

※本報告書は、試験法開発における検討結果をまとめたものであり、試験法の実施に際して参考として下さい。なお、報告書の内容と通知または告示試験法との間に齟齬がある場合には、通知または告示試験法が優先することをご留意ください。

残留農薬等に関するポジティブリスト 制度導入に係る分析法開発

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（畜水産物：はちみつの場合）

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（畜水産物：はちみつの場合）の検討結果

[目的]

既存の「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、ノルフロキサシン及びフルメキン試験法（畜水産物）」に、これら試験法の分析対象化合物であるキノロン系合成抗菌物質と類似の構造を有し、ポジティブリスト制度において暫定基準値が設定されているマルボフロキサシンを分析対象化合物として追加し、はちみつに対して適用可能な試験法の検討、開発を行う。更に、確認手法としても優れたLC-MS/MSを用いて検出及び定量可能な試験法を開発する。

[検討対象化合物の構造等]

・エンロフロキサシン

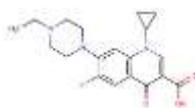
構造式： $C_{19}H_{22}FN_3O_3$

融点：220°C

log P_{OW}値：0.7

水溶解度：3400 mg/L

蒸気圧： 1.9×10^{-13} mmHg



・シプロフロキサシン

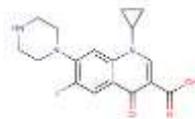
構造式： $C_{17}H_{18}FN_3O_3$

融点：不明

log P_{OW}値：0.28

水溶解度：30000 mg/L

蒸気圧： 1.65×10^{-12} mmHg



・オキシリニック酸

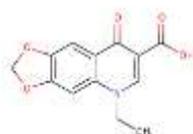
構造式： $C_{13}H_{11}NO_5$

融点：315°C

log P_{OW}値：0.94

水溶解度：3.2 mg/L

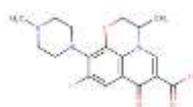
蒸気圧： 4.75×10^{-8} mmHg



・オフロキサシン

構造式： $C_{18}H_{20}FN_3O_4$

融点：254°C



log P_{OW}値：-0.39

水溶解度：28300 mg/L

蒸気圧：1.55×10⁻¹³ mmHg

• オルビフロキサシン

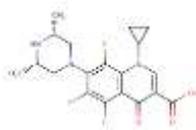
構造式：C₁₉H₂₀F₃N₃O₃

融点：不明

log P_{OW}値：不明

水溶解度：不明

蒸気圧：不明



• サラフロキサシン

構造式：C₂₀H₁₇F₂N₃O₃

融点：不明

log P_{OW}値：1.07

水溶解度：不明

蒸気圧：不明



• ジフロキサシン

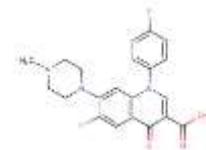
構造式：C₂₁H₁₉F₂N₃O₃

融点：不明

log P_{OW}値：0.89

水溶解度：1330 mg/L

蒸気圧：2.25×10⁻¹⁴ mmHg



• ダノフロキサシン

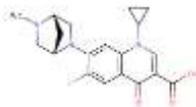
構造式：C₁₉H₂₀FN₃O₃

融点：不明

log P_{OW}値：不明

水溶解度：不明

蒸気圧：不明



• ナリジクス酸

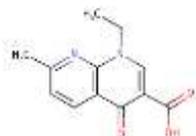
構造式：C₁₂H₁₂N₂O₃

融点：229.5°C

log P_{OW}値：1.59

水溶解度：100 mg/L

蒸気圧：3.56×10⁻⁷ mmHg

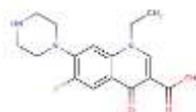


• ノルフロキサシン

構造式：C₁₆H₁₈FN₃O₃

融点：227°C

log P_{OW}値：-1.03



水溶解度：178000 mg/L
蒸気圧： 6.77×10^{-13} mmHg

・フルメキン

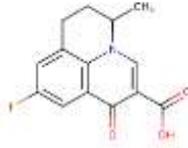
構造式： $C_{14}H_{12}FNO_3$

融点：不明

log P_{OW} 値：1.6

水溶解度：2190 mg/L

蒸気圧： 2.45×10^{-7} mmHg



・マルボフロキサシン

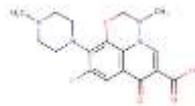
構造式： $C_{17}H_{19}FN_4O_4$

融点：

log P_{OW} 値：不明

水溶解度：不明

蒸気圧：不明



[実験方法]

1. 試料

市販の純粋（糖無添加）はちみつ（原産国不明）、レンゲはちみつ（国産）、アザミはちみつ（国産）、ソバはちみつ（国産）を用いた。

2. 試薬、試液

蒸留水及びメタノールは、和光純薬工業（株）の液体クロマトグラフ用を用いた。ギ酸及びギ酸アンモニウムは、和光純薬工業（株）の試薬特級のものを用いた。また、アンモニア溶液（28～30%）は、関東化学（株）の試薬特級のものを用いた。

ブチルジメチルアミノメチル化ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム（500 mg）はWaters社製Oasis MAXを用い、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）はVarian社製Bond Elut PSAを用いた。

また、標準品は以下のものを用いた。

エンロフロキサシン；関東化学（株）（純度99.8%）、シプロフロキサシン塩酸塩；関東化学（株）（純度95.0%）、オキシソリニック酸；林純薬工業（株）（純度99.2%）、オフロキサシン；関東化学（株）（純度99.9%）、オルビフロキサシン；林純薬工業（株）（純度99.9%）、サラフロキサシン塩酸塩；関東化学（株）（純度95.0%）、ジフロキサシン塩酸塩；関東化学（株）（純度99.0%）、ダノフロキサシンメシル酸塩；関東化学（株）（純度99.9%）、ナリジクス酸；関東化学（株）（純度99.8%）、ノルフロキサシン；関東化学（株）（純度99.7%）、フルメキン；林純薬工業（株）（純度99.9%）、マルボフロキサシン；林純薬工業（株）（純度99.8%）

標準原液の調製^{注1)}：各検討対象化合物をメタノールに溶解し、0.1 mg/mLの標準原液を調製した。

検量線用標準溶液：各標準原液を混合し、50 mmol/Lギ酸アンモニウム溶液及び250 mmol/Lギ酸含有メタノール溶液（2：3）混液で希釈して、0.000625～0.0075 mg/Lの標準溶液を数点調製した。

注1) オキシリニック酸、オルビフロキサシン、ナリジクス酸、ノルフロキサシン、フルメキン等はメタノールへの溶解性が低く、1 mg/mLの原液を調製することは困難であった。0.1 mg/mLの濃度では、全検討対象化合物をメタノールに溶解可能であったため、標準原液の濃度は0.1 mg/mL（メタノール溶液）とした。

なお、1 mg/mL標準原液を調製する必要がある場合には、エンロフロキサシン、シプロフロキサシン、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、ノルフロキサシン及びマルボフロキサシンについては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）混液など、オキシリニック酸及びフルメキンについては500 mmol/Lアンモニア溶液及びメタノール（2：3）混液などを用いると良い。

3. 装置

液体クロマトグラフはWaters社製Acquity UPLC、タンデム質量分析計はWaters社製Acquity TQ Detectorを用いた。

4. 測定条件

本試験法における測定条件を以下に示した。

カラム：Inertsil ODS-4（粒径3 µm、内径3.0 mm、長さ150 mm、GL Sciences製）

カラム温度：40 °C

移動相：

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ギ酸及び25 mmol/Lギ酸アンモニウム含有メタノール溶液

グラジエント条件：A液及びB液について下表の濃度勾配で送液した。

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
35.1	80	20
45.0	80	20

移動相流速： 0.4 mL/min

イオン化モード： ESI(+)

キャピラリー電圧： 1.0 kV

ソース温度： 150°C

脱溶媒温度： 400°C

コーンガス流量： 50 L/hr

脱溶媒ガス流量： 800 L/hr

測定イオン (m/z) :

分析対象化合物	プリカーサーイオン (m/z)	プロダクトイオン (m/z)		保持時間 (分)
		定量	定性	
エンロフロキサシン	360	342	316	16.9
シプロフロキサシン	332	314	231	16.0
オキシリニック酸	262	244	216	24.7
オフロキサシン	362	318	261	13.8
オルビフロキサシン	396	352	378	18.1
サラフロキサシン	386	368	299	20.0
ジフロキサシン	400	382	299	19.4
ダノフロキサシン	358	340	255	16.8
ナリジクス酸	233	215	187	26.0
ノルフロキサシン	320	302	276	15.1
フルメキン	262	202	244	26.1
マルボフロキサシン	363	72	345	11.5

5. 定量

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の各0.000625～0.0075 mg/L溶液 (50 mmol/Lギ酸アンモニウム溶液及び250 mmol/Lギ酸含有メタノー

ル溶液（2：3）混液）を調製し、この10 µLをLC-MS/MSに注入して、ピーク面積法にて各分析対象化合物の検量線を作成した。

試験溶液（0.5 g試料/mL）10 µLをLC-MS/MSに注入し、絶対検量線法を用いて各分析対象化合物の含量を求めた。

6. 試験溶液の調製

1) 抽出^{注2}

はちみつ試料5.0 gを50 mL容遠沈管に量り採った。これに1 mol/Lアンモニア溶液20 mLを加えて10分間激しく振とうした後、毎分3,000回転で10分間遠心分離した。遠心分離後に得られた上澄液を抽出溶液試験原液とした。

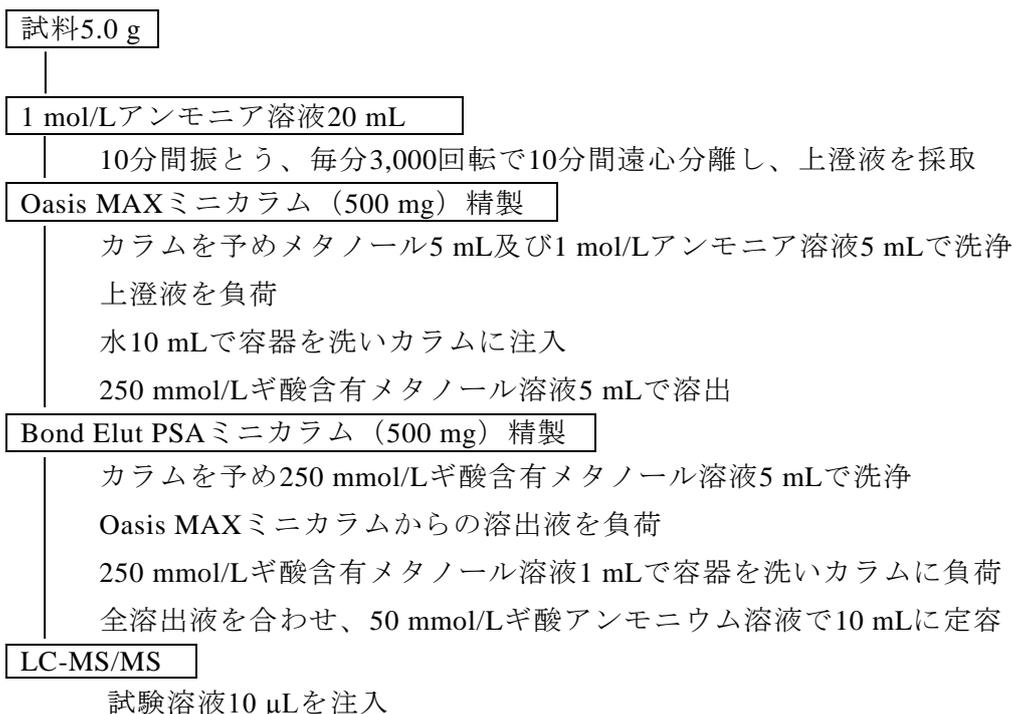
注2) 本操作において、検討したはちみつでは沈殿は全く得られなかったため、抽出操作は1回とした。なお、遠心分離は、振とう後に生じる泡を消失させるために行う。

2) 精製

抽出溶液を、予めメタノール及び1 mol/Lアンモニア溶液各5 mLを順次注入して平衡化したブチルジメチルアミノメチル化ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム（Oasis MAX、500 mg）に負荷した。水10 mLで抽出溶液が入っていた容器を洗い、先のカラムに注入し、流出液は捨てた。次いで、250 mmol/Lギ酸含有メタノール溶液5 mLで分析対象化合物を溶出した。

溶出液を、予め250 mmol/Lギ酸含有メタノール溶液5 mLを注入して平衡化したエチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラム（Bond Elut PSA、500 mg）に負荷した。次いで、250 mmol/Lギ酸含有メタノール溶液1 mLで容器を洗い、先のカラムに注入し、カラムからの全溶出液を採った。

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10 mLに定容したものを試験溶液とした。



7. マトリックス添加標準溶液の調製

上述の方法により調製した各はちみつ試料のブランク試験溶液1.0 mLを40℃以下で窒素を吹き付けながら乾固した後、残留物に0.005 mg/L（試料中0.01 ppm相当）の溶媒標準溶液1.0 mLを添加し、マトリックス添加標準溶液を調製した。

[結果及び考察]

1. 現行通知試験法「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、ノルフロキサシン及びフルメキン試験法（畜水産物）」の適用性について

現行の通知試験法においては、蛍光検出器付きHPLCで定量し、LC/MSで確認することとなっているが、ソバはちみつ等の試料を測定に供した場合、極めて多くの夾雑ピークの影響により各分析対象化合物を測定することができなかった。また、タンデム型質量分析計を用いた場合においても、多くの夾雑ピークが確認され、定量が困難であった（図1）。したがって、現行の通知試験法に準じた分析法の適用は困難であると判断した。

2. 新たな分析法の組み立てについて

上述のように、現行の通知試験法を用いてソバはちみつ等の試料を測定することは困難であると判断し、新たな試験法の作成を試みた。

検討の結果、実験方法に示したように、はちみつ試料を1 mol/Lアンモニア溶液に

溶解した後、ブチルジメチルアミノメチル化ジビニルベンゼン-*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用いて精製を行い、LC-MS/MSにより測定する方法を採用した。

なお、抽出液には、はちみつ試料を溶解可能であり、強塩基性陰イオン交換ミニカラムを用いた精製法の検討において、Oasis MAXを用いた際に全ての分析対象化合物が良好にカラムに保持されたことから、1 mol/Lアンモニア水溶液を用いることとした。

3. 測定条件の検討

1) 質量分析における測定イオンの選択

まず、タンデム質量分析計における各分析対象化合物の測定イオンの選択を試みた。すなわち、分析対象化合物の標準溶液（10 µg/mL）をそれぞれLC-MS/MSに10 µL注入し、スキャン測定及びプロダクトイオンスキャン測定を行った。なお、測定はフローインジェクション分析により行った。

図2に、エレクトロスプレーイオン化（ESI）のポジティブイオンモードにおいて得られた各分析対象化合物のマススペクトル及びプロダクトイオンスペクトルを示した。得られた結果より、オキシリニック酸及びフルメキンを除いた10化合物については、最もシグナル強度が高かったプロダクトイオンを定量用イオンに選択し、2番目にシグナル強度が高かったプロダクトイオンを定性用イオンに選択した。オキシリニック酸及びフルメキンについては、プリカーサーイオン（ m/z 262）及び最もシグナル強度が高かったプロダクトイオン（ m/z 244）について同じイオンが得られたため、LCでの分離により誤認の可能性は少ないと考えられるが、誤認の可能性を少なくするために以下のように測定イオンを選択した。オキシリニック酸については、最もシグナル強度が高かったイオン（ m/z 244）と2番目にシグナル強度が高かったイオン（ m/z 216）の比が5：1程度であったことから、高感度な測定を目的として m/z 244を定量用プロダクトイオンに、フルメキンでは全く生成しなかった m/z 216を定性用プロダクトイオンに選択した。フルメキンについては、オキシリニック酸では全く生成しないため誤認の可能性がなく、且つ最もシグナル強度が高かった m/z 244の80%の強度が得られるため高感度な測定が可能であると考えられた m/z 202を定量用プロダクトイオンとして選択し、 m/z 244を定性用プロダクトイオンとして選択した。

以上のような検討により選択した各分析対象化合物の測定イオン（プリカーサーイオン及びプロダクトイオン）、コーン電圧及びコリジョンエネルギーを表1に示した。

表1 各分析対象化合物の測定イオン

化合物	プリカーサーイオン		プロダクトイオン			
	m/z	コロン電圧 (V)	定量		定性	
			m/z	CE (eV)	m/z	CE (eV)
エンロフロキサシン	360	40	342	20	316	20
シプロフロキサシン	332	40	314	20	231	40
オキソリニック酸	262	40	244	20	216	30
オフロキサシン	362	50	318	20	261	30
オルビフロキサシン	396	40	352	20	378	20
サラフロキサシン	386	50	368	20	299	30
ジフロキサシン	400	40	382	20	299	30
ダノフロキサシン	358	40	340	20	255	40
ナリジクス酸	233	30	215	20	187	30
ノルフロキサシン	320	40	302	20	276	20
フルメキン	262	40	202	40	244	20
マルボフロキサシン	363	30	72	30	345	20

CE：コリジョンエネルギー

2) 分析カラムについて

測定機器としてWaters社製Acquity UPLC及びAcquity TQ Detector、分析カラムには一般的なLC-MS用ODSカラムである関東化学株式会社製Mightysil RP-18 GP（粒径3 µm、内径3.0 mm、長さ150 mm）を用い、移動相及びグラジエント条件を現行の通知試験法と同様に設定し（アセトニトリル及び0.1%ギ酸溶液の混液（1：99）から

（1：0）までの濃度勾配を35分間で行い、（1：0）で5分間保持する）、各分析対象化合物を測定したところ、低濃度（0.0025～0.1 µg/mL）では、検量線に良好な直線関係が得られなかった。

分析対象化合物は、金属イオンとキレートを形成する構造を有しているため、分析カラムの充填剤であるシリカゲル表面の金属不純物に結合し、特に低濃度ではカラムから溶出され難いことが原因と推察された。そこで、充填剤であるシリカゲル表面の金属不純物を可能な限り排除したジーエルサイエンス株式会社製Inertsil ODS-4（粒径3 µm、内径3.0 mm、長さ150 mm）を用いた結果、全ての分析対象化合物において、上に示した濃度範囲においても良好な直線関係が得られた。

3) 移動相及びグラジエント条件の検討

上述の分析カラムを用いることにより、低濃度における検量線の直線性は改善されたが、多くの分析対象化合物においてピークのテーリングが確認された。

一方、移動相に25 mmol/Lギ酸含有メタノール及び25 mmol/Lギ酸溶液を用いた場合には、上記のようなピークのテーリングが改善され、全ての分析対象化合物において対称性の良いシャープなピークが得られた。また、測定感度においても、アセトニトリルを用いた場合と比較して、メタノールを用いた方が3～10倍の測定感度の向上が確認された。更に、揮発性の塩であるギ酸アンモニウムを添加した移動相を用いたところ、更なるピーク形状の改善が確認され、全ての化合物において良好な

ピーク形状が得られたことから、25 mmol/Lのギ酸アンモニウムを移動相に添加することとした。

グラジエント条件については、現行の通知試験法と同様のグラジエント条件では各化合物の分離が不十分であったが、検討の結果、上記4. 測定条件に記載した移動相及びグラジエント条件を用いることにより、各分析対象化合物を比較的良好に分離することが可能となった（図3）。

4) 検量線

添加濃度（0.01 ppm）に対する回収率12.5%（0.000625 µg/mL）、25%（0.00125 µg/mL）、50%（0.0025 µg/mL）、75%（0.00375 µg/mL）、100%（0.005 µg/mL）、120%（0.006 µg/mL）及び150%（0.0075 µg/mL）相当濃度の各分析対象化合物の標準溶液10 µLをLC-MS/MSに注入し、検量線を作成した結果、全ての分析対象化合物において相関係数0.995以上の良好な直線性が得られた（図4-1）。

また、参考として、広い濃度範囲（0.001 µg/mL、0.0025 µg/mL、0.005 µg/mL、0.01 µg/mL、0.05 µg/mL、0.1 µg/mL、0.5 µg/mL、1 µg/mL、5 µg/mL及び10 µg/mL）における各分析対象化合物濃度とピーク面積の関係を図4-2左側に示し、良好な直線関係が得られた濃度範囲における検量線を図4-2右側に示した。

5) 定量限界

S/N 10以上となるピークが得られる濃度から求めた結果、各分析対象化合物の定量限界は0.01 mg/kgであった。

4. 試験溶液調製法の検討

1) 強塩基性陰イオン交換ミニカラムによる精製

本試験法における分析対象化合物は、全てカルボキシル基を有している。そこで、この官能基を利用した精製法、すなわち、カルボキシル基と結合する強塩基性陰イオン交換ミニカラムを用いた精製を試みた。

Oasis MAX及びBond Elut SAXを用い、1 mol/Lアンモニア溶液に溶解した分析対象化合物を負荷した結果、Oasis MAXでは分析対象化合物の全てが良好に保持されたのに対し、Bond Elut SAXでは分析対象化合物の多くが完全にはカラムに保持されなかった。これは、Oasis MAXがイオン交換による保持だけでなく、逆相的な分配による保持力を有しているため、極性の高い分析対象化合物が効率的にカラムに保持されたことによるものと推察された。以上のことから、精製にはOasis MAXを用いることとした。

まず、担体充填量150 mgのMAXミニカラムを用いて、各分析対象化合物のカラムへの保持や溶出挙動について調査を行った。カラムへの保持については、1 mol/Lアンモニア溶液で負荷することで全ての分析対象化合物を完全にカラムに保持させる

ことが可能であった。洗浄操作については、水を用いた場合には分析対象化合物の溶出は認められなかったが、水及びメタノール（9：1）混液や水及びアセトニトリル（9：1）混液など、有機溶媒を加えた水混液を用いた場合には、極性の高い分析対象化合物の一部が溶出された。また、カラムに保持された全ての分析対象化合物は、250 mmol/Lギ酸含有メタノール溶液により、カラムから完全に溶出させることが可能であった。以上のことから、1 mol/Lアンモニア溶液で負荷し、水でカラムを洗浄後、250 mmol/Lギ酸含有メタノール溶液で溶出することとした。

しかし、担体充填量150 mgのMAXミニカラムを実際にソバはちみつ試料の精製に用いたところ、負荷の際にノルフロキサシンやシプロフロキサシン等の極性の高い分析対象化合物がカラムに保持されず回収率が低下した。500 mgの担体充填量のカラムを用いた際には、実試料を用いた場合においても、全ての分析対象化合物がカラムへの負荷の際に保持され、その後の水洗浄でも溶出されることなく、良好な回収率が得られたことから、以降の検討においては担体充填量500 mgのカラムを用いた。

表2に、担体充填量500 mgのMAXミニカラムへの各分析対象化合物の保持及びカラムからの溶出挙動を示した。得られた結果より、各分析対象化合物は、1 mol/Lのアンモニア溶液に溶解してMAXミニカラムに負荷することにより完全に保持され、水10 mLを用いた洗浄操作によっては溶出することなく、250 mmol/Lギ酸含有メタノール溶液5 mLを通液することにより完全に溶出させることが可能であることが確認された。

したがって、MAXミニカラムを用いた精製操作は、試料を1 mol/Lアンモニア溶液に溶解して負荷した後、水10 mLを通液して洗浄を行い、250 mmol/Lギ酸含有メタノール溶液5 mLを用いて溶出することとした。

表2 各分析対象化合物のOasis MAXミニカラムへの保持及びカラムからの溶出

分析対象化合物	溶出率 (%)			
	負荷*	水10 mL	250 mmol/Lギ酸含有メタノール溶液	
			0～5 mL	5～10 mL
エンロフロキサシン	0	0	107.5	0
シプロフロキサシン	0	0	98.9	0
オキシリニック酸	0	0	110.8	0
オフロキサシン	0	0	99.8	0
オルビフロキサシン	0	0	100.2	0
サラフロキサシン	0	0	99.0	0
ジフロキサシン	0	0	101.4	0
ダノフロキサシン	0	0	104.4	0
ナリジクス酸	0	0	95.0	0
ノルフロキサシン	0	0	91.5	0
フルメキン	0	0	108.1	0
マルボフロキサシン	0	0	100.6	0

*各分析対象化合物0.1 µg/mL溶液0.5 mLを1 mol/Lアンモニア溶液20 mLに添加し、

MAXミニカラム (500 mg) に負荷した。

2) 弱塩基性陰イオン交換カラムによる精製

上述のMAXミニカラムによる精製においては、洗浄の際にメタノールやアセトニトリルを含有した溶液を用いた場合には、極性の高い分析対象化合物が溶出されたことから、逆相的な分配のみによってMAXミニカラムに保持された夾雑物は、分析対象化合物と共に溶出され、取り除くことができないことが推察された。実際に、ソバはちみつ試料をMAXミニカラムのみで精製した時に得られた試験溶液の色は黄～茶色であり、さらにこの溶液をLC-MS/MS測定した結果、多くの分析対象化合物で120%を越える回収率（エンロフロキサシン 144%、オフロキサシン 142%、ダノフロキサシン 136%、ノルフロキサシン 160%及びマルボフロキサシン 147%）が得られ、イオン化の促進が確認された。そのため、MAXミニカラム精製に加えて、精製操作の追加について検討した。

まず、液/液分配や弱酸性陽イオン交換樹脂ミニカラムを用いた精製法を検討したが、良好な結果は得られなかった（後述の3）その他の精製方法について参照）。次に、弱塩基性の陰イオン交換基を有するエチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラム（Bond Elut PSA、500 mg）を用いた精製法を検討した。本ミニカラムは、畜水産物の農薬等一斉試験法などにおいて脂肪酸の除去等を目的として一般的に用いられている。また、他の農薬等の試験法開発において、肝臓試料の精製に用いた際、酸性の溶出溶媒を通液した場合でも肝臓試料由来の色素を除去することが可能であった。本知見に基づき、PSAミニカラムを用いることで、はちみつ試料由来の色素等の夾雑成分についても除去が可能であるかについて検討した。

まず、MAXミニカラムからの酸性の溶出液をPSAミニカラムに負荷することにより、目的の分析対象化合物はカラムを素通りさせ、分析対象化合物のイオン化を促進するマトリックス成分をPSAミニカラムに保持させて精製する方法を試みた。

表3に、各分析対象化合物のPSAミニカラムからの溶出パターンを示した。得られた結果より、各分析対象化合物は、250 mmol/Lギ酸含有メタノール溶液に溶解してPSAミニカラムに負荷することにより概ね溶出させることが可能であったが、カラムの空隙部分の溶液中に存在する分析対象化合物を溶出させるために、250 mmol/Lギ酸含有メタノール溶液1 mLを追加で通液することが必要であった。

したがって、PSAミニカラムを用いた精製操作は、MAXミニカラムからの溶出液（250 mmol/Lギ酸含有メタノール溶液5 mL）を負荷した後、250 mmol/Lギ酸含有メタノール溶液1 mLを通液する操作とした。

ソバはちみつ試料のMAXミニカラムからの溶出液をPSAミニカラムに負荷したところ、茶色の色素がPSAミニカラムに保持され、溶出液は淡黄色となり、精製前よりも色素が除去されたことから、本操作によりソバはちみつ試料由来の色素等の夾雑成分の除去効果が期待された。

また、ソバはちみつに0.01 ppmとなるように分析対象化合物を添加した試料を用いて得られたMAXミニカラムからの溶出液を用いて、上記のPSAミニカラムによる追加精製を行ったところ、全ての分析対象化合物において70～120%の回収率が得られた。このことから、PSAミニカラム精製は、LC-MS/MS測定において分析対象化合物のイオン化を促進するマトリックス成分の除去に有効であった。

表3 各分析対象化合物のPSAミニカラムからの溶出パターン

分析対象化合物	溶出率 (%)				合計
	負荷液 (0～5 mL)	5～6 mL	6～7 mL	7～8 mL	
エンロフロキサシン	87.4	12.9	0	0	100.3
シプロフロキサシン	87.2	13.9	0	0	101.1
オキシリニック酸	92.9	12.4	0	0	105.3
オフロキサシン	89.9	12.8	0	0	102.7
オルビフロキサシン	82.7	9.2	0	0	91.9
サラフロキサシン	81.6	15.1	0	0	96.8
ジフロキサシン	83.7	14.3	0	0	98.0
ダノフロキサシン	88.7	14.9	0	0	103.6
ナリジクス酸	79.7	12.4	0	0	92.2
ノルフロキサシン	90.5	8.9	0	0	99.4
フルメキン	84.1	10.5	0	0	94.6
マルボフロキサシン	87.3	9.9	0	0	97.2

* 各分析対象化合物0.05 µg/mL (250 mmol/Lギ酸含有メタノール溶液) 5 mLをPSAミニカラムに負荷。流出液 (負荷液素通り画分) を採った後、カラムに250 mmol/Lギ酸含有メタノール溶液1 mLずつを3回注入し、各流出液を採った。得られた各流出液を10 mLに定容 (最終検液の組成が、50 mmol/Lギ酸アンモニウム溶液及び250 mmol/Lギ酸含有メタノール溶液 (2:3) 混液となるように) し、LC-MS/MSで測定した。

3) その他の精製方法について

a) 液/液分配による精製

アセトニトリル及び飽和食塩水を用いた塩析操作による精製を試みた結果、比較的極性の低いオキシリニック酸、ナリジクス酸、フルメキンは精製効果が期待されるアセトニトリル層に分配されたが、その他の分析対象化合物はアセトニトリル層にはほとんど分配しなかった。また、酢酸エチル及び水を用いた分配においても、水層のpHや塩濃度等を変化した場合においても、分析対象化合物を精製効果が期待される酢酸エチル層に分配させることはできなかった。

b) ミニカラムを用いた精製

文献等においてキノロン系合成抗菌物質の精製に広く用いられている弱酸性陽イオン交換ミニカラム (Oasis WCX) を用いた結果、オキシリニック酸、ナリジクス酸及びフルメキンはメタノールで洗浄する際に溶出するため、精製効果が低いことが推察された。また、その他の分析対象化合物についてはメタノール洗浄で溶出されないものの、種々の溶出溶媒について検討したが、カラムから完全に溶出させるこ

とは困難であった。

5. 添加回収試験

本分析法により、純粋はちみつ、レンゲはちみつ（国産）、アザミはちみつ（国産）及びソバはちみつ（国産）を用いて添加回収試験を行い、その結果をそれぞれ表3～表6に示した。なお、添加回収試験は各分析対象化合物0.01 ppm相当を添加して行った。

はちみつ試料（表4）では、各分析対象化合物において回収率85～110%、RSD 1.0～3.6%と良好な結果が得られた。

同様にレンゲはちみつ試料（表5）では回収率86～114%、RSD 1.7～4.7%、アザミはちみつ試料（表6）では回収率81～116%、RSD 2.0～6.5%と良好な結果が得られた。

ソバはちみつ試料（表7）においては、オルビフロキサシンの回収率が若干低かったものの（5併行の平均値71%、RSD 2.8%）、その他の分析対象化合物においては回収率80～110%、RSD 1.3～5.2%の良好な結果が得られた。

また、図5に、各分析対象化合物のクロマトグラム（標準溶液、各はちみつ試料のブランク試験溶液及び添加試験溶液）を示した。

図5に示されるように、純粋はちみつ試料のブランク試験溶液においてシプロフロキサシン及びノルフロキサシンの保持時間に、レンゲはちみつ試料のブランク試験溶液においてはノルフロキサシンの保持時間にピークが検出された。これらのピーク面積は、シプロフロキサシン及びノルフロキサシンそれぞれの定量限界に相当する濃度から得られるピーク面積の1/10未満であったため定量はできなかった。なお、回収率の算出においては、各添加試料で得られたピーク面積値からブランク試料で得られたピーク面積値を差し引いて回収率を算出した。

表4 純粋はちみつの添加回収試験結果

分析対象化合物	回収率 (%)						RSD (%)
	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	平均	
エンロフロキサシン	105.3	108.5	102.6	104.0	105.2	105.1	2.1
シプロフロキサシン	87.0	85.0	89.3	90.6	87.3	87.8	2.5
オキシロニック酸	93.7	90.7	94.4	94.9	92.0	93.1	1.9
オフロキサシン	101.0	100.0	102.6	102.3	93.7	99.9	3.6
オルビフロキサシン	90.9	91.5	95.4	96.8	94.9	93.9	2.7
サラフロキサシン	88.6	93.7	96.4	92.1	90.9	92.3	3.2
ジフロキサシン	95.5	96.2	101.1	101.9	101.8	99.3	3.2
ダノフロキサシン	102.7	105.4	104.6	104.8	104.3	104.4	1.0
ナリジクス酸	96.5	97.8	101.0	93.9	92.6	96.4	3.4
ノルフロキサシン	86.7	91.3	92.9	93.5	86.9	90.3	3.6
フルメキン	94.5	101.1	96.0	94.5	93.4	95.9	3.2
マルボフロキサシン	101.7	103.1	100.0	101.6	100.7	101.4	1.2

表5 レンゲはちみつの添加回収試験結果

分析対象化合物	回収率 (%)						RSD (%)
	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	平均	
エンロフロキサシン	111.7	106.3	107.6	113.7	106.6	109.2	3.0
シプロフロキサシン	90.5	92.8	92.2	95.5	89.8	92.2	2.4
オキシリニック酸	90.1	89.7	89.8	88.5	86.4	88.9	1.7
オフロキサシン	106.8	102.5	99.7	107.3	106.9	104.6	3.2
オルビフロキサシン	98.8	92.7	97.8	104.6	94.7	97.7	4.7
サラフロキサシン	96.2	92.9	92.8	94.2	88.6	92.9	3.0
ジフロキサシン	103.8	96.6	100.7	102.6	102.9	101.3	2.8
ダノフロキサシン	109.8	107.8	102.3	112.4	105.0	107.5	3.7
ナリジクス酸	90.9	95.8	96.3	94.1	93.1	94.0	2.3
ノルフロキサシン	91.9	91.2	89.1	97.1	91.7	92.2	3.2
フルメキン	94.1	101.7	104.1	98.3	104.4	100.5	4.3
マルボフロキサシン	103.2	101.6	98.1	99.8	103.0	101.1	2.2

表6 アザミはちみつの添加回収試験結果

分析対象化合物	回収率 (%)						RSD (%)
	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	平均	
エンロフロキサシン	101.7	110.1	111.8	114.4	116.0	110.8	5.0
シプロフロキサシン	83.3	92.1	95.1	93.4	90.5	90.9	5.0
オキシリニック酸	89.4	94.7	96.9	92.7	93.8	93.5	3.0
オフロキサシン	98.6	108.0	108.4	105.3	105.4	105.1	3.7
オルビフロキサシン	83.0	93.4	98.1	93.9	87.8	91.2	6.5
サラフロキサシン	82.9	94.7	89.2	98.4	90.7	91.2	6.4
ジフロキサシン	92.4	99.9	102.9	102.8	103.5	100.3	4.6
ダノフロキサシン	99.9	106.9	108.5	109.9	112.1	107.5	4.3
ナリジクス酸	78.3	84.3	81.4	86.2	82.3	82.5	3.6
ノルフロキサシン	94.1	93.5	95.1	98.2	96.5	95.5	2.0
フルメキン	83.6	85.2	92.7	85.5	84.5	86.3	4.2
マルボフロキサシン	94.1	101.9	103.3	101.5	96.7	99.5	3.9

表7 ソバはちみつの添加回収試験結果

分析対象化合物	回収率 (%)						RSD (%)
	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	平均	
エンロフロキサシン	104.9	111.9	106.9	114.3	111.6	109.9	3.5
シプロフロキサシン	90.2	89.0	87.9	90.9	92.1	90.0	1.8
オキシリニック酸	80.0	81.4	79.1	78.8	83.2	80.5	2.3
オフロキサシン	89.9	93.4	91.4	96.6	94.4	93.1	2.8
オルビフロキサシン	67.8	72.1	71.0	71.5	73.0	71.1	2.8
サラフロキサシン	84.7	90.1	86.6	90.4	93.7	89.1	3.9
ジフロキサシン	95.9	99.1	101.5	101.8	100.1	99.7	2.4
ダノフロキサシン	100.1	102.9	103.3	101.8	103.2	102.3	1.3
ナリジクス酸	77.8	83.0	86.9	81.7	82.3	82.3	3.9
ノルフロキサシン	88.7	92.8	85.4	94.4	91.4	90.5	3.9
フルメキン	79.7	80.4	86.5	79.2	74.9	80.1	5.2
マルボフロキサシン	91.5	96.0	93.2	94.6	97.0	94.5	2.3

6. 試料マトリックスの測定値への影響

0.005 mg/L（試料中0.01 ppm相当）の溶媒標準溶液及び各はちみつ試料のマトリックス添加標準溶液をLC-MS/MSに注入し、ピーク面積を求めた。得られたピーク面積から、溶媒標準液のピーク面積に対するマトリックス添加標準液のピーク面積の比（%）を算出した（表8-1）。表8-1に示される通り、オルビフロキサシン及びナリジクス酸においてはイオン化阻害傾向が、ノルフロキサシンではイオン化促進傾向が観察された。

また、各はちみつ試料の添加回収試験で得られた回収率（5併行の平均値）を、マトリックス添加標準液と溶媒標準液のピーク面積比（表8-1の値）で除して得られた補正回収率を表8-2に示した。その結果、多くの化合物については補正回収率が100%に近い値となり、カラム精製等の操作における損失はほとんどないことが示された。一方、シプロフロキサシン、サラフロキサシン及びノルフロキサシンについては、補正回収率が80~90%であったことから、カラム精製等の操作において若干の損失があったことが推察された。また、はちみつ及びレンゲはちみつのナリジクス酸の補正回収率が110%を超える値となったが、この原因としてはマトリックス添加標準液の測定値の変動により、正確に補正することができなかったことが推察された。

表8-1 各試料における溶媒標準液とマトリックス添加標準液のピーク面積比

分析対象化合物	ピーク面積比（マトリックス添加標準液/溶媒標準液、%）			
	純粋はちみつ	レンゲはちみつ	アザミはちみつ	ソバはちみつ
エンロフロキサシン	104.5	105.7	107.7	103.5
シプロフロキサシン	102.9	103.2	98.2	99.7
オキシリニック酸	93.0	86.2	93.2	82.7
オフロキサシン	102.9	106.2	101.3	90.8
オルビフロキサシン	89.5	93.9	87.3	70.0
サラフロキサシン	104.0	101.5	96.2	93.3
ジフロキサシン	100.8	103.8	99.4	93.4
ダノフロキサシン	101.5	108.4	99.7	101.0
ナリジクス酸	85.9	81.1	83.4	81.2
ノルフロキサシン	110.3	103.1	112.7	115.8
フルメキン	97.6	98.2	93.0	86.8
マルボフロキサシン	98.2	103.6	97.9	91.5

表 8-2 各はちみつ試料における補正回収率

分析対象化合物	各はちみつ試料における補正回収率 (%)			
	純粋はちみつ	レンゲはちみつ	アザミはちみつ	ソバはちみつ
エンロフロキサシン	100.6	103.3	102.9	106.2
シプロフロキサシン	85.3	89.3	92.6	90.3
オキシリニック酸	100.1	103.1	100.3	97.3
オフロキサシン	97.1	98.5	103.8	102.5
オルビフロキサシン	104.9	104.0	104.5	101.6
サラフロキサシン	88.8	91.5	94.8	95.5
ジフロキサシン	98.5	97.6	100.9	106.7
ダノフロキサシン	102.9	99.2	107.8	101.3
ナリジクス酸	112.2	115.9	98.9	101.4
ノルフロキサシン	81.9	89.4	84.7	78.2
フルメキン	98.3	102.3	92.8	92.3
マルボフロキサシン	103.3	97.6	101.6	103.3

[結論]

はちみつ試料中のエンロフロキサシン、シプロフロキサシン（エンロフロキサシン代謝物）、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の試験法として、試料を1 mol/Lアンモニア溶液に溶解し、Oasis MAX及びBond Elut PSAミニカラムで精製した後、LC-MS/MSで定量及び確認を行う方法を開発した。純粋はちみつ、レンゲはちみつ、アザミはちみつ及びソバはちみつに適用した場合の添加回収率及び併行精度は良好であり、各分析対象化合物全て0.01 mg/kgでの定量分析が可能であると判断された。

[参考文献]

なし