

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 (250mg) 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  $\mu$  L 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  $\mu$  L 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  $\mu$  m) 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  $\mu\text{m}$ ） 内径 2.0～4.6 mm、長さ 50～250 mm

カラム温度：40°C

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°C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

## クリスタルバイオレット及びメチレンブルー試験法（畜水産物）

### 1. 分析対象化合物

農薬等の成分である物質	分析対象化合物
クリスタルバイオレット	クリスタルバイオレット
メチレンブルー	メチレンブルー

### 2. 装置

可視分光光度型検出器付き高速液体クロマトグラフ（HPLC-VIS）  
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。

アセトニトリル 液体クロマトグラフ用に製造したものを用いる。

水 液体クロマトグラフ用に製造したものを用いる。

ギ酸アンモニウム ギ酸アンモニウム（特級）

クエン酸・リン酸緩衝液（pH3.0）

第1液：クエン酸 57.6 g を量り、水を加えて溶かして 1,000 mL とする。

第2液：リン酸三ナトリウム 228 g を量り、水を加えて溶かして 1,000 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。

クリスタルバイオレット標準品 本品はクリスタルバイオレット（ $C_{25}H_{30}ClN_3$ : 407.98）94%以上を含み、融点は 215°C である。

メチレンブルー標準品 本品はメチレンブルー（ $C_{16}H_{18}N_3S_2Cl$ : 319.85）97%以上を含み、融点は 169~170°C である。

### 4. 試験溶液の調製

試料 5.00 g を量り採り、クエン酸・リン酸緩衝液（pH3.0）10 mL を加えて5分間細砕する。これにアセトニトリル 40 mL を加え、振とう機を用いて5分間激しく振り混ぜた後、毎分 2,600 回転で5分間遠心分離し、アセトニトリル層を分液ロートに採る。残留物にアセトニトリル 20 mL を加え、上記と同様に操作し、得られたアセトニトリル層を先の分液ロートに合わせる。これに *n*-ヘキサン 80 mL を加えて激しく振り混ぜた後、静置し、アセトニトリル層を採る。これに 20%塩化ナトリウム溶液 50 mL 及びジクロロメタン 50 mL を加えて5分間振とうした後、静置し、アセトニトリル層を採る。

これに適量の無水硫酸ナトリウムを加え、時々振り混ぜながら 15 分間放置した後、すり合わせ減圧濃縮器中にろ過し、40°C以下でアセトニトリル層を除去する。この残留物にアセトニトリル 2.0 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

各標準品の 10 mg/100 mL メタノール溶液を調製し、アセトニトリル及び 0.01 mol/L ギ