

**タンデム型 LC-MS の効果：** 精製水にチウラム 10ng

を添加し、所定の分析操作に従ってシングル型及びタンデム型 LC-MS を用いて測定を行った。その結果、シングル型では、水質試料中に存在する妨害物質の影響を受け、分析困難であったが、タンデム型を用いることにより、Fig. 1 に示すような妨害ピークのない良好なクロマトグラムを得ることができた。そのため、測定にはタンデム型 LC-MS を用いることとした。

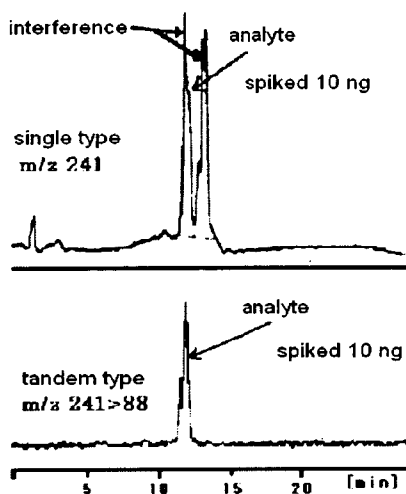


Fig. 1 Effect of tandem-type LC-MS

**検量線及び低濃度域での感度変動：** LC/MS の測定条件をチウラムに合わせて最適化した。最適化条件を Table 1 に示す。最適化により、0.05  $\mu\text{g/L}$  の極微量濃度域までチウラムをピークとして検出することができた。0.05  $\mu\text{g/L}$  のチウラム標準溶液 (試料換算濃度：0.0001  $\mu\text{g/L}$ ) のクロマトグラムを Fig.2 に示す。

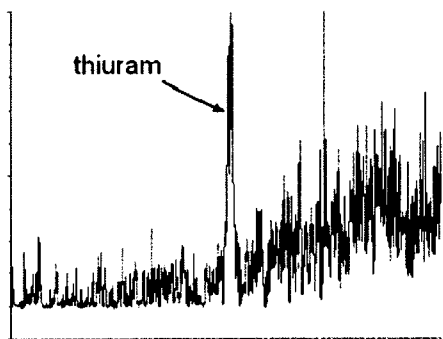


Fig.2 MRM chromatogram of the ultra trace level of thiamethoxam (0.05  $\mu\text{g/L}$ )

しかしながら、この濃度域では、Fig. 3 に示すように感度変動による検量線の落ち込みが確認された。US-EPA は、化学物質分析の理論の中で、検出下限値を推定する方法の一つに検量線の落ち込みなど低濃度域での感度が明瞭に変化する濃度を挙げている<sup>2)</sup>。LC/MS では、装置を最適化することにより、0.05  $\mu\text{g/L}$  までピークを検出できるものの、定量分析法としては、5  $\mu\text{g/L}$  (試料換算濃度：0.001  $\mu\text{g/L}$ ) 付近が分析装置の限界と考えられる。なお、5  $\mu\text{g/L}$  の標準溶液の繰返し測定から算出した装置検出限界は、0.5  $\mu\text{g/L}$  (試料換算濃度：0.0001  $\mu\text{g/L}$ ) であった。

**分析法検出下限値：** 精製水に 0.010  $\mu\text{g/L}$  となるようにチウラムを添加した後、本分析法を用いて繰返し測定を行った。繰返し測定の平均値及び標準偏差は、各々 0.0106  $\mu\text{g/L}$  (n=5) 及び 0.00571  $\mu\text{g/L}$  (相対標準偏差：5.4%) と良好な結果を示した。標準偏差から求めた分析法検出下限値は、0.0024  $\mu\text{g/L}$  に達し、従来の HPLC-UV 法の 0.4 - 3  $\mu\text{g/L}$  に比べ 160 - 1200 倍に高感度化することができた。

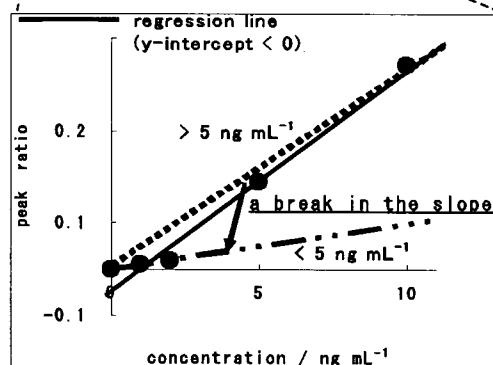
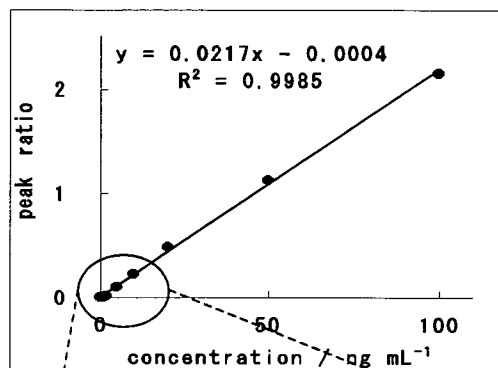


Fig.3 calibration curve and change in sensitivity at low analyte concentration (i.e. a break in the slope)

**【まとめ】**

LC/MS によるチウラムの高感度分析法を検討した結果、従来法に比べ 160-1200 倍高感度化することができた。今後は、河川水など実試料への適用を検討する予定である。

**謝辞** 本研究の一部は、環境省環境安全課からの化学物質環境実態調査委託業務を受けて実施したものである。研究の遂行にあたり、LC/MS 測定に関する有益なご助言を頂いた日本ウォーターズ(株)の米久保淳氏、カラム及び吸着剤の開発にご尽力頂いた昭和電工(株)の篠田昌子女史に深謝いたします。

**引用文献)**

- 1) 環境省環境リスク評価室. '化学物質の環境リスク評価', 第 2 巻: [37]チウラム, 2003, pp. 431-436.
- 2) John A. Glaser, et al.: Trace analyses for wastewaters, *Environmental Science & Technology*, 15(12), 1426-1435 (1981)

## LC/MSによる化学物質分析法の基礎的研究(33)

○花田喜文、梶原葉子、一田亜希子(北九州市環科研)、飛石和大、塚谷裕子(福岡県保環研)、佐々木和明、鎌田憲光(岩手県保環研セ)、吉澤正、清水明(千葉県保環研セ)、長谷川敦子(神奈川県保環科セ)、中澤剛、茨木剛、田辺頸子(新潟県保環研)、鈴木茂(中部大学)、中根知康(愛知県環調セ)、渡辺正敏、長谷川瞳(名古屋市環科研)、上堀美知子、今村清(大阪府環農総研)、古武家善成、吉田光方子(兵庫県健環研セ)、高良浩司(和歌山県環衛研セ)、森脇洋(信州大学)、八木正博、長谷川明彦(神戸市保環研)、浦山豊弘、吉岡敏行、劔持堅志(岡山県保環セ)、大野ちづ子(徳島県保環セ)、嘉村久美子、古谷典子(山口県保環セ)、

【はじめに】GC/MSでは測定困難な環境中化学物質について、LC/MSの適用可能性を検討した。本報は、環境省委託化学物質分析法開発調査における検討で得られた主な知見について取りまとめたものである。

【実験】水質試料中のi)チウラム、ii)m-アミノフェノール、iii)ヘキサコナゾールについてLC/MSによる分析法を検討した。

【結果と考察】チウラム(北九州市環科研)：農薬のチウラム(殺菌剤、年間使用量:395t、環境基準値:6 $\mu$ g/L)について高感度分析法を検討した。分析は、水試料1Lにサロゲートとしてチウラム-d<sub>12</sub>を添加し、昭和電工製Autoprep PS@Liq HQを用いて固相抽出した後、0.2mLまで濃縮後LC/MSで分析する方法を用いた。シングル型-質量分析計では、水質試料中の夾雑物による妨害を受け分析困難であったが、タンデム型-質量分析計を用いることにより、図i-1に示すように妨害ピークのない良好なクロマトグラムを得ることができた。また、精製水に0.010 $\mu$ g/Lとなるようにチウラムを添加した後、本分析法を用いて繰返し測定を行った。繰返し測定の平均値及び標準偏差は、各々0.0106 $\mu$ g/L(n=5)及び0.00571 $\mu$ g/L(相対標準偏差:5.4%)と良好な結果を示した。標準偏差から求めた分析法検出限界(MDL)は、0.0024 $\mu$ g/Lに達し、従来のHPLC-UV法の0.6 $\mu$ g/Lに比べ200倍以上高感度化することができた。LC/MSによるチウラムのピーク検出は、シングル型LC/MSでは、5ng/mL(試料換算:0.001 $\mu$ g/L)、タンデム型では図ii-2のように0.05ng/mL(試料換算:0.00001 $\mu$ g/L)までピークを観察することが可能であった。しかしながら、タンデム型の検出濃度レベルでは、検量線の落ち込みがみられ、極低濃度域の定量に課題が示された(図ii-3)。

---

### Fundamental studies on chemical analysis by liquid chromatography/mass spectrometry (33)

Yoshifumi HANADA, Yoko KAJIWARA, Akiko ICHIDA(Kitakyushu City Inst. Env. Sci., 1-2-1 Shin-ike, Tobata, Kitakyushu, 804-0082, TEL: 093-882-0333, Fax: 093-871-2535), Kazuhiro TOBIISHI, Hiroko TSUKATANI (Fukuoka Inst. Health Env. Sci.), Kazuaki SASAKI, Norimitsu KAMADA (Res. Inst. Env. Sci. Pub. Health Iwate Pref.), Tadashi YOSHIZAWA, Akira SHIMIZU (Chiba Pref. Env. Res. Center), Atsuko HASEGAWA (Kanagawa Env. Res. Center), Tsuyoshi NAKAZAWA, Tsuyoshi IBARAKI, Akiko TANABE (Niigata Pref. Inst. Pub. Health Env. Sci.), Shigeru SUZUKI (Chubu Univ.), Tomoyasu NAKANE(Aichi Env. Res. Center), Masatoshi WATANABE, Hitomi HASEGAWA (Nagoya City Env. Sci. Res. Inst.), Michiko UEBORI, Kiyoshi IMAMURA (Res. Inst. Env. Agri. Fish., Osaka Pref. Gov.), Yoshinari KOBUKE, Mihoko YOSHIDA (Hyogo Pref. Inst. Pub. Health Env. Sci.), Koji TAKARA (Wakayama Pref. Center Env. Pub. Health), Hiroshi MORIWAKI (Shinshu Univ.), Masahiro YAGI, Akihiko HASEGAWA (Kobe Inst. Health), Toyohiro URAYAMA, Toshiyuki YOSHIOKA, Katashi KENMOTSU (Okayama Pref. Inst. Env. Sci. Pub. Health), Chizuko OHNO (Tokushima Pref. Inst. Pub. Health Env. Sci.), Kumiko KAMURA, Noriko FURUYA (Yamaguchi Pref. Res. Inst. Pub. Health)

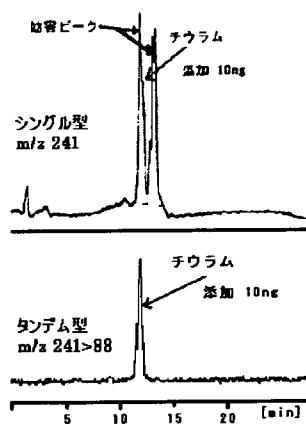


図 i-1 タンデム型の効果

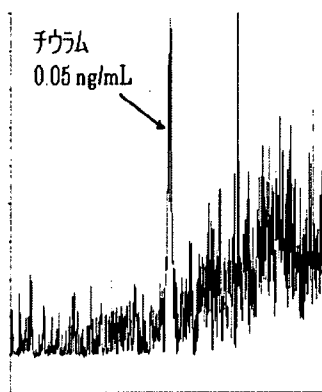


図 i-2 チウラム検出可能濃度

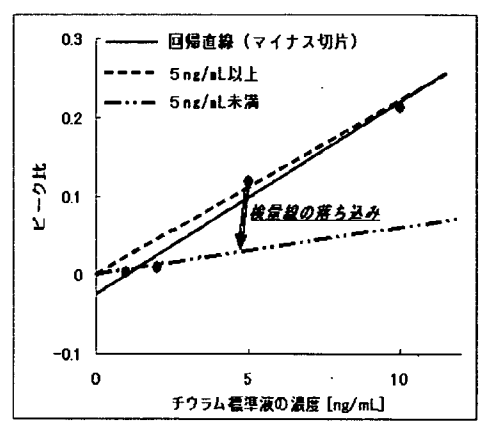


図 i-3 検量線の落ち込み

**m-アミノフェノール (福岡県保環研)**: 染料や医薬品中間体として使用される *m*-アミノフェノールの分析法を検討した。水質試料 100 mL を Waters 製 Oasis HLB Plus に通水した後、被検成分をメタノールで溶出し、シングル型 LC/MS で分析した。LC/MS によるアミノフェノール類の SIM クロマトグラムを図 ii-1 に示す。本分析法を用いることにより、存在するアミノフェノールの異性体 3 種を全て分離することが可能であった。また、MDL は  $0.007 \mu\text{g/L}$  であり、実試料 (海水) からの回収率及び相対標準偏差は 73% 及び 4.5% であった。さらに、環境試料中に存在する夾雑物の影響を低減するため、①固相吸着前に Sep-Pak tC18 カートリッジで試料水を洗浄、②吸着後のカートリッジを 2% メタノール溶液で洗浄、の 2 つのクリーンアップ法について検討した。その結果、どちらの方法も 80% 以上の回収率を示し、夾雑物の多い環境試料についても適用可能であることが示された。

**ヘキサコナゾール (福岡県保環研)**: 農薬のヘキサコナゾール (年間出荷量: 約 3.4 t) の分析法を検討した。シングル型質量分析では、クロマトグラムのバックグラウンドが高いため、タンデム型質量分析計を使用した。タンデム型質量分析計による低濃度のクロマトグラムを図 iii-1 に示す。分析法は、水質試料 200 mL を Waters 製 Sep-Pak Plus tC18 に通水した後、被検成分をメタノールで溶出し、タンデム型 LC/MS で分析する方法を選択した。ただし、LC/MS 測定用の試料液の溶液組成を LC/MS 移動相に合わせるため、6 mL のメタノールで溶出した後、精製水 2 mL を加え混合したものを試料液とした。本分析法の MDL は、 $0.057 \mu\text{g/L}$  であった。また、海水を用いた添加回収試験では、回収率 90.4%、相対標準偏差 7.3% と良好な結果を示した。

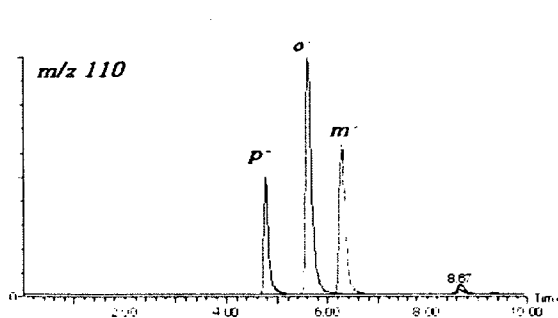


図 ii-1 アミノフェノール異性体の分離

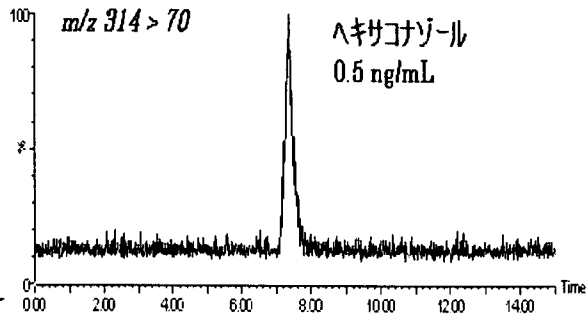


図 iii-1 タンデム型によるヘキサコナゾールの検出濃度

40 mm 空けて  
下さい。  
事務局で使用  
いたします。

## PCRを応用した分析法 ～PCR分析法の要素と性質～

わたなべたかひろ  
渡邊敬浩 (国立医薬品食品衛生研究所)  
E-mail, [tawata@nihs.go.jp](mailto:tawata@nihs.go.jp)

### 【はじめに】

PCRは、生物の生存に不可欠な機構の一つであるゲノミックDNAの複製を人為的に試験管内で再現し、温度制御の工夫を加えることにより反応を連鎖的に繰り返すことで、目的としたDNA配列を100万倍にも増幅する反応である。この反応が技術として確立された当初は、遺伝子の単離や発現量解析等、分子生物学の分野における強力な研究手法として使われるのみであったが、近年、分析化学の分野においても様々な方面への応用が試みられている。PCRは生化学反応を基本的な原理とする技術である。このため、PCRを応用した分析法(PCR法)は、生化学分析法(biochemical methods)として、物理化学の原理に基づく理化学分析法とは区別されることが多い。

そこで、分析の目的にあわせてPCR法を細分した後、特に定量分析を目的とするPCR法(定量PCR法)については、その要素と性質について、遺伝子組換え(GM)農作物を対象とした分析法を例に考察する。また、定量PCR法により得られるデータの解析を目的とし開発したアプリケーション(GiMlet)を用いた解析の実例についても紹介する。

### 【PCR法の細分】

分析の目的によってPCR法は定性法と定量法に大別されるが、いずれの場合においても分析対象物質はDNAである。

#### ・定性法

PCRを応用した定性法は、「DNAの特性を明らかにする」あるいは、「ある特性を持ったDNAの存在を明らかにする」のいずれを目的にするのかによってさらに細分できる。具体的に言えば、遺伝的疾患の診断や親子鑑定、農産物(作物、食肉、魚介)の品種判別等は前者に、遺伝子組換え作物やウイルスの検出は後者にあたるだろう。つまり、前者はDNA配列の同定や同定内容の比較を通じた判定を目的としており、後者は特定のDNA配列を検出することのみを目的としている。いわば化合物の同定と検出の関係に相当する。

#### ・定量法

正確には、「その過程を観測している」ということになるが、直感的には、PCR法によって測定される物質は、増幅された特定のDNA断片と言えるだろう。その方法としては、DNA断片の増幅と蛍光の放出とが対になるようにした上で蛍光強度を測定する方法(リアルタイムPCR; Hybprobe、サイクリングprobe、TaqMan probe等を使用する方法)や、DNA断片の増幅にもなって生じる副産物の濁度を測定する方法(LAMP法)等が挙げられる。しかし、いずれの方法によっても、もともと存在していた特定のDNA配列の量(初期DNA配列)を直接測定することはできない。あくまで、PCRにより増幅されたDNA断片の量を蛍光強度や増幅の副産物の量として測定し、その測定値から初期DNA配列数を推定する。また、初期DNA配列数の推定方法には、プラスミドDNA等を標準物質(標準試料)として使用し作成した検量線に内挿する方法や、標準試料及び分析試料の両方から測定される蛍光強度の増加割合を比較する方法等が用いられる。以後言及する定量法(定量PCR法)は、TaqMan probeを使用するリアルタイムPCRとプラスミドDNAを標準物質と

する検量線とを組み合わせた方法を意味するものとする。

また、実際の分析において、初期DNA配列数を知りたいということは希である。推定された初期DNA配列数からそのDNA配列を有する細胞や種子の量を、必要に応じて換算する。その特殊性については後述する。

### 【PCR法の要素と性質】

Codex Alimentarius Commission(国際食品規格委員会)は、FAO/WHO合同食品規格計画の下で食品規格、種々のガイドライン等を作成している。当Codexの手続きマニュアルには、Codex分析法の採択要件として1)特異性(specificity)、2)精確性(accuracy)、3)精度(precision; 併行再現性及び室間再現性)、4)検出限界(limit of detection)、5)感度(sensitivity)、6)実行性及び応用性(practicability及びapplicability)が挙げられ、これらについて明らかにすることが求められている。これらのうち、分析対象物質に依らず、全ての分析法に共通する基本的な要件は、特異性、精確性(真度及び精度)及び検出限界であろうと思われる。PCR法については、GM農作物を対象とした分析における一般要求事項がISO24276として規格化されており、この規格においても上記の要件について明らかにすることが求められている。以下、各要件に付随するPCR法の特徴について述べる。

#### 【特異性】

PCR法の特異性は、基本的には、標的としたDNA配列(標的DNA配列)及びその増幅に必要なプライマーと呼ばれるオリゴヌクレオチドの特性によって決定される。プライマーは任意に設計することが可能である。しかし、プライマーと標的DNA配列との間で起こる相補対の形成が厳密に起こらない場合には、目的としたDNA断片が増幅されないあるいは、意図しないDNA断片が増幅されるといった特異性の低下が生じる。相補対の形成には、プライマーの塩基配列及びその影響を受ける会合(アニーリング)温度等が関与しているとされているが、明確な理論的裏づけがないのが現状である。

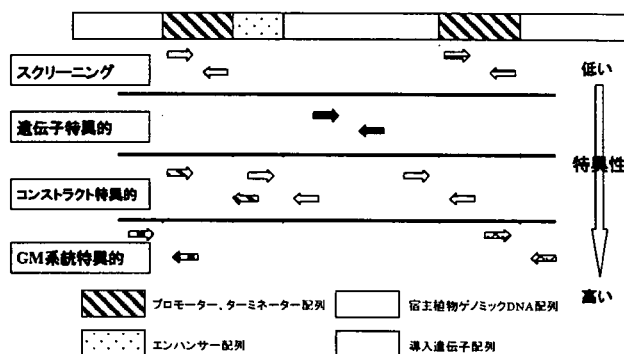


図1.GM農作物分析における特異性(選択性)の區別

また、分析法一般に共通する特異性という概念とは別に、PCR法に特有ともいえる特異性の概念が広まっている。GM農作物を例に挙げれば、同じ遺伝子が導入された複数の系統が存在している。これらに共通の、あるいは特定系統にのみ存在するDNA配列のいずれを標的DNA配列として設定するかによって、複数の系統が同時に、あるいは特定系統のみが分析されるか変化する(図1)。このような標的DNA配列の特性に基づく分析結果の内容の違いが特異性として認識される場合があるが、これはいわば選択性と呼ぶのが妥当だと思われる。

#### 【検出限界】

PCR法の検出限界は、理論的には標的DNA配列1分子である。現在の技術では、1分子の標的DNA配列を直接検出することは不可能であるが、PCRにより増幅すれば検出することが可能となる。この点において、他の化学物質を分析対象とした理化学分析とは大きく異なる。増幅という過程を共通項とすれば、生菌を培養によって増殖した後に検出する微生物を対象とした分析法

に近い。

また、PCR法の検出限界に関する特殊性は、検出限界濃度付近の試料を分析した場合に明確に観察される。例えば、1分子の標的DNA配列を含む溶液(マスターミックス)を2つに分割した場合、分割された溶液の一方には分子が存在しないことになる。従って、それぞれの溶液をPCR法で分析すると、一方の試験区では検出されるが、当然、もう一方の試験区では検出されないことになる。さらに、数分子の標的DNA配列を含むマスターミックスを複数に分割する場合には、分子が二項分布に従い試験区に分割されると考えられる。実際に上記の内容で試験を行い、各試験区に分割された標的DNA分子の数を測定してみると、まず、測定値の得られる試験区と得られない試験区が観察される(表1)。また、測定値が得られた試験区間でその値の比較を試みても、その差を明らかにすることは難しい(後述するCt値は、PCRの原理的には、標的DNA分子数が2倍の差を持つ場合に、1異なる。しかし、表1に示したCt値の大きさに明確な差は認められない)。これは、数分子の標的DNA分子の差を区別できるほどの精度を分析法が有していないことの表

れであろう。

Contents of LLRice 601 (DNA %)	Laboratory code							
	A				B			
	0	0.001	0.002	0.1	0	0.001	0.002	0.1
	—	—	38.41	33.01	—	38.41	35.93	32.30
	—	42.05	37.67	32.49	—	—	35.70	32.32
	—	36.93	36.78	33.01	—	—	—	32.85
	—	—	—	32.48	—	—	—	32.94
	—	37.32	36.14	32.16	—	—	38.12	32.23
Ct value	—	—	38.23	32.31	—	37.99	38.74	32.16
	41.93	37.07	—	32.00	—	37.13	36.82	32.28
	—	—	37.65	31.75	—	38.27	—	32.27
	—	39.72	36.37	31.86	—	38.41	—	31.99
	—	36.55	—	32.60	—	—	—	31.47

—: no PCR amplification occurred

表1. 検出限界濃度付近の試料を対象とした分析

### 【精確性(真度及び精度)】

#### ・真度

通常、理化学分析の場合、真度とは、分析対象物質の量をどれだけ確からしく定量可能かの程度を表す。例えば、SI単位にトレーサブルな量(濃度・mg/Lといった)として規定された標準物質を分析し、それに付与された値とどの程度一致した測定値が得られるかによって真度を測る。

一方、定量PCR法により得られる測定値は、DNA断片の増幅に伴い測定可能な蛍光強度等であり、さらにその測定値から初期DNA配列数が推定される。ゲノミックDNAの分子量は生物種によって異なり、また高分子物質であるため一意に決定できるものではない。これに対し、個別の定量PCR法で標的とされたDNA配列は低分子であり、その配列情報も明らかにされていることが多いことから、標的DNA配列の分子量を求め標準物質として規定することは可能かもしれない。しかし、いずれにせよ、トレーサブルであると考え得る量はDNA配列の数である。しかし先に言及したとおり、初期DNA配列数を知りたいということは希であり、推定された初期DNA配列数からそのDNA配列を有する細胞や種子の量が、必要に応じて換算される。GM農作物を対象とした分析法では、GM農作物の含有率を非GM農作物に対する、1)DNA配列数の比、2)種子数の比、3)種子粉砕物の重量比、とする考え方が提出されており、各国間における認識が異なっているのが現状である。つまり、測定単位(measurement unit)が規定されていない状態にある。このためと思われるが、ISO24276においても真度に関する規定は設けられておらず、今後、分析化学的な観点からの測定単位の規定と「何をもって真度を測るのか」の定義づけが必要であろう。

#### ・精度

定量PCR法の精度に関しては、分析法に求められる要件としての明確な規定がない。これは、

精度に影響を与える主要因の特定も含めた研究が十分に行われていないためであろうと思われる。そこで、リアルタイムPCRにより得られる一義的な測定量である蛍光データを、より高い自由度をもって解析するためのアプリケーション(GiMlet)を開発した。

まず、定量PCR法により最終的な値が得られるまでの一連の過程について、GM農作物の分析法を一例として説明する。リアルタイムPCRにより蛍光が生じた場合には、Ct値が得られる。リアルタイムPCRにより生じる蛍光には2種類があり、1種は特定のDNA配列の増幅に対応して強度が増加するreporter色素由来の蛍光であり、もう1種は試験区(well)間の位置効果の補正に使用されるreference色素由来の蛍光である。Ct値とは、reporter色素由来の蛍光値をreference色素の蛍光値によって除した値(Rn値)をベースライン補正して得られる値( $\Delta Rn$ 値)の経時的変動を、縦軸を $\Delta Rn$ 値、横軸をPCRのサイクル数として示したamplification plot curve上で、目的の $\Delta Rn$ 値に達したサイクル数(threshold lineとして規定)を意味する。さらに、得られたCt値を標準プラスミドDNAにより作成された検量線に内挿する。標準プラスミドDNAの量はコピー数として規定されているため、試験区から得られたCt値はコピー数に変換される(最終的なGM農作物の含有率は本コピー数に基づく算術によって求められる)。

このように、一義的な測定量が複数の変換を経た後に最終的な値として扱われるような分析法においては、またその変換が機器に付属のソフトウェアによってされる場合には、精度に影響を与える要因の特定が困難であり、また、ソフトウェア上の制限により適切な解析に不都合を生じる場合があることも考えられる。GiMletには、リアルタイムPCRの精度に影響を与える要因の特定とその大きさを評価可能とすることを目的に、1)各wellのPCR効率の算出、2)任意のベースライン補正等の機能を付与した。本アプリケーションを用い、ベースラインの補正方法や、機器精度の評価方法について検討した結果、1)ベースラインの補正方法を検量点の各点に応じ変動させることにより、各well由来の蛍光強度をより正確に補正することが可能であること、2)不良な測定値が得られる機器においては、各wellにおけるPCR効率が均一でないこと等が明らかになった。

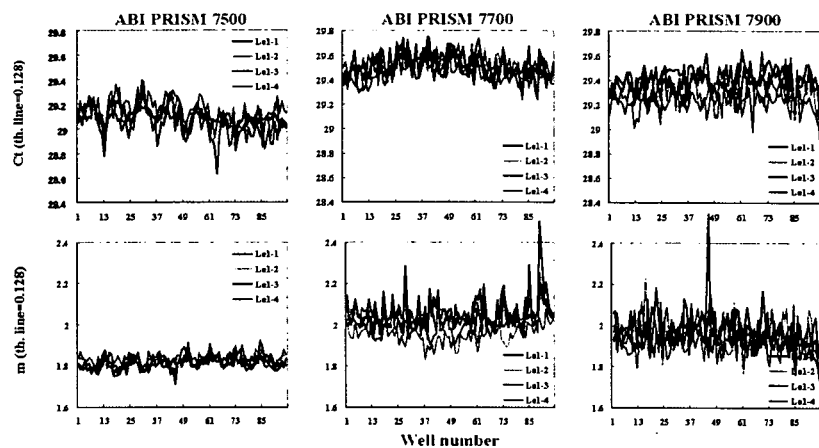


図2. GiMletを用いた解析の一例(リアルタイムPCR機器のwell間精度)

## 【おわりに】

PCR法は歴史の浅い分析法である。しかし、分析法として運用される以上はそれに求められる要件について明らかにし、必要に応じて改善していく努力が必要である。複雑な生体反応の一部として切り取られたとはいえ制限された生化学反応を原理とする以上、理化学分析とは異なる性質が明らかになる一方で、それらとの共通項についても明確な整理の下明らかにされていくべきものとする。

Examination of factors related to the uncertainty of the measurements obtained from real-time PCR using the newly developed software (GiMlet).

Monitoring of the amplification of targeted DNA sequences by PCR is referred to as real-time PCR. In Japan, quantitative methods based on TaqMan chemistry, which is one of the techniques used for the detection of PCR products, has been developed and adopted as the official method to monitor approved GM crops. In this methodology, 5' nuclease oligoprobes are used and the instrument detects the fluorescence derived from the hydrolysis of the probe during specific amplification of the targeted DNA sequences by PCR. Most analysts use the data calculated by the instrument software rather than the fluorescence data. Thus, the extent of data analysis is limited by the software, and inadequacy of calculations may interfere with proper evaluation of the data. To analyze the fluorescence data directly and determine the factors related to uncertainty of the real-time PCR data, we developed a software (GiMlet) and analyzed the data for the quantification of GM crops. GiMlet can analyze the multicomponent data exported by ABI's real-time PCR instruments and calculate the PCR efficiency for each well under variable baseline settings. The results of the analyses with GiMlet revealed that 1) PCR efficiency varied among wells and the degree of variation differed among three types of instruments used; 2) variable baseline correction, in which each calibration point is corrected separately, was more suitable than the conventional baseline correction under a fixed condition; 3) the value of the threshold line was an important factor for minimizing the variance of measurements.



## E01

食肉中ゲンタマイシン測定におけるアフィニティーカラムの有用性の検討

○北村渉<sup>1</sup>、齊藤貢一<sup>1</sup>、椛沢圭介<sup>1</sup>、岡山明子<sup>2</sup>、堀江正一<sup>3</sup>、岩崎雄介<sup>1</sup>、  
伊藤里恵<sup>1</sup>、中澤裕之<sup>1</sup>

<sup>1</sup>星薬大、<sup>2</sup>奈良県薬事研究センター、<sup>3</sup>埼玉衛研

【目的】食肉中に残留する薬物の分析においては、効率的に多種多様な夾雑成分を除去できる前処理法が必要とされている。本研究では、高い精製能力を持つアフィニティーカラムを用いた食肉中ゲンタマイシンのクリーンアップ法の構築を行った。

【結果】アフィニティーカラム及び固相抽出カートリッジによるクリーンアップを比較検討したところ、前者において夾雑成分の影響の少ない良好なクロマトグラムが得られた。ゲンタマイシンは3種の混合物 C1、C1a 及び C2 から構成されるが、作製したアフィニティーカラムは、その3成分とも十分な保持が可能であり、その回収率は89.3~96.8%となった。

【考察】アフィニティーカラムは固相抽出カートリッジよりも精製能に優れていることが分かり、選択的な前処理が可能であった。このことより、食肉中に残留するゲンタマイシン分析におけるアフィニティーカラムを用いた前処理法の有用性が示唆された。

## 27PW-pm157

アフィニティークロマトグラフィーを用いた食品中残留抗菌性物質の試料精製  
○北村 渉<sup>1</sup>, 齊藤 貢一<sup>1</sup>, 椛沢 圭介<sup>1</sup>, 岡山 明子<sup>2</sup>, 加藤 美穂子<sup>3</sup>, 小平 司<sup>3</sup>,  
堀江 正一<sup>4</sup>, 岩崎 雄介<sup>1</sup>, 伊藤 里恵<sup>1</sup>, 中澤 裕之<sup>1</sup>(<sup>1</sup>星薬大, <sup>2</sup>奈良薬事研セ, <sup>3</sup>フロンティア研, <sup>4</sup>埼玉衛研)

【目的】食品中に残留する抗菌性物質の分析を行う際、精製効果の高い試料前処理法が必要となる。そのようなクリーンアップ法には、特定の抗菌剤の精製に有用であるアフィニティークロマトグラフィーを用いた方法がある。この手法の交差反応を活かして、目的成分と構造が類似している化合物もカラムに保持させることが可能である。本研究では、動物用医薬品として使用量の多いエンロフロキサシン及びその極性の高さから分析が困難とされるゲンタマイシンに特異的なアフィニティークラムをそれぞれ作製し、目的成分とその類縁化合物の保持能及び、食肉を試料としてその精製効果を検討した。

【方法】作製したエンロフロキサシンに特異的なアフィニティークラムにはキノロン系抗菌剤を、ゲンタマイシンについてはアミノグリコシド系抗生物質を負荷し、それぞれの保持能を確認した。また、食肉を用いて、アフィニティークラムと固相抽出カートリッジによる精製効果を比較した。抗菌剤測定には、高速液体クロマトグラフィー/蛍光検出法を用い、アミノグリコシド系抗生物質は FMOC 試薬で蛍光誘導体化を行った。

【結果および考察】作製したエンロフロキサシンに特異的なアフィニティークラムには、エンロフロキサシン、シプロフロキサシン、ノルフロキサシン及びダノフロキサシンが、ゲンタマイシンの場合では、ゲンタマイシン、シソマイシン及びネチルマイシンが、残留分析に応用可能な保持能を有していた。また、作製したアフィニティークラムは他の固相抽出カートリッジに比べ、精製効果に優れており、アフィニティークラムを用いた目的成分と類縁化合物の同時分析及び試料精製への応用が示唆された。