

HPLCによる動物用医薬品等の一斉試験法Ⅲ（畜水産物）

1. 分析対象化合物

別表参照

2. 装置

液体クロマトグラフ・質量分析計（LC/MS）又は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2に示すものを用いる。

アセトニトリル 液体クロマトグラフ用に製造したもの。

水 液体クロマトグラフ用に製造したもの。

メタノール 液体クロマトグラフ用に製造したもの。

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 12~13 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 を充てんしたもの又はこれと同等の分離特性を有するものを用いる。
各動物用医薬品等標準品 各動物用医薬品等の純度が明らかなもの。

4. 試験溶液調製法

1) 抽出

試料 5.00 g を量り採り、アセトニトリル、メタノール及び 0.2%メタリン酸（1 : 1 : 3）混液 100 mL を加えて細砕した後、ケイソウ土を 2~3 mm の厚さに敷いたろ紙を用いてすり合わせ減圧濃縮器中に吸引ろ過する。ろ紙上の残留物にアセトニトリル、メタノール及び 0.2%メタリン酸（1 : 1 : 3）混液 20 mL を加えてかき混ぜた後、上記と同様に操作して、ろ液を合わせ、40℃以下で約 20 mL に濃縮する。

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 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、水 5 mL を注入し、流出液は捨てる。このカラムにメタノール 5 mL を注入し、溶出液をすり合わせ減圧濃縮器中に採り、40℃以下でメタノールを除去する。この残留物にアセトニトリル及び水（1 : 9）混液 1.0 mL を加えて溶かし、これを試験溶液とする。

5. 検量線の作成

各動物用医薬品等の標準品について、それぞれメタノール溶液を調製し、適切な濃度範囲の各動物用医薬品等を含むアセトニトリル及び水（1 : 9）混液溶液を数点調製する。それぞれ 5 µL を LC/MS 又は 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 HPLC に注入し、5 の検量線で各動物用医薬品等の含量を求める。

7. 確認試験

LC/MS 又は LC/MS/MS により確認する。

8. 測定条件

検出器：別表参照

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 100 mm、粒子径 3 μ m

カラム温度：40°C

移動相：アセトニトリル、0.005%ギ酸及び水混液（1：1：18）から（16：1：3）までの濃度勾配を 15 分間で行い、（16：1：3）で 5 分間保持する。

検出条件：別表参照

9. 定量限界

別表参照

10. 留意事項

1) 試験法の概要

各動物用医薬品等を試料からアセトニトリル、メタノール及び 0.2%メタリン酸溶液の混液で抽出し、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 又は LC/MS/MS で測定、確認する方法である。

2) 注意点

- ① 別表は本法を適用できる化合物を五十音順に示したものであるが、規制対象となる品目には本法を適用できない代謝物等の化合物が含まれる場合があるので留意すること。
- ② 本試験法は、別表に示した全ての化合物の同時分析を保証したものではない。化合物同士の相互作用による分解等及び測定への干渉等のおそれがあるため、分析対象とする化合物の組み合わせにおいてあらかじめこれらの点を検証する必要がある。
- ③ 空気酸化、光分解を起こしやすい動物用医薬品等があるので、全操作は遮光下で迅速に行う。
- ④ 標準品がメタノールに溶けにくい場合は、少量の *N,N*-ジメチルホルムアミドに溶解後、メタノールで希釈する。
- ⑤ LC/MS 又は LC/MS/MS の感度によっては、試験溶液をさらに HPLC の移動相で希釈する。
- ⑥ 絶対検量線法により一定の真度及び精度が得られなくても、安定同位体を用いた内標準法、標準添加法により補正できる場合がある。
- ⑦ 定量限界は、使用する機器、試験溶液の濃縮倍率及び試験溶液注入量により異なるので、必要に応じて最適条件を検討する。

11. 参考文献

なし

12. 類型

C

(別表)HPLCによる動物用医薬品等の一斉試験法Ⅲ(畜水産物)

品目名	分析対象化合物名	測定イオン (m/z)	定量限界 (mg/kg)
エトバベート	エトバベート	+260→260	0.01
オキシテトラサイクリン、クロルテトラサイクリン 及びテトラサイクリン	オキシテトラサイクリン	+461→426	0.02
	クロルテトラサイクリン	+479→462	0.03
	テトラサイクリン	+445→410	0.02
オキシベンダゾール	オキシベンダゾール	+250→218	0.01
オラキンドックス	オラキンドックス	+264→143	0.01
オルメトプリム	オルメトプリム	+275→123	0.02
クロビドール	クロビドール	+192→101	0.01
スピラマイシン	スピラマイシン I	+422→174	0.05
	ネオスピラマイシン I	+350→174	0.05
スルファキノキサリン	スルファキノキサリン	+301→156	0.01
スルファクロルピリダジン	スルファクロルピリダジン	+285→156	0.01
スルファジアジン	スルファジアジン	+251→156	0.01
スルファジミジン	スルファジミジン	+279→186	0.01
スルファジメキシシ	スルファジメキシシ	+311→156	0.01
スルファチアゾール	スルファチアゾール	+256→156	0.01
スルファドキシシ	スルファドキシシ	+311→156	0.01
スルファニトラン	スルファニトラン	-334→136	0.01
スルファピリジン	スルファピリジン	+250→156	0.01
スルファベンズアミド	スルファベンズアミド	+277→156	0.01
スルファメキサゾール	スルファメキサゾール	+254→92	0.01
スルファメキシピリダジン	スルファメキシピリダジン	+281→156	0.01
スルファメラジン	スルファメラジン	+265→156	0.01
スルファモノメキシシ	スルファモノメキシシ	+281→156	0.01
ゼラノール	ゼラノール	-321→321	0.01
チアンフェニコール	チアンフェニコール	-354→185	0.01
トリメトプリム	トリメトプリム	+291→123	0.02
酢酸トレンボロン	α -トレンボロン(肝臓)	+271→253	0.002
	β -トレンボロン(筋肉)	+271→253	0.002
ナイカルバジン	N,N'-ビス(4-ニトロフェニル)ウレア	-301→137	0.02
フルベンダゾール	フルベンダゾール	+314→282	0.01
5-プロピルスルホニル-1H-ベンズイミダゾール-2-アミン	5-プロピルスルホニル-1H-ベンズイミダゾール-2-アミン	+240→133	0.01
レバミゾール	レバミゾール	+205→178	0.01

◎化合物名の五十音順に示した。

◎測定イオンはLC/MS/MS測定における[プリカーサーイオン→プロダクトイオン]を示し、数字の前の符号はESI(-)あるいはESI(+)-測定におけるイオン化モードを示す。

オキシテトラサイクリン試験法（農産物）

1. 分析対象化合物

オキシテトラサイクリン

2. 装置

蛍光検出器付き高速液体クロマトグラフ（HPLC-FL）

液体クロマトグラフ・質量分析計（LC/MS）

3. 試薬、試液

次に示すもの以外は、総則の2に示すものを用いる。

イミダゾール イミダゾール（特級）

イミダゾール緩衝液 イミダゾール 68.08 g、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム 0.37 g 及び酢酸マグネシウム 10.72 g を水に溶かして 800 mL とする。これに酢酸を加えて pH7.2 に調整し、水を加えて 1,000 mL とする。

エチレンジアミン四酢酸含有クエン酸緩衝液 第1液：クエン酸 21.0 g を水に溶かして 1,000 mL とする。第2液：リン酸二ナトリウム 71.6 g を水に溶かして 1,000 mL とする。エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム 1.86 g に第1液 307 mL と第2液 193 mL を混和したものを加えて溶かす。

カルボキシメチル基結合型弱酸性陽イオン交換樹脂ミニカラム（250mg） 内径 12～13mm のポリプロピレン製のカラム管に、カルボキシメチル基結合型弱酸性陽イオン交換樹脂 250mg を充てんしたもの又はこれと同等の分離特性を有するものを用いる。

塩酸オキシテトラサイクリン標準品 本品 1.000 mg はオキシテトラサイクリン 0.850 mg 力価以上を含む。

4. 試験溶液の調製

1) 抽出

① 穀類、豆類及び種実類の場合

試料 10.0 g を量り採り、水 20 mL を加え、2時間放置する。これにエチレンジアミン四酢酸含有クエン酸緩衝液 50 mL を加え、3分間ホモジナイズした後、毎分 3,000 回転で 10 分間遠心分離を行い、水層を採る。残留物にエチレンジアミン四酢酸含有クエン酸緩衝液 20 mL を加え、1分間ホモジナイズした後、上記と同様に遠心分離を行い、水層を採り、先の水層に合わせ、吸引ろ過し、ろ液にエチレンジアミン四酢酸含有クエン酸緩衝液を加え、正確に 100 mL とする。

② 果実及び野菜の場合

試料 20.0 g を量り採り、エチレンジアミン四酢酸含有クエン酸緩衝液 50 mL を加え、3分間ホモジナイズした後、毎分 3,000 回転で 10 分間遠心分離を行い、水層を採る。残留物にエチレンジアミン四酢酸含有クエン酸緩衝液 20 mL を加え、1分間ホモジナイズした後、上記