

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）

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

2. 装置

蛍光検出器付き高速液体クロマトグラフ（HPLC-FL）

液体クロマトグラフ・質量分析計（LC/MS）

3. 試薬、試液

次に示すもの以外は、総則の2に示すものを用いる。

アセトニトリル 液体クロマトグラフ用に製造したのものを用いる。

水 液体クロマトグラフ用に製造したのものを用いる。

メタノール 液体クロマトグラフ用に製造したのものを用いる。

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（60 mg） 内径 12～13 mm 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 60 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%以上を含み、融点は 219～225℃である。

シプロフロキサシン標準品 本品はシプロフロキサシン 98%以上を含み、融点は 255～257℃である。

オキシリニック酸標準品 本品はオキシリニック酸（オキシリン酸）99%以上を含み、融点は 314～316℃である。

オフロキサシン標準品 本品はオフロキサシン 98%以上を含み、融点は 250～257℃である。

オルビフロキサシン標準品 本品はオルビフロキサシン 95%以上を含み、分解点は 263℃である。

塩酸サラフロキサシン標準品 本品は塩酸サラフロキサシン 95%以上を含み、融点は 200°Cである。

塩酸ジフロキサシン標準品 本品は塩酸ジフロキサシン 95%以上を含み、融点は 275°C以上である。

メシル酸ダノフロキサシン標準品 本品はメシル酸ダノフロキサシン 95%以上を含み、融点は 328°Cである。

ナリジクス酸標準品 本品はナリジクス酸 99%以上を含み、融点は 225~230°Cである。

ノルフロキサシン標準品 本品はノルフロキサシン 98%以上を含み、融点は 220~221°Cである。

フルメキン標準品 本品はフルメキン 99%以上を含み、融点は 253~255°Cである。

4. 試験溶液調製

1) 抽出

試料 5.00 g を量り採り、アセトニトリル及び 0.2% メタリン酸溶液 (2 : 3) 混液 100 mL を加えて細砕した後、吸引ろ過する。ろ紙上の残留物にアセトニトリル及び 0.2% メタリン酸溶液 (2 : 3) 混液 20 mL を加えてかき混ぜた後、上記と同様に操作して、ろ液を合わせ、40°C 以下で約 30 mL に濃縮する。

2) 精製

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 (60 mg) に、メタノール 5 mL 及び水 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、水 5 mL を注入し、流出液は捨てる。このカラムにメタノール 5 mL を注入し、溶出液をすり合わせ減圧濃縮器中に採り、40°C 以下でメタノールを除去する。この残留物に水及びメタノール (7 : 3) 混液 1.0 mL を加えて溶かし、これを試験溶液とする。

5. 検量線の作成

各標準品の 10 mg/100 mL メタノール溶液を調製し、水及びメタノール (7 : 3) 混液で希釈して 0.05~5 mg/L の標準溶液を数点調製する。それぞれ HPLC 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。

6. 定量

試験溶液を HPLC に注入し、5 の検量線で各物質の含量を求める。

なお、エンロフロキサシンについては、その代謝物のシプロフロキサシンとの和を分析値とする。

7. 確認試験

LC/MS により確認する。

8. 測定条件

HPLC

検出器 : FL

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、ダノフロキサシン及びノルフロキサシン：
励起波長 290 nm、蛍光波長 450 nm

オキシリニック酸、ナリジクス酸及びフルメキン：励起波長 325 nm、蛍光波長 365 nm

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲル 内径 2.0～6.0 mm、長さ 100～250 mm、
粒子径 2～5 μm

カラム温度：40°C

移動相：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。

保持時間の目安：20 分（エンロフロキサシン）

9. 定量限界

各分析対象化合物について 0.01 mg/kg

10. 留意事項

1) 試験法の概要

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、ノルフロキサシン及びフルメキンを試料からアセトニトリル及び 0.2%メタリン酸溶液の混液で抽出し、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、HPLC-FL で測定し、LC/MS で確認する方法である。

2) 注意点

- ① HPLC-FL 及び LC/MS における標準溶液及び試験溶液の標準的な注入量は、内径 3.0 mm のカラムにおいて 10 μL であるが、カラム及び装置により最適な注入量が異なる場合があるので、必要に応じて最適注入量を検討すること。
- ② LC/MS における測定条件は用いる装置により、最適なイオン化方法、生成するイオンが異なる場合があるので、装置ごとに最適条件を検討すること。

11. 参考文献

堀江ら、食品衛生学雑誌、36, 62(1995)

12. 類型

C

ツラスロマイシン試験法（畜水産物）

1. 分析対象化合物

ツラスロマイシン

2. 装置

液体クロマトグラフ・質量分析計（LC/MS 又は LC/MS/MS）

3. 試薬、試液

次に示すもの以外は、総則の2に示すものを用いる。

水 液体クロマトグラフ用に製造したものを用いる。

メタノール 液体クロマトグラフ用に製造したものを用いる。

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（60 mg） 内径 12～13 mm 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 60 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。

ツラスロマイシン標準品 本品はツラスロマイシン 97%以上を含み、融点は 190～192℃である。

4. 試験溶液調製

1) 抽出

① 筋肉、肝臓、腎臓及びその他の食用部分の場合

試料 5.00 g を量り採り、メタノール及び 0.2%メタリン酸溶液（3：7）混液 100 mL を加えて細砕した後、吸引ろ過する。ろ紙上の残留物にメタノール及び 0.2%メタリン酸溶液（3：7）20 mL を加えてかき混ぜた後、上記と同様に操作して、ろ液を合わせ、40℃以下で約 30 mL に濃縮する。

② 脂肪の場合

試料 5.00 g を量り採り、*n*-ヘキサン 30 mL 及び 0.2%メタリン酸溶液 70 mL を加えて細砕した後、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、残りの層を吸引ろ過する。ろ紙上の残留物にメタノール及び 0.2%メタリン酸溶液（3：7）混液 20 mL を加えてかき混ぜた後、上記と同様に操作して、ろ液を合わせ、40℃以下で約 30 mL に濃縮する。

2) 精製

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（60 mg）に、メタノール 5 mL 及び水 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、水 5 mL を注入し、流出液は捨てる。このカラムにメタノール 5 mL を注入し、溶出液をすり合わせ減圧濃縮器中に採り、40℃以下でメタノールを除去する。この残留物にアセトニトリル及び 0.05%トリフルオロ酢酸溶液（1：3）混液 1.0 mL を加えて溶かし、これを試験溶液とする。

5. 検量線の作成

ツラスロマイシン標準品の 10 mg/100 mL メタノール溶液を調製し、アセトニトリル及

び 0.05%トリフルオロ酢酸溶液（1：3）混液で希釈して 0.5～50 mg/L の標準溶液を数点調製する。それぞれ LC/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。

6. 定量

試験溶液を LC/MS に注入し、5 の検量線でツラスロマイシンの含量を求める。

7. 確認試験

LC/MS 又は LC/MS/MS により確認する。

8. 測定条件

LC/MS

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲル 内径 2.0～6.0 mm、長さ 100～250 mm

粒子径 2～5 μm

カラム温度：40°C

移動相：アセトニトリル及び 0.05%トリフルオロ酢酸溶液（1：3）混液

イオン化モード：ESI(+)

主なイオン(m/z)：577、807

保持時間の目安：4～6分

9. 定量限界

0.01 mg/kg

10. 留意事項

1) 試験法の概要

ツラスロマイシンを試料からメタノール及び 0.2%メタリン酸溶液の混液で抽出し、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 で測定及び確認する方法である。

2) 注意点

- ① LC/MS における標準溶液及び試験溶液の標準的な注入量は、内径 3.0 mm のカラムにおいて 10 μL であるが、カラム及び装置により最適な注入量が異なる場合があるので、必要に応じて最適注入量を検討すること。
- ② LC/MS における測定条件は用いる装置により、最適なイオン化方法、生成するイオンが異なる場合があるので、装置ごとに最適条件を検討すること。主なモニターイオン 577 (m/z) は、ツラスロマイシンの代謝物からも生成する場合があるので、他のイオンでも確認すること。

11. 参考文献

なし

12. 類型

C