

## 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3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pH 7.2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（250 mg） 内径12～13 mm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250 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。

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) 精製

スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラム (500 mg) に、メタノール10 mL、水10 mL、飽和エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム溶液5 mLを順次注入し、各流出液は捨てる。また、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 (250 mg) に、メタノール10 mL、2%ギ酸溶液10 mL、水20 mL、メタノール5 mLを順次注入し、各流出液は捨てる。スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラムに1) で得られた溶液20 mLを注入した後、流出液は捨てる。さらに、水30 mLを注入し、流出液は捨てる。その後、スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラムの下に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を接続し、メタノール5 mLを注入し、流出液は捨てる。スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラムを分離し、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にギ酸及びメタノール (1 : 1) 混液5 mLを注入し、溶出液を窒素気流下で濃縮し溶媒を除去する。この残留物に1.36%リン酸一カリウム溶液を加えて溶かし、1.0 mLとしたものを試験溶液とする。

## 5. 検量線の作成

オキシテトラサイクリン10.0 mg (力価) に相当する標準品をメタノールに溶解して10 mLとしたものを標準原液とする。これを1.36%リン酸一カリウムで希釈して、0.02~1 mg/L溶液を数点調製し、それぞれ10 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10 µLをHPLCに注入し、5の検量線でオキシテトラサイクリンの含量を求める。

## 7. 確認試験

LC/MSにより確認する。

## 8. 測定条件

### 1) HPLC

検出器 : FL (励起波長380 nm、蛍光波長520 nm)

カラム : オクタデシルシリル化シリカゲル (粒径5 µm) 内径4.6 mm、長さ150~250 mm

カラム温度 : 30°C

移動相：イミダゾール緩衝液及びメタノール（17：3）混液

保持時間の目安：5分

## 2) LC/MS

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲル（粒径3～5 μm） 内径2.0～4.6 mm、長さ50～250 mm

カラム温度：40℃

移動相：アセトニトリル、0.1%ギ酸溶液及び水（4：15：1）混液

イオン化モード：ESI（+）

主なイオン（*m/z*）：461、443

保持時間の目安：2.5分

## 9. 定量限界

0.01 mg/kg

## 10. 留意事項

### 1) 試験法の概要

オキシテトラサイクリンを試料からエチレンジアミン四酢酸含有クエン酸緩衝液で抽出し、スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラム及び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により精製して、HPLC-FLで測定、LC/MSで確認する方法である。

### 2) 注意点

(1) 遠心分離は、4℃で行うことが望ましい。

(2) キウイーなど抽出液の粘性が高い試料については、セライトを5 gほど添加して抽出操作を行うことで、回収率を向上させることが出来る場合がある。

(3) 8の2) に示した測定条件では、低濃度時においてトータルイオンクロマトグラム上でピークが確認できない場合があるので、試験溶液をさらに濃縮して測定する等の方法で対応する。

## 11. 参考文献

1) 厚生労働省通知第0124001号「食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について」（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試験法）（平成17年1月24日）

2) Yoshida K., Uemori H., *Chromatography*, 26, 67-69 (2005)

## 12. 類型

C