

Ⅱ．分担研究報告

2. 課題2:食品中アミノグリコシド系抗生物質分析法の開発

研究分担者 坂井隆敏

食品中残留農薬等の分析法に関する研究

課題2. 食品中アミノグリコシド系抗生物質分析法の開発

研究分担者 坂井隆敏 国立医薬品食品衛生研究所 食品部主任研究官

研究要旨

食品中アミノグリコシド系抗生物質の簡易・迅速な分析法の開発を目的として、LC-MS/MS を用いた高感度且つ高精度な測定法、畜産食品からの効率的な抽出法、種々の畜産食品由来の試料マトリックスの効率的且つ効果的な精製法について検討した。検討結果を基に効率的な分析法を構築し、畜産食品を用いた添加回収試験を実施することで、構築した分析法の適用性を評価した。

A. 研究目的

アミノグリコシド系抗生物質は、人や動物用の医薬品として広く使用されている。

農薬・動物用医薬品等の成分である物質については、使用された動物由来の食品の摂食により人の健康に害を及ぼすことのないよう、食品中の残留基準が設定されており、アミノグリコシド系抗生物質についても、動物用医薬品として使用される物質については食品中の残留基準が設定されている。したがって、各食品中のアミノグリコシド系抗生物質を検査する必要があるが、効率的な検査を実施するためには、食品中アミノグリコシド系抗生物質の簡易・迅速・高精度な分析法が必要不可欠である。

畜産食品中のアミノグリコシド系抗生物質の試験法としては、「ゲンタマイシン試験法(畜水産物)」及び「ジヒドロストレプトマイシン、ストレプトマイシン、スペクチノマイシン及びネオマイシン試験法(畜水産物)」が通知されているが、食品によっては効率的に精確な分析値が得られない場合があることが報告されている。また、当該試験法は、LC-MS(/MS)測定においてイオンペア

試薬(ヘプタフルオロ-*n*-酪酸)を含む移動相が使用されているが、LC-MS 用のイオンペア試薬の多くは腐食性が高く、分析機器への負担が大きい。

以上のような理由から、本研究においては、食品中のアミノグリコシド系抗生物質の簡易・迅速・高精度な分析法の開発を検討した。

平成 28 年度は、非常に極性が高い物質であるアミノグリコシド系抗生物質について、イオンペア試薬を使用することなく、また、誘導体化などの煩雑な操作を行うことなく、LC-MS/MS で高感度且つ高精度に測定可能な測定条件の確立について検討した。平成 29 年度は、非常に極性が高い物質であるアミノグリコシド系抗生物質について、種々の畜産物からの効率的な抽出法の確立について検討した。平成 30 年度は、畜産食品由来の試料マトリックスの効果的且つ効率的な精製方法の確立について検討した。また、前年度に検討した抽出法と組み合わせて分析法を構築し、畜産食品中のアミノグリコシド系抗生物質の分析法としての適用性について検討した。

B. 研究方法

①検討対象化合物

検討対象化合物は、アミノグリコシド系抗生物質の中から構造や分子量、物性等を考慮し、アプラマイシン、アミカシン、カスガマイシン、カナマイシン、ゲンタマイシン C1 (ゲンタマイシンの主要構成成分)、ジヒドロストレプトマイシン、ストレプトマイシン、スペクチノマイシン、ネオマイシン、ネチルマイシン及びハイグロマイシン B (ハイグロマイシンの主要構成成分) の合計 11 化合物を選択した。

②標準原液及び標準溶液の調製

選択した検討対象化合物について、それぞれ 1 mg/mL の標準原液を調製した。次いで、調製した標準原液を 0.1 vol%ギ酸及び 0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液 (1:1) 混液で希釈・混合し、必要な濃度の標準溶液もしくは混合標準溶液を調製した。

③タンデム型質量分析条件の設定

調製した標準溶液を用いて、タンデム型質量分析計 (MS/MS) における測定条件の最適化を行った。すなわち、各検討対象化合物の 10 µg/mL 標準溶液をそれぞれフローインジェクションで MS/MS に注入し、プリカーサーイオン、プロダクトイオン、コーン電圧及びコリジョンエネルギー等の測定パラメータを最適化した。

④液体クロマトグラフィー条件の検討

液体クロマトグラフ (LC) における測定条件の検討は、種々の分析カラムと移動相を用いて測定を行い、各検討対象化合物について得られたピーク形状や測定感度等を比較・考察し、最適測定条件の設定を試みた。なお、本検討には各検討対象化合物 100 ng/mL の混合標準溶液を用いた。

⑤効率的な抽出法の検討

種々の畜産物からの効率的な抽出法について検討した。

すなわち、牛の筋肉、牛の肝臓、牛乳、鶏卵を対象に、種々の抽出溶媒を用いた際の操作性や回収率について検討した。また、試料中のタンパク質等を沈殿させるための添加剤として、塩及び酸の添加について検討した。

⑥効率的且つ効果的な精製法の検討

種々の畜産食品由来の試料マトリックスの効果的且つ効率的な精製法について検討した。

すなわち、種々の固相カートリッジカラムを用い、負荷、洗浄、溶出条件等を検討した後、適用性を検討した。

⑦添加回収試験

検討対象食品として、牛の筋肉・脂肪・肝臓・乳及び鶏卵を用いた。各食品に、検討対象化合物を基準値濃度 (基準値が設定されていない場合は 0.1 ppm) 添加し、各食品の添加試料 5 個を以下に記載した方法に従って操作し、試験溶液を調製した。得られた試験溶液を LC-MS/MS で測定し、絶対検量線法により各検討対象化合物の真度及び併行精度を求めた。

試料 10.0 g を量り採り、2 mol/L 塩酸及びメタノール (1:1) 混液 50 mL、ギ酸アンモニウム 2 g を加えてホモジナイズした。牛の脂肪の場合は、*n*-ヘキサン 50 mL を加えてホモジナイズした。毎分 3,000 回転で 5 分間遠心分離後、水/メタノール混液層を採った。牛の脂肪の場合は、*n*-ヘキサン層を除去し、水/メタノール混液層を採った。残留物に 2 mol/L 塩酸及びメタノール (1:1) 混液 30 mL、ギ酸アンモニウム 2 g を加えてホモジナイズした。上記と同様の条件で遠心分離後、水/メタノール混液層を採り、先の水/メタノール混液層と合わせ、水を加えて 100 mL に定容した。定

容後の抽出液 10 mL を採り、酢酸エチル及び *n*-ヘキサン (1:1) 混液 10 mL を加えて振とう後、上記と同様の条件で遠心分離した。上層 (酢酸エチル/*n*-ヘキサン混液層) を捨て、下層 (水/メタノール混液層) を採った。この 1 mL に水 4 mL を加えた後、アンモニア水を用いて pH を 7.0~7.5 に調整した。

Oasis WCX (500 mg) にメタノール 5 mL 及び水 5 mL を順次注入してコンディショニングした後、上記で得られた溶液を注入した。次いで、アセトニトリル及び水 (1:4) 混液 5 mL、100 mmol/L リン酸塩緩衝液 (pH 7.0) 5 mL、水 5 mL で順次洗浄した後、アセトニトリル、ギ酸及び水 (2:1:7) 混液 10 mL で溶出した。溶出液に 2 mol/L ギ酸アンモニウム溶液 0.1 mL を加えた後、エタノールを加えながら 40°C 以下で濃縮し、溶媒を除去した。残留物を 0.1 vol% ギ酸・アセトニトリル溶液及び 20 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液 (pH 2.5) (1:1) 混液 1 mL に溶解したものを試験溶液とした。

また、検討対象化合物を添加していない試料 (ブランク試料) からマトリックス添加標準溶液を調製後、LC-MS/MS で測定し、「マトリックス添加標準溶液のピーク面積値/溶媒標準溶液のピーク面積値」を算出し、測定の際の試料マトリックスの影響を確認した。

図 1 に、試験溶液調製操作のフローを示した。

⑧装置及び測定条件等

以下に、本研究で使用した装置及び測定条件等を示した。

LC: Acquity UPLC (Waters 製)

分析カラム: ZIC-cHILIC PEEK HPLC

Column (内径 2.1 mm、長さ 100 mm、粒子径 3 µm、MERCK MILLIPORE 社製)

カラム温度: 40°C

流速: 0.4 mL/分

注入量: 5 µL

移動相:

A 液 20 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液 (pH 2.5)

B 液 0.1 vol% ギ酸・アセトニトリル溶液

グラジエント条件:

t_0 , B=60%; t_6 , B=5%; t_{14} , B=5%; $t_{14.1}$, B=60%; t_{24} , B=60%

MS/MS: Xevo TQ-S (Waters 製)

ソース温度: 150°C

脱溶媒温度: 600°C

窒素ガス流量: 1000 L/hr

コーンガス流量: 150 L/hr

キャピラリー電圧: 1.5 kV

イオン化法: エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法・ポジティブイオンモード

C. 研究結果及び考察

①タンデム型質量分析条件の設定

MS/MS 測定条件の最適化において得られた、各検討対象化合物のプリカーサーイオン、プロダクトイオン、コーン電圧及びコリジョンエネルギー等を表 1 に示した。全ての検討対象化合物は、ESI のポジティブイオンモードにおいて「プロトン付加分子イオン」と推察されるイオンが検出された。本研究では、これらのイオンを検討対象化合物のプリカーサーイオンとして選択した。プロダクトイオンは、選択したプリカーサーイオンを衝突誘起解離によりフラグメント化して得られるイオンの中から、最もイオン強度が高いイオンを選択した。

②液体クロマトグラフィー条件の検討

LC における測定条件の検討は、先ず種々の分析カラムを用いてアミノグリコシド系抗生物質

測定への適用性を検討した。親水性相互作用クロマトグラフィーで一般的に使用されるカルバモイル基、トリアゾール基、ジオール基を修飾した分析カラムを検討したところ、全ての検討対象化合物においては満足できる保持、ピーク形状及び測定感度が得られなかった。

そこで、両性イオン型官能基を修飾した ZIC-HILIC 及び ZIC-cHILIC (共に MERCK MILLIPORE 社製) を検討したところ、イオンペア試薬を用いることなく、非常に高い極性を有する検討対象化合物について良好な保持が得られたことから、以降、これら 2 種の分析カラムを用いて最適な移動相条件の検討を実施した。

種々の検討結果から、分析カラムとして ZIC-cHILIC を用い、移動相として 20 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液 (pH 2.5) 及び 0.1 vol% ギ酸・アセトニトリル溶液を用いることで、各検討対象化合物について良好な測定感度及びピーク形状が得られた。確立した LC-MS/MS 測定条件を用いて各検討対象化合物 100 ng/mL の混合標準溶液を繰り返し測定 (n=10) したところ、ピーク面積値の減少や増加傾向は確認されず、相対標準偏差 (RSD%) 7% 未満の良好な精度が得られた (表 2)。

③効率的な抽出法の検討

牛の筋肉、牛の肝臓、牛乳、鶏卵を対象に、検討対象化合物を効率的に抽出可能な抽出溶媒について検討した。

検討対象化合物であるアミノグリコシド系抗生物質は非常に極性が高い化合物である一方、対象食品である畜産物は脂肪等の低極性夾雑物を含む食品も多いことから、先ず、極性の高い含水溶媒と低極性の非水系溶媒を同時に用いる方法について検討した。

なお、抽出に含水溶媒を用いた場合には、食

品に依っては遠心分離後に残留物が得られず、清澄な抽出液が得られないこともあるため、タンパク質を沈殿させることを目的として塩及び酸の添加を検討した。添加する塩としては、LC の移動相にも使用しているギ酸アンモニウムを選択し、酸としては比較的取扱いが容易なギ酸を選択した。

各検討食品に水及びメタノールもしくはアセトニトリル、*n*-ヘキサンもしくは酢酸エチル、ギ酸アンモニウム及びギ酸を加え、ホモジナイズ及び遠心分離を行った結果、下層の含水溶媒層 (水及びメタノールもしくはアセトニトリル) は比較的清澄な溶液が得られたが、食品に依っては上層の非水系溶媒層がゲル状になる、上層と下層の間に浮遊物層が得られるなど、抽出液である含水溶媒層を採る操作が困難となる場合があることが確認された。

そこで、非水系溶媒を使用せず、含水溶媒である水及びメタノール混液のみでの抽出を検討した。

水及びメタノール混液のみで抽出する場合であっても、清澄な抽出液を得るためには塩及び酸の添加が必要であったことから、上述のギ酸アンモニウム及びギ酸を添加して検討した。

試料 10.0 g に対して、水及びメタノール混液 50 mL、ギ酸 0.5 mL、ギ酸アンモニウム 5 g を添加後、ホモジナイズ、遠心分離した結果、メタノール比率が 50% 以上の場合に各検討食品において比較的清澄な抽出液が得られた。そこで、牛の筋肉に各検討対象化合物を添加し、水及びメタノール (1:1) 混液 50 mL、ギ酸 0.5 mL、ギ酸アンモニウム 5 g を加えて抽出し、抽出液を LC-MS/MS で測定したところ、ネオマイシン等の特に極性が高い化合物が抽出されていないことが確認された。

添加する酸について再検討したところ、ギ酸の代わりに塩酸を添加することで、各検討食品において比較的清澄な抽出液が得られた。

そこで、牛の筋肉に各検討対象化合物を添加し、各比率の水及びメタノール混液(ギ酸アンモニウム 5 g 及び終濃度として 0.2 mol/L の塩酸を含む) 50 mL ずつで 2 回ホモジナイズ抽出し、抽出液を LC-MS/MS で測定した。また、各ブランク試料を同様に抽出し、抽出液に各検討対象化合物を添加したものをマトリックス添加標準溶液とした。各検討対象化合物について「抽出液におけるピーク面積値」/「マトリックス添加標準溶液におけるピーク面積値」×100 の値を算出し、これを回収率とした。結果を表 3 に示した。塩酸酸性条件下で抽出した場合には、水とメタノールの比率に関わらず、ネオマイシン等の非常に極性が高い物質であっても効率的に抽出可能であった。以上の結果から、高極性化合物であるアミノグリコシド系抗生物質を効率的に抽出するためには、強酸性条件下で抽出する必要があると考えられた。

次いで、他の畜産物への適用性について検討した。すなわち、牛の筋肉、牛の肝臓、牛乳及び鶏卵をそれぞれ 10.0 g 量り採り、各検討対象化合物 100 µg を添加した。室温で 30 分間放置後、水及びメタノール(1:1)混液(ギ酸アンモニウム 5 g 及び終濃度として 0.2 mol/L の塩酸を含む) 50 mL ずつで 2 回ホモジナイズ抽出した。抽出液を合わせ、100 mL に定容後、LC-MS/MS で測定した。結果を表 4 に示した。検討対象化合物と検討食品に組み合わせによっては、回収率が 60% 程度となる場合もあることが確認された。本検討においては、抽出液をそのまま測定したため、測定の際の試料マトリックスの影響により正確な測定値が得られていない可能性などを考慮する

と、得られた回収率は比較的良好であったと考えられた。

以上の結果及び考察から、塩酸酸性下、水及びメタノール混液を用いてホモジナイズ抽出することで、牛の筋肉、牛の肝臓、牛乳及び鶏卵から極性の高い各検討対象化合物を効率的に抽出可能であると推察された。

精製用固相カートリッジカラムにおける保持及び精製効果に対する影響等を考慮し、最終的には抽出溶媒として 2 mol/L 塩酸及びメタノール(1:1)混液を選択し、抽出の際に添加するギ酸アンモニウム量は 2 g とした。

④効率的且つ効果的な精製法の検討

畜産食品由来の試料マトリックスの効果的且つ効率的な精製法について検討した。すなわち、種々の固相カートリッジカラムを用い、負荷、洗浄、溶出条件等を検討した後、適用性を検討した。

先ず、強酸性陽イオン交換基を有する InertSep MC-1(500 mg)について検討した。カラム負荷においては、強酸性の抽出液をそのまま注入可能であった。また、抽出液 10 mL(試料 1 g 相当量)を負荷した場合であっても、各検討対象化合物の保持は良好であった。洗浄においてはアセトニトリルやアセトン、メタノールなど、洗浄効果が高いと考えられる種々の有機溶媒を使用することが可能であった。カラムからの溶出においては、アセトニトリル、アンモニア水及び水(5:1:4)混液などを用いることで比較的良好な回収率が得られたが、ストレプトマイシン及びジヒドロストレプトマイシンは全く溶出しないことが確認された。表 5 に、牛の肝臓及び鶏卵の添加試料(添加濃度 0.1 ppm, n=1)における各検討対象化合物の回収率を示した。

次いで、弱酸性陽イオン交換基を有する

Oasis WCX(500 mg)について検討した。カラム負荷においては、抽出液の pH を 7 付近に調整して注入することで良好な保持が得られた。なお、抽出液 10 mL(試料 1 g 相当量)を負荷した場合でも比較的良好な保持が得られたが、食品や抽出液中の塩濃度等の影響により回収率が低下する可能性があることが確認された。洗浄においては、アセトニトリルやメタノールなど、種々の有機溶媒を使用することが可能であった。カラムからの溶出においては、高濃度(10 vol%程度)のギ酸を含む溶液を用いることで良好な回収率が得られた。畜産食品由来の試料マトリックス存在下で適用性を確認したところ、一部の食品と検討対象化合物の組み合わせにおいてはイオン化抑制傾向が確認されたが、比較的良好な回収率が得られた。

以上の結果から、本研究においては弱酸性陽イオン交換基を有する Oasis WCXを用いた精製法を採用した。

なお、精製用固相カートリッジカラムからの抽出液を測定用試験溶液に置換する際など、検討対象化合物を含む溶液を効率的に濃縮するためには、エタノールなどを加えながらロータリーエバポレーター等で減圧濃縮を行う必要があるが、一部の検討対象化合物については濃縮工程において回収率が低下することが確認された。ギ酸アンモニウム等の塩を添加して濃縮することで、回収率低下を抑制することが可能であったことから、本研究においては、2 mol/L ギ酸アンモニウム溶液を 0.1 mL 添加して濃縮操作を実施した。

⑤ 添加回収試験

本研究で構築した分析法を用いて添加回収試験を実施した。検討対象食品には、牛の筋肉・脂肪・肝臓・乳及び鶏卵を用いた。添加濃度は

各食品における各検討対象化合物の基準値とし、基準値が設定されていない場合は 0.1 ppm を添加濃度とした。本研究で用いた検討食品と検討対象化合物の添加濃度の組み合わせを表 6 に示した。作成した添加試料を「B. 研究方法④ 添加回収試験」に記載した方法に従って操作し、試験溶液を調製した。得られた試験溶液を LC-MS/MS で測定し、絶対検量線法により各検討対象化合物の真度及び併行精度を求めた。また、マトリックス添加標準溶液を調製後、LC-MS/MS で測定し、「マトリックス添加標準溶液のピーク面積値/溶媒標準溶液のピーク面積値」を算出した。

本検討で得られた結果を表 7 及び表 8 に示した。また、牛の筋肉における各検討対象化合物のクロマトグラムを図 2~11 に示した。

牛の筋肉では、スペクチノマイシン及びジヒドロストレプトマイシンの真度が高く、マトリックス添加標準溶液の測定結果から測定の際のイオン化促進が原因であると推察された。また、カナマイシン及びネオマイシンにおいては若干低い真度が得られたが、マトリックス添加標準溶液の測定結果から測定の際の試料マトリックスの影響は小さく、試験溶液調製工程における損失が原因であることが推察された。その他の化合物については、比較的良好な真度及び併行精度が得られた。

牛の脂肪においては、ジヒドロストレプトマイシンの真度が高く、マトリックス添加標準溶液の測定結果から測定の際のイオン化促進が原因であると推察された。また、スペクチノマイシン、ハイグロマイシン B 及びアミカシンにおいては若干低い真度が得られ、マトリックス添加標準溶液の測定結果から測定の際のイオン化抑制が原因であると推察された。その他の化合物については、

比較的良好な真度及び併行精度が得られた。

牛の肝臓においては、ストレプトマイシンで真度 10%程度、その他の化合物で真度 50%～60%程度と低値であった。マトリックス添加標準溶液の測定結果から、ストレプトマイシンを除いて測定の際の試料マトリックスの影響は小さく、試料マトリックスの影響により精製用固相カートリッジカラムである Oasis WCX への保持が弱まったことなどが原因と推察された。

牛乳においては、ジヒドロストレプトマイシンの真度が高く、マトリックス添加標準溶液の測定結果から測定の際のイオン化促進が原因であると推察された。また、スペクチノマイシン及びハイグロマイシン B においては若干低い真度が得られ、マトリックス添加標準溶液の測定結果から測定の際のイオン化抑制が原因であると推察された。その他の化合物については、比較的良好な真度及び併行精度が得られた。

鶏卵においては、ジヒドロストレプトマイシンで高い真度が得られ、スペクチノマイシン、カナマイシン、ハイグロマイシン B、アプラマイシン及びネオマイシンで若干低い真度となった。

なお、カスガマイシンについては、使用した Oasis WCX に保持されなかったため、全ての検討食品において回収が得られなかった。

以上のように、本研究で構築した分析法を用いて畜産食品中のアミノグリコシド系抗生物質を分析した場合には、食品と化合物の組み合わせによっては良好な真度が得られない場合もあるが、概ね 50%以上の真度が得られ、併行精度は良好であった。このことから、構築した分析法は畜産食品中のアミノグリコシド系抗生物質のスクリーニング分析法として有用であると考えられた。実際の検査においては、本法を実施し、残留が疑われる場合には、ストレプトマシ及びジヒドロ

ストレプトマシについては弱酸性陽イオン交換カートリッジカラムへの負荷量を減らして実施し、その他の化合物については強酸性陽イオン交換固相カートリッジカラム精製の実施により、効率的な畜産食品中アミノグリコシド系抗生物質の分析が可能と考えられた。

D. 結論

食品中アミノグリコシド系抗生物質分析法の開発を目的として、LC-MS/MS を用いたアミノグリコシド系抗生物質の高感度且つ高精度な測定法、種々の畜産物からの効率的な抽出法、畜産食品由来の試料マトリックスの効果的且つ効率的な精製法の確立について検討した。検討した測定法、抽出法及び精製法を組み合わせる分析法を構築し、畜産食品中のアミノグリコシド系抗生物質分析法としての適用性を検討した。

LC-MS/MS 測定条件については、適切な MS/MS 条件を設定した後、分析カラムとして ZIC-cHILIC (MERCK MILLIPORE 社製)、移動相として 20 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液 (pH 2.5) 及び 0.1 vol% ギ酸・アセトニトリル溶液を用いることで、全ての検討対象化合物について良好なピーク形状が得られた。また、適切なグラジエント条件を設定することで、混合標準溶液の繰り返し測定において良好な併行精度が得られた。

抽出法については、抽出溶媒として水及びメタノール (1:1) 混液を使用し、タンパク質等を沈殿させるための添加剤としてギ酸アンモニウム及び塩酸を用いることで、検討した牛の筋肉、牛の肝臓、牛乳及び鶏卵から、極性の高い検討対象化合物を効率的に抽出可能であることが推察された。

精製法については、強酸性陽イオン交換固相カートリッジカラムを用いた場合には、カスガマイシン、ストレプトマイシン及びジヒドロストレプトマイシンには適用できないものの、その他の検討対象化合物については比較的良好な回収率が得られた。弱酸性陽イオン交換固相カートリッジカラムを採用した分析法を用い、添加回収試験を実施した結果、食品と化合物の組み合わせによっては良好な真度が得られない場合もあるが、概ね 50%以上の真度が得られ、併行精度は良好であった。

以上の結果から、本検討で構築した分析法は畜産食品中のアミノグリコシド系抗生物質のスクリーニング分析法として有用であると考えられた。本法を用いた分析の実施により残留が疑われる場合には、精製用固相カートリッジカラムへの負荷液量の調整や異なる固相カートリッジカラムを

用いた精製の実施などにより効率的な畜産食品中アミノグリコシド系抗生物質の分析が可能と考えられた。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1 タンデム型質量分析における検討対象化合物の測定条件

検討対象化合物	分子量	化学式	ESI	プリカーサーイオン (m/z)	コーン電圧 (V)	プロダクトイオン (m/z)	コリジョンエネルギー (eV)
アブラマイシン	539.59	C ₂₁ H ₄₁ N ₅ O ₁₁	+	540.3	20	217.2	25
アミカシン	585.60	C ₂₂ H ₄₃ N ₅ O ₁₃	+	586.3	20	163.2	25
カスガマイシン	379.36	C ₁₄ H ₂₅ N ₃ O ₉	+	380.1	20	112.1	15
カナマイシン	484.50	C ₁₉ H ₃₆ N ₄ O ₁₁	+	485.3	20	163.2	20
ゲンタマイシンC1	477.60	C ₂₁ H ₄₃ N ₅ O ₇	+	478.3	20	322.3	15
ジヒドロストレプトマイシン	583.59	C ₂₁ H ₄₁ N ₇ O ₁₂	+	584.3	80	263.2	25
ストレプトマイシン	581.58	C ₂₁ H ₃₉ N ₇ O ₁₂	+	582.3	100	263.2	30
スペクチノマイシン	332.35	C ₁₄ H ₂₄ N ₂ O ₇	+	333.2	60	98.1	25
ネオマイシン	614.65	C ₂₃ H ₄₆ N ₆ O ₁₃	+	615.4	20	161.2	25
ネチルマイシン	475.58	C ₂₁ H ₄₁ N ₅ O ₇	+	476.3	20	299.3	20
ハイグロマイシンB	527.50	C ₂₀ H ₃₇ N ₃ O ₁₃	+	528.2	20	177.2	25

表 2 混合標準溶液の繰り返し測定結果

化合物名	相対標準偏差 (RSD%)
アブラマイシン	2.8
アミカシン	6.3
カスガマイシン	4.7
カナマイシン	6.2
ゲンタマイシンC1	6.4
ジヒドロストレプトマイシン	3.6
ストレプトマイシン	3.8
スペクチノマイシン	3.5
ネオマイシン	6.2
ネチルマイシン	3.8
ハイグロマイシンB	2.7

表 3 牛の筋肉抽出液中の各検討対象化合物の回収率

	回収率(%)			
	水及びメタノール混液			
	(1:4)	(2:3)	(3:2)	(4:1)
アブラマイシン	119	105	96	96
アミカシン	97	80	85	105
カスガマイシン	88	94	95	81
カナマイシン	92	99	103	96
ゲンタマイシンC1	81	90	95	70
ジヒドロストレプトマイシン	83	90	93	107
ストレプトマイシン	84	89	98	115
スペクチノマイシン	84	99	94	94
ネオマイシン	102	91	71	76
ハイグロマイシンB	98	93	93	94

表 4 各試料抽出液中の各検討対象化合物の回収率

	回収率(%)			
	牛の筋肉	牛の肝臓	牛乳	鶏卵
アブラマイシン	72	80	139	67
アミカシン	71	82	149	72
カスガマイシン	100	88	90	79
カナマイシン	81	60	99	67
ゲンタマイシンC1	82	84	73	69
ジヒドロストレプトマイシン	94	70	107	72
ストレプトマイシン	84	64	96	69
スペクチノマイシン	88	72	103	81
ネオマイシン	91	81	114	75
ハイグロマイシンB	86	88	111	83

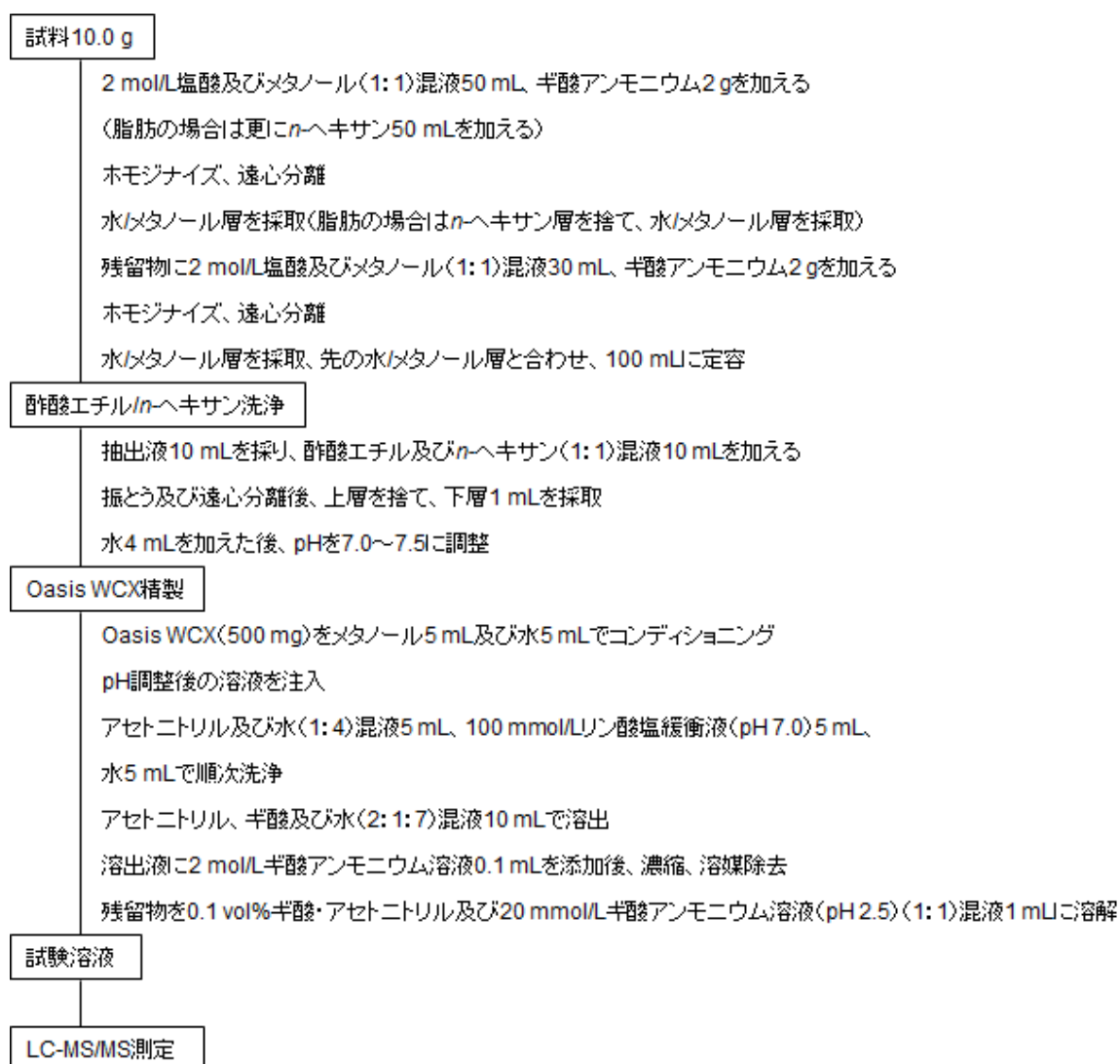


図 1 試験溶液調製法のフローチャート

表 5 強酸性陽イオン交換固相カートリッジカラム精製における検討対象化合物の回収率

	回収率(%、n=1、添加濃度0.1 ppm)	
	牛の肝臓	鶏卵
スペクチノマイシン	37	72
カスガマイシン	-	-
ネチルマイシン	110	184
ゲンタマイシンC1	80	104
カナマイシン	103	108
ハイグロマイシンB	42	133
アブラマイシン	99	99
ストレプトマイシン	-	-
ジヒドロストレプトマイシン	-	-
アミカシン	62	155
ネオマイシン	105	104

表 6 添加回収試験における検討対象化合物の添加濃度

	添加濃度(ppm)				
	牛の筋肉	牛の脂肪	牛の肝臓	牛乳	鶏卵
スペクチノマイシン	0.5	2	2	0.2	2
カスガマイシン	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
ネチルマイシン	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
ゲンタマイシンC1	0.1	0.1	2	0.2	0.1
カナマイシン	0.04	0.04	1	0.7	0.2
ハイグロマイシンB	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
アブラマイシン	0.5	0.5	5	0.1	0.1
ストレプトマイシン	0.6	0.6	0.6	0.2	0.1
ジヒドロストレプトマイシン	0.6	0.6	0.6	0.2	0.1
アミカシン	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
ネオマイシン	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5

*: 基準値が未設定の食品と検討対象化合物の組み合わせ

表 7 添加回収試験結果

	牛の筋肉		牛の脂肪		牛の肝臓		牛乳		鶏卵	
	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	真度 (%)	併行精度 (RSD%)
スペクチノマイシン	233	13.0	44	5.0	63	4.2	59	5.3	48	10.2
カスガマイシン	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ネチルマイシン	95	2.6	85	5.5	62	5.8	87	5.0	75	6.0
ゲンタマイシンC1	76	2.9	88	6.2	58	4.2	94	4.4	78	4.7
カナマイシン	61	10.2	78	4.9	55	7.5	71	6.4	62	6.7
ハイゲロマイシンB	78	5.0	47	11.9	60	2.4	61	12.6	54	5.5
アブラマイシン	74	3.4	76	3.9	58	3.6	80	9.0	69	7.1
ストレプトマイシン	80	1.1	103	5.9	13	4.8	110	11.0	105	12.0
ジヒドロストレプトマイシン	133	2.1	171	9.7	53	5.5	172	11.0	154	5.3
アミカシン	83	7.2	63	9.3	54	14.4	78	7.0	76	11.0
ネオマイシン	59	9.5	72	3.2	51	8.7	84	4.8	68	4.9

表 8 測定の際の試料マトリックスの影響

	測定の際の試料マトリックスの影響 [*]				
	牛の筋肉	牛の脂肪	牛の肝臓	牛乳	鶏卵
スペクチノマイシン	3.80	0.51	0.91	0.69	0.76
カスガマイシン	-	-	-	-	-
ネチルマイシン	1.20	1.02	1.01	0.99	0.84
ゲンタマイシンC1	1.14	1.05	0.92	1.00	1.33
カナマイシン	1.01	1.02	1.01	0.80	0.94
ハイゲロマイシンB	1.03	0.71	0.91	0.73	0.81
アブラマイシン	0.99	0.94	0.93	0.94	1.16
ストレプトマイシン	1.02	0.85	0.31	1.33	1.74
ジヒドロストレプトマイシン	1.37	2.24	0.75	2.06	2.27
アミカシン	1.19	0.77	0.90	0.87	1.13
ネオマイシン	1.07	0.92	1.05	1.01	0.87

*:マトリックス添加標準溶液のピーク面積値/溶媒標準溶液のピーク面積値

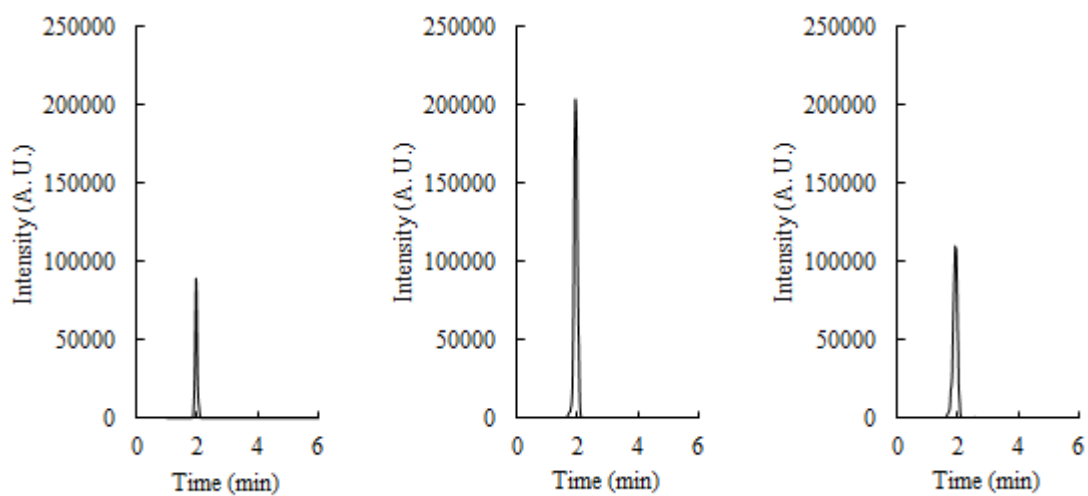


図 2 筋肉における SRM クロマトグラム(スペクチノマイシン)

左:溶媒標準溶液(回収率 100%相当濃度)、中:マトリックス添加標準溶液、右:添加試料

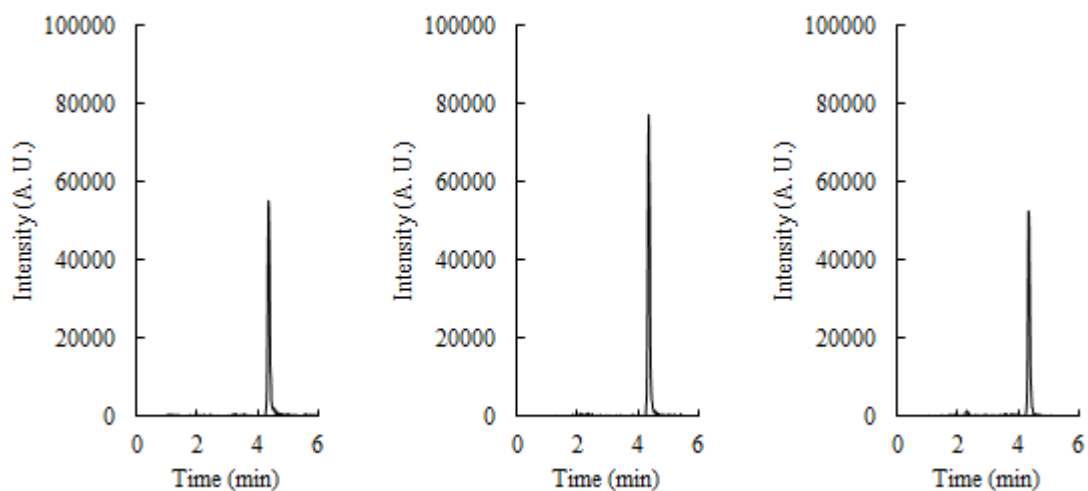


図 3 筋肉における SRM クロマトグラム(ネチルマイシン)

左:溶媒標準溶液(回収率 100%相当濃度)、中:マトリックス添加標準溶液、右:添加試料

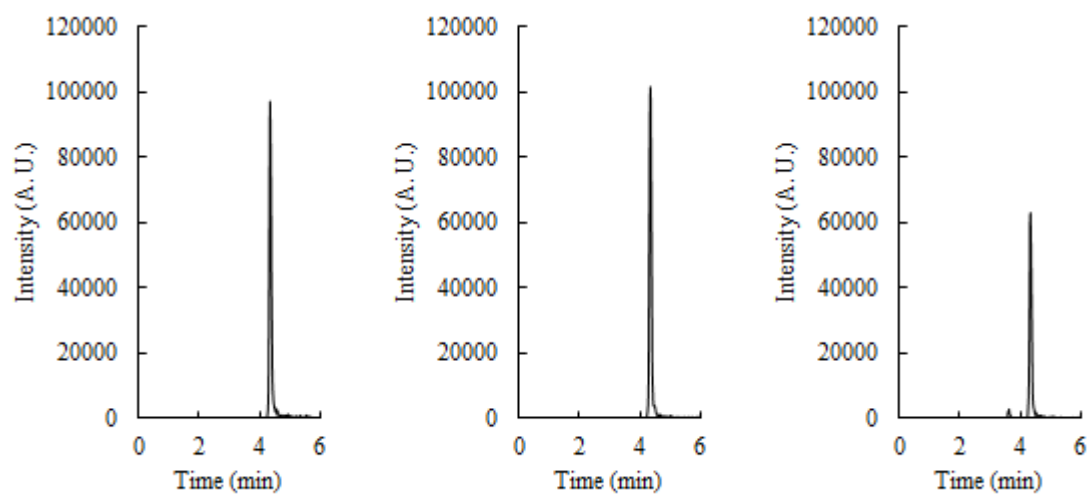


図 4 筋肉における SRM クロマトグラム(ゲンタマイシン)

左:溶媒標準溶液(回収率 100%相当濃度)、中:マトリックス添加標準溶液、右:添加試料

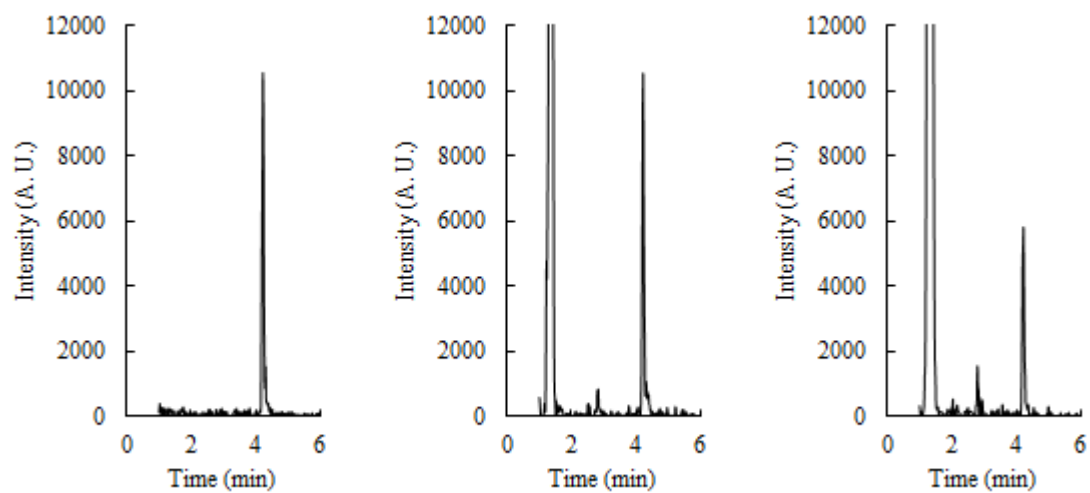


図 5 筋肉における SRM クロマトグラム(カナマイシン)

左:溶媒標準溶液(回収率 100%相当濃度)、中:マトリックス添加標準溶液、右:添加試料

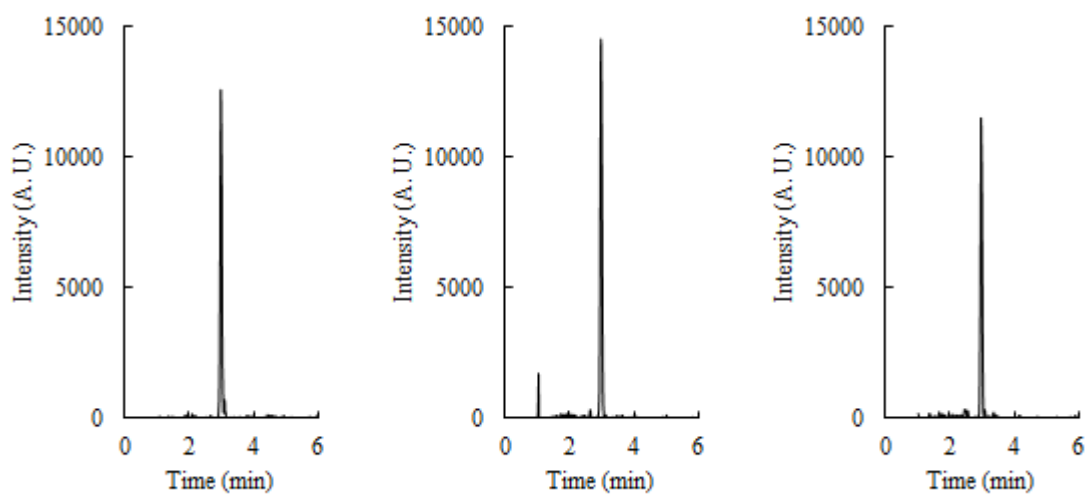


図 6 筋肉における SRM クロマトグラム(ハイグロマイシン)

左:溶媒標準溶液(回収率 100%相当濃度)、中:マトリックス添加標準溶液、右:添加試料

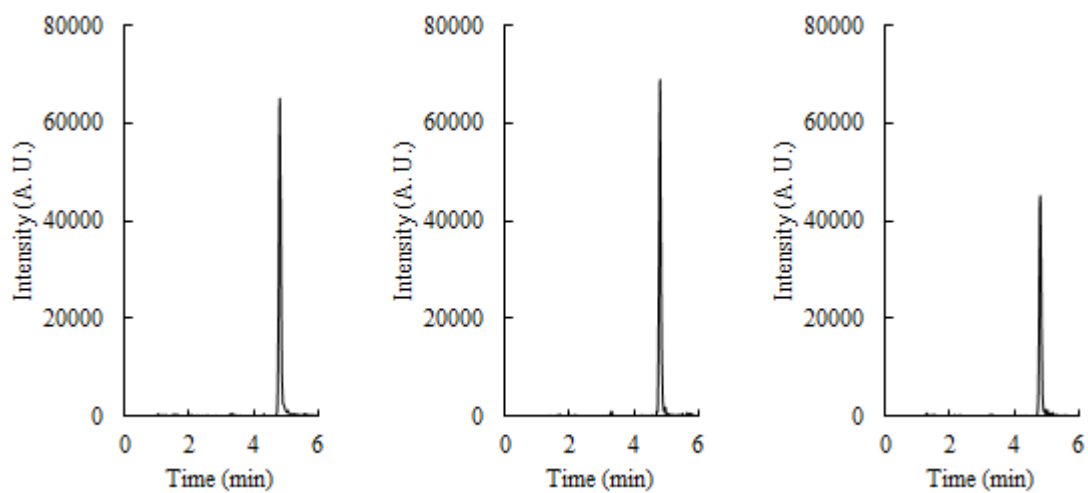


図 7 筋肉における SRM クロマトグラム(アプラマイシン)

左:溶媒標準溶液(回収率 100%相当濃度)、中:マトリックス添加標準溶液、右:添加試料

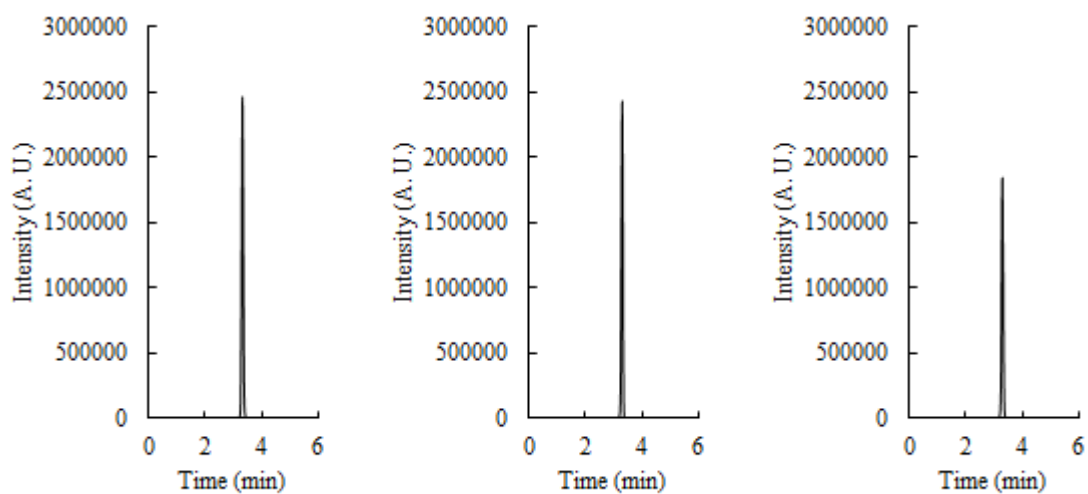


図 8 筋肉における SRM クロマトグラム(ストレプトマイシン)

左:溶媒標準溶液(回収率 100%相当濃度)、中:マトリックス添加標準溶液、右:添加試料

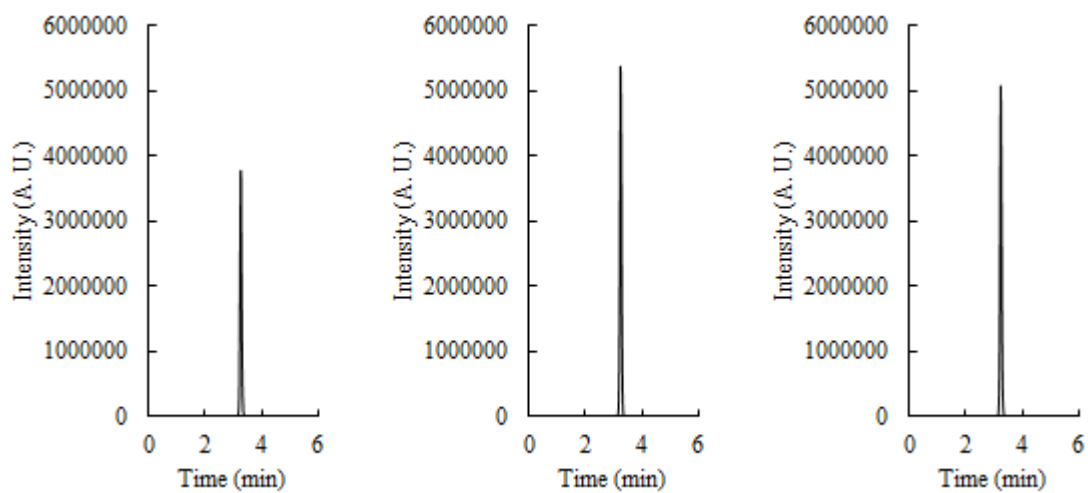


図 9 筋肉における SRM クロマトグラム(ジヒドロストレプトマイシン)

左:溶媒標準溶液(回収率 100%相当濃度)、中:マトリックス添加標準溶液、右:添加試料

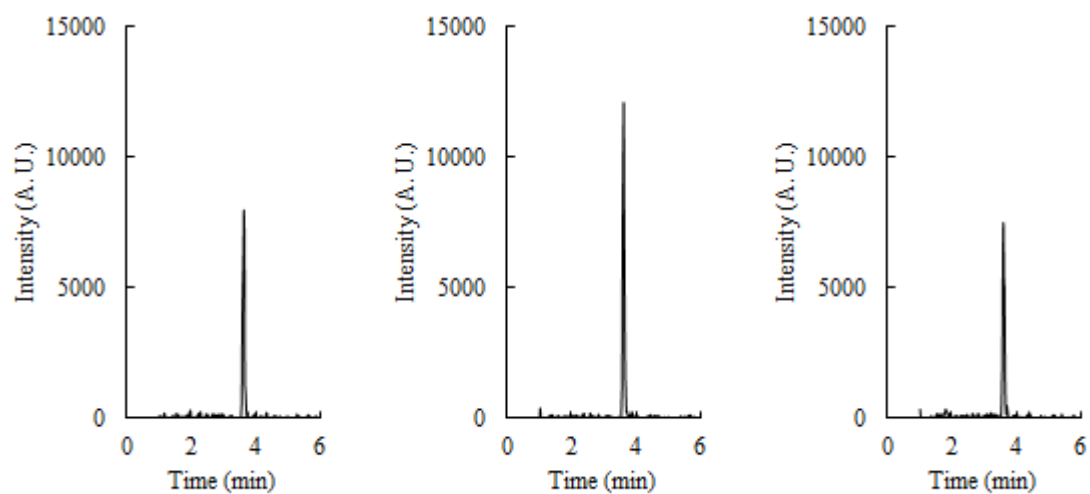


図 10 筋肉における SRM クロマトグラム(アミカシン)

左:溶媒標準溶液(回収率 100%相当濃度)、中:マトリックス添加標準溶液、右:添加試料

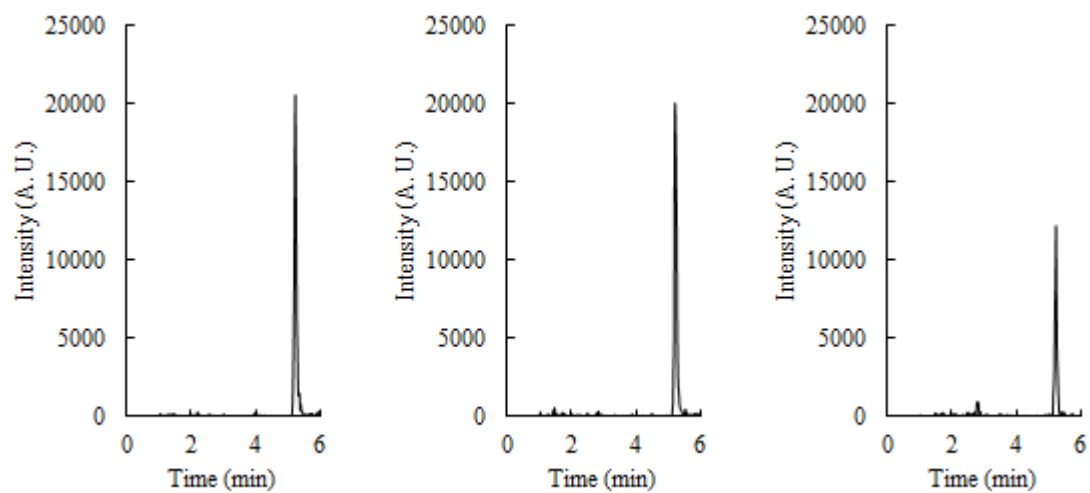


図 11 筋肉における SRM クロマトグラム(ネオマイシン)

左:溶媒標準溶液(回収率 100%相当濃度)、中:マトリックス添加標準溶液、右:添加試料