

フロルフェニコール試験法（畜水産物）

1. 分析対象化合物

フロルフェニコール

代謝物FFNH₂ [(1*R*,2*S*)-1-(4-メチルスルホニルフェニル)-2-アミノ-3-フルオロ-1-プロパノール]（以下「フロルフェニコールアミン」という。加水分解によりフロルフェニコールアミンに変換される化合物を含む。）

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。

スルホン酸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（150 mg） 内径12～13 mmのポリエチレン製のカラム管に、スルホン酸塩修飾ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体150 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。

フロルフェニコール標準品 本品はフロルフェニコール98%以上を含む。

フロルフェニコールアミン標準品 本品はフロルフェニコールアミン97%以上を含む。

5. 試験溶液の調製

1) 加水分解及び抽出

試料10.0 gに6 mol/L塩酸20 mLを加え、密栓して100℃で3時間加熱する。放冷後、水10 mL及び*n*-ヘキサン40 mLを加え、振とう後、毎分3,000回転で5分間遠心分離する。*n*-ヘキサン層を捨て、水層にケイソウ土2 gを加えて混合した後、吸引ろ過する。容器及びろ紙上の残留物をアセトン及び水（1：1）混液10 mLで2回洗い、洗液を吸引ろ過する。ろ液を合わせ、水を加えて正確に100 mLとする。

2) 精製

① 多孔性ケイソウ土カラムクロマトグラフィー

1) で得られた溶液から正確に2.5 mLを分取し、7.5 mol/L水酸化ナトリウム溶液1 mL及び塩化ナトリウム1 gを加えよく混合した後、多孔性ケイソウ土カラム（5

mL保持用) に注入する。このカラムを30分間放置した後、酢酸エチル30 mLを注入し、溶出液を40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物に0.1 vol%酢酸及びメタノール (1 : 1) 混液1 mLを加えて溶かす。

② スルホン酸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

スルホン酸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 (150 mg) にメタノール2 mL及び0.1 vol%酢酸及びメタノール (1 : 1) 混液3 mLを順次注入し、各流出液は捨てる。このカラムに①で得られた溶液を注入した後、0.1 vol%酢酸及びメタノール (1 : 1) 混液3 mL及びメタノール2 mLを順次注入し、各流出液は捨てる。次いで、アンモニア水及びメタノール (1 : 99) 混液5 mLを注入し、溶出液を40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物を0.1 vol%酢酸及びメタノール (9 : 1) 混液に溶かし、正確に1 mLとしたものを試験溶液とする。

6. 検量線の作成

フロルフェニコールアミン標準品の0.1 vol%酢酸及びメタノール (9 : 1) 混液の溶液を数点調製し、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0.0025 mg/Lである。

7. 定量

試験溶液をLC-MS/MSに注入し、6の検量線でフロルフェニコールアミンの含量を求める。

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150 mm、粒子径3 µm

カラム温度 : 40°C

移動相 : アセトニトリル及び0.1 vol%酢酸 (1 : 99) 混液

イオン化モード : ESI (+)

主なイオン (*m/z*) : プリカーサーイオン248、プロダクトイオン230、130

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

試料に塩酸を加えて加熱し、フロルフェニコール及びその代謝物をフロルフェニコールアミンに加水分解後、*n*-ヘキサンで洗浄し、多孔性ケイソウ土カラム及びスルホン酸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で精製した後、LC-MS/MSで定量及び確認する方法である。

2) 注意点

- ① 加水分解操作については、フロルフェニコール標準品を用いて、加水分解が十分に行われていることを確認すること。
- ② 加水分解においては、試料の塊がなくなり、暗褐色～黒色の溶液状態となるまで加熱すること。
- ③ 吸引ろ過の際、ろ過速度が遅い場合は、ガラス繊維ろ紙を用いると良い。
- ④ 吸引ろ過の際、気泡が発生し、定容が困難な場合は毎分3,000回転で5分間遠心分離すると良い。
- ⑤ *n*-ヘキサンで洗浄した後、浮遊物が認められない場合は、吸引ろ過を行う必要はない。吸引ろ過を行わない場合の操作を以下に示す。
n-ヘキサン層を捨て、水層にアセトン10 mLを加えた後、水を加えて正確に100 mLとする。
- ⑥ 定容の際、激しく振とうすると、試料によっては泡立つ場合があるため、穏やかに転倒混和する。
- ⑦ スルホン酸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において、濃縮の際に水が残る場合は、40℃以下で約0.5 mLまで濃縮した後、エタノールを2 mL程度加えて再度濃縮すると良い。
- ⑧ 多孔性ケイソウ土カラムクロマトグラフィーのみで精製が十分である場合は、スルホン酸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を省略してもよい。
- ⑨ 試験法開発時の基準値濃度での添加回収試験においては、スルホン酸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を省略した。
- ⑩ フロルフェニコールアミンの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248、プロダクトイオン230

定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン248、プロダクトイオン130

- ⑪ LC-MS/MS測定では、試料中の夾雑成分のキャリーオーバーの影響を軽減させるため、フロルフェニコールアミンが溶出した後に移動相のアセトニトリル濃度を上げてカラムを洗浄すると良い。
- ⑫ 試験法開発時に使用したフロルフェニコールのLC-MS/MS測定条件を以下に示す。

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150 mm、粒子径3 μm

カラム温度 : 40°C

移動相 : アセトニトリル及び0.1 vol% 酢酸 (1 : 99) 混液で6分間保持した後、(1 : 99) から (19 : 1) までの濃度勾配を6分間で行い、(19 : 1) で5分間保持する。

イオン化モード : ESI (-)

主なイオン

定量イオン (m/z) : プリカーサーイオン356、プロダクトイオン336

定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン356、プロダクトイオン185

注入量 : 5 μL

保持時間の目安 : 11分

- ⑬ 試験法開発時に検討した食品 : 牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、うなぎ

12. 参考文献

Determination and Confirmation of Florfenicol. CLG-FLOR 1.04. Revision 04. United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service, Office of Public Health Science, 2010.

13. 類型

C