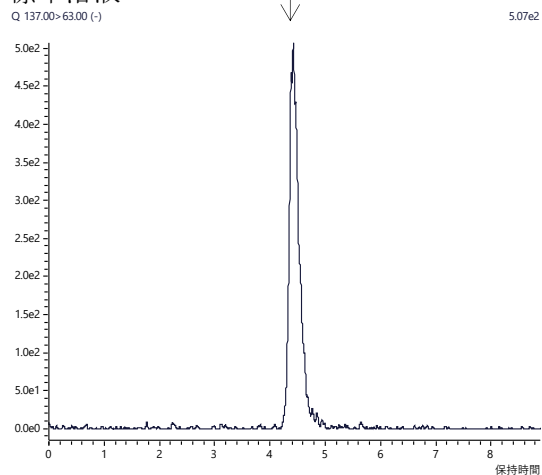
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

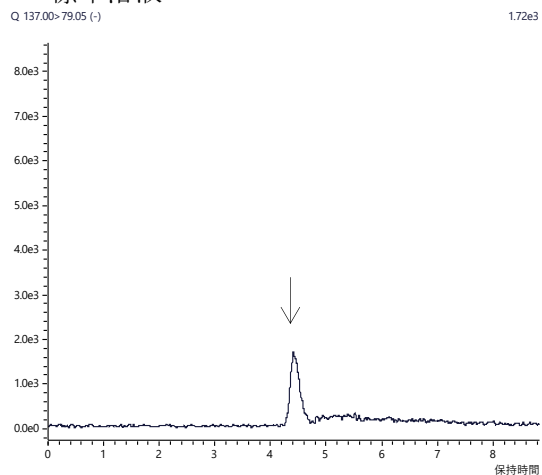


図 4-5 牛の肝臓の SRM クロマトグラム

ホスホマイシン

定量イオン ( $m/z$  -137→63)

添加濃度：0.05 ppm

図 4-6 牛の肝臓の SRM クロマトグラム

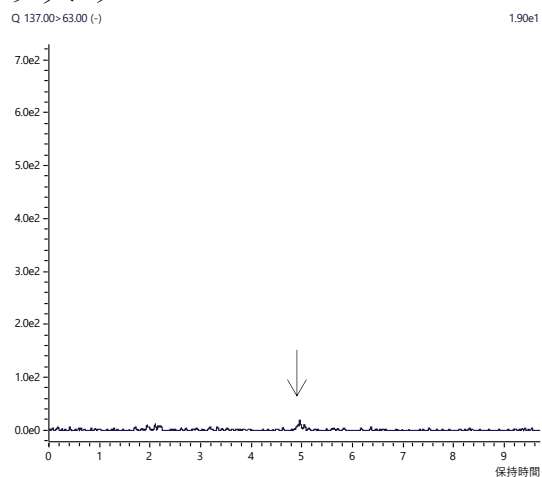
ホスホマイシン

定性イオン ( $m/z$  -137→79)

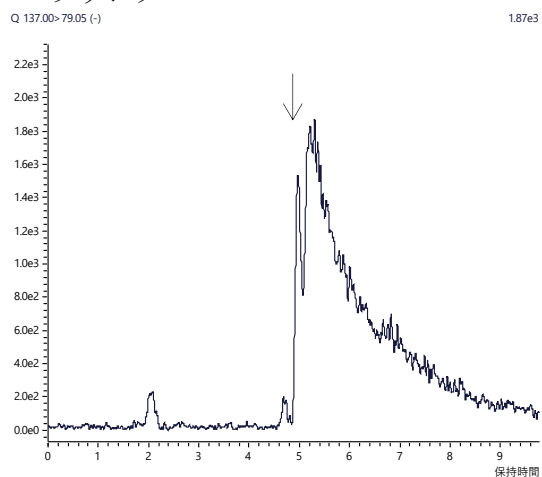
添加濃度：0.05 ppm

ホスホマイシンの添加回収試験におけるクロマトグラム（定量条件）

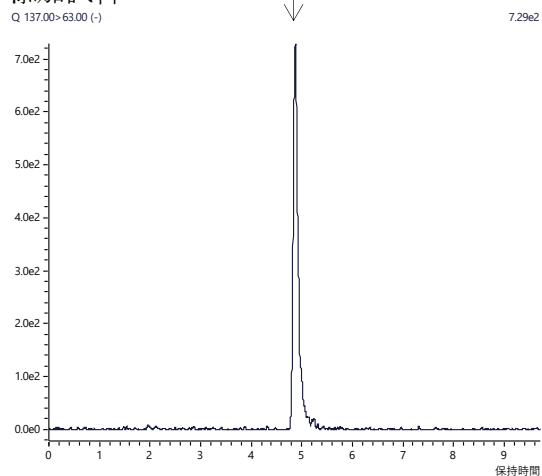
ブランク



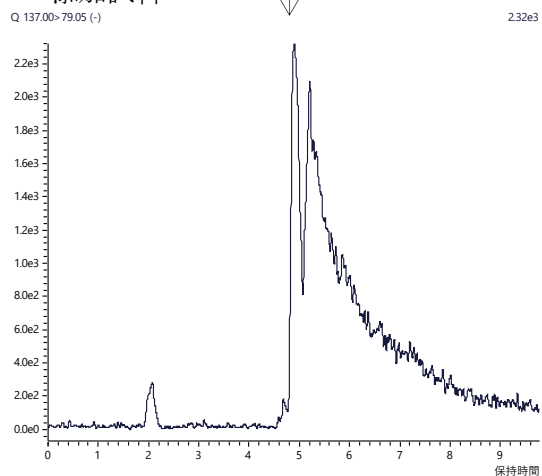
ブランク



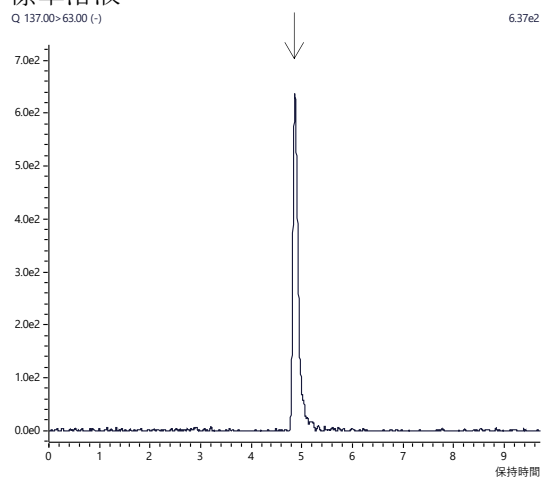
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

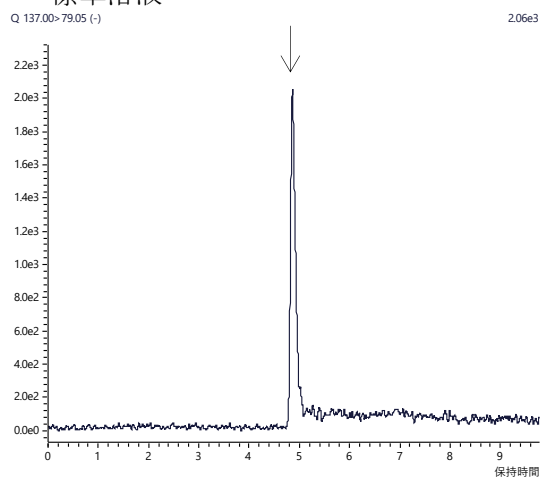
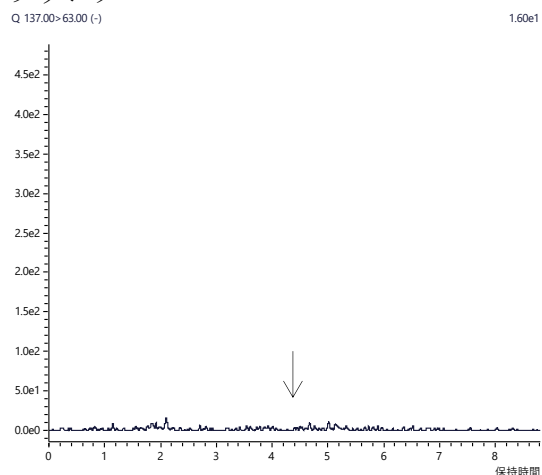


図 4-7 牛乳の SRM クロマトグラム  
ホスホマイシン  
定量イオン ( $m/z$  -137→63)  
添加濃度：0.05 ppm

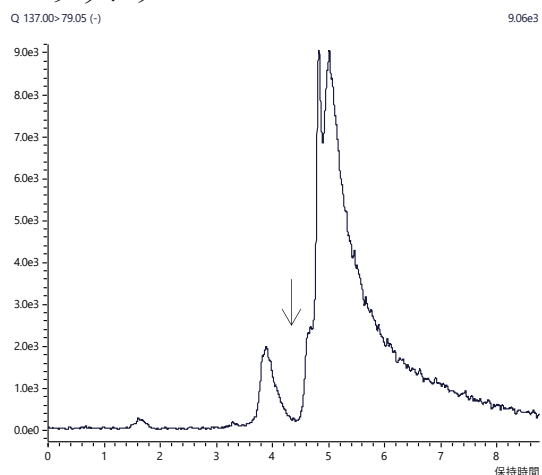
図 4-8 牛乳の SRM クロマトグラム  
ホスホマイシン  
定性イオン ( $m/z$  -137→79)  
添加濃度：0.05 ppm

ホスホマイシンの添加回収試験におけるクロマトグラム（定量条件）

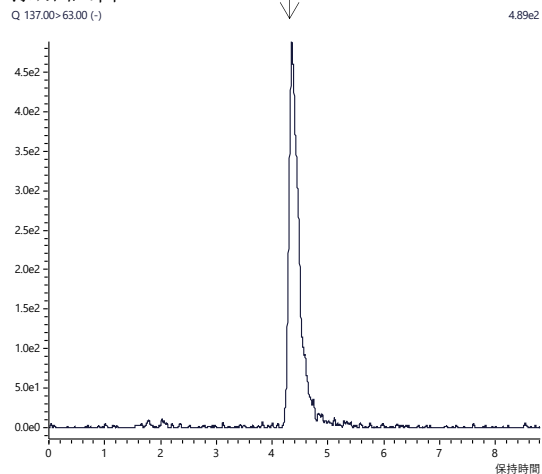
ブランク



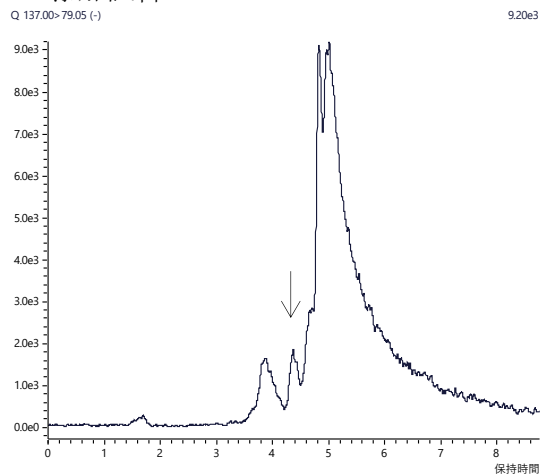
ブランク



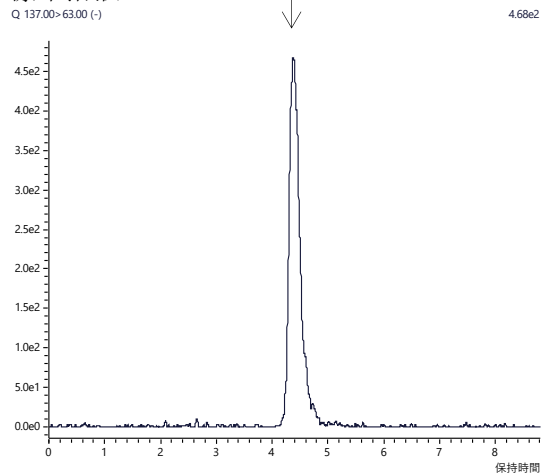
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

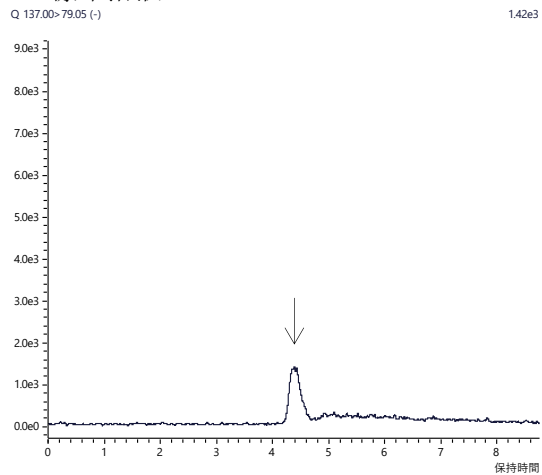
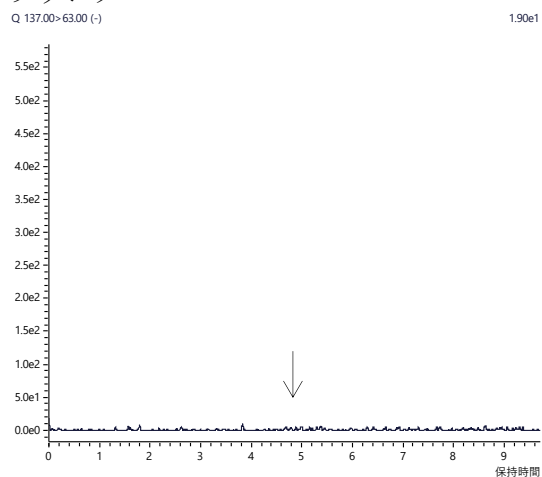


図 4-9 ブリの SRM クロマトグラム  
ホスホマイシン  
定量イオン ( $m/z$  -137→63)  
添加濃度：0.05 ppm

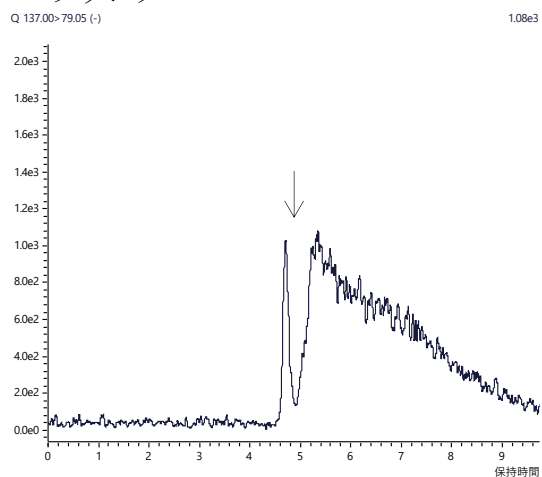
図 4-10 ブリの SRM クロマトグラム  
ホスホマイシン  
定性イオン ( $m/z$  -137→79)  
添加濃度：0.05 ppm

ホスホマイシンの添加回収試験におけるクロマトグラム（定量条件）

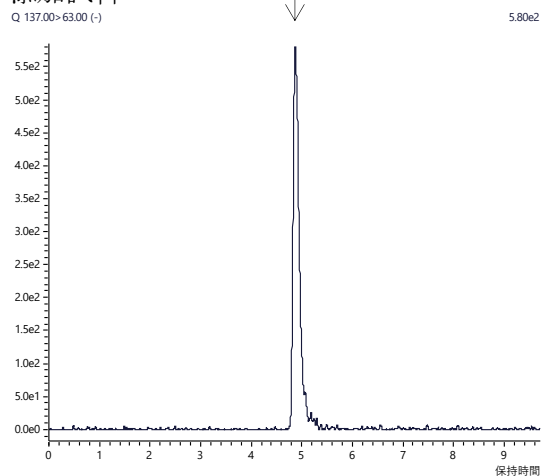
ブランク



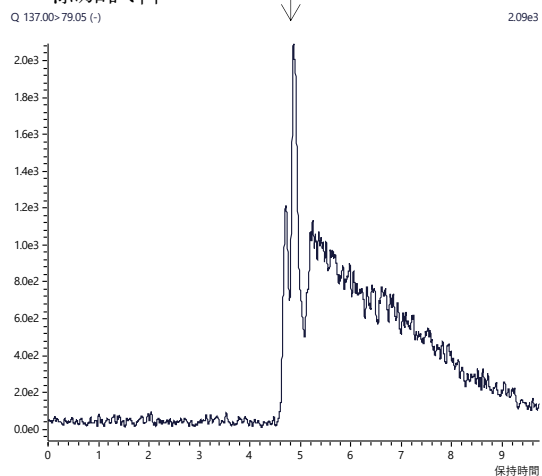
ブランク



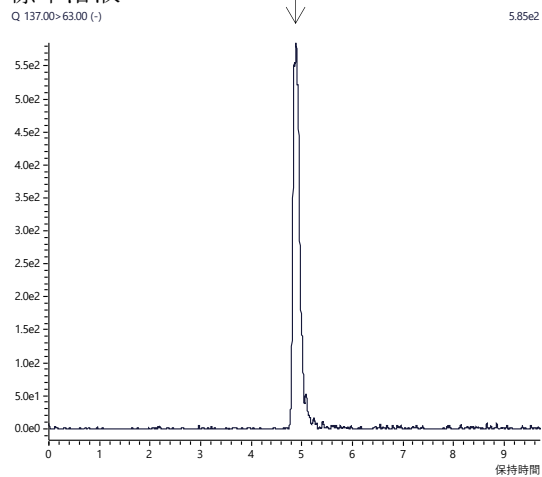
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

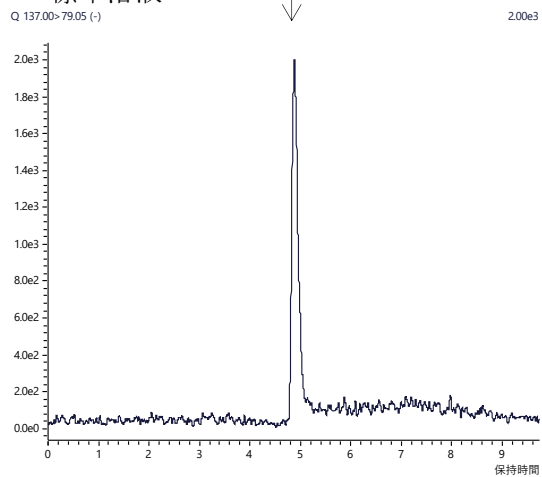
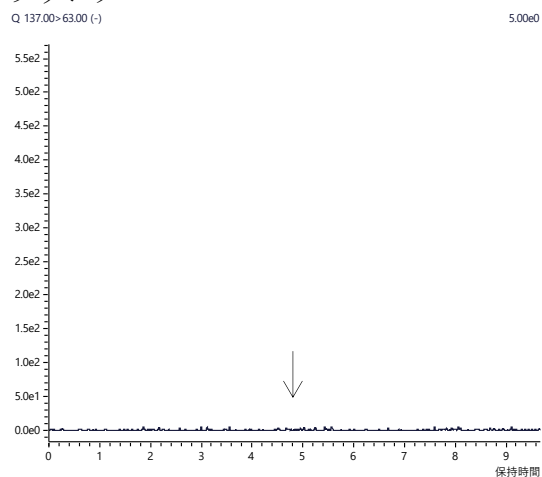


図 4-11 牛の筋肉の SRM クロマトグラム  
ホスホマイシン  
定量イオン ( $m/z$  -137→63)  
添加濃度：0.5 ppm

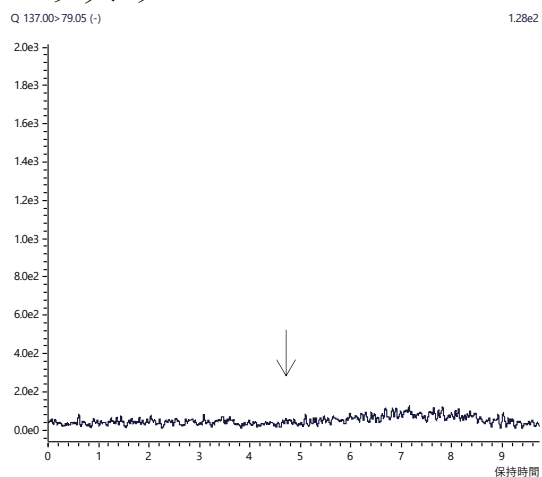
図 4-12 牛の筋肉の SRM クロマトグラム  
ホスホマイシン  
定性イオン ( $m/z$  -137→79)  
添加濃度：0.5 ppm

ホスホマイシンの添加回収試験におけるクロマトグラム（定量条件）

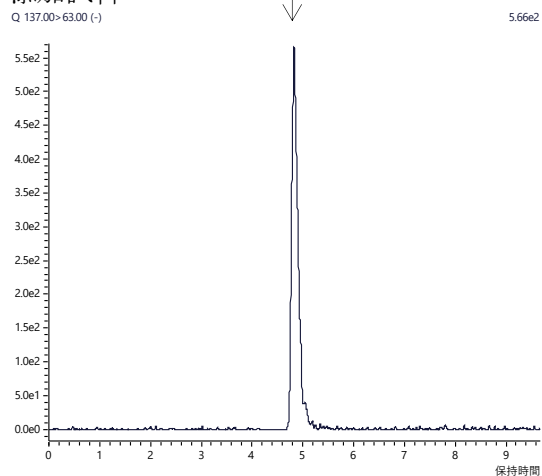
ブランク



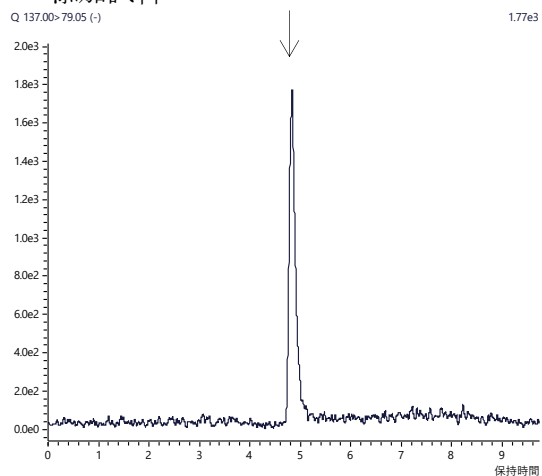
ブランク



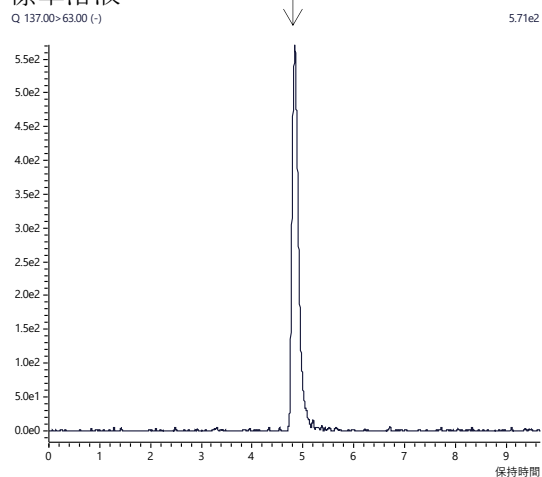
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

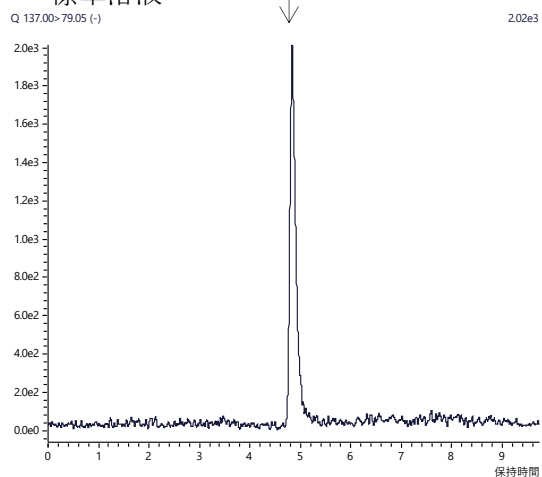


図 4-13 牛の脂肪の SRM クロマトグラム

ホスホマイシン

定量イオン ( $m/z$  -137→63)

添加濃度：0.5 ppm

図 4-14 牛の脂肪の SRM クロマトグラム

ホスホマイシン

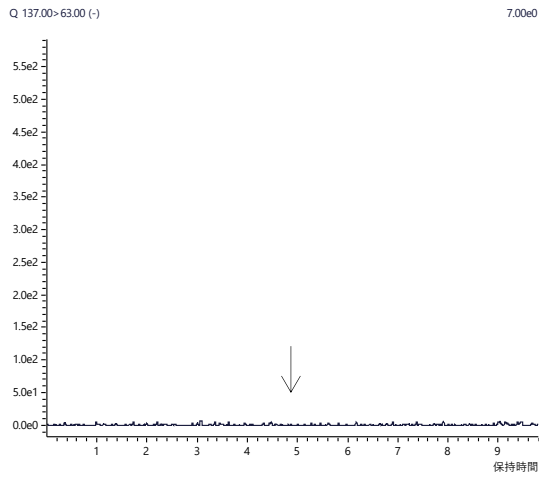
定性イオン ( $m/z$  -137→79)

添加濃度：0.5 ppm

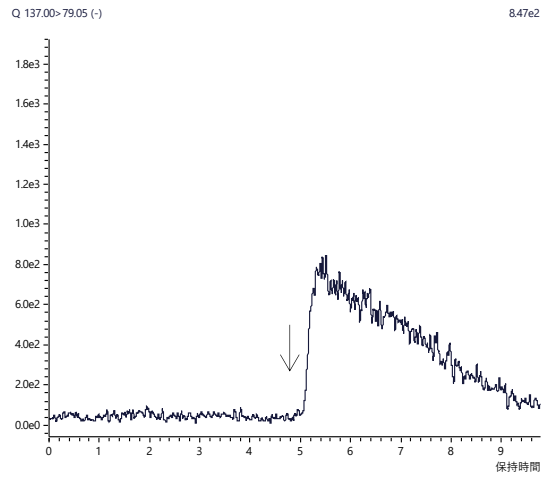


ホスホマイシンの添加回収試験におけるクロマトグラム（定量条件）

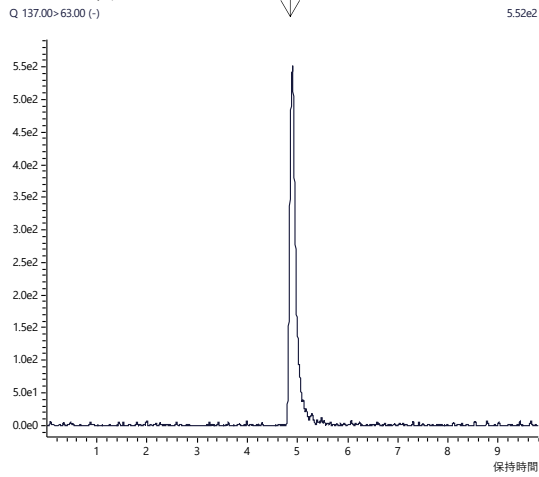
ブランク



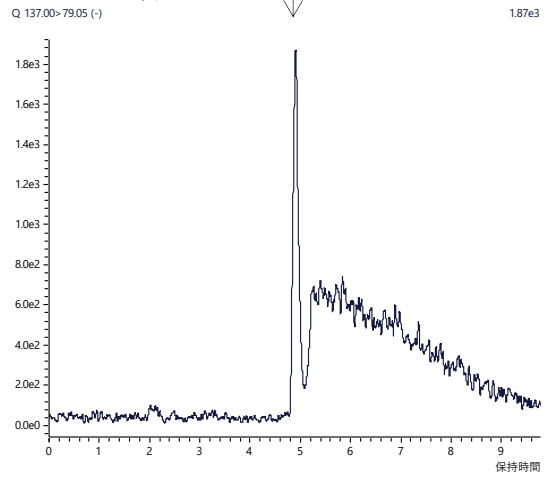
ブランク



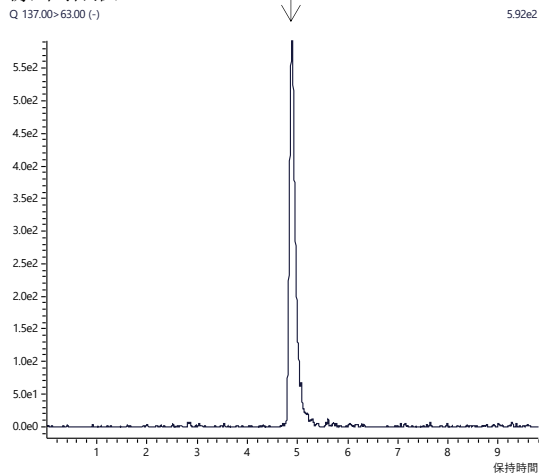
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

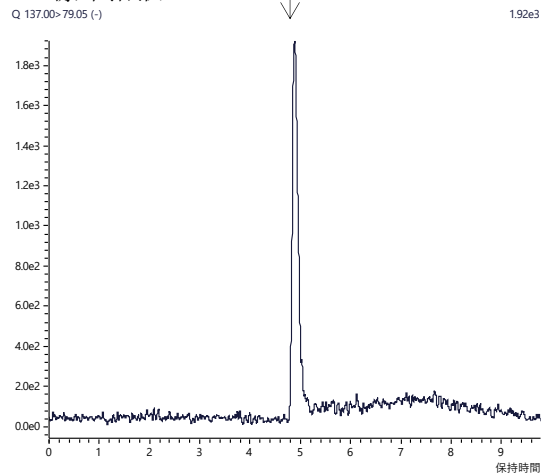
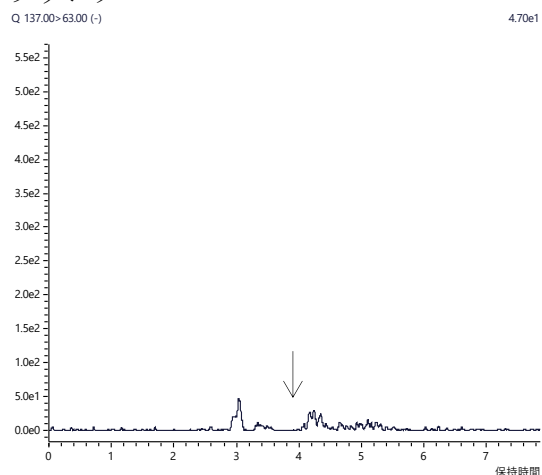


図 4-15 牛の肝臓の SRM クロマトグラム  
ホスホマイシン  
定量イオン ( $m/z$  -137→63)  
添加濃度：0.5 ppm

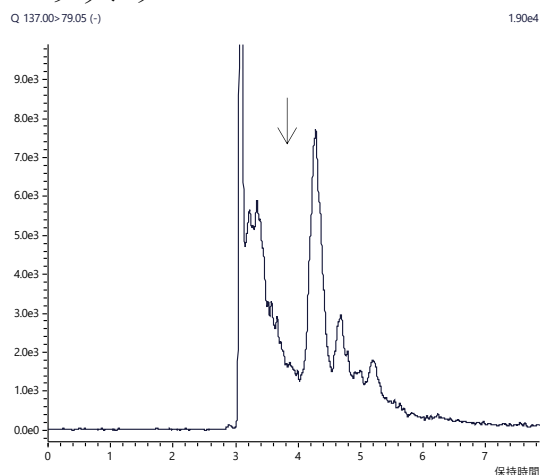
図 4-16 牛の肝臓の SRM クロマトグラム  
ホスホマイシン  
定性イオン ( $m/z$  -137→79)  
添加濃度：0.5 ppm

ホスホマイシンの添加回収試験におけるクロマトグラム（確認条件）

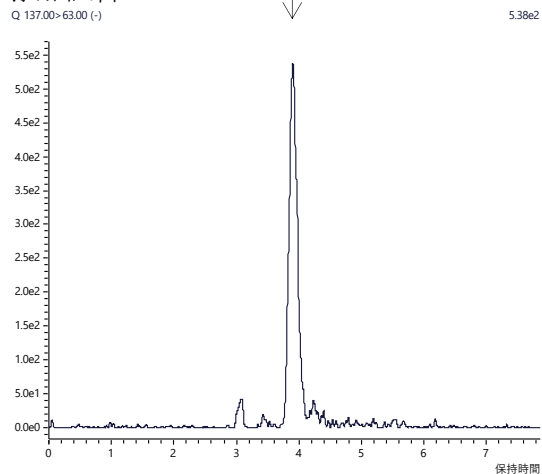
ブランク



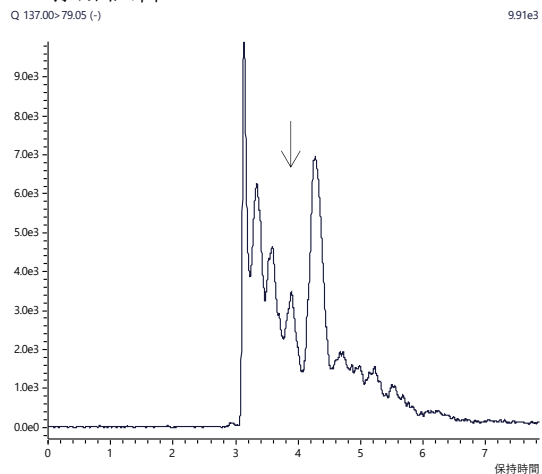
ブランク



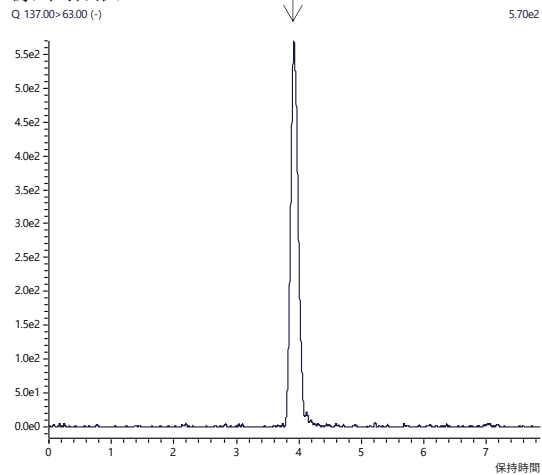
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

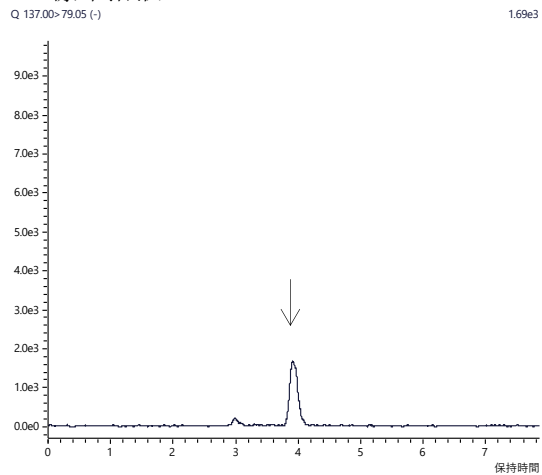
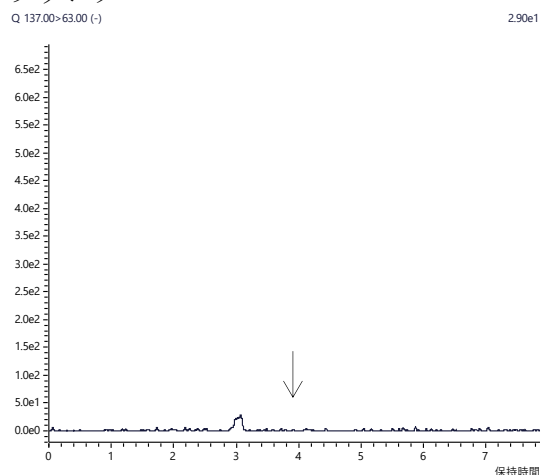


図 4-17 牛の筋肉の SRM クロマトグラム  
ホスホマイシン  
定量イオン ( $m/z$  -137→63)  
添加濃度：0.05 ppm

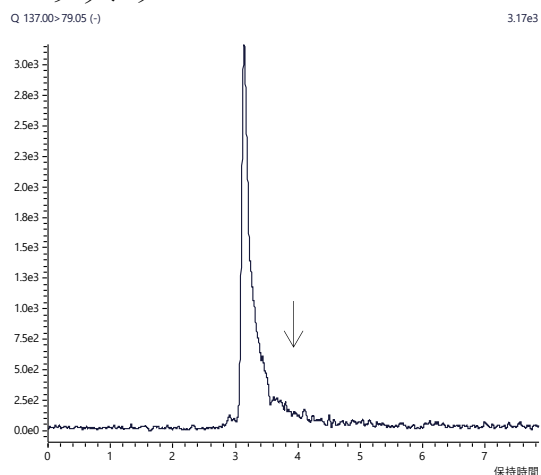
図 4-18 牛の筋肉の SRM クロマトグラム  
ホスホマイシン  
定性イオン ( $m/z$  -137→79)  
添加濃度：0.05 ppm

ホスホマイシンの添加回収試験におけるクロマトグラム（確認条件）

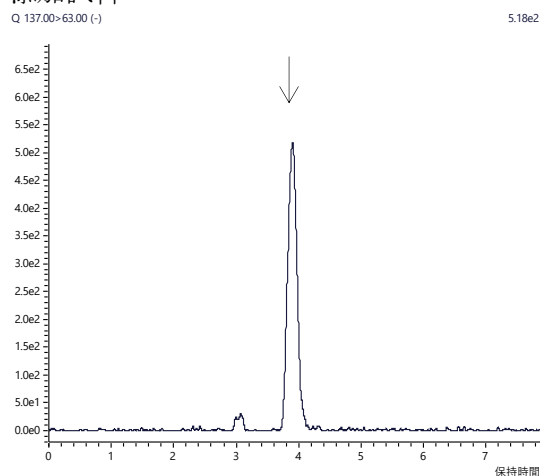
ブランク



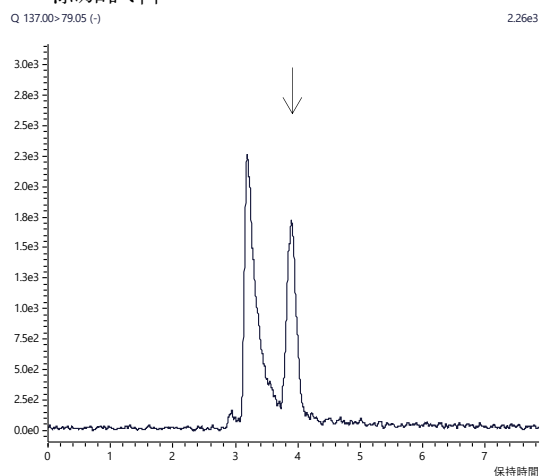
ブランク



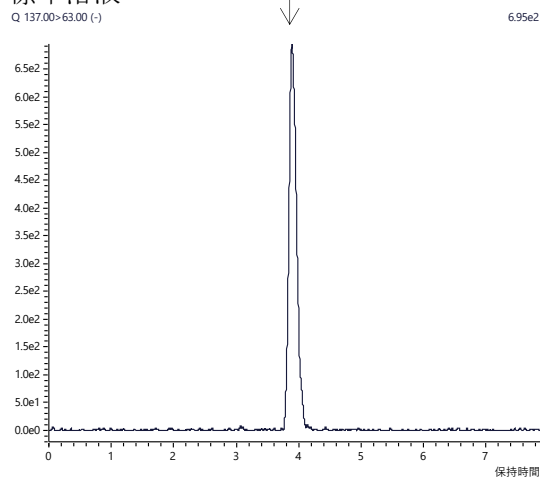
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

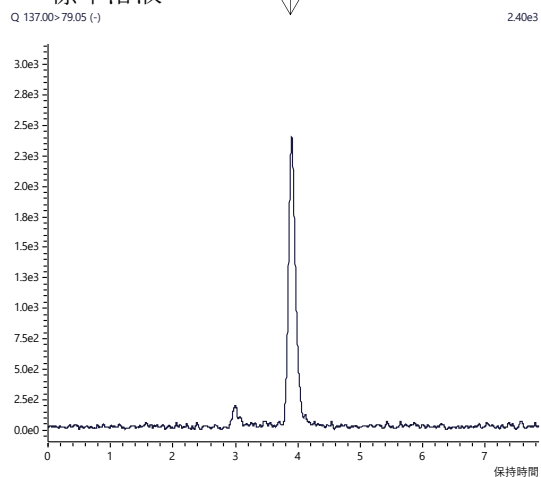


図 4-19 牛の脂肪の SRM クロマトグラム

ホスホマイシン

定量イオン ( $m/z$  -137→63)

添加濃度：0.05 ppm

図 4-20 牛の脂肪の SRM クロマトグラム

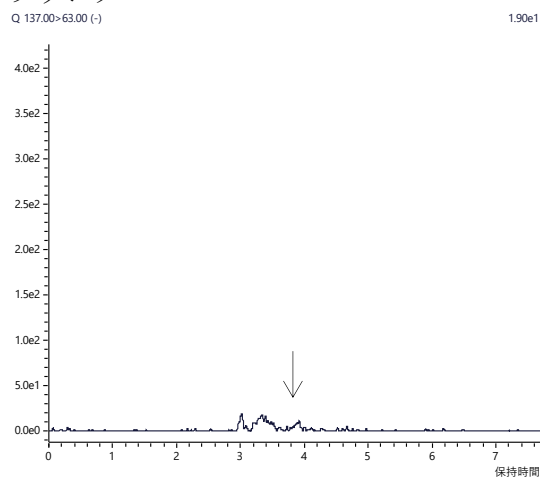
ホスホマイシン

定性イオン ( $m/z$  -137→79)

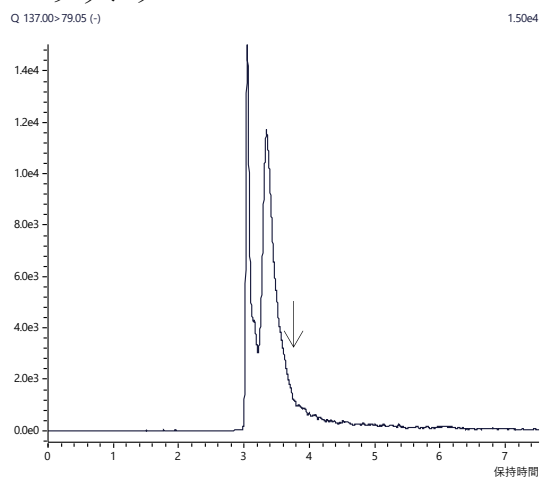
添加濃度：0.05 ppm

ホスホマイシンの添加回収試験におけるクロマトグラム（確認条件）

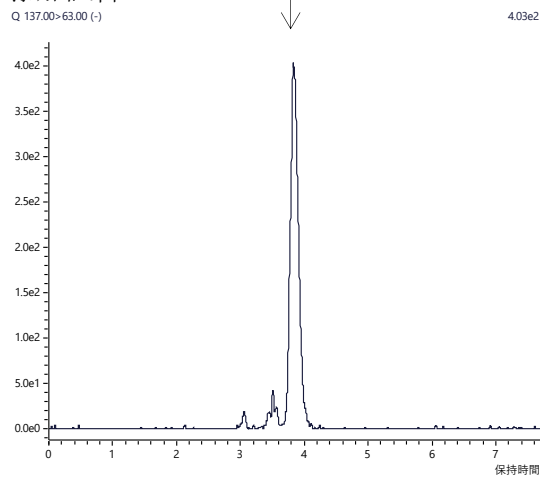
ブランク



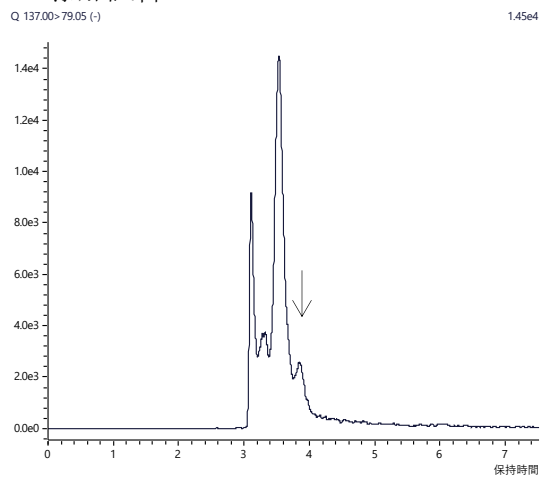
ブランク



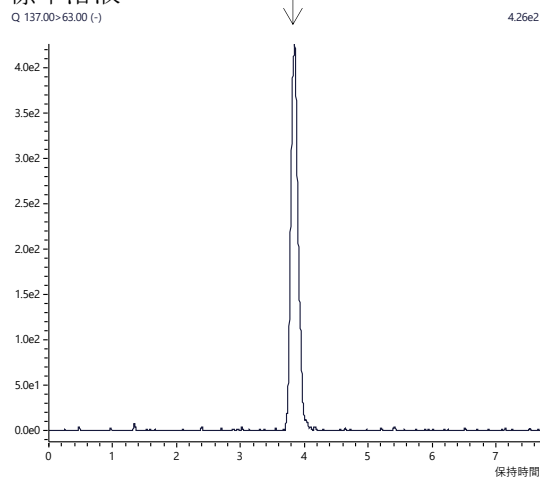
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

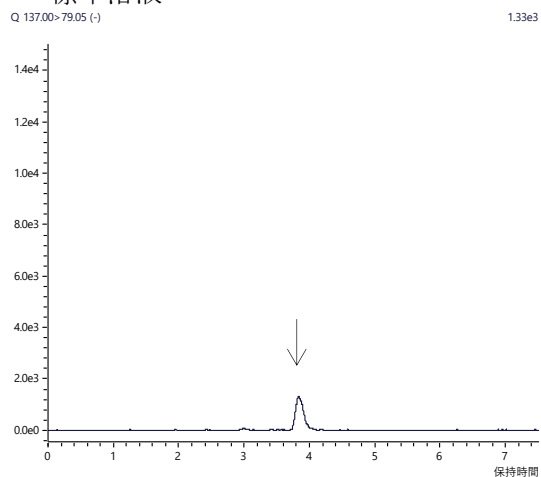


図 4-21 牛の肝臓の SRM クロマトグラム

ホスホマイシン

定量イオン ( $m/z$  -137→63)

添加濃度：0.05 ppm

図 4-22 牛の肝臓の SRM クロマトグラム

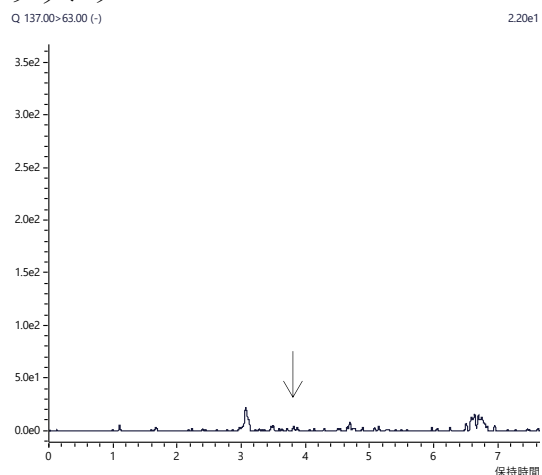
ホスホマイシン

定性イオン ( $m/z$  -137→79)

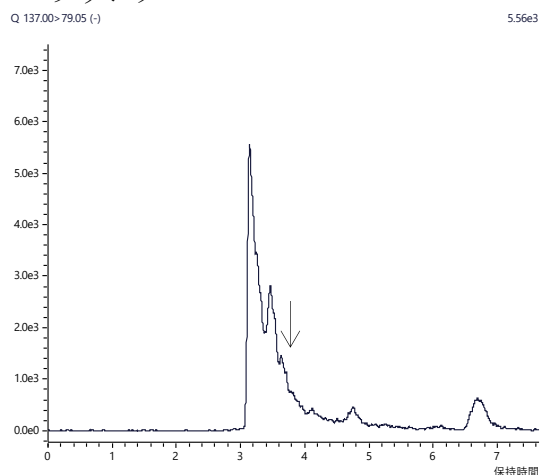
添加濃度：0.05 ppm

ホスホマイシンの添加回収試験におけるクロマトグラム（確認条件）

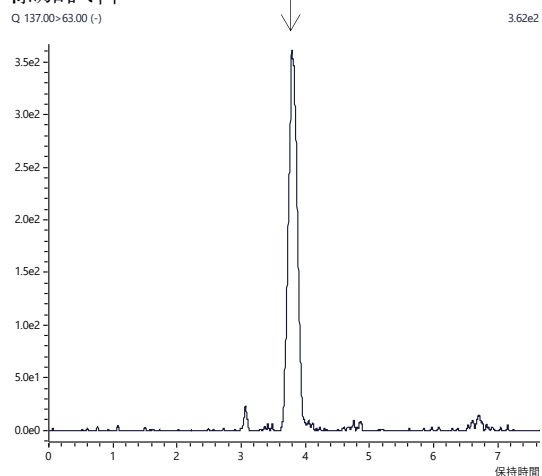
ブランク



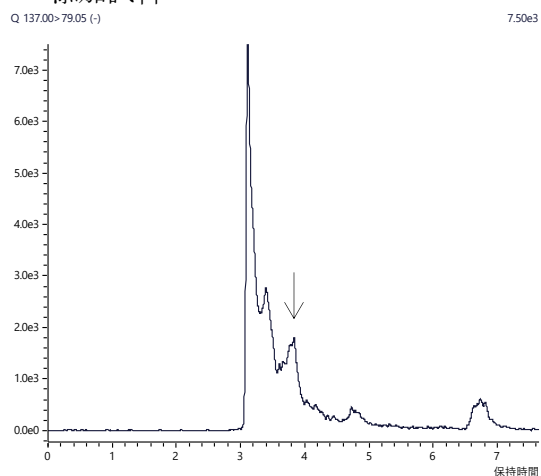
ブランク



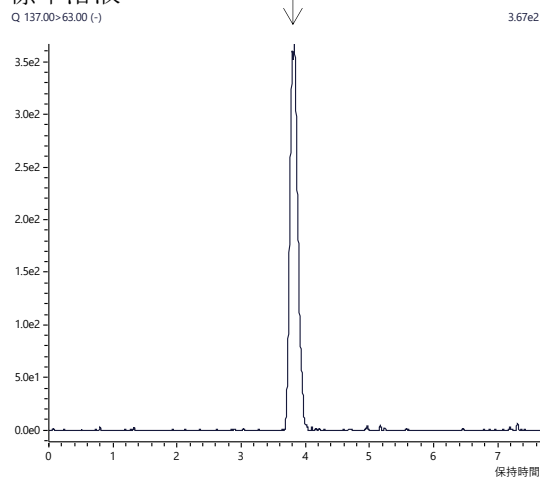
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

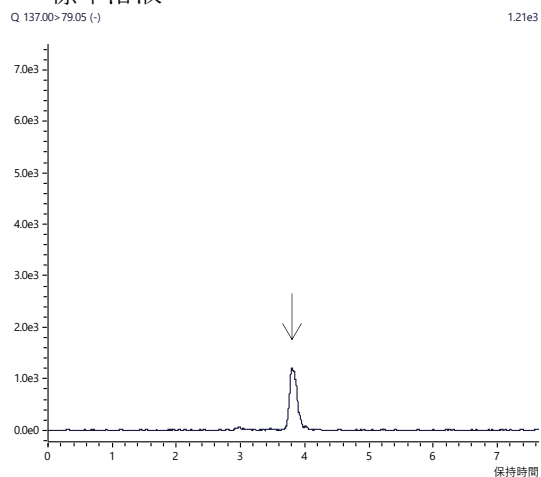


図 4-23 牛乳の SRM クロマトグラム

ホスホマイシン

定量イオン ( $m/z$  -137→63)

添加濃度：0.05 ppm

図 4-24 牛乳の SRM クロマトグラム

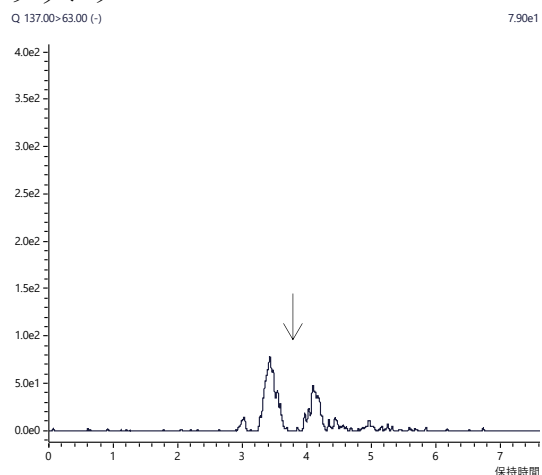
ホスホマイシン

定性イオン ( $m/z$  -137→79)

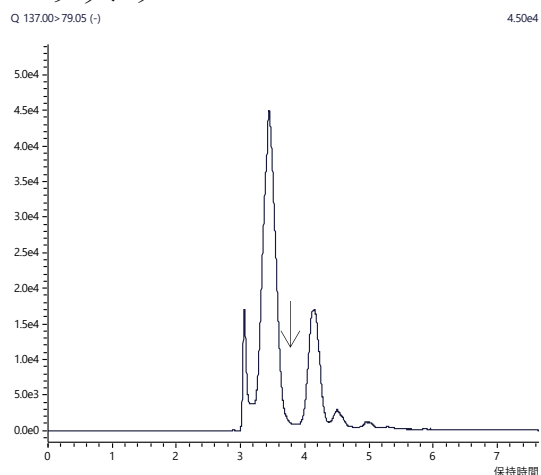
添加濃度：0.05 ppm

ホスホマイシンの添加回収試験におけるクロマトグラム（確認条件）

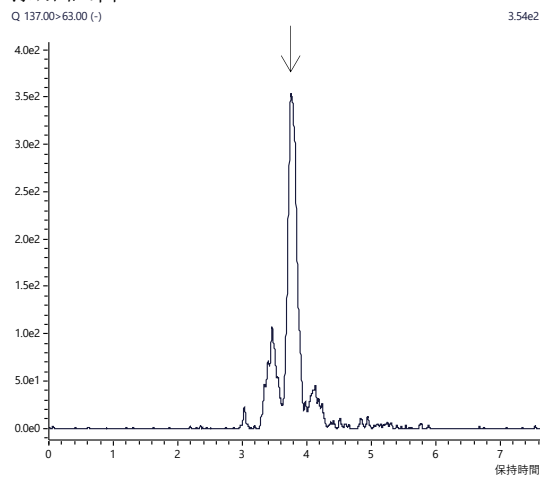
ブランク



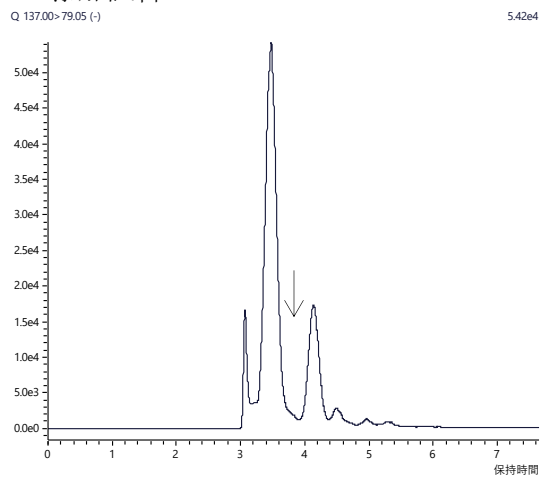
ブランク



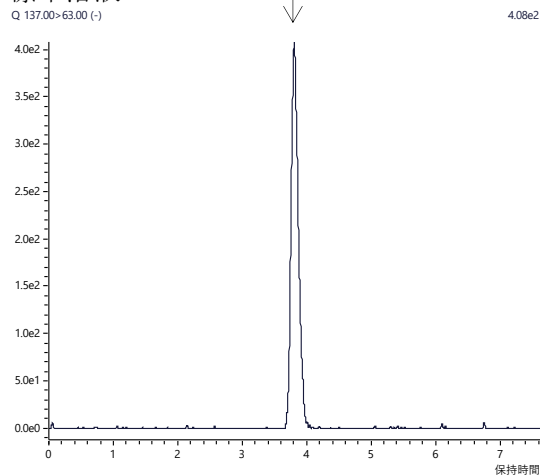
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

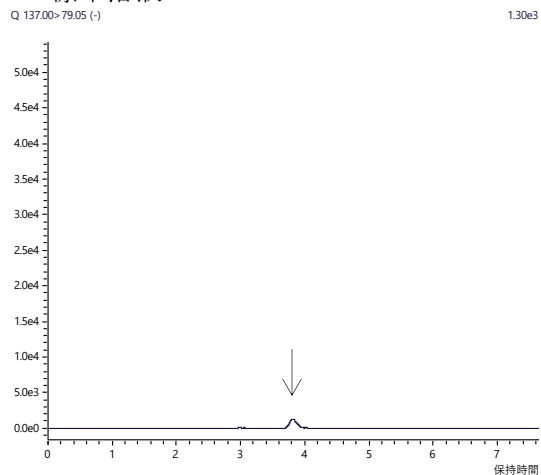


図 4-25 ブリの SRM クロマトグラム

ホスホマイシン

定量イオン ( $m/z$  -137→63)

添加濃度：0.05 ppm

図 4-26 ブリの SRM クロマトグラム

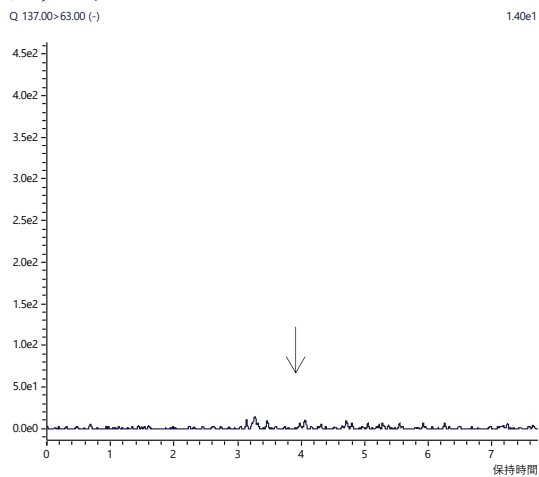
ホスホマイシン

定性イオン ( $m/z$  -137→79)

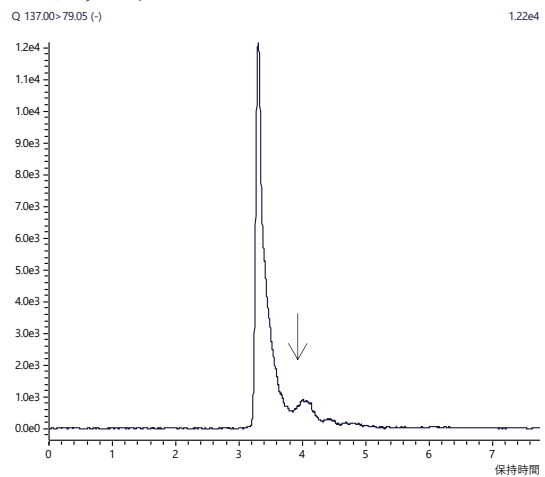
添加濃度：0.05 ppm

ホスホマイシンの添加回収試験におけるクロマトグラム（確認条件）

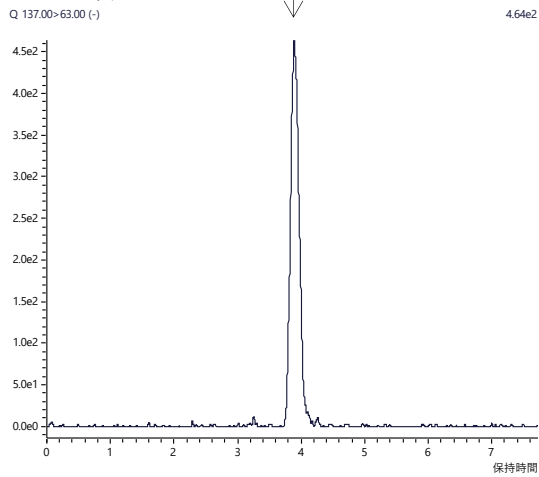
ブランク



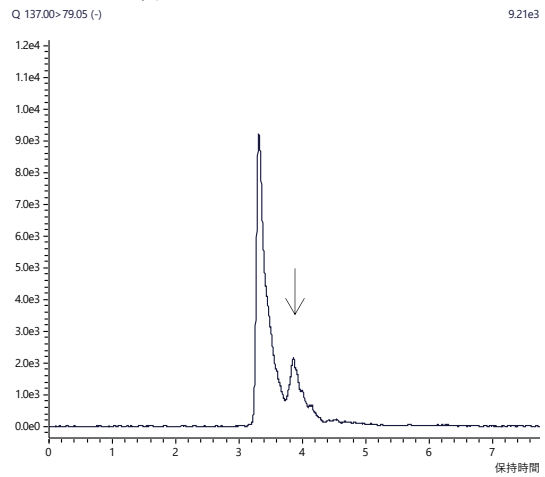
ブランク



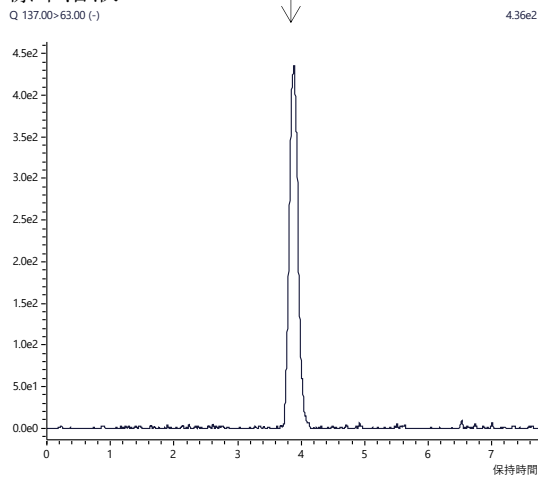
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

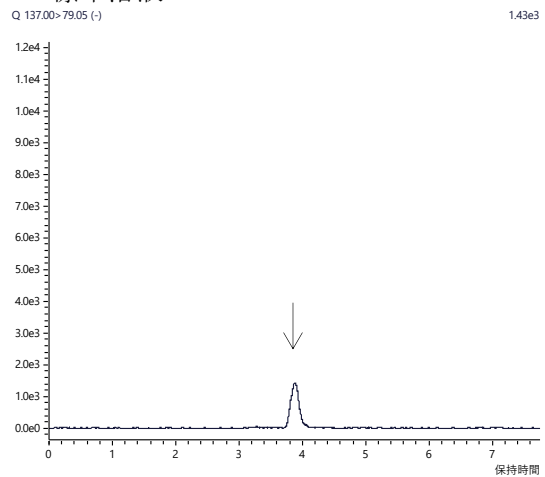


図 4-27 牛の筋肉の SRM クロマトグラム

ホスホマイシン

定量イオン ( $m/z$  -137→63)

添加濃度 : 0.5 ppm

図 4-28 牛の筋肉の SRM クロマトグラム

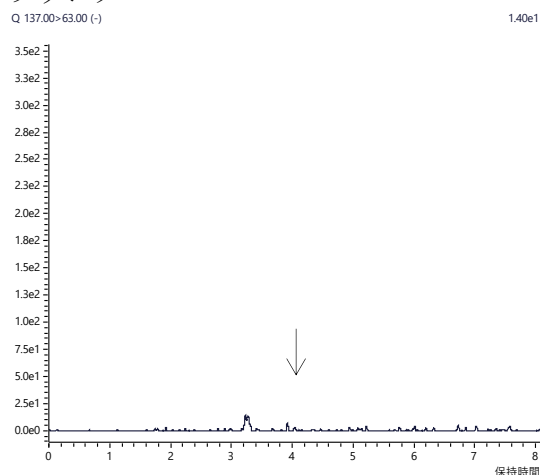
ホスホマイシン

定性イオン ( $m/z$  -137→79)

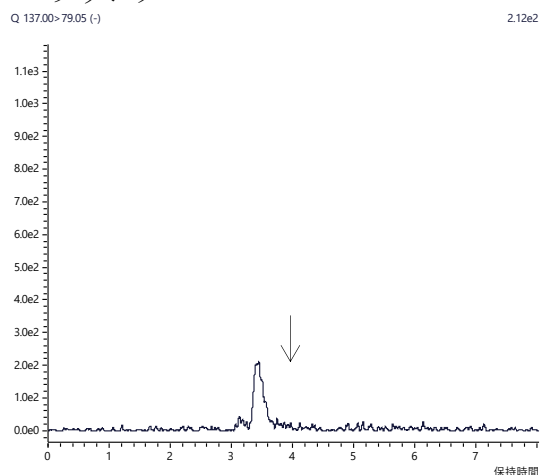
添加濃度 : 0.5 ppm

ホスホマイシンの添加回収試験におけるクロマトグラム（確認条件）

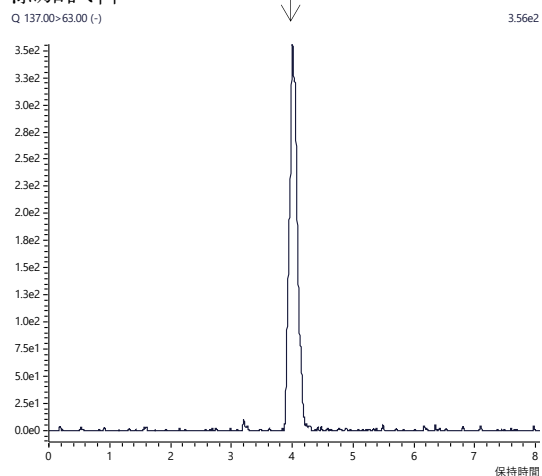
ブランク



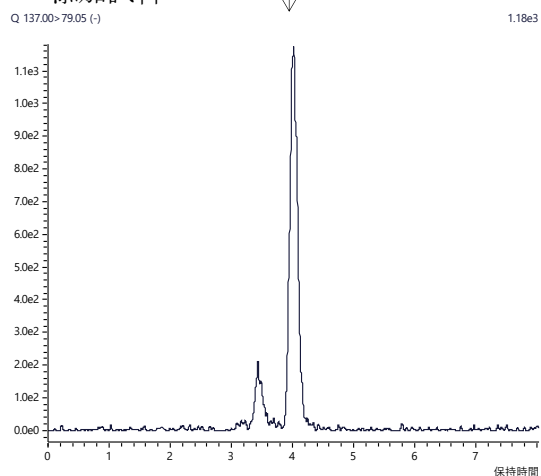
ブランク



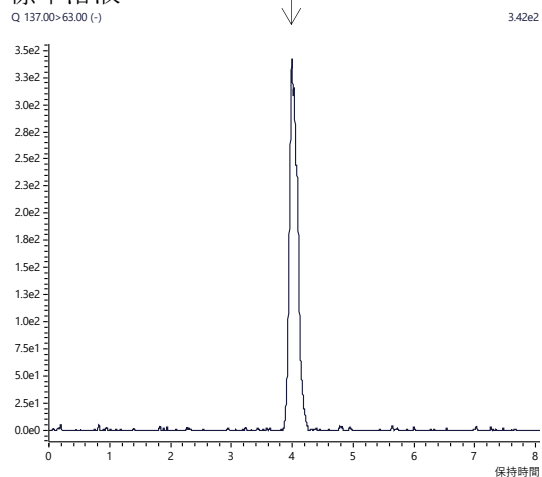
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

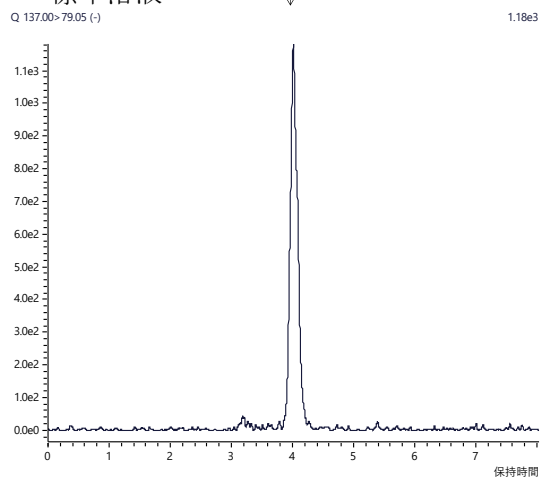


図 4-29 牛の脂肪の SRM クロマトグラム

ホスホマイシン

定量イオン ( $m/z$  -137→63)

添加濃度 : 0.5 ppm

図 4-30 牛の脂肪の SRM クロマトグラム

ホスホマイシン

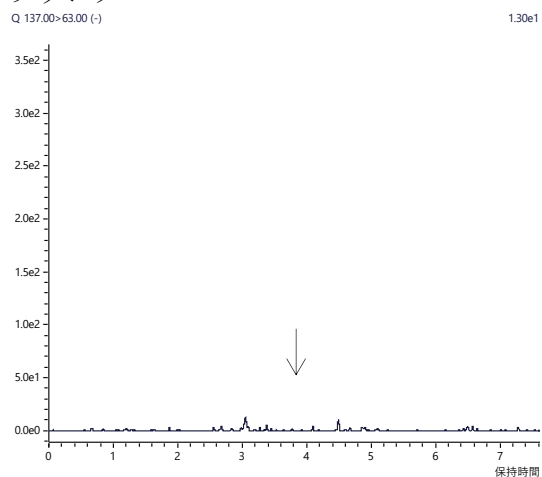
定性イオン ( $m/z$  -137→79)

添加濃度 : 0.5 ppm

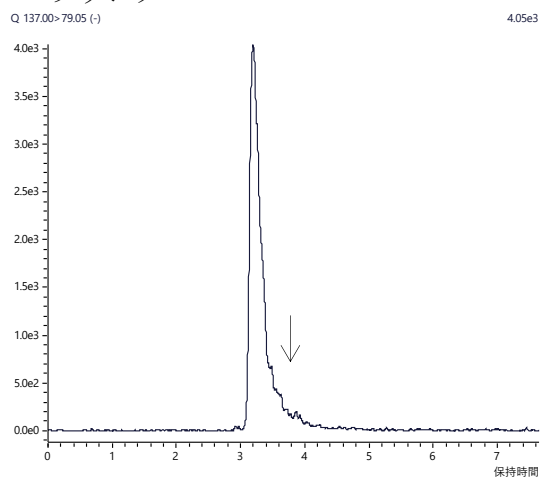


ホスホマイシンの添加回収試験におけるクロマトグラム（確認条件）

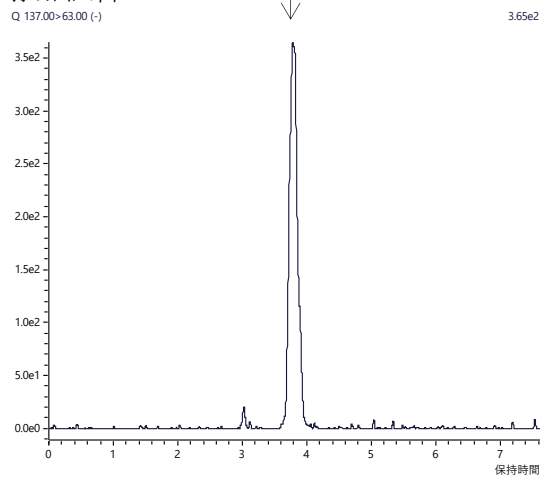
ブランク



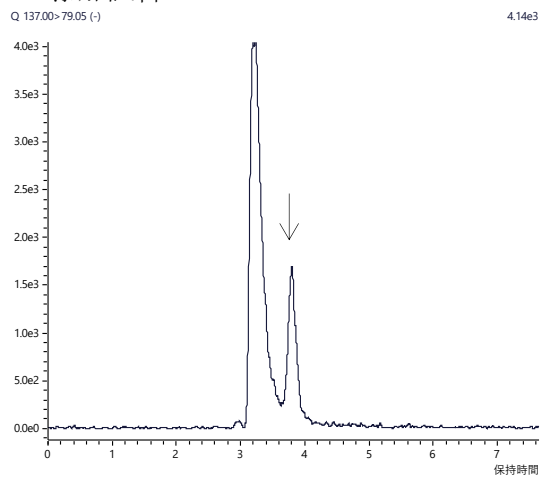
ブランク



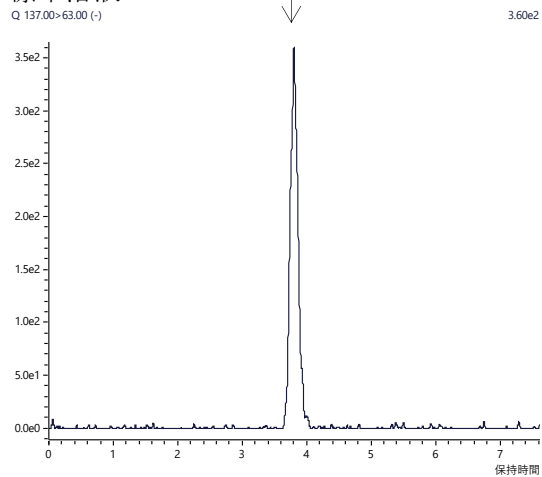
添加試料



添加試料



標準溶液



標準溶液

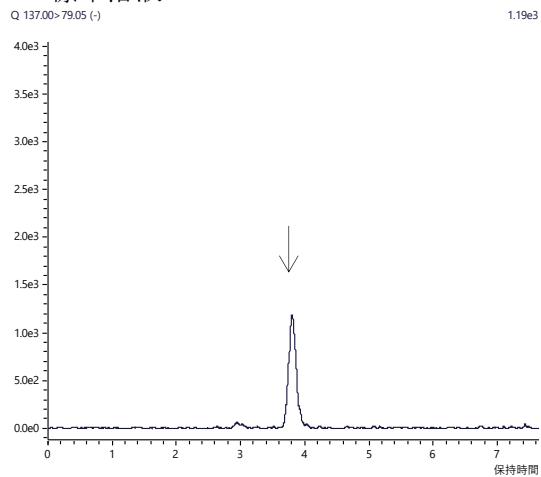


図 4-31 牛の肝臓の SRM クロマトグラム

ホスホマイシン

定量イオン ( $m/z$  -137→63)

添加濃度：0.5 ppm

図 4-32 牛の肝臓の SRM クロマトグラム

ホスホマイシン

定性イオン ( $m/z$  -137→79)

添加濃度：0.5 ppm

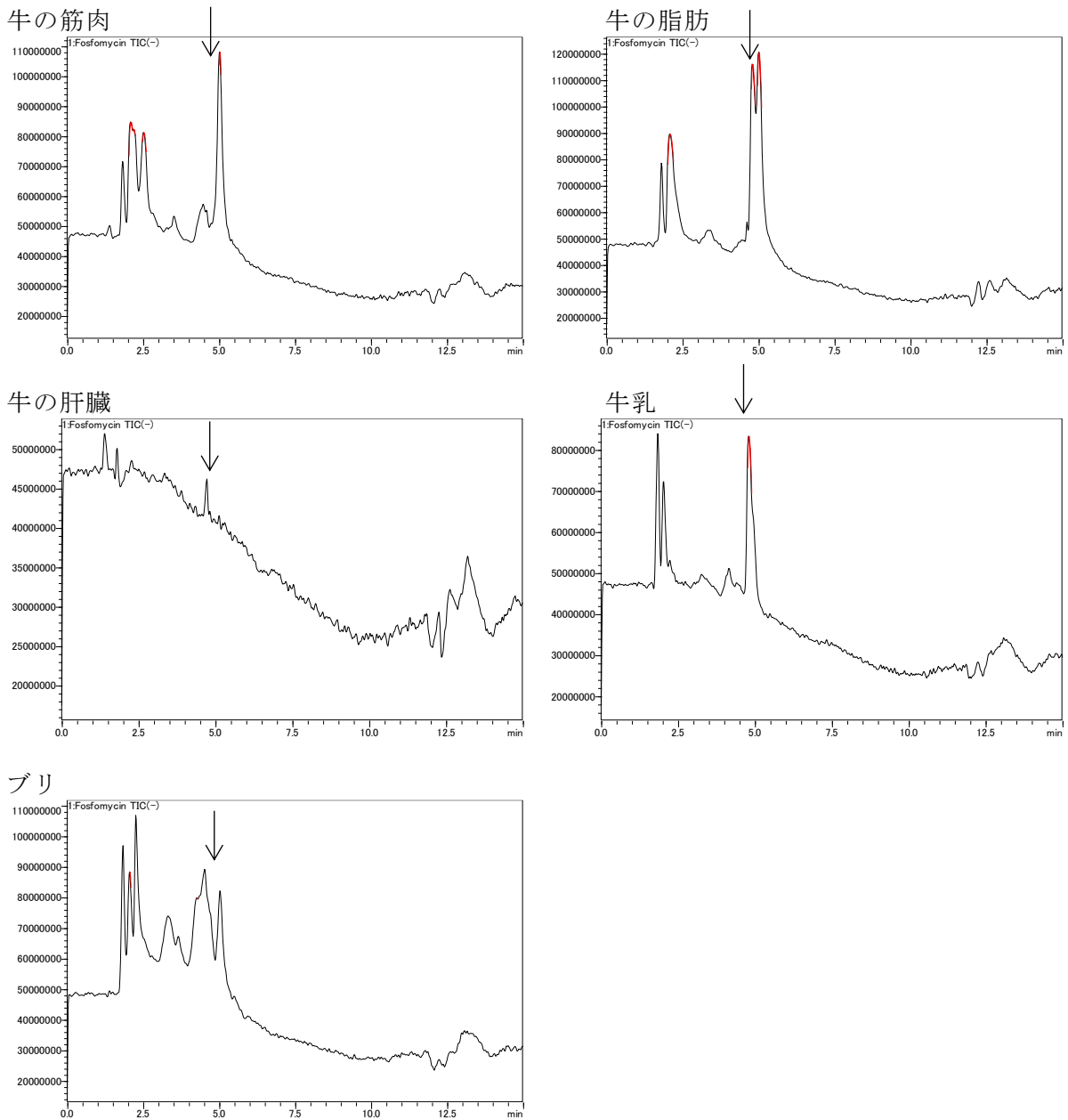
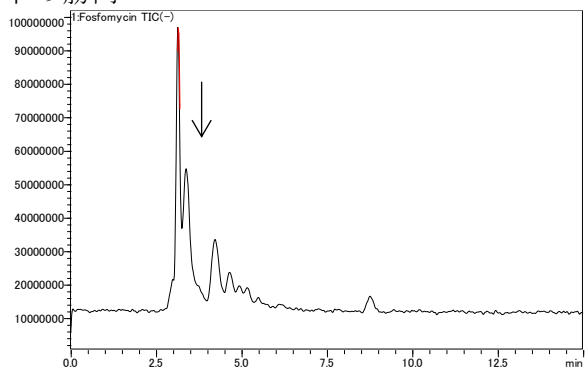
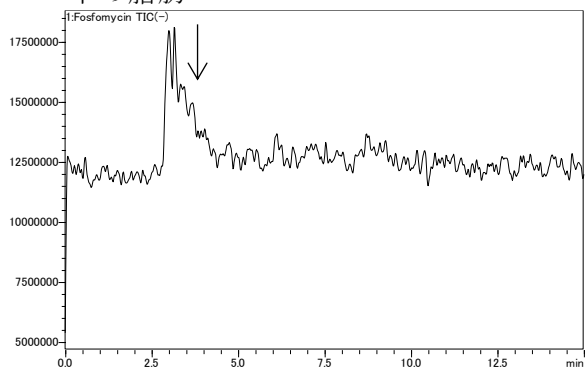


図 5-1 ブランク試料のトータルイオンカレントクロマトグラム (定量条件)  
(スキャン範囲: 50~500  $m/z$ )

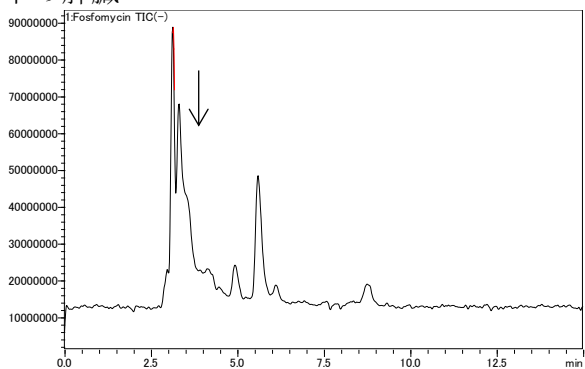
牛の筋肉



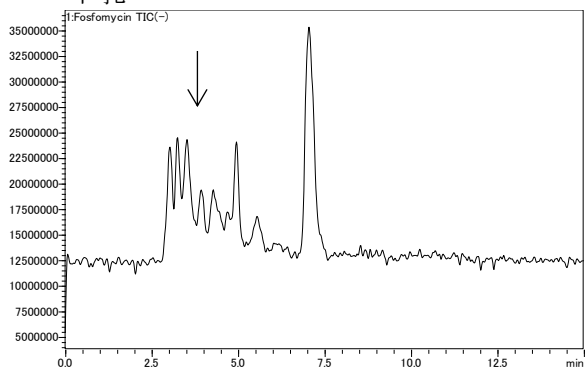
牛の脂肪



牛の肝臓



牛乳



ブリ

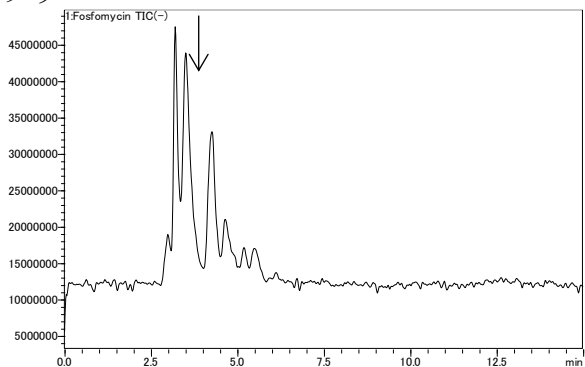


図 5-2 ブランク試料のトータルイオンカレントクロマトグラム (確認条件)  
(スキャン範囲 : 50~500  $m/z$ )