

ピルリマイシン試験法

1. 分析対象化合物

ピルリマイシン（肝臓については、ピルリマイシン及びピルリマイシンスルホキシド）

2. 装置

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。

塩酸ピルリマイシン一水和物標準品 本品は塩酸ピルリマイシン一水和物97%以上を含み、融点は210.5～212.5℃である。

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を充填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。

4. 試験溶液の調製

1) 筋肉の場合

(1) 抽出

可能な限り脂肪層を除き、細切均一化した後、その5.00 gを量り採る。

これにメタノール及び0.2%メタリン酸溶液の混液（3：7）100 mLを加え、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。ろ紙上の残留物にメタノール及び0.2%メタリン酸溶液の混液（3：7）20 mLを加え、かき混ぜた後、上記と同様に操作して、ろ液をその減圧濃縮器中に合わせ、40℃以下で30 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) 抽出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0.05%トリフルオロ酢酸の混液（1：3）1.0 mLを加えて溶かし、これを試験溶液とする。

2) 脂肪の場合

(1) 抽出

可能な限り筋肉層を除き、細切均一化した後、その5.00 gを量り採る。

これに*n*-ヘキサン30 mL及び0.2%メタリン酸溶液70 mLを加え、細砕した後、毎分3,000回転で5分間遠心分離する。0.2%メタリン酸溶液層を採り、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。ろ紙上の残留物にメタノール及び0.2%メタリン酸溶液の混液（3：7）20 mLを加え、かき混ぜた後、上記と同様に操作して、ろ液をその減圧濃縮器中に合わせ、40℃以下で30 mLに濃縮する。

(2) 精製

1) 筋肉の場合の(2) 精製を準用する。

3) 肝臓、腎臓、乳及びその他の食用部分の場合

(1) 抽出

肝臓の場合は、細切均一化した後、その5.00 gを量り採り、37℃で24時間放置する。

腎臓及びその他の食用部分の場合は、細切均一化した後、その5.00 gを量り採る。

乳の場合は、5.00 gを量り採る。

これにメタノール及び0.2%メタリン酸溶液の混液（3：7）100 mLを加え、細砕した後、ケイソウ土3 gを加えて混和し、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。ろ紙上の残留物にメタノール及び0.2%メタリン酸溶液の混液（3：7）20 mLを加え、かき混ぜた後、上記と同様に操作して、ろ液をその減圧濃縮器中に合わせ、40℃以下で約30 mLに濃縮する。

(2) 精製

1) 筋肉の場合の(2) 精製を準用する。

5. 検量線の作成

塩酸ピルリマイシン一水和物標準品の10 mg（ピルリマイシンとして）/100 mLメタノール溶液を、アセトニトリル及び0.05%トリフルオロ酢酸の混液で希釈して0.05~10 mg（ピルリマイシンとして）/Lの範囲内で数点調製し、それぞれLC/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

試験溶液をLC/MSに注入し、5. の検量線でピルリマイシンの含量を求める。

7. 測定条件 LC/MS

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲル（粒径2~5 μm）、内径2.0~6.0 mm、長さ100~250 mmのステンレス管を用いる。

カラム温度：40℃

移動相：アセトニトリル及び0.05%トリフルオロ酢酸の混液（1：3）

主なイオン (*m/z*)：ESI (+) において411

保持時間の目安：4~6分

8. 定量限界

0.01 mg/kg

9. 留意事項

1) 試験法の概要

肝臓の場合は、代謝物であるピルリマイシンスルホキシドをピルリマイシンに変化させるために、37℃で24時間放置する。

ピルリマイシンを試料からメタノール及び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で測定及び確認する方法である。

2) 注意点

(1) LC/MSにおける標準溶液及び試験溶液の標準的な注入量は、内径3.0 mmのカラムにおいて10 μ Lである。カラム及び装置により最適な注入量が異なる場合があるので、必要に応じて最適注入量を検討すること。

(2) 主なイオンは用いる装置により、最適なイオン化方法、生成するイオンが異なる場合があるので、装置ごとに最適条件を検討すること。

主なイオンの他に確認できるイオンとして、ESI (+) においては363 (m/z) がある。

10. 参考文献

なし

11. 類型

C