

HPLCによる動物用医薬品等の一斉試験法Ⅱ（畜水産物）

1. 分析対象化合物

別表参照

2. 装置

多波長検出器付き高速液体クロマトグラフ（HPLC-DAD）又は電気化学検出器付き高速液体クロマトグラフ（HPLC-ECD）又は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3に示すものを用いる。

アセトニトリル 高速液体クロマトグラフ用に製造されたもの。

水 高速液体クロマトグラフ用に製造されたもの。

メタノール 高速液体クロマトグラフ用に製造されたもの。

リン酸緩衝液（pH 3.0）

第1液：リン酸一カリウム27.2 gを量り、水を加えて溶かして1,000 mLとする。

第2液：リン酸2.31 gを量り、水を加えて溶かして100 mLとする。

第1液に第2液を加えて混和し、pHを3.0に調整する。

リン酸緩衝液（pH 5.0）

第1液：リン酸一カリウム27.2 gを量り、水を加えて溶かして1,000 mLとする。

第2液：リン酸二カリウム3.48 gを量り、水を加えて溶かして100 mLとする。

第1液に第2液を加えて混和し、pHを5.0に調整する。

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

(1) 筋肉、肝臓、腎臓、乳及びその他の食用部分の場合

試料5.00 gを量り採り、95%アセトニトリル水溶液30 mLを加え、ホモジナイズした後、毎分2,500回転で5分間遠心分離し、アセトニトリル層を採る。残留物に95%アセトニトリル水溶液30 mLを加えて激しく振り混ぜた後、上記と同様に遠心分離し、得られたアセトニトリル層を合わせる。

(2) 脂肪の場合

試料5.00 gを量り採り、95%アセトニトリル水溶液30 mL及び*n*-ヘキサン30 mLを加え、ホモジナイズした後、毎分2,500回転で5分間遠心分離し、アセトニトリル層を採る。残留物及び*n*-ヘキサンに95%アセトニトリル水溶液30 mLを加えて激しく振り混ぜた後、上記

と同様に遠心分離し、得られたアセトニトリル層を合わせる。

2) 精製

(1) 合成ケイ酸マグネシウムカラムクロマトグラフィー

内径15 mm、長さ300 mmのクロマトグラフ管に、カラムクロマトグラフィー用合成ケイ酸マグネシウム8 gをアセトニトリルに懸濁したものを入れ、カラムの上端に少量のアセトニトリルが残る程度までアセトニトリルを流出させる。このカラムにアセトニトリル100 mLを注入し、流出液は捨てる。このカラムに1) で得られた溶液及びアセトニトリル30 mLを順次注入し、溶出液を採る。これに*n*-ヘキサン100 mLを加え、振とう機を用いて3分間激しく振り混ぜた後、静置し、アセトニトリル層を採り、40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。残留物にリン酸緩衝液 (pH 5.0) 4 mLを加えて溶かし、水6 mLを加える。

(2) オクタデシルシリル化シリカゲルカラムクロマトグラフィー

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム (360 mg) に、メタノール10 mL、水10 mL及びリン酸緩衝液 (pH 5.0) 2 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、リン酸緩衝液 (pH 5.0) 5 mLを注入し、流出液は捨てる。このカラムに40%メタノール水溶液10 mL及び70%アセトニトリル水溶液10 mLを順次注入し、溶出液をそれぞれ別に採り、40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。40%メタノール水溶液から得られた残留物に5%メタノール水溶液2.0 mLを加えて溶かし、70%アセトニトリル水溶液から得られた残留物に35%メタノール水溶液2.0 mLを加えて溶かし、それぞ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、別表C18画分Aの動物用医薬品等については5%メタノール水溶液、別表C18画分Bの動物用医薬品等については35%メタノール水溶液で希釈して、適切な濃度範囲の検量線作成用標準溶液を数点調製する。それぞれ200 µLをHPLC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200 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4.6 mm、長さ250 mm、粒子径5 μm

カラム温度：40°C

移動相

HPLC-DAD：アセトニトリル、水及びリン酸緩衝液 (pH 3.0) 混液 (1 : 18 : 1) から (14 : 5 : 1) までの濃度勾配を30分間で行い、(14 : 5 : 1) で10分間保持する。

HPLC-ECD：アセトニトリル及び0.085 mol/Lリン酸一カリウム溶液 (2 : 3) 混液

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95%アセトニトリル水溶液で抽出し、合成ケイ酸マグネシウムカラムクロマトグラフィー、アセトニトリル/ヘキサン分配、さらにオクタデシルシリル化シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製した後、HPLC-DAD又はHPLC-ECDで測定する方法である。

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) 4. 試験溶液調製法の2) 精製の操作で用いる、カラムクロマトグラフィー用合成ケイ酸マグネシウムについては、総則の3の別表で示す、130°Cで12時間以上の加熱処理を行わないこと。
- (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) 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。

- (8) オクタデシルシリル化シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより得られる二種類の試験溶液における、各農薬等の画分の目安を別表に示す。オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムのロット、保存状態により、溶出挙動が変化する場合があるので、標準品を用いて確認する。
- (9) 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

寺田久屋ら、名古屋市衛生研究所報、35、101-105（1989）

12. 類型

C

(別表)HPLCによる動物用医薬品等の一斉試験法II(畜水産物)

品目名	分析対象化合物名	測定波長 (nm)	測定イオン (m/z)	C18画分	定量限界 (mg/kg)
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		-186→139	B	0.0001
アクロミド	アクロミド		+201→155	B	0.01
アザペロン	アザペロン		+328→123	A	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	280	+240→133	A	0.01
エトパベート	エトパベート	280	+238→206	A	0.01
オキサシリン	オキサシリン		+402→160	A	0.005
オキシベンダゾール	オキシベンダゾール	300	+250→176	A,B	0.01
オルメトプリム	オルメトプリム	280	+175→123	A,B	0.02
オレアンドマイシン	オレアンドマイシン		+688→158	B	0.01
カラゾロール	カラゾロール		+299→116	B	0.0005
カルプロフェン	カルプロフェン		+274→228	A,B	0.01
クロキサシリン	クロキサシリン		+437→160	A	0.005
クロサンテル	クロサンテル	230		B	0.05
クロピドール	クロピドール	280	+192→101	A	0.01
ケトプロフェン	ケトプロフェン		+255→105	A	0.005
酢酸メレンゲステロール	酢酸メレンゲステロール	300	+397→337	B	0.001
ジクラズリル	ジクラズリル	300	-405→334	B	0.01
ジニトルミド	ジニトルミド		+224→181	A	0.03
スルファキノキサリン	スルファキノキサリン	270	+301→156	A	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	270	+285→156	A	0.01
スルファジアジン	スルファジアジン	270	+251→92	A	0.01
スルファジミジン	スルファジミジン	270	+279→92	A	0.01
スルファジメトキシ	スルファジメトキシ	270	+311→156	A	0.01
スルファチアゾール	スルファチアゾール	270	+256→92	A	0.01
スルファドキシ	スルファドキシ	270	+311→156	A	0.01
スルファトロキサゾール	スルファトロキサゾール		+268→92	A	0.01
スルファニトラン	スルファニトラン	270	+336→65	A	0.01
スルファピリジン	スルファピリジン	270	+250→156	A	0.01
スルファブプロモメタジンナトリウム	スルファブプロモメタジンナトリウム		+357→92	A	0.01
スルファベンズアミド	スルファベンズアミド	270	+277→156	A	0.01
スルファメトキサゾール	スルファメトキサゾール	270	+254→92	A	0.01
スルファメトキシピリダジン	スルファメトキシピリダジン	270	+281→92	A	0.01
スルファメラジン	スルファメラジン	270	+265→92	A	0.01
スルファモノメトキシ	スルファモノメトキシ	270	+281→92	A	0.01
セファゾリン	セファゾリン		+455→323	A	0.01
セファピリン	セファピリン		+424→152	A	0.01
セフォペラゾン	セフォペラゾン		+646→143	A	0.01
セフロキシム	セフロキシム		+447→386	A	0.01
ゼラノール	ゼラノール	*	-321→277	A,B	0.0005
チアベンダゾール	チアベンダゾール	320	+202→175	A,B	0.01
	5-ヒドロキシチアベンダゾール	320	+218→191	A	0.01
チアムリン	チアムリン		+494→192	B	0.05
チアンフェニコール	チアンフェニコール	230	-345→185	A	0.01
トリメトプリム	トリメトプリム	280	+291→230	A	0.02
トルフェナム酸	トルフェナム酸		+262→209	B	0.001
酢酸トレンボロン	α -トレンボロン(肝臓)	350	+271→115	B	0.002
	β -トレンボロン(筋肉)	350	+271→115	B	0.002
ナイカルバジン	N,N'-ビス(4-ニトロフェニル)ウレア	300	-301→137	B	0.02
ナフシリン	ナフシリン		+415→199	A	0.01
ニフルスチレン酸	ニフルスチレン酸		-258→184	A	0.01
ノボビオシン	ノボビオシン	300	+613→189	B	0.01
ノルジェストメット	ノルジェストメット		+373→313	B	0.0001

品目名	分析対象化合物名	測定波長 (nm)	測定イオン (m/z)	C18画分	定量限界 (mg/kg)
ビチオノール	ビチオノール		-355→161	B	0.002
ピリメタミン	ピリメタミン		+249→177	B	0.02
ファミフル	ファミフル		+326→93	A	0.02
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		+351→160	A	0.002
プラジクアンテル	プラジクアンテル		+313→203	B	0.01
フルベンダゾール	フルベンダゾール	300	+314→282	B	0.002
ブロチゾラム	ブロチゾラム		+395→314	B	0.0005
フロルフェニコール	フロルフェニコール		-358→185	A	0.01
ベンジルペニシリン	ベンジルペニシリン		+335→91	A	0.005(筋肉、脂肪、 内臓) 0.001(乳)
メベンダゾール	メベンダゾール		+296→264	B	0.0001
メロキシカム	メロキシカム		+352→115	A,B	0.0001
ラサロシド	ラサロシド		+592→337	B	0.005
リンコマイシン	リンコマイシン		+407→126	A,B	0.05
レバミゾール	レバミゾール	230	+205→178	A	0.002
ワルファリン	ワルファリン		+309→163	A,B	0.001

◎ 化合物名の五十音順に示した。

◎ 測定波長は紫外分光光度型検出器又は多波長検出器付き高速液体クロマトグラフによるものを示す。

◎ 測定イオンはLC/MS/MSによるもので、ESIネガティブ(-)ポジティブ(+)測定によるものを示す。

◎ ゼラノールについては、電気化学検出器付き高速液体クロマトグラフ(Eg 850 mV、E1 500 mV、E2 750 mV)で測定する。

◎ C18画分のうち、Aは40%メタノール水画分、Bは70%アセトニトリル画分を示す。