

LC/MSによる動物用医薬品等の一斉試験法 I (畜水産物)

1. 分析対象化合物

別表参照

2. 適用食品

畜水産物

3. 装置

液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計 (LC-MS/MS)

4. 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。

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。(各動物用医薬品等の個別試験法で、標準品の純度が示されている場合にはそれに従う。示されていない場合には、純度95%以上のものを使用することが望ましい。)

5. 試験溶液の調製

1) 抽出

試料10.0 gを量り採る。はちみつの場合は、試料10.0 gを量り採り、水10 mLを加えて溶かす。これに、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル50 mL、*n*-ヘキサン50 mL及び酢酸1 mLを加えてホモジナイズした後、無水硫酸ナトリウム20 gを加えてさらにホモジナイズする。毎分3,000回転で5分間遠心分離した後、*n*-ヘキサン層を捨て、アセトニトリル層を採る。残留物にアセトニトリル50 mLを加えてホモジナイズし、上記と同様に遠心分離する。アセトニトリル層を採り、先のアセトニトリル層と合わせ、アセトニトリルを加えて正確に100 mLとする。この溶液から正確に5 mLを分取し、40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物に0.1 vol%ギ酸及びメタノール (1 : 4) 混液1 mLを加えて溶かす。

2) 精製

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム (1,000 mg) にメタノール5 mL、0.1 vol%ギ酸及びメタノール (1 : 4) 混液5 mLを順次注入し、各流出液は捨てる。このカラムに1) で得られた溶液を注入した後、さらに0.1 vol%ギ酸及びメタノール (1 : 4) 混液15 mLを注入し、負荷液を含む全溶出液を採る。溶出液を40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物をアセトニトリル及び0.1 vol%ギ酸 (1 : 3) 混液に溶かし、正確に1 mLとしたものを試験溶液とする。

6. 検量線の作成

各動物用医薬品等の標準品を適切な溶媒に溶かして標準原液を調製する。各標準原液を適宜混合して、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0.1 vol%ギ酸 (1 : 3) 混液の溶液を数点調製し、それぞれを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。

7. 定量

試験溶液をLC-MS/MSに注入し、6. の検量線で各動物用医薬品等の含量を求める。

8. 確認試験

LC-MS/MSにより確認する。

9. 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3.0 mm、長さ150 mm、粒子径3 μm

カラム温度：40℃

移動相：A液及びB液について下表の条件で送液する。

A液：0.1 vol%ギ酸

B液：0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液

時間 (分)	A液 (%)	B液 (%)
0.0	99	1
5.0	99	1
35.0	0	100
40.0	0	100

イオン化モード：ESI (+) 及びESI (-)

主なイオン (m/z)：別表参照

注入量：5 μL

保持時間の目安：別表参照

10. 定量限界

別表参照

11. 留意事項

1) 試験法の概要

各動物用医薬品等を試料から、酢酸酸性下、*n*-ヘキサン及び無水硫酸ナトリウム存在下、アセトニトリルで抽出する。オクタデシ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。また、保持時間の異なる異性体は、化合物名欄に個別に示した。
- 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 別表に示した化合物の中には、分析操作中に経時的に減少するものがあるので、全操作は迅速に行う。
- ④ 各動物用医薬品等標準品は、可能な限り高純度のものを使用すること。
- ⑤ 定容後のアセトニトリル抽出液中に浮遊物が認められる場合には、遠心分離を行い上澄液を以降の操作に用いても良い。
- ⑥ 濃縮し、溶媒を完全に除去する操作は、窒素気流を用いて穏やかに行う。
- ⑦ ミニカラムは使用条件で各動物用医薬品等の溶出調査を事前に行い、溶出位置を確認してから使用する。
- ⑧ 精確な測定値を得るためには、試験溶液の希釈やマトリックス添加標準溶液又は標準添加法を用いることが必要な場合がある。
- ⑨ 定量限界は使用する装置や測定条件により異なるので、必要に応じて最適条件を検討する。
- ⑩ LC-MS/MSの感度によっては、試験溶液を更にアセトニトリル及び0.1 vol%ギ酸 (1 : 3) 混液で希釈する。

- ⑩ 試験法開発時に検討した食品：牛の筋肉、鶏の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳、鶏卵、はちみつ、うなぎ、さけ、しじみ

12. 参考文献

なし

13. 類型

C

(別表)LC/MSによる動物用医薬品等の一斉試験法 I (畜水産物)

品目	分析対象化合物 ¹⁾	相対保持時間 ²⁾	主なイオン(m/z) ³⁾						定量限界(mg/kg) ⁴⁾
2-アセチルアミノ-5-ニトロチアゾール	2-アセチルアミノ-5-ニトロチアゾール	0.68	-186 → 139	-186 → 96					0.01
アザペロン	アザペロール	0.55	+330 → 312	+330 → 121	+330 → 109	+330 → 78			0.01
アルベンダゾール	5-プロピルスルホニル-1H-ベンズイミダゾール-2-アミン (アルベンダゾール代謝物 I)	0.52	+240 → 198	+240 → 133	+240 → 91				0.01
エトパペート	エトパペート	0.75	+238 → 206	+238 → 136	+238 → 80				0.01
オキシベンダゾール	オキシベンダゾール	0.68	+250 → 218	+250 → 176	+250 → 80				0.01
オルビフロキサシン	オルビフロキサシン	0.60	+396 → 352	+396 → 295	+396 → 267	+396 → 226			0.01
オルメプリム	オルメプリム	0.57	+275 → 259	+275 → 123	+275 → 81				0.01
カラゾロール	カラゾロール	0.68	+299 → 222	+299 → 194	+299 → 116				0.001
キシラジン	キシラジン	0.61	+221 → 164	+221 → 90					0.01
クロピドール	クロピドール	0.51	+194 → 101	+192 → 101	+192 → 87				0.01
ケトプロフェン	ケトプロフェン	0.91	+255 → 209	+255 → 194	+255 → 105	+255 → 77			0.01
ジアベリジン	ジアベリジン	0.52	+261 → 245	+261 → 123	+261 → 107	+261 → 81			0.01
ジシクラニル	ジシクラニル	0.43	+191 → 163	+191 → 150	+191 → 109	+191 → 92	+191 → 41		0.01
ジニトルミド	ジニトルミド	0.67	-224 → 181	-224 → 77	-224 → 42				0.01
ジフルベンズロン	ジフルベンズロン	1.04	+311 → 158	+311 → 141					0.01
ジフロキサシン	ジフロキサシン	0.63	+400 → 356	+400 → 306	+400 → 299	+400 → 256			0.01
ジョサマイシン	ジョサマイシン	0.84	+828 → 174	+828 → 109					0.01
スルファトロキサゾール	スルファトロキサゾール	0.69	+268 → 156	+268 → 108	+268 → 92				0.01
スルファニトラン	スルファニトラン	0.84	+336 → 156	+336 → 134	+336 → 65	-334 → 136	-334 → 133		0.01
スルファメラジン	スルファメラジン	0.57	+265 → 156	+265 → 108	+265 → 92				0.01
チアベンダゾール	チアベンダゾール	0.53	+202 → 175	+202 → 131	+202 → 104				0.01*
チアムリン	チアムリン	0.80	+495 → 91	+495 → 73	+494 → 192	+494 → 119			0.01
チアンフェニコール	チアンフェニコール	0.57	-354 → 290	-354 → 185					0.01
トリクロルホン	トリクロルホン	0.61	+257 → 127	+257 → 109	+257 → 79				0.004
トリメプリム	トリメプリム	0.54	+291 → 261	+291 → 230	+291 → 123				0.01*
ナイカルバジン	N, N'-ビス-(4-ニトロフェニル)ウレア	0.99	-301 → 137	-301 → 107					0.01
ナリジクス酸	ナリジクス酸	0.82	+233 → 215	+233 → 187	+233 → 159	+233 → 104			0.01
ニトロキシニル	ニトロキシニル	0.87	-289 → 162	-289 → 127					0.01
バルネムリン	バルネムリン	0.81	+565 → 263	+565 → 164					0.01
ハロフジノン	ハロフジノン	0.66	+416 → 120	+416 → 100					0.01
ピランテル	ピランテル-1	0.52	+207 → 150	+207 → 136	+207 → 109	+207 → 97			0.01
	ピランテル-2	0.57	+207 → 150	+207 → 136	+207 → 109	+207 → 97			0.01
ピリメタミン	ピリメタミン	0.67	+249 → 233	+249 → 198	+249 → 177	+249 → 128			0.01
ファミフル	ファミフル	0.98	+326 → 281	+326 → 217	+326 → 109	+326 → 93			0.01*
フェノキシメチルペニシリン	フェノキシメチルペニシリン	0.82	+351 → 229	+351 → 160	+351 → 137	+351 → 114	-349 → 208	-349 → 93	0.01
ブラジクアンテル	ブラジクアンテル	0.92	+313 → 203	+313 → 174	+313 → 83				0.01
ブリフィニウム	ブリフィニウム	0.82	+307 → 87	+307 → 86	+306 → 91	+306 → 86			0.01
フルニキシ	フルニキシ	0.94	+297 → 279	+297 → 264	+297 → 109				0.01
フルベンダゾール	フルベンダゾール	0.81	+314 → 282	+314 → 123	+314 → 95				0.01
フルメキン	フルメキン	0.83	+262 → 244	+262 → 202	+262 → 126				0.01
プロチゾラム	プロチゾラム	0.89	+395 → 316	+395 → 314	+393 → 314	+393 → 279			0.0005
プロマシル	プロマシル	0.77	+261 → 205	+261 → 188					0.01
フロルフェニコール	フロルフェニコール	0.69	-356 → 336	-356 → 185					0.01
マホプラジン	マホプラジン	0.68	+402 → 193	+402 → 122	+402 → 70				0.01
メチルプレドニゾン	メチルプレドニゾン	0.80	+375 → 339	+375 → 185	+375 → 161	+375 → 135			0.01
メベンダゾール	メベンダゾール	0.78	+296 → 264	+296 → 131	+296 → 105	+296 → 77			0.01
メロキシカム	メロキシカム	0.94	+352 → 141	+352 → 115	+352 → 73				0.01
メンプトン	メンプトン	0.89	+259 → 241	+259 → 185	+259 → 159	+259 → 114			0.01
レバミゾール	レバミゾール	0.51	+205 → 178	+205 → 91					0.01

1) 試験法を適用できる分析対象化合物を品目の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。また、保持時間の異なる異性体は、分析対象化合物欄に個別に示した。

2) 相対保持時間はイソキサフルトールの保持時間(22~27分)に対する相対値であり、検出機関の平均値で示した。

3) 主なイオンは、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(+又は-)は、ESI測定におけるイオン化モード(ESI(+))又はESI(-))を示す。各イオンは、数字の大きい順に示した。

4) 定量限界は、添加濃度0.01 ppm(又は最小添加濃度)での添加回収試験における添加試料中の分析対象化合物のピークのS/Nが、1食品でも10以上の値が得られた場合には0.01 mg/kg(又は最小添加濃度)とした。添加濃度0.01 ppmでの添加回収試験の結果がない場合には、マトリックス添加標準溶液を用いて試料中0.01 ppmに相当する分析対象化合物のピークのS/Nが、1食品でも10以上の値が得られた場合には、定量限界の推定値を0.01 mg/kgとし「*」をつけて示した。