

エンロフロキサシン、オキシリニック酸、オフロキサシン、オルビフロキサシン、サラフロキサシン、ジフロキサシン、ダノフロキサシン、ナリジクス酸、ノルフロキサシン、フルメキン及びマルボフロキサシン試験法（はちみつ）

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
エンロフロキサシン	エンロフロキサシン、シプロフロキサシン
オキシリニック酸	オキシリニック酸
オフロキサシン	オフロキサシン
オルビフロキサシン	オルビフロキサシン
サラフロキサシン	サラフロキサシン
ジフロキサシン	ジフロキサシン
ダノフロキサシン	ダノフロキサシン
ナリジクス酸	ナリジクス酸
ノルフロキサシン	ノルフロキサシン
フルメキン	フルメキン
マルボフロキサシン	マルボフロキサシン

2. 適用食品

はちみつ

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。

4級アンモニウム塩修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム（500 mg） 内径12～13 mmのポリエチレン製のカラム管に、4級アンモニウム塩修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体500 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。

エンロフロキサシン標準品 本品はエンロフロキサシン98%以上を含む。

シプロフロキサシン標準品 本品はシプロフロキサシン、塩酸シプロフロキサシン、又は塩酸シプロフロキサシン一水和物95%以上を含む。

オキシリニック酸標準品 本品はオキシリニック酸98%以上を含む。

オフロキサシン標準品 本品はオフロキサシン98%以上を含む。

オルビフロキサシン標準品 本品はオルビフロキサシン98%以上を含む。

サラフロキサシン標準品 本品はサラフロキサシン又は塩酸サラフロキサシン95%以上を含む。

ジフロキサシン標準品 本品はジフロキサシン又は塩酸ジフロキサシン98%以上

を含む。

ダノフロキサシン標準品 本品はダノフロキサシン又はメシル酸ダノフロキサシン98%以上を含む。

ナリジクス酸標準品 本品はナリジクス酸98%以上を含む。

ノルフロキサシン標準品 本品はノルフロキサシン98%以上を含む。

フルメキン標準品 本品はフルメキン98%以上を含む。

マルボフロキサシン標準品 本品はマルボフロキサシン98%以上を含む。

25 mmol/Lギ酸含有25 mmol/Lギ酸アンモニウム溶液 ギ酸1.15 g及びギ酸アンモニウム1.58 gに水を加えて1,000 mLとする。

25 mmol/Lギ酸含有25 mmol/Lギ酸アンモニウム・メタノール溶液 ギ酸1.15 g及びギ酸アンモニウム1.58 gにメタノールを加えて1,000 mLとする。

5. 試験溶液の調製

1) 抽出

試料5.00 gを量り採り、これに1 mol/Lアンモニア溶液20 mLを加え、10分間振とうした後、毎分3,000回転で10分間遠心分離し、上澄液を採る。

2) 精製

① 4級アンモニウム塩修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体カラムクロマトグラフィー

4級アンモニウム塩修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム (500 mg) に、メタノール5 mL及び1 mol/Lアンモニア溶液5 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、さらに水10 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで250 mmol/Lギ酸・メタノール溶液5 mLを注入し、溶出液を採る。

② 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クロマトグラフィー

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 (500 mg) に、250 mmol/Lギ酸・メタノール溶液5 mLを注入し、流出液は捨てる。このカラムに、a) で得られた溶液を注入し、さらに、250 mmol/Lギ酸・メタノール溶液1 mLを注入し、全溶出液を採る。得られた溶出液を50 mmol/Lギ酸アンモニウム溶液を用いて正確に10 mLとしたものを試験溶液とする。

6. 検量線の作成

各分析対象化合物の標準品をメタノールに溶解し、100 mg/Lの標準原液を調製する。各標準原液を適宜混合して50 mmol/Lギ酸アンモニウム溶液及び250 mmol/Lギ酸・メ

タノール溶液（2：3）混液で希釈した溶液を数点調製し、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の濃度は各分析対象化合物について0.005 mg/Lである。

7. 定量

試験溶液をLC-MS/MSに注入し、6. の検量線で各分析対象化合物の含量を求める。なお、エンロフロキサシンについては、その代謝物であるシプロフロキサシンとの和を分析値とする。

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3.0 mm、長さ150 mm、粒子径3 µm

カラム温度：40℃

移動相：A液及びB液について下表の濃度勾配で送液する。

A液：25 mmol/Lギ酸含有25 mmol/Lギ酸アンモニウム溶液

B液：25 mmol/Lギ酸含有25 mmol/Lギ酸アンモニウム・メタノール溶液

時間 (分)	A液 (%)	B液 (%)
0.0	80	20
5.0	80	20
20.0	65	35
25.0	20	80
30.0	0	100
35.0	0	100

イオン化モード：ESI (+)

主なイオン (m/z) :

エンロフロキサシン；プリカーサーイオン360、プロダクトイオン342、316

シプロフロキサシン；プリカーサーイオン332、プロダクトイオン314、231

オキシリニック酸；プリカーサーイオン262、プロダクトイオン244、216

オフロキサシン；プリカーサーイオン362、プロダクトイオン318、261

オルビフロキサシン；プリカーサーイオン396、プロダクトイオン378、352

サラフロキサシン；プリカーサーイオン386、プロダクトイオン368、299

ジフロキサシン；プリカーサーイオン400、プロダクトイオン382、299

ダノフロキサシン；プリカーサーイオン358、プロダクトイオン340、255

ナリジクス酸；プリカーサーイオン233、プロダクトイオン215、187
ノルフロキサシン；プリカーサーイオン320、プロダクトイオン302、276
フルメキン；プリカーサーイオン262、プロダクトイオン244、202
マルボフロキサシン；プリカーサーイオン363、プロダクトイオン345、72

注入量：10 μ L

保持時間の目安：

エンロフロキサシン 17分
シプロフロキサシン 16分
オキシリニック酸 25分
オフロキサシン 14分
オルビフロキサシン 18分
サラフロキサシン 20分
ジフロキサシン 19分
ダノフロキサシン 17分
ナリジクス酸 26分
ノルフロキサシン 15分
フルメキン 26分
マルボフロキサシン 12分

10. 定量限界

各分析対象化合物について0.01 mg/kg

11. 概要

エンロフロキサシン、シプロフロキサシン、オキシリニック酸、オフロキサシン、オルビフロキサシン、サラフロキサシン、ジフロキサシン、ダノフロキサシン、ナリジクス酸、ノルフロキサシン、フルメキン及びマルボフロキサシンをはちみつ試料から1 mol/Lアンモニア溶液で抽出し、4級アンモニウム塩修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム及びエチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムをで精製し、LC-MS/MSで定量及び確認する方法である。

12. 参考

1) 各分析対象化合物の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。

エンロフロキサシン

定量イオン (m/z)：プリカーサーイオン360、プロダクトイオン342

定性イオン (m/z)：プリカーサーイオン360、プロダクトイオン316

シプロフロキサシン

定量イオン (m/z)	: プリカーサーイオン332、プロダクトイオン314
定性イオン (m/z)	: プリカーサーイオン332、プロダクトイオン231
オキシリニック酸	
定量イオン (m/z)	: プリカーサーイオン262、プロダクトイオン244
定性イオン (m/z)	: プリカーサーイオン262、プロダクトイオン216
オフロキサシン	
定量イオン (m/z)	: プリカーサーイオン362、プロダクトイオン318
定性イオン (m/z)	: プリカーサーイオン362、プロダクトイオン261
オルビフロキサシン	
定量イオン (m/z)	: プリカーサーイオン396、プロダクトイオン352
定性イオン (m/z)	: プリカーサーイオン396、プロダクトイオン378
サラフロキサシン	
定量イオン (m/z)	: プリカーサーイオン386、プロダクトイオン368
定性イオン (m/z)	: プリカーサーイオン386、プロダクトイオン299
ジフロキサシン	
定量イオン (m/z)	: プリカーサーイオン400、プロダクトイオン382
定性イオン (m/z)	: プリカーサーイオン400、プロダクトイオン299
ダノフロキサシン	
定量イオン (m/z)	: プリカーサーイオン358、プロダクトイオン340
定性イオン (m/z)	: プリカーサーイオン358、プロダクトイオン255
ナリジクス酸	
定量イオン (m/z)	: プリカーサーイオン233、プロダクトイオン215
定性イオン (m/z)	: プリカーサーイオン233、プロダクトイオン187
ノルフロキサシン	
定量イオン (m/z)	: プリカーサーイオン320、プロダクトイオン302
定性イオン (m/z)	: プリカーサーイオン320、プロダクトイオン276
フルメキン	
定量イオン (m/z)	: プリカーサーイオン262、プロダクトイオン202
定性イオン (m/z)	: プリカーサーイオン262、プロダクトイオン244
マルボフロキサシン	
定量イオン (m/z)	: プリカーサーイオン363、プロダクトイオン72
定性イオン (m/z)	: プリカーサーイオン363、プロダクトイオン345

2) 本試験法の分析対象化合物は、低濃度では検量線の直線性が低下する場合がある。その場合には、充填剤であるシリカゲル表面の金属不純物が少ない分析カラムを用いると良い。

3) 本試験法の分析対象化合物は、ガラスに吸着する場合がある。その場合には、ポリプロピレン製の器具を用いると良い。

4) 本試験法の分析対象化合物は、光による分解を受けやすい化合物もあるため、試験溶液調製までの操作を出来るだけ迅速に行う必要がある。

5) 試験法開発時に検討した食品：はちみつ

13. 参考文献

なし

14. 類型

C