

クロラムフェニコール試験法

クロラムフェニコール及びクロラムフェニコールグルクロン酸抱合体を分析対象とする。

1. 装置

液体クロマトグラフ・タンデム質量分析計を用いる。

2. 試薬・試液

次に示すもの以外は、第2 添加物の部C 試薬・試液等の項に示すものを用いる。

アセトニトリル 当該農薬等の成分である物質の分析の妨害となる物質を含まないものを用いる。

酢酸エチル 当該農薬等の成分である物質の分析の妨害となる物質を含まないものを用いる。

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 (500mg) 内径12~13mmのポリエチレン製のカラム管に、ジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体500mgを充填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。

メタノール 当該農薬等の成分である物質の分析の妨害となる物質を含まないものを用いる。

水 蒸留水、精製水、純水等の化学分析に適したものを用いる。当該農薬等の成分である物質の分析の妨害物質を含む場合には、n-ヘキサン等の溶媒で洗浄したものを用いる。

β -グルクロニダーゼ (タイプ I X-A) *Escherichia coli*由来の β -グルクロニダーゼタイプ I X-Aを用いる。本品の1単位は、フェノールフタレイン β -D-グルクロニドを基質として、pH6.8、37℃において1時間に1.0 μ gのフェノールフタレインを生成する酵素量とする。

β -グルクロニダーゼ溶液 β -グルクロニダーゼ (タイプ I X-A) を0.1mol/lリン酸緩衝液 (pH6.8) に溶かして、1,500単位/mlとなるように調製する。用時調製する。

0.1mol/lリン酸緩衝液 (pH6.8)

第1液：リン酸二水素カリウム1.36gを量り、水を加えて溶かして正確に100mlとする。

第2液：リン酸水素二ナトリウム1.42gを量り、水を加えて溶かして正確に100mlとする。

第1液に第2液を加えて混和し、pHを6.8に調整する。

3. 標準品

クロラムフェニコール標準品 本品はクロラムフェニコール98%以上を含む。

4. 試験溶液の調製

a 抽出法

筋肉、脂肪、肝臓、腎臓及び魚介類等の場合は、検体を細切均一化した後、その10.0 gを量り採る。

乳、卵、はちみつ及びローヤルゼリー（乾燥したものを除く。）の場合は、検体をよく混合して均一化した後、その10.0 gを量り採る。

ローヤルゼリー（乾燥したものに限る。）の場合は、検体をよく混合して均一化した後、その5.00 gを量り採り、水10mlを加えて30分間放置する。

これにメタノール50mlを加え、細切均一化した後、毎分3,000回転で5分間遠心分離し、上澄液を採る。残留物にメタノール30mlを加えて細切均一化し、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、メタノールで正確に100mlとする。この溶液から正確に4 mlを採り、40℃以下で溶媒を除去する。この残留物に0.1mol/lリン酸緩衝液（pH6.8）9 mlを加えて、超音波処理を行い、よく混合する。

b 加水分解

a 抽出法で得られた溶液にβ-グルクロニダーゼ溶液1 mlを加え、37℃で60分間加温する。加水分解後の溶液に酢酸エチル10mlを加えて振とう抽出する。抽出液を毎分3,000回転で5分間遠心分離し、酢酸エチル層を採る。水層に酢酸エチル10mlを加えて振とう抽出した後、上記と同様に遠心分離する。得られた酢酸エチル層を合わせ、40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物に水及びメタノールの混液（1：1）5 mlを加え、超音波処理を行い、よく混合する。

c 精製法

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（500mg）にメタノール5 ml並びに水及びメタノールの混液（1：1）5 mlを順次注入し、各流出液は捨てる。このカラムにb 加水分解で得られた溶液5 mlを注入した後、水及びメタノールの混液（1：1）5 mlを注入し、流出液は捨てる。この溶液に水及びメタノールの混液（1：4）10mlを注入し、溶出液を40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物をアセトニトリル及び水の混液（3：7）に溶かして正確に2 ml（ローヤルゼリー（乾燥したものに限る。）にあっては正確に1 ml）としたものを試験溶液とする。

5. 操作法

a 検量線の作成

クロラムフェニコール標準品のアセトニトリル及び水の混液（3：7）の溶液を数点調製し、それぞれ液体クロマトグラフ・タンデム質量分析計に注入し、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0.0005mg/kgに相当する試験溶液の濃度は、0.0001mg/lである。

b 定量試験

試験溶液を液体クロマトグラフ・タンデム質量分析計に注入し、a 検量線の作成によりクロラムフェニコールの定量を行う。

c 確認試験

液体クロマトグラフ・タンデム質量分析計により確認する。

d 測定条件

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲル 内径2.1mm、長さ150mm、粒子径 3 μm

カラム温度：40°C

移動相：アセトニトリル及び10mmol/l 酢酸アンモニウム溶液の混液（3 : 7）

イオン化モード：エレクトロスプレーイオン化法 ネガティブイオンモード

主なイオン（m/z）：

プリカーサーイオン321、プロダクトイオン152

プリカーサーイオン323、プロダクトイオン152

注入量：5 μl

保持時間の目安：4分