

ドキシサイクリン試験法（畜水産物）

1. 分析対象化合物

ドキシサイクリン

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。

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・二水和物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。

ドキシサイクリン塩酸塩水和物標準品 本品はドキシサイクリン塩酸塩水和物98%以上を含む。

5. 試験溶液の調製

1) 抽出

試料10.0 gにエチレンジアミン四酢酸含有クエン酸緩衝液10 mL及びアセトン50 mLを加え、ホモジナイズした後、毎分3,000回転で5分間遠心分離し、上澄液を採る。残留物にアセトン25 mLを加えてホモジナイズし、上記と同様に遠心分離し、上澄液を採る。得られた上澄液を合わせ、アセトンを加え正確に100 mLとする。

この溶液から正確に5 mLを分取し、40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物に*n*-ヘキサン5 mLを加え、*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル5 mLずつで2回振とう抽出する。抽出液を合わせて40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物に0.1 vol%ギ酸・メタノール溶液1 mLを加えて溶かす。

2) 精製

エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルカラム (500 mg) に0.1 mol/L塩酸10 mL、0.1 vol%ギ酸・メタノール溶液20 mLを順次注入し、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 (265 mg) に0.1 mol/L塩酸10 mL、0.1 vol%ギ酸・メタノール溶液20 mLを順次注入し、各流出液は捨てる。エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルカラムの下部にスチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラムを接続する。このカラムに1) で得られた溶液を注入し、さらに0.1 vol%ギ酸・メタノール9 mLを注入して、負荷液を含む全溶出液を採り、0.1 vol%ギ酸・メタノール溶液を加えて正確に10 mLとしたものを試験溶液とする。

6. 検量線の作成

ドキシサイクリン塩酸塩水和物標準品をメタノールに溶かし、ドキシサイクリンとして 1,000 mg/L の標準原液とする。標準原液を 0.1 vol%ギ酸・メタノール溶液で希釈して標準溶液を数点調製し、それぞれ 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。なお、本法に従って試験溶液を調製した場合、試料中 0.01 mg/kg に相当する試験溶液中濃度は 0.0005 mg/L である。

7. 定量

試験溶液を LC-MS/MS に注入し、6 の検量線でドキシサイクリンの含量を求める。

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2.1 mm、長さ100 mm、粒子径5 µm

カラム温度：40°C

移動相：0.1 vol%ギ酸及び0.1 vol%ギ酸・メタノール溶液（19：1）から（1：19）までの濃度勾配を8分間で行い、（19：1）で3分間保持する。

イオン化モード：ESI（+）

主なイオン (m/z)：プリカーサーイオン445、プロダクトイオン428、154

注入量：5 µL

保持時間の目安：5分

10. 定量限界

0.01 mg/kg

11. 留意事項

1) 試験法の概要

ドキシサイクリンを試料からエチレンジアミン四酢酸存在下アセトンで抽出し、アセトニリル/ヘキサン分配による脱脂後、エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラム及びスチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラムで精製し、LC-MS/MSで定量及び確認する方法である。

2) 注意点

- ① ドキシサイクリンのLC-MS/MS測定で、試験法開発時に使用したイオンを以下に示す。

定量イオン (m/z)：プリカーサーイオン 445、プロダクトイオン 428

定性イオン (m/z)：プリカーサーイオン 445、プロダクトイオン 154

- ② ドキシサイクリンはガラス壁に吸着しやすいため、使用する器具類はポリプロピレン製を用いると良い。
- ③ 濃縮時に突沸しやすいため、窒素気流下で溶媒を除去すると良い。
- ④ ドキシサイクリンは、測定に用いるオクタデシルシリル化シリカゲルカラムによってはリーディングが見られることがある。

- ⑤ ドキシサイクリンは試験溶液中で徐々に分解しやすいので、測定は試験溶液の調製後、速やかに行う。また、測定中は試験溶液を冷却することが望ましい。
- ⑥ 標準原液 (1,000 mg/L) は-20°Cで保存すれば、1 ヶ月程度は安定である。検量線用標準溶液は用時調製すること。
- ⑦ 試験法開発時に検討した食品：豚の筋肉、豚の脂肪、豚の肝臓、鶏の筋肉及びぶり

12. 参考文献
なし

13. 類型
C